実験的ラット子宮内感染症モデルの作製と CTX による治療効果 (第1報)

笠 井 一 弘・宮 本 政 樹 ヘキストジャパン株式会社総合開発研究所

高瀬善次郎 川崎医科大学産婦人科

(昭和 57 年 3 月 25 日受付)

ラットの子宮内へ E. coli を接種し、実験的子宮内感染症モデルの作製を試みるとともに、感染モデルを用いて、抗生剤の治療効果の比較についても検討した。

実験には、処女、分娩翌日および分娩4日後のラットを用いた。それぞれのラットには、子宮頸部に結紮を施し、子宮角内に5%ムチン液とともに菌液を注入した。その結果、分娩4日後の子宮において菌定着は最も良好であり、組織学的にも子宮腔、 腺管への好中球浸潤を伴う顕著な子宮内膜の炎症性変化がみられた。

このような感染動物を用いて、CTX,CEZ の治療効果を比較した。CTX 投与の場合、CEZ に比べ明らかに優れた治療効果がみられた。この結果は、作製されたラットの子宮内感染モデルが、抗生剤の治療効果を *in vivo* で予測する一手段となることを示唆している。

抗生物質の病巣における治療効果を予測 するには、MIC、MBC はもちろんのこと、蛋白結 合 率、 β -lactamase に対する安定性などの、 $in\ vitro$ の成績が参考にされる。さらに $in\ vivo$ における血中あるいは組 織 内 濃度、またそれらにおける薬剤濃度の持続時間も抗菌作用に影響を与える要素となっている。そしてこれらの総合評価のために、実験的感染症動物を用いての治療実験は、有用な一手段であると考えられている 10 。

したがって、マウスの全身感染^{2,3)}、モルモット・ラットの皮下感染⁴⁾、マウスの気道感染⁵⁾、ウサギの角膜感染⁵⁾、ラット・ウサギ・イヌにおける尿路感染^{7,8)}など多くの感染モデルが作製され、治療実験成績が報告されている。

一方,産婦人科領域では,感染症に対する臨床報告の多い反面,小動物における実験的子宮内感染症の作製および,それを用いての治療実験に関する報告は必ずしも多くない⁹⁾。そこで著者らは,*E. coli* を感染菌として,ラットでの子宮内感染症モデル作製を試みるとともに,これを用いて抗生物質の治療効果を検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 感染菌

菌株として、産婦人科領域の感染症において検出率の高い E. coli を選び、予備実験において、あらかじめラット子宮内で良好な定着が確認された、臨床分離の Ec-

89 を実験に使用した。

2. 動物および菌接種

動物(Jcl-SD:日本クレア)は、8~12 週令の処女ラットおよび、11~17 週令の初産分娩後のラットを用いた。

菌接種に際し、動物にはそれぞれペントバルビタール 麻酔下、腹部の小切開を施し、血管を避けて子宮頸部を 結紮した後、接種菌液(5 %ムチン液とハートインフュ ージョンブイヨン 20 時間培養菌液等量)を 0.1 ml づ つ両子宮角内に注入した。

菌接種動物は、最終投与翌日に血液培養のため心臓穿刺により採血し、その後直ちに解剖に供した。摘出した子宮、脾臓、腎臓はそれぞれの割面をドリガルスキー改良培地(BTB 培地:栄研)表面にスタンプし、37℃ 24時間培養後、コロニー形成の有無により、子宮内膜面あるいは臓器内の菌を検索した。また子宮内に浸出液、膿汁の貯留を認めたものは、10 倍段階希釈し菌数を定量した。さらに子宮は 10% ホルマリン液で固定し、HE 染色組織標本を作り鏡検した。

3. 薬剤

抗生剤は、CTX(Cefotaxime: ヘキストジャパン) および CEZ(Cefazolin: 藤沢薬品)を用い、注射用生理食塩液にて 0.4% 浴液を調製し、それぞれ 40 mg/kg の割合でラット尾静脈内へ投与した。

4. 血中および子宮組織内 CTX, CEZ の濃度

ラットにおける,CTX および CEZ 40 mg/kg 投与時の血中および子宮組織内濃度は,それぞれの楽剤を尾静脈内に投与後,15 分,30 分,1,2,4 時間の各時点で各群5 匹のラットを用いて測定した。 濃度測定は CTX の場合,M.luteus ATCC 9341,CEZ の場合は B.su-btilis ATCC 6633 を検定菌とした薄層カップ法により行なった。

5. 治療実験

治療実験には、1群10匹の処女ラットおよび1群15匹の分娩4日後のラットを用いた。子宮内感染症は、前者の場合 10^6 cells/ml,後者は 10^6 cells/ml の菌液を、両子宮角にそれぞれ0.1 ml 注入して作製した。

抗生剤の投与量は、CTX、CE2 それぞれ 40 mg/kg とし、初回投与は菌接種3時間後の1日1回、また翌日 からは1日2回(午前10時、午後4時)すなわち処女 群では5日間計9回,分娩群では6日間計11回をラット尾静脈内に連投した。動物は最終投与翌日に採血,解削し,細菌学的,組織学的検索を行なった。

II. 実験成績

- 1. 子宮感染症モデル作製のための検討
- 1) 感染菌の MIC

感染菌に対する CTX, CEZ の MIC を日本化学療法 学会標準法で測定したところ, それぞれ $0.2 \mu g/ml$, $3.13 \mu g/ml$ の値を示した。

2) 処女ラットおよび分娩ラット子宮における繭の定 着状態

処女ラットおよび分娩ラットへ 10° cells/ml の E. coli を接種し、菌の定着状態を検討した。その 成 績は Table 1 に示したように、処女群では、敗血症に起因すると考えられる死亡が 10 例中 5 例認められた。また死

Table 1 Organ distribution of E. coli in rats examined 6 days after intrauterine inoculation at 10⁸ cells/ml

	Auden al Ni	ļ B	acterial gr	No. of organisms in exudate in the		
Group	Animal No.	Blood	Spleen	Kidney	Uterus	uterus
	V- 1	_	+	##	##	
	2*	+	#	##	##	
	3*	+	##	; 	##	!
	4*	+	##	##	##	
V::	5*	+	##	##	##	
Virgin rats	6	! _	+	i –	##	
	7	+	+	+	##	
	8	_	++	+	##	9. 0×10 ⁸
	9*	+	##	##	#	
	10	_	_	_	##	
	D I - 1	_	_	_	_	
Rats delivered	2	<u> </u>	+	#	#	
one day before inoculation	3	-	-	_	_	
	4	_	-	_	-	
	D II - 1	_	+		##	
	2	+	+	+	##	
	3	+	+	-	##	
	4	_	+	+	##	
Rats delivered	5	_	+	+	##	
4 days before inoculation	6	_	+	+	#	
oculation	7	-	_	+	#	
	8	-	+	+	#	
	9*	+	##	##	##	
	10*	+	##	##	#	

a) The ratings are: -, no colonies; +, 1-50 colonies; ++, 51 or more colonies; ++, colonies grown all over the surface of the agar medium

^{*} Died

Fig. 1 Histological changes in the uterus of a virgin rat examined 6 days after experimental intrauterine infection with E. coli

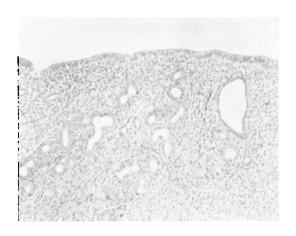
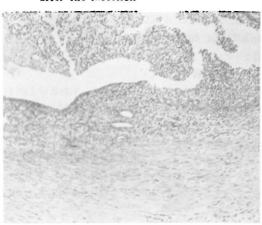


Fig. 2 Histological changes in the uterus of a rat infected with E. coli experimentally 4 days after delivery and examined 6 days after the infection



亡例については死亡時に、残余のラットについては、菌接種6日後に、細菌学的検索を加えた結果、全例の子宮から菌が培養され、同時に検索した血液、脾臓、腎臓からいずれも接種した菌が培養された。しかし、菌接種部である子宮には、組織学的に軽度の子宮内膜の炎症性変化が、生存、死亡例の別なく散発してみられたのみであった(Fig. 1)。

一方,分娩翌日に菌接種したものでは,死亡例はなく,また子宮より菌が培養できたものは,4例中1例にすぎなかった。

これに対し、分娩4日後に菌を接種した群では、10 例中2例が死亡し、子宮および脾臓、腎臓より、接種し た菌が高濃度に培養された。さらに、組織学的にも子宮 腔あるいは腺管内に好中球浸潤を伴う子宮内膜の強い炎 症性変化が、全例に観察された (Fig. 2)。

3) 接種菌量の検討

分娩4日目のラットに、菌を10⁴,10⁶,10⁶ cells/ml 接種し、子宮の感染状態を比較した。菌接種7日後の子 宮の細菌学的検索においては、各菌量群とも全例より多 数の菌が培養された。また組織学的にも、腺管内に好中 球浸潤を伴う子宮内膜の炎症性変化が、いずれの菌量に おいても同程度に認められ、接種菌量による感染程度に 顕著な差はみられなかった。しかし、敗血症によると考

Fig. 3 Concentrations of CTX and CEZ in rat plasma and uterus after intravenous injection of 40 mg/kg

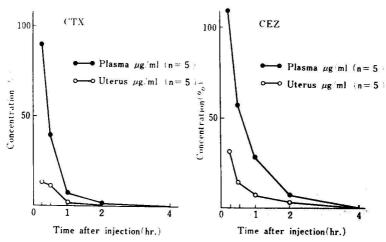


Table 2 Therapeutic effect of CTX and CEZ on the uterus of virgin rats infected with E. coli experimentally

	2 (A. 5.70)	В	acterial gr	No. of organisms in exudate in the		
Drug	Animal No.	Blood	Spleen	Kidney	Uterus	in exudate in the uterus
	V N- 1*	+	##	+++	##	
 (Control)	2	-	+		1+	
	3*	+	+++	+++	+++	
	4	_	_		_	
	5*	+	 +	+++	##	
	6	_			+	
	7	_	+	-	+	
	8*	+	+++	+++	+++	
	9*	+	+++	+++	##	
	10*	+	+++	+#+	##	4. 0 × 10 ⁸
	V X - 1	-	-	_	· ·	
	2	_	_		_	1
	3	_	_		_	
	4	-	_		_	
СТХ	5	_	_	_		
CIX	6	_	-	_	_	!
	7	_	_		_	· !
	8	-	_	-	_	
	9	_	_	_	-	
	10	-	-	-	· -	
	V Z - 1	-	_	_	##	
	2	_	_	_	-	
	3	_	-	_	+	
	4	_	_	_	+	
CEZ	5	-	_	_	#	
	6	_	_	_	##	8. 2×10^8
	7	_	_	_	+	
	8	_	-	_		
	9	_	_	+	-	
	10	_	-	-	_	

The drugs were administered intravenously at 9 doses (in total, 360 mg/kg) over a period of 5 days: a dose of 40 mg/kg on the day of inoculation and 2 doses daily for the following 4 days.

えられる死亡率は、10⁸ 接種では 28% (8/29)、10⁶ では 4% (1/24)、10⁶ では 11% (1/9) であり、10⁸ 接種の場合は他の2群に比較し、明らかに高率であった。

以上の実験成績は、ラットにおける子宮内感染症が、 処女ラットおよび分娩4日後のラットにおいて、容易に 作製できることを示していた。そこで、これらの子宮内 感染モデルを用いて以下の治療実験を試みた。

2. 治療実験

1) 血中および子宮組織内濃度

CTX, CEZ の 40 mg/kg を、5 yrトの尾静脈内に投与したときの、血中および子宮組織内濃度は、Fig.3 に示したように、いずれの濃度も CEZ が CTX に比べ高値を示していたが、両剤とも投与後 4 時間では、血中あるいは子宮組織内から消失していた。

2) 感染処女ラットに対する治療効果

薬物非投与群では、10⁸ cells/ml の菌量を接種した

a) The ratings are: -, no colonies; +, 1-50 colonies; +, 51 or more colonies; +, colonies grown all over the surface of the agar medium

^{*} Died

Table 3 Histological findings in the uterus of virgin rats infected with E. coli experimentally and treated with CTX and CEZ

Drug		(Control)						СТХ							CEZ															
Findings ^{a)}	V	N	lo#	l a	le •	ı e	17	lu *	lo#l	10*		X					No			110		Z	10	14	16	16	1 7			110
	1	2	၂၁	4	5	, o	1/_	10	137 1	10	1	1.4	3		Ü	Į Q	-	10		110	-	12	10	14	10	10	1	0	y	10
Cell infiltration in the mucosa and submucosa	+	+	_	 -	+	-	-	-			<u> </u>	 -	_	_	_	-	+	_	-		; {{	-	<u></u>	_	+	+	! -	-	-	+
Cell infiltration in the lumen	- -	-	-	-	_	_	_	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	_	_	 	.	+	_	-	-	_
Cell infiltration in the gland	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	_	-	 -	-	-	-	+	_	_	<u> </u>	_	_		_	-	_
Interstitial inflammation	-	-	_	_	-	-	-	-	-	_	-	-	-	-		 -	<u> </u>	_	_	_		-	_	_	_	_	-	-	-	
Mesenteritis	-	<u>'</u> -	_	-	-	_		-	-	-		-			-	<u> </u> –		-	-			-	-	-	-	-	_	_	_	_

The drugs were administered intravenously at 9 doses (in total, 360 mg/kg) over a period of 5 days: a dose of 40 mg/kg on the day of inoculation and 2 doses daily for the following 4 days.

- a) The ratings are: -, no change; +, slight; ||, moderate
- * Died

時, 感染6日目までに 10 例中6例が死亡した。細菌培養の結果, 死亡例すべての子宮, 脾臓, 腎臓, 血液から接種した菌が分離された。また生存した4例のうち3例の子宮と2例の脾臓から菌が培養された。

一方、CTX、CEZ の投与(40 mg/kg、9回5日間)によっては、いずれも死亡例は全く認められなかった。培養成績においては、CEZ 投与の場合、10 例中6 例の子宮および1 例の腎臓より E. coli が分離されたのに対し、CTX 投与では、全例とも子宮、脾臓、腎臓の菌培養成績は陰性であった。子宮の組織学的観察では、薬物非投与群、薬物投与群のいずれにおいても、軽度の子宮粘膜および粘膜下組織への細胞浸潤が認められ、両者間に明らかな差は認められなかった(Table 2、3)。

3) 感染分娩ラットに対する治療効果

薬物非投与群では、15 例中1例が死亡し、死亡 例も 含め全例の子宮より接種した菌が培養され、組織学的に も子宮に強い炎症性変化が認められた。

一方,薬物投与群においては,死亡例はみられなかった。菌培養の成績は,CEZの15例全例の子宮より接種菌が認められたのに対し,CTX投与群では,15例中8例は菌陰性であり,CEZ群に比べ明らかに良好な治療効果が認められた。さらに,組織学的にもCEZ投与群では,非投与群と同程度の強い炎症性変化がみられたが,CTX投与群では,子宮腔内,腺管への好中球浸潤を伴う子宮内膜の炎症性変化は,非投与群に比べ軽度であった(Table 4,5)。

III. 考 察

一般に細菌感染症において,菌の定着は菌自体の病原

性はもちろんのこと、感染部位の状態あるいは、生体の 防衛因子の影響も無視できない。

今回の実験において、処女ラットと分娩ラットの子宮 内感染状態を比較したとき、その感染の程度は、分娩4 日後>処女ラット>分娩1日後の順であり、分娩4日後 のラットは処女ラットに比べ、子宮内感染に対して感受 性の強いことが認められた。この原因の一つとして、分 娩ラットの場合、出産により内膜が損傷し、処女ラット に比べ、菌が侵入しやすい状態にあったことが考えられ る。

しかしながら、分娩翌日ラットの子宮内感染の程度をみると、分娩翌日の子宮は、分娩による子宮内膜損傷の修復程度が4日目に対し弱く、より感染しやすい状態と考えられたにもかかわらず、菌の定着は明らかに低率であり、その感染程度は、内膜の損傷の少ない処女ラットよりも劣っていた。この一因として、分娩直後にみられる白血球の一時的増加100が原因となり、増加した白血球の喰菌作用により、分娩翌日には、子宮内への菌の定着が困難となることが考えられる。したがって、子宮内感染症モデル作製には、子宮内膜の損傷程度とともに、白血球数などの生体の生理状態も考慮する必要があろう。

また、このようにして作製された子宮内感染動物に抗生剤を投与した時、今回の実験結果に示したように、治療効果が認められた。このことは、ラットの子宮内感染症モデルが、種々の抗生物質の治療効果を in vivo で評価するための一手段となることを示唆している。

Table 4 Therapeutic effect of CTX and CEZ on the uterus of rats infected with E. coli experimentally 4 days after delivery

Drug	A simal No	В	acterial gr	No. of organisms		
Drug	Animal No.	Blood	Spleen	Kidney	Uterus	in exudate in the uterus
	D N - 1	-	_	-	##	7. 2×10 ⁸
	2 3	_	_	_	111	
	4		_	_	##	3. 0×10°
	5*	+	##	#	 	1.8×10°
	6	<u> </u>	-		 	1.8×10° 3.2×10°
_	7	_	_	_	III -	3.2 \ 10
(Control)	8	-	_	_	++	
	9	_	_	_	#	
	10	_	+	-	##	3.0×10^9
	11	-	_	_	#	
	12	i –	+	++	#	
	13	i -	_	_	##	
	14	-	_	_	##	
	15	-		_	+	
	D X- 1	-	_	_		
	2	_	-	_	##	3. 5 × 10°
	3	_	_	_		<10 ²
	4	-	_	_	#	4. 0×10°
	5	-	_	_	-	<10 ²
	6	-	_	_	_	
CTX	7	_	+	+	##	4.1×10^{8}
CIX	8	-	_	_	-	
	9	· –	_	_	++	
	11	-	_	_	#	
	12	<u> </u>	_	_	+	<10²
	13	+	#	+	++	1. 4×10°
	14	_	<u></u>		_	1. 120
	15	-	_	-	-	
	D Z - 1	-	_	_	#	3. 3×10°
	2	-	-	-	##	3.4×10^{9}
	3	' -	_	-	##	5. 2×10°
	4	_	-	-	##	2.2×10^9
	5	_	-	-	##	1.5×10^{9}
	6	-	_	-	#	
CEZ	7 8		_	_	##	
	9	_	_	_	#	
	10	_	_		₩ !	
	11	_	_	_	#	
	12	_	_	-	##	
	13	_	_		##	
	14	-	-	-	+	
	15	-	-	-	##	

The drugs were administered intravenously at 11 doses (in total, 440 mg/kg) over a period of 6 days: a dose of 40 mg/kg on the day of inoculation and 2 doses daily for the following 5 days.

a) The ratings are: -, no colonies; +, 1-50 colonies; +, 51 or more colonies; #, colonies grown all over the surface of the agar medium

^{*} Died

Table 5 Histological findings in the uterus of rats infected with E. coli experimentally 4 days after delivery and treated with CTX and CEZ

Drug		- (C	ontrol)		C	ГХ			C	EZ	
No. of animals		15	(1)			1	5		1	1	.5	
	No. of animals with findings rateds)											
Findings	+11+	++	+	-	##	#	+	-	#	#	+	
Cell infiltration in the mucosa and submucosa	8	4	2(1)	1	2	5	2	6	5	10	0	0
Cell infiltration in the lumen	1	7	5	2(1)	0	3	4	8	8	4	3	0
Cell infiltration in the gland	o	7	4	3(1)	0	2	0	13	2	5	3	5
Interstitial instammation	. 0	0	1	14(1)	0	0	0	15	0	0	0	15
Mesenteritis	0	0	1	14(1)	0	0	1	14	. 0	0	3	14

The drugs were administered intravenously at 11 doses (in total, 440 mg/kg) over a period of 6 days: a dose of 40 mg/kg on the day of inoculation and 2 doses daily for the following 5 days.

- a) The ratings are: -, no change; +, slight; ||, moderate; |||, severe
- () No. of animals which died

文 献

- 五島瑳智子,小川正俊: 感染モデルと治療効果-基礎的考察。最新医学 35:1805~1811, 1980
- 小池健一:実験的緑膿菌感染症に対する Schizophyllan の感染防御作用。Jap. J. Antibiot. 29: 1098~1105, 1976
- 川崎賢二,関口金雄,小川正俊, 辻 明良, 五島 建智子: Opportunistic pathogen と宿主防衛機 能の関連について。Chemotherapy 28: 14~21, 1980
- 村川武雄,西田 実:ラット炎症 pouch 内感染 実験系とセファロスポリン類の効果。Jap. J. Antibiot. 26:449~453, 1973
- 5) 宇塚良夫,永武 毅,松本慶蔵,宍戸春美,力富 直人,渡辺貴和雄:実験肺炎を場とする CEZ, GM 併用療法の解析。Chemotherapy 28:809~ 815, 1980

- 6) 大石正夫, 今井正雄, 高橋篁子, 中枝武豊: 眼科 領域における 3',4'-dideoxy-Kanamycin B の基 遊的ならびに臨床的検討。 Chemotherapy 22: 1012~1018, 1974
- 7) 熊沢浄一:実験的腎盂腎炎研究の現状。Chemotherapy 29:1~8, 1981
- 8) 横田好子,河野洋子,若井芳美,上村利明,西田 実:ラットにおける実験的混合感染系と抗生物質 の評価。Jap. J. Antibiot. 29:859~867, 1976
- 9) 舘野以也,西田亭子,黒津幸雄,保田 隆,才川 勇: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。Chemo therapy 29:68~75, 1981
- 10) 株 香苗:日本人並に日本産医学実験動物の解剖 学及び生理学的計数。解剖生理計数 表刊 行 会, 214~238, 1965

EXPERIMENTAL INTRAUTERINE INFECTION IN RATS AND THERAPEUTIC EFFECTS OF CEFOTAXIME (CTX) ON THE INFECTION

KAZUHIRO KASAI and MASAKI MIYAMOTO
Development Laboratories, Hoechst Japan Limited

ZENJIRO TAKASE

Department of Obstetrics and Gynecology, Kawasaki Medical school

Intrauterine infection was induced experimentally in rats, and the therapeutic effects of antibiotics (CTX and cefazolin (CEZ)) on the infection were determined to examine the availability of such animals as the experimental model.

Virgin rats, and rats delivered the day before and 4 days before the test were used. The cervix of each animal was ligatured, and E. coli suspension mixed with 5% mucin was injected into both uterine horns. Among such infected uteri, the uterus in the group delivered 4 days before the test was in optimal conditions for bacterial growth. Histologically, the uterus of these cases showed inflammatory changes in the endometrium and neutrophil infiltration into the lumen and gland.

When the two antibiotics were intravenously administered to the animals infected as above, therapeutic effects were shown apparently with both drugs, and CTX was more effective than CEZ. Thus, such animals may serve as the model with which in vivo effects of antibiotics can be estimated.