

29【P2】Ⅲ-401

ウエルシュ菌 ϵ 毒素の培養 MDCK 細胞単層バリアー機能に対する影響

○糸林 由加里¹, 永浜 政博¹, 櫻井 純¹ (徳島文理大薬)

[目的] D 型ウエルシュ菌の ϵ 毒素は、致死、壊死活性を有し、腸性中毒症の原因毒素である。 ϵ 毒素は、MDCK 細胞膜上のラフトに結合後、オリゴマーを形成し細胞毒性を示し、最近、Petit らは、本毒素が MDCK 細胞のバリアー機能を低下させると報告した。我々は、 ϵ 毒素の毒性活性を明らかにするため、 ϵ 毒素による培養 MDCK 細胞単層のバリアー機能低下と Ca^{2+} の関係について検討をした。

[方法] 24well のトランズウェルに培養した MDCK 細胞の電気抵抗値 (TER) は、ERS 抵抗値システム (Millipore 社) を用いて測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、Fura-2AM を細胞に取り込ませ、細胞内イオン解析システム (浜松ホトニクス) で測定した。

[結果と考察] ϵ 毒素を MDCK 細胞に作用させると、その直後に一過性の Ca^{2+} 流入、そして、その後、持続的な Ca^{2+} 流入が認められた。次に、 Ca^{2+} -free 溶液中では、毒素によって一過性の Ca^{2+} 流入のみが認められ、この場合、細胞内貯蔵 Ca^{2+} の遊離が示唆された。また、 ϵ 毒素刺激後、約 5 分で代謝産物である IP_3 量が最大となることから、本毒素がレセプターに結合後、内因性 PLC を活性化し、 IP_3 が生成され、この IP_3 が細胞内貯蔵 Ca^{2+} を遊離すると考えられる。一方、トランズウェルに培養した MDCK 細胞に ϵ 毒素を作用させると、毒素の用量に依存して TER が減少し、さらに ^{14}C -マンニトールを用いた膜透過実験でも、 ^{14}C -マンニトールの透過亢進が毒素の用量に依存して認められた。また、本毒素の TER 低下作用は、細胞内 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM や PLC 特異的阻害剤である U73122 により阻された。この結果から、本毒素による MDCK 細胞の TER の低下は、本毒素による内因性 PLC の活性化により IP_3 が生成され、その遊離した IP_3 による細胞内 Ca^{2+} 遊離の誘導が関与していると推察される。