

原 著

実験的非定型抗酸菌症に関する研究

8. マウスを対象とした *Mycobacterium intracellulare*
吸入感染の試み (続報)

久世文幸・桜井信男

京都大学結核胸部疾患研究所内科1

受付 昭和58年8月3日

A STUDY ON EXPERIMENTAL MYCOBACTERIOSES
PROVOKED BY ATYPICAL MYCOBACTERIA8. Trials of Airborne Infection of Mice with *Mycobacterium intracellulare* (The second report)

Fumiyuki KUZE* and Nobuo SAKURAI

(Received for publication August 3, 1983)

The ddY conventional mice were infected aerogenically with a mouse virulent strain 31F093T of *M. avium-intracellulare* (*M. intracellulare*), using TRI-R Airborn Infection Apparatus Model A42. The strain produced a 1,000-fold increase in the number of viable mycobacteria recovered from lung, and a two-fold increase of lung weight after fifteen weeks of infection. The number of the viable bacilli was retained thereafter essentially on the same level with an ever increasing lung weight, which reached a 3-fold value at 28 weeks of infection. No deaths due to the infection ensued during the period of observation.

Macroscopic lung lesions consisted of densely scattered small nodular lesions combined with dispersed grossly big nodules, which became visible at six weeks of infection. These lesions demonstrated histopathologically multiple granuloma formation at six weeks of infection, and diffuse proliferative changes thereafter.

The aerogenical pretreatment with an amorphous silica (Aerosil, Degussa, Frankfurt a.M. (FRG)) accelerated the disease, which was demonstrated macroscopically as well as microscopically beyond nine weeks of infection. The pretreatment, however, could not change the disease process to an acute form.

These chronic persistent lung infections in mice, which were aerogenically provoked by *M. intracellulare* 31F093T, have a few advantages as the models for experimental chemotherapy besides its being akin to the human infection in view of the route of infection. First, the infection procedure is much easier than intravenous and intraperitoneal infections in a large scale of experiment; second, a larger number of mice can be dealt with due to easier observations aimed only at the lung disease; third, various aerogenical pretreatments can be

* From the First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

evaluated.

Keywords: Airborne infection, Experimental infection. in mice, *Mycobacterium avium-intracellulare*

キーワード: 吸入感染, マウス実験的感染症, *Mycobacterium avium-intracellulare*

序 論

Mycobacterium avium-intracellulare (以下 *M. intracellulare*) 症の治療術式の検討, あるいはその発症機転の解明のためには適切な動物実験システムの確立がぜひとも必要である。著者らは数年来, まず *in vivo* における諸種治療術式の比較検討に耐えうる実験的感染症の作成に主眼を置き, マウスを対象として継続検討し, その成績^{1)~5)} を本誌に報告した。この中には米国分離株 TMC1469株を用いた経尾静脈感染²⁾, 吸入感染³⁾, 経気管感染⁴⁾の成績が含まれているが, いずれの感染経路を用いても明らかな進行性病変を起こしえたとはいえず結論できなかった。しかし, 最近に至り, より毒力の強い菌株検索⁵⁾ の過程で, 本部分離 31F093T 株が静脈感染ならびに腹腔内感染で, 著者らの所期の目的を一応満足させる慢性進行性病変をマウスに惹起することを見出だした。本菌株の実験的治療法を目的とした有用性については, 静脈感染系を用いた治療実験の概略を報告⁶⁾ し, 今後本菌株を諸種治療術式の比較検討に使用する予定であるが, 今回は肺非定型抗酸菌症の実験モデルとしては, その感染経路から考えて静脈感染系に比し, より人体感染症に近いと思われる吸入感染系の有用性について検討した。

1. 実験材料ならびに方法

1) 実験動物

ddY 雄普通マウス (静岡実験動物より購入) を使用した。3 週齢で実験を開始し, 飼料は市販の固形飼料 (船橋農場) を用いた。

2) 使用菌株

M. intracellulare 31F093T 株⁵⁾ を使用した。前回報告した実験 I⁵⁾ における第 3 回尾静脈感染後 7 週の肺還元菌を用い, 1% 小川培地に発育した本菌の極微量を白金線を用いることにより, 50ml の modified Dubos Tween albumin 液体培地 (0.05% Tween 80 含有) に接種し, 3 週間培養した菌液 (1.00×10^9 v.u./ml) を冷蔵庫 (4°C) で約 1 ヶ月保存したものを使用した。

3) 吸入操作

吸入装置として TRI-R Airborne Infection Apparatus Model A42 (TRI-R Instruments, Inc., N.Y.11570 U.S.A.) を使用した。Middlebrook⁷⁾ の考案した装置の改良型で約 100 匹のマウスに対して同時吸入操作が可能である。本実験では silica 吸入と 31F093T 株吸入感染の両操作に本装置を使用した。

silica 吸入には nebulizing time 30 分, cloud decay time 30 分, decontamination time 15 分で, また吸入感染では preheat period 15 分, nebulizing time 60 分, cloud decay time 30 分, decontamination time 20 分で操作した。両者とも main air flow 28L/min, compressor air flow 4L/min の条件である。silica 吸入前処置は連日 10 回行ない, 前処置終了後直ちに感染を実施したが, 感染操作は 1 回に止めた。

4) 実験群の編成とその後の観察

計 103 匹のマウスで 5 実験群を作成し, 前処置としての silica 吸入, ならびに 31F093T 株吸入感染を下記の要領で実施した。

第 1 群 吸入感染のみ (43 匹)

第 2 群 silica A10 回吸入後吸入感染 (20 匹)

第 3 群 silica B10 回吸入後吸入感染 (20 匹)

第 4 群 silica A10 回吸入のみ (10 匹)

第 5 群 silica B10 回吸入のみ (10 匹)

silica は無水ケイ酸 (半井化学, 径 70~100 μ m) (以下 silica A) と amorphous silica (Aerosil) (Degussa, Frankfurt a.M. (FRG), 径 25~50nm) (以下 silica B) の 2 種類を使用し, それぞれ 5mg/ml, 4mg/ml の滅菌蒸留水懸濁液を吸入液として使用した。

なお, 31F093T 株吸入感染には上記菌液 (1.0×10^9 v.u./ml) を直接吸入用を使用した。

感染後 3 日目に第 1 群のマウス 3 匹を剖検, 臓器重量を観察の上, 肺, 脾, 腎を定量培養し, 各臓器 (per organ) の生菌数を求め, 次いで感染後 3 週, 6 週, 9 週, 15 週に第 1, 2, 3 群の各 5 匹のマウスを剖検, 臓器重量, 臓器肉眼病変を観察し, 内 3 匹で臓器内生菌数の測定を実施した。更に, 残りの 2 匹は病理組織学的検索に供した。第 4, 5 群については感染後 3 週, 6 週, 9 週, 15 週の時点で同様に病理組織学的検索に供

した。第1, 4, 5群の残余のマウスはより長期間の観察に使用した。なお、実験群に含まれるマウス以外に5匹の同一齢の正常マウスを比較観察に使用している。

臓器定量培養では、3匹のマウスの肺、脾、腎をそれぞれ一括し、2% NaOHで10倍の磨碎懸濁液(日本精器ユニバーサルホモゲナイザーを使用)を作成の上、更に2% NaOHを用いた10倍希釈系列を0.1mlずつ1%小川培地に接種、6週間培養し発育した集落数から臓器内平均生菌数を算定した。

臓器の病理組織学的検索には、10%ホルマリンで固定後、Hematoxylin-Eosin染色を実施した。

II. 実験成績

図1, 2, 3に体重および肺、脾重量の推移を示した。正常マウスと比較し、感染群すべてについて感染後9週以後体重増加の抑制が認められた。3感染群の中ではsilica B (amorphous silica) 前処置群(第3群)が15週の観察で体重の減少傾向が示唆された。肺重量の推移をみると、silica 前処置群(第2, 3群)では両者ともに15週まで顕著な増加が続いているが、前処置なしの感染群(第1群)では6週以後肺重量の増加が15週までみられない。脾重量はsilica B前処置群(第3群)のみに15週でかなりの増加がみられた。silica 吸入のみを実施した2群の体重ならびに臓器重量の変

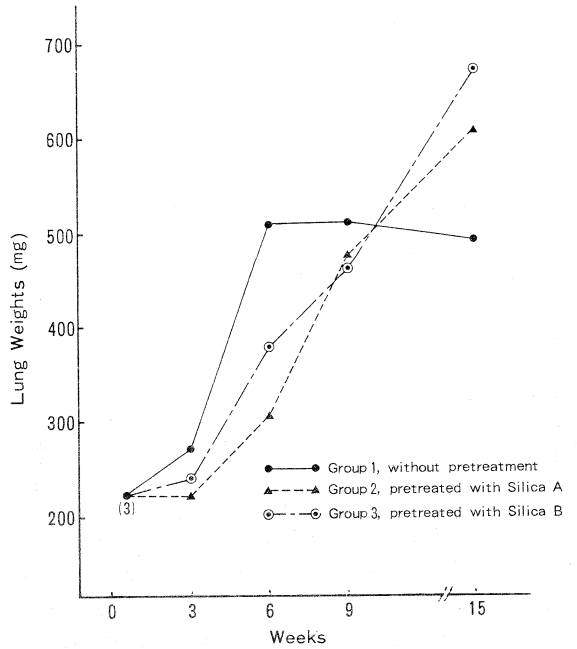


Fig. 2. Average lung weights of mice. Each point represents the average value of 5 mice except where indicated by a number in parenthesis.

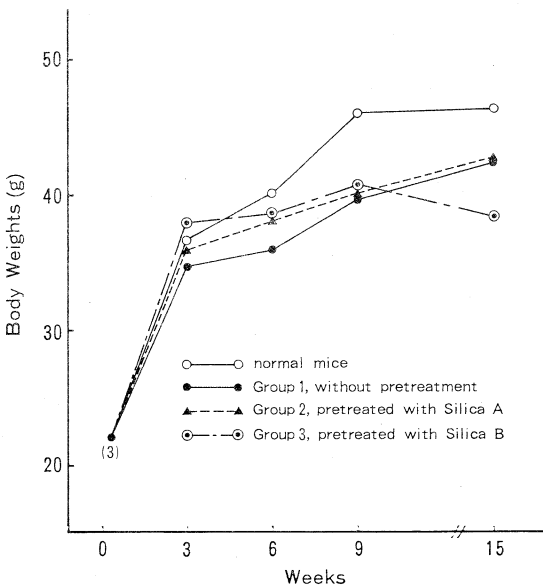


Fig. 1. Average body weight of mice. Each point represents, the average value of 5 mice except where indicated by a number in parenthesis.

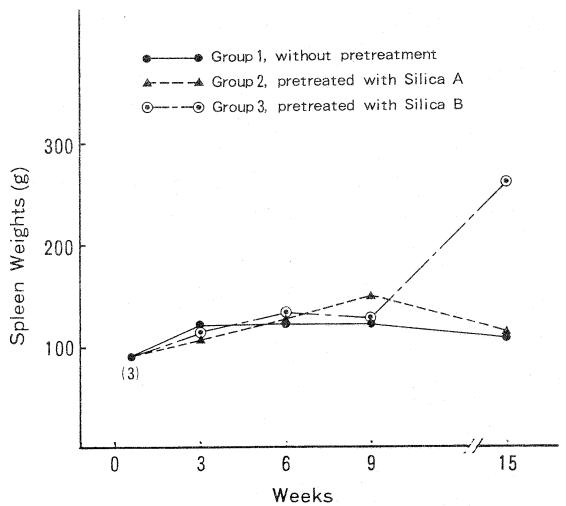


Fig. 3. Average spleen weights of mice. Each point represents the average value of 5 mice except where indicated by a number in parenthesis.

化には特記すべきものはなかった。

感染後15週以降の観察は吸入感染のみを実施した第1群のマウスで継続中であるが(図1, 2, 3には示して

いない), 現在までの最終観察時(感染後28週)には平均体重 42.9g, 平均肺, 脾重量はそれぞれ 0.77g, 0.2gで, 一時停止しているかにみえた肺重量が再び増加傾向を示していた。なお, 長期観察用のマウスも含め, 感染後28週までに死亡したマウスはなかった。

吸入感染実験群(第1, 2, 3群)の肺, 脾, 腎の平均生菌数の推移を図4に示した。吸入感染後3日の肺には 1.69×10^4 v.u. の生菌数が還元され, 感染後15週ではそれぞれ, 3.20×10^7 v.u. (第1群), 1.58×10^7 v.u. (第2群), 1.09×10^8 v.u. (第3群)と増加がみられる。silica B 吸入群(第3群)では9週から15週にかけて他の2群より還元菌数は多く, 感染後3日の約6,400倍に達している。他の感染群でも1,000倍前後の増加がみられた。感染後3週以降では脾, 腎からも次第に生菌数の還元がみられるが, 脾に関しては, silica 前処置の2群からの還元が3週後で早く, 吸入感染のみの群(第1群)では還元が遅れる傾向があった。また, 腎からの還元は silica B 前処置群(第3群)に最も早くみられ6週後で, 次いで silica A 群の還元がみられるが, 第1群では15週ではじめて還元がみられた。第1群の長期間の観察例(図4には示していない)では28週後, 脾で 2.67×10^8 v.u., 腎では 2.34×10^4 v.u. の還元がみられており, 両臓器でも生菌数の着実な増加が示唆された。28週後肺還元菌数は 7.05×10^8 v.u. を示し, 感染後15週以

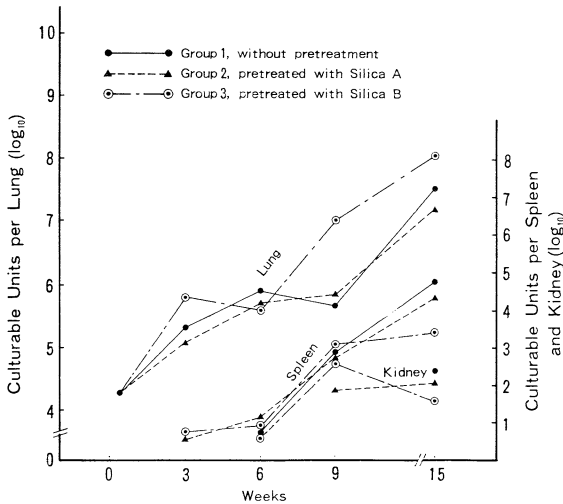


Fig. 4. Average viable counts of mycobacteria from organs of mice air-borne infected with *M. intracellulare* 31 F093 T.

Table 1. Macroscopic Pulmonary Lesions of Mice Infected Aerogenically with *M. intracellulare* (31 F093 T)

Lapse of Time after Challenge	G1. Infection alone	G2. Infection after Silica A	G3. Infection after Silica B	G4. Silica A alone	G5. Silica B alone
3 days	- - -				
3 weeks	* # - # + +	- + - + -	- # + # #	- -	- -
6 weeks	* ## # # # # #	## # # # # #	### # # # # #	- -	- -
9 weeks	# # # # # #	### # # # # #	# # # # # #	- -	- -
15 weeks	# # # # #	# # # # #	○ ## # # # # #	- -	- -

* Grades of the lesion : --=no macroscopic lesion, +=a few scattered small nodules, #=many small nodules, ##=innumerable small nodules, ###=innumerable small with big nodules
○ subcutaneous nodule in tail ◎ pudendo-gluteal abscess with ulceration

降、肺では生菌数はほぼ一定に維持されていると考えられた。

表1に肺の肉眼病変を記載した。silica 前処置のないマウスも含め、感染後6週以降、感染マウスのすべてに高度な肉眼病変が認められた。肺は経静脈感染時の所見(粟粒病変)とやや異なり、肺表面を密におおう小結節病変に加え、多数の粗大結節病変を示すものが多かった。肺肉眼病変の発現は silica B 前処置群(第3群)に僅かに早く、感染後3週でかなり高頻度に認められた。silica 前処置のみのマウス(第4、5群)には明らかな肉眼病変はなかった。また、silica B 前処置群(第3群)感染後15週の所見で、その1匹に尾部の結節、3匹に陰部から臀部にかけて潰瘍を伴う膿瘍形成が観察された。

各実験群ごとの肺組織学的所見は表2に総括した。3感染群(第1、2、3群)の肺所見に質的な差異はなく、(1)気管支周囲の単核球浸潤、(2)類上皮様細胞の出現を伴う肉芽腫性変化⁸⁾、(3)びまん性繁殖型病変⁸⁾な

どであるが、経静脈感染時の所見⁵⁾に比較すると滲出性変化の合併が多い印象をうけた。なお、壊死性の変化は認められなかった。

上記の基本病変は記載した順序で出現するようであり、感染後15週以後はびまん性繁殖型病変がリンパ球集簇巣を伴って長期間存続すると考えられた。3感染群相互間の比較では、感染後15週で silica B 前処置群(第3群)にびまん性繁殖型病変が最も高度に認められた。図5に代表的な組織所見を示した。

III. 考 案

著者らの選択した *M. intracellulare* 31F093T 株と ddY マウスを用いて、前回報告⁵⁾した静脈感染、腹腔内感染両系に加え、吸入感染系でも慢性感染モデルを作成できた。人体感染症に一步近づいたモデルといえよう。本感染モデルの利点は、(1)密閉式で biohazard を考慮した実験装置を必要とするが、感染操作が極めて

Table 2. Histopathological Findings of the Lungs of Mice Infected Aerogenically with *M. intracellulare* (31F093T)

Mode of Infection	Weeks after Infection			
	3	6	9	15
G1. Infection alone	Peri. B. Mono. infil. + * ⁽²⁾ †	Dif. Prol. Exu. ### (1), + (1) Ep. gl. ## (1), + (1) Br. pn. + (1)	Dif. Prol. Exu. + (1) Ep. gl. + (1), + (1) M φ infil. + (1)	Dif. Prol. Exu. ## (1), # (1) Ep. gl. + (2) L. agg. + (2)
G2. Infection after Silica A	n. p.	Peri. B. Mono. infil. # (1), + (1) Ep. gl. ## (1) M φ infil. + (1)	Dif. Prol. Exu. # (1) Ep. gl. + (2) M φ infil. + (1)	Dif. Prol. Exu. ## (1), + (1) Ep. gl. + (2) L. agg. + (2)
G3. Infection after Silica B	Small subpleural inflammation + (1)	Br. pn. ## (1) Ep. gl. # (1), + (1) L. agg. + (1)	Dif. Prol. Exu. + (1) Ep. gl. + (2) L. agg. ## (1), # (1)	Dif. Prol. Exu. ### (2) Ep. gl. + (1) L. agg. + (1)
G4. Silica A alone	Peri. B. L. agg. + (1) Small subpleural inflammation + (1)	L. agg. + (1)	n. p.	L. agg. + (1)
G5. Silica B alone	Peri. B. Mono. infil. + (2)	n. p.	n. p.	n. p.

*: +, #, ##, ###: grades of pathological findings. †: The numbers of mice which showed the respective pathology.
Abbreviations: Peri. B. Mono. infil. = peribronchial mononuclear cell infiltration, Peri. B. L. agg = Peribronchial lymphocyte aggregate, Dif. Prol. Exu. = Diffuse Proliferative change with exudation, Ep. gl. = Epithelioid cell granuloma, L. agg. = Lymphocyte aggregate, M φ infil. = Macrophage infiltration, Br. pn. = Bronchopneumonia

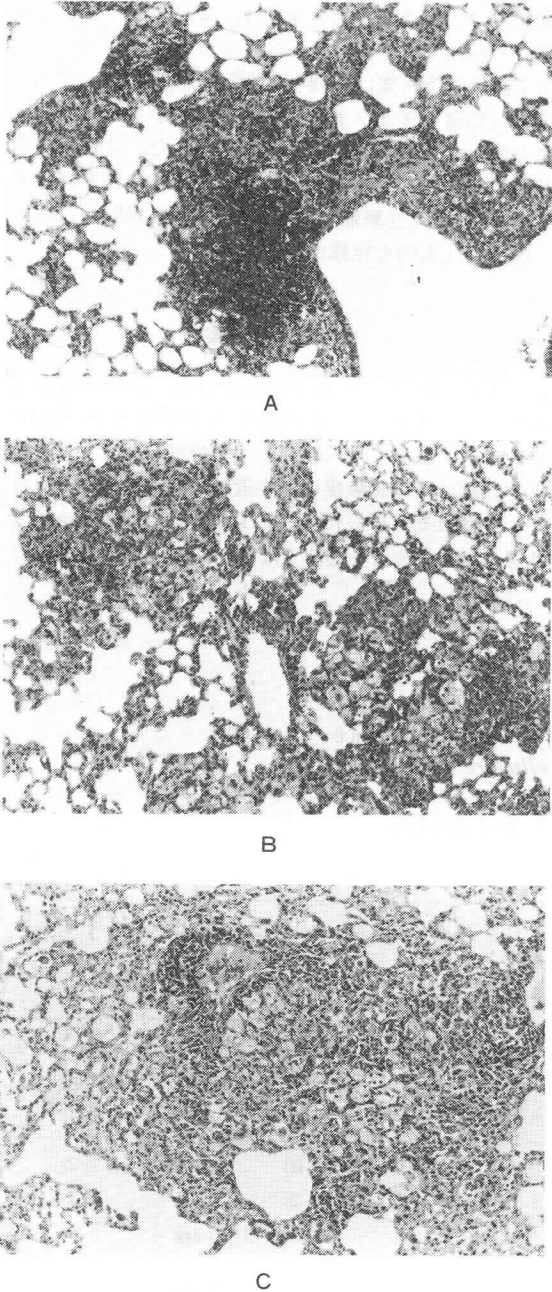


Fig.5. Histopathologic findings of the lungs of mice infected aerogenically with *M. intracellulare* 31 F 093 T.

- A. Peribronchial mononuclear cell infiltration at 6 weeks (without pretreatment).
- B. Granuloma formation at 9 weeks (without pretreatment).
- C. Diffuse proliferative lesions with foamy cells at 15 weeks (pretreatment with amorphous silica).

容易なこと、(2)實際上肺に選択的に進行性病変を惹起できることで肺病変のみを指標とした化学療法術式の評価を可能とし、より多数匹のマウスの同時処理ができること、(3)本実験でも試みた気道系を介する前処置が可能であること、などであろう。

結核菌を用いた吸入感染に関して、本邦では下出・豊原⁹⁾¹⁰⁾のモルモットを用いた検討がある。彼らはINH高度耐性カタラーゼ陰性人型結核菌と同株INH感受性菌との毒力の比較で、静脈内感染ではINH耐性菌はINH感受性菌に比し、著明な毒力の低下がみられたが、吸入感染ではINH耐性菌の毒力は静脈内感染による場合のごとき著明な低下はみられなかったと報告している。結核菌より毒力が弱いとされる *M. intracellulare* の感染経路としては吸入感染の有利さを推測させる成績であるが、既に報告³⁾した *M. intracellulare* 米国株 TMC 1469 株を用いた吸入感染の試みでは、肺内生菌数は経時的増加がみられず、肺病理所見も乏しく、今回報告した 31F093T 株での所見と格段の差があり、菌株選択の必要性を今さらながら痛感した次第である。

M. intracellulare mouse virulent strain D673 を用いた感染実験の成績は Collins ら¹¹⁾¹²⁾ が、同様な毒力を持つとされる 8330, 571-8 株での成績は Gangadharam ら¹³⁾ が記載している。Collins ら¹²⁾ の D673 株を用いた成績では吸入感染後 6 ヶ月で肺内生菌数は約 100 倍の増加を示している。著者らのマウス毒力株 31F093T 株では感染後 15 週で既に 1,000 倍前後の増加がみられ、実験的化学療法のためのモデルとしてはより有利であるといえよう。著者らの今回試みた前処置としての silica 吸入は *M. intracellulare* とマウスの組み合わせでは新しい検討の 1 つと考えるが、実験動物感染モデルに気道を介して silica 前処置を実施した報告¹⁴⁾¹⁵⁾ は既にあり、Tacquet ら¹⁴⁾ はマウスまたはモルモットを *M. kansasii* の感染前に炭粉、石英粉塵などに暴露すると病変の悪化が認められたとしており、下出ら¹⁵⁾ もモルモット肺内に silica を *M. kansasii* 感染前に注入することにより、比較的長期間の菌数保持が観察されたと報告している。今回の著者らの silica 前処置の方法は、これらの報告とは異なると考えられるが、amorphous silica で前処置した感染群 (第 3 群) で感染後 9 週以降肺内生菌数が他の感染群より多かったこと、また、同実験群で感染後 15 週の肺病理所見が顕著であったことより、*M. intracellulare* 感染に対し、amorphous silica の前吸入がなんらかの影響を与えたことが示唆される。また、感染初期の肺内生菌数は amorphous silica 前処置の有無によって著明な差が認められず、むしろ感染後かなり日時が経過してから差が認められたことは、観察期間の長短はあるが下出ら¹⁵⁾ の *M. kansasii* を用いたモルモットの成績と類似した点であり、興味深い。また、silica 前処置群の肺重量の増加も、感染後比較的後

期に顕著であった。本実験で使用した2種類のsilicaのうち、無水ケイ酸(半井化学)の影響は明らかでなかったが、おそらく両silicaの粒子径の差それ自体の要因と、粒子径の差が吸入の際の末梢部位への定着に差を生じさせたという2つが重なった結果であろう。

肺に高度な病変が認められたにもかかわらず、長期観察中の第1群の残り10匹のマウスは感染後28週に至る現在まで死亡していない。マウス実験的 *M. intracellulare* 症の persistency は極めて顕著な特徴と考えられ、今後慢性感染モデルの1典型として多くの研究課題に素材を提供しようと考えられる。

amorphous silica の吸入前処置により、感染初期に病変を増悪させ、*M. intracellulare* 感染を急性化することはできなかったが、比較的感染後期に病変を修飾することは可能であると思われた。最近、Gangadharamら¹⁶⁾は、beige マウスを用いて *M. intracellulare* の急性感染モデルを作成したと報告したが、compromised host を用いた感染モデルとして注目すべきものである。しかし、人体感染症の多くでみられる経過により類似したモデルは、著者らの作成したとき慢性感染モデルであると考えられ、緊急の課題はこのモデルを用いた治療術式の解明であろう。

IV. 結 論

TRI-R Airborne Infection Apparatus Model A42 を用い、ddY 雄普通マウスにマウス毒力株31F093T 株を吸入感染させ、慢性進行性の実験的肺 *M. intracellulare* 症を作成することができた。

感染後15週で肺内生菌数は約1,000倍になり、肺重量は2.2倍に増加した。一部のマウスで長期観察を続けているが、感染後28週に至っても肺内生菌数は15週時と同程度維持された。肺重量は更に増加し、約4倍に達した。この間マウスの死亡は認められなかった。

前処置として amorphous silica を10回吸入させることにより、感染後9週以後の肺内生菌数、肺重量は更に増加傾向を増し、感染後15週ではそれぞれ約6,400倍、約3倍に達した。

肺肉眼病変としては、密な小結節病変に多数の粗大結節病変の加わった所見を呈し、感染後6週で全マウスに明らかになるが、amorphous silica 吸入前処置群では感染後3週で既に多くのマウスで識別可能であった。

肺病理組織学的検討では、感染後6週の肉芽腫性変化と同15週のびまん性繁殖型病変が主体をなし、amorphous silica 前処置マウスでは感染後15週でより高度の病変が認められた。

今回著者らの作成した吸入感染モデルは感染経路として、より人体肺感染症に近い利点の他、(1)感染操作の容易さ、(2)肺所見のみを指標にしうることにより、よ

り多数匹のマウスの同時処理が可能であること、(3)気道系を介する前処置が可能であるなどの点で実験的化学療法に有用性を発揮すると考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、病理組織の判定について御協力いただいた本研究所病理学部門鈴木康弘助教授、amorphous silica (Aerosil) を提供された本研究所内科学第2部門木野稔也講師、ならびに病理組織切片作成に御協力いただいた松下隆寿氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 久世文幸 他：実験的非定型抗酸菌症に関する研究
1. 非定型抗酸菌のマウスに対する病原性について (i)一経尾静脈感染の成績一、結核、53:39, 1978.
- 2) 久世文幸 他：実験的非定型抗酸菌症に関する研究
2. *Mycobacterium intracellulare* (米国株) 感染マウスに対する抗結核薬の併用効果一経尾静脈感染の成績一、結核、54:453, 1979.
- 3) 李 英徹 他：実験的非定型抗酸菌症に関する研究
3. マウスを対象とした *Mycobacterium intracellulare* 吸入感染の試み、結核、56:513, 1981.
- 4) 李 英徹：経気管感染による *M. intracellulare* 症実験モデル作成の試み、結核、58:279, 1983.
- 5) 久世文幸 他：実験的非定型抗酸菌症に関する研究
7. *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex のマウスに対する病原性について(ii)一mouse virulent strain の検索一、結核、59:13, 1984.
- 6) 久世文幸：実験的非定型抗酸菌症 (第58回日本結核病学会総会特別講演)、結核、58:469, 1983.
- 7) Middlebrook, G.: An apparatus for airborne infection of mice, Soc Exp Biol Med, 80:105, 1952.
- 8) 上田雄幹：抗酸菌の細胞内寄生性と組織反応の型一マウスの実験結核を中心として、結核、51:491, 1976.
- 9) 下出久雄・豊原希一：結核菌の吸入感染による実験的研究、とくにINH耐性菌による感染とBCG免疫との関係、結核、36:728, 1961.
- 10) 下出久雄・豊原希一：INH高度耐性結核菌の毒力に関する研究、吸入感染による場合と静脈内感染による場合の毒力の差について、結核、36:776, 1961.
- 11) Collins, F. M. et al.: Immune response to persistent mycobacterial infection, Infection and Immunity, 20:430, 1978.
- 12) Collins, F.M. and Watson, S.R.: Immune responses to atypical mycobacterial lung infections, Reviews of Infectious Diseases, 3:981, 1981.

- 13) Gangadharam, P.R. et al. : Experimental infections with *Mycobacterium intracellulare*, Reviews of Infectious Diseases, 3 : 973, 1981.
- 14) Tacquet, A. and Tison, A. : *In vitro* and *in vivo* activity of dextro-2,2' (ethylenediamino) di-1-butanol (Ethambutol) used alone or in combination against atypical mycobacteria, Am Rev Resp Dis, 90 : 339, 1964. (Abstract of Rev Tuberc (Paris) , 27 : 431-443, 1963.)
- 15) 下出久雄・豊原希一：非定型抗酸菌の実験的研究 1. *M. kansasii* のモルモットにおける吸入感染初期像, および珪酸注入, BCG 接種の影響, 結核, 46 : 13, 1971.
- 16) Gangadharam, P. R. et al. : An acute infection model for *Mycobacterium intracellulare* disease using beige mice : Preliminary results, Am Rev Resp Dis, 127 : 648, 1983.