

## サル の腸内細菌叢 に対する Bicyclomycin の影響

峯 靖弘・浅野英夫・野々山重男・西田 実

藤沢薬品中央研究所

五島 瑳 智子・桑 原 章 吾

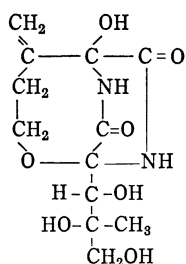
東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 50 年 2 月 24 日受付)

或る種の抗生物質の経口投与が、腸内細菌叢に変化を与え、下痢その他の消化管の障害を誘発することについてはすでに報告されている<sup>1-3)</sup>。

藤沢薬品・中央研究所で開発された新抗生物質, Bicyclomycin<sup>4,5)</sup> は *Streptomyces sapporonensis* の培養液から単離された抗生物質で, Fig. 1 に示す化学構造を有し, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* group を除く腸内細菌群, すなわち *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Citrobacter* および *Enterobacter cloacae* などに抗菌活性をもち, また他のいずれの市販抗生物質とも差耐性を示さない特異な抗生物質である<sup>6-8)</sup>。最近われわれはこの抗生物質がサルの実験的赤痢症に有効であることを報告したが<sup>9)</sup>, この抗生物質を腸内殺菌剤として検討することを目的として, その連続経口投与時の腸内細菌叢に及ぼす影響を調べたので, その結果を報告する。

Fig. 1 Chemical structure of bicyclomycin



8, 10-diaza-6-hydroxy-5-methylene-1-(2'-methyl-1', 2', 3'-trihydroxypropyl)-2-oxabicyclo 4, 2, 2 decan-7, 9-dione

## 実験材料および実験方法

## 1. 抗生物質

Bicyclomycin(BM, 藤沢薬品), Kanamycin(KM, 明治製菓), Ampicillin(AB-PC, 藤沢薬品)を使用した。

## 2. 動物および飼料

アカゲザル(5~6 kg, ♂)を入手後6カ月間, オリエンタル社のサル用固型飼料を100 g/日与え, 隔日にリンゴおよびバナナを与えた。なお, 水は自動給水装置により随時摂取させた。

## 3. 投与量および投与方法

健康なサル, 各群2匹に BM, KM または ABPC を 0.5% methylcellulose 溶液に溶解(10 mg/ml)して, その 20 mg/kg を1日2回経口投与した。抗生物質の投与は下痢便を生ずるまで継続した。下痢便が生じてから48時間後にサルを致死させ, 腸管を分離した(BM および ABPC は 25 日間, KM は1日の投与)。

## 4. 腸管の分離

分離した腸管を迅速に次のように区分した。十二指腸, 空腸, 廻腸部分を3等分し, 小腸上部, 中部, 下部に分け, 小腸中部および下部を検体とした。さらに盲腸および結腸・直腸部を次に記載する方法により菌数の測定をおこなった。

## 5. 菌の分離, 同定, 菌数の測定

各腸管部位(内容物を含む)を1g採取し, 嫌気菌性用希釈液(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 g, 塩酸システイン 1.0 g, Tween 80 1.0 g, Agar 1.0 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0)で均一な懸濁液とする。この液を連続的に10倍希釈する。各希釈液の0.1 ml を下記の寒天培地にコンラージ法によって塗抹した。

好気性菌については, 37°C, 24~48時間培養後コロニー数の測定および菌の同定をおこなった。

嫌気性菌は, gas pak 法(BBL)で37°C, 48時間培養後必要に応じ, 所定の方法によりグラム染色同定した。

## ・好気性菌

Trypticase soy agar (BBL) : 全菌数

DHL agar medium (栄研) : *Enterobacteriaceae*

*Staphylococcus* No. 110 (ニッサン) : *Staphylococcus*

EF agar medium (ニッサン) : *Enterococcus*

NAC agar medium (ニッサン) : *Pseudomonas*

## ・嫌気性菌

GAM agar medium (ニッサン) : 全菌数

LBS agar (BBL) : *Lactobacillus*

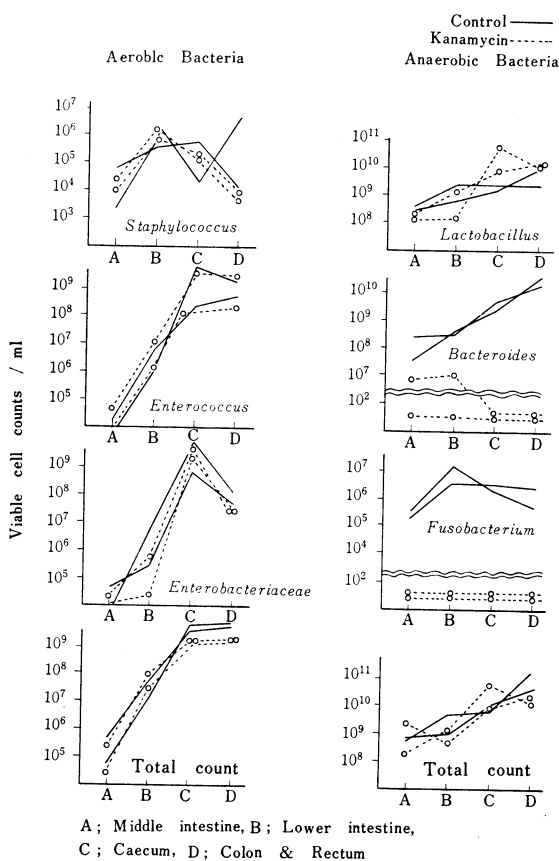
*Bacteroides* medium (ニッサン) : *Bacteroides*

変法 FM 培地 (ニッサン) : *Fusobacterium*

CW agar medium (KM 含有, ニッサン) :

*Clostridium*

Fig. 2 Effect of bicyclomycin on the intestinal microflora of rhesus monkeys  
(40 mg/kg/day, 25 days)



## 実験結果

### I Bicyclomycin

サル2匹にBMを20 mg/kg, 1日2回, 25日間連続経口投与したが, 便性状は不変で, 下痢が生じなかった。投与は25日で中止し, その後48時間目に腸管各部位を採取し, 実験の項に記載した方法によって生菌数を測定した。Fig. 2において実線は無投与 control, 点線はBM投与の各2匹の腸管各部位のg当りの菌数を示す。

#### 1) 好気性菌

*Staphylococcus*は無投与の対照群の腸管各部位における菌数は2匹間でかなりの差異があり, 1例は小腸中部で約10<sup>9</sup>/g, 小腸下部で約10<sup>6</sup>/g, 盲腸部で10<sup>4</sup>/g, 結腸・直腸部で10<sup>7</sup>/gと各部位により相当の変化がみられた。しかし, 他の例では小腸中部, 小腸下部, 盲腸部は10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>/g, 結腸・盲腸部で10<sup>4</sup>/gの生菌数を示した。これに対し, Bicyclomycinを上記の量で連続投与した2例では, 両動物とも全く良く一致した菌の分布

を示した。小腸中部で10<sup>4</sup>/g, 小腸下部で10<sup>5</sup>/g, 盲腸部で10<sup>4</sup>/g, 結腸・直腸部で10<sup>8</sup>/gとなり, 小腸下部の菌数が最も多い。

*Enterococcus*ではBM投与群は, 対照群と比較して各部位とも菌数に大差がなく, またその分布傾向も類似した傾向を示した。とくに菌の分布傾向をみると, 両群とも小腸中部<小腸下部<盲腸=直腸と消化管の下部になるほど菌数が増加する。最も菌数の少ない部位, 小腸中部で両群とも10<sup>5</sup>/g以下, 最も菌数の多い盲腸および直腸ではいずれも10<sup>9</sup>/gまたは10<sup>9</sup>/g以上であった。*Enterococcus*はBMの投与で全く影響をうけないことが明らかに認められた。

つぎに*Enterobacteriaceae*も*Enterococcus*とほぼ類似した消化管内分布を示した。すなわち, 消化管上部ほど菌数は少なく, 盲腸部が最も高い。投与群では10<sup>9</sup>/g前後, 無投与対照群では10<sup>9</sup>/g前後の濃度を示した。しかし, 直腸では両群とも1段階低い菌数を示した。

つぎに両群の全菌数を比較したが, ほとんど差が認められず, *Enterococcus*にみられたように盲腸, 直腸に最も高い濃度(約10<sup>10</sup>/g)を示した。この結果からBMの経口投与がわれわれが測定した好気性菌群の菌数の分布に影響を与えないことがわかる。

#### 2) 嫌気性菌

*Lactobacillus*はBMの投与群, 無投与対照群とも腸管内生菌数に有意の差は認められなかった。ただ生菌数は小腸中部で両群とも約10<sup>8</sup>/gであるが, 結腸・直腸部では両群とも10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup>/gと消化管下部ほど菌数は多い傾向にある。

*Bacteroides*でもBMの投与によって結腸・直腸部を除いて生菌数の著変はみられない。結腸・直腸部では対照群は10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>/gの生菌数を示したが, 投与群では10<sup>9</sup>/gとやや低値を示した。

*Fusobacterium*でも小腸両部および盲腸部における生菌数は, BMの投与群と対照群の間で大差は認められない。ただBMを投与した2例中1例で10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>/gに菌数が減少している。

BM投与群および対照群の全菌数を比較したが両群間に大差はなく, 腸管各部位における分布傾向も大差はなかった。

### II 対照抗生物質, AB-PC および KM

Fig. 3およびFig. 4は対照として用いたAB-PCおよびKMの投与時における消化管各部位のfloraの変化を示したものである。Fig. 3およびFig. 4における実線は, Fig. 2に記載した同じ対照群の成績を再記したもので, 点線は抗生物質投与時の結果を示したものである。

Fig. 3 Effect of ampicillin on the intestinal microflora of rhesus monkeys (40 mg/kg/day, 25 days)

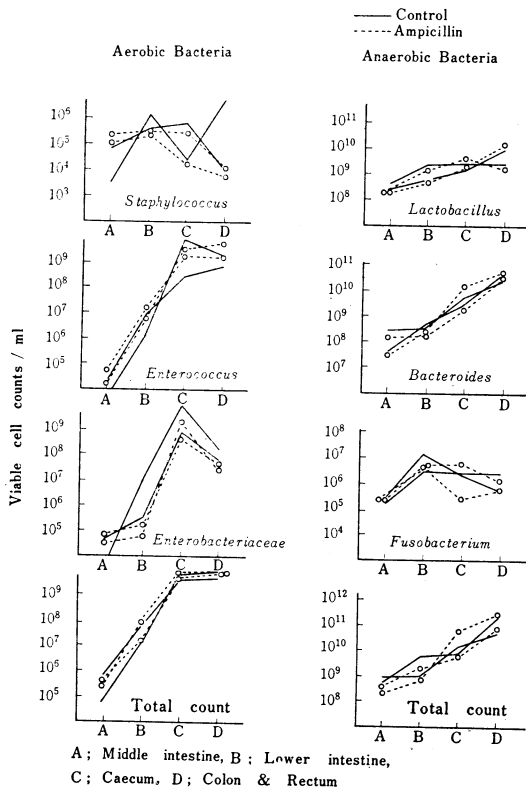
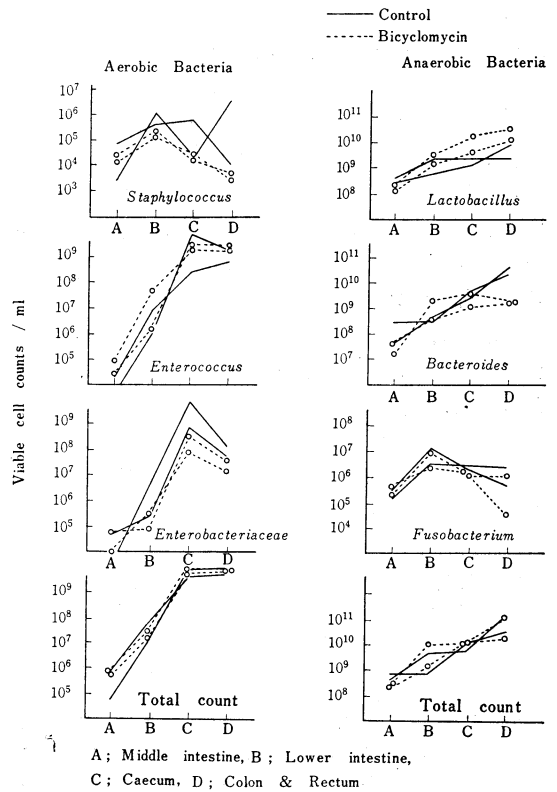


Fig. 4 Effect of kanamycin on the intestinal microflora of rhesus monkeys (40 mg/kg/day, 1 day)



AB-PC(Fig. 3) は BM の場合と同様 20 mg/kg, 1 日 2 回, 25 日間経口投与しても下痢は認められなかった。また Fig. 3 のとおり, 好気性菌および嫌気性菌とも対照群と比較して生菌数および分布において著明な変化は認められなかった。

つぎに KM は 20 mg/kg 1 日 2 回の投与で激しい下痢が発生し, 薬剤の投与は 1 日で中止し, 48 時間後に消化管各部位に菌数を測定した。KM 投与の場合, 好気性菌群は対照群と比較して, ほとんど変化が認められなかった。しかし, *Bacteroides* および *Fusobacterium* は著明に減少し, 消化管のいずれの部位においても生菌数は  $10^3/g$  以下であった。この現象はさらに 2 例のサルを追加して再検したが, 全く同様の現象が認められた。

考 察

抗生物質を経口的に連続投与すると, 実験動物またはヒトの腸内細菌叢に影響を与えることは, すでに報告されている。C. P. MILLER ら<sup>1)</sup>は Streptomycin をマウスに経口投与すると, *Enterococcus*, *Lactobacillus* およびグラム陰性桿菌の全てが減少し, *Salmonella* の経口感染に対する感受性が増強されることを報告している。

S. M. FINEGOLD ら<sup>2)</sup>は Lincomycin による嫌気性菌の減少を, B. A. SHIDLOVSKY ら<sup>3)</sup>は Colistin または Erythromycin の投与による腸内細菌叢の変化を報告している。また H. GAYA らは Cephalexin の経口投与を受けた患者の便中に *P. aeruginosa* が優勢となることを報告している。

一般に抗生物質の腸内細菌叢におよぼす影響は, とうぜん使用された抗生物質の抗菌スペクトラムおよび抗菌活性, 消化管内における消長などにより一様でないことは明らかである。われわれが本報において検討した Bicyclomycin は狭域抗生物質で, 感受性菌に対する抗菌活性も他剤と比較して強くない。本報の成績によれば, サルに 40 mg/kg の Bicyclomycin を 25 日間連続投与しても, 菌検索の対象とした *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* などの好気性菌, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* などの嫌気性菌は, いずれも著明な菌数の変化を示さなかった。この結果は 40 mg/kg 1 日の投与で *Bacteroides* および *Fusobacterium* が消失した Kanamycin の場合と極めて対照的であった。

サルを用いた実験的赤痢症に対し、Bicyclomycin が有効であることを報告したが<sup>9)</sup>、本報で明らかとなっており、Bicyclomycin は比較的大量、長期間経口投与したが、腸内細菌叢に影響が少なく、腸内細菌剤として望ましい性状をもつことが明らかになった。

#### 要 約

健康なサルに Bicyclomycin, Ampicillin を 20 mg/kg, 1 日 2 回, 25 日間投与して小腸中部, 下部, 盲腸, 結腸・直腸各部位の好気性および嫌気性菌の生菌数およびその分布を検討したが, 著明な変化はみられなかった。しかし Kanamycin を 20 mg/kg, 1 日 2 回投与すると下痢を生じた。

この場合, 好気性菌群には著明な変化がみられなかったが, *Bacteroides* および *Fusobacterium* が腸管のいずれの部位からも激減した。

稿を終るにあたり, 本実験に御援助いただきました当中央研究所 中野所長および熊田副所長に感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) C. P. MILLER & M. BOHNHOFF : Changes in the mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to *Salmonella* infection following streptomycin treatment. *J. Infect. Dis.* 113 : 59~66(1963)
- 2) S. M. FINEGOLD, *et al.* : Lincomycin : Activity against anaerobes and effect on normal human fecal flora. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1965:659~667
- 3) B. A. SHIDLOVSKY, *et al.* : The effect of colistin alone and in combination with erythromycin propionate on the intestinal flora of man. *Antibiot. & Chemoth.* 10(10) : 640~643(1960)
- 4) T. MIYOSHI, *et al.* : Bicyclomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiotics* 25 (10) : 569~575 (1972)
- 5) T. KAMIYA, *et al.* : Bicyclomycin, a new antibiotic. II. Structural elucidation and acyl derivatives. *J. Antibiotics* 25 (10) : 576~581 (1972)
- 6) M. NISHIDA, *et al.* : Bicyclomycin, a new antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity. *J. Antibiotics* 25(10) : 582~593 (1972)
- 7) M. NISHIDA, *et al.* : Bicyclomycin, a new antibiotic. IV. Absorption, excretion and tissue distribution. *J. Antibiotics* 25(10) : 594~601 (1972)
- 8) Y. MINE, S. NONOYAMA & M. NISHIDA : Antigenicity of bicyclomycin and its cross-reactivity with benzylpenicillin. *Jap. J. Antibiotics* 27(4) : 456~462(1974)
- 9) M. NISHIDA, *et al.* : Therapeutic efficacy of bicyclomycin for shigellosis experimentally induced in rhesus monkeys. *J. Antibiotics* 27(12) : 976~983(1974)
- 10) H. GAYA, P. I. ADNITT & P. TURNER : Changes in gut flora after cephalixin treatment. *Brit. Med. J.* 3 : 624~625(1970)

## EFFECT OF BICYCLOMYCIN ON INTESTINAL MICROFLORA OF MONKEYS

YASUHIRO MINE, HIDEO ASANO, SHIGEO NONOYAMA  
and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

SACHIKO GOTO and SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine

This study was undertaken to compare the changes in the enteric microflora of rhesus monkeys following oral dosing of bicyclomycin, ampicillin and kanamycin at 20 mg/kg twice daily for 25 days.

The numbers of aerobic and anaerobic bacteria in the various parts of the intestinal tract were not markedly changed by the repeated doses of bicyclomycin as well as ampicillin, and normal feces were excreted over the administration period of these antibiotics.

However, on the first day following the same dosing of kanamycin, the numbers of *Bacteroides* and *Fusobacterium* were markedly reduced in the intestines of all monkeys tested and severe diarrhea was observed.