

細菌抗原に対する口蓋扁桃の免疫応答

田中紀充 福山 聡 牛飼雅人 黒野祐一

鹿児島大学耳鼻咽喉科学教室

Immune Responses of Mononuclear Cells Isolated from Palatine Tonsil against Bacterial Antigens

Norimitsu TANAKA, Satoshi FUKUYAMA, Masato USHIKAI and Yuichi KURONO
Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Kagoshima University.

Various bacteria and the antigens such as lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) always stimulate the mucosal surfaces of upper respiratory tract. However, fatal responses such as endotoxin shock are rare to be observed, suggesting the presence of some regulatory system in tonsils. In this study, we examined the immune responses of tonsillar mononuclear cells against LPS and LTA.

Cytokines production (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) by palatine tonsil mononuclear cells (TNMC) in response to LPS or LTA was significantly lower than those of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Only a few CD14-positive cells were observed in palatine tonsil and the incidence of TLR4 expressing cells was lower than PBMC. The expression of TLR2, but not TLR4, was detected by RT-PCR. Those results suggest that CD14, TLR4 and TLR2 are associated with hypo-responses of palatine tonsil against LPS and LTA and that the mechanisms inducing immune responses might be different between LPS and LTA.

はじめに

口蓋扁桃の位置する咽頭を含め、上気道は常に外界の微生物と接触しており、この微生物に対して生体が適切に反応する事は、病原菌侵入阻止、あるいは常在菌に対する過剰反応防止の面から非常に重要と考えられている。しかし、口腔咽頭はグラム陰性菌のリポポリサッカライド（以下、LPS）やグラム陽性菌のリポタイコ酸（以下、LTA）などの菌体構成成分にさらされているにもかかわらず、血中で起こるエンドトキシンショックのような激しい反応は誘発されない。LPSに対する反応において、以前

よりLPS結合蛋白レセプターとしてCD14がよく知られているが、近年、Toll-Like Receptor（以下、TLR）が細菌特異的菌体構造を認識する受容体であることが明らかとなってきた¹⁾。

今回我々は、口蓋扁桃単核球（以下、TNMC）におけるLPS刺激に対する反応、及び、TLRの発現を、末梢血単核球（以下、PBMC）と比較し検討したので、若干の考察を加えて報告する。

材料と方法

当科において、慢性扁桃炎、習慣性扁桃炎の

診断にて口蓋扁桃摘出術を施行した18歳以上の成人15症例（男性10例，女性5例）から，同意を得たうえで口蓋扁桃組織および末梢血を採取し，これらを材料として用いた。尚，手術は，全身炎症所見なく，咽頭無症状もしくは軽度の時期に施行した。

口蓋扁桃組織，末梢血から比重遠沈法で分離したTNMC，PBMCを 10^6 個/mlに調整し，プレートに注入した。これに， $10\mu\text{g/ml}$ の当科で精製した*Haemophilus influenzae*のエンドトキシン（ET），*Escherichia coli*のLPS（SIGMA CHEMICAL CO.），*Streptococcus pyogenes*のLTA（SIGMA CHEMICAL CO.）の刺激下，または非刺激下に24時間（ 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ ）培養した。

得られた培養上清中の炎症性サイトカイン， $\text{TNF}\alpha$ ， $\text{IL-1}\beta$ ， IL-6 ， IL-8 をELISA法（BioSource International, Inc.）で測定した。

次に，TNMC，PBMCをFITC標識抗CD14抗体（Miltenyi Biotec），PE標識抗TLR4抗体（Miltenyi Biotec）で標識し，フローサイトメトリーにてCD14およびTLR4の発現を検討した。

また，刺激，非刺激後の単核球よりRNAを抽出し，RT-PCR法にてTLR2，TLR4の発現を観察した。

結 果

Fig.1にELISA法によるサイトカインの測定結果を示す。ET，LPS，LTAいずれの刺激においても，TNMCのサイトカイン産生はPBMCと比較して有意に低値を示した。

フローサイトメトリーにより，PBMCにはCD14陽性細胞が7.3%存在したが，TNMCには0.28%しか存在しなかった。また，PBMCのCD14陽性細胞の74.9%にTLR4の発現をみたが，TNMCにおいては，CD14陽性細胞の33.6%に発現しているのみであった。

Fig.2にてRT-PCRの結果を示す。TNMC

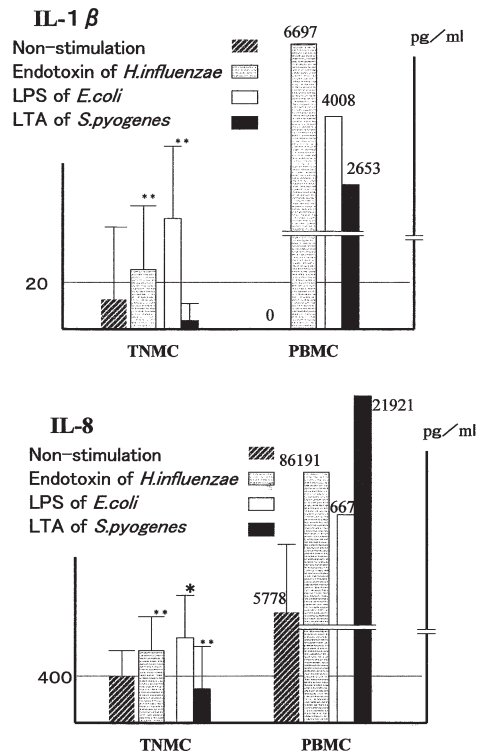


Fig. 1 Cytokines Production by Mononuclear Cells in Palatine Tonsil and Peripheral Blood Detected by ELISA

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with PBMC

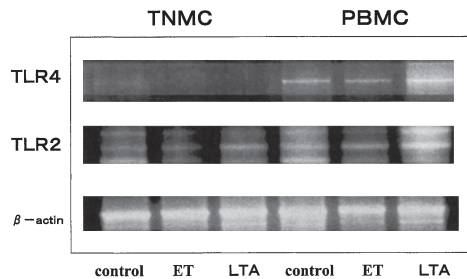


Fig. 2 RT-PCR findings of the expression of TLR4 and TLR2 gene targets

において，TLR4の発現はほとんど認められず，TLR2はPBMCと比較すると弱い傾向にあるが発現が認められた。ET，LTA刺激によるレセプター発現の変化はなかった。

考 察

今回の実験において、PBMCと比較して有意なTNMCにおけるLPS低反応性が観察された。そこで、どのようなメカニズムでこの低反応性をきたす結果となるのかを考察してみた。

まず、LPS等に対する抗原提示細胞である単球系細胞、すなわちCD14陽性細胞の細胞数が、末梢血中と比較し口蓋扁桃内に20分の1程度と少ないことがあげられる。今後、CD14陽性細胞を単離もしくは口蓋扁桃と末梢血で細胞数をそろえた考察が必要となる。しかし、刺激によるIL-8産生は末梢血の100から数100分の1しかなく、LTAに対する低反応性とあわせると細胞数の差のみによる現象とは考えにくい。口蓋扁桃CD14陽性細胞におけるTLR4の発現が低いこと、RT-PCRにてTLR4遺伝子発現が低いことより、今回の口蓋扁桃LPS低反応性にTLR4の発現が大きく関与している可能性が示唆される。

また、今回LPSに加えてLTAに対してもTNMCの低反応性が観察された。LPSはTLR4で、LTAはTLR2で認識されるとされている^{2, 3)}。RT-PCRにてTNMCにおけるTLR4とTLR2の発現に差があることから、同じ低反応でも、グラム陰性菌LPSに対してはTLR4のレセプターレベルの現象で、グラム陽性菌LTAに対してはレセプター以下のシグナル伝達レベルの現象である可能性が示唆される。

この口蓋扁桃におけるLPSおよびLTA刺激低反応性が、習慣性扁桃炎、慢性扁桃炎といった炎症が繰り返される病態にどのように関与するかについて、今後、さらに検討を要すると考えられた。

ま と め

口蓋扁桃のLPSに対する免疫応答を観察した。TNMCは、PBMCと比較してLPS・LTA刺激に対して低反応性を示した。この低反応性に、CD14、TLR4、TLR2の発現の関与が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Medzhitov R. Preston-Hurlburt P. & Janeway C. A. Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388:394-397, 1997.
- 2) Akira S. Takeda K. & Kaisho T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.*, 2: 675-680, 2001.
- 3) Hoshino K. Takeuchi O. Kawai T. Sanjo H. Ogawa T. Takeda Y. Takeda K. & Akira S.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.*, 162: 3749-3752, 1999.

質 疑 応 答

質問 原淵保明 (旭川医大)

非刺激時のサイトカイン産生は扁桃と末梢血核球で差があったのか。扁桃ではCD14やTLR陽性である単球が数%であるためにこのような結果になった可能性があるのか、単球のみを分離して培養実験をして欲しい。

応答 田中紀充 (鹿児島大)

CD14陽性細胞のcell populationの違いは先生ご指導の通りでございます。現段階では単離できておらず今後検討したいと考えております。無刺激におきましてもIL-6、IL-8に関しては末梢血にて産生認め口蓋扁桃におきましてもごく少量であります産生認めます。

質問 西崎和則（岡山大）

単核球の反応において他の白血球とのグルー
プコミュニケーションの中でどのような影響を
持つと考えられるか。

応答 田中紀充（鹿児島大）

御質問の内容については、未だ考察しておら
ず今後の研究課題とさせていただきます。

別刷り請求先および連絡先：田中紀充

〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8丁目35-1

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科教室

TEL 099-275-5410 FAX 099-264-8296