

実験的子宮内感染症ラットの作製とセファロスポリン系 薬剤による治療効果について

館 野 政 也

富山県立中央病院産婦人科

西田 亨子・黒津 幸雄・保 田 隆・才 川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和55年6月16日受付)

1) Progesterone 投与下でラット子宮内に *Escherichia coli* を接種し、実験的子宮内感染症を惹起させた。このとき体温の上昇および末梢白血球数の増加が認められ、さらに子宮内貯溜液（浸出液）および子宮の組織学的検討により子宮内感染が確実に成功したことが証明された。

2) この実験的感染症ラットに、cefoperazone (CPZ), cefazolin (CEZ) および cephalothin (CET) の各 50 mg/kg を筋肉内投与した結果、CPZ の子宮筋層内および子宮内貯溜液中への移行性は、最も優れていた。次いで CEZ, CET の順であった。

3) 種々の菌による実験的子宮内感染症ラットに CPZ, CEZ および CET を筋肉内に投与しその治療効果について比較検討した。*E. coli* 感染例では CPZ, CEZ の順に優れ、CET は効果が認められなかった。*Klebsiella pneumoniae* および *Proteus mirabilis* 感染例では CPZ だけが有効であり、他剤の効果は認められなかった。また *Staphylococcus aureus* 感染例では *E. coli* 感染例とほぼ同様の成績が得られた。

序 文

近年産婦人科領域における感染症の起因菌はグラム陰性菌の割合が増加しており、ことに耐性菌の問題も大きくとりあげられるようになってきた¹⁻³⁾。また産婦人科領域感染症の化学療法については、臨床的にかなり検討されているが、薬剤の有効かつ適切な使用方法に関してはさらに実験的に詳細な検討が必要である。そこで臨床により近い感染モデルを動物で作製して、抗生物質の効果をより客観的に評価することを試みた。

動物を用いた子宮内感染モデルについてはほとんど研究されていない。今回われわれは progesterone 投与下でラット子宮内に菌を感染させることにより実験的子宮内感染症の作製に成功した。そこでこのモデルを用いてセファロスポリン系薬剤の子宮への移行性および治療効果を比較検討したので併せて報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

Cefoperazone (T-1551, CPZ: 富山化学工業), cefazolin (CEZ: 藤沢薬品), cephalothin (CET: 塩野義製薬), progesterone (オオホルミルテウム: 帝国臓器) を用いた。

2. 使用菌株

臨床分離株の *Escherichia coli* TK-143, *Escherichia coli* TK-55, *Klebsiella pneumoniae* Y-41, *Proteus mirabilis* T-287 および *Staphylococcus aureus* F-139 を用いた。

3. 使用動物

Wistar 系雌ラット、体重 170~250 g を用い、1群 3匹とした。

4. 実験的子宮内感染症ラットの作製

Wistar 系雌ラットに菌感染前日から progesterone 1 mg/rat を1日2回筋肉内に投与して、内分泌学的に progesterone 優位の環境下でラットを背位に固定後開腹し、動脈をさけて子宮頸を縫合糸で結紮した。2本の子宮角に菌懸濁液を 0.1 ml ずつ注射器で注入し、注入口をアロンアルファ（瞬間接着剤）でふさぎ感染を惹起させた。なお感染の維持をはかるため progesterone は毎日投与した。

感染に用いた菌懸濁液は heart infusion agar (栄研) に1夜培養後、菌体をかきとり滅菌生理食塩水あるいは5% ムチン加生理食塩水に浮遊させ、所定の濃度の菌液になるよう調製して用いた。

5. 感染に伴う炎症所見検査

菌接種（0日）から経日的にラットの体温、末梢白血

球数, 子宮内生菌数および子宮重量(子宮内貯溜液を含む)を測定した。また経日的にラットを殺し, 子宮を摘出し 10% ホルマリン液で固定後, パラフィン包埋, haematoxylin-eosin 染色を行ない子宮組織標本を作製し, 組織の経日的変化を光学顕微鏡下で観察した。

6. 子宮内貯溜液の性状および細胞学的検査

菌感染4日後の子宮内貯溜液を採取し, 遠心(50,000 G×30 min.)後その上清中の蛋白含量を LOWRY 法で定量し, CPZ, CEZ および CET との蛋白結合率を遠心限外濾過法(2,500 rpm×30 min.)により測定した。

また子宮貯溜液を採取後, 塗抹標本を作製し GIEMSA 染色を行ない光学顕微鏡下で観察した。

7. 感染菌に対する MIC の測定

日本化学療法学会標準法に従って行なった。

8. 実験的子宮内感染症ラットにおける薬剤の血中濃度および子宮組織内濃度の測定

ラット子宮内に *E. coli* TK-143 を 10^5 cells/rat 接種し, 感染3日後 CPZ, CEZ および CET の各 50mg/kg を筋肉内投与し経時的に血液を採取し, 同時に子宮を摘出して各薬剤の血中, 子宮筋層内および子宮内貯溜液中濃度を bioassay 法により測定した。

CPZ は *Micrococcus luteus* ATCC 9341, CEZ および CET は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするペーパー・ディスク法で濃度測定を行なった。なお標準曲線の作製はラット血清および子宮貯溜液の遠心(50,000 G×30 min.)上清液を用い, 子宮筋層および子宮内貯溜液の経時的サンプルには 50% エタノール buffer を等量混合して用いた。

9. 実験的子宮内感染症ラットに対する薬剤の治療効果

ラット子宮内に *E. coli* TK-143, *E. coli* TK-55, *K. pneumoniae* Y-41, *P. mirabilis* T-287 および *S. aureus* F-139 を接種し, 感染2日後 CPZ, CEZ および CET の 100 mg/kg あるいは 50 mg/kg を1日2回, 3日間連続筋肉内投与し, 経日的に子宮を摘出し, 子宮内生菌数および子宮重量(子宮内貯溜液を含む)を測定し, 治療効果を判定した。

II. 実験結果

1. ラットにおける子宮内感染症の惹起

Progesterone 0.1 mg/rat ×2/day, 0.3 mg/rat ×2/day, 1 mg/rat ×2/day を菌接種前日から毎日投与したラットに, *E. coli* TK-143 の 3.0×10^5 cells/rat (5% ムチン加)を子宮内に接種し, 感染後の子宮内生菌数および子宮重量の経日的な変化を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。progesterone 0.1 mg/rat ×2/day 以上の投与量で菌の定着と増殖が認められ, 子宮重量では3日以後

Fig. 1 Relationship between doses of progesterone and bacterial cells in uterus of intrauterine infected rats

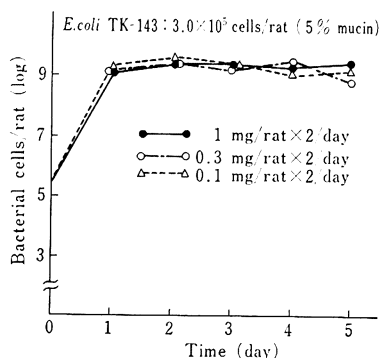


Fig. 2 Relationship between doses of progesterone and uterine weights of intrauterine infected rats

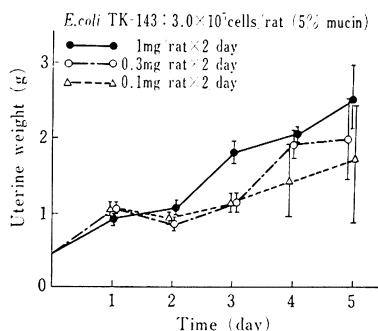
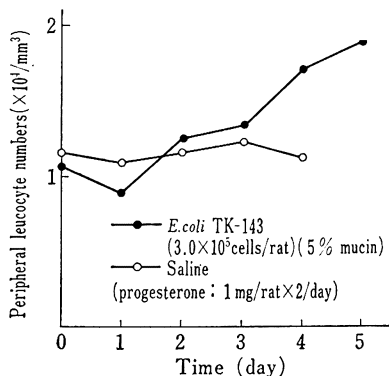


Fig. 3 Changes of peripheral leucocyte numbers in rat with intrauterine infection



投与量の増大にともない重量は増加し, バラツキも少なかった。

Progesterone 1 mg/rat ×2/day 処置ラットに *E. coli* TK-143 の 3.0×10^5 cells/rat (5% ムチン加)を子宮内に注入し, その後の末梢白血球数および体温の経日的な変化を Fig. 3 および Fig. 4 に示した。なお対照と

して生理食塩水を子宮内に注入したラットの末梢白血球数および体温も同時に測定し比較検討した。菌感染ラットの末梢白血球数は徐々に増加する傾向が認められ、4日以後著しく増加した。また体温は感染1日後から上昇し、以後上昇を維持した。一方、生理食塩水を子宮内に注入した非感染ラットでは、末梢白血球数の増加、体温の上昇は認められなかった。

E. coli TK-143 の 3.0×10^5 cells/rat を5% ムチン加生理食塩水懸濁液および生理食塩水懸濁液として子宮内に接種し、感染後の子宮重量の経日的変化を Fig. 5 に示した。子宮重量はムチン懸濁液のほうが生理食塩水懸

濁液より大きくなった。肉眼的観察ではムチン懸濁液のほうが子宮内貯溜液の量が多かったが、両者の子宮内細菌数の経日的変化は同程度であり、ともに菌は確実に子宮内で定着し増殖していた。

また同条件下で子宮内感染させた後の子宮組織の経日的な標本を Photo. 1 に示した。感染2日後の子宮組織では間質の浮腫状および間質内好中球の浸潤が認められ、3日および5日後には著明な細胞浸潤、子宮内膜の肥厚、上皮内浸潤および繊維細胞の増殖のみられる強い

Fig. 4 Changes of body temperature in rat with intrauterine infection

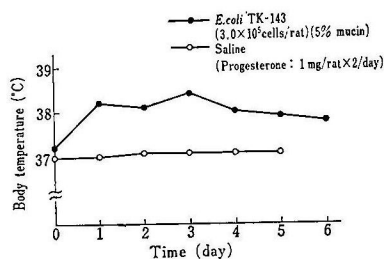
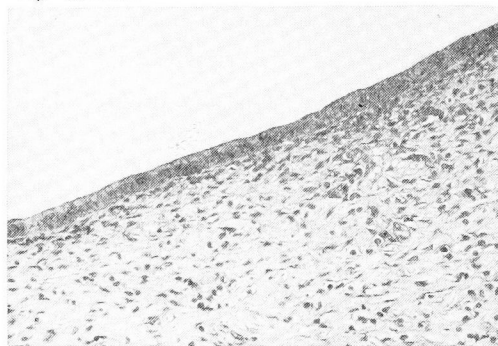
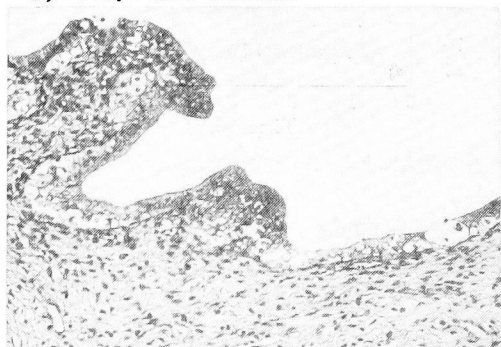


Photo. 1 Histological changes of uterine tissue in rats with intrauterine infections (×231)

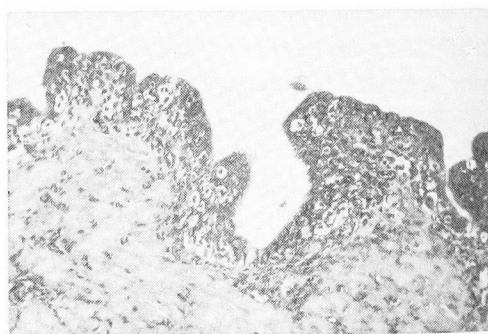
a) Normal



b) 2 days after infection



c) 3 days after infection



d) 5 days after infection

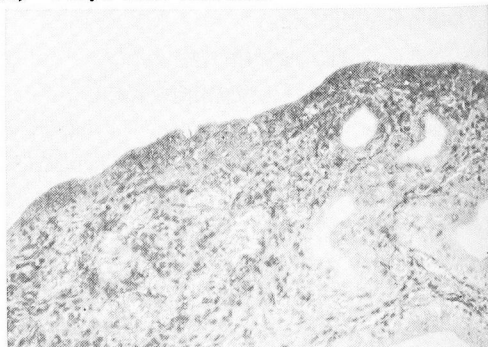
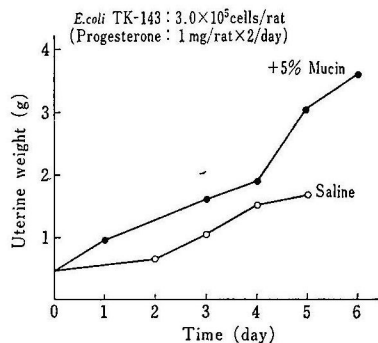


Fig. 5 Changes of uterine weights of rats with intrauterine infections due to two bacterial suspensions



炎症像が認められ、子宮内感染が確実に成立していることが確認された。

2. 子宮内貯溜液の性状および細胞学的検査

菌感染4日後の子宮内貯溜液に対するCPZ,CEZおよびCETの蛋白結合率を求めTable1に示した。いずれの薬剤も対応する血清蛋白結合率より低かった。LOWRY法により子宮内貯溜液中の蛋白含量を算出した結果、2.45%であった。

菌感染4日後の子宮内貯溜液を採取し、GIEMSA染色を行ない光学顕微鏡下で観察した結果、好中率およびリンパ球が多く認められ、子宮内に貯溜した液は浸出液であることを確認した。

3. 感染菌に対するMICの測定

E. coli TK-143, *E. coli* TK-55, *K. pneumoniae*

Y-41, *P. mirabilis* T-287 および *S. aureus* F-139 に対するCPZ,CEZおよびCETのMICを測定しTable2に示したが、いずれの薬剤に対しても感受性株であった。

Fig. 6 Serum levels of CPZ,CEZ and CET after intramuscular administrations of 50 mg/kg in rats with intrauterine infections

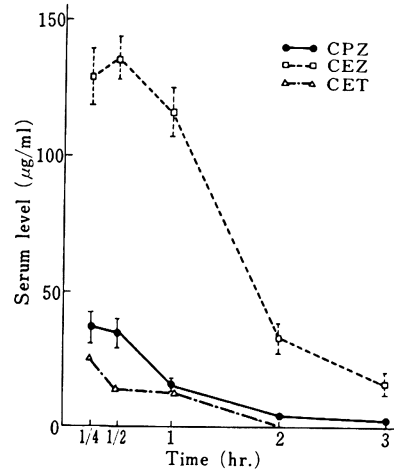


Fig. 7 Uterine muscle and exudate levels of CPZ,CEZ and CET after intramuscular administrations of 50 mg/kg in rats with intrauterine infections

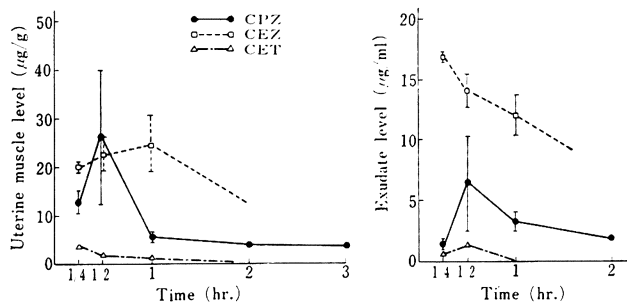


Table 2 MICs (μg/ml) of CPZ, CEZ and CET

Strain	Drug	CPZ		CEZ		CET	
		10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸
<i>E. coli</i> TK-143		0.39	0.39	0.78	3.13	12.5	50
<i>E. coli</i> TK-55		0.1	0.39	1.56	3.13	6.25	12.5
<i>K. pneumoniae</i> Y-41		0.2	3.13	1.56	12.5	6.25	25
<i>P. mirabilis</i> T-287		1.56	1.56	25	25	6.25	25
<i>S. aureus</i> F-139		3.13	6.25	0.78	1.56	0.39	3.13

Inoculum size : 1 loopful of bacterial suspension (10⁶ and 10⁸ cells/ml)

Table 3 Ratio of uterine muscle and exudate levels of CPZ, CEZ and CET to serum levels

Drug		CPZ	CEZ	CET
Uterine muscle	hr			
	1/4	0.34	0.15	0.15
	1/2	0.8	0.17	0.12
	1	0.4	0.21	—
	2	1.1	—	—
	3	1.3	—	—
Exudate	hr			
	1/4	0.04	0.13	0.02
	1/2	0.19	0.1	0.1
	1	0.22	0.1	—
	2	0.47	—	—
	3	0.44	—	—

4. 実験的子宮内感染症ラットにおけるCPZ, CEZおよびCETの血中, 子宮筋層内および子宮内貯溜液中濃度

感染3日後にCPZ, CEZ および CET の各 50 mg/kg を筋肉内投与し, その後の各薬剤の血中, 子宮筋層内および子宮内貯溜液中濃度を測定し Fig. 6 および Fig. 7 に示した。また血中濃度に対する子宮筋層内および子宮内貯溜液中濃度の比(血清比)を Table 3 に示した。

血中濃度においては, CEZ が最も高く推移し, 次いで CPZ, CET の順であった。最高血中濃度は CEZ が 30 分で 135.5 $\mu\text{g/ml}$, CPZ が 15 分で 36.6 $\mu\text{g/ml}$, CET が 15 分で 25.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。子宮筋層内および子宮内貯溜液中濃度においても CEZ が最も高く推移し, 次いで CPZ, CET の順であった。これらの最高濃度は子宮筋層内で CEZ が 60 分で 24.9 $\mu\text{g/g}$ (血清比 0.21), CPZ が 30 分で 26.2 $\mu\text{g/g}$ (血清比 0.8), CET が 15 分で 3.75 $\mu\text{g/g}$ (血清比 0.15) であり, 子宮内貯溜液中では CEZ が 15 分で 16.8 $\mu\text{g/ml}$ (血清比 0.13), CPZ が 30 分で 6.4 $\mu\text{g/ml}$ (血清比 0.19), CET が 30 分で 1.4 $\mu\text{g/ml}$ (血清比 0.1) であった。子宮筋層内および子宮内貯溜液中への薬剤の移行性は, CPZ が各時間とも他剤より血清比が高く, とくに 120 分でも 4.3 $\mu\text{g/g}$ (血清比 1.1) および 1.8 $\mu\text{g/ml}$ (血清比 0.47) を示し, 子宮への移行性は CPZ のほうが CEZ, CET より優れていると考えられた。

5. 実験的子宮内感染症ラットに対するCPZ, CEZおよびCETの治療効果

a) *E. coli* TK-143 による感染

E. coli TK-143 による子宮内感染症ラットに対する CPZ, CEZ および CET の治療効果を生菌数を子宮内生菌数および子宮重量より比較した結果を Fig. 8 に示した。*E. coli*

Fig. 8 Therapeutic effects of CPZ, CEZ and CET against intrauterine infections with *E. coli* TK-143 in rats

Therapy : for 3 days of 100 mg/kg $\times$ 2/day (i. m.)

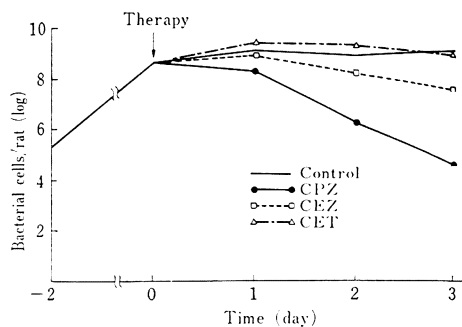


Fig. 8 (Continued)

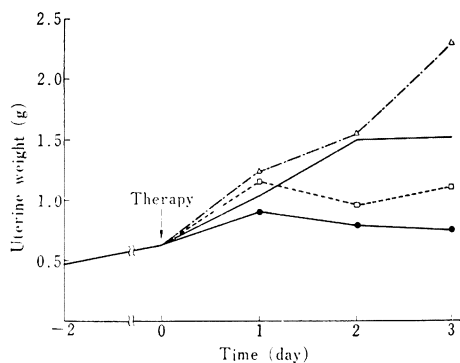
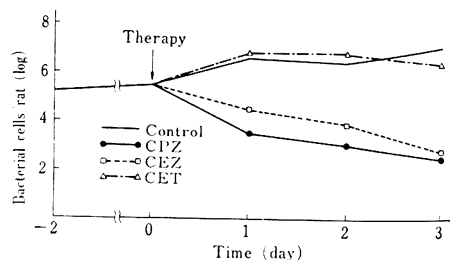


Fig. 9 Therapeutic effects of CPZ, CEZ and CET against intrauterine infections with *E. coli* TK-55 in rats

Therapy : for 3 days of 100 mg/kg $\times$ 2/day (i. m.)



TK-143 を 2.6×10^5 cells/rat 接種し, 感染2日後各薬剤の 100 mg/kg $\times$ 2/day を3日間連続筋肉内投与した。

CPZ は投与1日後から生菌数は減少し, 3日後に 4.2×10^4 cells/rat まで減少した。また子宮重量は投与1日

Fig. 9 (Continued)

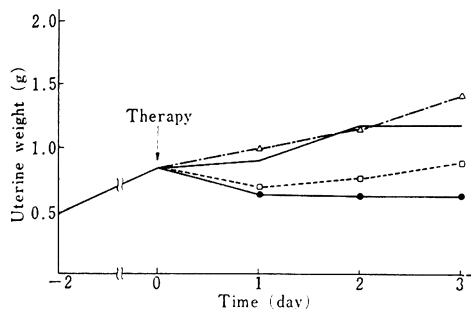
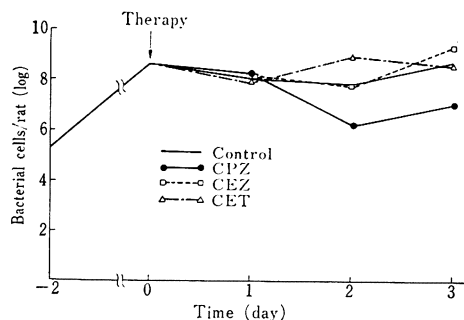
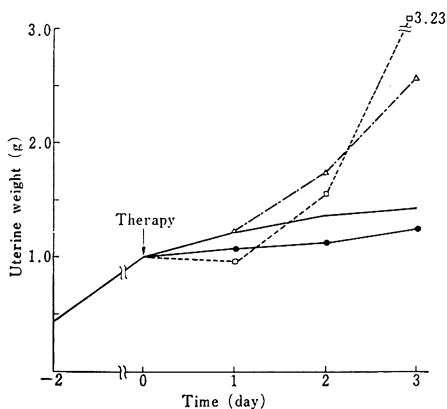
Fig. 10 Therapeutic effects of CPZ, CEZ and CET against intrauterine infections with *K. pneumoniae* Y-41 in ratsTherapy : for 3 days of 100 mg/kg $\times$ 2/day (i. m.)

Fig. 10 (Continued)



後わずかに増加したが、以後増加は抑えられた。一方、CEZ は投与2日後より生菌数はわずかに減少し3日後に 3.7×10^7 cells/rat まで減少した。子宮重量は投与1日後増加し、以後増加は抑えられた。CET では生菌数

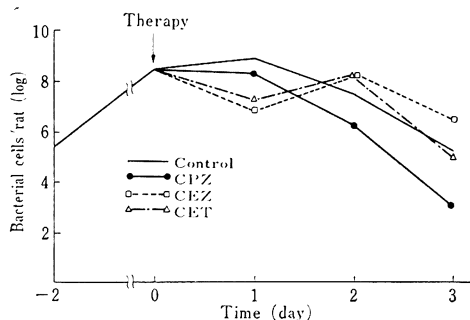
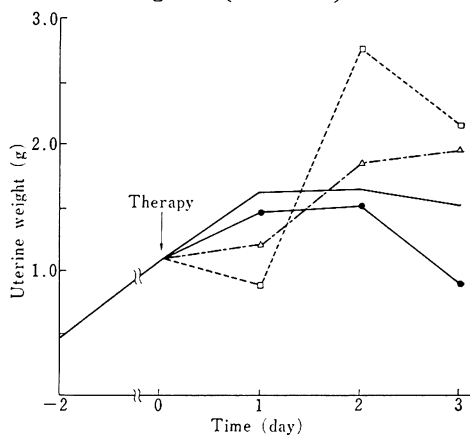
Fig. 11 Therapeutic effects of CPZ, CEZ and CET against intrauterine infections with *P. mirabilis* T-287 in ratsTherapy : for 3 days of 100 mg/kg $\times$ 2/day (i. m.)

Fig. 11 (Continued)



および子宮重量とも減少せず、無治療群より増加する傾向が認められた。

b) *E. coli* TK-55 による感染

E. coli TK-55 による子宮内感染症に対する薬剤の治療効果を Fig. 9 に示した。*E. coli* TK-55 を 1.7×10^6 cells/rat 接種し、感染2日後各薬剤の 100 mg/kg $\times$ 2/day を3日間連続筋肉内投与した。

CPZ は投与1日後から生菌数は減少し、3日後に 3.0×10^2 cells/rat まで減少した。またそれに応じ1日後から子宮重量も減少した。CEZ は投与1日後から生菌数が減少し3日後には 3.2×10^2 cells/rat になったが、子宮重量は抑制傾向を示した。CET は生菌数および子宮重量とも減少しなかった。

c) *K. pneumoniae* Y-41 による感染

K. pneumoniae Y-41 による子宮内感染症に対する薬剤の治療効果を Fig. 10 に示した。*K. pneumoniae* Y-41 を 1.78×10^5 cells/rat 接種し、感染2日後各薬

Fig. 12 Therapeutic effects of CPZ, CEZ and CET against intrauterine infections with *S. aureus* F-139 in rats

Therapy: for 3 days of 50 mg/kg $\times$ 2/day (i. m.)

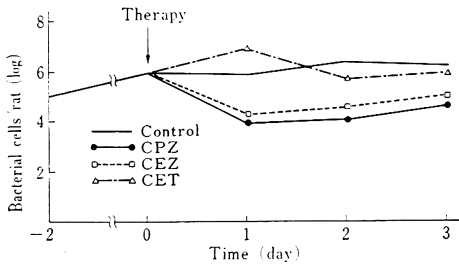
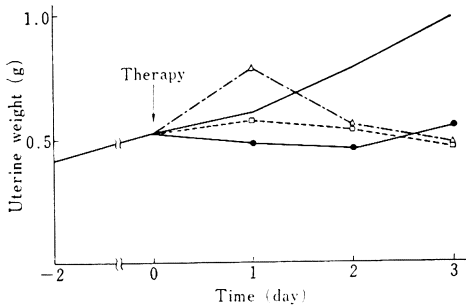


Fig. 12 (Continued)



剤の 100 mg/kg $\times$ 2/day を 3 日間連続筋肉内投与した。

CPZ は投与 2 日後生菌数は 1.7×10^6 cells/rat まで減少したが、3 日後 1.2×10^7 cells/rat に増殖した。子宮重量はやや増加する傾向が認められた。一方、CEZ および CET 投与は生菌数の減少は認められず、子宮重量も増大し、無治療群より炎症は悪化した。

d) *P. mirabilis* T-287 による感染

P. mirabilis T-287 による子宮内感染症に対する薬剤の治療効果を Fig. 11 に示した。*P. mirabilis* T-287 を 2.7×10^5 cells/rat (5% ムチン加) 接種し、感染 2 日後各薬剤の 100 mg/kg $\times$ 2/day を 3 日間連続筋肉内投与した。

CPZ は投与 1 日後から生菌数は減少し、3 日後に 1.1×10^3 cells/rat まで減少した。また子宮重量は 3 日後に減少した。一方、CEZ および CET は投与 1 日後に生菌数および子宮重量の減少が認められたが、2 日後無治療群より炎症は悪化する傾向を示した。

なお、無治療群は 3 日後から生菌数の減少および子宮重量の増加抑制を示し、自然治癒の傾向が認められた。

e) *S. aureus* F-139 による感染

S. aureus F-139 による子宮内感染症に対する薬剤の治療効果を Fig. 12 に示した。*S. aureus* F-139 を 5.2×10^4 cells/rat 接種し、感染 2 日後各薬剤の 50 mg/kg $\times$ 2/day を 3 日間連続筋肉内投与した。

CPZ は投与 1 日後生菌数が 7.9×10^3 cells/rat まで、子宮重量もわずかに減少したが、以後減少はみられなかった。CEZ は投与 1 日後生菌数が 1.6×10^4 cells/rat まで減少し、以後減少はみられなかった。また子宮重量は 2 日以後減少した。CET は投与 1 日後生菌数および子宮重量が無治療群より増加し、以後減少したが効果は弱かった。

考察および結論

子宮内感染を動物で成立させることは常に動物、ことにラットは汚染された環境で飼育されている関係上はなはだ困難であり、腔式、あるいは開腹の上子宮内に *E. coli* などの生菌を注入しても殆どの場合感染は成立しない。これは汚染環境に順応するための宿主の強い免疫学的機構による生体防衛とも考えられる。

我々は感染症に対する抗生物質、ことに cephalosporin 系のより客観的な効果のデータを得るために、感染モデル動物の成立をはかるため種々の検討を行なった。

まず estrogen を投与してラットの子宮を浮腫状にした後、子宮内に菌の注入を試みたが感染は成立しなかった。これは estrogen 優位の環境では発情期と同様な状態が誘起され、外子宮口が開口し、さらに子宮の蠕動が高まるため、子宮内感染がおこっても腔が drainage の役割を果し、子宮内容物が流出してしまうことが知られているが、今回の我々の実験では子宮を頸部で結紮しているため、このようなことは考えにくい。

そこで今回我々はラット子宮内に *E. coli* を接種する前日から progesterone を毎日投与して子宮内感染の惹起を試みた。その結果、経日的に子宮内生菌数の増加、体温の上昇および末梢白血球数の増加が認められた。また子宮内には好中球およびリンパ球を多く含む浸出液が認められ、子宮の組織学的検討からも感染の成立が証明された。Estrogen 処置ラットでは子宮内感染が惹起されず、progesterone 処置ラットで感染が惹起される理由については、明解に説明することはできないが、両 steroid hormone の生理作用を考えると、estrogen によって子宮は肥大し子宮内膜は増殖し、子宮筋の収縮性も増加し菌が定着しにくい環境にあることが想像される。

これに反して progesterone によって子宮内膜は分泌期となり、子宮内膜の glycogen 量も estrogen 投与時よりは増加し、さらに antiestrogenic に作用し、子宮筋の収縮は起りにくく静止状態になる。この子宮内膜の

分泌期像への変化, glycogen の増量と子宮筋の静止状態が菌の定着に大きく作用するものと考えられる。

この実験的子宮内感染症ラットを用いて cephalosporin 系薬剤の子宮内移行性を検討した結果, 子宮筋層内および子宮内貯溜液中への移行性は CPZ, CEZ, CET の順に良好な成績が得られた。これは CPZ の蛋白結合性が CEZ および CET より弱いためと考えられる。またヒトで我々は種々の抗生物質の胎盤通過性や子宮および付属器への薬剤の移行性などについて報告^{4,5)}しているが, この実験結果からヒトにおいても CPZ は良好に内性器へ移行するものと思われる。

次に種々の菌による実験的子宮内感染症ラットに CPZ, CEZ および CET を筋肉内に投与し, その治療効果についても比較検討した。E. coli 感染例では CPZ, CEZ の順に優れ, CET は効果が認められなかった。K. pneumoniae および P. mirabilis 感染例では CPZ だけが有効であり, 他剤の効果は認められなかった。また S. aureus 感染例では E. coli 感染例とほぼ同様の成績が得られた。

近年, 産婦人科領域における感染症はグラム陰性菌の占める割合が増加してきている現状において, CPZ は抗菌力的にも優れ, かつ子宮組織への移行性も良好なことから, 今後産婦人科領域感染症に用いて大いに有用な抗生剤であると思われる。

文 献

- 1) 池本秀雄: 最近の院内感染をめぐって。産婦の世界 29: 1111~1114, 1977
- 2) 館野政也: 産科病棟における院内感染防止対策。産婦の世界 29: 1131~1137, 1977
- 3) 松田静治: 抗生物質の選び方。産婦治療 33: 331~305, 1978
- 4) 館野政也, 他 14 名: 産婦人科領域における新抗生物質 T-1220 の臨床応用と子宮付属器内濃度について。産婦の世界 29: 1053~1060, 1977
- 5) 館野政也, 舌野 徹, 朝本明弘, 林 義則, 金井 皓明: 抗生物質の胎盤通過性とアルブミンとの結合性に関する研究—新抗生物質 T-1551 の基礎と臨床—。産婦の世界 32: 209~215, 1980

PREPARATION OF EXPERIMENTAL INTRAUTERINE INFECTED RATS AND STUDY ON THERAPEUTIC EFFECTS OF CEPHALOSPORINS

MASAYA TATENO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Toyama Prefectural Central Hospital

NAGAKO NISIDA, YUKIO KUROTSU, TAKASHI YASUDA and ISAMU SAIKAWA
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

1. *Escherichia coli* TK-143 was inoculated in uterus of rat to which progesterone was preadministered. And then the rising of body temperature and the increasing of peripheral leucocyte numbers were recognized, and the fluids accumulated in uterus (exudate) and histological changes of uterine tissue proved the performance of intrauterine infection in rats.

2. Cefoperazone (CPZ), CEZ and CET were administered 50 mg/kg intramuscularly to rats described above. It resulted that transference of CPZ to uterine muscle and exudate was the best, and followed CEZ and CET.

3. The therapeutic effects of CPZ, CEZ and CET against intrauterine infections due to some bacteria were studied in rats. Against the infection with *E. coli*, the effect of CPZ was superior to CEZ, and CET was inferior. And with *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*, CPZ was only effective, others were no. With regard to *Staphylococcus aureus*, the result was almost the same as that of *E. coli*.