

アスベスト線維曝露による多クローン性リンパ球活性化と MHC Class II との関連

渡辺 佳樹

近年、環境汚染物質であるアスベスト線維の曝露により各種臓器癌や自己免疫疾患の発生率の増加が指摘され、当科においても、末梢血分離単核細胞にクリソタイル繊維の添加することにより、CD4⁺ CD45RA⁺ 細胞 (Suppressor-inducer cell) の活性化が引き起こされることを報告してきた。今回の実験では、クリソタイル繊維以外のアスベスト線維においても同様に CD4⁺ CD45RA⁺ 細胞の活性化と細胞内カルシウム、及び IL-2 の増加を引き起こすことを証明した。またこれらの変化は MHC Class II 陽性細胞を破壊することにより認めなくなった。以上よりアスベスト線維によるリンパ球活性化には MHC Class II 陽性細胞が必要であり、またリンパ球活性化は珪酸を含む各種アスベスト線維および珪酸単独によってもひきおこされることから、珪酸化合物特有の現象と考えられた。また、ポリクローナルな T cell の活性化と MHC 依存性から、これら珪酸化合物によるリンパ球活性化がスーパー抗原としての作用による可能性も考えられた。(平成 6 年 2 月 25 日採用)

Polyclonal Activation of Human Lymphocytes by Asbestos is Dependent on MHC Class II

Yoshiki Watanabe

Recently, it has been reported by investigators that some kinds of cancer and autoimmune diseases are caused by exposure to asbestos fibers. Previously, we reported that CD4⁺ CD45RA⁺ cells (suppressor-inducer cell) could be stimulated by chrysotile fibers. In this study, we found that several kind of asbestos fibers (chrysotile, crocidolite, anthophyllite, and amosite) stimulated suppressor-inducer T cells, resulting in an elevated intracellular Ca⁺⁺ level and release of IL-2 from human lymphocytes. However, as reported here in activation of lymphocytes was not detected after destruction of MHC Class II. Based on these results, the author considers that activation of lymphocytes by silicate might be dependent on MHC Class II and that this phenomenon might be characterized by a biological reaction of the silica-compound. Moreover, the polyclonal activation of lymphocytes and dependence on MHC may be a superantigen like effect. (Accepted on February 25, 1994)

Kawasaki Igakkaishi 20(2) : 77-84, 1994

Key Words ① Asbestos fiber ② Lymphocyte ③ Activation
④ MHC Class II

はじめに

近年、環境汚染物質であるアスベスト線維の曝露により各種臓器癌（胸膜中皮腫，肺癌）や自己免疫疾患（SLE，PSS）の発生率の増加が指摘され，人体，特に細胞性免疫への影響が示唆されている^{1)~5)}．これにたいし，我々も末梢血分離単核細胞にクリソタイル繊維の添加することにより，CD4⁺CD45RA⁺の選択的な活性化を引き起こすこと，またPHAを添加することにより，PHAによるリンパ球幼若化が減弱することなどを報告してきた⁶⁾⁷⁾．今回の実験は，これらクリソタイル繊維による一連の反応が，クリソタイル線維特有の反応なのか，それともアスベスト線維全体の特徴なのかを判断し，さらに，もしこれら一連の反応がアスベスト線維全体の特徴であるならば，それらアスベスト線維によるリンパ球活性化の機序を解明することを目的としておこなった．

実験材料と方法

末梢血からの単核球分離：健康な成人ボランティア30人から末梢血を採取しFicoll-Hypaque法にて単核細胞を分離⁸⁾，ペニシリン100 μg/ml，ストレプトマイシン100 μg/mlを含む培地，RPMI 1640+10% FCSに浮遊させた．

CD45RAモノクローナル抗体及びCD4モノクローナル抗体による表面マーカーの測定：採取した単核細胞は 1×10^6 cells/mlで培地に浮遊させ，最終濃度50 μg/mlとなるように各種アスベスト繊維を添加し，5% CO₂ インキュベーター中にて12-72時間培養後遠心洗浄後，CD45RA⁺モノクローナル抗体(Coulter Electronics, Hialeah, FL)とPE標識CD4モノクローナル抗体(Orthomune, USA)の二重染色を行いFACStar (Becton-Dickinson)あるいはFACSort (Becton-Dickinson)により測定をおこないConsort 30, Lysys II (ともにBecton-Dickinson Immunocytometry systems)を用

いて解析を行った．またコントロールとしてアスベスト無添加群を作製し同様の処理をおこなった．

また実験用のアスベスト繊維はUICC標準品を用い，180°C，1時間の滅菌処理後実験に使用した．

なお，統計学的処理については，コントロール群のPositive cellを100とし，それに対応する各種アスベスト添加群を算出し，Wilcoxon testにて有意差検定を行い， $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した．また生死判定は，FACStarによるFDA (Fluorescein diacetate)とPI (Propidium)の二重染色法にて検討した．

リンパ球細胞内遊離Ca⁺⁺の測定：分離単核細胞は，Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ free Hanks液で洗浄後，10 μMカルシウム蛍光指示薬(Fluo-3AM, 同仁化学)に37°C 30分間反応させ，遠心洗浄後，Hanks液に室温10分間放置，これに各種アスベスト線維を添加し，経時的に(1分，3分，5分，10分，30分)細胞内遊離Ca⁺⁺の変化をFACStarあるいはFACSortにより測定し，Consort 30, Lysys IIを用いて解析を行った^{9)~11)}．さらにナイロンウールカラム法(Collect T-Cell Kit, フナコシ)にてT細胞のみを分離し，同様の処理をおこなった．

IL-2Rの測定：分離単核細胞に各種アスベスト線維を添加し，24時間5% CO₂ インキュベーター中にて培養後，遠心洗浄後PE標識抗IL-2Rモノクローナル抗体で染色し，FACStarにて測定後，Consort 30にて解析をおこなった．(Positive ControlとしてPHAを用いた．)

IL-2の測定：分離単核細胞を無血清培地(AIM-V, GIBCO)に浮遊させ，各種アスベスト線維を添加し，5% CO₂ インキュベーター中にて培養後，経時的に上清をとりだし-80°C凍結保存した．また96穴プレートにIL-2依存T細胞株であるCTLL 2を無血清培地に浮遊させ， 2×10^5 cells/100 μl/wellで分注し，凍結保存していた上清を100 μl/well分注し，48時間培養する．培養終了24時間前に³H-TdRを0.2 μCi/wellくわえてその取り込みを測定した¹²⁾．また

アスベスト線維と HLA (Human leucocyte antigen) system との関連を調べるため、分離単核細胞に抗 HLA-DR モノクローナル抗体(IM-

MUNOTECH S. A.) 10 μ l/ml と新鮮血清 100 μ l/ml を添加し、37°C 60分間反応させ、遠心洗浄後アスベスト線維を添加し、5%CO₂ インキ

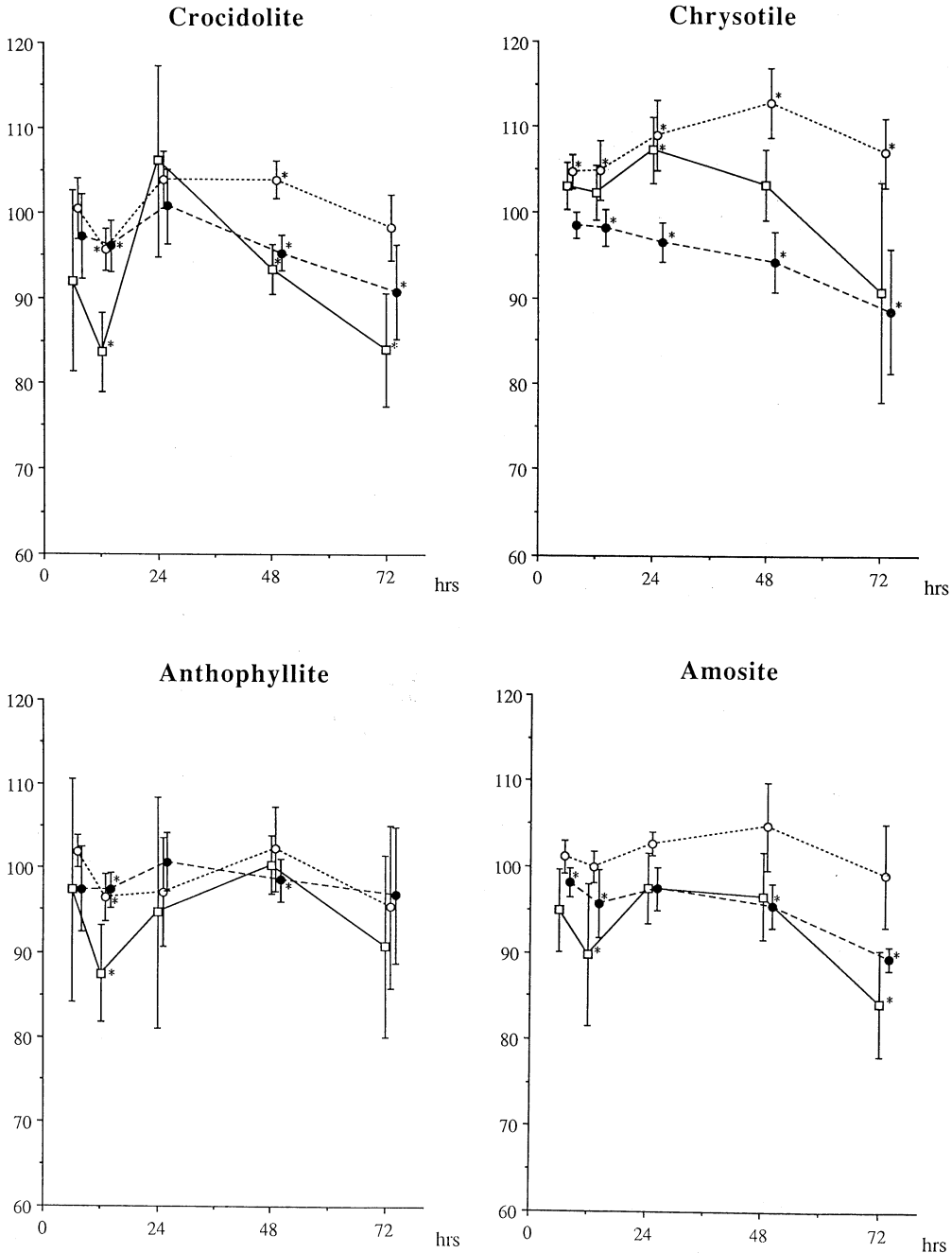


Fig. 1. Modulation of cell surface CD4 and CD45RA after incubation of PBMC with 50 μ g/ml crocidolite, chrysotile, anthophyllite and amosite asbestos fibers. □—□ CD4+ CD45RA+ cells; ○—○ CD4+ cells; ●—● CD45RA+ cells. Calculation of the index was based on the control cells incubated without asbestos fibers. Mean \pm SD (n = 6).

ュベーター中にて培養後、経時的に上清をとりだし凍結保存させ、同様の処理を行った。有意差検定は Wilcoxon test にておこない、 $p < 0.05$ 以下の有意差ありと判定した。

結 果

1. 各種アスベスト線維添加による末血中 $CD4^+$ $CD45RA^+$ 細胞への影響

フローサイトメトリーによる表面マーカー測定結果より、横軸はアスベスト線維添加後の

培養時間を、縦軸はアスベスト線維末添加群 (Control) の蛍光陽性細胞数を100とし、各種アスベスト線維添加群の蛍光陽性細胞数をその相対値として示した (Fig. 1)。リンパ球 $CD4^+$ $CD45RA^+$ 細胞 (Double positive: DP) はアスベスト添加後12時間にて、クロソドライト、アンソフィライト、アモサイト添加群において各々27%、14%、11%の減少をしめした。その後アスベスト線維添加後24時間にてほぼアスベスト線維末添加群の状態まで回復し、一過性の表面マーカーの低下を認めた。また、 $CD4^+$ 細胞においても同様の経過が認められるが、アモサイトでは、アスベスト添加後12時間にて有意差はみられなかった。なお培養リンパ球上清中 LDH 活性はアスベスト線維添加後24時間までで増加傾向を認めなかった (Table 1)。また FDA と PI による生死判定では培養後1週間で90%以上の生存率を

Table 1. LDH activity in culture supernatant of PBMC

Asbestos fiber	Incubation time				
	6h	12h	24h	72h	7day
None	154	176	120	117	125
Anthophyllite	154	172	140	121	136
Amosite	154	156	130	100	136
Crocidolite	144	164	130	125	136

A lactate dehydrogenase assay was performed using a modified method of Hill. The number indicates the International Unit of the Enzyme. PBMC were incubated with asbestos fibers at a final concentration of $50 \mu\text{g/ml}$.

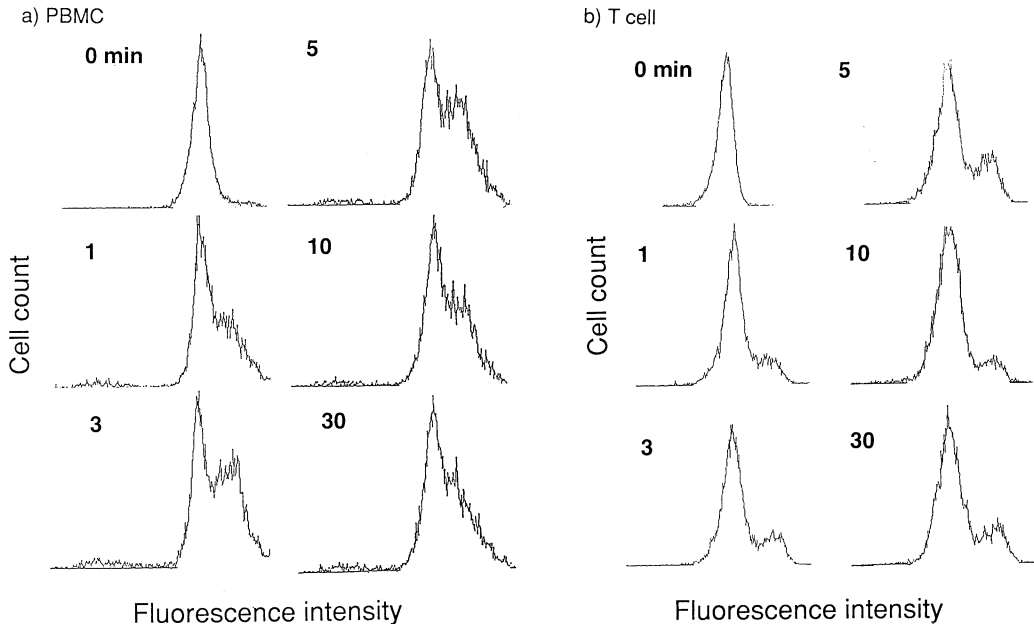


Fig. 2. Intracellular Ca^{++} level analysed flowcytometrically. PBMC were incubated with a) chrysotile fiber ($50 \mu\text{g/ml}$), or fractionated T cells incubated with, b) crocidolite fiber ($50 \mu\text{g/ml}$) for 5 to 30 min.

しめし、特定のリンパ球サブセットの消失によるものではないことが考えられた。

2. 各種アスベスト線維添加による末血中リンパ球細胞内遊離 Ca^{++} への影響

フローサイトメトリーでの測定結果を示した。横軸は蛍光強度 (Fluorescence) を、縦軸は細胞数を示す。分離単核細胞にクリソタイル線維添加後 1 分より蛍光強度の増加を認め、添加後 3 分にてその最大値に達した。つぎにナイロンウールカラム法にて T 細胞を選択的に採取 (純度 99 % 以上) し、クロシドライト線維を添

Table 2. Effect of Chrysotile or Crocidolite on intracellular Ca^{++}

a)

Incubated time	Positive cell (%)
0 min	5.6
1 min	41.1
3 min	52.2
5 min	39.6
10 min	32.1
30 min	46.2

b)

Incubated time	Positive cell (%)
0 min	0.9
1 min	17.2
3 min	21.0
5 min	25.0
10 min	12.5
30 min	19.5

Percentages of PBMC (a) or fractionated T cells (b) with elevated intracellular Ca^{++} level. Cells were incubated with asbestos fibers for 1 to 30 min and analysed flowcytometrically.

Table 3. Effect of Chrysotile on IL-2R expression

Asbestos	Positive cells (%)
Control	8.4
PHA10 μ g/ml	25.2
Chrysotile 50 μ g/ml	12.0
Chrysotile 100 μ g/ml	17.6

IL-2 receptor expression analysed flowcytometrically after co-culture of PBMC with chrysotile fiber (50 μ g/ml, 100 μ g/ml) or PHA (10 μ g/ml) for 24 hrs

加したところ、添加後 1 分より蛍光強度の増加を認め、添加後 5 分にてその最大値に達した (Fig. 2).

蛍光強度 185 以上の蛍光陽性細胞数を、全細胞数を 100 とした相対値として表すと、クリソタイル未添加群では蛍光陽性細胞は 5.6 % であるが、クリソタイル添加後 3 分にて 52.2 % まで増加した。また T 細胞を選択的に採取した群では、蛍光強度 195 以上の蛍光陽性細胞数を、全細胞数を 100 とした相対値とした表すと、クロシドライト未添加群では蛍光陽性細胞は 0.9 % であるが、クロシドライト添加後 5 分にて 25.0 % まで増加した (Table 2a, b).

3. クリソタイル線維添加による末血中リンパ球 IL-2R への影響

蛍光強度 60 以上をしめす陽性細胞数を、全細胞数を 100 とした時の相対値としてあらわした表 (Table 3) である。クリソタイル線維未添加群 (Control) は 8.4 %、クリソタイル線維 50 μ g/ml, 100 μ g/ml は各々 12.0 %、17.6 % であった。

4. 各種アスベスト線維添加による末血中リンパ球 IL-2 産生への影響

各種アスベスト線維添加による末血中リンパ球の IL-2 産生への影響を CTLL-2 を用いた Biological assay にて測定した。クロシドライト線維添加後 72, 96 時間の培養上清にて、またクリソタイル線維添加後 96 時間の培養上清にて IL-2 産生の増加を認めた (Table 4)。また抗 HLA-DR モノクローナル抗体に新鮮血清 (補体を含む) を添加した群は、クリソタイル線維添加によるリンパ球 IL-2 への影響を認めなかった (Table 5)。

考 察

既に当科絹川らにより^{6),7)}、末梢血由来単核細胞にたいし、クリソタイル線維を添加することにより、 $CD4^+$ $CD45RA^+$ 細胞 (Suppressor-inducer T cell) が選択的に刺激され、同時に $CD4^+$ 細胞における IL-2R の発現を誘導するこ

Table 4. Biological assay of IL-2

hrs	Control	Chrysotile 100 $\mu\text{g/ml}$	Crocidolite 100 $\mu\text{g/ml}$
24	898.8 \pm 275.7	1091.6 \pm 209.8	1021.0 \pm 130.9
48	814.3 \pm 107.4	892.7 \pm 193.5	870.7 \pm 142.2
72	780.0 \pm 158.8	592.0 \pm 50.8	1156.6 \pm 139.5*
96	501.2 \pm 36.9	668.8 \pm 100.1*	730.2 \pm 30.5*

(* < 0.05)

PBMC were incubated with chrysotile fiber (100 $\mu\text{g/ml}$) or crocidolite fiber (100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 to 96 hrs, and culture supernatant was harvested and store at -80°C . IL-2 dependent mouse cytotoxic T cell line CTLL-2 ($2 \times 10^5/\text{well}$) were cultured in microplate with the culture supernate for 48 hrs. $^3\text{H-TdR}$ (0.2 $\mu\text{Ci/well}$) was added 16 hrs before cell harvest and incorporation of $^3\text{H-TdR}$ was counted using a scintillation counter (Aloka LSC-900). Statistical significance was analysed by the Wilcoxon test. (Mean \pm SD, n=5)

Table 5. Bioassay of IL-2 released in response to chrysotile fiber stimulation.

Culture supernate from	Incorporation of $^3\text{H-TdR}$ (DPM)
PBMC	6424 \pm 2036*
PBMC+chrysotile	10108 \pm 4205*
PBMC+anti-HLA DR/DP +complement	3196 \pm 1482
PBMC+anti-HLA DR/DP +complement	3317 \pm 1557
Cell free culture medium	4532 \pm 2257
Cell free culture medium +chrysotile	4266 \pm 1185

(* < 0.05)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated with or without chrysotile (100 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h. Some PBMC were pretreated with anti-HLA DR/DP mAb and fresh human plasma as the source of complement for 1h, washed with PBS and incubated with or without chrysotile (100 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h. The culture supernate was centrifuged at 3000 rpm for 5 min and used for the bioassay. IL-2 dependent CTLL-2 ($2 \times 10^5/\text{well}$) were incubated with the culture supernate of PBMC (diluted 1:1 with RPMI 1640 medium supplemented with 15% FCS) for 48 h. $^3\text{H-TdR}$ (1 $\mu\text{Ci/well}$) was added to each well 16 h before cell harvest. Statistical significance was analysed by the Wilcoxon test. (Mean \pm SD, n=5)

とが報告されており、今回の実験はこれらクリソタイル線維による一連の反応がクリソタイル線維特有の反応なのか、アスベスト線維全体の特徴なのかを判断し、さらにもしこれら一連の

反応がアスベスト線維全体の特徴であるならば、それらアスベスト線維によるリンパ球活性化の機序を解明することを目的とした。

今回、クリソタイル以外のアスベスト線維としてクロシドライト、アモサイト、アンソフィライト線維を用いた。

FITC-CD45RA モノクローナル抗体及び PE-CD4 モノクローナル抗体による二重染色の結果からは、各種アスベ

スト線維の添加により、クリソタイル線維の場合とよく似た、添加後12時間の CD4⁺ 細胞と CD4⁺ CD45RA⁺ 細胞の一時的な減少傾向とその後の回復傾向を認め、これらの変化はクリソタイル線維特有の変化ではなく、アスベスト線維全体の特徴であると考えられた。

Weyand ら^{13),14)} によれば CD4⁺ 細胞の一過性の減少は、CD4⁺ 細胞の一時的な活性化を示唆するものであり、また CD4⁺ CD45RA⁺ 細胞の過度の活性化は、免疫抑制や発癌を誘発するとされ、アスベスト線維添加によるこれら一連の変化はアスベスト線維曝露による各種臓器癌や自己免疫疾患の発生機序と関与があるものと考えられた。

リンパ球細胞内遊離 Ca⁺⁺ の測定の結果ではアスベスト線維添加後1分でその増加を認め、添加後3分で最大値となった。またこれらの反応より単球の影響を除去し T 細胞のみでの測定も行った。その結果アスベスト線維添加後3分でその増加を認め、添加後5分にて最大値となり、アスベスト線維添加によるリンパ球活性化は T 細胞のみでも可能であり、単球の存在はその促進因子となりうる事が推測された。またこれらリンパ球細胞内遊離 Ca⁺⁺ の増加は当科山口¹⁵⁾ によると、珪酸でも同様に認められており、これら一連のアスベスト線維によるリンパ球活性化はアスベスト線維特有のものではなく、むしろ珪酸化合物の特徴であると考えられた。

つぎに、リンパ球活性化による IL-2R の発現は、アスベスト線維添加後24時間にて有意にその発現が増加しており、IL-2 の産生はアスベスト線維添加後72時間より有意に増加していた。

これら一連のリンパ球活性化がアスベスト線維の種類により、その程度が異なることについては、その珪酸化合物に含まれる金属によるものではないかと推測された。

以上より、アスベスト線維はリンパ球活性化を誘発することは明らかであり、アスベストosis患者のように慢性的に体内にて、リンパ球活性化を誘発する可能性をもつ場合、発癌、免疫不全を誘発する一因となるものと考えられた。

T細胞膜の活性化には2つの経路が知られ、T cell receptor と CD3 が MHC と抗原結合してシグナル伝達する特異的免疫応答反応の他に、MHC と抗原結合物が T cell receptor の特定の V β 領域と反応するスーパー抗原による活性化とが知られている^{19)~20)}。また、以前より免疫反応と関係のある HLA Class I, あるいは HLA Class II とアスベストosis との関与が検討されている^{21)~24)}。今回抗 HLA-DR モノクローナル

抗体と新鮮血清をくわえ、MHC Class II 呈示細胞を破壊し、それにより、アスベスト添加によるリンパ球細胞内遊離 Ca⁺⁺ の増加や IL-2 の産生がどのように変化するかを観察した。その結果、アスベスト線維添加後もリンパ球細胞内遊離 Ca⁺⁺ や IL-2 の増加は認められず、リンパ球活性化が引き起こされていないことが認められた。このことより、アスベスト線維添加によるリンパ球活性化の機序に MHC Class II がなんらかの寄与をおよぼしていることが示唆された。このことより T cell のポリクローナルな活性化と MHC 依存性から、珪酸化合物がスーパー抗原として働く可能性も考えられた。

稿を終えるにあたり、直接ご指導、ご検閲を賜った川崎医科大学衛生学教室 植木絢子教授に深甚なる謝意を表すとともに、実験についてご助言、ご協力いただいた同教室員の皆様方、また培養センターの皆様方に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 5-604) の援助をうけている。

文 献

- 1) Becklake MR : Lung structure as a risk factor in adverse pulmonary responses to asbestos exposure. *Am Rev Respir Dis* 128 : 385—388, 1983
- 2) Mossman BT, Gee JBL : Asbestos related disease. *N Engl J Med* 320 : 1721—1730, 1989
- 3) Turner-Warwick M, Paker WR : Circulating rheumatoid and antinuclear factors in asbestos workers. *BMJ* 3 : 492—495, 1970
- 4) Huuskonen MS, Rasanen JA, Karkonen H, Asp S : Asbestos exposure as a cause of immunological stimulation. *Scand J Respr Dis* 59 : 326—332, 1978
- 5) Anton-Culver H, Culver BD, Kurosaki T : Immune response in shipyard workers with X ray abnormalities consistent with asbestos exposure. *Br J Ind Med* 45 : 464—468, 1988
- 6) Kinugawa K, Ueki A, Yamaguchi M, Watanabe Y, Kawakami Y, Hyodoh F, Tsushima H : Activation of human CD4⁺ CD45RA⁺ T cells by chrysotile asbestos in vitro. *Cancer Lett* 66 : 99—106, 1992
- 7) 絹川敬吾 : アスベスト (クリソタイル) 線維によるリンパ球への影響. *川崎医学会誌* 16 : 172—179, 1990
- 8) Böyum A : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 : 77—84, 1968
- 9) Eberhand M, Erne P : Kinetics of Calcium binding to Fluo-3 determined by stopped flow fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun* 163 : 309—314, 1989
- 10) Akwasi M, Joseph P, Kao Y, Roger Y Tsien : Fluorescent Indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluoresce in chromophores. *J Biol Chem* 264 : 8171—8178, 1989

- 11) Ger T, Rijkers, Louis B, Justement, Arjan W, Griffioen, John C, Cambier : Improved Method for Measuring Intracellular Ca⁺⁺ with Fluo-3. *Cytometry* 11 : 923—927, 1990
- 12) Hirano T, Sudo T, Teranishi T, Fujimoto K, Iizuka M, Kobayashi S, Onoue, K : Translation of human interleukin 2 mRNA in xenopus laevis oocytes. *Microbiol Immunol* 27 : 87—94, 1983
- 13) Weyand CM, Goronzy J, Fathman CG : Modulation of CD 4 by antigenic activation. *J Immunol* 138 : 1351—1354, 1987
- 14) Takada S, Engleman EG : Evidence for an association between CD 8 molecules and the T cell receptor complex on cytotoxic T cells. *J Immunol* 137 : 3231—3235, 1987
- 15) 山口雅英, 岸本卓巳, 渡辺佳樹, 川上泰彦, 兵藤文則, 植木絢子 : In vivo および in vitro における珪酸のヒト末梢リンパ球に及ぼす作用. (投稿準備中)
- 16) Abul KA, Andrew HL, Jordan SP : Antigen presentation and T cell antigen recognition, molecular basis of T cell antigen recognition and activation. *In Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company. 1991, pp. 115—167
- 17) 吉開泰信 : SuperantigenとT細胞レセプター. 「Annual Review免疫1992」(菊地浩吉, 矢田純一, 奥村康編). 東京, 中外医学社. 1992, pp. 42—50
- 18) Marrack P, Kappler J : The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248 : 705—711, 1990
- 19) Janeway Jr CA : Selective elements for the V β region of the T cell receptor : Mls and bacterial toxic mitogens. *Adv Immunol* 50 : 1—52, 1991
- 20) Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM, Superantigens : Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Ann Rev Immunol* 9 : 745—772, 1991
- 21) Darke C, Wagner M, McMillian G : HLA-A and B antigen frequencies in an asbestos exposed population with normal and abnormal chest radiograph. *Tissue Antigens* 13 : 228—232, 1979
- 22) Begin R, Menard H, Decarie F, St-Sauveur A : Immunogenetic factors as determinant of asbestosis. *Lung* 165 : 159—163, 1987
- 23) Libby DM, Gibofsky A, Fotino M, Waters SJ, Smith JP : Immunogenetic and clinical findings in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 127 : 618—622, 1983
- 24) Jarad N Al, Uthayakumar S, Buckland EJ, Green TS, Ord J, Newland AC, Rudd RM : The histocompatibility antigen in asbestos related disease. *Br J Ind Med* 49 : 826—831, 1992