

マウス *Listeria monocytogenes* 感染に対する 酵母マンナンの防御機構について

大川 喜男 *^a, 小林真紀子 ^{b,c}, 鈴木 益子 ^{b,d}
東北薬科大学第二衛生化学教室 ^a, 同微生物学教室 ^b,
ゼリア新薬工業株式会社中央研究所 ^c, 仙台真菌研究所 ^d

Protective Mechanisms of Yeast Mannan against *Listeria monocytogenes* Infection in Mice

Yoshio OKAWA *^a, Makiko KOBAYASHI ^{b,c}, Masuko SUZUKI ^{b,d}

(Received November 22, 2003)

In order to clarify the mechanisms of the protective effects against *Listeria monocytogenes* infection in mice of both mannans, a neutral mannan (WNM) and an acidic mannan (WAM025) fractions from bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, we investigated *in vitro* bacterial-growth inhibitory activity. The activity of peritoneal phagocytes, macrophages and polymorphonuclear leucocytes, in mice administered with the mannans was enhanced compared with the activity of those from the untreated mice. The activity of the mannan-induced peritoneal phagocytes was inhibited by addition of serine protease inhibitors, diisopropyl fluorophosphate and phenylmethylsulfonyl fluoride. The macrophage activating factor-releasing activity from the mannan-activated spleen lymphocytes was also enhanced compared with that from non-activated spleen lymphocytes.

Key words — *Listeria monocytogenes*; mannan; peritoneal phagocytes; growth-inhibitory activity; macrophage-activating factor

リステリア菌 *Listeria monocytogenes* はグラム陽性、通性嫌気性の桿菌で、人畜共通感染症であるリステリア症（敗血症、髄膜炎¹⁾や脳炎²⁾の原因菌となる。成人における感染では、妊娠や、肝硬変、糖尿病、白血病、悪性腫瘍などの基礎疾患を有するものが多く、一種の日和見感染症としてとらえることができる。また、本菌は細胞侵入性があり、マクロファージ内での殺菌をエスケープして増殖する細胞内寄生性細菌である。³⁾ その感染防御には細胞性免疫⁴⁾が主要な役割を担っていることもよく知られている。著者らは、現在感染症領域で問題になっている日和見感染症の病原因子と生体の防御機構を解明し、その予防や診断・治療法の開発のため、代表的な病原細菌・真菌類を用いて一連

の検討を行ってきた。⁵⁾ 酵母マンナンの感染防御実験は最初に *Staphylococcus aureus*,^{6,7)} 次に、*Candida albicans*,^{8,9)} 続いて *Pseudomonas aeruginosa*^{10,11)} と *Listeria monocytogenes*¹¹⁾ で行ってきた。マウスリステリア感染に対する酵母マンナンの防御の機構については、現在まで、マンナン投与マウスの肝臓のクッパー細胞のリステリア菌増殖抑制活性とリゾゾーム酵素、特に酸性ホスファターゼと中性プロテアーゼ、活性について報告した。¹¹⁾ 本論文では、マンナン投与マウスの腹腔食細胞のリステリア菌増殖抑制活性と脾臓リンパ球からのマクロファージ活性化因子産生能について検討した。

材料及び方法

1) 動物

BALB/c 雄性マウス (日本 SLC) 体重 22 ± 2 g を使用した.

2) 菌株

Listeria monocytogenes serotype 4b 株は東北大学医学部細菌学教室石田教授 (現名誉教授) より分与されたもので, ブレインハート斜面寒天培地で培養した種菌を Soy broth 液体培地で 37°C , 20 時間培養した.

3) マンナン画分

パン酵母, *Saccharomyces cerevisiae* (オリエンタル酵母社) から Okubo らの方法¹²⁾ に従い調製した. すなわち, オートクレーブ抽出して得たバルクマンナンを DEAE-セファデックスカラムにより, 水溶出画分 (WNM) と 0.25 M 食塩水溶出画分 (WAM025) に分画して用いた.

4) セリンプロテアーゼ阻害剤

セリンプロテアーゼ阻害剤として, ジイソプロピルフルオロフォスフェート (DFP, Sigma) と フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF, Sigma) をそれぞれジメチルスルフォキシドとハンクス緩衝液に溶解して用いた.

5) マンナンの投与方法

WNM 及び WAM025 はそれぞれ滅菌生理食塩水に溶解し, 150 mg/kg/day, 5 日間マウス腹腔内に連続投与した. 各実験で, マウスは 1 群 5 匹を使用した. 本実験は東北薬科大学の動物実験指針に従って行った.

6) 腹腔食細胞の調製

マウス腹腔浸出細胞 (PEC) はマンナン連続投与 1 日後にハンクス緩衝液にて採取した. PEC からのマクロファージと多形核白血球 (PMN) の分離は Percoll-グラジエント遠心法によって行った.¹³⁾

7) 食細胞による *L. monocytogenes* 増殖抑制活性

各食細胞 5×10^6 個/0.1 ml, *L. monocytogenes* 1×10^6 個/10 μl および正常マウス血清 10 μl とを 96 穴丸底プレート (Falcon) に加え, 37°C , 3 時間 5% CO_2 下で培養した.¹¹⁾ セリンプロテアーゼ阻害剤の実験では, さまざまな濃度の阻

害剤の溶液 10 μl を上記反応液に添加して行った. 培養後, 水 100 μl を加えて食細胞をラバーポリスマンからはがし, さらに激しくピペッティングして食細胞を破壊し, 細胞内の菌を浮遊させた. その 1,000 倍希釈液をブレインハートインフュージョン寒天培地に 20 μl 入れ, 37°C , 20 時間培養後, 生じた *L. monocytogenes* のコロニー数 (CFU) を数え, 食細胞添加群を A, 非添加群を B として, 増殖抑制率を次式によって算定した.

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

8) 脾臓リンパ球培養上清の調製

マンナン連続投与 1 日後のマウスの脾臓より非付着性細胞を得, 10% FBS 含有 RPM1640 培地で 1×10^6 個/ml に調整し, 37°C , 48 時間 5% CO_2 下で培養し, 培養上清を得た.

9) マクロファージ活性化因子の測定

マクロファージ活性化因子 (MAF) は前報¹⁴⁾ に準じて測定した. すなわち, 2% カゼイン投与 4 日後の腹腔より, カゼイン誘導マクロファージ (1×10^5 個) を調製し, 脾臓リンパ球培養上清 (100 μl) と混合, 37°C , 48 時間 5% CO_2 下で培養した. 培養上清を除去後, 7) の記載に従って食細胞による *L. monocytogenes* 増殖抑制活性を測定した.

10) 統計処理

有意差検定は Student's *t*-test により行った.

実験結果

1) マンナン投与マウス腹腔浸出細胞の *L. monocytogenes* 増殖抑制活性

マンナン投与マウス腹腔浸出細胞 (PEC) による *L. monocytogenes* 増殖抑制活性を検討した結果は Table 1 に示した. 未処理マウスに比べ, 両マンナン投与マウスで顕著な増殖抑制活性がみられた. 次に, マンナン投与マウス PEC より Percoll グラジエント遠心によりマクロファージと PMN を分離し, *L. monocytogenes* 増殖抑制活性を検討した. なお, WNM 投与マウスでは大部分がマクロファージであり, PMN は分離

Table 1. Growth-inhibitory Activity of *L. monocytogenes* Cells by PEC in Mice Administered with WNM or WAM025^{a)}

PEC	CFU	Growth inhibition (%)
None (before incubation)	38 ± 9	-
None (after incubation)	181 ± 22	0
Untreated PEC	119 ± 10	34
WNM-treated PEC	53 ± 4	71 ^{b,c)}
WAM025-treated PEC	40 ± 7	78 ^{b,c)}

a) Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0-4, and growth-inhibitory activity of PEC was determined on day 5. The results are expressed as the mean value of five cultures ± S.E.

b) $P < 0.0001$ versus growth inhibition (%) of None (after incubation) group.

c) $P < 0.001$ versus growth inhibition (%) of Untreated PEC group.

Table 2. Growth-inhibitory Activity of *L. monocytogenes* Cells by Macrophages and PMN Separated from PEC in Mice Administered with WNM or WAM025^{a)}

Cells	CFU	Growth inhibition (%)
None (before incubation)	50 ± 3	-
None (after incubation)	333 ± 79	0
Untreated macrophages	176 ± 4	47
WNM-treated macrophages	137 ± 9	59 ^{b)}
WAM025-treated macrophages	135 ± 21	59
WAM025-treated PMN	41 ± 19	85 ^{b)}

a) Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0-4. PEC were separated into macrophages and PMN by percoll-gradient centrifugation on day 5 and the growth-inhibitory activity was determined. The results are expressed as the mean value of five cultures ± S.E.

b) $P < 0.01$ versus None (after incubation) group.

されなかった。結果は Table 2 に示すが、マンナン投与マウスマクロファージ並びに PMN 両者に活性上昇が認められたが、特に、WAM025 投与マウス PMN において高い活性がみられた。

2) 腹腔浸出細胞の *L. monocytogenes* 増殖抑制活性へのセリンプロテアーゼ阻害剤の影響

マンナン投与マウス腹腔浸出細胞 (PEC) による *L. monocytogenes* 増殖抑制活性において、セリンプロテアーゼの関与があるかどうかを検討するため、セリンプロテアーゼ阻害剤の影響について検討した。その結果は Table 3 に示したが、両マンナン投与マウス PEC において、両セリンプロテアーゼ阻害剤 (DFP と PMSF) により、PEC による *L. monocytogenes* 増殖抑制活性が顕著に抑制されることが明らかになった。

3) 脾臓リンパ球培養上清のマクロファージ活性化因子

マンナン投与マウス非付着性脾臓細胞培養上清による *L. monocytogenes* 増殖抑制活性を検討した結果は Table 4 に示した。両マンナン投与マウスにおいて、脾臓細胞から顕著なマクロファージ活性化因子 (MAF) の産生が明らかになった。

考 察

著者らは、BRM によるマウスリステリア感染防御能について、マンナンやキチン、キトサン並びにそのオリゴ糖を用いて検討してきた。^{11,14-16)} 一般に、*L. monocytogenes* の感染防御において、獲得抵抗性は細胞性免疫によって仲介

Table 3. Effects of Serine Protease Inhibitors on Growth-inhibitory Activity of *L. monocytogenes* Cells by PEC in Mice Administered with WNM or WAM025^{a)}

PEC	Protease inhibitor (mM)	CFU	Growth inhibition (%)
None (before incubation)		38 ± 8	-
None (after incubation)		181 ± 22	0
Untreated PEC		119 ± 9	34
WNM-treated PEC		54 ± 1	71
〃	DFP (0.25)	64 ± 14	65
〃	DFP (0.75)	111 ± 30	39
〃	DFP (1.00)	103 ± 7	34
〃	PMSF (0.1)	98 ± 6	46
〃	PMSF (0.5)	101 ± 7	44
〃	PMSF (1.0)	118 ± 10	35
WAM025-treated PEC		81 ± 7	55
〃	DFP (0.25)	173 ± 16	4
〃	DFP (0.75)	186 ± 10	-
〃	PMSF (0.1)	118 ± 3	35
〃	PMSF (0.5)	141 ± 20	22
〃	PMSF (1.0)	156 ± 3	14

a) Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0-4. PEC were separated on day 5 and the growth-inhibitory activity was determined with/without protease inhibitors. The results are expressed as the mean value of five cultures ± S.E.

Table 4. Effects of Spleen Lymphocyte Supernatants of Mice Administered with WNM or WAM025 on Growth-inhibitory Activity of *L. monocytogenes* Cells by Macrophages^{a)}

Supernatant	CFU	Growth inhibition (%)
None (before incubation)	37 ± 4	-
None (after incubation)	218 ± 17	0
Buffer	109 ± 12	50
Untreated spleen sup	266 ± 6	-
WNM-treated spleen sup	10 ± 4	96 ^{b)}
WAM025-treated spleen sup	10 ± 1	96 ^{b)}

a) Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0-4. The nonadherent spleen cells were separated on day 5, and incubated at 37 °C for 48 h in 5% CO₂. Casein-induced macrophages were mixed with the spleen cell supernatants, and cultured for additional 48 h in a 5% CO₂. After the culture supernatants were removed, the growth-inhibitory activity of the macrophages was determined. The results are expressed as the mean value of five cultures ± S.E.

b) $P < 0.001$ versus None (after incubation) group.

されるけれども、⁴⁾ 少なくとも感染初期においては、マクロファージ、そして新しく導入された単球やPMNが重要な役割を果たすことが知られている。¹⁷⁻²¹⁾ 先に、マンナン投与マウスは *L. monocytogenes* 感染に対し防御能があること、そのメカニズムの検討から、肝臓のクッパー細胞

が重要な役割を担っていることを報告した。¹¹⁾

今回は、*L. monocytogenes* 増殖抑制活性を指標に、腹腔浸出食細胞と脾臓リンパ球からのマクロファージ活性化因子について検討を加えた。Table 1 と 2 に示したように、マンナン投与マウス腹腔食細胞、マクロファージとPMN、はノー

マルマウス腹腔マクロファージに比べ、顕著な *L. monocytogenes* 増殖抑制活性を示した。現在まで著者らは、キチン、キトサンやマンナン投与マウス腹腔マクロファージのセリンプロテアーゼが腫瘍細胞やカンジダの障害性に関与していることを阻害剤を用いた実験で証明してきた。^{22,23)} 更に最近、マンナン投与マウスの肝臓のクッパー細胞によるインターロイキン1産生にセリンプロテアーゼの関与を示唆した。²⁴⁾ そこで、マンナン投与マウス腹腔食細胞の *L. monocytogenes* 増殖抑制活性にセリンプロテアーゼの関与の有無を明らかにするため、阻害剤のDFPとPMSFを用いて検討した。その結果、顕著な抑制がみられた (Table 3) ことより、リステリアの増殖抑制活性にセリンプロテアーゼの関与が考えられた。このように、細胞内のセリンプロテアーゼは広く生体の機能調節に関与していることが想定される。また、マンナン投与マウス脾臓リンパ球培養上清による顕著なマクロファージ活性化因子 (MAF) の産生性が明らかになった (Table 4)。これはマンナン投与により特異的に活性化されたT細胞から、インターフェロンガンマ (IFN- γ) に代表されるサイトカインが産生されて、^{14,25)} マクロファージの細胞内殺菌能が亢進したものと考えられる。われわれは、すでにアセチルキトオリゴ糖の *L. monocytogenes* 感染防御の機構としてもMAF活性を明らかにしているが、今回マンナンの *L. monocytogenes* 感染防御においても、細胞性免疫の関与が明らかになった。

このように、マンナンは感染初期に働くマクロファージやPMNの殺菌活性、セリンプロテアーゼなどのリソゾーム酵素、^{6,11,22,24)} 血清リゾチーム、^{6,7)} 活性酸素^{7,8)} やミエロペルオキシダーゼ⁸⁾ など、を増大させ、さらには、細胞性免疫をも亢進させることにより強力な生体防御能を発現すると考えられる。

REFERENCES

- 1) Simpson J. F., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **34**, 657-663 (1971).
- 2) Aladro Y., Ponce P., Santullano V., Angel-Moreno A., Santana M. A., *Eur. Radiol.*, **6**, 188-191 (1996).
- 3) Farber J. M., Peterkin P. I., *Microbiol. Rev.*, **55**, 476-511 (1991).
- 4) Mackaness G. B., *J. Exp. Med.*, **116**, 381-406 (1962).
- 5) Okawa Y., *Annual Report Tohoku College of Pharmacy*, **45**, 39-58 (1998).
- 6) Okawa Y., Okura Y., Hashimoto K., Matsumoto T., Suzuki S., Suzuki M., *Carbohydr. Res.*, **108**, 328-334 (1982).
- 7) Okawa Y., Okura Y., Hashimoto K., Suzuki K., Suzuki S., Suzuki M., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 942-947 (1985).
- 8) Okawa Y., Suzuki K., Kobayashi M., Asagi M., Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **30**, 957-967 (1986).
- 9) Okawa Y., Abe K., Watanabe T., Sasaki H., Suzuki M., *Journal of Tohoku Pharmaceutical University*, **49**, 103-107 (2002).
- 10) Kobayashi M., Katsumata Y., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **36**, 191-195 (1989).
- 11) Kobayashi M., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 807-809 (1990).
- 12) Okubo Y., Suzuki S., *Carbohydr. Res.*, **62**, 135-141 (1978).
- 13) Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 943-950 (1984).
- 14) Tokoro A., Kobayashi M., Tatewaki N., Suzuki K., Okawa Y., Mikami T., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **33**, 357-367 (1989).
- 15) Okawa Y., Kato K., Suzuki K., Suzuki M., Suzuki S., *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **36**, 169-174 (1989).
- 16) Okawa Y., Kobayashi M., Suzuki S., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 902-904 (2003).
- 17) McRipley R. J., Sbarra A. J., *J. Bacteriol.*, **94**, 1425-1430 (1967).
- 18) Tatsukawa K., Mitsuyama M., Takeya K., Nomoto K., *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 161-166 (1979).
- 19) MacGowan A. P., Peterson P. K., Keane W., Quie P. G., *Infect. Immun.*, **40**, 440-443 (1983).

- 20) Czuprynski C. J., Campbell P. A., Henson P. M., *J. Reticuloendothel. Soc.*, **34**, 29-44 (1983).
- 21) Bortolussi R., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Van Asbeck B. S., Verhoef J., *Infect. Immun.*, **55**, 3197-3203 (1987).
- 22) Okawa Y., Ozeki Y., Suzuki K., Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1138-1143 (1987).
- 23) Suzuki K., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 375-379 (1987).
- 24) Okawa Y., Abe K., Watanabe T., Sasaki H., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1506-1508 (2002).
- 25) Handa T., Mitsuyama M., Ake Serushago B., Muramori K., Nomoto K., *Immunology*, **65**, 427-432 (1988).