菌体内毒素のマウス $\gamma\delta$ 型 T リンパ球に対する マイトジェン作用

新田敏正・今井啓全・小笠原祐子・北村和典^{*1)}、中野昌康^{*2)}

Mitogenic activity of bacterial lipopolysaccharide on the $\gamma\delta$ T lymphocyte

In vitro proliferative responses of T lymphocytes to bacterial lipopolysaccharides (LPS) were examined by determining the uptake of tritiated thymidine (^3H -TdR) into cells. T lymphocyte populations were taken and purified from proteose peptone-induced peritoneal exudate cell (PEC), spleen and thymus of C3H/HeN or C3H/HeJ mice. LPS were prepared from *Salmonella typhimurium*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* by the phenol-water procedure.

The T lymphocytes taken from PEC (PEC-T) of C3H/HeN mice showed an increased ^3H -TdR uptake in response to LPS from *S. typhimurium* (S. t-LPS), while PEC-T of C3H/HeJ, splenic T and thymic T lymphocyte of C3H/HeN mice did not respond to S. t-LPS. Other LPS also have a mitogenic ability to PEC-T lymphocytes too, while those of S. t-LPS and P. i-LPS were higher than that of F. n-LPS or P. g-LPS. The response of PEC from C3H/HeN mice to S. t-LPS was abolished, when the PEC-T were pretreated with anti-Thy-1 or $\gamma\delta$ TCR antibody plus complement (c), but not anti- $\alpha\beta$ TCR antibody plus C. The thymic T lymphocytes did not show any increase of ^3H -TdR uptake in response to LPS or anti- $\gamma\delta$ TCR antibody. However, obvious uptake did occur when the cells were stimulated with LPS and anti- $\gamma\delta$ TCR antibody together.

The results suggest that LPS has a mitogenic ability to a T lymphocytes population bearing $\gamma\delta$ TCR in PEC that had been stimulated previously by proteose peptone.

Rec. 10/21/1994, Acc. 11/11/1994, pp 49~54

Toshimasa Nitta, Hiroaki Imai, Yuuko Ogasawara,
Kazunori Kitamura, Masayasu Nakano*

key words : mitogenic activity, LPS, $\gamma\delta$ T lymphocyte

菌体内毒素(lipopolysaccharide : LPS)は免疫担当細胞を含め、哺乳類の種々な細胞に対するさまざまな生物活性を有している¹⁾。特に、免疫担当細胞のなかのBリンパ球やマクロファージ(M ϕ)はLPSにきわめて強い反応を示す。LPSにより活性化されたマウスBリンパ球は分裂し、抗体産生細胞に分化する。また、LPSの作用を受けたM ϕ は、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン

(IL)-1, IL-6, 凝血促進因子、プロスタグランジン、ロイコトリエン、活性酸素そして一酸化窒素などのさまざまな活性をもつ物質を産生することが知られている²⁾。

このようなBリンパ球やM ϕ に対するLPSの作用にくらべ、免疫担当細胞のなかの重要な細胞の一つであるTリンパ球に対するLPSの生物活性に関しては不明な点が多い。大多数のTリンパ球はLPSに反応しないとされ、ごく少数のTリンパ球のみがLPSに反応すると考えられている³⁾。しかし、LPSが作用するTリンパ球がどのような細胞なのかは不明である。

本研究ではLPSがTリンパ球レセプター(TCR)を介して刺激されたマウスの $\gamma\delta$ 型Tリン

^{*1)} Department of Bacteriology, Ohu University School of Dentistry, Koriyama, Fukushima 963 奥羽大学歯学部口腔細菌学講座

^{*2)} Department of Microbiology, Jichi Medical School, Tochigi-ken 329-04 自治医科大学微生物学教室
Offprint requests to : Toshimasa Nitta, Department of Bacteriology, Ohu University school of Dentistry, 31-1 Misumido, Tomita, koriyama, Fukushima 963, Japan

パ球にマイトジェン作用を示すことを明らかにしたので報告する。

方法と材料

① 実験動物：C3H/HeN および C3H/HeJ 系マウス(日本クレア, 東京), 5～10 週齢の雄を使用した。

② 使用菌株：講座保存の *Salmonella typhimurium* LT₂ 株と歯周病患者より分離した *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* および *Fusobacterium nucleatum* 株を使用した。

③ LPS の抽出：Westphal らのフェノール法⁴⁾にて抽出し, 3 回の遠心(100,000×g, 1 時間)にて精製した。

④ 抗血清：抗マウス $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ T 細胞レセプター(TCR)抗体(Pharminogen, CA, USA), 抗マウス B 細胞(LR-1)抗体(Serotec Ltd, Oxon, UK), 抗 Thy-1.2 抗体(Cedarlane Laboratories Ltd, Ontario, Canada), 抗マウスマクロファージ(Mac-1)抗体(Caltag Laboratorie Inc., CA, USA)そして抗 Ia^k 抗体 [ATH 抗 ATL(Ia^k)] (Cedarlane Laboratories Ltd, Ontario, Canada)を使用した。

⑤ 補体：Low-toxic マウスリンパ球用モット補体(Cedarlane Laboratories Ltd, Ontario, Canada)を用いた。

⑥ 細胞培養培地：10%に熱処理牛胎児血清(Flow Laboratories, Stanmore, Australia), ペニシリン(100 U/ml)そしてストレプトマイシン(100 mg/ml)を含む RPMI-1640 培地(日水製薬, 東京)を使用した。

⑦ 腹腔滲出細胞(PEC)の採集：3 日前に 1.5 ml の 10%プロテオースペプトン液をマウスの腹腔内に投与し, 腹腔内洗浄により滲出細胞(PECs)を集めた。この PECs を培地にて洗浄後, 5 ml の培地に浮遊させ, その細胞液を 2 g のナイロンファイバー(和光純薬, 大阪)を詰めた 20 ml のカラムにのせ, 37°C45 分間インキュベートさせた。その後, 37°Cに温めた 30 ml の培地にてカラム通過(PEC-Nfc)細胞を集めた。

⑧ 脾臓細胞および胸腺細胞の採集：マウスを頸椎脱臼により屠殺し, 脾臓と胸腺を取り出した。これらを培地中で単細胞にほぐし, 細胞の凝集片

をナイロンメッシュにて除去し, 洗浄後, 細胞浮遊液として使用した。

⑨ Tリンパ球の精製：PEC-Nfc 細胞, 脾臓および胸腺細胞をそれぞれ 2×10^7 個/ml に調製し, この 2 ml に 1 ml の抗 Ia^k 抗体(5 倍に希釈したもの), 1 ml の抗 Mac-1 抗体(20 μ g)そして 1 ml の抗 LR-1 抗体(100 倍希釈)を加え氷中で 60 分間インキュベートした。その後, 2 倍に希釈した補体 1 ml を加え, 37°C30 分間インキュベートした。

これらの細胞を培地にて洗浄後, セファデックス G-10 を 15 ml 含むカラムを通過させ, それらの細胞を精製 Tリンパ球としてそれぞれ PEC 由来 Tリンパ球 (PEC-T), 脾臓細胞(splenic-T)および胸腺由来(thymic-T) Tリンパ球として使用した。

⑩ PECよりの Bリンパ球の精製： 2×10^7 個/ml に調製した PEC 細胞液 3 ml に 1 ml の抗 Thy-1(100 倍希釈)および抗 Mac-1 抗体(20 μ g)を加え氷中で 60 分間インキュベートした。その後 2 倍に希釈した補体 1 ml を加え, 37°C30 分間インキュベートした。これらの細胞液をセファデックス G-10 のカラムを通過させ, その細胞を Bリンパ球として使用した。

⑪ 細胞培養と活性化の測定：培地を用い, 一定数の細胞を 96 穴のマイクロプレートにて 5% CO₂-95% 空気中 37°Cの条件下で 48 時間培養し, 培養終了の 20 時間前にウエル当り 37 KBq の ³H-サイミジン (³H-TdR) を加え, 細胞内に取り込まれた ³H-TdR の量を液体シンチレーションカウンタ(ALOKA 社, 東京)で測定した。

結果

(1) マウス Tリンパ球の LPS に対する反応
C3H/HeN マウスの PEC-T, splenic-T および thymic-T を種々な量の LPS 共存下で 48 時間培養し, ³H-TdR の細胞内への取り込み量を測定した。その結果を表 1 に示した。

表 1 に認められるように, PEC-T リンパ球のみが LPS の共存量に依存して ³H-TdR の取り込み量の増加がみられ, thymic および splenic-T リンパ球ではそのような取り込み増加は認められなかった。

表 1 LPS によるマウス腹腔内滲出細胞由来Tリンパ球の活性化

LPS の培地への 添加量 (μg)	^3H -サイミジンの取り込み量 ($\times 10^{-3}$ cpm/培養細胞)*		
	胸腺Tリンパ球	脾臓Tリンパ球	腹腔内Tリンパ球
0	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.6 ± 0.4
0.1	0.2 ± 0	2.1 ± 1.0	5.5 ± 1.2
1	0.3 ± 0.1	2.2 ± 0.6	15.6 ± 1.5
10	0.3 ± 0	2.0 ± 0.5	12.6 ± 0.3

*: 胸腺Tリンパ球は 5×10^5 細胞/0.2 ml/培養, 脾臓, および腹腔内Tリンパ球は 1×10^5 細胞/0.2 ml/培養で 48 時間培養した。

図 1 歯周疾患関連細菌由来 LPS の腹腔内Tリンパ球活性化の比較

腹腔内Tリンパ球 (パネルA) およびBリンパ球 (パネルB), 1×10^5 細胞/0.2 ml/培養にそれぞれ *S. typhimurium* LT2(○), *P. gingivalis* (▲), *P. intermedia* (●) および *F. nucleatum* (■) の LPS を添加し 48 時間培養した。培養終了の 20 時間前に ^3H -サイミジンを加えた。

(2) C3H/HeJ マウスのTリンパ球の LPS への反応

C3H/HeJ マウスの PEC-T リンパ球の LPS への反応性の有無を検討した。C3H/HeJ および C3H/HeN マウス PEC-T リンパ球をさまざまな量の LPS 共存下で培養し、48 時間後の ^3H -TdR の取り込み量を測定した。表 2 に認められるように、C3H/HeJ の PEC-T リンパ球は LPS に反応し ^3H -TdR の取り込み増加を示さなかった。

(3) 歯周疾患関連細菌由来 LPS の PEC-T リンパ球への作用の比較

P. gingivalis や *P. intermedia* の LPS は腸内細菌の LPS とは化学構造や生物活性が大きく異なることが知られている⁵⁾。そこでこれら LPS の PEC-T リンパ球への活性化作用の有無とその強さを *S. typhimurium* の LPS と比較した。対照として PEC 由来Bリンパ球についても行った。 1×10^5 個の PEC-T およびBリンパ球それぞれに 0.1~10 μg の LPS を共存下あるいは非共存下で 48 時間培養し、 ^3H -TdR の取り込み量を測定した。その結果を図 1 に示した。

パネルAが PEC-T, パネルBが PEC-B リンパ

表 2 C3H/HeN および C3H/HeJ マウスの腹腔内渗出細胞
由来Tリンパ球の LPS 反応性

LPS の培地への 添加量 (μg)	^3H -サイミジンの取り込み量 ($\times 10^{-3}$ cpm/培養細胞) *	
	C3H/HeN	C3H/HeJ
0	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1
0.1	5.2 ± 0.5	0.7 ± 0.1
1	7.7 ± 1.2	0.8 ± 0.1
10	5.5 ± 0.4	0.8 ± 0.1

*：腹腔内Tリンパ球は 1×10^5 細胞/0.2 ml/培養で 48 時間培養した。表 3 抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体による腹腔内Tリンパ球の
LPS 反応の抑制

腹腔内Tリンパ球 の前処理 * ¹⁾	培地への 添加 * ²⁾	^3H -サイミジン 取り込み量 ($\times 10^{-3}$ cpm/培養細胞) * ³⁾
無処理	—	1.4 ± 0.6
	LPS	10.5 ± 1.1
抗 Thy-1	—	1.1 ± 0.3
抗体と補体	LPS	1.8 ± 0.2
抗 $\alpha\beta$ TCR	—	1.2 ± 0.3
抗体と補体	LPS	8.0 ± 0.2
抗 $\gamma\delta$ TCR	—	1.3 ± 0.2
抗体と補体	LPS	1.9 ± 0.1

*¹⁾：腹腔内渗出細胞由来Tリンパ球 3×10^6 細胞/ 1 ml
にそれぞれの抗体を加え氷中で 60 分間反応後、補
体を加え 37°C 30 分処理した。*²⁾：LPS の量は $1 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ /培養*³⁾： 1×10^5 細胞/0.2 ml/培養で 48 時間培養

球の結果である。Bリンパ球は *P. intermedia* の LPS により *S. typhimurium* の LPS にくらべ強い ^3H -TdR の取り込み増加を示すが、Tリンパ球は双方同程度の ^3H -TdR の取り込みを示した。

(4) LPS に反応する PEC-T リンパ球の種類

LPS に反応する PEC-T リンパ球がどのようなTリンパ球なのかを検討した。PEC-T リンパ球を 1×10^6 個/ml に調製し、それらの細胞にそれぞれ抗 Thy-1 抗体(100 倍希釈)、抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体($25 \mu\text{g}$)、そして抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体($25 \mu\text{g}$)を加え、氷中で 60 分間静置した。さらにそれら抗体処理細胞にモルモット補体(最終濃度 10 倍)を 37°C 30 分間作用させ、洗浄後、LPS の共存あるいは非共存下で 48 時間培養し、 ^3H -TdR の取り込み量を測定した。その結果を表 3 に示した。

PEC-T リンパ球の LPS 反応性は抗 Thy-1 と

表 4 胸腺由来Tリンパ球の抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体と
LPS による活性化

胸腺Tリンパ球培 養培地への添加物 * ¹⁾	^3H -サイミジン 取り込み量 ($\times 10^{-2}$ cpm/培養細胞) * ²⁾
NONE	1.5 ± 0.2
LPS	1.8 ± 0.2
抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体	1.6 ± 0.4
抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体+LPS	1.7 ± 0.6
抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体	1.9 ± 0.2
抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体+LPS	14.1 ± 0.3

*¹⁾：LPS： $1 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ /培養抗 $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ TCR 抗体： $2 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ /培養*²⁾：胸腺Tリンパ球は 5×10^5 細胞/0.2 ml/培養で 48 時間培養した。

抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体と補体処理により消失し、抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体と補体処理では LPS 反応性が認められた。これらの成績は LPS に反応するTリンパ球は $\gamma\delta$ 型Tリンパ球であることを示すと考えられる。

(5) $\gamma\delta$ 型Tリンパ球の LPS 反応性の獲得

Thymic-T リンパ球は表 1 に示すように、LPS に反応を示さなかった。ところがプロテオースペプトン投与マウスからの PEC-T リンパ球の $\gamma\delta$ 型Tリンパ球は LPS により活性化された(表 3)。これらの成績は抗原の刺激を受けた $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が LPS に反応を示すようになることを示唆すると推測される。そこで thymic-T リンパ球が TCR への刺激で LPS 反応を示すようになるかを検討した。

5×10^6 の thymic-T リンパ球を $2 \mu\text{g}$ の抗 $\alpha\beta$ あるいは抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体と LPS の共存下、あるいは LPS や抗 TCR 抗体それぞれ単独共存下で 48 時間培養し、細胞による ^3H -TdR の取り込み

量を測定した。その結果を表4に示した。thymic-T リンパ球は抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体と LPS の共存下で ^3H -TdR の取り込み増加が認められ、抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体と LPS ではそのような増加は認められなかった。

考 察

LPS がマウス B リンパ球に対する強力なマイトジェンであることはよく知られている⁶⁾が、T リンパ球にはそのような作用は示さないと考えられてきた。しかし、ある種の T リンパ球は LPS により活性化される。抗原と LPS を投与されたマウスの脾臓内 T リンパ球は抗原のみを投与されたマウスにくらべ高い DNA 合成を示す⁷⁾ことや、T リンパ球をあらかじめレクチンや抗原で刺激し LPS を作用させると強い分裂を示す⁸⁻¹⁰⁾。

さらに、Vogel ら³⁾は、ある種の T リンパ球株化細胞が LPS によりいちじるしく分裂することや、マウス脾臓細胞中の T リンパ球のうち約 3% の細胞が LPS に反応し活性化させることを示している。

今回、筆者らはプロテオースペプトン投与された C3H/HeN マウスの PEC-T リンパ球が LPS により活性化されることを示した。また、この反応は B リンパ球やマクロファージの LPS への反応が第4番目の常染色体上にある *lps*-locus の異常に基づき無反応とされる C3H/HeJ マウス¹¹⁾の PEC-T リンパ球では不反応であった(表2)。

さらに、LPS のなかでもその化学構造が異なり、その B リンパ球や他の細胞に対する生物活性が腸内細菌の LPS にくらべいちじるしく強い、あるいは腸内細菌 LPS にない活性をもつとされる歯周疾患関連菌の中の *P. intermedia* や *P. gingivalis* の LPS⁵⁾ の T リンパ球への作用を調べると、どの LPS も PEC-T リンパ球への作用が認められたが、LPS によってその強さが異なり、*P. intermedia* の LPS は *S. typhimurium* の LPS の作用と同程度であり、*P. gingivalis* の LPS は弱い作用であった。B リンパ球に対して認められる *P. intermedia* LPS の強いマイトジェン作用は認められなかった(図1)。

LPS に反応する PEC-T リンパ球は抗 Thy-1 や抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体と補体で処理することで LPS

反応性が消失したことから、LPS に反応性を示す細胞は $\gamma\delta$ 型 T リンパ球であると考えられる。 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は PEC-T リンパ球群のみならず thymic-T にもそして splenic-T リンパ球群のなかに数%存在する。また、抹消血や組織中の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は *Salmonella*¹²⁾、*Mycobacterium*^{13,14)} あるいは *Listeria*¹⁵⁾ 感染で増加し、その $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は mycobacterial antigen (PPD) や heat shock protein (Hsp) を認識して分化する¹³⁻¹⁷⁾。したがって、今回の PEC-T リンパ球のみが LPS に反応し thymic-T や splenic-T リンパ球が LPS 不反応であったのは、プロテオースペプトン投与が LPS に反応するような刺激効果を与えているものと推測される。したがって、LPS は刺激を受けない $\gamma\delta$ 型 T リンパ球には作用せず、なんらかの刺激を受けた $\gamma\delta$ 型 T リンパ球に作用することと考えられる。事実、LPS に不反応な thymic-T リンパ球を *in vitro* の培養系で、抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体共存下で LPS を作用させると thymic-T リンパ球も LPS に反応を示した。

以上の知見は、LPS が $\gamma\delta$ TCR へのなんらかの刺激を受けた $\gamma\delta$ 型 T リンパ球に作用し活性化させる作用をもつことを示すと考えられる。

文 献

- 1) Morrison, D. C., Ryan, J. L. : Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* 28 : 293-450, 1979.
- 2) Nathan, C. F. : Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79 : 319-326, 1987.
- 3) Vogel, S. N., Hilfiker, M. L., Caulfield, M. J. : Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 130 : 1774-1779, 1983.
- 4) Westphal, O., Lüderitz, O. : Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien. *Angew. Chem.* 66 : 407-417, 1954.
- 5) Hamada, S., Koga, T., Nishihara, T., Fujiwara, T., Okahashi, N. : Characterization and immunobiologic activities of lipopolysaccharides from periodontal bacteria. *Adv. Dent. Res.* 2 : 284-291, 1988.
- 6) Janossy, G., Greaves, M. F., Doenhoff, M. J., Snajdr, J. : Lymphocyte activation. V. Quantitation of the proliferative response to mitogen using defined T and B cell population. *Clin. Exp. Im.* 14 : 581-596, 1973.
- 7) Mita, A., Ohta, H., Mita, T. : Induction of specific T cell proliferation by lipid A in mice immunized with sheep red blood cells. *J. Immunol.* 128 : 1709-1711, 1982.
- 8) Bismuth, G., Duphot, M., Theze, J. : LPS and spe-

- cific T cell responses: Interleukin 1(IL-1)-independent amplification of antigen-specific T helper(TH) cell proliferation. J. Immunol. 134: 1415-1421, 1985.
- 9) Nitta, T., Imai, H., Ogasawara, Y., Hirayama, N., Nakano, M.: Antigen-specific proliferative response of peritoneal exudate lymphocytes primed with antigen and bacterial lipopolysaccharide: The roles of Ia⁺ accessory cells and IL-2. Microbiol. Immunol. 37: 953-960, 1993.
 - 10) Nitta, T., Konno-Ejiri, H., Nemoto, K., Okumura, S., Ozawa, A., Nakano, M.: The roles of interleukins in the synergistic effect of B-cell mitogens with concanavalin A on hydrocortisone-resistant thymic cell population. Immunology 59: 209-216, 1986.
 - 11) Sultz, B. M.: Genetic control of leukocyte responses to endotoxin. Nature 219: 1253-1254, 1968.
 - 12) Emoto, M., Danbara, H., Yoshikai, Y.: Induction of $\gamma\delta$ T cells in murine salmonellosis by an avirulent but not by a virulent strain of *Salmonella choleraesuis*. J. Exp. Med. 176: 362-372, 1992.
 - 13) Janis, E. M., Kaufman, S. H. E., Schwartz, R. H., Pardoll, D. M.: Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Science 244: 713-716, 1989.
 - 14) Inoue, T., Yoshikai, Y., Matsuzaki, G., Nomoto, K.: Early appearing $\gamma\delta$ -bearing T cells during infection with Calmette Guerin Bacillus. J. Immunol. 146: 2754-2762, 1991.
 - 15) Ohga, S., Yoshikai, Y., Takeda, Y., Hiromatsu, K., Nomoto, K.: Sequential appearance of $\gamma\delta$ - and α/β -bearing T cells in the peritoneal cavity during an i. p. infection with *Listeria monocytogenes*. Eur. J. Immunol. 20: 533-538, 1990.
 - 16) Porcelli, S., Brenner, M. B., Band, H.: Biology of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor. Immunol Rev. 120: 137-183, 1991.
 - 17) Young, R. A., Elliott, T. J.: Stress proteins, infection, and immune surveillance. Cell 59: 5-8, 1989.