

内毒素による直接的な細胞障害作用の研究

川崎医科大学 微生物
美 禰 弘 子
(昭和52年8月6日受付)

Studies on Direct Cytotoxicity of Endotoxin

Hiroko Mine

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School

(Accepted on Aug. 6, 1977)

群体形成緑藻の一種である *Pleodorina californica* をパイロット細胞として用い、内毒素の *in vitro* における直接的な細胞障害作用を調べた。*P. californica* の粘液多糖類の分泌が内毒素によって特異的に阻害され、この結果、光学顕微鏡下でも明らかな形態形成異常群体が生じる。

内毒素の化学構造と活性の関係をこのような *P. californica* の異常な群体をメルクマールにして調べた。

内毒素の三種の単独成分（脂質、糖質、タンパク質成分）のうち単独で活性を示したのは糖質成分のみであった。また、LPS（糖脂質）の活性は糖質成分の活性よりも高く、LPS. Pro（完全な内毒素）の活性はLPSの活性よりも高かった。

単独成分のうちタンパク質成分は糖質成分やLPSさらにはLPS. Proに添加することによりそれぞれ活性を増強することが示された。

Cytotoxicity of endotoxin was studied *in vitro* using a colonial green alga, *Pleodorina californica* as a pilot cell.

Secretion of mucopolysaccharide of *P. californica* was specifically inhibited by endotoxin and as this result, morphologically abnormal colonies which could be clearly distinguished from normal colonies under optical microscope were brought about.

Relationship between chemical composition of endotoxin and its activity was studied by observing abnormal colonies as merkmal. Among three single components of endotoxin (lipid, polysaccharide and protein moiety) only polysaccharide moiety showed activity. Activity of lipopolysaccharide (LPS) was larger than that of polysaccharide moiety and also activity of LPS. Protein (complete endotoxin) was larger than that of LPS.

Protein moiety was demonstrated to have ability to increase activity of polysaccharide moiety, LPS and LPS. Protein.

はじめに

内毒素の作用機序に関する研究は数多いが、その大部分は個体レベル、すなわち *in vivo* におけるものである。また、*in vitro* における内毒素の作用機序に関する研究も何らかの形で免疫系の関与した細胞をパイロット細胞として用いたものが多い。

私達は *in vitro* において、しかも免疫系の関与しない細胞をパイロット細胞として内毒素の直接的な細胞障害作用を解析している。私達がパイロット細胞として選んだのは群体形成緑藻の一種である *Pleodorina californica* である¹⁾²⁾。*p. californica* は内毒素により特異的な障害を受けることが示された³⁾⁴⁾ので、この細胞障害作用を調べるとともにこれをメルクマールにすることによって内毒素の化学構造と活性の関係について調べた。

材料と方法

内毒素は *E. coli* 0111 株から調整した *E. coli* は、グイオン培地を用い 37°C で振とう培養またはジャーフェーマンターを用いて培養した。Lipopolysaccharide-protein からなる完全な内毒素は、Boivin 法⁵⁾により抽出した。本論文中、特別のことわりなく内毒素という場合はこの Boivin 法により抽出したものをいう。

調整した内毒素は室温乾燥後冷蔵庫で保存している。内毒素の溶解液には *p. californica* の培地である Volvox 培地⁶⁾を用いた。滅菌が必要な時には 120°C で 15 分のオートクレーブ処理をおこなった。

P. californica は Volvox 培地を用い、16 時間明所 + 8 時間暗所 / 24 時間の光条件下で 20°C で静置培養した。一定の大きさに達した *P. californica* の群体を集めテフロンホモジェナイザーを用いて群体を構成する細胞を単離した。

単離した *P. californica* の細胞を Volvox 培地中で上記の培養条件に置き、これに一定濃

度の内毒素またはその構成成分を添加し、一定時間毎に少量を取り光学顕微鏡下で細胞の観察をすることにより内毒素の作用を調べた。

内毒素の致死効果を調べる際のマウスは ICR 系雄 4 週齢 (平均体重 30 g) を用いた。マウスの致死の有無は 3 日間にわたる観察をおこない、それらを合計して LD₅₀ を求めた。

結果

(1) 内毒素の基本的な性質.

E. coli 0111 株から Boivin 法で抽出した内毒素はマウスに対する LD₅₀ が 2500 μg/マウスであった。また、定性的ではあるがウサギ (体重 3 kg) の静脈に 1 mg 量の内毒素を注射したところ体温の上昇が見られた。

内毒素は耐熱性であり、120°C、15 分のオートクレーブ処理によっても活性 (マウス致死活性) の変化は見られなかった。

(2) *Pleodorina californica* の一般的な性質.

パイロット細胞として用いた *P. californica* の一般的な性質について説明する。*P. californica* は群体形成をおこなう緑藻であり、通常 32, 64, 128 など 2ⁿ からなる細胞数の群体を形成する。n の大きさは 1~7 であり、人為的にコントロールすることができる。群体は 2 種類の分化した細胞から構成されている。一つは somatic cell と呼ばれる細胞分裂能力を欠く細胞であり、眼点という細胞内顆粒を有し群体の機能維持をつかさどっていると思われる。これに対しもう一方は reproducing cell と呼ばれる細胞であり、名前のとおり細胞分裂能力を有し群体中のすべての reproducing cell が細胞分裂をおこなって娘群体を形成する。群体は走光性を示すが、その運動方向に対する前半球の表層に somatic cell が、後半球に reproducing cell が一層に並んでいる。この 2 種類の細胞が群体の外に出した鞭毛の運動により群体は光に反応した動きをすることができる。群体の内部は粘液多糖類で満たされており、これは細胞分裂の終了後細胞から分泌されたもので

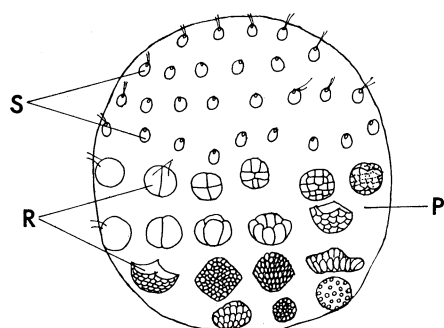


Fig. 1. Colony of *Pleodorina californica*.
S=somatic cell, R=reproducing cell,
P=intercellular polysaccharide.

ある。このような *p. californica* の生活史を模式的に **Fig. 1** に示した。しかし実際には一つの群体中の reproducing cell の成熟，細胞分裂，細胞分化，形態形成は同調している。

(3) *P. californica* に対する内毒素の作用。

P. californica の一般的な性質の説明からも明らかのように，この細胞を用いることにより種々の性質に対する内毒素の作用を一度に，しかも簡単に調べることができる。この結果，鞭毛の運動能力，鞭毛の再生能力，細胞分裂の回数，細胞分化，細胞の生死は 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においてもほとんど影響がみられなかった。これに対して *P. californica* において内毒素により特異的な障害作用が見られたのは粘液多糖類の分泌と，これに伴う形態形成運動であった。内毒素により粘液多糖類の分泌が阻害されると正常な群体と異なり細胞の密着したコンパクトな異常群体ができあがる。この異常群体は，光学顕微鏡下で十分識別観察が可能である (**Fig. 2**)。

(4) 内毒素作用の濃度依存性。

P. californica の異常群体形成をメルクマールにして内毒素作用の濃度依存性を調べた。この結果を **Table 1** に示す。全群体中の異常群体の占める割合 (%) を阻害度とした。この結果 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 50% 阻害，500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 100% の阻害がみられた。低濃度ではいくら長時間作用させても阻害がみられず，高濃度においても細胞死はみられなかった。しかし

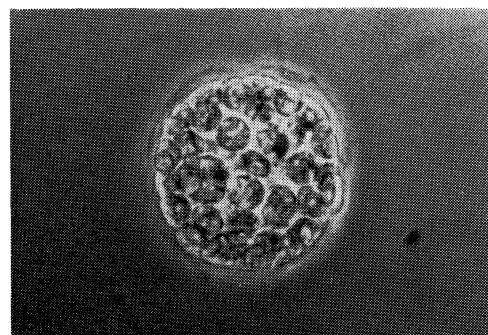
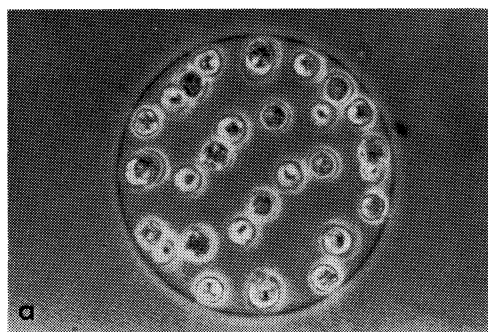


Fig. 2. Normal (a) and endoxin-inhibited colony (b) of *P. californica*.

Table 1. Effect of endotoxin on colony formation of *P. californica*.

conc. of endotoxin $\mu\text{g}/\text{ml}$	200	300	400	500	750	1000
inhibition rate (%)	0	20	50	100	100	100

$$\text{Inhibition rate} = \frac{\text{No. of abnormal colonies}}{\text{No. of total colonies}} \times 100$$

高濃度の内毒素を作用させた細胞を高倍率の光学顕微鏡で観察すると細胞の著しい液胞化が観察された。この細胞の液胞化は低濃度の内毒素処理によっても長時間経過すれば出現することが示された。

(5) 内毒素作用の特異性。

内毒素の *P. californica* の粘液多糖類分泌障害作用の特異性の程度を検討した。内毒素の化学構造は糖脂質，タンパク質複合体であり，後に述べるように多糖部分に主な活性が見られたので，種々の糖質の *P. californica* に対する作用を調べた。用いた糖質はグルコース，シュ

ークロースの二種類の単糖類, イヌリン, グリコーゲン, デキストラン, ヒアロウロン酸, コンドロイチン硫酸, ヘパリン, グルクロン酸の7種類の多糖類および *Chlorella ellipsoidea* (単細胞性緑藻) と *P. californica* から内毒素と同じ方法で抽出した天然多糖類2種の計11種類について最高 1000 $\mu\text{g/ml}$ までの種々の濃度で *P. californica* に作用させたが, 内毒素のみでみられたような阻害作用は全く観察されなかった。

(6) 内毒素作用の可逆性.

内毒素作用の可逆性について検討した. 100%阻害のおこる 500 $\mu\text{g/ml}$ の内毒素で12時間 *P. californica* を処理し異常群体が形成された時点で, これら異常群体を内毒素を含まない Volvox 培地中に入れて培養すると間もなく細胞外への粘液多糖類の分泌が始まり, はぼ正常に近い群体になった. すなわち内毒素の *P. californica* に対する阻害作用は可逆的であることが示された.

(7) 内毒素の活性部位.

a) 内毒素の化学組成.

Boivin 法により得られた内毒素は分子量数百万に達する巨大分子であり, その化学構造は糖脂質, タンパク質複合体である. このうち脂質成分が9~12%, 多糖類成分が50~55%, タンパク質成分が17~20%である⁸⁾. また, 抽出条件を変えると糖脂質 (Lipo-polysaccharide; LPS), ヤリポプロティン (Lipo-protein; L. Pro) が得られる. 脂質, 糖質, タンパク質の3種の単独成分は Boivin 法で抽出した内毒素 (Lipo-polysaccharide protein; LPS. Pro) や LPS, から種々の方法によって単離される.

b) LPS. Pro の作用.

LPS. Pro の作用については(4)の内毒素の作用 (Table 1.) を参照すること.

c) LPS の作用.

LPS は *E. coli* 0111 から Westphal の温フェノール水抽出法⁹⁾ により抽出した. LPS を用いて *P. californica* に対する群体形成阻害について調べたところ 400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で50%の阻害, 500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で100%の阻害がみ

られた (Table 2.).

Table 2. Inhibition effects of endotoxin moieties on colony formation of *P. californica*.

Numbers in columns are inhibition rates (see text in Table 1.).

com- ponents	conc. $\mu\text{g/ml}$					
	200	300	400	500	750	1000
LPS	0	0	50	100	100	100
L. Pro	0	0	0	0	0	0
Lipid	0	0	0	0	0	0
Polysacch- aride	0	0	10	50	50	90
Protein	0	0	0	0	0	0

d) L. Pro の作用.

L. Pro は Boivin 法で抽出した LPS. Pro を1%の酢酸で90°C, 4時間加水分解し, 173,000 g 20分の遠心沈殿物として得た¹⁰⁾. L. Pro は1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても *P. californica* に対する阻害作用が全く見られなかった (Table 2.).

e) 脂質, 糖質およびタンパク質成分の作用.

Westphal 法により調整した LPS を 0.1 N HCl で 90°C, 30分間加水分解し, 17,000 g, 30分の遠心沈殿物として脂質成分を, 上清に5倍量のエタノールを加え, 沈殿成分として糖質成分を得た¹¹⁾. また, LPS の Westphal 法による抽出過程においてフェノール層から9.5倍量のエタノール沈殿成分としてタンパク質成分¹²⁾を得た.

これら3種類の内毒素の単独構成成分の *P. californica* に対する作用を調べた (Table 2.). この結果, 脂質およびタンパク質成分は単独で加えても全く阻害作用を示さなかったが, 糖質成分は単独でも阻害活性を示した.

f) 各成分の同時添加による効果.

内毒素の種々の構成成分の *P. californica* 群体形成阻害活性を比較すると (Table 1., Table 2.), 最も比活性の高いのが LPS. Pro であることが示された. そこで活性の見られた糖質成

分に、タンパク質成分および脂質成分を同時に添加してその活性の変化を調べた。この結果、脂質成分には添加効果が見られなかったが、タンパク質成分には著しい活性増加作用のあることが示された。そこでこのタンパク質成分を糖質成分、LPS, LPS. Pro に添加してその活性

増加作用をくわしく調べた (Table 3.)。

このようなタンパク質成分の内毒素活性増加作用をマウスに対する致死活性をメルクマールにして調べた結果、LPS. Pro による致死活性がタンパク質成分の添加により増強されることが判明した (Table 4.)。

Table 3. Additional effects of protein moiety on inhibition effects of endotoxin or its components on *P. californica*. Numbers in columns are inhibition rates (see text in Table 1.).

components and protein	conc. µg/ml	200	300	400	500	750	1000
	Polysaccharide		0	0	10	50	50
Polysaccharide + Protein		0	0	30	80	90	100
LPS		0	0	50	100	100	100
LPS + Protein		0	40	90	100	100	100
LPS. Pro		0	20	50	100	100	100
LPS. Pro + Protein		0	50	100	100	100	100

Table 4. Additional effects of protein moiety on lethality of mouse by endotoxin (LPS. Pro).

Experiment	Lethality
Protein 1 mg/mouse	0/4
Protein 2.5 mg/mouse	0/4
Protein 5 mg/mouse	0/4
LPS. Pro 1 mg/mouse	0/4
LPS. Pro 2.5 mg/mouse	2/4
LPS. Pro 5 mg/mouse	4/4
LPS. Pro 1 mg + Protein 1 mg	1/4
LPS. Pro 1 mg + Protein 2.5 mg	3/4
LPS. Pro 2.5 mg + Protein 1 mg	2/4
LPS. Pro 2.5 mg + Protein 2.5 mg	4/4

$$\text{Lethality} = \frac{\text{No. of dead mouse.}}{\text{No. of total mouse.}}$$

考 察

P. californica をパイロット細胞として内毒素の直接的な細胞障害作用を調べた結果、内毒素は細胞の生死にかかわるような基礎的な代謝を阻害せず、より高度な機構（例えば細胞間の統一を制御するような機構）を阻害することが示唆された。*P. californica* の場合には細胞間の多糖類の分泌が阻害され、この結果、群体形成が異常になることが示された。このような内毒素の阻害作用が一般の動物細胞に対しても普遍化できるかどうか今後検討していく予定である。

種々の内毒素構成成分の活性について *P. californica* に対する群体形成阻害をメルクマールにして調べた結果、単独成分でも活性のあったのは糖質成分のみであった。しかし、LPS (糖脂質) の活性は糖質単独の活性よりも高く、LPS. Pro (完全な内毒素) の活性は LPS の活性よりも高かった。これらの実験結果は、脂質およびタンパク質成分は糖質成分でみられた活性を増強する作用があることを示唆している。事実、タンパク質成分を糖質成分、LPS さらには LPS. Pro に添加するとそれぞれ活性が増加する現象がみられた。このように *P. californica* をターゲット細胞として用いることによって得られた内毒素の活性と、その他の個体レベルにおける作用との平行関係については今後検討していく予定であるが、現在おこなっている実験においてはマウスの致死活性との間に平行関係が見られている。

文 献

- 1) Gerisch, G.: Die Zelldifferenzierung bei *Pleodorina californica* und die Organisation der Phytomonadenkolonien, Arch. Protistenk., 104: 292—358, 1959.
- 2) 美禰弘子: *Pleodorina californica* における群体形成機構, 日本細菌学雑誌, 28: 271, 197.
- 3) 美禰弘子: *Pleodorina californica* における細胞障害作用について, 日本細菌学雑誌, 31: 335—336, 1976.
- 4) 美禰弘子: 内毒素の細胞障害作用に関する研究, 日本細菌学雑誌, 32: 474, 1977.
- 5) Boivin, A., Mesrobianu, I. et Mesrobianu L: Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques, Comptes Rendues de la Société de Biologie, 113: 490—492, 1933.
- 6) Darden W. H. Jr.: Sexual differentiation in *Volvox aureus*, J. Protozool., 13: 239—255, 1966.
- 7) Mine, H.: Cellular differentiation in *Pleodorina californica*: in preparation.
- 8) 本間 遜: 細菌内毒素, 講談社, 1973, P 153.
- 9) Westphal O. and Jann K.: Bacterial lipopolysaccharides-extraction with phenol-water and further applications of the procedure, Methods carbohydrate chem., 5: 83—91, 1965.
- 10) Wober W. and Alaupovic P.: Studies on the protein moiety of endotoxin from gram-negative bacteria, Eur. J. Biochem., 19: 340—356, 1971.