

ラット carboxymethyl cellulose ポーチ系による新実験的感染症モデルの作成

安食 洋子・川田 晴美・飯島 政子

安田 紘・岩田 正之

三共株式会社生物研究所*

(平成2年1月10日受付・平成2年2月28日受理)

ラット背部皮下に作成する carboxymethyl cellulose (CMC) ポーチを応用し、実験的感染モデルを作り、従来から用いられてきたクロトン油肉芽腫ポーチ法との比較を行った。その結果、1) 感染菌として用いた *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, および *Bacteroides fragilis* はいずれも両ポーチ内で速やかに増殖し、感染の成立が認められた。2) 菌感染惹起時のポーチ内液中白血球数、補体価、浸出蛋白質量は両ポーチで異なったが、感染24時間後にはほぼ等しくなった。浸出蛋白質の組成および成分比については両ポーチ間に差を認めなかった。3) 病理組織学的には、CMC ポーチ内皮下組織で著しい好中球の浸潤を主とする炎症像が、また、クロトン油ポーチ内皮下組織で肉芽腫がそれぞれ観察された。4) ポーチ内への β -ラクタム剤の移行は CMC ポーチでより良好であった。

以上のことから、CMC ポーチ内実験的感染症モデルは各種抗菌剤の評価系として使用し得るものであり、さらに操作が簡単で短時間で実験に供することができる利点を有することが示された。

Key words: 実験的感染症, ラット, Carboxymethyl cellulose pouch, Granuloma pouch

In vivo における抗生物質の抗菌力評価は主としてマウスの全身感染症に対する治療成績によってなされてきたが、これと平行して、より臨床での感染症に近い系、また、感染の場での薬物動態を加味した抗感染効果の評価が可能な系の開発が進められてきた。これら所謂実験的局所感染症系の1つとして1953年 SELYE¹⁾はラットを用いたクロトン油肉芽腫ポーチ法を考案した。この系ではポーチ内に惹起した感染の消長を、ポーチ内滲出液中生菌数の推移という形で比較的長時間にわたって同一個体を用いて評価でき、さらに取り出した滲出液中の薬剤濃度も同時に測定し得るという利点を有し、抗生物質の *in vivo* 評価系の一つとして多用されてきた^{2,3,4)}。しかし、本系はポーチの作成に7~12日を要すること、クロトン油に発癌性が認められていること^{5,6)}、さらにポーチ内滲出液中に常にクロトン油、オリーブ油が微量混在するため、サンプルの取り扱い、使用器具の汚染の面で支障をきたすことがあること等の理由により手軽に使用できるものとは言い難かった。そこで我々は、このクロトン油肉芽腫ポーチ法に代わり得る実験的感染症系の開発を目的としてきたが、今回、抗炎症剤の評価系として従来用いられてきた carboxymethyl cellulose ポーチ法^{7,8)}が本目的に合致することを見出し、従来のクロトン油肉芽腫ポーチ法と比較検討したので報告する。

I. 材料と方法

1) 薬剤

Cefmetazole (CMZ) 三共(株), flomoxef (FMOX) 塩野義製薬(株)および cefodizime (CDZM) (当社研究所にて合成)を用いた。Carboxymethyl cellulose (CMC) は第一化学薬品(株)より、また、クロトン油、オリーブ油はそれぞれ東京化成工業(株)、三晃製薬工業(株)より購入した。

2) 動物

体重130g前後のウイスター今道系雄性ラットを動物繁殖研究所(土浦市)より購入し、約1週間の予備飼育の後実験に供した。

3) 菌株

Staphylococcus aureus Smith 株, *Escherichia coli* 704 株, *Pseudomonas aeruginosa* 1008 株, および *Bacteroides fragilis* 30079 株を用いた。前3菌株はトリプトソイブイオン培地 (TSB, BBL) 中で37°C, 20時間培養したものを、また、*B. fragilis* は GAM ブイオン (GAM-B, 日水) 中で37°C, 20時間、嫌氣的条件下で培養したものをそれぞれの培地で適宜希釈し、感染菌液として使用した。

4) CMC ポーチの作成と感染の惹起

*東京都品川区広町 1-2-58

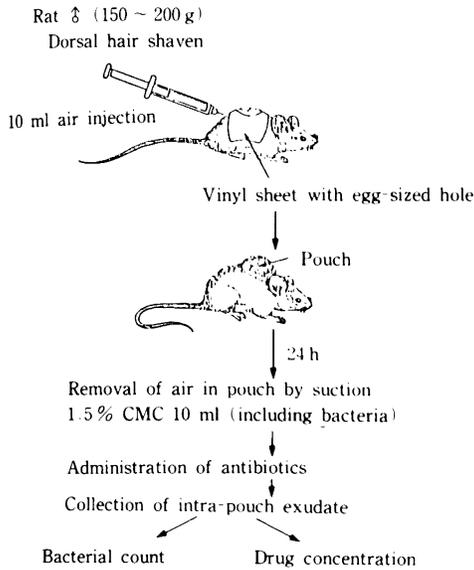


Fig. 1. Pouch formation and induction of infection in rat

CMC ポーチの作成は石川らの方法²⁾に従い、Fig. 1 に示すごとく行った。すなわち、麻酔下でラット背部の皮毛を電気バリカンで切除し、鶏卵大に穴をあけたビニールシートで除毛した肩甲骨の後部を覆い、その後部約 3 cm の所から 21 G の注射針を皮下に刺入し、10 ml の空気を注入して皮下に卵型の空気ポーチを作成した。注射針を引き抜いた直後、刺入口を瞬間接着剤で封じた。翌日、麻酔下でポーチ内の空気を吸引除去した後、滅菌した 1.5% CMC の生理的食塩水（生食水）懸濁液 10 ml を注入して CMC ポーチを作成した。感染の惹起は、所定の菌数を含む感染菌液 1 ml を CMC ポーチ作成のために注入する CMC 懸濁液 10 ml に混合することにより行った。

5) クロトン油肉芽腫ポーチ (granuloma ポーチ) の作成と感染の惹起

SELYE の方法³⁾に従った。すなわち、CMC ポーチ作成の際と同様の方法で空気ポーチを作成し、直後に 1% のクロトン油を含むオリーブ油 1 ml を注入した。2 日後、ポーチ内の空気を除去した。感染の惹起は、クロトン油ポーチ作成後 1 週間目に所定の菌数を含む感染菌液 1 ml をポーチ内に注入することにより行った。

6) 薬剤によるポーチ内感染の治療

各薬剤は注射用蒸留水に溶解し、菌感染 1 時間後に 50 mg/kg を静脈内投与した。

7) ポーチ内生菌数の測定

ポーチ内液 0.2 ml を注射筒にて採取し、TSB で希

釈、トリプトソイ寒天 (TSA, BBL) 平板に 0.1 ml 塗布して培養後生じたコロニー数から生菌数 (colony forming units; CFU) を算出した。*B. fragilis* の場合には採取したポーチ内液を GAM B で希釈、GAM 寒天 (GAM A, 日水) 平板に 0.1 ml 塗布して嫌気的条件下で培養した。一群 3 ~ 4 匹を用いた。

8) ポーチ内滲出液中白血球数の測定

採取したポーチ内液を、CMC ポーチの場合は生食水で、granuloma ポーチの場合にはチュルク液で適宜希釈して血算盤にて計数した。一群 5 匹を用いた。

9) ポーチ内滲出液中補体価の測定

MAYER 原法⁹⁾の 1/2.5 法により測定した。一群 5 匹を用いた。

10) ポーチ内滲出液中蛋白質量とその組成の測定

蛋白質量は FOLIN 法¹⁰⁾により測定した。なお、標準曲線は bovine serum albumin を用いて作成した。蛋白質の定性は 10% SDS-polyacrylamide 電気泳動で、標準物質として γ -globulin, albumin, α_1 acid glycoprotein を用いて行った。各蛋白質成分の定量は cellulose acetate 膜電気泳動後の densitometer による測定にて行った。一群 3 ~ 4 匹を用いた。

11) 組織切片の作製と染色

10%緩衝ホルマリン液で組織片を固定し、定法に従ってパラフィン切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色およびギムザ染色を施した。

12) ポーチ内薬剤濃度の測定

採取したポーチ内液中の薬剤濃度を bioassay 法で測定した。検定菌として *B. subtilis* を用いた。一群 3 ~ 4 匹を用いた。標準曲線作成用の各抗生剤の 2 倍段階希釈液は 1.5% CMC の生理的食塩水懸濁液もしくは granuloma ポーチ内滲出液を用いて作成した。

II. 成 績

1) ポーチ内感染菌数の推移

S. aureus Smith 株は 1×10^9 , 1×10^7 , 1×10^5 CFU/rat, *E. coli* 704 株, *P. aeruginosa* 1008 株は 1×10^8 , 1×10^6 , $1 \cdot 10^4$ CFU/rat, *B. fragilis* 30079 株は 1×10^{10} , 1×10^8 , 1×10^6 CFU/rat, 各ポーチ内に注入接種した。

ポーチ内生菌数の推移を Fig. 2 a) ~ d) に示した。各菌共、接種量のいかんにかかわらず両ポーチ内ではほぼ同様に増殖し、感染 24 時間後にはいずれの場合も $10^7 \sim 10^9$ CFU/ml に達したが、*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. fragilis* では感染 3 時間後までの増殖が granuloma ポーチで抑制される傾向が認められた。

2) ポーチ内滲出液中白血球数の推移

結果を Fig. 3 a) に示した。横軸は菌感染後時間で

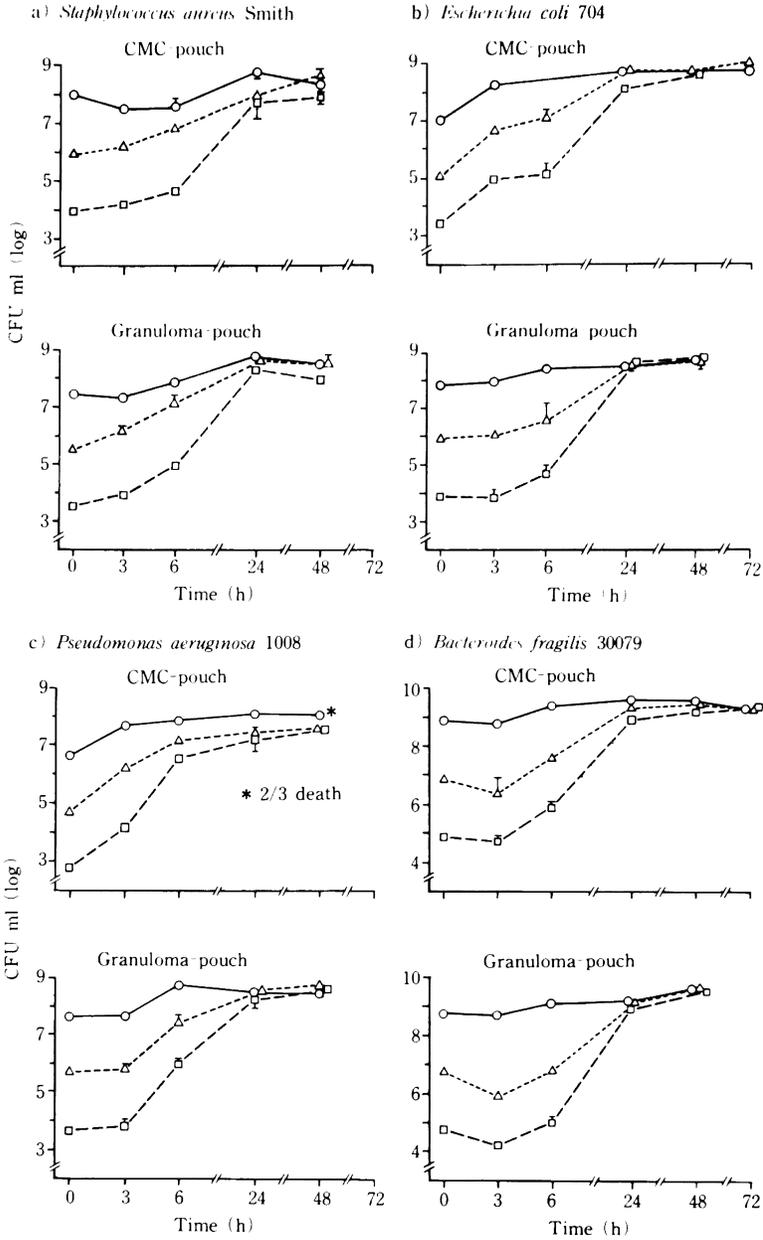


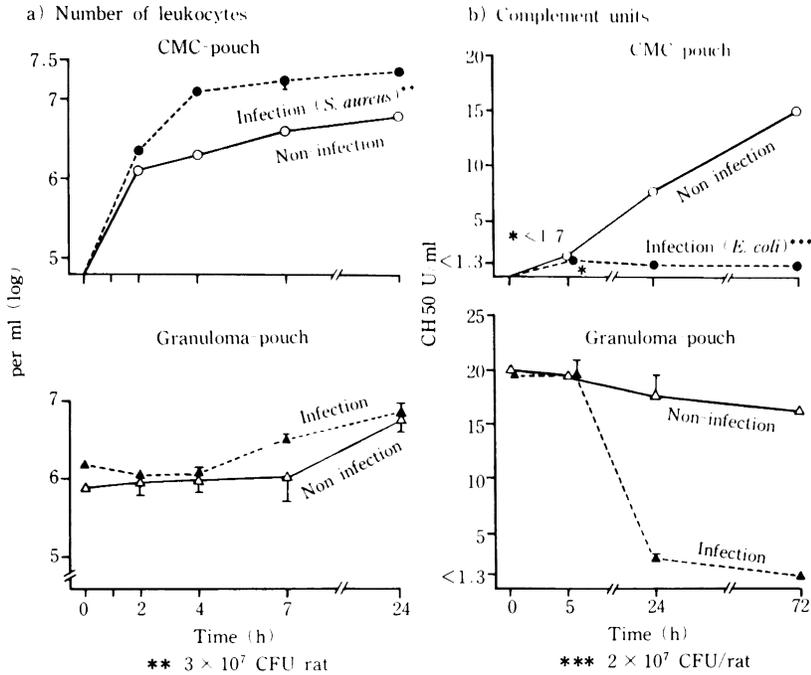
Fig. 2. Number of bacteria in pouch

ある。CMC ポーチではポーチ作成と同時に菌を感染させるため、菌感染時、すなわち0時間、における白血球数はほぼ0であった。これに対し、granuloma ポーチではポーチ作成後1週間を経てから菌を感染させるため、菌感染時のポーチ内滲出液中白血球数はすでに約 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に達していた。CMC ポーチでも時間の経過と共に白血球数は増加し、24時間後には

granuloma ポーチでのそれとほぼ同数になった。CMC ポーチ内での白血球数の増加は菌感染 (*S. aureus*) 時でより速やかであった。

3) ポーチ内滲出液中補体価の推移

結果を Fig. 3 b) に示した。CMC ポーチでは、白血球数の推移の場合と同様、菌感染時の補体価はほぼ0であった。これに対し、granuloma ポーチ浸出液中補



S. aureus : *Staphylococcus aureus*, *E. coli* : *Escherichia coli*

Fig. 3. Defence factors in pouch : number of leukocytes and complement units

体価は菌感染時すでに約 20 CH₅₀に達していた。非感染の CMC ポーチ内補体価は CMC 注入後速やかに上昇し、72 時間後には granuloma ポーチ内でのそれとほぼ同レベルに達した。菌感染 CMC ポーチ内の補体価は上昇しなかった。Granuloma ポーチ内補体価は菌感染後速やかに下降した。

4) ポーチ内滲出蛋白量とその組成

ポーチ内滲出蛋白量の推移を Fig. 4 a) に示した。CMC ポーチ内蛋白量はポーチ作成(菌接種)時以降 24 時間まで経時的に増加し、その程度は菌感染の有無に依存しなかった。Granuloma ポーチ内蛋白量は菌感染時すでに 20~25 mg/ml に達しており、その後感染群では漸増傾向を示したが、非感染群ではほぼ定値で推移した。ポーチ内滲出蛋白の組成を Fig. 4 b) に示した。ポーチの種類、感染の有無にかかわらず、蛋白組成およびその成分比は常にほぼ一定で、正常ラット血清中の蛋白組成、成分比との間に大差を認めなかった。

5) 病理組織学的検討

Fig. 5 a) は CMC 注入 24 時間後の CMC ポーチの組織像である。皮下組織では細胞、特に好中球の著しい浸潤が、また、皮下組織から筋層にかけては浮腫、結合織の膨化、断裂、筋束の解離などが認められ、典型的な炎症像と思われた。Fig. 5 b) はクロトン油注入

8 日後の granuloma ポーチのものである。大小の空胞が多数認められ、その間隙を埋めるように繊維芽細胞と結合組織の著しい増生、毛細血管の新生が見られ、肉芽腫となっていた。

6) ポーチ内感染に対する各種 β-ラクタム剤の治療効果とポーチ内薬剤濃度推移

S. aureus Smith 株によるポーチ内感染に対する CMZ, FMOX, CDZM の治療効果と、その時の各薬剤のポーチ内濃度推移をそれぞれ Fig. 6 a), 6 b) に示した。なお、感染菌に対する各薬剤の MIC (μg/ml) は、CMZ ; 1.56, FMOX ; 0.39, CDZM ; 6.25 であった。CMZ, FMOX の治療効果は両ポーチで良好であったが、CDZM の治療効果は両ポーチ間で著しく異なった。ポーチ内薬剤濃度は、各薬剤共、CMC ポーチに比べ granuloma ポーチで低く推移した。

III. 考 察

実験的感染症モデルの一つとして従来用いられてきた granuloma ポーチ内感染系に代わり得る系の作成を目指し、carboxymethyl cellulose (CMC) ポーチ内感染系を考案した。この系が各種抗菌薬の評価を目的とした実験的感染症系として有用なものであるかどうかを明らかにする目的で、いくつかの角度から granuloma ポーチ法と比較検討した。

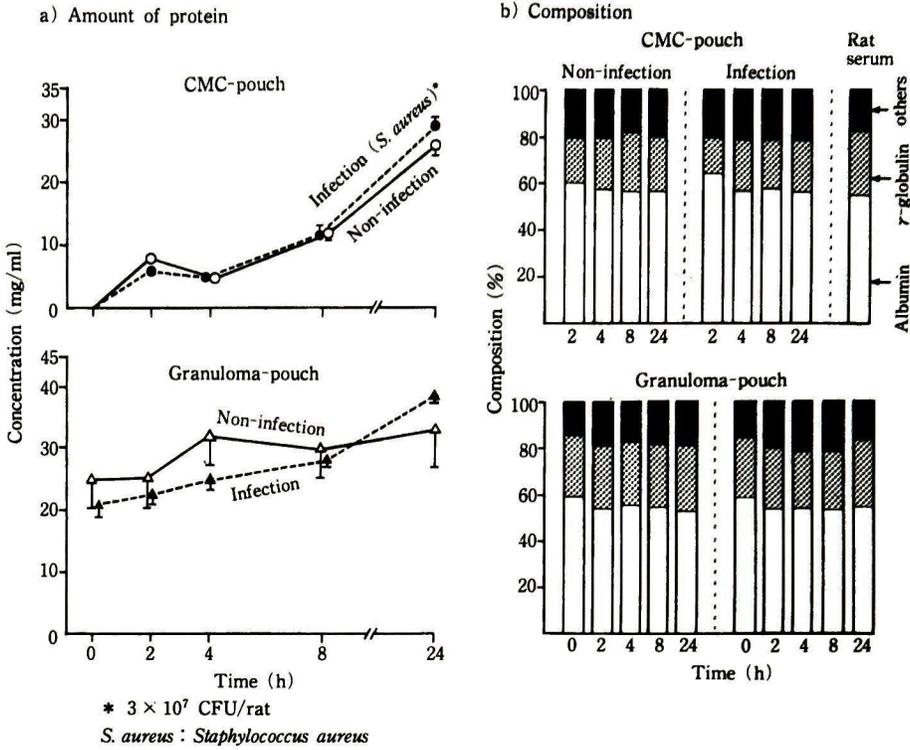


Fig. 4. Amount and composition of exudated protein

a) CMC pouch

b) Granuloma pouch

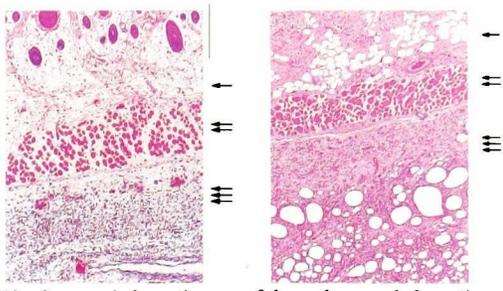


Fig. 5. Histopathological sections of both pouches

まず、感染菌として *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* および *B. fragilis* を用いて、接種後のポーチ内生菌数を測定した。その結果、接種された各菌は CMC ポーチ内で、granuloma ポーチ内でも同様によく増殖し、感染が成立することが示された。なお、菌接種0時間の両ポーチ内液量1 ml 当りの菌数 (Fig. 2) が異なるのは、両ポーチ内液量が異なるためである。また、CMC ポーチ、granuloma ポーチ共にポーチ内滲出液中に

$10^7 \sim 10^9$ CFU/ml の菌が検出される状態は少なくとも菌接種後2週間持続することを確認している。この間ラットは生存したが、*P. aeruginosa* の高菌量を感染させた CMC ポーチ群では1~3日の間に全例が、granuloma ポーチ群では4~6日の間に4例中3例が死亡した。これらのラットでは死亡直前に血中で *P. aeruginosa* の生菌数が著増することを確認した。

生菌数の推移についてみると [Fig. 2 a)~d)], *E. coli* と *P. aeruginosa* は、CMC ポーチでは接種直後から速やかに増殖を始めたが、granuloma ポーチでは接種3時間後まで増殖が抑制される傾向が認められた。*S. aureus* は両ポーチでほぼ同様の推移を示した。*B. fragilis* は両ポーチで共に感染初期にいったん菌数が減少する傾向が観察されたが、その程度は granuloma ポーチでより顕著であった。これら両ポーチにおける接種後生菌数の推移の違いは、菌接種時における両ポーチ内の生体防禦因子、すなわち白血球数、補体価、の量的相違によるものと推測された。すなわち、CMC ポーチ内への菌の接種は CMC ポーチの作成と同時に行為されるため、その時点での CMC ポーチ内液中の白血球数、補体価はほぼゼロであると考えられる [Fig.

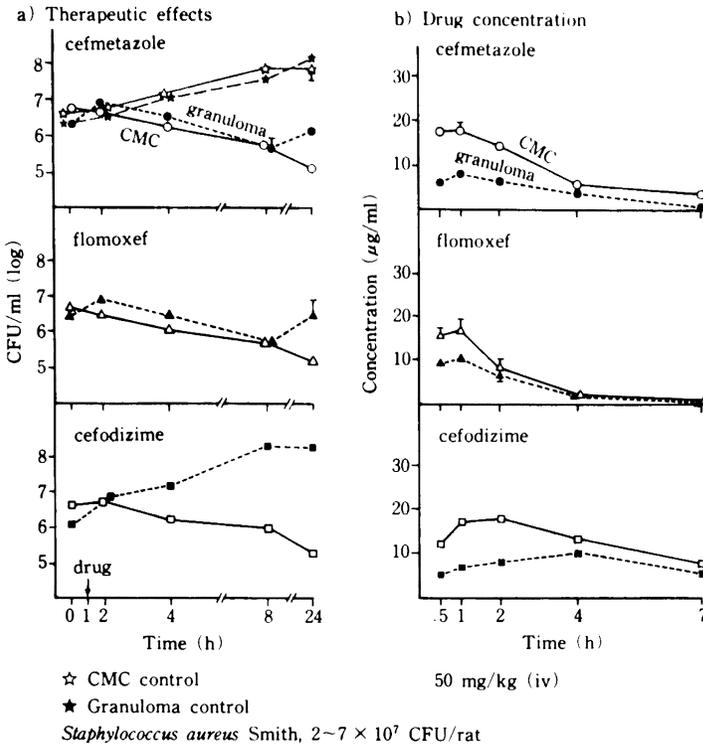


Fig. 6. Therapeutic effects of β -lactam antibiotics on an infection in the pouch and drug concentration in the pouch

3 a), b)]. これに対して, granuloma ポーチ内への菌の接種はポーチ作成後約1週間を経てから行われるため, その時点で, ポーチ内は白血球, 補体を含む滲出液が貯留した状態にある [Fig. 3 a), b)]. それゆえ, granuloma ポーチ内に接種された菌は, ただちにそれら防禦因子の攻撃にさらされることになり, その結果初期の増殖が妨げられるのであろうと考えられる。事実, granuloma ポーチ内の補体価は菌の接種により急激に減少し, CMC ポーチ内の補体価は菌感染時には上昇しなかった [Fig. 3 b)]. 結果は示さなかったが, ポーチ内への菌の接種により血清中補体価にはさしたる変動が生じないことを確認しており, ポーチ内補体価の減少は, 感染局所での菌と生体防禦因子との攻防を示唆するものであろう。*S. aureus* 感染の場合のみ菌接種後生菌数の推移に両ポーチで違いが見られなかった理由は明らかではないが, 補体その他に対する感受性がグラム陽性菌と陰性菌とで異なることに起因するのではないかと考えられる。

ポーチ内滲出蛋白量は, CMC ポーチの場合, ポーチ作成 (菌接種) 後速やかに増加した。これに対し, granuloma ポーチの場合には, さきに述べた理由によ

り菌感染時にすでに高値を示していた。滲出蛋白組成とその成分比については, 両ポーチ共正常ラット血清中のそれらとほぼ同じであった。CMC ポーチにおいても, 白血球数, 補体価, 滲出蛋白量は共にポーチ作成24時間後には granuloma ポーチ内とほぼ同じレベルに達し, 病理組織像 [Fig. 5 a), b)] が示すごとく, 炎症と肉芽腫という両ポーチ成因上の違いは明らかであっても, 感染の場としての諸条件はほぼ同じであることが示された。

次に, *S. aureus* による両ポーチ内感染に対する各種 β -ラクタム剤の治療効果およびポーチ内薬剤濃度を比較した [Fig. 6 a), b)]. CMZ, FMOX の治療効果は両ポーチで共に良好であったが, CDZM のそれには著しい差が生じた。この原因は CDZM の両ポーチ内への移行性の違いに起因するものと考えられた。CMZ, FMOX の場合も CDZM と同様, CMC ポーチ内濃度に比べ granuloma ポーチ内濃度が常に低値を示したが, 両薬剤の感染菌に対する抗菌力 (MIC) が優れていたため治療効果にさほどの差が生じなかったものと考えられる。各薬剤の CMC ポーチ, granuloma ポーチへの移行性が異なることの理由は明らかではな

いが、両ポーチの成因の違いに起因するものと考えられる。すなわち、クロトン油ポーチにおける肉芽形成が薬剤透過性阻害要因の一つとなったのであろう。

以上、今回我々が実験的局所感染症モデルの一つとして作成したラット背部皮下 CMC ポーチ内感染系が、従来用いられてきた granuloma ポーチ法と同様に、感染部位への薬剤移行を加味した抗菌剤の評価系として使用可能なものであり、さらに、ポーチの作成と菌感染がクロトン油を用いることなく短期間で簡単に行えるという利点を有するものであることを示した。

カテーテル、カニューレ挿入に端を発する感染症、呼吸器感染症、尿路感染症等々、感染部位に十分な濃度の抗菌剤が存在し得ると考えられるのにもかかわらず、それら感染症が難治化の過程をたどる場合が数多く知られている。最近、これら感染症の難治化の原因として菌による biofilm の形成が考えられるようになってきた^{11,12)}。感染菌の組織への定着、biofilm の形成、その場への抗菌剤の移行、菌との接触と相互作用といった感染の場における一連の出来事に関する研究は今後の感染症治療学の重要な一側面になるものと考えられる。

こうした研究の手段の一つとして granuloma ポーチを用いる試みもなされており¹³⁾、今回我々が開発した CMC ポーチ内感染系はこのような研究手段の一つとしても有用なものとなる可能性を持つものと考えられる。

謝 辞

本研究に際し、*B. fragilis* 30079 株を供与下さり、貴重な御助言をいただいた岐阜大学嫌気性菌研究施設の上野一恵教授に深謝いたします。

文 献

- SELVE H : On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissue to injury. An experimental study with the granuloma pouch technique. *JAMA* 152 : 1207~1213, 1953
- NISHIDA M, MURAKAWA T : Exudate levels and bactericidal activity of cefazolin in a new local infection system using rat granuloma pouches. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 11 : 1042~1048, 1977
- 渡辺泰雄, 西田亨子, 山本忠美子, 林 敏雄, 保田隆, 才川 勇 : ラット Pouch 内実験的感染症系に於ける薬剤の効果。 *Chemotherapy* 27 : 865~869, 1979
- 大橋兼津希, 加藤直樹, 渡辺邦友, 上野一恵 : ラット・パウチを用いた *Bacteroides fragilis* 感染の治療実験。 *嫌気性菌感染症研究* 17 : 99~104, 1987
- BOUTWELL R K, BOSCH D, RUSCH H P : On the role of croton oil in tumor formation. *Cancer Research* 17 : 71~75 1957
- BOUTWELL R K, BOSCH D K : The carcinogenicity of creosote oil : its role in the induction of skin tumors in mice. *Cancer Research* 18 : 1171~1175, 1958
- 石川 浩, 新延信吉, 鶴藤 丞 : 抗炎症薬の作用形式の研究, Carboxymethyl cellulose 嚢法による抗炎症作用の定量的解析。 *薬学雑誌* 88 : 1472~1477, 1968
- 田中喜一郎, 飯塚義夫 : Bimetopyrol の抗炎症作用 (第 1 報) 急性炎症に対する抑制効果。 *薬学雑誌* 92 : 1~10, 1972
- MAYER M M : Complement and complement fixation. In : *Experimental Immunochimistry*. 2nd ed. pp.133~240, Thomas, C. C. Publ., Springfield, 1961
- HENRY R, SOBEL C, KIM J : A modified carbonate-phosphotungstate method for the determination of uric acid and comparison with the spectrophotometric uricase method. *Am. J. Clin. Pathol.* 28 : 152~159, 1957
- 牧之瀬信一, 水間良裕, 川原和也, 川原元司, 後藤俊弘, 坂本日朗, 大井好忠 : 実験的易感染性マウスの膀胱上皮細胞への細菌接着性の検討。第 37 回日本化学療法学会 (東京) 講演抄録集 69 頁, 1989
- 大垣憲隆, 渡辺秀裕, 押谷 浩, 小林宏行 : Biofilm の病理生態学的意義について。第 36 回日本化学療法学会東日本支部総会 (新潟市) 講演抄録集 105 頁, 1989
- 中山一誠, 山地恵美子, 川村弘志, 川口 広, 秋枝洋三, 鈴木俊明, 渡辺哲弥, 糸川冠治 : ラット・パウチ内実験感染系 : 特に *S. aureus* 単独感染および *E. coli*・*B. fragilis* 混合感染について。第 36 回日本化学療法学会東日本支部総会 (新潟市) 講演抄録集 92 頁, 1989

A NEW EXPERIMENTAL INFECTION MODEL
IN A CARBOXYMETHYL CELLULOSE POUCH
ON THE BACK OF RAT

YOKO AJIKI, HARUMI KAWADA, MASAKO IJIMA, HIROSHI YASUDA and MASAYUKI IWATA
Biological Research Laboratories, SANKYO Co., Ltd., 2-58, Hiromachi 1-chome,
Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan

An experimental infection model which was induced in a carboxymethyl cellulose (CMC) pouch on the back of rat was newly designed and compared with the croton oil-induced granuloma pouch method. The results were as follows :

1) *Staphylococcus aureus*, *Eseherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacteroides fragilis* which had been injected into each type of pouch rapidly increased to complete an infection.

2) The number of white blood cells, complement units and amounts of exudated protein in the two types of pouch were almost the same at 24 h after bacterial injection, though different from each other at the time of injection. The composition of exudated protein did not differ between the two types.

3) In the pathological investigations, an inflammatory pattern characterized by a remarkable infiltration of neutrophils in the subcutis of the CMC pouch and a granuloma in the croton oil pouch were observed.

4) Penetration of β -lactam antibiotics into the CMC pouch was better than that into the granuloma pouch.

Our results strongly suggest that the experimental infection model in the CMC pouch was useful in evaluating various antibacterial agents and that the model had the merits of being easy to operate and quick to prepare.