

原

著

マラリア感染マウス脳における胸腺外分化 T 細胞 (IL-2R β^+ TCR^{int} 細胞) 出現の検討

今井 邦 英

新潟大学大学院医歯学総合研究科
地域疾患制御学（免疫医動物学）専攻
（主任：安保 徹教授）

Expansion of IL-2R β^+ TCR^{int} cells in the brain of mice infected with malaria

Kunihide IMAI

Department of Immunology and Medical Zoology,
Graduate Student, School of Medicine, (Niigata University)
(Director: Prof. Toru ABO)

Abstract

Mice were injected with 10^4 parasitized (a nonlethal strain of *Plasmodium yoelii*) erythrocytes and parasitemia was enumerated in the blood. Parasitemia appeared from day 5 to day 28, showing a peak at day 18. At this peak time, lymphocytes were isolated from the brain, liver, spleen and blood. The number of lymphocyte yielded by these organs increased prominently. The phenotype of lymphocytes was examined by immunofluorescence tests. Brain lymphocytes were a mixture of IL-2R β^- CD3^{high} cells (conventional T cells) and IL-2R β^+ CD3^{int} cells (extrathymic T cells) before and after infection. This pattern was quite similar to that in the liver, the only difference being that NK1.1⁻ CD3^{int} cells (i.e., NKT cells) which were abundant in the liver were absent in the brain. In the case of the spleen and blood, the major lymphocytes were conventional T cells, irrespective of infection. In parallel with the increase of brain lymphocytes during infection, histology of the brain indicated the accumulation of such cells in the tissue. In the blood, parasitemia and body temperature were inversely correlated, i.e., body temperature decreased with parasitemia, and monocytes increased in number in the nonlethal-strain infection. In case of the

Reprint requests to: Kunihide IMAI
Department of Immunology and
Medical Zoology
Niigata University
1 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1番町
新潟大学免疫医動物学教室 今井 邦 英

lethal-strain infection, granulocytes increased in number in the blood and these mice died within day 5. These results suggest that brain lymphocytes might be associated with resistance or severity of malarial infection and that the major such lymphocytes were extrathymic T cells.

Key words: brain, extrathymic T cells, liver, malaria, TCR^{int} cells

はじめに

マクロファージは宿主の免疫機構の一環として、体全体に分布するのが一般的である。マクロファージは血液中に存在する場合単球と呼ばれるが、肝臓にあるものはクッパー細胞とよばれ、脳に存在するものはグリア細胞などと呼ばれる。マクロファージの場合と同様に、胸腺外分化 T 細胞も様々な臓器に存在する。このような臓器には、腸管²⁾⁻⁴⁾、肝臓⁵⁾⁻⁷⁾、外分泌腺 (例えば唾液腺や涙腺)⁸⁾ や子宮⁹⁾⁻¹⁰⁾ などがある。胸腺外分化 T 細胞が存在する臓器では、胸腺外分化 T 細胞自体は似たようなあるいは異なった分布を示すことがある。例えば、肝臓での胸腺外分化 T 細胞は、IL-2R β^+ TCR^{int} 細胞、NK1.1⁺ 細胞および NK1.1⁻ 細胞の混合したものである⁵⁾。NK1.1⁺ TCR^{int} 細胞は通常、NKT 細胞と呼ばれる¹¹⁾⁻¹⁵⁾。これらの T 細胞は、T 細胞レセプター (TCR)¹⁶⁾ に対し、V α 14J α 281 に関する様々なチェーンを有しており、CD1d 分子と一緒にある種の糖脂質 (具体的には α -galactosylceramide) を認識することができる¹⁷⁾。小腸の胸腺外分化 T 細胞は IL-2R β^+ (主として $\gamma \delta$ T 細胞) や IL-2R β^- (主として $\alpha \beta$ T 細胞) の混合したものであり、この場合、ほとんどの胸腺外分化 T 細胞は NK1.1⁻ 細胞であった¹⁸⁾⁻²⁰⁾。

胸腺外分化 T 細胞に関する所見の観点から考察するにあたり、脳は胸腺外分化 T 細胞を含有し、これらの胸腺外分化 T 細胞はマラリア感染後、細胞数が著しく増加することを確認しようと試みた。最近の研究で²¹⁾⁻²³⁾、われわれは数の上で胸腺外分化 T 細胞を刺激するもっとも有用な方法は、マラリア感染であることを報告している。この時、通常の T 細胞すなわち胸腺由来の IL-2R β^+ TCR^{high} は、胸腺の萎縮に伴い、細胞数が

著しく減少することが知られている。IL-2R β^+ TCR^{int} 細胞は脳でも確認され、これらの T 細胞はマラリア感染に伴い著しい増多をみることがわかった。この結果に基づくと脳も特異な増殖の仕方で胸腺外分化 T 細胞を含みこの T 細胞がマラリア感染に反応することが示唆される。この現象は脳マラリアにみられる症状に関連する可能性がある。

対象と方法

マウスとマラリア感染

C57BL/6 (通称 B6) の 8 から 20 週齢のマウスを実験に用いた。これらのマウスは特異抗原のない飼われることのない新潟大学動物実験施設で育成された。これらのマウスにマラリア感染を起こさせるために 1×10^4 /ml 個の赤血球に上述のマラリア非致死株の *P. yoelii* を感染させた²¹⁾。感染赤血球の数は Giemsa 染色を行った後、計測した。**細胞の抽出**

肝臓、脳からのリンパ球の抽出は既に報告した方法によって行った⁵⁾。すなわち、肝臓、脳の組織は摘出した後、200-gauge のステンレスのスチールメッシュを通し、Eagle MEM (ニッスイ社) に 5mM の HEPES および加熱非活化した 2% 子牛血清を加えた培地を用いて suspend した。この medium で一度洗浄した後、細胞は 35% パーコール 15ml (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) によって 2000 回転 15 分間、比重遠心を行った。このペレットは、赤血球を破碎するため、再度 suspend を行った (lysing buffer の組成は 155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA-Na, 170mM Tris (pH 7.3))。脾リンパ球採取にあたっては、NH₄Cl を用いて赤血球の破碎を行った。他の報告では、この赤血球破碎の行程は、なお lysing buffer を用いて行っている施設もある。

Immunofluorescence tests

Immunofluorescence tests はリンパ球の phenotype を決定するために行われる¹⁸⁾. この行程は FITC-, PE-, Biotine-接合抗体を用いて行い, Biotine-接合抗体を用いての染色では, streptavidin (Caltag Lab., San Francisco, CA) による TRI-COLOR 染色を行った. ここで用いた抗体は, anti-CD3 (145-2C11), anti-IL-2R β (TM- β 1), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 (53-6.7), anti-erythrocyte (TER119) 抗体 (PharMingen, San Diego, CA) である. これらの細胞は FACScan (Becton-Dickinson Co., Mountain View, CA) で解析した. 非特異的抗体の結合を阻止するために, ラベル抗体による染色を行う前に CD16/32 (2.4G2) (PharMingen) を加えた. 死滅した細胞は, forward scatter, side scatter, propidium iodide gating によって, 排除した.

脳の病理学的検討

脳の病理組織は 10% リン酸緩衝フォルマリンで固定を行い, パラフィンに包埋した. 4 μ m の厚さに切片を作製し, ヘマトキシリン, エオジンで染色を行った.

統計学的解析

統計学的有意差の検討は, Student's t-test によって解析を行った.

結 果

マラリア感染後, 脳内のリンパ球数は著しく増加した.

マウスには 1×10^4 /ml 個の感染赤血球を腹腔内接種し, その末梢血中の感染赤血球数を経時的に計測した (図 1A). 感染赤血球は, 接種後 6 日目に初めて出現し 27 日目まで持続してみられた. ピークは 18 日目に認められた. 18 日目に, リンパ球はマウスの脳, 肝臓, 脾臓から抽出された. リンパ球数はいずれの臓器においても, 著増していた ($p < 0.05$) (図 1B).

リンパ球増多様式に関する脳と肝臓での一致と相違

われわれは, 胸腺外分化 T 細胞 (つまり IL-2R

$\beta + CD3^{int}$ 細胞) が正常マウスの肝臓で増多しており, このような胸腺外分化 T 細胞はマラリア感染後に数と比率において著しく増多することは既に報告した²¹⁾⁻²³⁾. この実験においては, 脳リンパ球の phenotype をマラリア感染の前後で, 肝臓のリンパ球の phenotype と比較している (図 2A). IL-2R $\beta + CD3^{int}$ 細胞はマラリア感染に伴い, 接種後 18 日目に増多することがわかった. 特に興味深いのは, IL-2R $\beta + CD3^{int}$ 細胞は存在比率が低いものの, 正常マウスの脳にも存在することである. また, IL-2R $\beta + CD3^{-}$ NK 細胞もマラリアに感染しているにも拘わらず, 脳にわずかな比率ながら存在するのである. さらに NKT 細胞の phenotype を決定するために, 脳のリンパ球に対し, CD3 と NK1.1 のいわゆる two-color 染色を行った. マラリア感染後, 約 10% の NKT 細胞が確認された. NK 細胞 (NK1.1 $+ CD3^{-}$) と NKT (NK1.1 $+ CD3^{int}$) は正常マウスの脳ではほとんどみられなかった. 続いて, B 細胞 (B220 $+ CD3^{int}$) と非定型的 T 細胞 (B220 $+ CD3^{-}$) を確認するために, B220, CD3 の抗体で two-color 染色を行った. その結果, 正常マウスの脳には, かなりの比率 (36.8%) で B220 $+ B cell$ を含んでいた. しかし, マラリア感染後, この population はむしろ減少し, 通常の T 細胞 (B220 $+ CD3^{+}$) がわずかにみられるようになった.

肝臓, 脾臓, 末梢血のリンパ球の phenotype も, マラリア感染の前後で検索した (図 2B). この検討の結果では, IL-2R $\beta + CD3^{int}$ 細胞 (つまり胸腺外 T 細胞) と IL-2R $\beta - CD3^{high}$ 細胞 (通常の T 細胞) とのいずれもが, 正常マウスの肝臓に存在していた. 脾臓では, T 細胞のほとんどは, IL-2R $\beta - CD3^{high}$ 細胞に分類された. マラリア感染後, IL-2R $\beta + CD3^{int}$ 細胞は肝臓で著しく増多していた. この T 細胞のほとんどは NK1.1 $- CD3^{int}$ であり, CD3 と NK1.1 の two-color 染色で示すとおりである. その結果, 非定型的 T 細胞 (すなわち B220 $+ CD3^{-}$) のあるものは, マラリア感染後の肝臓でみられた. これらの現象 (すなわち NK1.1 $- CD3^{int}$ と非定型的 T 細胞 B220 $+ T$ 細胞の混在) は脾臓や血液ではみられなかった. 換言

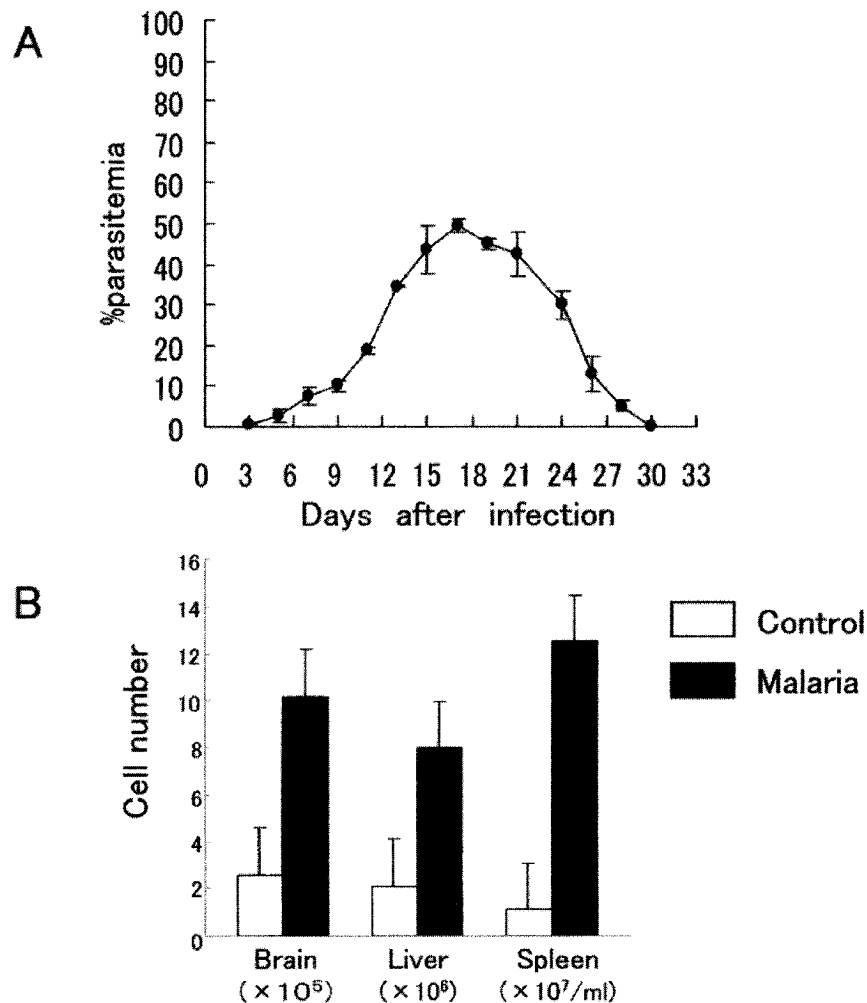


図1 マラリア感染中における経時的解析

A. 感染赤血球の推移 (%), B. 脳, 肝臓, 脾臓のリンパ球数. 感染赤血球数は非致死株の *P. yoelii* に感染させたマウスの梢血において計測した. 脳, 肝臓, 脾臓におけるリンパ球はマラリア感染後 18 日前後に抽出し, 総数を計測した. 平均および標準偏差は 4 回の実験を経て得られた.

すれば, マラリア感染後のリンパ球の分布は, 脳と肝臓で酷似していた.

マラリア感染経過中の脳病理組織

脳の組織は正常マウス (コントロール) および非致死株 *P. yoelii* 感染後 18 日目のマウスから摘出し, ヘマトキシリン, エオジンで染色を行った. コントロールマウス脳と比べると, マラリア感染マウスではリンパ球ならびに他の単核細胞の浸潤が認められた. これは immunofluorescence テス

トで, マラリア感染マウスにおいて胸腺外分化 T 細胞およびその他の細胞に一致するものと考えられる (図 3A, B).

マラリア感染経過における血液中の免疫学的パラメーターの変移

正常マウスの場合, リンパ球および単球の増多が認められる (図 4 左). マウスに *P. Yoelii* の非致死株 (17NXI) を感染させると, リンパ球の比率が減少し, 単球の比率が増加している (図 4 中

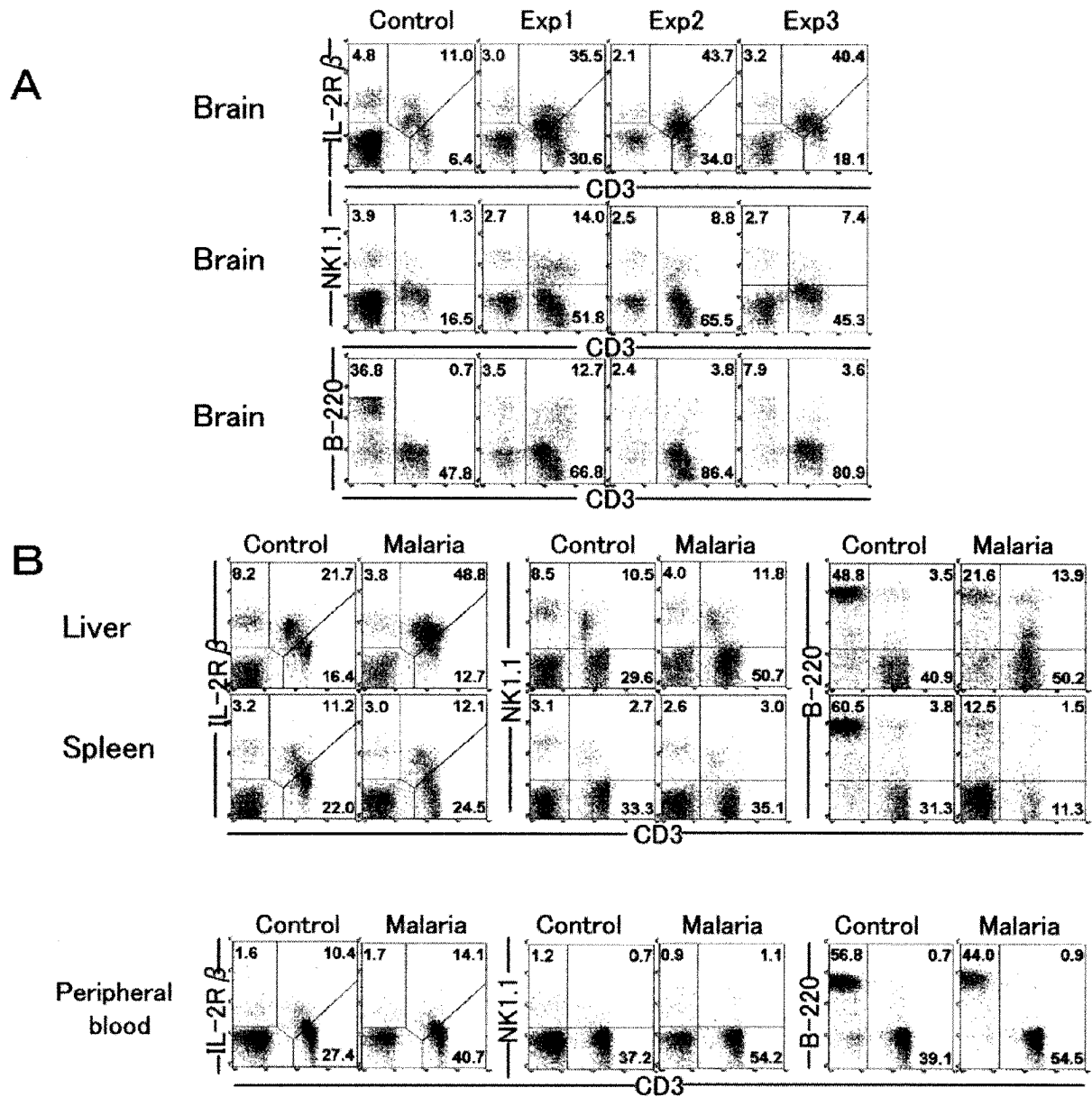


図2

脳リンパ球の Phenotype (A), 肝臓, 脾臓, 末梢血の Phenotype (B). リンパ球はすべて感染後18日目に抽出した. リンパ球の表面上の phenotype を確認するために Two-color 染色を行った. 図に示される数字は, 設定を行った領域での fluorescence 陽性の細胞が占める割合を示している.

央). 正常マウスにおいては, 体温は通常 38℃ に保たれる. これに対し, 感染赤血球の出現に伴い, 非致死株に感染したマウスの体温は低下した. しかし, 感染から回復しえたマウスの体温は正常に復した.

この実験の終局において, マウスに *P. Yoelii* の

致死株 (17XL) を感染させた (図4右). この実験群において得られた結果で注目すべきは, 顆粒球比率の著しい増加と体温の低下である. これらのマウスは著しい感染赤血球の増多を示しつつ, マラリア感染後約5日目に死亡した.

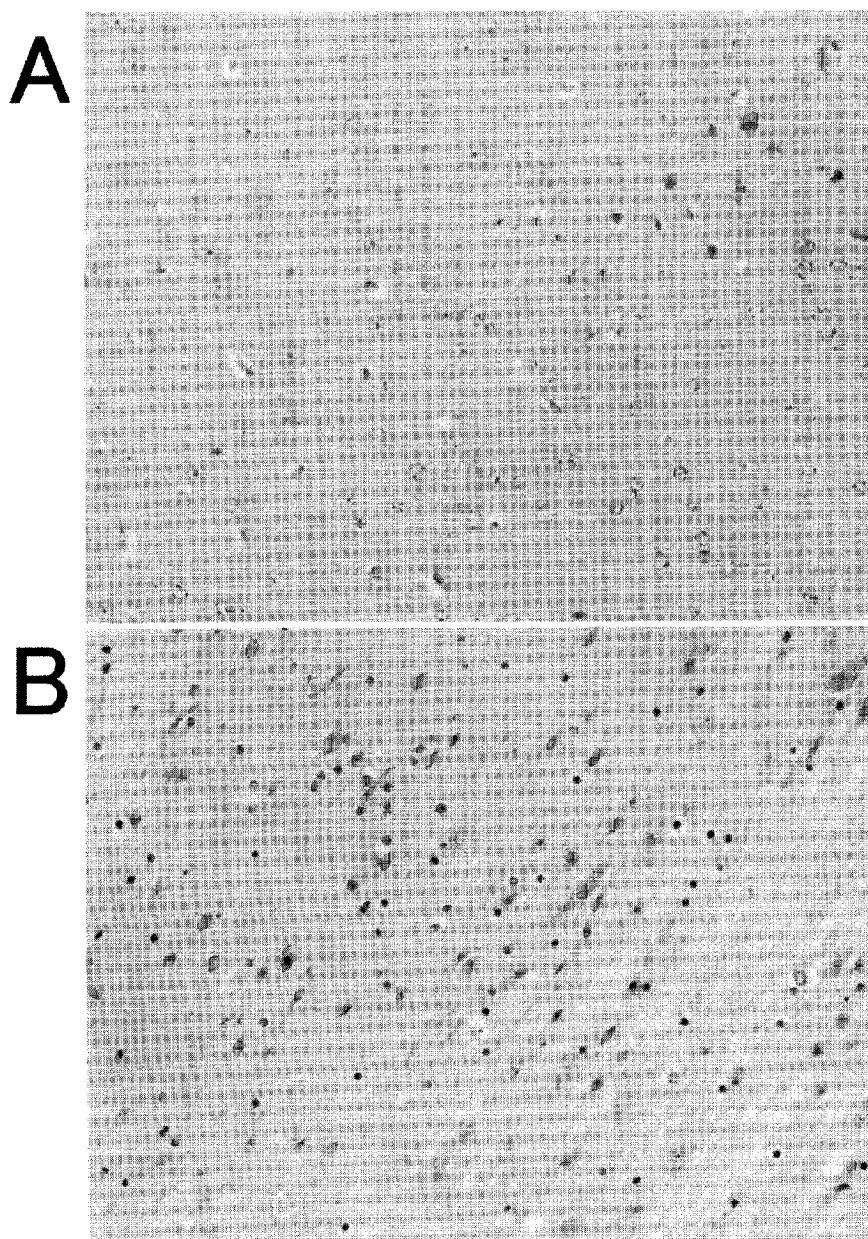


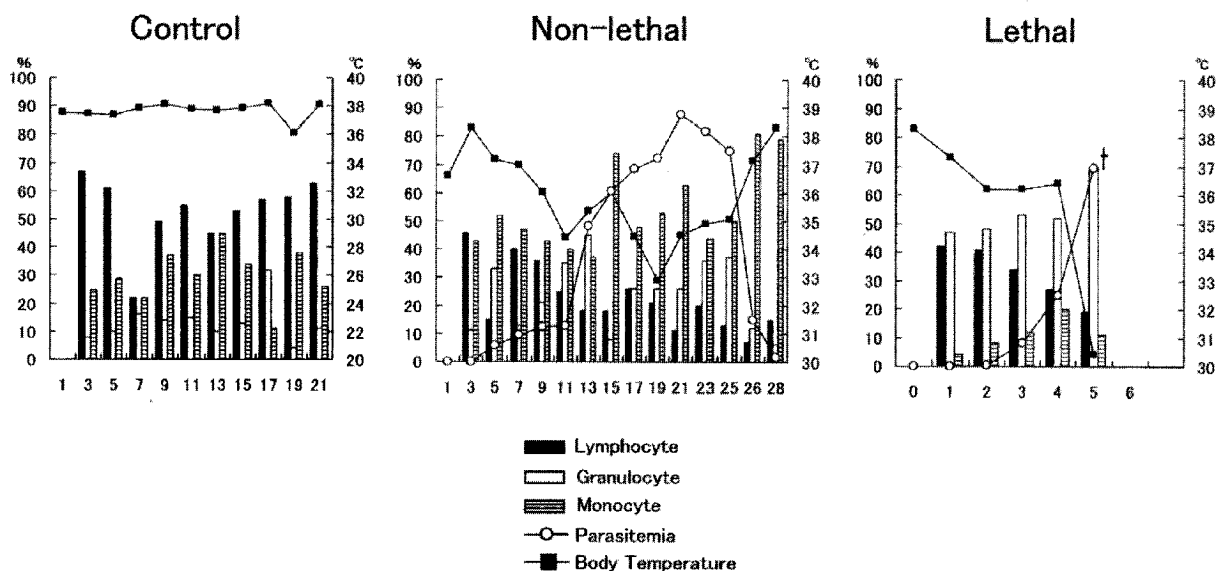
図3 脳の病理組織図 (×200).

A. コントロール B. マラリア感染マウス (感染後18日目).
ヘマトキシリンエオジン染色

考 察

本研究によってわれわれは、正常マウスの脳でも胸腺外分化 T 細胞でもみられるが、マラリア感染マウスの脳ではさらに同 T 細胞が著しく増多するのを確認した。これに関連し、肝臓では、IL-2R β^+ TCR^{int} の phenotype の胸腺外分化 T 細胞

を含有し、この type の T 細胞の中には、NK1.1⁺, NK1.1⁻のいずれも存在することがわかっており、このことは既に報告している⁵⁾。また、これも既に報告したとおり、胸腺が先天的に欠損しているヌードマウスでの T 細胞はすべて IL-2R β^+ NK1.1⁻ TCR^{int} に分類されることがわかっている²⁴⁾。したがって、本実験の結果は、脳でみられ



マラリア感染後、肝臓では同様に B220 陽性の T 細胞が増加していた (0.7 → 12.7 % 実験 1)。一方、脾臓と末梢血ではマラリアに感染しても、このような T 細胞はみられなかった。

マラリア感染の経過中、末梢血の免疫学的パラメーターは、一連の実験の最後に体温の経時的変化に平行して検索した。P. yoelii の感染例では、致死株ならびに非致死株とも感染赤血球の絶対数と体温は、ほぼ反比例の関係にある。すなわち、感染赤血球の数が多い例では、体温の低下が認められた。著しい体温の低下はおそらく循環不全が引き起こされているためと考えられる。このメカニズムとして、感染赤血球による主幹動脈の閉塞が、この循環不全に関わっている可能性がある。その根拠は、非致死株感染では単球の増多がみられるが、致死株感染では顆粒球が増加していることである。また、顆粒球は多量のスーパーオキシドの産生能を有するため、これが臓器損傷を引き起こしマウスは死に至ると考えられる。臓器損傷の中には肝不全も含まれ、これは顆粒球と胸腺外分化 T 細胞によって引き起こされるものと考えられる。いずれのケースでも、脳は臓器特異的な胸腺外分化 T 細胞を含み、このようなリンパ球が脳マラリア特有の神経症状に関わっていることが、本研究によって示唆されるのである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の指導を賜りました、免疫医動物学教室の安保徹教授、関川弘雄助教授、脳神経外科学教室の田中隆一教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Kobayashi Y, Miyaji C, Watanabe H, Umezu H, Hasegawa G and Abo T: Role of macrophage scavenger receptor in endotoxin shock. J Pathol 192: 263-272, 2000.
- 2) Bandeira A, Itoharu S, Bonneville M, Brulen-Defranoux O, Mota-Santos T, Coutinho A and Tonegawa S: Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. Proc Natl Acad Sci USA 88: 43-47, 1991.
- 3) Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C and Vassalli P: Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: A role for the gut epithelium in T cell differentiation. J Exp Med 173: 471-481, 1991.
- 4) Rocha B, Vassalli P and Guy-Grand D: The V β repertoire of mouse gut homodimeric α CD8⁺ intraepithelial T cell receptor α/β^+ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. J Exp Med 173: 483-486, 1991.
- 5) Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H and Abo T: Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1⁺ T cells in various immune organs. NK1.1⁺ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. J Immunol 155: 2972-2983, 1995.
- 6) Watanabe H, Miyaji C, Seki S and Abo T: c-kit⁺ stem cells and thymocyte precursors in the livers of adult mice. J Exp Med 184: 687-693, 1996.
- 7) Moroda T, Iiai T, Kawachi Y, Kawamura T, Hatakeyama K and Abo T: Restricted appearance of self-reactive clones into intermediate T cell receptor cells in neonatally thymectomized mice with autoimmune disease. Eur J Immunol 26: 3084-3091, 1996.
- 8) Narita J, Kawamura T, Miyaji C, Watanabe H, Honda S, Koya T, Arakawa M and Abo T: Abundance of NKT cells in the salivary glands but absence thereof in the liver and thymus of *aly/aly* mice with Sjögren syndrome. Cell Immunol 192: 149-158, 1999.
- 9) Minagawa M, Narita J, Tada T, Maruyama S, Shimizu T, Bannai M, Oya H, Hatakeyama K and Abo T: Mechanisms underlying immunologic states during pregnancy: possible association of the sympathetic nervous system. Cell Immunol 196: 1-13, 1999.
- 10) Wang S, Li C, Kawamura H, Watanabe H and Abo T: Unique sensitivity to α -galactosylceramide of NKT cells in the uterus. Cell Immunol 215: 98-105, 2002.

- 11) Kikly K and Dennert G: Evidence for extrathymic development of TNK cells. $\text{NK1}^+ \text{CD3}^+$ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J Immunol* 149: 403-412, 1992.
- 12) Bendelac A: Mouse NK1^+ T cells. *Curr Opin Immunol* 7: 367-374, 1995.
- 13) MacDonald HR: NK1.1^+ T cell receptor- α/β^+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J Exp Med* 182: 633-638, 1995.
- 14) Bix M and Locksley RM: Natural T cells. Cells that co-express NKRp-1 and TCR. *J Immunol* 155: 1020-1022, 1995.
- 15) Vicari AP and Zlotnik A: Mouse NK1.1^+ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today* 17: 71-76, 1996.
- 16) Makino Y, Yamagata N, Sasho T, Adachi Y, Kanno R, Koseki H, Kanno M and Taniguchi M: Extrathymic development of $\text{V}\alpha 14$ -positive T cells. *J Exp Med* 177: 1399-1408, 1993.
- 17) Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR and Brutkiewicz RR: CD1 recognition by mouse NK1^+ T lymphocytes. *Science* 268: 863-865, 1995.
- 18) Ohtsuka K, Hasegawa K, Yamagiwa S, Sato K, Nakayama M, Watanabe H, Asakura H and Abo T: Intraepithelial lymphocytes in colon have similar properties to intraepithelial lymphocytes in small intestine and hepatic intermediate TCR cells. *Digest Dis Sci* 41: 902-911, 1996.
- 19) Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, Iwanaga T, Yoshida Y, Honda S, Watanabe H, Suzuki K, Asakura H and Abo T: The primary site of $\text{CD4}^- \text{B220}^+ \alpha\beta$ T cells in *lpr* mice: the appendix in normal mice. *J Immunol* 160: 2665-2674, 1998.
- 20) Bannai M, Kawamura T, Naito T, Kameyama H, Abe T, Kawamura H, Tsukada C, Watanabe H, Hatakeyama K, Hamada H, Nishiyama Y, Ishikawa H, Takeda K, Okumura K, Taniguchi M and Abo T: Abundance of unconventional CD8^+ natural killer T cells in the large intestine. *Eur J Immunol* 31: 3361-3369, 2001.
- 21) Weerasinghe A, Sekikawa H, Watanabe H, Mannoor MDK, Morshed SRM, Halder RC, Kawamura T, Kosaka T, Miyaji C, Kawamura H, Seki S and Abo T: Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1^- subset, with protection from malaria. *Cell Immunol* 207: 28-35, 2001.
- 22) Mannoor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1^+ and NK1.1^- subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. *Cell Immunol* 211: 96-104, 2001.
- 23) Mannoor MK, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169: 301-306, 2002.
- 24) Halder RC, Kawamura T, Bannai M, Watanabe H, Kawamura H, Mannoor MK, Morshed SRM and Abo T: Intensive generation of NK1.1^- extrathymic T cells in the liver by injection of bone marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic major histocompatibility complex antigens. *Immunology* 102: 450-459, 2001.
- 25) Yamamoto S, Sato Y, Shimizu T, Halder RC, Oya H, Bannai M, Suzuki K, Ishikawa H, Hatakeyama K and Abo T: Consistent infiltration of thymus-derived T cells into the parenchymal space of the liver in normal mice. *Hepatology* 30: 705-713, 1999.
- 26) Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, Iwanaga T, Yoshida Y, Honda S, Watanabe H, Suzuki K, Asakura H and Abo T: The primary site of $\text{CD4}^- \text{B220}^+ \alpha\beta$ T cells in *lpr* mice: the appendix in normal mice. *J Immunol* 160: 2665-2674, 1998.
- 27) Suzuki M, Miura S, Mori M, Kai A, Suzuki H, Fukumura D, Suematsu M and Tsuchiya M: Rebamipide, a novel antiulcer agent, attenuates *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal cell injury associated with neutrophil-derived oxidants. *Gut* 35: 1375-1378, 1994.
- 28) Takeda Y, Watanabe H, Yonehara S, Yamashita T, Saito S and Sendo F: Rapid acceleration of

- neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α .
Int Immunol 5: 691-694, 1993.
- 29) Yuo A, Kitagawa S, Suzuki I, Urabe A, Okabe T, Saito M and Takaku F: Tumor necrosis factor as an activator of human granulocytes. Potentiation of the metabolisms triggered by the Ca²⁺-mobilizing agonists. J Immunol 142: 1678-1684, 1989.
- 30) Kato T, Sato Y, Takahashi S, Kawamura H, Hatakeyama K and Abo T: Involvement of natural killer T cells and granulocytes in the inflammation induced by partial hepatectomy. J Hepatol 40: 285-290, 2004.

(平成 17 年 11 月 8 日受付)