

ヨーネ菌実験感染マウスモデルの肉芽腫形成に関する
病理学的検討

田中 省吾

目次

序文	-----	3
第一章：近交系マウスを用いたヨーネ病実験感染モデルの確立	----	7
1. 緒言		
2. 材料と方法		
	・マウスおよびヨーネ菌接種法	
	・病理組織学的検索	
	・肝臓および脾臓における抗酸菌数の測定	
	・形態計測学的解析	
	・統計処理	
3. 成績		
	・臨床症状および肉眼所見	
	・病理組織学的所見	
	・形態計測学的解析結果	
4. 考察		
第二章：ヨーネ菌実験感染マウスに形成される肉芽腫性病変の組織化学的、 超微細形態学および免疫組織化学的比較	-----	13
1. 緒言		
2. 材料と方法		
	・マウスおよびヨーネ菌接種法	
	・酸性フォスファターゼ (AcPase) の組織化学的検出	
	・透過型電子顕微鏡による観察	
	・免疫組織化学的検索	
	・AcPase 陽性部および免疫染色陽性部面積の画像解析	
	・統計処理	
3. 成績		
	・光顕による AcPase 陽性反応部の検索結果	

- ・肉芽腫の超微細形態学的所見
- ・脾臓の免疫組織化学的所見および画像解析結果

4. 考察

第三章：ヨ－ネ菌実験感染 $\gamma\delta$ 型Tリンパ球欠損BALB/cマウスにみられた
肉芽腫形成の抑制について。 ----- 23

1. 緒言

2. 材料と方法

- ・マウス
- ・ヨ－ネ菌接種法および病理組織学的検索
- ・形態計測学的解析
- ・脾臓からのヨ－ネ菌分離培養
- ・統計処理

3. 成績

- ・病理組織学的所見
- ・肝臓に形成された肉芽腫の形態計測学的検索結果
- ・脾臓におけるヨ－ネ菌の細菌学的検索結果

4. 考察

要約 ----- 30

結論 ----- 34

謝辞 ----- 36

文献 ----- 37

図表 ----- 47

序 文

ヨーネ病は、臨床的に慢性持続性の下痢や消瘦を主徴とし、病理組織学的には、回腸遠位部を主体とする肉芽腫性腸炎および腸間膜リンパ節における肉芽腫性リンパ節炎を特徴とする疾病である [17]。本病は、抗酸菌増殖を伴うウシの腸結核様疾病として Johne と Frothingham [44] により 1895 年に初めて報告された。その後、Bang ら [3] により多数の類似症例が病理組織学的に検討された結果、ヨーネ病 (Johne disease) あるいは別名パラ結核病 (paratuberculosis) として今日知られるようになった。1910 年には、初めて原因菌が分離培養され [90]、本病がヨーネ菌 (*Mycobacterium paratuberculosis*; 旧名 *M. johnei*) 感染に起因することが明らかにされた。ヨーネ菌は、抗酸菌属の遅発育性菌に属し [97]、その生物学的特性として *in vivo* で感染宿主の食細胞に細胞内寄生性を示すこと [17] や *in vitro* でマイコバクチン (mycobactin) 依存性に発育することが知られている [68]。また、抗酸菌属間の DNA 相同性に関する研究から、ヨーネ菌は、鳥型結核菌 (*Mycobacterium avium*) に極めて近縁であることが明らかにされ、現在は、鳥型結核菌の亜種 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) として分類学的な位置づけがなされている [80]。ヨーネ菌の感染宿主域は、自然感染症例として報告されているウシ [17]、メン羊 [46, 86] およびヤギ [92] 等の家畜反芻獣が大部分を占めるが、シカ、ムフロン、エルク、アメリカバイソン等の野生反芻獣における希少症例も報告されている [17, 93]。また、単胃の家畜を用いたヨーネ菌感染実験により、ブタ [47, 54]、ニワトリ [55] およびウマ [56] にも本菌に対する感受性があることが知られている。

ヨーネ病の発生は、今日までに欧米を始めとしてオセアニア、アジア、アフリカおよび中・南米で報告されているが、既に全世界の畜産国に蔓延しているものと推測されている [18]。我が国におけるヨーネ病の発生は、1930 年に英国から輸入されたショートホーン種のウシで初めて記載され [89]、1959 年に下痢を発病して斃死したアメリカからの輸入ウシの症例が、病理学的に確定診断された初発とされている [96]。

その後、輸入ウシと関連して1970年まで散発的な発生がみられるようになった [34]。そのため海外からの輸入牛の増加に伴うヨーネ病防疫対策の強化を目的として、1971年に我が国の家畜伝染病予防法で定める法定伝染病に指定された。ヨーネ病による法令殺処分頭数は、1980年まで年間10頭未満であり、臨床症状と病理組織学的検査をもとにした年間総検査頭数に対する平均陽性率も0.07%以下であった。しかし、国内での移動に伴う不顕性感染ウシからの二次感染と思われる黒毛和種群における発生が報告 [95] され、菌分離法が診断に応用されるようになると法令殺処分されるウシの頭数は、1980年以降著しい増加傾向に転じた。家畜伝染病予防事業による検査頭数の増加と検査地域の拡大を反映して法令殺処分頭数は、1986年に100頭を、1991年には200頭を突破した。翌1992年にはヨーネ病診断基準の改訂によりELISA法が正式採択されたことによって検出感度も向上し、1992年から1996年までの5年間の平均殺処分頭数は243.8頭、平均陽性率は0.22%であった。検査頭数が急増した1997年には、殺処分頭数は574頭に達し、陽性率も0.81%と過去最高を記録した。1998年には、検査頭数のさらなる増加に伴いそれを上回る785頭が殺処分されたが、陽性率は、0.20%と逆に低下がみられた。また昨年の殺処分頭数は886頭であり、本病は、我が国の法定伝染病に指定されている疾病の中でも群を抜いた発生がみられることから我が国の畜産界における最重要経済損耗疾病として現在認識されている。

ヨーネ病の感染は、多くの場合生後間もない時期にヨーネ菌によって汚染された糞便を哺乳獣が経口的に接種することにより始まる [48]。その後、4ヶ月 [84] から15年 [58] におよぶ長い不顕性感染期を経て発症に至るが、むしろ若齢での発症は希で、通常は3～5歳齢で発症する例が多い [58]。ヨーネ病を防濁するためには、この長期にわたる不顕性感染期において可能な限り早期に的確な診断を下し、罹患獣を適切に摘発淘汰することが重要であることから、特異性と感度がともに高く実用的で有効なヨーネ病の新しい早期診断法、さらには予防法の開発が期待されている。そのためにもヨーネ病の病理発生、特に不顕性感染期における生体の免疫反応や発症に至る病態を解明することが不可欠であるが、未だ充分明らかにされていないのが現状で

ある。そして、これまでヨーネ病の病理発生機序に関する研究を困難にしてきた原因として、本来の宿主である大型の反芻獣を用いた感染実験が容易でないことやヨーネ菌感染による肉芽腫形成を簡便に再現できる適当な実験小動物モデルが存在しなかったことが挙げられている。

ヨーネ病の病理発生機序の解明を目的として、現在までに数多くの実験小動物によるヨーネ病実験感染モデルの作出が試みられてきた。1943年にFrancis [29] は、ヨーネ菌接種後8ヶ月のマウスの腸管にウシのヨーネ病に類似する病変の再現に初めて成功し、その後多くの研究者によってマウス [12, 15, 39, 57, 64, 90], ラット [90], ハムスター [33, 39, 41], モルモット [64, 90], ウサギ [39, 41, 64, 75, 90], ニワトリ [55, 64] およびハト [64] を用いたヨーネ菌感染実験が試みられてきた。そして多くの場合、ウシのヨーネ病の特徴所見である腸管の類上皮細胞肉芽腫を形成するには至らなかった。また、接種された菌株歴や接種生菌量が明確でなかったために確実に病変を早期に再現可能なモデルとは成り得なかった。しかし、肝臓や脾臓に形成される病変から、マウスがウサギやその他の実験小動物に比べてヨーネ菌に対する感受性が高く、ヨーネ病実験感染モデルとしての可能性が指摘されていた [29]。そしてマウスの系統によって感受性が著しく異なることやウシのヨーネ病に類する腸管病変を形成させるまでに時間を要すること [13] が今後の問題となっていた。また、ヌードマウス [1, 38] や SCID bg マウス [67] などの免疫機能不全マウスを用いたヨーネ菌実験感染も試みられた。ヨーネ病の病理発生機序およびマウス系統間における感受性差異について免疫担当細胞の動態や機能から解明していくためには、感受性が高く早期に確実に病変を再現できる近交系マウス系統を見いだすことが必要である。さらに、実験感染時に用いたヨーネ菌の株歴、継代数、接種法および接種生菌数を明らかにしてヨーネ病実験感染モデルとして確立させることが必要である。

近交系マウスのヨーネ菌に対する感受性は、第1染色体上の *Bcg* 遺伝子によって調節されていることが明らかにされており [31], ウシのヨーネ菌に対する抗病性を支配する遺伝的形質も一躍注目されるようになった。*Bcg* 遺伝子は、近年、*Lsh* 遺伝

子および *Ity* 遺伝子とともに natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) 遺伝子として統合された [91]. 同遺伝子はマクロファージの膜輸送能に関する膜蛋白をコードし, マクロファージの機能的差異に関連していること [9] が知られるようになった. しかし, *Bcg* (*Nramp*) 遺伝子がマウスの系統間でどのような機序により感受性差異を生じるか, またヨーネ病の病理発生機序との関連については, 未だ完全に解明されるに至っていない. 本論文では, ヨーネ病実験感染モデルを確立すること目的として, 対立する *Bcg* 遺伝子型を持つ近交系の BALB/c マウス (感受性) と C3H/HeJ マウス (抵抗性) を用いてヨーネ菌実験感染を試みた. これを用いて *Bcg* 遺伝子によって支配される両マウス系統間における免疫応答の差異を病理組織学的に検討した. また形成される病変のマウス系統間差異を組織化学的, 超微細形態学および免疫組織化学的手法により比較した. さらにウシの腸管免疫組織に多数分布する $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が, ヨーネ菌に対するウシの高い感受性にどのような役割を果たしているのかを解明するため, マウスモデルでヨーネ菌実験感染を試みた. 実験には, 感受性系統 BALB/c マウスから作出した $\gamma\delta$ 型 T リンパ球欠損ミュータント BALB/c マウスを用い, ヨーネ菌感染後, 同細胞が欠損することによる肉芽腫形成および菌増殖性に及ぼす影響を検討した.

第一章：近交系マウスを用いたヨーネ病実験感染モデルの確立.

1. 緒言

ヨーネ病の病理発生機序に関しては、不明な点が未だに数多く残されているのが現状である。その原因の一つには、これまでヨーネ菌感染による肉芽腫形成を簡便に効率よく再現できる適当な実験小動物モデルが存在しなかったことが挙げられている。マウスは、系統により他の実験小動物と比較してヨーネ菌に対する感受性が高いことが報告されており [29]、マウスの先天的感受性および抵抗性は、第一染色体上の *Bcg* 遺伝子 (*Nramp* 遺伝子と同義 [91]) によって調節されていることが明らかにされている [31]。 *Bcg* 遺伝子には対立遺伝子 *Bcg^r* (抵抗性) と *Bcg^s* (感受性) が存在し、これらの遺伝子がマクロファージの多様な機能発現に関与していることが明らかにされている [9, 11]。しかし、ヨーネ菌感染に起因する病変形成に *Bcg* 遺伝子がどのような役割を果たしているのかについては解明されていない。

本章では、ヨーネ菌に対する感受性を比較するため、他の抗酸菌感染実験により感受性差異が認められている近交系マウス、BALB/c (*Bcg^s*) マウスと C3H/HeJ (*Bcg^r*) マウス [10, 35] を用いてヨーネ菌実験感染を試み、ヨーネ病実験感染モデルとしての可能性を病理組織学および形態計測学的に検討した。さらに *Bcg* 遺伝子が関与する両マウス系統の病変を病理組織学的に比較した。

2. 材料と方法

マウスおよびヨーネ菌接種法： 市販（日本エスエルシー K.K., 浜松市）の6週齢雌、BALB/c マウスおよび C3H/HeJ マウス計 40 頭を使用した。各系統マウス 12 頭に2ヶ月間培養したヨーネ菌 ATCC19698 株 [61] 生菌を各頭 0.5 ml (5×10^8 colony-forming units; CFU) 腹腔内に接種した。また非感染対照群として各系統マウス 8 頭に同量の

滅菌生理食塩水を腹腔内に接種した。

病理組織学的検索： ヨーネ菌接種後3週，6週，9週および32週の各週に両系統マウスの感染群3頭と対照群2頭をクロロフォルム吸入麻酔後，頸椎脱臼により安楽死させ，肝臓と脾臓を含む全主要臓器を採取した。肝臓と脾臓は重量測定後，10%リン酸緩衝ホルマリン（以下緩衝ホルマリン）で固定し，3ブロックに分割してパラフィン包埋した。その他の臓器も緩衝ホルマリンで固定後，パラフィン包埋した。各パラフィンブロックから5 μm 厚切片を作製し，HE染色あるいは抗酸菌染色（Ziehl-Neelsen法）を実施した。

肝臓および脾臓における抗酸菌数の測定： 肝臓内における抗酸菌数の測定は，抗酸菌染色標本上で光学顕微鏡下で観察された40箇所の結節性肉芽腫内に認められた菌数を測定した。また脾臓では，肉芽腫結節が接触，融合して肉芽腫結節を単位とする菌数測定が困難なため，倍率400倍の光学顕微鏡下で任意に選択された100視野に検出された総菌数を測定した。

形態計測学的解析： 肝臓と脾臓に形成された肉芽腫面積を両マウス系統間で比較するため，各マウスから採材した肝臓と脾臓の各3ブロックより作製したHE染色標本を用い，画像解析装置（Cosmozone, Nikon Co., 東京）により全肉芽腫面積（10個以上のマクロファージ集簇巣を一つの肉芽腫と定義）と切片全表面積を各切片上で測定した。測定結果から，肝臓と脾臓における各マウスの切片1 mm^2 あたりの平均肉芽腫面積を算出した。

統計処理： 得られた数値データの平均値，標準偏差および標準誤差は，農林水産省筑波計算センターのHP 9000/720ワークステーションを使用し，Statistical Analysis System (SAS)によって算出した。

3. 成績

臨床症状および肉眼所見

ヨーネ菌接種後32週までにウシのヨーネ病でみられるような下痢や消瘦等の臨床症状は、いずれの感染群マウスにも認められなかった。しかし、感染群 BALB/c マウスでは、菌接種後9週および32週において著明な脾臓の腫大と脾臓重量の増加 (Fig.1) がみられ、感染群 C3H/HeJ マウスの脾臓重量に比べて5倍および8倍にそれぞれ増加していた ($P < 0.05$)。非感染対照群マウスの脾臓重量は、両マウス系統とも菌接種後32週まで0.10 g から0.13 g の範囲内であった。一方、肝臓重量は、感染群 BALB/c マウスと C3H/HeJ マウスの間に有意差は認められなかった (データ示さず)。また菌接種後9週および32週の感染群 BALB/c マウスにおいて小腸の管壁に著明な肥厚がみられたが、感染群 C3H/HeJ マウスの腸管には、著変は認められなかった。両マウス系統の非感染対照群では、臨床症状および臓器の肉眼的変化はみられなかった。

病理組織学的所見

両系統とも感染群マウスの肝臓では、菌接種後3週でグリソン鞘周辺に肉芽腫の形成が認められた。感染群 BALB/c マウスの肝臓に形成された肉芽腫は、主として類上皮細胞で構成されており、接種後32週までに類上皮細胞肉芽腫 (Fig. 2) は肝小葉全体に広がっていた。一方、感染群 C3H/HeJ マウスの肝臓で菌接種後6週、9週および32週にみられた肉芽腫は、病理組織学的な特徴から BALB/c マウスと同様の類上皮細胞肉芽腫および類上皮細胞を中心に多数のリンパ球とマクロファージの浸潤がみられる肉芽腫 (Fig. 3) の2種類に分類された。菌接種後9週から32週までにリンパ球とマクロファージの浸潤を伴う肉芽腫が優位を占める傾向にあった。抗酸菌染色により肝臓に検出されたヨーネ菌は、両マウス系統とも肉芽腫を構築する類上皮細胞内とクッパー細胞内に認められた。感染群 BALB/c マウスにおける1肉芽腫結節あ

たりの平均菌数 (± 標準偏差) は、菌接種後 3 週では 31.5 ± 11.9 であったが、菌接種後 3 2 週には 712.2 ± 345.8 まで増数していた。一方、感染群 C3H/HeJ マウスの平均菌数も菌接種後 3 2 週に最も増加していた (333.0 ± 224.9) が、多数のリンパ球とマクロファージの浸潤を伴う肉芽腫内に検出される菌数は少ない傾向がみられた。

脾臓においては、両系統マウスともに菌接種後 3 週で白脾髄辺縁帯に菌を貪食したマクロファージが散見された。その後、感染群 BALB/c マウスでは、菌接種後 3 2 週までに類上皮細胞肉芽腫が増数、拡張して白脾髄および赤脾髄の大部分を占め、白脾髄のリンパ球が著明に減少する傾向にあった。また、検出された菌数も菌接種後 3 週では 32.2 ± 17.6 であったが、菌接種後 3 2 週では 1000 以上で正確な菌数の測定は不能となった。一方、感染群 C3H/HeJ マウスでは、肉芽腫性病変の拡張が制限されるとともにリンパ球は増数し、検出される菌数は、感染群 BALB/c マウスに比較すると少数で菌接種後 3 2 週においても 80.5 ± 49.6 であった。

腸管での肉芽腫の形成は、感染群 BALB/c マウスのみにおいて認められた。菌接種後 3 週においては、小腸パイエル板のドーム域およびリンパ濾胞間域に少数のヨーネ菌を貪食したマクロファージが僅かにみられる程度であったが、菌接種後 6 週では小腸の粘膜固有層およびパイエル板 (Fig. 4) にウシのヨーネ病に類似する小型の肉芽腫結節が認められた。その後、菌接種後 3 2 週までに肉芽腫結節は増数、拡張して病変の分布も小腸から大腸まで広がり、抗酸菌染色によってこれらの肉芽腫結節内に多数のヨーネ菌が検出された (Fig. 5)。

その他の臓器における肉芽腫の形成は、脾臓では感染群 BALB/c マウスの 75% (9/12)、感染群 C3H/HeJ マウスの 25% (3/12) にみられ、肺ではそれぞれ 42% (5/12) と 25% (3/12) であり、いずれも感染群 BALB/c マウスの方が高率であった (Table 1)。また、感染群 C3H/HeJ マウスでは菌接種後 3 2 週の脾臓と肺における肉芽腫の形成は認められず、腸管と同様に感染群 BALB/c マウスのみにおいて菌接種後 3 2 週までに菌増殖を伴う肉芽腫の形成が胸腺で 75% (9/12)、子宮で 67% (8/12) および心臓で 17% (2/12) にみられた。

一方、両系統マウスともに非感染群マウスでは、いずれの臓器においても病変形成は認められなかった。

形態計測学的解析結果

両系統マウスの肝臓と脾臓における平均肉芽腫面積の推移を Fig. 6 と Fig. 7 に示した。感染群 BALB/c マウスの肝臓では、菌接種後 3 週、9 週および 3 2 週で切片表面積 1 mm² あたりの平均肉芽腫面積は、感染群 C3H/HeJ マウスよりも有意に大きい値を示した。菌接種後 3 2 週の C3H/HeJ マウスの平均肉芽腫面積は、 $11.4 \times 10^3 \text{ mm}^2$ であったのに対し、BALB/c マウスの平均肉芽腫面積は、 $119.3 \times 10^3 \text{ mm}^2$ で約 10.5 倍に拡張していた ($P < 0.05$)。反対に感染群 C3H/HeJ マウスでは、菌接種後 6 週をピークとして菌接種後 3 2 週まで平均肉芽腫面積の有意な減少がみられた ($P < 0.05$)。

脾臓における切片表面積 1 mm² あたりの平均肉芽腫面積は、感染群 BALB/c マウスのみで漸次増大し、菌接種後 3 2 週の平均肉芽腫面積は $513.6 \times 10^3 \text{ mm}^2$ であり、感染群 C3H/HeJ マウスの平均肉芽腫面積 $7.0 \times 10^3 \text{ mm}^2$ の約 73 倍になっていた ($P < 0.05$)。一方、感染群 C3H/HeJ マウスの平均肉芽腫面積は、各週間で有意差はみられず、肉芽腫の形成は最小限に抑制されていた。

4. 考察

BALB/c マウスは、ヨ－ネ菌接種後 3 2 週までに肝臓と脾臓において進行性に肉芽腫面積の増大がみられ、肉芽腫内には増殖した多数の菌が認められた。一方、近交系 C3H/HeJ マウスでは、菌接種後の同時期までに肝臓、脾臓ともに菌増殖と肉芽腫形成が BALB/c マウスに比べて著しく抑制されていた。また BALB/c マウスのみにおいて菌接種後 6 週の小腸に肉芽腫の形成がみられた。これらのことからヨ－ネ菌 ATCC19698 株は、BALB/c マウスに対して強い病原性を示し、ウシのヨ－ネ病でみられる肉芽腫に類似する病変形成を誘導したことから、ヨ－ネ病実験感染モデルとし

て簡便で有用なモデルとなることが明らかになった。対照的に C3H/HeJ マウスは、ヨーネ菌感染に対する抵抗性の機序を解明するためのモデルとして有用であると思われた。

これまで近交系のマウスを用いたヨーネ菌の感染実験では、C57 マウスが有用であることが報告されている [13, 14, 60]。しかし、C57 マウスではヨーネ病罹患ウシ由来のヨーネ菌（湿重量 2 mg）を腹腔内に接種しても腸管に肉芽腫形成を認めるまでに3ヶ月を要している [13]。また BALB/c マウスを用いた他のヨーネ菌感染実験においても、ヨーネ菌 Linda 株（ATCC43015）を 10^{10} cell 胃内接種したが、接種後6ヶ月以内に腸管で肉芽腫性病変を形成するには至っていない [37, 38]。これらの報告から近交系のマウス系統間でヨーネ菌感染に対する感受性に明白な差が示唆された。そして、感受性マウス系統をウシのヨーネ病の実験感染モデルとして用いた場合でも菌接種から病変形成まで長期間を要すると考えられていた。さらに系統ばかりでなく、マウスの週齢、菌接種法およびヨーネ菌の由来や接種生菌数なども感受性を左右するため、感受性マウスをヨーネ病実験感染モデルとして用いるには、これらの要因について本実験の方法を正確に再現して実施する必要があると思われる。

また本実験では、BALB/c マウスと C3H/HeJ マウス間におけるヨーネ菌接種後の病変の組織学的差異が明らかにされた。即ち前者の病変は、類上皮細胞肉芽腫が主体であり、後者では多数のリンパ球とマクロファージの参画を伴う肉芽腫が優位を占めた。これらの肉芽腫の形態的差異は、それぞれのマウス系統における細胞性免疫の機能的活性の差異を反映していると考えられ、その背景には *Bcg* (*Nramp*) 遺伝子が何らかの役割を果たしているものと推測された。*Bcg* 遺伝子の存在は、ウシでも推測されており [31]、両マウス系統をヨーネ病実験感染モデルとして用いることによって免疫応答の差異を解明することは、ウシのヨーネ病における病理発生機序の解明に役立つものと考えられた。

第二章：ヨーネ菌実験感染マウスに形成される肉芽腫性病変の組織化学的，超微細形態学および免疫組織化学的比較.

1. 緒言

近交系マウス系統 BALB/c および C3H/HeJ が，ヨーネ菌感染に対する感受性および抵抗性を解明する上で有用な実験感染モデルとなることが前章で明らかにされた。しかし，*Bcg* 遺伝子が関与すると報告 [31] されているウシやマウスのヨーネ菌感染に対する感受性の調節機序および肉芽腫形成に果たす役割については不明な点が数多く残されている。また，*Bcg* 遺伝子は，マクロファージの抗原提示に関連する MHC class II の発現特性に関与することが報告 [22, 45] されているが，対立する *Bcg* 遺伝子を有するマウス系統間のヨーネ菌感染に対する細胞性免疫応答の差異については明らかにされていない。さらにヨーネ菌感染によって形成される肉芽腫についての超微細形態学的研究は少なく，肉芽腫内で増殖するヨーネ菌の超微細構造に関しても異なる報告がなされている [6, 50, 72, 82].

本章では，ヨーネ菌実験感染モデルとして確立した感受性系統 BALB/c マウスと抵抗性系統 C3H/HeJ マウスにおける感受性差異がどのような機序によるのかを明らかにすることを目的とした。そのためにヨーネ菌接種後に肝臓と脾臓で形成された肉芽腫に参画するマクロファージ系細胞（マクロファージ，類上皮細胞および多核巨細胞）の活性を酸性フォスファターゼ（AcPase）の局在を指標として組織化学的に検出し，画像解析によって両系統マウス間で比較した。また，マウス系統間における肉芽腫の形態的差異および AcPase の細胞内での局在について超微細形態学的に検索した。さらに両マウス系統間における免疫応答の差異を解明するために脾臓での肉芽腫形成過程における T リンパ球サブクラス（ $CD4^+$, $CD8^+$ および $\gamma\delta$ 型 T リンパ球）と B リンパ球の分布，動態について比較するとともに肉芽腫に参画するマクロファージ系細胞の MHC class II 抗原提示についても免疫組織化学的に検索した。

2. 材料と方法

マウスおよびヨーネ菌接種法： 第一章で記載したと同様に6週齢雌，BALB/c およびC3H/HeJ マウスを使用し，感染群にはヨーネ菌 ATCC19698 株生菌を各頭 0.5 ml (5×10^9 CFU)，非感染対照群には，同量の滅菌生理食塩水を腹腔内接種した．菌接種後3週，6週，9週および3 2週の各週に各系統マウスの感染群，対照群から肝臓と脾臓を採取した．

酸性フォスファターゼ (AcPase) の組織化学的検出： 無固定の肝臓および脾臓を -80°C に冷却したN-ヘキサン中で急速凍結後，6 μm 厚の凍結切片を作製した．光学顕微鏡による AcPase 陽性部の画像解析を目的とした標本には，ナフトール AS 法 [77] を実施し，基質としてナフトール AS-BI リン酸 (シグマ社，St. Louis, MO, USA) [19] を使用してパラローズアニリン (シグマ社) で発色させた．陰性対照は，10 mM フッ化ナトリウムを添加した基質に反応させた．また他の切片は，透過型電顕下で細胞内の AcPase を観察するために金属塩法 [78] を以下の要領で実施した．まず肝臓と脾臓の凍結切片を2% (v/v) グルタルアルデヒドと8% (w/v) 蔗糖を添加した0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で2時間固定後，冷カコジル酸緩衝液で一晩洗浄． 37°C に加温した反応基質液 (0.05 M 酢酸緩衝液，pH 5.0；3 mM 硝酸鉛；10 mM β -グリセロリン酸ソーダ；0.23 M 蔗糖) 中で20分間反応後，光顕観察用には1% 黄色硫化アンモニウム液で2分間処理して発色させた．電顕観察用には，発色液の代わりに2% (w/v) オスミウム酸と7.5% (w/v) 蔗糖を添加した0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で1時間再固定後，蒸留水で洗浄した．電顕による観察の際，AcPase 陽性産物とオスミウム酸染色顆粒との混同を避けるため，一部の切片にはオスミウム酸による再固定は実施しなかった．

透過型電子顕微鏡による観察： 各マウスから採材した肝臓と脾臓の一部は、2% (v/v) グルタルアルデヒドと2% (v/v) パラフォルムアルデヒド混合 0.1 M リン酸緩衝液で2時間固定後、7.5% (w/v) 蔗糖と2% (w/v) オスミウム酸混合 0.1 M リン酸緩衝液で1時間再固定した。これらの臓器片および AcPase 染色を施した切片は、脱水後に Spurr [85] の低粘度エポキシ樹脂包埋法を改良した串田変法 [52] に従い、切片については、Ruiter ら [76] の方法によりゼラチンカプセル上に樹脂包埋した。超薄切片作製後、AcPase の検出を目的としないものには、酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色後に透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM-1200EX) で観察した。

免疫組織化学的検索： 各マウスの脾臓から連続凍結切片を作製し、アセトンで固定した後、HE 染色および酵素抗体法を実施した。一次抗体として pan T リンパ球とそのサブクラス CD4⁺および CD8⁺ T リンパ球の検出には、ビオチン標識モノクローナル抗体、抗 Thy1.2 (Becton Dickinson, California, USA), 抗 L3/T4 (Caltag Laboratories Inc., California, USA) および抗 Lyt-2 (Caltag)をそれぞれ使用し、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の検出には、抗 δ 鎖モノクローナル抗体 (理化学研究所脳科学総合研究センターの糸原重美博士より分与された) を用いた。B リンパ球の検出には抗 IgM モノクローナル抗体 (大日本製薬) を使用した。MHC class II 抗原は、ビオチン標識抗 I-A^d (C3H/HeJ マウス) および抗 I-A^{bk} (BALB/c マウス) モノクローナル抗体 (明治乳業 K.K.) を用いて検出した。一次抗体反応後、ヒストファインキット (ニチレイ) を用いたストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法の手順に従い、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) (同仁科学研究所 K.K.) により発色させた。さらに一部の切片では、肉芽腫を構成するマクロファージ系細胞の抗原提示能とヨーネ菌増殖との関連を検索するために MHC class II の免疫染色と抗酸菌染色 (オーラミン法) による二重染色を実施した。

AcPase 陽性部および免疫染色陽性部面積の画像解析： 光顕観察用の AcPase 組織化学染色標本については、画像解析装置 (Luzex F, Nikon, 東京) を用いて切片全面積を

測定した。また AcPase 陽性部面積は、カラー解析による画像の二値化処理後 (Fig. 8) に個々の陽性部面積を測定し、各マウス臓器の切片 1 mm²あたりの AcPase 陽性部面積を算出した。またヨーネ菌接種後 3 週、6 週および 9 週の脾臓の pan T リンパ球、CD4⁺および CD8⁺ T リンパ球の検出を目的とした免疫染色標本も、AcPase 陽性部面積の測定と同様に各切片上の白脾髄領域と赤脾髄領域の全面積および陽性部面積をそれぞれ測定して各領域内の平均陽性部面積および平均陽性面積率を算出した。

統計処理： データの統計処理は、第一章に記載した方法に準じて行った。

3. 成績

顕微鏡による AcPase 陽性反応部の検索結果： AcPase 陽性部面積の画像解析結果を Fig. 9 と Fig. 10 に示した。画像解析に用いた凍結切片の 1 標本あたりの切片全面積は、それぞれ肝臓が 25.5~49.2 mm²、脾臓が 12.3~27.7 mm² の範囲内にあった。非感染対照群 BALB/c および C3H/HeJ マウスの肝臓では、強い AcPase 陽性反応をクッパー細胞に認めたが、肝細胞での反応は微弱であった。また対照群の脾臓においては、白脾髄および赤脾髄のマクロファージ、特に白脾髄辺縁帯に散在するマクロファージに強い AcPase 陽性反応がみられた。非感染群の肝臓における平均陽性部面積は、C3H/HeJ マウスの方が有意に広範であった ($P < 0.01$) が、脾臓では逆に BALB/c マウスの平均陽性部面積の方が広がった ($P < 0.05$)。

ヨーネ菌接種後 3 週における両マウス系統感染群では、肝臓と脾臓に形成された肉芽腫に一致して強い AcPase 陽性反応が認められ、両臓器において BALB/c マウスの方が C3H/HeJ マウスよりも有意に広い範囲に陽性反応がみられた ($P < 0.01$)。また感染群 BALB/c マウスでは、菌接種後 9 週まで両臓器に形成される肉芽腫の増大に反して平均 AcPase 陽性部面積が肝臓で菌接種後 6 週、脾臓で 9 週に減少する傾向を認めた (Fig. 11)。菌接種後 9 週における感染群 BALB/c マウスの平均陽性部面積は、

感染群 C3H/HeJ マウスに比べて、特に脾臓で有意な減少がみられた ($P < 0.01$)。一方、感染群 C3H/HeJ マウスの肝臓と脾臓においては、小型の肉芽腫結節とその周囲に浸潤するマクロファージに強い陽性反応が認められ (Fig. 12)、浸潤するマクロファージ数の増加とともに平均 AcPase 陽性部面積も菌接種後 9 週まで漸増していた。

肉芽腫の超微細形態学的所見： ヨーネ菌接種後 3 週の肝臓と脾臓では、両系統マウスともにクッパー細胞、マクロファージおよび類上皮細胞内のファゴゾームに菌が認められた (Fig. 13)。ヨーネ菌は、幅 16~21 nm の細胞壁と 11~14 nm の細胞質膜を有しており、菌とファゴゾーム膜が密着しているため細胞質内に遊離しているように見えるが、すべての菌がファゴゾーム内に存在していた。菌を貪食したこれらの細胞では、AcPase 反応産物が核膜と小胞体内に認められたが、菌を内包するファゴゾーム内にはみられなかった。また両系統マウスともに菌接種後 3 週に認められた類上皮細胞は、中等量のミトコンドリアと少数の拡張した小胞体を有し、菌接種後 6 週になるとファゴゾームおよび菌と AcPase 反応産物を内包するファゴライソゾームが出現した。感染群 BALB/c マウスの類上皮細胞では、菌接種後 9 週および 3 2 週に大型のファゴライソゾーム (large phagolysosomes; LPLs) と小型のファゴライソゾーム (small phagolysosomes; SPLs) が細胞質内にみられるようになった (Fig. 14)。LPLs は、多量の AcPase 反応産物を含有するとともに細胞壁が部分的に消失した菌や変性した菌を多数内包していた。一方、SPLs は、AcPase 反応産物をほとんど含まず (Fig. 15A)、1~4 個の少数の菌を容れており、肝臓よりも脾臓の類上皮細胞に多く出現する傾向を認めた。さらに BALB/c マウスの肝臓と脾臓の類上皮細胞では、菌接種後 3 2 週までに SPLs が著明に増加し、LPLs は減少する傾向にあった。これらの SPLs 内に観察された菌の多くは明瞭な electron-transparent zone (ETZ) を形成しており、正常な菌構造を保持していた (Fig. 15B)。これとは反対に感染群 C3H/HeJ マウスの肝臓と脾臓の類上皮細胞では、多数のミトコンドリアと小胞体が見られ、菌接種後 6 週および 9 週から LPLs が優位を占めるようになった。さらに菌接種後 3 2 週にみられた C3H/HeJ

マウスの LPLs では、内包された菌のほとんどが変性あるいは消化されるとともに多量の AcPase 反応産物が検出された (Fig. 16A, B および C).

脾臓の免疫組織学的所見および画像解析結果： 非感染対照群の白脾髄やリンパ性細胞動脈周鞘 (PALS)では、抗 pan T リンパ球抗体で陽性を示す細胞が主に外周の辺縁帯にみられ、陽性部面積および面積率ともに BALB/c マウスの方が C3H/HeJ マウスよりも有意に広範で高率であった ($P < 0.005$) (Fig. 17A および C). しかし、脾柱周囲あるいは散在性に陽性細胞がみられた赤脾髄では、両系統マウス間で面積および面積率に有意差を認めなかった (Fig. 17B および D). 感染群 BALB/c マウスの白脾髄は、菌接種後 3 週、6 週および 9 週に萎縮がみられ、対照群 BALB/c マウスに比較して陽性部面積および面積率ともに低下し ($P < 0.05$) (Fig. 17A), 残存する陽性細胞は肉芽腫結節に近在する傾向にあった (Fig. 18A). また赤脾髄においても陽性部面積率は非感染群より低率であった ($P < 0.001$) (Fig. 17B). 一方、感染群 C3H/HeJ マウスの白脾髄では、菌接種後 3 週および 6 週で対照群 C3H/HeJ マウスより面積および面積率ともに低下していたが ($P < 0.001$), 胚中心の形成とともに菌接種後 9 週では正常域まで回復がみられた (Fig. 17C). また赤脾髄では、同対照群と比べて有意差を認めなかった (Fig. 17D および 18B).

CD4⁺ T リンパ球は、両マウス系統の非感染対照群において白脾髄の辺縁帯および赤脾髄に散在し、系統間で陽性部面積および面積率に明瞭な差異を認めなかった (Fig. 19). 感染群 BALB/c マウスの白脾髄では、リンパ濾胞細胞の減少と肉芽腫の増大に伴って菌接種後 6 週および 9 週で対照群 BALB/c マウスより面積および面積率とも有意な低下がみられ ($P < 0.0005$) (Fig. 19A および 20), また赤脾髄でも菌接種後 9 週に面積および面積率とも低下していたが同対照群との間に有意差はみられなかった (Fig. 19B). これに対して感染群 C3H/HeJ マウスでは、肉芽腫結節の出現頻度が高い白脾髄辺縁帯に接する赤脾髄を主体に菌接種後 3 週に対照群 C3H/HeJ マウスより広範な面積を占めていた ($P < 0.005$) (Fig. 19D). しかし、菌接種後 6 週以降の赤脾

髓および白脾髄では各週とも同対照群に比較して差異をみとめなかった (Fig. 19C および D).

両マウス系統の非感染対照群における CD8⁺ T リンパ球は、CD4⁺ T リンパ球同様に白脾髄辺縁帯および赤脾髄に散見された。対照群 BALB/c マウスの白脾髄では、陽性細胞の面積および面積率ともに対照群 C3H/HeJ マウスよりも有意に広範で高率を示し ($P < 0.0005$) (Fig. 21A および C), 赤脾髄においても陽性部面積率は C3H/HeJ マウスより有意に高かった ($P < 0.0001$) (Fig. 21B および D). 感染群 BALB/c マウスでは、白脾髄や赤脾髄に形成された肉芽腫結節周囲に陽性細胞が集簇する傾向にあったが (Fig. 22A), 白脾髄では陽性部面積および面積率ともに菌接種後 3 週から対照群 BALB/c マウスに比較して有意に低く ($P < 0.0001$) (Fig. 21A), 赤脾髄では陽性部面積率が低下していた ($P < 0.0001$) (Fig. 21B and 22B). 一方、感染群 C3H/HeJ マウスの白脾髄では、菌接種後 6 週まで陽性部面積が対照群 C3H/HeJ マウスより低い傾向を示したが ($P < 0.05$), 菌接種後 9 週では増加して同対照群に比べても差異は認められなかった (Fig. 21C). さらに C3H/HeJ マウスの赤脾髄においては、菌接種後 6 週をピークに陽性部面積が増加していた ($P < 0.01$) (Fig. 21D).

ヨーネ菌接種後 3 週から 9 週までに $\gamma\delta$ 型 T リンパ球には各週間に著明な変動は認められず、両マウス系統ともに白脾髄辺縁帯あるいは赤脾髄に少数認められたのみであった。また B リンパ球は、両マウス系統の非感染対照群において白脾髄の胚中心を主体に認められ、赤脾髄にも強陽性細胞が散見された。感染群 BALB/c マウスでは、菌接種後 9 週まで白脾髄の萎縮と肉芽腫結節の増大に伴って陽性細胞が減少していた (Fig. 23A). 一方、感染群 C3H/HeJ マウスでは、同対照群に比べて著明な B リンパ球の変動を認めなかった (Fig. 23B).

さらに感染群 BALB/c マウスの脾臓に形成された肉芽腫では、菌接種後 9 週に肉芽腫内での菌増殖に伴って MHC class II 抗原の発現が減弱する傾向が認められた (Fig. 24A および B). 一方、感染群 C3H/HeJ マウスの多くの肉芽腫結節では、強い MHC class II 抗原の発現がみられ、これらの肉芽腫には菌が少ない傾向にあった (Fig. 24C およ

びD).

4. 考察

AcPase 陽性部面積の推移を指標としたマクロファージ活性は、非感染対照群において C3H/HeJ マウスより BALB/c マウスが肝臓では低く、脾臓では高い傾向がみられた。また対照群 BALB/c マウスの脾臓では、白脾髄に分布する pan T リンパ球と CD8⁺ T リンパ球が対照群 C3H/HeJ マウスよりも多く、両マウス系統間でマクロファージの数や活性とともにリンパ球の種類や数に先天的な差異があることが明らかにされた。*Mycobacterium bovis* の実験感染では、ウサギ [19, 20, 21] やマウス [87] に形成された肉芽腫性病変において、類上皮細胞の細胞質内 AcPase 活性が上昇することが報告されており、酵素活性の高い類上皮細胞では、活性の低い細胞よりも内部で増殖する菌数は少ないことが知られている [19]。本章の実験でも感受性系統 BALB/c マウスにおいては、マクロファージによるヨーネ菌貪食後、一時的に殺菌的酵素活性が上昇していたが、菌が増殖する際には活性が減弱していた。これに対し抵抗性系統 C3H/HeJ マウスでは酵素活性が持続したことから、両マウス系統間における感受性差異は、マクロファージ活性の持続性に起因するものと考えられた。

電顕によるヨーネ菌感染マクロファージの所見に関して、Smith [82] は、C57 マウス系統を用いたヨーネ菌感染実験により腸管にみられた菌が宿主細胞の膜によって囲まれており、菌周囲に ETZ が存在しないことを報告した。しかし、Bendixen ら [6] は、ヨーネ菌に感染した牛の腸管マクロファージ内で増殖した菌に明瞭な ETZ の形成を認め、大部分の菌が本章で記載された SPLs に類似するファゴライソゾーム内に存在することを明らかにしている。さらに糖脂質で構築される ETZ が、電顕試料作製の際の人工的産物によるものではないことが凍結置換法による電顕観察により病原性抗酸菌で証明され [73]、菌壁を構成するペプチドグリカン層よりも外側に位置する ETZ は、マクロファージの殺菌作用の防御に重要な役割を果たしていると考えられている

[24, 25]. 本章の感染実験に用いられた両マウス系統においても、全てのヨーネ菌がマクロファージのファゴゾームに隙間なく密着して内包されるか、ファゴライソゾーム内に観察されており、Bendixen ら [6] の報告と同様に多くの菌に ETZ の形成を菌壁外側に認めた。また感染群 BALB/c マウスでは、C57 マウス系統を用いた *Mycobacterium avium* 感染実験で観察されたもの [30] と同様の SPLs が菌接種後 3 2 週までに類上皮細胞内で多数を占め、内部で正常構造を保持した菌が増殖していた。SPLs の増加は、ライソゾームとファゴライソゾームの融合阻止、あるいはライソゾーム酵素産生の活性低下を示唆すると思われ、SPLs は、マクロファージ内におけるヨーネ菌増殖の場となっている。一方、感染群 C3H/HeJ マウスの類上皮細胞では、豊富なライソゾーム酵素と変性した菌を容れた LPLs が優勢で、ファゴライソゾームにおける殺菌作用の持続によって菌の ETZ による殺菌回避にもかかわらず感染防御が成立すると考えられた。また近年、*Bcg* 遺伝子は、natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) 遺伝子と呼ばれ、感染早期における抗酸菌の殺菌、消化作用に関与することが示唆されている [91]。同遺伝子産物は、ファゴゾームの pH を低下させる [36] ことから、C3H/HeJ マウスの LPLs 内で検出された AcPase などの高い酵素活性によって有効に菌が殺菌、消化されたと考えられ、この作用は、*Nramp* 遺伝子の支配を受けていると思われる。

また両マウス系統の脾臓における免疫組織化学的な比較から、BALB/c マウスでは、菌接種後 9 週までに類上皮細胞肉芽腫の拡大に伴う B リンパ球、CD4⁺ および CD8⁺ T リンパ球の減少がみられた。しかし、反対に C3H/HeJ マウスでは、感染早期に CD4⁺ および CD8⁺ T リンパ球の有意な増加がみられたことから、感受性系統 BALB/c マウスでは細胞性免疫応答の抑制が示唆された。Denis ら [22] は、*Bcg*⁺ マウスの脾臓には MHC class II 抗原陽性細胞が *Bcg*⁻ マウスに比べて多数存在し、特異的および非特異的刺激に対する免疫応答が亢進していると推測している。本章の実験結果からも細胞性免疫の誘導に重要なマクロファージの抗原提示能の比較により、多数の菌が増殖した BALB/c マウスの類上皮細胞では MHC class II 抗原の発現が弱く、菌の少ない

C3H/HeJ マウスの類上皮細胞では強い発現を認めた。マウス系統間における免疫応答の差異は、類上皮細胞の抗原提示能の差異に起因すると推察された。

第三章：ヨーネ菌実験感染 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球欠損 BALB/c マウスにみられた肉芽腫形成の抑制について

1. 緒言

ヨーネ菌や他の抗酸菌に対する生体防御は、 $CD4^+$ および $CD8^+$ T リンパ球が属する $\alpha\beta$ 型 T リンパ球による細胞性免疫応答が主体である [16, 71]. また、抗酸菌 [65, 66] や他の細胞内寄生菌 [27, 70] に起因する感染症の感染初期では、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球も感染防御に機能していることが示唆されており、感染局所において 70-kD マイコバクテリア熱ショック蛋白 [8] やサイトカイン [51, 69, 88] の刺激により、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が増殖、活性化することが知られている. さらに活性化した $\gamma\delta$ 型 T リンパ球からは、前炎症性サイトカインが産生され [4, 42, 81], 炎症部位に参画するマクロファージ、 $\alpha\beta$ 型 T リンパ球およびナチュラルキラー (NK) 細胞の機能を調節していることが示唆されている [5]. これらのことから $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は、細菌感染に対する生体防御機構において食細胞系の抗原提示から $\alpha\beta$ 型 T リンパ球の高度な抗原特異的免疫応答に至る行程へ橋渡しする役割を担っていると考えられてきた [28]. 一方、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が生体内で抗酸菌の増殖を抑制することについて疑問視する報告 [26, 79] や感染局所に炎症性細胞を集簇させることのみが $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の役割であるとする報告 [53, 83] もある. 特にヨーネ菌感染に対する牛の免疫応答における $\gamma\delta$ 型 T 細胞の役割については、不明な点が数多く残されているのが現状である.

そこで本章では、ヨーネ菌感染における $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の役割を解明するために実験感染モデルとして確立した高感受性の野生型 BALB/c マウスと $\gamma\delta$ 型 T リンパ球を欠損したミュータント BALB/c マウスを用いてヨーネ菌実験感染を試み、肉芽腫形成と菌増殖を指標として両マウスを比較検討した.

2. 材料と方法

マウス： 10 週齢雌の TcR- δ^+ ミュータント BALB/c マウス (ミュータントマウス) および TcR- $\delta^{+/+}$ 野生型 BALB/c マウス (野生型マウス) 各 30 頭を実験に供した。TcR- δ 遺伝子を欠損したミュータントマウスは、糸原ら [43] が Gene Targeting 法により作出したマウスを用い、さらにフローサイトメトリーにより同マウスのリンパ系組織や上皮組織内には $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が存在しないことを確認した (データ示さず)。野生型マウスは、日本 SLC K.K. (浜松市) より購入した。実験期間中、全てのマウスは、SPF 環境下で飼育した。

ヨーネ菌接種法および病理組織学的検索： 野生型およびミュータントマウス各 20 頭にヨーネ菌 ATCC19698 株生菌 [61] を少量 (4×10^6 CFU/頭 ; $n = 10$) あるいは多量 (4×10^9 CFU/頭 ; $n = 10$) 腹腔内接種した。非感染対照群として各群 10 頭に滅菌生理食塩水 0.5 ml を腹腔内接種した。接種後 6 週および 18 週に少量、多量接種群とも野生型およびミュータントマウス各群 5 頭をエーテル吸入麻酔後に頸椎脱臼により安楽死させた。各マウスから採材した肝臓は、病理組織学的検索および形態計測学的解析に用い、脾臓は細菌学的検索に使用した。その他の腹腔内および胸腔内臓器は、病理組織学的検索に用いた。病理組織学的検索のために脾臓以外の臓器は、常法に従って 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋して 5 μ m の切片を作製し、HE 染色および抗酸菌染色 (Ziehl-Neelsen 法) を実施した。

形態計測学的解析： 各マウスから肝臓の HE 染色標本 4 枚を用い、第一章に記載した方法に準じて実施した。肉芽腫形成の評価には、それぞれのマウスについて倍率 400 倍の顕微鏡下で 25 視野を無作為選抜し、マクロファージ 10 個以上の集簇を基準とする肉芽腫の数と面積を測定した。さらに各マウス群ごとに肝臓切片 1 mm² あたりの平均肉芽腫数および平均面積を算出した。

脾臓からのヨーネ菌分離培養： ヨーネ菌接種後6週および18週にマウス全頭より採材した全脾臓のホモジネートを作製し、マイコバクチン添加ハロルド培地 [62] 上でヨーネ菌を分離培養した。各脾臓あたりのヨーネ菌 colony forming units (CFU) は、ホモジネートの10倍段階希釈液による培養結果から算出し、反復試験3回で得られた数値の平均値と標準偏差を求めた。

統計処理： 得られた数値は、各マウス群5頭の平均値 ± 標準偏差で表した。各マウス群間の統計学的有意差は、ANOVA (analysis of variance) を用いて危険率 0.5% で Sheffe's *F* テストにより検定した。

3. 成績

病理組織学的所見： ヨーネ菌を多量接種した野生型 BALB/c マウスの肝臓では、菌接種後6週において主にマクロファージと類上皮細胞から成り、僅かにリンパ球が混在する小型で多巣状の肉芽腫が、肝小葉の中間域からグリソン鞘周囲に認められた (Fig. 25A)。菌接種後18週の同マウス群の肝臓では、肉芽腫に参画するマクロファージと類上皮細胞あるいは多核巨細胞の増数により肉芽腫が拡大していた。さらに隣接する肉芽腫結節どうしは接着して肝小葉全体に広がり、中心性壊死や乾酪変性を伴わない大型の類上皮細胞肉芽腫を形成した (Fig. 25B)。その結果、1視野内に占める各肉芽腫結節の面積は、菌接種後6週より増大していたが、肉芽腫数は減少した。同様の肉芽腫結節は、ヨーネ菌少量接種群の野生型 BALB/c マウスでも認められたが、肉芽腫を構成する細胞数は、菌接種後6週および18週ともに多量接種群の野生型マウスに比べ少数であった。抗酸菌染色により野生型 BALB/c マウスにみられたこれらの類上皮細胞肉芽腫内には多数の抗酸菌が検出されたが、肉芽腫結節以外の部位に認められた菌は比較的少数であった。一方、ヨーネ菌を多量接種したミュータント BALB/c マウスの肝臓では、菌接種後6週に多数のリンパ球と少数の好中球の浸潤を

伴うマクロファージを主体とする肉芽腫結節がみられた (Fig. 26A). さらに菌接種後18週と同マウス群の肝臓では, 肉芽腫に参画する細胞数が著明に減少し, 残存する肉芽腫も類上皮細胞や多核巨細胞の出現を伴わず, 少数の浸潤マクロファージとリンパ球から構成されていた (Fig. 26B). また抗酸菌は, 類洞内に浸潤したマクロファージやクッパー細胞内で広範囲に検出された. 菌少量接種群のミュータントマウスの肝臓では, 菌接種後6週および18週ともに肉芽腫形成が最小限に抑制され, 菌の検出も希であった.

肝臓以外の臓器においては, マクロファージに貪食された少数の抗酸菌が, 多量接種群の野生型およびミュータントマウスの腸間膜リンパ節の皮質, 腸管漿膜, 膀胱と子宮漿膜および肺胸膜に菌接種後6週および18週で認められた. しかし, 多量接種群の野生型マウスのみで胸腺皮質と髄質およびパイエル板のリンパ濾胞 (Fig. 27A および B) に抗酸菌を容れた肉芽腫結節の形成がみられた.

非感染対照群の野生型およびミュータント BALB/c マウスでは, 接種後18週までに病変形成を認めなかった.

肝臓に形成された肉芽腫の形態計測学的検索結果: ミュータントマウスの肝臓では, 多量接種群において菌接種後18週に有意な平均肉芽腫数の減少 ($P < 0.005$) が認められた (Table 2). 対照的に野生型マウスでは, 菌接種量に関わらず菌接種後6週と18週間で平均肉芽腫数に有意差はみられなかった. しかし, 菌接種後18週の多量接種群では, ミュータントマウスよりも野生型マウスの平均肉芽腫数は有意に増加していた ($P < 0.05$). 一方, 肝臓における平均肉芽腫面積を比較すると, 菌接種後6週では少量および多量接種群の野生型マウスとミュータントマウス間でいずれも有意差は認められなかった (Table 2). しかし, 菌接種後18週の少量および多量接種群野生型マウスの平均肉芽腫面積は, ミュータントマウスよりも有意に増大し ($P < 0.05$), 少量接種群で3.3倍, 多量接種群で6.4倍に拡大していた.

脾臓におけるヨーネ菌の細菌学的検索結果： ヨーネ菌少量および多量接種群の野生型およびミュータントマウスとも菌接種後6週から18週までに有意な菌増殖 ($P < 0.001$) が認められた (Table 3). 少量接種群の野生型マウスとミュータントマウス間では、菌接種後6週と18週間に増殖菌数の差異はみられなかったが、多量接種群の野生型マウスでは、菌増殖数を同群ミュータントマウスに比較して菌接種後18週で有意に増数していた ($P < 0.05$).

4. 考察

ヨーネ病の病理発生において $\gamma\delta$ 型 T リンパ球がどのような役割を果たしているのかを解明するため、ヨーネ菌に高い感受性を有する野生型 BALB/c マウスと $\gamma\delta$ 型 T リンパ球欠損ミュータント BALB/c マウスにヨーネ菌感染実験を試み、肉芽腫形成と菌増殖を比較した。野生型マウスの肝臓においては、菌接種量および接種後の経過時間とともに類上皮細胞肉芽腫の面積が増大し、接種後18週の野生型マウスの肝臓に形成された肉芽腫数および肉芽腫面積は、ミュータントマウスに比較して、特に多量接種群で有意に高値を示した。野生型マウスにみられた成熟した類上皮細胞肉芽腫の形成は、細胞内におけるヨーネ菌の殺菌あるいは増殖抑制に有効ではないが、ヨーネ菌等の細胞内寄生菌が生体内に拡散することを防除していると考えられている [49]. 本章の成績でも野生型マウスの肝臓では、肉芽腫形成部外に存在するヨーネ菌よりも菌増殖の場としての類上皮細胞肉芽腫内により多くの菌を認めた。一方、ミュータントマウスの肝臓では、菌接種量に関わらず菌接種後6週にみられた肉芽腫が18週では退縮し、しばしば肉芽腫形成部位とは関連なくヨーネ菌が検出され、肝臓全体に拡散する傾向がみられた。野生型およびミュータントマウスに形成された病変は、いずれもマクロファージが主体の肉芽腫ではあるが、両者の病変は形態学的に明らかに相違していた。野生型マウスに形成された類上皮細胞肉芽腫とは対照的に浸潤マクロファージと多数のリンパ球が病変内で優位を占めるミュータントマウスの肉芽腫は、未成

熟な肉芽腫あるいは特異な炎症反応と考えられ、これらのリンパ球や浸潤マクロファージは、肉芽腫性病変の修復に関与していると思われる。同様な肉芽腫形成の抑制および修復は、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球欠損マウスを用いた他の細胞内寄生菌、すなわち結核菌 [53]、トリ型結核菌 [79] および *Listeria monocytogenes* [23] の感染実験においても報告されている。また、脾臓における菌増殖性を比較しても多量接種群のミュータントマウスでは、野生型マウスに比べて有意に低下しており、ミュータントマウスでは菌増殖巣としての肉芽腫形成の抑制、あるいは *Salmonella choleraesuis* 感染実験で示唆 [28] されているようなマクロファージの TNF- α 産生能低下が考えられた。さらに近年、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球欠損マウスや牛由来の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球を移植したキメラマウスを用いた同リンパ球の機能に関する研究により、結核菌感染時に $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が肉芽腫の構築と菌の拡散防除に関与していること [26, 53] や感染局所に炎症性細胞を集簇させる役割があること [83] が報告されている。

現在までに牛の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球には2種類のサブポピュレーションが存在することが知られている [59]。一つは、膜表面に WC1 抗原を有し、CD2⁺、CD4⁺ および CD8⁺ の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球であり、他方は WC1 抗原を持たず、CD2⁺ および CD8⁺ の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球である。これら2種類の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の機能については、未だ不明であるが、マウスやヒトの $\gamma\delta$ 型 T リンパ球と同様に Th1 型サイトカインである IFN- γ 、TNF- α および IL-2 の産生能を有することが明らかにされている [94]。IFN- γ と TNF- α は、肉芽腫形成において相乗的に機能することが知られており [32]、IL-2 は、T リンパ球、B リンパ球、マクロファージおよび NK 細胞の増殖を誘導する [2, 74] とともに CD4⁺ T リンパ球から IFN- γ と TNF- α の産生を亢進させることが報告 [63] されている。さらに機能的な T および B リンパ球が欠損し、NK 細胞活性が先天的に低下した SCID bg (sever combined immunodeficient beige) マウスでもヨ-ネ菌感染部位にマクロファージの集簇は形成される [67] が、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は MCP-1 (macrophage chemokine - 1) を産生して、炎症反応の調節をしていることも知られるようになった [23]。これらのことから $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は、肉芽腫形成に関与するマクロファージ、

NK 細胞および $\alpha\beta$ 型 T リンパ球の機能を補佐する役割を果たしていると考えられる。

反芻獣においては、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球がヒトやマウスに比べて免疫系組織に多数存在している [40]。若齢ウシの GALT (gut-associated lymphoid tissue) に有意に存在する $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は、ヨーネ菌感染に対する感受性を高めるとともにヨーネ菌感染により肉芽腫形成を促進していると考えられる。また、ウシのヨーネ病の主徴である下痢や削瘦の発症は、これまでヒスタミン、サイトトキシンおよび発熱物質に起因すると考えられていたが、ヨーネ病罹患ウシ腸管にみられる無秩序な肉芽腫形成もサルコイドーシスと同様に [7] 正常な腸管組織を破壊して下痢の発症機序に関与しているものと思われる。

以上をまとめると $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は、ヨーネ菌感染に対して防除に働くよりも細胞性免疫能の調整および類上皮細胞肉芽腫の形成に重要な役割を果たしており、ウシのヨーネ病においては、多数存在する $\gamma\delta$ 型 T リンパ球によって肉芽腫形成が促進される結果、臨床症状の発現を誘導すると考えられた。

要 約

ウシのヨーネ病は、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) 感染に起因する疾病で、臨床的に慢性持続性の下痢や消瘦を主徴とし、病理組織学的には肉芽腫性腸炎や肉芽腫性リンパ節炎を特徴としている。本病は、1895年に初めて論文に記載されて以来、今や全世界の畜産国への蔓延が推測され、我が国の畜産界においても最重要損耗疾病として認識されている。実用的で有効なヨーネ病の新しい早期診断法および予防法の開発には、本病の病理発生機序を解明することが必要不可欠であるが、未だ不明な点が数多い。ヨーネ病の病理発生に関する研究を困難にしてきた原因の一つは、適当な実験小動物モデルが存在しなかったことであり、今日までヨーネ病感染モデルの確立を目的として様々な実験小動物による感染実験が試みられてきた。マウスは、他の実験小動物に比べてヨーネ菌に対して感受性が高いことが知られている。しかし、系統間の感受性差異が大きいことや病変形成に長時間を要することから、より感受性が高く早期に確実に病変を再現できるマウス系統を見だし、菌の由来、接種法および接種生菌数を明確にしてヨーネ病実験感染モデルとして確立することが期待されてきた。また近年、近交系マウスのヨーネ菌に対する感受性は、第1染色体上に存在する *Bcg* 遺伝子に支配されることが報告され、哺乳動物の抗病性を支配する遺伝的形質も一躍注目されてきた。

そこで本論文では、ヨーネ菌実験感染モデルの確立を目的として、対立する *Bcg* 遺伝子型を持つ近交系の BALB/c マウス (感受性) と C3H/HeJ マウス (抵抗性) にヨーネ菌感染実験を試み、*Bcg* 遺伝子に支配される感受性の系統間差異を病理組織学的に検討した。また、形成される病変の系統間差異を組織化学的、超微細形態学および免疫組織化学的に比較した。さらにウシの腸管粘膜に多数分布する $\gamma\delta$ 型 T 細胞が、ヨーネ菌に対するウシの高い感受性にどのような役割を果たしているのかを解明するため、感受性系統 BALB/c マウスから作出した $\gamma\delta$ 型 T 細胞欠損ミュータントマウスにヨーネ菌感染実験を試みた。そして、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の欠損による肉芽腫形成およ

び菌増殖性への影響を検討した。これらの成績は以下の通りである。

1. ヨーネ菌に対する感受性を比較するため、対立する *Bcg* 遺伝子型を持つ近交系の BALB/c マウスと C3H/HeJ マウスにヨーネ菌 ATCC19698 株生菌 (5×10^8 CFU/頭) を腹腔内接種し、形成される病変を病理組織学的および形態計測学的に比較した。

BALB/c マウスでは、類上皮細胞や多核巨細胞からなる類上皮細胞肉芽腫の形成を肝臓、脾臓、膵臓、子宮、胸腺、肺および心臓の多種臓器に認め、肝臓と脾臓の肉芽腫面積および菌数は、菌接種後に漸次増加した。また、ウシのヨーネ病で見られるような腸管粘膜固有層やパイエル板における類上皮細胞肉芽腫の形成が、菌接種後6週以降に認められた。これらのことから BALB/c マウスは、ヨーネ菌に対してウシと同様の高い感受性を示すことが明らかにされた。一方、C3H/HeJ マウスでは、多核巨細胞の出現が希で類上皮細胞の数が少なく、マクロファージと多数のリンパ球からなる肉芽腫を肝臓、脾臓、膵臓および肺に認めた。しかし、腸管での肉芽腫形成はみられなかった。さらに肝臓と脾臓に形成された肉芽腫面積は、菌接種後6週以降に縮小し、病変内の菌数も BALB/c マウスに比べて有意に少なく、ヨーネ菌に対して強い抵抗性を示した。以上の結果から、ヨーネ病実験感染モデルとして両マウス系統間の病変形成過程を比較することは、ヨーネ病の病理発生機序を解明する上で簡便かつ有効であると考えられた。

2. ヨーネ病実験感染モデルとして確立した感受性系統 BALB/c マウスと抵抗性系統 C3H/HeJ マウスにおける感受性差異の機序を解明するため、肉芽腫に参画するマクロファージ系細胞の活性を酸性フォスファターゼの局在を指標として系統間で比較した。また、肉芽腫の超微細形態学的差異についても検索した。さらにマウス系統間の病変形成過程における T リンパ球、B リンパ球の動態を免疫組織学的に比較するとともに肉芽腫に参画するマクロファージ系細胞の MHC class II 抗原提示能を検索した。

BALB/c マウスでは、肉芽腫面積の拡大に伴って肝臓で3週以降、脾臓で6週以降

に酸性フォスファターゼが減少し、電顕的にライソゾーム酵素が少ない多数の小型のファゴライソゾーム内で菌が増殖していた。反対に C3H/HeJ マウスでは、菌接種後 9 週以降に肝臓と脾臓における肉芽腫の退縮に伴って酸性フォスファターゼが漸次増加し、電顕的には、類上皮細胞内に多量のライソゾーム酵素と変性した菌を内包した大型のファゴライソゾームがみられた。これらのことから BALB/c マウスでは、肉芽腫を構成する類上皮細胞の菌処理酵素の産生能低下が考えられた。また両マウス系統の脾臓を免疫組織学的に比較すると BALB/c マウスでは、菌接種後 9 週までに類上皮細胞肉芽腫の拡大に伴って B リンパ球、CD4⁺ および CD8⁺ T リンパ球がともに減少し、細胞性免疫応答の抑制が示唆された。一方、C3H/HeJ マウスでは、感染後早期に肉芽腫性病変が出現する赤脾髄において CD4⁺ T リンパ球および CD8⁺ T リンパ球の有意な増加がみられた。さらに類上皮細胞の MHC class II 抗原の発現が、同細胞内に菌が増殖した BALB/c マウスでは弱く、菌の少ない C3H/HeJ マウスでは強いことから、類上皮細胞の抗原提示能の差異が免疫応答の系統間差異に起因するものと推察された。

3. ウシの腸管粘膜には、ヒトやマウスに比べて多数の $\gamma\delta$ 型 T 細胞が分布している。そこで、ヨーネ菌感染に対するウシの高い感受性が $\gamma\delta$ 型 T 細胞に関連があるかどうかを明らかにするため、以下の実験を行った。感受性系統 BALB/c マウスから作出された $\gamma\delta$ 型 T 細胞欠損ミュータントマウス（ミュータントマウス）と野生型 BALB/c マウスにヨーネ菌 ATCC19698 株生菌（多量接種群； 4×10^9 CFU/頭，少量接種群； 4×10^6 CFU/頭）を腹腔内接種した。これらのマウスにおいて、肉芽腫形成と菌増殖における $\gamma\delta$ 型 T 細胞の役割を病理組織学的および形態計測学的に解析した。また、両マウスの脾臓におけるヨーネ菌の増殖性を比較した。

野生型 BALB/c マウスでは、胸腺や腸管のパイエル板などの胸腔内および腹腔内の多種臓器に類上皮細胞肉芽腫の形成がみられ、肝臓の肉芽腫面積は、接種菌量および接種後の経過時間に伴って拡大した。一方、ミュータントマウスでは、胸腺とパイエ

ル板に病変形成が見られず、肝臓の肉芽腫面積も菌接種後18週までに縮小する傾向にあった。さらにミュータントマウスの病変は、類上皮細胞や多核巨細胞の出現を伴わず、リンパ球が著明に浸潤する特異な肉芽腫像を呈していた。脾臓における菌の増殖は、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の存在の有無に関わらず、いずれのマウスでも菌接種後18週まで有意に増加していた。これらの結果から、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、殺菌的には機能せず、主に類上皮細胞肉芽腫の形成に関与することが考えられた。

結 論

ヨーネ病の病理発生機序の解明に有用な実験感染モデルを確立するため、抗酸菌感染に対して遺伝的に感受性を示す近交系マウス系統 BALB/c マウスと抵抗性系統 C3H/HeJ マウスを用いてヨーネ菌実験感染を試み、系統間における感受性差異を検討した。BALB/c マウス系統は、先天的にヨーネ菌に対して牛と同様の高い感受性を示し、腹腔内へのヨーネ菌接種後、早期に腸管を含めた多種臓器に広範囲で多数の菌増殖を伴う類上皮細胞肉芽腫を確実に形成することができた。一方、C3H/HeJ マウスは、ヨーネ菌感染に強い抵抗性を示し、肉芽腫性病変の退縮および菌の増殖が抑制されることが明らかとなった。よって両系統マウスは、ヨーネ病における生体の防御機構および遺伝子による抗病性の調節機構を解明する上で簡便かつ有効な実験感染モデルとなると思われる。

また両マウス系統間における感受性差異の機序を解明するため、両マウス系統に形成される肉芽腫の超微細形態学的差異を明らかにするとともにヨーネ菌感染後の脾臓の免疫担当細胞の動態と機能を免疫組織化学的および組織化学的に検索した。ヨーネ病実験感染モデルとして確立した BALB/c マウスの高い感受性は、ヨーネ菌を貪食したマクロファージの抗原提示能低下とそれに伴う T リンパ球を主体とする細胞性免疫の誘導低下に起因していると考えられた。さらにヨーネ菌侵襲後の類上皮細胞内でファゴライソゾームにおける消化酵素減少による殺菌能低下に起因した菌増殖とそれに反応する肉芽腫の拡大も誘導することが明らかにされた。一方、C3H/HeJ マウスのヨーネ菌感染に対する強い抵抗性は、ヨーネ菌感染の局所における CD4⁺ および CD8⁺ T リンパ球を主体とする細胞性免疫の活性化とそれに誘導されるマクロファージ内での酵素産生亢進による殺菌能の活性化に起因し、菌を殺菌・排除して病変修復に向かうと考えられた。

さらにウシの免疫組織に数多く分布していることが知られる $\gamma\delta$ 型 T リンパ球とヨーネ菌感染に対する感受性との関連を明らかにするため、感受性マウス系統 BALB/c

から作出された $\gamma\delta$ 型 T リンパ球欠損ミュータント BALB/c マウスと野生型 BALB/c マウスにヨーネ菌実験感染を試みた。そして、肉芽腫形成と菌増殖における $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の役割について病理組織学的および形態計測学的に解析するとともにヨーネ菌増殖性を比較した。ヨーネ菌接種後に野生型 BALB/c マウスでみられたウシのヨーネ病と同様の広範な類上皮細胞肉芽腫の形成には、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞が重要な役割を果たしているが、菌増殖の抑制に対する $\gamma\delta$ 型 T 細胞の直接的な関与は薄いものと思われた。肉芽腫の形成は、菌を感染局所に包囲し、拡散を防ぐとともに局所での殺菌効果を上げる上で細胞性免疫における重要な免疫応答である。しかし、ヒトやマウスに比べて特に多く分布することが報告されている反芻獣の腸管の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は、ヨーネ菌感染において殺菌よりむしろ無秩序な類上皮細胞肉芽腫の形成を誘導して正常な腸管組織の構築を破壊し、機能を阻害することによって下痢などの臨床症状を起こす要因になっている。したがって、反芻獣のヨーネ菌に対する感受性の高さに $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が関与していると考えられた。

今回、マウスの実験感染モデルで解明されたヨーネ病の病理発生機序に関する新知見として、ヨーネ菌貪食に始まる免疫応答の初期段階にマクロファージの消化酵素産生による菌処理能および抗原提示能の機能不全により、有効な細胞性免疫の誘導抑制および持続的なマクロファージの菌処理能や抗原提示能の維持阻害が明らかにされた。また、 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球は、マクロファージの集簇および類上皮細胞肉芽腫の形成誘導に関与することが明らかとなった。以上の結果から、ヨーネ菌は、機能不全を起こしたマクロファージ内で生体防御機構から逃れるとともに肉芽腫の拡大に伴って増殖していると考えられた。これらの知見は、ヨーネ菌感受性家畜の腸管に好発するヨーネ病の病理発生機序を解明する上で有用であるばかりでなく、家畜の抗病性育種における重要な指標になると思われる。さらに病理発生の主体がマクロファージの機能不全であることから、若齢ウシにおける易感染性の機構解明とマクロファージ機能の活性化を利用した感染・発病の予防技術の開発にも貢献すると思われる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜った東京大学小野寺節教授に謹んで深甚なる謝意を表します。

また，本研究の遂行と総括にあたり，御厚情をもって御指導と御助言を賜りました農林水産省家畜衛生試験場細菌・寄生虫病研究部横溝祐一博士に心より深謝申し上げます。さらに，終始懇切なる御助言と御支援を頂きました農林水産省家畜衛生試験場九州支場臨床病理研究室佐藤真澄博士，農林水産省国際農林水産業研究センター谷口稔明博士に謹んで感謝いたします。

文 献

1. Adams, J., Follett, D., Hamilton, H. and Czuprynski, C.: Effects of administration of anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies on *Mycobacterium paratuberculosis* infection in intragastrically challenged mice. *Immunol.Lett.*, **35**: 183-190, 1993.
2. Allouche, M., Sahraoui, Y., Augery-Bourget, Y., Perrakis, M., Jasmin, C. and Georgoulas, V.: Interleukin 2 receptors. *Leuk.Res.*, **14**: 699-703, 1990.
3. Bang, B.: Chronische psuedotuberkuloese darmentzuendung beim rinde. *Berl.Tieraerztl.Wschr.*, **42**: 759-763, 1906.
4. Barnes, P.F., Grisso, C.L., Abrams, J.S., Band, H., Rea, T.H. and modlin, R.L.: $\gamma\delta$ T lymphocytes in human tuberculosis. *J.Infect.Dis.*, **165**: 506-512, 1992.
5. Battistini, L., Borsellino, G., Sawicki, G., Poccia, F., Salvetti, M., Ristori, G. and Brosnan, C.F.: Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J.Immunol.*, **159**: 3723-3730, 1997.
6. Bendixen, P.H., Bloch, B. and Jorgensen, J.B.: Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro* and *in vivo*: Light microscopic and electron microscopic observation. *Am.J.Vet.Res.*, **42**: 109-113, 1981.
7. Bergeron, A., Bonay, M., Kambouchner, M., Lecossier, D., Riquet, M., Soler, P., Hance, A. and Tazi, A.: Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas. *J.Immunol.*, **159**: 3034-3043, 1997.
8. Bonorino, C., Nardi, N.B., Zhang, X. and Wysocki, L.J.: Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement. *J.Immunol.*, **161**: 5210-5216, 1998.
9. Brown, D.H., Lafuse, W.P. and Zwilling, B.S.: Stabilized expression of mRNA is associated with mycobacterial resistance controlled by *Nramp1*. *Infect.Immun.*, **65**: 597-

- 603, 1997.
10. Buschman, E., Apt, A.S., Nickonenko, B.V., Moroz, A.M., Averbakh, M.H. and Skamene, E.: Genetic aspects of innate resistance and acquired immunity to Mycobacteria in inbred mice. *Springer Semin.Immun.*, **10**: 337-358, 1988.
 11. Buschman, E., Taniyama, T., Nakamura, R. and Skamene, E.: Functional expression of the *Bcg* gene in macrophages. *Res.Immunol.*, **140**: 793-797, 1989.
 12. Chandler, R.L.: Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. I. Infection in swiss white mice and its modification by suramin and cortisone. *J.CompPathol.*, **71**: 118-130, 1961.
 13. Chandler, R.L.: Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. IV. Comparative susceptibility to infection of C57, C.B.A and Swiss white mice. *J.CompPathol.*, **71**: 233-242, 1961.
 14. Chandler, R.L.: Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. V. Further studies on the comparative susceptibility of C57 black mice. *J.CompPathol.*, **72**: 198-213, 1962.
 15. Chandler, R.L.: Johne's disease in domestic and experimental animals. *Proc.Roy.Soc.Med.*, **57**: 481-482, 1964.
 16. Chiodini, R.J. and Davis, W.C.: The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4⁺ helper and CD8⁺ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate γ/δ^+ T-cell cytotoxicity. *Microb.Pathogenesis*, **14**: 355-367, 1993.
 17. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. and Merkal, R.: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*, **74**: 218-262, 1984.
 18. Collins, M.T. and Manning, E.J.B.: Johne's disease - The international perspective. *Paratuberculosis Newsletter*, **8**: 2-5, 1996.
 19. Dannenberg, A.M.Jr.: Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: Specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes.

- Bacteriol.Rev.*, **32**: 85-102, 1968.
20. Dannenberg, A.M.Jr., Meyer, O.T., Esterly, J.R. and Kambara, T.: The local nature of immunity in tuberculosis, illustrated histochemically in dermal BCG lesions. *J.Immunol.*, **100**: 931-941, 1968.
 21. Dannenberg, A.M., Jr., Suga, M. and Garcia-Gonzales, J.E.: Macrophages in granulomas: Histochemical evidence suggesting local control of heterogeneous functions. In: *Haematology and Blood Transfusion*, Schmalzl, F., Huhn, D. and Schaefer, H.E. Eds, Springer-Verlag, New York, pp.109-119, 1981
 22. Denis, M., Buschman, E., Forget, A., Pelletier, M. and Skamene, E.: Pleiotropic effects of the *Bcg* gene. II. Genetic Restriction of responses to mitogens and allogeneic targets. *J.Immunol.*, **141**: 3988-3993, 1988.
 23. DiTirro, J., Rhoades, E.R., Roberts, A.D., Burke, J.M., Mukasa, A., Cooper, A.M., Frank, A.A., Born, W.K. and Orme, I.M.: Disruption of the cellular inflammatory response to *Listeria monocytogenes* infection in mice with disruptions in targeted genes. *Infect.Immun.*, **66**: 2284-2289, 1998.
 24. Draper, P. and Rees, R.J.W.: Electron-transparent zone of mycobacteria may be a defence mechanism. *Nature*, **228**: 860-861, 1970.
 25. Draper, P. and Rees, R.J.W.: The nature of the electron-transparency zone that surrounds *Mycobacterium lepraemurium* inside host cells. *J.Gen.Mycobiol.*, **77**: 79-87, 1973.
 26. D'Souza, C.D., Cooper, A.M., Frank, A.A., Mazzaccaro, R.J., Bloom, B.R. and Orme, I.M.: An anti-inflammatory role for $\gamma\delta$ T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.*, **158**: 1217-1221, 1997.
 27. Emoto, M., Danbara, H. and Yoshikai, Y.: Induction of $\gamma\delta$ T cells in murine salmonellosis by an avirulent but not by a virulent strain of *Salmonella choleraesuis*. *J.Exp.Med.*, **176**: 363-372, 1992.
 28. Emoto, M., Naito, T., Nakamura, R. and Yoshikai, Y.: Different appearance of $\gamma\delta$ T cells

- during salmonellosis between *Ityr* and *Itys* mice. *J.Immunol.*, **150**: 3411-3420, 1993.
29. Francis, J.: Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. *J.CompPathol.*, **53**: 140-150, 1943.
 30. Frehel, C., de Chastellier, C., Lang, T. and Rastogi, N.: Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect.Immun.*, **52**: 252-262, 1986.
 31. Frelier, P.F., Templeton, J.W., Estes, M., Whitford, H.W. and Kienle, R.D.: Genetic regulation of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in recombinant inbred mice. *VetPathol.*, **27**: 362-364, 1990.
 32. Garcia, I., Miyazaki, Y., Marchal, G., Lesslauer, W. and Vassalli, P.: High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR 1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN- γ in the differentiation of protective granulomas. *Eur.J.Immunol.*, **27**: 3182-3190, 1997.
 33. Gilmour, N.J.L., Campbell, J. and Brotherson, J.G.: The pathogenesis of *Mycobacterium johnei* in orally dosed hamsters. *J.CompPathol.*, **73**: 98-106, 1965.
 34. Goto, H., Yachida, S., Shirahata, T., Shimizu, K. and Ono, T.: Some observations on bovine paratuberculosis in Japan. *Jap.J.Vet.Sci.*, **34**: 291-296, 1972.
 35. Goto, Y., Nakamura, R.M., Takahoshi, H. and Tokunaga, T.: Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *Infect.Immun.*, **46**: 135-140, 1984.
 36. Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P. and Grinstein, S.: Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) impairs phagosomal acidification. *J.Exp.Med.*, **188**: 351-364, 1998.
 37. Hamilton, H., Follett, D., Adams, J. and Czuprynski, C.: Role of cellular immunity in resistance to experimental intestinal paratuberculosis (abstract). In: *89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology*. New Orleans, Louisiana, pp.167, 1989.
 38. Hamilton, H.L., Cooley, A.J., Adams, J.L. and Czuprynsky, C.J.: *Mycobacterium*

- paratuberculosis* monoassociated nude mice as a paratuberculosis model. *Vet.Pathol.*, **28**: 146-155, 1991.
39. Harding, H.P.: The histopathology of *Mycobacterium johnei* infection in small laboratory animals. *J.Pathol.Bacteriol.*, **78**: 157-169, 1959.
 40. Hein, W.R. and Mackay, C.R.: Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. *Immunol.Today*, **12**: 30-34, 1991.
 41. Hirsch, A.: Infection of hamsters and rabbits with *Mycobacterium johnei*. *J.CompPathol.*, **66**: 260-269, 1956.
 42. Inoue, T., Yoshikai, Y., Matsuzaki, G. and Monoto, K.: Early appearing $\gamma\delta$ -bearing T cells during infection with calmette guerin bacillus. *J.Immunol.*, **146**: 2754-2762, 1991.
 43. Itohara, S., Mombaerts, P., Lafaille, J., Iacomini, J., Nelson, A., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Farr, A. and Tonegawa, S.: T cell receptor δ gene mutant mice: independent generation of $\alpha\beta$ T cells and programmed rearrangements of $\gamma\delta$ TCR genes. *Cell*, **72**: 337-348, 1993.
 44. Johne, H.A. and Frothingham, L.: Ein eigenthumlicher fall von tuberculose beim rind. *Deutsche Zeitschrift f. Thiermed. u. vergl. Pathologie.*, **21**: 438-454, 1895.
 45. Johnson, S.C. and Zwilling, B.S.: Continuous expression of I-A antigen by peritoneal macrophages from mice resistant to *Mycobacterium bovis* (strain BCG). *J.Leukoc.Biol.*, **38**: 635-645, 1985.
 46. Johnston, W.S. and MacLachlan, G.K.: Johne's disease in sheep [letter]. *Vet.Rec.*, **119**: 75, 1986.
 47. Jorgensen, J.B.: Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet.Scand.*, **10**: 275-287, 1969.
 48. Julian, R.J.: A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can.Vet.J.*, **16**: 33-43, 1975.
 49. Kindler, V., Sappino, A.P., Grau, G.E., Piguet, P.F. and Vassalli, P.: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection.

- Cell*, **56**: 731-740, 1989.
50. Kim, J.C.S., Sange, V.L. and Whitenack, D.L.: Ultrastructural studies of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *VM/SAC*, **71**: 78-83, 1976.
 51. Kjeldsen-Kragh, J., Quayle, A.J., Skallehegg, B.S., Sioud, M. and Forre, O.: Selective activation of resting human T lymphocytes by interleukin-2. *Eur.J.Immunol.*, **23**: 2092-2099, 1993.
 52. 串田弘. 低粘度エポキシ樹脂包埋法. *細胞*, **13**: 4-8, 1981.
 53. Ladel, C.H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K. and Kaufmann, S.H.E.: Protective role of γ/δ T cells and α/β T cells in tuberculosis. *Eur.J.Immunol.*, **25**: 2877-2881, 1995.
 54. Larsen, A.B., Moon, H.W. and Merkal, R.S.: Susceptibility of swine to mycobacterium paratuberculosis. *Am.J.Vet.Res.*, **32**: 589-595, 1971.
 55. Larsen, A.B. and Moon, H.W.: Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am.J.Vet.Res.*, **33**: 1231-1235, 1972.
 56. Larsen, A.B., Moon, H.W. and Merkal, R.S.: Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.*, **33**: 2185-2189, 1972.
 57. Lominski, I., Cameron, J. and Roberts, G.B.S.: Experimental Johne's disease in mice. *JPathol.Bacteriol.*, **LXXI**: 211-222, 1956.
 58. Macindoe, R.H.F.: What can we do about Johne's disease? *Aust.Vet.J.*, **26**: 216-220, 1950.
 59. Machugh, N.D., Mburu, J.K., Carol, M.J., Wyatt, C.R., Orden, J.A. and Davis, W.C.: Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology*, **92**: 340-345, 1997.
 60. Madge, D.S.: Malabsorption in C57 mice experimentally infected with Johne's disease. *Comp.Biochem.Physiol.*, **40A**: 649-658, 1971.
 61. Merkal, R.S.: Proposal of ATCC 19698 as the Neotype strain of *Mycobacterium paratuberculosis* Bergey et al. 1923. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **29**: 263-264, 1979.
 62. Merkal, R.S., Kopecky, K.E., Larsen, A.B. and Thurston, J.R.: Improvements in the

- techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.*, **25**: 1290-1294, 1964.
63. Mielke, M.E., Peters, C. and Hahn, H.: Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol.Rev.*, **158**: 79-93, 1997.
 64. Mohler, W.M.: Johne's disease infection of laboratory animals with aid of paraffin oil. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **94**: 590-594, 1939.
 65. Munk, M.E., Gatrill, A.J. and kaufmann, S.H.: Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. *J.Immunol.*, **145**: 2434-2439, 1990.
 66. Mutwiri, G.K., Rosendal, S., Kosecka, U., Yager, J., Perdue, M. and Butler, D.G.: Adoptive transfer of congenic spleen cells reduces the severity of clinical disease and pathology in SCID Bg mice infected with *Mycobacterium paratuberculosis* (MPTB) of bovine origin. In: *Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis*, Chiodini, R., Collins, M. and Bassey, E.O.E. Eds., IAP, Cambridge, pp.189-201, 1994.
 67. Mutwiri, G.K., Butler, D.G., Rosendal, S. and Yager, J.: Experimental infection of sever combined immunodeficient beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Infect.Immun.*, **60**: 4074-4079, 1992.
 68. Nemoto, H.: Mycobactin requirement for growth of *Mycobacterium johnei* in semisolid medium. *NIAH Quarterly*, **9**: 53-54, 1969.
 69. Nishimura, H., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Grabstein, K.H., Paxton, R., Sugamura, K., Bluestone, J.A. and Yoshikai, Y.: IL-15 is a novel growth factor for murine $\gamma\delta$ T cells induced by salmonella infection. *J.Immunol.*, **156**: 663-669, 1996.
 70. Ohga, S., Yoshikai, Y., Takeda, Y., Hiromatsu, K. and Nomoto, K.: Sequential appearance of $\gamma\delta$ - and α/β -bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur.J.Immunol.*, **20**: 533-538, 1990.

71. Orme, I.M., Andersen, P. and Boom, W.H.: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Infect.Dis.*, **167**: 1481-1497, 1993.
72. Paliwal, O.P. and Rehbinder, C.: Ultrastructural studies of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. *Acta Vet.Scand.*, **22**: 180-188, 1981.
73. Paul, T.R. and Beveridge, T.J.: Preservation of surface lipids and determination of ultrastructure of *Mycobacterium kansasii* by freeze-substitution. *Infect.Immun.*, **62**: 1542-1550, 1994.
74. Perussia, B., Ramoni, C., Anegon, I., Cuturi, M.C., Faust, J. and Trinchieri, G.: Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat.Immune Cell Growth Regul.*, **6**: 171-188, 1987.
75. Rankin, J.D.: The experimental production of Johne's disease in laboratory rabbits. *JPathol.Bacteriol.*, **75**: 363-366, 1958.
76. Ruiters, D.J., Mauw, B.J. and Beyer-Boon, M.E.: Ultrastructure of normal epithelial cells in Papanicolaou-stained cervical smears. An application of a modified open-face embedding technique for transmission electron microscopy. *Acta Cytol.* **23**: 507-515, 1979.
77. 佐野豊. 酸性フォスファターゼ検出のためのナフトール AS 法. 組織学研究法, 第4版, 南山堂, pp.530-531, 1972.
78. 佐野豊. 酸性フォスファターゼ証明のための磷酸鉛法. 組織学研究法, 第4版, 南山堂, pp.529-530, 1972.
79. Saunders, B.M., Frank, A.A., Cooper, A.M. and Orme, I.M.: Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice. *Infect.Immun.*, **66**: 5508-5514, 1998.
80. Saxegaard, F., Baess, I. and Jantzen, E.: Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.*, **96**: 497-502, 1988.
81. Smith, D., Hansch, H., Bancroft, G. and Ehlers, S.: T-cell-independent granuloma

- formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology*, **92**: 413-421, 1997.
82. Smith, K.: Electron microscopical observation on *Mycobacterium johnei*. *Res.Vet.Sci.*, **10**: 1-3, 1969.
 83. Smith, R.A., Kreeger, J.M., Alvarez, A.J., Goin, J.C., Davis, W.C., Whipple, D.L. and Estes, D.M.: Role of CD8⁺ and WC-1⁺ $\gamma\delta$ T cells in resistance to *Mycobacterium bovis* infection in the SCID-bg mouse. *J.Leukoc.Biol.*, **65**: 28-34, 1999.
 84. Smythe, R.H. and Christie, G.J.: Some observations on Johne's disease with a further note on the examination of faecal samples. *Vet.Rec.*, **62**: 429-440, 1950.
 85. Spurr, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J.Ultras.Res.*, **26**: 31-43, 1969.
 86. Stamp, J.T. and Watt, J.A.: Johne's disease in sheep. *J.CompPathol.*, **64**: 26-40, 1954.
 87. Stokes, R.W. and Collins, F.M.: Growth of *Mycobacterium avium* in activated macrophages harvested from inbred mice with differing innate susceptibilities to mycobacterial infection. *Infect.Immun.*, **56**: 2250-2254, 1988
 88. Takano, M., Nishimura, H., Kimura, Y., Mokuno, Y., Washizu, J., Itohara, S., Nimura, Y. and Yoshikai, Y.: Protective roles of $\gamma\delta$ T cells and interleukin-15 in *Escherichia coli* infection in mice. *Infect.Immun.*, **66**: 3270-3278, 1998.
 89. 竹原好兵. 牛のパラ結核性腸炎の発生例に就いて. *中央獣医学会雑誌*, **43**: 311-320, 1930.
 90. Twort, F.W. and Ingram, G.L.Y.: A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronic pseudotuberculosis bovis*, *Johne*, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovine. *Proc.Royal Soc.London*, **84**: 517-542, 1911.
 91. Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. and Gros, P.: Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, **73**: 469-485, 1993.

92. West, G., Agbo, M., Willeberg, P., Ruppanner, R., Aalund, O. and Behymer, D.: Paratuberculosis in California dairy goats. *California Vet.*, **33**: 1511-1515, 1979.
93. Williams, E.S., Snyder, S.P. and Martin, K.L.: Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet.Pathol.*, **20**: 274-290, 1983.
94. Wood, P.R. and Seow, H.-F.: T cell cytokines and disease prevention. *Vet.Immunol.Immunop.*, **54**: 33-44, 1996.
95. 横溝祐一. 牛のヨーネ病. *家畜診療*, 281: 5-11, 1986.
96. 横溝祐一. 総説 牛ヨーネ病に関する新知見と防疫戦略. *山口獣医学雑誌*, 26: 1-26, 1999.
97. 柚木弘之. マイコバクテリア属. *獣医微生物学*, 第1版, 養賢堂, pp.444-455, 1989.

图 表

Table 1. ヨーネ菌接種後3週, 6週, 9週および32週における BALB/c および C3H/HeJ マウスの肉芽腫形成がみられた臓器および頭数

臓器	菌接種後3週, 6週, 9週および32週の各臓器における 肉芽腫形成が認められたマウス頭数							
	BALB/c マウス (n=3 頭 / 週)				C3H/HeJ マウス (n=3 頭 / 週)			
	3	6	9	32	3	6	9	32
肝臓	3	3	3	3	3	3	3	3
脾臓	3	3	3	3	3	3	3	3
膵臓	0	3	3	3	1	1	1	0
肺	0	0	2	3	1	2	0	0
小腸	0	3	3	3	0	0	0	0
大腸	0	2	3	3	0	0	0	0
胸腺	0	3	3	3	0	0	0	0
心臓	0	0	1	1	0	0	0	0
子宮	0	2	3	3	0	0	0	0

Table 2. ヨーネ菌接種後6週および18週の野生型BALB/cおよび $\gamma\delta$ Tリンパ球欠損ミュータントBALB/cマウスの肝臓における平均肉芽腫数および平均肉芽腫面積 (n=5 マウス/群)

菌接種量	感染後週	切片1mm ² あたりの平均肉芽腫面積			
		切片1mm ² あたりの平均肉芽腫数 ± 標準偏差		(x 10 ³ mm ²) ± 標準偏差	
		ミュータントマウス群	野生型マウス群	ミュータントマウス群	野生型マウス群
少量 (4 x 10 ⁶ CFU/マウス)	6	4.9 ± 4.7	7.4 ± 7.9	3.9 ± 2.8	6.9 ± 5.4
	18	2.8 ± 2.4	5.7 ± 1.4	2.9 ± 1.1	9.5 ± 2.1 [§]
多量 (4 x 10 ⁹ CFU/マウス)	6	50.4 ± 5.1	47.0 ± 8.2	50.6 ± 25.0	38.1 ± 19.9
	18	24.4 ± 16.1 [*]	45.7 ± 6.0 [¶]	12.2 ± 6.0	78.6 ± 47.7 [¶]

[§] P < 0.05 少量菌接種後18週におけるミュータントマウス群と比較. ^{*} P < 0.005 多量菌接種後6週におけるミュータントマウス群と比較.

[¶] P < 0.05 多量菌接種後18週におけるミュータントマウス群と比較.

Table 3. ヨーネ菌接種後6週および18週の野生型BALB/cおよび $\gamma\delta$ Tリンパ球欠損ミュータントBALB/cマウスの脾臓における

菌増殖性の比較 (n=5 マウス/群)

菌接種量	感染後週	脾臓あたり Log ₁₀ CFU (平均 ± 標準偏差)	
		ミュータントマウス群	野生型マウス群
少量 (4 × 10 ⁶ CFU/マウス)	6	0.8 ± 0.7	2.4 ± 0.6
	18	6.2 ± 1.4 [†]	8.0 ± 1.5 ^{††}
多量 (4 × 10 ⁹ CFU/マウス)	6	3.0 ± 0.9	3.1 ± 0.9
	18	7.6 ± 0.1 [*]	9.9 ± 0.2 ^{§*}

[†]P < 0.0001 少量菌接種後6週におけるミュータントマウス群と比較. ^{††}P < 0.001 少量菌接種後6週における野生型マウス群と比較.

^{*}P < 0.0001 多量菌接種後6週におけるミュータントマウス群と比較. [§]P < 0.0001 多量菌接種後6週における野生型マウス群と比較.

[§]P < 0.05 多量菌接種後18週におけるミュータントマウス群と比較.

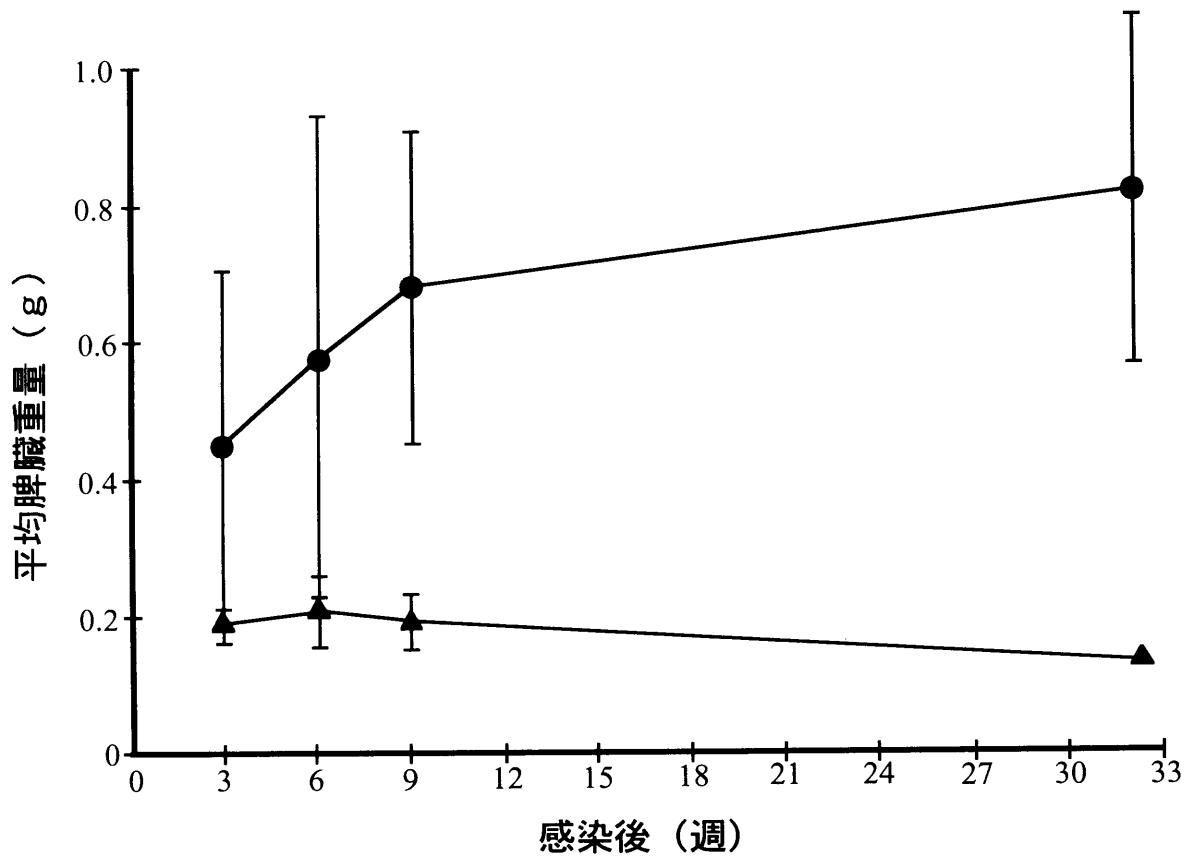


Fig. 1. ヨーネ菌接種後のBALB/c (●)およびC3H/HeJ (▲)マウスにおける平均脾臓重量の推移. バーは95%信頼限界.

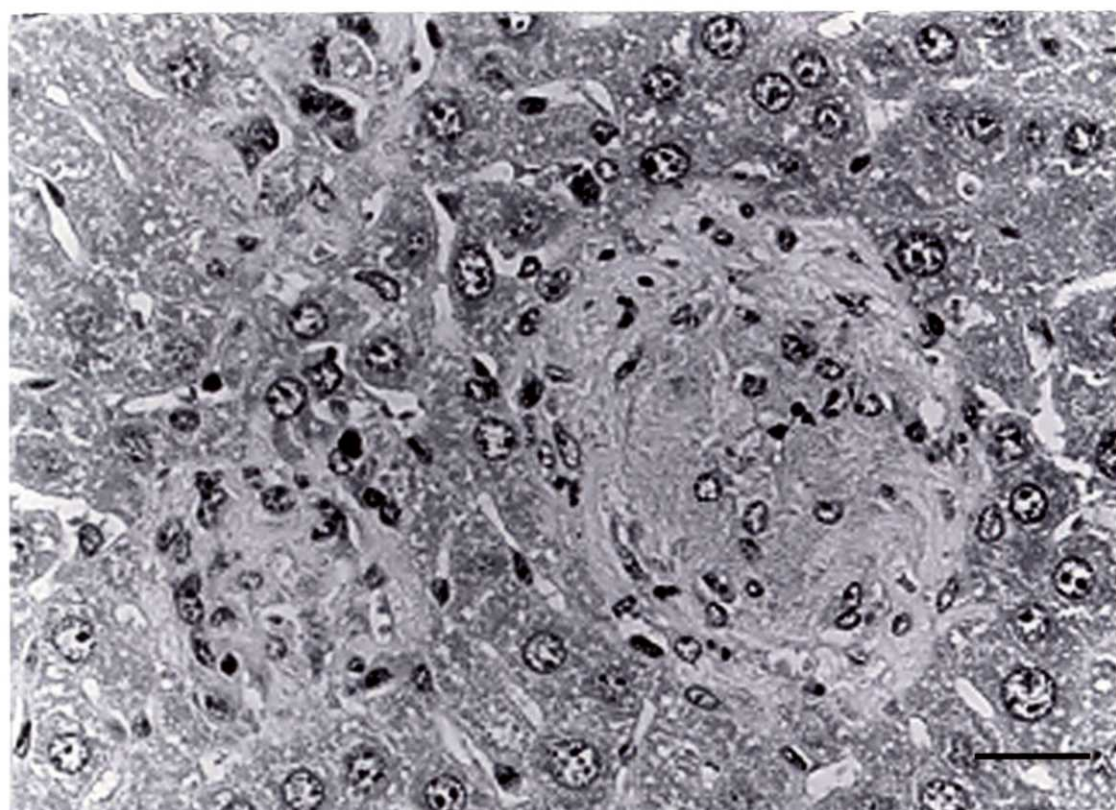


Fig. 2. ヨーネ菌接種後 32 週における BALB/c マウスの肝臓実質に認められた類上皮細胞肉芽腫. HE 染色. Bar = 25 μ m.

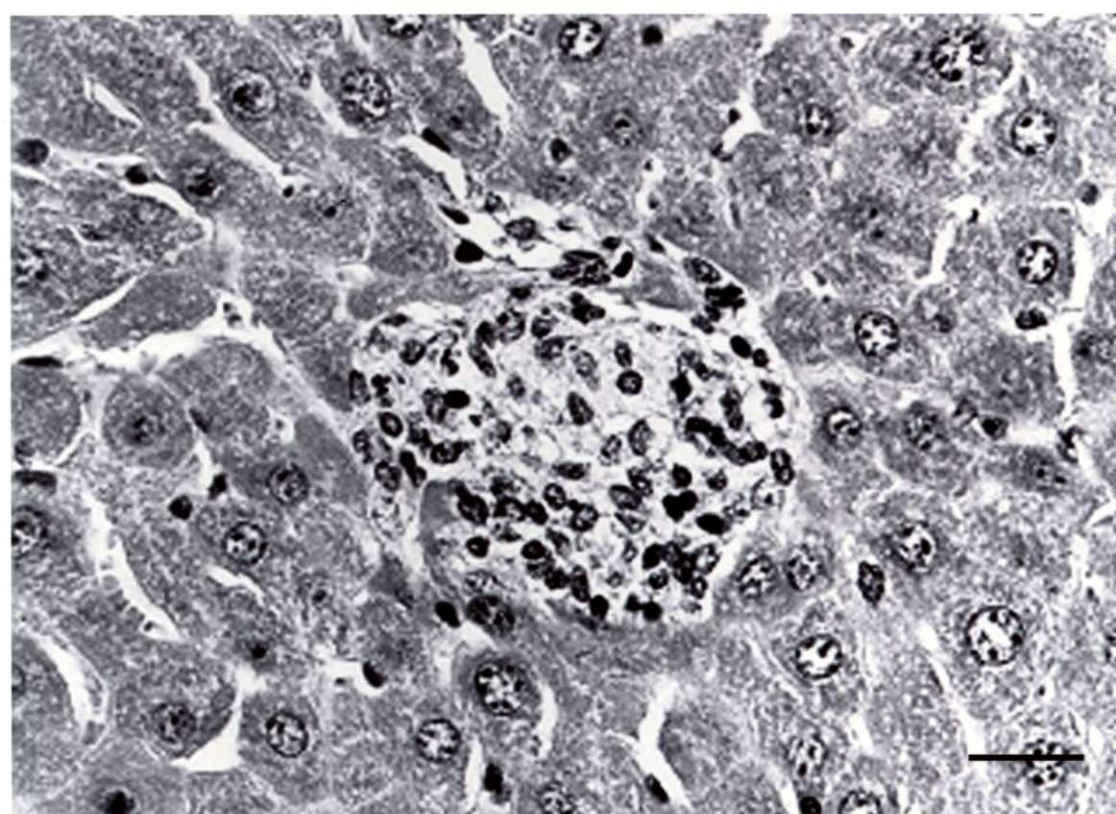


Fig. 3. ヨーネ菌接種後 32 週における C3H/HeJ マウスの肝臓実質に認められた肉芽腫結節. 結節辺縁に多数のリンパ球とマクロファージの浸潤がみられる. HE 染色. Bar = 25 μ m.

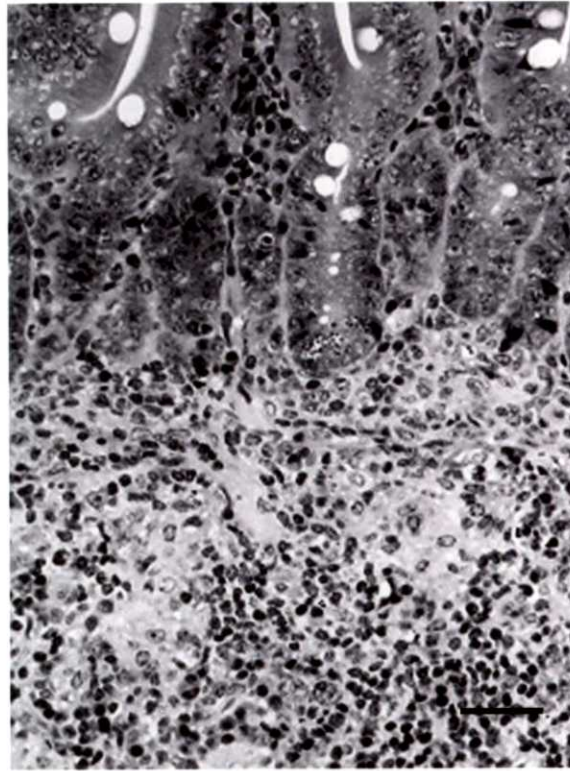


Fig. 4. ヨーネ菌接種後6週におけるBALB/cマウスの小腸パイエル板リンパ濾胞に形成された肉芽腫結節. HE染色. Bar = 40 μ m.

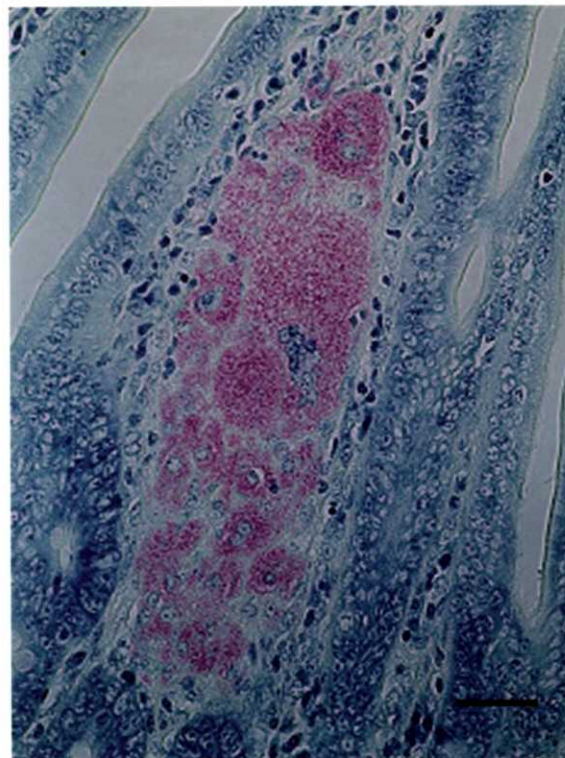


Fig. 5. ヨーネ菌接種後32週におけるBALB/cマウスの小腸粘膜固有層に形成された類上皮細胞肉芽腫内に多数の菌(赤色)が検出された. 抗酸菌染色(Ziehl-Neelsen法). Bar = 40 μ m.

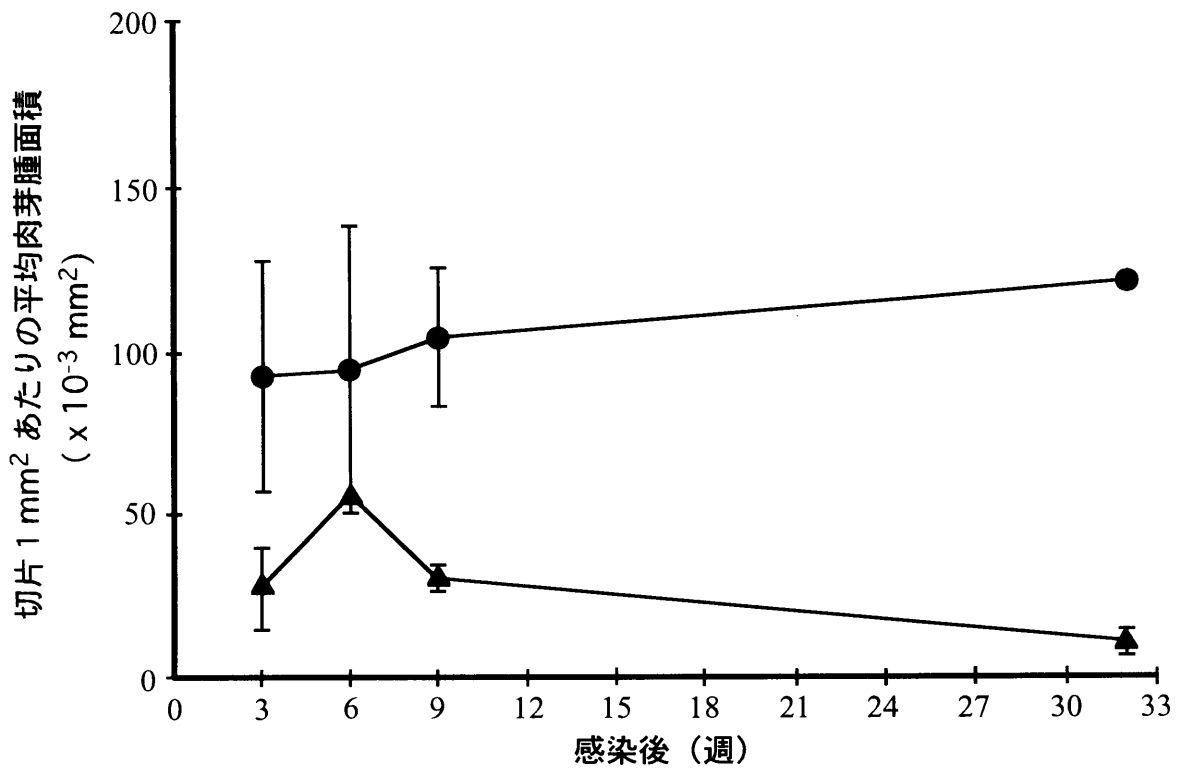


Fig. 6. ヨーネ菌接種後のBALB/c (●)およびC3H/HeJ (▲)マウスの肝臓における平均肉芽腫面積の推移. バーは95%信頼限界.

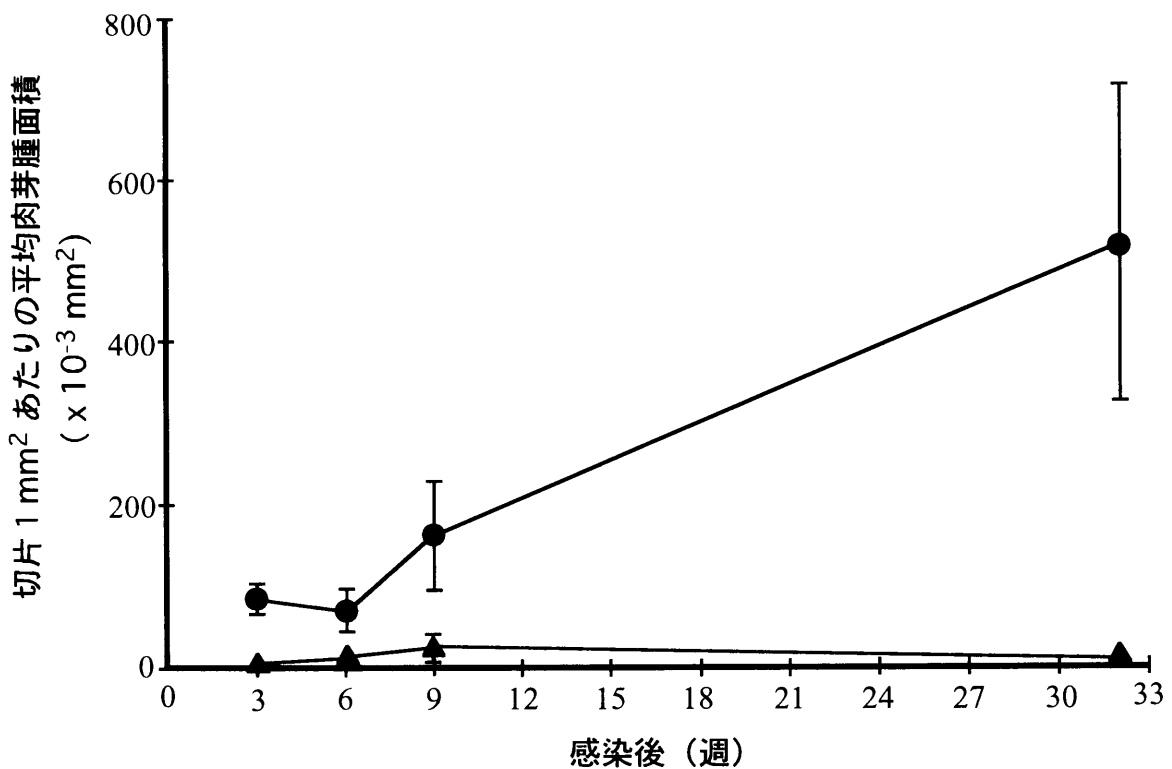


Fig. 7. ヨーネ菌接種後のBALB/c (●)およびC3H/HeJ (▲)マウスの脾臓における平均肉芽腫面積の推移. バーは95%信頼限界.

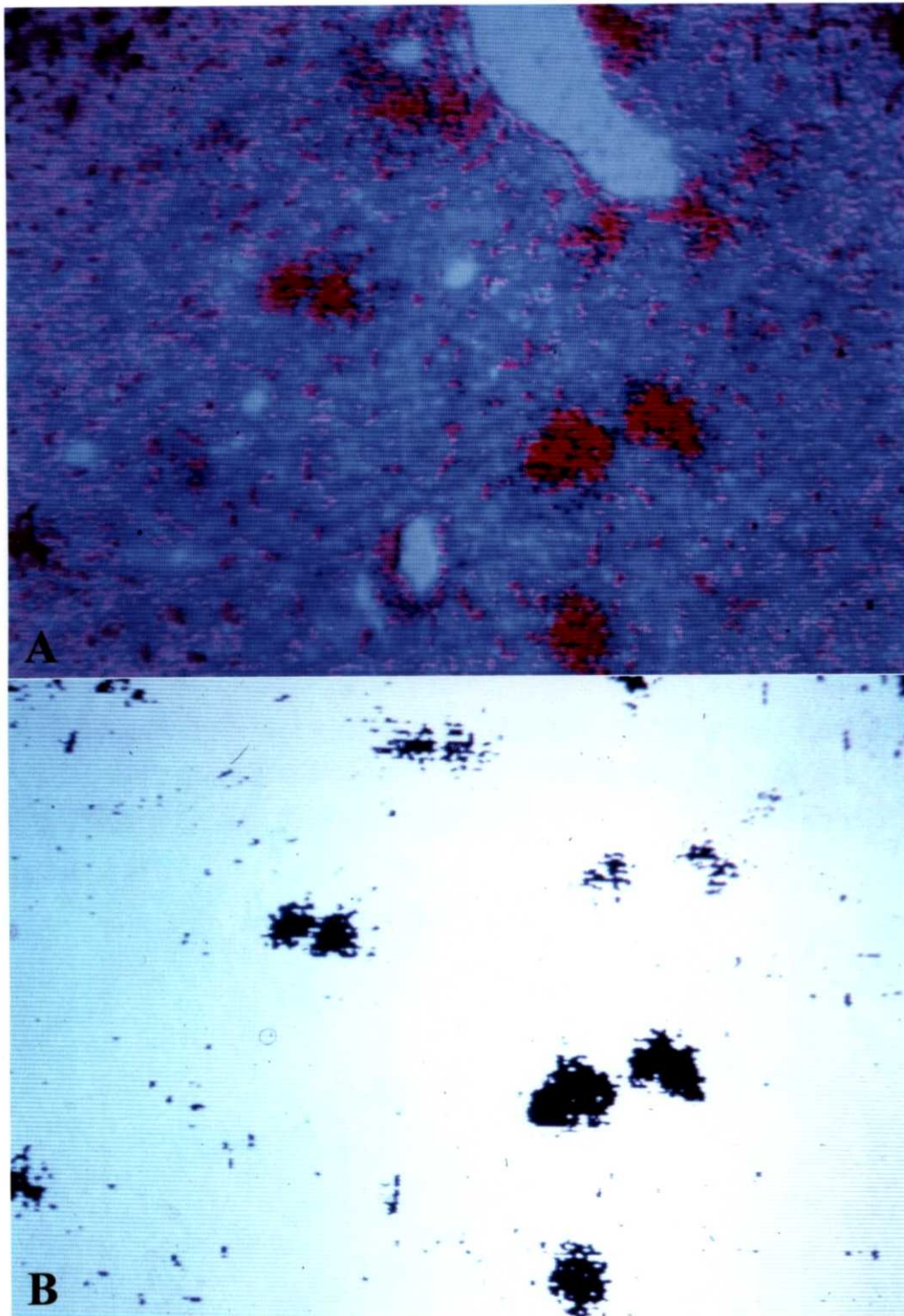


Fig. 8. カラー解析による酸性フォスファターゼ (AcPase) 陽性部面積測定のための画像処理. A: AcPase 組織化学染色によりヨーネ菌接種後 9 週における BALB/c マウスの肝臓で肉芽腫形成部に一致する陽性反応 (赤色) が認められる. B: 赤色の陽性反応部位をカラー抽出後, 二値化処理した画像.

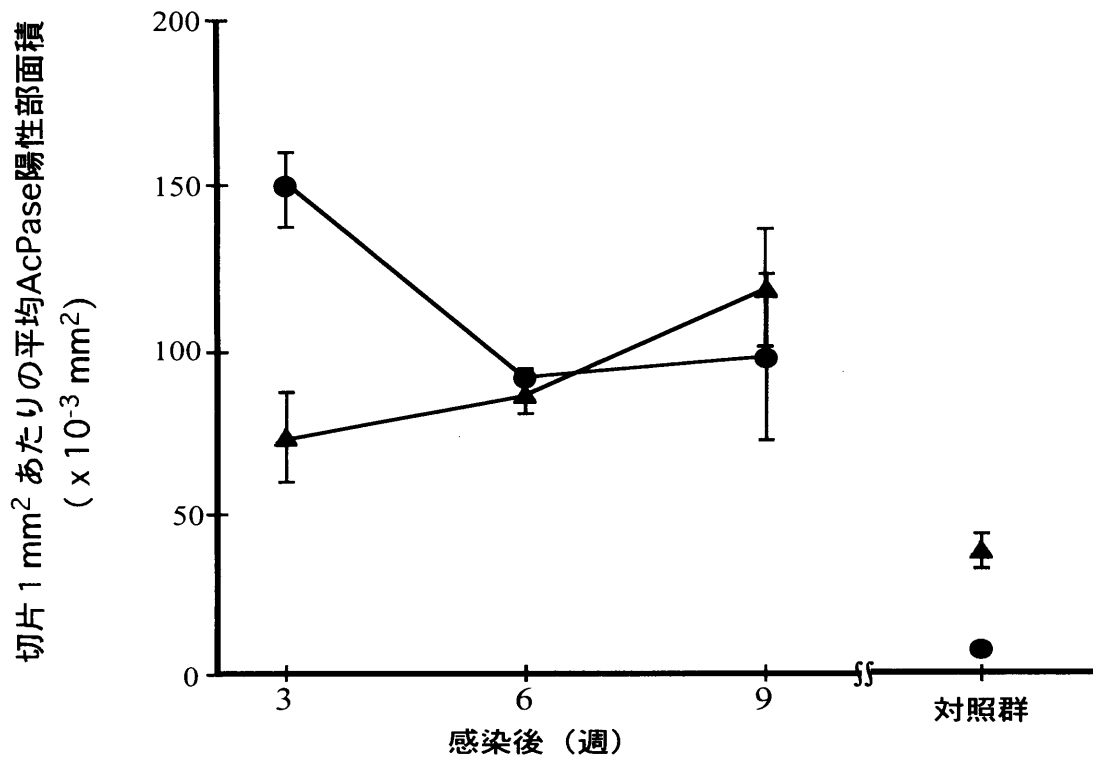


Fig. 9. ヨーネ菌接種後のBALB/c (●)およびC3H/HeJ (▲)マウスの肝臓における平均AcPase陽性部面積の推移. 各週における非感染マウス群の平均を対照群とした. バーは95%信頼限界.

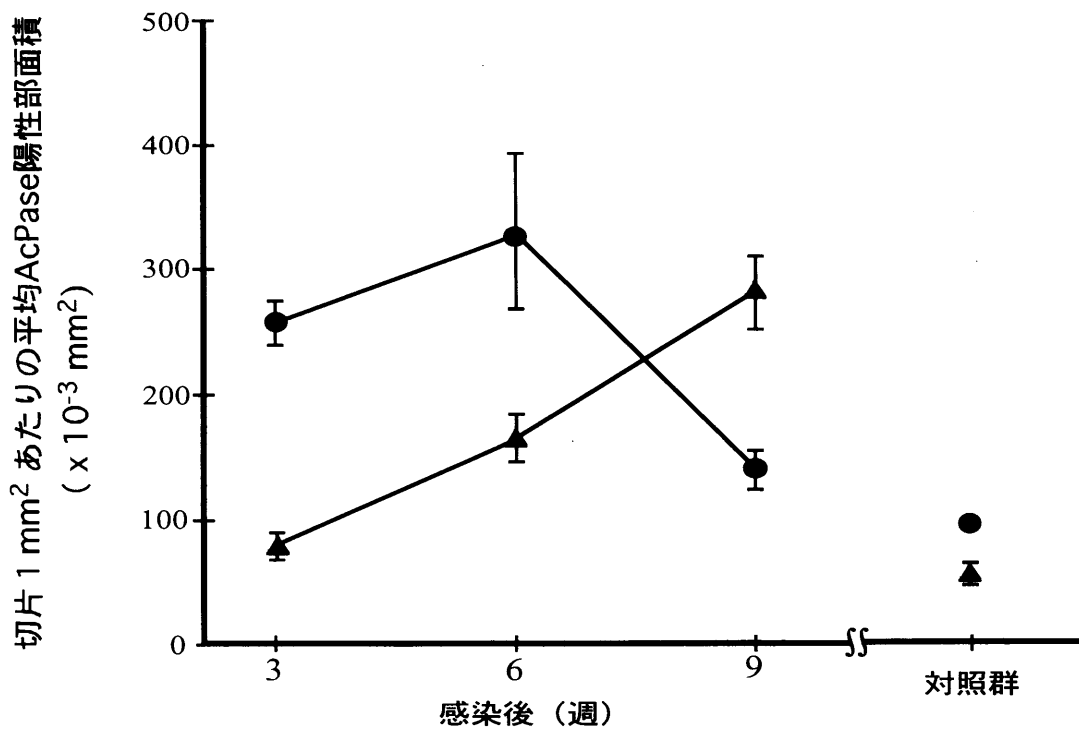


Fig. 10. ヨーネ菌接種後のBALB/c (●)およびC3H/HeJ (▲)マウスの脾臓における平均AcPase陽性部面積の推移. 各週における非感染マウス群の平均を対照群とした. バーは95%信頼限界.

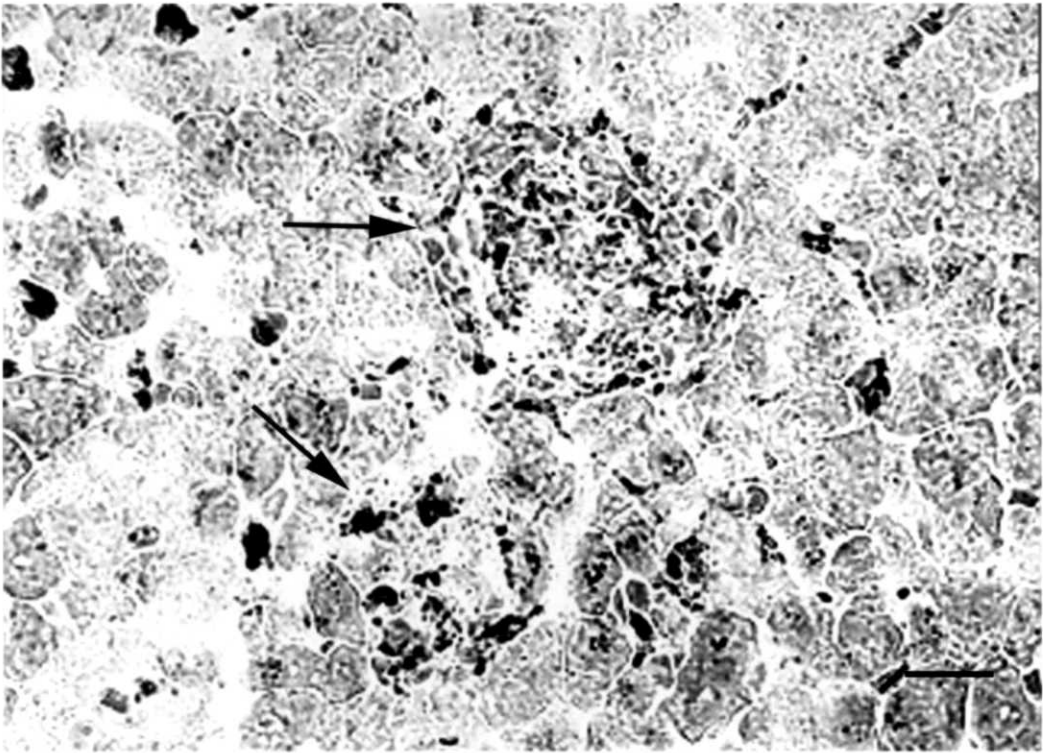


Fig. 11. ヨーネ菌接種後9週におけるBALB/cマウスの肝臓に形成された肉芽腫(矢印)内に散在するAcPase染色陽性部. 肉芽腫に参画する類上皮細胞の多くはAcPase活性に乏しい. AcPase組織化学染色(ナフトールAS法). Bar = 25 μ m.

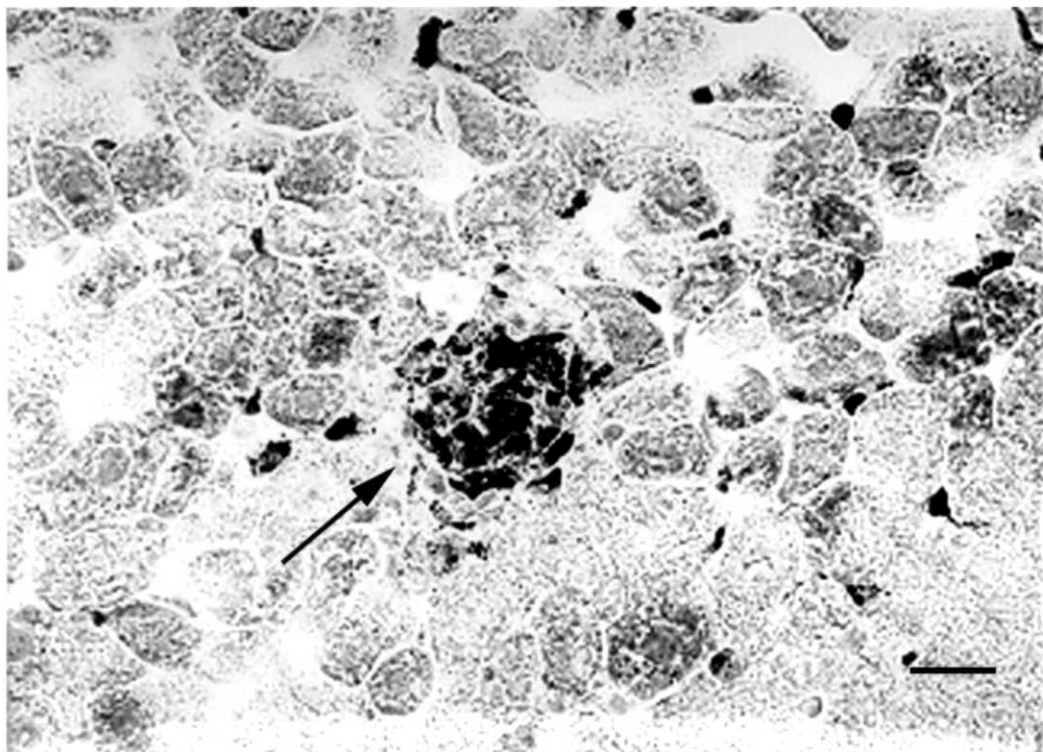


Fig. 12. ヨーネ菌接種後9週におけるC3H/HeJマウスの肝臓にみられた小型の類上皮細胞肉芽腫(矢印)では,高いAcPase活性が認められる. AcPase組織化学染色(ナフトールAS法). Bar = 25 μ m.

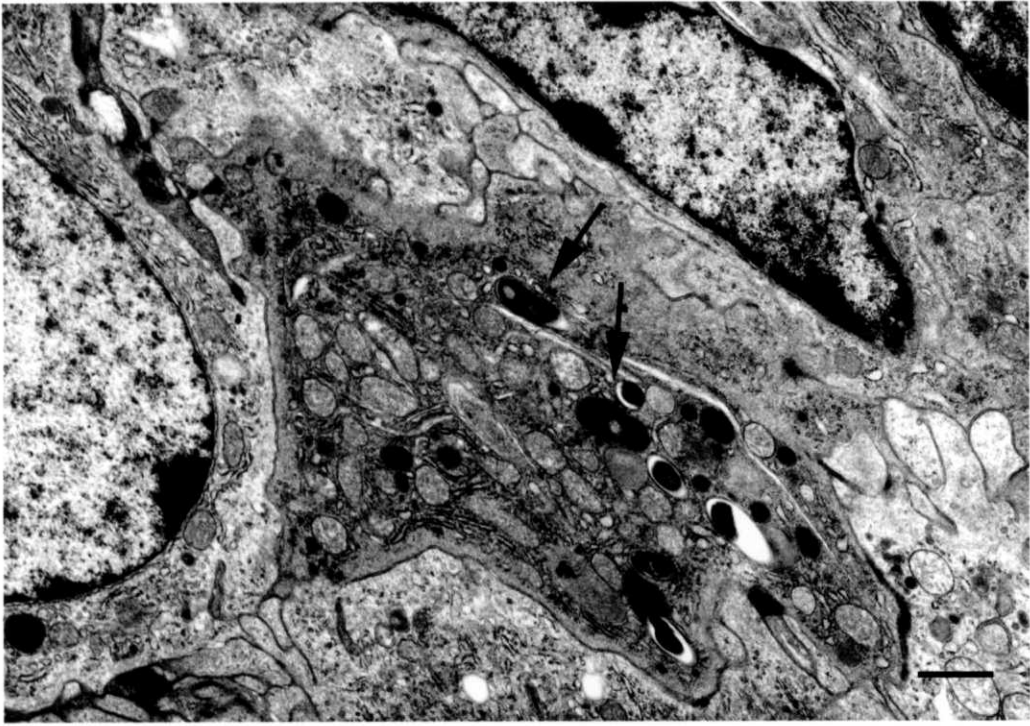


Fig. 13. ヨーネ菌接種後3週におけるBALB/cマウスの肝臓にみられたマクロファージ内の菌(矢印)は、ファゴソームに内包されている。透過電顕写真像。Bar = 1 μ m.

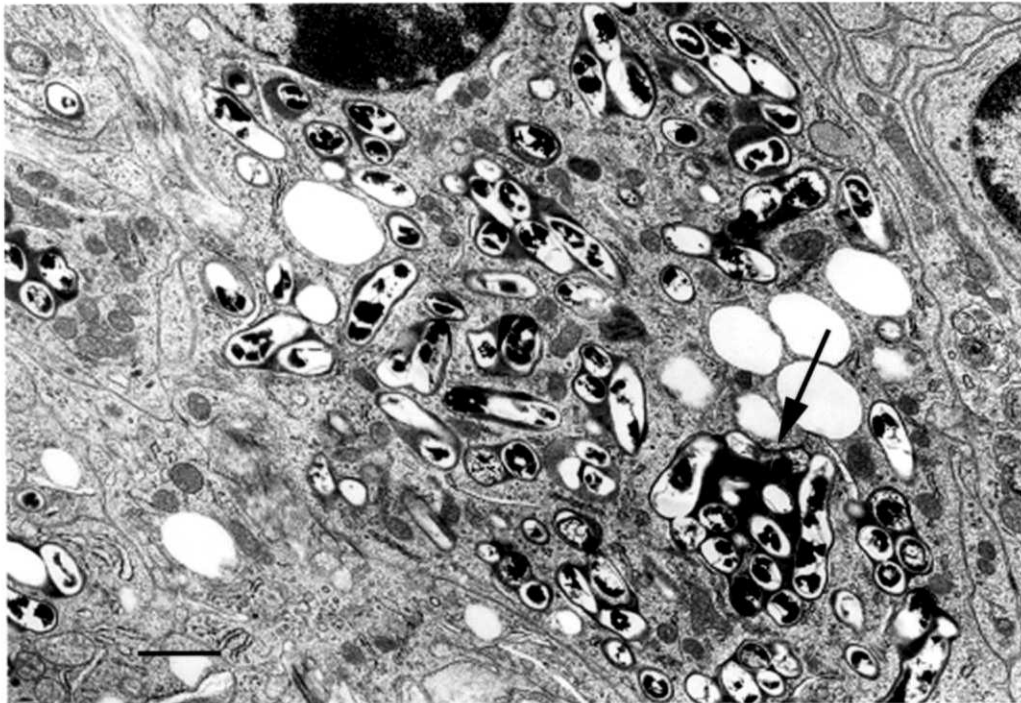


Fig. 14. ヨーネ菌接種後3.2週におけるBALB/cマウスの肝臓に形成された肉芽腫内の類上皮細胞では、大部分の菌が小型のファゴライソゾーム(SPLs)内に認められるが、矢印で示す大型のファゴライソゾーム(LPL)に内包される菌もみられる。透過電顕写真像。Bar = 1 μ m.

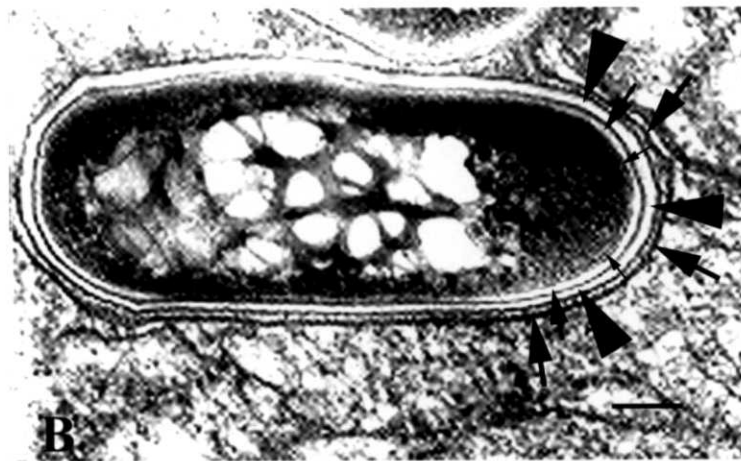
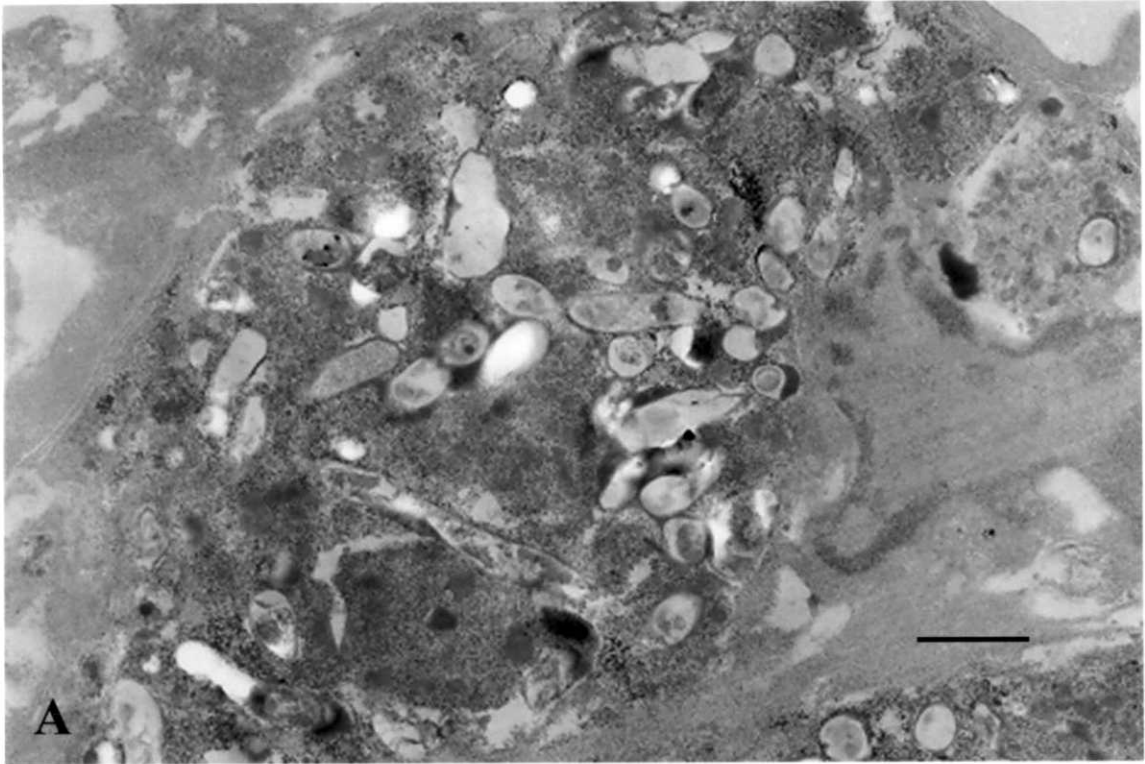


Fig. 15. ヨーネ菌接種後 32 週における BALB/c マウスの肝臓に形成された肉芽腫内にみられた菌の透過電顕像。A: 少数の菌を内包する小型のファゴライソゾーム内には, AcPase 反応産物が極めて少量である。金属塩法。Bar = 1 μ m。B: すべての菌は, ファゴライソゾーム膜 (大矢印) に囲まれた腔内にみられ, 電子透過帯 (矢頭) は, 菌細胞質膜 (小矢印) と細胞壁 (中矢印) の外側に存在している。Bar = 100 nm。

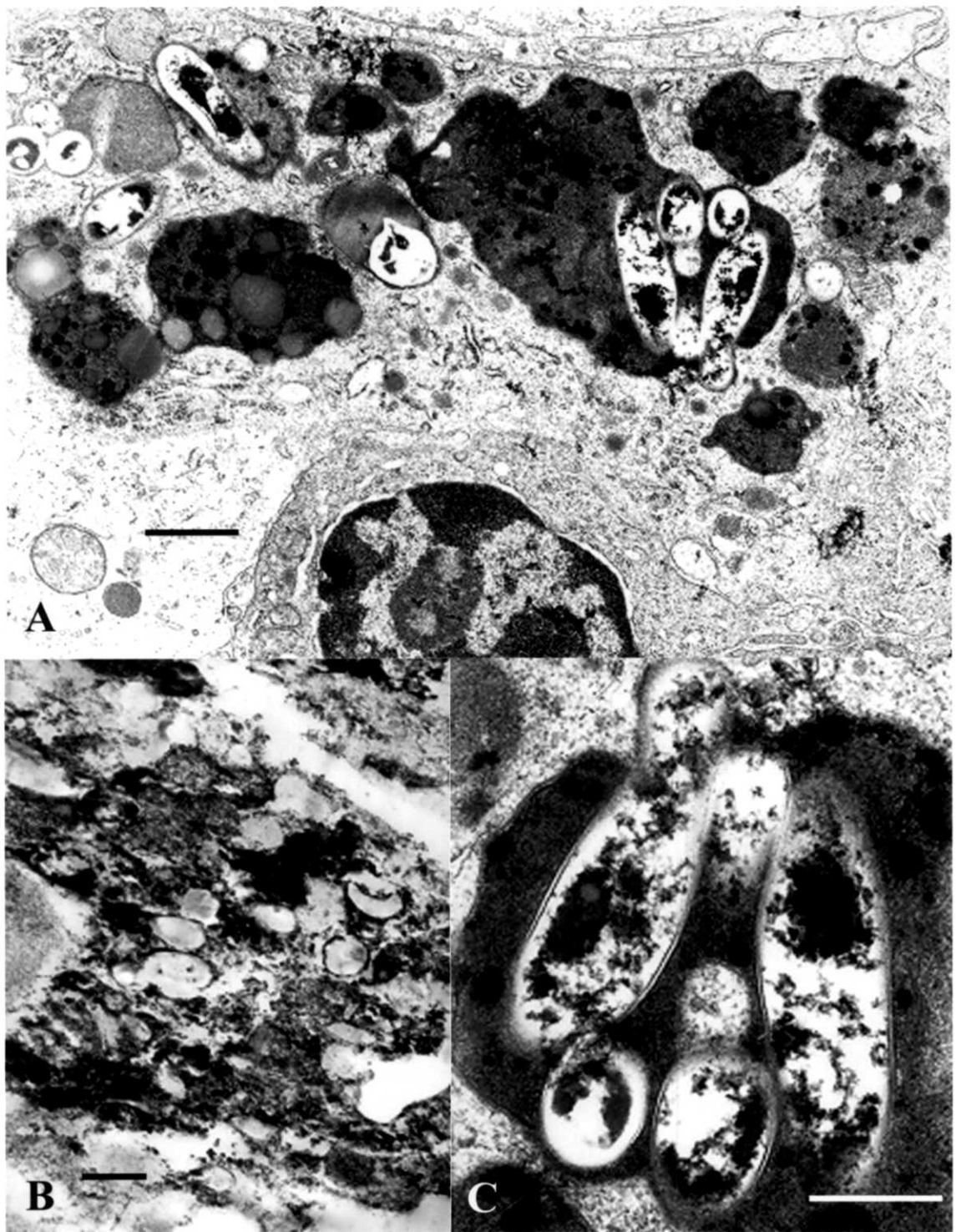


Fig. 16. ヨーネ菌接種後 32 週における C3H/HeJ マウスの肝臓に形成された肉芽腫内にみられた菌の透過電顕像. A: 類上皮細胞内には, 少数の菌と電子密度の高い多量のライソゾーム酵素を含む大型のファゴライソゾームが多数認められる. Bar = 1 μ m. B: 大型のファゴライソゾーム内の菌周囲には, 多量の AcPase 反応物が検出される. 金属塩法. Bar = 500 nm. C: LPLs 内にみられた多数の菌に菌壁の部分的消失や変性が認められる. Bar = 500 nm.

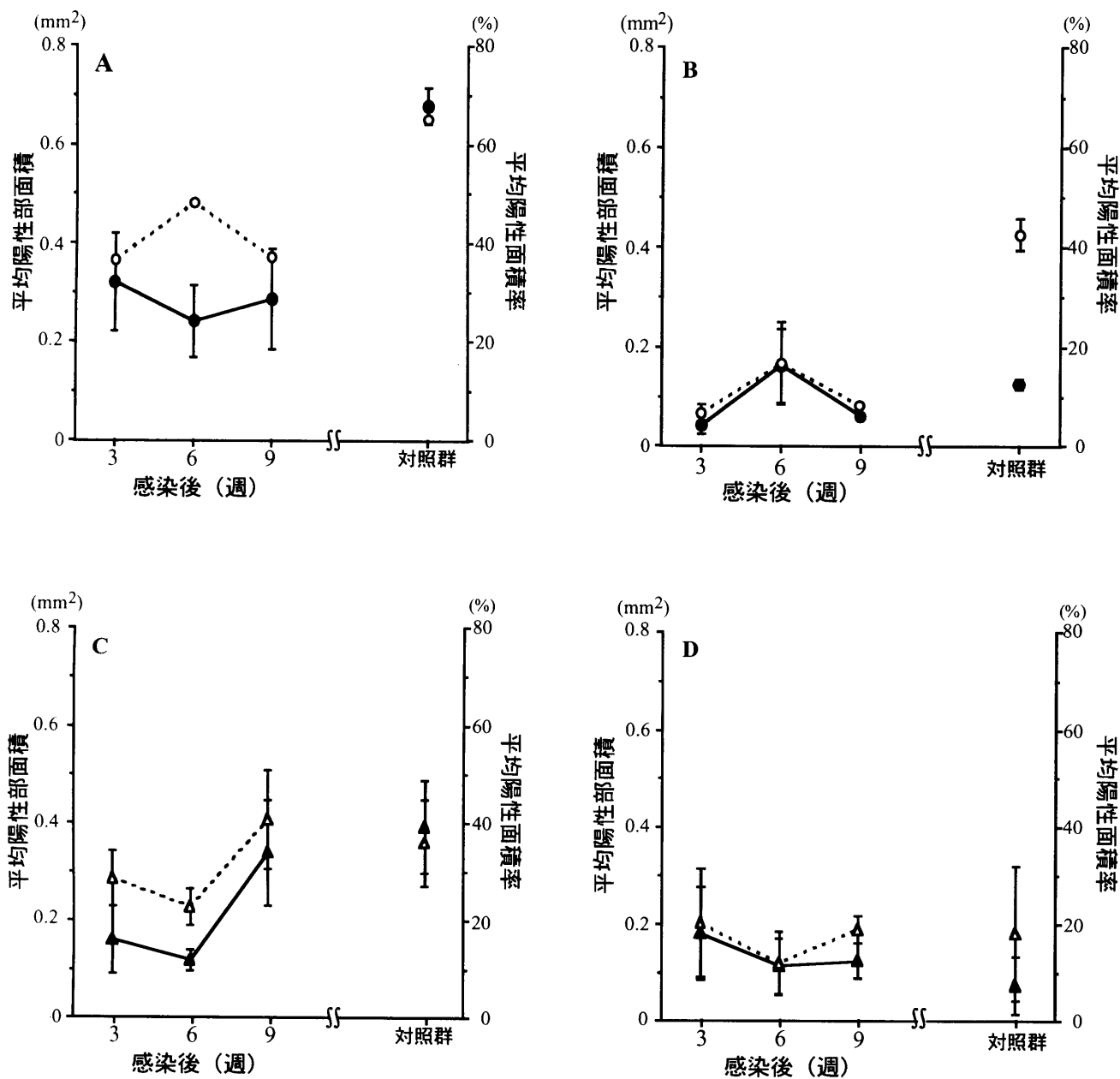


Fig. 17. ヨーネ菌接種後3週, 6週および9週におけるBALB/c (●および○) とC3H/HeJ (▲および△) マウスの白脾髄および赤脾髄におけるpan Tリンパ球の平均陽性部面積 (—) と平均陽性部面積率 (---) の推移.
 A: BALB/cマウスの白脾髄における平均面積および平均面積率.
 B: BALB/cマウスの赤脾髄における平均面積および平均面積率.
 C: C3H/HeJマウスの白脾髄における平均面積および平均面積率.
 D: C3H/HeJマウスの赤脾髄における平均面積および平均面積率.

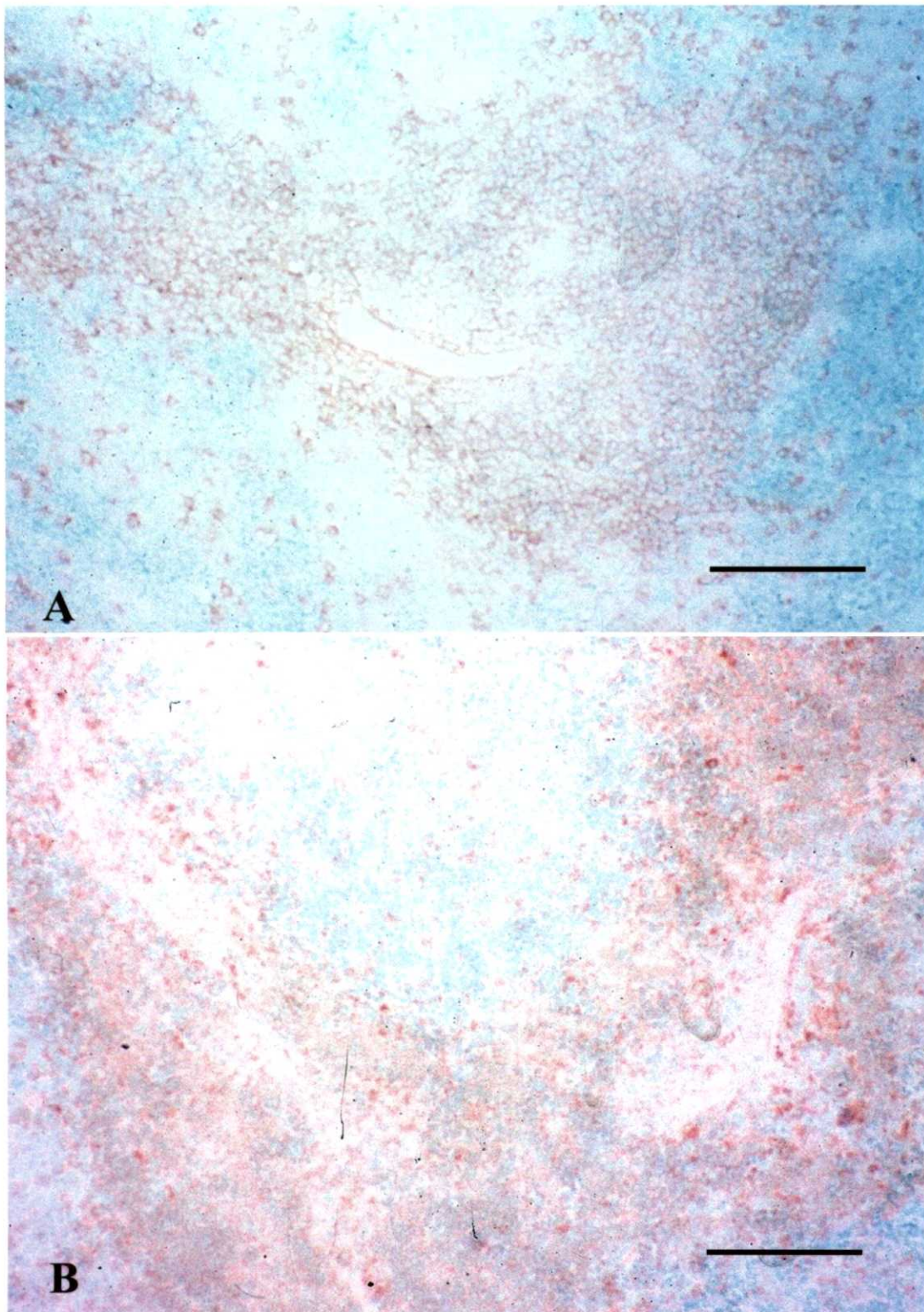


Fig. 18. ヨーネ菌接種後9週における感染群マウスの脾臓における pan Tリンパ球の分布と動態. A: BALB/c マウスでは, 濾胞辺縁帯での肉芽腫形成とともに陽性細胞の減少がみられる. Bar = 100 μ m. B: C3H/HeJ マウスでは, 濾胞辺縁帯を主体として多数の陽性細胞が認められる. Bar = 100 μ m. A,Bとも抗 Thy1.2 抗体を用いた免疫染色 (SAB法).

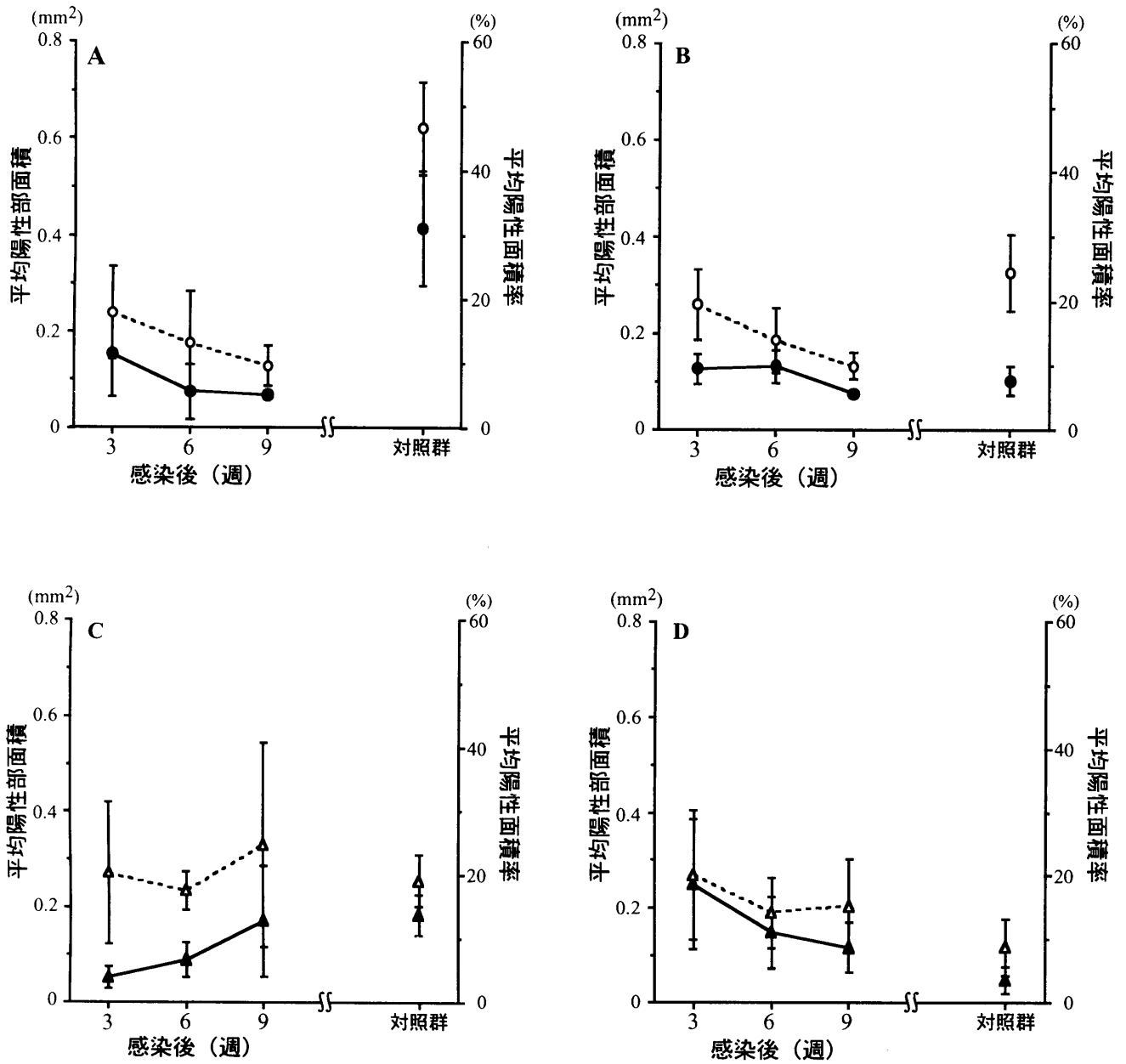


Fig. 19. ヨーネ菌接種後3週, 6週および9週におけるBALB/c (●および○) とC3H/HeJ (▲および△) マウスの白脾髄および赤脾髄におけるCD4⁺Tリンパ球の平均陽性部面積 (—) と平均陽性部面積率 (---) の推移.
 A: BALB/cマウスの白脾髄における平均面積および平均面積率.
 B: BALB/cマウスの赤脾髄における平均面積および平均面積率.
 C: C3H/HeJマウスの白脾髄における平均面積および平均面積率.
 D: C3H/HeJマウスの赤脾髄における平均面積および平均面積率.

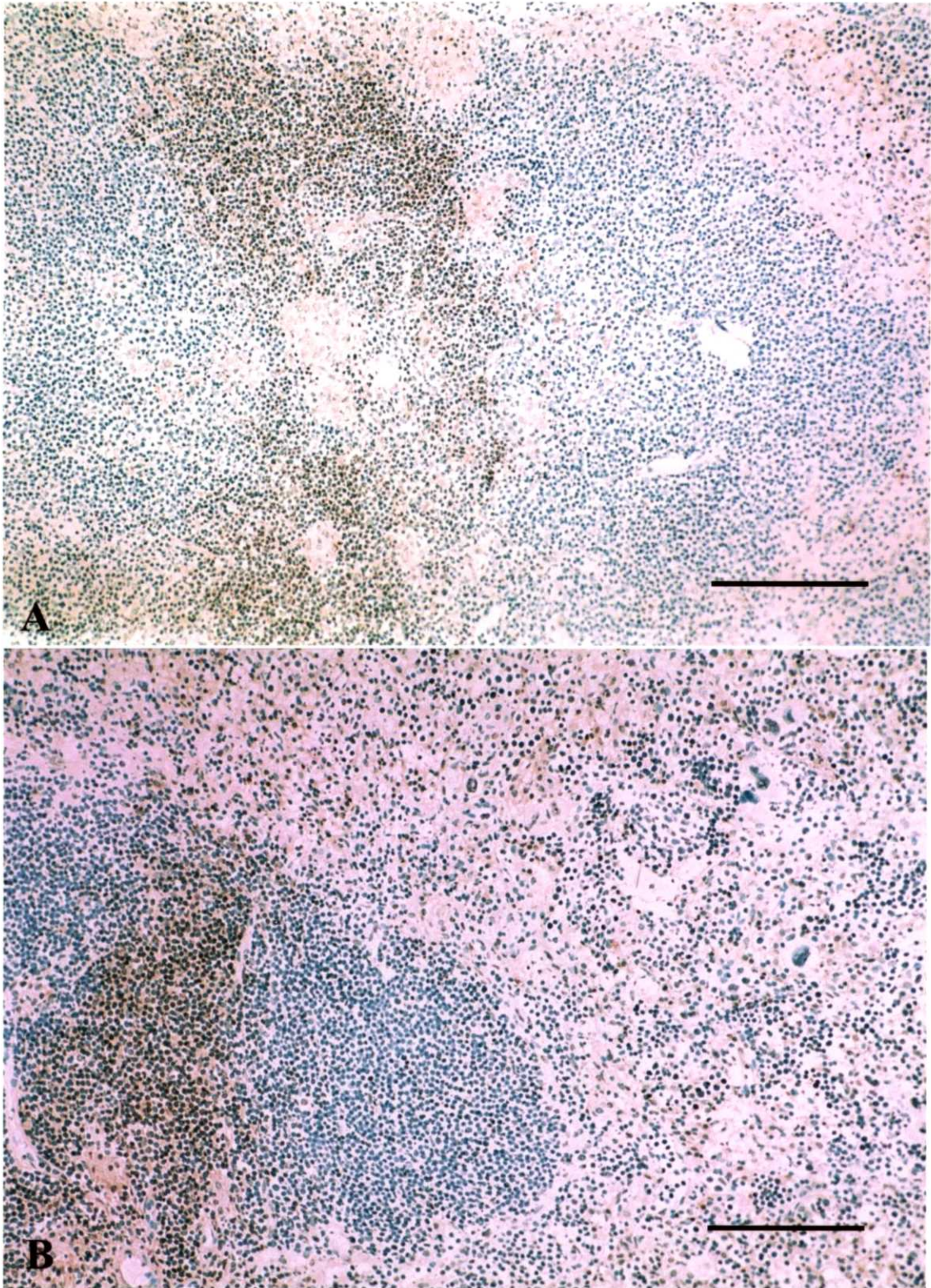


Fig. 20. 感染群 BALB/c マウスの脾臓における $CD4^+$ Tリンパ球の分布と動態. A: ヨーネ菌接種後3週では, 白脾髄辺縁帯に多数の陽性細胞を認める. Bar = 100 μ m. B: 菌接種後9週では, 白脾髄の萎縮とともに陽性細胞の減少がみられる. Bar = 100 μ m. A,Bとも抗 L3/T4 抗体を用いた免疫染色 (SAB法).

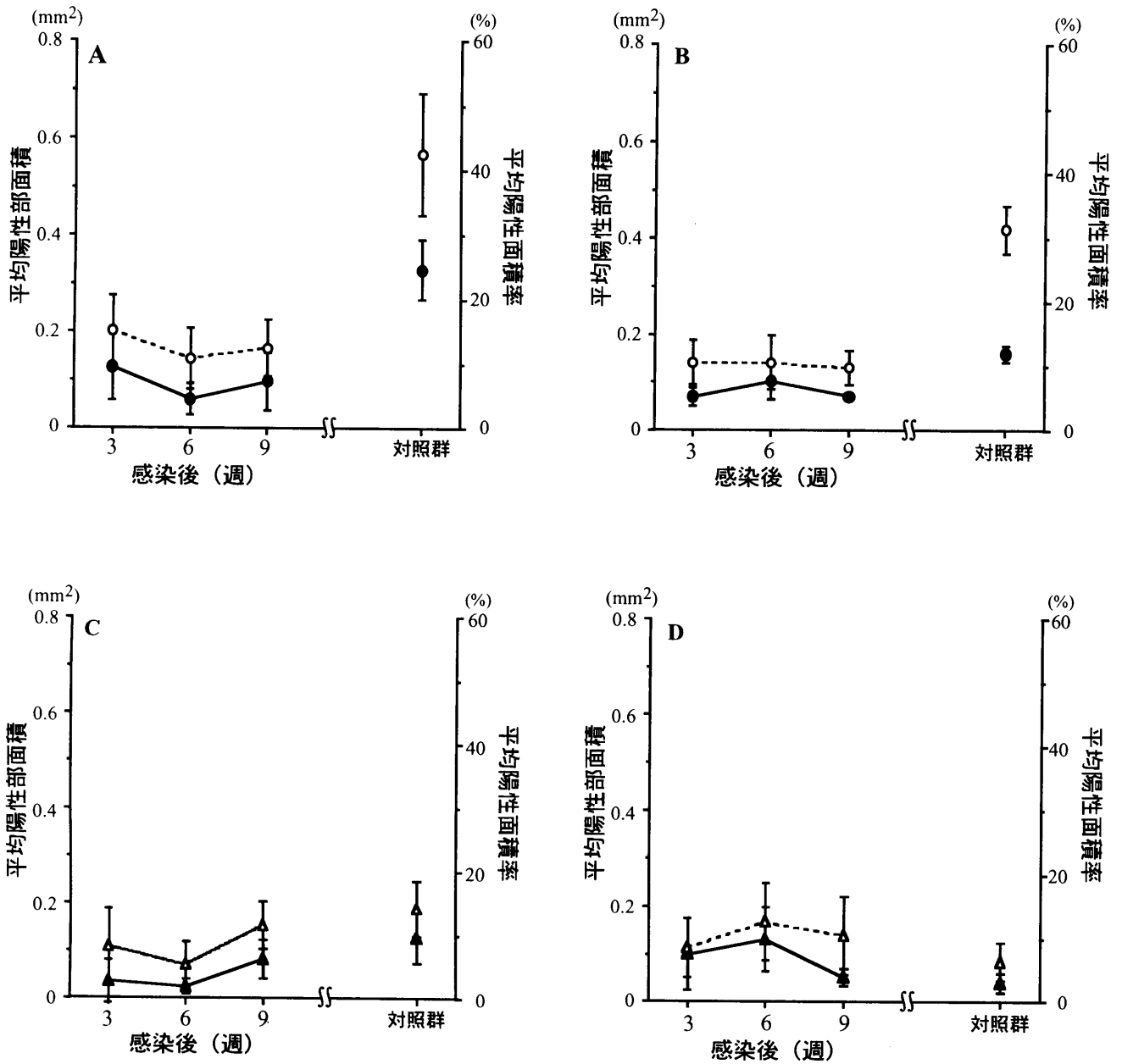


Fig. 21. ヨーネ菌接種後3週, 6週および9週におけるBALB/c (●および○) とC3H/HeJ (▲および△) マウスの白脾髄および赤脾髄におけるCD8⁺Tリンパ球の平均陽性部面積 (—) と平均陽性部面積率 (---) の推移.
 A: BALB/cマウスの白脾髄における平均面積および平均面積率.
 B: BALB/cマウスの赤脾髄における平均面積および平均面積率.
 C: C3H/HeJマウスの白脾髄における平均面積および平均面積率.
 D: C3H/HeJマウスの赤脾髄における平均面積および平均面積率.

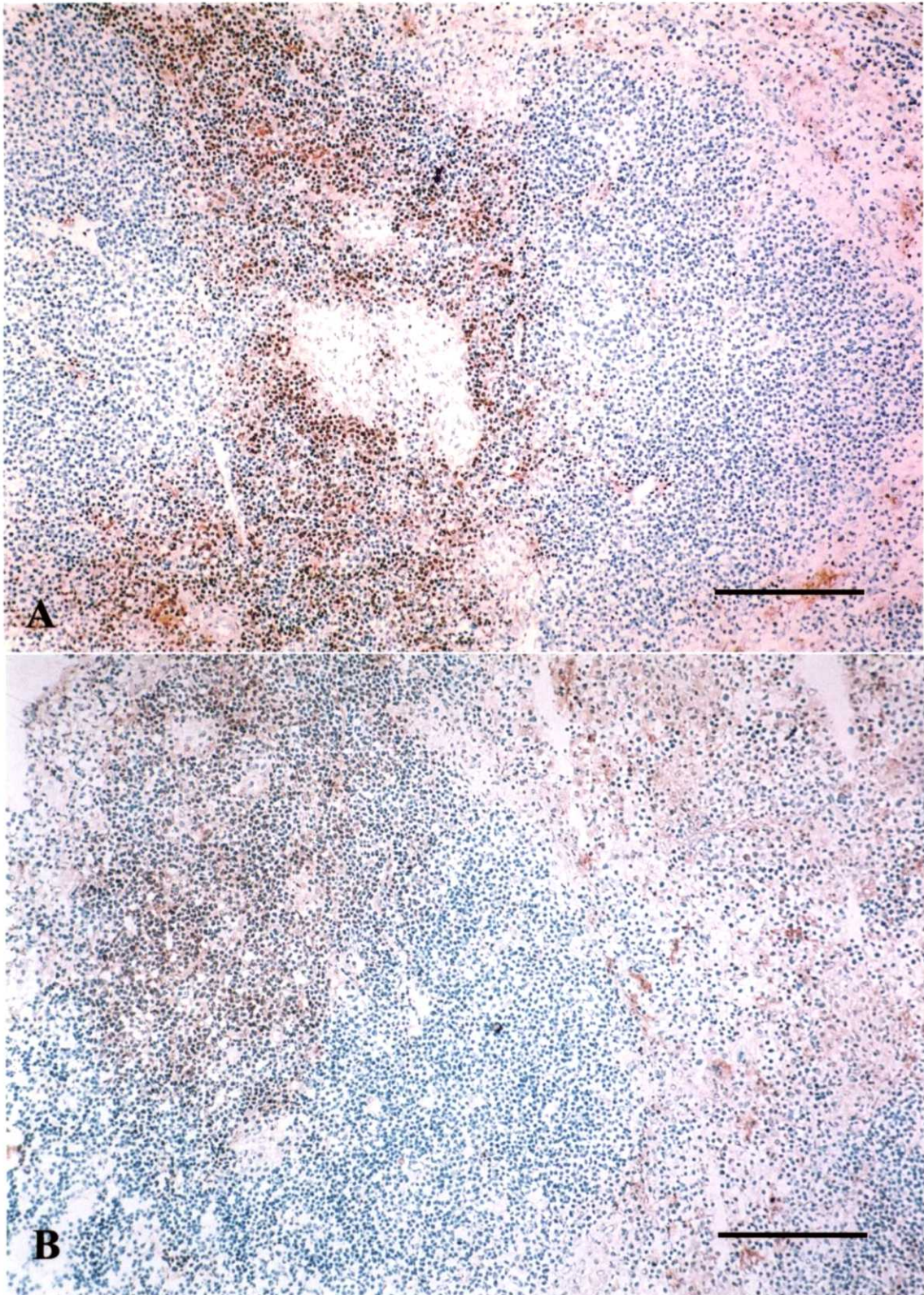


Fig. 22. 感染群 BALB/c マウスの脾臓における $CD8^+$ T リンパ球の分布と動態. A: ヨーネ菌接種後 3 週では, 白脾髄辺縁帯に形成された肉芽腫近辺に陽性細胞を認めた. Bar = 100 μ m. B: 菌接種後 9 週では, 白脾髄の萎縮と肉芽腫の拡大とともに陽性細胞の減少がみられる. Bar = 100 μ m. A,B とも抗 Lyt2 抗体を用いた免疫染色 (SAB 法).

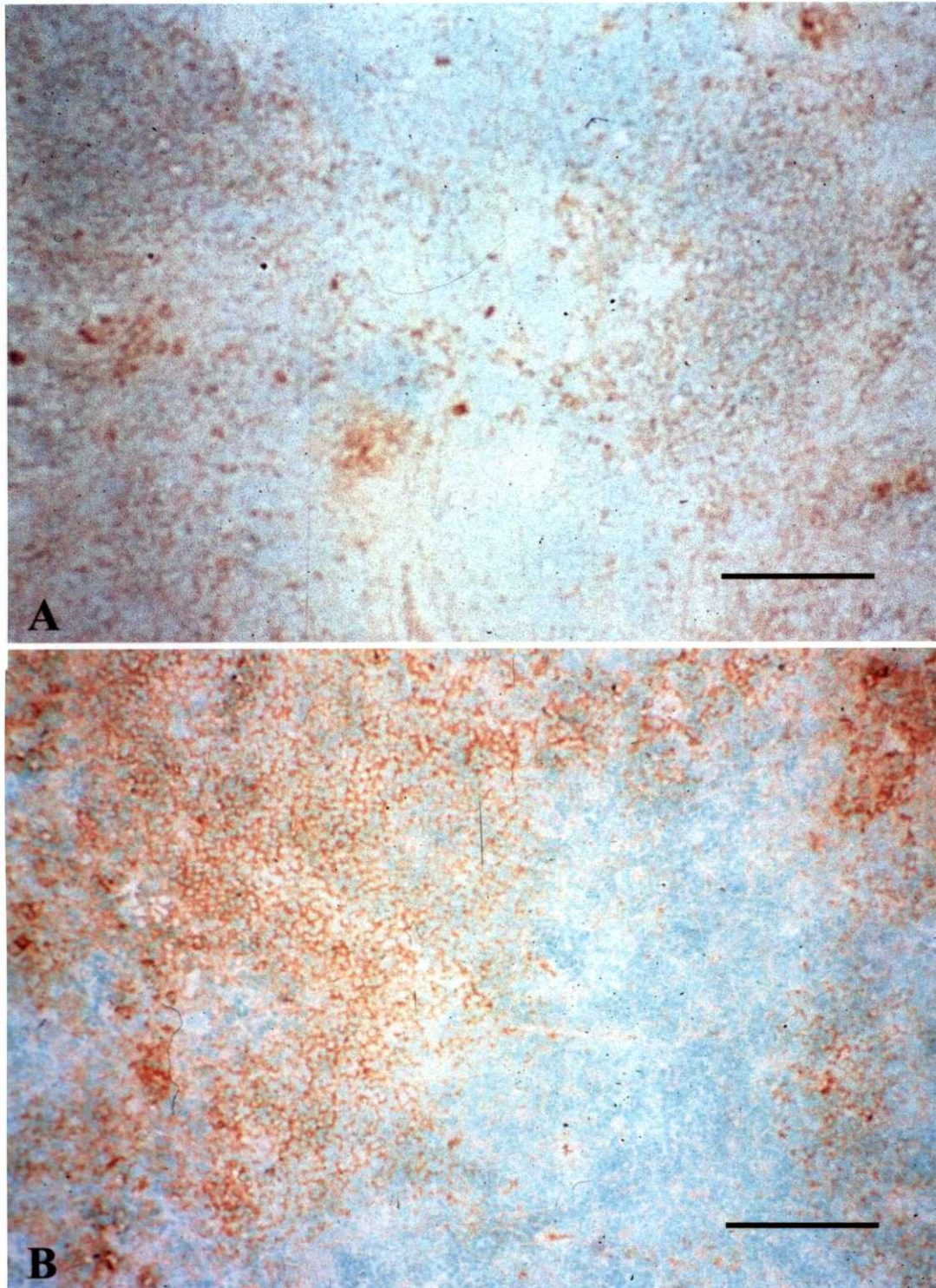


Fig. 23. ヨーネ菌接種後9週における感染群マウスの脾臓におけるBリンパ球の分布と動態. A: BALB/cマウスでは,肉芽腫形成とリンパ濾胞の萎縮とともに陽性細胞の減少がみられる. Bar = 100 μ m. B: C3H/HeJマウスでは,リンパ濾胞と赤脾髄に多数の陽性細胞が認められる. Bar = 100 μ m. A,Bとも抗IgM抗体を用いた免疫染色(SAB法).

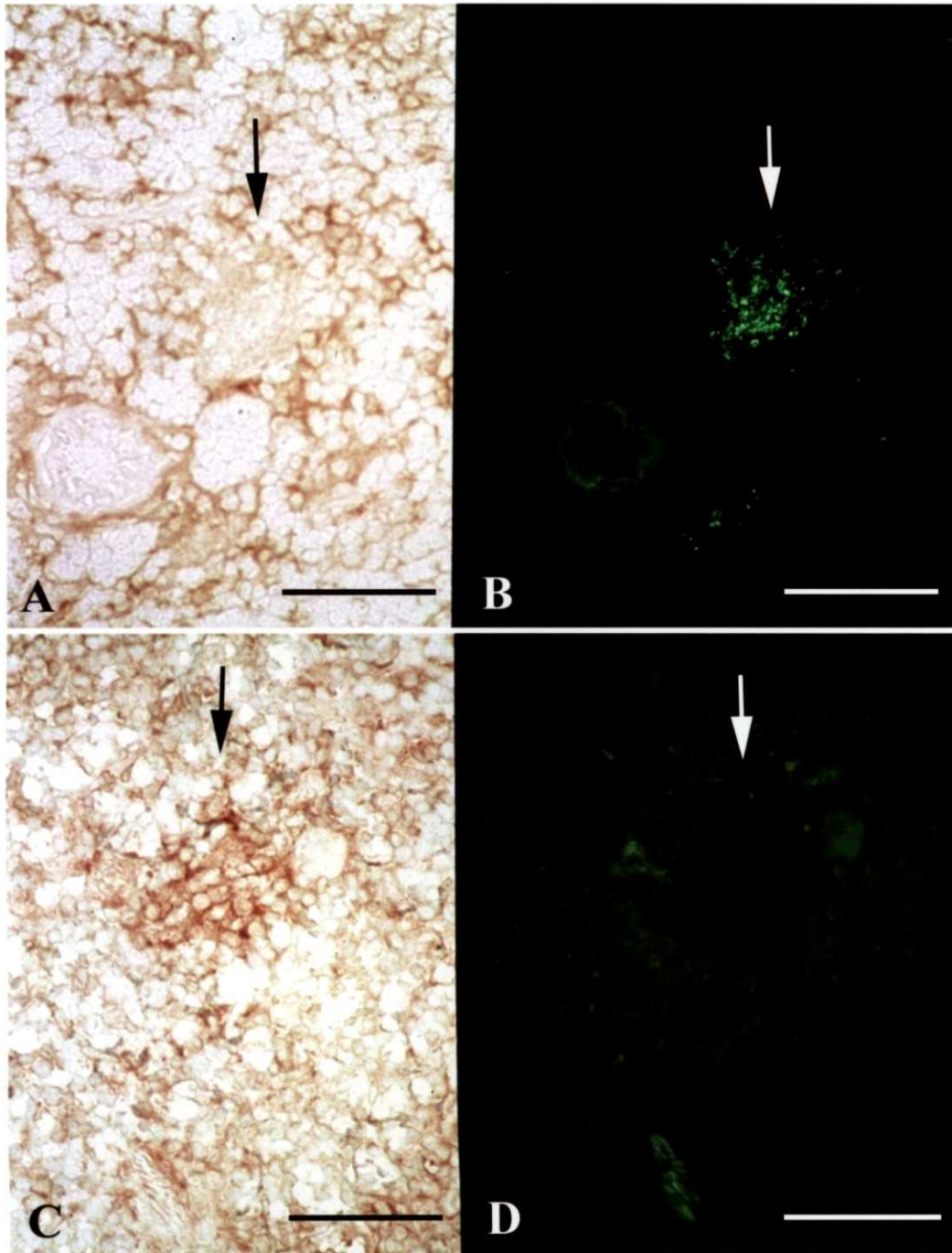


Fig. 24. ヨーネ菌接種後9週における感染群マウスの脾臓に形成された肉芽腫におけるMHC class II (I-A抗原)発現と菌増殖. A: 微弱なI-A抗原発現を示すBALB/cマウスの肉芽腫結節(矢印). 免疫染色(SAB法). Bar = 50 μ m. B: 同結節(矢印)内に検出される多数の菌. 抗酸菌染色(オーラミン法). Bar = 50 μ m. C: 強いI-A抗原発現がみられるC3H/HeJマウスの肉芽腫結節(矢印). 免疫染色(SAB法). Bar = 50 μ m. D: 同結節(矢印)内に菌は検出されない. 抗酸菌染色(オーラミン法). Bar = 50 μ m.

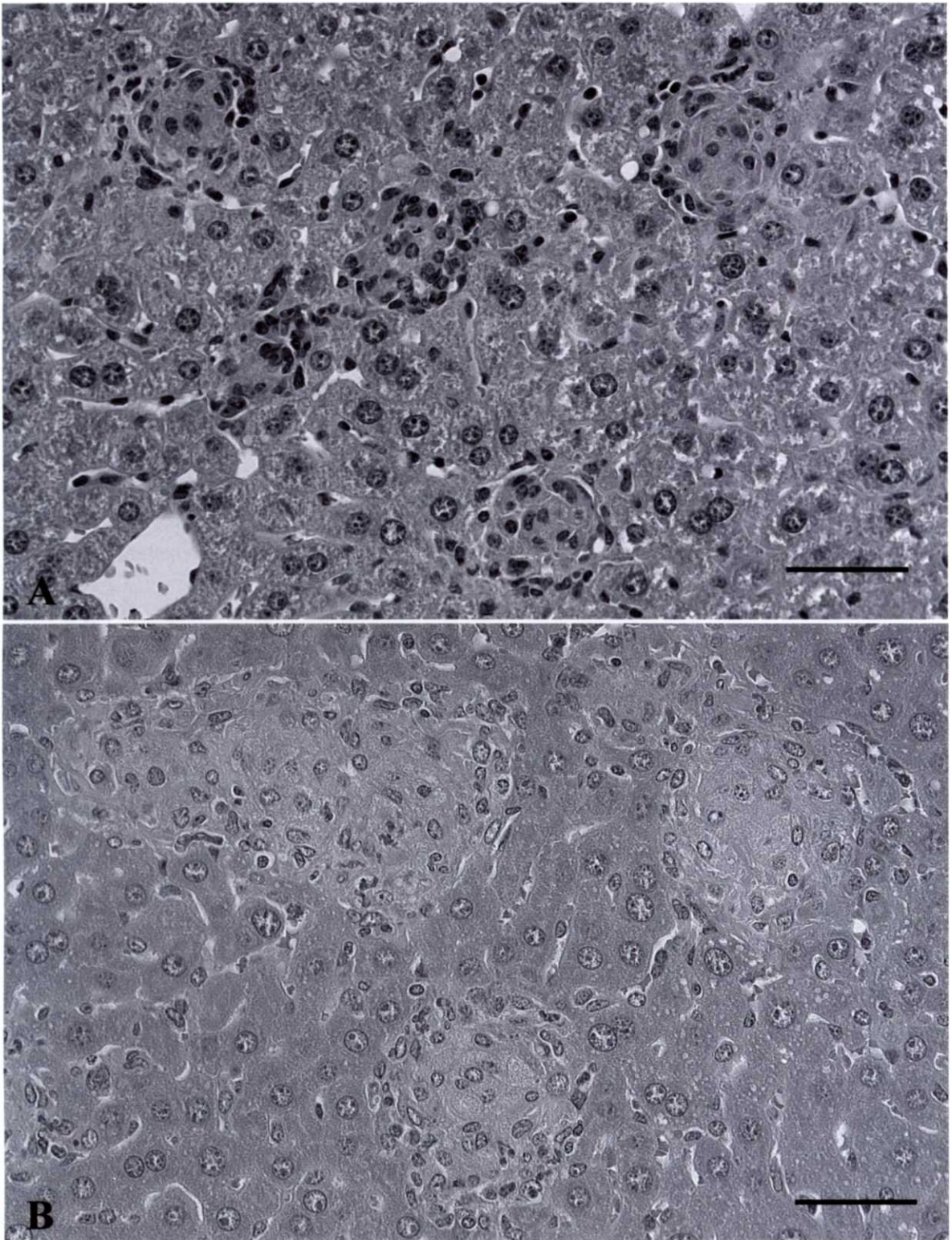


Fig. 25. ヨーネ菌多量接種群野生型 BALB/c マウスの肝臓における肉芽腫形成. A: 菌接種後 6 週肉芽腫結節は、主に類上皮細胞で構成され、周囲に多数のリンパ球浸潤を伴っている. HE 染色. Bar = 50 μ m. B: 菌接種後 18 週にみられた炎症細胞の浸潤を伴わない類上皮細胞肉芽腫. HE 染色. Bar = 50 μ m.

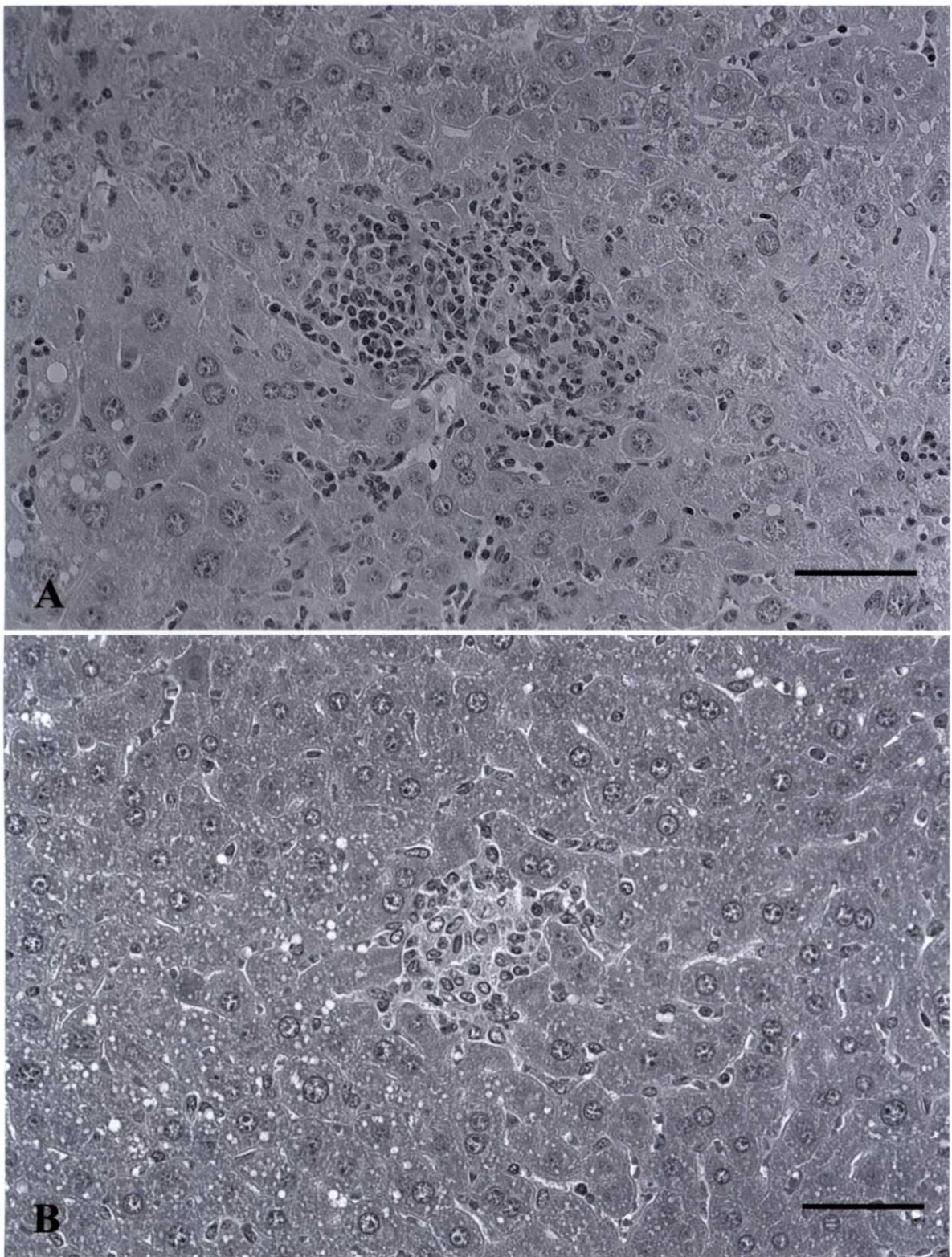


Fig. 26. ヨーネ菌多量接種群ミュータント BALB/c マウスの肝臓における肉芽腫形成. A: 菌接種後 6 週肉芽腫結節は、主にリンパ球とマクロファージで構成され、類上皮細胞は比較的少ない. HE 染色. Bar = 50 μ m. B: 菌接種後 18 週にみられた肉芽腫は、菌接種後 6 週に比べて小型で少数である. HE 染色. Bar = 50 μ m.

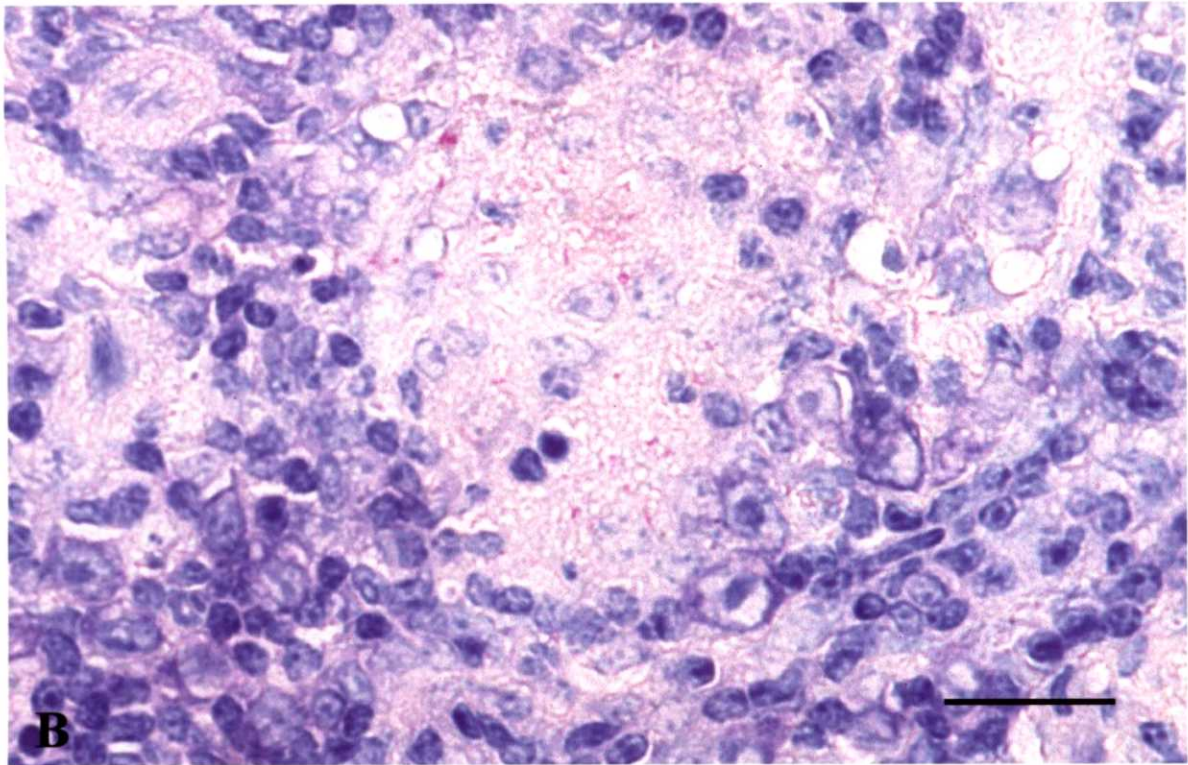
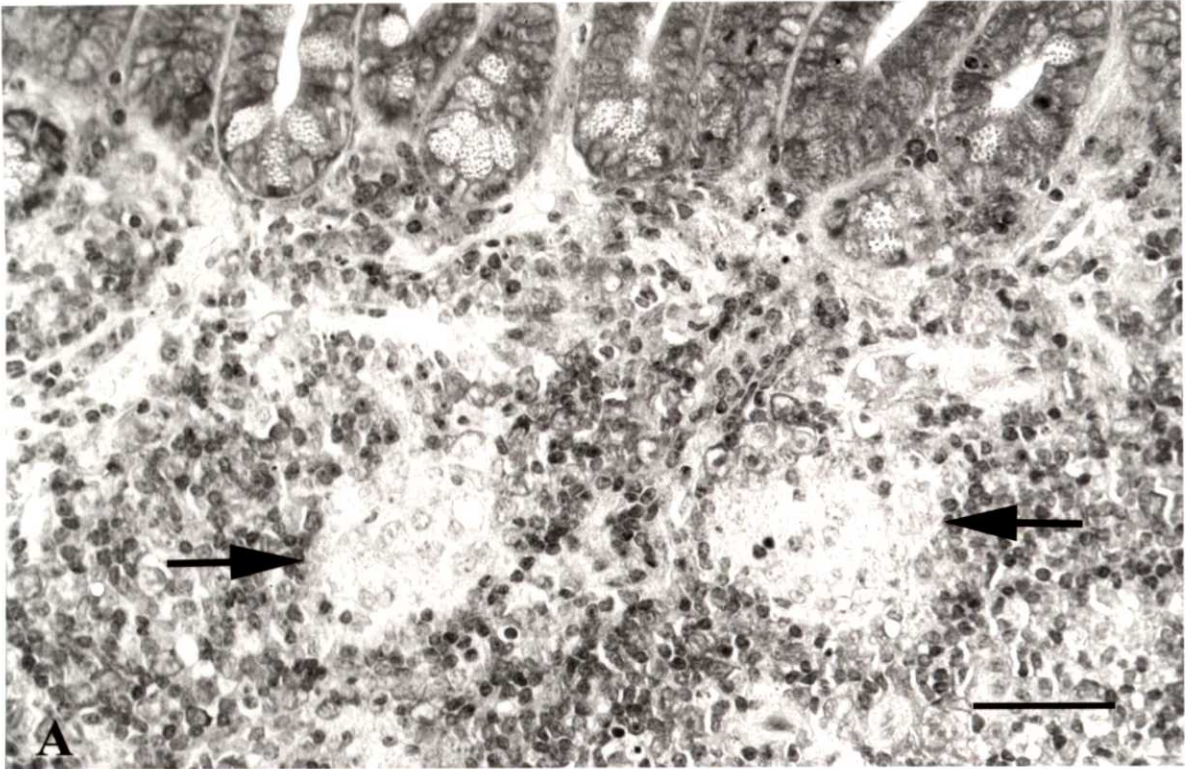


Fig. 27. ヨーネ菌多量接種群野生型 BALB/c マウスの小腸における肉芽腫形成. A: 菌接種後 18 週の小腸パイエル板のリンパ濾胞内に形成された類上皮細胞肉芽腫 (矢印). HE 染色. Bar = 40 μ m. B: 同部肉芽腫結節内にヨーネ菌 (赤色) がみられる. 抗酸菌染色 (Ziehl-Neelsen 法). Bar = 20 μ m.