

## ラット肺炎球菌性髄膜炎モデルの作製

春日 修・谷 佳都・芝田 和夫・石井 信男・奥野 哲  
佐久間由光・前澤 功・岩崎 仁・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所

(昭和 62 年 10 月 3 日受付)

ラットの大槽内へ *Streptococcus pneumoniae* type III を  $1 \times 10^8$  CFU/ラット接種することにより、化膿性髄膜炎モデルを作製した。ラットは細菌接種 2 日後より死亡し、5 日後までに全例死亡した。髄液中菌数は死亡直前まで血液中菌数よりも常に高い値を維持した。また、感染髄液の血液生化学的検査では好中球の出現、総タンパク量の増加およびグルコース量の減少が観察され、病理組織学的検索では大脳、小脳、延髄および脊髄のクモ膜下腔に好中球を主体とする炎症性細胞浸潤が観察された。よって、本モデルは致死性の肺炎球菌性髄膜炎モデルとみなされた。

化膿性髄膜炎が難治感染症である理由の一つとして、多くの抗菌剤の髄液への移行が血液脳関門によって抑制されることが挙げられる。したがって、抗菌剤の髄液への移行性の良否が化膿性髄膜炎に対する有用性を知る重要な鍵となっている。そこで、臨床例に近似する実験的化膿性髄膜炎モデルを作製することは、本症の化学療法の解析に有力な手段になるとの考えから、これまで多くの研究者により実験的化膿性髄膜炎モデルが種々の動物を用いて作製され、報告されている<sup>1-7)</sup>。我々は動物個体の均一化が比較的容易なラットを用いて、抗菌剤の治療効果、髄液中殺菌作用および髄液中移行性などが検討できるラット致死性肺炎球菌性髄膜炎モデルの作製を試みた。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用菌株

*Streptococcus pneumoniae* type III (京都薬科大学微生物学教室より分与)を用いた。

## 2. 接種菌液調製

*S. pneumoniae* type III を 10% 非働化馬血清加ハートインフュージョン寒天培地 (HIA: 栄研化学) 斜面にて  $37^{\circ}\text{C}$ 、18 時間培養後、トリプトソイブイオン (TSB: 栄研化学) に浮遊させ接種菌液とした。接種菌液は TSB で  $2.5 \times 10^8$  CFU/ml および  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml となるように希釈し、用時まで氷冷下で保存した。

## 3. 使用動物

生後 7 週齢の Crj-SD 系雄性ラット (体重: 190~210 g) を使用した。

## 4. 使用薬剤

Aspoxicillin (ASPC: 田辺製薬) を使用した。

## 5. 髄液採取針および感染動物の作製

テルモ注射針 25 G 1/1 TW (テルモ) の接合部を焼き取った針部分にポリエチレン細管 No. 3 (ヒビキ) を接着剤 (アロンアルファ: 東亜合成化学) で接続し、 $10 \mu\text{l}$  ずつ目印をつけた長さ約 10 cm の髄液採取針を作製した。

大槽内接種感染ラットはエーテル麻酔下のラット後頭部を酒精綿で消毒後、上記髄液採取針を挿入し、髄液を  $10 \mu\text{l}$  採取した後、 $1.5 \times 10^7$  CFU/ml、 $1.5 \times 10^8$  CFU/ml、 $1.5 \times 10^8$  CFU/ml および  $1.5 \times 10^4$  CFU/ml の各菌液  $10 \mu\text{l}$  をゆっくり注入して作製した。

静脈内接種感染ラットは  $2.5 \times 10^8$  CFU/ml、 $7.5 \times 10^7$  CFU/ml、 $7.5 \times 10^8$  CFU/ml および  $7.5 \times 10^8$  CFU/ml の各菌液 0.2 ml をツベルクリン用テルモシリンジ (テルモ) で尾静脈内へ接種して作製した。

## 6. 髄液および血液の採取

髄液はエーテル麻酔下、ラット大槽内に髄液採取針を挿入して 10~50  $\mu\text{l}$  採取し、血液はラット心臓から 1 ml 採取した。

## 7. 感染髄液および血液中菌数の測定

細菌接種後の髄液中および血液中菌数変化は 1 群 5 匹のラットを用いて検討した。細菌接種後、5 分、6 時間、24 時間、48 時間および 72 時間に採取した髄液および血液を TSB で適宜希釈後、10% 馬血液加 HIA と混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、一夜培養後、形成したコロニー数 (CFU) から菌数を測定した。

## 8. 感染髄液中の白血球数、総タンパク量およびグルコース量の測定

白血球数の測定および白血球像の観察は 1 群 4 匹のラ

ットを用いて行なった。本菌  $1 \times 10^8$  CFU/ラットを大槽内接種後、6時間、24時間および48時間に髄液を採取し、一部をチュルク液（関東化学）で希釈後、Bürker-Türkの血球計算板を用いて白血球数を測定、残りの一部で塗抹標本を作り、ライト染色液（武藤化学薬品）で染色後、白血球の形態を観察した。総タンパク量およびグルコース量の測定は1群4～8匹のラットを用いて、本菌  $1 \times 10^8$  CFU/ラット接種後、6時間、24時間および48時間に採取した髄液について実施した。総タンパク量はCoomassie brilliant blue G-250（半井化学）を用いた色素結合法により、グルコース量はGLザイム（榮研化学）を用いたグルコースオキシダーゼ法により測定した。なお、対照として、非感染（0時間）ラットの髄液およびTSBのみを大槽内接種して24時間後に採取した髄液についても同様な検査を実施した。

#### 9. *S. pneumoniae* type III の大槽内接種ラットに対する薬剤の治療効果

本菌  $1 \times 10^8$  CFU/ラット大槽内接種24時間後の感染ラット1群5匹を用いて、ASPC 20 mg/kg および 4 mg/kg を尾静脈内に単回投与し、薬剤投与後14日までの生存数を薬剤無投与対照群と比較した。

#### 10. 病理組織学的検索

1群5匹のラットを用いて、本菌  $1 \times 10^8$  CFU/ラットを大槽内接種後、24時間および44時間に大腿動・静脈切断により放血殺処分し、臓器摘出後、全身の剥皮を行ない、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定完了後、筋肉を可能な限り削ぎ落とし、脊椎は横隔膜付着部高位で切断し、蟻酸脱灰してパラフィン切片を作製した。大脳は下垂体を含む横断、小脳・延髄は松果体を含む縦断および脊髄は胸大部の縦断切片を作製し、hematoxylin-eosin染色を施して鏡検した。なお、対照として、

TSBのみを大槽内接種したラットを、また、ASPC 20 mg/kg を静脈内へ単回投与し、14日間生存したラットについても同様に検索した。

## II. 成績

### 1. *S. pneumoniae* type III の大槽内接種および静脈内接種による感染力の比較

種々の菌量を槽内および静脈内接種したラットの14日後までの生存数をTable 1に示した。大槽内接種の場合、 $1.5 \times 10^8$  CFU/ラットで2日後より死亡が観察され、5日までに全例死亡した。接種菌量を少なくすると死亡までの日数が若干長くなり、菌量に依存した感染力が認められた。一方、静脈内接種の場合、 $5 \times 10^7$  CFU/ラットで14日後までに全例のラットは死亡したが、その感染力は大槽内接種  $1.5 \times 10^8$  CFU/ラットとほぼ同等であった。

### 2. *S. pneumoniae* type III の大槽内および静脈内接種後の髄液中および血液中菌数変化

両感染におけるラットの死亡原因を検索するために、大槽内  $1 \times 10^8$  CFU/ラットおよび静脈内  $5 \times 10^7$  CFU/ラットについて、細菌接種後の髄液中および血液中菌数の経時的变化を比較した。Table 2に示したように大槽内  $1 \times 10^8$  CFU/ラット接種の場合、髄液中菌数は6時間後接種直後（5分： $4 \times 10^8$  CFU/ml）の約1/10に減少したが、24時間後には  $1 \times 10^7$  CFU/mlまで増加し、以後、72時間まではほとんど変化しなかった。血液中には接種直後から細菌が検出され、6時間後まで急激に増加、以後、48時間までゆるやかに増加した。なお、測定した髄液中および血液中の最高菌数はそれぞれ  $4 \times 10^7$  CFU/ml および  $3 \times 10^4$  CFU/ml で、髄液中菌数は常に血液中菌数よりも高い値を維持した。一方、静脈内  $5 \times 10^7$  CFU/ラット接種の場合、血液中菌数は接種6時間

Table 1. Virulence of *S. pneumoniae* type III in rats

Route	Inoculum size (CFU/rat)	No. of survivors						
		(Days after inoculation)						
		0	1	2	3	5	7	14
ic	$1.5 \times 10^8$	5	5	3	2	0	0	0
	$1.5 \times 10^4$	5	5	4	3	0	0	0
	$1.5 \times 10^3$	5	5	4	2	1	1	0
	$1.5 \times 10^2$	5	5	5	3	1	1	1
	TSB medium	5	5	5	5	5	5	5
iv	$5.0 \times 10^7$	5	5	5	4	4	1	0
	$1.5 \times 10^7$	5	5	5	5	5	2	2
	$1.5 \times 10^6$	5	5	5	5	5	5	5
	$1.5 \times 10^5$	5	5	5	5	5	5	5

ic : intracisternal inoculation.

iv : intravenous inoculation.

Table 2. Distribution of *S. pneumoniae* type III in CSF and blood of rats after intracisternal or intravenous inoculation

Route	Inoculum size (CFU/rat)	Time after inoculation	No. of rats tested	Bacterial counts ( $\log_{10}$ CFU/ml)	
				CSF	Blood
ic	$1 \times 10^5$	5 min	5	$5.6 \pm 0.29$	$1.4 \pm 0.75$
		6 h	5	$4.8 \pm 0.61$	$3.1 \pm 0.26$
		24 h	5	$7.0 \pm 0.26$	$3.8 \pm 0.48$
		48 h	5	$7.6 \pm 0.82$	$4.4 \pm 1.43$
		72 h	4*	$7.2 \pm 0.31$	$2.9 \pm 1.51$
iv	$5 \times 10^7$	5 min	5	< 2	$6.2 \pm 0.12$
		6 h	5	< 2	$4.5 \pm 0.54$
		24 h	5	< 2	$6.0 \pm 0.56$
		48 h	5	$3.4 \pm 3.11$	$5.9 \pm 1.04$
		72 h	4*	$6.3 \pm 2.29$	$6.4 \pm 1.21$

Each value represents the mean of 4 to 5 rats  $\pm$  standard deviation.

\* One of five rats died until 72 h after inoculation.

Table 3. WBC, total protein and glucose in CSF of rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

Time after inoculation	WBC cells/mm <sup>3</sup> (log)	Total protein <sup>a)</sup> mg/dl	Glucose <sup>b)</sup> mg/dl
0 h	< 1	$25.9 \pm 13.05$	$66.6 \pm 5.68$
6 h	$3.8 \pm 0.26$	$179.4 \pm 71.96^*$	$54.4 \pm 4.66^*$
24 h	$3.7 \pm 0.27$	$347.8 \pm 206.22^*$	$34.0 \pm 8.16^*$
48 h	$3.2 \pm 0.39$	$217.9 \pm 101.86^*$	$49.7 \pm 10.49^*$
TSB medium (24 h after injection)	$2.1 \pm 1.10$	$22.9 \pm 4.56$	$61.3 \pm 2.31$

Each value represents the mean of 4 to 8 rats  $\pm$  standard deviation.

\* Significantly different from 0 h control value ( $p < 0.01$ ).

a) Coomassie brilliant blue G-250 method.

b) Glucose oxidase method.

後で接種直後の約 1/100 に減少したが、24 時間後には接種直後の菌数まで回復し、以後、72 時間まではほとんど変化しなかった。髄液中には 24 時間後まで細菌は検出されなかったが、48 時間後に 3 例のラットから、72 時間後には全例（1 例死亡）のラットから細菌が検出された。

### 3. 髄液所見

本菌  $1 \times 10^5$  CFU/ラットを大槽内接種したラットの感染髄液の血液生化学的所見を Table 3 に示した。白血球は感染 6 時間後ですでに髄液中に観察され、以後、48 時間後までその数はほとんど変化しなかった。しかし、白血球の形態別では 6 時間後までは好中球が主体であったが、24 時間後では円形細胞も増加し、全体の 1/3 を占めていた。総タンパク量およびグルコース量は 6 時間後から変化が認められ、総タンパク量は感染 6 時間後から非感染髄液総タンパク量 ( $25.9$  mg/dl) と比較して有

意 ( $p < 0.01$ ) に増加、グルコース量は感染 6 時間後から非感染髄液総グルコース量 ( $66.6$  mg/dl) と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に減少していた。なお、細菌浮遊液として用いた TSB を  $10 \mu\text{l}$  大槽内接種したラット髄液では、24 時間後に円形細胞が中心の白血球が観察されたが、総タンパク量およびグルコース量には非感染髄液と比較して有意な変化は認められなかった。

### 4. *S. pneumoniae* type III の大槽内接種ラットに対する ASPC の治療効果

本感染モデルが抗菌剤の化膿性髄膜炎に対する治療効果の評価に利用できるかどうかを ASPC を用いて検討した。本菌  $1 \times 10^5$  CFU/ラット大槽内接種 24 時間後のラットに ASPC を尾静脈内へ単回投与し、14 日間の生存数を薬剤無投与対照群と比較した。Table 4 に示したように、薬剤無投与対照群が 2 日以降に全例 (3/3) 死亡したのに対して、ASPC 投与群は  $20$  mg/kg 投与で全例

Table 4. Therapeutic effect of ASPC on experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III in rats

Dose	No. of survivors						
	(Days after injection)						
	0	1	2	4	5	7	14
20 mg/kg	5	5	5	5	5	5	5
4 mg/kg	5	5	5	4	3	1	1
Control	3	3	3	0	0	0	0

ASPC was intravenously injected 24 h after infection.

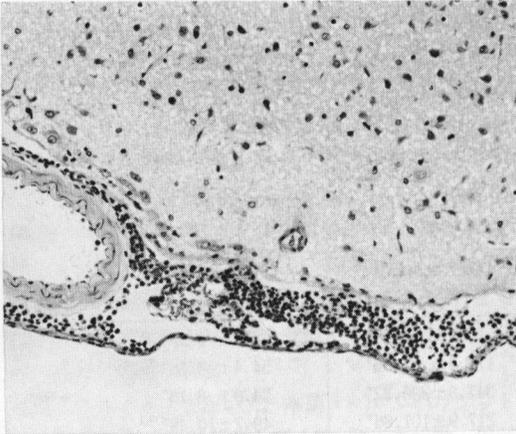


Fig. 1-a

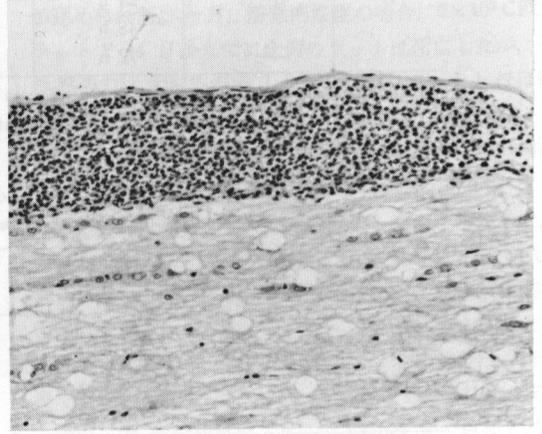


Fig. 1-b

Fig. 1. Histology of cerebral and spinal cord lesions in rats induced by intracisternal inoculation of *S. pneumoniae* type III.

HE stain.  $\times 150$ .

- Basal region of cerebrum of a rat sacrificed 24 hours after inoculation. Inflammatory cellular infiltration is seen in subarachnoid space.
- Spinal cord of a rat sacrificed 24 hours after inoculation. Marked inflammatory cellular infiltration is seen in subarachnoid space.

(5/5), 4 mg/kg 投与で1例 (1/5) が14日後まで生存し、投与量に依存した治療効果が認められた。また、ASPC 投与後14日間生存したラットには体重の増加および髄液中細菌の陰性化が観察された。

#### 5. 病理組織学的所見

病理組織学的検索は本菌  $1 \times 10^5$  CFU/ラット大槽内接種後24時間および44時間に行なった。Fig. 1に24時間後の典型的な化膿性髄膜炎像を示した。検索した大脳、小脳、延髄および脊髄いずれの部位でも、クモ膜下腔に好中球を主体とする炎症性細胞浸潤（いわゆる膿性浸潤）が観察された。クモ膜下腔に貯留した膿性渗出物の量は24時間後の病理像に比較し、44時間後の像で若干多かった。一方、対照としてTSBのみを大槽内接種し、24時間および44時間後に検索した2例中1例にクモ膜下腔に軽微な炎症性細胞浸潤像が観察されたが、細

菌接種例と比べると、ほとんど無視し得る程度のものであった。

本菌接種24時間後にASPC 20 mg/kg 静脈内単回投与し、14日間生存した例ではFig. 2に示したように、大脳底部のクモ膜下腔に局限した単核円形細胞の小集簇がわずかに観察されたが、小脳、延髄および脊髄には特記すべき変化は観察されなかった。

### III. 考 察

実験動物における感染症病態モデルは作製が容易で臨床像により近いことが望まれる。今回、我々が作製したラット化膿性髄膜炎モデルは、病理組織学的検索において各部クモ膜下腔に典型的な化膿性髄膜炎像が観察されたこと、および髄液の血液生化学的検査におけるヒトの化膿性髄膜炎診断基準<sup>8-9)</sup>とされる好中球の出現、総タンパク量の増加およびグルコース量の減少が認められた

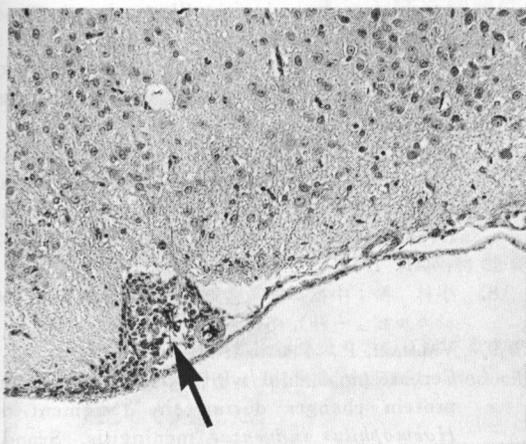


Fig. 2-a

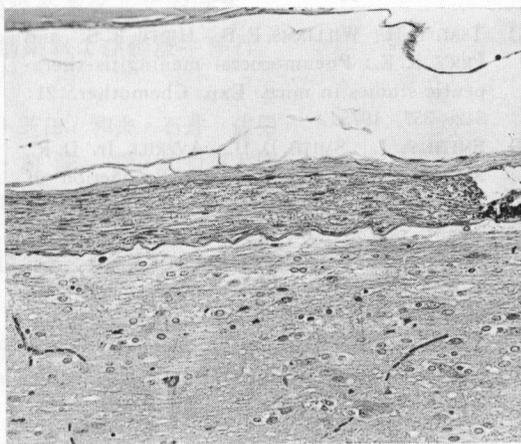


Fig. 2-b

Fig. 2. Histology of cerebrum and spinal cord of a rat treated with 20 mg/kg of ASPC (intravenous bolus injection) 24 hours after *S. pneumoniae* type III inoculation and killed 14 days thereafter. HE stain.  $\times 150$ .

- Basal region of cerebrum of a rat treated with ASPC. Small cluster of round cells (arrow) is seen in subarachnoid space.
- Spinal cord of a rat treated with ASPC, showing normal morphology.

ことなどから、実験動物における化膿性髄膜炎モデルとして妥当であると考えられた。

本モデルの特徴は比較的手技が簡便で、化膿性髄膜炎の主要な起炎菌である<sup>10-11)</sup>肺炎球菌を用いた致死性のモデルである。この致死性については細菌接種後の血液中および髄液中菌数の消長を、敗血症による死亡と考えられる静脈内接種ラットのそれと比較した。本モデルでは髄液中菌数は常に血液中菌数よりも高い値を維持し、ラットが死亡寸前である72時間後でも髄液中菌数( $2 \times 10^7$  CFU/ml)が血液中菌数( $8 \times 10^2$  CFU/ml)より明らかに高い値を示していた。一方、静脈内接種の場合、血液中菌数は髄液中菌数より常に高い値を示してラットは死亡した。このことから、本モデルにおけるラットの死亡原因は化膿性髄膜炎によるものと考えられた。

化膿性髄膜炎モデルは種々の動物を用いて作製されているが<sup>1-7)</sup>、これらは血行性によるモデルと大槽内接種によるモデルに分けられる。血行性による感染は主に幼若ラットが用いられ、経鼻および腹腔内接種により惹起している<sup>2-4)</sup>。しかしながら、幼若ラットは個体が小さく髄液採取が困難な点がある。大槽内接種による感染は一般に成熟家兎が用いられており、主に抗菌剤の髄液中への移行性が検討されている<sup>6,7)</sup>。家兎を用いたモデルは髄液採取が比較的容易で、連続採取が可能なことから髄液中薬物動態解析が詳細に検討できる利点がある。しかし、家兎は薬剤を比較的多量必要とするため、例数を多

数必要とする感染治療実験には経費増大等のマイナス面が考えられる。本モデルはラットを用いたことにより家兎の約1/10のスケールで実験が可能であり、致死性モデルであることから、抗菌剤の髄液中への移行性と髄液中殺菌作用の結果をラットの生死、すなわち、治療効果として手軽に検討できる。さらに、本モデルにおけるラット髄液採取量はラットの頭蓋内圧に依存するが、ラットが死亡直前まで採取すると最大量で約50  $\mu$ lの採取が可能であることから、薬剤の髄液中濃度も高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いることにより検討できる。また、ラットは細菌接種2日後より死亡すること、および1回当りの髄液採取間隔を3時間以上、採取量を10~15  $\mu$ lと少なくすると、連続採取(3~4回)が可能になることから、同一個体における髄液中の菌数推移、すなわち、抗菌剤の髄液中殺菌作用の検討ができる。

このように、今回報告したラット肺炎球菌性髄膜炎モデルは抗菌剤評価に必要な種々の検討が可能なモデルであり、抗菌剤の臨床での有用性を予測する上で有益なモデルと考えられる。

(謝辞) 本研究に際し、貴重な御助言をいただいた田辺製薬株式会社生物研究所主任研究員杉原重孝氏に深謝致します。

## 文 献

- 1) TSAI, Y. H., WILLIAMS, E. B., HIRTH, R. S. and PRICE, K. E.: Pneumococcal meningitis-therapeutic studies in mice. *Exp. Chemother.* 21: 342~357, 1975
- 2) SMITH, A. L., SMITH, D. H., AVERILL, Jr. D. R., MARINO, J. and MOXON, E. R.: Production of *Haemophilus influenzae* B meningitis in infant rats by intraperitoneal inoculation. *Infect. Immun.* 8: 278~290, 1973
- 3) MOXON, E. R., SMITH, A. L., AVERILL, D. R. and SMITH, D. H.: *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats after intranasal inoculation. *J. Infect. Dis.* 129: 154~162, 1974
- 4) KIM, K. S., MANOCCHIO, M. and BAYER, A. S.: Efficacy of cefotaxime and latamoxef for *Escherichia coli* bacteremia and meningitis in newbornrats. *Chemotherapy (Base 1)* 30: 262~269, 1984
- 5) VERGIN, H., BISHOP-FREUDLING, G. B., FOING, N., SZELENYI, I., ARMENGAUD, H. and THO, T.: Diffusion of metioprim, tetroxoprim and sulphadiazine in the cerebrospinal fluid of dogs with healthy meninges and dogs with experimental meningitis. *Chemotherapy(Base 1)* 30: 297~304, 1984
- 6) 小林 裕, 春田恒和, 阪田保隆: 感染症の実験モデルと化学療法, 髄膜炎. *化学療法の領域* 1: 806~812, 1985
- 7) DACEY, R. G. and SANDE, M. A.: Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 437~441, 1974
- 8) 小林 裕: 中枢神経系感染症総論. *感染症学 (メジカルビュー社)*, 532~534 頁, 1982
- 9) VALMARI, P., PELTOLA, H. and KATAJA, M.: Cerebrospinal fluid white cell, glucose and protein changes during the treatment of *Haemophilus influenzae* meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 18: 39~43, 1986
- 10) 小林 裕, 春田恒和, 森川嘉郎, 藤原 徹: 本邦における 1966 年以降 13 年間の小児化膿性髄膜炎の動向. 127 施設におけるアンケート調査成績. *Jap. J. Antibiot.* 32: 795~805, 1979
- 11) 小林 裕: 各種感染症と抗菌薬の使い方, 髄膜炎. *治療* 67: 861~866, 1985

## AN EXPERIMENTAL MENINGITIS MODEL IN RATS USING *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* TYPE III

OSAMU KASUGA, KATO TANI, KAZUO SHIBATA, NOBUO ISHII,  
SATOSHI OKUNO, YOSHIMITSU SAKUMA, ISAO MAEZAWA,  
HITOSHI IWASAKI and TOUTARO YAMAGUCHI

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Toda

An experimental meningitis model in rats was prepared by intracisternal inoculation with  $1 \times 10^8$  CFU/rat of *Streptococcus pneumoniae* type III. The rats began to die 2 days after infection and all had died within 5 days. Bacterial cell counts in the cerebrospinal fluid (CSF) of the infected rats were always higher than those in blood until immediately before death. Biochemical analysis of the infected CSF revealed that the number of migrated polymorphonuclear leucocytes (PMN) and the total protein level increased significantly, whereas the glucose level decreased. In the infected rats, extravasation of inflammatory cells consisting mainly of PMN was observed in the subarachnoid space of the cerebrum, cerebellum, medulla oblongata, and spinal cord by histological examination. Accordingly, this is considered a fatal *S. pneumoniae* meningitis model in rats.