

## 第55回総会シンポジウム

## マクロファージと結核感染

座長 齋藤和久

慶応義塾大学医学部微生物学教室

受付 昭和55年7月7日

The 55th Annual Meeting Symposium

## MACROPHAGES AND TUBERCULOUS INFECTION

Chairman: Kazuhisa SAITO\*

(Received for publication July 7, 1980)

## Introductory Remarks

Since old time, it has been known that tuberculous lesions are closely associated with macrophages, e.g., macrophages are constituent cells of granuloma in tuberculous lesions. In 1952, *in vitro* experiments revealed that tubercle bacilli phagocytized by macrophages were able to proliferate within macrophages, and thus the concept of the intracellular parasites was established. Furthermore, it was found that macrophages obtained from animals immune against tuberculous infection inhibited the intracellular proliferation of phagocytized tubercle bacilli. The mechanism of the inhibitory effect of "immune" macrophages on tubercle bacilli was explored, and was shown to be a consequence of T cell-mediated immunity. This symposium aims to solve problems relevant to macrophages which participate in several facets of tuberculous infection.

Macrophages participate in several facets of tuberculous infection: (1) Macrophages play a role in the first defense against tubercle bacilli at early stage of the infection, (2) they play an important role as antigen presenting cells in the induction of effector T cells as well as in the stimulation of the induced effector T cells, and (3) macrophages activated by the antigen-stimulated effector T cells play a central role in immunity against tuberculous infection. In addition, macrophages are known to suppress immune responses under certain conditions.

The role of macrophages in (1) and (3) is relevant to the mechanisms of the intracellular killing of bacteria by macrophages, and the mechanisms have been explored by biochemical and metabolic studies of phagocytizing macrophages. Drs. Minakami and Ando will present their data obtained by the studies along this line.

In the antigen presentation by macrophages, MHC products expressed on the macrophage cell membrane are known to be crucial. In the induction and manifestation of cell-mediated immunity to tuberculosis, products coded for by I region genes are important. Dr. Tokunaga will present confirmative data with this respect.

Antigen-stimulated effector T cells activate macrophages via lymphokine, macrophage activating factor (MAF). Dr. Tokunaga obtained data which suggest that receptors for the MAF are present on macrophage cell membrane and expression of the receptor may be related to the differentiation stage of macrophages. In addition to the activation of macrophages by MAF, bacterial components of tubercle bacilli activate macrophages, and Dr. Ito will present data on the activation of macrophages by mycobacteria and nocardia cell wall skeleton (CWS). It will be of interest to compare mechanism of CWS-directed activation and that of MAF-mediated activation.

On the suppressor macrophages for immune response, Dr. Kato will show that macrophages from animals previously injected with BCG suppress delayed-type hypersensitivity and prostaglandin released from the macrophages may be an active principle in the suppression.

Thus macrophages exert diverse functions in various facets of infection and immunity, and whether or not each

\* From the Department of Microbiology, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan.

of the different functions is exerted by different subset of macrophages or macrophages at distinct differentiative stage becomes an important problem of the studies. Macrophage cell lines originated from macrophage/monocyte lineage give us useful and valuable information for clarification of this problem. Various macrophage cell lines, which express different markers, e.g., IgFc receptor, C3 receptor, phagocytizing activity and so on, in different combinations have been extensively studied by Dr. Ralf for the functions in various respects. He will present his data which are related to infection and immunity.

I hope that vivid discussions on the talks in this symposium should stimulate studies of macrophages and tuberculous infection.

## 1. はじめに

### Introduction

座長 齋藤和久

ご承知のように、結核とマクロファージの密接な関係は古くから知られており、例えば結核病巣の肉芽腫を構成する細胞が組織球・マクロファージに由来することが観察されていた。そして1952年には、結核においてはマクロファージ内に取り込まれた感染菌が細胞内でも増殖することが *in vitro* の実験で明らかにされ、細胞内寄生細菌感染症の概念が生まれた。更に結核に対し免疫になつて動物のマクロファージは結核菌の細胞内増殖を阻止することが見出された。そしてその機序として、細胞性免疫により生じたエフェクターTリンパ球が対応抗原で刺激されるとマクロファージを活性化し、活性化されたマクロファージは取り込んだ結核菌の増殖を阻止することがわかつた。本シンポジウムでは、結核感染の種々な相に関与するマクロファージについて、マクロファージに焦点をおいて討議していきたい。

マクロファージは結核感染の種々な段階で種々な機能を果たす。①感染初期における結核菌に対する防御機構としての役割、②細胞性免疫応答におけるエフェクターTリンパ球の誘導の段階、および誘導により生じたエフェクターTリンパ球の免疫発現の段階で、必須とされる抗原提供細胞としての役割、③エフェクターTリンパ球の免疫発現により活性化されたマクロファージが果たす結核感染防御免疫における中心的な役割などである。それに、マクロファージは②の他に、ある条件下では免疫応答の抑制という面で調節的に働く。

①、③の感染防御におけるマクロファージの役割は、マクロファージの細胞内殺菌機構の解明の方向で追究され、それは食作用を行なつているマクロファージの代謝、生化学との関連で追究されている。水上氏と安藤氏はこの方面の研究成果について述べる。

②の問題は、Tリンパ球の抗原認識に関して重要な問題を提起している。それはTリンパ球が抗原を認識して

分化・分裂してエフェクターTリンパ球となるためには、外来抗原とともに抗原提供細胞(マクロファージ)の細胞膜に major histocompatibility gene complex(MHC)によりコードされて表現されている産物をも認識しなければならないことである。そしてこのようにして誘導されたエフェクターTリンパ球は、誘導される際に認識したと同じ MHC 産物と外来抗原を再び認識してはじめて免疫機能を発現する。徳永氏はこのことを確認した成績を述べる。

③のマクロファージの活性化は、抗原刺激をうけたエフェクターTリンパ球が産生するリンホカインのうちのマクロファージ活性化因子(MAF)を介して行なわれる。徳永氏はマクロファージのMAFに対するリセプターの問題、またこのリセプターの表現とマクロファージの分化との関連について述べる。一方、結核感染においては、結核菌の菌体成分がマクロファージを活性化するという事実がある。伊藤氏はBCG、およびノカルジアの cell wall skeleton (CWS) のマクロファージ活性化作用について述べるが、CWSの活性化機構と、MAFを介しての活性化機構の比較検討は将来の興味ある課題であろう。

免疫応答に対するサプレッサーマクロファージに関しては、加藤氏はBCGをあらかじめ接種された動物のマクロファージが遅延型アレルギーを抑制すること、この抑制はそのようなマクロファージが放出するプロスタグランジンによるものであろうことを示す。

以上のように多彩な機能を示すマクロファージがそれぞれ異なる細胞か否かが問題となる。そして近年、マクロファージと総称される細胞集団は、種々のマーカー、例えばIgGのFcに対するリセプター、補体C3に対するリセプター、Ia抗原、食食能の有無により亜集団に分けられ、各亜集団の機能が異なることが明らかにされつつあり、またこれとマクロファージの分化の過程と

の関連も示されている。この問題の追究にはマクロファージ単球系細胞に由来する株化された cell line が貴重な情報を提供している。Dr. Ralf はさまざまな cell line について、そのマーカー、および機能について広範な追究を行なっているが、本日はそれらのうちの感染および

免疫に関連した成績を述べる。

以上、本シンポジウムで取り上げる問題の概略を述べたが、活発な討論により、この分野の研究のみならず結核研究全般の将来の発展に寄与できることを期待する。

## 2. 顆粒球やマクロファージの殺菌と関係する活性酸素生成の機構

九州大学生化学 水上茂樹

### 2. FORMATION OF ACTIVE OXYGEN RELATED TO BACTERICIDAL ACTIONS OF GRANULOCYTES AND MACROPHAGES

Shigeki MINAKAMI

Department of Biochemistry, Kyushu University School of Medicine

食細胞が食作用によつて取り込んだ細菌を殺す機構は長い間消化作用によるものと考えられてきたが、近年の研究によるといわゆる「活性化酸素」が主として殺菌に関連していると考えられるようになった。活性酸素と呼ばれているのは、超酸化イオン ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシルフリーラジカル ( $HO\cdot$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) である。

細菌の取り込みとともに食細胞の酸素消費は上昇する。この変化は細菌取り込みのためのエネルギー供給反応ではなく、殺菌と関連するものである。ミトコンドリアの酸化的リン酸化と関係していないことは、青酸やオリゴマイシンなどで阻害されないことによつて明らかである。この酸素消費の増加は NADPH-酸化酵素の活性化によるものであり、この酵素は NADPH によつて酸素分子 ( $O_2$ ) を還元して  $O_2^-$  とする (図1)。 $H_2O_2$  は  $O_2^-$  のディスミューテーションによつて作られ、 $HO\cdot$  や  $^1O_2$  も引き続いて作られる (図2)。食細胞中に取り込まれた細菌は活性酸素によつて直接に殺されたり、ミエロペルオキシダーゼ- $H_2O_2$  系の触媒するハロゲン化によつて殺菌される。ミエロペルオキシダーゼによつて作られ

るアルデヒドも殺菌作用を示す。

NADPH-酸化酵素の活性化は細菌が細胞膜と接触することによつて起きるもので、細菌取り込みの過程を必要とはしない。例えば細胞の運動を阻害し細菌の取り込みを阻害するサイトカラシン E (または D) は顆粒球やマクロファージの  $O_2^-$  生成反応を活性化する (図3)。サイトカラシンで刺激した細胞の外液には大量の  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  が出現する。このうちで  $O_2^-$  は食細胞より放出されたもので、 $H_2O_2$  は二次的に  $O_2^-$  から作られたものである。 $O_2^-$  を産生する NADPH-酸化酵素は細胞膜の表面にあると考えられており、細菌の取り込みを伴う場合に細胞膜が陥没して食胞 (ファゴソーム) を形成するとそれに伴つて食胞内面に移り、 $O_2^-$  を食胞内に放出して殺菌の役割を果たす。サイトカラシン処理によつて食胞形成が阻害されると、 $O_2^-$  は細胞外に直接放出される。サイトカラシン処理のときにみられる  $H_2O_2$  出現は SOD (超酸化イオンディスミターゼ) によつて阻害されるのに対し、細菌取り込みのさいの反応は阻害されず、後者

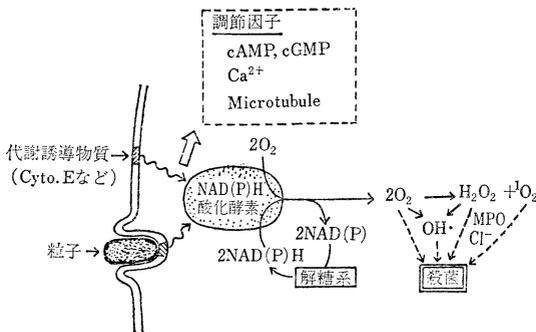


図1 白血球酸素代謝の変化の機構

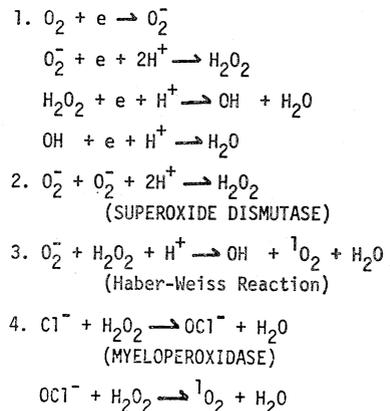


図2 活性酸素の相互変化

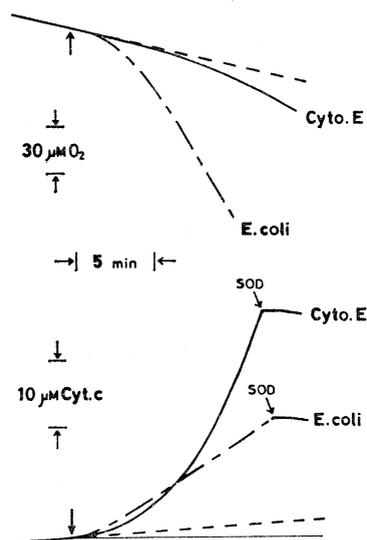


図3 サイトカラシンEによる呼吸促進(上図)および  $O_2^-$  放出(下図)。SOD: 超酸化物ディスムターゼ

の場合  $H_2O_2$  が食胞から放出されたものであることを示している。

食作用によって活性化された NADPH-酸化酵素は顆粒成分(細胞膜断片?)に見出される。細菌取り込みに伴う  $H_2O_2$  放出が *p*-ヒドロキシマーキュリ安息香酸(PCMB)のような膜透過性薬品によつてのみ阻害されるのに対し、サイトカラシン処理による  $H_2O_2$  出現が *p*-マーキュリベンゼンスルホン酸のように不透過性の薬品によつても阻害されることは、上記の機構を支持する。

サイトカラシンによつて誘発される  $O_2^-$  放出はコンカナバリン A,  $D_2O$  などで促進され、環状 AMP によつて阻害される。このことは NADPH-酸化酵素の活性化に微細管(マイクロチュービュル)が関連していることを示している。活性の直接の引き金が細胞内  $Ca^{2+}$  イオンである可能性を示す実験として、 $Ca^{2+}$  の細胞内拮抗剤である TMB-8 (ジエチルアミノ・オクテル・トリメトキシ安息香酸)によつて活性化が阻害され、これは

Table 1.  $O_2^-$ -Generation by Mouse Peritoneal Macrophage Preparations (Mean  $\pm$  S.D.)

Treatment	nmol $O_2^-$ min $^{-1}$ $5 \times 10^5$ cells $^{-1}$
None(resident)	0.09 $\pm$ 0.06 (n=8)
Glycogen	0.11 $\pm$ 0.06 (n=3)
Paraffin oil	0.74 $\pm$ 0.13 (n=7)
Aoyama B	0.54 $\pm$ 0.20 (n=5)

Table 2. Effect of Inhibitors on  $O_2^-$ -Generation by Guinea Pig Peritoneal Macrophage

Inhibitors	Inhibition
2-Deoxyglucose (2 mM)	75%
KCN (1 mM)	29%
Azide (5 mM)	16%
Antimycin A (20 $\mu$ M)	46%

$Ca^{2+}$  (イオノフォア A 23187 存在下)によつて解除される。

サイトカラシンEによる  $O_2^-$  放出反応は顆粒球の機能検査、例えば慢性肉芽腫症の診断に用いられ、またマクロファージの機能検査への応用も試みられている。

これまで述べてきた活性酸素生成の機構に関して、マクロファージと顆粒球と根本的な差はないものと考えられる。表1に種々の刺激方法によつて得たマウス腹腔マクロファージの麦芽ヘマグルチニンとサイトカラシンEによる  $O_2^-$  放出を示している。パラフィン油や結核菌処理によつて得られたマクロファージは  $O_2^-$  放出活性が高い。マクロファージの  $O_2^-$  生成系が顆粒球と異なる点は、後者の反応が解糖にのみ依存しミトコンドリアの呼吸を必要とするのに対し、前者は一部を酸化リン酸化に依存していることである。表2に示すようにマクロファージの  $O_2^-$  放出は呼吸阻害剤によつて阻害される。

マクロファージのもつている殺菌と関連した代謝変化は顆粒球の代謝に比べるとまだ研究が進んでおらず、今後の研究の進歩に待つところが多い。

### 3. 肺胞マクロファージの抗結核菌作用機構

熊本大学医学部第1内科 安藤正幸, 杉本峯晴  
菅守隆, 堀尾直

#### 3. ANTIMYCOBACTERIAL MECHANISMS OF ACTIVATED ALVEOLAR MACROPHAGES

Masayuki ANDO, Mineharu SUGIMOTO, Moritaka, SUGA and Sunao HORIO

The First Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School

#### はじめに

#### 成績

肺胞マクロファージ (AM) は呼吸細気管支から肺胞に至る下部気道の生体防御機構の主役を担っていると考えられている。しかしながら, AM は, *in vitro* では, 黄色ブドウ球菌などの simple bacteria は殺菌するが, intracellular growth bacteria と呼ばれる結核菌やリステリア菌は殺菌しえない。AM がこれらの菌を殺菌するためには, 種々の stimulants により活性化されることが重要となる。そこで今回は, 正常肺および炎症肺における stimulants の問題と, これら stimulants により誘導された活性化 AM の抗結核菌作用機序について, AM の代謝面から検討した従来の我々の成績<sup>1)~4)</sup> ならびに今回行なつた実験結果をあわせて報告し, 活性化 AM の抗結核菌作用機構に関する我々の見解を述べる。

#### 方法

動物は家兔を, 結核菌は BCG 菌を用いた。AM は剔出肺を生食水にて経気管的に洗浄して採取した。培養液は 10% FCS を含む RPMI 1640 を用いた。肺胞被覆層成分としては, 剔出肺を生食水で経気管的に洗浄して得た液を, 遠沈して細胞成分を除去後, 更に millipore filter にて粘液, 塵埃, 細菌を除去した。この液を Diaflo 膜で濃縮後, millipore filter で無菌化したものを用いた (以下 PW と略す)。AM の機能は, BCG 菌の細胞内増殖抑制効果, ガラス面への粘着能, NBT 還元能, スーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 産生能, カゼインに対する遊走能, 貪食能で検討し, 形態学的には走査型顕微鏡 (SEM) による観察と光顕による spreading 率で検討した。試験管内での O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は xanthine oxidase-purine system を用いた。PW 中の AM 活性化物質の精製には Sepharose 4B column chromatography, affinity chromatography, 免疫電気泳動などの手技を用いた。細胞膜の NAD(P)H oxidase 活性は AM の postnuclear fraction について測定した。

#### A. 正常肺について

##### 1. *in vitro* における正常 AM の抗菌作用

正常家兔肺から採取した AM は, *in vitro* では, 黄色ブドウ球菌は殺菌するが, リステリア菌や結核菌のうちでも弱毒菌に属する BCG 菌の細胞内増殖を抑制しえなかつた (Fig. 1)。この *in vitro* の結果が, もし *in vivo* においても事実であるとするならば, AM は結核感染の初期防御の役割をはたしていないことになる。この結論はおそらく正しくないであろう。そこで我々は, 「*in vivo* においては, AM は肺胞内環境因子, とりわけ AM が存在している肺胞被覆層成分が, AM の機能を高めている」との作業仮説のもとに, 以下の実験を行なつた。

##### 2. 正常肺洗浄液 (PW) 存在下における AM の形態と機能<sup>1)4)5)</sup>

正常成熟家兔から得た PW を正常 AM の単層培養に添加すると, AM はガラス面への粘着能が充進し, spread

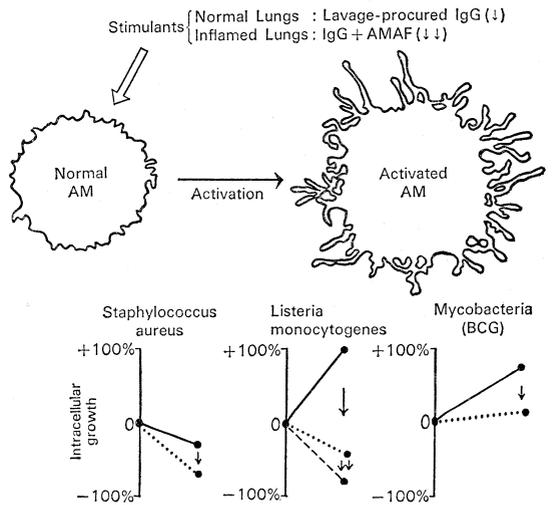


Fig. 1.

し、NBT 還元能、 $O_2^-$  産生能が亢進した。SEM では細胞膜の microvilli, filopodia の増大と数の増加が顕著であり、ガラス面へしつかり付着していた。また ruffles は消失していた。これらの形態ならびに機能の変化は PW の添加濃度、作用時間と相関し、蛋白量  $150\mu\text{g/ml}$  以上、作用時間 60 分以上で有意差があつた。対照とした lymphokine では腹腔滲出細胞 (PEC) には活性化作用を示したが、AM には作用しなかつた。以上の結果は、正常 AM は正常 PW の存在下で活性化 AM となることを示している。

### 3. PW 活性化 AM の抗 BCG 菌作用<sup>2)</sup>

正常 AM に BCG 菌を感染させ培養すると、BCG 菌は AM 内で増殖し、AM の NBT 還元能ならびに  $O_2^-$  産生能は明らかに低下した。一方、BCG 感染 AM に PW を添加すると、AM は BCG の細胞内増殖を抑制し、NBT 還元能ならびに  $O_2^-$  産生能は著しく亢進していた。このことは、PW 活性化 AM は抗結核菌作用を示し、その機序に  $O_2^-$  が関与していることを示唆している。

### 4. $O_2^-$ -generating-catalase system による試験管内 BCG 殺菌作用<sup>2)</sup>

Xanthine oxidase-purine system を用いて試験管内で産生した  $O_2^-$  が BCG に殺菌的に作用するか否かを検討した。その結果、 $O_2^-$  自体は BCG に殺菌的に作用するが、その作用は弱い。しかしながら、この系に catalase が共存すると、殺菌効果は増強した。この殺菌効果は catalase の添加濃度に明らかに相関し、また catalase の至適 pH である 4.0~5.0 の間で最も高い活性が得られた。このときの  $O_2^-$  産生は少量ではあるが steady-state に産生されていた。AM の phagosome 内は acid pH であること、また AM は多量の catalase を有し、その一部は phagosome 内に移行することから、この殺菌系は AM で起こりうる機序と思われる。

### 5. 活性化 AM の NAD(P)H oxidase の検討

PW 活性化 AM による  $O_2^-$  産生は細胞外膜で行なわれていることを NBT と SOD を用いた SEM で確認し、かつ KCN 耐性であることも確認したのち、PW 活性化 AM の postnuclear fraction における NAD(P)H oxidase の活性を検討した。結果は正常 AM も PW 活性化 AM もその NAD(P)H oxidase 活性において差はなかつた。このことは、AM の  $O_2^-$  産生機構は PMN とは異なる可能性を示唆しているように思える。

### 6. PW 中の AM 活性化物質の検討<sup>1)</sup>

正常 PW を Sepharose 4B でゲル濾過すると、5 画分に分けられた。活性化物質は第 4 画分にのみ存在し、かつ分子量 16 万のところで最も高い活性が認められた。そこでこの画分から、抗兔 IgG 抗体を吸着させた affinity chromatography を用いて、IgG を除去したところ活性は消失し、得られた IgG を添加したところ活性がみら

れた。この IgG の作用は dose-dependent であつた。したがって、PW 中の AM 活性化物質は肺内 IgG であることが確認された。

### 7. Neonates の AM と PW の検討<sup>3)</sup>

上述した成熟家兎における AM と PW に関する実験結果が正しいとすれば、感染抵抗性の低い新生児家兎では、その AM あるいは PW に問題があることが考えられる。そこで生後 7 日目の新生児家兎について検討した結果、AM の  $O_2^-$  産生能は弱く、またその PW は phospholipids は充分に含有しているが、IgG 含有量がきわめて少なく、AM 活性化作用がないことがわかつた。この成績は新生児肺の易感染性の一面をとらえており、重要な知見と考えられる。

### B. 炎症肺について

BCG 肺肉芽腫病変をモデルとして、炎症肺における AM と PW の関係について検討した。肺病変から得たマクロファージ (PM) の数は正常肺の AM 数の 5 倍以上であり、その機能は遊走能、食食能、NTB 還元能、 $O_2^-$  産生能のいずれも亢進していた。この炎症肺から得た PW を正常な AM に作用させると、AM の  $O_2^-$  産生能は著明に亢進し、強いリステリア殺菌作用を示した (Fig. 1)。この炎症肺の PW 中には正常 PW や血清には存在しない肺局所由来と思われる AM 活性化物質 (分子量 30 万~70 万) があることがわかつた。この物質については現在更に検討中であるが、前述したごとく、我々の系には lymphokine は作用しなかつたことから、この物質が lymphokine である可能性は少ないであろう。以上の結果から、BCG 肺肉芽腫病変においても、我々が以前に BCG 皮内病変について報告した如く<sup>6)7)</sup>、AM の集積とその活性化が顕著であること、およびこれらの現象を誘導する stimulants が炎症肺の PW 中に存在す

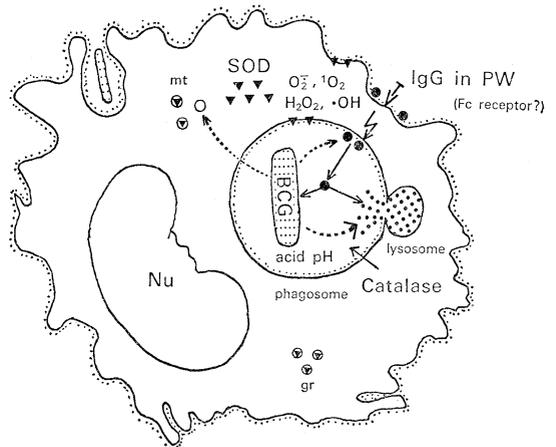


Fig. 2. A hypothesis antimycobacterial mechanisms in the AM activated by IgG in PW or serum.

ることを知りえた。

## 考 案

以上の成績から、我々は正常肺ならびに炎症肺における AM の活性化とその抗結核菌作用機構を次のように考えている (Fig. 2)。正常肺では、肺胞被覆層中に比較的少量に存在する肺内 IgG が、その Fc-portion で AM の細胞膜の Fc-receptor に結合すると、それが stimulant となり、細胞二重膜外層で  $O_2^-$  産生が高まり細胞外へ放出される (細胞外へ放出された  $O_2^-$  は水溶液中では容易に他の active oxygen  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_3$  へと移行するので、 $O_2^-$ -generating system と呼ぶ)。食菌時には細胞膜が陥入して phagosome が形成されるが、その内面は細胞二重膜外層よりなるので、 $O_2^-$  は phagosome 内に放出されることになる。この  $O_2^-$  (あるいは  $O_2^-$ -generating system) は単独で、あるいは catalase の共存下で抗結核菌作用を示す。肺に炎症が起こると、肺局所で産生される IgG や血清由来の IgG で、この機序が更に増強されると共に、炎症肺局所で新たに産生される別の AM 活性化物質により、 $O_2^-$ -generating system は更に亢進し、その結果炎症肺の AM はより強い抗結核菌作用を示すようになるのであろう (Fig. 1, 2)。

## 4. ENHANCEMENT OF MACROPHAGE CYTOTOXICITY TO TUMORS AND PRODUCTION OF MEGAKARYOCYTE-STIMULATING FACTORS BY MICROBIAL AGENTS

Peter RALPH, Neil WILLIAMS, Ilona NAKOINZ, Heather JACKSON,  
Masami ITO, Ichiro AZUMA and Yuichi YAMAMURA

Sloan-Kettering Institute; First Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University; Institute of Immunological Science, Hokkaido University; and Third Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital.

### SUMMARY

*In vivo*, *Mycobacterium* BCG and related muramyl dipeptide induce the production of colony stimulating and potentiation factors for megakaryocytopoiesis. *In vitro* experiments show that LPS, BCG and zymosan induce the same factors in peritoneal and cell line macrophages. Cell lines, in parallel with normal macrophages, can be induced to kill tumor targets with antibody, lymphokine, LPS, MDP and other microbial immunomodulators. Individual cell lines give a restricted response to activating signals, suggesting that they belong to different subsets of normal mononuclear phagocytes. Mutant or variant cell lines defective in peroxide and superoxide anion production have normal levels of tumor cytotoxicity when stimulated by LPS, phorbol myristate or antibody, showing that these oxygen intermediates are not involved in these tumor and RBC lysis experiments. Using several lines as effector cells against different tumor targets demonstrates that a variety of toxic mechanisms must be elaborated by macrophages.

### USES OF MACROPHAGE CELL LINES

Macrophage-like cell lines are tumors of the monocyte/macrophage lineage adapted to culture, or obtained during growth of macrophages *in vitro*. There are over 25 lines from different strains of mice (Table 1 and ref. 1), induced by viruses, mineral oil or occurring spontaneously, and one human line U937 from a patient with diffuse histiocytic lymphoma. Most of the lines have typical receptors for immunoglobulin Fc and complement, phagocytose latex

一方、このような機構が作動していない AM, すなわち非活性化 AM では、結核菌の産生する cord factor をはじめとする cytotoxic factors により、AM の方が逆に障害され、 $O_2^-$  産生機構は低下し、結核菌の細胞内増殖を来すものと考えられる。

## 結 論

結核感染の初期防御機構における肺胞マクロファージの役割を正常肺ならびに炎症肺局所における液性成分との相互作用の面から検討し、AM の抗結核菌作用機構に  $O_2^-$ -generating system + catalase の作用が重要であるとの結論を得た。

## 文 献

- 1) Ando, M. et al.: Infect. Immun., 20: 476, 1978.
- 2) Ando, M. et al.: Infect. Immun., 24: 404, 1979.
- 3) Sugimoto, M. et al.: J. Reticuloendothel. Soc., 27: 595, 1980.
- 4) Horio, S. et al. (In preparation).
- 5) Ando, M. et al.: Infect. Immun., 13: 1442, 1976.
- 6) Ando, M. et al.: J. Immunol., 109: 8, 1972.
- 7) Dannenberg, A.M. et al.: J. Immunol., 109: 1109, 1972.

Table 1. Macrophage-Related Cell Lines<sup>a</sup>

Line	Mouse strain	Etiology	Fc	C	LZ	Latex	Ab-RBC	
							$\phi$	K
M1	SL	S	(-)	-	-	(-)	-	-
WEHI-3	C	Oil	+	+	(+)	+	-	-
SKW2	C	A-MuLV	+	+	+	+		
LS 23	CAL-20	M-MuLV	+	+	+	+	+	(+)
P 388 D <sub>1</sub>	DBA/2	S?	+	+	+	+	+	(+)
J 774	C	Oil	+	+	+	+	+	(+)
PU5-1,8	C	S	+	+	+	+	+	(+)
RAW 264	BAB/14	A-MuLV	+	+	+	+	+	(+)
B/6	C57B1/6	S	+	+	+	+		
U 937	Human		+	+	+	i	i	i

<sup>a</sup> C=BALB/c strain; S=spontaneous; A=Abelson; M-MuLV=Moloney murine leukemia virus; Fc and C=receptors for immunoglobulin and complement; LZ=lysozyme; latex phagocytosis; antibody-dependent sheep RBC phagocytosis (Ab-RBC  $\phi$ ) and killing (K); i=induced by human lymphokine<sup>91</sup>.

beads, contain lysosomal enzymes and produce lysozyme, prostaglandin and granulocyte/macrophage-colony stimulating factor<sup>21</sup>. Synthesis of factors stimulating mouse T cells and human and mouse antibody production have been described<sup>11</sup>. Some of the lines phagocytose and lyse antibody-coated RBC and kill tumor targets with antibody<sup>31</sup>. Lipopolysaccharide (LPS), tuberculin PPD, *Mycobacterium* BCG, yeast zymosan and other immunomodulators induce or enhance these activities in cell lines similarly to their effect on normal macrophages<sup>11-51</sup>.

The advantages of cell lines in the study of macrophages are both practical and scientific. 1) They are convenient—cultures yield  $10^6$  cells/ml and the doubling time (16–20 hr) allows a 100-fold increase in cell numbers in 5–6 days. 2) They have constant activity. Macrophages harvested from mice vary greatly in tumoricidal and other activities unless they are maintained in a carefully controlled environment with a constant microbial flora. Cell lines can change gradually, or rarely lose some macrophage properties, but this is not a problem over several months time, and the initial cell type can be obtained from liquid nitrogen freezings. 3) The cell lines are pure macrophages, so there is no question of suppressing or stimulating effects by a small number of contaminating cells, e.g. T lymphocytes. Being homogeneous or clonable, most of the cells should respond in the same way in experiments, whereas *in vivo* sources of macrophages may contain different subsets or degrees of maturation. 4) Because they are growing rapidly, it is possible to select and analyze variants or mutants lacking a given property, and to study functions of macrophage populations at different stages of the cell cycle.

#### MECHANISMS OF MACROPHAGE TOXICITY TO TUMORS

Table 2 shows that macrophage line J774 kills about 25% M1 tumor targets “spontaneously,” with lower cytotoxicity apparent with other lines and peritoneal cells. In 2/3 experiments, conditioned medium from J774 contained a toxic factor for M1. Inclusion of LPS in the 20-hr assay caused another 15–30% targets to be lysed by all the effectors tested except the immature WEHI-3 and M1 lines. LPS concentrations as low as  $0.001 \mu\text{g/ml}$  significantly stimulated J774 toxicity. Antibody-dependent cellular cytotoxicity ranged from 9–35% for the active macrophage lines. In a study of lymphokine-activated lysis of non-hemic tumor targets, only J774, PU5-1.8 and RAW264 lines were stimulated to kill SV-3T3 (Table 2). Lymphokine-induced lysis of SV-3T3 occurred at less than 0.5:1 ratio of effector-to-target cells for RAW264 ( $2 \times 10^4/\text{ml}$ ), whereas normal peritoneal cells required 10-fold higher numbers for comparable killing.

Two mechanisms proposed for macrophage toxicity are  $\text{H}_2\text{O}_2$  and superoxide anion production<sup>81,91</sup>. Two clones of J774 lacking NBT reduction,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^-$  generation during stimulation by tumor promoter phorbol myristate acetate (PMA) or zymosan<sup>101</sup> were tested. These clones kill M1 spontaneously and show enhanced lysis with LPS and PMA stimulation similarly to the standard J774.1 line. In antibody-dependent killing, the 16C3C clone was considerably superior to J774.1. There was no difference among these three clones in antibody-dependent phago-

Table 2. Activation of Macrophage Cell Line Cytotoxicity

Macrophage	% M1 targets killed			% SV-3 T 3 killed	
	--	LPS	Antibody	--	Lymphokine
J 774	25	48	42	5	25
RAW 264	15	37	26	-9	31
PU 5-1.8	6	38	21	8	33
P 388 D 1	4	21	39	-5	8
LS 23	3	29	12		
WEHI-3	0	3	3	3	4
M 1	—	2	0	-3	2
PC	12	26	14		
U 937				3	6

Mouse macrophage cell lines at 20:1 or C3H/Anf resident peritoneal cells (PC), at 40:1 incubated in duplicate with  $^{125}\text{I}$ UdR-labeled myeloblast M1 targets 18 hr. Some cultures contained 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS or antibody-coated targets (1:50 dilution rabbit anti-BALB/c spleen, 20 min at 23°). Background IUdR release with 20:1 unlabeled M1 (5–15%) subtracted. Standard errors were less than 7% of means; differences above 3% are significant. For  $^3\text{H}$ -thymidine labeled SV-3 T 3 transformed fibroblast targets, macrophage cell lines at 12:1 were used for 40 hr. Background lysis of SV-3T3 was 18%, with lymphokine 19%. Lymphokine was 1:10 dilution of PPD-stimulated spleen conditioned medium from BCG-primed C3H/Anf mice<sup>7</sup>. Standard errors were less than 15% of means.

cytotoxicity and lysis of sheep RBC. Therefore oxygen intermediates are probably not necessary in cytotoxicity for certain RBC and tumor targets.

As with microbes, tumor targets vary in susceptibility to killing by different macrophage mechanisms. Antibody-dependent lysis of M1 and human U937 tumor targets is similar but U937 is not killed by LPS or lymphokine stimulation of RAW264, whereas M1 is. Thus, U937 is susceptible to lysis mediated by antibody but not by two other methods even though the RAW264 effector is capable of cytotoxicity to other targets using all three agents. As another example, LS23 macrophage line kills mouse pre-B lymphoma 18-8 spontaneously but not M1 significantly, yet LPS induces lysis of M1 but not that of 18-8. This clearly suggests that at least two lytic mechanisms are operable in LS23. Spontaneous toxicity and that stimulated by MDP and other agents in macrophage cell lines have also been described by other investigators<sup>117-131</sup>. We expect the molecular mechanisms of macrophage *activation* and *cytotoxicity* will be understood through a combination of genetic differences<sup>7</sup>, biochemical analysis<sup>8,9</sup>, somatic cell genetics<sup>10</sup> and cloned cell lines.

#### MEGAKARYOCYTE-STIMULATING FACTORS PRODUCED BY MACROPHAGES

Murine megakaryopoiesis is stimulated *in vitro* by megakaryocyte colony-stimulating factor (MK-CSF) and megakaryocyte-potentiating factor (MK-PF). The agar colony forming assay is used with morphology, size of cells and specific choline esterase staining to determine cell types. The standard source of MK-CSF is the monocyte cell line WEHI-3 which also makes separate G/M-CSFs<sup>14</sup>. MK-PF does not promote megakaryopoiesis directly *in vitro* but increases the incidence of clonable megakaryocyte progenitor cells in the presence of CSF<sup>14</sup>. PF is found in conditioned medium (CM) of murine lung, bone marrow and adherent peritoneal cells (Table 3). WEHI-3 cell line makes MK-CSF but almost no PF. Line J774 makes PF constitutively and stimulation with LPS induces G/M-CSF but not MK-CSF. P388D1 line can be induced to produce all three factors by 0.01 to 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS. T lymphocytes may also regulate megakaryopoiesis since the EL4 T leukemia line, previously shown to synthesize G/M-CSF<sup>2</sup>, could be induced with T cell mitogen Con A for PF and MK-CSF as well.

Abnormal thrombopoiesis is observed in some patients with tuberculosis and changes in the level of megakaryocyte stimuli produced by macrophages induced by microbial adjuvants including *Mycobacterium* BCG and N-acetyl muramyl dipeptide (MDP) have been investigated. Serum and three-day lung conditioned medium from mice injected with MDP (4 or 40  $\mu\text{g}$  i.v.) contained high levels of MK-PF (Table 4). Maximum activity could be obtained at a 1:300 final dilution by this source of PF. Exceeding large colonies (>200 cells) were produced by MDP-stimulated lung

Table 3. Assay for Megakaryocyte Colony-stimulating Factor (MK-CSF) and Potentiation Factor (MK-PF)

Source	Colonies per 10 <sup>5</sup> Marrow Cells		
	Gran-M $\phi$	MK-CSF (with PF)*	MK-PF (with CSF)**
0	0	0	0
Macrophage line			
WEHI-3	160	10.9 $\pm$ 2.6	0
J 774	0	0	5.9 $\pm$ 0.8
J 774+LPS 1 $\mu$ g/ml	104	0	6.1
P 388 D 1	0	0	0
P 388+LPS 1 $\mu$ g/ml	98	2.8 $\pm$ 0.9	15.7 $\pm$ 1.4
T lymphoma line			
EL 4	0	0	0
EL 4+Con A 25 $\mu$ g/ml	88	2.6 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.6
Lung CM	112	0	10.1 $\pm$ 1.2
Marrow CM	39	0.4 $\pm$ 0.4	11.2 $\pm$ 1.5
Peritoneal exudate***	0	0	11.8 $\pm$ 1.5
Spleen	0	0	0

\* Peritoneal macrophage CM.

\*\* WEHI-3 medium, 3.2 colonies background subtracted.

\*\*\* Four days after mineral oil injection i.p. in C57B1/6 mice. Assay uses 0.1~0.2 ml test CM added to 1 ml agar culture and incubated 7 days<sup>14)</sup>. CM is serum free or containing 10% fetal calf serum for cell lines initiated at 3 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml, harvested at day 3.

Table 4. Effect of BCG and Ac-MDP on Production of Megakaryocyte Growth Factors

Source	Colonies per 10 <sup>5</sup> Marrow Cells		
	GM-CSF	MK-CSF	MK-PF
Lung CM	112	0	10.1 $\pm$ 1.2
LPS 40 $\mu$ g iv	180	0	9.8 $\pm$ 1.8
MDP 40 $\mu$ g iv	121	1.3 $\pm$ 1.3	28.4 $\pm$ 2.1
Peritoneal cells			
CM	1	0	0
LPS 1 $\mu$ g/ml	26	0	5.3 $\pm$ 2.6
BCG 5 $\times$ 10 <sup>5</sup> /ml	45	4.7 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 1.5
Zym 25 $\mu$ g/ml	35	3.3 $\pm$ 1.3	12.0 $\pm$ 1.1
Macrophage cell line			
B/6 CM	134	0	0.9 $\pm$ 0.9
LPS 1 $\mu$ g/ml	112	0	0.9 $\pm$ 0
BCG 5 $\times$ 10 <sup>5</sup> /ml	87	0	22.2 $\pm$ 4.0

One pair lungs 5 hr after injection, minced and incubated 3 days in 5 ml serum free medium; 10<sup>6</sup> resident peritoneal cells from C57B1/6 mice or 3 $\times$ 10<sup>5</sup> B/6 cell line per ml cultured 3 days in 10% fetal calf serum.

CM. Small quantities of MK-CSF were also detected, but only at low dilutions of the CM. In contrast, injection of LPS did not induce PF despite high G/M-CSF concentrations. *Mycobacterium* BCG and zymosan were also especially active in producing MK-CSF and PF by culturing with mouse peritoneal cells *in vitro*. Macrophage line B/6 was induced very strongly by BCG for PF, but not MK-CSF.

*In conclusion*, stimulation of host macrophages by mycobacteria or their cell components may enhance the production of factors influencing megakaryocyte maturation and platelet turnover in tuberculosis patients with platelet

disorders. Cell lines may complement normal macrophage and *in vivo* studies to determine subsets of mononuclear phagocytes and mechanisms of response to microbial infections.

## REFERENCES

- 1) Ralph, P.: *In* van Furth R. (ed.): "Mononuclear Phagocytes—Functional Aspects," The Hague: Martinus Nijhoff (in press), 1980.
- 2) Ralph, P. et al.: *Cancer Res.*, 38 : 1414, 1978.
- 3) Ralph, P. and Nakoinz, I.: *J. Immunol.*, 119 : 950, 1977.
- 4) Ralph, P. et al.: *J. Exp. Med.*, 146 : 611, 1977.
- 5) Ralph, P. et al.: *J. Immunol.*, 121 : 300, 1978.
- 6) Koren, H. S. et al.: *Nature*, 279 : 328, 1979.
- 7) Ruco, L. P. and Meltzer, M.S.: *Cell. Immunol.*, 41 : 35, 1978.
- 8) Nathan, C. F. et al.: *J. Exp. Med.*, 149 : 100, 1979.
- 9) Weiss, S. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77 : 584, 1980.
- 10) Bloom, B. R. et al.: *Fed. Proc.*, 37 : 2765, 1978.
- 11) Askamit, R. R. and Kim, K. J.: *J. Immunol.*, 122 : 1785, 1979.
- 12) Taniyama, T. and Holden, H. T.: *Cell. Immunol.*, 48 : 369, 1979.
- 13) Russel, S. W. et al.: Submitted for publication.
- 14) Williams, N.: *Blood Cells*, 5 : 35, 1979.

## 5. マクロファージの活性化と分化

国立予防衛生研究所 徳 永 徹

(共同研究者：赤川清子，山本三郎，片岡哲朗，中村玲子，  
田中弘久，米田尚弘，三浦馨，高橋宏)

### 5. ACTIVATION AND DIFFERENTIATION OF MACROPHAGE

Tohru TOKUNAGA

Department of Tuberculosis, National Institute of Health

結核免疫の誘導と発現の過程におけるマクロファージの役割が、極めて重要なことは論をまたないが、同時にその役割は極めて多様であり、機能を異にするマクロファージのいくつかのサブセットや、あるいは分化の段階を異にするマクロファージのいくつかの機能集団の関与の可能性も考えられる。本シンポジウムでは、結核免疫の成立と発現の2過程について、それぞれにおけるマクロファージの役割と特色を、私共のここ数年間の知見を中心に述べてみたい。

#### (1) 結核免疫の成立とマクロファージ

結核感染におけるマクロファージの役割は、いくつかに分けて考えられる。結核初感染の場合には、結核菌に対する生体の初期反応の一環としてマクロファージは菌を捕食するが、この段階のマクロファージの殺菌能力ははなはだ弱いと考えられている。

しかしこれらのマクロファージのあるものは、結核菌のもつ抗原を処理し、マクロファージの細胞表面の Ia 抗原と associate した形で、その抗原情報を T リンパ球へ提示し、それに対するレセプターを持つ T リンパ球は

増殖して、クローンの増大がおこる。これが結核免疫の成立過程であり、このリンパ球が感作リンパ球である。再感染の場合にも、抗原情報は同様な形でマクロファージによつて感作 T リンパ球へ提示される。表 1 はこのような結核菌抗原情報をリンパ球に提示するマクロファージに関する私共の実験成績である。

すなわち、組織適合抗原を異にする近交系モルモット (strain 2, strain 13, JY-1 および JY-2) を BCG で免疫し、その脾細胞浮遊液をナイロン繊維カラムを通して、感作 T リンパ球を enrich し、responding cell とした。一方、腹腔滲出細胞を壁面に付着させて、マクロファージ分画を得、これに PPD をパルスして stimulating cell とした。この両者を混合培養し、PPD 特異的なリンパ球の幼若化反応をみた。その成績の一部が表 1 に示してある<sup>1)</sup>。

このように抗原情報の授受が行なわれるためには、T リンパ球とマクロファージの間に組織適合抗原の一致が必要であるという Shevach らの成績<sup>2)</sup> が、我々の系でも確認できた。なお、別の実験で、この反応のためには、組織適合性を支配するモルモットの遺伝子領域の中の B

Table 1. Requirement for Histocompatible Macrophages in Antigen-mediated DNA Synthesis in BCG-immune Guinea Pig Lymph Node Lymphocytes

Macrophage		<sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm)	
Strain	PPD pulse	Strain JY-1	Strain JY-2
JY-1	-	1,844	2,283
	+	23,525	2,233
JY-2	-	6,295	1,335
	+	7,310	9,574
2	-	2,601	2,494
	+	3,004	2,580

Peritoneal macrophages ( $10^6$ ) induced by oil were pulsed with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PPD for 60 min at 37°, washed and mixed with an equal number of syngeneic or allogeneic lymph node lymphocytes from animals immunized with living BCG. Lymphocyte blast formation was assessed after 72 hr of culture; 1  $\mu\text{Ci}$  <sup>3</sup>H-TdR was added for the last 18 hr.

Table 2. MAF Activity of Culture Supernatants of BCG-primed (C3H  $\times$  SWM) F1 Spleen Cells and PPD-pulsed or Nonpulsed Parental Macrophages on the Tumoricidal Activity of CDF1 Macrophages

Macrophages cultured with BCG-primed cells	PPD pulse	MAF activity	
		[ <sup>3</sup> H]TdR uptake by P815 mastocytoma <sup>a</sup>	Cytotoxicity (% inhibition <sup>b</sup> )
-	-	20,927 $\pm$ 737	-5.7 <sup>c</sup>
C3H/He	-	22,020 $\pm$ 1,170	-11.2
C3H/He	+	18,141 $\pm$ 2,776	8.4
SWM/Ms	-	21,732 $\pm$ 1,559	-9.8
SWM/Ms	+	3,278 $\pm$ 666	83.4

<sup>a</sup> Each value represents counts per minute  $\pm$  standard error. [<sup>3</sup>H]TdR uptake by P815 mastocytoma without CDF1 macrophages was 19,792  $\pm$  2,768 cpm.

<sup>b</sup> Each value represents percent inhibition, i.e., [(counts per minute of P815 alone - experimental counts per minute) / counts per minute of P815 alone]  $\times$  100.

<sup>c</sup> Value represents cytotoxicity of nonactivated CDF1 macrophages against P815.

領域の一致は必要でないことも明らかとなった。

このように Ia 陽性の抗原提示細胞は、必ずしも食作用を有しなくてもよいことが知られているが、Ia 抗原陽性で、かつ食作用ないし細胞傷害作用を有するマクロファージが存在するか否かは、必ずしも明らかでない。私共は、最近 Protein A, ポリ-L-リシン, Ia 抗体などを用いて、Ia 陽性マクロファージの positive selection に成功し、その多くが FcR 陽性であり、食作用だけでなく、細胞傷害作用をも有することを示唆する成績を得た。

図1は、SWM/Ms と C3H/He という2系統のマウスを BCG で免疫したのちの PPD による足蹠反応値を示している。明らかに SWM は高応答性、C3H は低応答性マウスであるが<sup>3)</sup>、私共は後者の低応答性についてそれが BCG 特異的なサブレッサー T リンパ球の誘導によることを見出した<sup>4)</sup>。そして更に、この低応答性マウスにおいては、表2に示すように、そのマクロファージが感作リンパ球へ抗原を提示する能力に大きな差がある

ことが知られた<sup>5)</sup>。この差が Ia 陽性細胞の差によるものか否か、またこの差がサブレッサー T の誘導に結びつくのか否かは、未だ明らかでなく、検討中である。

このほか、BCG を大量静注すると、脾中に抗体産生を抑制するマクロファージが出現することも観察している。

## (2) 結核免疫の発現とマクロファージ

感作 T リンパ球がマクロファージを介して抗原と結合し、リンフォカインを産生放出することにより、局所にマクロファージを集積せしめこれを強く活性化することが、結核免疫の発現過程と考えられている。

私共は、リンフォカインがマクロファージを活性化する機構の研究を行なってきたが、それらの中から、以下のような問題につき実験の結果を述べてみたい。

a) リンフォカインとマクロファージの相互作用の最初のステップは、リンフォカインの細胞表面レセプターへの結合である。マウスの場合、D-マンノースがこの

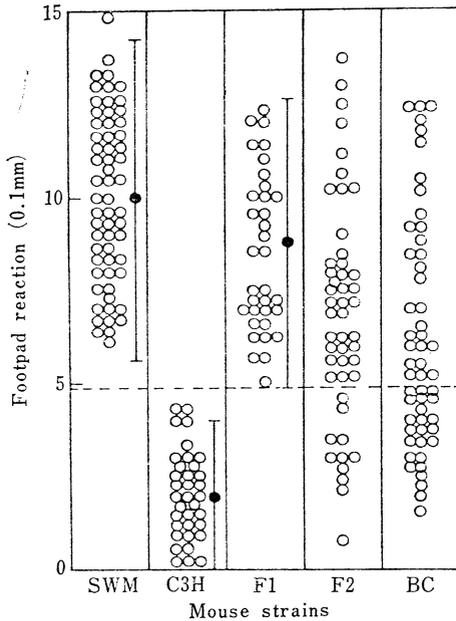


Fig. 1. FPR to PPD in BCG-immunized SWM/Ms and C3H/He mice and their hybrids. The results for the FPR were plotted by individual values. The vertical bars indicate the mean  $\pm$  twice the standard deviation FPR in each group. The mean  $\pm$  twice the standard deviation in C3H/He was set as the upper limit of low responsiveness and is indicated by the broken line. BC refers to (F1  $\times$  C3H) BC.

レセプターの主要構成糖であることが、多くの実験事実から強く示唆された<sup>6)</sup>。LPS のマクロファージへの吸着も D-マンノースにより阻止されるが、しかしマクロファージの LPS レセプターとリンフォカインレセプターは、別個のものであることを示す成績が得られた。

b) リンフォカインによるマクロファージの活性化には、細胞内のマイクロフィラメントが必要であり、微小管の関与は少ない。また蛋白合成は不可欠であるが、DNA 合成を必要としない。

c) リンフォカインにより活性化されるマクロファージには、heterogeneity がある。腹腔常在マクロファージは活性化されにくく、腹腔滲出性マクロファージはされやすい。この差は、リンフォカインレセプターの差による可能性があり、また前者は後者の分化が進み、一種の退行型である可能性がある。

d) マクロファージの活性化は、分化と密接に関連していると思われる。私共は、リンフォカインを含むマウス血清自体が、マクロファージの分化を促すことを見出した。また合成 MDP には、マクロファージの前駆細胞の分化を促進する作用はないが、ある段階まで分化が進んでいると考えられるマクロファージのクローン (J774-1 細胞) を刺激して、マクロファージ分化因子を産出せしめることを見出した<sup>7)</sup>。マクロファージの活性化は、マクロファージの分化の段階と関連があり、またマクロファージ活性化因子と分化促進因子の間にも関連がある可能性がある。このようにリンパ球産生物質がマクロファージの分化を促す一方、マクロファージ産生物質がリンパ球の活性化と同時にマクロファージ自身の分化をも促す、というサイクルの存在が認められた。一方また、マクロファージ活性化物質の多くがマクロファージの分化促進因子でもあることは、活性化と分化の関連を考えるうえに極めて興味深い事実のように思われる。

なお、結核免疫のエフェクターは、遅延型アレルギーに関与する感作リンパ球が抗原特異的に放出するリンフォカインによつて活性化されるマクロファージであることについては、多くの人が容認するところである。しかしそれならば、死菌免疫モルモットで、強い遅延型アレルギーが成立するのに、抗菌免疫がそれほど強くないのはなぜであろうか。この古くて新しい疑問について、私共は本学会においてその考えの一端を示したが<sup>8)</sup>、結核免疫とマクロファージを考えてゆくうえでも、今後の重要な研究課題の一つと考えられる。

## 文 献

- 1) Tokunaga, T. et al.: Gann Monograph on Cancer Research, 21 : 59, 1978.
- 2) Rosenthal, A.S. et al.: J. Exp. Med., 138 : 1194, 1973.
- 3) Nakamura, R.M. et al.: Infec. Immun., 22 : 657, 1978.
- 4) Nakamura, R.M. et al.: Infec. Immun., 28 : 331, 1980.
- 5) Nakamura, R.M. et al.: Infec. Immun., 27 : 268, 1980.
- 6) Tokunaga, T. et al.: Immunology Immunotherapy of Cancer, eds. Terry/Yamamura, Elsevier, North Holland, Inc., New York, Amsterdam, Oxford, p. 71, 1979.
- 7) Akagawa, K. et al.: Microbiol. Immunol., 1980.
- 8) 三浦 馨他: 結核, 55 : 72, 1980.

## 6. 菌体成分 cell-wall skeleton(CWS) によるマクロファージの活性化

富山医科薬科大学医学部第1内科 伊藤正己

## 6. ACTIVATION OF MACROPHAGES INDUCED BY CELL-WALL SKELETON (CWS)

The First Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Masami ITO

感染や腫瘍に対する生体の防御機構において、マクロファージは重要な役割を果たすと考えられている。マクロファージは BCG などの免疫賦活物質によつて活性化されるが、その機序は必ずしも明確ではない。一方、BCG およびその類縁菌である *Nocardia rubra* (*N. rubra*) の各細胞壁から抽出、精製されたミコール酸・アラビノガラクトタン・ムコペプチドを組成とする骨格成分 cell-wall skeleton (CWS) が強い免疫学的活性を保有することが明らかにされた。したがつて、マクロファージの機能に及ぼす CWS の効果とその機序に関する検討は CWS のもつ免疫学的活性の発現機構を解明するための一つのアプローチであると思われる。本研究では CWS によるマクロファージの諸機能の活性化について、特に腫瘍細胞傷害能に重点をおいて解析した。

## 方 法

BCG, *N. rubra* からの CWS (BCG-CWS, *N. rubra*-CWS とおのおの略す) を腹腔内投与したマウス (C3H/He, C57BL/6, CBA, 7~9 週齢) から腹腔マクロファージ, BCG-CWS を気管内投与したラット (ドンリュウ, 200~250 g) からは肺胞マクロファージを採取して、以下の指標について観察した。①遊出数。遊出した腹腔、肺胞各マクロファージの細胞数を経時的に算定した。②2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) 摂取率。代謝活性の指標として、腹腔、肺胞各マクロファージの 2-DG 摂取率を Siddigi らの方法で測定した。③食作用。Zymosan に対する腹腔、肺胞各マクロファージの食作用活性を May-Giemsa 染色を用いて測定した。これら①~③の測定には、mineral oil-attached の BCG-CWS, *N. rubra*-CWS を C3H/He マウス腹腔内に 100 $\mu$ g, ラット気管内に 400 $\mu$ g 投与した。④腫瘍細胞傷害能。この測定には squalene 処理の *N. rubra*-CWS 50 $\mu$ g をマウス (C57 BL/6, CBA) 腹腔内に投与した。投与 5 日後の腹腔滲出細胞 (PEC) をエフェクター細胞とし、<sup>125</sup>I-デオキシウリジン ([<sup>125</sup>I]IdUrd) で標識した腫瘍細胞に対する細胞傷害能を 24 時間の [<sup>125</sup>I]IdUrd release assay で測定した。標的腫瘍細胞には FBL-3 (C57 BL/6 マウス

由来白血病細胞), Meth A (BALB/c マウス由来線維肉腫細胞), CEM (ヒト由来 Tリンパ腫細胞) を用いた。次に PEC について、④プラスチック ディッシュへの粘着性による粘着細胞と非粘着細胞の分離、⑤抗マクロファージ血清と補体処理、⑥抗 Thy 1.2 抗体と補体処理、⑦マクロファージ機能抑制物質カラゲナン処理を行ない、PEC 中のエフェクター細胞がマクロファージであることを同定した。更に腫瘍細胞傷害性マクロファージの産生に最適な *N. rubra*-CWS の投与量, ルート, timing についても観察した。

## 結 果

①遊出数。BCG-CWS 投与により、比較に用いた BCG (400 $\mu$ g) と同様の肺胞マクロファージ数の著増がみられ、そのピークは投与後 14~21 日であつた (Fig. 1)。同様に、マウス腹腔マクロファージも BCG-CWS, *N. rubra*-CWS 各腹腔内投与により著しく増加したがその

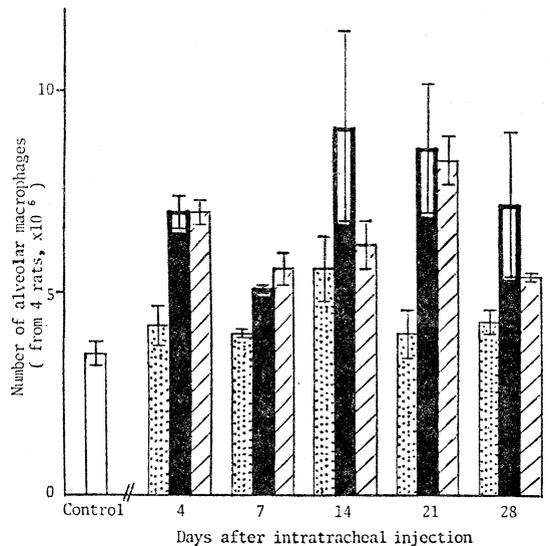


Fig. 1. Accumulation of alveolar macrophages after intratracheal injection of oil-droplets (□), BCG-CWS (■) or BCG (▨). Each vertical bar presents standard error.

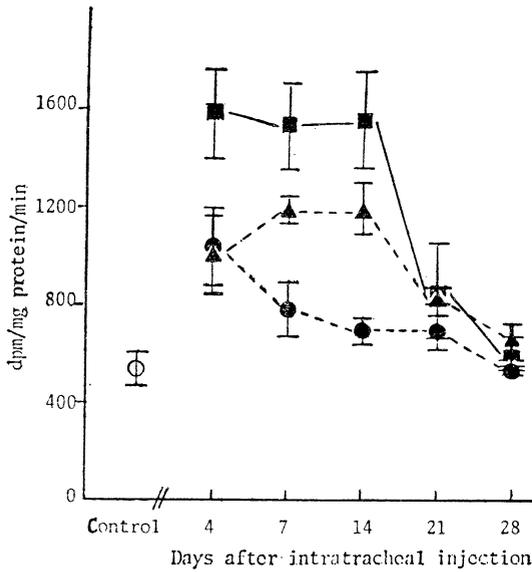


Fig. 2. Uptake of 2-DG by alveolar macrophages treated with oil-droplets (●), BCG-CWS (■) or BCG (▲). Each vertical bar presents standard error.

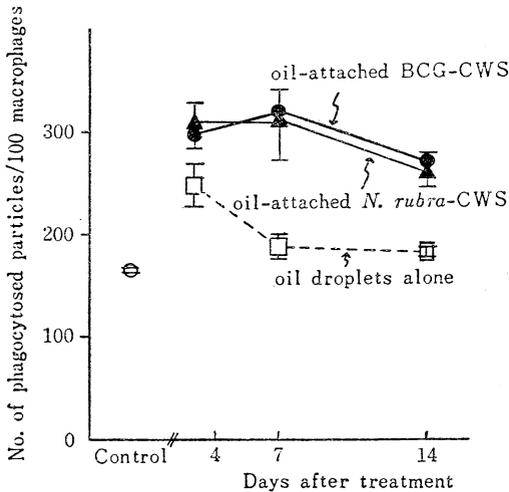


Fig. 3. Phagocytic activity of peritoneal macrophages. Each value indicates mean of 3 determinations, except that of saline group which is a mean of 4 determinations at day 4 and 7, and separately shown in the graph. Each vertical bar represents SE.

ピークは5~7日後であり、肺胞マクロファージと異なるパターンを示した。② 2-DG 摂取率。Fig. 2はラット肺胞マクロファージの 2-DG 摂取率である。BCG-CWS が BCG (400 $\mu$ g) と同等ないし以上の増強を投与後4~14日にわたつてもたらずことが観察された。マウス腹腔マクロファージについても同様の結果が、BCG-CWS, *N. rubra*-CWS 各投与でみられた。③食作用。マウス腹腔マクロファージの Zymosan に対する食作用も

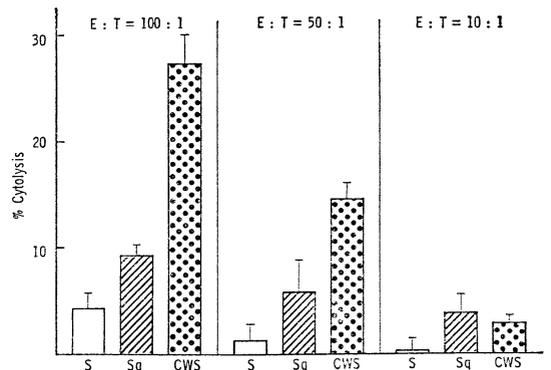


Fig. 4. The cytolytic activity of PEC from *N. rubra*-CWS injected mice measured as a function of the effector to target cell ratios.

C57BL/6 mice were given 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS (CWS, dotted columns), squalene alone (Sq, hatched columns), corresponding to that attaching to 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS, and saline only (S, open columns) i.p., respectively, and their PEC were harvested 5 days later. These cells were assayed with [ $^{125}$ I] IdUrd-labeled FBL-3 target cells for 24 hr at effector-to-target cell ratios from 100:1 to 10:1 as described in *Materials and Methods*. The columns represent the mean of 10 experiments; bars, S.D.

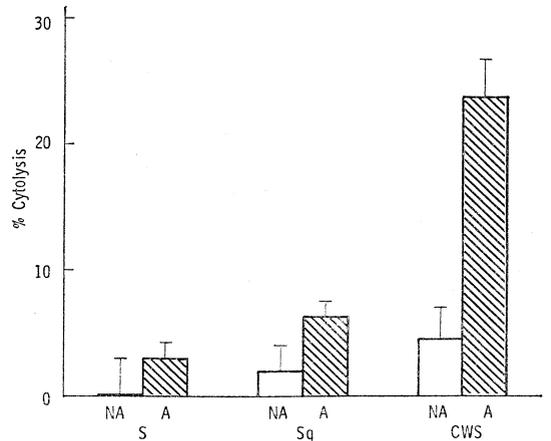


Fig. 5. Adherent properties of *N. rubra*-CWS-induced exudate effector cells.

C57BL/6 mice were given 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS (CWS), squalene alone (Sq), corresponding to that attaching to 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS, and saline only (S) i.p., respectively, and peritoneal exudates harvested 5 days later. The separation procedure is detailed in *Materials and Methods*. Adherent (A, hatched columns) and nonadherent (NA, open columns) PEC were assayed against  $10^4$  [ $^{125}$ I] IdUrd-labeled FBL-3 target cells for 24 hr at an effector-to-target cell ratio of 100:1.

BCG-CWS, *N. rubra*-CWS によつて著しく活性化された (Fig. 3)。同様の結果はラット肺胞マクロファージについても得られた。以上①~③の実験では対照群として saline 投与 (図中に control と表示) のほかに mineral oil-droplets 単独投与を行なつたが、投与後4日に軽度の変化のみみられただけであつた。④腫瘍細胞傷害能。

Table 1. Treatment of *N. rubra*-CWS-induced Adherent PEC with Antimacrophage Antiserum and Complement

Treatment of adherent PEC	% Cytolysis <sup>a</sup>
None	33±2 <sup>b</sup>
Antimacrophage antiserum	30±4
Antimacrophage antiserum+ Complement	6±5 <sup>c</sup>
Complement	29±6
Normal mouse serum	31±4
Normal mouse serum+Complement	37±6

<sup>a</sup> Adherent PEC were obtained from CBA mice given 50 µg *N. rubra*-CWS i.p. 5 days before harvesting. Cytolysis of FBL-3 cells was measured in a 24-hr [<sup>125</sup>I] IdUrd release assay at an effector-to-target cell ratio of 100:1.

<sup>b</sup> Mean±S.D. of 4 experiments.

<sup>c</sup> *p*<0.01 compared to untreated controls.

Table 2. Sensitivity of *N. rubra*-CWS-induced Adherent PEC to anti-Thy 1,2 Serum in the Presence of Complement

Treatment of adherent PEC	% Cytolysis <sup>a</sup>
None	29±8 <sup>b</sup>
Anti-Thy 1,2 serum	24±1
Anti-Thy 1,2 serum+Complement	25±3
Complement	34±4

<sup>a</sup> Adherent PEC were obtained from CBA mice given 50 µg *N. rubra*-CWS i.p. 5 days before harvesting. These cells were assayed with [<sup>125</sup>I] IdUrd-labeled FBL-3 target cells for 24 hr at an effector-to-target cell ratio of 100:1.

<sup>b</sup> Mean±S.D. of 4 experiments.

Table 3. Abrogation of Cytolytic Activities of *N. rubra*-CWS-induced Adherent PEC by Carrageenan<sup>a</sup>

Treatment (i.p.)	% Cytolysis <sup>b</sup>
<i>N. rubra</i> -CWS (50µg)	
+None	23.5±2.3
+Carrageenan (1 mg)	14.0±1.3 <sup>c</sup>
+Carrageenan (5 mg)	9.5±1.0 <sup>d</sup>
Squalene alone	5.7±1.5
Saline	1.0±0.3

<sup>a</sup> Adherent PEC were obtained from C57BL/6 mice injected with *N. rubra*-CWS and carrageenan simultaneously by the i.p. route 5 days previously.

<sup>b</sup> Cytolysis of FBL-3 cells was measured in a 24-hr [<sup>125</sup>I] IdUrd release assay at an effector-to-target cell ratio of 100:1. Mean±S.D. of 4 experiments.

<sup>c</sup> *p*<0.05 compared to *N. rubra*-CWS+None-treated controls.

<sup>d</sup> *p*<0.01 compared to *N. rubra*-CWS+None-treated controls.

Fig. 4 は *N. rubra*-CWS を 50µg, C57 BL/6 マウス腹腔内に投与後 5 日の PEC が示す同系腫瘍 FBL-3 に対する細胞傷害率である。エフェクター：標的細胞比 100

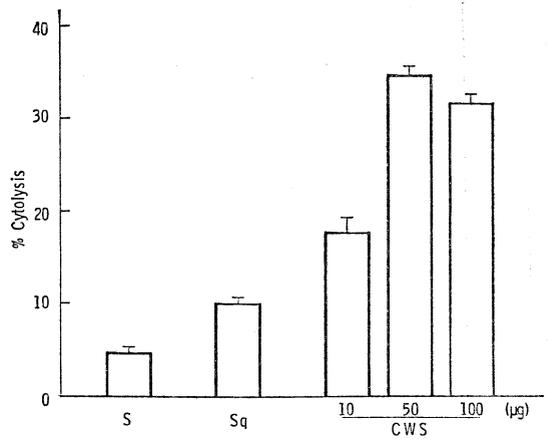


Fig. 6. Dose of *N. rubra*-CWS required to affect adherent PEC.

C57BL/6 mice were injected i.p. with 10, 50, or 100 µg *N. rubra*-CWS (CWS) in 0.5 ml saline and adherent PEC assayed at day 5 with 10<sup>4</sup> [<sup>125</sup>I]IdUrd-labeled FBL-3 target cells at an effector-to-target cell ratio of 100:1 for 24 hr. The i.p injection of squalene alone (Sq), corresponding to that attaching to 100 µg *N. rubra*-CWS or saline only (S) was used as controls. Each column shown is the mean of 3 experiments; bars, S.D.

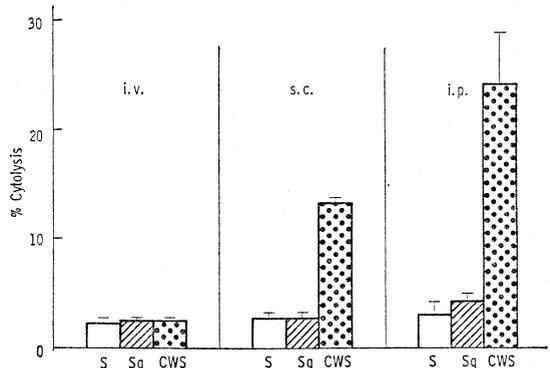


Fig. 7. Effect of *N. rubra*-CWS injection site on production of cytolytic adherent PEC.

Adherent PEC were obtained from C57BL/6 mice injected with 50 µg *N. rubra*-CWS (CWS, dotted columns) i.v., s.c., or i.p. 5 days previously. The cells were then assayed as effector cells against [<sup>125</sup>I]IdUrd-labeled FBL-3 target cells at an effector-to-target cell ratio of 100:1 for 24 hr. Adherent PEC harvested from the mice injected i.p. with squalene alone (Sq, hatched columns), corresponding to that attaching to 50 µg *N. rubra*-CWS or saline only (S, open columns) were used as controls. The columns represent the mean of 3 experiments; bars, S.D.

: 1, 50:1 で PEC が著明な腫瘍細胞傷害性を発揮することが示された。これに反し対照群の saline,あるいは squalene 単独投与の PEC には有意の腫瘍細胞傷害性はみられなかった。同様の結果は CBA マウスについても得られた。この腫瘍細胞傷害性 PEC をプラスチック ディッシュを用いて粘着性 PEC と非粘着性 PEC に分

Table 4. Cytolytic Activities of Spleen Cells and Lymph Node Cells from Mice Injected with *N. rubra*-CWS

Effector cells	Treatment (i.p.)	% Cytolysis		
		100 : 1	50 : 1	10 : 1
Spleen cells	Saline	1.0±1.5	1.5±0.3	1.0±1.2
	Squalene	2.7±0.3	2.0±0.6	1.8±1.0
	<i>N. rubra</i> -CWS	4.3±1.8	0.7±0.3	1.8±1.1
Lymph node cells	Saline	2.0±0.9	0.0±0.7	0.8±0.8
	Squalene	1.8±0.9	1.8±1.1	1.0±0.8
	<i>N. rubra</i> -CWS	2.8±0.9	1.7±0.3	1.0±1.1
Adherent PEC	<i>N. rubra</i> -CWS	24.0±2.5	18.2±2.0	6.0±2.3

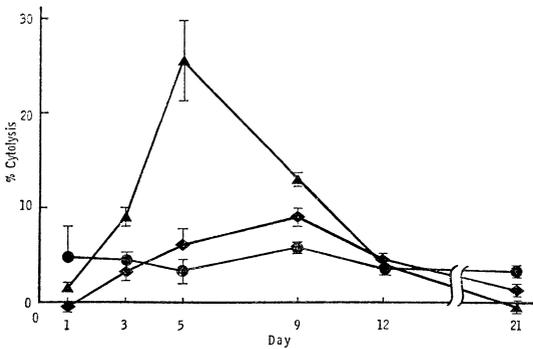


Fig. 8. The cytolytic activities of adherent PEC were measured as a function of time after i.p. *N. rubra*-CWS injection.

C57BL/6 mice were injected i.p. on day 0 with 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS ( $\blacktriangle$ ). The adherent PEC were harvested from 1 to 21 days later and assayed with [ $^{125}$ I]IdUrd-labeled FBL-3 target cells. The assays employed  $10^4$  target cells incubated with  $10^6$  effector adherent PEC for 24 hr. The adherent PEC taken from the mice injected i.p. with squalene alone ( $\blacklozenge$ ), corresponding to that attaching to 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS or saline only ( $\bullet$ ) were used as controls. Each point represents the mean of 3 experiments; bars, S.D.

離しておのおのについて腫瘍細胞傷害能を測定したのが Fig. 5 である。図からあきらかなように、*N. rubra*-CWS によつて誘導される腫瘍細胞傷害性エフェクター細胞は PEC のうちの粘着性細胞であることが確かめられた。この粘着性 PEC は活発な食作用を有しかつ形態的にもマクロファージであることが示唆されたが、同定のために更に以下の実験を行なつた。*N. rubra*-CWS 50 $\mu$ g を CBA マウス腹腔内投与 5 日後に採取した粘着性 PEC を抗マクロファージ血清と補体で処理後、FBL-3 に対する細胞傷害能を測定した (Table 1)。その結果、粘着性 PEC の強い腫瘍細胞傷害活性は抗マクロファージ血清と補体処理でほぼ完全に消失していた。このことは粘着性 PEC がマクロファージ抗原を保有することを意味する。また、粘着性 PEC を抗 Thy 1.2 抗体と補体で処理してもその腫瘍細胞傷害能は影響されない

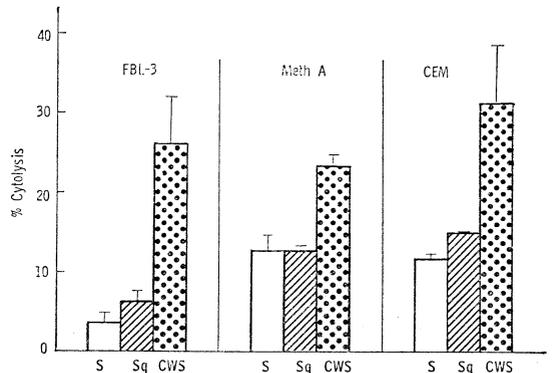


Fig. 9. Target cells lysed by *N. rubra*-CWS-induced adherent PEC.

Adherent PEC were obtained from C57BL/6 mice 5 days after injection of 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS (CWS, dotted columns) i.p. Cytolysis of the various target cells tested was measured in a 24-hr [ $^{125}$ I]IdUrd release assay at an effector-to-target cell ratio of 100 : 1. Adherent PEC obtained from the mice injected i.p. with squalene alone (Sq, hatched columns), corresponding to that attaching to 50  $\mu$ g *N. rubra*-CWS or saline only (S, open columns) 5 days previously were used as controls. The columns represent the mean of 3 experiments; bars, S.D.

ことから粘着性 PEC に混在した T リンパ球がエフェクター細胞である可能性は否定された (Table 2)。Table 3 は粘着性 PEC をマクロファージの選択的機能抑制物質カラゲナンで処理した実験結果である。*N. rubra*-CWS で誘導された粘着性 PEC の腫瘍細胞傷害能がカラゲナンの量に依存して著明に抑制された。このデータからも腫瘍細胞傷害性の粘着性 PEC はマクロファージであることが示唆された。*N. rubra*-CWS の投与量、ルート、timing と粘着性 PEC の腫瘍細胞傷害能の関係を次に観察した。投与量では、10 $\mu$ g 腹腔内投与でも低いながら有意の活性化がみられ、50~100 $\mu$ g でプラトーに達することが示された (Fig. 6)。投与ルートについては、腹腔内投与で最も強い活性化がみられ、皮下投与では弱く、静脈内投与では活性化されなかつた (Fig. 7)。また、粘着性 PEC の腫瘍細胞傷害能は *N. rubra*-CWS 50 $\mu$ g 腹腔

内投与後5日がピークで、その後は漸次減弱を示した (Fig. 8)。Fig. 9 は標的細胞に同系、同種、異種の各種腫瘍細胞を用いて、粘着性 PEC による細胞傷害率を比較したデータである。C57BL/6 マウスに *N. rubra*-CWS 50 $\mu$ g 腹腔内投与して5日後の粘着性 PEC は同系 FBL-3、同種 Meth A、異種 CEM の各種腫瘍細胞に対して著明な細胞傷害能を発揮した。しかし粘着性 PEC と異なり、*N. rubra*-CWS 腹腔内投与マウスの脾細胞およびリンパ節細胞には腫瘍細胞傷害能がみられなかつた (Ta-

ble 4)。

[結語] 今回の実験結果から、CWS がマクロファージの諸機能を著明に活性化することが示された。この活性化機序については現在検討が進められている。たとえば、腫瘍細胞傷害能の活性化機序に関して、CWS は直接的にマクロファージを活性化するのではなく T リンパ球由来可溶性因子の産生を介して活性化することを示唆する知見が得られている。

## 7. BCG 生菌で誘導されるマクロファージ様細胞の結核感作への関与

北海道大学免疫科学研究所 加藤 一之

### 7. INVOLVEMENT OF THE MACROPHAGE-LIKE CELLS INDUCED BY LIVE BCG INJECTION IN THE TUBERCULOUS SENSITIZATION

Kazuyuki KATO

Institute of Immunological Science, Hokkaido University

BCG 生菌は結核予防接種に用いられるのみならず、強力なアジュバント活性をもつために腫瘍の免疫療法にも用いられている。このように体内で増殖する BCG は多彩な免疫応答を惹起するのであるが、それに関与する種々の細胞の性質、相互関係はなお不明な点が多い。

我々は結核遅延型皮膚反応が BCG 生菌をあらかじめ投与することによつて抑制される現象を確認し、この抑制現象に関与する細胞がマクロファージ様の細胞であることを明らかにした。結核感染の際、BCG 生菌免疫宿主ではマクロファージが感染防御に主役を演ずることはよく知られた事実であるが、感染防御と密接な平行関係をもつと言われている遅延型反応が実験条件の設定を変えると BCG によつて誘導されるマクロファージ様の細胞によつて抑制されることは結核感染とマクロファージのかかわり合いを追究するうえではなほ興味深く思われる。

上述の BCG 生菌接種によつて誘導される遅延型反応抑制細胞の性質について次に述べるごとく検討した。

#### I. 実験材料と方法

使用した動物は C3H/HeMS マウスで、一部の実験では C57BL/6 マウスも用いた。同一実験では性、週齢を揃えて生後 6~10週齢のものを使用した。遅延型反応のための感作には米国 NIH, Rocky Mountain Laboratory の Dr. Ribí より分与をうけた BCG 細胞壁 (CW) を Ribí らの方法によつて水中油系エマルジョンとしてマウス当り 300 $\mu$ g ずつ頸部の皮下に接種した。遅延型皮膚反応は PPD 10 $\mu$ g を足蹠皮内に注射、24時間後の

腫脹をダイヤルゲージで測定する方法で調べた。BCG 生菌はソートン培養 8~10日目の菌膜を型のごとく水晶玉入りコルベンで手振り法によつて磨碎、生食水浮遊液とし、マウス当り生菌単位約  $10^8$  を静注、実験によつては腹腔にも投与した。また対照実験として BCG 死菌も用いたが、その調製には上記、生食水浮遊 BCG 生菌を 100 $^{\circ}$ C、30分間加熱した。遅延型反応を *in vitro* で解析するためにマクロファージ遊走阻止試験 (MI テスト) を用いた。このテストは遅延型皮膚反応の *in vitro* の示標とされているものである。このテストに用いる腹腔浸出細胞 (PEC) は 12%カゼインソーダ生食水 3ml を腹腔注射 3日目にハンクス液で洗浄し採集した。BCGCW 感作マウス PEC を毛細管につめ、Sykes-Moor 型チャンパーで PPD 50 $\mu$ g/ml 添加および非添加の 15%仔牛血清加イーグル培地中で、それぞれ 24時間 5%炭酸ガス環境下培養を行ない、毛細管断端から遊走した面積を測定し、両者の百分率、すなわち % 阻止率を以て被検 PEC の MI 活性を示した。また、BCG 生菌静注マウス PEC の BCGCW 感作マウスの MI 活性への影響をみるには両 PEC をおおよそ等量混合したものの MI 活性を測定した。

#### II. 実験結果

##### 1) BCG 前処置による BCGCW 感作遅延型皮膚反応の抑制

BCG 生菌および死菌をそれぞれ静脈と腹腔に接種し、3週後に BCGCW を皮下に感作、さらに 4週後に PPD による足蹠反応を調べた結果は図 1 に示した。BCG 生

菌前処置では静脈、腹腔群共に足蹠反応は抑制された。他方、死菌前処置では静脈群においてのみ抑制がみられた。また、これらのマウスの PEC について MI 活性を調べた結果は図1の右欄に示したように、死菌前処置静脈群を除き、足蹠反応が抑制された群は MI 活性も消失し両者は平行した。

2) BCGCW 感作 PEC の MI 活性に対する BCG 生菌静注マウス PEC の抑制効果

前実験で示された BCG 生菌前処置マウスにおける遅延型足蹠反応の抑制を *in vitro* で解析するために BCG-CW 感作4週後の PEC と BCG 生菌静注3週後の PEC

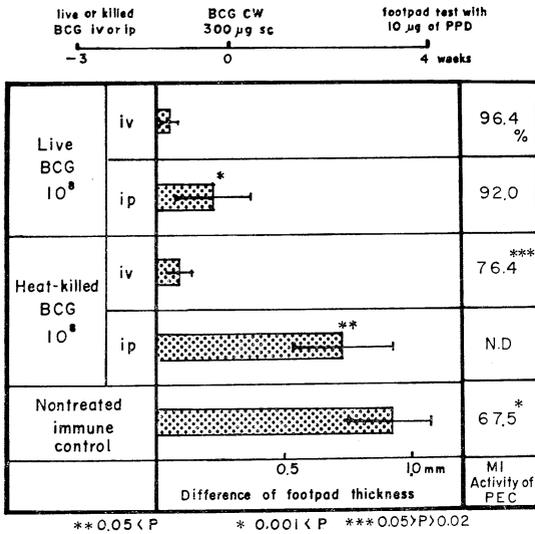


Fig. 1. DTH responses in C3H mice sensitized with BCG CW. C3H mice injected by the live or heat-killed BCG iv, ip 3 weeks before the immunization with BCG CW. Footpad thickness was measured four weeks after the immunization with BCG CW. MI activity of PEC was estimated by the per cent migration of the cells.

ND: not done

とを等量混合して MI 活性を調べた。結果は表1に明らかのように BCG 生菌静注マウス PEC を加えることによつてのみ MI 活性の抑制がみられた。対照の正常マウス PEC と BCG 死菌静注マウス PEC には全く抑制効果はなかつた。ここで BCG 生菌静注 PEC の抑制という表現に1つの検討すべき点がある。それは BCG 生菌静注 PEC がマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) に感受性がないために、それ自身遊走して BCGCW 感作 PEC の遊走阻止状態をおおい、あたかも BCGCW 感作 PEC の遊走阻止が抑制されたときみなされたのではないかということである。しかし、BCG 生菌静注 PEC は BCGCW 感作マウスの対応抗原での脱感作で得られた MIF を含む血清によつて遊走が明らかに阻止されたので、上に述べた見かけ上の遊走阻止抑制の可能性は除外してよいと思われる。

3) BCG 生菌静注 PEC 中の抑制細胞の性質

前実験でみられた BCG 生菌静注 PEC の抑制効果を示す細胞の性質を検討した。まず、BCG 生菌静注 PEC をプラスチック・シャーレに付着するものと非付着のものに分け、それぞれの BCGCW 感作 PEC の MI 活性に対する抑制効果をみた成績が表2である。表に明らかのようにプラスチック・シャーレ付着性細胞にのみ抑制効果があつた。次に、この付着性細胞をウサギ抗マウス Ig 血清あるいは Antibrain-associated  $\theta$  血清で処置し、B細胞、T細胞のほとんど存在しないことが確かめられたが、この場合も抑制効果に変動を来さなかつた。以上の結果から、この抑制作用を示す細胞はマクロファージ様のものであると考えられる。

4) 抑制細胞出現の時間的経過

BCG 生菌静注3, 12および21日後の PEC の BCGCW 感作マウス PECMI 活性抑制効果を調べた。結果は表3のように3日後のものには抑制効果はなかつたが、12日以降のものに抑制効果が示された。したがつて少なくと

Table 1. Inhibitory Effect of PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice

PEC from	Mixed with PEC from	MI activity
Mice <sup>a)</sup> immunized subcutaneously with 300 µg of oil-treated BCG CW	—	63.8*
	Normal mice	55.6*
	Live BCG-injected mice <sup>2)</sup>	124.1
	Killed BCG-injected mice <sup>2)</sup>	62.7*
Live BCG-injected mice <sup>b)</sup>		85.1**
Killed BCG-injected mice <sup>b)</sup>		112.5

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) These mice were injected intravenously with 10<sup>8</sup> live or heat-killed BCG 3 weeks before cell harvest.

\*  $p < 0.001$

\*\*  $0.1 > p > 0.05$

Table 2. Inhibitory Effect of Adherent PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice

PEC from	Mixed with	MI activity
Mice <sup>a)</sup> immunized subcutaneously with 300 $\mu$ g of oil-treated BCG CW	PEC from normal Mice	64.7*
	PEC from live BCG-injected mice <sup>b)</sup>	110.3
	Adherent PEC from live BCG-injected mice	115.7
	Non-adherent PEC from live BCG-injected mice	73.9**

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) These mice were injected intravenously with 10<sup>8</sup> live BCG 3 weeks before cell harvest.

\*  $p < 0.001$

\*\*  $0.01 < p < 0.02$

Table 3. Time Course of Development of Inhibitory Effect of PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized mice

PEC from	Mixed with	MI activity
Mice <sup>a)</sup> immunized subcutaneously with 300 $\mu$ g of oil-treated BCG CW	N-PEC	83.7*
	3d-L-BCG-PEC <sup>b)</sup>	71.7*
	12d-L-BCG-PEC <sup>b)</sup>	112.1
	21d-L-BCG-PEC <sup>b)</sup>	105.6

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) PEC from mice intravenously injected with live BCG 3, 12, 21 days before cell harvest, respectively.

\*  $0.001 < p < 0.01$

も BCG 静注12日以後に MI 活性抑制細胞が出現することが明らかになった。

#### 5) 抑制細胞は H-2 barrier を越えて働くか

抑制細胞が主要組織適合抗原遺伝子 H-2 を異にするマウスの BCGCW 感作 PEC の MI 活性にも作用するか否かを今までで用いた C3H/He マウスを H-2 の違う C57 BL/6 マウスを用い、両者の組合せで調べた。BCGCW 感作 C57 BL/6 PEC の MI 活性を BCG 生菌静注 C3 H/HePEC は抑制した。また逆に C3 H/He の MI 活性を C57 BL/6 の抑制細胞が明らかに低下させた。このように抑制細胞は H-2 の barrier を越えて働くことが明らかである。

#### 6) 抑制効果に及ぼす Indomethacin の影響

BCG 生菌静注 PEC の MI 活性抑制は Prostaglandin の拮抗剤である Indomethacin を 10<sup>-2</sup> $\mu$ g/ml 添加することによつて解除された。これはこの系に Prostaglandin の関与を示唆する。

#### 7) 抑制効果に及ぼす Methotrexate の影響

BCG 生菌静注後 11 日、および 16 日に Methotrexate 15 mg/kg ずつ 2 回腹腔投与し、その 5 日後に BCGCW で感作したマウスでは遅延型足蹠反応の抑制が methotrexate で処置しない対照の 60% まで回復することが見出された。これを *in vitro* で調べてみると、BCG 生菌静注 PEC にみられる MI 活性抑制が methotrexate 処置によつて解除されることがわかつた。

#### 8) BCG 生菌静注による遅延型皮膚反応抑制の特異性

BCG 生菌静注前処置によつてリステリヤ加熱死菌感作遅延型反応も明らかに抑制されることが知られ、本抑制作用は抗原特異的なものでないことが明らかにされた。

以上、BCG 生菌静注によつて誘導されるマクロファージ様細胞の結核遅延型反応抑制効果を明らかにしたが、今後、結核感染防御の主役であるマクロファージとの関係を追究することは複雑な結核感染の様相を明確にする主要なポイントとなるであろう。