薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (12) 1124-1128 (1981)

Thiopeptin および Bicyclomycin によるラット消化管内における尿素分解の抑制¹⁾

竹部幸子, 三井詔子, 小橋恭一,* 長谷純一

富山医科薬科大学薬学部

Inhibition of Ureolysis in Rat Intestine with Thiopeptin and Bicyclomycin *in Vivo* and *in Vitro*¹⁾

SACHIKO TAKEBE, NORIKO MITSUI, KYOICHI KOBASHI* and JUN'ICHI HASE

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University,
2630 Sugitani Toyama-shi, Toyama, 930-01, Japan

(Received April 30, 1981)

Investigations were performed on the effect of peptidic antibiotics such as thiopeptin and bicyclomycin on ureolysis in rat. Neither drug inhibited urease activity of ileum-caecum contents. Thiopeptin (46 mg/kg/d) or bicyclomycin (100 mg/kg/d) was orally administered to rats two days before the measurement of ¹⁴C-ureolysis: the percentage of recovery of radioactivity expired into the breathing air was assayed (*in vivo* measurement). The depression percentages with thiopeptin and bicyclomycin were 59 and 35%, respectively. Urease activities of ileum-caecum contents of rats (*in vitro* measurement) 4 days after the treatment with thiopeptin and bicyclomycin decreased to 7 and 60% of the control rats, respectively. When being fed with thiofeed containing 100 ppm thiopeptin (10 mg thiopeptin/kg/d) for ten days, urease activity (*in vitro* measurement) decreased to 50–65%, but feeding of bicyclofeed containing 1000 ppm bicyclomycin (100 mg bicyclomycin/kg/d) was not effective. Susceptibility of 24 strains of intestinal bacteria to these antibiotics was examined. Thiopeptin inhibited strongly the growth of *Eubacterium lentum* and *Eubacterium aerofaciens* (MIC were 23 and 26.6 ng/ml, respectively), which were known to be urease-producing bacteria. The growth of other urease-negative bacteria was also inhibited by thiopeptin in the similar concentrations. These results suggested that the intestinal flora were markedly affected by the antibiotics, resulting in the depression of ureolysis *in vivo* and decrease of urease activity of ileum-caecum contents. Bicyclomycin did not affect the growth of test bacteria at all.

Keywords—urease; inhibition of ureolysis; rat intestine; thiopeptin; bicyclomycin

哺乳動物の体内で生合成される尿素の約 25% は消化管内に排泄される。²⁻⁴⁾ この尿素は消化管微生物 (*Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* 等) の菌体内ウレアーゼにより加水分解され^{5,6)} NH₃ と CO₂ を生ずる。この NH₃ は、肝硬変、尿毒症および stagnant loop syndrome の患者では高アンモニア血症の一因^{3,7)} となり、また畜産領域での尿素飼料給付によるアンモニア中毒の成因⁸⁾ と考えられている。この消化管内での尿素分解は、ウレアーゼの特異的阻害剤であるヒドロキサム酸⁹⁻¹¹⁾ や抗生物質、clindamycin,^{12,13)} cefazolin¹³⁾ 等を投与することで抑制することが出来る。これまで種々の抗菌剤投与による尿素分解抑制を検討¹³⁾ してきたが、今回、あらたにペプチド系の抗生物質である thiopeptin¹⁴⁾ および bicyclomycin¹⁵⁾ を用いて、ラット消化管内での尿素分解に対する抑制効果を検討した。

実 験 の 部

供試動物 ラット (ウィスター系, ♀, 静岡農協) は、4 週令で購入し、日本クレア固型飼料 (飼育用 CE-2) で 1–2 週間飼育した後、実験に用いた (体重 100–150 g)。

供試化合物および投与量 Thiopeptin および bicyclomycin は、藤沢薬品工業より供与された。Thiopeptin は 5% エタノールに懸濁し、また bicyclomycin は用時蒸留水に溶解して、胃ゾンデで強制経口投与した。薬物の投与量は Table I に示した。また用いた thiopeptin 添加飼料 (Thiofeed) および bicyclomycin 添加飼料 (Bicyclofeed) は、日本クレア粉末飼料 (飼育用 CE-2) に thiopeptin 終濃度 100 ppm, bicyclomycin 終濃度 1000 ppm をそれぞれに含むものである。

供試化合物投与計画および尿素分解活性の測定法 ラット 3—6 匹を一群とし、供試化合物の指定量を 2 日間にわたって朝夕 2 回胃ゾンデで強制経口投与した。対照群には蒸留水を同様に投与した。3 日目に ^{14}C -尿素 ($1.2 \mu\text{Ci}$, 6 mg) を経口投与し、6 時間までに呼気中に排泄される $^{14}\text{CO}_2$ の放射活性を経時的に測定し *in vivo* で尿素分解活性を求めた (*in vivo* measurement)。4 日目にラット回盲腸部内容物を取り出し、ウレアーゼ活性を測定した (*in vitro* measurement)。In *in vivo* での尿素分解活性は、投与した全放射活性に対する呼気中放射活性の百分率 (%) で示した。対照ラットの分解率には個体差 (12—20 %) があるので、あらかじめ一群について *in vivo* における尿素分解率を求めて対照値とし、3 日後同じ群について薬物を 2 日間投与して尿素分解率を測定し、薬物の分解抑制率を求めた。In *in vitro* でのウレアーゼ活性は、腸内容物乾燥重量 (g) あたり、37°C, 30 分間に加水分解される尿素の μmol 数 ($\Delta\text{urea } \mu\text{mol/g} \cdot \text{dry wt.}$) で示した。両測定法の詳細は前報¹³⁾ に述べた方法に従った。

供試化合物飼料による飼育は自由摂取で 10 日間行ない、*in vivo* および *in vitro* で尿素分解活性を測定した。対照群は、日本クレア粉末飼料 (飼育用 CE-2) で同期間飼育した。

抗菌活性の測定法 供試菌株のうち、*Peptostreptococcus* 2 株、*Eubacterium* 4 株、*Bacteroides* 2 株、*Veillonella* 2 株、*Bifidobacterium* 3 株、*Clostridium* 2 株、*Streptococcus faecalis* II-136、*Lactobacillus brevis* II-46 は光岡知足博士 (理化学研究所)、*Lactobacillus* 5 株は西沢幾男氏 (ミヤリサン研究所)、*Proteus mirabilis* S₂ は竹内秀雄博士 (滋賀医大) より分与された。Thiopeptin 添加培地は、滅菌 GAM 半流動培地 (日水) 3 ml に、各濃度の thiopeptin-dimethyl sulfoxide 溶液 0.2 ml を加えて調製した。Bicyclomycin 添加培地は、bicyclomycin を滅菌蒸留水に溶解し各濃度に滅菌蒸留水で希釈した後、上記培地に添加して調製した。各供試菌株を、GAM 半流動培地にて、37°C, 24—48 時間培養した後、この菌液 0.1 ml (生菌数 10^7 — 10^8) を供試化合物添加培地 3.2 ml に植菌し、thiopeptin の場合 48 時間後、bicyclomycin の場合 24 時間後の菌の発育を観察し、最小発育阻止濃度 (MIC, $\mu\text{g/ml}$) を求めた。

結 果 の 部

ラット体内における ^{14}C -尿素分解に及ぼす薬物投与の効果 (*in Vivo* Measurement)

Table I に見られるごとく thiopeptin は、46 mg 投与で 44% (第 I 回実験) および 67% (第 II 回実験) の抑制率を示した。18.4 mg 投与では個体差があって抑制率にかなりのバラツキを示したが、平均 36% の抑制率であった。Bicyclomycin は、20 mg 投与で抑制効果を示さず、100 mg 投与で 40% (第 I 回実験) および 30% (第 II

TABLE I. Effect of Thiopeptin and Bicyclomycin on Ureolysis *in Vivo* and *in Vitro*

Test compound	Dose mg/kg/d (number of rats)	Ureolysis <i>in vivo</i>			Urease activity <i>in vitro</i> ($\Delta\text{urea } \mu\text{mol/30min/g} \cdot \text{dry wt.}$)			
		Excretion % as $^{14}\text{CO}_2$		Depression (%)	Control ^{a)}		Treatment	
		Control	Treatment		Neutral	Acid	Neutral	Acid
Thiopeptin	2 (3)	13.0	13.6	0	181.5	380.4	190.8 (1.05) ^{*c)}	455.9 (1.19) ^{*c)}
	18.4 (13)	18.8	12.0	36.1	375.6	574.1	64.5 (82.9) ^{b)}	112.1 (80.5) ^{b)}
	46 I (5)	12.9	7.28	43.6	181.5	380.4	22.9 (87.4)	121.2 (68.2)
	46 II (6)	19.0	6.22	67.3	375.6	574.1	8.79 (97.7)	11.9 (98.0)
Bicyclomycin	20 (6)	16.7	21.0	0	375.6	574.1	348.8 (7.2)	642.7 (1.11) [*]
	100 I (5)	12.1	6.79	42.4	181.5	380.4	60.3 (66.8)	234.2 (48.5)
	100 II (6)	19.5	13.6	30.3	375.6	574.1	311.8 (17.0)	458.9 (20.1)

Ureolysis *in vivo* and urease activity *in vitro* were measured as described in our previous report.¹³⁾

a) The neutral and acid urease activity, 181.5 and 380.4, respectively, were the average values of ileum-caecum contents of twelve rats of the control group and 375.6 and 574.1 were those of six rats of another control group.

b) Parentheses showed the decrease percentages of urease activity of ileum-caecum contents by the treatment of drug.

c) (*): When the values after the administration of drug were larger than that of the control, the parentheses showed the increasing ratios.

Fig. 1. Inhibition of Ureolysis by Thiopeptin and Bicyclomycin

The closed circles showed the average percentages of ^{14}C -ureolysis of eleven rats of the control group to which 1.0 ml of distilled water was administered orally in place of a drug solution, followed by the administration of ^{14}C -urea according to the experimental schedules described in the previous report.¹⁸⁾ The open circles showed the average percentages of ^{14}C -ureolysis of eleven rats of thiopeptin treatment (A: 46 mg/kg/d) and those of bicyclomycin treatment (B: 100 mg/kg/d).

アーゼには、中性域で活性の高いウレアーゼと酸性域で活性の高いウレアーゼの2種存在することを見出している⁶⁾ので、pH 7.0とpH 5.0の2つの条件で測定した。対照ラットで活性が群により大きく変動したが、これは実験開始前の飼育条件に左右されと考えられる。中性ウレアーゼ活性は、thiopeptin 18.4 mg投与で83%の減少を、また46 mg投与で87および97%の減少を示した。Bicyclomycin 20 mg投与で効果はなく、100 mg投与では、67%の減少を示した群とわずか17%の減少しかみられない群と相異なる結果を得た。酸性ウレアーゼ活性も中性ウレアーゼ活性とほぼ比例した減少を示した。なお、thiopeptinおよびbicyclomycinは、それぞれ0.52, 2.6 mMで、消化管内容物より抽出した粗ウレアーゼ標品の活性に対して、全く阻害活性を示さなかった。

薬物添加飼料による飼育ラット体内での尿素分解の変動

対照ラットの1日あたりの平均餌摂取量は、13.4 gで、thiofeed (thiopeptin 100 ppm) 飼育ラットでは、IおよびIIの実験で、それぞれ13.7, 14.7 gであった、したがってthiopeptinとして10 mg/kg/日を10日間摂取したことになる。 ^{14}C -尿素分解の抑制率は、強制経口投与時に比較して若干低い値を示した。一方回盲腸部内容物のウレアーゼ活性は、中性域および酸性域いずれにおいても、対照のほぼ半分に減少した (Table II)。Thiopeptinの飼料中の濃度を50 ppmに下げても、100 ppm添加時とほぼ類似した抑制値を得た。

Bicyclofeed (bicyclomycin 1000 ppm) 飼育ラットの平均餌摂取量は14.9 gであった。したがって bicyclomy-

回実験)の抑制率を示した。Fig. 1. AおよびBに、これらの薬物投与による ^{14}C -尿素分解の経時変化を示した。Fig. 1. Aに示すように、thiopeptin (46 mg)は、 ^{14}C -尿素投与後1時間後で85.1%(第I, II回実験の平均)と高い抑制を示した。しかし時間と共に抑制率は減少し、6時間後では58.8%(第I, II回実験の平均)であった。Fig. 1. Bに示したbicyclomycin (100 mg)も同様に、抑制率は時間と共に減少した。

ラットにおける回盲腸部内容物のウレアーゼ活性に及ぼす薬物投与の効果 (*in Vitro* Measurement)

前項で示した ^{14}C -尿素をラットに投与して得られる尿素分解 (*in vivo* measurement)は、体内での総分解率を示し、この分解は主として消化管内全体での尿素分解によると考えられる。一方、ウレアーゼ活性の高い回盲腸部内容物のウレアーゼ活性について、薬物投与による増減を比較検討した (Table I)。著者らは消化管内ウレ

TABLE II. Effect of Thiofeed on Ureolysis *in Vivo* and *in Vitro*

Exp. No.	Number of Rats	Ureolysis <i>in vivo</i>			Urease activity <i>in vitro</i> (<i>A</i> urea μ mol/30min/g·dry wt.)				
		Excretion Control	% as $^{14}\text{CO}_2$		Depression %	Control		Treatment	
			Treatment			Neutral	Acid	Neutral	Acid
I	5	15.21	13.32	12.5	235.4	331.0	116.1	113.6	
II	4	13.65	10.13	25.8	235.4	331.0	164.9	168.1	

Rats were maintained with powdered food (Nihon Clea CE-2) containing 100 ppm thiopeptin (Thiofeed) for 10 days. Ureolysis *in vivo* and urease activity *in vitro* were measured according to our previous report.¹⁹⁾

cin として 100 mg/kg/日摂取していることになるが、 ^{14}C -尿素分解率および回盲腸部内容物ウレアーゼ活性は対照とほぼ同程度で尿素分解抑制を認めなかった。

腸内細菌に対する抗菌活性

ウレアーゼ陽性株 4 株と、陰性株 20 株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を検討した結果を Table III に示した。

Thiopeptin は、ウレアーゼ陽性株の *Eubacterium lentum* 515, *Eubacterium aerofaciens* ATCC 25986 に強い発育阻止効果を示したが、*Proteus mirabilis* S₂ に対しては阻止効果を示さなかった。陰性株の *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* 等にも発育阻止効果を示したが、*Bacteroides*, *Veillonella* に対しては著明な効果を示さなかった。

Bicyclomycin は、高濃度にもかかわらず試験株のいずれにも発育阻止効果を示さなかった。

TABLE III. Antibacterial Activity of Thiopeptin and Bicyclomycin against Intestinal Bacteria

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	
	Thiopeptin	Bicyclomycin
Urease-positive		
<i>Eubacterium lentum</i> 515	0.0230	>417
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC 25986	0.0266	>600
<i>Lactobacillus fermenti</i> sp. 3-91	0.364	>600
<i>Proteus mirabilis</i> S ₂	>148	>600
Urease-negative		
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> EBF 77/25	0.0579	>417
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 4330	0.0579	>417
<i>Eubacterium limosum</i> VPI 5167	0.291	>417
<i>Eubacterium rectale</i> BGM 48	0.291	>417
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>thetaiota</i>	28.7	>606
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>vulgatus</i>	28.7	>606
<i>Veillonella alcalescens</i> ATCC 17745	>291	>417
<i>Veillonella parvula</i> ss. <i>parvula</i> ATCC 10790	>291	>417
<i>Bifidobacterium bifidum</i> a E 319	0.115	>606
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0.0579	>606
<i>Bifidobacterium longum</i> IV-55	0.0230	>606
<i>Clostridium sphenoides</i> VI-22	1.35	>606
<i>Clostridium perfringens</i> To-23	0.135	>600
<i>Lactobacillus brevis</i> II-46	0.148	>600
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IAM-1043	0.0676	>600
<i>Lactobacillus xylosus</i> ATCC 155775	0.148	>600
<i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830	0.364	>600
<i>Lactobacillus fermenti</i> ATCC 9338	0.364	>600
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0.364	>600
<i>Streptococcus faecalis</i> II-136	0.148	>600

a) Minimum inhibitory concentration (MIC) is expressed in terms of μg per ml at which the growth in GAM medium is completely suppressed for 48 h by thiopeptin or for 24 h by bicyclomycin.

考 察

著者らは先に哺乳動物の体内での尿素分解抑制が、抗菌剤投与によって消化管内で尿素分解の主役である嫌気性菌の発育阻止により達成しうることを報告した。¹³⁾ 例えば clindamycin のように *in vitro* で嫌気性菌に強い抗菌活性を示すものは、体内での尿素分解を強く抑制した。また、宿主側の腸内細菌叢の個体差が、尿素分解抑制面からみた場合、著明に現われたのが metronidazole で、個体により体内での尿素分解を荷っている細菌が異なることを示唆していた。

Thiopeptin は, *Mycoplasma* (MIC : 0.00075—10 $\mu\text{g/ml}$) やグラム陽性菌 (MIC: 0.06—0.5 $\mu\text{g/ml}$) に抗菌活性ありと報告されている.¹⁴⁾ Table III に示したごとく, 腸内で優勢な偏性嫌気性菌で, しかもウレアーゼ産生菌である *Eubacterium lentum* および *Eubacterium aerofaciens* に強力な発育阻止作用を示した. このことは Table I で示した本抗生物質の尿素分解の抑制を裏付けるものであった. しかし, 通性嫌気性菌でウレアーゼ産生菌である *Proteus mirabilis* に対しては全く効果が認められず, 消化管内でこの菌がもともと優勢か, 本剤投与により優勢となった個体では, *in vivo* での抑制が生じないことを示唆している. Thiopeptin 18.4 mg 投与の際に抑制率が個体によりかなり変動した一因を成していると推察される. Thiopeptin 投与で認められる抑制率の個体による変動は, 上述の宿主の腸内細菌叢の個体差と共に, この薬物の水に対する難溶性に起因する可能性もある.

Thiopeptin 投与で, Fig. 1. A に示したように抑制率の経時的減少が観察された. この結果は, この薬物が, 経口的に投与した尿素の消化管腔内での初期の分解 (尿素の一次分解¹⁶⁾) を強く抑制し, 一旦消化管より吸収され再度消化管内に排泄される尿素の分解 (尿素の二次分解¹⁶⁾) には効果が劣っているためと推測される. また¹⁴C-尿素分解抑制に比較し, 回盲腸部内容物のウレアーゼ活性の減少が大きいことは, 消化管下部での分解を強く抑制していることを示唆している. この thiopeptin の尿素分解抑制力は, 前報¹³⁾ の clindamycin, cefazolin, thiophenicol に次ぐもので, 尿素分解抑制パターンも類似していた.

Bicyclomycin は, *Proteus* や *Pseudomonas* を除くグラム陰性菌 (MIC 12.5—100 $\mu\text{g/ml}$) に有効と報告¹⁵⁾ されているが, 試験菌株ではいずれにも発育阻止を示さなかった. しかし, Table I の結果のごとく 100 mg 投与で ¹⁴C-尿素分解抑制が認められ, 試験菌株以外のウレアーゼ産生菌種に効果が期待される. Table I で回盲腸部内容物のウレアーゼ活性の減少の認められた群 (I 群) と減少の程度の小さい群 (II 群) とが認められた. 対照ラット群のウレアーゼ活性—特に中性域での活性—が大きく異なり, 腸内での尿素分解を荷う菌叢の差を示唆しているので, これが抑制率の変動の一因と考えられる. この薬物の尿素分解抑制力は, neomycin より若干低下し, kanamycin と同程度であった.

強制経口投与と飼料添加とを比較すると, thiopeptin はいずれにおいても抑制効果を示したが, bicyclomycin は後者では効果を示さなかった. Thiopeptin は, 体内で尿素由来のアモニア生成を減少しうること, および飼料添加による効果も認められることより, 反刍動物での N-出納の改善に役立ち, 発育促進効果が期待される.

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第 99 年会で発表, 札幌, 1979 年 8 月.
- 2) M. Walser, L. J. Bodenlos, *J. Clin. Invest.*, **38**, 1617 (1959).
- 3) E. A. Jones, R. A. Smallwood, A. Craigie, V. M. Rodenoer, *Clin. Sci.*, **37**, 825 (1969).
- 4) J. A. Gibson, N. J. Park, G. E. Slanden, A. M. Dawson, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **50**, 51 (1976).
- 5) 鈴木邦夫, 光岡知足, *医学と生物学*, **93**, 359 (1976).
- 6) K. Suzuki, Y. Benno, T. Mitsuoka, S. Takebe, K. Kobashi, J. Hase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 379 (1979).
- 7) 海藤勇, 佐藤俊一, 佐原 元, 有末太郎, *診断と治療*, **59**, 101 (1971).
- 8) 新林恒一, *栄養生理研究会報*, **15**, 23 (1971).
- 9) 小橋恭一, 竹部幸子, 寺島直美, 長谷純一, *無菌生物*, **4**, 11 (1974).
- 10) W. H. Summerskill, F. Thorsell, J. H. Feinberg, J. S. Aldrete, *Gastroenterology*, **54**, 20 (1967).
- 11) W. N. Fishbein, *Biochem. Medicine*, **1**, 111 (1967).
- 12) K. Ueno, K. Ninomiya, K. Watanabe, H. Imamura, S. Kubota, I. Mochizuki, S. Suzuki, *J. Germfree*, **5**, 16 (1975).
- 13) 竹部幸子, 小橋恭一, 長谷純一, 伊藤 広, *薬誌*, **99**, 51 (1979).
- 14) N. Miyairi, T. Miyoshi, H. Aoki, M. Kosaka, H. Ikushima, K. Kunugita, H. Sakai, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1**, 192 (1972).
- 15) M. Mishida, Y. Mine, T. Matsubara, S. Kuwahara, *J. Antibiotics*, **25**, 569 (1972).
- 16) 小橋恭一, 竹部幸子, 長谷純一, 小泉 保, *生化学*, **46**, 634, (1974).