

## 建立細菌感染及治療的小鼠動物模式

---

陳志忠<sup>1</sup> 莊銀清<sup>1,2</sup>

奇美醫學中心<sup>1</sup> 醫學研究部<sup>2</sup> 內科部

### 前 言

在近代醫學上，面臨的最大問題之一是感染性疾病日趨複雜，且微生物急速產生抗藥性，為了解決這個問題，科學家們無不傾力研究。而僅以試管內(in vitro)的研究方式，如 MIC(minimum inhibitory concentration)、MBC(minimum bacteriocidal concentration)、time-kill 的方式，或進一步使用細胞培養來研究，雖可以提供許多有效的訊息，但仍不足以將人體的真正感染情形完整模擬出來。所以儘管在保護動物的聲浪日益加重的壓力下，動物實驗在感染性疾病的研究中，仍有迫切的需要性。根據 2000 年科學雜誌(Science)報導[1]，在科學研究中實驗小鼠(mice)的使用，全球每年已超過二千五百萬隻，佔所有實驗哺乳類動物的 90% 以上。在感染疾病的研究中，小鼠更佔了重要的地位，原因在於小鼠的基因組合與人類具有 90% 以上的相似性，且小鼠對微生物感染的感受性與人類非常相近，免疫系統也幾乎相同。此外，小鼠的基因特性明確，更能以基因工程建立起需要的特別品系。目前世界上常用的近交品系(in bred)就有 250 多種，而突變品系更高達 350 種以上，故較其他動物更能提供研究者適切的實驗模式。目前感染實驗除特定微生物或特定感染模式外，一般多能以小鼠設計出適當實驗。

### 小鼠品系的選擇

要建立一個成功的小鼠感染實驗模式，首先要選擇適當的小鼠品系，目前國內常用的品系有 A/HeJ, A/HeN, AKR/J, AKR/N, BALB/cBy, BALB/cAnN, C3H/HeJ, C3H/HeN, C57BL/6J, CBA/CaJ, CBA/N, DBA/2J, DBA/2N, NZB/BINJ, NZW/Lac, Nude, SCID 等約 20~30 種 [2,3]，介紹於表一，這些小鼠外型看似相同，然而特性皆略有不同，如 A 系與 BALB/c 系在存活期、自發性腫瘤、對藥物的反應及生殖上都有明顯差異，又如實驗上常用的 BALB/c 小鼠，對肺炎雙球菌誘發的肺臟感染模式具有高度的感受性，能成功誘發支氣管肺炎，造成肺部大量嗜中性球及淋巴球(lymphocytes)浸潤，而使用另一常見的品系 C57BL/6 時，只能造成較輕微的細胞浸潤與組織損傷[4]，所以不當的選擇只會徒增生命的浪費。然而可惜的是目前科學界針對各種感染模式的實驗動物選擇，並無直接建議或實用通則可依循，研究者只能多參考文獻資料，以既有模式為研究起點，減少不必要的試誤。

### 微生物的選擇

在感染模式的建立中，細菌的選擇要考慮的因素包含：致病菌與臨床狀況的相關性、對實驗動物的毒性、可造成動物感染的狀況、在 in vitro 對藥物的敏感性等等。實驗小鼠與人類對微生物的感受性非常相似，人的致病菌通常亦可在小鼠造成感染，但須注意的是所選擇的菌株是否能使小鼠形成研究者需要的感染狀態，例如臨床分離的 *Salmonella typhimurium* 在 BALB/c 小鼠皆可造成徵狀，但只有部分菌株可以形成慢性感染[5]，所以當研究目的是慢性感染時所選擇菌株就必須考量。而對於毒力太弱的菌株，有時為了增加細

菌感染能力，常需使用先天免疫缺失的裸鼠(nude mice)、重度合併免疫缺失小鼠 (severe combined immunodeficiency; SCID)或利用抗 Ig 的抗體，放射線或化學物質(例如：cyclophosphamide、cyclosporin)、mucin 等抑制小鼠部分免疫功能，進而幫助細菌在小鼠體內建立感染。

細菌的接種方式也必須考量，目前對於一般性感染實驗，使用的接種方式有腹腔注射(intraperitoneal; ip)、靜脈注射(intravenous; iv)、肌肉注射(intramucular; im)、皮下注射(subcutaneous; sc)、餵食管給予(per oral; po)、氣管內給予(intratracheal; it)、鼻腔給予(intranasal; in)等。而其他藉助外科手術的方式則視特定需要。不同的投予途徑常會造成截然不同的感染情形，例如 ip 與 iv 均常用於建立全身性感染，但如果以 ip 給予 BALB/c 小鼠 *Enterococcus faecalis* ( $5 \times 10^8$  CFU)會造成急性感染，小鼠於 24 至 48 小時內快速死亡，但以 iv 給予則會在 7 至 10 天才死亡[6]，所以研究者須依實驗的需求選擇適當的投予途徑，才能建立出成功的實驗模式。

## 抗菌藥物的選擇

在感染動物實驗中，抗菌藥物的使用必須考慮的包含藥物種類、感染菌對藥物的感受性試驗(MIC、MBC)的結果、投予的時間、投予的途徑、劑量、投藥間隔、藥物在動物體內的有效濃度與分佈(area under the concentration time curve; AUC)等。在感染動物之前，將菌株先以選擇的藥物進行藥物敏感性試驗是必要的。其中最低抑制濃度 (MIC)是選擇藥物的一大考量，例如過高的 MIC 將使實驗動物體內無法到達有效劑量而降低成功的可能性[7]。

## 抗菌藥用藥量的選擇及換算

在選擇藥物進行實驗時，應該投予多少劑量是實驗設計的重要問題，劑量過高，可能引起藥物中毒；劑量不足，則作用不明顯，而一般多根據臨床用量以單位公斤體重給予的劑量(mg/kg)換算成小鼠的劑量。雖然以實驗小鼠建立感染模式，可以模擬在人體的感染狀況，但小鼠仍有許多生理特性與人類迥異，例如小鼠心跳速率每分鐘約 300 至 600 次，呼吸約 60-250 次，均較人類為快，小鼠對藥物的耐受性較高，代謝速率也較人類快出許多，故以人體劑量來直接換算小鼠的給藥量時，往往無法達到預期療效。根據 Bayer 公司的研究團隊對 moxifloxacin 在人體與小鼠體內代謝情形的藥物動力學[8]，顯示藥物在小鼠體內的清除速率(clearance)極快，約人體的 30 倍，藥物半衰期( $t_{1/2}$ )僅 14 分之 1。所以在小鼠實驗中給藥濃度或投藥時間間隔就不宜以人體用藥直接為依據。可以按下述方法確定劑量：

- 1.MIC/MBC：在試管內先確定藥物對菌的最低抑菌濃度(MIC)及最低殺菌濃度(MBC)。
- 2.AUC/Cmax：對空白小鼠(Naive mice)投予代測藥物，測定藥物在特定標的器官的 AUC 及 Cmax(maximum concentration)等藥物動力學等資料。
- 3.再根據藥物種類，合併 MIC 與 AUC 等藥物動力學資料，推算出藥物可能有效的投予劑量，從而建立出實驗架構。

建立實驗室本身的藥物動力學資料固然很重要，但卻不容易。目前許多科學家提出一些簡單的方式[9]，即在人體與各種動物間換算藥物劑量時，以每平方公尺面積給予的劑量(mg/m<sup>2</sup>)來取代每公斤體重的劑量，則小鼠每公斤體重的劑量約為成人的 9 倍，整理簡化出劑量換算係數於表二。甚至有科學家認為小鼠對藥

物的耐受性較人為大，用人的劑量換算小鼠的劑量時約需乘以 25 至 50 倍。除此之外，也應考慮給藥途徑不同，所用的劑量也應不同，如靜脈注射所需劑量為 100 單位，肌肉注射為 100 單位，皮下注射 100-200 單位，口服約 400 單位[9]等

綜合上述各點，一個成功的細菌感染小鼠的治療動物模式，不外乎三大關鍵：實驗動物、感染細菌與抗菌藥物，而彼此之間又有著複雜的關係，總總因素交互影響實驗的結果，且無一不是實驗必須著墨之處，面面俱到才能有好的研究成果(圖一)，此外，實驗環境的良莠，有時亦能左右實驗成敗，目前實驗上多以無特定病原菌(specific pathogen free; SPF)動物為研究材料就是針對這方面的考量。雖然動物實驗對醫學發展十分重要，研究者仍應本著人道立場，遵守三 R 原則[10]，以「取代原則」replacement，改用替代方法來取代動物實驗，依「減量原則」reduction，盡可能減少動物使用量，謹守「改良原則」refinement，避免重複同樣的實驗，減少實驗動物遭受的痛苦，如此才能使醫學研究更具意義。

表一 常用小鼠品系特性比較

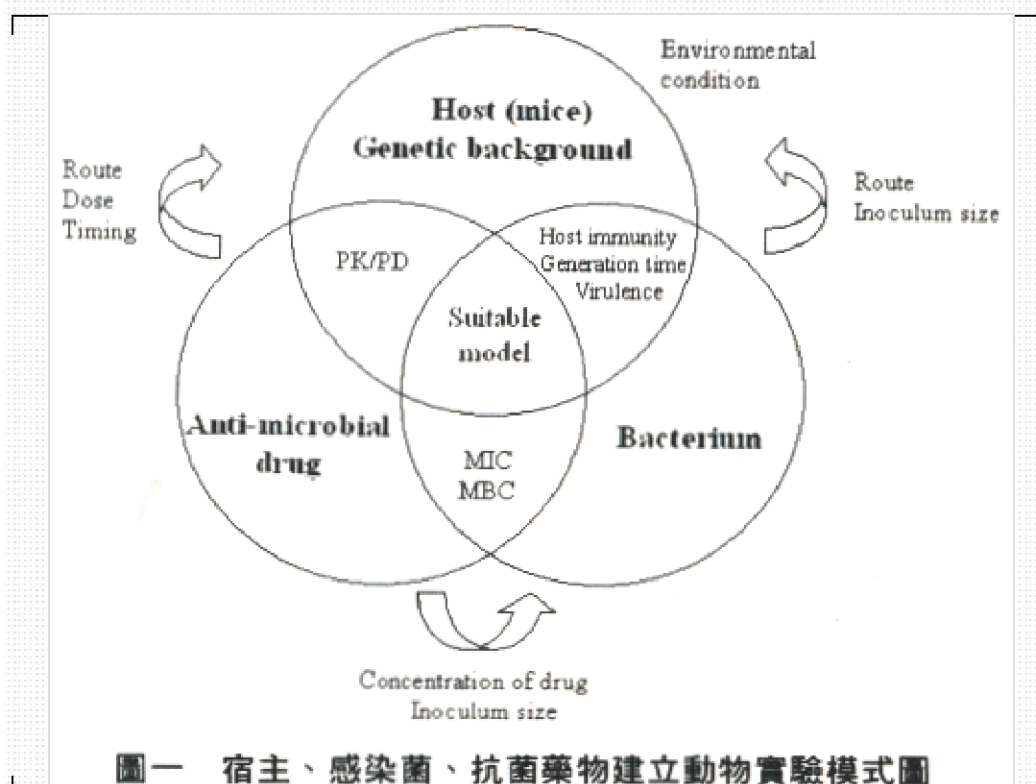
| 品系                   | 亞系                                  | H-2 基因 | 免疫學特性   | 生理學特性                    |
|----------------------|-------------------------------------|--------|---|--------------------------|
| <u>近交系 (inbred)</u>  |                                     |        |   |                          |
| A                    | A/HeJ,<br>A/HeN                     | H-2a   | 缺乏補體 C5，干擾素表現量較低  | 血壓低，對 X 光照射具高度敏感性        |
| AKR                  | AKR/J,<br>AKR/N                     | H-2k   | 缺乏補體 C5，容易誘發免疫耐受性，干擾素表現量高   | 血液過氧化氫酶活性高               |
| BALB/c               | BALB/cBy,<br>BALB/cAnN,<br>BALB/cJ  | H-2d   | 易患慢性肺炎，多數個體於 6 月齡以後出現免疫球蛋白過多症。主要是 IgG1 和 IgA 量的增加                     | 血壓較高，網狀內皮系統器官與體重之比值較大的增加 |
| C3H                  | C3H/HeJ,<br>C3H/HeN                 | H-2k   | 在 IgG 的分類中 IgG1 和 IgG2a 較高，IgG2b 量較低，對脂多糖非特異性活化 B 細胞的作用呈低反應性          | 紅血球及白血球數較少，血液中氧化氫酶活性高    |
| C57BL/6              | C57BL/6J,<br>C57BL/6N               | H-2b   | IgG 在 20 月齡前緩慢增加，有的個體 12 個月齡後可超過 800 $\mu$ g/mL，干擾素產量較高               | 嗜酒精性高，對結核桿菌敏感            |
| CBA                  | CBA/N,<br>CBA/J,<br>CBA/Ca          | H-2k   | 易誘發免疫耐受性  | 血壓較高。對維生素 K 不足高度敏感       |
| DBA                  | DBA/2J,<br>DBA/2N                   | H-2d   | 在一般飼養條件下三月齡鼠血清免疫球蛋白量為 1,000 $\mu$ g/mL 左右，相當於 BALB/C 的 1/2。其中，IgM 值較高 | 紅血球多。血壓較低                |
| <u>遠交系 (outbred)</u> |                                     |        |   |                          |
| ICR                  | ICR/JCL                             | -      | -   | 周邊血液和骨髓細胞，具有較好的穩定性       |
| <u>突變系 (mutant)</u>  |                                     |        |   |                          |
| Nude                 | BALB/c nu，-<br>C57BL/6<br>nu，ICR nu | -      | 缺少 T 細胞，巨噬細胞及 NK 細胞數量較多，巨噬細胞活性較高                                      | 缺少胸腺，先天無毛髮               |
| SCID                 | BALB/c Scid -                       | -      | 缺少 T 及 B 細胞，無法產生抗體，無法排斥皮膚移植   | 淋巴結極小，胸腺只有一般小鼠的十分之一      |

表二 實驗動物與人體的每公斤體重劑量換算系數表<sup>a</sup>

| 換算系數                 | A 組動物或成人     |             |             |            |          |           |            |
|----------------------|--------------|-------------|-------------|------------|----------|-----------|------------|
|                      | 小鼠<br>0.02kg | 大鼠<br>0.2kg | 豚鼠<br>0.4kg | 兔<br>1.5kg | 貓<br>2kg | 犬<br>12kg | 成人<br>60kg |
| 小鼠 20g               | 1.0          | 1.6         | 1.6         | 2.7        | 3.2      | 4.8       | 9.01       |
| 大鼠 0.2kg             | 0.7          | 1.0         | 1.14        | 1.88       | 2.3      | 3.6       | 6.25       |
| B 組動物或成人<br>豚鼠 0.4kg | 0.61         | 0.87        | 1.0         | 1.65       | 2.05     | 3.0       | 5.55       |
| 兔 1.5kg              | 0.37         | 0.52        | 0.6         | 1.0        | 1.23     | 1.76      | 2.30       |
| 貓 2.0kg              | 0.30         | 0.42        | 0.48        | 0.81       | 1.0      | 1.44      | 2.70       |
| 犬 12kg               | 0.21         | 0.28        | 0.34        | 0.56       | 0.68     | 1.0       | 1.88       |
| 成人 60kg              | 0.11         | 0.16        | 0.18        | 0.304      | 0.371    | 0.531     | 1.0        |

\* 資料來源：大衆醫藥網 <http://www.windrug.com/pic/30/11/28/214.htm>

<sup>a</sup> 查詢時，參考動物選 A 組，實驗動物選 B 組，交叉格中數字即為乘與倍數。



## 參考文獻

1. Pennisi E: A mouse chronology. *Science* 2000; 288:248-57.
2. Immunodeficient rodents opening new doors for investigators. *Research Animal Review* 1996;1:1-8.
3. 大眾醫藥網 · 摘自 <http://www.windrug.com/pic/30/11/28/064.htm> 。
4. Preston JA, Beagley KW, Gibson PG, et al: Genetic background affects susceptibility in nonfatal pneumococcal bronchopneumonia. *Eur Respir J* 2004;23:224-31.
5. Sukupolvi S, Edelstein A, Rhen M: Development of a murine model of chronic Salmonella infection. *Infect Immun* 1997;65:838-42.
6. Gentry-Weeks C, Estay M, Loui C, et al: Intravenous mouse infection model for studying the pathology of Enterococcus faecalis infections. *Infect Immun* 2003;71:1434-41.
7. Sharma KK, Sangraula H, Mediratta PK: Some new concepts in antibacterial drug therapy. *Indian J Pharmacol* 2002;34:390-6.
8. Siefert HM, Domdey-Bette A, Henninger K, et al: Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:69-76.
9. 大眾醫藥網 · 摘自 <http://www.windrug.com/pic/30/11/28/214.htm> 。
10. 房曼琪：眾生平等——動物實驗模式之批判 · 關懷生命協會 · 摘自 <http://www.lca.org.tw/report/d4.htm> 。