

## *Staphylococcus epidermidis* slime protease の細胞性免疫に対する抑制作用

佐々木 実 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任：金子 克教授)

[受付：1989年2月9日]

**抄録：***Staphylococcus epidermidis* の産生するslime中のproteaseが細胞性免疫、とくにリンパ球の幼若化および膜タンパクにおよぼす影響についてヒト末梢血、マウス脾臓リンパ球を用いて検討した。T細胞マイトジェンである phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) によりヒト末梢血Tリンパ球は幼若化したが、リンパ球培養液中に*S. epidermidis* slime protease を25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  加えて培養するとTリンパ球の幼若化は用量依存的に抑制された。同様にマウス脾臓リンパ球もPHA, Con Aで幼若化して、*S. epidermidis* slime protease で用量依存的に抑制された。しかし lipopolysaccharide (LPS-*E. coli*) によるBリンパ球の幼若化は*S. epidermidis* slime protease を加えてもその抑制は、PHA, Con AのTリンパ球の幼若化に対する抑制よりも弱かった。また、リンパ球膜タンパクのSDS-polyacrylamide gel 電気泳動、オートラジオグラフィーによる分析の結果では、リンパ球膜タンパクのフラグメントは*S. epidermidis* slime protease 処理により、分子量約70,000 dalton の特徴的フラグメントの消失が観察された。

これらのことから*S. epidermidis* slime protease はTリンパ球機能を抑制し、細胞性免疫の不全状態を来して、*S. epidermidis* による感染の増悪、さらに他の微生物による二次感染を引き起こすことも考えられ、*S. epidermidis* slime protease の病原因子としての可能性が示唆された。

**Key words :** *Staphylococcus epidermidis*, slime protease, cellular immunity, lymphocyte transformation, suppression.

### 緒 言

細胞性免疫は、細菌やウイルスなどの感染防御、癌あるいは移植片などに対する免疫学的監視機構など、多くの免疫反応に係る重要な役割を担っている。また、細菌の産生するproteaseは、細菌感染の成立に影響をおよぼす重要な病原因子の一つであり、生体防御因子に対する作用については種々報告<sup>1-5)</sup>されている。しかし細菌の産生するproteaseの細胞性免疫に対す

る作用については、*Pseudomonas aeruginosa* の産生するelastaseとproteaseのみの報告<sup>6,7)</sup>があるにすぎない。著者ら<sup>4,5)</sup>は*Staphylococcus epidermidis* の産生するslime中のproteaseが、生体防御因子(好中球、補体、抗体など)に対して抑制作用を示すことを報告してきた。

今回は、*S. epidermidis* slime proteaseの細胞性免疫におよぼす影響について、マイトジェンによるリンパ球の幼若化を指標に、また、リ

Suppression of cellular immunity by slime protease purified from *Staphylococcus epidermidis*.

Minoru SASAKI and Masaru KANEKO

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 15 : 18-23, 1990

ンパ球膜タンパクにおよぼす影響について検討したので報告する。

### 材料および方法

1. *S. epidermidis* の産生する slime protease の精製:

著者ら<sup>8)</sup>の方法に従い、DEAE-sephacel (Pharmacia) および hydroxylapatite (生化学工業) カラムクロマトグラフィーにより単一なものに精製した。

2. ヒトリンパ球の分離:

ヒト末梢血25mlを滅菌した注射器で無菌的に採取してヘパリン加試験管に入れ、phosphate buffered salineで2倍に希釈して、血球分離液セパレートL (武蔵化学) に重層した。そして1,400rpm, 30分間遠心して分離したリンパ球層を滅菌毛細管ピペットで無菌的に採取した。

3. マウスリンパ球の分離:

BALB/cマウス (5週齢, 雄) を頸椎脱臼により屠殺し、脾臓を摘出してペニシリン100単位/ml, ストレプトマイシン100  $\mu$ g/mlを含むRPMI 1640 (ニッスイ-2) の入った滅菌シャーレの中でピンセットを用いてほぐし、1,000rpm, 10分間遠心分離して細胞を集め、さらに、RPMI 1640で2回洗浄した。

4. リンパ球幼若化反応:

マイクロタイタープレート (96 well, Falcon) にヒトあるいはマウスリンパ球を $2.2 \times 10^5$  /mlとなるように培養液 (15% ヒト血清, ペニシリン100単位/ml, ストレプトマイシン100  $\mu$ g/mlを含むRPMI 1640) に浮遊させ、各wellに0.18mlずつ分注した。マイトジェンとして phytohemagglutinin (PHA, Difco) の原液をRPMI 1640で100倍に希釈したものを concanavalin A (Con A, Sigma) の100  $\mu$ g/ml あるいは lipopolysaccharide (LPS-*Escherichia coli* serotype 026 : B6, Difco) の500  $\mu$ g/ml をそれぞれ10  $\mu$ lずつ各wellに加えて混和した。さらに、*S. epidermidis* slime protease の25, 50および100  $\mu$ g/ml をそれぞれ10  $\mu$ l/well加

えて混和し、37°C, 48時間, 5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。その後、各wellに37.0KBq (1  $\mu$ Ci) の<sup>3</sup>H-チミジン10  $\mu$ lを加えて良く混和し24時間培養した。培養後、セルハーベスター (ラボサイエンス) で細胞をグラスファイバーフィルター上に集めて、蒸留水で洗浄し乾燥させた。その後、試料の部分を取り出し、バイアルビンに入れて、シンチレーター (和光純薬) 6mlを加え、液体シンチレーションカウンター (アロカ) でリンパ球にとり込まれた<sup>3</sup>H-チミジンの放射活性を測定した。対照としてはリンパ球にPHA, Con A, LPS および*S. epidermidis* slime proteaseの代りに、同量のRPMI 1640を加えて培養した場合の<sup>3</sup>H-チミジンのリンパ球へのとり込みの値を計測して用いた。

5. リンパ球膜タンパクにおよぼす *S. epidermidis* slime protease の影響:

宮下の方法<sup>9)</sup>に従い、滅菌試験管にヒト末梢血リンパ球 $1 \times 10^6$ 個/mlを含む培養液1mlをとり、*S. epidermidis* slime protease 100  $\mu$ g/mlを加えて混和し、37°C, 5% CO<sub>2</sub>存在下で6, 12, 24時間培養した。培養後、遠心分離して細胞を集め、RPMI 1640に溶解した lactoperoxidase (2 mg/ml, Sigma) 100  $\mu$ lと<sup>125</sup>Iの3.7MBq (100  $\mu$ Ci)を加え、さらにRPMI 1640で希釈した0.03%過酸化水素水を100  $\mu$ l加えて混和し、これを4分ごとに4回、反応させて膜タンパクをラベルした。次に、Nonidet P-40 (Sigma) を各試験管に0.5ml加え、攪拌して15分間氷で冷したのち、液をマイクロチューブに移して微量遠心器 (サクマ, 150IV) を用いて7,000rpm, 20分間遠心して膜タンパクを抽出した。抽出したリンパ球膜タンパクをLaemmliの方法<sup>10)</sup>に従い、10% SDS-polyacrylamide gel 電気泳動により分離した。オートラジオグラフィーはゲルを乾燥器 (アトー) で乾燥させた後、X線フィルムとあわせてカセットに入れ-80°Cで4日間感光させたあとで、現象してタンパクフラグメントについて検討した。

## 結 果

### 1. *S. epidermidis* slime protease のヒト末梢血リンパ球幼若化におよぼす影響:

T細胞マイトジェンであるPHA および Con A の刺激によるリンパ球の幼若化を $^3\text{H}$ -チミジンのとり込みの値で表わし100%とすると, Fig. 1 に示すように, PHA の刺激による $^3\text{H}$ -チミジンのとり込みの値は, *S. epidermidis* slime protease を加えることにより低下し, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で slime protease を加えない場合の34%, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では13%の値を示した。また, Con A の場合にも *S. epidermidis* slime protease を加えることにより $^3\text{H}$ -チミジンのとり込みの低下が認められ, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では slime protease を加えない場合の17%, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では, 3%であり, PHA, Con A いずれのT細胞マイトジェンに対しても *S. epidermidis* slime protease は, 用量依存的にTリンパ球の幼若化を抑制した。

### 2. *S. epidermidis* slime protease のマウスリ

### ンパ球幼若化におよぼす影響:

PHA, Con A および LPS によるリンパ球の幼若化を $^3\text{H}$ -チミジンのとり込みの値で表わし

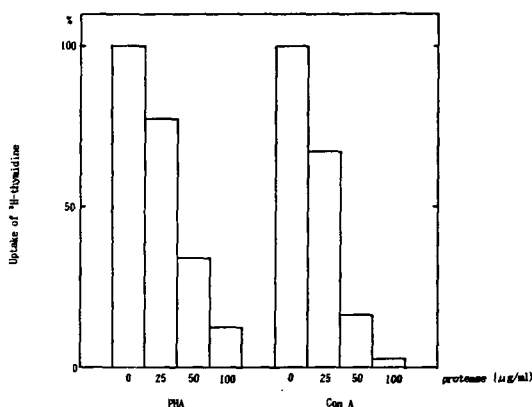


Fig.1 Suppressive effect of *S. epidermidis* slime protease on blast transformation of human peripheral blood lymphocyte induced by phytohemagglutinin (PHA) or concanavalin A (Con A).

*S. epidermidis* slime protease was added to culture medium at the final concentration of 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

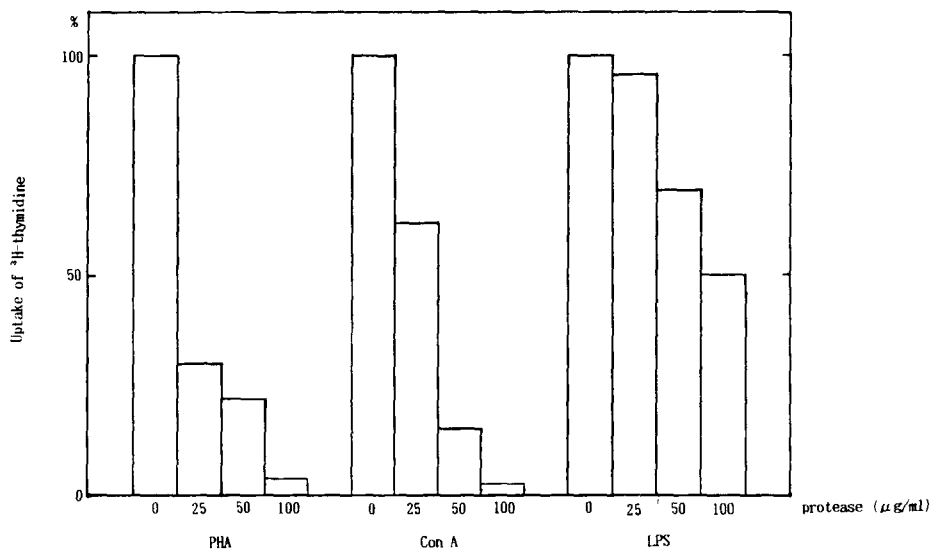
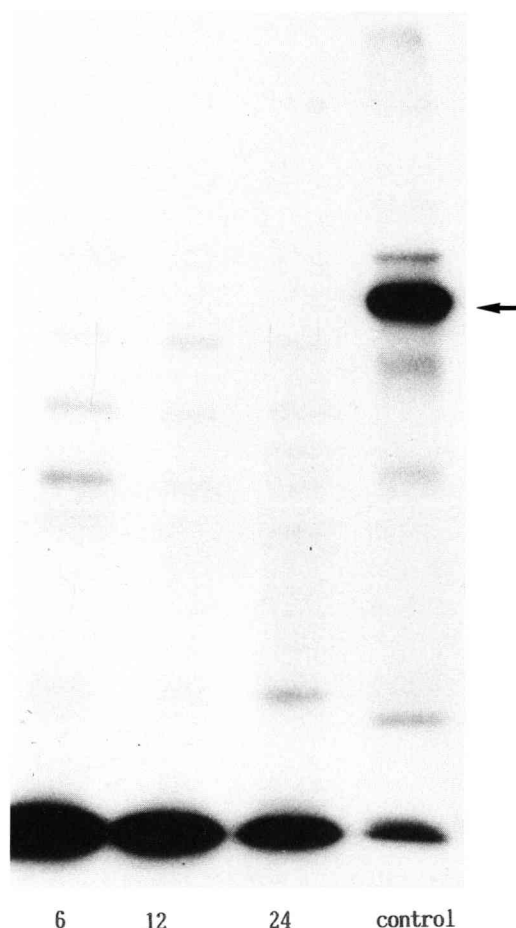


Fig.2 Suppressive effect of *S. epidermidis* slime protease on blast transformation of mouse spleen lymphocyte induced by phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS).

*S. epidermidis* slime protease was added to culture medium at the final concentration of 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



**Fig.3** Autoradiography of SDS-polyacrylamide gel of  $^{125}\text{I}$ -labelled surface membrane protein of lymphocyte. *S. epidermidis* slime protease ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added to culture medium, and the media were incubated 6, 12 and 24hr. After incubation, surface membrane protein of lymphocyte was labelled by  $^{125}\text{I}$ . The surface membrane protein was separated by SDS-PAGE, and then we performed autoradiography. Arrow indicates about 70,000 dalton of surface membrane protein of lymphocyte.

100%とすると、Fig. 2に示すように、PHAの刺激による $^3\text{H}$ -チミジンのとり込みの値は、*S. epidermidis* slime proteaseを加えることにより低下し、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ではslime protease

を加えない場合の30%、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ では22%、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ では3%の値を示して用量依存的にリンパ球の幼若化が抑制された。Con Aの場合は*S. epidermidis* slime protease  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた場合62%に、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で18%、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ では2%の値を示して用量依存的にリンパ球の幼若化の抑制が認められた。一方、LPSによるBリンパ球の幼若化に対して*S. epidermidis* slime proteaseを $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた場合には96%、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ では69%、そして $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ では50%の値を示したが、これはPHAおよびCon AによるTリンパ球の幼若化に対する抑制作用にくらべると弱かった。

### 3. *S. epidermidis* slime protease のリンパ球膜タンパクにおよぼす影響 :

Fig. 3から明らかなように、正常ヒトリンパ球に存在する特徴的なタンパクのバンド(矢印、分子量約70,000 dalton)は*S. epidermidis* slime proteaseを加えた場合、培養時間が長くなるにしたがって消失し、12時間および24時間ではほとんど認められなかった。

## 考 察

リンパ球幼若化反応は、リンパ球の最も基本的な機能検査法のひとつである。リンパ球はある種の抗原あるいはマイトジェンの刺激により分裂増殖し、種々のリンホカインの産生や抗体産生ならびに細胞障害活性などの免疫学的機能を発揮するようになる<sup>11)</sup>。なかでも、Tリンパ球の産生するInterleukin-2 (IL-2), Macrophage activating factor, Macrophage migration inhibitory factorなどは免疫学的に重要な可溶性因子として注目されている。

ブドウ球菌による感染症は皮膚・軟部組織感染症、菌血症など多岐にわたっている。しかも、その誘発因子として白血球機能の減退あるいは欠如などの免疫不全<sup>12)</sup>、異物の装着<sup>13)</sup>などがあげられる。最近、*S. epidermidis*は菌血症<sup>14)</sup>でその分離率が増加し、宿主の免疫能(抵抗性)が感染、発症に影響をおよぼしていることが話題になっている。

Theander ら<sup>6)</sup> は *Pseudomonas aeruginosa* の産生する elastase と protease が T リンパ球の幼若化を抑制するが、その抑制はリンパ球サブセット CD4<sup>+</sup> や CD8<sup>+</sup> 細胞のいずれに対しても同程度であり、また、IL-2 活性、IL-2 と、IL2 レセプターへの結合阻害や、IL-2 に対する分解作用があることなどを報告している。一方、Pedersen ら<sup>7)</sup> はリンパ球の CD4<sup>+</sup> 細胞を *P. aeruginosa* が産生する elastase あるいは protease で処理すると、モノクローナル抗体の CD4<sup>+</sup> 細胞への結合が阻害されるが、CD3、CD5、CD8 への結合は阻害されず、酵素作用に選択性のあることを報告している。

本研究において、*S. epidermidis* slime protease がリンパ球の幼若化を抑制し、さらに、リンパ球膜タンパクを分解することが明らかになった。これらのことは、リンパ球膜表面に存在する種々のレセプターなどの機能性タンパクが分解されることを示す。すなわち、細胞外からの刺激が細胞内へ伝達されないことになる。また、マイトジェンの刺激により遊離されたリンホカインが分解され、リンホカインの刺激がリンパ球へ伝わらず、リンホカインーリンパ球カスケード系の制御が崩れることなどが推察される。さらに、*S. epidermidis* slime protease が、T リンパ球の幼若化を抑制すると可溶性リンホカインの産生、あるいはリンホカインによる種々のエフェクター細胞の活性化が、抑制されることも考えられる。

T 細胞マイトジェンとして知られている PHA は T リンパ球の CD2 を、また、Con A は CD3 を含む膜タンパクと反応すると考えられている<sup>11)</sup>。*S. epidermidis* slime protease はこれらマイトジェンのいずれの幼若化作用をも用量依存的に強く抑制した。しかしながら、LPS によるマウス B リンパ球の幼若化に対する抑制は、PHA や Con A による T リンパ球幼若化の抑制にくらべて弱かった。したがって、*S. epidermidis* slime protease のリンパ球に対する作用には膜抗原特異性のあることも考えられ

る。このことはオートラジオグラフィーによる分析から、*S. epidermidis* slime protease が細胞性免疫の発現、あるいは感染防御に重要な役割を演じているといわれる<sup>15,16)</sup> リンパ球膜タンパクに影響をおよぼすことから推察できる。なお、この点については、今後、膜抗原特異的モノクローナル抗体を用いて、膜タンパクへの結合におよぼす影響などを検討する必要があると考える。

以上のことから、*S. epidermidis* slime protease のリンパ球に対する作用は、宿主 (compromised host の場合が多い) の免疫不全状態をさらに悪化させ、*S. epidermidis*、その他の細菌、真菌、ウイルスなどの微生物による感染を容易なものとする。著者ら<sup>4,5)</sup> がすでに報告した *S. epidermidis* slime protease の感染防御因子に対する抑制作用などをあわせ考えると、その病原因子としての役割は大きいものと推察される。

## 結 語

1. *S. epidermidis* slime protease は PHA, Con A によるヒト末梢血およびマウス脾臓 T リンパ球の幼若化を用量依存的に強く抑制した。
2. *S. epidermidis* slime protease は LPS によるマウス B リンパ球の幼若化を抑制したが、PHA, Con A による T リンパ球の幼若化の抑制と比較すると弱かった。
3. *S. epidermidis* slime protease は分子量約 70,000 dalton の特徴的リンパ球膜タンパクフラグメントを分解した。
4. *S. epidermidis* slime protease による T リンパ球機能に対する抑制は、細胞性免疫の不全状態を来し、*S. epidermidis* による感染の増悪とその他の微生物による二次感染を容易なものとする可能性が示唆された。

本研究の一部は、圭陵会学術振興会研究助成第65号により行われた。

**Abstract :** The effect of slime protease obtained from *Staphylococcus epidermidis* on the cellular immunity was examined using lymphocytes from human peripheral blood and mouse spleen. Lymphocyte transformation of human peripheral blood was promoted by phytohemagglutinin (PHA) and concanavalin A (Con A) and blast transformation was suppressed dose-dependently by addition of *S. epidermidis* slime protease (25,50,100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to the culture medium. Lymphocyte transformation of mouse spleen was promoted by PHA and Con A. Blast transformation was however suppressed dose-dependently by addition of *S. epidermidis* slime protease (25,50,100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to the culture medium. On the other hand, blast transformation of mouse spleen by lipopolysaccharide was suppressed dose-dependently by *S. epidermidis* slime protease, but the suppression was weaker than that of blast transformation in the presence of PHA and Con A.

In SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography, about 70,000 dalton of surface membrane protein of lymphocyte disappeared after the treatment with *S. epidermidis* slime protease.

These results indicate that *S. epidermidis* slime protease may cause immunodeficiency and may thus result in secondary infection by *S. epidermidis* or other microorganisms.

# 文 献

- 1) Montgomerie, J.Z., Kalmanson, G.M. and Guze, L.B. : Virulence of enterococci in experimental pyelonephritis. *Urol Res.* 5 : 99-102, 1977.
- 2) Matsumoto, K., Yamamoto, T., Kamata, R. and Maeda, H. : Pathogenesis of serratal infection. : Activation of the Hageman factor-prekallikrein cascade by serratal protease. *J. Biochem.* 96 : 739-749, 1984.
- 3) Kharazmi, A., Eriskin, H.O., Döring, G., Goldstein, W. and Hoiby, N. : Effect of *Pseudomonas aeruginosa* proteases on human leucocyte phagocytosis and bactericidal activity. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C* 94 : 175-179, 1986.
- 4) 佐々木実, 金子 克 : *Staphylococcus epidermidis* slime protease の オプソニン化 におよぼす影響, 第43回日本細菌学会東北支部総会, 抄録集, 51ページ, 1989.
- 5) 佐々木実, 金子 克 : *Staphylococcus epidermidis* slime protease の 血清 protease inhibitor におよぼす影響, 岩医大歯誌, 14 : 195-200, 1989.
- 6) Theander, T.G., Kharazmi, A., Pedersen, B.K., Christensen, L., D., Tvede, N., Poulsen, L.K., Ødum, N., Svenson, M. and Bendtzen, K. : Inhibition of human lymphocyte proliferation and cleavage of interleukin-2 by *Pseudomonas aeruginosa* protease. *Infect. Immun.* 56 : 1673-1677, 1988.
- 7) Pedersen, B.K., Kharazmi, A., Theander, T.G., Ødum, N., Andersen, V. and Bendtzen, K. : Selective modulation of the CD 4 molecular complex by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and elastase. *Scand. J. Immunol.* 26 : 91-94, 1987.
- 8) 佐々木実, 金子 克 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する slime 中にみとめられる protease の精製とその性状について, 岩医大歯誌, 14 : 17-25, 1989.
- 9) 宮下俊之 : 白血球膜糖蛋白の SDS-PAGE による分析, 臨床免疫, 19 (suppl. 12) : 49-55, 1987.
- 10) Laemmli, U.K. : Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 11) 田中稔之, 橋本嘉幸 : リンパ球の活性化・増殖と細胞膜糖タンパク質, 臨床免疫, 19 : 924-931, 1987.
- 12) 有賀 正, 松本脩三 : 免疫不全状態における感染症——病態別にみた感染症——, 臨床免疫, 19 : 194-203, 1987.
- 13) Haslett, T.M., Isenberg, H.D., Hilton, E., Tucci, V., Kay, B.G. and Vellozzi, E.M. : Microbiology of indwelling central intravascular catheters. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 696-701, 1988.
- 14) Michael, A.M., Michael, A.P. and Richard, P.W. : Coagulase-negative staphylococci bacteremia. *Ann. Intern. Med.* 110 : 9-16, 1989.
- 15) Parkman, R., O' Donnell, E.R., Kenney, D.M., Perrine, S. and Rosen, F.S. : Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* ii : 1387-1389, 1981.
- 16) 高瀬浩造 : 細胞膜糖タンパク異常と免疫不全 (LFA-1 欠損症, Wiskott-Aldrich 症候群), 臨床免疫, 19 : 932-939, 1987.