

原 著

実験的マウス結核症モデルを用いたガンマイインター
フェロン療法の試み川上 和義・照屋 勝治・當山 雅樹
久手堅 憲史・斎藤 厚

琉球大学医学部第1内科

受付 平成6年5月16日

受理 平成6年7月14日

A THERAPEUTIC TRIAL OF EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS WITH
GAMMA-INTERFERON IN AN IMMUNOCOMPROMISED
MOUSE MODELKazuyoshi KAWAKAMI^{*}, Katsuji TERUYA, Masaki TOHYAMA
Norifumi KUDEKEN and Atsushi SAITO

(Received 16 May 1994/Accepted 14 July 1994)

It has been well documented that IFN- γ plays an important role in the host defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection through activating macrophages to kill the organism. In the present study, we studied the effects of *in vivo* injection of monoclonal antibody against IFN- γ (anti-IFN- γ mAb) on the mycobacterial infection to confirm the role of this cytokine.

The injection of anti-IFN- γ mAb suppressed the enhanced expression of MHC class II and ICAM-1 on pulmonary parenchymal macrophages induced by intravenous injection of *Mycobacterium bovis* BCG. The number of bacilli recovered from lung of mice treated with anti-IFN- γ mAb and injected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was significantly larger than that of the control infected mice. From these results, it was indicated that anti-IFN- γ mAb blocked the activities of endogenously synthesized IFN- γ , thus inhibited the activation of macrophages to kill the bacilli.

Next, CD4⁺ T cell-depleted mice were prepared by injecting anti-CD4 mAb and used as immunocompromised animal. When infected with *M. tuberculosis*, the multiplication of the bacilli within the lungs of such immunocompromised mice was much more enhanced in comparison with the control mice with intact CD4⁺ T cells. Administration of IFN- γ significantly reduced the number of the bacilli in lung.

Further, in an *in vitro* study with human lung macrophages, IFN- γ enhanced the killing activity of macrophages against *M. tuberculosis* in a dose dependent manner, and suboptimal dose of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ synergistically augmented the effect of IFN

*From the First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-01 Japan.

-7.

These results suggest that an adjuvant therapy with IFN- γ may be hopeful in the treatment of tuberculosis caused by multi-drug resistant bacilli in immunocompromised patients.

Key words : Tuberculosis, Mice, IFN- γ , Macrophage, 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃

キーワード : 結核症, マウス, ガンマインターフェロン, マクロファージ, 活性型ビタミンD₃

緒 言

結核罹患率は、化学療法薬の開発に伴い1955年以降順調に減少してきたが、1985年頃よりその減少速度の鈍化がみられている。その原因の一つとして、社会情勢の変化、医療の高度化に伴って高齢者や免疫力の低下した患者が増加しつつあることが挙げられる。これらの患者の中には、化学療法への反応が悪いため治療が長期化し、抗結核薬への耐性化が起り難治化する症例も出現している。ことに米国においては、AIDSに合併する結核症において高度に耐性化した結核菌が高頻度に分離されている¹⁾。

近年の遺伝子工学の進歩に伴い種々の病原体に対する生体防御機構が分子レベルで理解されるようになってきた。結核菌を含む多くの細胞内寄生細菌の排除にはIFN- γ によるマクロファージの活性化を必要とすることがよく知られている²⁾。最近 AIDS患者においてIFN- γ の産生誘導に重要なインターロイキン12(IL-12)の産生が低下していることが報告されており³⁾、結果としてIFN- γ の産生低下も予想される。このような免疫不全患者に伴う難治性結核症に対し、補助的療法としてIFN- γ のようなサイトカインを投与することは意味のあることと思われる。今回われわれは、CD4陽性T細胞欠損マウスを用いて免疫不全状態における結核症モデルを作製してIFN- γ 療法を試みその有用性について検討した。併せてヒトの肺内マクロファージを用いて同療法のヒトへの応用の可能性についても検討したので報告する。

材料と方法

1) マウス

日本SLC(静岡)より7週齢で購入したSPF雄のDBA/2マウスを約1週間飼育した後実験に用いた。マウスは納入時より実験終了時までエアカーテン付きのアイソレーター内で滅菌した水と飼料で飼育された。

2) 供試菌

① *Mycobacterium bovis* BCG: 日本ビーシージー

製造株式会社より購入した *Mycobacterium bovis* BCGを生食で稀釈後 1×10^7 cfuをマウスの眼窩静脈叢より接種した。

② *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv): 実験には結核予防会結核研究所から供与されたヒト型結核菌H37Rvを用いた。使用に際してはMiddlebrook 7H9液体培地にて1週間培養して増殖させ生食で3回洗浄した後McFarland法で 1×10^8 cfu/mlに調整したものを稀釈して用いた。

3) 肺内白血球分画の精製

マウスをエーテル麻酔後脱臼開胸して右心室から冷生食により肺内血管症を十分に洗浄した。肺を摘出してステンレスメッシュですり潰しコラゲナーゼおよびDNase Iとで37°C 1時間インキュベートした後パーコール比重遠沈法にて白血球分画を精製した。また、ヒト肺内マクロファージは41歳女性、エキソスモーカーで右S⁶の腺癌のため右下葉切除した肺の正常部分を得、マウスと同様な方法で白血球分画を精製した後、48ウェルカルチャープレートで37°C 1時間インキュベートし非付着細胞を除去したものをマクロファージとした。

4) フローサイトメトリー

マウス肺内白血球分画の細胞を抗MHCクラスII抗体(AMS-32.1, PharMingen社, San Diego, 米国)または抗ICAM-1抗体(3E2, PharMingen社)で染色後、サイトロン(Beckton Dickinson社, Mountain View, 米国)を用い散乱プロファイルにおいてマクロファージ部分にゲートをかけ各表面抗原の発現について解析した。

5) 内因性IFN- γ のブロッキング

ATCCより購入した抗IFN- γ 抗体産生細胞(クローンR4-6A2)の培養上清からプロテインAカラムキット(アマシャムジャパン, 東京)を用いて抗体(ラットIgG)を精製した。内因性IFN- γ をブロックするために200 μ gの抗IFN- γ 抗体を感染3日前、当日およびその後2回/週の割合で腹腔内へ接種した。コントロールとしてラットIgGを用いた。

6) IFN- γ による治療実験

ATCCより購入した抗CD4抗体産生細胞(GK1.5)をヌードマウスに接種して得られた腹水 $25\mu\text{l}$ を抗IFN- γ 抗体の場合と同様なスケジュールでマウスに接種し、フローサイトメトリー解析でCD4陽性T細胞を1%以下にまで除去できた。このマウスにH37Rv約 1×10^7 cfuを眼窩静脈より接種し1日後、2週間または4週間後に肺を摘出しすり潰した後、0.2% Tween 80を加えた蒸留水で10段階希釈しMiddlebrook 7H11培地に接種して肺内菌数を調べた。このとき感染日より連日4週間5,000単位のリコンビナントマウスIFN- γ (第一製薬より供与)を腹腔内に投与しその影響についても検討した。

7) ヒト肺内マクロファージの殺菌能に対するIFN- γ の影響

ヒト肺内マクロファージ(1×10^6 /well)を各種濃度のリコンビナントヒトIFN- γ (第一製薬より供与)、 1nM の活性型ビタミンD₃(日本ロッシュより供与)と4日間インキュベートした後結核菌と混合培養し6時間後に遊離菌を洗浄した。そして、各試薬を新たに添加してさらに7日間培養した後にカルチャーウェル内の結核菌数を調べた。

8) 統計処理

統計学的解析にはStudent's *t* testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) BCGによる肺内マクロファージの活性化と内因性IFN- γ のブロッキングによる影響

Mycobacterium bovis BCGを静脈内投与し2週間後に肺組織から白血球分画を精製し、マクロファージ活性化抗原として知られているMHCクラスIIまたはICAM-1を認識する抗体で染色後フローサイトメトリーで解析した。散乱プロフィールにおいてマクロファージ分画にゲートをかけて解析するとMHCクラスII、ICAM-1ともにBCG投与によってその発現が増強したが、抗IFN- γ 抗体を投与することによって内因性のIFN- γ をブロッキングすると、これらのマクロファージ活性化抗原の発現増強が強く抑制された(Fig.1)。

2) 内因性IFN- γ のブロッキングによる肺内での結核菌排除の抑制

結核感染防御におけるIFN- γ の重要性を明らかにするために、ヒト型結核菌をマウスに経静脈感染させ2週間後に肺内菌数を調べる実験において同時に抗体を投与することによって内因性のIFN- γ をブロッキングした際の影響について検討した。Fig.2に示すように、結核菌感染後2週間目の肺内菌数は、抗IFN- γ 抗体を投与したマウスではラットIgGを投与したコントロールマウス

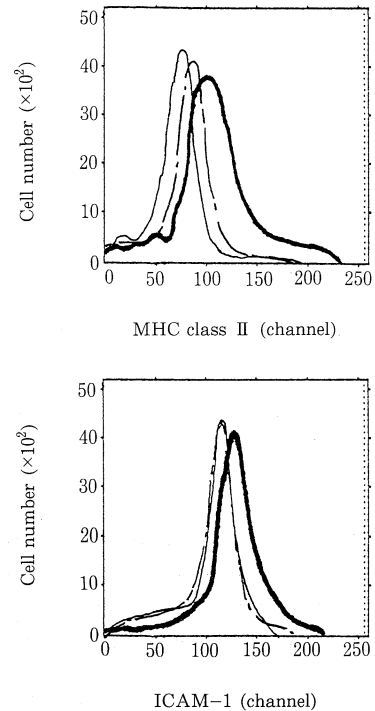


Fig. 1 Effect of blocking of endogenous IFN- γ on the activation of pulmonary parenchymal macrophages after infection with *M. bovis* BCG. Mice were infected intravenously with saline (—), or *M. bovis* BCG (1×10^7 cfu) in the presence of an irrelevant rat IgG (---) or anti-IFN- γ mAb (· · ·). Pulmonary parenchymal leukocytes were obtained 7 days after the infection, and stained with anti-MHC class II (upper) or anti-ICAM-1 (lower). A flow cytometric analysis was carried out for the macrophage population defined by forward and side scatters. The experiment was performed using three mice, and representative results was shown.

スに比べ有意に増加していた。

3) CD4陽性Tリンパ球欠損マウスにおける結核菌感染に対するIFN- γ の治療効果

免疫不全モデルとして抗CD4抗体を投与することによってCD4陽性Tリンパ球を欠損させたマウスにヒト型結核菌を経静脈感染させ経時的に肺内菌数を調べたところ、コントロールマウスに比べCD4陽性Tリンパ球欠損マウスでは4週間目に有意な菌数の増加が認められた(Fig.3)。このモデルを用いてIFN- γ による結核症の治療を試みた。結核菌感染と同時に5000単位のIFN- γ を連日腹腔内投与し4週間後に肺内菌数を調べたと

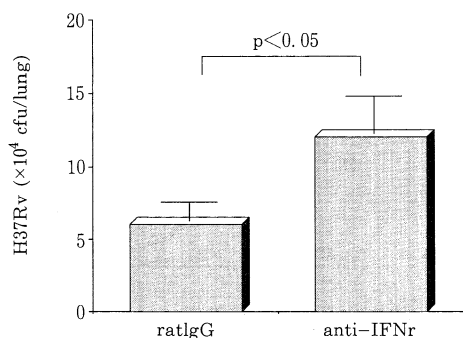


Fig. 2 Effect of blocking of endogenous IFN- γ on the elimination of organisms in the lungs of mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv. Mice, treated with an irrelevant rat IgG or anti-IFN- γ , were infected intravenously with *M. tuberculosis* H37Rv. The number of viable organisms in lung was quantitated 14 days after the infection. Each result represents the mean \pm standard deviation (SD) of three mice.

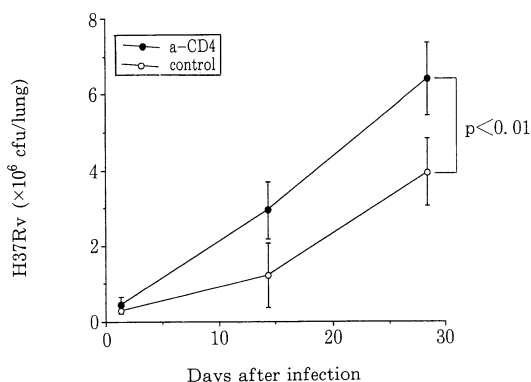


Fig. 3 Effect of *in vivo* depletion of CD4⁺ T cells on the elimination of organisms in the lungs of mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv. Mice, treated with control ascites (○) or anti-CD4 mAb (●), were infected intravenously with *M. tuberculosis* H37Rv. The number of organisms in lung was quantitated 1, 14 and 28 days after the infection. Each result represents the mean \pm SD of three mice.

こゝ Fig.4 に示すように IFN- γ の投与は、CD4 陽性 T リンパ球欠損マウスにおける肺内菌数の増加を有意な差をもって減少させた。

4) IFN- γ によるヒト肺内マクロファージの抗結核菌活性の増強と活性型ビタミン D₃ の相乗効果

肺癌患者の手術肺から正常組織の一部を得、先に示し

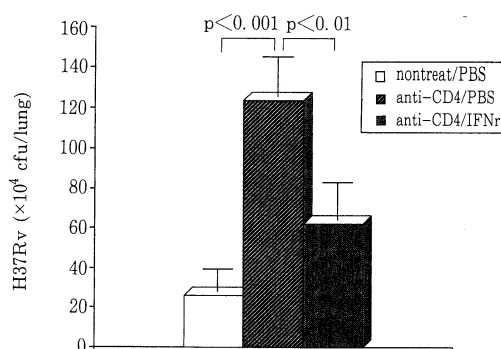


Fig. 4 Therapy with IFN- γ of the experimental tuberculosis in the mice depleted of CD4⁺ T cells. Mice were treated and infected as in Figure 3, and therapy with IFN- γ was attempted by daily intraperitoneal-injection of this cytokine (5,000 U/mouse) until mice were sacrificed 28 days after the infection. Each result represents the mean \pm SD of three mice.

た方法に従って精製したマクロファージを4日間 IFN- γ とインキュベート後に6時間結核菌と混合培養し、遊離の菌を除去した後さらに7日間培養しマクロファージ内の菌数を調べた。同時に活性型ビタミン D₃ の併用効果についても検討した。Fig.5 に示すように IFN- γ の濃度に応じてマクロファージによる抗結核菌作用の増強効果が認められ、さらにこれは 1nM の活性型ビタミン D₃ との併用により相乗的に増強された。

考 察

結核菌は宿主に感染するとまず組織マクロファージに貪食されるが、細胞内殺菌に対してエスケープ機構を有しているため殺菌されずに細胞内で増殖を開始する⁴⁾。生体はそれに対し主としてヘルパー T 細胞から産生される IFN- γ によってマクロファージを活性化しその殺菌能を高めることで対処しようとする²⁾。マウスの系では殺菌物質として最近注目を集めている NO のマクロファージにおける産生を IFN- γ が増大させることが報告されている⁵⁾。また、IFN- γ はマクロファージ上の補体レセプターや Fc レセプターの発現を増加させることによって結核菌の貪食を助けたり、MHC クラス II や ICAM-1 のような接着分子の発現を増加させることでヘルパー T 細胞への抗原提示能を高めて、結核菌に特異的な T 細胞の活性化をより効率的に誘導する作用が知られている²⁾。

このような IFN- γ によるマクロファージの抗結核菌活性の増強効果は、マウスにおいてよく検討されてい

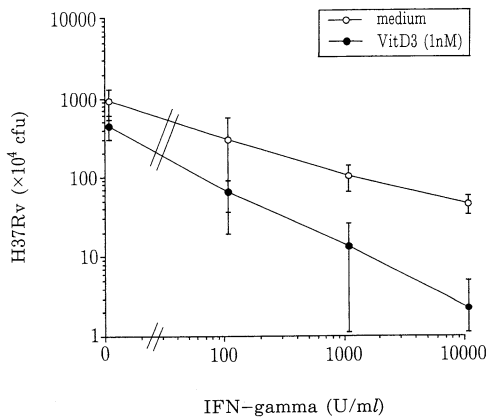


Fig. 5 Synergistic effect of IFN- γ and 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on anti-mycobacterial activity of human pulmonary macrophages. Macrophages were prepared from a small piece of human lung obtained by operation, and cultured at 1×10^6 /well with various doses of recombinant human IFN- γ in the presence (●) or absence of 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (○) for 4 days. The cultures were incubated with *M. tuberculosis* H37Rv (1×10^6 cfu/well) for 6 h, and the free bacteria were washed out by medium. After further 7 days culture in the presence or absence of each reagent, the number of organisms in each culture well was quantitated. Each result represents the mean \pm SD of triplicate cultures.

る⁹⁾。今回のわれわれのデータでも、BCGによるマウスの肺内マクロファージの活性化がIFN- γ によって担われていること、結核菌感染防御において内因性のIFN- γ が必須であることが明らかになった。さらに、最近2つのグループからIFN- γ 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて、より直接的に結核感染防御におけるIFN- γ の重要性について検討した結果が報告されている⁷⁾⁸⁾。ノックアウトマウスではコントロールマウスに比べて肺や脾臓、肝臓からの菌の排除が遅延し、生存期間も著明に短縮している。抗体を用いた今回の実験に比べて結核菌に対する生体からの排除はるかに低下している結果となっているのは、完全にIFN- γ の産生がブロックされているためと思われる。

また、免疫不全モデルとしてCD4陽性T細胞を抗体によって欠損させたマウスにヒト型結核菌を感染させた時に、コントロールマウスに比べて肺からの菌の排除が遅延することを示したが、このことは結核感染防御におけるCD4陽性T細胞の重要性を再確認する成績となっ

た。ヘルパーT細胞が主要なIFN- γ の産生細胞であることを考えれば、これらの細胞が主として障害されるAIDS (acquired immunodeficiency syndrome) やATL (adult T cell leukemia) では内因性のIFN- γ を介したマクロファージによる殺菌機構はあまり期待できない。また、われわれはステロイド投与マウスにおいてもヘルパーT細胞が減少することを観察している(未発表データ)。したがって、このような患者にIFN- γ を外から投与することは生体からの菌の排除を促進する意味で理にかなった方法であると考えられる。事実、本実験ではCD4陽性T細胞欠損マウスにおいてもIFN- γ 投与によって結核菌の排除が有意に促進される結果が得られた。

しかしながら、ヒトへのIFN- γ 療法の応用を考えるときにいくつかの問題点が考えられる。第1に、これまでの報告ではヒトの末梢血単球そのものまたはこれを*in vitro*で培養してマクロファージに分化させた細胞を用いて、その殺菌能へおよびIFN- γ の影響について検討しているが、いずれもマウスに比べると結核菌に対する殺菌能の増強効果が極めて弱く⁹⁾、中には逆に結核菌の増殖を促進させるとの報告もなされている⁹⁾¹⁰⁾。最近、Akagawaら¹¹⁾は末梢血単球がサイトカインの影響下に種々のマクロファージに分化し得ることを報告している。単球をGM-CSFとともに培養すると肺マクロファージに類似した性格を有するようになる。

そこでわれわれは、肺からの結核菌の排除には肺マクロファージや組織マクロファージが主要なエフェクター細胞になるものと考え、また分化様式の異なるマクロファージのIFN- γ に対する反応性が異なる可能性を考慮して、末梢血単球の代わりにヒトの手術肺から直接精製したマクロファージを用いて同様の実験を行った。その結果、IFN- γ による抗結核菌活性の増強効果が認められたが、今回は末梢血単球との比較は実施していないため、その効果が末梢血単球には認められず、肺マクロファージだけにみられるものかどうかについては明らかではない。また、肺内マクロファージの中に混じている末梢血単球の影響も考慮する必要がある。

第2には、IFN- γ 投与による副作用の問題であるが、これまでいくつかの疾患において種々の投与方法で試みられているが、今のところ重篤な副作用の報告はない^{12)~17)}。しかしながら、AIDSにおいてはIFN- γ によりマクロファージから産生誘導され得ると考えられるTNF- α ¹⁸⁾がウイルスの増殖を促進させる可能性があり¹⁹⁾考慮すべき点であると思われる。

活性型ビタミンD₃はマクロファージの活性化や分化を誘導することが知られており²⁰⁾、単独またはIFN- γ との併用で末梢血単球の抗結核菌活性を増強するという

報告がある²¹⁾²²⁾。肺内マクロファージを用いたわれわれの実験結果でも、常用量の内服で到達可能と考えられる血中濃度である0.2 nM²³⁾に近い量の活性型ビタミンD₃の添加により、それ単独では弱いもののIFN- γ との併用によって相乗的に結核菌に対する殺菌能を増強した。このことからIFN- γ と活性型ビタミンD₃の併用も有効な補助療法となり得る可能性があると考えられた。

結 語

1) *Mycobacterium bovis* BCG 感染によるマウス肺内マクロファージの活性化はIFN- γ を介するものであった。

2) マウスモデルにおいてヒト型結核菌に対する生体防御機構にIFN- γ が必須であった。

3) CD4⁺ T細胞欠損マウスではコントロールに比べて実験的結核症の悪化が認められたが、IFN- γ 投与によって改善がみられた。

4) IFN- γ はヒト手術肺由来のマクロファージの抗結核菌活性を増強し、活性型ビタミンD₃との併用によってこの作用は相乗的に強められた。

以上のことから、免疫不全患者に伴う難治性結核症においてIFN- γ 療法は補助療法として有効である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Chaisson RE : Mycobacteria and HIV infection. 結核. 1994 ; 69 : 179.
- 2) Nathan CF : Interferon gamma and macrophage activation in cell-mediated immunity. In : Mechanisms of host resistance to infectious agents, tumors and allografts, Steinman RM, North RJ, eds. The Rockefeller University Press, New York, 1986, 165-184.
- 3) Hall SS : IL-12 holds promise against cancer, glimmer of AIDS hope. Science. 1994 ; 263 : 1685-1686.
- 4) 光山正雄 : 貪食, 殺菌, エスケープ, Medical Immunology. 1993 ; 26 : 35-45.
- 5) 中野昌康 : マクロファージ機能とアルギニン-NO系, Annual Review 免疫. 1993 ; 62-69.
- 6) Rook GAW, Steele J, Ainsworth M, et al. : Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* : comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. Immunol. 1986 ; 59 : 333-338.
- 7) Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, et al. : Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. J Exp Med. 1993 ; 178 : 2243-2247.
- 8) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al. : An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med. 1993 ; 178 : 2249-2254.
- 9) Douvas GS, Looker DL, Vatter AE, et al. : Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. Infect Immun. 1985 ; 50 : 1-8.
- 10) Denis M : Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes : activation by cytokine and calcitriol. Clin Exp Immunol. 1991 ; 84 : 200-206.
- 11) Akagawa KS, Kamoshita K, Tokunaga T : Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages. J Immunol. 1988 ; 141 : 3383-3390.
- 12) 太良光利 : 成人T細胞白血病に対するインターフェロン- γ の吸入療法, Prog Med. 1993 ; 13 : 1159-1166.
- 13) Squires KE, Murphy WF, Madoff LC, et al. : Interferon- γ and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. J Infect Dis. 1989 ; 159 : 599-600.
- 14) Bougniewicz M, Jaffe HS, Izu A, et al. : Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. Am J Med. 1990 ; 88 : 365-370.
- 15) Ezekowitz RAB, Orkin SH, Newburger PE : Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. J Clin Inv. 1987 ; 80 : 1009-1016.
- 16) Nathan CF, Kaplan G, Levis WR, et al. : Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon- γ in patients with

- lepromatous leprosy. N Engl J Med. 1986 ; 315 : 6-15
- 17) Martin Rj, Boguniewicz M, Henson JE, et al. : The effect of inhaled interferon gamma in normal human airways. Am Rev Respir Dis. 1993 ; 148 : 1677-1682.
- 18) Hart PH, Whitty GA, Piccoli DS, et al. : Control by IFN- γ and PGE2 of TNF- α and IL-1 production by human monocytes. Immunol. 1989 ; 66 : 376-383.
- 19) Vyakarnam A, Mckeating J, Meager A, et al. : Tumor necrosis factors (alpha, beta) induced by HIV-I in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication. AIDS. 1990 ; 4 : 21-27.
- 20) Amento EP, Bhalla AK, Kurnick JT, et al. : 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ induces maturation of human monocyte cell line U937, and in association with a factor from human T lymphocytes augments production of the monokine, mononuclear cell factor. J Clin Inv. 1984 ; 73 : 731-739.
- 21) Rook GAW, Steele J, Fraher L, et al. : Vitamin D₃, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. Immunol. 1986 ; 57 : 159-163.
- 22) Crowle AJ, Ross EJ, May MH : Inhibition by 1, 25(OH) 2-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. Infect Immun. 1987 ; 55 : 2945-2950.
- 23) 窪田 実, 伊藤 信, 溝口雅康, 他 : 薬剤としての活性型ビタミン D₃ 1 α -hydroxyvitamin D₃ と 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ : 経口投与後の 1 α , 25-dihydroxyvitamin D 濃度の比較, 薬理と治療. 1983 ; 11 : 141-147.