— 原 著 —

非定型抗酸菌に対する遅延型アレルギーの サプレッサー細胞についての研究

北村 勝彦

日本医科大学小児科学教室 (主任: 植田 穰教授
指導: 手代木正教授)

Suppressor T cells against delayed type hypersensitivity to *Mycobacterium intracellulare*

Katsuhiko Kitamura

Department of Pediatrics (Chief: Prof. Yutaka Ueda, Director: Prof. Tadashi Teshirogi),
Nippon Medical School

Mycobacterium intracellulare Mino strain (Mino) grows progressively in the organs of susceptible mice, such as C57BL/6, C57BL/10 or BALB/c. It is very difficult to induce acquired immunity against *M. intracellulare* in those susceptible mice. C57BL/6 (B6) mice show no or very weak delayed type hypersensitivity (DTH) to partially purified Mino antigens when sensitized with 10^7 living Mino subcutaneously.

B6 mice pretreated with cyclophosphamide (CY) showed enhanced DTH to Mino, suggesting that suppressor mechanism exists in this system. Whether or not such a suppressor mechanism exists in the induction phase of DTH (A) and/or in the expression phase of DTH (B) was examined by cell transfer experiments. Recipients for testing (A) were B6 mice receiving CY 2 days before an immunization, and those for (B) were B6 mice receiving both CY and subcutaneous injections of Mino 3 weeks before the cell transfer. B6 mice which were intravenously injected with Mino a week or 6 weeks before preparing spleen cell suspension, were used as the donors. Single cell suspensions of the spleens were plated on tissue culture dishes and non-adherent cells were harvested after incubating for 60 min at 37°C. These cells were used for cell transfer.

In the induction phase experiment, recipient mice received the cells before sensitization, while they received the cells after sensitization in the expression phase experiment. DTH were markedly suppressed in the cell transferred groups as compared with the non-transferred groups. This activity disappeared by treatment of the transferred cells with antibody (α Thy-1 Ab) and complement. It was confirmed that the spleens in an early stage of Mino infection contain suppressor T cells which inhibit the induction of DTH (Ts-aff), while the spleen in the late stage of Mino infection have suppressor T cells which inhibit the expression of DTH (Ts-eff) as well as Ts-aff.

Surface markers of Ts were Thy-1⁺, Lyt-2⁺ and I-J⁺. Mice immunized with Mino showed DTH to Mino-antigens but not to BCG-antigens, and visa versa. However, in the transfer experiments, Ts from mice injected with Mino suppressed DTH of BCG-immuned mice to PPD, while an antigenic cross-reaction was not observed between Mino and sheep erythrocytes. It is speculated that the existence of crossreactive antigenicity among mycobacteria. It is likely that these suppressor T cells may play a critical role in the suppression of cell-mediated immunity to *M. intracellulare*, resulting in the continuous growth of the bacteria in the host.

Key words: *Mycobacterium intracellulare*, suppressor T cells, delayed type hypersensitivity, natural resistance

緒 言

Correspondence to Katsuhiko Kitamura, Department of Pediatrics, Nippon Medical School First Hospital, 3-5-5, Iidabashi, Chiyoda-ku, Tokyo, 102 Japan

わが国の非定型抗酸菌感染症のなかで最も症例が多いのは *Mycobacterium intracellulare* (M.i.) による肺

疾患である。本来、自然界に広く存在する本菌は、一般に病原性は低いが生体の免疫不全に伴い日和見感染症を起こす原因菌となることはよく知られている。近年、後天性免疫不全症候群 (acquired immuno deficiency syndrome, AIDS) の流行に伴い、その発症数は増加傾向にある¹⁾。その一方、有効な抗菌物質がなく治療の困難な疾患でありその対策が急がれている。*M.i.* は動物に対しても感染力が弱く時にブタなどから分離されるものの、マウスやモルモットでの実験モデルが少ないため研究が困難であった。

Goto ら²⁾は、*M.i.* の多くの株を種々の系統のマウスに感染させそのうちのある菌株がある系統のマウスの体内で増殖することを見出した。すなわち、比較的病原性の強い株、K 4 や Mino は、BALB/c, C 57 BL/6, C 57 BL/10 などのマウス体内では増殖を続け、最終的にはマウスを死に至らしめる。しかし、これらの強毒株も、C 3 H, SJL, DBA/2, CBA, A/J というようなマウスでは全く増殖しない。この系統差はマウスの第 1 染色体上の *Ity-Bcg-Lsh* 遺伝子またはそれと密接に連鎖した遺伝子によって支配され、抵抗性が優性に表現されるためとしている。この *M.i.* Mino 株と感受性マウスの組み合わせは、これまで適当な動物実験モデルがないために進まなかった非定型抗酸菌症の研究に有力な手段を与えることになった。

ヒト型結核菌 *M. tuberculosis* H 37 RV やウシ型結核菌 *M. bovis* Ravenel をマウスに感染させても接種菌量によっては必ずしも結核症が進行して動物が死ぬとは限らない。これは少量の強毒菌が感染してもこれに対し細胞性免疫が成立して菌の増殖を阻止するためであることが知られている³⁾。

結核免疫の成立は抗生物質の抗菌作用による菌の除去とあわせて、結核症の治療にとって重要な要素であるといえる。その機作として、細胞性免疫、特に遅延型アレルギーに關与する T 細胞 (Tdh) が放出する lymphokine (LK) によって活性化された macrophage (mφ) が菌を殺すことが知られている。ところが、*M.i.* の感染の場合は、感受性マウスにおいて結核菌感染にみられるような感染防御機構が成立せず、菌量のいかににかかわらず菌は増殖を続け、ついには宿主を死に至らしめる。この菌の増殖している間に遅延型アレルギーの成立は認められない。一方、抵抗性のマウスでは 10⁷ の *M.i.* を静脈内に接種しても菌は増殖することなく持続し、一方わずかな菌数の減少はあっても、細胞性免疫の成立に伴ってみられるような菌の排除は

認められない²⁾。この *M.i.* 感染マウスにみられる細胞性免疫の不成立の機作については報告がない。

さきに Nakamura, Tokunaga ら⁴⁻⁶⁾は弱毒ウシ型結核菌 *M. bovis* BCG の感作において、マウスの系統により遅延型アレルギー反応に差が有り、それが遺伝子支配を受けていることを報告した。C 3 H/He にみられる遅延型アレルギー低反応の機作は、遅延型アレルギーの成立を抑制するサプレッサー T 細胞 (Ts) が出現するためであること、および Ts を除去するような実験条件下では、低反応性マウス C 3 H/He が BCG に高反応を示すようになることが明らかにされている³⁾。そこで、*M.i.* Mino 感染マウスにみられる細胞性免疫応答の欠如にもサプレッサー機構が関与しているのではないかと考え、以下の実験を行った。

その結果、*M.i.* に感受性のマウスでは菌感染により遅延型アレルギーの誘導を抑える afferent-phase の Ts (Ts-aff) と、発現を抑える efferent-phase の Ts (Ts-eff) の 2 型の Ts が出現することが示唆されたのでその概要について報告する。

実験材料および方法

(1) 菌株

Mycobacterium intracellulare Mino 株 (以下 Mino と略す) は患者分離菌を Tween-小川培地で 3 代継代したものを Middlebrook-7 H 9 にて培養し、10⁸/ml に調整後分注し、-80℃ にて保存し、実験に際して 37℃ で融解して用いた。*Mycobacterium bovis* BCG (BCG) は日本ビーシージー製造株式会社製 (東京) の日本株を用いた。

(2) マウス

C 57 BL/6, C 57 BL/10, B 10・BR, C 3 H/He, CxJ 8 を使用した。CxJ 8 は Salk Institute 由来のリコンビナントマウスで、Mino に抵抗性である。その他のマウスは静岡実験動物農業協同組合 (浜松市、静岡) から購入した。このうち C 3 H/He は Mino 抵抗性、他は感受性である。マウスはいずれも 6 ないし 8 週齢のものを実験に供した。以下の各実験に対する数値は 1 群 5 匹の平均値と標準偏差で表した。

(3) 臓器内生菌数の測定

Mino 10⁷ を静脈内注射した後、一定期間において脾臓から菌の還元培養を行った。すなわち、ホモジェナイズした脾懸濁液を段階希釈し適当な濃度で Tween-小川培地にまき、生ずる抗酸菌のコロニー数を数え脾内生菌数を算定した。

(4) 遅延型反応惹起抗原

M. intracellulare purified protein derivative (PPD-I) は, Mino を Sauton 液体培地で 37℃, 6 週間培養した後, 121℃, 15 分間かけて殺菌し, 培養液を Millipore filter (孔径 0.45 μm) でろ過した。このろ液を硫酸塩析し精製した。足蹠反応惹起には, この 15 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ を用いた。標準ツベルクリン (PPDs) は予研製造のものを用いた。ヒツジ赤血球 (SRBC) は日本バイオテスト研究所 (東京) より購入, phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し, 2,000 回転, 10 分間遠心して沈渣を 10% の PBS 懸濁液とした。これは $2 \times 10^9 \text{ cells}/\text{ml}$ に相当する。遅延型足蹠反応を惹起するには, この 0.05 ml を足蹠に注射した。

(5) 抗体および補体処理

抗 Thy-1 $\cdot$ 2 抗体 (Cedarlane Lab. Ltd., Canada), 抗 Lys-2 $\cdot$ 2 抗体 (Cedarlane Lab. Ltd., Canada) を使用した。抗 I-J $\cdot$ 抗体 {B 10 $\cdot$ A (3R) に対する B 10 $\cdot$ A (5R) のマウス抗血清} は米国 NIH より恵与された。上記抗体で細胞を 37℃, 30 分間処理後, 遠心で上清を除き補体 (low toxic rabbit complement, Cedarlane Lab. Ltd., Canada) を加え 37℃, 30 分間処理した。

(6) 免疫と遅延型アレルギーの測定

Mino に対する遅延型アレルギーは, Mino 生菌 10^7 をマウスの皮下に注射し, 3 週後に足蹠に PPD-I を注射して, 24~72 時間後の足蹠反応を測定した。PPD-I は 15 μg , PPDs は 10 μg をそれぞれ 0.05 ml の PBS に溶解し, マウスの一方の足蹠に注射し, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後の足蹠の腫脹を, dial thickness gauge (Peacock. Ozaki Co., 東京) で測定し, 注射前の足蹠の厚さとの差を 0.01 mm の単位で表現した。SRBC に対する遅延型アレルギーは SRBC $10^8/0.05 \text{ ml}$ を足蹠に注射, 4 日後に反対側に同量の SRBC を注射し, 24 時間後の足蹠反応を測定した。

(7) cyclophosphamide 処理

cyclophosphamide (以下 CY と略す) は, シオノギ製薬 (大阪) よりエンドキサン®の商標にて市販のものを, 用時注射用蒸留水に溶解し, 10 mg/ml の濃度に調整した。マウスには CY を 100 mg/kg の割合で, 免疫の 2 日前に腹腔内投与した。

(8) 細胞移入実験における細胞の調整と分画

C 57 BL/6 マウスの脾臓を無菌的に取り出し, ハサミで細切後, ステンレスメッシュ (# 200) を通して細胞浮遊液とした。Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄後, 0.83% 塩化アンモニウム溶液で溶

Fig. 1 Viable bacteria (10^7) were injected intravenously into C 57 BL/6, C 57 BL/10, B 10 $\cdot$ BR, CxJ8 and C3H/He strains of mice. The mice were killed at various times after the injection, and number of bacteria was determined by counting the colony-forming units on T-Ogawa egg medium supplemented with Tween 80.

Time course of the growth of *M. intracellulare* Mino in the spleens of 5 different strains of inbred mice.

血, HBSS で 3 回洗浄した。この細胞を, 5 % fetal calf serum (FCS) 加 RPMI-1640 培養液に $10^7/\text{ml}$ の濃度で浮遊させ, プラスチックシャーレ (Falcon 3003, 径 90 mm) に 10 ml ずつまき, 37℃, 90 分間培養した。その後シャーレに非付着性の細胞を集めて移入実験に用いた。

結 果

1. マウス系統差による臓器内生菌数の相違

今回使用した 5 系統のマウスのうち, *M. i.* 感受性とされるのは C 57 BL/6, C 57 BL/10, B 10 $\cdot$ BR であり, 抵抗性とされるのは C 3 H/He, CxJ 8 である。そこで, Mino に対しての感染性を調べた。なお, 感受性のあるマウス 3 系統と抵抗性の 2 系統は, Mino に対しての感染性が脾内生菌数においておのおのほぼ類似の傾向を示していたので, 図には一括して示した (Fig. 1)。

菌の静注 3 週後より感受性群と抵抗性群の間に著しい臓器内生菌数の差がみられた。感受性群では菌は徐々に増加するのに比べ, 抵抗性群では菌はほぼ同じ菌数を維持していた。感受性群の一つである C 57 BL/

Table 1 DTH to PPD-I in B 6 mice injected with *M. intracellulare* Mino

Viable units of Mino	Injection route	Time (weeks) after Mino injection	Pretreated with CY	DTH (1/100 mm±SE)
10 ⁴	iv	3	—	5.6± 3.3
10 ⁶	iv	1	—	8.2± 2.6
		3	—	10.2± 3.8
		6	—	10.0± 2.9
10 ⁶	sc	3	—	17.0± 8.3
		3	+	60.6±28.4
10 ⁷	sc	3	—	17.8± 8.3
		3	+	60.6±28.4

Various doses of Mino were injected intravenously (iv) or subcutaneously (sc) with or without CY pretreatment. DTH were determined by footpad swelling.

6 マウス (以下 B 6 と略す) について以下に感染と細胞性免疫の成立について検討した。

2. 菌の感染経路と遅延型アレルギー

BCG に対する遅延型アレルギーの低反応性は、マウスの系統差のほか接種のルートによる差がみられること、また、この低応答性は CY の前処理により消失することが報告されている⁷⁾。そこで、はじめに菌の感染経路の差異による PPD-I に対する遅延型アレルギーの差が生じるか否か検討した。

Table 1 に示すように、感受性マウスに 10⁶ の Mino 生菌を静注した場合、感染後 1 週から 6 週のいずれにおいても PPD-I に対する遅延型アレルギーが有意に認められない。10⁶ の Mino 生菌を皮下接種した場合には、3 週後に弱い遅延型アレルギーが認められた。CY 前処理後 10⁶ または 10⁷ の Mino を皮下接種するとさらに強い遅延型アレルギーが成立した。しかし、10⁴ という少量の菌を静注した場合には遅延型アレルギーは成立せず CY の効果もみられなかった (未発表データ)。

10⁶ の Mino を皮下接種した時、CY 前処理を行った場合とそうでない場合の遅延型アレルギーの経時的変化を Fig. 2 に示した。CY 処理群では未処理群に比べ著しく遅延型アレルギーの増強が認められた。一般に CY は Ts の precursor 細胞に働き Ts の機能を抑えることが知られている⁷⁾。このことから、Mino 感染において遅延型アレルギーの成立を抑えるサプレッサー機構が働いている可能性を考え、細胞移入の系を用いて検討した。

Fig. 2 Viable Mino (10⁷) were injected subcutaneously.

After 6 days, delayed type hypersensitivity reaction against PPD-I were measured. Footpad swelling to PPD-I in B 6 mice pretreated with or without cyclophosphamide.

●—●: Pretreated with CY 200 mg/kg
○---○: Non-treated

3. Mino 感染初期の脾臓に出現する Ts

B 6 に CY を前投与すると、Mino に対する遅延型アレルギーが成立することから、細胞性免疫の誘導の段階に働くサプレッサー機構が存在するものと考えた。これを証明するために、感染初期の B 6 をサプレッサーのドナーとして準備し、細胞移入実験を行った。Mino 10⁶ を静脈内注射した B 6 から 6 日後に脾臓を摘出し脾細胞浮遊液を作った。これをプラスチックシャーレにまき、付着性の細胞 (主に mφ) を除き非付

Table 2 Suppressor T cells in the induction phase

Exp.	Cell transfer	DTH (1/100 mm±SE)
I	—	84.0±21.0
	+	12.0±3.7
II	—	74.6±23.5
	+	24.0±19.0
	+(anti-Thy 1+C)	88.0±9.7

Exp. I : Nonadherent spleen cells (2×10^7 cells/mouse) from B6 mice injected intravenously with Mino (10^6) 6 days before, were transferred to CY pretreated B6 mice.
DTH footpad reaction was measured 21 days later.

Exp. II : Exp. I was repeated, with an exception that the cells were pretreated with anti-Thy 1 antibody and complement, before transfer in additional group.

着性のリンパ球を集めた。mφを除く理由は、mφが食した菌の混入を避けるためである。この非付着性細胞 2×10^7 /mouse を CY 処理した B6 に尾静脈より移入し、直ちにレシピエントに Mino 10^7 を皮下注射した。3 週後、PPD-I に対する遅延型アレルギーを足蹠反応で測定した。

結果は、Table 2 に示すように Mino 静注 6 日後の脾臓の非付着性細胞を移入したマウスでは遅延型アレルギーの成立が抑制された。この抑制は、移入するリンパ球をあらかじめ抗 Thy-1 抗体と補体で処理しておくで消失したので、抑制細胞は T 細胞であることが分かった。この細胞は細胞性免疫の誘導を抑えるので、いわゆる Ts-aff であると考えられた。

4. Mino 感染後期の脾臓に存在する Ts

Mino は感受性マウスの体内では増殖を続け、菌数の減少をみることはない。このことから、このマウスでは Mino に対する細胞性免疫が成立しないのか、あるいは成立している細胞性免疫の発現が抑制されているのか、のどちらかではないかと考えた。そこで感染後期の脾細胞をとり、これが細胞性免疫の誘導、あるいは発現にどのような影響を与えるかを細胞移入の系で検討した。

(1) 感染後期の脾臓に存在するサブレッサー細胞の細胞性免疫誘導に対する効果

Mino 10^6 静注 6 週後の B6 の脾細胞からプラスチック付着性細胞 (mφ) を除き、これを CY 処理した

Table 3 Effect of Ts transfer from mice injected with Mino 6 weeks before on DTH in mice sensitized with Mino 1 week before

Exp.	Cell transfer	Pretreatment of the cells	DTH (1/100 mm±SE)
I	—	—	79.0±23.0
	+	—	12.4±4.0
II	—	—	74.6±23.5
	+	—	24.0±19.0
	+	anti-Thy 1+C	88.0±9.7

Exp. I : Spleen cells (2×10^7 cells/mouse) from mice injected with Mino (10^6) 6 weeks before were transferred to mice sensitized with Mino 1 week before.

Exp. II : In one group cells were pretreated with anti-Thy 1 antibody and complement before transfer.

Table 4 Effect of Ts transfer from mice injected with Mino 6 weeks before on DTH in mice sensitized with Mino 3 weeks before

Group	Cell transfer	Pretreatment of the cells	DTH (1/100 mm±SE)
1	—	—	60.5±25.3
2	+	—	12.0±7.6
3	+	anti-Thy 1+C	53.5±17.2
4	+	anti-Lyt 2+C	62.6±12.1

Spleen cells (2×10^7 cells/mouse) from mice injected with Mino (10^7) 6 weeks before were transferred to mice Mino sensitized 3 weeks before.

B6 に尾静脈より 2×10^7 /mouse 移入した。3 週後、遅延型アレルギーを PPD-I で惹起させた。Table 3 にみられるように、感染後期の脾臓に存在する非付着性細胞は感染初期のそれと同じように細胞性免疫の誘導を抑制した。この抑制は抗 Thy-1 抗体と補体の処理で失われるので、抑制細胞は T 細胞であることが判明した。すなわち感染後期の脾臓にも Ts-aff が存在することが明らかになった。

(2) 感染後期の脾臓に存在するサブレッサー細胞の細胞性免疫の発現に対する効果

CY 処理後 Mino 10^7 で皮下感作し 3 週を経たレシピエント (すでに感作が成立している) に、上記 Mino 10^6 静注 6 週後の B6 の脾臓の非付着性細胞を 2×10^7 /mouse 尾静脈から移入した。直ちにレシピエントの足蹠に PPD-I を注射し 24~72 時間後の遅延型足蹠反応を測定した。

Table 4 にみられるように、この細胞の移入により

Table 5 Effects of transfer of spleen cells from mice injected with Mino 1 week or 5 weeks before on the induction or expression of DTH to PPD-I

Exp.	Spleen cells from mice injected with Mino	Cell transfer	Recipient mice	DTH (1/100 mm±SE)
I	No transfer	—	Non-sensitized	68±23
	1 week before	+		20±7
	5 weeks before	+		24±11
II	No transfer	—	Sensitized	70±20
	1 week before	+		72±18
	5 weeks before	+		30±6

Spleen cell suspensions were prepared from mice injected with Mino (10^7) 1 week before or with the bacteria (10^6) 5 weeks before. In Exp. I 10^7 of the spleen cells were transferred intravenously into normal mice pretreated with CY 2 days before and given subcutaneous injections with Mino (10^7) simultaneously. DTH to PPD-I was tested 3 weeks later.

In Exp. II the spleen cells (10^7) were transferred intravenously into mice that had been pretreated with CY and injected with Mino (10^7) subcutaneously 3 weeks before. DTH was tested immediately after cell transfer.

レシビエントの遅延型アレルギーの発現は抑制されていた。感作の成立している対照は強い足蹠反応を示した。この抑制は抗 Thy-1 抗体と補体、または抗 Lyt-2 抗体と補体の処理で失われていることから抑制細胞は Lyt-2 陽性細胞であることが明らかとなった。すなわち、感染後期の脾臓には Ts-eff も存在することが分かった。

5. Ts-aff と Ts-eff の異同

感染後期の脾臓に免疫の誘導に対する Ts-aff と免疫の発現に対する Ts-eff がともに存在することから、この両者の異同が問題となる。これまでの検討では、どちらも T 細胞であると考えられた。そこで、この異同を検討するために感染初期の脾臓に存在するサブレッサー細胞が細胞性免疫の誘導および発現の段階にそれぞれ働くかどうかを調べた。

Mino 10^7 静注 1 週後の脾臓の非付着性細胞と Mino 10^6 静注 5 週後の脾臓の非付着性細胞を未処理マウス、および Mino 感作マウスにそれぞれ移入し、それぞれの遅延型アレルギーを比較した。なお、この場合の静注菌数の差は、移入する時点での生体内の菌数を合わせるための操作である。すなわち、Ts-aff 活性をみるためには、CY 処理 2 日後のレシビエントに 10^7 /mouse の細胞を移入し、直ちに Mino 10^7 を皮下注射し

Table 6 Effect of treatment of transferred cells with anti-I-J^b antibody on Ts activity

Spleen cells from mice injected with Mino	Pretreatment of the spleen cells with	DTH (1/100 mm±SE)
1 week	Complement (C) alone	24±9
	anti-I-J ^b +C	42±12
	No transfer	68±23
5 weeks	C alone	26±9
	anti-I-J ^b +C	17±5
	No transfer	68±23

See the legend of Table 5.

感作し、3 週後の遅延型アレルギーを測定、Ts-eff 活性は、CY 処理後 Mino 10^7 を皮下注射して感作し、3 週後の B 6 に細胞移入し、直ちに PPD-I で遅延型アレルギーを測定する方法で行った。

Table 5 にみられるように、Mino 静注 1 週後の脾臓には Ts-aff 活性は有るが Ts-eff 活性はない。一方、5 週後の脾臓には、Ts-aff と Ts-eff の両活性が有り、先の実験の結果と同じである。この結果は、Ts-aff と Ts-eff が異なる subpopulation である可能性を示唆している。さらに、同じ実験で抗 I-J^b 抗体と補体で処理した 1 週後の脾細胞は、Ts-aff 活性が減弱した (Table 6)。すなわち Ts-aff は I-J^b 陽性であるようであった。しかし、抗 I-J^b 抗体と補体で処理した 5 週後の脾細胞は、Ts-eff 活性を示した。したがって、Ts-eff は I-J^b 陰性であると考えられた。ただし、この点については同じ細胞で Ts-aff 活性に対する抗 I-J^b 抗体と補体の効果をみる必要がある。

6. 抑制の cross-reactivity

Mino 感染によって生じる Ts が他の抗原に対する免疫応答に影響を及ぼすか否かを、近縁の菌種である BCG と、全く異なった抗原と考えられる SRBC を用いてその交叉性を検討した。

BCG に対する遅延型アレルギーは 10^7 生菌皮下感作の場合、2 週以後に強い反応がみられた。SRBC に対する遅延型アレルギーは足蹠に抗原注射を行って 4 日後に検出することができた。そこで、CY 処理 B 6 をレシビエントとし BCG、Mino または SRBC で感作して 4 日後に SRBC に対する、また 2 週後に BCG あるいは Mino に対する遅延型アレルギーを別々の足蹠で、それぞれ SRBC、PPDs、PPD-I を惹起抗原として検出した。この系に感作前に、Mino 感作により生じた Ts を移入することにより Ts-aff の、また感作成立後

Table 7 Crossreactive Ts-aff between BCG and Mino
(Effect of transfer of spleen cells from mice
injected with Mino 1 week before on DTH to
SRBC, BCG or PPD-I)

Group	Cell transfer	Recipients sensitized with	Elicited antigen	DTH (1/100 mm±SE)
1	—	SRBC	SRBC	106.7±33.2
2	+			121.7±13.8
3	—	BCG	PPDs	158.4±23.7
4	+			54.4±26.6
5	—	Mino	PPD-I	53.4±18.5
6	+			28.0±5.8

Spleen cells were obtained from mice injected with Mino (10^7) intravenously 1 week before. Recipient mice immunized with SRBC (10^8) BCG (10^7) or Mino (10^7) 2 weeks before the cell transfer. Elicited antigens were injected simultaneously with the transfer into the footpads, and DTH was tested 3 days later.

Table 8 Crossreactive Ts-eff between BCG and Mino

Group	Cell transfer	Recipients sensitized with	Elicited antigen	DTH (1/100 mm±SE)
1	—	BCG	PPDs	80.8±38.0
2	+			8.6±7.4
3	—	Mino	PPD-I	56.2±18.8
4	+			15.6±12.8

The effect of transfer of spleen cells from mice injected with Mino 5 weeks before on DTH in recipient mice immunized with BCG or Mino 2 weeks before the cell transfer.

に Ts 細胞を移入することにより Ts-eff の交叉反応性を検討した (Table 7).

Mino の Ts-aff は SRBC に対する反応には影響せず BCG に対する遅延型アレルギーは強く抑制した。Ts-eff も同じく BCG に対しては Mino に対するのと同程度の抑制を示した (Table 8)。しかし、足蹠反応の抑制の強さの比較は困難で、この系では両者に交叉反応が有ることしか分からなかった。

考 察

非定型抗酸菌 *M. intracellulare* Mino 株は感受性の系統のマウス体内で増殖を続け、ついには宿主をたおす。一方、抵抗性の系統のマウスでは大量の菌の接種によっても菌の増殖はみられない。しかし菌が組織から消失することなく長期間持続し接種直後の菌数を維

持している。この系統差はマウスの第 1 染色体上にある *Ity-Bcg-Lsh* 遺伝子によって支配されている²⁾。その遺伝子産物はまだ同定されていないが *M.i.* は細胞内寄生菌であり、マウスの $m\phi$ の中で増殖する³⁾。したがって、抵抗性と感受性の系統差は $m\phi$ の産生する物質の差ではないかと考えられる。 $m\phi$ が LK, 特にインターフェロン- γ が主体であると考えられる macrophage activating factor (MAF) によって活性化されると結核菌などに殺菌的に働くことはよく知られている。すなわち、細胞性免疫の成立した生体の感作 T 細胞が抗原を認識して放出する MAF によって、活性化された $m\phi$ が食菌作用を活発に行い殺菌を行う。

非定型抗酸菌感受性マウスでは菌が増殖を続けるが、このことは非定型抗酸菌に対する細胞性免疫が成立せず、感作 T 細胞が出来ないので MAF の産生放出が乏しい結果、活性化 $m\phi$ が出来ないためではないかと考えられる。著者は *in vitro* で LK とともに培養すると、感受性マウスの $m\phi$ も抵抗性マウスの $m\phi$ と同じように Mino に対し殺菌的に働くことを観察したが、このことは、上述の推測を裏付けるものと考えられる (未発表データ)。著者はこれらの事実から、何らかの理由により、感受性マウスでは、Mino に対し細胞性免疫が成立しないのではないかと考えた。

CY は免疫抑制剤、また制ガン剤として知られる薬剤であるが、遅延型アレルギーの増強を起こす作用が有る。この理由は、遅延型アレルギーに対する Ts を除去するためといわれている⁷⁾。本実験でも CY が遅延型アレルギーを増強することが知られ、この系にサブレッサーの関与が在ることが示唆された。そこで細胞移入実験を行った結果、予想したように遅延型アレルギーの Ts が誘導されていることが明らかとなった。さらにレシピエントを変えることによって、Mino 感染初期の脾臓中には遅延型アレルギーの誘導の段階で作用する Ts-aff が存在し、感染後期の脾臓には遅延型アレルギーの発現の段階で働く Ts-eff が存在することが明らかとなった。感染後期の脾臓には Ts-aff も存在した。しかし、Ts-eff は感染初期の脾臓には認められなかった。

この事実は、Ts-aff と Ts-eff が異なる細胞集団である、つまり Mino の感染によって 2 型の Ts が出現することを示唆する。しかし、Ts-aff と Ts-eff は、単に effective dose に差があっただけであるという可能性も否定はできない。

Nakamura and Tokunaga⁹⁾は、BCG に対する Ts

は Ts-aff として働き、Ts-eff の活性はないと報告した。この機作は、いったん感作が成立した場合には、感作 T 細胞が再度抗原と出会うと LK を放出し、遅延型アレルギーを惹起するまでの反応が非感作状態に比べすみやかに起こり、かつ少量の抗原で十分であるので、Ts が抑制因子を放出してこの pathway を阻害する効果が現れにくいと考えられる。それに対し、非定型抗酸菌の感染の Ts-eff 活性は BCG の場合とは比較にならないほど強いのではないと思われる。

Benacerraf の一派は、ハプテンを結合した脾細胞を抗原とするマウスの実験系を用いて Ts の pathway を解析し、Ts 1, Ts 2, Ts 3 の 3 種の Ts が存在することを報告した¹⁰⁾。Ts 1 は TsF 1 を放出し、Ts 2 に働いて、Ts 3 の前駆細胞を Ts 3 に分化させる TsF 2 を出させる。Ts 3 は最終的なサブプレッサーのエフェクターである。この系の Ts 1 は非定型抗酸菌感染の Ts-aff に、また Ts 3 は Ts-eff に相当する。Ts 2 に相当する T 細胞群が在るかどうかは現在のところ不明である。

Germain and Benacerraf¹¹⁾の論理によると、Ts-pathway では Ts 同士の作用は種々の factor を介して行われ、TsF 1 は idiotypic 陽性、I-J 陽性、Ts 2 は idiotypic 陽性、I-J 陽性、Lyt-2 陽性、Ts 3 は idiotypic 陽性、I-J 陽性、Lyt-2 陽性であるという。

非定型抗酸菌感染の初期と後期のおのおの Ts を conventional な抗 I-J 抗体で処理した結果、Ts-aff は I-J 陽性、Ts-eff は I-J 陰性であった。しかし I-J 分子自体が明らかにされていない現在では、この I-J 陽性の結果を Ts-pathway にあてはめることはできない。抗 I-J 抗体が異なれば異なった結果が出る可能性もある。したがって、本実験において、Ts-aff が I-J 陽性、Ts-eff が I-J 陰性という結果が得られたことは、両方の Ts が異なった細胞群に属することを示唆するにとどまるであろう。

Watson and Collins¹²⁾は *M. avium* の感染において、細胞性免疫を抑制する Ts が誘導されるという事実を報告した。彼らは 10^6 から 10^8 という大量の *M. avium* を静脈内接種したマウスで SRBC に対する足蹠反応が一時期抑制されることを観察した。しかし、アロ抗原に対する遅延型アレルギーは抑制されなかった。非特異的な抑制が弱い点では、本研究の結果と類似しているが、BCG に対する交叉性については報告がない。同じ抗酸菌ということで、*M. i.* と BCG に対する反応が交叉することは考えやすいが、実際には遅延

型アレルギーのレベルでの交叉は弱い。すなわち BCG 生菌で皮下感作した B 6 の PPD-I に対する遅延型アレルギーおよび逆に Mino 感作した B 6 の PPDs に対する遅延型アレルギーは弱い(未発表データ)。その一方で Ts のレベルで強い交叉性がみられたのは Ts と Tdh が異なるエピトープを認識しているためかもしれない。Mino の感染によって出現した Ts が BCG に対する細胞性免疫を抑制することはこの研究によって初めて報告された。

WHO が南インドで行った BCG ワクチンの抗結核効果を調べるフィールド調査は、7 年半の追跡の結果、BCG 無効という結論であった¹³⁾。しかし、この地方では非定型抗酸菌の感染が広範にみられる事実が報告されている。もし非定型抗酸菌の感染がマウスモデルにおけるのと同じように、ヒトでも BCG の免疫効果に抑制的に働くものだとすれば、この大がかりな研究が思わぬ結果をもたらした原因が、非定型抗酸菌による BCG 免疫効果の抑制によるものと説明することができよう。ただし、結核症と非定型抗酸菌症の併発は一般に少ないので、ヒトとの相似性についてはさらに慎重な検討が必要と思われる。

このように、非定型抗酸菌の感染におけるマウスモデルの解析は、ヒトにおける抗結核免疫の機作の解明にも有用な情報をもたらすと考えられ、今後さらに研究を深化させるべき興味あるモデル系と考えられる。

結 論

非定型抗酸菌 (*M. intracellulare* Mino 株) の感染に対し感受性を示すマウス系統では、臓器内生菌数は経時的に増加し、遅延型アレルギー反応は成立しない。一方、抵抗性マウス系統では、菌は組織内で持続的に存在するが増殖することはない。本論文では、感受性マウスにおける遅延型アレルギーの不成立の機作について研究した。

1) 感受性マウスにおける非定型抗酸菌に対する遅延型アレルギーの不成立の原因は菌の静注後、特異的にサブプレッサー T 細胞が誘導されることによるものと認められた。

2) このサブプレッサー T 細胞には、菌の感染初期に出現し持続的に存在して遅延型アレルギーの成立を抑制する afferent-phase のサブプレッサー T 細胞 (Ts-aff) と、感染後期に出現し遅延型アレルギーの発現を抑制する efferent-phase のサブプレッサー T 細胞 (Ts-eff) が存在することが示唆された。

3) *M. intracellulare* Mino 株と近縁の菌種である BCG との交叉反応性について検討した結果, エフェクター T 細胞における両者の交叉反応性は弱い, サプレッサー T 細胞における交叉反応性は強く, 非定型抗酸菌感染において出現するサプレッサー T 細胞の解析が, 今後ヒトにおける抗結核免疫の機作の解明に有用な情報をもたらすと考えられた。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜った国立予防衛生研究所細胞免疫部 徳永徹部長, ならびに直接御指導, 御教示をいただいた中村玲子博士に深謝いたします。また, 終始, 御討論いただいた後藤義孝博士, 早稲田大学大学院理工学研究科 難波憲司修士, その他様々な御助言, 御協力を賜った細胞免疫部諸先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Winster, S.M., Bernard, E.M., Gold, J.W.M. and Armstrong, D.: Humoral response to disseminated infection by *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* in acquired immunodeficiency syndrome and Hairy cell leukemia. J. Infect. Dis., 151, 523~527, 1985.
- 2) Goto, Y., Nakamura, R.M., Takahashi, H. and Tokunaga, T.: Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. Infect. Immun., 46, 135~140, 1984.
- 3) Mackaness, G.B., Auclair, D.J. and Lagrange, P.H.: Immunoprecipitation with BCG. I. Immune response to different strains and preparations. J. Natl. Cancer Inst., 51, 1655~1667, 1973.
- 4) Nakamura, R.M. and Tokunaga, T.: Strain difference of delayed-type hypersensitivity to BCG and its genetic control in mice. Infect. Immun., 22, 657~664, 1978.
- 5) Nakamura, R.M. and Tokunaga, T.: Non-H-2-linked difference in delayed-type hypersensitivity in mice. Immunol. Lett., 2, 87~89, 1980.
- 6) Nakamura, R.M., Tokunaga, T. and Yamamoto, S.: Difference in antigen-presenting ability of macrophage between high- and low-responder mice in delayed-type hypersensitivity to *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun., 27, 268~270, 1980.
- 7) Goto, M., Mitsuoka, A., Sugiyama, M. and Kitano, M.: Enhancement of delayed hypersensitivity reaction with varieties of anticancer drugs. J. Exp. Med., 154, 204~209, 1981.
- 8) Goto, Y., Takahashi, H. and Tokunaga, T.: Strain difference of mouse to *M. intracellulare* infection. Kekkaku, 57, 573~578, 1982.
- 9) Nakamura, R.M. and Tokunaga, T.: Induction of suppressor T cells in delayed-type hypersensitivity to *Mycobacterium bovis* BCG in low-responder mice. Infect. Immun., 28, 331~335, 1980.
- 10) Weinberger, J.Z., Germain, R.N., Ju, S.T., Greene, M.I., Benacerraf, B. and Dorf, M.E.: Hapten specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. II. Demonstration of idiotypic determinants on suppressor T cells. J. Exp. Med., 150, 761~767, 1979.
- 11) Germain, R.N. and Benacerraf, B.: A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen-specific immune suppression. Scand. J. Immunol., 13, 1~10, 1981.
- 12) Watson, S.R. and Collins, F.M.: The specificity of suppressor T cells induced by chronic *Mycobacterium avium* infection in mice. Clin. Exp. Immunol., 43, 10~19, 1981.
- 13) World Health Organization: Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention; First report. Bull. WHO, 57, 819~827, 1979.

(受付: 1988年8月30日)