

Mg 欠乏ラット多形核白血球の活性貪食能と画像解析について

吉原 富子¹⁾・細川 優²⁾・鈴木 和男³⁾・山口 賢次¹⁾
(¹⁾東京家政大学*, ²⁾国立健康・栄養研究所**, ³⁾国立予防衛生研究所***)

Active phagocytosis and image analysis of polymorphonuclear leukocytes in Mg-deficient rats

Tomiko YOSHIHARA¹⁾, Yu HOSOKAWA²⁾, Kazuo SUZUKI³⁾, Kenji YAMAGUCHI¹⁾

¹⁾*Tokyo Kasei University*

²⁾*The National Institute of Health and Nutrition*

³⁾*National Institute of Health*

We have determined leukocytes active phagocytosis in Mg-deficiency using by free 3-(p-hydroxyphenyl propionic acid, HPPA) conjugated microspheres (HPPA-MS) as an evaluative approach to the PMN function. We also have attempted to conduct the image analysis of events in viable PMN. There is no difference between Mg-deficient group and control on day 4 and 7 in the phagocytizing HPPA-MS using PMN. However, Mg-deficient group showed higher values than the control on day 11. The number of phagocytized HPPA-MS per cell increased high values on day 7 in the Mg-deficient group. The total activity of MPO was significantly higher in the Mg-deficient group on day 11. These results indicate Mg-deficient group tended to increase in active phagocytosis and bactericidal function in this study.

白血球による異物代謝機構は、生体防御に重要な役割を果たしている。著者らはこれまでマグネシウム欠乏時の白血球機能を検討してきたが、その結果としてマグネシウム欠乏では、白血球の著しい増加が見られること¹⁾、FMLP、PMA 刺激時のスーパーオキシドアニオンの生成が上昇すること、ライソゾーム酵素の活性は著しく上昇するが、細胞外への放出率はむしろ低下すること、および FMLP 刺激後の細胞内遊離 Ca 濃度は上昇すること²⁾を認めている。そこで今回は白血球機能を評価する一つの方法として鈴木等によって開発された基質結合マイクロビーズ³⁾を用い、マグネシウム欠乏時の多形核白血球の

*所在地：東京都板橋区加賀 1-18-1 (〒173)

**所在地：東京都新宿区戸山 1-23-1 (〒162)

***所在地：東京都品川区上大崎 2-10-35 (〒141)

活性貪食能を測定した。

実験方法

5週齢の雄性SD系ラットをAIN-76TM組成の飼料で10日間予備飼育後、Table 1に示すような実験飼料で11日間自由摂取させ飼育した。また、多形核白血球の分離方法は前報¹⁾同様、飼育4, 7, 11日にエーテル麻酔で腹部大動脈より採血後、リンホプレップを用いる密度勾配および1.5%デキストラン T-500を用いる沈降法で分離精製した。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Control	Deficient
	%	
Casein	20.0	20.0
Cornstarch	15.0	15.0
Sucrose	50.0	50.0
Fiber	5.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0
AIN Mineral mix	3.5	3.5 ¹⁾
AIN Vitamin mix	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3
Magnesium ²⁾	500 ppm	14 ppm

¹⁾Magnesium oxide was omitted from AIN mineral mixture. ²⁾Magnesium was determined by atomic absorption spectrophotometry.

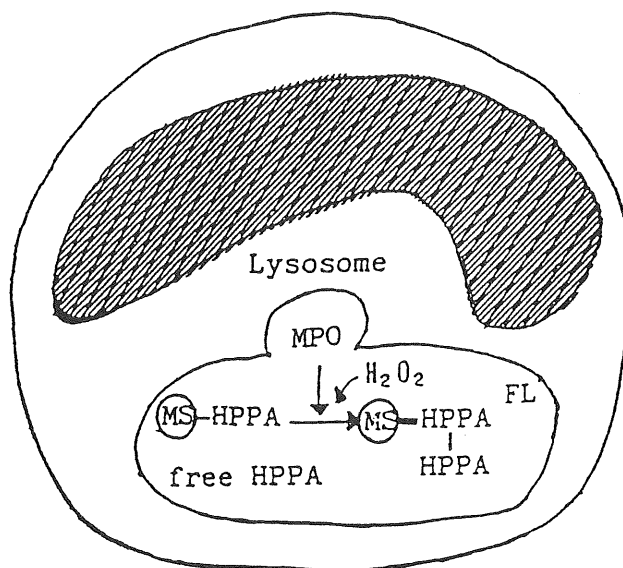


Fig. 1. A scheme for production of fluorescence HPPA-MS derived from HPPA-MS by MPO.

一方、今回用いた基質結合マイクロビーズは、直径 $1.9\ \mu\text{m}$ のアクリル系ポリマーマイクロビーズにアミドを介してパラヒドロキシプロピオン酸 (HPPA) を結合させたもの (HPPA-MS) である。Fig. 1 に HPPA-MS を用いた活性貪食の測定原理を示した。すなわち食作用により食胞中に取り込まれた HPPA-MS は、過酸化水素の存在下、ライソゾームから放出されたミエロパーオキシデースの作用により free の HPPA と二重結合を形成し蛍光を発生させるため、この蛍光量を測定した。この測定方法を用いることによって貪食されたマイクロビーズの数と、刺激により食胞中に放出されたミエロパーオキシデース (MPO) 活性も同時に測定することが可能である。

貪食方法は、白血球浮遊液、ヒト血漿アルブミン存在下、HPPA-MS、HPPA を 37°C 、10 分間保温後混合し、さらに 37°C 、10 分間貪食をさせた。この時の蛍光強度、個々の細胞の画像解析およびフクシン染色による食作用を測定した。画像解析は多方面で開発、応用^{4,5)}されているが、鈴木ら³⁾の用いている蛍光画像解析法で行った。

実験結果と考察

40 万の白血球を用いて HPPA-MS を貪食させた時に発生した蛍光強度を蛍光計 (日立 650-10S 型) で測定した結果を Fig. 2 に示した。マグネシウム欠乏 4 日目、7 日目では両群に差は見られないが、11 日目においてマグネシウム欠乏群では対照群に対して有意に高値を示している。Fig. 3 は、細胞一個当りの貪食された HPPA-MS の数を測定した結果である。マグネシウム欠乏群では、7 日目には高くなっ

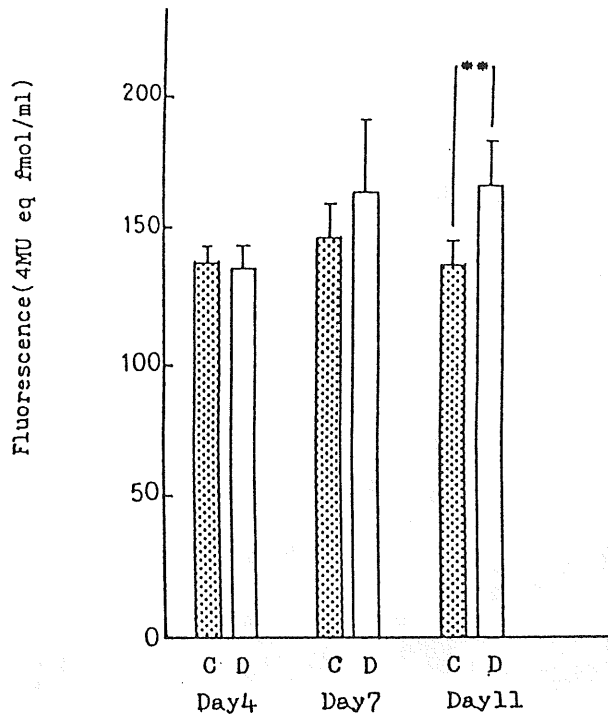


Fig. 2. Fluorescence production from phagocytized HPPA-MS in PMN. Means $\pm$ SD, ** $p < 0.05$

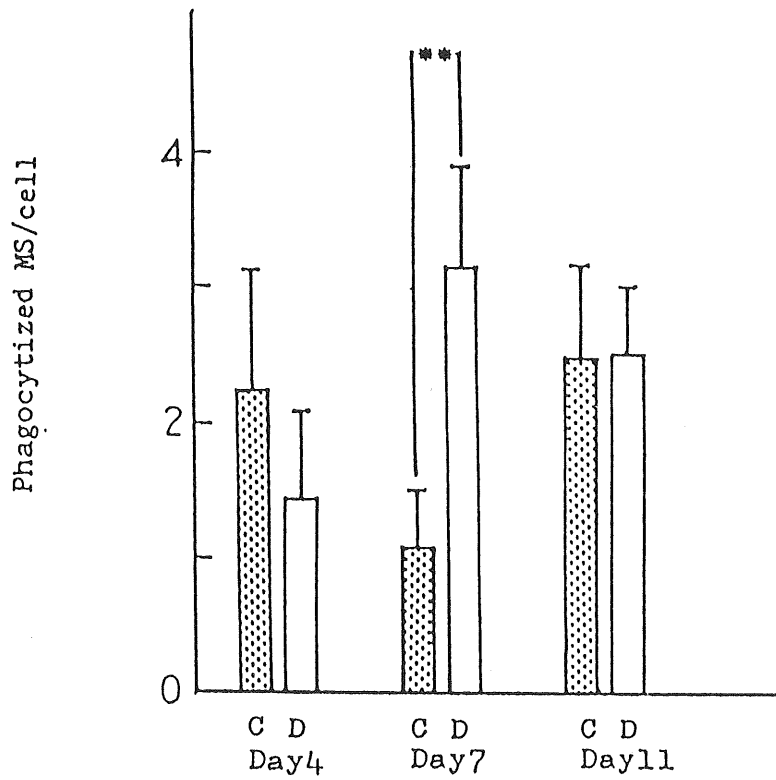


Fig. 3. Phagocytosis of microspheres per cell by PMN. Means $\pm$ SD, $^{**}p < 0.01$

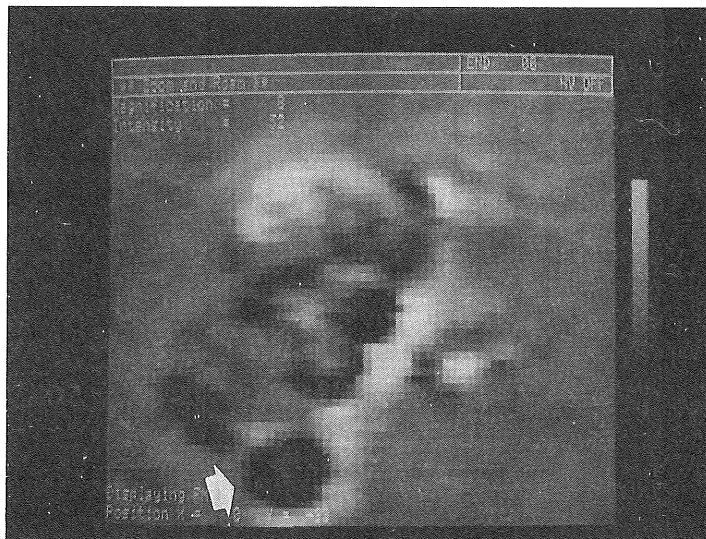


Fig. 4. HPPA-MS after phagocytized.

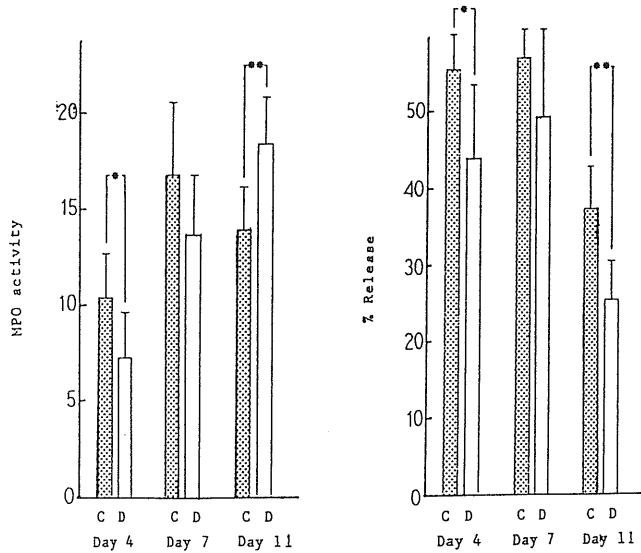


Fig. 5. MPO activity ($\Delta A_{665} / \text{min} / 2 \times 10^6 \text{ PMN}$). Means $\pm$ SD, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

ているが、11日目では、貪食 HPPA-MS の数は対照と差が認められなかった。また、Fig.4 は HPPA-MS の貪食直後の様子を蛍光顕微鏡でとらえ、ビデオスクリーンに写したときの写真である。矢印の部分に貪食された HPPA-MS で、また周囲に蛍光を発生していることがわかる。このように貪食された一つの HPPA-MS にスポットをあてて発生する蛍光強度の経時変化を高速 VTR と蛍光画像処理システムを用いて見てみると貪食直後の蛍光は対照群と比較して約 2 倍近く高く一つの HPPA-MS が発生する蛍光強度そのものが上昇していることが認められる。さらに MPO 総活性については、Fig. 5 に見られるように、11日目には、対照群では有意に高くこれが活性貪食あるいは画像解析で見られた蛍光の上昇の原因となっていると推定された。マグネシウムに関する報告は Ca, Na, K, P, Fe などと比較して少なくまた代謝も複雑である。しかし、虚血性疾患、心不全、高血圧などのこれら心血管系疾患において近年、特にマグネシウムの重要性が認識されている。またエネルギー代謝、体温調節、ホルモンの分泌などマグネシウムの生理作用は多岐に及んでいるため今後さらに検討を加える必要があると思われる。

文 献

1. 吉原富子, 細川 優, 山口賢次 (1989) マグネシウム 8:175-179
2. 吉原富子, 細川 優, 佐藤郁雄, 東條仁美, 新関嗣郎, 山口賢次 (1989) 微量栄養素研究 6: 27-31
3. SUZUKI, K., S. HOSAKA et al. J. Cell Biol. 投稿中
4. DENGLE, J., H. BERTSCH et al. (1988) Methods Inf Med 27(2): 53-57
5. 菅原 勇, 森 茂郎ほか (1988) 臨床免疫 20(6): 561-566