

## 魚類白血球のスーパーオキサイド ( $O_2^-$ ) 産生能の特徴と キラヤサポニンの産生能への影響

武田州弘・芦田貴行・永良育久・沖増英治・雨村明倫・松本正樹\*<sup>1</sup>

福山大学内海生物資源研究所・太陽化学(株)総合研究所\*<sup>1</sup>

Characteristics of Superoxide Production Activity in Fish and Mammalian Leukocyte  
and Effect of Quillaja Saponin on Its Activity.

Kunihiro Takeda, Takayuki Ashida, Yasuhisa Nagara, Eiji Okimasu, Akinori  
Amemura and Masaki Matsumoto

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho,  
Innoshima, Hiroshima 722-21, Japan; Central Laboratories, Taiyo Kagaku Co.  
Ltd., Takara-machi, Yokkaichi, Mie 551, Japan\*<sup>1</sup>)

*Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.5, 17 - 25 (1994).*

To evaluate the protective effect of dietary saponins on the mortality of yellow tails by *Enterococcus seriolicida* infection (T. Ashida et al. in preparation), we investigated the effects of saponins on superoxide anion ( $O_2^-$ ) production by polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in guinea pigs or yellow tails in vitro. When stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), the  $O_2^-$  production was accelerated in PMNs of mammals and fishes and the quillaja saponin pretreatment in vitro significantly suppressed the  $O_2^-$  production. When stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), the  $O_2^-$  production was accelerated and the quillaja saponin pretreatment in vitro significantly accelerated the  $O_2^-$  production at low concentrations ( $< 10 \mu g/ml$ ).

白血球は貪食作用または各種の刺激物に接触すると Respiratory burst と呼ばれるミトコンドリアとは無関係な酸素消費が生じる<sup>1)</sup>。この消費された酸素は、HMP側路でつくられたNADPH から電子が細胞膜に局在する NADPH Oxidase により酸素分子に渡され1電子還元されたスーパー

オキシド ( $O_2^-$ ) が生成される。この  $O_2^-$  やこれより派生する過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) やヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ )、さらには1重項酸素 ( $^1O_2$ ) などが活性酸素と呼ばれる分子種であり、 $OH\cdot$  や  $^1O_2$  が炎症作用の原因になっている<sup>2)</sup>。

NADPH Oxidase の活性化機構の刺激物による違い<sup>2,3)</sup> は、Fig.1 に示した。fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) は、形質膜に局在する刺激物受容体を介して膜酵素のホスホリパーゼに働き NADPH Oxidase を活性化させ、PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) は、細胞質内プロテインキナーゼC (PKC) と複合体を形成して NADPH Oxidase の 47 kDa サブユニットをリン酸化することによって NADPH Oxidase を活性化させる。さらに、グラム陰性菌の細胞壁を構成している LPS (lipopolysaccharide) は、形質膜に存在する受容体を介しチロシンキナーゼ関与のもとに NADPH Oxidase を活性化させる。また、白血球の  $O_2^-$  産生には  $Ca^{2+}$  が必須であり、細胞内カルシウムの枯渇した白血球は、たとえ刺激物とその受容体に結合しても  $O_2^-$  生成は起こらない。この NADPH Oxidase の活性化には、細胞内遊離カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の上昇が重要な働きをしている。この  $[Ca^{2+}]_i$  は、刺激に伴い nM オーダーの変動が生じ、PKCやホスホリパーゼを活性化していると考えられ<sup>4)</sup>、一連の炎症応答の引き金になっている。

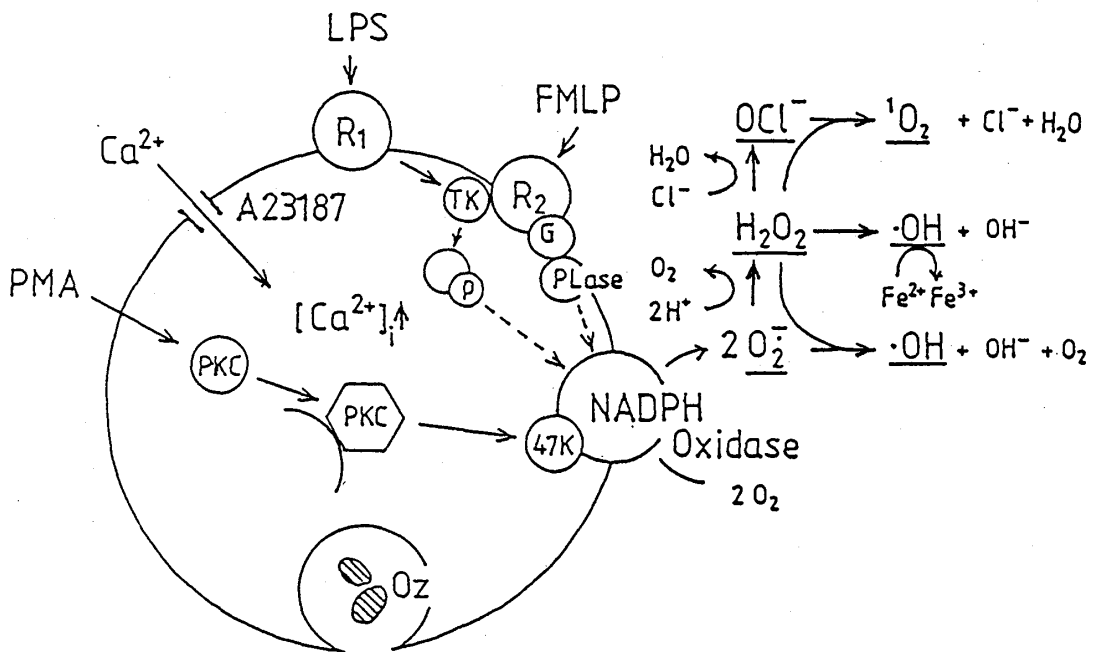


Fig. -1 Mechanisms of superoxide production in PMNs.

A23187, Calcium ionophore; Oz, Opsonized zymosan; R1, R2, Receptor; G, GTP binding protein; PLase, Phospholipase; TK, Tyrosine kinase;  $\cdot OH$ , Hydroxyl radical;  $H_2O_2$ , Hydrogen peroxide;  $^1O_2$ , Singlet oxygen;  $OCl^-$ , Hypochloride

一方、生体を構成している微量成分のトコフェロール、アスコルビン酸、カロテノイド、ユビキノンなどの代表的なラジカルスカベンジャーとともに、様々な天然生理活性物質が生体内でこれら炎症から生じる「さび」から生体を守っている<sup>5)</sup>。それら天然生理活性物質の内、植物由来のトリテルペノイドサポニンのキラヤサポニンは、古くからその免疫賦活効果が認められており、近年、その食品添加効果が注目されている<sup>6)</sup>。

さきに我々は、ブリの *Enterococcus seriolicida* の細菌疾病をキラヤサポニンの食餌投与により未然に防疫し、その延命を促すことを明らかにした（芦田ら投稿準備中）。そこで、本研究は、白血球に及ぼすこれらサポニンの直接効果を明らかにするために、各種の刺激物に応じた刺激機構にしたがって白血球の  $O_2^-$  産生能を測定した。また、魚類白血球の  $O_2^-$  産生能の特徴についてモルモット白血球と比較検討をした。

## 材 料 お よ び 方 法

### 腹腔内浸出細胞 (PEC) の採取法ならびに細胞の計数法と活性染色法

ニジマスやモルモットの腹腔内に、オートクレーブ滅菌した 2 % カゼイン酸ナトリウム含有生理的食塩水を生体重の 1~10 % 量、注射した。その後、15~16 時間後に放血採血し、腹腔内より浸出細胞を洗浄採取し、KRP 溶液 (クレブス・リンガー・リン酸緩衝液) にて遠心洗浄 (1,000 rpm, 5 min, 4 °C) をした。沈査の 10 倍希釈を行い、Turk 液で染色し血球検査板にて細胞数を計測した。また、マクロファージや好中球を分染するために  $\alpha$ -naphthyl acetate を基質とするエステラーゼ染色を施し、細胞種を判定した<sup>7)</sup>。

### $O_2^-$ 産生測定法

50  $\mu$ M Cytochrome c (Cyt. c), 10 mM Glucose, 1 mM  $CaCl_2$  を含む 15 °C あるいは 37 °C の KRP (pH 7.4) に腹腔内浸出細胞 ( $5 \times 10^5$  cells / ml) を懸濁し、Cyt. c の還元による 550 nm の吸光度の経時的増大より測定した。 $O_2^-$  産生量は、Cyt. c の分子吸光係数 (21 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) より求めた。また、測定は反応液を温度調節し攪拌装置を持つ日立製分光光度計 (3210型) で行った<sup>8)</sup>。

## 結 果 お よ び 考 察

### 魚類および哺乳類白血球の $O_2^-$ 産生能の特徴について

細菌感染によって生じる変化を白血球による活性酸素産生のシグナル伝達の違いにより解析した。

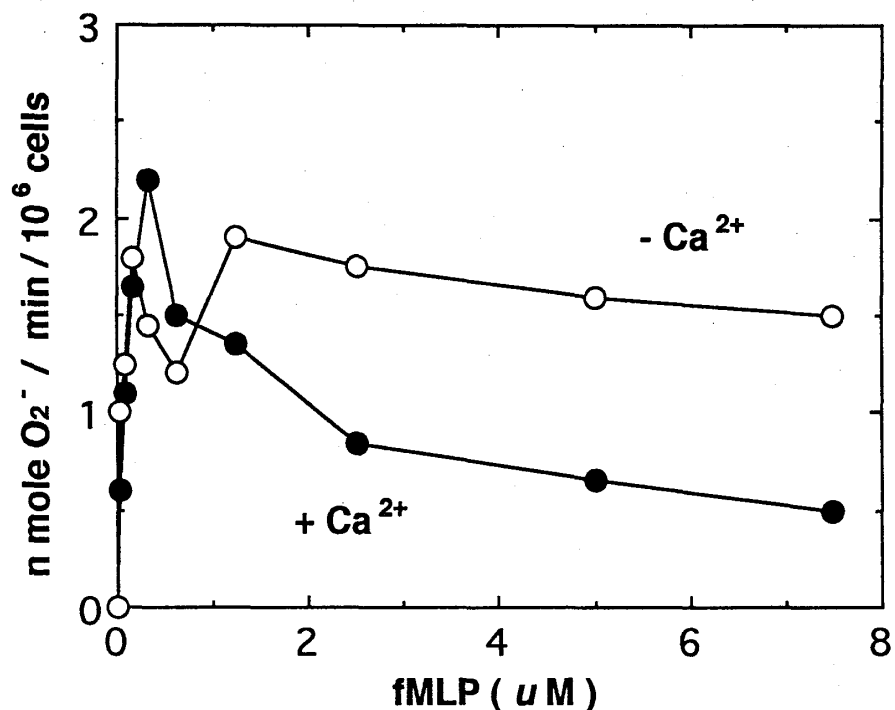


Fig.-2 Superoxide generation activity in guinea pig leukocyte by fMLP.

Cyt. c の還元量 (A<sub>550</sub> の減少) よりモルモット腹腔内浸出好中球の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量を算出した。Ca<sup>2+</sup> 有無の KRP 溶液を, スターラー付キュベット内 (37℃) に入れ, 経時的に計測した。刺激物添加に伴う活性変化の初速度 (3 分以内) をその酵素活性値とした。刺激物の添加量は, 反応液 (2 ml) の 1/100 量以下に抑えた。

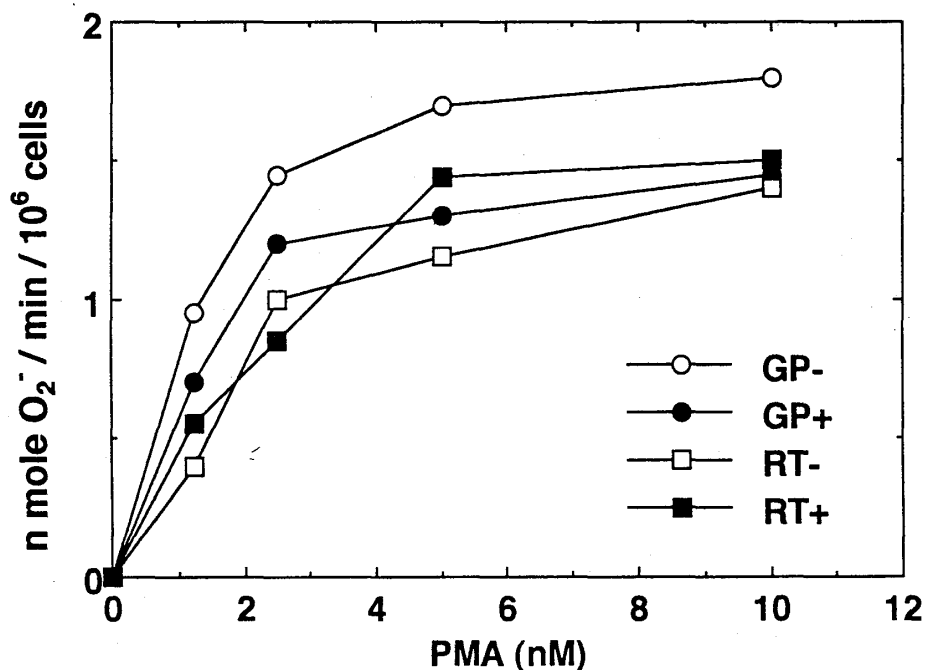


Fig.-3 Comparison of the superoxide generation activity in guinea pig and rainbow trout leukocyte by PMA with (+) or without (-) calcium.

ニジマス腹腔内浸出好中球は, 15℃ で測定した。その他の測定条件は Fig. 2 と同じ。

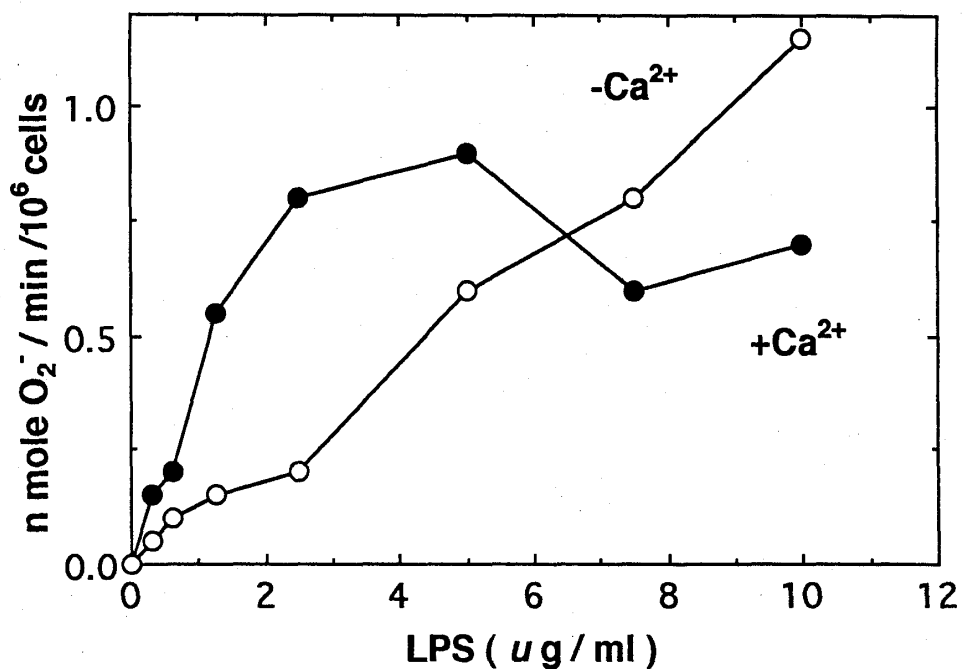


Fig.-4 Superoxide generation activity in guinea pig leukocyte by LPS.

測定条件は Fig. 2 と同じ。

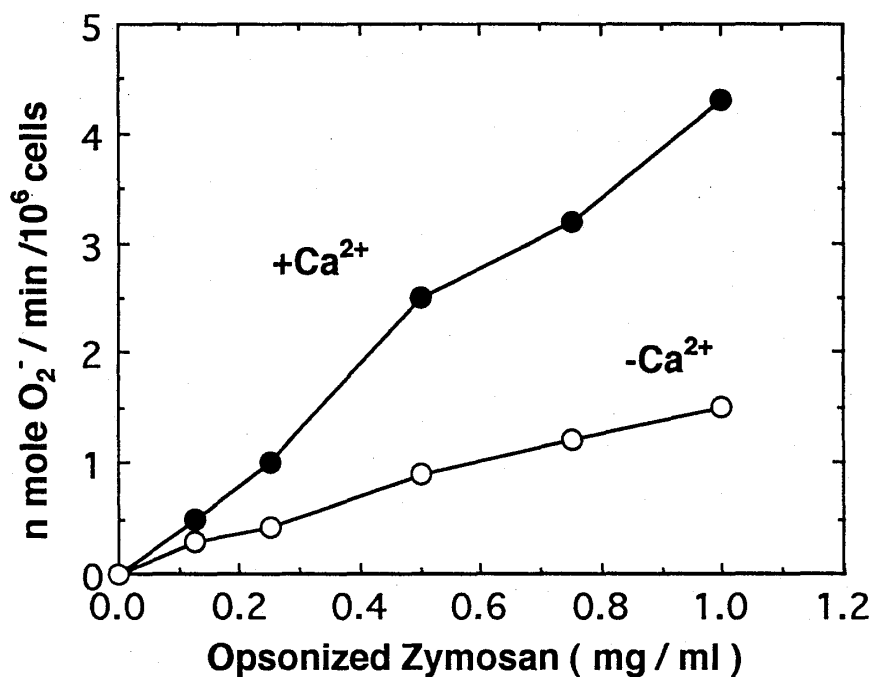
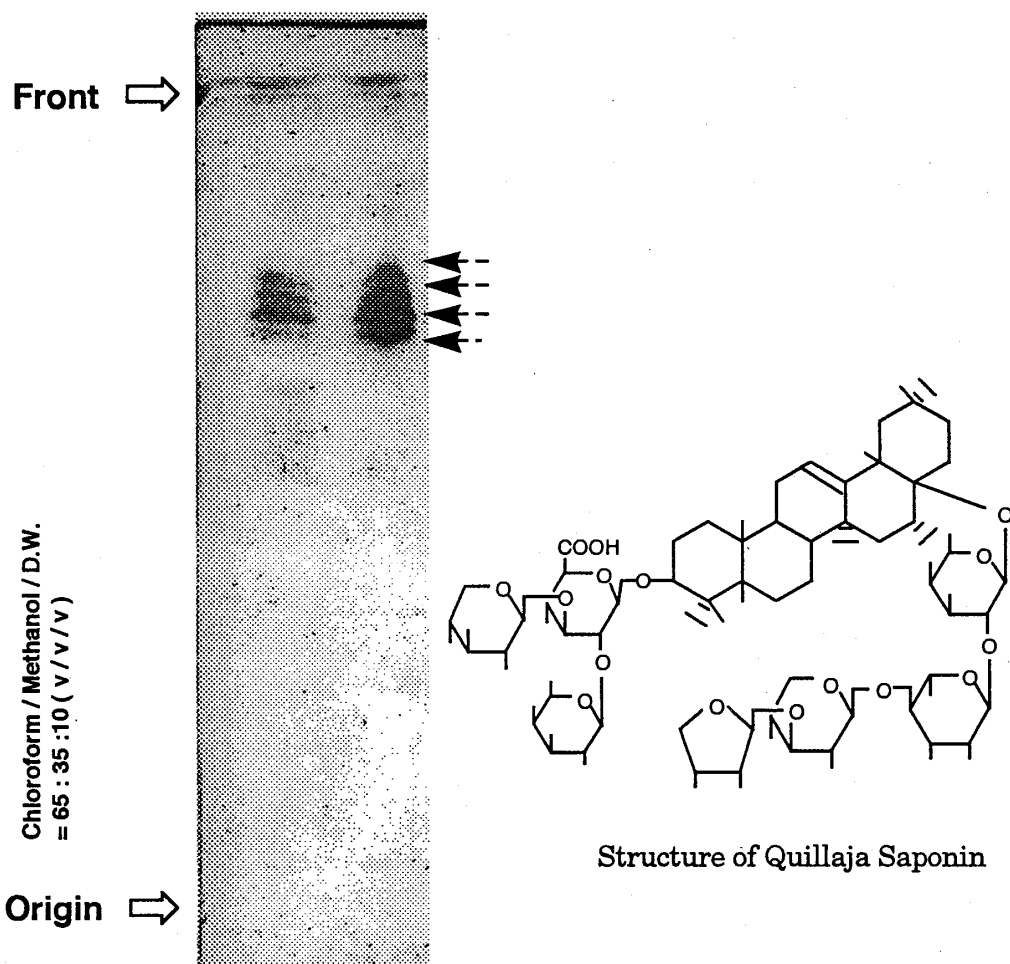


Fig.-5 Superoxide generation activity in guinea pig leukocyte by opsonized zymosan.

オプソニン化チモージンとモルモット血清を 37 ℃ で 1 時間、保温した後、洗浄したチモージンを使用した。その他の測定条件は Fig. 2 と同じ。



**Fig.-6 Thin layer chromatogram of Q. saponin extract.**

高性能薄層クロマトグラフ用ガラスプレート (HPTLC Silica Gel 60, Merck) を用いて、クロロホルム / メタノール / 蒸留水 = 65 : 35 : 10 (v / v / v) の展開液で展開し、硫酸発色を行った。

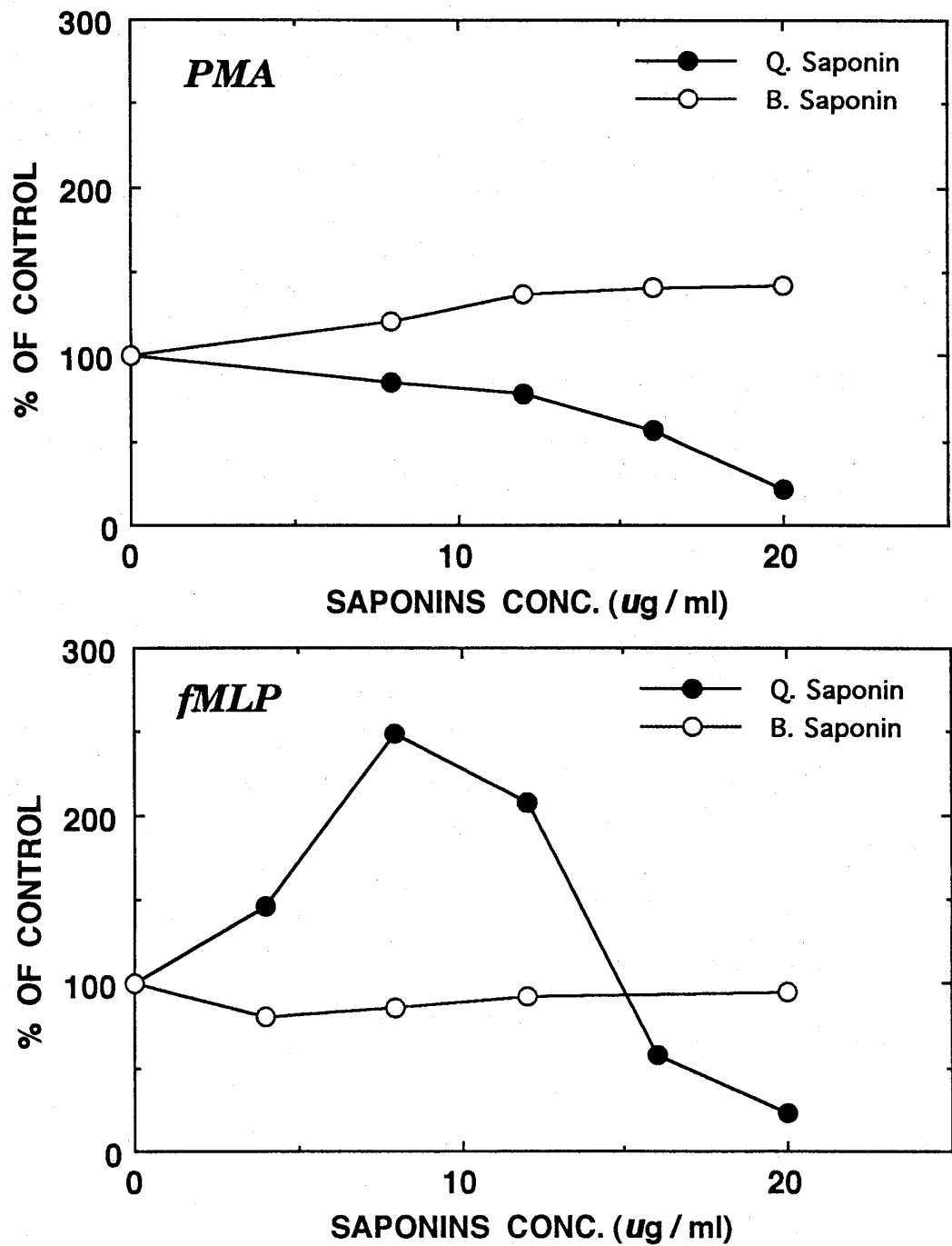


Fig.-7 Effect of saponins on the superoxide generation by stimuli in guinea pig leukocyte.

各々のサポニン、刺激物添加の約 2 分前に添加した。サポニンだけの  $O_2^-$  産生変化は、ほとんど認められなかった (結果は示さず)。その他の測定条件は Fig. 2 と同じ。

刺激物としてホルミルメチオニンをアミノ末端に持つトリペプチドで白血球の走化因子の fMLP , 発ガンプロモーターの PMA , そしてグラム陰性菌の細胞壁の主要成分の LPS, さらに血清補体で活性化されたチモーザン (Oz) を用い, それらの刺激物による NADPH Oxidase 活性化機構の違いに留意して  $O_2^-$  産生に対する  $Ca^{2+}$  の関与について検討した。

fMLPは形質膜に存在するfMLPの受容体を介して, 膜内ホスホリパーゼ酵素群を活性化させると考えられているが, Fig.2 に見られるごとく, ごく低濃度でそのリガンド・レセプター複合体形成が生じそのシグナルが充足されることが認められた。PKC と結合して複合体を形成し, 直接にPKC を活性化し 47kDa 蛋白をリン酸化することで NADPH Oxidase を活性化すると考えられている PMA による  $O_2^-$  産生の  $Ca^{2+}$  添加効果は, 顕著に認められなかった。またニジマスの  $O_2^-$  産生能はモルモットの  $O_2^-$  産生能と顕著な違いはなかった (Fig.3)。

また, LPSは細胞膜に存在する受容体を介して細胞膜結合型チロシンキナーゼの関与のもとに NADPH Oxidase を活性化させると考えられているが, Fig.4 に見られるごとく *S. typhimurium* の LPS は, 高い  $O_2^-$  産生が認められるのに対して *E. coli* の LPS では全く  $O_2^-$  産生は認められなかった (結果は示さず)。また, Oz 刺激は白血球の異物排除機構としての貪食現象を顕著に示すもので, 細胞内骨格系収縮蛋白がその働きを担っており,  $Ca^{2+}$  イオンの存在により NADPH Oxidase 活性が促進されることが認められた (Fig.5)。

魚類白血球を用いた結果, 特に fMLP, LPS 刺激はばらつきが多かった。これらのシグナル応答伝達機構には他の膜内酵素の関与が示唆されていることや, 細胞内エネルギーレベルによりそれら刺激物の膜受容体数の変化が明らかにされている<sup>9)</sup> ことから, このような結果が生じたものと推察された。一方, PMA 刺激は細胞質内の遊離型 PKC が受容体となっていることより, 比較的安定した結果が得られた。したがって, 使用する白血球のエネルギー状態をいかに高く安定的に保ったままで実験に供するかが今後の課題といえる。

#### 白血球の $O_2^-$ 産生能におよぼすサポニンの効果

サポニンはキラヤの樹皮やサトウダイコンよりアルコール抽出した粗精製物を用いた (太陽化学より供与された)。その薄層クロマト分析の結果とキラヤサポニンの構造を Fig.6 に示した。用いたキラヤサポニン抽出物には, 約 4 種類の配糖体が含まれていることが認められた。

そこで, これらサポニン抽出物によるモルモット白血球の  $O_2^-$  産生能におよぼす効果について, PMA と fMLP の 2 種類の刺激物を用いて検索した。その結果 Fig.7 に示されるように, ピートサポニン抽出物はどちらの刺激物においても影響をほとんど与えなかったが, キラヤサポニン抽出物は PMA 刺激を抑制する効果が認められた。fMLP 刺激ではその低濃度 (10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  以下) において促進効果が認められたが, その高濃度においては抑制効果が認められ, その 2 相性効果が認められた。キラヤサポニンは, トリテルペノイドのオレアノール酸と糖鎖からなる配糖体であることから推察して, そのトリテルペノイドが PMA 刺激による PKC 活性を抑制していることや fMLP 刺激によるホスホリパーゼ活性を促進していると考えられる。したがってこれらの結果より, そのオレアノール酸による形質膜の修飾ならびに抗プロモーター様活性が示唆され, この物質が細



菌感染疾病に対する抗病効果を有していると推察された。

## 要 約

モルモットやブリの腹腔内浸出多形核白血球の各種刺激物の違いによる  $O_2^-$  産生能の特徴について検索した。また、細菌性魚病に対して延命効果を示す植物由来天然生理活性物質のサポニンによる、免疫担当細胞の多形核白血球の  $O_2^-$  産生能におよぼす効果について検索した。fMLP 刺激による  $O_2^-$  産生能は、形質膜に存在する受容体の状態により大きく影響されるため魚類白血球では一定した結果は得られなかったが、モルモットではサポニン添加により促進 ( $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  以下)ならびに阻害効果 (高濃度) が認められサポニンによる形質膜の修飾が推察された。また、PMA 刺激による  $O_2^-$  産生能におよぼすサポニンは濃度依存的に阻害効果を示し、その分子構造から抗プロモーション作用を有していると推察された。

## 文 献

- 1) M. Miyahara and E. Okimasu : " *Oxygen Radicals* ", pp 43-47, Elsevier Science Publishers B.V., Netherland, (1992).
- 2) M. Yamamoto, K. Saeki and K. Utsumi : *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 450-455 (1991).
- 3) 佐藤英介, 秋丸国広, 内海耕慥, 井上正康 : 代謝, 29 (1), 15-23 (1992).
- 4) M. Yamamoto, E. Okimasu, S. Terada nad K. Utsumi : *Cell Struct. Funct.*, 12, 357-367 (1987).
- 5) M. Kurashige, E. Okimasu, M. Inoue and K. Utsumi : *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, 22, 27-38 (1990).
- 6) M. Sugano, S. Goto, Y. Yamada, K. Yoshida, Y. Hashimoto, T. Matsuo and M. Kimoto : *J. Nutr.* 120, 977-985 (1990).
- 7) 吉田美夫 : 福山大学大学院工学研究科生物工学専攻修士論文 (1993).
- 8) M. Kuroki, N. Kamo, Y. Kobatake, E. Okimasu and K. Utsumi : *Biochim. Biophys. Acta*, 693, 326-334 (1982).
- 9) E. Sato, Y. Takehara, J. Sasaki, T. Matsuno and K. Utsumi : *Cell Struct. Funct.* 11, 125-134 (1988).