

腸内細菌 *Bacteroides fragilis* 由来スフィンゴリン脂質の 哺乳類細胞への影響

加藤信子・武藤吉徳*・田中香お里**
渡辺邦友**・上野一恵***

はじめに

スフィンゴリン脂質は、長鎖塩基であるスフィンゴシンとリン酸をその分子内に有する極性脂質で、主に生体膜中に見いだされる。本脂質が細菌に存在するのは極めてまれで、ごく少数の属に限られている。嫌気性無芽胞グラム陰性菌のバクテロイデス属の菌種は菌体成分として、このスフィンゴリン脂質を有している数少ない腸内細菌の一群である。現在、このバクテロイデスには10菌種が属し、ヒト腸管内の常在菌として最も優勢な菌群である。なかでもバクテロイデス フラジリスは、腹腔内感染症等から高頻度に分離され、内因性感染症の原因菌として特に重要視されている。しかしながら、本菌種の病原因子については幾つかの示唆を与えられているものの不明である。

腸内細菌叢の主要な構成員 *B. fragilis* には菌体成分としてCPE (セラミドホスホリルエタノールアミン) とCPG (セラミドホスホリルグリセロール) というアルカリに安定な脂質スフィンゴリン脂質の存在が知られている^{1,2)}。この脂質が感染時、宿主の細胞に影響を及ぼすことは十分に予想される。そこで、*B. fragilis* から得たスフィンゴリン脂質が、マウスの好中球と培養細胞のHL-60 (急性前骨髄球性白血病) 細胞及びCHO (チャイニーズ ハムスター卵巣) 細胞に与える影響を解析したので報告する。

材料と方法

1. ASLリポソーム (liposome) の調製

脂質人工膜の小胞であるリポソームは、*B. fragilis* から得たスフィンゴリン脂質画分であるASL (Alkali Stable Lipid) を用いて作製した。ASLは200mgをクロロホルムに溶解させ、均一分散後、エバポレーター (37℃) で蒸発乾固した。このようにして形成されたlipid filmにRPMI 1640 10mlを加え、超音波処理することによりリポソームが形成される。リポソームは分注し、凍結保存 (-70℃) した。使用時には水中で融解させてから攪拌処理 (vortexing) をした後、実験に供した。なお、作製したリポソームは0.02mg/ μ lのASLを含有する。

2. マウス腹腔渗出性好中球の採取

SPF マウス (6~8週齢、ICR♀体重28~30g、購入2日後) の腹側を70%エタノールで消毒後、好中球誘導物質として5%カゼインナトリウム生理食塩水2ml (高压滅菌 121℃, 15分) を腹腔内注射して、17~18時間絶食させた。その後、マウスをエーテル麻酔して、ペーパータオルを敷いた板上に腹部を上にして置いた (生きている状態)。次に70%エタノールを散布し、頸動脈を切断し脱血死させる。そして、ピンセットで腹部表皮をつまみ上げて、表皮を切り、左右に広げ、腹膜を露出させる。下腹部の腹筋の部分より針先を刺し込み、針穴を下に向けて一気に冷PBS 5mlを腹腔内に注入すると、細胞が浮

* 岐阜大学医学部看護学科

** 岐阜大学医学部病原微生物科学

*** 岐阜医療技術短期大学

遊してくる。針を抜くときは上方から腹膜をなでるように指をすべらせて穴をふさぎ、30秒間マッサージして、細胞を浮遊させて腹腔内液を注射器で回収する。回収した腹腔内液は脂肪塊を除くため、金属またはナイロンメッシュ (200mesh) を用いてろ過しながらポリプロピレン製遠心チューブ (15ml) に集め水中に置く。この操作をさらに2回繰り返して腹腔内を洗浄することにより、15ml/匹の細胞浮遊液を採取できる。5匹のマウスから集められた細胞浮遊液は遠心分離 (4℃ 1000rpm 10分) によって細胞 pellet にした。この pellet に赤血球混入の場合は溶血処理 (0.2% NaCl 5 ml を加えて懸濁、7秒後直ちに 1.6% NaCl 5 ml を添加後、遠心操作を行った。そして、PBS で2回洗浄遠心し、さらに RPMI 1640 で1回洗浄、遠心して腹腔滲出性好中球の pellet を得た。この pellet は直ちに 5% FCS-RPMI 1640 培地の一定量に懸濁して、腹腔滲出性好中球浮遊液として水中に保存 (5時間保存) しながら実験に供した。なお、この細胞液の一部 (20 μl) を 0.2% トリパンブルーで染色して血球計算盤で細胞数をカウントし、生細胞数 (好中球率) を毎回求めた。

3. シトクロムCを用いた遊離 O₂⁻の測定

シトクロムC溶液に加えられた好中球がPMA刺激で放出する O₂⁻は、550nmの波長で、ダブルビーム分光光度計を用いて連続的

実験デザイン

	対 照		スフィンゴリン脂質	
	レファレンスセル 反応液A	サンプルセル 反応液B	レファレンスセル 反応液A	サンプルセル 反応液B
シトクロムC	+	+	+	+
SOD	+	-	+	-
細胞	+	+	+	+
RPMI 1640	+	+	+	+
	-----	-----	-----	-----
	37℃	5分	37℃	5分
ASL	-	-	+	+
	-----	-----	-----	-----
	37℃	10分後	37℃	10分後
PMA	+	+	+	+
	-----	-----	-----	-----
	37℃	550nm	37℃	550nm

終濃度：シトクロムC ; 150 μM, SOD ; 30 μg/ml, 細胞数 ; 10⁶個/ml, PMA ; 200nM

にモニターした。反応液AからSODを除いたものが反応液Bである。ASLの各終濃度は、0.5, 0.7, 1.0mg/mlで行った。

4. HL-60細胞の培養

細胞は基本増殖培地 (40ml : RPMI 1640 (含フェノールレット) 35.6ml, 10% FCS 4 ml, 0.01% 抗生物質 0.4ml, 7.5% NaHCO₃ 5滴) の9mlを用い、37℃、5% CO₂インキュベーター中で培養を行った。増殖したHL-60培養液は遠心してHL-60のpelletを得て一定量の培地に懸濁し、生細胞数をカウントして用いた。

結果および考察

1. マウス好中球に対するASLの影響

好中球を形態観察するためには、マウスから得た 9.62 × 10⁶ 個/ml 5% FCS-RPMI 1640の細胞液 (生細胞率 ; 97.2%) 50 μl、ASL 10 μl (終濃度 0.5mg/ml) と5% FCS-RPMI 1640培地 140 μlとで全量 200 μlをガラスボトムディッシュ(B)に置いた。また対照としてASLを除いた200 μlを別のガラスボトムディッシュ(A)に置き、双方を37℃のプレート上で保温しながら観察した。ASLを作用させて90~100分後の生きた状態の好中球を観察した微分干渉顕微鏡像が図1である。ASLを作用させて30分間は双方とも細胞に変化は見られなかった。しかし、さらに

時間が経過すると、ASLを加えた好中球(B)の周囲は著しく伸展して細胞面積が拡大することが明らかになった。一方、対照の(A)は100分後も大きな変化がなく、比較的丸い形態を呈していた。

好中球の伸展反応は、リポ多糖 (LPS) な

どの刺激においても報告されている^{3,4)}。

図2(A)は、図1(B)と同じ状態のASL存在下の好中球である。この伸展し、細胞面積も大きくなった好中球についてDNAを染色する蛍光色素であるHoechst 33258を用いて核を染色して観察すると、核に変化は見ら

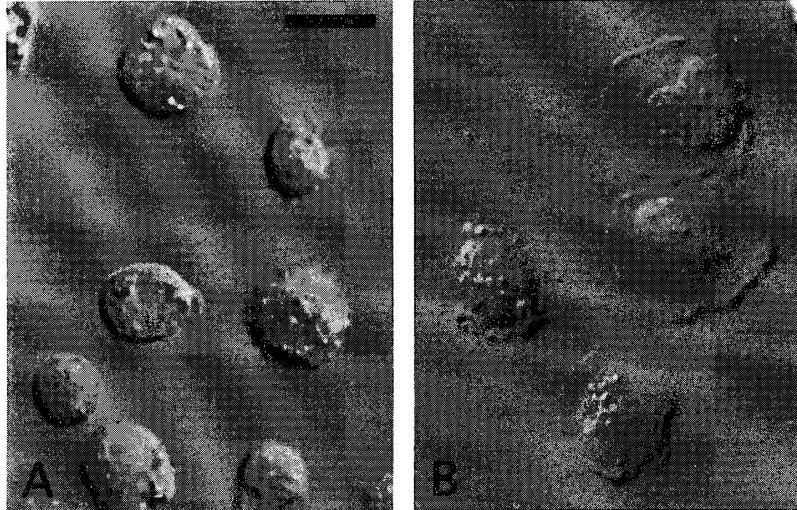


図1 マウス好中球に対する *B.fragilis* スフィンゴリン脂質の影響

A: 対照 (バー: 10 μ m)
B: スフィンゴリン脂質存在下
(微分干渉顕微鏡像)

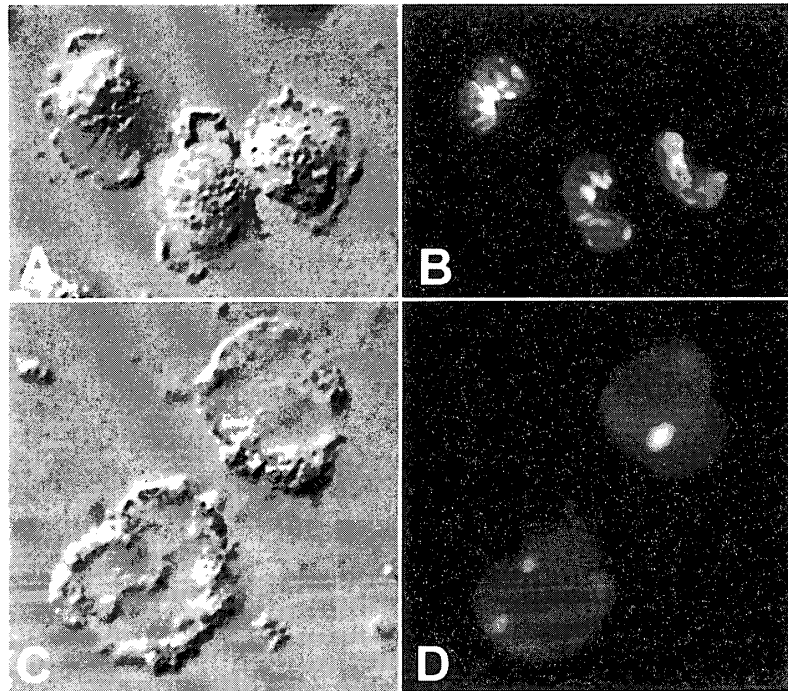


図2 *B.fragilis* スフィンゴリン脂質のマウス好中球の核への影響

A: スフィンゴリン脂質(0.5mg/ml)存在下90分培養 B: (A)の核
C: スフィンゴリン脂質(0.5mg/ml)存在下140分培養 D: (C)の核
(B,D: 蛍光色素 Hoechst 33258 による核染色)

れず (図2-B)、好中球としての機能を保持していることが明らかである。一方、ASLを作用させて140分後の好中球は図2(C)に見られるように、細胞の中央部が陥没している状態が観察される。この状態の好中球の核は図2(D)に見られるように断片化が観察され、細胞死(アポトーシス)を起している可能性が強く示唆される。

生体(宿主)に細菌が侵入すると好中球が感染部位に遊走し、リソゾーム酵素の放出、活性酸素の生成、貪食、という一連の反応を通じて細菌を消化する⁵⁾。今回、検討したスフィンゴリン脂質と同じような細菌由来成分であるリポ多糖(LPS)は、こうした好中球機能を阻害することによって感染防御系を乱すことが知られている^{6,7)}。また、好中球は細菌の菌体成分に対する応答性が高いので、走化性を介した遊走能の引き金にもなっている。*B.fragilis*のスフィンゴリン脂質は、LPSと同様に細菌由来成分であることから、本脂質に対する好中球の応答性に興味を持たれる。

2. マウス好中球の O_2^- 産生に対する ASL の影響

好中球の殺菌作用の中心的な過程は、 O_2^- などの活性酸素の産生^{8,9)}である。そこで、好中球機能に対するスフィンゴリン脂質の影響を解析した。

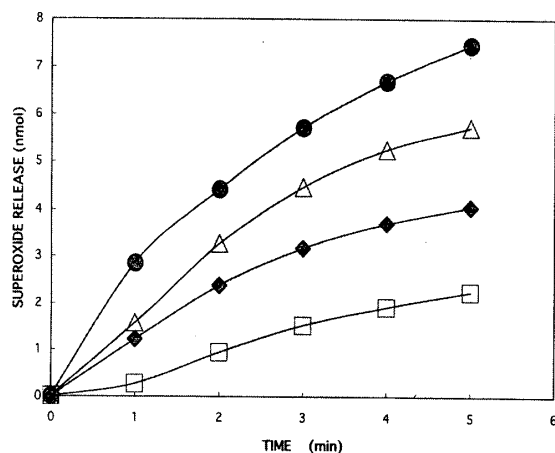


図3 マウス好中球の PMA による O_2^- 生成に対する *B.fragilis* スフィンゴリン脂質の影響

● control ◆ 0.7mg/ml
 △ 0.5mg/ml □ 1mg/ml

図3は、マウス好中球の PMA による活性酸素 (O_2^-) 産生を *B.fragilis* スフィンゴリン脂質が濃度に依存して抑制していることを示している。

プロテインキナーゼC (タンパク質リン酸化酵素) の活性化剤である PMA (phorbol myristate acetate) で刺激されると、好中球は急激に O_2^- を産生する^{10,11)}。この反応は好中球機能の一部を再現していると考えられる。PMA の作用部位がプロテインキナーゼCであるとすると、この結果はスフィンゴリン脂質がこの酵素より後の反応系を阻害することによって O_2^- の産生を抑制していることを示している。

一方、予備的な実験ではあるが、ASL がマウス好中球の貪食活性を著しく阻害することも観察された。また、*B.fragilis* の菌体自体がマクロファージや好中球の貪食活性を阻害することがいくつか報告されている^{12,13,14)}。

以上、好中球に関する結果から *B.fragilis* を含むバクテロイデス属のスフィンゴリン脂質は感染防御系の細胞である好中球の機能を抑制できる菌体成分であることは明らかであり、スフィンゴリン脂質をバクテロイデス属の病原因子の一つと考えることができる。

3. 培養細胞 HL-60 に対する ASL の影響

HL-60 細胞はヒト急性前骨髄球性白血病患者の末梢血から樹立された浮遊性の前骨髄球性細胞株である。この細胞は、12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート (TPA) などの発ガンプロモーターや活性型ビタミン D_3 を含む培地で培養すると、単球やマクロファージに分化する。一方、ジメチルスルホキシド (DMSO) やレチノイン酸 (RA) などを加えて培養すると顆粒球に分化する。このような特徴を持つ HL-60 細胞を用いて、*B.fragilis* 由来スフィンゴリン脂質が培養細胞系に及ぼす影響を観察した。

図4は、3日間培養した HL-60 細胞を用いた結果である。ASL の存在下でさらに90分培養された HL-60 細胞(C)は、対照の正常細胞(A)と比べて細胞の大きさが異なり萎

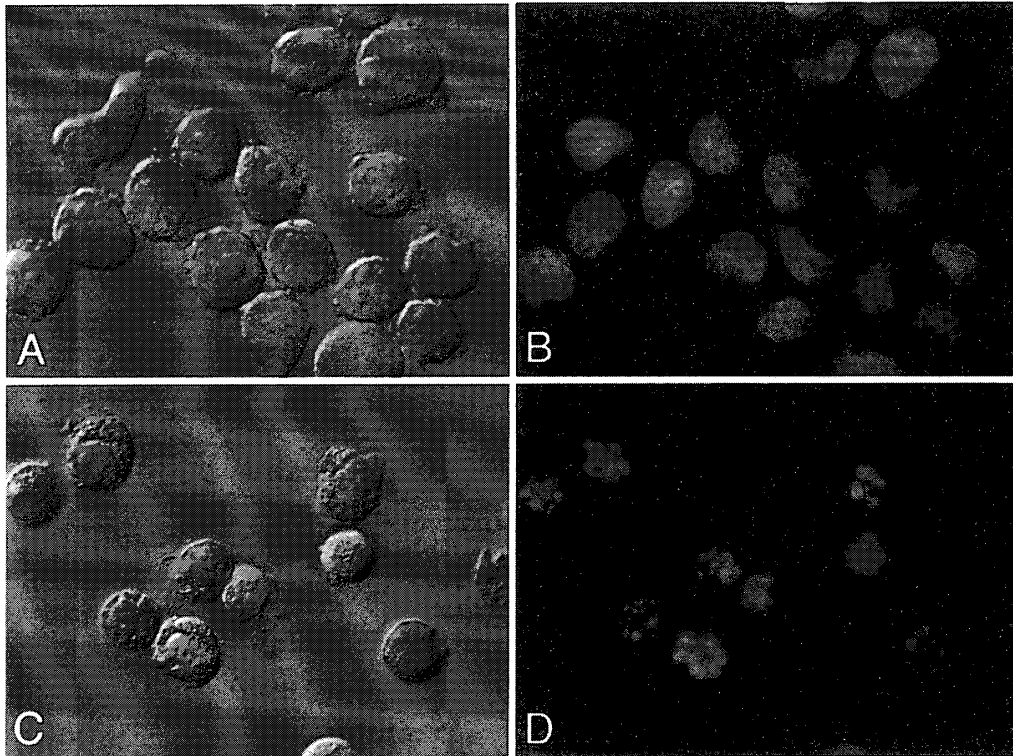


図4 HL-60 細胞に対する *B.fragilis* スフィンゴリン脂質の影響

A, B: 対照 C, D: スフィンゴリン脂質存在下
(B, D: 蛍光色素 Hoechst 33258 による核染色)

縮(C)しているのが観察される。これらの細胞(A), (C)のDNAを蛍光色素のHoechst 33258を用いて染色したものが(B)と(D)で、ASL存在下の細胞(D)では核の凝縮や断片化が観察された。

スフィンゴリン脂質によって誘発される、こうした変化はアポトーシスを起こしている細胞に見られる現象である¹⁵⁾。したがって、バクテロイデスのスフィンゴリン脂質がアポトーシスの誘導物質であることが予想されるため、ASL存在下で培養したHL-60細胞のDNAを抽出し電気泳動にかけた。その結果(写真の提示なし)、正常細胞からのDNAは高分子量部分にバンドを見ることができのに対し、ASL存在下でのDNAは低分子量域に複数のバンドがラダー状に認められた。DNAの低分子量化(断片化)は、アポトーシスに特徴的で多くの細胞系で報告されてきている^{16,17)}。

もう一つの培養細胞CHOは、チャイニーズハムスター卵巣の生検由来の樹立細胞株で繊維芽性細胞である。この細胞は細胞融合

による遺伝子の発現の調節機構の研究や突然変異の分離などに適する付着性の細胞株である。図5は、このCHO細胞に対するスフィンゴリン脂質の影響を観察したものである。写真Aは正常細胞の付着状態を示している。写真BはAの細胞の核を見たものである。ASL存在下で培養した細胞が写真Cで、萎縮し丸くなっている。この細胞の核を観察すると、好中球・HL-60細胞と同じように核の断片化(Dの矢印)が見られる。つまり、CHO細胞においてもアポトーシスを示唆する結果となり、*B.fragilis*由来スフィンゴリン脂質によるアポトーシスの誘発は細胞の種類に依存しない現象であると考えられる。

細菌に感染したとき、まず生体防御機構の構成員である好中球やマクロファージのような食細胞が作動する。食細胞の反応性の調節に細胞内情報伝達系が重要な役割を果たしていることはよく知られている^{18,5)}。特に、スフィンゴリン脂質の代謝産物であるスフィンゴシンで活性が抑制されるプロテインキナーゼCは、食細胞の反応性の調節に重要な役割

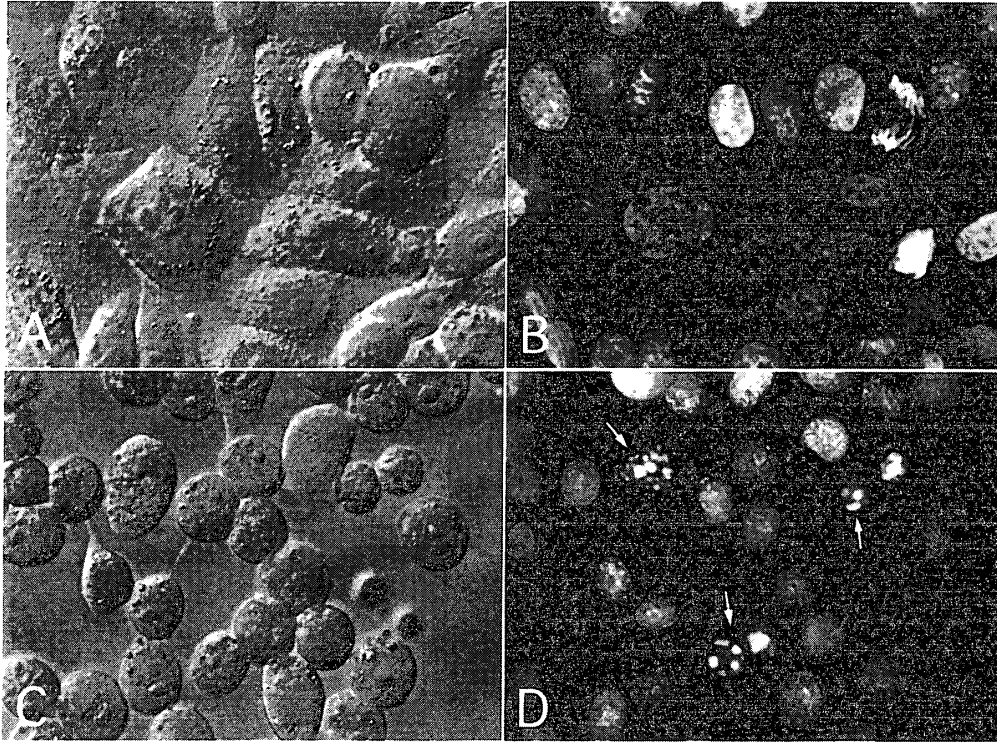


図5 CHO細胞に対する *B.fragilis* スフィンゴリン脂質の影響

A, B: 対照 C, D: スフィンゴリン脂質存在下
(B, D: 蛍光色素 Hoechst 33258 による核染色)

を果たす酵素である^{19,20)}。このことは、*B.fragilis* のようなスフィンゴリン脂質を持っている病原性の細菌においては、病巣内の菌体や食細胞に取り込まれた菌体の成分であるスフィンゴリン脂質が宿主細胞とりわけ食細胞系の細胞内情報伝達系に影響を及ぼす可能性を強く示唆している。今回得た好中球における結果は、バクテロイデス属のスフィンゴリン脂質であるセラミドホスホリルエタノールアミンとセラミドホスホリルグリセロールが好中球機能を抑制することを実際に示している。したがって、バクテロイデス属スフィンゴリン脂質はリポ多糖などと同様に菌体の構成成分としての機能だけでなく、感染時の病原因子として宿主の生体防御系の細胞機能を擾乱することが可能であり、本属による感染の成立と維持に大きく関与していると考えられる。

HL-60細胞で明らかになったスフィンゴリン脂質のアポトーシス誘導能は、バクテロイデス属による感染病巣の形成機構に注目すべき手がかりを与えてくれた。通常、*B.fragilis*

などによる腹腔内感染症では、感染部位に感染菌体を含む膿瘍が形成される^{21,22)}。この膿瘍の組織像は複雑であるが、死滅した宿主組織細胞が多量に含まれていることが知られている。これらの死細胞がどのようにして生じたかは不明であるが、菌体由来のスフィンゴリン脂質によるアポトーシスの可能性も充分にあり得る。今後、さらなる研究が望まれるところである。

文 献

- 1) LaBach, J. P. and White, D. C.: J. Lipid Res., 1969; 10:528-534
- 2) Kato, M. Muto, Y. Tanaka, K. Watanabe, K. and Ueno, K.: Anaerobe., 1995; 1:135-139
- 3) Enis GIRARD, Robert PAQUIN and Andre D. BEAULIEU.: 1997; 325:147-153
- 4) Charlie C. Chang, Scott M. and Prabhas V. Moghe: Biomaterials: 1999; 20:273-281
- 5) Romeo, D.: Trends Biochem. Sci. 1982; 7:408-411
- 6) Wilson ME.: Rev. Infect Dis. 1985; 7(3): 404-418

- 7) Forehand JR, Bomalski JS and Johnston RB. Adv Exp Med Biol. 1991; 297: 65-73
- 8) Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC.: Blood. 1998; 92(9): 3007-3017.
- 9) Clark RA.: J. Infect Dis. 1999; 179 Suppl 2: S309-317.
- 10) Cooke E and Hallett MB.: Biochem J. 1985; 232(2): 323-327.
- 11) Strnad CF and Wong K.: Can J Physiol Pharmacol. 1985; 63(12): 1543-1546
- 12) Jones GR and Gemmell CG.: J Med Microbiol. 1982; 15(3): 351-361
- 13) Namavar F, MacLaren DM.: Infect Immun. 1983; 40(3): 930-935
- 14) Rodloff AC, Hahn H and Friedman H.: Infect Immun. 1986; 52(2): 488-492
- 15) Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR.: Br J Cancer. 1972; 26(4): 239-257
- 16) Peter ME, Heufelder AE and Hengartner MO.: Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(24): 12736-12737
- 17) Robertson JD and Orrenius S.: Crit Rev Toxicol. 2000; 30(5): 609-627
- 18) Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L.: Lab Invest. 2000; 80(5): 617-653
- 19) Bell RM, Loomis CR and Hannun YA.: Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1988; 53 Pt 1:103-110
- 20) Hannun YA and Bell RM.: Clin Chim Acta. 1989; 185(3): 333-345
- 21) Finegold S M.: Gneral Aspects of Anaerobic Infection. In Anaerobic Infections in Humans. (Finegold S. M., George W. L. ed.), p.137-153, Academic Press, San Diego, CA., 1989.
- 22) Tanaka, Y., Watanabe, K., Shimakra, Y., Bando, K., Kato, N. and Ueno, K.: CHEMOTHERAPY 1992; 40:1224-1230

— 食物栄養学科 —