

原 著

自動吸入暴露感染装置を用いた実験的結核モデル確立のための
最適条件とその応用例菅原 勇 山田 博之 大友 幸二 青木 俊明
水野 悟 宇田川 忠

(財)結核予防会結核研究所分子病理学科

OPTIMAL CONDITIONS FOR ESTABLISHMENT OF EXPERIMENTAL
TUBERCULOSIS MODEL USING AN AUTOMATED INHALATION
EXPOSURE APPARATUS AND ITS APPLICATION*Isamu SUGAWARA, Hiroyuki YAMADA, Koji OTOMO, Toshiaki AOKI,
Satoru MIZUNO, and Tadashi UDAGAWA*Department of Molecular Pathology, The Research Institute of Tuberculosis,
Japan Anti-tuberculosis Association

Animal (mouse and guinea pig) pulmonary tuberculosis models were established, using an automated inhalation exposure apparatus (Glas-Col Corp., USA, Model 099CA-4212). This apparatus includes four steps—preheating, nebulization, cloud decay and decontamination. The optimal conditions for *M. tuberculosis* H37Rv strain infection experiments were as follows: 10^{5-6} colony forming unit (cfu) tubercle bacilli; preheating for 15 min.; nebulization for 90 min.; cloud decay for 15 min. and decontamination for 5 min. When 10^4 cfu *M. tuberculosis* H37Rv strain were introduced into the lungs of interferon (IFN)-gamma knockout mice, using the inhalation exposure apparatus and were followed up for 9 months, the primitive cavitory lesions were observed. This apparatus was also useful for inhalation exposure experiments of guinea pigs. This apparatus can also be utilized for animal inhalation experiments of allergens.

Key words: Automated inhalation exposure apparatus, Guinea pig, Mouse, *M. tuberculosis*

キーワードズ: 自動吸入暴露感染装置, モルモット, マウス, 結核菌

緒 言

結核および非結核性抗酸菌症が, 細胞性免疫の低下と

共に多発する。エイズ, 新生児, 老人における結核および非結核性抗酸菌症で顕著である。特に, 非結核性抗酸菌症の治療は難しく, より良い薬剤の開発が望まれてい

*〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

*3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533
Japan.

(Received 9 Feb. 2000/Accepted 3 Apr. 2000)

る。従来、動物感染実験には、簡便性から、静脈注射が用いられてきた。結核は結核菌の吸入感染で引き起こされる慢性感染症であるので、結核の病態の詳細な把握、およびより良い抗結核剤の開発には、吸入感染系による再現性のある実験的結核モデルの確立が必須である。吸入感染系を用いた実験的結核症の論文は、Tableに示したように、少なからず存在するが^{1)~10)}、実験的結核モデルの確立に至る基礎的条件を検討した報告は、文献検索したかぎり、存在しない。われわれは、結核の成り立ちを、詳細に解析するため、実験的結核モデルの確立を試みた。感染実験に自動吸入暴露感染装置を導入して、80回以上の感染実験を行い、基礎条件を決定した。今回、自動吸入暴露感染装置を用いた際の基礎的感染条件と2, 3の応用実験例を示したい。この装置は感染実験に有用であるのみならず、様々のアレルギーを用いた

アレルギーの研究にも応用可能である。

実験材料および方法

1. 吸入暴露感染装置の概要

この装置 (Model 099CA-4212) は、アメリカ、インディアナ州 Glas-Col 社により製造された。Middlebrook が1952年にプロトタイプを作製した装置を、改良を加えて、自動制御可能にしたものである⁴⁾。Fig. 1にこの装置の全体像を、図示してある。この装置を運転するには、前もって、装置全体をプレヒートする。空気をコンプレッサ (ca. 5 l/min) で圧縮して、圧縮空気をベンチュリ管へ送り、ベンチュリ管に存在する結核菌を含む生理的食塩水を霧状粒子にする。この霧状粒子をヘパフィルター (0.3ミクロン) を通した空気で送り、ケージ内にいる動物を、収納してあるコンパートメント (チャ

Table Reports concerning experimental tuberculosis using inhalation exposure apparatuses

J. L. Blaisdell <i>et al.</i>	Am. Rev. Tuberc. 46 : 205-209, 1942.
M. B. Lurie	Am. Rev. Tuberc. 55 : 124-127, 1947.
G. Middlebrook	Proc. Soc. Exp. Biol. 80 : 105-110, 1952.
D. W. Smith <i>et al.</i>	J. Bacteriol. 91 : 718-724, 1966.
E. H. Wiegand <i>et al.</i>	Am. Rev. Resp. Dis. 102 : 422-429, 1970.
G. L. Truitt and G. B. Mackness	Am. Rev. Resp. Dis. 104 : 829-843, 1971.
D. N. McMurray <i>et al.</i>	Infect. Immun. 39 : 793-799, 1983.
岩井和郎, 他	昭和59年度環境庁委託業務報告書, p.27-31, 1984.
I. M. Orme	J. Immunol. 138 : 293-298, 1987.
R. A. Bartow <i>et al.</i>	Infect. Immun. 57 : 1374-1379, 1989.

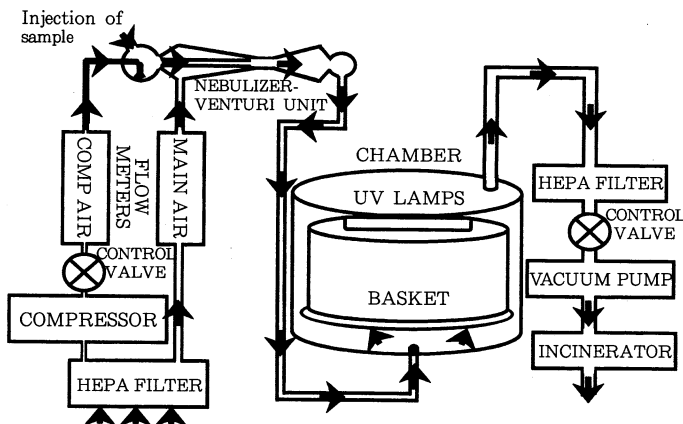


Fig. 1 Diagram of an inhalation exposure system (IES) apparatus

ンバーとも言う)へと導入する。コンパートメントには、全部で5ケージ(バスケットとも言う)あり、マウス125匹、モルモット10頭、ラット25匹が、1回の実験で使用できる。一定時間後、そのコンパートメントは霧状空気であらされ、その空気は、徐々に、真空ポンプで引いて(ca. 40 l/min)、焼却炉を通して部屋に出される。その後、ふたについている殺菌用UVランプが点灯して、動物に一定時間UV照射する。コンパートメントを通して出た汚染空気は、HEPAフィルターで濾過し、摂氏788度の焼却炉で焼かれるので、結核菌は生存できない。以上、この装置は4サイクルから成り、preheating(プレヒート)、nebulization(霧状化)、cloud decay(換気)、decontamination(殺菌)と称する。この吸入暴露感染装置は、P3レベルの実験が行われうる大部屋の隅に、小さな陰圧室(圧力:45Pa)の部屋を作り、前室と装置を設置する後室に二分した。感染実験終了後、前室で使い捨てのガウン(ホギー社製)、頭巾、面覆い、マスク(Moldex社製)、ブーツカバー、ゴム手袋を二重に身につけて、後室に入った。コンパートメント内にあるケージからマウスを取り出し、毛に結核菌が付着している可能性があるので、50倍に希釈した消毒剤(アノン、日産化学)で毛を拭いた。消毒したマウスをバイオハザード用のケージに移して、感染動物室(P3レベル)内で飼育した。マウスは週1回ケージを交換し、モルモットは週3回ケージを交換した。使用済みのケージは、速やかにオートクレーブした。この小部屋から出るときは、前室で、先ほどのガウン、頭巾、マスク、ブーツカバー、ゴム手袋、面覆いはずし、分別収集ごみ袋に収納して、オートクレーブを行った。

2. 結核菌の培養

結核菌株はH37Rv(ATCC 25618)を用い、ADCエンリッチメントを含むMiddlebrook 7H9 broth液体培地で37°C、4週間培養し集菌した。

3. 感染実験条件の検討

前述したサイクルのうち、霧状化するのに必要な時間を変えた。すなわち、30分、60分、90分の3段階を設定した。霧状化する液量(生理的食塩水)を、2.5、5、10mlの3段階に設定した。また、生理的食塩水に含まれる結核菌コロニー数を 10^4 から 10^8 コロニー形成単位(cfu)まで、5段階に分けて感染実験を行った。最適感染暴露条件を得る実験には、1ケージに20匹のBALB/c雌マウスとC57BL/6雌マウス(6週齢)を用いた。感染直後、感染肺を取り出し重さを測った後、肺をすりつぶして得たホモジネートを小川培地に植えて、4週間培養し、出現したコロニーを数えた。吸入暴露感染実験後7週で、マウスを解剖し、肺、脾、肝など主要な臓器の病変の程度を調べた。

4. 応用例1-マウス慢性感染実験

ガンマインターフェロン欠損マウス20匹(6週齢雌)をH37Rv 10^4 cfuで感染暴露させた。吸入暴露感染装置の操作条件は、プレヒート15分、霧状化90分、換気15分、殺菌5分であった。暴露後、感染実験室のバイオハザード用ケージに入れて飼育し、1年間経過、観察した。死亡直後、解剖し、肺、脾、肝、腎組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色、チール・ネールゼン染色を施行した。

5. 応用例2-モルモット慢性感染実験

Hartley雌モルモット(5週齢)25頭をH37Rv 10^6 cfuで吸入暴露感染実験を行った。4で述べたように、実験を行った。感染後1日から6カ月まで経過、観察し、適当な時点で解剖し、各種組織標本を作製した。右肺内の結核菌数は、感染暴露後、5日、1週、2週、3週、4週、5週、6週、12週、21週に肺重量を測定した後、肺をすりつぶして、その一定量を小川培地で4週間培養してコロニー(cfu)を求めた。

結 果

1. 吸入暴露感染装置を用いた実験条件の検討

霧状化するのに必要な時間を30、60、90分に設定して実験を行ったところ、いずれの時間でも肺に病変が認められた。ただし液量を5mlにしたときに、30分では約3ml、60分では約0.2mlベンチュリ管内に残存した。90分では完全に霧状化され、ベンチュリ管内に液量は残存しなかった。

霧状化する液量を2.5、5、10mlの3段階に設定したところ、完全に霧状化するのに、それぞれ35分、70分、4時間以上要した。2.5mlでは、マウスの体毛の湿りがわずか、5ml、10mlで適度な湿りが認められた。吸入暴露感染実験後7週で、出現した肺病変を評価したところ、2.5mlでは病変数のばらつきが見られたのに対し、5ml、10mlでは平均10ヶとマウス間にばらつきが見られなかった。

次に、5mlの液量にH37Rvを 10^4 から 10^8 cfu加えて、感染実験直後(day 0)のcfuを4週間、小川培地で培養後、測定した。Fig. 2で示したように、 10^4 cfuでは平均1 cfu、 10^6 では平均80 cfu、 10^8 では平均1,000 cfuが得られた。同時に、肺組織内での出現した病変の数を検討したところ、 10^4 では病変が見られず、 10^5 では平均6ヶ、 10^6 では平均10認められた。 10^7 以上では、大小様々の、多くの肉芽腫性病変が認められた。

以上の実験結果と感染暴露実験に要する時間を考慮して、至適実験条件を、プレヒート15分、霧状化90分、換気15分、殺菌5分とした。2以下の、慢性感染暴露実験は、この条件下で、施行された。

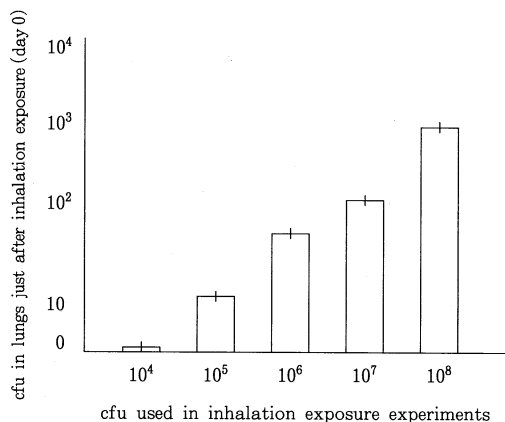


Fig. 2 Pulmonary cfu at day 0 in BALB/c mice infected with 10^4 - 10^8 cfu H37Rv strain using an inhalation exposure system (IES) apparatus

2. 応用例 1-マウス慢性感染実験

感染実験終了後、6カ月から徐々にマウスは死に至り、9カ月目で20匹全部が死亡した。病変の主座は肺であり、壊死性病変が顕著であった (Fig. 3a)。抗酸菌染色では、壊死部を囲むように帯状に分布していた (Fig. 3b)。壊死中心部にも、わずかながら結核菌が認められた。時間の経過と共に壊死巣を囲んで膠原線維の増生が顕著になり、アザン染色で帯状に青く染色され、9カ月目の肺病変でより一層明らかとなった。Fig. 3cに初期空洞病変が示されている。中心部は壊死であり、結核菌の増殖が顕著である。時期を遅れて、脾、肝にも多発性壊死病変が見られた。興味あることに、腎臓には病変は認められなかった。

3. 応用例 2-モルモット慢性感染実験

Fig. 4は吸入暴露感染実験後、一定の時点での肺、脾における結核菌 cfu の変化を示す。感染1週後から肺内結核菌は増殖し始め、以後増加傾向にあるが、4週後から少し減少傾向に転じ、21週で少し増加した。脾臓の結核菌は1週目で見られず、2週で増加傾向に転じた。以後増え続け、6週から減少した。

肉眼的には、小さな肉芽腫が白い小結節として感染後12日から認められ (Fig. 5a)、大きさは約1ミリメートルだった。以後様々の段階にある肉芽腫病変が認められた (Fig. 5b)。中心性壊死を伴う肉芽腫が、時間の経過とともに、認められた。感染後21週の肺には大きな肉芽腫が認められ膠原線維が増加してきたが、マウス慢性感染実験で見られた初期空洞病変は見られなかった。結核菌の増殖の顕著な時期 (3~6週) に対応して、脾に肉芽腫が認められた。肝臓のグリソン鞘に微小肉芽腫

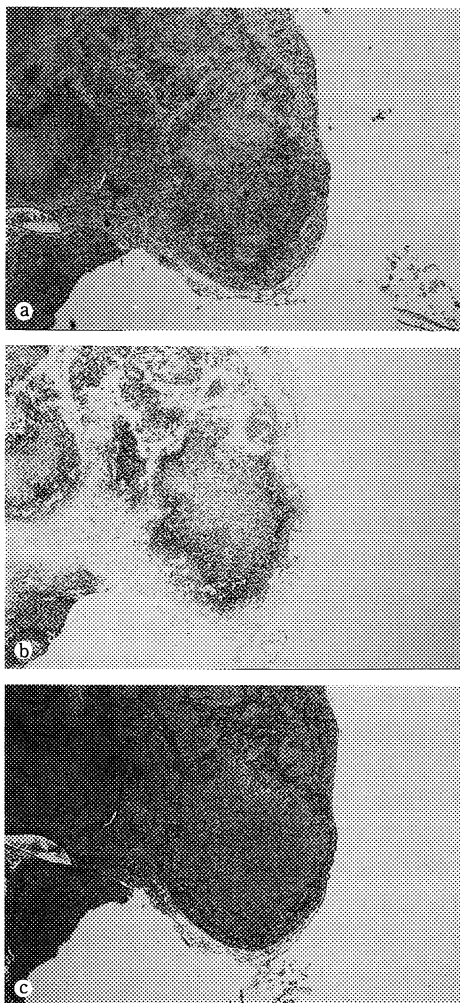


Fig. 3 Histopathology of the lung of interferon-gamma knockout mice infected with 10^4 cfu H37Rv strain using an IES apparatus

- (a) The right lung 8 months post-infection. X40. H&E stain. The necrotic tissue is surrounded by epithelioid macrophages and fibroblasts.
- (b) The same lesion stained with Ziehl-Neelsen stain. X40. The numerous tubercle bacilli are present in the necrotic lesion.
- (c) The same lesion surrounded by thick collagen fibers. X40. Azan stain.

が見られた。腎には結核病変は、見られなかった。

考 察

われわれは、自動吸入暴露感染装置を用いて、週1回

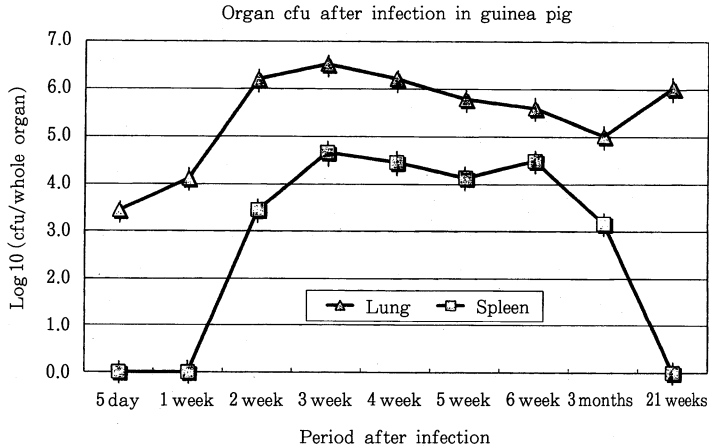


Fig. 4 Pulmonary and splenic cfu at an indicated time point post-infection with 10^6 cfu H37Rv strain using the IES apparatus

のペースで80回以上感染実験を行い、この装置の最適操作条件を、プレヒート15分、霧状化90分、換気15分、殺菌5分に設定した。用いた結核菌のコロニー数は、 10^6 cfuである。この条件で感染実験を行うと、感染直後、肺に結核菌が day 0 で、約200 cfu 存在すると推定された。この装置は、世界で使われているのものにもかかわらず、至適操作条件が記載された報告がない。これが、われわれが、種々実験条件を変えて、実験を施行した理由である。この感染条件では、全肺野に、ほぼ均等に白い小結節が出現し、上葉に、病変が集中することはなかった。今回、基礎条件の検討に、免疫系の正常な BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを使用した。H37Rv 10^5 cfu を吸入暴露させると、Day 0 では10ヶの結核菌が肺内存在したことになる。このような少数の結核菌でも、7週後に肺内に肉芽腫性病変を誘導できた。消化管免疫と違って、気道免疫は不完全な免疫系しか持たないのかもしれない。また肺胞マクロファージは、それほど強力な殺結核菌機構を持たない可能性がある。今後の興味ある研究テーマである。肺のコロニー形成単位 (cfu) の経時的变化を追究したところ、マウス、モルモットで、一定のなめらかな曲線が得られたのに対して、マウスの尾静脈注射で行われた感染実験では、得られた cfu のばらつきが多く、なめらかな曲線が得られないのと好対照をなした。従って、この装置を用いた感染実験は、定量性に優れていると考えられる。

われわれの使用した自動吸入暴露感染装置の原型は、1952年、Middlebrook により考案され、以後改良されてきたものである³⁾。原型との主要な相違点は、原型が殺菌装置として、濾過装置を利用しているのに対して、

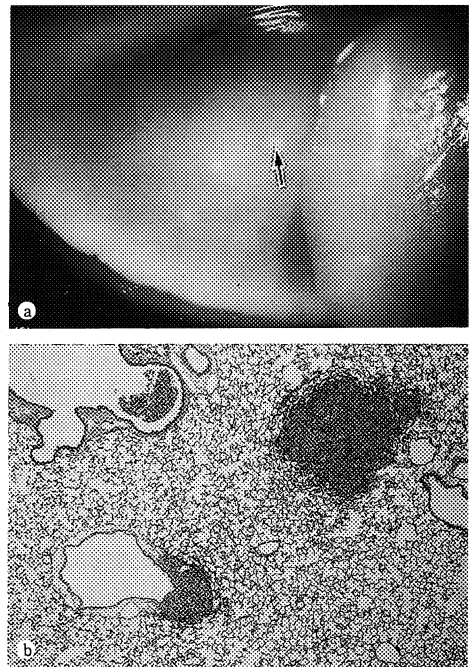


Fig. 5 Lung pathology of the infected guinea pig using the IES apparatus

- (a) Macroscopical finding of the right lung 12 days post-infection. Whitish nodules (→) are recognized.
- (b) Histopathology of the right lung 21 days post-infection. X40. H&E stain. Mature and immature granulomas are recognized.

本装置は、汚染空気をヘパフィルターで濾過した後、焼却炉で結核菌を燃やすことである。環境衛生上、本装置の方が優れている。1952年以前にも吸入暴露感染装置が考案されているが¹⁾²⁾、経鼻式、経気管式があり、原理が非常に原始的で、実験者が、感染する危険性が大き、労働衛生上問題がある。

本装置を用いてマウス長期感染実験を施行したところ、肺、脾に初期空洞病変に類似した病変を認めた。Dannenbergは、マウスで結核性空洞病変を誘導できないと報告しているが¹¹⁾、われわれの作製した結核病変は、厚い膠原線維に包まれ、中心部は壊死からなり、しかも多数の結核菌を認める点で、初期空洞病変としてよいと考える。もちろん、ヒト結核の空洞病変ほど著明ではない。しかし、マウスで空洞病変を作るには、正常マウスを用いても作れず、ガンマインターフェロン欠損マウスを用い、結核菌数をできるだけ少なくする必要がある。われわれは、以前に、強毒結核菌株をガンマインターフェロン欠損マウスに投与すると、多発性壊死組織を肺、脾、肝に誘導して死ぬが、弱毒BCG Pasteur株では典型的肉芽腫が誘導され、しかもこれらのマウスは死なないことを報告した¹²⁾。現在、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)欠損マウスで、空洞病変が作製できるか否か実験中である¹³⁾。

従来、結核菌感染実験には、施行が容易なことから、静注が用いられてきた。結核は、慢性経気道感染症であるので、経気管的に、少ない結核菌数で再現性のある結核病変が誘導できる動物モデルが望まれている。本装置を使用することにより、確実に結核病変が誘導できる。われわれの、動物モデルは、慢性感染症である結核治療の新規な薬剤開発に役立つだろう。本装置の結核感染実験以外の応用例を列記する。アレルゲンを吸入暴露して動物に、気管支喘息動物モデルを作製できる可能性がある。最近、サルコイドーシスの病因に *Propionibacterium acnes* が関与していると言われている。この *P. acnes* を吸入暴露させて肺に肉芽腫病変を誘導できるかに関する実験にも応用できるだろう。

われわれの確立した自動吸入暴露感染装置による動物結核モデル実験は、バイオハザードを十分考慮して、施行されている。類似した感染系を作って研究しようとしている研究者に、実験の見学を歓迎する。

謝 辞

本報告に、使用した装置を結核研究所に、導入するに当たり、装置に関する情報を提供していただいたコロラド州立大学微生物・免疫学教室 Ian Orme 教授に謝意を表す。この研究の一部は、厚生省国際共同研究費(主任研究者：菅原 勇)により遂行された。

文 献

- 1) Blaisdell JL, Hambleton A: A device for infecting animals by inhalation. *Am Rev Tuberc.* 1942; 46: 205-209.
- 2) Lurie MB: Experimental air-borne tuberculosis and its control. *Am Rev Tuberc.* 1947; 55: 124-127.
- 3) Middlebrook G: An apparatus for airborne infection of mice. *Proc Soc Exp Biol.* 1952; 80: 105-110.
- 4) Smith DW, Wiegshaus E, Navalkar R, et al.: Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. I. Preliminary studies in BCG-vaccinated and nonvaccinated animals. *J Bacteriol.* 1966; 91: 718-724.
- 5) Wiegshaus EH, McMurray DN, Grover AA, et al.: Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. III. Relevance of microbial enumeration to acquired resistance in guinea pigs. *Am Rev Resp Dis.* 1970; 102: 422-429.
- 6) Truitt GL, Mackaness GB: Cell-mediated resistance to aerogenic infection of the lung. *Am Rev Resp Dis.* 1971; 104: 829-843.
- 7) 岩井和郎, 宇田川忠, 高家久子: ディーゼル排出ガス暴露が実験結核症に及ぼす影響。昭和59年度環境庁委託業務報告書。1984, 27-31.
- 8) McMurray DN, Carlomango MA, Cumberland PA, et al.: Respiratory infection with attenuated *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in malnourished guinea pigs. *Infect Immun.* 1983; 39: 793-799.
- 9) Orme IM: The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1987; 138: 293-298.
- 10) Bartow RA, McMurray DN: Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG affects the distribution of Fc receptor-bearing T lymphocytes in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 1989; 57: 1374-1379.
- 11) Dannenberg AM: Pathophysiology: Basic aspects. In: *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections* (ed. Schlossberg D), Saunders, New York, 1999, 17-28.
- 12) Sugawara I, Yamada H, Kazumi Y, et al.:

Granulomas in interferon gamma gene-disrupted mice are inducible by avirulent *Mycobacterium*, but not by virulent *Mycobacterium*. J Med Microbiol. 1998; 47: 871-877.

13) Kaneko H, Yamada H, Kazumi Y, et al.: The role of tumor necrosis factor-alpha in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in TNF-alpha deficient mice. Lab Invest. 1999; 79: 379-386.