

Pseudomonas aeruginosa による生体防御調節機構
(抗リステリア活性の誘導)

奈良県立医科大学細菌学教室
上海道範昭

MECHANISM OF BIOPHYLACTIC REGULATION INDUCED
BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
(INDUCTION OF ANTI-LISTERIAL ACTIVITY)

NORIAKI KAMIKAIIDOU

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received January 26, 1994

Abstract: Subcutaneous inoculation of *Pseudomonas aeruginosa*, either mucoid type or non-mucoid type, 72h before a lethal infection with *Listeria monocytogenes* induced anti-listerial resistance in mice. Non-mucoid *P. aeruginosa* was more efficient in inducing the resistance than mucoid. Formalin, acetone, or heat-killed cells of *P. aeruginosa* induced the protection as effective in as did viable organisms of *P. aeruginosa*. Endotoxin low-responder C3H/HeJ mice were not protected from listerial lethal infection by this treatment. These results indicate that anti-listerial resistance conferred by *P. aeruginosa* is attributed to lipopolysaccharide (LPS). This resistance was adoptively transferred to naive mice by peritoneal cells from the mice pretreated intraperitoneally with heat-killed *P. aeruginosa*. These peritoneal cells were able to produce tumor necrosis factor- α upon stimulation with heat-killed *L. monocytogenes* and also to exhibit enhanced phagocytic activity. Macrophages are predominant in the peritoneal cells, as determined by the negative selection. Moreover, endogenous interferon- γ (IFN- γ), which is a strong macrophage activator, was induced to a significant extent in the bloodstream of mice pretreated with *P. aeruginosa* 72h after infection with *L. monocytogenes*. Pretreatment with monoclonal anti IFN- γ antibody resulted in significant reduction in anti-listerial resistance conferred by *P. aeruginosa*. Thus, it is assumed that peritoneal macrophages stimulated by LPS of *P. aeruginosa* could be fully activated by IFN- γ produced upon listerial infection, thereby exerting high magnitude anti-listerial activity.

Index Terms

Pseudomonas aeruginosa, *Listeria monocytogenes*, lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ)

緒 言

近年、臓器移植の導入、癌の化学療法の進歩、さらには AIDS を始めとする免疫不全患者の増加に伴って、日

和見感染症が臨床の場で大きな問題となっている。特に *Pseudomonas aeruginosa* は、種々の抗生物質に抵抗性を示すという理由のみならず、本菌の定着が生体防御能を一層低下させることから、日和見感染症の中でも特に

重要な疾患とみなされている。*P. aeruginosa*の生体防御機構に及ぼす作用としては皮膚移植片に対する拒絶反応の抑制¹⁾、ツベルクリン反応の抑制²⁾、接触性過敏反応の抑制³⁾、ヒトリンパ球のDNA合成抑制⁴⁾など主としてT細胞機能の抑制作用に関するものがよく知られているが、これらの抑制機序に関してはいまだに十分には解明されていない。

一方、マウスにおいては、*P. aeruginosa*の前処置により*Listeria monocytogenes*に対する抵抗性が亢進するという報告⁵⁾がある。*L. monocytogenes*はマウスに対しては、典型的な細胞内寄生菌であり、本菌に対しては生体側の細胞性免疫が重要な役割を担っていることはよく知られている⁶⁾。このことから、*P. aeruginosa*の生体防御機構に対する作用は、リンパ球機能の抑制ということだけでなく、ある種の感染に対しては抵抗性を増強する作用の存在する可能性がある。そこで本研究では、*P. aeruginosa*をマウスの背側皮下に前投与することによって、*L. monocytogenes*に対する感染抵抗性がどの様に変化するかを解析することで、*P. aeruginosa*の生体防御機構に対する作用を詳細に検討した。

方法と材料

1. 動物：ICR雌マウス(4—5週令)およびC3H/HeN, C3H/HeJ雌マウス(5—6週令)をそれぞれ日本SLCより購入し、実験に供した。抗体の作製には日本クレアより購入した白色家兎(雌, 2kg)を使用した。

2. 菌株：*P. aeruginosa* YM(mucoid型)及びN-42(non-mucoid型)、*L. monocytogenes* EGD、*Salmonella typhimurium* LT-2を用いた。EGD株のICRマウス及びC3H/HeNマウスに対するLD₅₀はそれぞれ10⁴及び5×10³ colony forming unit(CFU)、LT-2株のICRマウスおよびC3H/HeNマウスに対するLD₅₀はそれぞれ10⁵及び5×10²CFUであった。EGD株及びLT-2株はtryptic soy broth(Difco社)で37℃、4—5時間振とう培養したものを、YM株およびN-42株はmucoid産生用培地(1% Bactopepton, 2% グルコン酸ナトリウム含有培地⁷⁾)で18—20時間振とう培養したものをを用いた。

3. 培養液：腹腔浸出細胞の培養にはEagle minimum essential medium (MEM)(Flow Laboratories, Scotland)に10%牛胎児血清, 20 mM HEPES, 3.0 mg/ml NaHCO₃, 0.3 g/l L-グルタミン, 100 u/ml penicillin G, 50 μg/ml streptomycinを添加したものをを用いた。

4. 臓器内菌数の測定：EGD感染マウスより無菌的に脾臓を摘出し、0.5%サポニン入り生理食塩水1 ml中でhomogenizer (REI ELECTRIC CO., LTD.)を用いて

脾抽出液を作製し、段階希釈したものをtryptic soy agar plate上に塗抹、37℃18—24時間培養後にコロニー数を測定し、臓器内菌数をCFU量で算出した。

5. *P. aeruginosa* N-42(non-mucoid型)の各種死菌体の作製：

加熱死菌体；既述の方法にて培養後、遠心沈澱により菌体を回収し、生理食塩水で2度洗浄した後生理食塩水10 mlに懸濁し、吸光度計(HITACHI MODEL 100-10)にて菌液の濃度をA₅₄₀=0.1(7.5×10⁷CFUに相当)に基づき5×10⁹/mlに調整したのち60℃30分の加熱処理により死菌液とし、遠沈洗浄後10 mlの生理食塩水に再懸濁して標品として用いた。

ホルマリン死菌体；加熱死菌体と同様に菌数を調整後、ホルマリン(最終濃度0.3%)を加え、37℃12時間静置し、続いて4℃2日静置後十分に遠心洗浄しホルマリンを除去したものを標品として用いた。

アセトン死菌体；Landyの方法¹²⁾に準じ、培養菌体を遠心洗浄後生理食塩水に懸濁し、アセトンを75%の割合に添加し、37℃1時間アセトン処理を行った後遠心にて菌体を回収した。同操作を3度繰返した後、100%アセトンを加え37℃12時間処置後、グラスフィルターで濾過し、乾燥機(CHEMY AUTO-DESICCATOR)にて十分に乾燥後約5×10⁹/mlの濃度に生理食塩水で調整したものを標品として用いた。

6. *P. aeruginosa*のlipopolysaccharide(LPS)の抽出：Phenol-Water法¹³⁾にてN-42株よりLPSを抽出。またさらにRNase(最終濃度2 μg/ml, Sigma社製)を加え40℃3時間酵素処理後、Proteinase K(最終濃度100 μg/ml, Sigma社製)を加え37℃2時間処理した後、再度フェノール抽出したものを標品として用いた。LPS量は凍結乾燥後のdry weight量で表示した。

7. Adoptive cell transfer test: non-mucoid型N-42株の加熱死菌体約2.5×10⁹個をC3H/HeNマウスに腹腔内投与し、3日後腹腔浸出細胞をPBS(-)6 mlにてperitoneal lavageをおこない回収した。回収した細胞はPBS(-)にて洗浄後10⁶/mlに調整した後、1 mlを正常マウスの腹腔内に移入し、8日後に*L. monocytogenes* EGD株5×10⁵CFU(100 LD₅₀)で腹腔内攻撃した。抵抗性の移入の成否は感染後14日目の生存率で判定した。コントロールとして10%プロテオース・ペプトン2 mlを腹腔内投与して誘導した腹腔浸出細胞を移入したマウスを用いた。

8. 腹腔浸出細胞のルミノール依存性化学発光(CL)の測定：non-mucoid型N-42株の加熱死菌体約10⁹個をICRマウスの腹腔内に投与し、3日後前述の方法にて

腹腔浸出細胞を回収し、培養液にて 5×10^6 /ml の濃度に調整して用いた。腹腔浸出細胞浮遊液 $400 \mu\text{l}$ をキュベットにとり、 37°C 5 分間前加温後、ルミノール液(ペーリンガー社製) $2 \times 10^{-9}\text{M}$ を $30 \mu\text{l}$ 添加し、次にオプソニン化ザイモザン(Sigma Chemical 社製ザイモザンを健常人新鮮血清にてオプソニン化) $170 \mu\text{l}$ を加えよく混和した後直ちにルミフォトメーター TD 4000(ラボサイエンス社製)にて peak 値を測定した。コントロールとして 10% プロテオース・ペプトン 2 ml を腹腔内投与して誘導した腹腔浸出細胞を用いた。

9. *P. aeruginosa* の加熱死菌体によって誘導された腹腔マクロファージの培養上清の作製: C3H/HeN マウスに non-mucoid 型 N-42 型株の加熱死菌体約 10^8 個を腹腔内投与し 3 日後回収した腹腔浸出細胞、10% プロテオース・ペプトン 2 ml を投与して誘導した細胞、*L. monocytogenes* EGD 株 5×10^6 CFU で免疫後 30 日目にプロテオース・ペプトンを投与して誘導した細胞をそれぞれ前述の方法にて回収し、 4×10^6 /ml の濃度で培養液に浮遊させた。24 穴平底カルチャープレートに細胞浮遊液を $500 \mu\text{l}$ づつ加え、 37°C 5% CO_2 インキュベーター内で 2 時間プレート底面に接着させた後、培養液を交換し非附着細胞を除去した。これに EGD 株の加熱死菌体を約 2×10^8 個/ml に調整した培養 $500 \mu\text{l}$ を加え、 CO_2 インキュベーター内で 48 時間培養し、その上清から遠心により菌体を除去した後、membrane filtration したものをリステリア刺激マクロファージの培養上清として用いた。

10. Tumor necrosis factor(TNF)の測定: 96 穴マイクロプレートに L 929(マウス線維芽細胞)を $100 \mu\text{l}$ (2×10^4 /well)分注し、9. で得たサンプルを $100 \mu\text{l}$ づつ添加し、48 時間後の生存 L 929 細胞数を Cell Titer 96™ Non radioactive Cell Proliferation/Cytotoxicity Assay System(生化学工業)を用いて測定した。

11. 抗体の作製: 抗 TNF- α 抗体はマウスリコンビナント TNF- α (Genzyme 社製)を等量の Hunter's Titer Max adjuvant に混じて家兎の背部皮下に数カ所接種し、3 週間後に追加免疫し、最終免疫から 12 日目に全採血を行い、硫酸分析法にて γ -グロブリン標品を得た。 γ -グロブリン量は Protein assay kit(Bio Rad 社製)を用いて測定した。

12. 血清中の Interferon- γ (IFN- γ)、TNF- α および Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)の測定: non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体約 5×10^8 個を C3H/HeN マウスの背側皮下に接種し、3 日後 *L. monocytogenes* EGD 株 10^6 CFU 量で腹腔内攻撃し、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間、24 時

間、48 時間、72 時間後に腹部大動脈より採血し、分離した血清を用いて、Inter Test- γ ™ Mouse INF- γ kit (Genzyme 社製)、Factor-Test Mouse TNF- α kit (Genzyme 社製)および Murine GM-CSF Elisa kit (Endogen 社製)により IFN- γ 、TNF- α および GM-CSF 量を測定した。

結 果

1. *P. aeruginosa* 局所感染の *L. monocytogenes* に対する感染防御に及ぼす影響

P. aeruginosa YM 株および N-42 株の 5×10^7 CFU 量を ICR マウスの背側皮下に感染させると、3 日後には著明な膿瘍を形成する。*P. aeruginosa* による膿瘍形成マウスにおける *L. monocytogenes* に対する抵抗力を調べたところ、*P. aeruginosa* による前処置で *L. monocytogenes* に対するマウスの抵抗力の増強が認められた。特に non-mucoid 型で約 90% のマウスが、mucoid 型でも 50% 以上のマウスが生存した(Fig. 1)。なお、*P. aeruginosa* 感染後 24, 48, 72 時間後に血液培養を行ったところ血中からの *P. aeruginosa* の回収は認められなかった。

2. 脾臓内菌数の推移

P. aeruginosa 2 株のうち *L. monocytogenes* に対して著しい抵抗力を付与した non-mucoid 型 N-42 株で上述と同様の前処置を ICR マウスに行い、3 日後 *L. monocytogenes* EGD 株 10^6 CFU 量で腹腔内攻撃し、24, 48, 72 時間、6 日後の脾臓内菌数の推移を調べたところ、*P. aeruginosa* 前処置群と生理食塩水で前処置を行ったコントロール群とでは 24 時間後の時点ですでに脾臓内菌数は約 $1.5 \log_{10}$ CFU の差があり、前処置群では 3-6 日目の間に急速に菌が消失するのが認められた(Fig. 2)。

3. *L. monocytogenes* に対する再感染抵抗力の獲得 non-mucoid 型 N-42 株前処置マウスに *L. monocytogenes* EGD 株 10^6 CFU 量で腹腔内攻撃し、14 日生存後に EGD 株 5×10^6 CFU (500LD_{50}) 量で再び腹腔内攻撃して再感染抵抗力成立の有無を見たところ、*P. aeruginosa* 前処置により初感染を生き延びたマウスにおいては全てのマウスで 14 日以上生存がみられ、再感染抵抗力の獲得が認められた(Table 1)。

4. *P. aeruginosa* 死菌体の *L. monocytogenes* に対する感染防御に及ぼす作用

non-mucoid 型 N-42 株のホルマリン死菌体、加熱死菌体、アセトン死菌体をそれぞれ約 5×10^8 個 ICR マウスの背側皮下に接種し、3 日後 *L. monocytogenes* EGD

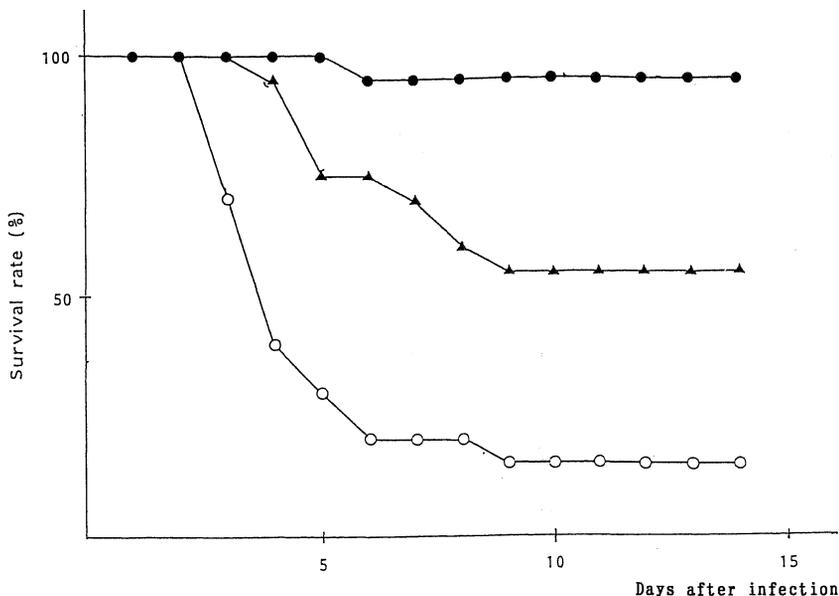


Fig. 1. *P. aeruginosa* (non-mucoid and mucoid type)-induced resistance to a lethal challenge with *L. monocytogenes* EGD. Groups of 7 normal (○), Non-mucoid type *P. aeruginosa*-treated (●) or Mucoid type *P. aeruginosa*-treated (▲) mice received 10^6 EGD intraperitoneally 3 days after treatment. The same experiments were repeated three times and results were expressed as the mean of them.

株 10^6 CFU 量で腹腔内攻撃し、14日後の生存率を調べ、また14日生存マウスに 10^7 CFU (1000 LD₅₀)量で腹腔内再攻撃し、再感染抵抗性の成立の有無を調べたところ、EGD感染後14日目の生存率はそれぞれホルマリン死菌体前処置群では90%、加熱死菌体及びアセトン死菌体前処置群では100%であった。また、14日生存マウスに対する再攻撃でもホルマリン死菌体、加熱死菌体、アセトン死菌体前処置群全てにおいて14日以上生存し、いずれの死菌体を用いた場合でもN-42株の生菌による前処置の場合と同様の *L. monocytogenes* に対する抵抗性の獲得と生存マウスにおける再感染抵抗性の成立が認められた。この結果より、*L. monocytogenes* に対する抵抗性の付与には生菌が産生する外毒素よりも菌体構成成分が関与していると考えられた (Table 2)。

5. C3H/HeJ マウス (LPS low responder) における *P. aeruginosa* の感染防御作用

LPS low responder である C3H/HeJ マウスおよび LPS responder である C3H/HeN マウスに non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体 5×10^8 個で前処置を行い、*L. monocytogenes* EGD 株 10^6 CFU (500 LD₅₀)量或いは 5×10^5 CFU (100 LD₅₀)量で腹腔内攻撃したところ、C3H/HeN マウスではいずれも EGD 株接種後14日目

Table 1. Mouse protection against reinfection with *L. monocytogenes*

Pretreatment	1st infection (day3)	Reinfection (day14)	Survival rate (%) (14 days after reinfection)
A. <i>P. aeruginosa</i> viable cells (5×10^7 sc)	<i>L. monocytogenes</i> (10^8 ip)	<i>L. monocytogenes</i> (5×10^6 ip)	100
B. Saline (sc)	<i>L. monocytogenes</i> (5×10^8 ip)	<i>L. monocytogenes</i> (5×10^6 ip)	100
C. Untreated		<i>L. monocytogenes</i> (5×10^6 ip)	0

The same experiments were repeated 3 times and same results were expressed. Each group consisted of 6 mice.

まではすべて生存したが、C3H/HeJ マウスでは 5×10^5 CFU 量接種群で20%生存したのみで、 10^6 CFU 量接種群は感染後3-7日の間に全てのマウスが死亡した。このことより抵抗性の誘導には菌体構成成分中のLPSが強く関与することが想像された (Table 3)。

6. *P. aeruginosa* N-42 株由来 LPS の *L. monocytogenes* に対する感染防御に及ぼす作用

non-mucoid 型 N-42 株より Phenol-Water 抽出法にて得たLPSを用いてICRマウスを前処置し、*L.*

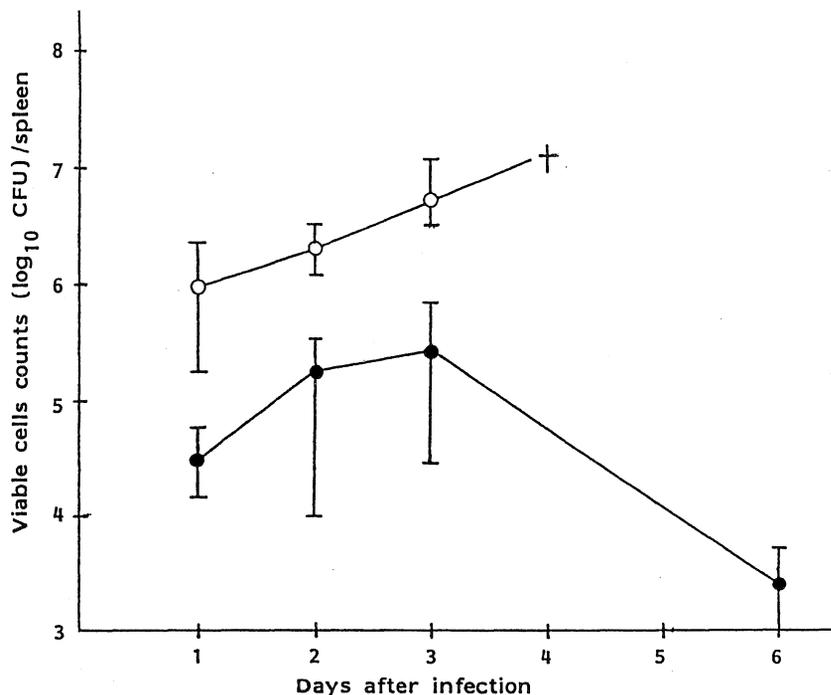


Fig. 2. Growth of *L. monocytogenes* EGD in spleen of *P. aeruginosa* (non-mucoid type)-treated mice after an ip inoculation with 10^6 organisms. The bars indicate the range of counts.

○ : Control (normal mice)

● : *P. aeruginosa* (non-mucoid type)-treated mice

Table 2. Protective activity of various killed-*P. aeruginosa* preparations to a lethal challenge with *L. monocytogenes*

Type of <i>P. aeruginosa</i> treated with :	Survival rate (%) (14 days after primary infection of <i>L. monocytogenes</i>)	Survival rate (%) (14 days after reinfection)
A. Formalin-killed <i>P. aeruginosa</i> (5×10^8)	90	90
B. Heat-killed <i>P. aeruginosa</i> (5×10^8)	100	100
C. Acetone-killed <i>P. aeruginosa</i> (5×10^8)	100	80
D. Viable <i>P. aeruginosa</i> (5×10^7)	100	100
E. Saline	0	

Each group consisted of 5 mice.

Primary infection was done with 10^6 CFU of *L. monocytogenes* 3 days after treatment.

Reinfection was done with 10^7 CFU of *L. monocytogenes* 14 days after the primary infection.

Table 3. Protection of C3H/HeJ mice against infection with *L. monocytogenes*

Groups of mice treated with :	Challenge dose of <i>L. monocytogenes</i>	Survival rate (%) at 14 days postinfection
Heat-killed <i>p. aeruginosa</i> (5×10^8 ip)	10^6 ip	0
	5×10^6 ip	20
Saline (Negative control)	10^6 ip	0

monocytogenes に対する抵抗性が付与されるかどうか検討したところ、加熱死菌体を用いた場合と同様の抵抗性の獲得を認めた。RNase および Proteinase K で処理した後に Phenol-Water 法により再抽出して得た LPS を標品として用いても LPS $100 \mu\text{g}$ 接種群で 100% の生存率を、LPS $20 \mu\text{g}$ 接種群は 40% の生存率を認めた (Table 4).

7. *P. aeruginosa* (加熱死菌体) の *S. typhimurium* LT-2 株に対する感染防御効果

L. monocytogenes の様な典型的な細胞内寄生菌では

なく、細胞外増殖菌との中間に位置していると言われて
いる *S. typhimurium* を用いて non-mucoid 型 N-42 株
の加熱死菌体による前処置の効果が見られるかを検討し
た (Fig. 3)。前処置 3 日後の ICR マウスに LT-2 株 10^5
CFU ($100 LD_{50}$) 量で腹腔内攻撃した場合、20% の生存し
か認められず、さらに C3H/HeN マウスを加熱死菌体で
前処置したときには、LT-2 株 10^4 CFU ($20 LD_{50}$) 量に対
して、わずかに延命効果が見られるのみで有意の抵抗力
の獲得は認められなかった。

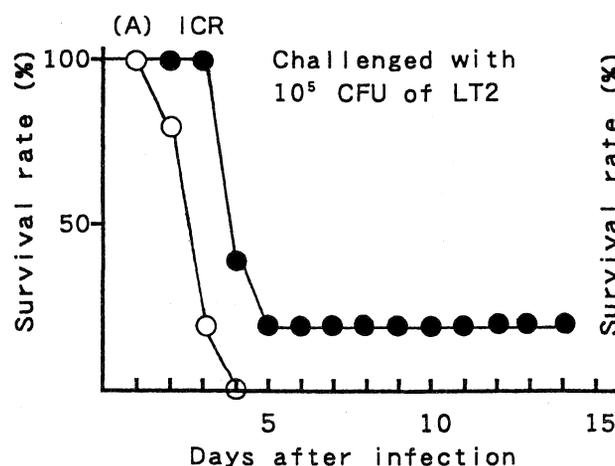
8. Adoptive cell transfer による抵抗力の伝達

non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体で誘導した腹腔
浸出細胞を移入した群では *L. monocytogenes* EGD 株感
染後 14 日目の生存率は 85.0% であり、EGD 株に対する
抵抗力が伝達された (Table 5)。プロテオース・ペプトン
で誘導した腹腔浸出細胞を移入した群では 22.6% の生
存を認めた。なお、non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体

Table 4. Effect of *P. aeruginosa*-LPS on resistance in ICR mice to a lethal challenge with *L. monocytogenes*

Groups of mice	Survival rate (%) at 12 days postinfection
A. LPS (100 μ g)	100
B. LPS (20 μ g)	40
C. Saline	0

Mice were challenged ip with 10^6 CFU of *L. monocytogenes* EGD 3 days after treatment with *P. aeruginosa*-LPS.



で誘導した腹腔浸出細胞を抗マクロファージ抗体および
補体で処理した後にトリパンブルーで染色し、マクロフ
ァージの比率を算定したところ、その純度は約 75% であ
った。

9. CL による活性酸素産生能の測定

non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体を用いて誘導し
た腹腔浸出細胞のルミノール依存性化学発光による活性
酸素の産生量は、プロテオース・ペプトンで誘導した腹
腔浸出細胞のそれに比べ約 7 倍の peak 値を示し、活性
酸素が著明に産生されているのが認められた (Table 6)。

10. *P. aeruginosa* の加熱死菌体誘導腹腔浸出細胞の TNF- α 産生能

non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体で誘導した腹腔

Table 5. Adoptive protection by peritoneal cells

Cells transferred	Survival rate (%) at 14 days postinfection
<i>P. aeruginosa</i> (Heat-killed cells)-induced PEC	85.0 \pm 13.2
Proteose peptone-induced PEC	22.6 \pm 17.6
None	0 \pm 0.0

The same experiments were repeated 3 times and results were expressed as the mean \pm SD of them. Donors were given 2.5×10^9 of heat-killed cells intraperitoneally 3 days before passive cell transfer. Recipients were infected with *L. monocytogenes* EGD (5×10^6 CFU) intraperitoneally after passive cell transfer.

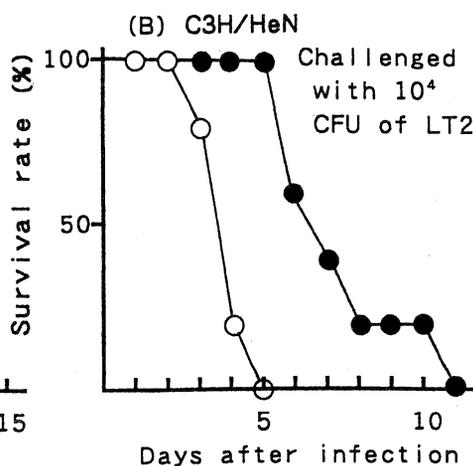


Fig. 3. *P. aeruginosa* (Heat-killed cell)-induced resistance to a lethal challenge with *S. typhimurium* LT2. Groups of normal (○) or *P. aeruginosa*-pretreated (●) mice were challenged with *S. typhimurium* LT2 3 days later.

Table 6. Chemiluminescence of *P. aeruginosa*-induced mouse peritoneal cells

Cells from mice treated with :	Peak response (mean rlu±SD)
Heat-killed cells	111.00±10.76
Proteose peptone	14.34± 5.80

※ Mice were given 0.2 ml (10^9) of heat-killed cells or proteose peptone intraperitoneally 72 hr earlier.

Results were expressed as the mean±SD for three separate experiments.

浸出細胞をEGD株で刺激した培養上清中には *L. monocytogenes* 免疫マウスの腹腔浸出細胞と同レベルの TNF- α の産生が認められた (Table 7).

11. 抗 IFN- γ 抗体および抗 TNF- α 抗体の *P. aeruginosa* N-42 株 (加熱死菌体) 前処置効果に対する作用

リステリア感染症においては、内因性 IFN- γ および TNF- α の作用が重要であるとされており¹⁴⁾、抗 IFN- γ 、抗 TNF- α 抗体を投与することによって *P. aeruginosa* 加熱死菌体前処置により誘導される抗リステリア活性が消失するかどうか検討を行った。

non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体を皮下接種した C3H/HeN マウスの腹腔内に感染 4 時間前に抗 IFN- γ モノクローナル抗体 (Genzyme 社製) 500 μ g および抗 TNF- α 抗体 1000 μ g および 500 μ g を投与し、*L. monocytogenes* EGD 株 10^6 CFU 量で腹腔内攻撃後の、生存率を調べた。抗 IFN- γ 抗体投与マウスは 14 日目までに 80% が、抗 TNF- α 抗体投与マウスは全て死亡し、死菌体により誘導される抗リステリア活性は消失した。尚、正常家兔の γ -グロブリン標品を同量投与した場合には、N-42 株による前処置効果の消失は見られなかった (Table 8)。

12. *P. aeruginosa* 前処置マウスにおける感染後の血中 IFN- γ 、TNF- α および GM-CSF 量の測定

non-mucoid 型 N-42 株の加熱死菌体前処置群と未処置群の間に感染 48 時間までは IFN- γ の産生量に有意な差は見られなかったが、72 時間の時点では前処置群は未処置群に比べて産生の亢進がみられた。また、GM-CSF は加熱死菌体前処置群では感染 2 時間の時点で有意の産生がみられた。一方、TNF- α は加熱死菌体前処置群と未処置群との間には 48 時間までは有意な差はなかったが、72 時間以降に未処置群血清中に急激な増加が認められた (Fig 4)。

Table 7. TNF- α production in culture supernatant fluids of peritoneal cells after stimulation with heat-killed *L. monocytogenes*

Treatment of mice	TNF- α activity (ng/ml)
<i>P. aeruginosa</i> (Heat-killed cell)	119
Proteose peptone	69
Proteose peptone induced PEC after immunization with <i>L. monocytogenes</i>	128
Negative control (Medium)	Undetectable

PEC were stimulated with heat-killed *L. monocytogenes* for 48hr.

TNF- α activity were measured by the bioassay. Each assay was done in triplicate.

Table 8. Effect of anti-IFN- γ and anti-TNF- α antibody on mouse protection to *L. monocytogenes* by heat-killed *P. aeruginosa*

Pretreated with :	Survival rate (%) at 14 days postinfection
Anti-IFN- γ Ab (500 μ g/mouse)	20
Anti-TNF- α Ab (500 μ g/mouse)	0
Normal rabbit immunoglobulin (500 μ g/mouse)	100

Mice were pretreated with heat-killed *P. aeruginosa* (5×10^8 s. c) 3 days before the challenge of *L. monocytogenes* (10^6 CFU). Antibody was inoculated ip 4h before Listeria infection.

考 察

P. aeruginosa には生体防御機構の調節作用があることはよく知られている^{5,15)}が、その機序に関しては解明されていない点が多い。この機序解明のために、リステリア感染をモデルとして *P. aeruginosa* の生体防御調節作用を詳細に検討した。

著者は *P. aeruginosa* をマウスの背側皮下に接種して膿瘍を形成させることで、*L. monocytogenes* の腹腔内攻撃に対して抵抗性の増強を認めた。また、グルロン酸とマンヌロン酸のポリマーからなる多糖体の alginate を産生する mucoid 型より alginate を産生しない non-

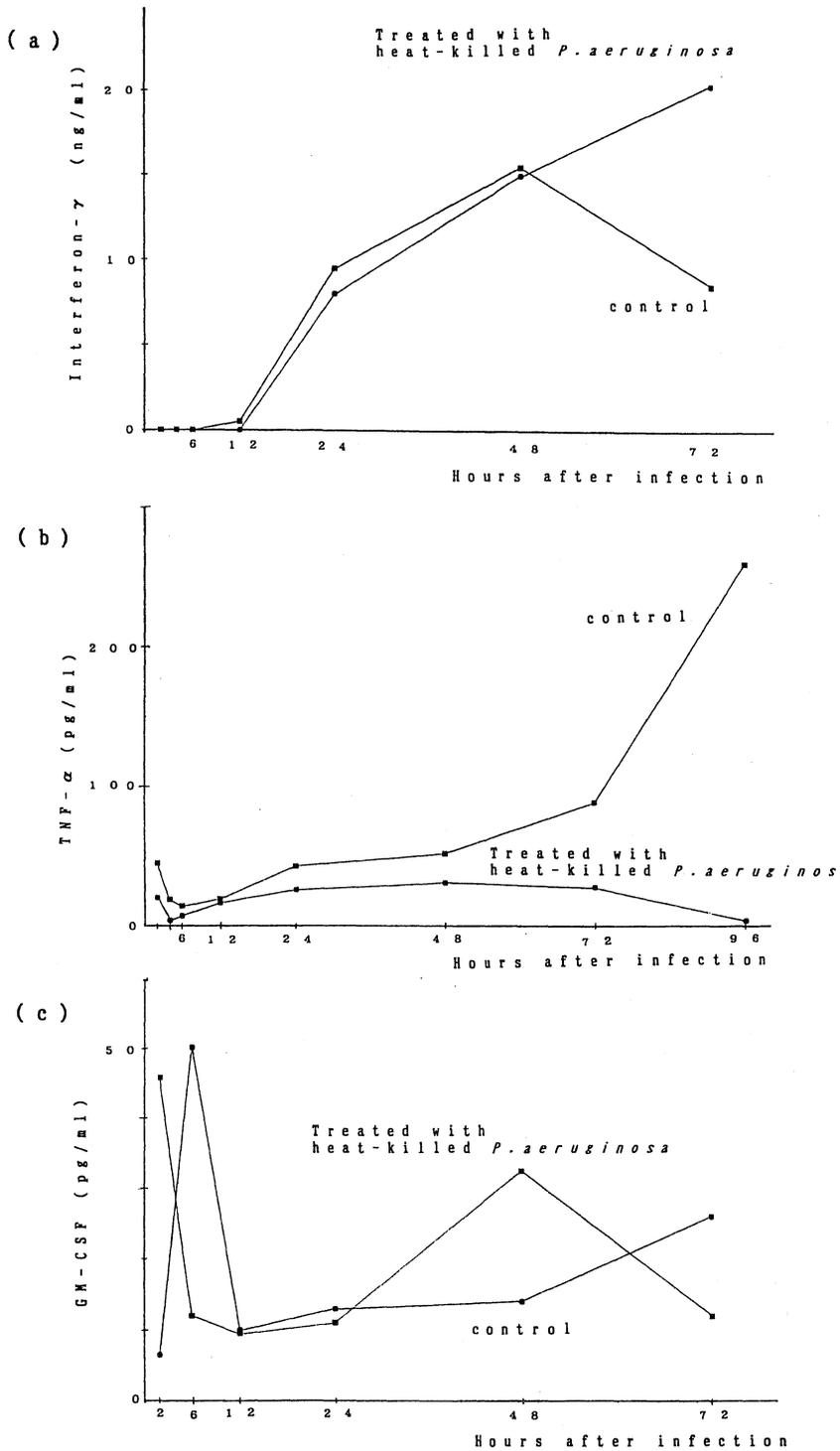


Fig. 4. Quantitation of IFN- γ (a), TNF-(b), GM-CSF(c) in the blood of mice following *L. monocytogenes* infection by ELISA.

mucoid型にその効果は著明であった。更に、初回感染の生存マウスにおいては再感染抵抗性の成立もみられた。

P. aeruginosa は alginate 以外にも exotoxin A, phospholipase C, elastase, catalase 等の種々の病原因子を産生して生体の免疫機構に影響をおよぼすとされている。^{7,8,9,10)}しかし、種々の死菌体でも同様の効果が得られたこと、LPS-low responder の C3H/HeJ マウスを用いた場合このような抵抗性の増強がほとんどみられなかったことより菌体構成成分、特に LPS が関与していることが考えられたため、phenol-water 抽出により精製した LPS を前処置に用いたところ、抵抗性の増強がみられ、LPS が主に作用していると考えられた。また non-mucoid 型に比べて mucoid 型で効果が弱いのは、mucoid 型では alginate の存在により in vivo で LPS の効果が十分に発現し得ないのか、alginate による RES 系抑制作用^{11,16,17)}によるものなのか、いずれかの機構で *P. aeruginosa* の LPS による RES 系細胞の十分な刺激な得られなかったものと推察された。

一方、*L. monocytogenes* に対する生体防御機構としては、感染初期には好中球・マクロファージなどにより非特異的な貪食がおこなわれるが、本菌はこれらの作用に抵抗して宿主細胞内でリソソームと融合以前にファゴゾーム膜を傷害し、細胞質内へ脱出して細胞内殺菌をエスケープして増殖する。中期以降に特異抗原によって刺激された CD4⁺TH1T 細胞が主体となって抗原特異的に産生される IFN- γ によって活性化されたマクロファージによって貪食殺菌される。また免疫成立後には強い遅延型過敏反応と T 細胞依存性の再感染防御免疫が成立するのを特徴としている。本菌による感染には特異抗体が全く無効であるため、このような細胞内寄生菌感染には種々のサイトカインが必要不可欠な役割を果たし、中でも TNF- α 、GM-CSF、INF- γ が重要といわれている^{14,15)}。本実験系においては、感染初期の段階で脾臓内菌数に差を認めることから、LPS により RES 系が活性化され、初期の非特異的貪食殺菌能が亢進している可能性が考えられ、マクロファージの機能およびサイトカイン産生能を中心に検討した。

P. aeruginosa の加熱死菌体で誘導したマクロファージを主体とする腹腔浸出細胞を正常マウスに移入することで *L. monocytogenes* に対する感染抵抗性も伝達されることより、LPS によって活性化される補体を中心とする液性因子の関与よりもマクロファージを Effector cell とする生体防御機構の亢進が主体であると考えられた。

また、*P. aeruginosa* 処置マウス由来マクロファージでは活性酸素産生能の増強や、マクロファージ活性化の主要

な因子となる TNF- α の in vitro での産生の増強が認められ、さらに感染のきわめて初期に GM-CSF の産生も有意に亢進していることなどから、*P. aeruginosa* による前処置により、マクロファージが非特異的に強い活性化を受けていることが推測された。抗 IFN- γ 抗体の投与で *P. aeruginosa* の前処置による *L. monocytogenes* に対する抵抗性が消失したことより IFN- γ は抗リステリア活性を担う effector の一つであると考えられた。*L. monocytogenes* 感染によって誘導される血清中の INF- γ 量には感染初期の段階で *P. aeruginosa* 前処置の有無による有意な差はなく、感染 48 時間から有意の差がみられた事実は LPS 刺激マクロファージの強い抗リステリア活性により感染初期に *L. monocytogenes* の増殖を十分にコントロールし得たことに起因するものと思われる。このことは、*P. aeruginosa* の LPS によって活性化されたマクロファージが、*L. monocytogenes* 感染によって誘導される IFN- γ によって 2 段階の活性化を受け、より強い抗リステリア活性を発現し得る可能性を示唆するものである¹⁹⁾。

このような LPS の効果は *L. monocytogenes* の様な典型的な細胞内寄生菌ではなく、細胞外増殖菌との中間に位置し、その感染防御には液性因子も重要な役割を担っているといわれている *S. typhimurium* に対しては十分に発現せず、延命効果がみられるのみであった。このことは *P. aeruginosa* による前処置効果がマクロファージの強い活性化に基づいていることを示唆するものと思われる。

近年、リステリア抵抗性マウスでは、感染早期に GM-CSF および IFN- γ が産生されるのに対し、非抵抗性マウスでは両サイトカインの産生が低いことが報告されている²⁰⁾。この事実は、*P. aeruginosa* の LPS 処置において、リステリア抵抗性マウスと同様の生体防御機構がマウス体内に誘導されていることを意味するものと思われる。マクロファージの活性化因子として認識されているこれら 2 つのサイトカインの産生能亢進状態は、*P. aeruginosa* が定着した生体にとって或意味では強力な防御体制の確立と考えられる。*P. aeruginosa* の産生する exoenzyme には種々の細胞毒性因子、特にリンパ球抑制因子が含まれることから、これら exoenzyme の産生能を欠如した変異株を得ることによって、*P. aeruginosa* も OK-432 の様な biological response modifier (BRM) への道が開けるものと期待される。また、*S. typhimurium* の LPS、*E. coli* の加熱死菌体で前処置をおこなった場合でも *L. monocytogenes* に対する抵抗性の増強を確認しているが、*P. aeruginosa* の内毒素蛋白な外膜成分中には

他のグラム陰性菌にはみられない強力なインターフェロン誘導能²¹⁾や抗腫瘍活性²²⁾が存在する事が知られており、更にその生体定着能が優れていることから、他のグラム陰性菌に比べ、compromised hostにおいて臨床上極めて有効な BRM 標品になり得る可能性があると思われる。

結 語

P. aeruginosa をマウスの背側皮下に前投与することによって、*L. monocytogenes* に対する感染抵抗性が増強されるという現象をもとに、*P. aeruginosa* の生体防御機構に対する作用を解析した。

1. *L. monocytogenes* に対する抵抗性の増強作用は、*P. aeruginosa* の生菌のみならず、加熱死菌体、ホルマリオン死菌体、アセトン死菌体を前処置に用いた場合でも認められた。

2. LPS-Low responder である C3H/HeJ マウスには *P. aeruginosa* 前処置による *L. monocytogenes* に対する抵抗性の増強は認められなかった。

3. *P. aeruginosa* より phenol-water 抽出した LPS を前処置に用いた場合、同様の抵抗性の獲得を認め、本効果は LPS に由来するものであった。

4. 本効果は *P. aeruginosa* の加熱死菌体で前処置したマウスの腹腔浸出細胞を移入することによって、正常マウスに伝達し得た。

5. *P. aeruginosa* の加熱死菌体を用いて誘導した腹腔浸出細胞は、ルミノール依存性化学発光による活性酸素の著明な亢進を認めた。

6. *P. aeruginosa* の加熱死菌体を用いて誘導した腹腔浸出細胞を *L. monocytogenes* の加熱死菌体で刺激したところ、その培養上清中に著明な TNF- α の産生を認めた。

7. *P. aeruginosa* の前処置効果は、*L. monocytogenes* 感染前に抗 IFN- γ 抗体を投与することにより消失した。

8. *P. aeruginosa* 前処置マウスにおける *L. monocytogenes* 感染後の内因性 IFN- γ 産生量は感染 48 時間後までは未処置群に比べて有意な差は無かったが、72 時間後の時点では有意な差が認められた。

9. 生体側の Effector 因子としては、LPS によって非特異的に活性化されたマクロファージが、*L. monocytogenes* 感染によって誘導される IFN- γ によって 2 段階の活性化を受けることで、強力な抗リステア活性が誘導されているものと考えられた。

稿を終えるにあたり、始終御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました細菌学教室榎葉周三教授、ならびに喜多英

二助教授に深謝を捧げるとともに、細菌学教室の諸兄に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第 45 回日本細菌学会関西支部総会(平成 4 年 10 月)、第 66 回日本細菌学会総会(平成 5 年 3 月)、第 2 回日本細菌学会中部関西合同支部総会(平成 5 年 11 月)に於いて発表した。

文 献

- 1) Stone, H. H., Given, K. S. and Martin, J. D. : Surg. Gynecol. Obstet. 124: 1067-1070, 1967.
- 2) Floersheim, G. L., Hopff, W. H., Gasser, M. and Bucher, K. : Clin. Exp. Immunol. 9: 241-247, 1971.
- 3) Colizzi, V., Garzelli, C., Campa, M. and Falcone, G. : Infect. Immun. 21: 354-359, 1978.
- 4) Issekutz, T. B. and Stoltz, J. M. : Infect. Immun. 48: 832-838, 1985.
- 5) Blackwood, L. L. : Infect. Immun. 47: 840-842, 1985.
- 6) 野本亀久雄 : 日本細菌学雑誌 37(2) : 479-495, 1982.
- 7) Misfeldt, M. L., Legaard, P. K., Howell, S. E., Fornella, M. H. and Legrand, R. D. : Infect. Immun. 58: 978-982, 1990.
- 8) Berk, R. S., Brown, D., Coutinho, I. and Meyers, D. : Infect. Immun. 55: 1728-1730, 1987.
- 9) Ulmer, A. J., Pryjma, J., Tarnok, Z., Ernst, M. and Flad, H. D. : Infect. Immun. 58: 808-815, 1990.
- 10) Bergmann, U., Scheffer, J., Koller, M., Schonfeld, W., Erbs, G., Muller, F. E. and Konig, W. : Infect. Immun. 57: 2187-2195, 1989.
- 11) Oliver, A. M. and Weir, D. M. : J. Clin. Lab. Immunol. 10: 221-224, 1983.
- 12) Landy, M. : Am. J. Hyg. 58: 148-164, 1953.
- 13) Westphal, O. and Luderitz, O. : Angew. Chem. 66: 407-417, 1954.
- 14) Nakane, A., Minagawa, T. and Kato, K. : Infect. Immun. 56: 2563-2569, 1988.
- 15) Blackwood, L. L., Lin, T. and Rowe, J. I. : Infect. Immun. 55: 639-644, 1987.
- 16) Schwarzmann, S. and Boring, J. R. : Infect. Immun. 3: 762-767, 1971.
- 17) Learn, D. B., Brestel, E. P. and Seetharama, S. : Infect. Immun. 55: 1813-1818, 1987.
- 18) Nakane, A., Numata, A. and Mdnagawa, T. :

- Infect. Immun. 60: 523-528, 1992.
- 19) **Adams, D. O. and Hamilton, T. A.** : Ann. Rev. Immunol. 2: 283-318, 1984.
- 20) **Iizawa, Y., Wagner, R. D. and Czuprynski, C. J.** : Infect. Immun. 61: 3739-3744, 1993.
- 21) **阿部千代治, 棚元憲一, 本間 遜, 樽谷和男, 小島保彦** : 第 22 回毒素シンポジウム予稿集. p45, 1975.
- 22) **Hoshi, A., Kanzawa, F., Kuretani, K., Homma, J. and Abe, C.** : Gann 64: 523-525, 1973.