

*Pseudomonas aeruginosa* 性実験的マウス肺炎モデル I

## 感染条件の設定

福岡 義和・田井 賢・山城 芳子  
保田 隆・才川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和 55 年 4 月 14 日受付)

新たにマウスでの *Pseudomonas aeruginosa* 性肺炎モデル作製について検討を行ない、次の結果を得た。

被検菌の接種方法としてはガラスネブライザーによる噴霧気道感染方法が最も優れており、その際のガラスネブライザー中の被検菌液濃度とマウス肺内接種菌量とは相関した。

マウス肺内への菌の定着性を増大させるためには cyclophosphamide 腹腔内投与が有効であり、投与量は 250mg/kg が至適であった。被検菌の接種は cyclophosphamide 投与から 5 日後とした。この感染系ではマウス肺内被検菌の初期クリアランスがみられ、若干の変動はあるものの菌接種後 30~48 時間以内に全てのマウスは死亡した。

以上の実験系下では肺に炎症像が確認され、*P. aeruginosa* による肺炎と思われた。

## 緒 言

実験的肺炎モデルの作製については、マウスを用い *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, 等のグラム陰性菌を被検菌とした肺炎系が作製され<sup>1,2)</sup>、多くの知見が得られている。

近年臨床面において泌尿器科領域だけでなく、内科系においても *Pseudomonas aeruginosa* による感染が増加傾向にあり、難治性 *P. aeruginosa* 性肺炎が多数報告されている。しかしながら *P. aeruginosa* による実験的肺炎モデル作製については未だ殆んど検討されていない。

そこで臨床により近似した *P. aeruginosa* 性マウス実験的肺炎モデルを作製するために種々検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

## 材 料 と 方 法

## 1. 被検菌

臨床分離株 *Pseudomonas aeruginosa* S-51 を用いた。被検菌は Heart infusion agar (HIA) 平板で 37°C, 1 夜培養後、生理食塩水に懸濁していた。

## 2. 被検動物

4 週令の SLC/ICR 系雌マウスを 1 群 10 匹として用いた。

## 3. 菌感染方法

透明塩化ビニール製の耐圧容器中にマウスを入れ、ガラスネブライザー中の菌液を 1kg/cm<sup>2</sup> の圧力で 30 分間

噴霧し感染を行なった。

## 4. 免疫抑制剤投与方法

imuran (東京田辺製薬) は 100mg/kg を経口的に 4 日間連続投与し、翌日感染を行なった。cyclophosphamide (塩野義製薬) は、50, 100, 250mg/kg を各々腹腔内投与し、5 日後に感染を行なった。

## 5. 肺内生菌数の測定

マウスを脱血屠殺し、肺を無菌的に摘出後 5 ml の生理食塩水を加えて氷冷下ホモジナイズした。これを希釈後 HIA 平板上に 0.05ml 塗布し、37°C, 1 夜培養後生菌数を測定した。

## 6. 脾臓細胞数測定

マウスを脱血屠殺し、脾臓を摘出後 MEM 培地 (榮研) にて脾臓細胞を懸濁し、0.1% ゲンチアナバイオレット染色した細胞をトーマの血球計数盤を用い測定した。

## 7. 組織標本の作製

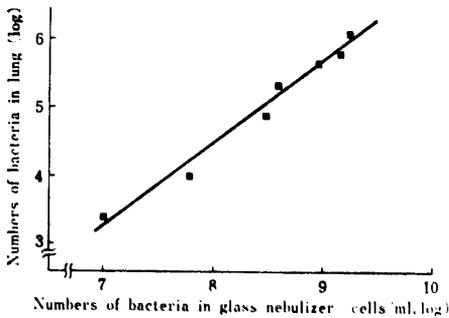
## a) 光学顕微鏡

マウスを脱血屠殺し、肺を摘出後常法に準じて 10% ホルマリンで固定し、ヘマトキシリンエオジン染色により標本を作製した。

## b) 透過型電子顕微鏡

上記同様、肺を摘出後 2% glutaraldehyde 溶液にて前固定を行ない、1% OsO<sub>4</sub> で本固定後、超薄切片をエボン抱埋し酢酸ウランおよび硝酸鉛の 2 重染色により

Fig. 1 Relationship between the numbers of *P. aeruginosa* S-51 in lungs of mice and in glass nebulizer



標本を作製した。

### 成績

#### 1. 正常マウスでの感染実験

ネブライザーで菌液を 30 分間噴霧した場合の菌量とマウス肺内生菌数との関係を Fig. 1 に示した。ネブライザー中の菌量の増大ともない肺内生菌数は増加し、相関関係が認められた。従って、本法はマウス肺内の感染方法としては充分使用し得るものといえる。

*P. aeruginosa* S-51 を約  $10^8$  cells/mouse 接種した場合、マウス肺内生菌数は初期クリアランスなしに増加し約 15 時間以内に全例死亡した。しかし、これ以下の接種菌量では全例死に至らせることはなかった。

#### 2. 免疫抑制剤投与マウスでの感染実験

##### a) 免疫抑制剤投与マウスの脾臓細胞数の変化

免疫抑制剤である imuran あるいは cyclophosphamide をマウスに投与し、脾臓細胞数の変化を指標として宿主抵抗性の減弱度を調べた。

Fig. 2 は cyclophosphamide を腹腔内投与した際の脾臓細胞数の線日的変化を示すが、投与量に応じて細胞数は control に比べて減少し、100, 250mg/kg では投与 3 日後が最低となり、以後徐々に回復傾向を示した。

一方、imuran では Fig. 3 に示すとおり、連投することにより脾臓細胞数の減少傾向はみられるものの投与終了翌日においてもその減少度は cyclophosphamide の 50mg/kg 投与群程度でしかなかった。

##### b) 免疫抑制剤投与時のマウス感染実験

マウスに imuran または cyclophosphamide 投与後  $4 \times 10^8$  cells/mouse 接種し経口的に生存率を比較した。Fig. 4 に示すとおり cyclophosphamide 投与群は 2 日以内に全例死亡したのに対し、imuran 投与群は control と差がみられず、効果はみられなかった。

cyclophosphamide 投与により脾臓細胞数が 3 日後に最低となり以後回復傾向を示すことから、投与 5 日後に

Fig. 2 Spleen cells of mice after intraperitoneal administration of cyclophosphamide

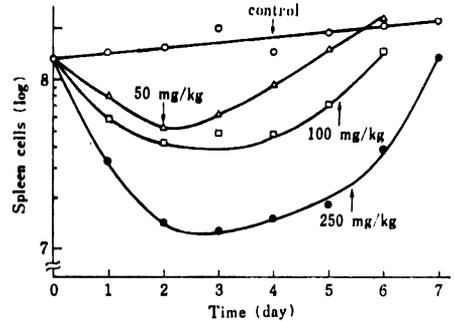


Fig. 3 Spleen cells of mice after peroral administration of imuran

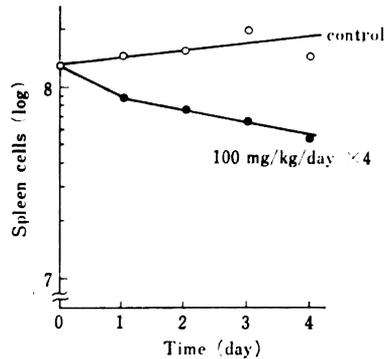
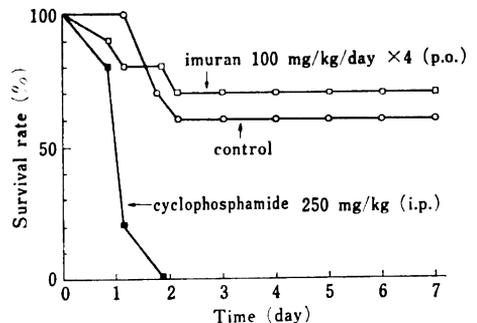


Fig. 4 Survival rate of *P. aeruginosa*-infected mice after administration of imuran and cyclophosphamide



$2.3 \times 10^8$  cells/mouse の菌量を接種し cyclophosphamide と感染死との関係を調べた。その結果、cyclophosphamide 250mg/kg 投与群では全例感染死した。しか

Fig. 5 Survival rate of *P. aeruginosa*-infected mice after administration of cyclophosphamide (250 mg/kg, i. p.)

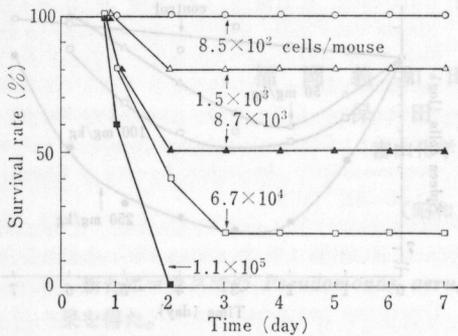
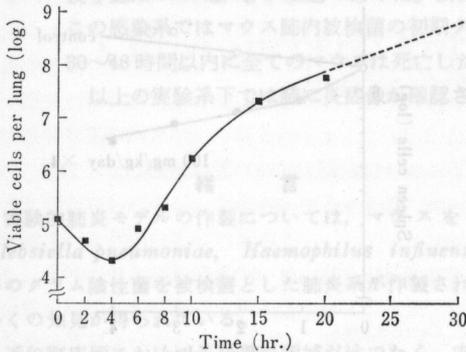


Fig. 6 Viable cells in lungs of *P. aeruginosa*-infected mice after administration of cyclophosphamide (250 mg/kg, i. p.)



し 100mg/kg では 40% の感染死であり 50mg/kg では全生生存した。

次に cyclophosphamide 250mg/kg 投与 5 日後に、菌量を変えて感染死との関係調べ、その結果を Fig. 5 に示した。接種菌量と感染死との間には相関がみられ、*P. aeruginosa* S-51 の LD<sub>50</sub> 値は 9 × 10<sup>8</sup> cells/mouse であった。

そこで全例死亡した菌量の 1.1 × 10<sup>5</sup> cells/mouse を接種し、肺内生菌数の変動を経時的に調べた。その結果、Fig. 6 に示すとおり、接種後 4 時間までは初期クリアランスがみられ、以後増殖を開始し 20 時間以後から約 10<sup>8</sup> cells/mouse となり、若干の変動はみられるものの 30-48 時間以内には全てのマウスは死亡した。

c) 組織学的検討

感染 24 時間後の肺を組織学的に検討した。Fig. 7 は光学顕微鏡下で観察した切片像であるが、肺胞壁の肥厚、肺胞腔への赤血球の浸潤がみられ、明らかな肺炎像が観察された。また電子顕微鏡下では Fig. 8 に示すとおり、

Fig. 7 Histological changes in *P. aeruginosa*-infected mice (×100)

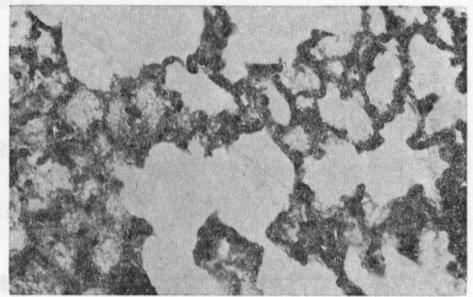
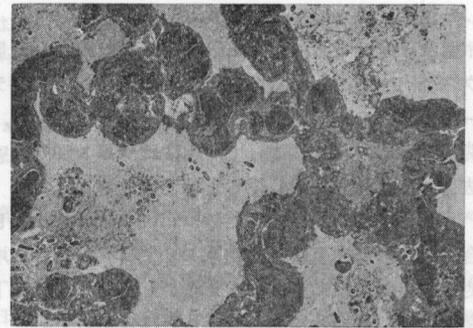


Fig. 8 Histological changes in *P. aeruginosa*-infected mice (×1,000)



り、肺胞壁、肺胞腔で菌が観察された。

考 察

実験的肺炎モデルについてはグラム陽性菌<sup>1)</sup>、陰性菌<sup>1,4,5,6)</sup>ともに種々示唆に富んだ報告がなされている。その中でもグラム陰性桿菌性肺炎については、臨床上治療の困難なことで人々の注目を集めている。そのグラム陰性桿菌性肺炎の中でも難治性といわれている *P. aeruginosa* 性肺炎が近年増加傾向にある。ところが *P. aeruginosa* 性肺炎については適当な実験的肺炎モデルの作製が殆どなされていない。そこで多数の個体を同時に用いることのできるマウスを被検動物として、検討した。

*P. aeruginosa* の中で感染性の高い *P. aeruginosa* S-51 株を用いたが、正常マウスでは肺の定着性が悪く、接種菌量が約 10<sup>8</sup> cells/mouse では短時間のうちに死亡し、それ以下では菌はクリアランスされた。そこで宿主抵抗性を減弱させることを検討したところ、imuran 投与では control と有意の差はみられなかったが cyclophosphamide 投与では定着性は増大し、肺炎の成立が認められた。cyclophosphamide を用いた感染系は脾臓

細胞数の増減からもわかるように、松島ら<sup>7)</sup>の担癌マウスでの *Serratia marcescens* 性感染と同様、弱毒菌の日和見感染に似た感染系であると思われる。また、*P. aeruginosa* S-51 株による感染系では *Klebsiella pneumoniae* 性肺感染における松本ら<sup>1)</sup>の報告と同様に一時的にクリアランスされ、ついで増殖する。従って、この肺炎の経過は臨床例により近いものと考えられる。

今後、この感染系を用いて各種抗生剤による治療実験等を行ない、肺炎治療の基礎的検討を行ないたい。

本論文の要旨は第 25 回日本化学療法学会東日本支部総会において発表した。

この研究におきまして種々御教示、御助言を賜りました長崎大学熱研内科 松本慶蔵教授に深甚なる感謝の意を捧げます。

#### 引用文献

- 1) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武 毅, 宍戸春美, 鈴木寛, 野口行雄, 玉置公俊, 羅 士易, 井手政利: 噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。日胸疾会誌 16: 581~587, 1978

- 2) 西武, 土屋皓司: *K. pneumoniae* による実験的マウス気道感染症について。I. 感染条件の設定。日本細菌学雑誌 30: 119, 1975
- 3) 川合雄英: 肺臓瘍内への抗生剤の移行にかんする実験的研究。Chemotherapy 23: 3144~3165, 1975
- 4) BERENDT, R. F.; G. G. LONG & J. S. WALKER: Treatment of respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in mice with aerosols of kanamycin. Antimicrob. Agents & Chemoth. 8: 585~590, 1975
- 5) 宇塚良夫, 松本慶蔵, 永武 毅, 宍戸春美: 実験肺炎治療過程における相性肺内生菌数減少パターン。医学のあゆみ 109: 430~432, 1979
- 6) 野口行雄, 松本慶蔵, 井手政利, 山本真志, 田口幹雄: 抗生物質の気管支・肺胞系における新吸収知見。医学のあゆみ 110: 27~29, 1979
- 7) 松島敏春, 田野吉彦, 副島林造: *Serratia marcescens* の病原性に関する実験的研究, 毒力の検討ならびに実験的肺炎の作製。Chemotherapy 26: 188~194, 1978

## EXPERIMENTAL MURINE PNEUMONIAE MODEL DUE TO *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. I

### Studies on Conditions of Infection

YOSHIKAZU FOKUOKA, MASARU TAI, YOSHIKO YAMASHIRO,

TAKASHI YASUDA and ISAMU SAIKAWA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The experimental murine pneumoniae models due to *Pseudomonas aeruginosa* have been studied, and the results were as follows:

- 1) The aerosol exposure system was superior in the infected method with challenge organisms to others. And the numbers of bacteria in lungs of mice were correlated with those in glass nebulizer.
- 2) The intraperitoneal injection of cyclophosphamide to mice increased in the fixation of bacteria in lungs of mice. The dose of cyclophosphamide was best at 250mg/kg, and the infection was started at 5 days after the administration of cyclophosphamide.
- 3) In this aerosol exposure system, the preliminary clearance of bacteria in lungs of mice was observed, and all mice were dead in 30~48 hours.
- 4) The histological changes in lungs of mice were observed in this aerosol exposure infection, and that proved the murine pneumoniae due to *P. aeruginosa*.