

化学療法剤評価法としての実験的マウス腹腔内膿瘍モデルの検討

田中 保知・渡辺 邦友・島倉 康彦・板東香お里

武藤 吉徳・加藤 直樹・上野 一恵

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設*

(平成4年3月6日受付・平成4年5月26日受理)

マウスを用いた腹腔内膿瘍モデルを化学療法剤評価法として確立するために、本実験が施行された。まず *Bacteroides fragilis* および *Bacteroides thetaiotaomicron* の参考菌株および臨床分離株を用いて、それらの膿瘍形成力を検討した。また、これらの嫌気性菌と *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* との混合接種による膿瘍形成力についても検討した。*B. fragilis* および *B. thetaiotaomicron* の臨床分離株の中には比較的高い膿瘍形成率を得ることができる株が存在した。これらの株と *E. faecalis*, *S. aureus* との混合接種で、さらに高い膿瘍形成率が認められた。つぎに、clindamycin に感受性および耐性の *B. fragilis* 2株を用いて、このモデルにおける clindamycin の *in vivo* 効果の評価法を検討した。この *in vivo* 効果は、膿瘍形成率と膿瘍中の細菌数の2つのパラメータを検討することにより可能と考えられた。

Key words: 動物実験モデル, 腹腔内膿瘍, 化学療法剤, 感染防御効果, 治療効果

Bacteroides fragilis group は、偏性嫌気性菌の中で、腹腔内感染症からもっとも高い頻度で分離される臨床上重要な菌群である¹⁾。近年、*B. fragilis* group に対して *in vitro* でかなりの抗菌作用を示す第三世代のセフェムや新キノロン剤などの化学療法剤が開発されてきたが、これらの薬剤の *B. fragilis* group 感染症に対する臨床的有用性がどの程度であるのか必ずしも明確でない点が指摘されている^{2,3)}。化学療法剤の *in vivo* における基礎的評価を前臨床試験においてより充実させることが、この問題を解決する一助となるかもしれない。

たとえば、化学療法剤の腹腔内感染症に対する効果を判定する場合には、細菌の腹腔内接種によって生じる腹膜炎とそれに引き続く敗血症死を防御する力のみ評価するのではなく、その後生じる偏性嫌気性菌を主体とする腹腔内膿瘍形成を阻止できるか、あるいは生じた腹腔内膿瘍を内科的に治療できるかどうかという観点からの評価も試みられるべきである。

さて Weinstein らにより開発されたラット腹腔内骨盤腔内感染症の実験モデルは、いわゆる二相性のヒトの腹腔内感染症をよくシミュレートしたモデルであり⁴⁾、すでに Bartlett らにより化学療法剤評価に用いられた⁵⁾。しかし菌液を含むゲラチンカプセルを外科的にラットの腹腔内に挿入する操作が必要なのが、その化学療法剤評価への応用を躊躇させていた。しかし、Shapiro らが膿瘍形成機転

の研究を行う際に、このモデルがマウスで接種液を腹腔内接種するだけで成立することを明らかにした⁶⁾。

今回著者らはマウスを用いた腹腔内膿瘍モデルを嫌気性菌の関連する膿瘍に対する化学療法剤評価法として定着させるべく基礎的実験を実施した。

I. 材料と方法

1. 動物

実験動物としてマウスを用いた。用いたマウスは C57 BL/6 J jcl (日本クレア), 雄, 5~8 週齢 (体重 22~24 g) であった。

2. 使用菌株

National Collection of Type Cultures (NCTC) より入手した *B. fragilis* NCTC 10581 および臨床分離株である *B. fragilis* 3株および *Bacteroides thetaiotaomicron* 6株を用いた。混合接種に用いた *Enterococcus faecalis* は ATCC 29212 株および臨床分離の K-1 株を、*Staphylococcus aureus* は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した *S. aureus* ATCC 25923 株およびマウス盲腸から著者らが分離した CC-25 株を用いた。これらの株は使用時まで、滅菌スキムミルクに懸濁して -70°C で凍結保存した。

3. Autoclaved Caecal Contents (ACC) の調製
Std: Wister-ST 系ラット (5 週齢, 雄) に脂肪の

* 岐阜市司町 40

少ない赤みの挽き肉 (1日 40 g) と水のみを給餌して 2 週間以上飼育し、その後解剖により盲腸、結腸、直腸内容を採取した。得られた腸管内容物を計量し、等量のペプトン・イーストエキストラクト・グルコース・ブロス (PYG broth; Scott Laboratory, Inc.) を加えてよく攪拌し、その混合物を二重にしたガーゼで濾過した。濾液はゴム栓付きガラスバイアルに 5 ml ずつ分注し、121°C で 15 分高圧滅菌した。滅菌後液体窒素で急速凍結し、使用時まで -70°C で保存した。使用前日には嫌気性チェンバー (平沢製作所) 内に搬入し、解凍・還元した。

4. 菌液の作製

凍結菌液を解凍して変法 GAM 寒天培地 (日水製薬) または Brucella HK 血液寒天培地 (極東製薬) で 48 時間嫌気培養し、生じた集落を PYG Broth 中に懸濁し、適当な濁度の菌液を作製した。この菌液と、前日から嫌気チェンバー内で還元しておいた ACC を等量混合したものを腹腔内接種菌液とし、その 0.1 ml をマウスに腹腔内接種した。接種菌量は接種後ただちに定量培養法を行って算定した。

5. 腹腔内膿瘍の検索

菌接種後 7 日目に解剖により腹腔内膿瘍を検索した。マウスをジエチルエーテルで麻酔して致死させ、背位保定して腹部を消毒した後、正中切開して腹腔内を露出させ、腹腔内膿瘍を検索した。膿瘍形成が認められた場合には、その形成部位、長径および短径および肉眼的特徴を記録後に摘出し、膿瘍内容物の直接塗抹標本の作製、内容物からの菌の回収、膿瘍の組織標本の作製などの種々の用途に供した。

膿瘍の判定基準は Shapiro らの方法に準じた⁹⁾。すなわち、グラム染色で多形核白血球と菌体の確認ができる膿汁を多量に含んでいる、内腔のある腫瘤で、その膿汁より接種菌を回収できる場合を膿瘍と判定した。

6. マウス腹腔内膿瘍モデルを用いての化学療法剤の評価法の検討

すでに嫌気性菌についての効果が明確な clindamycin (CLDM, 日本アップジョン) を用いて検討した。

(1) 膿瘍形成阻止実験 (菌接種直後投薬実験)

マウスに CLDM 感受性の *B. fragilis* NCTC 10581 (MIC 0.05 µg/ml) および CLDM 耐性の *B. fragilis* GAI 20479 (MIC 100 µg/ml 以上) をそれぞれ 8.7×10^6 CFU/mouse 接種した。菌接種 1 時間後および 3 時間目に CLDM を皮下投与し、さらにその翌日から 1 日 2 回 5 日間の投与を続けた。投与量は、1 回 25

mg/kg および 50 mg/kg の 2 段階で設定した。投薬中止翌日に腹腔内膿瘍形成率、回収した膿瘍の数および膿瘍中の菌数を算定した。

(2) 治療実験

マウスに CLDM 感受性の *B. fragilis* NCTC 10581 (9.9×10^6 CFU/mouse) を接種した。菌接種後 3 日間は投薬せず、膿瘍形成が確認される 4 日目から 1 日 2 回 3 日間 CLDM を投薬する治療実験を実施した。対象に無治療群および菌接種直後投薬群を設定した。後者では CLDM の総投与量を実験群と同一にした。

7. 膿瘍中細菌数の測定

腹腔内から無菌的に回収した膿瘍に切開を加え、1 ml の嫌気性希釈液または Anaerobe broth (Difco) に投入し、滅菌ガラスビーズを加えてボルテックスミキサーで攪拌した。同希釈液を用いて 10 倍階段希釈を実施し、膿瘍 1 個当たりの生菌数を算定した。平板培地は変法 GAM 寒天培地、血液寒天培地および Paromomycin-Kanamycin 添加 Brucella 血液寒天培地を用いた。

II. 結 果

1. 嫌気性菌の膿瘍形成能の検討 (Table 1)

(1) *B. fragilis* NCTC 10581 による膿瘍形成

Table 1 に *B. fragilis* NCTC 10581 の膿瘍形成率を接種菌量別に示した。 10^7 CFU/mouse 以上の接種で膿瘍形成率は 70% と高率であった。Fig. 1 は腹腔内に見出された膿瘍、Fig. 2 は膿瘍の組織像 (HE 染色) である。膿瘍の分布は胃の大湾から膀胱にかけて、および小腸・腸間膜に付着して多く見られた。膿瘍の構造は、中心の壊死性組織塊、その周囲の主に多形核白血球からなる白血球の層、およびその外側を取り巻く線維芽細胞およびコラーゲンを多量に含む層の明瞭な 3 層構造を呈していた。

(2) *B. fragilis* 臨床分離株による膿瘍形成

臨床材料から分離された *B. fragilis* GAI 20464, GAI 20479, GAI 20494 の 3 株を選び、マウス皮下で 5 代継代した後、*B. fragilis* NCTC 10581 株を対照にして膿瘍形成実験を行った。接種菌量は $10^{7.0}$ CFU/mouse を目安とした。臨床分離株の膿瘍形成率は 30 ~ 50% 程度であり、*B. fragilis* NCTC 10581 株のそれよりやや低率であった。しかしその後 *B. fragilis* GAI 20479 株をマウス皮下でさらに数回継代したところ、後の治療実験においては *B. fragilis* NCTC 10581 株と同じ程度の高い膿瘍形成率を示すに至った (Table 2)。

(3) *B. thetaiotaomicron* の膿瘍形成能

B. thetaiotaomicron GAI 5628, GAI-1-40, GAI-2-

Table 1. Abscess-forming abilities of *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, and facultative anaerobic organisms

Strain	Inoculum (Log ₁₀ CFU/mouse)	No. of mice with abscess/Total
<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	6.2	2/10
<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	7.0	7/10
<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	7.5	7/10
<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	8.2	7/10

<i>B. fragilis</i> GAI 20464	7.1	4/10
<i>B. fragilis</i> GAI 20479	7.0	5/10
<i>B. fragilis</i> GAI 20496	6.9	3/10

<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI 5628	8.3	2/10
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-1-40	8.6	3/10
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-2-18	8.7	2/10
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-2-49	8.3	6/10
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-4-14	8.7	6/10
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-5-45	8.3	9/10

<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	7.0	6/ 8
<i>B. fragilis</i> GAI 20479	7.0	2/ 5
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-5-45	7.1	2/ 9
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-5-45	6.7	3/10
<i>S. aureus</i> CC-25	4.0	4/10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4.0	3/10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4.0	2/10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7.0	4/ 7 (2/9)*
<i>E. faecalis</i> K-1	6.2	4/ 5

<i>B. fragilis</i> GAI 20479	6.7	6/10
+ <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4.7	
<i>B. fragilis</i> NCTC 10581	5.5	5/ 5
+ <i>E. faecalis</i> K-1	5.9	
<i>B. fragilis</i> GAI 20479	6.7	9/10
+ <i>S. aureus</i> CC-25	3.7	
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-5-45	6.4	9/10
+ <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	3.7	
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-5-45	6.7	8/ 8 (1/9)*
+ <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6.5	
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-5-45	6.7	7/ 9
+ <i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.7	

()*: Lethality before necropsy

18, GAI-2-49, GAI-4-14, GAI-5-45の6株をマウス皮下で5代継代した後、接種菌量を10⁸ CFU/mouse程度に調整して腹腔内に接種した。5~7日目の解剖

時に60~90%の膿瘍形成を示す株が存在した。これらの膿瘍中には*B. fragilis*の場合とは異なり、やや粘性の低い内容物が存在した。内容物の直接塗抹標本に



Fig. 1. Intraabdominal abscess in mice inoculated intraperitoneally with *Bacteroides fragilis* and ACC. Abscess was found in the adipose tissue between mesentery and pancreas.



Fig. 2. Histological section of intraabdominal abscess. Hematoxylin-Eosin stain. Arrow indicates the core of the abscess, which consisted of necrotic debris.

において、*B. fragilis* の場合より細菌の菌体数が少ない印象を受けた。この実験において最も高い膿瘍形成率を示した *B. thetaiotaomicron* GAI-5-45 株と *B. fragilis* NCTC 10581 株の膿瘍形成率を接種菌量を $10^{7.0}$ CFU/mouse に減じて比較したところ、*B. thetaiotaomicron* GAI-5-45 株の膿瘍形成能は *B. fragilis* NCTC 10581 株のそれより劣っていた。

(4) *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis* と *E. fae-*

calis, *S. aureus* の混合接種による膿瘍形成

B. fragilis GAI 20479 の $10^{8.7}$ CFU/mouse 接種は、*S. aureus* CC-25 の $10^{8.7}$ CFU/mouse または *E. faecalis* ATCC 29212 の $10^{4.7}$ CFU/mouse と混合して接種することにより顕著に高い膿瘍形成率を示した。*B. thetaiotaomicron* GAI-5-45 の $10^{6.7}$ CFU/mouse 接種は *S. aureus* ATCC 25923 の $10^{8.7}$ CFU/mouse の混合接種により、また別の実験で *B. thetaiotaomicron* GAI-5-45 の $10^{8.4}$ CFU/mouse 接種は *E. faecalis* ATCC 29212 の $10^{8.7}$ CFU/mouse と混合接種することにより、それぞれの菌種を単独で接種した場合よりも顕著に高い膿瘍形成率を示した。

2. 膿瘍中の細菌の定量成績

(1) 膿瘍形成阻止実験 (Table 2)

① CLDM 感受性 *B. fragilis* NCTC 10581 株を用いた場合の成績

CLDM 非投薬群では 8 匹中 8 匹に 8 個の膿瘍形成が認められ、回収された膿瘍 1 個あたりの *B. fragilis* の菌数は $5.2 \pm 1.6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ であった。一方 25 mg/kg 投薬群では 8 匹中 2 匹に 8 個、50 mg/kg 投薬群では 11 匹中 4 匹に 11 個の膿瘍形成が認められた。膿瘍 1 個あたりの生菌数はそれぞれ 1.5 ± 0.4 , $1.8 \pm 0.9 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ であった。この CLDM 投薬群の膿瘍中生菌数はいずれも CLDM 非投薬群に比べて有意に低い菌数 ($p < 0.001$) であった。

② CLDM 耐性 *B. fragilis* GAI 20479 株を用いた場合の成績

CLDM 非投薬群では 9 匹中 8 匹に 9 個の膿瘍形成が認められ、膿瘍 1 個あたりの生菌数は $5.1 \pm 1.6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ であった。25 mg/kg 投薬群では 8 匹中 8 匹に 10 個、50 mg/kg 投薬群でも 7 匹中 7 匹に 9 個の膿瘍形成が認められ、膿瘍 1 個あたりの生菌数はそれぞれ 4.5 ± 1.8 , $4.4 \pm 1.2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ であった。CLDM 投薬群と非投薬群の膿瘍中生菌数に有意な差は認められなかった。

(2) 治療実験 (Table 3)

CLDM に感受性な *B. fragilis* NCTC 10581 を用いた菌液を接種した直後から CLDM 投薬を開始した群、接種 4 日目から CLDM の投薬を開始した群、および CLDM 非投与群の 3 群での膿瘍形成率 (膿瘍形成数) はそれぞれ 10 匹中 8 匹 (11 個)、9 匹中 9 匹 (10 個)、11 匹中 11 匹 (9 個) であり、各群間には有意差は認められなかった。また各群の膿瘍中生菌数は 2.9 ± 1.5 , 5.3 ± 0.8 , および $5.2 \pm 0.8 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ であり、菌接種後 4 日目に CLDM の投薬を開始した群と CLDM 非投与群との間には有意差は認められな

Table 2. Effects of clindamycin on intraabdominal abscess formation and viable cell count in abscesses caused by *Bacteroides fragilis* NCTC 10581 and GAI 20479

Strain	clindamycin treatment (mg/kg)	No. of mice with Abscesses/Total	Mean \pm SD (Log ₁₀ CFU/abscess)
NCTC 10581	—	8/ 8	5.2 \pm 1.6
	25	2/ 8	1.5 \pm 0.4
	50	4/11	1.8 \pm 0.9
GAI 20479	—	8/ 9	5.1 \pm 1.6
	25	8/ 8	4.5 \pm 1.8
	50	7/ 7	4.4 \pm 1.2

* p < 0.001

Table 3. Prophylactic and therapeutic effect of clindamycin in intraabdominal abscess model

Chemotherapy (25 mg/kg, 2 times/day)	No. of mice with Abscesses/Total	Mean \pm SD (Log ₁₀ CFU/abscess)
None (Control)	11/11	5.2 \pm 0.8
Early phase of infection	8/10	2.9 \pm 1.5
Later phase of infection	9/ 9	5.3 \pm 0.8

* p < 0.001

った。一方菌接種直後に CLDM の投薬を開始した群では CLDM 非投与群よりも有意に低い膿瘍中生菌数 (p < 0.001) を示した。

III. 考 察

Bartlett らは、ラット腹腔内膿瘍モデルが化学療法剤の *in vivo* 評価法として使用できることを報告した。しかしまたこのモデルの欠点として、特殊な菌株でしか再現できないこと、判定法でいくつかの問題点を指摘するなど、その応用を躊躇させる表現を残していた⁵⁾。しかし、このモデルはヒトの感染症をよくシミュレートした魅力あるモデルであること⁴⁾、また Shapiro らの研究によりマウスでの応用の可能性が強く示唆された⁶⁾ことから、著者らは Shapiro により報告されたマウスのモデルを化学療法剤評価のためのモデルとして利用するための基礎的検討を行った。

まず本研究で *B. fragilis* NCTC 10581 が、比較的低下接種菌量 (10^{7.0} CFU/mouse) で C 57 BL/6 J マウスにおいて、かなり安定した膿瘍形成率を示すことが確認された。しかしこの株はほとんどの化学療法剤に感受性の高い株であることが感受性試験の結果から明らかとなった (data not shown)。今日の新規化学療法剤の評価の際には、既存の薬剤に対して耐性を獲得した菌株など複数の株を用いる必要がある。したがっ

て化学療法剤に対する感受性の異なる *B. fragilis* の複数の株によっても比較的安定した膿瘍形成率を得ることができることが必須の条件となる。今回の著者らの実験成績で、CLDM 耐性株である *B. fragilis* GAI 20479 株を用いても、動物皮下での十分な継代により薬剤の評価にたりの高い膿瘍形成率を得られることが知られた。

さらに臨床材料から *B. fragilis* について高頻度に分離され、各種 β -lactam 系薬剤に対し *B. fragilis* よりむしろ耐性傾向が強い *B. thetaiotaomicron* の膿瘍形成についても同様の観点から検討された。その結果、10^{8.0} CFU/mouse の接種で高い膿瘍形成が認められた。

また *B. fragilis* group の細菌は、腹腔内膿瘍から分離される頻度の高い菌群であるが、他の通性嫌気性菌と共に分離されることが普通である。むしろ嫌気性菌単独の感染モデルより混合感染のモデルがより現実に近いモデルということができ、重要性が高い。しかも第三世代のセフェムが広く臨床で使用されるようになって以来、これらに耐性傾向が強い *Enterococcus* spp. や Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* との混合感染の可能性も高いと考えられる。そこで *B. fragilis* および *B. thetaiotaomicron* とこれらの通性嫌

気性菌との混合接種による膿瘍形成を検討した。*B. fragilis* や *B. thetaiotaomicron* に少量の *E. faecalis* を混合した場合、それぞれの菌種を単独で接種した場合に比して著明に高い膿瘍形成能が認められた。また同様に、膿瘍形成能は *S. aureus* との混合によっても上昇した。この混合接種実験において、*E. faecalis* の菌量が比較的高い場合には接種から1週間以内に斃死するマウスが見られ、混合接種実験においては接種菌量の検討が重要であると考えられる。

In vivo での実験における化学療法剤の効果の判定法を設定することは非常に重要である。Bartlettらは、ラットを用いた実験感染モデルで、種々の既存の薬剤の効果を実験的に判定した。彼らは、凍結ラット盲腸内容を解凍して100匹以上のラットに腹腔内接種し、致死率と膿瘍形成率を求め、さらに治癒率を算出することで薬剤間の *in vivo* 効果の比較を行った⁷⁾。著者らは、嫌気性菌に対する効果が明らかとされるCLDMを使用して、実際の膿瘍形成予防効果および治療効果の判定法の検討を実施した。著者らの実験結果は、膿瘍形成率に加え膿瘍中の細菌数を測定することによって1群10匹程度の比較的少数のマウスを用いて薬剤の効果を実験的に判定できる可能性を示唆している。これは動物実験の倫理面に対する配慮からも望ましいと考えている⁸⁾。

また、化学療法剤の *in vivo* における評価には腹腔内膿瘍中の薬剤濃度の検討が不可欠であるが、このモデルでは薬物の膿瘍中への移行を実験的に検討することが可能であると考えられる。今後はその点についての検討を行う必要があると考えている。

以上の結果から、著者らのマウスを用いた実験的感染モデルは、嫌気性菌単独あるいは嫌気性菌と好気性

菌の混合感染によって生じる腹腔内膿瘍に対する化学療法剤の評価において有用性の高いモデルであると考えられる。

文 献

- 1) Finegold S M: General Aspects of Anaerobic Infection. In *Anaerobic Infections in Humans* (Finegold S M, George W L ed.), p.137~153, Academic Press, San Diego, CA., 1989
- 2) Finegold S M and NCCLS working group on anaerobic susceptibility testing: Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *J Clin Microb* 7: 1253~1256, 1988
- 3) Rosenblatt J E: Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria. In *Anaerobic Infections in Humans* (Finegold S M, George W L ed.), p.137~153, Academic Press, San Diego, CA., 1989
- 4) Weinstein W M, Onderdonk A B, Bartlett J G, Gorbach S L: Experimental intra-abdominal abscesses in rats; Development of an experimental model. *Infect Immun* 10: 1250~1255, 1974
- 5) Bartlett J G: Intraabdominal abscess. In *Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy Volume 2*. (Zak O, Sande M A ed.), p.92~114, Academic Press, London, UK, 1986
- 6) Shapiro M E, Onderdonk A B, Kasper D L, Finberg R W: Cellular immunity to *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide. *J Exp Med* 154: 1188~1192, 1982
- 7) Bartlett J G, Louie T J, Gorbach S L: Therapeutic efficacy of 29 antimicrobial regimens in experimental intraabdominal sepsis. *Rev Inf Dis* 3: 535~542, 1981
- 8) 佐藤徳光: 動物実験の科学性と倫理。動物実験の基本 (佐藤徳光著), p.2~3, 西村書店, 新潟, 1986

Experimental mice intraabdominal abscess model for
the evaluation of chemotherapeutic agents

Yasunori Tanaka, Kunitomo Watanabe, Yasuhiko Shimakura, Kaori Bando,
Yoshinori Muto, Naoki Kato and Kazue Ueno
Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine,
Tsukasa-Machi 40, Gifu 500, Japan

An experimental intraabdominal abscess model in mice was studied to establish a standardized protocol for evaluating chemotherapeutic agents *in vivo*. First of all, the reference strains and clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* were used to determine their abscess-forming abilities along with or without *Enterococcus faecalis* or *Staphylococcus aureus*. Some of the clinical isolates of *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* showed very good abscess-forming ability by themselves. Moreover, their abscess-forming abilities were strikingly enhanced when they were inoculated with *E. faecalis* or *S. aureus* concomitantly. Using this abscess model, an *in vivo* evaluation of clindamycin was carried out against both clindamycin-sensitive and clindamycin-resistant *B. fragilis* isolates. Two parameters, rate of abscess formation and viable bacterial count in abscess, were useful to determine the *in vivo* efficacy of the chemotherapeutic agents.