

抗生物質の発熱性物質試験におけるウサギ下痢症と *Clostridium difficile* の分離

原 由起子・長岡 芳昭・高橋佐喜子・水野 左敏
国立予防衛生研究所, 抗生物質部*

(平成2年9月10日受付・平成2年11月20日受理)

ウサギを使用した各種注射用抗生物質製剤の発熱性物質試験における下痢発症率を調べた。また下痢原因菌としての *Clostridium difficile* の分離を行った。その結果、

1) ウサギの抗生物質起因性下痢症は、lincomycin 系、methyltetrazol·thiomethyl 基を持つ cephem 系および一部の penicillin 系の抗生物質により高率に誘起された。

2) 最も下痢発症率の高い sulbactam·cefoperazone 投与およびその他の下痢発症率が高い抗生物質 (lincomycin, latamoxef, sulbenicillin) 投与のウサギ盲腸内容物は *C. difficile* enterotoxin 検出キット (*C. D. Check. D-1*) に対して陽性反応を示した。

3) Sulbactam·cefoperazone 投与ウサギ盲腸内容物より *C. difficile* を分離したことから本菌が下痢の主な原因と考えられた。

Key words : 抗生物質起因性下痢症, *Clostridium difficile*, ウサギ

日本抗生物質医薬品基準(日抗基)による注射用抗生物質製剤の発熱性物質試験¹⁾は、耳静脈投与後のウサギの体温上昇を測定し、製剤中に混入する可能性のある発熱性物質を検査するものだが、近年の cephem 系抗生物質を中心とした新抗生物質の開発もあり、供試したウサギの約半数が下痢により死亡する。また、人において抗生物質の副作用で下痢が起こることが知られており、これは抗生物質が腸内細菌の菌交代症を引き起こしたためと考えられる。我々は多種の抗生物質製剤について行った発熱性物質試験において、どのような抗生物質によりウサギが下痢で死亡するか検索するとともに抗生物質起因性下痢症の原因菌の一つといわれている *Clostridium difficile*²⁻⁶⁾ の分離、同定および毒素の検出を行った。

I. 材料と方法

1. 発熱性物質試験に用いられた動物および抗生物質投与方法

1985年8月から1988年12月までに、体重2.9kgから4.0kgの日本白色種の雌ウサギ、1,608羽を試験に用いた。ウサギは同一ウサギを繰り返し発熱性物質試験に用い総注射回数は5,614回、投与した抗生物質の種類は82種であった。各注射用抗生物質は日抗基に従った濃度溶液を1ml/kg、耳静脈に投与した。

2. *C. difficile* の enterotoxin と cytotoxin の検出 下痢で死亡したウサギの盲腸内容物については、液

状の内容物を採取し3,000 rpm, 15 min 遠心し上清を *C. D. Check. D-1 kit* (三菱化成) のラテックス凝集反応により enterotoxin を検出した。遠心上清をさらに10,000 rpm, 20 min 遠心し、その上清をフィルター(0.45 μm) で濾過した液を cytotoxin の assay に用い、HeLa S3 cells の細胞変性によって検出した。細胞を24-well plate に10⁵ cells ずつまき10% fetal bovine serum 含有の Eagle's Minimum Essential Medium で37°C, 24 h, CO₂ incubator 中で培養した。サンプルは10倍希釈で10⁻⁴まで希釈し各100 μl ずつを細胞に加え、0.5 ml の growth medium で培養し、48h 後に顕微鏡で観察した。

C. difficile の産生する enterotoxin および cytotoxin の検出は37°C, 48 h, cooked meat medium で培養した培養濾液を用いた。

3. *C. difficile* の分離と同定

Sulbactam·cefoperazone (SBT/CPZ) 投与によって下痢死亡したウサギ3検体の盲腸の10 cm 区間を両端結紮し取り出し、嫌気性グローブボックス内で盲腸内容物を採取した。嫌気条件下で10倍希釈で10⁻⁵まで希釈し卵黄非添加のCCFA培地⁷⁾にて37°Cで3日間培養した。分離した菌株は生化学性状と揮発性脂肪酸の分析により同定した⁸⁾。さらに、*C. difficile* に特異的な *p*-cresol を検出するために *p*-hydroxy phenyl

acetic acid 添加 CFA 培地で培養した。参照菌株として type strain である Japan Collection of Microorganisms (JCM) 1296 を使用した。

4. 整腸剤による下痢予防

動物は薬剤投与経験のない体重 2.5 kg の雌のウサギで、1 群 13 羽ずつ使用した。抗生物質の投与は、発熱性物質試験と同量 (25 mg SBT/ml/kg) の SBT/CPZ を耳静脈接種した。整腸剤には新ビオフェルミン S 錠 (武田薬品) とミヤリサン A 錠 (ミヤリサン) を使用し、それぞれ 1.5 錠/日/羽および 2 錠/日/羽を飼料に混入し投与した。なお、整腸剤は抗生物質投与前 1 週間より投与を始め、その後 10 日間観察した。

II. 結 果

1985 年 8 月から 1988 年 12 月までの発熱性物質試験に用いたウサギ 1,608 羽のうち下痢死亡したものは 902 羽、56.1% であった。同一のウサギは繰り返して発熱性物質試験に用いたが、最終回に投与した抗生物質が下痢を引き起こしたと考えると、投与した 82 種の抗生物質のうち 60 種、73.2% が下痢の原因となった。

同期間内の抗生物質の系統別による下痢発症率およ

び高い下痢発症率の抗生物質を Table 1 に示した。抗生物質の系別に比較すると lincomycin 系が最も高く 40.2%、次いで cephem 系が 21.5%、penicillin 系で 19.8% であった。一方、aminoglycoside 系では 2.5%、その他で 7.8% と低い値であった。また、個別に比較すると化学構造中に methyltetrazol·thiomethyl 基をもつ cephem 系は高い発症率を示す傾向があった。特に、SBT/CPZ が最も高く 65.1% であった。その他 cefmetazole (CMZ) 49.7%、cefminox 39.3% が高い値を示した。

各種抗生物質投与ウサギの盲腸内容物について C. D. Check. D-1 kit を用いて *C. difficile* enterotoxin の検出を行ったところ多種の抗生物質で陽性反応がみられた。Fig. 1 に C. D. Check. D-1 kit の陽性例と陰性例を示した。1 番は SBT/CPZ 投与ウサギのサンプルで陽性反応を示している。4 番は piperacillin 投与ウサギのサンプルで陰性反応を示している。2, 5 番は陰性コントロール、3, 6 番は陽性コントロールである。Table 2 は各種抗生物質における enterotoxin 陽性率を示している。8 種類で陽性反応がみられたが特に

Table 1. Incidence of diarrhea in rabbits after antibiotic injection

Antibiotic group	Rate of diarrhea	Antibiotic	Rate of diarrhea (%)
Lincomycins	40.2% (2)**	clindamycin	45.2
		lincomycin	35.1
Cephems	21.5% (27)	sulbactam/cefoperazone*	65.1
		cefmetazole*	49.7
		cefminox*	39.3
		cefoperazone*	37.3
		cefpiramide*	34.8
		cefuzonam	32.2
		latamoxef*	29.2
		ceftriaxone	28.5
Penicillins	19.8% (14)	piperacillin	42.4
		aspoxicillin	40.3
Aminoglycosides	2.5% (14)	beknamycin	6.7
		dibekacin	6.1
Others	7.8% (25)		

* antibiotics having a methyltetrazol·thiomethyl group.

** the number in parentheses indicates the number of antibiotics tested for pyrogens.

Table 2. Rate of C. D. Check. D-1 kit positive reactions in diarrheic rabbits after antibiotic injection

Antibiotic group	Antibiotic	Number of positive rabbits/ total number of rabbits tested
Lincomycins	lincomycin	2 / 7
	clindamycin	0 / 2
Cephems	sulbactam/cefoperazone*	34/36
	cefmetazole*	0 / 27
	latamoxef*	2 / 3
	cefoperazone*	1 / 3
	cefpiramide*	1 / 3
	cefodizime	1 / 5
Penicillins	piperacillin	0 / 5
	sulbenicillin	2 / 3
	clavulanate/ticarcillin	1 / 7

* antibiotics having a methyltetrazol · thiomethyl group.

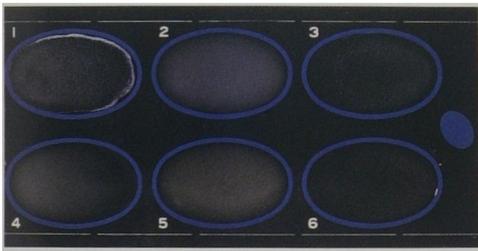


Fig. 1. Detection of enterotoxin with the C. D. Check. D-1 kit. 1, positive reaction with SBT/CPZ; 2 and 5, negative control; 3 and 6, positive control; 4, negative reaction with piperacillin.

SBT/CPZ は 36 例中 34 例 (94.4%) が陽性を示した。その他の cephem 系および penicillin 系抗生物質でも数は少ないが陽性を示し、そのほとんどが高い死亡率を示すものであった (Table 1)。一方、CMZ では死亡率は高いが (49.7%), 27 例中陽性反応例がまったくみられなかった。

SBT/CPZ 投与によって下痢を起こした 3 例のウサギの盲腸内容物から *C. difficile* と思われる黄色 R 型グラム陽性有芽胞桿菌を 3 検体全てから $10^6 \sim 10^7$ /g 分離した。分離した菌と *C. difficile* の type strain の生化学性状を Table 3 に示した。両者を比較すると分離菌株は ribose を分解しない点が異なっていたが、そ

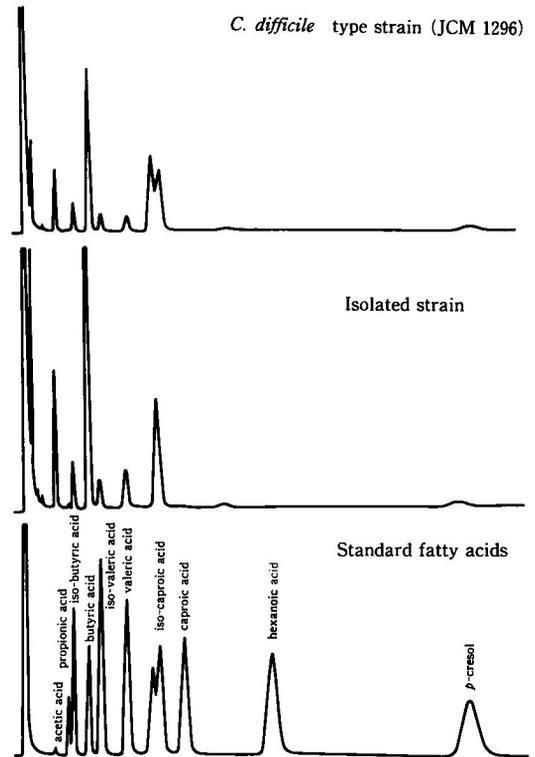


Fig. 2. Gas chromatograms of CCFA agar extracts

Table 3. Biochemical characteristics of isolated bacterial strains

	<i>Clostridium difficile</i> type strain (JCM 1296)	Isolated strains (3 strains)
Acid produced from		
Arabinose		
Xylose	W	W
Rhamnose		-
Ribose	W	-
Glucose	+	+
Mannose	W	W
Fructose	+	+
Galactose		
Sucrose		
Maltose		-
Cellobiose		-
Lactose	-	-
Trehalose	W	-*
Melibiose	-	-
Raffinose	-	-
Melezitose	+	+
Starch	-	-
Mannitol	W	+*
Inositol	-	-
Esculin	-	-
Salicin	W	W
Amygdalin	-	-
Starch hydrolyzed	-	-
Esculin hydrolyzed	+	+
Gas produced	+	+
Indole produced	-	-
Nitrate reduced	-	-
Gelatin liquefied	+	+
Lecithinase produced	-	-
Lipase produced	-	-
Catalase produced	-	-
Milk reaction	-	-
Haemolysis (horse blood)	-	-
Main products from	A B	A B
GAM semisolid medium	ic ib v iv	ic ib v iv
<i>p</i> -cresol produced from CCFA agar	+	+

-: pH >6.0, +: pH <5.5, W: pH 5.5~5.9, +*: +>60% W<40%.

-*: ->60% W<40%, W-: W>60% -<40%, A: acetic acid, B: butyric acid,
ic: iso-caproic acid, ib: iso-butyric acid, v: valeric acid, iv: iso-valeric acid

れ以外の性状については両者共に Bergy's Manual of Systematic Bacteriology の記載と一致していた。また GAM semi-solid medium からの揮発性脂肪酸をガスクロマトグラフィーで分析した結果、両者とも acetic acid, butyric acid を多量に、iso-caproic acid, iso-butyric acid, valeric acid および iso-valeric acid を少量ながら産生した。また、*p*-hydroxy phenyl acetic acid 添加の CCFA 培地のガスクロマトグラフィーによる分析を行った結果、各種揮発性脂肪酸の他に *C. difficile* に特異的に産生される *p*-cresol¹⁰⁾ を少量ながら両者で検出した。以上の事から分離菌株を *C. difficile* と同定した。さらに、分離菌株は C. D. Check. D-1 kit による enterotoxin の検出および HeLa S 3 cells を用いた cytotoxin の検出でいずれも陽性であり毒素産生株であった。

III. 考 察

ウサギの抗生物質起因性下痢症を注射用抗生物質の種類別に調べると lincomycin 系, methyltetrazol-thiomethyl 基をもつ cephem 系および一部の penicillin 系抗生物質により高率に起こることがわかった。一方, aminoglycoside 系抗生物質では下痢発症率が低かった。この下痢発症率の相違はこれらの抗生物質の排泄経路の相違と関係し, lincomycin 系や一部の cephem 系抗生物質のように胆汁排泄の良いものでは下痢発症率が一般に高く, aminoglycoside 系のように尿路排泄が主たる排泄経路のものでは下痢発症率が低いと考えられる。

近年, C. D. Check. D-1 kit は enterotoxin 以外の細菌由来の蛋白質と反応することが明らかにされているが^{10,11)}, *C. difficile* の enterotoxin に関連した下痢症のスクリーニングの一つとして有用である。このキットを使用して各種抗生物質により引き起こされた下痢症について検索した結果, SBT/CPZ 投与ウサギ下痢症では 36 例中 34 例 (94%) が C. D. Check. D-1 kit に陽性を示した。そして, 最も高率に下痢症を引き起こした本抗生物質を投与ウサギの盲腸内容物より *C. difficile* を分離同定した。このことはウサギの抗生物質起因性 C. D. Check. D-1 kit 陽性下痢症の主たる原因菌が *C. difficile* であることを示唆している。しかし, CMZ のように高率に下痢を発症するにもかかわらず, C. D. Check. D-1 kit に対して陽性反応を示さない (27 例中 0 例, Table 2) ものもあり, 本菌以外の原因菌の存在も推測される。また近年, ウサギの抗生物質起因性下痢症の原因菌として *Clostridium spiroforme*¹²⁾ があげられているが, SBT/CPZ による下痢症では検出されなかった。しかし, その他の抗生

物質による下痢症について検索を進める必要があると思われる。

ヒトにおいても抗生物質の副作用として大腸炎が問題となるが, ウサギを用いた発熱性物質試験での抗生物質投与量は体重当たりヒト 1 日投与量の 2~3 倍の投与量であること, 抗生物質の代謝, 排泄経路に動物種差があることなど, 今回の結果からヒトに対する副作用の強さを直接論ずることはできないと思われる。特に, 下痢により死亡したウサギの解剖所見で病変が盲腸に限局していたか, ウサギは消化管に対する盲腸の割合が大きいのか特徴であり盲腸はウサギの消化吸収に重要な働きを持つことが知られている。また, ウサギは盲腸内容物中の栄養素の再吸収の役割があると言われている食糞の行動をするが, 下痢の発症により食糞できなくなることが考えられ, ウサギにおいては特に重症化すると思われる。

また, 整腸剤の前投与による SBT/CPZ 起因性下痢症予防効果について検討した。その結果, ビオフェルミン S 錠およびミヤリサン A 錠の 17 日間の経口投与によりコントロール群での死亡率 100% と比較してそれぞれ 69.0% および 76.2% と若干の死亡率の低下がみられたが, 十分な予防はできなかった。しかし, 整腸剤の予防効果については実験条件や飼料のビタミン強化などの検討の余地があると思われる。

文 献

- 1) 日本抗生物質医薬品基準解説, 発熱性物質試験法, 717~718 頁, 薬業時報社, 1990
- 2) Bartlett J G, Chang T W, Gurwith M, Gorbach S L, Onderdonk A B: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 294: 531~534, 1978
- 3) Borriello S P, Larson H E: Antibiotic and pseudomembranous colitis. J antimicrob Chemother 7 (Suppl.) A: 53~62, 1981
- 4) Jerold E R, Pakes S P: Implication of *Clostridium difficile* and *C. perfringens* iota toxins in experimental lincomycin associated colitis of rabbits. Lab Anim Sci 3: 253~257, 1982
- 5) Lason H S, Price A B, Honour P, Borriello S P: *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. Lancet i: 1063~1066, 1978
- 6) 田口信洋, 阿部章彦, 三上 震, 荒井 正: *Clostridium difficile* による実験的抗生物質起因性下痢の予防. 日本細菌学会誌 43: 829~835, 1988
- 7) 小林とよ子: 抗菌剤投与と *Clostridium difficile* による下痢症に関する研究. The Japanese Journal of Antibiotics 36(2): 464~475, 1983
- 8) Cato E P, George W L, Finegold S M: Genus *Clostridium* Prazmowski, 23^{3A}: 1141~1200, 1986

- In Sneath P H A, Mair N S, Shapem E, Holt J G. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1986
- 9) Nunez Montiel O L, Thompson F S, Dowell V R: Norleucine tyrosine broth for rapid identification of *Clostridium difficile* by gas-liquid chromatography. J Clin Microbiol 17 (2): 382~385, 1983
 - 10) Borriello S P, Barely F E, Reed P J, Welch A R, Brown J D, Burdon D W: Analysis of latex agglutination test for *Clostridium difficile* toxin A (D 1) and differentiation between *C. difficile* toxins A and B and latex reactive protein. J Clin Pathol 40: 573-580, 1987
 - 11) David M L, Ball W D, Toth J, Wilkins T D: Characterization of cross reactive proteins detected by culturette brand rapid latex test for *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 26 (3): 397~400, 1988
 - 12) Borriello S P, Carman R J: Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic associated diarrhea and colitis in rabbits. J Clin Microbiol 17 (3): 414~418, 1983

ANTIBIOTIC-INDUCED DIARRHEA OF RABBITS IN THE PYROGEN TEST AND ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Yukiko Hara, Yoshiaki Nagaoka, Sakiko Takahashi and Satoshi Mizuno

Department of Antibiotics, National Institute of Health,
Kamiosaki 2-10-35, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan

We examined the incidence of diarrhea in rabbits used in the pyrogen test for injectable antibiotics, and isolated *Clostridium difficile* as a causative bacterium of this antibiotic-induced diarrhea. The results are summarized as follows:

- 1) Diarrhea was most frequently induced by lincomycins, cephem antibiotics having a methyltetrazol · thiomethyl group, and some penicillin antibiotics.
- 2) The cecum contents from diarrheic rabbits given sulbactam · cefoperazone, lincomycin, latamoxef and sulbenicillin, reacted positively with the kit for *C. difficile* enterotoxin (C. D. Check-D-1).
- 3) *C. difficile* was isolated from the cecum of rabbits injected with sulbactam · cefoperazone, which caused the highest incidence of diarrhea, indicating that this bacterium is a major etiological agent in antibiotic-induced diarrhea.