

氏 名(本籍) たか 高 はし 橋 けい 計 すけ 介

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 597 号

学位授与年月日 平 成 10 年 9 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 マガキ血球における生体防御機能の発現に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 森 勝 義  
教 授 谷 口 和 也  
教 授 木 島 明 博

# 論文内容要旨

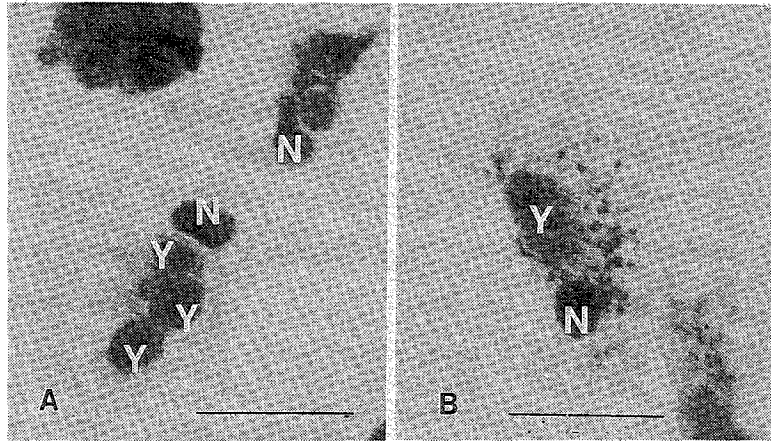
## 序 論

二枚貝では、他の無脊椎動物と同様に免疫グロブリンの産生能やTリンパ球様の細胞の存在は知られていない。したがって、二枚貝の生体防御機構は、非特異的な防御反応を示す因子群、すなわち血球の貪食能を軸とした細胞性防御因子と少数の液性防御因子との相互作用を介して成立していると考えられる。特に、液性因子の活性が弱い二枚貝では、血球が生体防御機構の中心であり、異物（非自己）の排除という役割を担っていると考えられる。二枚貝の血球は、血リンパに存在するマクロファージ様の細胞であり、旺盛な貪食能を示すことが古くから知られ、これまでも数多くの報告がある。しかし、血球の貪食能の発現に深く関連する異物認識、走化性などの異物に対する反応性、異物の種類による貪食様式や貪食能の違いなどについては、なお十分には明らかにされていない。また、取り込んだ異物の処理、特に病原性を有する細菌に対する殺菌・排除の過程についても不明な点が多く残されている。

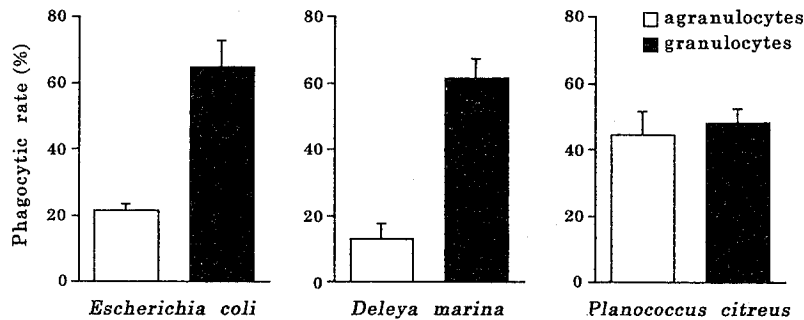
本研究では、海産二枚貝のマガキ *Crassostrea gigas* の血球を対象として、血球が2つの細胞集団で構成されることを明らかにし、各々の異物認識および貪食の機構を解析した。さらに、細菌の貪食に伴う活性酸素の生成機構と生成される分子種について検討し、血球による細胞内殺菌の過程において、活性酸素を介した酸素依存性の殺菌がみられるか否かについて調べた。また、細菌を貪食した特定の細胞集団にアポトーシスが誘導されることを見出し、この過程への活性酸素の関与についても検討を加えた。

## 第1章 血球による異物認識と貪食機構

マガキの血球は、血球の大きさや顆粒の有無、染色性の違いなどの形態学的観察に基づいて分類した結果、無顆粒球と顆粒球の2つの細胞集団に大別された。これらの細胞集団は、60% Percoll 溶液を用いた連続密度勾配遠心によって、無顆粒球層と顆粒球層に、各々90%以上の純度で分離することができた。そこで、分離した血球を用いて異物を貪食させた結果、無顆粒球、顆粒球ともに強い貪食能を示すことが明らかとなった (**Fig. 1**)。しかし、異物の種類によって、無顆粒球と顆粒球の貪食活性に違いのあることが示された。すなわち、細菌を異物とした場合、今回の供試細菌については、その種類に関わりなく顆粒球の方が常に高い貪食率を示した (**Fig. 2**)。一方、パン酵母、固定赤血球、そしてラテックスビーズを異物とした場合は、無顆粒球の方が1.5倍から5.5倍も高い貪食率を示した (**Table 1**)。さらに、パン酵母と大腸菌に対して、ホルマリン処理、100℃で60分間の熱処理、121℃で20分間のオートクレーブ処理を加えたものに対する貪食能を比較した結果、無顆粒球の貪食は、いずれの処理を行った場合でも無処理のものと変わらなかった。しかし、大腸菌に対する顆粒球の貪食は、ホルマリン処理、オートクレーブ処理によって大きく低下し、特にオートクレーブ処理された大腸菌はほとんど貪食できないことが示された (**Fig. 3**)。以上のこ



**Fig. 1** Light micrographs of *Crassostrea gigas* hemocytes phagocytizing yeast. Hemocytes were attached and spread on the surface of glass slide for 30 min of incubation. After incubation, spread hemocytes were treated with yeast particles for 60 min. Agranulocytes (A) and granulocytes (B) were stained with May-Grünwald and Giemsa staining for 15 min. N, nuclear of hemocyte; Y, yeast particle. Bars indicate 10 $\mu$ m scale.



**Fig. 2** Phagocytosis of three species of bacteria by *C. gigas* hemocytes. The extent of phagocytosis was determined by randomly counting at least 400 hemocytes from each monolayer under oil immersion lens of light microscopy. Three species of bacteria, *Escherichia coli*, *Deleya marina*, and *Planococcus citreus*, were tested as foreign particles. The percentage exhibiting phagocytosis (phagocytic rate) was calculated as

$$\frac{\text{number of hemocytes engulfing at least one bacterium}}{\text{total number of hemocytes counted}} \times 100$$

Results are means  $\pm$  SE of five separate experiments performed in triplicate.

**Table 1** Phagocytosis of various particles by *C. gigas* hemocytes

Particle	Agranulocyte		Granulocyte	
	PR (%)	PI	PR (%)	PI
Saccharomyces cerevisiae	86.1	6.39	15.9	2.37
Human RBC	34.3	3.21	22.4	1.57
Latex beads ( $\phi$ 2 $\mu$ m)	73.5	11.08	44.7	5.48

Hemocyte monolayers and foreign particles were co-incubated for 60 min at 20 $^{\circ}$ C.

The percentage exhibiting phagocytosis (phagocytic rate, PR) was calculated as

$$\frac{\text{number of hemocytes engulfing at least one particle}}{\text{total number of hemocytes counted}} \times 100$$

Phagocytic index (PI) was expressed as the average number of particles ingested in one hemocyte.

Results are means of six separate experiments performed in triplicate.

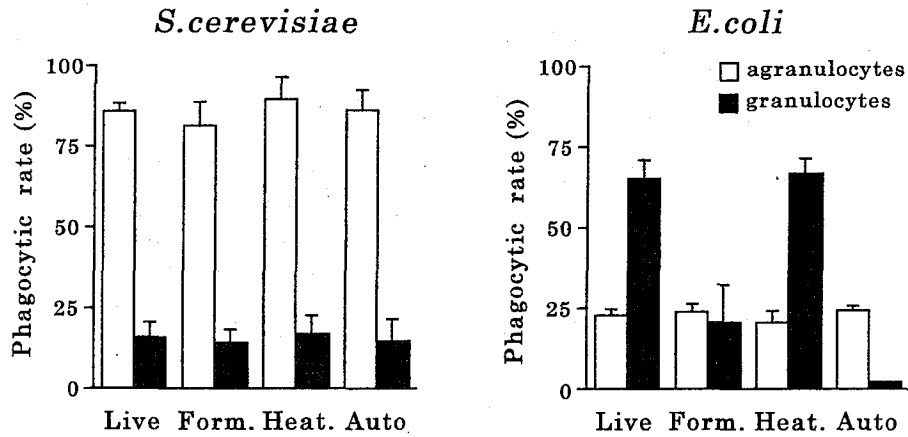


Fig. 3 Phagocytosis of *S. cerevisiae* (baker's yeast) and *E. coli* after no treatment (Live), formalinization (Form.), heating at 100°C for 60 min (Heat.), and autoclaving at 121°C for 20 min (Auto.).

とから、顆粒球は、細菌の有する特定の構造や分子を特異的に認識して貪食していることが推察された。すなわち、上記の処理を加えたことによる貪食率の変化は、顆粒球により認識されていた細菌の部位や分子が変性したため、貪食できなくなった結果であると考えられた。

細菌に対する顆粒球の高い反応性は、走化性の点でも明らかにされた。顆粒球は細菌由来の走化性ペプチドである fMLP に対して明確な走化性を示した (Fig. 4)。この走化性は、アンタゴニストの t-Boc-MLP の共存下で、ほとんど抑制されたことから、顆粒球は fMLP に対するレセプターを有していて、これを介して走化性因子を認識し、細菌に対して遊走することが示唆された。一方、無顆粒球には、fMLP に対する走化性は認められず、この点でも 2 種類の血球の間で違いがみられた。

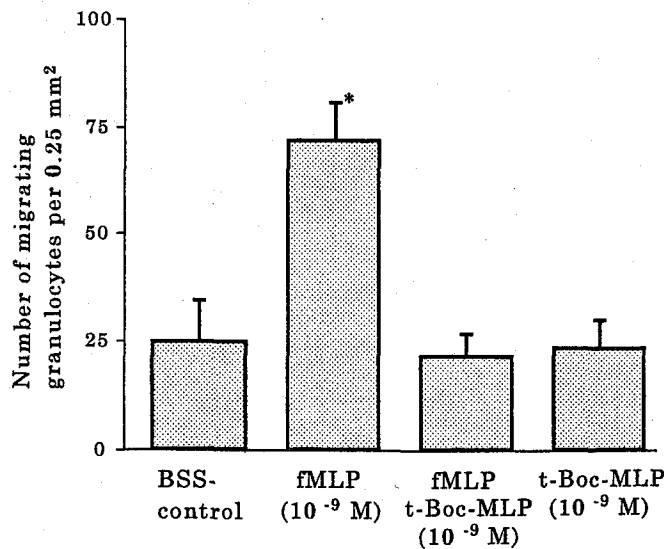


Fig. 4 Inhibition of granulocyte migration toward fMLP by t-Boc-MLP. Migration of granulocytes was measured toward BSS-control, toward fMLP, toward fMLP in the presence of t-Boc-MLP, and toward t-Boc-MLP. Results are means  $\pm$  SE of six separate experiments. \*Migration toward fMLP alone is significantly greater than migration toward BSS-control ( $p < 0.01$ ).

## 第2章 血球による活性酸素の生成と酸素依存性の殺菌機構

無顆粒球においては、NADPH オキシダーゼ様の酵素活性が認められ、哺乳類の白血球と同様に、ホルボールエステルや貪食の刺激によってスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) が最初に生成されることが明らかとなった (Fig. 5)。また、無顆粒球ではスーパーオキシドジスムターゼによる酵素的不均化反応の結果、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が生成することも示された。さらに、 $O_2^-$  と  $H_2O_2$

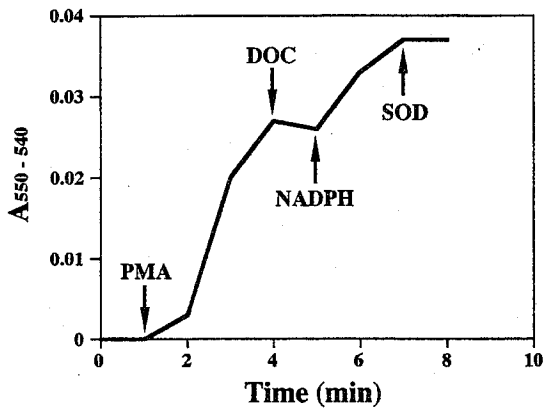


Fig. 5 Detection of  $O_2^-$  generation by NADPH-oxidase activity in PMA-activated hemocytes by the reduction of acetylated ferricytochrome *c*. Hemocytes ( $5 \times 10^7$  cells) were suspended in 2 ml of KRPG containing 2 mM  $NaN_3$  and exposed sequentially to 100 ng/ml of PMA, 0.05% (W/V) deoxycholate (DOC), 0.1 mM NADPH, and 150 U/ml of Cu / Zn-SOD.

の反応から、反応性が非常に高く、活性酸素による殺菌反応の主体となると考えられるヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) が生成されることも明らかとなった (Fig. 6)。以上のことから、無顆粒球には、好中球と類似した厳密な活性酸素代謝系が備わっていると考えられた。一方、顆粒球には NADPH オキシダーゼの活性は認められず、 $O_2^-$  の生成もみられなかった。しかし、 $H_2O_2$  は無顆粒球の生成量の約45%の生成が認められた (Table 2)。このことは、顆粒球における  $H_2O_2$  の生成は、無顆粒球とは異なる経路で行われていることを示唆している。 $O_2^-$  が生成されないことから、顆粒球では  $\cdot OH$  の生成も認められな

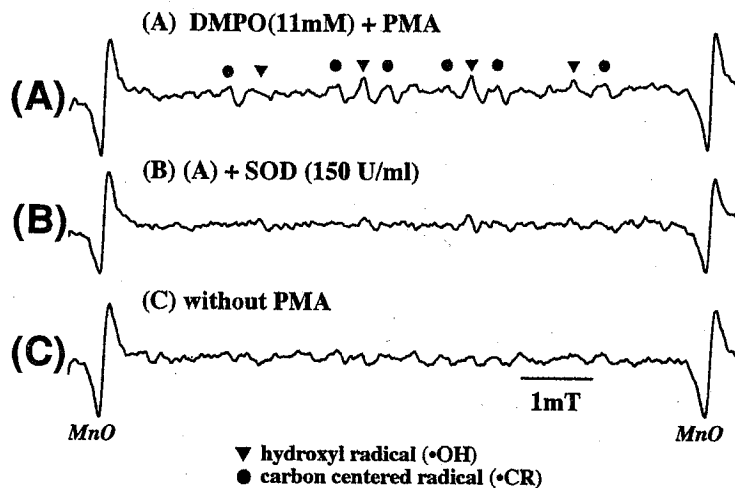


Fig. 6 ESR signals of radical spin adducts generated 21.5 min after the initiation of the reaction of PMA-stimulated agranulocytes. The reactions were started by the addition of 100 ng/ml of PMA to agranulocyte suspension ( $5 \times 10^6$  cells/ml) containing 11 mM DMPO and 500  $\mu M$  DTPA. (A), ESR spectrum observed on stimulation with PMA. (B), spectrum obtained for the same reaction mixture as (A) with 150 U/ml of SOD. (C), spectrum obtained for the agranulocyte suspension without PMA. Signals marked with closed reverse-triangles belong to the adduct of hydroxyl radical, and signals marked closed circles belong to the adduct of carbon centered radical. *MnO*, manganese oxide.

**Table 2** Phagocytosis-associated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by granulocytes

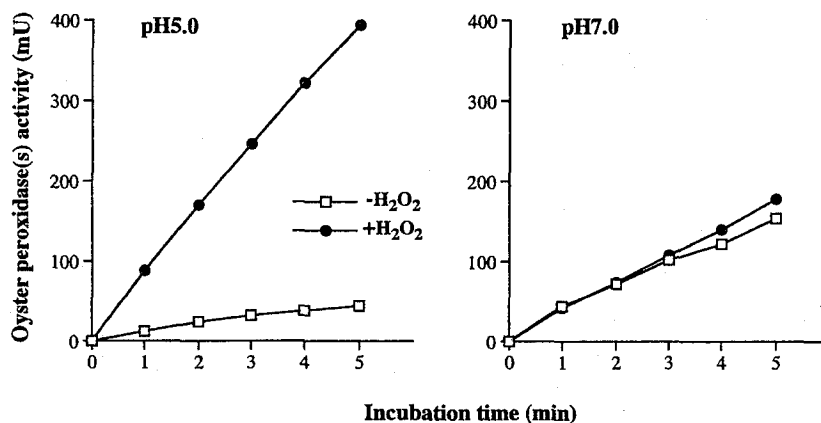
Time (min)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generation- (nmol/mg·protein)	
	Resting	Phagocytizing
0	0	0
60	18.8 ± 2.06	33.7 ± 3.31 *
120	23.4 ± 1.27	43.2 ± 6.46 *

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was measured by using a scopoletin oxidation method for granulocytes phagocytizing *E. coli*.

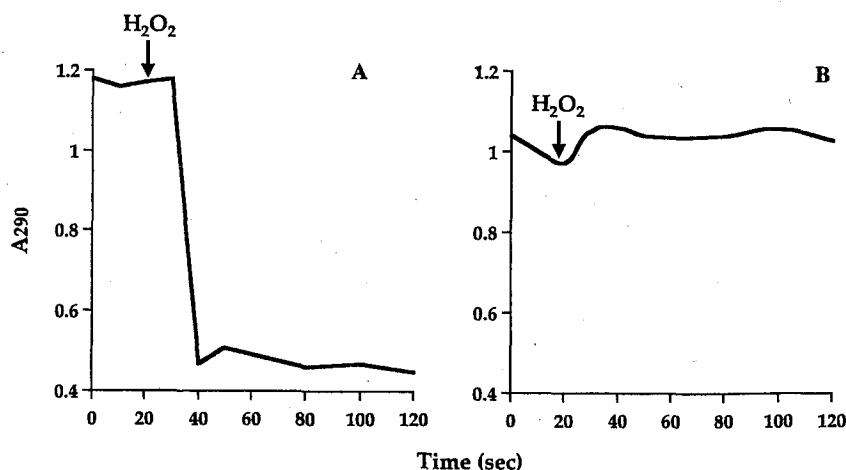
Mean ± SE of average of five determinations.

\*Significantly different from the value of resting in each time (p<0.01).

ったが、酸性に至適 pH を持つペルオキシダーゼの高い活性が検出された (Fig. 7)。このペルオキシダーゼは、塩素イオンと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の存在下でモノクロロジメドンの塩素化反応を促進した (Fig. 8)。すなわち、顆粒球には、ミエロペルオキシダーゼと機能的な相同性を有するペルオキシダー



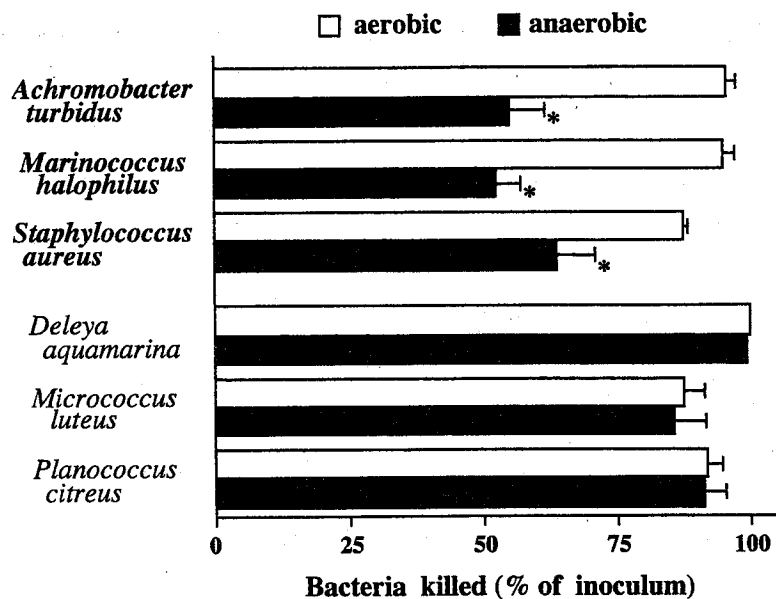
**Fig. 7** Effects of pH on activity of oyster peroxidase (s) in granulocyte homogenate. The pH-dependent activities at pH5.0 and 7.0 were determined by measuring its conversion of TMB in the absence or presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM).



**Fig. 8** Time course of OPO-catalyzed chlorination of monochlorodimedon (MCD) in granulocyte homogenate. Granulocyte homogenate was added to the reaction mixture in 100 mM potassium phosphate (pH5.0) containing 100 μM MCD and 100 mM NaCl. The reaction was initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration, 100 μM), and spectrometric monitoring was continued for 120sec. MCD chlorination was determined by measuring the decrease in absorbance at 290 nm.

ゼが存在して、非常に殺菌力の強い次亜塩素酸を生成することが明らかとなった。無顆粒球では、この反応はみられなかった。以上のように、無顆粒球では・OH、顆粒球では次亜塩素酸というように、血球の種類によって異なっているが、どちらの血球集団も強力な殺菌成分を生成することが示された。

次に、強い殺菌力を有する上記の活性酸素関連分子が、実際の細胞内殺菌の場で機能するの否かについて検討した。活性酸素の生成を抑制する目的で窒素で封入した低酸素条件を設定し、細菌を貪食させた後の細胞内殺菌率を好气的条件下での値と比較した。その結果、好气的条件下での貪食120分後の測定において、血球は供試した6種類の細菌のいずれに対しても高い殺菌率を示し、貪食した細菌の85%から99%を殺菌していたのに対し、低酸素条件下では、*Achromobacter*



**Fig. 9** Intracellular killing of bacteria by hemocytes in aerobic and anaerobic conditions. Bacteria (initial density,  $1 \times 10^8$  CFU/ml) were incubated with adherent hemocytes for 60 min at 20°C. The number of bacteria killed was calculated by subtracting the colony count level after 120 min from the initial number of colony counting. The columns indicate the means, and the bars indicate the SD of six determinations. \*Significantly different from the killing rate of each bacterium under aerobic condition ( $p < 0.05$ ).

**Table 3** Effects of radical scavengers on killing and ingesting of *Achromobacter turbidus* by oyster hemocytes under the aerobic condition

Scavenger	Bacteria killed (%)	Hemocytes ingesting bacteria (%)
Without scavenger	96.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	44.6 ± 2.9
SOD (100U/ml)	84.9 ± 5.1 <sup>b</sup>	41.9 ± 4.3
Catalase (500U/ml)	45.8 ± 9.0 <sup>c</sup>	46.1 ± 4.9
Benzoate (10mM)	90.9 ± 4.7 <sup>a, b</sup>	42.2 ± 5.7
N-acetylcysteine (10mM)	42.4 ± 7.6 <sup>c</sup>	45.2 ± 1.8

Differences between a and b, a and c, b and c are significant ( $p < 0.05$ ).

*turbidus*, *Marinococcus halophilus*, *Staphylococcus aureus* の3種類の細菌に対する殺菌率が有意に低下した (Fig. 9)。しかし、その際の殺菌率の低下は25%から40%と部分的なものであった。また、好氣的条件下での *A. turbidus* に対する細胞内殺菌は、活性酸素消去剤の添加によって有意に抑制され、低酸素条件での値とよく一致していた (Table 3)。以上のことから、マガキ血球の細胞内殺菌において、すべてを担うものではないが、活性酸素が殺菌因子として機能していると考えられた。さらに、低酸素・好氣の両条件下で殺菌率に違いのみられなかった *Micrococcus luteus* について、抗酸化力の強いカロテノイド色素を欠損させた変異株を作製して、好氣的条件下での細胞内殺菌率の経時変化を野性株の場合と比較した結果、色素欠損株は食食後の非常に早い段階で殺菌されることが明らかとなった (Fig. 10)。ここでみられた早期の殺菌は、活性酸素消去剤、特にカタラーゼの添加で強く抑制されること、また、低酸素条件では、色素欠損株と野性株に対する殺菌率の経時変化の違いはほとんどみられなくなることが示された。これらの結果と先の3種類の細菌に対する結果を総合して考察すると、マガキ血球ではいずれの細菌を食食した場合にも活性酸素は生成され、活性酸素に対して感受性の高い細菌種の殺菌および多くの細菌種に対する初期段階での殺菌に有効に機能していると結論される。

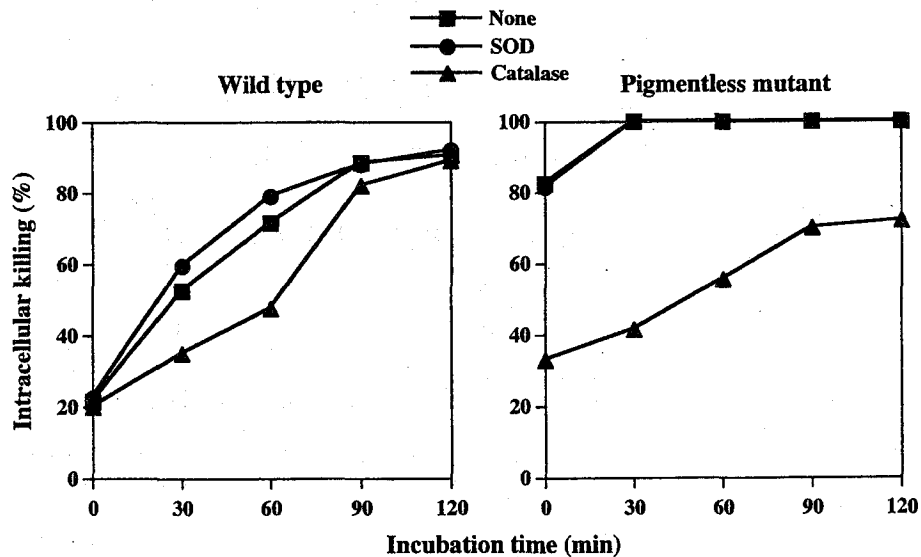


Fig. 10 Time course of intracellular killing of wild type and pigmentless mutant strains of *M. luteus* phagocytized by hemocytes in aerobic condition. For phagocytosis, Each strain and hemocytes were co-incubated for 60 min at 20°C. Incubation for intracellular killing was continued for 120 min at 20°C. SOD (100 U/ml) and catalase (1000 U/ml) were added to the culture medium of hemocytes.

### 第3章 細菌の食食により誘起される無顆粒球のアポトーシス

海洋性細菌の *Planococcus citreus* を食食した血球が、食食3時間後から急激な細胞死を起こし、食食12時間後の生存率は19.6%と *P. citreus* を添加しなかった対照区の生存率の88.7%と比較して大きく低下する現象が見いだされた (Fig. 11)。細胞死を起こした血球は、ほとんどが無顆粒球であった。顕微鏡下での観察の結果、死亡した無顆粒球では、細胞の縮小および核の断片化という



アポトーシス細胞の特徴がみられたことから、生化学的な解析としてクロマチン DNA の断片化の有無を調べた結果、ヌクレオソーム単位での断片化は認められなかったが、50-220 kbp の大きな断片化は起こっていた (Fig. 12)。以上のことから、*P. citreus* の貪食により誘起される無顆粒球の細胞死は、アポトーシスであると判断した。この無顆粒球のアポトーシスは、 $H_2O_2$  の消去酵素であるカタラーゼと抗酸化剤の N-アセチルシステインの添加によって、強く抑制された (Fig. 13)。同様に、低酸素条件下で *P. citreus* を貪食した無顆粒球でも、アポトーシスの誘起は抑制され、有意に生存率が高くなった。以上のことから、無顆粒球のアポトーシスの誘起に活性酸素が関与していると考えられた。しかし、活性酸素生成の刺激剤であるホルボールエステルの添加では、アポトーシスはみられず、細菌の貪食が必要な過程であることが示唆された。

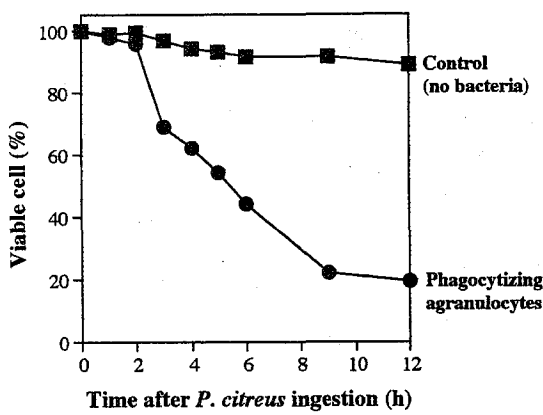


Fig. 11 Effects of *P. citreus* ingestion on agranulocyte survival. After incubation of agranulocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) with  $1 \times 10^8$  CFU/ml of *P. citreus* for the indicated times, viable cells were counted under standard fluorescein microscopy following Live/Dead cell staining.

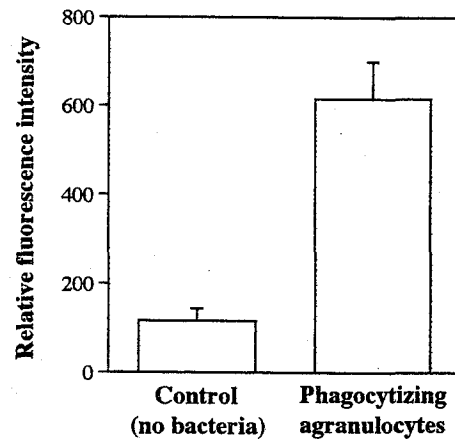


Fig. 12 DNA fragmentation in apoptotic agranulocytes induced by *P. citreus* ingestion. Fractional solubilized DNA fragment was quantitated by SYBR-Green I fluorescent staining after 12 h of *P. citreus* ingestion.

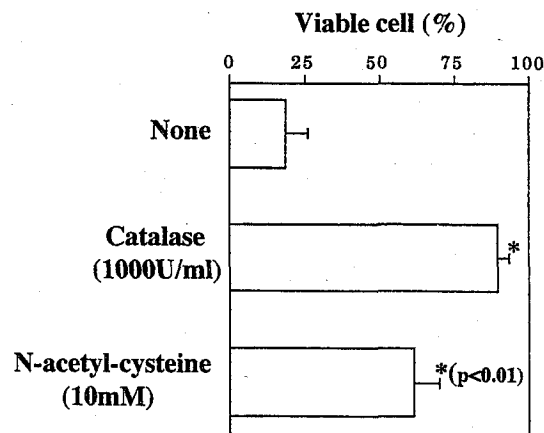


Fig. 13 Effects of oxygen radical scavengers on cell death of agranulocytes ingesting *P. citreus*. Agranulocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with  $1 \times 10^8$  CFU/ml of *P. citreus* in the presence or absence of catalase or N-acetyl-cysteine for 12 h. Results are means  $\pm$  SE of five separate experiments.

## 総 括

以上の結果から、マガキ血球は無顆粒球と顆粒球の2つの細胞集団から構成され、各々の血球で異物認識および貪食のしくみが異なっており、無顆粒球は防御の初期反応を担うマクロファージ様の細胞として、また顆粒球は細菌に対して特異的に反応する professional phagocyte として、多様な異物に対応していることが明らかとなった。貪食した細菌に対する細胞内殺菌の過程において、血球の生成する活性酸素が関与していることが証明された。しかし、それは細胞内殺菌機構のすべてを担うものではなく、酸素に依存しない殺菌因子の存在も示唆された。細菌を貪食した無顆粒球は、アポトーシスを起こすことが観察され、異物を貪食した血球の終末の状態を示す1つの形として注目された。また、このアポトーシスの誘起に活性酸素が深く関与していることが明らかにされた。

## 論文審査結果要旨

他の無脊椎動物と同様に、二枚貝には、免疫グロブリンの産生能がないことから、高い貪食能を有する血球がその生体防御機構の中心を担うと考えられる。二枚貝血球の貪食能についてはよく知られているが、貪食能の発現に深く関連する異物認識、走化性などの異物に対する反応性については、なお十分には明らかではない。また、取り込んだ異物の処理、特に病原性を有する細菌に対する殺菌・排除の過程についても、ほとんど解明されていない。

本研究では、海産二枚貝のマガキ *Crassostrea gigas* の血球における生体防御機能の発現、特に異物認識とそれに続く貪食、取り込んだ細菌に対する細胞内殺菌、そして貪食血球の終末過程という一連の反応系について解析した。

まず、マガキの血球を形態学的観察に基づいて無顆粒球と顆粒球の2つの細胞集団に大別した。これらの貪食能、走化性を検討した結果、異物の種類によって、無顆粒球と顆粒球の貪食活性に違いのあること、特に、顆粒球は、細菌の有する特定の構造や分子を特異的に認識して貪食能を発現することを明らかにした。また、顆粒球は細菌由来の走化性ペプチドに対して高い遊走能を持つことを明らかにした。無顆粒球では走化性は認められず、2種類の血球集団の間で細菌に対する反応性に大きな違いのあることを示した（第1章）。

無顆粒球においては、貪食の刺激によってスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) が最初に生成されることを明らかにした。さらに、活性酸素による殺菌反応の主体となるヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) が生成されることも明らかにし、好中球と類似した厳密な活性酸素代謝系が備わっていることを示した。一方、顆粒球のみで活性が認められるペルオキシダーゼが、塩素イオンと過酸化水素の存在下で、殺菌力の強い次亜塩素酸を生成することを明らかにした。また、これらの活性酸素関連分子が実際の細胞内殺菌の場で機能するのか否かを検討した結果、活性酸素がすべてを担うものではないが、殺菌因子として十分機能していることを明らかにした（第2章）。

海洋性細菌の *Planococcus citreus* を貪食した無顆粒球が、急激な細胞死を起こす現象を見出し、この細胞死がアポトーシスであることを明らかにした。また、無顆粒球のアポトーシスの誘起に活性酸素が関与していることを示した（第3章）。

以上のように本研究は、マガキ血球を構成する2つの細胞集団において異物認識および貪食のしくみが異なっていること、すなわち、無顆粒球は防御の初期反応を担うマクロファージ様の細胞として、また顆粒球は細菌に対して特異的に反応する **professional phagocyte** として、多様な異物に対応していることを明らかにした。また、細胞内殺菌の過程に血球の生成する活性酸素が関与していることを証明した。さらに、細菌を貪食した無顆粒球に、アポトーシスを起こす細胞があることを明らかにし、異物を貪食した血球の終末形態として、これまで知られていない形があることを発見した。本研究の成果は、二枚貝の生体防御研究に新たな局面を開くとともに、生体防御能を指標とした二枚貝の健康度評価法の確立に寄与すると考えられる。よって審査委員一同は本論文の著者が博士（農学）の学位を授与されるのに値するものと判定した。