

今村賞受賞記念講演

肺結核症における NK 細胞の基礎的・臨床的研究

米田 尚弘

奈良県立医科大学第二内科

受付 平成8年7月29日

Commemorative Lecture of Receiving Imamura Memorial Prize

NK CELL IN PULMONARY TUBERCULOSIS
FROM BASIC AND CLINICAL POINT OF VIEW

Takahiro YONEDA, M. D.*

(Received 29 July 1996)

Although natural killer (NK) cells, which lyse certain tumors *in vitro*, have been shown to provide early defense mechanism against cancer growth and viral infection, possible role in the host defense against pulmonary tuberculosis remains undefined. A series of my studies have recently provided several evidence supporting the involvement of NK cells in the immunopathology of pulmonary tuberculosis.

NK cell activity in patients with active pulmonary tuberculosis was significantly augmented compared with that in age-, sex- matched healthy controls, which suggests NK cells are activated *in vivo* in pulmonary tuberculosis. Lung NK cells from BCG-infected mice also are shown to be activated. Asialo GM1 was demonstrated to be a novel surface marker of mice NK cells, which inhibited activation of NK cells by interferon.

Chronic intractable tuberculosis was classified with a combination of NK cell activity and delayed-type hypersensitivity reaction to 2, 4-dinitrochlorobenzene. Subgroup defined with high NK cell activity and normal delayed-type hypersensitivity was characterized with moderate radiographical lesions and stable clinical course, suggesting the immune-spectrum classification was associated with clinical manifestations.

Malnutrition has been suggested to be a risk factor associated with the development and reactivation of pulmonary tuberculosis. NK cell activity was significantly correlated with visceral proteins. IL-2 producing capability was significantly decreased in patients with serum albumin less than 3.5g/dl.

More recently, I established an *in vitro* system evaluating quantitative capability for intracellular killing by human monocytes, in which monocyte phagocytize *Mycobacterium tuberculosis* and subsequently inhibit intracellular replication of the organisms by adding some cytokines or cells. Purified NK cells by using discontinuous gradient centrifugation and magnetic separation technique were added to *M. tuberculosis*-infected monocytes monolayer. Purified NK cells inhibit intracellular replication within monocytes in dose response manner.

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

In conclusion these findings suggest that (1) NK cells are activated in pulmonary tuberculosis and that (2) NK cells are related with nutritional status and that (3) the immune spectrum defined by NK cell and delayed-type hypersensitivity are related with clinical manifestations and that (4) NK cells may be involved with an early defense mechanism in terms of activation of intracellular killing by human monocyte/macrophage system.

Key words : NK cell, Pulmonary tuberculosis, Asialo GM 1, Immune-spectrum, Malnutrition, Intracellular killing

キーワードズ : NK 細胞, 肺結核症, アシアロ GM 1, 免疫スペクトル, 栄養障害, 細胞内殺菌

緒 言

natural killer (NK) 細胞は1970年代はじめに未感染, MHC 非拘束性に細胞障害性を示すリンパ球として, Takasugi¹⁾, Kiessling²⁾らによってほぼ同時期に報告された。その後国立予研で葛西³⁾, 著者らによりマウス NK 細胞マーカーとしてアシアロ GM 1 が報告され, 形態学的には large granular lymphocyte (LGL) であることや, ヒトの表面マーカーも最近明らかにされてきた⁴⁾。

NK 細胞の機能に関しては, 腫瘍の発生・転移の制御⁵⁾ やウイルス感染防御作用⁶⁾ が知られているが, その他の微生物感染での役割は注目されず不明な点が多いのが現状である。最近, 2, 3 の細胞内寄生細菌や寄生虫における役割が報告⁶⁾ されているが, 抗酸菌感染症での役割はほとんど不明である。

著者は1982年から肺結核症の NK 細胞に関する研究をおこない, 1983年にはじめて肺結核患者での NK 細胞の動態を報告⁷⁾ した。その後, 抗酸菌感染に関して若干の研究が報告されている。肺結核症における NK 細胞の基礎的・臨床的観点から, 著者のこれまでの研究を紹介する。第一点としては, 肺結核症での NK 細胞の動態について, 第二点として NK 細胞と臨床病態との関連性に関して——(1) 難治性肺結核症における免疫スペクトルと臨床的多様性, (2) 肺結核症の栄養障害と NK 細胞との関連性, 第三点として直接的に NK 細胞の結核菌増殖抑制に対する作用を検討する目的で最近, 作成した *in vitro* モデルの成果を簡単に報告する。

方 法

実験1: 活動性肺結核患者および健常人を対象として, 末梢血単核細胞の NK 細胞活性を K562 を標的細胞として⁸⁾ ⁵¹Cr 遊離法を用いて既述の方法⁸⁾ で測定した。

実験2: 感染局所の NK 細胞動態を検討する目的で, BCG 経静脈感染マウス肺 NK 細胞活性を測定した。瀉

血, bronchoalveolar lavage, pulmonary vascular washing 後肺を細切し, YAC-1 に対する NK 細胞活性を測定した。

マウス NK 細胞マーカーを研究する目的で, 抗アシアロ GM 1 抗体を *in vivo*, *in vitro* での NK 細胞活性に対する影響, interferon (IFN) による NK 細胞活性化に対する影響を BALB/c nu/nu マウスを用いて検討した。

実験3: 1年以上排菌が持続する慢性難治症例の宿主側の免疫学的背景を研究する目的で, NK 細胞と多様な臨床病態の関連性を検討した。

実験4: 肺結核患者の臨床栄養評価の手法を駆使して包括的栄養評価⁹⁾ (身体計測, 内臓蛋白, 血漿アミノ酸分析) を行い, NK 細胞活性などの細胞性免疫能との関連性を研究した。

実験5: 末梢血単球を付着法にて分離し, M. Tb 株として H37Ra と1時間混合培養して食後洗浄する。一方, 非付着細胞はナイロンウールカラム通過後, パコール非連続密度勾配法を用いて, NK 細胞と high-density T 細胞を濃縮し, 必要に応じてパンニング, Immuno-beads 法でさらに純化して (この方法により95%程度に純化される), 結核菌貪食単球 monolayer に添加し, 7~10日間培養後単球の lysate を3週間培養し colony forming unit (CFU) を算定した。

成 績

(1) 肺結核患者の NK 細胞活性

NK 細胞活性の結果を示す。NK 細胞活性は年齢・性の影響を受けるので, 年齢・性のマッチした健常人と比較すると, 患者群で著明に高値を示し, 肺結核患者で NK 細胞が活性化されていることが示された (図1)。

排菌状態によって3群に分けて検討すると, 3カ月間の化学療法による排菌陰性群は, 未治療初回診断例群と比較して有意に高値を示した。慢性難治例は両群の中間に位置したが, 排菌陰性化群と比較して有意に低値を示

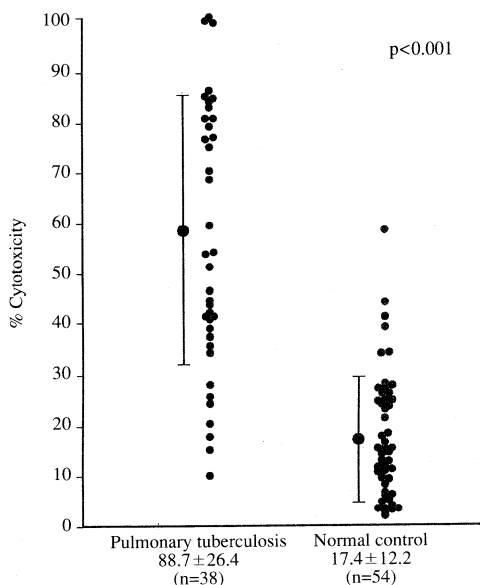


図1 活動性肺結核患者のNK細胞活性
effector/target ratio=20

した。

(2) マウス肺NK活性

マウスNK活性は系統差、年齢により影響を認めた。SPF-ICR系マウスにBCG10⁸静注後のNK細胞活性のkineticを検討したところ、肺ではBCG感染後NK細胞活性の上昇を認めた。

(3) マウスNK細胞表面マーカー

抗アシアロGM1抗体によるマウスNK細胞活性に対する影響を検討すると、明瞭なdose-response curveを示し、20 μlで完全にNK細胞活性が抑制された。in vivo, in vitroで抗アシアロGM1抗体で処理しておくともIFNによるNK細胞活性化が完全に抑制されること(図2)が示され、IFNレセプターが同一細胞上にある可能性を示唆した。

(4) 慢性難治性肺結核における免疫スペクトル分類

1年以上排菌が持続する慢性難治症例の宿主側の免疫学的背景を研究する目的で、NK細胞と多様な臨床病態の関連性を検討した。

慢性難治例のNK活性の平均値は治療後排菌陰性化群に比較して低値を示し、NK細胞が難治化に何らかの関与をしている可能性が推測された。また、NK細胞活性の分布をみると、70%以上の高値群、30~70%の中間値群、30%未満の低値群に分極化する傾向を認めた。NK細胞活性と遅延型皮膚反応を組み合わせる免疫学的スペクトル分類を試みた。高NK群は全例遅延型皮膚

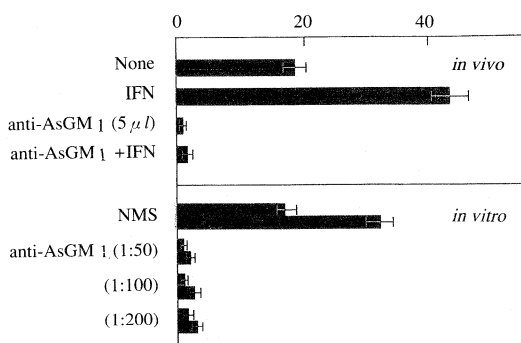


図2 抗 asialoGM1 抗体による IFN- NK 細胞系に対する影響

反応が陽性で、一方低NK群の90%は低下しており両者に関連性を認めた。

また、胸部レントゲン所見と免疫スペクトルの関連性を検討すると、低NK群の75%は広汎型(far advanced)で、進行性増悪例が多数を占めた。高NK群の75%は非広汎型(mild)で、不変安定例が統計的に有意に大多数を占めた。

(5) NK細胞と栄養障害

PPD遅延型皮膚反応と栄養状態の関連性を見ると、陰性群は陽性群に比較して、標準体重をはじめ身体計測値、内臓蛋白、血漿アミノ酸(分枝鎖アミノ酸、分枝鎖アミノ酸/芳香族アミノ酸比)とが有意に低値を示し、遅延型皮膚反応が蛋白・エネルギー・アミノ酸栄養障害と密接に関連することが示唆された。NK細胞活性は血清アルブミン、RBP(retinal binding protein)、PA(prealbumin)の内臓蛋白と有意の正の相関を示した(図3)。

IL-2-NK細胞系と内臓蛋白の関連性を検討すると、血清アルブミン値が3.5g/dl未満患者は3.5g/dl以上患者群に比較してIL-2産生能が著明に低下し、NK細胞活性も同様の動態を示し、3.5g/dl未満で著明に低値を示した。

肺結核患者では、末梢血単球のTNF-α(tumor necrosis factor-α)産生能は著明に亢進していた。栄養状態との関連では、中等~軽度栄養障害では、TNF-αは内臓蛋白、血漿アミノ酸、体脂肪量などと有意の負の相関を示し、一方、高度栄養障害患者では産生低下を示した。

(6) In vitroモデルを用いたヒトNK細胞の検討

単球lysateの結核菌増殖のタイムコースを検討した。無処理コントロール単球では殺菌・増殖抑制は認められなかった。NK細胞添加群では、4日目ごろから増殖抑制が認められ、7~10日後には有意の増殖抑制・殺菌が

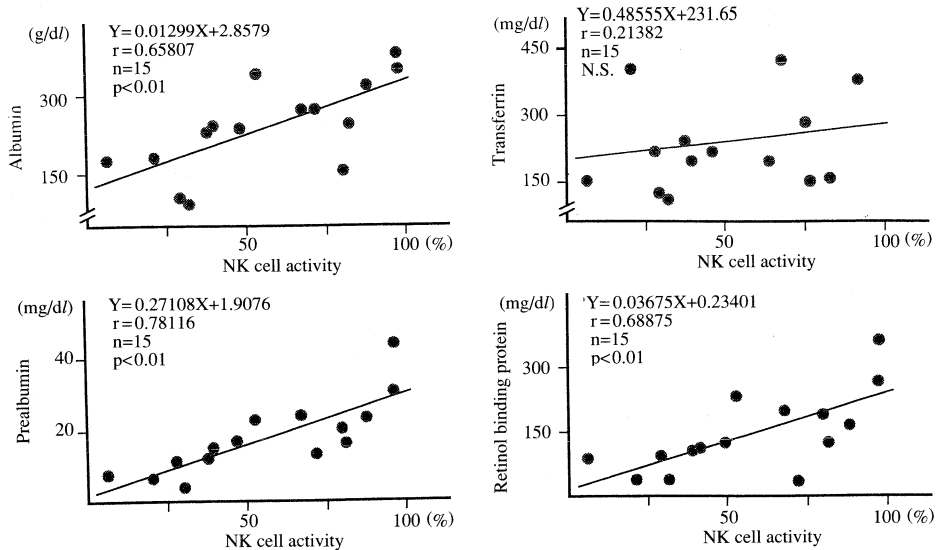


図3 肺結核患者における内臓蛋白とNK細胞活性の関連性

認められた。T細胞添加群でもNK細胞よりやや遅れ、7日ごろから有意の殺菌が認められた。この実験系では付着単球の細胞数は減少しておらず、CFUの減少は単球の活性化による細胞内増殖抑制・殺菌を反映していると考えられた。NK細胞は比較的早期に単球を活性化する可能性が示唆された。

添加T細胞、NK細胞数と細胞内殺菌の関連性を示す。dose-responseな増殖抑制が明瞭である(図4)。NK細胞を200U IL-2と48時間混合培養し活性化し、lymphokine-activated killer (LAK)細胞を作製し、貪食単球系に添加し同様の検討をした。その結果、LAK細胞は、強力な細胞内殺菌増強効果を示した。この殺菌作用は、NK細胞・貪食単球混合培養上清中にも認められ、NK細胞が貪食単球により活性化され、NK細胞から産生されるサイトカインにより単球の細胞内殺菌が増強される可能性が示唆された。

結核菌貪食単球に対する各種サイトカインの影響を検討した成績を示す。ヒトにおいてはTNF- α 、IL-2、GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)が細胞内増殖抑制・殺菌を増強するが、マウスにおいてMAF (macrophage activating factor)活性が知られているIFN- γ はヒトでは増殖抑制作用がなく、むしろ若干の増殖促進効果が認められた。このことから、NK細胞が産生するTNF- α 、GM-CSFなどが単球活性化に関与している可能性が推測された。

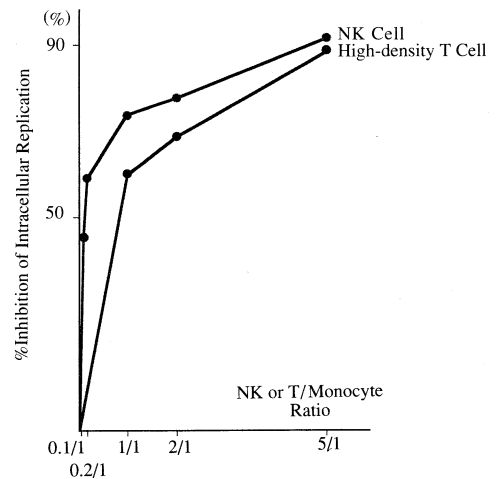


図4 *Mycobacterium tuberculosis* 貪食ヒト単球内殺菌に対する純化NK細胞、T細胞添加による殺菌増強効果

考 察

NK細胞の機能に関しては、腫瘍の発生・転移の制御やウイルス感染防御作用が知られているが、その他の微生物感染での役割は注目されず不明な点が多いのが現状である。最近、2, 3の細胞内寄生細菌や寄生虫における役割が報告されているが、抗酸菌感染症での役割は不明確な点が多い。

本研究により、肺結核患者群でNK細胞活性が著明に高値を示し、肺結核患者でNK細胞が活性化されていることが示された。排菌量・臨床病態などにより、NK細胞活性が変動する可能性が示唆された。NK細胞の基礎的動態に関する私の検討ではマウスを用いた検討により、末梢血、脾臓、肝臓だけでなく、生体防御のfirst-lineである肺、特に間質にもNK細胞が分布していることが明らかになった。また、NK細胞活性化の機序に関しては、BCGや結核菌細胞壁のリピド成分等による活性化マクロファージから産生されるIFN- γ 、IL-12、TNF- α などの種々のサイトカインがNK細胞活性化に関与している可能性⁹⁾が示唆された。

マウスNK細胞マーカーに関する検討では、*in vivo*、*in vitro*で抗アシアロGM1抗体で処理しておく、NK細胞活性がほぼ完全に抑制された。また、IFNによるNK細胞活性化が完全に抑制されることが示され、IFNレセプターが同一細胞上にある可能性を示唆した⁹⁾。

慢性難治症例の宿主側の免疫学的背景を研究する目的で、NK細胞と多様な臨床病態の関連性を検討した。本研究ではNK細胞・遅延型皮膚反応で規定される免疫スペクトルは慢性難治例の臨床的多様性と密接に対応していることが示唆された¹⁰⁾。

当科を含め幾つかの内外のprospectiveな疫学調査により、「やせ」型体格あるいは栄養障害が肺結核発病、再燃のリスクファクターであることが示唆されてきた。とくに、われわれは肺結核患者の臨床栄養評価の手法を駆使して包括的栄養評価を行い、細胞性免疫能との関連性を研究してきた¹¹⁾。

NK細胞と栄養障害の関連性に関しては従来ほとんど研究されていない。内臓蛋白がNK細胞活性の規定要

因の一つであることが新たに示された。IL-2はNK細胞活性化因子の一つであることが知られている。今回の成績から、栄養障害によるNK細胞活性の低下にはIL-2産生能の低下が関与していると推測される¹²⁾。

TNF- α は活性化マクロファージなどから産生され、NK細胞活性化、結核性肉芽腫形成¹³⁾などに必須の役割を果たすことが報告されている。一方、TNF- α はカケチンとも呼ばれ発熱、食欲不振など一般的な炎症にともなう症状のほか、代謝系に対しても主として異化亢進作用を示す¹⁴⁾。肺結核症においては本来生体防御のために産生されたTNF- α の慢性的過剰産生が、脂肪組織の減少、筋肉蛋白分解、アミノ酸流出、肝での蛋白合成抑制などの異化亢進による栄養障害を増悪させ、高度栄養障害に至ると産生が障害され、免疫抑制による難治化が増強されると考えられる。このように、肺結核では免疫・栄養・サイトカインの相互作用、ネットワークが形成されていると考えられる。

マウスでは、結核菌に対する防御機構は結核菌特異的T細胞から産生される主としてIFN- γ などのサイトカインによるマクロファージ活性化が細胞内殺菌の中心的役割を果たすことが明確になっている¹⁵⁾が、ヒトでは細胞内殺菌の機序や、マクロファージ活性化因子に関して依然明確ではない。ヒトでの食細胞系の細胞内殺菌・増殖抑制を評価するために、著者はCase Western Reserve大学Ellner研究室で結核菌貪食末梢血単球の*in vitro*モデルを確立し、その機序を簡便に解析することを試みた¹⁶⁾¹⁷⁾。NK細胞添加群では、4日目ごろから増殖抑制が認められ、7~10日後には有意の増殖抑制・殺菌が認められた。T細胞添加群でもNK細胞よりやや遅れ、7日目ごろから有意の殺菌が認められた。NK

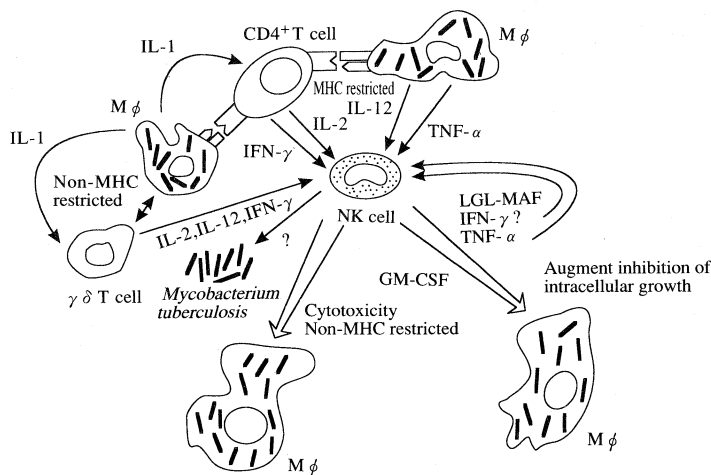


図5 結核菌感染におけるNK細胞の役割 (一部仮説)

細胞はT細胞に比較して早期に単球を活性化する可能性が示唆された。NK細胞は結核菌貪食単球に対してdose-responseな増殖抑制が明瞭であった。この殺菌作用は、NK細胞・貪食単球混合培養上清中にも認められ、NK細胞が貪食単球により活性化され、NK細胞から産生されるサイトカインにより単球の細胞内殺菌が増強される可能性が示唆された¹⁸⁾。

以上の成績から結核菌感染におけるNK細胞の役割を中心にまとめたシェーマ(図5)である。マクロファージは結核菌を貪食し、LAM, TDMなどの細胞壁成分により直接・非特異的に活性化されたマクロファージから産生されたIL-12, TNF- α によりNK細胞が感染の比較的初期に活性化されると考えられる¹⁹⁾。

著者は結核菌貪食単球に対する各種サイトカインの影響を*in vitro*で検討した²⁰⁾。ヒトにおいてはTNF- α , IL-2, GM-CSFが細胞内増殖抑制・殺菌を増強するが、マウスにおいてMAF活性が知られているIFN- γ はヒトでは増殖抑制作用がなく、むしろ若干の増殖促進効果が認められた。このことから、NK細胞が産生するTNF- α , GM-CSFなどが単球活性化に関与している可能性が推測された。活性化されたNK細胞からはLGL-MAFというべきTNF- α , GM-CSF, IFN- γ が産生され、結核菌を貪食したマクロファージの細胞内殺菌、増殖抑制が起こると推測される。ただし、著者の研究では、IFN- γ はヒトでマクロファージ活性化因子としては作用していないとの成績を得ている。NK細胞自体が結核菌に対して直接作用を示すかは不明である。感染初期には、また $\gamma\delta$ T細胞も活性化され、産生されたIL-12によりTh1系の活性化とともにマクロファージ、NK細胞の活性化が起きる。

一方、少し遅れて、結核菌のプロセッシング、抗原呈示を受けた抗原特異的CD4⁺T細胞は、IL-12による分化誘導、IL-1により活性化され、マクロファージ活性化に対して殺菌増強作用、NK細胞活性化を惹起し、結核菌に対する特異的protective immunityが成立すると推測される。

こうした主要な経路以外にも、CD4⁺, CD8⁺T細胞による細胞障害活性が補動的に作動することが報告されており、NK細胞に関しても、最近、著者は貪食マクロファージに対して細胞障害活性を示す現象をpreliminaryに観察している。このように、従来考えられていた以上にNK細胞は結核免疫機構の中で重要な役割を果たしているものと考えられる。

おわりに

この研究は、NK細胞が結核感染においても生体防御の自然抵抗性(natural immunity)を担うかもしれ

ないという魅力的な発想への興味から始まった。最近、ようやく、感染免疫におけるNK細胞の役割が知られるようになってきた。著者の研究がNK細胞の肺結核症の発病・進展への関与の可能性を示唆できたこととすれば幸いである。

謝 辞

本研究は奈良県立医科大学第二内科の成田亘啓教授をはじめ、呼吸器研究グループの先生方(塚口勝彦, 吉川雅則, 徳山猛, 夫彰啓, 岡本行功, 福岡和也, 山本智生, 竹中英昭, 岡村英生, 友田恒一, 福岡篤彦, 仲谷宗裕, 斧原康人, 小林厚先生)の長年の協力の成果であり、深く感謝する。座長をしていただいた徳永徹先生には国立予防衛生研究所細胞免疫部時代、葛西正孝先生とともにNK研究をはじめの研究の手ほどきをしていただいたことに深謝する。また、貴重な症例をご教示いただいた国立西奈良病院内科 田村猛夏医長, 宮崎隆治院長先生, 天理市立病院 前川純子先生に感謝する。米国留学中、*in vitro* studyをご指導頂いたCase Western Reserve 大学感染症科 Jerrold J. Ellner 先生の寛大な指導に感謝する。大学院時代結核研究の端緒をつけていただいた三上理一郎先生に感謝する。

最後に、伝統ある今村賞に御推薦いただいた京大胸部疾患研究所の久世文幸教授、選考いただいた片山会長ほか選考委員の先生方に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: Quantitation of the microassay for cell-mediated immunity through electronic image analysis. *J Natl Cancer Inst.* 1973; 37: 77.
- 2) Kiessling R, Klein E, Wigzell H: "Natural killer cells in the mouse. *Eur J Immunol.* 1975; 5: 112.
- 3) Kasai M, Yoneda T, Habu S, et al.: *In vivo* effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature.* 1981; 291: 334.
- 4) Lanier LL, Le AM, Civin CI, et al.: The relationship of CD16 and Leu-19 antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986; 136: 4480.
- 5) Welsh RM: Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *J Exp Med.* 1978; 148: 163.
- 6) Blanchard DK, Stewart WE, Klein TW, et

- al.: Cytolytic activity of peripheral blood leukocytes against *Legionella pneumophila*-infected monocytes. *J Immunol.* 1987; 139: 551.
- 7) Yoneda T, Kasai M, Ishibashi J, et al.: NK cell activity in pulmonary tuberculosis. *Br J Dis Chest.* 1983; 77: 185.
 - 8) Yoneda T, Yoshikawa M, Tsukaguchi K, et al.: Nutritional assessment of chronic pulmonary diseases. In: *Nutritional Support in Organ Failure.* Ed. by Tanaka T, Okada A. Amsterdam Elsevier Science Publishers, 1990, pp165.
 - 9) Moreno C, Taverne JS, Mehlert A, et al.: Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumor necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1989; 76: 240.
 - 10) Yoneda T, Mikami R, Sakaguchi Y, et al.: The relationship between natural killer cell activity and delayed-type hypersensitivity reaction to 2, 4-dinitrochlorobenzene in the spectrum of chronic, intractable pulmonary tuberculosis. *Tubercle.* 1987; 68: 59.
 - 11) 米田尚弘: 肺結核での栄養障害と細胞性免疫. *結核.* 1989; 64: 39.
 - 12) 米田尚弘: 持続排菌患者の集学的研究—栄養の立場から. *結核.* 1996; 71: 57.
 - 13) Kindler V, Sappino AP, Grau GE, et al.: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bacterial granuloma in BCG infection. *Cell.* 1989; 56: 731.
 - 14) Moldawar LL, Lowry SF: Cachectin: Its impact on metabolic and nutritional status. *Ann Rev Nutr.* 1988; 8: 585.
 - 15) Flesch I, Kaufmann SHE: Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains by mycobacterial tuberculosis. *J Immunol.* 1987; 138: 4408.
 - 16) Yoneda T, Ellner JJ, Boom WH: T-cell dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145: 686.
 - 17) Hirsch CS, Yoneda T, Averill L: Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor- β 1. *J Inf Dis.* 1994; 170: 1229.
 - 18) Yoneda T, Ellner JJ, Boom WH: NK cell/T cell dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* (submitted to)
 - 19) 露口泉夫: 結核免疫とサイトカイン. *結核.* 1995; 70: 1.
 - 20) Yoneda T, Toossi Z, Ellner JJ: Effect of a panel of cytokines on intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 873 A.