

原 著

*Mycobacterium avium-intracellulare* Complex 症における  
リンパ球の PPD 抗原反応性について

— IFN- $\gamma$  産生能を指標として —

友 田 恒 一 ・ 米 田 尚 弘 ・ 塚 口 勝 彦  
吉 川 雅 則 ・ 徳 山 猛 ・ 夫 彰 啓  
福 岡 和 也 ・ 仲 谷 宗 裕 ・ 成 田 亘 啓

奈良県立医科大学第 2 内科

田 坂 博 信

広島大学医学部細菌学教室

受付 平成 5 年 11 月 29 日

RESPONSIVENESS OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH *M. AVIUM*-  
*INTRACELLULARE* COMPLEX (MAC) INFECTION TO PPDs AS  
MEASURED BY IFN- $\gamma$  PRODUCTION

Koichi TOMODA<sup>\*</sup>, Takahiro YONEDA, Katsuhiko TSUKAGUCHI,  
Masanori YOSHIKAWA, Takeshi TOKUYAMA, Akihiro FU,  
Kazuya FUKUOKA, Munenori NAKAYA, Nobuhiro NARITA  
and Hiromichi TASAKA

(Received for publication November 29, 1993)

We investigated the responsiveness of peripheral blood lymphocytes (PBLs) from patients with *M. avium-intracellulare* complex (MAC) infection to the stimulation with PPDs by measuring their IFN- $\gamma$  producing ability. PBLs were obtained from MAC patients at active stage (culture-positive after three-month chemotherapy), those at inactive stage (culture-negative for three months after or during chemotherapy), and healthy donors. PPDs used were PPD-S prepared from *M. tuberculosis*, PPD-B from *M. intracellulare*, and PPD-Y from *M. kansasii*.

PBLs from active MAC patients did not produce IFN- $\gamma$  to a significant extent by stimulation with any of three PPDs, while PBLs from inactive MAC patients showed higher responses to each PPD compared to those from active patients. In inactive MAC patients, the maximal response was observed to PPD-B among three PPDs. On the other hand, PBLs from healthy controls produced different levels of IFN- $\gamma$  in response to three different PPDs, and their response was most remarkable to PPD-S.

\* From the Second Department of Internal Medicine of Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara-shi, Nara 634 Japan.

These results indicated that the responsiveness of patients' PBLs to PPDs was impaired during active stage of MAC infection and restored on recovery from the disease.

**Key words :** *M. avium-intracellulare* complex (MAC), Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), Lymphocytes, PPD antigens, Atypical mycobacteriosis

**キーワード :** *M. avium-intracellulare* complex (MAC), Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), リンパ球, PPD 抗原, 非定型抗酸菌症

## 緒 言

近年肺結核症の減少の鈍化とともに非定型抗酸菌症の増加が報告されている<sup>1)</sup>。高齢化が進む現代社会においてはさらに増加することが予想される。また非定型抗酸菌は acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) 末期の日和見感染症の起原因菌としても注目されている。このことは非定型抗酸菌に対する生体防御因子としてT細胞の重要性を示唆するものであるが、非定型抗酸菌感染症におけるT細胞機能についての詳細な検討はなされていない。

細胞内寄生細菌感染に対しては、T細胞を中心とする細胞性免疫応答が生体防御の中心であることはよく知られており、特にマウスの結核菌感染時には結核菌抗原に反応するCD4<sup>+</sup>T細胞のIFN- $\gamma$ 産生能が結核免疫の機能的なマーカーになるとの報告<sup>2)</sup>がなされている。そこで今回我々は、*Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 症の患者リンパ球の各種抗酸菌由来 PPD 抗原に対する反応性を、*in vitro*における患者リンパ球の抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生能を指標として解析した。その結果IFN- $\gamma$ 産生能からみたMAC症患者リンパ球のPPD抗原に対する反応性は、活動期患者においていずれの抗酸菌由来 PPD 抗原に対しても健常人や非活動期患者と異なり低いことが認められた。

## 対 象

1985年の非定型抗酸菌症研究班の診断基準<sup>3)</sup>を満たすMAC症18例を対象とした。抗結核薬投与にも関わらず3カ月以上喀痰培養陽性が持続し、自覚症状をはじめ臨床学的に改善が認められないものを活動例(12例, 62.6 $\pm$ 12.1歳)、抗結核薬投与により自覚症状をはじめ臨床学的に改善が認められ喀痰培養が陰性化し以後3カ月以上陰性が持続しているものを非活動例(6例, 65.3 $\pm$ 17.3歳)、これらの症例と年齢を合わせた健常人(11例, 69.7 $\pm$ 8.5歳)を対照とした。なおすべてMAC症は抗結核薬投与中であつた。

## 方 法

### 1) 末梢血リンパ球の分離

ヘパリン加採血した静脈血に、同量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え混和した後、Ficoll-Hypaque 比重遠心法(400g, 30分間)で単核球(mononuclear cell)分画を採取し、PBSで3回洗浄後、10% fetal calf serum (FCS) (Sigma社)加RPMI1640 (GIBCO社)培養液に浮遊させた。MAC感染時に誘導されることが知られている免疫抑制性マクロファージ<sup>4)</sup>の影響を少なくするためにこの細胞浮遊液から付着細胞を除去した。つまりFCSにてコーティングしたプラスチックペトリディッシュ(CORNING社25020)を用いて37°C, 5% CO<sub>2</sub>のもとで1時間静置培養し付着細胞を除去した。培養後非付着細胞を回収しPBSで3回洗浄、10% FCS加RPMI1640培養液で10<sup>7</sup>/mlに調整しリンパ球分画とした。

なお、この操作で調整した非付着細胞分画には平均3-5%の単球(monocyte)が含まれることをFACS解析で認めた。この割合は健常人および患者の非付着細胞分画において有意な差は認められなかった。

### 2) 培養上清の回収

10<sup>7</sup>/mlに調整したリンパ球浮遊液100 $\mu$ lを96穴平板プレート(CORNING社24860)に分注し、20 $\mu$ g/mlに調整した各種抗原PPD S (*M. tuberculosis*由来, 日本BCG社製), PPD B (*M. intracellulare*由来), PPD Y (*M. kansasii*由来)を100 $\mu$ l添加または非添加の後、Tsuyuguchiらの方法<sup>5)</sup>に従って37°C 5% CO<sub>2</sub>下で24時間培養して得た上清を回収し、-80°Cで測定まで保存した。この上清中のIFN- $\gamma$ 活性を、各リンパ球標品のPPD抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生能とした。なおPPD B, PPD Yは田坂の方法<sup>6)</sup>で調整したものをを用いた。

### 3) IFN- $\gamma$ 活性の測定

MEDGENIX社のELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) キットを使用した。IFN $\gamma$ に対するマウスモノクローナル抗体を固層化したマイクロプレートに、上述の培養上清と標準液を50 $\mu$ l, horsera-

dish peroxidase (HRP) 結合抗 IFN- $\gamma$  マウスモノクローナル抗体 (2次抗体) 50 $\mu$ l を添加し、室温で2時間反応後基質として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有 TMB (tetramethylbenzidine) を添加し、呈色させ 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止し各ウエルの 450 nm における吸光度を測定した。標準検量線から各標品中の IFN- $\gamma$  量を決定した。

なお当検討での統計学的検討には Student *t* 検定を用いた。

結 果

1) 抗原非添加時の IFN- $\gamma$  産生能 (Fig 1)

非活動例 (Inactive MAC) 患者の IFN- $\gamma$  産生能は 1.5 $\pm$ 0.7 IU/ml, 活動例 (Active MAC) 患者では、0.6 $\pm$ 0.2 IU/ml, 健常者においては 0.7 $\pm$ 0.2 IU/ml であった。このことから非活動期患者の T細胞は活動期例や健常者のリンパ球に比べ *ex vivo* で活性化されている傾向があると考えられた。

2) 各種抗原添加時の IFN- $\gamma$  産生能 (Fig 2)

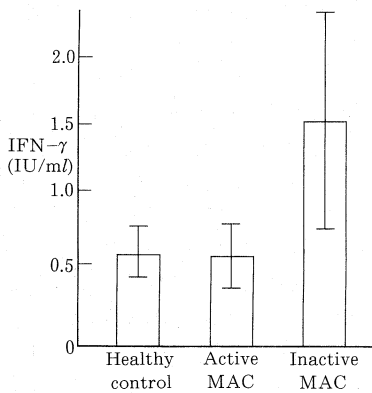


Fig. 1 IFN- $\gamma$  Production by Lymphocytes without Stimulation

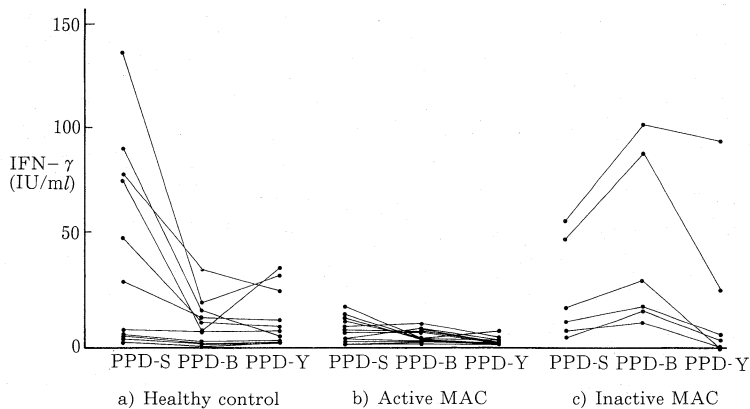


Fig. 2 IFN- $\gamma$  Production by Lymphocytes with PPDs from Three Mycobacteria (PPD S : *M. tuberculosis*, PPD B : *M. intracellulare*, PPD Y : *M. kansasii*)

Table Comparison of IFN- $\gamma$  production by lymphocytes stimulated with PPD-B among the active and inactive MAC patients, and healthy control.

	Mean $\pm$ SD (IU/ml)
a) Control	11.2 $\pm$ 11.9
b) Active MAC	9.7 $\pm$ 16.2
c) Inactive MAC	38.6 $\pm$ 40.4

no significant difference between each of three groups

a) 健常者の場合

PPD S 抗原刺激時に IFN- $\gamma$  産生能は亢進傾向にあり、うち3例では PPD Y 抗原添加時にも IFN- $\gamma$  産生能の亢進がみられた。また各種抗原添加によっても IFN- $\gamma$  産生能の亢進がみられない症例もあった。

b) 活動期患者の場合

用いた3種いずれの抗原刺激に対しても患者リンパ球の IFN- $\gamma$  産生能の亢進はみられなかった。

c) 非活動期患者の場合

MAC 由来の PPD B 抗原刺激時に IFN- $\gamma$  産生能は全例で亢進していた。特に6例中2例には著明な亢進がみられ、この2例においては PPD S, PPD Y 添加時にも IFN- $\gamma$  産生能の亢進がみられた。

3) PPD B 抗原刺激時の IFN- $\gamma$  産生能の比較

3群間 (活動期患者, 非活動期患者, 健常者) の PPD B 抗原添加時の IFN- $\gamma$  産生能を各群での平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。有意差は認められなかったが、非活動期患者で平均値が 38.6 IU/ml と最も高値で、活動期患者の約4倍の値を示した。(Table)

## 考 察

IFN- $\gamma$  は、活性化Tリンパ球やNK細胞から産生されるサイトカインとして知られ<sup>7)</sup>、マクロファージ<sup>8)</sup>やTリンパ球の活性化<sup>9)</sup>作用を持つことが知られている。富岡ら<sup>10)</sup>はマクロファージの抗酸菌に対する殺菌能亢進作用は単独では発現せず、他のサイトカインも必要ではないかと推察している。一方ではDaltonら<sup>11)</sup>はIFN- $\gamma$  遺伝子をノックアウトしたマウスを用いた実験から抗酸菌感染に対する生体防御におけるIFN- $\gamma$ の重要性を報告している。MAC感染症におけるIFN- $\gamma$ の役割は未だ定かではない<sup>12)~14)</sup>が、これらの事実はIFN- $\gamma$ がMAC感染に対する生体防御と密接に関与している可能性を示唆するものである。

本研究では、MAC感染患者末梢血リンパ球の3種抗酸菌由来PPD抗原に対する反応性をIFN- $\gamma$ 産生能を指標として検討することで、ヒトMAC感染におけるTリンパ球機能の解析を試みた。抗原非添加時のIFN- $\gamma$ 産生能の比較から非活動例患者リンパ球は*ex vivo*でも一部活性化されていることが認められた。また非活動症例では特に*M. intracellulare*由来のPPD抗原に対し、健康人では*M. tuberculosis*由来のPPD抗原に対しても反応性を示しIFN- $\gamma$ 産生能が亢進していた。一方、活動例患者リンパ球のIFN- $\gamma$ 産生能は3種いずれのPPD抗原に対しても有意のIFN- $\gamma$ 産生能が認められなかった。

一般に各種抗酸菌菌体成分は、IFN- $\gamma$ 産生を誘導することが知られている<sup>15)16)</sup>。一方で抗酸菌菌体成分による細胞性免疫抑制作用の存在<sup>17)~20)</sup>も知られており、MAC活動期患者のIFN- $\gamma$ 産生能低下と何らかの関連があるものと思われる。特にMAC活動期患者のPPD応答性の低下はPPDの由来に関係なく非特異的であることからMAC感染で誘導されると報告されているサブレッサー細胞の存在<sup>21)</sup>によるCD4<sup>+</sup>T細胞機能抑制が最も強く疑われた。

本研究の結果から、T細胞のPPD特異的IFN- $\gamma$ 産生能の低下がMAC感染における病態の活動性と深い関連があり、T細胞のPPD反応性の回復と亢進がMAC非活動型状態への転換と深いかかわりがあるものと考えられた。難治性であるとされるMAC症に対する生体防御機構および病態の把握という観点から、PPDに対するT細胞反応性の回復が、病態改善の引き金であるのか結果としての現象であるのかを解明することが今後の課題であると思われた。

## 結 語

非定型抗酸菌症の代表的存在の*M. avium-intracellulare* complex 症における患者リンパ球のPPD

抗原に対する抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生能を解析した。その結果IFN- $\gamma$ からみたMAC患者リンパ球のPPD抗原に対する反応性は、活動期患者においていずれの抗酸菌由来PPD抗原に対しても健康人や非活動期患者とは異なり反応性が低いことが認められた。

## 謝 辞

当研究に対しご協力頂きました国療西奈良病院 宮崎隆治先生、白井史朗先生、塚口真理子先生、平井妙代子先生および星ヶ丘厚生年金病院 北村和道先生、竹中英昭先生に深謝致します。また貴重なご助言を頂きました奈良県立医科大学細菌学教室助教授 喜多英二先生に深謝致します。

なお本論文の要旨は第68回日本結核病学会総会(1993年4月東京)にて発表した。

## 文 献

- 1) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：国療非定型抗酸菌症共同研究班1986年度報告，結核，1988；63：493-499.
- 2) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al. : IFN- $\gamma$ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. J Immunol. 1992；148：2887-2893.
- 3) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：非定型抗酸菌症（肺感染症）の診断基準，結核，1985；60：51.
- 4) 富岡治明，斎藤 肇：*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，結核，1992；67：47-54.
- 5) Tsuyuguchi I, Shiratsuchi H, Okuda Y, et al. : An analysis of *in vitro* T cell responsiveness in nontuberculous mycobacterial infection. Chest. 1988；94：822-829.
- 6) 田坂博信：PPD-Bによる皮内反応，結核，1993；68：47-50.
- 7) Vilcek J, Gray PW, Rinderknecht E, et al. : Interferon  $\gamma$  : A lymphokine for all seasons. Lymphokines. 1985；11：1-32.
- 8) Schreiber RD, Celada A : Molecular characterization of Interferon  $\gamma$  as a macrophage activating factor. Lymphokines. 1985；11：87-118.
- 9) Lui Y, Janeway CA Jr : Interferon  $\gamma$  plays a critical role in induced cell death of effector T cell : a possible third mechanism of self-tolerance. J Exp Med. 1990；172：1735-1739.

- 10) 富岡治明, 斎藤 肇 : 非定型抗酸菌症の発症要因に関する基礎的研究, 日細菌誌. 1991 ; 46 : 827-837.
- 11) Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, et al. : Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. Science. 1993 ; 259 : 1739-1742.
- 12) Denis M : Growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes : identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth. Eur J Immunol. 1991 ; 21 : 391-395.
- 13) Shiratsuchi H, Johnson JL, Ellner JJ : Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. J Immunol. 1991 ; 146 : 3165-3170.
- 14) Bermudez LEM, Young LS : Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- $\gamma$  is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. J Immunol. 1988 ; 140 : 3006-3013.
- 15) Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, et al. : Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. Microbiol Immunol. 1992 ; 36 : 55-66.
- 16) Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, et al. : *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- $\alpha/\beta$  and- $\gamma$  with deoxy ribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. Jpn J Cancer Res. 1988 ; 79 : 866-873.
- 17) Kleinhenz ME, Ellner JJ, Spagnuolo PJ, et al. : Suppression of lymphocyte responses by tuberculous and mycobacterial arabinogalactan. J Clin Invest. 1981 ; 68 : 153-162.
- 18) Brownback PE, Barrow W : Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. Infect Immun. 1988 ; 56 : 1044-1050.
- 19) Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP : Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 1988 ; 140 : 634-640.
- 20) 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. 1990 ; 58 : 1369-1378.
- 21) 中村玲子 : 非定型抗酸菌の前感染による BCG 免疫の抑制, 結核. 1993 ; 68 : 361-365.