

## アスベスト (クリソタイル) 線維によるリンパ球への影響

### (I) PHA (phytohaemagglutinin) のリンパ球幼若化に及ぼす影響

絹川 敬吾

アスベスト線維曝露は、胸膜中皮腫、肺線維症、肺癌の発生と関連があるとされている。さらに自己抗体の出現、高グロブリン血症などの発生が報告されている。アスベスト線維は PHA (phytohaemagglutinin) のリンパ球幼若化を抑制すると報告されている。我々はこの PHA 幼若化抑制の機序解明のために、アスベスト (クリソタイル) 線維による  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込み、リンパ球増殖因子の指標である IL-2 receptor (IL-2R) および PHA のリンパ球結合について調べた。PHA 刺激によるリンパ球の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みおよび IL-2R はクリソタイル線維 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) によって抑制された。クリソタイル線維による IL-2R の抑制は PHA 幼若化抑制と関係があると思われた。PHA とリンパ球の結合強度はむしろ増強し、PHA とリンパ球との結合障害によるものではないことが判明した。

さらにリンパ球サブセットへの影響についてフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、クリソタイル線維負荷により  $\text{CD4}^+$  細胞は 12 時間までに減少しその後回復したことから、 $\text{CD4}^+$  細胞が選択的に刺激されていると思われた。(平成 2 年 5 月 31 日採用)

## Effect of Asbestos (Chrysotile) Fiber on Lymphocytes

### (I) Effect on PHA Stimulated Lymphocytes

Keigo Kinugawa

Exposure to asbestos fibers is associated with a variety of disorders, including mesothelioma, lung fibrosis and cancer. Persons exposed to asbestos display systemic immunological alternations, including increased serum immunoglobulins and increased prevalence of autoantibodies. Asbestos fibers are known to depress the mitogenic stimuli of PHA to lymphocytes.

We examined the effects of asbestos (chrysotile) fiber on the proliferation of PHA-stimulated lymphocytes and the PHA binding activity of lymphocytes in vitro. The incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine and the expression of interleukin-2 receptor (IL-2R) were depressed when the cells were exposed to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of chrysotile fiber with or without PHA. These data indicate that the depression of IL-2R expression by chrysotile fiber may be relevant to the decreased proliferative activity of PHA-stimulated lymphocytes.

The PHA binding activity of lymphocytes was significantly enhanced after chrysotile fiber exposure as compared with that in the non-exposed group. These results indicate that the depression of PHA stimuli with chrysotile fiber

is not due to blocking of PHA binding to lymphocytes.

In addition, using flow cytometry, we observed modulations of the markers on lymphocyte subsets after exposure to chrysotile fiber. Exposure to chrysotile induced a rapid (<12hrs) decrease in CD4<sup>+</sup> cells but recovery thereafter, which suggests that CD4<sup>+</sup> cells are selectively activated by chrysotile fiber. (Accepted on May 31, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16(2): 166-171, 1990

**Key Words** ① Asbestos ② PHA ③ Lymphocytes ④ Activation

## はじめに

アスベスト線維曝露により自己抗体の出現高グロブリン血症,<sup>1)</sup> B細胞系白血病などの発生が報告され、また PHA (phytohaemagglutinin) のリンパ球幼若化を抑制する<sup>2)</sup> と報告されている。今回我々はこの PHA 幼若化抑制の機序解明のために、アスベスト（クリソタイル）線維による ① <sup>3</sup>H-thymidine の取り込み、② リンパ球増殖因子である IL-2 に対する receptor の発現、<sup>3)</sup> ③ PHA のリンパ球結合力、④ リンパ球サブセットのマーカー発現への影響についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

## 実験材料と方法

### 1. 末梢血からの単核球分離

健康な成人ボランティア 10 人から末梢血を得、Ficoll-Hypaque 法にて単核球を分離し、<sup>4)</sup> ペニシリン 100 IU/ml、ストレプトマイシン 100 μg/ml を含む無血清培地に 1×10<sup>6</sup>/ml で浮遊させた。

### 2. アスベスト線維

UICC 標準品であるクリソタイル線維を南アフリカ Pnuoconiosis Research Unit より譲り受けた。乾熱滅菌されたクリソタイル線維の直径は 0.21~0.40 μm、長さは 2.01~4.00 μm であった。

### 3. <sup>3</sup>H-thymidine 取り込みへの影響

96-well プレート (Corning) に最終濃度が、単核球 1×10<sup>5</sup>/well, PHA (Difco) 10 μg/ml, クリソタイル線維 0.50 μg/ml にまきこみ、37°C 4 日間、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中に

て培養後 <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを測定した。<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは、測定 18~20 時間前に <sup>3</sup>H-thymidine を 2 μCi/ml となるよう加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-700, Aloka) にて測定した。

### 4. IL-2 receptor (IL-2R) 発現への影響

単核球 1×10<sup>6</sup>/ml に最終濃度が PHA 10 μg/ml, クリソタイル線維 0.50 μg/ml になるよう添加して、37°C・24 時間、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中にて培養後、FITC 標識 anti-human IL-2R モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson) を 4°C・30 分間反応させた後 FACstar によって解析した。

### 5. クリソタイル線維とリンパ球の反応

最終濃度 0.50 μg/ml となるよう、クリソタイル線維を加え 5% CO<sub>2</sub> 中にて種々の時間培養後、FITC 標識 PHA 10 μg/ml (Sigma Chem. Co., USA), PE 標識 OKT 4 (anti-CD4) または OKT 8 (anti-CD8) モノクローナル抗体 (Ortho-mune, USA) 10 μl で単染色および二重染色を室温にて 30 分行い、FACstar によって解析した。

### 6. 生死判定

トリパンブルー染色法とフローサイトメトリー法による FDA (fluorescein diacetate, Sigma)/PI (propidium iodide, Sigma) 同時染色法<sup>5)</sup> によって検討した。

### 7. 統計学的検索

得られた値は、Wilcoxon test にて統計学的に解析を行い p<0.05 以下を有意差ありと判定した。

結 果

1. <sup>3</sup>H-thymidineの取り込みに対するクリソ  
 タイル線維の影響

96-well マイクロプレートにて反応させた細胞への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを同一条件につき3例ずつ測定した. **Figure 1** に示すごとく PHA 刺激に伴うリンパ球への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは, クリソタイル線維負荷により有意に減少した ( $p < 0.01$ ).

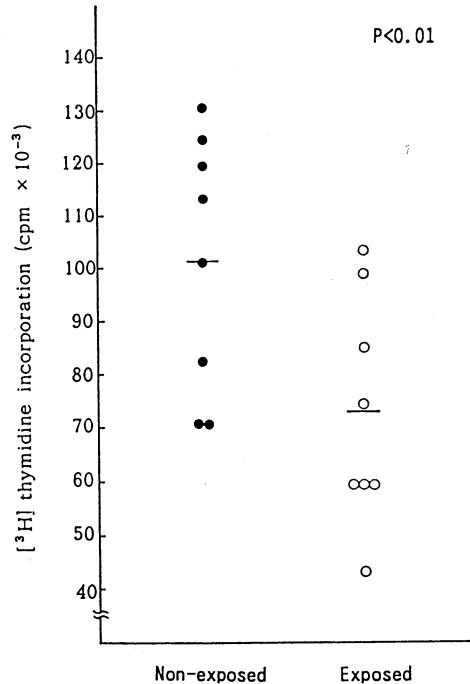
2. PHA 刺激に伴うリンパ球の IL-2R 発現  
 へのクリソタイル線維の影響

末梢血より分離したリンパ球を PHA とともに 24 時間培養すると, 著明な IL-2R の発現が認められる. PHA 10  $\mu\text{g/ml}$  刺激に伴うリンパ球の IL-2R 発現の典型的な histogram を **Figure 2** に示した. コントロール (PHA のみを加えた群) のリンパ球 IL-2R 発現率は 65.3%, PHA とともにクリソタイル線維 50  $\mu\text{g/ml}$  を加えると IL-2R 発現率は 43.5% と明らかに抑制した. 次に 10 例につき検討した結果, コントロールの IL-2R 発現率は  $54.3 \pm 6.6$ , クリソタイル線維負荷群では  $42.3 \pm 7.1$  と有意に減少し ( $p < 0.01$ ), また IL-2R の蛍光強度もコントロール群  $91.3 \pm 16.6$ , クリソタイル線維負荷群  $70.5 \pm 12.9$  と有意に低下した ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 3**). この事実は PHA 刺激に伴うリンパ球幼若化が, <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みにおけると同様に抑制されていることを, 増殖の一つである IL-2R 発現の面から示している.

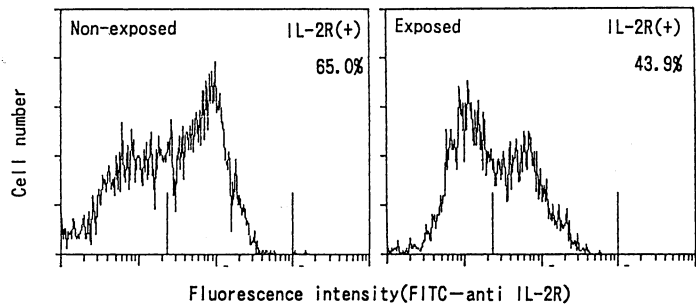
3. クリソタイル線維による  
 PHA のリンパ球結合への  
 影響 (**Fig. 4**)

得られた末梢血リンパ球は, 1 時間あるいは 6 時間クリソタイル線維と培養後, FITC-PHA で単染色を行い, リンパ球における PHA の結合強度をヒストグラムで表した. **Figure 4** に

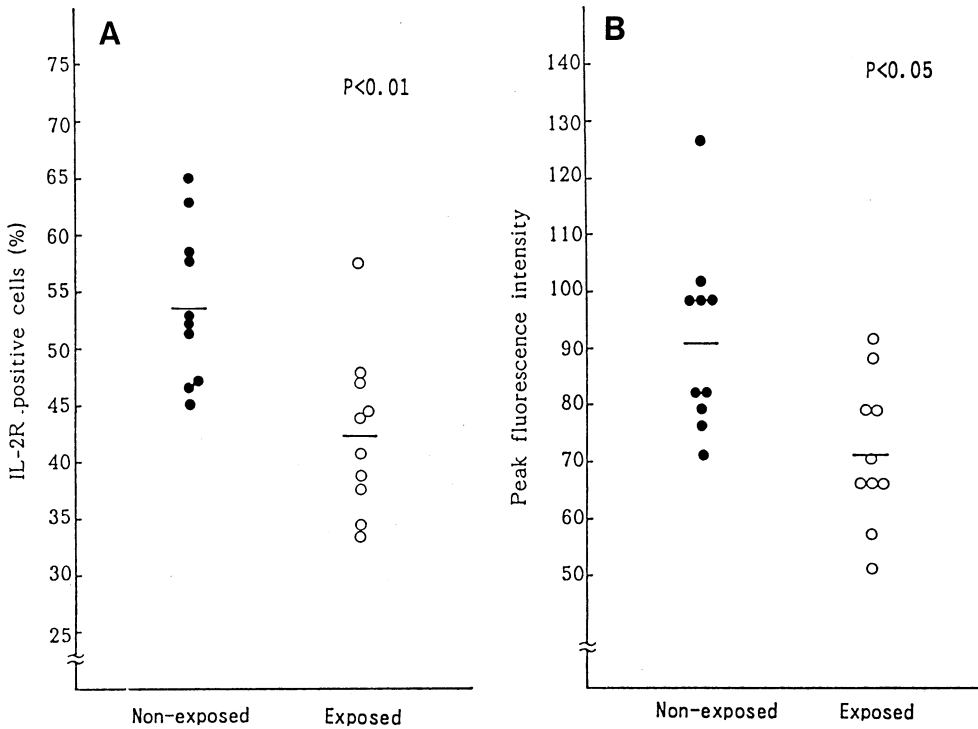
示すようにヒストグラムのピークはクリソタイル線維負荷により右方へ偏位して FITC 蛍光強度の増強を示し, PHA との結合性が上昇したことを示した. ヒストグラムのピーク値の FITC 蛍光強度 (log 値) を指標として, 10 例を比較検討した結果, 1 時間におけるコントロール値を 100 とすると, 1 時間クリソタイル線維負荷では  $171 \pm 54$ , 6 時間コントロール



**Fig. 1.** Suppressed <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into PHA stimulated lymphocytes by chrysotile fiber

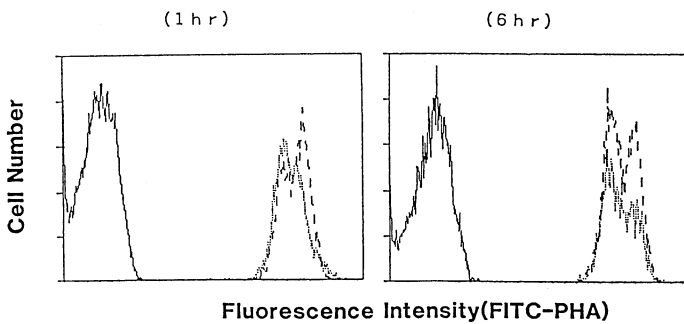


**Fig. 2.** IL-2R expression on PHA stimulated lymphocytes by chrysotile fiber



**Fig. 3.** Modulation of IL-2R expression on PHA stimulated lymphocytes by chrysotile fiber

- (A) The percentage of IL-2R positive cells
- (B) The fluorescence intensity of IL-2R positive cells



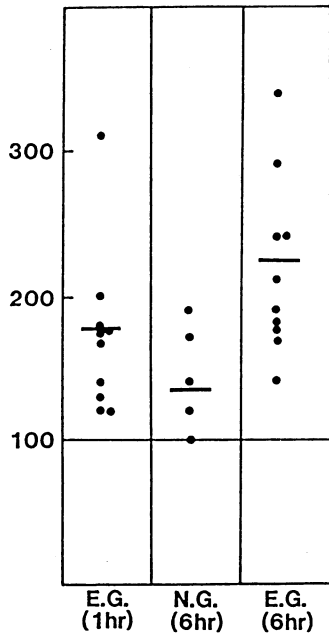
**Fig. 4.** PHA binding activity of lymphocytes  
(—) Unstained, (-----) Non-exposed, (----) Exposed

144±33, 6時間クリソタイル線維負荷 224±60と明らかにクリソタイル線維負荷によりPHAのリンパ球への結合は増強した(1時間  $p < 0.01$ , 6時間  $p < 0.01$ ) (Fig. 5).

- 4. CD4, CD8 抗原陽性率の経時的推移 (Fig. 6)
- コントロール群における CD4<sup>+</sup> 細胞の比率

は, 1時間  $48.6 \pm 8.8\%$ , 6時間  $33.2 \pm 16.5\%$ , 12時間  $24.5 \pm 9.4\%$ でありクリソタイル線維負荷群では1時間  $28.4 \pm 16.5\%$ , 6時間  $16.4 \pm 14.0\%$ , 12時間  $9.2 \pm 4.4\%$ と明らかに減少し, 18時間で再度増加し始め24時間以降ではコントロール群と有意差を認めなかった. 一方 CD8<sup>+</sup> 細胞はクリソタイル線維負荷により1時間, 6時間では軽度増加したが, 12時間以後

ではコントロール群と同じ変化を呈した. また, CD4<sup>+</sup> 細胞および CD8<sup>+</sup> 細胞における蛍光強度の変化についてクリソタイル線維の影響を検討したところ, CD4<sup>+</sup> 細胞はクリソタイル線維負荷後6および12時間にはコントロールに比し, 40%の抑制をみたが24, 48時間でコントロールのレベルまで回復した. 一方, CD8<sup>+</sup>



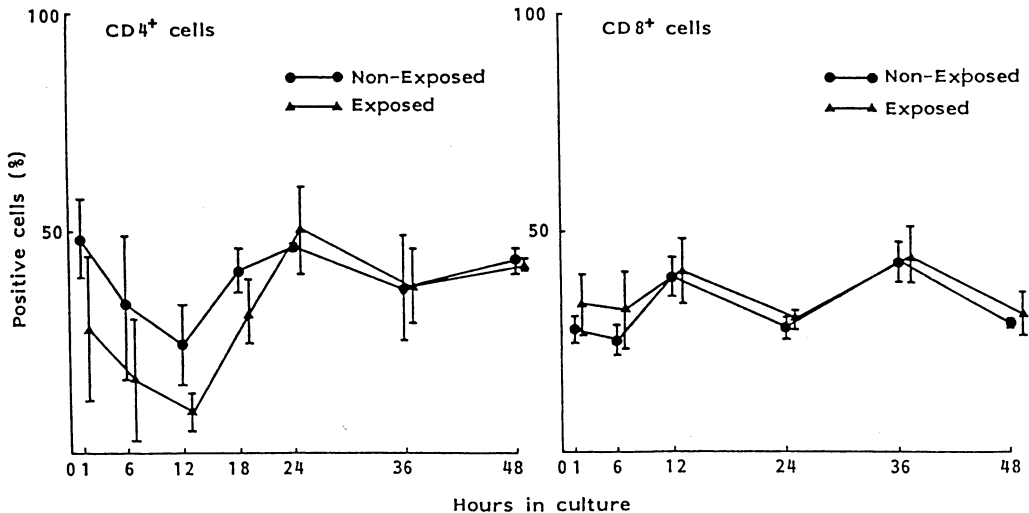
**Fig. 5.** Effect of chrysotile fiber on the PHA binding activity of human lymphocytes  
 E. G.: Exposed group  
 N. G.: Non-exposed group

細胞では途中軽度の蛍光強度の低下を示した。これらの所見が示すようにクリソタイル線維負荷により、12時間までに CD4<sup>+</sup> 細胞の減少および蛍光強度の低下を認め、24時間以降には再度回復したことは、一時的に CD4<sup>+</sup> 細胞が活性化されていると考えられた。

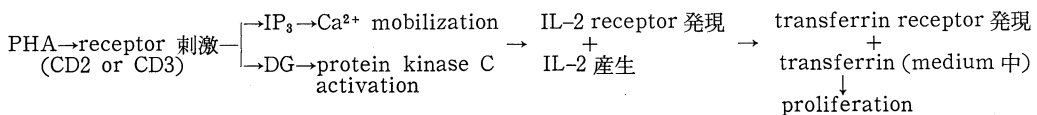
**考 察**

PHA 刺激に伴うリンパ球幼若化に及ぼすクリソタイル線維の影響として、諸家の報告<sup>2)</sup>と同様 <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みの抑制をみたことより、クリソタイル線維は明らかにリンパ球幼若化を抑制することが判明した。リンパ球幼若化機構について一般に知られている一連の反応をまとめて **Figure 7** に示した。<sup>6)</sup> 今回、PHA 刺激に伴う IL-2R 発現の抑制が認められたことから、IL-2R 発現に先行する cell cycle 早期に影響<sup>7)</sup>を及ぼして増殖を抑制している可能性があると考えた。

PHA とリンパ球の結合に対する影響では、クリソタイル線維との反応により PHA のリン



**Fig. 6.** Time course of modulation in lymphocyte subsets (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> cells)



**Fig. 7.** Pathway of lymphocyte activation with PHA

パ球への結合はむしろ増強を示し、特に CD8<sup>+</sup> 細胞への PHA の結合が増強していた<sup>9)</sup> ことから、クリソタイル線維による PHA のリンパ球幼若化抑制は、PHA がリンパ球に結合するのを障害するためではないことが判明した。Kagamimori ら<sup>9)</sup> はクリソタイル線維がリンパ球と単球との相互作用を低下させることで、PHA のリンパ球への幼若化抑制を引き起こしているのではないかと推論している。

PHA 刺激に伴うリンパ球サブセットの変化に及ぼすクリソタイル線維の影響として、CD4 抗原陽性細胞の割合 および 蛍光強度は 12 時間

までに減少したが、24 時間以降では回復を示した。Takada ら、<sup>10)</sup> Weyand ら<sup>11)</sup> が特異抗原による刺激の例で述べているように、このことは CD4<sup>+</sup> 細胞をクリソタイル線維が一時的に活性化していることを示唆するものと思われる。この活性化が、CD4<sup>+</sup> 細胞のどのようなサブセットに関与しているのかについて検討が必要と思われる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲をいただいた川崎医科大学 望月義夫学長（前衛生学教授）、ならびに衛生学 植木絢子教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Lange, A., Smolik, R., Zatonski, W. and Szymanska, J.: Autoantibodies and serum immunoglobulin levels in asbestos workers. *Int. Arch. Arbeitsmed.* 32 : 313—318, 1974
- 2) Barbers, R. G., Suih, W. H. and Saxon, A.: In vitro depression of human lymphocyte mitogen response (phytohaemagglutinin) by asbestos fibres. *Clin. Exp. Immunol.* 48 : 602—610, 1982
- 3) Poulton, T. A., Gallagher, A., Potts, R. C. and Swanson, B. J.: Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation. *Immunology* 64 : 419—424, 1988
- 4) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 : 77—84, 1968
- 5) Jones, K. H. and Senft, J. A.: An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33 : 77—79, 1985
- 6) Mier, J. W. and Gallo, C.: Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 : 3494—3498, 1980
- 7) Strominger, J.: Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J. Exp. Med.* 157 : 461—466, 1983
- 8) Kinugawa, K., Hyodoh, F., Andoh, A., Ueki, A., Tanaka, H. and Mochizuki, Y.: Elevated binding activity of CD8<sup>+</sup> cells with phytohaemagglutinin by asbestos fibre in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 80 : 89—93, 1990
- 9) Kagamimori, S., Scott, M. P., Brown, D. G., Edwards, R. E. and Wagner, M. M. F.: Effects of chrysotile asbestos on mononuclear cells in vitro. *Br. J. Exp. Pathol.* 61 : 55—60, 1980
- 10) Takada, S. and Engleman, E. G.: Evidence for an association between CD8 molecules and the T cell receptor complex on cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 139 : 3231—3235, 1987
- 11) Weyand, C. M., Goronzy, J. and Fathman, C. G.: Modulation of CD4 by antigenic activation. *J. Immunol.* 138 : 1351—1354, 1987