

アスベスト(クリソタイル)線維によるリンパ球への影響

(Ⅱ) クリソタイル線維によるサプレッサー・インデューサーTリンパ球の活性化

絹川 敬吾

アスベスト線維の一つであるクリソタイル線維が末梢血リンパ球のCD4⁺細胞を選択的に刺激していると考えられる旨を第1報で報告した。本論文では、さらにCD4⁺細胞のどのサブセット(CD4⁺2H4⁺あるいはCD4⁺4B4⁺)を刺激しているかについて検討したところCD4⁺2H4⁺いわゆる suppressor-inducer 細胞の活性化が認められた。すなわち、培養12時間後では、CD4⁺2H4⁺細胞の割合および蛍光強度がクリソタイル線維負荷により一時的に低下し、24, 48時間はクリソタイル無処理群とほとんど差を認めないまでに回復した。CD4⁺4B4⁺細胞では、このような変化は認められなかった。また、これに伴うIL-2 receptor (IL-2R) 発現および細胞内カルシウム(Ca⁺⁺)の増加を認めた。これらの結果より、CD4⁺2H4⁺(suppressor-inducer) T細胞が選択的に刺激されていると考えた。

このCD4⁺2H4⁺(suppressor-inducer) T細胞の選択的刺激は、以前報告したPHAとリンパ球結合の増強がCD8⁺細胞において顕著であったこととの関連が示唆された。クリソタイル線維による suppressor T細胞の活性化は、アスベスト労働者でみられる癌発生あるいは自己免疫において重要な役割を示すと思われる。(平成2年6月4日採用)

Effect of Asbestos (Chrysotile) Fiber on Lymphocytes

(Ⅱ) Activation of Suppressor-Inducer T Lymphocytes by Chrysotile Fiber

Keigo Kinugawa

It was reported that CD4⁺ cells were selectively activated by chrysotile fiber. In this study, we observed that the modulation of CD4⁺2H4⁺(suppressor-inducer) cells was prominent among CD4⁺ cells and that it became maximal at 12hrs and recovered thereafter. These results indicate that CD4⁺2H4⁺ cells were selectively activated by chrysotile fiber. An increased expression of IL-2 receptor and an elevated intracellular calcium (Ca⁺⁺) level were observed in CD4⁺2H4⁺ cells incubated with chrysotile fiber. It might be possible that the enhancement of PHA binding activity on CD8⁺ cells by chrysotile fiber reported in the previous paper was associated with the activation of CD4⁺2H4⁺ cells by chrysotile fiber, as detected in this study. It seems that the activation of suppressor T cells

with chrysotile fiber may play an important role in the oncogenesis or autoimmunity observed in asbestos workers in vivo. (Accepted on June 4, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16(2) : 172-179, 1990

Key Words ① Chrysotile fiber ② Lymphocyte subsets ③ Activation
④ IL-2 receptor ⑤ Ca⁺⁺

はじめに

アスベスト線維の一つであるクリソタイル線維が末梢血リンパ球の CD4⁺ 細胞を選択的に刺激していると考えられる旨を第1報で報告した。本論文は、さらに CD4⁺ 細胞のどのサブセット (CD4⁺ 2H4⁺ あるいは CD4⁺ 4B4⁺) を刺激しているかについて検討した。また、それに伴う IL-2 receptor (IL-2R) 発現³⁾ および細胞内カルシウム (Ca⁺⁺) 濃度^{4),5)} について検討したので報告する。

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末梢血 (10人) から Ficoll-Hypaque 法で単核細胞を分離し⁶⁾ ペニシリン 100 μg/ml, ストレプトマイシン 100 μg/ml を含む無血清培地に浮遊させた。
2. クリソタイル線維は UICC 標準品を用いた。
3. CD4⁺ リンパ球サブセットの測定
単核細胞は 1×10⁶/ml で培地に浮遊させ最終濃度 0.50 μg/ml となるようクリソタイル線維

を加え 5% CO₂ 中にて 12~48 時間培養後 FITC 標識 2H4 または 4B4 モノクローナル抗体 (Coulter Electronics, Hialeah, FL) と PE 標識 OKT4 モノクローナル抗体 (Orthomune, USA) の二重染色を行い、FACstar (Becton-Dickinson) による解析を行った。

4. IL-2 receptor (IL-2R) の測定

リンパ球の IL-2R 発現についても同様に 24 時間培養後、FITC 標識抗 IL-2R モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson) との単染色および PE 標識 OKT4 あるいは OKT8 モノクローナル抗体との二重染色を行い、FACstar によって解析した。これらの操作方法については、**Figure 1** にまとめ

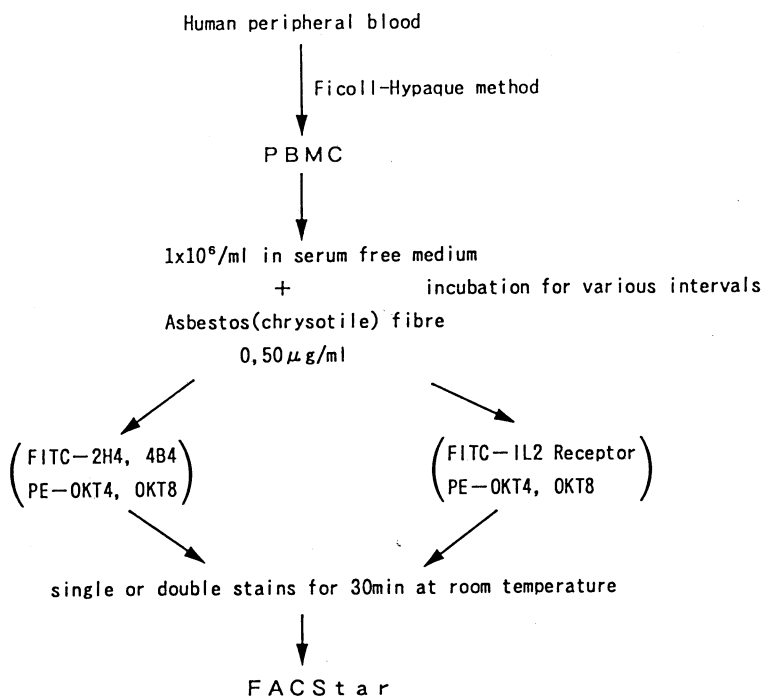


Fig. 1. Experimental procedure

PBMC: peripheral blood mononuclear cells
FITC: fluorescein isothiocyanate
PE: phycoerythrin

て示すごとくである。

5. リンパ球の細胞内遊離 Ca 濃度の測定

細胞内 Ca^{++} 濃度測定には Ca 蛍光指示薬である Fluo 3-AM (DOJIN) を用いて単核細胞と 30 分反応後, クリソタイル線維 $0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて 30 分後に FACstar によって解析した。

また, positive コントロールとして PHA $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 30 分刺激したリンパ球を同様に測定した。

6. 生死判定

トリパンプ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⁷⁾ 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. クリソタイル線維による $CD4^+2H4^+$ (suppressor-inducer) T細胞への影響

FITC 標識 2H4 と PH 標識 OKT4 モノクローナル抗体との二重染色による等高線標示グラフを示した (Fig. 2)。 $CD4^+2H4^+$ 細胞いわゆる suppressor-inducer T 細胞は培養 12 時間後で陽性細胞の割合および蛍光強度がクリソタイル線維負荷により一時的に低下したが, 24, 48 時間ではクリソタイル無処理群と比較してほとんど差を認めなかった。クリソタイル無処理群値を 100 としてクリソタイル線維処理群の値を求めて影響をみると, 培養 12 時間後では $CD4^+2H4^+$ 細胞の占める割合および蛍光強度はそれぞれ約 40%, 22% の低下があり, 24, 48 時間後ではほぼクリソタイル無処理群の値まで回復し, $CD4^+$ 細胞の経時的変化と同様な変化を示した (Figs. 4, 5)。

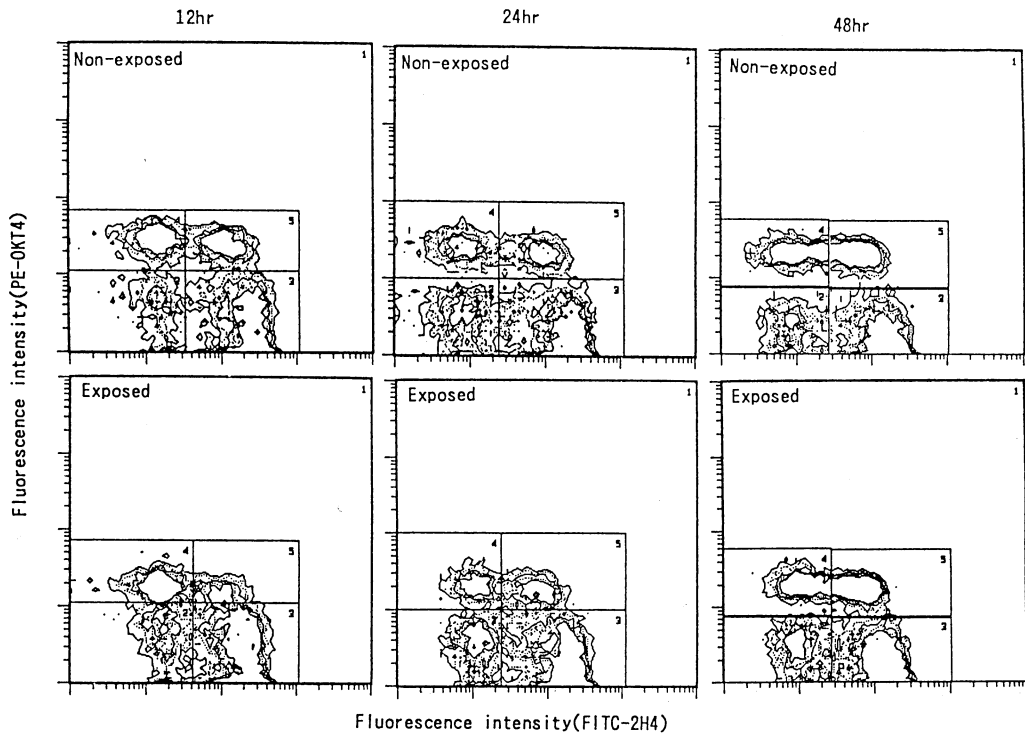


Fig. 2. Modulation of CD4 and 2H4 antigen induced by chrysotile fiber. The expression of CD4 and 2H4 were evaluated by simultaneous double staining with PE-OKT4 and FITC-2H4, and fluorescence analysis using flow cytometry.

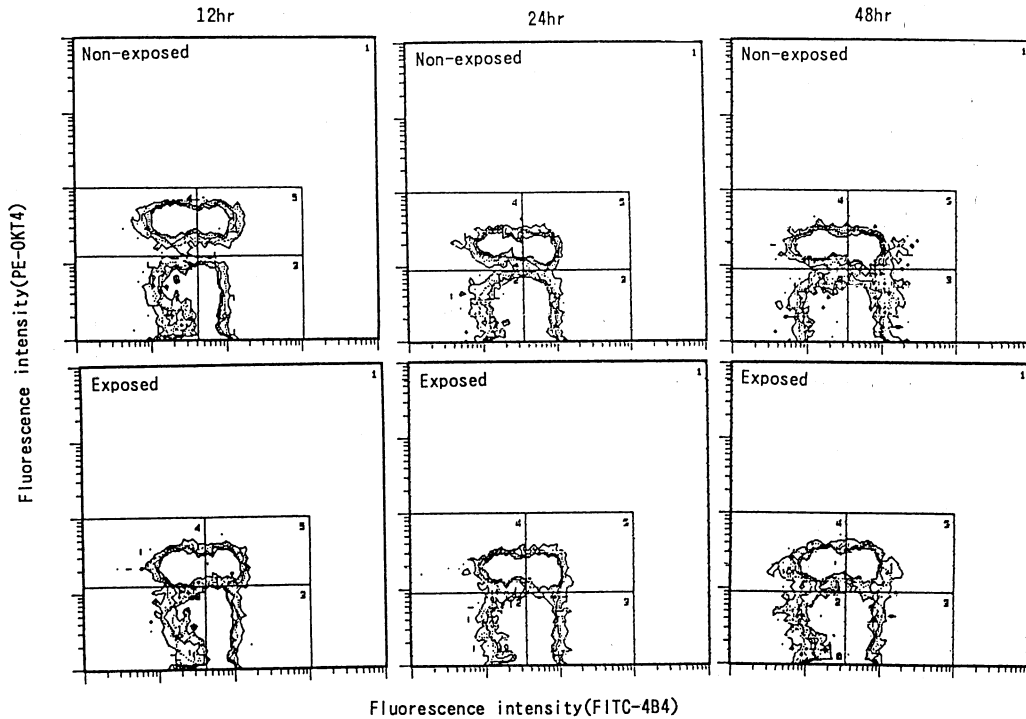


Fig. 3. Modulation of CD4 and 4B4 antigen induced by chrysotile fiber. The expression of CD4 and 4B4 were evaluated by simultaneous double-staining with PE-OKT4 and FITC-4B4, and fluorescence analysis using flowcytometry.

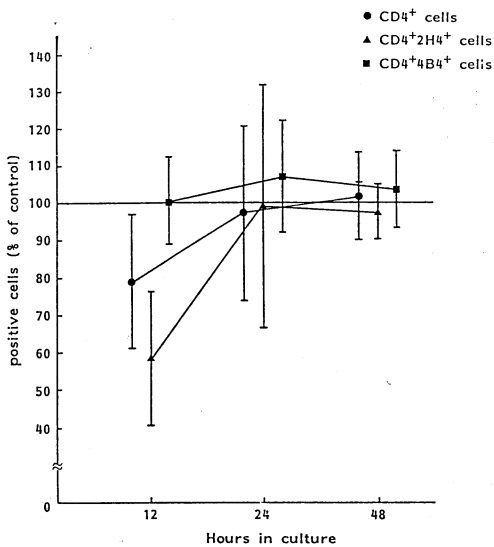


Fig. 4. The expression of surface antigens on lymphocyte subsets. Calculation of the index was based on positive cells incubated without chrysotile fiber.

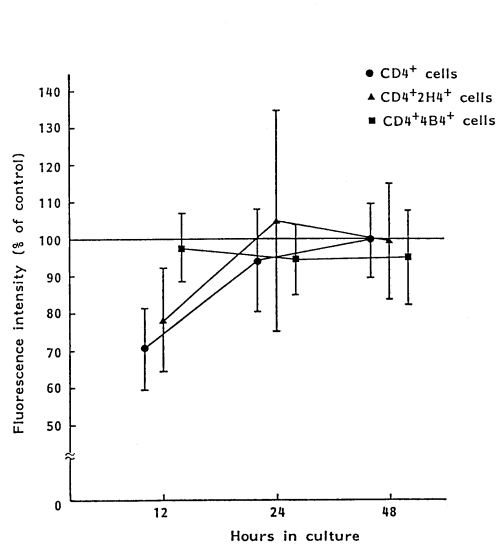


Fig. 5. The fluorescence intensity of each surface antigen on lymphocyte subsets. Calculation of the index was based on the fluorescence intensity of cells incubated without chrysotile fiber.

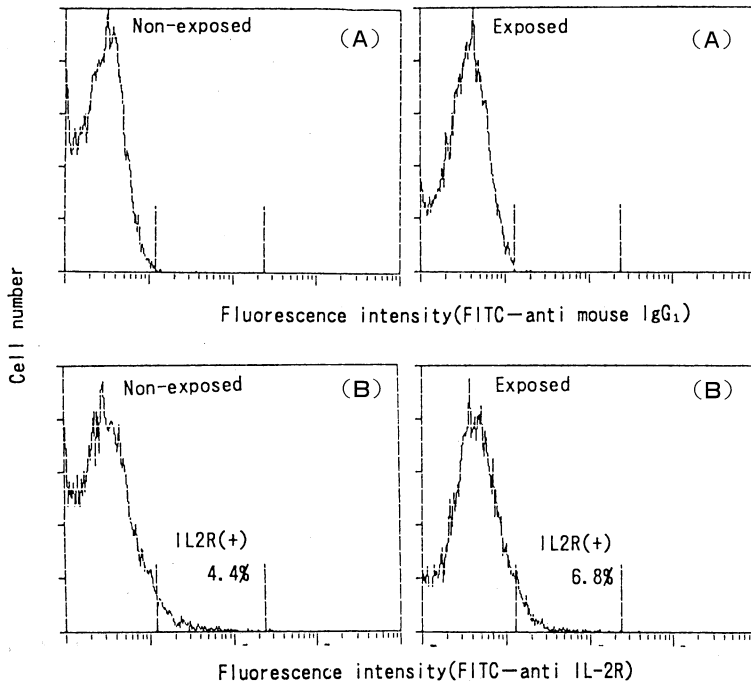
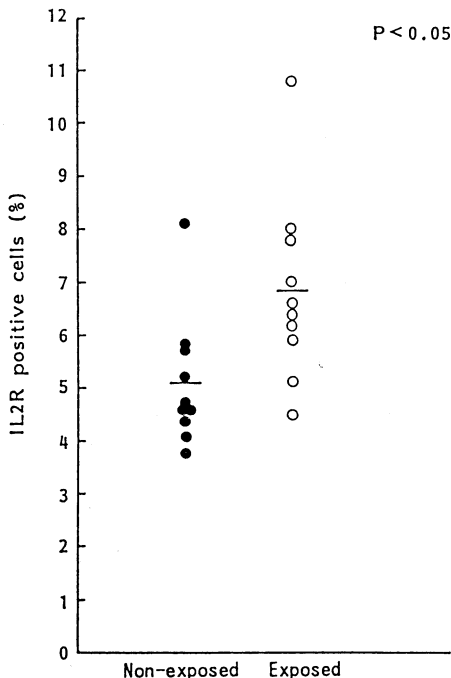


Fig. 6. Effect of chrysotile fiber on IL-2R expression of lymphocytes. One of ten similar experiments is demonstrated. (A) FITC-anti mouse IgG₁ monoclonal antibody was used as a non-specific control. (B) IL-2R was evaluated by single stain using FITC-anti human IL-2R monoclonal antibody.



した。リンパ球の IL-2R 発現は FITC 標識抗マウス IgG₁ コントロールでの反応域を negative コントロールとして、特異抗体で染色される細胞数を測定したところ、クリソタイル線維無処理群 4.4%、処理群 6.8% とクリソタイル線維負荷により陽性率が増加した例を示した (Fig. 6)。10 例についてのデータを検討すると、IL-2R 発現はクリソタイル線維無処理群 5.1 ± 1.2 、処理群 6.8 ± 1.7 とクリソタイル線維負荷により有意に増加した ($p < 0.05$) (Fig. 7)。次にこの IL-2R 陽性細胞がどのリンパ球サブセットに属するかを、FITC 標識抗 IL-2R

Fig. 7. Effect of chrysotile fiber on IL-2R expression in lymphocytes

Mean value in non-exposed group: 5.1 ± 1.2
 Mean value in exposed group: 6.8 ± 1.7 ($p < 0.05$)

2. クリソタイル線維による CD4⁺4B4⁺ (helperinducer) T 細胞への影響

FITC 標識 4B4 と PE 標識 OKT4 モノクローナル抗体との二重染色による等高線標示グラフを示した (Fig. 3)。CD4⁺4B4⁺ 細胞の占める割合および蛍光強度はクリソタイル線維負荷による経時的影響を示さなかった (Figs. 4, 5)。

3. クリソタイル線維によるリンパ球 IL-2 receptor(IL-2R) 発現への影響

リンパ球 1×10^6 /ml とクリソタイル線維 0.50 μ g/ml を 24 時間培養後、FITC 標識抗 IL-2R モノクローナル抗体で単染色し、ヒストグラムを解析

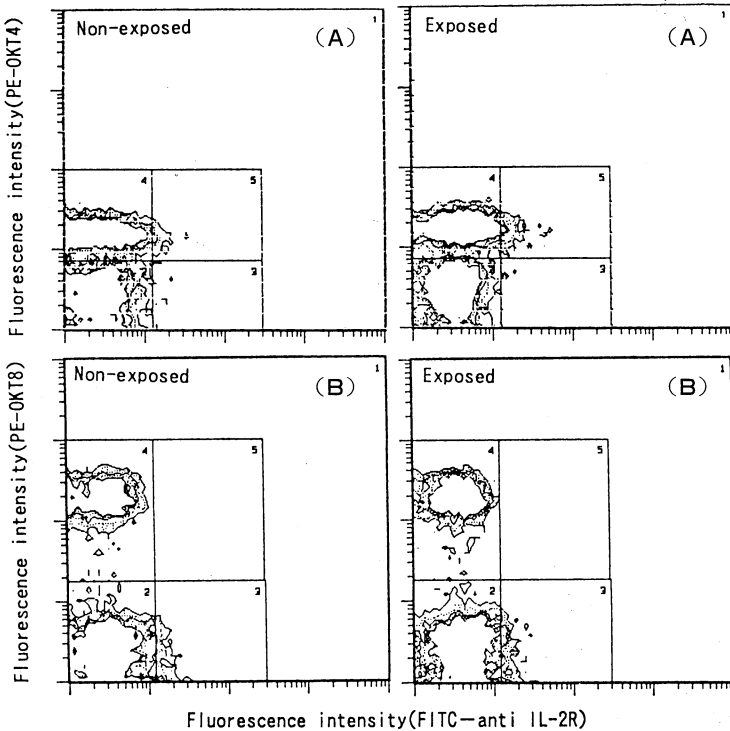


Fig. 8. Effect of chrysotile fiber on IL-2 receptor expression in CD4⁺ or CD8⁺ cells

- (A) CD4 antigen and IL-2R expression were evaluated by simultaneous double-staining using PE-OKT4 and FITC-anti IL-2R monoclonal antibody.
- (B) CD8 antigen and IL-2R expression were evaluated by simultaneous double-staining using PE-OKT8 and FITC-anti IL-2R monoclonal antibody.

モノクローナル抗体と PE 標識抗 CD4 および抗 CD8 モノクローナル抗体との二重染色による等高線標示グラフで検討すると、CD8⁺ 細胞ではクリソタイル線維による IL-2R 陽性細胞の増加はなく、主に CD4⁺ 細胞において IL-2R 発現の増加をみた (Fig. 8).

4. クリソタイル線維による細胞内遊離カルシウム濃度への影響

Fluo3-AMによる蛍光強度を指標として Ca⁺⁺ 濃度を測定しクリソタイル線維の影響を検討しヒストグラムで示した (Fig. 9). クリソタイル線維負荷により Fluo3-AMによる蛍光強度の増強があり細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の増加を認めた. また、positive コントロールとしては、PHA 添加細胞群を用いた (Table 1).

考 察

クリソタイル線維負荷により CD4⁺ 細胞が、12 時間で一時的に CD4 抗原陽性細胞の占める割合および蛍光強度が低下し、24 時間以後では回復を示したことは先の論文にて報告した。⁸⁾

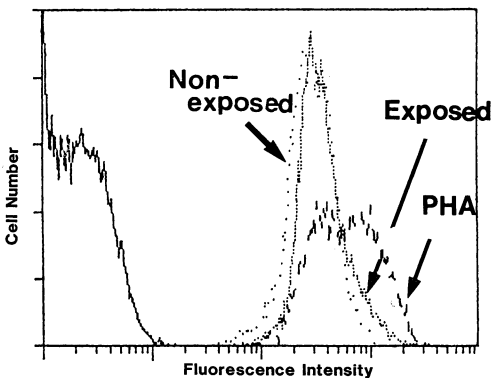


Fig. 9. Effect of stimulating factors on the fluorescence intensity of Fluo-3AM in lymphocytes

- (—) unstained
- (·····) control
- (- - -) incubated with chrysotile fibre
- (- · -) incubated with PHA (10 μg/ml)

Table 1. Effect of stimulating factors on the mean fluorescence intensity of Fluo-3AM in lymphocytes

	Mean fluorescence intensity
Non-exposed	362 ± 21
Exposed	425 ± 43*
PHA	724 ± 74**

* p < 0.05, ** p < 0.01 compared with non-exposed group

この事実は、Takadaら⁹⁾、Weyandら¹⁰⁾の報告よりCD4⁺細胞が一時的に刺激されていると考えられる。本論文ではさらにどのCD4⁺サブセット(CD4⁺2H4⁺: suppressor-inducer, CD4⁺4B4⁺: helper-inducer)^{11,2)}が刺激を受けているかを検討した。その結果、2H4抗原が陽性細胞の占める割合および蛍光強度とも、CD4抗原と同様な経時的変化を示し、クリソタイル線維はCD4⁺2H4⁺細胞を選択的に刺激していると考えられた。

リンパ球の刺激による一連の反応の途中で、細胞膜表面に表れる抗原の一つとしてIL-2Rがあり、細胞自身が産生する増殖因子であるIL-2と反応することが報告されている。¹¹⁾

今回の実験において、抗IL-2Rモノクローナル抗体を用いて調べたところクリソタイル線維負荷によりCD4⁺細胞上でのIL-2R発現が増加することが判明した。また、最近では、¹²⁾細胞活性化の指標として細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇が報告されている。¹³⁾この細胞内Ca⁺⁺濃度を測定するために、蛍光指示薬(Fluo3-AM)を用いた。その結果、クリソタイル線維負荷により細胞内Ca⁺⁺濃度の増加を示すことがわ

かった。

以上より、クリソタイル線維はCD4⁺2H4⁺細胞を選択的に刺激しそれに伴い細胞内Ca⁺⁺濃度の増加およびCD4⁺細胞におけるIL-2R発現を誘導すると考えられた。このCD4⁺2H4⁺(suppressor-inducer)T細胞の選択的刺激は、以前報告したPHAとリンパ球結合の増強がCD8⁺細胞において顕著であった¹⁴⁾こととの関連が示唆された。また、suppressor T cellの過度の活性化は生体における免疫抑制¹⁵⁾や癌の発生との関連があるとされており、アスベスト線維の発癌性¹⁶⁾との関連において興味深いと思われる。

結 語

クリソタイル線維はCD4⁺2H4⁺細胞を選択的に刺激しそれに伴い細胞内Ca⁺⁺濃度の増加およびCD4⁺細胞におけるIL-2R発現を誘導すると考えられた。

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) Morimoto, C., Letvin, N. L., Distaso, J. A., Aldrich, W. R. and Schlossman, S. F.: The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J. Immunol.* 134: 1508—1515, 1985
- 2) Morimoto, C., Letvin, N. L., Boyd, A. W., Hagan, M., Brown, H. M., Kornacki, M. M. and Schlossman, S. F.: The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J. Immunol.* 134: 3762—3768, 1985
- 3) Negoro, S., Hara, H., Miyata, S., Saiki, O., Tanaka, T., Yoshizaki, K., Igarashi, T. and Kishimoto, S.: Mechanism of age-related decline in antigen-specific T cell proliferative response: IL-2 induced proliferative response of purified Tac-positive T cells. *Mech. Ageing Dev.* 36: 223—227, 1986
- 4) Minta, A., Kao, J. P. Y. and Tsien, R. Y.: Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264: 8171—8178, 1989
- 5) Kao, J. P. Y., Harootunian, A. T. and Tsien, R. Y.: Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by Fluo-3. *J. Biol. Chem.* 264: 8179—8184, 1989
- 6) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 21: 77—84, 1968
- 7) Jones, K. H. and Senft, J. A.: An improved method to determine cell viability by sim-

- ultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33 : 77—79, 1985
- 8) 絹川敬吾, 兵藤文則, 植木絢子, 田中啓幹, 望月義夫: アスベスト線維によるリンパ球の PHA 結合性への影響. *フローサイトメトリー* 9 : 67—70, 1989
 - 9) 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
 - 10) Weyand, C. M., Goronzy, J. and Fathman, C. G.: Modulation of CD4 by antigenic activation. *J. Immunol.* 138 : 1351—1354, 1987
 - 11) Sztain, M. B., Serrate, S. A. and Goldstein, A. L.: Modulation of interleukin 2 receptor expression on normal human lymphocytes by thymic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 : 6107—6112, 1986
 - 12) Strominger, J.: Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J. Exp. Med.* 157 : 461—466, 1983
 - 13) Mittler, R. S. and Hoffmann, M. K.: Synergism between HIV gp120 and gp120-specific antibody in blocking human T cell activation. *Science* 245 : 1380—1382, 1989
 - 14) Kinugawa, K., Hyodoh, F., Andoh, A., Ueki, A., Tanaka, H. and Mochizuki, Y.: Elevated binding activity of CD8⁺ cells with phytohaemagglutinin by asbestos fibre in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 80 : 89—93, 1990
 - 15) Campbell, M. J., Wagner, M. M. F., Scott, M. P. and Brown, D. G.: Sequential immunological studies on an asbestos exposed population. Factors affecting lymphocyte function. *Clin. Exp. Immunol.* 39 : 176—182, 1980
 - 16) Becklake, M. R.: Asbestos-related diseases of the lung and other organs : Their epidemiology and implications for clinical practice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 114 : 187—193, 1976