

第 63 回総会特別講演

BCG による免疫応答の制御

加藤 一之

北海道大学医学部細菌学教室

受付 昭和 63 年 8 月 11 日

The 63rd Annual Meeting Special Lecture

SUPPRESSION OF IMMUNE RESPONSE IN MICE TREATED
WITH LIVE AND KILLED BCG

Kazuyuki KATO *

(Received for publication August 11, 1988)

We observed that delayed-type hypersensitivity (DTH), which was estimated by footpad reactions in mice immunized with *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) cell walls (CW), was suppressed by previous injection of live BCG. We analysed the DTH suppression using macrophage migration inhibition (MI) test. Peritoneal exudate cells (PEC) from live BCG-injected mice (L-BCG-PEC) were mixed with PEC from BCG-CW immunized mice (Effector PEC). As a control, we used normal mouse PEC (N-PEC). MI activity of mixture of Effector PEC and N-PEC was observed, but not of Effector PEC and L-BCG-PEC. The result showed that suppressor cells in L-BCG-PEC suppressed the MI activity of the Effector PEC. The characteristics of the suppressor cells in L-BCG-PEC were as follows :

1. The suppressor cells in L-BCG-PEC belonged to macrophage.
2. The suppressor macrophages were induced in PEC at least 12 days after live BCG injection.
3. The suppression was antigen non-specific and operated across the H-2 barrier.
4. Prostaglandin E₁ produced by the suppressor macrophages suppressed the MI activity of the Effector PEC.
5. The suppressor macrophages were sensitive to methotrexate (MTX).
6. MTX-sensitive cells in normal mouse bone marrow (Natural suppressor cells) suppressed the MI activity of the Effector PEC. The natural suppressor cells were characterized by immature macrophages. No the suppressor macrophages against MI activity were induced by live BCG injection in PEC of MTX-treated mice. Natural suppressor cells in normal mouse bone marrow may be of origin of the suppressor macrophages.

On the other hand, we also observed that BCG-CW induced DTH response was suppressed in killed BCG-injected mice and that the MI activity of mixture of the Effector

* From the Department of Bacteriology School of Medicine Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku Sapporo 060 Japan.

PEC and the PEC from mice injected intravenously with killed BCG (K-BCG-PEC) was positive. This finding suggested that no *in vivo* phenomenon (DTH) correlated *in vitro* phenomenon (MI activity of PEC) and that no suppressor cells were induced in K-BCG-PEC. To analyze the mechanism of DTH suppression in killed BCG injected mice, we examined the spleen cells from mice injected with killed BCG (K-BCG-sp-cells). The MI activity of mixture of K-BCG-sp-cells and the Effector PEC was negative, suggesting that suppressor cells in the K-BCG-sp-cells suppressed the MI activity of the Effector PEC. The characteristics of the suppressor cells in K-BCG-sp-cells were as follows:

1. The suppressor cells in K-BCG-sp-cells were Ly-2⁺, I-J⁺ cells.
2. The suppressor T cells were sensitive to cyclophosphamide.
3. The suppressor T cells operated antigen-nonspecifically.
4. DTH was suppressed in mice treated with tuberculin active peptide (TAP), the antigen portion of BCG, and muramyl dipeptide (MDP), the adjuvant portion of BCG. TAP and MDP induced antigen specific suppressor T cells and antigen nonspecific suppressor T cells, respectively. Therefore, two different kinds of suppressor T cells which were induced by antigen and adjuvant of BCG may operate in killed BCG-induced DTH suppression.

Key words : Bacillus Calmette Guérin, Delayed type hypersensitivity, Macrophage migration inhibition activity, Suppressor macrophages, Suppressor T cells, Prostaglandin, Natural suppressor cells, Muramyl dipeptide

キーワードズ : BCG, 遅延型反応, マクロファージ遊走阻止活性, 抑制性マクロファージ, 抑制性T細胞, プロスタグランジン, ナチュラルサプレッサー細胞, ムラミルジペプチド

はじめに

今から50年前, Freund¹⁾は結核菌とバラフィンオイルの混合物を動物に投与することにより, 液性免疫および細胞性免疫が増強することを見出した。この混合物が, 今日, Freund's Complete Adjuvantと呼ばれている。多くの菌体成分は Adjuvant 活性を有しているが, 最も強い活性を有するものは結核菌や BCG などの *Mycobacterium* 属であろう。BCG は, 生菌, 死菌を問わず強力な immunopotentiator として, 免疫の実験のみならず, 臨床においても一部の腫瘍の免疫療法に用いられている。このように, 結核菌や BCG の持つ生物活性の中で Adjuvant 活性としての免疫増強作用が最もよく知られ研究されてきた。

しかし, 結核菌や BCG の持つ immunopotentiator の働きとは逆に, 免疫反応を抑制する現象も示されている。すなわち, BCG を頻回に投与されたモルモットにおいて, その特異的抗原である PPD のみならず, *Candida albicans*, Streptokinase や Mumps の免疫に対しても, 遅延型 (DTH) 反応で示される細胞性免疫が抑制されることが, Lamourex & Poisson²⁾に

よって報告された。一方, われわれもあらかじめ BCG 生菌, および死菌で処置したマウスにおいて DTH が抑制される現象を見出した。この現象を DTH 反応の *in vitro* の測定法とされている Macrophage migration inhibition (MI) assay を用いて追究した。BCG 生菌処置マウスにおける DTH 反応抑制には抑制性マクロファージ (Mφ) が, BCG 死菌処置マウスにおいて抑制性 T 細胞が誘導され, DTH 反応が抑制されていることが明らかになった。本稿において抑制性 Mφ と抑制性 T 細胞の性質について述べる。

1. BCG 生菌および死菌による DTH 反応抑制

C3H/He マウスを BCG 細胞壁 (CW) で皮下に感作し, 4 週後に PPD を用いて足蹠反応を行うと強い反応が起きる。しかし, BCG-CW で感作する 3 週間前に BCG (日本株) 生菌の 10⁸ colony forming unit (CFU) を静注 (iv), あるいは腹腔 (ip) 投与しておくと, BCG-CW で誘導される DTH 反応は抑制された。一方, 同様にして前処置に BCG 加熱死菌を用いた場合, iv 処置マウスでは DTH 反応は抑制されるが, ip 処置マウスでは抑制はみられなかった (図1)。

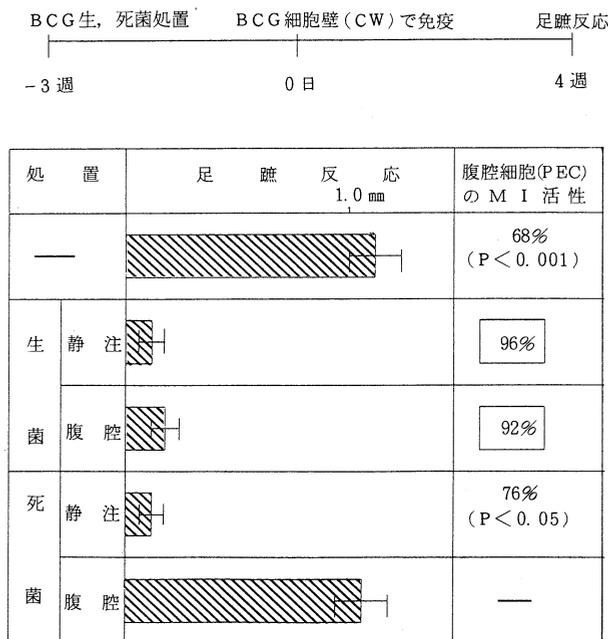


図1 BCG生菌，死菌処置マウスのDTH反応の抑制とPECのMI活性

次に、われわれは、これらのマウスの腹腔浸出細胞(PEC)のMI活性〔=(PPDの存在下でPECを培養した際のPECの遊走面積/PPDの非存在下でPECを培養した際のPECの遊走面積)×100〕を調べた。強いDTH反応を示した対照群のMI活性は68%と陽性であった。一方、BCG生菌ivあるいはip処置群では96, 92%とMI活性は消失していた。BCG死菌処置群でもDTH反応は抑制されるが、これらのPECのMI活性も76%と陽性を示した(図1)。すなわち、BCG生菌処置群では*in vivo*(足趾反応)と*in vitro*(MI assay)は一致したが、BCG死菌処置群では*in vivo*と*in vitro*の現象は一致しなかった。この現象は、BCG生菌処置によるDTH反応抑制機構と、BCG死菌処置によるDTH反応抑制機構は、異なっていると考えられた。そこで、われわれはBCG生菌および死菌のiv処置によって起こるDTH反応抑制機構をMI assayを用いて解析した。

2. BCG生菌静注処置によるDTH抑制の解析

A) BCG生菌静注処置による抑制性Mφの腹腔への誘導

BCG生菌静注処置マウスにおいて、BCG-CW感作によるDTH反応が抑制される現象を、われわれはBCG生菌投与によって抑制細胞が誘導され、DTH反応が抑

制されたと考えた。そこで、これをMI assayを用いて調べるために、BCG-CWで4週間感作したMI活性陽性PEC(BCG-CW Effector PEC)にBCG生菌および死菌を投与して3週間後に得たPEC(L-BCG-PECおよびK-BCG-PEC)を等量混合し、MI活性を測定した。一方、対照には無処置マウスPEC(N-PEC)を用いた。

表1に示したように、BCG-CW Effector PECは64%とMI活性は陽性であり、これにN-PECを加えてMI活性を測定しても56%と陽性であった。しかし、L-BCG-PECを加えると124%とMI活性は消失した。また、K-BCG-PECを加えた場合のMI活性は63%と陽性であった。この結果は、図1に示したBCG生、死菌静注処置によるDTH反応抑制マウスのPECのMI活性とよく一致した。

L-BCG-PECとBCG-CW Effector PECを混合したPECのMI活性消失現象について、L-BCG-PEC中にBCG-CW Effector PECのMI活性を抑制する抑制細胞の存在が示唆された。そこで、この抑制細胞を調べた結果、プラスチック付着の性質を持ち、細胞表面にθ抗原やIgを持たない細胞、すなわちマクロファージに属する細胞で抑制性Mφと考えられた³⁾。

抑制性Mφはここに示したMI活性抑制効果以外にも、cytotoxic T細胞の誘導に対して、あるいはCon-

表1 BCG生菌, 死菌処置マウスPECのMI活性に対する抑制効果

感作細胞	被検細胞 PPD	PECの遊走面積 ^{e)} (cm ²)	MI活性
BCG-CW Effector PEC ^{a)}	— { + -	2.5 ± 0.44	64% (P < 0.001)
		3.9 ± 0.55	
	N-PEC ^{b)} { + -	1.4 ± 0.25	56% (P < 0.001)
		2.6 ± 0.25	
	L-BCG-PEC ^{c)} { + -	2.7 ± 0.10	124%
		2.2 ± 0.26	
K-BCG-PEC ^{d)} { + -	1.6 ± 0.54	63% (P < 0.001)	
	2.6 ± 0.17		
—	L-BCG-PEC { + -	1.6 ± 0.20	85% (P > 0.1)
		1.8 ± 0.12	
	K-BCG-PEC { + -	1.9 ± 0.28	112%
		1.7 ± 0.11	

a) : BCG-CW 300 μ g を C3H マウスに感作し, 4 週後に得た PEC。

b) : 無処置 C3H マウスより得た PEC。

c) : BCG 生菌を C3H マウスに静注, 3 週後に得た PEC。

d) : BCG 死菌を C3H マウスに静注, 3 週後に得た PEC。

e) : 平均 ± 標準偏差。

表2 抑制性M ϕ のMI活性におよぼすインドメサシンの効果

感作細胞	被検細胞	インドメサシン(μ g/ml)	MI活性
BCG-CW Effector PEC ^{a)}	N-PEC ^{b)}	0	70% (P < 0.01)
		10 ⁻²	67% (P < 0.01)
	L-BCG-PEC ^{c)}	0	93%
		10 ⁻²	60% (P < 0.001)
		10 ⁻³	60% (P < 0.001)
			60% (P < 0.001)

a) : BCG-CW 300 μ g を C3H マウスに感作し, 4 週後に得た PEC。

b) : 無処置 C3H マウスより得た PEC。

c) : BCG 生菌静注 3 週後に得た PEC。

canavallin A, phytohemagglutinin (PHA), lipopolysaccharide などの mitogen に対する T, B リンパ球の増殖反応も抑制することが報告されている⁴⁾⁻⁶⁾。

この抑制細胞は BCG 生菌を投与して 12 日前後にその抑制効果は最大に達すること, さらにこの抑制細胞は抗原非特異的に, マウスの主要組織遺伝子複合体 (H-2) を越えて働くことも明らかにされている³⁾⁵⁾。抑制性 M ϕ は BCG 生菌以外にも *Corynebacterium parvum*⁷⁾, pyran copolymer⁸⁾, diethylstilbesterol⁹⁾ によっても誘導されることが報告されている。

B) 抑制性 M ϕ のプロスタグランジン (PG) の分泌
マウス, モルモット, 家兎あるいはヒトの M ϕ を M ϕ 活性化物質で刺激すると, PGE を分泌することが示されている¹⁰⁾¹¹⁾。一方, また, PGE₁, E₂ が *in vitro* で免疫応答を抑制することや, リンホカインの産生を抑制することも示されている¹²⁾。このようなことから, BCG 生菌によって誘導される抑制性 M ϕ も PG を分泌し, MI 活性を抑制していることが推定された。

そこで, まず PG の合成阻害剤であるインドメサシンを BCG-CW Effector PEC と L-BCG-PEC の混

合 PEC の MI 活性測定の際に加え、抑制効果が消失するか否かを検討した。その結果、表 2 に示したように 10^{-2} 、 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ のインドメサジンの存在下では、MI 活性抑制効果は消失した。このことから、BCG 生菌を投与して得た PEC から PG が合成、分泌していることが推定された。

そこで、Radioimmunoassay で L-BCG-PEC の 24 時間培養上清中の PGE_1 と $\text{PGF}_{2\alpha}$ を測定した。対照には N-PEC を用いた。L-BCG-PEC 中の PGE_1 の濃度は N-PEC のそれに比べ 6.4 倍高く、特に L-BCG-PEC 中のプラスチック付着細胞、すなわち $M\phi$ から合成分泌されていることが明らかにされた¹³⁾。また、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の方は L-BCG-PEC も N-PEC も差はなく、低値を示していた¹³⁾。

さらに、われわれは、PGE の MI 活性抑制効果を確認するため、合成 PGE_1 、 E_2 、 $\text{F}_{2\alpha}$ を MI 活性陽性である BCG-CW Effector PEC に加え、MI 活性が消失するか否かを検討した。その結果、 PGE_1 、 E_2 の $1\mu\text{g/ml}$ の存在で BCG-CW Effector PEC の MI 活性は消失した。しかし、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ は $5\mu\text{g/ml}$ の濃度を用いても、BCG-CW Effector PEC の MI 活性を消失させなかった¹³⁾。PGE は BCG-CW 感作 T 細胞からの MI factor (MIF) の分泌を抑制することにより MI 活性を抑制していると考えられる。

BCG 生菌以外にも *C. parvum* によって誘導される抑制性 $M\phi$ からも PGE が分泌することが示されており¹⁴⁾、BCG 生菌によって誘導される抑制性 $M\phi$ と同じ性質を持つと考えられる。

C) 抑制性 $M\phi$ の methotrexate (MTX) に対する感受性

BCG 生菌をマウスに投与することにより抑制性 $M\phi$ が誘導されることを示してきたが、ヒトの疾患であるホジキン氏病¹⁵⁾、多発性骨髄腫¹⁶⁾ 全身性エリトマトーゼス¹⁷⁾、真菌症¹⁸⁾、結核症¹⁹⁾、サルコイドジス²⁰⁾ においても抑制性 $M\phi$ の存在が報告されている。これら抑制性 $M\phi$ の認められた疾患では、非特異的に免疫反応が抑制されている。もし、抑制性 $M\phi$ に感受性のある薬剤が明らかにされれば、これらの疾患の免疫状態を回復することができる。

そこで、これらヒトの疾患のモデルとしてマウスに BCG 生菌を投与して誘導される抑制性 $M\phi$ に感受性のある薬剤を検討した。その結果、抑制性 $M\phi$ は葉酸代謝拮抗剤である MTX に対して感受性があった。²¹⁾ 最初に BCG-CW で感作する 5 日、10 日前に MTX 15mg/kg を ip 投与した。このような MTX の処置に対しても BCG-CW で誘導される DTH 反応は MTX を投与しない場合と差はなかった。すなわち、MTX は BCG-

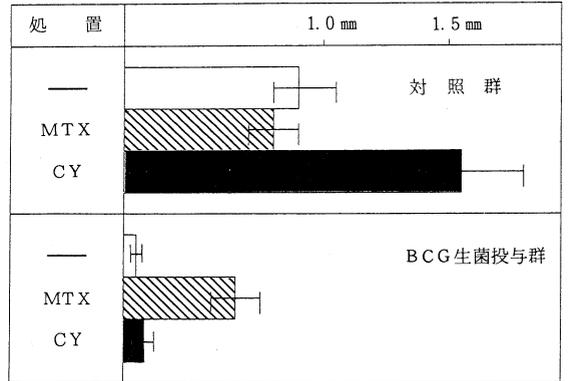
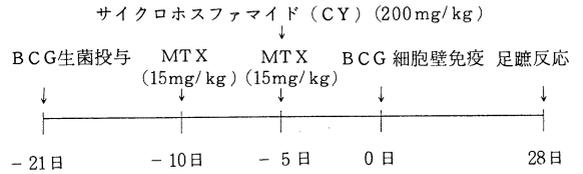


図 2 BCG 生菌による DTH 反応抑制に対するメソトレキセート (MTX) の効果

CW で誘導される DTH 反応に影響をおよぼさなかった。一方、BCG 生菌を投与して抑制性 $M\phi$ を誘導した場合、MTX の投与で DTH 反応は対照群の 70% 程度の回復がみられた (図 2)。一方、cyclophosphamide (CY) は、抑制性 T 細胞に対して感受性のある薬剤として知られているが²²⁾、抑制性 $M\phi$ に対して感受性はなかった (図 2)。

MTX を投与することにより BCG 生菌処置による DTH 反応抑制が解除される機構を、MI assay を用いて検討した。BCG-CW Effector PEC に L-BCG-PEC を加え MI 活性を測定すると、103% と陰性であった。しかし、BCG 生菌を投与して PEC を採集する 5 日、10 日前に MTX を投与して得た PEC (L-BCG-MTX-PEC) を用いると、73% と MI 活性は陽性を示した (表 3)。このことは、MTX が抑制性 $M\phi$ の DTH 抑制の解除に働いたことを示している。

次にわれわれは、MTX の BCG 生菌による抑制性 $M\phi$ の誘導に対する阻止効果を検討した。すなわち、MTX 15mg/kg を 5 日間隔で 2 回投与したマウスに BCG 生菌を投与して得た PEC (MTX-L-BCG-PEC) に、抑制効果が存在するか否かを調べた。MTX-L-BCG-PEC に BCG-CW Effector PEC を加えると、65% と MI 活性は陽性で抑制効果はみられなかった (表 4)。この事実から、MTX が BCG 生菌による抑制性 $M\phi$ の誘導を抑制することが明らかになった。このような報告

表3 抑制性Mφの抑制発現に対するMTXの効果

感作細胞	被検細胞	MI活性
BCG-CW Effector PEC ^{a)}	N-PEC	59% (P < 0.01)
	N-MTX-PEC	52% (P < 0.01)

	L-BCG-PEC ^{b)}	103%
	L-BCG-MTX-PEC ^{c)}	73% (P < 0.02)

a) : BCG-CW 300 μg をC3Hマウスに感作し、4週後に得たPEC。

b) : BCG生菌をC3Hマウスに静注し、3週後に得たPEC。

c) : BCG生菌をC3Hマウスに静注し、その後11日、16日目にMTX 15mg/kgを腹腔に投与した。BCG生菌静注4週後に得たPEC。

表4 抑制性Mφの誘導に対するMTXの効果

感作細胞	被検細胞	MI活性
BCG-CW Effector PEC ^{a)}	N-PEC	61% (P < 0.001)
	MTX-N-PEC	64% (P < 0.001)

	L-BCG-PEC ^{b)}	106%
	MTX-L-BCG-PEC ^{c)}	65% (P < 0.001)

a) : BCG-CW 300 μg をC3Hマウスに感し、4週後に得たPEC。

b) : BCG生菌をC3Hマウスに静注し、3週後に得たPEC。

c) : MTXをBCG生菌投与前10日、5日にC3Hマウスの腹腔に注射した。そしてBCG生菌投与3週後に得たPEC。

は、Orbach-Arbouys & Castes²³⁾によってもなされている。彼らによると、BCG生菌で抑制したPHAによるリンパ球の増殖反応、Graft vs Host反応は、MTXの投与で回復するという。

D) 抑制性Mφの起源について

今述べた実験結果によって、MTXで処置しておいたマウスにBCG生菌を投与しても、抑制性Mφが誘導されないことが明らかにされた。この事実は、抑制性Mφの前駆細胞がMTXに感受性があり除かれたため、BCG生菌を投与しても、もはやPEC中に抑制細胞は誘導されないであろうと考えられた。

マクロファージの起源は骨髄(BM)であるので、われわれは、BM細胞、BCG生菌、そしてMTXの三者について抑制性Mφの前駆細胞の観点から検討した。

BMを移入する12、7日前に15mg/kgのMTXを、そして2日前にBCG生菌を投与した。このようなマウスのBM細胞(MTX-L-BCG-BM)10⁷個を、900rad照射マウスに移入した。一方、MTXのみ投与(MTX-N-BM)の群、BCG生菌のみ投与(L-BCG-BM)の群、あるいはMTX、BCG生菌両方共投与しない(N-BM)の群のBMも対照として、これらのBM細胞を900rad照射マウスに移入した。移入後、BCG-CWヤリステリア菌で免疫し、DTHを足蹠反応で調べた。その結果を図3に示した。BCG-BM細胞を移入されたマウスのDTH反応は明らかに抑制されたが、MTX-L-BCG-BM細胞を移入されたマウスのDTH反応は抑制されなかった(図3)。

一方、L-BCG-BM細胞、あるいはMTX-L-BCG-BM細胞を移入されたマウスのPECをBM移入後、19

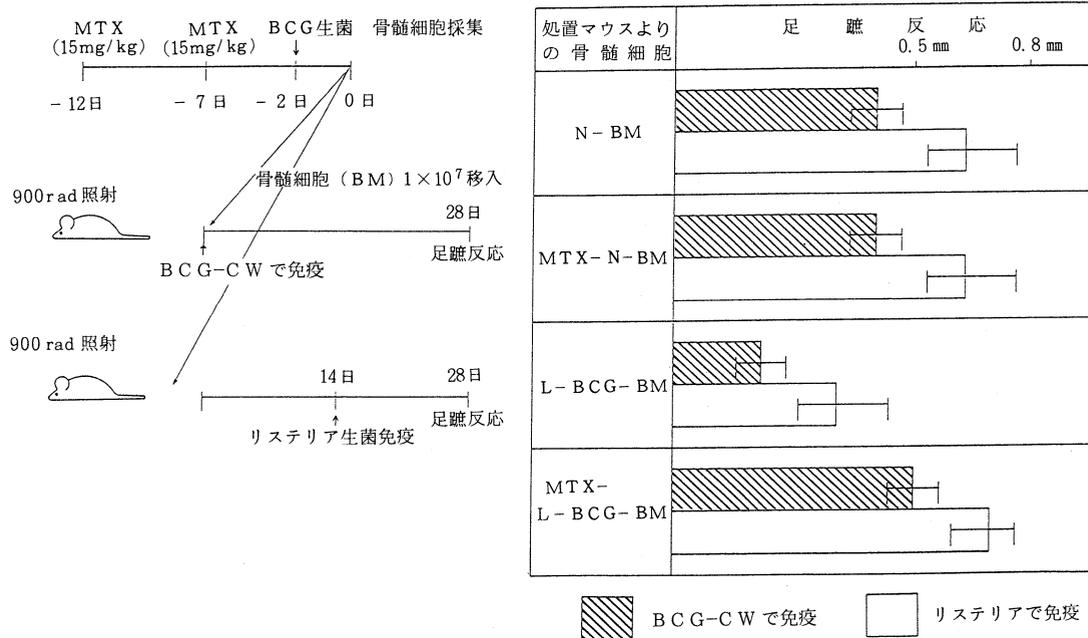


図3 骨髄細胞移入によるDTH反応抑制

表5 無処置マウス骨髄細胞(N-BM)とMTX処置マウス骨髄細胞(MTX-BM)のMI活性におよぼす効果

感作細胞	被検細胞	感作細胞:被検細胞比	MI活性
BCG-CW Effector PEC a) (C3Hマウス)	N-BM b) (C3Hマウス)	1 : 1	132%
	(C3Hマウス)	3 : 1	105%
	MTX-BM c) (C3Hマウス)	1 : 1	67% (P < 0.001)
	(C3Hマウス)	3 : 1	55% (P < 0.001)
	N-BM b) (C57BL/6マウス)	3 : 1	100%
	MTX-BM c) (C57BL/6マウス)	3 : 1	74% (P < 0.05)

a) : BCG-CW 300 μg を C3H マウスに感作し、4 週後に得た PEC。

b) : 無処置 C3H あるいは C57BL/6 マウスの BM。

c) : MTX 15mg/kg を BM 採集前 5 日、10 日に投与して得た C3H あるいは C57BL/6 マウスの BM。

日目に採集し BCG-CW Effector PEC と混合し、MI 活性を測定した。前者には抑制効果はあったが、後者には抑制効果はなかった。これらの事実は BM 中に MTX に感受性のある抑制性 Mφ の前駆細胞が存在することを示唆していた²⁴⁾。

次にわれわれは、BM 中の抑制性 Mφ の前駆細胞の

性質について検討した。C3H マウスから得た BCG-CW Effector PEC を、無処置の同系統である C3H マウスの BM 細胞 (N-BM) と 1 : 1, 1 : 3 の割合で混合した際の MI 活性は 132, 105 % と陰性であった。一方、MTX 投与の同系統の C3H マウスの BM 細胞 (MTX-BM) を用いた場合、MI 活性は 67, 55 % と陽性であっ

表6 BCG死菌静注マウス脾細胞 (non-adherent細胞) の
MI 活性抑制効果

感作細胞	被検脾細胞	MI 活性
BCG-CW Effector PEC a)	N-non-ad. 細胞 b)	59% (P < 0.001)
	K-BCG-non-ad. 細胞 c)	105%
	L-BCG-non-ad. 細胞 d)	68% (P < 0.001)

a) : BCG-CW 300 μ g を C3H マウスに感作し, 4 週後に得た PEC。

b) : 無処置 C3H マウスの脾細胞の Sephadex G-10 カラム通過画分。

c) : BCG 死菌静注 C3H マウスの脾細胞の Sephadex G-10 カラム通過画分。

d) : BCG 生菌静注 C3H マウスの脾細胞の Sephadex G-10 カラム通過画分。

た (表5)。BCG-CW Effector PEC を得た C3H マウスの系統と異なる C57BL/6 マウスの BM 細胞を用いた場合も同様の結果を得た (表5)。これらの事実は, 正常マウス BM 中に MI 活性を抑制する natural suppressor (NS) 細胞の存在を示すものである。

また, この NS 細胞は MTX に感受性を持つ以外にいかなる性質を持つかを検討した。その結果, この抑制細胞は表面に θ 抗原, Ig を持たない細胞であり, Fc receptor を持ち, 貪食能を有し, 放射線に感受性があることより, 未熟な M ϕ 系の細胞と考えた²⁴⁾。ヒトを含め多くの動物の BM 中に抗体産生²⁵⁾, 細胞性免疫²⁶⁾, NK 細胞活性²⁷⁾などを抑制する抑制細胞の存在することが報告されてきた。このような細胞は Corvèse ら²⁸⁾によって未熟な monocyte-myeloid 系細胞であることが報告され, われわれの結果と一致している。

以上の結果より, BM 中の未熟な M ϕ 系に属する NS 細胞は, BCG 生菌によって BM から腹腔に遊走し, 抑制性 M ϕ としてその機能を発現するものと考えられた。

3. BCG 死菌静注処置による DTH 抑制の解析

図1に BCG 死菌静注処置マウスにおいても BCG-CW で誘導される DTH 反応は抑制されるが, PEC の MI 活性は陽性で *in vivo* と *in vitro* の現象は一致しないことを示した。この事実は, PEC 中に抑制細胞が誘導されていないと考えられた。そこで, われわれは, この抑制細胞がいかなる機構によるものかを検討した。

A) BCG 死菌静注による抑制性 T 細胞の脾臓への誘導

従来から脾臓に免疫応答を抑制する抑制細胞が誘導されることが報告されている。そこで, われわれは BCG 死菌をマウスに静注後, 21 日目に脾臓を摘出し, この細胞浮遊液を Sephadex G-10 カラムを通過させ non-adherent 画分 (K-BCG-non-ad. 細胞) を得た。こ

の細胞を BCG-CW Effector PEC に加え (BCG-CW Effector PEC : K-BCG-non-ad. 細胞 = 9 : 1), MI 活性を測定した。対照には無処置マウス (N-non-ad. 細胞) あるいは BCG 生菌静注マウス (L-BCG-non-ad. 細胞) の脾細胞の non-adherent 画分を用いた。

表6に示したように, BCG-CW Effector PEC に K-BCG-non-ad. 細胞を加えた際の MI 活性は 105% と陰性であった。このことは, K-BCG-non-ad. 細胞中に MI 活性を抑制する細胞が存在することを示している。この抑制細胞は抗 Brain associated θ (BA θ) 抗血清と補体の処置で MI 活性抑制効果が消失したことから T 細胞といえる²⁹⁾。さらにこの細胞は, Ly2⁺, I-J⁺ の表面抗原を持っていることも明らかにされた (未発表)。

B) BCG 死菌による DTH 抑制に対する cyclophosphamide (CY) の解除効果

抑制性 T 細胞は CY に対して感受性があることが報告されてきた²⁷⁾。そこでわれわれも, BCG 死菌処置マ

BCG 死菌投与 CY (200 mg/kg) BCG-CW で免疫 足趾反応
- 21日 - 5日 0日 28日

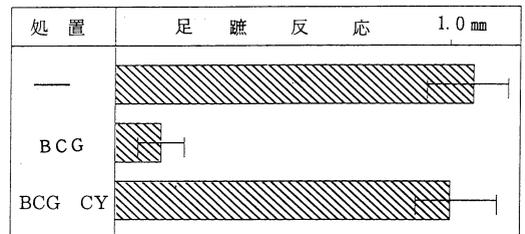


図4 BCG 死菌処置による DTH 反応抑制
に対する CY の効果

ウスにおける DTH 反応抑制が CY 処置によって解除されるか否かを調べた。BCG 死菌を BCG-CW で感作する 21 日前に静注しておくこと、明らかに BCG-CW で誘導される DTH 反応は抑制されるが、BCG-CW で感作する 5 日前に CY を 200 mg/kg を腹腔に投与すると、DTH 反応の抑制が解除された (図 4)。このことは明らかに BCG 死菌静注で誘導される抑制細胞は、CY に対して感受性があることを示している。

C) BCG 死菌による抑制性 T 細胞の抗原特異性について

BCG 死菌によって誘導される抑制性 T 細胞は抗原特異的か否かを検討するため、BCG-CW 感作にかえりステリア菌の感作で誘導される DTH 反応を調べた。BCG 死菌静注後 21 日目にリステリア生菌 5×10^4 CFU で感作した。感作 10 日目に、Listeria soluble protein (LSP) を用いて足蹠反応を調べた。その結果、BCG 死菌処置群 (0.09 ± 0.04 mm) は無処置の対照群 (0.45 ± 0.06 mm) に比べ有意 ($P < 0.001$) に抑制された。

また、BCG 死菌静注マウスおよび無処置マウスの脾細胞 5×10^7 個をそれぞれ無処置マウスに移入し、Listeria 菌で感作し、10 日後に足蹠反応を調べた。BCG 死菌処置マウスの脾細胞を移入したマウスの足蹠反応 (0.12 ± 0.07 mm) は対照 (0.55 ± 0.06 mm) に比べ有意 ($P < 0.001$) に抑制された。

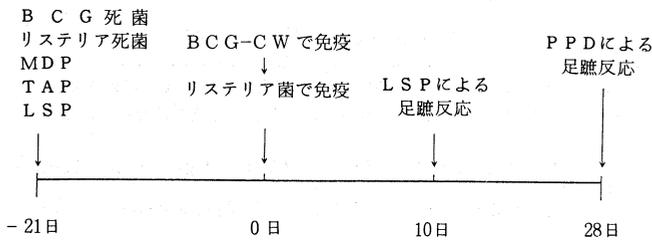
これらの結果より、BCG 死菌静注処置によって抗原非特異的抑制細胞が脾に誘導されていることが示された。

また、この抑制細胞はマウスの主要組織遺伝子複合体 (H-2) を越えて働くことも明らかになっている (未発表)。

D) BCG 死菌の抗原部分 (Tuberculin active peptide, TAP) とアジュバント部分 (Muramyl dipeptide, MDP) による抑制性 T 細胞の誘導について

BCG 死菌静注処置によって抗原非特異的抑制細胞が誘導されることを明らかにした。一般に菌体は免疫的立場からみて、抗原部分とアジュバント部分から成り立っている。今、BCG とリステリア菌を例にとってみると、BCG において抗原部分の一つは TAP であり、アジュバント部分の一つは MDP である。一方、リステリア菌において抗原部分の一つは Listeria soluble protein (LSP) であり、アジュバント部分の一つは MDP である。そこで、われわれは、TAP, LSP, MDP の投与と DTH 反応抑制の関係を検討した。

500 μ g の TAP, LSP, MDP をそれぞれ water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion としてマウスに静注した。21 日後に BCG-CW で感作し、4 週後に PPD を用いて足蹠反応を調べた。感作抗原である BCG-CW の特異的抗原である TAP, あるいはアジュバントである MDP で処置した群は、対照の vehicle のみを投与した群に比べ有意に DTH 反応は低下した。一方、BCG-CW とは無関係なりステリア菌より得た LSP で処置したマウスでは、DTH 反応は抑制されなかった (図 5)。



(I) BCG-CW で免疫

処置	足蹠反応 0.5 mm
対照	0.45 ± 0.06
BCG死菌	0.09 ± 0.04
MDP	0.12 ± 0.07
TAP	0.12 ± 0.07
LSP	0.12 ± 0.07

(II) リステリア生菌で免疫

処置	足蹠反応 0.9 mm
対照	0.55 ± 0.06
リステリア死菌	0.12 ± 0.07
MDP	0.12 ± 0.07
TAP	0.12 ± 0.07
LSP	0.12 ± 0.07

図 5 MDP, TAP, LSP 静注処置マウスにおける DTH 反応抑制

表7 MDP, TAP, LSP 投与マウス脾細胞
(non-adherent 画分) の BCG-CW 感
作MI 活性陽性 PEC に対する抑制効果

感作細胞	被検細胞	MI 活性
BCG-CW Effector PEC ^{a)}	N-non-ad. 細胞 ^{b)}	57% (P < 0.01)
	MDP-non-ad. 細胞 ^{c)}	86% (P > 0.05)
	TAP-non-ad. 細胞 ^{d)}	93%
	LSP-non-ad. 細胞 ^{e)}	57% (P < 0.01)

a) : BCG-CW を 300 μ g C3Hマウスに感作し, 4 週後に得た PEC。

b) : vehicle (W/O/W) を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

c) : MDP 500 μ g を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

d) : TAP 500 μ g を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

e) : LSP 500 μ g を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

表8 MDP, TAP, LSP 投与マウス脾細胞
(non-adherent 画分) のリステリア菌
感作MI 活性陽性 PEC

感作細胞	被検細胞	MI 活性
Listeria Effector PEC ^{a)}	N-non-ad. 細胞 ^{b)}	58% (P < 0.001)
	MDP-non-ad. 細胞 ^{c)}	98%
	TAP-non-ad. 細胞 ^{d)}	50% (P < 0.001)
	LSP-non-ad. 細胞 ^{e)}	97%

a) : リステリア菌 10⁴ CFU を C3Hマウスに感作し, 10 日後に得た PEC。

b) : vehicle (W/O/W) を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

c) : MDP 500 μ g を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

d) : TAP 500 μ g を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

e) : LSP 500 μ g を C3Hマウスに投与し, 3 週後の脾細胞の non-adherent 画分。

次に感作抗原を BCG-CW からリステリア菌にかえ同様に LSP, MDP で処置したマウスの DTH 反応抑制効果について検討した。リステリア菌で感作後 10 日目に LSP で足蹠反応を調べた。その結果, 感作抗原のリステリア菌の持つ特異的抗原である LSP, あるいはそのアジュバントの MDP で処置した群は対照の vehicle のみ投与した群に比べ有意に DTH 反応が抑制された。一方, リステリア菌と無関係な BCG 由来の特異抗原である TAP で処置した群は抑制されなかった (図5)。

これら事実, 菌体成分の抗原部分の蛋白によって抗原特異的抑制が, アジュバント部分によって抗原非特異的抑制が誘導されることを示していた。

次にわれわれは, 抗原部分, あるいはアジュバント部分によって誘導される抑制細胞を, MI assay を用いて検討した。BCG-CW Effector PEC に 500 μ g の MDP, TAP, LSP をそれぞれ W/O/W として投与したマウスの脾細胞の non-adherent 画分 (MDP-non-ad. 細胞, TAP-non-ad. 細胞, LSP-non-ad. 細胞) を 9:1 の割合で混合し, MI assay を行った。対照に

vehicleのみを投与したマウスの脾細胞(N-non-ad.細胞)を用いた。

表7に示したように、MDP-non-ad.細胞, TAP-non-ad.細胞を加えた際のMI活性は86, 93%と陰性であり、BCG-CW Effector PECのMI活性はMDP-non-ad.細胞, TAP-non-ad.細胞によって抑制された(表7)。一方、LSP-non-ad.細胞を加えた際のMI活性は57%と陽性を示し、MI活性は抑制されなかった。

次にわれわれは、BCG-CW Effector PECにかえ、リステリア菌で免疫して得たMI活性陽性PEC(Listeria Effector PEC)を用いた。これにMDP-non-ad.細胞, TAP-non-ad.細胞, LSP-non-ad.細胞を加え、MI活性を測定した。MDP-non-ad.細胞, LSP-non-ad.細胞を加えた際のMI活性は98, 97%と陰性を示し、Listeria Effector PECのMI活性はMDP-non-ad.細胞, LSP-non-ad.細胞によって抑制された。しかし、TAP-non-ad.細胞を加えた際のMI活性は50%と陽性を示し、抑制されなかった(表8)。

以上の結果より、菌体のアジュバントを投与して得た脾のnon-adherent細胞は抗原非特異的にMI活性を抑制し、菌体の抗原部分を投与して得た脾のnon-adherent細胞は抗原特異的にMI活性を抑制することが明らかになった。

さらに、われわれは、MDP-non-ad.細胞, およびTAP-non-ad.細胞中のMI活性抑制細胞を調べた。両者共、抗Brain associated θ 抗血清と補体処理で抑制効果が消失したが、抗Ig血清と補体処理では抑制効果は消失しなかったことによりT細胞であった³⁰⁾。すなわち、菌体のアジュバント部分により抗原非特異的抑制性T細胞が、抗原部分により抗原特異的抑制性T細胞が誘導されることが明らかになった。

おわりに

BCG生菌, および死菌で処置したマウスにおいて、抑制性M ϕ と抑制性T細胞が誘導されDTH反応が抑制されることを示した。表9に、これまで述べてきた抑制性M ϕ と抑制性T細胞の性質についてまとめた。

マクロファージは本来持つ貪食作用, 抗原提示機能のほか、種々の生物活性を持った物質を合成, 分泌することが示されている。そして、炎症, 生体防御, 正常代謝機構に重要な役割を演じていることも示されている。ここに述べてきた抑制性M ϕ は、multifaced cellsとしてのM ϕ の一機能が示されたのである。このような抑制性M ϕ は、リンパ球で認められているように、それぞれ機能が異なったM ϕ の一つのサブセットとして存在するのか、同一細胞が本来保持していた種々の機能がM ϕ の活性化状態, 発育段階によって表現されたものか、今後の問題と考えられる。

一方、細菌細胞壁の最小アジュバント活性単位としてのMDPが明らかにされ、このものの免疫増強作用以外の種々の生物活性が示されている³¹⁾。われわれの示したMDPの抗原非特異的抑制性T細胞の誘導能もその一つである。MDP, TAPによる抑制性T細胞誘導の機構, さらに抑制性T細胞因子の性状など、今後、解明されねばならぬ問題が残されている。

謝 辞

本研究は昭和52年から62年までの10年間、北大免疫科学研究所在職中に行ったものである。この間、有馬純, 山本健一, 東市郎の三教授からご指導をいただいた。さらに国立療養所札幌南病院, 久世彰彦院長からも変わらぬ激励をいただいた。深く感謝の意を表する次第である。また終わりに、第63回日本結核病学会総会において本主題による特別講演の機会を与えて頂いた日本結核病学会の諸先輩に厚くお礼を申しあげる。

文 献

- 1) Freund, J. et al. : Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil, Proc Soc Exp Biol Med, 37 : 509, 1937.
- 2) Lamourex, G. and Poisson, R. : BCG and immunological anergy, Lancet, 18 : 989, 1974.
- 3) Kato, K. et al. : Suppression of BCG cell wall induced delayed-type hypersensitivity

表9 BCGによって誘導される抑制性M ϕ と抑制性T細胞の性質

抑 制 細 胞	抑 制 性 M ϕ	抑 制 性 T 細 胞
接 種 B C G	生 菌	死 菌
抗 原 特 異 性	非 特 異 的	非 特 異 的 お よ び 特 異 的
H - 2 拘 束 性	無	無
感 受 性 薬 剤	メ ソ ト レ キ セ ー ト	サイ ク ロ ホ ス フ ァ マ イ ド
抑 制 因 子	プ ロ ス タ グ ラ ン ジ ン E	?

- by BCG pre-treatment. I. Induction of adherent suppressor cells by live BCG injection and characterization, *Immunology*, 42 : 259, 1981.
- 4) Florentin, I. et al. : Studies on the mechanisms of action of BCG, *Cancer Immunol Immunother*, 1 : 31, 1976.
 - 5) Klimpel, G. R. and Henney, C. R. : BCG-induced suppressor cells. I. Demonstration of a macrophage-like suppressor cell that inhibits cytotoxic T cell generation *in vitro*, *J Immunol*, 120 : 563, 1978.
 - 6) Tarcotte, R. et al. : Opposite effects of BCG on spleen and lymph node cells: Lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis, *Infect Immun*, 21 : 696, 1978.
 - 7) Kirchner, H. et al. : Splenic suppressor macrophages induced in mice by injection of *Corynebacterium parvum*, *J Immunol*, 115 : 1212, 1975.
 - 8) Baird, L. G. and Kaplan, A. M. : Macrophage regulation of mitogen-induced blastogenesis. I. Demonstration of inhibitory cells in the spleens and peritoneal exudates of mice, *Cell Immunol*, 28 : 22, 1977.
 - 9) Kato, K. et al. : Suppression of delayed-type hypersensitivity in mice pretreated with diethylstilbesterol : Involvement of sex hormones in immunomodulation, *J Leuko Biol*, 43 : 530, 1988.
 - 10) Brune, K. et al. : Pharmacological control of prostaglandin and thromboxane release from macrophages, *Nature*, 247 : 261, 1978.
 - 11) Gemsa, D. et al. : The effects of phagocytosis, dextran sulfate and cell damage on PGE₁ sensitivity and PGE₁ production of macrophages, *J Immunol*, 120 : 1187, 1978.
 - 12) Gordon, D. et al. : Control of lymphokine secretion by prostaglandins, *Nature*, 262 : 401, 1976.
 - 13) Kato, K. and Yamamoto, K. : Involvement of prostaglandin E₁ in delayed-type hypersensitivity suppression induced with live *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 36 : 426, 1982.
 - 14) Grimm, W. et al. : Prostaglandin synthesis in spleen cell cultures of mice injected with *Corynebacterium parvum*, *Cell Immunol*, 40 : 419, 1978.
 - 15) Twomey, J. J. et al. : Hodgkin's disease : An immunodepleting and immunosuppressive disorder, *J Clin Invest*, 56 : 467, 1975.
 - 16) Broder, S. et al. : Impaired synthesis of polyclonal (non-paraprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with myeloma, *N Engl J Med*, 293 : 887, 1975.
 - 17) Markenson, J. A. et al. : Responses of fractionated cells from patients with systemic lupus erythematosus and normals to plant mitogen : Evidence for a suppressor population of monocytes, *Proc Soc Exp Biol Med*, 158 : 5, 1978.
 - 18) Stobo, J. D. : Immunosuppression in man : Suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells, *J Immunol*, 119 : 918, 1977.
 - 19) Ellner, J. J. : Suppressor adherent cells in human tuberculosis, *J Immunol*, 121 : 2573, 1978.
 - 20) Goodwin, J. S. et al. : Suppressor cell function in sarcoidosis, *Ann Intern Med*, 90 : 169, 1979.
 - 21) Kato, K. and Yamamoto, K. : Restoration of suppressed delayed-type hypersensitivity induced in mice by live BCG after methotrexate administration, *Int J Immunopharmac*, 4 : 463, 1982.
 - 22) Polak, L. and Turk, J. L. : Reversal of immunological tolerance by cyclophosphamide through inhibition of suppressor cell activity, *Nature*, 249 : 654, 1974.
 - 23) Orbach-Arbouys, S. and Castes, B. : Augmentation of immune responses after methotrexate administration, *Immunology*, 36 : 265, 1979.
 - 24) Kato, K., et al. : Migration of natural suppressor cells from bone marrow to peritoneal cavity by live BCG, *J Immunol*, 135 : 3361, 1985.
 - 25) Bains, M. A. et al. : Regulatory cells in human bone marrow : Suppression of an *in vitro* primary antibody response, *Cell Immunol*, 74 : 150, 1982.
 - 26) Soderberg, L. S. F. : Regulation of constitutive bone marrow cell proliferation by bone

- marrow suppressor cells, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 74 : 341, 1984.
- 27) Punjabi, C. J. et al. : Suppression of natural killer activity in human blood and bone marrow cultures by bone marrow-adherent OKM1-positive cells, *Cell Immunol*, 77 : 13, 1983.
- 28) Corvese, J. S. et al. : Inhibition of an *in vitro* antibody response by a suppressor cell in normal bone marrow, *Cell Immunol*, 49 : 293, 1980.
- 29) Kato, K. and Yamamoto, K. : Suppression of BCG cell wall induced delayed-type hypersensitivity by BCG pretreatment. II. Induction of suppressor T cells by heat killed BCG injection, *Immunology*, 45 : 655, 1982.
- 30) Kato, K. et al. : Suppression of BCG cell wall-induced delayed-type hypersensitivity by pretreatment with killed BCG : Induction of nonspecific suppressor T cells by the adjuvant portion (MDP) and of specific suppressor T cells by antigen portion (TAP), *J Immunol*, 132 : 2790, 1984.
- 31) Kato, K. and Yamamoto, K. : Role of adjuvant and immunogenic moieties of *M. tuberculosis* in pathogenicity. *IN : Mycobacterium Tuberculosis*, p.39, Plenum Publishing Corporation, New York, 1988.