

低蛋白ダイエットによる自然免疫活性化と マラリア感染防御

アノージャ アーリヤシンヘ

新潟大学大学院医歯学総合研究科

免疫学・医動物学分野（主任：安保 徹教授）

Protection Against Malaria Due to Innate Immunity Enhanced by Low - protein Diet

Anoja ARIYASINGHE

Division of Immunology and Medical Zoology,

Department of Infectious Disease

Control and International Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Toru ABO)

要 旨

通常の実験で用いられるマウスは、蛋白質を25%含有する餌を与えられている。本研究では、マウスに低蛋白質含有の餌を与え、マラリア感染防御に対する影響を調べた。低蛋白ダイエットにより、胸腺萎縮が誘導されてメインストリームのT細胞が抑制され、逆に肝臓における自然免疫を活性化することが明らかとなった。その結果、低蛋白ダイエットにより、非致死性のみならず致死性のマラリア感染に対して抵抗性を獲得した。低蛋白ダイエットによるマラリア抵抗性獲得のメカニズムとしては、胸腺外分化T細胞および自己抗体産生B-1細胞の活性化が考えられた。

Key words: Malaria, Innate Immunity, Low - protein diet, Extrathymic T cell, Autoantibody

緒 言

マラリアは細胞内寄生病原体であり、抗原特異的な免疫すなわち獲得免疫からの攻撃を免れる。マラリア感染における炎症の場は、肝臓と、脾臓髄質であり、臨床的には肝脾腫となって現われる。これらの臓器には、通常のT細胞（胸腺由来T細胞）よりも、進化レベルが低く自己反応性を持つ胸腺外分化T細胞が豊富に存在し、マラリア感染における炎症には、胸腺外分化T細胞が大きく関与していることをわれわれは明らかにしてきた^{1) - 4)}。さらに、マラリア感染時には、自己抗体の産生も見られる。つまり、マラリア感染防御は、抗原特異的な獲得免疫によってなされるのではな

胞）よりも、進化レベルが低く自己反応性を持つ胸腺外分化T細胞が豊富に存在し、マラリア感染における炎症には、胸腺外分化T細胞が大きく関与していることをわれわれは明らかにしてきた^{1) - 4)}。さらに、マラリア感染時には、自己抗体の産生も見られる。つまり、マラリア感染防御は、抗原特異的な獲得免疫によってなされるのではな

Reprint requests to: Anoja ARIYASINGHE
Department of Immunology
Niigata University School of Medicine
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市旭町通り1 - 757
新潟大学医学部医動物学教室
アノージャ・アーリヤシンヘ

く、主に、胸腺外分化T細胞と、自己抗体産生B-1細胞といった原始的な細胞、つまり自然免疫によってなされる。

通常、実験に用いられるマウスは、蛋白質を25%含有する餌を与えられているが、最近、われわれは、低蛋白ダイエット(蛋白質を0~12.5%含有する餌を与える)によって胸腺萎縮が誘導され、メインストリームのT細胞分化が抑制され、逆に、肝臓における自然免疫を活性化することを見出した(未発表データ)。これらの知見をもとに、本研究では、低蛋白ダイエットがマラリア感染防御にどのような影響をあたえるかを検討した。低蛋白ダイエットによりマウスは、非致死性のみならず致死性のマラリア感染に対して抵抗性を示した。これらのマウスは、明らかな parasitemia を認めず、自然免疫系の活性化によってマラリア感染を防御していた。これらの結果は、マラリア感染を予防する上で、重要であると考えられた。

材料と方法

1. マウス

8~20週齢(体重約20g)のC57BL/6(B6)マウスを用いた。マウスには、通常の餌(25%蛋白質含有)、低蛋白含有の餌(それぞれ、0%、5%、12.5%蛋白質含有)を1週間与えた。それぞれの実験群においては、10匹のマウスを使用した。各実験群間で、餌摂取量に差はなく、また、餌摂取後の体重変化は見られなかった。

2. マラリア感染

非致死性株(17XNL)または致死性株(17XL)の*P. yoelii*を感染させた 10^4 個の赤血球をマウスに腹腔内投与した¹⁾。

3. 細胞分離

定法²⁾に従い、肝臓、脾臓および胸腺のリンパ球を、マラリア感染マウスおよびコントロールマウスより分離した。

4. フローサイトメトリー

リンパ球サブセットの表面抗原の解析は、フローサイトメトリーによって行った。用いた抗体は、

anti-CD3(145-2C11)、anti-CD122(TM- β 1)、anti-NK1.1(PK136)、anti-CD4(RM4-5)、anti-erythrocyte(TER119)、anti-CD8(53-6.7)であり、これらは、BD Pharmingen社から購入した。

5. 自己抗体の検出

血清中の、ssDNAに対するIgGおよびIgM抗体は、ELISAによって測定した⁵⁾。

6. 組織所見

マウス各臓器を10%ホルマリンにて固定した後、パラフィンで包埋し、 $4\mu\text{m}$ の厚さの切片を作製し、Hematoxylin-Eosinにて染色した。

結 果

通常の餌(25%蛋白質含有)、低蛋白含有の餌(それぞれ、0%、5%、12.5%の蛋白質含有の餌)を1週間マウスに与えた後、非致死株である*P. yoelii*(17XNL株)感染赤血球 10^4 個をマウスに腹腔内投与した。通常の餌を与えられたマウスでは、感染後18日でparasitemiaのピークが見られた(図1)。低蛋白ダイエット群では、そのようなparasitemiaは見られなかった。

餌中の蛋白質含有量のリンパ球数に与える影響を調べるため、低蛋白含有の餌をマウスに1週間与えた。その後、さらに4週間同じ餌を与え、1週間ごとに、肝臓、脾臓、胸腺のリンパ球数を測定した(図2左)。どの時点でも、肝臓と脾臓におけるリンパ球数の変化は見られなかった。しかし、5%蛋白質含有の餌を与えたマウスの胸腺細胞数は徐々に減少した。また、蛋白質を含まない餌を与えたマウスの胸腺細胞数は、1週間で大きく減少し、低いままであった。次に、それぞれの餌を1週間与えた後、マラリアを感染させ、細胞数の変化を調べた(図2右)。通常の餌を与えたマウスでは、肝臓と脾臓のリンパ球数は、感染後21日をピークとして増加した。対照的に、蛋白質を含まない餌、5%蛋白質含有の餌を与えたマウスでは、そのような増加は見られなかった。胸腺のリンパ球数については、通常の餌を与えた群では、感染後1週間で急激に減少したが、5%蛋白質含有の

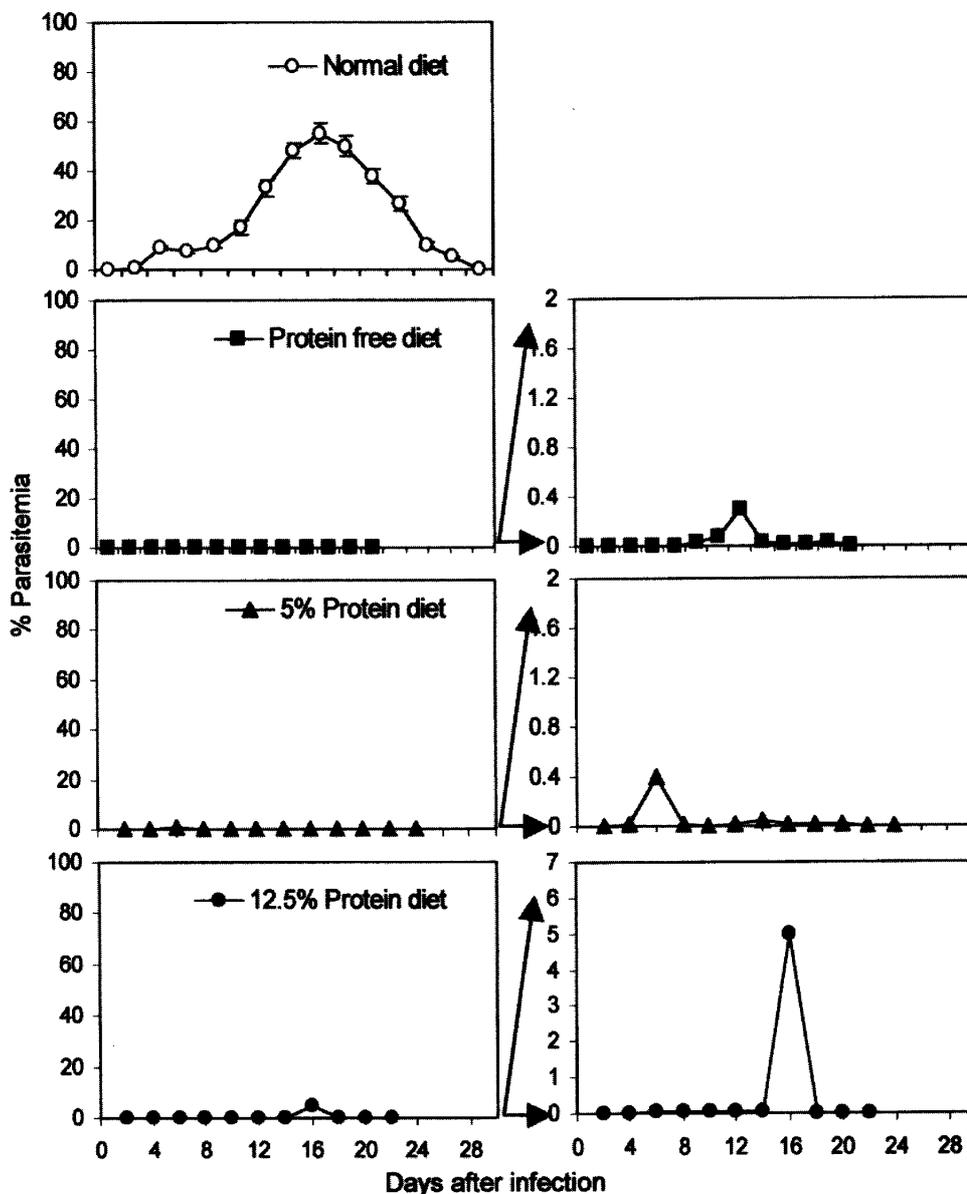


図 1

低蛋白ダイエットの、マラリア感染時 parasitemia に与える影響. 図左は、図右のスケールを拡大した.

餌を与えたマウスでは、減少の程度は低かった。蛋白質を含まない餌を与えたマウスは、感染の有無にかかわらず、胸腺細胞数は低いままであった。

われわれは、マラリア感染マウスの肝臓で増加するリンパ球は、NK1.1⁻ intermediate TCR 細胞 (NK1.1⁻ TCR^{int} 細胞) であることを報告してきた。低蛋白含有の餌を与えたマラリア感染マウスに同様の変化が見られるかどうかをフローサイトメトリーで調べた (図 3)。まず、どの実験群にお

いてもマラリア感染中に増加する細胞は、CD3^{int}IL-2R β ⁺細胞であった (図 3 上)。5%蛋白質含有の餌を与えたマウスでは、NKT 細胞の増加が特徴的であった (図 3 下)。

予備実験で、われわれは、マラリア感染マウスの肝臓と脾臓で、赤血球の造血が起きることを確認している (未発表データ)。赤血球造血は、有核赤血球 (TER119⁺ CD3⁻) の出現によって確認することができるが、5%蛋白質含有の餌を与え

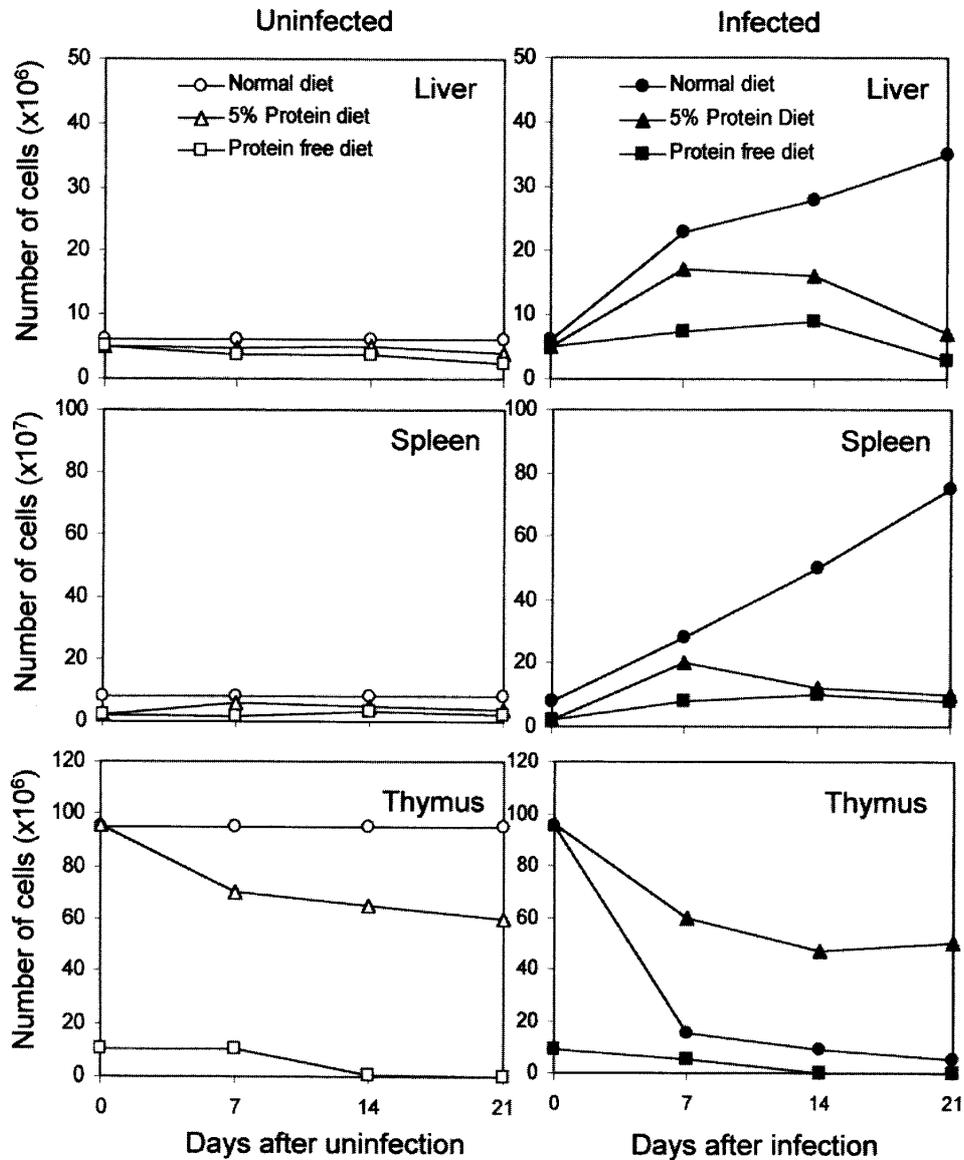


図2

低蛋白ダイエットの、マラリア感染時リンパ球数に与える影響。

たマウスでは、この有核赤血球の出現は抑えられていた(図4)。

マラリア感染中の炎症反応を評価するため、ヘマトクリット値と組織像を調べた(図5)。通常の餌を与えたマウスでは、感染後、ヘマトクリット値が60%から20%へ減少した(図5A)。対照的に、低蛋白含有の餌を与えたマウスでは、マラリア感染によってヘマトクリット値の減少は見られなかった。興味深いことに、低蛋白含有の餌を与

えたマウスは、マラリア感染がない状態でもヘマトクリット値の軽度の減少が見られた。肝臓の組織所見では、正常の肝臓(図5B上)に比べ、通常の餌を与えたマウスでは、感染21日目に、リンパ球と網内系細胞の集積が多く見られた(図5B中)。一方、低蛋白含有の餌を与えたマウスでは、感染後21日目でも、正常の肝臓の所見を呈していた(図5B下)。血清中のGPT値も組織所見と相関していた(図5C)。マラリア感染時には、胸

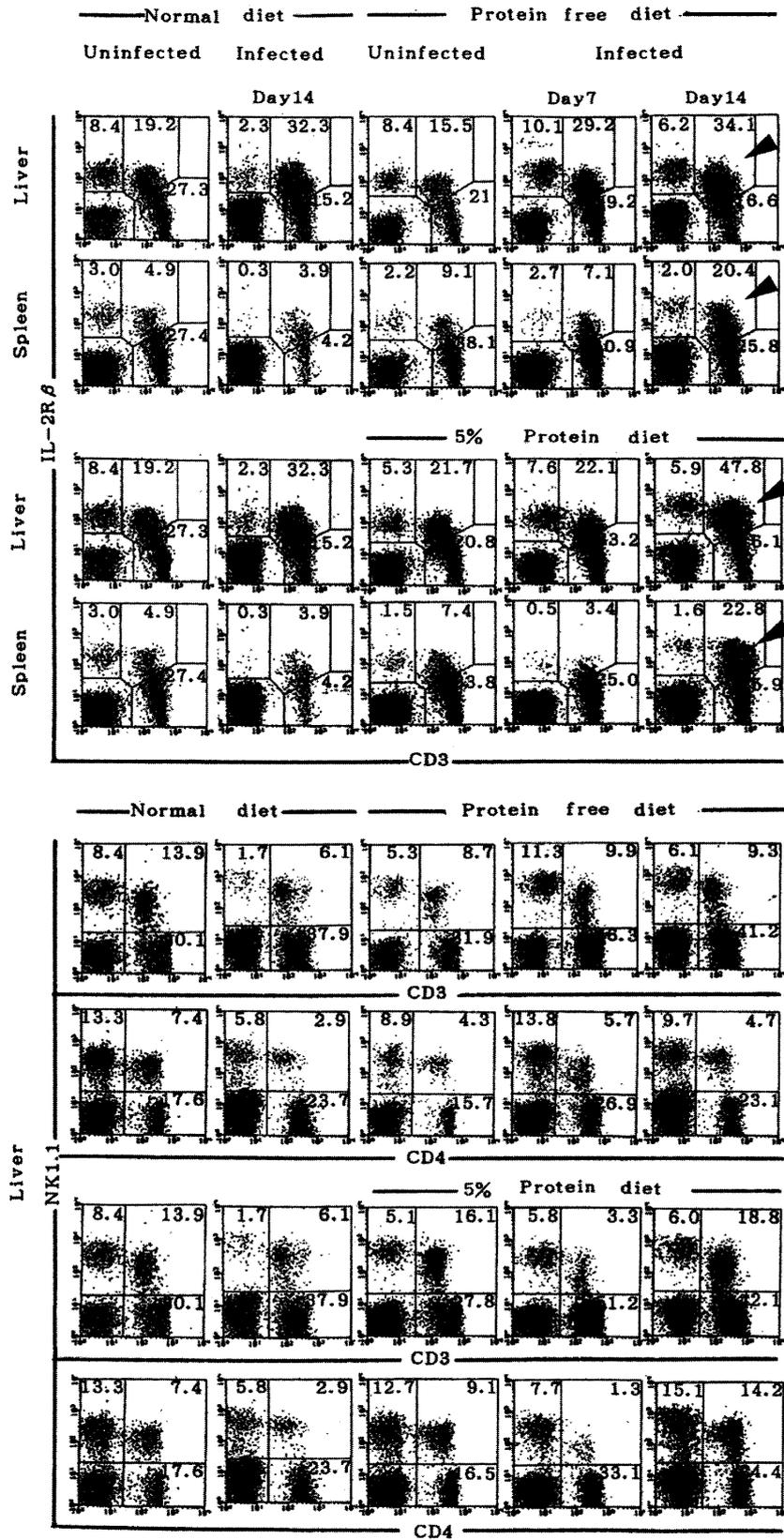


図 3

低蛋白含有の餌を与えたマウスの各臓器からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーにて解析。

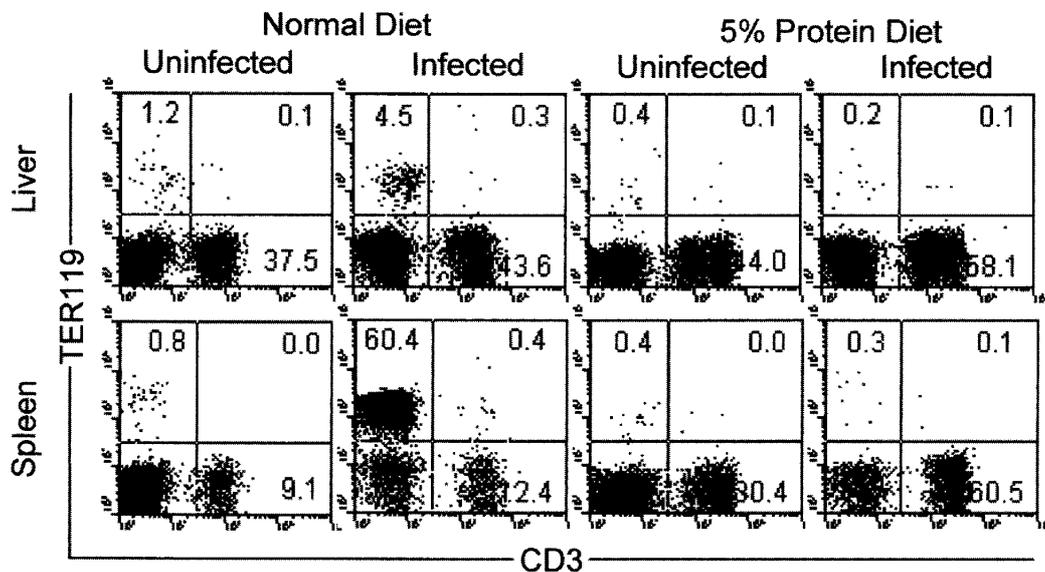


図4

マラリア感染による有核赤血球の出現。

腺外分化T細胞の増加とともに、自己抗体の産生がみられることが、報告されている^{6)–10)}ため、低蛋白含有の餌を与えたマウスのマラリア感染時にもそれが見られるかどうかを検討した。低蛋白含有の餌を与えたマウスでは、通常の餌を与えたマウスに比し、有意にIgMタイプの自己抗体が血清中で上昇していた(図5D)。反対に、IgGタイプの自己抗体は、通常の餌を与えたマウスで上昇していた。

低蛋白餌を与えマラリア感染から回復したマウスに、非致死株の *P. yoelii* を再感染させた。低蛋白餌を1週間与えた後マラリアを感染させ、マラリア感染から回復した後、通常の餌を1週間与え、非致死株の *P. yoelii* を再感染させた。初めから通常の餌を与えたマウスでは、マラリア感染再感染後には、parasitemiaが見られたが、低蛋白含有の餌を与えたマウスでは、それは見られなかった(図6)。

次に、非致死性株のマラリアを感染させた後、致死株である17XL株を再感染させた(図7)。通常の餌を与えたマウスでは、致死性株の再感染で死亡したが、低蛋白ダイエット群は、parasitemiaを示すことなく回復した。

最後の実験では、セルソーターによってTCR^{int}

細胞とTCR^{high}細胞を分離し、細胞移入実験を行った(図8)。5%蛋白質含有の餌を与えマラリア感染から回復したマウスより、リンパ球および純化したT細胞を分離し、通常の餌を与え、6.5Gy照射したマウスに移入し、マラリア感染に対する効果を調べた。放射線照射のみの群は、parasitemiaは遅れて見られたが、最終的には、感染によって死亡した。マラリア感染から回復したマウスの肝臓リンパ球を移入するとマラリア感染は完全に防がれた。通常の餌を与えたマウスからのリンパ球にはそのような効果は認められなかった(図8A)。TCR^{int}細胞とTCR^{high}細胞を分離した細胞移入実験により、肝臓のT細胞のうち、TCR^{int}細胞にエフェクター効果があることがわかった(図8B)。

考 察

本研究により、低蛋白ダイエットにより、マウスはマラリア感染に対して、抵抗性を獲得することが明らかになった。興味深いことに、低蛋白含有の餌を与えたマウスは、致死性のマラリア株に対しても、parasitemiaを示すことなく抵抗性を示した。低蛋白ダイエットにより、胸腺の萎縮と、胸腺

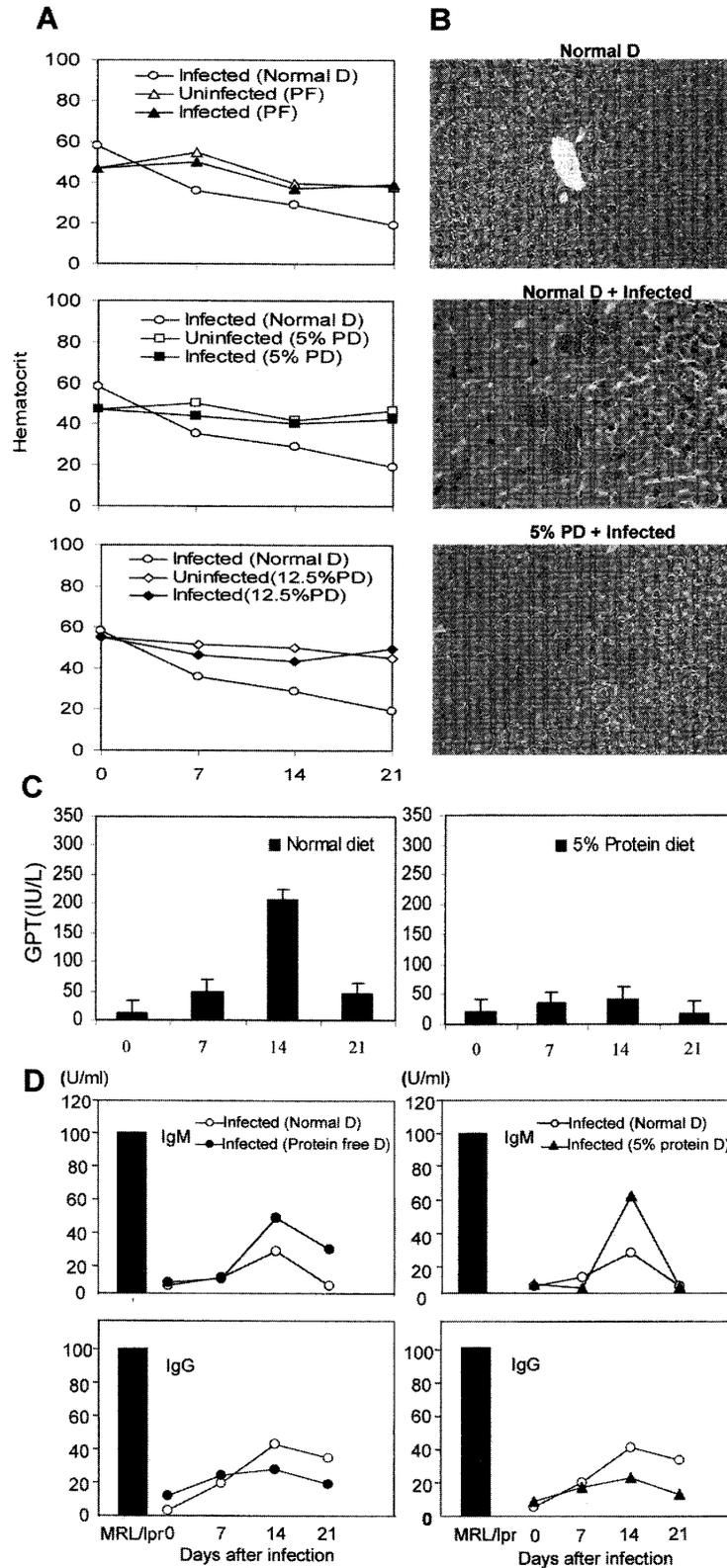


図 5

- A：低蛋白ダイエットによる，マラリア感染時へマトクリット値に与える影響。
 B：低蛋白ダイエットによる，マラリア感染時の肝臓への細胞浸潤に与える影響。
 C：低蛋白ダイエットによる，マラリア感染時 GPT 値に与える影響。
 D：低蛋白ダイエットによる，マラリア感染時自己抗体産生に与える影響。

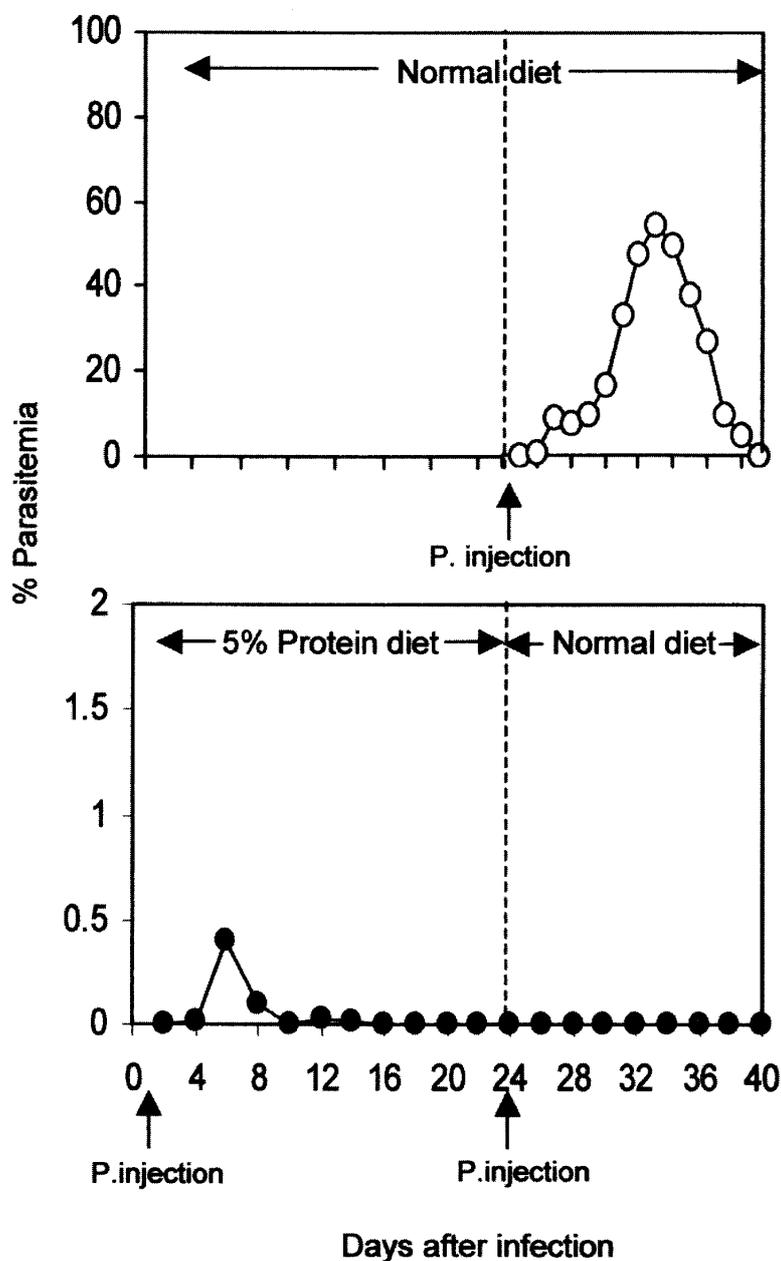


図6

低蛋白含有の餌を与えマラリア感染から回復したマウスに、マラリアを再感染させ、parasitemiaを測定。

外分化T細胞である $IL-2R\beta^+ TCR^{int}$ 細胞¹¹⁾¹²⁾の増加がみられたことから、自然免疫系が活性化されたことによると考えられる。われわれは、マラリア感染防御の主なエフェクター細胞は、胸腺外分化T細胞であることを明らかにしており¹⁾⁻³⁾、低蛋白ダイエットにより、これらのエフェクター細胞が活性化され、マラリアを効率よく排除でき

たとえられる。

はじめ、われわれは、低蛋白含有の餌をマウスに与えることにより、マラリア感染に対して、感受性が強くなると推測したが、結果は、まったくの反対で、マウスは、むしろ、マラリア感染に対して、抵抗性を示すようになった。興味深いことに、はじめに低蛋白含有の餌を与えておくと、

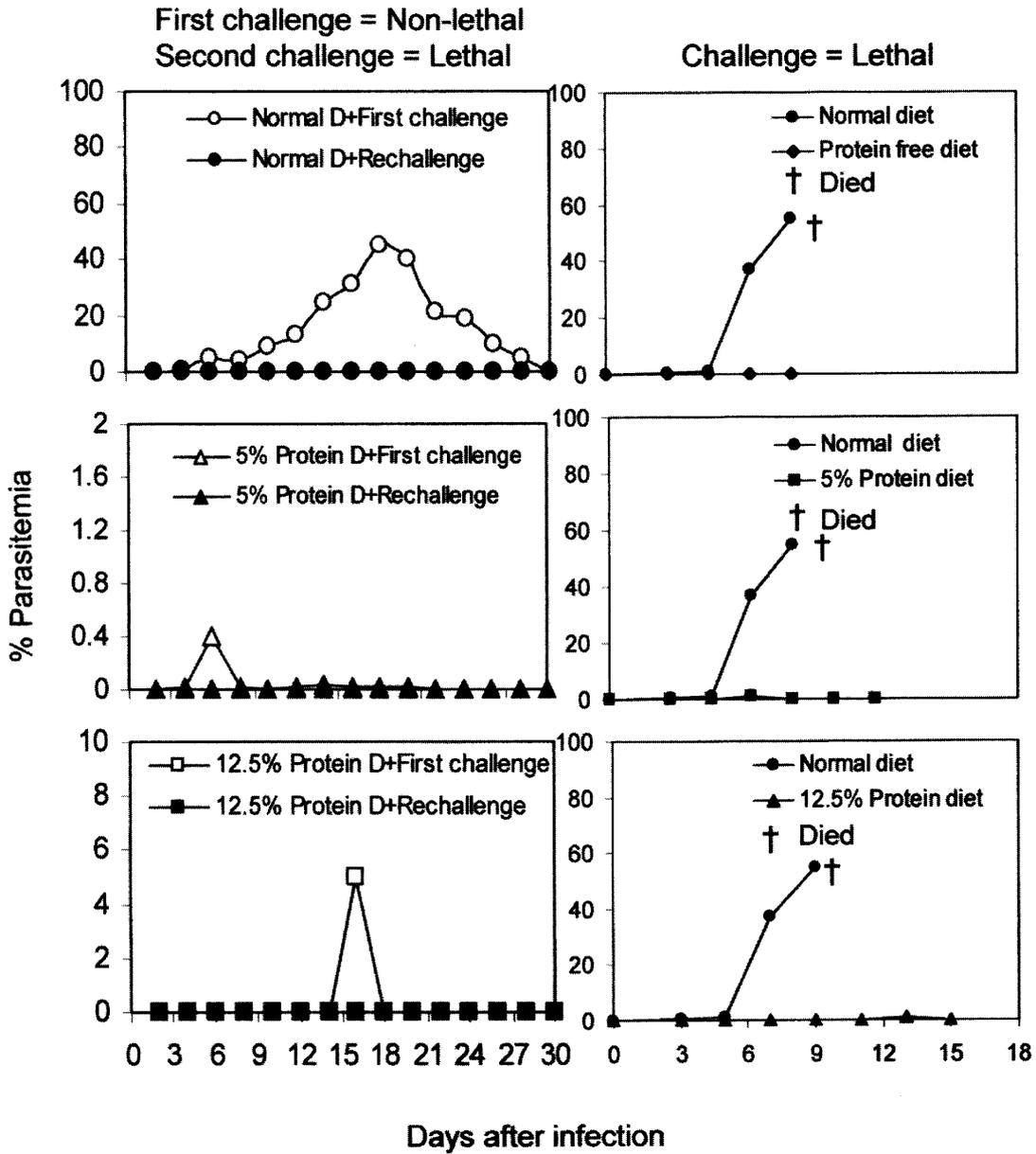


図 7

非致死性のマラリア感染後、致死性のマラリアを感染させ、parasitemiaを測定。

後で通常の餌にもどしても、マラリア感染に対する抵抗性は、維持されることがわかった。これは、自然免疫系の活性化が、低蛋白質含有の餌を与え始めた時点でなされることを示唆する。マウスとヒトの研究において、低栄養が parasitemia のレベルを減らすことが報告されているが^{13)–16)}、これらの研究では、胸腺外分化 T 細胞を含む自然免疫系の関与が考察されておらず、そのメカニズムは不明であった。

われわれは、以前の研究において、ストレスが自然免疫系を活性化させ、逆に獲得免疫系の働きを弱めることを報告してきた^{17)–19)}。本研究により、低蛋白質含有の餌を与えたマウスも、このストレス反応に似た反応を示すことがわかった。ストレスは胸腺の萎縮を誘導し、通常の T 細胞の分化を抑制し、獲得免疫系を不活性化し、逆に自然免疫系を活性化する^{20)–23)}。ただし、低蛋白餌が自然免疫系を活性化させ、マラリア感染抵抗性

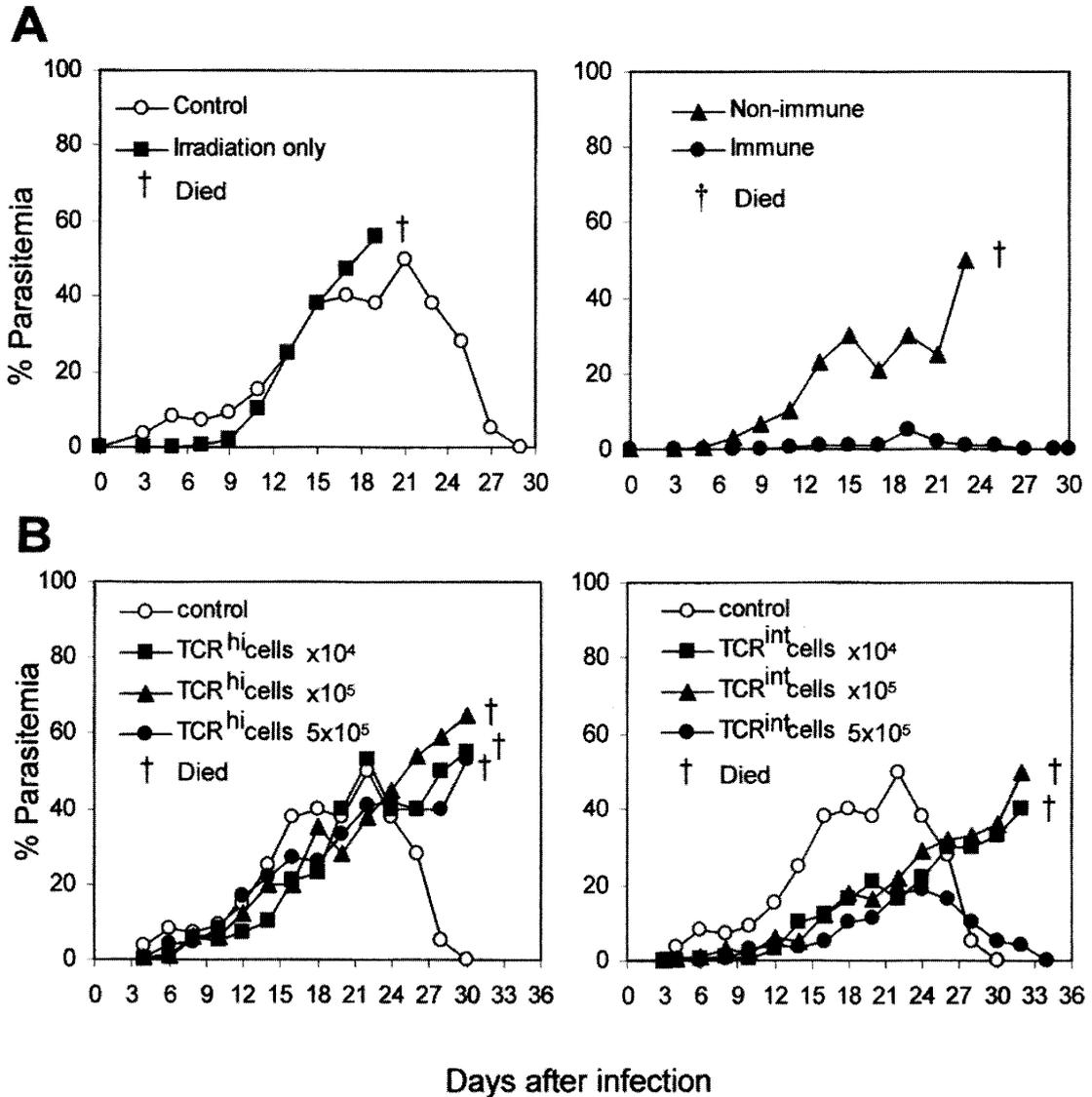


図 8

TCR^{high} 細胞または TCR^{int} 細胞を 6.5Gy 照射したマウスに移入し、マラリアを感染させて parasitemia を測定。

を誘導するとはいえ、蛋白質を全く含まない餌を与えると、栄養状態が悪化するため、蛋白質の含量は、5～12.5%にする必要がある。

われわれは、一連の報告¹⁾⁻³⁾で、マラリア感染防御は、以下に挙げる自然免疫系の活性化によってなされることを強調してきた。1) 胸腺外分化 T 細胞である、CD8⁺ NK1.1⁻ TCR^{int} 細胞の重要性。2) B-1 細胞の活性化と自己抗体産生。3) 胸腺萎縮による通常の T 細胞の分化障害。4) マラリアに対する獲得および記憶免疫の速やかな消

失。本研究の結果は、これらに矛盾しない。

通常の餌を与えられたマウスの肝リンパ球を細胞移入してもマラリア感染を防ぐことはできなかったが、低蛋白質含有の餌を与えたマウスのそれを細胞移入すると、マラリア感染を完全に防ぐことができた。この肝リンパ球の分画のうち、マラリア感染防御に必要なエフェクター細胞は、胸腺外分化 T 細胞であることが、細胞移入実験で明らかになった。また、低蛋白質含有の餌を与えたマウスでは B-1 細胞の活性化による自己抗体産生

も見られた。これらのことから、低蛋白質含有の餌を与えたマウスでは、胸腺外分化 T 細胞と B-1 細胞といった自然免疫系の細胞²⁴⁾²⁵⁾ が活性化し、マラリア感染防御に関与していることが強く示唆された。

本研究により、食事中の蛋白質含有量を調節することにより、自然免疫系を活性化し、マラリア感染に対する抵抗性を獲得しうる事が明らかになった。日常生活において、過度の蛋白質摂取を抑えることが、マラリア感染予防に有用であることが示唆された。

文 献

- 1) Weerasinghe A, Sekikawa H, Watanabe H, Mannoor MK, Morshed SRM, Halder RC, Kawamura T, Kosaka T, Miyaji C, Kawamura H, Seki S and Abo T: Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1⁻ subset, with protection from malaria. *Cell Immunol* 207: 28-35, 2001.
- 2) Mannoor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1⁺ and NK1.1⁻ subsets of intermediate TCR cells which are constituents of the innate immunity. *Cell Immunol* 211: 96-104, 2001.
- 3) Mannoor MK, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169: 301-306, 2002.
- 4) Abo T, Kawamura T and Watanabe H: Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174: 135-149, 2000.
- 5) Ito S, Ueno M, Nishi S, Arakawa M, Ikarashi Y, Saitoh T and Fujiwara M: Histological characteristics of lupus nephritis in F1 mice with chronic graft-versus-host reaction across MHC class II difference. *Autoimmunity* 12: 79-87, 1992.
- 6) Wenisch C, Wenisch H, Bankl HC, Exner M, Graninger W, Looareesuwan S and Rumpold H: Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies after acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 132-134, 1996.
- 7) Lloyd CM, Collins I, Belcher AJ, Manuelpillai N, Wozencraft AO and Staines NA: Characterization and pathological significance of monoclonal DNA-binding antibodies from mice with experimental malaria infection. *Infect Immun* 62: 1982-1988, 1994.
- 8) Ribeiro CD, Alfred C, Monjour L and Gentilini M: Normal frequency of anti-thyroglobulin antibodies in hyperendemic areas of malaria: relevance to the understanding of autoantibody formation in malaria. *Trop Geogr Med* 36: 323-328, 1984.
- 9) Kataaha PK, Facer CA, Mortazavi-Milani SM, Stierle H and Holborow EJ: Stimulation of autoantibody production in normal blood lymphocytes by malaria culture supernatants. *Parasite Immunol* 6: 481-492, 1984.
- 10) Ribeiro CT, de Roquefeuil S, Druilhe P, Monjour L, Homberg JC and Gentilini M: Abnormal anti-single stranded (ss) DNA activity in sera from *Plasmodium falciparum* infected individuals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 742-746, 1984.
- 11) Halder RC, Kawamura T, Bannai M, Watanabe H, Kawamura H, Mannoor MDK, Morshed SRM and Abo T: Intensive generation of NK1.1⁻ extrathymic T cells in the liver by injection of bone marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic MHC antigens. *Immunology* 102: 450-459, 2001.
- 12) Kameyama H, Kawamura T, Naito T, Bannai M, Shimamura K, Hatakeyama K and Abo T: Size of the population of CD4⁺ natural killer T cells in the liver is maintained without supply by the thymus during adult life. *Immunology* 104: 135-141, 2001.
- 13) Fagbenro-Beyioku AF and Oyerinde JP: Effect of host-diet inadequacy on the course of infection of *Plasmodium yoelii* nigeriensis. *West Afr J Med* 9: 124-128, 1990.

- 14) Levander OA, Ager AL, Morris Jr. VC and May RG: *Plasmodium yoelii*: comparative antimalarial activities of dietary fish oils and fish oil concentrates in vitamin E - deficient mice. *Exp Parasitol* 70: 323 - 329, 1990.
- 15) Shankar AH: Nutritional modulation of malaria morbidity and mortality. *J Infect Dis* 182 (Suppl): S37 - 53, 2000.
- 16) Takakura M, Uza M, Sasaki Y, Nagahama N, Phommpida S, Bounyadeth S, Kobayashi J, Toma T and Miyagi I: The relationship between anthropometric indicators of nutritional status and malaria infection among youths in Khammouane Province, Laos PDR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32: 262 - 267, 2001.
- 17) Maruyama S, Tsukahara A, Suzuki S, Tada T, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T: Quick recovery in the generation of self-reactive CD4^{low} NKT cells by an alternative intrathymic pathway when restored from acute thymic atrophy. *Clin Exp Immunol* 117: 587 - 595, 1999.
- 18) Shimizu T, Kawamura T, Miyaji C, Oya H, Bannai M, Yamamoto S, Weerasinghe A, Halder RC, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T: Resistance of extrathymic T cells to stress and a role of endogenous glucocorticoids in stress-associated immunosuppression. *Scand J Immunol* 51: 285 - 292, 2000.
- 19) Oya H, Kawamura T, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T: The differential effect of stress on NKT and NK cell function. *Clin Exp Immunol* 121: 384 - 390, 2000.
- 20) Lewin R: Stress proteins: Are links in disease. *Science* 240: 1732 - 1733, 1988.
- 21) O'Leary A: Stress, emotion, and human immune function. *Psychol Bull* 108: 363 - 382, 1990.
- 22) Tagoh H, Nishijo H, Uwano T, Kishi H, Ono T and Muraguchi A: Reciprocal IL - 1 beta gene expression in medial and lateral hypothalamic areas in SART - stressed mice. *Neurosci Letters* 184: 17 - 20, 1995.
- 23) Bryant HU, Bernton EW and Holaday JW: Immunosuppressive effects of chronic morphine treatment in mice. *Life Sciences* 41: 1731 - 1738, 1987.
- 24) Miyakawa R, Miyaji C, Watanabe H, Yokoyama H, Tsukada C, Asakura H and Abo T: Unconventional NK1.1⁻ intermediate TCR cells as major T lymphocytes expanding in chronic graft-versus-host disease. *Eur J Immunol* 32: 2521 - 2531, 2002.
- 25) Morshed SRM, Mannoor K, Halder RC, Kawamura H, Bannai M, Sekikawa H, Watanabe H and Abo T: Tissue - specific expansion of NKT and CD5⁺ B cells at the onset of autoimmune disease in (NZB × NZW) F₁ mice. *Eur J Immunol* 32: 2551 - 2561, 2002.

(平成16年1月16日受付)