

## 新経口セフェム剤 ME 1207 のビーグル犬腸内菌叢に及ぼす影響

田村 淳・井田 孝志・斉藤早紀子・鈴木平治郎

新里鉄太郎・三坂 正人・中山 悦子

明治製菓株式会社薬品総合研究所\*

和田 光 一

カルピス食品工業株式会社腸内フローララボラトリー

新経口セフェム系抗生物質 ME 1207 をビーグル犬に 12 mg/kg/day 及び 250 mg/kg/day を設定し、1 日 1 回、14 日間連続経口投与を行い、投与期間前、投与期間中、投与期間終了後の腸内菌叢の変化を測定した。また、*Clostridium difficile* の D-1 抗原の検出、ME 1206 の糞便中抗菌活性の検出及び糞便中  $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定を行った。更に ME 1207 投与群について糞便中分離菌の ME 1206 耐性菌の割合について測定した。これらの成績を以下に示す。

1. 糞便の性状は、実験期間中を通していずれの投与群においても正常で、下痢などの異常は認められなかった。

2. 12 mg/kg/day 投与群では、Enterobacteriaceae の若干の減少及び嫌気性菌群の一時的な減少が認められた。250 mg/kg/day 投与群では、Enterobacteriaceae は減少ないし検出限界以下となり、*Enterococcus* spp. 主体の菌叢となった。嫌気性菌群も大部分検出限界以下となった。投与期間終了後には、元の菌叢に回復した。

3. *C. difficile* は、特に 12 mg/kg/day 投与群で出現頻度が高かった。また *C. difficile* の産生する D-1 抗原は、対照群及び 12 mg/kg/day 投与群で多く検出されたが、250 mg/kg/day 投与群では投与開始後、検出されない例が多かった。

4. 糞便中の抗菌活性に関しては、12 mg/kg/day 投与群で検出はわずかであったが、250 mg/kg/day 投与群では ME 1206 が 1,000  $\mu$ g/g 以上の高濃度で検出された。

5. 糞便中の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は総じて低かった。

6. 耐性菌への菌交代は、Enterobacteriaceae で ME 1207 投与期間中に認められたが、*Staphylococcus* spp. では耐性菌は認められなかった。また Streptococcaceae は、ME 1207 投与期間中 *Enterococcus* spp. 主体の菌叢に変化した。

**Key words** : ME 1207, ME 1206, ビーグル犬腸内菌叢

新規経口用エステル型セフェム系抗生物質 ME 1207 は、経口投与後腸管から吸収され、腸管壁のエステラーゼによって ME 1206 に加水分解される。

この ME 1206 は、嫌気性菌を含むグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対し、幅広い抗菌スペクトルを有し、強い抗菌力を示す<sup>1)</sup>。

今回我々は、ビーグル犬を用いて ME 1207 の経口投与による腸内菌叢への影響を検討した。また抗菌剤投与の際、*Clostridium difficile* による偽膜性大腸炎の惹起が懸念されるので、*C. difficile* とその産生する D-1 抗原の検出を実施したので報告する。

## I. 実験材料と方法

## 1. 実験動物

ビーグル犬(雄、月齢 5~6 カ月、体重 7.15~8.20 kg) 12 頭を用いた。

## 2. 投与薬剤及び投与方法

ME 1207 は、ME 1207 錠と同一成分の混合物を用いた。

1 群を 4 頭とし、3 群に分けた。そのうち 2 群には ME 1207 を 12 mg 力価/kg 又は 250 mg 力価/kg となるように強制的に経口投与し、対照群には ME 1207 を含まないプラセボを同時投与した。投与は 1 日 1 回、14 日間連続で行なった。

\*〒222 横浜市港北区師岡町 760

投与量の選択は、ME 1207 のイヌを用いた亜急性毒性試験の無影響量 (250 mg/kg)<sup>2)</sup> ならびに推定される臨床用量 (600 mg/man/day)<sup>3)</sup> に基づき設定した。

### 3. 糞便採取

糞便の採取は、投与開始 9 日前 (before 9 th day), 前日 (before 1 st day), 投与開始 2 日目 (during 2 nd day), 同 5 日目 (during 5 th day), 同 8 日目 (during 8 th day), 投与終了 1 日目 (after 1 st day), 同 7 日目 (after 7 th day), 同 21 日目 (after 21 st day) の計 8 回行った。採取日に排泄された糞便は、その性状を観察した後プラスチック容器に採取し、嫌気状態で保冷し、試験に供した。

### 4. 糞便菌叢の検索

光岡の方法に従って実施した<sup>4)</sup>。すなわち採取した検体 1g を秤量し、直ちに 9 ml の嫌気性希釈液を含む中試験管に移し、酸素不含、無菌炭酸ガス通気下で良く混和した ( $10^{-1}$ )。その 1 ml を新しい希釈液 9 ml に加え、上記の炭酸ガスを吹き込みながら、同様に  $10^{-8}$  倍まで希釈し、順次、希釈液の 0.05 ml を嫌気性菌用平板 10 種類、好気性菌用 (*Lactobacillus* selective medium (LBS) を含む) 平板 8 種類に一樣に塗抹した。使用した培地の詳細は、Table 1 に示した。嫌気性菌用平板は、還元スチールウールと共にジャーに入れ炭酸ガスで置換後、37°C 72 時間嫌気培養した。また、DHL, 5% 綿羊脱繊維血加 Trypticase soy (TS) 培地は、37°C で 24 時間好気培養、TATAC, PEES, Potato

dextrose (P), NAC, カンジダ培地は、37°C 72 時間好気培養した。LBS 培地は、ジャーに入れ、還元スチールウールを入れずに、炭酸ガスで置換して 37°C 72 時間微好気培養した。培養終了後、各培地に発育した集落の形状及びその数を記録し、それぞれグラム染色を行い集落の形状、グラム染色性、細胞の形態によって菌群を決定して集計した。Neomycin naglar (NN) 培地上で Lecithinase (+) の性状を示した集落については、乾燥ウェルシュ菌 A 型抗毒素濾紙 (白水) を用い NN 培地上で Lecithinase 中和試験を行い陽性の菌株を *Clostridium perfringens* として集計した。

### 5. *Clostridium difficile* D-1 抗原の検出

D-1 抗原の検出には、C. D. チェック・D-1 (三菱化成工業) を用いた。すなわち検体 0.5 g に 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml を加えて懸濁後、更に 1, 2, 2-trifluoroethane 0.5 ml を加え、遠心分離 (3,000 rpm, 15 分) した。その上清 100  $\mu$ l をスライド板上にとり、次いで D-1 抗原感作ラテックス試薬 40  $\mu$ l を添加、スライド板をゆっくり揺り動かし 3 分後にラテックス試薬の凝集を肉眼で観察した。凝集したものを陽性と判定した。

### 6. 糞便中の ME 1206 濃度の測定

糞便 5 g と抽出用緩衝液 (メタノール: 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.0 = 2: 1) 20 ml を混合し、ホモジネート後、3,000 rpm, 15 分遠心分離し、その上清を測定試料とした。薬剤濃度の測定は、カップ法による Bioas-

Table 1. Isolation of aerobic and anaerobic bacteria from fecal flora

Medium (abbreviation, manufacture)	Selection
for aerobes	
Trypticase soy blood agar (TS, base BBL)	aerobic bacteria
DHL agar (DHL, EIKEN)	Enterobacteriaceae
TATAC agar (TATAC)	Streptococcaceae
PEES agar (PEES, base EIKEN No. 110)	<i>Staphylococcus</i> spp.
NAC agar (NAC, EIKEN)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Potato dextrose agar (P, base EIKEN)	Yeasts
<i>Candida</i> agar (NISSUI)	<i>Candida albicans</i>
<i>Lactobacillus</i> selective medium (LBS, base BBL)	<i>Lactobacillus</i> spp.
for anaerobes	
EG agar (EG, EIKEN)	anaerobic bacteria
BL agar (BL, NISSUI)	anaerobic bacteria
BS-2 agar (BS, base NISSUI BL agar)	<i>Bifidobacterium</i> spp.
NBGT agar (NBGT, base NISSUI EG agar)	Bacteroidaceae
<i>Bacteroides</i> bile esculin agar (BBE, KYOKUTO)	<i>Bacteroides fragilis</i> group
Neomycin Naglar agar (NN)	Lecithinase(+) <i>Clostridium</i> spp.
PMS agar (PMS, base EIKEN EG agar)	anaerobic cocci
ES agar (ES, base EIKEN EG agar)	<i>Eubacterium</i> spp.
Modified FM agar (FM, NISSUI)	<i>Fusobacterium</i> spp.
CCMA agar (CCMA, NISSUI)	<i>Clostridium difficile</i>

Table 2-1. Normal fecal flora of beagle dog feces (control group, n=4)

Organism	before 9th day	before 1st day	during 2nd day	during 5th day
Total	10.1±0.56 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	10.9±0.12(100)	10.2±0.34(100)	9.9±0.08(100)
Total aerobes	9.8±0.44(100)	10.2±0.20(100)	10.0±0.10(100)	9.8±0.06(100)
Enterobacteriaceae	7.3±8.1(100)	7.1±0.82(100)	5.5±1.75(100)	5.4±0.32(100)
Streptococcaceae	9.5±0.52(100)	9.8±0.34(100)	8.7±0.63(100)	8.6±0.47(100)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2.8±0.09( 50)	3.2±0.87(100)	— <sup>c</sup> ( 0)	3.2 ( 25)
Yeasts	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Candida albicans</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.0 ( 25)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	9.2±0.79(100)	9.9±0.17(100)	9.9±0.15(100)	9.8±0.07(100)
Total anaerobes	9.5±0.82(100)	10.8±0.17(100)	9.5±0.74(100)	9.2±0.19(100)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.4±1.57( 75)	9.5±0.79(100)	8.7±0.84( 75)	8.6±0.86(100)
<i>Eubacterium</i> spp.	8.8±0.92(100)	9.9±0.25(100)	8.8±0.99(100)	8.3±0.28(100)
Bacteroidaceae	9.1±0.79(100)	10.7±0.15(100)	8.7±0.95(100)	8.3±0.53(100)
<i>B. fragilis</i> group	8.1±0.45(100)	9.7±0.25(100)	7.4±0.72(100)	7.1±1.21(100)
<i>Fusobacterium</i> spp.	6.8±0.48(100)	7.7±1.72(100)	5.7±1.09( 75)	4.6 ( 25)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	8.4±1.22(100)	9.7±0.47(100)	8.6±1.17(100)	8.0±0.92( 50)
<i>Clostridium</i> spp.	8.5±0.74(100)	9.1±0.58(100)	7.7±1.29( 50)	8.6±0.00( 50)
Lecithinase(-)	8.5±0.74(100)	9.1±0.58(100)	7.7±1.29( 50)	8.6 ( 50)
<i>C. difficile</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
Lecithinase(+)	2.6 ( 25)	— ( 0)	— ( 0)	2.6 ( 25)
<i>C. perfringens</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)

<sup>a</sup> Mean±S. D. (Log<sub>10</sub> CFU/g of wet feces)

<sup>b</sup> Percentage of beagle dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

<sup>c</sup> Not detected

Table2-2. Normal fecal flora of beagle dog feces (control group, n=4)

Organism	during 8th day	after 1st day	after 7th day	after 21st day
Total	9.9±0.04 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	10.2±0.37(100)	10.7±0.37(100)	9.6±0.64(100)
Total aerobes	9.6±0.17(100)	9.9±0.21(100)	10.2±0.16(100)	9.2±0.88(100)
Enterobacteriaceae	6.2±1.82(100)	6.4±1.51(100)	6.7±1.50(100)	6.8±0.48(100)
Streptococcaceae	7.4±1.82(100)	8.6±1.15(100)	9.3±0.50(100)	8.9±0.88(100)
<i>Staphylococcus</i> spp.	3.3±1.26( 75)	2.6±0.40( 25)	3.5±1.65( 75)	4.2±1.34(100)
Yeasts	— <sup>c</sup> ( 0)	2.3 ( 0)	— ( 0)	2.8 ( 25)
<i>Candida albicans</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	2.8 ( 25)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.9 ( 25)	2.6 ( 25)	4.2 ( 25)	2.6±0.43( 50)
<i>Lactobacillus</i> spp.	9.5±0.28(100)	9.9±0.24(100)	10.1±0.11(100)	8.8±1.12(100)
Total anaerobes	9.6±0.17(100)	9.6±1.15(100)	10.5±0.51(100)	9.1±0.37(100)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9.0±0.08( 75)	8.6±0.01( 50)	9.6±0.47( 57)	7.9±0.89( 50)
<i>Eubacterium</i> spp.	8.9±0.43(100)	9.0±0.81(100)	9.7±0.74(100)	8.6±0.57(100)
Bacteroidaceae	9.0±0.34(100)	9.1±1.55(100)	10.2±0.57(100)	8.0±0.30(100)
<i>B. fragilis</i> group	7.9±0.68(100)	8.8±1.72( 75)	8.3±0.55(100)	7.0±0.50(100)
<i>Fusobacterium</i> spp.	6.0±1.49(100)	6.3±1.25( 75)	5.9±0.25( 50)	5.6 ( 25)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	8.6±0.24( 75)	8.5±0.17( 75)	9.6±0.59(100)	7.8±0.93(100)
<i>Clostridium</i> spp.	8.8±0.42(100)	9.5±0.48( 75)	9.5±0.58(100)	8.5±0.42(100)
Lecithinase(-)	8.8±0.42(100)	9.5±0.48( 75)	9.5±0.58(100)	8.5±0.42(100)
<i>C. difficile</i>	— ( 0)	2.7±0.49( 50)	— ( 0)	— ( 0)
Lecithinase(+)	— ( 0)	— ( 0)	2.3 ( 25)	— ( 0)
<i>C. perfringens</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)

<sup>a</sup> Mean±S. D. (Log<sub>10</sub> CFU/g of wet feces)

<sup>b</sup> Percentage of beagle dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

<sup>c</sup> Not detected

Table 3-1. Effect of ME1207 on fecal flora of beagle dog feces (12mg/kg/day, n=4)

Organism	before 9th day	before 1st day	during 2nd day	during 5th day
Total	10.5±0.20 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	10.9±0.14(100)	9.5±0.30(100)	10.1±0.31(100)
Total aerobes	10.3±0.25(100)	10.3±0.20(100)	9.4±0.26(100)	10.1±0.30(100)
Enterobacteriaceae	6.9±0.61(100)	7.9±0.52(100)	6.3±2.29( 75)	5.4±2.31(100)
Streptococcaceae	9.8±0.37(100)	10.0±0.38(100)	9.0±0.28(100)	10.0±0.29(100)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2.9±0.65( 75)	3.4±0.80(100)	3.6 ( 25)	2.3 ( 25)
Yeasts	— <sup>c</sup> ( 0)	2.7±0.55( 50)	2.8 ( 25)	— ( 0)
<i>Candida albicans</i>	— ( 0)	2.7±0.55( 50)	2.8 ( 25)	— ( 0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.3 ( 25)	2.5±0.21( 50)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	10.1±0.25(100)	9.9±0.12(100)	8.2±1.43(100)	9.1±0.38(100)
Total anaerobes	9.8±0.52(100)	10.8±0.16(100)	8.1±0.98(100)	9.0±0.47(100)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9.7±0.35( 75)	8.9±0.36( 75)	8.2±0.78( 50)	8.7±0.12( 50)
<i>Eubacterium</i> spp.	9.1±0.36(100)	9.9±0.26(100)	6.9±2.04( 50)	7.3 ( 25)
Bacteroidaceae	8.5±0.93(100)	10.6±0.20(100)	6.7±2.55(100)	8.2±1.29(100)
<i>B. fragilis</i> group	7.3±0.59(100)	9.9±0.39(100)	5.1±2.03(100)	7.2±0.78( 75)
<i>Fusobacterium</i> spp.	6.4±0.30( 75)	7.4±2.73( 75)	4.1±1.86( 50)	4.7±2.04( 50)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	7.9±1.54(100)	9.7±0.38(100)	7.3 ( 25)	8.1±0.71( 50)
<i>Clostridium</i> spp.	8.7±0.85(100)	9.0±0.75(100)	7.4±0.85( 75)	7.4±1.86(100)
Lecithinase(-)	8.7±0.85(100)	9.0±0.75(100)	7.4±0.85( 75)	7.4±1.86(100)
<i>C. difficile</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	4.6 ( 25)
Lecithinase(+)	5.2±0.38( 50)	3.0 ( 25)	— ( 0)	— ( 0)
<i>C. perfringens</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)

<sup>a</sup> Mean ± S. D. (Log<sub>10</sub> CFU/g of wet feces)

<sup>b</sup> Percentage of beagle dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

<sup>c</sup> Not detected

Table 3-2. Effect of ME1207 on fecal flora of beagle dog feces (12mg/kg/day, n=4)

Organism	during 8th day	after 1st day	after 7th day	after 21st day
Total	9.4±0.36 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	9.8±0.32(100)	10.3±0.49(100)	10.0±0.11(100)
Total aerobes	9.1±0.67(100)	9.7±0.30(100)	9.8±0.54(100)	9.6±0.18(100)
Enterobacteriaceae	4.2±0.32(100)	4.4±1.10(100)	7.4±0.67(100)	6.2±0.45(100)
Streptococcaceae	9.0±0.66(100)	9.6±0.28(100)	8.9±0.89(100)	8.7±1.09(100)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2.5±0.21( 50)	2.6 ( 25)	3.1±0.71( 50)	5.3±3.52( 75)
Yeasts	— <sup>c</sup> ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Candida albicans</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.6±1.32(100)	7.6±1.67(100)	9.6±0.60(100)	9.4±0.04(100)
Total anaerobes	8.8±0.64(100)	8.6±1.34(100)	9.9±0.94(100)	9.6±0.52(100)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.0±0.88( 75)	9.0±0.25( 75)	8.6±1.60(100)	8.7±0.92(100)
<i>Eubacterium</i> spp.	8.1±0.28( 75)	7.6±1.84( 50)	9.2±1.06(100)	8.5±0.90(100)
Bacteroidaceae	7.9±1.67(100)	7.5±2.00( 75)	9.0±1.21(100)	8.7±1.75(100)
<i>B. fragilis</i> group	5.5±1.75(100)	7.2±1.70( 75)	7.4±1.66(100)	8.1±1.79(100)
<i>Fusobacterium</i> spp.	2.3 ( 25)	— ( 0)	5.5±2.27( 50)	6.0±1.17( 75)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	7.4 ( 25)	8.6 ( 25)	8.9±0.84(100)	8.1±0.28( 50)
<i>Clostridium</i> spp.	8.2±0.69(100)	7.5±1.24(100)	9.1±0.92(100)	8.7±0.74(100)
Lecithinase(-)	8.2±0.69(100)	7.5±1.24(100)	9.1±0.92(100)	8.7±0.74(100)
<i>C. difficile</i>	5.0±1.05( 75)	4.4±0.72( 75)	7.0 ( 25)	3.2±0.04( 50)
Lecithinase(+)	— ( 0)	— ( 0)	4.0±0.92( 50)	( 0)
<i>C. perfringens</i>	— ( 0)	— ( 0)	4.6 ( 25)	( 0)

<sup>a</sup> Mean ± S. D. (Log<sub>10</sub> CFU/g of wet feces)

<sup>b</sup> Percentage of beagle dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

<sup>c</sup> Not detected

Table 4-1. Effect of ME1207 on fecal flora of beagle dog feces (250 mg/kg/day, n=4)

Organism	before 9th day	before 1st day	during 2nd day	during 5th day
Total	10.6 ± 0.48 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	10.9 ± 0.29(100)	9.0 ± 0.98(100)	9.9 ± 0.76(100)
Total aerobes	10.0 ± 0.54(100)	10.2 ± 0.53(100)	8.8 ± 1.08(100)	9.9 ± 0.76(100)
Enterobacteriaceae	7.6 ± 1.25(100)	7.8 ± 0.57(100)	2.8 ( 25)	3.5 ( 25)
Streptococcaceae	9.2 ± 1.11(100)	8.9 ± 1.76(100)	8.5 ± 1.40(100)	9.9 ± 0.76(100)
<i>Staphylococcus</i> spp.	3.7 ± 0.71( 75)	3.5 ± 0.85( 75)	— ( 0)	— ( 0)
Yeasts	— <sup>c</sup> ( 0)	— ( 0)	2.6 ( 25)	2.8 ( 25)
<i>Candida albicans</i>	— ( 0)	— ( 0)	2.6 ( 25)	— ( 0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	9.7 ± 0.52(100)	10.0 ± 0.45(100)	8.3 ± 0.89( 75)	4.3 ( 25)
Total anaerobes	10.4 ± 0.49(100)	10.8 ± 0.23(100)	4.8 ± 3.29( 75)	3.5 ( 25)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.7 ± 1.49(100)	9.5 ± 0.42(100)	6.1 ± 3.47( 50)	— ( 0)
<i>Eubacterium</i> spp.	9.8 ± 0.69(100)	10.1 ± 0.17(100)	— ( 0)	— ( 0)
Bacteroidaceae	9.6 ± 0.75(100)	10.6 ± 0.34(100)	2.3 ( 25)	— ( 0)
<i>B. fragilis</i> group	8.7 ± 0.63(100)	9.6 ± 0.72(100)	2.3 ( 25)	— ( 0)
<i>Fusobacterium</i> spp.	7.0 ± 1.34(100)	6.5 ± 1.63( 75)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	9.7 ± 0.43(100)	9.6 ± 0.33(100)	— ( 0)	— ( 0)
<i>Clostridium</i> spp.	9.1 ± 0.38(100)	8.9 ± 1.12(100)	2.3 ( 25)	3.5 ( 25)
Lecithinase(-)	9.1 ± 0.38(100)	8.9 ± 1.12(100)	2.3 ( 25)	3.5 ( 25)
<i>C. difficile</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)
Lecithinase(+)	— ( 0)	3.0 ( 25)	— ( 0)	— ( 0)
<i>C. perfringens</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)

<sup>a</sup> Mean ± S. D. (Log<sub>10</sub> CFU/g of wet feces)

<sup>b</sup> Percentage of beagle dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

<sup>c</sup> Not detected

Table 4-2. Effect of ME1207 on fecal flora of beagle dog feces (250mg/kg/day, n=4)

Organism	during 8th day	after 1st day	after 7th day	after 21st day
Total	9.5 ± 0.73 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	9.3 ± 0.92(100)	10.2 ± 0.28(100)	10.1 ± 0.69(100)
Total aerobes	9.5 ± 0.82(100)	9.3 ± 0.91(100)	10.0 ± 0.32(100)	9.9 ± 0.53(100)
Enterobacteriaceae	4.4 ± 0.45( 75)	4.1 ± 2.48(100)	7.2 ± 0.70(100)	6.1 ± 2.11(100)
Streptococcaceae	9.5 ± 0.82(100)	9.3 ± 0.91(100)	8.9 ± 0.55(100)	9.1 ± 0.74(100)
<i>Staphylococcus</i> spp.	— <sup>c</sup> ( 0)	— ( 0)	2.3 ( 25)	3.6 ± 0.64(100)
Yeasts	— ( 0)	2.8 ( 25)	— ( 0)	2.3 ( 25)
<i>Candida albicans</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	2.3 ( 25)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	— ( 0)	4.2 ( 25)	2.6 ( 25)	— ( 0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.1 ± 1.72(100)	6.5 ± 0.74( 75)	10.0 ± 0.29(100)	9.7 ± 0.54(100)
Total anaerobes	6.8 ± 1.76(100)	5.8 ± 4.24( 50)	9.7 ± 0.20(100)	9.3 ± 1.43(100)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	— ( 0)	— ( 0)	8.6 ± 0.92(100)	9.0 ± 0.74( 50)
<i>Eubacterium</i> spp.	— ( 0)	— ( 0)	8.7 ± 0.42(100)	8.9 ± 1.10(100)
Bacteroidaceae	7.9 ( 25)	8.8 ( 25)	9.2 ± 0.46(100)	8.2 ± 2.94(100)
<i>B. fragilis</i> group	— ( 0)	— ( 0)	8.3 ± 0.41(100)	6.7 ± 2.05(100)
<i>Fusobacterium</i> spp.	— ( 0)	— ( 0)	4.2 ± 0.96(100)	7.3 ( 25)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	— ( 0)	— ( 0)	8.7 ± 0.31( 75)	8.8 ± 0.66( 75)
<i>Clostridium</i> spp.	6.7 ± 1.62(100)	2.8 ( 25)	8.7 ± 0.09(100)	8.9 ± 0.79( 75)
Lecithinase(-)	6.7 ± 1.62(100)	2.8 ( 25)	8.7 ± 0.09(100)	8.9 ± 0.79( 75)
<i>C. difficile</i>	— ( 0)	— ( 0)	3.7 ± 0.95(100)	— ( 0)
Lecithinase(+)	— ( 0)	— ( 0)	4.5 ± 1.88( 75)	3.2 ± 1.28( 50)
<i>C. perfringens</i>	— ( 0)	— ( 0)	— ( 0)	3.2 ± 1.28( 50)

<sup>a</sup> Mean ± S. D. (Log<sub>10</sub> CFU/g of wet feces)

<sup>b</sup> Percentage of beagle dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

<sup>c</sup> Not detected

say で行なった。試験菌には *Escherichia coli* NIHJ を用いた。

#### 7. 糞便中の $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定

ME 1207 投与群の糞便中の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を投与開始前日、投与開始 8 日目、投与終了 1 日目、同 7 日目について測定した。糞便を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 5 倍希釈し、攪拌後、4°C にて、3,000 rpm、20 分遠心分離し、その上清をフィルター (0.45  $\mu$ m) で濾過し被検液とした。 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定は、cephaloridine (塩野義製薬) を基質としたマイクロヨード法の変法<sup>9)</sup>で行った。

#### 8. 糞便中分離菌の ME 1206 耐性に対する感受性測定のチェック

ME 1207 投与群の投与開始前日、投与開始 8 日目、投与終了 1 日目、同 7 日目、同 21 日目の計 5 回の糞便より分離された Enterobacteriaceae, Streptococcaceae 及び *Staphylococcus* spp. につき各 20 株を無作為に選択し、以下の寒天平板に楊子ストリークした。すなわち Enterobacteriaceae 及び *Staphylococcus* spp. については感受性測定用寒天平板培地 (STA: 日水) 及びその ME 1206 を 12.5, 100  $\mu$ g/ml 含有する同寒天平板培地に、Streptococcaceae については同量の ME 1206 及び 5% 馬脱纖維血を含有する STA 寒天平板培地を用いた。

各寒天平板培地に植菌後 37°C 20 時間培養し、ME 1206 の 12.5  $\mu$ g/ml 含有平板に増殖した株を ME 1206 耐性菌と判定した。

また、測定した一部の菌について、Api 20 E, Api 20 STREP 及び Api STAPH (アスカ純薬) を用いて菌種の同定を行った。

## II. 結 果

### 1. 糞便の性状

糞便の性状は、実験期間中を通していずれの投与群においても正常で、下痢などの異常は認められなかった。

### 2. 糞便菌叢の変動

対照群, 12 mg/kg/day 及び 250 mg/kg/day 投与群 (4 匹) の総菌数, 総好気性菌数, 総嫌気性菌数及び各菌群菌数の菌数平均値, 標準偏差及び検出率の経日変動を Tables 2~4 に示した。

1) 対照群 (プラセボ) では、実験期間中を通して菌叢は一定しており、その変動は小さかった。また対照群 4 頭の各個体によるバラツキも小さかった。

好気性菌群では、*Lactobacillus* spp., Streptococcaceae, 次いで Enterobacteriaceae が多く、*Staphylococcus* spp. は少数であった。Yeast, *Pseudomonas aeruginosa* の出現は時々認められる程度だった。

嫌気性菌群の主体は *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., Bacteroidaceae, *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp. であった。*C. difficile* はほとんど検出されず、2 検体に 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>CFU/g 検出されたのみであった。

2) 12 mg/kg/day 投与群では、ほとんど総好気性菌数の変動は認められなかった。

総嫌気性菌数には、投与期間中やや減少傾向が認められた。各菌群では、Enterobacteriaceae に投与期間中減少傾向が認められ、嫌気性菌群にも一時的な減少が認められる例があった。

3) 250 mg/kg/day 投与群では、総好気性菌数の変動はほとんど認められなかった。

総嫌気性菌数は著しく減少し検出限界以下になる例

Table 5. Detection of *Clostridium difficile* and D-1 antigen in beagle dog feces in the control group and the groups administered ME1207.

		before		during			after		
		9th	1st	2nd	5th	8th	1st	7th	21st
Control	<i>C. difficile</i>	0/4*	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4	0/4
	D-1 antigen	1/4	3/4	4/4	3/4	3/4	4/4	4/4	3/4
12mg/kg/day	<i>C. difficile</i>	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	3/4	1/4	2/4
	D-1 antigen	1/4	4/4	3/4	2/4	3/4	1/4	2/4	1/4
250mg/kg/day	<i>C. difficile</i>	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4
	D-1 antigen	3/4	3/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\*  $\frac{\text{number of beagle dogs detected}}{\text{number of beagle dogs in a group}}$

もあった。

好気性菌群では、Enterobacteriaceae 及び *Lactobacillus* spp. が減少ないし検出限界以下となり、*Staphylococcus* spp. は投与期間中全く検出されなかった。Streptococcaceae には、大きな変動は見られなかった。

嫌気性の各菌種は投与期間中ほとんど検出されなかった。

### 3. *C. difficile* 及び D-1 抗原の検出

*C. difficile* 及び D-1 抗原の検出結果を Table 5 に示す。

*C. difficile* は 12 mg/kg/day 投与群で投与期間後半にやや多く検出されたが、250 mg/kg/day 投与群では投与終了 7 日目に一過性に検出された以外は全く検出されなかった。D-1 抗原は対照群及び投与期間前においても多頻度に検出されたが、特に ME 1207 投与群で多く検出される傾向はなかった。

### 4. 糞便中の ME 1206 濃度

ME 1206 の糞便中濃度の結果を Table 6 に示した。

12 mg/kg/day 投与群では、投与期間中の糞便の中に ME 1206 が 4 検体に 1.2~36  $\mu\text{g/g}$  検出されたが、他は全て 1  $\mu\text{g/g}$  以下であった。

250 mg/kg/day 投与群では、投与期間中 1 検体を除き ME 1206 は 1,000  $\mu\text{g/g}$  以上検出された。

### 5. 糞便中の $\beta$ -ラクタマーゼ活性

糞便中の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性の結果を Table 7 に示した。

全体的に糞便中の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は低かったが、投与期間中では投与期間前後よりやや高い活性が認められた。

### 6. 糞便分離細菌からの ME 1206 耐性菌の検出

Enterobacteriaceae については、投与期間中耐性菌の割合が多くなったが、投与終了 7 日目には、全例耐性菌は検出されなくなった。同定の結果、感受性菌は全て *E. coli* で、耐性菌は全て *Enterobacter cloacae* であった (Table 8)。

Streptococcaceae については投与期間前、耐性菌は認められなかったが、投与期間中は全て耐性菌となり、

Table 6. Fecal concentration of ME1206 in beagle dog feces in the groups administered ME1207

Beagle dog no.	ME1207 administration	before		during			after		
		9th day	1st day	2nd day	5th day	8th day	1st day	7th day	21st day
1	12 mg/kg/day	—**	—	14.4*	0.58	—	—	—	—
2	12 mg/kg/day	—	—	—	—	1.22	36.0	—	—
3	12 mg/kg/day	—	—	4.18	—	—	—	—	—
4	12 mg/kg/day	—	—	0.17	0.33	0.91	0.13	—	—
5	250 mg/kg/day	—	—	1,680	5,580	5,240	8,630	—	—
6	250 mg/kg/day	—	—	4,840	6,280	2,270	6,200	—	—
7	250 mg/kg/day	—	—	5,340	11,500	7,010	1,710	—	—
8	250 mg/kg/day	—	—	4,650	1,470	5,400	6,330	—	—

\*  $\mu\text{g/g}$

\*\* ; Not detected (<0.125  $\mu\text{g/g}$ )

Table 7.  $\beta$ -lactamase activity in feces of beagle dogs administered ME1207

Beagle dog no.	before 1st day	during 8th day	after 1st day	after 7th day
1	<0.05*	0.08	0.08	0.11
2	<0.05	0.09	0.09	<0.05
3	<0.05	0.20	0.09	<0.05
4	<0.05	0.09	0.08	<0.05
5	<0.05	0.07	0.09	<0.05
6	<0.05	0.06	0.06	<0.05
7	<0.05	0.08	0.06	<0.05
8	<0.05	0.06	<0.05	<0.05

\*  $\mu$  mol cephaloridine hydrolysed/min/g

Assay ; microiodometric method

Table 8. Proportion of ME1206-resistant strains of Enterobacteriaceae isolated from beagle dog feces after oral administration of ME1207

Beagle dog no.	administration of ME1207	before 1st day	during 8th day	after 1st day	after 7th day	after 21st day
1	12 mg/kg/day	0/20*	2/4	0/20	0/20	0/20
2	12 mg/kg/day	0/20	20/20	10/10	0/20	0/20
3	12 mg/kg/day	0/20	0/2	0/7	0/20	0/20
4	12 mg/kg/day	0/20	16/20	20/20	0/20	0/20
5	250 mg/kg/day	0/20	—**	6/6	0/20	0/7
6	250 mg/kg/day	0/20	20/20	2/2	0/20	0/20
7	250 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	0/20	0/20
8	250 mg/kg/day	0/20	20/20	1/1	0/20	0/20

\*  $\frac{\text{Number of ME1206-resistant strains}}{\text{Number of strains tested}}$

\*\*Not detected

Table 9. Proportion of ME1206-resistant strains of Streptococcaceae isolated from beagle dog feces after oral administration of ME1207

Beagle dog no.	administration of ME1207	before 1st day	during 8th day	after 1st day	after 7th day	after 21st day
1	12 mg/kg/day	0/20*	20/20	20/20	17/20	3/20
2	12 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	1/20	0/20
3	12 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	9/20	9/20
4	12 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	0/20	0/20
5	250 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	2/20	0/20
6	250 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	3/20	2/20
7	250 mg/kg/day	0/20	20/20	20/20	1/12	0/20
8	250 mg/kg/day	1/20	20/20	20/20	4/20	0/20

\*  $\frac{\text{Number of ME1206-resistant strains}}{\text{Number of strains tested}}$

投与終了7日目、21日目で耐性菌の割合は減少した。同定の結果、感受性菌は *Streptococcus* spp. で、耐性菌は *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* であった (Table 9)。

*Staphylococcus* spp. の検出は投与期間中減少傾向にあり、耐性菌の出現は全く認められなかった。数株について同定した結果、*Staphylococcus aureus* であった。

### III. 考 察

今回、我々はビーグル犬を用いて ME 1207 の経口投与による腸内菌叢への影響を調べた。臨床推定投与量の 12 mg/kg/day 投与群では、糞便中に薬剤の抗菌活性がわずかに認められ、Enterobacteriaceae, 嫌気性

菌群の若干の減少傾向が認められた。250 mg/kg/day 投与群では、糞便中に 1,000  $\mu\text{g/g}$  以上の抗菌活性が認められ、腸内菌叢の変動も著しく、*Enterococcus* spp. 主体の菌叢に変化した。

また、ME 1207 投与群については、Enterobacteriaceae で、*E. coli* から *E. cloacae* に、また Streptococcaceae は *Enterococcus* spp. に菌交代を起こした。この現象は他のセフム剤でも一般的に認められている<sup>6,7)</sup>。

本廣らの健康成人における ME 1207 の 200 mg $\times$ 3 回/day $\times$ 7 日連投による腸内菌叢の変動試験の報告では、7 名中 3 名の糞便中に 1,000  $\mu\text{g/g}$  前後の高濃度が検出されているが、他の 4 名にはほとんど ME 1206 が



検出されていない<sup>8)</sup>。また cefixime, cefpodoxime proxetil の健康成人の腸内菌叢の変動試験の報告では、その約半数に抗菌活性が認められず、それは糞便中の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性と相関していることが示されている<sup>7,9)</sup>。cefuroxime axetil の同様の報告では、全例糞便中に抗菌活性が認められていない<sup>10)</sup>。

*Bacteroides fragilis* group はオキシイミノセファロsporinaゼを産生している。この酵素によりほとんどのセフェム剤は加水分解を受ける。ME 1206 もこの酵素により加水分解される<sup>3)</sup>。従って、ヒトの場合、糞便中に  $\beta$ -ラクタマーゼ活性の高い場合は薬剤が消失し、腸内菌叢の影響も少なくなると考えられる。しかし、今回用いたビーグル犬の場合は、ヒトと異なり同一環境で飼育されていることから個体差が少なく腸内菌叢も一様で有り、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性も低かった為、ME 1206 がほぼ全例に検出されたと考えられる。

近年、各種抗生物質の投与による *C. difficile* の異常増殖とその毒素による下痢、偽膜性大腸炎の発症が注目されている<sup>11,12)</sup>。各種経口セフェム剤においても、*C. difficile* の出現が認められている。今回のビーグル犬の実験では、12 mg/kg/day 投与群において、*C. difficile* の出現傾向が認められたが、D-1 抗原は対照群、投与前の糞便からも多く検出されており、投与による明確な変化がつかめなかった。また 250 mg/kg/day 投与群では、投与期間中 *C. difficile*、D-1 抗原ともに検出されなかった。これは糞便中に高濃度に存在する ME 1206 が *C. difficile* の増殖を阻止したことによるものかもしれない。

ME 1207 のビーグル犬腸内菌叢に及ぼす影響の結果は、各種経口セフェム剤のヒト腸内菌叢への影響の結果と概ね一致するものであった。従って、ME 1207 使用の際には、耐性 Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp. の増加及び *C. difficile* の増加等を念頭におく必要がある。

## 文 献

- 1) Tamura A, Okamoto R, Yoshida T, Yamamoto H, Kondo S, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of ME1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1421~1426, 1988
- 2) 新里鉄太郎, 鈴木平治郎, 瀬戸 登, 大石 浩助, 早坂 弘康, 松下 直子, 平本 典子, 西山 省二, 西田 信一, 藤田 正敬: 経口セフェム系抗生物質 ME 1207 の安全性に関する研究, 第 2 報 イヌを用いた急性, 亜急性及び慢性毒性試験. *Chemotherapy* 40(S-2): 186~231, 1992
- 3) 横田 健, 島田 馨: 第 39 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム. ME 1207, 東京, 1991
- 4) 光岡知足: 腸内菌の世界, 叢文社刊, 1980
- 5) 澤井哲夫, 高橋郁子:  $\beta$ -ラクタマーゼ活性測定法とその応用. *蛋白質核酸酵素* 23: 391~400, 1978
- 6) 千田俊雄, 留奥はるみ, 長谷川潔, 岡村 登, 中谷林太郎: 新セフェム系抗生物質 T-2588 の長期連続投与後のビーグル犬腸内細菌叢に及ぼす影響. *Chemotherapy* 34(S-2): 92~97, 1986
- 7) 田島政三, 渡辺邦友, 上野一恵: 健康成人の腸内細菌叢に及ぼす CS-807 の影響. *Chemotherapy* 36(S-1): 215~228, 1988
- 8) 本廣 孝, 半田 祥一, 山田 秀二, 沖 眞一郎, 津村 直幹, 吉永陽一郎, 佐々木宏和, 織田 慶子, 荒巻 雅史, 川上 晃, 古賀 達彦, 阪田 保隆, 西山 享, 富永 薫, 山下 文雄: ME 1207 のヒト糞便内細菌叢に対する影響. *Chomotherapy* 特集号 40(S-2): 75~86, 1992
- 9) 沢 赫代, 小林とよ子, 神野英毅, 中島光好: Cefixime (CFIX) の健康成人の腸内細菌叢に対する影響. *Chemotherapy* 33(S-6): 169~180, 1985
- 10) 沢 赫代, 沢村治樹, 山岡一清, 関口和夫, 小林とよ子, 渡辺邦友, 上野一恵: Cefuroxime axetil (CXM-AX) の健康人およびマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響. *Chemotherapy* 34(S-5): 38~47, 1986
- 11) 島田 馨, 稲松孝思, 井熊克仁, 浦山京子: Antibiotic-associated colitis における *Clostridium difficile* の病因的意義について. *感染症学雑誌* 56: 769~773, 1982
- 12) 上野一恵, 小林とよ子, 渡辺邦友: 薬剤性腸炎: 細菌学的立場から. *臨床成人病* 14: 1039~1049, 1984

THE EFFECT OF ME 1207, A NEW ORAL CEPHALOSPORIN, ON THE  
INTESTINAL MICROFLORA OF BEAGLE DOGS

Atsushi Tamura, Takashi Ida, Sakiko Saito,  
Heijiro Suzuki, Tetsutaro Niizato, Masato Misaka  
Etsuko Nakayama

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.  
760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

Koichi Wada

Intestinal Flora Laboratory, The Calpis Food Industry Co., Ltd.

The alteration of the fecal microflora was inspected before, during and after oral administration of ME1207 (pivaloyloxymethyl ester of ME1206) to three groups of beagle dogs (12mg/kg/day, 250mg/kg/day and control group) at single dose per day for 14 consecutive days. We investigated the detection of D-1 antigen from *Clostridium difficile*, the antibacterial activity of ME1206 and  $\beta$ -lactamase activity in the feces, and determined the proportion of ME1206-resistant strains isolated from the feces in the groups administered ME1207.

1. The feces of three groups each were normal during the experiment, and no changes such as diarrhea were observed.

2. A slight decrease of Enterobacteriaceae and a transient decrease of anaerobes were observed in the 12mg/kg/day group. A substantial decrease of Enterobacteriaceae was observed and as the results the main fecal flora was *Enterococcus* spp. in the 250mg/kg/day group.

3. The detection rate of *C. difficile* was high in the 12mg/kg/day group.

4. The antibacterial activity as ME1206 in the feces was low in the 12mg/kg/day group but high (more than 1000 $\mu$ g/g) in the 250mg/kg/day group.

5.  $\beta$ -lactamase activity in the feces was low.

6. The resistant strains were observed in the Enterobacteriaceae but not in the *Staphylococcus* spp. during administration of ME1207.