

新生児の腸内細菌叢における *C. difficile* の動態及びその意義について

— 臨床及び実験的検討 —

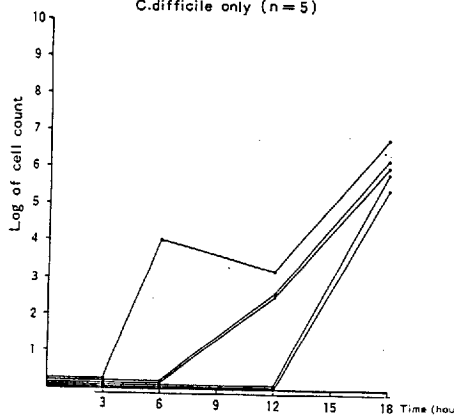
慶大小児科

佐藤 吉壮・城 裕之・老川 忠雄

近年、*C. difficile* と抗生剤使用に起因する腸炎、偽膜性腸炎（以下PMC）との関連が注目されている。新生児領域においても *Necrotizing enterocolitis*（以下NEC）は病理学的にもPMCと類似しており、又、*C. difficile* との関連を示唆する文献も散見される。今回我々は、無菌マウスを使用して *C. difficile* の腸内細菌叢への定着について preliminary な実験を行った。又、*C. difficile* の toxin 検出法に Latex凝集法を用い、健常新生児において検討を加えたので報告する。

動物実験は日本クレアより購入した生後4週齢のICR無菌マウスを用い、5例は *C. difficile* 単独の菌液を経口的に投与し、5例は *E. coli*, *S. faecalis*, *C. difficile* 3種混合菌液を経口的に投与し、経時的に糞便中の *C. difficile* の菌数を測定した。*C. difficile* 単独菌液を投与した時の菌数の推移を Fig.1.

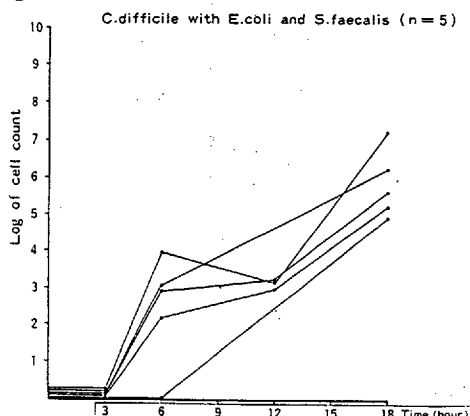
Fig.1 Viable cell count of *C. difficile*
C. difficile only (n=5)



に示す。5例中1例は投与後6時間で 10^4 のオーダーで検出され、投与後12時間では5例中3例までは糞便中に *C. difficile* を検出した。

18時間では全例検出されている。これに対して3種混合菌液投与群では Fig.2 に示すごとく、5

Fig.2 Viable cell count of *C. difficile*



例中4例が6時間で *C. difficile* が検出されており、単独投与群と比べ、*C. difficile* の糞便中への出現までの時間に差が認められた。しかし、投与後18時間の最終的な菌数には差を認めなかった。

Latex凝集反応による toxin 検出法を Fig.3 に示す。糞便 0.2g に BSA 加 Tris Buffer を 0.2ml 加え、よく混和し、3,000 回転で 15 分間遠心分離した上清 100 μ l に *C. difficile* D-1 toxin のウサギ免疫血清より得られた IgG 分画を直径 0.2-0.4 μ のポリスチレン樹脂に吸着させた Latex 反応液を 1 滴加え、速やかに混和し、3 分後に凝集の有無を判定する。なお、この Latex 反応液及び Buffer は三菱化成研究所より分与されたもので、その肉眼的凝集限界は toxin 250 ng/ml に調整されている。この Latex 法を用い、抗生剤の投与をうけていない新生児及び未熟児 14 例で計 68 検体につき、*C. difficile* toxin の検索を行った。結果を Table 1 に示す。生後 7 日目までは 38 検

体検索を行い、toxin は全例陰性であった。

Fig. 3

Latex agglutination test for *C. difficile* toxin

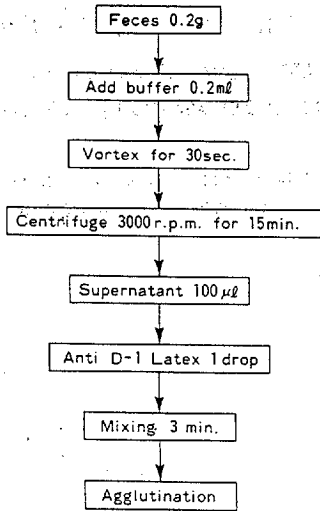


Table 1

Age	Total number	Toxin (+)	Detection rate (%)
0 → 7 day	38	0	0
8 → 14 day	13	3	23.1
15 → 21 day	11	4	36.4
22 → 28 day	6	3	50.0

8日目から14日目では13検体でtoxin陽性は3例で陽性率は23.1%であった。15日目から21日目までは11検体でtoxin陽性は4例で陽性率は36.4%、22日目から28日目では6検体でtoxin陽性は3例で陽性率は50%であった。なお、*C. difficile* organismは全例検出されなかった。toxin陽性となった症例は3例で全例未熟児であり、Table. 2に示す。

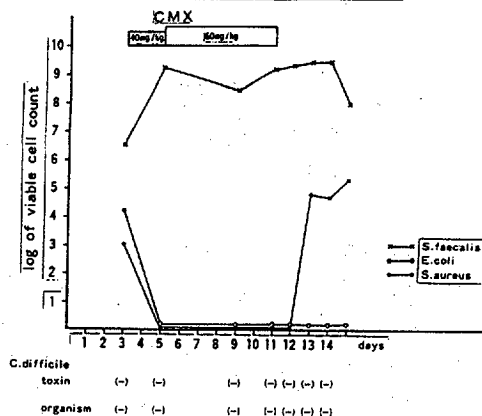
Table 2

Case NO.	Gestational age (w)	Body weight (g)	<i>C. difficile</i> toxin detection rate			
			0-7 day	8-14 day	15-21 day	22-28 day
1	32	1541	—	2/2	1/4	0/2
2	32	1590	—	0/1	2/6	1/2
3	30	1383	0/2	1/1	1/1	2/2

1例目は32週、1541gで出生。呼吸障害もなく、栄養も出生翌日よりtube feedingしえた症例であったが、toxinは8日目から14日目の間に2/2に、15日目から21日目の間に1/4に検出されている。腹部膨満、下痢、嘔吐等の消化器症状は認めなかった。2例目は32週、1590gで出生。呼吸障害はなく、栄養も出生翌日よりtube feedingを開始している。この症例ではtoxinは15日目より21日目の間に2/6、22日目から28日目の間に1/2に検出された。消化器症状は認めていない。3例目は30週、1383gで出生。RDSでrespiratorを使用し呼吸管理を行った症例である。抗生剤は使用していない。この症例ではtoxinは8日目から14日目の間に1/1、15日目から21日目の間に1/1、22日目から28日目の間に2/2に検出されている。消化器症状は認めていない。

次に抗生剤投与を行った新生児においても投与前、投与中、投与後に糞便内好気性菌の推移及び*C. difficile* toxin, organismの検索を行った。典型的な症例をFig. 4に示す。症例は40週、4300gで出生。尿路感染症で3日よりCefmenoxime(CMX)を8日使用している。投与前の糞便中では、*S. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*が認められたが、CMX投与開始後2日目には*E. coli*, *S. aureus*は消失し、*S. faecalis*のみとなり、投与中止後、*S. aureus*は再び検出されている。*C. difficile*はtoxin, organismとも全期間を通して陰性であった。

Fig 4 Case 4 G.K. 3days



動物実験においては、*C. difficile* 単独で投与した群より、*E. coli* 及び *S. faecalis* と共に投与した群の方が糞便内より *C. difficile* が検出されるまでの時間が短いという結果であった。今回の実験はまだ Preliminary ではあるが、flora への定着という面では、他の腸内細菌との間に何らかの interaction があるのではないかという疑問をいだかせた。今後も、in vivo 及び in vitro でのこの interaction についての実験をすすめ、さらに生菌剤との interaction についても検討していく方針である。*C. difficile* toxin の検出法は従来、Hela 細胞、H. A. 細胞、CHO 細胞等に対する Cytopathic effect を用いて行われていたが、細胞培養が必要であり、又、判定までに時間がかかるために一般には普及していない。今回、我々の施行した Latex 法では手技は簡便であり、その検出限界も 250 ml/ml と非常に敏感であるため、臨床的にも十分に応用しようと思われる。今回の新生児、未熟児における *C. difficile* toxin の検索では、出生後の日数が 7 日以内では検出率は 0 であったのに、日数が経過していくに従い、その検出率は増加していた。文献的には出生後 1 週以内から多く検出されるものも、1~2 週前後に多いものもあるが、症例数は少ないが我々のデータからは日数の経過とともに検出率は増加する傾向であった。又、分娩法、栄養法による差も、経膈分娩、母乳栄養児に検出率が高いという報告があるが、今回我々は検討していない。今後、症例数を増し、検討を加えたいと思う。

C. difficile organism の検索であるが、新生児以外で toxin 強陽性を示す症例では organism も検出されており、今回のデータで toxin を示し、organism が検出されない検体は糞便 1 g あたりの菌数が少ない可能性もあり、今後更に検討していく。抗生剤使用後の toxin の検出率は、直後よりも 2 週後から 2 ヶ月後の期間の方が高いという報告もある。抗生剤投与群での検討も今回の報告では toxin, organism 共に検出しえなかったが、現在抗生剤投与中止後翌日より toxin 陽性となっている症例を経過観察中であり、今後も症例数を増やし検討していく。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



近年、C.difficile と抗生剤使用に起因する腸炎、偽膜性腸炎(以下 PMC)との関連が注目されている。新生児領域においても Necrotizing enterocolitis(以下 NEC)は病理学的にも PMC と類似しており、又、C.difficile との関連を示唆する文献も散見される。今回我々は、無菌マウスを使用して C.difficile の腸内細菌叢への定着について preliminary な実験を行った。又、C.difficile の toxin 検出法に Latex 凝集法を用い、健常新生児において検討を加えたので報告する。