

ヒト型結核菌に対するマウス系統間における 抵抗性及び肺病変の比較

奈良県立医科大学細菌学教室

油 納 善 久

COMPARISON OF RESISTANCE AND PATHOLOGIC CHANGES IN THE LUNG AMONG VARIOUS MOUSE STRAINS AFTER INFECTION WITH *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV

YOSHIHISA YUNOU

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received December 15, 1999

Abstract: Five inbred strains of mice were examined for resistance to intravenous infection with 10^5 colony-forming units of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Based on the difference in survival time, five strains were classified into two groups: susceptible (CBA and DBA/2) and resistant (BALB/c, A/J, C57BL/6) strains. After infection with *M. tuberculosis*, mycobacteria rapidly multiplied in the lung with low levels of pulmonary IL-12 production in CBA mice; resulting in the progression of necrotic pneumonia. In contrast, mycobacteria slowly multiplied in association with high levels of IL-12 production in the lung of C57BL/6 mice; leading to the development of granulomas. In C57BL/6 mice, the growth of bacteria was suppressed over a long period (6th-24th weeks) after infection, and granulomatous response in the lung was followed by progressive fibrosis capable of preventing bacterial dissemination. When alveolar macrophages from both strains were infected *in vitro* with *M. tuberculosis* at a ratio of 1:10, the degree of phagocytic activity was not different between two strains, but C57BL/6 cells displayed higher anti-mycobacterial activity compared to CBA cells. These results suggest that murine natural resistance against *M. tuberculosis* depends on the anti-mycobacterial activity of alveolar macrophages, and the early production of IL-12 in the lung upon infection appears to be associated with the innate resistance and subsequent induction of *M. tuberculosis*-specific immunity. Moreover, vaccination with BCG was effective in reducing bacterial growth in both mouse strains during the initial phase of infection, while its effect was expressed in only resistant mice as the retardation of histopathologic progression during the late phase.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 33~45, 2000)

Key words: IL-12, alveolar macrophage, natural resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, lung granuloma, BCG

緒 言

結核は世界的にみて患者数の多い感染症のひとつであり、日本においても戦後減少してきた新規感染患者数が、近年再び増加のきざしを見せ、結核の集団感染が社会問題になり、緊急の対策が必要とされている。

結核に対する唯一のワクチンである BCG(弱毒ウシ型結核菌)の効果については、乳幼児の重症結核(髄膜炎、粟粒結核)に対する予防効果が認められているものの、乳幼児以外ではその評価は様々に別れている¹⁾。今日、BCG にかわる新しいワクチン開発が必要とされているが、そのためには、結核菌感染に関わる免疫学的機構や結核病変の形成機序に関する基礎的知見が必要であるがまだ十分には解明されていない。

モルモット、ウサギなどの実験動物にヒト型結核菌を感染させると肺に結核性病変が形成されることが報告されている^{2,3)}。またマウスの結核菌静注感染モデルにおいて、主要な病変は肺に存在し、肺病変は感染後の時間経過とともに増悪するが肝臓、脾臓、腎臓の病変は獲得免疫の成立にともなって治癒に向かうことが報告されている⁴⁾。マウスは他の実験動物に比べ遺伝的解析が進んでおり、遺伝子レベルの解析を含めた結核菌感染の研究に適していると考えられるが、結核は長期間にわたる慢性感染症であるため、長期間の解析が必要と考えられる。

種々の純系マウスは結核菌感染と BCG 感染に対しては異なる抵抗性を示す可能性が近年報告され、結核菌抵抗性マウスと感受性マウスを交雑した F1 は抵抗性であり、この遺伝形質は主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex, MHC)遺伝子や BCG に対する自然抵抗性遺伝子(*bcg*^r)とは異なると考えられている⁵⁾が、詳細についてはまだ知られていない。

本研究では、マウス系統間における結核菌抵抗性の差が生じる機序を調べるため、抵抗性マウスと感受性マウスに結核菌強毒株 H37Rv を静注感染させ最長 300 日間にわたって肺内菌数および肺組織病変を調べた。また、肺胞マクロファージを用いて *in vitro* でマクロファージの貪食能と抗結核菌活性を調べた。さらに、細胞性免疫の誘導に重要な役割を果たす interleukin(IL)-12 の産生動態についても解析を行った。これらの解析結果から、抵抗性マウスでは肺胞マクロファージの結核菌に対する抗菌力が強いこと、IL-12 の誘導産生が感染初期から亢進していることが、感染後期の特異免疫を誘導し得ること、さらに感染肺における肉芽形成のレベルに抵抗性が反映されることが確認された。また BCG ワクチンの効果は感染初期と後期で異なる型で表現されることが認め

られた。

材料と方法

(1) マウス：

6週～8週令雌の BALB/c, C57BL/6, A/J, DBA/2 マウス(日本 SLC 社, 浜松), 6～8週令雌の CBA マウス(日本チャールズリバー社, 横浜)を用いた。奈良医大の動物飼育施設において SPF 環境下で飼育し、感染実験はすべて P3 レベルの実験操作規準に基づいて行った。

(2) 菌株：

免疫には *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 株(京都大学大学院医学研究科感染免疫学講座微生物感染症学, 光山正雄先生から御恵与)を用いた。感染菌には *M. tuberculosis* H37Rv 株を用いた。

両菌とも Middlebrook 7H9 broth(Difco 社, Detroit, Michigan)(ADC enrichment 含有)で 14 日間 37°C に置いて静置培養し、増殖菌体を遠心集菌し十分に洗浄後、セルバンカー液(日本全薬工業, 郡山)で、*M. bovis* BCG は 2.5×10^8 CFU(colony forming unit)/ml, *M. tuberculosis* は 7.5×10^8 CFU/ml の濃度にそれぞれ調整し、 -80°C で凍結保存した。以後の実験ではすべて同じロットの菌体を使用時に生理食塩水で希釈して用いた。なお、凍結保存で両菌の生存率は低下しなかった。

(3) 結核菌感染と BCG 免疫法：

ヒト型結核菌 H37Rv 10^6 CFU をマウス尾静脈から投与した。各系統マウスの肺内菌数、50% 生存日数(median survival time : MST)を測定し、各マウス系統の結核菌抵抗性を判定した。

さらに 5 種類のマウス系統を比較した中で肺内菌数の差が最も大きかった CBA マウスと C57BL/6 マウスを選び、以下の実験を行った。

両系マウス(6～8週令, 雌)の尾基部背面に *M. bovis* BCG Pasteur 株 10^4 CFU の皮下注射による生菌免疫を施し、6週間後に *M. tuberculosis* H37Rv 株 10^6 CFU を尾静脈から感染させた。同菌を感染させた両系の非免疫マウス(12～14週令, 雌)をコントロールに用いた。

両系マウスの免疫群, 非免疫群の肺内菌数, 肺の組織所見, 肺病変面積および MST を最高 300 日間にわたって調べた。

(4) 臓器内菌数の測定法：

結核菌静注感染後、所定の時期にマウスの左肺を摘出しハサミで細片化の後、1.5 ml 容量のエッペンドルフチューブを用い Middlebrook 7H9 broth 1 ml 中でホモジネートし、同 broth で段階希釈した。各希釈液 $10 \mu\text{l}$ を Middlebrook 7H10 agar (OADC enrichment 含有)

(DIFCO社)に塗抹し、37°Cで3~4週間培養後にCFU数を測定した(plate count法)。

(5) 組織学解析法:

マウスの肺を10%中性ホルマリンで3日間固定後、パラフィン包埋し、肺門部を含む正中断面の切片を切り出し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本、チールネルゼン染色標本、Masson染色標本を作成した。標本はブライントで観察して病理所見を記載した。

(6) 肺病変面積の測定法:

マウス肺のHE染色標本をScan Jet 4C/T(Hewlett Packard社, Palo Alto, California)で走査して得られた画像をコンピューターに取り込み、NIH Imageソフトを用いて肺全体の面積に占める肺病変面積の割合を測定した。

(7) 肺におけるIL-12の産生:

CBAマウスとC57BL/6マウスに結核菌を静注感染させ、所定の時期にマウスの右肺を摘出しハサミで細切した後、氷冷しながら1.5ml容量のエッペンドルフチューブを用い、0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)(ナカライテスク社, 京都)含有10mM phosphate buffer(pH 7.2)1ml中でホモジネートを作製した。

バイオセイフティ型高速冷却遠心器Microcentrifuge FORCE 20(Denver Instrument社, Denver, Colorado)を用いて7200×g, 10分間の遠心で得られた上清を、New Steradisc 13(0.45μm)(クラボウ社, 大阪)を用いてろ過滅菌した後、IL-12測定までの間-80°Cで凍結保存した。IL-12の測定にはENDOGEN社製enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)キット(Woburn, Massachusetts)を用いた。サンプル中の蛋白量はDC protein assay kit(Bio-Rad社, Hercules, California)を用いて測定した。

(8) 肺胞マクロファージの結核菌貪食能, および抗結核菌活性:

CBAマウスとC57BL/6マウスの肺胞マクロファージは常法に従って採取した⁹⁾。

肺胞マクロファージの生細胞数はトリパンブルー染色法で測定し、Eagle's minimal essential medium(MEM)(Flow Laboratories社, Mclean, Virginia)[10mM (N-2-hydroxy ethyl)piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES), 0.07% NaHCO₃, 0.5mM 2-mercaptoethanol, 10% heat-inactivated fetal bovine serum(ICN Biomedicals社, Costa Mesa, California)含有]で10⁶個/mlに調整した。この細胞浮遊液100μlを96穴平板マイクロプレート(Corning社, New York)

に分注し、37°C 5% CO₂下で24時間プレート底に付着させた。37°Cに保温したMEMで非付着細胞を洗浄除去後、同培養液にて調整したH37Rv菌液100μl(10⁷CFU/ml)を各ウェルに添加した。菌浮遊液の代わりに同量の培養液100μlを添加し、24時間・72時間後における肺胞マクロファージの生存率測定時のコントロールとした。抗マクロファージ抗体(clone m1/70.15, Sera-Lab社, Sussex, United Kingdom)及び補体による細胞障害試験から、24時間の培養で各ウェルに付着した細胞の97.5±2.3%がマクロファージであることを確認した。

感染24時間後に37°Cに保温したMEM(100μg/ml streptomycin含有)にて各ウェルを3回洗浄し、死細胞および細胞外の結核菌を除去した。

感染ウェルのうち5ウェルには200μlの0.1% Triton-Xを添加し細胞を溶解後、plate count法を用いて各ウェル中のCFU数を測定した(CFU_{time24})。別の5ウェルを用いて、0.05% collagenase S-1(新田ゼラチン, 大阪)及び0.025% EDTA(pH 7.4)含有PBSで付着細胞を回収後、トリパンブルー染色法にて24時間感染後の生細胞数(viable count time 24: VC_{time24})を測定した。

残りの10ウェルには100μlのfresh MEM(100μg/ml streptomycin及び50μg/ml kanamycin含有)を添加し、さらに48時間培養を継続し、培養終了時に24時間後と同操作にて各ウェル中のCFU数(CFU_{time72})及びVC_{time72}を測定した。

感染24時間後のCFU_{time24}をVC_{time24}で除した数値を貪食率(phagocytic index)とし、感染開始72時間後については細胞あたりの生菌数(CFU_{time72}/VC_{time72})をマクロファージの抗菌活性の比較に用いた。

結 果

(1) 各系統マウスの結核菌抵抗性

①生存日数:

MSTの比較においてはCBAが67日、DBA/2は100日、C57BL/6は219日、BALB/c, A/Jは共に200日以上であった(Table 1)。この結果からMSTが100日以下のCBA, DBA/2を結核菌感受性とし、200日以上のC57BL/6, BALB/c, A/Jを結核菌抵抗性と判定した。

②肺内菌数:

各系統マウスの結核菌感染後の肺内菌数をFig. 1に示した。結核菌感染1週目から14週目までの肺内菌数を測定したところ、1週目では各マウス系統間で有意の差は認めず、系統間における菌数の差は1-3週目の間に明瞭となった。結核菌感受性CBA, DBA/2ではマウスが

Table 1. Median survival time (MST) of five inbred mouse strains

Strain	MST(days)
CBA	67
DBA/2	100
A/J	>200
C57BL/6	>200
Balb/c	>200

Groups of 10 mice were intravenously inoculated with 10^5 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv. The results were expressed as the mean of two experiments.

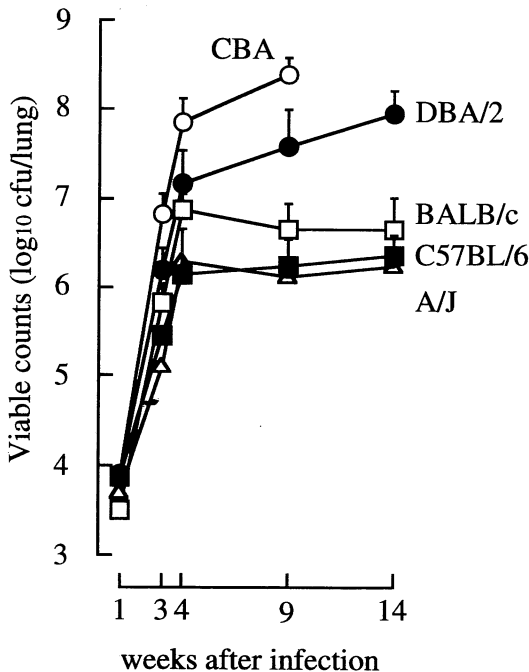


Fig. 1. Growth of *M. tuberculosis* in the lung of five inbred strains of mice after infection with 10^5 CFU of strain H37Rv. Each group consisted of 10 mice. Each point represents the mean of 3 different experiments. Bars represent standard deviation (SD).

死亡するまで菌の増殖を認めたのに対して、結核菌抵抗性 C57BL/6, BALB/c, A/J マウスでは 6 週目以降、菌の増殖は抑制されれば一定の菌数が保たれた。

(2) 抵抗性 C57BL/6 マウスと感受性 CBA マウスの比較:

① MST 比較:

両系マウスの免疫群, 非免疫群の結核菌感染後の生存曲線を Fig. 2 に示した。

非免疫 CBA マウスの MST は 67 日(9 週), 免疫 CBA マウスは 100 日(14 週)で, BCG 免疫により 1.5 倍の MST の延長を認めた。

一方, C57BL/6 マウスでは非免疫群の MST は 219 日(31 週), 免疫 C57BL/6 マウスでは 300 日(43 週)以上で BCG 免疫により MST は 1.3 倍以上の延長を認めた。しかし, BCG 免疫効果を MST の延長率を基準に判定すると, 両群での免疫効果に有意の差は認められなかった。

免疫 C57BL/6 マウスは観察を終了した 300 日目すべて生存していたが, この時のマウスは体重が減少し衰弱している様子が観察された。

② 肺内菌数の比較

非免疫 CBA マウスの肺内菌数は感染後はほぼ直線的に増加し, 感染 9 週目には 10^8 CFU 以上に達してマウスは死亡した(Fig. 3)。非免疫 C57BL/6 マウスの肺内菌数の増加は非免疫 CBA マウスに比べると遅く, 両系統間の菌数の差は感染 1 週目から有意差($P < 0.01$)が現われ, 3 週目以降の菌数の差は 30 倍以上に拡大した。

さらに, 非免疫 C57BL/6 マウスでは 6 週目から 24 週目まで肺内菌数の増加は認められず, この間は一定の菌数が保たれた。

24 週目以降は再びゆるやかな増加に転じ, 31 週目にマウスは死亡した。しかし, C57BL/6 マウス死亡時の肺内菌数は 3.2×10^6 CFU で, 非免疫 CBA マウス死亡時の 1.4% の菌数にすぎなかった。

両系マウスにおける BCG 免疫の有効性を肺内結核菌増殖抑制で判定すると, 免疫 CBA マウスでは感染 3 週目では 1 週目の菌数の 5 倍にとどまり, これは非免疫マウス群における 858 倍の増加に比して有意な抑制効果として認められた($P < 0.01$)。しかし, 3 週目から 6 週目迄の肺内菌数増加率は非免疫群の 13 倍に対し, 免疫群で 11 倍となり, 感染 3 週目以降には BCG 免疫による有意の肺内増菌抑制効果を認めなかった。

C57BL/6 マウスの免疫群と非免疫群の比較において, 感染後 1 週目と 3 週目の間における肺内菌数の増加率は非免疫 C57BL/6 マウスでは 35 倍, 免疫 C57BL/6 マウスでは 0.4 倍となり, 免疫群で著しく抑制された。これ

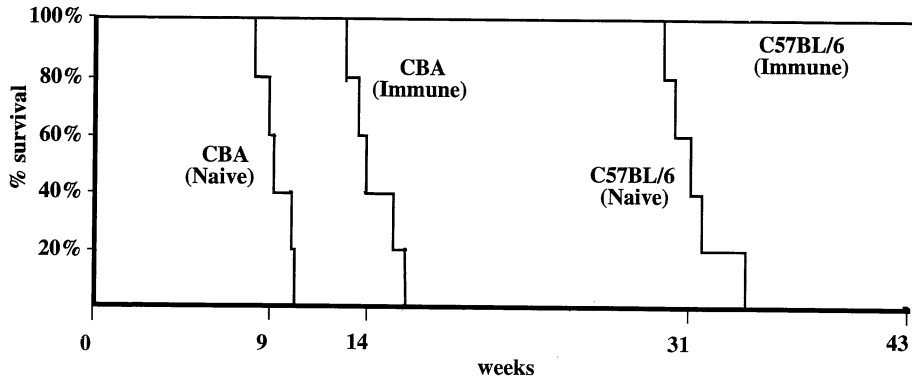


Fig. 2. Effect of BCG immunization on mouse survival against infection of *M. tuberculosis*. Groups of 20 mice were immunized with subcutaneous inoculation of 10^4 CFU of *M. bovis* (BGG) strain Pasteur six weeks before challenge with 10^5 CFU of strain H37Rv. The same experiments were repeated three times, and a representative result is shown.

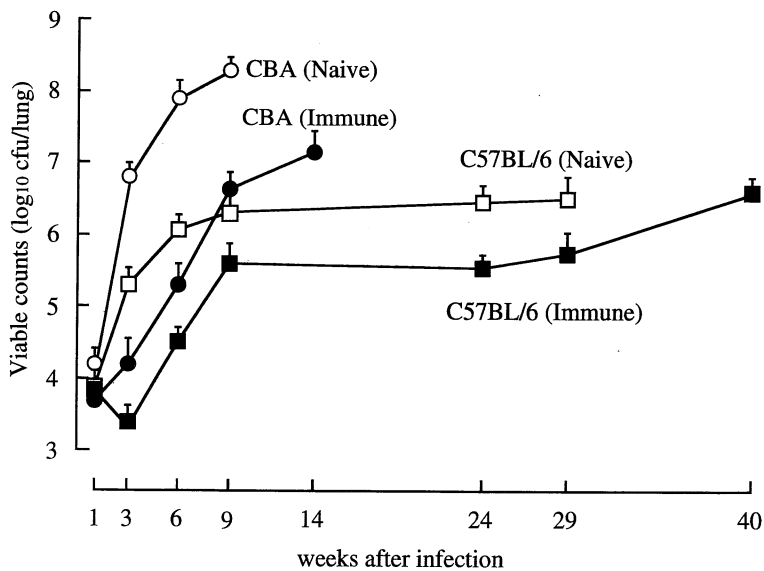


Fig. 3. Mycobacterial growth in the lung of unimmunized and BCG-immunized C57BL/6 and CBA mice after infection with 10^5 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv. Each point represents the mean value from 5 mice. Bars represent SD.

に対して3週目と6週目の間における菌数の増加率は非免疫群では5倍、免疫群では16倍となり、BCG免疫による有意な肺内結核菌増殖抑制効果を認めなかった。

両系マウスともにBCG免疫の効果を生内菌数からみると、結核菌感染後3週以内における肺での結核菌の増殖抑制という形で表現されるにとどまった。

③肺病理変化の比較：

i) 非免疫群：

非免疫CBAマウスの肺は感染1週目にはほぼ正常で、ごく一部に限局的な炎症像(少数のマクロファージの遊出)を認めるだけであった。

感染後3週目の肺では壊死性の滲出性肺炎が主体であり(Fig. 4-a, c), 抗酸菌染色では泡沫状マクロファージの細胞質内に多数の抗酸菌を認めた(Fig. 5-a)。マウスが死亡した9週目には肺全体に滲出性肺炎が広がり部分的に地図上の壊死を認めた(Fig. 4-b)。抗酸菌染色では肺全体に非常に多数の抗酸菌が存在していた(Fig. 5-b)。

C57BL/6マウスの肺は感染1週目はほぼ正常に保たれていたが、3週目の肺にはマクロファージ/組織球が限局性に集簇し境界明瞭で小さな巣状肺炎が散在していた(Fig. 6-a, d)。6週目にはそれらが悪化し、広範囲に散在する巣状肺炎像が認められた(Fig. 6-b)。

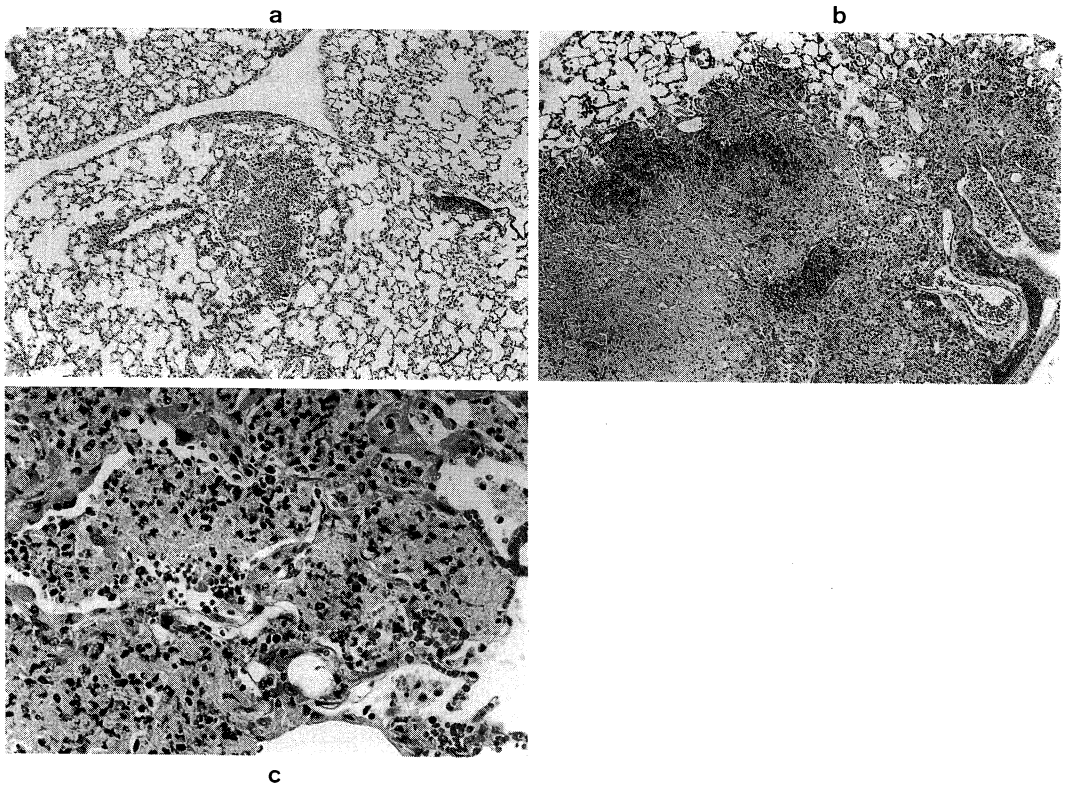


Fig. 4. Photomicrographs of lungs from susceptible CBA mice. (a) The lung was obtained 3 weeks after infection. Sections were stained with Hematoxylin-and eosin (HE), showing focal necrotizing pneumonia. (original magnification; $\times 100$). (b) The lung was obtained after 9 weeks of infection, showing a wide spread of necrosis (HE, original magnification; $\times 100$). (c) The lung was obtained after 3 weeks of infection, showing cellular debris and nuclear fragments in the alveolar space (HE, original magnification; $\times 400$).

6週目から24週目にかけて器質化、線維化が進行し、24週目には顕微鏡的蜂巢肺(microscopic honeycomb)様の肺病変を形成し(Fig. 6-c), 器質化した部分にはMasson染色で青く染色される膠原繊維の増生が認められた。抗酸菌染色では組織中の抗酸菌はごく少数で菌の増殖が抑制されている様子が観察されたが、器質化された病変中に存在する細胞集塊(cyst)中には少数の抗酸菌が認められた(Fig. 5-c).

ii) 免疫群：

両系マウスともに免疫群では、感染1週目から小さな肉芽腫が形成された。

免疫CBAマウスでは感染後肺内菌数の増加とともに肉芽腫構造が破壊され、感染6週目には辺縁不明瞭かつ大きな巣状肺炎を認めた。抗酸菌染色では泡沫状マクロファージの内部に多数の抗酸菌が検出された。

免疫C57BL/6マウスの感染6週目の肺では境界明瞭かつ小さな巣状肺炎を認め、多数のリンパ球の滲出をともっていた。病変部には少数の抗酸菌が存在した。(データ省略)

免疫C57BL/6マウスの感染40週目の肺組織では、肺全体にび慢性肺炎像を認めたが、間質の一部に治癒機転を示す強い器質化と異型上皮化生(扁平上皮化生)を認めた(Fig. 7).

④肺病変面積の比較：

両系マウスの免疫群、非免疫群の結核菌感染後の肺病変面積をFig. 8に示した。

非免疫CBAマウスでは、肺病変面積は急速かつ直線的に増加し、マウスが死亡する9週目には59%に達した。免疫CBAマウスでは、感染3週目から6週目までの増加はわずかであったが、6週目以降は急速に増加し、マウスが死亡する14週目には56%に達した。

非免疫C57BL/6マウスでは、肺病変面積の増加速度は非免疫CBAマウスに比して遅く、感染9週目から24週目にかけて11.3%から39.4%まで増加した。

免疫C57BL/6マウスでは感染24週目までの肺病変面積の増加速度は、非免疫C57BL/6マウスに比しさらに遅く、感染29週目でも免疫CBAマウスの感染14週目病変面積の1/2以下にとどまった。感染40週目におい

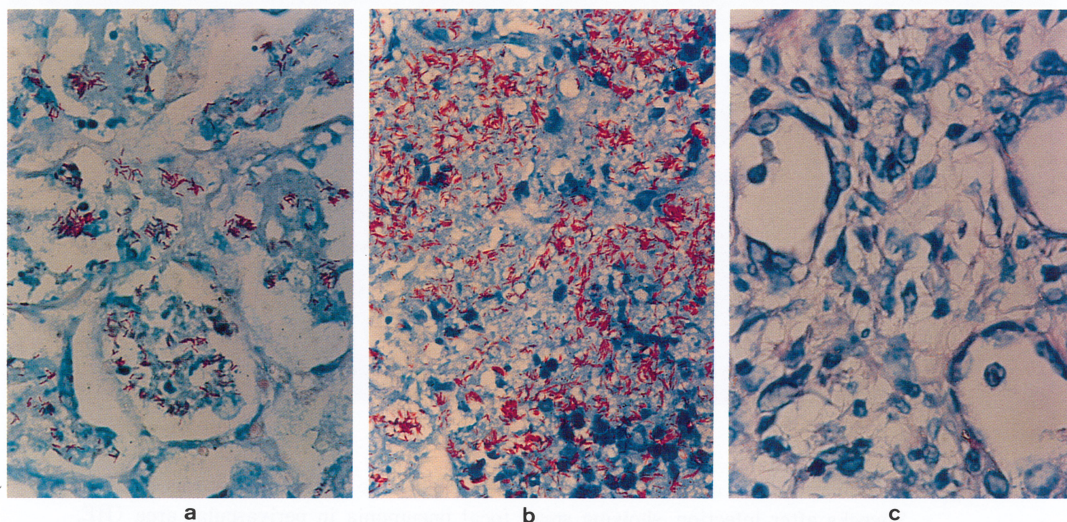


Fig. 5. Ziehl-Neelsen staining for acid-fast bacilli (AFB). (original magnification ; $\times 1000$). (a) The lung of CBA mouse after 3 weeks of infection, showing many AFB in the foamy macrophages. (b) The lung of CBA mouse after 9 weeks of infection, showing high density of AFB observed in the necrotic area. (c) The lung of C57BL/6 mouse after 24 weeks of infection, showing only few AFB in the lesion.

ても病変面積は50%以下であった。BCG免疫の効果は抵抗性マウスにおいてのみ、感染後期における肺病変の進展遅延化として表現された。

⑤肺におけるIL-12の産生：

結核菌感染後、6時間後、3日、及び7日後、にマウスの肺抽出液中のIL-12濃度を測定した(Fig. 9)。C57BL/6マウスでは感染6時間後には既に肺内IL-12濃度が上昇し、感染3日後には一過性に低下するが、感染7日後には著明な産生亢進が認められた。これに対してCBAマウスではC57BL/6マウスに比してIL-12濃度が低く、

感染7日後においても顕著な増加は認めなかった。未感染のマウスでは両系マウス(CBA, C57BL/6)ともに肺抽出液のIL-12濃度は検出感度以下であった(<5 pg/mg protein)。

⑥肺胞マクロファージの結核菌貪食能と抗結核菌活性：

肺胞マクロファージの*in vitro*での感染実験の結果をTable 2に示した。両系マウスの肺胞マクロファージは共に*in vitro*感染24時間後において100%生存していた。感染24時間後のマクロファージのphagocytic indexは両系マウスマクロファージ間で有意差を認めな

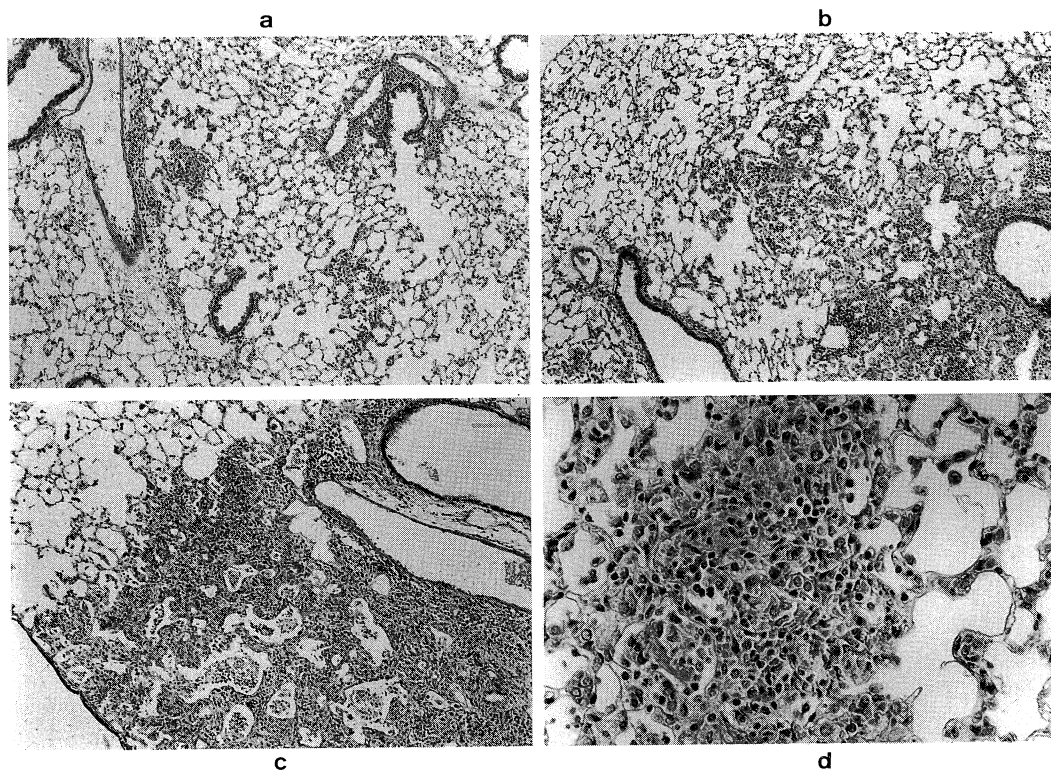


Fig. 6. Photomicrographs of lungs from resistant C57BL/6 mice. (a) The lung was obtained 3 weeks after infection, showing small focal pneumonia in perivascular area (HE, original magnification; $\times 100$). (b) The lung was obtained after 6 weeks of infection, showing that many lymphocytes accumulated at the lesion. (HE, original magnification; $\times 100$). (c) The lung was obtained after 24 weeks of infection, showing honeycomb appearance with extensive fibrosis. The fibrosis was interrupted by many cysts (HE, original magnification; $\times 100$). (d) The lung was obtained after 3 weeks of infection, showing granulomatous response with macrophages and histiocytes (HE, original magnification; $\times 400$).

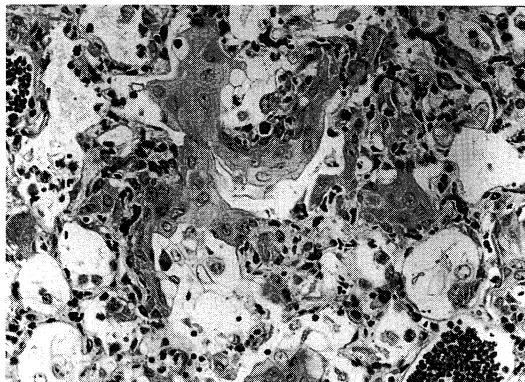


Fig. 7. Photomicrographs of the lung from BCG-immunized C57BL/6 mouse after 40 weeks of infection. Sections showed squamous cell metaplasia (HE, original magnification; $\times 100$).

かった($P < 0.05$).

感染 72 時間後のマクロファージ細胞 1 個あたりの細胞内生菌数は CBA マクロファージで 63.3 ± 5.5 CFU, C57BL/6 マクロファージで 14.9 ± 1.7 CFU で、両系マウスの肺胞マクロファージの抗結核菌活性に有意な差が認められた($P < 0.01$)。しかし、感染 72 時間後の生細胞数を比較すると、CBA マクロファージでは 91.6% の細胞がウエル底に付着生存していたが、C57BL/6 マクロファージでは 67% に低下していた。

考 察

5 種類のマウス系統間の比較において、結核菌感染後の生存日数の違いから CBA, DBA/2 が結核菌抵抗性、BALB/c, A/J, C57BL/6 が結核菌抵抗性と考えられた。感受性マウスではマウスが死亡するまで肺内菌数が増加し続けたが、これに対して抵抗性マウスでは感染 6 週目以降、肺内菌数の増加が抑制され、肺における持続的な結核菌感染成立による免疫機構の成立で、菌の増殖抑制機構が働いたと考えられた。

結核菌抵抗性に関する遺伝形質は *M. bovis* BCG に対するマウスの自然抵抗性遺伝子(*bcg*⁷)とは一致しないことが報告されている^{5,7}。BALB/c, C57BL/6 マウスは BCG 感受性であり、CBA, DBA/2, A/J は BCG 抵抗性であるが⁸、今回の結果においてもマウスの結核菌感受性と BCG 感受性は相反していると考えられた。結核菌

H37Rv 感染後の CBA・C57BL/6 マウス間での肺内菌数には、感染 1 週目から有意差が現われ、感染 1 週目と 3 週目の間からさらに大きくなった。このことから、感染初期の結核菌抵抗性の差は両系マウスの自然抵抗性の差に基づくと考えられた。

肺胞マクロファージの *in vitro* 感染実験では、24 時間培養後の結核菌貪食能は両系マウス間で同レベルでありながら、72 時間培養後では C57BL/6 マクロファージの抗結核菌活性は CBA マウスに比し有意に高く、マクロファージの機能的な差が両系マウスの感染初期における結核菌抵抗性の違いを左右していると考えられた。この *in vitro* 感染系で、C57BL/6 マクロファージに細胞死が多くみられたことから、結核菌の食細胞内へのエスケープに対する防禦機構として、細胞死が存在すると推察される。この細胞死がアポトーシスであるか、現在検討中である。

この *in vitro* におけるマクロファージの抗菌力の差異は、結核菌感染後 3 週目から両系マウスの肺病変の差異として観察された。CBA マウスでは肺胞マクロファージの細胞質内に多数の抗酸菌が存在していたのに対して、C57BL/6 マウスでは抗酸菌が少なく、肺胞マクロファージの抗結核菌活性が両系間で異なることが肺組織の抗酸菌染色からも確認された。

マウスの結核菌抵抗性に関与する因子として、IL-2, interferon(IFN)- γ , tumor necrosis factor(TNF)- α , inducible nitric oxide synthase(iNOS)などが報告されている^{9,10,11,12}。IL-12 は多くの感染性微生物の刺激によってマクロファージから産生されるサイトカインで、natural killer(NK)細胞の活性化や T helper 1(Th 1)系の分化を促進する一方で、感染防禦機構の時間的推移のなかで自然抵抗性と後期獲得免疫の橋渡しの役割を担う早期誘導反応において、中心的な役割を果たすと考えられている。

今回の研究では結核菌感染後 1 週間以内の初期における自然抵抗性のレベルで両系マウス間に差が認められたことから、感染初期において重要な役割を果たす IL-12 の感染局所における産生動態を調べた。感染後 6 時間から両系マウスの肺における IL-12 産生量に差が認められ、IL-12 産生量の差が両系マウス間の結核菌に対する初期抵抗性の違いに関与していると考えられた。先天的に IL-12 受容体が欠損したヒトでは抗酸菌に対する感受性が極めて高く重症の感染をひき起こすとされ¹³、マウスへの IL-12 の投与によって結核菌に対する抵抗性が増強することも報告されている^{14,15}。マウスにおける非定型抗酸菌 *M. avium* (MAC) 感染においても、MAC

抵抗性の DBA/2 マウスでの IL-12 産生量は MAC 感受性 BALB/c マウスに比し有意に高く、その差は感染後 1 日以内に現われ、IL-12 投与によって感受性マウスの抵抗性が増強されることが報告されている¹⁶⁾。これらの事実から感染早期に産生される IL-12 が、抗酸菌に対する自然抵抗性を増強し、結果的に特異免疫を担う Th 1 サブセットの誘導を可能にするものと推察される¹⁶⁾。当教室の Matsui らは、結核菌感染 7 日目の両系マウスの肺における各種サイトカイン mRNA の発現量をサザンブ

ロット法で比較し、C57BL/6 マウスでは CBA マウスに比し、IFN- γ mRNA の発現量が有意に増強しているが、IL-2、IL-4 及び IL-10 の mRNA 発現量には有意差の無いことを認めている (Matsui *et al.*, 2000, 投稿中)。この事実は、感染初期における IL-12 の産生亢進は、Th 1 系誘導以前に NK 細胞を活性化することで IFN- γ の産生を促がしている可能性を示唆するものである。

ヒトの結核病変における病理学的な基本パターンとして、マクロファージ等の細胞成分および液体成分の肺胞

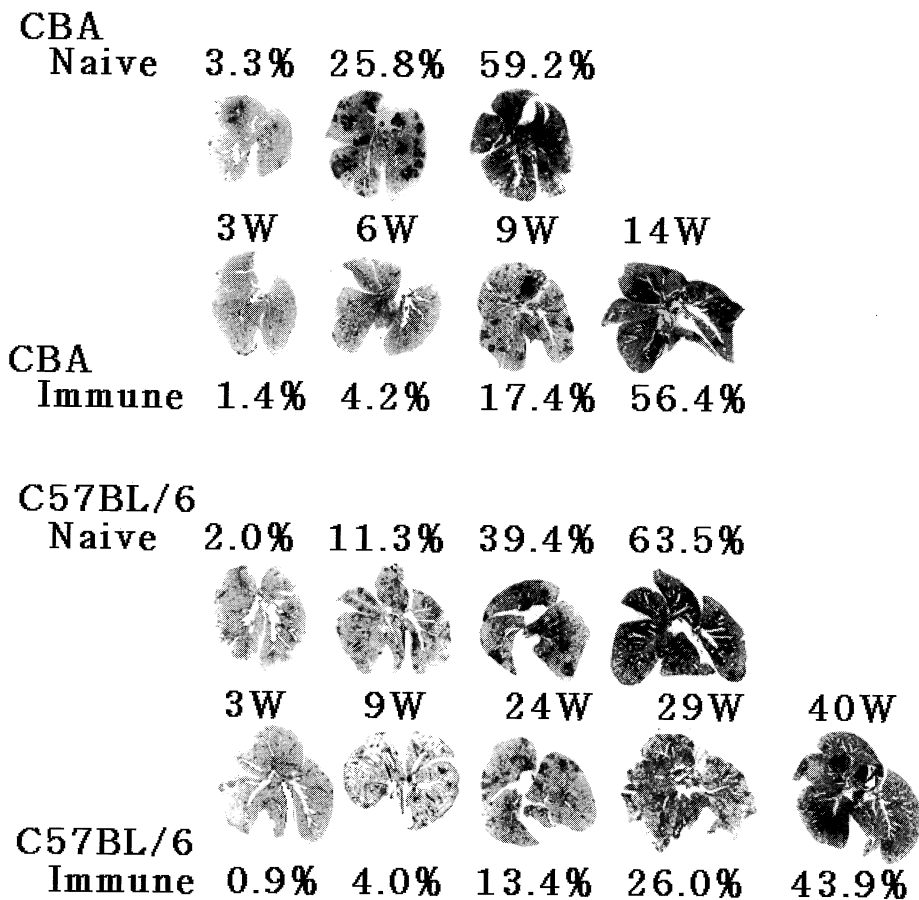


Fig. 8. Comparison of the affected lung area (%) after infection of *M. tuberculosis* H37Rv between CBA and C57BL/6 mice. Lung sections stained with HE were scanned with a computer-assisted Scan Jet 4C/T, and the ratio of the affected area was calculated with NIH Image software. At each time point, lungs from three different mice were assayed. The experiments was done twice. Results are expressed as the mean of 6 mice. SD was within 10% of each mean value.

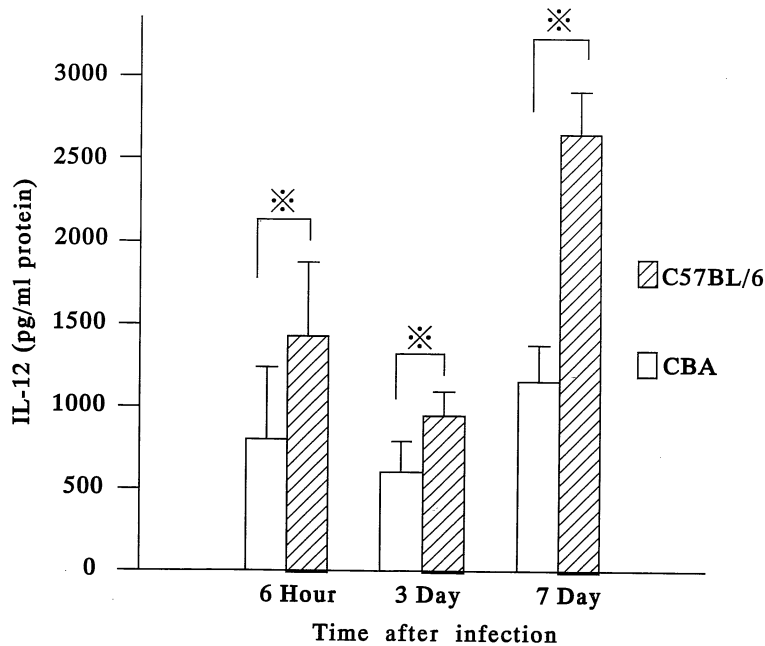


Fig. 9. Measurement of IL-12 in the lung. Lung extract was prepared from the lungs of three individual mice at each time point after infection of *M. tuberculosis*. Serial dilutions of each extract were assayed in duplicate for quantity of IL-12 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The same experiments were repeated three times. Results are expressed as the mean \pm SD for 18 determinants. * $P < 0.01$

Table 2. Anti-*M. tuberculosis* activity of alveolar macrophages obtained from C57BL/6 and CBA mice

Macrophages from:	Anti mycobacterial activity			
	24 Hours		72 Hours	
	Viable cells (% control)	Phagocytic index	Viable cells (% control)	No. of viable mycobacteria (CFU) per cell
CBA	100%	5.4 \pm 0.4	91.6%	63.3 \pm 5.5
C57BL/6	100%	5.0 \pm 1.0	67%	14.9 \pm 1.7

Alveolar macrophages of CBA and C57BL/6 mice were incubated with *M. tuberculosis* H37Rv at the infection ratio of 10 bacteria per cell. Phagocytic index was expressed as the number of viable mycobacteria per viable cell at 24h of incubation. Viable cell counts were expressed as % of control cell culture, the number of which was determined by culturing macrophages without infection. The number of viable mycobacteria was expressed as the number of CFU per viable cell at 72h of incubation. Results were obtained from three separate experiments in which culture was done in triplicate. Results are expressed as the mean \pm SD.

腔への滲出を特徴とする滲出性反応(exudative response), 結核菌抗原特異的 Th 1 により活性化されたマクロファージが病変部に動員され, 類上皮細胞肉芽腫形成を主体とする増殖性反応(productive response)および, 病変の中心部に凝固壊死がおこる乾酪性反応(caseation)が挙げられている¹⁷⁾.

一方マウスではヒトの肺結核で典型的に見られるような中心性乾酪壊死をともなった肉芽腫病変は形成されないが, 結核菌抵抗性 C57BL/6 マウスではヒトの結核病変に相当する肉芽腫様の反応が起こることが報告されている^{18,19)}. 本研究においてもヒトの結核病変での増殖性反応と同様の肉芽腫様病変が認められ, 菌の増殖が抑制された点から, 抵抗性マウスの生体反応はヒトの慢性肺結核に対する反応と類似していると思われた.

CBA マウスの壊死性肺炎像は種々の遺伝子のノックアウトマウス(iNOS, IL-12, IFN- γ , TNF- α)で報告されている壊死性肺病変に類似しており^{9,10)}, また後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者の肺結核やステロイドホルモン投与により悪化したヒトの肺結核あるいは粟粒結核など免疫機能の低下した個体の肺結核病変にも類似している²⁰⁾ことから, 壊死性の滲出性肺炎像は結核菌抵抗性が低下した宿主に共通して現われる病理変化と考えられた.

BCG 免疫の効果は両系マウスともに感染初期(3 週以内)には肉芽腫病変の形成と肺内菌数の増加率の抑制という形で表現された. 一方, 感染後期には抵抗性マウスにおいてのみ, 病巣進展の抑制効果として現れたが, 肺内における結核菌増殖抑制効果は得られなかった. このことからマウスにおいて BCG 免疫の効果は感染初期の肺内結核菌増殖抑制と, 感染後期における抵抗性宿主での遅延型反応が過度に進行するのを抑制することにあると考えられた.

ヒトにおいても, 肺結核病変の進展は菌体蛋白に対する生体側の遅延型反応によって形成されると考えられている²¹⁾. 感受性マウスでは結核菌体に対する遅延型反応が過度に生じること, 一方抵抗性マウスでは防禦的レベルでの遅延型反応にとどまることが, 両系マウスの抵抗性の差として表現されていると考えられた.

本研究の結果から, 結核菌に対する自然抵抗性を規定するのは, 感染 3 週目迄の肺胞マクロファージの結核菌に対する殺菌能のレベルであり, 殺菌能或いは増殖抑制能の強いマクロファージでは早期に IL-12 の誘導産生が亢進し, NK 細胞の活性化による IFN- γ の産生が生じると考えられた. 同様の解析結果が, サルモネラ抵抗性マウスと感受性マウスの間でも得られており²²⁾, 細胞

内寄生菌に対する宿主間の抵抗性の差異を規定する基本的生体応答と考えられた.

結 語

- 1) 結核菌抵抗性 C57BL/6 マウスではヒト成人における結核性肺病変に近い病変が形成され, 感受性 CBA マウスでは AIDS 患者やステロイド使用中の患者など抵抗性の低い個体に近い結核性肺病変が形成された.
- 2) 免疫 C57BL/6 マウスと CBA マウスの結核菌抵抗性の差に, 肺胞マクロファージの抗結核菌活性の違い, 及び結核菌感染早期における IL-12 産生量の差が関与している可能性が認められた.
- 3) BCG 免疫では, 肺内結核菌増殖抑制は感染の初期に限られ, 感染後期では抵抗性マウスにおいてのみ過度の遅延型反応による病巣進展を遅延化し得ることが認められた.
- 4) 結核菌持続感染によって C57BL/6 マウスの肺に形成される間質の高度な繊維化と肥厚は, 菌の増殖抑制に関係する一方で, 肺病変の進展に関与していると考えられた.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました奈良県立医科大学細菌学教室喜多英二教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 日々の研究に際してご助言をいただいで多大なお世話になった教職員諸兄姉に感謝の意を表します. また, 病理所見の御指導を賜った奈良県立医科大学第二内科濱田薫先生に深謝申し上げます.

なお本研究の一部は第 52 回日本細菌学会関西支部会(1999 年 10 月大阪府吹田市), 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会(1999 年 11 月京都市)で発表した.

文 献

- 1) Bloom, B. R. and Fine, P. E. M.: The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. In Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control (Bloom, B. R., ed) Washington, DC, ASM Press, pp.531-557, 1994.
- 2) North, R. J. and Izzo, A. A.: Mycobacterial virulence. Virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* have faster *in vivo* doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity. J. Exp. Med. 177:

- 1723-1733, 1993.
- 3) **McMurray, D. N.** : Guinea pig model of tuberculosis. In: Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. (Bloom, B. R., ed) Washington, DC, ASM Press, pp.135-147, 1994.
 - 4) **Dannenberg, A. M.** : Rabbit model of tuberculosis. In: Tuberculosis: pathogenesis protection, and control. (Bloom, B. R., ed) Washington, DC, ASM Press, pp.149-156, 1994.
 - 5) **Mediana, E. and North, R. J.** : Resistant ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nrampl genotype. *Immunology*. **93**: 270-274, 1998.
 - 6) 高須賀直美, 赤川清子 : マクロファージの採取と精製 肺胞マクロファージ. マクロファージ実験マニュアル. p 18-21, 1997.
 - 7) **Nikonenko, B. V., Apt, A. S., Mezhlumova, M. B., Avdienko, V. G., Yeremeev, V. V. and Moroz, A. M.** : Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clin. Exp. Immunol.* **104** : 37-43, 1996.
 - 8) **Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Turcotte, R. and Skamene, E.** : Control of *Bcg* gene of early resistance in mice to infections with BCG substrains and atypical mycobacteria. *Clinical Exp. Immunol.* **63** : 517-525, 1986.
 - 9) **Cooper, A. M., Magram, J., Ferrante, J. and Orme, I. M.** : Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **186** : 39-45, 1997.
 - 10) **Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., and Bloom, B. R.** : An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* **178** : 2249-2254, 1993.
 - 11) **MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K. and Nathan, C. F.** : Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** : 5243-5248, 1997.
 - 12) 徳永 徹 : 結核菌の感染と免疫. 細胞内寄生菌の基礎と臨床. ライフサイエンス・メディカ社, 東京, p.43-49, 1996.
 - 13) **Altare, F., Durandy, A., Lammas, D. and Casanova, J. L.** : Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280** : 1432-1435, 1998.
 - 14) **Cooper, A. M., Roberts, A. D., Rhoades, E. R., Callahan, J. E. and Orme, I. M.** : The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* **84** : 423-432, 1995.
 - 15) **Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Triebold, K. J., Sypek, J., Wolf, S. and Bloom, R.** : IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunology* **155** : 2515-2524, 1995.
 - 16) **Kobayashi, K., Yamazaki, J., Kasama, T., Katsura, T., Kasahara, K., Wolf, S. F. and Shimamura, T.** : Interleukin (IL)-12 deficiency in susceptible mice infected with *Mycobacterium avium* and amelioration of established infection by IL-12 replacement therapy. *J. Infectious Diseases* **174** : 564-573, 1996.
 - 17) 岩崎龍郎 : 結核病変の基本的様相とその成立. 結核の病理. p 23-28, 1997.
 - 18) **Rhoades, E. R., Frank, A. A. and Orme, I. M.** : Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease.* **78** : 57-66, 1997.
 - 19) **Dune, P. L. and North, R. J.** : Persistent infection with virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs of mice causes progressive pathology. *J. Med. Microbiol.* **45** : 103-109, 1996.
 - 20) 岩崎龍郎 : HIV 感染に合併した結核症. 結核の病理. p 138, 1997.
 - 21) **Yamamura, Y.** : Pathogenesis of tuberculous cavity. *Adv. Tuberc. Res.* **9** : 13, 1985.
 - 22) **Nishikawa, F., Yoshikawa, S., Harada, H., Kita, M. and Kita, E.** : The full expression of the *Ity* phenotype in *Ity*^r mice requires C3 activation by *Salmonella* lipopolysaccharide. *Immunology* **95** : 640-647, 1994.