

Imipenem/Cilastatin sodium(MK-0787/MK-0791)

のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響

今朝洞忠孝・渡辺 邦友・朝日 良成・宮内 正幸・上野 一恵

岐阜大学医学部付属嫌気性菌実験施設

西 浦 常 雄

岐阜大学医学部泌尿器科

(昭和 60 年 12 月 13 日受付)

健康な志願者男子 4 名に、新規 carbapenem 系抗生物質 imipenem/cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791) を 1 回 500 mg/500 mg, 1 日 2 回, 5 日間連続静脈内投与し、その際の腸内細菌叢に対する影響を糞便中の構成細菌を検索することにより検討した。

対象 4 例とも薬剤投与期間中および投与終了翌日に好気性菌群および嫌気性菌群共に総菌数および腸内の主要細菌叢構成菌群である *Enterobacteriaceae* および *Bacteroidaceae* においてわずかに減少傾向が認められた。しかし、これらの変化は投与終了後速やかに回復した。対象とした 4 例中の 2 例より薬剤投与期間中あるいは投与終了後に、D-I 毒素生産性の *Clostridium difficile* が分離されたが、その糞便中の菌数は $1 \times 10^2 \sim 3 \times 10^8$ CFU/g とわずかであった。

本実験期間中には軟便・下痢の発生はみられなかった。また、採取したいずれの検体からも imipenem は検出されなかった。

Imipenem (MK-0787) は、米国 Merck 社にて開発された新規 carbapenem 系抗生物質である。その化学名は (5R, 6S)-3-[[2-(formimidoylamino) ethyl] thio]-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3, 2, 0]hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate で、その化学構造式を Fig. 1 に示す。本剤は、嫌気性菌を含むグラム陽性菌および陰性菌に対し強い抗菌力を幅広く示す。特に従来の β -lactam 剤が効き難いとされている *Enterococcus faecalis* および *Pseudomonas aeruginosa* にも強い抗菌力を示すことがすでに報告されている¹⁻²⁾。しかし、imipenem は生体に投与すると dehydropeptidase-I (DHP-I) による加水分解を受け、 β -lactam 環が開裂することが判明した³⁾。そこで DHP-I に対する選択的阻害剤、cilastatin sodium (MK-0791) が開発された。その化学名は (Z)-7-[(R)-2-amino-2-carboxyethyl] thio]-2-[(S)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxamido]-2-heptenoic acid monosodium salt である (Fig. 1)。現在、imipenem は、この cilastatin sodium と 1:1 の割合にて配合した形で開発されている。

近年、抗生剤の投与によりヒトおよび実験動物の腸内細菌叢が変化すること、および感染症の治療のため、化学療法剤の投与を行なっている際に疑膜性大腸炎によ

る下痢が発生することなどの報告が数多くなされている⁴⁻⁵⁾。Imipenem は、すでに胆汁中へ移行することが報告されているが⁶⁾、本剤を連続投与した際に、その腸内細菌叢がどのような影響を受けるかは、いまだ知られていない。本研究では、imipenem/cilastatin sodium を 5 日間、正常健康人に静脈内連続投与した際の腸内細菌叢の経日的変化を検討したのでその結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 対象

志願した健康成人男子 4 名 (年齢 25~46 歳, 体重 58~69 kg) を対象とした。

2. 使用薬剤

日本メルク萬有株式会社より供与を受けた MK-0787/MK-0791 (500 mg/500 mg) (Lot PMSO-6) を使用した。

3. 投与方法

MK-0787/MK-0791 投与日程を Table 1 に示す。本剤 (500 mg/500 mg) を生理食塩液 (大塚薬品) 100 ml に溶解し、各 volunteer に 1 日 2 回, 12 時間間隔で 5 日間 (計 10 回) 静脈内連続投与を行なった。

4. 検体および検査法

検査日程を Table 1 に示す。検査は薬剤投与開始 7 日前, 投与開始 3 日目, 投与終了後 1, 7, 14, 28 日目の

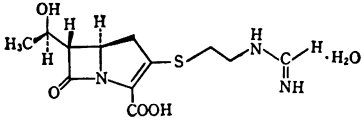
Fig 1 Chemical structure of imipenem and cilastatin sodium

(1) MK-0787

一般名: Imipenem (p-INN)

化学名: (5*R*,6*S*)-3-[2-(formimidoylamino)ethyl]thio]-6-[(*R*)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate

構造式:

分子式: $C_{12}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$

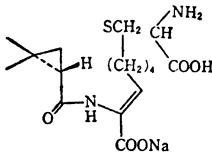
分子量: 317.36

(2) MK-0791

一般名: Cilastatin Sodium (p-INN)

化学名: (*Z*)-7-[[(*R*)-2-amino-2-carboxyethyl]thio]-2-[(*S*)-2,2-dimethylcyclo-propanecarboxamido]-2-heptenoic acid monosodium salt

構造式:

分子式: $C_{16}H_{25}N_2O_5SNa$

分子量: 380.43

合計6回行った。

1) 培地および培養方法

培地および培養方法は上野の方法に準じて実施した⁷⁾。好気性菌検査用培地としては、非選択培地として TS Blood agar を、選択培地として DHL agar, EF agar, *Staphylococcus* medium 110 agar, GAM-Ethanol agar, NAC agar および GE agar を用いた。嫌気性菌検定用培地としては、非選択培地として BL agar および GAM agar を、選択培地として BBE agar, Modified FM agar, CW agar, GAM-Ethanol agar, BS agar, Modified LBS agar, Modified VS agar, PEA Azide agar, Rifampicin Blood agar および CCMA agar を用いた。これらの嫌気性菌検査用培地は使用2日前までに作製し、嫌気条件下 (N_2 : 80%, H_2 : 10%, CO_2 : 10%) に保存し、還元処理後に使用した。

嫌気条件下にて糞便10倍希釈液より10倍段階希釈系列を作製し、その各希釈液を非選択培地および CCMA agar へは0.1 ml ずつ、3分画シャーレを用いて作製した選択培地は0.05 ml ずつ塗布した。好気性菌検査用平板は37°Cにて24~48時間、嫌気性菌検査用平板は嫌気チェンバー内で35°Cにて48時間~2週間培養した。

2) 同定および菌数算定

平板培地上の各コロニーはコロニーの形態、グラム染色標本の鏡検、好気発育試験および Bergey's manual 第8版に基づく各種の生化学的性状試験により同定を行った。また、菌数算定は平板上のコロニーを数えた後、希釈率を乗じ、糞便1g中の菌数を求めた。

5. 糞便中薬剤濃度の測定

Imipenem の濃度測定は *Bacillus subtilis* ATCC 12432 を検定菌とした bioassay により行なった⁸⁾。糞便0.5gに2mlのMES安定化剤[1M Morpholine-ethane sulfonate 緩衝液 (pH 6.0)/Ethylene glycol (1:1, v/v)]

Table 1 Time sequence of MK-0787/MK-0791 administration, and fecal collection

Procedure	Day 7	Day 1			Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 12	Day 19	Day 33
		Hours										
Intravenous injection 1 g/day (b.i.d.)		↑	↑		↑	↑	↑	↑				
Fecal collections (for MK-0787 concentration)		○	○	○	○				○			
Fecal collections (for microflora)	●					●			●	●	●	●

Fig. 2 Effects of MK-0787/MK-0791 on the fecal microflora of volunteer A

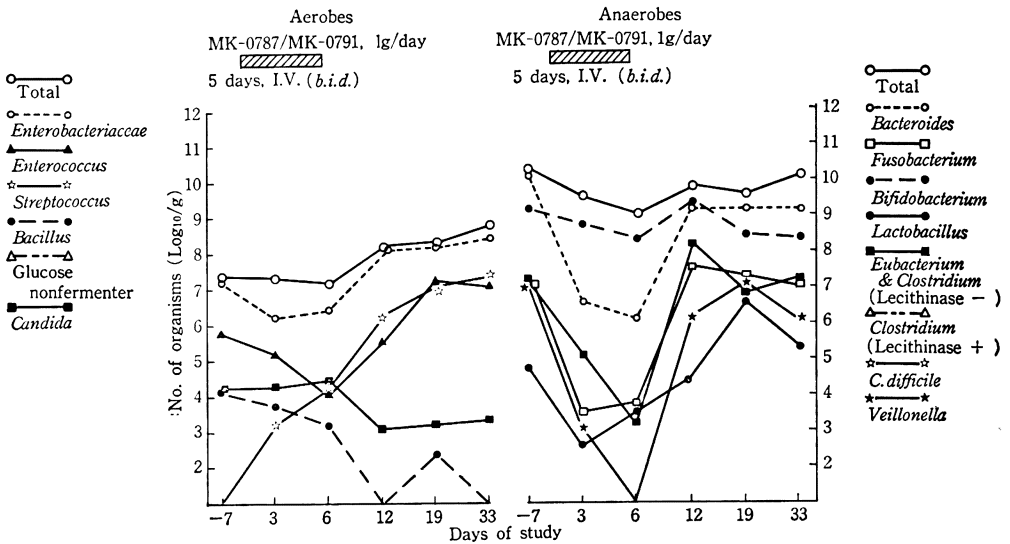
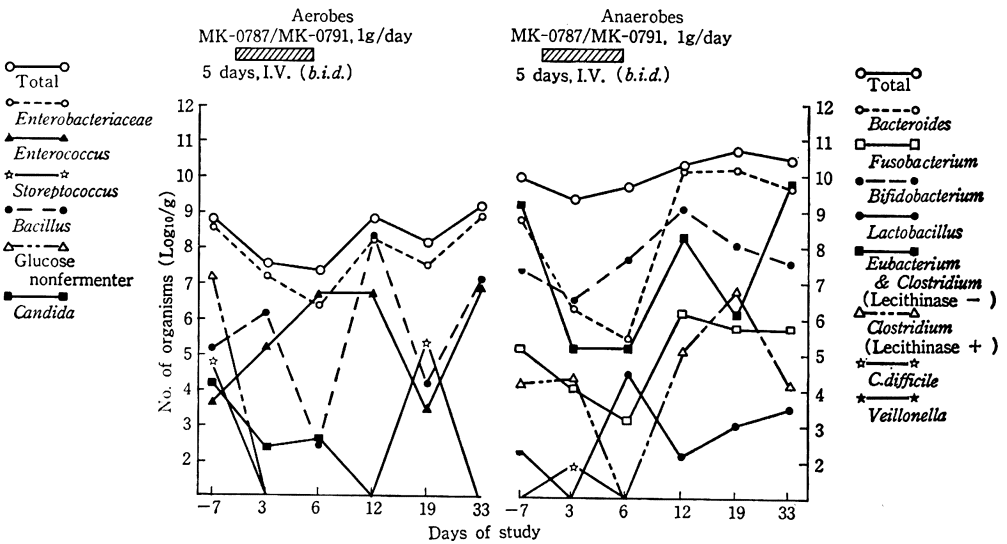


Fig. 3 Effects of MK-0787/MK-0791 on the fecal microflora of volunteer B



を加えホモジナイズし、遠心分離 (3,500rpm, 15分) 後の上清を bioassay の検体とした。

6. *C. difficile* D-I 毒素の検出

糞便に等量の 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え混和後、12,000rpm, 4°C, 20分間遠心した。上清を 0.45 μm のミリポアフィルターで濾過後、これを検液とした。D-I 毒素の検出は Latex 試薬 (三菱化成) を用いて行なった⁹⁾。

II. 結 果

1. 腸内細菌叢に対する影響

volunteer A, B, C, D の総菌数および各菌群菌数の経日変動を、それぞれ Fig. 2, 3, 4, 5 に示す。

1) 総菌数

前述の実験スケジュールに従い、薬剤投与および糞便採取を行ない、それぞれの総菌数を測定した。

各 volunteer 間において多少の差はみられるものの5例全例とも、投与開始3日目 (実験第3日) および投与

Fig. 4 Effects of MK-0787/MK-0791 on the fecal microflora of volunteer C

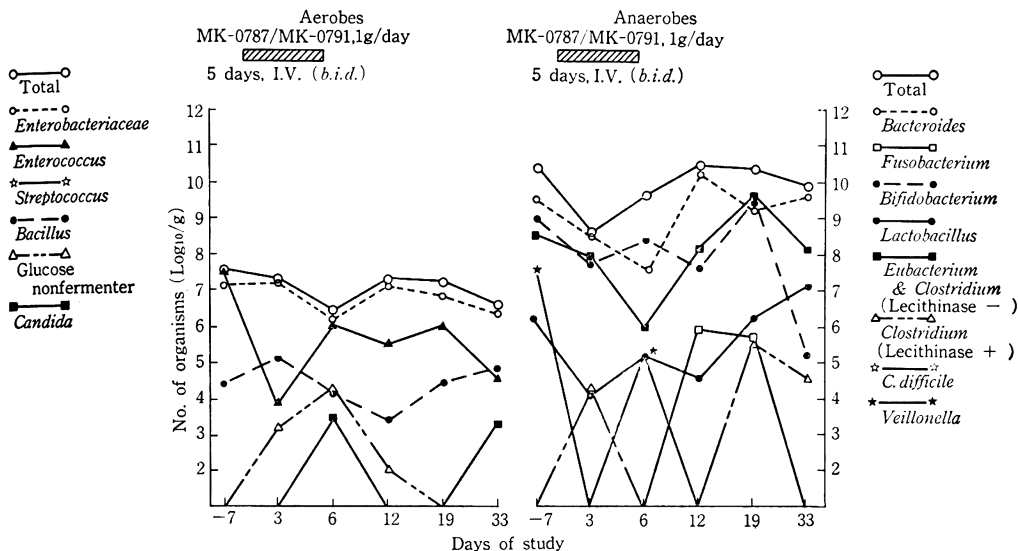
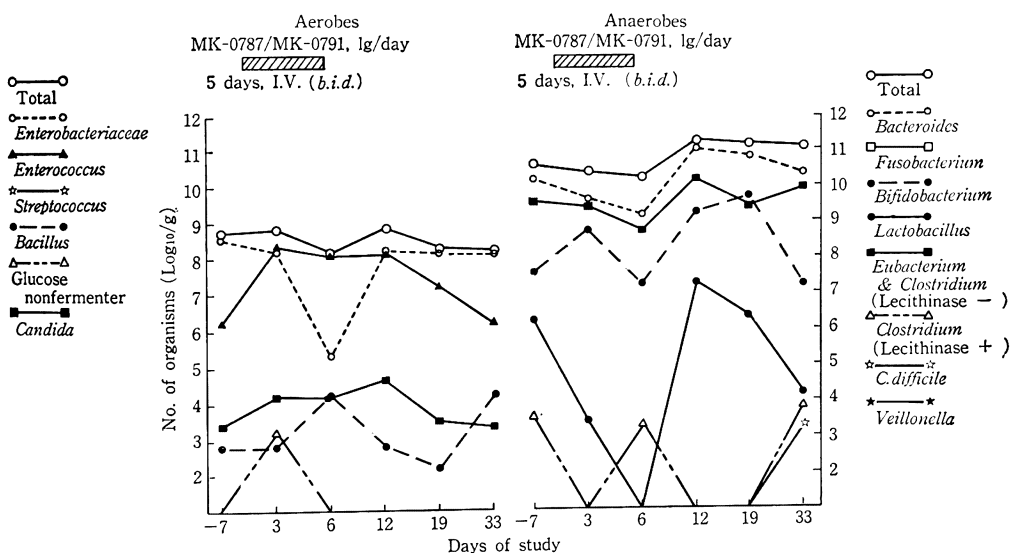


Fig. 5 Effects of MK-0787/MK-0791 on the fecal microflora of volunteer D



終了翌日にわずかに総菌数の減少傾向が認められた。最も大きな減少が認められたのは volunteer C の投与開始 3 日目 (実験第 3 日) で、ちなみに投与開始前に 3.3×10^{10} CFU/g であったものが 6.3×10^8 CFU/g に減少した。しかし、この菌数の減少も投与終了後 1 週間目 (実験第 12 日) にはすでに完全に回復していた。Imipenem 投与による総菌数の減少はそのほとんどが嫌気性菌の減少によるものであった。

2) 好気性菌

volunteer A では、投与開始 3 日目 (実験第 3 日) に *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* および *Bacillus* が減少したが、*Streptococcus* は増加した。投与終了翌日 (実験第 6 日) にもこの傾向は同じであった。投与終了 7 日目 (実験第 12 日) には *Enterobacteriaceae* および *Enterococcus* は投与開始前の水準に回復していた。しかし、*Bacillus* は投与終了後も減少傾向を、そして *Streptococcus* は逆に増加傾向を示した。volunteer B では投与開始 3 日目 (実験第 3 日) に *Enterobacteriaceae* およ

び *Candida* が減少したが、*Enterococcus* および *Bacillus* は増加した。投与終了翌日（実験第6日）には *Enterobacteriaceae* はさらに減少し、そして *Bacillus* も減少した。反面、*Enterococcus* はさらに増加した。投与終了7日目（実験第12日）には、腸内細菌叢主要構成菌群である *Enterobacteriaceae* は投与前の水準に回復した。volunteer C では、投与開始3日目（実験第3日）では *Enterococcus* のみが減少し、その他の *Enterobacteriaceae*、およびブドウ糖非発酵性菌群は増加した。投与終了翌日（実験第6日）には、投与開始3日目（実験第3日）に増加傾向を示した *Enterobacteriaceae* も明らかに減少した。しかし、ブドウ糖非発酵性菌群はさらに増加し、そして *Enterococcus* および *Candida* も投与開始3日目より増加した。*Bacillus* は試験期間を通じて薬剤投与の影響をあまり受けなかった。volunteer D では、投与開始前（実験第7日）に 5.4×10^8 CFU/g であった。*Enterobacteriaceae* が投与終了翌日（実験第6日）に 2.7×10^5 CFU/g と imipenem 投与の影響を受け、明らかに減少が認められた。一方、好気性菌の総菌数は投与翌日にも大きな変動は認められなかった。

3) 嫌気性菌

volunteer A では、投与開始3日目（実験第3日）あるいは投与翌日（実験第6日）に *Bacteroidaceae* で 1.3×10^{10} CFU/g から 1.6×10^6 CFU/g に、*Eubacterium* および *Clostridia* (Lecithinase <->) で 3.2×10^7 CFU/g から 2.4×10^3 CFU/g に、*Veillonella* で 2.0×10^7 CFU/g から 2.0×10^2 CFU/g（検出限界）以下に、*Fusobacterium* で 1.6×10^7 CFU/g から 6.0×10^8 CFU/g に、*Lactobacillus* で 7.8×10^4 CFU/g から 6.0×10^2 CFU/g に減少した。しかし、嫌気性菌総数の変動がわずかであったのは、検体中の主要構成菌群であった *Bifidobacterium* の変動が少なかったためである。これらの減少も投与終了7日目（実験第12日）で完全に回復した。volunteer B では、投与開始3日目（実験第3日）および投与終了翌日（実験第6日）に *Bacteroidaceae* および *Eubacterium* と *Clostridia* (Lecithinase <->) が減少したが、*Bifidobacterium* と *Lactobacillus* は投与開始3日目（実験第3日）にのみわずかに減少し、投与終了翌日にはすでに増加傾向を示した。Imipenem の投与により一時減少した *Bacteroidaceae*、*Eubacterium* および *Clostridia* (Lecithinase <->) および Lecithinase <+>) も投与終了1週間後（実験第12日）には完全に回復した。volunteer C では、投与開始3日目（実験第3日）に投与前には検出されなかった *Clostridia* (Lecithinase <+>) が 3.0×10^4 CFU/g の頻度で増加した他は、*Bacteroidaceae*、*Eubacterium* と

Clostridia (Lecithinase <->) および *Veillonella* 共にわずかに減少した。*Bifidobacterium* および *Lactobacillus* は imipenem 投与の影響をほとんど受けなかった。一方、imipenem の投与終了前と後とを比較すると、投与終了翌日まで検出されていた *Veillonella* が投与終了1週間目（実験第12日）以後には全く検出されず、代りに *Fusobacterium* が 10^5 CFU/g の頻度で投与終了1週間目（実験第12日）および投与終了2週間目（実験第19日）に検出された。volunteer D では、投与開始前に 3.0×10^6 CFU/g の頻度にて検出されていた *Lactobacillus* が投与終了翌日（実験第6日）に検出限界以下に減少した。その他は嫌気性菌総菌数および各菌群共に imipenem 投与の影響はほとんど認められなかった。

2. *C. difficile* の消長と *C. difficile* D-I 毒素の検出
volunteer B の投与開始3日目（実験第3日）の検体および volunteer D の投与終了4週間目（実験第33日）の検体よりそれぞれ 1×10^2 CFU/g（検出限界）および 3×10^3 CFU/g の頻度にて *C. difficile* が検出された。そして、同定のために CCMA agar 平板より分離した株は Latex 試薬を用いた *C. difficile* D-I 毒素検出凝集試験にてすべて陽性であった。しかし、その他の糞便検体からは *C. difficile* も *C. difficile* D-I 毒素も共に検出されなかった。

3. 糞便中薬剤濃度

対象4例より Table 1 に示したスケジュールにて検体を採取し、imipenem の糞便中濃度を測定した。Imipenem の測定限界は $0.5 \mu\text{g/g}$ であったが、試験に供したすべての検体から imipenem は検出できなかった。

III. 考 察

J. S. KAHAN らにより発見された、carbopenem 系抗生物質 thienamycin の新規誘導体である imipenem は各種の臨床試験にてすでに高い評価を受けた注射用製剤である。我々は本剤が、強くそして幅広い抗菌スペクトルを有すること、および胆汁中へ移行することなどを考慮し、本剤を志願した健康成人に5日間連続静脈内投与した際のその正常腸内細菌叢構成菌群の変動を検討した。

対象4例の imipenem 投与開始前、投与期間中および投与終了後における腸内細菌叢の経日的変動を観察すると、volunteer A, B, C, D 共に好気性菌群の腸内細菌叢主要構成菌群である *Enterobacteriaceae* と嫌気性菌群の腸内細菌叢主要構成菌群である *Bacteroidaceae* が imipenem 投与の影響を受け、投与期間中および投与終了直後に減少した。そしてその減少の程度はそれぞれの総菌数の変動値より大きかった。この *Enterobacteriaceae* や *Bacteroidaceae* の明らかな減少にもかかわらず総菌数の減少がわずかであった理由は、volunteer A で

は主要腸内菌群である *Bifidobacterium* が imipenem 投与の影響をほとんど受けなかったためであり, volunteer B では同様に *Bifidobacterium* の変動が少なかったことと, imipenem の投与により逆に *Enterococcus* が増加したためである。また, volunteer C では他剤に比べ *Enterobacteriaceae* および *Bacteroidaceae* の減少が少なく, 加えて *Bifidobacterium* の変動が少なかったためである。volunteer D の主要菌群では *Enterobacteriaceae* のみに減少が認められたが, volunteer B と同様, imipenem の投与期間中に *Enterococcus* が増加したため, 総菌数の変動はほとんど認められなかった。

これまでに cefoperazone, cefpiramide およびその他の β -lactam 系注射用抗生剤の腸内細菌叢に関する研究がいくつか報告されている¹⁰⁻¹¹⁾が, いずれも薬剤投与により総菌数でみても 100 分の 1 もしくはそれ以下に急激に減少している。そしてまた, 菌種レベルでみると, 投与期間中は検出限界以下になっている例が多い。本剤は正常腸内細菌叢に対し影響を与えるものの, その程度はこれまで報告されている注射用 β -lactam 剤と比べて非常にわずかであった。

4 例中 2 例より D-I 毒素生産性の *C. difficile* が検出されたが, *C. difficile* は通常の糞便検査にても 25% 前後の頻度にて, 健康人より検出されるものであり, また, volunteer B および D において検出された *C. difficile* の菌数も健康人中にみられるその菌数と大差がなかった。これらのことより volunteer B および D において検出された *C. difficile* の消長は imipenem の投与による影響ではないと考えられた。

Imipenem の胆汁中移行性は投与 6 時間後までの累積で 1% 前後であることが報告されている⁹⁾。このことより, 糞便中の imipenem 濃度を 5 $\mu\text{g/g}$ 程度と推定していたが, 実際は *B. subtilis* ATCC 12432 を用いた測定での検出限界 (0.5 $\mu\text{g/g}$) 以下であった。一方, 主要腸内構成細菌叢の最小発育阻止濃度が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 前後であることから考え, 今後 imipenem の検出限界を改善し, 各菌の最小発育阻止濃度レベルまでが測定可能となれば, 更に明確な imipenem と腸内細菌叢との関係が検討できると考える。

文 献

- 1) KROPP, H.; J. G. SUNDELLOP, J. S. KAHAN, F. M. KAHAN & J. BIRNBAUM: MK-0787 (N-formimidoyl thienamycin): Evaluation of *in vitro* and *in vivo* activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 993~1000, 1980
- 2) NEU, H. C. & P. LABTHAVIKUL: Comparative *in vitro* activity of N-formimidoyl thienamycin against gram-positive and gram-negative aerobic and anaerobic species and its β -lactamase stability. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 180~187, 1982
- 3) KROPP, H.; J. G. SUNDELLOP, R. HAJDU & F. M. KAHAN: Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 62~70, 1982
- 4) 上野一恵, 渡辺邦友, 小林とよ子: 偽膜性腸炎と *Clostridium difficile*. *モダンメディア* 25: 798~810, 1979
- 5) 小林とよ子: 抗菌剤投与と *Clostridium difficile* による下痢症に関する研究. *Jpn. J. Antibiotics* 36: 464~476, 1983
- 6) 第 22 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム II 資料. MK-0787/MK-0791
- 7) 上野一恵, 常岡健二, 加藤岸夫, 川崎賢二, 坂口正之, 下岡新雄: ヒト腸内菌叢・糞便性状におよぼす sultamicin の影響. *Chemotherapy* 33 (S-2): 154~169, 1985
- 8) 今朝洞忠孝, 朝日良成, 橋爪照隆: Imipenem (MK-0787) の微生物学的定量法による体液内濃度測定法に関する検討. *Chemotherapy* 33 (S-4): 275~281, 1985
- 9) KOHNO, H.; T. KOBAYASHI & K. UENO: Latex immunoassay of *Clostridium difficile* toxins (D-1, D-2) in human feces. *J. Clin. Microbiol.* (in press)
- 10) 千田俊雄, 柴岡はるみ, 相楽裕子, 中谷林太郎: 新セファロsporin系抗生物質 Cefoperazone のヒト腸内菌叢に及ぼす影響. *Chemotherapy* 31: 920~926, 1983
- 11) 中谷林太郎, 千田俊雄, 柴岡はるみ, 相楽裕子: 新セファロsporin系抗生物質 Cefpiramide (SM-1652) の静脈内連続投与時におけるヒト腸内菌叢の変動と糞便中薬剤濃度. *Chemotherapy* 31 (S-1): 187~197, 1983

THE EFFECT OF IMPENEM/CILASTATIN SODIUM
(MK-0787/MK-0791) ADMINISTERED INTRAVENOUSLY
ON HUMAN FECAL MICROFLORA

TADATAKA KESADO, KUNITOMO WATANABE, YOSHINARI ASAHI,
MASAYUKI MIYAUCHI and KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine

TSUNEO NISHIURA

Department of Urology, Gifu University, School of Medicine

Influence of imipenem/cilastatin sodium on the human fecal microflora was studied, employing 4 volunteer (healthy adult males, A, B, C and D) to whom 500 mg/500 mg of imipenem/cilastatin sodium was intravenously administered twice a day for 5 days.

1) The total counts of fecal aerobic and anaerobic organisms were slightly decreased in all of the subjects by administration of imipenem/cilastatin sodium. Imipenem/cilastatin sodium, at least, caused the reduction of the number of aerobic and anaerobic bacteria belonging to *Enterobacteriaceae* and *Bacteroidaceae* during the administration period.

2) A period of 1 week after withdrawal of imipenem/cilastatin sodium was sufficient for recovery of fecal microflora to normal levels.

3) *Clostridium difficile* strains, which produce D-1 toxin, were isolated from 2 out of 4 subjects. No diarrhoea was, however, observed in any subjects during the period of study.