

【原著・基礎】

腸管出血性大腸菌によるマウスの腸管感染モデルに対する抗菌薬の影響

—抗菌薬による腸管内 verotoxin の遊離とマウスの致死作用について—

小林 寅詰¹⁾・村岡 宏江¹⁾・松崎 薫¹⁾・雑賀 威¹⁾・西田 実¹⁾秋田 博伸²⁾・岩田 敏³⁾・佐藤 吉壮⁴⁾・砂川 慶介⁵⁾¹⁾ 三菱化学ビーシーエル・化学療法研究室*²⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科³⁾ 国立霞ヶ浦病院小児科⁴⁾ 総合太田病院小児科⁵⁾ 国立東京第二病院小児科

(平成9年12月16日受付・平成10年1月30日受理)

ICR系, IQI無菌マウス (5週齢) に verotoxin 産生 *Escherichia coli* O157: H7, NK2 または R29 株を経口的に接種した。両試験菌の場合ともに, 対照とした2匹の無治療マウスはいずれも投与1日後から糞便中に, 10^{10} ~ 10^{11} CFU/g の菌量が認められ, 両試験菌のマウス腸内における安定な定着が確認された。しかしこの期間内で死亡マウスはなかった。次に両感染マウス各3匹に norfloxacin (NFLX) 3 mg/kg×2/日を6日間, 連続経口投与したが, 全例ともに投与1日後には糞便中に 625~2,500 ng/g の VT2 が排泄され, 2日後には VT1 が 1,250~5,000 ng/g, VT2 が 40,000 ng/g と糞便中から非常に多量の verotoxin が検出された。NFLX を投与したマウスでは糞便中の菌量の減少傾向がみられたが, 全例ともに薬剤の投与開始4日または5日後に死亡した。他方, 両感染系に fosfomycin (FOM) を 25 mg/kg×2/日, 6日間の連続経口投与を行ったが, すべてのマウスの糞便中に verotoxin の排泄はなく, 死亡マウスはみられなかった。NFLX の投与後に死亡した全マウスの下部腸管の内容物中に VT2 が高濃度に検出された。また腸管の剖検の結果では6例中4例に多量の出血がみられ, 他の2例の糞便は潜血反応が認められた。一方, FOM の投与マウスにはこのような所見はなかった。無菌マウスを用いた *E. coli* O157: H7 の腸管感染のためのこのモデル系は, 抗菌薬による verotoxin の *in vivo* 産生の測定と動物に対する障害作用を評価する1つの方法として有用であると思われる。

Key words: *E. coli* O157: H7, antibacterial drug, verotoxin, germ free mouse

1996年, 夏期に我が国の各地で, verotoxin を産生する主として *Escherichia coli* O157: H7 その他の腸管出血性大腸菌 (EHEC) の経口感染による下痢症が集团的または散発的に発生し, 一部は溶血性尿毒症候群または出血性大腸炎などの重症例が報告された¹⁾。EHEC による腸管感染症の治療については, 一般に抗菌薬の投与が有効であるとする報告があるが, 抗菌薬の投与を疑問視する意見もある^{2,3)}。この問題に関連して, *in vitro* の実験結果から *E. coli* O157: H7 の verotoxin の産生または培養液中への遊離が, 抗菌薬によって増強されることが報告されている⁴⁻⁶⁾。しかしこれらの検討は試験管内に一定量の抗菌薬が連続的に存在する条件下, 生体内, 特に腸管内における薬物動態とは大きな隔りがある。

今回我々は, 従来から実験に用いている無菌マウスに腸管出血性大腸菌 O157: H7 を感染定着させることに成功し, 本菌の感染治療薬と指定されている fosfomycin (FOM) およ

び norfloxacin (NFLX) 投与と腸管内毒素産生性に関し, 興味ある知見を得たので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

1996年, 東京の医療施設において腸管出血性大腸菌感染症と診断された患者2名より分離され, 当研究室でスキムミルク中に -80℃ に保存している VT1 および VT2 を産生する *E. coli* O157: H7, NK2 および R29 株を使用した。

2. 使用マウスおよび飼育条件

ICR系, IQI無菌マウス (5週齢, 雄, 日本クレア社) を実験動物として用いた。

マウスは Aero Clean Bench (ニッコー) 内の1ゲートに1匹を割りふり無菌的に飼育した。固形試料は放射線滅菌した CL-2 (日本クレア社) を使用した。水およびその他の資材はすべてあらかじめ 121℃, 20分間

の高圧蒸気滅菌をした。

3. *E. coli* O157: H7 試験菌株の感染と同定⁷⁾

E. coli O157: H7 NK2 または R29 株を滅菌生理食塩水に約 1×10^8 CFU/ml 懸濁し、ゾンデを用いて無菌マウスに 0.5 ml 経口投与した。翌日、マウスから自然排泄便を採取し、定量培養を行い菌の定着を確認した。すなわち採取した糞便重量を正確に計測し、5 ml の Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco) 中に入れ、ボルテックスミキサーで激しく混和後、新しい同 broth で 100 倍の希釈系列を作成した。各糞便懸濁液 0.1 ml をソルビトールマッコニー寒天 (OXOID) にコンラージ塗抹し、18 時間培養後、ソルビトール非分解集落を数え、その中から数個を釣菌し同定した。同定には VITEK system (bioMeluex) を使用して大腸菌の確認を行い、大腸菌 O157 検出キット「UNI」(OXOID)⁸⁾ を用いて O157 の血清型を確認した。

4. 投与薬剤

Fosfomycin-Ca 塩 (明治製菓) および norfloxacin (杏林製菓) を使用した。

5. 抗菌薬による治療

滅菌した 0.5 % カルボキシメチルセルロース水溶液で、FOM は $1,000 \mu\text{g/ml}$ 、NFLX は $120 \mu\text{g/ml}$ 濃度の懸濁液を調整した。各懸濁液を一群 3 匹の感染マウス (菌接種後 2 日目) に 0.5 ml ずつ、1 日 2 回 (FOM は 1 日、合計 50 mg/kg ; NFLX は合計 6 mg/kg) 6 日間連続して経口投与した。

6. 糞便および腸内容物中の verotoxin の測定

薬剤を投与した 6 日間、朝の投与の直前に糞便を前記のとおり採取して毒素量を測定した。毒素の定量には糞便または腸内容物を正確に秤量し、5 ml の BHIB 中に入れ、十分に混和後、 $3,000 \text{ r.p.m.}$ 、30 分間、 4°C で遠心分離し、その上清を VTEC-RPLA「生研

(デンカ生研) を用いて、逆受け身ラテックス凝集反応により定量した⁹⁾。

7. 腸管内の感染菌および毒素の分布

治療実験の期間中に死亡したマウスから腸管を採取し、腸上部 (胃から約 3 cm (十二指腸部分))、腸中部 (盲腸より上部約 3 cm)、腸下部 (大腸部分) から内容物を無菌的に採出して、菌数および毒素を定量した。対照として薬剤無投与群 ($n=2$) から糞便または腸内容物を採取し、同様に測定を行った。また死亡マウスの腸内の出血を観察し、肉眼的に異常のない場合はオルトルジン法により潜血の有無を確認した。

II. 結 果

1. *E. coli* O157: H7 感染マウスにおける糞便中菌量と verotoxin 量および抗菌薬による治療

Fig. 1 に薬剤無投与群 (コントロール) の成績を示した。NK2 株または R29 株の感染後 1 日経過した各マウスの糞便中の菌量は 1.2×10^{11} から 3.2×10^{11} CFU/g と高値を示した。また図から明らかとなっており、観察した 6 日目までその菌量のレベルは維持され、試験菌のマウス腸管内への定着が確認された。

NK2 感染マウスに NFLX を連続投与した成績を Fig. 2 に示した。投与 1 日後 (2 回目の投与から約 15 時間後) の糞便中の菌量は 1.2×10^{11} ~ 2.4×10^{11} CFU/g で VT2 のみが 625 ~ $1,250 \text{ ng/g}$ 検出された。投与 2 日後 (4 回目の投与から約 15 時間後) における糞便中の菌量はほとんど変化なかったが verotoxin 量は激増し、VT1 は $2,500$ ~ $5,000 \text{ ng/g}$ 、また VT2 はいずれも $40,000 \text{ ng/g}$ と高値を示した。投与 3 日後では 1.2×10^8 ~ 4.0×10^8 CFU/g と糞便中菌量の減少が認められたが、verotoxin 量は VT1、VT2 とともに 2 日目と同様に高値であった。投与 4 日後では試験マウス 3 匹中 1 匹は死亡し、生存した 1 匹からの糞便中の菌量はさらに減少

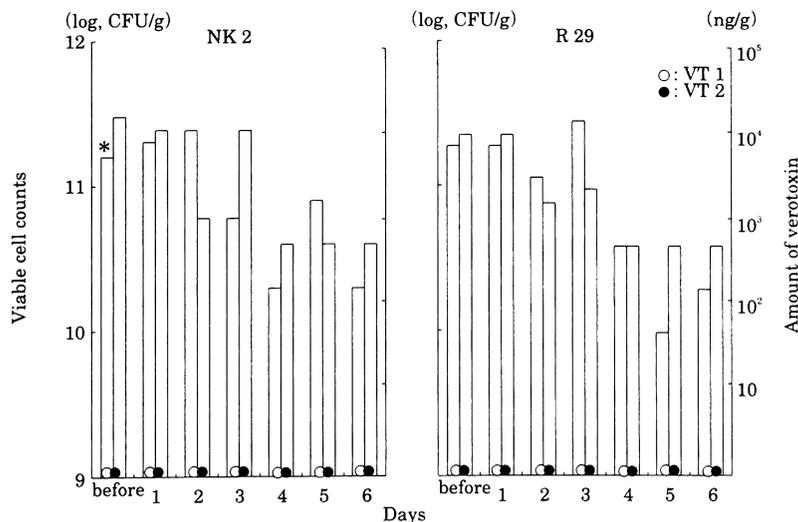


Fig. 1. Bacterial cell counts and verotoxins in feces of mice after infection with *Escherichia coli* O157: H7 NK2 or R29 strains.

*The columns show viable cell counts in feces of each mouse

し 2.4×10^6 CFU/g, VT2 のみが 2,500 ng/g 検出された。残りの 1 匹は排便を認めなかった。投与 5 日後では残り 2 匹ともに死亡した。図中に示さなかったが死亡直前の観察では各マウスともに明らかな痙攣作用を認めた。

一方 FOM 連続投与群 (Fig. 3) では投与 1 日後で NFLX 投与群と大差のない菌量が存在したが, verotoxin は検出されなかった。投与 2 日後以降においても各試験マウスともに投与前と同レベルの菌量が維持され ($1.0 \times 10^{10} \sim 4.0 \times 10^{11}$ CFU/g) 投与 6 日後まで全例 verotoxin は検出されなかった。

Fig. 4 および Fig. 5 に示した R29 感染マウスにおいても NK2 感染群と同様な成績を示した。NFLX 投与によりまず VT2 が激増し, その後 VT1 が増加した。投

与 3 日後から菌量の減少および一部に VT1 の減少を認め 4 日後には 3 匹中 2 匹が死亡し, 5 日後には全マウスが死亡した (Fig. 4)。

FOM 投与群では投与 6 日後まで投与前と同様の糞便中菌量を維持し, いずれのマウス糞便からも verotoxin は検出されなかった (Fig. 5)。

2. 死亡および生存マウスの腸管内の菌量と verotoxin 量

E. coli O157: H7 感染マウスの治療実験で, NK2 および R29 株の感染の場合ともに, NFLX で治療した計 6 例は, 投与第 4 または 5 日ですべて死亡した。各死亡マウスの腸管各部位の菌量および verotoxin 量を測定し, 腸管出血の有無, および糞便の潜血反応の成績を Table 1 に示した。NFLX が投与された 6 例のほと

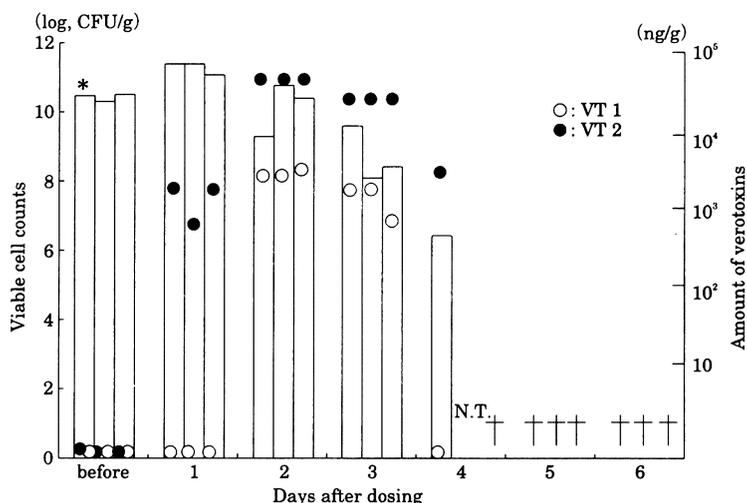


Fig. 2. Bacterial cell counts and verotoxins in feces of mice infected with *Escherichia coli* O157: H7 NK2 before and after oral dosing with norfloxacin for 6 days.

*The columns show viable cell counts in feces of each mouse

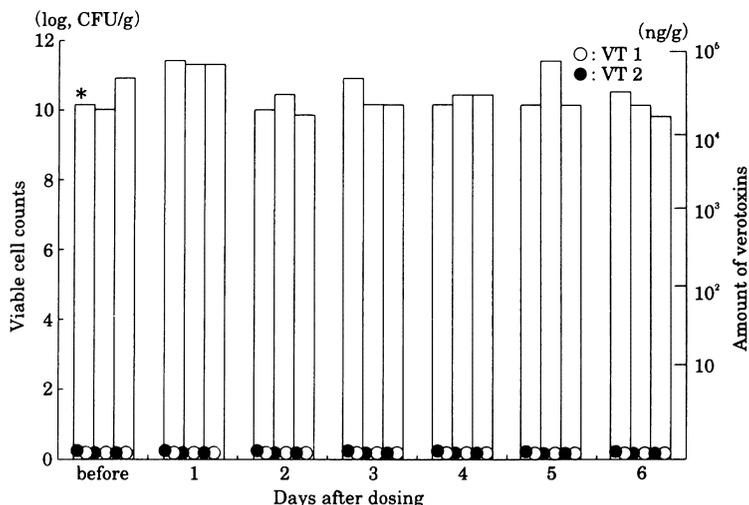


Fig. 3. Bacterial cell counts and verotoxins in feces of mice infected with *Escherichia coli* O157: H7 NK2 before and after oral dosing with fosfomycin for 6 days.

*The columns show viable cell counts in feces of each mouse

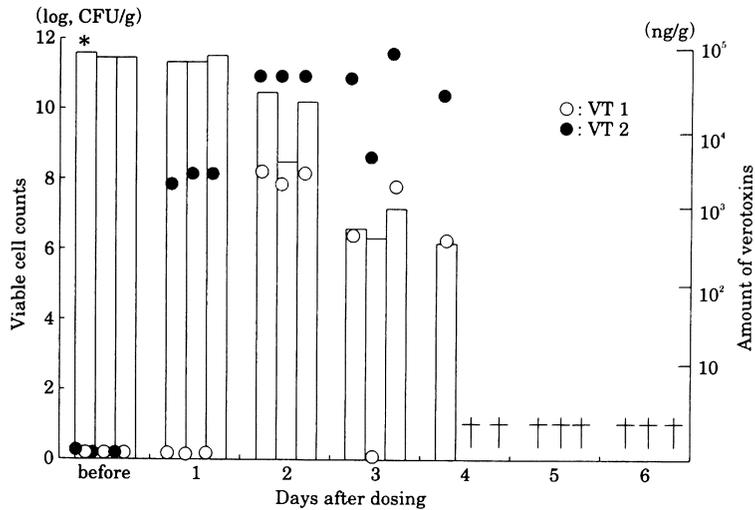


Fig. 4. Bacterial cell counts and verotoxins in feces of mice infected with *Escherichia coli* O157: H7 R29 before and after oral dosing with norfloxacin for 6 days.

*The columns show viable cell counts in feces of each mouse

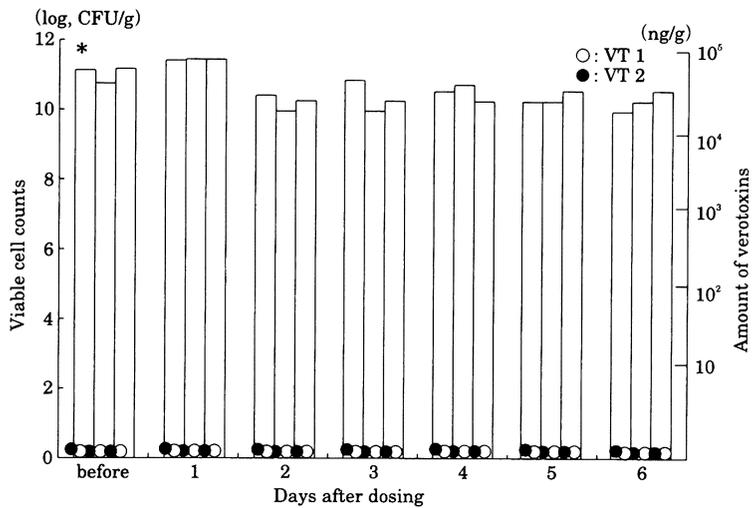


Fig. 5. Bacterial cell counts and verotoxins in feces of mice infected with *Escherichia coli* O157: H7 R29 before and after oral dosing with fosfomycin for 6 days.

*The columns show viable cell counts in feces of each mouse

Table 1. Bacterial cell counts and verotoxins in the intestinal contents of *Escherichia coli* O157: H7-infected mice which died during serial treatment with norfloxacin

Mouse no.	Strain challenged	Date of death	Viable cells (log, CFU/g) and verotoxins (ng/g) of intestinal contents									Intestinal bleeding	Occult blood reaction
			upper			middle			lower				
			cell	VT 1	VT 2	cell	VT 1	VT 2	cell	VT 1	VT 2		
1	NK 2	5	<3.30	-	78	<3.30	-	-	3.78	-	1,250	positive	
2	NK 2	5	<3.30	-	78	<3.30	-	10,000	9.00	1,250	20,000	negative	positive
3	NK 2	4	<3.30	-	625	4.26	-	-	8.30	625	20,000	positive	
9	R 29	5	3.30	-	78	3.30	-	-	<3.30	-	20,000	positive	
10	R 29	4	<3.30	-	156	4.80	-	156	3.60	313	40,000	positive	
11	R 29	4	<3.30	-	-	<3.30	-	-	8.30	625	40,000	negative	positive

The treatment regimen was 3 mg of norfloxacin per kg per dose, twice daily

Table 2. Bacterial cell counts and verotoxins in the intestinal contents of *Escherichia coli* O157-infected mice sacrificed at 7 days after the final fosfomycin treatment

Mouse no.	Strain challenged	Viable cells (log, CFU/g) and verotoxins (ng/g) of intestinal contents									intestinal bleeding
		upper			middle			lower			
		cell	VT1	VT2	cell	VT1	VT2	cell	VT1	VT2	
4	NK 2*	8.15	-	-	9.00	-	-	11.08	-	-	negative
5	NK 2*	7.60	-	-	8.00	-	-	11.00	-	-	negative
6	NK 2*	7.60	-	-	8.60	-	-	10.38	-	-	negative
7	NK 2**	7.30	-	-	9.78	-	-	10.78	-	-	negative
8	NK 2**	6.53	-	-	7.78	-	-	10.70	-	-	negative
12	R 29*	7.30	-	-	10.00	-	-	10.90	-	-	negative
13	R 29*	9.30	-	-	9.78	-	-	11.00	-	-	negative
14	R 29*	8.78	-	-	10.00	-	-	10.60	-	-	negative
15	R 29**	8.60	-	-	11.30	-	-	12.00	-	-	negative
16	R 29**	6.70	-	-	8.30	-	-	10.78	-	-	negative

*The treatment regimen was 25 mg of fosfomycin per kg per dose, twice daily

**Control mice (untreated)

んどのマウスの腸管上部および中部の菌量は低く、検出限界以下の例が認められた。しかし腸管下部の菌数は比較的高く、 1.0×10^9 CFU/g が最高値で他の 2 匹のマウス腸管下部で同レベルの菌量が検出された。

Verotoxin 量では、腸管の各部位のうち下部にもっとも多量に存在することが確認された。すなわち VT1 はこの部位の内容物中に 6 例中 4 例に 313~1,250 ng/g, VT2 は 6 例中 5 例で 20,000~40,000 ng/g, 残り 1 例は 1,250 ng/g と高値を示した。これに対して腸管上部および中部の内容物中からは VT1 はまったく検出されなかった。しかし VT2 は 6 例中 5 例の上部腸管から 78~625 ng/g, 2 例の中部から 10,000 および 156 ng/g 検出された。死亡マウスの腸管の観察結果では、6 例中 4 例に明らかな出血が認められ、肉眼的に腸管出血の見られなかった 2 例のオルトリジン法による潜血反応は強陽性であった。

Table 2 には NK2 および R29 による感染マウスに FOM を投与した各 3 例および無投与の各 2 例について、投与実験が完了した翌日に前述同様に解剖を行い、腸管内に残留する菌量および verotoxin 量を示した。FOM の投与群および対照群ともに、腸管各部位から多量の試験菌が検出されたが、verotoxin は全例から検出されなかった。

III. 考 察

我々は、さきに *E. coli* O157: H7 の臨床分離株は一般に常用抗菌薬の多くに感受性をもつことを報告したが¹⁰⁾、同様な結果は他の研究によっても確認されている^{4,5)}。それらの薬剤のうち、我が国では FOM その他の抗菌薬が *E. coli* O157: H7 などの EHEC による下痢症の治療に応用されている¹⁾。

一方、NFLX などのキノロン系抗菌薬は EHEC に対して強い *in vitro* 抗菌活性をもつが、これらの抗菌薬は EHEC の verotoxin の *in vitro* 産生または培養液中へ

遊離を増強することが報告されている^{4~6)}。また国外における EHEC の感染による下痢または出血性腸炎に対して、これらの抗菌薬を投与して無投与群と比較した成績では明確な改善が報告されていない¹¹⁾。このような事実から、抗菌薬を EHEC 感染症へ臨床的に応用することに積極的に賛成しない意見もある。Walterspiel ら⁶⁾ は、ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole その他の薬剤が *in vitro* で作用したとき、*E. coli* O157: H7 および O26 からの verotoxin の遊離は菌株および抗菌薬の種類によって大きな相違があり、ciprofloxacin がもっとも強い遊離作用を示すことを明らかにした。この研究を通じて、抗菌薬の投与は EHEC の腸管感染症から溶血性尿毒症を併発するリスク因子になる可能性を示唆している。しかし EHEC の抗菌薬による verotoxin の *in vitro* における遊離が、そのまま臨床の EHEC 感染における抗菌薬の影響をただちに反映するとは考えにくい。

この問題に関連して、我々は無菌マウスを利用して *E. coli* O157: H7 の腸管感染モデルを作成し、抗菌薬の投与時の verotoxin の腸管内への遊離または糞便中への排泄、さらにマウスへの障害について検討した。すでにマウスを用いた *E. coli* O157: H7 の腸管感染モデルとしては、Wadolowski ら^{12,13)} および Karpman ら¹⁴⁾ の報告がある。Wadolowski らの実験では、CD-1 マウスに streptomycin を前投与し、常在好気性菌の増殖を抑制して *E. coli* O157: H7 を経口的に接種した。この条件で試験菌が腸管内に高レベルに定着したが、感染マウスに下痢その他の腸管の異常症状を観察しなかった。

Karpman らは、抗菌薬の前処理をしない他の系統のマウスに *E. coli* O157: H7 を腸管内に接種し、マウスの腸管内に安定的な菌の定着と便性状の異常を観察している。すなわちマウスの *E. coli* O157: H7 の実験感

染モデルでは、用いられたマウスの系統および感染菌とした *E. coli* O157: H7 のマウスの腸管に対する病原性により、腸管に試験菌が多量に定着しても腸管の異常症状が発現しない場合があることを示している。本報の我々のマウス感染モデルでは、*E. coli* O157: H7 の経口接種によりマウス腸管内に安定的に菌が定着するが、マウスには外見上、格別の異常な症状は認められない。しかし試験菌の接種条件の変化、または菌の毒力の強化によりマウスの腸管に障害を誘発できる可能性はある。この系を用いて、各種の抗菌薬を連続投与した場合の verotoxin の糞便中または腸管内への遊離を *in vivo* において評価した。

我々の *E. coli* O157: H7 感染のマウスモデルでは、Fig. 1 のとおり、NK2 および R29 の場合ともに、薬剤無投与の対照群では糞便中に 10^{10} ~ 10^{11} CFU/g の生菌数が検出されたが、verotoxin の排泄はまったくみられなかった。NFLX の 3 mg/kg \times 2/日、6 日間の投与 2 日終了 (4 回の投与後) から NK2 および R29 株の両感染で糞便中菌数が減少し、同時に VT1 および VT2 の糞便中への排泄が激増する傾向がみられ、第 4~第 5 日終了後には全例が死亡した。死亡マウスの剖検では、下部腸管に出血所見または糞便の潜血反応が認められた。死因に関する詳細な検討は行っていないため断定はできないが、腸管内 verotoxin の顕著な増加に伴い死亡することから、このことが重要な要因であると考えられる。また、今回の実験成績から VT2 に比べ VT1 が遅れて検出され VT2 量に比べ少ないのは、*in vitro* における実験でも認められているように VT2 に比べ VT1 は菌体外へ放出されにくいであろう^{4,15)}。これに対して FOM の 50 mg/kg/日、6 日間の投与では、投与 6 日後まで投与前と同様の菌量を維持した。FOM の投与群では腸管出血および潜血反応はまったくみられなかった。感染マウスに対する FOM の結果は、FOM が *E. coli* O157: H7 感染症の治療に不適当であることを意味するものではなく、実際には臨床的に FOM はヒトの EHEC 感染症に投与され治療効果を示している。一方薬剤の吸収排泄は動物種によって大きく相違することは周知のとおりである。本報の実験において *E. coli* O157: H7 感染マウスの腸管内の感染菌が FOM の投与によって減少しなかったのは、柳沼ら¹⁶⁾ および石沢ら¹⁷⁾ がラットを用いて示した FOM の実験動物における吸収性の特異性を反映したものと考えられる。すなわち本報で用いたマウスと同じ齧歯類のラットと比較して、ヒトの FOM の経口吸収率は 25~36% と低く、ラットの 1/3 程度であるとされている。今回のマウスにおいても FOM が腸内の *E. coli* O157: H7 に抗菌作用を発揮する以前に吸収され、感染菌の減少は認められなかったと考えられる。また、同実験系で、FOM 投与群からはコントロール同様 VT が検出されな

かった点については FOM の腸管内濃度が明らかに低かったためであろう。高田ら⁴⁾ は EHEC を用いた *in vitro* の実験で、FOM は MIC 以上の濃度では VT1, 2 の経時的遊離は認められなかったと報告している。結果には示さなかったが我々の実験では、菌体内外の VT 量は FOM によって影響を受けないことを確認している。しかしこれらはあくまでも *in vitro* での成績であるため、今後さらにヒト腸管内薬剤濃度に近い濃度となる FOM 投与量で実験感染に対する効果を検討する必要がある。

この無菌マウスを用いる *E. coli* O157: H7 の腸管感染モデルは、抗菌薬の有効性評価に用いられる全身感染モデルとは異なり、対照マウスは死亡しないが、この腸管感染マウスに各種の抗菌薬を投与した場合、感染菌から verotoxin の遊離、マウスに対する障害作用または致死作用を判定する一方法として有用であることが示唆された。

文 献

- 1) 森口直彦, 八木和郎, 山本 隆, 他: 腸管出血性大腸菌の薬剤感受性と抗菌剤投与について一堺市での集団食中毒から一。Jpn. J. Antibiotics 50: 591~596, 1997
- 2) Ostroff S M, Kobayashi J M, Lewis J H: Infections with *Escherichia coli* O157: H7 in Washington state. The first year of statewide disease surveillance. JAMA 262: 355~359, 1989
- 3) Proulx F, Turgeon J P, Delage G, et al.: Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157: H7 enteritis. J Pediatr. 121: 299~303, 1992
- 4) 高田利彦, 田端麻紀子, 菅野由美子, 他: 腸管出血性大腸菌 O157 に対する各種抗菌薬の抗菌力と verotoxin 遊離作用の検討。日化療誌 45: 265~269, 1997
- 5) 伊藤輝代, 秋野恵美, 平松啓一: 腸管出血性大腸菌 O157 に用いる抗生物質の検討。感染症誌 71: 130~135, 1997
- 6) Walterspiel J N, Ashkenazi S, Morrow A L, et al.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular shiga-like toxin I. Infection 20: 25~29, 1992
- 7) Forbes B A, Granato P A: Processing specimens for bacteria. In Manual of Clinical Microbiology 6th ed. (Murray P R, et al. ed.), p.265~281, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1995
- 8) March S B, Ratnam S: Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. J Clin Microbiol. 27: 1675~1677, 1989
- 9) 甲斐明美, 山田澄夫, 松下 秀, 他: ラテックス凝集反応による大腸菌 Verocytotoxin1 及び 2 の検出とその応用。日細誌 44: 434, 1989
- 10) 小林寅詰, 大沢宏充, 原田 賢, 他: 1996 年夏期に主として関東地方およびその他の地域の臨床施設において分離された下痢原性大腸菌に関する検討一特に大腸菌 O157 について一。感染症誌 71: 495~500, 1997
- 11) Pavia A T, Nichols C R, Green D P, et al.:

- Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr.* 116: 544~551, 1990
- 12) Wadolowski E A, Sung L M, Burris J A, et al.: Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce shiga-like toxin type II. *Infect Immun.* 58: 3959~3965, 1990
- 13) Wadolowski E A, Burris J A, O' Brien A D: Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Infect Immun.* 58: 2438~2445, 1990
- 14) Karpman D, Connell H, Svensson M, et al.: The role of lipopolysaccharide and shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *JID* 175: 611~620, 1997
- 15) 小林寅詰, 雑賀 威, 村岡宏江, 他: Verotoxin 産生 *Escherichia coli* (VTEC) の毒素産生性と諸性状について。第 71 回日本感染症学会総会, 札幌, 1997
- 16) 柳沼恵一, 早坂洋司, 村田信二郎, 他: Fosfomycin・カルシウム塩のラット経口投与後における体内挙動。薬剤学 35: 199~208, 1975
- 17) 石沢孝之, 友野法子, 仲由武実, 他: Fosfomycin の消化管吸収に及ぼす溶解性と胃酸の影響。明治製菓研究年報 31: 17~21, 1992

A mouse model of *Escherichia coli* O157: H7 infection for evaluation of antibacterial drugs

— *In vivo* release of verotoxins and toxic effect on mice —

Intetsu Kobayashi¹⁾, Hiroe Muraoka¹⁾, Kaoru Matsuzaki¹⁾, Takeshi Saika¹⁾,
Minoru Nishida¹⁾, Hironobu Akita²⁾, Satoshi Iwata³⁾,
Yoshitake Sato⁴⁾ and Keisuke Sunakawa⁵⁾

¹⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi-Kagaku Bio-Clinical Laboratories,
Shimura 3-30-1, Itabashi-ku, Tokyo 174-8555, Japan

²⁾ Department of Pediatrics, St. Marianna University. Yokohama City Seibu Hospital

³⁾ Department of Pediatrics, Kasumigaura National Hospital

⁴⁾ Ota General Hospital

⁵⁾ Department of Pediatrics, The Second Tokyo National Hospital

IQI mice (ICR, 5 weeks old) were orally challenged with verotoxin-producing strains of *Escherichia coli* O157: H7 NK2 or R29. The viable cells, at 10^{10} ~ 10^{11} CFU/g, excreted into the feces were collected from the non-treated mice for 1~6 days after infections with both strains, which indicates stable inoculation in their intestinal tracts. No mice died in the non-treated groups during or after the dosing period. Norfloxacin was given orally at a dose of 3 mg/kg twice/day for 6 days to three mice each which were infected with NK2 or R29 strains. VT2 of 625~2,500 ng/g was found in the feces of the infected mice for 15 hours after two doses on the first day of norfloxacin dosing, and large amounts of VT1 (1,250~5,000 ng/g) and VT2 (40,000 ng/g) were also found in the feces for 15 hours after dosing on the second day. Although a marked decrease in the viable cell count was found in the feces of the mice given norfloxacin, all the mice died within 4~5 days after onset. On the other hand, when fosfomycin was given to the infected mice at a dose of 25 mg/kg twice/day for 6 days, no verotoxins were found in any feces of the mice and no mice died of infection with either *E. coli* O157: H7 NK2 or R29. Very high concentrations of VT2 were found in the contents of the lower intestines of mice which died after norfloxacin dosing. Bleeding was detected in the intestines of 4 of the 6 dead mice, and a positive occult reaction was observed in feces of the other 2 mice. No such changes were observed in the mice given fosfomycin. This intestinal infection model in mice infected with *E. coli* O157: H7 may be useful for evaluating the *in vivo* production or liberation of verotoxins by antibacterial drugs and their toxic effects on mice infected with this bacterial strain.