

珪酸化合物によるヒトリンパ球の活性化およびスーパー抗原作用

山口 雅英

珪酸化合物のヒトリンパ球に対する作用として、特定の TcR $V\beta$ レパートアを活性化させるスーパー抗原作用の有無を検討した。シリカおよびアスベストの一つであるクリソタイルによりヒト末梢血リンパ球を刺激し、細胞内 Ca^{++} 濃度を測定したところ、全体の10~20%のリンパ球に上昇がみられた。次にクリソタイル刺激後72時間の $V\beta$ レパートアの割合を測定した。 $V\beta$ 5.3あるいは $V\beta$ 6.7 陽性細胞の割合が有意に上昇しており、これらのレパートアが特異的に分裂増殖したものと考えられた。またクリソタイル刺激により活性化(細胞内 Ca^{++} の上昇)した細胞群を sorting により回収し、その $V\beta$ レパートアの割合を測定した。この場合も同様に $V\beta$ 5.3 あるいは $V\beta$ 6.7 陽性細胞の割合が上昇した。従って、シリカおよびクリソタイルは特定の $V\beta$ レパートアを特異的に活性化、増殖させることからスーパー抗原作用を有するものと思われた。(平成8年9月6日採用)

Activation of Human Lymphocytes by a Silica Compound with Superantigen-like Action

Masahide YAMAGUCHI

We investigated whether silica compounds act on human lymphocytes as a superantigen that activates all T lymphocytes bearing the appropriate T cell receptor $V\beta$ repertoire. We measured the intracellular Ca^{++} level in human lymphocytes incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ silica or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chrysotile asbestos, and 10 to 20% of all lymphocytes showed a high Ca^{++} level, indicating activation of the cells. Next, the $V\beta$ repertoire of chrysotile-stimulated lymphocytes from nine healthy individuals was investigated. A significant increase in the expression of $V\beta$ 5.3 or $V\beta$ 6.7 was found in several samples. Then, we sorted out the fractions having a high Ca^{++} level and analyzed their repertoire. The cells bearing a $V\beta$ 5.3 or 6.7 repertoire increased significantly. These results suggest that chrysotile asbestos acts as a superantigen to human lymphocytes. (Accepted on September 6, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(2): 73-79, 1996

Key Words ① Silica compound ② Superantigen
③ Chrysotile asbestos ④ $V\beta$ repertoire

はじめに

我々の教室では以前より珪酸化合物のヒトリンパ球に対する作用について検討している^{1),2)}. 珪酸化合物には珪酸自体であるシリカ, 珪酸と金属酸化物との化合物であるアスベスト, オルガノポリシロキサンに各種添加剤を加えたシリコンがあるが, このうち特にアスベストについてはヒトリンパ球を活性化させること, CD 4⁺ CD 45 RA⁺ サブセットを有意に減少させることなどを報告した^{1),2)}. このサブセットの減少は各種の自己免疫疾患患者の末梢血においても観察されており^{3),4)}, その関連性が注目されている. 従来から珪肺症と自己免疫疾患との合併は数多く報告されており⁵⁾⁻⁸⁾, 古くはアジュバント病⁹⁾として報告されていた. また最近では, 特定の TcR V β レパートアを持つ T 細胞にのみ作用するスーパー抗原が報告されており¹⁰⁾⁻¹²⁾, さらに

材料と方法

1. 単核細胞 (PBMC) の分離

正常人 (ボランティア) の末梢静脈より血液適量を, ヘパリン添加採血し, 等量の PBS を加えて希釈した. これをセパレート L (武藤化学) に静かに重層し, Boyum¹⁵⁾ の方法に準じて比重遠心法 (1500 rpm, 30分) で PBMC を分離した. 分離後得られた PBMC は PBS で 2 回洗浄し実

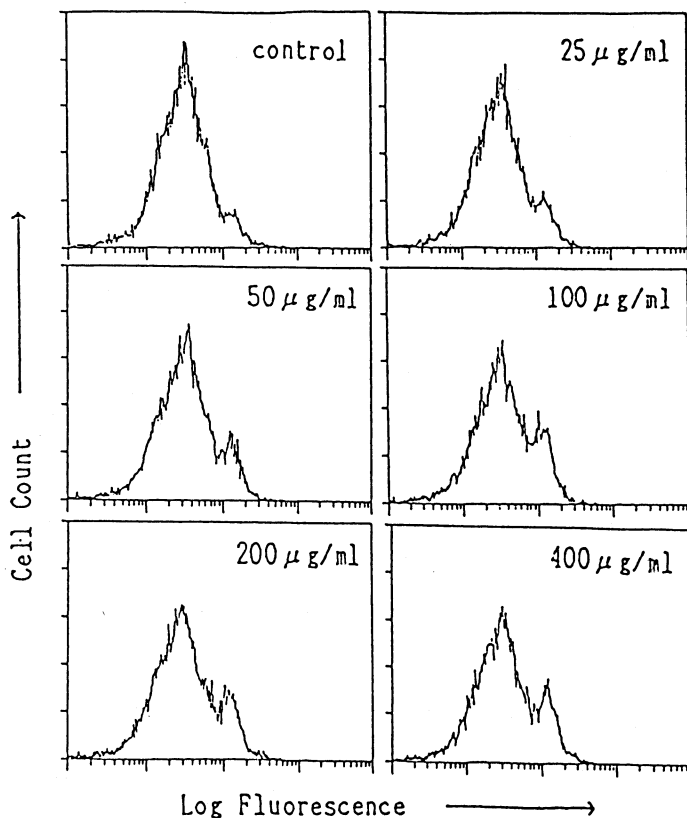


Fig. 1. Intracellular Ca⁺⁺ level in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after incubation with SiO₂. PBMC were pre-incubated with Ca indicator Fluo3-AM (10 μg/ml) for 30 min at 37 °C, washed in Hanks' solution, then incubated with 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml SiO₂ for 5 min. The cells were analysed with a FACStar model of flow cytometer.

験に用いた.

2. 珪酸化合物

リンパ球を刺激するための珪酸化合物として, シリカ (無水ケイ酸; 半井化学), クリソタイル (UICC 標準品) を 180 °C, 1 時間滅菌して使用した.

3. 抗体

TcR V β レパートアの測定には, PE 標識抗 CD 14 (Leu M 3) 抗体および, 以下の抗 TcR V β および抗 TcR V α モノクローナル抗体 (Diversi-TTM, T CELL DIAGNOSTICS, INC.) を使用した. それぞれの抗体は以下のエピトープに対応する.

β V 5 a : V β 5.2+5.3, β V 5 b : V β 5.3,

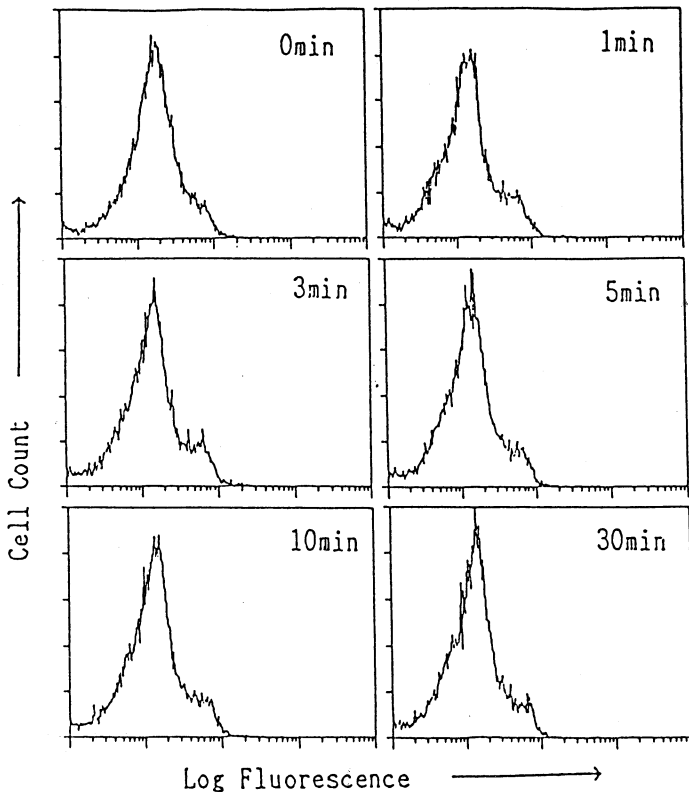


Fig. 2. Fluo 3-AM loaded PBMC were incubated with $100 \mu\text{g/ml}$ SiO_2 . The cells analysed flow cytometrically after 1 for 30 min.

$\beta\text{V}5\text{c}:\text{V}\beta5.1$, $\beta\text{V}6\text{a}:\text{V}\beta6.7$, $\beta\text{V}8\text{a}:\text{V}\beta8$ subfamily, $\beta\text{V}12\text{a}:\text{V}\beta12.1$, $\alpha\text{V}2\text{a}:\text{V}\alpha2$ subfamily

4. 細胞内 Ca^{++} 濃度の測定

分離した PBMC 1×10^6 を PBS 1 ml 中に浮遊させ、細胞内 Ca^{++} 濃度指示薬 Fluo 3-AM (同仁化学) を $10 \mu\text{g}$ 加え、 37°C で 30 分間静置して、細胞内に吸収させ、PBS で 2 回洗浄した後、Hank's 液 6 ml に浮遊させた。この浮遊液にシリカを $25 \mu\text{g/ml}$ ~ $400 \mu\text{g/ml}$ の割合で加え、5 分後の蛍光強度をフローサイトメーター (FACStar, Becton Deckinson) で測定した。また、シリカの濃度を一定 ($100 \mu\text{g/ml}$) にして、蛍光強度を経時的 (0, 1, 3, 5, 10, 30 min) に測定した。同様の測定をクリソタイルについても行い、得られた結果は CONSORT 30 で解

析した。

5. TcR V β レポートアの測定

PBMC 1×10^7 を RPM1 1640 培地 (20% FCS ペニシリン 100 U, ストレプトマイシン $100 \mu\text{g/ml}$, ファンギゾン $0.25 \mu\text{g/ml}$) に浮遊させ、これを二分して実験に用いた。一方には $100 \mu\text{g/ml}$ の割合でクリソタイルを加え、5% CO_2 , 37°C で 72 時間培養した。もう一方にはクリソタイルを加えずに、同様の条件下で培養しコントロールとした。培養後は PBS で数回洗浄した後、8 等分し、それぞれを $100 \mu\text{l}$ PBS に浮遊させ、FITC 標識抗 TcR V β モノクローナル抗体 7 種を $10 \mu\text{l}$ ずつ添加し (一つはコントロール)、さらに PE 標識抗 CD 14 抗体を添加した後、 4°C , 30 分間反応させ、PBS で 2 回洗浄後フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。以上の実験は健康人 9 名より得られた PBMC についてそれぞれ

行った。

6. Sorting 法

分離した PBMC 5×10^7 は 5 ml PBS に浮遊させ、Fluo 3-AM $50 \mu\text{g}$ 加えた後、 37°C で 30 分間静置して細胞内に吸収させ、PBS で 2 回洗浄して Hank's 液 1 ml に浮遊させた。これにクリソタイルを $200 \mu\text{g/ml}$ の割合で加え、直ちにフローサイトメーターを用いた sorting によって、蛍光強度の上昇 (活性化) した細胞群のみを抽出した。抽出された細胞群は PBS で 2 回洗浄した後、8 等分し、FITC 標識抗 TcR V β 抗体 7 種および PE 標識抗 CD 14 抗体をそれぞれ添加して 4°C , 12 時間反応させ、PBS で 2 回洗浄した後フローサイトメーターで蛍光強度を測定しそれぞれのレポートアの陽性細胞の割合を解析した。

結 果

1. 珪酸化合物によるヒトリンパ球の活性化

シリカを作用させることにより活性化リンパ球の割合が増加した。すなわち、シリカを加えない場合は細胞内 Ca^{++} 上昇を示す蛍光強度の強い細胞群（活性化されたリンパ球）はごく一部（5%以下）であったが、シリカを $25 \mu\text{g/ml}$ ~ $100 \mu\text{g/ml}$ 添加した場合は、濃度依存性に蛍光強度の強い細胞群の割合が上昇し、やがてプラトー（10~20%）に達した（Fig. 1）。次にシリカの濃度を $100 \mu\text{g/ml}$ にして細胞内 Ca^{++} の上昇を経時的に測定したところ、反応開始から1~3分後にピークを示し、以後漸減した（Fig. 2）。クリソタイルを添加した場合はシリカを添加したときよりも活性化細胞の割合がより高く明瞭で、且つ同様の経時的变化を示した（Fig. 3）。

2. クリソタイル刺激による TCR $V\beta$ レパートアの変化

Heegらの報告¹⁶⁾によるとスーパー抗原による特定の $V\beta$ レパートアの増加は72時間をピークに起こっている。これを参考に、今回の実験ではクリソタイル刺激後72時間における各 $V\beta$ レパートアの割合をモノクローナル抗体を用い

測定した。PBMCの中にはリンパ球の他に単球も含まれるので、CD 14 陽性細胞は除外して解析を行った。クリソタイル添加後72時間における TCR $V\beta$ レパートアは、無添加のコントロールと比較して10%以上の増加がみられたものを

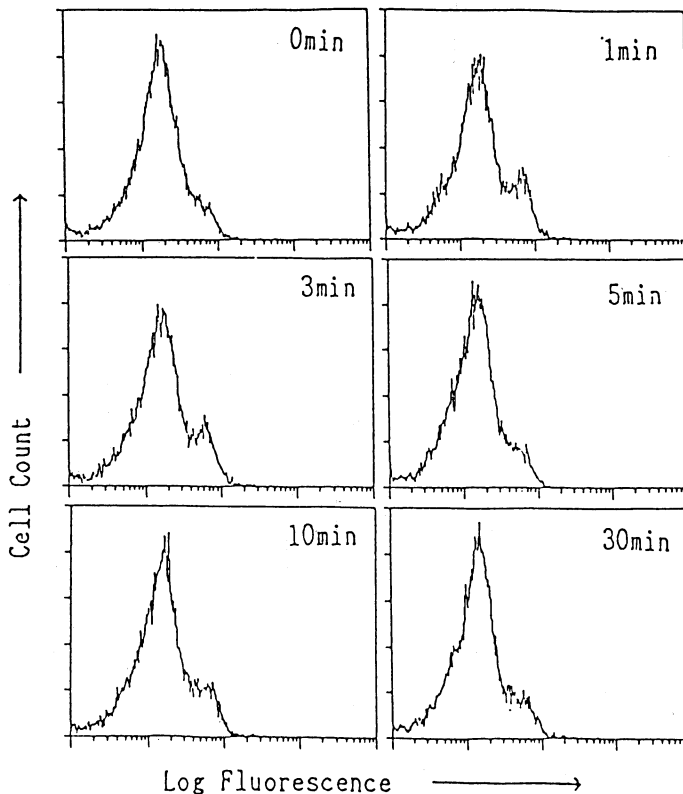


Fig. 3. Fluo 3-AM loaded PBMC were incubated with $100 \mu\text{g/ml}$ chrysotile. The cells analysed flow cytometrically after 1 for 30 min.

Table 1. TcR $V\beta$ repertoire analysed after incubation of PBMC with chrysotile.

$V\beta$ repertoire	decreased	no change	increased
5.2+5.3	6	3	0
5.3	3	2	4
5.1	6	2	1
6.7	4	3	2
8 subfamily	5	4	0
12.1	7	2	0
$\alpha 2$ subfamily	7	1	1

PBMC were incubated $100 \mu\text{g/ml}$ chrysotile for 72 hrs. The cells were washed and stained with FITC-labelled monoclonal antibodies specific to TcR $V\beta$ repertoires, and analysed flow cytometrically.

increased, 10%以上の減少がみられたものを decreased として評価した（Table 1）。細胞の生存率は Kinugawa ら¹⁷⁾によると90%以上であり、クリソタイル（ $100 \mu\text{g/ml}$ ）の添加では、特定の細胞群が死滅する可能性はないと思われる。この条件下で特定のレパートアの増加があるか否

かを判定し、減少したレパートアは特定のレパートアの増加に伴う相対的な減少と考えた。著者らの実験では9例中4例にV β 5.3の増加がみられ、このうちの2例ではさらにV β 5.1, V α 2 sub-familyの増加がみられた。また別の2例ではV β 6.7のみが増加していたが、その他の3例ではいずれのレパートアも増加しなかった。

3. 活性化リンパ球のV β レパートア

クリソタイル刺激により活性化の起こった細胞群を sorting により回収し、V β レパートアの割合に差があるか否かを測定した (Table 2. Exp, 1, 2, 3)。また、10 μ g/ml PHA により活性化した細胞群を同様に回収 (Fig. 4) して測定し、コントロール (Table 2, Exp. 4) とした。

Table 2 に示す様に Exp. 1 ではV β 6.7 陽性細胞が全リンパ球の36.90%を占めており、Exp. 2, 3ではV β 5.3 陽性細胞がそれぞれ21.61%, 18.18%と他のレパートアに比べて多く含まれていた。これに対して10 μ g/ml PHA で刺激した Exp. 4 (control) では、各レパートア間に大差はみられなかった。また、Exp. 1~4 を通じて全体的に陽性細胞の割合が高いのは、sorting により損傷を受けた細胞への非特異的な抗体の吸着と、Fluo-3AM の蛍光色素の残存によるものと考えられるが、そのなかでV β 5.3 およびV β 6.7 陽性細胞の割合は他のレパートアに比べて高値であると判断された。

考 察

スーパー抗原は1989年 White らの報告¹⁷⁾ 以来、MHC class II 分子によって提示されるが

Table 2. TcR V β repertoires in PBMC stimulated with chrysothile.

V β repertoire	5.2 \pm 5.3	5.3	5.1	6.7	8 sub- family	12.1	α 2 sub- family
Exp. 1	10.95	14.3	10.78	36.90	—	—	—
Exp. 2	7.98	21.61	8.14	8.79	6.8	10.06	5.56
Exp. 3	2.67	18.18	8.39	6.36	5.17	—	—
Exp. 4	15.19	13.59	12.00	16.37	11.57	13.63	10.93

PBMC loaded with Fluo 3-AM (10 μ g/ml) for 30 min in PBS were washed with PBS and incubated with 200 μ g/ml chrysothile (Exp. 1, 2, 3). A part of specimen was incubate with 10 μ g/ml PHA (Exp. 4). The cells with an elevated intracellular Ca⁺⁺ level were fractionated using FACScan, and double stained with PE-CD14 (Leu M3) and FITC-anti TcR V β repertoire mAb overnight at 4°C. CD 14 negative and TcR V β positive cells were calculated flow cytometrically.

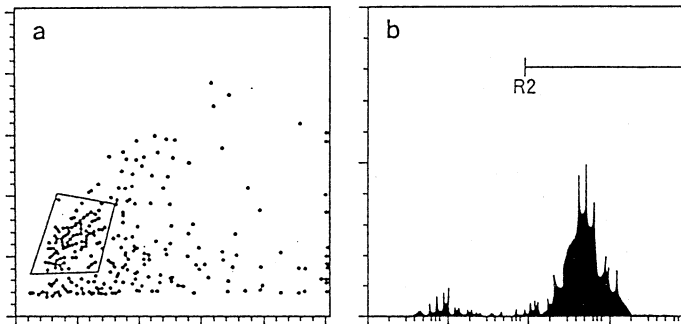


Fig. 4. Fluo 3-AM loaded PBMC were incubated with 10 μ g/ml PHA. The cells analysed and sorted flow cytometrically.

- a) Enclosed fraction were human lymphocytes.
b) Right fraction were lymphocytes with high level intracellular Ca⁺⁺.

MHC 拘束性を示さず、特定の TcR V β を発現した T 細胞によって認識される一群の抗原と定義されている。このスーパー抗原は強力な T 細胞の mitogen であるが、特定のレパートアを一時的に増加させた後は逆にそのクローンを死滅させることが判明している^{18),19)}。Heeg らの報告¹⁵⁾ によるスーパー抗原である staphylococcal enterotoxin B を BALB/c mice に投与した場合72時間後をピークにV β 8が増加した。これを基に、今回の実験では明かな増加を期待される72時間後の各V β レパートアの割合をモノクローナル抗体を用いて測定した。その結果V β 5.3 またはV β 6.7 陽性細胞の割合がコントロールに比べて上昇しており (Table 1) これらのレパートアが特異的に活性化され分裂増殖したものと考えられた。また、mitosis に先だって、まず細胞が活性化されるが、その指標として細胞内

Ca⁺⁺濃度を測定した。これは最初の実験で1分後には既に上昇しているため、sortingにより回収して、その細胞群の各Vβレパートアの割合を調べた。その結果、先の実験結果と同様にVβ5.3またはVβ6.7陽性細胞の割合が有意に高かった(Table 2)。これらの結果からクリソタイルはVβ5.3またはVβ6.7陽性細胞を選択的に活性化、増殖させており、スーパー抗原作用を持つと考えられる。一つのスーパー抗原に対応するVβレパートアは複数存在することが明らかになっているが¹²⁾、今回の結果のように個体によるレパートアの違いはVβ以外に、スーパー抗原への反応に関与する未知の部位(TcR Vα等)が存在すると考えられるが²⁰⁾、これについては今後の研究の課題である。

以前より珪肺症と自己免疫疾患との合併疾患は、強皮症^{5),6)}をはじめとして、自己免疫性溶血性貧血⁷⁾や神経疾患⁸⁾など数多く報告されてきた。これらの合併症は古くはアジュバント病⁹⁾と

して捉えられたが、以前の研究で我々はCD4⁺CD45RA⁺減少が関与しているのではないかと考えた¹⁾。最近、自己免疫疾患とスーパー抗原との関連を示唆する報告が散見される。Colcらは、マイコプラズマ産生のスーパー抗原(MAM)によりmiceに自己免疫性の関節炎が起こることを報告している¹⁴⁾。また、Friedmanらはスーパー抗原とGVHD、SLEとの関連性を述べている¹³⁾。これらの病因論については未だ不明な点が数多く残されているが、スーパー抗原が関与している可能性は充分あると考えられ、これらの問題については今後の研究課題である。

本研究に際して協力を頂いた川崎医科大学組織培養免疫センターの東脇久恵、桑野なるみ、同衛生学教室の坂口治子、宮原芳枝の諸氏に感謝致します。

この研究は川崎医科大学プロジェクト研究費(4-602)による援助を受けて行われた。

文 献

- 1) Kinugawa K, Ueki A, Yamaguchi M, Watanabe Y, Kawakami Y, Hyodoh F, Tushima H: Activation of human CD4⁺CD45RA⁺ T cells by chrysotile asbestos in vitro. *Cancer Lett* 66: 99-106, 1992
- 2) Watanabe Y, Yamaguchi M, Kawakami Y, Hyodoh F, Tsushima H, Ueki A: Human CD4⁺CD45RA⁺ lymphocytes can be stimulated by crocidolite, anthophyllite and amosite asbestos in vitro. *Int J Oncol* 2: 209-212, 1993
- 3) Morimoto C, David AH, Howard LM, Norman LL, Margaret H, John D, Stuart FS: Selective loss of the suppressor-inducer T cell subset in progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 316: 67-72, 1987
- 4) Morimoto C, Alfred DS, Norman LL: A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus patients demonstrated with anti-2H4 antibody. *J Clin Invest* 79: 762-768, 1987
- 5) Hausteil UF, Ziegler V, Herrmann K, Mchlborn J, Schmidt C: Silica-induced scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 22: 444-448, 1990
- 6) Rustin MHA, Bull HA, Ziegler V: Silica-associated systemic sclerosis is clinically, serologically and immunologically indistinguishable from idiopathic systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 123: 725-734, 1990
- 7) 村松公美子, 山本 保, 長谷川明, 三間孝雄, 高井和江, 真田雅好: 自己免疫溶血性貧血を合併した珪肺症の1例. *日胸* 48: 45-50, 1989
- 8) 得丸幸夫, 平山恵造, 北 耕平, 河村 満, 片山 薫: 珪肺症に合併した感覚性運動失調型ニューロパチーの2症例. *臨床神経学* 30: 933-938, 1990
- 9) 三好和夫: アジュバント病. *臨床免疫* 5: 785-794, 1973
- 10) 松崎吾郎, 野本亀久雄: MHCとSuperantigenの相互作用. *臨床免疫* 23: 772-778, 1991

- 11) 吉開泰信：Superantigen と T 細胞レセプター. Annual Review 免疫 42—50, 1992
- 12) 今西健一, 内山竹彦：スーパー抗原と T 細胞活性化. Annual Review 免疫 8—17, 1993
- 13) Friedman SM, Posnett DN, Tumang JR, Cole BC, Crow MK : A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. Arthritis Rheum 34 : 468—480, 1991
- 14) Cole BC, Griffiths MM : Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the mycoplasma arthritidis superantigen man. Arthritis Rheum 36 : 994—1002, 1993
- 15) Boyum A : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21 (suppl 97) : 77—84, 1968
- 16) Heeg K, Bendigs S, Miethke T, Wagner H : Induction of unresponsiveness to the superantigen staphylococcal enterotoxin B : cyclosporin A resistant split unresponsiveness unfolds in vivo without preceding clonal expansion. Int Immunol 5 : 929—937, 1993
- 17) White J, Herman A, Pullen AM : The $V\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B : stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. Cell 56 : 27—35, 1989
- 18) Kawabe Y, Ochi A : Selective anergy of $V\beta 8^+$ $CD4^+$ T cells in staphylococcus enterotoxin B-primed mice. J Exp Med 172 : 1065—1070, 1990
- 19) Rellahan BL, Jones LA, Kruisbeek AM : In vivo induction of anergy in peripheral $V\beta^+$ T cells by staphylococcal enterotoxin B. J Exp Med 172 : 1091—1100, 1990
- 20) Quaration S, Verhoef A, Kahan M, Londei M : Expression of responsiveness to bacterial enterotoxin. Immunol 78 : 600—605, 1983