

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫

座長 安藤 正 幸 (熊本大学医学部第 1 内科)

受付 平成 3 年 7 月 8 日

The 66th Annual Meeting Symposium

IV. IMMUNITY AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM*
COMPLEX INFECTION

Chairman : Masayuki ANDO *

Symposists :

1. Effect of natural resistance gene on the immune response against *Mycobacterium avium* complex infection : Reiko M. NAKAMURA (Department of Cellular Immunology, National Institute of Health)
2. Immunosuppressive macrophages induced in *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice : Haruaki TOMIOKA and Hajime SAITO (Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University)
3. Intracellular killing mechanisms of alveolar macrophages against *Mycobacterium avium* complex : Moritaka SUGA (Internal Medicine of Kumamoto Rosai Hospital and The First Department of Internal Medicine Kumamoto University Medical School)
4. Effect of cytokines on anti-*Mycobacterium avium* complex (MAC) activities of human alveolar macrophages : Katsuhiro SUZUKI and Fumiyuki KUZE (Department of Infection and Inflammation, Chest Disease Research Institute, Kyoto University)
5. Clinico-immunological study of the patients infected with *Mycobacterium avium* complex (MAC) : Yasuko HARADA (National Ohmuta Hospital)

Special comment :

Mycobacterium avium complex (MAC)-induced immunosuppression : Izuo TSUYUGUCHI (Osaka Prefectural Habikino Hospital)

(Received for publication July 8, 1991)

Recently, nontuberculous mycobacteriosis, especially *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection, has become of major interest because of the following reasons : (1) MAC infection is increasing relatively resulting from the decreasing of tuberculosis. (2) The disease is frequently encountered as a serious opportunistic infection in patients with immunosuppressive state such as AIDS. (3) The disease is difficult to treat because MAC strains frequently show natural resistance to antituberculosis drugs. Therefore, it is very

* From the First Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School, Kumamoto 860 Japan.

important to better understand the immunity against MAC infection for the control of the disease.

In this symposium, Dr. Nakamura reported on the relationship between the natural resistance gene in Bcg-congenic mice and the intracellular killing mechanisms of the host macrophages against *Mycobacterium avium* Mino infection, and suggested that genetic control plays an important role on the defense mechanisms against MAC in the host macrophages.

Dr. Tomioka spoke on the profiles and characteristics of immunosuppressive macrophages induced by MAC infection in mice, and postulated that prostaglandins, nitric oxide radical, and free long chain fatty acids played certain role in the expression of suppressor action of the macrophages.

The intracellular killing mechanisms of human and rat alveolar macrophages (AM) activated by various cytokines were reported by Dr. Suzuki and Dr. Suga, respectively. Dr. Suzuki reported that GM-CSF and TNF- α could activate human AM to inhibit the growth of MAC. Dr. Suga reported that intracellular growth of MAC was inhibited in rat AM stimulated by TNF- α , but not by IFN- γ .

Dr. Harada reported that number and function of T cells in patients with MAC infection were lower than those of healthy controls, suggesting that patients with MAC infection are in an immunosuppressive state.

Finally, Dr. Tsuyuguchi suggested that triggering mechanism of MAC infection might be brought about the host immunodeficiency, but once overt disease is established, the infected MAC by themselves act immunosuppressively.

Key words : Macrophages, cytokines, Immunosuppression

キーワード : マクロファージ, サイトカイン, 免疫抑制

シンポジスト

1. *M. avium* complex 感染症における免疫応答の遺伝的解析
中村玲子 (国立予防衛生研)
 2. *Mycobacterium avium* complex 感染マウスに誘導される免疫抑制性マクロファージの性状
富岡治明・斎藤 肇 (島根医科大)
 3. *M. avium* complex に対する肺胞マクロファージの細胞内殺菌機序
菅 守隆 (熊本大医学部1内・熊本労災病)
 4. ヒト肺胞マクロファージの *M. avium* complex 増殖抑制作用に及ぼす各種サイトカインの影響
鈴木克洋・久世文幸 (京都大胸部疾患研)
 5. *M. avium* complex 感染症の臨床免疫学的側面
原田泰子 (国療大牟田病)
- 特別発言：
M. avium complex 菌体による免疫抑制
露口泉夫 (大阪府立羽曳野病)

近年、非定型抗酸菌症、ことに *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症が注目を集めている。その理由として、(1) 結核の減少によって本症が相対的に重要となってきたこと、(2) エイズなどの免疫不全患

者における日和見感染症の起炎菌として本菌の重要性が明らかにされてきたこと、(3) 本菌に有効な薬剤が少なく難治性となりやすいこと、などがあげられる。したがって、本疾患をコントロールするにあたって MAC 感

症における免疫についてよく理解しておくことは大変重要なことである。

本シンポジウムにおいて、中村玲子博士はBCGに対する自然抵抗性遺伝子とMAC (Mino) 感染に対するマクロファージの細胞内殺菌機序との関係について検討した成績を述べ、宿主マクロファージのMAC感染防御機能に遺伝的なコントロールが重要な役割をしていることを示唆した。

富岡治明博士はマウスにおけるMAC感染によって誘導される免疫抑制性マクロファージの概略と特徴について述べ、プロスタグランジン、酸化窒素ラジカル、長鎖遊離脂肪酸がマクロファージの抑制作用の発現に何らかの役割をしていることを示唆した。

MACに対する活性化肺胞マクロファージ (AM) の細胞内殺菌能については菅守隆博士と鈴木克洋博士によ

て報告された。菅博士はTNF-alphaによって活性化されたラットAMはMACの細胞内増殖を抑制するが、IFN-gammaではこの作用はみられなかったことを報告し、鈴木博士はTNFとGM-CSFで活性化されたヒトAMがMACの細胞内増殖を抑制することを明らかにした。

原田泰子博士はMAC感染症の患者における末梢血T細胞の数と機能は健常者のものと比較して低下していることを報告し、本症患者は免疫抑制の状態にあることを示唆した。

最後に、露口泉夫博士はMAC感染の引金は宿主の免疫不全状態によってもたらされるが、一度本症が成立すると、感染したMACそれ自身が免疫抑制的に作用することを示唆した。

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫1. *M. avium* Complex 感染症における免疫応答の遺伝的解析

中 村 玲 子

国立予衛生研究所細胞免疫部

受付 平成 3 年 7 月 8 日

1. EFFECT OF NATURAL RESISTANCE GENE ON THE IMMUNE RESPONSE
AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX INFECTION

Reiko M. NAKAMURA *

(Received for publication July 8, 1991)

Natural resistance gene (Bcg) is mapped to chromosome # 1 and known to control the host resistance against *Mycobacterium avium* Mino infection in mice. Using two sets of Bcg-congenic mice, BALB/c vs C.D2 and B10.A vs B10.A.Bcg^r, we determined phenotypic differences in macrophages between Bcg^s and Bcg^r. Bcg gene product is not detected yet but thought to be expressed in macrophages and should be effective in mycobacteria-killing mechanisms of the host macrophages. It was found that AcM.1 expression is higher in Bcg^r than Bcg^s, while O₂⁻ production and granuloma formation are stronger in Bcg^s than Bcg^r. Cytokine messages were detected in Mino-infected macrophages. TNF is produced more in Bcg^s, while IL-6 is higher in Bcg^r. IL-1 was almost the same in both strains. Exogenous cytokines, IL-4 or IFN- γ , added to the culture of Mino-infected macrophages, enhanced the bacteria killing in Bcg^r but not in Bcg^s.

Key words : Natural resistance, MAC, Bcg gene

キーワードズ : 自然抵抗性, MAC, Bcg 遺伝子

緒 言

MAC 感染症の問題点は、有効な化学療法剤がないために治療が困難なことである。したがって、宿主の免疫系による感染抵抗性は、MAC 感染における重要な防御機構である。

マウスでは、MAC 感染に対し感受性の系統と抵抗性の系統があり、これは第一染色体上の自然抵抗性遺伝子

の支配を受けていることが知られている¹⁾。この抵抗性は特異抗原に対する免疫によるものではないが、結果として抗酸菌の増殖が阻止される点では同じ機作によると考えられる²⁾。私たちは、この遺伝子による抵抗性の機作を解析することにより、免疫によって成立する抗菌活性の機作を解明することができるのではないかと考えている。

自然抵抗性遺伝子 (Bcg-Ity-Lsh) に支配される感

* From the Department of Cellular Immunology, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

染抵抗性は、細胞内寄生病原体である抗酸菌、*Salmonella typhimurium* および *Leishmania donovani* に対するもので、これらがマクロファージ内で増殖する微生物であることから、この遺伝子産物がマクロファージに発現していることが予想される。しかし遺伝子のクローニングはまだ成功していないし、遺伝子産物も特定されていない。この遺伝子に関してコンジュニックなマウスが開発されたので³⁾、私たちはそれを用いてマクロファージの活性化を比較し、Bcg 遺伝子の産物について手掛りを得ようと試みている。

材料および方法

マウス：Bcg 遺伝子に関して感受性の BALB/c (Bcg^s) とその抵抗性コンジュニック C.D2 (Bcg^r) を用いた。C.D2 は BALB/c に DBA/2 の Bcg 遺伝子を導入した近交系である。このマウスは予研で自家繁殖している。BALB/c は日本 SLC から購入した。Bcg 遺伝子に関してコンジュニックな B10.A.Bcg^r も Skamene 博士より分与を受けた⁴⁾。対照として B10.A を SLC より購入して用いた。

抗酸菌：*Mycobacterium avium* Mino を用いた。菌の増殖には Middlebrook の 7H9 培地を用いた。

RNA 抽出：Acid guanidium thiocyanate phenol chloroform (AGPC) 法により腹腔マクロファージまたは脾臓の RNA を抽出した。細胞融解液組成は、4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate, 10% sarcocyl, 0.1M2ME である。融解液 1 に対しフェノール 1, 2M 酢酸ナトリウム 0.1, クロロホルム 0.2 の割合で混ぜて RNA を抽出した。

mRNA の検出：RNA 5 μ g をニトロセルロースメンブランにプロット (ハイブリスロット, BRL-HS2918) し、cDNA とハイブリダイズさせた。検出には ECL キット (Amersham) を用いた。

AcM.1 抗体：活性化マクロファージの表面抗原を検出するモノクローナル抗体 AcM.1⁵⁾ は予研の谷山博士より供与された。細胞をビオチン化 AcM.1 と FITC アビジンで染色し、FACS で解析した。

cDNA：IL-1 α プロローブは東京免疫薬理研・木根淵博士より、TNF α プロローブは予研・谷山博士より、IL-6 プロローブはバイオマテリアル研・須藤博士より供与を受けた。

活性酸素の産生：腹腔マクロファージの O₂⁻ 産生を化学発光により測定した。基質にはルシゲニン、刺激剤には *M. avium* Mino, PMA を用い、Biolumat LB 9500 で測定した。

結 果

(1) Bcg 遺伝子の表現型：Bcg^s (感受性) のマウス

の肺・肝・脾では *M. avium* Mino は増殖を続け、最終的にはマウスを殺すが、Bcg^r (抵抗性) のマウスでは Mino 菌は増えることなく、長期間にわたってほぼ同程度の生菌が臓器から回収される。しかし細胞性免疫が成立して、臓器から菌が検出できなくなるようなことはない。Bcg^s マウスは BALB/c, C57BL/6, C57BL/10, Bcg^r マウスは、C3H/He, DBA/2, A/J, AKR, SJL などである。C.D2 と B10.A.Bcg^r は Bcg^r の表現型を示す。図 1 は BALB/c と C.D2 の脾臓内での Mino 菌の増殖を示す。両系統マウスから腹腔マクロファージを採取し、96 穴プレート内で Mino 菌とともに培養すると、菌数は *in vivo* の場合と同様に BALB/c では増加するが、C.D2 では増加しない。この事実は、Bcg 遺伝子がマクロファージに表現されているという仮説を証明するものである (図 2)。

(2) 活性化マクロファージのマーカー AcM.1 の発現：正常マウスの腹腔マクロファージの AcM.1 発現は極めて弱いが、BCG で免疫したマウスのマクロファージには AcM.1 が強く発現している。このようなマクロファージを含む細胞集団は、強い抗腫瘍・抗菌活性を示す。LPS と IFN- γ はマクロファージを活性化することが知られているので、これらを腹腔内に投与したマウスのマクロファージについて、AcM.1 の発現を検討した。LPS 50 ng/mouse, または IFN- γ 10³ U/mouse を ip して 3 日後の腹腔マクロファージの AcM.1 発現は未処置対照と変わらなかったが、両者を同時に投与した場合は Bcg^r マウスにおいて強い

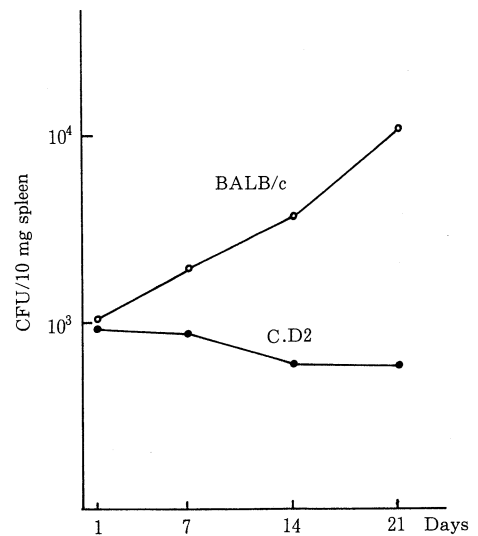


図 1 *M. avium* Mino の *in vivo* 増殖
Mino 1 × 10⁴ を静注後 1 ~ 21 日のマウス脾臓中の生菌数をコロニー形成により測定した。

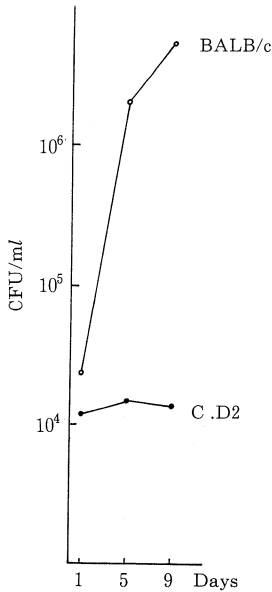


図2 *M. avium* Mino の *in vitro* 培養マクロファージ中での増殖

Mino $2 \times 10^5/ml$ をマクロファージと 1:1 の割合に混ぜ、96穴プレートに1時間粘着後洗浄し、新しい培地を加えて1~9日培養した。各時点で細胞中の全菌数をコロニー形成能で測定した。

AcM.1 の発現がみられた。しかし、 Bcg^s マウスでは対照と変わらなかった (図3)。 Bcg 遺伝子はマクロファージの AcM.1 発現を促進させる作用があると思われる (谷山忠義との共同研究)。

(3) 活性酸素の産生: プロテオース・ペプトンで誘出させた腹腔浸出マクロファージを $10^6/ml$ の濃度でハンクス液に浮遊し、LB9500用の測定チューブに1mlずつ分注し、37°CのCO₂ふらん器で1日培養して好中球を除去した。この材料につき、Mino菌、Zymosan、またはPMAで刺激して、O₂⁻の産生を化学発光により検出し、 Bcg^s (BALB/c) と Bcg^r (C.D2) の比較を行った。いずれの刺激によっても、BALB/cの方が高いO₂⁻の産生を示した。(BALB×C.D2)F1は抗菌活性では Bcg^r 型を示す、すなわちrはsに対し優位であるが、F1のO₂⁻産生はC.D2と同じであった。この結果は、 Bcg 遺伝子はO₂⁻の産生を抑制するように作用していることを示唆する。図4に、Minoで刺激した場合の例を示す。発光基質はルシフェリンである (医科研・金ヶ崎士朗、小林園子との共同研究)。

(4) 腹腔マクロファージのTNFα産生: チオグリコレートで誘出させた腹腔マクロファージをLPS, LPS+IFN-γで刺激し、1~24時間後の上清中のTNF

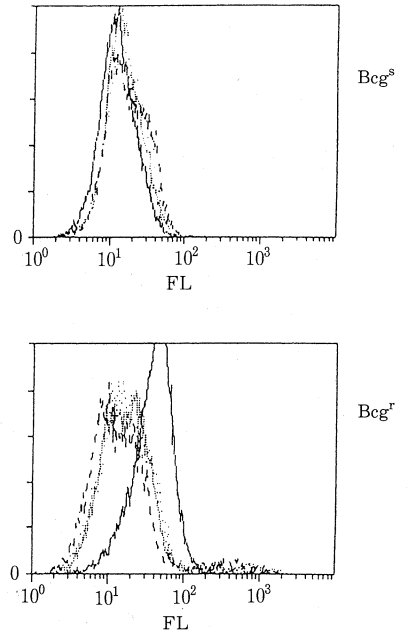


図3 Bcg^s および Bcg^r マウスの腹腔浸出マクロファージの AcM.1 発現

Bcg^s (B10. A) と Bcg^r (B10. A. Bcg^r) の腹腔浸出マクロファージを AcM.1 抗体で染色し FACS で解析した。マウスの処置としてプロテオース・ペプトンのみ ip 群 (……), LPS 50 ng ip 群 (-----), IFN-γ 10^3u ip 群 (----), LPS+IFN-γ 群 (——) の4群をおいた。

の活性を L929 細胞に対する細胞傷害活性により測定した。BALB/c のマクロファージは、C.D2 のマクロファージより高い TNFα 産生を示した (表) (東京疫疫薬理研・藤井直子、吉田彪との共同研究)。

(5) *M. avium* Mino 感染脾臓中のサイトカイン mRNA の検出: Mino を 10^6 静注して1~2日後のマウスの脾から RNA を抽出し、TNFα, IL-1, IL-6 のメッセージを Bcg^s と Bcg^r で比較した。TNFα の mRNA は Bcg^s に強く発現し、IL-1 は両者にあまり差がなく、IL-6 は Bcg^r に強い傾向がみられた (図5-a, b, c)。

(6) マクロファージの抗菌活性を増強するサイトカインの検索: *in vitro* で腹腔マクロファージに Mino 菌を貪食させ、よく洗って貪食されなかった菌を除き、96穴プレートで培養した。経時的に細胞を破壊して生菌数を寒天培地上のコロニー形成能で算出した。 Bcg^s マウスのマクロファージ内では菌は増殖をつづけ、 Bcg^r マウスのマクロファージ内では菌の増殖は抑制されるが、減少はしない。この系にさまざまなサイトカインを添加

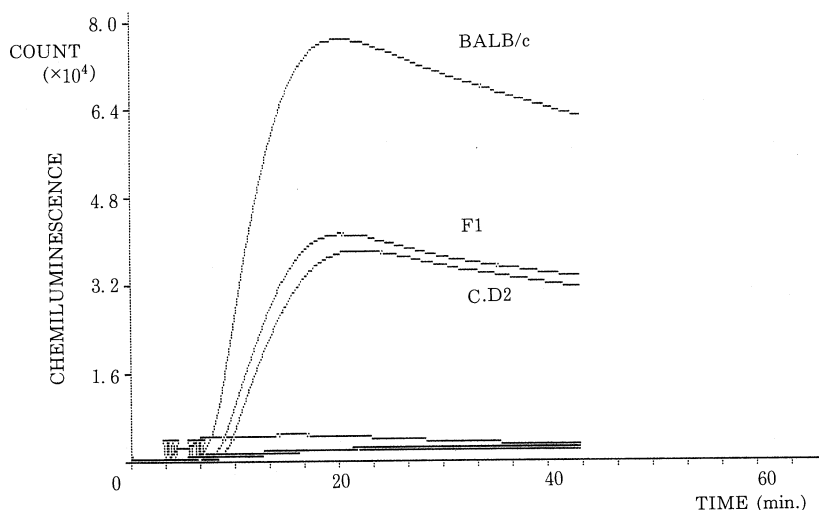


図4 BALB/c, C. D2, およびその F1 の腹腔マクロファージの O_2^- 産生能

腹腔浸出細胞を1日培養し好中球を除いたマクロファージ集団に、*M. avium* Mino を食菌させ、ルシゲニンを基質とした化学発光を測定した。

表 BALB/c, C.D2 マクロファージの TNF 産生能

Stimuli hrs	BALB/c		C.D2	
	Zymosan + LPS 10 ng	Zymosan + LPS 100 ng	Zymosan + LPS 10 ng	Zymosan + LPS 100 ng
1	12	12	12	12
2	37	62	29	48
3	135	200	62	12
4	540	400	90	120
5	520	700	170	120
6	800	520	120	135
7	800	600	250	240
8	1700	1000	400	370

TNF : Unit/ml

腹腔浸出マクロファージを96穴プレートに粘着させ、Zymosan (1.25mg/ml) と LPS10ng/ml または100ng/ml を混在させて刺激し、1~8時間後の上清中の TNF をL929 細胞傷害性により測定した。マクロファージは 5×10^5 /well (100 μ l) である。

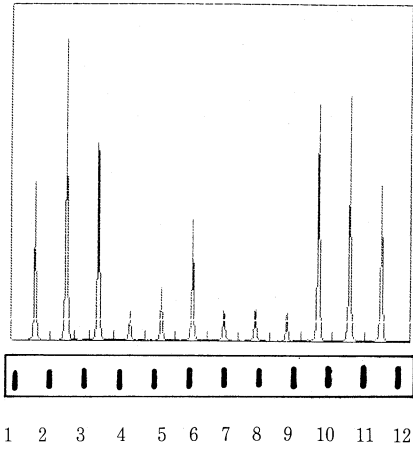
し、生菌数の変動によって、サイトカインがマクロファージの抗菌力にどのような影響を及ぼすかを検討した。

rhCSF-1, GM-CSF, INF- α/β は単独の投与でマクロファージの抗菌力を増強することはなかった。Bcg^r マウスのマクロファージに INF- γ , または IL-4 を添加した場合、明らかな抗菌力の増強が認めら

れ、マクロファージが殺菌的に働くことが知られた。しかし Bcg^s マクロファージではこれらのサイトカインの効果は認められなかった(図6)。また、L929 細胞の培養上清はマクロファージの抗菌力を増強することが知られたので、いくつかのサイトカインの相乗作用があるものと思われる。

考 察

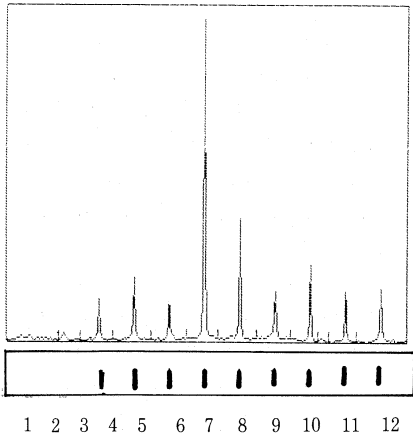
自然抵抗性遺伝子(Bcg)のコンジュニック・マウスを用いて、抗酸菌(特に非定型抗酸菌)に対する宿主の抵抗性の機作を解明することが本研究の目的である。そのアプローチの1つとして、マクロファージの活性化に関連すると思われるいくつかの表現型が、Bcg 遺伝子と関連しているかどうかを検討した。活性化マクロファージのマーカー AcM.1 の表現が Bcg 遺伝子と関連することが知られた。同じくマクロファージ活性化に伴って出現する Ia 抗原も、Bcg 遺伝子と関連するという報告があり⁶⁾、Bcg 遺伝子産物がマクロファージ活性化に影響を与えていると考えられる。しかしながら、肉芽腫形成、活性酸素の産生、TNF α の産生が、いずれも Bcg^s の方に高いという結果は、マクロファージの抗菌活性と矛盾するように思われる。この点に関して、私たちは次のように考える。すなわち、Bcg^s マクロファージは抗酸菌を貪食すると TNF α を出しやすい性質をもっている。TNF α は肉芽腫形成のひきがねになるサイトカインで、免疫とは無関係にサイトカイン・ネッ



a) IL-1 α

IL-1 mRNA

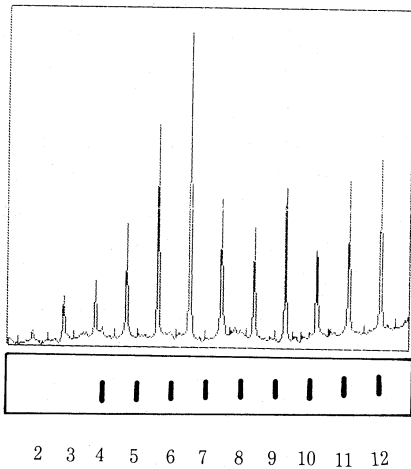
1, 2, 3	4h	1, 4, 7, 10	BALB/c
4, 5, 6	1d after Mino iv.	2, 5, 8, 11	C.D2
7, 8, 9	2d	3, 6, 9, 12	F1
10, 11, 12	3d		



b) TNF α

TNF mRNA

1, 2, 3	4h	1, 4, 7, 10	BALB/c
4, 5, 6	1d after Mino iv.	2, 5, 8, 11	C.D2
7, 8, 9	2d	3, 6, 9, 12	F1
10, 11, 12	3d		



c) IL-6

IL-6 mRNA

1, 2, 3	4h	1, 4, 7, 10	BALB/c
4, 5, 6	1d after Mino iv.	2, 5, 8, 11	C.D2
7, 8, 9	2d	3, 6, 9, 12	F1
10, 11, 12	3d		

図5 サイトカインの mRNA 検出

BALB/c, C. D2, および F1 マウスに Mino を静注し, 4時間後, 1日後, および 2日後の脾臓の RNA 中の各サイトカイン・メッセージをノザン・ブロッティングで検出した。

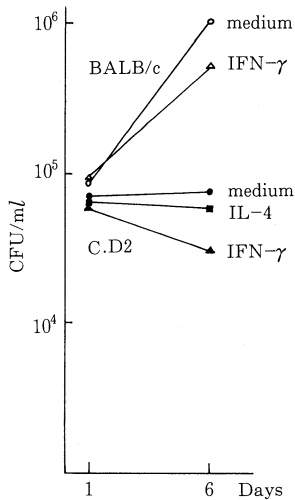


図6 マクロファージ抗菌活性に及ぼすサイトカインの影響

M. avium Mino を貪食したマクロファージの *in vitro* 培養系に、IFN- γ 、IL-4 または CSF-1 を加えて6日間培養し、菌数をコロニー形成能で測定した。

トワークを動かし、肉芽腫を形成する。また、TNF α がマクロファージの O $_2^-$ 産生を増強することが知られている⁷⁾。O $_2^-$ の主な産生細胞は好中球であって、多くの細菌は好中球の産生する活性酸素によって殺菌されるが、抗酸菌は好中球によって殺されない。したがって、Bcg 遺伝子関連の殺菌作用は、恐らく活性酸素とは無関係であろう。それ故、一見矛盾に思われる肉芽腫形成や O $_2^-$ 産生の Bcg^s マウスとの関係は、TNF 産生により説明できる。しかし、TNF が IFN- γ と共存するとマクロファージの抗酸菌に対する殺菌力を増強するという報告があるので⁸⁾、サイトカインの相乗作用については今後検討しなくてはならない。IL-1 と IL-6 の産生と Bcg 遺伝子の関連は、さらに検討の必要がある。IL-6 の産生は、IL-1、TNF によって制御されることが知られている⁹⁾ ので、Bcg 遺伝子の差がその制御のプロセスに関与しているかどうかとも問題となる点である。IFN- β (cDNA は東レより供与された) の mRNA は、Mino 感染後期の Bcg^r マウスの脾に強く発現していた。これは、Mino 感染によるサイトカイン・ネットワークの初期のステップには関係ないと思われるが、自然抵抗性の発現に何らかの関与があるのかもしれない。Bcg 遺伝子のクローニングは、これらの疑問に直接答えるもので、その成功が期待される。

謝 辞

cDNA を分与して頂きました東京免疫薬理研・木根淵博士、バイオマテリアル研・小林所長、須藤博士、予

研・谷山博士に感謝いたします。研究上の御協力を頂きました医科研・金ヶ崎博士、小林博士、東京免疫薬理研・吉田所長、藤井研究員、予研・細胞免疫部・谷山博士、山崎利雄研究員、竹川真理子研究員に厚く御礼申し上げます。この研究は一部 HS 財団の援助を受けました。

文 献

- 1) Goto, Y., Nakamura, R. M., Takahashi, H. et al. : Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice, *Infect Immun*, 46 : 135-140, 1984.
- 2) 中村玲子 : 自然抵抗性遺伝子, *臨床免疫*, 22 (7) : 1051~1056, 1990.
- 3) Potter, M., O'Brien, A. D., Skamene, E. et al. : A BALB/c congenic strain of mice that carries a genetic locus (Ity^r) controlling resistance to intracellular parasites, *Infect Immun*, 40 : 1234-1235, 1983.
- 4) Danis, M., Forget, A., Pelletier, M. and Skamene, E. : Pleiotropic effects of the Bcg gene : III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages, *Clin Exp Immunol*, 73 : 370-375, 1988.
- 5) Taniyama, T. and Tokunaga, T. : Monoclonal antibodies directed against mouse macrophages in different stages of activation for tumor cytotoxicity, *J Immunol*, 131 : 1032-1037, 1983.
- 6) Zwillig, B. S., Vespa, L. and Massie, M. : Regulation of I-A expression by murine peritoneal macrophages : differences linked to the Bcg gene, *J Immunol*, 138 : 1372-1376, 1987.
- 7) Tsujimoto, M., Yokota, S., Vilček, J. and Weissmann, G. : Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils, *Bioch Bioph Res Comm*, 137 : 1094-1100, 1986.
- 8) Flesch, I. E. A. and Kaufmann, S. H. E. : Activation of tuberculostatic macrophage function by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor, *Infect Immun*, 58 : 2675-2677, 1990.
- 9) Ellias, J. A. and Lentz, V. : IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA, *J Immunol*, 145 : 161-166, 1990.

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫2. *Mycobacterium avium* Complex 感染マウスに誘導される
免疫抑制性マクロファージの性状

富岡 治明・斎藤 肇

島根医科大学微生物・免疫学教室

受付 平成 3 年 7 月 8 日

2. IMMUNOSUPPRESSIVE MACROPHAGES INDUCED IN *MYCOBACTERIUM*
AVIUM COMPLEX INFECTION INDUCED IN MICE

Haruaki TOMIOKA* and Hajime SAITO

(Received for publication July 8, 1991)

Profiles of generation and characteristics of splenic macrophages ($M\phi$ s), which suppress the ConA mitogenic response of splenic T cells, induced in mice during the course of *Mycobacterium avium* complex infections were investigated. In MAC-infected mice, reduction of ConA mitogenesis of spleen cells (SPCs) was seen after week 2 and the reduced state thereafter lasted as long as at least for 8 weeks. Splenic $M\phi$ s with a potent suppressive activity against SPC mitogenesis were transiently induced around 2 weeks after infection. Splenic $M\phi$ s of BALB/c (MAC-susceptible) mice had similar but somewhat weaker suppressor activity, as compared to those of CBA/JN (MAC-resistant) mice. The suppressor activity of BALB/c $M\phi$ s lasted much longer than did CBA/JN $M\phi$ s. MAC-induced splenic $M\phi$ s were markedly elevated in chemiluminescence and this coincided with increase in immunosuppressive activity. These $M\phi$ s inhibited the generation of IL-2-reactive T cell populations in response to ConA-signals, without showing any inhibitory effect against IL-2 producing ability of target T cells. Because immunosuppressive $M\phi$ s having the same characteristics were also induced in BALB/c athymic nude mice, thereby indicating that mature T cells are not prerequisite for induction of the present suppressor $M\phi$ s in MAC-infected host mice. Prostaglandins (PGs), nitric oxide radical ($NO\cdot$) and free long chain fatty acids are thought to play certain role in the expression of suppressor action of MAC-induced $M\phi$ s, because of the following reasons. Indomethacin (inhibitor of PG synthesis), myoglobin (scavenger of $NO\cdot$) overcome the suppressor activity of MAC-induced $M\phi$ s, and free fatty acids had an inhibitory activity against SPC mitogenesis. On the contrary, superoxide dismutase-catalase (active oxygen scavengers) did not overcome suppressor activity of MAC-induced $M\phi$ s and neither tumor necrosis factor- α , IL-1 α , IL-6 nor interferon- γ exhibited suppressive activity against SPC mitogenesis. Therefore, it is unlikely that either active oxygens, above monokines or lymphokine acts as

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

a mediator for the present immunosuppressive Mφs.

Key words : *Mycobacterium avium* complex, MAC, immunosuppressive macrophage

キーワード : *Mycobacterium avium* complex, MAC, 免疫抑制性マクロファージ

緒言

Mycobacterium avium complex (MAC) は宿主感染部位での滞留性が長く、局所性並びに全身性の抵抗力減弱を示す AIDS などの易感染宿主に好んで感染・発症し、また諸種化学療法剤に対する抵抗性が高いことなどから極めて難治性であることが知られている¹⁾。一般に重症抗酸菌感染症宿主では、T細胞やB細胞の機能不全を中心とした免疫不応性がみられることが多く、このことがあるいはMAC感染における感染部位での菌の滞留性の長い一因をなしているものかとも考えられる。

先にわれわれ²⁾³⁾は、実験的マウスMAC感染において、感染の比較的早期に免疫抑制性マクロファージ(Mφ)が誘導されることを報告した。今回は、その免疫不応性の成立において果たす役割についての検討成績について報告する。

方法

(1) 供試菌：教室保存の *M. intracellulare* N-260株あるいは京都大久世文幸教授より分与を受けた同31F093株のいずれもSmT集落株を用いた。

(2) マウス：8～12週齢のBALB/c系(Bcg^s：MAC感受性；日本クレア)並びにCBA/JN系(Bcg^r：MAC抵抗性；日本チャールスリバー)雄マウスを用いた。

(3) MAC感染脾Mφの免疫抑制活性：*M. intracellulare* (約 1×10^8)の尾静脈内感染1～16週後のマウスの脾細胞由来Mφの96 well microtiter tray上の単層培養あるいはプラスチック付着細胞画分(主としてMφよりなる)と正常マウスよりの脾細胞($1.25 \sim 2.5 \times 10^5$)とを混合培養し、ConA ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)に対する脾細胞の増殖性応答に及ぼす作用を、細胞への³H-チミジンの取り込みを指標として測定した²⁾。

(4) 脾細胞のIL-2産生能：上記(3)条件での脾細胞の25時間培養上清中のIL-2活性を、別途調製したConA blastoid cellあるいはCTLL-2細胞の増殖応答を指標として測定した³⁾。

(5) IL-2反応性T細胞の誘導：上記(3)の条件での48時間培養の非付着細胞を集めて別のwellに移し、 α -methyl mannosideを含むHanks液(HBSS)

で洗浄後、recombinant IL-2を含む培地中で72時間培養し、その増殖性応答を測定した²⁾。

(6) Mφ化学発光(CL)：脾細胞あるいは上述のプラスチック付着性細胞の $2 \sim 4 \times 10^6$ を10 mM HEPES, 0.1 mM luminol 加HBSS (pH7.4)に浮遊し、phorbol myristate acetate (PMA, 100 ng/ml)の添加の系で37°C, 3分間にわたってのCLをATP lumicounterで計測した²⁾。

結果

1. 脾における抑制性Mφ誘導の経時的推移

Fig. 1はMAC感染BALB/c系マウスの脾内CFU, 脾細胞のConA応答性, 脾Mφの正常T細胞のConA mitogenesisに及ぼす抑制活性, PMAで誘起されるCLを指標とした活性酸素産生能の推移をみたものである。脾細胞のConA応答性は2週以後に著しく低下し、以後はその状態が継続したのに対して、脾Mφの抑制活性並びにCLはいずれも感染2週で最も強く以後は減弱し、極めて近似したパターンをもって推移した。

なお、MAC感染BALB/c系マウスとCBA/JN系マウスにおける脾MφのT細胞のConA応答能に対する抑制活性の推移を見たところ、両系統マウスにおいて、感染2週後に強い抑制活性がみられ、以後減弱するパターンがみられた。しかし、この際、感染2週目での抑制活性はMAC抵抗性CBA/JN系マウスにおいて、MAC感受性BALB/c系マウスにおけるよりもやや強かったのに対し、それ以後のphaseでの減弱はBALB/cマウスにおいてCBA/JNマウスにおけるよりもかなり遅く、MAC感受性マウスでは抵抗性マウスよりも感染によって誘導される免疫抑制性Mφの機能がより長く持続する傾向が認められた。

2. 免疫抑制性Mφ誘導におけるT細胞の関与

MAC感染宿主の脾での免疫抑制性Mφの誘導における成熟T細胞の役割を知る目的で、MAC感染BALB/c系athymic nudeマウスの脾Mφの免疫抑制活性について検討した。Fig. 2はeuthymicマウスのプラスチック付着細胞の脾T細胞のConA mitogenesisに及ぼす抑制作用についてみたものである。いずれのマウスのMφにも強い抑制作用がみられたが、その活性はeuthymicマウスの方がathymicマウスよりも細胞当たりの活性では約4倍強かった。また、これらの脾MφのPMA

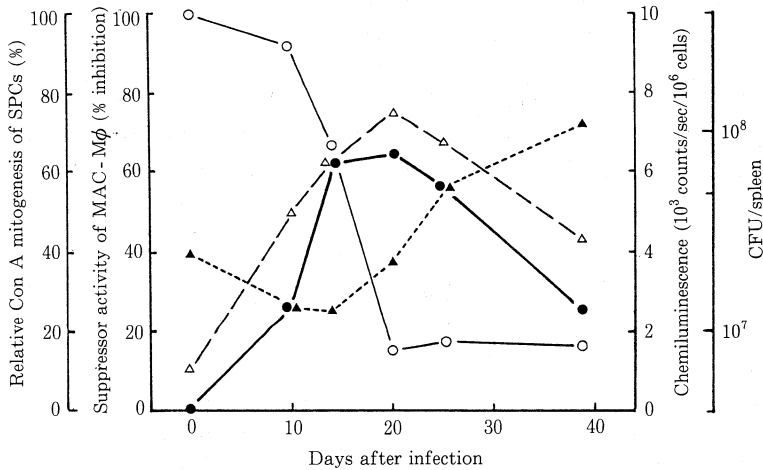


Fig. 1. Changes in ConA mitogenic response of splenic T cells (○), suppressor activity against SPC mitogenesis (●) of splenic Mφs and their PMA-triggered CL (△) during the course of MAC infection. ▲, CFU/spleen.

誘起 CL は, athymic マウスでは euthymic マウスに比べてはやや低かったが, ともに強いものであった。したがって, MAC 感染マウスの脾では, T 細胞機能依存性の Mφ の活性化から抑制性 Mφ の誘導の過程のみならず, T 細胞非依存性の Mφ 機能の亢進とそれに連動しての suppressor 活性の発現といった過程も同時に進行するものと思われる。また, これら MAC 感染 athymic および euthymic マウスの脾 Mφ は, 脾 T 細胞の IL-2 産生能にはいずれも有意な抑制作用は示さず, ConA シグナルによる IL-2 反応性 T 細胞の誘導を強く抑制し, その程度は euthymic Mφ > athymic Mφ であった。

3. MAC 誘導免疫抑制性 Mφ のターゲット

MAC 感染で誘導される免疫抑制性 Mφ が T 細胞のどのような機能に影響を及ぼすのかについて検討した。Table 1 は T 細胞の IL-2 産生能に及ぼす作用を見たものであるが, ConA blastoid cell の IL-2 増殖性応答を指標として見た限りでは, MAC 感染誘導脾 Mφ は T 細胞の IL-2 産生には抑制作用は示さず, むしろこれを亢進させる傾向が認められた。なお, CTLL-2 細胞の IL-2 増殖性応答を指標した場合でも, 同様な成績が得られた。

次に, ConA のシグナルを受けた T 細胞の IL-2 反応性 T 細胞サブセットへの活性化に及ぼす効果について検討した。Fig. 3-A は正常脾細胞を ConA 添加の培地中で MAC 誘導脾 Mφ と 48 時間混合培養した後, 非附着細胞を別の well に移し, 洗浄後に recombinant IL-2 を加えた培地中でさらに 72 時間培養して IL-2 に

対する増殖性応答をみたものであるが, IL-2 反応性 T 細胞の誘導は MAC 誘導脾 Mφ の混合培養によって強く抑制された。これに対して, 別途に調製した ConA blastoid cell を先の primary culture で得られた附着細胞と IL-2 添加培地中で混合培養した場合はそうした抑制はみられなかった (Fig. 3-B)。さらに, 別途行った実験において MAC 感染脾 Mφ は ConA シグナルによって誘導される脾 T 細胞の IL-2 receptor の発現を有意に抑制作用することが分かった。以上, MAC 感染で脾に誘導される抑制性 Mφ では主として ConA

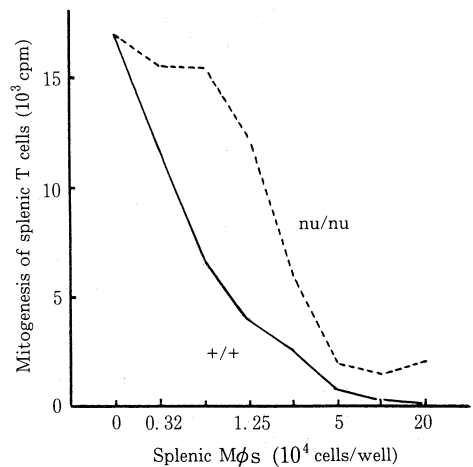


Fig. 2. Suppressive activity of splenic Mφs induced in euthymic and athymic mice infected with the MAC.

Table 1. Influence of MAC-induced Splenic M ϕ s on IL-2 Producing Ability of Splenic T cells^{a)}

Number of SPCs (10 ⁶ cells)	Number of MAC-induced splenic M ϕ s (10 ⁴ cells)	IL-2 production by splenic T cells (cpm; SEM, n=3)
—	—	40±6
—	1.8	36±5
—	4.8	68±13
—	7.2	281±178
1.0	—	25,625±279
1.0	1.8	29,318±4,354
1.0	4.8	36,830±726
1.0	7.2	33,515±1,950

a) The indicated number of spleen cells (SPCs) were cultured in the medium containing 2 μ g/ml of ConA with or without addition of MAC-induced splenic M ϕ s for 25 hr. The amount of IL-2 produced in the culture medium was measured in terms of proliferative response of ConA blastoid cells.

シグナルによる T 細胞の IL-2 反応性 T 細胞への活性化の過程にその作用点があるものように思われる。

4. MAC 誘導脾 M ϕ の免疫抑制性メディエーター

他の細菌感染宿主で誘導される抑制性 M ϕ のメディエーターの 1 つとして知られる prostaglandin (PG) の関与についてみたところ、MAC 誘導脾 M ϕ の抑制活性は

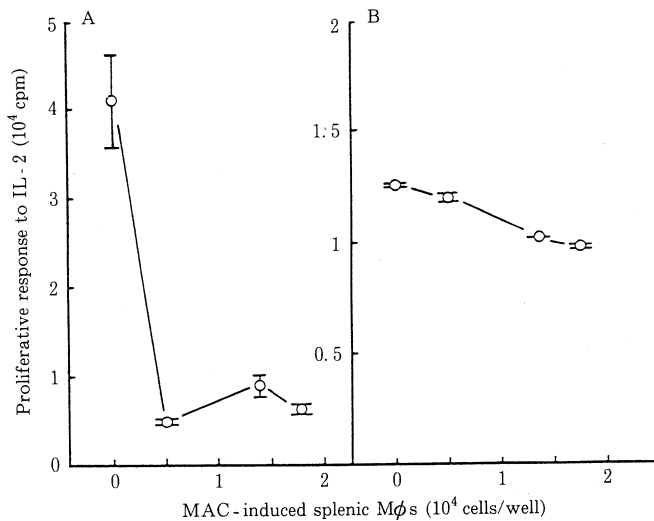


Fig. 3. Evidence for the suppression of the generation of IL-2-reactive T cells (A) without causing reduction in the IL-2-induced proliferation of the IL-2-reactive T cells (B) by the MAC-induced splenic M ϕ s. (A) Nonadherent cells harvested from ConA-induced SPC culture with or without MAC-induced splenic M ϕ s were further cultivated in the medium containing exogenous IL-2. (B) ConA blastoid cells were co-cultured with adherent cells from the ConA-induced SPC culture as in (A) in the presence of exogenous IL-2.

Table 2. Effects of N^G - N^G -dimethyl Arginine (Arg) and Myoglobin on the Immunosuppressive Activity of MAC-induced Splenic M ϕ s

Number of SPCs seeded for preparation of M ϕ monolayer (10^6 cells)	Addition	Relative SPC mitogenesis (%)
—	—	100 ^{a)}
1	None	40.6 \pm 7.1
1	N^G - N^G -dimethyl Arg	25.2 \pm 0.3
1	Myoglobin	52.2 \pm 0.5
2	None	19.3 \pm 2.9
2	N^G - N^G -dimethyl Arg	21.3 \pm 1.3
2	Myoglobin	48.9 \pm 1.8

a) SPC mitogenesis in the absence of splenic M ϕ s was as follows : None added, 98,986 \pm 4,402 cpm ; N^G - N^G -dimethyl Arg added, 11,073 \pm 303 cpm ; Myoglobin added, 34,284, \pm 1,206 cpm.

PG合成阻害剤である indomethacin ($1\mu\text{g/ml}$)の添加により、脾 M ϕ の添加数が 3.2×10^4 cells/well と少ない系では 100%解除されることから、MAC感染で誘導される抑制性 M ϕ の作用発現においても PG が重要な役割を演じているといえよう。

次に、活性酸素分子種については、MAC誘導 M ϕ の免疫抑制活性は、xanthine oxidase-acetaldehyde系で産生される活性酸素の大腸菌に対する殺菌活性の大部分を scavenge するに足る量の superoxide dismutase-catalase の添加 (各 100 および 2,000 units/ml) によっても解除されえなかったことよりして、 O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素分子種が本 M ϕ の抑制作用の発現のメディエーターとなっている可能性は少ないといえよう。

最近、L-arginine (L-Arg) の代謝過程での NO_2^- / NO_3^- の生成に伴って生ずる $NO\cdot$ が、M ϕ の抗腫瘍作用や抗菌活性のメディエーターとなっている可能性が示唆されている⁴⁾。Table 2 は L-Arg 代謝阻害剤である N^G - N^G -dimethyl-L-Arg 並びに $NO\cdot$ の scavenger である myoglobin 添加の影響について検討したものである。 N^G - N^G -dimethyl-L-Arg では M ϕ の免疫抑制活性の増強が、逆に myoglobin ではその若干の低下がみられた。このことより、L-Arg 代謝以外の経路で産生される $NO\cdot$ が部分的にせよ MAC 誘導脾 M ϕ の T 細胞機能抑制活性の発現に何らかの役割を演じている可能性が考えられる。

最近、MAC 菌体よりの glycopeptidolipid が、T

細胞のマイトジェン応答を抑制することが報告されているが⁵⁾、われわれは MAC よりの phospholipid 画分にもそうした活性のあることを見いだしている (未発表)。また、M ϕ は活性化に伴い遊離脂肪酸の産生能が亢進することが知られている。そこで長鎖遊離脂肪酸の脾細胞の ConA 応答に及ぼす作用をみたところ、oleic acid, linoleic acid, linolenic acid および arachidonic acid はいずれも $25\mu\text{g/ml}$ の添加で ConA mitogenesis を強く阻害し、その阻害率は各々 99, 92, 31 および 65%であった。したがって、MAC 誘導 M ϕ の T 細胞機能抑制活性発現においては、少なくともそれらの部分的関与の可能性が考えられる。この場合、供試いずれの脂肪酸とも T 細胞の IL-2 産生能に対しては強い阻害作用を示したが、IL-2 反応性 T 細胞への活性化にはさしたる抑制を及ぼさないことが分かった。他方、MAC 感染で誘導される脾 M ϕ では、IL-2 産生能の低下はほとんど見られず、上述したように、IL-2 反応性 T 細胞サブセットへの活性化の抑制が強くみられており、このことは、あるいは遊離脂肪酸のメディエーターとしての関与は余り大きいものではないことを示唆しているものと思われる。

Table 3 は、腫瘍細胞に対しては強い細胞毒性を示し、M ϕ に対しては活性化作用を示すことの知られているモノカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α) の脾 T 細胞の ConA mitogenesis に及ぼす作用をみたものであるが、脾 T 細胞の ConA 応答能は TNF- α の 156~2,500 units/ml の添加、あるいはそれと interferon-

Table 3. Effect of Some Monokines and IFN - γ on ConA Mitogenesis of Spleen Cells (SPCs)

Addition (units/ml)	SPC ConA mitogenesis (cpm \pm SEM, n=3)
-	79, 141 \pm 1, 159
TNF - α (156)	84, 224 \pm 3, 717
TNF - α (625)	78, 049 \pm 2, 218
TNF - α (2, 500)	75, 640 \pm 959
IFN - γ (156)	77, 067 \pm 1, 182
IFN - γ (625)	72, 997 \pm 386
IFN - γ (2, 500)	67, 762 \pm 466
IFN - γ (500)	75, 526 \pm 663
IFN - γ (500) + TNF - α (20)	72, 640 \pm 2, 856
IFN - γ (500) + TNF - α (320)	76, 322 \pm 759
IFN - γ (500) + TNF - α (5, 000)	73, 064 \pm 1, 728
-	40, 259 \pm 1, 255
IL - 1 (6. 25)	39, 260 \pm 409
IL - 1 (12. 5)	40, 448 \pm 2, 067
IL - 1 (100)	40, 560 \pm 1, 109
-	31, 236 \pm 230
IL - 6 (156)	32, 746 \pm 755
IL - 6 (625)	31, 130 \pm 1, 119
IL - 6 (2, 500)	25, 891 \pm 189

SPCs (2×10^5) were cultured in the medium containing $2 \mu\text{g/ml}$ of ConA with or without addition of indicated cytokines.

γ (IFN - γ) との同時添加によっても何らの影響も受けなかった。また、別のモノカインである IL - 1α 並びに IL - 6 の添加によっても、高濃度の IL - 6 で弱い阻害がみられはしたが、両者において有意な抑制はみられなかった。したがって、TNF - α 、IL - 1α 、IL - 6 といったモノカインあるいは IFN - γ が ConA 応答抑制の直接のメディエーターとして働いている可能性は少ないものようである。

以上、MAC 感染により誘導される免疫抑制性 M ϕ の作用発現のメディエーターとしては、上述の成績よりみて、PG、NO \cdot 、遊離脂肪酸並びにそれらの相乗作用が考えられる。他に M ϕ の産生する抑制性サイトカインである transforming growth factor - β^3 、lymphocyte blastogenesis inhibitory factor⁷⁾ なども重要な役割を演じているものと思われるが、その詳細については今後の検討に待ちたい。

考 察

以上の成績より、MAC 感染マウスでは T 細胞依存性の機構のみならず、T 細胞非依存性のメカニズムによっても脾細胞の ConA mitogenesis に対する抑制性 M ϕ が誘導され、これが T 細胞の IL - 2 反応性 T 細胞への活性化の過程を抑制することが明らかになった。この免疫抑制性 M ϕ はいずれも MAC 感染 2 週間後に最も強く誘導されてくるが、その後本活性は急速に低下し、感染 10 週間にはみられなくなってしまうのに対して、脾細胞の ConA 応答能は感染 2 週後にみられた著しい低下がずっと持続した。したがって本 M ϕ は、MAC 感染によって惹起される T 細胞の機能低下の直接の原因とは成り得ないものようであり、むしろ感染中期から誘導される suppressor T cell 主導型の免疫不応性⁸⁾ の成立に何らかの役割を演じているものと思われる。また、脾 M ϕ の T 細胞機能抑制活性の推移は、活性酸素産生能のそれとよく連動しており、これは免疫抑制性 M ϕ が

いわゆる活性化Mφの裏返しの存在であるとする考え方を支持するものである。

先にわれわれは、*M. tuberculosis* 感染マウスでもその活性に程度の差はあるが、今回のMAC感染でみられたと同様な性状を有する免疫抑制性Mφが誘導されてくることを明らかにしたが、このことよりすれば、MAC感染宿主における免疫抑制性Mφの誘導という現象はMACに特異的なものではなく、抗酸菌などのいわゆるpersistenceの高い寄生菌による慢性感染に普遍的に見られるものなのかもしれない。

MACは*M. tuberculosis*ほどビルレンスは強くはないが、いわゆる「活性化Mφ」の殺菌メカニズムに対する抵抗性は*M. tuberculosis*に比べて強く、宿主内でのpersistenceは極めて高いことが知られている⁹⁾。先のわれわれの検討でも¹⁰⁾、MAC(*M. intracellulare*)をマウスに静脈内接種した場合、強毒のSmT集落株のみならず弱毒のSmD集落株による場合でも、感染1週目までは肝内CUFの減少、即ち肝Mφによる感染菌の排除は全くみられなかった。したがってMACでは、感染後6~12時間で一過性の肝内CFU減少のみられるリステリアの場合¹¹⁾とは異なり、肝の常在Mφあるいは感染後に血流中より集積する炎症Mφの殺菌作用に対して強い抵抗性を有するものと思われる。

さらにわれわれが別途行った実験で、IFN- γ およびTNF- α の両者が宿主Mφの*M. tuberculosis* complexに対する*in vitro*抗菌活性を亢進させるが、MACを始めとする他種抗酸菌に対しては、IFN- γ 処理Mφにおいてのみ抗菌活性の亢進がみられることを明らかにしており(論文執筆中)、MAC感染に対する宿主抵抗性の発現におけるT細胞依存性免疫機構の重要さがうかがわれる。事実、BALB/c euthymicマウスとathymic nudeマウスとでは、感染4週以後、前者では数カ月間にわたって徐々に感染が進行するのに対して、後者では臓器内CFUの急速な増加がみられ、速やかに終末感染へと移行していくことが明らかになった¹⁰⁾。

今回の検討においてMAC感染で誘導される免疫抑制性Mφは、それ自体が生体内でのT細胞機能の低下の直接の原因になるものとは考え難いが、他方、T細胞のmitogenesisに対する抑制作用などを介した何らかのメカニズムでいわゆる免疫デプレッションを招来し、MAC抗原に特異的な抑制性T細胞の誘導、ひいてはT細胞の抗原応答不全を惹起するものと思われる。したがって、このような観点からすれば免疫抑制性Mφの作用とMACの宿主体内での滞留性との間には何らかの関係が存在するものといえよう。

結 語

M. avium complex (MAC) 感染マウスの脾細胞中

に誘導される免疫抑制性Mφの性状について検討し以下の知見を得た。

1) MAC感染2週以後少なくとも8週間にわたって、脾T細胞のConA増殖性応答能の低下がみられた。他方、脾細胞のConA応答に対する抑制性Mφが、感染2週間後の宿主脾に一過性に誘導された。この脾Mφの抑制活性はMAC抵抗性のCBA/JN系マウスと感受性のBALB/cマウスとでは同程度であったが、前者では後者におけるよりもより速やかに減弱した。

2) MAC感染誘導脾Mφは、T細胞のConAシグナルに反応してのIL-2反応性サブセットへの活性化を強く抑制したが、IL-2産生能は阻害しなかった。

3) BALB/c athymic nudeマウスでも、euthymicマウスにおけると同様な性状を有する抑制性Mφが誘導されたことから、抑制性Mφの誘導には成熟T細胞の関与は必須ではないものといえよう。

4) MAC誘導脾Mφの脾細胞のConA応答に対する抑制作用のメディエーターとしては、PG, NO-, 遊離脂肪酸のいずれかあるいはそれらの協同作用が考えられたが、活性酸素やTNF, IL-1, IL-6, IFNなどのサイトカインの関与の可能性は低いものと思われた。

文 献

- 1) Wolinsky, E.: Nontuberculous mycobacteria and associated disease, *Am Rev Respir Dis*, 119: 107-159, 1979.
- 2) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K.: Characteristics of immunosuppressive macrophages induced in host spleen cells by *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* infections in mice, *Microbiol Immunol*, 34: 283-297, 1990.
- 3) Tomioka, H., Saito, H., Yamada, Y.: Characteristics of immunosuppressive macrophages induced in spleen cells by *Mycobacterium avium* complex infections in mice, *J Gen Microbiol*, 136: 965-973, 1990.
- 4) Stuehr, D.J., Nathan, C.F.: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition of tumor target cells, *J Exp Med*, 169: 1543-1555, 1989.
- 5) Brownback, P.E., Barrow, W.W.: Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex, *Infect Immun*, 56, 1044-1050, 1988.
- 6) Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wong, H.L. et al.: Transforming growth factor- β is a potent

- immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation, *J Immunol*, 140 : 3026-3032, 1988.
- 7) 土生芳樹, 杉村和久 : 抑制性サイトカイン, *Annual Review 免疫* 1989, p. 100~108, 中外医学社, 1989.
- 8) Bullock, W.E., Carlson, E.M., Gershon, R. K.: The evolution of immunosuppressive cell populations in experimental mycobacterial infection, *J Immunol*, 120 : 1709-1716, 1978.
- 9) Orme, I.M., Collins, F.M.: Resistance of various strains of mycobacteria to killing by activated macrophages *in vivo*, *J Immunol*, 131 : 1425-1454, 1986.
- 10) Saito, H., Tomioka, H.: The role of macrophages in host defence mechanisms against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice, *Res Microbiol*, 141 : 206-212, 1990.
- 11) Mitsuyama, M., Takeya, K., Nomoto, K. et al.: Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*, *J Gen Microbiol*, 106 : 165-171, 1978.

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫3. *M. avium* Complex に対する肺胞マクロファージ
の細胞内殺菌機序

菅 守 隆**

熊本労災病院内科

土井俊徳・赤池孝章・安藤正幸

熊本大学医学部第1内科**

受付 平成3年7月8日

3. INTRACELLULAR KILLING MECHANISMS OF ALVEOLAR MACROPHAGES
AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEXMoritaka SUGA*, Toshinori DOI, Takaaki AKAIKE
and Masayuki ANDO

(Received for publication July 8, 1991)

To clarify the intracellular killing mechanisms of alveolar macrophages against *Mycobacterium avium* complex, effects of cytokines on O_2^- and NO_2^- production from normal and BCG-induced alveolar macrophages were studied. Intracellular growth of *M. avium* complex was inhibited in the alveolar macrophages stimulated by TNF, but not IFN. Enhancement of O_2^- production by normal alveolar macrophages stimulated by cytokines, was associated with the inhibition of intracellular growth of *M. avium* complex.

However, when NO_2^- production by the alveolar macrophages was enhanced by the stimulating of IFN or IFN+TNF, in the presence L-arginine in the culture medium, their defense activity against *M. avium* complex decreased.

Key words : Alveolar macrophage, *Mycobacterium avium* complex, Superoxide (O_2^-), Nitrite (NO_2^-), Cytokines

キーワード : 肺胞マクロファージ, *M. avium* complex, スーパーオキシド (O_2^-), 亜硝酸イオン (NO_2^-), サイトカイン

はじめに

結核菌や非定型抗酸菌などの細胞内寄生性細菌に対す

る感染防御には、活性化されたマクロファージ系細胞の細胞内殺菌能の亢進が不可欠である。その活性化機序の1つとして、サイトカインの役割が考えられている。こ

* From the Internal Medicine of Kumamoto Rosai Hospital, 1670 Takehara-machi Yatsushiro, Kumamoto 866 Japan.

これらのサイトカインのうち, tumor necrosis factor- α (TNF) は, 活性化されたマクロファージより産生されるモノカインで¹⁾, 感染の場において重要な役割をしていることが考えられている。また, interferon- γ (IFN) は抗ウイルス作用とともにマクロファージ活性化作用を有することが知られている。

これら細胞内寄生性細菌に対する細胞内殺菌には, 従来よりスーパーオキシド (O_2^-) を始めとする活性酸素が重要な役割を果たしていると考えられる²⁾³⁾。また, 最近, マクロファージは種々の刺激により L-arginine (L-arg) を利用して, その代謝産物である NO , NO_2^- , NO_3^- を産生し, これらの物質がメディエーターとして細胞内代謝に関与している可能性が示唆されている。

そこで, 今回, *Mycobacterium avium* complex (MAC) に対する肺胞マクロファージ (PAM) の細胞内殺菌機構を明らかにする目的で, IFN, TNF などのサイトカイン存在下で MAC に対する PAM 細胞内殺菌について検討した。さらに, その機序を PAM の O_2^- 産生能や PAM の L-arg 代謝産物の産生に及ぼすサイトカインの影響の点から検討するとともに, L-arg 代謝産物による O_2^- 産生能への影響などについて検討した。

方 法

実験動物: Wister rat 雄 (300~400 g) を用いた。

PAM: ラットを pentobarbital の腹腔内投与にて麻酔し, 腹部大動脈切断により失血死させた後, 気管切開してテフロンチューブを挿入し, 2mMEDTA を含む phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) 10ml で 10 回洗浄した。洗浄液を 400 xg, 10 分間遠心後, 沈渣を Krebs Ringer Phosphate (KRP, pr 124) に再浮遊させ, 2 回洗浄した後, PAM 浮遊液として用いた。

細菌: *M. intracellulare* は, 京都大学胸部疾患研究所第一内科久世教授より供与を受けた *Mycobacterium avium* complex (MAC) (31F093 株) をデュボス液体培地で増殖させ, 10 日目の発育菌液を $-80^\circ C$ に保存した。使用時に, KRP に浮遊させ, 2,500 xg, 30 分間遠心を 2 回繰り返した後, KRP に浮遊させ, 吸光度 570 nm で 0.20 になるように調整し, 5.0×10^7 viable unit/ml の菌浮遊液として使用した。

サイトカイン: recombinant murine IFN は塩野義製薬より, recombinant human TNF は旭化成より供与を受けた。PAM 培養液中に濃度, 添加時期, 培養時間を変えてサイトカインを添加し, PAM の O_2^- 産生能, NO_2^- 産生量, MAC に対する細胞内増殖抑制への影響を検討した。

O_2^- 産生能: PAM の O_2^- 産生能は phorbol myristate acetate 刺激によるチトクローム C 還元法にて測定した。

培養液中の NO_2^- 量: Griess 試薬 (1% sulfanilamide / 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride / 2% H_2PO_4) を加えて一定時間反応させた後, 550 nm における吸光度から標準曲線により求めた。

L-arg による PAM O_2^- 産生能と NO_2^- 産生量への影響: L-arg による PAM O_2^- 産生能と NO_2^- 量への影響は, L-arg を含まない RPMI1640 培養液に種々の濃度の L-arg を添加して検討した。また, $NaNO_2$ を添加して NO_2^- の直接作用による O_2^- 産生能への影響をみた。また, L-arg のアナログであり, NO_2^- の competitive inhibitor の N^G -monomethyl L-arginine を添加して PAM の O_2^- 産生能と NO_2^- 産生量への影響を検討した。

PAM による MAC の細胞内増殖抑制: KRP に浮遊させた菌と PAM (10:1) を Lab. Tec chamber slide に入れ, 5 時間培養後, 2 回洗浄して非貪食菌を除去した。培養液を RPMI1640 (10% FCS 含) に交換したのち, サイトカインの濃度, 添加時期を変えて培養したサイトカイン添加群と非添加群の 2 群に分けて培養し, 培養 24, 48 時間後の細胞内菌をフクシン液染色して count するとともに, これらの菌を還元培養して 2 週間後にコロニーを count した。また, Lab. Tec chamber slide のほか, Falcon tube, 24 穴プレートなどで同様の検討を行った。

結 果

サイトカイン存在下における MAC の PAM 細胞内増殖抑制作用: PAM に菌を貪食させた後, TNF を添加し, 48 時間培養した PAM は, サイトカイン非添加群に比べて細胞内菌数が有意に少なく, TNF は MAC の細胞内増殖を抑制した (Fig. 1)。これらの細胞内増殖抑制機序を明らかにする目的で以下の実験を試みた。

PAM の O_2^- 産生能に及ぼすサイトカインの影響: 採

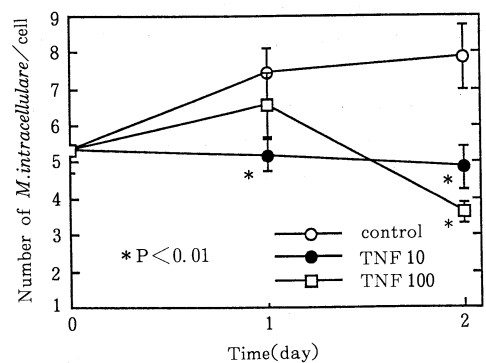


Fig. 1. Effect of TNF on the inhibition of intracellular growth of *M. avium* complex in normal alveolar macrophages.

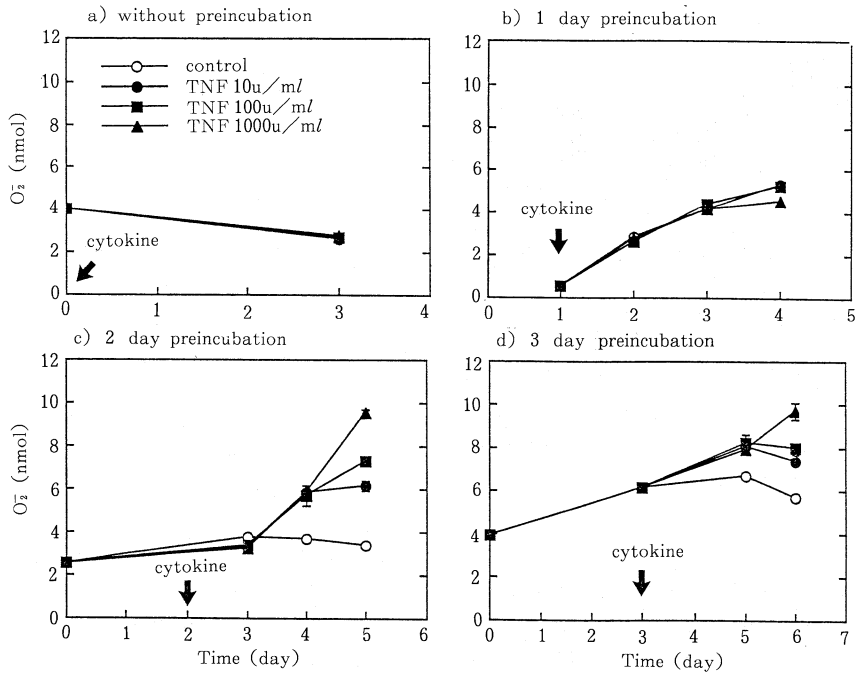


Fig. 2. O_2^- production from normal alveolar macrophages stimulated by TNF.

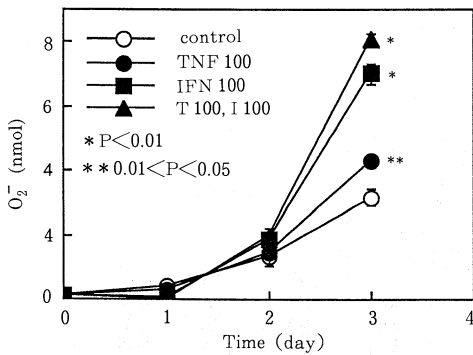


Fig. 3. O_2^- production from BCG-induced alveolar macrophages stimulated by TNF or/and IFN.

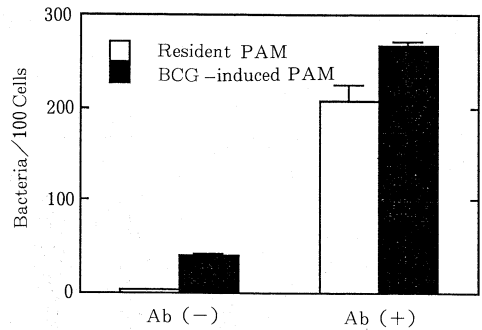


Fig. 4. Phagocytosis of *M. avium* complex by normal and BCG-induced alveolar macrophages, with or without specific antibody to *M. avium* complex.

取直後から2, 24, 72時間ガラス面に付着させて preincubation した PAM に TNF を添加し、さらに 72 時間まで培養した PAM の O_2^- 産生能を検討した。その結果、採取直後および 2~24 時間 preincubation した PAM に TNF を添加しても PAM の O_2^- 産生能の亢進は認められなかった (Figs. 2-a, 2-b) が、48 時間以上 preincubation した後に TNF を添加培養すると O_2^- 産生能の著明な亢進が認められた (Figs. 2-c, 2-d)。INF についても同様な成績であった。このことは、正

常 PAM にサイトカインが作用するには何らかの priming が必要と考えられた。

そこで、炎症局所の PAM として BCG 肉芽腫より採取した PAM について同様の検討をした。その結果、BCG 肉芽腫より採取した PAM のサイトカインによる O_2^- 産生能は、正常 PAM と異なり、preincubation なしにサイトカインにより O_2^- 産生能が亢進することが明らかとなった (Fig. 3)。

正常 PAM と BCG 肉芽腫 PAM の貪食能と MAC

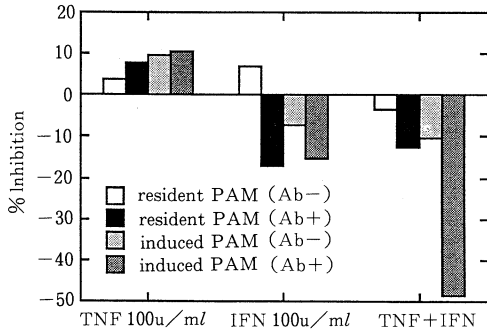


Fig. 5. Effect of TNF and/or IFN on inhibition of intracellular growth of *M. avium* complex in normal alveolar macrophages, with or without specific antibody to *M. avium* complex.

に対する細胞内増殖抑制作用：MAC特異抗体IgGを結合した菌も結合していない菌も正常PAMに比べてBCG肉芽腫より採取した肺マクロファージの貪食能が亢進していた (Fig. 4)。さらに、これらの細胞についてサイトカインと特異抗体による細胞内増殖抑制作用を検討した結果、TNF添加群ではいずれのPAMも細胞内増殖を抑制するが、特異抗体の有無による差は認められなかった。また、IFN添加群では正常PAMを除いて細胞内

増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 5)。

サイトカイン刺激によるPAMのL-arg代謝産物の産生能：IFN濃度を100 u/mlと1,000 u/mlに一定にして、TNF濃度を0から1,000 u/mlまで変化させた時のPAMの NO_2^- と O_2^- 産生量を検討した。 NO_2^- 産生はL-arg非存在下ではほとんど認められず、L-argが存在するとIFN単独でも比較的少量の NO_2^- を産生するが、TNF単独ではほとんど産生しなかった。INFによる NO_2^- 産生能はTNFによって濃度依存的に増強された。一方、L-arg存在下での O_2^- 産性能は、TNF濃度に関係なく減少し、特にIFNが高濃度の時著明であった (Fig. 6)。

サイトカイン刺激による NO_2^- と O_2^- 産生能について、培養液中のL-arg濃度変化の影響を検討した。 NO_2^- 産生量はL-arg濃度依存性に増加し、一方、 O_2^- 産生能は逆にL-arg濃度依存性に減少した (Fig. 7)。

L-arg濃度を一定にして、これにL-arg拮抗物質を種々の濃度で添加するとサイトカインにより増強された NO_2^- 産生能は、濃度依存性に減少し、 O_2^- 産性能は逆に増加した (Fig. 8)。

次に、L-argを含まない培養液に種々の濃度の NaNO_2 を添加して NO_2^- を発生させ、 NO_2^- の直接作用による O_2^- 産生能への影響を検討した。その結果、 NO_2^- 自身はPAMの O_2^- 産生能に何ら影響を与えなかった (Fig. 9)。

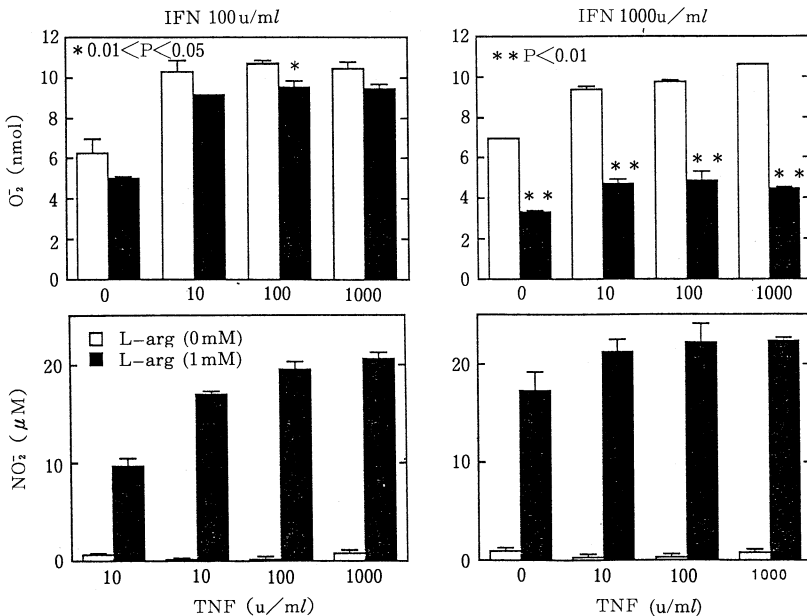


Fig. 6. O_2^- and NO_2^- production from normal alveolar macrophages stimulated by IFN and/or TNF, in the presence or the absence of L-arginine in the culture medium.

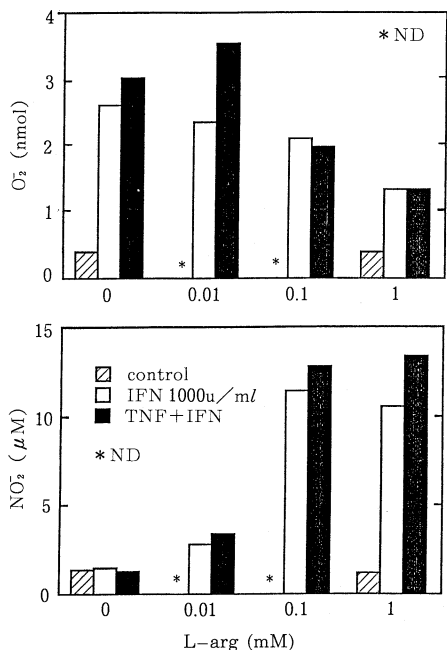


Fig. 7. Effect of L-arginine cocentration on O₂⁻ and NO₂⁻ production by normal alveolar macrophages stimulated by IFN and TNF.

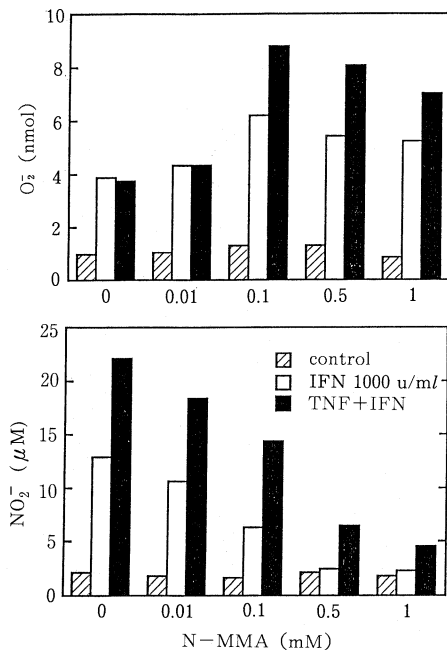


Fig. 8. Effect of N-MMA on O₂⁻ and NO₂⁻ production by normal alveolar macrophages stimulated by IFN and TNF, in the presence of L-arginine in the culture medium.

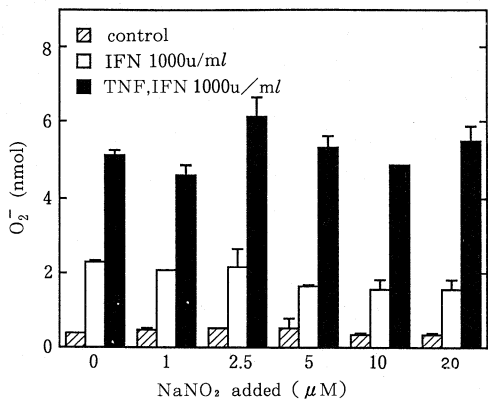


Fig. 9. Effect of NaNO₂ on O₂⁻ production by normal alveolar macrophages stimulated by IFN and/or TNF.

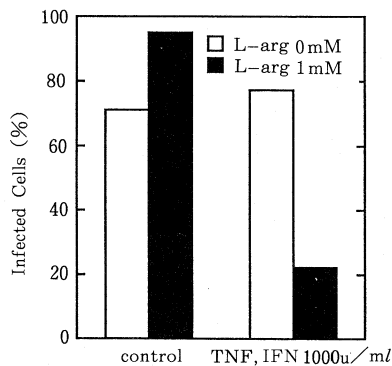


Fig. 10. Phagocytosis of *M. avium* complex by normal macrophages stimulated by IFN and TNF, in the presence or the absence of L-arginine in the culture medium.

PAMのNO₂⁻産生能とPAMの貪食、細胞内殺菌機能との関係：L-arg存在下で高濃度のサイトカイン刺激によりNO₂⁻産性能が亢進しているPAMは、貪食能が著しく低下することが明らかとなった。(Fig. 10)。

また、PAMが産生するNO₂⁻量とMACの細胞内増殖の抑制との関係を検討した。L-argを含む培地でサ

イトカインとともにNO₂⁻産生inhibitorを添加して、産生するNO₂⁻を抑制したPAMは、MACの細胞内増殖抑制率が増加した(Fig. 11)。

考 案

TNFとIFNのサイトカインを用いてMACに対す

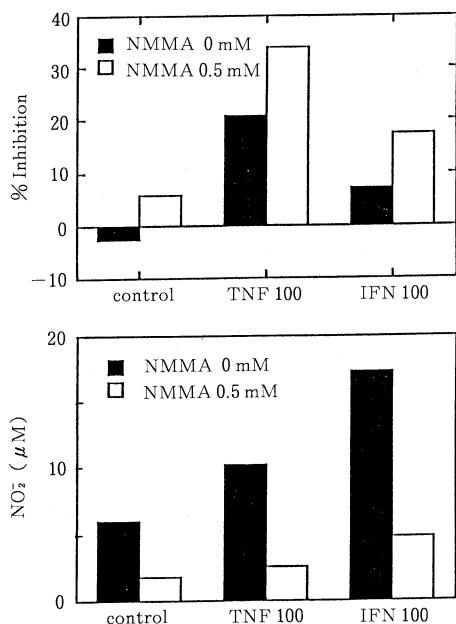


Fig. 11. Effect of N-MMA on inhibition of intracellular growth of *M. avium* complex in normal alveolar macrophages stimulated by TNF or IFN, in the presence of L-arginine in the culture medium.

る PAM の細胞内殺菌機構について、O₂⁻ および NO₂⁻ 産生機構の面より検討した。

TNF は、10 u/ml の低濃度から 1,000 u/ml の高濃度まで正常 PAM および炎症局所の PAM のいずれに対しても MAC の細胞内増殖を抑制し、その時の PAM の O₂⁻ 産生能は亢進していた。これまで、細菌⁴⁾ やウイルス感染⁵⁾ 時に血清中に TNF 活性が見出されることや、TNF を *in vitro*^{6)~8)}、*in vivo*⁹⁾ で作用させることにより、種々の pathogen の増殖が抑制され、感染動物の致死率が減少することなどから、TNF は感染の場において重要な役割をしていることが考えられている。この機序として、主として好中球機能の亢進^{10)~14)}、とくに活性酸素の役割が重要と考えられている。また、TNF がマクロファージ機能を亢進するとの報告があり⁹⁾¹⁵⁾、今回のわれわれの検討でも、PAM の活性酸素の産生能の亢進が MAC の細胞内増殖抑制の一因として関与していると考えられる成績であった。

一方、IFN は PAM による MAC の細胞内増殖抑制に一定の効果を示さず、条件によっては増殖を促進させた。これまで、IFN はマクロファージ内の Mycobacteria の増殖を促進させる¹⁶⁾¹⁷⁾ ことや、菌種によって異なる¹⁸⁾ との報告がある。この機序については不明であるが、今回われわれの検討で明らかのように、L-arg

存在下で IFN が、NO₂⁻ 産生能を亢進させて、貪食能および O₂⁻ 産生能などの感染防御機能を低下させ、細胞内増殖を促進させる可能性が示唆された。

TNF および IFN が正常 PAM の O₂⁻ 産生能を亢進するには、一定の preincubation を必要とし、一方、BCG 肉芽腫病巣の PAM に対しては直ちに作用したことより、サイトカインによる正常 PAM の O₂⁻ 産生亢進作用には、何らかの priming を必要することが示唆された。

これまで、*in vitro* においてマクロファージに TNF を作用させると O₂⁻ 産生が亢進すること¹⁵⁾ や貪食した菌を殺菌する⁹⁾ との報告が見られるが、それらのマクロファージは免疫複合体と併用したり、末梢血単球を培養したマクロファージ様細胞を使用したり、ある程度 priming された状態であると考えられる。正常 PAM には何らかの抑制がかかっている可能性が考えられており、その要因としてサーファクタントの関与が考えられている¹⁹⁾。

特異抗体 IgG は、貪食能を亢進させるが、細胞内増殖抑制作用に寄与しなかった。BCG を用いて細胞内殺菌を検討したわれわれの以前の成績では、肺内 IgG が PAM の O₂⁻ 産生能を亢進させ、細胞内殺菌能をも亢進させること²⁾、また、特異抗体 IgG が細胞内殺菌機序に重要な役割を果たすことを報告した²⁰⁾。今回の MAC を使用した成績との相違は菌種の違い以外明らかでない。

L-arg 存在下でサイトカイン刺激による PAM の NO₂⁻ 産生能は、IFN 単独刺激により亢進し、これは TNF により増強されるが、TNF 単独刺激では産生されなかった。サイトカイン刺激で NO₂⁻ 産生能が亢進した PAM は、O₂⁻ 産生能が逆に低下することが明らかとなった。このサイトカイン刺激による PAM の NO₂⁻ 産生能は L-arg の濃度依存性に増加し、O₂⁻ 産生能は逆に低下した。また、L-arg 拮抗物質により濃度依存性に NO₂⁻ 産生能は低下し、O₂⁻ 産生能は逆に増加した。しかし、NO₂⁻ 自身は直接 O₂⁻ 産生能に影響しなかった。これらの成績は、PAM の L-arg 代謝産物の産生は、作用するサイトカインの種類とその濃度により異なり、また、サイトカイン刺激により PAM の産生された L-arg 代謝産物が自己調節的に自らの O₂⁻ 産生能を制御している可能性が示唆された。

これまで、L-arg 代謝産物が感染防御に関与する報告と²¹⁾、関与しない報告があり²²⁾、現在一定の見解が得られていない。今回のわれわれの成績では、NO₂⁻ は、MAC に対する PAM の細胞内増殖抑制に関与せず、NO₂⁻ 産生能の亢進は貪食能および O₂⁻ 産生能などの感染防御機能を低下させ、細胞内増殖を促進させることが示唆された。

これらの結果を踏まえて、今後、MAC に対する

マクロファージの細胞内殺菌機構を解明するには、TNFのようなサイトカインと他のマクロファージ活性化因子との相互作用、貪食された菌が存在する phagosome と lysosome fusion の促進機序、これに続いて起こるライソゾーム酵素と O_2^- のような細胞内殺菌物質との相互作用など、多面的な検討が必要と考えられる。

結 語

Mycobacterium avium complex (MAC) に対する肺胞マクロファージ (PAM) の細胞内殺菌機構を明らかにする目的で、サイトカインが PAM の細胞内殺菌作用に及ぼす影響と、その機序を O_2^- と L-arg 代謝産物 NO_2^- 産生能の面より検討した。サイトカインのうち TNF は MAC が PAM 細胞内で増殖するのを抑制したが、IFN は一定の傾向を示さなかった。 O_2^- 産生能の亢進は細胞内殺菌機序の重要な一因と考えられたが、 NO_2^- 産生量の増加は PAM 感染防御機能を抑制すると考えられた。

文 献

- 1) Curie, G.A. and Basham., C.: Activated macrophages release a factor which lyses malignant cells but not normal cells, J Exp Med, 142 : 1600-1605, 1975.
- 2) Ando, M. et al.: Activation of alveolar macrophages exposed to lavage-procured immunoglobulin G obtained from normal rabbit lungs, Infect Immun, 20 : 476-484, 1978.
- 3) Ando, M. et al.: Superoxide production in pulmonary alveolar macrophages and killing of BCG by the superoxide-generating system with or without catalase, Infect Immun 24 : 404-410, 1979.
- 4) Williams, D.M. et al.: Tumor necrosis factor alpha is a cytotoxin induced by murine Chlamydia trachomatis infection, Infect Immun, 57 : 1351-1355, 1989.
- 5) Aderka, D. et al.: Tumor necrosis factor induction by Sendai virus, J Immunol 136 : 2938-2942, 1986.
- 6) Stevenson, M.M. and Ghadirian, E.: Human recombinant tumor necrosis factor alpha protects susceptible A/J mice against lethal Plasmodium chabaudi as infection, Infect Immun, 57 : 3936-3939, 1989.
- 7) Cross, A.S. et al.: Pretreatment with recombinant murine tumor necrosis factor α cachectin and murine interleukin 1 α protects mice from lethal bacterial infection, J Exp Med, 169 : 2021-2027, 1989.
- 8) Desiderio, J.V. et al.: Protection of mice against Listeria monocytogenes infection by recombinant human tumor necrosis factor alpha, Infect Immun, 57 : 1615-1617, 1989.
- 9) Bermudez, L.E.M. and Young, L. S.: Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- γ , is associated with macrophage killing of Mycobacterium avium complex, J Immunol, 140 : 3006-3013, 1988.
- 10) Tsujimoto, M. et al.: Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils, Biochem Biophys Res Commun, 137 : 1094-1100, 1986.
- 11) Larrik, J. W. et al. : Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes, Blood, 69 : 640-644, 1987.
- 12) Klebanoff, S.J. et al.: Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor, J Immunol, 136 : 4220-4225, 1986.
- 13) Berkow, R. L. et al.: Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor, J Immunol, 139 : 3783-3791, 1987.
- 14) Ferrante, A.: Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity : increased fungicidal activity against Torulopsis glabrata and Candida albicans and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release, Infect Immun, 57 : 2115-2122, 1989.
- 15) Warren, J. S. et al. : Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O_2^- responses by rat alveolar macrophages, Am J Pathol, 130 : 489-495, 1988.
- 16) Mor, N. et al.: Enhancement of growth of Mycobacterium lepraemurium in macrophages by gamma interferon, Infect Immun, 57 : 2586-2587, 1989.
- 17) Douvas, G.S. et al.: Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophages-associated mycobacteria, Infect Immun, 50 : 1-8, 1985.

- 18) Flesch, I. and Kaufman, S.H.E.: Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Immunol*, 138 : 4408-4413, 1987.
- 19) Hayakawa, H. et al.: Pulmonary surfactant inhibits priming of rabbit alveolar macrophage : evidence that surfactant suppresses the oxidative burst of alveolar macrophage in infant rabbits, *Am Rev Respir Dis*, 140 : 1390-1397, 1989.
- 20) Suga, M. et al.: Triggering effects of opsonized-IgG antibody on the superoxide release in phagosome and phagosome-lysosome fusion by pulmonary alveolar macrophages, *J Clin Lab Immunol*, 1991 (in press).
- 21) Granger, D. L. et al.: Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages, *J Clin Invest*, 81 : 1129-1136, 1987.
- 22) Cameron, M.L. et al.: Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate, *Am Rev Respir Dis*, 142 : 1313-1319, 1990.

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫4. ヒト肺胞マクロファージの *M. avium* Complex 増殖抑制作用に
及ぼす各種サイトカインの影響

鈴木 克洋・山本 誉・弓場 吉哲
佐藤 敦夫・久保 嘉朗
村山 尚子・久世 文幸

京都大学胸部疾患研究所感染症学, 第 1 内科

受付 平成 3 年 7 月 8 日

4. EFFECT OF CYTOKINES ON ANTI-MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX
(MAC) ACTIVITIES OF HUMAN ALVEOLAR MACROPHAGES

Katsuhiko SUZUKI*, Takashi YAMAMOTO, Yoshiaki YUBA,
Atsuo SATO, Yoshirou KUBO, Takako MURAYAMA
and Fumiyuki KUZE

(Received for publication July 8, 1991)

The macrophage is an essential component of the host defense against intracellular pathogens including MAC. Especially alveolar macrophages act as a first line defense in the lungs against MAC infection. Some cytokines were reported to activate mouse peritoneal macrophages and human monocyte-derived macrophages to inhibit growth or kill MAC. But we could find only one report describing the effect of cytokines on anti-MAC activities of human alveolar macrophages (PAM). Thus, we investigated the effect of several cytokines on anti-MAC activities of PAM.

PAM were recovered from 12 healthy subjects by bronchoalveolar lavage and cells were cultured in RPMI 1640 with 10% heat-inactivated human AB serum. After 2 hours incubation nonadherent cells were discarded by vigorous washing to form monolayers of PAM (2×10^5 PAM in each 11-mm diameter tissue culture dish). Then we added 2×10^6 viable MAC bacteria (31F093T) and each cytokine to the wells simultaneously. We prepared the well without cytokines as control. After 96 hours incubation, PAM were disrupted by sonication, then all bacteria that had located inside and outside of the cells were plated onto 7H10 agar. The results are reported as mean colony forming units per each well. We had determined the optimal dose of each cytokine to prime PAM for enhanced O_2^- release and we used that optimal dose in this experiment.

PAM with TNF- α pretreatment, and PAM with IFN- γ pretreatment could release increased amount of O_2^- significantly, compared with control. PAM with IL-2 pretreatment and PAM with GM-CSF pretreatment also released somewhat increased

* From the Department of Infection and Inflammation, First Clinic of Medicine Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

amount of O_2^- . The mean colony forming unit of every well with or without cytokines increased in number after 96 hours incubation. No intracellular killing of MAC was observed. The mean colony forming unit of wells with TNF- α and wells with GM-CSF were significantly less than that of control wells.

We concluded that : 1) MAC could multiply in the PAM even if they were activated by cytokines. 2) GM-CSF and TNF-alpha could activate PAM to inhibit growth of MAC. 3) Enhancement of O_2^- secretion induced by pretreatment of each cytokine might have no relation to the ability of PAM to inhibit growth of MAC.

Key words : Human alveolar macrophages, *Mycobacterium avium* complex, Cytokine, TNF- α , GM-CSF

キーワード : ヒト肺胞マクロファージ, *Mycobacterium avium* complex, Cytokine, TNF- α , GM-CSF

緒 言

化学療法の発達により、抗酸菌に対する生体防御機構解明への興味が失われて久しい。その後、結核に変わり有効な化学療法がない *M. avium* complex (MAC) 症のわが国における相対的増加¹⁾²⁾、世界的な後天性免疫不全症候群 (AIDS) の流行と抗酸菌症合併の高い頻度³⁾⁴⁾が、抗酸菌感染に対する研究者の興味を再び喚起した。

MAC は、AIDS 患者から分離される最も頻度の高い細菌であり、しばしば致死的な全身感染症を惹起する³⁾⁴⁾。また、わが国における非 AIDS、肺 MAC 症の統計においても、肺結核後遺症、人工気胸術後、塵肺、気管支拡張症等、肺に基礎疾患を有する二次感染型が多いと報告されており¹⁾⁵⁾、全身または局所の生体防御能の低下が MAC 症発症に重要な意味を持つと考えられている。一般的に抗酸菌の生体防御機構の中心は、各種サイトカインで活性化されたマクロファージであり⁶⁾⁷⁾、MAC 感染においても活性化マクロファージが貪食殺菌を行うものと考えられる。以上の事実より、マクロファージの活性化の低下が MAC 症発症の基礎に存在しているのではないかと考えられ、その観点より幾人かの著者がマウス腹腔マクロファージやヒトの単球由来マクロファージを用い、*in vitro*での抗 MAC 作用に及ぼす種々のサイトカインによる活性化の影響を見る実験を報告している^{8)~10)}。

MAC 症の 97% は肺 MAC 症であり¹⁾、体内への侵入門戸の大部分は経気道的であると考えられる。したがってヒト肺胞マクロファージ (PAM) は、MAC 感染防御の第一線にいるものと思われるが、PAM の抗 MAC 作用に関する報告は少ない。今回われわれは、MAC 症の予防や治療への各種サイトカインの臨床応用という観点より、PAM の *in vitro*における抗 MAC 作用に及ぼす各種サイトカインの影響を検討し、Granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor と Tumor necrosis factor- α が、PAM の抗 MAC 作用を増強する結果を得たので報告する。

方 法

1) PAM の調整

諸種症状の精査目的で気管支鏡を施行した症例中で胸部レントゲン上、気管支鏡所見上異常を認めず肺に疾患がないと考えられた non-current smoker (最近 1 年間以上喫煙していない者) 12 名を対象とした。気管支鏡を用い右中葉を温滅菌生理食塩水 50 ml \times 4 回にて洗浄し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を得た。

遠沈後、細胞成分を RPMI1640 培地 (Gibco 社製, L-glutamine 含有, 抗生剤不含) にて洗浄した後、10% ヒト AB 型血清と 100 unit/ml の penicillin-G (SIGMA 社製) を含む RPMI1640 培地に 4×10^5 /ml の細胞濃度に浮遊させ、48 穴の組織培養用プレート (Costar 社製) に 0.5 ml ずつ plating した。37°C 5% CO_2 環境下で 2 時間培養後、RPMI1640 培地にて洗浄することで非付着細胞を除去し、PAM の単層培養とした。

これらの付着条件の PAM とは別に、上記と同濃度、同培地の細胞をテフロンチューブ (ナルゲン社製) に 0.5 ml ずつ注入し、浮遊条件の培養とした。

2) 細菌の調整

小川培地に保存している *M. avium* complex, 31 F093T 株¹¹⁾ を、Dubos 液体培地中で 14 日間培養し、約 5×10^8 cfu/ml の濃度に調節後、菌液を 3 ml ずつに分注し、-80°C にて保存した。実験毎に保存菌液を溶解し遠沈後、RPMI1640 培地にて洗浄し、同培地 1 ml に再浮遊させた。超音波ソニケーター (トミー精工社製) にて個々の細菌を分離分散した後、培地にて 2×10^7 /ml の濃度に調節した。

3) 各種サイトカイン

PAMを活性化するサイトカインとしては、以下の物質を用いた。

- (1) recombinant interferon- γ (IFN- γ , Chemicon international, USA)
- (2) recombinant interleukin-2 (IL-2, 武田薬品より恵与を受けた。)
- (3) natural type tumor necrosis factor- α (TNF- α , 持田製薬より恵与を受けた。)
- (4) recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, ヘキスト ジャパンより恵与を受けた。)

それぞれのサイトカインは、RPMI1640培地にて適当濃度に希釈し分注後、 -20°C にて保存し、実験毎に溶解し培地にて当該濃度に希釈して用いた。

4) 貪食能の検討

テフロンチューブ中で浮遊条件で培養中のPAM ($2 \times 10^5 / 0.5 \text{ ml}$) に10倍量 ($2 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$) の31F093Tを加え、2時間から72時間培養した。時間毎によくかくはん後、 0.1 ml の培地をとりだし生食 2 ml で希釈し、浮遊細胞収集装置(トミー精工社製)を用いて、細胞塗抹標本を作製した。2時間以上風乾後、Ziehl-Neelsen染色(cold stain, 対染色としてmethylene blueを用いた)を行い、1000倍検鏡下にマクロファージ1細胞当たりの貪食抗酸菌数の平均(phagocytic index)と、1個以上の抗酸菌を貪食しているマクロファージの割合(% phagocytosis)を計算した。マクロファージは、毎回200個以上を観察した。

5) 抗MAC作用の検討

付着条件下で培養中のPAM ($2 \times 10^5 / 0.5 \text{ ml}$) に、10倍量の31F093T ($2 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$) と、適当濃度に調節した各種サイトカインを同時に投与し、2時間から96時間培養した後、超音波ソニケーターにて細胞を破碎しかつよくかくはん後、培養液を7H10寒天培地(Difco社製)上にplatingした。5% CO_2 環境下で

14日間培養した後、PAM内外の総生菌数を寒天上のcolony forming unit (CFU) 数より計算した。controlとして、サイトカインのかわりに培地を入れたwellと、培地のみでPAMのないwellを準備した。

6) スーパーオキシドアニオン産生能の検討

付着条件で培養中のPAMの活性化の1つの指標として、phrbol myristate acetate (PMA, 500 ng/ml) で1時間刺激したときに放出される superoxide anion (O_2^-) 量を cytochrome-c還元法で定量した¹²⁾。別に用意したwellの蛋白量をLowry法で定量し、 O_2^- 産生能はmg蛋白当たりの放出量(nmol/mg protein)で表した。

7) 統計処理

control群と各々のサイトカイン群との比較は、Studentのpaired t testをもちい、両側検定で危険率0.05以下を有意とした。

結 果

1) O_2^- 産生能に及ぼす各種サイトカインの影響

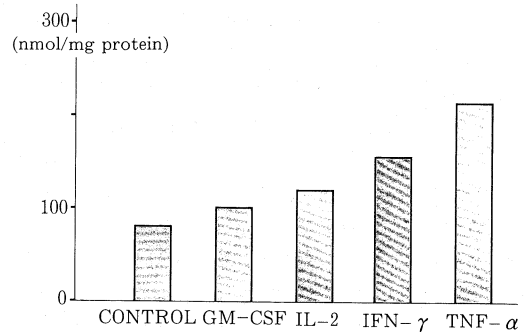
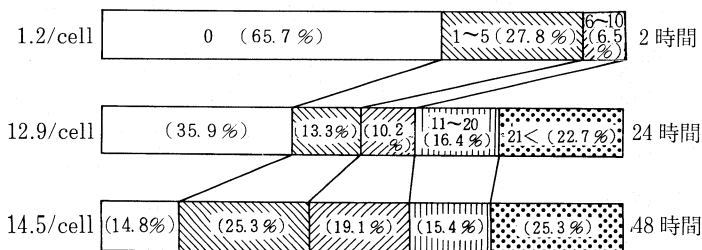


図1 O_2^- 産生能に対する各種サイトカインの影響(代表的3例の平均値)

各種サイトカインで48時間前処理後、PMA (500 ng/ml) で60分刺激した時放出されるmgタンパク当たりの O_2^- 量を示している。

表1 PAMによるMACの貪食の経時的変化



PAMを貪食抗酸菌数0, 1-5, 6-10, 11-20, 21<の5群に分けた時、各群の割合(%)の経時的変化を示した。左端の数字は、1PAM平均の貪食抗酸菌数を表している。

PAMの活性化の一般的指標として、活性酸素で最初に産生される O_2^- の産生能を検討し、各種サイトカインのおおよその至適濃度を決定した。種々の濃度の各種サイトカインで48時間前処理した後、PMA (500ng/ml)で1時間刺激した時放出される O_2^- 量を定量した。IFN- γ 前処理では10-100 U/mlで、IL-2では10-100 U/mlで、TNF- α では500 U/mlで、GM-CSFでは200-2000 U/mlで、それぞれ O_2^- 産生量は最大となった。(データ未発表)。以後の実験では、各種サイトカインは、上記の至適と思われる濃度で用いた。図1に、代表的3例の O_2^- 産生能の平均値を示した。各々のサイトカインの前処理はPAMの O_2^- 産生能を増大させており、PAMを活性化したものと思われた。 O_2^- 産生能に与える影響は、TNF- α > IFN- γ > IL-2 > GM-CSFの順に強かった。

2) PAMによるMACの貪食

10%熱非働化ヒトAB型血清加RPMI1640培地中で浮遊条件で培養しているPAMに10倍量のMAC, 31F093T株を添加し、経時的にサイトスピンにて塗抹標本作製し、貪食の検討を行った。浮遊条件を用いた理由は、1本のチューブより経時的な採取が可能である点と、塗抹標本が付着条件と比べ鮮明となりPAMに貪食された細菌の定量が容易となる点からである。表1に貪食の経時変化を示した。PAMを貪食抗酸菌数0, 1-5, 6-10, 11-20, 20以上の5群に分け各々の比率と、1 PAM平均の貪食抗酸菌数 (phagocytic index)を呈示した。感染2時間で平均1.2, 24時間で平均12.9, 48時間で平均14.5個の抗酸菌が貪食されていた。MACのdoubling timeが液体培地中で24時間程度であること、また今回の実験系における感染24時間での生菌数の増加が約2倍(後述)であることも併せ考えると、感染24時間で既に添加した細菌の半分以上が貪食されていると考えられた。図2に1個以上の抗酸菌を貪食しているPAMの割合(% phagocytosis)の経時変化を

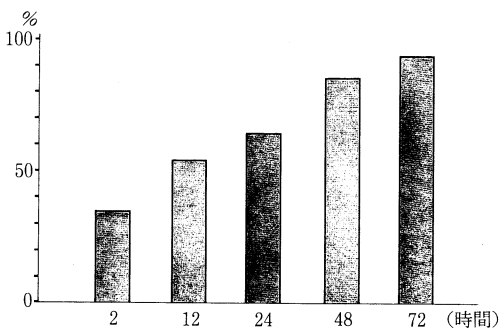


図2 MAC貪食PAMの割合の経時的変化

1個以上の抗酸菌を貪食しているPAMの割合(%)の経時的変化を示している。

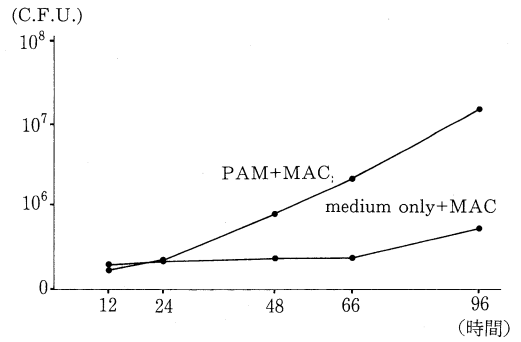


図3 MAC生菌数の経時的変化

PAMにMACを加えた群では著明な生菌数の増加が見られるが、PAMがなく培地だけの群では生菌数の増加はたかだか4倍程度である。

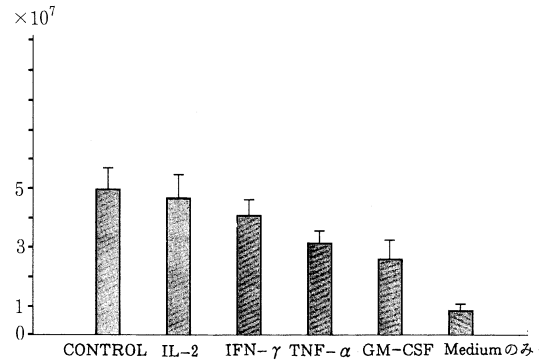


図4 96時間培養後の生菌数

TNF- α 投与群とGM-CSF投与群で、control群と比べて有意な生菌数の低下が見られた。

示した。感染12時間で既に半分以上のPAMが、感染48時間では90%近くのPAMがMACを貪食していた。

これらの貪食の指標に関しては、各種サイトカインの存在は有意な変化をもたらさなかった(データ未発表)。

3) PAM内外でのMACの増殖

今回の実験系におけるMACの増殖が細胞内外のどちらで主に起きているかを調べるために、PAM (2×10^5)にMAC (2×10^6)を添加した群と、培地(RPMI1640 + 10%ヒトAB型血清)のみでPAMのないwellに同量のMACを添加した群におけるMAC生菌数の変化を経時的に検討した(図3)。PAMにMACを加えた群では96時間で生菌数が約25倍に増加しているのに対して、培地だけの群では、生菌数の増加はたかだか4倍程度であった。感染24時間で既に半分以上のMACが貪食されていることも考え併せるとPAMにMACを加えた群における生菌数の増加は、ほとんどが細胞内でのMACの増殖によるものと考えられた。

4) PAMの抗MAC作用に及ぼす各種サイトカインの影響

表2 96時間培養後の生菌数

	CONTROL	IL-2	IFN- γ	TNF- α	GM-CSF	MEDIUMのみ
C.F.U.	4.9 \pm 0.7	4.6 \pm 0.8	4.1 \pm 0.5	3.1 \pm 0.4	2.6 \pm 0.4	0.88 \pm 0.2
%inhibition		6.10	16.3	36.7	46.9	82.0
		N.S.	N.S.	P<0.05	P<0.01	P<0.001

%inhibition=controlのC.F.U./各群のC.F.U./controlのC.F.U. \times 100
統計は、対応のあるStudentのt test, 両側検定を用いた。

平均値 \pm 標準誤差 ($\times 10^7$)

付着条件で培養中のPAM (2×10^5)に、10倍量のMAC (2×10^6)と至適濃度と思われる濃度の各種サイトカインを同時投与し、96時間培養後超音波破碎し7H10寒天培地上のcolony数で、PAM内外の生菌数を検討した(図4, 表2)。コントロール群, 各種サイトカイン群とも生菌数の増加がみられ、しかも増加の程度は培地のみ群と比べて明らかに大きく、PAMによるMACの殺菌は認められなかった。

コントロール群の生菌数が、4.9 \pm 0.7(平均値 \pm 標準誤差, $\times 10^7$)だったのに対して、TNF- α 投与群とGM-CSF投与群の生菌数はそれぞれ、3.1 \pm 0.4, 2.6 \pm 0.7と、有意に減少していた。今回の実験条件においてMACの増殖がほとんどPAM内でおこる点、各種サイトカインはPAMのMAC貪食に有意な影響を与えなかった点も併せて考えると、TNF- α とGM-CSFがそれぞれPAMのMAC増殖抑制作用を活性化した可能性が高いと考えられた。IL-2投与群とIFN- γ 投与群の生菌数は、コントロール群と有意差がなく、PAMの抗MAC作用に影響を与えなかったものと考えられた。

考 察

今回の実験結果では、常在ヒト肺胞マクロファージ(PAM)のみならず、種々のサイトカインで活性化されたPAM中でも*M. avium* complex (MAC) 31F093T株は殺菌されなかった。しかし、TNF- α とGM-CSFにより活性化されたPAMにおいて有意なMAC増殖抑制作用の亢進が観察された。また、スーパーオキシドアニオン(O $_2^-$)産生能の活性化とMAC増殖抑制作用の活性化との間に相関がみられず、O $_2^-$ とPAMの抗MAC作用との関連が少ない可能性が示唆された。

今回の実験では、PAMにMACと各種サイトカインを同時投与する方法を用いた。これは、通常用いられるPAMにMACを数時間から24時間貪食させ培地を交換することで細胞外の細菌を排除しておいてから、サイトカインを投与する方法とは異なっている。この方法を用いた理由は、1) サイトカインの治療、予防への臨床

応用を考えた場合、まず同時投与の効果を検討する必要があると判断したこと、2) 貪食後培地を交換、洗浄し細胞外の細菌を排除した場合、well毎の生菌数のばらつきが大きくなることの2点を考慮したためである。結果でも述べたとおり、MACの増殖がほとんどPAM内で生じている点、また各種サイトカインがPAMのMAC貪食に有意な影響を与えなかった点より、TNF- α とGM-CSFがPAMのMAC増殖抑制作用を活性化した可能性が高いと考えた。

Bermudez, Youngらは、ヒト単球由来マクロファージを用いた一連の実験で、TNF- α とGM-CSFがマクロファージのMAC殺菌能を亢進すること、またTNF- α とGM-CSFに相乗効果が見られることを報告している⁸⁾⁹⁾。さらに彼らは活性型ビタミンD $_3$ が、ヒト単球由来マクロファージのMAC殺菌能を亢進すること、そしてその作用がマクロファージ自身からのTNF- α とGM-CSFの分泌促進によるものであることを報告している¹³⁾。

今回のわれわれの実験結果は、彼らの結果をさらに支持するものと考えられる。しかし、今回の実験では彼らの結果と異なりMACの殺菌作用までは認めなかった。これはわれわれが、1) 肺胞マクロファージを用いたこと、2) 31F093Tという毒力の強い菌株を用いたこと、3) 細菌とサイトカインを同時投与し洗浄しなかったため、結果的にPAMに貪食される菌量が多くなったこと、などによるものと思われる。

最近Roseらは、recombinant macrophage colony-stimulating factorとinterferon- γ を同時投与することで、それぞれ単独投与では全く認めなかったヒト肺胞マクロファージのMAC増殖抑制作用が、著明に亢進すると報告している¹⁴⁾。これは、ある種のサイトカインの組合せが単独では認められない強い作用を示す例として注目し得る。今後種々のサイトカインの組合せが、PAMの抗MAC作用に与える影響の検討も必要と思われる。

マクロファージがMACの増殖抑制をしたり殺菌をする機序に関してはよく分かっていない。Gangad-

haram は、MAC が *M. tuberculosis* と異なり過酸化水素に抵抗性が有ると報告している¹⁵⁾。また、Bermudez, Young らは、ヒト単球由来マクロファージを用いた阻害実験で、活性酸素は、MAC 弱毒株の殺菌には関与しているが、強毒株の殺菌には関与していないと報告している¹⁶⁾。今回の MAC 強毒株を用いたわれわれの実験でも、O₂⁻ 産生能の活性化の程度と MAC 増殖抑制効果との間に相関関係が認められず、間接的ながら、MAC の増殖抑制、殺菌に活性酸素が関与しないという彼らの意見を支持する結果と考えられた。今後、MAC の細胞内増殖抑制や殺菌機序に関してさらに検討する必要があると思われる。

MAC 感染症に対する有効な化学療法がない現在、種々のサイトカインや biological response modifier (BRM) による、いわゆる免疫療法が注目されている。今回のわれわれの結果や、Young⁸⁾⁹⁾¹³⁾、Rose¹⁴⁾ らの一連の結果は、サイトカインの臨床使用に期待を抱かせるものと思われる。しかしながら、いくつかのサイトカインが MAC の増殖をかえって促進するとの報告もあり¹⁰⁾、生体内における複雑なサイトカインネットワーク¹⁷⁾ を考えた場合、サイトカインの臨床使用には慎重な態度が必要と考えられる。

結 論

気管支肺胞洗浄にて採取したヒト肺胞マクロファージ (PAM) の、*in vitro* における、抗 *M. avium* complex (MAC) 作用に及ぼす各種サイトカインの影響を検討し、以下の結論を得た。

- 1) 常在 PAM のみならず活性化 PAM においても MAC の殺菌は認めなかった。
- 2) TNF- α 、GM-CSF で活性化した PAM に MAC 増殖抑制作用の亢進を認めた。
- 3) O₂⁻ 産生能の亢進と MAC 増殖抑制作用の亢進との間には相関関係を認めなかった。

文 献

- 1) 久世文幸：非定型抗酸菌症，呼吸，4：1298~1318，1985。
- 2) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：日本における非定型抗酸菌症の研究（国療非定型抗酸菌症共同研究班 1986 年度報告），結核，63：493~499，1988。
- 3) Hawkins, C.C., Gold, E.W.M., Whimbey, E. et al.: *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome, ANN Intern Med, 105: 184-188, 1986。
- 4) Zakowski, P., Fligiel, S., Berlin, G.W. et al.: Disseminated *Mycobacterium avium intracellulare* infections in homosexual men dying of the acquired immunodeficiency, JAMA, 248: 2980-2982, 1982。
- 5) 山本正彦：我が国における非定型抗酸菌症の現状，結核，60：495~501，1985。
- 6) Edwards, D., Kirkpatrick, C.H.: The immunology of Mycobacterial Disease, AM Rev Respir Dis, 134: 1062-1071, 1986。
- 7) Dannenberg, A.M. Jr.: Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis, AM Rev Respir Dis, 125: 25-29, 1982。
- 8) Bermudez, L.E., Young, L.S.: Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- γ , is associated with macrophage killing of *mycobacterium avium* complex, J Immunol, 140: 3006-3013, 1988。
- 9) Bermudez, L.E., Young, L.S.: Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates human macrophages to inhibit growth or kill *mycobacterium avium* complex, J Leuko Biol, 48: 67-73, 1990。
- 10) Denis, M.: Growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes: identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth, Eur J Immunol, 21: 391-395, 1991。
- 11) Kuze, F.: Experimental chemotherapy in chronic *mycobacterium avium*-intracellulare infection of mice, Am Rev Respir Dis, 129: 453-459, 1984。
- 12) Johnston, R.B.Jr., Godzik, C.A., Cohn, Z. A.: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages, J Exp Med, 148: 115-127, 1978。
- 13) Bermudez, L.E., Young, L.S.: 1, 25Dihydroxyvitamin D₃-dependent inhibition of growth or killing of *mycobacterium avium* complex in human macrophages is mediated by TNF and GM-CSF, Cell Immunol, 127: 432-441, 1990。
- 14) Rose, R.M., Fuglestad, J.M., Remington, L.: Growth inhibition of *mycobacterium avium* complex in human alveolar macrophages by the combination of recombinant macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma, Am J Respir Cell Mol

Biol, 4 : 248-254, 1991.

15) Gangadharam, P.R.J., Pratt, P.F.: Susceptibility of *mycobacterium intracellulare* to hydrogen peroxide, Am Rev Respir Dis, 130 : 309-311, 1984.

16) Bermudez, L.M., Young, L.S.: Oxidative and

non-oxidative intracellular killing of *mycobacterium avium* complex, Microbial Pathogenesis, 7 : 289-298, 1989.

17) Balkwill, F.R., Burke, F.: The cytokine network, Immunol today, 10 : 299-303.

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫5. *M. avium* Complex 感染症の臨床免疫学的側面

原 田 泰 子 ・ 原 田 進 ・ 加 治 木 章
 北 原 義 也 ・ 高 本 正 祇
 石 橋 凡 雄 ・ 篠 田 厚

国立療養所大牟田病院

受付 平成 3 年 7 月 8 日

CLINICO-IMMUNOLOGICAL STUDY OF THE PATIENTS INFECTED
 WITH *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX (MAC)

Yasuko HARADA*, Susumu HARADA, Akira KAJIKI,
 Yosinari KITAHARA, Masahiro TAKAMOTO,
 Tsuneo ISHIBASHI and Atushi SHINODA

(Received for publication July 8, 1991)

Lymphocyte functions of the peripheral blood in the patients infected with MAC (MAC-pts) were evaluated comparatively with age-matched normal controls by using flowcytometry.

The results obtained were as follows :

- 1) In normal controls, the number of total lymphocytes and the proportion and number of T lymphocyte subsets significantly decreased with age. The proportion of natural killer lymphocytes significantly increased in elder controls.
- 2) In MAC-pts, the number of total lymphocytes and T lymphocyte subsets were significantly lower and the proportion of natural killer lymphocytes were higher respectively than normal controls.
- 3) The lymphocyte proliferation induced by PPD-S stimulation *in vitro* in MAC-pts was significantly lower than the normal controls in both age groups of 50-69 and 70-89 years old.
- 4) The lymphocyte proliferation induced by PPD-S stimulation in MAC-pts was increased slightly by adding recombinant IL-2 and significantly higher by depletion of monocytes. By combination of both treatments, it recovered to the level of normal controls.

From these results, we suggested that the decline of lymphocyte proliferation induced by PPD-S stimulation in MAC-pts was due to the decrease of IL-2 production by antigen committed lymphocytes and suppression by monocytes.

- 5) Lymphocyte proliferation induced by PHA stimulation *in vitro* was also significantly depressed in MAC-pts as compared with normal controls.

* From the National Ohmuta Hospital, Tachibana 1044-1, Ohmuta 837 Japan.

Key words : MAC infection, Lymphocyte subsets, Lymphocyte proliferation, suppressor monocyte

キーワード : MAC 感染症, リンパ球サブセット, リンパ球増殖反応, サプレッサーモノサイト

はじめに

AIDS 患者に多発する全身播種性 *M. avium* complex (以下 MAC と略) 感染症^{1)~3)} が最近の話題となっている。

しかしわれわれが、日常の臨床のなかで遭遇する MAC 感染症は、ほとんど全例、肺結核症や塵肺、慢性気管支炎などの、先行する肺疾患に伴ったものであり、しかも高齢者である。その発症に関する免疫学的な背景の一つは、確かに肺局所の感染抵抗性の減弱であると考えられるが、全身的な要因は加齢によるものだけであろうか？

われわれは前報⁴⁾⁵⁾において MAC 感染症の末梢血リンパ球サブセット並びに、PPD 惹起リンパ球増殖反応が低下していることを報告したが、今回はそのリンパ球機能について、さらに種々の検討を加えるとともに、加齢自体の免疫能に及ぼす影響を重視し、Age match させた健常高齢者との比較検討を行った。

対象と方法

対象

MAC 感染症：〔非定型抗酸菌症(肺感染症)の診断基準〕を満たす症例で、抗結核剤による治療にもかかわらず持続あるいは断続的に MAC を排菌し、病像が漸次悪化の傾向をたどっている非改善例 42 例(男性 18 名, 女性 24 名)であり、年齢は 54~86 歳(平均 73 歳)である。全例とも免疫能の低下をきたすような合併症は有していない。

健常対照群：10 歳代 10 例(全例女性, 平均年齢 16 歳), 20 歳代 19 例(男性 7 例, 女性 12 例, 平均年齢 26 歳), 30 歳代 22 例(男性 13 例, 女性 9 例, 平均年齢 34 歳), 40 歳代 16 例(男性 9 例, 女性 7 例, 平均年齢 45 歳), 50 歳代 18 例(男性 9 例, 女性 9 例, 平均年齢 54 歳), 60 歳代 18 例(男性 8 例, 女性 10 例, 平均年齢 65 歳), 70 歳代 26 例(男性 10 例, 女性 16 例, 平均年齢 75 歳), 80 歳代 21 例(男性 13 例, 女性 8 例, 平均年齢 84 歳)の 150 名で前報⁶⁾の症例も含まれる。その内訳は当院療育ボランティアの高校生, 当院職員, 老人ホーム入居者等であり, 末梢血検査, 血液生化学検査, 胸部レ線像に特に異常を認めないものに限った。

培養方法とリンパ球サブセットの測定：前報⁴⁾⁵⁾と全く同一の方法で行った。末梢血をヘパリン加採血後

Lymphoprep にて単核細胞層を採取し, PBS で 2 回, MEM にて 1 回洗浄後リンパ球数を $1.0 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整し, 一部はリンパ球サブセットの測定に用い, 一部は培養液 RPMI1640 (20% AB serum, L-glutamine, Penicillin, Streptomycin 加) に浮遊させた。この細胞浮遊液 1 ml に対して抗原 PPD-S (人型結核菌青山 B 株より精製, 日本ビーシージー社製) の場合は, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 液を 0.1 ml 添加して 7 日間, mitogen PHA (PHA-M form #670-0576AD, GIBCO 社製) の場合は, 1/10 希釈液 0.1 ml を添加して 3 日間 CO2 incubator で培養を行った。

培養後, 培養液中のリンパ球数を血球計算板の白血球分画より算定し, これより各々のリンパ球サブセットの絶対数を求めた。リンパ球サブセットは, モノクローナル抗体による二重染色法により FACS-analyzer を用いて測定した。

単球除去 (Monocyte depletion) : 上記方法で分離された末梢血単核球をベトリ皿にて 2 時間 incubate することにより行った。incubate の前後で, 単核球中の CD14 (Leu M3) 陽性細胞を測定し, 単球が 5% 以下に除去されているのを確認した。

モノクローナル抗体：前報と同じく Leu シリーズ (Becton Dickinson 社) の Leu 4, Leu 2a, Leu 2A, Leu 3a, Leu 8, Leu 15, HLA-DR, 抗 IL-2 receptor (IL-2R) を用いた。Fluorescein isocyanate 標識と Phycoerythrin 標識の抗体を組み合わせ, 二重染色により解析した。

recombinant IL-2 : シオノギ社製の R-IL-2 試薬〔シオノギ〕(1×10^4 Units) を蒸留水にて希釈し, 予備実験より終濃度 200 U/ml が至適濃度であることを確かめ, リンパ球培養を行う際抗原 PPD-S とともに添加した。

リンパ球培養上清中の Free IL-2 receptor (Free IL-2R) : リンパ球培養上清を用いて T セルサイエンス社の Cellfree IL-2R assay kit (ELISA) で測定した。

Lymphocyte proliferation ratio (L. P. Ratio) : PHA 惹起リンパ球増殖反応においては, PHA 刺激下培養の各サブセットの細胞数と PHA 無刺激の対照培養の細胞数の比を, 仮に Lymphocyte proliferation ratio とした。

有意差の検定 : Student t-test で行った。

表1 健康人末梢血リンパ球サブセットの加齢に伴う変化

年代	(絶対数/mm ³ , ()内%)							
	10代	20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代
症例数	10	19	22	16	18	18	26	21
平均年齢	16.0±0.8	25.8±2.3	33.7±2.2	44.6±3.1	54.3±3.1	64.9±3.2	74.9±2.7	83.9±2.6
リンパ球総数	1970±500	1870±740	2340±800	2040±800	1940±530	1870±550	1860±690*	1800±660*
T細胞サブセット								
CD 3 (Leu 4)	1350±420 (67.2±6.6)	1290±560 (69.6±9.0)	1600±780 (66.9±10.8)	1380±570 (66.9±9.8)	1280±420 (65.3±8.1)	1230±360 (66.0±9.7)	1080±420* (58.4±9.1) # 1	1070±460* (57.4±14.5) # 2
CD 4 (Leu 3)	800±330 (39.6±10.6)	690±270 (38.4±7.7)	910±400 (38.7±7.8)	870±410 (41.9±9.6)	790±300 (40.2±8.3)	840±310 (44.1±7.7) # 3	780±340 (41.9±8.2)	690±290 (37.5±11.3) # 4
CD 8 (Leu 2)	610±210 (30.7±5.9)	600±310 (31.3±5.5)	700±380 (28.2±6.7)	540±320 (25.4±8.9)	530±180 (27.7±6.8)	430±170 (23.1±7.8)	390±210** (20.3±7.7) # 5	420±240* (21.8±7.1) # 6
NK細胞サブセット								
CD57 (Leu 7)	220±120 (11.9±8.5)	410±250 (20.6±7.3)	520±300 (22.7±9.0)	530±360 (25.5±11.2)	520±220 (27.3±10.3)	440±290 (23.0±9.4)	490±290 (26.1±10.1)	630±370 (32.2±11.6) # 7
CD16 (Leu11)	230±80 (12.4±6.0)	250±160 (12.8±6.9)	250±130 (10.9±8.4)	190±120 (9.7±4.7)	240±140 (12.3±5.8)	220±150 (11.7±6.6)	290±210 (15.4±8.6)	300±250 (15.2±9.2)
Leu7 ⁻ 11 ⁺	150±70 (7.8±3.6)	150±90 (7.8±3.8)	130±70 (5.5±3.7)	110±60 (5.9±2.6)	110±40 (5.7±2.1)	130±100 (6.4±4.6)	170±150 (6.8±4.6)	170±150 (8.2±6.0)
Leu7 ⁺ 11 ⁺	80±50 (4.6±4.5)	130±140 (5.9±4.6)	130±90 (5.9±5.7)	80±70 (3.8±2.4)	100±70 (5.6±3.8)	110±90 (6.1±4.3)	160±140 (9.1±6.4)	160±160 (8.5±6.2)
Leu7 ⁺ 11 ⁻	140±90 (7.3±4.5)	400±220 (16.3±7.8)	400±290 (16.3±7.4)	460±330 (21.7±10.8)	400±170 (21.1±8.3)	320±270 (16.9±9.6)	290±220 (17.0±8.0)	440±360 (23.7±13.5) # 8
Leu7 ⁺ 2 ⁺	80±40 (4.2±1.6)	160±120 (7.3±3.3)	190±100 (7.9±3.1)	180±170 (8.3±6.5)	190±110 (9.8±4.6)	140±90 (6.9±3.5)	140±120 (7.1±4.7)	160±140 (8.0±5.5)

絶対数 70歳代, 80歳代と30歳代の間に: * : P<0.05, ** : P<0.005
 比率 # 1 : 10歳代~40歳代との間に P<0.01, 50歳代と, 60歳代との間に P<0.05,
 # 2 : 20歳代との間に P<0.01, 40歳~60歳代との間に P<0.05,
 # 3 : 20歳代, 30歳代との間に P<0.05,
 # 4 : 60歳代との間に P<0.05,
 # 5 : 10歳代~30歳代, 50歳代との間に P<0.01,
 # 6 : 10歳代~30歳代との間に P<0.01, 50歳代との間に P<0.05,
 # 7 : 10歳代~30歳代との間に P<0.01,
 # 8 : 10歳代~30歳代との間に P<0.05

成 績

I. 末梢血リンパ球サブセットの加齢に伴う変化 (絶対数と比率)

①健康人において

健康人を10歳代から80歳まで10歳きざみに分け、その各年代におけるリンパ球総数, Leu 4 (CD 3) 陽性の Pan T細胞, Leu 3 (CD 4) 陽性の Helper/Inducer T細胞, Leu 2 (CD 8) 陽性の Suppressor/Cytotoxic T細胞の絶対数と比率を表1に示した。

リンパ球総数は、30歳代をピークとし、加齢とともに減少するが、70, 80歳代は、30歳代と比較し、有意に減少していた。

T細胞サブセットは、Pan T細胞 (CD3⁺) は70歳代, 80歳代で比率, 絶対数とも低下 (絶対数は30歳代と, 比率では70歳代は、それ以下のすべての年齢層と

の間に、80歳代は20歳代~60歳代との間に有意差が見られた), Helper/Inducer T細胞 (CD4⁺) は、特に変化が見られなかったが (絶対数は低下傾向ではあるが若年者に比べ特に有意差なし), Suppressor/Cytotoxic T細胞 (CD8⁺) は比率, 絶対数とも70, 80歳代で低下を示した (絶対数は30歳代と, 比率では40歳代と60歳代を除くすべての若年者との間に有意差が見られた)。

Natural Killer (NK) 細胞サブセットは、NK細胞の機能としての活性の強さが、Leu7⁺Leu2⁺ < Leu7⁺Leu11⁻ < Leu7⁺Leu11⁺ < Leu7⁻Leu11⁺ の順であるとの報告^{7b)}があるため、Leu7 (CD57), Leu11 (CD16), Leu2 (CD8) の組み合わせによる二重染色によってNK細胞の亜画分まで検討した。CD57 (Leu7), CD16 (Leu11) 陽性細胞は加齢に伴い増加の傾向を示し、特に80歳代では、CD57 (Leu7) 陽性細胞の比率が30歳代に比べ有意に高値を示した。この増加について

表2 健康人とMAC感染症における末梢血リンパ球サブセットの比較

症例数	(絶対数/mm ³ , ()内%)	
	健康人	MAC感染症
平均年齢	75.0±7.9	73.1±7.3
リンパ球総数	1840±640	1510±770*
T細胞サブセット		
CD 3 (Leu 4)	1120±430 (60.2±11.9)	890±510** (57.9±12.4)
CD 4 (Leu 3)	770±320 (41.1±9.5)	570±320** (37.7±10.2)
CD 8 (Leu 2)	410±210 (21.6±7.6)	380±330 (23.6±10.8)
NK細胞サブセット		
CD 57 (Leu 7)	520±330 (27.2±10.9)	560±390 (34.3±14.7)*
CD 16 (Leu 11)	270±210 (14.3±8.5)	290±280 (18.0±10.3)*
Leu 7 ⁻ 11 ⁺	150±140 (7.1±5.2)	130±130 (9.0±4.6)
Leu 7 ⁺ 11 ⁺	340±290 (8.1±6.0)	160±210 (9.4±8.4)
Leu 7 ⁺ 11 ⁻	160±140 (19.1±11.0)	380±300 (24.5±14.4)*
Leu 7 ⁺ 2 ⁺	140±120 (7.3±4.7)	180±210 (10.8±8.2)**

健康人とMAC感染症との間に：*：P<0.05, **：P<0.01

て亜画分で検討すると、NK活性の強いといわれる Leu7⁺Leu11⁺, Leu7⁻Leu11⁺ の増加ではなく、活性の弱い Leu7⁺Leu11⁻ の増加であった(80歳代でその比率は10~30歳代に比べ有意に高かった)。

② MAC 感染症において

上記の結果より末梢血リンパ球には加齢に伴う変化が見られることがわかったので、同年齢の健康人との比較を行った。末梢血リンパ球サブセットを測定したMAC感染症症例は60歳代12例、70歳代18例、80歳代12例の計42例(平均年齢73歳)であるため、健康人も60歳代以上の67例(平均年齢75歳)と比較を行った。

表2に示すように、MAC感染症では、リンパ球総数、T細胞サブセット即ちPan T細胞(CD3⁺)、Helper/Inducer T細胞(CD4⁺)の比率、絶対数が同年齢の健康人に比べ低下しており、特に絶対数は有意に低下が見られた。

NK細胞は、CD57(Leu7)、CD16(Leu11)陽性細胞とも、T細胞サブセットの結果とは逆に同年齢の健康人に比べその比率が有意に増加していた。亜画分では健康人と同様にLeu7⁺Leu11⁻の比率が有意に増加するとともに、Leu7⁺Leu2⁺の比率も有意に増加していた。

II. PPD-S 惹起リンパ球増殖反応

PPD-S刺激によってリンパ球総数、CD3(Leu4)陽性のPan T細胞、活性化T細胞の各フェノタイプ即ちCD3⁺HLA-DR⁺(DR⁺Leu4⁺; HLA-DR陽性のPan T細胞)、CD25(IL-2 receptor 陽性細胞)、CD25⁺CD4⁺(IL-2-R⁺Leu3⁺; IL-2 receptor 陽性のHelper/Inducer T細胞)が増殖するのを観察した。

1. 加齢による影響(表3)

50~69歳と70~89歳の両年齢層でMAC感染症と健康人との比較を行った。

a. 50~69歳において

MAC感染症では、健康人に比べPPD-S刺激によるリンパ球総数、Pan T細胞の増殖ならびに活性化T細胞各サブセットの出現が有意に弱かった。

b. 70~89歳において

健康人においても、この年齢層では、50~69歳に比べPPD-S刺激によるリンパ球の増殖が弱くなる傾向が見られたが、MAC感染症では、50~69歳の場合と同様にリンパ球総数とすべてのサブセットが、健康者よりさらに有意に低下していた。

2. recombinant IL-2 (rIL-2) 添加の影響(表4)

上記結果より、MAC感染症では同年齢の健康人に比べ、PPD-S刺激による活性化T細胞の出現が低下して

表3 PPD-S 刺激による末梢血リンパ球増殖反応の比較

(絶対数/mm³)

	50~69歳				70~89歳			
	健常人		MAC感染症		健常人		MAC感染症	
症例数	8		8		8		13	
平均年齢	61.0±6.2		67.1±1.7		77.4±4.5		78.3±3.6	
リンパ球総数	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S (-)	PPD-S (+)
CD 3 (Leu 4)	470±90	880±220	310±150	500±210*	500±130	730±240	290±110	290±140#
活性化T細胞	300±70	540±130	190±130	320±160*	310±120	440±160	180±80	180±90#
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (Leu4 ⁺ HLA-DR ⁺)	20±10	230±160	20±10	80±50**	30±10	160±130	10±6	30±30#
CD 25 (IL2-R ⁺)	20±6	330±160	20±10	130±70**	20±7	230±190	10±7	50±40#
CD25 ⁺ CD4 ⁺ (IL2-R ⁺ Leu3 ⁺)	10±5	210±100	10±7	110±70*	10±6	150±140	7±3	30±30#

健常人と MAC 感染症 (50~69 歳) の PPD-S (+) との間に: * : P<0.01, ** : P<0.05
 健常人と MAC 感染症 (70~89 歳) の PPD-S (+) との間に: # : P<0.01,
 PPD-S (-) は対照培養群, PPD-S (+) は PPD 10 μg/ml を加えて 7 日間培養した群を表す

表4 PPD-S 刺激による末梢血リンパ球増殖反応における recombinant IL-2 の効果

(絶対数/mm³)

	MAC 感染症		
	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S+rIL-2
リンパ球総数	280±120	330±170	440±190
CD 3 (Leu 4)	180±100	200±120	260±110
活性化T細胞			
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (Leu4 ⁺ HLA-DR ⁺)	10±7	50±50	80±30
CD 25 (IL2-R ⁺)	10±2	50±60	50±30
CD25 ⁺ CD4 ⁺ (IL2-R ⁺ Leu3 ⁺)	10±8	60±60	130±60

症例数: 8例 平均年齢: 73.9±4.7歳
 PPD-S (-) は対照培養群, PPD-S (+) は PPD-S 10 μg/ml を加えて 7 日間培養した群,
 PPD-S (+) + rIL-2 は PPD-S 10 μg/ml とともに rIL-2 200 U/ml を加えて 7 日間培養した群を表す

いたことより, rIL-2 を PPD-S とともに添加し, リンパ球の増殖に及ぼす影響を観察した。

その結果, PPD-S+rIL-2 群では, PPD-S 単独群に比べリンパ球総数, Pan T 細胞, 活性化T細胞の増殖が増加し, リンパ球の PPD-S に対する反応性がわずかに回復するのが見られた。

3. 単球除去 (Monocyte depletion) の影響 (表5)
 単球が PPD-S 惹起リンパ球増殖に及ぼす影響を観察した。

単球除去群 (以下単球 (-) 群と略) では, 単球 (+) 群に比べ, リンパ球総数, CD3 陽性の Pan T 細胞の増殖並びに, 活性化T細胞の出現も有意に増加しており,

単球を除去することで, PPD-S 刺激に対するリンパ球の反応性が有意に回復するのが見られた。

リンパ球培養上清中の Free IL-2 receptor も単球 (-) 群が約 2 倍程度に有意に増加していた。

4. 単球除去と recombinant IL-2 添加の併用 (表6)

単球を除去した上で, PPD-S とともに, rIL-2 を加え, リンパ球の増殖を観察した。単球 (+) 群と単球 (-) 群で, それぞれ対照培養群, PPD-S 単独群, PPD-S+rIL-2 群の 3 群を作り比較を行った。

その結果, 単球除去し, PPD-S に rIL-2 を添加した群において, リンパ球総数, CD3 陽性の Pan T 細胞

表5 PPD-S 刺激による末梢血リンパ球増殖反応における単球除去 (Monocyte depletion) の影響

	MAC感染症			
	Monocyte (+)		Monocyte (-)	
	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S (-)	PPD-S (+)
リンパ球総数	280±130	350±190	510±110	820±310 *
CD 3 (Leu 4)	170±100	210±140	330±110	470±200 *
活性化T細胞				
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (Leu4 ⁺ HLA-DR ⁺)	10±10	50±40	20±7	160±130 **
CD 25 (IL2-R ⁺)	10±7	70±70	20±10	190±160 **
CD25 ⁺ CD4 ⁺ (IL2-R ⁺ Leu3 ⁺)	10±2	60±70	8±4	130±160
Free IL-2 receptor # in culture fluid	260±130	950±380	280±120	1860±1030 **

症例数：13例 平均年齢：73.7±6.4歳

Mo (+) PPD-S (+) と Mo (-) PPD-S (+) との間に：* : P<0.01, ** : P<0.05,

Monocyte (+) は単球のある群, Monocyte (-) は単球除去群を表わす

: 単位は U/ml

表6 PPD-S 刺激による末梢血リンパ球増殖反応における単球除去 + recombinant IL-2 の影響

	MAC感染症					
	Monocyte (+)			Monocyte (-)		
	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S+rIL-2	PPD-S (-)	PPD-S (+)	PPD-S+rIL-2
リンパ球総数	280±120	330±170	440±190	500±110	770±330 #	870±320 *
CD 3 (Leu 4)	180±100	200±120	260±110	310±130	430±220 #	550±260 **
活性化T細胞						
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (Leu4 ⁺ HLA-DR ⁺)	10±7	50±50	80±30	10±10	120±110	250±180 *
CD 25 (IL2-R ⁺)	10±8	60±60	130±60	20±10	150±150	370±150 **
CD25 ⁺ CD4 ⁺ (IL2-R ⁺ Leu3 ⁺)	10±2	50±60	50±30	8±5	100±140	150±120 *

症例数：8例 平均年齢：73.9±4.7歳

Monocyte (+) は単球のある群, Monocyte (-) は単球除去群を表す

Mo (+) PPD-S+rIL-2 と Mo (-) PPD-S+rIL-2 との間に：* : P<0.05, ** : P<0.01

Mo (+) PPD-S (+) と Mo (-) PPD-S (+) との間に：# : P<0.01

胞の増殖, 活性化T細胞の出現が有意に増加し, 他群に比べ最も PPD-S に対するリンパ球の反応性が回復しているのが見られた。

Ⅲ. PHA 惹起リンパ球増殖反応 (表7)

PPD-S の場合と同様に PHA 惹起リンパ球増殖反応を行い, MAC 感染症と同年齢の健康人との間で Lymphocyte Proliferation Ratio (L. P. Ratio) で比較を行った。

MAC 感染症において, リンパ球総数, CD3 陽性 Pan T 細胞の増殖は特に差が見られなかったが,

活性化T細胞の出現は, 低下しており, とくに HLA-DR 陽性の Pan T 細胞 (CD3⁺HLA-DR⁺), IL-2 receptor 陽性細胞 (CD25⁺) は, 健康人より有意に低下していた。

リンパ球培養上清中の Free IL-2 receptor も同年齢の健康人に比べ, MAC 感染症群で有意に低下していた。

また, IL-2 receptor 陽性細胞とリンパ球培養上清中の Free IL-2 receptor との間には相関がみられた (データ省略)。

表7 PHA 刺激による末梢血リンパ球増殖反応の比較

	(L. P. Ratio)	
	健常人	MAC感染症
症例数	18	21
平均年齢	74.9±8.8	75.3±6.7
リンパ球総数	1.1±0.4	1.1±0.5
CD 3 (Leu 4)	1.1±0.6	1.1±0.3
活性化T細胞		
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (Leu4 ⁺ HLA-DR ⁺)	9.3±7.2	4.9±2.2*
CD 25 (IL2-R ⁺)	18.6±11.1	12.4±3.9*
CD25 ⁺ CD4 ⁺ (IL2-R ⁺ Leu3 ⁺)	14.9±12.0	10.5±4.3
Free IL-2 receptor # in culture fluid	1530±820	1010±440**

健常人と MAC 感染症との間に：* : P<0.05, ** P<0.01

Lymphocyte proliferation ratio (L. P. Ratio)=PHA (+) 3日間
培養後のリンパ球数/PHA (-) 対照培養リンパ球数

: 単位は U/ml

考 案

今回、われわれが検討の対象とし、また日常診療している MAC 感染症は、AIDS や悪性腫瘍等の全身的な免疫機能低下をきたす疾患に伴ったものではなく、そのほとんどが肺結核症や塵肺、慢性気管支炎などの先行する肺疾患、即ち肺局所の抵抗減弱部位を有する高齢者である。一方、健常人において、加齢が免疫反応に及ぼす影響については種々の報告が有り、高齢者では一般に加齢に伴い免疫反応やリンパ球機能が減弱するとの報告^{9)~16)}が多い。したがって、MAC 感染症における臨床免疫学的な検討を試みるにあたって、年齢を考慮に入れることが不可欠と考えられるため、まず健常人において、加齢の免疫能に及ぼす検討を行った。

MAC 感染症の最も多い年代は、70~80 歳代であるため、その年代の健常人末梢血リンパ球の各フェノタイプを、10 歳さざみで分けた若年者と比較した (表1)。その結果、リンパ球数、T 細胞サブセットは加齢とともに減少していき、特に 70 歳代、80 歳代では若年者に比べ有意に低下していた。NK 細胞は逆に高齢者では増加していたが、その増加は NK 細胞の亜画分の検討によれば、活性の弱いとされるサブセットの増加によるものであった。

この健常人におけるリンパ球サブセットの結果から、高齢者 (特に 70 歳以上) では若年者に比べ明らかな差が見られ、高齢者に偏っている MAC 感染症の免疫学的な検討を行う際には、必ず同年齢の健常人との比較が必要と考えられた。

MAC 感染症の末梢血リンパ球サブセットは、リンパ球総数、T 細胞サブセットが、同年齢の健常人に比べ有意に低下していたが、NK 細胞においては、このような T 細胞サブセットの低下とは逆に、同年齢の健常人に比べ有意に高値を示した。ただし、亜画分における検討では、健常高齢者の傾向と同様に NK 活性の弱いといわれる画分 (Leu7⁺IL1⁻, Leu7⁺2⁺) の増加が顕著であった。このように、加齢による影響を差し引いてもなお circulating T リンパ球の有意な低下が見られるという結果は、MAC 感染症の全身的な細胞性免疫機能の低下を示唆するものと考えられる。

NK 細胞については、健常高齢者において、NK 細胞数と機能面の活性に解離が見られるとの報告¹⁷⁾ もあれば、NK 細胞の比率は若年者と差はないが、活性の上昇は見られるとの報告¹⁸⁾ もある。一方、NK 細胞による一般細菌に対する殺菌作用についての報告¹⁹⁾ もあり、MAC 感染症における NK 細胞の増加の意味について、さらなる検討が必要と考えられる。現在、K562 腫瘍細胞をターゲット細胞として用い、Carboxy Fluorescein-diacetate (C-FDA) 法²⁰⁾ により NK 活性を測定し検討中であるが、現時点では、MAC 感染症群と健常群との間に有意な差は見られていない。

in vitro におけるリンパ球増殖反応を見る方法としては ³H-thymidine の取り込みを測るリンパ球幼若化反応 (Lymphoblast transformation) が現在まで最も広く行われているが、われわれは、前報⁴⁾⁵⁾ と同様に、抗原や Mitogen 刺激後増殖するリンパ球のフェノタイプの変化を見た。

50～69歳と70～89歳の二つの年齢層で、同年齢の健康人と比較した結果(表3)、健康人においてもPPD-S刺激に対するリンパ球の増殖反応は加齢とともに低下して来るが、MAC感染症群においては、両年齢層とも健康人に比べ、リンパ球特にT細胞の増殖、活性化T細胞の出現がさらに有意に低下していた。したがって、MAC感染症では加齢による影響を除いてもなお、PPD-Sに対する反応性が低下しているといえるであろう。また、MAC感染症の特異抗原であるPPD-B刺激による培養結果については前報⁵⁾で報告したが、PPD-Sよりもさらに反応性が低下していた。

T細胞の増殖は、PPD刺激の場合 helper T細胞が産生したIL-2がその細胞に発現したIL-2 receptorに結合することにより、autocrineに増殖していくと考えられている。われわれの結果では、MAC感染症リンパ球はPPD-S刺激に対して helper T細胞の増殖が弱く、活性化Tリンパ球中のIL-2 receptor陽性細胞の出現も低下していた。またツベルクリン低反応性の初期の活動性結核や慢性難治性結核において見られる、PPDに対するリンパ球増殖反応の低下は、IL-2産生能の低下に由来しており、recombinant IL-2の投与により回復が見られるとの報告^{21)~23)}もある。

そこで、われわれもMAC感染症のリンパ球培養の際に、外来性にrecombinant IL-2を投与して反応性が回復するかどうか調べた(表4)。その結果、PPD-S+rIL-2添加群で、リンパ球の増殖は増加したが、PPD-S単独群に比べ有意差はみられず、反応性はわずかに回復した。

この結果より、MAC感染症におけるPPD-Sに対する反応性の低下はIL-2産生のみの問題ではなく、他の要因の関与も考えられた。

以前より、ツベルクリン反応が減弱しており、末梢血の単核球がPPD-Sに対して low responderである活動性肺結核症においては、付着細胞(単球: suppressor monocyteと表現)を取り除くことによってその反応性が回復するという報告^{24)~28)}が多数あり、MAC感染症でも、そのような suppressor monocyteの存在を示す報告²⁹⁾³⁰⁾がわずかながら見られる。したがって、われわれもそれについて検討を行った(表5)。その結果、単球を取り除きPPD-S刺激を加えた群において有意にリンパ球、Pan T細胞の増殖、活性化T細胞の出現、リンパ球培養上清中のFree IL-2Rが増加していた。この反応性の回復は先のPPD-SとともにrIL-2を添加して培養した場合より良好であった。結果は示していないが、健康人において同様の処置を行った場合、単球除去の影響はPPD-Sに対するリンパ球の反応性に特に変化を与えないばかりか、逆に反応性が低下するような症例も見られた。次に、単球除去と

rIL-2を組み合せ検討した。その結果、リンパ球の反応性は最も顕著に増加し、同年齢の健康人と同程度までに回復した。

単球の膜表面抗原に関して、HLA-DR陽性の単球は抗原提示細胞といわれ、HLA-DR陰性の単球は suppressor monocyteとして働くとの報告²⁵⁾がある。われわれのデータでもMAC感染症患者は一般に分離した単核球中に単球の占める比率が大きく、単球中にHLA-DR陰性の単球の占める比率が大きかった(未発表データ)。免疫調節機構の一端を担う単球(マクロファージ)には、upとdownのregulationの役割があり、down regulationにおいては、単球の産生する各種モノカインが種々の免疫反応において抑制的に働くと考えられている³¹⁾。中でもPrpstaglandin E2(PGE2)は強力な免疫抑制物質としてよく知られており、helper T細胞に働きIL-2産生やIL-2 receptorの発現を抑制してT細胞の増殖を抑えるといわれる³²⁾。したがって、Indomethacin等のPGE2の産生を抑制する物質の投与により単球の免疫抑制作用が除かれることも分かっている。

実際、MAC感染症患者にIndomethacinを投与し、皮膚反応の改善が得られたり、PPDに対するリンパ球の増殖反応が改善したという報告³³⁾³⁴⁾が見られる。われわれの結果も含めてMAC感染症では、suppressor monocyteが増加しており、免疫反応の進行におけるdown regulationへの偏りが存在するのかもしれない。

発病には至らずとも結核菌の感染を受け、ツ陽転の70歳以上の健常高齢者や、その大多数が先行する肺炎患として肺結核症を有するMAC感染症にとってPPD-SはPPD-Bとともに特異的抗原といえる。したがって、PHAのような非特異的mitogenに対するリンパ球の反応性の検討も必要と考えた。測定値は絶対数ではなくL. P. Ratioで比較した。その結果、MAC感染症では同年齢の健康人に比べ、PHA刺激に対する活性化T細胞の出現、リンパ球上清中のFree IL-2Rが有意に低下していた。

IL-2R陽性細胞とFree IL-2Rとの相関については、Rubinらの活性化リンパ球が細胞表面にIL-2Rを表出するとともに培養上清中にIL-2Rを放出するとの報告³⁵⁾がある。このPHAに対する反応性については、³H-thymidineの取り込みで見たリンパ球増殖反応では、低下していなかったとの報告もある³⁶⁾。

これまでの、末梢血リンパ球サブセットや*in vitro*でのPPDやPHAに対するリンパ球増殖反応の成績から、MAC感染症においては、肺局所の感染抵抗性の減弱だけでなく、全身的な免疫機能の低下が存在することが考えられる。しかし、それがMAC感染症の発症にかかわっているのか、それともMAC感染症の結果と

してもたらされたものであるのかについては、常に問題となるところである。

抗酸菌やライ菌などにおいて、その菌体成分が宿主の免疫機能を低下させるという報告^{37)~40)}は数多く見られる。MAC感染症においてもMAC菌体、あるいはそのリピッド分画が、単球の抗原提示細胞としての機能を低下させることでPPDやmitogenに対するリンパ球幼若化反応を抑制するとの報告⁴¹⁾もある。

先行する肺疾患などにより局所的に、また高齢などにより全身的に免疫機能が低下した状態でMACによる感染が起こった場合、殺菌に有効な治療がない現在、持続感染が続くことにより、単球によるdown regulationへの偏移や、上記のようなMACそのものによる作用も含めて、さらなる免疫反応性の低下が進行するのかもしれない。

この点について臨床免疫学的には、MAC感染症例において、発症時よりかなりの長期にわたる経過観察で免疫反応の推移を捉えることや、治癒した症例における免疫機能の測定などが今後の検討課題であろう。

ま と め

MAC感染症（非改善例）の末梢血リンパ球機能について、末梢血リンパ球サブセット並びに*in vitro*でのPPD, PHA惹起リンパ球増殖反応を主に種々の検討を行った。また加齢自体の免疫反応に及ぼす影響を考え、Age matchさせた健康高齢者との比較を行った。

1. 健康人の末梢血リンパ球サブセットにおいて以下のような加齢に伴う変動が見られた。

高齢者では、若年者に比べリンパ球、T細胞系は比率、絶対数とも有意に低値を示したが、Natural Killer細胞の比率は逆に有意に増加していた。

2. MAC感染症の末梢血リンパ球サブセットにおいて

同年齢の健康高齢者と比較し、MAC感染症においては、リンパ球、T細胞系の絶対数が有意に低値を示したが、Natural Killer細胞の比率は有意に増加していた。

3. MAC感染症の末梢血リンパ球増殖反応において(*in vitro*)

①抗原PPD-Sに対するリンパ球増殖反応

50~69歳、70~89歳の両年齢層に分けて健康人と比較した結果、両年齢群ともMAC感染症においてリンパ球の反応性が有意に低下していた。

MAC感染症におけるこのようなリンパ球の反応性の低下に対して

* PPD-Sとともに recombinant IL-2 (200U) を加えて培養した結果、リンパ球の反応性の軽度の回復が見られた。

* 単球除去後培養した群では、単球(+)群に比べ有

意にリンパ球の反応性が回復した。

* 単球除去しPPD-SとともにrIL-2を加えて培養した結果、リンパ球の反応性がさらに増強され、健康人と同程度まで回復した。

したがって、PPD-Sに対する反応性の低下の原因としては、Antigen committed lymphocyteのIL-2産生能の低下とともにSuppressor Monocyteの存在が示唆された。

②非特異的mitogenであるPHAに対するリンパ球増殖反応

PPD-Sの場合と同様に、同年齢の健康人に比べ活性化T細胞の出現が有意に低く、リンパ球の反応性が低下していた。

文 献

- 1) Green, J. B., Sidhu, G. S., Lewin, S. et al. : *Mycobacterium avium-intracellulare* : A cause of disseminated life-threatening infection in homosexuals and drug abuses, *Ann Intern Med*, 97 : 539-546, 1982.
- 2) Zakowski, P., Fligiel, S., Berlin, G. W. et al. : Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency, *JAMA*, 248 : 2980-2982, 1982.
- 3) Hawkins, C. C., Gold, J. W. M., Whimbey, E. et al. : *Mycobacterium avium* complex infection with the acquired immunodeficiency syndrome, *Ann Intern Med*, 105 : 184-188, 1986.
- 4) 原田泰子, 原田 進, 高本正祇他 : 非定型抗酸菌症の免疫学的検討, I 末梢血リンパ球サブセット値について, *結核*, 63 : 555-561, 1988.
- 5) 原田泰子, 石橋凡雄, 原田 進他 : フローサイトメトリーによるPPD活性化リンパ球の解析, *結核*, 64 : 79-84, 1989.
- 6) 石橋凡雄, 原田泰子, 高本正祇他 : リンパ球サブセットの正常値及び加齢に伴う変動, *結核*, 62 : 21-28, 1987.
- 7) Abo, T., Miller, C. A., Gartland, G. L. et al. : Differentiation stages of human natural killer cells in lymphoid tissues from fetal to adult life, *J Exp Med*, 157 : 273-284, 1983.
- 8) Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, N. L. : Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens, *J Immunol*, 131 : 1789-1796, 1983.

- 9) Walford, R. L. : Immunology and aging, *Am J Clin Pathol*, 74 : 247-253, 1980.
- 10) Walford, R. L. : Studies in immunogerontology, *J Am Geriat Soc*, 30 : 617-625, 1980.
- 11) Gills, S., Kozak, R., Durante, M. et al. : Immunological studies of aging, *J Clin Invest*, 67 : 937-942, 1981.
- 12) Marrie, T. J., Johnson, S., Durant, H. : Cell-mediated immunity of healthy adult novascotians in various age groups compared with nursing home and hospitalized senior citizens, *J Allergy Clin Immunol*, 81 : 836-843, 1988.
- 13) Nagel, J. E., Chopra, R. K., Chrest, F. J. et al. : Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohaemagglutinin-stimulated cells from elderly donors, *J Clin Invest*, 81 : 1096-1102, 1988.
- 14) Nagel, J. E., Chopra, R. K., Powers, D. C. et al. : Effect of age on the human high affinity interleukin 2 receptor of phytohaemagglutinin stimulated peripheral blood lymphocytes, *Clin Exp Immunol*, 75 : 286-291, 1989.
- 15) 岸本 進 : 免疫の立場からみた老化, *最新医学*, 44 : 954-958, 1989.
- 16) Lehtonen, L., Eskola, J., Vainio, Olli. et al. : Changes in lymphocyte subsets and immune competence in very advanced age, *J Gerontol*, 45 : 108-112, 1990.
- 17) Facchini, A., Mariani, E., Mariani, A. R., Papa, S. et al. : Increased number of circulating Leu11⁺ (CD16) large granular lymphocytes and decreased NK activity during human ageing, *Clin Exp Immunol*, 68 : 340-347, 1987.
- 18) 坂根 剛, 丹羽毅夫 : ヒトの加齢に伴う免疫能の変化とその発現機序—II. 老化とNK 活性—, *Jpn J Clin Immunol*, 10 : 267-271, 1987.
- 19) Penarrubia, P. G., Koster, F. T., Kelley, R. O. et al. : Antibacterial activity of human natural killer cells, *J Exp Med*, 169 : 99-113, 1989.
- 20) 藤崎正美, 後藤裕子, 羽柴克子他 : 蛍光自動測定装置を用いたNK細胞活性測定法 (C-FDA法), *Med Immunol*, 12 : 125-128, 1986.
- 21) Toossi, Z., Kleinhenz, M. E., Ellner, J. J. : Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis, *J Exp Med*, 163 : 1162-1172, 1986.
- 22) Shiratsuchi, H., Okuda, Y., Tsuyuguchi, I. : Recombinant human interleukin-2 reverses *in vitro*-deficient cell-mediated immune responses to tuberculin purified protein derivative by lymphocytes of tuberculous patients, *Infect Immunol*, 55 : 2126-2131, 1987.
- 23) 露口泉夫 : 人の結核症の免疫, *結核*, 65 : 591-601, 1990.
- 24) Ellner, J. J., Spagnuolo, P. J., Schachter, B. Z. et al. : Augmentation of selective monocyte functions in tuberculosis, *J Infect Dis*, 144 : 391-398, 1981.
- 25) Twardy, D. J., Schachter, B. Z., Ellner, J. J. : Association of altered dynamics of monocyte surface expression of human leukocyte antigen DR with immunosuppression in tuberculosis, *J Infect Dis*, 149 : 31-37, 1984.
- 26) Kleinhenz, M. E., Ellner, J. J. : Immunoregulatory adherent cells in human tuberculosis : radiation-sensitive antigen-specific suppression by monocytes, *J Infect Dis*, 152, 171-176, 1985.
- 27) Ellner, J. J. : Immune dysregulation in human tuberculosis, *J Lab Clin Med*, 108 : 142-149, 1986.
- 28) Toossi, Z., Sedor, J. R., Lapurga, R. J. et al. : Expression of functional interleukin 2 receptors by peripheral blood, monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis, *J Clin Invest*, 85, 1777-1784, 1990.
- 29) Edwards, C. K., III, Hedegaard, H. B., Zlotnik, A. et al. : Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice : association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon- γ , *J Immunol*, 136, 1820-1827, 1986.
- 30) Tomioka, H., Saito, H., Yamada, Y. : Characteristics of immunosuppressive macrophages induced in spleen cells by *Mycobacterium avium* complex infections in mice, *J General Microbiol*, 136 : 965-973, 1990.
- 31) 吉田 彪, 加藤琢磨 : マクロファージによる生と負

- の免疫調節, 臨床免疫, 22 : 1028~1037, 1990.
- 32) Rappaport, R. S., Dodge, G. R. : Prostaglandine E inhibits the production of human interleukin 2, J Exp Med, 155 : 943-948, 1982.
 - 33) Mason, U. G. III., Greenberg, L. E., Yen, S. S. : Indomethacin-responsive mononuclear cell dysfunction in "Atypical" Mycobacteriosis, Cell Immunol, 71 : 54-65, 1982.
 - 34) Mason, U. G. III., Kirkpatrick, C. H. : Modulation of immunologic responses in nontuberculous mycobacterial infections with indomethacin, J Clin Immunol, 4 : 112-117, 1984.
 - 35) Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E. et al. : Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*, J Immunol, 135 : 3172-3177, 1985.
 - 36) Tsuyuguchi, I., Shiratsuchi, H., Okuda, Y. et al. : An analysis of *in vitro* T cell responsiveness in nontuberculous mycobacterial infection, Chest, 94 : 822-829, 1988.
 - 37) Kleinhenz, M. E., Ellner, J. J., Spangnolo, P. J. : Suppression of lymphocyte responses by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan, J Clin Invest, 68 : 153-162, 1981.
 - 38) Pabst, M. J., Gross, J. M., Brozna, J. P. et al. : Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*, J Immunol, 140 : 634-640, 1988.
 - 39) Brownback, P. E., Barrow, W. W. : Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex, Infect Immun, 56 : 1044-1050, 1988.
 - 40) Fournie, J. J., Adams, E., Mullins, R. J. et al. : Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenolic glycolipids, Infect Immun, 57 : 3653-3659, 1989.
 - 41) Tsuyuguchi, I., Kawasumi, H., Takashima, T. et al. : *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex induced suppression of T-cell proliferation *in vitro* by regulation of monocyte accessory cell activity, Infect Immun, 58 : 1369-1378, 1990.

第 66 回総会シンポジウム

IV. *Mycobacterium avium* Complex 感染症の免疫特別発言 : *M. avium* Complex 菌体による免疫抑制

露 口 泉 夫

大阪府立羽曳野病院

受付 平成 3 年 7 月 8 日

Special Comment : *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX (MAC)
-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

Izuo TSUYUGUCHI *

(Received for publication July 8, 1991)

MAC infection is often associated with immunodeficiency of the host. Our present study has demonstrated that MAC organisms and MAC-derived lipid/cord factor induce *in vitro* suppression of ConA and PPD tuberculin-induced proliferative responses of lymphocytes not only in patients with MAC infection but also in healthy individuals. As to the mechanism of immunosuppression by MAC organisms, we postulate that MAC organisms alter the membrane characteristics of monocyte and prevent the effective physical interaction required for activation of T cells.

Taken together, our results suggest that triggering mechanism of MAC infection might be brought about by the host's immunodeficiency, but once overt disease is established, the infected mycobacteria by themselves act immunosuppressively.

Key words : MAC, Immunosuppression

キーワード : MAC 菌体, 免疫抑制

ヒトの MAC 感染症では、特異的および非特異的の刺激による T リンパ球機能の低下が明らかである。この機能低下が感染以前より宿主に具わっていたものか、あるいは MAC 感染の結果としてみられるのか、の問題がある。

そこでわれわれは、末梢血リンパ球を用い、*in vitro* で MAC 菌体がヒトの免疫系にどのような影響を与えるかを検討した。その結果明らかにし得たことは、1) MAC 菌体 lysate は、非特異的な ConA および特異的な PPD 刺激によるリンパ球幼若化反応に抑制的に作用すること。2) 宿主が抗酸菌に感染しているかどうか、

の有無にかかわらず見られること。3) 単球、いわゆる accessory cell 表面における LeuM 3 (CD14) や CR3 (CD11b) の表出をブロックすることである。

おそらく MAC 菌体は、マクロファージによる抗原の processing や T リンパ球への抗原の presentation を阻止することにより、T リンパ球の活性化がブロックされるものと考えられる。このことは、これら表面マーカーに対するモノクローン抗体を培養系に入れることにより、MAC 菌体によるのと同様な抑制効果を示すことにより確認された。

LeuM 3 分子の機能に関しては明らかではないが、

* From the Osaka Prefectural Habikino Hospital, 3-7 Habikino, Habikino City, Osaka 583 Japan.

Phagocytosis に関与することが報告されている。また、CD11b 分子は細胞間の接着に必要な分子である。また、菌体 lysate のみならず、リピッド分画さらには菌体細胞壁の主要成分であるコードファクターにこの抑制活性がみられた。リピッド処理の単球は Con A 刺激と PPD 刺激の反応をブロックしたが、その際未処理の単球が存在する限り反応の抑制は見られなかった。したがって MAC 団体による抑制が、いわゆる suppressor マクロファージを介してなされているとは考え難い。

これらの実験結果から考察すると、いったん MAC による持続感染が成立した個体においては、菌体成分の

持つ免疫抑制作用により、マクロファージ-Tリンパ球系がブロックされ、そのために宿主の抗菌免疫機能がさらに低下することが考えられる。一方、菌自体にとっては、細胞内寄生に好都合な環境が形づくられることになろう。したがって MAC による持続感染がさらに進行し、ますます悪循環が回りだすことになる。

MAC 感染症の治療を考えた場合、特に感染初期の段階で、いかに宿主の「抵抗力」をたかめる手段をとるか、また、その予防にあたっては、将来発症の場となりやすい高齢者の結核の治療においては、これらの点を十分留意する必要があるだろう。

短 報

結核・感染症サーベイランス（結核月報）

（平成3年9月概況）

厚生省保健医療局結核・感染症対策室編

1. 調査対象及び客体

全国の結核予防法第24条（結核登録票）による平成3年9月新登録患者及び初感染結核の新登録者を対象とし、その全数を客体とする。

2. 調査方法

結核・感染症サーベイランスシステムを利用したオンライン集計（保健所→都道府県・指定都市→厚生省）による。

3. 調査結果

(1) 性・年齢階級別新登録患者数

平成3年9月の新登録患者は4,118人（肺結核：初回登録総数3,554, 再登録総数237, 不明総数19）（対前年同月比360人減）である。これを性別にみると男2,653人, 女1,465人である。一方, 年齢階級別にみると, 40歳以上は3,331人であり, 全年齢の約80.9%を占める。

(2) 都道府県・指定都市別新登録患者数

新登録患者を都道府県・指定都市別にみると, 東京都(380人), 大阪府(248人), 大阪市(246人)が多く, 山梨県(10人), 仙台市(13人), 島根県(21人), 鳥取県(22人)が少ない(指定都市別掲)。

(3) 排菌有無別・活動性分類別新登録患者数

新登録患者を排菌有無別にみると, 排菌有の肺結核(1,493人)は全体の約36.3%である。一方, 活動性分類別にみると, 感染性肺結核(2,099人)は全体の約51.0%である。

(4) 化学療法内容別新登録患者数

新登録患者を化学療法内容別にみると, イソニコチン酸ヒドラジド, リファンピシンを併用している者(3,850人)は全体の約93.5%である。

(5) 患者発見方法別新登録患者数

新登録患者を患者発見方法別にみると, 医療機関受診(3,311人)で発見された者が多い(約80.4%)。

(6) 患者職業分類別新登録患者数

新登録患者を患者職業分類別にみると, その他の職業(3,717人)は約90.3%で最も多い。一方, 従業禁止業務(接客業及び保健関係等従事者)(120人)は全体の約2.9%である。

(7) 公費負担区別別新登録患者数

新登録患者を公費負担区別にみると, 結核予防法第34条によるものは1,904人(約46.2%), 第35条によるものは1,104人(約26.8%), その他1,110人(約27.0%)である。

(8) 初感染結核の新登録者数

初感染結核の新登録者は, 412人であり, 対前年同月比46人増である。

(9) 都道府県・指定都市別年換算罹患率*

月間の新発生患者数を年換算罹患率でみると, 人口10万対40.7(対前年同月比3.5減)である。これを都道府県・指定都市別にみると, 大阪市(114.1), 神戸市(77.4)などが多く, 山梨県(14.3), 仙台市(17.2)などが少ない(図)。

*年換算罹患率(人口10万対)=(当年日数÷当日日数) × (新登録患者数÷人口) × 100,000

[人口は「平成2年国勢調査速報(要計表による人口)」による]

結核サーベイランス

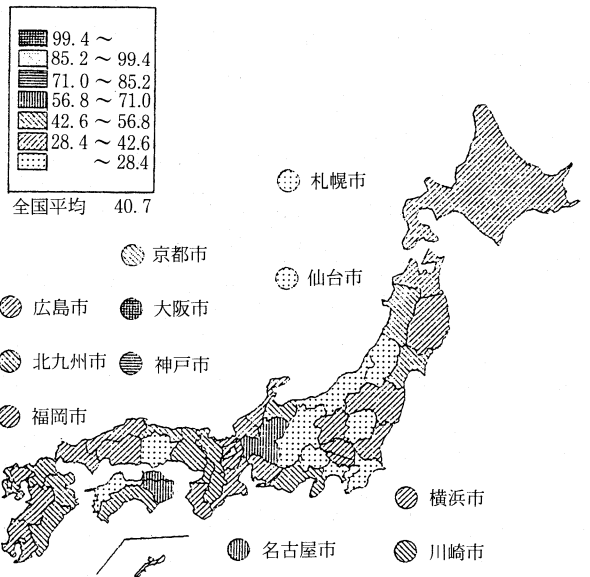


図 都道府県・指定都市別年換算罹患率 (指定都市別掲)

表1 平成3年9月 新登録患者数一性，都道府県・指定都市・政令市別

	総数				総数				総数		
	男	女	女		男	女	男		女		
総数	4,118	2,653	1,465	大阪府	248	171	77	京都市	65	36	29
				兵庫県	151	85	66	大阪市	246	174	72
北海道	117	77	40	奈良県	55	36	19	神戸市	94	56	38
青森県	49	30	19	和歌山県	37	25	12	広島市	34	21	13
岩手県	49	35	14	鳥取県	22	14	8	北九州市	43	28	15
宮城県	49	33	16	島根県	21	16	5	福岡市	37	26	11
秋田県	46	28	18	岡山県	41	22	19	(再掲)			
山形県	25	15	10	広島県	61	42	19	小樽市	6	5	1
福島県	57	36	21	山口県	47	28	19	函館市	11	7	4
茨城県	95	53	42	徳島県	46	29	17	千葉市	14	10	4
栃木県	38	21	17	香川県	52	33	19	横須賀市	13	12	1
群馬県	59	38	21	愛媛県	28	21	7	新潟市	9	5	4
埼玉県	162	108	54	高知県	35	19	16	金沢市	16	9	7
千葉県	122	80	42	福岡県	114	81	33	岐阜市	21	15	6
東京都	380	262	118	佐賀県	28	21	7	静岡市	31	15	16
神奈川県	72	53	19	長崎県	65	35	30	浜松市	16	8	8
新潟県	53	35	18	熊本県	60	37	23	堺市	34	23	11
富山県	24	13	11	大分県	45	29	16	東大阪市	14	10	4
石川県	31	22	9	宮崎県	48	30	18	尼崎市	29	15	14
福井県	27	19	8	鹿児島県	54	37	17	姫路市	15	9	6
山梨県	10	5	5	沖縄県	40	22	18	和歌山市	11	8	3
長野県	34	22	12	(別掲)				呉市	12	6	6
岐阜県	102	63	39	札幌市	39	25	14	下関市	9	4	5
静岡県	151	84	67	仙台市	13	7	6	大牟田市	6	6	-
愛知県	130	85	45	横浜市	85	56	29	長崎市	12	7	5
三重県	55	36	19	川崎市	42	31	11	佐世保市	6	2	4
滋賀県	39	19	20	名古屋市	101	57	44	熊本市	8	5	3
京都府	45	31	14					鹿児島市	7	3	4

表2 平成3年9月 新登録患者数一排菌有無，性・年齢階級別

	総数	肺結核 排菌 排菌				総数	肺結核 排菌 排菌				総数	肺結核 排菌 排菌		
		総数	あり	なし			総数	あり	なし			総数	あり	なし
総数	3,810	1,493	2,317	15~19歳	59	17	42	50~59歳	619	243	376			
男	2,508	1,004	1,504	男	32	9	23	男	417	165	252			
女	1,302	489	813	女	27	8	19	女	202	78	124			
0~4歳	11	-	11	20~29	339	97	242	60~69	828	328	500			
男	4	-	4	男	168	50	118	男	578	231	347			
女	7	-	7	女	171	47	124	女	250	97	153			
5~9	3	-	3	30~39	302	119	183	70歳~	1,177	467	710			
男	2	-	2	男	186	74	112	男	765	295	470			
女	1	-	1	女	116	45	71	女	412	172	240			
10~14	8	-	8	40~49	464	222	242	不詳	-	-	-			
男	6	-	6	男	350	180	170	男	-	-	-			
女	2	-	2	女	114	42	72	女	-	-	-			

表3 結核サーベイランス対前年同月比等比較表

	9月分	前年同月	平成3年 3月分	4月分	5月分	6月分	7月分	8月分
新登録患者数	(100.0) 4,118	(108.7) 4,476	(88.7) 3,651	(94.7) 3,898	(99.2) 4,083	(116.9) 4,812	(111.3) 4,585	(107.4) 4,422
40歳以上新登録患者数	(100.0) 3,331	(110.3) 3,572	(90.2) 3,005	(95.4) 3,178	(108.7) 3,622	(113.4) 3,776	(108.1) 3,601	(107.3) 3,575
排菌有の肺結核	(100.0) 1,493	(104.9) 1,580	(88.6) 1,323	(94.5) 1,411	(101.2) 1,511	(117.5) 1,755	(110.1) 1,644	(106.3) 1,587
感染性肺結核	(100.0) 2,099	(106.3) 2,205	(86.8) 1,821	(94.4) 1,981	(99.4) 2,086	(116.8) 2,451	(110.0) 2,308	(107.1) 2,249
RFP, INH 2剤併用	(100.0) 3,850	(107.9) 4,175	(87.8) 3,380	(94.3) 3,631	(99.0) 3,812	(118.7) 4,569	(111.2) 4,282	(107.1) 4,124
医療機関での発見	(100.0) 3,311	(109.0) 3,595	(94.2) 3,120	(101.4) 3,356	(104.3) 3,453	(122.7) 4,061	(112.9) 3,737	(107.6) 3,564
その他の職業	(100.0) 3,171	(128.2) 4,024	(105.0) 3,329	(110.6) 3,506	(113.5) 3,600	(130.3) 4,133	(127.4) 4,040	(125.6) 3,983
従業禁止の職業	(100.0) 120	(78.3) 112	(70.0) 84	(71.7) 86	(80.8) 97	(126.7) 152	(113.3) 136	(75.8) 91
公費負担区分								
34条	(100.0) 1,904	(111.6) 2,130	(87.0) 1,657	(92.8) 1,767	(99.9) 1,903	(120.2) 2,289	(113.1) 2,153	(109.7) 2,088
35条	(100.0) 1,104	(107.2) 1,219	(90.8) 1,002	(102.2) 1,128	(103.1) 1,138	(128.7) 1,421	(112.8) 1,245	(105.5) 1,165
その他	(100.0) 1,110	(105.4) 1,127	(89.4) 992	(90.4) 1,003	(93.9) 1,042	(99.3) 1,102	(106.9) 1,187	(105.3) 1,169
初感染結核	(100.0) 412	(88.8) 473	(63.6) 262	(78.6) 324	(91.3) 376	(124.3) 512	(105.8) 436	(122.3) 504
り患率	(100.0) 40.7	(108.6) 42.8	(85.7) 34.9	(94.6) 38.5	(95.6) 38.9	(116.5) 47.4	(107.4) 43.7	(103.4) 42.1

(上段の数値は当月(9月)分を100とした場合の指数である)