

血清型の異なる *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 刺激によるマウス脾細胞のサイトカイン誘導

The induction of cytokines from mouse splenocytes stimulated with serotype-specific *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)

藤原 永年 *

Nagatoshi Fujiwara

Mycobacterium avium and *Mycobacterium intracellulare* (MAC) are the most common isolates of nontuberculous mycobacteria, which cause pulmonary diseases. MAC species are classified into 28 serotypes based on the epitopic oligosaccharide structure of the serotype-specific glycopeptidolipid (GPL) antigen. In this study, it is checked the induction of cytokines from mouse splenocytes stimulated with serotype-specific MAC strains. The inflammatory cytokine, TNF- α was produced at 24 hr after the stimulation of MAC serotype 2, 4, 16 bacilli. The amount of MAC serotype 2 stimulation was the highest, and the production was stationary until 72 hr. Those of MAC serotype 4, 16 were increased from 24 hr to 72 hr, although the level was low. Th1-related cytokine, IL-12p40 was produced, and the amount of MAC serotype 2 was the highest. In addition, the splenocytes produced TNF- α , IL-12p40, IFN- γ at 24 hr after the stimulation with the molecule, serotype 4-GPL. As the results, the induction of cytokines related with the host immune system was heterogeneity in the stimulation of MAC serotypes, and it is implied that the serotype-specific GPLs affect the host-pathogen interaction and the induction of immune system.

1. 緒言

Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) は結核菌に次いでヒトからの分離頻度が高い抗酸菌であり、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の末期に合併する日和見病原体としても重要視されている。Brennanらは、MACの細胞表層成分である抗原性糖ペプチド脂質 glycopeptidolipid (GPL) の糖鎖構造からMACは少なくとも28種類以上の血清型に分類され、ヒトや家畜及び環境から分離される菌株には血清型に偏りがあることを報告した¹⁻²⁾。さらに、AIDSに伴うMAC感染症では、特に血清型4, 1, 8菌の分離頻度が高いこと、血清型4型を始めとする特定の血清型菌がヒトに対して強い病原性を示すことから、血清型と病原性の関連が注目されている。本報告では、*in vitro* の系でマウスの脾細胞をMAC血清型2, 4, 16型菌で刺激し、産生される炎症性、Th1およびTh2関連サイトカインから、血清型による宿主免疫応答の差異を考察した。また、単離精製した細胞表層抗原である血清型4型GPLでマウス脾細胞を刺激した際の宿主免疫応答について解析した。

2. 方法

2.1 使用菌株

MAC菌株のうち現在の分類学上で*M. avium*のtype strainである血清型2型菌 (ATCC 35712)、*M. intracellulare*のtype strainである血清型16型菌 (ATCC 13950) およびヒトからの分離頻度が最も高い*M. avium* 血清型4型菌 (ATCC 35767) をMiddlebrook 7H₉液体培地で37°C、2週間培養した。培養液を適宜希釈してMiddlebrook 7H₁₀プレート上での発育コロニー数から、colony

* 食物栄養学科 教授

forming units (CFU) を算出した。

2.2 マウス脾細胞の *in vitro* 刺激

C57BL/6 (雌 8 週齢) 純系マウスから無菌的に脾臓を摘出し、2枚のフロスト付きスライドグラスですりつぶした。遠心分離と赤血球溶解液により赤血球を除去後、phosphate-buffered saline (PBS) で2回洗浄し、 1.0×10^6 cells/mlの濃度になるよう10% 胎児ウシ血清 (FCS) 加 RPMI1640培地に懸濁し、96 wellマイクロプレートで培養した。各MAC菌株は 1.0×10^5 CFU/mlとなるように調製し、各wellに追加してマウス脾細胞を刺激した。37°Cで24, 48, 72時間培養した。また、予めイソプロパノールに溶解した血清型4型GPLを0.1, 1.0, 10 μ g/wellとなるように96 wellマイクロプレートに加えて自然乾固させた後、マウス脾細胞を加えて37°Cで24時間刺激した。培養液量はすべて200 μ l とし、培養終了後に培養上清を回収してサイトカイン測定まで-30°Cで保存した。

2.3 サイトカイン測定

培養上清に産生された各種サイトカインTumor Necrosis Factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-12p40, Interferon (IFN)- γ 濃度をELISA法により測定した。Coating bufferで希釈したcapture antibodyを96 well enhanced protein-binding ELISA plateにovernightコーティングした。Blocking bufferで1時間ブロッキングした後サンプルと既知濃度のサイトカインを50 μ l/well加え、4°Cで一晩反応させた。その後、PBS/Tween 20で5回洗浄し、blocking buffer/Tween 20で希釈したdetection biotin-antibodyを50 μ l/well加え、90分間室温で反応させた。PBS/Tween 20で5回洗浄した後streptavidin-horseradish peroxidaseを加え、45分間室温で反応させた。PBS/Tween 20で5回洗浄した後、基質と発色試薬o-phenylenediamineを加え30分間反応させ、2 M H_2SO_4 で反応を停止して492 nmの吸光度を測定した。標準曲線から各サンプルのサイトカイン濃度を定量した。

3. 結果

3.1 MAC血清型2, 4, 16型菌の刺激によるマウス脾細胞のサイトカイン産生誘導

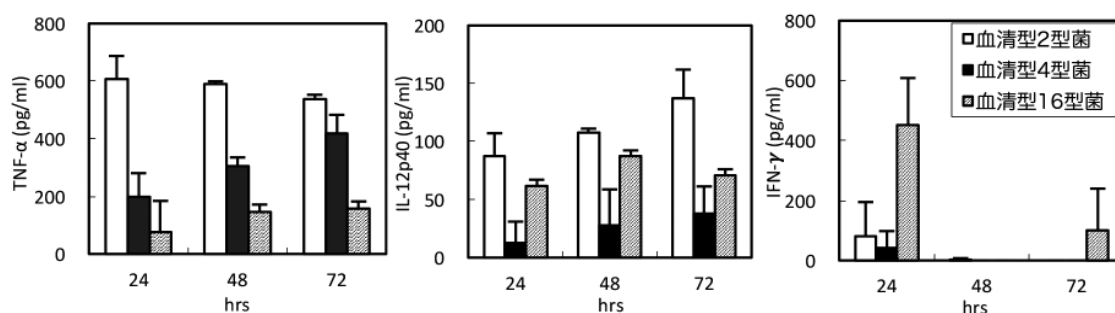


Fig. 1 Kinetics of cytokine production from mouse splenocytes stimulated with serotype-specific MAC strains

マウス脾細胞をMAC血清型2, 4, 16型菌それぞれで刺激し (MOI, 菌: 脾細胞=1:10)、24, 48, 72時間後の培養上清中に産生されたTNF- α , IL-12p40, IFN- γ をFig. 1に示した。

炎症性サイトカインであるTNF- α 産生量を刺激したMAC血清型菌株間で比較すると、すべての時点でMAC血清型2型菌>4型菌>16型菌となっていた。MAC血清型2型菌刺激によるTNF- α 産生量は、刺激開始後24時間目にピークを示し、その後72時間まで微減しながら継続的に産生されていた。一方、MAC血清型4, 16型菌刺激では、72時間まで経時的に産生量が増加

していた。MAC血清型2型菌刺激によるTNF- α 産生量は、他の2菌株刺激の場合と比べ有意に高く、TNF- α 産生パターンも異なっていた。

Th1関連サイトカインであるIL-12p40は血清型の違いにかかわらず、刺激後72時間まで漸増的に産生されていた。その産生量はMAC血清型2型菌>16型菌>4型菌となっていた。IFN- γ は刺激24時間後に一時的に産生され、その産生量はMAC血清型16型菌>2型菌>4型菌であった。48, 72時間後ではほとんど検出されなかった。

Th2関連サイトカインであるIL-4については、本実験系の何れの時点においても検出限界以下であった (Data not shown)。

3.2 血清型4型GPLの構造

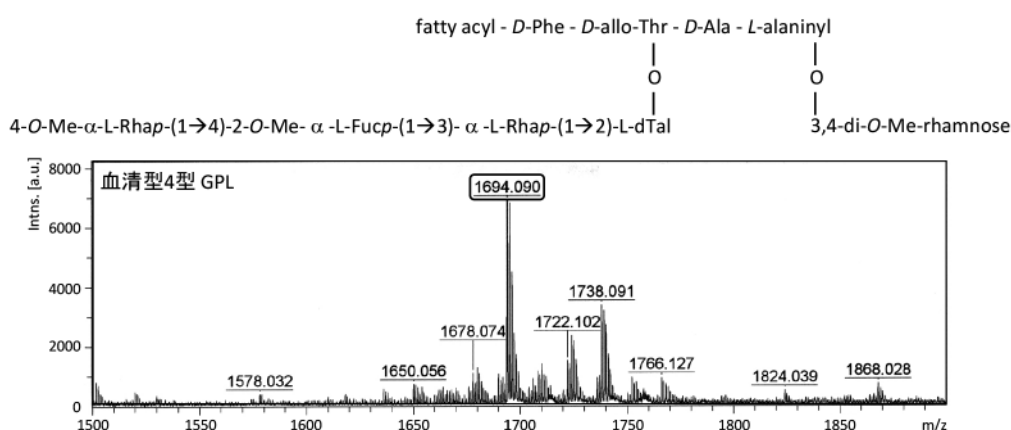


Fig. 2 Proposed structure and MALDI-TOF/MS spectrum of MAC serotype 4 GPL.

血清型4型GPLは、MAC血清型4型菌から抽出した総脂質画分を弱アルカリ加水分解し、2層分配により得られた有機層の粗脂質画分を薄層クロマトグラフィーにより精製純化した。質量分析の結果からFig. 2に示した構造であることを確認した。

3.3 血清型4型GPL刺激によるマウス脾細胞のサイトカイン産生

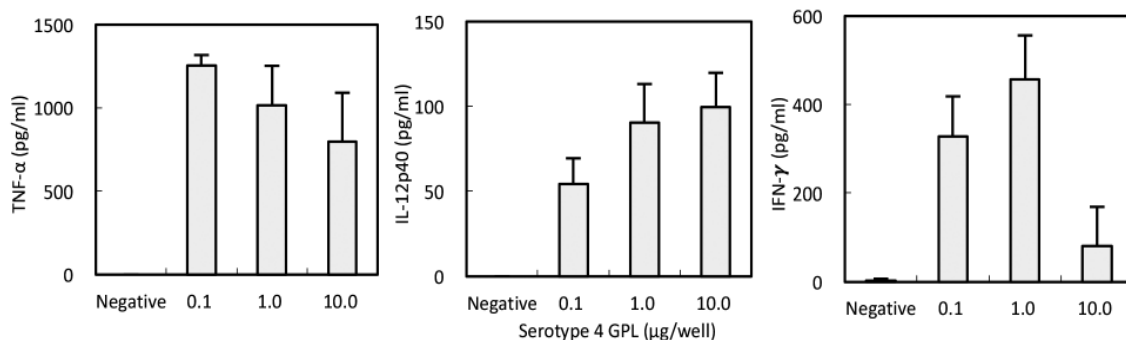


Fig. 3 Cytokine production of mouse splenocytes stimulated with MAC serotype 4 GPL.

血清型4型GPLでマウス脾細胞を刺激し、24時間後の培養上清中に産生されるサイトカイン量をFig. 3に示した。マウス脾細胞はGPL 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ の刺激により大量のTNF- α を産生した。その産生量はMAC血清型2型菌刺激 (MOI=1:10) の約2倍であった。GPL濃度を1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ に増加するとTNF- α 産生量は減少していた。Th1関連サイトカインについては、IL-12p40がGPL 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{well}$ 、IFN- γ がGPL 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ の範囲内で濃度依存的に産生された。高濃度GPLでは過刺激による脾細胞の細胞傷害が考えられた。実際、刺激を加えた培養細胞の顕微

鏡観察で死細胞の割合が多くなっていた。Th1関連サイトカインIL-4についてはMAC血清型菌刺激の場合と同様、検出限界以下であった。

4. 考察

抗酸菌感染症においては、細胞性免疫を中心とした宿主感染防御機構が重要であると考えられている。今回の実験では、マウス脾細胞を用いて血清型の異なるMAC菌が宿主応答に与える影響を検討した。TNF- α は主に単球/マクロファージから産生される炎症性のサイトカインであるが、MAC血清型2型菌で刺激した場合、TNF- α は24時間後にピークを示し、その後も持続的に産生されていた。この結果は、MAC血清型4, 16型菌に比べMAC血清型2型菌の方が宿主初期免疫応答である自然免疫を強力に惹起したものと考えられる。また、IL-12p40産生能は今回用いた血清型の異なる3菌種で産生パターンに差はなかったが、その産生量はTNF- α と同様にMAC血清型2型菌が有意に高かった。IL-12はTh1誘導型のサイトカインであり、IL-12の刺激によりT細胞が活性化されIFN- γ 産生を誘導し、細胞性免疫が惹起される。本実験系では、IFN- γ は刺激24時間後に一部産生されただけでその後は殆ど検出されなかった。抗原刺激により獲得免疫が活性化されるには自然免疫に比べ時間的遅れがあり、IFN- γ 産生を検討するためには、より長期的観察が必要であったと思われる。今回、刺激後24時間で一時的に検出されたIFN- γ 産生細胞群は主としてNK細胞やNKT細胞であったと推測される。Th2関連サイトカインIL-4は本実験系で全く検出されなかったことは、Th1関連サイトカインIL-12p40が有意に発現され、Th2型の液性免疫へのシフトが抑制的に働いているものと考えられた。しかしながら、ヒトMAC感染症患者血清中に抗GPL抗体が上昇していることが報告されており^{3,4)}、MAC感染における液性免疫が宿主感染防御に関与していることが想定され、ヒトとマウスの種差を含め、さらなる検討が必要である。

MAC血清型の相異によりサイトカイン誘導が異なることは、その血清型特異抗原であるGPLの存在が反映されていることが考えられる。今回はヒトからの検出頻度の高い4型GPLを単離精製し、直接マウス脾細胞を刺激してサイトカイン産生能を検証した。GPL濃度を0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ で刺激したところ、TNF- α は高濃度では産生量が減少したが、0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ の刺激で1 ng/ml以上の高産生量であった。IL-12p40とIFN- γ については、低濃度のGPL刺激により濃度依存的に産生された。これらの結果はGPL自身に免疫惹起能があり、各種MAC血清型菌刺激による宿主応答の違いはGPL構造を反映していると結論づけた。今回は4型GPLのみを検討したが、今後2, 16型GPLについても同様の検討を行い、MAC血清型菌の違いによる宿主応答との連関を比較する必要がある。

以上より、MAC血清型菌による宿主応答は血清型により異なり、特にMAC血清型2型菌は強い免疫惹起能を有していることが示唆された。

5. 参考文献

1. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:29-63.
2. Chatterjee D, Khoo KH. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(14):2018-42.
3. Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, Fujiwara N, Yano I, Ogura T, Ito M, Kobayashi K. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin Infect Dis.* 2002;35(11):1328-35.

4. Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, Naka T, Fujiwara N, Kobayashi M, Yano I, Ito M, Kobayashi K. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. Clin Diagn Lab Immunol. 2005;12 (1):44-51.