

原 著

Staphylococcus epidermidis slime protease
の T リンパ球機能に対する抑制機構について

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 : 1990年 6 月11日]

抄録 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する slime 中の protease が, T リンパ球膜抗原 CD 2, CD 3, CD 4, および CD 8 に対する作用とマクロファージ活性化因子 (MAF) 産生におよぼす影響について検討した。*S. epidermidis* slime protease (slime protease) 処理により T リンパ球 CD 2, CD 4 および CD 8 とそれぞれに対するモノクローナル抗体の結合が阻害され, その結果, CD 2, CD 4 および CD 8 陽性細胞数は slime protease の用量に依存して減少した。また, phytohemagglutinin 刺激による T リンパ球からの MAF 産生も slime protease で T リンパ球を処理すると, 用量依存的に抑制された。なお, 本実験で slime protease は, T リンパ球に対し細胞毒性を示さなかった。

以上の結果から, slime protease により T リンパ球が活性化されてできる活性物質 MAF の産生は抑制されることが示された。このことは slime protease が T リンパ球膜抗原を分解して, 障害を与えることにより引き起こされたものと考えられる。

Key words : *Staphylococcus epidermidis*, slime protease, T lymphocyte, macrophage activating factor, suppression.

緒 言

Staphylococcus epidermidis は日和見感染の病原菌としてあげられるが, その病原因子については多くの報告がある^{1,2)}。著者らは, *S. epidermidis* slime 中にみられる protease が, *Pseudomonas aeruginosa* の産生する elastase や protease で報告³⁻⁶⁾されているのと同様に, 種々の生体防御因子, (血清中の IgG, protease inhibitor, 補体) 好中球の貪食能, T リンパ球

の幼若化などに対して抑制作用を示して *S. epidermidis* の病原性発現に重要な役割を担っていることを報告⁷⁻⁹⁾してきた。とくに, *S. epidermidis* slime protease (slime protease) の T リンパ球幼若化に対する抑制作用は, T リンパ球膜タンパクを分解して, マイトジェンの刺激を阻害することと関連が深いことを示唆してきた。本論文では, slime protease が T リンパ球と T リンパ球膜抗原特異的モノクローナル抗体との結合におよぼす影響, あるいはマイ

The mechanism of the suppression of T lymphocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime protease.

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 : 113-118, 1990

トジェン刺激によるTリンパ球のマクロファージ活性化因子(MAF)産生におよぼすslime proteaseの影響について検討し,slime proteaseがTリンパ球幼若化とMAF産生を抑制する機構について考察したので報告する。

材料および方法

1. *Staphylococcus epidermidis* slime proteaseのマクロファージ活性化因子産生におよぼす影響

BALB/cマウス(5週齢,雄)脾臓リンパ球を培養液[ペニシリン100単位/ml,ストレプトマイシン100 μ g/ml,10%ヒト血清を含むRPMI 1640(ニッスイ)]に 1×10^6 /mlとなるように浮遊させた。そのリンパ球培養液1mlとslime proteaseの2.5, 5, 10, および25 μ g/mlとを12穴のマクロタイタープレート(Costar)に入れ,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で24時間培養した。培養後,遠心して上清を除き,再びslime protease処理リンパ球を培養液に 1×10^6 /mlとなるように再浮遊させ,phytohemagglutinin(PHA,Difco)の原液をphosphate buffered saline(PBS)で100倍希釈したものを100 μ lずつ加えて,さらに48時間培養した。培養後,得られた上清をMAF含有画分とした。slime protease未処理のリンパ球についても同様の手順で培養し,MAF含有画分を得た。MAF含有画分のそれぞれ1mlと培養液に浮遊させたモルモット腹腔マクロファージ 1×10^6 /mlの1mlを12穴のマクロタイタープレート中で37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で69時間培養して,³H-グルコサミン(Amersham)37kBq(1 μ Ci)を加えて,さらに3時間培養した。培養後,マクロファージにとり込まれた³H-グルコサミンの放射活性を液体シンチレーションカウンター(アロカ)で測定した。また,対照としてはslime protease未処理リンパ球でPHA刺激をしない培養上清によるマクロファージの³H-グルコサミンとり込みの値を用いた。

2. *Staphylococcus epidermidis* slime pro-

teaseのTリンパ球膜抗原に対する影響

培養液にヒト末梢血リンパ球を 1×10^6 /mlとなるように浮遊させ,その1mlとslime proteaseの25,50および100 μ g/mlを24穴のマクロタイタープレート(Costar)中で37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で48時間培養した。培養後,遠心してリンパ球を集め,PBSで2回洗浄して,PBSに 2×10^6 /mlとなるように再浮遊させた。このリンパ球浮遊液0.1mlとFITCラベルモノクローナル抗体T4(DACO)あるいはNU-T1,NU-T3,NU-T_s/c(ニチレイ)を小試験管に入れ,4 $^{\circ}$ Cで,遮光して1時間反応させた。反応後,蛍光顕微鏡(ニコン)で観察した。

3. *Staphylococcus epidermidis* slime proteaseのリンパ球生存率におよぼす影響

培養液中のヒトリンパ球(1×10^6 /ml)1mlとslime proteaseの25,50および100 μ g/mlを24穴のマクロタイタープレート中で37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で48時間培養した。培養後,遠心してリンパ球を集め,0.25%トリパンブルーで染色されたリンパ球と染色されなかったリンパ球を数え生存率を求めた。

結 果

1. *Staphylococcus epidermidis* slime proteaseのMAF産生におよぼす影響

Slime protease未処理マウスリンパ球でPHA刺激を行わない培養上清について,マクロファージの³H-グルコサミンとり込みの値は700cpmであった。一方,slime protease未処理リンパ球でPHA刺激をした培養上清では,マクロファージの³H-グルコサミンとり込みの値がPHA刺激をしなかった対照の約2.6倍に高まった。しかし,リンパ球をslime protease 2.5~25 μ g/mlの濃度で処理した後,PHAで刺激して得られたリンパ球の培養上清を用いてのマクロファージの活性化は,slime proteaseの5,10および25 μ g/mlでは,それぞれ1030,930および880cpmの値であり,³H-グルコサミンのとり込みはslime protease未処理リン

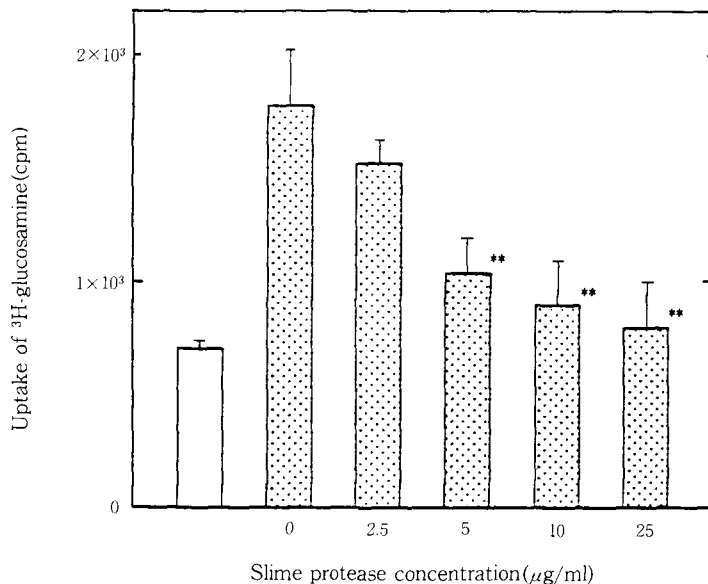


Fig.1 Effect of *Staphylococcus epidermidis* slime protease on the macrophage activating factor production.

□ : lymphocytes not stimulated by phytohemagglutinin (PHA).

▨ : lymphocytes stimulated by PHA. The lymphocytes were treated with *S. epidermidis* slime protease (2.5, 5, 10 and 25 µg/ml).

Results are shown as mean ± SD of 4 experiments. Statistical analysis : **P < 0.01 as compared with the value of the PHA-stimulated lymphocytes not treated with *S. epidermidis* slime protease.

パ球で PHA 刺激をした培養上清と比較して抑制され、有意差を認めた (Fig.1)。

2. *Staphylococcus epidermidis* slime protease の T リンパ球膜抗原に対する影響

ヒト末梢血 T リンパ球膜抗原 CD 2 に対するモノクローナル抗体 NU-T1 の結合は、正常ヒトリンパ球では 69% の細胞に認められた。一方、slime protease 処理をしたものでは、slime protease 50 および 100 µg/ml では、それぞれ陽性細胞数は 49% および 42% と減少し、有意差が認められた。また、CD 4 に対するモノクローナル抗体 T4 の結合は、正常ヒト T リンパ球では 49% の細胞に認めた。slime protease 25, 50 および 100 µg/ml 処理では、それぞれ 34%, 24%, および 21% に陽性細胞数が減少し有意差が認められた。さらに、CD 8

に対するモノクローナル抗体 NU-T_{5/c} の結合も正常ヒト T リンパ球では 35% であったが、slime protease の用量に依存して陽性細胞数が減少し、slime protease 25, 50 および 100 µg/ml の処理では、それぞれ 30%, 20% および 13% の値に減少し、有意差が認められた。一方、CD 3 に対するモノクローナル抗体 NU-T3 の結合は、正常ヒト T リンパ球では 65% であったが、slime protease 25, 50 および 100 µg/ml の処理では、陽性細胞数はそれぞれ 59%, 57% および 52% の値を示し、50 および 100 µg/ml で有意差を認めたもののわずかに減少したにすぎなかった (Fig. 2)。

3. *Staphylococcus epidermidis* slime protease のリンパ球生存率におよぼす影響

ヒト末梢血リンパ球 1 × 10⁶ / ml の 1 ml と

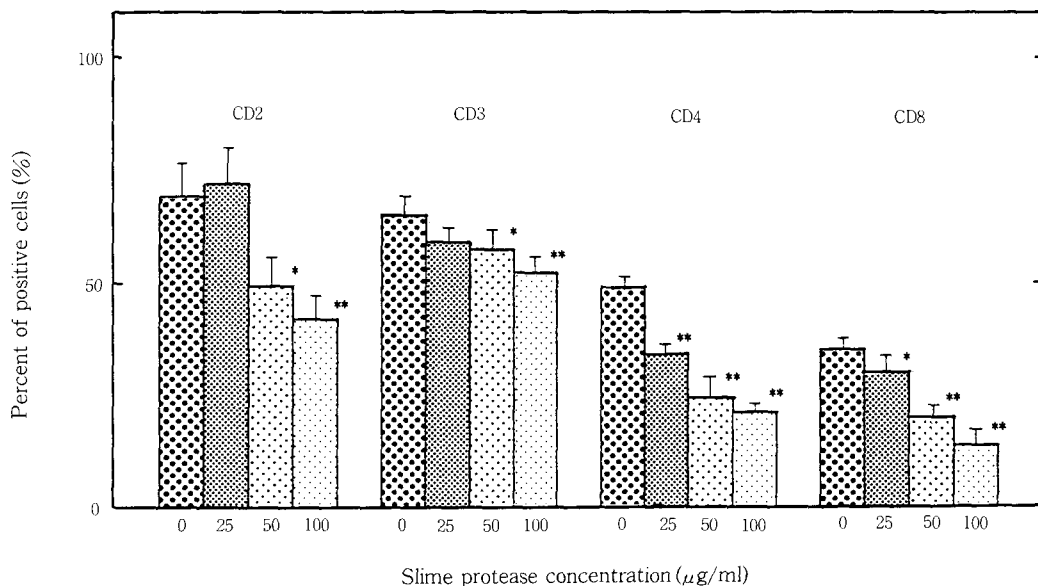


Fig.2 Effect of *Staphylococcus epidermidis* slime protease on the CD 2 , CD 3 , CD 4 and CD 8 of T lymphocyte surface membrane antigens. Results are shown as mean \pm SD of 4 experiments with blood lymphocytes bound with monoclonal antibody. The lymphocytes were treated with *S. epidermidis* slime protease (25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Statistical analysis : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the value of the T lymphocytes which were not treated with *S. epidermidis* slime protease.

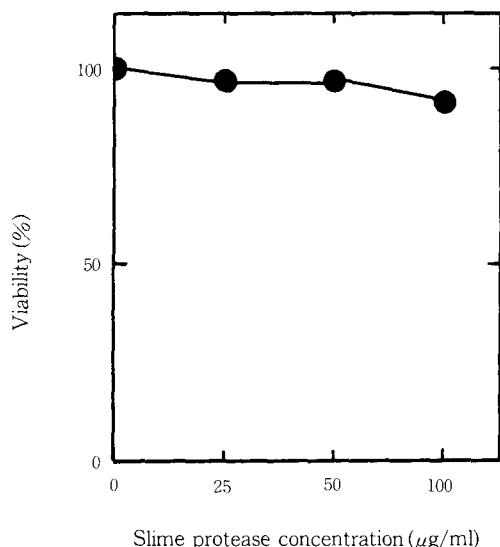


Fig.3 Effect of *Staphylococcus epidermidis* slime protease on the viability of lymphocytes. The lymphocytes were treated with *S. epidermidis* slime protease (25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

slime protease の25, 50および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を37°C, 5% CO_2 存在下で48時間培養後のリンパ球生存率は, slime protease 未処理の対照とほとんど差異がなく, それぞれ98%, 98%および94%の値であった (Fig. 3)。

考 察

近年, Tリンパ球膜抗原に対するモノクローナル抗体は, Tリンパ球機能を知る目的やリンパ球サブセットの解析, そして臨床的には自己免疫疾患や免疫不全症の診断に利用されるようになってきた。現在, CD4, CD8などのTリンパ球サブセットを初めとして, 多くのTリンパ球レセプターあるいは表面膜抗原に対するモノクローナル抗体が作製されている。

P. aeruginosa の産生する elastase や protease は Tリンパ球の CD4 を分解して抗 CD4 モノクローナル抗体の結合を阻害するが, CD8陽性細胞への抗 CD8モノクローナル抗体

の結合は阻害しない。しかしながら, trypsin は CD4, CD8 陽性細胞のいずれに対するモノクローナル抗体の結合も阻害するとの報告¹²⁾がある。著者らの slime protease は CD2, CD3, CD4 および CD8 に対するモノクローナル抗体の結合を阻害したが, CD3 に対するモノクローナル抗体の結合阻害は他のモノクローナル抗体にくらべて弱いものであった。したがって, *P. aeruginosa* の産生する elastase や protease にみられるような明らかな特異性は認められなかった。しかし, 著者らは slime protease の生体成分中にある IgG, elastin, gelatin, などを基質として用いた実験で, 特異的に分解作用が認められたことを報告した¹³⁾。さらに, その他の T リンパ球膜抗原についても詳細に検討すれば, 特異的な生物活性が認められる可能性もあるものと推察される。

また, T リンパ球はマイトジェンあるいは種々の抗原が, T リンパ球膜抗原レセプターに結合することにより活性化されるが, これは T リンパ球が抗原刺激をうけると, ホスホリパーゼ C の活性化に引き続いて, DNA 合成が促進されて, T リンパ球の芽球化あるいは種々のリンホカインを産生するものと考えられている。

一方, マクロファージ活性化因子 (MAF) は, 細胞内寄生性細菌 (チフス菌, 結核菌など) の殺菌作用の亢進, 抗腫瘍活性の発現あるいは Interleukin 1 産生の増加などの作用を有するリンホカインの一つである^{14,15)}。この MAF 産生における最初の認識は, T リンパ球膜レセプターを介して行われ, T リンパ球活性化において T リンパ球膜レセプターは, 重要な役割を演じる物質である。著者らは, 本実験において slime protease が, T リンパ球の MAF 産生を抑制することを明らかにした。

このことは, slime protease が, PHA 刺激

による T リンパ球の認識部位である T リンパ球膜タンパクへ強い影響を与えることを示しているものと考えられる。さらに, このことは, すでに著者らが報告したように slime protease により, T リンパ球膜タンパクの分解が顕著に認められたことから明らかである⁹⁾。すなわち, slime protease はリンパ球膜表面タンパク抗原 leukocyte function antigen, T cell receptor, CD2, CD3, CD4 あるいは CD8 などの抗原提示細胞からの情報を認識する部位である T リンパ球膜レセプターを分解し, あるいはその構造に変化を来し, T リンパ球活性化経路を遮断して, 種々の刺激に対する T リンパ球の応答を低下させたものと考えられる。slime protease はこのような機構で, T リンパ球の幼若化あるいは MAF 産生の応答を抑制したことが考えられる。

MAF に代表されるリンホカインは, 細胞間の情報伝達を行い, 免疫応答に重要な役割を担う物質であるが, slime protease の T リンパ球に対する作用は, MAF などのリンホカインの産生を抑制して, マクロファージによる生体防御活性を著しく低下させ, 宿主の抵抗性を弱めて, 感染を増強させる役割を演じるものと推察される。

結 語

1. *S. epidermidis* slime protease は T リンパ球から MAF の産生を用量依存的に抑制した。
2. *S. epidermidis* slime protease は, T リンパ球 CD2⁺, CD4⁺ および CD8⁺ 細胞数を用量依存的に減少させたが, T リンパ球に対する細胞毒性は認められなかった。

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 : We studied the effects of slime protease obtained from *Staphylococcus epidermidis* on membrane surface antigens (CD 2 , CD 3 , CD 4 , and CD 8) and on the production of a macrophage activating factor (MFA) from T lymphocytes. The numbers of CD 2 , CD 4 and CD 8 positive cells were reduced by the treatment with *S.epidermidis* slime protease. Namely, the binding of the monoclonal antibody to each of the antigens was inhibited. The MAF production was suppressed dose-dependently after the treatment with *S.epidermidis* slime protease. Futhermore, *S.epidermidis* slime protease had no toxic effect on the lymphocytes.

These results suggest that *S.epidermidis* slime protease cleaved the lymphocyte membrane antigens to suppress the production of MAF from activated T lymphocytes.

文 献

- 1) Ohshima, Y., Usui, Y., Ichiman, Y., and Yoshida, K.: Biochemical characterization of cell surface substance from encapsulated strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg. suppl.* 14:207-212, 1985.
- 2) Scheifele, D.W., Bjornson, G.L. Dyer, R. A. and Dimmick, J.E. : Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect. Immun.* 55 : 2268-2273, 1987.
- 3) Morihar, K., Tsuzuki, H. and Oda, K. : Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa* : Inactivation of human plasma α_1 -protease inhibitor. *Infect. Immun.* 24 : 188-193, 1979.
- 4) Kharazmi, A., Döring, G., Høiby, N. and Valerius, N.H. : Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and elastase with human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Infect. Immun.* 43 : 161-164, 1984.
- 5) Holder, I.A. and Wheeler, R. : Experimental studies of pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa* : elastase, an IgG protease. *Can. J. Microbiol.* 30 : 1118-1124, 1984.
- 6) Theader, 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* proteases. *Infect. Immun.* 56 : 1673-1677, 1988.
- 7) 佐々木実, 金子 克 : *Staphylococcus epidermidis* 精製 slime protease のマウスにおける病原性について, 岩医大歯誌, 14 : 100-106, 1989.
- 8) 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.
- 9) 佐々木実, 金子 克 : *Staphylococcus epidermidis* slime protease の細胞性免疫に対する抑制作用, 岩医大歯誌, 15 : 18-23, 1990.
- 10) Fowles, R.E., Fajardo, I.M., Leibowitch, J.L. and David, J.R. : The inhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138 : 952-967, 1973.
- 11) Meltzer, M.S. : Macrophage activation for tumour cytotoxicity. : Characterization of priming and triggering signals during lymphokine activation. *J. Immunol.* 127 : 179-183, 1981.
- 12) Pedersen, B.K., Kharazmi, A., Theander, T.G., Ødum, N., Andersen, V. and Bendtzen, K. : Selective modulation of the CD4 molecular complex by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and elastase. *Scand. J. Immunol.* 26 : 91-94, 1987.
- 13) 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.