

マウスマクロファージ活性化を指標とした 海水中のエンドトキシン様物質の分析

Analysis of Endotoxin like Compound in Sea Water
by Macrophage Activation

高木 邦明¹・稻村 達海¹・宮田 崇¹・和田 卓²
五十嵐保正²・萩原 快次²・祐田 泰延¹

Kuniaki TAKAGI, Tatsumi INAMURA, Takashi MIYATA, Takashi WADA,

Yasumasa IGARASHI, Yoshitsugu HAGIWARA and Yasunobu SUKETA

Abstract

We previously reported that several functions of macrophage were enhanced by pretreatment with deep sea water (DSW) in depth dependent manner. However, the augmentative substances in DSW and the suppressive matters in surface sea water (SSW) have never investigated. In this study, we fractionated the macrophage activation factors (MAFs) from deep sea water by hydrophobic column chromatography and compared the content of the MAFs between SSW and DSW. In addition, we demonstrate that the one of MAFs in DSW is an endotoxin, a major component of outer membrane in Gram-negative bacteria.

Key Words: Macrophage, endotoxin, deep sea water, dissolved organic matter

要 旨

海洋深層水は現在多くの分野で活用が進められているが、医療分野においてはアトピー性皮膚炎の海水浴療法の改善法として治療に用いられている。アトピー性皮膚炎は多種類の免疫系細胞がその発症に関与している。患者は血液中の抗体（IgE）の濃度や炎症に関わる細胞種の違いから、IgE 値の高い Th 2（液性免疫）優性型と IgE 低値の Th 1（細胞性免疫）優性型に分類されている。本論文では海水中のマクロファージ活性化物質を解析し、その有力な 1 因子としてエンドトキシンを同定したので報告する。

海水中のマクロファージ活性化物質は本研究で表層より深層水の中に多く存在していることが明らかとなった。治療例から、患部の免疫担当細胞がエンドトキシンにより活性化され、Th 2 優性型から Th 1 優性型に Th バランスが変化することにより、Th 2 優性型のアトピー性皮膚炎患者においては症状の改善がみられ、Th 1 優性型の患者においては悪化すると推定される。

1. 緒 言

海洋深層水は富栄養、低温、清浄という性質を有していることが大きな特徴である。これらの性質を利用して現在多くの分野でその活用が進められ、医療分野においてはアトピー性皮膚炎の海水浴療法の改善法として治療に用いられている（野村ら、

1996）。

アトピー性皮膚炎は花粉症や気管支喘息と並ぶ代表的なアレルギー疾患で、多種類の免疫系細胞がその発症に関与している。患者は血液中の抗体（IgE）の濃度や炎症に関わる細胞種の違いから、IgE 値の高い Th 2（液性免疫）優性型と IgE 低値の Th 1（細胞性免疫）優性型に分類されている。深層水の

¹静岡県立大学薬学部（〒422-8526 静岡県静岡市谷田 52-1）

²静岡県水産試験場（〒425-0033 静岡県焼津市小川汐入 3690）

利用で改善が観られたのは Th2 優性型の患者と思われるが（野村ら, 1996），その海洋深層水の作用機序あるいは Th1 優性型患者への毒性等はほとんど明らかになっていない。

マクロファージ系細胞は外来の異物や細菌を貪食すると同時に，抗原を T 細胞に提示したり，活性化して分泌性ペプチド（サイトカイン）やラジカルあるいは低分子の分泌物を放出して他の細胞の活性化を制御する。図-1 に示したように，患者が Th2 優性あるいは Th1 優性型になるか（Th バランス）は，マクロファージを主とした複数種の細胞から出されたサイトカインによって決まる。そのため免疫療法の効果を検討する上で，マクロファージの活性化の度合いや活性化マクロファージから分泌される分子種を分析することは非常に重要となる。

我々はマウスマクロファージ系細胞の活性化が海水の前処理により深度依存的に促進されることを報告している（高木ら, 2000）。本論文では，この深度依存的変化が海水の高浸透圧のみでは説明できないことから，我々は海水中のマクロファージ活性化物質を解析し，その有力な 1 因子としてエンドトキシンを同定したので報告する。

2. 実験方法

(1) 検 水

実験に用いた海水は駿河湾内の各採水地点—St.3（北緯 34 度 51 分，東経 138 度 28 分）水深 0 m および 350 m, St.2（北緯 34 度 51 分，東経 138 度 38 分）水深 600 m, St.A（北緯 34 度 45.5 分，東経 138 度 25.5 分）水深 600 m, St.F（北緯 34 度 51 分，東経 138 度 25.5 分）水深 600 m—より 1999 年 8 月 12 日から 2000 年 6 月 30 日まで計 4 回にわたりニスキン採水機を用いて採水した。

(2) 疎水クロマトグラフィーによる海水の濃縮

各海水 3 L を，3.44 % 塩化ナトリウム溶液で活性化させた疏水クロマトグラフィー（東ソー社製，ブチルトーヨーパール 650 M） $(0.785 \text{ cm}^2 \times 10 \text{ cm})$ に 4 °C で添加した。吸着物質を 5 mM リン酸緩衝液（pH7.6）200 ml で 280 nm の吸光度を基

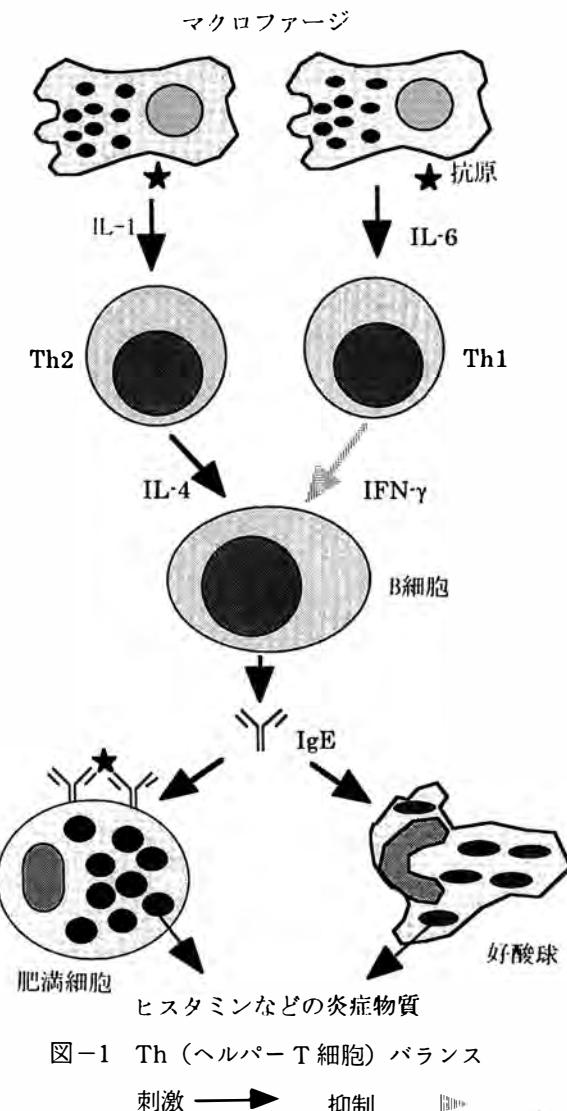


図-1 Th (ヘルパー T 細胞) バランス

刺激 → 抑制

に 40 ml ずつ 5 分間に溶出した。

(3) 細胞および培養方法

マウスマクロファージ系細胞 J774.1 は国立衛生試験所細胞バンクより入手した。Mm1 は市川が樹立した M1 の亜株で，本研究室で継代培養しているものを用いた。各細胞とも 8 % ウシ胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) で培養し，活性化因子としてインターフェロン γ (IFN- γ , Genzyme 社製) さらにエンドトキシンとしてリポポリサッカライド (LPS, Difco 社製) を用いた。

バイオアッセイ：全ての実験で 96 穴マイクロプレートを使用し，各実験での添加試料の組み合わせおよび添加量を表にまとめた。1) 疏水クロマトの各分画および 2 倍濃度の D-MEM 50 μl そして

表-1 バイオアッセイの条件

バイオアッセイ 1	
試料および細胞	添加量 (μl)
疎水クロマト分画	50
2xD-MEM	50
IFN- γ (30 u/ml)	100
J774.1	100

バイオアッセイ 2	
試料および細胞	添加量 (μl)
ポリミキシン B (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	50
2xD-MEM	50
クロマト分画	50

↓ 37 °C 1 時間前処理

IFN- γ (60 u/ml)	50
J774.1	100

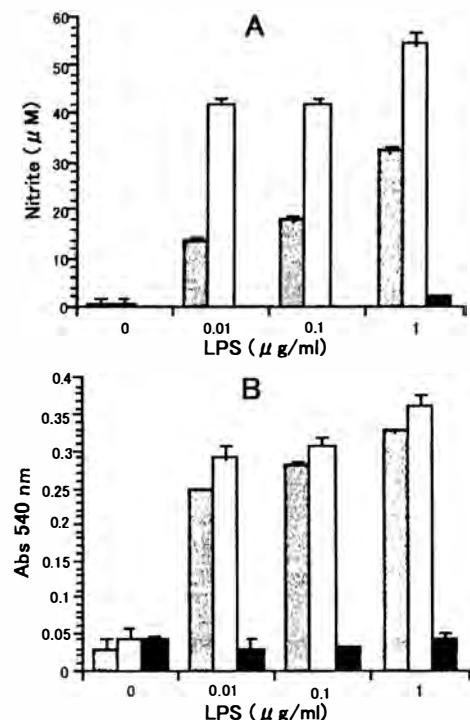
J774.1 100 μl (1×10^5 cells/well) および IFN- γ (30 u/ml) 100 μl を添加し一定時間培養後、細胞の活性化を測定した。2) エンドトキシンの中和実験では *Bacillus polyamyxa* 由来抗生物質のポリミキシン B (PB, Sigma 社製) を特異的中和剤として用いた。D-MEM で希釈したポリミキシン B (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl とクロマト分画 50 μl および 2xD-MEM 50 μl を 96 well plate 中で 1 時間前処理した後、細胞と IFN- γ を前述のように加え一定時間培養後細胞の活性化を測定した。

(4) 細胞活性化の測定

細胞の活性化の指標は一酸化窒素 (NO) とサイトカインの一種のインターロイキン 6 (IL-6) の産生量で示した。NO 産生量は 24 時間後の培養上清中の亜硝酸イオンを Griess 法で測定し (Takagi *et al.*, 1991A), IL-6 産生量は 48 時間後の培養上清を IL-6 特異感受性細胞株 Mm1 の培養系に添加し、48 時間培養後の NO 産生量の吸光度から求めた (Takagi *et al.*, 1991B)。

3. 実験結果

本研究で使用したマクロファージ系細胞の J774.1 は一般的に腹腔内常在性マクロファージの諸性質を持つ。本実験の前にこの諸性質の確認とポリミキシン B の中和実験の条件を検討した。図-2 に示したように、J774.1 はエンドトキシンの添加

図-2 J774.1 の LPS および IFN- γ による活性化とポリミキシン B による抑制効果

A : NO 产生, B : IL-6 产生

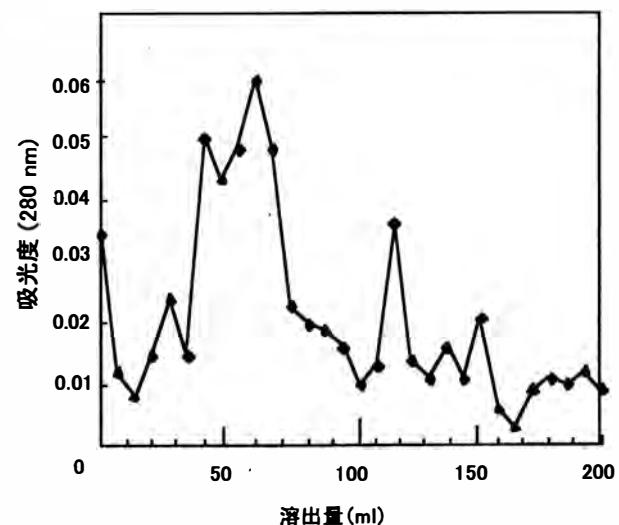
□ : IFN- γ 未刺激, □ : IFN- γ 刺激■ : IFN- γ 刺激時ポリミキシン B (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 前処理

図-3 疎水クロマトグラフィー溶出パターン

により濃度依存的に活性化した。IFN- γ は単独ではその活性化は観られなかったが、エンドトキシンの作用を促進した。また、図には 1 濃度しか示していないが、ポリミキシン B は最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の添加で活性化 J774.1 の NO および IL-6 両産生誘導を完全に抑制した。

海水を疎水クロマトグラフィーにかけると、その

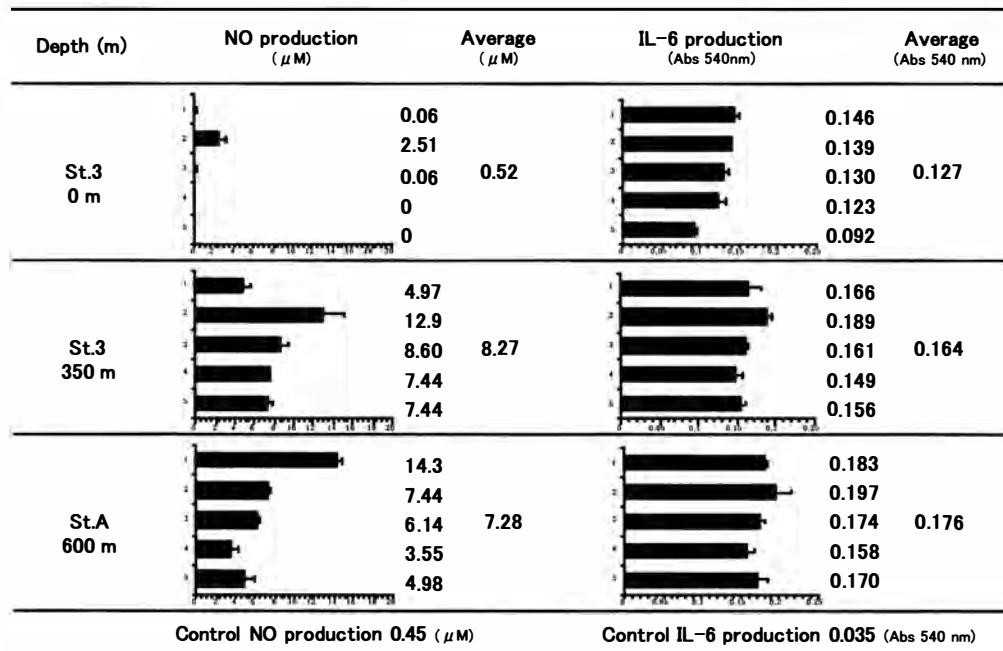
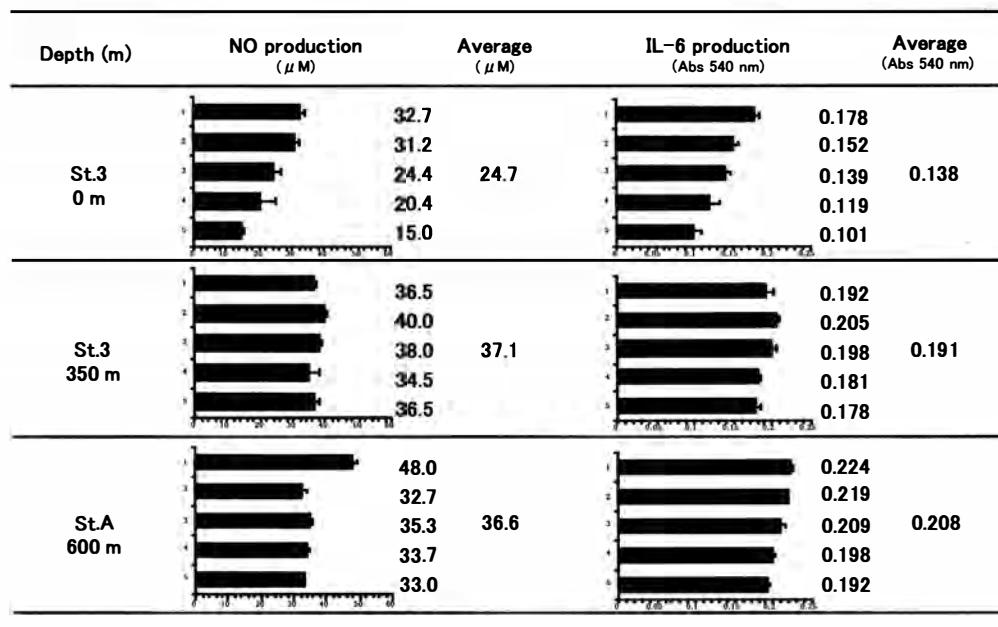


図-4 疎水クロマトグラフィー溶出分画によるJ774.1活性化

図-5 疎水クロマトグラフィー溶出分画によるJ774.1活性化
-IFN- γ 共処理-

溶出パターンは各採水点あるいは採水日毎に若干の違いが観られたが、その内代表的な溶出パターンを図-3に示した。次に海水中の溶存有機物によるマクロファージ活性化を検討するために、各検水の溶出した5分画をIFN- γ を含まない培養系でJ774.1と共に培養した。その結果、深度0mからの検水においては分画2を除いてほとんどNO産生誘導が観られなかったが、深度350mおよび600mから採水した検水ではNO産生が著しく誘導された。

またIL-6産生においても、350mおよび600mの両分画は0mの検水の分画と比較して1.29から1.39倍高く誘導した(図-4)。さらにIFN- γ を共処理した場合においても、350mおよび600mからの両分画で培養した細胞の方が0mの分画とともに培養した細胞より、NOでは1.48～1.50倍にIL-6では1.38～1.51倍高く産生した(図-5)。

NOおよびIL-6産生誘導を平均した各採水点の数値から明らかのように、疎水クロマト溶出分画に

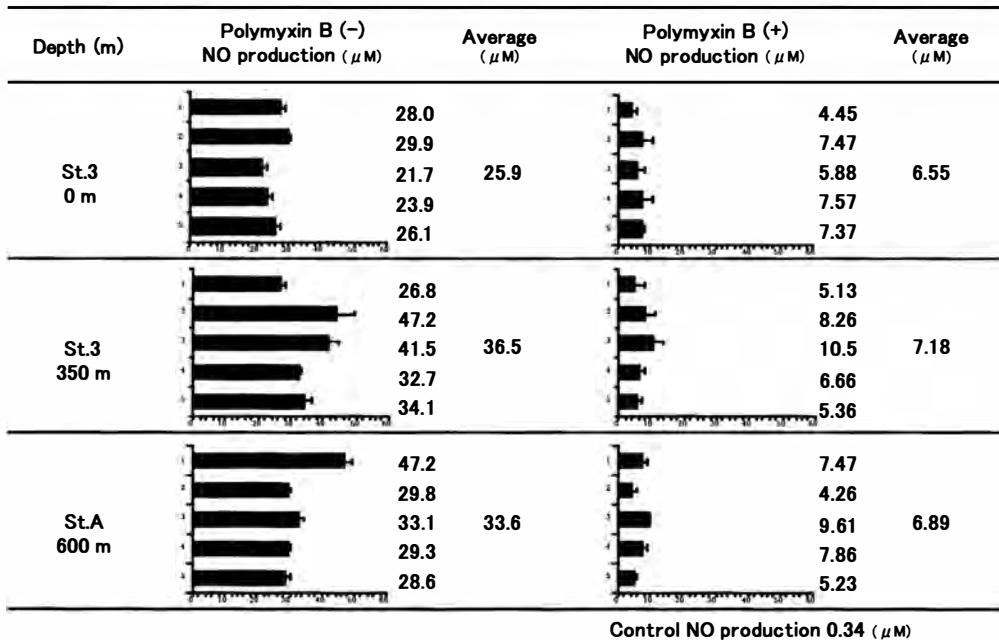


図-6 疎水クロマトグラフィー溶出分画による J774.1 活性化に及ぼすポリミキシン B の影響 (NO 產生)
-IFN- γ 共処理-

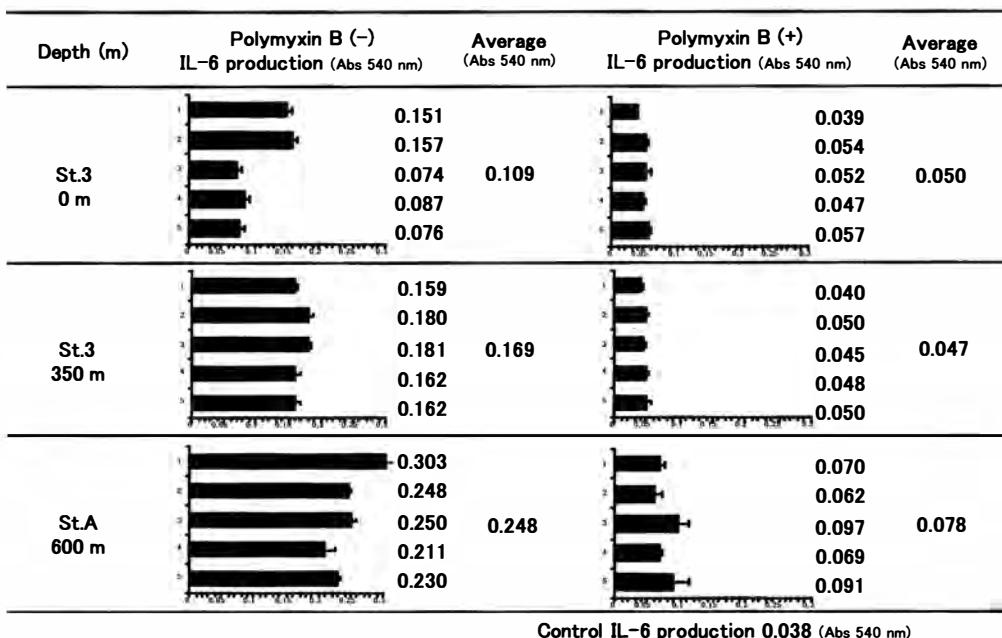


図-7 疎水クロマトグラフィー溶出分画による J774.1 活性化に及ぼすポリミキシン B の影響 (IL-6 產生)
-IFN- γ 共処理-

よる J774.1 への作用は図-2 のエンドトキシンの作用と類似していたことから、疎水クロマト溶出分画へのポリミキシン B の作用を検討した。図-6 に示したように、ポリミキシン B は疎水クロマト分画による J774.1 の NO 产生誘導を顕著に抑制した。しかし、図-2 の LPS の場合と異なりその抑制効果は完全ではなく約 70 % であった。また、IL-6 产生誘導においてもポリミキシン B により疎

水クロマト分画の J774.1 への作用は顕著に抑制された (図-7)。

4. 考 察

環境水中の溶存有機物質 (DOM) はこれまで全有機炭素濃度 (TOC) あるいは溶存有機炭素濃度 (DOC) として全体的に分析されてきたが、あるいはアンバーライト XAD 系 (松原・浦野, 1994)

や Sep-Pak 系 (浦野ら, 1995) を中心にした吸着クロマトで溶出分離されてきた。本論文では、海水中の DOM の免疫細胞への作用が中心課題であり極力自然な状態で分離することを目的としたので、有機溶媒による抽出あるいは酸性下で試料を吸着させる XAD 系樹脂は避けた。また、一般的の分離精製に使用される担体は低イオン強度で試料を添加し、高イオン強度あるいは pH 変化、変性剤等で吸着物質を溶出する担体が大多数である。しかし、今回は試料が海水であることから以上の場合では、生理活性を維持したまま DOM を分離するのは困難と考え疎水分画法を選択した。当然この操作で分離できない物質の存在も予想されたが、図-3 に示したように、280 nm における吸光度から海水中には多量の DOM が存在しているものと推測された。

一般に海水中の DOM は深度依存的に減少していることが報告されており (Martin and Fitzwater, 1992), 今回採水した駿河湾の海水においても同様の結果が得られている (結果未掲載)。またデータには示さないが、本論文で使用した各検水の採水点毎の吸光度の積算値は表層水の方が高いことから各分画の DOM も深度に依存して減少しているものと予想された。しかし、図-4, 5 の結果から海水中のマクロファージ活性化物質が表層水より深層水の方が多く存在していることが明らかとなった。他の分離方法との比較や例証を積まないと明確なことを言えないが、本論文の結果は海水中からマクロファージを活性化させる特定の物質を疎水クロマトグラフィー 1 回の操作で分離濃縮できることを提示している。

外来の異物に対して第一線で働くマクロファージはその役割上、多種類の物質で活性化される。しかし、図-6, 7 で示したようにエンドトキシンの特異的中和剤のポリミキシン B が DOM のマクロファージへの作用を 70 % 近く抑制した結果はエンドトキシンが海水中に溶存していることを示唆している。またポリミキシン B により中和されないで残った活性が、深度 600 m の IL-6 産生を除いて、各検水間で有意な差が観られなかったことより、海水の DOM 中にはポリミキシン B 非感受性のマクロファージ活性化因子が深度に関係なく一定量存在していて、

疎水クロマト分画で表層水と深層水での差は分画中のエンドトキシン量に起因するものと考えられた。

エンドトキシンはグラム陰性菌外膜の主要構成成分である。海水中の海洋微生物と陸上細菌の間での相同性は明らかではないが、エンドトキシンと同じくグラム陰性菌の外膜に存在する膜タンパク質ポーリンと抗原性が共通のタンパク質が複数種発見されている (Suzuki *et al.*, 1997)。これらのことから、我々は表層に生存していた細菌の死骸が適度の分解を受けながら徐々に沈降し、エンドトキシンが深度依存的に疎水クロマトに吸着しやすい形態になったために、DOM 中のエンドトキシン量に差が生じたものと推測している。

野村らは海洋深層水によるアトピー性皮膚炎患者への治療で 56 % の有効率があり、かつ Th2 優性型の患者においてその有効率が高いこと、さらに Th1 優性型の患者では有効率が低く悪化例も見られることが報告している (野村ら, 1996)。この報告と今回の結果を合わせて考察すると、患部の免疫担当細胞がエンドトキシンによって活性化され、Th2 優性型から Th1 優性型に Th バランスが変化することにより、Th2 優性型のアトピー性皮膚炎患者においては症状の改善が観られ、Th1 優性型の患者においてはさらに悪化したものと推測している。

謝 辞

本研究は静岡県のプロジェクト研究「駿河湾深層水の利用方法と開発」により行われたものであり、記して謝意を表す。

参考文献

- Martin. J. H. and S. E. Fitzwater (1992) : Dissolved organic carbon in the Atlantic, Southern and Pacific oceans. *Nature*, 356, 699-700.
- 松原英隆, 浦野絢平 (1994) : フミン質を構成する芳香族成分の分析方法の検討, *水環研* 17, 50-59.
- 野村伊知郎, 松本健治, 藤枝幹也, 森田英雄, 倉繁隆信, 田辺伸吾, 山口光明 (1996) : 海洋深層水によるアトピー性皮膚炎の治療. *アレルギーの臨床* 16 (6), 37-40.
- Suzuki S., Kogura K. and Tanoue E. (1997):

- Immunochemical detection of dissolved proteins and their source bacteria in marine environments. *Marine Ecol. Prog. 158*, 1-9.
- Takagi, K., Nakagami, H., Nakano, T. and Suketa, Y. (1991A) : Induction of nitrite production in mouse spleen cells by immunization. *Biochim. Biophys. Acta. 1092*, 15-20.
- Takagi, K., Hosaka, T. and Suketa, Y. (1991B) : Effect of recombinant interleulin-6 on nitrite production of mouse myeloid leulemia cells. *J. Cell. Physiol. 147*, 306-310.
- 高木邦明, 稲村達海, 河尻正博, 野矢和夫, 萩原快次, 祐田泰延 (2000) : 海洋深層水のマクロファージに及ぼす影響, *海深研 1*, 13-18.
- 浦野絢平, 岡部文枝, 高梨啓和, 藤江幸一 (1995) : 水道水の Ames 変異原性に関する研究 第3報 日本の水道水の変異原性レベルの解析, *水環研 18*, 1001-1011.

(2001. 1. 5 受付, 2001. 2. 26 受理)