

【第 123 回成医学会総会宿題報告】

## 黄色ブドウ球菌と宿主細胞との関わりについて

関 啓 子

東京慈恵会医科大学微生物学講座第 2

### INTERACTION BETWEEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND HOST CELLS

Keiko SEKI

Department of Microbiology (II), The Jikei University School of Medicine

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is known as the causative agent of purulent inflammation or food poisoning, while it is known as one of the indigenous microorganisms on face or mucosa of nasal cavity. The purpose of present study is to demonstrate the substances involved in the bacterial adherence, and also to consider whether apoptosis of bacteria-infected cell would be important for the host animal or not.

Two clinical isolates of *S. aureus*, OK1 and OK11, and L929 fibroblast were used. In an *in vivo* experiment with mice, OK11 showed higher virulent than OK1. L929 cells ingested more numbers of OK11 than OK1 during the 6-hr incubation. Morphological verifications using inhibitors of actin-polymerization revealed that intracellular F-actin bundle plays an important role on the ingestion of *S. aureus*. Apoptosis was induced into the cells infected with either OK1 or OK11. The tumor-necrosis-factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) content in the medium increased as the incubation time. TNF- $\alpha$  released by the infected cell might play a role as the extrinsic inducer of apoptosis for that cell. Chromatin condensation, one of the morphological criteria of apoptosis, was greatly different between OK1- and OK11-infected cells. Chromatin within a nucleus heavily condensed to form large clumps and the nuclear membrane was not found in an OK1-infected cell, while some smaller condensed clumps of chromatin were beneath the nuclear membrane and many dense spots were observed in the nucleoplasm of an OK11-infected cell. All above events including the ingestion of bacteria were strongly presented in case of OK11.

By these results, the bacterial strain with higher virulence appeared to be ingested by and induce apoptosis to the fibroblast. From the viewpoint of the host defense mechanism, the cells which were invaded by or actively incorporated many bacteria need to be apoptotic to prevent the further expansion of the infectious foci.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 123-35)

Key words: *Staphylococcus aureus*, fibroblast, host defense mechanism, apoptosis, F-actin

#### I. は じ め に

黄色ブドウ球菌は伝染性膿痂疹、蜂巣炎、癰あるいは癰などの化膿性皮膚疾患、骨髓炎、髄膜炎、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS)、トキシックショック症候群 (TSS)、および食中毒など多くの疾患の起因菌として知られている。SSSS、

TSS,あるいは食中毒のように特定の毒素との関係が明確にされているものもあるが、ほとんどの場合において発症のメカニズムは明らかにされていない。これまで筆者らの研究室では黄色ブドウ球菌に関する研究を長年行ってきており、マウスを用いた感染実験で、静脈内接種された黄色ブドウ球菌は腎に長く留まり膿瘍を形成するこ

と<sup>1)-5)</sup>、ごく少量の菌でも腎に膿瘍を形成し得ること<sup>6)</sup>、また、異物とともに菌を接種した場合には感染巣の拡大が促進されること<sup>7)-9)</sup>などを明らかにしている。しかし、細胞への接着に関わる因子や、疾患の増悪因子については未解決の部分が非常に多いというのが現状である。また、アトピー性皮膚炎の患部からは黄色ブドウ球菌がほぼ100%に近い率で分離され<sup>10)-14)</sup>、本菌が患部の増悪化に関わっていることは十分に予測されるが、単独の因子の作用であるか、あるいはいくつかの因子の複合作用であるかはいまだ明らかにされていない。一方、疾患とは関わりなく、30~40%の健常者の鼻腔内には黄色ブドウ球菌が定着し<sup>15)</sup>、除菌を行っても同一人に頻回に定着することが明らかにされており<sup>16)</sup>、この事実は菌の定着し易さに宿主の要因が大きく関わっていることを示唆している。以上のように、感染症の発症には菌が産生する毒素や分解酵素が関与することはもちろんであるが、防御機能も含めた宿主側の因子が大きな影響を及ぼしていると考え、筆者らはこれまで黄色ブドウ球菌の病原因子の解析とともに、宿主との相互作用を明らかにする目的でマウスや培養細胞を用いて検討を重ねてきた。本稿ではこれまでに得られた結果を述べ、今後の展望などについて考えてみたい。

## II. 黄色ブドウ球菌菌株とその性質

おもに使用している黄色ブドウ球菌菌株はOK1およびOK11株で、これは岡山大学皮膚科でアトピー性皮膚炎患部から採取して東京慈恵会医科大学微生物学講座第2に分与され、分離した株である。亜テルル酸カリウムと卵黄を含むスタンブ用培地に採取された検体をマンニット食塩培地上に広げて分離し、得られた孤立コロニーのコアグラージェ産生性<sup>17)</sup>を確認の上、黄色ブドウ球菌菌株とした。病原性をBALB/cマウスの尾静脈内接

種によるLD<sub>50</sub>で評価し、低病原性のOK1と高病原性のOK11を実験の対象とした。両菌株の性状は、Table 1に示す通りである。ウサギ赤血球の溶血反応により $\alpha$ -hemolysin活性の有無を、ラテックスビーズを用いた逆受身凝集反応（デンカ生研製検出キット）により enterotoxin-A, B, C, D および toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) の産生を判定した。PCRの結果から、両菌株とも Panton-Valentine leukocidin (PV-leukocidin)<sup>18)</sup> および exfoliative toxin<sup>19)</sup> の遺伝子は保有せず、 $\gamma$ -hemolysin 遺伝子<sup>18)</sup>を保有することが確認された。いずれの菌株もペニシリン感受性を示し、マウスに対する病原性がOK1で著しく低いことを除き、その他の性質についてはあまり大きな違いは認められなかった。

## III. 線維芽細胞による黄色ブドウ球菌の取り込み

好中球やマクロファージが黄色ブドウ球菌を始めとする多くの細菌を取り込み、細胞内で殺菌処理することは周知の事実であり、これは生体の防御機能のひとつである。好中球などのようなプロフェッショナルな貪食細胞とは別に、細菌を取り込む細胞の存在がいくつか報告されている<sup>20)-25)</sup>。筆者らも培養細胞のいくつかについて黄色ブドウ球菌を取り込むか否かを検討し、腎細胞や線維芽細胞が黄色ブドウ球菌を活発に取り込むことを明らかにした<sup>26)-30)</sup>。これらの細胞を用いた実験では、ブドウ球菌属のうち、ヒトに常在的に存在する表皮ブドウ球菌のような病原性の低い菌種は取り込まれず、概して黄色ブドウ球菌はよく取り込まれた。また、黄色ブドウ球菌の中でも取り込まれ方は菌株に依り、病原性の強い株の方が取り込まれやすい傾向にあった。この、低病原性のブドウ球菌が取り込まれないという事実は、マクロファージ<sup>31)</sup>や好中球<sup>32)</sup>においても同様で (Fig.

Table 1. Characterization of two staphylococcal strains, OK1 and OK11

	coagulase type	$\alpha$ -toxin	$\gamma$ -hemolysin	PV-leukocidin	enterotoxin	exfoliative toxin	LD <sub>50</sub> (CFU/head)
OK1	I	+	+	—	D	—	2.7×10 <sup>7</sup>
OK11	V	+	+	—	—	—	4.8×10 <sup>6</sup>

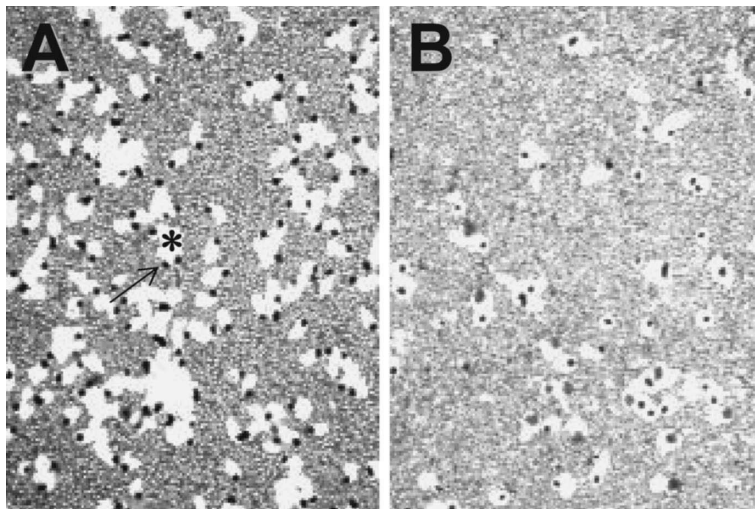


Fig. 1. Phagocytosis of human polymorphonuclear cells. Phagocytosis of polymorphonuclear cell (PMN) was observed using phagocytic plaque method<sup>32)</sup>. After a PMN (a black granule, arrow) ingested a lot of staphylococci, white part (phagocytic plaque, \*) was formed around the PMN. Background is a staphylococcal thin-layer formed on a plastic dish. A, *S. aureus*; B, *S. epidermidis*.

1), 一見矛盾しているようにも思われるが, 細胞内で菌が殺菌処理されない仕組みがあるならば, それは疾患の発症機構と関連するのではないかと考えている。

では, 黄色ブドウ球菌が線維芽細胞に取り込まれるならば, アドヘジンとしての役割を何が果たしているのだろうか? この疑問を解決するために, 生体内物質のうちで細菌が接触する可能性のあるもののひとつとして細胞外マトリックスを想定し, さらにその中のフィブロネクチンに焦点を絞った。進士らがフィブロネクチン結合タンパク (FnBP) について検討したところ, OK1, OK11 のいずれも FnBP を保有することが明白になったが, フィブロネクチンの結合量は OK11 の方が多く, OK11 の菌細胞表面でフィブロネクチンが多量体を形成して結合するのではないかと推測された<sup>31)33)</sup>。マクロファージと同様に L929 細胞は低病原性の OK1 より高病原性の OK11 をはるかに多量に取り込んだ (Table 2)。これは上述の OK11 におけるフィブロネクチン多量体形成に関連すると考えられた。L929 細胞の菌取り込みにフィブロネクチンが大きく関与していることは, 抗体を添加した条件下で菌の取り込みが大きく低下したことから, フィブロネクチンを添加した際には取り込み

Table 2. Ingestion of *Staphylococcus aureus* cells by L929 fibroblasts

OK1 (CFU/well)	OK11 (CFU/well)
$(1.4 \pm 1.9) \times 10^6$	$(6.1 \pm 1.3) \times 10^7$

*S. aureus* and L929 cells were incubated in a 24-well culture plate for 1 h. L929 cells were lysed with sterile water after the removal of the extracellular bacteria with lyso-staphin. Then, bacterial suspension was diluted and plated onto the normal agar plates, and the number of colony was counted on the next day. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Difference between two values is significant ( $p < 0.001$ ).

数が少し増加したことなどから示唆された (Fig. 2-A および D)。フィブロネクチン添加による取り込み数の増加の割合はマクロファージに比べると小さい。これは, L929 細胞が産生したフィブロネクチンが細胞表面上にネットワーク状に分布し (Fig. 3), 菌はここに FnBP を介して結合するため, 添加されたフィブロネクチンの影響を受けないからであろう。菌取り込みへのフィブロネクチンの関与は, FnBP 遺伝子欠損株や本来フィブロ

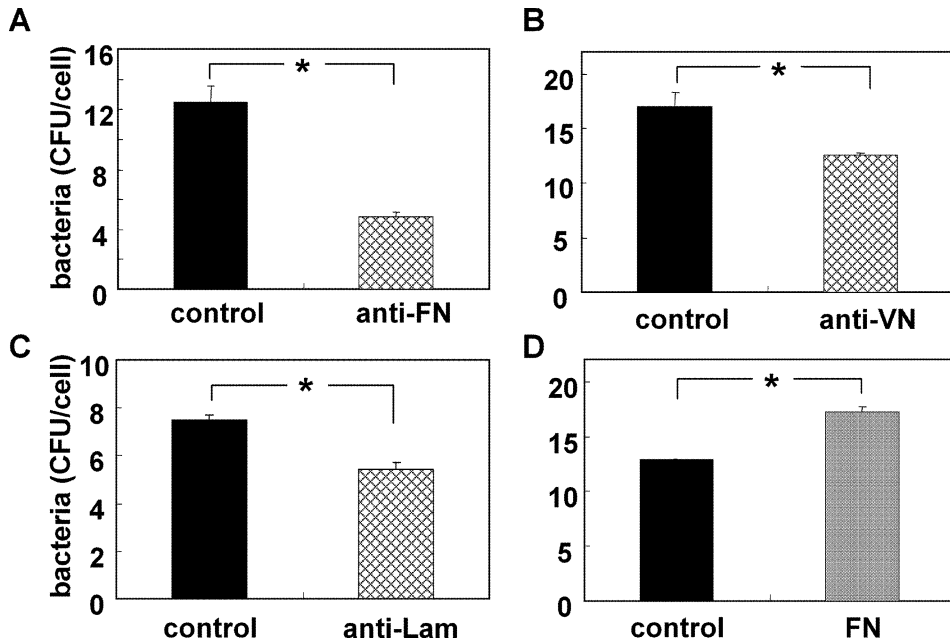


Fig. 2. Effects of extracellular matrices on ingestion of staphylococci. L929 and staphylococcal cells were incubated with (A) anti-fibronectin, (B) anti-vitronectin, (C) anti-laminin, and (D) fibronectin, respectively, at 37°C for 1 h. 'Control' in each graph is the result obtained from a reaction mixture without each additive.

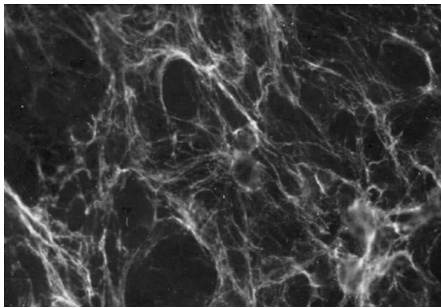


Fig. 3. Fibronectin-network formed on L929 cells. FITC-labeled anti-mouse cellular fibronectin was used.

ネクチンを産生しない血管内皮細胞などを用いた進士の検討でも明らかにされている<sup>32)</sup>。黄色ブドウ球菌においては FnBP のほかにラミニン結合タンパク<sup>34)</sup> やビトロネクチン結合タンパク<sup>35)</sup> の存在も明らかにされているので、抗ラミニン抗体や抗ビトロネクチン抗体を添加した際の取り込みを検討した。この場合にも抗フィブロネクチン抗体添加時ほどではないが、取り込み数の減少が認められており (Fig. 2-B および C)、これらの細

胞外マトリックスも菌の取り込みに関与していると考えられた。

次に、細胞が積極的に菌を取り込んでいるのかどうか、ということについて考えてみたい。黄色ブドウ球菌を取り込ませた L929 細胞を化学固定し、電子顕微鏡で観察した。走査電子顕微鏡法による細胞表面構造観察 (Fig. 4) や凍結切断レプリカ法による細胞膜二次元構造の観察 (Fig. 5) を行ったところ、菌を取り込ませた直後には菌直下の細胞膜が窪み、その後、菌周囲の細胞膜が盛り上がり襞を生じた。これによって菌は細胞内に取り込まれ、ファゴソーム内に菌が観察された。ついで、細胞形態とくに細胞骨格系の構造保存に優れているといわれる急速加圧凍結を行って細胞内の微細構造を詳細に観察したところ (Fig. 6)、菌が細胞膜に接着している直下や、細胞内に取り込まれた菌の周囲には F-アクチンを主体とした細胞骨格と思われる構造物が明瞭に認められた。細胞には細胞質内に三次元的に細胞骨格のネットワークが存在し、細胞の移動、強化、可溶性物質や顆粒状物質の取り込みに際したエンドソームや

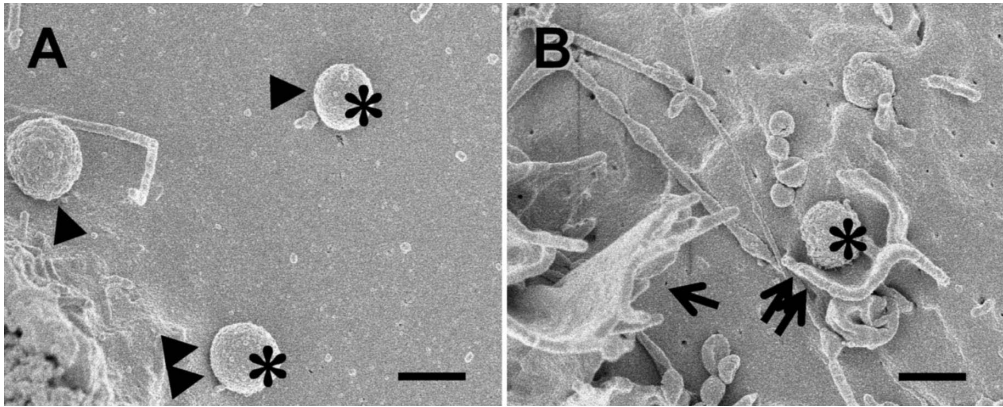


Fig. 4. Scanning electron micrographs of L929 cells. Fibroblasts were fixed (A) 15 and (B) 60 minutes after the infection. In earlier time (A), plasma membrane was dented (arrowheads) by attachment of bacteria (\*). Then, plasma membrane swelled up to form pseudopodia (arrows) around the bacteria (B). Bar=1  $\mu$ m.

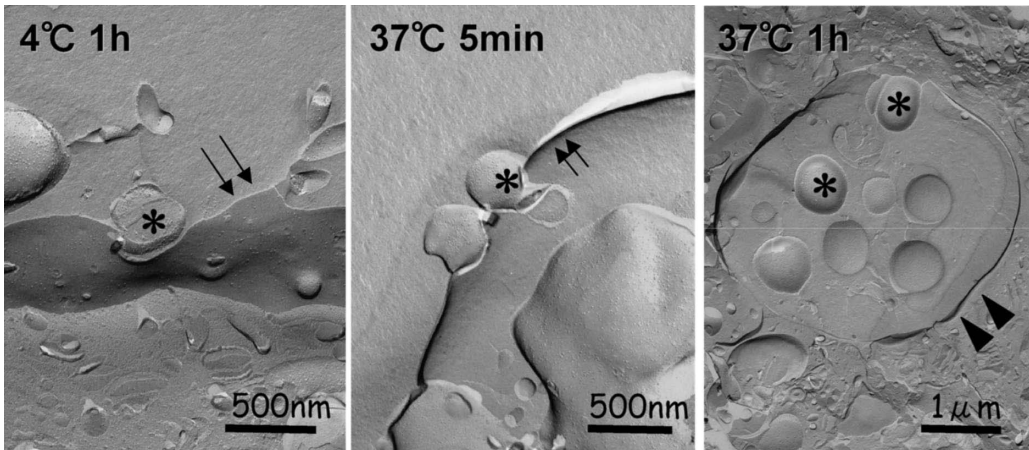


Fig. 5. Freeze fracture replica images. \*, *S. aureus*; ↑, cell membrane; ▲, phagosomal membrane.

ピノソームの形成と移動,あるいは細胞の生合成で生じた物質や分解物が入った小胞の移動,細胞外マトリックスへの付着などの機能を果たしていることが知られている。そのおもな機能構成分子はアクチンやチューブリンであり,さらにそれらのタンパク質に結合するミオシン,カルモデュリン,スペクトリンなどがある。そこで,筆者らはG-アクチンの重合体であるアクチンフィラメント(F-アクチン)に注目して実験を行った。F-アクチンへのG-アクチン重合を阻害するサイトカラシンD(CytD),およびF-アクチンの脱重合剤として知られるラトランキュリンA(LTA)によ

る取り込み阻害を見たところ,いずれの薬剤を用いてもL929細胞による黄色ブドウ球菌の取り込み数が著しく減少し,LTAによる取り込み数は特に低値を示した(Fig.7)。F-アクチンをローダミン標識ファロイジンで染色するとFig.8のような蛍光顕微鏡像が得られた。すなわち,非感染の無処理L929細胞はディッシュによく接着しており,細胞内によく伸展したF-アクチンのストレスファイバーを観察することができたが,CytDあるいはLTA処理により細胞の接着性は失われて形が丸みを帯び,F-アクチンのストレスファイバーは消失してアクチンの小さい塊が細胞質内に

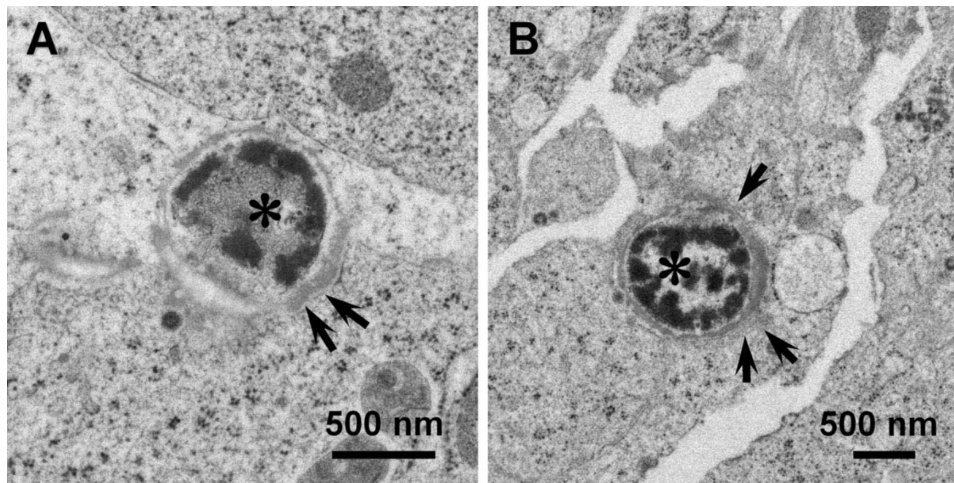


Fig. 6. Transmission electron micrographs of L929 cells. Cells were fixed with high pressure rapid freezing method. Bundles of actin filaments (arrows) are recognized under the cell membrane beneath a bacterium as well as around a bacterium ingested by L929 cell. \*, *S. aureus*.

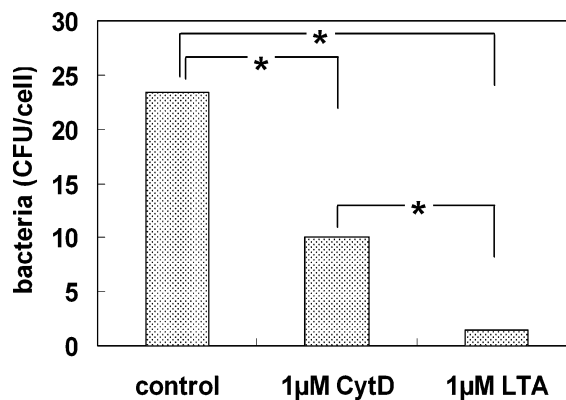


Fig. 7. Effect of F-actin-depolymerizing agents on the ingestion of *S. aureus*. L929 and staphylococcal cells were incubated in the presence of the inhibitor, cytochalasin D (CytD) or latrunculin A (LTA). \*; significant ( $p < 0.0001$ ).

分散していた。また、黄色ブドウ球菌のプロテイン A が免疫グロブリン G (IgG) の Fc 部位と非特異的に結合する性質を利用して、FITC 標識ウサギ IgG とローダミン標識ファロイジンで感染細胞を二重染色すると、F-アクチンの細胞質内伸展も認められるが、非感染細胞とは異なって細胞辺縁に非常に多く集積し、その一端に FITC の緑色蛍光が認められ、F-アクチンに黄色ブドウ球菌が結合していることを示唆させる像が得られた。さらに、GFP 融合アクチン発現ベクター (Clontech) を導入した L929 細胞 (GFP-actin-L929) を作成し、この細胞による、BacLight™

Red bacterial stain (Molecular Probe) 標識黄色ブドウ球菌の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡下で数分間にわたり動画像として記録した。アクチン束が伸びた先に存在していた菌が消失したり、細胞表面上に存在していた菌が短時間のうちに消失したりする様子が観察され、これは菌が細胞内に取り込まれたことを示唆する画像であった。一方、この細胞を LTA で処理した場合にはアクチン束が伸びることも、また、細胞表面の菌が消失することもなかった。以上のことより、L929 細胞は F-アクチンを駆使して非常に活発に菌を取り込むことが明らかとなった。

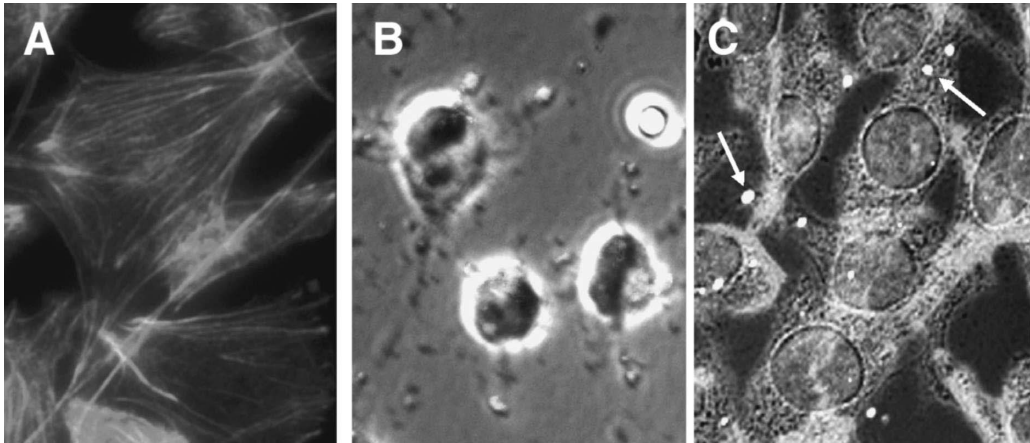


Fig. 8. Actin filaments of L929 cells with or without latrunculin A-treatment. Well-developed stress fibers are recognized within fibroblasts (A). Stress fibers are not recognized in the latrunculin A-treated fibroblasts (B). 'B' is an image using Nomarski optics merged with the fluorescent filter. In the *S. aureus*-infected cells (C), actin fiber-assemblages are near the rim of the cell, and the ingested bacteria (arrows) are at the end of the fiber.

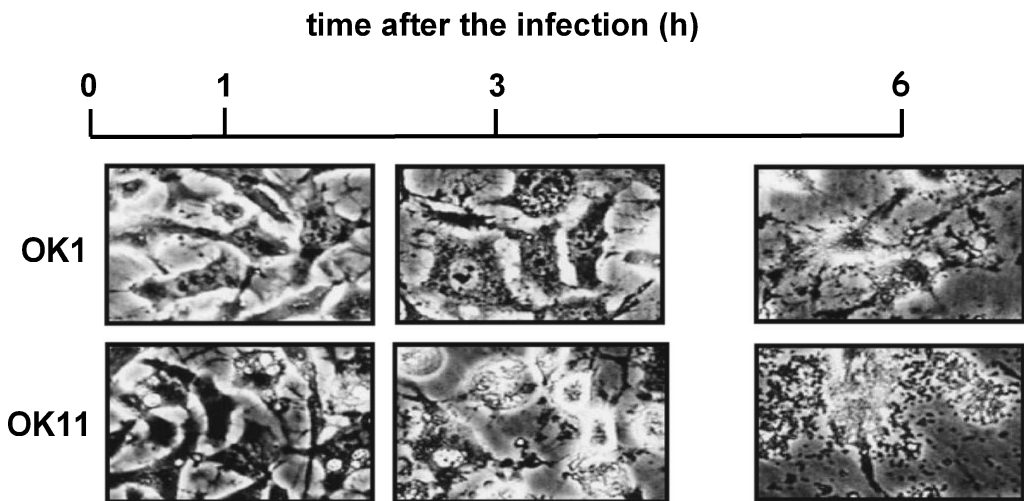


Fig. 9. Alteration of the cell shape after bacterial infection.

#### IV. 菌を取り込んだ線維芽細胞における アポトーシスの誘導

L929 細胞に菌を感染させると 3 時間後には細胞がディッシュから徐々に剥がれ始め、ディッシュへの接着をかりうじて保持している細胞も次第に丸みを帯び、6 時間後には接着している細胞はわずかになった (Fig. 9)。そこで、ディッシュに残った細胞と剥がれて浮き上がった細胞についてアポトーシスのひとつの指標となる Terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色を行ったところ、感染 3 時間後で、剥がれた細胞の 90% は TUNEL 陽性であり、接着して残っている細胞も約半数は陽性であった。接着して残った細胞について透過型電子顕微鏡による観察を行うと、OK1 感染細胞と OK11 感染細胞とでは核の様相が明らかに異なっていた (Fig. 10)。大半の OK1 感染細胞は傷害を受けていなかったが、アポトーシスを起こしているものもあった。そのような細

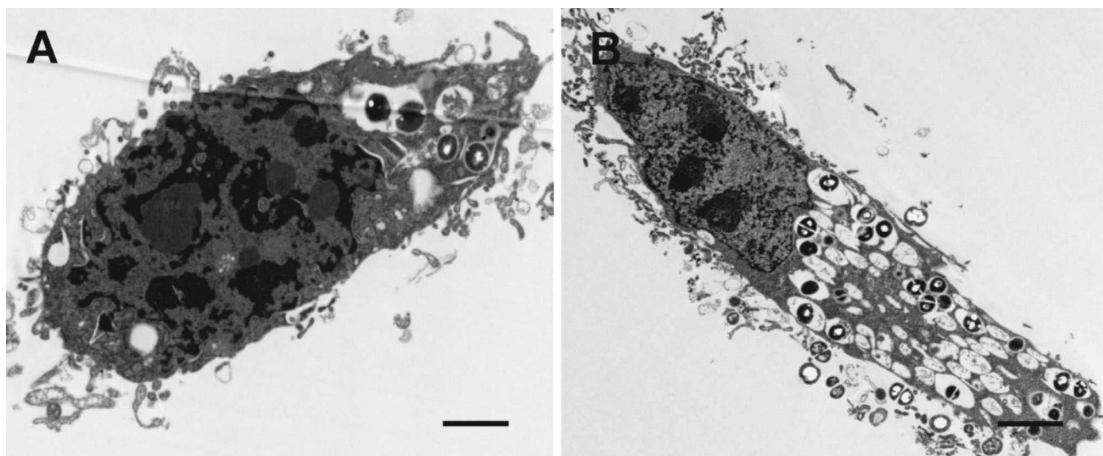


Fig. 10. Transmission electron micrographs of *S. aureus*-infected L929 cells. A, OK1-infected cell; B, OK11-infected cell. Bar=2  $\mu$ m.

胞では核膜が消失し、核はクロマチンが強く凝縮していくつかの断片を形成しており、細胞質中のミトコンドリアなどの構造が比較的良好に保存されていた。一方、OK11感染細胞では傷害を受けたものが多く認められた。それらの細胞ではあまり大きくないクロマチン凝集塊が核質内や核膜に沿った核の周縁部に存在していた。また、細胞質には空胞が多く、細胞内小器官は膨潤していたり破壊されていたりした。これらの像から、OK1感染では典型的なアポトーシスが誘導され、OK11感染ではアポトーシスも誘導されるがネクローシスにいたる細胞がかなり多いと考えられた。

阻害ペプチドを用いた検討においてはカスパーゼ8およびカスパーゼ3の活性阻害ペプチド (40  $\mu$ M IETD および 40  $\mu$ M DEVD) の添加によりアポトーシスが阻止されたので、デスレセプターを介し、これらのプロテアーゼを経てアポトーシスが誘導される可能性が考えられた。一方、カスパーゼ9の阻害ペプチド (40  $\mu$ M LEHD) ではアポトーシスが阻害されなかったため、細胞内に取り込まれた菌産生物のミトコンドリア傷害によるアポトーシス誘導の可能性は低いのではないかと考えた。OK11感染後3時間から6時間にかけて細胞からのTNF- $\alpha$  およびIL-6放出が増加し、これは感染細胞の破壊と関連しているのではないかと考えられた。また、IL-1 $\beta$ はOK1感染により多く放出され、IL-8は逆に時間経過とともに減少した。さらに、培地中にTNF- $\alpha$ の中和抗体を添加

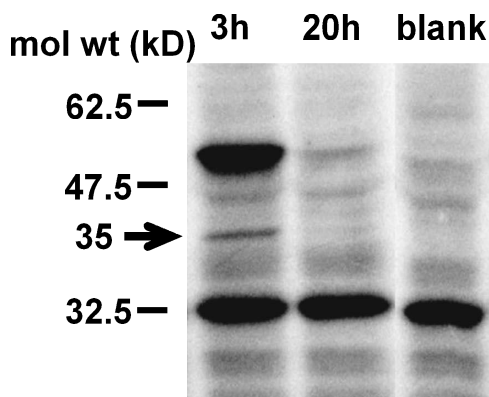


Fig. 11. Western blot analysis of caspase 3 in OK11-infected L929 cells. Caspase 3 with the molecular weight of 35 kD was obviously detected only when 3 h-cultured bacteria were used.

しておくともアポトーシスが誘導されにくくなるということからも、L929細胞のアポトーシスは細胞内からよりも細胞から放出されたTNF- $\alpha$ により誘導されるのではないかと考えている。

一方、細胞内に取り込まれた菌がアポトーシス誘導に全く関与しないかどうかを調べるために、培養時間の異なる菌、すなわち代謝活性の異なる菌を用いて検討した。Fig. 11は3時間培養OK11あるいは20時間培養OK11を感染させ、細胞質中のカスパーゼ3をウェスタンブロットで検出したものである。早期対数増殖期(3時間培養)の菌を感染させるとカスパーゼ3が誘導されるのに対



し、静止期（20 時間培養）の菌を感染させても誘導されなかった。取り込みも OK1, OK11 とともに 3 時間培養菌の方が多かった。いずれにしても、代謝活性の盛んな時期の菌を取り込んだ場合にアポトーシス誘導が著しいことから、細胞内に存在する菌の代謝産物もアポトーシスに何らかの形で関与しているであろうと考えられた。

#### V. 黄色ブドウ球菌を取り込んだ好中球におけるアポトーシス誘導

健康成人の好中球をデキストランと Ficoll-Paque を用いて分離し、菌の取り込みとアポトーシス誘導との関連を検討した。好中球も OK1 より OK11 を多く取り込んだが、線維芽細胞とは異なり、対数増殖期の菌よりも静止期の菌を多く取り込んだ (Fig. 12)。静止期の菌を取り込んだ好中球では細胞内菌数が多いにもかかわらず分葉核の形状が比較的良好に保たれていたが、対数増殖期の菌を取り込んだ好中球では核は丸くなるかあるいは核が消失しており、細胞の傷害が著しいと考えられた (Fig. 13)。この事実は、対数増殖期の菌の代謝が活発であり、代謝産物により細胞の傷害が起きている可能性があることを示唆する。対数増殖期の菌を貪食した好中球では DNA の断片化が生じており (Fig. 14)、アポトーシスを起こして

いることが明確であった。光学顕微鏡による観察で丸く見えた核は、透過電子顕微鏡ではクロマチンの著しい凝縮を伴う断片化した核や電子密度が低く核質の構造が疎になっている核として観察され、アポトーシスが誘導されているものとネクローシスが誘導されているものが混在することがより明確になった (Fig. 15-A および B)。さらに、菌の培養上清を細胞に作用させた場合の形態を検討したところ、静止期よりも対数増殖期の菌培養上清の方がアポトーシスあるいはネクローシス誘導性が強く (Fig. 15-C)、L929 線維芽細胞でもほ

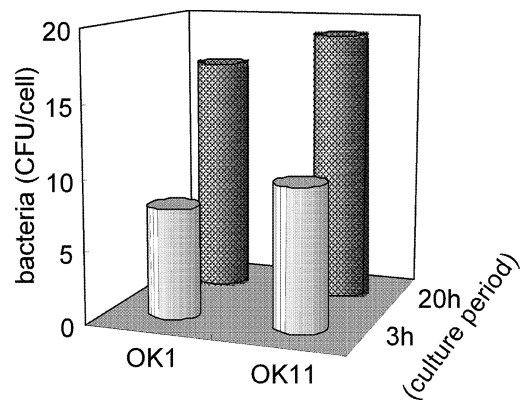


Fig. 12. Phagocytosis of bacteria cultured for different hours by polymorphonuclear cells.

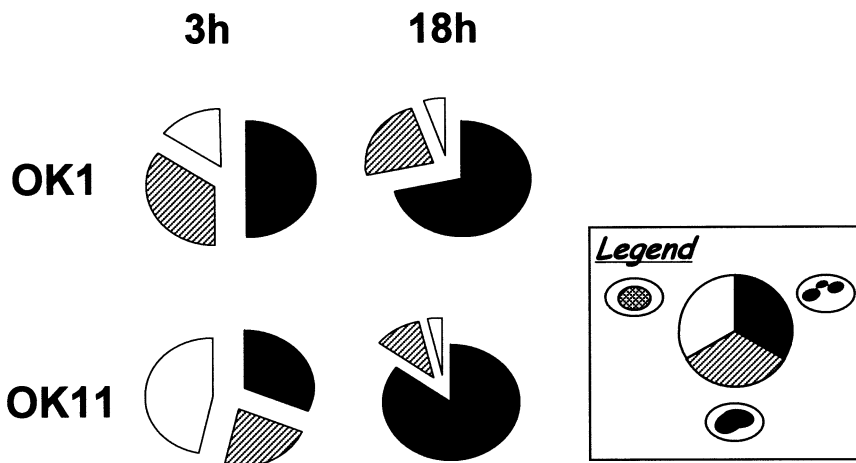


Fig. 13. Variation of nuclear shape in *S. aureus*-ingesting polymorphonuclear cells. PMNs were classified into three groups due to the nuclear shape, and the results were translated in a pie chart. As illustrated in the legend box, the ratio of the cell with normal nucleus is shown as dark area, the cell with condensed chromatin as hatched area, and the cell with nucleus damaged and dyed in pale blue or pink with Giemsa's solution as white area.

ば同様の結果が得られた。サイトカインの放出については、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8 のいずれも対数増殖期の菌より静止期の菌で放出される量が多く、特に OK11 では多いことが認められた。菌培養上清中の一定菌数当たりの白血球傷害活性と赤血球溶血活性はいずれも培養 6~9 時間後に最も高くなり、これらにより生細胞が減少するため、対数増殖期の菌を用いた場合に放出されるサイトカイン量が少なくなる可能性が考えられた。

## VI. お わ り に

好中球やマクロファージのようなプロフェッショナルな貪食細胞とは異なり、線維芽細胞ある

いは内皮細胞が取り込んだ菌を殺菌するかどうかということについては明確な解答が得られてない。線維芽細胞により取り込まれた細菌は殺菌されるよりもむしろ増殖しているのではないかと考えられるような報告もある<sup>36)37)</sup>。それでは線維芽細胞が高病原性の黄色ブドウ球菌を取り込むことは疾患の増悪に繋がるのであろうか、あるいは生体防御に繋がるのであろうか？ いずれも可能性があると考えられる。細菌を取り込んだ細胞からアポトーシス小体が生じた際にマクロファージなどの処理細胞が捕食すれば殺菌されてしまい、この場合は感染細胞が感染巣の拡大に対する一種のバリアーとなろう。一方、細胞がネクローシスを起こすと細胞の崩壊とともに細菌は細胞外に出るが、そのような細菌には宿主細胞の細胞質の一部が付着している。この付着物は細菌にとって保護膜のような役割を果たし、菌が好中球などに貪食されにくくなるばかりでなく血中の抗菌物質に対しても抵抗できる状況をつくり、分裂・増殖して感染巣を拡大できる、と推測される。また、クロマチン凝縮と核の断片化が生じていながら細胞質は膨潤して菌が飛び出しかけている、といったアポトーシスとネクローシスの中間型のような感染線維芽細胞の電子顕微鏡像も得ているが、これも菌が増殖できる状況であると思われる。この中間型はタイプ 2 アポトーシスと呼ばれ、EB ウィルスで B リンパ球に誘導されるもの<sup>38)</sup> やアンチマ

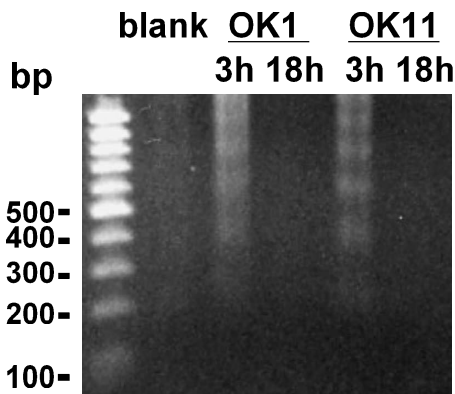


Fig. 14. DNA ladderling of *S. aureus*-ingesting polymorphonuclear cells.

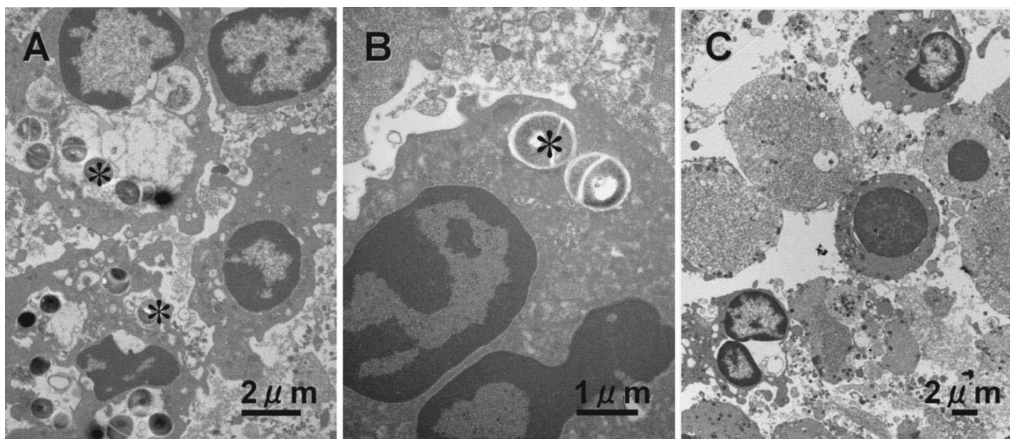


Fig. 15. Transmission electron micrographs of polymorphonuclear cells. PMNs phagocytosed lots of OK11 in a logarithmic phase (A and B). Condensed chromatin are recognized. On the other hand, PMNs were incubated in culture supernatant of OK11 (C). \*, *S. aureus*.

イシン A でラット線維芽細胞に誘導されるもの<sup>39)</sup>などが報告されている。また、本稿ではその詳細を述べていないが、生体防御機構の一員である好中球が感染巣の拡大に寄与している可能性のある *in vivo* の実験結果をこれまでに得ている。そのひとつは、好中球がその殺菌能を超えるほどの菌を食菌した場合である<sup>2)</sup>。加熱死菌の前投与によりマウスの好中球貪食能が亢進したため、あとから接種した生菌を多量に貪食できるが殺菌することができず、菌は生きたまま好中球により腎に運ばれて定着・増殖し、腎内菌数が加熱死菌非投与マウスよりも高値を示したのであろう、と推測した。もうひとつはリゾスタフィン投与マウスを用いた実験で得られた<sup>5)</sup>。マウスにリゾスタフィンを投与すると好中球に貪食されていない菌は溶菌するが、すでに貪食されていた菌はリゾスタフィンの作用を受けにくく、好中球内で増殖した状態で腎に運ばれ感染巣を形成したのであろう、と推測した。これらの結果は、好中球が黄色ブドウ球菌にとってある種の隠れ家になり得ることを示唆している。

一方、細菌を取り込んだ細胞の産生物質が誘導したアポトーシス細胞をマクロファージなどの貪食細胞が処理する、さらに貪食細胞から種々のサイトカインが放出される、などの一連の応答反応から考えると、アポトーシスが感染阻止に役立っている、ともいえる<sup>40)–42)</sup>。

アポトーシスになるかネクローシスになるか、また、これらのことが生体にとって感染防御に繋がるのか病巣拡大に繋がるのかは、菌種や菌数、あるいは細胞の種類によって異なることが明らかである。細胞内で生ずる実に微妙なアンバランスに伴って代謝経路がわずかに変化し、その先行きが決定されると考えられる。ここに影響を及ぼしているものは、冒頭でも述べたように、菌が産生する多くの毒素や種々の酵素であり、また、宿主細胞が保有する食菌作用や抗菌物質の産生性、常在細菌叢を構成する細菌などである。毒素や酵素が細胞や組織に作用すると感染症へと発展するが、食菌作用、抗菌物質、および常在細菌は感染防御に大きな影響を及ぼしている。感染症に罹患しない、感染症に罹患して回復する、あるいは重篤になる、というさまざまな過程における重要な因子

を詳細に解析することができれば、疾患の予防あるいは治療を確実にできるのではないかと考えている。

本宿題報告の機会を与えてくださいました、成医学会長の栗原敏学長ならびに運営委員の諸先生、座長の労をおとり下さいました微生物学講座第2・益田昭吾教授に厚く御礼申し上げます。また、これまでに多大なご助言・ご協力を賜りました進士ひとみ講師をはじめとする講座関係諸氏に深謝いたします。形態学関連の検討に関してはDNA医学研究所分子細胞生物学部門・佐々木博之助教授をはじめ関係諸氏のご指導とご協力を、また、遺伝子組換えに関しては(株)KAN研究所・松井毅主任研究員(現 大阪大学)のご指導をいただきました。ここに御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Hasegawa N, Kondo I, Hoshina S, Kurosaka K. Comparison of virulence and immunity of *Staphylococcus aureus* in mouse kidney. *Jikeikai Med J* 1987; 34: 195-203.
- 2) Seki K, Nishihara S, Ikigai H, Mausda S. Effect of intravenous administration of heat-killed bacterial cells on blood clearance and kidney lodgement property of *Staphylococcus aureus* organisms subsequently injected to mice. *Jikeikai Med J* 1988; 35: 275-84.
- 3) Seki K, Ogasawara M, Sakurada J, Murai M, Masuda S. Altered virulence of a pleiotropic *Staphylococcus aureus* mutant with a low producibility of coagulase and other factors in mice. *Microbiol Immunol* 1989; 33: 981-90.
- 4) 関啓子, 櫻田純次, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 益田昭吾. 黄色ブドウ球菌の腎創傷部位への定着およびその後の増殖に関与する因子の解析. *Bacterial Adherence 研究* 1999; 13: 30-3.
- 5) Seki K, Shinji H, Murai M, Tajima A, Masuda S. Effect of lysostaphin on establishment of staphylococcal infectious foci in mouse kidney. *Jikeikai Med J* 2005; 52: 21-9.
- 6) Kondo I, Masuda S, Kimura K, Kurosaka K, Hasegawa N. Effects of intrarenal inoculation of *Staphylococcus aureus* on mice. *Infect Immun* 1971; 4: 103-9.
- 7) Ishida Y, Seki K. Effects of intrasplenic inoculation of live *Staphylococcus aureus* organisms on resistance of mice against intravenously and intrarenally inoculated *S. aureus* organisms. *Jikeikai Med J* 1992; 39: 21-31.

- 8) Murai M, Seki K, Sakurada J, Usui A, Masuda S. Subcutaneous growth of *Staphylococcus aureus* concomitantly inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. *Microbiol Immunol* 1995; 39: 725-8.
- 9) Murai M, Kobayashi Y, Shinji H, Sakurada J, Seki K. Role of leukocytes in intratumoral growth of a small inoculum of *Staphylococcus aureus*: special reference to staphylocidal activity of neutrophils in an Ehrlich ascites tumor cell preparation. *Jikeikai Med J* 1999; 46: 95-108.
- 10) 秋山尚範, 多田譲治, 鳥越利加子, 戸井洋一郎, 神崎寛子, 荒田次郎. アトピー性皮膚炎の皮膚病変部における *Staphylococcus aureus* の定量的検討. *日皮会誌* 1994; 104: 1249-57.
- 11) 関啓子, 益田昭吾. アトピー由来黄色ブドウ球菌の病原性に関する検討: 特に Cowan I 株との比較による. *臨床と微生物* 1996; 23: 371.
- 12) Terada M, Tsutsui H, Imai Y, Yasuda K, Mizutani H, Yamanishi K, et al. Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8816-21.
- 13) Cardona ID, Cho SH, Leung DY. Role of bacterial superantigens in atopic dermatitis: implications for future therapeutic strategies. *Am J Clin Dermatol* 2006; 7: 273-9.
- 14) Lomholt H, Andersen KE, Kilian M. *Staphylococcus aureus* clonal dynamics and virulence factors in children with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 977-82.
- 15) 関啓子, 櫻田純次, 益田昭吾. 医学生の鼻腔より分離した黄色ブドウ球菌の性状について. *臨床と微生物* 1992; 19: 377.
- 16) 梅田昭子, 呼蘭, 天児和暢. 健康人における黄色ブドウ球菌の感染動態の調査. *臨床と微生物* 1992; 19: 376-7.
- 17) Hwang S, Seki K, Sakurada J, Ogasawara M, Murai M, Ohmayu S, et al. Improved methods for detection and serotyping of coagulase from *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 1989; 33: 175-82.
- 18) Lina G, Piemont Y, Godall-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128-32.
- 19) Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Polland DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxin, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 426-30.
- 20) Murai M, Usui A, Seki K, Sakurada J, Masuda S. Intracellular localization of *Staphylococcus aureus* within primary cultured mouse kidney cells. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 431-43.
- 21) Yao L, Lowy FD, Berman JW. Interleukin-8 gene expression in *Staphylococcus aureus*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 1995; 63: 1835-9.
- 22) Menzies BE, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 1998; 66: 5994-8.
- 23) Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, Poutrel B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci* 2000; 83: 418-29.
- 24) Wesson CA, Derlinger J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, Trumble WR. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspase 8 and 3. *Infect Immun* 2000; 68: 2998-3001.
- 25) Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Erickson EA, Wells CL. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *J Surg Res* 2003; 114: 42-9.
- 26) Usui A, Murai M, Seki K, Sakurada J, Masuda S. Conspicuous ingestion of *Staphylococcus aureus* organisms by murin fibroblasts *in vitro*. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 545-50.
- 27) Murai M, Seki K, Sakurada J, Usui A, Masuda S. Effects of cytochalasins B and D on *Staphylococcus aureus* adherence to and ingestion by mouse renal cells from primary culture. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 69-73.
- 28) Shinji H, Sakurada J, Seki K, Murai M, Masuda S. Different effects of fibronectin on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci by murine peritoneal macrophages. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 851-61.
- 29) Murai M, Sakurada J, Seki K, Shinji H, Hirota Y, Masuda S. Apoptosis observed in BALB/3T3 cells having ingested *Staphylococcus au-*

- reus*. Microbiol Immunol 1999 ; 43 : 653-61.
- 30) 関啓子, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 益田昭吾. アトピー性皮膚炎由来黄色ブドウ球菌感染に伴う線維芽細胞のアポトーシス. Bacterial Adherence Biofilm 2004 ; 18 : 32-6.
- 31) Shinji H, Seki K, Tajima A, Uchida A, Masuda S. Fibronectin bound to the surface of *Staphylococcus aureus* induces association of very late antigen 5 and intracellular signaling factors with macrophage cytoskeleton. Infect Immun 2003 ; 71 : 140-6.
- 32) Seki K, Murai M, Sakurada J, Shirahige A, Koabayashi N, Hwang S, et al. Simple method for observation of phagocytosis on bacterial thinlayer. Microbiol Immunol 1989 ; 33 : 81-5.
- 33) Shinji H, Kamada M, Seki K, Tajima A, Iwase T, Masuda S. Expression and distribution of very late antigen 5 in mouse peritoneal macrophage upon ingestion of fibronectin-bound *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 2007 ; 51 : 63-71.
- 34) 吉沢幸夫, Gong Z, 近藤勇. 黄色ブドウ球菌のラミニン結合タンパク. 臨床と微生物 1992 ; 19 : 398-9.
- 35) Liang OD, Flock JI, Wadström T. Isolation and characterization of vitronectin-binding surface protein from *Staphylococcus aureus*. Biochim Biophys Acta 1995 ; 1250 : 110-6.
- 36) Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect Immun 1998 ; 66 : 336-42.
- 37) Haslinger-Löffler B, Wagner B, Brück M, Strangfeld K, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* induces caspase-independent cell death in human peritoneal mesothelial cells. Kidney Int 2006 ; 70 : 1089-98.
- 38) Satoh M, Yasuda T, Higaki T, Goto M, Tanuma S, Ide T, et al. Innate apoptosis of human B lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus: Modulation by cellular immortalization and senescence. Cell Struct Funct 2003 ; 28 : 61-70.
- 39) Papucci L, Formigli L, Schiavone N, Tani A, Donnini M, Lapucci A, et al. Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on *c-myc* and *bcl-2* expression. Cell Tissue Res 2004 ; 316 : 197-209.
- 40) Watson RWG, Redmond P, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. J Immunol 1996 ; 3986-92.
- 41) Grassme H, Jendrosseck V, Gulbins E. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. Apoptosis 2001 ; 6 : 441-5.
- 42) DeLeo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. Apoptosis 2004 ; 9 : 399-413.