

第73回総会特別講演

結核防御免疫の誘導と発現

光山 正雄

京都大学大学院医学研究科微生物感染症学

The 73rd Annual Meeting Special Lecture

MECHANISMS OF INDUCTION AND EXPRESSION OF
ANTI-TUBERCULOUS IMMUNITY

Masao MITSUYAMA*

The induction of anti-tuberculous immunity highly depends on the cytokines produced endogenously at the initial stage of immunization. Among several cytokines, IFN- γ appears to be the most important to generate antigen-specific Th1 type of protective T cells in mice. IL-12 and IL-18, which are produced by macrophages in response to virulent mycobacteria, are responsible for stimulating NK cells to produce IFN- γ . Once antigen-specific Th1 cells are generated, Th1-dependent macrophage activation was effective in the elimination of infected bacteria through enhanced production of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates. In *Listeria monocytogenes*, one of the intracellular bacteria, listeriolysin O (LLO) appeared to be responsible for the induction of endogenous IFN- γ from NK cells. The possible mechanisms operating in the induction and expression of anti-tuberculous immunity are discussed with special reference to cytokine responses. An application of LLO to the induction of protective immunity is also discussed.

Key words : Anti-tuberculous immunity, Cytokine, Gamma interferon, Macrophage, Th1 cells

キーワードズ : 結核免疫, サイトカイン, ガンマイ
インターフェロン, マクロファージ, Th1細胞

1. はじめに

結核は典型的な慢性肉芽腫性炎症であり、肉芽腫形成、組織の壊死や乾酪化などがみられ、これら病変の進展にはマクロファージ、T($\alpha\beta$ T)細胞のほか、NK細胞や $\gamma\delta$ T細胞も複雑に関与している。また同時に感染防御や治癒機転にもこれらの免疫担当細胞の働きが必須であ

る。結核防御免疫の発現に抗体が関与しないこと、病態にも防御にもT細胞とマクロファージを主体とする細胞性免疫が深く関与することは古くから知られ、異論のないところである。しかし、その誘導や発現のメカニズムについては必ずしも明確なコンセンサスが得られている訳ではない。免疫防御を構成する因子で近年最も研究成果が得られたものにサイトカインがあげられ、多くの

別刷り請求先：
光山 正雄
京都大学大学院医学研究科微生物感染症学
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

* From the Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshida-Konocho, Kyoto 606-8501 Japan.
(Received 24 Sep. 1998)

サイトカイン遺伝子がクローニングされ、レセプターもほぼ同定されて、さらに発現調節機構が解明されつつある。ここでは、主に感染宿主の内因性サイトカイン応答を中心に、とくに防御免疫の誘導発現機構について、われわれの研究成果を基盤として解説を試みたい。

2. 結核菌の病原性とその因子

結核が健常宿主にも慢性感染として起こる理由として、*Mycobacterium tuberculosis* が示す、感染宿主の異物処理細胞であるマクロファージの細胞内殺菌をエスケープする能力が重要であり、さらに慢性の抗原刺激の持続とともに、結核菌（ひろく抗酸菌）の細胞壁成分や分泌性蛋白に抗酸菌以外の一般細菌とは違って極めて免疫刺激活性の高いものが多いことがあげられよう。またいわゆる毒素性急性感染を起こす細菌のように、宿主標的細胞を直接破壊したり機能を障害するといった特異な蛋白毒素を産生しない（少なくともこれまでのところ知られていない）ことや、この菌の世代時間が長い（増殖が緩やか）ことにも、かなりの意義があると考えられる。

宿主は培地とは異なり、さまざまな防御機構を保有している。生体の感染防御機構の基盤は食細胞（好中球、マクロファージ）であり、旺盛な異物貪食能と細胞内殺菌機構に特徴付けられる。一般に食細胞が細菌を貪食すると細胞膜に包まれた食胞内の菌に対しては、まず殺菌性ラジカルである活性酸素が作用し、さらに細胞質リソソーム顆粒が融合（P-L fusion）して顆粒内の殺菌物質が放出される（表1）。とくにアズール顆粒に貯蔵されている各種殺菌蛋白の殺菌活性は高い。また P-L

fusion により MPO やハロゲンが供給されると H_2O_2 から極めて殺菌力に富む OCl^- が生成される。したがって貪食された細菌は通常これらのいずれかの機構によって殺菌される。しかし結核菌に代表される細胞内寄生菌は貪食に抵抗することはないが、P-L fusion までのいずれかの細胞内ステップをエスケープして殺菌を免れることができる。また好中球でなく好んでマクロファージに取り込まれる（入り込む）が、これはマクロファージの顆粒には defensin が無い、好中球に比べると細胞あたりの活性酸素生成量が低いなど、その細胞内殺菌能が比較的低いことが増殖の場を与える結果となっている。

結核菌がこのような複数の殺菌機構を免れる機構としては、次のようなものが想定されている（表2）。結核菌はマクロファージ表面のマノースレセプター、補体レセプター（CR1, CR3）、Fcレセプターを介して貪食され食胞内に閉じ込められる。見方によっては積極的侵入ともみえるが、決して細胞質内へ直接 invade する訳ではない。ROI のうち初期に作用する O_2^- や H_2O_2 は本菌のもつ高い SOD や catalase など消去酵素活性で消去されてしまう。細胞壁糖脂質成分である glycolipid (GL) や lipoarabinomannan (LAM) には ROI の抑制作用が認められる¹⁾。しかしリソソーム顆粒に貯蔵される各種殺菌性蛋白や H_2O_2 -MPO-halide 系が作用すると抵抗できないものと思われる。これを免れるための主要なエスケープ機構はリソソームの食胞への融合阻害で、結核菌以外にも多くの細胞内寄生体にみられるエスケープ機構である。結核菌による P-L fusion 阻害にはその代謝産物である sulfatide や NH_4^+

表1 食細胞の細胞内殺菌機構

殺菌因子	分子量	存在部位	殺菌のメカニズム	食細胞種
活性酸素 (ROI) (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2)	<100	食胞内部	核酸, 蛋白, 脂質傷害	PMN > Mφ
活性窒素酸化物 (RNI) ($\cdot NO$, $\cdot NO_2^-$)	<100	細胞質内	呼吸系, 核酸傷害	Mφ
myeloperoxidase	149,000	アズール顆粒	殺菌性 OCl^- 生成	PMN >> Mφ
defensin	3,500	アズール顆粒	膜傷害?	PMN
cathepsin G	27,000	アズール顆粒	代謝障害	PMN, Mφ
azurocidin	29,000	アズール顆粒	?	PMN, Mφ
proteinase 3	29,000	アズール顆粒	?	PMN, Mφ
BPI (CAP57)	57,000	アズール顆粒	外膜透過性亢進	PMN, Mφ
lysozyme	14,000	特殊顆粒	細胞壁切断	PMN, Mφ
lactoferrin	88,000	特殊顆粒	遊離鉄の枯渇	PMN, Mφ

表2 結核菌の食細胞内殺菌因子からのエスケープ機序

エスケープの対象因子	機序	関与する菌側因子
活性酸素 (O_2^-)	消去	superoxide dismutase (SOD)
活性酸素 (H_2O_2)	消去	catalase
活性酸素 (各種)	阻害	GL, ST, LAM
活性窒素酸化物	阻害	<i>noxRI</i> 産物
食胞内 pH 低下	抑制	NH_4^+ 産生
リソソーム顆粒	P-L fusion 阻害	? (ST, NH_4^+ , LAM?)
リソソーム顆粒	食胞から脱出	hemolysin?

GL : glycolipids, ST : sulfatides, LAM : lipoarabinomannan

が働くと思定されているものの²⁾、その分子レベルでのメカニズムは未だ明確でない。またリソソーム酵素の最適 pH は低く、食胞では H^+ -ATPase が作用して pH の低下が起こるが、 NH_4^+ はこれを阻害して万一 P-L fusion が進んでも殺菌を受けにくくするらしい。また電子顕微鏡下には食胞から細胞質へ脱出した菌が観察されることもあり、hemolysin が食胞膜を傷害して脱出する可能性も完全に否定はできない³⁾。活性酸素やリソソームから供給される殺菌蛋白を免れても、マクロファージが活性化されると iNOS 依存的に産生される窒素酸化物ラジカルが作用するが、これに抵抗する遺伝子 *noxRI* が極く最近クローニングされ、新たなエスケープ因子として注目されている⁴⁾。

以上のごとく結核菌は複数の因子により正常なマクロファージの殺菌を巧妙にエスケープし、宿主防御因子が作用しにくい細胞内に生息し増殖して慢性炎症を持続させることになる。

3. 免疫防御の発現における Th1 細胞と 活性マクロファージ

マウスを *Mycobacterium bovis* BCG 生菌で免疫すると、数週間には結核菌や BCG 感染に対する極めて強い防御免疫が誘導される。免疫マウスの感染抵抗性は $CD4^+$ T 細胞で非免疫マウスに受身移入ができ、レシピエントのマクロファージを枯渇させるとその移入効果がみられなくなるので、 $CD4^+$ T 細胞とマクロファージの両者が必須であることが示唆される。古くから BCG による結核防御免疫誘導成立のパラメータとして、DTH 反応 (ツベルクリン反応) が用いられてきた。これは Th1 型 T 細胞の抗原特異的な各種サイトカイン産生に基づく炎症反応を生体内発現させるもので、惹起抗原としての PPD に特異的な T 細胞の存在を確認する

ことができる。しかし DTH は毛細血管内皮、マクロファージ、T 細胞、各種サイトカインなどの複雑な相互作用の総合された結果であり、防御免疫誘導の機構を T 細胞の分化誘導として解析するには、感染抵抗性発現を担う T 細胞を *in vitro* で追跡するに最も適した特徴を見出す必要がある。

致死量以下の *M. bovis* BCG 生菌で免疫したマウスには再感染防御免疫 (攻撃感染に対する高い抵抗性) と DTH が誘導されるが、死菌で免疫したマウスでは抗原特異的 DTH は生菌免疫マウスと同程度に成立するにも関わらず、再感染防御免疫は成立しない。生菌免疫マウスにみられる防御免疫と DTH、死菌免疫マウスの DTH はともに $CD4^+$ T 細胞の受動移入で非免疫マウスに移入発現される。この両群のマウス由来の T 細胞を PPD で再刺激したときに、どのようなサイトカインが *in vitro* で産生されるかしらべたところ、基本的なサイトカイン産生パターンはいずれも Th1 型であったが、高い $IFN-\gamma$ 産生能は生菌免疫マウス由来の細胞に限ってみられた⁵⁾。以上の結果から、いわゆる感染抵抗性 T 細胞はとくに高い抗原特異的 $IFN-\gamma$ 産生能に特徴づけられ、さらに DTH それ自身は抗原特異的 T 細胞 (とくに Th1 型) の存在を示すものではあるが、必ずしも防御免疫成立のパラメータとは成り得ないことが示唆された。われわれは上記の成績から、抗原特異的な Th1 細胞にも分化の程度により、高い $IFN-\gamma$ 産生能を示す感染抵抗性 T 細胞 (protective T cell) と、必ずしも $IFN-\gamma$ 産生能は高くなくとも MIF などの産生により DTH を発現できる T_{DTH} とが、機能分化の違いとして存在すると考えている。各々の認識抗原をしらべてみても、いずれの T 細胞群も主要認識抗原は同様であり、さらに生菌免疫で誘導される $IFN-\gamma$ 産生能の高い Th1 細胞群が反応する抗原は、免疫防御を単独では誘導でき

ない死菌にも存在する抗原であった⁶⁾。したがって感染防御免疫を担う Th1 細胞は抗原特異的な IFN- γ 産生能を特徴とし、その誘導過程には抗原性以外の因子が関与する可能性が示唆された。

宿主の動物種が何であれ、結核菌や多くの病原抗酸菌の第一義的な標的細胞はマクロファージであると考えられる。マクロファージに取り込まれた結核菌が殺菌をエスケープして生存、増殖することは前述のとおりであるが、一方、免疫防御の成立した動物由来の活性化マクロファージ内では、その細胞内増殖は明らかに抑制される。*in vitro* でも IFN- γ で活性化されたマクロファージでは結核菌の増殖抑制がみられる⁷⁾。IFN- γ が作用して活性化されたマクロファージでは、活性酸素 (ROI) 産生が著明に亢進し、さらに P-L fusion が促進される。さらに通常発現していない誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 遺伝子の発現が誘導され、その酵素活性によって L-arginine から酸化反応によって NO ラジカルが産生される。NO ラジカルはまた活性化によって産生される活性酸素と反応して ONOO⁻ (peroxynitrite) となり、呼吸鎖の金属配位蛋白や核酸を傷害して殺菌能を発揮する。数多くのサイトカインがマクロファージに作用して機能を活性化するが、われわれは BCG により誘導される iNOS を生菌と死菌刺激で比較検討し、炎症性サイトカインが産生される条件でも IFN- γ の発現が誘導されない限り、殺菌活性亢進に有効な iNOS 発現は起こらないことを明らかにしており⁸⁾、IFN- γ が iNOS の発現を最も効率良く誘導するサイトカインであることに疑問の余地はないであろう。

結核菌と同様にマクロファージ内殺菌をエスケープする細胞内寄生菌のひとつであるリステリア (*Listeria monocytogenes*) に対するマクロファージ活性化の影響について、より信頼できる *in vitro* 測定法⁹⁾ を開発してしらべたわれわれの成績では、IFN- γ を用いた活性化のタイミングによって、活性酸素群と窒素酸化物ラジカルが共同または異なった関与によって、細胞内殺菌の亢進にあずかっていることが示されている¹⁰⁾。これらの共同作用によって細胞内殺菌能が格段に亢進し、菌の細胞内寄生が困難になると考えられる。このような細胞内殺菌を亢進させる活性化因子として作用する IFN- γ を大量に産生できる Th1 の分化誘導は、マクロファージ活性化を介した結核防御免疫発現に極めて重要な役割を果たすことになる。

IFN- γ ノックアウトマウスを用いた研究では、結核菌静注感染後の臓器内菌数が肺や肝で 2.0Log 近く増加し、生存率の低下もみられるが、IFN- γ の投与で改善されることが示されている¹¹⁾。動物でほぼ証明されたマクロファージ活性化における IFN- γ の中心的作用は、

必ずしもヒト由来マクロファージについてもコンセンサスが得られているとは言い難い状況であったが、最近、先天的 IFN- γ レセプター欠損乳児に重篤な抗酸菌感染がみられた報告から、ヒトでも IFN- γ の重要性は変わらないものとみなされつつある¹²⁾。

4. 感染抵抗性 Th1 細胞の分化誘導

IFN- γ 産生性の感染抵抗性 Th1 細胞を、死菌による免疫で生菌免疫同様に実験動物に誘導することは困難である。また結核菌からは多くの蛋白抗原が単離されるが、それら蛋白抗原の各々には生菌免疫により感染防御免疫が誘導された個体の T 細胞を刺激する抗原性はあっても、各蛋白それぞれ自身のみで感染防御免疫を誘導することは容易ではない。そこで、感染抵抗性 Th1 細胞 (抗原特異的 IFN- γ 産生性 T 細胞) の誘導機構として、抗原性の問題とは別に抗原特異的 T 細胞を高い IFN- γ 産生性 T 細胞へと分化させる因子を考える必要があると思われる。

われわれは細胞内寄生菌の *M. bovis* BCG やリステリアを用いたマウス免疫モデルにおいて、死菌が防御免疫を誘導できない機構として、死菌と生菌の間の抗原的な違いよりも、宿主に対するサイトカイン誘導能の違いが関与することを示唆する成績を得てきた。すなわち、菌が宿主に接種された初期におこる内因性サイトカインの発現をしらべると、生菌免疫マウスには強い IFN- γ 発現が誘導されるが、死菌免疫マウスではこれがみられない。マウス脾細胞を刺激する *in vitro* の系で解析すると、生菌刺激でマクロファージから産生される IL-12, IL-18, TNF α などが NK 細胞に作用して IFN- γ の発現を誘導していることが判明した^{13) 14)}。感染または免疫の初期には多くの炎症性サイトカイン産生がみられるが、なかでも IFN- γ は Th1 の分化に必須の役割を果たすことが知られている。そこで、生菌免疫の早期に誘導される NK 細胞からの IFN- γ が真に生菌免疫による感染抵抗性 Th1 細胞の機能分化に必須の役割を果たすか否かをみるために、免疫早期にラット抗マウス IFN- γ 中和抗体を投与して、本来誘導されるべき感染防御免疫への影響をしらべた。その結果、リステリアでも BCG でも、ほぼ完全に感染抵抗性 Th1 細胞の誘導が阻害され、初期の IFN- γ 発現誘導が *in vitro* で中心的作用をすることが証明された^{15) 16)}。

リステリアの場合、最終的に NK 細胞からの IFN- γ 産生に働く生菌特有の因子を検索した結果、リステリアの細胞内寄生を可能にする病原因子であるリステリオリン O (LLO) が最も重要であることが、LLO 産生能の異なる菌株や精製 LLO を用いた実験で明らかになった^{17) 18)}。次に当然考えられることは、感染防御免疫誘

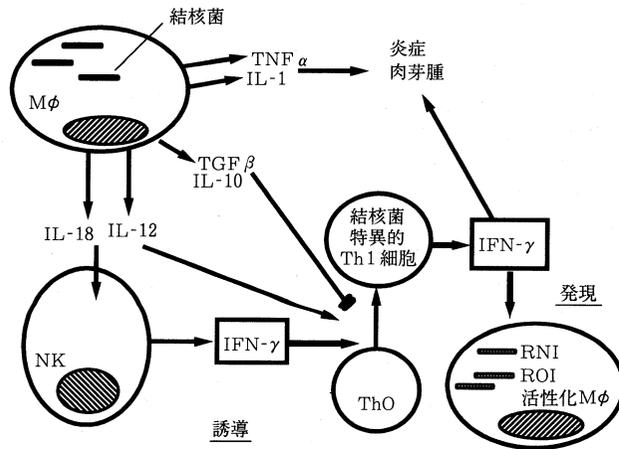


図 結核防御免疫の誘導と発現に関わる主要サイトカイン

導が不可能な死菌による免疫に際して、内因性 IFN- γ 誘導能の高い LLO を併用すれば、病原生菌で免疫したと同様に強い抗原特異的な免疫防御が誘導される可能性である。われわれはそこで、LLO をリポソームに封入してマクロファージに取り込まれやすくし、死菌や LLO(-) 生菌株など、単独での免疫では防御免疫が誘導されない系に併用投与してみた。その結果、死菌または LLO(-) 株生菌による免疫に LLO を併用すると、LLO(+) の生菌による免疫に匹敵する程度の抗原特異的な感染抵抗性 Th1 細胞が誘導され、非免疫マウスへも防御免疫を移入できる成績が得られた^{19) 20)}。

これらの実験成績をまとめると、図のようなシエマを描くことができる。リステリアの LLO に相当する因子が、結核菌や BCG では何であるのかは今後の検索にまたざるを得ないが、そのような因子が発見され遺伝子クローニングができれば、有用な防御免疫の人為的賦与が可能になるであろう。

おわりに

ややドグマ的ともいえる Th1, Th2 サブセットの概念が一般に受け入れられ、結核防御免疫は T 細胞のなかでも Th1 が主体であることに疑問をはさむものはない。しかし、抗原特異的 Th1 細胞群は何故結核菌では誘導されやすいのか、Th1 細胞のどの機能が結局のところ結核防御免疫に必須であるのかについては、未だに研究の余地が多い。さらに、マウスをはじめとする実験動物での成績がヒトにおける結核防御免疫にそのまま還元できるものについても議論は絶えない。

われわれの、抗原特異的 IFN- γ 産生性 T 細胞の分

化誘導における NK 細胞由来内因性 IFN- γ の中心的役割は、マウスでの成績であり、これを臨床の場でも確認することは容易ではないが重要である。一方、同じ細胞内寄生菌であるリステリアの実験系において見出されたリステリオリシン O の示す一種のアジュバント効果は、もしその細小活性単位が明らかになれば、生物学的にも興味ある展開が期待されるだろう。現在われわれは、各種リコンビナント LLO を作製して、Th1 細胞の分化に必須のサイトカイン誘導能と、毒素としての溶血活性を分離しつつあり、新たな成果が間もなく得られるものと考えている。同様の活性は結核菌やその他の抗酸菌にもみられるので、サイトカイン誘導能をパラメータとして変異株を検索することによって、リステリアの LLO に相当する結核菌由来因子の特定にも力を注いでいきたい。

文 献

- 1) Chan J, Farr XD, Hunter SW, et al.: Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun.* 1991; 59: 1775.
- 2) Gordon AH, Hart PD, Young MR: Ammonium inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature.* 1980; 286: 79.
- 3) King CH, Mundayoor S, Crawford JT, et al.: Expression of contact-dependent cytolytic activity of *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the locus encoding the activity.

- Infect Immun. 1993; 61: 2708.
- 4) Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, et al.: A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med. 1997; 186: 1885.
 - 5) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al.: IFN- γ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. J Immunol. 1992; 148: 2887.
 - 6) Kawamura I, Yang J, Takaesu Y, et al.: Determination of the mycobacterial antigen provoking IFN- γ production as a possible protective antigen in *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1994; 62: 4396.
 - 7) Flesch I, Kaufmann SH: Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1987; 138: 4408.
 - 8) Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M: Involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide in the expression of nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice induced by viable but not killed *Mycobacterium bovis* BCG. Microbial Pathogenesis. 1997; 22: 79.
 - 9) Ohya S, Xiong H, Tanabe Y, et al.: Killing mechanism of *Listeria monocytogenes* in activated macrophages as determined by an improved assay system. J Med Microbiol. 1998; 47: 211.
 - 10) Ohya S, Tanabe Y, Makino M, et al.: The contribution of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates to listericidal mechanisms differ in macrophages activated pre- and postinfection. Infect Immun. 1998; 66: 4043.
 - 11) Flynn JL, Chan J, Triebelod JK, et al.: An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med. 1993; 178: 2249.
 - 12) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al.: A mutation in the interferon- γ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. New Engl J Med. 1996; 335: 1945.
 - 13) Xiong H, Nishibori T, Ohya S, et al.: Involvement of various combinations of endogenous inflammatory cytokines in *Listeria monocytogenes*-induced expression of inducible nitric oxide synthase in mice. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996; 16: 257.
 - 14) Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M: Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG. Study of the mechanism of the different abilities of viable and killed BCG. J Immunol. 1995; 155: 5728.
 - 15) Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M: Requirement of the initial production of gamma interferon in the generation of protective immunity of mice against *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 1997; 65: 72.
 - 16) Yang J, Mitsuyama M: An essential role for the endogenous gamma interferon in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG. Immunology. 1997; 91: 529.
 - 17) Nishibori T, Cooray K, Xiong H, et al.: Correlation between the presence of virulence-associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in various strains of *Listeria* spp. Microbiol Immunol. 1995; 39: 343.
 - 18) Nishibori T, Xiong H, Kawamura I, et al.: Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and the role of macrophages and NK cells. Infect Immun. 1996; 64: 3188.
 - 19) Tanabe Y, Xiong H, Nomura T, et al.: Induction of protective T cells against *Listeria monocytogenes* in mice by immunization with a listeriolysin O-negative strain of bacteria and liposome-encapsulated listeriolysin O. Infect Immun. 1998; submitted.
 - 20) Xiong H, Ohya S, Mitsuyama M: Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice. Immunology. 1998; 94: 14.