

## 原 著

*M. intracellulare* 感染症の実験的研究 (2)

マウス系統間にみられる感受性差

後藤 義孝・高橋 宏・徳永 徹

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 57 年 4 月 30 日

STRAIN DIFFERENCE OF MOUSE TO *M. INTRACELLULARE* INFECTION

Yoshitaka GOTO,\* Hiroshi TAKAHASHI and Tohru TOKUNAGA

(Received for publication April 30, 1982)

A comparison was made on the susceptibility of 9 strains of mice against infection with 2 virulent strains of *M. intracellulare*. C57BL/6, BALB/c and CF<sub>1</sub> mice were found to be susceptible; number of colony-formers increased in the livers and the spleens of these mice when inoculated with 10<sup>7</sup> viable bacilli intravenously. Histopathologically a large number of granulomas appeared in the livers and the spleens of mice when tested on the 21st day after infection. Other 6 strains of mice (A/J, ASW, CBA, C3H/He, DBA/2 and ddY) were resistant; number of colony-formers did not increase in the livers and the spleens, and only small numbers of granulomas could be detected at the 21st day after infection. From these results, it was thought that the different susceptibilities in different mouse strains were controlled genetically by non-H-2 linked gene(s), because mice with the same H-2 haplotype, BALB/c and DBA/2, showed different susceptibility to *M. intracellulare*.

C57BL/6 mice were susceptible against low virulent *M. intracellulare*; number of colony-formers in the spleens and the lungs decreased once 3 weeks after infection, and then continued to increase till 45 weeks of observation period. Severe granulomatous lesions appeared in the livers, the spleens and the lungs at the later stage of infection.

## 序 論

非定型抗酸菌症(AM 症)の研究には適当な *in vivo* 実験系が必要である。今までに種々な抗酸菌とマウスを用いた感染実験が報告されている<sup>1)~4)</sup>が、*M. intracellulare* とマウスの組み合わせによる AM 症実験モデル作成は困難であると指摘されている<sup>2)</sup>。その理由としては、*M. intracellulare* が一般に毒力が弱いうえに、人工培地による培養で集落変異を起し、容易に毒力の低下を来す<sup>3)</sup>ことが挙げられよう。この点については前報告<sup>6)</sup>において、Tween 加卵培地に継代することにより毒力低

下を防止しうることを示した。しかしこの他に、従来宿主側の遺伝的な感受性の差についての考慮がなされないこともその一因として挙げるべきであろう。抗酸菌の感染に対するマウスの系統図の感受性の差については、人型結核菌<sup>7)</sup>、BCG<sup>8)9)</sup>、そらい菌<sup>10)11)</sup>を用いた感染実験でよく知られている。そこで我々は *M. intracellulare* に対し、高感受性を示すマウスの検索を試みた。我々はさきに AM 症患者から分離された *M. intracellulare* が CF<sub>1</sub> マウスの脾臓で増加することを報告した<sup>6)</sup>。今回はそのうち 2 株を用いて 7 系統の近交系マウスと CF<sub>1</sub> マウスを含む 2 系統の雑系マウス感に染させ、臓器内生菌還元

\* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiyosaki, Shinagawa-ku, Tokyo-141 Japan.

培養と病理組織学的検索により感受性の違いを比較した。

### I. 材料・方法

マウス：6週ないし8週齢の近交系ならびに雑系の雌マウスを用いた。A/J, ASW と CF<sub>1</sub> は自家繁殖のもの、BALB/c, C57BL/6, C3H/He, DBA/2 および ddY は静岡実験動物より、また CBA は大村実験動物より購入、実験に供した。飼料は固型飼料（船橋農場）を、水は水道水を与えた。

菌：AM 症患者より分離された *M. intracellulare* のうち Mino 株と Tanabe 株を用いた。Mino 株は小川培地で分離、培養したものを Tween 培地<sup>6)</sup>で 37°C、20 日間培養後感染実験に供した。Tanabe 株は小川培地で継代されたもの (Tanabe-O 株) とマウスを 2 回通過後 Tween 培地で分離培養したもの (Tanabe-M 株) を再度、前者は小川培地で、後者は Tween 培地でそれぞれ 37°C、20 日間培養後実験に供した。

感染・定量培養：各系統マウスの感受性を比較する短期感染実験には、Mino 株と Tanabe-M 株を用い、3 週間の観察を行なった。また慢性期の病変をみるため、長期感染実験には小川培地に継代して菌力が低下していると考えられる Tanabe-O 株を用い、45 週まで観察した。培養菌は滅菌蒸留水で菌浮遊液とし、1,000 回転 3 分間遠心後、その上清を適当希釈して接種液とした。接種液 0.2 ml ずつマウス尾静脈に接種した。短期感染実験の場合は、1~2×10<sup>7</sup>/匹を、長期感染の場合は 5×10<sup>6</sup>/匹を感染せしめた。この感染菌量は、接種液を 10 倍段階希釈して適当希釈を 0.1 ml ずつ Tween 培地に接種、

37°C、4 週間培養後形成された集落数より算定した。各系統のマウスの感受性は感染後 1 日と 21 日目の肝および脾内生菌数を測定することにより調べた。また長期感染実験では感染直後、3, 7, 12, 16, 45 週目に肝・脾および肺内の生菌数を調べた。雑菌汚染を避けて採取した臓器を重量測定後、一部をガラスホモジナイザーで磨碎し、10 倍量の滅菌蒸留水を加えて乳剤とした。さらに滅菌蒸留水で 10 倍段階希釈して各希釈液を 0.1 ml ずつ Tween 培地に接種した。37°C、4 週間培養後、形成された集落数から臓器あたりの菌数を算定した。

病理組織学的検索：培養の残りの臓器をリン酸緩衝食ホルマリン水で数日間固定後、水洗、脱水してパラフィン包埋とした。マイクロトームで 4 μm に薄切し、Hematoxylin-Eosin 染色を行なった。菌検索には Ziehl-Neelsen 染色を行なった。

### II. 成績

各系統マウスの Mino 株と Tanabe-M 株に対する感受性の比較

Mino 株と Tanabe-M 株を各系統のマウスにそれぞれ 1 匹当たり 1~2×10<sup>7</sup> 集落形成単位感染させた。感染後 1 日と 21 日目に肝および脾内の生菌数を測定し増加率を調べた(表 1)。Mino 株を感染させた場合(表 1 上段)、最も菌増加が著明であつたのは C57BL/6 と CF<sub>1</sub> マウスで、肝では 45 倍、脾では 90 倍に増加した。次いで BALB/c マウスが肝で 9.5 倍、脾で 66 倍に増加した。A/J, C3H/He, CBA, DBA/2, ddY の 5 系統のマウスでは肝・脾ともに菌の増加はほとんどみられなかつ

表 1 マウス系統間にみられた菌増殖の差

感染菌株	マウス系統	H-2タイプ	肝内生菌数		増加率	脾内生菌数		増加率
			1日	21日		1日	21日	
Mino	A/J	a	6.89 <sup>a</sup>	6.97±0.08 <sup>b</sup>	1.20 <sup>c</sup>	6.10 <sup>a</sup>	6.46±0.12 <sup>b</sup>	2.29 <sup>c</sup>
	C57BL/6	b	6.86	8.52±0.17	45.7	5.71	7.66±0.17	89.1
	BALB/c	d	6.90	7.88±0.10	9.56	5.87	7.69±0.09	66.1
	DBA/2	d	6.79	6.80±0.04	1.03	5.65	6.02±0.17	2.33
	CBA	k	6.81	7.02±0.14	1.62	5.67	5.82±0.09	1.41
	C3H/He	k	6.86	6.99±0.14	1.35	5.61	5.77±0.16	1.45
	CF <sub>1</sub>	不明	6.79	8.45±0.05	45.7	5.72	7.68±0.15	91.2
	ddY	不明	6.75	6.93±0.12	1.51	5.63	6.06±0.14	2.69
Tanabe-M	C57BL/6	b	7.30	8.17±0.10	7.40	6.10	7.75±0.12	44.6
	BALB/c	d	7.31	7.98±0.07	4.68	6.17	7.36±0.09	15.5
	C3H/He	k	7.22	7.05±0.18	0.68	6.11	5.81±0.05	0.50
	ASW	s	7.28	7.13±0.67	0.71	6.11	6.73±0.44	4.16
	CF <sub>1</sub>	不明	7.20	8.79±0.13	39.0	6.13	8.15±0.17	104.6
	ddY	不明	7.23	6.97±0.18	0.55	6.16	6.23±0.17	1.17

a : 2 匹の平均 (log 10)

b : 4 匹の平均 (log 10) ± S. D

c : 増加率 =  $\frac{21日目の生菌数(平均)}{1日目の生菌数(平均)}$

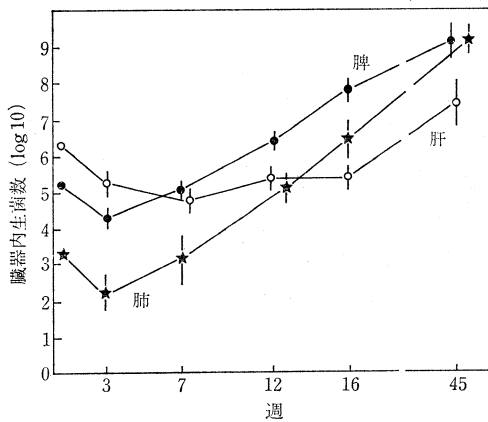


図1 臓器内生菌数の推移 Tanabe O株  $5 \times 10^6$  c.f.u./マウス i.v. 各点は4匹の平均、縦線はS.D.を示す。

た。

Tanabe-M株を感染させた場合(表1下段), CF<sub>1</sub>の肝で39倍, 脾で100倍以上の菌増殖がみられた。ASWは脾で4倍程度の菌増殖がみられたが肝では減少した。C3H/He, ddYは肝・脾ともに菌数は横ばいかむしろ減少した。これらの成績から CF<sub>1</sub>, C57BL/6, BALB/cの3系統が他の6系統に比べて感受性が高いことが知られた。

#### 長期感染実験

近交系マウスのなかで感受性の高い C57BL/6 に  $5.0 \times 10^6$  集落形成単位の Tanabe-O 株を感染させ, 感染直後, 3, 7, 12, 16, 45の各週に肝・脾および肺内の生菌数は感染後3週には感染直後の  $1/10$  の  $10^5$  に減少し, 以後16週までほぼ横ばいの菌数であったが, 45週では  $10^{7.5}$  に増加した。脾および肺も肝同様, 感染後3週目にはそれぞれ  $10^4$ ,  $10^2$  と感染直後の  $1/10$  の菌数に減少したが, 以後徐々に増加して45週目には脾・肺ともに  $10^9$  に達した。

#### 病理学的検索

感染後21日目の各系統のマウスの肝・脾ならびに長期間感染させた C57BL/6 マウスの肝・脾・肺について肉眼的および組織学的検索を行なった。

##### (1) 感染21日目のマウスの肝・脾所見

菌が著明に増殖した系統のマウスでは感染1日の同系統のマウスに比べ, CF<sub>1</sub>の肝で2.1倍, 脾で8.0倍に, C57BL/6では肝2.0倍, 脾6.7倍, BALB/cでは肝1.3倍, 脾3.6倍とそれぞれ腫大していた。これら3系統のマウスの病理組織所見はほぼ同様で, 肝では全葉にヘマトキシリンに淡染する大型核をもつマクロファージより成る径  $100 \sim 150 \mu\text{m}$  の肉芽腫が多数認められた(写真1, 2)。Ziehl-Neelsen染色では肉芽腫1個あたり数個の菌が証明された。

脾ではリンパ球およびマクロファージの増加に伴う濾胞の拡張や赤脾髄, 脾洞の拡張がみられた。濾胞内や濾胞辺縁帯にはマクロファージより成る肉芽腫が多数認められ, Ziehl-Neelsen染色で肉芽腫内に菌が証明された。

一方, 菌増殖の乏しかった残る6系統のマウスでは, 肝・脾の腫大はほとんどないかあつても軽度で, 病理組織所見でも肝・脾ともに肉芽腫数は少なかつた。肉芽腫の大きさは  $50 \sim 100 \mu\text{m}$  と小型で, 周囲にリンパ球浸潤を伴うものもあつた(写真3)。肉芽腫内に菌はほとんど認められなかつた。

##### (2) 長期感染マウスの病理所見

Tanabe-O株を C57BL/6 マウスに感染させ, 4匹は45週まで観察を続けたが死亡するものはなかつた。しかし45週目には4匹とも消瘦, 衰弱していた。また3匹の尾部に小豆大の結節が数個認められ, 結節の一部が壊死に陥っているものもあつた。

感染期間を通じて肝の肉眼的変化は明らかでなかつた。病理組織所見では, 感染後16週目までの個体では, 周囲にリンパ球浸潤を伴った大型の肉芽腫が少数認められただけであつたが, 感染後45週目の個体では肉芽腫が多数認められ内部に多数の菌が証明された。

脾は感染後12週で腫大が認められ,  $300 \sim 400 \text{mg}$  と正常マウスの3~4倍の重量を示した。以後菌数の増加に伴ってより腫大し, 重量も感染後45週には  $600 \sim 800 \text{mg}$  と増加した。感染後45週の個体では肉眼的に白色壊死斑が認められた。病理組織所見では, 感染後12週目の個体では濾胞内や濾胞辺縁帯に多数の肉芽腫がみられた。Ziehl-Neelsen染色ではびまん性繁殖像を呈したマクロファージ内に多数の菌が証明された。感染後45週目の個体にみられた白色壊死部は薄い結合織性の膜で包まれた abscess で, 膜の内側は中心の壊死組織を囲んで大型のマクロファージがみられ, 細胞内には菌が充満していた。

肺の肉眼的病変は感染12週以降の個体に認められた。全葉に粟粒大の灰白色結節が形成され, 16週, 45週と結節数は増加した。肺全体に硬度を増し, 特に45週目の個体では肺葉が完全に灰白色結節におきかわつていた。病理組織所見では感染後3週目の個体では病変が認められなかつたが, 7週目の個体では肺胞中隔にマクロファージとリンパ球から成る小集簇巣がみられた。12および16週目には肺胞中隔に大小の肉芽腫が散見され, 肺胞腔には大型のマクロファージが, また気管支血管周囲にはリンパ球が浸潤していた。45週目にはこれらの所見に加えて肺葉全体にマクロファージがびまん性に繁殖する像がみられ(写真4), Ziehl-Neelsen染色で細胞質内に多数の菌が認められた。

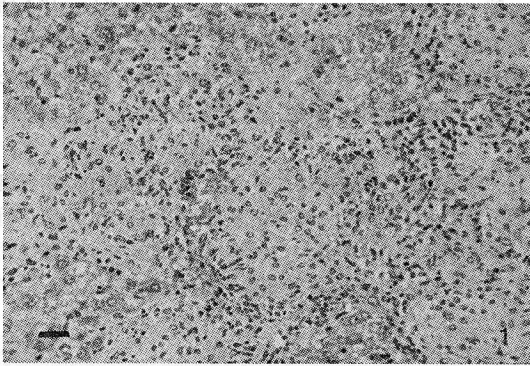


写真 1 C57BL/6 マウスの肝。感染後 3 週目。多数の肉芽腫形成を認める。H.E 染色 (写真中のスケールは 20  $\mu\text{m}$ )

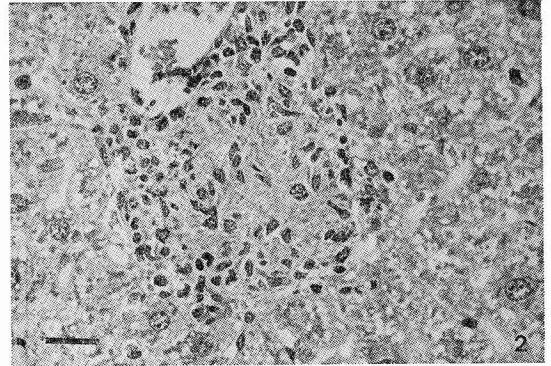


写真 2 マウスの肝。写真 1 の拡大図。

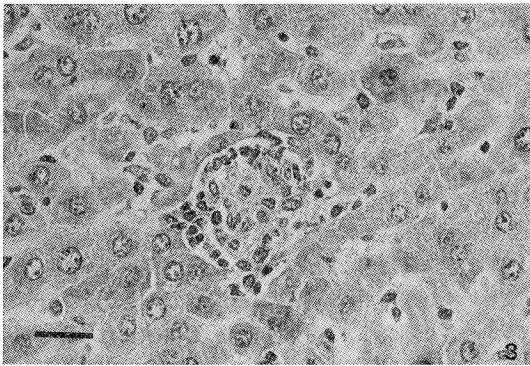


写真 3 CBA マウスの肝。感染 3 週目にみられた小型の肉芽腫。H.E. 染色 (写真 2 と同拡大)

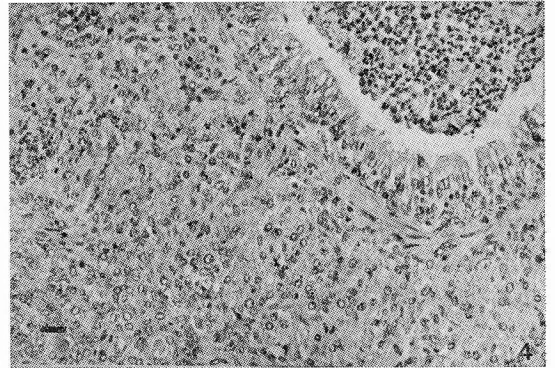


写真 4 C57BL/6 の肺。感染 45 週目。マクロファージのびまん性繁殖により肺胞腔は消失し無気となる。右上方の気管支腔には壊死細胞を含む炎症性滲出物が充満している。

### III. 考 察

AM 症の実験感染系の確立には、菌側の要因として宿主に対する病原性 (菌力) が挙げられるが、このことについて我々は AM 症患者由来の新鮮分離株は小川培地継代菌よりもマウスに対する菌力が強いこと、一度菌力の低下した菌でもマウスを通過させることによつて菌力を増強しうることを前に報告した<sup>9)</sup>。

一方、宿主側からすれば *M. intracellulare* に対する感受性の高いことが望まれる。人型結核菌をはじめ、BCG、そらい菌など抗酸菌に対するマウスの感受性は系統により著しい差があることが知られている<sup>7)-11)</sup>。そこで今回、我々は 7 種類の近交系と 2 種類の雑系、計 9 系統のマウスの *M. intracellulare* に対する感受性を調べた。その結果、近交系の C57BL/6、BALB/c と雑系の CF<sub>1</sub> マウスが高い感受性を示した。残る 6 系統のマウスでは、菌はほとんど増加しないか、むしろ減少するところから感受性は高くないと考えられる。この実験から高感受性マウスに菌力の強い *M. intracellulare* を大量 ( $10^7$ ) 静脈

感染させることによつて、3 週目にはこれらマウスの肝・脾で確実に菌が増殖し、病変を形成させうることが分かった。したがって短期間の実験系として利用しうるものと考えられる。

マウスの系統間にみられた *M. intracellulare* に対する感受性の差は、自然抵抗性と菌に対する特異免疫の成立発現という 2 つの要因の総和の差によるものと考えられる<sup>9)12)</sup>。最近、近交系マウスを用いて種々の病原微生物に対する感受性や免疫応答の遺伝的解析がすすめられており、それらがマウス主要組織適合性遺伝子領域によりコントロールされているという報告<sup>13)14)</sup>と、この遺伝子領域にはリンクしていない遺伝子によりコントロールされているという報告<sup>15)16)</sup>とがある。また本研究部において、BCG に対する低応答性マウスでは、BCG 特異的サブレッサー T 細胞が優位に出現しており、それをコントロールする遺伝子は H-2 にリンクしていないという知見が報告されている<sup>9)17)18)</sup>。Gros らによれば BCG に対する自然抵抗性は H-2 とは異なつた優性で常染色体上に位置した単一の遺伝子によりコントロールされている

という<sup>19)</sup>。今回の我々の実験では H-2 タイプが同じ d である BALB/c と DBA/2 が前者は感受性、後者はむしろ抵抗力を示したところから、少なくとも感染初期(21日まで)の系統間にみられた感受性差には H-2 とはリンクしない遺伝子の関与が示唆される。Forgetらによれば BCG に対して C57BL/6, BALB/c マウスは感受性、A/J, CBA, C3H/He, DBA/2 マウスは抵抗力を示し、これは我々の *M. intracellulare* に対する近交系マウスの成績と一致する<sup>20)</sup>。雑系 CF<sub>1</sub> マウスについては彼らの成績と我々の成績は一致しなかつたが、我々の CF<sub>1</sub> マウスは長期間クローズドで飼育され、BCG や結核菌に対して感受性の高いものが選択されてきたためかもしれない。*M. intracellulare* に対する抵抗力をコントロールする遺伝子は興味ある問題であるが、ヒトの AM 症は遺伝的素因よりむしろ二次的肺機能障害に伴う合併症であろうとされ<sup>20)</sup>、マウスの発病機序とは異なつた要因も考慮すべきであろう。

病理組織では、感染後 3 週目の肝・脾に人型結核菌や BCG 感染によつて形成されるような肉芽腫が認められた。肉芽腫は感受性の高い C57BL/6, BALB/c, CF<sub>1</sub> マウスでは他の 6 系統のマウスに比べて大型で数も多かつた。このように肉芽腫病変もまたマウスの系統によつて差がみられた。肉芽腫形成には細胞性免疫の関与が考えられるが、H-2 が同じであつても肉芽腫の大きさ、数が異なることから、肉芽腫形成にも H-2 とは異なつた別の遺伝子の関与が示唆される<sup>21)</sup>。

菌力の低下した Tanabe-O 株を C57BL/6 マウスに感染させ長期間観察した結果、肝・脾・肺で菌が増殖することが知られた。実験期間中に死亡した例はなかつたが、後期の肉眼的および病理組織学的所見は、マウスの菌に対する抵抗力の著しい低下を示し、長期間を要するけれども実験的に肺に重篤な肉芽腫病変を作らせることができた。

これらのことはマウスの系統と菌力の強弱を選択することによつて、短期・長期の AM 症の *in vivo* モデル作成が可能であることを示している。

#### IV. 結 論

菌力の強い *M. intracellulare* 2 株を近交系、雑系合わせて 9 系統のマウスに静脈より感染させ、3 週後にマウスの菌に対する感受性を調べた。その結果、C57BL/6, BALB/c, CF<sub>1</sub> の肝・脾で菌はよく増殖し、病理組織学的にもこれらの臓器に多数の肉芽腫がみられ、これら 3 系統のマウスは感受性の高いことが分かつた。しかし A/J, ASW, C3H/He, CBA, DBA/2, ddY の 6 系統のマウスでは菌はほとんど増殖しないかむしろ減少し、病変も軽微であつた。また高感受性の C57BL/6 マウスでは菌力の低下した *M. intracellulare* でも長期間の観察により

菌は脾・肺で著明に増殖し、これら臓器に重篤な肉芽腫病変が形成された。感受性の高いマウスを選択的に用いることによつて AM 症の *in vivo* 実験系を確立しうることが示された。

稿を終るにあたり、松矢徳太郎技官の技術的援助に感謝いたします。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。

#### 文 献

- Collins, F.M. et al.: Immune response to persistent mycobacterial infection in mice, *Infect Immun*, 20: 430, 1978.
- 久世文幸他: 実験的非定型抗酸菌症に関する研究。1. 非定型抗酸菌症のマウスに対する病原性について, *結核*, 53: 39, 1978.
- Watson, S.R. et al.: Development of suppressor T cells in *Mycobacterium habana* infected mice, *Infect Immun*, 25: 497, 1979.
- 李 英徹他: 実験的非定型抗酸菌症に関する研究。(3). マウスを対象とした *Mycobacterium intracellulare* 吸入感染の試み, *結核*, 56: 513, 1981.
- Moehling, J.M. et al.: Relationship of colonial morphology to virulence for chickens of *Mycobacterium avium* and the nonphotochromogens, *Amer Rev Respir Dis*, 92: 704, 1965.
- 後藤義孝他: *M. intracellulare* 感染症の実験的研究。(1). Tween 添加培地による発育促進と CF<sub>1</sub> マウスに対する病原性について, *結核*, 57: 519, 1982.
- Pierce, C. et al.: Infection of mice with mammalian tubercle bacilli grown in tween-albumin medium, *J Exp Med*, 86: 159, 1947.
- Forget, A. et al.: Difference in response among inbred strains to infection with small doses of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 32: 42, 1981.
- Nakamura, R.M. et al.: Strain difference of delayed-type hypersensitivity to BCG and its genetic control in mice, *Infect Immun*, 22: 657, 1978.
- Closs, O. et al.: Experimental murine leprosy. 1. Clinical and histological evidence for varying susceptibility of mice to infection with *Mycobacterium lepraemurium*, *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A*, 81: 401, 1973.
- 川口陽一郎: 実験鼠癩の病型とマウスの系統, *日本細菌学雑誌*, 31: 682, 1976.
- Hormache, C.E.: Natural resistance to *Salmonella typhimurium* in different inbred strains, *Immunology*, 37: 311, 1979.
- Zinkernagel, R.M. et al.: H-2 compatibility requirement for virus specific T cell-mediated effector functions in vivo. 1. Specificity of T cell conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2 K and H-2 D, *J Immunol*, 117: 1495, 1976.

- 14) Zinkernagel, R.M. et al.: H-2 restriction of cell-mediated immunity to an intracellular bacterium. Effector T cells are specific for Listeria antigen in association with H-2 I region-coded self-markers, *J Exp Med*, 145: 1353, 1977.
- 15) Bradley, D.J.: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*, *Nature*, 250: 353, 1974.
- 16) Plant, J. et al.: Locating salmonella resistance gene on mouse chromosome 1, *Clin Exp Immunol*, 37: 1, 1979.
- 17) Nakamura, R.M. et al.: Non H-2-linked difference in delayed-type hypersensitivity, *Immunology letters*, 2: 87, 1980.
- 18) Nakamura, R.M. et al.: Induction of suppressor T cells in delayed-type hypersensitivity to *Mycobacterium bovis* BCG in low responder mice, *Infect Immun*, 28: 331, 1980.
- 19) Gross, P. et al.: Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice, *J Immunol*, 127: 2417, 1981.
- 20) 東村道雄: 肺非定型抗酸菌症の発症要因, *結核*, 52: 367, 1977.
- 21) Allen, E.M.: Strain variation in BCG induced chronic pulmonary inflammation in mice. 1. Basic model and possible genetic control by non H-2 genes, *J Immunol*, 119: 343, 1977.