

たん白質栄養によるマクロファージの O_2^- 産生量とカンジダ貪食能の変化

PROTEIN MALNUTRITION IMPAIRS SUPEROXIDE ANION PRODUCTION AND *CANDIDA* PHAGOCYTOSIS BY MACROPHAGES

六反一仁・手嶋茂忠・山本由美子・木戸康博・志塚ふじ子・岸恭一(徳島大学医学部)

寺本房子(川崎医療福祉大学臨床栄養科)

Kazuhito ROKUTAN¹, Shigetada TESHIMA¹, Yumiko YAMAMOTO¹, Yasuhiro KIDO¹, Fujiko SHIZUKA¹, Kyoichi KISHI¹ and Fusako TERAMOTO²

¹Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

²Kawasaki University of Medical Welfare, Kurashiki 701-01

ABSTRACT

In response to appropriate stimuli, macrophages release a large amount of oxygen radicals through the NADPH oxidase. This "respiratory burst" is essential for their microbicidal activity. Female C3H/He-slc mice at 4 weeks old were allocated to low protein (5% casein or 5% soy protein) or control (20% casein or 20% soy protein) diets for 2 weeks. Superoxide anion (O_2^-) production, stimulated by phorbol myristate acetate (PMA), in resident peritoneal macrophages was significantly increased in the protein-malnourished groups. These macrophages did not increase the capacity for PMA-stimulated O_2^- release after treatment with lipopolysaccharide *in vitro*. Protein malnutrition did not impair the phagocytosis of unopsonized *Candida albicans*, while there was no increase in the ability of *Candida* phagocytosis after opsonization. These results suggest that protein malnutrition may impair the O_2^- release and phagocytosis of macrophages. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 79-82, 1993.

マクロファージは侵入した微生物の貪食、抗原の処理、リンパ球への抗原提示を行い、感染防御の1次機構として重要な役割を果たしている。この微生物の殺菌には、細胞膜に存在する NADPH oxidase からのスーパーオキシドアニオン(O_2^-)と、それから派生するいくつかの活性酸素種が必須であり、その重要性に関しては、遺伝的に NADPH oxidase 系の欠損している慢性肉芽腫症の患者が生後まもなくより重症感染症を繰り返し、早期に死亡することからも明らかである¹⁾。

一方、開発途上国では、低栄養による感染症の死亡率が高く、特に低たん白質栄養による免疫不全が問題となっている²⁾。本研究は感染防御の1次機構で重要な役割を果たすマクロファージの機能のうち、 O_2^- 産生能と貪食能に焦点を絞り、低たん白質食の影響を調べ、併せて大豆たん白質の効果についても検討した。

実験方法

動物および飼料

生後4週齢の雌 C3H/He-slc マウスを4群に分け、

たん白質源として5, 20%カゼイン食および5, 20%分離大豆たん白質(SPI)食を与え, それぞれ自由摂食で2週間飼育した。

マクロファージの分離と培養

2週間の飼育後, 頸骨脱臼で屠殺し, 冷生食水で腹腔内を洗浄した。洗浄液を回収して腹腔細胞を得た。得られた腹腔細胞を Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (Flow 社)で洗浄後, DMEM に浮遊させ, 24ウェルの培養プレートにて, 37°C, 5% CO₂ で2時間培養した。培養後冷リン酸緩衝液で洗浄して非付着細胞を除き, マクロファージを得た。このマクロファージを10 ng/mL エンドトキシン(LPS; from *E. coli*, K-235, Sigma)で12時間培養した³⁾。

マクロファージの O₂⁻ の測定

マクロファージを12時間培養後の培養液を除き, 80 μM のシトクローム C を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) を加え, 500 ng/mL の phorbol myristate acetate (PMA) で刺激した。刺激後60分間に産生された O₂⁻ 量を分析した。O₂⁻ 量は, シトクローム C の還元量を分光光度計を用いて550 nm で測定し, 分子吸光係数(A₅₅₀=21.0・—mM)を用いて求め, マクロファージたん白質あたりの量で表した。なおこの値は SOD を添加した条件で測定されるシトクローム C 還元量を基礎値とし, それを差し引いた SOD 阻害シトクローム C 還元量として求めた³⁾。今回, マク

ロファージの分離および培養にはエンドトキシンフリーの系を用いた⁴⁾。

マクロファージによるカンジダ貪食能の測定

上記の方法で得られた腹腔細胞中のマクロファージ (5×10⁵ cells/mL)にカンジダ(*Candida albicans*)

Table 1. Low protein diets and food intake

Groups		Food intake
		g/day
5%	Casein	2.67±0.59
20%	Casein	2.27±0.36
5%	SPI	2.78±0.56
20%	SPI	2.25±0.37

Values are mean±SD (n=5).

Table 2. Effect of low protein diets on the numbers of peritoneal cells

Groups		Peritoneal cells
		×10 ⁵
5%	Casein	**4.6±1.1 (n=11)
20%	Casein	8.1±1.3 (n=11)
5%	SPI	**2.5±1.1 (n=13)
20%	SPI	6.3±2.0 (n=12)

Values are mean±SD. **p<0.001 by Student's *t* test (5% vs. 20% protein).

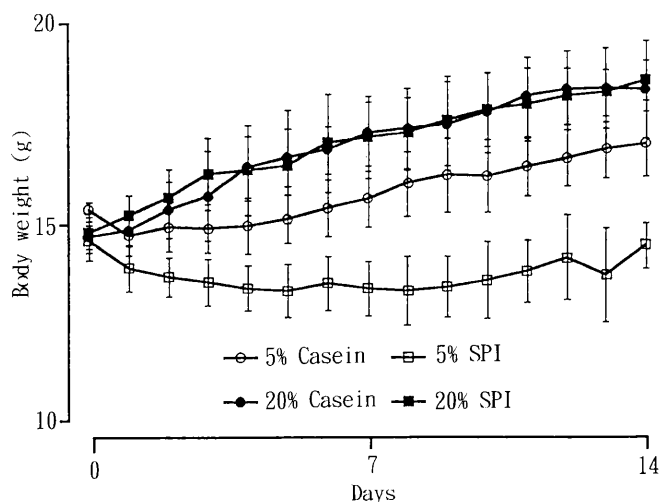


Fig. 1. Body weight changes of mice. Values are mean±SD (n=5).

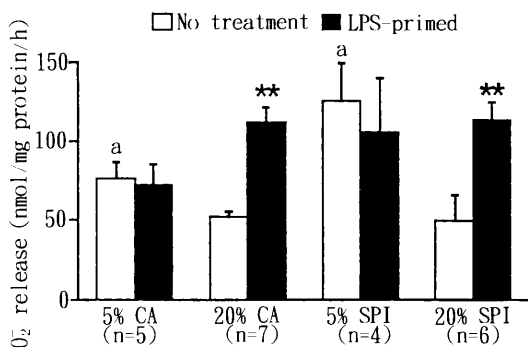


Fig. 2. Effect of protein malnutrition on PMA-stimulated O₂⁻ release. Resident peritoneal macrophages were cultivated for 12 hr with or without 10 ng/mL LPS, then stimulated by 500 ng/mL PMA. O₂⁻ release was measured as described in Materials and Methods. a; Significantly increased compared with 20% casein ($p < 0.001$ by Student's t test). **; Significantly increased after treatment with LPS ($p < 0.001$ by Student's t test).

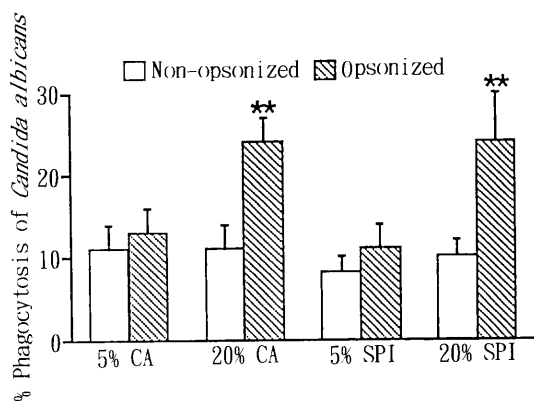


Fig. 3. Effect of protein malnutrition on *Candida albicans* phagocytosis. Values are mean $\pm$ SD ($n = 5$). **; Significantly increased by opsonization ($p < 0.001$ by Student's t test).

(5×10^5 個/mL)を加え、37°Cで60分間振盪培養した。培養後サイトセントリフュージにより細胞をスライドグラス上に集め、70%エタノールで固定し、ギムザ染色を行った。マクロファージによるカンジダの貪食は顕微鏡下でカンジダを100個数え、マクロファージに貪食されているカンジダの数を%で表した⁵⁾。

結 果

体重変化

Fig. 1に各たん白質食群の体重変化を示したが、5% SPI食ではほとんど体重増加を認めず、また、5%カゼイン食群も、20%カゼイン食群に比べ体重増加は劣っていた。摂食量は5%たん白質食群でやや多い傾向を示したが、有意ではなかった(Table 1)。1匹あたりの腹腔細胞数についても検討したが、Table 2に示したように、5%たん白質食群で有意に低く、特に5% SPI食群では著しかった。

マクロファージの O₂⁻産生

PMAは直接 protein kinase C (PKC)を活性化させO₂⁻の産生を引き起こす。まず、常在性マクロファージのPMA刺激によるO₂⁻産生量を測定した。エンドトキシンフリーの系で培養したマクロファージのO₂⁻産生量は、通常の固形飼料で飼育した場合、約50 nmol/mgたん白質/60分であるが、20%カゼイン食、20% SPI食ともそれと同程度の値を示した。5%カゼイン食ではこれより有意に高く、5% SPI食では20%カゼイン食の約2.5倍に亢進していた。In vitroにおいてLPSによる活性化に伴うO₂⁻産生能の亢進についても検討した(Fig. 2)。20%カゼイン食および20% SPI食群はLPSによる活性化にともないO₂⁻の産生能も2倍以上に亢進したが、5%たん白質食群ではO₂⁻の産生能の亢進は全く認められなかった。

マクロファージによるカンジダの貪食能

腹腔マクロファージによるカンジダの貪食能について各たん白質食の影響を調べ、そのオプソニン化による変化についても併せて検討した。Fig. 3に示したように、オプソニン化されていないカンジダに対するマクロファージの非特異的な貪食能は、たん白質レベルや質の差にかかわらず各群等しかった。これに対して、オプソニン化の効果は20%たん白質食群で認められたが、5%たん白質食にすると消失し、またカゼインとSPIにおける質の違いも認められなかった。

考 察

5%カゼインあるいは5% SPIを含む低たん白質食を用いて離乳期のマウスを2週間飼育し、実験的に作製した低たん白質栄養状態において、以下のようなマクロファージの機能不全が認められた。1) 低たん白質食群の常在性マクロファージはPMA刺激によるO₂⁻産生が亢進しており、2) in vitroにおいてLPSによる活性化を行った場合、それ以上のO₂⁻産生増加が認められないこと、3) カンジダのオプソニン化によ

る貪食能の亢進が全く認められないことなどである。栄養状態の良好なマウスの常在性マクロファージをエンドトキシンフリーの系で分離培養した場合、PMA刺激による O_2^- 産生量は約50 nmol/mg たん白質/60分と低値であるが、*in vivo* あるいは *in vitro* で LPS, γ -インターフェロン、M-CSF などの活性化因子を作用させるとその産生量は飛躍的に増加する。この O_2^- 産生量の厳密な調節は、非感染時の活性酸素種による組織障害を防ぎ、侵入微生物に対してのみ効果的に機能を亢進させるために重要である。低たん白質食群で認められた O_2^- 産生量の変化は、まさしくこの調節機能から逸脱した、生体にとっては不利な機能不全と考えられる。これが活性化に伴う変化でないことは、腹腔細胞の数が増すどころか逆に著明に低下していること、カンジダの貪食能も増加していないことなどからも窺える。

一方、カンジダの貪機能について見ると、オプソニン化されていないカンジダに対する非特異的な貪食能は低たん白質食により有意な低下を示さなかったものの、オプソニン化による貪食能の亢進が全く認められなかったことから、低たん白質栄養状態では特異的な2次免疫応答に関連するマクロファージの機能が低下していることを示唆する。

このように、たん白質欠乏における免疫不全の一因として、マクロファージの機能不全の関与が示唆された。なお SPI はカゼインに比べ低たん白質食によるマクロファージの機能不全がやや強く現れる傾向を示したが、20%という十分な量を摂取すれば、今回検討し

たマクロファージの機能の面からはたん白質源として良好であると思われた。

文 献

- 1) Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI and Malech HL (1988): Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosolic factors. *Science*, **242**, 1298-1301.
- 2) Gross RL and Newberne PM (1980): Role of nutrition in immunologic functions. *Physiol Rev*, **60**, 188-302.
- 3) Rokutan K, Hosokawa T, Nakamura K, Koyama K, Aoike A and Kawai K (1988): Increased superoxide anion production and glutathione peroxidase activity in peritoneal macrophages from autoimmune-prone MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **87**, 113-119.
- 4) Rokutan K, Thomas JA and Johnston RB Jr (1991): Phagocytosis and stimulation of the respiratory burst by phorbol diester initiate S-thiolation of specific proteins in macrophages. *J Immunol*, **147**, 260-264.
- 5) Maródi L, Korchak HM and Johnston RB Jr (1991): Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, **146**, 2783-2789.