胸腺ホルモンとインターロイキン2刺激でみられる臍帯血 リンパ球サブセットの変化とT細胞ヘルパー活性の増強

高橋 比路美・新保 敏和
高橋 清美・山倉 徹也・中川 俊郎

Jpn. J. Clin. Immun., 9(2): 81~91, 1986.

Effects of a combination of thymopoietin pentapeptide (TP-5) and interleukin 2 on lymphocyte subsets and helper activity of cord blood T cells

Hiromi Takahashi, Toshikazu Shimbo, Kiyomi Takahashi,
Tetsuya Yamakura and Toshiro Nakagawa

*Department of Pediatrics, Mizonokuchi Hospital,
Teikyo University School of Medicine*

[Summary]

There have been several reports that lymphocytes of human cord blood have poor functional properties because of their immaturity and/or the presence of suppressor cells. We studied here the *in vitro* effects of thymopoietin pentapeptide (TP-5) and interleukin 2 (IL-2) on cord blood T cells. Lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry through the use of monoclonal antibodies after a 48 h culture period in TP-5 (optimal dose; 1 µg/ml) and/or IL-2 (non-mitogenic dose used; 1% vol/vol). OKT 8-positive cells were significantly decreased after treatment in combination with TP-5 and IL-2. But there were no changes in the proportion of OKT 3-, T 4-, T 11- and IaI-positive cells. Poor helper activity of cord blood T cells, which was examined by enhancing activity of immunoglobulin-production of normal adult non-T cells stimulated by pokeweed mitogen, was enhanced to a significant level of IgG production after treatment in combination with two agents. Crude IL-2 activity was reevaluated through the use of recombinant IL-2.

Key words : thymic hormone (TP-5),
interleukin 2,
cordblood T cells,
OKT 8-positive cells,
helper activity of T cells

【概 要】

臍帯血リンパ球の機能は成人リンパ球に比べきわめて不良であるが、胸腺ホルモン (TP-5) と interleukin 2 (IL-2) の併用処理により、その機能の高まる可能性が示された。臍帯血リンパ球を TP-5 と IL-2 とで処理すると、OKT 8 陽性細胞は減少し、OKT 4 陽性細胞は増加傾向を示したために、OKT 4:8 比は有意に上昇した。そして、T細胞の機能にも変化がみられ、とくに IgG 産生に働くT細胞のヘルパー活性の有意な増強が認められた。

I. はじめに

新生児期から乳児早期にかけての反復性感染症や重症感染症に陥りやすい要因の1つに、免疫担当細胞ないしは液性因子の機能低下があげられている¹⁻⁵⁾。なかでも、体液性免疫や細胞性免疫の担い手であるリンパ球の性状や機能に関しては臍帯血リンパ球などを用いての詳細な検討がある。臍帯血リンパ球は成人のリンパ球に比べその反応性が極度に不良であり、細胞レベルで調べてみると、B細胞、T細胞、マクロファージなどそれぞれの機能不全が観察されている¹⁻⁷⁾。不全の内容に関しては、これら免疫担当細胞がまだ十分に成熟していないためとする報告^{3-6,8-11)}と抑制活性をもつサプレッサーT細胞の増強があるためとする報告^{2,3,5)}などがある。

リンパ球の分化・成熟を誘導する物質の1つに胸腺由来の液性因子がある。それは胸腺の上皮細胞から分泌される物質であり、胸腺ホルモンとも称されるが、T細胞の分化・成熟・活性化に働くとされる。現在までに10種類以上の物質がウシ胸腺などから抽出され、一部のものは精製され、その生物学的活性に関する報告も多い¹²⁻¹⁶⁾。

Interleukin 2 (IL-2) はT細胞の増殖を促す液性因子であり、T cell growth factor (TCGF)¹⁷⁾ や T-lymphocytotropic hormone¹⁸⁾ とも呼ばれる。これは抗原や mitogen で刺激を受けたT細胞から産生・分泌される可溶性物質であり、T細胞の活性化や機能の発現・維持に重要な働きを有している。しかし、この物質は必ずしもT細胞にのみ選択的に作用するものではなく、B細胞^{19,24)}やNK細胞^{21,22)}の増殖・活性化にも関与していることが最近になって示されている。

臍帯血リンパ球の中には胸腺ホルモンの刺激を受けて成熟する未熟なT細胞が存在すること^{8,23-25)}、胸腺細胞のようなより未熟なT細胞にもIL-2産生能が微弱ながら存在し、またIL-2存在下でのアロ抗原刺激でキラーT細胞が出現したという報告など²⁶⁻³¹⁾から、胸腺内でのT細胞分化にIL-2が関与している可能性が考えられる

こと、しかも臍帯血リンパ球のIL-2産生能は十分でないこと⁴⁾などから、私達は臍帯血リンパ球に胸腺ホルモンとIL-2とを添加しその影響を検討してみた。その結果、リンパ球サブセットの変化とともに免疫グロブリン産生に及ぼすT細胞ヘルパー活性の亢進が観察され、胸腺ホルモンとIL-2の両因子の作用によりT細胞分化の起こる可能性が示唆された。

II. 方 法

1. 合成胸腺ホルモン (TP-5)

TP-5 は胸腺ホルモン thymopoietin の合成 pentapeptide であり³²⁻³⁴⁾、その原末 (Ortho 社 G. Goldstein 博士より分与、Lot No. 11610 B) を培養液 RPMI-1640 (Gibco) に溶解希釈後、ミリポアフィルター (0.22 μ m) で濾過してから使用した。なお、リンパ球に対する直接細胞障害性は、10 mg/ml の高濃度の TP-5 を臍帯血単核細胞または健康成人末梢血単核細胞 5×10^6 /ml に加え、37°C、5% CO₂ 下で培養し、48時間まで観察したが、trypan blue dye exclusion test での細胞生存率には有意な変化を認めなかった。

2. interleukin 2 (IL-2)

Inouye らの方法³⁵⁾に準じて作製した。概略は、健康成人末梢血単核細胞からプラスチックシャーレへの付着細胞を除去後、細胞を1% (v/v) ヒト血清添加 RPMI-1640 培養液に浮遊 (1×10^6 /ml 濃度) させ、これに1% (v/v) phytohemagglutinin (PHA-M, Difco) を加え、5% CO₂ 存在下で37°C、48時間培養した。この培養上清をIL-2とし、残存するPHA-Mはニワトリ赤血球濃縮液を用いて吸収除去した。なお、IL-2のロット差を少なくする目的から、今回の実験では健康成人5名より作製したIL-2を同量ずつ混和して使用した。

3. recombinant interleukin 2 (rIL-2)

rIL-2は味の素の研究所から供与されたものをRPMI-1640で希釈し1,000単位/mlとし、-80°Cに保存、使

用時に溶解し培養液で最終濃度 50 単位/ml になるように調整して使用した。

4. モノクローナル抗体

5 種のモノクローナル抗体: OKT 3 (T 細胞全体に反応), OKT 4 (ヘルパー/インデューサー T 細胞), OKT 8 (キラー/サブプレッサー T 細胞), OKT 11 (E レセプター陽性細胞), OKIa 1 (ヒト Ia 様抗原陽性細胞) (Ortho) を用いてリンパ球サブセットを検討した。

5. 臍帯血の採取

母親に合併症はなく、自然分娩による満期産児の臍帯血を用いた。臍帯結紮直後の臍帯より、ヘパリン処理した注射器で無菌的に採取した。

6. 臍帯血単核細胞の分離と TP-5 および IL-2 によるその処理

臍帯血から Ficoll-Hypaque 比重遠心法³⁶⁾により単核細胞を分離し、リン酸緩衝食液 (PBS, pH 7.2) で 2 回洗浄、さらに培養液で 1 回洗浄後、培養液に 1×10^6 /ml 濃度に浮遊した。なお培養液としては RPMI-1640 に胎児ウシ血清 (FCS, Gibco, Lot. No. A 484423), penicillin 100 単位/ml, streptomycin 100 μ g/ml, HEPES 25 mM を加えたものを用いた。

細胞浮遊液 5 ml を培養シャーレ (Falcon # 3002) にとり、これに TP-5 1 μ g/ml または IL-2 1% (v/v) を添加し、5% CO₂ 存在下で 37°C, 48 時間培養後、非附着細胞を回収し、培養液で 3 回洗浄後以下の検索に用いた。

7. E ロゼット形成細胞の検出

TP-5 処理単核細胞 5×10^5 個を小試験管にとり、FCS 0.1 ml に浮遊した。これに neuraminidase (Hoechst) 処理ヒツジ赤血球の 1% (v/v) FCS 浮遊液³⁷⁾ 0.1 ml を加え、混和後遠心し氷水中に 2~3 時間静置後、細胞を再浮遊し、ヒツジ赤血球が 3 個以上結合した細胞を、E ロゼット陽性細胞として、その百分率を求めた。

8. リンパ球サブセットの解析

臍帯血リンパ球のサブセットを、フローサイトメトリーを用いて解析した。OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKT 11 は蛍光色素 fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識モノクローナル抗体を用いた。単核細胞浮遊液 ($2 \sim 4 \times 10^6$ /ml) 100 μ l に各抗体液 10 μ l を加え、2~8°C, 30 分間反応させた後、PBS (0.1% NaN₃ 添加) で 2 回洗浄後、

図 1 臍帯血 T 細胞のヘルパー活性測定法

PBS 1 ml に再浮遊させ、Spectrum III (Ortho) で FITC 陽性細胞の百分率を求めた³⁸⁾。

OKIa 1 陽性細胞の検索は、単核細胞浮遊液 100 μ l と OKIa 1 抗体 10 μ l を上記と同様に反応させ、2 回洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体液 (Tago) 100 μ l を加え、さらに 2~8°C, 30 分間反応させ、洗浄後 PBS 1 ml に再浮遊させ解析した。

9. T 細胞の分離法

健常成人末梢血単核細胞および臍帯血単核細胞から、ヒツジ赤血球ロゼット沈降法により T 細胞を分離した。その概略は FCS に浮遊した単核細胞 1×10^6 個にノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球を 2×10^8 個の割合で添加し、遠心した。氷水中に 1 時間静置後、軽く細胞を浮遊させてから、Ficoll-Hypaque 比重遠心法によりロゼット形成細胞と、非形成細胞とを分離した³⁹⁾。

ロゼット形成細胞を T 細胞、またロゼット非形成細胞を非 T 細胞として以下の実験で用いた。なお、混入するヒツジ赤血球は 0.83% NH₄Cl 液を用いて溶血除去した。

10. T 細胞ヘルパー活性の測定

B 細胞を Pokeweed mitogen (PWM, Difco) で刺激すると B 細胞は抗体産生細胞へと分化する。この反応は T 細胞に依存性であり、B 細胞の抗体産生細胞への分化を補助する T 細胞の活性をヘルパー活性として評価した⁴⁰⁾。

その概要は、図 1 に示す組み合わせに従い、培養チューブに健常人非 T 細胞 2×10^5 個と健常人または臍帯血

図2 臍帯血単核細胞のEロゼット形成に及ぼす TP-5 と IL-2 の効果

図3 モノクローナル抗体によるリンパ球サブセットに及ぼす TP-5 と IL-2 の効果

T細胞 4×10^5 個をとり、PWM $5 \mu\text{g/ml}$ 添加培養液 1 ml に浮遊後、 37°C 、5% CO_2 下で 6 日間培養した。

培養終了後、各チューブの細胞数を算定し、塗抹標本を作製した。標本は冷アセトンで 10 分間固定後、FITC 標識抗ヒト IgG、IgA または IgM 抗体液を細胞塗抹面に重層した。室温で 1 時間反応後、PBS で洗浄、50% グリセリン-PBS で包埋、蛍光顕微鏡を用いて細胞質内に蛍光を認める細胞（細胞質内免疫グロブリン陽性細胞）の百分率を求め、さらに絶対数を算出した。

健康人 T 細胞添加時に観察される免疫グロブリン産生細胞数の増加をヘルパー活性 100% として臍帯血 T 細胞の活性を換算した。

11. 検定法

各群の検定比較は両側 t 検定を用いて行い、危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) のものを有意な変化とした。

図4 OKT 4 : 8 比に及ぼす TP-5 と IL-2 の効果

III. 結果

1. Eロゼット形成能に与える TP-5 と IL-2 の効果

Eロゼット形成能に与える TP-5 の効果を図2に示した。各種濃度の TP-5 で臍帯血単核細胞を 48 時間処理後、Eロゼット形成能を検討した。図では TP-5 と IL-2 無添加の値を 100% とする % コントロール値（平均値 $n=3$ ）で示した。TP-5 単独処理の場合ではEロゼット形成能がやや増加する傾向はあるが、いずれも有意な増加ではなかった。一方、TP-5 と IL-2 存在下では TP-5 の 0.1 または $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度でEロゼット形成能の有意な増加が認められた。ここで用いた IL-2 は 1% (v/v) 濃度で通常のリンパ球培養で用いられる IL-2 の 1/20 濃度であり、この濃度では 48 時間培養でEロゼット形成能に変化を与えず、またトリチウムサイミジン取り込み能でも有意な変化を認めなかった（データ省略）。

したがって、以下の検討での薬剤濃度は、TP-5 を $1 \mu\text{g/ml}$ 、IL-2 を 1% (v/v) の濃度を用いた。

2. リンパ球サブセット百分率に及ぼす TP-5 と IL-2 の効果の検討

臍帯血単核細胞を TP-5 単独、IL-2 単独、TP-5 と IL-2 の両者および薬剤無添加の 4 つの組み合わせに分けて検討した。図3のごとく、OKT 3, OKT 11, OKT 4, OKT 8, OKIa 1 値のいずれにおいても各組み合わせ間に有意差を認めなかった。

次に OKT 4 : 8 の比を検討してみたところ（図4）、薬剤無添加時の比が 1.0 以下の群では各薬剤処理群間に

表 1 OKT 4 陽性細胞, OKT 8 陽性細胞および OKT 4:8 比に及ぼす TP-5 と IL-2 の効果

薬剤処理 OKT4:8比		無処理	TP-5	TP-5 + IL-2	IL-2
≥1.0	T4 ⁺ (%)	44.76±9.19	45.16±10.43	53.92±8.09	52.60±6.01
	T8 ⁺ (%)	27.92±4.66	30.28±3.25	23.60±4.32	27.36±4.73
	T4:8	1.68±0.60	1.52±0.47	2.32±0.40	1.98±0.34
<1.0	T4 ⁺ (%)	32.46±5.49	31.22±6.48	33.90±6.36	35.04±8.12
	T8 ⁺ (%)	46.38±8.25	42.20±9.40	42.36±8.16	45.00±3.87
	T4:8	0.74±0.21	0.76±0.24	0.82±0.22	0.78±0.15

各数値は平均±1SDを示す

* P<0.05

** P<0.01

図 5 免疫グロブリン産生に及ぼす臍帯血T細胞のヘルパー活性およびTP-5とIL-2の効果

有意な変化がみられなかったのに反し、比が1.0以上の場合には各薬剤間に明らかに変化が認められた。すなわち、OKT 4:8 比が1.0以上の場合にはTP-5+IL-2群でOKT 8値の減少($p<0.05$)および有意ではないがOKT 4値の増加傾向が認められ(表1), その結果OKT 4:8 比がTP-5単独, 無処理群に比し有意の上昇を示したと考えられた。

なお, このような結果は他のOKT 3, OKT 11, OKIa 1の分析からは得られなかった。また, 一部の実験ではOKT 6, OKT 9, OKT 10, Leu 7についても検討したが, いずれも有意な変化を認めえなかった(データ省略)。

3. T細胞ヘルパー活性へのTP-5とIL-2の効果

臍帯血単核細胞をTP-5やIL-2で48時間処理後, Eロゼット沈降法でT細胞を分離した。分離T細胞を健康成人の非T細胞に加え, PWM存在下に6日間培養後, 免疫グロブリン産生細胞数を検討し, 臍帯血T細胞のヘ

ルパー活性を求め, その結果を図5に示した。臍帯血T細胞のヘルパー活性は無処理の場合でみると各免疫グロブリンクラスで10%前後の値であり, 健康成人の活性($85\pm25\%$)に比べきわめて低値であった。各処理別にT細胞ヘルパー活性の変化をみると, いずれの免疫グロブリンクラスの産生においてもTP-5+IL-2処理群が最大のヘルパー活性を示し, しかも, IgG産生でのT細胞のヘルパー活性はそのTP-5+IL-2処理により有意に高まったが, IgAやIgM産生系においてはいずれも統計学的に有意な変化ではなかった。

4. rIL-2を用いてのT細胞ヘルパー活性の検討

これまでの検討で用いたIL-2はリンパ球のPHA刺激培養上清であり, 精製されたものではなく, またIL-2以外の液性因子も種々含まれている。したがって, 上述の成績がIL-2の作用によるものか否かを確かめるために, rIL-2を用いて再検討した。図6に示した結果は

図 6 TP-5 と recombinant IL-2 による OKT 4:8 比の変化と T 細胞ヘルパー活性の増強

preliminary なものであるが、TP-5+rIL-2 処理により OKT 4:8 比に有意な上昇のみられた症例 (上段) とみられない症例 (下段) とがあり (ともに代表例)、これは上述の結果 2 と同様の成績であった。しかも、各症例での T 細胞のヘルパー活性をみると、OKT 4:8 比が上昇する場合に T 細胞ヘルパー活性の有意な増強が認められた。しかし、そのヘルパー活性の増強は IgG 産生に対してのみであり、IgM や IgA 産生への影響はみられなかった。次に IgG 産生におけるヘルパー活性の変化を 8 例の臍帯血 T 細胞で調べたところ (図 7)、3 例に有意な活性の増強が認められた。

IV. 考 案

胸腺ホルモンは胸腺の上皮細胞より分泌される液性因子であり、胸腺細胞の分化・成熟を促し、前胸腺細胞を胸腺細胞へと分化させる働きをもつ^{32,41)}。ウシ胸腺を用いて抽出・精製された物質に thymopoietin (thymine)¹²⁾、thymosin (thymosin fraction V, thymosin α_1)^{13,14)}、thymic humoral factor (THF)¹⁶⁾ などがあるが、それらの性状や生物学的活性については必ずしも一致した成績ではなく、まだ不明な点も多い。

今回の実験に用いた TP-5 (図 8) は thymopoietin pentapeptide, thymopentin, thymopoietin₃₂₋₃₆ などの名

図 7 TP-5 と recombinant IL-2 による T 細胞ヘルパー活性の変化

図 8 TP-5 の構造

称でも呼ばれているが、合成されたペプチドであり、そのアミノ酸配列は Arg-Lys-Asp-Val-Tyr であり、分子量 679.76 の物質である³²⁾。これは G. Goldstein ら¹²⁾のウシ胸腺抽出の thymopoietin (49 個のアミノ酸より成り、分子量は 5562) の“活性部分 (active site)”である第 32 位から 36 位のアミノ酸部分にあたり、thymopoietin と同等の活性のあることが証明されている。

胸腺ホルモンは上述のごとく胸腺内が主要な働き場所であるが、末梢血中にも微量ながら存在し、リンパ球の成熟や機能の維持に関係しているらしいことが示されている。血漿中より抽出された物質には facteur thymique serique (FTS)¹⁵⁾ があり、ヒト由来の FTS は成人末梢血リンパ球に存在する未熟 T 細胞に働き、より成熟した T 細胞を誘導する作用があるという⁴²⁾。

一方、IL-2 は以前 T cell growth factor と呼ばれていたものであり、T 細胞の活性化や機能の発現・維持に重要な働きを有しており、抗原や mitogen 刺激を受けた T 細胞より分泌される可溶性因子の 1 つである¹⁷⁾。これは胸腺ホルモンと異なりより成熟した T 細胞に作用す

ると考えられるが^{43,44)}、いくつかの報告にもみられるように、未熟なT細胞の活性化にも関与している可能性がある²⁶⁻³¹⁾。

本研究では未熟なリンパ球として臍帯血リンパ球を用い、TP-5 や IL-2 がT細胞の分化・成熟にどのような影響を与えるかについて、T細胞の表面形質や機能の変化を調べることに検討した。TP-5 および IL-2 はそれぞれ単独では臍帯血T細胞に対しとくに影響を与えなかったが、両者の併用により次のような効果が認められた。すなわち表面形質の変化ではEロゼット形成細胞百分率の増加、OKT 8 陽性細胞百分率の減少、OKT 4 : 8 比の上昇がみられたが、OKT 3, OKT 4, OKT 11, OKIa 1 陽性細胞の百分率には有意な変化は観察されなかった。しかし、OKT 4 陽性細胞は有意ではないが増加傾向を示し、OKT 8 陽性細胞が減少した結果、OKT 4 : 8 比は明らかに増加した。このような変化はT細胞の機能にもなんらかの影響を与えている可能性があり、つぎにT細胞の機能としてヘルパー活性を検討してみた。

その結果、IgG 産生に働くT細胞のヘルパー活性の有意な上昇が観察され、これは recombinant IL-2 を用いても同様に示された。したがって、臍帯血T細胞の中には TP-5 と IL-2 の両因子に反応し、膜抗原の変化および機能発現を惹起しうる細胞が存在するといえる。

TP-5 に関するこのような結果はほかに報告をみないが、別の胸腺ホルモンに関しては臍帯血リンパ球を用いていくつかの報告(後述)があり、胸腺細胞以後のリンパ球の分化ないし成熟にも胸腺ホルモンが関与していることがうかがわれる。また、本論文でも示された臍帯血T細胞の heterogeneity については、thymosin fraction V による検討²³⁾でも同様のことが観察されており、臍帯血中には分化段階の異なる種々のT細胞が存在する可能性が考えられる。

IL-2 にリンパ球が反応できるためには、リンパ球に IL-2 レセプターが表出されていることが必要である。成人末梢血リンパ球には1細胞当たり平均200個のレセプターがあるといわれるが⁴⁵⁾、臍帯血リンパ球ではまだ十分に解析されていない。しかし IL-2 への反応性が悪いこと^{4,45)}などからみてレセプターの数はさらに少ないことが予想される。一方、胸腺細胞の分化や成熟に IL-2 が関与している可能性もあり²⁶⁻³¹⁾、本研究で示されたように、臍帯血リンパ球の中にも IL-2 レセプターの表出されている細胞が少数ながら存在する可能性がある。

Eロゼット形成への影響については種々の胸腺ホルモンで検討されている。Eロゼット百分率の増加^{8,11,25)}、

いわゆる heavy rosette (avid E rosette) の増加⁴²⁾、active E rosette の増加^{8,24)} がみられるが、OKT 11 陽性細胞百分率には変化がないという²³⁾。これはEレセプターの数の増加または avidity の増加が起こり、その結果Eロゼット陰性細胞が陽性細胞へと変化するためと考えられている^{8,46)}。今回の検討で TP-5 単独ではEロゼット形成への効果を認めなかったが、これはノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球を用いたためと考えられる⁸⁾。

OKT 4 : 8 比が1.0以上の検体では、TP-5 と IL-2 の両者添加培養により OKT 8 陽性細胞百分率の減少がみられたが、このような効果は他の胸腺ホルモン単独での検討では報告されていない^{11,23)}。しかし、今回の検討で示されたT細胞ヘルパー活性の増強と OKT 8 陽性細胞の減少とはよく符合した結果であると思われる⁴⁶⁻⁴⁹⁾。

胸腺ホルモンによりT細胞のヘルパー活性が増強したとする Tan らの報告⁸⁾がある。彼らは thymosin fraction V を用いて検討したが、私達と同様に PWM 刺激成人非T細胞への影響で臍帯血T細胞の効果を調べている。この場合の効果は未熟なT細胞(ノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球とのロゼット形成は可能だが、非処理のものとのロゼット形成は不可能なT細胞)に対してのみ認められている。私達の結果はT細胞全体でみた効果であり、しかも TP-5 と IL-2 との併用により観察された効果であった。さらに、Tan らの報告では抗体のクラスを識別していないのでわからないが、私達の成績ではT細胞のヘルパー活性の増強はIgG産生の場合にのみ認められ、IgM や IgA に関しては観察されなかった。

TP-5 と IL-2 が臍帯血リンパ球に及ぼす効果は一定ではなく、リンパ球分画の OKT 4 : 8 比によって、それらの効果に差違がみられた。つまり、OKT 4 : 8 比が1.0以上 (OKT 4 $\geq$ OKT 8) の場合には TP-5 と IL-2 処理により上述の変化が認められたのに反し、1.0未満 (OKT 4 < OKT 8) の場合にはいずれの変化も認められなかった。このことは在胎週数が同じであっても、臍帯血T細胞の分化・成熟段階には個人差があることを示唆しているといえよう。臍帯血リンパ球の OKT 4 と OKT 8 陽性細胞の合計は OKT 3 陽性細胞数より大であるが、成人ではこの逆となるという⁹⁾。今回検討した対照培養 (TP-5, IL-2 無添加で48時間培養) でみると、OKT 4 と OKT 8 陽性細胞の合計は OKT 4 : 8 $\geq$ 1 の群で $72.6 \pm 6.0\%$ 、OKT 4 : 8 < 1 の群で $79.2 \pm 6.3\%$ と両群に差はなかったが、OKT 3 陽性細胞数はそれぞれ $65.5 \pm 14.6\%$ 、 $51.0 \pm 14.9\%$ であり、OKT 4 : 8 $\geq$ 1 群で OKT 3 陽性細胞数は有意に高かった。また OKIa 1 陽性細胞数もそれぞれ $12.5 \pm 6.1\%$ 、 $5.3 \pm 1.4\%$ と OKT 4 : 8 $\geq$ 1

群で高かった。これらの結果は OKT 4:8 $\geq$ 1 群に属するリンパ球が成人リンパ球の性状により近いことを示し、臍帯血リンパ球の中でも分化・成熟の高い段階にある細胞といえるであろう。このような分化・成熟段階の違いによって TP-5 や IL-2 に対する反応性が異なり、T細胞のヘルパー活性が増強したと考えられた。

最後に、TP-5 と IL-2 というT細胞の分化・成熟に関与する2種の物質がT細胞にどのような機序で作用するのか、T細胞以外の細胞も関与するのかなど不明な点も多いが、これらの解析が今後の課題となるであろう。

V. 結 論

臍帯血単核細胞に合成胸腺ホルモン (TP-5, 1 μ g/ml) と interleukin 2 (IL-2, 1% v/v, nonmitogenic dose) とを加え、37°C, 5% CO₂ 下で 48 時間培養後、リンパ球サブセットおよび分離T細胞のヘルパー活性の検討を行い次の結果を得た。

- 1) E ロゼット形成細胞数の増加がみられた。

2) モノクローナル抗体を用いての検討で OKT 8 陽性細胞百分率の低下と OKT 4:8 比の上昇が観察されたが、OKT 3, OKT 4, OKT 11, OKIa 1 各陽性細胞百分率には変化はみられなかった。

3) Pokeweed mitogen 刺激リンパ球の免疫グロブリン産生系において、IgG 産生のヘルパー活性が増強した。しかし IgA や IgM のヘルパー活性には変化はなかった。

4) 上の2), 3) の結果は recombinant IL-2 (50 unit/ml) を用いても同様に示された。

以上の結果は TP-5 または IL-2 単独では得られず、両者の併用が必要であり、胸腺ホルモンと IL-2 の共同作用の存在が示された。また、これらの結果は約半数の症例でしか得られなかったことより、臍帯血リンパ球の分化・成熟段階には個人差がある可能性が示唆された。

本論文の要旨は第 88 回日本小児科学会総会 (昭和 60 年 6 月, 札幌) で発表した。

文 献

- 1) Pabst, H.F., Kreth, H.W. : Ontogeny of the immune response as a basis of childhood disease. *J. Pediatr.*, 97 : 519~534, 1980.
- 2) Hayward, A.R. : Development of lymphocyte responses and interactions in the human fetus and newborn. *Immunol. Rev.*, 57 : 39~60, 1981.
- 3) Miyawaki, T., Moriya, N., Nagaoki, T., Taniguchi, N. : Maturation of B-cell differentiation ability and T-cell regulatory function in infancy and childhood. *Immunol. Rev.*, 57 : 61~87, 1981.
- 4) Andersson, U., Bird, A.G., Britton, S., Palacios, R. : Humoral and cellular immunity in humans studied at cell level from birth to two years of age. *Immunol. Rev.*, 57 : 5~38, 1981.
- 5) Gathings, W.E., Kubagawa, H., Cooper, M.D. : A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans. *Immunol. Rev.*, 57 : 107~126, 1981.
- 6) Van Tol, M.J.D., Zijlstra, J., Zegers, B.J.M., Ballieux, R.E. : Antigen-induced plaque-forming cell responses in cultures of peripheral blood mononuclear cells of human neonates and infants. *J. Pediatr.*, 105 : 738~744, 1984.
- 7) Pascal, C., Galanaud, P., Dormont, J., Wallon, C. : Primary *in vitro* antibody response in human cord blood lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.*, 1 : 275~283, 1980.
- 8) Tan, P.L.J., Shore, A. : Thymosin induces helper function in OKT 3-positive, E-rosette-negative human cord blood T cells. *Scand. J. Immunol.*, 20 : 27~34, 1984.
- 9) Maccario, R., Nespoli, L., Mingrat, G., Vitiello, A., Ugazio, A.G., Burgio, G.R. : Lymphocyte subpopulations in the neonate : Identification of an immature subset of OKT 8-positive, OKT 3-negative cells. *J. Immunol.*, 130 : 1129~1131, 1983.
- 10) Gerli, R., Rambotti, P., Cerneti, C., Velardi, A., Spinozzi, F. : Evidence for phenotypic T precursor cells in human cord blood. *Br. J. Haematol.*, 53 : 685~686, 1983.
- 11) Velardi, A., Gerli, R., Rambotti, P., Spinozzi, F., Cerneti, C., Angelini, A., Martelli, M.F. : The *in vitro* effect of a calf thymus extract (Thymostimulin) on T cell phenotypes in cord blood lymphocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2 : 250~253, 1982.

- 12) Goldstein, G., Maranaro, A. : Thymin: A thymic polypeptide causing the neuromuscular block of myasthenia gravis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 183 : 230~240, 1971.
- 13) Goldstein, A.L., Slater, F.D., White, A. : Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 56 : 1010~1017, 1966.
- 14) McClure, J.E., Lameris, N., Wara, D.W., Goldstein, A.L. : Immunochemical studies on thymosin: Radioimmunoassay of thymosin α_1 . *J. Immunol.*, 128 : 368~375, 1982.
- 15) Bach, J.F., Dardenne, M., Pleau, J.M., Rosa, J. : Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature (Lond.)*, 266 : 55~57, 1977.
- 16) Yakir, Y., Kook, A.I., Trainin, N. : Enrichment of *in vitro* and *in vivo* immunologic activity of purified fractions of calf thymic hormone. *J. Exp. Med.*, 148 : 71~83, 1978.
- 17) Smith, K.A. : T-cell growth factor. *Immunol. Rev.*, 51 : 337~357, 1980.
- 18) Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R. : Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193 : 1007~1008, 1976.
- 19) Zubler, R.H., Lowenthal, J.W., Erard, F., Hashimoto, N., Devos, R., Macdonald, H.R. : Activated B cells express receptor for, and proliferate in response to, pure interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 160 : 1170~1183, 1984.
- 20) Nakanishi, K., Malek, T.R., Smith, K.A., Hamaoka, T., Shevach, E.M., Paul, W.E. : Both interleukin 2 and a second T cell derived factor in EL-4 supernatant have activity as differentiation factors in IgM synthesis. *J. Exp. Med.*, 160 : 1605~1621, 1984.
- 21) Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E., Gillis, S. : Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature (Lond.)*, 291 : 335~338, 1981.
- 22) Domzig, W., Stadler, B.M., Herberman, R.B. : Interleukin 2 dependence of human natural killer cell activity. *J. Immunol.*, 130 : 1970~1973, 1983.
- 23) Ho, A.D., Stehle, B., Dietz, G., Hunstein, W., Hoffbrand, A.V. : Terminal differentiation of cord blood lymphocytes induced by thymosin fraction 5 and thymosin α_1 . *Scand. J. Immunol.*, 21 : 221~225, 1985.
- 24) Shoham, J., Cohen, M., Chandali, Y., Avni, A. : Thymic hormonal activity on human peripheral blood lymphocytes, *in vitro*. I. Reciprocal effect on T and B rosette formation. *Immunology*, 41 : 353~359, 1980.
- 25) Fiorilli, M., Aiuti, F., Ammirati, P., Luzi, G., Schirrmacher, V. : Effect of thymic factor on human lymphoid cells of umbilical cord blood and children with T cell deficiency. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 53 : 242~246, 1977.
- 26) Ceredig, R., Glasebrook, A.L., Macdonald, H.R. : Phenotypic and functional properties of murine thymocytes. I. Precursors of cytolytic T lymphocytes and interleukin 2-producing cells are all contained within a subpopulation of "mature" thymocytes as analyzed by monoclonal antibodies and flow microfluorometry. *J. Exp. Med.*, 155 : 358~379, 1982.
- 27) Ceredig, R., Dialynas, D.P., Fitch, F.W., Macdonald, H.R. : Precursors of T cell growth factor producing cells in the thymus: Ontogeny, frequency, and quantitative recovery in a subpopulation of phenotypically mature thymocytes defined by monoclonal antibody GK-1.5. *J. Exp. Med.*, 158 : 1654~1671, 1983.
- 28) Wagner, H., Hardt, C., Bartlett, R., Rollinghoff, M., Pfizenmaier, K. : Intrathymic differentiation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) precursors. I. The CTL immunocompetence of peanut agglutininpositive (cortical) and negative (medullary) Lyt 123 thymocytes. *J. Immunol.*, 125 : 2532~2538, 1980.
- 29) Toribio, M.L., Hera, A., Pereira, P. and Landazuri, M.O. : Modulation of cytolytic T cell function by lectins. *J. Immunol.*, 134 : 2179~2184, 1985.
- 30) Durantez, A., Landazuri, M.O.D., Silva, A., Kresler, M. : Comparison of the cytotoxic activities of different human lymphoid tissues. *J.*

- Clin. Lab. Immunol., 2 : 59~65, 1979.
- 31) Toribio, M.L., Landazuri, M.O.D., Lopez-Botet, M. : Induction of natural killer-like cytotoxicity in cultured human thymocytes. Eur. J. Immunol., 13 : 964~969, 1983.
 - 32) Goldstein, G., Scheid, M.P., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H., Van Wause, J.A. : A synthetic pentapeptide with biological activity. Characteristic of the thymic hormone thymopoietin. Science, 204 : 1309~1310, 1979.
 - 33) Tischio, J.P., Patrik, J.E., Weintraub, H.S., Chasin, M., Goldstein, G. : Short *in vitro* half-life of thymopoietin 32~36 pentapeptide in human plasma. Int. J. Peptide. Protein Res., 14 : 479~484, 1979.
 - 34) Nash, L., Good, R.A., Hatzfeld, A., Goldstein, G., Incefy, G.S. : *In vitro* differentiation of two surface markers for immature T cells by the synthetic pentapeptide, thymopoietin. J. Immunol., 126 : 150~153, 1981.
 - 35) Inouye, H., Hank, J.A., Alter, B.J., Bach, F. H. : TCGF production for cloning and growth of functional human T lymphocytes. Scand. J. Immunol., 12 : 149~154, 1980.
 - 36) Boyum, A. : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand. J. Clin. Invest., 21 : 77~89, 1968.
 - 37) Weiner, M.S., Bianco, C., Nussenzweig, V. : Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. Blood, 42 : 939~946, 1973.
 - 38) Lifter, J. : Methodologies for enumerating peripheral T lymphocytes. J. Clin. Immunol., 2 : 20~23, 1982.
 - 39) Saxon, A., Feldhaus, J., Adrianrobin, R. : Single step separation of human T and B cells using AET treated SRBC rosettes. J. Immunol. Methods, 12 : 285~288, 1976.
 - 40) Yata, J., Kobayashi, N., Shimbo, T., Kakihara, U., Sugahara, M., Yamakura, T. : Requirement of HLA compatibility between T- and B-cells in mitogen-induced *in vitro* immunoglobulin production. J. Clin. Lab. Immunol., 1 : 245~248, 1978.
 - 41) Cheung, N., Sherr, D.H., Heghinian, K.M., Benacerraf, B., Dorf, M.E. : Immune suppression *in vivo* with antigenmodified syngeneic cells. I. T-cell-mediated suppression to the terpolymer poly-(Glu, Lys, Phe). J. Exp. Med., 148 : 1539~1549, 1978.
 - 42) Levai, J.S., Utermohlen, V. : The effect of a human plasma thymic factor on human peripheral blood mononuclear cell subpopulations. Clin. Immunol. Immunopathol., 27 : 433~443, 1983.
 - 43) Irle, C., Piguet, P.F., Vassalli, P. : *In vitro* maturation of immature thymocytes into immunocompetent T cells in the absence of direct thymic influence. J. Exp. Med., 148 : 32~45, 1978.
 - 44) Kruisbeek, A.M., Zijlstra, J.J., Kroese, J.M. : Distinct effects of T cell growth factors and thymic epithelial factors on the generation of cytotoxic T lymphocytes by thymocyte subpopulations. J. Immunol., 125 : 995~1002, 1980.
 - 45) Robb, R.J., Munck, A., Smith, K.A. : T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. J. Exp. Med., 154 : 1455~1474, 1981.
 - 46) Rodriguez, M.A., Bankhurst, A.D., Ceuppens, J.L., Williams, R.C. : Characterization of the suppressor cell activity in human cord blood lymphocytes. J. Clin. Invest., 68 : 1577~1585, 1981.
 - 47) Clement, L.T., Dagg, M.K., Lehmyer, J.E., Kiyotaki, M. : Two phenotypically distinct suppressor T cell subpopulations inhibit the induction of B cell differentiation by phytohemagglutinin. J. Immunol., 131 : 1214~1217, 1983.
 - 48) Damle, N.K., Mohagheghpour, N., Kansas, G. S., Fishwild, D.M., Engleman, E.G. : Immunoregulatory T cell circuits in man. Identification of a distinct T cell circuits in man. Identification of a distinct T cell subpopulation of the helper/inducer lineage that amplifies the development of alloantigen-specific suppressor

- T cells. J. Immunol., 134 : 235~243, 1985.
- 49) Kansan, G.S., Wood, G.S., Fishwild, D.M., Engleman, E.G. : Functional characterization of human T lymphocyte subsets distinguished by monoclonal anti-leu-8. J. Immunol., 134 : 2995~3002, 1985.
-