

第55回総会特別講演

結核病学の今昔
—基礎面—

染谷四郎

国立公衆衛生院

受付 昭和55年6月28日

The 55th Annual Meeting Special Lecture

PRESENT AND PAST OF TUBERCULOSIS RESEARCH

—On Aspect of Basic Studies—

Shiro SOMEYA*

(Received for publication June 28, 1980)

Experimental studies on mycobacterial infection using inbred, specific pathogen free, germ-free and athymic "nude" mice performed by us during the past three decades at Department of Microbiology and Gnotobiology Research Laboratory of our Institute of Public Health, were outlined.

Brief discussions were made on the susceptibility of various inbred mouse strains to tuberculous infection, the restoration of the anti-microbial resistance and delayed-type hypersensitivity of germ-free mice by the association of intestinal flora, recovery of anti-tuberculous immunity and granuloma formation in nude mice infected with mycobacteria by the transplantation with T-cell-containing lymphoid cells, and effects of H-2 gene histocompatibility between macrophages and T-lymphocytes on cellular immunity by transfer experiment in nude mice.

It was emphasized that the immunogenetical studies of tuberculosis using congenic mouse strains for H-2 gen complex; inbred mouse strains carrying defined haplotypes of H-2 gene complex from divers origins, should further be promoted.

本学会の第50回総会記念事業としてまとめられた「結核研究50年」において、我が国の結核病学の歴史について各専門分野にわたり、多くの研究者によつて詳細に述べられているので、今更これを繰返す必要はないと思う。したがつて、私が今日まで実施してきた主としてマウスによる結核の実験的研究を中心にその概略を紹介し、少しく私見を述べることにする。

1. 近交系マウスによる実験結核の研究

私が公衆衛生院に入った1940年当時、結核実験に使用

された動物は主としてモルモットであつて、実験成績の判定はもつばらリンパ節や内臓の病変、重量を目安として行なわれていた。しかし、接種局所、リンパ節および臓器内の生菌数を定量的に測定する小川ら^{1)~4)}の定量培養法の確立は結核の実験的研究の発展に大いに貢献した。私達は結核の動物実験において使用する実験動物の種類、系統、飼育条件、動物実験室の環境などの諸因子によつて実験成績が大きく変動し、結果の判断に苦慮したことを度々経験した。再現性のある実験成績を得るためには結核菌感染に対する感受性が均一である近交系 (Inbred

* From the Institute of Public Health, 4-6-1, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo 108 Japan.

：兄妹交配を20代以上続け、その後も兄妹交配を続けたもの) 動物を使用することが重要であり、取扱いの簡便さや同一条件の動物を数多く使用することが可能であるなどの点からマウスが最も適当な実験動物であると考えた。

米国においては1940年ごろから1950年の前半にかけて、各種の系統マウスについての結核感染実験の研究が多数報告されている。我が国においても岩崎ら⁵⁾はマウスによる結核化学療法剤のスクリーニング・テストについて報告している。当時のマウスによる結核実験では、市販雑種や系統などの記載のないマウスを使用している実験が多く、近交系マウスによる研究は比較的少なかった。近交系動物として入手できたのは主としてマウスであつたので、私達はまず各種系統マウスについて結核感受性を比較検討した。

私達の各系統マウスの結核感受性に関する研究成績⁶⁾⁻⁹⁾を要約すると次の通りである。各種系統マウスの結核菌感染に対する感受性は、各系統間で著しい差異があり、感受性の高い系統としては CF1, C₅₇BL/6, dba, NC, KK などがあげられた。また CFW 系マウスは感受性をもつとも低く、dd 系マウス (closed colony: 一定の集団内で交配, 他の集団からの移入なく維持されたもの) はそれらの中間の感受性を示したが、感受性の均一性をみると、dd 系マウスはややバラツキの多い成績を示したが、近交系マウスは均一であつた。このような知見に基づいて、私達は近交系マウスによる各種の結核の実験的研究¹⁰⁾⁻¹⁶⁾を実施した。また金井¹⁷⁾⁻¹⁹⁾は近交系マウスの実験結核症における被免疫性について検討し、結核菌 H₃₇Ra 株生菌免疫と死菌免疫とによる感染防御の賦与がマウスの系統によつて異なるという興味ある現象

を報告している。このように実験目的に適する系統の近交系マウスを用いて各種の結核の実験的研究が行なわれるようになった。

1960年前後から結核における免疫とアレルギーの関係が重要な研究課題として取り上げられ、本学会のシンポジウムや要望課題として度々活発に討論されている。私達も山村教授らと共同して各種の結核菌の菌体成分の生物学的性状に関する実験を行なつた。また、ツベルクリン・アレルギーの受身伝達に関する研究が Chase²⁰⁾によつて報告され、我が国においてもその追試の研究が実施されているが、この問題に対する本格的研究は橋本ら²¹⁾²²⁾によつて行なわれ、動物レベルの実験を脱してようやく細胞レベルの研究が行なわれるようになった。しかし、使用する動物は主としてモルモットであつた。その後、ツベルクリン・アレルギーや結核免疫が結核免疫動物のリンパ球様細胞による受身伝達の手法を用いてその機序の解明が進み、その主役は胸腺に依存するT細胞から由来した感作リンパ球であることが明らかにされた。

これより先、マウスにおける遅延型アレルギーの検査方法として Grayら²³⁾の足蹠反応 (Foot pad test) や Davidら²⁴⁾による *in vitro* の測定法としてマクロファージ遊走阻止試験 (MMI test) が広く行なわれ、マウスも結核実験に盛んに用いられるようになった。山本ら²⁵⁾²⁶⁾は BCG 細胞壁免疫 CAF₁ 系マウスを用い、肺細胞によるマクロファージ遊走阻止と結核菌感染に対する抵抗性について研究している。その後今日まで、マウスを用いて細胞免疫学的研究が各方面で盛んに実施され、本学会の総会シンポジウムの課題として採用されて、活発な討議が行なわれている。

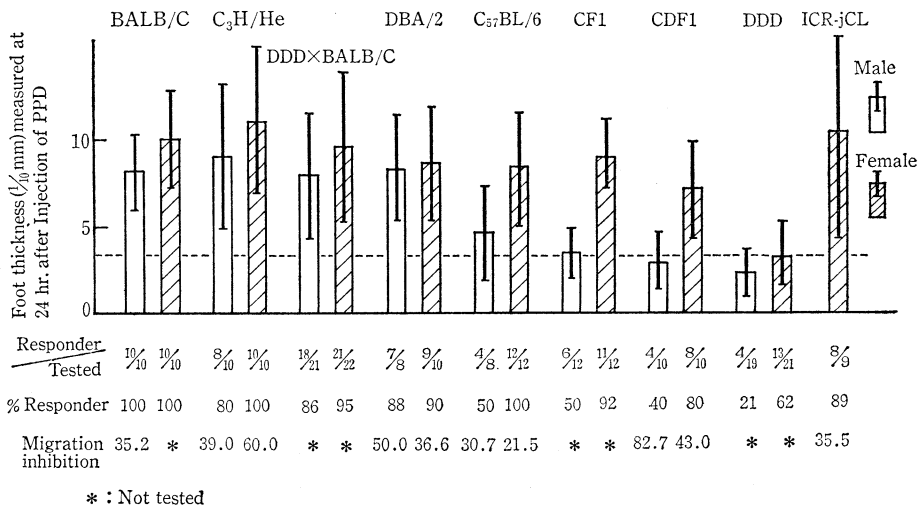


Fig. 1. Foot pad test and macrophage migration inhibition test in various barrier sustained mice.

山崎ら²⁷⁾は各種の近交系マウスについて、結核死菌またはその分画による感作後の遅延型アレルギーの発現状況を足蹠反応と MMI test によつて系統別の比較を行なっているが、その成績によると、足蹠反応と MMI test との成績はよく相関し、高反応性の系統から低反応性の系統のものへと広く分布し、結核感受性の高い C₅₇BL/6, DBA/2 は比較的高い反応性を示し、雌マウスは雄マウスに比して反応性が高いことが知られたが、他の系統では結核感受性とアレルギー反応性との間に相関を認めることはできなかつた (Fig. 1)。これらの成績は結核死菌感作による成績であるが、結核生菌感染の場合にはツベルクリン・アレルギーの発現に違いがあることも予想される。最近、徳永ら²⁸⁾²⁹⁾は BCG 生菌接種による遅延型アレルギーの発現がマウスの系統によつて異なり、Low responder のマウスでは、BCG 特異的サブリンパー T 細胞が出現することを報告している。

以上の事実は BCG 難陽転の機序との関連においても興味あるところであり、この解明のため、各系統マウスについて免疫遺伝学的検討を行なうことが重要である。

2. SPF および無菌マウスによる実験的結核症の研究

我が国において近交系動物が各方面で使用されると同時に、病原体の感染していない“清浄な動物”を実験に使用すべきであることが一般に認識されるようになり、病原体を保有していない SPF 動物 (Specific pathogen free animal) が作出され、入手可能となつた。更に、全く細菌を保有していない無菌動物も一部の研究者によつて実験に使用されるようになった。

私達が1964年以来実施した SPF マウスの結核感染実験の成績¹⁵⁾¹⁶⁾³⁰⁾³¹⁾によると、強毒結核菌感染後の生存日数による結核感受性の比較では ICR および CF1 系の SPF マウスは conventional マウスに比べ感受性が高く、また極めて均一な成績を示し、更に BCG 接種後の感染防御力の比較でも SPF マウスにおける免疫効果の成立は conventional マウスよりも優れているという成績であつた。最近研究者の間で精度の高い再現性のある実験成績を得るために SPF 動物を用いる傾向となつているのは誠に喜ばしいことである。

次に、私達が行なつた無菌マウスによる結核実験の成績^{32)~36)}について述べることにする。常在細菌叢 (主として腸内フローラ) が病原体の感染に対する抵抗性にどのような影響を与えているかということは宿主の感染抵抗性を考える際にまず第一に考えておかなければならない点である。興味ある事実は、無菌マウスの結核菌感染に対する抵抗性は SPF マウスよりも著しく低いということである。また、結核死菌感作後のツベルクリン・アレルギーをみると、無菌マウスは SPF マウスより著し

く劣ることが知られた。無菌マウスの遅延型アレルギー低反応性の機序については、私達はすでにアレルギー表現 (expression) の段階での無菌マウスのマクロファージの働きは正常であるが、感作リンパ球の感作の誘導および発達の段階で無菌マウスは SPF マウスと異なることを示す実験成績を得ている。

このような無菌マウスと SPF マウスとの間の結核感染抵抗性および遅延型アレルギー発現の差異の機序については、感作誘導の段階でマクロファージにフローラから何らかの影響が作用するのか、その結果マクロファージより T リンパ球への抗原情報の伝達が影響を受けるのか、あるいは T リンパ球の分化増殖にフローラが直接働くのかなどは重要な研究課題である。

また、無菌マウスにフローラを構成している大腸菌を単一定着させただけでも、ツベルクリン・アレルギーは相当程度回復し、一代継代すると SPF マウスと同程度の反応を示すようになるのに、感染抵抗性の方は数代継代しても容易に回復せず、SPF マウスと同程度の抵抗性を獲得するには相当数継代を行なう必要がある。この問題の解明のためにはフローラの構成菌の種類、フローラによる宿主のマクロファージやリンパ球などの活性化の問題など多くの事柄が検討されなければならないものと

Table 1. Lethal Effect of i.v. Administered *E. coli* in GF and GB Mice

Dose of <i>E. coli</i> (v.u)	Group	Mortality (%)
5 × 10 ⁸	GF	83.3 (5/6)
	GB*	40.0 (2/5)
3.8 × 10 ⁸	GF	83.3 (5/6)
	GB*	28.6 (2/7)
5 × 10 ⁸	GF	100 (5/5)
	GB**	100 (5/5)
4 × 10 ⁸	GF	83.3 (5/6)
	GB**	100 (5/5)

* 3 weeks after administration with *B. longum*

** 2 weeks after administration with *B. longum*

Table 2. Viable Counts of *M. bovis* Ravenel in Organs of GF, GB and SPF Mice

Group	No. mice	Liver	Lung
GF	3	6.28 ± 0.39 (7.36 ± 0.31)	7.44 ± 0.23 (7.95 ± 0.27)
GB	6	5.28 ± 0.29 (6.49 ± 0.27)	6.48 ± 0.22 (7.04 ± 0.21)
SPF	6	4.13 ± 0.04 (5.25 ± 0.16)	5.71 ± 0.27 (6.08 ± 0.32)

Values indicate mean(log) ± S.D. per 100 mg tissue

Values in parentheses indicate per whole organ

Mice were sacrificed 9ws after injection (9 × 10⁷/mouse)

Table 3. Number of Granulomas and Viable BCG in the Liver of Nudes Transferred with Spleen Cells

Exp.	Spleen cells		Recipient liver*	
	Donor	H-2 haplotype region KIrSD	Number of granulomas	Viable counts (log)
1	BALB/C	dddd	245.2±52.2	6.22±0.15
	C ₅₇ BL/6	bbbb	10.6±5.5	6.82±0.11
	C ₅₇ BL/10	bbbb	12.0±7.3	6.84±0.25
	No cell		8.0±5.1	6.68±0.29
2	B10.D2/	dddd	147.2±90.1	6.78±0.30
	DDD	?	18.2±9.4	7.00±0.07
	HR	?	15.0±6.8	6.76±0.30
	No cell		20.6±7.5	6.92±0.08
3	HTG	dddb	187.8±125.6	6.66±0.56
	B10A(5R)	bbdd	58.8±17.4	7.48±0.11
	B10.BR	KKKK	42.0±6.7	7.55±0.13
	No cell		43.2±5.1	7.46±0.11

* Average of 4~5 mice

Table 4. Effect of Transfer of Spleen Cells Treated with Anti BAT+C'

Treatment	No. mice	Liver	
		Number of granulomas	Viable counts (log)
antiBAT+C'	6	100.0±26.1	7.60±0.25
C' only	6	373.3±49.9	6.67±0.10
No cell	6	78.3±15.6	7.54±0.17

思われる。

無菌マウスに腸内常在菌を経口投与した場合、投与菌はマウス体内でどのような態度をとっているのであろうかは興味のあるところである。最近山崎ら³⁷⁾が行なった実験成績では、無菌マウスに腸内常在菌叢を構成する菌の1つである *Bifidobacterium longum* (以下 B 菌と略す) を経口投与すると、投与後 7, 14 日において肝、腎に B 菌を証明することができたが、21 日には培養によつては証明できなかつた。次に、B 菌を投与した無菌マウス (GB と略す) に病原大腸菌 (0-111, K-58) を静注により感染させると、Table 1 に示すように、投与後 3 週に感染させた場合には GB 群は無処理無菌マウス (GF と略す) 群より死亡率が明らかに低下していることが知られた。また、同様の実験を強毒結核菌 Ravelen 株感染によつて調べてみると、Table 2 に示すように臓器内生菌数の比較では GB 群は GF 群と SPF マウスとの中間の値を示し、B 菌を経口投与することによつて無菌マウスが結核菌感染に対する抵抗性も増強することが知られた。このような抵抗性の増強はフローラによつて無菌マウスのマクロファージの活性化が起こっているためであることが考えられ、これを示唆する実験成績が山崎ら³⁸⁾によ

つて報告されている。

3. ヌードマウスによる実験的結核症の研究

結核感染に対する宿主の抵抗性、すなわち細胞性免疫、遅延型アレルギーの成立には胸腺 (T リンパ球) が重要な役割を果たすことが明らかにされて、T リンパ球の機能の解析の手段として先天的胸腺欠損ヌードマウスが広く使用されるようになった。

私達は 1974 年以来ヌードマウスを用いて結核実験を行ない、すでにその成績^{36)38)~43)}を度々報告している。これを要約すると、ヌードマウス (BALB/C 系 nu/nu マウス) の牛型結核菌 (Ravelen 株) 感染実験によればヌードマウスはヘテロマウス (nu/+ : nu/nu と同腹の nu 遺伝子が heterozygous なマウス) より結核感染抵抗性が弱いことがわかつた。

次に、ヌードマウスの BCG 感染実験についてであるが、武谷ら⁴³⁾はヌードマウスにおける BCG の増殖には日本株とフランス株との間に著明な差異があり、日本株 BCG はフランス株に比してビルレンスが著しく弱く、ヌードマウス臓器内で殆んど増殖しないと述べている。しかし、私達の実験では、ヌードマウスに BCG (日本株) $10^6 \sim 10^7$ を静脈内感染を行なうと、24 週以降に徐々に衰弱し、50 週までに死亡した。弱毒な BCG の感染においてもヌードマウスは全観察期間中最後まで菌の排除が起こらず、致死感染となつて遂には死亡することが認められた。

ヌードマウスにヘテロマウスの胸腺の移植または胸腺細胞の移入を行なうと、対照の無処理ヌードマウスより結核菌感染後の生存日数は延長し、臓器内生菌数も少な

いことがみられた。また、ヌードマウスが死亡する時期に移植マウスの臓器の病変を組織学的に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の形成されていることが認められた。この事実からT細胞がマウスの結核感染抵抗性および類上皮細胞肉芽腫の成立に重要な役割を果たしていることが知られる。

また、無菌ヌードマウスにフローラを定着させ、Gnotebiotic ヌードマウスにすることによつて、結核菌感染に対する抵抗性がやや高まるという実験結果から、無菌ヌードマウスのマクロファージの抗菌活性がフローラの刺激によつて非特異的に上昇することが考えられる。その機序の解明の1つとして、マクロファージの貪食能および消化能を比較検討し、Gnotebiotic ヌードマウスのマクロファージの活性は無菌ヌードマウスのそれよりも明らかに高いことがわかった。

更に、H-2 haplotype recombinant マウスの脾細胞移入による感染肉芽腫成立の実験を行つたが、その成績⁴⁵⁾によるとヌードマウスに ECG 感染後、H-2 Complex の haplotype が適合したマウスの脾細胞を移入すると、Table 3 に示すように典型的肉芽腫が形成され、菌の増殖が抑制されるのに対し、H-2 Complex 不適合細胞の移入では肉芽腫形成が少なく、菌増殖も抑制されなかつた。また、Table 4 に示すように脾細胞を抗 θ 血清と補体とで処理することによつて活性を失うことから、移入脾細胞中の活性を示す細胞はTリンパ球であることが明らかにされ、更にこの H-2 Complex の適合性はKI領域に含まれることが示唆された。齋藤⁴⁶⁾も細胞性免疫の発現におけるTリンパ球とマクロファージとの相互作用に対する H-2 Complex 適合性の影響について研究を続けており、免疫マウスリンパ球と受容マウスの H-2 Complex が適合する場合にのみ、リンパ球移入による感染防御免疫の伝達が可能であると述べている。

以上述べた私達の研究成績から少しく考察を行なうと次の通りである。①近交系や SPF マウス、更に無菌マウスやヌードマウスなどの出現は新しい検査方法の開発や学問的な新発見と相俟つて、結核の実験的研究の発展に寄与したところが極めて大きい。無菌マウスにおけるフローラの実験で述べたように、平素実験に使用されている正常動物は各種の微生物からなるフローラの洗礼を受けており、すでに前処置された動物であることを忘れてはならない。②結核に限らず、あらゆる感染症の動物実験について共通していえることであるが、“Genetical control, Disease control, Environmental control” された実験動物を用いて、よく規制された環境で動物実験を行なうことによつて初めて信頼しうる成績が得られるということは、動物実験を行なうものの常識である。しかし、この条件を充分満たす実験動物や動物実験室を用意することはそう簡単ではない。研究目的に合致した実験

動物がたやすく入手可能な供給体制、動物実験施設、その他の必要な研究基盤の早急な整備が望まれるところである。③近年免疫学の研究において免疫遺伝学の重要性が指摘されており、マウスにおいてはヒトの HL-A 系との対比から H-2 系が重視されてきている。我が国ではこの方面の対応が著しく遅れており、特に H-2 遺伝子群 haplotype が明確にされた近交系マウス、H-2 congenic 系マウスなどを結核研究に導入することが必要である。④我が国の結核研究、特に基礎研究進歩の跡を回顧すると、その大きな推進力となつたものとして文部省総合研究結核研究班や1960年以降は日米医学協力計画委員会結核部会の活発な共同研究がある。これらの研究活動が我が国の結核研究の発展に対し大きな貢献を果たしたことを特記しておかなければならない。

終わりに本特別講演の機会を与えられた山村雄一会長に心からの謝意を表すると共に、上田雄幹、山崎省二両博士はじめ多くの共同研究者のご協力に深謝する。

文 献

- 1) 小川辰次・佐波 薫：結核，24：45，1949.
- 2) 小川辰次：結核，24：51，1949.
- 3) 小川辰次・石井和夫：結核，24：57，1949.
- 4) 小川辰次他：結核，24：80；97，1949.
- 5) 岩崎龍郎・小川辰次：結核，24：173，1949.
- 6) 染谷四郎他：実験動物彙報，4：57，1955.
- 7) 染谷四郎：結核，35(増刊号)：1，1960.
- 8) 染谷四郎：胸部疾患，4：485，1960.
- 9) 染谷四郎他：日本細菌学雑誌，17：886，1962.
- 10) 染谷四郎他：日本臨床結核，15：28，1956.
- 11) 染谷四郎・林 治：日本細菌学雑誌，11：979，1956.
- 12) 林 治・染谷四郎：日本細菌学雑誌，13：658，1958.
- 13) 染谷四郎・林 治：結核，34：78，1959.
- 14) 小山憲次郎：結核，39：64，1964.
- 15) 染谷四郎：厚生指針，12：8，1965.
- 16) 小山憲次郎：結核，40：295，1965.
- 17) 金井興美：医学と生物学，59：74，1961.
- 18) 金井興美：医学と生物学，59：93，1961.
- 19) 金井興美：医学と生物学，59：167，1961.
- 20) Chase, M.W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 59：134，1945.
- 21) 橋本達一郎・三浦 馨：医学と生物学，69：247，1964.
- 22) 橋本達一郎・三浦 馨：医学と生物学，69：291，1964.
- 23) Gray, D.F. and Jennings, P.A.: Am. Rev. Tuberc., 72：171，1955.
- 24) David, J.R. et al.: J. Immun., 93：264，1964.
- 25) Yamamoto, K. and Anacker, R.L.: Infect. Immun., 1：587，1970.
- 26) Yamamoto, K. et al.: Infect. Immun., 1：595，1970.
- 27) 山崎省二他：結核，50：53，1975.
- 28) Nakamura, R.M. and Tokunaga, T.: Infect. Immun., 22：637，1978.

- 29) Nakamura, R.M. and Tokunaga, T.: *Infect. Immun.*, 27 : 268, 1980.
- 30) 山崎省二他 : 結核, 43 : 373, 1968.
- 31) 小山憲次朗他 : 結核, 43 : 373, 1968.
- 32) 上田雄幹 : 結核, 48 : 1, 1973.
- 33) Ueda, K. et al.: *J. Reticuloendothel. Soc.*, 12 : 545, 1973.
- 34) Ueda, K. et al.: *Jap. J. Microbiol.*, 17 : 533, 1973.
- 35) Ueda, K. et al.: *J. Reticuloendothel. Soc.*, 18 : 107, 1975.
- 36) 上田雄幹 : 結核, 52 : 533, 1977.
- 37) 山崎省二他 : 第43回日本細菌学会関東支部総会 (1980年6月6日).
- 38) 山崎省二他 : 日米医学協力計画結核部会報告書 (昭和53年度), p. 131, 1979.
- 39) Ueda, K. et al.: *J. Reticuloendothel. Soc.*, 19 : 77, 1976.
- 40) Ueda, K. et al.: *Jap. J. Exp. Med.*, 47 : 467, 1977.
- 41) Ueda, K. et al.: *Jap. J. Exp. Med.*, 48 : 533, 1978.
- 42) Ueda, K. et al.: *Jap. J. Tuberc. Chest. Dis.*, 21 : 15, 1978.
- 43) 上田雄幹 : 結核, 54 : 445, 1979.
- 44) Takeya, K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 100 : 403, 1977.
- 45) 上田雄幹他 : 日米医学協力計画結核部会報告書 (昭和53年度), p. 175, 1979.
- 46) 齊藤和久 : 日米医学協力計画結核部会報告書 (昭和53年度), p. 141, 1979.