

AT-2266 のウサギ腸内細菌叢に及ぼす影響

井上 了・久保雄嗣・阪口雄三・中村信一

大日本製薬株式会社総合研究所

AT-2266 の 50 mg/kg/回, 1日2回, 5日間連続経口投与によるウサギ腸内細菌叢および一般症状に及ぼす影響を, 同様に投与した Ampicillin (ABPC) との比較のもとに検討した。

ABPC 投与群では投薬により体重および糞便量は共に減少した。5日間投与後の糞便細菌叢には大きな変化が見られ, *Enterobacteriaceae* は糞便 1g 当り平均 $10^{4.4}$ から $10^{9.1}$ 個に増加し, *Streptococcus* は平均 $10^{5.4}$ から $10^{1.3}$ 個に減少した。投与終了後 8 日目には *Enterobacteriaceae* は平均 $10^{5.7}$ 個, *Streptococcus* は平均 $10^{3.0}$ 個となり, やや回復傾向が認められた。一方 *Bacteroidaceae* の菌数は観察期間中有意の変化は見られなかった。投薬により増加した *Enterobacteriaceae* のほとんどは *Escherichia coli* であり, その MIC 値は AT-2266 0.2 μ g/ml, ABPC 3.13 \times 100 μ g/ml であった。

AT-2266 投与群では投薬による体重および糞便量の変化は認められなかった。この群では投薬前 3 羽中 2 羽に検出された *Enterobacteriaceae* (平均 $10^{3.3}$ 個/g 糞便) は投与 5 日後には 3 羽中 1 羽でのみ検出 (平均 $10^{1.3}$ 個/g 糞便) され, 投与終了後 8 日目では 3 羽とも検出されなかった。一方, *Bacteroidaceae* と *Streptococcus* の菌数は観察期間中有意の変化は見られなかった。

このような結果から AT-2266 は *Bacteroidaceae* や *Streptococcus* などのウサギ主要腸内細菌叢構成菌に大きな影響を与えない薬物と考えられる。

AT-2266 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid] はグラム陰性菌, グラム陽性菌, ブドウ糖非発酵菌などに強い抗菌作用を有する新規ピリドンカルボン酸系抗菌剤である¹⁾。本剤の嫌気性菌に対する作用は菌種により異なるが, 概して弱いことが報告されている²⁾。経口抗菌剤で抗菌スペクトラムの広いものは腸内細菌叢に影響を与える可能性が考えられるので, この点につきウサギを用いて検討した。

I. 実験材料および方法

1. 動物

日本白色種雄性ウサギ (体重 2.7~2.9 kg) を用い, 飼育は個々のケージに入れて行った。飲水は水道水を, 飼料は RC-4 (オリエンタル酵母) を滅菌することなく十分量与え, 自由に摂取せしめた。動物室は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $62.5 \pm 2.5\%$ に調整した。

2. 薬剤および投与方法

AT-2266 は当研究所で合成された標品 (1.5 水和物) を用い, Ampicillin (ABPC) は市販品 (ナトリウム塩, 明治製薬) を用いた。両剤とも 0.4% カルボキシメチルセルローズに 12.5 mg/ml の濃度に懸濁または溶解し, 50 mg/kg/回, 1日2回, 5日間, 1群3羽のウサギに強制経口投与した。

3. 糞便細菌の検索

糞便は投薬開始日 (0 日目) の投薬前, 5日間投与後の翌日 (5 日目) および投与終了後 8 日目 (12 日目) の合計 3 回, 各個体より新鮮糞便約 0.5 g をす速く秤量し, 光岡培地³⁾ 10 ml 中に入れ懸濁した。この懸濁液を希釈緩衝液 A⁴⁾ で 10 倍段階で連続希釈を行い, それぞれ 50 μ l を Table 1 に示す菌分離用寒天平板^{3,4)} にコンラージ棒で塗布し, 同表に記載したごとく培養を行った。なお嫌気培養にはガスバック法 (BBL) を用いた。各菌の family や genus の推定は光岡の方法³⁾ に従った。*Enterobacteriaceae* に属する菌株の species の同定にはミニテック法 (BBL) を用いた。各寒天平板上のコロニー数からそれぞれの family や genus のコロニー数を総合的に判断し, 希釈倍数を掛けて糞便 1g 当りの菌数を算出した。

4. 薬剤感受性の測定

分離菌株の薬剤感受性は日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法⁵⁾ に従って測定した。

5. 統計処理

0 日目, 5 日目および 12 日目のウサギ体重の測定結果は平均 \pm 標準偏差で示し, 有意差検定は Student の t-test に従って実施した。

II. 実験結果

ウサギに AT-2266 または ABPC を 50mg/kg/回, 1

日2回、5日間経口投与し、一般症状、糞便菌叢の変化および糞便中細菌の薬剤感受性を測定した。

1. 一般症状

無処置対照群および AT-2266 投与群の一般症状には異常は認められず、体重にも大きな変化は見られなかった (Table 2)。一方、ABPC 投与群では投与開始3日目より糞便量が著明に減少し、いずれの個体においても体重は軽度に減少した。ABPC 投与終了後、糞便量は翌日より正常に復し、体重も次第に増加した。

2. 糞便細菌叢の変化

Table 3 に示すごとく無処置対照群では0日目 (投薬開始日) に *Enterobacteriaceae* は全く検出されず、*Bacteroidaceae* と *Streptococcus* は3羽全例にそれぞれ平均 $10^{8.1}$ および $10^{8.7}$ 個/g 検出された。5日目 (投薬終了翌日) には3羽中1羽、12日目 (投薬終了後8日目) には3羽中2羽に *Enterobacteriaceae* が検出されたが、菌数は少なく 10^1 個/g 前後であった。

Bacteroidaceae と *Streptococcus* は0日目におけると同様5日目および12日目においても3羽全例に検出され、菌数は0日目と同様それぞれ約 10^8 および 10^8 個/g のレベルであった。

なお *Staphylococcus* や *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, *Lactobacillus*, *Clostridium* などの嫌気性菌はいずれの測定日においても全く検出されなかった。

ABPC 投与群では0日目に3羽中1羽のみに *Enterobacteriaceae* が検出され平均 $10^{1.4}$ 個/g であったが、5日目には3羽全例に検出され平均 $10^{8.1}$ 個/g のレベルになり、投薬による異常増殖が認められた。しかし12日目にはかなりレベルは低下し、3羽の平均菌数は $10^{8.7}$ 個/g となった。*Bacteroidaceae* には投薬による著明な変化は見られなかった。*Streptococcus* は投薬により0日目平均 $10^{8.4}$ 個/g から5日目平均 $10^{1.3}$ 個/g (1羽のみ検出) と減少したが、12日目にはやや回復し平均 $10^{8.0}$ 個/g となった。

AT-2266 投与群では0日目の投薬開始前に採取した糞便中から3羽中2羽に *Enterobacteriaceae* が検出され平均 $10^{8.3}$ 個/g のレベルであったが、5日目では3羽中1羽にのみ検出され平均 $10^{1.3}$ 個/g のレベルであり、12日目では全く検出されなかった。*Bacteroidaceae* および *Streptococcus* は0日目に3羽全例に平均 $10^{8.7}$ および $10^{8.3}$ 個/g 検出されたが、5および12日目においても菌数の変化は 10^1 以内であった。

3. 糞便中細菌の薬剤感受性

ABPC 投与により *Streptococcus* が減少するのはその

Table 1 Media and incubation methods for the isolation of bacteria in rabbit feces

Organism	Medium	Incubation method
<i>Anaerobes</i>	EG (Nissan)	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Anaerobes</i>	BL (Nissan)	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Bacteroidaceae</i>	NBGT*	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Bifidobacterium</i>	BS*	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Eubacterium</i>	ES*	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Lactobacillus</i>	Modified LBS*	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Clostridium**</i>	NN*	37°C, anaerobic, 72 hours
<i>Streptococcus</i>	TATAC*	37°C, aerobic, 48 hours
<i>Staphylococcus</i>	PEES*	37°C, aerobic, 48 hours
<i>Enterobacteriaceae</i>	DHL (Eiken)	37°C, aerobic, 48 hours
<i>Aerobes</i>	Blood agar	37°C, aerobic, 48 hours

* See references 3 and 4

**Lecithinase positive

Table 2 Changes of body weight in rabbits serially receiving AT-2266 or ampicillin at an oral dose of 50 mg/kg, twice a day for 5 days

Group	Body weight (kg) on day:		
	0	5	12
Non-treated control	2.72 ± 0.12*	2.88 ± 0.20	3.20 ± 0.26
ABPC	2.78 ± 0.13	2.55 ± 0.05	2.67 ± 0.12**
AT-2266	2.75 ± 0.10	2.77 ± 0.10	3.02 ± 0.15

*Average of 3 rabbits ± standard deviation

**Significantly different from non-treated control (P < 0.05)

抗菌スペクトラムから当然予想された所であったが、*Enterobacteriaceae* が増加するのは意外な結果であった。その理由を解明するため0, 5, 12日目に分離された *Enterobacteriaceae* を同定し、薬剤感受性を調べた (Table 4)。0日目に分離された *Enterobacteriaceae*

Table 3 Changes of bacterial flora in rabbit feces by serial oral administration of AT-2266 or ampicillin

Group	Organism	Log (bacterial number per g feces) on day :		
		0	5	12
Non-treated control	<i>Enterobacteriaceae</i>	(0)**	1.2 ± 2.1*(1)	2.9 ± 2.6 (2)
	<i>Bacteroidaceae</i>	8.1 ± 0.9 (3)	8.6 ± 0.2 (3)	8.8 ± 0.2 (3)
	<i>Bifidobacterium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Eubacterium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Peptococcaceae</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Lactobacillus</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Clostridium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Streptococcus</i>	5.7 ± 0.5 (3)	5.8 ± 0.3 (3)	5.9 ± 1.0 (3)
	<i>Staphylococcus</i>	(0)	(0)	(0)
	Total bacteria	8.1 ± 0.9 (3)	8.6 ± 0.2 (3)	8.8 ± 0.2 (3)
ABPC	<i>Enterobacteriaceae</i>	1.4 ± 2.4 (1)	9.1 ± 0.2 (3)	5.7 ± 0.5 (3)
	<i>Bacteroidaceae</i>	8.8 ± 0.2 (3)	8.4 ± 0.1 (3)	9.4 ± 0.2 (3)
	<i>Bifidobacterium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Eubacterium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Peptococcaceae</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Lactobacillus</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Clostridium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Streptococcus</i>	5.4 ± 0.3 (3)	1.3 ± 2.3 (1)	3.0 ± 0.2 (3)
	<i>Staphylococcus</i>	(0)	(0)	(0)
	Total bacteria	8.8 ± 0.2 (3)	9.2 ± 0.1 (3)	9.5 ± 0.2 (3)
AT-2266	<i>Enterobacteriaceae</i>	3.3 ± 2.9 (2)	1.3 ± 2.2 (1)	(0)
	<i>Bacteroidaceae</i>	8.7 ± 0.1 (3)	9.5 ± 0.2 (3)	9.1 ± 0.3 (3)
	<i>Bifidobacterium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Eubacterium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Peptococcaceae</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Lactobacillus</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Clostridium</i>	(0)	(0)	(0)
	<i>Streptococcus</i>	5.3 ± 0.7 (3)	4.6 ± 1.1 (3)	4.5 ± 1.6 (3)
	<i>Staphylococcus</i>	(0)	(0)	(0)
	Total bacteria	8.7 ± 0.1 (3)	9.5 ± 0.2 (3)	9.1 ± 0.3 (3)

* Average of 3 fecal samples ± standard deviation

**Number of bacterium-positive fecal samples

Drug treatment: 50 mg/kg/dose, twice a day for 5 days

はいずれも *E. coli* で、その感受性を MIC 値で示すと AT-2266 0.2 µg/ml, ABPC 3.13 µg/ml であった。5 日目に分離された *Enterobacteriaceae* もすべて *E. coli* であったが、感受性は AT-2266 0.2 µg/ml, ABPC 3.13 ~ > 100 µg/ml で、ABPC 高度耐性株が検出さ

れた。12 日目には ABPC 投与群のみから *Enterobacteriaceae* が検出されたが、同定の結果 *E. coli* と *Klebsiella pneumoniae* が混在しており、それぞれの AT-2266 に対する感受性は 0.2 および 0.39 µg/ml, ABPC に対する感受性は 3.13 ~ > 100 µg/ml および

Table 4 Drug susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from feces of rabbits orally treated with AT-2266 or ampicillin

Day	Group	Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			AT-2266	ABPC
0	AT-2266	<i>E. coli</i>	0.2	3.13
	AT-2266	<i>E. coli</i>	0.2	3.13
	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	3.13
5	AT-2266	<i>E. coli</i>	0.2	>100
	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	3.13
	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	>100
	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	>100
12	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	3.13
	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	>100
	ABPC	<i>E. coli</i>	0.2	>100
	ABPC	<i>K. pneumoniae</i>	0.39	12.5

Drug treatment: 50 mg/kg/dose, twice a day for 5 days

12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

III. 考 察

腸内細菌叢は動物種によりかなり異なっていることは広く知られた事実である⁹⁾。抗菌剤の腸内細菌叢に及ぼす影響を調べるため、どの動物を用いるのが適当であるかについては定説はないが、今回われわれは比較的腸内細菌叢の単純なウサギを用いて、AT-2266の腸内細菌叢に及ぼす影響をABPCを陽性対照化合物として調べた。

投与前のウサギの糞便中では *Bacteroidaceae* が圧倒的に優性で次いで *Streptococcus* であり、*Enterobacteriaceae* は検出される個体とされない個体があり、その他の菌種は検出されなかった。このように菌叢構成は比較的単純かつ安定で、無処置対照群では菌数変動はほぼ1オーダー以内に納まっているので、薬剤が *Bacteroidaceae* や *Streptococcus* にどのような影響を及ぼすかを調べるにはウサギは適当な動物種と思われる。

ABPCを50 mg/kg/回、1日2回、5日間連続経口投与したウサギでは、投与により *Streptococcus* の減少と共に *Enterobacteriaceae* の異常増殖がひき起された。異常増殖した *Enterobacteriaceae* は2羽ではABPC高度耐性菌であったが、1羽ではABPC感受性 *E. coli* であった。ABPC投与によりABPC感受性菌が増加する理由は明らかではないが、ABPC感受性 *E. coli* の増加した個体ではABPCに耐性の *Bacteroidaceae* が高レベルに共存していたので、*Bacteroidaceae* の生産す

る β -ラクタマーゼによりABPCが分解されていた可能性も考えられる。

一方、AT-2266を50 mg/kg/回、1日2回、5日間連続経口投与したウサギでは、投与前3羽中2羽に検出された *Enterobacteriaceae* (平均 $10^{8.3}$ 個/g) が投薬終了翌日に3羽中1羽にのみ検出 (平均 $10^{1.4}$ 個/g) され、投薬終了後8日目には3羽とも検出されなくなった。この事はAT-2266の抗菌作用のためとも考えられるが、前述のごとくウサギの腸内では *Enterobacteriaceae* は菌叢構成菌の中では菌数が少なくかつ検出頻度が一定していないので、この結果から直ちに本剤の *Enterobacteriaceae* に対する作用を云々することは避けるべきであろう。一方 *Bacteroidaceae* と *Streptococcus* は投薬終了翌日および終了後8日目のいずれの時点においても有意の変化は認められなかった。したがってAT-2266は今回のような実験条件下ではこれらの菌種に影響を与えないものと判断される。

河合らのAT-2266 phase I試験におけるヒト糞便細菌叢検討結果では、AT-2266 1回400 mg、1日2回、5日間投与で *Enterobacteriaceae* および *Staphylococcus* は減少したが、*Anaerobes* および *Streptococcus* はほとんど変動しなかったと報告されている⁷⁾。したがってウサギの実験結果は *Enterobacteriaceae*、*Anaerobes* および *Streptococcus* に関してはヒトにおける実験結果をよく予測していると思われる。

ウサギおよびヒトの実験結果を総合してみると、AT-2266は腸内の *Enterobacteriaceae* や *Staphylococcus* を減少させるが、*Anaerobes* や *Streptococcus* などの主要腸内細菌叢構成菌には大きな影響を与えない薬物と考えられる。(実施期間: 昭和57年7月~同年8月)

文 献

- 1) 中村信一, 片江宏巳, 南 明, 中田勝久, 井上 了, 山岸純一, 高瀬善行, 清水當尚: AT-2266 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 32(S-3): 70~85, 1984
- 2) 賀川和宣, 武内美登利, 沢 赫代, 山田 寿, 梅村厚志, 渡辺邦友, 上野一恵: AT-2266 の嫌気性菌に対する抗菌作用について. *Chemotherapy* 32(S-3)34~42, 1984
- 3) 光岡知足: 腸内細菌叢の検索手技. *感染症学雑誌* 45: 406~419, 1971
- 4) 上野一恵, 光岡知足, 渡辺邦友: 嫌気性菌の分離と同定法. *細菌学技術叢書* 3: 97, 1982
- 5) MIC測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 6) 光岡知足: 動物とヒトにおける腸内細菌叢とその成立. *日本医師会雑誌* 67: 132~207, 1972
- 7) 河合 満, 中西通泰, 前川暢夫: AT-2266 の臨床第1相試験. *Chemotherapy* 32(S-3): 334~358, 1984

INFLUENCE OF AT-2266 ON RABBIT FECAL FLORA

SATORU INOUE, YUJI KUBO, YUZO SAKAGUCHI, SHINICHI NAKAMURA
and MASANAO SHIMIZU

Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

AT-2266 or ampicillin (ABPC) was orally administered to rabbits at a dose of 50 mg/kg per dose, twice a day for 5 days, and their general symptoms and fecal flora were checked before and after administration.

ABPC administration caused the decrease of body weight and fecal amount, and a marked change of fecal flora, i. e. the remarkable increase in the number of *Enterobacteriaceae* and the significant decrease in that of *Streptococcus*. The increased *Enterobacteriaceae* were mainly *Escherichia coli*, and the MIC values of AT-2266 and ABPC for them were 0.2 and 3.13~ >100 µg/ml respectively.

AT-2266 administration did not affect body weight nor fecal amount, but decreased the number of *Enterobacteriaceae*, a minor component of rabbit fecal flora, without affecting the number of *Bacteroidaceae* and *Streptococcus*.

These results indicate that AT-2266 being different from ABPC is a drug not affecting major components of rabbit fecal flora.