

マウス *Mycobacterium intracellulare*
感染におけるサイトカイン産生動態と抵抗性

奈良県立医科大学細菌学教室

松井 則夫

ROLE OF CYTOKINES IN EXPRESSION OF
INNATE RESISTANCE AND SUSCEPTIBILITY TO
MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE INFECTIONS
IN MICE

NORIO MATSUI

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received September 29, 1995

Abstract: The purpose of this study was to better the sequence of cytokine mRNA expression during the infectious course of *Mycobacterium intracellulare*, belonging to *Mycobacterium avium* complex (MAC), in MAC-resistant A/J mice and MAC-susceptible C 57 BL/6 mice. Cytokine mRNA expression was detected by polymerase chain reaction-assisted amplification of RNA extracted from the spleen cells of individual mice euthanized on days 0 to 40 of infection.

By using this method, mRNAs for IL-2, IL-3, IL-5, IFN- α and IFN- β were not detected in RNA from the spleen cells of infected mice of both strains over the infection period. Expression of mRNAs for IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ remained similar in intensity and timing between both mouse strains during infection. The mRNA for IL-4 was expressed in RNA from C 57 BL/6 spleen cells after day 9, at the time when the number of viable *M. intracellulare* began increasing in the spleen of C 57 BL/6 mice, while IL-4 mRNA was not induced in A/J spleen cells throughout the infectious course. Moreover, mRNA for IL-10 was expressed in C 57 BL/6 mice at higher levels than that in A/J mice after day 6 of infection. Recombinant IL-4 and IL-10 affected anti-MAC activity of spleen cells from MAC-infected A/J mice *in vitro*, and also recombinant IL-4 suppressed the *in vitro* production of IFN- γ by infected A/J spleen cells upon stimulation with *M. intracellulare* extract.

These results suggest that the induction of inhibitory cytokines, including IL-4 and IL-10, after MAC infection results in deterioration of mouse innate resistance to MAC infection.

Index Terms

M. intracellulare, MAC infection, cytokines, IL-4, IL-10, RT-PCR

結 言

わが国における非定型抗酸菌症の発生率は年々増加し、

現在新入院患者で抗酸菌培養陽性の10%以上をしめる。菌種別では *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) が約70%と高率である。非定型抗酸菌は結

核菌(*M. tuberculosis*)に比して毒力は弱く、先行する AIDS や呼吸器疾患など宿主の全身や局所の抵抗力の低下に伴って発症することが多い。MAC が抗結核剤に対して抵抗性を示すことから、本感染症は治療が困難で、持続感染例では徐々に進行して予後不良の事が多い¹⁾。そこで、MAC の宿主攻撃因子からのエスケープ機構の解明に力が注がれている。

抗酸菌に対する宿主の抵抗性には、感染初期に働く自然抵抗性とその後誘導される特異的免疫の両方が関係すると考えられている²⁻⁴⁾。抗酸菌に対する宿主抵抗性の解析は主としてマウス実験系が用いられ、多くの純系マウスは結核菌、BCG、MAC などの抗酸菌に対する自然抵抗性の違いによって BCG 感受性(Bcg^s)=MAC 感受性(C 57 BL/6, BALB/C, B 10. A)と BCG 抵抗性(BCG^r)=MAC 抵抗性(A/J, C 3 H/He, DBA/2)の2つのグループに分けられている。その自然抵抗性の差は第1染色体上に存在する Bcg 遺伝子と呼ばれる単一の遺伝子に支配され、主としてマクロファージの殺菌能の差に表現されるといわれている^{5,6)}。一方、抗酸菌に対する特異的免疫はおもに CD 4⁺T 細胞に担われ^{7,8)}、MHC(主要組織適合性抗原)(マウスでは H-2 領域)の影響下にあるとされている⁹⁻¹⁰⁾。

一般に、MAC 等の抗酸菌が宿主体内に侵入すると、マクロファージ等の細網内皮系の細胞に喰食され、一部は細胞内殺菌を受ける事が知られている。このマクロファージの MAC 殺菌能に対するサイトカインの効果については多くの報告があるが未だ確定されていない¹¹⁻¹⁴⁾。

今回、MAC に対する宿主抵抗性が大きく異なる2系統のマウス(C 57 BL/6, A/J)に MAC を静注感染させた後、脾臓 RNA 中の各種サイトカイン mRNA の発現を RT-PCR(reverse-transcriptase assisted polymerase chain reaction)法で調べた。その結果両系マウスの MAC 抵抗性の差が抑制性サイトカインである IL-4, IL-10 の発現の差にもとづく可能性を示唆する結果を得たので報告する。

方法と材料

1. マウス：SLC 社(浜松、静岡)から購入した A/J, C 57 BL/6(ともに6~8週令、雌)を1週間クリーンな環境で飼育したものを使用した。

2. 菌株：*Mycobacterium intracellulare* 31 F 0 93 T 株(京都大学胸部結核研究所の久世教授から分与頂いた)を MAC として用いた。Middlebrook-7 H 9-broth(DIFCO 社, Detroit, Mich., USA)で 37°C, 14 日間振盪培養、遠心集菌し十分に洗浄し、セル・バンカー液(日本全薬工

業, 郡山, 福島)で 6×10^8 CFU/ml(colony forming unit/ml)の濃度に調整し、-80°C で凍結保存した。以後の実験ではすべてこの同じロットの菌体を使用時に生理食塩水で希釈して用いた。尚、凍結保存による生菌数の低下は認められなかった。

3. 菌体抽出液-Whole Cell Lysate(WCL)-の調整：31 F 0 93 T 株を Middlebrook-7 H 9-broth 中で 14 日間、37°C で振盪培養、遠心集菌し十分に洗浄後、氷冷しながら Ultrasonic Disruptor UD 200(Tomy 精工社東京)を使って 200 ワットの超音波で 2 分間破砕した。超音波破砕液を $12000 \times g$, 20 分間、4°C で遠心して得た上清を WCL とした。タンパク質濃度が $200 \mu\text{g/ml}$ となるよう PBS(-)で希釈後、-20°C で保存した。

4. 細菌感染および脾内菌数の測定：31 F 0 93 T 株 1.5×10^8 cfu/ml の 0.2 ml (3×10^7 CFU)を両系マウス尾静脈内に静注感染させた。感染後 1 日, 3 日, 6 日, 9 日, 14 日, 20 日, 30 日, 40 日に脾臓内の生菌数および脾重量を測定した。脾臓の半分を 1 ml の Middlebrook-7 H 9-broth 中でテフロン・ホモジナイザーを用いてホモジネートし、同 broth で希釈後その希釈液 $10 \mu\text{l}$ を Middlebrook-7 H 10(Difco 社)寒天平板にプレーティングした。このプレートを 14 日間、37°C で培養し、CFU 数を算定した。結果は 1 匹のマウスの脾臓中の CFU 数を対数で表した。

5. 脾細胞の培養：MAC 感染後 20 日の A/J マウスから脾臓を無菌的に取り出し、常温にて single cell suspension を作成した後、osmotic shock によって赤血球を溶血させ、残りの脾細胞を 2.5×10^6 個/ml となるように Alpha-MEM(Flow Laboratories 社, Mclean, Va., USA) 10 mM HEPES, 0.07% NaHCO_3 , 0.5 mM 2-mercaptoethanol, $50 \mu\text{g/ml}$ penicilline-G, $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum(ICN Biomedicals 社, Costa Mesa, CA, USA)含有)に浮遊させた。この細胞浮遊液 $100 \mu\text{l}$ づつを 96 穴平底カルチャープレート(Corning 社, New York)に WCL を最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、murine IL-4($0-50 \text{ ng/ml}$)(Genzyme 社, Boston, Mass., USA)の存在下で培養した。培養液に添加した濃度の両抗生剤は MAC の viability に影響を与えないことを予備実験で確認した。培養温度は 37°C とし、培養時間は、脾細胞の MAC 殺菌能の測定の場合には 5 日間、培養上清中の IFN- γ 測定の場合には 72 時間とした。なお、培養上清は IFN- γ 測定までの間、-110°C で保存した。

6. 付着脾臓細胞の培養：脾細胞浮遊液 3.5×10^6 /ml

1 ml を 24 穴カルチャー・プレート (Corning 社) に入れ, 2 時間, 37°C で preincubate した後, 非付着脾細胞を十分に洗浄除去, トリプシン・EDTA 法にて付着脾細胞を回収した。この方法での 1 ウェルあたりの付着細胞数は約 3.8×10^5 個であった。α-naphtyl-butyrate esterase 陽性で yeast 食能を有する細胞が 85% 以上を占める付着細胞標品のみを実験に用いた。最終濃度 10 μg/ml の WCL の共存下に, 最終濃度 50 ng/ml の recombinant murine IL-4 (rmIL-4) (Genzyme 社) または, 最終濃度 50 ng/ml の recombinant murine IL-10 (rmIL-10) (Genzyme 社) を培養系に添加して 5 日間培養した。

7. 脾細胞の MAC 殺菌能の測定: 脾細胞の培養終了後, カルチャー・プレート 1 穴あたり 0.05% Triton-X を含有する生理食塩水 100 μl を加え細胞を溶解させた後, 溶解液の一定量を, Middlebrook-7 H 10 寒天平板上にプレーティングし 37°C, 14 日間培養後 CFU 数を測定した。

8. RT-PCR 法による mRNA の増幅: マウス脾より AGPC 法 (acid guanidiumthiocyanate-phenol-chloroform-RNA extraction method)¹⁵⁾ で RNA を抽出し 65°C, 5 分間加熱後急冷した。RNA 0.8 μg を逆転写酵素反応緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 各 200 μg/ml の dATP・dGTP・dCTP・dTTP, 1 μM oligo(dT)₁₆ Primer, 20 単位 RNasin (Ribo-nuclease inhibitor) と, 100 単位 MoMuLV RNase H-reverse transcriptase (Life Technology 社, Gaithersburg, MD, USA) と混合し 43°C 90 分間反応させることにより cDNA を合成した。5 μl の cDNA を PCR 反応緩衝液 (50 mM KCl, 10 mM Tris HCL ph 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton-X, 各 200 μM の dATP・dGTP・dCTP・dTTP, 200 nM Primer, 1 単位 Taq polymerase (Toyobo 社, 大阪) に混合し, ミネラルオイルを重層した。QUICKTHERMO PERSONAL (Nippon Genetics 社, 東京) で 94°C, 1 分 (denaturation); 60°C, 1 分 (annealing); 72°C, 1 分 (extension) を 35 サイクル行い, PCR 産物 10 μl を 1.5% アガロースゲル電気泳動 (100 V, 30 分) し, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物を確認した。DNA 分子量マーカーは, 123 bp DNA Ladder (Lifetechnology 社) を用いた。

9. Primers: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TNF-α, β-action に特異的な primer は京都府立医科大学微生物学教室の喜多正和先生から分与いただいた物を使用した。その基

本配列は EBML データバンクに登録されている配列を用い, RNA 中の DNA 混入による遺伝子増幅による可能性を排除するため, 少なくとも 1 つのイントロンをはさむエクソン部分からデザインされている。

10. サンプル RNA 濃度を段階希釈した場合の RT-PCR 産物の発現量の変化: マウス脾臓から抽出した total RNA を 10 倍ずつ段階希釈し, 反応の出発段階での mRNA の量を変化させた。そして β-アクトンをプライマーとして RT-PCR 反応産物の発現量 (電気流動用ゲルにおけるバンドの強さ) を調べた。反応の出発段階における total RNA の量は原液では 0.8 μg とし, その 1

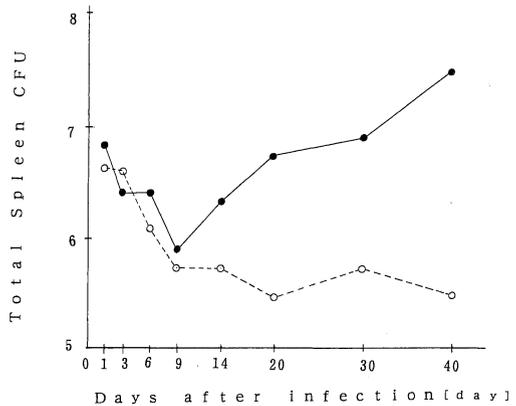


Fig. 1. Growth of *M. intracellulare* 31F093T in the spleen of A/J (○) and C57BL/6 (●) mice after an intravenous injection (3×10^7 CFU per mouse). Data are expressed as mean values (n=5); the SD was omitted; it never exceeded 0.1.

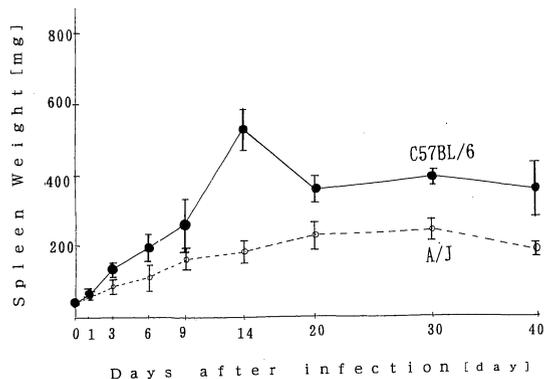


Fig. 2. Changes in the spleen weight of infection A/J (○) and C57BL/6 (●) mice after intravenous injection with 3×10^7 CFU of *M. intracellulare* 31F093T. Data are expressed as the mean \pm SD (n=5).

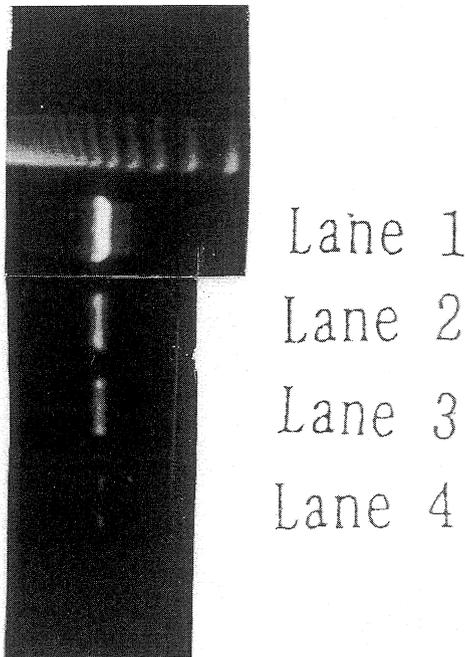


Fig. 3. Scoring of PCR products by the intensity of visualized bands after electrophoresis. RNA samples were 10-fold diluted and transcribed into cDNA by reverse transcriptase. cDNA was subjected to 35 cycles of PCR with β -actin primers. The reaction products were visualized by electrophoresis and were scored by the intensity of bands as follows: +3(lane 1), +2(lane 2), +1(lane 3) \pm (lane 4).

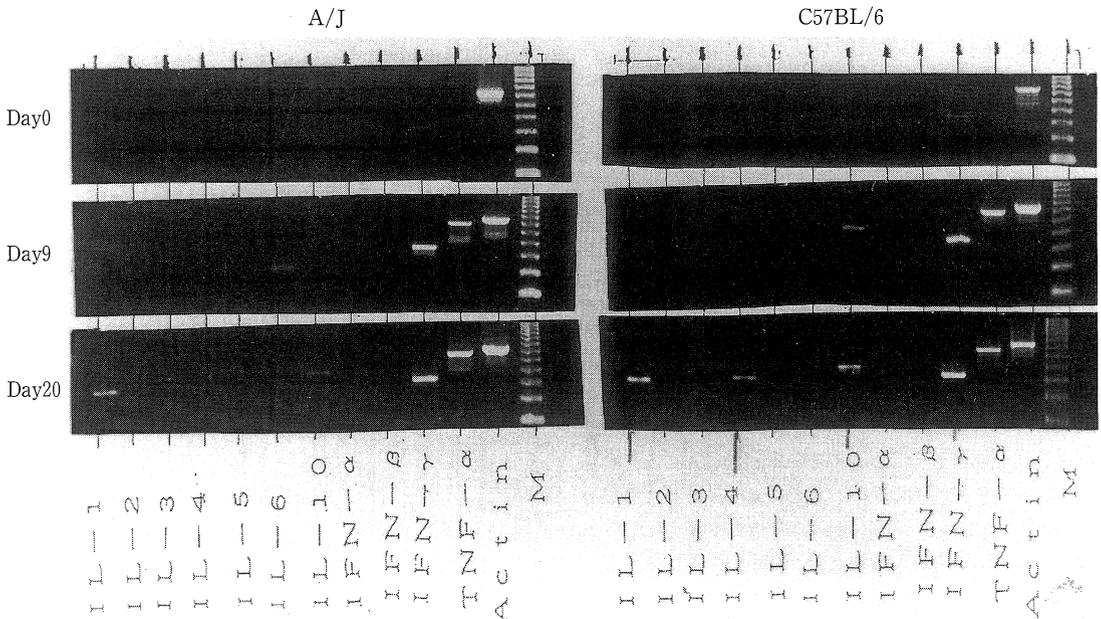


Fig. 4. PCR-assisted amplification of cytokine and β -actin mRNAs from spleen cells of representative individual mice. RNA samples were extracted from the spleens 9 and 20 days after an intravenous infection with 3×10^7 CFU of *M. intracellulare* 31 F093T. RNA samples prepared before infection (day 0) served as a control.

/10, 1/100, 1/1000 量の total RNA を用い上記の方法にしたがって, RT-PCR を行なった.

11. RNA 濃度の測定: RNA 濃度の測定には Gene Quant II (Pharmacia Biotech 社, Cambridge, England) を用いた.

12. A/J マウス脾細胞の培養上清の IFN- γ 濃度の測定: MAC 感染 20 日の A/J マウス脾細胞 (5×10^6 /穴) を

WCL 共存下にて 5 日間培養し上清の IFN- γ 濃度を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 測定用キット: Intertest- γ (Genzyme 社) を使用した.

結 果

1. MAC 感染マウスの脾内菌数の経時的变化: 感染 9 日後までは A/J, C57 BL/6 とともに脾内菌数は減少し, 両系マウス間で脾臓内菌数に差はみとめられなかった. 9 日以降 C57 BL/6 では脾内菌数は増加に転じ, その後今回観察を終了した 40 日目には $3.0 \pm 1.3 \times 10^7$ CFU に達した. これに対して A/J では 9 日から 40 日までほぼ一定の菌数を保った. 40 日目では C57 BL/6 マウスの脾内菌数は A/J のそれに比して約 100 倍の増加をみとめた (Fig. 1).

2. MAC 感染マウスの脾重量の経時的变化: C57 BL/

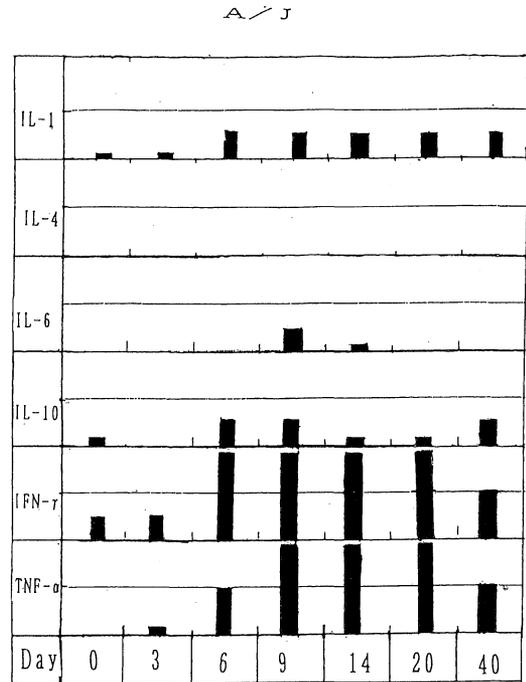
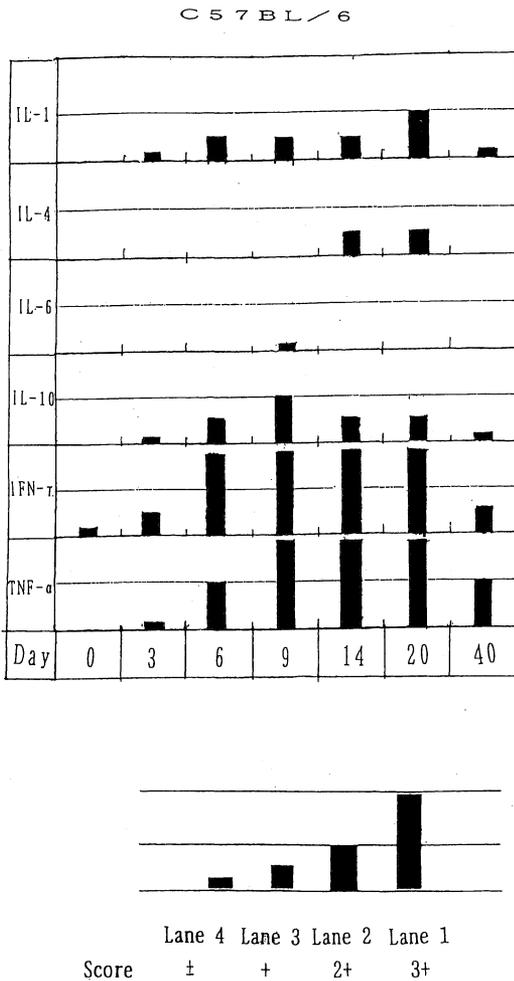


Fig. 5. Kinetics of expression of cytokine mRNA in the spleen of A/J and C57BL/6 mice infected with *M. intracellulare* 31F093T. At the indicated times, five mice were killed and their spleens were removed. Total RNA was extracted from the spleen cells and transcribed into cDNA by reverse transcriptase. cDNA was subjected to 35 cycles of PCR with the indicated primers. The reaction products were visualised by electrophoresis and were scored by the intensity of bands as described in the footnote of Figure 3. These semiquantitative scores were used only for comparing the amounts of products from samples obtained with the same primer.

6の脾重量は感染後9日から14日にかけて急速に増加し、14日から20日に急速に減少、その後40日まで重量変化は認められなかった。MAC感染前の脾重量は両系のマウスで等しいが、感染後のA/Jの脾重量は全期間を通じてC57BL/6よりも小さくC57BL/6のような急激な変化は示さなかった(Fig. 2)。

3. サンプルRNA濃度を段階希釈した場合のβ-action cDNA発現量の変化: RT-PCR解析したtotal RNA量が0.8μgの場合(レーン1)とその1/10, 1/100, 1/1000量(それぞれ, レーン2, 3, 4)におけるcDNA発現量をアガロース電気泳動におけるバンドの濃さから半定量的にスコアー化した(Fig. 3)。バンドの強さを肉眼的に見て最も強いものから順に(+3)レーン1; (+2)レーン2; (+)レーン3; (±)レーン4の4段階に区分した。以後の実験では、各種サイトカインmRNAの発現量を各々のバンドの強さによってこの4段階の区分に従って記載した。

4. MAC感染マウス脾臓内の各種サイトカインmRNA発現のRT-PCR法による検出: 今回調べたサイトカインmRNAはIL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TNF-αである。両系マウス脾臓のDay 0, Day 9, Day 20におけるmRNA発現を比較した(Fig. 4)。また半定量的スコアー化を行なって得た結果を示した(Fig. 5)。IL-2, IL-

3, IL-5, IFN-α, IFN-βは全期間を通じてどちらのマウスにおいても検出されなかった。またIL-1, IFN-γ, TNF-αは両系のマウスでともに感染初期(3日目)から発現し、9日~20日にピークに達したが、両系のマウスの間に量的な差を見いだすことはできなかった。IL-6 mRNAは両系のマウスで共に感染9日後に弱く発現したが量的な差は見られなかった。しかし両系マウスの間で脾内菌数の差が出始める頃(9日-14日)に、IL-4がC57BL/6で発現するのに対してA/Jでは全期間を通じて発現しなかった。さらに、IL-10はC57BL/6では6日目から発現しA/Jでは9日目から発現した。またIL-10は9-20日の間、A/Jにくらべて、C57BL/6において量的により多く発現した。

5. A/Jマウス脾細胞のMAC殺菌能に対するIL-4, IL-10の影響: MAC感染後20日目のA/Jマウスの脾細胞(2.5×10⁵/穴)をWCLの共存下に5日間培養後の培養系における生菌数を比較した(Fig. 6)。培養開始前の菌数は350±35 CFU/穴であった。培養5日目の菌数はIL-4, IL-10非添加の場合は8±1 CFU/穴、50 ng/mlのIL-4添加時は1170±72 CFU/穴、50 ng/mlのIL-10添加時は459±94 CFU/穴であった。IL-4, IL-10それぞれ10~100 ng/mlの濃度で添加した培養液中における31 F 0 93株の増殖率は非添加時と差異を認めなかった。

6. A/Jマウス脾細胞のMAC殺菌能に対するIL-

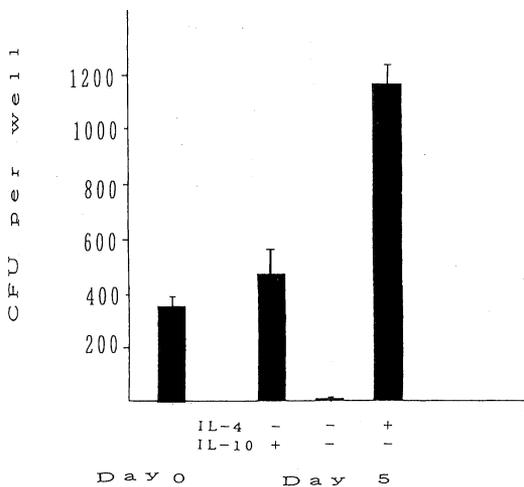


Fig. 6. Effect of treatment with rmIL-4 or rmIL-10 on the intracellular killing ability of MAC of A/J spleen cells.

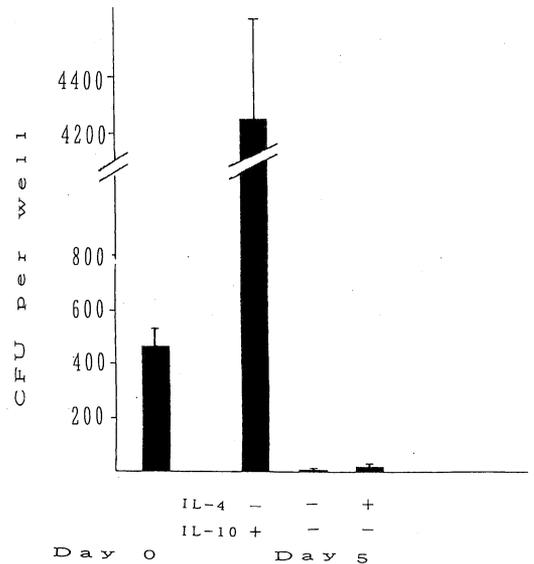


Fig. 7. Effect of treatment with rmIL-4 or rmIL-10 on the intracellular killing ability of MAC of A/J splenic adherent cells.

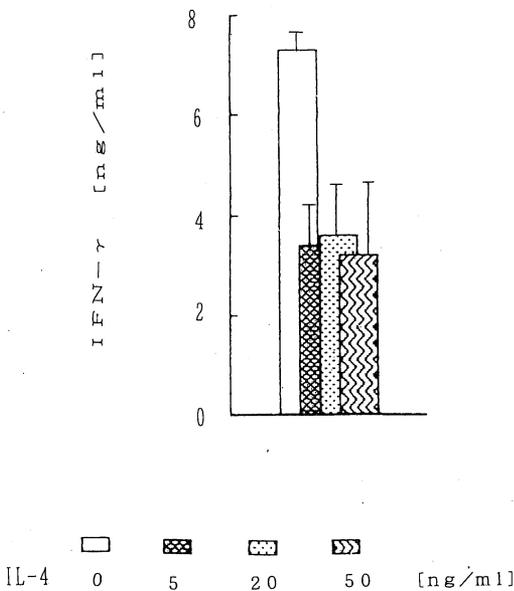


Fig. 8. Effect of rmIL-4 on the production of IFN- γ by A/J spleen cells. Spleen cells were prepared from A/J mice 20 days previously infected with 3×10^7 CFU of *M. intracellulare* 31F093T, and the cells were cultured with *M. intracellulare* extract and the indicated concentrations of rmIL-4 for 72h.

4, IL-10の影響: MAC感染20日後のA/Jマウスの脾細胞中の付着細胞をWCL共存下で5日間培養後の培養系における生菌数を比較した(Fig. 7). 培養開始前の菌数は 455 ± 84 CFU/穴であった。5日間培養後の菌数は, IL-4, IL-10無添加の場合は 6 ± 4 CFU/穴, 50 ng/mlのIL-4添加時には 32 ± 8 CFU/穴, 50 ng/mlのIL-10添加時には 4260 ± 369 CFU/穴であった。

7. A/Jマウス培養脾細胞のIFN- γ 産生能に対するIL-4の影響: MAC感染A/Jマウス脾細胞の培養上清中におけるIFN- γ 濃度をELISA法で調べた(Fig. 8). IL-4非添加時には 7.3 ± 0.27 ng/mlで, 5 ng/mlのIL-4添加時には 3.86 ± 0.8 ng/mlのIL-4添加時には 3.93 ± 0.98 ng/ml, 50 ng/mlのIL-4添加時には 3.62 ± 1.42 ng/mlであった。

考 察

MACは非定型抗酸菌群に属している *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* の総称で, この2種の菌は分野学上の位置が非常に近く生化学的には区別できないが, 種特異的なプローブをつかったPCR法により区別が可能である。従来は *M. intracellulare* がヒ

トの病原菌で, *M. avium* が鳥等の動物での病原体とされたが, DNAプローブを用いた解析からヒトMAC症の約50%は *M. avium* であることが近年明らかにされている。今回の実験では *M. intracellulare* 31F093T株をMACとして使用した。

一般に結核菌やMACなどの抗酸菌は通性細胞内寄生菌であり, 極めて脂質に富んだ牽牢な細胞壁を有することもあって喰食細胞の殺菌能に対する抵抗性が強く, 非刺激マクロファージ内ではほとんど殺菌されない。マクロファージ殺菌能からの抗酸菌のエスケープにかかわるメカニズムは複雑である。例えば堅牢な細胞壁, 活性酸素産生能の阻害, 活性窒素産生能の阻害, ファゴソームから細胞質への逃避, ファゴソーム・リソソーム融合の阻害, マクロファージ不活化サイトカイン(IL-10, TGF- β)の誘導など多くの因子が指摘されている¹⁶⁾。

細胞内寄生菌に対する宿主防御の効果的な発現には, 菌体抗原を取り込んだマクロファージ等の抗原提示細胞からの抗原シグナルとマクロファージやNK細胞により産生されるco-stimulatory signal(IL-12, IFN- γ 等)に反応してのヘルパーT細胞(Th)のclonal expansionを必要とする。マウスThはそのサイトカイン産生パターンによって, Th-1とTh-2のsubtypeに分類されることが知られている。Th-1は主としてIFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-2, GM-CSFを産生し, Th-2はIL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10などを産生する。癩はヒトにおける典型的な細胞内寄生菌感染症である。癩の病型の中で細胞性免疫応答が優位を占めるT型病型の病変部位ではマウスにおけるTh-1型サイトカインmRNAの発現が主体となり, 抵抗性の低いL型の病変では, Th-2型サイトカインmRNA発現パターンを示すことが報告されている¹⁷⁾。このことは抗酸菌感染における宿主防御機構が主としてTh-1に担われていることを示唆するものである。Th-1の前駆T細胞(Th-0)からの誘導にはマクロファージの産生するIL-12が直接的に, あるいはNKの活性化やIFN- γ 産生細胞を介して間接的に関与している¹⁸⁾。一方Th-2が産生するIL-4や, Th-2およびマクロファージが産生するIL-10はマクロファージのIL-12産生阻害を介して, あるいはTh-0に直接作用してTh-0 \rightarrow Th-1への分化を抑制することが知られている¹⁹⁾。今回の実験では, Th-2サイトカインであるIL-4, IL-10のmRNA発現について, 両系マウス(C57BL/6, A/J)でMAC感染後の脾内菌数に差が出始める頃に, その量と発現時期に差がみられた。IL-10 mRNAはC57BL/6においてA/JよりもMAC感染後早期からまた量的にも多く発現した。またIL-4 mRNAはC57

BL/6において14日～20日に発現したが、A/Jでは全く発現しなかった。

このIL-4、IL-10 mRNAの発現の差と両系マウスのマクロファージのMACに対する殺菌作用の差との関連を明らかにするため *in vitro* における感染脾細胞の抗MAC活性におよぼすIL-4、IL-10の影響を解析した。未分画脾細胞のMAC殺菌能は50 ng/mlのIL-4および50 ng/mlのIL-10によって抑制された。一方、付着脾細胞のMAC殺菌能は50 ng/mlのIL-10によって著明に抑制されたが、50 ng/mlのIL-4では抑制されなかった。以上のことから、IL-4とIL-10は共に付着脾細胞のMAC殺菌能を抑制するが、両者のサイトカインは作用する細胞が異なり、IL-10は付着性脾細胞に直接的抑制効果を示し、IL-4は非付着性脾細胞を介してのみ間接的に付着性脾細胞の殺菌能を抑制する可能性が示唆された。今回用いた付着性脾細胞の85%以上が α -naphthyl butyrate esterase 染色陽性で yeast 喰食能を有していることから、マクロファージが主体を占めるものと考えられた。

IL-4、IL-10は抑制性サイトカインとして、種々の感染症において宿主抵抗性を制御することが報告されている。IL-4に関しては、リーシュマニア(原虫)感染において感受性マウスでは局所リンパ節にIL-4 mRNAが発現するのに対して、抵抗性マウスではIL-4 mRNAが発現しないこと、さらに感受性マウスに抗IL-4抗体を投与するとマウスがリーシュマニア感染から生き延びることが報告されている¹⁹⁾。マウスの結核菌感染においてもIL-4がIL-2レセプター発現の抑制を介してT細胞の増殖を抑制することもあきらかにされている^{20,21)}。今回の実験で、MAC感染A/Jマウス脾細胞の*in vitro*におけるIFN- γ 産生が5 ng/ml以上のIL-4によって抑制された。また、IL-2によって刺激されたヒト・リンパ球からのマクロファージ活性化因子としてのIFN- γ 、TNF- α 産生もIL-4によって抑制されたとする報告がある²²⁾。マウスのマクロファージをIFN- γ で活性化することにより結核菌、BCGおよびMACに対する殺菌能が亢進することが見いだされている^{16,23-25)}。このことから、今回 *in vitro* で認められたIL-4によるマクロファージのMAC殺菌能の抑制には、非付着脾細胞におけるIFN- γ 産生の抑制が関与しているものと考えられた。一方、IL-10についてはTNF- α 、GM-CSFによるマクロファージ殺菌能の増強効果を抑制することや、抗IL-10抗体をMAC感染後のマウスに投与すると脾内菌数が減少することが報告されている²³⁾。今回 *in vitro* で認められたIL-10による脾細胞のMAC殺菌能抑制作用は、これらマクロ

ファージ活性化因子のTh-2における合成阻害と、マクロファージの細胞内殺菌能に対する直接的抑制作用から成り立っていると推察される。

近年、細胞内抗酸菌に対する殺菌メカニズムに誘導性窒素酸化物が重要な役割を担っていることが明らかにされている²⁶⁻²⁷⁾。さらに、IL-10やTGF- β 等によるマクロファージの殺菌能抑制とマクロファージの活性窒素酸化物産生能の低下が相関している²⁸⁻²⁹⁾。ことから、IL-10によるマクロファージの直接的な殺菌能抑制効果がより重要であると思われる。これら抑制性サイトカインの脾臓マクロファージや腹腔内マクロファージおよび血中単球からの産生は抗酸菌の菌体成分によって誘導される³⁰⁻³²⁾ことがあきらかにされている。従って、抗酸菌感染症におけるfinal effectorであるマクロファージの抗MAC活性はTh-2由来抑制性サイトカインで制御を受けることもさることながら、食菌されたMACの菌体成分によって誘導される内因性抑制性サイトカイン(IL-10やTGF- β)によるマクロファージ機能のdown regulationがより重要であると考えられる。

このことと関連して、C57BL/6の脾重量はMAC感染14日目をピークとして14日～20日目に急速に減少するが、その理由としてこの時期は脾内菌数が急増する時期でもあり、菌体成分によって抑制性サイトカインの持続的な産生が誘導されその結果、リンパ球の増殖が抑制されるためではないかと推測している。

今回使用したC57BL/6(BCG^r, H-2^a)とA/J(BCG^s, H-2^b)は抗酸菌に対する抵抗性を支配するBcg遺伝子とMHC領域の両方が異なっている。マウスのBcg遺伝子は抗酸菌感染初期における自然抵抗性の有無を決定しまたMHC領域はその後に誘導される獲得免疫の強さに影響を与えると言われている²⁷⁾。したがって、Bcg遺伝子のみを異にするcongenic mouse strainを用いてMAC菌体成分に対するマクロファージの内因性抑制性サイトカイン産生動態を明らかにすることで、MAC感染持続化機構をより明確にできるものと思われる。

結 語

1. 感受性マウス(C57BL/6)と抵抗性マウス(A/J)の脾内菌数は、MAC感染9日目から差が出始め、40日目には約100倍の開きがあった。

2. IL-4 mRNAは両系マウスの脾内菌数に差が出始める9日目にC57BL/6において発現したが、A/Jでは全期間を通じて発現しなかった。

3. IL-10 mRNAはMAC感染6日目から、A/Jに比べてC57BL/6で高い発現レベルを示した。

4. *in vitro* において rIL-10 は付着性脾細胞(85%以上がマクロファージ)の MAC 殺菌能を直接的に抑制した。
5. *in vitro* において rIL-4 は非付着性脾細胞を介して間接的に付着性脾細胞の MAC 殺菌能を抑制した。
6. *in vitro* において rIL-4 は 5 ng/ml 以上の濃度で未分画脾細胞の IFN- γ 産生を抑制した。
7. 今回の実験の結果から、抑制性サイトカインである IL-4, IL-10 の産生亢進が, C57BL/6 マウスにおける MAC 感受性の一因となっている可能性が考えられた。

文 献

- 1) 青柳昭雄：非定型抗酸菌症。感染症の現状と対策。日本医師会編, p202-206, 1993.
- 2) Pelletier, M., Forget, A., Bourassa, D., Gros, P. and Skamene, E. : Immunopathology of BCG Infectuonin Genetically Resistant and Susceptible Mouce Strains. *J. Immunol.* **129** : 2179-2185, 1982.
- 3) Saito, H. and Tomioka, H. : The role of macrophages in host defence mechanisms agaunst *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. 5th Forumin Microbiology, p207-212, 1990.
- 4) 富岡治明, 斎藤 肇：非結核性抗酸菌の発症要因に関する基礎的研究。日本細菌学雑誌 **46** : 827-837, 1991.
- 5) Goto, Y. : Comparative studies on the functions of BCG^s and BCG^f bone marrow macrophages in micobacterial infection *in vitro*. Twenty-ninth Joint Reserch Conference on Tuberculosis and Leprosy(Kyoto), p17-21, 1994.
- 6) Vidal, S., Wallo, D., Vogan, K., Skamene, E. and Gros, P. : Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for BCG. *Cell* **73** : 469-485, 1993.
- 7) Orme, M. I. : The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **138** : 293-298, 1987.
- 8) Orme, M. I., Miller, S. E., Roberts, D. A., Furney, K. S., Griffin, P. K., Dobos, M. K., Chi, D., Rivoire, B. and Brennan, J. P. : T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **148** : 189-196, 1992.
- 9) Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, F., Bruyn, J., Kentos, A., Drowart, A., Vooren J. and Goldman, M. : Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* **60** : 2880-2886, 1992.
- 10) Denis, M. and Ghadirian, E. : Interleukin-1 is involved in mouse resistance to *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* **62** : 457-461, 1994.
- 11) Flesch, I. and Kaufmann, S. : Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* **189** : 316-339, 1993.
- 12) Hubbard, R. and Collons, F. : Immunomodulation of macrophage killing of *Mycobacterium avium in vitro*. *Infect. Immun.* **59** : 570-574, 1991.
- 13) Flesch, I. and Kaufmann, S. : Mechanism involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages, role of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* **59** : 3213-3218, 1991.
- 14) Appelberg, R., Castro, A., Pedrosa, J., Silvia, R., Orme, I. and Minoprio, P. : Role of interferone and tumor necrosis factor alpha during T-Cell-INdependent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect. Immun.* **62** : 3963-3971, 1994.
- 15) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** : 156-159, 1987.
- 16) 富岡治明：(総説)抗酸菌感染症が難治性である理由を探る。日本細菌学雑誌 **50** : 687-701, 1995.
- 17) Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Res, T. H., Bloom, B. R. and Modlin, R. L. : Defining protective response to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* **254** : 277-279, 1991.
- 18) Trinchieri, G. : Interleukin-12 and its role in the generation of Th-1 cells. *Immunol. Today* **14** : 335-337, 1993.
- 19) Sadick, M., Heinzel, F., Bettio, H., Pu, R., Dawkins, R. and Locksley, R. : Cure of murine leishmaniasis with anti-Interleukin-4 monoclonal anti-body. *J. Exp. Med.* **171** : 115-127, 1990.
- 20) Ho, L. J., He, H., Rios, M. and Wick, E. : Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granurocyte-monocyte

- colony-stimulating factor, and interleukin-3 for anti leishmanial activity and oxidative burst capacity. *J. Infect. Dis.* **165**: 344-351, 1992.
- 21) **Martinez, O., Gibbons, R., Garovoy, M.** and **Anderson, F.** : IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. *J. Immunol.* **144**: 2211-2215, 1990.
- 22) **Bello - Fernandez, C., oblakowski, P., Meager, A., Duncombe, A. S., Rill, D. M., Hoffbrand, A. V.** and **Brenner, M. K.** : IL-4 acts as a homeostatic regulator of IL-2-induced TNF and IFN- γ . *Immunology* **72**: 161-166, 1991.
- 23) **Luiz, E. B.** and **Jamila, C.** : Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10, and administration of anti IL-10 to infection in mice. *Infect. Immun.* **61**: 3093-3097, 1993.
- 24) **Bermudez, L. E.** and **Kaplan, G.** : Recombinant cytokines for controlling mycobacterial infections. *Trends. Microbiol.* **3**: 22-27, 1995.
- 25) **Rook, G. A. W., Steele, J., Ainsworth, M.** and **Champion, B. R.** : Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* : comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* **59**: 333-338, 1986.
- 26) **Chan, J.** and **Kauffmann, S. H. E.** : Immune mechanisms of protection. *in* Tuberculosis, Pathogenesis, Protection, and Control (Bloom, B. R., ed.). ASM Press, Washington, D. C., p389-415, 1994.
- 27) **Xie, Q. W., Whisnant, R.** and **Nathan, C.** : promotor of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**: 1779-1784, 1993.
- 28) **Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S.** and **Bloom, B. R.** : Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **175**: 1111-1122, 1992.
- 29) **Doi, T., Ando, M., Akaike, T., Suga, M., Sato, K.** and **Maeda, H.** : Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immun.* **61**: 1980-1989, 1993.
- 30) **Bermudez, L. E.** : Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . *J. Immunol.* **150**: 1838-1845, 1993.
- 31) **Denis, M.** and **Chadirian, E.** : IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. *J. Immunol.* **151**: 5425-5430, 1993.
- 32) **Sieling, P. A., Abrams, J. S., Yamamura, M., Salgame, P., Bloom, B. R., Rea, T. H.** and **Modlin, R. L.** : Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *J. Immunol.* **150**: 5501-5510, 1993.