

Mycobacterium intracellulare 菌体成分による サイトカイン誘導能に関する研究

奈良県立医科大学第2内科学教室

小林 厚

ROLE OF CYTOKINE EXPRESSION TO MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE LYSATE

ATSUSHI KOBAYASHI

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 21, 1998

Abstract: Cell-mediated immune response is known to play a central role in host resistance to *Mycobacterium avium complex* (MAC) infection. However, the mechanisms accounting for the persistent survival of intracellular MAC organisms are not elucidated. Interleukin (IL)-10 inhibits anti-mycobacterial activity of macrophages, which are considered to be final effectors against MAC organisms. Clarification of the mechanisms of how IL-10 is induced in association with MAC infection is important to understand the pathogenesis of MAC infection.

The present study was addressed to determine the active moiety in the lysate of *M. intracellulare* 31 F 093 T to induce IL-10 production. The fraction with a molecular weight of 50 k Da and pI 6.8 was found to induce IL-10 production to a great extent and to suppress IL-12 induction in culture of C 57 BL/6 (*Bcg^s*) mice spleen cells. Administration of this fraction into A/J (*Bcg^r*) mice increased spleen weight and the number of viable mycobacteria in the spleen after infection with *M. intracellulare* 31 F 093 T. In addition, this treatment suppressed the formation of granulomatous lesions in the lung of infected mice.

These findings indicate that a 50 k Da, pI 6.8 fraction extracted from *M. intracellulare* 31 F 093 T contains one of the factors contributing to the progression of MAC infection. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 353~364, 1998)

Key words: *Mycobacterium avium complex* (MAC) infection, *Mycobacterium intracellulare*, cytokines, interleukin-10, interleukin-12

緒 言

Mycobacterium avium complex (MAC)は非定型抗酸菌症の原因菌の70-80%を占め最も多く¹⁾, acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)患者などの易感染性宿主の日和見感染菌として重要である²⁾. MAC感染症は一般に諸種抗結核薬や抗菌薬に耐性で治療は困難な場合が多い³⁾. 結核菌をはじめとする抗酸菌は細胞内寄生

菌で、一般に抗酸菌感染に対する宿主防御機能は細胞性免疫が担っているが、MAC感染に対する宿主応答については不明な点も多い。抗酸菌に対する宿主防御機能が発現するには、細胞内寄生菌と反応した macrophage(Mφ)や natural killer(NK)細胞などが産生する interleukin(IL)-12 と interferon(IFN)- γ によってナイーブ CD4 T細胞が T helper(Th)1細胞へ分化し、Th1細胞から産生される IFN- γ が Mφ を活性化することが必要

である⁴⁻⁶⁾。しかし、IL-4, IL-10, transforming growth factor(TGF)- β などのTh2細胞由来サイトカインは、M ϕ 機能を抑制したりナイーブCD4T細胞のTh1への分化を抑制し、細胞内寄生菌の排除が遅延することで抗酸菌の持続感染を招くと考えられている⁷⁻¹¹⁾。またMAC感染による抑制性サイトカインの産生誘導機構は明らかではなく、MAC感染におけるIL-10の誘導機構の解析が難治性MAC感染症の病態解明に重要である。

本研究ではMAC感染でのIL-10の誘導機構を解析する目的で、*M. intracellulare* 31 F 093 T菌体抽出液からゲル濾過およびクロマトフォーカシングでIL-10を誘導する画分を分離した。この画分の*in vitro*および*in vivo*におけるサイトカイン産生誘導能について詳細に検討し、新知見を得たので報告する。

材料と方法

1) 動物

実験動物は6-8週齢、雌でMAC感染性SPFC 57 BL

/6(*Bcg*^S)マウスとMAC抵抗性SPFA/J(*Bcg*^r)マウス(SLC社、静岡)とを用いた。

2) 菌株

Mycobacterium intracellulare 31 F 093 T株(京都大学胸部疾患研究所、久世文世教授から御恵与)を用いた。同菌株をMiddlebrook 7H9 broth(Difco社、Detroit, MI)中で37°C14日間静置培養した。菌体を遠心集菌し十分に洗浄後、セル・バンカー液(日本全薬工業、郡山)で 1.5×10^8 CFU/ml(colony forming unit/ml)の濃度に調整し、-80°Cで凍結保存した。以後の実験はすべて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、凍結保存で生菌数は低下しなかった。

3) 菌体抽出液の作製と分離

Middlebrook 7H9 broth中で14日間培養により得られた31 F 093 T株菌体を遠心集菌し十分に洗浄後、氷冷下で超音波破砕器(UD 200®, TOMY社、東京)で200ワット、3分間超音波破砕し、破砕液を4°C、30,000gで30分間遠心した。この操作を3回繰り返し得られた上清

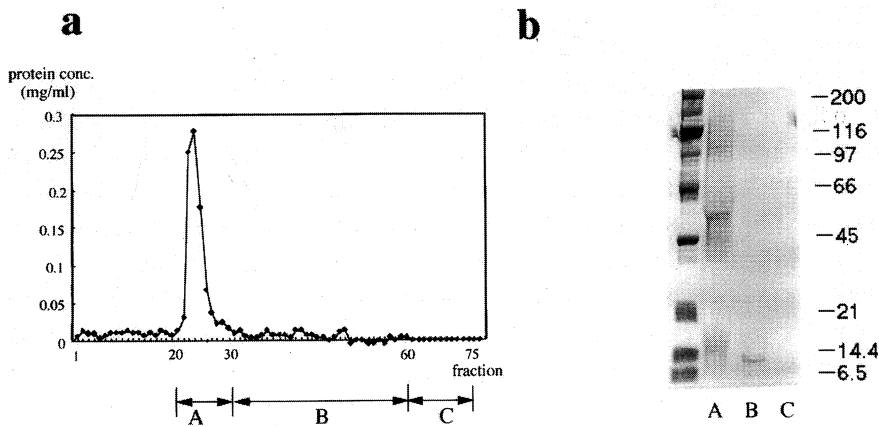


Fig. 1. Fractionation of MAC lysate.

a. Chromatographic profile(4 ml/fraction)of MAC lysate by Sephadex G-100 column. Only a single peak was obtained. Three fractions, A : 20-30, B : 31-60, C : 61-75 fraction numbers were pooled. Each lysate was adjusted to a concentration of $100 \mu\text{g/ml}$. ($V_0=80$ ml)
 b. SDS-PAGE of fractions A, B and C under unreducing condition. Fraction C was not visualized by Coomassie staining. In the following experiments, fraction C was concentrated by ultrafiltration. The MWs of the major band in each fraction were as follows ; A, 15-103 kDa, B, 13 kDa as determined by SDS-PAGE, C, 5-10 kDa as determined by ultrafiltration using MW-cut off membranes.

を硫酸アンモニウム 60%飽和で塩析し得られた沈殿物を菌体抽出液とした。菌体抽出液 1.5 ml を Sephadex G-100 カラム (90×2.5 cm) (Pharmacia Biotech 社, Sweden) で分画し, 各 4 ml 採取し各フラクションの蛋白量を BioSpec-1600[®] (島津製作所, 京都) を用いて測定した (Fig. 1 a)。全フラクションを 3 画分に分け (画分 A: 20~30, 画分 B: 31~60, 画分 C: 61~75), 各画分を phosphate-buffered saline (PBS) で 24 時間透析後蛋白濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し, 各画分のサイトカイン誘導能を測定した。さらに画分 A を Sephadex G-200 カラム (45×1.6 cm) (Pharmacia Biotech 社) で分画し, 各 4 ml 採取し各フラクションの吸光度 (280 nm) を測定した (Fig. 2 a)。fast flow のピーク (画分 A₁: 9~16) および slow flow のピーク (画分 A₂: 30~38) をそれぞれ PBS で 24 時間透析後蛋白濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し, 各画分のサイトカイン誘導能を測定した。さらに画分 A₁ を 0.025 M Tris-acetate buffer, pH 8.3 で 24 時間透析後, 同バッファーで平衡化したクロマトフォーカシングカラム (PBE 94 ゲル, KI×40 cm, Pharmacia Biotech 社) に添加し, polybuffer 96 (30%) と polybuffer 74 (70%)

から成る溶出液 (希釈率 1:10, pH 5.0) 400 ml でクロマトフォーカシングを実施した (流速 8 ml/h)。pH は 2 ml で 0.02 の変化が生じるように設定した。溶出液は各 2 ml 採取し, 各フラクションの吸光度 (280 nm) と pH を測定した (Fig. 3)。溶出順に分画 A₁₋₁ (pH 7.88), A₁₋₂ (pH 6.80), A₁₋₃ (pH 5.63), A₁₋₄ (pH 5.27), A₁₋₅ (pH 4.58) とし, 各画分を飽和硫酸で 24 時間透析し polybuffer を除去後, PBS で 72 時間以上透析し蛋白濃度を 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したものを最終標品とした。分画する過程で蛋白分解酵素の阻害剤は添加せず, すべての過程は 4 $^{\circ}\text{C}$ 下で行った。

4) 電気泳動

各画分の分子量を測定するため Laemli の方法に従って SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を施行した。泳動 sample は sample buffer で可溶化後 100 $^{\circ}\text{C}$ 5 分加熱して用い, 1 レーンあたり 10 μl を 3.8% 2-mercaptoethanol (2 ME) による還元下と非還元下とで泳動した。ゲルは 12.5% non-gradient minigel PAGEL 12.5 L (ATTO 社, 東京) を用い, 電気泳動 10 mA, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下で行った。ゲルは Coomassie brilliant

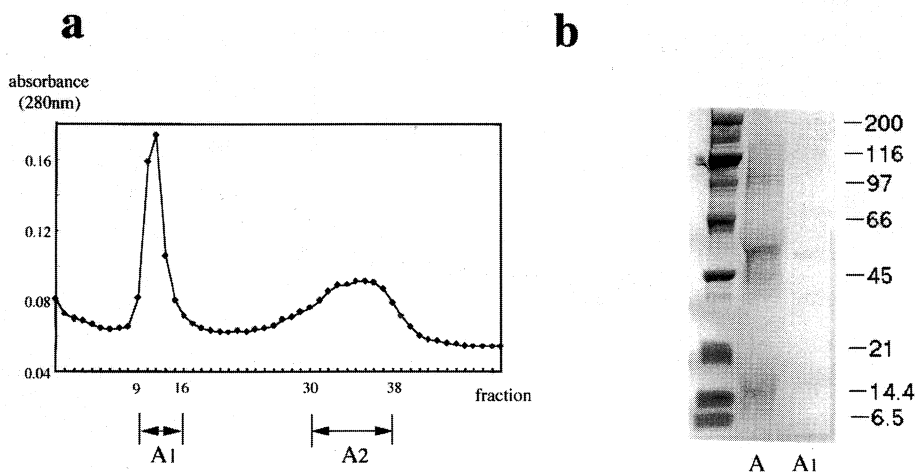


Fig. 2. Fractionation of fraction A

a. Chromatographic profile (4 ml/fraction) of fraction A by Sephadex G-200. Elution profile showed the presence of two different peaks. Two fractions, A₁, 9-16, A₂, 30-38 fraction numbers were pooled. Each fraction was adjusted to a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$. ($V_0=28$ ml)

b. SDS-PAGE of fractions A and A₁ under nonreducing condition. The molecular weight of fraction A₁ was approximately 50 kDa.

blue で染色した。

5) *in vitro* におけるサイトカイン誘導能の検討

RT-PCR: SPFC 57 BL/6 マウスを1週間 SPF 下で飼育後脾臓を無菌的に採取し, 常法により single cell suspension を作製した後, hypotonic lysis で赤血球を除去した。脾細胞をトリパンブルーで染色し細胞数を数え, Eagle's minimal essential medium (MEM) (Flow Laboratories 社, Mclean, Va), 10 mM HEPES, 0.07 % NaHCO₃, 0.5 mM 2-mercaptoethanol, 50 μg/ml streptomycin, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (ICN Biomedicals 社, Costa Mesa, CA) の培養液中で 5.0 × 10⁶ 個/ml に調整した。この細胞浮遊液 1.0 × 10⁶ 個/200 μl ずつ 96 穴平底マイクロプレート (Corning 社, NY) に分注し, 先に精製した各分画 1 μg/10 μl, もしくは同量の PBS (対照) を添加し, 37°C, 5 % CO₂ 下で 48 時間培養した。培養終了後 TRIzol® (GIBCO BRL 社, Gathersburg, MD) を用い, acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC) 法で全 RNA を抽出し¹²⁾, reverse-transcriptase assisted polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で β-actin, IL-10, IL-12,

IFN-γ mRNA の発現を調べた。すなわち抽出した RNA 0.8 μg あたり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 0.2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1 μM oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer], 20 単位 RNase (Ribo-nuclease) inhibitor, 100 単位 Reverse transcriptase (GIBCO BRL 社) を混合し 42°C, 50 分と 70 分, 15 分間反応させ cDNA を合成した。2 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 0.2 mM の dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0.2 mM Primer, 4 単位 Taq polymerase (GIBCO BRL 社)] に混合し, ミネラルオイルを重層した。この反応液を Thermal cycler (QUICKTHERMO PERSONAL®, Nippon Genetics 社, 東京) で 94°C, 1 分, 60°C, 1 分および 72°C, 1 分を 35 サイクル行い, 得られた PCR 産物 10 μl を 1.5 % アガロースゲル電気泳動 (100 V, 30 分) し, 泳動後バンドはエチジウムブロマイド染色を確認した。使用した各種サイトカインに特異的な primer の塩基配列を Table 1 に示した。DNA 分子量のマーカーは 123 bp DNA Ladder

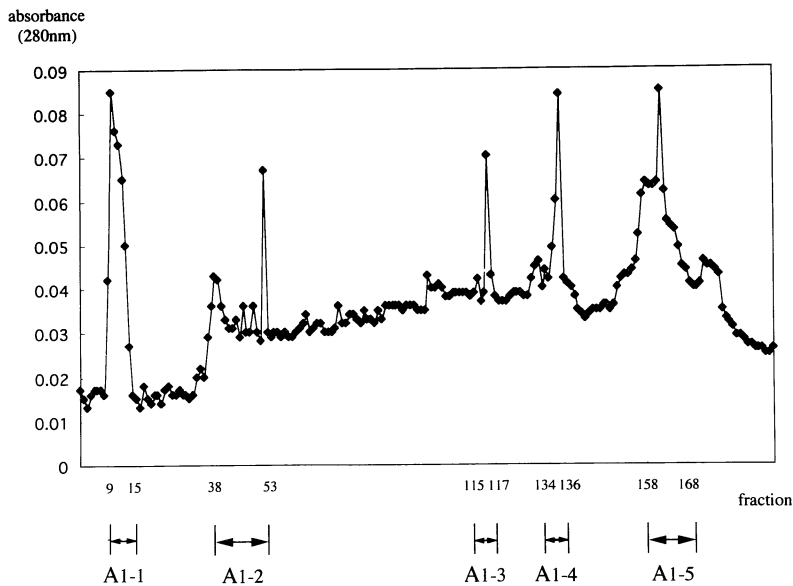


Fig. 3. Fractionation of fraction A₁

Chromatographic profile of fraction A₁ by chromatofocusing. Five peaks were obtained. The pI of each fraction was 7.88(fr. A₁₋₁), 6.80(fr. A₁₋₂), 5.63(fr. A₁₋₃), 5.27(fr. A₁₋₄), 4.58(fr. A₁₋₅). Each fraction was adjusted to a concentration of 35 μg/ml.

Table 1. Sequences of primer sets

Cytokine		Nucleotides
β -actin	sense	CTGAAGTACCCATTGAACATGGC
	antisense	CAGAGCAGTAATCTCCTTCTGCAT
IL-10	sense	CTCTTACTGACTGGCATGAGGATC
	antisense	CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAATTT
IL-12	sense	AAGTGGCGTTGGAAGCACGG
	antisense	GAACACATGCCACTTGCTG

(GIBCO BRL 社)を用い、検出サイトカインの同定を行った。RNA濃度はGene Quant II® (Pharmacia Biotech 社, Cambridge)で測定した。

ELISA: マウス脾細胞からの RNA 抽出と同時に培養上清を回収し、サイトカイン測定までの間-80°Cで保存した。培養上清中の IL-10, IL-12, IFN- γ 産生量を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。IL-10, IFN- γ の測定には Perseptive 社製, IL-12 の測定には GENZYME 社製 ELISA キットを用いた。

6) 画分 A₁₋₂ の *in vivo* における影響

MAC 菌体画分の中で *in vitro* において IL-10 を誘導し、IL-12 産生を抑制した画分 A₁₋₂ のみについて、*in vivo* では MAC に対して抵抗性とされている A/J マウスを用いることで同画分が抵抗性を減弱させるか解析した。A/J マウスに *M. intracellulare* 31 F 093 T (3×10⁷ CFU/0.2 ml) を静脈内感染させ、画分 A₁₋₂ を感染後 1 日、3 日および 6 日目に腹腔内投与し 9 日目に脾臓と肺とを摘出した。画分 A₁₋₂ 非投与の感染 A/J マウスを対照とした。両マウス群での脾重量、脾臓内菌数、臓器内 IL-10 mRNA 発現および肺の病理組織像の相違を比較検討した。脾臓内生菌数の算出は脾臓を 1 ml Middlebrook 7 H 9 broth 中でテフロン・ホモゲナイザーでホモジネートし同 broth で希釈後その希釈液 10 μ l 中の生菌数を Middlebrook 7 H 10 (Difco 社, Detroit, MI) を用いて plate count 法を用い 37°C 14 日間培養後に測定した。肺病理組織標本を作製しヘマトキシリン・エオジン染色で観察した。

7) 統計学的処理

2 群間の有意差の検定には unpaired Student's t-test を用い、危険率 5%未満を有意とした。

結 果

1) 電気泳動

画分 A, B, C の SDS-PAGE では画分 A は 15-103 kDa の範囲に 3 ヶ所、画分 B は 13 kDa に 1 ヶ所バンドを認めた。画分 C はこの泳動法および Coomassie 染色では検出し得なかった (ultrafiltration により 5~10 kDa の分子量を有していることを確認した) (Fig. 1 b)。

画分 A, A₁, A₂ の SDS-PAGE では画分 A₁ は 50 kDa にバンドを認めた。画分 A₂ は Coomassie 染色では検出されなかった (Fig. 2 b)。

2) *in vitro* でのサイトカイン誘導能

A, B, C いずれの画分でも IL-10 mRNA の発現誘導を認め、産生能では画分 A で他 2 画分よりも有意な産生を認めた (p<0.01) (Fig. 4)。IL-12 mRNA の発現は画分 C で認められたが、画分 A, B では検出レベル以下であった。画分 C は IL-12 の産生亢進も伴っていた (Fig. 5)。A, B, C いずれの画分でも IFN- γ mRNA の発現誘導を認め、画分 C では産生亢進も認め (p<0.01)、IL-12 の場合と同様の傾向であった (Fig. 6)。A が IL-10 を有意に産生する画分であったため、次に画分 A を Sephadex G-200 を用いたゲル濾過により画分 A₁, A₂ に分離しサイトカイン産生能を検討した。

A₁, A₂ いずれの画分でも IL-10 mRNA の発現誘導を認め、A₁ が A₂ よりも IL-10 産生能が強かった (Fig. 7)。画分 A による IL-10 産生は画分 A₁ が担っているものと考えられた。A, A₁ の画分では IL-12 mRNA の発現誘導は検出レベル以下で、産生能では A₁ が A₂ よりも低値であった (Fig. 8)。これらの結果から画分 A₁ による IL-10 産生誘導と IL-12 産生抑制の可能性が示唆された。そこで画分 A₁ のクロマトフォーカシングを実施した。

IL-10 mRNA は画分 A₁₋₂, A₁₋₅ で、IL-12 mRNA は画分 A₁₋₃, A₁₋₅ でそれぞれ強い発現を認め、特に画分

A₁₋₂はIL-10 mRNA発現を誘導したがIL-12 mRNAの発現は検出レベル以下に留まった(Fig. 9). 以上から、画分 A₁₋₂は *in vitro* でIL-10産生を誘導しIL-12の産生を抑制するため、MAC感染持続化の要因になり得る可能性があり *in vivo* での作用を検討した.

3) *in vivo* での画分 A₁₋₂ の作用

M. intracellulare 31 F 093 T を感染させた A/J マウスで画分 A₁₋₂ の投与効果を感染マウスの脾重量と脾臓

Table 2. Spleen weights and CFU in either fraction A₁₋₂ injected or not injected mice.

	A ₁₋₂ injected	A ₁₋₂ not injected
Weight(mg)	183±11	136±25*
CFU	15×10 ⁴	8.3×10 ⁴ *

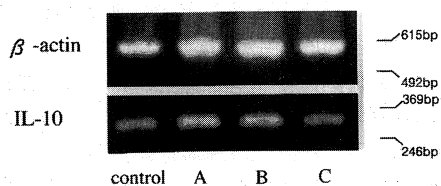
Values are mean±SD

* p<0.05, for the difference between Fr.

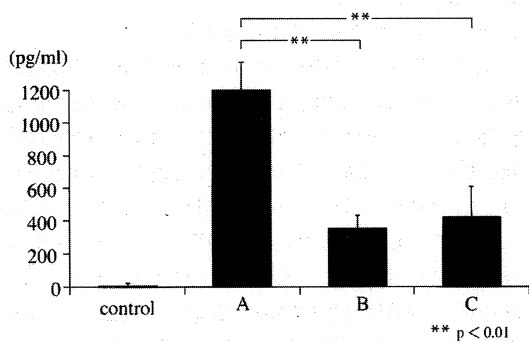
A₁₋₂ injected and not injected groups

CFU : colony forming unit

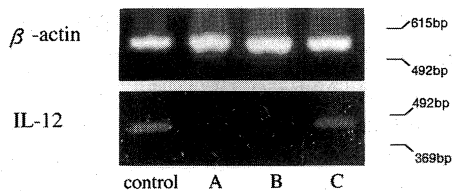
RT-PCR



ELISA



RT-PCR



ELISA

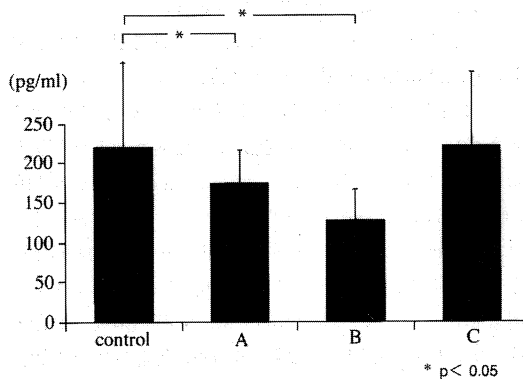


Fig. 4. IL-10 induction by C57 BL/6 spleen cells stimulated with fractions A, B, and C

IL-10 mRNA expression in RNA of spleen cells stimulated with 1µg/10µl of each fraction for 48 h. Quantitation of IL-10 in culture supernatants of stimulated spleen cells by ELISA.

Fig. 5. IL-12 induction by C57 BL/6 spleen cells stimulated with fractions A, B, and C

IL-12 mRNA expression in RNA of spleen cells stimulated with 1µg/10µl of each fraction for 48 h. Quantitation of IL-12 in culture supernatants of stimulated spleen cells by ELISA.

内菌数で判定した。画分 A₁₋₂ 投与で脾重量と脾臓内菌数は有意に高値を示し(p<0.05)(Table 2), *in vivo* でも画分 A₁₋₂ は MAC 持続感染を助長するものと考えられた。脾臓内 IL-10 mRNA の発現は、画分 A₁₋₂ 投与マウスで発現が認められたが、画分 A₁₋₂ 非投与マウスでは検出レベル以下で(Fig. 10), 画分 A₁₋₂ による臓器内 IL-10 誘導亢進が示唆された。臓器内 IL-12 mRNA の発現はこの実験系ではいずれのマウスでも検出レベル以下

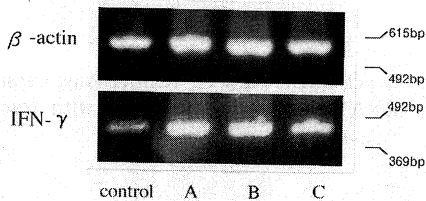
であった。

摘出肺の病理組織像は、画分 A₁₋₂ 投与で対照マウスに比べ個々の肉芽腫は小さく辺縁が不明瞭で肉芽腫の形成が抑制される傾向にあった(Fig. 11)。

考 察

抗酸菌感染で宿主に誘導される抵抗性は、主に Mφ と T 細胞で構成される細胞性免疫とされている。しかし、

RT-PCR



ELISA

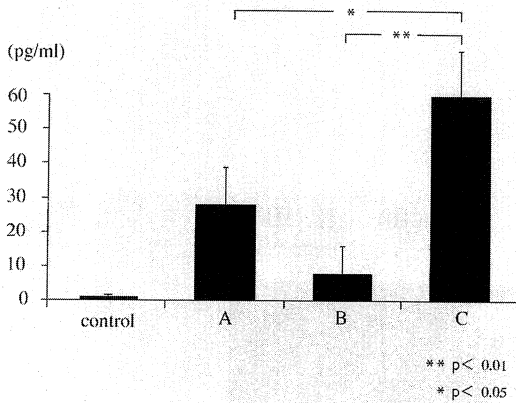
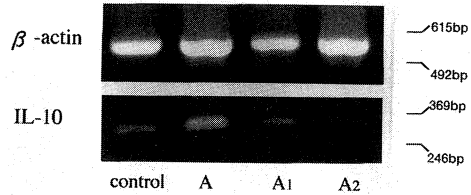


Fig. 6. IFN- γ induction by C57 BL/6 spleen cells stimulated with fractions A, B, and C

IFN- γ mRNA expression in RNA of spleen cells stimulated with 1 μ g/10 μ l of each fraction for 48 h. Quantitation of IFN- γ in culture supernatants of stimulated spleen cells by ELISA.

RT-PCR



ELISA

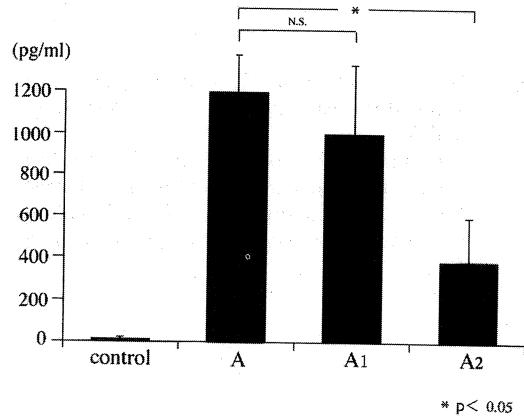


Fig. 7. IL-10 induction by C57 BL/6 spleen cells stimulated with fractions A, A₁, and A₂

IL-10 mRNA of spleen cells stimulated with 1 μ g/10 μ l of each fraction for 48 h. Quantitation of IL-10 in culture supernatants of stimulated spleen cells by ELISA.

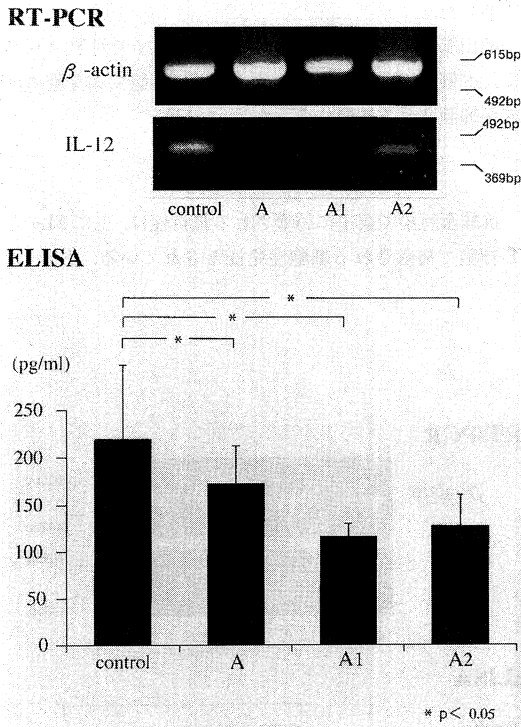


Fig. 8. IL-12 induction by C57BL/6 spleen cells stimulated with 1 μ g/10 μ l of fractions A, A₁, and A₂

IL-12 mRNA expression in RNA of spleen cells stimulated with 1 μ g/10 μ l of each fraction for 48 h. Quantitation of IL-12 in culture supernatants of stimulated spleen cells by ELISA.

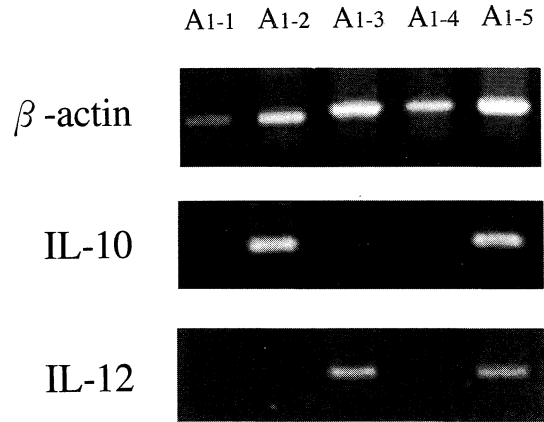


Fig. 9. β -actin, IL-10 and IL-12 mRNA expression in RNA spleen cells stimulated with fractions A₁₋₁₋₅

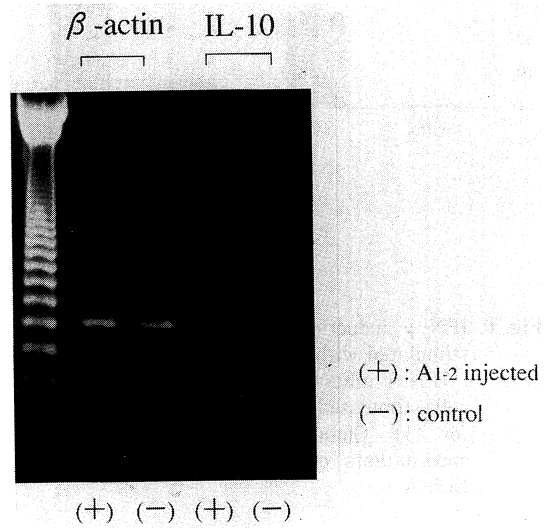


Fig. 10. β -actin and IL-10 mRNA expression in RNA spleen cells in mice with or without injection of fraction A₁₋₂.

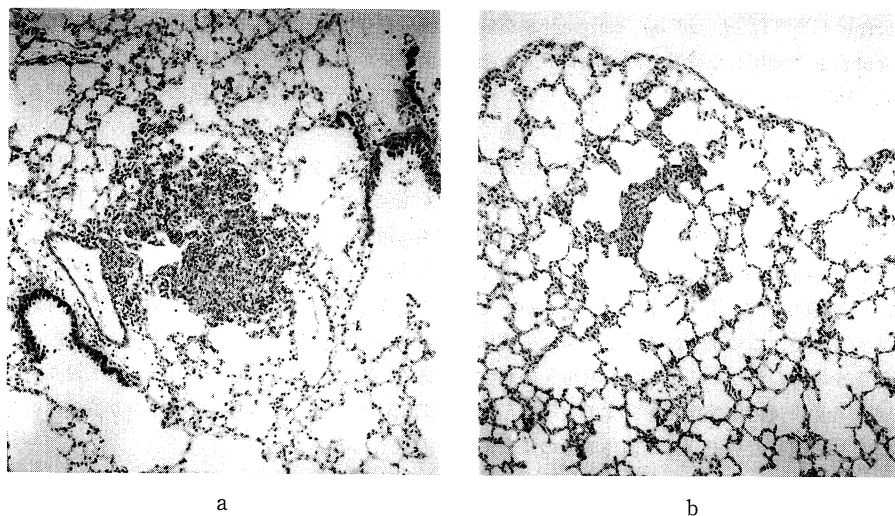


Fig. 11. Pathological findings of the lung by hematoxylin eosin stain(×100).
 a. infected mice without ingestion of fraction A₁₋₂, showing an apparent granulomatous lesion.
 b. infected mice with ingestion of fraction A₁₋₂, showing no apparent granulomatous lesion.

AIDSのような免疫不全あるいは高齢化、担癌状態などの要因で免疫力が低下した易感染性宿主では抗酸菌に対する抵抗力が弱まり発症に至る²⁾。米国では AIDS 患者の剖検例の 50%以上が MAC に感染していると報告されている³⁾。MAC に有効な治療法は確立されておらず免疫学的アプローチが期待される。今回の検討で *M. intracellulare* 31 F 093 T から分離し得た 50 kDa, pI 6.8 の画分が、IL-10 の誘導活性を持ち MAC 感染を増悪させる一因になり得ることが示された。

細菌が生体に侵入すると Mφ に貪食され殺菌、消化されるが、MAC などの抗酸菌は脂質に豊んだ細胞壁を有しており、非刺激 Mφ ではほとんど殺菌されず Mφ 内に持続感染する。Mφ の活性化が抗酸菌防御免疫に主要な役割を果たしており、Mφ を活性化するサイトカインとして T 細胞あるいは NK 細胞が産生する IFN-γ¹³⁾、活性化された Mφ から産生される (tumor necrosis factor(TNF)-α¹⁴⁻¹⁵⁾ などが考えられている。ヘルパー T 細胞は産生するサイトカインの種類で Th 1 細胞と Th 2 細胞とに分けられるが、抗酸菌に対する宿主防御免疫ではナイーブ CD 4 T 細胞の Th 1 細胞への分化が重要である。Mφ や NK 細胞から産生される IL-12 が Th 1 細胞への分化に^{4,5)}、NK 1.1 CD 4 T 細胞から産生される IL-4 が Th 2 細胞への分化に、それぞれ重要であること

が明らかになっている⁹⁾。抗酸菌感染では Mφ 内の小胞体内に集積した菌体刺激により Mφ には IL-12 産生が誘導され、IL-12 によって刺激を受けた NK 細胞から IFN-γ が産生されることで Th 0 細胞が Th 1 細胞に分化する。活性化された Th 1 細胞が産生する IFN-γ で最終エフェクターである Mφ が活性化され抗酸菌の除去に働くと考えられている。

一方、IL-4、IL-10、TGF-β などの Th 2 細胞由来サイトカインが存在し、IL-10 と TGF-β は共役的に Th 1 細胞の分化や Mφ の機能を抑制するとされており⁷⁻¹¹⁾、Th 1 細胞と Th 2 細胞とは互いに制御しあっている¹⁰⁾。Maggi ら¹⁷⁾ はヒト末梢血単核球で Th 1 細胞の産生する IFN-γ で Th 2 細胞の機能が低下し、Th 2 細胞が産生する IL-4 投与で Th 1 細胞の機能が低下すると報告し Th 1 細胞と Th 2 細胞との互いの制御を指摘している。したがって抗酸菌免疫を活性化するには Th 1 細胞由来のサイトカインである IL-12、IFN-γ の産生誘導を亢進し、IL-10 に代表される Th 2 細胞由来 Mφ 抑制性サイトカインの誘導を制御することが重要である。

抗酸菌菌体の生化学的構成としては脂質、蛋白、多糖類が挙げられそれぞれの生物活性が指摘されている。抗酸菌の細胞表面は多くの脂質で覆われており MAC 感染における免疫系に影響を与えることが報告されてい

る¹⁸⁻²¹⁾。Barrow ら^{18,19)}は *M. avium* serover 8 から silicic acid column で抽出した脂質分画ではヒト末梢血単核球からの TNF- α の産生が誘導され、またリンパ球の増殖が抑制されるが、glycopeptidolipid(GPL)分画ではそれらの活性が認められず、脂質と GPL との生物活性が異なるとしている。Tomioaka ら²⁰⁾は *M. intracellulare* N-260 から得られた脂質を 3 分画(phospholipid fraction, polar fr., apolar mycosite fr.)に分け、前 2 分画はマウス脾細胞の分化、T cell からの IL-2 の産生を抑制したとしている。このように MAC 由来の脂質は TNF- α の産生を誘導したり、リンパ球の増殖を抑制するなどさまざまな免疫反応修飾作用を有すると考えられる。一方、MAC に特異的な免疫反応は菌体成分の蛋白により誘導されるとされており、さまざまな精製蛋白による免疫反応が報告されている²¹⁾。IFN- γ 産生は *M. avium paratuberculosis* 由来 30 kDa 蛋白と *M. avium subsp. silvaticum* 由来 40 kDa 蛋白とが羊の末梢血リンパ球から IFN- γ の有意な産生を誘導すると報告されている²²⁾。また *Mycobacterium avium* 由来 48~52 と 62 kDa 蛋白は、ヒト単球由来 M ϕ からの TNF- α の有意な産生を誘導すると報告されている²³⁾。Th 2 細胞由来サイトカインについては *Mycobacterium avium* 由来 33 と 65 kDa 蛋白は、ヒト M ϕ からの TGF- β 産生を誘導したと報告されている²⁴⁾が、MAC 感染で IL-10 を誘導する菌体成分を検討した報告はない。

IL-10 は Th 1 細胞分化と M ϕ 活性化とを抑制するサイトカインとして重要である⁷⁻¹¹⁾。Fiorentino ら⁸⁾は、IL-10 投与で M ϕ や Th 1 細胞から産生される TNF- α 、IFN- γ などの M ϕ 活性化サイトカインの産生が抑制され、同量の IL-4 とでは IL-10 の方が抑制作用が強いと報告している。また抗 IL-10 抗体投与で MAC に対する抵抗性が回復したとする報告がある^{25,26)}。Bermudez ら²⁶⁾は *M. avium* を感染させた腹腔 M ϕ に IL-10 を投与すると TNF- α の産生が抑制され、抗 IL-10 抗体投与でマウスの肝と脾臓内菌数は低下したと報告している。Denis ら²²⁾も抗 IL-10 抗体投与で BALB/c マウス (*Bcg*⁸⁾)の脾臓内菌数が有意に低下したとしており、難治性 MAC 感染症での IL-10 の重要性が示唆される。

今回の検討で *M. intracellulare* 31 F 093 T 由来 50 kDa, pI 6.8 の画分に C 57 BL/6(*Bcg*⁸⁾)マウス脾細胞に対し、IL-10 の強い産生誘導活性と、IL-12 の産生抑制活性が確認された。同分画は A/J(*Bcg*⁷⁾)マウスにおいて腹腔内投与で、感染後マウスの脾重要および脾臓内菌数を増加したことから、MAC 感染を進展させ得る因子を含む画分であると考えられた。肺の病理組織像では同

画分投与で肉芽腫形成が抑制される傾向にあった。抗酸菌感染での肉芽腫形成には IL-1, TNF- α の関与が指摘されている^{27,28)}がその詳細については解明されていない。IL-12 投与で Th 1 や NK 細胞からの IFN- γ 産生が亢進し、IFN- γ が M ϕ を活性化させ最終的に肉芽腫炎症を増強したことが報告されており²⁹⁾、IL-12 が肉芽腫形成に影響を及ぼすことが指摘されている。今回の検討でも *in vitro* で同画分が IL-12 の産生誘導を抑制し得たことから、MAC 抵抗性マウスにおける肉芽腫形成抑制の一因を担うと考えられた。肉芽腫は抗酸菌の増殖抑制あるいは封じ込めを担うと考えられており、肉芽腫形成抑制は宿主抵抗性の抑制につながり抗酸菌感染の一因と考えられる。

以上から今回初めて *M. intracellulare* 31 F 093 T より分離された 50 kDa, pI 6.8 の画分は MAC 感染症増悪因子として重要な役割を演じていると考えられる。MAC 感染症の病態をより詳細に解明するには本実験系において難治性が IL-10 だけによるものかを確認するため、50 kDa, pI 6.8 画分の *in vivo* における作用を IL-10 モノクローン抗体が中和し得るか検討することと、また同画分の糖成分、脂質成分を含めた詳細な構成成分の解析が望まれる。

結 語

M. intracellulare 31 F 093 T 菌体成分によるサイトカイン誘導能を検討した。

M. intracellulare 31 F 093 T 菌体抽出液からゲル濾過およびクロマトソークシングを用いてマウス脾細胞に IL-10 産生を誘導する画分を分離した。

1) *in vitro* で *M. intracellulare* 31 F 093 T 由来 50 kDa, pI 6.8 の画分が、C 57 BL/6 マウス (*Bcg*⁸⁾)脾細胞において IL-10 産生を誘導し、IL-12 の産生を抑制した。

2) 同画分を A/J マウス (*Bcg*⁷⁾)に投与することで、脾重量と脾臓内菌数との有意な増加を認め、MAC 感染を増悪することが証明された。同画分投与で脾臓内 IL-10 mRNA の発現が誘導され、IL-10 が MAC 感染を増悪させる一因と考えられた。肺病理組織像で同画分投与で肉芽腫形成が抑制され宿主防御機能が低下する可能性が示唆された。

以上から今回 *M. intracellulare* 31 F 093 T から分離した 50 kDa, pI 6.8 の画分は、IL-10 の産生誘導を介して MAC 感染を持続化されるの一因となり得ることが証明され、MAC 感染症の病理解析の上で新しい知見を得ることができた。

なお本研究の一部は第72回日本結核病学会総会(1997年6月札幌), 第27回日本免疫学会総会(1997年10月札幌), 第73回日本結核病学会総会(1998年4月新潟), 1998年アメリカ胸部疾患学会(1998年4月シカゴ)で発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました奈良県立医科大学第2内科学教室成田亘啓教授, 奈良県立医科大学細菌学教室喜多英二教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 御校閲, 御助言を賜りました奈良県立医科大学第3内科学教室福井博教授に深謝申し上げます。さらに研究の遂行に終始御指導いただいた奈良県立医科大学第2内科学教室米田尚弘講師, 日々の研究に御協力頂いた奈良県立医科大学第2内科学教室, 細菌学教室の諸兄姉に感謝致します。

文 献

- 1) Falkinham, J. O. : Epidemiology of infection by nontuberculosis Mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. **9** : 177-215, 1996.
- 2) Benson, C. A. and Ellner, J. J. : *Mycobacterium avium complex* infection and AIDS : advances in theory and practice. Clin. Infect. Dis. **17** : 7-20, 1993.
- 3) Ellner, J. J., Goldberger, M. J. and Parenti, D. M. : *Mycobacterium avium complex* infection and AIDS : a therapeutic dilemma in rapid evolution. J. Infect. Dis. **163** : 1326-1335, 1991.
- 4) Trinchieri, G. : Interleukin-12 and role in the generation of Th 1 cells. Immunol. Today **14** : 335-338, 1993.
- 5) Hsieh, C. S., Marcatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. and Murphy, K. M. : Development of Th 1 CD 4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. Science **260** : 547-549, 1993.
- 6) Kawamura, I., Yang, J., Takaesu, Y., Fujita, M., Nomoto, K. and Mitsuyama, M. : Antigen provoking gamma interferon production in response to *Mycobacterium bovis* BCG and functional difference in T-cell responses to this antigen between viable and killed BCG-immunized mice. Infect. Immun. **62** : 4396-4403, 1994.
- 7) Sieling, P. A., Abrams, J. S., Yamamura, M., Salgame, P., Bloon, 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.
- 8) Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O'Garra, A. : IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol. **147** : 3815-3822, 1991.
- 9) Mosmann, T. R. and Moore, K. W. : The role of IL-10 in crossregulation of Th 1 and Th 2 responses. Immunol. Today. **12** : 49-53, 1993.
- 10) Bogdan, C., Vodovotz, Y. and Nathan, C. : Macrophage deactivation by interleukin 10. J. Exp. Med. **174** : 1549-1555, 1991.
- 11) Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W. and O'Garra, A. : IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th 1 cells. J. Immunol. **146** : 3444-3450, 1991.
- 12) Chomezynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162** : 156-159, 1987.
- 13) Murray, H. W. : Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. Ann. Intern. Med. **108** : 595-608, 1988.
- 14) Denis, M. : Modulation of *Mycobacterium avium* growth *in vivo* by cytokines : involvement of tumor necrosis factor in resistance to atypical mycobacteria. Clin. Exp. Immunol. **83** : 466-471, 1991.
- 15) Denis, M. : Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*. J. Leukocyte Biol. **49** : 380-389, 1991.
- 16) Mosmann, T. R. and Sad, S. : The expanding universe of T-cell subsets : Th 1, Th 2 and more. Immunol. Today. **17** : 138-146, 1993.
- 17) Magii, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Ruggi, F. S., Carli, M. D., Ricci, M. and Romagnani, S. : Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in

- vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* **148** : 2142-2147, 1992.
- 18) **Barrow, W. W., Carvalho, J. P., Davis, T. L., Wright, E. L., Bachelet, M. and Rastogi, N.** : Immunomodulation of human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* **61** : 5286-5293, 1993.
- 19) **Barrow, W. W., Davis, T. L., Wright, E. L., Labrousse, V., Bachelet, M. and Rastogi, N.** : Immunomodulatory spectrum of lipids associated with *Mycobacterium avium* serovar 8. *Infect. Immun.* **63** : 126-133, 1995.
- 20) **Tomioka, H. and Saito, H.** : Phospholipids of *Mycobacterium intracellulare* inhibit T cell blastogenesis. *Microbiol.* **140** : 829-837, 1994.
- 21) **光山正雄** : 抗結核防御免疫の誘導と発現機構. 資料と展望 **18** : 1-13, 1996.
- 22) **Burrells, C., Inglis, N. F., Davies, R. C. and Sharp, J. M.** : Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and paratuberculosis using two defined mycobacterial antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45** : 311-320, 1995.
- 23) **Rao, S. P., Ratnakar, P. and Catanzaro, A.** : Macrophage release of tumor necrosis factor- α , by *Mycobacterium avium* antigens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **15** : 27-34, 1996.
- 24) **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.
- 25) **Bermudez, L. E. and Champs, J.** : Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. *Infect. Immunol.* **61** : 3093-3097, 1993.
- 26) **Denis, M. and Ghadirian, E.** : IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infection. *J. Immunol.* **151** : 5425-5430, 1993.
- 27) **Shikama, Y., Kobayashi, K., Kasahara, K., Kaga, S., Hashimoto, M., Yoneya, I., Hosoda, S., Soejima, K., Ide, H. and Takahashi, T.** : Granuloma formation by artificial microparticles *in vitro*. *Am. J. Pathol.* **134** : 1189-1199, 1989.
- 28) **Kindler, V., Sappino, A. P., Grau, G. E., Piguet, P. F. and Vassalli, P.** : The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56** : 731-740, 1989.
- 29) **Kobayashi, K., Yamazaki, J., Kasama, T., Katsura, T., Kasahara, K., Wolf, S. F. and Shimamura, T.** : Interleukin (IL)-12 deficiency in susceptible mice infected with *Mycobacterium avium* and amelioration of established by IL-12 replacement therapy. *J. Infect. Dis.* **174** : 564-573, 1996.