

原 著

*Mycobacterium intracellulare* 感染症モデル動物としての  
免疫不全マウスおよび同ラット

江森方子・斎藤 肇・富岡治明

島根医科大学微生物・免疫学教室

瀬戸川 朝 一

同 眼科学教室

受付 平成5年10月8日

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MODEL ANIMALS FOR DISSEMINATED  
*MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX INFECTIONS USING  
IMMUNODEFICIENT MICE AND RATS

Masako EMORI, Hajime SAITO\*, Haruaki TOMIOKA  
and Tomoichi SETOGAWA

(Received for publication October 8, 1993)

In order to establish an animal model for disseminated *M. avium* complex (MAC) infections frequently encountered in AIDS patients, we studied growth of *M. intracellulare* in visceral organs (lungs, livers, spleens, kidneys), in blood, and in footpads of mice with defined immunodeficiencies, such as SCID mice with T and B cell-defect, BALB/c athymic nude mice with matured T cell-defect, and beige mice with NK cell-defect. In addition, Sprague-Dawley rats with acquired immunodeficiency induced by cyclosporine-treatment were also examined. The following results were obtained.

1) SCID mice : First, SCID mice were infected sc with  $6.1 \times 10^6$  CFU of *M. intracellulare* N-260 (virulent SmT colonial variant) into the hind footpad. The organisms grew in the footpad remarkably during the 12 weeks after infection in SCID mice, where the growth rate was much greater than that in CB-17 strain mice with the same genotype as SCID mice and in BALB/c mice with Bcg<sup>s</sup> genotype (CB-17 and BALB/c mice are MAC-susceptible). Furthermore, in SCID mice, bacteremia and dissemination of organisms to the visceral organs were observed but not in the two control strains of mice.

Second, SCID mice were infected iv with  $4.8 \times 10^6$  CFU. The bacterial loads in the viscera of SCID mice after infection were larger than those of CB-17 mice except for livers. However, the incidence and the degree of gross lung lesions were much less in SCID mice compared to CB-17 mice, presumably due to the defect in T cell-mediated immune reactions in SCID mice.

\* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

2) BALB/c athymic nude mice and beige mice : Various strains of mice (BALB/c athymic nude, beige, SCID, CB-17, BALB/c euthymic) were infected iv with  $4.8 \times 10^6$  CFU of *M. intracellulare* N-260. The severity of the pulmonary lesions and the size of bacterial loads in the lungs were the greatest in beige mice. On the other hand, the bacterial loads in the spleens and kidneys of SCID mice and BALB/c athymic nude mice were similar and higher when compared to those in beige, CB-17, and BALB/c mice.

3) Cyclosporine-treated Sprague-Dawley rats : In the cyclosporine-treated rats, iv infection with  $2.1 \times 10^7$  CFU of *M. intracellulare* N-260 resulted in a slight increase in the bacterial loads in the lungs and spleens during the first 8 weeks after infection. This suggests that persistent infection was inducible in the cyclosporine-treated rats. In contrast, organisms were gradually eliminated from lungs and spleens in normal rats.

These findings indicate that a systemic infection can be induced by challenging *M. intracellulare* into the footpad of SCID mice. This experimental system may serve as a model for the disseminated MAC infections seen in immune compromised hosts such as AIDS patients.

**Key words** : *Mycobacterium intracellulare* infection model, Immunodeficiency, SCID mouse, Beige mouse, Athymic nude mouse, Cyclosporine-treated rats

**キーワード** : *Mycobacterium intracellulare* 感染モデル, 免疫不全, SCID マウス, Beige マウス, 無胸腺ヌードマウス, シクロスポリン処理ラット

## 緒言

*Mycobacterium avium* complex (MAC) は, AIDS などの免疫不全患者にしばしば感染・発症し, 近年特に米国において極めて重大な問題となっている。本菌群は一般に諸種の抗結核剤に対して耐性で, これによる感染症は難治性, 予後不良であることは周知のところである<sup>1)</sup>。したがって, MAC 症に対する新しい化学療法剤の探索が急がれるところであるが, この際, 薬剤の *in vivo* の実験系での効果判定には MAC に対する易感染動物モデルを用いることが望ましい。そこで, 今回われわれは, 種々の免疫不全マウスおよびラットに *M. intracellulare* を感染させ, 主として感染部位, 内臓および血中の生菌数の推移を追跡し, これらの点を勘案してこれらの動物の MAC 易感染動物としての価値の検討を行った。

## 材料と方法

### 1) 供試菌

MAC 症患者より分離され, 当教室において DNA プローブで *M. intracellulare* と同定された N-260 株 (SmT variant) を Middlebrook 7H9 broth 中で,  $OD_{540nm} = 0.15$  になるまで培養後, 3,000 rpm, 15 分間遠心して得られた菌を同種 broth に浮遊させ, さらに 1,000 rpm, 5 分間遠心して大きい菌塊を除いた上

清を超音波処理 (Handy sonic, トミー精工) し, 7H9 broth により  $OD_{540nm} = 0.03 \sim 0.6$  に調整した菌浮遊液 ( $4.8 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^8$  生菌単位) を用いた。

### 2) 動物および感染実験

#### (1) マウス

日本 SLC (静岡) より購入した SCID (T および B 細胞欠損<sup>2)</sup>) およびそのバックグラウンド CB-17 マウス並びに athymic BALB/c および BALB/c 系マウス, 鐘淵化学工業生物化学研究所より分与された beige マウス (NK 細胞欠損<sup>3)</sup>) のいずれも 6 週齢の雌を用いた。これらの動物のうち SCID, athymic BALB/c および beige の各マウスは, 納入時から実験終了時までビニールアイソレーター内で滅菌した水と飼料で飼育された。

感染は以下の経路で行った。

a) 足蹠内接種 : SCID, CB-17 および BALB/c の各マウスの右後肢足蹠皮下へ供試菌の 0.03 ml ( $6.1 \times 10^6$  生菌単位) を接種し 1 日, 4, 8 および 12 週後に屠殺, 剖検し, 足蹠, 内臓および血液 (1 ml) 中の還元生菌単位を計測した。

b) 静脈内接種 : SCID, CB-17, athymic BALB/c, BALB/c, および beige の各マウスの尾静脈内へ供試菌の 0.2 ml ( $1.8 \times 10^8 \sim 1.8 \times 10^7$  生菌単位) を接種し, 1 日, 4, 8 および 12 週後に, 屠殺, 剖検して, 臓器の肉眼的病変の有無ないし程度の観察並びに生菌単位

の計測を行った。

(2) ラット

感染2週間前より実験終了時まで、cyclosporine (サンド薬品) の20 mg/kgを週2回、40 mg/kgを週1回のサイクルで繰り返し皮下投与したSprague-Dawley系8週齢雄ラットを宿主とした。cyclosporine投与開始2週後のラットに供試菌の1 ml ( $2.1 \times 10^7$  生菌単位) を尾静脈内接種し、1日および8週後の肺および脾内の生菌単位を計測した。

上記各動物における生菌単位の測定には、足趾組織あるいは臓器(肺、肝、脾、腎)をガラスホモジナイザーを用いて5~10 mlの生食水で均等化し、2% NaOHを1/10量加えて20秒間処理後、直ちに0.5 N HClで中和し、蒸留水で10倍段階希釈したもの0.1 mlをMiddlebrook 7H11寒天平板上にひろげ、CO<sub>2</sub> 孵卵器(5% CO<sub>2</sub>-95%空気, 37°C)内で2週間培養後の発生集落数を読みとった。血液は、クロロホルムで麻酔した動物の心臓より、ヘパリンナトリウム(1,000単位/ml)で内筒をぬらした注射器を用いて採取し、同量の滅菌水を加えて20秒間超音波処理し細胞を破壊したものの0.1 mlを7H11寒天平板上にひろげ、上述したと同様にして培養し発生集落数を読みとった。

結 果

1. マウス足趾内接種

足趾内での菌数はSCIDマウスでは感染後4、8および12週と時間の経過とともに増大したのに対して、CB-17およびBALB/cマウスでは感染4週以降では時間の経過とともに減少した(Fig. 1)。次に感染12週後においては、これらマウスの内臓からの還元生菌単位はTable 1に示すようである。これからわかるように、腎からはSCIDマウスのみが菌が検出され(4.32 ± 0.61 生菌単位)、また、表には示さなかったが、血液ではSCIDマウスにおいてのみ4匹中2匹ではあるが、

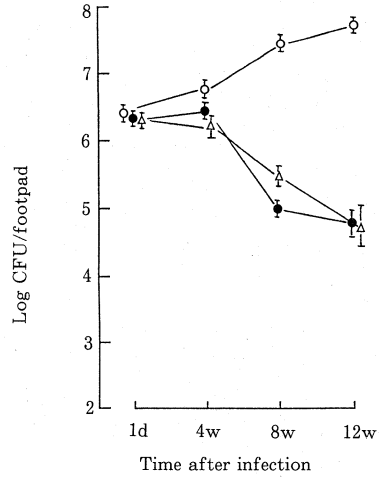


Fig. 1 Changes in the bacterial loads in the footpads of SCID (○), CB-17 (●) and BALB/c (△) mice during the course of *M. intracellulare* infection. Animals were infected s.c. with  $6.1 \times 10^6$  of *M. intracellulare* into the right hind footpad.

その1 ml中より10および20生菌単位が検出された。さらに肺、肝、および脾ではいずれのマウスにおいても菌は検出されたが、SCIDマウスにおいてはCB-17およびBALB/cマウスにおけるよりも肺で0.4~0.6オーダー、肝で2.0~3.0オーダー、脾で1.7~2.3オーダー高い還元生菌単位が得られた。なお、BALB/cとCB-17マウスの肺、肝および脾よりの還元生菌単位には有意差はみられなかった。

2. 静脈内接種

(1) 実験1: 免疫不全マウス(SCID, athymic BA

Table 1 Number of CFUs Recovered from Mice 12 Weeks after Subcutaneous Infection into Footpad with *M. intracellulare*<sup>1)</sup>

Mouse strain	Number of mice	Log CFU/organ (mean ± SEM)			
		Lung	Liver	Spleen	Kidney
SCID	4	4.33 ± 0.49 <sup>2)</sup>	5.68 ± 0.16	6.37 ± 0.06	4.32 ± 0.61
CB-17	4	3.96 ± 0.27	3.70 ± 0.11	4.64 ± 0.16	— <sup>3)</sup>
BALB/c	4	3.77 ± 0.34	2.40 ± 0.52	4.05 ± 0.31	—

1) Mice were infected subcutaneously with  $6.1 \times 10^6$  of *M. intracellulare* into the right hind footpad.  
 2) Statistically significant differences were noted between the values for SCID mice and those for other strain mice except for lungs.  
 3) Lower than detectable level (=1.77).

**Table 2** The Incidence and Degree of Gross Lung Lesions in Various Strain Mice Infected with *M. intracellulare*<sup>1)</sup> Intravenously

Mouse Strain	Number of mice	Number of mice with indicated lung lesion score at <sup>2)</sup> :															
		4 w					8 w					12w					
		-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	
SCID	3	3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	2	0	0	0	
CB-17	3	3	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	0	
Athymic BALB/c	3	3	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	
BALB/c	3	3	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	2	0	
Beige	3	0	0	3	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3	

1) Mice were infected with  $4.8 \times 10^6$  CFU of *M. intracellulare* N-260 intravenously.

2) Lung lesions were scored as described in Table 2.

**Table 3** Effect of Cyclosporine Treatment on the Growth of Organisms in the Organs of Sprague-Dawley Rats Infected with *M. intracellulare*<sup>1)</sup> Intravenously

Cyclosporine	Log CFU/organ (mean $\pm$ SEM)			
	Lung		Spleen	
	Day 1	Week 8	Day 1	Week 8
-	5.14 $\pm$ 0.05	4.10 $\pm$ 0.09	5.88 $\pm$ 0.07	4.39 $\pm$ 0.11
+ <sup>2)</sup>	5.04 $\pm$ 0.07	5.11 $\pm$ 0.06	5.88 $\pm$ 0.05	5.99 $\pm$ 0.09

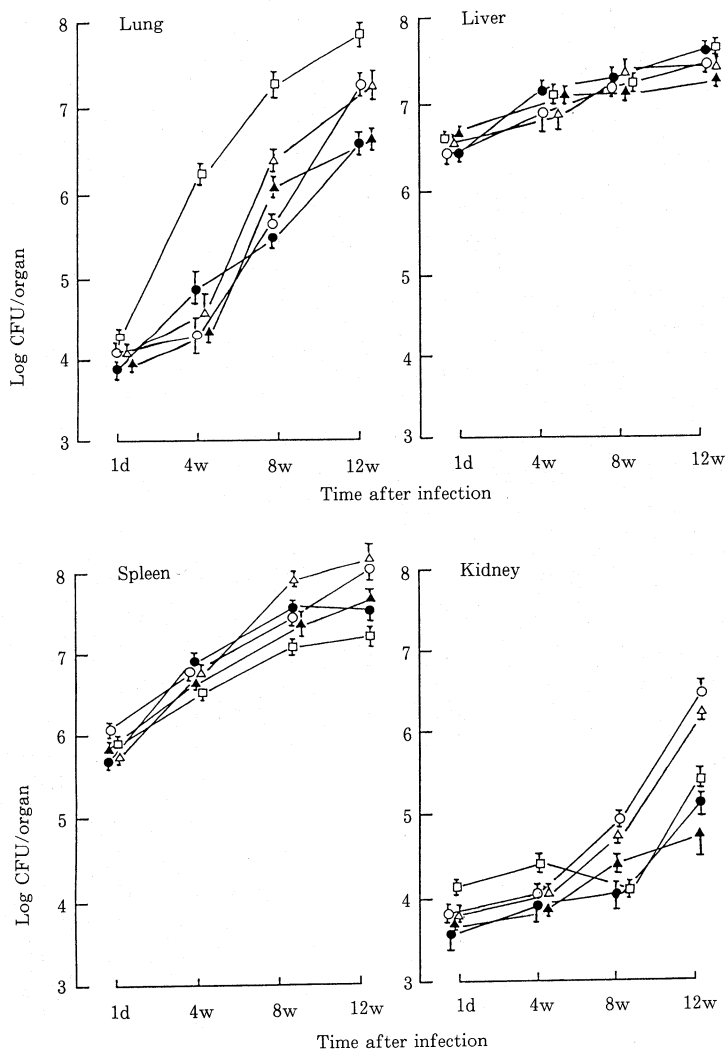
1) Rats were infected with  $2.1 \times 10^7$  CFU of *M. intracellulare* N-260 intravenously.

2) Cyclosporine was administered subcutaneously at 20 mg/kg twice a week and at 40 mg/kg once a week, starting at 2 weeks before infection and continuing till the end of the experiment.

LB/c, beige), CB-17, BALB/c マウスについての検討 (Table 2 参照)。 *M. intracellulare* N-260 株の  $4.8 \times 10^6$  生菌単位静脈内接種時の肺における結核結節様病変は感染4週では beige マウスのみにもみられ (2+), 8週および12週と時の経過とともに病変の程度も高度となった (3+ ~ 4+) のに対して SCID, および athymic BALB/c マウスでは結核結節様病変の発現頻度は低く, その程度も軽かった。また CB-17 および BALB/c マウスでは beige マウスとこれらマウスとの中間的病変がみられた。臓器内生菌単位は, Fig. 2 に示すように, beige マウスの肺では感染早期より著しい菌の増殖推移を示し, 他のマウスを大きく凌駕し, 感染12週後には感染1日後に比べて3.5オーダーの増大がみられた。肺, 脾および腎では, すべてのマウスにおいて感染後, 時間の経過とともにその増大がみられたが, SCID および athymic BALB/c マウスにおいて, 感染12週後にバックグラウンドの CB-17 および BALB/c

マウスにおけるよりも菌の増殖が著しかったのに対して, 肝ではいずれの時期のいずれのマウスにおいても, その増大の程度に大差はみられなかった。また, 感染12週後の SCID, athymic BALB/c および beige 各3匹のマウス全例の血中より菌が検出され 1 ml 中の log CFU 値はそれぞれ  $3.09 \pm 0.10$ ,  $2.74 \pm 0.09$ ,  $2.28 \pm 0.10$  であったが, これらマウス系統間に大差はなかった。一方, CB-17 マウスよりは3匹中1匹に血中より菌が検出され ( $\log \text{CFU/ml} = 1.60$ ), BALB/c マウスでは菌は検出されなかった。

(2) 実験2: cyclosporine 投与ラットについての検討 (Table 3 参照)。cyclosporine 非処置ラットの *M. intracellulare* N-260 感染8週後の肺において, 感染1日におけるよりも1オーダーの, また脾において1.5オーダーの菌の減少がみられたのに対して, cyclosporine 投与ラットにおいては菌の減少傾向はみられず, 持続感染の様相を呈した。



**Fig. 2** Changes in the number of colony forming units (CFU) of organisms recovered from visceral organs of various strain mice infected i. v. with  $4.8 \times 10^6$  of *M. intracellulare*. Symbols ; ○, SCID ; △, Athymic BALB/c ; □, Beige ; ●, CB-17 ; ▲, BALB/c. Each symbol and bar indicate the mean and standard error (n=3), respectively.

**考 察**

SCID マウスは、T細胞とB細胞の機能が前駆細胞の遺伝的酵素異常により欠如しており、胸腺や痕跡程度の所属リンパ節は存在しているが成熟T細胞はなく、循環血液中の血球はほとんどが好中球である<sup>2)</sup>。與儀ら<sup>4)</sup>はらい菌のSCIDマウス足蹠内接種により、感染部位での著しい菌の増殖と、全身への散布を認め、SCIDマウスがらい菌の感染モデル動物として優れていることに

ついて報告している。

今回、われわれの *M. intracellulare* N-260 足蹠内接種実験でも、SCIDマウスのバックグラウンドであるCB-17マウス並びにBALB/cマウスにおいては、感染後の時間の経過とともに感染部位よりの菌の排除・減少がみられたのに対して、SCIDマウスではこれらとは逆に感染部位での菌の増殖がみられ、内臓への菌の散布も前2者に比して著しかった。ことに静脈内接種では、SCIDマウスにおいては肺の肉眼的結核結節様病変は

CB-17 マウスに比して軽度であったが、肺並びに腎よりの還元生菌単位は感染8週以降CB-17 マウスにおけるよりも多かった。また、別途に  $1.8 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^7$  生菌単位の菌を接種した実験では、両マウスの差は菌の接種量に依存しており、感染後の時間的経過とともに大きくなった（未発表データ）。

以上の結果より、SCID マウスでは感染菌が局所より全身へと散布しやすいと思われる、これらの病態は自然界に広く存在すると考えられる MAC が AIDS 患者に感染し、やがては全身播種性感染へと進展していく過程と似ており、このことは SCID マウスが MAC 感染モデル動物となり得る可能性を示唆しているものと思われる。

各種免疫不全マウスへの *M. intracellulare* N-260 静脈内接種では、NK 細胞が欠如し、 $CD8^+$  T 細胞の機能が低下している<sup>5)</sup> beige マウスの肺で感染早期より著しい菌の増殖がみられた。これは今後の検討にまたねばならないが、このことがあるいは MAC 感染進展における NK 細胞あるいは  $CD8^+$  T 細胞の重要性をうかがわせるものかもしれない。また、Brown らの方法<sup>6)</sup> により cyclosporine を投与したラットでは、菌は排除・減少されることなく持続感染の様相を呈したが、このことはあるいは MAC 感染進展における  $CD4^+$  T 細胞の重要性を示唆しているものかもしれないが、これも今後の検討にまちたい。一方、SCID マウスと athymic BALB/c マウスの内臓における菌の増殖の程度に大差がなかったことより、MAC 感染進展における B 細胞の役割は小さいものといつてよいのではあるまいか。

beige マウスは、MAC 感染モデル動物として報告されたものであるが<sup>3)</sup>、われわれの今回の *M. intracellulare* についての本動物を用いた検討では、肺における菌の増殖の程度は SCID および athymic BALB/c マウスといった他の免疫不全マウスあるいは対照の CB-17 および BALB/c マウスを凌駕したが、脾および腎における菌の増殖の程度は、SCID および athymic BALB/c マウスの方が著しく、したがって beige マウスは全身播種性感染モデル動物としては必ずしも満足すべきものとはいえないのではなからうか。

今後、これらの問題点を踏まえて、より適切な MAC 全身播種性感染モデル動物開発についての研究を進めることが必要であろう。

## 結 語

SCID, athymic BALB/c および beige マウス並びに cyclosporine 投与ラットに *M. intracellulare* を足蹠皮下あるいは静脈内接種し、これらの動物の全身播種性感染モデルとしての有用性について検討し、概要以

下の知見を得た。

1. SCID マウスへの足蹠内接種では菌の感染部位での増殖および血流中への出現並びに内臓への菌の散布が顕著であった。

2. 静脈内接種により、beige マウスでは感染早期より肺内での、また SCID マウス、athymic BALB/c マウスでは脾および腎内での著しい菌の増殖がみられた。

3. cyclosporine 投与ラットへの静脈内接種により肺および脾では、持続感染の様相を呈したのに対して、正常ラットでは感染後、時間の経過とともに菌の減少がみられた。

## 謝 辞

beige マウスを分与して頂いた鐘淵化学工業株式会社（兵庫）に深謝します。

## 文 献

- 1) Horsburgh CR Jr, Selik RM : The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis.* 1989 ; 139 : 4-7.
- 2) Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ, et al. : Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. *Am J Pathol.* 1985 ; 120 : 464-477.
- 3) Gangadharam PRJ, Edward III CK, Murthy PS, et al. : An acute infection model for *Mycobacterium intracellulare* disease using beige mice. *Am Rev Respir Dis.* 1983 ; 127 : 648-649.
- 4) Yogi Y, Nakamura K, Inoue T, et al. : Susceptibility of severe combined immunodeficient (SCID) mice to *Mycobacterium leprae* : multiplication of the bacillus and dissemination of the infection at early stage. *Jpn J Leprosy.* 1991 ; 60 : 139-145.
- 5) Saxena RK, Saxena QB, Adler WH : Defective T-cell response in beige mice. *Nature.* 1982 ; 295 : 240-241.
- 6) Brown ST, Edwards FF, Bernard EM, et al. : Progressive disseminated infection with *Mycobacterium avium* complex after intravenous and oral challenge in cyclosporine-treated rats. *J Infect Dis.* 1991 ; 164 : 922-927.