

## 実験感染における実験条件と感染防御効果に関する研究

(1) マウスの条件による感染菌の菌力、抗菌薬投与後の血中濃度、尿中排泄の比較

小川正俊・上村利明・川崎賢二

宮崎修一・五島瑛智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和56年5月16日受付)

感染治療実験に用いるマウス dd, ddN, ddy, ICR の各系統について、感染菌に対する感受性、抗菌薬投与時の血中濃度、尿中排泄、および感染防御効果を検討した。

*Escherichia coli* C11 株のマウス腹腔内感染における MLD は、ICR マウスがもっとも小さく、菌に対する感受性が高かった。また同一系統であっても、週令によって感染菌に対する感受性に差がみられた。この原因を調べるため、carbon-clearance による細網内皮系の機能を調べたところ、ICR は dd に比べ、有意に低かった。

抗菌薬投与による血中濃度は、マウス各系統間に差がみられた。

以上の実験成績により、*in vivo* における抗菌作用の評価において、同一実験系で同時に行なった場合のみ、ED<sub>50</sub> の比較が可能であると考えられた。また治療効果を判定する資料としての吸収、排泄の成績は、感染実験に用いた同条件の動物を用いるべきであることが示唆された。

抗菌薬の基礎的評価には感受性測定を中心とする *in vitro* での抗菌力成績と、マウス感染治療実験を主とした *in vivo* 抗菌力成績が必要である。MIC 測定に関しては、化学療法学会標準法が設定され、各機関からの資料を総合的に判断するのにさほどの困難はない<sup>1)</sup>。しかし *in vivo* 効果判定には基準がなく、各研究施設毎に実験手技のみならず、使用する実験動物も異なり、それらの機関より収集された資料を単純に比較することはできない。また医療の発達、特に化学療法の発展に伴い感染症の起炎菌にも大きな変化がみられ、opportunistic infection が日常的になっている現況から、実験感染においてもマウスに特定の病原性を示さない弱毒菌を使用する必要が生じてきた<sup>2)</sup>。臨床での感染症の様相の多様性を反映して、実験感染系にも一層の複雑化が求められている。

さらに現在のように抗菌剤の種々の誘導体が相継ぎ開発されてくると、それら薬剤間の比較には正確さとともに、感度のよい実験法が要求される。*in vivo* での実験は *in vitro* に比べ関与する因子が多岐にわたるため、実験条件によっては、正確な優劣の判断が難しいばかりでなく、場合によっては誤った評価を下す危険がある。

いうまでもなく抗菌薬は感染症の治療が目的であるから、最終の評価は臨床効果の判断をまたねばならないが、臨床への足がかりとなる *in vivo* 実験においては、

できるだけ統一された感度のよい「物指し」となる実験条件で行なうことが必要である。

われわれはこれまでにマウス感染治療実験において、感染防御効果に変動を与える各種要因について検討してきたが<sup>3-12)</sup>、今回はマウス系統、週令差などによる感染菌に対する感受性の違い、および抗菌薬投与における血中濃度の差について検討し、マウス系統間に差のあることを実証した。

以上の実験成績を提示し、実験感染モデルのあり方について考察した。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用菌株

*Escherichia coli* C11

*Serratia marcescens* No. 2

*Serratia marcescens* No. 8

*Pseudomonas aeruginosa* A 14

*Pseudomonas aeruginosa* GNB-1-139

*Pseudomonas aeruginosa* NC-5

*Pseudomonas cepacia* 201

*Pseudomonas maltophilia* 227

*Achromobacter xylosoxidans* 285

*Acinetobacter calcoaceticus* 402

*Alcaligenes faecalis* 117

*Flavobacterium meningosepticum* 462

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

## 2. 使用薬剤

ampicillin (ABPC) 904  $\mu\text{g}/\text{mg}$  藤沢薬品  
 carbenicillin (CBPC) 800  $\mu\text{g}/\text{mg}$  台糖ファイザー  
 sulbenicillin (SBPC) 871  $\mu\text{g}/\text{mg}$  武田薬品  
 cefazolin (CEZ) 933  $\mu\text{g}/\text{mg}$  藤沢薬品  
 gentamicin (GM) 584  $\mu\text{g}/\text{mg}$  塩野義製薬  
 dibekacin (DKB) 704  $\mu\text{g}/\text{mg}$  明治製菓

## 3. 菌力の測定および感染方法

普通寒天斜面培地に1夜培養した菌を滅菌生理食塩水に浮遊させ、さらにこの浮遊液を滅菌生理食塩水で種々の濃度に希釈し、その0.5 mlをマウス腹腔内に接種し、5日後の生死により菌力を測定した。

同時にこれらの菌液に等量の10% mucin (wilson gastric mucin) 溶液を加えて (mucin の最終濃度は5%) 同様の実験を行ない、mucin 添加時の菌力についても測定した。

## 4. carbon-clearance による細網内皮系機能 (RES) の測定

carbon 量はマウス体重100g 当り、16 mg/0.2 ml とし、尾静脈より注入、経時的に内腎静脈から毛細管で採血した一定量について、比色により carbon-clearance の経過を観察した。

## 5. マウス血清の殺菌作用

ICR, 4週令, 雄マウスおよび ddN, 5週令, 雄マウス各々30匹を断頭採血, 1時間室温に放置した後, 4°C, 3,000 rpm 20分遠心し, 30匹分の血清をプールし, 直ちに菌と作用させ殺菌作用を検討した。

血清1.8 ml に菌液 ( $3 \times 10^7$  cells/ml) 0.2 ml を添加し, 37°C のフラン器内に静置し, 経時的に生菌数を測定した。

対照として0.85% 滅菌生理食塩水を用いた。

## 6. 血液学および臨床化学的検査

各系のマウス30匹をエーテル麻酔し, ヘパリン処理注射器にて心臓から全採血した。

この血液をプールし, ヘマトクリット値を調べ, 残りの血液は遠心分離し, 血漿について Total protein, Albumin, GOT, GPT, Al-phosphatase, LDH, Total cholesterol, creatinine, Urea-N は, Flieger (日本テクトロン), glucose は, グルコローダー (シノテスト) Na, K は炎光光度計, Cl は chloride counter (HIRA NUMA), Ca, P は AAII (テクニコン) にて測定した。

## 7. マウス血清中濃度

マウスは体重をそろえるため ddN マウスは5週令, ICR マウスは4週令のそれぞれ雄を用いた。

1群9匹とし, ABPCは1 mg/mouse, 0.5 mg/mouse を経口投与, CBPC, SBPC は1 mg/mouse, 0.5 mg/mouse を皮下投与, CEZ, GM, DKBは0.5 mg/mouse, 0.25 mg/mouse を皮下投与後, 一定時間毎に1群ずつ断頭採血した血液をプールし, 分離した血清中の活性を *B. subtilis* ATCC 6633 を用いた cup 法で測定した。

## 8. 尿中排泄率の測定

ddN mouse, ICR mouse 1群4匹を使用した。投与量は, ABPC, CBPC, SBPC は1 mg/mouse, CEZ, GM, DKB は0.5 mg/mouse とした。投与後マウスは群毎にメタボリックケージに入れ, 0~3, 3~6, および6~24時間後の尿を採取し, 血中濃度と同様 bioassay にて薬剤濃度を測定した。

## II. 実験成績

### 1. マウス系統差および週令差による菌感受性の変動

Fig. 1 Influence of the strain and the age of mice on the susceptibility to infection of *E. coli*

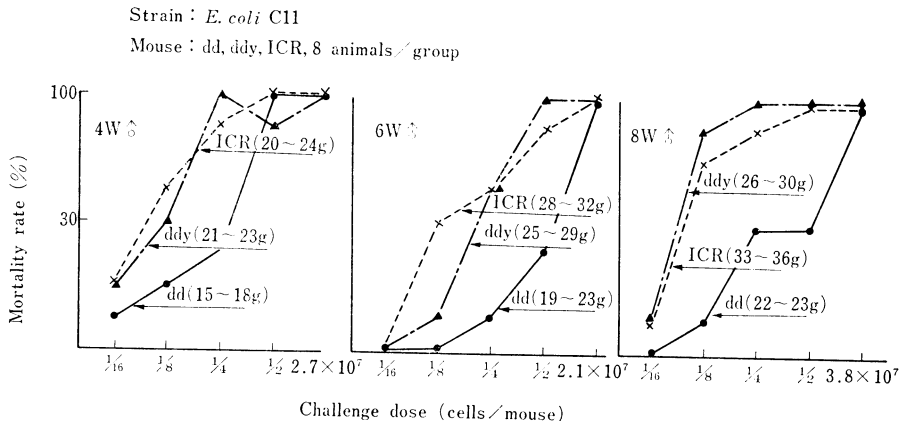
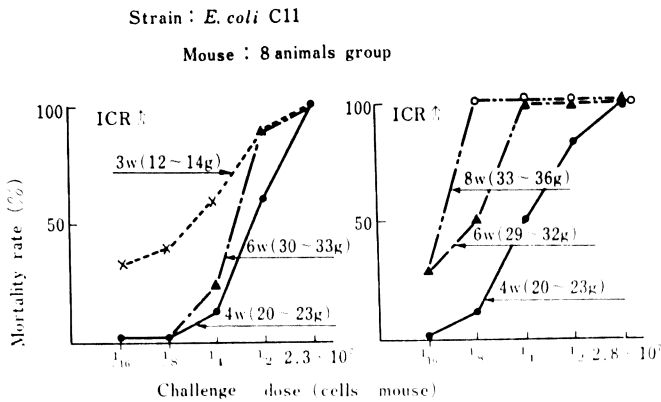


Fig. 2 Influence of the age of ICR mice on the susceptibility to infection of *E. coli*



1) 系統の差

Fig. 1 は dd, ddy, ICR の 3 系統の雄、1 群 8 匹を用い、4, 6, 8 の各週令における感染菌感受性を調べたものである。

攻撃菌は *E. coli* C 11 株を用い、MLD に近い菌量を最大量とし、その 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 の各菌量をそれぞれ腹腔内に接種、その生死を 5 日間観察した。

マウスの体重は、dd がもっとも小さく、ddy, ICR の順に大きくなっている。

攻撃菌量は体重を考慮せず、すべての系に同一の量を用いたが、体重のもっとも軽い、dd が一番感受性が低く、したがって菌の virulence も低い結果となった。

ddy と ICR では、体重は ICR が大きい、菌感受性はほとんど差が認められず、成績の安定性はバラツキの少ない点で、ICR が優れていた。

2) 週令の差

*E. coli* C 11 株に対する感受性は、ICR 系がもっとも高いことが判明したので、この系について週令の差による菌感受性の違いを調べたのが Fig. 2 である。

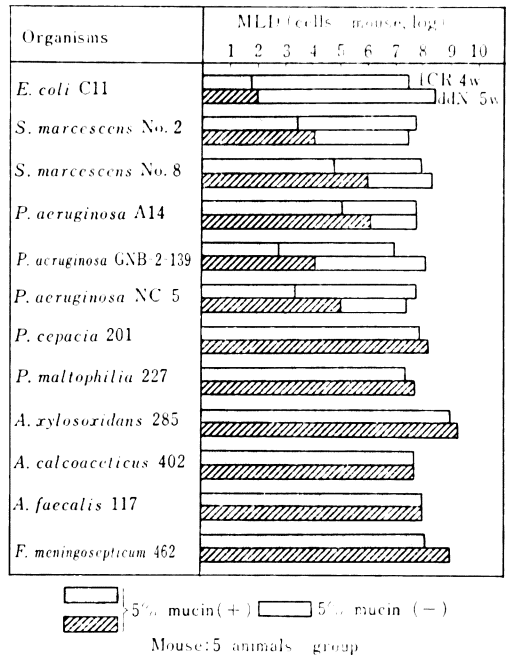
マウスの週令は 3, 4, 6 週のものを行なったが、4 週令が感受性が鈍く、3 週、6 週は 4 週より感受性が高いという成績が得られている。さらに 4, 6, 8 週について行なったものでは、やはり 4 週がもっとも感受性が低く、6 週、8 週がむしろ菌に対する抵抗性が弱いという結果が得られた。

3) 感染菌に対する感受性

*E. coli* C 11 株感染に対し、ICR マウスの感受性がもっとも優れていることが認められたが、他菌種、特に opportunistic infection の原因菌となる菌種を用い、ICR マウス、ddN マウスの感受性を検討したのが Fig. 3 である。

体重をそろえる意味から、ICR マウスは 4 週令、ddN

Fig. 3 Comparison between the susceptibility of ICR and ddN mice



マウスは 5 週令を用いた。

体重は両系とも 19 ± 1g とした、*S. marcescens*, *P. aeruginosa* に対しても ICR マウスの方が、ddN マウスより MLD が小さく、感受性が高いことが示されている。その傾向は mucin 添加少量菌接種の感染においてより著明であった。

*P. cepacia*, *P. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *A. calcoaceticus*, *A. faecalis*, *F. meningosepticum* は特にマウスに対する菌力が弱く、mucin 添加時でも 10<sup>9</sup>

Fig. 4 Comparison between the carbon-clearance levels of ICR and dd mice

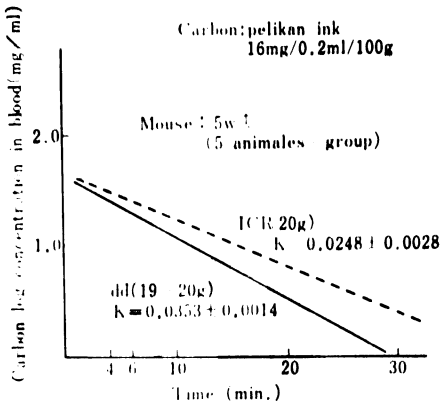
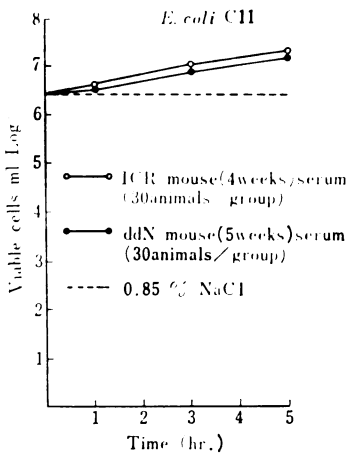


Fig. 5 Comparison between the bactericidal effect with serum of ICR and ddN mice



cells/mouse 以上の菌で攻撃しないとマウスを 100% 死亡させることができないため、差が明らかではない。しかし差のあるものでは、すべて ICR マウスの方が感受性が高かった。

4) carbon-clearance による RES (細網内皮系) 機能の差

感染菌に対する感受性がマウスの系によって異なる原因を調べるため dd マウス, ICR マウスの 2 系統について、細網内皮系の機能の差を carbon-clearance によって検討したのが Fig. 4 である。

dd マウスでは 30 分で血中の carbon 粒子が消失するのに比べ、ICR マウスでは、その速度が dd 系より遅く、30 分の時点では血中にかなりの残留 carbon が認められた。

Table 1 Comparison between hematological and serum biochemical values of ICR and ddN mice

Test items		ddN 5w ♂	ICR 4w ♂	ICR 5w ♂
Hematocrit	%	38	42.5	43
Na	mM	144	148	142
K	mM	7.9	8.1	7.9
Cl	mM	104	105	105
Ca	mEq/l	4.5	4.3	4.5
P	mg/100 ml	8.7	8.8	8.7
Urea-N	mg/100 ml	23.5	22	24
Creatinine	mg/100 ml	0.4	0.3	0.4
Blood glucose	mg/100 ml	142	165	158
Total-cholesterol	mg/100 ml	115	125	137
GOT	RF-U	78	144	105
GPT	RF-U	22	15	14
Al-phosphatase	mU/ml	210	313	254
Total-protein	g/100 ml	4.8	4.4	4.6
Albumin	g/100 ml	2.4	2.4	2.5
Globulin	g/100 ml	0.74	0.38	0.37
A/G		3.2	6.24	6.56
Body weight	g/group	19 ± 1	19 ± 1	20 ± 1

細網内皮系細胞の清浄能力は、対象が菌と carbon で同一とはいえないであろうが、RES 機能検査の一つである carbon-clearance test において ICR マウスが ddN マウスより劣っていることは、菌の感受性が ICR マウスに対して高いことの原因の一つと考えられる。

5) マウス血清の殺菌作用

ICR マウス, ddN マウス血清の殺菌作用の差が感染菌の感受性の違いに影響する可能性を考え、*E. coli* C11 株を用いて検討した成績が Fig. 5 である。

ICR マウス, ddN マウス血清はともに、*E. coli* C11 株に対して殺菌作用を示さなかった。

6) 血液学および臨床化学的検査

系統間の菌感受性の差の原因を調べる目的から、各系統のマウス血液、血漿成分の違いを検討した成績が、Table 1 である。

Blood glucose, Total-cholesterol, GOT, GPT, Al-phosphatase, Globulin, A/G に違いがみられた。

この成績と菌感受性の違いが、どのように関連するかは不明である。

2. マウス系統差による薬剤の血清濃度, 尿中濃度
    - 1) 血清中濃度
- ABPC は経口投与, CBPC, SBPC, CEZ, GM, DKB

Fig. 6 Comparison between the serum levels of ICR and ddN mice after administration of penicillins

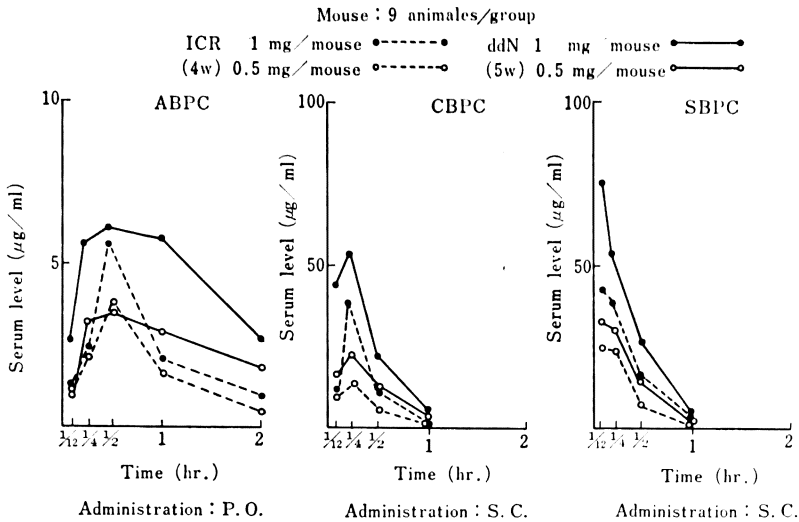


Fig. 7 Comparison between the serum levels of ICR and ddN mice after administration of cefazolin

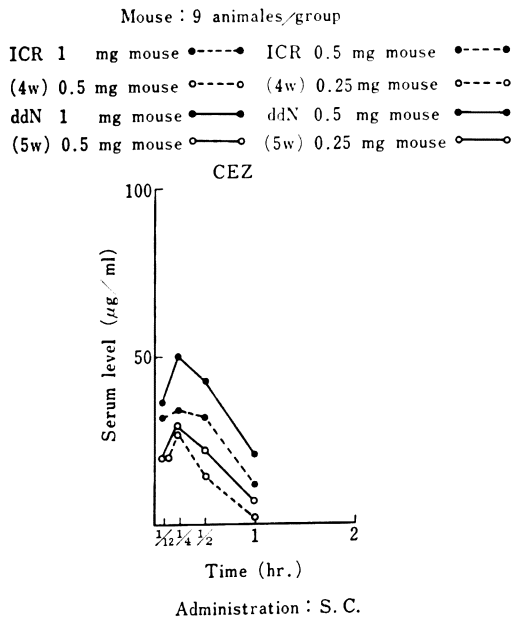
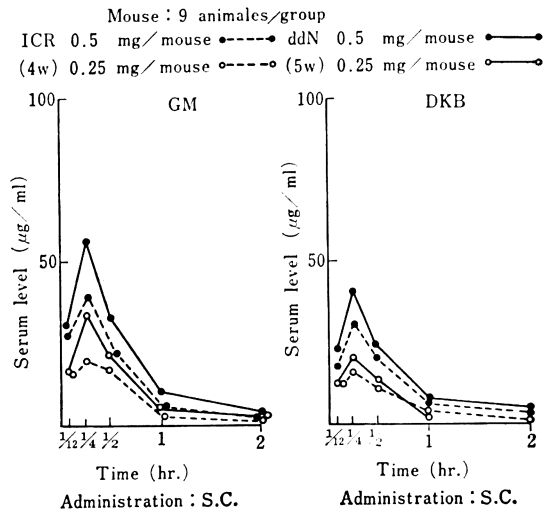


Fig. 8 Comparison between the serum levels of ICR and ddN mice after administration of gentamicin and dibekacin



は皮下投与により、ICR マウス、ddN マウスの血清中濃度を比較し、その成績を Fig. 6~8 に示した。

ABPC, CBPC, SBPC, CEZ, GM, DKB においては、ddN マウスが ICR マウスより高い血清中濃度を示した。

2) 尿中排泄

抗生剤投与後 24 時間までの尿中への排泄率を ICR マウス、ddN マウスと比較した成績は Fig. 9~12 に示した。

尿中排泄も、血清中濃度と同様に ABPC, CBPC, SBPC, CEZ, GM, DKB は ddN 系マウスの方が、ICR マウスに比べ排泄率が高い成績が得られた。

III. 考察と結論

抗菌薬の *in vivo* 評価には、しばしばマウス実験的敗

Fig. 9 Comparison between the urinary excretion of ICR and ddN mice after administration of ampicillin and carbenicillin

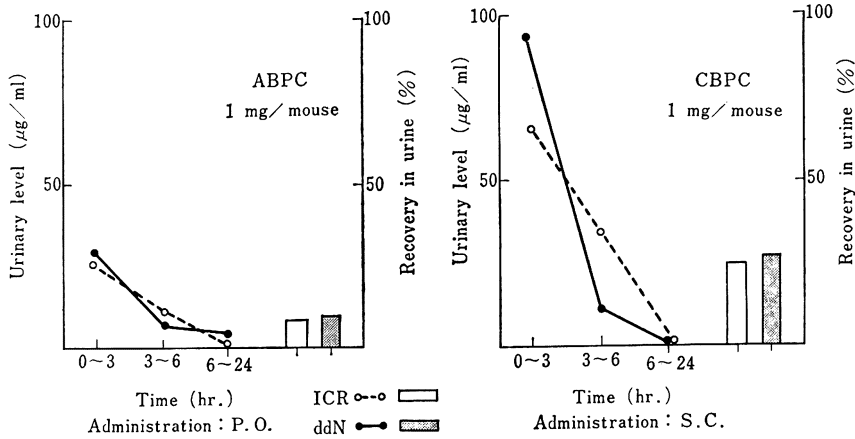


Fig. 10 Comparison between the urinary excretion of ICR and ddN mice after administration of sulbenicillin

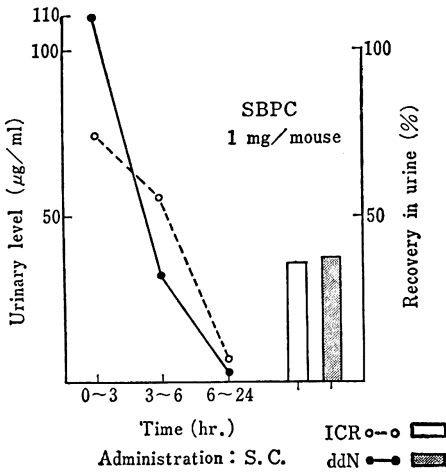


Fig. 11 Comparison between the urinary excretion of ICR and ddN mice after administration of cefazolin

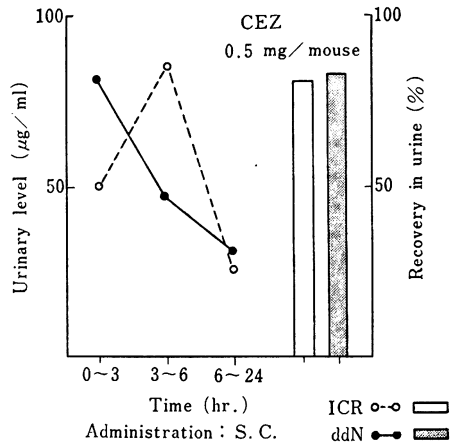
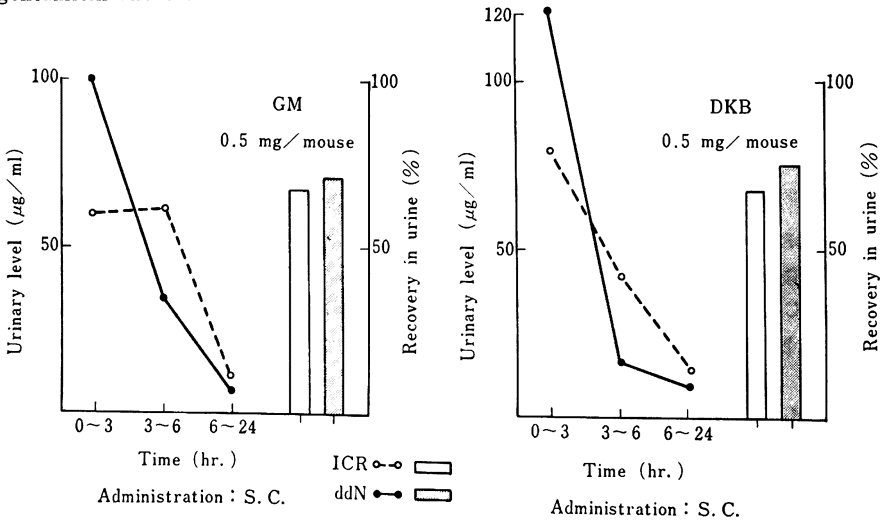


Fig. 12 Comparison between the urinary excretion of ICR and ddN mice after administration of gentamicin and dibekacin



血症における感染防御試験が用いられるが、その成績は、実験条件によって大きく変動する。

本実験においても、腹腔内攻撃菌への感受性は系統間で差異が認められ、ICR マウスがもっとも感受性であった。

この原因の1つとして、carbon-clearance によるRES機能が、ICR マウスは dd 系よりも劣り、感染しやすい性質をそなえていることが認められた。

一方マウス血清は単独では、菌に対し殺菌能が無いことが確認されており、この系統間の差異は RES 機能も含めたマウス生体内異物喰食能の優劣によるのではないかと推察されるが、この点についてはマウスの食菌細胞を集めることの困難さからまだ実証していない。

マウス血清成分の比較では、系統間でグロブリン量などに差異が認められたが、これが攻撃菌に対する感受性の差に直接的に関与する因子かどうかは明らかでない。

感染菌に対する感受性の解析には、免疫の問題が不可欠であるが、この点についてもマウスにおける明らかな資料はなく、われわれも今回は触れることができなかった。

また ICR マウスは攻撃菌に対する感受性が dd マウスに比べ個体差が小さく、特に弱毒菌を使用する実験感染系には適した系と考えられる。

ICR および ddN マウス間での抗菌薬の体内動態は、一般的に ddN マウスの血清中濃度が高く、尿中排泄も良好である。

抗菌薬の基礎的評価に強く要求されるのは、再現性であり *in vitro* 効果と *in vivo* 効果の相関である。*in vitro* は実験条件の設定が比較的容易であるが、*in vivo* では実験成績を変動させる要因が多い。

本研究は感染実験を行なう動物の条件を一定にしなければならぬ必要性を実験的に示したものであり、感染治療実験に関与すると思われる各種条件を検討した成績は、実験目的に適した動物系を選択するのに役立つものと考えられる。

## 文 献

- 1) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23: 1~2, 1975
- 2) 五島瑛智子：微生物生態と Opportunistic infec-

tion. 防菌防黴 6: 31~42, 1978

- 3) 五島瑛智子, 堂ヶ崎 勲, 一色義人, 野藤隆夫, 桑原章吾: 抗菌薬の試験管内抗菌力と感染防御効果の関連性について。感染, 炎症, 免疫 1 (1): 11~22, 1971
- 4) GOTO, S.; Y. ISSHIKI, & T. KAMATA.: *In vivo* laboratory evaluation of cephalixin and cephaloglycin. Proceedings of a symposium on the clinical evaluation of cephalixin. 10~13, 1969
- 5) 五島瑛智子, 上村利明, 堂ヶ崎 勲, 桑原章吾, 西田 実: 実験感染におけるマウスの系統, 周令差による菌感受性の変動。日本実験動物研究会第7回研究会, 1972
- 6) 五島瑛智子, 堂ヶ崎 勲, 金子康子, 滝田聖観, 小川正俊, 桑原章吾: 緑膿菌マウス感染における治療効果に関連する要因について。第19回日本化学療法学会東日本支部総会, 1972
- 7) 野藤隆夫: Sulfa 剤の試験管内抗菌力と感染防御効果の相関 I, 感受性測定の見直し—特に接種菌量の問題について—。Chemotherapy 20: 638~645, 1972
- 8) 野藤隆夫: Sulfa 剤の試験管内抗菌力と感染防御効果の相関 II, マウス実験感染における防御効果と MIC との関連性について。Chemotherapy 20: 646~652, 1972
- 9) 一色義人: 試験管内抗菌作用と感染防御効果との相関について, (1) Ampicillin, Cyclacillin, Cephalixin の感受性測定法の検討。Chemotherapy 23: 3781~3789, 1975
- 10) 一色義人: 試験管内抗菌作用と感染防御効果との相関について, (2) Ampicillin, Cephalixin, Cyclacillin における MIC とマウス実験的感染に対する防御効果との関連性, 特に攻撃菌量と投与方法の影響について。Chemotherapy 23: 3790~3797, 1975
- 11) 堂ヶ崎 勲, 一色義人, 五島瑛智子, 桑原章吾: 試験管内感受性と感染防御効果との相関について, (2) Ampicillin, Cephalixin, Cyclacillin を投与したマウス実験感染症の臓器内菌数と治療効果の関連について。第19回日本化学療法学会総会, 1971
- 12) 上村利明, 五島瑛智子, 桑原章吾: マウス実験感染における各種要目の検討, マウス系統および週令による実験化学療法成績の動揺—*E. coli* C11株と CEZ, ABPC, KM の組合せについて。第20回日本化学療法学会総会, 1972

## STUDIES ON EXPERIMENTAL CONDITIONS AND THERAPEUTIC EFFECTS IN EXPERIMENTAL INFECTIONS

(1) COMPARATIVE STUDIES ON THE VIRULENCE OF INFECTIOUS AGENTS AND THE SERUM LEVELS, URINARY EXCRETION AND PROTECTIVE EFFECTS OF ANTIBIOTICS ADMINISTERED IN MICE OF DIFFERENT STRAINS

MASATOSHI OGAWA, TOSHAKI KAMIMURA, KENJI KAWASAEI,  
SHUICHI MIYAZAKI and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

Comparative studies were made on mice of dd, ddy, ddN and ICR strains on the susceptibilities to an infectious agent and the serum levels attained, urinary excretion and the therapeutic effects of antibiotics administered.

MLD of *Escherichia coli* C11 administered intraperitoneally was the smallest in ICR strain, showing the highest susceptibility. In mice of the same strain, the susceptibility differed depending upon the age.

The activity of the reticuloendothelial system estimated from the carbon-clearance level of ICR mice was significantly lower than that of dd mice.

The serum level attained after antibiotic administration varied depending upon the mouse strain.

The above results indicate that, in assessing the *in vivo* antibacterial effect, ED<sub>50</sub> values can be compared only when determined simultaneously to the same mouse strain. It was also suggested that, to examine antibiotics for their absorption and excretion to evaluate the therapeutic effect, experimental animals of the same strain under the same physiological conditions as those used for experimental infection should be used.