

地域開発助成

助成番号：207

マクロージ内トキソプラズマ原虫増殖抑制 に対する細胞内代謝系の関与

斎藤篤志

獣医学科家畜生理学研究室

1. 目的

トキソプラズマ (Tp) 原虫は細胞内で増殖し、ついにはその宿主細胞を破壊する。しかし、Tp 感染腹腔マクロファージ (Mφ) が Tp 慢性感染牛血清由来免疫賦活物質 (オビオアクチン) 添加培養液で培養されると Mφ 内での Tp 増殖は著明に抑制され、また、オビオアクチンで処理された Mφ は、未処理 Mφ に比較しホルボールミスチン酸 (PMA) 刺激により H_2O_2 や O_2^- の放出量が増大する (Suzuki, N. et al., 1984)。現在食細胞内における殺原虫機構に関与する因子として H_2O_2 や O_2^- の様な活性酸素中間体が広い支持を受けている (Haidaris, C. G. and Bonventre, P. F., 1982, Johnston, R. B. Jr., 1981, Murray, H. W. and Cohn, Z. A., 1980, Murray, H. W. et al., 1983)。

本研究の目的は、in vitro で Mφ を活性化し、Mφ 内 Tp 増殖を抑制させ、さらに Mφ からの活性酸素放出を増大させる物質としてオビオアクチン、in vitro の系で活性酸素放出能を増大させる muramyl dipeptide (MDP) (Leclerc, C. and Chedid, L., 1984, Pabst, M. J. and Johnston, R. B., Jr., 1980) 及び生体内に投与する事により、その生体由来 Mφ の活性酸素放出能を増大させる (Ogawa, R. et al., 1985) 物質として Tp 可溶性抗原 (TLA) を用い、Tp の Mφ 内増殖と Mφ の活性酸素産生能及び細胞内代謝関連酵素並びに酸素消費を測定し、活性化 Mφ による抗 Tp 作用の細胞機序をさぐるものである。

2. 方法

1. 供試動物、原虫及び刺激物質

本実験には当研究室にて繁殖増殖された 5~7 週齢の ICR/JCR 系雌性マウスが使用された。また、供試原虫として当研究室でマウスにて継代された *Toxoplasma gondii* RH 株が使用された。オビオアクチンは、Tp 過免疫牛血清より Nagasawa ら (1981) の方法に準じて作製された。TLA はマウス腹腔内で増殖した Tp 栄養型虫体を用い Igarashi ら (1979) の方法によって作製された。MDP は Peninsula Lab. 製のものを使用した。使用濃度は、酸素消費に関する実験以外、オビオアクチンについては、in vitro の系において Mφ 及び腎初代培養細胞内での Tp 増殖を抑制する至適濃度 (Suzuki, N. et al., 1984) 5mg/ml, MDP については Mφ からの活性酸素放出能を増大させる至適濃度 1μg/ml, および TLA については、in vivo の系においてマウスに投与し、そのマウス由来の Mφ を活性化させる (Ogawa, R. et al., 1985) マウス 1 頭あたりの投与量 100μg を基本とし 100 μg/ml の濃度とした。

2. マウス腹腔 M ϕ 単層培養標本と浮遊 M ϕ 標本の作製

M ϕ 単層培養標本は、グリコーゲン誘導マウス腹腔 M ϕ を用い Nagasawa ら (1981) の方法に準じて作製された。熱非働化仔牛血清を 10% 含む TC-199 (TC-199-CS) にて 1×10^6 細胞/ml になる様に腹腔単核細胞懸濁液を調製し、TC-199-CS 1ml と円型カバースリッが入っている培養プレート (FB-16-24, Flow Lab., USA) の各ホールに 1ml 分注し、5%CO₂ 培養器内で 6 時間培養した。その後、カバースリッ片に附着しなかった細胞を取りのぞき、TC-199-CS でさらに 18 時間培養を続け M ϕ 単層培養標本とした。浮遊 M ϕ 標本は以下の様にして作られた。TC-199-CS にて 1×10^6 細胞/ml に調製された腹腔単核細胞をペトリ皿に入れ、5%CO₂ 培養器で 37℃ にて 3 時間培養した。次いで非附着性の細胞を洗浄にて取り除いた後、Ca²⁺ を含まない Hanks 液 (HBSS) 存在下でラバーポリスマンを用いて静かに附着細胞をはがし、その細胞を TC-199-CS で洗浄後、細胞数を 1×10^6 細胞/ml に調製し、浮遊 M ϕ 標本とした。

3. M ϕ 内 Tp 増殖抑制の評価

M ϕ 単層培養標本と 1×10^5 個の Tp 虫体を培養器内で孵置し、1 時間後に細胞外の Tp 虫体を洗浄除去した。その後所定の濃度のオビオアクチン、MDP 或は TLA を含む TC-199-CS で Tp 感染 M ϕ を 48 時間培養し、カバーガラスの上の M ϕ 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 ϕ 、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。

4. M ϕ 内酵素、アデニンスクレオチド、H₂O₂ および O₂⁻ の測定

所定の濃度のオビオアクチン、MDP 或は TLA を含む TC-199-CS で 48 時間培養された M ϕ 単層培養標本が生理的食塩水存在下でソニケーター (model W-220F, Ultrasonics, USA) にて破碎され、その懸濁液中のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、ATP、ADP、AMP がペーリンガー・マンハイム社の測定キットで測定された。培養 M ϕ からの H₂O₂ 放出量は Nakano 法 (Nakano, M., et al., 1968) で、O₂⁻ が McCord と Fridovich の方法 (1969) で測定された。

5. 酸素消費量の測定

酸素消費量は、クラーク型酸素電極を用い oxygen uptake system (model 102A, Instech Lab., USA) で測定された。あらかじめ 1×10^6 M ϕ /ml に調製された M ϕ 懸濁液を 650 μ m³ の容積の酸素分圧測定室に満たし、酸素分圧が定常状態になってから種々の濃度のオビオアクチン、MDP 或は TLA を注入し酸素分圧の変化を測定した。正味の消費量は、定常状態からの変化分で示し、nl/ 1×10^6 細胞/min の単位で表現された。

3. 結 果

1. M ϕ 内での Tp 増殖と活性酸素中間体の放出

M ϕ 内での Tp の増殖は、オビオアクチンで処理された M ϕ 内でのみ抑制された。Tp を含まない M ϕ は、オビオアクチン処理で $71.3 \pm 4.2\%$ を示し、対照郡のそれよりも有意に大きい比率を示した ($P < 0.05$)。MDP 及び TLA 処理群のそれらは、対照群に比較し有意な差を示さなかった。また下記の式より M ϕ 内での Tp 増殖抑制率 (Toxo-GIF) を算出した。

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

Toxo-GIF 値においてもオビオアクチン処理群は有意に高い値を示したが、MDP および TLA 群は、対照群に比較し有意な差を示さなかった (表 1)。しかし、活性酸素中間体の放出は、オビオアクチン群と MDP 群で増加した (表 1)。

表 1. Toxoplasmacidal activity of glycogen induced peritoneal macrophages and oxygen intermediates released from glycogen induced peritoneal macrophages. The macrophages were cultivated with Obioactin (5 mg/ml), MDP (1 μg/ml), TLA (100 μg/ml) or plain medium (control) for 48hrs in vitro. Each value represents the mean ± SE of four experiments.

Treated	Mean percentage of macrophages with Toxoplasma			Toxo-GIF (%)	Release of oxygen intermediates (nmols/100 μg protein/60min)	
	0 Tp	1-5 Tp	≥6 Tp		O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Control (plain medium)	45.8±5.0	30.8±5.2	23.5±1.8		0.80±0.07	21.05±2.61
Obioactin (5 mg/ml)	71.3±4.2	18.5±2.6	10.3±1.7	48.5±10.4	1.93±0.28	26.10±4.47
MDP (1 μg/ml)	50.8±9.1	27.8±4.2	21.5±6.0	11.8±10.3	1.05±0.14	27.72±5.38
TLA (100 μg/ml)	56.0±5.7	25.8±3.5	18.3±2.5	20.5±3.9	0.68±0.06	22.38±2.78

2. Mφ 内酵素およびアデニンスクレオチド含有量

表 2 に示す如く、MDP 群とオビオアクチン群で Mφ 内の G6PD の上昇がみられた。また、TLA 群の LDH と GLDH の活性が、対照群より有意に低かった。MDP 群とオビオアクチン群の GOT, LDH, GLDH 活性および TLA 群の G6PD と GOT 活性は、対照群のそれらの値に近いものであった。ATP 含有量は、オビオアクチン、MDP および TLA 処理で増加の傾向を示し、オビオアクチ

表 2. Activities of G6PD, GOT, LDH and GLDH, and contents of AMP, ADP and ATP in glycogen induced peritoneal macrophages cultivated with Obioactin (5 mg/ml), MDP (1 μg/ml), TLA (100 μg/ml) or plain medium (control) for 48hrs in vitro. Each value represents the mean ± SE of five experiments.

Treated	G6PD*	GOT*	LDH*	GLDH*	AMP**	ADP**	ATP**
Control (plain medium)	31.5±14.8	37.8±6.9	112.7±41.1	35.1±7.7	8.6±3.5	123.0±6.2	4.6±0.7
Obioactin (5 mg/ml)	56.2±22.9	30.2±4.4	149.0±83.7	43.3±13.7	21.2±1.6	159.1±36.6	7.9±0.6
MDP (1 μg/ml)	83.4±15.7	43.7±5.7	130.0±39.4	50.8±13.2	8.6±3.6	100.1±6.2	5.3±0.5
TLA (100 μg/ml)	33.2±16.1	34.2±7.1	52.6±10.7	10.8±2.8	8.7±2.1	203.1±95.8	6.8±0.5

*mU/mg protein, **nmols/mg protein

ン群のそれは推計学的に有意であった。ATP/ADP比は、対照群とTLA群で0.033~0.037であったが、MDP群とオビオアクチン群では0.05~0.053の値を示した。

3. 酸素消費

定常状態におけるMφの酸素消費量は $6.4 \pm 0.6 \text{ nl}/1 \times 10^6 \text{ 細胞}/\text{min}$ であった。酸素分圧測定室へ

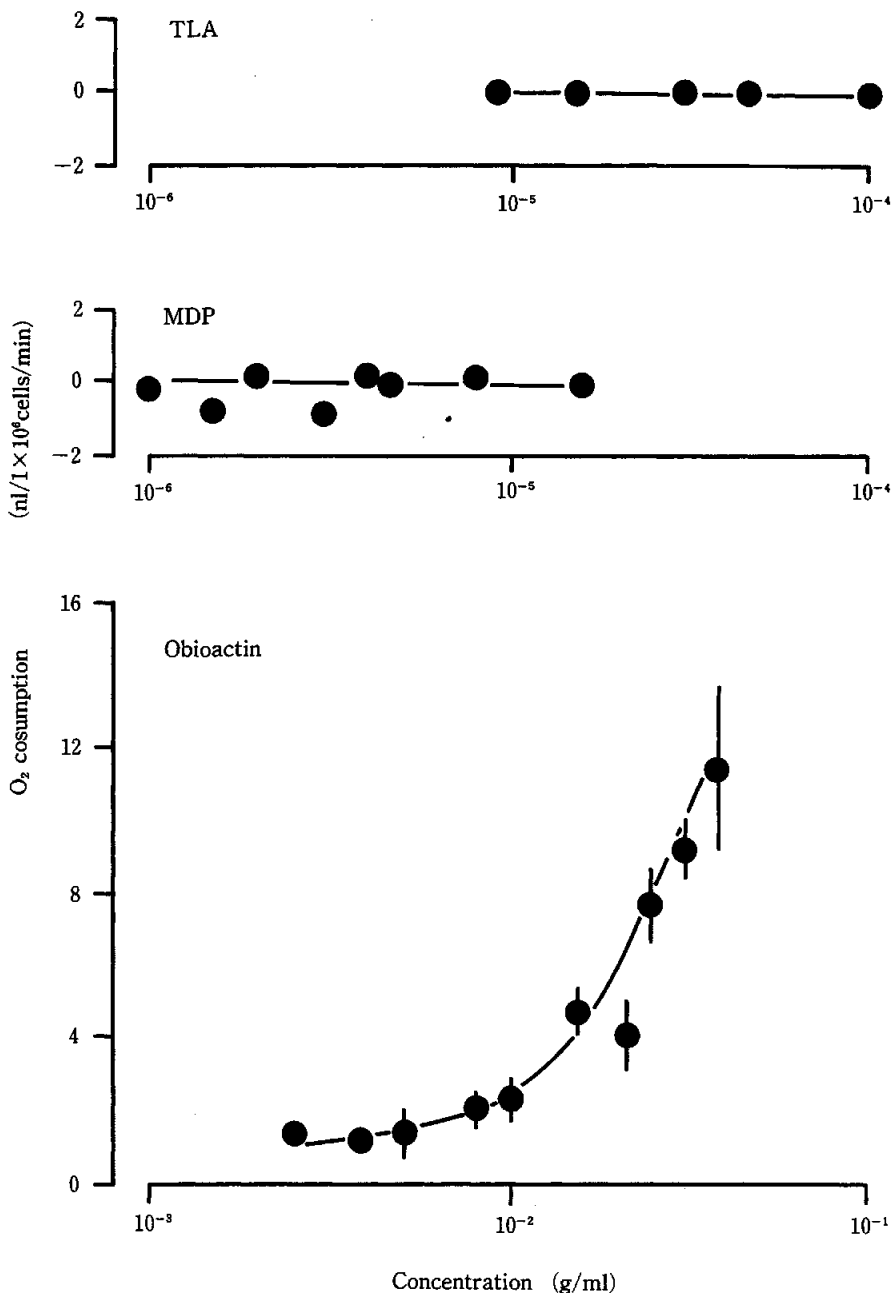


図1. Relationship between the actual oxygen consumption of peritoneal macrophages and dose of TLA, MDP or Obioactin. The vertical axis indicates the oxygen consumption. The horizontal axis indicates the concentration of each substance. Each value represents the mean (\pm SE) of five experiments.

のオビアクチン投与量を増すと $M\phi$ の酸素消費量は、オビアクチンの濃度上昇につれて増加した。しかし、MDP や TLA の濃度変化により著明な酸素消費量の変化はみられなかった (図 1)。更にオビアクチンによる酸素消費量の増大は、ミトコンドリアにおける呼吸阻害剤である KCN で完全に阻害されなかった。しかし、MDP や TLA の存在下で KCN を作用させると、 $M\phi$ の呼吸は完全に阻害された。

4. 考 察

オビアクチンと MDP は、 $M\phi$ からの活性酸素中間体放出をたかめたが、 $M\phi$ 内での Tp 増殖を抑制したのはオビアクチンだけであった。細胞内殺原虫の機序として現在広い支持をうけている活性酸素依存性の機構でオビアクチンの作用を説明する事ができる。しかし、MDP の様に活性酸素中間体放出能が上昇しても $M\phi$ 内 Tp 増殖が抑制されない現象は、MDP 刺激の場合活性酸素の放出方向が細胞外に向ってだけであり、食胞 (Tp 原虫を含む細胞内小胞) 内に活性酸素が放出されないという考えにくい可能性を完全に否定できないとしても、 $M\phi$ 内における殺原虫現象は、必ずしも活性酸素が関与していない事を示すものか、或いは、活性酸素の他に何か別の因子の関与を示すものかもしれない。また最近では活性酸素の全く関与しない細胞内殺原虫現象が報告されている (Kierszenbaum, F. et al., 1984, Mauel, J. 1984., Murray, H. W. et al., 1985, Wilson, C. B. et al., 1982)。

測定された細胞内代謝関連酵素のうち、オビアクチン群と MDP 群において G6PD 活性上昇がみられた。G6PD はグルコース・6・リン酸より 6・ホスホグルコノ δ ・ラクトンへの反応に関与する酵素であり、この酵素活性の上昇はグルコース代謝の内でヘキソースモノリン酸路の活性を示すものである。また、この反応によって細胞質内の NADPH が上昇する。活性酸素産生には NADPH が重要な因子となっている事から、オビアクチンや MDP による活性酸素産生上昇は、ヘキソースモノリン酸路の活性化と関連しているものと推論されうる。また、オビアクチン処理で、LDH, GOT 及び GLDH の活性上昇がみられなかった事は、 $M\phi$ 内 Tp 増殖抑制には嫌氣的解糖やトリカルボン酸回路の活性化とは直接的に関連していない事を示している。細胞内高エネルギーリン酸化合物 ATP と ADP の比率は、細胞の代謝亢進状態を示すものと言われている (Soboll, S. et al., 1978)。TLA 処理群の $M\phi$ 内 ATP 含量は比較的高い値を示したが、TLA 群における ATP/ADP 値が対照群のそれとほぼ同じであった事は、ATP 含量増加は生理学的意味の小さい事を示すものかもしれない。これに反し MDP とオビアクチン群のそれらは 0.05 以上を示し、代謝亢進を示すものと思われる。また、 $M\phi$ の酸素消費はオビアクチン群においてのみ濃度依存性に増大し、それが KCN で完全におさえられなかった事は、酸化的リン酸化による代謝亢進だけでなく、それ以外の系で酸素消費を増大させる事を示している。本研究で示された MDP との差は、 $M\phi$ 内 Tp 増殖と酸素消費に対する作用であった事から、オビアクチンによる $M\phi$ 内 Tp 増殖には、強力な細胞内代謝賦活が強く関していると推察できる。尚、本研究の内容は Zbl. Bakt. Hyg. に投稿中である。