

海洋深層水のマクロファージに及ぼす影響

Effects of Deep Seawater on Function of Mouse Macrophage

高木 邦明¹・稲村 達海²・河尻 正博³・野矢 和夫⁴・萩原 快次⁴・祐田 泰延¹

Kuniaki TAKAGI, Tatsumi INAMURA, Masahiro KAWAJIRI, Kazuo NOYA,
Yoshitugu HAGIWARA and Yasunobu SUKETA

Abstract

Deep sea water is recently under trial as an efficacious reagent for a cure of atopic dermatitis. However, the biologically effective substances, including cytotoxic compounds, in deep sea water are almost unknown. We investigated the effects of deep sea water on function of mouse macrophage in vitro. We found that 1) mitochondrial activity, active oxygen and NO production in macrophage cells cultured with stimulants were enhanced by pretreatment with deep sea water in depth dependent manner; 2) on the other hand, treatment with deep sea water reduced NO production of preactivated cells in depth dependent manner; 3) the both activities of deep sea water stored in 4°C for one year were lower than that stored in -30 °C. These results indicate that substances which are able to affect the immune response exist in deep sea water. The immune response is different way and dependent on host condition.

Key Words: Deep seawater, macrophage, inflammation, activation

1. 緒 言

海洋深層水は富栄養、低温、清浄という性質を有し、これらの性質が季節によりほとんど変動しないことが特徴である。また、海洋深層水は自然の物質循環により生成することから、再生可能な新資源として、冷熱・エネルギー、食品加工、養殖、化粧品・医療等多くの分野からその利活用が検討されている。

アレルギーは近年急激に患者が増加した疾患であることから、それに対する予防や療法が広く検討されている。その代表疾患でもあるアトピー性皮膚炎は、重症になると一般生活に支障をきたすことから、有効な治療法の開発が試みられてきた。海水浴療法はその中でも効果の観られた方法であったが¹⁾、季節的制限、紫外線効果および混在細菌等の問題があっ

た。

最近、海水浴療法改善策として海洋深層水が利用され良い成果が得られている^{2), 3)}。しかし、海洋深層水利用の全患者に有効性が認められているわけではなく、毒性を含め海洋深層水の免疫系や皮膚細胞への作用機構も明らかとなっていない。そこで、本研究では免疫担当細胞の一つのマクロファージ (Mφ) に焦点をあて、海洋深層水の Mφ への影響を検討した。

2. 方 法

(1) 検 水

採水点—北緯 34 度 51 分、東経 138 度 38 分。
採水日—1997 年 7 月 17 日、9 月 12 日。採水方法—ニスキン採水器を使用し、水深 0, 50, 100, 350,

¹ 静岡県立大学薬学部製薬学科 (〒422-8002 静岡市谷田 52-1)

² 静岡県立大学修士課程

³ 静岡県農林水産部水産資源室 (〒420-8601 静岡市追手町 9-6)

⁴ 静岡県水産試験場漁業開発部 (〒425-0033 焼津市小川汐入 3690)

600 m の各点より採水し、入港後直ちに -30°C で凍結保存した。実験直前に融解し、ろ過滅菌後に使用した。保存法の検討では、濾過滅菌後の検水を 4°C で1年以上保管した。

(2) 細胞および培養方法

マウスマクロファージ系細胞株 RAW264 は理化学研究所細胞銀行より購入し、同系細胞株の J774.1 は国立衛生試験所細胞バンクより入手した。Mm1 は市川が樹立した M1 の亜株で⁴⁾、本研究室で継代培養しているものを使用した。各細胞とも、8%ウシ胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) で培養した。RAW264 および J774.1 の活性化因子には、インターフェロン γ (IFN- γ , Genzyme 社製) および細菌菌体壁 (LPS, Difco 社製) を使用した。

検水処理：1) 濾過滅菌した各海水を 8% FCS D-MEM で 3 倍希釈し、刺激因子存在・非存在下で 48 時間培養後、各試験項目で測定した。2) 細胞を予め 24 時間 96 穴プレートあるいは 3 cm 培養皿で培養後、培養上清を吸引除去し、ろ過滅菌した検水を加え 30 分室温で反応させた。次に検水を吸引除去後、刺激因子存在非存在下で 24–48 時間培養し、その細胞の活性度を測定した。3) 予め活性化させたマクロファージを使用する実験では、細胞を検水で処理する前に 24 時間、刺激因子と前培養しておき、検水処理後も二次的に刺激した。

(3) 細胞活性度の測定

細胞の生存率あるいは増殖率をミトコンドリアの脱水素酵素活性を指標に MTT 法で、活性化の度合いを一酸化窒素 (NO) を指標に Griess 法で亜硝酸イオンを測定することで求めた⁵⁾。また、細胞内の産生された活性酸素を dichlorofluorescein acetate で、NO を DAF-2DA⁶⁾で、またミトコンドリア活性を rhodamine123 で染色後、フローサイトメーターにより解析した。

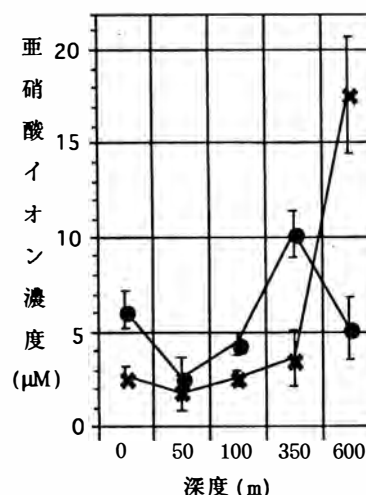


図-1 海洋深層水の RAW264 一酸化窒素産生に及ぼす影響

●, 7月17日採水; ×, 9月12日採水

3. 結 果

(1) 海洋深層水によるマクロファージ系細胞の活性化

海洋深層水の直接的な細胞への影響を観る目的で、各検水を培養液で 3 倍希釈した後、RAW264 と LPS 存在下で 48 時間培養し、その際の培養液中の亜硝酸イオン濃度を図-1 に示した。1997 年 7 月に採水した水深 600 m の検水を除き、培養上清中の亜硝酸イオン濃度は水深 50 m で一端下降した後、採水点の深度に依存して上昇した。

アトピー性皮膚炎の治療では、海洋深層水を抗炎症剤使用前に洗浄した患部に一次的に塗布することで利用されている⁷⁾。また、海水は通常培養液より高張であることから、Mm1 を各検水と直接 30 分反応した後、通常の培養液に交換し、24 時間培養してそのミトコンドリア活性を MTT 法で測定した (図-2)。図から判るように、水深 50 m の検水でいったんミトコンドリア活性が減少し、その後、深度に依存して細胞の活性が上昇した。結果には示さないが、海水の細胞への処理時間は細胞障害性の現れる前の 30 分を採用した。また、MTT 法と同様のデータは細胞内 LDH 活性測定からも得られている。

図-1, 2 の結果から海水はその深度に依存してある程度細胞を活性化させることが明らかとなった。しかし、両データでは培養中に細胞数に変化が現れ

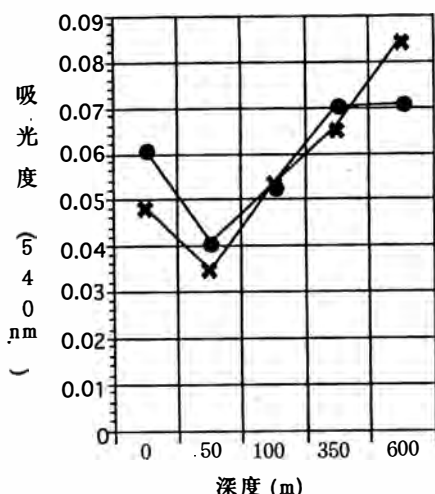


図-2 海洋深層水の Mm1 細胞増殖に及ぼす影響
●, 7月17日採水; ×, 9月12日採水

たために観察されたものとも考えられるので、次に個々の細胞の状態を計測するためにフローサイトメーターを用いて細胞の活性化の度合いを計測した。J774.1 を 3 cm 培養皿で 24 時間培養後、培養上清を吸引除去し、検水 (0.9 % および 3.44 % 食塩水あるいは 9 月採水の水深 600 m の海洋深層水) を加え 30 分室温で反応させた。次に検水を吸引除去した後、刺激因子を加え 24 時間培養し細胞を各蛍光色素で染色後、ミトコンドリア活性、細胞内活性酸素産生量そして一酸化窒素産生量をフローサイトメーターで測定した。

図-3 に示したように、細胞を生理食塩水で処理したことで、蛍光強度の低い領域 F の約 70 % の細胞は蛍光強度の高い領域 E に移行した。また、3.44 % 食塩水で処理することにより、細胞の蛍光強度は全体的に右に移動した。このような傾向は海洋深層水を前処理した細胞でもさらに強まった。

図-4 には刺激因子処理により産生される活性酸素量の変化を示した。図中 N は刺激因子未処理の細胞のフローサイトメーターパターンである。生理食塩水で前処理し、刺激因子を添加することで細胞の蛍光強度は大きく右に移動した。前処理する検水を 3.44 % 食塩水さらに海洋深層水に変えることで右に移動する細胞数が徐々に増加した。同様の蛍光は一酸化窒素産生細胞群でも観察された (図-5)。しかし、海洋深層水を処理した細胞群の一酸化窒素産生を示す蛍光強度は、3.44 % 食塩水処理の高張

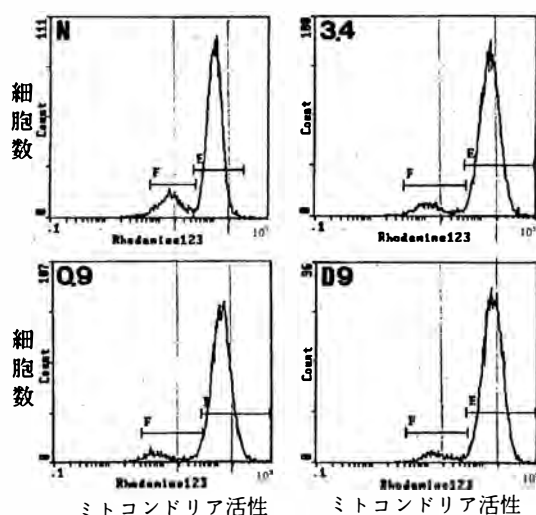


図-3 海洋深層水の J774.1 細胞のミトコンドリア活性に及ぼす影響
N: 未処理, 0.9 : 0.9 % NaCl 処理,
3.4 : 3.44 % NaCl 処理, D9 : 600 m 深層水処理

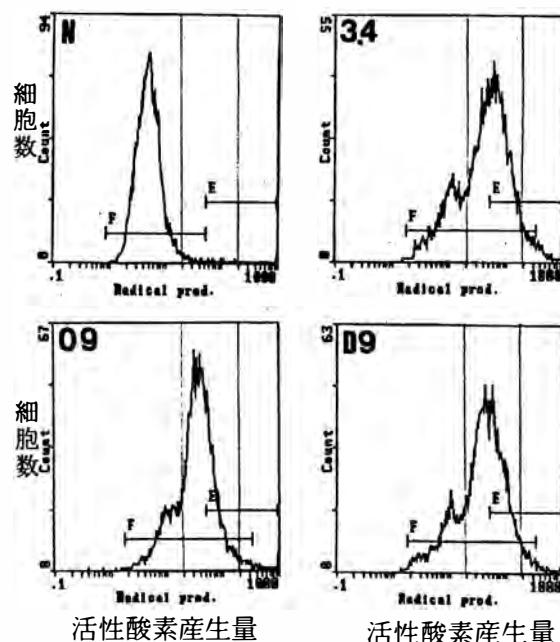


図-4 海洋深層水の J774.1 細胞の活性酸素産生に及ぼす影響
N: 刺激因子非存在下で培養, 0.9 : 0.9 % NaCl 処理,
3.4 : 3.44 % NaCl 処理, D9 : 600 m 深層水処理
0.9, 3.4, D9: 検水処理後刺激因子と培養

刺激細胞群とほとんど一致していた。

(2) 海洋深層水による活性化マクロファージへの影響

炎症の場に存在する Mφ はすでに活性化した状態の Mφ であり、その活性化の度合いは炎症の強度により異なっている。そこで次の実験として、活

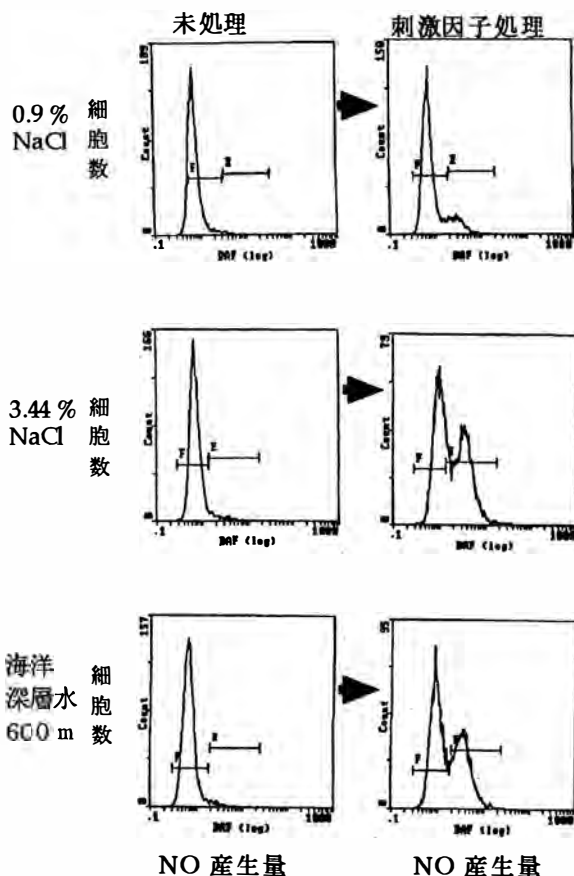


図-5 海洋深層水の J774.1 細胞の NO 産生に及ぼす影響

活性化してある Mφ を深層水処理することで、Mφ の二次刺激後の変化を検討した。図-6A に示すように、刺激因子を添加せずに 24 時間前培養した細胞群は海水の処理より NO 産生は亢進した。しかし、24 時間刺激因子と培養し、すでに活性化した細胞群では逆に海水の処理により、二次刺激後の NO 産生海水の深度に依存して有意に減少した (図-6B)。

(3) 海洋深層水の保存法による変化の検討

約 1 年間にわたり、図-1 から図-6 の実験を繰り返して、再現性の確認をした。その結果、深層水の Mφ への効果は徐々に減衰する傾向が観察された。そこで、保存法による深層水の Mφ への効果の違いを検討した。1997 年 7 月採水の試料を二分し、一部を 1 年間冷凍保存、他を無菌フィルターでろ過した後に冷蔵保存して、細胞の前処理に使用した。その結果、冷蔵保存した試料は未刺激の細胞にも、あるいは活性化させた細胞においても、深度

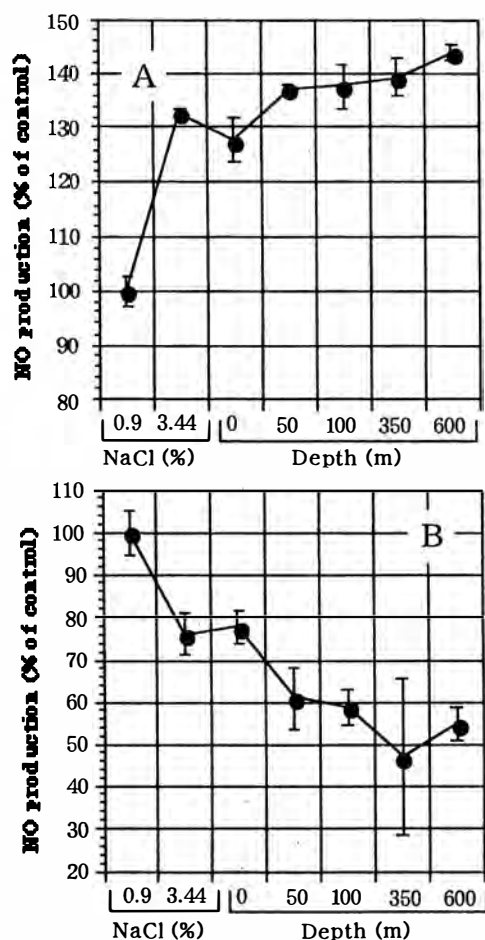


図-6 活性化 J774.1 に対する海洋深層水の影響

A: 未刺激 J774.1, B: 既刺激 J774.1 (20U/ml IFN- γ と 0.1g/ml LPS で 24 時間前培養)

による活性化の上昇あるいは減少はほとんど観られなかった。しかし、凍結保存した試料においては、未刺激の細胞では深度に依存して活性化を増大させ、活性化しておいた細胞では、逆に一酸化窒素産生を抑制する結果が得られた (図-7)。

4. 考 察

定常状態の Mφ は非特異的貪食能により主に生体防御にあたる。しかし、種々の寄生体が生体内に感染した場合、Mφ は活性化することで効率的に異物を排除することができる。この定常状態から活性化状態に変化する度合いを分析することは、感染防御の初期段階でのパラメーターを知る上で極めて重要となる。

図-1 および図-2 の結果から、Mφ は海水の前処理により刺激因子に対する応答性が高まった。この結果と図-3 から図-5 の結果を合せると、海水

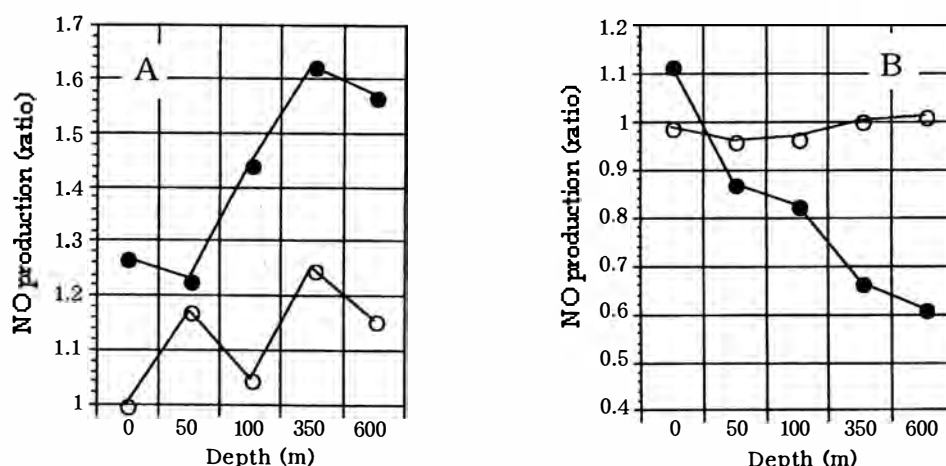


図-6 保存法の違いによる海洋深層水の J774.1 一酸化窒素産生に及ぼす影響の変化
 A: 未刺激 J774.1, B: 既刺激 J774.1 (20U/ml IFN- γ と 0.1 μ g/ml LPS で 24 時間前培養)
 ●, 冷凍保存; ○, 冷蔵保存

処理により、個々の細胞が高応答性となり、その活性度と培養時間の積算値と一酸化窒素の産生との間に正の相関性がありその産生が有意に上昇したものと推測される。さらに図-3 から図-5 の実験結果から、M ϕ は高張条件に一次的に曝されることだけでも、応答性が亢進していた。これは表層水による海水浴療法でも効果が観られたことを指示しているのかもしれない。図-5 の一酸化窒素産生の実験結果では、3.44 % 食塩水と海洋深層水処理の細胞間ではほとんど違いが観られなかった。しかし、図-1 や図-6A および図-7A では海洋深層水前処理の M ϕ の方が明らかに NO 産生は増加していた。著者らはこの違いはフローサイトメーターによる結果は蛍光染色した一時期の細胞の性質を表わし、他の結果は蓄積した産生物の濃度を表わしているために生じた相違と考え^{8), 9)}、全体的には海洋深層水の方が高張溶液単独よりも効果があるものと推測した。

免疫疾患の場合、免疫担当細胞は疾患時にはすでに活性化した状態であることが多い。アトピー性皮膚炎の場合でも、黄色ブドウ球菌が炎症部に感染していることが知られており¹⁰⁾、多くの免疫担当細胞はすでに活性化している。そこで、第二段階として、活性化マクロファージへの海洋深層水の影響を検討した結果が図-6B である。この図-6A や図-1 から図-5 の結果と明らかに反対である結果は、細胞が刺激因子と反応する際の状態により応答性が異なることを意味している。このことは疾患の重症度や

炎症に関わる細胞種の違いで海洋深層水の効果が変わることを意味しており、海洋深層水のアトピー性皮膚炎への利用には注意が要すると考えられた。また、今回は M ϕ への影響のみ検討しているが、他の免疫担当細胞との複合系でさらに詳細な検討が必要と考えられた。

検水の保存法の違いにより M ϕ への影響が異なったことから、本実験系で分析する限りにおいて、深層水には保存方法によって変化する物質の存在あるいは海洋深層水そのものの特性が変化するものと推測された。

参考文献

- 1) 宮地良樹編：アトピー性皮膚炎治療－最新のトピックス－，椿 俊和，坂口直哉，坂本泰寿，内田啓司，飯倉洋治：アトピー性皮膚炎と海水浴，209-218，先端医学社，1996。
- 2) 野村伊知郎：海洋深層水によるアトピー性皮膚炎の治療，治療 77，2528-2530，1995。
- 3) Adachi, J., Sumitsuzi, H., Endo, K., Fukuzumi, T. and Aoki, T.: Evaluation of the effect of short-term application of deep sea water on atopic dermatitis, Jpn. J. Allerg. 47, 57-60, 1998.
- 4) Takagi, K., Hosaka, T. and Suketa, Y.: Effect of recombinant interleukin-6 on nitrite production of mouse myeloid leukemia cells. J. Cell. Physiol. 147, 306-310, 1991.
- 5) Takagi, K., Nakagami, H., Nakano, T. and Suketa, Y.: Induction of nitrite production in mouse spleen cells by immunization. Biochim. Biophys. Acta 1092, 15-20, 1991.

- 6) Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. and Nagano, T.: Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. Chem. Pharm. Bull., 43, 373-375, 1998.
 - 7) 松井宏夫監修:「アトピー性皮膚炎」専門医・病院ガイド, 野村伊知郎:海洋深層水によるアトピーの治療, 123-125, 法研, 1997.
 - 8) 高木邦明, 祐田泰延:マクロファージ系細胞からの一酸化窒素産生誘導の特性. 生化学, 67, 1287-1290, 1995.
 - 9) Kanematsu, M., Takagi, K., Masuda, N. and Suketa, Y.: Lead inhibits nitric oxide production transiently by mRNA level in murine macrophage cell lines. Biol. Pharm. Bull. 19, 949-951, 1996.
 - 10) 多田譲治:アトピー性皮膚炎と感染症. 医学のあゆみ, 188, 827-830, 1999.
- (2000. 2. 29受付)