

8 環境微生物由来リポ多糖曝露による免疫応答評価のためのアッセイ細胞選定

Selection of cell lines for evaluating immune responses caused by exposure to bacterial lipopolysaccharides in aquatic environment

京都大学大学院 野村昌弘 西日本旅客鉄道株式会社 但馬智之
京都大学大学院 大河内由美子 伊藤禎彦
Kyoto Univ. Masahiro Nomura
West Japan Railway Company Satoshi Tajima
Kyoto Univ. Yumiko Ohkouchi, Sadahiko Itoh

1. はじめに

エンドトキシンはグラム陰性菌やシアノバクテリアの細胞外膜構成物質であるリポ多糖 (LPS : Lipopolysaccharides) が示す生物活性であり、ヒトの体内に取り込まれると炎症、発熱などの症状を引き起こす。水道水においても、水源におけるシアノバクテリアの異常増殖や配管内での微生物再増殖を受けてエンドトキシン濃度が上昇した場合、これに曝露されたヒトが健康被害を受ける可能性がある。水道水中エンドトキシン濃度は現在、カプトガニ血球抽出物 (LAL) を用いたアッセイにより定量的に評価されている。しかし、ヒトの免疫システムとは反応原理の異なる LAL アッセイが、ヒトに対するエンドトキシンの毒性指標として有効であるかは議論が続いている¹⁾。そこで本研究では、エンドトキシンのヒトに対する毒性を評価するためのより直接的な指標として炎症性サイトカインの産生に着目し、3 種類のヒト細胞を用いたエンドトキシン曝露実験を通じて環境水中のエンドトキシン濃度及び毒性変化の検出に適した細胞を選定する。また、水道原水である河川水中微生物由来 LPS を選定した細胞に曝露して、産生されるサイトカイン濃度およびそのパターンを調べる。さらに LAL アッセイによる評価結果ならびに大腸菌由来エンドトキシン曝露結果と比較し、水環境に普遍的に存在する微生物由来炎症誘発性物質に関する知見を集積する。

2. 実験方法

2.1 LPS 曝露に対する免疫応答評価のためのアッセイ細胞・条件検討

本研究ではアッセイ細胞の候補として、ヒトと環境の外部境界を構成する表皮のおよそ 95% を占めるケラチノサイト (正常ヒト成人乳房表皮角化細胞、クラボウ)、ならびにエンドトキシンが体内に取り込まれた際に免疫反応の中心を担う血球細胞として 2 種の単球細胞 CD14⁺ monocyte (白血球由来ヒト単球正常細胞、Lonza)、THP-1 (白血病ヒト由来単球細胞、JCRB 0112.1) の免疫担当細胞 3 種類を検討した。これらの細胞懸濁液を 96 ウェルマイクロプレートに 100 μ L ずつ播種して 37°C CO₂ 濃度 5% で前培養した後に、エンドトキシンフリー水で調製した精製 LPS (*E.coli* O55:B5 由来、Sigma Aldrich Japan) 溶液を 10 μ L ずつ曝露した。一定時間曝露後にこの細胞培養液を遠心分離して、上清中のサイトカインを測定し

表 1 細胞培養・LPS 曝露条件

	ケラチノサイト	CD14 ⁺ monocyte	THP-1
基礎培地	EpilifeTM (GIBCO)	LGM-3 (Lonza)	RPMI 1640
添加物質	EDGS	10% FBS	5% FBS
継代数	4	2~3	不明
細胞播種濃度	1.0 $\times$ 10 ⁵ cells/mL	1.0 $\times$ 10 ⁶ cells/mL	1.0 $\times$ 10 ⁶ cells/mL
前培養	24 時間	3 時間	3 時間
曝露時間	48時間	6時間、24時間	6時間、24時間
サイトカイン	IL-8、TNF- α	IL-8、TNF- α	IL-8、TNF- α

た。測定には Human IL-8 ELISA 及び Human TNF- α ELISA (Tepnel Life Science) を用いた。細胞培養・LPS 曝露の諸条件を表 1 に示す。

2.2 環境微生物由来 LPS の細胞曝露

(1) 河川水の高分子画分濃縮

LPS を抽出する環境水試料として、2010 年 12 月 26 日に淀川(採水地点は大阪市淀川大堰付近)で 20 L 採水した。河川水中の全微生物数は DAPI 染色後蛍光顕微鏡観察により測定し、またエンドトキシン濃度は LAL アッセイにより測定した。LAL アッセイにはパイロクロム(生化学バイオビジネス)およびリムルス KY テストワコー(和光純薬)を用いた。この河川水をガラス繊維ろ紙(GA-100, ADVANTEC)を用いてろ過し SS を除去した後、分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜(Q0100, ADVANTEC)により分子量 10 ~ 20 kDa 程度²⁾である LPS が含まれる高分子画分を濃縮し、凍結乾燥した。

(2) LPS 抽出

Bernardová ら³⁾の方法に従い、以下の LPS 抽出・精製操作を行った。(1)で得られた LPS 濃縮物をエンドトキシンフリー水 30 mL に溶解し、等量の 90% フェノール溶液を加えて 65 ~ 70°C で 15 分間激しく攪拌した。遠心分離により LPS が含まれる水層を回収し、再びエンドトキシンフリー水 30 mL を加えて同条件で攪拌および水層の回収を行った。2 回の抽出操作で回収した水層を混合し、分画分子量 1 kDa の透析膜(Spectra/Por 7, Spectrum labo)を用いて 3 ~ 4 日間エンドトキシンフリー水に対して透析を行った後に凍結乾燥した。

(3) LPS 精製 (RNA の除去)

(2)で得られた抽出 LPS から RNA を除去するために、25 μ g/mL RNase A 溶液 30 mL に溶解し、37°C で 16 時間インキュベートした。等量の 90% フェノール溶液を加えて、激しく攪拌した後に遠心分離し、水層を回収して (2)と同条件で透析を行った。さらに、分画分子量 3 kDa の限外ろ過膜(Amicon Ultra-15, Millipore)を用いて低分子物質を除去し、凍結乾燥した。

(4) LPS の濃度調整と細胞曝露

(3)で精製した LPS をエンドトキシンフリー水に溶解しろ過滅菌した。溶液のエンドトキシン活性を LAL アッセイにより測定した後、エンドトキシンフリー水で濃度調整したものを曝露試料として 2.1 で決定した細胞・条件で曝露及びサイトカイン測定を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 LPS 曝露に対する免疫応答評価のためのアッセイ細胞・条件の検討

ケラチノサイトの大腸菌由来 LPS 曝露による IL-8 産生量を図 1(a) に示す。30000 EU/mL 以下の LPS 曝露では IL-8 産生量に変化は見られず、45000 EU/mL 以上の曝露濃度のみで増加した。既往調査によると水道水中のエンドトキシン濃度が 1 ~ 10 EU/mL 程度⁴⁾、環境水中では 100 ~ 7000 EU/mL 程度⁵⁾であるが、ケラチノサイトはそれらのエンドトキシン濃度では免疫応答が観察できないため、本研究で用いるアッセイ細胞には適さないと判断した。なお、LPS 曝露による TNF- α の増加は見られなかった。

CD14⁺ monocyte については、6 時間曝露の結果のみを図 1(b) に示す。ここには示していないが、24 時間曝露時の TNF- α 産生量は最大 0.25 ng/10⁶ cells 程度と 6 時間曝露時と比較して非常に少なく、いったん産生された TNF- α が 24 時間の曝露中に分解されたと考えられる。そのため、6 時間がより適切な曝露時間と判断した。CD14⁺ monocyte はわずか 0.3 EU/mL の曝露により高濃度のサイトカインを産生し、それ以上の濃度で曝露しても産生量の増加は見られなかった。つまり、低濃度エンドトキシンの定性的検出には適しているが、水道水や環境水のエンドトキシンについて評価を行うには多段階の希釈が必要となり、測定誤差の原因となるため、CD14⁺ monocyte も本研究の目的には適さないと判断した。

THP-1 についても CD14⁺ monocyte と同様、6 時間曝露が適していると判断できた。結果を図 1(c) に

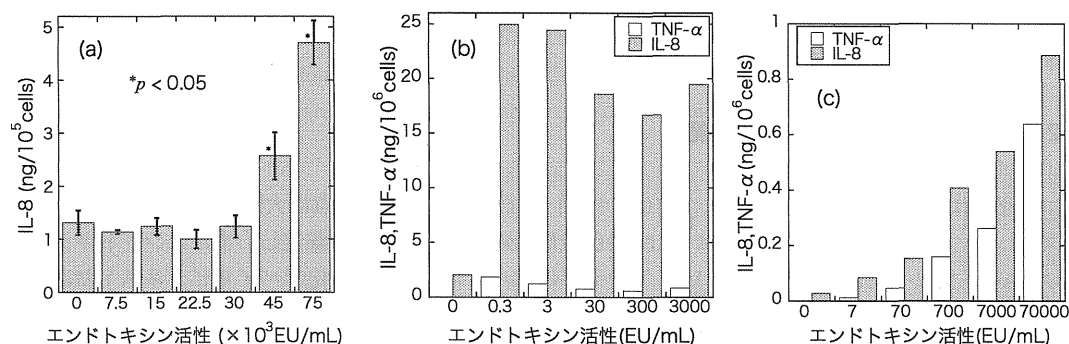


図1 大腸菌由来 LPS 曝露による各ヒト細胞のサイトカイン産生
(a) ケラチノサイト (b) CD14⁺ monocyte (c) THP-1

示す。THP-1 では 7～70000 EU/mL の曝露濃度で LPS 濃度依存的に IL-8、TNF- α 共に産生量が増加した。この結果は、前述の水道水及び環境水に近い広範囲のエンドトキシン濃度でその変化を検出できる可能性を示している。そのため 3 細胞のうち最もアッセイ細胞に適していると判断した。

ヒトの外部境界を構成するケラチノサイトでは、LPS 曝露によるサイトカイン産生の結果をヒトに対する毒性の強さにより直接的に解釈できるが、THP-1 は血球細胞であるため直接 LPS に曝露されることは少ない。起こりうる LPS 曝露形態としては創傷部位における曝露等、ごく限られたケースである。また実際にエンドトキシンがヒト体内に取り込まれた場合、種々の物理的、化学的な防御が作用するため、実際に血球細胞に対する曝露量を評価するためには各曝露経路における吸収効率を考慮する必要がある。

そのため、本研究で得られたサイトカイン産生量をエンドトキシン曝露による毒性指標として直接利用することは難しいものの、従来の LAL アッセイでは水道水や環境水におけるエンドトキシン濃度変動しかとらえられなかったのに対して、毒性（炎症誘発性）の変化を検出できる点が大きな利点と言える。

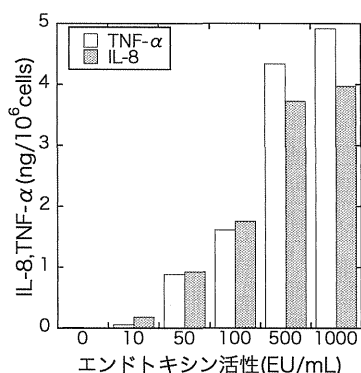


図2 環境微生物由来 LPS 曝露による THP-1 のサイトカイン産生

3.2 環境微生物由来 LPS の細胞曝露

河川水のエンドトキシン濃度は 440 EU/mL であった。また、微生物数は 3.9×10^5 cells/mL であり、これらの結果より単位微生物細胞あたりエンドトキシン活性は 1.1×10^{-3} EU/cells であることがわかった。

次に、抽出・精製後の環境微生物由来 LPS を THP-1 に曝露した場合のサイトカイン産生結果を図 2 に示す。わずか 50 EU/mL の LPS 曝露で TNF- α を 8.8×10^{-1} ng/10⁶ cells、IL-8 を 9.3×10^{-1} ng/10⁶ cells 産生し、図 1(c) に示した大腸菌由来 LPS を 70 EU/mL 曝露した時のサイトカイン産生量 (TNF- α : 4.7×10^{-2} ng/10⁶ cells、IL-8 : 1.5×10^{-1} ng/10⁶ cells) と比べると、TNF- α は約 19 倍、IL-8 は約 6 倍産生された。更に曝露濃度を上げるにつれてサイトカイン産生量は増加し、1000 EU/mL 曝露では TNF- α を 4.9 ng/10⁶ cells、IL-8 を 4.0 ng/10⁶ cells 産生した。

環境微生物と大腸菌、それぞれ由来の異なる LPS 曝露によりこのように、サイトカイン産生量およびパターンが大きく異なる原因の一つとして、LPS 以外の物質がヒト細胞のサイトカイン産生に影響を与えている可能性がある。Skovbjerg ら⁶⁾が PBMCs (末梢血単核球) に 37 種の不活化した細菌を曝露し、7 種のサイトカイン産生量を測定した。その結果、グラム陽性菌曝露により IL-12、IFN- γ 、TNF、IL-1 β をグラム陰性菌より高濃度で産生し、IL-6、IL-8、IL-10 ではその逆であるという傾向を報告している。

この差異は種々の微生物由来物質ごとに免疫応答誘発性が異なるためと考えられる。本研究でも THP-1 に環境微生物由来 LPS を曝露した結果 (図 2)、大腸菌由来 LPS 曝露時 (図 1(c)) と比較して $\text{TNF-}\alpha$ の産生量が大幅に増加した。しかし、Nakagawa ら⁷⁾はヒトの血液細胞に LPS 及びペプチドグリカン、黄色ブドウ球菌、Poly(I:C) の 4 種の発熱物質を曝露し、サイトカイン産生量を測定した結果、LPS がより低濃度の曝露で IL-6、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 の産生を誘発するのに対して、他の物質では同じサイトカインを産生させるのに LPS の 500 倍以上の濃度が必要となることを示した。本研究で用いた細胞とは異なるものの、LPS は他の微生物由来発熱物質と比較してはるかに強い免疫応答誘発性を有すると考えられることから、本研究で観察された環境微生物由来 LPS 曝露によるより強いサイトカイン産生は環境微生物と大腸菌の LPS 構造の差異によるものと推測できる。

これらの結果より、LAL アッセイにより測定したエンドトキシン活性のみからは、ヒト細胞における免疫応答の強さを推定できないことが示された。よって、エンドトキシンが誘発する炎症作用の強さを推定するには、反応メカニズムがヒトと異なる LAL を用いるよりも、ヒト細胞を用いたアッセイの方が適切であると言える。また、ヒト細胞における免疫応答評価で用いられる LPS は多くが大腸菌由来であるが、環境微生物由来 LPS が大腸菌由来 LPS よりも非常に強い免疫応答を誘発したことから、大腸菌由来 LPS を用いたアッセイのみから LPS のヒトに対する影響を推定すると、影響の過小評価につながる可能性があるため注意が必要である。

4. 結論

本研究では、環境微生物由来 LPS に対してヒト細胞が示す免疫応答評価を目的として、アッセイに適した細胞と条件の選定を行った。得られた主要な知見を以下に示す。

- 1) ケラチノサイト、 CD14^+ monocyte、ならびに THP-1 の 3 細胞の LPS 曝露による免疫応答評価を IL-8 および $\text{TNF-}\alpha$ の産生を指標として比較した。その結果、THP-1 を用いて 6 時間の曝露を行うアッセイ系が最適であった。
- 2) 由来微生物の異なる LPS を THP-1 に曝露すると、LAL アッセイにより測定したエンドトキシン活性が同程度であっても誘発する免疫応答の強さは大きく異なった。よって、エンドトキシンのヒトに対する影響を推定するには、ヒトの免疫システムと異なる原理で反応する LAL を用いたアッセイよりも、ヒト細胞を用いたアッセイが適している。
- 3) 環境微生物由来 LPS は大腸菌由来 LPS よりも強い免疫応答を誘発した。このように環境水中には強い免疫応答を誘発する微生物が普遍的に存在するため、その情報集積が必要である。

参考文献

- 1) Eperon, S. and Jungi, T.W.: The use of human monocyte lines as indicators of endotoxin, *J. Immunol. Methods.*, Vol.194, No.2, pp.121-129, 1996
- 2) Petsch, D. and Anspach, F. B.: Endotoxin removal from protein solutions, *J. Biotechnol.*, Vol.76, No.2-3, pp.97-119, 2000.
- 3) Bernardová, K., Babica, P., Marsálek, B. and Bláha, L.: Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga, *J. Appl. Toxicol.*, Vol.28, pp.72-77, 2008.
- 4) Ohkouchi, Y., Ly, B.T. and Itoh, S.: Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator, *Advances in Asian Environ. Eng.*, pp.13-19, 2009.
- 5) Takigami, H.: Toxicological Risk Assessment of Environmental Waters Using Bioassays, 京都大学学位論文, 1998.
- 6) Skovbjerg, S., Martner, A., Hynsjo, L., Hesse, C., Olsen, I., Dewhirst, F.E., Tham, W. and Wold, A.E.: Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness, *J. Interferon Cytokine Res.*, Vol.30, No.1, pp.23-32, 2010
- 7) Nakagawa, Y., Maeda, H. and Murai, T.: Evaluation of the In Vitro Pyrogen Test System Based on Proinflammatory Cytokine Release from Human Monocytes: Comparison with a Human Whole Blood Culture Test System and with the Rabbit Pyrogen Test, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Vol.9, No.3, pp.588-597, 2002

キーワード：リポ多糖, ヒト細胞, 免疫応答, 環境微生物, 河川水

Key Words：lipopolysaccharide, human cell, immune response, bacteria, river water