

マウスの盲腸内細菌叢と盲腸内容の揮発性脂肪酸組成におよぼす 各種抗生物質投与の影響. II

静脈内注射による影響

今井章浩・森下けい子

武田薬品工業株式会社中央研究所, 生物研究所

(昭和53年8月7日受付)

緒 言

著者らはさきに各種抗生物質を経口投与したマウスにおける盲腸内細菌叢の変化および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化は薬剤の種類によって異なることを報告した¹⁾。また、薬剤によっては *furfural* の産生を認めたが、その産生は嫌気性菌群の菌数の著しい減少と *fusiform bacteria* の消失に相関する成績を得た¹⁾。

ラット、ウサギなどの実験動物にペニシリンおよびマクロライド系抗生物質を静脈内に注射すると、胆汁中に多量の薬剤が検出される²⁾。この事実から静脈内に注射された抗生物質が胆汁を経由して消化管内に入り、その結果、盲腸内細菌叢が攪乱され、さらには盲腸内容の揮発性脂肪酸組成に変化が起これると考えられる。

本報告では抗生物質をマウスに静脈内注射し、盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成におよぼす影響について検討した。

実験材料および実験方法

マウス : Slc : ddY マウス, 雄, 生後 5~6 週, 体重 26~30 g のものを用い, 1 実験群における体重の幅は 2 g 以内とした。飼育条件は前報¹⁾と同じである。

盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸の検索には 1 群 3 匹づつを用い, 実験は 5 回にわけて実施した。抗生物質注射後の薬剤濃度の測定には 1 群 20~30 匹を用いた。

薬剤および投与方法 : Penicillin G (PCG) (明治製薬), Ampicillin (ABPC), Sulbenicillin (SBPC) (以上, 武田薬品), Carbenicillin (CBPC), Cefazolin (CEZ) (以上, 藤沢薬品), Cephaloridine (CER), Cephalothin (CET) (以上, 塩野義製薬), Kanamycin (KM) (武田薬品) および Erythromycin (EM) (大日本製薬) を用いた。各薬剤は滅菌蒸留水に 20 mg/ml の濃度に溶かし, その 0.25 ml (5 mg/mouse) を 1 日 2 回 (朝, 夕) 計 5 回, マウスの尾静脈内に注射した。

盲腸内細菌叢の検索および Gas chromatography による盲腸内容の揮発性脂肪酸の測定 : 最終注射後 5 時間

に, マウスをエーテル麻酔により屠殺後, 盲腸を取り出し, 盲腸の一部, 長さ約 5 mm を盲腸内細菌叢の培養に, 残部を揮発性脂肪酸の検索に供した。培養法ならびに脂肪酸分析法は前報¹⁾と全く同じ方法によった。

薬剤濃度の測定

1) **材料の採取** : 最終注射後 5 時間における薬剤濃度の測定には, 1 群 20~30 匹のうち, 7 匹はエーテル麻酔後, 腋動脈を切断し, あらかじめヘパリン液で湿らせた駒込ピペットで血液を採取した。屠殺後, 肝の 1 片 (約 200 mg) および内容物を含む十二指腸, 小腸中央部, 回腸 (それぞれ長さ約 1 cm) および盲腸をとり, それぞれプールのした。残りのマウス (13~23 匹) は屠殺後, 開腹し, デイスポーザブル注射器 (1 ml) によって胆汁を吸引, 採取した。なお, 前記の 7 匹の胆汁も同様に採取し, 各薬剤注射群ごとに胆汁をプールのした。

また, ABPC および CEZ 注射群は経時的に薬剤濃度を測定した。すなわち, 最終注射後 1, 2 および 3 時間にそれぞれ 3 匹を前記と同様に採血後, 肝の 1 片および盲腸をとり, それぞれプールのした。

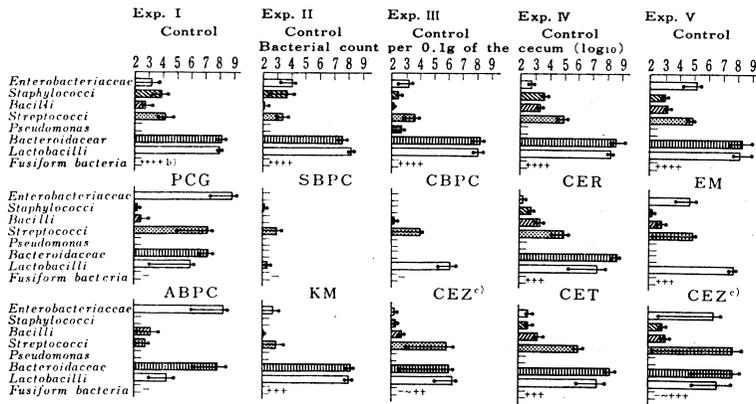
2) **材料の処理** : 採血した血液は 3,000 r.p.m. 15 分間遠心分離し, 上清 (血漿) を採取した。肝および消化管各部位は秤量後, 2 倍量の pH 7.2 のリン酸緩衝液 (PBS) を加えて, ガラスホモジナイザーを用いて均等な浮遊液をつくり, 3,000 r.p.m. 30 分間遠心分離し, その上清を採取した。胆汁はそのまま用いた。

3) **薬剤濃度の測定** : 血漿, 肝, 胆汁および消化管各部位の薬剤濃度は *Bac. subtilis* ATCC 6633 を被検菌とする薄層カップ法により測定した。すなわち, 血漿中濃度は 5 倍稀釈した無処理マウスの血漿による標準曲線から濃度を算定した。肝, 胆汁および消化管各部位の濃度は PBS による標準曲線から濃度を算定した。

実験成績

1. 盲腸内細菌叢の変化

その成績を Fig. 1 に示す。無処置対照群では好気性菌群の菌数は実験ごとに多少の変動がみられ, Exp. III で

Fig. 1 Changes of cecal flora after intravenous injection of various antibiotics^{a)}

- a) Five mg of PCG, ABPC, SBPC, CBPC, CEZ, CER, CET, KM or EM were intravenously injected to mice, twice a day, 5 times in total, respectively. ($n=3$)
- b) For counting anaerobic fusiform bacteria, smears of cecal homogenate were prepared and stained by GRAM's method. Rated as \pm if detectable microscopically on preparations.
- c) In CEZ treated group, two experiments (Exp. III and Exp. V) were performed because there were differences among individuals in the Exp. III.

は *Pseudomonas* が検出されたが、嫌気性菌群および fusiform bacteria の菌数はほぼ一定であった。

PCG 注射群では *Enterobacteriaceae* および *Streptococci* の菌数が著しく増加し、*Lactobacilli* の菌数が減少したが、その他の菌種の菌数に多少の変動がみられた。ABPC 注射群では *Enterobacteriaceae* の菌数が著しく増加したが、*Staphylococci*, *Streptococci* および *Lactobacilli* の菌数は減少した。SBPC および CBPC 注射群では全菌数の著しい減少がみられ、その菌叢は一部の好気性菌群と *Lactobacilli* によって構成された。さらに、上記 4 注射群では fusiform bacteria は検出できなかった。

CEZ 注射群では第 1 回実験 (Exp. III) において *Streptococci* および *Bacteroidaceae* の菌数に著しい個体差がみられたので、第 2 回実験 (Exp. V) を行なった。第 2 回実験においても、それらの菌数に著しい個体差がみられた。両実験成績から、好気性菌群の菌数の変化には一定した傾向がみられなかったが、嫌気性菌群の菌数は減少し、とくに *Bacteroidaceae* の菌数は 2 回の実験ともそれぞれ 1 匹に著しい減少がみられた。また、fusiform bacteria の菌数は減少し、*Bacteroidaceae* の菌数が著しく減少した個体 (計 2 匹) では検出できなかった。CER, CET および KM 注射群では培養可能な盲腸内細菌数に多少の変動がみられ、fusiform bacteria の菌数はやや減少したにすぎなかった。EM 注射群では *Bacteroidaceae* は検出できなかったが、好気性菌群お

よび *Lactobacilli* の菌数には殆んど変化はなく、fusiform bacteria の菌数はやや減少した。なお、Yeasts および *Clostridia* に全例から検出できなかった。

2. 盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化

盲腸内容の揮発性脂肪酸の定量値を Table 1 に示した。無処置対照群では実験ごとに差がみられたが、前実験¹⁾と同様に acetic acid が主成分で $54.4\sim65.9\times 10^{-3}$ $\mu\text{moles/mg}$ 存在し、propionic acid および *n*-butyric acid はそれぞれ $4.0\sim6.6\times 10^{-3}$ $\mu\text{moles/mg}$ および $17.5\sim23.4\times 10^{-3}$ $\mu\text{moles/mg}$ であった。また、iso-butyric acid, iso-および *n*-valeric acid は殆んど検出できなかった。

PCG, ABPC, SBPC および CBPC 注射群では acetic acid の濃度が著しく減少し、propionic acid および *n*-butyric acid は検出できなかった。しかし、これらの 4 注射群には furfural が検出された。

CEZ 注射群では盲腸内細菌叢の変化に個体差がみられたと同様に盲腸内容の揮発性脂肪酸組成にも個体差がみられた。すなわち、fusiform bacteria が検出できなかった 2 匹においては SBPC 注射群における揮発性脂肪酸組成とはほぼ同じパターンを示し、furfural が検出された。その他のマウスでは acetic acid, propionic acid および *n*-butyric acid の濃度が著しく減少した。CER および CET 注射群では acetic acid および propionic acid の濃度が、KM 注射群では acetic acid, propionic acid および *n*-butyric acid の濃度がやや減少した。

Table 1 Effects of intravenous injection of various antibiotics upon volatile fatty acids and furfural contents in the cecum of mice^{a)}
($\times 10^{-3} \mu$ moles/mg of the cecum with their contents)

Exp. No.	Groups	Acetic acid	Propionic acid	n-Butyric acid	Furfural
I	Control	65.9 \pm 6.5 ^{b)}	6.6 \pm 0.9	20.9 \pm 2.0	0
	PCG	29.8 \pm 5.3	0	0	2.3 \pm 0.2
	ABPC	35.5 \pm 5.6	0	0	2.3 \pm 0.1
II	Control	59.3 \pm 3.0	6.3 \pm 0.6	21.2 \pm 5.5	0
	SBPC	20.8 \pm 3.0	0	0	2.2 \pm 0.3
	KM	42.4 \pm 3.0	2.8 \pm 0.5	11.3 \pm 0.9	0
III	Control	60.2 \pm 3.0	5.3 \pm 1.9	23.4 \pm 1.9	0
	CBPC	17.8 \pm 0.1	0	0	1.0 \pm 0.1
	CEZ	32.7 \pm 15.3	1.2 \pm 1.0	5.8 \pm 6.0	0.6 \pm 1.1
IV	Control	54.4 \pm 5.1	4.0 \pm 1.5	17.5 \pm 2.4	0
	CER	40.0 \pm 5.7	2.3 \pm 0.4	17.8 \pm 3.1	0
	CET	45.3 \pm 4.3	2.3 \pm 0.1	16.9 \pm 1.8	0
V	Control	57.2 \pm 4.4	6.1 \pm 0.5	18.6 \pm 4.0	0
	EM	59.2 \pm 5.7	1.9 \pm 0.3	24.4 \pm 6.4	0
	CEZ	45.3 \pm 13.5	2.6 \pm 0.8	9.1 \pm 8.1	trace

a) Five mg of PCG, ABPC, SBPC, CBPC, CEZ, CER, CET, KM or EM were intravenously injected to mice, twice a day, 5 times in total, respectively. All mice were sacrificed at 5 hours after the last injection. ($n=3$)

Iso-butyric, iso-valeric and n-valeric acids were not detected in significant amount in each group.

b) Mean \pm S. D.

EM 注射群では propionic acid の濃度が減少したが、n-butyric acid の濃度はやや増加した。

3. 血漿、肝、胆汁および消化管内薬剤濃度

1) ABPC および CEZ 注射後の薬剤濃度の経時的変化

その成績を Table 2 に示す。血漿中および肝内濃度は

ABPC および CEZ 注射群とも、注射後 1 時間をピークとして漸次低下し、5 時間後には殆んど検出できなかった。

注射後 5 時間における胆汁中濃度は ABPC 注射群では 100 μ g/ml 以上、CEZ 注射群では 88.0 μ g/ml であった。両注射群とも十二指腸内濃度は胆汁中のそれに比し

Table 2 Drug concentrations in plasma, liver, bile and various regions of gastrointestinal tract after intravenous injection of ABPC or CEZ^{a)}
(μ g/g or ml)

	ABPC				CEZ			
	1 hr.	2 hr.	3 hr.	5 hr.	1 hr.	2 hr.	3 hr.	5 hr.
Plasma	6.4	0.6	0.1	<0.1	27.0	2.3	— ^{b)}	—
Liver	3.9	0.6	0.1	—	57.0	1.3	—	—
Bile	NT ^{c)}	NT	NT	>100.0	NT	NT	NT	88.0
Duodenum	NT	NT	NT	0.3	NT	NT	NT	7.2
Middle small intestine	NT	NT	NT	0.6	NT	NT	NT	5.4
Ileum	NT	NT	NT	21.0	NT	NT	NT	11.4
Cecum	—	4.8	9.6	12.0	—	1.4	—	—

a) Five mg of ABPC or CEZ were intravenously injected to mice, twice a day, 5 times in total, respectively. Plasma and tissue samples were obtained from 3 mice at 1~3 hr. and from 7 mice at 5 hr.; the bile was collected from about 20 mice.

b) —, not detected

c) NT, not tested

Table 3 Drug concentrations in plasma, liver, bile and various regions of gastrointestinal tract after intravenous injection of various antibiotics^{a)} ($\mu\text{g/g}$ or ml)

	PCG	SBPC	CBPC	CER	CET	KM	EM
Plasma	<0.1	— ^{b)}	—	—	—	7.0	—
Liver	—	—	—	—	—	—	—
Bile	>100.0	>100.0	>100.0	29.4	7.5	3.6	69.0
Duodenum	9.0	4.5	0.7	1.1	0.3	<0.1	—
Middle small intestine	3.6	4.5	4.1	21.6	2.3	1.3	11.0
Ileum	6.3	28.8	6.3	21.6	0.8	4.8	9.0
Cecum	1.1	>100.0	>100.0	—	—	4.8	11.4

a) Five mg of PCG, SBPC, CBPC, CER, CET, KM or EM were intravenously injected to mice, twice a day, 5 times in total, respectively. All mice were sacrificed at 5 hours after the last injection. Plasma and tissue samples were obtained from 7 mice, the bile was collected from about 20 mice.

b) —, not detected

て低く、回腸にかけて増加する傾向を示した。一方、盲腸内濃度は両注射群とも、注射後2時間に検出された。その後、ABPC注射群では濃度が増加する傾向を示し、5時間後には12.0 $\mu\text{g/g}$ となったが、CEZ注射群では3時間以後には検出できなかった。

2) その他の薬剤の注射後5時間における薬剤濃度

その成績をTable 3に示す。血漿中濃度はPCGおよびKM注射群に検出されたが、その他の薬剤注射群では検出できなかった。また、肝内濃度はいずれの薬剤注射群とも検出できなかった。

胆汁中濃度はPCG, SBPCおよびCBPC注射群では100 $\mu\text{g/ml}$ 以上、CER, CET, KMおよびEM注射群ではそれぞれ29.4, 7.5, 3.6および69.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。各注射群とも十二指腸から回腸までの薬剤濃度は胆汁中濃度比して低濃度であった。盲腸内濃度はPCG注射群では1.1 $\mu\text{g/g}$, SBPCおよびCBPC注射群では100 $\mu\text{g/g}$ 以上、KM注射群では4.8 $\mu\text{g/g}$, EM注射群では11.4 $\mu\text{g/g}$ であったが、CERおよびCET注射群では検出できなかった。

考 察

本実験においてはマウスに抗生物質を静脈内注射し、盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成におよぼす影響について検討した。経口投与実験¹⁾と比較すると、同一薬剤でも投与方法によりそれらの変化に差がみられた。すなわち、ABPC注射群において *Enterobacteriaceae* の菌数が著しく増加したほかは好気性菌群の菌数には投与方法による差がみられなかった。PCGおよびABPC注射群では嫌気性菌群の菌数、EM注射群では *Lactobacilli* の菌数が経口投与において認められたほど著しく減少しなかった。fusiform bacteria におよぼす影響には投与方法による差を認めなかった。一方、盲腸内

容の揮発性脂肪酸組成の変化を経口投与での変化と比較すると、PCGおよびABPC注射群では acetic acid の濃度が高かったほかはほぼ同一のパターンを示し、とくに furfural は両投与方法において検出された。しかし、EM注射群では *n*-butyric acid の濃度が増加したが、その程度は経口投与よりも少なかった。両投与方法にみられたこれらの変化の差は盲腸内薬剤濃度の差に起因すると思われる。すなわち、静脈内注射した薬剤が胆汁を介して消化管内に入るため、盲腸内薬剤濃度が経口投与に比して著しく低いことが原因と推察される。

マウスに静脈内注射した抗生物質の体液内および組織内有効濃度の高さおよびその維持時間は薬剤の種類によって異なる³⁾。また、薬剤の種類によっては盲腸内において分解されることも報告されている⁴⁾。本実験においても、静脈内注射後の盲腸内濃度は薬剤の種類によってピークとなる時間が異なり、注射後5時間において、SBPCおよびCBPC注射群では高濃度存在したが、CEZ, CERおよびCET注射群では検出できなかった。一方、供試した薬剤はそれぞれ抗菌スペクトラムを異にし^{2,5)}、とくにマウスにおける経口投与実験で fusiform bacteria に対して PCG^{1,6,7)} および ABPC^{1,8)} は抗菌力を示すが、EM^{1,9)} は抗菌力を示さない。その他の薬剤の本菌に対する抗菌力は明らかでない。これらの事実から、抗生物質の静脈内注射後にみられる盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化は経口投与の場合と同様に薬剤の種類によって異なるものと思われる。なお、CEZ注射群では盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化に著しい個体差がみられた。本実験では盲腸内薬剤濃度を個体別に検索しなかったため、それらの個体差が盲腸内薬剤濃度の個体差によるかは明らかでない。

本実験においても、fusiform bacteria が検出できなかった群、すなわち、PCG, ABPC, SBPC および CBPC 注射群のマウスおよび CEZ 注射群の一部のマウスの盲腸内容には furfural が検出された。一方、fusiform bacteria が検出された群、すなわち、CEZ 注射群の残りのマウスおよび CER, CET, KM および EM 注射群のマウスの盲腸内容には furfural は検出されなかった。本実験成績および前実験成績¹⁾から、furfural の産生は嫌気性菌群、とくに *Lactobacilli* の菌数の減少と fusiform bacteria の消失に相関するものと思われる。これらの相関関係を明らかにするためには germ free mice に各菌種を単一または混合投与し、盲腸内細菌叢の変化と盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化とを検索することが必要と考える。

総 括

PCG, ABPC, SBPC, CBPC, CEZ, CER, CET, KM および EM をそれぞれ 5 mg ずつ、1 日 2 回 (朝, 夕)、計 5 回、Slc : ddY マウスに静脈内注射し、最終注射後 5 時間にマウスを屠殺し、盲腸内細菌叢の変化および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化を調べた。

(1) PCG 注射群では *Enterobacteriaceae* および *Streptococci* の菌数が、ABPC 注射群では *Enterobacteriaceae* の菌数がそれぞれ著しく増加したが、両注射群とも *Lactobacilli* の菌数は減少した。SBPC および CBPC 注射群では全菌数の著しい減少がみられた。これらの 4 薬剤注射群ではいずれも fusiform bacteria は検出できなかった。4 薬剤注射群とも、acetic acid の濃度は著しく減少し、propionic acid および *n*-butyric acid は検出できなかったが、furfural が検出された。

(2) CEZ 注射群では盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化に著しい個体差がみられ、一部のマウスにおいては SBPC 注射群におけるそれらの変化とほぼ同一のパターンを示すものもあった。CEZ 注射群のその他の個体、CER, CET および KM 注射群では培養可能な盲腸内細菌数に変動がみられ、fusiform bacteria の菌数はやや減少した。CEZ 注射群では acetic acid, propionic acid および *n*-butyric acid の濃度が著しく減少した。CER および CET 注射群では acetic acid および propionic acid の濃度が、KM 注射群では acetic acid, propionic acid および *n*-butyric acid の濃度がそれぞれやや減少した。一方、EM 注射群では *Bacteroidaceae* は検出できなかったが、fusiform bacteria の菌数はやや減少した。propionic acid の濃度は減少したが、*n*-butyric acid の濃度はやや増加した。

(3) 抗生物質の静脈内注射後にみられた盲腸内細菌叢および盲腸内容の揮発性脂肪酸組成の変化の差は静脈

内注射後の盲腸内薬剤濃度の差およびそれらの抗菌スペクトラムの差によるものと思われる。

(4) 本実験成績と経口投与実験 (前実験) 成績から furfural の産生は嫌気性菌群、とくに *Lactobacilli* の菌数の減少と fusiform bacteria の消失に相関するものと思われる。

(本報告の要旨は第 26 回日本化学療法学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 今井章浩, 森下けい子: マウスの盲腸内細菌叢と盲腸内容の揮発性脂肪酸組成におよぼす各種抗生物質投与の影響。I。経口投与による影響。Chemotherapy 26 : 345~350, 1978
- 2) 中沢昭三: 抗生物質の基礎知識, 1971, 南山堂 (東京)
- 3) 戸辺健介, 西野武志, 中沢昭三: 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析。7。大腸菌に対する Cefoxitin の効果。Chemotherapy 26 (S-1) : 100~119, 1978
- 4) ROSS, G. W. ; M. J. DAVIES, S. M. KIRBY & D. M. RYAN : Degradation of selected cephalosporins by homogenates of the alimentary tract of rats. J. Med. Microbiol. 3 : 511~519, 1970
- 5) 上野一恵: 嫌気性菌の分類と薬剤感受性。Chemotherapy 26 : 66~71, 1978
- 6) LEE, A. & E. GEMMELL : Changes in the mouse intestinal microflora during weaning : Role of volatile fatty acid. Infect. Immun. 5 : 1~7, 1972
- 7) IMAI, A. : Fecal flora and cecal weights in mice given validamycin A. Exp. Animals 23 : 215~224, 1971
- 8) SCHAEGLER, R. W. : Gut microflora and nutrition in the non-ruminant. The relationship between the host and its intestinal microflora. Proc. Nutr. Soc. 32 : 41~47, 1973

EFFECTS OF VARIOUS ANTIBIOTICS ON THE BACTERIAL FLORA
AND VOLATILE FATTY ACID COMPOSITION
IN CECAL CONTENTS OF MICE. II

Intravenous Injection

AKIHIRO IMAI and KEIKO MORISHITA

Biological Research Laboratories, Central Research Division,
Takeda Chemical Industries, Ltd.

Five mg of benzylpenicillin (PCG), ampicillin (ABPC), sulbenicillin (SBPC), carbenicillin (CBPC), cefazolin (CEZ), cephaloridine (CER), cephalothin (CET), kanamycin (KM) or erythromycin (EM) were intravenously injected to mice, twice a day, five times in total, respectively. All mice were sacrificed at five hours after the last injection. The microflora and volatile fatty acid composition in cecal contents were examined by selective culture and gas chromatographic analysis.

(1) The number of *Enterobacteriaceae* and *streptococci* in PCG treated mice and the number of *Enterobacteriaceae* in ABPC treated mice were markedly increased with a concomitant decrease in the number of *lactobacilli*. On the other hand, in SBPC and CBPC treated mice, the number of culturable bacteria was markedly decreased. Fusiform bacteria could not be detected in these four groups. Acetic, propionic and *n*-butyric acids were markedly decreased and furfural was detected in these four groups.

(2) In CEZ treated mice, there were considerable differences in microflora and fatty acid composition among individuals: some mice showed patterns very similar to those observed in SBPC treated mice; while others showed decreased in the number of culturable cecal bacteria and fusiform bacteria and in concentration of acetic, propionic and *n*-butyric acids. In CER, CET or KM treated mice, the number of culturable cecal bacteria and fusiform bacteria tended to decrease. There was no considerable alteration in the concentration of these volatile fatty acids in comparison with those of the untreated control.

On the other hand, in EM treated mice, *Bacteroidaceae* was detected and the number of fusiform bacteria was slightly decreased. The concentration of propionic acid was decreased, but *n*-butyric acid was slightly increased. Furfural was detected only in some of CEZ treated mice.

(3) Changes in the microflora and volatile fatty acid composition in cecal contents of mice after intravenous injection of various antibiotics appear to be resulted from the differences in the drug concentrations of cecal contents and in antibacterial spectrum of these drugs.

(4) From these findings and the results of orally administered experiments (previous experiments), marked decrease in the number of anaerobic bacteria, especially of *lactobacilli* and a disappearance of fusiform bacteria appear to result in production of furfural.