

活性化血小板の活性酸素による マイクロフィラリアの殺虫作用

早崎 峯夫*

主要な抗フィラリア剤であるジエチルカルバマジン (DEC) の作用機序について多くの研究が行われてきたが、未だに解明されてなく寄生虫学領域の主要な研究課題の一つとなっている。DEC は、血小板フリーの場所ではマイクロフィラリア (mf) の殺虫効果はみられず、mf の殺虫には血小板の存在を必要とすることが示唆された。さらに、DEC により血小板が活性化されて殺虫作用を発揮するためにはフィラリア由来排泄分泌産物 (ES) を必要とした。すなわち DEC は ES 産物の存在のもとに、血小板を活性化させ、活性化した血小板が mf を殺虫する機序の存在が強く示唆された。さらに、殺虫因子として活性化血小板から放出される活性酸素が強く示唆された。

Key Words: ジエチルカルバマジン/マイクロフィラリア/活性酸素/血小板、
排泄分泌産物

I はじめに

寄生虫の感染に対して、宿主体内で起こっている免疫学的防御機序が解り始めてきたのはそれほど古いことではない。現在では、免疫担当細胞群が集中的に寄生虫を攻撃してダメージを与え殺虫するが、そのなかでも好酸球が大きな役割を果たすことが解っている。ところが、最近血小板も大きな役割を果たすことが解り、その殺虫因子として活性酸素が注目されている。

II 抗体依存性細胞性細胞障害作用

宿主による寄生虫殺滅作用には、抗体依存性細胞性細胞障害作用 Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) と呼ばれる機序が働いている³⁾。この作用にはマクロファージ、好中球、好酸球、血小板、マスト細胞、好塩基球、

キラー細胞などが関与していて、これらの細胞は膜表面に Fc リセプターや C₃b リセプターをもち、虫体に付着している抗体や免疫複合体あるいは補体の介在により虫体表面に付着して寄生虫を攻撃する。寄生虫に付着するとこれら細胞の代謝が発発になり、細胞障害性の活性酸素 (酸素代謝物) や中性蛋白溶解酵素あるいは殺菌性蛋白を放出して、寄生虫の体表クチクラにダメージを与えて殺虫へと導く。特に好酸球から放出される主要塩基性蛋白 Major basic protein (MBS) は直接的に寄生虫を障害する^{1,2,12)}。

III 寄生虫感染と血小板

血小板が宿主の寄生虫殺滅機序において重要な役割を果たしていることがわかったのは、最近のことである。血小板の機能は止血作用のほか、セロトニンの取り込みと能動輸送、炭素やコラーゲ

*Mineo Hayasaki 東京農工大学農学部獣医学科家畜内科学教室 助教授

特集●感染症と活性酸素

ンなどの貪食（真の貪食とは認められていない）、貯蔵顆粒からの成分放出（濃染顆粒からはセロトニン、Caイオンなど、 α 顆粒からはライソゾーム酵素や陽イオン因子など）、プロスタグランジン（ E_2 , $F_2\alpha$ ）の合成などの細胞反応が知られており、また炎症反応の場において血管透過性の亢進、白血球走化性の促進、殺菌作用などに関与している。しかし、この他に、近年、血小板膜表面にIgE リセプターが存在し、IgE 依存性に血小板が活性化されることが証明されて、即時型アレルギー反応における炎症反応の発現に密接に関与していることが明らかになった^{9,10)}。さらに、抗フィラリア剤であるDECの殺虫機序の研究がきっかけとなって寄生虫感染防御に血小板が大きく関わっていることが知られるようになった。

IV フィラリア（糸状虫）感染とジェチルカルバマジン（DEC）

DECは約45年前より用いられていて、医学領域では特に抗ミクロフィラリア（mf）剤としてバンクロフト糸状虫感染症やマレー糸状虫感染症などのリンパ系フィラリア症に用いられ、獣医学領域では抗フィラリア幼虫剤として犬糸状虫感染症やセタリア感染症などに用いられている。

ところが、DECは代謝・排泄がかなり早く、

蓄積性がきわめて低いという特徴をもつ¹⁰⁾。犬を用いた実験では、単一投与後約1時間で血中濃度はピークに達し、投与後24時間には血中から検出されず、ほとんどが尿へ排泄され糞や精液からは検出されない。また、例えばDEC 5.5mg/kgを210日間連続投与しても組織への蓄積はみられない。しかも、その殺虫作用は、DEC自体あるいはその代謝物による直接効果がみられない^{5,7,10)}ことから、本剤の殺虫機序が多くの研究者の興味を引いてきた。

例えば、今までに、特異抗体が重要な役割を果たすとする説、リンパ細胞が重要な役割を果たすとする説、DECが虫体表面にダメージを与えてADCCに曝されやすくするとする説、補体が重要な役割を果たすとする説、好酸球が重要な役割を果たすとする説、など多くの報告がみられ、また詳細な総説をみる^{14,15,17)}。それらはともに、DECが宿主の免疫防御機序に働いて間接的に殺虫効果を発揮するという興味深い推論を示唆している。

このことから、現在、DECの殺虫機序の解明は寄生虫感染に対する宿主の免疫防御機序の解明の研究に大きく資するものにとらえられていて、寄生虫学における重要な主題の一つに取り上げられている。

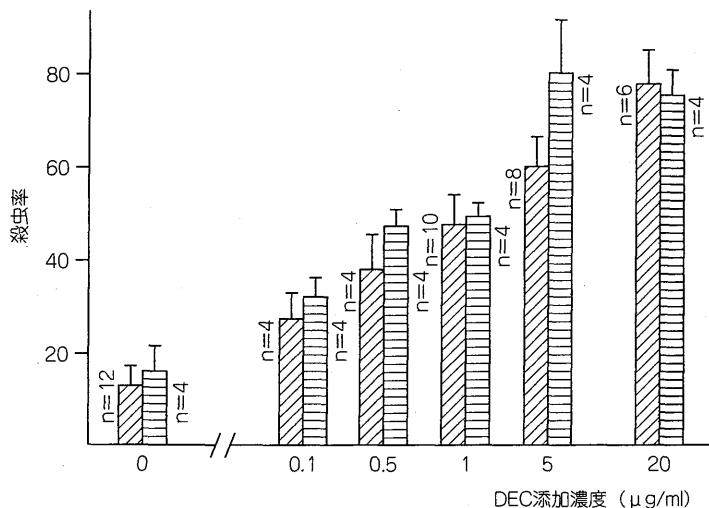


図1 DEC添加量依存性のmf殺虫効果
斜線は血清無添加，横線は血清添加。

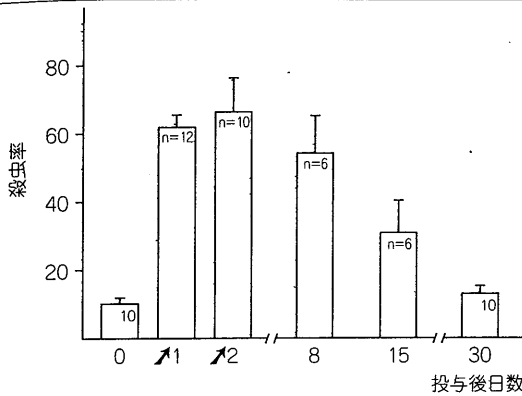


図2 DEC 処理正常人血小板のmf殺虫作用
第1日および第2日にそれぞれ DEC 25mg と75mgを投与。

V ジェチルカルバマジンと血小板による mf 殺虫作用

mf の殺虫効果は、DEC の一定濃度下において血小板数と相関し⁶⁾、臨床的に DEC の最小有効血清中濃度である0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の DEC 濃度にある患者から採取した血小板でも、*in vitro*にて mf を殺虫できる⁶⁾。しかし、胸腔などの血小板フリーの場所では高濃度の DEC を用いても mf の殺虫効果は認められない^{7,8)}。これらのことは DEC による mf の殺虫に血小板が重要な役割を果たしている可能性を強く示唆している。そこで DEC 投与下における血小板による mf 殺虫作用が研究された^{5,9)}。

*in vitro*にて、正常人血小板 (7.5 $\times 10^7$ 個) および DEC を添加し、48時間培養後に mf の殺虫率を算定すると DEC の添加量依存性に殺虫率が增高する。しかもこれらの反応系に正常人血清 (10%に混合) を加えても mf 殺虫率に差異はみられない (図1) ことから、補体は関与していない。また、健康人に DEC を2回投与 (25mgおよび75mg) した後、経日的に血小板を採取し、*in vitro*にて mf (100匹) を血小板 (7.5 $\times 10^7$ 個) および正常人血清 (20 μl) とともに18時間培養すると、投与第8日に採取した血小板においても著明なmf殺虫効果が認められ、第15日においてもなお明らかな殺虫効果が認められる (図2)。このことは、DEC で活用化された血小板が mf

表1 DEC による殺虫作用におけるフィラリア由来 ES 産物の関与

mf (100匹) 添加	殺虫率
血小板 (1.5 $\times 10^8$) のみ	7 \pm 5
血小板+DEC (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	37 \pm 9
血小板+DEC+ES (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	59 \pm 25
DEC のみ	3 \pm 3
DEC+ES	4 \pm 3
培養液のみ	3 \pm 2

表2 DEC と ES 産物による活性化血小板の殺虫効果

シストソミューラ (100匹) と共に	殺虫率
血小板 (7.5 $\times 10^7$) +DEC (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	9 \pm 2
血小板+DEC+ES (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	73 \pm 4
血小板+ES	13 \pm 2

表3 抗イディオ型単クローン抗体による殺虫効果の増強

シストソミューラ (100匹) 添加	殺虫率
血小板 (1.5 $\times 10^8$) のみ	12+2
血小板+DEC (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) +ES (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	57+7
血小板+DEC+Ab2 (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	42+6
血小板+DEC+ES+Ab2	77+12

Ab2: ES 抗原持異抗イディオ型単クローン抗体

殺虫効果を発揮することを示唆している。

なお、血小板の代わりに顆粒球を加えても mf 殺虫は認められない。また、NK細胞やキラー T 細胞の関与も否定されている。

次に、mf を DEC (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と正常血小板 (1.5 $\times 10^8$ 個) とともに培養すると、mf 殺虫効果が認められるが、これにフィラリア虫体の排泄分泌 Excretory-secretory (ES) 産物を添加すると mf 殺虫率がさらに增高 (表1) した。このことから、DEC による血小板の活性化にフィラリア ES 産物の存在が必要であることが明らかになった。したがって、これまでの実験にみられた mf 殺虫は培養中に mf が ES 産物を放出するため、

特集●感染症と活性酸素

血小板による殺虫機序が働いたものと解釈された。

さらに、DEC と正常血小板とES産物を含む培養液中に mf の代わりにマンソン住血吸虫の幼虫シストソミューラを加えるとシストソミューラ殺虫効果が認められ(表2)、しかも添加量依存性の殺虫作用が認められた。以上のことから、DEC による血小板の活性化にはフィラリアES産物の存在が必要であり、活性化した血小板はmfのほかにシストソミューラも殺虫することが示唆された。

なお、類似の細胞障害作用 cytotoxicity が、DEC の関与しない別の機序により活性化された血小板においても発現させることが認められている。すなわち、血小板膜表面にはIgEリセプターが存在する^{4,6)} ことから、IgEを結合させた血小板に抗IgE血清を加えると血小板が活性化され、mf¹⁶⁾ やシストソミューラ^{9,10)} の殺虫作用を示すことが認められており、これらは血小板が寄生虫に対する免疫防御において重要な細胞因子であることを示唆している。

さらに、DECによる血小板の活性化にフィラリアES産物の存在が必要であることを証明するために、フィラリアES抗原特異単クローン抗体(Ab1)から抗イディオ型単クローン抗体を作製した。ES抗原特異抗イディオ型単クローン抗体(Ab2)の免疫活性はES抗原と同じ活性を示し、ES抗原のように働く。この抗イディオ型抗体をシストソミューラ、DEC、血小板の培養液に加え、ES抗原を加えた場合と類似の殺虫率がみられ、ES抗原とAb2を同時に加えると殺虫率は著明に増高した(表3)。しかも、Ab2を加えた殺虫率は添加量依存性に増高した。また、この反応系に、さらにAb1を加えたところAb2がAb1により不活化され、殺虫率はAb1の添加量依存性に減弱した。このように、DECによる血小板の活性化にフィラリアES産物が重要な役割を持ち、活性化血小板の殺虫作用は虫種非特異性であった。

また、Ab2を用いたフローサイトメトリーによりAb2が血小板表面膜上に特異的に結合することが認められ、さらに放射線標識血小板表面膜

表4 アラキドン酸経路阻害剤の殺虫効果への影響

mf (100匹), 血小板 (7.5×10 ⁶) と共に	殺虫率
DEC (20μg/ml) のみ	82±3
DEC+アスピリン (0.3×10 ⁻³ M)	95±2
アスピリンのみ	14±4
DEC+NDGA (10 ⁻⁶ M)	15±1
NDGA のみ	12±1
DEC+Esculetin (10 ⁻⁶ M)	15±3
Esculetin のみ	10±2
DEC+5, 8, 11, 14- (21≡4) (5×10 ⁻⁶ M)	19±4
5, 8, 11, 14- (21≡4) のみ	15±12

NDGA : nordihydroguaiaretic acid.

Esculetin : 6, 7-dihydroxy-coumarin.

5, 8, 11, 14- (21≡4) : 5, 8, 11, 14-heneicosate-traynoic acid.

蛋白のAb2を用いたアフィニティークロマトグラフィーとそのAb2反応分画のSDS-PAGEによる解析によりフィラリアES物質に対するリセプターの存在が確認された。

VI 血小板と活性酸素

活性化血小板から遊離される直接的な殺虫因子はなんだろうか。高濃度のDECは血小板からのセロトニンの放出を誘導する¹³⁾が、しかしセロトニン(1/10¹¹Mから1/10⁹Mまで添加)の寄生虫に対する有害作用は認められなかった。アラキドン酸代謝物も血小板にて形成される。そこで、シクロオキシゲナーゼ阻害剤のアセチルサリチル酸(アスピリン)を、mf、DEC、血小板の反応系に添加しても、非添加対照群に比較して殺虫率の低下はまったく認められなかった。これに対して、DECを含まないmf、血小板、アスピリンだけの反応系での殺虫効果は認められなかった(表4)。これらは、シクロオキシゲナーゼ経路はmf殺虫機序に関与していないことを示している。一方、リポオキシゲナーゼ経路について、リポオキシゲナーゼ阻害剤を用いて検討した。阻害剤にはノルジヒドログアイアレン酸(NDGA)、ジヒドロキシマリン(Esculetin)、ヘンエイコサテ

表5 活性酸素除去剤の殺虫効果への影響

シストソミューラ (100匹) +血小板 (7.5×10 ⁷) +DEC (20μg/ml) +ES (5μg/ml) と共に	殺虫率
無添加	92±4
尿酸 (10 ⁻⁴ M)	32±2
蟻酸ナトリウム (10 ⁻⁴ M)	37±3
マンニトール (10 ⁻⁴ M)	41±6
サリチル酸 (10 ⁻⁴ M)	47±3

トライノイック酸 (5, 8, 11, 14- (21≡4)) をそれぞれ mf, DEC, 血小板の反応系に添加すると, DEC を除いた対照群 (mf, 血小板, リポオキシゲナーゼ阻害剤のみの反応系) とほぼ類似の殺虫率を示した。このことから, リポオキシゲナーゼ経路の関与が強く示唆された。なお, その後の実験で, DEC, ES産物と ¹⁴C-アラキドン酸前処理血小板を培養し, 培養液中に遊離するシクロオキシゲナーゼ, リポオキシゲナーゼあるいはその他の oxygenate された物質の増加を薄層クロマトグラフィ, さらには高速液体クロマトグラフィによっても証明することができていない。

つぎに, 活性化血小板から放出される活性酸素(酸素代謝物)による殺虫効果について, 各酸素除去剤(スカベンジャー)を用いて検討した。DEC, 血小板, ES産物の反応系に尿酸, 蟻酸ナトリウム, マンニトール, サリチル酸を添加すると著明な殺虫率の低下が認められ(表5), 活性酸素が殺虫因子として大きな役割を果たしていることが示唆された。一方, DEC および ES産物の添加量を少量にして, 血小板の殺虫効果を減弱させた反応系を置き, これにリポオキシゲナーゼ経路の増強に働く Feイオンを添加したところ殺虫率の著明な増高が認められた。さらに, この反応系に鉄キレート剤の O-フェナンスロリンを加え, 血小板の鉄の利用を抑制すると殺虫効果は著明に低下した。このように, Feイオンの添加が明らかに殺虫効果を増強させていることから, 殺虫機序にリポオキシゲナーゼ経路が大きく関与してい

表6 活性酸素産生剤の殺虫効果への影響

シストソミューラ (100匹) +血小板 (7.5×10 ⁷) と共に	殺虫率
無添加	12±4
DEC (5μg/ml) +ES (1μg/ml)	29±3
DEC+ES+Fe (10 ⁻¹¹ M)	73±2
DEC+ES+Fe (10 ⁻¹¹ M) +O-phenanthroline (10 ⁻⁶ M)	18±5
Phenazine Methosulphate (10 ⁻⁸ M)	73±3
Phenazine Methosulphate (10 ⁻¹⁰ M)	48±4
Phenazine Methosulphate (10 ⁻¹² M)	26±3

ることが示された。

さらに, 活性酸素産生剤を用いて, 血小板の活性酸素による殺虫効果をみた(表6)。すなわち, 血小板にフェナジンメトスルフェート(PMS)を添加し, DEC, ES産物を含まない反応系における殺虫効果を検討したところ, PMSの添加量依存性に殺虫効果が増高した。なお, PMS単独(10⁻⁶M)では殺虫効果は認められなかった。このようにPMSが血小板に働いて殺虫効果を賦与してことが示されたことから, 殺虫因子として活性酸素が大きく関与していることが示された。

VII おわりに

活性酸素による殺虫機序が生体内でも起きているかどうかを生化学的に検討する必要がある。しかし, 以上に示したデータは, DEC処理血小板のmf殺虫作用に活性酸素の関与があることを十分に示している。現在, 生体内では, 活性化血小板から放出された活性酸素がmfの体表にダメージを与え, 障害を受けたmfに対してADCC機序が働いて殺虫するのであろうと考えられている。

文 献

- 1) Butterworth, A. E., et al.: Interaction between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. J. Exp. Med., 150: 1456-1471 (1979)
- 2) Butterworth, A. E., et al.: Damage to schi-

特集●感染症と活性酸素

- stosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.*, **122** : 211-229 (1979)
- 3) Capron, A., et al. : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against parasites. *Progr. Allergy*, **31** : 234-267 (1982)
- 4) Capron, A., et al. : From parasites to allergy : a second receptor for IgE. *Immunol. Today*, **7** : 15-18 (1986)
- 5) Cesbron, J.Y., et al. : Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*, **325** : No. 6104, 533-536 (1987)
- 6) Cesbron, J.Y., et al. : *Onchocerca volvulus* : Monoclonal anti-idiotypic antibody as antigen signal for the microfilaricidal cytotoxicity of diethylcarbamazine-treated platelets. *J. Immunol.*, **141** : 279-285 (1988)
- 7) Hawking, F., et al. : The mode of action of Hetrazan on filarial worms. *Brit. J. Pharmacol.*, **5** : 217-238 (1950)
- 8) Hawking F., et al. : Diethylcarbamazine and new compounds for the treatment of filariasis. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, **16** : 129-194 (1979)
- 9) Joseph, M., et al. : A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, **303** : No.5920, 810-812 (1983)
- 10) Joseph, M., et al. : Participation de récepteur pour l'IgE à la toxicité des plaquettes sanguines contre les schistosomes. *C.R. Acad. Sci., Paris* **298** : 55-60 (1984)
- 11) Joseph, M., et al. : The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.*, **16** : 306-312 (1986)
- 12) Kay, A. B. : The role of the eosinophil. *J. Allergy and Clin. Immunol.*, **64** : 90-114 (1979)
- 13) Kowalski, K. A., et al. : Modulation of equine platelet function by diethylcarbamazine (DEC). *Am. J. Pathol.*, **113** : 1-7 (1983)
- 14) Mackenzie, C. D. : Diethylcarbamazine : A review of its action in onchocerciasis, lymphatic filariasis and inflammation. *Tropical Diseases Bulletin*, **82** : No.10, R1-R37 (1985)
- 15) Ottesen, E. A. : Description, mechanisms and control of reactions to treatment in the human filariasis. *Filariasis, Ciba Foundation Symposium 127*, 265-279, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- 16) Pancré, V., et al. : IgE-dependent killing of *B. malayi* microfilariae by human platelets and its modulation by T cell products. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **85** : 483-486 (1988)
- 17) Subrahmanyam, D. : Antifilarials and their mode of action. *Filariasis, Ciba Foundation Symposium 127* : 246-259, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.