サルモネラ菌からのヒト B リンパ球マイトジェン (endotoxin protein) の分離とその性状

佐 藤 譲・岡 野 健・菊 地 孝 夫・鈴 木 昇
片 岡 茂 樹・野 村 暢 郎・後 藤 由 夫・熊 谷 勝 男*

Isolation and characterization of human B lymphocyte mitogen (endotoxin protein) from *Salmonella minnesota*

Jo Satoh, Tsuyoshi Okano, Takao Kikuchi, Noboru Suzuki
Shigeki Kataoka, Nobuo Nomura, Yoshio Goto and Katsuo Kumagai *

The Third Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine.

** Department of Microbiology, Tohoku University School of Dentistry.*

【Summary】

Endotoxin protein (EP) was isolated from the TCA-extracted lipopolysaccharide (LPS) of *Salmonella minnesota* R595 by the use of aqueous phenol. The EP stimulated human B lymphocytes to synthesize DNA, even though T lymphocytes were depleted with the nylon column method, the E-rosetting method, or the mouse anti-human monoclonal antibody and complement. However, it is not concluded whether the EP is a human T-independent B cell mitogen or not, because it was not denied that a few T lymphocytes remained in the B lymphocyte fraction. The maximum uptake of ³H-TdR to lymphocytes was at 3 days after culture. The EP stimulated the lymphocytes from every human donors, and its stimulation was greater than that of LPS. Further, the EP produced the increase of immunoglobulin synthesis in human B lymphocytes.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gel electrophoresis revealed that the EP was heterogeneous protein, and its molecular weight was from approximately 10,000 to 40,000. Lipid A was detected in the EP by the limulus test, and the lipid A portion of the EP could be responsible for the mitogenic activity as well as LPS, since its mitogenic activity was inhibited by polymyxin B. It seems unlikely that the mitogenic activity of EP was due to the contamination by LPS, because the EP scarcely contained 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) which was reported to bridge between the polysaccharide and the lipid A in LPS.

Key words : endotoxin protein
human B lymphocyte mitogen
lipid A
Salmonella minnesota

【概 要】

Endotoxin protein (EP) はグラム陰性桿菌の外膜に存在し、TCA で抽出した LPS に結合して分離される。この LPS-EP 複合体を温フェノール・水で処理すると、フェノール層に EP が得られる。我々はこの方法に従って *S. minnesota* R 595 の粗 LPS から蛋白成分を抽出して EP を得た。この EP のマイトジェン活性は我々の粗 LPS や市販の LPS (*E. coli* 0111:B4) より強く、全ての donor のリンパ球 DNA 合成を促進した。EP は、ナイロン付着性、E-ロゼット非形成性リンパ球に対してマイトジェン作用を有し、また抗ヒトTリンパ球モノクロナル抗体と補体で処理したリンパ球に対しても同様の作用を示したことから、Tリンパ球非依存性のBリンパ球マイトジェンと考えられた。その組成はポリアクリルアミド電気泳動法および limulus テストから、分子量 10,000 から 40,000 の蛋白で、多量の lipid A を結合していることが知られた。そしてポリミキシンBによる阻害実験から、EP のマイトジェン活性の本態は LPS と同様に lipid A にあることが示唆された。

I. はじめに

マイトジェンとはリンパ球を非特異的に分裂・増殖させる物質で、特異抗原によるリンパ球活性化のモデルとしてリンパ球機能の研究に使用されている。ヒトTリンパ球マイトジェンとしては phytohemagglutinin (PHA) や concanavalin A (Con A) など¹⁾が知られ、臨床的にもTリンパ球機能検査に広く利用されている。ところが、ヒトBリンパ球については、マウスBリンパ球に対する lipopolysaccharide (LPS)²⁾のような強力なマイトジェンが少なく、Bリンパ球研究の進歩のさまたげになっている。pokeweed mitogen (PWM) はヒトBリンパ球マイトジェンであるがTリンパ球依存性のため、Bリンパ球機能の解析にはTおよびBリンパ球の分離・組み合わせ実験が必要となる。このような煩雑さは、Tリンパ球非依存性のヒトBリンパ球マイトジェンがあれば解決されるものと考えられる。近年、このような目的にあうものとして endotoxin protein (EP)^{4,5)}, nocardia water soluble mitogen (NWSM)⁶⁾, staphylococcus aureus⁷⁾, ulex mitogen⁸⁾ などが知られはじめており、徐々に臨床研究面にも応用されていくものと思われるが、評価がまだ一定していないものもある。EP はグラム陰性桿菌の外膜に LPS と結合して存在する蛋白で⁹⁾, Goodman らによってTリンパ球依存性のヒトBリンパ球マイトジェンであると報告されている⁴⁾。我々もヒトBリンパ球機能検査への応用を目的として、トリクロル酢酸 (TCA) で抽出したサルモネラ菌の LPS から EP の抽出・精製を試みた。そして、ほぼ良好なヒトおよびマウスのTリンパ球非依存性と考えられるBリンパ球マイトジェンを得たので、そのマイトジェン活性や組成・作用機序などについて報告する。

II. 材料および方法

(1) 菌 株:

岩手医科大学細菌学教室吉田昌男教授よりご供与いただいた *Salmonella minnesota* R4, R5, R60, R345, R595, *Salmonella typhimurium* TV 160, LT2, *Pseudomonas* K39 の 8 菌種をブレインハートインフュージョン培地で 24 時間静置培養後、ホルマリン処理 (終濃度 0.3%) を行い、死菌を用いた。後述の EP 抽出に用いた *S. minnesota* R 595 は 200 l のタンク (科薬抗生物質株式会社のご好意による) 中で普通ブイヨンにて 24 時間培養して得た。

(2) LPS および EP の抽出¹⁰⁾:

上記の菌を 4,000×G, 15 分間遠心して集菌し、生理食塩水で 3 回洗浄後、0.25 N TCA で室温 3 時間振とう抽出を行った。これを 6,000×G, 30 分間遠心して得た上清を NaOH で pH 6.5 にした後、2 倍量の -20°C 冷エタノールを加え -4°C で overnight 反応させた。反応後、6,000×G, 30 分間遠心して沈渣を集め、少量の純水に溶解させ純水で透析した。これを 27,000×G, 1 時間遠心して得た上清を凍結乾燥し、粗 LPS とした。以下の粗 LPS からの EP の抽出は *S. minnesota* R 595 についてのみ行った。粗 LPS 500 mg を純水 20 ml に溶解し、等量の 90% フェノール液を加えて 65°C 45 分間振とう抽出した。4°C に冷却後、8,000×G, 20 分間遠心してフェノール層と水層に分離し、フェノール層はさらに等量の純水を加え 65°C で再抽出した。フェノール層に 5 倍量の -20°C 冷エタノールを混合し -20°C で overnight 反応させた後、4,000×G, 20 分間遠心して沈渣を集めた。沈渣をエタノールで 5 回洗浄し純水で透析後、凍結乾燥して EP とした。500 mg の粗 LPS から

7.4 mg の EP を得た。水層も同様に処理して精製 LPS とした。実験に用いた粗 LPS と EP の濃度は吸光光度計 (280 μ m, Spectrophotometer, 日立) で測定した。

(3) ヒトリンパ球の分離と分画：

ヒトリンパ球はヘパリン加末梢血を Ficoll-Isopaque (比重 1.077) 比重遠心法で分離して得た。T および B リンパ球の分画にはナイロンウールカラム法、E-ロゼット法、およびマウス抗ヒト T リンパ球モノクローナル抗体と補体を用いた。ナイロンウールカラム法では、10% ウシ胎仔血清 (FCS) を添加 RPMI-1640 培地に浮遊させたリンパ球を 1 g のナイロンウール (和光純薬) をつめた注射筒に入れ、37°C 1 時間インキュベートしたのち、37°C の培地を流しナイロン付着と非付着細胞に分画した。E-ロゼット法では¹¹⁾、ヒツジ赤血球 (SRBC) をノイラミニダーゼ (Behring Institut) で 37°C 30 分間処理したのち、100% FCS に浮遊させた。ノイラミニダーゼ処理 SRBC とヒトリンパ球を混合し、1,000 rpm 5 分間遠心してロゼット形成させたのち、静かに再浮遊させ Ficoll-Isopaque に重層、遠心して管底の E-ロゼット形成細胞と中間層の E-ロゼット非形成細胞に分離した。SRBC を 0.83% トリス塩化アンモニウム溶液で溶血させ残ったリンパ球を使用した。抗 T リンパ球抗体は Hybritech 社のマウス抗ヒト T リンパ球モノクローナル抗体¹²⁾を使用した。5 倍希釈した 0.5 ml の抗 T 抗体を 1×10^7 のリンパ球に加え、37°C 30 分間インキュベートしたのち、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。これに補体として家兔血清 (Behring Institut) を加え 37°C 30 分間インキュベート後、リンパ球を PBS で 3 回洗浄して実験に用いた。

(4) マウスリンパ球の分離と分画：

8~12 週齢、雄 C3H/He マウス (舟橋農場) の脾臓をハサミで細切し、メッシュを通して単細胞を得、脾リンパ球とした。マウス T および B リンパ球の分画には AKR 抗 Thy 1.2 抗体 (Seale) とモルモット補体 (極東製薬) を用い、前述のヒトリンパ球と同様の処理を行った。すなわち、脾リンパ球を抗 Thy 1.2 抗体で処理したのち、モルモット補体で T リンパ球を傷害し B リンパ球分画を得た。

(5) リンパ球培養：

リンパ球を 10% FCS, 10 mM HEPES 緩衝液添加 RPMI-1640 培地に浮遊させ $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml に調整し、この 0.2 ml をマイクロプレート (Falcon, No. 3040, 3041) に分注、各種マイトジェンを添加して 37°C 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。培養時間は表 4 以外の実験では 72 時間とした。

(6) リンパ球 DNA 合成の測定：

リンパ球培養の最後の 24 時間に ³H-Thymidine (³H-TdR, specific activity 5.0 Ci/mmol, The Radiochemical Centre) を各ウェルに 0.1 μ Ci ずつ添加し、培養終了後サンプルハーベスター (ラボマッシュ 101) でガラスファイバー上にリンパ球を回収した。ガラスファイバーをトルエンシンチレーターに入れ、リンパ球中に取り込まれた ³H-TdR を液体シンチレーションカウンター (Aloka) で測定 (cpm) した。stimulation index (S.I.) は S.I. : (マイトジェン添加リンパ球の cpm) ÷ (マイトジェン非添加リンパ球の cpm) で求めた。実験はすべて triplicate で行い、cpm の平均値と標準偏差 (SD) を求めたが、SD はほぼ 10% 以下であったので表中では省略した。

(7) マイトジェン：

前述の 8 種の菌株の粗 LPS と S. minnesota R 595 の EP のほかに市販の LPS (E. coli 0111 : B4, Difco), PHA-P (Difco), Con A (Sigma) を表中に示した濃度で使用した。

(8) 免疫グロブリン産生細胞の検出：

protein A 結合 SRBC を標的細胞にしてカニンガムチェンバーを利用したブランク法¹³⁾を用いた。SRBC に CrCl₃ で protein A (Pharmacia) を結合させ、これに EP で刺激しておいたヒトリンパ球、家兔抗ヒト μ 鎖あるいは γ 鎖血清 (DACO), あらかじめ SRBC で吸収しておいたモルモット補体 (極東製薬) を混合してカニンガムチェンバーに注入し、37°C overnight 培養後、溶血ブランクを数え、リンパ球 1×10^6 個あたりのブランク数を算定した。

(9) EP の化学分析：

蛋白量は bovine serum albumin を標準に Lowry 法¹⁴⁾で、糖はグルコースを標準に Anthrone 法¹⁵⁾で、2-Keto-3-deoxyoctonate (KDO) は thiobarbituric acid 法¹⁶⁾で定量した。なお、これらの成分は原資料が少ないため原資料の正確な絶対値がわからないものもあったので、構成比 (%) ではなく糖を基準にした相対的量で表現した。lipid A の測定は limulus lysate テスト (プレゲル, 帝国臓器製薬) によるバイオアッセイで半定量した¹⁷⁾。測定用のガラス器具はすべて 250°C 1 時間滅菌し、蒸留水は endotoxin free の注射用を使用した。プレゲルのゲル化の程度は強い順序に ++, +, $\pm$, - で表現した。

(10) EP の分子量の測定：

分子量は SDS・ポリアクリルアミド・スラブ電気泳動法¹⁸⁾によって測定した。0.5% sodium dodecyl sulfate

表 1 TCA で抽出した LPS のマイトジェン活性

Crude LPS or ConA	$\mu\text{g/ml}$	CPM(S.I.)	
		Human PBL	C3H/He Sp.
None	0	768(1.0)	650(1.0)
Sal. minne. R4	7	1,148(1.5)	1,063(1.6)
	35	1,328(1.7)	2,134(3.3)
" R5	7	1,263(1.7)	1,059(1.6)
	35	774(1.0)	777(1.2)
" R60	7	1,184(1.5)	1,075(1.7)
	35	1,004(1.3)	1,059(1.6)
" R345	7	1,091(1.4)	744(1.2)
	35	2,378(3.1)	1,160(1.8)
" R595	7	2,141(2.8)	2,352(3.6)
	35	1,775(2.3)	3,287(5.1)
Sal. typhi. TV160	7	1,050(1.4)	421(0.7)
	35	1,312(1.7)	746(1.2)
" LT2	7	1,076(1.4)	770(1.2)
	35	953(1.2)	575(1.2)
Pseudomonas K39	7	1,146(1.5)	651(1.0)
	35	979(1.3)	889(1.4)
ConA	5	10,111(13.2)	52,906(81.4)

表 2 EP のヒト末梢血リンパ球およびマウス脾リンパ球に対するマイトジェン活性

Exp.	Mito- gens	$\mu\text{g/ml}$	CPM(S.I.)	
			Human PBL	C3H/He Sp.
I	None	0	426(1.0)	1,490(1.0)
	EP	10	1,438(3.4)	30,575(20.5)
	"	30	1,820(4.3)	39,310(26.4)
	"	100	1,039(2.4)	29,367(19.7)
	PHA	30	27,300(64.1)	6,622(4.4)
II	None	0	778(1.0)	1,319(1.0)
	EP	10	2,050(2.6)	9,088(6.9)
	"	30	3,217(4.1)	15,708(11.9)
	"	100	4,356(5.6)	17,853(13.5)
	ConA	5	13,124(16.9)	39,308(29.0)
	LPS (E. coli)	30	2,241(2.9)	11,701(8.9)

(SDS), 2% β -mercaptoethanol トリス緩衝液 (pH 7.0) で 80°C 30 分間還元した EP (20 μg) を 5~15% の濃度勾配のポリアクリルアミド・スラブゲルに重層し, 4 mA で 18 時間電気泳動したのち, Coomassie Brilliant Blue R 250 で染色した。標準蛋白には Schwarz-Mann 社の ferritin (MW 18,500, 220,000), lactate (MW 36,000), catalase (MW 60,000), bovine serum albumin (MW 67,000), ブタ thyroglobulin (MW 330,000) を使用した。

表 3 EP の健康人末梢血リンパ球に対するマイトジェン活性

Donor	CPM(S.I.)			
	None (30 $\mu\text{g/ml}$)	EP (30 $\mu\text{g/ml}$)	LPS(E.coli) (30 $\mu\text{g/ml}$)	PHA (30 $\mu\text{g/ml}$)
1	778(1.0)	3,217(4.1)	2,241(2.9)	ND
2	426(1.0)	1,820(4.3)	ND	27,300(64.1)
3	557(1.0)	3,340(6.0)	1,388(2.5)	30,114(54.1)
4	624(1.0)	1,338(2.1)	703(1.1)	19,932(32.0)
5	390(1.0)	723(1.9)	717(1.8)	29,236(75.0)
6	302(1.0)	768(2.5)	272(0.9)	26,808(89.0)
7	659(1.0)	4,711(7.1)	1,847(2.8)	4,883(7.4)

表 4 EP ヒト末梢血リンパ球に対するマイトジェン活性の経時変化

Mitogen ($\mu\text{g/ml}$)	CPM(S.I.)		
	3days	5days	7days
None	1,759(1.0)	1,858(1.0)	379(1.0)
EP (30)	5,676(3.2)	3,997(2.2)	851(2.2)

III. 結 果

(1) 粗 LPS のマイトジェン活性のスクリーニング:

TCA で抽出した 8 種の粗 LPS をヒト末梢血リンパ球と C3H/He マウス脾リンパ球培養液中に添加し, 3 日間培養してそのマイトジェン活性をスクリーニングした。表 1 のとおり, S. minnesota R 595 の粗 LPS がヒトおよびマウスリンパ球に最も強いマイトジェン活性を示したので, 以下の EP の分離, 精製にはこの株のみを使用した。

(2) EP のマイトジェン活性:

S. minnesota R 595 の粗 LPS からフェノール法で分離した EP のマイトジェン活性を表 2, 表 3 に示した。EP は 30~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で最大の活性を示した。S.I. は粗 LPS と比較して, ヒト末梢血リンパ球の場合で約 2 倍に, マウス脾リンパ球の場合で約 5 倍に増強した (表 2)。多数の健康人末梢血リンパ球に対しても, 個人差は認められるがほぼ良好なマイトジェン活性を有していた (表 3)。E. coli (0111:B4) の LPS と比較しても, ヒト末梢血リンパ球 (表 3) とマウス脾リンパ球 (表 2) のいずれに対しても EP の方が強い活性を示した。次に, EP によるマイトジェン反応を 3 日から 7 日まで経時的に観察した。表 4 はヒト末梢血を用いたものだが, ^3H -TdR の取り込み量は培養 3 日目に最大となり以後減少した。したがって, 以下の実験条件はすべて EP 30

表 5 ナイロンウールカラムで分画したヒト末梢血リンパ球に対する EP のマイトジェン活性

Human PBL	CPM (S.I.)		
	None	EP(30 μ g/ml)	ConA(5 μ g/ml)
Nontreated	845 (1.0)	1,101 (1.3)	14,027 (16.6)
Nylon-adherent	3,326 (1.0)	9,214 (2.8)	24,664 (7.8)
Nylon-nonadherent	492 (1.0)	321 (0.7)	14,782 (30.0)

表 6 E-ロゼット法で分画したヒト末梢血リンパ球に対する EP のマイトジェン活性

Exp. Human PBL	CPM (S.I.)			
	None	EP(30 μ g/ml)	PHA(30 μ g/ml)	ConA(5 μ g/ml)
Non-treated	557 (1.0)	3,340 (6.0)	30,114 (54.1)	17,061 (30.6)
I Non-E-rosette	624 (1.0)	1,153 (1.8)	804 (1.3)	860 (1.4)
E-rosette	473 (1.0)	882 (1.8)	32,884 (69.5)	23,862 (50.4)
Non-treated	644 (1.0)	1,181 (1.8)	31,950 (49.6)	21,369 (33.1)
II Non-E-rosette	1,316 (1.0)	5,125 (3.9)	20,461 (15.5)	ND
E-rosette	1,069 (1.0)	814 (0.8)	50,351 (47.1)	15,300 (14.3)

表 7 抗ヒトTリンパ球抗体と補体で処理したヒト末梢血リンパ球に対する EP のマイトジェン活性

Lymphocyte (4×10^5)	Treatment	CPM (S.I.)				
		None	EP (30 μ g/ml)	LPS(E.coli) (30 μ g/ml)	PHA (30 μ g/ml)	ConA (5 μ g/ml)
Human PBL	C'	1,277(1.0)	6,372(5.0)	3,694(2.9)	11,267(8.8)	8,997(7.0)
"	anti-human T + C'	986(1.0)	6,110(6.2)	3,112(3.2)	5,024(5.1)	5,860(5.9)

表 8 抗 Thy. 1, 2 血清と補体で処理した C3H/He マウス脾リンパ球に対する EP のマイトジェン活性

Lymphocytes (2×10^5)	Treatment	CPM (S.I.)			
		None	EP (30 μ g/ml)	LPS(E.coli) (30 μ g/ml)	ConA (5 μ g/ml)
C3H/He	C'	1,434(1.0)	9,446(6.6)	9,826(6.8)	16,437(11.5)
Spleen	anti-Thy-1,2 + C'	903(1.0)	19,056(21.1)	12,403(13.7)	3,937(4.4)

μ g/ml, リンパ球培養は3日間とした。

(3) EP に反応する細胞：

EP に反応して分裂するリンパ球のサブポピュレーションを明らかにするため、ヒト末梢血リンパ球をナイロンウールカラム法、E-ロゼット法、およびマウス抗ヒトTリンパ球モノクローナル抗体と家免補体で分画した。表5のとおり、Bリンパ球と単球を多く含むナイロン付

着細胞はEPに反応したが、Tリンパ球に富むナイロン非付着細胞は反応しなかった。E-ロゼット法でも(表6)、Bリンパ球や単球に富むE-ロゼット非形成細胞はEPに反応したが、PHAやConAに対する反応性は弱かった。一方、Tリンパ球に富むE-ロゼット形成細胞はEPに対してほとんど反応しなかったが、PHAやConAにはよく反応した。抗ヒトTリンパ球抗体と補体による

表 9 EP によるヒト末梢血リンパ球の抗体産生細胞への分化

Culture days	Ig-class	PFC/10 ⁶ cells	
		None	EP
3	IgM	200	1,133
	IgG	100	133
5	IgM	167	3,700
	IgG	233	300
7	IgM	167	3,500
	IgG	167	667

表 10 EP の相対的組成

Extract from Sal. minnesota	Relative Composition		
	Sugar	KDO	Protein
crude LPS	1.0	0.2	2.2
purified LPS	1.0	0.2	trace
Endotoxin Protein	1.0	trace	24.4

Sugar を 1 とした相対的量を示している。
(材料および方法の項を参考のこと)

表 11 リムルテストによる EP 中のリピド A の検出

Mitogens	ng/ml	Limulus Test
		Gelation
LPS (E. coli 0111B4)	10	+
	1.0	+
	0.1	±
	0.01	-
EP (Sal. minnesota)	10	+
	1.0	+
	0.1	+
	0.01	±

+: firm gel within 1 hr.

+: semi-solid gel within 1 hr.

±: flocculation in 1 hr.

-: no appearance of gel in 1 hr.

ヒト末梢血リンパ球の処理では, PHA および Con A 反応性は低下したが, EP および LPS (E. coli 0111 : B4) に対する反応性は影響を受けなかった (表 7)。マウス脾リンパ球についても同様の結果を得た。すなわち, C3H/He マウス脾リンパ球を抗 Thy 1. 2 血清と補体で処理して T リンパ球を除去しても, Con A 反応性は低下したが, EP および LPS (E. coli 0111 : B4) 反応性は減

図 1 EP の SDS・ポリアクリルアミド電気泳動

表 12 ポリミキシン B による EP のマイトゲン活性の阻害

Lympho- cytes	Mitogens	μg/ml	CPM(% Inhibition)	
			None	Polymyxin-B (1 μg/ml)
C3H/He mouse spleen	None	0	1,041	1,043(0)
	EP	3	17,751	9,198(48)
	"	10	23,734	12,781(46)
	"	30	21,741	14,101(41)
	LPS	3	20,007	8,636(57)
	(E. coli)	10	25,468	16,964(33)
	ConA	2	19,643	23,436(0)
	"	6	28,856	32,302(0)
Human PBL	PHA	30	3,722	3,879(0)
	None	0	557	1,266(0)
	EP	30	3,340	2,710(19)
	LPS	30	1,943	1,388(29)
	(E. coli) ConA	10	17,061	16,815(1)

少しなかった (表 8)。

(4) EP の免疫グロブリン産生細胞分化誘導能:

EP が B リンパ球を活性化して分裂させるだけでなく, 免疫グロブリン産生細胞への分化も誘導できるかどうかをブラーク法によって検討した。表 9 は, ヒト末梢血リンパ球を EP とともに培養して IgM および IgG 産生細胞の出現を 3 日から 7 日まで経時的に観察したものである。IgM および IgG 産生細胞とも培養 3 日目から出現し, IgM 産生細胞は 5 日目に, IgG 産生細胞は 7 日目に

最大となった。免疫グロブリンクラスとしては IgM 産生細胞数が IgG よりはるかに多かった。

(5) EP の組成と分子量：

EP の組成を糖・KDO・蛋白および lipid A について検討した。S. minnesota から抽出した粗 LPS, 精製 LPS, EP のそれぞれ同一資料を用い, 糖は Anthrone 法で, KDO は thiobarbituric acid 法で, 蛋白は Lowry 法で測定し, 組成は糖に対する KDO あるいは蛋白の相対的量で表現した。表 10 のとおり, TCA で抽出した粗 LPS には糖, KDO と多量の蛋白が含まれていた。さらにフェノール法によって抽出すると, 水層から回収した精製 LPS では蛋白が失われ, 逆に, フェノール層から回収した EP には蛋白が濃縮されていた。LPS 中で lipid A と結合して存在するといわれている KDO¹⁶⁾ については, 粗 LPS と精製 LPS には比較的多量含まれていたが EP にはほとんど検出されなかった (表 10)。しかし, lipid A の生物活性を検出するといわれている limulus テスト²⁸⁾で, lipid A を半定量すると, EP には LPS (E. coli 0111 : B4) に含まれている以上の多量の lipid A が含まれていた (表 11)。次に, 組成の大半を蛋白によってしめられていた EP の分子量を SDS・ポリアクリルアミド・スラブ電気泳動法で測定した。図 1 のとおり, 分子量約 10,000 から 40,000 の領域に Coomassie Brilliant Blue で染色された 4 本のバンドが確認された。

(6) EP のマイトジェン活性におよぼすポリミキシン B の影響：

ポリミキシン B は, lipid A に結合して LPS の種々の生物活性を中和すると報告されている^{28,29,30)}。EP のマイトジェン活性への lipid A の関与を明らかにするために, マウス脾リンパ球およびヒト末梢血リンパ球培養液中に EP とともにポリミキシン B (台糖ファイザー) を添加した。1 μ g/ml のポリミキシン B は, LPS (E. coli 0111 : B4) および EP のマイトジェン活性をマウス脾リンパ球の場合約 50%, ヒトリンパ球の場合 20~30% 抑制した。しかし, PHA および Con A のマイトジェン活性には何ら影響をおよぼさなかった (表 12)。

IV. 考 按

S. minnesota R 595 から分離したわれわれの EP も, ヒトおよびマウス (C3H/He) の T リンパ球非依存性と考えられる B リンパ球マイトジェンであることが示された。そして, EP の組成の大部分は分子量約 10,000 から 40,000 の蛋白であるが, limulus テストから, EP には多量の lipid A が結合していることが, さらにポリミキシン B による阻害実験から, EP のマイトジェン活性の本

態は LPS と同様に lipid A である可能性が示唆された。

EP はグラム陰性桿菌の外膜に存在する蛋白で, TCA で抽出した LPS に結合して分離される⁹⁾。この LPS-EP 複合体を温フェノール・水で処理すると水層から LPS が, フェノール層から EP が抽出される^{10,19)}。われわれはこの方法に従って S. minnesota R 595 の粗 LPS から蛋白成分を抽出して EP として使用した。EP のマイトジェン活性は精製前の粗 LPS (表 1) や市販の LPS (E. coli 0111 : B4) より強力であり (表 2, 3), 個人差はあるが多数の donor のヒトリンパ球 DNA 合成を促進した (表 3)。EP に反応するヒトリンパ球サブポピュレーションについては, データのばらつきは多少あるが, ナイロン附着リンパ球 (表 5), E-ロゼット非形成リンパ球 (表 6), 抗ヒト T リンパ球モノクローナル抗体と補体処理リンパ球分画 (表 7) は EP に反応したが, ナイロン非附着リンパ球 (表 5), E-ロゼット形成リンパ球 (表 6) は EP にほとんど反応しなかったことから, T リンパ球ではなく B リンパ球と考えられる。EP による B リンパ球の幼若化が T リンパ球依存性かどうかについては, T リンパ球の除去処理によっても EP に対する反応性は低下しなかった (表 5, 6, 7) ことから T リンパ球非依存性と思われるが, しかし, T リンパ球を除去した B リンパ球分画には PHA や Con A に対する反応性が完全に減少せず残っている (表 5, 6, 7) ので, B リンパ球分画への少量の T リンパ球の混入を否定できない。Miller ら²⁰⁾は新鮮ヒト血清を使用し, 7 日間培養という条件下ではあるが, LPS は T リンパ球依存性ヒト B リンパ球マイトジェンであり, この場合, 少量のリンパ球があれば十分であると述べている。したがって, EP によるヒト B リンパ球活性化も少量の T リンパ球に対する依存性を否定はできない。これらの結果は C3H/He マウス脾リンパ球についても同様である (表 8)。データのばらつきの原因は T および B リンパ球の純度の差が混入する単球の量的な差と考えられる。マクロファージ依存性かどうかは検討しなかった。EP によるヒト末梢血リンパ球 DNA 合成のピークは 3 日目にあり, 以後漸減した (表 4)。このことは, 多数の donor のリンパ球に対しても活性を有していた (表 3) こととあわせて, 特異抗原によるリンパ球の活性化ではなく^{21,22)}。EP はマイトジェンであることを示している。さらに, EP は B リンパ球を分裂させるだけでなく, IgM や IgG などの抗体産生細胞まで分化させることができる (表 9) という B リンパ球の polyclonal activator²³⁾ としての性質もそなえていた。以上の B リンパ球マイトジェンとしての EP の性質は, Goodman ら^{4,5,10)}が S. typhosa から抽出した EP の性質とほぼ一

致している。これらの EP は NWSM⁶⁾, *Staphylococcus aureus*⁷⁾, *ulex mitogen*⁸⁾ などとともにヒトBリンパ球活性化のよき研究材料となるであろう。

EP の組成については資料が少なかったため、糖、KDO、蛋白の相対的量しか検索できなかった(表10)が、大部分が蛋白から構成されていた。これは同じ *S. minnesota* の粗 LPS から抽出した精製 LPS が主に KDO を含んだ糖から構成されていたのと同対照的である。KDO とは LPS 中で多糖と lipid A の間に介在する糖の一種である¹⁶⁾。SDS・ポリアクリルアミド電気泳動によると、EP は分子量約 10,000 から 40,000 の蛋白から構成される heterogeneous な蛋白であった(図1)。このことは Goodman らも述べている²⁴⁾。このうちどの蛋白がマイトジェン活性に関係しているのかは不明である。しかし、注目すべきことは、lipid A を *limulus* テストによって半定量すると EP は LPS (*E. coli* 0111:B4) が含有している以上の多量の lipid A を含んでいたことである(表11)。lipid A は LPS に含まれている脂質で、KDO を間にはさんで多糖に結合しており¹⁶⁾、マイトジェン活性^{25, 26, 27)}をはじめとする LPS の種々の生物活性の本態といわれている。*limulus* テストはカブトガニの血液成分が endotoxin によってゲル化することを利用した endotoxin 検出法¹⁷⁾で、endotoxin 中の lipid A によってゲル化がおけるとされている²⁸⁾。EP 資料中から多量に検出された lipid A (表11)については、同じ資料中には KDO がほとんど含まれていなかった(表10)ことから EP に混入した LPS 中の lipid A を検出したものではなく、EP に結合して存在する lipid A を検出したものと考えられる。したがって、EP のマイトジェン活性も LPS と同様に lipid A に起因することが推測される。このことを確認するために EP にポリミキシンBを作用させてみた。ポリミキシンBは環状ペプチドの抗生

物質であり、lipid A に結合して LPS のマイトジェン活性²⁹⁾、カブトガニゲル化反応³⁰⁾、補体結合性³¹⁾などを阻害するといわれている。表12では、ポリミキシンBはLPSのマイトジェン活性の阻害と同程度にEPのマイトジェン活性を阻害しており、EPのマイトジェン活性はLPSと同様にlipidAに起因することを示唆している。この場合、EPの構造としてKDOを介さないprotein-lipidAのコンプレックスが考えられるが、このような構造をとるものとして Wober ら¹⁹⁾が *Serratia marcescens* や *E. coli* の endotoxin から抽出した“simple protein”や、Betz や Morrison^{32, 33)} が *E. coli* から抽出した lipid A-associated protein (LAP) が既に知られている。LAP による C3H/St マウス脾リンパ球のマイトジェン反応はポリミキシンBで阻害されない³²⁾などの EP との差異もあるが、EP もこのようなものと類似のものかもしれない。そして、EP は LPS よりマイトジェン活性が高いことから、lipid A のほかに EP の蛋白部分がヒトBリンパ球の活性化に重要な役割をはたしていることは想像にかたくない。しかし、EP と“simple protein”や LAP との異同や、EP がなぜ LPS よりも強くヒトBリンパ球を活性化するのかなどについては今後の問題である。

最後に、菌体をご供与していただいた岩手医大吉田昌男教授、菌体の大量培養にご協力いただいた科薬抗生物質株式会社、東北大歯学部力石秀実博士、*limulus test* のご指導をいただいた当教室矢島義昭博士、SDS-PAGE のご指導をいただいた東北大歯学部清水義信助教授に感謝いたします。

なお本研究は昭和55年度文部省科学研究費 No. 577994 によった。本論文の要旨は第10回日本免疫学会総会で発表した。

文 献

- 1) Janossy, G. and Greaves, M.F.: Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocyte to phytoimitogens. *Clin. Exp. Immunol.*, 9: 483~498, 1971.
- 2) Gery, I., Kruger, J. and Spiessell, S.Z.: Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin. Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T 6T6 thymus grafts. *J. Immunol.*, 108: 1088~1091, 1972.
- 3) Keightley, R.G., Cooper, M.D. and Lawton, A.R.: The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. *J. Immunol.*, 117: 1538~1544, 1976.
- 4) Goodman, G.M. and Sultzter, B.M.: Endotoxin protein is a mitogen and polyclonal activator of human B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 149: 713~723, 1979.
- 5) Goodman, G.W. and Sultzter, B.M.: Further studies on the activation of lymphocytes by

- endotoxin protein. *J. Immunol.*, 122 : 1329~1334, 1979.
- 6) Brochier, J., Bona, C., Ciorbaru, R., Revillard, J.P. and Chedid, L. : A human T-independent B lymphocyte mitogen extracted from nocardia opaca. *J. Immunol.*, 117 : 1431~1439, 1976.
 - 7) Kasahara, T., Kin, K., Itoh, Y., Kawai, T., Morita, M. and Shioiri-Nakano, K. : Cellular cooperation in lymphocyte activation I. Cooperative and non-cooperation responses of human T and B lymphocytes to various mitogens. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 58 : 260~273, 1979.
 - 8) Yamaguchi, N., Yoshimatsu, K., Toyoshima, S. and Osawa, T. : Isolation and characterization of a mitogenic substance for murine and human B lymphocytes from *Ulex europeus* seeds. *J. Immunol.*, 126 : 2290~2295, 1981.
 - 9) Westphal, O. : Bacterial endotoxins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 49 : 1~43, 1975.
 - 10) Sultz, B.M. and Goodman, G.W. : Endotoxin protein : A B-cell mitogen and polyclonal activator of C3H/HeJ lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 144 : 821~827, 1976.
 - 11) Weiner, M.S., Bianco, C. and Nussenzweig, V. : Enhanced binding of neuraminidase treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. *Blood*, 42 : 939~946, 1973.
 - 12) Royston, I., Majda, J.A., Baird, S.M., Meserve, B.L. and Griffiths, J.C. : Monoclonal antibody specific for human T lymphocytes : Identification of normal and malignant T-cells. *Blood*, 54 (Suppl. 1) : 106 a, 1979.
 - 13) 西川伸一, 平田健雄, 泉 孝英 : Protein A 結合ヒツジ赤血球を標的にしたヒト免疫グロブリン産生細胞のプラーク法による検出. 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, 1978, pp. 2163~2199.
 - 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265~275, 1951.
 - 15) Roe, J.H. : The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 212 : 335~343, 1955.
 - 16) Dröge, W., Lehmann, V., Lüderitz, O. and Westphal, O. : Structural investigations on the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 14 : 175~184, 1970.
 - 17) 玉熊正悦, 石山 賢, 碓井 昌 : 血中 *E. coli* エンドトキシンの測定 : Limulus Lysate Test を中心に. 内科, 30 : 629~633, 1972.
 - 18) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406~4412, 1969.
 - 19) Wober, W. and Alaupovic, P. : Studies on the protein moiety of endotoxin from gram-negative bacteria : Characterization of the protein moiety isolated by phenol treatment of endotoxin from *Serratia marcescens* 08 and *Escherichia coli* 0 141 : K 85 (B). *Eur. J. Biochem.*, 19 : 340~356, 1971.
 - 20) Miller, R.A., Gartner, S. and Kaplan, H.S. : Stimulation of mitogenic responses in human peripheral blood lymphocytes by lipopolysaccharide : Serum and T helper cell requirements. *J. Immunol.*, 121 : 2160~2164.
 - 21) Brown, J.M., Leon, M.A. and Lightbody, J.J. : Isolation of a human lymphocyte mitogen from wheat germ with N-acetyl-D-glucosamine specificity. *J. Immunol.*, 117 : 1976~1980, 1976.
 - 22) Patters, M.R., Genco, R.J., Reed, M.J. and Mashimo, P.A. : Blastogenic response of human lymphocytes to oral bacterial antigens : Comparison of individuals with periodontal disease to normal and edentulous subjects. *Infect. Immun.*, 14 : 1213~1220, 1976.
 - 23) Fauci, A.S. and Pratt, K.R. : Polyclonal activation of bonemarrow-derived lymphocytes from human peripheral blood measured by a direct plaque-forming cell assay. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 73 : 3676~3679, 1976.
 - 24) Goodman, G.W. and Sultz, B.M. : Lymphocyte activation by endotoxin protein. *Am. Soc. Microbiol.*, E 29 : 47 (Abstr), 1978.
 - 25) Chiller, J.M., Skidmore, B.J., Morrison, D.C. and Weigle, W.O. : Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvant activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70 : 2129~2133, 1973.

- 26) Smith, C.I.E., Hammarström, L., Bird, A.G., Kunori, T., Gustafsson, B. and Holme, T. : Lipopolysaccharide and lipid A-induced human blood lymphocyte activation as detected by a protein A plaque assay. *Eur. J. Immunol.*, 9 : 619~625, 1979.
- 27) Gregory, S.H., Zimmerman, D.H. and Kern, M. : The lipid A moiety of lipopolysaccharide is specifically bound to B cell subpopulations of responder and nonresponder animals. *J. Immunol.*, 125 : 102~107, 1980.
- 28) Nowotny, A., Behling, U.H. and Chang, H.L. : Relation of structure to function in bacterial endotoxins. *J. Immunol.*, 115 : 199~203, 1975.
- 29) Jacobs, D.M. and Morrison, D.C. : Inhibition of the mitogenic response to lipopolysaccharide (LPS) in mouse spleen cells by polymyxin B. *J. Immunol.*, 118 : 21~27, 1977.
- 30) 丹羽 允, 平松 卓, 原田敏枝 : ゲル化反応から見た内毒素活性の新側面. *日本細菌学雑誌*, 31 : 43, 1976.
- 31) Morrison, D.C. and Jacobs, D.M. : Inhibition of lipopolysaccharide-initiated activation of serum complement by Polymyxin B. *Infect. Immun.*, 13 : 298~301, 1976.
- 32) Betz, S.J. and Morrison, D.C. : Chemical and biological properties of a protein-rich fraction of bacterial lipopolysaccharides. I. The in vitro murine lymphocyte response. *J. Immunol.*, 119 : 1475~1481, 1977.
- 33) Morrison, D.C. and Betz, S.J. : Chemical and biological properties of a protein-rich fraction of bacterial lipopolysaccharides. II. The in vitro rat peritoneal mast cell response. *J. Immunol.*, 119 : 1790~1795, 1977.
-