

原 著

BCG 感作マウス脾細胞の抗原特異的増殖反応
および IL-2/IL-4 産生能の検討照屋 勝治・川上 和義
當山 雅樹・斎藤 厚

琉球大学医学部第一内科学教室

受付 平成6年8月8日

受理 平成7年1月6日

ANALYSIS OF ANTIGEN-SPECIFIC PROLIFERATION AND IL-2/IL-4
PRODUCTION OF SPLEEN CELLS FROM MICE INFECTED
WITH *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCGKatsuji TERUYA*, Kazuyoshi KAWAKAMI,
Masaki TOHYAMA and Atsushi SAITO

(Received 8 August 1994/Accepted 6 January 1995)

The present study was performed in order to define the responding populations and profiles of cytokine production in BCG-primed spleen cells restimulated *in vitro* with antigen. Spleen cells from DBA/2 mice, one of BCG-resistant strains (*Bcg^r*), infected with *Mycobacterium bovis* BCG vigorously proliferated by restimulation with heat-killed BCG. This response peaked as early as on day 3 after BCG infection, and then decreased to the basal level by 3 weeks. Blocking of IL-2R α chain or IL-4 by each antibody partially inhibited it, but anti-IFN- γ antibody did not, suggesting that both IL-2 and IL-4 were involved in the proliferation of primed spleen cells. CD4⁺ and $\gamma\delta$ TCR-bearing T cell were responding populations to BCG, but CD8⁺ T cell was not, because depletion of CD4⁺ or $\gamma\delta$ T cells by the treatment with each antibody and complement inhibited proliferation and IL-2/IL-4 production, but that of CD8⁺ T cells did not. Further study demonstrated that spleen cells from BCG-resistant DBA/2 mice produced more IL-2/IL-4 than those from BALB/c mice, one of BCG-susceptible strains (*Bcg^s*), in response to BCG.

These results suggest that both CD4⁺ and $\gamma\delta$ TCR-bearing T cells play an important role in the host defense against *M. bovis* BCG infection, and that the magnitude of cytokine production is one of the critical factors to define the susceptibility of mice to this pathogen in the late phase of infection.

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

Key words : BCG, Proliferation of spleen cells, Cytokine production, Susceptibility to BCG

キーワード : BCG, 脾細胞増殖反応, サイトカイン産生, BCG 抵抗性

緒言

結核菌に対する感染防御のエフェクターは主にマクロファージが担っている。しかし、結核菌はファゴソームとリソソームの融合を阻害するなど種々の機構により殺菌に抵抗するため、マクロファージが結核菌に対して十分な殺菌能を持つには IFN- γ をはじめとする種々のサイトカインによって活性化される必要がある¹⁾。そのようなサイトカインは主にヘルパー T 細胞によって産生されるが、これには IL-2 や IFN- γ を産生し細胞性免疫を賦活する Th1 と、IL-4 や IL-10 を産生し液性免疫を賦活する Th2 の 2 種が存在し、これらは互いに抑制的に作用しながら免疫系に関与することが分かっている²⁾。マクロファージの活性化には Th1 より産生されるサイトカインがより重要であり³⁾、免疫系における Th1 と Th2 の量的質的關係が特異免疫獲得後の結核菌に対する感染抵抗性に関与していることが推測される。

今回、われわれは BCG で感作されたマウスの脾細胞を用い、*in vitro* で BCG 加熱死菌を用いて再刺激した場合の脾細胞の抗原特異的増殖反応およびそれにおける IL-2 (Th1 系サイトカイン) と IL-4 (Th2 系サイトカイン) の関与について検討を行った。さらに自然抵抗性遺伝子 *Bcg* によって規定される BCG 抵抗性マウスと感受性マウスとの IL-2/IL-4 産生における比較検討も行ったので以下報告する。

材料および方法

1) 菌株と調整法

乾燥 BCG ワクチン (日本 BCG 製造株式会社) を使用直前に生食で溶解したものをマウスの感作に用いた。また同菌を 121°C, 30 分間オートクレーブ処理したものを加熱死菌として *in vitro* での再刺激に用いた。

2) マウス

Bcg 遺伝子に関し抵抗性の DBA/2 マウス (*Bcg*^r) または感受性の BALB/c マウス (*Bcg*^s) (7 週齢, 雄) を日本 SLC (静岡) より購入した。マウスは購入後約 1 週間飼育した後、実験に用いた。また、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した。

3) BCG 感作マウス脾細胞の BCG 死菌に対する増殖反応

BCG 5×10^6 cfu を眼窩静脈叢より経静脈的に接種し、経時的に取り出した脾細胞 (1×10^5 /ウェル) を、BCG 加熱死菌とともに 96 ウェルマイクロカルチャープレートで 3 日間培養した。増殖反応は最後の 6 時間の ³H サイミジンの取り込みで評価した。

4) 増殖反応への抗サイトカイン抗体の影響

感作脾細胞の BCG 再刺激による増殖反応への抗 IL-2R α 鎖, 抗 IL-4, および抗 IFN- γ 抗体の影響について検討した。抗体は ATCC から購入した抗体産生細胞 (各々クローン 7D4, 11B11, R4-6A2) の培養上清を 25% の濃度で用いた。ここで用いた抗 IL-2R α 鎖および抗 IL-4 抗体は 25% の濃度でそれぞれ 20 U/ml の IL-2, 200 U/ml の IL-4 の活性を 50% 抑制した。

5) CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR 陽性 T 細胞サブセットの除去

一部の実験では抗体および補体を用いて脾細胞中の CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR 陽性 T 細胞サブセットを除去し、その影響について検討した。ATCC より購入した抗 CD4, 抗 CD8, 抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体産生細胞 (各々クローン GK 1.5, 53-6.72, UC7-13D5) をヌードマウスに接種して得られた腹水 $2.5 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ 細胞と脾細胞とを氷上で 30 分間反応させた後、3 回洗浄し、さらに補体 $40 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ 細胞 (low-toxic guinea pig complement, セダレーン社, 米国) を加え 37°C, 30 分間処理した。処理後、フローサイトメトリーにて CD4, CD8 陽性細胞が 1% 以下にまで除去されているのを確認した。

6) 培養上清中の IL-2/IL-4 の測定

感作 1 週後に取り出した脾細胞 5×10^5 /well を BCG 加熱死菌 5×10^5 /well とともに 24 時間培養し、得られた培養上清とともに IL-2/IL-4 依存性細胞株である CTLL-2 (味の素株式会社基礎研究部羽室淳爾先生より供与) を 28 時間培養し、最後の 4 時間における ³H サイミジンの取り込み量を測定することによって、培養上清中の両サイトカインの量を調べた。

7) 統計処理

有意差の検定は Student's *t*-test にて行った。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1) BCG 感作マウス脾細胞の BCG 加熱死菌に対す

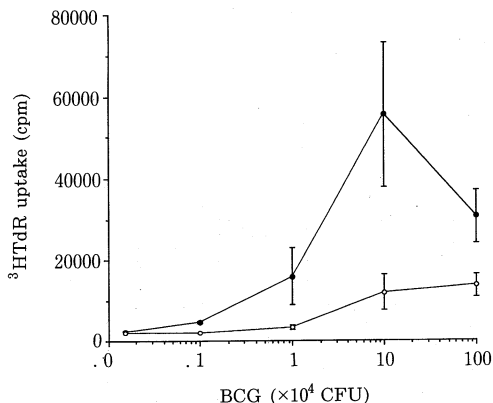


Fig. 1 Proliferation of Spleen Cells from BCG-infected Mice by *in vitro* Restimulation

Three DBA/2 mice were injected intravenously with either saline (open symbols) or 5×10^6 cfu of *M. bovis* BCG (closed symbols). Seven days after infection, spleen cells (1×10^5 /well) were cultured in triplicate with various amounts of heat-killed BCG for 3 days. Proliferation was assessed by incorporation of ^3H thymidine for the last 6h. Each point represents the mean \pm SD of three mice.

る増殖反応

DBA/2 マウスに BCG を接種後、1 週目に脾細胞を取り出しさまざまな量の BCG 加熱死菌とともに培養した。増殖反応の結果を Fig. 1 に示す。BCG 感作群は生食投与群に比べ、強い増殖反応が用量依存性に認められた。しかし、加える BCG 加熱死菌の量が多すぎると逆に増殖反応は抑制された。この増殖反応が最も強く起こった BCG 濃度を至適濃度として、以後の増殖反応に用いた。一方、生食投与群でも高濃度の BCG 死菌刺激に対しては若干の増殖反応が認められた。

2) 増殖反応の経時的変化

DBA/2 マウスに BCG を接種後、1, 3, 9, 22 日後に脾細胞を取り出して同様の検討を行った。BCG 加熱死菌による刺激は至適濃度 (1×10^5 /ウェル) で行った。増殖反応は ^3H サイミジンの取り込みの無刺激群との比 (Stimulation Index) で評価した。BCG 感作群の増殖反応は感作後比較的早期にピークを示し、感作 9 日後には早くも反応性の低下が見られた。感作 22 日後ではもはや生食投与群とほとんど同程度の増殖反応しか認められなかった (Fig. 2)。われわれは増殖反応のピークを感作 1 週後と推定し、以後の実験はすべて感作後 1 週で行うこととした。

3) 増殖反応におけるサイトカインの影響

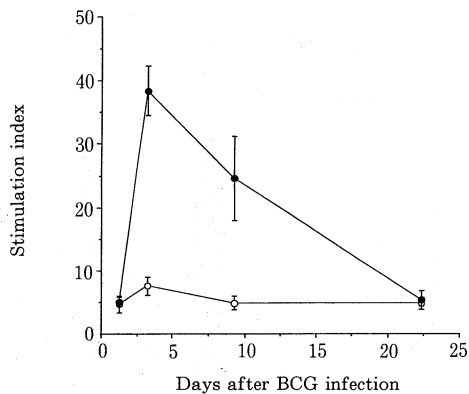


Fig. 2 Proliferation of Spleen Cells at Various Times after BCG-infection

Spleen cells obtained from DBA/2 mice 1, 3, 9, and 22 days after intravenous injection with saline (○) or 5×10^6 cfu of *M. bovis* BCG (●) were cultured at 1×10^5 /well with heat-killed BCG (1×10^5 cfu/well) for 3 days. Proliferation was assessed by incorporation of ^3H thymidine for the last 6h. Results are expressed as a stimulation index calculated by the following formula: cpm when cultured with BCG/cpm when cultured with medium. Each point represents the mean \pm SD of three mice.

IL-2R α 鎖あるいは IL-4 に対するモノクローナル抗体を用いて、培養系の各サイトカインの作用をブロックした際の増殖反応への影響について検討を行った。増殖反応はいずれの抗体によっても部分的に抑制され (Fig. 3), この増殖反応が IL-2, IL-4 の両サイトカインによって担われていることを示した。なお、抗 IFN- γ 抗体では増殖反応に何の影響も認められなかった。

4) CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR 陽性 T 細胞除去の増殖反応における影響

次に CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR 陽性 T 細胞をそれぞれに対するモノクローナル抗体および補体により除去した場合の増殖反応について調べた。CD4 陽性 T 細胞の除去により増殖反応の抑制が認められたが、CD8 陽性 T 細胞を除去しても増殖反応に何ら影響は認めなかった (Fig. 4-a)。また $\gamma\delta$ T 細胞を除去すると脾細胞の増殖反応は有意に抑制された (Fig. 4-b)。

5) CD4, CD8 陽性 T 細胞除去のサイトカイン産生における影響

同様の方法で CD4 あるいは CD8 陽性細胞を除去し、BCG 加熱死菌とともに 24 時間培養したときの培養上

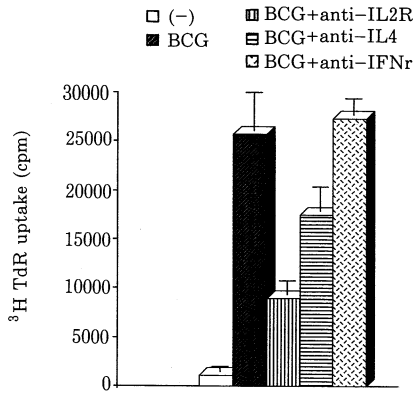


Fig. 3 Effect of Anti-Cytokine Antibodies on BCG-induced Spleen Cell Proliferation

Spleen cells obtained from DBA/2 mice 7 days after infection with 5×10^6 cfu of *M. bovis* BCG were cultured at 1×10^5 /well with heat-killed BCG (1×10^5 cfu/well) for 3 days. Culture supernatants of hybridomas producing anti-IL-2R α chain, IL-4, and IFN- γ mAbs were added at 1 : 3 dilution as indicated to examine the effects of these Abs. Proliferation was assessed by incorporation of ^3H thymidine for the last 6h. Each point represents the mean \pm SD of triplicate cultures.

清中のサイトカインの量を IL-2/IL-4 依存性細胞株である CTLL-2 の増殖反応を用いて比較した。CD8 陽性 T 細胞を除去した場合はサイトカインの産生は変わらないが、CD4 陽性 T 細胞の除去によりサイトカインの産生は強く抑制された (Fig. 5)。

6) BCG 抵抗性マウス (DBA/2) と感受性マウス (BALB/c) の BCG に対する IL-2/IL-4 産生の比較

BCG 感受性系統である BALB/c マウスについても BCG による感作を行い、感作 1 週後の脾細胞 5×10^5 /well を BCG 加熱死菌 5×10^5 /well とともに 24 時間培養して得られた培養上清について、IL-2/IL-4 産生の検討を行った。感受性系統である BALB/c の感作脾細胞も BCG 死菌に反応して IL-2/IL-4 の産生が認められた。しかし、対照として用いた抵抗性ストレインである DBA/2 のそれに比べ反応は弱く、産生されるサイトカインの量も少ないことが示された (Fig. 6)。また、同様の結果が他の菌量の BCG 刺激についても得られた (未発表データ)。

考 察

BCG 感作マウスの脾細胞は *in vitro* での BCG 死菌

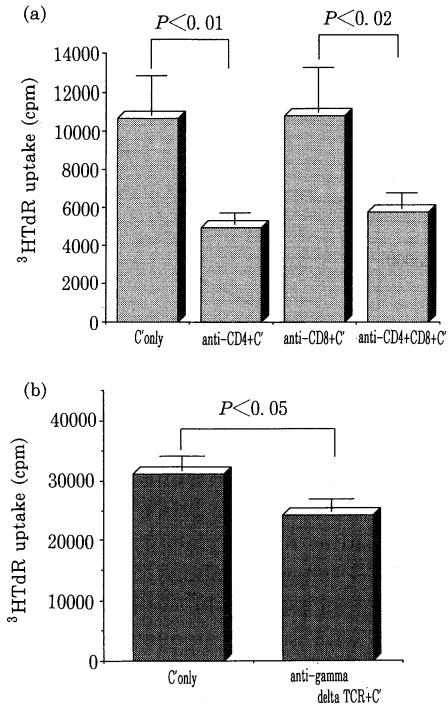


Fig. 4 Effect of Depletion of T Cell Subsets on the Proliferative Response

Spleen cells obtained from DBA/2 mice 7 days after intravenous injection with 5×10^6 cfu of BCG were treated with anti-CD4 and/or-CD8, or anti- $\gamma\delta$ TCR mAb, and complement to deplete each subset of T cells. (a), (b) The resultant cells were cultured at 1×10^5 /well with heat-killed BCG (1×10^5 cfu/well) for 3 days, and an incorporation of ^3H thymidine was measured. Results are expressed as the mean \pm SD of triplicate cultures.

による刺激に対し強い増殖反応を示し、BCG 感染による反応性クローンの質的あるいは量的増大が示唆された。しかし、高用量の抗原では逆に増殖抑制が認められた。エンドトキシン、ザイモザン、*Corynebacterium parvum* 等のような強い刺激にตอบสนองして、マクロファージは多量のプロスタグランジンを一過性に産生するが、これらは T 細胞に対し増殖抑制およびサイトカイン産生抑制を起こすことが報告されている⁴⁾。また、同じ抗酸菌である *M. avium* complex の菌体成分である glycopospholipid が T 細胞の増殖を抑制するとの報告もあり⁵⁾、多量の BCG 抗原刺激による増殖反応抑制も一部はこれらの機序を介している可能性が考えられる。

増殖反応の経時的検討では強い増殖反応が比較的早期に起こり、以後急速に減弱して感作 3 週後には感作によ

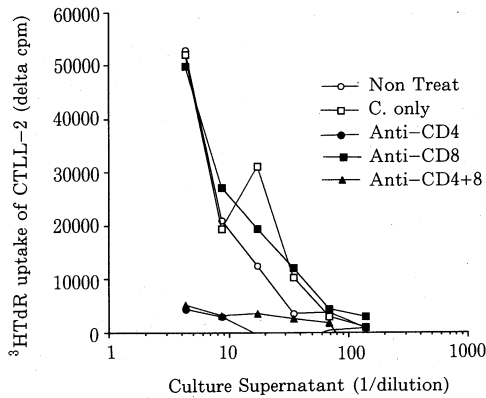


Fig. 5 Effect of Depletion of T Cell Subsets on the Cytokine Production

The cells prepared as in Fig. 4 were cultured at 5×10^5 /well with heat-killed BCG (5×10^5 cfu/well) for 24h, and the culture supernatants were assessed for IL-2/IL-4 activity by a CTLL-2 assay. Results are expressed as an incorporation of ^3H thymidine by CTLL-2 cultured with various dilutions of the culture supernatants of spleen cells subtracted by that only with medium.

る2次性の強い応答がほとんど完全に消失してしまった。この結果は一見、BCG感作による免疫学的記憶が消失してしまったかのようにみえるが、記憶リンパ球もしくは活性化リンパ球が完全に消失してしまうには期間的に短すぎるように思える⁶⁾。われわれはBCG感染マウス(DBA/2)において脾臓内リンパ球数が感染1週後をピークに減少していく一方で、肺内リンパ球数は4週以後も増加し続けることを見だしており(未発表データ)、脾臓内においては菌体の排除が比較的速やかに行われるのに対し、肺内の菌体排除は遷延すると推測される。脾臓での菌体排除は脾臓内反応性クローンの他臓器への遊走を起こし、それにより反応性クローンが枯渇した結果、反応性が低下した可能性もあると思われる。

T細胞サブセットを除去して行った検討では、CD8陽性T細胞を除去しても感作脾細胞のBCG死菌に対する増殖反応およびサイトカイン産生にはほとんど影響のないことを示した。CD8陽性T細胞はその細胞傷害活性により、結核感染マクロファージを破壊することによって結核感染防御に関与する可能性がある。しかし、結核菌を貪食したマクロファージに対する活性化リンパ球の細胞傷害活性はCD8陽性T細胞にはなくCD4陽性T細胞に存在したという報告⁷⁾や、マウスの結核感染モデルにおいて、抗CD4抗体投与によるCD4陽性T細胞

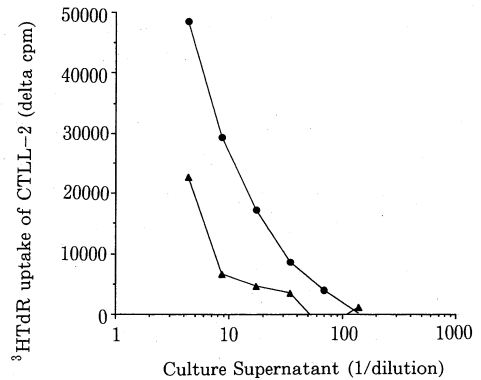


Fig. 6 IL-2/IL-4 Production by Spleen Cells from Mice Resistant or Susceptible to BCG

Spleen cells obtained from mice resistant (DBA/2) (●) or susceptible (BALB/c) (▲) to BCG 7 days after intravenous injection with 5×10^6 cfu of BCG were cultured at 5×10^5 /well with 5×10^5 cfu/well of heat-killed BCG for 24h, and the culture supernatants were assessed for IL-2/IL-4 activity by a CTLL-2 assay. Results are expressed as an incorporation of ^3H thymidine by CTLL-2 cultured with various dilutions of the culture supernatants of spleen cells subtracted by that only with medium.

の除去が生存日数の著明な短縮を起こしたのに対し、抗CD8抗体投与によるCD8陽性細胞の除去は何ら影響を与えなかったという報告⁸⁾があり、CD8陽性T細胞は結核感染防御においてそれほど重要な役割を果たしていないのかもしれない。今回のわれわれの結果もこれを支持するものと考えられる。

感作脾細胞のBCG再刺激による増殖反応はCD4、CD8陽性T細胞をとともに除去することによって50%程度抑制されるが、かなりの反応が残存した。通常、CD4またはCD8分子を発現するのは $\alpha\beta$ T細胞受容体をもったT細胞と考えられ、それ以外の $\gamma\delta$ T細胞やB細胞が応答細胞であるものと思われる。今回の検討で $\gamma\delta$ T細胞を除去することにより増殖反応が20%程度抑制されることも分かったが、残存した反応を説明するには十分ではなく、B細胞も主要な応答細胞のひとつであるものと推測される。また、抗IL-4抗体による有意な増殖反応の抑制(Fig. 3)は、B細胞増殖因子のひとつでもあるIL-4によるB細胞の増殖が脾細胞中で起こっている可能性を示唆するものである。BCG感染における液性免疫の役割については細胞性免疫ほど重要視されていないが、今回のわれわれの検討でかなりのB細胞反

応が存在すると考えられることから、B細胞によって担われる液性免疫の意義について見直す必要があると思われる。

BCGに対する自然抵抗性は、BCG Montreal 株において Skamene らによって提唱⁹⁾され、その後さまざまな BCG 株においてもこの分類が成り立つ¹⁰⁾ことが示された。今回用いた BCG 日本株については、*Bcg^r* が *Bcg^s* よりも感染抵抗性を示すものの著明な差は認めなかったとの報告もある¹⁰⁾。最近、Vidal らによって *Bcg* candidate (*Nramp*) が同定され¹¹⁾、この抵抗性の系統差はマクロファージレベルに存在することが分かっている。構造的に真核生物の酸化窒素の輸送に関与する膜蛋白とホモロジーの高いことからその機能が推測されているが、まだその詳細は明らかではない。

今回、われわれは、マウスの脾細胞を用いた本実験系において、BCG 加熱死菌による再刺激により、抵抗性マウスの DBA/2 が感受性マウスの BALB/c よりも強いサイトカイン産生を起こすことを示した。脾細胞増殖反応は抗原特異的であり、*Bcg* 遺伝子の規定する自然抵抗性とは概念を異にする。特異免疫獲得後の感染抵抗性は、*Bcg* 遺伝子で規定されるものとは異なっていることが *M. tuberculosis* の系では確かめられており¹²⁾、同じ遺伝子で感染抵抗性が規定されているマウスリーシュマニア感染モデルにおいても、同じ感受性系統に分類されている BALB/c と C57BL/6 で、前者が感染後期において Th2 優位の誘導が起こり、有効な感染防御を行うことができずに感染死するのに対し、後者は Th1 優位の誘導によって、特異免疫獲得後、治癒することが知られている¹³⁾。今回のわれわれの結果は、感受性系統の BALB/c が感染後期においても有効な特異免疫を誘導できない可能性を示唆するものであり、原因としては T 細胞レベルでの違い、もしくはマクロファージの抗原提示レベルにおける違いが考えられる。最近、マクロファージ上の costimulatory molecule として知られる B7 が感受性系統の BALB/c においては BCG 感染後に down regulate されるが、抵抗性マウスの C3H/HeJ では感染後も変化が見られなかったという報告¹⁴⁾があり、興味深い。われわれも、BCG 感染後の脾細胞における PHA response が BALB/c において著明に低下し、DBA/2 ではほとんど変化しないのを観察しており(未発表データ)、今回のわれわれの結果もマクロファージ上の costimulatory molecule の down regulation によるものである可能性があると思われる。

また今回の検討では、DBA/2 において Th1 サイトカインである IL-2、Th2 サイトカインである IL-4 の両者の関与が示唆されたが、BALB/c においても両者が関与していることが確かめられており(未発表データ)、

リーシュマニア感染モデルのような明確な関係は必ずしも存在していないようである。ただし、Th1 および Th2 からのサイトカイン産生の相対的量的バランスが BCG に対する抵抗性を規定する因子となる可能性は考えられると思われる。また感染の各ステージでサイトカインの産生パターンが異なることも考えられ、今回、Th1、Th2 系サイトカインの両者の産生が認められたことは、BCG 刺激によって Th0 から Th1 にシフトしていく途中の経過をみている可能性もある。

今回、*in vitro* での刺激に BCG 加熱死菌を用いたが、BCG 生菌を用いればまた異なったサイトカイン産生パターンを示す可能性がある。例えば、 $\gamma\delta$ T 細胞は死菌刺激と生菌刺激で反応が異なるという報告や¹⁵⁾、*Legionella pneumophila* 抗原吸入による肺マクロファージの活性化において、活性化には生菌による刺激が必要であったという報告¹⁶⁾は、今回の実験系においても生菌刺激と死菌刺激で異なる反応を示す可能性を示唆している。死菌に対する反応が必ずしも生菌に対する反応を反映していない可能性を考慮する必要があると思われる。

文 献

- 1) 光山正雄：貪食，殺菌，エスケープ. *Medical Immunology*. 1993 ; 26 : 35-45.
- 2) Seder RA, Paul WE : Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Ann Rev Immunol*. 1994 ; 12 : 635-673.
- 3) 小野崎菊夫：マクロファージの活性化. *免疫薬理*. 1993 ; 11 : 17-22.
- 4) Stenson WF, Parker CW : Opinion ; Prostaglandines, macrophages, and immunity. *J Immunol*. 1980 ; 125 : 1-6.
- 5) Brownback PE, Barrow WW : Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun*. 1988 ; 56 : 1044-1050.
- 6) Orme IM : Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 1988 ; 140 : 3589-3593.
- 7) Pithie AD, Rahelu M, Kumararatne DS, et al. : Generation of cytolytic T cells in individuals infected by *Mycobacterium tuberculosis* and vaccinated with BCG. *Thorax*. 1992 ; 47 : 695-701.
- 8) Leveton C, Barnass S, Champion B, et al. :

- T-cell-mediated protection of mice against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1989 ; 57 : 390-395.
- 9) Gros P, Skamene E, Forget A : Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol.* 1981 ; 127 : 2417-2421.
 - 10) Denis M, Forget A, Peloletier M, et al. : Control of the *Bcg* gene of early resistance in mice to infections with BCG substrains and atypical mycobacteria. *Clin Exp Immunol.* 1986 ; 63 : 517-525.
 - 11) Vidal SM, Malo D, Vogan K, et al. : Natural resistance to infection with intracellular parasites : Isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell.* 1993 ; 73 : 469-485.
 - 12) Brett S, Orrell JM, Beck JS, et al. : Influence of H-2 gene on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs of chronically infected mice. *Immunology.* 1992 ; 76 : 129-132.
 - 13) Coffman RL, Varkila K, Scott P, et al. : Role of cytokines in the differentiation of CD4⁺ T cell subsets *in vivo*. *Immunol Rev.* 1991 ; 123 : 189-229.
 - 14) Saha B, Das G, Vohra H, et al. : Macrophage-T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of co-stimulatory molecules on *Mycobacterium*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur J Immunol.* 1994 ; 24 : 2618-2624.
 - 15) Boom WH, Chervenak KA, Mincek MA, et al. : Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human $\gamma\delta$ T cells activated by live *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1992 ; 60 : 3480-3488.
 - 16) Skerrett SJ, Martin TR : Alveolar macrophage activation in experimental legionellosis. *J Immunol.* 1991 ; 147 : 337-345.