

原 著

実験的マウス抗酸菌症の経気道感染モデルの開発：
尾静脈感染モデルとの比較

土 井 教 生

結核予防会結核研究所基礎研究部

DEVELOPMENT OF THE INTRATRACHEAL INFECTION MODEL OF
EXPERIMENTAL MURINE MYCOBACTERIOSIS :

Comparison with the Intravenous Infection Model

Norio DOI*

An intratracheal infection method of experimental murine mycobacteriosis was developed for an *in vivo* study of antimycobacterial agents.

Two models of intratracheal (IT) and intravenous (IV) routes of infection with mycobacteria of the same inoculum dose were compared in terms of the mean survival days of mice or bacterial loads in organs during the course of infection. IT model with either of *M. bovis* Ravenel, *M. tuberculosis* Kurono, *M. tuberculosis* H37Rv or *M. intracellulare* N-256 exhibited a much more distinct lung-specific infection than IV model with the same dose of respective mycobacterial strains.

The intratracheal infection method presented in this report does not require any special equipment and is a much safer method for the researcher than airborne infection. In this model, following slight anesthetizing of mice, bacillary suspension was injected quantitatively into lungs through the mouth and trachea by using a specially modified needle set with a short fine polyethylene tube.

This IT model may be useful not only for the *in vivo* assessment of anti-mycobacterial agents but also for the comparison of virulence among various mycobacterial strains.

Key words : Intratracheal infection, Intravenous infection, Mouse, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*

キーワード：経気道感染，尾静脈感染，マウス，結核菌，*Mycobacterium intracellulare*

結 言

新薬の治療効果を既存薬との対比で検討する上で，近交系マウスを用いる *in vivo* 治療実験は，臨床治験に先

立って欠かすことのできない基礎研究段階である。

近年，後天性免疫不全症候群で併発する全身播種型の抗酸菌症が問題となっているが^{1)~3)}，結核症をはじめ抗酸菌症としては肺感染症例が圧倒的多数を占め，宿主

別刷り請求先：
土井 教生
結核予防会結核研究所基礎研究部
〒204-0022 東京都清瀬市松山3-1-24

* From the Department of Basic Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022 Japan.

(Received 27 Oct. 1997 / Accepted 12 Dec. 1997)

の臨床経過の鍵を握るのは肺病巣であるという本質は依然として変わらない。したがって、化学療法剤の治療効果を追究するための基礎研究も、可能な限り肺病変を主体とする「肺感染モデル動物」の実験系で検討すべきであろう。

本報告で示す経気道感染の方法は、簡単な器具を用いて菌液を直接マウスの肺内に定量的に注入する安全な方法である。この「経気道感染モデル系」が従来からの「尾静脈感染モデル系」と並び、化学療法剤の基礎研究において、有益な実験感染モデルであることを示したい。

材料と方法

実験方法：実験(1) *M. bovis* Ravenel 株と *M. tuberculosis* Kurono 株を用いて、各菌種の同一菌量を IT と IV の異なる経路から感染させた。作製した4種類の感染モデル系は同時並行で観察し、IT と IV のマウス平均生存日数 (mean ± SD; 各 n=10) を比較した。

実験(2) *M. tuberculosis* H37Rv 株、同 Kurono 株、*M. intracellulare* N-256 株を用いて、各菌種の同一菌量を IT と IV の異なる経路から感染させた。2菌種3株計6種類のモデル系を同時並行で観察し、肺・肝・脾内 cfu の経時的推移を比較した。

抗酸菌株：*M. bovis* Ravenel (NIHJ 1607) 株は国立予防衛生研究所（現 国立感染症研究所）細胞免疫部高橋宏博士（当時）、*M. tuberculosis* H37Rv 株 (ATCC 27294) は広島大学医学部細菌学教室田坂博信博士（当時）、*M. intracellulare* N-256（臨床分離株）は島根医科大学医学部微生物・免疫

学教室 斎藤肇博士（当時）より分与された菌株を使用した。*M. tuberculosis* Kurono 株は結核研究所に凍結乾燥保存の菌株を使用した。

動物：BALB/c CrSlc 6 週令雌マウス（日本エスエルシー）を用いた。

菌液の調製：Youmans の方法に従い⁴⁾、Proskauer & Beck 液体培地で5～7日間培養し、早期に発育する薄い菌膜を採取した。これから調製した菌液をマウスに肺感染させ、4～6週間経過後に肺から7H10寒天平板培地 (Difco) を用いて菌を回収した。肺回収菌を、H37Rv, Kurono, Ravenel 株は Dubos 液体培地 (Difco) で、N-256株は7H9 液体培地 (Difco) で、それぞれの菌株ともに4回と同調培養 (21, 10, 7, 5日間) により、菌の代謝活性を高め、培養日令を揃えた。培養菌液は濁度 0.125 (560nm) に達した時点で遠心集菌し、セラムチューブに分注後、氷水中で30秒間超音波処理し、-80℃で凍結保存した。

感染菌量：実験(1)では、Ravenel は 1.0×10^4 cfu, Kurono は 1.0×10^5 cfu, 実験(2)では、H37Rv と Kurono は 1.0×10^6 cfu, N-256 は 1.0×10^7 cfu/マウスを Dubos 液体培地または7H9 液体培地に懸濁して接種した。両実験ともに、同一菌株を感染させた IT と IV にはそれぞれ同一の菌量を接種した。

IV 感染：26番ゲージ 1/2 インチの注射針と 1ml 容量のシリンジを用いて、尾静脈から菌液 0.2ml を注入。

IT 感染：麻酔条件は、(a) ketamine (Park-Davis 社) と xylazine (Bayer 社) を 80:16mg の割合で混和し、10倍希釈後、200 μ l/マウスを腹腔内投与⁵⁾、

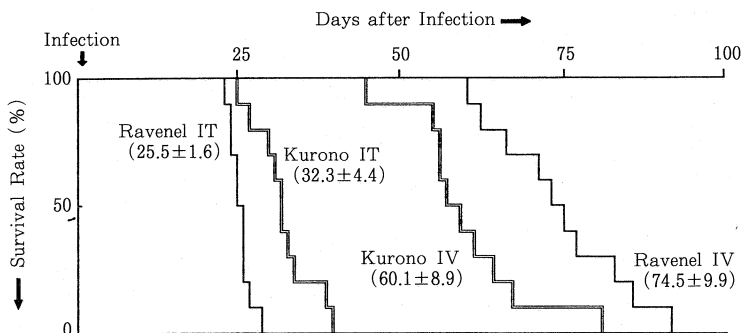


Fig. 1 Comparison of the survival days between the IT- and IV-infected mice. BALB/c mice were infected with 1.0×10^4 cfu of *M. bovis* Ravenel or 1.0×10^5 cfu of *M. tuberculosis* Kurono by the different routes. The numbers in parentheses represent the mean survival days (mean ± SD) of each group (n=10). IT: intratracheal infection, IV: intravenous infection.

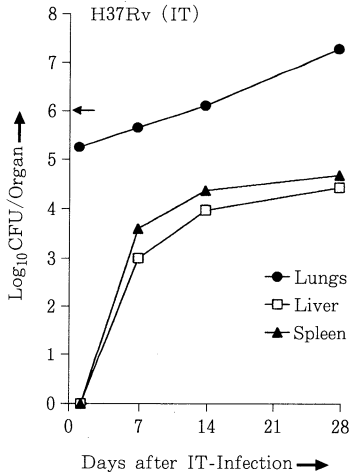


Fig. 2 Growth of *M. tuberculosis* H37Rv in the lungs, liver and spleen following infection (1.0×10^6 cfu) of BALB/c mice through the intratracheal route. Each point represents the average of three mice. The standard deviations (SD) were less than 0.12 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

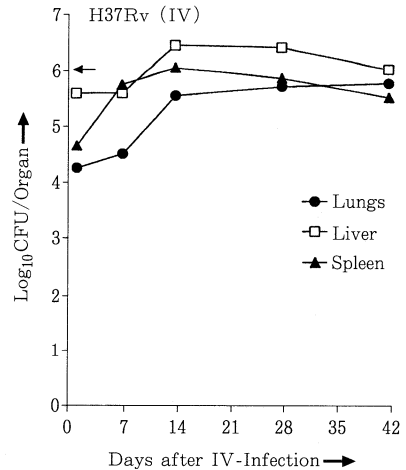


Fig. 3 Growth of *M. tuberculosis* H37Rv in the lungs, liver and spleen following infection (1.0×10^6 cfu) of BALB/c mice through the intravenous route. Each point represents the average of three mice. The standard deviations (SD) were less than 0.12 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

または、(b) pentobarbital (Abott Lab.) を10倍希釈後、 $10 \mu\text{l}$ /マウス体重 g の割合で腹腔内投与、のいずれかにより行った。肺内への菌液注入時は、額帯鏡を用いてマウス口腔内を照射し、先端を斜めにカットしたポリエチレンチューブ (長さ25mm; SP37, 夏目製作所) を装着した 25番ゲージ 5/8 インチの注射針をマウス気管内に挿入。次いで、予め菌液0.1ml とその上層に0.1ml の空気を吸引した 1ml 容量のシリンジを 気管内に挿入した注射針に接続して、菌液を定量的に肺内に注入した。

臓器内菌数の測定：無菌的に摘出した肺、肝、脾を秤量後、ガラスホモジナイザー (岩城硝子) で臓器を摩砕し、冷却滅菌精製水で10倍希釈系列を作製した。各希釈系列を 2本の 1% 小川培地にそれぞれ0.1ml ずつ接種し、3~4週間37℃水平位置で培養後、各2本の培地の検出コロニーの平均値を基に臓器内総菌数を算出した。

結 果

実験 (1) IT モデルと IV モデルの生存日数の比較

M. bovis Ravenel 10^4 cfu 感染の IT と IV のマウス平均生存日数はそれぞれ 25.5 ± 1.6 , 74.5 ± 9.9 日、*M. tuberculosis* Kurono 10^5 cfu 感染の IT と IV ではそれぞれ 32.3 ± 4.4 , 60.1 ± 8.9 日で、Ravenel 株、

Kurono 株感染ともに IT が IV に比してより強力な感染であることを示した (Fig. 1)。

実験 (2) 同一菌数を感染させた IT と IV の抗酸菌臓器内分布

1) 結核菌感染

H37Rv 感染系：感染 1 日目、IT では接種菌の 1/10 以上を肺から検出し、肝・脾ではゼロ。7 日目から 28 日目まで感染菌は肺のみで増加傾向を維持し、肺内 cfu は終始 肝・脾と比較して 10^2 倍以上で推移した (Fig. 2)。IV では感染 1 日目、肝>脾>肺の順で接種菌を検出した。14 日目までは 肺、肝、脾ともに増加を示したが、それ以降は横這い傾向を示した (Fig. 3)。H37Rv 感染マウス 6 週後の肺-肝-脾の重量比は、非感染対照マウス対比で、IT 系 3.56 : 0.57 : 0.56 倍、IV 系 2.37 : 1.36 : 4.67 倍 (各 n=3) で、IT が IV に比べてより肺特異性の高い感染モデルであることを示した (Fig. 4)。

Kurono 感染系：IT 系は 20 日目に肺内菌数が 10^7 を超えて死亡した。検出菌量の肺>脾>肝の順位と臓器内菌数の経時的推移は H37Rv の IT 系と同様だった (Fig. 5)。IV 系の感染 1 日目、肝>脾>肺の順で接種菌を検出した。脾>肝の推移は H37Rv IV 系と同様だったが、肺のみは H37Rv IV 系と異なり、cfu は横這いに転ずることなく 20 日目の死亡まで増加が続いた

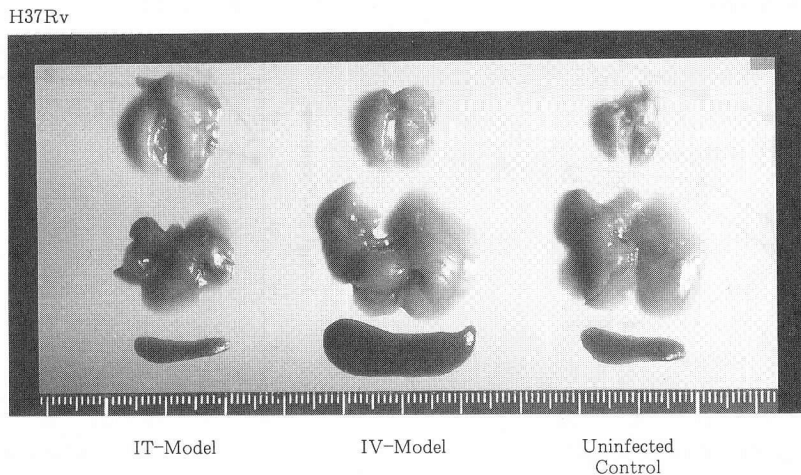


Fig. 4 Features of the lungs, liver and spleen of BALB/c mice 6 weeks post-infection with 10^6 cfu of *M. tuberculosis* H37Rv through the intratracheal and intravenous routes.

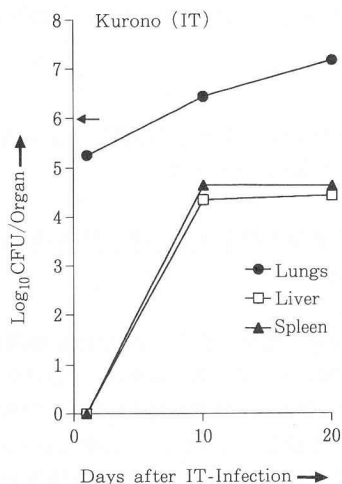


Fig. 5 Growth of *M. tuberculosis* Kurono in the lungs, liver and spleen following infection (1.0×10^6 cfu) of BALB/c mice through the intratracheal route. Each point represents the average of three mice. The standard deviations (SD) were less than 0.11 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

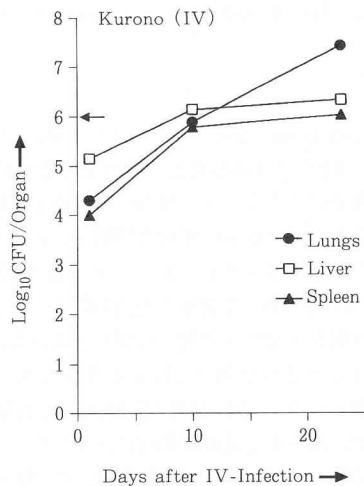


Fig. 6 Growth of *M. tuberculosis* Kurono in the lungs, liver and spleen following infection (1.0×10^6) of BALB/c mice through the intravenous route. Each point represents the average of three mice. The standard deviations (SD) were less than 0.11 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

(Fig. 6)。

IT 感染モデルでは感染菌株の毒力の違いに関わらず肺内 cfu が肝・脾の 10^2 倍以上で推移した (Fig. 2, Fig. 5)。IV モデルでは、肺内における菌の増殖過程は

毒力の異なる 2 株の結核菌で明らかな違いが認められた (Fig. 3, Fig. 6)²³⁾。

2) *M. intracellulare* 感染

N-256感染系 : IT では 1 日目に接種菌の約 50% を肺

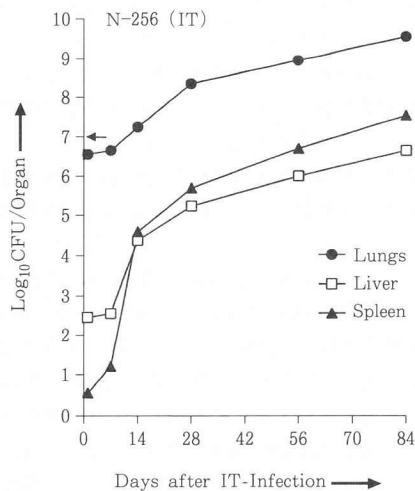


Fig. 7 Bacterial loads of *M. intracellulare* N-256 in the lungs, liver and spleen following infection (1.0×10^7 cfu) of BALB/c mice through the intratracheal route. Each point represents the average of three mice. The standard deviations (SD) were less than 0.15 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

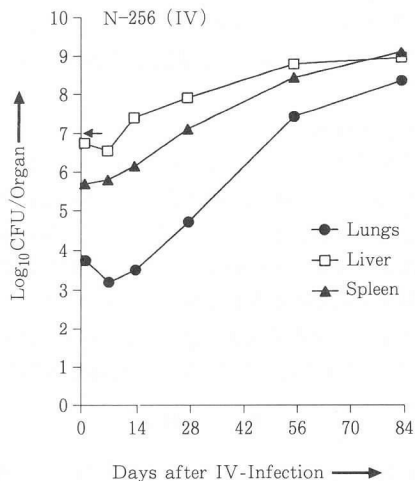


Fig. 8 Bacterial loads of *M. intracellulare* N-256 in the lungs, liver and spleen following infection (1.0×10^7 cfu) of BALB/c mice through the intravenous route. Each point represents the average of three mice. The standard deviations (SD) were less than 0.15 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

N-256

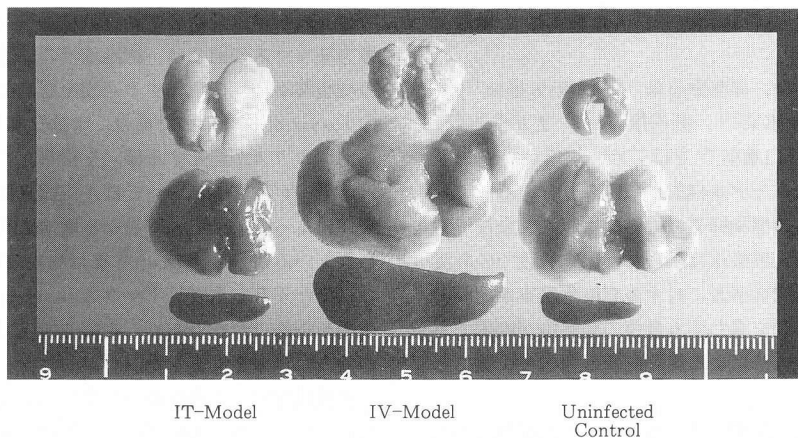


Fig. 9 Features of the lungs, liver and spleen of BALB/c mice 12 weeks post-infection with 10^7 cfu of *M. intracellulare* N-256 through the intratracheal and intravenous routes.

から検出し、肺内 cfu は12週目まで増加を示した。肝・脾では、1日目で肺と比較して $1/10^4$ と $1/10^6$ 、4週目で $1/10^3$ 、12週目で $1/10^2$ 程度の差で臓器内 cfu が推移した (Fig. 7)。IV では1日目に接種菌の80%以上を肝

から検出し、脾では接種菌量の $1/10$ 、肺では $1/10^3$ 以下の cfu を検出した。IV の肺内菌数は1~8週まで急速な増殖傾向を示すが、12週目に至っても脾・肝内菌数の $1/10$ 程度に留まった (Fig. 8)。N-256感染12週後の

マウス肺-肝-脾の重量比は、非感染対照マウスとの対比でIT系 3.60:0.83:1.63倍、IV系 2.09:1.67:9.2倍で(各 n=3)、IVの肝・脾の肥大が顕著だった(Fig. 9)。

3) 病理学的検索

結核菌感染モデルと *M. intracellulare* N-256 感染モデルの肺、脾、肝組織に対する Ziehl-Neelsen 染色、抗 BCG 抗体染色、Hematoxylin-Eosin 染色を用いた経時的な顕微鏡下の観察では、IT・IV間の比較において、臓器内菌量の差異を反映して病変の程度には顕著な差があるが、細胞構成など質的な面では差が認められなかった。(病理学的検索については別報で報告の予定。)

考 察

実験動物として用いられている齧歯類の中で、肺感染後に類上皮細胞肉芽腫形成から乾酪病巣形成、ついで乾酪壊死を経て空洞形成に至る、ヒト類似の肺病変を形成する代表的な動物はウサギである⁶⁾。しかし、多数の動物を必要とする治療実験の目的には均一な遺伝形質を持つ近交系マウスが最も現実的な選択肢となる。抗酸菌感染モデルマウスとしては、BALB/c、C57B1/6等の感受性系統マウス、C3H/Heに代表される感染抵抗性系統マウスがよく知られている⁷⁾。近年では後天性免疫不全症候群における全身播種型のヒト *M. avium-intracellulare* complex (MAC) 感染症に近い病変が得られる系統として beige マウスを使用する報告も増えている⁸⁾⁹⁾。

感染経路としては、尾静脈感染¹⁰⁾¹¹⁾、吸入感染¹²⁾、点鼻感染¹³⁾、足蹠感染¹⁴⁾、脳内接種¹⁵⁾、皮下感染¹⁶⁾、腹腔内感染¹⁷⁾、経口感染¹⁸⁾をはじめ、従来からさまざまな感染経路によるモデル作成が試みられている。この中でヒトでの自然の感染経過に近いのは吸入感染法であろう。しかし、吸入感染法は限られた研究施設でのみ実施可能であり、研究従事者に対する感染危険率が高いこと、治療実験の必要を満たす大量菌の肺感染が困難である理由から、この方法による実験成績の報告も少数にとどまっている¹⁹⁾。

この吸入感染法に比較して本報告で示した経気道感染の方法を用いる長所は、(a) P3 レベルのバイオハザード設備さえあれば特殊な機器を必要とせずに簡単な器具を用いて肺特異性の高い感染モデルを容易に作成できる。(b) 感染菌量、注入する液量とも自由に設定できるので、急性感染モデルから微量菌感染モデルまで作成可能である。(c) 菌液をシリンジからマウス肺内に直接注入するため感染菌が周囲にエアロゾルとなって飛散することがなく安全性が高いという点が挙げられる。欠点としては、(i) 麻酔の条件が厳密で、マウスの体重を1匹毎に測定

し必要量の麻酔薬を正確に投与する必要があること、(ii) 気管内に注射針を装着したポリエチレンチューブを的確に挿入するために一定の熟練を要すること、(iii) IVよりも操作手順が多いため、1日で感染可能なマウスの数が限られる、という点が挙げられる。

感染経路の異なるモデル系では *in vivo* における感染菌の臓器内分布が異なることは、これまでも報告例がある^{20)~23)}。

今回は Ravenel 株と Kurono 株を用いて IT と IV モデルマウスの生存日数を示したが、H37Rv 株の 10^5 cfu を同様に比較した結果は、IT、IVともに上述の2菌株対比ではるかに長い生存日数(>24週)を示し、Fig.1の右方に位置するため省略した。IV感染モデルマウスの生存日数で結核菌株の毒力(virulence)を比較したDunnらの報告²⁴⁾によると、Ravenel株の毒力が最も強く、次いで *M. tuberculosis* Erdman 株、H37Rv 株の順位であった。本報告では強毒ヒト型結核菌として Kurono 株を用い、Ravenel 株の感染菌量も、IT系とIV系との差が明確になる 10^4 cfu という比較的少ない菌量で実施した結果を示したが、IT系の菌株間の毒力の順位はDunnらのIVの結果と同様であった。また、Ravenel株 10^5 cfu IV感染マウスの生存日数は27~34日で、IV感染系における菌株間の毒力の優劣順位(Ravenel>Kurono>H37Rv)もDunnらの報告と一致した。

Dunnらは、長期の生存日数を示すH37Rv等の結核菌感染マウスの肺では、組織球性の肺炎が慢性の繊維芽細胞性繊維症に変化する過程を認めたのに対し、強毒のRavenel株を用いた場合、十分な肺病変が形成される前にマウスが斃死する傾向を指摘している²⁴⁾。一般に感染モデル実験においては、供試菌は調製された培養条件によって *in vivo* で異なる増殖傾向を示すことが知られているが²⁰⁾、Ravenel株は感染前の培養条件の違いにほとんど左右されずマウス *in vivo* で強い毒力を示すやや特殊な菌株であり、本報告でもRavenel株はその強力な毒力を実証した。

各種臓器内での感染菌の分布については、ITモデル系については他に報告例がなく比較できないが、健常マウスに結核菌またはBCG株をIV感染させたCollinsら²¹⁾は、0 dayの肝臓・脾臓・肺内の感染菌の分布の比率が90:9:1だったことを報告しており、本報告のFig. 3, Fig. 6で示した結核菌のIV感染後1 dayの臓器内分布の比率とは異なっていたが、肝臓に最も多く菌が分布したことから、肺で検出した菌が1~5%だった点で類似した傾向を示した。また、SCIDマウスとCB-17マウスを用いたIV系でH37Rv, Erdman, H37Ra, BCG株の臓器内菌数の経時的推移を追跡したNorth

らの報告²⁵⁾と今回の実験(2)のIVモデルの結果を対照すると、Kurono株とErdman株との肺、肝、脾内cfu分布と経時的推移はまったく同一の傾向を示し、3臓器内におけるH37Rv株のcfu分布と経時的推移でもほとんど差が認められなかった。

Collins²⁰⁾、North²⁵⁾らは、結核菌株の毒力の違いは、マウス肺内における菌の増殖力の差として認められたことを示しているが、本報告でもH37Rv株とKurono株のIV感染マウスにおいて、両者の肺内cfuの経時的推移は明らかに異なった(Fig. 3, Fig. 6)。しかし、ITではこれら2菌株の肺内増殖の傾向に差は認められず、両菌株ともに吸入感染モデルの肺内cfuの増殖曲線²⁵⁾に類似した経時的推移を示した。

一方、beigeマウスと*M. avium* 101株を用いた系で、尾静脈感染、腹腔感染、経口感染、点鼻感染、肛門感染の5種類の感染系を比較対照したGangadharamらの報告²²⁾によると、感染1日目の接種菌の臓器内分布(肺-脾-肝-リンパ節)では、点鼻感染:3.4-0-0-0%、尾静脈感染:30.0-16.6-28.8-0%で、点鼻感染の結果が経気道感染の結果に比較的近似していたが、彼らの尾静脈感染の結果はN-256株を用いた本報告の結果とは明らかに異なった。これは感染菌株とマウスの系統の違いによるものと推定された。

病理学的検索でIT系とIV系に質的な差が認められなかったことについては、本報告で示した経気道感染モデルが、「化学療法剤の*in vivo*治療実験系」という目的に焦点を絞り、 $10^4 \sim 10^7$ cfu/マウスという大量の菌を感染させて両者を比較したためと推定される。 10^2 cfu以下の微量菌を感染させて肉芽腫形成過程を比較すれば、両モデル間の病理学的な相違が見出される可能性が高いと推定される。H37Rv株、Erdman株を用いて、吸入感染モデルとIVモデルを比較したNorthは、微量の吸入感染が大量のIV感染に勝る肺病変を惹起することを示している²³⁾。感染防御免疫を追究する目的には、このITモデルではなく、Northらが示した微量菌の吸入感染モデルがより適当であろう。

今回示したITモデルは、IVモデルとは明らかに異なる感染菌の臓器内分布を示し、いずれの抗酸菌株を用いても肺重点型の感染モデルが得られた。しかし、ITの方法で 10^2 cfu以下の微量菌感染モデルを作成する場合、少ない感染菌量と注入液量で4葉からなるマウスの肺に菌を均等に感染させることは、吸入感染の場合と同じく²⁶⁾、ほとんど不可能である。動物感染モデルは実験の目的によって使い分けるのは当然であり、このITモデルは「抗結核剤の効果の判定」や「抗酸菌の毒力の検定」などに優れたモデルであると考えられる。

なお、本報告の方法で3種類のリファマイシン誘導体の*in vivo*短期治療効果を検討した結果²⁷⁾を本誌に報告した。

ま と め

- (1) Ketamineとxylazineの組み合わせ、またはpentobarbital単用による簡易麻酔条件下、安全で定量的な気管内注入によるマウス経気道感染の方法・手技を開発した。
- (2) 結核菌の同一菌量を感染させたITとIVモデルにおけるマウス生存日数の比較では、ITはIVと比較して平均生存日数が短く、強い肺感染モデルであることを示した。
- (3) 抗酸菌3菌株を用いた感染菌の臓器内分布の比較では、ITモデル系はIVモデル系と異なり、いずれも「肺重点型の感染モデル系」であることを示した。

謝 辞

本研究は大阪市立大学医学部細菌学教室 矢野郁也教授の御指導のもとに行われた。矢野教授の終始変わらぬ御指導と御鞭撻に深甚な感謝を捧げます。

適切な助言を与えて下さった結核予防会結核研究所 故岩崎龍郎名誉所長、故豊原希一博士に感謝いたします。本研究の要旨は、第67、68、69回日本結核病学会総会で発表した。

文 献

- 1) Nightingale SD, Cameron DW, Gordin FM, et al.: Two controlled trials of rifabutin prophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. *N Engl J Med.* 1993; 329: 828-833.
- 2) Dautzenberg B, Castellani P, Pellegrin JL: Early bactericidal activity of rifabutin versus that of placebo in treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1722-1725.
- 3) Havlir DV, Dube MP, Sattler FR, et al.: Prophylaxis against disseminated *Mycobacterium avium* complex with weekly azithromycin, daily rifabutin, or both. *N Engl J Med.* 1996; 335: 392-398.
- 4) Youmans GP: Subsurface growth of virulent human tubercle bacilli in a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1944; 57: 122-125.

- 5) Green CG, Knight J, Precious S, et al.: Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Laboratory Animals*. 1981; 15: 163-170.
- 6) Converse PJ, Dannenberg AM, Estep JE, et al.: Cavity tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. *Infect Immun*. 1996; 64: 4776-4787.
- 7) Buschman E, Apt AS, Nickonenco BV, et al.: Genetic aspects of innate resistance and acquired immunity in inbred mice. *Springer Semin Immunopathol*. 1988; 10: 319-336.
- 8) Gangadharam PRJ, Perumal VK, Farhi DC, et al.: Beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease: optimal conditions for the host and parasite. *Tubercle*. 1989; 70: 257-271.
- 9) Gangadharam PRJ: Minireview, Beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1647-1654.
- 10) Grosset J, Truffot-Pernot Ch, Bismuth R, et al.: Recent results of chemotherapy in experimental tuberculosis of the mouse. *Bull IUAT*. 1983; 58: 90-96.
- 11) Dhillon J, Dickinson JM, Sole K, et al.: Preventive chemotherapy of tuberculosis in Cornell model mice with combinations of rifampin, isoniazid, and pyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 552-555.
- 12) Cooper AM, Callahan JE, Griffin JP, et al.: Old mice are able to control low-dose aerogenic infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995; 63: 3259-3265.
- 13) Saunders BM, Cheers C: Intranasal infection of beige mice with *Mycobacterium avium* complex: role of neutrophils and natural killer cells. *Infect Immun*. 1996; 64: 4236-4241.
- 14) Shepard CC: The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med*. 1960; 112: 445-454.
- 15) Steenken W, Wolinsky E, Pratt PC: Streptomycin and PAS in experimental tuberculosis of guinea pigs infected intracerebrally with virulent tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc*. 1951; 64: 87-101.
- 16) Carpenter CM, Stokinger HE, Suhrland LG, et al.: Chemotherapy of murine leprosy. *Am Rev Tuberc*. 1949; 60: 359-365.
- 17) Bunch-Christensen K, Ladeford A and Guld J: The virulence of some strains of BCG for golden hamsters. *Bull World Health Organ*. 1968; 39: 821-828.
- 18) Bermudez LE, Petrofsky M, Kolonoski P, et al.: An animal model of *Mycobacterium avium* complex disseminated infection after colonization of the intestinal tract. *J Infect Dis*. 1992; 165: 75-79.
- 19) Kelly BP, Furney SK, Jessen MT, et al.: Low-dose aerosol infection model for testing drugs for efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 2809-2812.
- 20) Collins FM and Smith MM: A comparative study of the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* measured in mice and guinea pigs. *Am Rev Respir Dis*. 1969; 110: 631-639.
- 21) Collins FM and Montalbino V: Relative immunogenicity of streptomycin-susceptible and -resistant strains of BCG. II. Effect of the route of inoculation on growth and immunogenicity. *Am Rev Respir Dis*. 1975; 111: 43-51.
- 22) Gangadharam PRJ, Perumal VK, Parikh K, et al.: Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium* complex infections by different routes of challenge. *Am Rev Respir Dis*. 1989; 139: 1098-1104.
- 23) North RJ: *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J Infect Dis*. 1995; 172: 1550-1553.
- 24) Dunn PL, North RJ: Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice.

- Infect Immun. 1995; 63: 3428-3437.
- 25) North RJ, Izzo AA: Mycobacterial virulence. Virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* have faster *in vivo* doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity. J Exp Med. 1993; 177: 1723-1733.
- 26) Barclay WR, Ribic E, Anacker R, et al.: Aerosol induced tuberculosis in subhuman primates. United States-Japan cooperative medical science program; Fourth Annual Tuberculosis Research Conference. NIH. 1969; paper No. II-3: 1-8.
- 27) 土井教生: 実験的マウス結核症に対する benzoxazinorifamycin KRM-1648 の *in vivo* 治療効果, (1) 経気道感染モデルと尾静脈感染モデルを用いた短期治療効果の検討. 結核. ; 1998; 73: 53-64.