

原 著

Interferon- γ あるいはTumor necrosis factor- α
処理マウス腹腔マクロファージにおける
抗マイコバクテリア活性発現の様相の差違について

佐藤 勝昌・富岡 治明

島根医科大学微生物・免疫学教室

斎藤 肇

国立多摩研究所

受付 平成8年5月24日

受理 平成8年8月1日

DIFFERENTIAL GROWTH INHIBITION OF MYCOBACTERIA BY
INTERFERON- γ -OR TUMOR NECROSIS FACTOR- α -TREATED
MURINE PERITONEAL MACROPHAGES

Katsumasa SATO, Haruaki TOMIOKA*
and Hajime SAITO

(Received 24 May 1996/Accepted 1 August 1996)

Growth inhibition of the intracellular mycobacteria such as *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, and *M. chelonae* subsp. *abscessus* by interferon- γ (IFN- γ)- or tumor necrosis factor- α (TNF- α)-treated murine peritoneal macrophages elicited by proteose peptone was studied *in vitro*. Macrophages were infected with slowly growing mycobacteria and the extracellular mycobacteria were washed out. Then, macrophages were treated with IFN- γ or TNF- α at a concentration of 10 to 1000 U/ml for 2 days. In another experiment, macrophages were pretreated with these cytokines for 1 day then infected with rapidly growing mycobacteria as before. Macrophages were cultured with or without IFN- γ or TNF- α for additional day. Mycobacterial growth was assessed by determination of colony-forming units on 7H11 agar plates after destruction of the macrophages. Stimulation of macrophages with IFN- γ reduced the growth of mycobacteria. However, except for *M. tuberculosis* and *M. bovis*, growth was not inhibited by macrophages treated with TNF- α . IFN- γ seems to be an important cytokine for the activation of mycobactericidal mechanisms in murine macrophages. Stimulation with IFN- γ or TNF- α and subsequent phagocytosis of *M. tuberculosis*

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

or *M. intracellulare* increased O_2^- production, which was assayed by the method of cytochrome C reduction by murine peritoneal macrophages. Phorbol myristate acetate-triggered O_2^- production was also elevated by the cytokine pretreatment of the macrophages, suggesting that mycobacterial growth inhibition did not parallel the production of reactive oxygen intermediates in TNF- α -activated murine peritoneal macrophages. These data suggest that bactericidal mechanisms of murine macrophages against nontuberculous mycobacteria may not depend on reactive oxygen intermediates.

Key words : IFN- γ TNF- α , Murine macrophages, Slowly growing mycobacteria, Rapidly growing mycobacteria, ROI

キーワード : IFN- γ , TNF- α , マウスマクロファージ, 遅発育抗酸菌, 迅速発育抗酸菌, ROI

はじめに

AIDSの世界的な蔓延とともに結核あるいは *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は重要な問題となっているが、多剤耐性結核や、元来多くの抗菌剤に対して感受性の低いMACをはじめとする多くの非定型抗酸菌による感染症の治療は、かなり困難である。われわれの実験的マウスMAC感染症についての検討では、ベンゾキサジノリファマイシン誘導体KRM-1648やクラリスロマイシンなどの比較的優れた *in vitro* 抗菌活性を有する薬剤を用いた場合でも、期待したほどの効果はみられないこと、さらに、これらの薬剤を含む多剤併用でも、薬剤投与による一過性の臓器内感染菌数の減少がみられるものの、その後の菌の再増殖は抑えられないことが明らかになっている^{1)~5)}。

感作T細胞あるいはマクロファージ(M ϕ)が産生するIFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-2などのサイトカイン(CK)により活性化されたM ϕ では、抗酸菌などの細胞内寄生菌に対する抗菌活性が増強されることが知られているが、菌種・菌株あるいはM ϕ の動物種などの違いによって、必ずしも一致した成績が得られておらず、これらCK処理によってM ϕ の抗菌活性は増強されたとする報告のみならず、逆に抑制されたとするものもある^{6)~17)}。

今回の実験では、IFN- γ あるいはTNF- α で処理されたマウス腹腔M ϕ の結核菌やMACなどの非定型抗酸菌に対する抗菌活性と、これらCKで処理されたM ϕ のreactive oxygen intermediates (ROI)産生能を検討することによって、これらのCKによって処理されたM ϕ が抗酸菌の増殖抑制あるいは殺菌にどのようにかかわっているのか、また、抗酸菌に対するM ϕ のROI依存性殺菌メカニズムの関与はどの程度であるのかを知ることを目的としている。得られた知見は、難治性抗酸菌感染症の治療に応用できるものと考えられる。

方 法

(1) 供試菌

M. tuberculosis H37Rv株, *M. bovis* BCG Yoken株, *M. kansasii* ATCC 12478株, *M. avium* N-425株, *M. intracellulare* N-260株, *M. fortuitum* ATCC 6841株および *M. chelonae* subsp. *abscessus* ATCC19977株を供試した。いずれの菌株も7H9 broth中37℃で3~7日培養したものを蒸留水で遠心洗浄し、OD(540nm)=0.4~0.8になるように蒸留水で調製した。

さらに、 O_2^- 測定用の菌株(H37Rv, N-260)については、7H11寒天培地上、5%CO₂環境下、37℃で2週間培養したものを蒸留水で遠心洗浄後、OD=14になるように蒸留水で調製した。なお、供試MAC2菌株はいずれも平滑、透明、不整形のコロニー形状を有する強毒株である。

(2) マクロファージ

8~12週齢のBALB/c系雌マウス(日本SLC, 静岡)に10% proteose peptoneの2mlを腹腔内投与し、4日後に2% FBS-ハンクス氏液(以下、HBSS)で腹腔浸出細胞(PEC)を回収した。遠心洗浄後、10mM HEPES含有10% FBS-RPMI 1640培地(以下、RPMI)に細胞を浮遊(7.5×10⁶/ml)させ、その1mlを組織培養用ウエル(24well; Corning Glass Works, NY, USA)に加え、5%CO₂下、37℃、3時間培養した。次いで、2% FBS-HBSSで3回洗浄して非付着細胞を除去し、M ϕ 単層培養を得た。

O_2^- 測定用M ϕ の調製では、上述したPECの10% FBS-RPMI細胞浮遊液(1×10⁶/ml)の2.5mlを組織培養用ウエル(6well; Corning)に加え、上述したと同様の方法でM ϕ 単層培養を得た。

(3) 抗菌活性

遅発育抗酸菌の場合、10% FBS-RPMIに浮遊させた

菌液 (3.7~8.5×10⁶ CFU/ml) の1mlをMφ単層培養上に注ぎ、1時間培養後、Mφを2% FBS-HBSSで5回洗浄し、recombinant mouse IFN-γ (Genzyme, MA, USA) あるいは recombinant human TNF-α (大日本製薬, 大阪) 含有各10% FBS-RPMI の1mlを注いだ。2日間培養後、各wellに1mlの蒸留水を加えた後に Handy sonic (Model UR-20P, Tomy Seiko Co., LTD, Tokyo) を用いて約15秒間の超音波処理でMφを破壊させた後、菌数を7H11寒天培地上で計測した。また、別途ウエル上のMφをギムザ染色し、顕微鏡下でMφ数を計測した。

迅速発育抗酸菌の場合では、各々の供試CKをMφ単層培養に加え、1日間の前培養を行った。次いで、Mφを2% FBS-HBSSで3回洗浄し、菌液 (6.5~7.1×10⁶ CFU/ml) を注ぎ、1時間培養後、さらにMφを2% FBS-HBSSで5回洗浄した。次に、供試CK含有培養液を加え12時間培養した後、Mφを2% FBS-HBSSで3回洗浄後、新たなCK含有10% FBS-RPMIを加えてさらに12時間培養した。実験終了後(感染1日後)、CK含有培養液を除去しMφを洗浄後、各wellに2mlの蒸留水を加えた。そして、上述と同様な方法で菌数並びにMφ数の計測を行った。

(4) O₂⁻測定

単層培養MφにIFN-γあるいはTNF-α含有10% FBS-RPMIの2.5mlを注ぎ、2日間培養後にHBSS (0.1% glucose含有, phenol red 不含: pH=7.2) で

3回洗浄した。次いで、80μM cytochrome C 含有HBSS (同上) の2.5mlを添加した後、OD=14の*M. tuberculosis* あるいは *M. intracellulare* の各0.1mlまたは2.5μg/ml phorbol myristate acetate (PMA) の10μlを添加し、37℃で90分間インキュベートした。MφからのO₂⁻産生量は、回収した培養上清のOD (550nm) 値の低下の度合いを測定することによってもとめた¹⁸⁾。

結 果

(1) 遅発育抗酸菌に対するMφの抗菌活性に及ぼすIFN-γとTNF-αの作用

Table 1に結核菌と*M. bovis*に対するIFN-γとTNF-α処理Mφの抗菌活性を示した。いずれのCK処理によってもこれら両菌株に対するMφの抗菌活性の増強がみられたが、その作用はIFN-γの方がTNF-αよりも若干強い傾向にあった。

Table 2は*M. kansasii*についての成績を示したものであるが、IFN-γ処理により、今回供試のいずれの用量においてもほぼ同程度、即ちMφ内感染菌の約50%の増殖阻害が認められた。しかし、TNF-α処理MφではMφ内感染菌の増殖抑制はみられず、むしろCK非処理対照Mφにおけるよりも、その増殖が助長される傾向を認めた。

Table 3にはIFN-γおよびTNF-α処理MφのMACに対する抗菌活性を示した。IFN-γ処理により

Table 1 Antimicrobial Activity of IFN-γ- or TNF-α-treated Macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* complex^{a)}

Agent	Concentration (U/ml)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv			<i>M. bovis</i> BCG Yoken		
		CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms ^{b)} (%)	CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms (%)
		0 time	2-day		0 time	2-day	
None	—	23±0.9	79±3.6	—	14±1.1	5.6±0.6	—
IFN-γ	10	NT ^{c)}	60±0.8 ^{d)}	24	NT	4.8±0.1	14
	10 ²	NT	53±2.1 ^{e)}	33	NT	4.1±0.3	27
	10 ³	NT	59±4.0 ^{d)}	25	NT	3.3±0.2 ^{d)}	41
TNF-α	10	NT	63±1.6 ^{d)}	20	NT	4.7±0.5	16
	10 ²	NT	62±4.2 ^{d)}	22	NT	5.0±0.2	11
	10 ³	NT	67±3.6	15	NT	5.2±0.4	7

a) Macrophages were cultured with *M. tuberculosis* (8.5×10⁶ CFU/ml) or *M. bovis* (3.7×10⁶ CFU/ml) suspended in 10% FBS-RPMI 1640 medium for 1 hr, and the extracellular bacteria were washed out. Then, macrophages were cultured in the medium with or without the addition of IFN-γ or TNF-α for 2 days. Intracellular growth of the organisms was measured by counting colony-forming units (CFU) on 7H11 agar plates for the macrophage cell lysates.

b) Growth inhibition (%) = {1 - (Ntx/Nto in cytokine-treated macrophages)/(Ntx/Nto in nontreated macrophages)} × 100. Nto and Ntx are numbers of CFU at 0 time and 2-day, respectively. Values are expressed as mean ± SE (n=3).

c) Not tested.

d) Significantly different from nontreated macrophages at p<0.05.

e) Significantly different from nontreated macrophages at p<0.01.

Table 2 Antimicrobial Activity of IFN- γ - or TNF- α -treated Macrophages against *Mycobacterium kansasii*^{a)}

Agent	Concentration (U/ml)	<i>M. kansasii</i> ATCC 12478		
		CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms ^{b)} (%)
		0 time	2-day	
None	—	11±0.8	45±2.4	—
IFN- γ	10	NT ^{c)}	23±1.1 ^{e)}	49
	10 ²	NT	19±0.4 ^{e)}	58
	10 ³	NT	23±0.9 ^{e)}	49
TNF- α	10	NT	47±4.3	— 4
	10 ²	NT	49±5.8	— 9
	10 ³	NT	50±3.5	—11

a) Macrophages were infected with *M. kansasii* (4.8×10^6 CFU/ml). The other details are the same as indicated in Table 1.

Table 3 Antimicrobial Activity of IFN- γ - or TNF- α -treated Macrophages against *Mycobacterium avium* complex^{a)}

Agent	Concentration (U/ml)	<i>M. avium</i> N-425			<i>M. intracellulare</i> N-260		
		CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms ^{b)} (%)	CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms (%)
		0 time	2-day		0 time	2-day	
None	—	14±0.6	12±1.1	—	6.0±0.2	15±0.1	—
IFN- γ	10	NT ^{c)}	10±0.9	17	NT	11±0.4 ^{e)}	27
	10 ²	NT	10±0.4	17	NT	11±1.3	27
	10 ³	NT	11±1.2	8	NT	11±0.5 ^{d)}	27
TNF- α	10	NT	13±0.7	— 8	NT	19±0.8 ^{d)}	—27
	10 ²	NT	12±0.6	0	NT	19±0.8 ^{d)}	—27
	10 ³	NT	12±1.2	0	NT	14±0.5	7

a) Macrophages were infected with *M. avium* (5.4×10^6 CFU/ml) or *M. intracellulare* (4.3×10^6 CFU/ml). The other details are the same as indicated in Table 1.

M ϕ の *M. avium* 並びに *M. intracellulare* のいずれの菌株に対する抗菌活性も増強される傾向がみられたが、IFN- γ 濃度を10² U/ml 以上に増加させても M ϕ の抗菌活性のさらなる増強は認めなかった。他方、TNF- α 処理によつては、M ϕ のいずれの MAC 菌株に対する抗菌活性にも増強はみられず、むしろ TNF- α の用量によつては M ϕ 内被食菌の増殖が促進される傾向を認めた。

(2) 迅速発育抗酸菌に対する M ϕ の抗菌活性に及ぼす IFN- γ と TNF- α の作用

Table 4 は *M. fortuitum* と *M. chelonae* subsp. *abscessus* についての成績を示した。*M. fortuitum* の場合、M ϕ の供試菌に対する食食能 (0 time) は食食

前1日間のCK処理により若干低下する傾向が認められたが(阻害率: 7.3~33.4%), M ϕ 内被食菌に対する抗菌活性そのものはIFN- γ 処理によって増強されることが分かった。これに対して、TNF- α にはそのようなM ϕ 抗菌活性増強能は全く認められず、かえつてM ϕ の抗菌活性が抑制される傾向が認められた。

M. chelonae subsp. *abscessus* の場合においては、上述の場合と同様に、IFN- γ 前処理M ϕ での供試菌食食能の低下、並びに被食菌に対する抗菌活性の亢進が認められたものの、TNF- α での前処理によつてはM ϕ の供試菌食食能は逆に増強されること、さらに被食菌に対するM ϕ 抗菌活性はTNF- α 処理によつてむしろ抑制されることが明らかとなった。なお、これらのCK

Table 4 Antimicrobial Activity of IFN- γ - or TNF- α -treated Macrophages against *Mycobacterium fortuitum* complex^{a)}

Agent	Concentration (U/ml)	<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841			<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977		
		CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms ^{b)} (%)	CFU/100 macrophages		Growth inhibition of organisms (%)
		0 time	1-day		0 time	1-day	
None	—	83±2.5	305±11	—	34±2.3	159±1.8	—
IFN- γ	10	66±4.4 ^{c)}	181±19 ^{d)}	25	17±0.9 ^{d)}	41±5.0 ^{d)}	48
	10 ²	63±1.7 ^{d)}	167±15 ^{d)}	28	16±0.8 ^{d)}	28±4.1 ^{d)}	63
	10 ³	56±11	162±12 ^{d)}	21	15±0.4 ^{d)}	45±2.9 ^{d)}	36
TNF- α	10	77±10	433±46 ^{c)}	— 53	52±0.7 ^{d)}	279±13 ^{c)}	—15
	10 ²	69±4.7	435±35 ^{c)}	— 72	64±1.9 ^{d)}	281±12 ^{d)}	6
	10 ³	60±7.6 ^{c)}	459±48 ^{c)}	—108	58±1.0 ^{d)}	337±14 ^{d)}	—24

a) Macrophages were pretreated in 10% FBS-RPMI 1640 medium with or without IFN- γ or TNF- α for 24 h, and then infected with *M. fortuitum* (6.5×10^6 CFU/ml) or *M. chelonae* subsp. *abscessus* (7.1×10^6 CFU/ml) in RPMI medium. After 1 h incubation, the extracellular bacteria were washed out. Macrophages were then cultured in the medium with or without IFN- γ or TNF- α for additional 24 h. Intracellular growth of the organisms was measured by counting colony-forming units (CFU) on 7H11 agar plates for the macrophage cell lysates.

b) Growth inhibition (%) = $\{1 - (\text{Ntx/Nto in cytokine-treated macrophages}) / (\text{Ntx/Nto in nontreated macrophages})\} \times 100$. Nto and Ntx are numbers of CFU at 0 time and 1-day, respectively. Values are expressed as mean \pm SE (n=3).

c) Significantly different from nontreated macrophages at $p < 0.05$.

d) Significantly different from nontreated macrophages at $p < 0.01$.

Table 5 Effect of Cytokine Pretreatment on the Mycobacteria- or PMA-triggered Respiratory Burst of Macrophages

Triggering	Agent	Concentration	O ₂ ⁻ release ^{a)} (pmoles/min/10 ⁶ cells)	Relative O ₂ ⁻ value
(A)				
PMA	None	—	90 \pm 19	100
	IFN- γ	10 U/ml	346 \pm 8.1 ^{b)}	388
	IFN- γ	10 ² U/ml	401 \pm 12 ^{b)}	446
	IFN- γ	10 ³ U/ml	446 \pm 16 ^{b)}	496
	TNF- α	10 U/ml	448 \pm 39 ^{b)}	498
	TNF- α	10 ² U/ml	567 \pm 76 ^{b)}	630
	TNF- α	10 ³ U/ml	641 \pm 20 ^{b)}	712
(B)				
PMA	None	—	60 \pm 8.0	100
	IFN- γ	10 ² U/ml	379 \pm 13 ^{b)}	632
	TNF- α	10 ² U/ml	422 \pm 15 ^{b)}	703
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	None	—	133 \pm 12	100
	IFN- γ	10 ² U/ml	296 \pm 22 ^{b)}	223
	TNF- α	10 ² U/ml	259 \pm 9.5 ^{b)}	195
<i>M. intracellulare</i> N-260	None	—	62 \pm 4.6	100
	IFN- γ	10 ² U/ml	271 \pm 15 ^{b)}	437
	TNF- α	10 ² U/ml	335 \pm 8.1 ^{b)}	540

a) Mouse peritoneal macrophages were cultured in 10% FBS-RPMI 1640 medium on 6-well culture dishes in the presence or absence of IFN- γ or TNF- α . After 2-day cultivation, macrophages were rinsed with phenol red-free HBSS (pH7.2) containing 0.1% glucose, and overlaid with 2.5 ml of HBSS containing 80 μ M of cytochrome C. A 10 μ l portion of phorbol myristate acetate (PMA) (2.5 μ g/ml) or a 100 μ l portion of mycobacterial suspension (OD_{540nm}=14) was then added to the medium. After 90-min incubation, the medium was removed, and the extent of reduction of cytochrome C was spectrophotometrically measured from the OD values at 550 nm. Values are expressed as mean \pm SE (n=3).

b) Significantly different from nontreated macrophages at $p < 0.01$.

で24時間前培養した後の菌貪食時における培養 well 上の付着 Mφ 細胞数は、対照群 (CK 不含培地中での前培養後の Mφ) のそれとの間に有意差を認めなかった。

(3) Mφ の O_2^- 産生能に及ぼす IFN- γ および TNF- α の効果

IFN- γ および TNF- α 処理 Mφ の PMA あるいは結核菌, *M. intracellulare* 菌体刺激による O_2^- 産生能は Table 5 に示したとおりである。IFN- γ と TNF- α のいずれの CK とも, Mφ の PMA 刺激 O_2^- 産生能を強く増強させたが, その効果は 10 U/ml の用量で既に plateau に達し, その増加はさほど用量に依存したものではないことが分かった (Table 5-A)。また, 結核菌あるいは *M. intracellulare* などの菌体刺激による Mφ の O_2^- 産生もまた, これらの CK による前処理によって有意に増強されることが分かった (Table 5-B)。なお, Mφ を PMA あるいは菌体で刺激しない場合の O_2^- 産生は認められなかった。

考 察

一般に IFN- γ 処理で活性化された Mφ では, *Listeria*, *Leishmania* や *Trypanosoma* など多くの細胞内寄生菌 (寄生体) に対する殺菌 (殺細胞) 活性が増強することが知られている^{19)~25)}。ところが, 抗酸菌に対する抗菌活性については, 特にマウス Mφ の場合には IFN- γ 処理によって結核菌, *M. bovis*, MAC などに対してその亢進がみられるとするものが多いが^{6) 7) 11) 12) 14) 16)}, *M. lepraemurium* に対する抗菌活性はかえって低下することが報告されている²⁶⁾。今回のわれわれの検討では, IFN- γ には供試 7 抗酸菌に対する Mφ の抗菌活性の有意な増強能が認められたことから, IFN- γ は結核菌や MAC のみならず多くの非定型抗酸菌に対するマウス Mφ の抗菌活性の増強に深くかかわっているものと考えられる。Ding ら²⁷⁾ は諸種 CK の H_2O_2 並びに NO_2^- 産生を指標としての Mφ の抗菌活性の増強作用について検討し, 供試 12 種の CK のうちでは IFN- γ のみにそのような増強作用があることを見いだしているが, このことから IFN- γ が Mφ の抗菌活性の増強に最も重要な CK であることが肯首される。TNF- α については, *Leishmania* や *Trypanosoma* などの原虫さらには結核菌や MAC などの抗酸菌に対する Mφ 殺菌 (殺細胞) 能の増強効果が報告されている^{17) 23) 24) 28) 29)}。

今回のわれわれの検討では, 結核菌群を供試した場合には, IFN- γ および TNF- α のいずれの CK で処理されたマウス Mφ でも, その抗菌活性の亢進が認められることが分かった。しかしながら, MAC などの非定型抗酸菌の場合には, IFN- γ には Mφ の抗菌活性の有意

な増強作用がみられたのに対して, TNF- α にはそうした作用は認められず, むしろ抗菌活性の減弱を来すような場合もあることが分かった。したがって, TNF- α は結核菌群に対する Mφ の抗菌活性を増強させるものの, 非定型抗酸菌に対する Mφ の抗菌活性は増強し得ないように思われる。

ところで, Table 5 に示すように, IFN- γ のみならず TNF- α 処理においても Mφ の O_2^- 産生能は著しく増強されることが分かった。このことは, TNF- α による Mφ の ROI 産生能の増強は, 非定型抗酸菌に対する Mφ の抗菌活性の発現とは連動していないことを示すものと思われる。因みに Rook ら⁶⁾ は, IFN- γ 処理マウス腹腔 Mφ では結核菌に対する抗菌活性が増強されるが, ヒト単球由来 Mφ を同様に IFN- γ で処理した場合にはそのような効果がみられないことを見いだしている。この場合, いずれの Mφ でも IFN- γ 処理によりその PMA 誘導 ROI 産生能の亢進が認められている。また, Flesch ら⁷⁾ は IFN- γ 処理を行ったマウス骨髄由来 Mφ の結核菌群に対する抗菌活性について検討し, 結核菌 H37Rv 株と *M. bovis* BCG 株では Mφ による増殖抑制がみられるのに対して, 結核菌 Middelburg 株では IFN- γ 処理によりむしろ Mφ 内増殖が助長される傾向が認められること, また, IFN- γ で処理した Mφ の BCG 菌刺激 ROI 産生能と IFN- γ 非処理 Mφ のそれとの間にはほとんど差がみられないことから, 少なくともマウス骨髄由来 Mφ の結核菌群に対する抗菌活性の発現には, ROI が直接関与するようなメカニズムはあまり有効ではないと報告している。さらに, IFN- γ 活性化マウス由来 J774.16 Mφ 細胞株あるいはマウス腹腔 Mφ の結核菌や MAC に対する抗菌活性についての検討においても, ROI の殺菌メカニズムの発現への関与については否定的な成績^{11) 12)} が得られている。さらにわれわれは, 無細胞系での検討により抗酸菌は ROI の単独作用に対しては抵抗性が強く, 例えば Xanthin oxidase-acetaldehyde 系で産生される O_2^- , $\cdot OH$ を中心とする ROI ではほとんどが殺菌されないが, Fe^{2+} -EDTA を触媒とする H_2O_2 依存ハロゲン化反応系にはいずれも強い感受性を示し, 速やかに殺菌されることを見いだしている^{30) 31)}。したがって, Mφ の抗酸菌, 特に非定型抗酸菌に対する抗菌活性の発現においては, ROI 分子単独では殺菌性エフェクターとしては重要な役割を演じ得ないものと思われる。しかしながら, 今回の実験では, 結核菌は ROI 産生能が高まっている TNF- α 処理 Mφ によってその増殖が抑制されており, マクロファージの結核菌に対する抗菌活性の発現においては, ROI はある程度重要な役割を果たしているものと思われる。現在, 抗酸菌に対する Mφ の殺

菌機構にかかわる他のエフェクター分子について検討を進めているところである。

ま と め

結核菌群に対しては、IFN- γ およびTNF- α のいずれのCKで処理されたマウスM ϕ でもその抗菌活性の増強が認められたが、MACなどの非定型抗酸菌に対しては、IFN- γ にはM ϕ の抗菌活性の増強作用がみられたのに対して、TNF- α にはそうした作用は認められなかった。しかしながら、IFN- γ のみならずTNF- α のいずれのCK処理においてもM ϕ のO₂産生能は著しく増強されることが分かった。したがって、M ϕ の非定型抗酸菌に対するROI依存性殺菌メカニズムの関与は否定的であることが示唆された。

文 献

- 1) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇 : Sparfloxacin の抗マイコバクテリア活性, 結核. 1991; 66: 643-649.
- 2) Tomioka H, Saito H, Sato K, et al. : Chemotherapeutic efficacy of newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36: 387-393.
- 3) 斎藤 肇, 富岡治明, 佐藤勝昌, 他 : *Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン系薬剤 KRM-1648 の長期治療. 1994; 69: 59-63.
- 4) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : In vitro and in vivo activities of clarithromycin against the *Mycobacterium avium* complex. Int J Antimicrob Agents. 1994; 4: 175-181.
- 5) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : Therapeutic effect of KRM-1648 with various antimicrobials against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. Tubercle Lung Dis. 1995; 76: 51-58.
- 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. Immunology. 1986; 59: 333-338.
- 7) Flesch I, Kaufmann HE : Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1987; 138: 4408-4413.
- 8) Bermudez LEM, Young LS : Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- γ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. J Immunol. 1988; 140: 3006-3013.
- 9) Squires KE, Murphy WF, Madoff LC, et al. : Interferon- γ and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. J Infect Dis. 1989; 159: 599-600.
- 10) Toba H, Crawford JT, Ellner JJ : Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activating factor activity of gamma interferon. Infect Immun. 1989; 57: 239-244.
- 11) Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, et al. : Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med. 1992; 175: 1111-1122.
- 12) Appelberg R, Orme IM : Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. Immunology. 1993; 80: 352-359.
- 13) Doi T, Ando M, Akaike T, et al. : Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. Infect Immun. 1993; 61: 1980-1989.
- 14) Hsu N, Young LS, Bermudez LE : Response to stimulation with recombinant cytokines and synthesis of cytokines by murine intestinal macrophages infected with the *Mycobacterium avium* complex. Infect Immun. 1995; 63: 528-533.
- 15) Sarmiento AM, Appelberg R : Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in in vitro-cultured mouse macrophages. Infect Immun. 1995; 63: 3759-3764.
- 16) 富岡治明 : 抗酸菌感染症が難治性である理由を探る. 細菌学誌. 1995; 50: 687-701.
- 17) Denis M, Gregg EO, Ghandirian E : Cytokine

- modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol.* 1990 ; 12 : 721-727.
- 18) Johnston RB Jr, Godzik CA, Cohn ZA : Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med.* 1978 ; 148 : 115-127.
 - 19) Denis M, Gregg EO : Studies on cytokine activation of listericidal activity in murine macrophages. *Canad J Immunol.* 1990 ; 36 : 671-675.
 - 20) Buchmuller-Rouiller Y, Mauel J : Macrophage activation for intracellular killing as induced by calcium ionophore. Correlation with biologic and biochemical events. *J Immunol.* 1991 ; 146 : 217-223.
 - 21) Murray HW, Scavuzzo D, Jacobs JL, et al. : In vitro and in vivo activation of human mononuclear phagocytes by interferon- γ . Studies with normal and AIDS monocytes. *J Immunol.* 1987 ; 138 : 2457-2462.
 - 22) Vincendeau P, Daulouede S : Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves in L-arginine-dependent mechanism. *J Immunol.* 1991 ; 146 : 4338-4343.
 - 23) Ho JL, He SH, Rios MJC, et al. : Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte-monocyte colony-stimulating factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. *J Infect Dis.* 1992 ; 165 : 344-351.
 - 24) Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M : Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Letters.* 1992 ; 33 : 35-40.
 - 25) Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S : The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves in L-arginine-dependent, nitro oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol.* 1992 ; 22 : 2501-2506.
 - 26) Denis M : Modulation of *Mycobacterium lepraemurium* growth in murine macrophages : Beneficial effect of tumor necrosis factor alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun.* 1991 ; 59 : 705-707.
 - 27) Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages - Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988 ; 141 : 2407-2412.
 - 28) Denis M : Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium* : killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leukocyte Biol.* 1991 ; 49 : 380-387.
 - 29) Denis M, Gregg EO : Recombinant tumor necrosis factor-alpha decrease whereas recombinant interleukin-6 increase growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunol.* 1990 ; 71 : 139-141.
 - 30) Yamada Y, Saito H, Tomioka H, et al. : Susceptibility of micro-organisms to active oxygen species : Sensitivity to the xanthine-oxidase-mediated antimicrobial system. *J Gen Microbiol.* 1987 ; 133 : 2007-2014.
 - 31) Yamada Y, Saito H, Tomioka H, et al. : Relationship between the susceptibility of various bacteria to active oxygen species and to intracellular killing by macrophages. *J Gen Microbiol.* 1987 ; 133 : 2014-2021.