

NM441 のイヌ腸内細菌叢に及ぼす影響

原 哲郎¹⁾・宮田 愛子¹⁾・荒明美奈子¹⁾・河原條勝己¹⁾・和田 光一²⁾¹⁾明治製菓株式会社薬品総合研究所*, ²⁾カルピス食品工業株式会社腸内フローララボラトリー

新規プロドラッグ型キノロン系合成抗菌薬 NM441 を、活性本体 NM394 換算量としてイヌに 100mg/dog および 1,000mg/dog となるように 1 日 1 回、14 日間連続経口投与を行い、投与前後の腸内細菌叢の変化、*Clostridium difficile* 関連抗原の検出、糞便中の活性本体 NM394 濃度の測定、および薬剤投与前後の分離菌の感受性の変化を検討した。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正常で、下痢等の異常は認められなかった。

2) 総好気性菌数および総嫌気性菌数は、実験期間中を通してほとんど変動は認められなかった。

Enterobacteriaceae については、薬剤投与 8 頭中 1 例を除いて検出されなかったが、投与終了後 7 日目には投与前のレベルに回復した。*C. difficile* は薬剤投与前に 8 頭中 1 例に検出されたが、それ以外は全く検出されなかった。

3) NM441 投与により *C. difficile* 関連抗原は投与後 7, 14 日目に検出されたが、投与終了後 28 日目には検出されなくなる傾向にあった。

4) 糞便中の NM394 の濃度は投与中 3~9 μ g/mg 検出されたが、投与終了後 7 日目には検出されなかった。

5) 投与中耐性上昇が認められた *Staphylococcus*, *Streptococcus* および *Bacteroides fragilis* においても投与終了後 28 日目では元の状態に回復した。

Key words: NM441, キノロン系合成抗菌薬, イヌ腸内細菌叢, *Clostridium difficile* 関連抗原

NM441 は新規なプロドラッグ型のキノロン系合成抗菌薬であり、経口投与後、小腸上部から吸収されて速やかに抗菌活性本体である NM394 に変換される¹⁾。

NM394 はグラム陽性、陰性の好気性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを有し、嫌気性菌に対しても抗菌力を有している¹⁾。吸収された NM394 は血中および組織内に移行し、主に尿および糞中に活性本体として排泄される¹⁾。

広い抗菌スペクトラムを有する化学療法剤の投与は、腸管内細菌叢に強く影響することが既に知られている²⁾。今回、我々はイヌに NM441 を連続経口投与したときの腸管内細菌叢構成菌群的量的、質的变化および投与後の回復について検討した。また、偽膜性大腸炎の原因となる *Clostridium difficile* の出現の有無と同菌の関連抗原の検出および糞便中の NM394 の濃度も併せて検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用動物

7 ヶ月齢で富士アニマルファーム株式会社より搬入したビーグル犬雄 8 頭を 7 日間、馴化飼育を行い、異常のないことを確認した 8 頭(体重 9.0~10.5kg)を試験に使用した。

飼料は 1 頭当たり 1 日 300g の犬用固形飼料 DS (オリエンタル酵母工業株式会社) を馴化期間および休薬期間は午前中に給餌し、薬剤投与期間は投与約 1 時間後に給餌した。給水は公共水道水を自由に摂取させた。

2 使用薬剤および投与方法

NM441 錠 (Lot No. 100-2-2-5) は 1 錠中に活性本体 NM394 として 100mg を含有する。投与量は NM394 換算量として示した。なお、被験物質は遮光した気密容器に入れて室温に保存した。

1 群を 4 頭とし、2 群に分けた。その 1 群には 100mg/dog を、一方の 1 群には 1,000mg/dog を強制的経口法で 1 日 1 回、14 日間連続投与した。

投与量は推定される臨床用量 (200mg/man/day)¹⁾ を上回る投与量として設定した。

NM394 は日本新薬株式会社で合成されたものを、ciprofloxacin (CPFX) は市販製剤より抽出、精製したものを用いた。

3 腸内細菌叢の検索

NM441 投与開始 5, 3 日前, 投与開始後 7 日目, 投与終了後 1, 7, 14, 28 日目の合計 7 回にわたり糞便中の細菌叢の定量培養を実施した。

1) 培地

(1) 好気性菌用培地

好気性菌の総菌数算定用として Trypticase Soy 血液寒天培地を用いた。*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* の菌数算定には、それぞれ DHL 寒天培地 (栄研化学), Triphenyltetrazolium chloride acrydine thallosulfate aesculin

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

Medium	Selection
for aerobes	
Trypticase soy blood agar (TS, base BBL)	aerobic bacteria
DHL agar (DHL, EIKEN)	<i>Enterobacteriaceae</i>
TATAC agar (TATAC)	<i>Streptococcus</i> spp.
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</i> spp.
<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)	<i>Bacteroidaceae</i>
<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, <i>Veillonella</i> , <i>Megasphaera</i>
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>

crystal violet (TATAC) 寒天培地, Phenylethyl alcohol egg yolk suspension (PEES) 寒天培地, NAC 寒天培地 (栄研化学) を, Yeasts, *Candida* spp. 選択培地としてポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学), カンジダ培地 (日水製薬) を, また *Lactobacillus* の選択培地として変法 LBS 寒天培地を用いた。

(2) 嫌気性菌用培地

嫌気性菌総菌数の算定には EG 馬血液寒天培地 (栄研化学) および BL 馬血液寒天培地 (日水製薬) を用いた。*Bifidobacterium*, *Bacteroidaceae*, *Bacteroides fragilis* group, *Eubacterium*, *Fusobacterium* の菌数の算定には *Bifidobacterium* Selective 寒天培地, Neomycin Brilliant Green Taurocholate 血液寒天培地, BBE 寒天培地 (極東製薬), *Eubacterium* Selective 血液寒天培地, 変法 FM 培地 (日水製薬) を用い, 嫌気性グラム陽性球菌, *Veillonella* および *Megasphaera* の菌数の算定には *Peptococcaceae* *Megasphaera* Selective 寒天培地を, lecithinase 陽性および陰性 *Clostridium* の菌数の算定には Neomycin 添加 CW 卵黄寒天培地を, また *C. difficile* の菌数算定には CCMA 培地 (日水製薬) を用いた。

2) 糞便の採取および定量培養

自然排泄便をポリ袋に採取し, 検体の性状を記録した後よく混合した。検体 1g を秤量し, 直ちに 9ml の嫌気性希釈液を含む中試験管に移し, 酸素不含炭酸ガスの噴射下でよく混和し, その 1ml を新しい希釈液 9ml に加え, 上記の炭酸ガスを吹き込みながら, 同様に 10^8 倍まで希釈した。各希釈液の 0.05ml を嫌気性菌用平板 10 種類と好気性菌用平板 8 種類に様に塗抹した。嫌気性菌用平板は還元スチールウールとともに速やかにジャーに入れ, ジャー内のガス環境を炭酸ガスで置換して 37°C で 72 時間嫌気性培養した。また, DHL 寒天培地,

Trypticase Soy 血液寒天培地は 37°C で 24 時間好気性培養, TATAC 寒天培地, PEES 寒天培地, ポテトデキストロース寒天培地, カンジダ培地は 37°C で 72 時間好気性培養した。変法 LBS 寒天培地についてはジャーに入れ, 還元スチールウールを入れずにジャー内の大気を炭酸ガスで置換して, 37°C で 72 時間培養した。

培養終了後, 各培地に発育した集落の性状およびその数を記録し, それぞれのグラム染色を行い, 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 添加 CW 卵黄寒天培地上で lecithinase 陽性の性状を示した集落については乾燥ウエルシュ菌型抗毒素濾紙 (日水製薬) を用いて CW 卵黄寒天培地上で lecithinase 中和反応を行い, 陽性の株を *Clostridium perfringens* として集計した。

4 *C. difficile* 関連抗原の検出

C. difficile 関連抗原の検出には C. D. チェック・D-1 (三菱化成) を用いた。すなわち, 検体 0.5g に 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 0.5ml を加えて懸濁後, さらに 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane 0.5ml を加え遠心分離した。その上清 100 μ l をスライド板上にとり, 次いで *C. difficile* 関連抗原感作ラテックス試薬 40 μ l を添加し凝集を肉眼で観察した。

5 糞便中の NM394 濃度の測定

薬剤投与開始後 7 日目および最終投与後 1, 7 日目の糞便に 19 倍量の希釈液 (1/15M リン酸緩衝液, pH8.0) を加え攪拌し, 試料とした。薬剤濃度の測定は, 試験菌に *Escherichia coli* Kp 株を用いて Agar well 法によって行った⁴⁾。

6 薬剤投与前後分離菌の感受性測定

薬剤投与開始 3 日前, 投与終了後 1, 7, 14, 28 日目に分離された *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Strepto-*

coccus および *B. fragilis* の NM394 および CPFX に対する感受性の変化を、MIC を測定することによって検討した。

II. 結 果

1. 一般状態

100mg/dog/day および 1,000mg/dog/day を投与した全例で一般状態、糞便の性状および体重に異常は認められなかった。

2. 腸内細菌叢構成菌群の菌数および検出率

100mg/dog/day および 1,000mg/dog/day 投与群 (n=4) の総菌数、総好気性菌数、総嫌気性菌数および各菌群菌数の平均値、標準偏差ならびに検出率の経日変動を Table 2, 3 に示した。

1) 100mg/dog/day 投与群

総好気性菌数および総嫌気性菌数の変動は、実験期間中ほとんど認められなかった。好気性菌群では、薬剤投与中に *Enterobacteriaceae* は全く検出されなかったが、投与終了後 7 日目には投与前のレベルに回復した。*Streptococcus* および *Lactobacillus* については、ほとんど変動は認められなかった。また、*Candida* spp., *P. aeruginosa* は 4 頭全例の犬から全く検出されなかった。

嫌気性菌群では、*Bacteroidaceae* および *Eubacterium* の変動は認められなかった。また、*C. difficile* は薬剤投与前に 4 頭中 1 例検出されたが、それ以外は全く検出されなかった。*C. perfringens* は薬剤投与 5 日前に 4 頭中

2 例、3 日前に 1 例検出されたが、投与中および投与終了後 1 日目には 1 例も検出されなかった。しかし、投与終了後 7 日目に 1 例、また投与終了後 14 日目および 28 日目には全例で検出された。

2) 1,000mg/dog/day 投与群

好気性菌群では、*Enterobacteriaceae* は薬剤投与中には 4 頭中 3 例に、投与終了後 1 日目には全例で検出されなかったが、投与終了後 7 日目には投与前のレベルに回復した。

嫌気性菌群では、*Bacteroidaceae* および *Eubacterium* は投与期間中に軽度の減少を示したが、薬剤投与終了後速やかに回復した。*Clostridium* は薬剤投与中および投与終了後 1 日目の糞便から検出されなかったが、投与終了後 7 日目には投与前の菌数に回復した。*C. difficile*, *C. perfringens* は全期間すべての検体から全く検出されなかった。

3. *C. difficile* 関連抗原の検出

C. difficile 関連抗原の検出結果を Table 4 に示した。

100mg/dog/day 投与群では投与終了後 7 日目および 14 日目に 4 頭中 3 例、1,000mg/dog/day 投与群では投与終了後 7 日目および 14 日目に 4 頭中 1 例に 500ng/ml 検出されたが、投与終了後 28 日目には両群ともに 4 頭中 1 例検出されるのみで、検出されなくなる傾向であった。

Table 2. Effects of NM441 on fecal flora of beagle dog feces (100mg/dog/day, n=4)

Organism	Before 5th day	Before 3rd day	During 7th day	After 1st day	After 7th day	After 14th day	After 28th day
Total bacteria	10.6±0.55 ^a (100 ^b)	10.1±0.32 (100)	10.7±0.17 (100)	10.1±0.62 (100)	10.3±0.26 (100)	10.7±0.20 (100)	10.6±0.30 (100)
Total aerobes	9.3±1.24 (100)	9.3±0.78 (100)	9.2±1.53 (100)	9.8±0.49 (100)	10.0±0.23 (100)	10.0±0.44 (100)	10.2±0.19 (100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.3±0.95 (100)	6.9±1.10 (100)	— (0)	6.8 (25)	7.9±1.09 (100)	8.0±0.54 (100)	8.3±0.71 (100)
<i>Streptococcus</i>	9.2±1.50 (100)	9.1±0.91 (100)	9.3±1.08 (75)	9.5±0.55 (100)	9.9±0.25 (100)	9.7±0.50 (100)	9.9±0.28 (100)
<i>Staphylococcus</i>	3.0±0.07 (50)	— (0)	— (0)	4.2 (25)	— (0)	— (0)	— (0)
Yeasts	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Candida</i> spp.	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Corynebacterium</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Bacillus</i>	— (0)	— (0)	2.8 (25)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Lactobacillus</i>	7.7±0.67 (100)	7.8±0.61 (100)	8.5±1.22 (100)	8.4±1.85 (100)	9.1±0.62 (100)	9.6±0.43 (100)	9.6±0.45 (100)
Total anaerobes	10.4±0.87 (100)	9.8±0.46 (100)	10.5±0.47 (100)	9.7±0.88 (100)	10.0±0.32 (100)	10.6±0.22 (100)	10.2±0.62 (100)
<i>Bifidobacterium</i>	8.4 (25)	8.0±0.68 (75)	8.5±0.21 (50)	9.0±0.60 (50)	8.6±0.25 (100)	9.1±0.42 (75)	9.5±0.64 (50)
<i>Eubacterium</i>	9.4±1.10 (100)	9.1±0.11 (100)	9.2±1.15 (100)	8.2±1.88 (100)	9.0±0.50 (100)	9.7±0.24 (100)	8.9±0.53 (100)
<i>Bacteroidaceae</i>	10.3±0.89 (100)	9.5±0.61 (100)	10.4±0.52 (100)	9.6±0.82 (100)	9.9±0.38 (100)	10.4±0.35 (100)	10.0±0.70 (100)
<i>Bacteroides fragilis</i> group	8.4±0.54 (100)	7.5±0.32 (100)	8.3±2.02 (100)	8.2±1.08 (100)	8.4±0.88 (100)	9.0±0.10 (100)	8.8±1.20 (100)
<i>Fusobacterium</i>	5.9±1.08 (75)	6.4±1.57 (75)	7.6±2.29 (75)	6.6±1.23 (75)	8.6±0.20 (75)	8.0±2.05 (75)	7.6±0.34 (75)
<i>Megamonas hypermegas</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Mitsuokella</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
Gram (+) anaerobic cocci	9.3±0.74 (100)	8.8±0.69 (100)	9.3±0.48 (100)	8.2 (25)	8.7±0.17 (50)	9.5±0.21 (100)	9.3±0.27 (100)
<i>Clostridium</i>	9.3±0.76 (100)	8.5±0.79 (100)	9.0±0.60 (75)	9.2±0.56 (50)	8.7±0.38 (100)	9.5±0.34 (100)	8.9±0.78 (100)
Lecithinase (-)	9.3±0.76 (100)	8.5±0.79 (100)	9.0±0.60 (75)	9.2±0.56 (50)	8.7±0.38 (100)	9.5±0.34 (100)	8.9±0.83 (100)
<i>Clostridium difficile</i>	2.3 (25)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
Lecithinase (+)	4.3±0.69 (100)	3.3±0.21 (50)	— (0)	— (0)	4.8±2.20 (75)	4.7±0.88 (100)	6.6±1.09 (100)
<i>Clostridium perfringens</i>	4.7±0.95 (50)	3.1 (25)	— (0)	— (0)	3.6 (25)	4.7±0.88 (100)	6.6±1.09 (100)
<i>Veillonella</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Megasphaera</i>	3.5±0.67 (50)	3.7 (25)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)

^a Mean±SD (Log CFU/g feces), ^b Frequency of occurrence (%), ^c Not detected

Table 3. Effects of NM441 on fecal flora of beagle dog feces (1,000mg/dog/day, n=4)

Organism	Before 5th day	Before 3rd day	During 7th day	After 1st day	After 7th day	After 14th day	After 28th day
Total bacteria	10.7±0.22 ^a (100 ^b)	10.3±0.32 (100)	9.9±0.88 (100)	10.3±0.50 (100)	10.6±0.18 (100)	10.4±0.63 (100)	10.7±0.31 (100)
Total aerobes	9.4±0.79 (100)	9.6±0.25 (100)	9.3±0.68 (100)	9.5±0.50 (100)	10.2±0.32 (100)	10.1±0.62 (100)	10.0±0.26 (100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.4±0.83 (100)	7.8±0.76 (100)	6.6 (25)	— (0)	7.9±0.84 (100)	8.3±0.62 (100)	8.4±0.52 (100)
<i>Streptococcus</i>	9.3±0.89 (100)	9.5±0.28 (100)	7.3±0.62 (75)	9.4±0.51 (100)	10.0±0.28 (100)	9.9±0.56 (100)	9.9±0.21 (100)
<i>Staphylococcus</i>	2.5±0.21 (50)	2.5±0.21 (50)	8.7 (25)	— (0)	— (0)	— (0)	2.3 (25)
Yeasts	— ^c (0)	— (0)	2.3 (25)	2.3 (25)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Candida</i> spp.	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Corynebacterium</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Bacillus</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Lactobacillus</i>	8.0±0.49 (100)	7.8±0.45 (100)	9.1±0.94 (100)	8.2±0.93 (100)	9.4±0.84 (100)	9.5±1.08 (100)	9.2±0.54 (100)
Total anaerobes	10.5±0.55 (100)	10.2±0.35 (100)	8.8±2.33 (100)	10.0±0.84 (100)	10.4±0.10 (100)	9.8±0.73 (100)	10.6±0.40 (100)
<i>Bifidobacterium</i>	9.3±0.82 (50)	8.3±0.52 (50)	8.9 (25)	8.6±0.42 (75)	9.0±0.54 (100)	8.5±0.56 (50)	9.1 (25)
<i>Eubacterium</i>	9.5±0.62 (100)	9.3±0.33 (100)	8.8±0.82 (50)	6.5±0.76 (50)	9.5±0.35 (100)	9.4±0.53 (75)	9.5±0.37 (100)
<i>Bacteroidaceae</i>	10.3±0.49 (100)	9.9±0.27 (100)	8.6±2.28 (100)	10.0±0.85 (100)	10.2±0.10 (100)	9.6±0.83 (100)	10.4±0.53 (100)
<i>Bacteroides fragilis</i> group	7.9±0.93 (75)	8.0±0.81 (100)	7.0±2.93 (100)	8.9±0.56 (100)	9.1±0.49 (100)	8.2±0.76 (100)	8.3±0.31 (100)
<i>Fusobacterium</i>	8.7±1.31 (50)	7.2±0.91 (50)	6.8±2.70 (100)	8.1±1.32 (100)	8.4±0.56 (75)	7.6±0.38 (100)	7.8±1.11 (75)
<i>Megamonas hypermegas</i>	7.6 (25)	7.3 (25)	— (0)	— (0)	— (0)	8.3 (25)	— (0)
<i>Mitsuokella</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
Gram (+) anaerobic cocci	9.9±0.01 (75)	9.5±0.75 (100)	9.2±1.28 (50)	6.8 (25)	9.0±0.41 (100)	9.0±0.07 (50)	9.9±0.41 (75)
<i>Clostridium</i>	9.4±0.60 (100)	8.9±0.43 (100)	— (0)	— (0)	8.8±1.32 (100)	9.1±0.71 (50)	7.3±1.79 (100)
Lecithinase (-)	9.4±0.60 (100)	8.9±0.43 (100)	— (0)	— (0)	9.4±0.53 (75)	9.1±0.71 (50)	7.7±1.82 (75)
<i>Clostridium difficile</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
Lecithinase (+)	3.0±0.96 (50)	2.5±0.21 (50)	— (0)	— (0)	5.8±2.14 (100)	6.1±1.24 (75)	6.3±1.00 (75)
<i>Clostridium perfringens</i>	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)
<i>Veillonella</i>	— (0)	4.3 (25)	— (0)	— (0)	3.6 (25)	— (0)	— (0)
<i>Megasphaera</i>	5.4±3.11 (50)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)	— (0)

^a Mean±SD (Log CFU/g feces), ^b Frequency of occurrence (%), ^c Not detected

Table 4. Effect of NM441 on *Clostridium difficile* related antigen in fecal

Dose (mg/dog)	100				1,000			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Animal No.								
Before 5th day	—	—	—	—	—	±	—	—
Before 3rd day	—	—	±	±	—	±	±	±
During 7th day	±	—	±	—	—	±	—	—
After 1st day	±	±	±	—	—	±	—	±
After 7th day	+	+	+	—	+	—	*	—
After 14th day	+	+	+	—	+	±	±	—
After 28th day	±	±	+	—	±	—	+	±

—: <250ng/ml Non agglutination
 ±: 250ng/ml Weak agglutination
 +: 500ng/ml Agglutination
 ++: >500ng/ml Strong agglutination
 *: Non specific agglutination

4. 糞便中の NM394 の濃度

糞便中の NM394 の濃度の結果を Table 5 に示した。100mg/dog/day および 1,000mg/dog/day 投与群で薬剤投与後 7 日目のそれぞれの糞便中に平均 3.13 および 9.72 μg/mg, 投与終了後 1 日目に 3.01 および 6.10 μg/mg が検出されたが, 投与終了後 7 日目には検出限界以下となった。

5. 薬剤投与前後に分離された菌株の NM394 および CPFYX に対する感受性の変化

投与前後に分離された *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* および *B. fragilis* の薬剤感受性分布をそれぞれ Table 6~9 に示した。Enterobacteria-

ceae に対する感受性の変化は薬剤投与前後で認められなかった。*Staphylococcus* の分離株数は少ないものの, 投与終了後 1 日目で耐性度の上昇傾向が認められたが, 以降, 感受性の菌が少数分離されるか, 全く分離されなくなり, 耐性菌は消失した。*Streptococcus* に対しては薬剤投与終了後 1 日目で耐性が上昇するものの, 投与終了後 7 日目には元に戻っていた。*B. fragilis* では薬剤投与終了後 1 日目で耐性上昇が認められたが, 投与終了後 7 日目, 14 日目, 28 日目と徐々に投与前の状態に回復する傾向にあった。また, *Enterobacteriaceae* について同定した結果, Table 10 に示すように期間中分離されたものほとんどが *E. coli* であった。

Table 8. MIC distribution of NM394 and ciprofloxacin against *Streptococcus*

Group	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)														
		≤ 0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
100mg/dog	NM394	Before 3rd day				1	4	4	12	4						
		After 1st day							12			3	10			
		After 7th day				1	1	4	6	13						
		After 14th day				7	1	1	14	2						
		After 28th day					1	1	19	4						
	ciprofloxacin	Before 3rd day					2	6	11	6						
		After 1st day							12			1	10	1	1	
		After 7th day							5	2	11	7				
		After 14th day				7	1	2	14	1						
		After 28th day					1	3	13	8						
1,000mg/dog	NM394	Before 3rd day				1	2	8	13	1						
		After 1st day							2			4	19			
		After 7th day				1		4	7	12		1				
		After 14th day				1	1	7	16							
		After 28th day	2			2	11	10								
	ciprofloxacin	Before 3rd day				1	1	5	10	8						
		After 1st day									2	3	20			
		After 7th day					1	1	4	17	1			1		
		After 14th day				1	2	7	12	3						
		After 28th day		1		1		17	4	1	1					

Table 9. MIC distribution of NM394 and ciprofloxacin against *Bacteroides fragilis*

Group	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)														
		≤ 0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
100mg/dog	NM394	Before 3rd day					6	3	10	1	4	1				
		After 1st day										5	15	3	2	
		After 7th day					1			1	1	2	11	5	4	
		After 14th day					1	2	1		1	13	3	4		
		After 28th day					1		6	1	5	8	4			
	ciprofloxacin	Before 3rd day							13	5	3	3	1			
		After 1st day										6	15	1	1	2
		After 7th day							1	1	2	3	14		4	
		After 14th day							1	2	1	5	9	3	4	
		After 28th day							5	8	5	5	2			
1,000mg/dog	NM394	Before 3rd day	2				4	6	8	5						
		After 1st day												8	17	
		After 7th day									1	7	14	1	1	1
		After 14th day					4				2	5	2	7	2	3
		After 28th day					2	1	11	5			5	1		
	ciprofloxacin	Before 3rd day							17	3	5					
		After 1st day												8		17
		After 7th day										6	17		2	
		After 14th day								1	3	2	8	8		3
		After 28th day							6	8	3		7			1

Table 10. List of *Enterobacteriaceae* isolated before and after NM441 administration

Group	Organism	No. of isolates				
		Before 3rd day	After 1st day	After 7th day	After 14th day	After 28th day
100mg/dog	<i>Escherichia coli</i>	23	25	24	25	24
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2		1		1
1,000mg/dog	<i>Escherichia coli</i>	32		25	25	25
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	2				

Ⅲ. 考 察

抗菌薬の投与はヒトおよび動物の腸内細菌叢に変化をもたらすことが知られている。その腸内細菌叢の変動の程度は、薬剤の抗菌スペクトラムと抗菌力、その体内動態、薬剤の腸内での安定性などにより異なる⁵⁾とされている⁵⁾。

新規キノロン系合成抗菌薬 NM441 は経口投与した時、腸管から吸収され速やかに抗菌活性本体である NM394 に変換されることが明らかにされている¹⁾。活性本体 NM394 は好気性グラム陽性菌、陰性菌、嫌気性菌に対して広い抗菌スペクトラムを有している¹⁾。

NM441 の経口投与が与える動物の腸内細菌叢への影響をビーグル犬を用いて検討した。本薬剤の 100mg を 14 日間投与した全例で *Enterobacteriaceae* の消失が認められたが、*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroidaceae* にはほとんど変動が認められなかった。1,000mg を同じ期間内投与した時、*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* は糞便中から消失ないし顕著な菌数減少が認められたが、*Bacteroidaceae* の変化は軽度であった。また、両投与群ともに糞便内総菌数の変化はほとんどみられず、前記以外の菌群の変化も顕著ではなかった。このような現象は他のキノロン薬でも認められている^{2,6)}。

抗菌薬投与によって起こる *C. difficile* による下痢症、偽膜性大腸炎は重要な問題である。NM441 を投与した糞便中から *C. difficile* は分離されなかったが、*C. difficile* 関連抗原がわずかに検出された。糞便中の *C. difficile* が

検出限界 (2×10^2 CFU/g) であったため菌が分離されず、抗原のみが検出されたと考えられた。

投与前後に分離された菌の感受性の変化は *Enterobacteriaceae* ではほとんどなく、*Streptococcus* では投与終了直後には耐性が上がるものの投与終了後 7 日目で元に回復した。*B. fragilis* では前 2 菌種よりも回復するのに時間がかかるようであった。NM441 を投与したビーグル犬の糞便内細菌叢の変化は 14 日間の休薬で薬剤投与前の細菌叢に回復するものと考えられた。

以上、NM441 を経口投与することによって、糞便内細菌叢の変動が多少認められるため、使用時にはこのことを念頭におくべきであると考えられた。

文 献

- 1) 名出頼男, 副島林造: 第 42 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。NM441, 名古屋, 1994
- 2) 渡辺邦友, 加藤直樹, 武藤吉徳, 坂東香お里, 沢 赫代, 上野一恵: Fleroxacin のヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響。Chemotherapy 38(S-2): 328~337, 1990
- 3) 光岡知足: 腸内菌の世界, 叢文社, 1980
- 4) 松田真人, 奥山義男, 森野 昭, 尾崎正邦: NM441 の体液中濃度測定法。日化療会誌 44(S-1): 147~154, 1996
- 5) Nord CE: Effect of Antimicrobials on Human Flora. In Anaerobic Infections in Humans (Finegold, George W L ed.), p. 55~80, Academic Press Inc, 1989
- 6) 渡辺邦友, 青木 誠, 小林とよ子, 沢 赫代, 上野一恵: BAY o 9867 の健康成人の腸内細菌叢に及ぼす影響。Chemotherapy 33(S-7): 88~99, 1985

The effect of NM441, a new quinolone, on the intestinal microflora of beagle dogs

Tetsuro Hara¹⁾, Aiko Miyata¹⁾, Minako Araake¹⁾, Katsumi Kawaharajo¹⁾ and Koichi Wada²⁾

¹⁾Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

²⁾Intestinal Flora Laboratory, The Calpis Food Industry Co., Ltd.

Fecal microflora was inspected before, during and after oral administration of NM441, the prodrug of the new quinolone NM394, to two groups of beagle dogs (100mg/dog/day and 1,000mg/dog/day, as NM394) at single dose per day for 14 consecutive days. We investigated the detection of *Clostridium difficile* related antigen, the antibacterial activity of NM394 and the concentration of NM394 in the feces.

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

2) The total aerobes and anaerobes counts during the experiment were not significantly changed. The count of *Enterobacteriaceae* remained under the detection limit, those at 7 days after administration were similar to those before administration.

3) The *C. difficile* related antigen was detected in 4 animals at 7 and 14 days after administration of the drug, but not detected 28 days post-administration.

4) The antibacterial activity of NM394 in the feces was low in all groups.

5) The resistant strains observed were *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Bacteroides fragilis*.