総 説

サルモネラ感染症に対する初期感染防御機構

水 野 由 美

Host defense mechanisms against *Salmonella* infection

Yumi MIZUNO

Department of Pediatric Infectious Diseases, Fukuoka Children's Hospital and Medical Center for Infectious Diseases

(Received October 25, 2004)

summary

Salmonella is one of the gram negative intracellular pathogens. The immune response to *Salmonella* includes innate immunity and adaptive immunity. The intestinal epithelium, neutrophil, macrophage, dendritic cell, NK cell, NK T cell and $\gamma\delta$ T cell take important part in former process, and antigen specific T cell and B cell take part in the later process.

Macrophages and dendritic cells increase in number early after *Salmonella* infection and produce variety of cytokines. Especially, IL-12, IL-15 and IL-18 play important roles in protection against *Salmonella* infection, proliferation of NK cell, NKT cell and $\gamma\delta$ T cell, producing IFN- γ , in addition, IL-12 and IL-18 induce IFN- γ production by Th1 cells and adaptive immune response.

Key words—*Salmonella* infection; intracellular pathogen; Th1 cells; Th1 cytokine; $\gamma\delta$ T cell

抄 録

サルモネラは細胞内寄生性のグラム陰性桿菌であり、その感染防御には上皮細胞、好中球、マクロファージ、樹状細胞などが関与する抗原非特異的な自然免疫と抗原特異的な獲得免疫に大きくわけられ、その間にNK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などが関与する早期誘導反応がある。サルモネラに感染し増殖したマクロファージ、樹状細胞は多くのサイトカインを産生する。そのサイトカインの中でもIL-12、IL-15、IL-18はNK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞の誘導、IFN- γ による早期の病原体の排除に重要であり、IL-12およびIL-18は樹状細胞による抗原提示に反応したTh1細胞をはじめとする獲得免疫の誘導に重要な役割を果たす。

I. はじめに

サルモネラはグラム陰性桿菌に属する細胞内寄生細菌で、約2000の血清型がある。宿主による病原性の発現の違いがあり、*S. typhimurium*はマウスにはヒトのtyphoid feverに相当する全身感染を起すが、一般にヒトには胃腸炎をひこおす。逆に*S. typhi*はヒトには全身感染をおこすがマウスには胃腸炎を起こすのみである。サルモネラ感染は急性胃腸炎と菌血症を伴ったチフス様疾患に分けられるが、この両型に明確に区別できない場合もある。WHOの推定では年間1600万人が腸チフスに罹患しうち60万人が死亡しており、未だ死亡率の高い疾患である。

細胞内寄生細菌は貪食されたマクロファージ、樹状細胞内で生存、増殖することができる宿主の殺菌機構を回避する種々の特徴を有している。主としてマクロファージ内で増殖するため、菌体に対する特異抗体が産生されても作用できず、感染防御には抗原非特異的な自然免疫のほかに抗原特異的なT細胞による獲得免疫（細胞性免疫防御）が重要な役割を果たす。抗原特異的なT細胞はサイトカインの産生によりマクロファージを活性化して細胞内殺菌能を亢進させたり、感染細胞を直接傷害して、細胞内寄生細菌に対する防御を発揮する¹⁾。細胞内寄生細菌に対する免疫応答の研究には結核菌やリステリアが広く用いられてきた。しかし、近年分子微生物学の進歩とともにサルモネラの病原性や宿主細胞との相互作用、免疫応答についての分子学的あるいは免疫学的研究が進んでいる。サルモネラに対するTh1

図1 Th1細胞・サイトカインを中心としたサルモネラに対する感染防御機構

サイトカインを中心とした初期感染防御機構についての最近の知見を述べる。

II. サルモネラの病原性の分子機構²⁾

近年、サルモネラの細胞侵入性を規定する遺伝子が明らかになっている。サルモネラの染色体には遺伝子の水平伝播によって獲得された遺伝子群 *Salmonella* pathogenicity island (SPI) があり、現在5つの SPI-1~5 が知られている。SPI-1 と SPI-5 は腸炎の発症に、SPI-2 と SPI-3 は全身感染を起すのに必要な蛋白をコードしている。サルモネラの全身感染は腸管からの侵入後、リンパ管、ついで血中に入り、腸間膜リンパ節、次いで肝、脾に移行するが、その間、菌はマクロファージ内にあり生体防御システムによる菌排除から免れている。SPI-2 は細胞内ファゴゾームに取り込まれることによって発現し、ファゴゾーム-リソソーム融合の抑制、活性酸素による細胞内殺菌から免れる機能、ファゴゾームの NADPH oxidase の発現の阻害に関する機能をコードしている。したがって、マクロファージに取り込まれた後その殺菌作用に抵抗し、肝、脾に広がるために必要な遺伝子である。SPI-1 の領域に存在する遺伝子は酸素欠乏、高浸透圧など腸管内に似た条件で発現される。SPI-1 にコードされる蛋白のう

ち type III secretion system により細胞内に注入されるエフェクター分子は Sop (*Salmonella* outer protein) と呼ばれ腸管上皮内への菌の侵入を助け、腸管への液体貯留を行い、好中球の浸潤を主体とした炎症を引き起こす。その他に SPI-1 は侵入に必要な蛋白 Sip (*Salmonella* invasion protein) をコードしている。SPI のほかに侵入性のサルモネラには大型のプラスミドがあり、病原性の発揮に関連する spv (*Salmonella* plasmid virulence) と呼ばれる遺伝子群が存在する。これらは肝、脾内での増殖に必要である。

III. 腸管上皮細胞の免疫応答

腸管上皮細胞には食物の消化吸収に働く細胞群のほかに各種 mucins などの粘液構成成分の産生を介し食物抗原や微生物の生体内への進入を防ぐ物理的バリアとして機能している。また腸管上皮細胞は病原微生物が生体内に進入すると病原体そのものあるいはその産生するリポポリサッカライド (LPS) やペプチドグリカン (PGN) などの菌体成分を認識して defensin³⁾ などを管腔側に分泌して、病原微生物の排除に働いたり、IL-8 などのケモカインを産生して炎症細胞の感染局所への浸潤を誘導する。Defensin は腸管の Paneth 細胞のほかに好中球からも産生され DC や T 細胞の走化因子としても働く。

サルモネラが消化管上皮へ侵入する主な侵入門戸は enterocyte, CD18-expressing phagocyte, M 細胞 (Membranous epithelial cell) である。M 細胞は小腸の Peyer 板のようなリンパ組織の上の follicle-associated epithelium (FAE) に存在する⁴⁾。管腔側には不規則な microvilli があり、側底面側の細胞質は陥入しリンパ球やマクロファージが入り込んでいる。病原性による進入門戸の違いについては未だ不明な点が多い。

サルモネラはグラム陰性菌で外膜構成成分として Lipopolysaccharide (LPS) を有していて、この LPS は CD14 や Toll like receptor (TLR4) を介して細胞に結合しマクロファージを活性化する⁵⁾。サルモネラのフラジェリンに対しては、TLR5 が pattern-recognition receptor として働き腸管上皮を活性化させる⁶⁾。

ヒト腸上皮細胞に *S. dublin*, *S. typhimurium* あるいは *S. typhi* の生菌を感染させた実験では、多くのサイトカインの mRNA の増加が報告されている⁷⁾。好中球に作用する IL-8, GRO $\alpha/\beta/\gamma$, ENA78,

G-CSF, GM-CSF, PEEC (pathogen-elicited epithelial chemoattractant), $CD4^+$ Th1 memory T 細胞に作用する IP10, Mig, I-TAC (interferon-inducible T cell chemoattractants), マクロファージ, T 細胞に作用する MCP-1, MIP-1 β , 樹状細胞, T 細胞に作用する MIP-3 α , TRNTES, マクロファージ, B 細胞, 上皮細胞, 線維芽細胞に作用する IL-6, マクロファージ, T 細胞, 上皮細胞, 線維芽細胞に作用する TNF- α などのサイトカインの mRNA の増加や培養上清中への分泌の増加が報告されている⁷⁾. これらのサイトカインはサルモネラの感染時に種々の白血球が遊走し, 早期の炎症反応・防御反応の開始・相互作用することに関与しているものと考えられている.

IV. 単球/マクロファージ

単球/マクロファージはサルモネラ感染に対する宿主の免疫応答で重要な役割を担っている. 単球/マクロファージをサルモネラ生菌あるいはその産物 (LPS, porins, flagellin, cytochalasin D) とともに培養すると種々のサイトカインの mRNA の発現あるいは分泌の増加が報告されている⁷⁾. 単球/マクロファージからの産生が増加するサイトカインには proinflammatory cytokine としては IL-1, TNF- α , IL-6 があり, ケモカインとしては MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 α , KC, hematopoietic growth factor としては GM-CSF, 他に IL-12, IL-18 の増加が報告されている. IL-12 はサルモネラのマクロファージへの感染後 p40 subunit が著明に上昇するが, 活性のある IL-12p70 はわずかに上昇するのみである. IL-18 は感染直後の短時間増加するがその後減少する. この IL-12 と IL-18 はサルモネラに対する生態防御上重要な働きをする IFN- γ の産生を誘導する.

V. Dendritic cell

樹状細胞は自然免疫と獲得免疫の橋渡する抗原提示細胞として重要な役割を担っている. Peyer 板のリンパ濾胞 (the follicle-associated epithelium) では $CD8\alpha^-CD11b^-DC$ が M cell に接近して存在し, 腸管内の細菌を貪食している. 他の食細胞である好中球, マクロファージも感染の際, パイエル板に浸潤し細菌の uptake に関与している. サルモネラ感染マウスでは 5 日後には $CD8\alpha^-$ と $CD8\alpha^+CD4^-DC$ が脾の red pulp に流入してくるため倍増

するが $CD8\alpha^+$ および $CD8\alpha^-CD4^-DC$ の数は変わらない. $CD8\alpha^+DC$ は TNF- α を産生しサルモネラの感染防御に重要であるが TNF- α 産生細胞数としてはマクロファージと好中球の方が多い. DC の産生する TNF- α は局所で作用しオートクラインに働き, DC の成熟と遊走に作用しているのかもしれないがサルモネラ感染における DC の産生する TNF- α の役割は未だ解明されていない^{8,9)}. サルモネラを感染させたマウスにおいてはその感染経路, 細胞の採取部位により異なるが 病初期においては, IL-12 を産生する DC の明らかな増加はみられない. 脾の DC 上には co-stimulatory factor である CD86, CD80 および CD40 の発現が増加している. これらの co-stimulatory factor を発現した DC はさらにサルモネラ特異的 $CD4^+$ あるいは $CD8^+$ T 細胞を誘導する⁸⁾.

VI. 実験動物 (マウス) におけるサルモネラに対する免疫応答

サルモネラ感染において IFN- γ はもっとも研究されているサイトカインであるが, マウスを用いた実験で *in vivo* での種々のサイトカインの関与が明らかになっている⁷⁾. マウスを用いた実験の報告ではサルモネラの感染後, 種々の臓器で IL-1 と TNF- α は増加していた. TNF α あるいは IFN- γ に対する抗体を投与したマウスに *S. typhimurium* を感染させると死亡率が上昇し, 逆に TNF- α あるいは IFN- γ を投与すると減少することより, サルモネラ感染における重要性が報告されている. IFN- γ は T 細胞, NK 細胞で産生され, サルモネラを感染させたマウスの腸管粘膜, パイエル板, 腸間膜リンパ節, 脾, 肝での mRNA の発現および循環血中での増加が報告されている. また, IFN- γ の中和抗体を投与したマウスや IFN- γ knock-out マウスではサルモネラを感染させると脾, 肝での菌の増加し生存率が低下する. IFN- γ は食細胞をはじめ種々の細胞に作用するが, マクロファージを活性化してその殺菌能を高めることがサルモネラ感染において最も重要である. IFN- γ の産生を促進するサイトカインに IL-12, IL-18 がありいずれもマクロファージが分泌する. IL-12 は p35 と p40 のサブユニットからなり, p35 は恒常的に発現しているが, p40 は刺激によりマクロファージや樹状細胞からの産生が誘導され, サルモネラの感染後, パイエル板, 腸間膜リンパ節, 肝, 脾出の発現が増加する. それぞれのサブユ

ニットは単独では生物学的活性を持たないが ヘテロダイマーを形成し生物学的活性を持つ IL-12p70 となる。サルモネラ感染マウスに IL-12 中和抗体を投与すると脾での IFN- γ の発現および血清中 IFN- γ 濃度が 中和抗体を投与しなかったマウスに比べ低く、脾の細菌数が増加し、生存率が低下するが、IL-12 を投与すると宿主の生存率が上昇することより、IL-12 が IFN- γ の産生を誘導しサルモネラの感染防御に重要な役割を果たす。IL-12 の機能には、Th1 細胞の分化、増殖を誘導、T 細胞、NK 細胞からの IFN- γ の産生、マクロファージの活性化などがある。

IL-18 はマクロファージで産生され、Th1 細胞や NK 細胞に作用し IFN- γ の誘導作用がある。IL-18 の中和抗体を投与したマウスにサルモネラを感染させると IL-12 の場合と同様に肝、脾での菌数が増加し生存率が低下、INF- γ の低下がする。

サルモネラを腹腔内投与すると T 細胞、NK 細胞の growth factor である IL-15 の腹腔内マクロファージでの発現が増加し、IL-15 に対する中和抗体を投与すると脾、肝、腹腔の菌数が増加するがこれは IL-15 抗体により腹腔内へ NK 細胞の influx が妨げられ、IFN- γ が減少することによって考えられ、IL-15 により誘導された NK 細胞による IFN- γ の産生がサルモネラ感染防御に働いていることを示唆するものである。

サルモネラに感染したマクロファージでは IL-15

の mRNA の発現及び培養上清中の IL-15 が増加しており、この IL-15 は $\gamma\delta$ T 細胞を活性化し IFN- γ の産生が誘導される^{10,11)}。また $\gamma\delta$ (i-IEL) T 細胞にも IL-15 の mRNA が発現しており、パラクラインに加えオートクラインに働きその増殖を助けることが示唆されている¹¹⁾。

Anti-inflammatory cytokine である IL-4, IL-10, TGF- β に関しては以下のような報告がある。サルモネラを腹腔内に感染させ、IL-4 を中和すると腹腔内の細菌数が減少し、この時血清中の INF- γ と IL-12 は増加している。サルモネラの感染後 IL-10 は腸管内、脾、肝で著明に増加する。TGF- β 1 をサルモネラ感染マウスに投与すると脾・肝での菌数が減少し、生存率が増加する。脾での IFN- γ と iNOS の mRNA の発現が増加し血清中の IFN- γ と脾のマクロファージからの NO の産生が上昇している。

VII. ヒトにおけるサルモネラに対する免疫応答

IL-12R β 1 鎖遺伝子の点変異では IL-12 レセプターを介した signaling の障害により IL-12 依存性 IFN- γ 産生の低下がありマイコバクテリア、サルモネラに対する易感染性を示す¹²⁾。IL-12p40 欠損症や IFN- γ R1, IFN- γ R2 の完全或いは部分欠損患者でも同様にマイコバクテリア、サルモネラ感染を反復することが報告されている^{13~16)}。

ヒトにおけるサルモネラに対する感染防御についての報告は未だ少ないが、われわれはチフスを含む

図2 サルモネラ感染患者の病初期において活性化(HLA-DR+あるいはCD69+)T細胞、特に $\gamma\delta$ T細胞が活性化されていた。S:全身型, G:胃腸炎型, Cont:対象

図3 サルモネラ感染患者の血清中 IFN γ , IL-12, IL-18, IL-15 (最高値) の比較. いずれのサイトカインもサルモネラ感染症患者で増加していたが, IL-15, IL-18 は全身感染型で胃腸炎型に比較し有意に高値だった. S: 全身型, G: 胃腸炎型, C: 対象

図4 サルモネラ感染患者の血清中サイトカインの経時変化

IL-15, IL-18 は胃腸炎型に比べ, 全身感染型でより高値でより長く持続していた. 上段: 全身型, 下段: 胃腸炎型

サルモネラ感染患者のリンパ球 subpopulation およびサイトカイン産生について検討した^{17,18)}.

サルモネラ感染患者の末梢血液中で V γ 9⁺Ti γ A⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が増加し¹⁷⁾, 病初期において T 細胞が活性化されるが特に $\gamma\delta$ T 細胞が活性化されており (図 2)¹⁸⁾, ヒト末梢血単核細胞を *S. typhi* の生菌と培養すると選択的な $\gamma\delta$ T 細胞の活性化がみられた. 患者血清中 IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-15 が増加し (図 3), IL-15, IL-18 は胃腸炎型に比べ, 全身感染型でより高値でより長く持続していた (図 4). また末梢血の $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞における IFN- γ mRNA の発現を RT-PCR で測定したところ, $\gamma\delta$ T 細胞にはコントロールに比し有意に多くの

IFN- γ mRNA が発現し (図 5), $\gamma\delta$ T 細胞が産生する IFN- γ がヒトのサルモネラ感染防御においても重要であると考えられた¹⁸⁾.

サルモネラ感染症は開発途上国では死亡率の高い感染症であり, また耐性菌の出現, HIV 感染者をはじめとする細胞性免疫不全状態での重症化などが問題となっている. サルモネラに対する感染防御機構には未だ不明なことが多く更なる研究がのぞまれるが, 今後, サルモネラ感染症の治療, より有効なワクチンの開発を含めた予防法, 他の細胞内寄生細菌に対する防御機構の解明に重要な役割を果たすものとする.

図5 末梢血の $\gamma\delta$ T細胞および $\alpha\beta$ T細胞におけるIFN- γ mRNAの発現。末梢血の $\gamma\delta$ T細胞および $\alpha\beta$ T細胞におけるIFN- γ mRNAの発現をRT-PCRで測定したところ、 $\gamma\delta$ T細胞にはコントロールに比し有意に多くのIFN- γ mRNAが発現していた。

謝 辞：稿を終えるにあたり御指導を承りました九州大学大学院医学研究院成長発達医学 原寿郎教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 光山正雄：感染防御免疫の機構。吉田眞一，柳 雄介編，戸田新細菌学，改訂 32 版，南山堂，東京 406-423, 2002.
- 2) 吉田眞一：腸内細菌科の細菌 サルモネラ属。吉田眞一，柳 雄介編，戸田新細菌学，改訂 32 版，南山堂，東京 558-563, 2002.
- 3) Granz T. : Defensins : Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3** : 710-720, 2003.
- 4) Jepson MA. and M. Ann Clark : The role of M cells in Salmonella infection. *Microb Infect* **3** : 1183-1190, 2001.
- 5) Freudedberg MA., et al. : Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to Salmonella typhimurium infection : LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microb Infect* **3** : 1213-1222, 2001.
- 6) Wick MJ : Living in the danger zone : innate immunity to Salmonella. *Curr Opin Microb* **7** : 51-57, 2004.
- 7) Eckmann L., Kagnoff MF. : Cytokines in host defense against Salmonella. *Microb Infect* **3** : 1191-1200, 2001.
- 8) Sundquist M., Rydström A., Wick MJ. : Immunity to Salmonella from a dendritic point of view. *Cell Microbio* **6** : 1-11, 2004.
- 9) Wick MJ. : The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella. *Immunol Lett.* **85** : 99-102, 2003.
- 10) Nishimura H., et al. : IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection. *J Immunol* **156** : 663-669, 1996.
- 11) Inagaki-Ohara K, et al. : Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cell receptor in mice. *Eur J Immunol* **27** : 2885-2891, 1997.
- 12) Altare F. et al. : Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280** : 1432-1435, 1998.
- 13) Jouanguy E et al. : Partial Interferon-Receptor 1 Deficiency in a Child with Tuberculoid Bacillus Calmette-Guérin Infection and a Sibling with Clinical Tuberculosis. *J. Clin. Invest.* **100** : 2658-2664, 1997.
- 14) Altare F. et al. : Inherited Interleukin 12 deficiency in a child with Bacille Calmette-Guérin and Salmonella enteritidis disseminated Infection. *J Clin Invest* **102** : 2035-2040, 1998.
- 15) Newport, M. J., et al. : A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* **335** : 1941-1949, 1996.
- 16) Jouanguy E., et al. : IL-12 and IFN- γ in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* **11** : 346-351, 1999.
- 17) Hara T., et al. : Predominant activation and expansion of V γ 9-bearing $\gamma\delta$ T cells in salmonella infection. *J Clin Invest* **90** : 204-210, 1992.
- 18) Mizuno Y., et al. : Th1 and Th1-inducing cytokines in Salmonella infection. *Clin Exp Immunol.* **131** : 111-117, 2003.