

細菌の病原因子と免疫応答

新潟大学医学部細菌学教室 光 山 正 雄

Relationship Between Virulence Factor of
Bacteria and the Immune Response

Masao MITSUYAMA

*Department of Bacteriology, Niigata University
School of Medicine*

Listeria monocytogenes is one of the facultative intracellular bacteria and generates typical cell-mediated immune response in infected host. Among several possible virulence factors, a 58kDa-hemolysin has been regarded as the main factor responsible for intracellular survival of this microbe within macrophages. T cells mediating delayed type hypersensitivity and protective immunity could be generated only when mice were immunized with viable, hemolysin-producing strain of *L. monocytogenes*. The generation of *Listeria*-specific protective T cells coincided with the ability of bacteria to induce 1L-1 production in macrophages. In vivo administration of recombinant 1L-1 promoted the functional differentiation of *Listeria*-specific T cells even in mice immunized with hemolysin-nonproducing killed bacterial vaccine. The purified 58kDa-hemolysin was shown to induce macrophage 1L-1 production in vitro. This is a typical example of direct contribution of virulence factor of bacteria to host immune response. The relationship between other virulence factors and host response was also discussed.

Key words: *Listeria monocytogenes*, bacterial virulence, protective immunity

リステリア, 細菌の病原性, 感染防御免疫

Reprint requests to: Masao MITSUYAMA,
Department of Bacteriology, Niigata
University School of Medicine, Asahimachi-
dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部細菌学教室

光 山 正 雄

はじめに

各種病原細菌の保有する病原因子について、分子レベル・遺伝子レベルでの研究が進んできたが、必ずしも感染病態や宿主免疫応答の解明に結びついてはいない。

我々は、細菌内寄生菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) の感染で誘導される細胞性免疫の成立・発現機構を、とくに本菌の病原因子との関わりで解析してきた。ここでは、いくつかの病原因子がどのように本菌による感染成立と免疫応答、とくにT細胞の分化に関与するかについて、最近の研究成績を中心にのべてみたい。

感染におけるリステリアの特性

リステリアはグラム陽性短桿菌で、哺乳類を中心にひろく分布しているが、汚染食品を介して経口的に宿主に侵入し、宿主抵抗性が減弱している場合には致命的な敗血症や髄膜炎を引き起こすことがある。本菌は、結核菌と同様にマクロファージ内でも生存可能ないわゆる細胞内寄生性細菌であり、感染宿主には強い細胞性免疫応答を誘導し、遅延型過敏反応 (DTH) や再感染抵抗性を成立させることが大きな特徴である。

マウスにリステリアを静脈内感染させると、肝脾で一時的に増殖するが1週間後で次第に排除され、この時期以降の脾には抗原特異的な CD4⁺ のT細胞が誘導され、感染防御免疫や DTH を非免疫マウスに移入することができる。主として CD4⁺ T細胞による DTH や防御免疫の発現はリステリアに限らず、結核菌、サルモネラなど細胞 (マクロファージ) 内寄生性を示す細菌感染に共通した現象であるが、T細胞による再感染防御免疫は何れの菌についても生菌では容易に誘導されるのに対し、死菌免疫ではその誘導が極めて困難であることも菌種を越えて普遍的に観察される¹⁾。すなわち、この種の菌にとって細胞内寄生性を可能にするメカニズムが、同時に感染防御免疫の誘導成立に直接関与している可能性があり、さらに感染防御免疫と DTH とは、同じ CD4⁺ T細胞の中でも機能的には異なったサブセットによって担われている可能性も考えられるので、これらの点につき解析を行った。

リステリアの産生する溶血素の病原因子としての役割

リステリア属には7つの菌種が知られているが、そのうちヒトや哺乳類に病原性を有するのは、代表的な菌種

で一般にリステリア菌とよばれる *L. monocytogenes* のほか、*L. seeligeri* と *L. ivanovii* の3菌種であり、これらのみが血液寒天平板上β溶血を示すことから、溶血素 (ヘモリシン) が病原因子として古くから重視されてきた。

リステリアのヘモリシンは、培養上清からイオン交換クロマトやゲル濾過により精製できる分子量 58,000 の蛋白で、その溶血素活性は酸化により失活し還元状態で発現される典型的な thiol-activated hemolysin である。コレステロール添加により溶血活性がなくなることや、ゲル内沈降では *Streptococcus pyogenes* の産生するストレプトリシン O (SLO) と共通抗原性があることから、この種の溶血素は同じファミリーに属するとされてきた。最近、各種グラム陽性菌のヘモリシン遺伝子がクローニングされ、アミノ酸配列でも極めて相同性が高く、とくに唯一のシステインを含むC末側はよく保存されていることが判明してきた²⁾。この同一ファミリーに属するヘモリシンの中で、感染における病原因子としての役割が確立しているのは実はリステリアのみである。

リステリオリシンOが本菌の主要な病原因子であることは、その遺伝子がクローニングされる以前に、主としてトランスポゾン挿入により得られた非溶血性の変異株を用いて示されてきた。マウスで検索されたトランスポゾン挿入変異株にみられる溶血性親株との違いとして、

- ①静脈接種 LD₅₀ の著明な上昇 (致死活性の低下)
- ②経静脈感染マウスでの脾内増殖能の低下
- ③経口感染マウスでの肝脾内増殖能の低下
- ④マクロファージ系細胞内での細胞内増殖能の低下
- ⑤感染マクロファージ内で食胞からのエスケープ能の消失

などがあり、これらからリステリオリシンOが、感染宿主のマクロファージ系細胞内で増殖し、細胞内寄生菌として肉芽腫性炎症を引き起こす本菌の病原性発揮に不可欠の因子であることはほぼ間違いない。

ところでリステリアのヘモリシンがマクロファージ内でどのように作用して細胞内寄生性に関与するのかは未だ明確ではない。貪食作用によりマクロファージに取り込まれたリステリアは一時的には食胞内に存在するが、食胞から細胞質へと脱出して増殖するので、この食胞膜の傷害に関与することが最も考えられる。我々は強毒の *L. monocytogenes* EGD 株の培養上清から 58 kD の溶血素を精製し、またこれに対するモノクローナル抗体も作成しているが³⁾、この溶血素蛋白をマウス腹腔マクロファージに作用させると著名な細胞膜傷害がみられ、

フォルボルエステル刺激に対する chemiluminescence 応答の消失や粒子状異物の貪食能低下が観察された。この膜傷害活性はコレステロールや血清の添加によりかなり解除されるので、おそらく宿主体内では食細胞の外部からこれを傷害することではなく、貪食されたマクロファージの食胞の内部（遊離コレステロールの少ない）で産生され、生体膜が inside-out となった食胞膜のみが傷害の標的となるものと思われる⁴⁾ (H. Yoshikawa, et al., manuscript in preparation)。赤血球を標的細胞として試験管内でみる限り同様の活性を発揮する thiol-activated type のヘモリシンを産生する *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *C. perfringens*, *B. alvei* などがリステリアと同じように細胞内寄生性を示し得ないのは、これらの菌がリステリアほど活性酸素の消去酵素 (catalase, SOD) 活性を有しないので、食細胞に貪食されるや否や食胞内に放出される O_2^- や H_2O_2 により殺菌され、溶血素産生のチャンスを失うのであろう。この点については今後モノクローナル抗体を用いて、マクロファージ食胞内での溶血素産生と生菌残存のカイネティクスをしらべていきたい。

ヘモリシンの宿主免疫応答に対する役割

細胞内寄生菌感染では、何故細胞性免疫が効率よく誘導されるのかは永い間の疑問であった。免疫防御に働くT細胞は一般に死菌では誘導されにくく、生菌による免疫すなわちある程度の感染が成立することが免疫応答には必要不可欠である⁵⁾。ところが、リステリア菌の種々の株をしらべるとヘモリシン産生能の無い株がみられ、そのような菌株では生菌を用いてマウスを免疫しても細胞性免疫が誘導されにくいことが見出された。そこで、感染宿主においては産生されるが死菌免疫では産生されないヘモリシン蛋白が、免疫防御を担うT細胞に特有のT cell epitope である可能性が考えられた。ところが生菌免疫マウス由来のT細胞を活性化する能力を比較す

ると、ヘモリシンの抗原性はあまり高くはなく、むしろ全菌体がその生死やヘモリシン産生能とは無関係に高いT細胞抗原性を示したことから、この可能性は否定的であった。次の可能性としては、種々の菌体抗原に特異的なT細胞群の分化にヘモリシンが関与することが考えられた。ヘモリシン産生株の生菌と死菌をマクロファージに作用させ in vitro で産生される IL-1 をしらべたところ、生菌にのみ強い IL-1 産生誘導能があり、生菌でもヘモリシン産生能の欠如した菌株ではこれがみられないことが判明した⁶⁾。そこで精製ヘモリシンやマクロファージに作用させたところ、培養上清や細胞内に高い IL-1 活性が検出され、その大部分は抗体による中和実験から大部分は IL-1 α であった。このことは IL-1 α の cDNA probe を用いた Northern blot でも確認された⁷⁾ (図 1)。つまり主要な病原因子であるヘモリシン

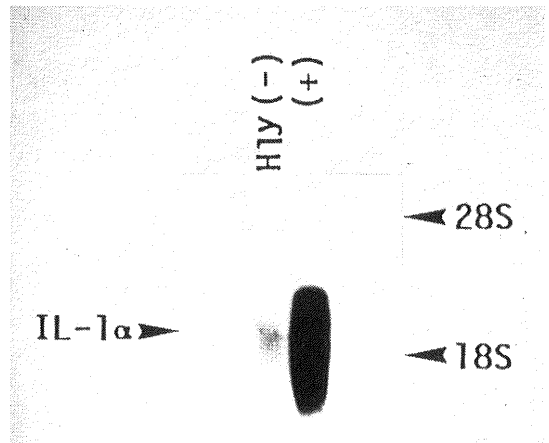


図 1 リステリアヘモリシンによるマクロファージ IL-1 産生誘導

精製した listeriolysin O (50 μ g/ml) でマウス腹腔マクロファージを 3 時間刺激し、ノーザンブロットで IL-1 α の mRNA 発現をしらべた。Hly (-) は無刺激対照。

表 1 rIL-1 投与によるリステリア特異的T細胞の機能分化の促進

免疫方法	T細胞の機能 (cpm)		
	抗原特異的分裂	IL-2 産生能	rIL-2 に対する反応
非免疫	440 \pm 120	2,930 \pm 320	1,020 \pm 210
リステリア死菌単独	300 \pm 60	2,440 \pm 130	720 \pm 130
rIL-1 単独投与	630 \pm 90	2,380 \pm 440	690 \pm 100
死菌+rIL-1	2,810 \pm 450	21,610 \pm 1,100	2,590 \pm 310
生菌	1,320 \pm 320	28,140 \pm 1,890	17,720 \pm 960

は、リステリア菌の宿主マクロファージ内での生存を可能にしている一方で、宿主免疫応答の初期過程に重要な IL-1 産生を促し、結果的にリステリア特異的 T 細胞の分化を促進するという二面性を有することが明らかとなった。IL-1 が実際に *in vivo* で作用し T 細胞分化を促進させることを確認する為に、本来抗原特異的 T 細胞の分化が進まない死菌単独免疫マウスに、免疫時と1日後の2回、リコンビナント IL-1 を投与した。免疫7日後の脾 T 細胞をリステリア抗原で刺戟すると、死菌免疫に加えて IL-1 を投与した群の T 細胞応答は、ほぼ生菌免疫群と同等のレベルに達していた⁸⁾ (表 1)。ヘモリシンには心臓毒性もあるらしく、その全身投与でマウスは死亡するので、ヘモリシン非産生株の生菌や野生株死菌による免疫と精製ヘモリシン投与によって T 細胞分化が促進されることを示す成績は今のところ得られていないが、感染局所ではこのようなプロセスによって T 細胞の分化が促進されているものと考えられる。

生菌で誘導される感染抵抗性 T 細胞の特徴

DTH や再感染防御免疫の誘導には生菌が不可欠であり、これが結核予防に今なお BCG 生菌ワクチンを用いる理由である。死菌であってもフロイントアジュバントなどを併用すると少なくとも DTH だけは誘導することができる。リステリア菌や結核菌を用いた実験から、DTH と感染防御免疫とは極めて関係深い免疫現象であるが必ずしも同一のものではないと考えられるようになってきた。しかしながら、どのような機能が感染抵抗性 T 細胞の特徴であり、また DTH を担う T 細胞とどのよ

うに異なるかは全く不明のままであった。

リステリア死菌を完全フロイントアジュバントに混じて免疫したマウスでは、DTH のみを発現する CD4⁺ の T 細胞が誘導され、一方生菌免疫マウスには、やはり CD4⁺ であるが DTH と感染防御免疫の双方を担う T 細胞が誘導されることを利用し、この2つの CD4⁺ T 細胞群の機能をしらべた。両者とも特異抗原刺戟によって分裂増殖し、培養上清中には IL-2 と IL-3 が同等に産生されたが、IL-4 産生は何れにもみられなかった (表 2)。これらの点でみると両者ともいわゆる TH1 タイプのヘルパー T 細胞の機能を有していたが、直接マクロファージに作用して感染防御発現に関与するサイトカインである MCF (マクロファージ走化因子) と、MAF (マクロファージ活性化因子) としてはたらく IFN- γ の産生能をみると、免疫防御能を示す生菌免疫マウス由来の T 細胞のみが抗原刺戟により IFN- γ を産生することが明らかとなった⁹⁾。IFN- γ 産生能は一般に TH1 細胞の機能と考えられているが、この実験事実からすると TH1 タイプの細胞はさらに2分され、機能的に IFN- γ 産生能を示すものが免疫防御の真の担い手であるものと考えられる。同様の機能分化は、最近行っている BCG を抗原とした実験でも認められ、数多くのサイトカイン産生能の中で IFN- γ 産生能が感染抵抗性 T 細胞の唯一の機能的マーカーであることがより普遍的なものであることが示されてきた (図 2) (Kawamura, I et al., manuscript in preparation)。以前に開発した感染抵抗性 T 細胞の *in vitro* induction system を用いて経時的な機能分化をみると、MCF 産生能の発現に遅れて

表 2 リステリアに対する DTH のみを発現する T 細胞 (T_{DTH}) と免疫防御を発現する T 細胞 (T_{ACR}) のサイトカイン産生能の違い

特異抗原刺戟 により産生される サイトカイン	非免疫 T	T _{DTH}	T _{ACR}
IL-2 ^a	2200±200	14100±450	7900±800
IL-3 ^b	900±80	9800±990	5200±300
IL-4 ^c	850±250	1050±330	1100±160
MCF ^d	36±11	113±12	114±23
IFN- γ ^e	21±6	46±11	480±22

各 T 細胞群をリステリア抗原で刺戟し、培養上清中の各サイトカイン活性を測定した。

^a1/4 希釈上清による HT-2 cell の分裂増殖 (³H-TdR uptake, cpm)

^b1/4 希釈上清による FDC-P2 cell の分裂増殖 (³H-TdR uptake, cpm)

^c1/4 希釈上清による CTLL-2 cell の抗 IL-2 抗体 (S4B6) 存在下における分裂増殖 (³H-TdR uptake, cpm)

^d1/2 希釈上清中のマクロファージ走化因子活性 (modified Boyden's method, No. of M ϕ /3HPF)

^e培養上清中の活性を IFN- γ -specific ELISA にて測定 (U/ml)

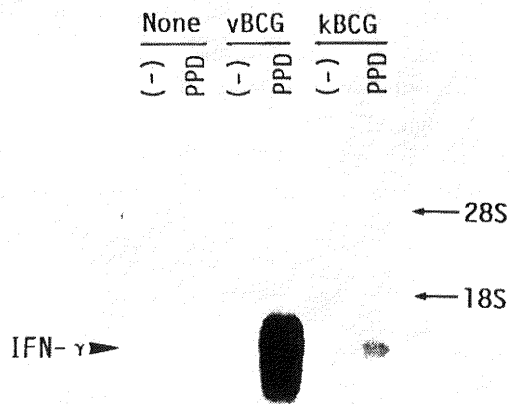


図2 ノーザンブロットによる T 細胞における IFN- γ の mRNA 発現の比較
非免疫群 (None), BCG 生菌免疫群 (vBCG), BCG 死菌免疫群 (kBCG) の各 T 細胞を APC 存在下で PPD 5 μ g/ml で 5 時間刺激した。(-) は抗原 (-) の対照。

IFN- γ 産生能が発現され、前者のみの機能発現段階の T 細胞を受身移入しても DTH の発現しかみられないことから、同じ TH1 タイプに異なった分化段階の存在が裏付けられる¹⁰⁾。

ストレス蛋白の病原性と宿主応答における意義

結核菌の有する数多くの抗原蛋白のうち、とくに 65 kD の蛋白が T, B 両免疫応答の重要な抗原であり、しかもこれが大腸菌の熱ショック蛋白 GroEL と高い相同性を有していることが明らかになって以来、にわかに病原性や免疫応答に関与する細菌のストレス蛋白への関心が高まってきている。リステリア菌も 32℃ の培養から 42℃ へ shift up した際に誘導される蛋白を ³⁵S-methionin でパルスし検出したところ数種の熱ショック蛋白がみられ、その中には BCG の 65 kD 特異的モノクローナル抗体によるウエスタンブロットで反応するものがあることが観察された。しかし、この蛋白の発現はマクロファージ内での増殖能やマウスに対する病原性の変化には関係していないようである (Mitsuyama, M., et al., manuscript in preparation)。また予備的な実験では、リステリア免疫脾細胞からの IL-2 や IFN- γ 産生量は、抗原として用いる菌体やその lysate 中の熱ショック蛋白発現とは無関係である成績が得られており、

熱ショック蛋白がリステリアのみならず細胞内寄生菌に普遍的な病原因子や T 細胞抗原として作用している可能性はないように思われる。

その他の病原因子の役割

リステリアは有鞭毛菌であり、細菌の鞭毛の中には宿主への定着に関与することが知られているものもあるので、何らかの病原因子として作用する可能性が考えられる。本菌の鞭毛は温度依存性に発現が抑制され、37℃ では無鞭毛であるが、自然感染は冷蔵保存食由来の経口感染が主体であることを考慮すると、有鞭毛菌が侵入定着していると想定される。有鞭毛菌と無鞭毛菌をマウスに経口感染させたが、有意の腸管定着率の違いは認められなかった。また部分精製した鞭毛で経口免疫すると、有鞭毛菌を感染させた場合の腸管からの排除が若干促進されたが、最終的な腸管から全身への感染の波及は防御し得なかったため、鞭毛の病原性における役割は殆どないものと思われる。

最近我々は、極めて高い phospholipase 活性を示すリステリア菌株を 2 株分離した。この菌の分泌蛋白を SDS-PAGE で展開し、ゲル上に milk agar を重層すると、分子量約 30,000 の単一バンドがこの活性を示すことが判明した。現在この phospholipase 活性のない isogenic mutant をトランスポゾン挿入により作成中であるが、本活性の高い菌株は、ヘモリシン産生能とは無関係に高い病原性を示すようであり、新しい病原因子である可能性も考えられる。

おわりに

我々のごく最近の研究についての第 467 回新潟医学会での特別講演内容を、やや総説的にまとめた。我々の研究目的は、細菌の病原因子が感染というダイナミズムの中でどのように宿主応答と相互関係を有するのかをリステリアや BCG を用いた感染実験から明らかにすることであり、最終的に細胞内寄生菌に普遍的な細胞性免疫誘導の機構を解明できれば、このような感染に対するより有効なワクチンの開発や、宿主免疫応答の修飾による治療へも役立つものと考えている。

本研究は、新潟大学医学研究助成金、文部省科学研究費、持田記念医学薬学振興財団助成金などの援助によりなされた。

参考文献

- 1) Mitsuyama, M., Fujimura, T., Fujita, M. and

- Terao, M.:** Establishment of listeriolysin O-specific monoclonal antibody and its application to a rapid detection of hemolysin-producing virulent strain of *Listeria monocytogenes*. J. Clin. Microbiol., submitted.
- 2) 光山正雄: 細胞内寄生菌に対するT細胞の分化誘導(総説). MEDICAL Immunology (メディカル免疫ノロジー), **21(3)**: 79~89, 1991.
- 3) 光山正雄: リステリア(総説). 臨床と微生物, **18**: 313~318, 1991.
- 4) 吉川博子, 河村伊久雄, 光山正雄: 精製リステリアヘモリシンのマウス腹腔マクロファージへの影響について. 日本細菌学雑誌, **46**: 331, 1991.
- 5) 光山正雄: 生菌と死菌に対する免疫応答の相違(総説). 臨床免疫, **22**: 934~940, 1990.
- 6) **Mitsuyama, M., Igarashi, K., Ohmori, T. and Nomoto, K.:** Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun., **58**: 1254~1260, 1990.
- 7) **Tsukada, H., Kawamura, I., Fujimura, T., Igarashi, K., Arakawa, M. and Mitsuyama, M.:** Induction of macrophage interleukin-1 production by *Listeria monocytogenes* hemolysin. Cell. Immunol., in press, 1992.
- 8) **Igarashi, K., Mitsuyama, M., Muramori, K., Tsukada, H. and Nomoto, K.:** Interleukin-1-induced promotion of T cell differentiation in mice immunized with killed *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun., **58**: 3973~3979, 1990.
- 9) **Tsukada, H., Kawamura, I., Arakawa, M., Nomoto, K. and Mitsuyama, M.:** Dissociated development of T cell mediating delayed-type hypersensitivity and protective T cells against *Listeria monocytogenes* and their functional difference in lymphokine production. Infect. Immun., **59**: 3589~3595, 1991.
- 10) **Muramori, K., Mitsuyama, M., Handa, T., Serushago, B.A. and Nomoto, K.:** A dissociated induction of MCF-producing and MAF-producing T cells specific for *Listeria monocytogenes* in the in vitro primary culture system. Immunology, **72**: 373~379, 1991.
-