

原 著

BCG 死菌感作マウスの staphylococcal enterotoxin A による
インターフェロン γ 産生の解析

水越紀子・石原智明・山本健一

北海道大学免疫科学研究所

加藤一之

北海道大学医学部細菌学教室

受付 昭和 62 年 12 月 17 日

ANALYSIS OF INTERFERON- γ PRODUCTION IN KILLED BCG-PRETREATED
MICE AFTER STIMULATION WITH STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN ANoriko MIZUKOSHI*, Chiaki ISHIHARA, Ken-ichi YAMAMOTO
and Kazuyuki KATO

(Received for publication December 17, 1987)

Staphylococcal enterotoxin A (SEA), a T cell mitogen, was found to induce a high level of interferon- γ (IFN- γ) in mice which had been immunized with killed Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion. The phenomenon was analysed by *in vivo* and *in vitro* experiments, and the following results were obtained.

1. The SEA-induced IFN was inactivated by treatment with 0.2M glycine-HCl (pH 2.0) but not by heating at 56°C for 30 min. nor by treatment with anti-IFN α/β antibodies, and the fact suggest that the IFN belonged to the γ type.
2. Treatment of the BCG-sensitized mice with silica and 2-chloroadenosine (2CA), specific lethal agents for macrophages, reduced the SEA-induced IFN production.
3. The SEA-induced IFN production occurred in mice immunized with BCG either intravenously or intraperitoneally, although they showed weak or no footpad reaction to purified protein derivatives (PPD). In contrast, mice sensitized subcutaneously with BCG showed strong foodpad reaction to PPD but not the SEA-induced IFN production. Thus, the mere presence of BCG-sensitized T cells does not appear to result in the SEA-induced IFN production.
4. *In vitro* experiments, in which SEA-induced IFN production was determined in the culture of BCG-sensitized spleen cells, showed that principal IFN-producing cells were Lyt-1⁺ T cells.
5. Deprivation of macrophages from BCG-sensitized spleen cell population by passing through Sephadex G-10 column reduced the SEA-induced IFN production in the culture. Addition of 2CA to the culture medium also reduced the SEA-induced IFN production

* From the Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Sapporo 060 Japan.

by the BCG-sensitized spleen cells.

6. The SEA-induced IFN production in the culture of the BCG-sensitized spleen cells was suppressed in the presence of lipoxygenase inhibitor, *i. e.*, caffeic acid or nordihydroguaiaretic acid.
7. The plastic adherent spleen cells (*i. e.* macrophages) from mice sensitized with BCG produced leukotriene C₄ (LTC₄). The suppression of the SEA-induced IFN production of BCG-sensitized spleen cells in the presence of the lipoxygenase inhibitor was prevented by addition of synthetic LTC₄.

These results suggest that LTC₄ released from macrophages activated by BCG causes production of IFN- γ by BCG-sensitized T cells responding to SEA.

Key words : interferon- γ production, activated macrophages, staphylococcal enterotoxin A, killed-BCG, leukotriene C₄

キーワード : インターフェロン γ 産生, 活性化マクロファージ, staphylococcal enterotoxin A, BCG死菌, ロイコトリエンC₄

はじめに

インターフェロン γ (IFN- γ) は, 種々の抗原で感作されたマウスの血清中¹⁾⁻³⁾ や, *in vitro*でのリンパ球培養上清中⁴⁾⁻⁸⁾ に対応抗原の刺激により産生されることが知られている。また, T細胞マイトジェンである phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A), staphylococcal enterotoxin A (SEA), pokeweed mitogen (PWM) あるいは streptolysin-O (SLO) が, *in vitro*でのヒト⁹⁾⁻¹²⁾ およびマウス⁸⁾¹³⁾⁻¹⁶⁾ リンパ球の IFN- γ 産生のインデューサーとなることが報告されている。

最近, 岡村ら¹⁶⁾ は, *Propionibacterium acnes* 接種マウスに T細胞マイトジェンを投与すると血中に IFN- γ が産生されることを, また Havellら¹⁷⁾ は, *Listeria monocytogenes* 接種6日目のマウス脾細胞を Con A や PHA で刺激すると培養上清中に, 正常マウス細胞に比べ, 10~20倍の IFN- γ が産生されることを報告している。彼らの報告は, 細胞性免疫が活性化されたマウスの T細胞が PHA や Con A の刺激により高力価の IFN- γ を産生することを示唆している。

しかしながら, このような細菌感染マウスにおける IFN- γ 産生機構はなお不明の点が多い。われわれは, Bacille de Calmette et Guérin (BCG) を感作したマウスに SEA を静注して, 血清中に高力価の IFN- γ が産生されることを見いだした。その産生機構をマクロファージ (M ϕ) の関与を中心に検討した。その結果, BCG により活性化された M ϕ から分泌される LTC₄ が IFN- γ 産生増強に関与することが示唆された。

材料・方法

マウス: 静岡実験動物センターより購入した C57BL/6 (B6) マウス (雌, 6~8週齢) を用いた。

BCG, SEA および試薬: BCG (日本株) はソートン培地で2週間培養し, 100°C 30分の加熱により死菌とした後, 蒸留水, アセトン, エチルエーテルで洗浄した。マウスに感作するためには, 0.2 ml の water-in-oil-in/water (W/O/W) emulsion 中に 1 mg の BCG を含むように調整した。つまり, BCG 菌液 (10 mg/60 μ l の生理食塩水) 中に等量のミネラルオイル (Drakeol-6VR) を加えてフロングラインダーで混合することにより W/O emulsion とした後, 0.2% の Tween 80 を含む生理食塩水をこの W/O emulsion に加え再び混合しオイルの濃度が3%となる W/O/W emulsion とした。対照には, BCG を含まない W/O/W を用いた。

PPD は, 西ドイツ, Robert Koch 研究所の Dr. W. Brehmer より供与を受けた。SEA は Serra Fine Biochemicals, Inc. (Garden City Park, NY) より, 2-chloroadenosine (2CA) は Gega Biochemicals (Tucson, AZ) より, silica (Min-U-Sil) は Whit-tacker, Clark and Daniels, Inc. (NY) より, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より, leukotriene C₄ (LTC₄) は Paesel Gmbh & Co. (Borsigallee 6,6000 Frankfurt) より, そして 2-mercaptoethanol (2ME) と caffeic acid は Nakarai Chemicals Ltd. (Kyoto) よりそれぞれ購入した。

IFN 力価の測定: IFN の力価の測定は, L細胞 (L929B 株) と水疱性口炎ウイルス (VSV, New Jersey

株)を用いて Armstrong¹⁸⁾の方法に従い semi-micro dye binding 法により行った。その方法を要約すると、L細胞を平底マイクロプレートに撒き完全に単細胞層を形成させた後、上清を捨て 100 μ l の段階希釈した IFN サンプルを入れ 5% CO₂ 存在下で 37°C 一昼夜放置した。その後、400 PFU の VSV を接種し、およそ 24 時間後に 0.5% クリスタルバイオレット、5% ホルマリン、50% エタノールと 0.85% NaCl を含む液で染色し、プレートを洗浄、乾燥した後、550 nm で吸光度を測定した。各プレートごとに置いたスタンダード IFN (NIH reference G-002-904-511 をもとにして作成) の希釈吸光度カーブよりサンプルの力価を求めた。

抗血清による IFN の中和：抗 α/β IFN 血清は東レ(株)基礎研究所の小林茂保博士より分与された。その血清は L細胞に New Castle disease virus (NDV) を接種して得られた IFN をウサギに感作して作成したものである。中和は IFN 含有血清および対象として NDV 誘導マウス L細胞 IFN を抗血清と 37°C 1 時間反応させることより行った。

肺、脾臓重量 index：肺および脾臓の肉芽腫形成の指標として対応臓器の重量を用いた。つまり、臓器重量を体重で割り、100 倍した数値を index として示した。

足蹠反応：BCG でマウスを感作し、4 週後に PPD, 10 μ g を含む生理食塩水、0.05 ml を左足蹠皮下に注射した。対照として同量の生理食塩水を右足蹠皮下に注射した。24 時間後、ダイヤルゲージで足蹠の厚さを測定し、両方の足蹠の差をもって腫脹の程度を表した。

培養脾細胞による IFN の産生：脾臓を無菌的に取り出しハンクス液中で磨砕し細胞浮遊液とした。その後、ステンレスメッシュを通し、ハンクス液で 2 回遠心洗浄し、馬血清 10%，HEPES 10 mM，グルタミン 2 mM，ペニシリン 100U/ml，ストレプトマイシン 100 μ g/ml を含む RPMI 1640 培養液に浮遊した。この細胞を平底のマイクロプレート (Corning 25860, Corning Glass Works, NY) に $2 \times 10^6/0.2$ ml/well に撒き、IFN を産生させるために 0.025 μ g/ml の SEA を加えた。すべての細胞は 3-4 well ずつ培養した。37°C，5% CO₂ 存在下で 72 時間、細胞を培養した後、上清を回収し、IFN 力価測定まで -20°C に保存した。

脾細胞の抗血清処理：抗 BA θ 抗体の調整はすでに報告した方法¹⁹⁾により行った。脾細胞 ($3-5 \times 10^7$ /ml) と 1 ml の 40 倍希釈の抗 BA θ 抗体を混合し 37°C 30 分放置した後、細胞を 1 回洗浄、これに寒天により細胞毒性を吸収したモルモット補体を加えた。37°C，30 分放置した後 2 回洗浄し、10% 馬血清 (M. A. Bioproducts, Walkersville, MD) を含む RPMI 1640 培養液 (Nissui Seiyaku Co., Ltd., Tokyo) に浮遊した。抗 Lyt-1.2 モノクローナル抗体は多田伸彦博士 (東海大学) より、

抗 Lyt-2.2 モノクローナル抗体は木村正治博士 (London Medical College) より分与された。 2×10^7 の脾細胞に 1 ml の 400 倍希釈の抗 Lyt 抗体を加え、4°C，30 分放置、洗浄後、ウサギ補体で 37°C 30 分処理し、2 回洗浄後 10% 馬血清を含む RPMI 1640 培養液に浮遊した。

Sephadex G-10 処理による M ϕ の除去：Ly γ ²⁰⁾ の方法に従い Sephadex G-10 カラム (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) で脾細胞を処理した。つまり、10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培養液に 1×10^8 /ml の脾細胞を浮遊させ、1 ml の浮遊液を 10 ml シリンジ中で Sephadex G-10 と 37°C で 30 分放置し、非付着細胞を溶出させた。溶出率は 20% であった。

LTC₄ の測定：LTC₄ を遊離させるため 1 ml の脾細胞浮遊液 (1×10^8 細胞/ml) を 1.4 mM の Ca イオンと 0.7 mM の Mg イオンを含む pH 7.4 の HBSS 中で 37°C 20 分反応させた後、 5×10^{-3} M の glutathione あるいは 5×10^{-4} M の L-cysteine (Sigma) 存在下で 80 μ M の arachidonic acid および 2 μ M の calcium ionophore A 23187 (Calbiochem, La Jolla, CA) と 37°C 5 分反応させた。ついで、2 ml の acid methanol (pH 3.0) を加えて反応を止め、細胞浮遊液を 15000 g 10 分遠心し、上清を集め nitrogen gas で乾燥させ、サンプルとして用いた。LTC₄ の測定は radioimmunoassay (RIA) キット (New England Nuclear, Boston, MA) を用いて行った。

結 果

BCG 感作 B6 マウスの SEA による血中 IFN の誘導
静脈内注射により BCG で感作したマウスに SEA を静注すると、2 時間後から血中に IFN が検出され、6~8 時間でピークに達し、10 時間後には減少した。一方、対照として W/O/W で処置したマウスに SEA を静注しても IFN の産生は、100 IU/ml 以下であった (Fig.)。また、BCG 感作のみのマウスにも IFN は産生されなかった。なお BCG を *i. v.* 投与後 1~6 週を経過したマウスに SEA を静注し 6 時間目の血中 IFN を測定した。BCG 感作後 1 週の IFN 産生量は、100 IU/ml 以下であったが、2 週目には 3700 IU/ml と増加し、3 週目には 4600 IU/ml に達した。しかし 4 週目には、IFN は、1200 IU/ml に減少し 6 週目には 290 IU/ml となった。

BCG 感作, SEA 静注により誘導される IFN の性状の検討

BCG 感作後 3 週目の B6 マウスに SEA を静注して誘導された IFN は 0.2 M glycine-HCl (pH 2.0) 処理で活性が低下したが、56°C 30 分および抗 α/β IFN 血清の処理では活性の変化はみられず、IFN- γ である

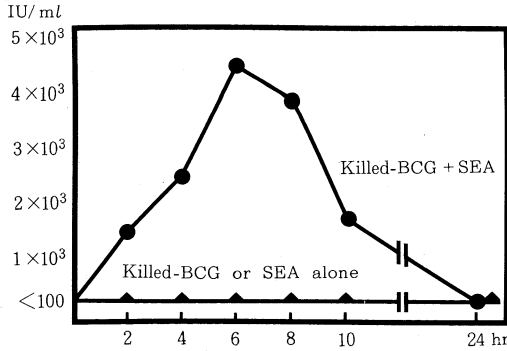


Fig. Six B6 mice were injected with 1mg of killed-BCG in W/O/W emulsion 3 weeks before SEA injection. They were divided into two groups; one group was injected *i. v.* with 0.5 μg of SEA, and the other group was not. As their control, three B6 mice which had been injected with W/O/W alone were injected *i. v.* with 0.5 μg of SEA. These mice were bled for measurement of IFN titers in the sera 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h after injection with SEA.

ことが示された (Table 1).

BCG 投与ルートと IFN 産生, 肉芽腫形成, 足蹠反応の関連

BCG を *i. v.* あるいは *i. p.* 注射したマウスは, SEA 投与により血中にそれぞれ 2110 IU/ml, 1440 IU/ml の IFN を産生した。これらのマウスでは, 脾臓の index が 1.27 あるいは 1.34 と高く, BCG を *i. v.* 投与したマ

ウスでは, 肺 index も 1.53 と有意に上昇していた。BCG を *s. c.* 投与したマウスおよび対照マウスでは, SEA 投与後 IFN は 100 IU/ml 以下とほとんど産生されず, また脾臓および肺の index は変化しなかった。PPD に対する足蹠反応に関しては, BCG を *s. c.* あるいは *i. v.* 投与したマウスでそれぞれ 0.45, 0.21 と明らかな反応を示したが, BCG を *i. p.* 投与したマウスでは明らかな反応を示さなかった (Table 2)。

IFN 産生に対する Mφ 阻害剤 silica, 2 CA 処理の影響

BCG で感作したマウスに Mφ 阻害剤である silica あるいは 2 CA を投与すると SEA による血中 IFN 産生は減少した。すなわち, silica, 2 CA を投与されたマウスでは, 血中 IFN 値はそれぞれ, Mφ 阻害剤を投与されないマウスの 69%, 37% であった (Table 3)。

BCG 感作 B6 マウス脾細胞の SEA による IFN の産生

BCG, *i. v.* 感作 3 週目のマウスの脾細胞 2 × 10⁶ を SEA, 0.025 μg/ml 存在下で 72 時間培養した上清中には, IFN が産生されたが, 対照マウス (W/O/W のみ注射) 脾細胞の SEA 添加培養上清中には IFN はほとんど産生されなかった。また, SEA 非存在下では BCG 感作マウス, 対照マウスの脾細胞ともに IFN を産生しなかった。上清中の IFN は, 血清の場合と同様に 0.2 M glycine-HCl (pH 2.0) で活性が低下したが, 56°C 30 分処理では力価に変化はなく, IFN-γ であることが示された。

SEA により誘導される IFN-γ の産生細胞の検討

BCG 感作マウスの脾細胞を抗 BA θ 抗体と補体で処理すると, SEA 存在下での IFN-γ の産生はほぼ完全

Table 1. Characterization of SEA-induced IFN in Mice Sensitized with Killed-BCG.

Treatment	IFN titer (IU/ml)	
	SEA-induced IFN ^{a)}	Mouse L cell IFN ^{b)}
None	2980	29300
Dialysis against 0.01 M PBS (pH 7.4) for 24 h	2980	25600
Dialysis against 0.2 M glycine-HCl (pH 2.0) for 24 h ^{c)}	18	36000
Heating at 56°C for 30 min	2620	7100
Anti-mouse L cell IFN antiserum ^{d)}	2200	230

a) Sera were collected 6h after *i. v.* injection with 0.5 μg of SEA from B6 mice which had been sensitized *i. v.* with 1mg of killed BCG 3 weeks before.
 b) Mouse L cell IFN was induced by New Castle disease virus in mouse L cells.
 c) Sera were dialyzed at 4°C against 0.2M glycine-HCl buffer (pH 2.0) for 24h and then against 0.001 M PBS (pH 7.4) for 24h.
 d) Antiserum containing anti-IFN (α/β) antibodies.

Table 2. Relation between Granuloma Formation in BCG-Sensitized Mice and Their IFN Production after Stimulation with SEA.

Mice injected with	IFN titer (IU/ml) ^{a)}	spleen index ^{b)}	lung index ^{b)}	footpad reaction to PPD ^{c)} (mm)
BCG <i>i.v.</i>	2110	1.27 ± 0.28	1.53 ± 0.21	0.21 ± 0.05
BCG <i>i.p.</i>	1440	1.34 ± 0.25	0.89 ± 0.10	0.03 ± 0.01
BCG <i>s.c.</i>	<80	0.63 ± 0.09	0.75 ± 0.15	0.45 ± 0.09
W/O/W <i>i.v.</i>	<80	0.52 ± 0.03	0.71 ± 0.18	0.02 ± 0.01

- a) Mice were injected with 1mg of killed-BCG in W/O/W or W/O/W alone 3 weeks before SEA injection. The mice were bled 6h after *i.v.* injection with 0.5 μg of SEA and IFN titers of their sera were measured.
- b) Spleen and lung indexes were determined 4 weeks after injection with 1mg of killed-BCG in W/O/W or W/O/W. Mean ± standard deviation.
- c) Footpad reaction was determined by measuring the swelling of the footpad 24h after *s.c.* injection with 10 μg of PPD into a footpad. Mean ± standard deviation.

Table 3. Effect of Silica and 2-Chloroadenosine on SEA-Induced IFN Production in BCG-Sensitized Mice.

Pretreatment ^{a)}	Treatment	IFN titer (IU/ml) ^{b)}
Killed-BCG	Silica ^{c)}	3210
Killed-BCG	2-chloroadenosine ^{d)}	1771
Killed-BCG	—	4800
Control (W/O/W)	—	<80

- a) Nine B6 mice were injected *i.v.* with 1mg of killed BCG in W/O/W emulsion 3 weeks before SEA injection. They were divided into 3 groups. As a control, three B6 mice were injected with W/O/W alone.
- b) All mice were bled 6h after *i.v.* injection with 0.5 μg of SEA and IFN titers in the sera were measured.
- c) 100mg/kg of silica were injected *i.p.* into the mice 1 and 3 days before SEA injection.
- d) 100 μg of 2-chloroadenosine in W/O/W emulsion were injected *i.v.* into the mice 1 and 2 days before SEA injection.

Table 4. Characterization of IFN-Producing Cell.

Exp.	Spleen cell source ^{a)}	Treatment ^{b)}	IFN titer ^{c)} (IU/ml)
1	Killed-BCG injected mice	None	780
	Killed-BCG injected mice	Anti-BA θ plus C	<20
	Control mice	None	50
2	Killed-BCG injected mice	None	547
	Killed-BCG injected mice	Anti-Lyt-1.2 plus C	30
	Killed-BCG injected mice	Anti-Lyt-2.2 plus C	309
	Control mice	None	<20

- a) Mice were injected *i.v.* with 1mg of killed BCG in W/O/W or with W/O/W alone (control) 3 weeks before.
- b) Spleen cells were treated with antisera and complement (C). 2×10^6 of the treated cells or of nontreated cells were cultured together with 0.025 μg/ml of SEA for 72h.
- c) IFN titer in the culture supernatant collected at 72h was measured.

Table 5. Effect of Elimination of Macrophages from Spleen Cells on the SEA-Induced IFN Production.

Exp.	Spleen cell source ^{a)}	Treatment ^{b)}	IFN titer ^{c)} (IU/ml)
1	Killed-BCG injected mice	None	780
	Killed-BCG injected mice	Sephadex G-10 column	190
	Control mice		<20
2	Killed-BCG injected mice	None	985
	Killed-BCG injected mice	0.1 mM 2 CA	<10
	Killed-BCG injected mice	0.05 mM 2 CA	<10
	Killed-BCG injected mice	0.01 mM 2 CA	184
	Control mice	None	98

a) See the footnote in Table 4.

b) In Exp. 1, Sephadex G-10 passed cells were cultured at a concentration of $2 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml}$ well. In Exp. 2, spleen cells were cultured in the presence of 0.1 mM, 0.05 mM or 0.01 mM of 2CA. All the cultures were stimulated with $0.025 \mu\text{g}$ of SEA.

c) IFN titer in the culture supernatant collected at 72h was measured.

Table 6. LTC₄ Production by Spleen Cells from Killed BCG-Immune Mice.

Spleen cell source ^{a)}	LTC ₄		
	ng / 2×10^7 cells/ml ^{b)}	ng / 1×10^8 cells/ml ^{b)}	ng / 1×10^8 cells/ml ^{c)}
Killed-BCG injected mice	0.53	3.11	2.68
Adherent cells from killed-BCG injected mice	0.78	1.44	1.67
Non-adherent cells from killed-BCG injected mice	0.35	0.42	0.58
Control mice	<0.25	0.35	0.17

a) Spleen cells were obtained from mice which had been injected with killed-BCG in W/O/W or W/O/W alone (control) 3 weeks earlier. The spleen cell suspension was incubated in plastic petri dishes (Corning 25020, Corning Glass Works, NY) at 37°C for 1h, and LTC₄ produced by the cells was determined by RIA.

b) The cells were suspended in HBSS containing 5×10^{-4} M L-cysteine.

c) The cells were suspended in HBSS containing 5×10^{-3} M glutathione.

に抑制され、IFN- γ 産生細胞は BA θ 陽性細胞、つまり T 細胞であると思われた。さらに IFN 産生 T 細胞の性状を検討した。BCG 感作マウス脾細胞は、抗 Lyt-1.2 抗体と補体の処理で SEA 存在下での IFN の産生がほぼ認められなくなったが、抗 Lyt-2.2 抗体と補体の処理では産生値に大きな変化はなく、IFN 産生細胞は主に、Lyt-1⁺ の T 細胞であると考えられた (Table 4)。

脾細胞中 M ϕ の IFN- γ 産生に対する影響

IFN 産生における M ϕ の関与を検討するため、M ϕ の除去、あるいは阻害に、Sephadex G-10 カラムと 2CA を用いた。SEA 存在下での IFN- γ 産生は BCG 感作マウス脾細胞を Sephadex G-10 で処理することにより減少した。また、2CA の培養液中への添加によ

ても IFN- γ の産生はその濃度に依存して低下した (Table 5)。

BCG 死菌感作マウス脾細胞からの LTC₄ の遊離

BCG 感作マウス脾細胞からの LTC₄ 遊離は対照として W/O/W を静注したマウスに比べ高かった。LTC₄ の産生は付着細胞、非付着細胞の両方にみられた。しかし、産生量は付着細胞が非付着細胞の約 3 倍であった (Table 6)。

脾細胞の IFN- γ 産生におけるカフェイン酸および NDGA の影響

LTC₄ 合成阻害剤であるカフェイン酸および NDGA の IFN- γ 産生への作用を検討した。BCG 感作マウスの脾細胞培養時にカフェイン酸および NDGA を添加す

ると、SEA 刺激による IFN- γ の産生は阻害剤の濃度に依存して減少した (Table 7)。

リボキシゲナーゼ阻害剤存在下での LTC₄ 添加による IFN- γ 産生の回復

BCG 感作マウスの脾細胞培養時に上述のリボキシゲナーゼ阻害剤と LTC₄ を共存させた。結果は、両阻害剤により抑制されていた SEA 刺激による IFN- γ の産生が回復した。その回復は LTC₄ の濃度に依存していた (Table 8)。

考 察

われわれは、BCG 感作マウスに T 細胞マイトージェンである SEA を投与することにより血中に IFN- γ が産生されることを見いだした。IFN- γ の産生は、SEA の単独投与では認められないことから、BCG により活性化された細胞の存在が必要であると思われた。

BCG は強い M ϕ 活性化物質である²¹⁾²²⁾ ことが知られている。われわれも、BCG を *i. v.* 感作したマウスの脾、肺、腹腔の M ϕ が強くスーパーオキシドを産生すること、またマウスの腫瘍細胞である Meth A 細胞の増殖を抑制したことを確認している (結果、省略)。そこで、BCG により活性化した M ϕ の IFN- γ 産生への関与を検討した。

まず、BCG 感作期間をかえて IFN 産生を調べると、M ϕ が最も活性化されると考えられる BCG 感作3週目で IFN 産生はピークに達した。次に、BCG の投与ルートを検討したところ、活性化 M ϕ の集積である肉芽腫を肺、脾臓、肝臓等に形成する *i. v.* および *i. p.* 感作マウスでは、SEA 投与により IFN が産生されたが、BCG 感作部位に小さい肉芽腫を形成するのみで、臓器に肉芽腫を形成しない BCG の *s. c.* 感作では、IFN は産生されなかった (Table 2)。さらに、M ϕ の特異的阻害剤である、silica および 2CA²³⁾²⁴⁾ をマウスに投

Table 7. Effect of Caffeic Acid and NDGA, Lipoygenase Inhibitors, on SEA-Induced IFN Production. ^{a)}

Caffeic acid (M) ^{b)}	IFN titer (IU/ml) ^{c)}
10 ⁻³	110 ± 43
10 ⁻⁴	164 ± 41
10 ⁻⁵	255 ± 48
-	511 ± 150
NDGA (M) ^{d)}	IFN titer (IU/ml)
10 ⁻⁴	<10
10 ⁻⁵	108 ± 26
10 ⁻⁶	310 ± 110
-	482 ± 76

- a) Spleen cells from BCG-sensitized mice were stimulated with SEA as described in Table 4 either in the presence or in the absence of lipoygenase inhibitor.
- b) Caffeic acid was dissolved in 10% of sodium carbonate and then diluted with medium.
- c) IFN titers in the culture supernatants were measured at 72h of cultivation.
- d) NDGA was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted with medium. In this experiment, culture medium containing 0.5% DMSO was used as a control.

与することにより、血中 IFN の減少が認められた (Table 3)。

これらの結果から、BCG 感作マウスに SEA を投与して血中に誘導される IFN- γ 産生には、BCG により活性化した M ϕ が関与していることが示唆された。

ところで、IFN- γ 産生細胞については、マウス、ヒトにおいて T 細胞あるいは Natural Killer 細胞であることが示されてきた^{15)17)25)~30)}。われわれも、抗 BA θ 処置、あるいは抗 Lyt-1 処置で IFN- γ 産生が低下し

Table 8. LTC₄ Circumvents Suppressive Effect of Lipoygenase Inhibitor on SEA-Induced IFN Production of BCG-Sensitized Spleen Cells. ^{a)}

Lipoygenase Inhibitor	IFN titers (IU/ml)		
	-	LTC ₄ 10 ⁻⁸ M	LTC ₄ 10 ⁻⁶ M
Caffeic acid 10 ⁻⁴ M	116 ± 43	132 ± 59	195 ± 41
10 ⁻⁵ M	248 ± 98	297 ± 64	323 ± 62
NDGA 10 ⁻⁵ M	143 ± 72	225 ± 60	300 ± 35
10 ⁻⁶ M	222 ± 72	N. D.	327 ± 12
None	288 ± 48	293 ± 24	313 ± 12

- a) Spleen cells (2×10⁶) from BCG-sensitized mice were suspended in the medium containing lipoygenase inhibitor, and were cultured and stimulated with SEA either in the presence or in the absence of LTC₄. On day 3, IFN titers in the culture supernatants were determined.

たこと、および抗Lyt-2処置ではIFN- γ 産生に差が認められなかったことから、Lyt-1⁺T細胞が産生細胞であると結論した。そこで、BCG感作による感作T細胞のみがIFN- γ の産生に重要な役割をはたしているか否かを検討した。BCGをs.c.感作すると4週後に強い遅延型反応が誘導されるが、SEAを投与してもIFN- γ の産生はみられなかった。一方、BCGの*i.p.*, *i.v.*感作によっては遅延型反応は誘導されないか、あるいは低い反応であるにもかかわらず、SEAによりIFN- γ は産生された(Table 2)。これらの事実から、BCG感作T細胞の単なる存在とIFN- γ の産生に強い相関はないものと推定される。

最近、マウス腹腔M ϕ が貪食刺激に反応してLTC₄およびLTB₄を分泌すること^{31)~33)}が報告されている。また、Drapierら³⁴⁾は*M. tuberculosis*で活性化された腹腔M ϕ がLTC₄, LTD₄などのslow reacting substance-A (SRS-A)を分泌することを報告している。さらに、Johnsonら³⁵⁾³⁶⁾はLTsがT細胞のマイトジェンによるIFN- γ 産生においてIL-2の必須な役割に代わり得ることを報告している。

そこでわれわれの実験において、IFN- γ 産生とLTC₄に焦点を当てて追究した。RIAによるLTC₄の測定の結果は、BCGで感作されたマウスの脾細胞は対照マウスの脾細胞に比べ多量のLTC₄を分泌することを示している。さらに、BCG感作マウス脾細胞のうち、LTC₄はM ϕ が主体であると考えられるプラスチック付着細胞から分泌されていることが示された(Table 6)。また、結果に示さなかったが、LTB₄もBCG感作マウスの脾細胞では高値を示していた。次に、リポキシゲナーゼの阻害剤である、caffeic acid³⁷⁾およびNDGA³⁸⁾をBCG感作マウスの脾細胞培養時に添加し、SEA誘導におけるIFN- γ 産生能を調べた。その結果、これら阻害剤の存在下で脾細胞のIFN産生は明らかに減少した(Table 7)。また、リポキシゲナーゼ阻害剤存在下で減少したIFN- γ の産生は合成LTC₄の添加で回復した(Table 8)。これらの結果は、LTC₄がIFN- γ の産生に関与していることを示唆している。

本研究において、われわれは、IFN- γ 産生に対し特にLTC₄の関与に重点をおいたが、おそらくJohnsonら³⁵⁾³⁶⁾が示したごとく、LTC₄以外のLTsも関与していると推定される。

本実験の結果は、おそらく活性化M ϕ から分泌されるLTC₄がIFN- γ 産生への正のシグナルとして働くことを示している。ところで、IFNはM ϕ を活性化すること^{39)~42)}も知られている。もし、IFN- γ により活性化されたM ϕ がLTsを分泌し、分泌されたLTsがSEAによるT細胞からのIFN- γ の産生を高めているのであれば、M ϕ とT細胞におけるLTs-IFN- γ 分

泌サーキットを調節する機構が存在すると思われる。

この抑制性調節機構は、明らかではないが、prostaglandin (PG) Eの関与が推定される。すなわち、われわれが先に報告⁴³⁾したように、BCGで活性化されたM ϕ はまた、PGEを分泌する。一方、PGEはリンパ球、M ϕ からのIFN- γ の産生を抑制する³⁵⁾⁴⁴⁾ことが報告されている。それゆえ、活性化M ϕ から分泌されるPGEはIFN- γ 産生において負のシグナルと考えられる。これらの見地からIFN- γ 産生の調節には、アラキドン酸カスケードのリポキシゲナーゼによるLTs合成は正のシグナルとして、またシクロオキシゲナーゼによるPGE合成は負のシグナルとして働いているのであろう。

IFN- γ 産生におけるアラキドン酸カスケードの役割をさらに明確なものとするために、リンパ球のLTsレセプターの確認などさらに検討が必要であると思われる。

結 論

BCG死菌で感作したB6マウスに3週後staphylococcal enterotoxin A (SEA)を静注すると、血中にインターフェロン(IFN)が産生された。この機構を検討し、次のことを明らかにした。

- 1) IFNの性状を調べたところ、pH 2.0の処理で失活したが、抗 $\alpha\beta$ IFN血清の処置では失活せず、IFN- γ であることが明らかになった。
- 2) SEAによる血中IFNの産生は、ほぼ全身のマクロファージ(M ϕ)が強く活性化されるBCGの投与ルートおよび投与後の時期に一致した。
- 3) BCG感作マウスにM ϕ 阻害剤であるsilicaあるいは2-chloroadenosineを投与するとSEAによるIFNの産生が減少した。
- 4) *in vitro*でBCG感作マウスの脾細胞を培養し、IFN- γ 産生細胞を調べたところ、Lyt-1⁺T細胞であった。
- 5) 脾細胞のM ϕ を除去あるいは阻害するとIFNの産生が減少した。
- 6) BCG感作マウスの脾細胞、特にその付着細胞から、多量のleukotriene (LT) C₄が分泌された。
- 7) BCG感作マウスの脾細胞培養時にLTC₄分泌を阻害するcaffeic acidあるいはnordihydroguaiaretic acidを共存させるとIFN- γ の産生が減少した。
- 8) BCG感作マウスの脾細胞培養時にLTC₄阻害剤とLTC₄を添加するとIFN- γ 産生の抑制は回復した。

以上のことから、BCG感作により活性化されたM ϕ がLTC₄分泌を介しIFN- γ 産生を増強していることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、実験にご協力をいただきました小野江和則博士、笠井憲雪博士、西平順博士、濱田直子、立花キヨ諸氏に厚くお礼申しあげます。また、抗

Lyt-1.2 抗体は、多田伸彦博士（東海大学）より、抗 Lyt-2.2 抗体は木村正治博士（London Medical College）より、抗 α/β IFN 抗体は、小林茂保博士（東レ）より分与を受けました。深く感謝致します。

文 献

- 1) Minagawa, T. and Ho, M. : Hyporeactivity factor produced after induction of immune interferon in mice sensitized with BCG, *Infect Immun*, 22 : 371-377, 1978.
- 2) Salvin, S. B., Younger, J. S. and Lederer, W. H. : Migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity, *Infect Immun*, 7 : 68-75, 1973.
- 3) Younger, J. S. and Salvin, S. B. : Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity, *J Immunol*, 111 : 1914-1922, 1973.
- 4) Gifford, G. E., Tibor, A. and Peavy, D. L. : Interferon production in mixed lymphocyte cell cultures, *Infect Immun*, 3 : 164-166, 1971.
- 5) Kircher, H., Zavotsky, R. and Schirrmacher, V. : Interferon production in the murine mixed lymphocyte culture. I. Interferon production caused by differences in the H-2K and H-2D region but not by differences in the I or the M locus, *Eur J Immunol*, 9 : 97-99, 1979.
- 6) Milstone, L. M. and Waksman, B. H. : Release of virus inhibitor from tuberculin-sensitized peritoneal cells stimulated by antigen, *J Immunol*, 105 : 1068-1071, 1970.
- 7) Neuman, C. and Sory, C. : Interferon. I. Production by lymphokine-activated murine macrophages, *Eur J Immunol*, 77 : 719-725, 1977.
- 8) Wallen, W. C., Dean, J. H. and Lucas, D. O. : Interferon and cellular immune response : Separation of interferon producing cells from DNA synthetic cells, *Cell Immunol*, 6 : 110-122, 1973.
- 9) Epstein, L. B., Cline, M. J. and Merigan, T. C. : The interferon of human macrophages and lymphocytes in the phytohemagglutinin-stimulated production of interferon, *J Clin Invest*, 50 : 744-753, 1971.
- 10) Friedman, R. M. and Cooper, H. I. : Stimulation of interferon production in human lymphocytes by mitogens, *Proc Soc Exp Biol Med*, 125 : 901-905, 1967.
- 11) Langford, M. P., Georgiades, J. A., Stanton, G. J. et al. : Large-scale production and physiochemical characterization of human immune interferon, *Infect Immun*, 26 : 36-41, 1979.
- 12) Wheelock, E. F. : Interferon-like virus inhibitor induced in human immune leukocytes by phytohemagglutinin, *Science (Wash. D. C.)*, 149 : 310-311, 1965.
- 13) Johnson, H. M., Stanton, G. J. and Baron, S. : Relative ability of mitogens to stimulate production of interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the *in vitro* immune response, *Proc Soc Exp Biol Med*, 154 : 138-141, 1977.
- 14) Stobo, J. Green, F., Jackson, L. et al. : Identification of mouse lymphoid cells required for interferon production following stimulations with mitogens, *J Immunol*, 112 : 1589-1593, 1974.
- 15) Torres, B. A., Yamamoto, J. K. and Johnson, H. M. : Cellular regulation of gamma interferon production : Lyt phenotype of the suppressor cell, *Infect Immun*, 35 : 770-776, 1982.
- 16) Okamura, H., Kawaguchi, K., Shoji, K. et al. : High-level induction of gamma interferon with various mitogens in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*, *Infect Immun*, 38 : 440-443, 1982.
- 17) Havell, E., Spitalny, G. L. and Patel, P. J. : Enhanced production of murine interferon by T cells generated in response to bacterial infection, *J Exp Med*, 156 : 112-127, 1982.
- 18) Armstrong, J. A. : Semi-micro-dye binding assay for rabbit interferon, *Appl Microbiol*, 21 : 723-725, 1971.
- 19) Kato K., Yamamoto, K., Kakinuma, M. et al. : Suppression of BCG cell wall induced delayed-type hypersensitivity by BCG pre-treatment. I. Induction of adherent suppressor cells by live BCG injection and their characterization, *Immunology*, 42 : 259-266, 1981.

- 20) Ly, I. A. and Mishell, R. I. : Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10, *J Immunol Methods*, 5 : 239-247, 1974.
- 21) Blanden, R. V., Lefford, M. J. and Mackaness, G. B. : The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice, *J Exp Med*, 129 : 1079-1101, 1969.
- 22) Kato, K., Yamamoto, K., Okuyama, H. et al. : Microbicidal activity and morphological characteristics of lung macrophages in *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-induced lung granuloma in mice, *Infect Immun*, 45 : 325-331, 1984.
- 23) Allison, A. C., Harington, J. S. and Birbeck, M. : An examination of cytotoxic effects of silica on macrophages, *J Exp Med*, 124 : 141-154, 1966.
- 24) Saito, T. and Yamaguchi, J. : 2-chloroadenosine : A selective lethal effect to mouse macrophages and its mechanism, *J Immunol*, 134 : 1815-1822, 1985.
- 25) Interferon nomenclature committee : Interferon nomenclature, *Nature*, 286 : 110, 1980.
- 26) Landolfo, S. Kirchner and Simon, M. M. : Production of immune interferon is regulated by more than one T cell subset : Lyt-1, 2, 3 and Qat-5 phenotypes of murine T lymphocytes involved in IFN- γ production in primary and secondary mixed lymphocyte reaction, *Eur J Immunol*, 12 : 295-299, 1982.
- 27) Klein, J. R., Raulet, B. H., Pasternack, M. S. et al. : Cytotoxic T lymphocytes produce immune interferon in response to antigen or mitogen, *J Exp Med*, 155 : 1198-1203, 1982.
- 28) Morris, A. G., Lin, Y. L. and Askonas, B. A. : Immune interferon release when a cloned cytotoxic T cell line meets its correct influenza-infected target cell, *Nature*, 295 : 150-152, 1982.
- 29) Mckimm-Breschkin, J. L., Mottram, P. L., Thomas, W. R. et al. : Antigen-specific production of immune interferon by T cell lines, *J Exp Med*, 155 : 1204-1209, 1982.
- 30) Miller, J. F. P. A., Mottram, P. L., Thomas, W. R. et al. : Antigen specificity of continuous T cell lines, In Boehmer, H., Hass, W., Kohler, G., Melchers, F. and Zenthen, J. (ed), *T Cell Hybridomas*, Springer-Verlag, Berlin, New York, pp.249-255, 1982.
- 31) Czop, J. K. and Austen, K. F. : Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their β -glucan receptor during phagocytosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 : 2751-2755, 1985.
- 32) Humes, J. L., Sadowski, S. Galavage, M. et al. : Evidence for two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages, *J Biol Chem*, 257 : 1591-1594, 1982.
- 33) Rouzer, C. A., Scott, W. A., Cohen, Z. et al. : Mouse peritoneal macrophages release leukotriene C in response to a phagocytic stimulus, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 4928-4932, 1980.
- 34) Drapier, J. C., Roubin, R., Petit, J. F. et al. : Lipid-mediator synthesis in peritoneal macrophages from mice injected with immunostimulants, *Biochem Biophys Acta*, 751 : 90-98, 1983.
- 35) Johnson, H. M., Russell, J. K. and Torres, B. A. : Second messenger role of arachidonic acid and its metabolites in interferon-production, *J Immunol*, 137 : 3053-3056, 1986.
- 36) Johnson, H. M. and Torres, B. A. : Leukotrienes: Positive signals for regulation of γ -interferon production, *J Immunol*, 132 : 413-416, 1984.
- 37) Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., et al. : Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis, *Biochem Biophys Acta*, 792 : 92-97, 1984.
- 38) Salari, H., Braquet, P. and Borgeat, P. : Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids, 15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW755C on metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets, *Prostaglandin Leukotrienes Med*, 13 : 53-60, 1984.
- 39) Jones, C. M., Varesis L., Herberman, R. B. et al. : Interferon activates macrophages to produce plasminogen activator, *J Interferon Res*, 2 : 377-386, 1982.
- 40) Benjamin, W. R., Steeg, P. S. and Farrar, J. J. : Production of immune interferon by

- interleukin 2-independent murine T cell line, Proc Natl Acad Sci USA, 79 : 5379-5383, 1982.
- 41) Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. et al. : Identification of interferon as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity, J Exp Med, 158 : 670-689, 1983.
- 42) Pace, J. L., Russell, S. W., Torres B. A. et al. : Recombinant mouse γ -interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing, J Immunol, 130 : 2011-2013, 1983.
- 43) Kato, K. and Yamamoto, K. : Involvement of prostaglandin E₁ in the delayed-type hypersensitivity suppression induced with live *Mycobacterium bovis* BCG, Infect Immun, 36 : 426-429, 1982.
- 44) Epstein, L. B. and Bourne, H. R. : Interferon production by mitogen stimulated lymphocytes : Cyclic AMP mediated inhibition by cholera toxin, In Oppenheim, J. J. and Rosenstreich, D. L. (ed), Mitogens in Immunology Academic Press, New York, pp.453-462, 1976.