

DL-8280 の嫌気性菌に対する *in vivo* 抗菌作用について

武内美登利・賀川和宣・青木 誠・小林とよ子・渡辺邦友・上野一恵

岐阜大学医学部付属嫌気性菌実験施設

DL-8280 の嫌気性菌に対する *in vivo* の抗菌作用を、本剤と近縁の抗菌剤である Norfloxacin (NFLX), Nalidixic acid (NA) と比較検討した。

B. fragilis の腹腔内感染後 DL-8280, NFLX および NA をそれぞれマウス1匹当たり 4 mg, 2 mg, 1 mg, 0.5 mg 1 回経口投与し、3 日間生存を観察した。DL-8280 は 2 mg 投与群においても 100%, 1 mg 投与群で 60%, 0.5 mg 投与群で 10% 生存した。NFLX では 4 mg 投与群で 100%, 2 mg 投与群で 20%, 1 mg 投与群で 10% 生存した。しかし NA では 4 mg 投与群で 20% 生存したが、2 mg 投与群では全例死亡した。

DL-8280, NFLX および NA をマウスに 7 日間投与し、盲腸内容物中の *C. difficile* の増加を検討した結果、NA 投与群では全例に *C. difficile* が著しく増加した。また NFLX では全例に *C. difficile* を検出したが菌数は極めて少数であった。DL-8280 投与群では *C. difficile* は全例において陰性であった。

DL-8280 は *in vitro* において *Fusobacterium* の一部の菌株を除いて、*Bacteroides* をはじめほとんどの嫌気性菌に対して強い抗菌作用と殺菌力を有しており、嫌気性菌感染症の抗菌剤として Clindamycin (CLDM) や Cephamycin 系抗生剤と同等あるいはそれ以上の有用性が期待された。

本報においては、*B. fragilis* の感染マウスを用いた感染予防実験ならびに、本剤投与によるマウス腸管内での *C. difficile* の異常増殖の有無について検討したので報告する。

I. 実験方法

1) 供試菌株と抗菌剤

マウスの感染実験には *B. fragilis* GAI 0537 株を用いた。本菌株の使用薬剤に対する MIC は次のごとくであった。

DL-8280 (第一製薬) : 3.13 μ g/mlNFLX (杏林製薬) : 25 μ g/mlNA (第一製薬) : 200 μ g/ml

2) 供試マウスと薬剤投与方法

ICR 系雄マウス (19~20 g) に *B. fragilis* の 24 時間培養菌を上野の嫌気性希釈液¹⁾にて濃厚液を作製し、その 0.3 ml 腹腔内に接種、1 時間後に DL-8280, NFLX および NA をそれぞれマウス 1 匹あたり 4 mg, 2 mg, 1 mg, 0.5 mg 1 回経口投与した。3 日間生死を観察した。観察期間を 3 日間とした理由は、本法により非治療群は 3 日間で全例が死亡したからである。1 群につきマウス 10 匹を用いた。なお腹腔内に接種した *B. fragilis* の濃厚菌液は、定量培養により 1 匹当たり 10⁹ cfu の生菌が接種されたことが確かめられた。

3) DL-8280 投与マウスの盲腸内 *C. difficile* の出現

DL-8280, NFLX および NA のそれぞれ 2 mg を 1 日 1 回、ICR 系雄マウスに 7 日間投与し、8 日目に屠殺して、盲腸内容物を変法 CCFA 培地を用いて定量培養法に供し *C. difficile* の菌数を測定した²⁾。抗菌剤の投与法は経口投与方法によった。*C. difficile* の培養法は本菌の特殊性状のため小林の方法により、全操作を Anaerobic glove box 内で行った²⁾。

II. 実験成績

1) *B. fragilis* 腹腔内感染マウスにおける DL-8280 の感染予防効果

B. fragilis の 10⁹ cfu を腹腔内に感染させたマウスに DL-8280, NFLX および NA の 4 mg, 2 mg, 1 mg, 0.5 mg をそれぞれ 1 回経口投与し、3 日間の生存を観察した成績を Table 1 に示した。

非治療群では 3 日間で 10 匹中 10 匹が死亡したが、DL-8280 治療群では 4 mg 投与群、2 mg 投与群では 10 匹中全例のマウスが生存した。1 mg 投与群では 10 匹中 6 匹 (60%), 0.5 mg 投与群でも 10 匹中 1 匹 (10%) が生存し、DL-8280 の *B. fragilis* に対する優れた感染予防効果を認めた。

NFLX 治療群では 4 mg 投与群では 10 匹中 10 匹が生存したが、2 mg 投与群では 10 匹中 2 匹 (20%), 1 mg 投与群では 10 匹中 1 匹 (10%) が生存し、0.5 mg 投与群では全例が死亡した。

NA 治療群では 4 mg 投与群で 10 匹中 2 匹が生存し

Table 1 Protecting effect of DL-8280, NFLX and NA on experimental intraperitoneal infections due to *B. fragilis* in mice

Organism	Challenge dose (cfu/mouse)	Drug (mg/mouse)	MIC : 10^6 cfu/ml (μ g/ml)	Survival	ED ₅₀ [*] (mg/mouse)
<i>B. fragilis</i> GAI 0537	10 ⁹ i.p.	DL-8280	3.13		<0.81
		4		10/10 (100%)	
		2		10/10 (100%)	
		1		6/10 (60%)	
		0.5		1/10 (10%)	
		NFLX	25		2.80
		4		10/10 (100%)	
		2		2/10 (20%)	
		1		1/10 (10%)	
		0.5		0/10 (0%)	
		NA	200		>4
		4		2/10 (20%)	
		2		0/10 (0%)	
		1		0/10 (0%)	
		0.5		0/10 (0%)	
		Control		0/10 (0%)	

• BEHRENS-KÄRBER method

Fig. 1 Appearance of *C. difficile* in caecum contents of mice administered DL-8280, NFLX and NA

Drug	Recovery of <i>C. difficile</i>					Rate of appearance of <i>C. difficile</i>				
	4+*	3+	2+	1+	—	20	40	60	80	100%
DL-8280					5					
NFLX					5					
NA	4			1						
Control					5					

Medication : Dose ; 2 mg/day, Term ; 7 days

Route : Oral administration

• 4+ : 10^4 cfu or more/plate, 3+ : 10^3 - 10^4 cfu/plate, 2+ : 10^2 - 10^3 cfu/plate, 1+ : 10^0 - 10^2 cfu/plate,

— : No growth

たのみで、2 mg, 1 mg, 0.5 mg 投与群ではマウス全例が死亡した。

DL-8280, NFLX および NA 投与群のいずれにおいても感染予防効果には投与量と密接な関係がみられ、投与量の増加に伴い生存率も増大した。

2) DL-8280 投与によるマウス盲腸内の *C. difficile* の出現

マウスに DL-8280, NFLX および NA を 7 日間投与し、その後のマウス盲腸内容物中の *C. difficile* の出現率および菌数を Fig. 1 に示した。1 群 5 匹のマウス

を用い、ケージ内での交叉感染を防ぐため、1 ケージにつき 1 匹のマウスを飼育して実験を行った。

非投与群のマウスでは 5 匹中 *C. difficile* は全く検出されなかった。

DL-8280 投与群においても、*C. difficile* は全く検出されなかった。

しかし、NFLX および NA 投与群では 5 匹中 5 匹 (100%) から *C. difficile* が検出されたが、盲腸内容物中の *C. difficile* の菌数は NA 投与群で最も多く、NFLX 投与群では菌数は極めて少なかった。

C. difficile を検出したマウスでは NA 投与群で盲腸内に *C. difficile* のエンテロトキシン (D-1 toxin) を検出した。しかし、盲腸の肉眼的所見では盲腸重量の増加、発赤、腫脹を認めたが下痢はみられなかった。NFLX 投与群では盲腸内容物中に *C. difficile* 毒素を検出できなかった。被検マウス腸管の病理組織学的検査は行わなかった。抗菌剤投与群から分離した *C. difficile* は全菌株が毒素産生株であった。

DL-8280 投与マウスでは盲腸重量は増大したが (622, 609, 725, 803, 763 mg/マウス体重 25.5~27 g), 下痢は認められなかった。

III. 考 察

DL-8280 は *in vitro* の実験において、嫌気性菌に対して強い抗菌作用をもっている。この *in vitro* の成績が *in vivo* においても同様に強い抗菌作用があるか否かについて検討した。一方、強い抗菌力と広い抗菌スペクトラムを有する経口投与剤では、腸内細菌叢の構成を乱して下痢を惹起する恐れがある。その原因菌の 1 つとして *C. difficile* が注目されている²⁾。

DL-8280 は *B. fragilis* の腹腔内感染マウスにおいて、比較薬剤として用いた NFLX, NA よりも著しく強い感染予防効果を示し、本剤の *in vitro* での *B. fragilis* に対する強い抗菌力が *in vivo* においても確認された。一方、本剤投与による腸管内常在性の *C. difficile* の異常増殖については、比較薬剤として用いた NFLX および NA において認められたが、DL-8280 においては認められなかった。したがって、DL-8280 投与によって *C. difficile* による偽膜性腸炎や下痢症の起る可能性は NFLX および NA よりも少ないことが示唆された。

以上の成績から DL-8280 は嫌気性菌感染症の治療抗菌剤として有用性が大いに期待される。

文 献

- 1) BALOWS, A.: *Anaerobic Bacteria: Role in Disease*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, U.S.A., 1973
- 2) 小林とよ子: 抗菌剤投与と *Clostridium difficile* による下痢症に関する研究。Jap. J. Antibiotics 36: 464~476, 1983

IN VIVO ACTIVITY OF DL-8280 AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

MIDORI TAKEUCHI, KAZUYOSHI KAGAWA, MAKOTO AOKI,
TOYOKO KOBAYASHI, KUNITOMO WATANABE and KAZUE UENO
Institute of Anaerobic Bacteriology, School of Medicine, Gifu University

In vivo antibacterial activity of DL-8280 against anaerobes was compared with its chemically related agents, norfloxacin (NFLX) and nalidixic acid (NA).

After intraperitoneal challenge of *B. fragilis* to mouse, DL-8280, NFLX or NA, was administered orally in doses of 4, 2, 1 or 0.5 mg and the mice were observed for 3 days. Survival rates in DL-8280 treated groups were 100% in both 4 and 2 mg groups, 60% in 1 mg group and 10% in 0.5 mg group. All mice in NFLX 4 mg group survived, 20% in 2 mg group and 10% in 1 mg group. Whereas 20% of NA 4 mg group survived, all of NA 2 mg group died.

Following 7 days administration of DL-8280, NFLX or NA to mice, change of *C. difficile* in cecum contents was examined. Significant increase in *C. difficile* was observed in all mice received NA. In NFLX treated mice, only small number of *C. difficile* was isolated. No *C. difficile* was observed in all mice received DL-8280.