

BAY o 9867 の健康成人の腸内細菌叢に及ぼす影響

渡辺邦友・青木 誠・小林とよ子

沢 赫代・上野一恵

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

健康な男子成人の志願者 7 名に BAY o 9867 の 200 mg 錠を 1 日 3 回 (毎食後), 7 日間経口投与し, 糞便内細菌叢に対する影響を検討した。本剤は好気性菌のうち *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 属, *Staphylococcus* 属の減少を来したが, 投与中止後比較的速やかに回復した。嫌気性菌の菌数には大きな影響は与えなかった。

本剤の投与中止後 4 例において *C. difficile* およびその毒素が検出された。

BAY o 9867 はバイエル社で開発された経口キノロン系抗菌剤で, 広い抗菌スペクトラムを示す¹⁻²⁾。

今回, 著者らは BAY o 9867 の第一相試験において, 糞便内細菌叢の変化を検索する機会を得たので報告する。

I. 対象および方法

1. 対象

対象者は健康な男性志願者 7 名で, 試験開始の 3 ヶ月前より如何なる抗菌剤の投与も受けていない。対象者の年齢, 体重等は Table 1 に示す如く, 21~23 才の男性, 体重は 52.5~66 kg であった。

2. 使用薬剤

BAY o 9867 200 mg 1 日 3 回毎食後, 7 日間連続で経口投与した。

3. 糞便中細菌数の測定方法

BAY o 9867 投与開始後, 連日便の性状を観察し, Table 2 に示す日程表に従い, 薬剤投与 4 日前および投与第 2, 4 日目, 投与終了後第 1, 4, 7, 14, 21, 28 日目に自然排泄した糞便を全量採取した。糞便は嫌気環境下でよく混合, その約 1 g を取り上野の希釈液³⁾にて 10 倍糞便希釈液を作り, これを希釈液で 100 倍希釈法により 10^{-7} 倍まで希釈した。夫々の糞便希釈液の 0.1 ml を Table 3, 4 に示した非選択培地および選択培地に塗抹, 好気性菌用培地は 37°C, 24~48 時間, 嫌気性菌用培地は Anaerobic chamber 内で 37°C, 48~96 時間培養した。Anaerobic chamber (Forma 社) は 3 種混合ガス ($H_2 : CO_2 : N_2 = 10 : 10 : 80$) と触媒により嫌気性環境が保持されている。夫々の培地は培養後, 異なった形態, 着色などから同一と考えられる集落ごとに計数し, 夫々の集落の代表的な集落を同定のために釣菌した。同一と考えられる集落についても 3 個の集落を釣菌して同定を行った。

夫々の集落は純粋集落を確認の上, グラム染色, 形態,

各種生化学的性状より同定した。好気性菌の同定には Api staph., Api Strepto., Enterotube II, Oxiferm を用い, 必要に応じて各種の補助試験を追加した。嫌気性菌の同定は, 各種生化学的性状とガスクロマトグラフィーによる低級脂肪酸の分析結果より同定した。

4. 糞便中の *Clostridium difficile* 毒素の検出

糞便中の *C. difficile* 毒素の検出は, 糞便に等量の 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) を加え, よく混合したのち, 10,000 G 30 分間 (4°C) 遠心し, その上澄液を試料とした。毒素の検出には D-1 ラテックス試薬 (ダイヤトロン社) を用いた LPIA 法により定量測定した⁴⁾。

5. 糞便中の BAY o 9867 の測定方法

糞便中の BAY o 9867 濃度は, 投与 4 日前, 投与第 2, 4 日目, 投与終了後第 1, 4, 7 日目の糞便について測定した。薬剤濃度測定は, 三菱油化メディカルサイエンス (株) にて *E. coli* Kp を検定菌とする Bioassay 法により行った。

II. 結 果

1. 糞便内細菌叢の変化について

BAY o 9867 の経口投与による糞便内細菌叢の変化は Fig. 1~7 に示した。

1) Subject A について

Subject A では本剤投与により嫌気性菌では質的, 量的にも大きな変動はみられなかった。しかし, 好気性菌では *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 属, *Staphylococcus* 属が減少したが, 投与中止後 7~14 日目頃までには, 投与前の細菌叢に質的, 量的にも回復した。

2) Subject B について

Subject B では, 本剤投与により嫌気性菌の質的, 量的な変動はとくにみられなかった。しかし, 好気性菌では *Enterobacteriaceae* が投与 2 日目から減少し, 投与中止後 7~14 日目頃から回復した。

Table 1 List of healthy volunteers

Subject No	Name	Age	Sex	Weight (kg)
A	N. K.	22	Male	66
B	K. S.	22	Male	52.5
C	M. K.	21	Male	59
D	K. S.	22	Male	65
E	T. Y.	23	Male	58
F	H. H.	21	Male	63
G	T. S.	21	Male	59.5

Table 2 Experimental schedule of BAY o 9867 administration and sampling of fecal specimens

		Day of study													
		-4	1	2	3	4	5	6	7	1	4	7	14	21	28
Before		During medication ② (oral administration, 200mg, 3/day)							After						
△①		△			△				△	△	△	△	△	△	△
		Microflora in feces													
△		△			△				△	△	△	△	△	△	△
		<i>Clostridium difficile</i> and their toxins in feces													
△		△			△				△	△	△				
		BAY o 9867 concentration in feces													

① : △; Sampling

② : All volunteers received BAY o 9867 orally, 200mg 3 times daily, for 7 days.

Table 3 Procedure for the isolation of aerobic bacteria from fecal flora

Medium	Dilutions of feces*				Incubation period (Days)	Selection
PEA blood agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	Gram positive cocci
No. 110 Egg yolk agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	<i>Staphylococcus</i>
SF agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	<i>Streptococcus</i>
DHL agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	<i>Enterobacteriaceae</i>
NAC agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	<i>Pseudomonas</i>
<i>Candida</i> GE agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	<i>Candida</i>
GAM agar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	2	Non-selective

* 0.1 ml of each dilution was plated on each medium used.

3) Subject Cについて

Subject Cでは、Subject A, Bと同様に本剤投与により嫌気性菌には大きな変動はみられなかった。

一方、好気性菌では本剤投与により *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 属, *Staphylococcus* 属が減少し、投与中止後7日目頃から回復がみられた。

4) Subject Dについて

Subject Dにおける糞便内細菌叢の変化は、Subject A, B, Cと同様に嫌気性菌には大きな変動はみられないが、*Fusobacterium* 属のみが本剤投与により10⁷cfu/gから10³cfu/g以下に減少したが、投与中止後7日目に回復し

た。

一方、好気性菌では *Enterobacteriaceae* は10⁶cfu/g, *Streptococcus* 属は10⁵cfu/g, *Staphylococcus* 属は10⁴cfu/gから夫々10³cfu/g以下にまで減少した。しかし、投与中止後7日目以降から漸次回復した。

5) Subject Eについて

嫌気性菌では、*Fusobacterium* 属のみが10⁵cfu/gから10³cfu/g以下に減少したが、投与中止後14日目より10³cfu/g以上となった。

一方、好気性菌では *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 属, *Staphylococcus* 属, ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌

Table 4 Procedure for the isolation of anaerobic bacteria from fecal flora

Medium	Dilutions of feces*	Incubation period (Days)	Selection
Vancomycin modified FM agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Fusobacterium</i>
Gentamicin-Vancomycin <i>Brucella</i> blood agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Bacteroidaceae</i>
<i>Bacteroides</i> bile esculin agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>B. fragilis</i> group
Gentamicin-Vancomycin <i>Brucella</i> laked blood agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	7	<i>B. melaninogenicus</i>
Rifampicin <i>Brucella</i> blood agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i>
Kanamycin CW Egg york agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Clostridium</i>
CW Egg york agar	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁶	4	<i>Clostridium</i>
CCFA agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	2	<i>C. difficile</i>
<i>Bifidobacterium</i> agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Lactobacillus</i> selective medium	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Lactobacillus</i>
PMS agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Peptococcaceae</i>
Vancomycin-Oleandomycin <i>Veillonella</i> agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	<i>Veillonella</i>
GAM agar	10 ⁻¹ 10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷	4	Non-selective

* 0.1 ml of each dilution was plated on each medium used.

が、本剤投与により10³cfu/g以下となった。投与中止後21~28日目頃までに投与前の細菌叢の構成を回復した。

6) Subject Fについて

Subject FではSubject Eとほぼ同様な変化を示した。本剤投与により*Fusobacterium*属が10⁴cfu/gから10³cfu/g以下となったが、投与中止後14日目頃には回復した。一方、嫌気性の球菌が本剤投与により菌数の増加を来した。

好気性菌は、他のSubjectと同様に*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*属、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌が10³cfu/g以下に減少したが、投与中止後21日目頃までに投与前の菌叢に回復した。

7) Subject Gについて

Subject Gでは、他のSubjectと異なり本剤の投与により嫌気性菌の減少はみられなかったが、投与中止後*Fusobacterium*属、*Bifidobacterium*属、嫌気性のグラム陽性桿菌、嫌気性のグラム陽性球菌の著しい増加がみとめられた。

一方、好気性菌では*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*属が減少したが、投与中止後7日目頃までに回復した。*Bacillus*属は本剤の投与中止後に著しい菌数の増加をみとめた。

2. 糞便内の薬剤濃度と菌数との関係

糞便内のBAY o 9867の濃度はFig. 1~7までに示す如く、投与前では当然のことながら検出されなかったが、投与の2日目では2.8~311 μg/g (平均142.0±

132.11 μg/g)で若干の個体差がみとめられた。Subject B, Cでは2.8および3.3 μg/gであったが、Subject A, D, E, F, Gでは50.6, 206, 299, 121, 311 μg/gであった。投与4日目では206~538 μg/g (337.9±109.84 μg/g)であった。投与中止後1日目では172~541 μg/g (350.7±139.35 μg/g)であったが、投与中止後4日目では0.3~206 μg/g (40.9±74.02 μg/g)で個体により異なっていた。投与中止後7日目ではSubject Fのみが0.2 μg/gに検出されたのみで他はすべて検出限界濃度(<0.2 μg/g)以下となっていた。

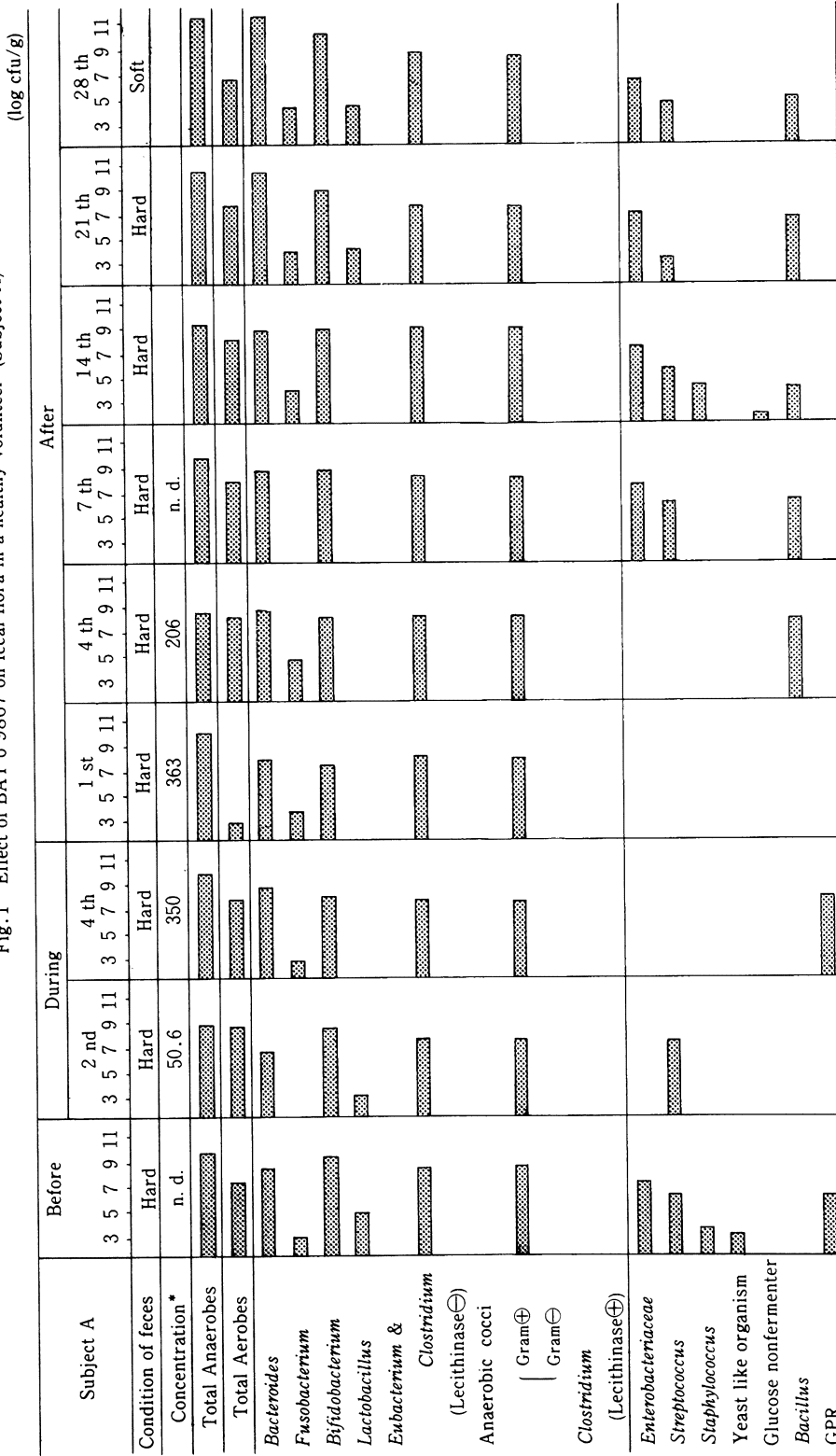
糞便内薬剤濃度と細菌叢の変化との間には、好気性菌のうち*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*属、*Staphylococcus*属の菌数と密接な相関関係がみとめられたが、嫌気性菌の菌数の変化とは相関関係はみとめられなかった。

本剤によって減少した菌数は、投与の中止後本剤の薬剤濃度が減少する7日目以後から回復する傾向がみとめられた。

3. 糞便中から*C. difficile*の分離と毒素の検出

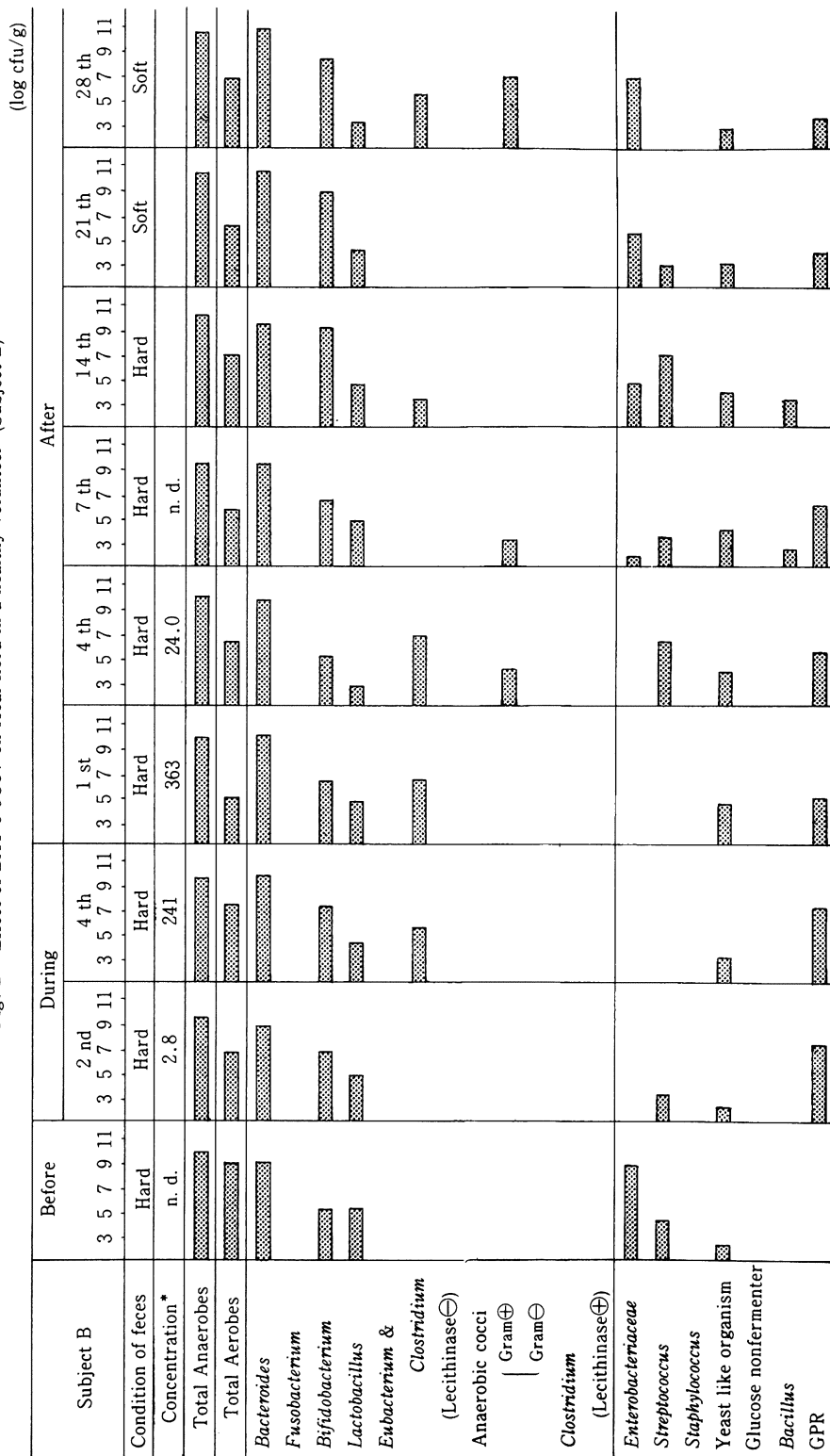
BAY o 9867の経口投与前後の糞便から*C. difficile*の分離と毒素の検出の成績をTable 5に示した。Subject Aは投与前の糞便から*C. difficile*を10⁵cfu/gに分離し、毒素を50 ng/mlに検出した。投与後の糞便ではSubject A, B, D, Fから*C. difficile*を10⁵cfu/gに分離し、毒素を検出したが、毒素量は50~500 ng/mlであった。Subject Bで*C. difficile*と毒素を検出した糞便は無形便であったが、無形便が*C. difficile*毒素に起因することの証

Fig. 1 Effect of BAY o 9867 on fecal flora in a healthy volunteer (Subject A)



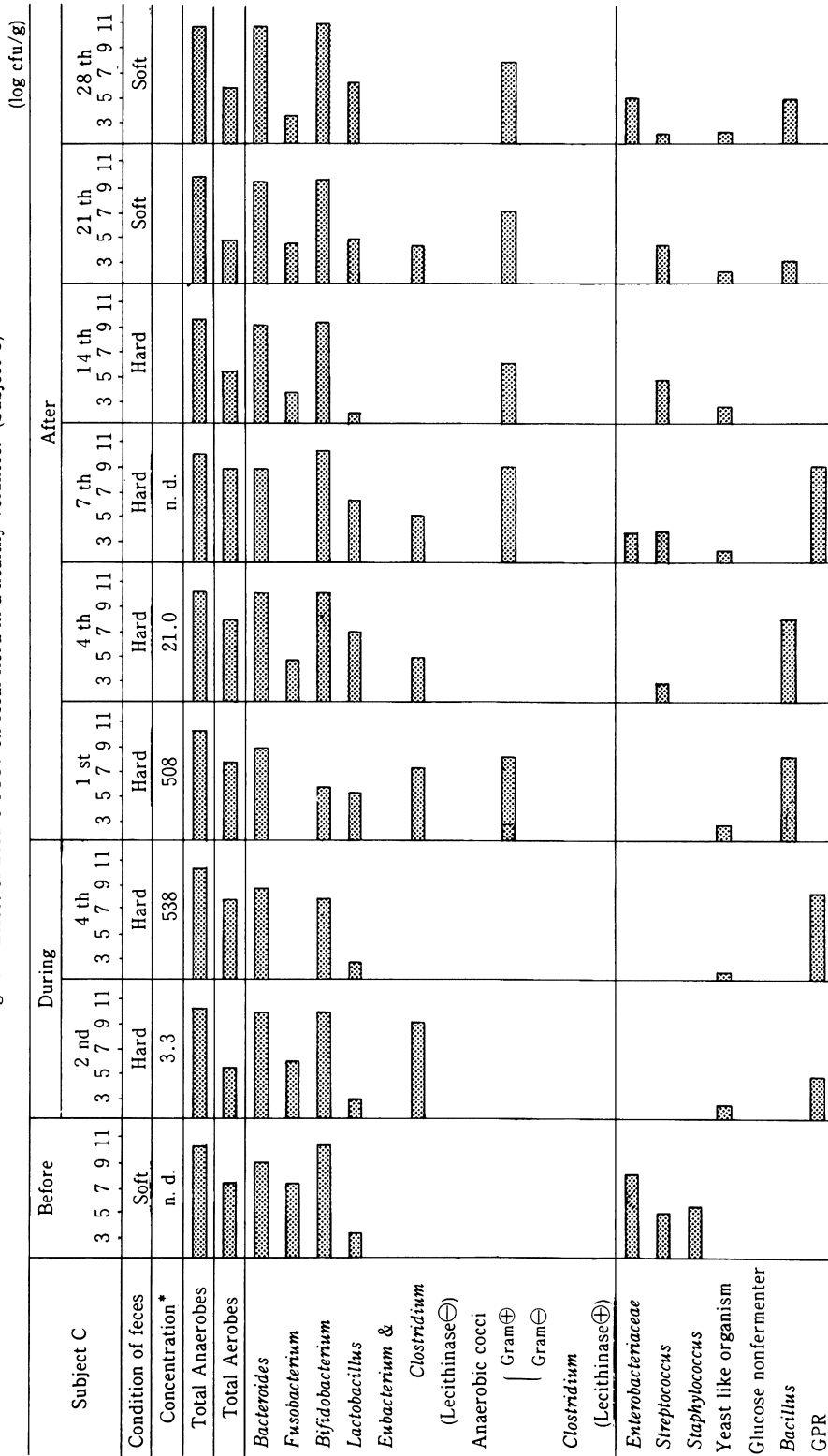
* $\mu\text{g/g}$ n. d. $< 0.2 \mu\text{g/g}$

Fig. 2 Effect of BAY o 9867 on fecal flora in a healthy volunteer (Subject B)

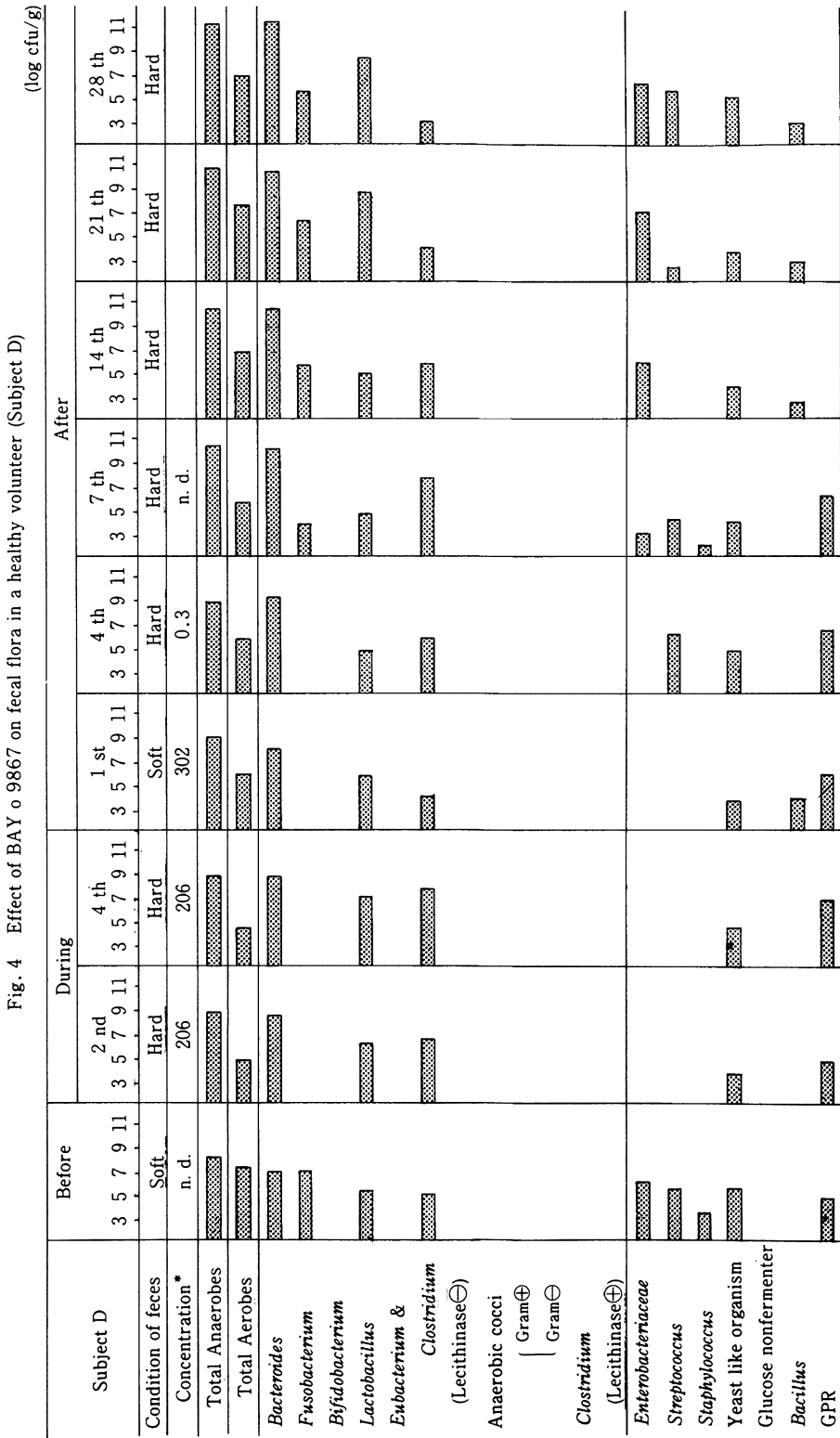


* μg/g n.d. < 0.2 μg/g

Fig. 3 Effect of BAY o 9867 on fecal flora in a healthy volunteer (Subject C)



* $\mu\text{g/g}$ n. d. $< 0.2 \mu\text{g/g}$



* $\mu\text{g/g}$ n.d. $< 0.2 \mu\text{g/g}$

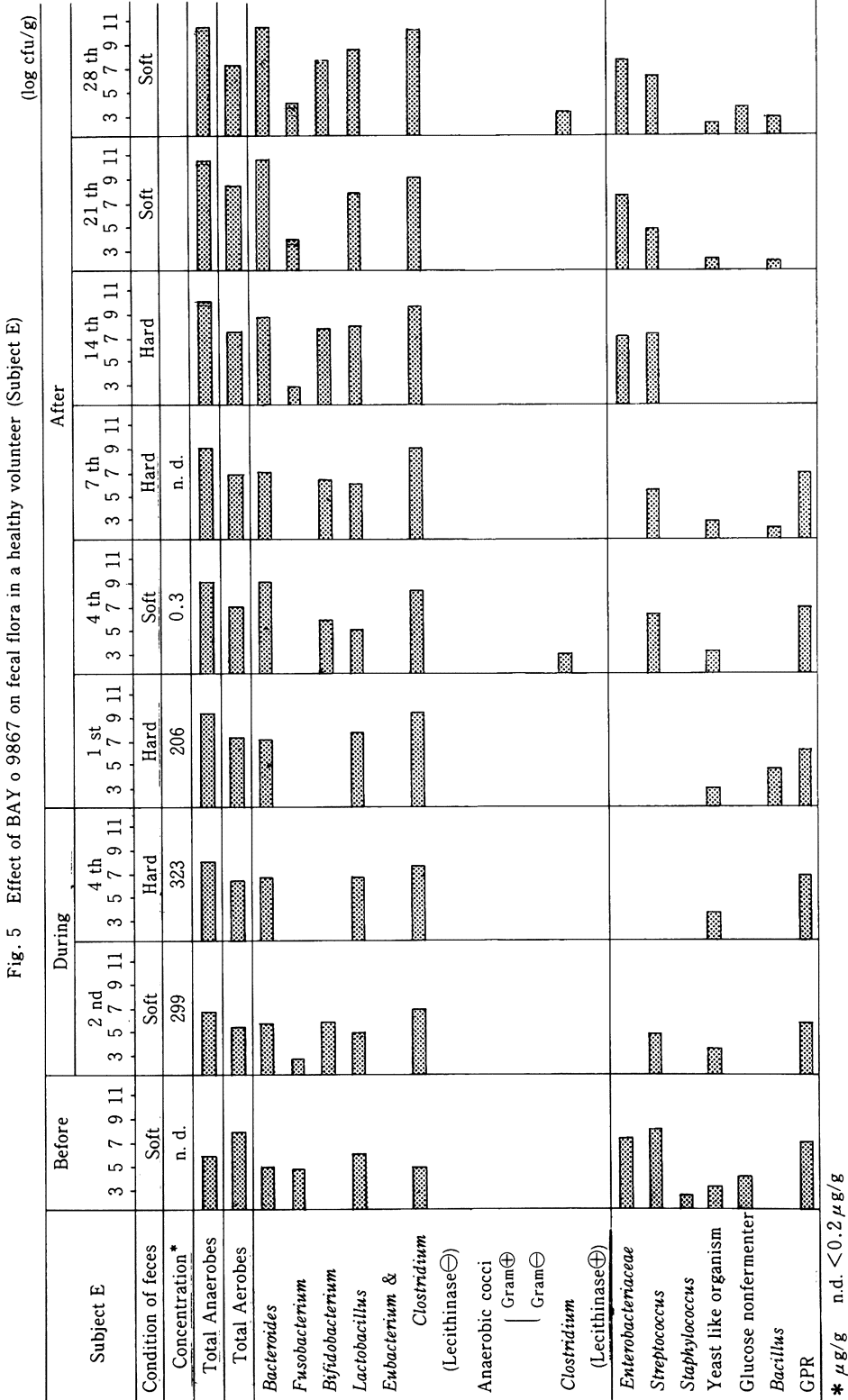
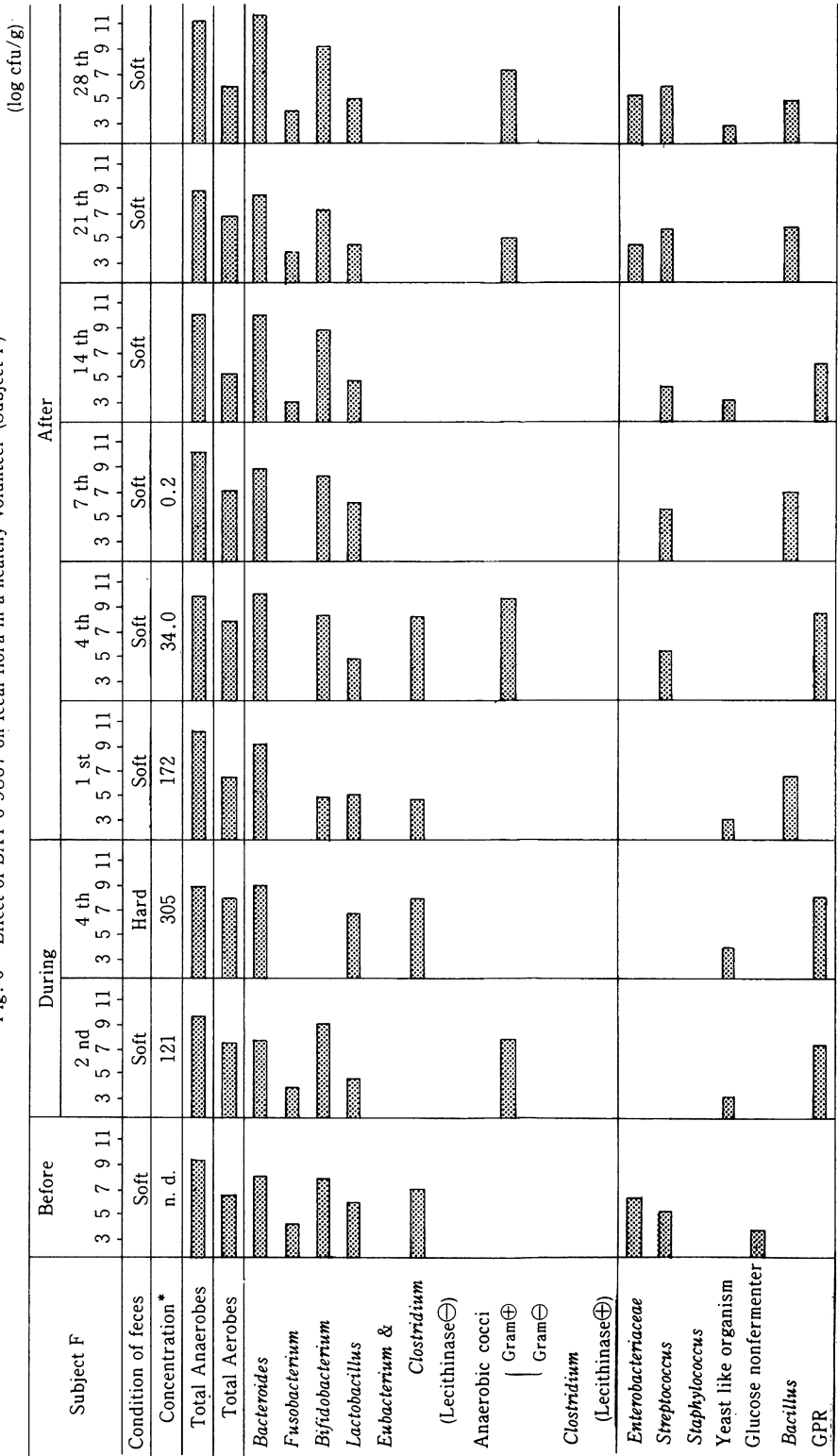
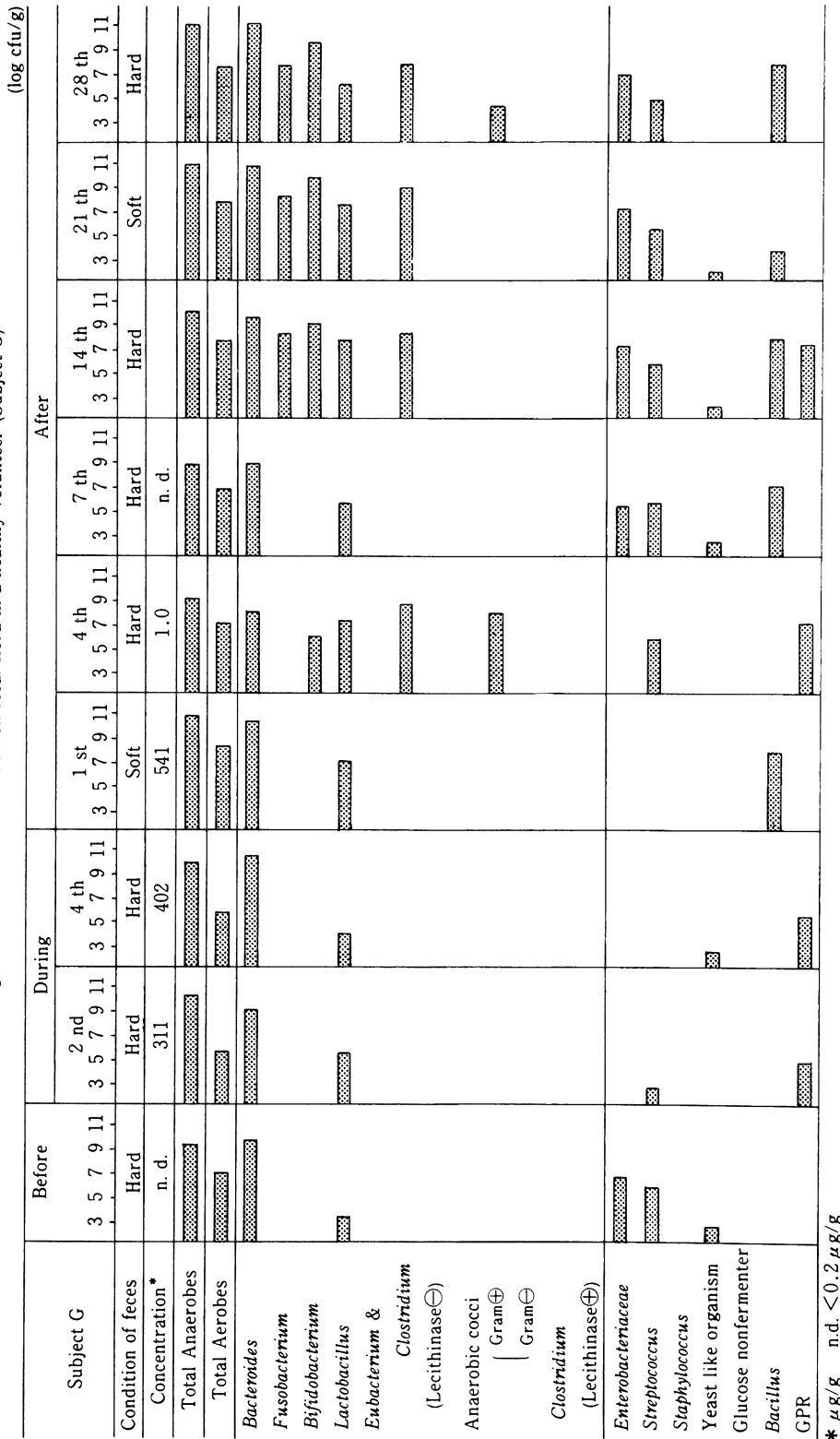


Fig. 6 Effect of BAY o 9867 on fecal flora in a healthy volunteer (Subject F)



* μg/g n.d. < 0.2 μg/g

Fig. 7 Effect of BAY o 9867 on fecal flora in a healthy volunteer (Subject G)



* $\mu\text{g/g}$ n. d. $< 0.2 \mu\text{g/g}$

Table 5 Detection of *C. difficile* and D-1 toxin in fecal specimens of healthy volunteers

Subject	Medication Organism	Before	During		After				
			2 nd	4 th	1 st	4 th	7 th	21th	28th
A	<i>C. difficile</i>	10 ⁵ *	—	—	—	—	10 ⁵	—	10 ⁵
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	50ng/ml	—	—	—	—	—	—	50ng/ml
B	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	10 ⁵	10 ⁵
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	300ng/ml	500ng/ml
C	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—
D	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	10 ⁵	10 ⁵
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	300ng/ml	300ng/ml
E	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—
F	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	10 ⁵	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	100ng/ml	—	—	—
G	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—

*No. of *C. difficile*/g of feces — : Not detected

扱は得られなかった。

Ⅲ. 考 案

抗菌剤投与による腸内細菌叢の変動は、薬剤の抗菌力、抗菌スペクトラム、消化管内での吸収の程度、胆汁排泄の程度、速さ、腸管内での薬剤の分解による不活性化などによって異なる。

BAY o 9867 は広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有する抗菌剤であるため^{1,2)}、経口投与により腸管内細菌叢の質的、量的な変動の起こることが予測される。しかし、今回の7名の健康男子の志願者について検討した結果、*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 属, *Staphylococcus* 属の菌数は、本剤の投与により10³cfu/g以下にまで減少したが、嫌気性菌に対しては殆んど影響はみとめられなかった。本剤投与で減少した細菌は、投与中止後14~21日までは殆んど細菌叢は質的、量的にも薬剤投与前の細菌叢を回復することがみとめられた。

本剤は、嫌気性菌に対しても強い抗菌力を示し、腸管内に *B. fragilis* をはじめ他の嫌気性菌に対しても有効薬剤濃度が検出されるにもかかわらず、嫌気性菌の菌数に変動がみられない理由は明らかでない。今後検討しなければならない。いずれにせよ、本剤が腸管内細菌叢の最優勢菌群である *Bacteroidaceae* の菌数に変化を与えないことはよいことで、かつ重要なことと考えられる。

本剤投与により7名中4名の糞便から *C. difficile* と毒

素を検出したが、著者らの経験では健康成人に抗生剤を投与することで約半数から *C. difficile* と毒素が検出されることから³⁾、とくに本剤に特徴的な現象ではない。*C. difficile* 毒素は腸管内で1000 ng/ml以上に検出されるときは下痢発症の誘因となることが多い⁴⁾。今回の志願者の糞便からは50~500 ng/mlの毒素が検出されたが、この位の毒素量では下痢は起こらないものと考えられる。

以上の成績からBAY o 9867は経口投与により腸管内細菌叢のうち *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* 属, *Staphylococcus* 属にのみ若干の菌数の減少が起こるが、投与中止後7日以上を経過すれば、細菌叢の質的、量的な乱れは薬剤投与前の状態に回復するものと考えられる。

文 献

- 1) WISE, R.; J. M. ANDREWS & L. J. EDWARDS : *In vitro* activity of BAY o 9867, a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23 : 559~564, 1983
- 2) MUYTJENS, H. L.; J. VAN DER ROS—VAN DE REPE & G. VAN VELDUIZEN : Comparative activities of Ciprofloxacin (BAY o 9867), Norfloxacin, Pipemidic acid and Nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24 : 302~304, 1983
- 3) UENO, K. et al. : Anaerobic bacteria, role in dis-

- ease, C. C. THOMAS, 1973
- 4) BANNO, Y; T. KOBAYASHI, H. KONO, K. WATANABE, K. UENO & Y. NOGAWA : Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. Rev. Inf. Disease 6 : S 11~S 20, 1984
- 5) 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

EFFECT OF BAY o 9867 ON HUMAN FECAL FLORA

KUNITOMO WATANABE, MAKOTO AOKI, TOYOKO KOBAYASHI, KAKUYO SAWA and KAZUE UENO
Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

BAY o 9867, a new quinoline derivative, was orally administered to 7 healthy male volunteers 200 mg 3 times for 7 days. Changes in bacterial flora in feces were studied, and following results were obtained.

Bacterial flora in feces showed marked effect of the drug on *Enterobacteriaceae*, genus *Streptococcus*, genus *Staphylococcus*. No changes in the number of genus *Bacteroides*, genus *Fusobacterium*, anaerobic cocci, genus *Eubacterium* and genus *Clostridium* were noticed during the investigation period, and no new colonizing aerobic and anaerobic bacteria were observed.

Four volunteers were colonized with *Clostridium difficile*, but a small amount of toxins (50~500 ng/ml) was detected in their stools; these volunteers had no diarrhea.