

## *Legionella pneumophila* による DBA/2 系マウス肺炎モデル

檜本佳典<sup>1)</sup>・黒坂勇一<sup>1)</sup>・苅部幸江<sup>1)</sup>・魚山里織<sup>1)</sup>・難波憲司<sup>2)</sup>・  
大谷 剛<sup>1)</sup>・山口恵三<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 第一三共株式会社生物医学第四研究所

<sup>2)</sup> Daiichi Sankyo Pharma Development, USA

<sup>3)</sup> 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

(2009年6月30日受付)

*Legionella pneumophila* 肺炎モデルを DBA/2 系マウスで作出した。DBA/2 系マウスに  $10^6$  CFU の *L. pneumophila* suzuki 株 (血清型 1) を点鼻接種すると、感染 14 日後においても  $10^4$  CFU/Lung の肺内菌数が維持され、マウスの死亡は認められなかった。感染前に Cyclophosphamide を投与すると致死感染となり、感染 4 から 5 日後にかけて全例のマウスが死亡した。病理組織学的には、感染初期には好中球の浸潤が認められたが、感染の進展とともに単球・マクロファージ系細胞の浸潤が顕著となり、感染後期にはリンパ球集簇と肺胞壁の肥厚を伴う間質性肺炎を呈した。透過型電子顕微鏡による肺の超微形態学的観察により、食細胞内での *L. pneumophila* の局在と分裂像が認められ、本モデルは *L. pneumophila* の生体内での増殖に基づく感染系であることが示唆された。

通性細胞内寄生性である *Legionella* 属菌は、自然環境に広く分布するグラム陰性桿菌である。クーリングタワーや循環式温泉などの人工的水利用設備からの分離も多く<sup>1)</sup>、エアロゾルを介して感受性宿主が菌を吸入した場合、肺炎やポンティアック熱を発症する<sup>2)</sup>。*Legionella* 肺炎は経過が急で、致死率も高い。多くの場合、*Legionella* 肺炎の起原菌は *L. pneumophila* であり、本邦においてはその約 43% が *L. pneumophila* 血清型 1 に、その他の血清型を含めると約 70% が *L. pneumophila* に起因すると報告されている<sup>3)</sup>。

一般的に感染病態と感染成立に関与する要因の解析には実験感染モデルが有用であるが、C57BL/6 系マウス<sup>4)</sup>あるいは C3H/HeN 系マウス<sup>5)</sup>

の感染系では肺内菌数が感染 3 日後には  $10^4$  CFU/Lung 以下に減少する傾向を示すことが報告されている。肺内において、感染後 7 日以上菌数が増加あるいは維持されるマウス感染系は、A/J 系マウスの肺炎モデル<sup>6)</sup>のみである。この A/J 系マウスの *Legionella* 肺炎モデルを用いて、菌側の病原因子<sup>7)</sup>、リザーバーとしての原虫の影響<sup>8)</sup> や病態成立における好中球の役割<sup>9)</sup> などが解析されてきた。また、この肺炎モデルは細胞内での接種菌の増殖に基づく感染系であることが報告されており<sup>6)</sup>、抗菌薬の細胞内への移行性を含めた薬効評価にも有用であることが示されている<sup>10)</sup>。

A/J 系マウスの *L. pneumophila* 感染に対する高い感受性は、腹腔マクロファージ内での *L. pneu-*

*mophila*の増殖性と相関するとされている。すなわち、C57BL/6, C3H/HeN, AKRおよびBALB/Cなどのマウス系統のマクロファージ内では*L. pneumophila*は増殖せず、肺内に*L. pneumophila*を接種しても感染は成立しないが、A/J系マウスのマクロファージ内では増殖が認められ、感染も成立する<sup>11~13</sup>。一方、DBA/2系マウス由来のマクロファージ内に感染した*L. pneumophila*は、A/J系マウス由来のマクロファージ内で認められる強い増殖性は示さないものの、感染初期菌数を維持することが報告されている<sup>13</sup>。

今回、我々はDBA/2系マウスを用いて*L. pneumophila*による肺炎モデルの作出を試み、報告されているA/J系マウス肺炎モデルよりも長期に肺内菌数が維持されることを見出した。肺病変の病理組織学的解析を含めて、その*L. pneumophila*肺炎モデルとしての有用性を検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

1996年に本邦で臨床分離された*L. pneumophila* suzuki株 血清型1 (東邦大学医学部 微生物・感染症学講座由来) を供試した。

### 2. 供試動物

動物はDBA/2系マウス (日本チャールス・リバー)、雌性、7週齢を用いた。動物の取り扱いは、第一三共株式会社「動物実験に関する細則」に準拠して実施した。

### 3. マウス肺炎モデル

接種菌液は、TATEDAら<sup>9)</sup>の方法に準じて調製した。すなわち、保存菌液をBuffered charcoal yeast extract (BCYE) 寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) に塗布して37°Cで3日間培養し、発育したコロニーをBuffered yeast extract

broth (BYEB) に接種した。これを、37°C 5%炭酸ガス濃度条件下で20時間振盪培養後、BYEBで25倍に希釈し、同条件下でさらに18時間振盪培養した。この培養液を $2.5 \times 10^7$  CFU/mlとなるように生理食塩液で希釈して接種菌液とした。

この菌液を、ペントバルビタール (ソムノペンチル、共立商事) の腹腔内投与 (72 mg/kg) により麻酔したマウスに、40  $\mu$ L/マウスの割合で点鼻接種した。

易感染処置群では、感染3日前にCyclophosphamide (エンドキサン、塩野義製薬) を300 mg/kgの割合で腹腔内投与した。

### 4. 細菌学的検討

感染1, 4, 7, 10および14日後のマウスから肺を無菌的に採取し (n=5)、副葉以外の肺葉について0.033%リン酸緩衝液 (PB, pH 7.0) を加えてホモジネート液を作製した。これを原液としてPBにて適宜希釈し、BCYE寒天培地に接種して37°Cで3~7日間培養した。培養後BCYE寒天培地上に発育したコロニー数を計測し、希釈倍率を基に肺内菌数を算出した。

### 5. 病理組織学的検討

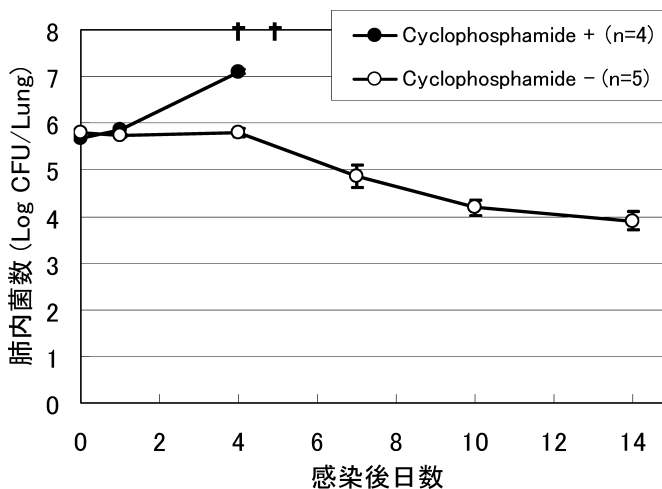
感染マウスから採材した肺の副葉については、10%中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定した後、定法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、これを光学顕微鏡にて観察した。

病態の推移について、便宜的に主要所見のグレードの軽度を1、中等度を2とし、当該グレードの例数との積を合計して各所見のスコアとし、時点ごとの累積表示で示した。

### 6. 超微形態学的検討

感染1, 2および4日後のマウスから肺左葉を採取し (n=2)、グルタルアルデヒド固定後、定

図1. *L. pneumophila* を DBA/2 系マウスに点鼻接種後の肺内菌数推移



常用対数変換した肺内菌数の平均値 ± 標準誤差。Cyclophosphamide 処置群 (4 匹) では、Day 4 および Day 5 に各 2 匹が死亡した。

法に従い、包埋、超薄切、電子染色を実施し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

## 成績

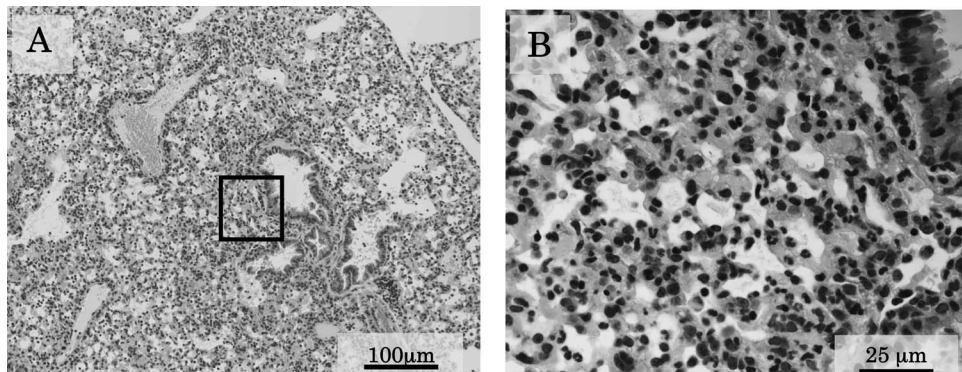
### 1. 肺内菌数の推移

DBA/2 系マウスに *L. pneumophila* suzuki 株  $10^6$  CFU を点鼻接種後 14 日目までの肺内菌数を経日的に検討した。その結果、図 1 に示したように、感染 4 日後までは接種菌量がほぼ維持されたが、その後肺内菌数は緩やかに減少に転じ、感染 7 から 14 日後にかけては  $10^4$  CFU/Lung のレベルで推移した。実験期間中にはマウスの死亡は認められなかった。一方、Cyclophosphamide を処置した DBA/2 系マウス (4 匹) に  $10^6$  CFU の *L. pneumophila* suzuki 株を点鼻接種した場合には、肺内菌数は感染翌日から増加し同 4 日後には  $10^7$  CFU 以上まで達し、感染 4 日後および、感染 5 日後には各 2 匹が死亡した。

### 2. 病理組織学的解析

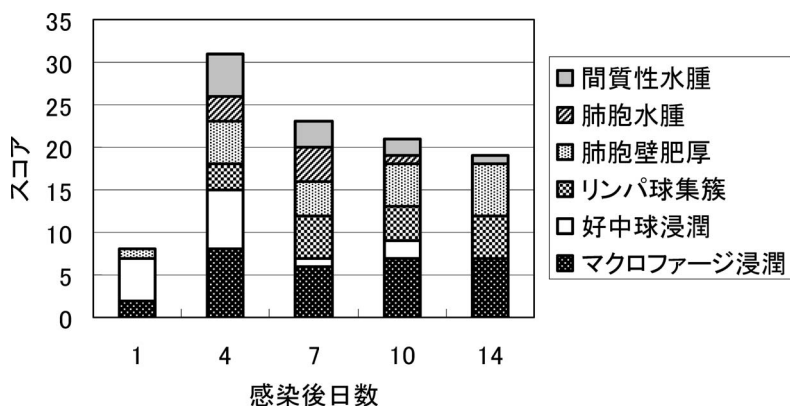
感染翌日から好中球を主体とする炎症細胞が肺胞壁へ浸潤し、この時期から軽度な肺炎像が確認された。感染 4 日後には単球/マクロファージ系細胞の浸潤も顕著となり、リンパ球集簇、肺胞壁の肥厚および水腫性変化を伴う中等度レベルの間質性肺炎像 (図 2) が認められ、その病変は肺全域に広がっていた。その後、肺内菌数が  $10^4$  CFU レベルで推移した感染 7 から 14 日後にかけて、好中球の浸潤および肺胞水腫は軽減したが、肺胞壁の肥厚とリンパ球集簇はいずれの個体標本にも認められ、肺炎病態の質の変化が確認された。肺胞内への浸潤細胞推移に着目すると、感染 1 から 4 日後には好中球が、同 4 日目以降には単球/マクロファージ系細胞へと変化し、また、感染 10 から 14 日後になると単球/マクロファージ系細胞に加えてリンパ球の浸潤も顕著に認められた (図 3)。本感染系では比較的長期に肺から接種菌が分離されたにもかかわらず、結核等の細胞内寄生菌感染で特徴的な肉芽腫形成は、感染 14 日後までのいずれの時点でも認められず、肺組織の傷害像も観

図2. *L. pneumophila* 感染4日後のDBA/2系マウスの肺の光顕像 (HE染色)



A: 低倍像, B: A中央□部分の高倍像

図3. *L. pneumophila* 感染DBA/2系マウスの肺の主要病理所見



各所見について、便宜的に軽度を1、中等度を2とし、当該グレードの例数との積を合計し、各所見のスコアとした。各スコアを時点ごとに累積表示した。

察されなかった。

### 3. 超微形態学的検討

細胞内寄生菌である *L. pneumophila* の本感染系における肺組織での存在様式について電子顕微鏡を用いて解析した。感染翌日の肺を電子顕微鏡で観察した結果、図4に示したように、*L. pneumophila* は肺胞内に浸潤してきたと考えられる好中球の細胞質内（食胞内）に感染・存在しており、一部の菌では二分裂下にあると推察される分裂像が認められた。好中球浸潤が最も多く認めら

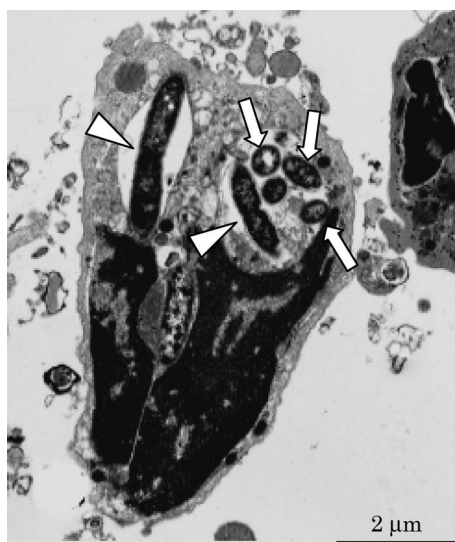
れる感染2日後においても、*L. pneumophila* が細胞内感染している標的細胞は好中球であり、菌を貪食している当該細胞への好中球集簇も認められた（図5）。感染4日後まで単球/マクロファージ系細胞による貪食像は観察されなかった。

### 考察

本研究ではDBA/2系マウスに *L. pneumophila* を点鼻接種して肺炎モデルを作製した。本感染モデルは、既報の致死性のモルモット肺炎モデル<sup>14,15)</sup>



図4. *L. pneumophila*によるDBA/2系マウス肺炎モデル：感染1日後の肺の電顕像



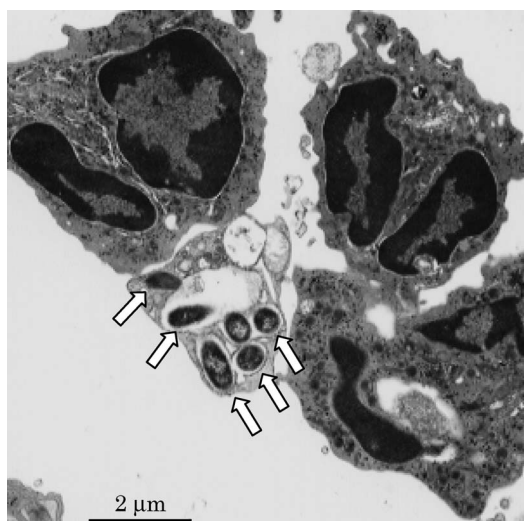
好中球内にレジオネラ菌（矢印）が認められ、一部にはくびれ（矢頭）が認められる。

とは異なり、A/J系マウスの肺炎モデル<sup>6)</sup>と同様に非致死性であり、遷延型の間質性肺炎病態を呈していた。

本研究に供試した *L. pneumophila* suzuki 株（血清型1）をA/J系マウスに気管内接種した報告<sup>9,16)</sup>と比較すると、DBA/2系マウスでは肺における初期の増殖の程度はA/J系マウスには及ばないものの、接種菌は感染14日後まで肺あたり  $10^4 \sim 10^6$  CFU 程度の菌数で推移し、より長期間にわたって肺から分離された。DBA/2系マウス由来のマクロファージに感染した *L. pneumophila* は、肺炎モデルに汎用されるモルモットやA/J系マウス由来のマクロファージ内で認められる強い増殖性は示さないものの、感染初期菌数を維持することが報告されており<sup>13)</sup>、このことは、本肺炎モデルでの肺内菌数の推移とよく一致しているものと推察された。

透過型電子顕微鏡を用いた検討から、本感染モデルは、感染翌日に肺胞内に浸潤した好中球の細

図5. *L. pneumophila*によるDBA/2系マウス肺炎モデル：感染2日後の肺の電顕像



レジオネラ菌（矢印）が認められる細胞を取囲むように好中球の集簇が認められる。

胞質内（食胞内）に菌体が認められ、一部の菌体では分裂像が認められたことから、*L. pneumophila*の細胞内での分裂・増殖に基づく感染系であることを示すものと考えられた。病理組織学的には感染翌日から肺への好中球およびマクロファージの浸潤が認められ、感染4日目以降は好中球が減少し、炎症細胞の主体が単球/マクロファージ系細胞に置き換わることから、*L. pneumophila*を食する免疫担当細胞も好中球から単球/マクロファージ系細胞へと置き換わるものと推察される。A/J系マウスを用いた *L. pneumophila*肺炎モデルにおいては、感染翌日で好中球、同2日後にはマクロファージで *L. pneumophila*の細胞内感染像が観察されている<sup>6)</sup>。本感染モデルでは、初期細胞応答はA/J系マウスのそれとよく一致していたが、DBA/2系マウスでは感染がより長期にわたるため、感染10日目以降のリンパ球の集簇が顕著となることが示され、より長期の宿主の防御応答の経時的推移が観察できるものと考えられた。本研究で認められたDBA/2系マウスの肺全域

における肺胞壁の肥厚および水腫性変化を伴う間質性肺炎像について、ヒトの *L. pneumophila* 感染時の急性気管支肺炎から間質性肺炎像に至る病態<sup>17)</sup>との関連性を推察することは興味深いことである。

一般にヒトの *L. pneumophila* 感染は急性肺炎の病態を呈して進行が速く、重篤な場合は呼吸不全をきたし死に至る<sup>2)</sup>。健康な人も発症するものの、高齢者や新生児に発症が多いことや、喫煙、大量飲酒などのリスクファクターが報告<sup>2)</sup>されているが、重篤化の要因は明らかではない。DBA/2系マウスの肺炎モデルでは、Cyclophosphamide を処置することにより、致死感染に移行することが示され、重篤化の要因解析に何らかの示唆を与えるものと思われた。

本研究では、DBA/2系マウスが *L. pneumophila* 接種によって肺炎像を呈することを明らかにしたが、その発症機構については明らかではない。DBA/2系マウスは、補体成分C5を先天的に欠損しているため食細胞の諸機能が低下しており、例えば *Candida albicans* を同系マウスに尾静脈内感染させると腎臓での菌数増加は他系統マウスよりも著しい結果が報告されている<sup>18)</sup>。このようなDBA/2系マウスの免疫学的背景と *L. pneumophila* 感染に対する感受性の関係の解析は今後の課題である。

## 引用文献

- 1) 小出道夫：注目すべき感染源と対策。化学療法の領域20: 569~578, 2004
- 2) 常 彬, 渡邊治雄：レジオネラ感染症の臨床病型と疫学。化学療法の領域20: 563~568, 2004
- 3) 布施 (都築) 関, 舘田一博, 山口恵三：尿中抗原診断：臨床に与えるインパクト。臨床と微生物32: 335~340, 2005
- 4) FUSE, E. T.; K. TATEDA, Y. KIKUCHI, *et al.*: Role of Toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. *J. Med. Microbiol.* 56: 305~312, 2007
- 5) LETTINGA, K. D.; S. FLORQUIN, P. SPEELMAN, *et al.*: Toll-like receptor 4 is not involved in host defense against pulmonary *Legionella pneumophila* infection in a mouse model. *J. Infect. Dis.* 186: 570~573, 2002
- 6) BRIELAND, J.; P. FREEMAN, R. KUNKEL, *et al.*: Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease. *Am. J. Pathol.* 145: 1537~1546, 1994
- 7) ROSSIER, O.; S. R. STARKENBURG & N. P. CIANCOTTO: *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect. Immun.* 72: 310~321, 2004
- 8) BRIELAND, J.; M. McCLAIN, L. HEATH, *et al.*: Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun.* 64: 2449~2456, 1996
- 9) TATEDA, K.; T. A. MOORE, M. W. NEWSTEAD, *et al.*: Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella* pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infect. Immun.* 69: 2017~2124, 2001
- 10) BRIELAND, J. K.; D. LOEBENBERG, F. MENZEL, *et al.*: Efficacy of SCH27899 in an animal model of Legionnaires' disease using immunocompromised A/J mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1333~1336, 2000
- 11) YOSHIDA, S. & Y. MIZUGUCHI: Multiplication of *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 in cultured peritoneal macrophages and its correlation to susceptibility of animals. *Can. J. Microbiol.* 32: 438~442, 1986
- 12) YAMAMOTO, Y.; T. W. KLEIN, C. A. NEWTON, *et al.*: Differential growth of *Legionella pneumophila* in guinea pig versus mouse macrophage cultures. *Infect. Immun.* 55: 1369~1374, 1987

- 13) YAMAMOTO, Y.; T. W. KLEIN, C. A. NEWTON, *et al.*: Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect. Immun.* 56: 370~375, 1988
- 14) HIGA, F.; N. ARAKAKI, M. TATEYAMA, *et al.*: *In vitro* and *in vivo* activity of olamufloxacin (HSR-903) against *Legionella* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 920~924, 2003
- 15) EDELSTEIN, P. H.; T. SHINZATO & M. A. EDELSTEIN: BMS-284756 (T-3811ME) a new fluoroquinolone: *in vitro* activity against *Legionella*, efficacy in a guinea pig model of *L. pneumophila* pneumonia and pharmacokinetics in guinea pigs. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 667~675, 2001
- 16) DENG, J. C.; K. TATEDA, X. ZENG, *et al.*: Transient transgenic expression of gamma interferon promotes *Legionella pneumophila* clearance in immunocompetent hosts. *Infect. Immun.* 69: 6382~6390, 2001
- 17) 斎藤 厚: 呼吸器感染症—最近の臨床—。感染症叢書: pp. 77~104, 1983
- 18) ASHMAN, R. B.; J. M. PAPADIMITRIOU, A. FULURIA, *et al.*: Role of complement C5 and T lymphocytes in pathogenesis of disseminated and mucosal candidiasis in susceptible DBA/2 mice. *Microb. Pathog.* 34: 103~113, 2003

## Novel model of replicative *Legionella pneumophila* lung infection in DBA/2 mice

YOSHINORI KASHIMOTO<sup>1)</sup>, YUICHI KUROSAKA<sup>1)</sup>, YUKIE KARIBE<sup>1)</sup>, SAORI UOYAMA<sup>1)</sup>,  
KENJI NAMBA<sup>2)</sup>, TSUYOSHI OTANI<sup>1)</sup> and KEIZO YAMAGUCHI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Daiichi Sankyo Co. Ltd., Biological Research Laboratories IV

<sup>2)</sup> Daiichi Sankyo Pharma Development, USA

<sup>3)</sup> Department of Microbiology and Infectious Disease,  
Toho University School of Medicine

We present here a new model of *Legionella pneumophila* lung infection in DBA/2 mice. By intranasal inoculation with  $10^6$  colony-forming units of *L. pneumophila* strain suzuki serogroup 1, persistent non-lethal lung infection was established as reflected by the detection of more than  $10^4$  CFU/lung of the organism 14 days after infection. Treatment of mice with cyclophosphamide before infection enhanced bacterial replication in the lungs and all cyclophosphamide-treated mice experienced lethal infection. Histopathologically, the course of non-lethal lung infection was characterized by early response of neutrophils, then monocyte/macrophages response in the alveoli with disease progression, and diffuse alveolar wall thickening with lymphocyte migration at later phase of infection. Transmission electron microscopic evaluation of the lungs confirmed that *L. pneumophila* located intracellularly within neutrophils and infrequently intracellular bacteria were observed undergoing binary fission. Therefore, the mouse model of replicative *L. pneumophila* lung infection provides method for evaluating pathogenesis of *L. pneumophila* lung infection and antibacterial therapy.