

AM-715 経口投与時のマウス糞便菌叢におよぼす影響

村山 哲・阿部 泰夫・入倉 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

AM-715 を連続経口投与することによって生ずる腸内菌叢および盲腸重量に与える影響を、マウスを用いて検討した。

AM-715 を 50, 100, 200 mg/kg 1 日 1 回, 50, 100 mg/kg を 1 日 2 回, 50 mg/kg を 1 日 3 回, 各々マウスへ 10 日間連続経口投与すると, マウス糞便中の *Enterobacteriaceae* のみ減少消失したが, 投与を中止すると 11~20 日以内に元の菌数にまで回復した。*Enterobacteriaceae* の species の変動(種)は認められず, 耐性菌も出現しなかった。検討した範囲で, 他菌叢への影響はなく, AM-715 投与による体重の減少ならびに下痢症状もみられなかった。

Gentamicin, erythromycin, cephalixin および carbenicillin と AM-715 との, 7 日間連続併用投与において, 糞便菌叢に対する影響は, 両剤の菌に対する影響の相加は認められたが, 菌叢の大きなパターンの変動は認められなかった。

AM-715 を 100 mg/kg 10 日間連続投与しても盲腸の湿重量の増加は認められなかった。

AM-715 はグラム陽性菌, 陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有する経口剤である¹⁾。一般に抗菌剤を経口的に投与すると, 腸内細菌叢に影響を与えて消化管機能異常をもたらし, 下痢を生ずる可能性や盲腸肥大等の障害を生ずることもあり得る。腸内細菌叢と糞便菌叢は同一といわれているので²⁾, AM-715 をマウスに連続経口投与して, 糞便菌叢および盲腸重量にどのような変化を与えるか検討した。

I. 実験材料および方法

1. マウス

ddY 系雄性マウス (SPF, 静動協) 生後約 5 週齢, 体重 25~28 g を用いた。1 群 3 匹とした。床敷はホワイトフレーク (オリエンタル酵母) を使い, 週 2 回交換した。飲水は水道水, 飼料は CA-1 固型飼料 (日本クレア) を自由に与えた。床敷, 水道水および飼料は滅菌せずに用いた。温度 22±2°C, 湿度は 60±5% の条件下で飼育した。

2. 薬剤および投与方法

AM-715, erythromycin (EM, 大日本製薬) および cephalixin (CEX, 塩野義製薬) は 0.5% carboxymethyl cellulose に懸濁し, 経口投与した。carbenicillin (CBPC, 藤沢薬品) および gentamicin (GM, 塩野義製薬) は筋肉内に注射した。

AM-715 の投与群は, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/kg を各々 1 日 1 回, また, 50, 100 mg/kg を 1 日 2 回, さらに 50 mg/kg を 1 日 3 回の合計 8 群とし, 投与期間は 10

日間連続とした。GM, CEX, EM および CBPC は 100 mg/kg を 1 日 1 回, 7 日間連続投与した。また, これらの薬剤と AM-715 との併用の場合は, 各々 100 mg/kg を 1 日 1 回, 7 日間併用投与した。

3. 薬剤投与後の動物の観察

毎朝, 投与前にマウスの体重を測定するとともに, 一般症状, とくに糞便の性状を観察した。

4. 糞便菌叢の検索

前島らのマウス糞便菌叢培養法³⁾ および COWAN and STEEL の方法⁴⁾ に準じ, Table 1 に示したように各菌群の Family または Genus を同定した。糞便中の生菌数の測定は AM-715 投与群の場合, 投与前, 投与 3 日後, 6 日後および投与中止 1 日後, 5 日後, 11 日後に, また GM, EM, CEX, CBPC の単独投与および, これらの薬剤と AM-715 との併用の場合は, 投与前, 投与 4 日後および投与中止 1 日後, 4 日後, 6 日後に各マウスの肛門から排泄される糞便 1~2 ケを直接採取した。糞便の性状を観察すると共に, これらを秤量後, 滅菌乳鉢に入れ, 100 倍量の希釈液⁵⁾を加え十分に磨砕し均一の液にした。さらにこれを希釈液で適当に希釈し, Table 1 に示す培地に塗布した。一定時間培養後, コロニー数を測定して, 糞便 0.1 g 中の生菌数に換算して表わした。嫌気性菌の培養は, Gas-Pak jar (BBL) を用いて同様に行なった。

5. 糞便中の *Enterobacteriaceae* の同定および MIC の測定

糞便中の *Enterobacteriaceae* は DHL- 寒天培地で分

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

Organism	Medium	Incubation
Aerobic		
<i>Enterobacteriaceae</i>	DHL-agar (E)	37° 48 hr
<i>Staphylococci</i>	Mannitol salt agar (E)	37° 48 hr
<i>Streptococci</i>	SF-medium (E)	37° 72 hr
Yeast	Potato dextrose (N)	37° 48 hr
<i>Pseudomonas</i>	NAC-agar (E)	37° 48 hr
Anaerobic		
<i>Bacteroidaceae</i>	Bacteroides medium (N)	37° 48 hr
<i>Lactobacilli</i>	LBS-medium (BBL)	37° 48 hr

(E): Eiken (N): Nissan

離後、グラム染色、形態観察さらに API 解析システム (アスカ純薬) で同定した。

MIC は日本化学療法学会標準法⁵⁾ によって測定した。

6. 盲腸重量の測定

糞便の検査と同時に、各群より任意にマウス 3 匹を抜き取り、開腹し、盲腸を採取した。内容物とともに秤量し、湿重量とした。その後 37°C で 2 日間乾燥し、乾燥重量とした。

II. 実験結果

1. 一般症状

各群の体重増加は無投薬対照群と同様であり、糞便の異常は EM および CBPC 群にやや軟便が認められる程度であり、AM-715 群には異常は認められなかった。

2. 糞便菌叢の変化

無処置対照群の糞便中の菌数は Fig. 1 に示したようにほぼ一定であった。

AM-715 を 50, 100, 200 mg/kg, 1 日 1 回 10 日間連続投与した場合の菌叢の変化は、それぞれ Fig. 2, 3 および 4 に示したように、50 mg/kg/day 投与群から *Enterobacteriaceae* の減少が 3 日目より認められた。AM-715 を 50 mg/kg 1 日 2 回および 3 回、100 mg/kg を 1 日 2 回の 10 日間連続投与による菌叢の変化は、それぞれ Fig. 5, 6 および 7 に示したように、1 回投与と同様 *Enterobacteriaceae* の減少が認められた。

AM-715 の各投与量毎の *Enterobacteriaceae* の消失および投与中止後の回復は Table 2 にまとめて示したように、12.5 mg/kg を 1 日 1 回連続投与では多少菌数は減

少するが、投与中止後 1 日で正常レベルまで回復した。1 日の投与回数も異なっても 1 日の投与量が 25 mg/kg 以上になると、投与開始後 2~3 日で菌が消失(検出限界以下)した。また、いずれの投与量でも投与中止後 11 日目では菌は検出されたが、正常レベルに戻るまでに 11~20 日かかった。

AM-715 のいずれの投与群でも、*Lactobacilli*, *Bacteroidaceae*, *Streptococci* および *Staphylococci* 群の菌数は変動しなかった。また、*Pseudomonas* および *Yeast* は投与前、投与中および投与中止後のいずれにも検出されなかった。

GM, EM, CEX および CBPC を各々 100 mg/kg 1 日 1 回 7 日間連続投与および、これらと AM-175 (100 mg/kg) との同様日数併用投与時の菌数の変化は Fig. 8, 9, 10 および 11 に示した。対照薬剤単独では、GM は *Enterobacteriaceae*, EM は *Bacteroidaceae*, CBPC は *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae* および *Staphylococci* の減少が認められたが、CEX ではいずれの菌も変化が認められなかった。AM-715 にこれらの薬剤を併用すると、AM-715 の菌叢の変化と、併用した各薬剤の菌叢の変化が相加的に作用することが認められたのみで、大きなパターンの変化は生じなかった。

AM-715, 50 mg/kg を 1 日 1 回 10 日間連続投与した群の、投与前および投与中止後 20 日目の菌数測定時に検出されたコロニーをそれぞれ任意に 10ヶ取り出し、species を検索し、さらに MIC 値を測定した。その結果は Table 3 に示したように、species にほとんど変化なく耐性菌も出現しなかった。

Fig. 1 Effect of 0.5% CMC (control) on the fecal flora of mice

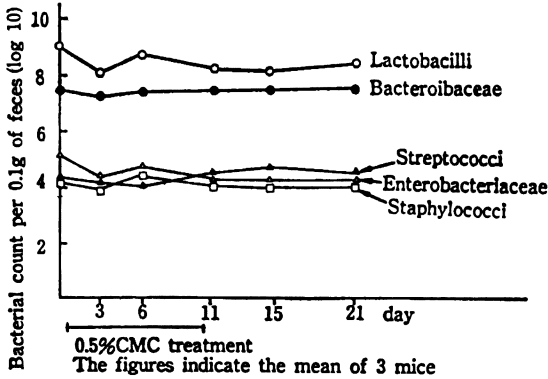


Fig. 2 Effect of AM-715 on the fecal flora of mice

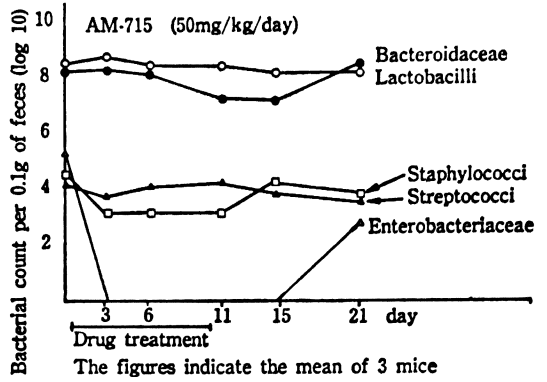


Fig. 3 Effect of AM-715 on the fecal flora of mice

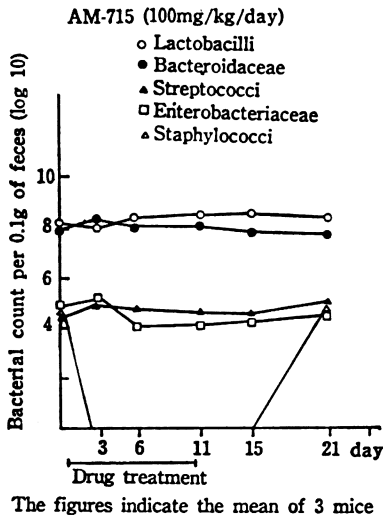


Fig. 4 Effect of AM-715 on the fecal flora of mice

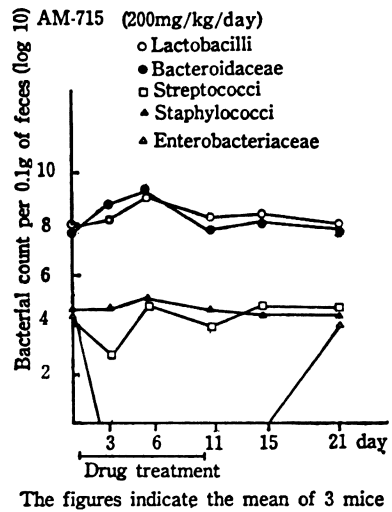


Fig. 5 Effect of AM-715 on the fecal flora of mice

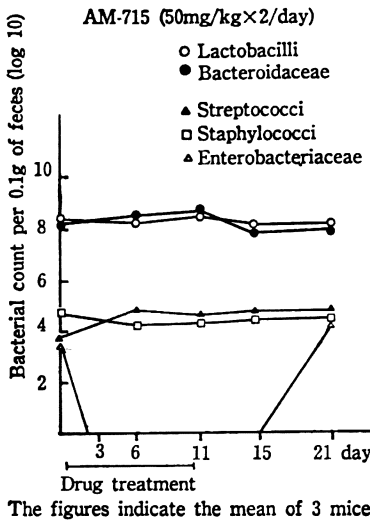


Fig. 6 Effect of AM-715 on the fecal flora of mice

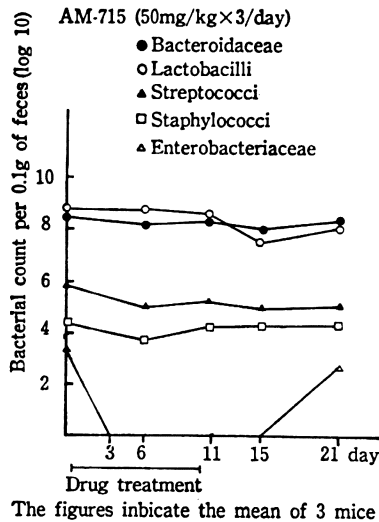
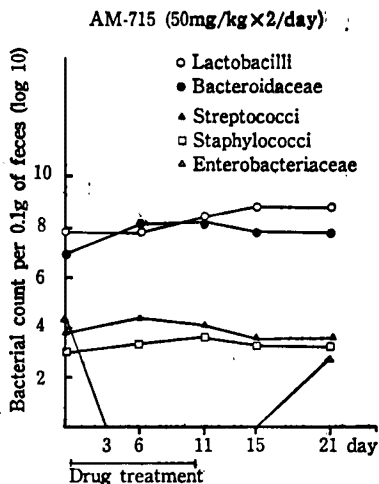
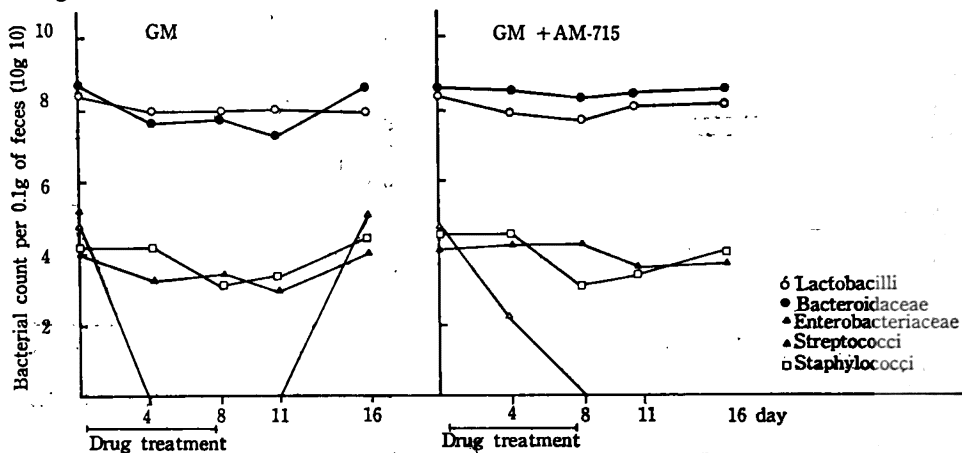


Fig. 7 Effect of AM-715 on the fecal flora of mice



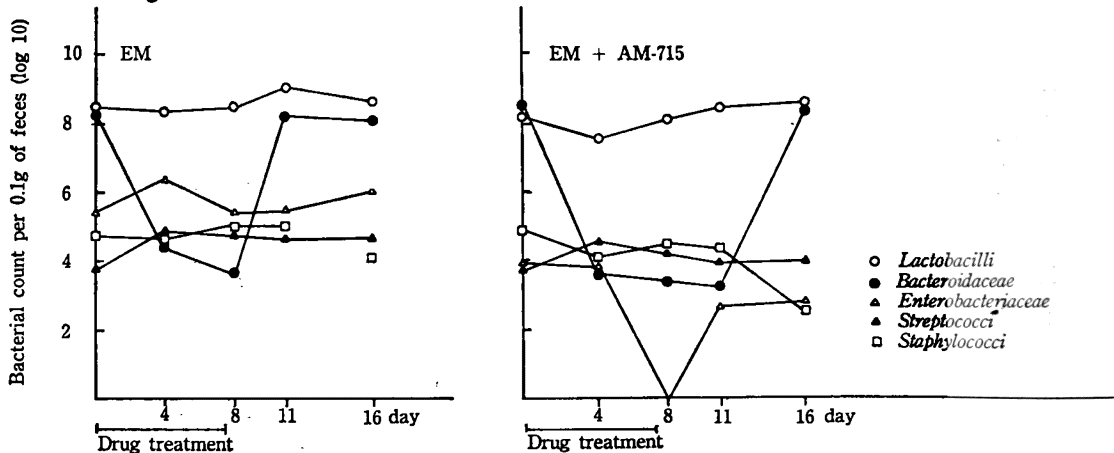
The figures indicate the mean of 3 mice

Fig. 8 Effect of GM and a combination of GM and AM-715 on the fecal flora of mice



The figures indicate the mean of 3 mice Dose:100mg/kg

Fig. 9 Effect of EM and a combination of EM and AM-715 on the fecal flora of mice



The figures indicate the mean of 3 mice Dose: 100mg/kg

3. 盲腸重量の変化

AM-715 100 mg/kg の 1 日 1 回 10 日間連続投与群の盲腸重量の変化は Table 4 に示した。各検査時における盲腸の肉眼的所見では対照群、投与群共に黄緑色を呈し、やや光沢を有し、対照群とに差はみられなかった。盲腸重量では、対照群との間に有意の差は認められず、体重増に伴う湿重量の自然増加はみられたが、対照群との間には水分含量に差は認められなかった。

III. 考 察

抗菌剤をマウスに経口投与すると、腸内菌叢に大きな変化を与え、盲腸が膨大化し軟便を排泄することや、その腸内菌叢の変化は薬剤の種類、濃度および投与期間に

Fig. 10 Effect of CEX and a combination of CEX and AM-715 on the fecal flora of mice

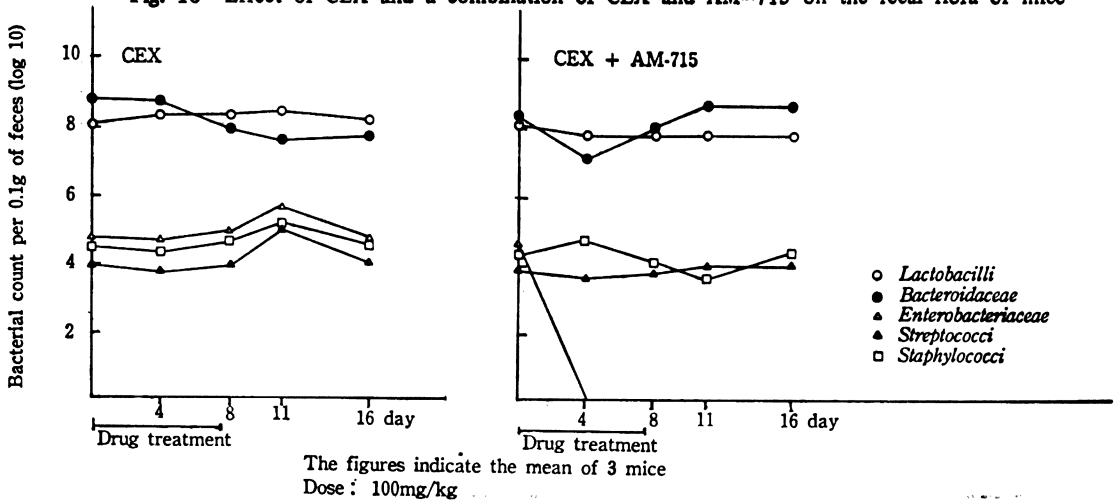
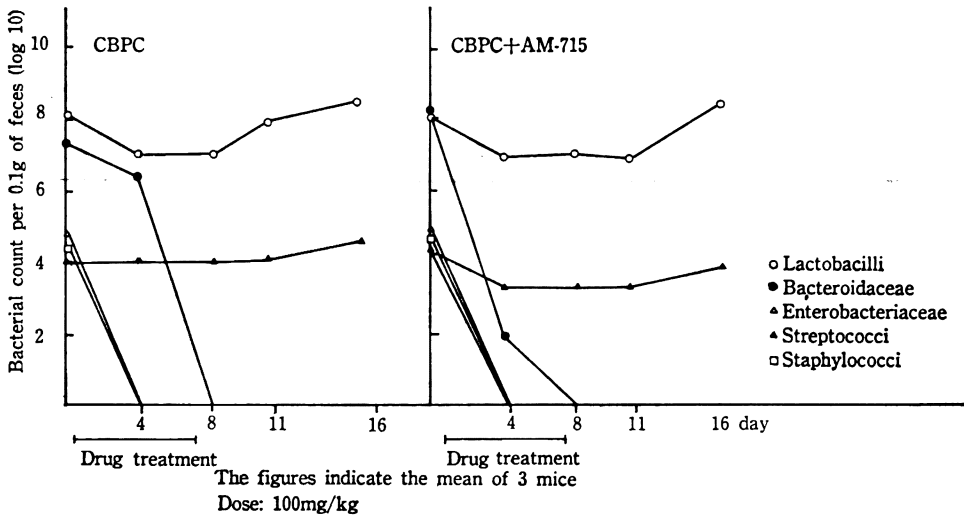


Fig. 11 Effect of CBPC and a combination of CBPC and AM-715 on the fecal flora of mice



より異なることが知られている⁶⁻⁸⁾。糞便菌叢は盲腸内菌叢と同一とされている²⁾ことから、AM-715の投与による糞便菌叢の変化および盲腸重量の変化を検討した。

AM-715を連続投与すると、*Enterobacteriaceae*のみが減少し、検索した他菌叢に対しほとんど影響を及ぼさず、*in vitro*の結果¹⁾を反映していた。AM-715の用量と*Enterobacteriaceae*の減少の関係を調べたところ、12.5 mg/kgの場合、菌の減少はあるものの消失に至らず、投与中止後1日で正常レベルの菌数まで回復した。それ以上の用量では菌は消失するが、投与中止後11日

から回復しはじめ、20日ではほぼ投与前の状態に回復した。1日の投与回数を2~3回に増加してもその影響は少なかった。10日間連続投与しても耐性菌の出現もなく、*Enterobacteriaceae*のspeciesの変動(種)もみられなかった。さらに、連続投与によって菌交代症が起こるか否かについて、特に*Pseudomonas*およびYeastについて検討したが、実験した範囲内では*Pseudomonas*およびYeastの増加は認められなかった。これらのことから、AM-715は腸内菌叢に対して影響の少ない薬剤であると考えられた。

Table 2 Changes of *Enterobacteriaceae* of fecal flora during and after oral administration of AM-715

Drug	Day	Dose (mg/kg/day)								
		Control*	12.5	25	50	100	200	50x3	50x2	100x2
Treatment	0	5.17**	4.99	4.04	5.56	4.97	4.20	4.00	3.48	4.36
	1	4.30	4.57	4.32	3.57	2.30	4.57	3.30	2.30	2.00
	2	4.71	4.30	3.30	3.17	0	0	1.48	0	0
	3	4.30	3.08	0	0	0	0	0	0	0
	6	4.81	2.04	0	0	0	0	0	0	0
	10	—***	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	4.51	4.11	0	0	0	0	0	0	0
No treatment	15	4.48	4.00	0	0	0	0	0	0	0
	21	4.30	4.78	2.48	2.90	4.95	3.94	2.62	4.38	2.79
	25	4.77	4.77	4.48	4.95	4.92	3.71	2.88	4.48	3.30
	30	5.30	4.54	4.00	5.17	4.48	4.39	3.88	4.56	4.25

The figures indicate the mean of 3 mice

AM-715 was orally administrated for consecutive 10 days

* : 0.5% CMC

** : Bacterial counts per 0.1 g of feces (log 10)

***: Not counted

マウスに抗菌剤を投与したとき認められる盲腸の膨大と盲腸内菌叢の関係について、fusiform bacteria の菌数減少が盲腸粘膜における水の転送機構を阻害し、盲腸を膨大させると言われている⁷⁾。本実験では AM-715 の連続投与により盲腸の膨大は認められなかった。このことは、AM-715 の連続投与により、軟便が認められなかったこと、嫌気性菌に対し抗菌作用が弱い⁹⁾、という事実からも裏付けられるであろう。

文 献

- 1) ITO, A.; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI: In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 17: 103~108, 1980
- 2) DRASAR, B. S. & M. J. HILL: Human Intestinal Flora, 43. Academic Press (London), 1974
- 3) 前島一三叔, 前島房子, 武田善直, 田嶋嘉雄: マウスの消化管内細菌に関する検索。I 培地の検討。実験動物 15: 54~67, 1966
- 4) COWAN, S. T. (坂崎利一訳): 医学細菌同定の手びき, 2版。東京: 近代出版, 1974
- 5) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 6) DUBOS, R.; R. W. SCHAEGLER & M. STEPHENS: The effect of antibacterial drugs on the fecal flora of mice. *J. Exp. Med.* 117: 231~243, 1963.
- 7) SAVAGE, D. C. & R. DUBOS: Alteration in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs. *ibid.* 123: 97~110, 1968
- 8) IMAI, A.: Fecal flora and cecal weights in mice given validamycin A. 実験動物 23: 215~223, 1974

Table 3 Species and MIC of *Enterobacteriaceae* before and after oral administration of AM-715 (50 mg/kg/day)

Before		After	
Species	MIC	Species	MIC
<i>E. coli</i>	0.05	<i>E. coli</i>	0.05
<i>E. coli</i>	0.05	<i>E. coli</i>	0.05
<i>E. coli</i>	0.05	<i>E. coli</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.05	<i>E. coli</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.1	<i>E. coli</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.1	<i>E. coli</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.1	<i>E. coli</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.1	<i>E. coli</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.1	<i>P. vulgaris</i>	0.1
<i>E. coli</i>	0.1	<i>P. vulgaris</i>	0.1

MIC: $\mu\text{g/ml}$

AM-715 was orally administrated for consecutive 10 days

Table 4 Wet and dry weights of the cecum with their contents in AM-715 treated mice

Group	Days of treatment									Days after treatment								
	0			3			6			1			5			11		
	Wet ¹⁾	Dry ²⁾	$\frac{\text{Dry}^3)}{\text{Wet}}$	Wet	Dry	$\frac{\text{Dry}}{\text{Wet}}$	Wet	Dry	$\frac{\text{Dry}}{\text{Wet}}$	Wet	Dry	$\frac{\text{Dry}}{\text{Wet}}$	Wet	Dry	$\frac{\text{Dry}}{\text{Wet}}$	Wet	Dry	$\frac{\text{Dry}}{\text{Wet}}$
Control	500 (2.0) ⁴⁾	120	24.0	590 (2.2)	150	25.4	550 (2.0)	150	27.3	650 (2.1)	180	27.7						
AM-715	540 (2.4)	130	24.1	540 (2.0)	150	27.8	610 (2.2)	150	24.6	670 (2.3)	170	25.4	610 (2.2)	160	26.2	600 (1.9)	160	26.7

1): Wet weight (mg)

2): Dry weight (mg)

3): $\frac{\text{Dry weight}}{\text{Wet weight}}$ (%)

4): The figures in the parentheses indicate the percent of body weights

The figures indicate the mean of 3 mice per group

Daily dose of AM-715 was 100 mg/kg

9) 甲畑俊郎, 後藤加寿美, 江崎孝行, 鈴木祥一郎: AM-715 の嫌気性菌に対する抗菌作用。第28回日本化学

療法学会総会(東京): 誌上発表 p.200, 1980

EFFECTS OF AM-715 ORAL DOSING IN FECAL MICROFLORA OF SPF-MICE

SATOSHI MURAYAMA, YASUO ABE and TSUTOMU IRIKURA

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

- Changes in fecal microflora and cecal weight were studied in mice after the oral administration of AM-715.
1. The number of aerobic and anaerobic bacteria except *Enterobacteriaceae* of fecal microflora, and species in *Enterobacteriaceae* were not changed by the daily administration of AM-715 at 50, 100 and 200 mg/kg/day, twice dosing a day of 50 and 100 mg/kg, thrice dosing a day of 50 mg/kg for 10 days, and the recovery to normal microflora was observed within 11~20 days after cessation of administration. No appearance of resistant strains, decrease of body weight or diarrhoea in mice were observed by the oral administration of AM-715.
 2. Administration of AM-715 in combination with EM, GM, CEX or CBPC showed additive effect on the fecal microflora, however the fecal microflora pattern was not affected.
 3. No increase of cecal weight were observed by the oral administration of AM-715 at 100 mg/kg/day for 10 days.