

原 著

非結核性抗酸菌感染マウスにおける $\gamma\delta$ 型 T細胞の動態と
抗酸菌由来 65 kD 熱ショック蛋白に対する
宿主リンパ球の増殖性応答

富岡 治明・斎藤 肇・江森 方子**

島根医科大学微生物・免疫学教室

瀬戸川 朝一

同 眼科学教室**

受付 平成4年8月24日

BEHAVIOUR OF $\gamma\delta$ TCR⁺ T CELLS DURING THE COURSE OF NONTUBERCULOUS
MYCOBACTERIAL INFECTIONS AND PROLIFERATIVE RESPONSE OF
HOST LYMPHOCYTES TO 65kD HEAT SHOCK PROTEIN

Haruaki TOMIOKA, Hajime SAITO*, Masako EMORI
and Tomoichi SETOGAWA

(Received for publication August 24, 1992)

In order to know the possibility that $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells induced by *Mycobacterium avium* complex (MAC) infections participate in the expression of host resistance and in the occurrence of Behçet disease, we examined the behaviour of them in MAC-infected host mice. In both BALB/c (*Bcg*^s; MAC-susceptible) and CBA/JN (*Bcg*^r; MAC-resistant) strain mice, a transient but appreciable increase in the number of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells in the host peritoneal lymphocytes was noted around week 1 to 2 after *M. intracellulare* infection via ip. route. The degree of induction of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells was somewhat higher in CBA/JN mice than in BALB/c mice. Therefore, $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells are partly responsible for the expression of host resistance against the MAC in the early phase of infection. However, the subsequent decrease in the level of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells was observed by week 5. Thus, in the case of chronic state of MAC infection, the size of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cell-pool seems to be in normal level. This suggests that per cell activity of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells rather than mobilizing number of them is important factor in the mechanisms for occurrence of allergic diseases including Behçet disease. Although, the early increase in $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells of peritoneal cells was also observed during the course of *M. fortuitum* infection, the degree of induction of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells in A/J mice (*M. fortuitum*-susceptible) was in similar level as that in BALB/c mice (*M. fortuitum*-resistant).

BALB/c (MAC-susceptible) strain mice were infected iv. with *M. intracellulare* with or

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

without subsequent ip. infection with *Streptococcus sanguis* and examined for proliferative response of peritoneal or splenic lymphocytes to either MAC PPD or recombinant 65kD heat shock protein (HSP) of *M. leprae*. In this case, only peritoneal lymphocytes from MAC-infected mice showed antigen specific response to PPD and the responsiveness was decreased in mice with multiple infections with MAC and *S. sanguis*. Although both the peritoneal and splenic lymphocytes showed significant response to 65kD HSP of *M. leprae*, the responsiveness was reduced by either MAC alone or MAC plus *S. sanguis* infections. Thus, no appreciable increase was observed in $\gamma\delta\text{TCR}^+$ T cell function on the basis of their proliferative response to 60kD-family HSPs, during the chronic infection due to MAC with or without simultaneous infection with *S. sanguis*.

Key words : $\gamma\delta\text{TCR}^+$ T cell, Heat shock protein, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium fortuitum*

キーワード : $\gamma\delta$ 型 T 細胞, 熱ショック蛋白, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium fortuitum*

緒 言

わが国における非結核性抗酸菌症の主要原因菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) は AIDS などの易感染性宿主に好んで感染・発症し¹⁾²⁾, また化学療法剤に対する感受性が一般に低い³⁾⁴⁾ ところから本菌による感染症は極めて難治性である。他方, 抗酸菌感染症では, *M. tuberculosis* あるいは *M. leprae* などの菌体抗原特異的に MHC-1 拘束性に誘導される CD8⁺ T細胞, あるいはこれらの抗酸菌の熱ショック蛋白 (HSP) に応答性の $\gamma\delta$ 型 T細胞などがエフェクターとなって, アレルギーあるいは自己免疫疾患が招来される可能性が示唆されている⁵⁾⁶⁾。

今回われわれは, MAC 感染マウスにおける $\gamma\delta$ 型 T細胞並びに $\alpha\beta$ 型 T細胞の挙動について検討するとともに, かかる慢性感染で誘導される自己 HSP 反応性 $\gamma\delta$ 型 T細胞のアレルギー疾患発症への関与の可能性を探る目的で, MAC 単独あるいは本菌と, ベーチェット病発症への関与が注目されている *Streptococcus sanguis*⁷⁾ との重感染マウスにおける宿主リンパ球の *M. leprae* の 65kD HSP に対する増殖性応答能についても検討した。

材料と方法

1) 供試菌

MAC 症患者より分離され, 教室で Gen Probe テスト (Gen-Probe 社, 米国) で *M. intracellulare* と同定された N-260 株 (SmT variant), *M. fortuitum* 18367 株 (業室株) および聖マリアンナ医大, 坂根剛教授より分与を受けた *S. sanguis* KTH-1 株を用いた。

2) 動物

日本クレアより購入した BALB/c 系 (MAC 感受性系統, Bcg^s)⁸⁾ および A/J 系マウス並びにチャールスリバーより購入した CBA/JN 系 (MAC 抵抗性系統, Bcg^r)⁸⁾ 雌マウス (5~8 週齢) を用いた。

3) 65kD HSP

国立多摩研究所, 野間口博子博士より分与を受けた recombinant *M. leprae* 65kD HSP⁹⁾ を用いた。

4) MAC 感染マウス腹腔リンパ球中の $\gamma\delta$ 型 T細胞および $\alpha\beta$ 型 T細胞の挙動

M. intracellulare N-260 株の 7H9 培地培養菌 (1 × 10⁸) を BALB/c および CBA/JN マウスの腹腔内に接種し, 5, 14 および 34 日後に腹腔細胞を採取し, これを plastic culture dish (75cm²) を用いて 10% 牛胎児血清 (FBS) 加 RPMI-1640 培地中で 2 時間培養後, 非付着細胞を集め, 正常ハムスター血清で 4°C, 15 分間 blocking 後, FITC 標識抗 $\alpha\beta\text{TCR}$ あるいは抗 $\gamma\delta\text{TCR}$ 並びに PE 標識抗 CD3 ハムスター単クローン抗体 (いずれも PharMingen 社) を含む 10% FBS 加 RPMI-1640 培地中で 4°C, 60 分間保った後, 0.1% 牛血清アルブミン加リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し, FACS 分析を行った。

5) 腹腔および脾リンパ球の 65kD HSP 並びに MAC PPD 応答性

M. intracellulare N-260 株の 7H9 培地培養菌の 2 × 10⁷ を BALB/c あるいは CBA/JN 系マウスの腹腔内に接種した。実験によっては, さらにその 4 週後に *S. sanguis* KTH-1 株の 10% FBS 加トリプトソイブイオン中培養菌の 1 × 10⁶ を接種し, その 5 日後に腹腔細胞並びに脾細胞を採取した。これらより上述 4) の方法で非付着細胞画分を集め, *M. intracellulare*

N-260株の Sauton 培地養濾液より硫酸沈殿法¹⁰⁾で調製した PPD (25 μ g/ml), *M. leprae* 65kD HSP (50 μ g/ml) あるいは熱ショック処理 (42°C, 30分) を施した自己脾細胞 (10⁵) を含む 5% FBS 加-RPMI1640 培地 (0.2ml) に腹腔リンパ球 (1 \times 10⁵) あるいは脾リンパ球 (2.5 \times 10⁵) を加えたものを, U底マイクロタイタープレートのウェル中で 37°C, 4日間培養し, [³H] チミジンの取込みをもってその増殖性応答を測定した。

結 果

1. MAC 感染マウスにおける $\gamma\delta$ 型 T 細胞および

Table 1 Induction of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells and $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells during the Course of *M. intracellulare* N-260 Infection in Mice^{a)}

Mice	Days after infection	$\gamma\delta$ T cells (%)	
		$\gamma\delta$ T cells (%)	$\alpha\beta$ T cells (%)
BALB/c	0	2.9	17.5
	5	2.0	32.5
	14	3.7	34.5
	34	2.2	3.8
CBA/JN	0	2.7	13.4
	5	4.4	28.9
	14	4.3	25.8
	34	3.8	21.5

a) Peritoneal cells were harvested and pooled from 3 or 4 mice infected ip with 1 \times 10⁸ CFU of *M. intracellulare* N-260 at indicated time and plastic nonadherent cells were subjected to FACS analysis after staining with either FITC-labelled anti- $\gamma\delta$ TCR or anti- $\alpha\beta$ TCR monoclonal antibody and PE-labelled anti-CD3 monoclonal antibody. Results are indicated in percentage of the $\gamma\delta$ T cells ($\gamma\delta$ TCR⁺, CD3⁺) or $\alpha\beta$ T cells ($\alpha\beta$ TCR⁺, CD3⁺) in nonadherent cell fraction of peritoneal cells.

Table 2 Induction of $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells during the Course of *M. fortuitum* 18367 Infection in Mice^{a)}

Days after infection	$\gamma\delta$ T cells (%)	
	A/J mice	BALB/c mice
0	7.1	6.7
3	9.1	11.0
7	18.7	11.1
14	11.8	3.2
28	7.6	11.0

a) Ratio of $\gamma\delta$ T cells in nonadherent cell fraction of peritoneal cells from *M. fortuitum*-infected mice was measured as in Table 1.

$\alpha\beta$ T 細胞の挙動

Table 1 に一括して示した。すなわち, MAC 感受性系統の BALB/c 系マウスについてみると, $\gamma\delta$ 型 T 細胞では感染 14 日後にわずかな, また $\alpha\beta$ 型 T 細胞では感染 5~14 日後に有意な増加がみられたが, 両細胞とも感染 34 日後には正常値あるいはそれ以下となり, これらの細胞の誘導は感染 2 週間後の一過性なものであることが分かった。

興味深いことに, こうした細胞の $\gamma\delta$ あるいは $\alpha\beta$ 型 T 細胞の誘導の時期は, MAC の静脈内多量 (10⁸ CFU) 接種を受けたマウスの感染早期にみられる脾での感染菌の一過性の排除反応のそれとよく一致しており (11), さらにこの phase では同時に脾マクロファージの活性酸素産生能を指標としての殺菌活性の亢進が顕著であり (11), $\gamma\delta$ あるいは $\alpha\beta$ 型 T 細胞により産生されるマクロファージ活性化因子またはそうした活性を有する別のサイトカイン (Tumor necrosis factor, macrophage migration-inhibition factor など) の重要性がうかがわれる。また, 感染 34 日後のマウスにおける $\alpha\beta$ 型 T 細胞の比率は対照に比べて著しい低下がみられたが, これはこの phase 以降にみられる T 細胞機能不全状態¹¹⁾ を反映したものと思われる。

他方, MAC 抵抗性系統である CBA/JN 系マウスでの MAC 感染後の腹腔細胞中の $\gamma\delta$ 型 T および $\alpha\beta$ 型 T 細胞の挙動についてみると, 両細胞とも上記 BALB/c 系マウスにおけると同様感染 5~14 日後に両細胞の増加がみられたが, その程度は $\gamma\delta$ 型 T 細胞では BALB/c 系マウスにおけるよりもやや高かった。 $\alpha\beta$ 型 T 細胞でもそれと大差はなかったが, 感染 34 日後でもなお高い細胞比率が維持された。

2. *M. fortuitum* 感染マウスにおける $\gamma\delta$ 型 T 細胞の挙動

Table 2 は, A/J マウス (*M. fortuitum* 感受性) 並びに BALB/c マウス (*M. fortuitum* 抵抗性) における *M. fortuitum* (2.9 \times 10⁷/mouse) の腹腔内接種後の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の挙動をみたものである。いずれも感染 7 日前後に $\gamma\delta$ 型 T 細胞の軽度の誘導がみられたが, マウス系統による差は明確ではなかった。

3. MAC 単独並びに *S. sanguis* との重感染マウスの腹腔および脾リンパ球の増殖性反応

MAC 単独あるいは *S. sanguis* との重感染 BALB/c 系並びに CBA/JN 系マウスにより採取・調製したプラスチック非付着性腹腔および脾細胞画分について, 65kD HSP を主要な T 細胞活性化抗原とすることの知られる MAC PPD⁹⁾ 並びに *M. leprae* の 65kD HSP, さらにその表面に自己の HSP を表現していると考えられる熱ショック (42°C, 30分) 自己脾細胞に対する増殖性応答について検討した (Table 3)。

Table 3 Proliferative response of peritoneal and splenic lymphocytes to MAC PPD, *M. leprae* 65kD HSP and heat-shocked autologous spleen cells

Cells	Mice	Infection	Proliferative response (cpm)			
			None	MAC PPD	65kD HSP	Heated SPCs
Peritoneal lymphocytes	CBA/JN	-	3,568	6,049	34,806	3,154
		MAC	4,871	2,066	10,574	3,054
		MAC+S. <i>sanguis</i>	15,277	16,280	24,251	21,560
Peritoneal lymphocytes	BALB/c	-	4,999	5,074	22,243	4,435
		MAC	6,711	29,862	18,186	4,428
		MAC+S. <i>sanguis</i>	3,885	20,468	17,423	3,524
Spleen cells	CBA/JN	-	10,893	16,865	34,094	10,460
		MAC	11,539	13,416	28,300	12,102
		MAC+S. <i>sanguis</i>	23,371	20,770	16,050	23,725
Spleen cells	BALB/c	-	1,356	12,067	54,785	1,798
		MAC	1,061	19,905	25,062	1,137
		MAC+S. <i>sanguis</i>	1,966	18,237	33,338	1,819

a) Peritoneal lymphocytes (plastic nonadherent cells) and spleen cells harvested from mice infected with 2×10^7 CFU of *M. intracellulare* N-260 (day-33) and 1×10^6 CFU of *S. sanguis* KTH-1 (day-5) were measured for their proliferative response to either MAC PPD ($25 \mu\text{g/ml}$), *M. leprae* 65 kD HSP ($50 \mu\text{g/ml}$) or heat-shocked (42°C , 30 min) autologous spleen cells (Heated SPCs; 10^5 cells), during 5-days cultivation.

まず、MAC PPD に対する応答についてみると、BALB/c 系マウスでは MAC 単独感染により腹腔リンパ球には抗原特異的な応答がみられ、その応答性は MAC・*S. sanguis* 重感染によりやや低下したのに対して、脾リンパ球では MAC 単独感染マウスと MAC と *S. sanguis* との重感染マウスとは、ほぼ同等の MAC PPD に対する増殖応答がみられたが、これは非感染マウスでも同様であったことから、抗原特異的の応答というよりはむしろ PPD 中のマイトジェンに対する増殖性応答と思われる。

次に、CBA/JN マウスでは、腹腔並びに脾内リンパ球はいずれも MAC 抗原特異的な増殖性応答を示さず、MAC・*S. sanguis* 重感染マウスの腹腔リンパ球や脾細胞では PPD 非添加の系でも PPD 添加の系と同程度の細胞増殖がみられた。

ここで、正常脾リンパ球の抗原 (-) での増殖応答が他の場合に比べてかなり高い現象については、この系統マウスの脾細胞中には培地に含まれる牛胎児血清中の何らかのマイトジェニックな成分に反応性の細胞群が多く存在している可能性が考えられる。リンパ球の自発増殖は MAC・*S. sanguis* との重感染マウスでより顕著になるところから、重感染マウスでは腹腔および脾リンパ球の活性化が著しいものと思われた。

次に、*M. leprae* の 65kD HSP に対する増殖応答

については、BALB/c 系マウスでは腹腔リンパ球と脾細胞のいずれの細胞の反応性とも正常マウスで最も高く、MAC 単独感染あるいは *S. sanguis* との重感染を受けたマウスではかえって有意な低下がみられたが、これは、CBA/JN マウスでも同様であった。以上、これらの菌の感染によって宿主の腹腔および脾リンパ球の 60kD ファミリーの HSP に対する反応性が特に亢進するような傾向は認められなかった。

さらに、熱ショック自己脾細胞に対する反応性については、MAC と *S. sanguis* との重感染を受けた CBA/JN マウスの腹腔脾細胞においてのみ有意な増殖性応答が認められた。

考 察

今回の実験成績より、感受性系統マウスと抵抗性系統マウスとを問わず、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は感染後比較的早期に誘導されて来ることから、感染早期での宿主抵抗性の発現になんらかの役割を演じている可能性が考えられるが、慢性感染に移行した宿主では $\gamma\delta$ 型 T 細胞は正常レベルに回復していたことからすると、たとえ $\gamma\delta$ 型 T 細胞が自己免疫疾患の成因になるとしても、その量的な増加によるものではなく、例えば自己 HSP に対する反応性の亢進といったような個々の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性の増強に起因したものと考えられる。

Inoue ら¹²⁾ は, *M. bovis* BCG 感染マウスでは感染の早期に $\gamma\delta$ 型 T 細胞の顕著な誘導がみられ, これは特に *Bcg^r* マウスで *Bcg^s* マウスにおけるよりも著しいことを報告している。われわれの上述の MAC 感染マウスについての成績 (Table 1) では, その誘導の程度こそやや低いものの Inoue らの報告とよく一致している。しかしながら, *M. fortuitum* 感染マウスでは感染早期に軽度の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の誘導がみられたが, その程度については感受性系統 (A/J) と抵抗性系統 (BALB/c) とで特に大きな差異はみられなかった。したがって, 少なくとも *M. fortuitum* 感染では宿主抵抗性に対する $\gamma\delta$ 型 T 細胞の関与の可能性は余り大きいものとは言い難い。これに関連して Griffin ら¹³⁾ も *M. tuberculosis* 感染マウスでの $\gamma\delta$ 型 T 細胞の誘導は余り顕著なものではないとしており, 一般に抗酸菌感染での宿主感染抵抗性の発現における $\gamma\delta$ 型 T 細胞の関与は $\alpha\beta$ 型 T 細胞にくらべてはかなり少ないものといつてよいのではなかろうか。しかしながら, この点について結論を出すには, 今後 ip 以外の接種経路での感染を含めて, 他臓器での $\gamma\delta$ および $\alpha\beta$ 型 T 細胞の挙動の詳細な検討が必要と思われる。

次に, MAC 単独並びに MAC と *S. sanguis* との重感染マウスからの腹腔および脾細胞について, *M. leprae* の 65kD HSP あるいは自己の HSP を表現している熱ショック自己脾細胞に対する増殖性応答性についてみると, 少なくとも今回の検討の限りでは, 抗酸菌の 60kD ファミリーの HSP に対する応答性が有意に亢進するという傾向は認められなかった。MAC PPD に対しては, MAC 感染 BALB/c 系マウスの腹腔リンパ球に抗原特異的な応答がみられたが, この場合のリンパ球は $\gamma\delta$ 型 T 細胞の一過性の誘導が終息してしまっている時期 (感染約 5 週後) に採取されたものであり, ここでみられた増殖性応答は主に $\alpha\beta$ 型 T 細胞のそれと考えられる。

今回の検討では, MAC 慢性感染宿主での $\gamma\delta$ 型 T 細胞の動態とその HSP 応答の解析を主目的としていたため, $\gamma\delta$ 型 T 細胞が最も強く誘導される phase (感染後 1~2 週) についての検討は行っていないので, 今後この点については MAC 感染後の時期を追っての詳細な検討が必要と思われる。

他方, MAC と *S. sanguis* との重感染 CBA/JN 系マウスの腹腔リンパ球のみに熱ショック自己脾細胞に対する増殖性応答, すなわち自己 HSP に対する応答が認められたが, このことはこれらの細菌感染とベーチェット病などのアレルギー疾患との係わり合いを解明する上での一つの重要な示唆を与える成績と思われるが, この点については, 現在, 感染後の時期, 接種菌量あるいは接種部位などの観点からの検討を進めている。

結 語

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染マウスにおける $\gamma\delta$ 型 T 細胞の動態を検討し以下の知見を得た。

1. BALB/c 系マウス (MAC 感受性) のみならず CBA/JN 系マウス (MAC 抵抗性) でも感染の早期に一過性の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の誘導がみられ, 宿主の感染抵抗性発現への関与がうかがわれた。

2. MAC 単独あるいは *S. sanguis* との重感染を受けた BALB/c 系マウスの腹腔リンパ球や脾リンパ球の抗酸菌よりの 65kD HSP に対する増殖応答性は正常マウスのそれよりもむしろ低下しており, MAC あるいは *S. sanguis* 感染による宿主 T 細胞の 60kD ファミリーの HSP に対する反応性の亢進傾向は認められなかった。

謝 辞

本研究の一部は平成 3 年度厚生省ベーチェット病調査研究班研究費により行われた。

M. leprae よりの 65kD HSP を分与頂いた野間口博子博士に深謝します。

文 献

- 1) Young LS, Inderlied GB, Berlin OG, et al. : Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. Rev Infect Dis. 1986 ; 8 : 1024-1033.
- 2) Wood GL, Washington JA. : Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* : review of microbiologic and clinical aspects. Rev Infect Dis. 1987 ; 9 : 275-294.
- 3) Wolinsky E : Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis. 1979 ; 119 : 107-159.
- 4) Rastogi N, Frehel C, Ryter A, et al. : Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium* : Is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? Am Rev Respir Dis. 1981 ; 20 : 666-1667.
- 5) 鳥越俊彦, 佐藤昇志, 菊池浩吉 : Heat shock protein (hsp) と感染免疫—hsp コネクションと宿主免疫応答—, 「Annual Review 免疫」1991, 菊池浩吉, 矢田純一, 奥村 康編, 1992 ; 342-350.
- 6) Res PCM, Schaar CG, Breedeld FC, et al. : Synovial fluid T cell reactivity against 65kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. Lancet. 1988 ; 27 : 478-480.

- 7) Isogai E, Ohono S, Takeshi K, et al. : Close association of *Streptococcus sanguis* uncommon serotype with Behçet's disease. *Bifidobact Microflora*. 1990 ; 9 : 27-41.
- 8) Goto Y, Nakamura R, Takahashi H, et al. : Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *Infect Immun*. 1984 ; 46 : 135-140.
- 9) Nomaguchi H, Park I, Kohsaka K. : Characterization of a 65k dalton heat-shock protein of mycobacteria, Twenty-Fifth Joint Conference on Leprosy Research. The United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 1990 ; p.48-51.
- 10) Chaparas SD, Maloney CJ, Hedrick SR. : Specificity of tuberculosis and antigens from various species of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1970 ; 101 : 74-83.
- 11) Tomioka H, Saito H, Yamada Y. : Characteristics of immunosuppressive macrophages induced in spleen cells by *Mycobacterium avium* complex infections in mice. *J Gen Microbiol*. 1990 ; 136 : 965-973.
- 12) Inoue T, Yoshikai Y, Matsuzaki G. : Early appearing γ/δ -bearing T cells during infection with *Calmette Guérin Bacillus*. *J Immunol*. 1991 ; 146 : 2754-2762.
- 13) Griffin JP, Harshan KV, Born WK, et al. : Kinetics of accumulation of $\gamma\delta$ receptor-bearing T lymphocytes in mice infected with live mycobacteria. *Infect Immun*. 1991 ; 59 : 4263-4265.