

原 著

実験的非定型抗酸菌症に関する研究

(9) *Mycobacterium avium* Complex マウス感染モデルでの
感染経路による比較検討正木 俊一郎・桜井 信男
加藤 元一・久世 文幸

京都大学結核胸部疾患研究所内科1

受付 昭和62年8月18日

A STUDY ON EXPERIMENTAL MYCOBACTERIOSES PROVOKED
BY ATYPICAL MYCOBACTERIA(9) Comparisons of the Mouse Infection Models by Three Different
Routes of Challenge with *M. avium* ComplexShunichiro MASAKI *, Nobuo SAKURAI, Motokazu KATO
and Fumiyuki KUZE

(Received for publication August 18, 1987)

Relatively large viable units of mouse virulent strain 31F093T of *M. avium* complex were challenged to conventional ddY mice by intravenous, intraperitoneal and airborne routes, and the differences of the pathological findings among these three infection models were evaluated by using several indices for the period of 15 weeks.

As the indices for comparison, the weight of total bodies and organs (lung, spleen, liver and kidney), extent of gross lesions and histopathological changes were used. In addition, the consecutively recovered viable units of bacilli from the lungs, spleens, and kidneys were also enumerated.

With intravenous and intraperitoneal infections, the main histopathological findings of the organs of mice were granulomatous lesions in the early stage and diffuse proliferative changes in lungs, and mononuclear cell aggregates and multiple glanulomas in the liver and spleen in the later stage.

In the mice infected by airborne route, no significant lesions were noticed in liver, spleen and kidney except in lungs, which demonstrated essentially the same histopathological findings seen in mice with intravenous and intraperitoneal infections, during the entire experimental periods. Although histopathological findings of the lungs showed essentially the same disease processes in the three kinds of models, the disease has been confined solely to the lungs in airborne infection model. It was suggested that the compartmentalization of the disease process in the lungs and possibly in its vicinity by airborne infection might offer a valuable tool for the evaluations of an active inflammatory cell interactions in lung per se provoked by the mycobacterium.

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

Key words : Bacterial infection, *Mycobacterium avium* complex, Murine experimental infection, Intravenous infection, Intraperitoneal infection, Airborne infection, Routes of infection.

キーワード : 細菌感染, *Mycobacterium avium* complex, マウス実験感染症, 静脈内感染, 腹腔内感染, 吸入感染, 感染経路

序 論

本邦で分離される非定型抗酸菌の中で、原因菌として最も高頻度に分離される *M. avium* complex は、諸種の抗菌薬に対し感受性が低く^{1)~8)}、更に本菌が日和見感染を起こす傾向が強いことも加わり、本菌による感染症の治療には数々の困難が伴っている。

また、本症の治療には抗結核薬の多剤併用^{9)~11)}が試みられてはいるものの、いまだ十分な治療効果を得るに至っていない。従って *M. avium* complex を用いた感染モデルの作成は、本症に対する今後の有効な薬剤を検索する上でも、また現在試みられている抗結核薬の併用効果の有効性の再検討を行う上でも意義あるものと考え、私どもは、従来より ddY マウス等を用いた経尾静脈、腹腔内並びに吸入感染による *M. avium* complex 慢性感染モデルについて種々の検討を加え報告してきた^{12)~15)}が、今回、3感染経路による感染病態を同時に比較検討を行ったので報告する。

1. 実験材料並びに方法

(1) 実験動物

ddY 雄マウス(静岡実験動物より購入)を使用し、5週齢で経尾静脈、腹腔内及び吸入による3経路で感染を実施した。飼料は、市販の固形飼料(船橋農場)を用いた。

(2) 使用菌株

今回使用した *M. avium* complex 31F093T 株は、本研究所附属病院入院患者の喀痰分離株で、この菌の1.5%グリセロール加 cornmeal 寒天培地上のコロニー形態は smooth translucent で、前回報告¹⁴⁾した実験に使用した菌株と同一のものである。実験にあたっては、本菌の1%小川培地発育菌を Dubos Tween albumin 液体培地(0.05% Tween[®]含有)に接種し、2週間培養菌液を適宜濃縮し感染菌液とした。

感染菌量は、使用時に感染菌液を滅菌生理食塩水で10倍希釈系列を作成しその0.1mlずつを1%小川培地に接種し培養することにより求めた。

(3) 実験方法

マウスを次の3通りの感染経路で感染させ、4実験群を作成した。

- 1) 非感染対照群
- 2) 経尾静脈感染群
- 3) 腹腔内感染群
- 4) 吸入感染群

非感染対照群を除き、経尾静脈及び腹腔内感染群では、マウス1匹あたり感染菌液(1.0×10^9 v.u./ml)の0.2ml(生菌単位数 ca. 5.0×10^8)を、また吸入感染群では同一感染菌液を用い吸入感染装置(Airborne Infection Apparatus, Model A42, TRI-R Instruments, INC [New York, U.S.A])を使用してそれぞれ感染させた。なお、吸入感染での感染翌日の肺内定着菌数は、 1.2×10^5 v.u./匹であった。

感染群それぞれ45匹を用い感染日より、1日目、1週間目その後は2週間間隔で、15週間目まで平均体重の推移を測定するとともに、各感染群より5匹ずつ屠殺剖検し肉眼的臓器病変・臓器重量を測定し、うち3匹で肺・脾及び腎の定量培養¹⁴⁾¹⁵⁾を実施した。残り2匹は臓器を10%ホルマリン固定した後、病理組織学的検討に使用した。

2. 実験成績

(1) 体重及び臓器重量の推移

Fig. 1に、各感染経路ごとの各時期に剖検したマウス5匹の体重・脾及び肺の平均重量の経時的推移を非感染対照群の値とともに示した。体重では、非感染対照群と吸入感染群で感染中期において若干の変動が認められたものの、いずれの感染群とも増加傾向を示し顕著な変化は認められなかった。次に臓器重量では、非感染対照群で実験期間を通じ肺・脾ともに殆ど重量変化は認められなかったが、経尾静脈及び腹腔内感染群で感染1週目以降、脾重量は顕著に増加し、11~15週の感染後期で対照群の5倍以上となり、同様に肺重量も両群ともに感染後次第に増加し、感染後期では対照群の2倍となった。吸入感染群では、実験期間中脾重量は殆ど変化が認められなかったが、肺重量は感染5週目以降で対照群の2倍以上となり、この状態が実験終了日まで継続した。なお、腎重量についてはデータを示さなかったが、非感染対照群を含め、いずれの感染群においても重量変化に有意な差は認められなかった。

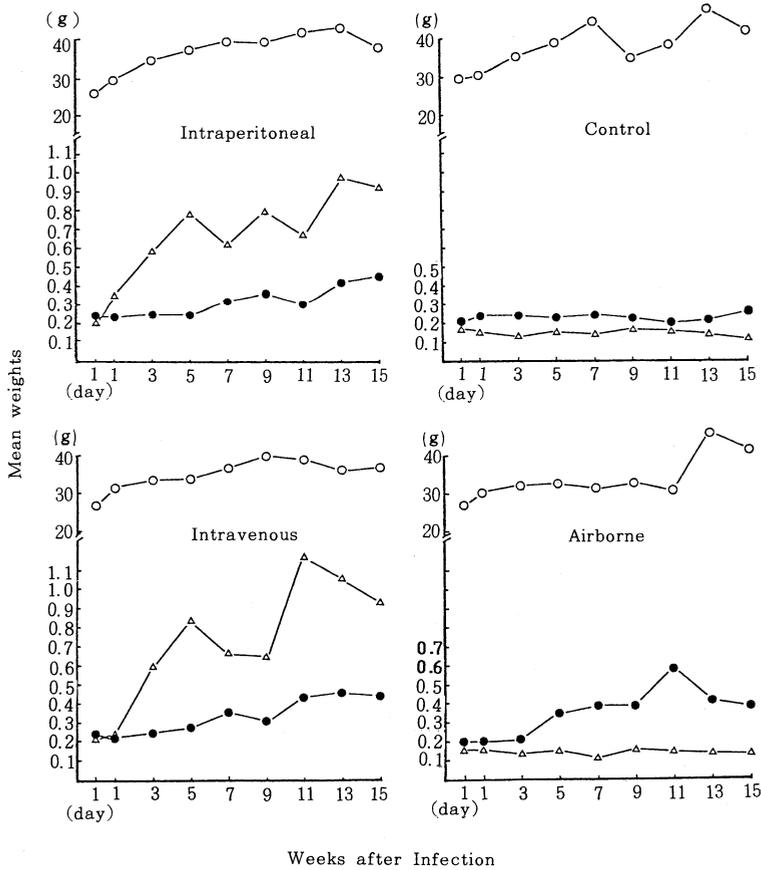


Fig. 1. Average Body, Spleen and Lung Weights of the Mice Infected with *M. avium* Complex (31F 093T).
 ○ - ○ body weight; ● - ● lung weight; △ - △ spleen weight. Each point represents the average value for 5 mice.

(2) 臓器の肉眼病変

Table に、各感染経路ごとにマウス 5 匹の肺・肝・腎・脾の肉眼病変の推移を示した。肺に注目すると、経尾静脈及び腹腔内感染群では感染 3 週日以降より、また吸入感染群では同 5 週日以降より肺に + ~ 卍 までの病変が肉眼で観察され、病変は週齢の経過とともに次第に強くなる傾向が認められたが、病変自体はいずれの感染経路とも最終観察時には、全肺に密に分布する微小結節病変とそれの融合したと考えられる中等大以上の結節病変の混在を示し、基本的には同一病変を示した。しかしながら感染経路別の肺病変の強さは、感染後 9 週までの間吸入感染群が最も強く、次いで経尾静脈・腹腔内感染群の順であった。

次に、肝・腎・脾の病変を観察したところ、経尾静脈及び腹腔内感染群では腫大、結節病変あるいは膿瘍の存在などで総合判断すると、肝・腎で 3 週日以降に、また

脾では経尾静脈感染群で既に感染後 1 日目腫大が認められ、以後病変の増悪が観察されたが、感染後 3 週以降では病変の強さは腹腔内感染群と比較し有意差があるようには思われなかった。一方、吸入感染群では僅かな例外を除いてこれらの臓器では肉眼的病変は認められなかった。

(3) 臓器内還元生菌数の推移

Fig. 2 に感染経路別の臓器内還元生菌数の推移を示した。肺ではいずれの感染経路とも 1 ~ 3 週で一時的還元生菌数の減少がみられ以後はかなり急激な増加を示したが、感染後 9 ~ 11 週でこの増加は停止した。なお経尾静脈、腹腔内感染群では、それぞれ感染 1 週目、感染 3 週目を基準とすれば、実験終了時には肺内生菌数は 1,000 倍以上に増加したが、吸入感染群では 100 倍以上 1,000 倍以下の増加にとどまった。

脾では、経尾静脈及び腹腔内感染群ともに還元菌数は

Table Macroscopic Findings of the Organs of Mice Infected with *M. avium* Complex (31F 093T)

| Lapse of time after infection (Week) | Infection route | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|-----------|-----------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|--|
| | Intravenous | | | Intraperitoneal | | | Airborne | | | |
| | Lungs | Li. | Kid. Sp. | Lungs | Li. | Kid. Sp. | Lungs | Li. | Kid. Sp. | |
| 1 day | * - - - | #0/5 | 0/5 3/5 | - - - | 0/5 0/5 0/5 | - - - | 0/5 0/5 0/5 | - - - | 0/5 0/5 0/5 | |
| 1 | - - - | 0/5 0/5 2/5 | - - - | 0/5 0/5 0/5 | - - - | 0/5 0/5 0/5 | - - - | 0/5 0/5 0/5 | | |
| 3 | - + + + + | 3/5 1/5 5/5 | + - - | 3/5 2/5 5/5 | - - - | 0/5 1/5 0/5 | - - - | 0/5 1/5 0/5 | | |
| 5 | ++ + + ++ + | 3/5 1/5 5/5 | + - + | 2/5 2/5 5/5 | +++ + + + + | 0/5 0/5 0/5 | +++ + + + + | 0/5 0/5 0/5 | | |
| 7 | ++ ++ ++ +++ ++ | 3/5 0/5 5/5 | + ++ + | 2/5 2/5 5/5 | +++ ++ ++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | +++ ++ ++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | | |
| 9 | ++ ++ +++ ++ + | 5/5 2/5 5/5 | + ++ ++ | 3/5 3/5 5/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | | |
| 11 | +++ ++ ++ +++ ++ | 4/5 3/5 5/5 | + + ++ | 2/5 0/5 4/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 1/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 1/5 | | |
| 13 | +++ +++ +++ +++ ++ | 5/5 0/5 5/5 | ++ ++ ++ | 4/5 0/5 5/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | | |
| 15 | +++ ++ ++ +++ ++ | 4/5 1/5 5/5 | +++ ++ ++ | 5/5 1/5 5/5 | +++ +++ +++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | + ++ ++ +++ ++ | 0/5 0/5 0/5 | | |

* : Symboles of gross lesions of Lungs ; - = no macroscopic lesion ; + = scattered small nodules ; ++ = many small nodules ; +++ = innumerable small nodules (miliary pattern) ; +++ = innumerable small nodules with a few big nodules

: Number of mice with macroscopic lesions
Abbreviations ; Li = Liver , Kid = Kidney , Sp = Spleen

感染後増加傾向を維持し、15週目で実験開始1日目と比較して約100倍程度の増加がみられた。なお吸入感染群でも7週目以降少数の菌の還元が認められたが、これは5週目以降の肺病巣よりの播種と考えられた。

腎では、腹腔内感染群において還元菌数が多く経尾静脈感染群を凌ぎ、吸入感染群の腎からの還元は検出限界以下にとどまった。

(4) 臓器の病理組織学的所見

感染経路別の肺・脾・肝・腎の病理組織学的所見をFig. 3~7に示した。肺については感染7週目及び15週目、その他の臓器については15週目の所見である。肺の7週目では、いずれの感染経路とも単核球の浸潤(mononuclear cell infiltration)やマクロファージの浸潤(macrophage infiltration)を主体とする肉芽腫性病変を示し、フォーミーマクロファージ(foamy macrophage)も多数認められた。更に、15週目では類上皮細胞(epithelioid cell)の出現も散見され、びまん性繁殖型の病変を呈していた。

脾・肝では、無数の小類上皮細胞性肉芽腫が経尾静脈

及び腹腔内感染群で認められたが、吸入感染群ではこれを認めなかった。腎では、経尾静脈感染群で軽度の間質性腎炎が観察されるにとどまった。

3. 考 察

有効な治療術式のいまだ確立されていない*M. avium* complex症においては、*in vivo*での治療効果の検討は前臨床試験として極めて重要な課題であるが、Burjanová¹⁶⁾らも述べているごとく従来卓越した感染モデルがなく、従って本症の病態解明を含め治療をいまだ困難なものにしている。

最近になり、*M. avium* complex症を対象とした治療術式の検討を目的として、マウスを用いた感染モデルの検討がShrontsら¹⁷⁾、李ら¹²⁾、久世^{13)~15)}ら、Gangadharamら¹⁸⁾により報告されているが、この中ではモデル作成に当たっての問題点として、菌株ごとにvirulenceが異なること、従って菌株の選択及びvirulenceを維持する方法の検討が必要であること、更に使用菌株の集落形態や発育状態の差によるvirulence

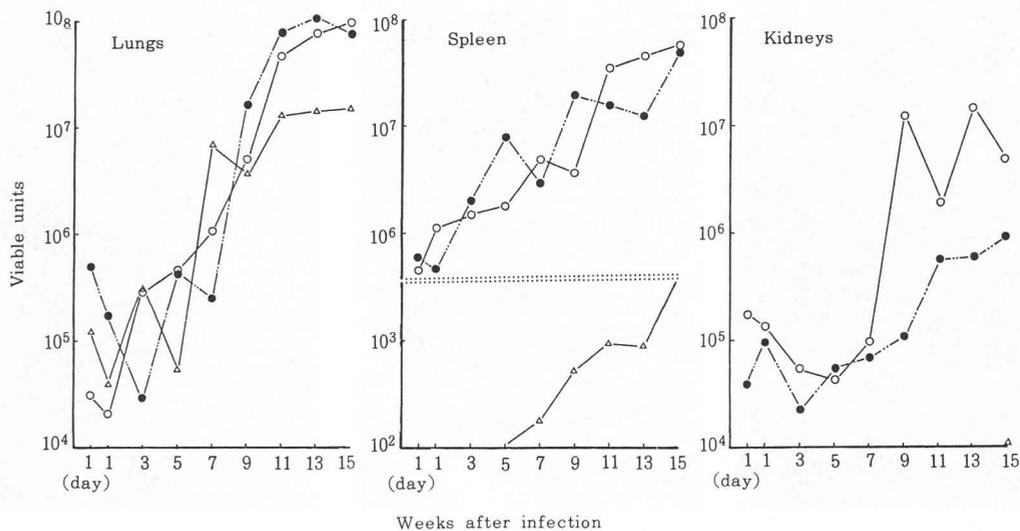
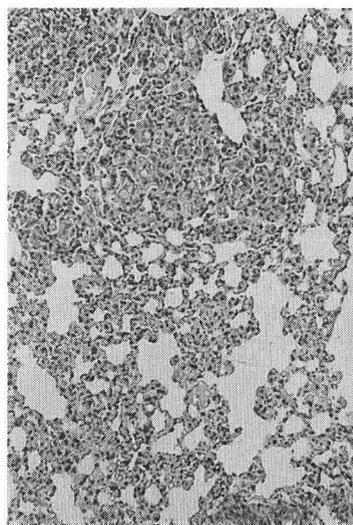
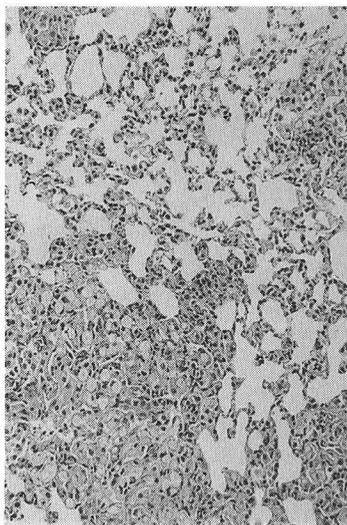


Fig. 2. Number of viable units of mycobacteria recovered from the organs of mice after infection with *M. avium* complex (31F093T).

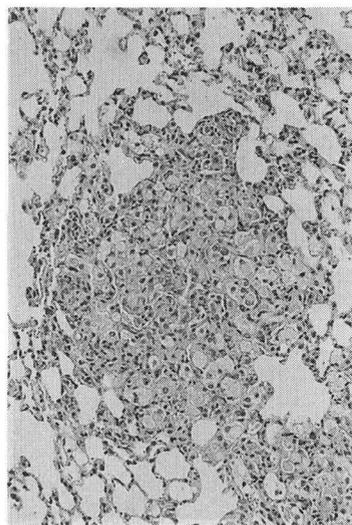
○—○ intraperitoneal; ●—● intravenous; △—△ airborne infection. Each point represents the average value for 3 mice.



Intraperitoneal

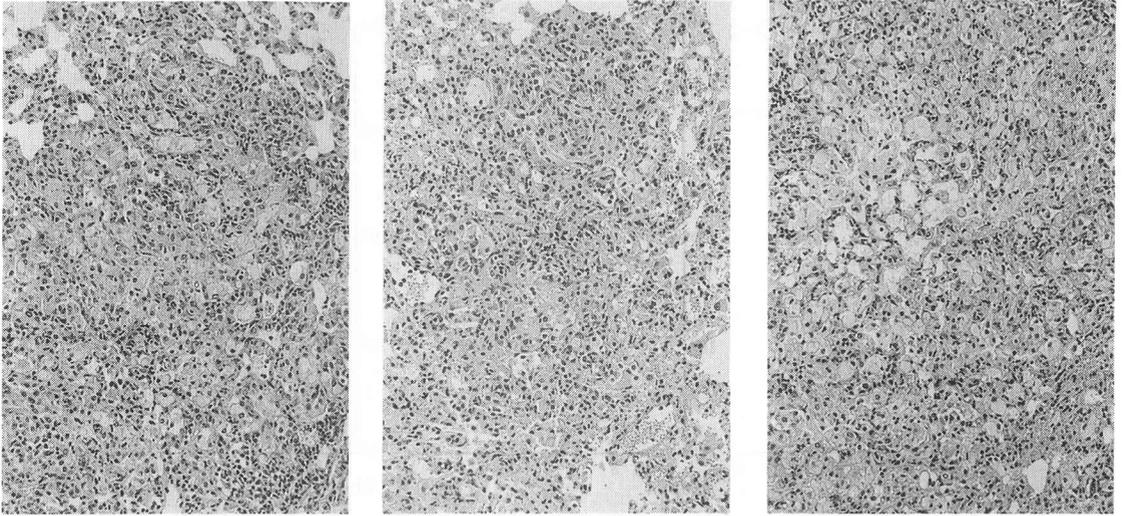


Intravenous



Airborne

Fig. 3. Lung, 7 weeks after infection, showing granulomas consisting of alveolar macrophages and mononuclear cells, as well as aggregation of foamy macrophages. (H. E., $\times 100$)

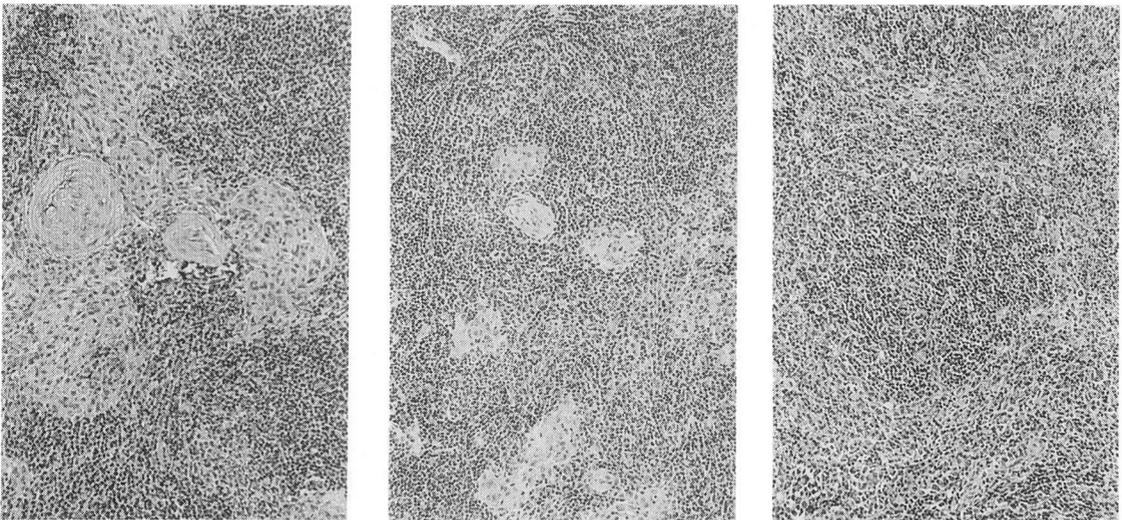


Intraperitoneal

Intravenous

Airborne

Fig. 4. Lung, 15 weeks after infection. Diffuse proliferative lesions consisting of macrophages, small mononuclear cells and epithelioid-like cells were demonstrated. (H. E. $\times 100$)

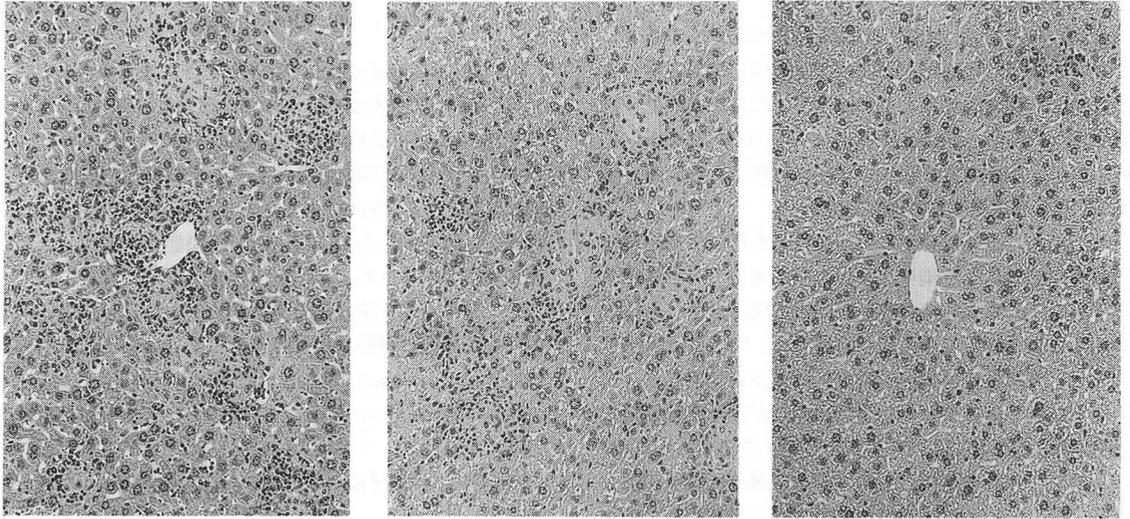


Intraperitoneal

Intravenous

Airborne

Fig. 5. Spleen, 15 weeks after infection. Epithelioid-like granulomas were seen when the infection was done by intraperitoneal and intravenous route except airborne route. (H. E. $\times 100$)

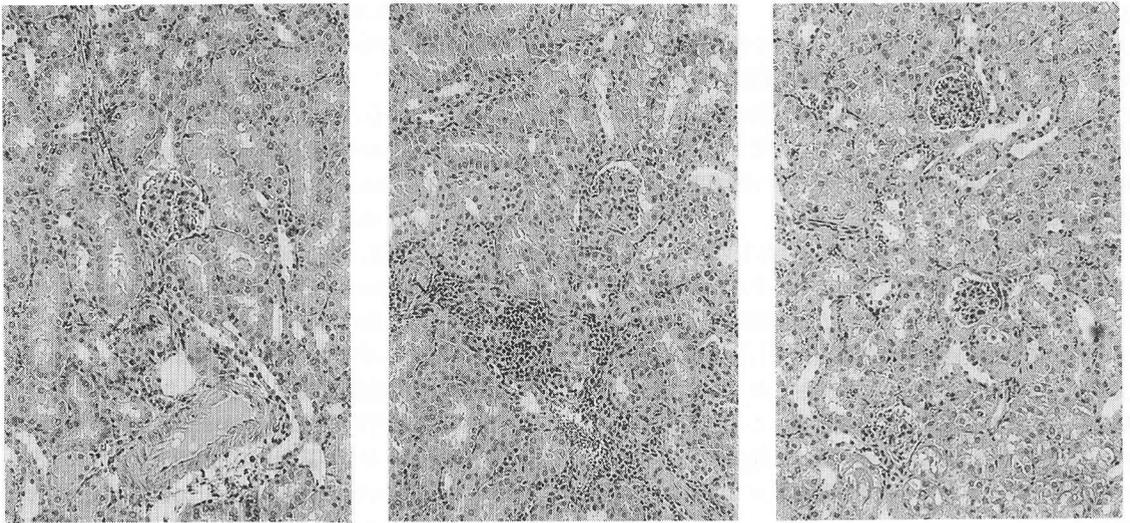


Intraperitoneal

Intravenous

Airborne

Fig. 6. Liver, 15 weeks after infection by intraperitoneal and intravenous routes. Epithelioid-like granulomas were demonstrated. No lesions were seen when the infection was done by airborne route. (H. E. $\times 100$)



Intraperitoneal

Intravenous

Airborne

Fig. 7. Kidney, 15 weeks after infection. Chronic interstitial nephritis was seen when the infection was done by intravenous route. (H. E. $\times 100$)

の差などの点が指摘されており¹⁴⁾¹⁹⁾、また今後の課題として感染方法自体にも言及している。

今回、私どもは、上記の問題点特に感染方法の差による違いが本症の病態にどのような差を生じるかを検討する目的で、従来より私どもが使用している本邦分離研究所保存の *M. avium* complex 31F093T 株を用いて経尾静脈、腹腔内及び吸入の3感染経路による同時比較を ddY マウスを使用し検討してみた。

この結果、改めていずれの感染経路を用いても治療術式の検討に有用な感染モデルが作成できることを確認するとともに、感染経路の違いが病変形成に大きな影響を与えるという特徴ある所見が得られた。つまり吸入感染法では、経尾静脈感染法や腹腔内感染法とは異なり、病変の形成及び臓器よりの生菌数の還元が、本実験期間では基本的に肺のみに限局するという所見である。これは、経尾静脈、腹腔内感染とも肺・脾の重量は感染後増加したのに対し、吸入感染法では肺重量のみが増加し、またその増加の程度は両感染より早期かつ顕著に認められたこと、臓器の肉眼的並びに病理組織学的所見より両感染ではいずれの臓器にも程度の差こそあれ病変が観察されたのに対し、吸入感染法では僅かな例外を除いて肺以外の臓器に病変は認められなかったこと、更に、臓器内還元生菌数の推移において経尾静脈・腹腔内感染では、肺・脾・腎ともに還元生菌数の増加が認められたが、吸入感染法ではその還元が主として肺のみにとどまっていたこと、などの結果から推察された。

また、感染後期(11週以降)に肺の還元菌数の増加の停止がいずれの感染経路においても観察されたが、このことは、肺におけるある種の感染抵抗性がより早期に発現したものと私どもは考えている。なおこの抵抗性の発現は、吸入感染においてより早期かつ強力である印象を受けた。

今回の成績は ddY マウスを用いたもので、これが ddY マウス自体の特徴であるのか、それとも他の系統のマウスにもあてはまるのかどうか、疑問の余地はあるものの、吸入感染法で他の方法と比較して感染後比較的長期間、病変が肺に限局して観察されたことは、臨床肺が感染の場として極めて頻度が高いことを考えれば、吸入感染モデルによる肺病変の成立過程の検討が、本症の病態解明を行う上でも重要な鍵を握っているように思われる。

最近久世ら²⁰⁾は、実験的マウス抗酸菌症を対象とした肺洗浄細胞、特に MP 系細胞・リンパ球、好中球などの動態を詳細に検討し、その結果から肺洗浄細胞の経時的観察が実験モデルの肉芽腫化を含む肺病変成立過程をある側面で解析できる可能性を示唆しているが、私どもの今回の3経路の感染方法による感染病態の同時比較から得られた結果は、上述の肺洗浄細胞の検討が意義あ

るものと改めて裏付けたものと考えた。

4. 結 論

M. avium complex 31F093T マウス毒力株を用い、経尾静脈・腹腔内及び吸入の3経路による ddY マウスの感染病態を同時比較し次の結果を得た。

(1) いずれの感染経路を用いても治療術式の検討に有効な感染モデルを作成できることを再確認するとともに、本モデルは *M. avium* complex 感染症の病態解明に今後の利用が期待される。

(2) これらの感染経路の異なるモデルは、感染経路別の感染防御能の解析、特に吸入感染を利用すれば、肺近傍の compartmentalize された場における cell interaction の *in vivo* での検討に適切なモデルを提供すると思われた。

(本論文の要旨は第62回日本結核病学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班(東村道雄他) : 日本における肺非定型抗酸菌症の疫学的、細菌学的研究、結核、55 : 273, 1980.
- 2) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班(東村道雄他) : 日本における非定型抗酸菌感染症の研究(国療非定型抗酸菌症共同研究班1985年度報告) — *Mycobacterium kansasii* 症の増加が続き、これが非定型抗酸菌症発生率を押し上げている一、結核、62 : 319, 1987.
- 3) Hobby, G. L. et al. : A study of pulmonary disease associated with mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* ; Identification and characterization of the mycobacteria, XVIII. A report of the Veterans Administration-Armed Forces Cooperative Study, Am Rev Respir Dis, 95 : 954, 1967.
- 4) 久世文幸他 : 非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性、II. 一般抗生物質、抗腫瘍剤、抗レプラ剤(B663)等に対する感受性、結核、49 : 189, 1974.
- 5) 内藤祐子他 : 非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 V. *Mycobacterium intracellulare* に対する主としてアミノグリコシッド系抗生物質の試験管内制菌作用、結核、54 : 423, 1979.
- 6) 桜井信男他 : 非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性 VI. サルファ剤とその合剤の試験管内制菌効果について、結核、58 : 415, 1983.
- 7) 桜井信男 : 非定型抗酸菌に対する主としてCephem系抗生物質の試験管内制菌効果について、結核、58 : 355, 1983.

- 8) Ryneerson, T. K. et al. : Rifampin : *in vitro* effect on atypical mycobacteria, *Am Rev Respir Dis*, 104 : 272, 1971.
- 9) Davidson, P. T. et al. : Treatment of disease due to *Mycobacterium intracellulare*, *Rev inf Dis*, 3 : 1052, 1981.
- 10) 喜多舒彦 : 非定型抗酸菌症の化学療法—特に *M. intracellulare* 症を中心として—, *結核*, 54 : 543, 1979.
- 11) 下出久雄 : 非定型抗酸菌症の臨床的研究—第13報, 多剤 (4~5剤) 併用療法による *M. intracellulare* 肺感染症の治療成績—, *日胸*, 40 : 669, 1981.
- 12) 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 : 11, 1981.
- 13) 久世文幸 : 実験的非定型抗酸菌症, *結核*, 58 : 469, 1983.
- 14) 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 (ii)—mouse virulent strain (マウス毒力株) の検索—, *結核*, 59 : 13, 1984.
- 15) 久世文幸・桜井信男 : 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), *結核*, 59 : 115, 1984.
- 16) Burjanovà, B. et al. : Experimental chemotherapy of mycobacteriosis provoked by atypical mycobacteria, *Adv Tuberc Res*, 17 : 154, 1970.
- 17) Shronts, J. S. et al. : Rifampin alone and combined with other drugs in *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium intracellulare* infection of mice, *Am Rev Respir Dis*, 104 : 728, 1971.
- 18) Gangadharam, P. R. et al. : An acute infection model for *Mycobacterium intracellulare* disease using beige mice : Preliminary results, *Am Rev Respir Dis*, 127 : 648, 1983.
- 19) F, Kuzu and F, Uchihira : Various colony-formers of *Mycobacterium avium*—*intracellulare*, *Eur J Respir Dis*, 65 : 402, 1984.
- 20) 久世文幸他 : 肉芽腫化—実験的マウス抗酸菌症を対象とした肺洗浄細胞の動態—, *日胸疾会誌*, 23 : 1105, 1985.