

原 著

非定型抗酸菌の前感染によるBCG免疫の抑制

II. 抗菌免疫の抑制

中 村 玲 子

国立予防衛生研究所細菌部

受付 平成4年10月29日

EFFECT OF ATYPICAL MYCOBACTERIAL INFECTION ON THE CELL-MEDIATED IMMUNITY INDUCED BY *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG IN MICE

II. SUPPRESSION OF PROTECTIVE IMMUNITY

Reiko M. NAKAMURA *

(Received for publication October 29, 1992)

The protective immunity against virulent mycobacteria is induced by *Mycobacterium bovis* BCG in mice. It was found that a preceding infection with a strain of atypical mycobacteria, *M. avium* Mino, suppresses the BCG-induced protective immunity. In the present study, protective immunity was judged by the extended survival time after the challenge with virulent mycobacteria, *M. bovis* Ravenel. C57BL/10 mice receiving BCG vaccination with 10^7 live bacilli sc showed prolonged survival after 10^6 injection with *M. bovis* Ravenel iv. Infection of these mice with *M. avium* Mino, 10^6 iv, 2 weeks before BCG vaccination shortened the survival time significantly. This suppression of protective immunity was caused by $CD8^+$ T cells. $CD4^+$ T cells also had a weak suppressive effect on the protective immunity, but was not the main population of suppressor T cells. Thus, it was confirmed that atypical mycobacterial infection produces $CD8^+$ suppressor T cells which inhibit both protective immunity and delayed-type hypersensitivity induced by BCG.

Key words : Atypical mycobacteria, Protective immunity, $CD8^+$ suppressor T cell

キーワード : 非定型抗酸菌, 抗菌免疫, $CD8^+$ 抑制性T細胞

中村らは非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium* Mino が、マウスに感染すると、その後のBCG免疫における遅延型アレルギーを抑制することを報告した¹⁾²⁾。この機作はサブプレッサーT細胞によるものであることも

明らかになった²⁾。しかし、非定型抗酸菌の前感染がBCG免疫による獲得抵抗性(抗菌免疫)、すなわち有毒結核菌の攻撃に対する抵抗性に対してどのような影響を及ぼすかは知られていなかった。そこで、本実験では、

*From the Department of Bacteriology, National Institute of Health, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan.

BCG 免疫マウスに有毒結核菌を感染させ、生存日数の延長を指標として獲得抵抗性を比較する系を用いて、非定型抗酸菌の前感染が BCG 免疫にどのような影響を与えるかを検討した。

その結果、非定型抗酸菌の前感染は、BCG 感作による遅延型アレルギーのみならず、抗菌免疫をも抑制することが明らかとなった。また、その抑制作用は、遅延型アレルギーの抑制と同様、サプレッサー T 細胞によって担われていることも判明した。

材料および方法

マウス：近交系 C57BL/10, C57BL/6 の 6～8 週齢の♀を用いた。動物はすべて SPF で、日本 SLC (浜松) より購入した。

抗酸菌：*Mycobacterium avium* Mino, *M. bovis* BCG (Tokyo), *M. bovis* Ravenel は、本研究室保存の菌株を Middlebrook の 7H9 培地で振とう培養し、 5×10^7 CFU/ml の濃度になったものを分注、 -80°C で保存した。実験にはこれを融解して使用した。

遅延型アレルギーの測定：BCG 免疫により誘導される遅延型アレルギーは、前報で報告したように BCG 生菌 10^7 で皮下感作したマウスの足蹠に精製ツベルクリン (PPD) を $10\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ PBS 注射し、24, 48 時間後の足蹠反応を測定して判定した²⁾。測定にはダイヤル・シックスゲージ (尾崎製作所, 東京) を使用、1/100mm 単位で表現した。

抗菌免疫の強度の判定：マウスに *M. bovis* Ravenel 10^6 生菌を尾静脈より注射し、生存日数を記録した。1 群 10 匹のマウスを用い、平均生存日数と SE から、各群間の生存日数の長さを統計学的に比較し、抵抗性の指

標とした。未処置マウスの有毒菌攻撃後の生存日数と、BCG 感作マウスのそれとを対照として実験群の免疫力を比較した。

細胞移入実験：C57BL/6 マウスに *M. avium* Mino の生菌 10^6 を静注し、1 週後に脾細胞浮遊液を調整し、赤血球を溶解させた後プラスチックプレートに 37°C 90 分付着させ、非付着性の細胞を集めて、これをドナー細胞とした。レシピエントには正常の C57BL/10 マウスを使用し、1 匹当たり 5×10^7 の細胞を尾静脈より移入した。

BCG 免疫：*M. bovis* BCG (Tokyo) 生菌 10^7 を皮下注射することによりマウスを免疫した。2 週後、PPD に対する足蹠反応で免疫の成立を確認した。

M. avium Mino の前感染：*M. avium* Mino 10^6 を静脈内注射することにより感染させた。前感染は BCG 免疫の 2 週前に行った。

M. bovis Ravenel による攻撃：すべてのマウスに 10^6 の *M. bovis* Ravenel を尾静脈より注射した。その時期は BCG 免疫の 14～17 日後であった。

抗体および補体：抗マウス CD4 (L3T4) 抗体、抗マウス CD8 (Lyt 2, 1) 抗体、および補体 (low toxic guinea pig complement) は Cedarlane Laboratory (Ontario, Canada) より購入した。抗体は細胞 10^8 当たり $10 \times$ 希釈を 0.1 ml, 補体は原液 0.1 ml を使用し、 37°C 60 分の処理後よく細胞を洗浄した。

統計処理：生存日数の比較は Student の *t*-検定法により有意差検定を行った。

結 果

1. *M. avium* Mino の前感染が BCG 免疫により誘

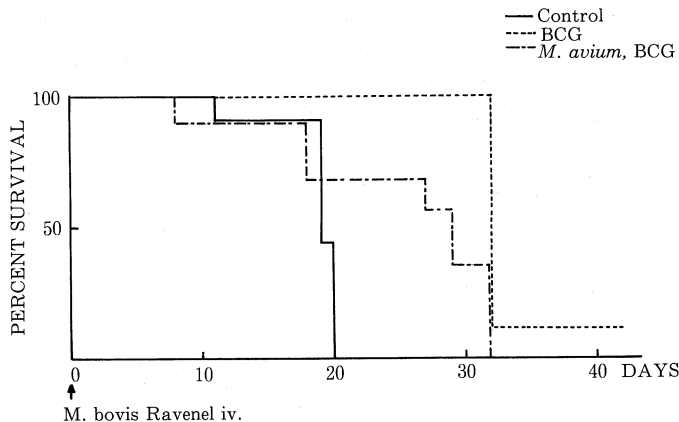


Fig. 1 Suppressive effect of *M. avium* Mino pre-infection on the protective immunity against *M. bovis* Ravenel induced by BCG-vaccination.

導される獲得抵抗性に与える影響

M. bovis Ravenel の攻撃に対し、BCG 免疫マウスの生存期間は非免疫マウスのそれに比べて有意に長く、抗菌免疫の誘導を示す結果を得た。Fig. 1 にみられるように、非免疫対照群が平均 19.5±0.5 日で死亡するのに対し、BCG 生菌 10⁷ で 2 週間前に免疫したマウスは平均生存日数が 35.7±9.8 日であり、危険率 1% 以下で有意の差を示した。この実験系において、BCG 免疫の 2 週前に *M. avium* Mino 10⁶ を静脈内接種したマウスは、*M. bovis* Ravenel の攻撃に対する抵抗性が減弱し、平均生存日数が 25.0±8.4 日であった。非定型抗酸菌前感染 BCG 免疫群と、BCG 免疫のみの群の生存日数の間には、危険率 1% 以下で有意差が認められた。この結果は、*M. avium* Mino の前感染が、BCG による抗菌免疫の誘導を抑制することを示している。

また、この実験で BCG 免疫後 2 週目（有毒菌攻撃の前）に、PPD に対する遅延型アレルギーの成立を足蹠反応で検討したところ、表に示すように Mino 前感染群では著明な遅延型アレルギーの抑制が認められ、前報での報告の結果²⁾ を確認した。

2. 非定型抗酸菌感染マウス脾細胞による BCG 免疫の抑制

われわれは第 1 報において、*M. avium* Mino の前

表 *M. avium* Mino の前感染による BCG 遅延型アレルギーの抑制

実験群	BCG 感作	足蹠反応 (1/100 mm)
Mino 感染	+	6.11 ± 3.25
非感染	+	37.55 ± 13.08

} P < 0.005

感染が BCG 免疫の遅延型アレルギーを抑制し、その作用がサブレッサー T 細胞によるものであることを示した²⁾。本実験における抗菌免疫の抑制が、遅延型アレルギーの場合と同様に細胞性のものであるか否かを確かめるため、細胞移入実験を行った。

すでに前報で知られているように、サブレッサー細胞の誘導は B10 マウスより B6 マウスの方が強いので、ドナーとして C57BL/6 マウスを用い、レシピエントには B10 マウスを用いた。*M. avium* Mino を 10⁶ 静注後 1 週めにドナーの脾を摘出、脾細胞浮遊液を作り、プラスチック非付着性のリンパ球を移入細胞として用いた。BCG 免疫は、細胞移入直後に行った。結果は Fig. 2 にみられるように、対照群（非免疫）マウスは *M. bovis* Ravenel 10⁶ の静脈内攻撃で 23.7±0.6 日で死亡したが、BCG 免疫群は 42.2±8.9 日の生存日数を示し、BCG による明らかな抗菌免疫の誘導が認められた。これに対し、Mino 感染マウスの脾リンパ球を移入後 BCG 免疫をした群では、有毒菌攻撃後の生存日数は 31.1±4.3 日であった。

非感作対照群と BCG 免疫群、BCG 免疫群と細胞移入群の間の平均生存日数には、それぞれ危険率 1% 以下で有意差が認められた。すなわち、Mino 感染マウス脾リンパ球には、BCG 免疫による抗菌免疫を抑制するサブレッサー細胞が存在することが知られた。ちなみに、BCG 免疫群と細胞移入後 BCG 免疫群の感作 2 週の PPD 足蹠反応は、それぞれ 50.5±13.2 および 33.5±20.8 (1/100 mm 単位) であった。

3. Mino 感染マウス脾細胞中のサブレッサー細胞の表面抗原の表現型

M. avium Mino 感染により生じる BCG 免疫の抑

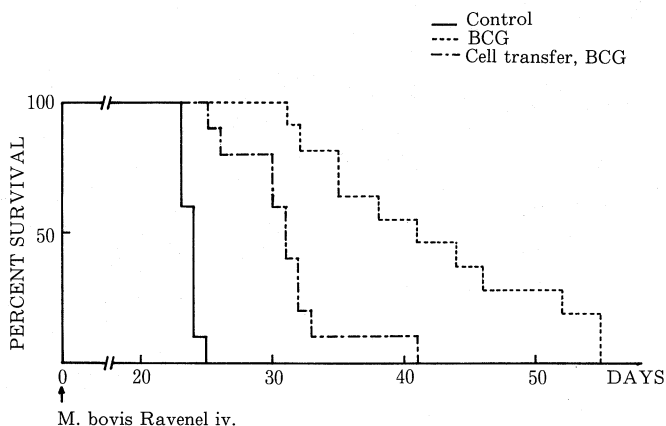


Fig. 2 Suppressive effect of the splenic lymphocytes transferred from the *M. avium* - infected donors on the protective immunity induced by BCG-vaccination.

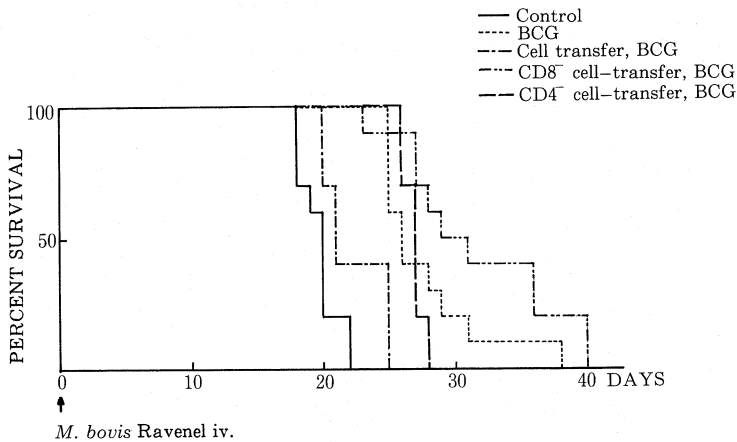


Fig. 3 Suppression of BCG-induced protective immunity is mediated by CD8⁺ splenic T cells of *M. avium* Mino-infected mice.

制細胞がどのような細胞であるかを調べるために、前述の実験系において移入する細胞をあらかじめ抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗Ly5抗体などの抗体と補体で処理し、特定の細胞群を除去した後移入する実験を行った。移入細胞を抗CD8抗体と補体で処理した場合には、抑制作用の解除が明らかに認められた。

Fig. 3 にみられるように、対照群の生存が 19.7 ± 1.4 日、BCG 免疫群が 27.8 ± 4.1 日、全脾リンパ球移入後 BCG 免疫群では生存が 22.3 ± 2.3 日であった。これに対し、この移入細胞を抗CD8抗体と補体で処理してから移入すると、その生存は 31.8 ± 5.7 日と有意に延長し、抑制の完全な解除が認められた。この結果はCD8⁺のリンパ球が主な抑制機構をつかさどっていることを示している。

一方、移入細胞を抗CD4抗体と補体で処理した場合も、弱いながら抑制の解除が認められ、その生存日数は 26.9 ± 0.7 日で、全脾リンパ球移入群との間には有意差があった。しかし、抗CD8処理群と、抗CD4処理群の間にも危険率1%以下の有意差があった。抗Ly5抗体処理細胞の移入の場合と、ドナーの血清を移入した場合は、抑制の解除は認められなかった。

考 察

われわれは以前に非定型抗酸菌の遅延型アレルギーを抑制するCD8⁺T細胞が存在することを見だし¹⁾、また、非定型抗酸菌の前感染がBCG免疫の遅延型アレルギーを抑制し、その機作はCD8⁺抑制性T細胞にあることを報告した²⁾。今回の実験により、この非定型抗酸菌前感染により生じる抑制性T細胞が、BCG免

疫による獲得抵抗性(抗菌免疫)をも抑制することが明らかになった。その表現型はやはりCD8陽性であった。しかしながら、われわれの実験においては、遅延型アレルギーを抑制するCD8⁺T細胞と、獲得抵抗性を抑制するCD8⁺T細胞が同じものか否かは不明である。その答を得るには、T細胞のクローニングが必要である。

一方、今回の実験では、CD4⁺T細胞にも弱いながら獲得抵抗性の抑制に働く効果があることが認められた。CD4⁺T細胞には遅延型アレルギーや獲得抵抗性に関与するT_H1細胞と、これに拮抗的に働くT_H2細胞の2つのタイプがあることが知られている³⁾⁴⁾。今回の実験で抗CD4抗体処理がBCG免疫の抑制の解除に働いたことから、この細胞集団にT_H2タイプの細胞が存在することが示唆される。しかし、CD4⁺T細胞の除去とCD8⁺T細胞の除去の効果には著明な差があり、本実験系において主な役割を果たしている抑制性T細胞はCD8⁺T細胞であることは明らかである。

非定型抗酸菌は結核菌に比較して病原性が低いが、最近では免疫不全症候群(AIDS)における日和見感染の原因菌として注目されるようになってきた⁵⁾。今回の実験の結果は、非定型抗酸菌自体は病原性が低くても、その感染が抗結核免疫の抑制に働く場合があることを示している。また、先の報告で述べたように、非定型抗酸菌の前感染は遅延型アレルギーの発現を抑制する¹⁾²⁾が、この作用は、BCG接種者を選別する際のツベルクリン反応を誤認させる可能性がある。東南アジア地区のように非定型抗酸菌の感染がまん延している地域では、ツベルクリン反応の結果をそのまま評価してよいかどうか問題である。

また、非定型抗酸菌の前感染が抗結核免疫に抑制的に働く場合があるという本実験の結果は、非定型抗酸菌が感染症（特に結核）における modifier の役割を果たすかもしれないという点で、無視できない菌群であることを示している。非定型抗酸菌の免疫学的検討はまだまだ十分でなく、今後の研究が期待される。

謝 辞

本研究は一部日米医学協力研究プロジェクトの援助を受けた。

文 献

- 1) Nakamura RM, Goto Y, Kitamura K, et al. : Two types of suppressor T cells that inhibit delayed-type hypersensitivity to *Mycobacterium intracellulare* in mice. Infect Immun. 1989 ; 57 : 779-784.
- 2) 中村玲子, 後藤義孝, 木ノ本雅通 : 非定型抗酸菌の前感染がBCG免疫に及ぼす影響 I. 遅延型アレルギー, 結核. 1990 ; 65 : 581-584.
- 3) Cher DJ & Mosmann TR : Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. J Immunol. 1987 ; 138 : 3688-3694.
- 4) Mosmann TR & Coffman RL : Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv Immunol. 1989 ; 46 : 111-147.
- 5) American Thoracic Society : Mycobacterioses and the acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Resp Dis. 1987 ; 136 : 492-496.