

## Opportunistic pathogen と宿主防衛機能の関連について

実験的白血球減少症マウスにおける各菌種の易感染化と抗菌薬の治療効果について

川崎賢二・関口金雄・小川正俊

辻 明 良・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 49 年 7 月 30 日受付)

Opportunistic infection は通常非病原菌とされている弱毒菌によって抵抗の減弱した宿主におこる感染症である。opportunistic pathogenの多くはマウスに対しても菌力が弱いので、opportunistic infection の実験モデルを設定するにはマウスに何らかの処置を施すことが必要である。

opportunistic infection 実験モデル設定のため cyclophosphamide 処理により白血球減少症マウスを作製し、無処理対照マウスと比較しながら各菌種および菌株の菌力の変動をしらべた。すなわち感染菌に対するマウスの感受性を MLD の変動域によって検討し、さらに抗菌剤による治療の難易を ED<sub>50</sub> によって比較した。

マウス白血球数は正常値 5,000~6,500 cells/cmm であったが、cyclophosphamide 250 mg/kg 投与後 4 日目には 900 cells/cmm まで減少し、マウスの感染菌に対する感受性は cyclophosphamide 投与量にほぼ平行して上昇した。易感染化の程度は菌種により差異が認められ、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌の中では緑膿菌がもっとも著明であった。

宿主の防衛機能の低下は化学療法効果にも反映し、大腸菌感染における経口ペニシリン、Ampicillin, Bacampicillin, Amoxicillin, 緑膿菌感染に対する Carbenicillin, Gentamicin の ED<sub>50</sub> 値は 2~3 倍に上昇した。

以上の実験成績から、opportunistic pathogen とされているグラム陰性桿菌群は宿主の抵抗減弱時に感染し易くなること、および感染から発症に至った症例では化学療法が奏効し難いことが裏付けられた。

## はじめに

近年、opportunistic infection として、*Staphylococcus epidermidis*, 非病原性腸内細菌、および *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとするブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌などによる感染症が注目されている<sup>1)</sup>。これらの感染症では宿主の基礎疾患その他による生体防衛機能の低下のみられる場合が多く、またこれらの菌の多くが常用抗菌薬に対し耐性を示すため、治療には困難が伴う。

しかもこれらの菌種の実験動物に対する菌力は一般に弱く、実験感染系の設定が困難であるため、chemotherapy の基礎的解析は未だ充分にはなされていない。

今回このような特殊病態モデルでの chemotherapy の解析の方法として、cyclophosphamide 処理により実験的白血球減少症を惹起したマウスを使用する感染系を設定し、無処理対照マウスと比較しながら各菌種菌株の菌力への感受性の変化、および抗菌剤による治療効果の変動について検討した<sup>2-6)</sup>。

## 実験材料および実験方法

## 1. 使用菌株

感染実験に供した菌種は、*Staphylococcus aureus* 2 株、*Escherichia coli* 3 株、*Serratia marcescens* 2 株、*Pseudomonas aeruginosa* 5 株、*Pseudomonas cepacia* 5 株、*Pseudomonas maltophilia* 5 株、*Acinetobacter calcoaceticus* 5 株、*Achromobacter xylosoxidans* 5 株、*Alcaligenes faecalis* 5 株、*Flavobacterium meningosepticum* 5 株であり、感染治療実験には *E. coli* C-11 株および *P. aeruginosa* NC-5 株を用いた。

## 2. 実験動物

ICR-JCL マウス、4 週令雄、体重 20~22g のものを、血液学および臨床化学的検査には 1 群 10 匹、感染実験には 1 群 6 匹、感染治療実験には 1 群 10 匹として使用した。

## 3. 使用薬剤

マウス実験的白血球減少症は cyclophosphamide (塩

野義製薬) を生理食塩水に溶解し、各種濃度の 0.5 ml をマウス腹腔内へ投与して惹起させた。

マウス感染治療実験に用いた抗菌剤は、ampicillin(万有製薬), bacampicillin(台糖ファイザー), amoxicillin(藤沢薬品), gentamicin(Schering), carbenicillin(台糖ファイザー)である。経口 penicillin は 0.5% CMC 懸濁液として、GM, CBPC は滅菌生理食塩水に溶解し、4倍希釈系列を作製、その 0.2 ml をマウスに投与した。

#### 4. 血液学および臨床化学的検査

cyclophosphamide 投与前、および投与後1時間、2日、4日、6日、8日の各時期にマウスをエーテル麻酔し、ヘパリン処理注射器にて心臓から全採血した。この血液を用いて、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値および血液像をしらべた。

残りの血液は遠心分離し、各採血時期の血漿を1検体にプールし、日立 500 型自動分析機により臨床化学的検査を行った。

#### 5. マウス感染および感染治療実験

マウスの実験感染は、普通寒天斜面での連日継代新鮮培養菌を滅菌生理食塩水、または5% ムチン液に浮遊させ、その 0.5 ml をマウス腹腔内へ接種した。

MLD 値の測定は、2倍希釈系列の菌液をマウスに接種し、1群全てのマウスを感染死させるに足る最低の菌量を測定して MLD 値とした。なお同様の実験を2度以上行い、MLD 値を確認した。

治療はマウスに感染菌接種後1時間に行い、観察は実験後10日目までとし、マウスの生残率から LITCHFIELD-WILCOXON 法にて ED<sub>50</sub> 値を算出した。

#### 実験成績

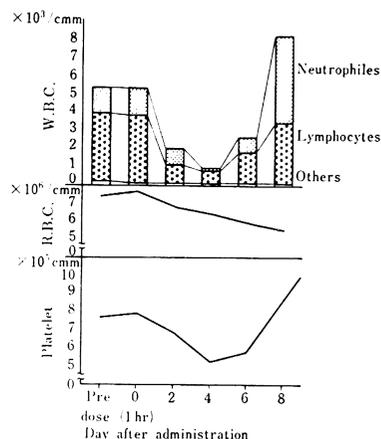
##### 1. cyclophosphamide 処理によるマウスの経時的変化

###### 1) 血液の変化

cyclophosphamide 250 mg/kg をマウス腹腔内へ投与し、経時的にマウス血液学的検査を行った成績を Fig. 1 および Table 1, 2 に示した。

白血球では好中球、リンパ球ともに減少し、投与前

Fig. 1 Differential blood cell count in mice after intraperitoneal administration of cyclophosphamide 250 mg/kg



5,000~6,500 cells/cmm であったものが、cyclophosphamide 250 mg/kg 投与後4日目には 900 cells/cmm となり、それ以降は回復へ向かった。

投与後8日目には、好中球は投与前値を上回り、とくに桿状核白血球の増加が著明であった。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値は投与2日目以降に軽度減少し、投与後8日目まで完全な回復はみられなかった。血小板数は投与後4日目にわずかに減少し、それ以後急速に回復、8日目には投与前の値を上回った。

血液像では、投与4日目以降、赤血球の多染性および大小不同、骨髓球の増加が著明に観察された。

血液学的検査と同時に臨床化学的検査も合わせて行ったが、Table 3 に示すとおり、ALP, GOT, GPT, 総ビリルビン量、総プロテイン量、アルブミン量、グロブリン量、A/G比、および総コレステロール値に大きな変動はみられなかった。

###### 2) 感染菌に対する感受性の変化

Fig. 2 に cyclophosphamide 250 mg/kg 投与後のマ

Table 1 Change on hematological values in mice after a single intraperitoneal administration of cyclophosphamide 250 mg/kg

	Pre Dose	1 hr	2 days	4 days	6 days	8 days
R. B. C., $\times 10^4$ /cmm	732.5 $\pm$ 21.2	756.4 $\pm$ 14.3	680.6 $\pm$ 18.1	636.8 $\pm$ 13.1 <sup>2+</sup>	591.0 $\pm$ 6.2 <sup>3+</sup>	554.5 $\pm$ 12.3 <sup>3+</sup>
W. B. C., $\times 10^2$ /cmm	52.8 $\pm$ 4.3	52.7 $\pm$ 3.3	20.0 $\pm$ 1.4 <sup>3+</sup>	9.2 $\pm$ 1.1 <sup>3+</sup>	25.8 $\pm$ 3.3 <sup>3+</sup>	81.9 $\pm$ 11.0 <sup>+</sup>
Platelet, $\times 10^4$ /cmm	76.6 $\pm$ 6.8	78.6 $\pm$ 3.4	69.2 $\pm$ 4.6	53.0 $\pm$ 3.7 <sup>2+</sup>	58.0 $\pm$ 4.3 <sup>+</sup>	100.6 $\pm$ 4.9 <sup>+</sup>
Hemoglobin, g/100 ml	13.1 $\pm$ 0.4	13.5 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.3	11.5 $\pm$ 0.2 <sup>+</sup>	9.6 $\pm$ 0.3 <sup>3+</sup>	9.7 $\pm$ 0.2 <sup>3+</sup>
Hematocrit, ml/100 ml	42.7 $\pm$ 1.1	44.7 $\pm$ 0.5	39.8 $\pm$ 0.7 <sup>+</sup>	36.0 $\pm$ 0.4 <sup>3+</sup>	30.9 $\pm$ 0.9 <sup>3+</sup>	32.2 $\pm$ 0.8 <sup>3+</sup>

Values are the means and standard errors of 10 mice.

+, 2+ and 3+ indicate significant levels of 5, 1 and 0.1% respectively.

Table 2 Differential white cell count in mice after a single intraperitoneal administration of cyclophosphamide 250 mg/kg

	Pre Dose	1 hr	2 days	4 days	6 days	8 days
Differential white cell count, percent						
Neutrophiles						
Stab cells	2.6(1~6)	8.0(1~20)	2.5(1~6)	2.1(0~10)	11.3(1~19)	10.4(4~16)
Segmentocytes	23.8(10~47)	19.7(9~32)	40.5(24~50)	11.2(1~30)	18.4(4~40)	47.2(24~70)
Lymphocytes	70.4(40~83)	71.3(53~88)	56.3(47~72)	83.2(60~90)	64.5(42~92)	40.7(21~67)
Monocytes	2.4(0~7)	0.7(0~3)	1.8(1~4)	3.5(0~5)	5.8(0~15)	1.7(0~3)
Eosinophiles	0.5(0~1)	0.3(0~2)	0.3(0~3)	0	0	0
Basophiles	0	0	0	0	0	0
Differential white cell counts/cmm						
Neutrophiles						
Stab cells	1,373	4,216	500	193	2,915	8,518
Segmentocytes	12,566	10,832	8,100	1,030	4,747	38,657
Lymphocytes	37,171	37,575	11,260	7,654	16,641	33,333
Monocytes	1,267	369	360	322	1,497	1,392
Eosinophiles	264	158	60	0	0	0
Basophiles	0	0	0	0	0	0

Values are the mean of 10 mice.

Figures in parenthesis indicate the range of data.

Table 3 Change on chemical values in serum of mice after a single intraperitoneal administration of cyclophosphamide 250 mg/kg

	Pre Dose	1 hr	2 days	4 days	6 days	8 days
Blood glucose, mg/kg	117.0	105.5	104.5	120.5	132.0	110.5
B. U. N., mg/kg	33.1	35.4	50.2	47.1	38.5	36.3
Alkaline phosphatase, K. A. units	12.6	12.3	8.7	9.3	8.7	7.7
GOT, Karmen units	81.5	127.0	76.0	69.5	73.5	81.5
GPT, Karmen units	28.0	68.0	26.0	29.0	28.5	36.0
Total bilirubin, mg/100 ml	0.5	0.8	0.5	0.4	0.4	0.5
Total protein, g/100 ml	5.3	5.3	5.3	5.2	5.2	5.3
Albumin, g/100 ml	3.7	3.6	3.7	3.7	3.8	3.8
Globulin, g/100 ml	1.6	1.8	1.6	1.5	1.4	1.6
A/G	2.3	2.0	2.4	2.6	2.7	2.4
Total chlesterol, mg/100 ml	139.0	136.5	164.0	125.5	114.0	123.0

Values are the means of 10 mice.

Five individual samples were pooled and analyzed.

ウス白血球数の変化と、各々の時点でのマウスに対する *P. aeruginosa* NC-5 の菌力を MLD 値で示した成績とを併記した。*P. aeruginosa* NC-5 をムチン添加でマウス腹腔内へ接種した場合、対照の無処理マウス群では MLD 値は  $3.0 \times 10^5$  cells/mouse であったが、cyclophosphamide 処理群では投与後日数により種々の程度に易感化がみられ、投与後 4 日目のマウス群での MLD 値は 10 cells/mouse 以下であった。投与後 8 日目のマウスの白血球数は正常値に回復しているにもかかわらず、MLD 値は無処理マウス群でのそれより小さく、1.0

$\times 10^4$  cells/mouse を示しており、処理群マウスは白血球減少の他にも何らかの障害を受けていることが考えられる<sup>7)</sup>。

3) cyclophosphamide 投与量によるマウスの変化  
cyclophosphamide 投与量と、投与後 4 日目のマウス白血球数およびマウスに対する *P. aeruginosa* NC-5 の MLD 値との関係を Fig. 3 に示した。白血球数の減少と MLD 値の低下がほぼ平行している。いずれも cyclophosphamide 125~250 mg/kg 投与で最低値を示した。投与量が 250 mg/kg を越えると死亡例が観察され、実

Fig. 2 Change on number of WBC and sensitivity of mice after treatment of cyclophosphamide

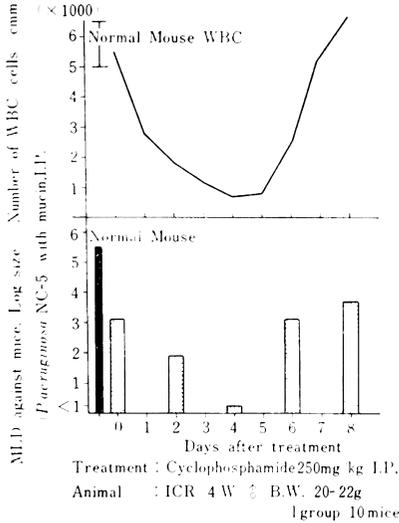


Fig. 4 Change of body weight of mice after treatment of cyclophosphamide

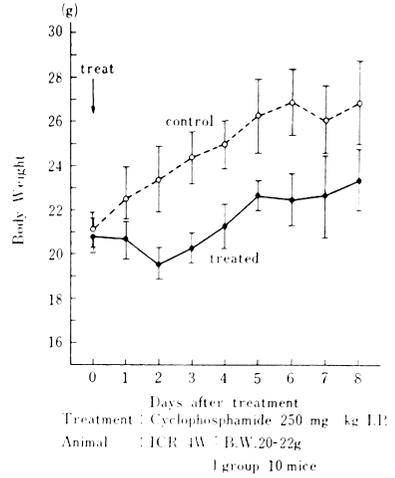


Fig. 3 Change on number of WBC and sensitivity of mice by dose of cyclophosphamide

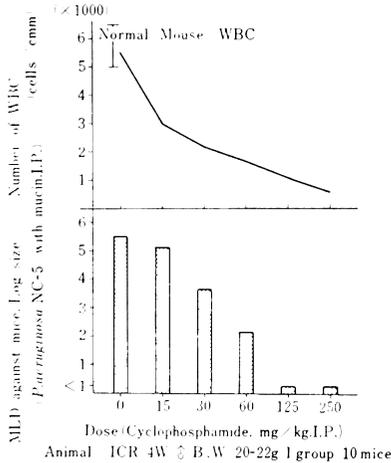


Fig. 5 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *S. aureus*, *E. coli* and *S. marcescens*

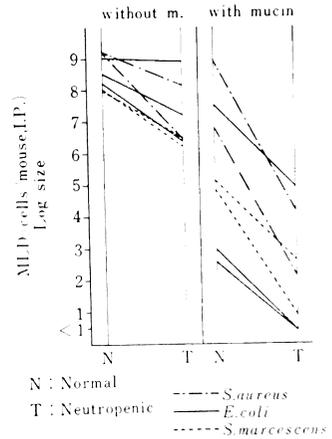


Fig. 5は *S. aureus* 2株, *E. coli* 3株, *S. marcescens* 2株を腹腔内感染させた場合の成績を示す。

*S. aureus* ではムチン無添加の感染で10~100倍の易感染化がみられ、ムチン添加ではさらに著明で約10,000倍であった。

*E. coli* ではムチン無添加の感染での易感染化は100倍以内であったが、ムチン添加では100倍以上であり、ムチン無添加でほとんど易感染化のみみられない *E. coli* NIHJ-JC 2株でも1,000倍の易感染化がみられた。

*S. marcescens* ではムチン無添加で約50倍、ムチン添加で500~5,000倍の易感染化がみられた。

Fig. 6は *P. aeruginosa* 5株の成績を示している。ム

験系として適当でない。

4) cyclophosphamide 処理マウスの体重の変化

Fig. 4は cyclophosphamide 250 mg/kg 処理群と無処理対照群の体重の変化をみたものである。体重は投与後2日目に対照群と比較し3~4g低値となり、以後飼育を続けても14日目までは完全な回復はみられなかった。

2. cyclophosphamide 処理マウスの各菌種に対する易感染化

以上の実験から cyclophosphamide の投与量は250 mg/kgとし、投与後4日目のマウスを感染実験に用いることとした。処理マウス群でみられる易感染化の比率は MLD 値の減少率を基準にして算出した。

Fig. 6 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *P. aeruginosa*

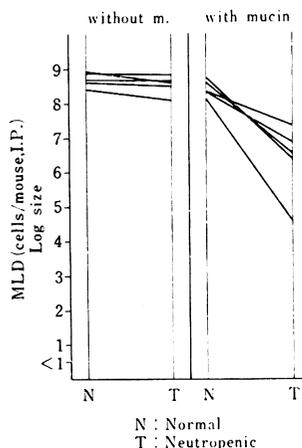
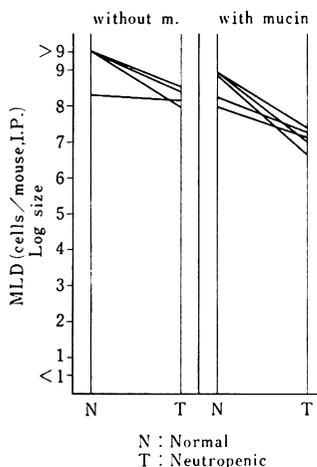


Fig. 7 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *P. cepacia*



チン無添加の感染では 2~100 倍、ムチン添加で 100 倍以上であり、100,000 倍以上の易感染化が観察される株もみられた。

Fig. 7 は *P. cepacia* 5 株で、本菌はマウスに対する菌がとくに弱く、ほとんどの株がムチン無添加では  $10^9$  cells 接種してもマウスを感染死させることができない。しかし cyclophosphamide 処理マウス群では  $10^8$  cells と低下した。ムチン添加での感染時の易感染化は 10~100 倍であった。

Fig. 8 は *P. maltophilia* 5 株での成績を示している。ムチン無添加の感染では cyclophosphamide 処理マウスにおける易感染化はほとんどみられない。しかしムチン添加の条件下では正常マウスより 100~10,000 倍の易感染化が観察された。

Fig. 8 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *P. maltophilia*

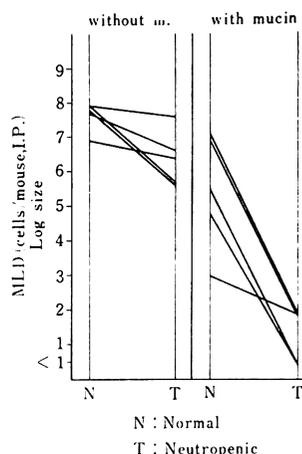


Fig. 9 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *A. calcoaceticus*

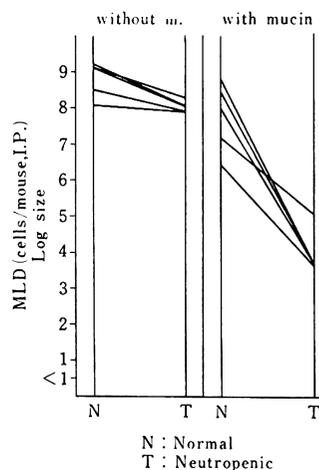


Fig. 9 は *A. calcoaceticus* 5 株での成績を示している。ムチン無添加では 10 倍以下の易感染化がみられる程度であるが、ムチン添加の感染では処理群マウスに 100~100,000 倍の易感染化が観察された。

Fig. 10 は *A. xylosoxidans* 5 株の成績で、*A. calcoaceticus* とほぼ同様の傾向を示している。

Fig. 11 は *A. faecalis* での成績で、易感染化の程度はムチン無添加の感染で 10 倍以下、ムチン添加で 10~100 倍であった。

Fig. 12 は *F. meningosepticum* で、この菌種もマウスに対しきわめて毒性が弱く、ムチン無添加では cyclophosphamide 処理マウスでも MLD 値は  $10^9$  cells/mouse 以上であり、ムチン添加の場合でも MLD 値は  $10^7$  cells/mouse 以上を示し、易感染化は 100 倍以下で

Fig. 10 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *A. xylosoxydans*

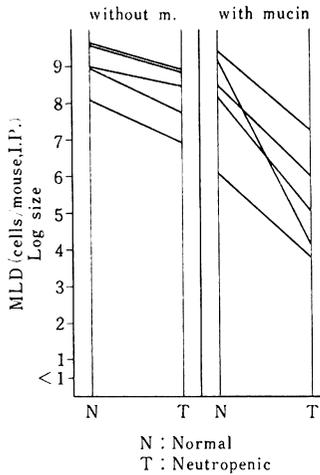


Fig. 12 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *F. meningosepticum*

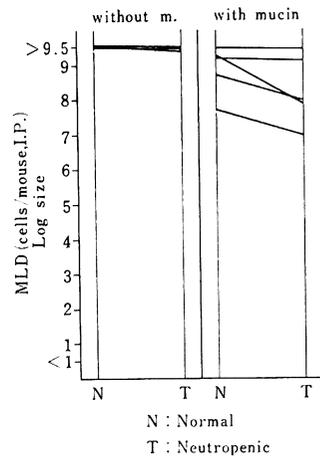


Fig. 11 Comparison of sensitivity between normal and neutropenic mice to *A. faecalis*

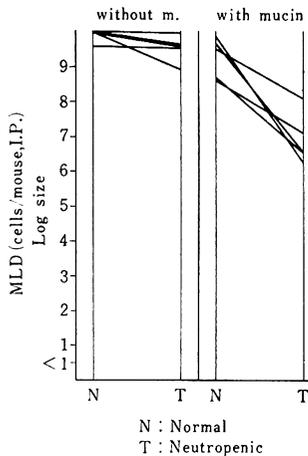
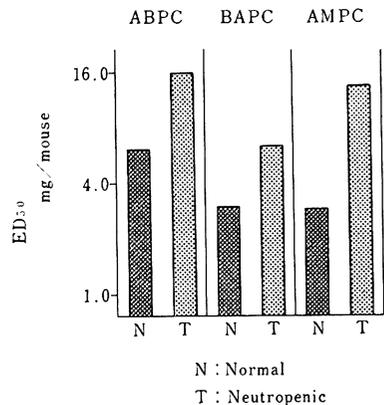


Fig. 13 Comparison of *in vivo* activity with neutropenic mice



challenge strain *E. coli* C-11  
challenge dose  $8.0 \times 10^8$ /mouse

あった。

3. 正常および cyclophosphamide 処理マウスでの感染治療実験

*E. coli* C-11 を正常および cyclophosphamide 処理マウス群に腹腔内接種し、感染 1 時間後に ampicillin, bacampicillin, amoxicillin を経口投与した。感染後 10 日目の生残率から算出した ED<sub>50</sub> 値を Fig. 13 に示した。3 薬剤ともに、cyclophosphamide 処理マウスでは治療効果は低下し、ED<sub>50</sub> 値は 2~3 倍に上昇している。

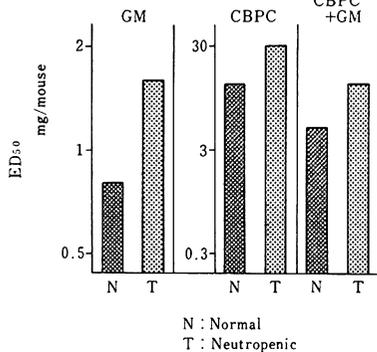
*P. aeruginosa* NC-5 を用い同様の実験を行い、carbenicillin, gentamicin で治療した成績を Fig. 14 に示した。処理マウスでは正常マウスに比し、gentamicin で 2 倍、carbenicillin で 3 倍の ED<sub>50</sub> 値が示されている。単独では全く治療効果のみられない gentamicin 0.2 mg

を carbenicillin 各 dose に併用したところ、著明な相乗効果が認められ、*P. aeruginosa* 感染に対する抗緑菌菌用 β-ラクタム系薬剤とアミノ配糖体系薬剤の併用の有効性が確認された<sup>9)</sup>。

考 察

正常なマウスでは感染を成立させるために大量の菌を接種せねばならない弱毒菌群も、cyclophosphamide により感染に対する防衛機能の 1 つである白血球数を異常に低下させた状態では感染の成立の易化が確認され、その傾向はムチン添加の感染でより著明であった。ムチンの生体内での挙動の詳細は明らかではないが、侵襲菌に対する白血球 phagocytosis をより困難にすることによ

Fig. 14 Comparison of *in vivo* activity with neutropenic mice



challenge strain *P. aeruginosa* NC-5  
challenge dose  $6.0 \times 10^5$ /mouse

Combination therapy: Mice were treated with 0.2 mg of GM and graded doses of CBPC at different sites.

り、生体の防衛機能の量的質的低下を増幅するものと推察される。

易感染化の程度には菌種による差がみられ、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌6菌種の中、*P. maltophilia*, *A. calcoaceticus*, *A. xylosoxidans* ではムチン添加の感染で100倍から100,000倍の易感染化がみられるのに比し、*P. cepacia*, *faecalis*, *F. meningosepticum* では100倍以下で、易感染化の強弱は、正常マウスに対する菌力、および臨床材料からの起炎菌としての検出頻度に対しかなりの相関性があるように思われる。

一方、cyclophosphamide 処理による抵抗性の減弱は化学療法剤治療効果にも反映し、マウス感染治療実験での各種抗菌剤の  $ED_{50}$  値は正常マウスでの値の2~3倍となり、临床上、とくに慢性消耗性疾患などにおける感染症では化学療法剤の効果は著しく低下することが予想

される。また今回の *in vivo* 実験で、緑膿菌感染に対する抗緑膿菌用  $\beta$ -ラクタム系薬剤とアミノ配糖体系薬剤の combination therapy の有効性が確認されたが、宿主防衛機能の完全な機能が期待し得ない場合の化学療法では、薬剤の殺菌力への依存がますます大きくなると思われ、薬剤の選択と同時により有効な combination therapy の検討が必要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 五島 達智子: 微生物生態と oppoortunistic infection. 防菌防黴 6: 31~42, 1978
- 2) SINGER, S. H.; M. FORD & R. L. KIRSCHSTEIN: Respiratory diseases in cyclophosphamide-treated mice. I. Increased virulence of *Mycoplasma pulmonis*. Infection & Immunity 5: 953~956, 1972.
- 3) 小林 謙, 橋 宣祥, 松本 勲, 影山健彦: 宮崎県高原地方における恙虫病リケッチアの性状、とくに感染マウスに対する cyclophosphamide の影響。ウイルス 22: 280, 1972
- 4) COZAD, G. C. & T. J. LINDSEY: Effect of cyclophosphamide on *Histoplasma capsulatum* infections in mice. Infection & Immunity 9: 261~265, 1974
- 5) HURD, J & R. B. HEATH: Effect of cyclophosphamide on infections in mice caused by virulent and avirulent strains of influenza virus. Infection & Immunity 11: 886~889, 1975
- 6) URANO, T. & K. MAEJIMA: Provocation of pseudomoniasis with cyclophosphamide in mice. Laboratory Animals 12: 159~161, 1978
- 7) PIERSON, C. L.; A. G. JOHNSON & I. FELLER: Effect of cyclophosphamide on the immune response to *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Infection & Immunity 14: 168~177, 1976
- 8) 中沢昭三, 大槻雅子, 野村知, 中尾雅文, 平井芳美, 吉岡啓志: 緑膿菌に対するアミノ配糖体抗生物質と合成ペニシリンの併用に関する基礎的研究。Chemotherapy 21: 1868, 1973

RELATIONSHIP BETWEEN OPPORTUNISTIC PATHOGEN AND  
PROTECTIVE FUNCTION OF THE HOST. ENHANCED  
SENSITIVITIES TO VARIOUS MICROORGANISMS OF  
EXPERIMENTALLY INDUCED LEUKOPENIC MICE  
AND THERAPEUTIC EFFECTS OF ANTIBIOTICS

KENJI KAWASAKI, KANEO SEKIGUCHI, MASATOSHI OGAWA,

AKIYOSHI TSUJI and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

Opportunistic infection is an infection occurring in the host whose protective function has been decreased with a low virulent microorganism regarded usually as a nonpathogen. Most opportunistic pathogens are so low in virulence to the mouse that some treatment must be given to it to establish an experimental model for opportunistic infection.

To establish an experimental model for opportunistic infection, leukopenia was induced by applying cyclophosphamide treatment to the mouse. Virulence of strains of various species to these mice was compared with that to nontreated control mice; sensitivities of mice to the infecting organisms were compared by MLD values and their variances and therapeutic effects of antibiotics by ED<sub>50</sub> values.

Leukocyte population of the mouse was normally 5,000~6,500 cells/cmm, which decreased to 900 cells/cmm in 4 days after administration of cyclophosphamide at a dose of 250 mg/kg. The sensitivities of the mouse to the infectious agent increased in parallel to the dose of cyclophosphamide.

The increased sensitivity differed depending upon the bacterial species; the sensitivity to *Pseudomonas aeruginosa* was the highest among glucose-nonfermenting gram-negative bacilli.

The effects of chemotherapy reflected the decreased protective function of the host. ED<sub>50</sub> values of peroral penicillin, ampicillin, bacampicillin, and amoxicillin in *Escherichia coli* infection and those of carbenicillin and gentamicin in *P. aeruginosa* infection increased by 2- to 3-fold.

The above results confirmed that the host with decreased protective function is vulnerable to infection with a group of gram-negative bacilli regarded as opportunistic pathogens, and that chemotherapy becomes less effective in such cases that developing symptoms from infection.