

マウス実験的子宮内感染症の作製について

尾花 芳樹・北川 英男・中 るり子
田中 和重・西野 武志・谷野 輝雄
京都薬科大学微生物学教室

(昭和61年 3月28日受付)

Escherichia coli 444 株を用いマウス実験的子宮内感染症の作製を試みた。

プロゲステロン無投与の生後5週齢のマウスを用いて、約 10^5 cells/mouse 以上の菌液を子宮角に注入することにより確実に子宮内感染症を惹起させることができた。また本感染症モデルは少なくとも7日間は持続するが、敗血症タイプの感染症ではないことが認められた。

本感染症に対する合成抗菌剤の効果を検討したところ、投与量に対応した治療効果が認められた。

以上のような結果より、*E. coli* によるマウス実験的子宮内感染症の作製が可能であり、本感染症は抗菌剤の薬効評価の一つとして応用できるものと思われた。

近年細菌感染症の多様化に伴い、抗菌物質の効果を、客観的に評価するため各種実験動物を用いた感染モデルが開発されており、呼吸器感染^{1,2)}、尿路感染^{4,5)}、下感染^{6,7)}などのモデルを用いた薬効評価が行なわれている。

一方、産婦人科領域の感染症に対する化学療法については、臨床的によく検討がなされているが、抗生物質の効かつ適切な使用方法に関してさらに詳細な実験的検討が必要である。しかしながら実験的感染モデルについて、ラット^{8~11)}、家兎^{11~13)}およびイヌ¹⁴⁾の子宮内感染にするわずかな研究があるに過ぎない。

今回著者らは実験的感染症で頻用されるマウスを用い、大腸菌による子宮内感染モデルの作製を試み、抗菌剤の薬効評価の応用性について検討した。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

Escherichia coli 444 株を使用した。

2. 使用動物

3rd-ddY 系雌マウス (5週齢, 21~23g) を用いた。

3. 使用薬物

Ofloxacin (OFLX: 力価 1,000 μ g/mg, 第一製薬) および ciprofloxacin (CPFX: 力価 901 μ g/mg, バイエル品) を用いた。

4. 実験的子宮内感染症の作製

接種菌液の調製は普通 ブイヨン (NB: 日水製薬) で C 18 時間培養した *E. coli* を同培地で希釈して用い、菌接種はペンタルビタール (Nembutal: Abbott

Lab. Co., Ltd.) 麻酔下のマウスの下腹部に小切開を入れ、子宮頸を結紮後左側子宮角に注射器を用いて 0.025 ml の菌液を注入した。注入口は瞬間接着剤で封じ菌液の漏れを防止した。また小切開部は縫合を行ない飼育観察した。菌接種後経時的に子宮を無菌的に摘出し、ホモゲナイズ後ドリガルスキー改良培地 (日水製薬) を用いて子宮内菌数を測定した。さらに摘出した子宮をグルタルアルデヒドおよびオスミウム酸で固定後、アルコール系列で脱水し臨界点乾燥、白金-パラジウム蒸着を行ない、走査電子顕微鏡の試料とした。

5. 合成抗菌剤の治療効果

a) 抗菌力測定

日本化学療法学会感受性測定法¹⁵⁾ に準じて最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

b) 治療効果の検討

マウス子宮角に *E. coli* (1.3×10^5 cells/mouse) を接種し、4時間後に 0.5% carboxymethylcellulose に溶解あるいは懸濁した薬物を経口投与した。菌接種 24 時間後に子宮を無菌的に摘出し、ホモゲナイズ後子宮内菌数を測定した。

II. 実験結果

1. 実験的子宮内感染症の作製

a) 接種菌量の検討

子宮内感染症惹起のための接種菌量について検討した結果を Table 1 に示した。 10^4 および 10^5 cells/mouse 接種について検討したところ、 10^4 cells 接種では平均子宮内菌数は約 4×10^6 cells/uterus であり、また個体間のバ

Table 1 Effect of inoculum size on the viable cell numbers of *Escherichia coli* 444 in uterus

No.	Log of viable cell numbers/uterus ^{b)}	
	3×10^5 ^{a)}	3×10^4 ^{a)}
1	7.91	6.46
2	7.11	8.64
3	7.00	6.73
4	7.30	7.75
5	7.80	6.53
6	5.19	4.16
7	7.16	7.29
8	7.37	5.71
Mean (\pm SD)	7.11 \pm 0.78	6.66 \pm 1.26

^{a)} Inoculum size (cells/mouse).

^{b)} Viable cell numbers were measured at 48 hours after inoculation.

ラツキがみられた。一方 10^5 cells 接種では 1 例回収菌数の低い個体 (No. 6) が認められたが、平均菌数は約 1×10^7 cells/uterus であり個体間のバラツキもあまり大きくなかった。この結果 10^5 cells/mouse 以上の接種菌量により感染が惹起されるものと考えられた。

b) マウス週齢の検討

感染に及ぼすマウス週齢の影響について検討した結果を Table 2 に示した。5 週齢、7 週齢および 9 週齢のマウスを用い、接種菌量 10^5 および 10^4 cells/mouse で検討したところ、5 週齢マウスが他の週齢のマウスよりも若干回収菌数が多く感染し易いことが分かった。この果結より以下の実験には 5 週齢のものを使用することにした。

c) プロゲステロン投与の検討

感染に及ぼすプロゲステロン (半井化学) 投与の影響について検討した結果を Table 3 に示した。なおプロゲステロンは菌接種前日および当日の 1 日 2 回筋肉内投与を行なった。プロゲステロン 0.1 および 0.2 mg/mouse

Table 2 Effect of aging on the viable cell numbers of *Escherichia coli* 444 in uterus

Inoculum size (cells/mouse)	Log of viable cell numbers/uterus (\pm SD) ^{a)}		
	5 weeks	7 weeks	9 weeks
2.3×10^4	6.23 \pm 0.68	5.46 \pm 2.64	3.96 \pm 2.53
2.3×10^3	4.37 \pm 2.73	2.86 \pm 2.69	3.46 \pm 1.15

^{a)} Viable cell numbers were measured at 48 hours after inoculation.

投与群からの菌の回収は約 3×10^7 cells/uterus、無投与群では 1×10^7 cells/uterus であり、投与群の方が若干多いことが認められたが有意な差ではなく、この条件下でのプロゲステロン投与の影響はほとんど認められなかった。

d) 子宮内および血中感染菌の消長

子宮内に菌を接種後経時的に子宮内および血中感染菌の消長について検討した結果を Fig. 1 に示した。 10^5 cells/mouse 接種後子宮内で感染菌は徐々に増殖し、24 時間後には約 100 倍に相当する約 1×10^7 cells/uterus を示し、少なくとも 7 日間同レベルの菌数を維持した。また血中菌数では感染 12 時間後に約 10^8 cells/ml レベルに達し、その後若干菌数の変動が認められるが、ほぼ同レベルの菌数を 7 日間維持した。このように本感染モデルは敗血症タイプの感染ではなく、子宮に局限した感染系であると思われた。

e) 子宮内腔の走査電子顕微鏡観察

子宮内腔について走査電子顕微鏡で観察した結果を Fig. 2 および 3 に示した。非感染状態の子宮内腔の上皮細胞は規則正しく配列しているが (Fig. 2)、感染のある場合は細胞表面は乱れ、細胞表面に付着している菌体や組織内に侵入しようとする菌体が観察された (Fig. 3)。

2. 合成抗菌剤による治療効果

OFLX および CPFX の治療効果について子宮内菌数を測定した結果を Fig. 4 に示した。両薬物は投与直

Table 3 Effect of progesterone on the viable cell numbers of *Escherichia coli* 444 in uterus

	Log of viable cell numbers/uterus (\pm SD) ^{b)}
Non-treatment (Control)	6.98 \pm 0.65
Progesterone (0.1 mg \times 2/day \times 2) ^{a)}	7.46 \pm 0.58
Progesterone (0.2 mg \times 2/day \times 2) ^{a)}	7.45 \pm 0.14

^{a)} Progesterone were administered intramuscularly.

^{b)} Viable cell numbers were measured at 48 hours after inoculation.

* Inoculum size: 2.5×10^5 cells/mouse.

Fig. 1 Viable cell numbers in blood and uterus after intrauterine inoculation with *Escherichia coli* 444

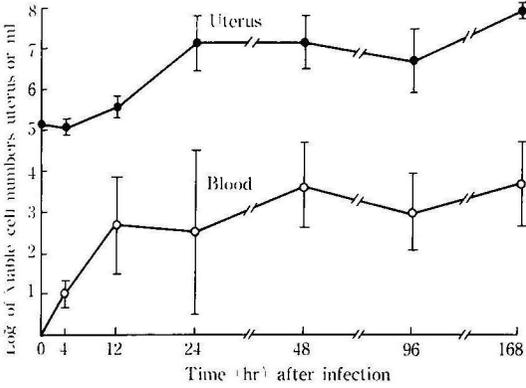


Fig. 2 Endometrial surface of normal mouse ($\times 6,000$)

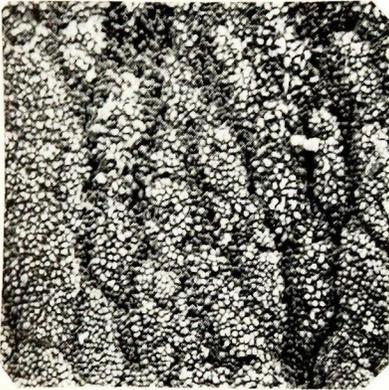


Fig. 3 Endometrial surface of mouse at 24 hr. after *E. coli* inoculation. Erosion of the cell surface-adhering *E. coli* is apparent. ($\times 6,600$)

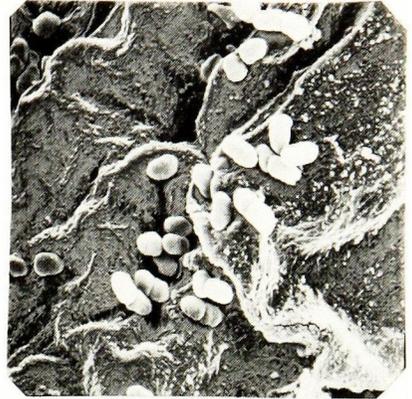
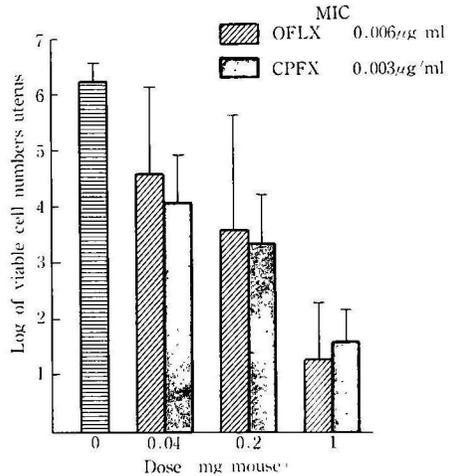


Fig. 4 Protective effect of OFLX and CPFX on the experimental uterine infection with *Escherichia coli* 444



* Viable cell numbers were measured at 24 hr. after administration.
 ** Inoculum size : 1.3×10^5 cells/mouse.

対応したほぼ同等の除菌効果が認められ、0.04 mg 投与では約 10^4 cells/uterus, 0.2 mg では約 10^3 cells/uterus となり、1 mg 投与では約 10^1 cells/uterus であり、本感染モデルは薬効評価の一つとして応用できるものと考えられた。

III. 総括および考察

好気性菌による実験的子宮内感染症については、ラット、家兎およびイヌを用いたモデルが報告されている⁸⁻¹⁴。また最近嫌気性菌単独あるいは嫌気性菌と好気菌による複数菌感染に関しても報告されるようになってきた^{16,17}。しかしこれらはいずれも動物の性周期を考し、性ホルモンの前投与や周産期動物の使用などの条件下で検討されてきた。今回われわれは、各種実験感染頻用されるマウスを用いて可能な限り単純な条件下で

の子宮内感染症の作製を試みた。その結果5週齢マウスを用い、約 10^5 cells/mouse 以上の菌液を接種することにより感染を惹起させることが可能であり、またこの感染症モデルは敗血症型ではないことが分かった。また感染惹起に及ぼすプロゲステロン投与の影響について検討したところ、無投与群と投与群で子宮内菌数はほぼ同レベルであり、本実験条件下におけるプロゲステロン投与の影響はほとんど認められなかった。すでに館野ら⁹は、ラット実験的子宮内感染症を作製する場合、プロゲステ

ロン前投与の必要性を示唆している。その理由としてプロゲステロン投与による子宮内膜の分泌期像への変化、グリコーゲンの増量および子宮筋の静止状態により感染菌の定着性が大きくなるとしている。またわれわれも、ラットを用いた子宮内感染モデルの場合、感染を確実に惹起するためにはプロゲステロン投与が必要であることを認めている。しかしながら今回のように、マウスを用いた場合感染惹起のためのプロゲステロン投与の必要性は認められなかった。これは実験動物の種差により生じるものと推察された。さらに組織学的観察より本感染症モデルは感染菌の増殖、固有層への侵入は認められるものの炎症反応は比較的軽度であることが観察された¹⁸⁾。すでに笠井ら¹⁰⁾は、妊娠後期のラットを用い、大腸菌による子宮内感染症について検討しており組織学的変化が軽度であることを報告している。しかしながら同菌種であっても炎症性が強いという報告⁹⁾もあり、菌株、感染方法などの条件によって差異が生じるものと考えられた。

また今回作製した子宮内感染症を使用して合成抗菌剤の治療効果について検討を行なった結果、投与量に対応した *in vivo* 効果が認められ、この感染モデルは薬効評価の一つとして応用できるものと考えられた。特にマウスは実験動物として取り扱いが比較的楽であり、本感染症は有用なモデルであると思われた。

文 献

- 1) 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
- 2) NISHI, T. & K. TSUCHIYA: Experimental respiratory tract infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice: chemotherapy with kanamycin. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 494~505, 1980
- 3) OBANA, Y.; T. NISHINO & T. TANINO: Therapeutic efficacy of β -lactam and aminoglycoside antibiotics on experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* B-54 in diabetic mice. J. Antibiotics 38: 941~947, 1985
- 4) NISHI, T. & K. TSUCHIYA: Experimental urinary tract infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Infect. Immun. 22: 508~515, 1978
- 5) OBANA, Y.; T. NISHINO & T. TANINO: *In-vitro* and *in-vivo* activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Antimicrob. Chemother. 15: 441~448, 1985
- 6) 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。Jpn. J. Antibiot. 26: 449~453, 1973
- 7) SAITO, M.; T. SAITO, K. YANO, K. SHIBATA, T. NISHINO & T. TANINO: Therapeutic effect of cefotetan in an experimental local infection with facultative and obligate anaerobes in granuloma pouches in rats. J. Antimicrob. Chemother. 13: 133~142, 1984
- 8) 館野政也, 西田亨子, 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。Chemotherapy 29: 68~75, 1981
- 9) 笠井一弘, 宮本政樹, 高瀬善次郎: 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 (第一報)。Chemotherapy 30: 1278~1285, 1982
- 10) 笠井一弘, 宮本政樹, 高瀬善次郎: 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 (第二報)。Chemotherapy 31: 988~991, 1983
- 11) NISHIKAWA, Y.; T. BABA & T. IMORI: Effect of the estrous cycle on uterine infection induced by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 43: 678~683, 1984
- 12) 鎌田洋一, 松田浩治, 野村紘一, 關守龍雄: ウサギを用いての子宮内感染モデルの作成。日本妊学会雑誌 28: 205~210, 1983
- 13) 關守龍雄, 鎌田洋一: ウサギ子宮内感染症モデルにおける Cefmenoxime の治療効果について。Chemotherapy 31: 947~951, 1983
- 14) 關守龍雄, 野村紘一, 馬場栄一郎, 菅原真一, 森岡 正: 実験的犬子宮蓄膿症の作成と作成した子宮蓄膿症に対する Cefmetazole による治療試験。日本不妊学会誌 24: 458~465, 1979
- 15) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 16) 笠井一弘, 宮本政樹: ラットにおける *B. fragilis* による実験的子宮内感染症の作製。Chemotherapy 32: 142, 1984
- 17) 岡田 淳: 実験モデルのオーバービュー。臨床と細菌 11: 171~178, 1984
- 18) 未発表データ。

EXPERIMENTAL UTERINE INFECTION IN MICE

YOSHIKI OBANA, HIDEO KITAGAWA, RURIKO NAKA

KAZUSHIGE TANAKA, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

An experimental uterine infection model was prepared in mice using *Escherichia coli* strain 444.

The uterine infection was distinctly caused by *E. coli* in five-week-old female mice untreated with progesterone. The induction of uterine infection with this organism was possible by the inoculation of ca. 10^5 cells per mouse or more. This infection model continued for at least 7 days, but did not turn into sepsis.

Against the uterine infection produced by *E. coli*, the corresponding therapeutic efficacy to the dose of ofloxacin and ciprofloxacin were observed.

Thus, the preparation of uterine infection caused by *E. coli* was successful. It seemed that this model can utilize as one of the *in-vivo* evaluation model to antibiotics.