

原 著

マクロファージの IL-12 産生を高値に誘導する結核菌体成分の解析

樋口 一 恵 ・ 原 田 登 之

結核予防会結核研究所基礎研究部免疫学科

内 山 隆 司

結核予防会複十字病院

藤 原 寛 ・ 上 田 千 里 ・ 露 口 泉 夫

大阪府立羽曳野病院

中 村 玲 子

日本 BCG 製造株式会社中央研究所

小 林 和 夫

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

青 木 正 和

結核予防会

ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*-DERIVED SUBSTANCE WHICH INDUCES INTERLEUKIN-12 PRODUCTION FROM MACROPHAGES

Kazue HIGUCHI*, Nobuyuki HARADA, Takashi UCHIYAMA,
Hiroshi, FUJIWARA, Chisato UEDA, Izuo TSUYUGUCHI,
Reiko M. NAKAMURA, Kazuo KOBAYASHI and Masakatsu AOKI

Protection of hosts against tuberculosis depends on expression of cellular immunity. To express cellular immunity, interleukin-12 (IL-12) has been shown to play an important role. Although *Mycobacterium tuberculosis* is known to induce IL-12 from macrophages (M ϕ s), the mechanism for the induction is still unclear.

To understand the mechanisms of IL-12 induction from M ϕ s by *M. tuberculosis*, the IL-12-inducing ability of substances derived from *M. tuberculosis* was investigated *in vitro*. Production of IL-12 in culture medium of M ϕ s was measured by ELISA system using specific antibodies. Live *M. tuberculosis* H37Rv induced slightly higher IL-12 production than live *M. tuberculosis* H37Ra upon stimulation of human or mouse alveolar macrophages (hAM ϕ s or mAM ϕ s). Heat-killed *M. tuberculosis* failed to induce IL-12 production of alveolar macrophages (AM ϕ). The responses of hAM ϕ s and mAM ϕ s to *M. tuberculosis* were remarkably different. mAM ϕ s produced five times larger amount of IL-12, compared with that from hAM ϕ s. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained by the density gradient centrifugation were also used for induction of IL-12

別刷り請求先:

樋口 一恵

結核予防会結核研究所基礎研究部免疫学科

〒204-0022 東京都清瀬市松山 3-1-24

* From the Division of Immunology, the Department of Basic Research, the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose City, Tokyo 204-0022, Japan.
(Received 16 Mar. 1998/Accepted 14 May 1998)

production. Although production levels of IL-12 from PBMC stimulated with *M. tuberculosis* were below the detectable level, addition of interferon- γ (IFN- γ) or neutralizing antibody against IL-10 augmented the production of IL-12 from PBMC, suggesting that IFN- γ and IL-10 regulate the production of IL-12 from M ϕ positively and negatively, respectively.

To characterize the physicochemical properties of IL-12-inducing molecules, *M. tuberculosis* H37Rv was disrupted by pressing with 1,000 bar and centrifuged and separated into cytosol and cell wall fraction. The culture filtrate was also examined on IL-12-inducing activity. Among the three subjects examined, cytosol was found to induce the highest production of IL-12 from mAM ϕ s 1 day after the stimulation. Addition of IFN- γ to the cytosol fraction markedly increased the production of IL-12 from mAM ϕ s. The molecular weight of IL-12-inducing substance was shown to be more than 30kDa by fractionating with molecular filters. Treatment of 30kDa-fraction with IL-12-inducing activity by proteinase K completely abolished the activity. Furthermore, approximately 90% of IL-12-inducing activity of 30kDa-fraction was lost by proteinase K treatment even in the presence of IFN- γ . These results indicate that the major component of IL-12-inducing activity is a protein. The identification of this IL-12-inducing active substance may provide a new therapeutic tool for tuberculosis.

Key words : Human alveolar macrophage (hAM ϕ), Mouse alveolar macrophage (mAM ϕ), Interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

キーワード : ヒト肺胞マクロファージ (hAM ϕ), マウス肺胞マクロファージ (mAM ϕ), インターロイキン-12 (IL-12), インターフェロン- γ (IFN- γ), 結核菌 H37Rv, 末梢血単核球 (PBMC)

はじめに

先進諸国における結核症は、抗結核薬の開発に伴い劇的な減少を示してきたが、全世界では年間290万から300万人が結核症で死亡し、その多くは発展途上国に集中している¹⁾。

しかし近年、わが国でも多剤耐性結核菌の出現による再燃や再発、また単発的に報告される集団感染や若年年齢での初感染患者の増加等により、結核の減少に鈍化が示されている²⁾³⁾。また、米国では HIV 感染に伴う合併症として結核患者の増加がみられ重要な社会問題となっている⁴⁾。

一般的に感染症の防御にはワクチン接種が有効であるが、成人結核に対する決定的なワクチンは今のところ報告されていない。このため欧米諸国は結核に対するワクチンの開発に主力を注ぎ、特に米国においては、米国内の細菌学者と免疫学者の総力を結集した新たな展開が始められている^{5)~7)}。わが国では、結核ワクチンとして、BCG を長期間使用してきたが、その有効性は幼児期接

種で15年程と考えられている。しかし成人での BCG 効果に関しては議論の余地が残されており⁸⁾、有効な結核ワクチンの開発は米国同様に重要な課題である。

結核に対するワクチン効果の中心的役割として、個体の細胞性免疫を特異的に増強することが考えられている^{9)~11)}。幾つかの報告に示されるように結核菌は、生体に感染した後マクロファージ (Macrophage: 以下 M ϕ と略す) に貪食され、結核菌を貪食した M ϕ は分子量 7 万のヘテロダイマーとして機能する IL-12 を産生してナイーブ T 細胞を Th 1 細胞に分化させる^{12)~16)}。この Th 1 細胞は IFN- γ を産生し、レジデント M ϕ は活性化され、結核菌に対する殺菌能を発現する。事実、マウスの結核菌感染モデル実験では、IL-12 を投与したマウスの生存日数が延びることが報告されている¹⁷⁾。

この Th 1 細胞を介する細胞性免疫において必須のサイトカインである IL-12 と、結核菌との関連については、特定の結核菌体成分で M ϕ を刺激した時に IL-12 産生が誘導されることが報告されている¹⁸⁾。

われわれは、Th 1 細胞分化と IL-12 が主要な反応関

係にあることから、IL-12産生を誘導する結核菌体成分を解析し、その機構を分子レベルで明らかにして、新たなワクチン開発の可能性を検索することを目的として本研究を開始した。

材料と方法

1. 肺胞マクロファージ (Alveolar macrophage: 以下AM ϕ と略す) の分離

ヒト肺胞マクロファージ (human alveolar macrophage: 以下hAM ϕ と略す) は、当研究所付属複十字病院において臨床的治療目的で肺胞洗浄を行った際の回収液 (bronchoalveolar lavage fluid: 以下BALFと略す) から7mlを採取して使用した。肺胞洗浄は右中葉、左4番、左5番、舌区のいずれかについて行った。症例は間質性肺炎 (IP: interstitial pneumonia), 特発性肺線維症 (IPF: idiopathic pulmonary fibrosis), 好酸球増多を伴った肺浸潤 (PIE: pulmonary infiltration with eosinophilia) およびサルコイドーシスであった。分取した肺胞洗浄液は800回転4℃で10分間遠心した後、10%牛胎児血清を含むMEMメEDIUMで細胞数 $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した。Lab-Tek Chamber Slide 中で一晩培養した後、非附着性の細胞をHBSSメEDIUMで3回洗浄して除去した。

マウス肺胞マクロファージ (mouse alveolar macrophage: 以下mAM ϕ と略す) の採取には6~10週齢のBALB/c雌マウス30匹を使用した。BAL操作は37℃に保温したPBSを使用して行った。BALFはプールして800回転4℃で15分間遠心した後、10%牛胎児血清を含有するMEMでmAM ϕ を $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、ヒトと同様に培養後使用した。hAM ϕ の同定はCD71 (トランスフェリン receptor) とHLA-DR (MHC Class II) に対する抗体を使用して免疫組織化学染色を行った。mAM ϕ はエステラーゼ染色を行った。これらの細胞染色法により実験に使用したhAM ϕ およびmAM ϕ はほぼ100% M ϕ であることを確認して使用した。

2. ヒト末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell: 以下PBMCと略す) の分離

PBMCは健康人の静脈血から比重遠心法で分離回収し、10%のヒトAB型血清を含む培養液RPMI-1640で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。

3. AM ϕ におけるIL-12産生誘導

1) 結核菌での刺激

M. tuberculosis H37Rv (ATCC: 27294) と H37Ra (ATCC: 25117) は Middlebrook 7H9 液体培地で3週間培養後に 5×10^8 CFU/mlに調整し、-80℃で凍結保存した生菌と加熱処理した死菌を用いて刺激した。

hAM ϕ またはmAM ϕ 培養系に最終濃度比1:10の割合になるように接種してIL-12の産生を誘導した。H37RvとH37Raの培養上清もIL-12産生誘導に使用した。AM ϕ を37℃、5% CO₂ インキュベーター内で72時間培養した後に上清を回収し、0.22 μm のフィルターでろ過滅菌してIL-12測定まで-80℃で保存した。IL-12測定はキット [ヒトIL-12 (p40 + p70); BioSource International Camarillo, CA, USA, マウスIL-12 (p40 + p70); Bio Source International Camarillo, CA, USA] を使用してELISAで(p40 + p70)を測定した。本キットにおける検出限界値は、マウスでは2pg/ml、ヒトでは1pg/mlであった。また、併用効果が報告されているIFN- γ ¹⁹⁾も実験に併用し、培養時間と濃度に関する条件の検討も行った。IFN- γ はPharMingen (San Diego, CA, USA) の製品を使用した。培養上清の保存とIL-12の測定は結核菌体で刺激した時と同様に行った。

2) 結核菌体成分による刺激

菌体成分の調製ではMiddlebrook 7H9液体培地でH37Rvを3週間培養し、3,000rpm、4℃で15分間遠心後、上清を廃棄して牛胎児血清を含まないMEM培地に再浮遊した。この時のMEM培地の液量は、増菌培養に使用した7H9培養液と等量とした。MEM培地に再浮遊した結核菌を超音波処理で分散した後、バイオハザード環境の安全キャビネット内に設置したミニラボ (Rannie) を使用して、1,000barで菌体を破碎させた。この破碎操作を2度行った後に、27,000 $\times g$ で4℃、30分間遠心して、cytosol成分とcell wall成分に分離した。Cell wallは分離回収したcytosolの液量と同量の無血清MEM培地に再浮遊した。これらの操作で得た菌体成分cytosolとcell wallをmAM ϕ の培養系に添加してIL-12の産生誘導を行った。

3) 分子量で分画を行った菌体成分による刺激

分子量での分画は、cytosolをミリポア社製の分子ふるいフィルター (ウルトラフリー) を使用して7,000rpm、4℃で20~30分遠心して行った。分子量によって、5kDa以下、10kDa以下、30kDa以下、30kDa以上の4分画に分けた。各々のcytosol分画はmAM ϕ 培養系に添加し、1)と同様に培養してその上清を-80℃に保存し、ELISAでIL-12 (p40 + p70)を測定した。一部の実験では、マウスIL-12 (p70)測定キット (Genzyme Cambridge, MA, USA) を使用してIL-12 (p70)も測定した。p70の測定限界値は5pg/mlであった。

分子量30kDa以上の分画については、hAM ϕ に対しても刺激を行い、培養上清を回収して前述と同様にIL-12を測定した。ここではp40 + p70とp70単独を測定

した。ヒト IL-12 (p70) の測定はキット (Endogen, Inc. Woburn, MA, USA) を使用して行った。このキットの測定限界値は 3pg/ml であった。

IL-12 産生刺激に用いた菌体成分の量は各々 10 μ l/ml を使用した。

4) 蛋白消化酵素 (Proteinase K) 処理を行った分子量 30kDa 以上の分画での刺激

500 μ l の cytosol (分子量 30kDa 以上の分画) に 20 mg/ml の proteinase K 50 μ l を添加し、water bath で 37 $^{\circ}$ C, 1 時間処理した後、阻害物質としてウシ胎児血清を添加して反応を中止させた。この酵素処理した cytosol 分画で mAM ϕ を刺激して IL-12 産生量を測定し、IL-12 誘導活性画分が蛋白質であるか否かについて検討した。

4. PBMC における IL-12 産生誘導

1) 結核菌および非定型抗酸菌での刺激

菌体は、*Mycobacterium avium*-intracellular complex (MAC) 症患者の喀痰から分離培養した 28 菌株 (*M. avium*: 以下 MA と略す、および *M. intracellulare*: 以下 MI と略す) と、結核患者から分離した 26 菌株について加熱滅菌した後に、PBS で 10mg/ml (湿性重量) に調整した。これらの菌体は使用時に超音波処理をして用いた。H37Rv と H37Ra 株も同様の処理を

して用いた。

臨床分離結核菌株のうち 10 菌株は多剤耐性菌 (MDR-TB: RFP, INH, EB, SM, KM, CPM, TH, CS, PAS のうち RFP, INH を含む 5 剤以上の薬剤に完全耐性菌)、16 菌株は薬剤感受性 (DS-TB: RFP, INH, EB, SM, KM, CPM, TH, CS, PAS の 9 剤すべてに感受性菌) であった。

PBMC に対して結核菌は 100 μ g/ml, MAC 菌は 50 μ g/ml 添加した。同時にヒトリコンビナント IFN- γ (1,000U/ml) および抗ヒト IL-10 抗体 (5 μ g/ml) を加えて *in vitro* で 24 時間培養し、培養上清を回収した。PBMC からの IL-12 産生量は、Wistar Institute の Dr. Trinchieri から供与されたヒト IL-12 特異的モノクローナル抗体 (C11.79 と C 8.6) を使用して、(p40 + p70) の量として測定した。測定限界値は 80pg/ml であった。

結 果

1. 結核菌, cell wall, cytosol および結核菌培養上清による AM ϕ の刺激と IL-12 産生

結核菌刺激による mAM ϕ の IL-12 産生誘導量は、3 回の繰り返し実験の代表例を Fig. 1 に示した。培養液対照群では検出限界値以下 (0) であったが、H37Rv の

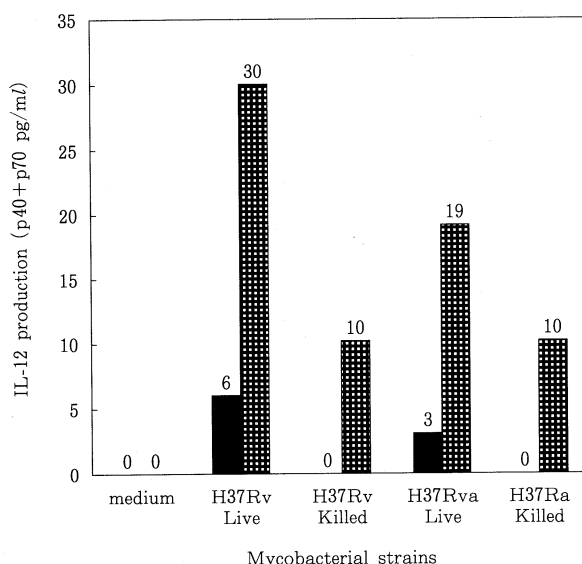


Fig.1 IL-12 production of human and mouse alveolar macrophages by stimulation with mycobacteria. Alveolar macrophages of human (■), and mice (▨) were stimulated with mycobacteria for 3 days. The production of IL-12 was measured by ELISA.

生菌においては30pg/ml, 死菌では10pg/mlを示し, H37Raの生菌では19pg/ml, 死菌では10pg/mlを示した。

mAMφによるIL-12産生誘導については, H37Rv生菌はH37Ra生菌に対して1.6倍の高誘導を示したが, 死菌では両者共に同様の低誘導であった。hAMφをH37Rv生菌で刺激した時のIL-12産生は6pg/mlであり, H37Ra生菌の時は3pg/mlであった。加熱処理した死菌においては両菌株共に検出限界値以下であった。特に結果として示さないが, 結核菌培養上清による刺激では, hAMφおよびmAMφのIL-12産生は測定限界値以下であった。

次にPBMCを結核菌で刺激し, 回収した培養上清中のIL-12を測定した。PBMCにおける菌体刺激の結果をFig. 2に示す。

何人かのDonorについて1回ずつ行った実験の代表例を示したものである。MAC菌単独ではIL-12誘導は検出限界値以下であったが, IFN-γ (1,000U/ml) を添加した時IL-12の産生量は増加し, IFN-γと抗IL-10抗体 (5μg/ml) を同時に添加した時はIL-12の産生量はさらに増加した。

Fig. 3は3人のDonorについて各々duplicateで行った結果をmean ± SEMで表した。抗IL-10抗体存在下においてMDRTB: 10菌株, DSTB: 16菌株, MA: 14菌株, MI: 14菌株で, 健康人PBMCを刺激した結果である。図に示すようにIL-12の産生量には大きな個人差がある。また, 各菌体による誘導能にもドナー間で個人差があり, MACの方が結核菌群より高い場合と低い場合があり, 一定の傾向は見られなかった。

次に, IL-12の産生誘導に併用効果が報告されているIFN-γの作用¹⁹⁾を確認するために, H37Rvの生菌と死菌および生菌体成分のcytosolとcell wallを各々mAMφ培養系に添加し24時間刺激した。

Fig. 4は3回の実験の代表例であるが, 培養上清中のIL-12産生量は, IFN-γ単独とメディウム単独対照群では各々測定限界値以下の0を示したが, H37Rv生菌にIFN-γを加えた群では80pg/ml, 死菌にIFN-γを加えた群では34pg/mlであった。この値は生菌単独 (19pg/ml) 時の4.3倍, 死菌単独 (6pg/ml) 時の6倍の誘導を示している。また, cytosolとcell wall各々にIFN-γを加えた群では, cytosolで105pg/ml, cell wallでは34pg/mlで, 各々の単独刺激 (cytosol:

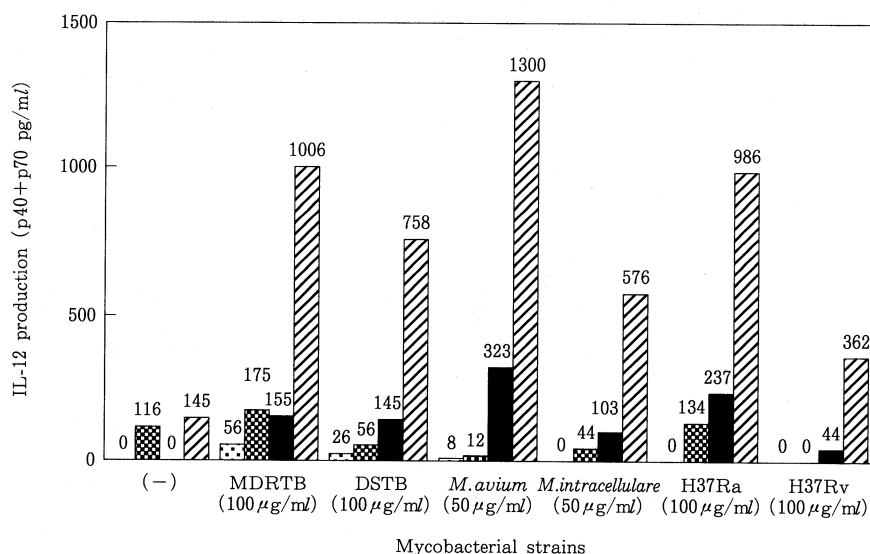


Fig. 2 IL-12 production by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with mycobacteria.

PBMCs were prepared from a healthy donor. Cells were (▨): stimulated with mycobacteria and IFN-γ (1,000U/ml), (■): with mycobacteria in the presence of anti-IL-10 antibody (5μg/ml), (▤): with mycobacteria and IFN-γ (1,000U/ml) in the presence of anti-IL-10 antibody (5μg/ml). (▧): Mycobacteria alone. Negative controls were not stimulated with mycobacteria in the presence of IFN-γ (1,000U/ml), anti-IL-10 antibody (5μg/ml), IFN-γ (1,000U/ml) and anti-IL-10 antibody (5μg/ml), or none.

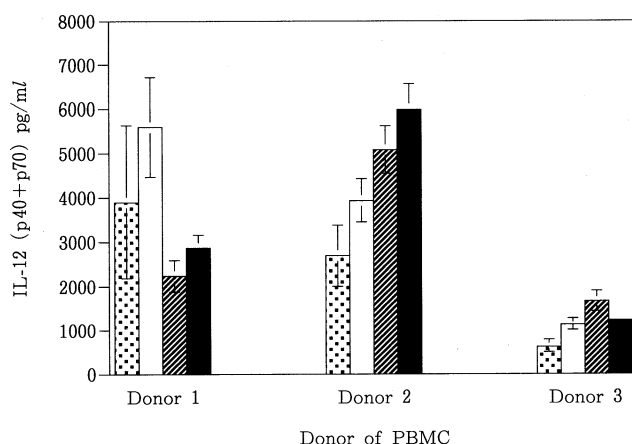


Fig.3 IL-12 production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with mycobacteria. PBMC were prepared from three donors. Cells were stimulated with the indicated mycobacterial strains. (▨): Stimulated with MDRTB (n=10 and 100 μ g/ml), (□): with DSTB (n=16 and 100 μ g/ml), (▤): with *M. avium* (n=14 and 50 μ g/ml), (■): with *M. intracellulare* (n=14 and 50 μ g/ml).

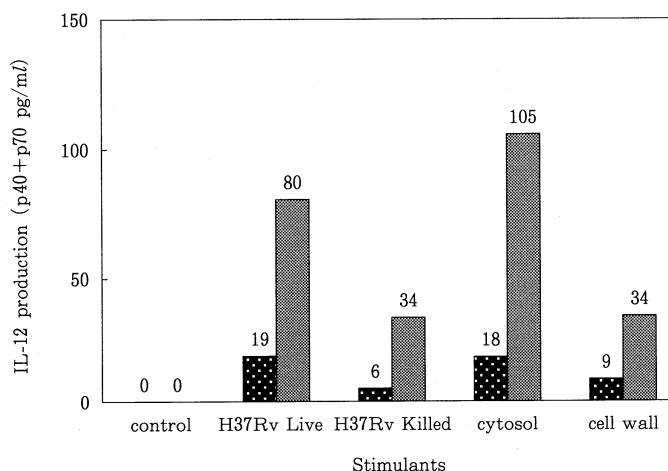


Fig.4 IL-12 production of mouse alveolar macrophages stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, cytosol, and cell wall component. Cells were stimulated with mycobacteria, mycobacterial component alone (▨), or component with IFN- γ (100U/ml) (■). Negative controls were cultured with IFN- γ (100U/ml) alone, and medium alone, respectively.

18pg/ml, cell wall: 9pg/ml) に対しては5.8倍から3.8倍高い IL-12産生誘導を示した。

さらに、この実験系に添加する IFN- γ 量の至適濃度を決定することを目的として、cytosol を10 μ l/ml 添加

した mAMφ 培養系に、IFN- γ を 100 U/ml から 1.56 U/ml まで倍々希釈して添加した。

結果は 2 回の繰り返し実験の代表例として Fig. 5 に示す。Cytosol 10 μ l/ml の単独刺激では、IL-12 産生量は 21 pg/ml であった。この実験系に 2 段階希釈した IFN- γ を添加した群では、cytosol 単独刺激時の 4 倍から 4.8 倍の IL-12 産生を示したが、IFN- γ の濃度変化に伴う顕著な影響は認められなかった。しかし、IFN- γ 添加濃度と IL-12 産生量の関係において、IFN- γ を 12.5 U/ml 添加した時に IL-12 の産生量は 103 pg/ml を示し、ここをピークに IFN- γ の最低濃度 1.56 U/ml から最大濃度 100 U/ml にかけて IL-12 産生量は緩やかに減少した。

また、刺激時間に関しても 3 回の実験の代表例として Fig. 6 に示すように、cytosol 単独刺激した群では 24 時間、72 時間、120 時間の時点で IL-12 産生量に有意差は見られなかったが、IFN- γ を添加して刺激した群では 24 時間の時点でピークの IL-12 産生が確認された。

2. 菌体成分の分画による Mφ 刺激

3 種類の分子ふるいフィルターを使用して分子量による分画を行った cytosol を、mAMφ 培養系に各々 20 μ l/ml 添加した。結果は特に示さないが、分子量 30 kDa 以下の画分による刺激では IL-12 産生は測定限界値以下であった。しかし、分子量 30 kDa 以上の分画による単独刺激群では IL-12 の産生は 87 pg/ml を示し、これに

IFN- γ を 10 U/ml 添加した群では 227 pg/ml の高い IL-12 産生誘導を示した。この結果に基づき mAMφ 培養系に対して分子量 30 kDa 以上の分画を 5, 10, 15, 20 (μ l/ml) ずつ添加した 4 群を設定し、各々の群に対して IFN- γ を 2.5, 5.0, 10 (U/ml) 添加した実験を行い、30 kDa 以上の分画刺激と IFN- γ 刺激との関連を検討した。

Fig. 7 は 3 回の実験の代表例である。IFN- γ 単独刺激では、どの濃度においても測定限界値以下であったが、30 kDa 以上の分画単独刺激では 5 μ l/ml の濃度で 32 pg/ml の IL-12、10 μ l/ml では 72 pg/ml の IL-12 産生があり、添加した分画の容量依存性に IL-12 産生量も増加し、20 μ l/ml では 99 pg/ml を示した。これらに対して濃度の違う IFN- γ を添加した場合、どの群も分画単独刺激よりも高い IL-12 産生を示したが、30 kDa 以上の分画量が同一の群では、IFN- γ 濃度の違いは IL-12 産生量に反映されず、30 kDa 以上の分画量の増加とともに IL-12 産生量も増加した。本実験では 30 kDa 以上の分画 20 μ l/ml の群に IFN- γ を 10 U/ml 添加した時に、IFN- γ を 2.5 U/ml 添加した時の 2 倍の IL-12 産生量 (1689 pg/ml) を示したが、他の群においては IL-12 産生量の増加と IFN- γ 濃度増加とのはっきりした関連は認められなかった。

Table は、30 kDa 以上の分画で特発性肺線維症 (IPF) の患者 2 例とサルコイドーシスの患者 1 例の

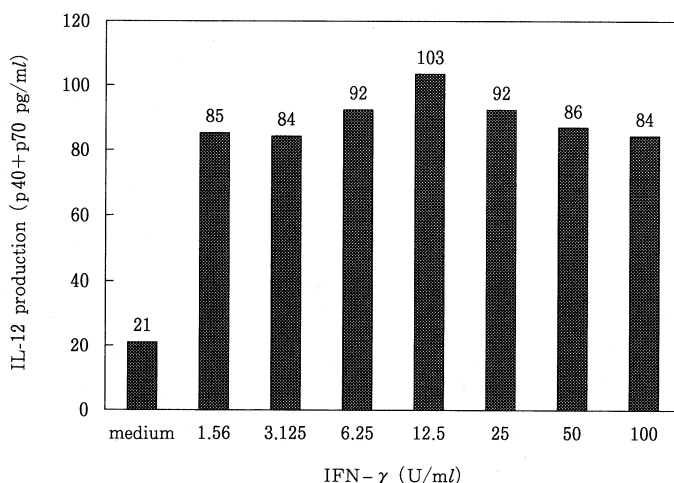


Fig. 5 Dose-kinetic study of IFN- γ on IL-12 production. Mouse alveolar macrophages were stimulated with cytosol of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in the presence of various concentrations of IFN- γ . Cytosol of H37Rv (10 μ l/ml) was added to all the IFN- γ concentration.

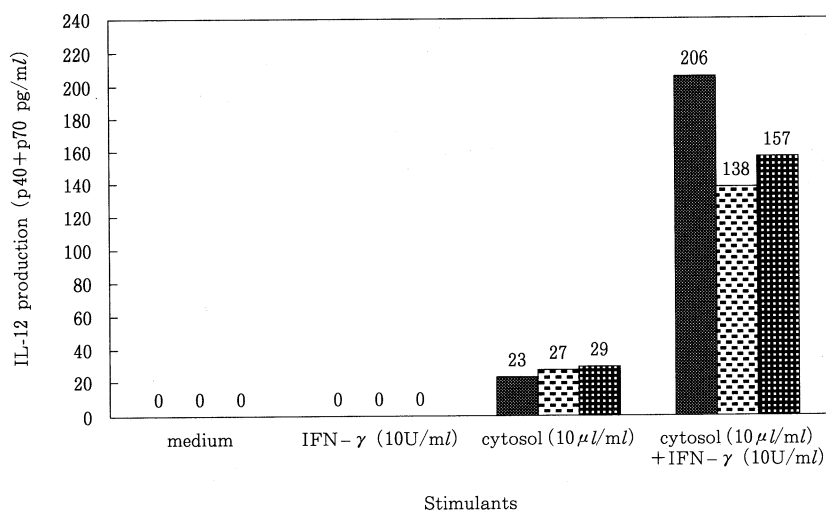


Fig.6 Time-kinetics of IL-12 production from mouse alveolar macrophages. Cells were stimulated with cytosol (10 μl/ml) or cytosol (10 μl/ml)+IFN-γ (10U/ml) for 24 hours (■), 72 hours (▤), 120 hours (▥), respectively. IL-12 production was measured by ELISA.

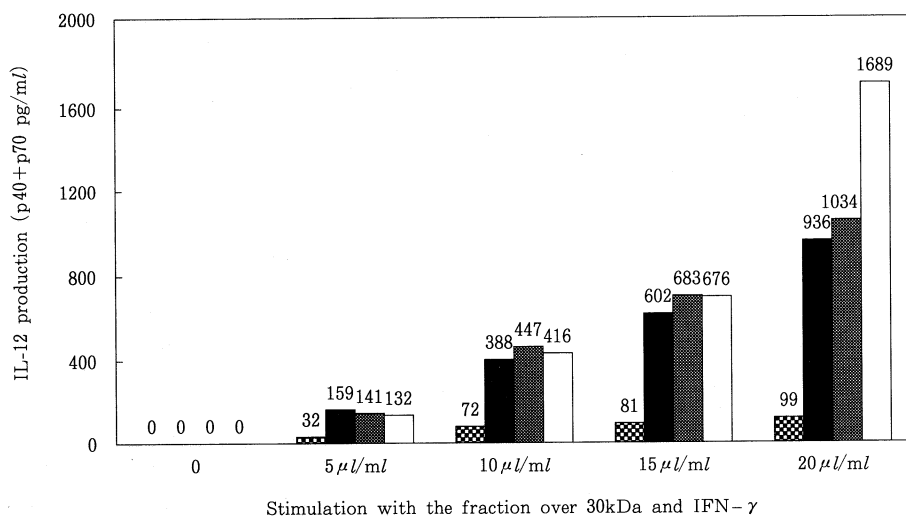


Fig.7 Synergistic effect of cytosol and IFN-γ on IL-12 production from mouse alveolar macrophages. IFN-γ was diluted two-fold as 10U/ml (■), 5.0U/ml (□), 2.5U/ml (▤) and 0U/ml (▥). And each concentration of IFN-γ was added to the respective cytosol concentration groups. Negative controls included IFN-γ alone without.

Table Induction of IL-12 (p40+p70 and p70 alone) in mouse or human alveolar macrophages stimulated with mycobacterial cytosol (30kDa)

Source of alveolar macrophages	Experiments	Stimulants	IL-12 production (pg/ml)	
			p40+p70	p70
Human	Donor 1	Medium	6.86×10	0
		IFN- γ (500U/ml)	1.05×10^2	0
		Cytosol (20 μ l/ml)	5.73×10^4	1.50×10^2
		Cytosol + IFN- γ	2.84×10^5	2.42×10^3
	Donor 2	Medium	0	0
		IFN- γ (500U/ml)	0	0
		Cytosol (20 μ l/ml)	4.44×10^2	0
		Cytosol + IFN- γ	1.69×10^3	0
	Donor 3	Medium	2.98×10^2	0
		IFN- γ (500U/ml)	ND	ND
		Cytosol (20 μ l/ml)	2.13×10^3	0
		Cytosol + IFN- γ	1.29×10^4	7.14×10
Mouse	Exp. 1	Medium	0	0
		IFN- γ (10U/ml)	0	0
		Cytosol (10 μ l/ml)	7.19×10	1.76×10
		Cytosol + IFN- γ	4.16×10^2	1.38×10
	Exp. 2	Medium	0	0
		IFN- γ (10U/ml)	0	0
		Cytosol (10 μ l/ml)	1.81×10	8.20
		Cytosol + IFN- γ	2.06×10^2	1.07×10

Cells (5×10^5 /ml) were stimulated for 24 hours.

Donor 1 and 3 were patients of IPF (Idiopathic pulmonary fibrosis), and Donor 2 was a patient of sarcoidosis. Thirty mice were used in each experiment for mAM ϕ .

Mouse experiment: Representative results of 10 experiments.

For one donor: table shows the results of a single experiment.

BALF から分取した hAM ϕ と mAM ϕ を刺激した結果である。上清中の IL-12 は p40 + p70 および p70 を測定した。

Donor 1 および 3 はメディウム対照においても IL-12 (p40) の産生を確認し、Donor 2 においては測定限界値以下であった。30kDa 以上の分画刺激で Donor 1 は、p40+p70 と p70 の産生を示したが、Donor 3 では p40 のみ産生した。

また 30kDa 以上の分画に IFN- γ を添加して刺激した時、Donor 1 と Donor 3 では p40+p70 および p70 の産生を確認したが、Donor 2 では p70 の産生はいずれの場合も測定限界値以下であった。

mAM ϕ では 30kDa 以上の分画単独刺激でも IFN- γ

を添加した刺激でも p70 の産生を確認した。これらの結果は結核菌体成分中の高分子物質が、hAM ϕ に対しても IL-12 産生を誘導する事を示唆している。

3. IL-12 産生誘導活性物質の特性

結核菌の cytosol に存在する IL-12 産生誘導活性物質の特性を調べるため、分子量 30kDa 以上の分画を蛋白質分解酵素である proteinase K で処理を行い、mAM ϕ を刺激して IL-12 産生量を測定した。

3 回の実験の代表例を Fig. 8 に示す。未処理の分子量 30kDa 以上の分画単独刺激では 114pg/ml であった IL-12 (p40+p70) 産生は proteinase K 処理分画刺激では測定限界値以下で、活性のほぼ 100% 消失した。また、IFN- γ 共存下では 935pg/ml であった IL-12 産生は、

proteinase K 処理により活性の90%以上が失われた。

考 察

結核菌に対する生体防御は、細胞性免疫の発現に依存している。そして、この細胞性免疫成立に不可欠なサイトカインである IL-12 は、結核菌感染により Mφ から産生されることはすでに知られているが²⁰⁾、その機序に関しては依然として明らかではない。

われわれは結核菌成分中の細胞質成分に着眼して、Mφ からの IL-12 産生誘導の解析を hAMφ および mAMφ を用いた *in vitro* 培養系で開始した。

M. tuberculosis H37Rv と H37Ra 生菌刺激による肺胞マクロファージの IL-12 産生量は、マウスではヒトの約 6 倍高く、また生菌の方が IL-12 産生誘導刺激が強いことを示している。これらの結果は、結核菌に対する動物種の反応性の違いを顕著に示しているが、AMφ に対して IL-12 産生を効率的に誘導する菌株は H37Rv 生菌であることも示唆している。また加熱処理により結核菌の Mφ に対する刺激能に変化が生じたことも示唆される。

臨床検体から分離された結核菌あるいは MAC 菌単独による IL-12 誘導は検出限界値以下であったが、IFN- γ を添加した時 IL-12 産生量は増加し、IFN- γ と抗 IL-10 抗体を同時に添加した時は IL-12 の産生量はさらに増加した。しかし本実験では、H37Rv 刺激群に IFN- γ を添加しても IL-12 の産生は検出限界値以下であったが、必ずしも別の Donor の実験結果と一致するもの

ではなかった。その理由はよくわからないが、個体および菌種の違いによって PBMC から誘導されるサイトカインの差があり、それが反映しているのかもしれない。

いずれにしろヒト PBMC は菌体単独刺激では IL-12 産生誘導をせず、IFN- γ および抗 IL-10 抗体が存在することにより、IL-12 を産生する。このことは、IL-12 の産生が IFN- γ と IL-10 により、それぞれ正と負の方向に調節されていることを示唆している。

また、健康人 PBMC を抗 IL-10 抗体存在下で MDRTB (10 菌株)、DSTB (16 菌株)、MA (14 菌株)、MI (14 菌株) で刺激した時、IL-12 の産生は菌株に特異的な傾向は見られなかった。これは、各 Donor の PBMC を構成する細胞集団のプロフィールと反応性の差によるものと考えられる。主な IL-12 産生細胞は単球であると考えられるが、PBMC は単球以外の細胞も含み、それらの細胞が IL-12 産生制御に影響を及ぼしている可能性もあるため、今後は PBMC から単球を分離して検討を行いたい。

IL-12 産生誘導に併用効果が報告されている IFN- γ ¹⁹⁾ の作用について追試した実験では、IL-12 産生量は H37Rv 生菌と死菌および cytosol と cell wall に IFN- γ を加えた群で、それらの単独刺激の時よりも高い IL-12 産生を示した。また、IL-12 産生量は cytosol に IFN- γ を添加した場合が最も高く、IL-12 産生には cytosol 中の成分が大きく関与していることを示唆する結果となった。同時に、今後の mAMφ に対して IL-12 産生を高値に誘導する菌体成分の解析は、標準を

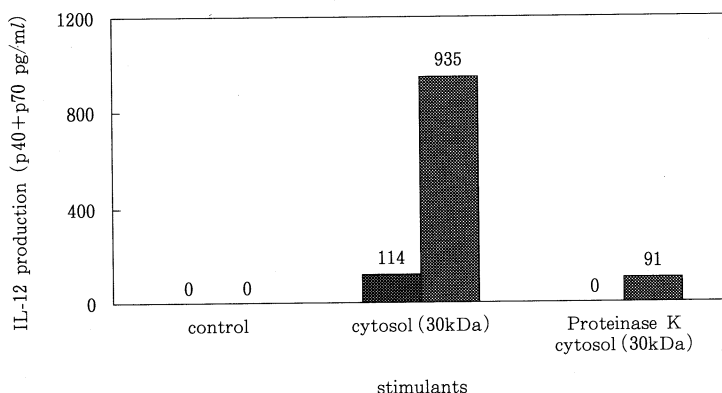


Fig.8 Abolishment of IL-12 inducing activity of mycobacterial cytosol fraction by proteinase K treatment.

Concentration of cytosol was 20 μ l/ml. Cells were stimulated with cytosol only (■), and cytosol plus 10U/ml of IFN- γ (▨). Negative controls included medium or IFN- γ only.

cytosolに絞り込むことを示唆する結果となった。

IFN- γ 量の至適濃度決定のため、cytosolを添加したmAM ϕ 培養系に倍々希釈したIFN- γ を添加した実験では、cytosol単独刺激に対して4倍強のIL-12産生を示したが、IFN- γ の濃度変化に依存的なIL-12産生量の変化は認められなかった。ここで使用したIFN- γ 添加量は、KaufmannらがC57BL/6マウス骨髄由来M ϕ で使用している量¹⁹⁾の1/10から1/600低い濃度であったが、IL-12産生量は彼らの結果に近い値であった。本実験結果はmAM ϕ の実験系では添加するIFN- γ 添加濃度は、1.56~100U/mlの範囲で使用可能であることを示した。

また、刺激時間に関してはcytosolとIFN- γ で刺激した場合24時間の時点でIL-12産生はピークになり、72時間、120時間では減少する傾向が示された。mAM ϕ を使用した実験系においては、IL-12産生誘導を顕著に示すIFN- γ の添加量と刺激時間は、これまでの報告^{19) 21)}に見られるよりも遥かに低濃度かつ短時間の刺激で可能であることを確認したが、この理由としては使用したマウス strain や M ϕ の種類の違いが考えられる。

Cytosolを分子量で分画した実験では分子量30kDa以下の画分刺激で、mAM ϕ によるIL-12産生が測定限界値以下であったが、分子量30kDa以上の分画では単独刺激群でも強いIL-12の産生を示し、IFN- γ 添加群ではさらにこれを増強させた。すなわち、mAM ϕ のIL-12産生を特異的に高める結核菌体成分は、30kDa以上のcytosol画分に存在することを強く示唆している。

また、mAM ϕ に添加した30kDa以上の分画量を、各々4群(5, 10, 15, 20 μ l/ml)設定し、各群にIFN- γ を(2.5, 5, 10U/ml)添加した時のIL-12産生は、30kDa以上の分画量とIFN- γ 濃度との関連を示唆する結果となった。30kDa以上の分画単独刺激では、添加した分画量の増加とともにIL-12産生量が増加した。これに濃度の違うIFN- γ を添加した場合、いずれも分画単独刺激より高いIL-12産生を示したが、分画量が同一の群内では、IFN- γ 濃度の増加はIL-12産生量の増加に反映されず(例外的に分画20 μ l/mlの群にIFN- γ 10U/ml添加した時に限りIL-12産生に顕著な増加がみられた)、IL-12産生量の増加は分画の量に依存的であった。

したがって、一定濃度以上のIFN- γ が存在する時、IL-12産生は30kDa以上の分画の量に依存するといえる。さらに、IFN- γ 存在下であっても結核菌体成分非存在下ではIL-12の産生誘導は起こらないことが明らかになった。

Tableに示したIPFの2例とサルコイドーシス1例において、hAM ϕ を30kDa以上の分画で刺激した場合、

mAM ϕ より高いIL-12(p40+p70)の産生が見られた。結核菌刺激では、mAM ϕ の方がhAM ϕ より遥かに高い産生量を示したが、30kDa以上の分画では反対の結果を示したことは大変興味深いことである。

Donor 1および3はメデイウム対照においてもIL-12(p40)産生を確認したが、この原因として両者はIPF由来AM ϕ で、その疾患に付随的にIL-12(p40)産生が誘導されていることが考えられるが、p40ホモダイマーはIL-12の作用を阻止することが報告されており^{22) 23)}、IPF成因との関連性から考えて興味深い結果であると思われる。

Donor 2はサルコイドーシス由来のもので、メデイウム対照では測定限界値以下であった。これらの反応と疾患との関連性は、今後さらに症例を増やして検討する必要がある。

30kDa以上の分画で刺激した場合、Donorによっては、p40+p70およびp70の産生に差が見られた。また、IFN- γ 添加の影響にも個体差が見られた。これらの結果はM ϕ のoriginがIL-12の産生に影響していることを示していて、その機序をさらに解析することが必要である。

Cytosolの特性について、30kDa以上の分画中のIL-12誘導活性は蛋白質分解酵素であるproteinase Kに感受性であり、この結果は、IL-12産生誘導活性物質の主体が蛋白質であることを強く示唆している。従来M ϕ を活性化する結核菌体成分として、細胞壁成分の脂質に注目されていたが、最近 *Leishmania* 生菌由来の蛋白質がM ϕ 等の抗原提示細胞を活性化し、IL-12産生を誘導することが報告されている²⁴⁾。同様に蛋白質と考えられる30kDa以上の結核菌体成分は、IL-12産生を誘導することから免疫調整物質となる可能性がある。

ヒトでの一部の例外を除き、IFN- γ 単独刺激ではIL-12産生は測定限界値以下であったが、30kDa以上の分画が加わるによりIL-12産生が上昇した。すなわち、菌体あるいは菌体成分によってIL-12産生経路が活性化し、続いてIFN- γ で誘導されるIL-12産生経路が活性化されることを示唆している。

今後はこの物質の分子解析とアミノ酸解析を行い、DNA配列を決定して、結核に対する細胞性免疫賦活物質として活用できる方向に進めたい。

謝 辞

本研究に使用した結核菌H37RvおよびH37Ra標準株の分与と、それらの維持管理法に関してご指導下さいました結核研究所基礎研究部部長阿部千代治先生に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kochi A: Tuberculosis as a global emergency. 結核. 1996; 71: 319-327.
- 2) 青木正和: 「結核—研究の進歩と今後の展望—」. 結核予防会, 1991, p12.
- 3) 青木正和: 結核感染をめぐる諸問題 (1). 結核. 1988; 63: 33-38.
- 4) Cantwell MF, Snider DF Jr, Cauthen GM, et al.: Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. JAMA. 1994; 272: 535-539.
- 5) Foulds J: Meeting Report: The Comstock conference on tuberculosis vaccine development. ASM News. 1997; 63: 256-258.
- 6) Fresno M, Kopf M, Rivas L: Cytokines and infectious diseases. Immunol Today. 1997; 18: 56-58.
- 7) Kagnoff MF, Eckmann L: Epithelial cells as sensors for microbial infection. J Clin Invest. 1997; 100: 6-10.
- 8) 橋本達一郎: 世界の結核予防における BCG ワクチン. 結核. 1997; 72: 270.
- 9) Gentschev I, Mollenkopf H-J, Sokolovic Z, et al.: Synthesis and secretion of bacterial antigens by attenuated *Salmonella* via the *Escherichia coli* hemolysin secretion system. Behring Inst Mitt. 1994; 95: 57-66.
- 10) Murrey PJ, Aldovini A, Young RA: Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 934-939.
- 11) Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, et al.: In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. J Immunol. 1997; 158: 816-826.
- 12) Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, et al.: Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 4143-4147.
- 13) Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, et al.: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. J Immunol. 1991; 146: 3074-3081.
- 14) Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, et al.: Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science 1993; 260: 547-549.
- 15) Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, et al.: Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 10188-10192.
- 16) Wu CY, Demeure C, Kiniwa M, et al.: IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. J Immunol. 1993; 151: 1938-1949.
- 17) Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, et al.: IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol. 1995; 155: 2515-2524.
- 18) Yoshida A, Koide Y: Arabinofuranosyl-terminated and mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium tuberculosis* induce different levels of interleukin-12 expression in murine macrophages. Infect Immun. 1997; 65: 1953-1955.
- 19) Flesch IEA, Hess JH, Huang S, et al.: Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon γ and tumor necrosis factor α . J Exp Med. 1995; 181: 1615-1621.
- 20) Trinchieri G, Gerosa F: Immunoregulation by interleukin-12. J Leukocyte Biol. 1996; 59: 505-511.
- 21) Dekruff RH, Gieni RS, Umetsu DT.: Antigen-driven but not lipopolysaccharide-driven IL-12 production in macrophages requires triggering of CD40. J Immunol. 1997; 158: 359-366.
- 22) Gately MK, Carvajal DM, Connaughton SE, et al.: Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. Ann N Y Acad Sci. 1996; 795: 1-12.
- 23) Gillesen S, Carvajal D, Ling P, et al.:

- Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. Eur J Immunol. 1995; 25: 200-206.
- 24) Probst P, Skeiky YAW, Steeves M, et al.: A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor- α production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. Eur J Immunol. 1997; 27: 2634-2642.