

## マクロファージの殺トキソプラズマ機構におけるリゾチームの関与

齋藤篤志

獣医学科家畜生理学教室

### 1. 目的

Obioactin (トキソプラズマ慢性感染牛血液由来免疫賦活物質) で処理された M $\phi$  は、 $\cdot$ OH (活性酸素中間体の一つ) の関与により M $\phi$  内での Tp 増殖が強く抑制されるが、lonomycin A (抗生物質の一種) で処理された M $\phi$  では Tp 増殖が抑制されるにもかかわらず、その機構には活性酸素中間体が殆ど関与していない。本研究は、活性酸素中間体非依存性殺 Tp 機構の一部を解明する目的でリゾチームと M $\phi$  内殺 Tp 現象との関連性を明らかにすることである。

### 2. 方法

#### 1) 供試動物、原虫及び刺激物質

実験には 7~8 週齢の BALB/c 系雌性マウスが使用された。また、供試原虫として *Toxoplasma gondii* RH 株が使用された。Obioactin は、Nagasawa ら (1981) の方法に準じて作製し、0.04~5 mg/ml で、lonimycin A (大正製薬) は 0.2~25 ng/ml の濃度で使用した。

#### 2) M $\phi$ 内 Tp 増殖抑制試験

熱非働化仔牛血清を 10% 含む TC-199 (TC-199-CS) にて  $1 \times 10^6$  細胞/ml になる様にグリコーゲン誘導腹腔単核細胞懸濁液を調製し、その 1 ml を 1 ml の TC-199-CS と円型カバースリップが入っている培養プレートの各ホールに分注し、5%CO<sub>2</sub> 培養器内で 6 時間培養した。その後、カバースリップに付着しなかった細胞を取り除き、TC-199-CS でさらに 17 時間培養を続け M $\phi$  単層培養標本とした。各 M $\phi$  単層培養標本と  $1 \times 10^5$  個の Tp を培養器内にて孵置し、1 時間後に細胞内に入らなかった Tp を洗浄除去した。その後、所定の濃度の Obioactin 或は lonomycin A を含む TC-199-CS で Tp 感染 M $\phi$  を培養し、48 時間後にカバースリップ上の M $\phi$  を May-Grünwald-Giemsa で染色した。染色標本は、鏡検により Tp を全く含まない M $\phi$ 、1~5 個の Tp を含むもの、および 6 個以上の Tp を含むものの割合が算出された。また、下記の式より M $\phi$  内での Tp 増殖抑制率 (Toxo-GIF) が計算された。

$$\text{Toxo-GIF (\%)} = 100 \times \left( 1 - \frac{\text{処置 M}\phi \text{ 中の Tp 含有 M}\phi \text{ の \%}}{\text{無処置 M}\phi \text{ 中の Tp 含有 M}\phi \text{ の \%}} \right)$$

#### 3) M $\phi$ 内および放出リゾチーム量の測定

グリコーゲン誘導腹腔細胞の TC-199-CS 懸濁液を 6 時間培養し、非付着細胞を取り除いた後さらに 18 時間培養を続けてリゾチーム測定のための M $\phi$  標本が作製された。それらの M $\phi$  は種々の濃度の Obioactin 或は lonomycin A で 0~48 時間培養された。所定の時間培養された M $\phi$  の超音波破碎液と培養上清に含まれるリゾチームが *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, U.S.

A.) を基質として濁度法にて測定され、卵白リゾチーム (Sigma, St. Louis, U.S.A.) を標準品とし、 $1 \times 10^7$  個の  $M\phi$  に由来する値 ( $\mu\text{g}/1 \times 10^7 M\phi$ ) で表わされた。

### 3. 結 果

#### 1) $M\phi$ 内 Tp 増殖に対する Obioactin と Ionomycin A の用量-反応関係

Obioactin (0.04~5 mg/ml) と Ionomycin A (0.2~25ng/ml) で 48 時間培養された Tp 含有  $M\phi$  にて Tp 増殖が観察された。

$M\phi$  内 Tp 増殖は、Obioactin 及び Ionomycin A の濃度上昇に連れて増大した (Table. 1)。Obioactin 群の全観察  $M\phi$  に占める Tp を含まない  $M\phi$  の割合は、非投与群で  $55.2 \pm 1.7\%$  であったのに対し、5 mg/ml 投与群では  $88.7 \pm 1.6\%$  と有意に増加した。Ionomycin A 群に於ても  $52.7 \pm 1.7\%$  から 25 ng/ml 投与群で  $99.9 \pm 0.1\%$  へと有意に増加した。Toxo-GIF 値は、5 mg/ml の Obioactin で  $74.8 \pm 3.5\%$  に、25 ng の Ionomycin A では  $99.2 \pm 0.1\%$  に達した。

Table.1. Toxoplasmodicidal activity in glycogen-induced mouse peritoneal macrophages treated with various concentration of Obioactin and Ionomycin A for 48 hours<sup>a)</sup>. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments.

Treatment		Mean percentage of macrophages with <i>Toxoplasma</i>			Toxo-GIF (%)
		0 Tp	1~5 Tp	6 $\geq$ Tp	
Untreated control		55.2 $\pm$ 1.7	23.3 $\pm$ 1.1	21.5 $\pm$ 1.4	0
Obioactin (mg/ml)	0.04	74.9 $\pm$ 3.8	14.3 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 2.7	44.0 $\pm$ 8.3
	0.2	76.4 $\pm$ 2.5	13.2 $\pm$ 0.9	10.4 $\pm$ 1.8	47.3 $\pm$ 5.5
	1.0	77.4 $\pm$ 2.7	11.5 $\pm$ 1.1	11.1 $\pm$ 1.7	49.6 $\pm$ 5.9
	5.0	88.7 $\pm$ 1.6	7.0 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.8	74.8 $\pm$ 3.5
Untreated control		52.7 $\pm$ 1.7	25.9 $\pm$ 1.4	21.4 $\pm$ 1.8	0
Ionomycin A (ng/ml)	0.2	52.2 $\pm$ 2.0	21.8 $\pm$ 1.6	26.0 $\pm$ 2.7	-1.1 $\pm$ 4.3
	1.0	70.1 $\pm$ 1.8	16.7 $\pm$ 1.2	13.2 $\pm$ 1.1	36.8 $\pm$ 3.7
	5.0	85.6 $\pm$ 1.3	11.1 $\pm$ 1.4	3.3 $\pm$ 0.4	69.6 $\pm$ 2.8
	25.0	99.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0	99.2 $\pm$ 0.1

a) Results were calculated from 500 independent macrophages in each experiment.

#### 2) $M\phi$ 内含有及び放出リゾチーム量に対する Obioactin と Ionomycin A の効果

$M\phi$  内リゾチーム含有量は、無処置対照群、Obioactin (5 mg/ml) 群、及び Ionomycin A (1 ng/ml) 群とも全時間経過に亘って殆ど変化せず、ほぼ  $2 \mu\text{g}$  であった (Fig. 1)。放出量は、全ての群に於て時間経過に連れて増加した。培養 48 時間に於ける Obioactin 群のそれは 48 時間目に於ける  $M\phi$  内含有量の 2 倍、Ionomycin A 群では約 3 倍であった。

3)  $M\phi$  内含有及び放出リゾチーム量に対する Obioactin 及び Ionomycin A の用量-反応関係  
種々の濃度の Obioactin (0.04~5.0 mg/ml) 或は Ionomycin A (0.2~25 ng/ml) で  $M\phi$  を 48 時間培養し、 $M\phi$  内リゾチーム含有量とリゾチーム放出量を測定した。 $M\phi$  内含有量は、投与量を上げて両群に於てほぼ同じ値であった。放出量は、両群とも投与量を増すに連れて減少した (Fig. 2)。

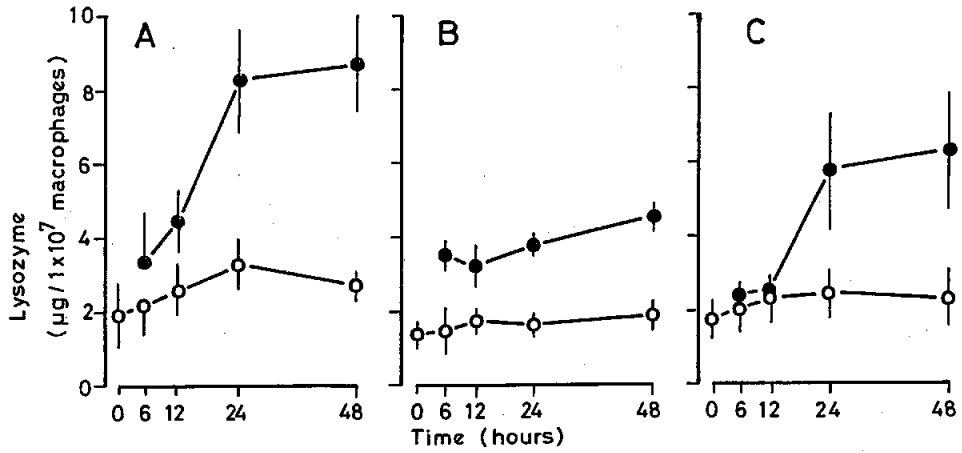


Fig. 1. Lysozyme levels on time courses in glycogen-induced mouse peritoneal macrophages incubated with plain medium (non-treated control, A), 5 mg/ml of Obioactin (B) and 1 ng/ml of lonomycin A (C). Each value represents the mean ( $\pm$ S. E. M.) of four experiments. The open circles represent lysozyme inside macrophages. The filled circles represent lysozyme released from macrophages.

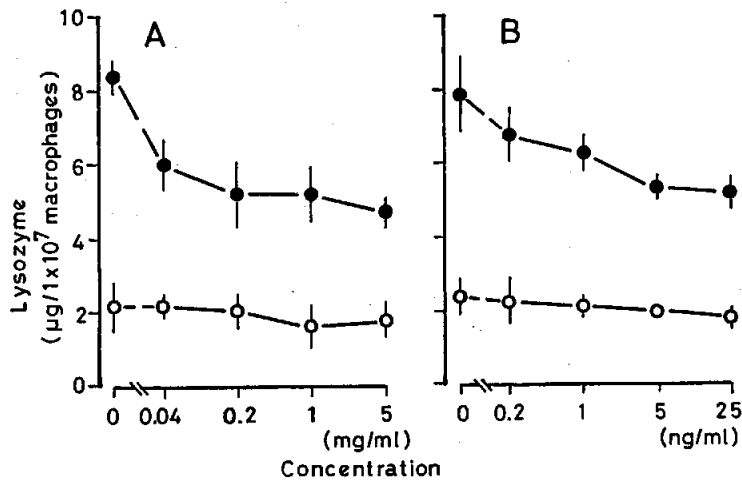


Fig. 2. Dose-response effect of Obioactin (A) and lonomycin A (B) on lysozyme levels in glycogen-induced mouse peritoneal macrophages. Each value represents the mean ( $\pm$ S. E. M.) of three experiments (nine experiments in non-treated control). Symbols as in Fig. 1.

#### 4. 考 察

Obioactin は、biological response modifiers (BRM)の範疇にはいる免疫賦活物質であり、M $\phi$ を活性化し M $\phi$  内で Tp だけでなく多くの微生物の増殖を抑える (Suzuki et al., 1984 ; Osaki et al., 1984 ; Saito et al., 1987)。また、抗生物質の一種ある Ionomycin A は、イオン輸送担体としての性質を有し、M $\phi$  内での Tp 増殖を強く抑える (Miyagami et al., 1981 ; Saito et al., 1987)。

一方、M $\phi$  内に於ける殺原虫事象の機序については活性酸素中間体の産生に関する研究 (Suzuki et al., 1984 ; Saito et al., 1987) や活性酸素中間体除去剤を用いた研究 (Takahashi 1987) から Obioactin による M $\phi$  内 Tp 増殖抑制の機序には活性酸素が強く関わっていると考えられているが、Ionomycin A によるそれは、活性酸素の関与では説明できない実験的事実がある (Saito et al., 1987)。

本研究では、Ionomycin A による M $\phi$  内 Tp 増殖抑制の機序を解明するための第一段階としてリゾチームの関与を調べたが、Ionomycin A による M $\phi$  内 Tp 増殖抑制と M $\phi$  内リゾチーム含有量及び放出量との間にリゾチームの関与を裏付ける如何なる相関性も得られなかったばかりでなく、むしろ、Ionomycin A の濃度上昇に連れてリゾチーム放出量が減少する事実が明かとなった。また、同様の事実が Obioactin を用いた実験からも得られたことから、Ionomycin A による M $\phi$  増殖抑制の機序のみならず Obioactin によるそれにもリゾチームは関与していないものと推察される。