誘導マクロファージの異物に対する付着作用について

九州歯科大学口腔細菌学講座（主任：内山長司教授）

岩 永 伸 子・内 山 長 司
西 嶋 博 史・辛 島 宣 美

昭和60年11月30日受付

本論文の要旨は昭和59年5月27日第44回九州歯科学会総会において発表した。

Attachment of Sheep Erythrocytes to the Induced Macrophages

Shinko Iwanaga, Choji Uchiyama, Hiroshi Nishijima and
Nobuyoshi Karashima

Department of Oral Bacteriology (Chief: Prof. Choji Uchiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Mouse peritoneal macrophages were induced by lipopolysaccharide (LPS), isolated and cultured for an hour. They were fixed with glutaraldehyde. Sheep erythrocytes (SRBC) and three other RBCs (mouse, rat and dog) were sensitized with LPS (LPS-RBC) and were also fixed. Each of the RBCs was added to the macrophages and incubated for 30 minutes at 37°C.

Then attachment of the RBCs to the macrophages was investigated.

The results obtained were as follows:

1. SRBC attached to the induced macrophages more than to the normal ones.
2. LPS-SRBC also attached to the induced macrophages more than to the normal ones.
3. LPS-SRBC attached to the normal macrophages in the same degree as SRBC.
4. SRBC and three other RBCs attached to the macrophages in the same degree.

These results suggested that LPS enhanced attachment of foreign bodies to the macrophages *in vivo*. And it was supposed from these results that the macrophages did not have the specific binding to SRBC.

Key words : *Macrophage activation / Attachment / LPS / SRBC*

緒 言

生体にとってマクロファージはリンパ球とならぶ重要な免疫担当細胞であり、口腔の感染防御においてもその果たす役割は大きい。

歯周疾患初期の炎症局所組織には多形核白血球が浸潤

し、次いでリンパ球、さらにマクロファージが集積してくる。歯周疾患の主な原因である歯垢中の細菌や、その代謝産物などは、多形核白血球およびマクロファージにより抗原として認識され、捕えられ、ついには多形核白血球およびマクロファージの細胞内で殺菌、消化される。

マクロファージにより、消化された抗原の情報を伝達されたTリンパ球は、成熟してさまざまなリンフォカインを放出し、Bリンパ球は形質細胞に成熟し抗体を産生する。このようにして、マクロファージとTリンパ球、Bリンパ球との相互作用により、マクロファージの異物に対する防御反応は増強されると考えられている。

マクロファージは感作リンパ球の産生するリンフォカインにより¹⁾、また直接には細菌細胞壁構成成分であるLPS (lipopolysaccharide) などによって²⁾ 活性化される。その結果マクロファージの機能、代謝、形態上に種々の変化が現われ、食作用の亢進³⁾、ライソゾーム酵素⁴⁾、コラゲナーゼ⁵⁾、エラスターゼ⁶⁾ 産生の増加、活性酸素放出の増大⁷⁾、特有のバラの花弁状 ruffle の発現^{8,9)} などがよく知られている。

口腔の感染局所組織、所属リンパ節などにおけるマクロファージの役割を解明するため、著者らは以前より、LPS などによるマクロファージの活性化に伴う形態、機能の変化について検索してきた¹⁰⁾。ところが今回の実験において、LPS によりマクロファージの異物に対する付着作用が亢進したと考えられる結果が得られた。

従来から、マクロファージの付着作用は食作用の第1段階であり、この付着作用による異物の認識が引き金となって第2段階の細胞内への摂取が行なわれ、こうしてマクロファージにとりこまれた異物は、次の第3段階で、食胞内に分泌されたライソゾーム酵素や活性酸素によって消化、殺菌されることが知られている。

このように、活性化されたマクロファージの食作用について、第2、第3段階の摂取、殺菌作用に関しては数多くの報告があるが¹¹⁻¹³⁾、第1段階の付着作用に関する報告は少ない。

そこで著者らの得た、LPS によりマクロファージの異物に対する付着作用が亢進したと考えられる結果について、さらに検討を試み、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

I. 実験材料

A. 実験動物

体重約30gのICR系マウスを7日以上飼育し、充分環境に順応させた後実験に供した。

B. 内毒素

Escherichia coli 0111:B4のlipopolysaccharide (LPS, Difco社製)を生理食塩水に溶解して、内毒素として用いた。

腹腔マクロファージ誘導用として5 μ g/ml、赤血球感作用として10mg/mlに調製した。

C. 赤血球

綿羊保存血液(東洋血清株式会社製)と、健康なマウス、ラット、イヌより採取した血液をそれぞれ、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で3回洗浄し、ヒツジ赤血球(SRBC)、マウス赤血球(MRBC)、ラット赤血球(RRBC)、イヌ赤血球(DRBC)として用いた。

II. 実験方法

A. マウス腹腔マクロファージの分離

正常マウスの腹腔よりマクロファージを分離し正常マクロファージとして用いた。また、マクロファージ誘導用のLPS(5 μ g/ml)2mlをマウス腹腔内に投与して3日後に腹腔マクロファージを分離し、誘導マクロファージとして用いた。

腹腔細胞の採取には血清無添加のEagle's essential medium (Gibco社製)に、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100 μ g/mlを添加した溶液(MEM)を使用した。MEM6mlで浸出細胞を洗い出し、細胞数を4 $\times 10^6$ /mlに調製した後プラスチックディッシュ(ϕ =60mm, Falcon社製)に1mlずつ分注した。このディッシュにMEMを2mlずつ加え、37°C、5%CO₂下で1時間培養してマクロファージを定着させた後MEMで2回洗浄し、非付着細胞を除いた。各ディッシュに10%仔牛血清加MEMを2mlずつ分注し実験に供した。

B. SRBCの感作

PBSで3回洗浄したSRBCの沈渣0.4mlをPBS10mlに浮遊させ、感作用に調製したLPS(10mg/ml)1mlを加えて37°C、30分間反応させた。その後PBSで3回洗浄しLPS感作SRBC(LPS-SRBC)として用いた。

C. マクロファージの固定

腹腔より分離しディッシュに定着させた正常マクロファージおよび誘導マクロファージをPBSで2回洗浄し、グルタルアルデヒドを2.5%含むPBS(GA-PBS)で10分間固定した。固定後グルタルアルデヒド臭が消えるまでPBSで洗浄した。これらを固定正常マクロファージおよび固定誘導マクロファージとして使用した。

D. 赤血球の固定

PBSで3回洗浄したMRBC, RRBC, SRBC, DRBCの沈渣0.4mlをPBS10mlにそれぞれ浮遊させ、室温で攪拌しながらGA-PBS3mlを滴下し、さら

に攪拌を続けた。1時間後、固定の終わった赤血球をそれぞれ PBS で5回洗浄し過剰のグルタルアルデヒドをブロックするために、1Mグリシン緩衝液 (pH 7.2) 1 ml に浮遊させた。これを室温に一夜放置した後 PBS で3回洗浄し、4種の固定正常 RBC として用いた。

また、4種の赤血球浮遊液に、感作用に調製した LPS (10mg/ml) を1ml ずつ加えて同様の操作を行ない、LPS を赤血球上に固定し4種の固定 LPS-RBC として用いた。

E. 食作用の測定

実験方法A～Dによりマクロファージと赤血球を調製した後、食作用の測定を行なった。

培養マクロファージの場合、正常マクロファージまたは誘導マクロファージの1ディッシュあたり 10^8 コの正常 SRBC または LPS-SRBC を加えた。

固定マクロファージの場合、固定正常マクロファージまたは固定誘導マクロファージの1ディッシュあたり 10^8 コの、4種類の固定正常 RBC または固定 LPS-RBC をそれぞれ加えた。

これらを37°C で30分間反応させた後、未反応の赤血球を MEM で洗うことによって除き、マクロファージを200個以上算定して赤血球を3個以上摂取あるいは付着している細胞 (Photo) の割合を求めた。

Photo SEM photograph of attachment of SRBC to macrophage

M: macrophage, S: SRBC

bar: 10 μ m

実験成績

I. 培養マクロファージによる SRBC の摂取

培養マクロファージによる SRBC の摂取率を測定した結果は Table 1 に示すとおりである。

Table 1 Ingestion of SRBC by macrophage
% (SD)

	LPS-induced macrophage	normal macrophage
SRBC sensitized with LPS	93.6 (1.9)	27.1 (4.3)
normal SRBC	80.0 (5.8)	8.4 (1.3)

Cells were incubated with SRBC at 37°C for 30 min and the percentage of the SRBC-incorporated cells was measured.

正常マクロファージによる正常 SRBC の摂取率は8.4%, LPS-SRBC の摂取率は27.1%であった。

一方、誘導マクロファージによる正常 SRBC の摂取率は80.0%, LPS-SRBC の摂取率は93.6%であった。

このように誘導マクロファージによる正常 SRBC の摂取率は正常マクロファージより61.6%高く、LPS-SRBC の摂取率は66.5%高かった。また正常マクロファージ、誘導マクロファージともに、LPS-SRBC の摂取率が正常 SRBC の摂取率より高く、その差は正常マクロファージでは18.7%, 誘導マクロファージでは13.6%であった。

誘導マクロファージによる SRBC の摂取率が正常マクロファージより高値であったことから、マクロファージは *in vivo* において LPS により活性化し、食作用が亢進したという結果を得た。また、正常および誘導マクロファージによる LPS-SRBC の摂取率が正常 SRBC の摂取率より高値であったことから、LPS-SRBC の LPS によりマクロファージが *in vitro* で活性化し、食作用が亢進したという結果を得た。

II. 固定マクロファージによる固定 RBC の付着

培養マクロファージによる SRBC の摂取率の成績より、LPS が *in vivo*, *in vitro* においてマクロファージの食作用を高めた結果を得た。

この場合、摂取作用の亢進だけでなく付着作用の亢進が行なわれているかを調べるため、マクロファージを固定して膜、タンパク質の自由度を失くし、細胞内への摂取作用を抑制して付着作用のみを検索した。また、赤血球に LPS を固定することにより LPS の *in vitro* でのマクロファージ活性化を抑制した。さらにマクロファージの SRBC に対する特異性の有無を調べるため、SRBC 以外の3種の RBC についても付着作用を検索した。

このようにして固定マクロファージによる固定 RBC の付着率を測定した結果は、Table 2 に示すとおりである。

Table 2 Attachment of RBCs to fixed macrophage

		% (SD)	
		LPS-induced macrophage	normal macrophage
LPS-bound RBC	mouse	7.3 (0.1)	< 0.5
	rat	11.0 (3.0)	< 0.5
	sheep	15.8 (0.5)	< 1.0
	dog	10.0 (1.7)	< 0.5
normal RBC	mouse	1.8 (0.3)	< 0.5
	rat	5.7 (1.2)	< 0.5
	sheep	4.4 (1.2)	< 0.5
	dog	4.0 (0.8)	< 0.5

Cells were incubated with each kind of RBC at 37°C for 30 min and the percentage of the RBC-bound cells was measured.

固定正常マクロファージによる固定正常 RBC の付着率は、4種の RBC とも 0.5%以下であった。これに対して固定 LPS-RBC の付着率は SRBC が 1.0%以下で、他3種の RBC は0.5%以下であった。

一方、固定誘導マクロファージによる固定正常 RBC の付着率は MRBC 1.8%, RRBC 5.7%, SRBC 4.4%, DRBC 4.0%であった。これに対して固定 LPS-RBC の付着率は MRBC 7.3%, RRBC 11.0%, SRBC 15.8%, DRBC 10.0%であった。

このようにマクロファージおよび赤血球を固定した場合、誘導マクロファージによる付着率は正常 RBC, LPS-RBC とともに、正常マクロファージによる付着率より高値を示し、その差は正常 RBC では 1.3~5.2%, LPS-RBC では 6.8~14.8%であった。また誘導マクロファージによる LPS-RBC の付着率は正常 RBC より 5.3~11.4%高かったが、正常マクロファージによる付着率は LPS-RBC, 正常 RBC と同程度であった。

RBC の種類による付着率の有意差は正常マクロファージの場合も誘導マクロファージの場合もみられなかった。

また実験成績 I に示した培養マクロファージによる摂取率にくらべ、固定マクロファージによる付着率は低値を示していた。

総括および考察

培養マクロファージによる SRBC の摂取率は、*in vivo*, *in vitro* において LPS によりマクロファージが活性化し食作用が亢進したという従来の報告³⁾と一致していた。また食作用のうち摂取作用を抑制した場合、LPS によりマクロファージが *in vivo* において活性化し、付着作用が亢進したと考えられる結果を得た。

マクロファージの食作用が亢進した理由として、マクロファージの膜表面に LPS に対する特異的なレセプターが存在しており、このレセプター数が LPS の刺激によって増加したことが考えられる。LPS に対するレセプターについては、Haeflner-Cavaillon ら (1982)¹⁴⁾ がウサギ腹腔マクロファージの細胞表面には LPS に対する特異的なレセプターが存在すると述べている。しかしながら今回の著者らの成績より、培養マクロファージの誘導マクロファージと正常マクロファージにおいて、摂取率の差が60%以上あるのに対し、固定マクロファージの誘導マクロファージと正常マクロファージにおいては、付着率の差が10%前後であった。このことからマクロファージの食作用は、マクロファージおよび赤血球を固定することにより活性が低下すると考えられた。また誘導マクロファージによる RBC の付着率は、LPS-RBC が正常 RBC にくらべ 5.3~11.4%高かったが、正常マクロファージによる RBC の付着率は LPS-RBC, 正常 RBC と同程度であったことから、マクロファージと LPS との間に特異的な結合はおこらなかったと考えられた。

従って、マウスの腹腔マクロファージには LPS に対する特異的なレセプターが存在していないか、あるいは存在していても、固定などによって LPS とマクロファージとの結合部位が立体的な障害をうけたため、マクロファージは LPS-RBC を特異的にではなく、単に異物として認識したと考えられた。

以上のことから今回の付着作用の亢進は、すでに *in vitro* においてマクロファージに、LPS の刺激によりバウの花弁状の特異的な ruffle が現われるという形態的变化が起こることが報告されている^{8), 9)} が、*in vivo* においても LPS によりマクロファージが活性化して同様の形態的变化が起こり、それによってマクロファージの細胞表面に異物が付着しやすくなったためであると推察

される。一方、赤血球の膜上に **LPS** を固定することによって赤血球の表面にも立体的な構造変化が起こり、それによって赤血球がマクロファージ細胞表面に付着しやすくなったことが考えられる。

また摂取率の成績よりマクロファージは **SRBC** に対して特異的なレセプターを持つ可能性が考えられたが、他の 3 種の **RBC** についても **SRBC** と同程度の付着率が得られたので、マクロファージは **SRBC** に対する特異性を持っていないことが示唆された。

マクロファージにより消化、殺菌作用をうけた抗原の抗原性は、マクロファージ表面に、マクロファージの細胞表面抗原 (マウスでは **Ia** 抗原, 以下 **Ia** 抗原と略す) とともに現わされる。自己の **Ia** 抗原と異物の抗原を表面に提示したマクロファージ¹⁵⁾ は付近のヘルパー **T** 細胞を活性化し、この **T** 細胞を介して **B** 細胞のプラズマ化を促進する。

こうしてプラズマ細胞から提示された抗原に対する特異的な抗体が産生され、新たに対面する同じ抗原性を持つ異物とすみやかに反応することができ、抗原と抗体とが反応してできた抗原抗体複合物は補体正経路を活性化するので、マクロファージは抗体、補体といったオプソニンを通して細胞表面のレセプターにより、特異的に抗原を認識することになる。この抗原の特異的認識によりマクロファージの食作用はさらに高まり、局所の免疫防御はより強固なものとなる。

Schnyder ら (1978)¹⁶⁾ により、マクロファージはいったん食作用を行なうと活性化した状態になり、**zymosan** と **formaldehyde** 処理 **SRBC** を摂取したマクロファージは直ちに大量のライソゾーム酵素を放出しはじめ、ひき続き細胞内 **LDH** の上昇がみられたこと、またグルコース消費量も増大したが、ラテックス粒子を貪食した場合にはこれらの活性化現象はみられなかったことが報告されている。

この報告から、**zymosan** や **formaldehyde** 処理 **SRBC** という生体関連物質の貪食によりマクロファージは活性化され、ラテックス粒子など生体に無関係な物質では活性化されることが推測される。口腔内においても死滅した細菌細胞などを貪食することによってマクロファージが活性化し、免疫応答が活発になると考えられる。

このようにマクロファージの食作用は免疫防御の出発点として大変重要な機能である。中でも第 1 段階の付着作用についての今回の著者らの成績より、細菌細胞壁構成成分である **LPS** の *in vivo* の刺激によって、マクロ

ファージが活性化し付着作用が亢進したことが示唆された。また、このことと先の **Schnyder** らの報告とを考えあわせると、口腔の歯周組織においてグラム陰性菌細胞壁の **LPS** によって付着作用の高まったマクロファージは、ひき続きすみやかに摂取作用を行ない、さらに活性化して多量のライソゾーム酵素による抗原処理、ヘルパー **T** 細胞への抗原性の伝達など、連続した免疫応答を活発に行なっていくことが推察される。

今回の実験成績よりマクロファージの付着作用は固定によって抑制され、膜表面のレセプターも障害をうけることが示唆されたことから、食作用や細胞表面レセプターに関しては培養マクロファージを利用する必要があると考えられる。さらに、レセプターだけでなくマクロファージ自身の表面抗原も活性化により変動していくと考えられる。

食作用により抗原を消化したマクロファージには、すでに述べたように自己の **Ia** 抗原とともに、異物の抗原性をヘルパー **T** 細胞に提示する役目がある。マクロファージの抗原提示能は、それによって特異的な免疫認識が開始される重要な機能であるので、今後、**Ia** 抗原を表現するマクロファージについて、**T** 細胞との相互作用などを検索していきたいと考えている。

結 論

口腔の感染防御におけるマクロファージの機能を解明する目的で、**LPS** で誘導したマウス腹腔マクロファージの異物に対する付着作用を検索した結果は以下のとおりである。

1. 誘導マクロファージによる正常 **SRBC** の付着率は正常マクロファージより 3.9% 高かった。
2. 誘導マクロファージによる **LPS-SRBC** の付着率は正常マクロファージより 14.8% 高かった。
3. 正常マクロファージによる **SRBC** の付着率は **LPS** の有無にかかわらず同程度であった。
4. 誘導マクロファージ、正常マクロファージとも、4 種の赤血球に対する付着率は赤血球の種類にかかわらず同程度であった。

これらの結果から、**LPS** は *in vivo* においてマクロファージの付着作用を亢進させることが示唆された。また、マクロファージと **SRBC** との結合は特異的なものではないと考えられた。

引用文献

- 1) 小野崎菊夫・橋本達一郎：マクロファージを活性化するリンフォカイン。蛋白質・核酸・酵素 26：1910—1924, 1981.
- 2) 中野昌康：リポ多糖の免疫学的活性。蛋白質・核酸・酵素, 別冊 21：269—282, 1976.
- 3) Mørand, B. and Kaplan, G. : Macrophage activation *in vivo* and *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 108 : 279—288, 1979.
- 4) Schnyder, J. and Baggiolini, M. : Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and non-stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 148 : 435—450, 1978.
- 5) Werb, Z. and Gordon, S. : Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142 : 346—360, 1975.
- 6) Werb, Z. and Gordon, S. : Elastase secretion by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142 : 361—377, 1975.
- 7) Nathan, C., Nogueira, N., Juangbhanich, C., Ellis, J. and Cohn, Z. : Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.* 149 : 1056—1068, 1979.
- 8) Onozaki, K., Homma, Y., Miura, K. and Hashimoto, T. : Scanning electron microscopic study of changes in the surfaces of lymphokine-treated guinea pig macrophages. *J. Reticuloendothelial Soc.* 30 : 471—481, 1981.
- 9) Homma, Y., Onozaki, K., Fukutomi, Y. and Hashimoto, T. : The mechanism of cell surface changes activated with purified migration inhibitory factor/macrophage activation factor. *Cellular Immunol.* 72 : 231—238, 1982.
- 10) 岩永伸子・野村直弘・井上庸三・井上博雅・何達人・内山長司：誘導マクロファージの培養中の形態学的分類とその機能について。九州歯会誌 38：435—442, 1984.
- 11) Shaw, D.R. and Griffin, Jr. F. M. : Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion. *Nature* 289 : 409—411, 1981.
- 12) Nathan, C.F. and Root, R.K. : Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 146 : 1648—1662, 1977.
- 13) Murray, H.W., Juangbhanich, C.W., Nathan, C.F. and Cohn, Z.A. : Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 150 : 950—964, 1979.
- 14) Haeffner-Cavaillon, N., Chaby, R., Cavaillon, J.M. and Szabó, L. : Lipopolysaccharide receptor on rabbit peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 128 : 1950—1954, 1982.
- 15) Stern, A.C., Erb, P. and Gisler, R.H. : Ia-bearing bone marrow-cultured macrophages induce antigen-specific helper T cells for antibody synthesis. *J. Immunol.* 123 : 612—615, 1978.
- 16) Schnyder, J. and Baggiolini, M. : Role of phagocytosis in the activation of macrophages. *J. Exp. Med.* 148 : 1449—1457, 1978.