

第 52 回 総 会 特 別 講 演

I. 先天的胸腺欠損ヌードマウスならびに無菌
マウスを用いた結核感染の実験的研究

上 田 雄 幹

東京大学医科学研究所獣医学研究部

受付 昭和 52 年 8 月 22 日

The 52nd Annual Meeting Special Lecture

I. EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION IN GERM-FREE
AND CONGENITALLY ATHYMIC NUDE MICE

Katsumoto UEDA*

(Received for publication August 22, 1977)

Two aspects of host defense mechanisms involved in tuberculosis infection were studied using exotic experimental animals; germ-free (GF) and congenitally athymic nude mice.

Germ-free mice were used to investigate the role of microbial flora on resistance to tuberculosis infection. A low level of resistance to a virulent strain of *Mycobacterium bovis* was observed in GF mice, showing shorter survival time and higher number of bacillary counts in organs as well as severer lesions than in flora-bearing mice having the same genetical background. The low level of resistance to the infection in GF mice seemed to be correlated with inadequate tuberculin hypersensitivity, which was revealed by footpad reaction, macrophage disappearance reaction and macrophage migration inhibition test. The induction of sensitized lymphocytes seemed to be influenced by concomitantly existing intestinal floral organisms. However, the reconstitution of microbial flora resulted in only tuberculin hypersensitivity but not the full recovery of resistance to infection.

The role of the thymus in resistance to a virulent strain of *M. bovis* was investigated using congenitally athymic nude mice. In nude mice, septicemic infection with wide-spread necrotic-exudative foci but rather slight pulmonary involvement was produced. Such fulminating infection was prevented to some degree by reconstituting the immunological activity of nude mice through thymus grafting or transfer of thymus-derived cells from syngeneic haired mice. This was confirmed by longer survival times and lower bacillary counts in organs than non-reconstituted nude mice, and severer pulmonary lesions and epithelioid granulomas comparable to in euthymic mice. With Japanese BCG, a limited degree of resistance was observed in nude mice with a plateau of bacillary growth curves and restriction of spreading of lesions in the liver and lymphoreticular organs, while they had progressive lesions in the lungs and kidneys. Various connective tissues, especially of subcutaneous and periosteal regions as well as in the brain were also involved, suggesting these lesions might be responsible for clinical symptoms observed at the final stages of the prolonged infection with BCG.

* From the Institute of Medical Science, University of Tokyo, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo 108 Japan.

Use of these exotic experimental animals in regard to the microbial and genetic conditions seems to be of advantage and even essential to elucidate the host defense mechanisms to tuberculosis infection.

結核症における宿主寄生体関係は極めて複雑で、現在なお菌側、宿主側双方からの解析的研究の積み重ねが必要な段階と思われるが、宿主側要因の解析は困難な面が多い。宿主側要因解析の一方法として特殊な実験動物を利用するアプローチがある。常在微生物が結核感染に及ぼす影響につき検討した無菌マウスを用いた研究、および結核感染に際して胸腺が果たす役割につき検討した先天的胸腺欠損ヌードマウスを用いた研究、について、これまでに得られた成績を紹介したい。

A. 無菌マウスを用いた研究

1. フローラと結核感染

常在細菌叢、主として腸内細菌叢（以下フローラ）が結核を含めた感染症に対する抵抗力に影響を与えていることは、すでにロックフェラー研究所の Dubos¹⁾ がフローラが限定されたマウスを用いた実験から指摘し、また宮川²⁾ によつても示唆されてきた。表 1 に微生物規制の観点から分けられた実験動物の区分とその定義を示すが、無菌 (GF) 動物は検出可能な微生物、寄生虫を持たないものと定義されている。これに対し普通の動物はコンベンショナルとよばれ、何ら微生物規制をうけていないもので、このような動物はそれぞれの動物自身に固有の各種の病原体の不顕性感染が多く、しばしば実験に重大な支障をもたらす。このような不顕性感染を除いたものとして SPF 動物があり、本実験ではこの SPF マウスをフローラを持つ対照マウスとして使用した。

2. 無菌マウスの強毒株感染

無菌マウスと SPF マウス (ICR 系, outbred) に *Mycobacterium bovis* Ravenel 株を 10⁴v. u. 静脈接種し経時的に肝、肺内菌量を調べると、感染 2 週以後菌量

に著明な差が現れ、SPF マウスでは菌量が停滞または下降する時期にも無菌マウスでは菌増殖が持続した。無菌マウスと SPF マウスのこの抵抗力の差がフローラの有無によるものか否かにつき、更に帝王切開により新たに無菌化してからの世代の短い無菌マウスと、そのもとなつた SPF マウスの子孫とをアイソレータで飼育し比較したが、やはり明瞭な差がみられ、無菌マウスの抵抗力が低い理由はフローラを欠くためであることが強く示唆された³⁾⁴⁾。

3. 無菌マウスのツベルクリン・アレルギー

次に無菌マウスの低い感染抵抗性と関連してツベルクリン・アレルギーの検討を行なつた。10⁴v. u. 接種後 PPD による足跡反応を調べると感染 2~3 週で SPF マウスでは明瞭な遅延型反応がみられるのに対し無菌マウスはほとんど反応しなかつた。更にパラフィン浮遊死菌で感作後 2 週で調べても明らかに無菌マウスの反応性が低かつた⁵⁾。このほか腹腔マクロファージ消失反応、腹腔滲出 (PE) 細胞を用いるマクロファージ遊走阻止 (MMI) 試験でも無菌マウスの反応が SPF マウスより弱いことが確認された⁶⁾。これらの知見から、無菌マウスが強毒株の感染に対し抵抗力が低い理由の主なものとして、感染に伴う感作の発現がフローラを持つマウスよりも劣ることが重要な意味を持つと考えられた。

4. 無菌マウスのツベルクリン・アレルギー低反応性の機序

無菌マウスにみられるツベルクリン・アレルギー低反応性が感作の誘導の段階に起因するのか発現の段階に起因するのかを検討した。感作 SPF マウスの PE 細胞を無処置の無菌および SPF マウスの足跡に注射し同時に PPD を注射して局所受身伝達を試みると、無菌マウス

Table 1. Microbial Condition of Experimental Animals

Class	Qualification of microbes*
GF Germ-free (axenic)	Free of detectable microbes
SPF Specific pathogen free (monoxenic to holoxenic)	Free of specified pathogenic microbes
CV Conventional (holoxenic)	No qualification
GN Gnotobiotic (mono-, di, ...polyxenic)	Associated with known microbe(s)
CVZ Conventionalized (holoxenic)	Associated with non-qualified microbes

* Including ecto- and endoparasites.

Fig.1. Normal Ability of Macrophages from Sensitized GF Mice to Express DTH

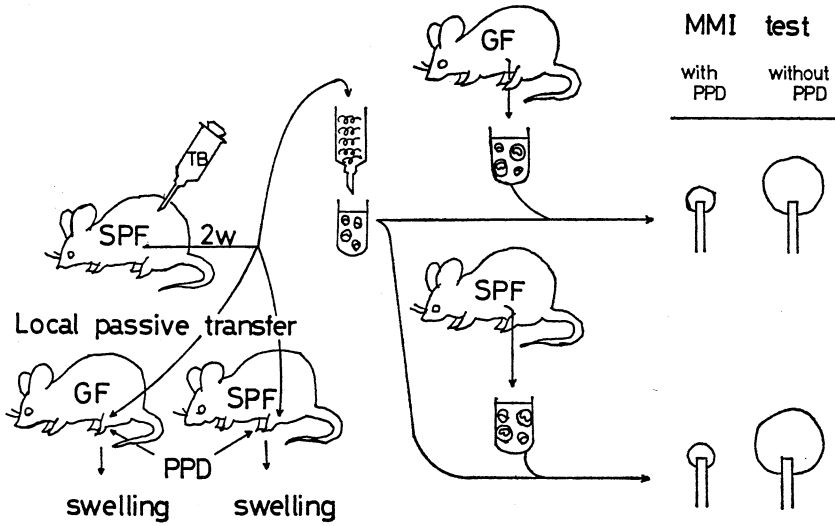
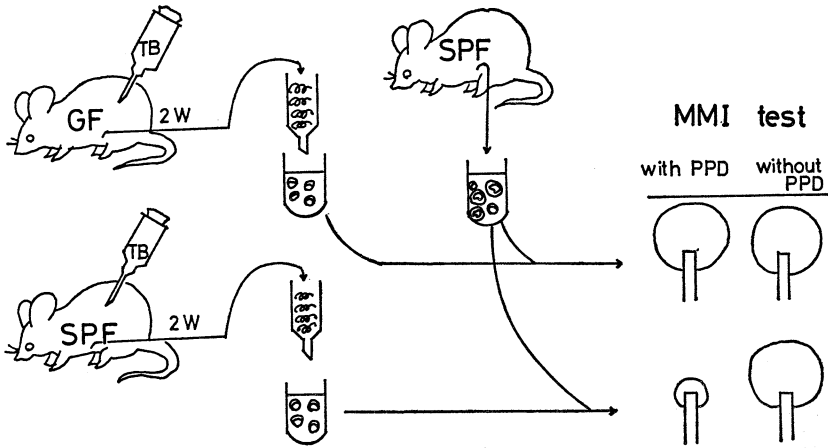


Fig.2. Low Ability of Lymphocytes from Sensitized GF Mice to Express DTH



でも足趾腫脹が起こった。また感作 SPF マウスの PE 細胞からリンパ球を集め、これと無処置無菌マウスの PE 細胞を混ぜて MMI を調べると遊走が阻止された (図1)。したがってツベルクリン・アレルギーの表現の段階では無菌マウスの単球-マクロファージ系は正常に作動するものとみなされた。一方、感作された無菌および SPF マウスから腹腔リンパ球を分離し、これらを無処置 SPF マウスの PE 細胞と混ぜて MMI を調べると無菌マウスのリンパ球では MMI が起こらないことがわかった (図2)。更に無菌マウスの局所リンパ節細胞も MMI 活性が低いことが知られ⁶⁾、無菌マウスは感作リンパ球の出現、つまり感作の誘導の段階で SPF マウスと異なることが明らかにされた。

更にフローラが感作の誘導の段階に影響していると考えられる二つの事実も見出された。すなわち無菌マウス

に結核菌と無関係な大腸菌などを投与してツベルクリン感作を行なうとアレルギーが回復することが見出されたが、この場合、感作と同時に大腸菌を投与した場合に回復が著明であつた⁶⁾。これは間接的であるが腸管内の菌が感作の誘導の段階に影響したことを示している。もう一つの知見は、無菌マウスを PPD で免疫した場合のツベルクリン抗体による即時型足趾反応は無菌マウスでも SPF マウスと同程度に現れたことで、無菌マウスのツベルクリン・アレルギーが弱いことを、単なる無菌環境下におけるリンパ系網系の全般的な低形成に帰することはできないことを示すものと考えられた⁶⁾。

5. 抵抗性の再構成および機序解明の展望

感作リンパ球の誘導の段階においてフローラからの影響がリンパ球に働くのか、あるいは抗原情報をリンパ球に伝える際のマクロファージに働くのかの解明は今後に

Fig. 3. Effect of Association of Floral Microbes on Recovery of DTH and Resistance

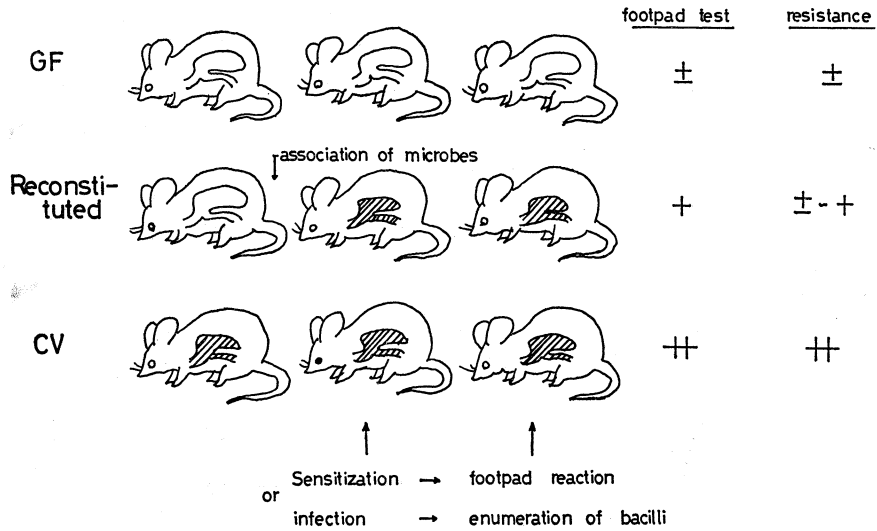


Table 2. Various Hypotrichotic Mutant Mice

Name	Symbol	Authors	Abnormal thymus development
Hairless	hr	Brooke 1926	?
Naked	N	Lebedinsky 1927	No report
Rhino	hr ^{rh}	Howard 1940	Dysplasia, Kawaji 1967
Bald	hr ^{ba}	Garber 1952	No report
Furless	fs	Green 1954	No report
Alopecia	Al	Dickie 1955	No report
Nude	nu	Flanagan 1966	Aplasia, Pantelouris 1968
Moth eaten	me	Green 1975	Hypoplasia, Green 1975

残された問題であるが、更にフローラからの影響を最終的に確認し、その機序を各種の段階において明らかにするためには、無菌マウスにフローラを新たにつけてフローラの再構成を行ない、このようなマウスについてアレルギーおよび抵抗性回復の機序を究明する必要がある。現在までのところ、無菌マウスを SPF マウスと同居させてフローラをつけて調べた限りではアレルギーはある程度回復するが抵抗性を回復させることは不成功に終わっている(図3)。この事実は、フローラ成立段階における構成菌の種類の問題、あるいはフローラ成立に対する正常抗体の影響の研究などが、研究の今後の展開には必要であることを示すものと思われる。

B. ノードマウスを用いた研究

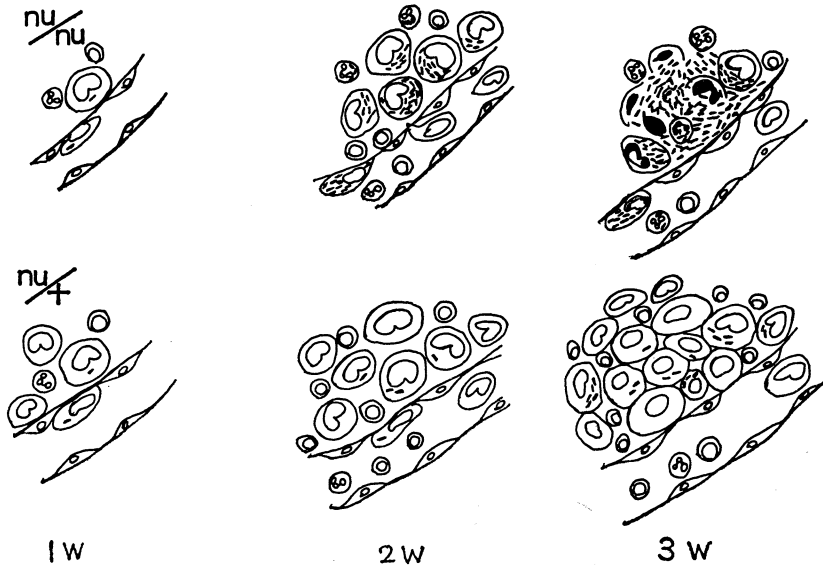
1. 結核感染における胸腺の役割

結核感染に対する宿主の抵抗性に胸腺が果たす役割については、九大の武谷⁷⁾、トルドー研究所の Collins⁸⁾、North⁹⁾ らにより胸腺摘出マウスを用いて研究されてきた。これら胸腺摘出マウスでは少量の胸腺由来リンパ球(T細胞)の残存が問題になる。そこで先天的胸腺欠損

ノードマウスを用い胸腺の役割について検討した。

ノードマウスは英国 Ruchill 病院の Grist によりクローズドコロニーのアルビノマウスに発見された突然変異で、Flanagan により常染色体上の劣勢遺伝子 *nu* によるものとして1966年報告され、1968年に Panteloulis により *nu* のホモ接合体すなわちノードマウスは被毛異常に加え胸腺の *agenesis* があることが明らかにされた(表2)。なおヘテロ接合体は胸腺を持つ対照マウスとして使用できる。使用したマウスは BALB/c 系に10代戻し交配した近交系に近いものである。ノードマウスがT細胞機能を欠くことは同種および異種移植が成立すること、遅延型アレルギーがみられないことなどから明らかであるが、マウス自身の感染病とくにマウス肝炎ウイルス、センダイウイルス、*Pneumocystis* などにより消耗病を起こし、長期間の飼育が困難であるとされてきた。われわれは SPF マウスに近い微生物規制の条件でアイソレータを使用することにより、無処置ノードマウスが1年以上にわたり異常を示さない条件で実験を行なった。

2. ノードマウスの強毒株感染

Fig. 4. A Scheme of Development of Lesion by *M. bovis* Ravenel (10⁴) in the Liver of Nudes

M. bovis 強毒株 10⁶ v. u. を静脈接種し経時的に血液および主要臓器内菌量を追跡すると感染1週では明らかでないが、2週ではヌードマウスの菌量がヘテロマウスよりも多くなった¹⁰⁾。種々の菌量で生残日数を調べると10⁴~10⁶ v. u. で2~3週で死亡し、2.3v. u. でも7週で死亡した。肉眼所見もヘテロマウスと全く異なり、肝、脾の腫大は比較的軽く小白斑が多発し、また心にも白色結節を認めたが肺病変は軽度であつた。ヘテロマウスは著明な肺病変を呈して死亡した。組織学的検索により、ヌードマウスでは主要臓器のほか全身の皮下織、脂肪組織に滲出・壊死型病巣が多発しているのが認められ、心、腎、肝、脾のほか脳にも病変がみられた。病巣成立の経時的観察によりヌードマウスでは、ある程度病巣に集合したマクロファージ内の菌増殖が抑えられず、やがてマクロファージが崩壊し滲出・壊死型病巣に移行することが知られた(図4)。以上の成績からヌードマウスの強毒株感染では、結核菌による敗血症が惹起されたものと理解された¹¹⁾。

3. 胸腺移植あるいはT細胞移入による回復

ヌードマウスの極端に低い抵抗性がT細胞を欠くためであることを確かめるため胸腺移植あるいはT細胞移入による抵抗性の回復を試みた。

ヘテロマウスの新生子胸腺を4週齢のヌードマウスの皮下に移植し、その4週後に移植部を調べると胸腺組織が形成されているのが確認されたが、その発達の程度には個体差があつた。この時点で、対照のヌードおよびヘテロマウスとともに感染実験を行なうと、移植マウスでは生残期間の延長、一定時期で調べた臓器内菌量の低下がみられたが、いずれも対照ヘテロマウスの水準には及

ばなかつた。またヘテロマウスの胸腺細胞を10⁷~10⁸移入し、細胞移入翌日に感染させると、やはり死亡までの日数がやや延長し、臓器内菌量も対照ヌードマウスよりは少なかつた。胸腺移植および胸腺細胞移入による抵抗性の再構成実験の結果を図5にまとめた。ヌードマウスでは心、腎、肝、脾などに滲出・壊死型病変を生じ早期に死亡したが、再構成マウスでは生残期間が延長し、かつ死亡時期の病変は肺が最も顕著になり、病変が主座する臓器がヘテロマウスに近くなつた。また組織学的にも、ヌードマウスが死亡する時期に移植マウスを調べるとヘテロマウスにみられるような類上皮細胞結節が形成されていた。

次に末梢リンパ装置由来の細胞移入による抵抗性回復を、1匹のヘテロマウスから1匹のヌードマウスに相当する細胞数を移入後、直ちに感染を行なつて調べると、抵抗力回復の効果は脾細胞では有効であつたが腹腔細胞や骨髄細胞では無効で、T細胞が抵抗力回復の主体であることが推察された(表3)。

以上から、T細胞がマウスの実験結核における抵抗性に重要であるとともに、肺病変および類上皮細胞肉芽腫の成立にも重要な役割を果たしていることが裏づけられたものとする。また再構成実験を通じて、回復した抵抗力がヘテロマウスの水準に及ばなかつたことは、強毒結核菌感染に対する抵抗力の発揮にはかなり多数のT細胞が必要であることを示すものと思われた¹²⁾。

4. ヌードマウスのBCG感染

ヌードマウスはT細胞機能を欠くが、一方、マクロファージの遊走能、貪食能はヘテロマウスよりも充進していることが報告され、また各種の病原体の弱毒株の感

Fig. 5. Survival Time and Main Affected Organs in T-cell Reconstituted (TG or TC) Nudes after Infection with *M. bovis* Ravenel (10^4)

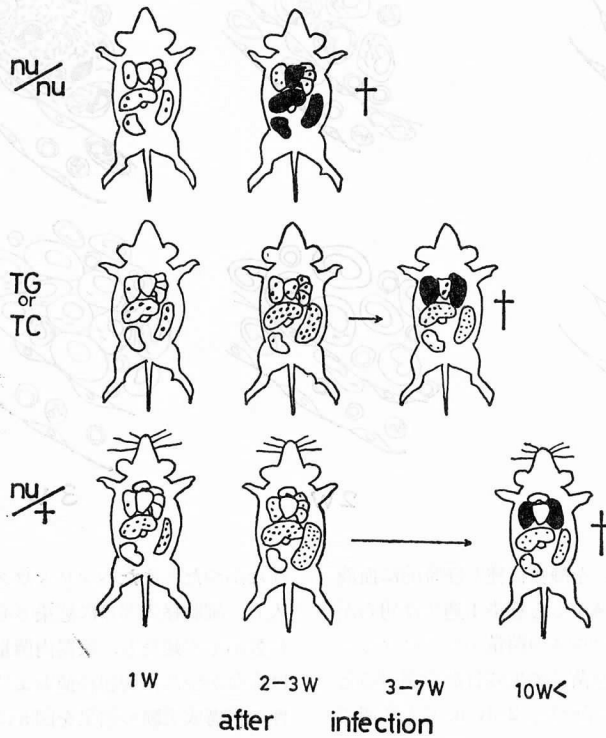
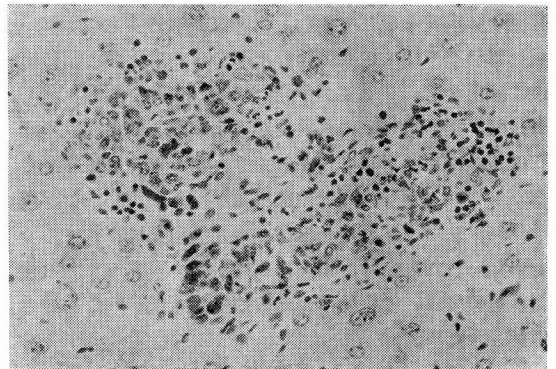


Table 3. Reconstitution of Antituberculous Resistance in Nude Mice

Procedure	Effect
Thymus grafting	+
Thymocyte transfer	+
Spleen cell transfer	
Normal cell	+
Immune cell	++
Peritoneal exudate cell transfer	
Normal cell	-
Immune cell	+
Bone marrow cell transfer	-

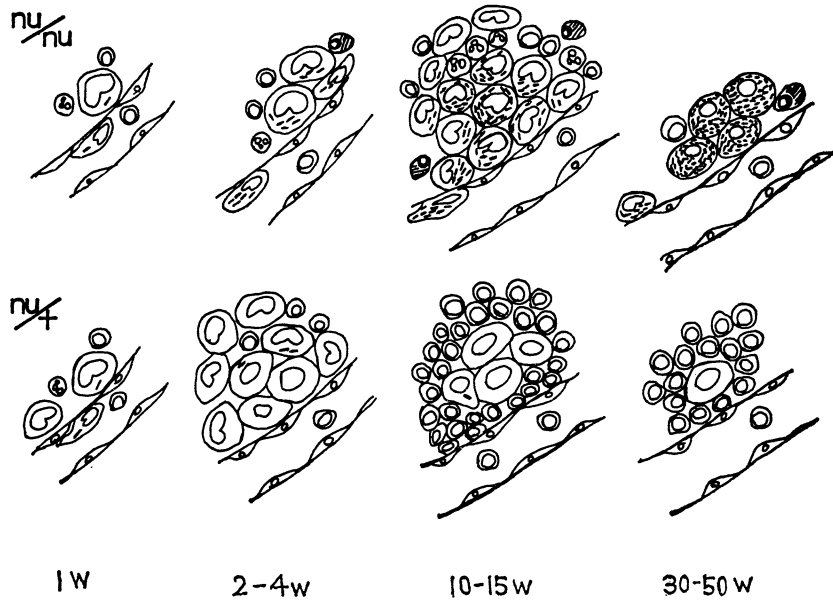
Fig. 6. Granulomas in the Liver of a Nude Mouse 15 Weeks after Infection with BCG (10^6)



染に対して抵抗性を示す場合があることが知られている。そこで弱毒結核菌 BCG の感染について検討した。

ヌードおよびヘテロマウスに BCG (日本株) 10^6 v. u. を静脈接種後50週まで臨床症状および臓器内菌量を調べると、臨床的にはヌードマウスも長期間何ら異常を示さず経過したが、感染6カ月以降徐々に消瘦、歩行異常を呈し、更に斜頸、回轉運動を示し約50週までに死亡した。主要臓器の菌量は、肝、脾では高い値を保ち続け、著しい増減がみられなかつたが、腎、肺では菌量が徐々に増加し続けた。接種菌量を 10^5 v. u. にすると肝、脾で

も菌増殖がみられ、12週以降に菌量がプラトーに達した。組織学的に検索すると、肝および脾、リンパ節、骨髄などの網内系臓器ではヌードマウスでも肉芽腫の形成がみられ(図6)、この肉芽腫内には菌が多く、感染末期には菌を充満したマクロファージのみの小集簇が目立つようになることが認められた(図7)。一方腎、肺では病変は末期になるほど著明になり、多少とも滲出・壊死性変化を伴う菌の多い病変が出現した。更に皮下織あるいは骨膜にも病巣が形成され、内耳、脳膜あるいは脳実質にも病変を認めるものがあり、後者の病変が、感染末期に

Fig. 7. A scheme of Development of Lesion by BCG (10⁶) in the Liver of Nudes

みられた異常運動など¹⁰⁾の原因と推察された。

以上、ヌードマウスの BCG 感染では、肝およびリンパ細網性臓器ではある程度菌の増殖、病変の拡大を抑えるが菌を排除することはなく、肺、腎、結合織などでは菌増殖が続き結局は致死的になるものと思われた¹³⁾。

まとめ

複雑な宿主寄生体関係を呈する結核症の宿主側要因の解析の手段として、特殊な実験動物を利用する試みを行なった。

一つは常在細菌叢が結核感染に与える影響を無菌マウスを用いて調べ、常在菌叢が宿主の抵抗性に影響を与えること、これは常在菌叢からの刺激が特異的感作リンパ球の誘導の段階に影響することに基づく免疫学的機序を介する現象であることを示した。

もう一つは、結核感染に対する宿主の抵抗における胸腺の役割についてヌードマウスを用いて検討し、ヌードマウスは強毒株の感染により敗血症を呈すること、T細胞移入により抵抗性の回復、類上皮細胞結節の形成をみることに、更に BCG 感染においても菌の排除が起らず致死感染になることなどを観察し、結核感染における宿主の抵抗性に T細胞が必須の要因であることを確認した。

微生物学的規制あるいは遺伝学的規制の行なわれた実験動物の利用が、結核の感染機構の解析に有用であり、時には必須であることを強調したい。

おわりに

どちらの研究についても機序の解析については糸口がつかめた段階であり、今後も引き続き努力する必要があることを痛感する。

終りに当り、特別講演の機会をお与え下さいました会長五味二郎先生ならびに理事会の諸先生、および座長の労をお取り下さいました岩井和郎先生に厚くお礼申し上げます。

なお、この研究は、私が昭和44年に国立公衆衛生院に参りましてから、同僚の山崎省二博士との協同行なわれたものであることを付記し、この一連の研究にオリエンテーションを与えられ、終始強力にご指導ご援助を頂きました国立公衆衛生院長染谷四郎先生に深謝致します。

参考文献

(結核に関する主要論文に止めた)

- 1) Dubos, R. J. and Schaedler, R. W.: J. Exp. Med., 111 : 407, 1960.
- 2) 宮川正澄: 結核, 37 : 332, 1962.
- 3) 上田雄幹: 結核, 48 : 1, 1973.
- 4) Ueda, K., Yamazaki, S. and Someya, S.: J. RES., 12 : 545, 1972.
- 5) Ueda, K., Yamazaki, S. and Someya, S.: Jap. J. Microbiol., 17 : 533, 1973.
- 6) Ueda, K., Yamazaki, S. and Someya, S.: J. RES., 18 : 107, 1975.
- 7) Takeya, K., Mori, R., Nomoto, K. and Nakayama,

- H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 469, 1967.
- 8) Collins, F. M., Congdon, C. C. and Morrison, N. E.: Inf. Immunity, 11 : 57, 1975.
- 9) North, R. J.: Inf. Immunity, 10 : 66, 1974.
- 10) Ueda, K., Yamazaki, S. and Someya, S.: J. RES., 19 : 77, 1976.
- 11) Ueda, K. et al.: Jap. J. Exp. Med., in press.
- 12) Ueda, K. et al.: Jap. J. Tuberc. Chest Dis., in press.
- 13) 上田他: 日米医学協力計画報告書, 1976.