



## ブドウ球菌外毒素の免疫活性に関する研究

山本, 千景  
河野, 潤一  
西藤, 岳彦  
清水, 晃

---

**(Citation)**

神戸大学農学部研究報告, 22(1):7-12

**(Issue Date)**

1996-01-30

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(JaLCD0I)**

<https://doi.org/10.24546/00178063>

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00178063>



## ブドウ球菌外毒素の免疫活性に関する研究

山本千景\*・河野潤一\*・西藤岳彦\*・清水 晃\*

(平成7年8月10日受理)

### Effect of Staphylococcal Exotoxins against T Cell Subsets in Spleen and Thymus of Mice

Chikage YAMAMOTO, Junichi KAWANO, Takehiko SAITO, and Akira SHIMIZU

#### Abstract

Staphylococcal enterotoxins (SEs) and toxic shock syndrome toxin-one (TSST-1) produced by *Staphylococcus aureus* are responsible for a number of diseases with different symptoms. These toxins are known as so called "super antigen". Super antigens activate extraordinarily T cells to release excessive cytokines, such as tumor necrosis factor and interleukin-2, which is considered to be the mechanism of pathogenesis of the diseases. This study deals with flowcytometric analysis of T cell subsets in the spleen and thymus of mice that were inoculated intraperitoneally with purified staphylococcal exotoxins of SEA, SEB, SEC, SED and TSST-1. The results are summarized as follows.

1) In the thymus of a mouse inoculated with 25 ng of TSST-1, both of the helper and cytotoxic T cells increased remarkably. In the spleen of the mouse both subsets of T cells slightly increased. The helper T cells in the thymus increased remarkably in a mouse inoculated with a small amount (17 pg =  $1.7 \times 10^{-2}$  ng) of TSST-1.

2) Decrease of the total cells of thymus and increase of the total cells of spleen were noted in mice inoculated with each 25 ng of SEA and SEB. In mice inoculated with each 25 ng of SEC and SED, increase of the immature T cells and the total cells of thymus was noted. In the thymus of mice inoculated with each 17 pg of SEA-SED, the helper T cells increased, and the cytotoxic T cells also increased with exception of the case of SEC.

This *in vivo* study clearly showed that with a small amount of staphylococcal exotoxins, especially TSST-1, the numbers of helper and cytotoxic T cells in the thymus and spleen are considerably affected.

#### 緒 言

ブドウ球菌属に属する菌種には現在約30種が知られているが、これらのうち病原性が最も強いものは黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) である。黄色ブドウ球菌による食中毒は、本菌によって生産されたエンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) を経口接種することで発症すると考えられ、その抗原性の違いから5つのサブタイプ (SEA~SEE) に分類されている。また、1978年にアメリカで見いだされたトキシックショック症候群

(toxic shock syndrome; TSS) は黄色ブドウ球菌が産生する外毒素 (toxic shock syndrome toxin-one; TSST-1) が原因であると考えられている<sup>1)</sup>。

ブドウ球菌性食中毒に特に強く認められる催吐作用については、経口接種されたSEsが腸管から吸収されて脳に存在する催吐中枢を刺激して嘔吐反応がおこるためと考えられてきた。ところが最近、SEsがスーパー抗原として作用することが明らかになり<sup>2)</sup>、腸管壁に存在するT細胞や肥満細胞などに外毒素が結合して各種の化学的メッダイーターが放出されるために局所で炎症がおこり食中毒症状を呈すると考えられるようになってきた。スーパー抗原とは、抗原提示細胞上の主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex; MHC) のクラスII分子

\* 応用免疫学教室

にペプチドに断片化されることなく直接結合し<sup>4,10</sup>、免疫応答での抗原特異性を規定するT細胞リセプター (T cell receptor; TCR) のクローン性を越えてそれぞれの外毒素特定のV $\beta$ を発現するTCRをもつT細胞群を一括して活性化する<sup>10,12</sup>、といった特徴をもつ抗原のことである。

スーパー抗原活性を有する細菌外毒素は、各種の細胞に対する機能障害や致死・溶解作用などの直接的作用を示さないことから、その機序についてはあまり解明されていない。しかしここ数年、これらの外毒素がスーパー抗原として作用し、T細胞を活性化させ、その結果 $\gamma$ -インターフェロン (INF- $\gamma$ ) やインターロイキン-2 (IL-2) などのリンフォカインの放出を促し、さらには単球やマクロファージの活性化も引き起こして腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) などのモノカイン量を亢進させる<sup>10</sup>、などの作用が明らかになってきた。適度のサイトカイン (リンフォカインやモノカインの総称) は感染防御機能を亢進させて生体にとって有利な反応となるが、MHCクラスII分子をもつ抗原提示細胞にスーパー抗原である外毒素が多数結合すると過剰のT細胞の活性化がおこり、必要以上に多量のサイトカインが放出される<sup>10</sup>。

細菌性スーパー抗原性病原因子がみられるものとして、TSSや猩紅熱の他、最近ではエルシニア感染症や泉熱、そして原因が不明ではあるがスーパー抗原が関与していると考えられている川崎病など<sup>11</sup>、発症機序については不明な点が現在でも多く見られるが、前述のような過剰のサイトカインが直接的な原因で異常反応がおこる、との考え方が主流になってきている。これらの疾病の発症機序を明らかにするためにも、サイトカイン分泌に重要な役割を占めるヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞においてのスーパー抗原による活性化の機序の詳細な解明が必要である。

現在、ブドウ球菌毒素に関する免疫学的研究はあらゆる方面からすすめられており、発病機構については急速に解明されつつある。本研究では、ブドウ球菌毒素が*in vivo*においてリンバ器官である脾臓と胸腺内のヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞に対して細胞数上のような変化を与えているのかを調べるために、フローサイトメトリーによってT細胞のサブセット解析を行った。以下、その成績について述べる。

## 材料および方法

### 1. ブドウ球菌外毒素

供試したブドウ球菌外毒素は、精製されたSEA、SEB、SEC、SEDおよびTSST-1 (いずれもデンカ生研製) である。

### 2. 供試動物

実験には、SPFのC3H/Heマウスの雄7週齢のもの29匹を用いた。

### 3. 細胞の調整

ブドウ球菌外毒素を滅菌生理食塩水を用いて所定の濃度に希釈し、それぞれ1mlをマウスの腹腔内に接種した。3日後に脾臓および胸腺を摘出し、リン酸緩衝液 [Dulbecco's PBS (-), pH7.2、以下PBSと略記] 内において押し出した細胞をメッシュ (#200) を通過させた。その後、遠心分離 (2,000 rpm、4℃、5分間) を行い、沈渣に赤血球除去用トリス緩衝液 [0.83% NH<sub>4</sub>Cl溶液と0.04% tris aminomethane (pH7.65) を9:1で混和したもの] を加えて完全に溶血させた後にPBSで3回遠心洗浄を行った。そして0.1% NaN<sub>3</sub> および1% ウシ胎仔血清 (Flow Laboratories) を添加したPBSに沈渣を再浮遊させ、この細胞液を1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/mlに調整した<sup>3</sup>。

### 4. 標識抗体

リンパ球の表面抗原の解析に用いる標識抗体には、マウスのT細胞の表面抗原 (サブセット) のうちCD8 (Lyt2) およびCD4 (L3T4) に対するモノクローナル抗体 (いずれも Cedarlane Laboratories) を用いた。CD8に対する抗体は fluorescein isothiocyanate (FITC)、CD4に対する抗体は phycoerythrin (PE) で標識されたものである。CD8は細胞傷害性T細胞、CD4はヘルパーT細胞の表面マーカーである。

前述の脾細胞および胸腺細胞の調整液100 $\mu$ lに、FITC標識抗CD8抗体とPE標識抗CD4抗体をそれぞれ5 $\mu$ lずつ加えた二重染色の試料を作製し、4℃で30分間静置して反応させた。

### 5. T細胞表面マーカーの解析

T細胞表面マーカーの解析には、自動細胞分析装置 (EPICS Profile II, Coulter) によるフローサイトメトリーを行った<sup>7</sup>。測定細胞数は約10,000とし、two-color解析を行った。

## 成 績

ブドウ球菌外毒素であるSEA、SEB、SEC、SEDおよび

Table 1. T cell subsets in spleen of mice inoculated with staphylococcal exotoxins

Inoculum size	Exotoxin	Percent of cells against total spleen cells <sup>*1</sup>		
		Helper T cell (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> )	Cytotoxic T cell (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	Number of total spleen cells
17 fg (1.7 × 10 <sup>-5</sup> ng)	SEA	17.2 (1.13) <sup>*2</sup>	7.6 (1.10)	NT <sup>*3</sup>
	SEB	15.4 (1.01)	7.5 (1.09)	NT
	SEC	17.4 (1.14)	7.9 (1.14)	NT
	SED	15.3 (1.01)	6.0 (0.87)	NT
	TSST-1	15.1 (0.99)	8.1 (1.17)	NT
	control <sup>*4</sup>	15.2 (1 )	6.9 (1 )	NT
1.7 pg (1.7 × 10 <sup>-3</sup> ng)	SEA	15.2 (0.89)	7.3 (1.03)	2.7 × 10 <sup>7</sup> (0.93)
	SEB	14.6 (0.85)	7.2 (1.01)	2.7 × 10 <sup>7</sup> (0.93)
	SEC	13.7 (0.80)	8.3 (1.17)	3.4 × 10 <sup>7</sup> (1.17)
	SED	14.9 (0.87)	7.3 (1.03)	2.7 × 10 <sup>7</sup> (0.93)
	TSST-1	8.5 (0.50)	4.8 (0.68)	5.9 × 10 <sup>7</sup> (2.03)
	control	17.1 (1 )	7.1 (1 )	2.9 × 10 <sup>7</sup> (1 )
17 fg (1.7 × 10 <sup>-2</sup> ng)	SEA	15.8 (0.80)	7.3 (0.90)	5.4 × 10 <sup>7</sup> (1.13)
	SEB	18.3 (0.92)	8.1 (1.00)	6.6 × 10 <sup>7</sup> (1.38)
	SEC	18.2 (0.92)	9.1 (1.12)	7.2 × 10 <sup>7</sup> (1.50)
	SED	18.2 (0.92)	7.6 (0.94)	6.0 × 10 <sup>7</sup> (1.25)
	TSST-1	20.5 (1.04)	8.1 (1.00)	6.3 × 10 <sup>7</sup> (1.31)
	control	19.8 (1 )	8.1 (1 )	4.8 × 10 <sup>7</sup> (1 )
25 ng	SEA	12.4 (1.06)	6.7 (0.76)	3.4 × 10 <sup>7</sup> (1.36)
	SEB	13.7 (1.17)	8.2 (0.93)	3.2 × 10 <sup>7</sup> (1.28)
	SEC	12.4 (1.05)	7.9 (0.88)	2.5 × 10 <sup>7</sup> (1.24)
	SED	12.9 (1.10)	8.8 (1.00)	2.7 × 10 <sup>7</sup> (1.08)
	TSST-1	12.3 (1.05)	7.7 (0.88)	3.1 × 10 <sup>7</sup> (1.24)
	control	11.7 (1 )	8.8 (1 )	2.5 × 10 <sup>7</sup> (1 )

<sup>\*1</sup> Immature T cells (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) were rarely found (< 0.01%).

<sup>\*2</sup> Ratio against control in each experiment is shown in parentheses.

<sup>\*3</sup> NT = Not tested.

<sup>\*4</sup> Mice were inoculated with saline.

TSST-1 (対照は生理的食塩液)をそれぞれマウスの腹腔内に投与し、脾臓および胸腺におけるT細胞のサブセット解析を行った。なお、脾臓では17 fg (1.7 × 10<sup>-5</sup> ng)、1.7 pg (1.7 × 10<sup>-3</sup> ng)、17 pg (1.7 × 10<sup>-2</sup> ng)および25 ng投与したもの、また胸腺については17 pgと25 ng投与したものについて解析を行った (Tables 1, 2)。

#### 1. SEA投与マウスにおけるT細胞の変化

17 pg投与のマウスでは、胸腺においては未熟T (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)細胞の割合および総細胞数には変化がなかったが、ヘルパーT (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>)細胞、細胞傷害性T (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)細胞の割合は共に増加していた (Table 2)。脾臓においては、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の割合は若干減少していた (Table 1)。25 ng投与のマウス

では、脾臓における総細胞数の増加と細胞傷害性T細胞の減少が認められたほかは胸腺、脾臓での変化は特に見られなかった (Tables 1, 2)。17 fg、1.7 pg投与のマウスでは特に変化はみられなかった (Table 1)。

#### 2. SEB投与マウスにおけるT細胞の変化

17 pg投与のマウスでは、胸腺においてヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞の割合が共に増加していた (Table 2)。脾臓においては、各T細胞の割合は特に変化が認められなかったが、脾臓総細胞数は増加していた (Table 1)。25 ng投与のマウスでは胸腺総細胞数が著明に減少していたが細胞傷害性T細胞の割合は増加しており、一方脾臓総細胞数は増加していた (Tables 1, 2)。17 fg、1.7 pg投与のマウスでは特に変化はみられなかった (Table 1)。

Table 2. T cell subsets in thymus of mice inoculated with staphylococcal exotoxins

Inoculum size	Exotoxin	Percent of cells against total thymus cells			Number of total thymus cells
		Helper T cell (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	Cytotoxic T cell (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	Immature T cell (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	
17 pg (1.7 × 10 <sup>-2</sup> ng)	SEA	9.6 (1.32) <sup>*1</sup>	2.4 (1.26)	84.1 (0.97)	3.9 × 10 <sup>7</sup> (1.18)
	SEB	10.1 (1.38)	2.3 (1.21)	83.4 (0.96)	Not tested
	SEC	9.3 (1.27)	2.0 (1.05)	85.2 (0.98)	5.4 × 10 <sup>7</sup> (1.64)
	SED	11.6 (1.59)	2.3 (1.21)	82.3 (0.95)	7.5 × 10 <sup>7</sup> (2.27)
	TSST-1	11.3 (1.55)	1.9 (1.00)	82.8 (0.95)	7.2 × 10 <sup>7</sup> (2.18)
	control <sup>*2</sup>	7.3 (1 )	1.9 (1 )	87.0 (1 )	3.3 × 10 <sup>7</sup> (1 )
25 ng	SEA	9.9 (1.03)	1.7 (0.94)	84.2 (0.99)	2.7 × 10 <sup>7</sup> (0.87)
	SEB	10.6 (1.10)	2.8 (1.56)	82.4 (0.97)	1.7 × 10 <sup>7</sup> (0.55)
	SEC	8.4 (0.88)	1.5 (0.83)	86.6 (1.02)	3.9 × 10 <sup>7</sup> (1.26)
	SED	7.6 (0.79)	2.1 (1.17)	86.9 (1.02)	3.2 × 10 <sup>7</sup> (1.03)
	TSST-1	15.6 (1.63)	4.5 (2.50)	75.7 (0.89)	2.1 × 10 <sup>7</sup> (0.68)
	control	9.6 (1 )	1.8 (1 )	84.8 (1 )	3.1 × 10 <sup>7</sup> (1 )

\*1 Ratio against control in each experiment is shown in parentheses.

\*2 Mice were inoculated with saline.

### 3. SEC投与マウスにおけるT細胞の変化

17 pg投与のマウスでは、胸腺においてヘルパーT細胞および総細胞数は増加しており (Table 2)、一方脾臓においてはヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の割合はいずれも変化が認められなかったが、脾臓総細胞数は増加していた (Table 1)。25 ng投与のマウスでは、胸腺総細胞数の増加、そしてヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の割合の若干の減少が認められ、脾臓においては総細胞数の増加が認められた (Tables 1, 2)。17 fg、1.7 pg投与のマウスでは特に変化はみられなかった (Table 1)。

### 4. SED投与マウスにおけるT細胞の変化

17 pg投与のマウスでは、胸腺においてヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞の割合はいずれも増加しており、総細胞数は著明に増加していた (Table 2)。また未熟T細胞の割合には変化がみられなかった。脾臓においては、各T細胞の割合には特に変化が認められなかったが、総細胞数は増加していた (Table 1)。25 ng投与のマウスでは、胸腺および脾臓において著変はみられなかった (Tables 1, 2)。17 fg、1.7 pg投与のマウスでも特に変化はみられなかった (Table 1)。

### 5. TSST-1投与マウスにおけるT細胞の変化

25 ng投与のマウスでは、胸腺総細胞数が顕著に減少していたが、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞は共に割合が増加していた (Table 2)。また未熟T細胞の割合は若

干減少の傾向にあった。脾臓においては、各T細胞の割合は特に変化が認められなかったが、総細胞数は増加していた (Table 1)。17 pg投与のマウスでは、胸腺総細胞数が顕著に増加しており、ヘルパーT細胞の割合も増加していた (Table 2)。脾臓においては、各T細胞の割合は特に変化が認められなかったが、脾臓総細胞数は増加していた (Table 1)。1.7 pg投与のマウスでは脾臓におけるヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の割合の著明な減少が認められたが総細胞数は増加していた (Table 1)。17 fg投与のマウスでは変化はみられなかった (Table 1)。

## 考 察

本研究ではブドウ球菌産生外毒素によって引き起こされる病原性の発症機序に深く関与していると思われるT細胞についての増強作用に注目し、SEA、SEB、SEC、SEDおよびTSST-1の5種の外毒素を供試したが、これらのうち最も顕著な変化を示したのはTSST-1である。

TSST-1 25 ng投与マウスの胸腺においては、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の割合は共に増加しており未熟T細胞の割合は変化がなかったが、総細胞数は著しく減少していた。また、脾臓においては各T細胞の割合には変化は認められないが、脾臓の総細胞数が増加しているので各T細胞数は実際には脾臓内で増加していると考

えられる。以上のことからTSST-1は、一次リンパ器官である胸腺におけるT細胞の分化促進と、成熟T細胞の二次リンパ器官（脾臓）への移行を促進する可能性が考えられた。17 pg ( $1.7 \times 10^{-2}$  ng)投与マウスにおいても胸腺におけるヘルパーT細胞数の増加が認められ、このとき胸腺総細胞数は著しく増加していた。したがってTSST-1は本投与量においては胸腺T細胞、特にヘルパーT細胞の増強を促すと考えられる。これらのことから、TSST-1の免疫学的作用は投与量によって異なるものと考えられる。

一方、SEA~SED 25 ng投与マウスにおいては、胸腺の総細胞数の減少と脾臓の総細胞数の増加がSEAとSEB投与マウスについて認められたのみで、他に著変はなかった。またSEA~SED 17 pg投与マウスにおいては、胸腺総細胞数の増加がSECとSEDについて認められ、SEA~SEDのいずれについても脾臓の総細胞数の増加がみられた。これらのことから、SEAとSEBについては特にT細胞の脾臓への移行促進、SECとSEDについては微量投与においてT細胞の増殖を促進すると考えられた。また、17 pg投与マウスにおいてSEA~SEDについての胸腺ではいずれもヘルパーT細胞の増加が認められ、SEA、SEB、SEDでは細胞傷害性T細胞の増加も認められたことから、これらのSEsは微量投与においてヘルパーT細胞あるいは細胞傷害性T細胞の分化を促進すると考えられた。

SEA~SED、およびTSST-1投与マウスの胸腺について、いずれも微量投与（17 pg）時の胸腺総細胞数の方が25 ng投与時より上回ることから、微量投与においては胸腺でのT細胞前駆細胞からのヘルパーT細胞・細胞傷害性T細胞への分化と共に、骨髄でのリンパ球系幹細胞からのT細胞前駆細胞への分化も促進する可能性が考えられ、25 ng投与においては多量の抗原刺激のためにT細胞前駆細胞が一過性に分化増殖して二次リンパ器官に移行したと推測される。

本研究によって得られた結果は微量のブドウ球菌毒素、特にTSST-1は*in vivo*において胸腺や脾臓のT細胞サブセットに大きな影響を与えることを明らかにしている。

今日では、細菌性外毒素の病原性の発症は外毒素の「毒素」としての直接の作用（細胞の傷害や機能停止など）よりも、むしろ外毒素の刺激によって大量に誘導されたT細胞由来因子、特にTNF- $\alpha$ を中心としたサイトカインの過剰産生が関与すると考えられている<sup>5,6,9</sup>ことから、今後細菌外毒素を投与したマウスの血清やマクロファージについて各種のサイトカイン活性を調べることも必要と考えられる。

## 要 約

ブドウ球菌が産生する外毒素によって引き起こされる病原性の発症機序にはT細胞の異常活性化が関与すると考えられている。本研究では、SEA~SEDおよびTSST-1の免疫学的作用を明らかにする一環として、各毒素投与マウスにおける胸腺および脾臓のT細胞のサブセット解析を行った。

1. TSST-1 25 ng投与マウスの胸腺においてはヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の割合は共に増加しており、脾臓においても各T細胞は増加していた。微量（17 pg =  $1.7 \times 10^{-2}$  ng）投与マウスでは胸腺におけるヘルパーT細胞が増加していた。

2. SEAとSEBの25 ng投与マウスでは、胸腺の総細胞数の減少と脾臓の総細胞数の増加が認められた。またSECとSEDについては、胸腺総細胞数が増加していた。

微量（17 pg）投与マウスにおいてSEA~SEDについての胸腺では、いずれもヘルパーT細胞の増加が認められ、SEA、SEB、SEDでは細胞傷害性T細胞の増加も認められた。

以上の結果から、ブドウ球菌外毒素はいずれも微量の投与によってマウスの胸腺や脾臓のT細胞サブセットに大きな影響を与えることが明らかとなった。また、その作用はTSST-1において顕著であった。

## 文 献

- 1) BERGDOLL, M. S., MOUTIE, T. C., KADIS, S., and AJL, S. J.: *Microbial Toxins*, pp. 265-326, Academic Press, New York, 1970.
- 2) BETLEY, M. J.: *Chem. Immunol.*, **55**, 1-35, 1993.
- 3) CHEN, J. Y.-J., QIAO, Y., KOMISAR, J. L., BAZE, W. B., HSU, I. -C., and TSENG, J.: *Infect. Immun.*, **62**, 4626-4631, 1994.
- 4) MARRACK, P., and KAPPLER, J.: *Science*, **248**, 705-711, 1990.
- 5) MIETHKE, T., WAHL, C., HEEG, K., ECHTENACHER, B., KRAMMER, P. H., and WAGNER, H.: *J. Exp. Med.*, **175**, 91-98, 1992.
- 6) PFELLER, K., MATSUYAMA, T., KUNDIG, T. M., SHAHINIAN, A., WIEGMANN, K., and OHASHI, P. S.: *Cell*, **73**, 457-467, 1993.
- 7) 高橋 英則, 吉田 象二: *検査と技術*, **16**, 17-22, 1988.
- 8) TODD, J. K., FISHAUT, M., KAPRAL, F., and WELCH, T.: *Lancet*, **ii**, 1116-1121, 1978.
- 9) 内山 竹彦: *臨床免疫*, **22**, 1544-1552, 1990.
- 10) 内山 竹彦, 巖 小傑: *メディヤサークル*, **36**,

- 9-20, 1990.
- 11) 内山 竹彦：メデイヤサークル，39，1-13，1994.
- 12) WHITE, J., HERMAN, A., PULLEN, A. M., KUBO, R., KAPPLER, J. W., and MARRACK, P. : *Cell*, 56, 27-35, 1989.