

Granuloma pouch における大腸菌, *Bacteroides* の共同性に関する研究

村 山 信 篤

慶応義塾大学医学部外科学教室

(昭和 53 年 1 月 5 日受付)

I. 緒 言

II. Granuloma pouch の基礎的検討

1) 方 法

2) 結 果

a) Granuloma pouch の病理組織学的所見

b) Granuloma pouch 内滲出液

i) 滲出液量

ii) 滲出液成分

iii) 滲出液ガス分析

3) 小 括

III. Granuloma pouch 内接種 *E. coli* および *Bacteroides* の消長

1) 方 法

2) 結 果

3) 小 括

IV. 考 按

V. 結 語

I. 緒 言

我々は大腸手術後の創感染症を臨床的、細菌学的に検討した結果、原因菌の主体をなすのは偏性嫌気性菌である *Bacteroides fragilis* であり (以下 *Bacteroides* と略す), さらに *Bacteroides* は通性嫌気性グラム陰性桿菌である大腸菌の感染症の成立に密接な関連のあることを知った¹⁾。外科的軟部組織感染症、ことに術後創感染症に関する検討は数多くみられるが、炎症巣に適した実験モデルの報告は少く、ことに炎症巣における細菌の消長の検索を定量的に行なうに適したモデルの報告はほとんどみない。我々はウィスター系ラットの背部皮下に Granuloma pouch を作成し、創感染症の実験モデルとしての特性を検討し、それを使用し炎症巣における大腸菌, *Bacteroides* の共同性について検討を行なった。

II. Granuloma pouch の基礎的検討

1) 方 法

Granuloma pouch の作成法は ROBERT 等の方法²⁾ に準じて行なった。被検動物は生後 3~4 週雄性ウィスター系ラット, 体重 150~170g を使用した。エーテル麻酔下のラットの背部皮下 (肉様膜下) に 20 ml の室内空気を 23G 針を用い, 滅菌注射器で注入, pouch 作成後

その内腔に 23G 針で, 滅菌 1% クロトン油加オリーブ油 1ml を注入, 内面に用手塗布した。2日後に 23G 針を用い空気だけを除去, その5日後に実験動物として使用した。

pouch 作成中のラット 6 頭に対して, 作成日, 2, 4, 5, 7, 8 日目にその pouch 壁を採取, 10% ホルマリン固定後 Hematoxylin-Eosin 染色を行ない, 組織学的検索に供した。他の 12 頭に対して pouch 作成 7, 8 日目に, 各 6 頭の pouch 内滲出液量の測定を行なった。また他の 10 頭に対し pouch 内滲出液の塗抹標本を作り, グラム染色を行ない滲出液成分の検討を行なった。次に pouch 作成 4 日目 2 頭, 5 日目 3 頭, 7 日目 9 頭, 8 日目 1 頭から, pouch 内滲出液 1ml を採取し, Corning-Evans blood gas analyzer (Model-165) によりガス分析を行なった。また pouch 作成 4 日目 3 頭, 5 日目 3 頭, 7 日目 3 頭, 8 日目 3 頭についての滲出液の蛋白含有量を, 屈折蛋白計 (日立) を使用して測定した。

2) 結 果

a) Granuloma pouch の病理組織学的所見

背部皮下に空気を注入した直後には, 肉様膜を含む皮下組織に著変がみられなかったが (Fig. 1), 2 日後すなわち空気の除去日には, 肉様膜下にリンパ球浸潤, 線維芽細胞の増生を伴う水腫様変化が, わずかにみられる (Fig. 2)。4 日目, 5 日目にはリンパ球, 線維芽細胞の増加, 不規則な線維の出現を伴う肉芽組織の形成がみられた。4 日目に比べ 5 日目の変化は増強し, 7 日目には線維形成がいっそう強まり, 炎症細胞は極めて少ないが, 線

Fig. 1

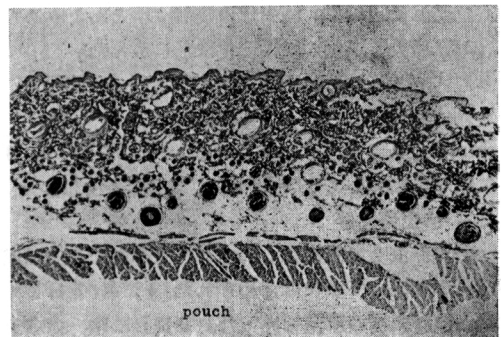


Fig. 2

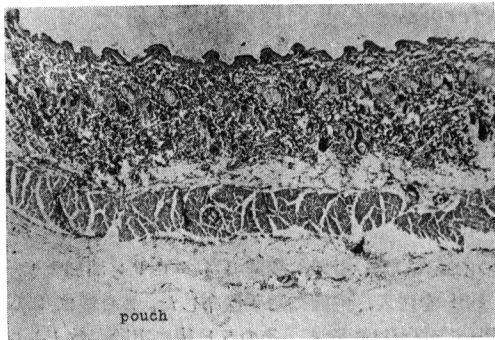


Fig. 3

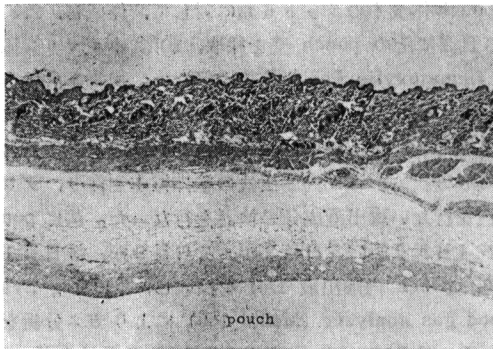
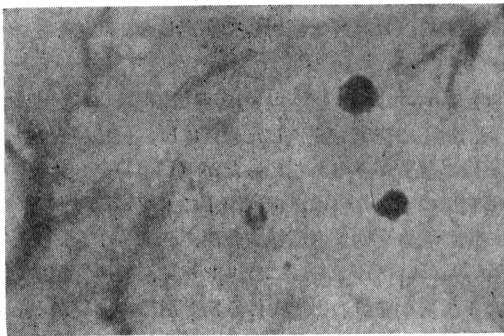


Fig. 4



維芽細胞、血管増生が著しい肉芽組織の所見がみられた (Fig.3)。8日目には、肉芽層が増加した所見が認められた。全経過を通じて、好中球の浸潤はほとんどみあたらず、細菌感染性炎症の組織変化は乏しかった。

b) Granuloma pouch 内滲出液

i) 滲出液量

pouch 作成7日目には6頭において10~15 ml, 8日目には6頭において11~18 mlの滲出液が得られた。

ii) 滲出液成分

pouch 作成2日目には、赤血球を主体とする血球成分が、原形を保って多数みとめられた。4日目、5日目も2日目とはほぼ同様の所見であった。6日目には、血球成分

Table 1. Gas analysis of pouch exudate on 7 th day

gas analyze	M ± S D (n)
pO ₂ (mmHg)	15.7 ± 7.6 (9)
pCO ₂ (mmHg)	50.3 ± 5.0 (9)
pH	7.184 ± 0.094 (9)
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	18.9 ± 5.4 (9)
total CO ₂ (mMol/L)	18.7 ± 4.0 (9)
BE (mEq/L)	11.7 ± 5.3 (9)
Protein (g/dl)	3.93 ± 0.13 (3)

は減少し、形態的にも萎縮がみられた。7日目には、この傾向が強まった (Fig.4)。したがって作成5日目頃までは、pouch 壁の血管から pouch 内腔への血球漏出は存在するが、6日目以降は、新たな漏出はないものと考えられる。

iii) 滲出液ガス分析

代表的な7日目の値は平均すると、pO₂ 15.7 mmHg, pCO₂ 50.3 mmHg, pH 7.184, HCO₃⁻ 18.9 mEq/L, total CO₂ 18.7 mMol/L, BE 11.7 mEq/L であり、血液に比し pO₂, BE が低値, pCO₂ が高値であることが判明した。蛋白含有量は平均 3.93 g/dl であった (Table 1)。

3) 小 括

以上、Granuloma pouch 壁の病理組織学的所見、pouch 内滲出液量、成分、ガス分析から、Granuloma pouch は作成7日目に性状は安定していることが判明した。従って炎症巣のモデルとして適していると判断し、感染実験をこの時期からは始めることとした。

III. Granuloma pouch 内接種 *E. coli* および *Bacteroides* の消長

1) 方法

E. coli NIHJ 株を Heart Infusion Agar 斜面培地に純培養した1白金耳を GAM プイオン培地 10 ml に接種し、37°C, 48 時間好気培養し、大腸菌原液とした。*Bacteroides fragilis* は臨床材料から分離し、GAM 半流動培地に培養、その 0.1ml を GAM プイオン培地 10ml に接種し、48 時間 GAS-PAK 法嫌気培養を行ない、原液とした。これら実験原液は希釈法による菌数算定により、各々 10⁹/ml の菌濃度であることを確認した。

34 頭のラットについて、作成7日目の pouch 内に大腸菌 10⁷ を注入接種し、そのうち 20 頭にさらに *Bacteroides* 10⁹ を注入した。24 時間後 pouch 内から滲出液 1ml を採取、GAM プイオン培地で 10 倍希釈系列を作り、滲出液中の *E. coli* NIHJ の菌数を算定した。

他の6頭には、大腸菌 10⁸ を注入、そのうち3頭には *Bacteroides* 10⁹ を注入した。各々 24 時間後の pouch

内大腸菌濃度を測定した。

また他の 13 頭には、大腸菌 10^9 を注入、そのうち 7 頭には *Bacteroides* 10^9 を注入、各々 24 時間後に、pouch 内大腸菌濃度を測定した。

なお、上記の 3 系列にて、大腸菌だけを注入した群を E 群、*Bacteroides* も共に注入した群を EB 群とした。

2) 結果

作成 7 日目の pouch 内滲出液は約 10ml であるので、大腸菌を 10^7 接種した場合、滲出液中の大腸菌濃度は $10^6/ml$ であると考えられた。24 時間後には 14 頭の E 群では $10^6/ml$ 、すなわち注入時の濃度を保ったものは 1 頭 (1/14)、13 頭は $10^4/ml$ 以下で、そのうち 8 頭は $10^2/ml$ 以下であった、20 頭の EB 群では $10^8/ml$ 3 頭、 $10^7/ml$ 2 頭であり、半数以上が $10^4/ml$ 以上の濃度であった (Fig.5)。

10^8 の大腸菌を接種した場合、24 時間後の pouch 内滲出液中大腸菌濃度は、E 群において $10^1/ml$ 12 頭、 $10^2/$

Fig.5. *E. coli* counts in granuloma pouch exudate ; 24 hours after inoculation of *E. coli* and *Bacteroides*

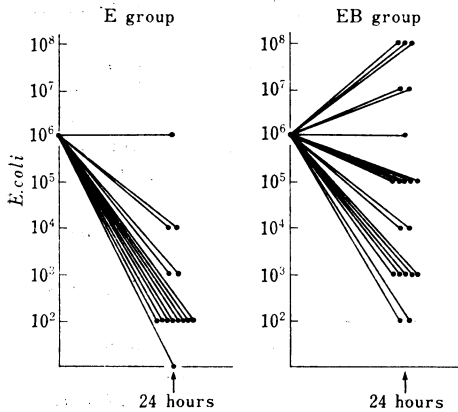


Fig.6. *E. coli* counts in granuloma pouch exudate ; 24 hours after inoculation of *E. coli* and *Bacteroides*

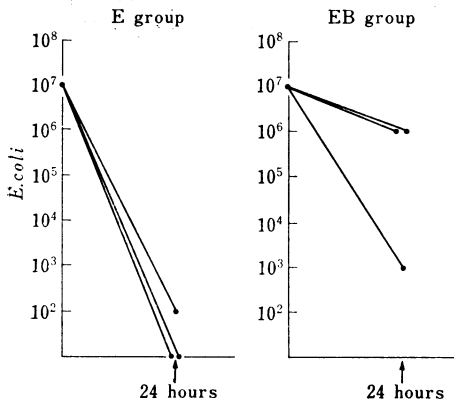
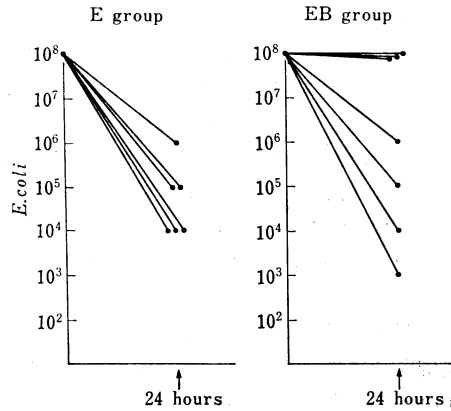


Fig.7. *E. coli* counts in granuloma pouch exudate ; 24 hours after inoculation of *E. coli* and *Bacteroides*



ml が 1 頭であった。EB 群では $10^6/ml$ が 2 頭、 $10^8/ml$ が 1 頭であった (Fig.6)。

大腸菌を 10^8 接種すると、24 時間後の大腸菌濃度は、E 群において $10^6/ml$ 1 頭、 $10^5/ml$ 2 頭、 $10^4/ml$ 3 頭であった。EB 群では $10^8/ml$ 3 頭、 10^8 、 10^5 、 10^4 、 10^3 が各 1 頭であった (Fig.7)。

以上の実験経過中に、菌注入後死亡したラット、および pouch 内に肉眼的に膿形成を認めたラットはなかった。

3) 小 括

作成 7 日目の Granuloma pouch に大腸菌を 10^9 、 10^8 、 10^7 注入した場合、24 時間後の pouch 内の大腸菌濃度は、注入時の濃度を保ち得たのは 10^7 注入群の 1 頭で、他はいずれも注入時濃度の 10^2 オーダー以下の濃度であった。これに対して同時に *Bacteroides* 10^9 を注入した群では、全般に大腸菌単独注入群より高い濃度で大腸菌は検出された。大腸菌 10^7 注入例においては、その傾向が明らかであり、ことに注入時濃度の $10^8/ml$ を上回る濃度で検出された例が、5 頭すなわち 1/4 にみられた。

IV. 考 按

手術創感染の発症のメカニズムは未だ明らかにされていないが、基本的には汚染細菌数とその病原性を総合した病原力が、局所の細菌防御力とのバランスに打ち勝った場合に発症すると考えられている³⁾。宿主条件が一定であり、汚染細菌種が一定ならば、汚染後の細菌数の増減がその後の発症を左右する大きな因子であると思われる⁴⁾。一方、臨床的には消化管手術、とくに大腸手術後では創感染頻度が高く、菌検索を行なうと大腸菌、*Bacteroides fragilis* の創汚染が大きな役割を果している成績を得ているため、創部における大腸菌数の増減を左右する因子の 1 つとして、従来弱毒菌と考えられていた

Bacteroides の存在に注目した。そこで実験的にウイスター系ラットの Granuloma pouch 内に接種した大腸菌菌数の消長に対する *Bacteroides fragilis* の存在の影響を検討した。

今日まで細菌性局所性炎症を論じた報告は数多くみられる。教室 大井は家兎の、皮内皮下、切創内に *Staph. aureus* を接種し、その後の菌の消長については、滅菌綿棒で擦過し、血液寒天平板に塗抹培養、菌数を測定する方法を行なった。この方法では、菌の回収において定量的な精度に欠ける難点があると考えて実験モデルを種種検討した。ROBERT等²⁾による Granuloma pouch は肉芽形成実験モデルとして作成したものであるが、我々は予備実験として基礎的検討の項で述べたとおり、次の点で創部局所感染症実験モデル、ことに炎症巣における菌数の増減の追求に適していると考えた。①作成7日目には、pouch 壁に肉芽組織が形成されており、その組織像は創傷治癒の過程における肉芽新生期の創部の状態⁶⁾に類似していること、②pouch 内滲出液が創部の肉芽組織間における滲出液とその性状が類似していること、③滲出液は外部からの再汚染の危険がないこと、④作成7日目には、滲出液の性状が均一であり、滲出液量も菌数計算に適する量であること、である。

Granuloma pouch 内接種実験の結果、大腸菌と *Bacteroides* が共存し、その菌数比率がことに 1:100 の場合に大腸菌が増殖しやすいと考えられた。一方、正常人腸内細菌叢では、*Bacteroides* は大腸菌の約 100 倍の濃度で存在していると報告されている⁷⁻¹⁰⁾。今回の実験で、pouch 内大腸菌と *Bacteroides* の至適菌数比率は腸内細菌叢のそれと一致しているといえよう。この成績は、生体内における両菌種の増殖には至適比率が存在することを示唆するものではないかと考える。

V. 結 語

1. ウイスター系ラットの背部皮下に作成した Granuloma pouch は作成7日目に、滲出液性状が安定し、細菌数の変動を追求するための局所炎症巣モデルとして適している。

2. Granuloma pouch内では、大腸菌は *Bacteroides*

と共存すると増殖しやすく、ことにその菌数比率が 1:100 の場合にその傾向が著しかった。

本論文の要旨は第 23 回日本化学療法学会東部支部総会にて発表した。

本研究に、慶応義塾大学 医学部 外科学教室 石引久弥 講師、その他諸先生の御協力を得、感謝する。

なお、本研究の1部に大山健康財団研究助成金を使用した。

引用文献

- 1) 村山信篤, 相川直樹, 馬場正三, 石引久弥, 阿部令彦, 富岡一, 内田博, 吉崎聰: 大腸手術後感染症と術前抗生物質投与について; *Bacteroides* の役割. *Chemotherapy* 23(12): 3798~3805, 1975
- 2) ROBERT, A.: The granuloma pouch as a routine assay for antiphylogistic compounds. *Acta Endocrinologica* 25: 105~112, 1957
- 3) STEWART, G. T.: Limitation of germ theory. *Lancet* 1: 1077~1085, 1968
- 4) 石井良治, 石引久弥, 大菅志郎, 田中豊治: 腹部外科における術後感染症と予防. *臨床と研究* 46: 121~128, 1969
- 5) 大井博之: 創感染防止に関する実験的研究, 特に発症機転と化学療法の限界について. *日外会誌* 69: 902~920, 1968
- 6) ANDERSON, W. A. D.: *Pathology* Vol.1, 6th ed., The C. V. Mosby Co., Saint Louis, p.61~63, 1971
- 7) BUCHAN, K. A. & J. C. GOULD: The bacterial ecology of the large bowel. *Postgrad. M. J.* 14: 43~54, 1967
- 8) DONALDSON, R. M., Jr.: Normal bacterial populations of the intestine and their relation to intestinal function. *New Engl. J. Med.* 270: 938~948, 1964
- 9) NICHOLAS, R. L. & R. E. CONDON: Antibiotics preparation of the colon: Failure of commonly used regimens. *Surg. Clin. N. Amer.* 51: 223~231, 1971
- 10) MOORE, W. E. C.; E. P. CATO & L. V. HOLDMAN: Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrence in clinical infections. *J. Infect. Dis.* 119: 641~649, 1969

EXPERIMENTAL STUDIES ON SYNBIOSIS OF *E. COLI* AND
BACTEROIDES IN THE GRANULOMA POUCH

NOBUATSU MURAYAMA

Department of Surgery, School of Medicine, Keio University

It was the aim of this experiment to confirm the role of co-existence of *Bacteroides fragilis* and *E. coli* in the postoperative wound infections which has been obtained from our clinical studies on colon surgery.

Seven days old granuloma pouches on the back of Wistar-rats were proved to be suitable as the experimental models of local infections. The pouches showed stabilized characteristics in chemical, physical and histological studies.

E. coli of 10^7 , 10^8 and 10^9 was inoculated in the pouches with or without *Bacteroides fragilis* of 10^9 . Twenty-four hours after inoculation, bacterial counts of *E. coli* revealed that *E. coli* survived and increased in counts when it was with *Bacteroides fragilis*. It also revealed that maximal counts of *E. coli* were obtained when the inoculated counts of *E. coli* were one-hundredth of *Bacteroides* counts, which suggested the optimal ratio of both bacteria in their symbiosis in postoperative wound infection.