

マウス糞便菌叢および盲腸重量に対する AB-206 の影響

並木信重郎・杉田和彦・山岸三千男

神郡邦男・大村貞文・田中一郎

大正製薬株式会社総合研究所

AB-206 はグラム陰性、および陽性菌に対して広い抗菌スペクトラム¹⁾を有する、経口で有用な合成抗菌剤である。経口投与が可能な抗生剤はその多くが、腸内菌叢の主要細菌である嫌気性菌に対して抗菌作用を有しており、そのため抗生剤の経口投与が、腸内細菌叢に変化を与え、下痢その他の障害を与えることが少なくない。そこで合成抗菌剤である AB-206 の連続経口投与が、マウスの腸内菌叢に変化を与えるかどうかを、盲腸内菌叢と菌叢が同一であるといわれている²⁾、糞便内菌叢を検討することにより調べた。また、AB-206 の連続経口投与が、マウス盲腸重量に及ぼす影響についても検討した。

I. 実験方法

マウス：ddY マウス (SPF) (静岡農協由来)、生後 4 週齢、♂、体重 18~21g、1 群 4 匹とした。床敷は鮑屑を用い、週 3 回交換した。飲水は水道水を、飼料は MF-固型飼料を自由に与えた。なお、水道水および飼料は滅菌せずに用いた。

薬剤投与方法：AB-206, Nalidixic acid (NA), Ery-

Table 1 Selective medium of organisms from fecal flora of mice and incubation method

Organism	Medium	Incubation
Aerobic		
<i>Staphylococci</i>	Mannitol Salt Agar (Eiken)	37°C, aerobic 48 hr
<i>Streptococci</i>	Azide Blood Agar (Difco)	37°C, aerobic 48 hr
	EF-medium (Nissan)	37°C, aerobic 48 hr
<i>Enterobacteriaceae</i>	DHL Agar (Eiken)	37°C, aerobic 48 hr
	Mac Conkey Agar (Eiken)	37°C, aerobic 48 hr
<i>Pseudomonas</i>	NAC Agar (Eiken)	37°C, aerobic 72 hr
Yeast	Potato Dextrose (Eiken)	37°C, aerobic 48 hr
Anaerobic		
<i>Bacteroidaceae</i>	Bacteroides medium (Nissan)	37°C, anaerobic 48 hr
<i>Clostridia</i>	CW Agar (Nissan)	37°C, anaerobic 72 hr
<i>Lactobacilli</i>	LBS medium (BBL)	37°C, anaerobic 48 hr

thromycin (EM) の所定量を 0.5%-CMC (carboxy methyl cellulose) に懸濁し、その 0.2 ml をゾンデを用いて、1 日 2 回、10 日間経口により注入した。

一般症状の観察：薬剤投与中、投与後の観察として、1 群 4 匹のマウスは毎朝、ただし薬剤投与期間中は薬剤投与前に、体重を測定するとともに、一般症状とくに糞便の状態について観察した。

糞便菌叢の検索：糞便は薬剤投与前日、投与 1 日、5 日、10 日後および投与中止後 5 日、11 日目 (薬剤投与期間中は投与前に) に採取した。採取方法は各々マウスの肛門を刺激することにより、直接排泄される糞便を、各々のマウスあたり 2~3 個採取した。糞便を秤量後、滅菌乳鉢に入れ、100 倍量の希釈液 (KH_2PO_4 4.5g, Na_2HPO_4 0.4g, 塩酸シスチン 1.0g, Tween-80 1.0g, 寒天 1.0g, 蒸留水 1,000ml, pH 7.0) を加えて十分に磨砕し、均一の希釈液にした。この希釈液を連続的に 10 倍希釈し、その希釈液の 0.1ml を Table 1 に示した培地上に、コンラージ法により塗抹し、一定時間培養後、各培地上のコロニー数を測定し、糞便 0.1g 中の生菌数に換算して表わした。

それぞれの分離培地上に生育した細菌は、グラム染色後の形態観察、および一部は生理試験によって、当該菌であることの確認を行なった。また、嫌気性菌の培養は、Gas-Pak jar (BBL) および TE-HER ANAERO BOX AZ-155 (平沢製作所) を用いて行なった。

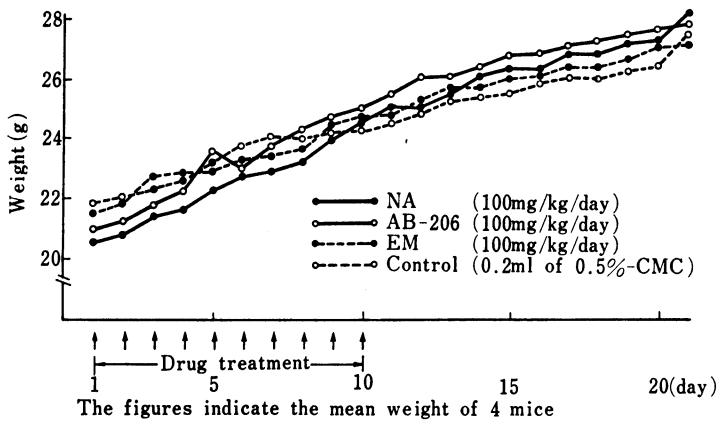
盲腸重量の測定：糞便の検査と同じ時点に、各群から任意にマウスを 4 匹抜き取り、エーテル麻酔により屠殺後、直ちに開腹し、盲腸を取り出し、内容物とともに秤量して湿重量とした。その後 37°C で 48 時間乾燥し、乾燥重量を測定後、(乾燥重量/湿重量)×100 で数値を表わし、この値と対照の薬剤無投与群の値を比較することにより、薬剤の腸内菌叢に対する影響を検討した。

糞便中の *Enterobacteriaceae* の同定：糞便中の *Enterobacteriaceae* は DHL 寒天培地、および Mac Conkey 寒天培地で分離後、グラム染色による形態観察、および API 解析システム (アスカ純薬(株)) により同定を行なった。

II. 実験成績

一般症状：Fig. 1 に示すように、AB-206, NA, EM 投

Fig.1 Changes of body weight



与群ともに対照群に比べて、体重増加に変化は認められず、また、糞便はEM投与群でやや軟便が認められるときがあったが、全体的に対照群との間に変化は認められなかった。

糞便菌叢の変化：AB-206投与群 (Fig. 2), NA投与群 (Fig. 3) は同様な傾向を示し、薬剤投与により *Enterobacteriaceae* のみが減少し、他の細菌叢には影響は認められなかった。また、薬剤投与中止後5日目に、*Enterobacteriaceae* の回復が認められた。また、*Pseudomonas*, Yeast は観察した全例から検出されなかった。一方、対照においたEM投与群ではFig. 4に示すように、嫌気性菌とくに *Bacteroides* の減少が顕著であり、また、*in vitro* の抗菌性を反映して、*Staphylococcus* が減少し、一方では *Enterobacteriaceae* の若干の増加が認められた。しかし投与中止により菌叢は投与前と同様な状態に復した。

盲腸重量の変化：各検査時における盲腸の肉眼的所見では、AB-206, NA, EM投与群ともに対照群との間に変化はなかった。盲腸重量の変化はTable 2に示したように、AB-206, NA, EM投与群、および対照群の4群の間に差は認められず、これら4群の盲腸湿重量は発育に伴い、自然増加が見られその体重比は1.5~2.0%であった。また、AB-206, NA, EM投与群と対照群の乾燥重量の湿重量に対する比はほぼ等しかった。

AB-206投与による糞便内 *Enterobacteriaceae* の変動：Fig. 2に示したように、AB-206の糞便内菌叢に対する影響は、*Enterobacteriaceae* にのみ認められた。そこでAB-206の各濃度別投与により、いかなる影響が現われるか、*Enterobacteriaceae* の菌数の変動、species間での変動の有無、耐性菌の出現頻度について検討した。なお、分離した *Enterobacteriaceae* はAPI 20 E (Analytab Products Inc., Plainview, New York) を用いて同定した。結果はTable 3に示したように、AB-

206の10日間連続投与において、50 mg/kg/dayではほとんど影響は認められず、75 mg/kg/dayでは投与3

Fig.2 Effect of AB-206 on the fecal flora of mice

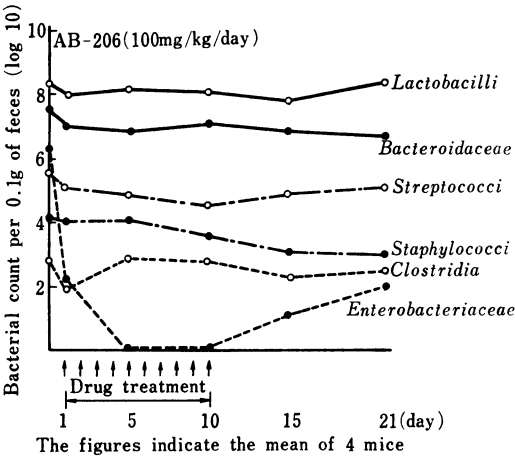


Fig.3 Effect of nalidixic acid on the fecal flora of mice

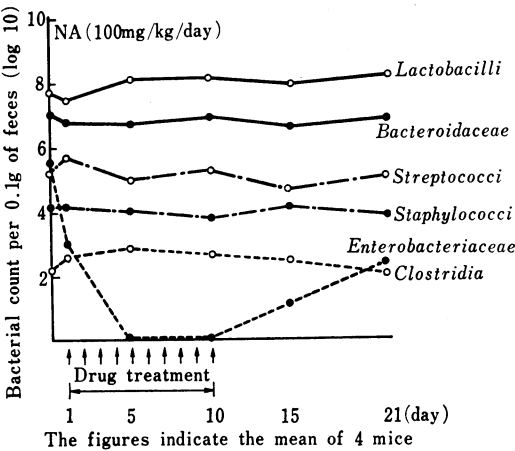


Table 2 Wet and dry weights of the cecum with their contents in AB-206, nalidixic acid or erythromycin treated mice

Group	Days on treatment									Days after treatment		
	2			5			7			7		
	Wet weights (mg)	Dry weights (mg)	Dry weights/Wet weights	Wet weights (mg)	Dry weights (mg)	Dry weights/Wet weights	Wet weights (mg)	Dry weights (mg)	Dry weights/Wet weights	Wet weights (mg)	Dry weights (mg)	Dry weights/Wet weights
Control	624	156	25.0 (%)	684	156	22.8 (%)	714	176	24.6 (%)	698	164	23.5 (%)
AB-206	628	162	25.8	692	172	24.9	724	182	25.1	726	178	24.5
NA	702	176	25.1	652	154	23.6	690	168	24.3	704	172	24.4
EM	652	153	23.5	678	168	24.8	682	162	23.8	714	167	23.4

AB-206, NA or EM was administrated at the concentration of 100 mg/kg/day. The figures indicate the mean of 4 mice per group.

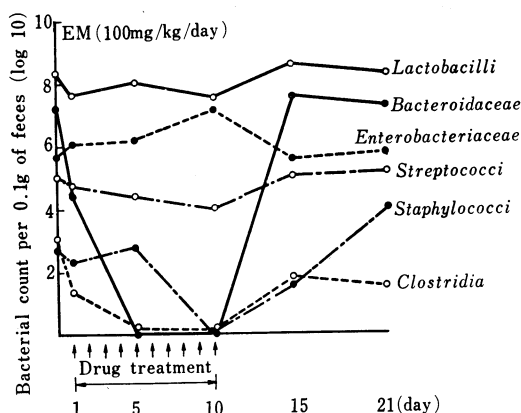
Table 3 Changes of *Enterobacteriaceae* of fecal flora during and after oral administration of AB-206. Bacterial counts per 0.1g of feces (log 10)

Day	Control	10mg/kg/day	25	50	75	100	150
0	4.87	4.53	6.70	4.56	5.46	4.78	4.11
1	4.72	5.43	4.46	4.15	4.29	3.89	3.93
3	6.70	6.15	4.41	4.23	3.58	2.40	0
5	4.40	6.95	4.20	4.20	3.49	0	0
7	5.68	5.90	5.00	4.93	2.40	0	0
10	5.30	4.65	4.83	3.62	2.41	0	0
13	4.59	5.18	4.76	3.78	3.40	0	0
15	4.20	4.92	4.41	4.41	4.36	3.20	0
24	5.08	5.08	4.64	4.23	4.40	2.90	2.78

Control (0.2 ml of 0.5%-CMC)

The figures indicate the mean of 4 mice.

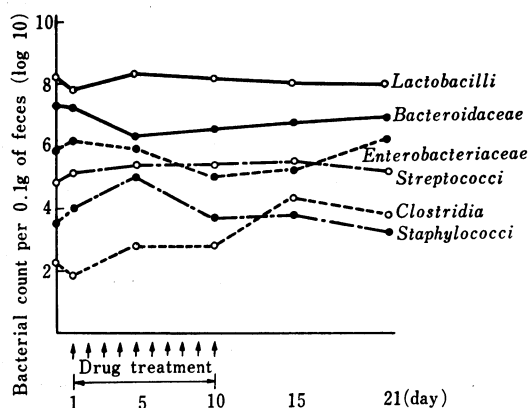
Fig.4 Effect of erythromycin on the fecal flora of mice



The figures indicate the mean of 4 mice

日目から若干の菌数の低下が認められた。また、100mg/kg/day では5日目に、150 mg/kg/day では3日目に、

Fig.5 Effect of 0.5%-CMC (control) on the fecal flora of mice



The figures indicate the mean of 4 mice

完全に糞便内の *Enterobacteriaceae* は消失した。しかし AB-206 の投与を中止することにより、菌叢は回復することが認められた。一方、分離した *Enterobacteriaceae* の species 間の変動について検討を行なったが、AB-206 投与前、投与期間中、投与後において特徴的な変動は認められなかった。

III. 考 察

抗生物質をマウスに経口で連続して与えると、薬剤の種類、濃度、および期間によっては腸内菌叢に影響を与え、そのため盲腸が膨大化し、軟便を排泄することが認められている^{3)~6)}。とくにその薬剤が経口投与で使用される場合には、腸内菌叢に影響を与えないことが望ましく、もし影響を与えたとしても、投与中止後速やかに菌叢が回復することが望ましい。AB-206 は *in vitro* の抗菌試験で、一部のグラム陽性菌およびほとんどすべてのグラム陰性菌に対して抗菌作用を有するが¹⁾、嫌気性菌に対しては *Clostridium*, *Veillonella* を除いて、抗

菌作用を有さない経口薬剤である。

糞便菌叢は盲腸内菌叢を反映しているといわれているため、本薬剤のマウス経口投与による、糞便中の菌叢の変化を検討することにより、AB-206 の腸内菌叢に与える影響を検討した。AB-206 を 100 mg/kg/day の割合で、マウスに 10 日間連続経口投与し、腸内菌叢に対する影響を検討した結果、Fig.2 に示すように、AB-206 は *in vitro* で強い抗菌活性を示す *Enterobacteriaceae* にのみ影響を与え、検討した他の細菌に対しては、影響を与えなかった。また、AB-206 が抗菌活性を示す、*Staphylococcus* に対しては影響が認められなかった。これは AB-206 が腸管下部では、*Enterobacteriaceae* には抗菌活性を示すが、*Staphylococcus* には活性を示さない、代謝物 M-1⁷⁾ に変化したためと考えられる。また、腸内菌叢の主要な細菌である嫌気性菌に対しても、*in vitro* と同様全く影響を与えないということは、AB-206 の経口薬剤としての、1つのすぐれた特徴を表わしているものと考えられる。

AB-206 の連続投与により、*Enterobacteriaceae* の species 間に変動が生じたり、耐性菌が出現するか否か、投薬を中止することにより、菌叢が元に戻るかどうかは重要な問題である。そこでこの点について検討を行なったが、AB-206 の高濃度連続投与により消失した *Enterobacteriaceae* も、その投与中止により元にもどり、また、とくに species 間の変動も認められず、耐性菌も検討した範囲では認められなかった。これはマウスの場合、抗生剤の連続投与による耐性菌の出現が、他の動物(豚、馬、鶏など)に比べて少ない⁸⁾ということもあるが、AB-206 が *in vitro* での耐性獲得試験でも NA と異なり、耐性度が *Escherichia coli* では 25 μ g/ml、*Proteus vulgaris* では 12.5 μ g/ml までしか上昇しない¹⁾という報告に見られるように、耐性を取りにくい薬剤であることを表わしているものと思われる。

AB-206 の連続投与により菌交代症が起り、*Pseudomonas*、*Yeast* などが増加するか否かを検討したが、AB-206 の経口投与は、腸管内で非常に少ない割合を占める、*Enterobacteriaceae* に対してのみ影響を与えるためか、検討した範囲でこれらの菌の増加は認められなかった。

マウスに抗生剤を投与した際に認められる、盲腸の膨大と盲腸内菌叢の変化との関係については、fusiform bacteria が関係しており、fusiform bacteria の減少が、盲腸粘膜での水の転送機構を阻害して、盲腸を膨大化させるといわれている⁴⁾。そこで、AB-206 の連続投与が、この現象に関係しているか否かを検討するため、今井の方法⁹⁾に従って実験を行なった。その結果、*in*

vitro の抗菌試験の結果を反映して、AB-206 の連続投与による盲腸の肥大は認められなかった。このことは AB-206 の投与が盲腸内の嫌気性菌に、影響を与えていないことを示している。また、AB-206 の 100mg/kg/day 10 日間連続投与において、マウスの一般症状として、体重減少、下痢症状(軟便)は認められず、このことは盲腸重量に対して影響を与えなかった(湿重量は増加しなかった)という、実験結果と合致するものと考えられる。

以上述べたように、AB-206 の経口投与は、腸管内の主要細菌である嫌気性菌に影響を与えず、好気性の *Enterobacteriaceae* にのみ影響を与えるが、投与中止によって菌叢は元に戻った。このことから AB-206 は腸管菌叢に対して影響の少ない薬剤であると考えられる。

IV. 結 語

AB-206 の経口投与が、腸内菌叢に与える影響を検討するために、マウスに AB-206 を経口投与し、糞便中菌叢の変動、とくに *Enterobacteriaceae* への影響、および内容物を含む盲腸重量への影響について検討した。

1) AB-206 の 100 mg/kg/day 10 日間連続投与により、マウス糞便内の *Enterobacteriaceae* のみが減少した。しかし薬剤投与中止により、菌叢は元に戻った。

2) AB-206 の連続投与により、マウス糞便中 *Enterobacteriaceae* への影響を検討したが、とくに投与による species の変動、耐性菌の出現は認められなかった。

3) 盲腸の湿潤重量は AB-206 投与により増加せず、AB-206 が腸内の嫌気性菌に影響を与えないことを示していた。

4) AB-206 のマウスへの 100 mg/kg/day 10 日間連続投与による体重の減少は認められず、また下痢症状(軟便)も認められなかった。

以上、要約すると、AB-206 のマウスへの連続経口投与は、腸内細菌叢のほとんどの細菌に影響を与えず、わずかに *Enterobacteriaceae* のみに影響を与えるが、それも投与中止により菌叢は元に戻し、腸内細菌叢への影響の少ない薬剤と判断される。

文 献

- 1) 三橋進: 第 24 回日本化学療法学会東日本支部総会新薬シンポジウム AB-206 抗菌力, 札幌, 1977
- 2) DRASAR, B. S. & M. J. HILL: Human Intestinal Flora. 43. 1974. Academic Press (London)
- 3) DUBOS, R.; R. W. SCHAEDELER & M. STEPHENS: The effect of antibacterial drugs on the fecal flora of mice. J. Exp. Med. 117: 231~243, 1963
- 4) SAVAGE, D. C. & J. S. MCALLISTER: Cecal enlargement and microbial flora in suckling mice given antibacterial drugs. Infection and

- Immunity 3 : 342~349, 1971
- 5) SAVAGE, D. C. & R. DUBOS : Alterations in the mouse cecum and its flora produced by anti-bacterial drugs. J. Exp. Med. 128 : 97~110, 1968
- 6) SCHAEGLER, R. W. : The relationship between the host and its intestinal microflora. Proc. Nutr. Soc. 32 : 41~47, 1973
- 7) 柴田清人 : 第 24 回日本化学療法学会東日本支部
総会新薬シンポジウム AB-206 吸収・排泄・体内分布および代謝, 札幌, 1977
- 8) 田嶋嘉雄 : 各種動物における抗生物質耐性菌の出現検索, ならびにマウスについての抗生物質投与実験。日獣会誌 21 : 277~287, 1968
- 9) IMAI, A. : Fecal flora and cecal weights in mice given Validamycin A. 実験動物 23 : 215~224, 1974

EFFECT OF AB-206 ON FECAL FLORA AND CECAL WEIGHTS IN MICE

SHINJURO NAMIKI, KAZUHIKO SUGITA, MICHIO YAMAGISHI, KUNIO KANGOURI,
SADAFUMI OHMURA and ICHIRO TANAKA
Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.

This study was undertaken to compare the changes of the fecal microflora and increase of cecal weights of mice following the oral administration of AB-206, nalidixic acid and erythromycin at 50 mg/kg twice daily for 10 days. The numbers of aerobic and anaerobic bacteria except *Enterobacteriaceae* of fecal microflora were not changed by the administration of AB-206 and the recovery of normal microflora was observed over the administration period. The appearance of resistant strain and increase of cecal weights in mice were not detected by the oral administration of AB-206.