ベージュマウスへのらい菌接種

高 坂 健 二 宮 田 泰 代 伊 藤 利根太郎
岡 村 宣 孝*

(大阪大学微生物病研究所癩部門)

(*兵庫医科大学内科学第5講座)

(受付: 1985年6月14日)

ヒトの Chediak-Higashi 症候群のモデル動物として利用されているベージュ (Beige) マウスの名称は、体毛, 耳, 尾, および眼の色の薄さに由来した beige mutant であるが, natural killer (NK) 活性の欠損が明らかにされて, 腫瘍免疫学の領域において注目されている(1)。

Chediak-Higashi syndrome は, 常染色体の劣性遺伝を示す比較的稀な疾患であり, 毛髪, 皮膚, 眼底などの部分的白皮症, 白血球その他体細胞質内の巨大顆粒または巨体ライソゾームの存在, そして, 化膿性細菌に対する抵抗力の減弱などが, 主要な診断上の特徴とされている。本疾患は重感染症を起し易く, 従って予後は極めて悪い(2)。

一方, ベージュマウスは, 第13染色体の linkage group XIVに突然変異を来したもので, beige 遺伝子 (bg/bg) は劣性であり, この遺伝子をホモにもつのがベージュ

マウスである(3)。その特質も, 部分的白色, 巨大顆粒の形成など Chediak-Higashi 症候群のそれと類似している(4,5)。さらに, 巨大顆粒の形成など lysosome の形態的異常のほか, lysosomal enzyme (Cneutral protease) の欠損, そして, NK 以外の cytolysis が正常であるにもかかわらず, NK 活性のみを欠損していることも明らかにされた(6-8)。

著者ら(9)および Colston ら(10)は, さきに先天性胸腺欠損ヌードマウスによる実験らい, すなわち, らい腫らいの実験モデルを開発, 確立して, らいの実験的研究への有用性を示し(11), らいの細菌学, 免疫学および化学療法の研究など各方面において利用されている(12-14)。

ヌードマウスの実験系とは別に, 実験らいを作りうる実験動物の検索を進めており, 本報では, ベージュマウスのらい菌感受性について報告する。

Table 1 Comparative table of Chediak-Higashi syndrome and Beige mouse

	Chediak-Higashi syndrome	Beige mouse
Genetics	autosomal, recessive	autosomal, recessive
Infectious diseases	easy	easy
Partial albinism	+	+
Giant granule	+	+
Pigment granule	decrease, giantic, amorphous	decrease, giantic, amorphous
Leucocytes		
number	decrease	normal
chemotaxis	reduced	reduced
phagocytosis	normal	normal
bactericidal activity	reduced	reduced
Lysosomal enzyme	neutral protease defect	neutral protease defect
Natural killer activity	defective	defective

(ref: K. Nakano¹⁾)

実験材料と方法

マウス：岡村によって作出，維持されたページュマウス，C57BL/6J-*bg/bg*，44匹および先天性肥満細胞欠損マウス（W/W^u）とページュマウスとの交配で得た W/W^u*bg/bg* マウスの F₃，18匹が実験に供され，対照として，正常マウスの CBA マウス22匹および C3H マウス10匹，さらに，ヌードマウス，BALB/c-*nu/nu*，10匹が加えられた。供試マウスはいずれも約6週齢である。

接種らい菌：患者由来ヌードマウス継代菌ならびに患者より直接得られたらい菌を接種材料にした。すなわち，ヌードマウスで継代した未治療患者由来のらい菌，クルメ（ナハ）株の6代菌および7代菌であり，他方，患者材料は，駿河療養所より分与を受けた再燃患者材料，スルガ-Y.M. および 奄美和光園より分与された未治療新患者材料，アマミ-K.M. である。

方法：菌液の調整は，まずらい菌を継代接種しているヌードマウスから，発症足蹠を可及的無菌的に切断し，ハサミで細切後磁製乳鉢内で軽く磨細，組織培養液 Ham-F12を加えて菌液とした。この菌液を1,000回転5分間遠心沈殿して上清をとり，さらに，沈渣に同様の操作を3回繰返してとった上清をプールしてアルカリ処理を行った。すなわち，プールした上清に等量の 1N NaOH を加えたのちに4倍量の蒸留水を加えて10,000r.p.m 20分の遠沈後，上清を捨てる。沈渣を蒸留水に再浮遊させて10,000r.p.m. 20分の遠沈，これをさらにもう一度繰返して菌の洗滌を行った。洗滌した最終沈渣を再度 Ham-F12液に浮遊させ，適宜希釈して接種菌液とした。

患者材料からの菌液の調製も，ヌードマウス継代らい菌のそれと同様の手順に従った。

このようにして作製した菌液から， $5.0 \times 10^3/0.05\text{ml}$ ， $1.1 \times 10^5/0.05\text{ml}$ ， $5.0 \times 10^6/0.05\text{ml}$ ， $2.0 \times 10^7/0.05\text{ml}$ および $7.0 \times 10^7/0.05\text{ml}$ のらい菌が，それぞれのマウスの右後足蹠に，ツベルクリン用注射器によって注射された。

供試菌液は，ブイヨン，普通寒天培地および小川培地で雑菌テストが行われ，雑菌の混入のなかったことが確かめられた。

判定法：菌接種後の経過に供して殺したマウスの足蹠を細切して乳剤を作り，菌数計算的に足蹠内におけるらい菌増殖の有無を調べ，対照マウスのそれと比較検討して判定するようにした。

実験成績

成績は Table 2および3に示した通りである。Table 2には，患者由来ヌードマウス継代らい菌の接種成績を示し，実験1および2はそれぞれ6代菌，7代菌の結果である。一方 Table 3には，患者から直接に得たらい菌接種の成績を示し，実験3，4は，それぞれ再燃および未治療新患者の材料である。

まず Table 2についてみると，実験1では，接種菌量を $5.0 \times 10^3/0.05\text{ml}$ と $7.0 \times 10^7/0.05\text{ml}$ の2通りとした。 5.0×10^3 接種の場合，対照の CBA マウスでは18カ月後に 8.1×10^5 ，20カ月後に 2.3×10^6 の菌が足蹠より回収された。この菌数は，従来の正常マウス足蹠におけるらい菌増殖のパターンに較べると著しく遅くれ， 10^6 に達するまでに20カ月を要していたが，傾向は同じである。一方，ページュマウスは，C57BL/6J-*bg/bg* および W/W^u*bg/bg* とともに，18カ月の観察であるが，前者ではほぼ対照と同数の菌が算定されたのに対し，後者ではより少い増菌であった。

他方， 7.0×10^7 を接種した場合には，対照群の CBA マウスおよびページュマウスの各群は，ともに接種菌量以下の菌数が算出されたに過ぎず，全く増菌していない。むしろ，減少傾向である。

実験2についても，対照群，実験群ともに，実験1と同様に，なんらの増菌の徴も示されていない。これに対して，ヌードマウス足蹠における増菌は著しく，16カ月後に 3.1×10^{10} の菌が回収された。

Table 3は，直接患者らい菌を接種した実験成績を示したものである。すなわち，実験3では再燃患者らい菌，そして実験4では未治療新患者らい菌が接種材料として用いられた。この場合，ページュマウスは C57BL/6J*bg/bg* のみを用い，接種菌量は 5.0×10^3 ， 1.1×10^5 ， 5.0×10^5 ， 5.0×10^6 である。

実験3，4はいずれも接種菌量を2段階に分けているが，ページュマウスの増菌傾向は対照マウスと大差のないものであって，ヌードマウスのそれと較べると大きな違いである。雄マウスに比して，雌マウスからの菌数がやや少いようであるが，雌雄間における感受性の違いを意味するほどのものとは思えない。

要するに，NK 活性を殆んど欠くページュマウス，すなわち，C57BL/6J-*bg/bg* および，beige 因子を導入した肥満細胞欠損マウス W/W^u-*bg/bg* のらい菌に対する感受性は，正常マウスの CBA あるいは C3H マウスの感受性を越えるものではなく，これらとほぼ同程

Table 2 Attempt to inoculate *M. leprae* into C57BL/6J-*bg/bg* and W/W^e-*bg/bg* mice (1)
Exp. 1. (Kurume-naha), 6th passages

Mouse	Inoculum	Harvested	
		18 months	20 months
CBA	5.0×10^3	8.1×10^5 (n=4)	2.3×10^6 (n=2)
C57BL/6J- <i>bg/bg</i>	5.0×10^3	9.4×10^5 (n=4)	
W/W ^e - <i>bg/bg</i> (F ₃)	5.0×10^3	1.4×10^5 (n=4)	
CBA	7.0×10^7	6.1×10^7 (n=4)	2.8×10^7 (n=2)
C57BL/6J- <i>bg/bg</i>	7.0×10^7	3.9×10^7 (n=4)	
W/W ^e - <i>bg/bg</i> (F ₃)	7.0×10^7	9.5×10^6 (n=4)	

Exp. 2. (Kurume-naha), 7th passages

Mouse	Inoculum	Harvested		
		14 months	16 mon.	17mon.
C3H	2.0×10^7	1.7×10^7 (n=4)	/	1.3×10^7 (n=2)
C57BL/6J- <i>bg/bg</i>	2.0×10^7	1.2×10^7 (n=4)	/	
BALB/c- <i>nu/nu</i>	2.0×10^7	/		3.1×10^{10}

n : number of mice

Table 3 Attempt to inoculate *M. leprae* into C57BL/6J-*bg/bg* mice (2)
Exp. 3. (Suruga-YM), patient (relapsed)

Mouse	Inoculum	Harvested	
		9 months	12 months
CBA	5.0×10^3	4.8×10^5 (n=4)	3.4×10^6 (n=1)
C57BL/6J- <i>bg/bg</i> (♂)	5.0×10^3	6.5×10^5 (n=4)	1.3×10^6 (n=1)
" (♀)	5.0×10^3	2.4×10^5 (n=4)	7.4×10^5 (n=2)
CBA	1.1×10^5	1.2×10^6 (n=4)	2.6×10^6 (n=1)
C57BL/6J- <i>bg/bg</i> (♀)	1.1×10^5	1.6×10^6 (n=4)	9.7×10^5 (n=1)

Exp. 4. (Amami-KM), patient (new and fresh)

Mouse	Inoculum	9 months
C3H	5.0×10^3	1.0×10^6 (n=4)
C57BL/6J- <i>bg/bg</i> (♂)	5.0×10^3	6.3×10^5 (n=4)
" (♀)	5.0×10^5	1.3×10^6 (n=4)
BALB/c- <i>nu/nu</i>	5.0×10^6	1.5×10^9 (n=1)

n : number of mice

度を示したに過ぎなかった。一方、ヌードマウスに接種したらい菌は、 5.0×10^6 接種の場合に9ヵ月後 1.5×10^9 /足、また、 2.0×10^7 接種の場合に 3.1×10^{10} /足(16ヵ月後)の菌が回収され、ヌードマウスのらい菌感受性の高

いことを示した。

考 案

W/W^e-*bg/bg* マウスは、遺伝性貧血マウスとして実

験血液学の分野で研究対象にされていたものであるが、先天的に肥満細胞を欠除していることが明らかになって、さらに利用価値が高まろうとしている^(15,16)。この $W/W^b\text{-}bg/bg$ マウスと $C57BL/6J\text{-}bg/bg$ のベージュマウスを交配して得られたのが $W/W^b\text{-}bg/bg$ マウスである。他方、ベージュマウスは人の Chediak-Higashi 症候群のモデル動物であって重症感染を起し易いことが知られている。従って、これらベージュマウスについてらい菌に対する感受性を検討したのが本報である。しかし、ベージュマウスの足趾内におけるらい菌の増殖は、正常マウス足趾内におけるそれを越えるものではなかった。容易に実験らいを形成するヌードマウスが高い NK 活性を有している^(17,18) ことと関連して、NK 活性がらい菌の増殖になんらの影響を及ぼさないであろうことが、ある程度予想されていたものであるが、 $C57BL/6J\text{-}bg/bg$ マウスおよび $W/W^b\text{-}bg/bg$ マウスはともに正常マウス足趾内におけるらい菌増殖と同傾向を示したに過ぎなかった。

結 語

ヒトの Chediak-Higashi 症候群のモデル動物であるベージュマウスならびにベージュマウスと肥満細胞欠損マウスとの交配で得られた $W/W^b\text{-}bg/bg$ マウスのらい菌に対する感受性を検討した。6 週齢ベージュマウス $C57BL/6J\text{-}bg/bg$ 44 匹および $W/W^b\text{-}bg/bg$ (F₃) 18 匹を供試し、その足趾に患者由来ヌードマウス継代らい菌、再燃患者らい菌および未治療新患者らい菌を接種し、足趾内におけるらい菌増殖の有無を菌数計算的に検討し、対照として同時に接種した正常マウスおよびヌードマウスの結果と比較した。しかし、ベージュマウス足趾内におけるらい菌増殖は、正常マウスにおけるものと同傾向を示したに過ぎなかった。

謝 辞

本研究は、日米医学協力研究会および大阪皮膚病研究会の援助によってその一部が行われた、深甚の謝意を表します。また、材料のご分与を頂いた国立療養所奄美和光園（真山旭園長）、同駿河療養所（石原重徳園長）の関係の方々ならびに培地の作製その他ご協力頂いた角田富美枝嬢に感謝いたします。

文 献

- 1) 中野啓一郎：Beige マウス，感染・炎症・免疫 **11**，258-265，(1981)。

- 2) 海老名卓三郎：Chediak-Higashi 病 (beige マウス)，疾患モデル動物ハンドブック，川俣順一，松下 宏編集，医歯薬出版 (1979)。
- 3) Lane, P.W.: Mouse News Letter **26**, 35, (1962)。
- 4) Vassali, J.D., Granelli-Piperno, Griscelli, C. and Reich, E.: Specific protease deficiency in polymorphonuclear leukocytes of Chediak-Higashi syndrome and beige mice. J. Exp. Med. **147**, 1285-1290, (1978)。
- 5) Roder, J. C. and Duwe, A.: The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. Nature **278**, 451-453, (1979)。
- 6) Roder, J.C.: The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermind impairment in natural killer cell function. J. Immun. **123**, 2168-2173, (1979)。
- 7) Roder, J.C., M.L. Lohman-Matters, W. Domizig and Wigzell, H.: The beige mutation in the mouse. II. Selectivity of the natural killer (NK) cell defect. J. Immun. **123**, 2174-2181, (1979)。
- 8) Kohsaka, K., Mori, T. and Ito, T.: Lepromatoid lesion developed in nude mouse inoculated with *Mycobacterium leprae*. Animal transmission of leprosy. La Lepro (Jap. J. Lep.) **45**, 177-187, (1976)。
- 9) Colston, M.J. and Hilson, G.R.F.: Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. Nature **262**, 399-400, (1976)。
- 10) 高坂，牧野，森，伊藤：ヌードマウスによる実験らいの確立，日本細菌誌，**33**，389-394，(1978)。
- 11) Kohsaka, K., Yoneda, Y., Arimochi, Y., Makino, M., Mori, T. and Ito, T.: Nude mice as a model for chemotherapy of leprosy. Proc 3rd Inter. Workshop on Nude Mice **1**, 59-65 Gustav Fischer (1982)。
- 12) 米田一男：らいの化学療法に関する研究。ヌードマウス実験らいによるらい化学療法剤クリーニング法の検討。阪大医誌，**33**，63-74，(1984)。
- 13) Hastings, R.C., Chehl, S., Shanon, E.J. and Job, C.K.: Reversal reactions in *M. leprae*-infected nude mice. Indian, J. Lep **56** (No. 1 suppl.) VIII/326, (1984)。
- 14) Kitamura, Y, Go, S. and Hatanaka, K.: Decrease of mast cells in W/W^b mice and their increase by bone marrow transplantation. Blood **52**, 447-452, (1978)。
- 15) 北村幸彦，横山正雄，園田 隆：肥満細胞欠損マウスとその胃病変，自然発症疾患モデル動物

- の開発と利用, 松下 宏編, 清至書院, (1982).
- 16) Tamaoki, N. et al: Characterization and strain difference of natural killer cells in nude mice. Proc, 3rd Int. Workshop on Nude Mice, 2, 413-421, Gustav Fischer, (1982).
- 17) 玉置憲一, 垣生園子: ノードマウスの Natural killer (NK) 細胞と移植腫瘍に対する効果, 人癌とノードマウス, 下里幸雄・玉置憲一編, 医歯薬出版, (1982).

Inoculation of *Mycobacterium leprae* into beige mice

KENJI KOHSAKA, YASUYO MIYATA, TONETARO ITO

(Department of Leprology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka, Japan)

NOBUTAKA OKAMURA

(Department of Internal Medicine 5th, Hyogo Medical Collage)

Beige mouse which has partially defective natural killer (NK) function, is known as a model of Chediak-Higashi syndrome in man.

Six-week-old beige mice, C57BL/6J-*bg/bg* and W/W^{*}*bg/bg*, were provided from Okamura and used in the experiment. CBA and C3H mice or nude mice (BALB/c-*nu/nu*) were added as controls.

Bacillary suspensions of *M. leprae* were prepared from 3 materials. Kurume-naha strain, 6th and 7th generation, was obtained from nude mouse developed experimental leprosy (obtained from a previously untreated patient and was passaged in nude mice). Suruga-YM and Amami-KM strains were prepared from a leproma taken from a relapse case of a lepromatous patient and from a newly untreated patient, respectively. The mice were inoculated with 5.0×10^3 , 1.1×10^5 , 5.0×10^5 , 5.0×10^6 , 2.0×10^7 and 7.0×10^7 *M. leprae* per 0.05 ml into their right hind foot pads.

No significant differences were observed in the growth of *M. leprae* between the beige and normal mice even though the proliferation was remarkable in nude mouse. When a small number of *M. leprae*, 5.0×10^3 , 1.1×10^5 and 5.0×10^5 was inoculated in beige mice, bacillary proliferation reached up to 10^6 in the foot pad the same as normal control group. On the other hand, no any proliferation found in the mice inoculated with a large number of the bacilli.

The results indicate that the susceptibility of beige mouse to infection of *M. leprae* was not over than that of normal mice.