

原 著

実験的結核感染組織における脂質変化

2. マウス腹腔滲出細胞を用いた実験モデルによる解析

近 藤 瑩 子・金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部・同細菌第1部

受付 昭和50年7月11日

STUDIES ON LIPID COMPOSITION OF EXPERIMENTALLY
PRODUCED TUBERCULOUS LESIONS

2. Experimental Models Using Mouse Peritoneal Exudate Cells

Eiko KONDO* and Koomi KANAI

(Received for publication July 11, 1975)

In order to gain an insight into the genesis of cholesterol esters in tuberculous mouse lung lesions, attempts were made to examine lipid composition of macrophages comparing normal and stimulated ones, and also comparing with neutrophils. These cells were obtained from the peritoneal cavity of normal and BCG-vaccinated mice.

Total lipid amount of macrophages was twice as much as that of neutrophils. The same was true with phospholipids and cholesterol. On the contrary, the content of triglycerides in neutrophils was two-fold as much as that of macrophages. Remarkable was the finding that cholesterol ester content of macrophages increased greatly when they were stimulated by casein. Lecithin, sphingomyelin, and phosphatidylethanolamine were the main phospholipids in both neutrophils and macrophages, and the percent distribution of these individual phospholipids was almost the same in these two cell types.

10^8 cells of normal macrophages were incubated with 50 mg of H37RvR-KM tubercle bacilli in 5 ml of Hank's solution containing kanamycin for 4 days at 37°C. Then, lipids were extracted from the mixture and fractionated. As shown in Fig.1, cholesterol ester content was 5 to 10 times as much as that of the incubation of normal macrophages alone. When heat-killed or avirulent tubercle bacilli were used instead of virulent ones, the increase of the ester amount was observed in the lesser extent.

1.8×10^9 cells of casein-stimulated macrophages were disrupted and fractionated into 10^3 g, 4×10^3 g, 18×10^3 g sediments and the supernatant. DNA was present mainly in 10^3 g sediment, and the major portion of protein was found in the supernatant. Total lipids, phospholipids and cholesterol were mainly distributed to the membrane-rich fractions, namely 4×10^3 g and 18×10^3 g sediments. However, cholesterol ester distribution was shifted to 10^3 g and 4×10^3 g sediments. Besides, the percent distribution of ester cholesterols in total lipids was high in 10^3 g sediment and the supernatant unlike other lipids.

* From Department of Tuberculosis and Department of Bacteriology I, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

The observations as above suggest that macrophages, when they are stimulated by mycobacterial infection, would come to have an increased amount of esterified cholesterol, and that this is the reason why cholesterol esters are accumulated in tuberculous lesions and particularly in the vicinity of infecting mycobacteria.

結核感染の進展に伴つて、マウス肺に肉芽形成が起こると、肺組織の脂質構成においてトリグリセライドが減少し、コレステロール量はあまり変化がないが、遊離脂肪酸、燐脂質そしてコレステロールエステル(以後、略してCE)の顕著な増量がみられる¹⁾²⁾。これらの変化は、肉芽肺より分離したマクロファージにおける変化と同一傾向であつた³⁾。感染マクロファージにおける脂質変化のうち、CEの増量は、この研究の動機となつた *in vivo* 菌での観察とよく関連しうるものであるが、この点をさらに確認するために、腹腔渗出細胞を用いて、感染によるマクロファージ脂質の変化のモデル実験を行つた。

実験材料と方法

動物そして脂質分析法に関しては前報告³⁾と同じである。

腹腔細胞の収獲: 正常マウスの腹腔内をそのまま Hanks 液で洗い出し、洗浄液を 1,000 rpm 5分遠沈して細胞を収獲した。また、正常マウスあるいは2週前に BCG 1 mg の静注をうけたマウスの腹腔内に、12%または6%カゼインの 2 ml を注射し、6時間または3日後に洗い出して同じく細胞成分を収獲した。細胞数の計算はビルケツルク血球計算板により、また分別は塗抹標本のギムザ染色によつた。

腹腔細胞と結核菌との混合インキュベーション: 腹腔細胞 10^8 前後とカナマイシン耐性の結核菌 50 mg (または 100 mg) とをカナマイシン 100 mcg/ml に含む Hanks 液 5 ml 中で混合し、37°C で4日間インキュベイトした。そのあと、45 ml のアセトンを加えて脂質を抽出し、残渣はさらにクロロホルム・メタノール(2:1)で抽出した。

細胞の分画: 正常マウスの12%カゼイン腹腔渗出細胞の 1.8×10^9 コを 0.2 M KCl の 10 ml に浮遊させ、これをテフロンホモジナイザーでひやしつゝ数回ストロークしたのち、 10^3 g, 4×10^3 g, 18×10^3 g, 10^5 g で分別遠沈し、各沈渣と最終上清とに分けた。

実験成績

マウス腹腔内洗液中の細胞構成と収量 (Table 1): 正常マウス腹腔を単に Hanks 液で洗い出して細胞を収獲した場合、その 89% はマクロファージとみられる単核円形細胞であつた。しかし12%カゼイン 2 ml の腹腔内注射で刺激した場合には、6時間後に収獲すると、得られた細胞の94% は好中球であり、3日後の収獲では75% がマクロファージで、そのほかリンパ球、好中球そして核のない膜様の細胞から成つていた。他方2週前に BCG 1 mg 静脈注射で感作されたマウスにおいては、腹腔細胞の67% はマクロファージで、12% がリンパ球であつた。このマウスにさらに6%カゼインの腹腔内注射で刺激すると、注射後6時間での収獲細胞の93% は好中球であり、3日後では63% がマクロファージ、11% がリンパ球、14% が好中球であつた。カゼインによつて誘出されたマクロファージは、McLaughlin⁴⁾ らによつても指摘されているように、正常(非刺激)の場合と違って細胞質の部分が伸展拡大し、“Nucleocytoplasmic ratio” が小であつた。

細胞収量は Table 1 に示すように、正常マウス腹腔ではマウス当り常に 2×10^6 前後であり、カゼイン誘出腹腔細胞数はその3~4倍に達する。BCG 感作マウスでは、正常の1.5倍または同程度の細胞数が得られる

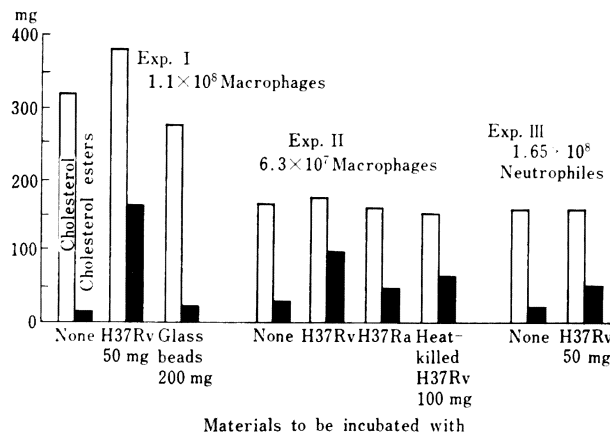
Table 1. Yield of Mouse Peritoneal Exudate Cells and Their Cell Type Population

Mice			Cell yield per mouse	Cell type population (%)			
BCG-vaccination	Casein-stimulation	Time to cell harvest		Neutrophiles	Macrophages	Lymphocytes	Others
no	no		2.2×10^6	1	89	8	2
no	yes	6 hr	8.3×10^6	94	(← ———— 6 ———— →)		
no	yes	3 days	6.8×10^6	9	75	9	7
yes	no		3.4×10^6	4	67	12	17
yes	yes	6 hr	2.0×10^7	93	(← ———— 7 ———— →)		
yes	yes	3 days	4.1×10^6	14	63	11	12

Table 2. Lipid Content of Mouse Peritoneal Exudate Cells

Mice	Casein-stimulation of peritoneal cavity	Main cell type in peritoneal exudate cells	Cell yield ($\times 10^6$)	Lipid content per 10^8 cells (mcg)				
				Total	Cholesterol		Triglycerides	Phospholipids
					Free	Ester		
Normal	no	Macrophages	1.5	3,000	267	108	84	2,159
Normal	yes		4.6	2,667	195	285	149	1,354
BCG-vaccinated	no		1.5	3,833	295	108	153	2,069
BCG-vaccinated	yes		6.9	2,194	202	151	59	1,048
Normal	yes	Neutrophiles	8.3	1,555	188	69	126	353
BCG-vaccinated	yes		20.0	1,660	100	27	111	—

Fig. 1. Formation of Cholesterol Esters in the Incubation Mixture of Mouse Peritoneal Exudate Cells and Mycobacteria



が、これにカゼイン誘出を行うと、誘出なしのときの1.2倍またあるときには4倍強の細胞が集められた。一方、好中球は正常マウスでは 8.3×10^8 、BCG マウスではこの2倍強が誘出された。

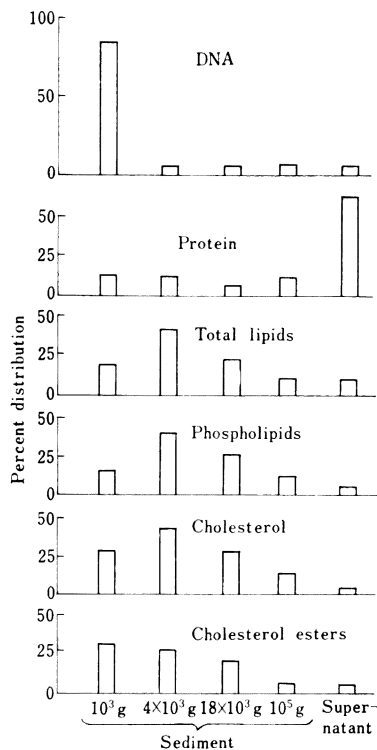
マクロファージと好中球の脂質：細胞 10^8 コ当りの脂質量を Table 2 に示した。総量においてマクロファージを主体とする細胞標本では、いずれも 3,000 μg 前後であるが、好中球では常にその半量の 1,500 μg 程度であった。しかし、その構成脂質について比較すると、正常マクロファージおよび好中球に少ないCEは、カゼイン誘出マクロファージに殊に多かつた。燐脂質とコレステロールはマクロファージのほうが好中球に比し多いが、これらの脂質と比べてトリグリセライド量の含有率が好中球に多いことも特徴的であつた。燐脂質の主成分は、レシチン、スフィンゴミエリン、フォスファチジルエタノールアミンで、これらの比率はマクロファージも好中球も殆んど同じであつた。その他に少量のカルジオリピン、リゾレシチン等が検出された。

マクロファージと結核菌の混合インキュベーションによるコレステロールエステルの生成：正常腹腔細胞の 10^8 コと H37Rv R-KM 50 mg とをカナマイシン 100

mcg/ml を含む 5 ml の Hanks 液中で4日間 37°C にインキュベートしたのち、脂質を抽出した。その結果、菌と混合インキュベートすることによって、正常腹腔細胞のみを単独で同じ条件においてインキュベートしたときの5~10倍にCEの増量がみられた。Fig.1に示すように、加熱死菌や弱毒株ではエステル生成量は少なく、また菌に変えて硝子ビーズを用いたときも効率が悪かつた。

マクロファージにおける脂質の細胞内分布：常にCE量の多く検出される12%カゼインによる腹腔滲出細胞 1.8×10^9 を 0.2 M KCl にうかべ、テフロンホモジナイザーを用いてこわし、 10^3 g, 4×10^3 g, 18×10^3 g, 10^5 g の遠沈分画と上清とに分け、沈渣分画は一定量の0.2 M KCl に再浮遊し、上清とともにDNAと蛋白量を測定し脂質はCM(2:1)で抽出して型のごとく分画定量した。Fig.2に示したようにDNAは 10^3 分画に、蛋白は上清分画に大部分が分布していたが、総脂質量は 4×10^3 g と 18×10^3 g の両分画つまり膜構成成分に多く、燐脂質と遊離コレステロールも同様のパターンで存在する。しかしCEに関しては 10^3 g と 4×10^3 g に多い。また総脂質中のCE含有率は 10^3 g 沈渣と上清にたかく、さ

Fig. 2. Percent Distribution of DNA, Protein, Lipids in Cell Fractions of Casein-induced Peritoneal Macrophages



らにこの2つの細胞分画からのエステル構成脂肪酸には、他の分画からのものと比べてC₁₈とC₂₀の不飽和脂肪酸が多かった。このような成績から、コレステロールとそのエステルとは細胞内での存在場所が異なり、生理化学的な意味も同一ではないように考えられる。

考 察

In vivo と *in vitro* のモデル実験によつて、正常マクロファージがカゼインあるいは結核菌の刺激をうけると、コレステロールのエステルが増量することが証明されたが、この *in vitro* の実験は血清を含まない Hanks 液中での菌とマクロファージの混合インキュベーションなので、エステル量増加はかならずしも血清リポ蛋白の流入によるものではなく、菌とマクロファージの直接的な相互作用によることを示唆している。この場合好中球ではエステル化は弱く、死菌、弱毒菌、硝子粉末などは有毒菌と比べると効果的でない。したがって有毒結核菌によるマクロファージの刺激、動員そして肉芽形成が感染組織のコレステロールのエステル化にあずかる役割は

大きいというべきであろう。Werb と Cohn⁵⁾ は組織培養細胞でラジオアイソトープを用いた実験で正常マウス腹腔細胞にはコレステロールエステルが検出できなかったことについて、マクロファージ中のコレステロールエステラーゼの存在によるものと考えた。彼らはマウス腹腔あるいはうさぎの肺マクロファージにその酵素の存在を証明した。一方、Tume と Day⁶⁾ はうさぎの腹腔と肺マクロファージにコレステロールエステル化酵素の存在を証明した。結核感染マクロファージあるいは特異的刺激を受けたマクロファージにおける CE 量の増量は、細胞のコレステロールエステル化酵素の活性上昇か、あるいはコレステロールエステラーゼ活性の阻害の結果として表現されるものであろう。抗酸菌それ自体によつてもコレステロールはエステル化されるということは、Razin と Shafer の *M. phlei*⁸⁾、Schubert らによる BCG を用いた研究⁹⁾ があり、エステルの中にはそういう反応により生成したものも含まれているにせよ、この反応の主役はマクロファージによるものと考えている。

いずれにせよ、これまで私達の得た成績を通覧すると、コレステロールエステルは感染菌の周辺においてことに多量存在する。また、このエステル型のマクロファージ分画への分布パターンをみると、他の脂質と多少異なっているので、その意味については明らかではないものの、エステル型が細胞の膜構造をはなれて菌体表面に吸着してゆく過程も考慮してよいだろう。これについては現在検討中であるので、いずれ報告の機会を持ちたい。

文 献

- 1) Kondo, E. and Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 24 : 345, 1971.
- 2) Kondo, E. and Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 27 : 59, 1974.
- 3) 近藤登子・金井興美: 結核, 50 : 225, 1975.
- 4) McLaughlin, J. F. et al.: J. Reticuloendothel. Soc., 12 : 293, 1972.
- 5) Werb, Z. and Cohn, Z. A.: J. Exptl. Med., 134 : 1545, 1969.
- 6) Tume, R. K. and Day, A. J.: J. Reticuloendothel. Soc., 7 : 338, 1970.
- 7) Day, A. J. and Tume, R. K.: Biochim. Biophys. Acta, 176 : 367, 1969.
- 8) Razin, S. and Shafer, Z.: J. Gen. Microbiol., 58 : 327, 1969.
- 9) Schubert, K. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 176 : 163, 1969.