

## 総 説

## ヌードマウスにおける抗酸菌感染

上 田 雄 幹

東京大学医科学研究所獣医学研究部

受付 昭和 54 年 6 月 22 日

## MYCOBACTERIAL INFECTIONS IN NUDE MICE

Katsumoto UEDA\*

(Received for publication June 22, 1979)

T-cell-mediated and non T-cell-mediated granuloma formation and antibacterial resistance were examined using nude mice infected with mycobacteria.

Nude mice of BALB/c-background showed very low resistance to infections with a virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* as well as to infection with *M. avium* in comparison with euthymic heterozygous littermate mice. This was evidenced by a shorter survival time, higher bacterial count and lesser number of granulomas in nude mice than in heterozygotes.

A low level of antimycobacterial resistance, however, seems to be operative in the liver and lymphoreticular organs of nude mice. After the virulent *M. bovis*-infection, the reticuloendothelial organs fell to exudative-necrotic lesions later than the other organs. Growth of attenuated strain BCG was suppressed in the RES organs revealing plateau in contrast to progressive increase in the lung and kidney. Such antimycobacterial resistance was less pronounced in nude mice maintained under germ-free condition than flora-bearing nude mice suggesting floral organisms play a role probably via macrophage activity for the non T-cell-mediated resistance.

Whether or not a T-cell independent immunological mechanism plays any role in the development of granulomas in nude mice after BCG infection or injection of killed organisms was pursued using nude mice rendered immunosuppressive against T independent antigen, *Brucella abortus*, by multiple injections of cyclophosphamide. The nude mice received such treatment still produced granulomas comparable in number and size to non-suppressed nude mice, and the fact indicates no participation of antibody-mediated mechanisms in the formation.

The low level of resistance and granuloma formation of nude mice in mycobacterial infections could be recovered, although never reached to the level of the heterozygotes, by transplantation with the thymus or T-cell-containing lymphoid cell suspensions from heterozygotes. Transfusion of spleen cells from intact mice possessing major histocompatibility antigen of the same halotype as to recipient BCG-infected nude mice (H-2d) produced hepatic granulomas while spleen cells from H-2-incompatible ones lacked such activity, and it suggests an H-2 restricted cell-interaction is operative in the T-cell mediated granuloma formation. This kind of cell transfer method seems to provide a useful procedure to investigate cellular interactions undergoing granuloma formation.

\* From the Department of Animal Pathology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Shirogane-dai, Minato-ku, Tokyo 108 Japan.

## 1. はじめに

結核菌をはじめとする抗酸菌の感染に対する宿主の抵抗性には感作T細胞を介する免疫応答が極めて重要であることは胸腺摘出マウスを用いて明らかにされてきた。先天的胸腺欠損ヌートマウス(nu/nu マウス, nu 遺伝子が homozygous なもの)は、いわば遺伝的に胸腺摘出を行なったものであり, suppressor activity を含めてT細胞機能の著しい低下が明らかにされていて, 感染における免疫機構の関与の研究に好適の実験動物である。

現在までのところ, BALB/c 系 nu/nu マウスではT細胞機能があるという直接的証明はない。CBA-nu/nu マウスでは1つのみであるか報告があり<sup>1)</sup>, また, 母親(通常, 胸腺が正常のものを使う)からのT細胞の影響, 間接的な証拠に基づく成熟T細胞の存在の指摘<sup>2)</sup>はあるものの, ほはT細胞機能欠損動物とみてよいように思われ, 少なくとも, 初生時胸腺摘出マウスよりはT細胞機能低下の度合は強いようである。また, 胸腺摘出・X線照射・骨髄細胞移入マウスのような人工的処置を必要としない利点もある。一方, nu/nu マウスにもT前駆細胞はあること, natural killer cell, あるいはマクロファージ系の活性が高いことなど, おそらく一部はT細胞機能欠損に適応した変化も伴っていることは考慮しておく必要があろう。

nu/nu マウスはT細胞機能欠損動物として利用する場合, 得られた知見がT細胞以外の異常と関係があるかどうか, また, T細胞機能欠損に基づく別の機能異常を介する二次的なものによるかどうかなどの問題もあり, T細胞移入などによる再構成実験を行なう必要もある。更に今回使用した nu/nu マウスはBALB/c系に戻し交配を9~10代行なったものであるが, その後はクロスト・コロニーで生産されており, BALB/c系と完全に同一ではなく, 免疫細胞学的取扱いをする場合不十分な点は残っている。また, nu/nu マウスは wasting syndrome が起こりやすく, その取扱いは十分な微生物学的コントロール(いわゆるSPF動物の利用)のもとで行なう必要があることは周知の通りである。

以上のような特性を持つnu/nuマウスの使用は, 先天的免疫異常のモデル動物として重要であるばかりでなく, 免疫応答の中心的役割を果たすT細胞機能が欠損した動物での感染に対する抵抗性の研究, あるいは, 移植された細胞が排除され難いことを利用した細胞移入による細胞相互作用の研究などが可能で, 結核感染における抗菌免疫あるいは感染肉芽腫の成因の解明にも有用であると思われる。ヌートマウスにおける *Mycobacterium bovis* 強毒(Ravenel) および弱毒(BCG)株感染実験の要は本学会その他に発表してあるの<sup>3)~5)</sup>, 今回は, これらおよび *M. avium* Flamingo 株感染の結果を要約したのち,

肉芽腫の問題を中心として2,3の問題点を取り上げて行なつた実験をまとめて紹介し, 御批判を頂ければと思う。

## 2. 病原性が異なる3株の抗酸菌の感染

i) *M. bovis* Ravenel: Ravenel 株  $10^3 \sim 10^6$  v.u. の静脈内接種後血液および臓器内生菌数を追跡すると, nu/+ (nu 遺伝子が heterozygous な同腹のもの, 胸腺異常のない対照として使用される) マウスでは, 肝, 脾などの菌量は接種後やがて頭打ちになり, 肺, 腎などでのみ菌が増加するのに対し, nu/nu マウスではどの臓器でも増加の一途をたどつた。また, いずれの接種菌量でも nu/nu マウスは nu/+ マウスに比べて早く死亡し, 2~3 v.u. 接種でも nu/nu マウスは約7週で死亡したのに対し, nu/+ マウスは約30週以上生残した。死亡時には nu/+ マウスでは肺病変一早期に死亡する場合は滲出・壊死巣, 長期間後死亡する場合はひまん性組織球繁殖巣一が著明であるのに対し, nu/nu マウスでは肺病変は比較的軽度で, 肝, 脾, 心, 腎, あるいは結合織, 漿膜などに灰白壊死巣が多発していた。これらの nu/nu マウスの病巣の形成を経時的にみると, 肝, 脾, リンパ節などでは滲出・壊死巣になる前に菌を多数持ったマクロファージの小結節が出現していたが, 心, 肺, 腎, あるいは結合織では, かなり早期からすでに核破砕を伴う病巣で, 肝およびリンパ細網性臓器とそれ以外の臓器組織の間にはかなりはつきりした差がみられた。

ii) *M. bovis* BCG・BCG 日本株  $10^6 \sim 10^7$  v.u. を静脈接種して臓器内生菌数をみると, nu/+ マウスでは初期の僅かな菌増殖ののち徐々に減少するのに対し, nu/nu マウスでは菌は増殖を続けた。しかし, nu/nu マウスでも, 肝, 脾では12週ころから増加の速度が鈍りプラトー状を呈した。一方, 腎, 肺では徐々に増加し続け, 肝, 脾の菌量を越えるようになった。 $10^6$  v.u. 接種では約50週,  $10^7$  v.u. 接種では30週前後で全身衰弱, 歩様異常, 斜頸などを呈して死亡した。また, 骨, 関節に腫瘍, 皮下に丘疹をみることもあつた。これら死亡例あるいは長期感染後の病変の程度は, 肝, 脾, リンパ節などでは比較的軽度で, しはしば胞体が抗酸菌および黄褐色顆粒で膨満(storage phenomenon)したマクロファージ集簇の散在が主であつたが, その他の臓器や皮下織, 脂肪織, 骨膜などではマクロファージのひまん性繁殖からなる大型の病巣が生じた。抗酸菌は多く, 菌を富有する細胞もあるが, 上記網内系臓器にみられるような黄褐色顆粒はみられず, 細胞の外形も多型性であつた。また, しはしば核破砕や好中球の浸潤も伴い, 中・内耳などでは内腔に膿状滲出物がみられた。骨髄はリンパ細網性臓器の変化に類似していたが, 外骨膜の病変が著明な部位では骨

吸収により骨髄に病変が及び広範な肉芽腫性骨髄炎を呈していた。経時的にみると、肝、脾では10~12週ごろ少数の大型の肉芽腫が現れ、その後著しい拡大をみずに上記の末期の状態に移行した。Ravenel 株と異なり BCG では3 v.u. の微量静脈接種では35週まで観察したが感染は成立していなかった。

iii) *M. avium* Flamingo: *M. avium* のマウスに対する病原性は *M. bovis* と異なり非常にマウスの系統による差が大きい<sup>6)</sup>。BALB/c 系は中等度の性質と思われ大量菌静脈接種で進行性感染を起こす。Flamingo 株 (Sero-type avium II) を  $10^7 \sim 10^8$  v.u. 静脈接種すると nu/nu マウスでは緩慢ながら種々の臓器で増殖を続け、特に肝、脾の菌量が多く30~40週で死亡した。nu/+ マウスでは12週までは nu/nu マウスと同程度に菌が増加したが、その後肝、脾ではプラトーがみられ、腎、肺では増加を続け、接種60週ごろに肝、脾でも再び菌が増加し死亡した。死亡時の病変は nu/nu, nu/+ マウスともかなり類似しており、抗酸菌で充満し storage phenomenon を呈するマクロファージの集簇が結節状あるいはびまん性に各臓器にみられ、特に腸管などにも著明で反芻獣のバラ結核に類似した像を呈していた。経時的にみると、nu/nu マウスの病変は感染8週までは軽微で菌を貪食した細胞が主に肝、脾に散在するのみであるが、その後12週ごろ組織球肉芽腫が出現し、やがて storage phenomenon を示す癩腫型に似た結節に移行した。nu/+ マウスでは4週ですでに肝、脾に組織球性肉芽腫が多発し、この状態が長期間続いたが、腎、肺、腸管、胸腺などではマクロファージのびまん性繁殖が生じ、細胞内の菌が多くなり nu/nu マウスの病変に似た状態となつた。

以上の3株の抗酸菌による nu/nu マウスの感染をそれぞれの nu/+ マウスのそれと比較した場合、共通点は nu/nu マウスでは抵抗力が極めて弱く、弱毒株の BCG に対してさえもこれを排除しえないことで、胸腺の存在が肉芽腫の形成、菌増殖の抑制、弱毒株の場合は更に菌の消失に必須であることが知られる。これら3株はいずれも nu/+ マウスにおいても菌の増殖がみられるものであるが、いわゆる非病原性抗酸菌は nu/nu マウスでも増殖しえないといわれ、われわれも、抗酸菌ではないが、*Propionibacterium acnes* は nu/nu マウスでも全く増殖できないことをみており、本来マウスに病原性を欠く微生物は nu/nu マウスにも感染しないように思われる。ここで興味があるのはマウスの系統により感受性に著しい差のみられる *M. avium* の場合で、高い感受性の C57BL/6 と低い感受性の C3H/He とに戻し交配を重ねた nu/nu マウスが利用できるよになれば、感受性を、免疫による抵抗性と分離して追求することが可能になると

思われる。

### 3. ヌードマウスにみられる抵抗性

胸腺の存在に依存する免疫機構が抵抗性の発現に重要であることは、前章に記した実験結果から明らかである。しかし、上記の実験から同時に、nu/nu マウスでも、感作T細胞の関与しない抵抗性が、リンパ細網性臓器あるいは肝などの網内系に富む臓器では、ある程度発揮されていると考えられる所見が得られた。すなわち、Ravenel 感染の場合に滲出・壊死性病変に陥るのが肝、脾などでは他の臓器、組織に比べ遅れることが認められ、また、BCG 感染では肝、脾では菌数増加に頭打ちがみられ、病変もマクロファージ内に抗酸菌とともに菌の死滅に由来すると思われる黄褐色顆粒が充満し、病巣も拡大しないなどの所見は nu/nu マウスにおける抵抗性の表現と思われる。Ravenel 株では3 v.u. でも必ず感染死させたが BCG ではこの菌量では感染が成立しなかつたことも、nu/nu マウスの抵抗性を示すと思われる。

nu/nu マウスの網内系臓器にある程度みられる抵抗性が、腸内常在菌などからの刺激に基づく非特異的抗菌活性の上昇によるかどうかを無菌 (GF) nu/nu マウスを用いて調べた。

GF nu/nu マウスと、これまで使用してきた nu/nu

Table 1. Survival Time of GF and SPF Nude Mice after i. v. Infection with Strain Ravenel

Dose	GF		SPF	
	No. mice	Mean(days) ±S.D.	No. mice	Mean(days) ±S.D.
$1.4 \times 10^3$	8	36.5 ± 2.6	11	45.4 ± 2.8
$2.0 \times 10^2$	5	28.6 ± 1.1	5	38.6 ± 3.1
$9.0 \times 10^3$	7	21.7 ± 2.4	7	29.3 ± 3.7

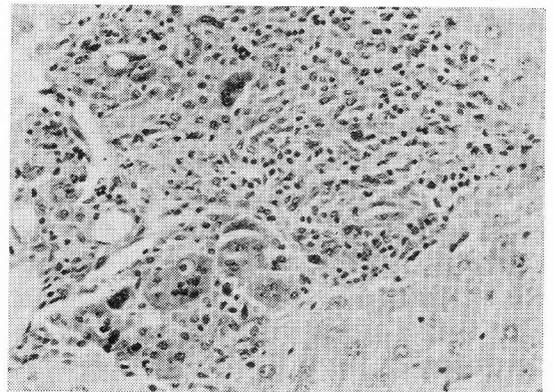


Fig. 1. A large non-epithelioid cell granuloma in the liver of a GF nude mouse. 45 weeks after i.v. infection with BCG. Multinucleated giant cells harbour many bacilli. Ziehl-Neelsen staining.

マウス（以下 SPF nu/nu マウスとよぶ）について Ravenel 株  $10^1 \sim 10^3$  を静脈接種し生存期間を調べると、僅かの差であるが GF nu/nu マウスが早く死亡した（表 1）。また、感染後一定時期の肝、肺の生菌数をみると有意に GF nu/nu マウスの方が高かった。死亡時の病変は両者似ていたが、GF nu/nu マウスが死亡しはじめる時期で病変を比較すると GF nu/nu マウスでは肝、脾の肉芽腫はより貧弱であり、その他の臓器でも壊死の傾向がより強かった。GF nu/nu マウスに BCG 1G<sup>6</sup> v.u. を静脈接種すると 30~45 週で SPF nu/nu マウスと同様全身衰弱で死亡し、同じ菌量では約 50 週で死亡した SPF nu/nu マウスより生存期間が短いと思われた。また、肝の肉芽腫が進行性で大型のものが末期にはかなり多数みられた（図 1）。

以上の GF nu/nu マウスを用いた結果は、腸内常在菌などによる非特異的刺激によつて nu/nu マウスでも僅かながら抵抗性を示すことを意味していると思われる。その抵抗性は主にマクロファージの機能によると思われるが、現在また推測の域を出ていない。

これに関連して、われわれはこれまでに、ICR マウス（Swiss Webster 系 outbred マウス、胸腺は正常）を用い GF マウスがフローラを持つた SPF マウスよりも結核菌の感染に対する抵抗性が低いこと<sup>7)</sup>、その機序の 1 つとして、GF マウスでは遅延型アレルギーの発現が弱く<sup>8)</sup>、それは感作 T 細胞の産生が SPF マウスよりも遅れるためであることを指摘してきた<sup>9)</sup>。今回の実験結果とあわせて考察すると、胸腺を持つたマウスでも無菌環境で飼育された場合はマクロファージの抗原処理の活性が低く、そのため二次的に感作 T 細胞の十分な産生を遅らせている可能性が大きく浮かび上がってきたように思われる。なお、GF nu/+ マウスと SPF nu/+ マウスに Ravenel 株  $10^4$  v.u. を静脈接種したところ、ICR マウス系ほど著しくはないが、やはり、GF マウスが早期に死亡した。

#### 4. ヌードマウスにおける肝肉芽腫の成因

上述のように nu/nu マウスに抗酸菌を静脈接種した場合、肉芽腫の発現状態が nu/+ マウスに比べ非常に異なる。肉芽腫の観察が容易な肝で調べると、いずれの抗酸菌でも nu/+ マウスでは組織球・類上皮細胞性の小肉芽腫が 2~4 週で出現したが、nu/nu マウスではこの時期には肉芽腫は非常に少なく、菌を貪食した細胞が孤立し、周囲にほとんど細胞反応を伴わない病巣（仮に無細胞反応感染巣とよぶ）が多いのが特徴であった。しかし、nu/nu マウスでも時期は遅れ、また、数も少ないがマクロファージを主とした細胞集簇がいずれの抗酸菌によつても出現した。Ravenel 株の少量菌を接種し死亡までの期間を長びかせると菌を富有するマクロファージの

結節がみられ、これがやがて滲出・壊死巣に変わることがみられ、BCG 接種では多少とも滲出・壊死性変化を伴う大型の肉芽腫が出現した。また *M. avium* の場合にもマクロファージの小結節が遅れて出現し、のちには膿腫様病巣となつた。これらの nu/nu マウスに出現する肉芽腫は、細胞内の菌が多いこと、マクロファージの輪郭が比較的明瞭で、やや粗な細胞集簇であることなどが nu/+ マウスにみられるものとは組織学的にみて異なる点であった。また、Ravenel および *M. avium* による nu/nu マウスの肝の肉芽腫ではリンパ球浸潤は極めて乏しかつた。

これらの nu/nu マウスにみられる肉芽腫の成因には感作 T 細胞の関与は考え難い。しかし、B 細胞が lymphokine を出すことが知られており<sup>10,11)</sup>、また、T-independent な抗原に対する抗体は nu/nu マウスでも産生されるので、抗原抗体複合体による肉芽腫<sup>12)</sup>である可能性も考えられ免疫機構の関与の有無については更に検討を要する。これらの可能性のうち、B 細胞による lymphokine 産生が関与しているかどうかについては、その産生には T 細胞の存在を必要とすることがモルモットで報告<sup>13)</sup>されており、nu/nu マウスではパラフィン浮遊結核死菌感作や BCG 感染によつては遅延型足蹠反応も、腹腔滲出細胞の MIF 産生もみられていないので<sup>14)</sup>、その可能性は少ないように思われる。

しかし、BCG による肉芽腫では、nu/nu マウスでも多少リンパ球あるいは形質細胞が肉芽腫周辺に浸潤しているのがみられ、それらリンパ様細胞がどのような機能を持つているのかは全くわかっていないが、何らかの免疫学的機序が肉芽腫形成に働いている可能性は否定しきれない。この点を明らかにする目的で、2, 3 の実験を行なつた。BCG 接種 nu/nu マウスの肝の凍結切片について、FITC 標識抗マウス IgG ウサギ抗体と反応させてみるとマクロファージに特異蛍光がみられた。このようなマクロファージの特異蛍光は nu/+ マウスの肉芽腫には認められなかつたので、その意義は不明であり、抗結核菌抗体かどうかも現在のところ不明であるが、少なくとも nu/nu マウスにみられる BCG による肉芽腫が nu/+ マウスのものとは異なつた性格を持つことを示す事実と考えられる。

次に、BCG その他の菌により nu/nu マウスに出現する肉芽腫形成に T-independent 抗原に対して産生される抗体が関与しているかどうかについて 2, 3 実験を行なつた。

nu/nu マウスは T-independent 抗原である *Brucella abortus* 死菌を注射するとよく凝集抗体を産生する。サイクロフォスファミド (CY) を抗原投与前 2 日、次いで週 2 回 50 mg/kg を注射し続けると凝集抗体の産生が抑えられ、ブースター注射を行なつても CY 投与を続けて

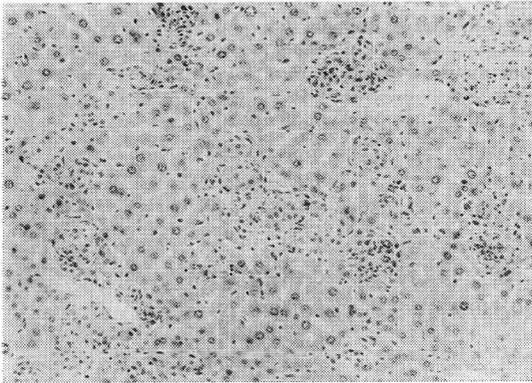


Fig. 2. Numerous granulomas appeared in the liver of a nude mouse which received multiple injections of cyclophosphamide and cortison acetate after i.v. infection with BCG. 6 weeks after infection. Hematoxylin-eosin staining.

いる間は抗体は検出されなかつた。このような CY 処置をした nu/nu マウスで BCG 静脈接種後 10~12 週後の肝を調べると、CY 無処置のものと同様に肉芽腫がみられた。更に、上記 CY 処置に加えて BCG 接種と同時にコルチゾン (hydrocortisone acetate) 2.5 mg を皮下注射し、以後毎週コルチゾン注射を続けた nu/nu マウスでは、肝に菌を富有了したマクロファージを主体とする肉芽腫が発生し、滲出性変化を伴うものが多かつたが、かえつて肉芽腫がよく発現し(図2)、この場合には菌の著しい増殖がみられた。

これらの知見は、上記のような免疫抑制処置をしない nu/nu マウスでも、ほとんど血清抗体が検出されないこととあわせて考えると、nu/nu マウスでみられる肉芽腫の形成は抗体の関与なしでも起こりうることを示しているように思われる。

大量の抗酸菌死菌を静脈内注射し約 1~2 週後に肝に出現する組織球性肉芽腫は nu/nu マウスでも nu/+ マウスと同様多数出現する。同様の肉芽腫は前述した *P. acnes* 死菌の静脈あるいは腹腔内注射によつてもできる。この *P. acnes* による肉芽腫について行なつた実験では、nu/nu マウスに生下時から隔日に抗マウス IgM を注射して B 細胞の分化を抑える isotype suppression<sup>15)</sup> を起こさせたものでも非処置 nu/nu マウスとほぼ同数の肉芽腫が出現することをみており、抗酸菌死菌による肉芽腫も免疫反応の関与なしにできる可能性があると思われる。更にいわゆる異物肉芽腫が nu/nu マウスでも出現することは、組織乳剤を足蹠皮内に注射した場合にも認められた<sup>16)</sup>。

以上、断片的な実験であるが、nu/nu マウスに出現する肉芽腫の成因には免疫反応の関与は少ないことが示唆された。おそらくその成因には、菌体成分あるいは代謝

Table 2. Effect of Thymus-grafting on Survival Time after i.v. Infection with Strain Ravenel

Exp. (dose)	Mice	No. mice	Mean(days) ± S.D.
1. ( $2.3 \times 10^4$ )	nu/nu grafted at subcutis	7	27.3 ± 8.1
	nu/nu	6	17.8 ± 2.0
	nu/+	6	95.8 ± 7.6
2. ( $1.0 \times 10^3$ )	nu/nu grafted under renal capsule	6	109.2 ± 24.8
	nu/nu	7	41.0 ± 15.3
	nu/+	3	211.3 ± 24.2

産物が直接あるいは宿主成分と反応し、特に補体の alternative pathway による活性化を介してマクロファージの chemotaxis を誘起する機序<sup>17)</sup> が大きいのではないかと推察される。

### 5. T細胞による抵抗性の回復

第1章で述べたように、nu/nu マウスと nu/+ マウスの差が胸腺の有無に基づくものであることは再構成実験により確かめる必要がある。この点は主に Ravenel 株を用いて調べた<sup>18)</sup>。BCG および *M. avium* については肉芽腫形成に関連して行なつたので後述する。

4 週齢の nu/nu マウスに生後 1~2 日齢の nu/+ マウスの胸腺を腋窩部皮下あるいは腎包膜下に移植し、移植後 4 週で Ravenel 株静脈接種を行なつた。表 2 に示すように胸腺移植により死亡までの日数はやや延びたが nu/+ マウスよりはかなり早く死亡した。胸腺移植が nu/+ マウスと同程度まで抵抗性を回復できなかつたことについては種々の理由が考えられるが、最も重要と思われるのは移植胸腺の大きさが intact の胸腺ほど大きくなつていないこと、また、移植胸腺にも菌が侵入増殖し末期には胸腺自身が破壊されてしまうことなどである。この知見は長期間菌が増殖し続ける結核菌に対する抵抗性発現には、かなり多数の T細胞の持続的供給が必要であることを考えさせる。これと関連した知見は、nu/+ マウスの *M. avium* 感染では、感染後数週を経てから胸腺摘出を行なつても生存期間が短くなることで、T細胞 depletion の効果の少ない成熟動物の胸腺摘出でも、長期間を経たのちには摘出の影響がみられるようになるというこれまでの報告<sup>19)</sup>ともあわせて考えると、T細胞にも Hayflick 数で知られる分裂回数の制限があり、これと関連した現象であることかも知れない。

胸腺細胞の移入によつても、nu/nu マウスの抵抗性はある程度しか回復しなかつた。この場合には移入細胞数が限られるため、その作用が胸腺移植よりも更に低くしか現れないのはやむをえないと思われる。

細胞移入による抵抗力の再構成はまた、菌接種後一定

Table 3. Effect of Lymphoid Cell Transfer on Viable Counts in the Lung of nu/nu Mice after i. v. Infection with Strain Ravenel

Exp. (dose)	Cells transferred (number per mouse)	Viable counts*(log ± S.D.)
1. ( $4.6 \times 10^4$ )	Normal spleen cells ( $8.4 \times 10^7$ )	7.32 ± 0.20**
	Immune spleen cells ( $8.4 \times 10^7$ )	6.87 ± 0.29**
	Normal PE cells ( $1.0 \times 10^7$ )	7.87 ± 0.22
	Immune PE cells ( $1.0 \times 10^7$ )	7.35 ± 0.25**
	No cell, nu/nu	7.70
	No cell, nu/+	6.23 ± 0.17**
2. ( $1.0 \times 10^4$ )	Bone marrow cells ( $6.0 \times 10^7$ )	6.67 ± 0.23
	No cell, nu/nu	6.83 ± 0.15
	No cell, nu/+	6.20 ± 0.25**

\* Exp.1, 21 days after infection

Exp.2, 17 days after infection

\*\* p&lt;0.01 against no cell, nu/nu

時期 (多くは nu/nu マウスが死亡する直前) の肝および肺の生菌数についても比較し, 胸腺細胞, 免疫 (パラフィン浮遊死菌) および非免疫脾細胞, 免疫腹腔腔滲出細胞では有意に臓器内生菌数が対照 nu/nu マウスより少なく, T 細胞を含む場合に有効であることを認めた (表 3)。また, これらの再構成群の病変は, 結節中の抗酸菌は nu/+ マウスのものより多い傾向があるが組織球・類上皮細胞肉芽腫ができており, 死亡例では nu/+ マウスと同様肺病変が著明であつた。

以上の実験では抵抗性の回復には T 細胞が関与することが推定されるだけで, T 細胞の subpopulation, helper T 細胞により活性化された B 細胞とその抗体などの関与についての解析は今後に残された問題である。

## 6. T 細胞移入による感染肉芽腫の成立

マウスは類上皮細胞が典型的な組織形態を示すことが少なく乾酪化も現れ難い動物であるために結核性肉芽腫の研究には適当でない面がある。しかし, 感染肉芽腫が, 単核食細胞が“病巣”に集積することにより成立するもので, 免疫反応によるその修飾を問題にする場合, 細胞免疫学的知見が豊富で, かつ, 多くの近交系を利用しうるマウスがより有利な面もある。nu/nu マウスでは nu/+ マウスに比べ組織球・類上皮細胞性肉芽腫が乏しいことから, nu/+ マウスにおける免疫反応がこの肉芽腫の出現には重要であることは明らかである。この点については, BCG あるいは *M. avium* 静脈接種後 nu/nu マウスの肝では感染後数週にわたって無細胞反応感染巣が多くみられるので細胞移入による肉芽腫発現の観察に好適である。

*M. avium* Flamingo 株  $10^7$  v.u. を静脈接種すると, nu/+ マウスでは 4 週以降肝に小肉芽腫が多発するが nu/nu マウスではほとんど出現しない。nu/+ マウスの胸腺細胞  $10^7$  を静脈注射し, 翌日に *M. avium* を接種し

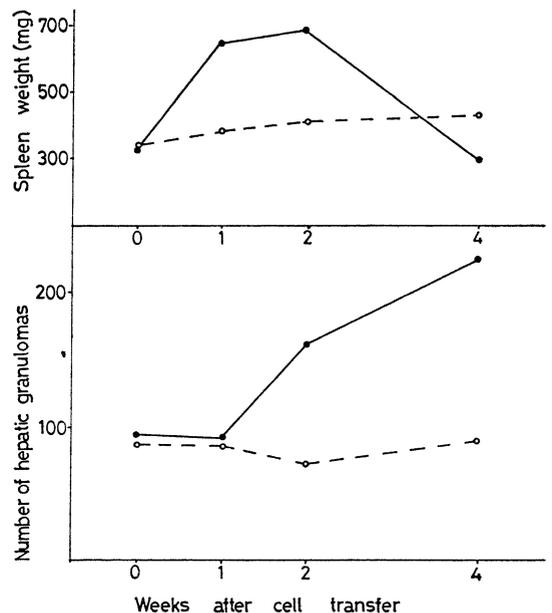


Fig. 3. Time course of splenic swelling and hepatic granuloma formation in BCG-infected nude mice following transfusion of spleen cells from intact heterozygotes.  $10^8$  spleen cells were transfused i. v. at 10 weeks after i. v. infection with  $10^7$  BCG.

た nu/nu マウスでは感染 4 週で nu/+ マウスに匹敵するほどの数の肉芽腫がみられた。この知見は nu/+ マウスの肝にみられる早期の肉芽腫形成に T 細胞が関与していることを示すものである。

感染肉芽腫の成立機序は, 侵入した結核菌がやがてマクロファージに取り込まれ, これがリンパ細網性臓器で T 細胞を活性化し感作 T 細胞が産生され (induction), この感作 T 細胞が感染巣にある菌を貪食したマクロファージと反応して (expression), 単球-マクロファージ系細胞の集簇を作ると一般に考えられている<sup>20)</sup>。この経過

Table 4. Number of Hepatic Granulomas after Allogeneic Cell Transfer\*

Spleen cell donor		H-2 halotype	Number of granulomas**		
			25~100 $\mu$ m	>100 $\mu$ m	Total
BCG-infected nudes	nu/+	d	43	1	44
			88	4	92
			138	13	151
			147	6	153
	C 3 H/He	k	21	8	29
			35	10	35
			34	20	54
			53	8	61
	DBA/2	d	8	3	11
			37	2	39
			199	10	209
			240	21	261
	No cell	•	14	6	20
			13	18	31
20			13	33	
14			55	69	
Intact nudes	nu/+	d	23	0	23
			58	0	58
	C 3 H/He	k	1	0	1
			2	0	2
	DBA/2	d	24	0	24
			100	0	100
	No cell	•	0	0	0
			1	0	1

\*  $4 \times 10^7$  cells were transferred i. v. at 5 weeks after i. v. infection with  $10^8$  BCG, and mice were killed 4 weeks after cell transfer. Intact nude mice were served for control.

\*\* Counted on 40 fields at  $\times 400$  magnification.

中の一連の細胞相互作用, 特にマクロファージとリンパ球およびリンパ球 subpopulation 間の反応は *in vitro* の実験系の利用により多くの知見が得られてきているが, 肉芽腫成立の機序の場合には最終的には *in vivo* での実験が重要である。

nu/nu マウスに BCG を静脈接種すると, 前述のように菌を貪食したマクロファージがリンパ細網性臓器と肝に多く出現する。このような状態のマウスに nu/+ マウスの脾細胞を移入することにより, 感作リンパ球の induction と, これに続いて肝などではその expression としての肉芽腫形成がみられることが予想される。そこで, BCG  $10^7$  v.u. を静脈接種し10週後の nu/nu マウスに nu/+ マウスの脾細胞 $10^8$  を静脈注射し, 経時的に脾重量と肝の肉芽腫を調べた(図3)。脾は細胞移入後約1週で著しく腫大し, これはリンパ球の著明な増生によることが認められた。肝には脾腫のピークが過ぎた4週後に肉芽腫が多発した。これは脾あるいはリンパ節で産生された感作リンパ球が肝に到達し, そこで細胞免疫の

expression としての肉芽腫が形成されたものと考えられる。新しい肉芽腫は, 無細胞反応感染巣に主に出現するようで, 菌を持った孤在する食細胞はほとんどみられなくなっていたが, 前に記したT細胞非依存性の大型肉芽腫の周囲にはさほど多数のマクロファージ, リンパ球の新たな集積はみられなかった。大型結節では比較的中心部にある菌を持ったマクロファージと感作リンパ球との接触が充分行なわれないのか, あるいは, 蛍光抗体法により証明された結節のマクロファージの Ig などにより immunological enhancement に類した阻止作用が働いたのかなどの理由が考えられる。

移入脾細胞中の活性を示した細胞は抗  $\theta$  血清と補体処理で活性を失うことからおそらく T細胞である。種々の系統のマウス脾細胞を移入し調べると, 表4に1例を示すように, BALB/c と同じハプロタイプ的主要組織適合遺伝子座 (MHC, マウスでは H-2) を持つ, DBA/2, B10D<sub>2</sub>/n の脾細胞移入によりやはり肉芽腫ができたが, ハプロタイプの異なる C3H/He, DDD, B10, B10BR で

はみられなかつたので、菌貪食マクロファージと移入された脾細胞との間の細胞間相互作用に依存する現象で、T細胞の認識機構が関与していることが示唆された。この方法は今後細胞間相互作用と、肉芽腫および抗菌活性との関係を検討するよい素材になりうるように思われる。

## 7. おわりに

以上、結核菌を中心とした抗酸菌感染についてヌードマウスを利用したわれわれの実験を紹介した。結核症は、臨床あるいは公衆衛生上現在でも最も重要な細菌感染症の1つであるが、それと同時に、単核貪食細胞内で菌が増殖する通性細胞内寄生菌による感染の代表的なものであり、“細胞免疫”研究の prototype となつたものである。結核症の示す複雑な感染経過、病理像および免疫学的変化は宿主・寄生体関係を取り扱う基礎医学、比較生物学の観点からも、極めて難解であるがそれゆえにまた研究意欲をそそる対象であると感じる。

## 謝 辞

この研究は国立公衆衛生院山崎省二博士、染谷四郎院長との協同研究であることを付記し、SPF動物実験室で動物飼育、実験補助に当たつた高本、上村両氏に深謝します。また無菌ヌードマウスの作出、供給について医科研動物センター鈴木潔博士、須藤カツ子技官ならひに小林、堀井両氏に謝意を表します。

## 文 献

(著者ら自身のもの以外の原著は主要なものにとどめた。)

- 1) KIROV, S M.: Eur. J. Immunol, 4:739, 1974.
- 2) Rudnicka, W. et al.: Eur. J. Immunol., 8:531, 1978.
- 3) 上田雄幹: Kekkaku, 52 533, 1977.
- 4) Ueda, K. et al.: J. J. Exp. Med., 47:467, 1977.
- 5) Ueda, K. et al.: J. J. Exp. Med, 48:533, 1978.
- 6) 後藤他: 第87回日本獣医学会, 1979
- 7) Ueda, K. et al.: J. RES, 12 545, 1972
- 8) Ueda, K. et al.: J. J. Microbiol, 17:533, 1973.
- 9) Ueda, K. et al.: J. RES., 18:107, 1975.
- 10) Yoshida, T. et al.: J. Exp. Med., 138:784, 1973.
- 11) Sugane, K. et al.: J. J. Exp. Med., 45 19, 1975.
- 12) Spector, W.G. and Heeson, N.: J. Pathol, 98:31, 1969.
- 13) Bloom, B.R. and Shevach, E.: J. Exp. Med., 142: 4306, 1975.
- 14) Ueda, K. et al.: J. RES., 19:77, 1976.
- 15) Manning, D.D.: J. RES., 18 63, 1975.
- 16) Ueda, K. et al.: J. J. Exp Med., 48:269, 1978.
- 17) Schorlemmer, H U. et al.: Immunology, 32 929, 1977.
- 18) Ueda, K. et al.: J. J. Tuberc. Chest Dis, 21.15, 1978.
- 19) Miller, J F.A.P. and Osoba, D.: Physiol. Rev., 47: 437, 1967.
- 20) Mackaness, G B. in Immunobiology, p.45, Sinauer Ass., Stanford, 1971.