TA-058 を投与したラットの腸内細菌叢の変化

前澤　功・松下　忠弘・春日　修・佐久間由光
吉田　弘嗣・恩田　時男・山口東太郎
田辺製薬株式会社微生物研究所

TA-058 を腹腔内に連日投与したラットの腸内細菌叢の変化を亜急性毒性試験終了時に調査し，さらに細菌叢の経日変化を調べたところ，TA-058 に感受性の *Streptococcus faecalis* グループ *Staphylococci* および *Escherichia coli* は減少し，*Enterobacteriaceae* の中で TA-058 に非感受性な *Klebsiella* sp. および indole (+) *Proteus* sp. が増加した。この菌叢変化は TA-058 の投与開始翌日に認められ，TA-058 の投与を中止することにより元の状態に回復したが，回復の状態は TA-058 の投与量が多いほど遅れる傾向を示した。

緒　言

多くの抗生物質について下痢の原因になり得ることが知られており，その原因の1つとして腸内細菌叢の変動が挙げられている[1]。TA-058 はラットに筋肉内投与した時に約27%の糞中排泄があり[2]，本剤が非経口投与によっても腸内細菌叢に影響を与えることが予測される。

今回，ラットの亜急性毒性試験終了時に，腸内の TA-058 に対する高度感受性菌および非感受性菌を選び，TA-058 投与によるこれら菌種の菌数変動と正常状態への回復を調べ，また変動の経過を知るために，ラットで経日的に *Enterobacteriaceae* の変化を観察したので報告する。

I　材料および方法

1. 供試動物と薬剤投与

TA-058 の亜急性毒性を観察するために TA-058 (250, 500, 1,000 および 5,000 mg/kg/day) および Carbenicillin (CBPC, 1,000 mg/kg/day) を5週間連続腹腔内注射して，最終回の注射から24時間後および4週間後のラット，ならびに TA-058 (250, 500, 1,000 mg/kg/day) および CBPC (1,000 mg/kg/day) を3カ月連続腹腔内投与した後24時間目のラットにつき，腸内細菌叢を調べた。これらのラットは，投与開始時に7週齢の Jcl : SD, 雄であった。

さらに，同じく Jcl : SD, 5週齢について，TA-058 を 50, 250 および 500 mg/kg/day, 10日間腹腔内投与し，その間経日的に腸内 *Enterobacteriaceae* の変動を調べた。

飼育期間を通じて，飲水および飼料（日本クレア (E-2)）は滅菌せずに自由に摂取させた。

薬剤は滅菌脱イオン水に溶解して1日1回投与し，対照群には生理食塩液を投与した。

2. 糞便の採取

亜急性毒性試験のラットは剖検時に直腸末端から口側に約 5 cm を切断して，その内容物を試験に供した。*Bacteroides* の菌数測定に供した糞便は，直腸を切断後，直ちに CO_2 を充填した試験管に移し，TE-HER ANAEROBOX AZ-155 (平澤製作所 ; H_2 : 10%, CO_2 : 10%, N_2 : 80%) 内で 0.05%酵母エキスを加えてホモジナイズした。10日間投与で経日的に観察した実験では，肛門をガラス棒で刺激し，排泄された糞便を直接採取した。

3. 糞便中の菌数計測

糞便のホモゲナイズを滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し，その 0.1 ml を下記の選択培地表面に塗抹し，37 °C で培養した。

Enterobacteriaceae は DHL 寒天培地（栄研）を使用し，*Staphylococci* は No. 110 培地（栄研），*Streptococcus faecalis* グループは SF 寒天培地（日水），*Pseudomonas aeruginosa* は Nac 寒天培地（栄研）で好気的に培養した。培養後それぞれの培地に生じたコロニー数を計測し，糞便 1 g 当りの菌数を算出した。

4. *Enterobacteriaceae* の同定

各糞便中の *Enterobacteriaceae* の変動を調べるに際し，TA-058 に感受性な菌種 (*E. coli* および *P. mirabilis*) と非感受性な菌種 (*Klebsiella* sp. および indole (+) *Proteus* sp.) について，これらの菌数変動を主体とする調査を行った。

(1) *Proteus* 属の同定

DHL 寒天培地に発育したコロニーの中，PPA 反応陽性で，オキシダーゼ試験陰性の性状を示すコロニーを

Table 1 Effect of TA-058 and CBPC on the fecal flora of rats in the course of subacute toxicity tests

	Drug	Dose (mg/kg)	*Enterobacteriaceae* (n=10)	*Staphylococci* (n=10)	*Streptococcus faecalis* group (n=10)	*Pseudomonas aeruginosa* (n=10)	*Bacteroides* (n=1)
Group of five weeks administration	Control		6.18±0.21**	5.37±0.67	7.11±0.58	<1.00	9.00
	TA-058	250	5.60±0.53	3.68±0.54	6.29±0.38	<1.00	9.91
	TA-058	500	6.75±0.80	3.27±0.41	6.36±0.52	<1.00	10.11
	TA-058	1,000	6.80±0.83	3.49±0.58	5.73±0.54	<1.00	10.20
	TA-058	5,000	6.81±0.80	3.30±0.48	5.67±0.56	<1.00	10.76
	CBPC	1,000	7.16±0.78	3.16±0.28	7.13±1.22	<1.00	10.15
Group of three months administration	Control		5.91±0.64	4.81±0.63	7.12±0.66	<1.00	8.86
	TA-058	250	6.03±0.89	1.42±1.76	6.23±0.33	<1.00	8.20
	TA-058	500	6.06±0.62	0.99±1.66	5.90±0.47	<1.00	7.95
	TA-058	1,000	6.07±0.87	1.90±1.41	5.60±0.49	<1.00	8.15
	CBPC	1,000	6.46±1.08	0.84±1.27	6.47±0.55	<1.00	8.75
Group of four weeks recovery*	Control		6.11±0.70	5.66±0.40	7.16±0.70	<1.00	8.23
	TA-058	1,000	6.08±0.86	5.51±0.23	6.46±0.30	<1.00	8.90
	TA-058	5,000	5.67±0.90	5.57±0.68	6.62±0.18	<1.00	7.79
	CBPC	1,000	6.04±0.81	5.95±0.36	6.74±0.30	<1.00	8.20

* Recovery periods : four weeks after TA-058 administration for five weeks

** Log_{10}no. of microorganisms/g, Mean±S.D.

Table 2 Changes of the numbers of *Enterobacteriaceae* in rats feces in the course of subacute toxicity tests

	Drug	Dose (mg/kg)	*Escherichia coli*	*Proteus* sp.	*Klebsiella* sp.
Group of five weeks administration	Control		98.0%	0%	2.0%
	TA-058	250	5.0	20.0	75.0
	TA-058	500	0	4.0	96.0
	TA-058	1,000	0	5.0	95.0
	TA-058	5,000	0	15.0	85.0
	CBPC	1,000	0	5.0	95.0
Group of three months administration	Control		98.0	0	2.0
	TA-058	250	0	12.6	87.4
	TA-058	500	0	9.0	91.0
	TA-058	1,000	0	17.0	83.0
	CBPC	1,000	0	0	100.0
Group of four weeks recovery*	Control		97.0	2.0	1.0
	TA-058	1,000	92.0	3.0	5.0
	TA-058	5,000	85.0	0	15.0
	CBPC	1,000	100.0	0	0

* Recovery periods : four weeks after TA-058 administration for five weeks

Proteus 属とした。さらにクリグラー確認培地およびサルフィド・インドール・モーティリティ（SIM）培地における諸性状を調べて，indole（＋）*Proteus* sp. と indole（－）*Proteus*（*P. mirabilis*）とに鑑別した。

(2) *Klebsiella* sp. と *E. coli* の同定

Proteus 属以外のコロニーの中，糖分解陽性でオキシダーゼ試験陰性を示したコロニーをクリグラー確認培地に移植して，乳糖分解陽性で硫化水素非産生のコロニーを選別した。ついで，SIM 培地で indole 産生および運動性を調べて，それぞれが陽性のコロニーを *E. coli*，陰性のコロニーを *Klebsiella* sp. とした。両菌種に分別後，さらに，サッカロース・マンニット培地での性状とシモンズ・クエン酸培地におけるクエン酸利用能を調べて *Klebsiella* sp. と *E. coli* を確認した。

5. *Bacteroides* の同定

バクテロイデス培地（日水）に発育したコロニーを糞便当り 100 コロニー無作為に GAM 半流動高層培地（日水）に移植して増菌後，HI 寒天培地（栄研）およびバクテロイデス培地にそれぞれ 3～4 cm 画線塗布し，前者は好気条件下で，後者は嫌気条件下で，37 °C，48 時間培養した。嫌気条件下で発育し，好気条件下で発育できないコロニーについて，グラム染色を行い顕微鏡で形態を観察した。この結果，嫌気条件下でのみ発育し，グラム陰性で桿状の形態を示すコロニーを *Bacteroides* とした。

II 実験結果

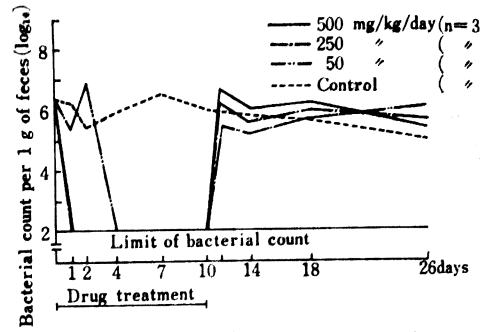
1. TA-058 を 5 週間あるいは 3 カ月間連続投与したラットおよび 5 週間投与後 4 週間休薬したラットの腸内菌叢

Table 1に各群の糞便 1 g 当りの菌数を示したが，5 週間あるいは 3 カ月間連続投与した後24時間目の腸内菌叢の変化は対照と比較すると，以下の如くであった。すなわち，*Staphylococci* および *S. faecalis* グループは減少し，*Enterobacteriaceae* は変化せず，*Bacteroides* は増加（5 週間投与）または僅かに減少（3 カ月投与）した。5 週間投与後 4 週間休薬したラットにおいては，すべて対照とほぼ同じ菌数が見られた。

これら各群について *Enterobacteriaceae* の内容を調べた結果を Table 2 に示す。

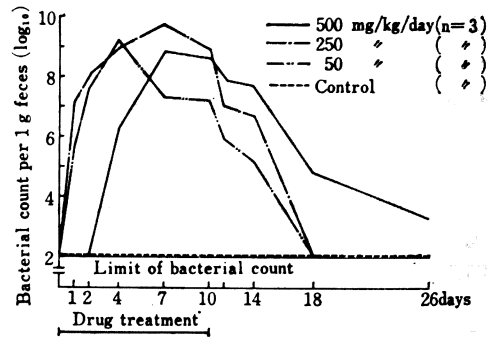
各菌種の分離率（%）は，対照では *E. coli* が多いのに対して，TA-058 および CBPC 投与群では *E. coli* は激減し，かわりに *Klebsiella* sp. が多くなっていた。5 週間連続投与後 4 週間休薬した群では，再び *E. coli* の分離が多くなり，対照群と近似した細菌叢を示していた。

Fig. 1 Effect of TA-058 on the numbers of *Escherichia coli* in rats feces



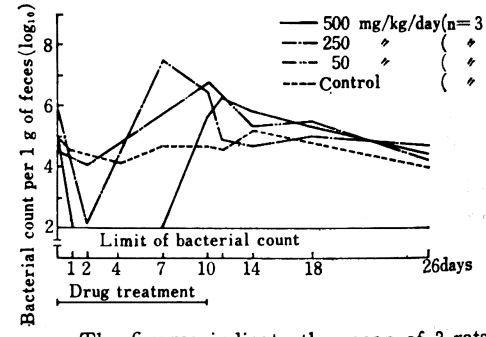
The figures indicate the mean of 3 rats

Fig. 2 Effect of TA-058 on the numbers of *Klebsiella* sp. in rats feces



The figures indicate the mean of 3 rats

Fig. 3 Effect of TA-058 on the numbers of *Proteus* sp. in rats feces



The figures indicate the mean of 3 rats

2. TA-058 を10日間腹腔内投与したラット糞便の *Enterobacteriaceae* の変化

Fig. 1,2,3 に *E. coli, Klebsiella* sp. および *Proteus* sp. の菌数変化を示した。糞便中の *E. coli* は 50 mg/kg の投与では投与開始後4日目，250 および 500 mg/kg 投与では投与開始翌日に糞便から検出されなくなった。これに対して，*Klebsiella* sp. は *E. coli* とは逆に増加した。*Proteus* sp. は TA-058 投与初期の糞では菌数が減少し，500 mg/kg 投与では投与開始翌日に糞便から検出されなくなったが，TA-058 の投与を続けると，再びその菌数は増加した。TA-058 投与後増加した *Proteus* sp. は全て indole (+) であった。

TA-058 の投与を中止すると，*E. coli* は投与中止後翌日に対照と同等の菌数が検出されるようになり，*Klebsiella* sp. は投与中止によりその菌数を漸減し，50 mg/kg および 250 mg/kg 投与群では投与中止後8日目には糞便から検出されなくなった。また *Proteus* sp. は *Klebsiella* sp. よりも速やかに対照と同等の菌数に復した。

考　察

TA-058 は非経口的に使用する半合成ペニシリン剤であるが，^{3}H 又は ^{14}C 標識 TA-058 をラットに筋肉内投与すると，投与放射能の約 27 %が糞便中に排泄され[2]，このことは，TA-058 を非経口的に投与したラットの腸内細菌叢がある程度影響を受けるであろうことを示唆する。今回の成績では，TA-058 を投与すると，TA-058 に感受性の *Staphylococci* や *S. faecalis* グループは明らかに菌数が減少し，*Enterobacteriaceae* の内，TA-058 に感受性の *E. coli* は TA-058 投与後菌数を減じ，TA-058 に非感性の *Klebsiella* sp. は逆に菌数が増加し，*in vitro* の抗菌活性と極めてよく相関していた。

β-ラクタム剤の非経口投与により，腸内細菌叢が変化することは，Piperacillin[3] や Cefotaxime[4] について最近報告されているが，Cefotaxime の場合と同様に，TA-058 の投与後休薬期間を置けばラットの大部分は対照と同じ細菌叢に回復した。

これらの腸内細菌叢の変動が宿主にどの程度あるいはどのような生理的影響を与えているかは不明であるが，同時に実施された病理組織学的および臨床病理学的検討において大きな変化が見られなかったことからすれば，影響は軽微なものと推察される。

文　献

1) 坂崎利一：下痢-腸炎と腸内細菌叢。最新医学33：2030～2033，1978

2) 高橋忠男，他：標識 TA-058 のマウス，ラットにおける体内動態。Chemotherapy 32 (S-2)：133～151，1984

3) 中谷林太郎，千田俊雄，石津景子，谷口博一：新合成ペニシリン T-1220 のイヌの腸内細菌フローラに対する影響。医学のあゆみ 101：773～775，1977

4) 笠井一弘，新井　進，宮本政樹，坂口　孝：Cefotaxime 静脈内投与時のラット糞便菌叢におよぼす影響。Chemotherapy 28 (S-1)：133～135，1980

INFLUENCE OF TA-058 ADMINISTRATION ON MICROFLORA IN RATS FECES

ISAO MAEZAWA, TADAHIRO MATSUSHITA, OSAMU KASUGA,
YOSHIMITSU SAKUMA, HIROTSUGU YOSHIDA,
TOKIO ONTA and TOUTARO YAMAGUCHI
Microbiological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

The changes of microflora in rats feces were studied in the course of subacute toxicity tests for TA-058 (5 week and 3 month periods). The changes were also examined in rats given the drug daily for 10 days.

In all of dosage groups tested, administration of TA-058 decreased the numbers of the drug sensitive species, *Streptococcus faecalis* group and *Staphylococci*, in microflora. However, the numbers of *Enterobacteriaceae* and *Bacteroides* almost remained unchanged or moderately increased. *Pseudomonas aeruginosa* was not detected in all feces. Among *Enterobacteriaceae, Klebsiella* sp. was found to be most dominant species, but *Escherichia coli* was rarely detectable one. Almost of all *Proteus* sp. isolated fromTA-058 administered rats were identified as indole-positive species.

In rats given the drug daily for 10 days, the numbers of *Escherichia coli* decreased 1 to 3 days after the drug administration and began to increase imediately after the withdrawal of the drug. On the other hand, the numbers of *Klebsiella* sp. increased for 4 to 7 days after the administration and gradually decreased.

The changes of fecal flora caused by the administration of TA-058 (5 weeks) were almost recovered to normal flora levels 4 weeks after the discontinuation of the drug administration.