

新セフェム系抗生物質 T-2588 の長期連続投与後の ビーグル犬腸内菌叢に及ぼす影響

千田 俊雄・留奥はるみ・長谷川 潔・岡村 登・中谷林太郎
東京医科歯科大学医学部微生物学教室

新セフェム系抗生物質 T-2588 を、ビーグル犬に各群指定用量（非投与群、200 mg/kg 投与群、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群）で 1 日 1 回、79 日間連続経口投与したのちの腸内菌叢の量的、質的变化を観察した。また *Enterobacteriaceae* については T-2525 耐性菌の出現率を測定した。さらに、*Clostridium difficile* の菌検出と糞便中毒素検出を行なった。

1. ビーグル犬に T-2588 を長期連続経口投与した場合、投与量が多いほど腸内菌叢の単純化が認められた。
2. 偏性嫌気性菌群の菌数減少率と本剤投与量との間に明確な用量一応答関係が認められた。
3. 好気性菌群では Streptococci および *Enterobacteriaceae* の増加が認められた。
4. *Enterobacteriaceae* 総数に対する T-2525 耐性 (MIC >12.5 μg/ml) *Enterobacteriaceae* 総数の割合は薬剤非投与群では平均 0.03% であったのに比べ、薬剤投与群では平均 76.3% と高比率を示した。
5. *C. difficile* は薬剤非投与群で検出されなかったのに対し、薬剤投与群では全例から平均 $10^{2.0}$ /g 検出された。これらの分離菌株はすべて毒素産生性を示した。しかし、糞便中毒素はすべて陰性で、便性状も全例とも正常であった。

新しく開発された経口用エステル型セフェム系抗生物質の T-2588 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 T-2525 に加水分解される。この T-2525 は好気性菌のみならず嫌気性菌を含むグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、強い抗菌力を示すこと、各種細菌産生の β-lactamase に対し強い抵抗性を示すこと、また、マウスの実験的感染症に対しても、*in vitro* 同様優れた生体内効果を示すことなどが知られている¹⁾。今回、ビーグル犬を対象として、T-2588 を 79 日間経口により連続投与したのち、その腸内菌叢構成菌群の量的・質的变化を観察した。また、*Enterobacteriaceae* については本剤耐性菌出現率を検査した。さらに、*Clostridium difficile* の分離培養とその糞便中毒素検出等を検討したので報告する。

I. 対象と方法

1. 対象

ビーグル犬 (♀, 月齢 17 カ月, 体重 8.0~11.4 kg) 10 頭を用いた。

2. 使用薬剤および投与方法

10 頭のビーグル犬を 3 頭 1 群とした 4 群に分け (ただし、800 mg/kg 投与群のみ 1 頭)、そのうち 3 群にはそれぞれ T-2588 (富山化学工業) の 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg をカプセル剤にして強制的経口法に

より、1 日 1 回、79 日間連続投与した。残りの 1 群 (3 頭) は T-2588 非投与対照群とした。

3. 腸内菌叢検査法

1) 糞便採取と輸送: 新鮮排泄便の約 1g を還元処置した輸送培地の 9 ml 入った採便管の中に入れ、水冷して輸送し、検体採取後 24 時間以内に培養検査を完了した。

2) 培地および培養方法: 光岡の方法に従って実施した²⁾。培地は Medium 10 を除く 3 種類の非選択平板培地 (TS, EG および BL) と 10 種類の選択平板培地 (DHL, PEES, TATAC, P, BS, CS, LBS, NBGT, NN および VS) に CCFA 培地 (cycloserine 500 μg/ml, cefoxitin 16 μg/ml) を加えた合計 14 種類の平板培地を用いた。好気性菌は 37°C, 24 時間、嫌気性菌は嫌気グローブボックス法 (Anaerobic System Model 1024, Forma Scientific 社) を用いて、37°C, 48 時間嫌気培養した。

3) 同定および菌数算定: 培養後、平板培地上に形成した集落形態、グラム染色標本の鏡検および好気発育試験によって菌群の同定を行なった。また、CCFA 培地上に形成したレンチナーゼ陰性、フルクトース分解の集落については、さらに光岡の方法³⁾および VPI の分類基準⁴⁾に従って *C. difficile* であるか否かの同定を行なった。菌数算定は平板上の集落を数え、糞便 1 グラム中の

Table 1 Normal fecal flora of Beagles (Control group)

Organisms	Log ₁₀ viable counts/g			Mean ^{a)} ± SD	Detection ^{b)} rate (%)
	Beagle 1	Beagle 2	Beagle 3		
Total	10.1	10.1	9.8	10.0±0.17	
<i>Bacteroidaceae</i>	9.6	9.6	9.6	9.6±0	100
Eubacteria ^{c)}	9.4	9.6	9.3	9.4±0.15	100
Bifidobacteria	0	8.6	8.3	8.5±0.21	67
<i>Peptococcaceae</i>	9.6	9.1	8.3	9.0±0.66	100
Lactobacilli	6.9	9.2	7.5	7.9±1.19	100
Streptococci	5.6	9.3	7.3	7.4±1.85	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.6	7.9	8.2	7.9±0.30	100
Clostridia (lecithinase(+))	0	0	0	0	0
Clostridia (lecithinase(-))	9.4	8.8	4.1	7.4±2.90	100
<i>Veillonellae</i>	0	0	0	0	0
Staphylococci	0	3.9	3.5	3.7±0.28	67
Bacilli	8.8	0	0	8.8	33
Yeasts	0	0	0	0	0
Total Aerobes	8.8	9.6	8.3	8.9±0.66	
Total Anaerobes	10.1	10.0	9.8	10.0±0.15	

^{a)} Mean log viable counts per gram of wet feces from the subject with positive cultures.

^{b)} Percentage of dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

^{c)} Include anaerobic Lactobacilli.

Table 2 The effect of T-2588 on fecal microflora in Beagles (200 mg/kg [P.O.])

Organisms	Log ₁₀ viable counts/g			Mean ^{a)} ± SD	Detection ^{b)} rate (%)
	Beagle 4	Beagle 5	Beagle 6		
Total	9.9	9.9	9.9	9.9±0	
<i>Bacteroidaceae</i>	8.6	6.6	4.8	6.7±1.90	100
Eubacteria ^{c)}	0	2.8	4.8	3.8±1.41	100
Bifidobacteria	0	0	2.8	2.8	33
<i>Peptococcaceae</i>	0	2.3	0	2.3	33
Lactobacilli	9.5	0	5.6	7.6±2.75	67
Streptococci	9.6	9.9	9.9	9.8±0.17	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.6	7.9	8.2	8.2±0.35	100
Clostridia (lecithinase(+))	0	0	0	0	0
Clostridia (lecithinase(-))	4.3	3.4	4.3	4.0±0.51	100
<i>Veillonellae</i>	0	0	0	0	0
Staphylococci	3.3	0	3.8	3.6±0.35	67
Bacilli	0	0	8.3	8.3	33
Yeasts	0	2.6	0	2.6	33
Total Aerobes	9.9	9.9	9.1	9.6±0.46	
Total Anaerobes	8.6	6.6	5.1	6.8±1.76	

^{a)} Mean log viable counts per gram of wet feces from the subject with positive cultures.

^{b)} Percentage of dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

^{c)} Include anaerobic Lactobacilli.

Table 3 The effect of T-2588 on fecal microflora in Beagles (400 mg/kg (P.O.))

Organisms	Log ₁₀ viable counts/g			Mean ^{a)} ± SD	Detection ^{b)} rate (%)
	Beagle 7	Beagle 8	Beagle 9		
Total	10.1	9.6	9.6	9.8 ± 0.29	
<i>Bacteroidaceae</i>	6.3	5.5	6.3	6.0 ± 0.46	100
Eubacteria ^{c)}	0	0	0	0	0
Bifidobacteria	0	0	0	0	0
<i>Peptococcaceae</i>	4.5	0	0	4.5	33
Lactobacilli	9.7	6.3	5.6	7.2 ± 2.19	100
Streptococci	9.8	9.6	9.6	9.7 ± 0.12	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.3	6.3	6.1	6.9 ± 1.21	100
Clostridia [lecithinase(+)]	0	0	0	0	0
Clostridia [lecithinase(-)]	4.5	4.0	3.4	4.0 ± 0.55	100
<i>Veillonellae</i>	0	0	0	0	0
Staphylococci	0	3.5	3.7	3.6 ± 0.14	67
Bacilli	0	0	0	0	0
Yeasts	0	0	0	0	0
Total Aerobes	10.1	9.6	9.6	9.8 ± 0.29	
Total Anaerobes	6.3	5.5	6.3	6.0 ± 0.46	

^{a)} Mean log viable counts per gram of wet feces from the subject with positive cultures.

^{b)} Percentage of dogs from which the bacterial group was detected at the lowest dilution tested.

^{c)} Include anaerobic Lactobacilli.

Table 4 The effect of T-2588 on fecal microflora in a Beagle (800 mg/kg(P.O.))

Organisms	Log ₁₀ viable counts/g
	Beagle 10
Total	9.8
<i>Bacteroidaceae</i>	5.8
Eubacteria ^{a)}	0
Bifidobacteria	0
<i>Peptococcaceae</i>	0
Lactobacilli	0
Streptococci	9.6
<i>Enterobacteriaceae</i>	9.2
Clostridia [lecithinase(+)]	0
Clostridia [lecithinase(-)]	4.3
<i>Veillonellae</i>	0
Staphylococci	0
Bacilli	0
Yeasts	0
G(+) Rod aerobes	8.8
G(+) Rod anaerobes	6.5
Total Aerobes	9.8
Total Anaerobes	6.6

^{a)} Include anaerobic Lactobacilli.

菌数 (N) を求めた。菌数はすべて対数 (log₁₀ N) で示した。検出限界菌数 (対数) は1グラムあたり 2.3 である。

4. T-2525 耐性 *Enterobacteriaceae* 菌数測定

方法はすべて前記した腸内菌叢検査法に準拠した。培地は T-2525 (富山化学工業) を 12.5 μg/ml の割合に加えた DHL 平板培地を用いた。この T-2525 添加平板培地に発育した集落を耐性菌とみなし、菌数算定した。

5. *Clostridium difficile* の糞便中毒素検出

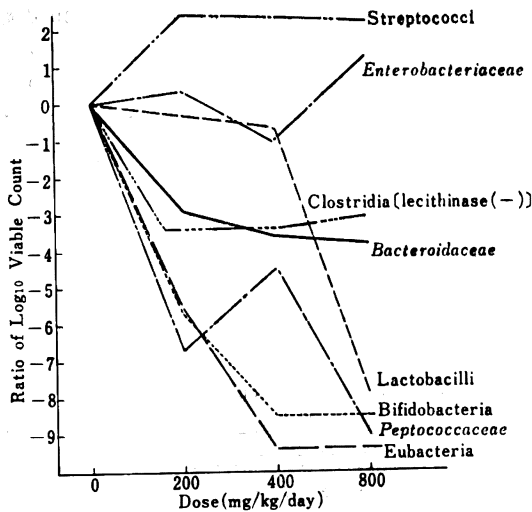
糞便 10 倍希釈サンプルに対し C. D. CHECK D-1 (ダイアマトロン) を用いて行なった。従って希釈前の糞便中毒素検出濃度限界値は約 1,250 ng/ml である。

II. 結 果

1. 腸内菌叢構成菌種の菌数および検出率

薬剤非投与群 (対照群) 3 頭, 200 mg/kg 投与群 3 頭, 400 mg/kg 投与群 3 頭および 800 mg/kg 1 頭の総菌数, 各菌群菌数, それらの各群菌数平均値および検出率を Table 1, 2, 3 および 4 に示す。腸内菌叢の総菌数平均値および各菌群菌数平均値において各薬剤投与群と薬剤非投与群 (対照群) との差を Fig. 1 に示す。総菌数では対照群, 各薬剤投与群ともほぼ同程度 (平均値 9.9/g) の菌数を示した。*Bacteroidaceae* は薬剤投与群が対照群に比べて約 10⁻²~10⁻³ に激減し, 投与量の多いほど減少程度が強い傾向を示した。また, Eubacteria, Bifidobacteria および *Peptococcaceae* も投与群では激減していた。すなわち, 200 mg/kg 投与群では, これらの菌群すべてが約 10⁻⁶ に減少していた。400 mg/kg 投与群では Eubacteria および Bifidobacteria が消失し, 800 mg/kg 投与群では Eubacteria, Bifidobacteria および *Pepto-*

Fig. 1 Changes in the ratio of viable counts of the fecal microflora by the increase in dosage of T-2525 as compared with those of controls



coccaceae のすべてが検出されなかった。Lactobacilli は 800 mg/kg 投与群では検出されなかったが、その他の 3 群ではほぼ同程度の菌数 (平均値 7.6/g) が検出された。Streptococci は薬剤投与群が対照群に比べて約 200 倍の増加を示していた。Enterobacteriaceae は対照群に比べて 200 mg/kg 投与群では 2 倍に増加し、400 mg/kg 投与群では、逆に 10^{-1} に減少していた。また、800 mg/kg 投与群では 20 倍の増加を認めた。レシチナーゼ陰性 Clostridia は、薬剤投与群が対照群に比べて約 10^{-3} に激減していた。その他の菌群、Staphylococci, Bacilli 等は検出率が低いために比較はできなかった。

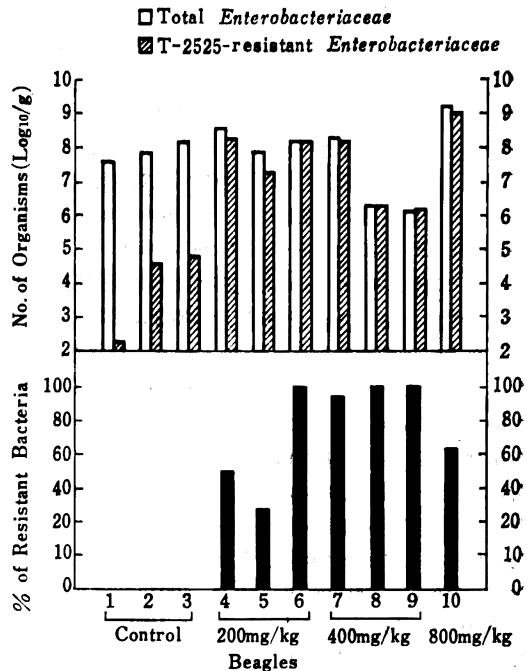
2. T-2525 耐性 Enterobacteriaceae の菌数と比率

対照群および薬剤投与群のビーグル犬全例について、糞便 1 グラム当りの T-2525 耐性 Enterobacteriaceae の菌数および Enterobacteriaceae の総数に対する T-2525 耐性 (MIC > 12.5 $\mu\text{g/ml}$) Enterobacteriaceae 総数の割合を Fig. 2 に示す。T-2525 耐性 Enterobacteriaceae の比率をみると、対照群の Beagle No. 1, 2 および 3 では、それぞれ 0.005%, 0.05% および 0.04% と非常に低率であった。200 mg/kg 投与群の Beagle No. 4, 5 および 6 では、それぞれ 50%, 27.5% および 100% であった。400 mg/kg 投与群の Beagle No. 7, 8 および 9 では、それぞれ 94%, 100%, 100% であった。800 mg/kg 投与群の Beagle No. 10 では 62.5% であった。

3. C. difficile の検出と糞便中毒素検出

薬剤投与群全例より C. difficile が検出された。すなわ

Fig. 2 Proportion of T-2525-resistant organisms of the Enterobacteriaceae in the fecal flora of Beagles



ち、それらの菌数は、200 mg/kg 投与群の Beagle No. 4, 5 および 6 では、それぞれ 4.3/g, 3.4/g および 4.0/g であった。400 mg/kg 投与群の Beagle No. 7, 8 および 9 では、それぞれ 3.9/g, 4.0/g および 3.4/g であった。800 mg/kg 投与群では 4.3/g であった。この C. difficile の生化学的性状は arabinose(-), xylose(+), rhamnose(-), glucose(+), mannose(+), fructose(+), sucrose(-), maltose(-), cellobiose(-), lactose(-), trehalose(-), raffinose(-), melezitose(+), starch(-), glycogen(-), sorbitol(-), esculin(-), salicin(w), amygdalin(-), starch hyd.(-), esculin hyd.(+), 20% bile (stimulate), H₂S(+), ammonia production(+), motility(-) であった。これらの C. difficile は全菌株とも毒素産生性を示した。また、ビーグル犬の糞便中毒素量を定性的に調べた結果、全例とも陰性であった。また、この時期の便性状は正常であった。

III. 考 察

新経口用セフェム系抗生物質 T-2588 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し広域抗菌スペクトルを有し、優れた抗菌活性を示すと報告されている¹⁾。この T-2588 をヒトに 14 日間連続経口投与した場合の腸内菌叢の経日変動については別に報告した⁴⁾。今回、ビーグル

犬を対照とし、これを非投与群、200 mg/kg 投与群、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群の4群に分け、T-2588 をそれぞれの用量で1日1回、79日間連続経口投与した場合、その腸内菌叢の量的・質的变化、用量一応答関係、耐性菌の出現率、*C. difficile* の検出と糞便中毒素検出等を検討した。

腸内菌叢の総菌数および各菌群菌数を薬剤非投与群(対照群)と各薬剤投与群とで比較すると、総菌数では対照群、薬剤投与群ともほぼ同程度の菌数を示した。それに対し、偏性嫌気性菌群では、*Bacteroidaceae*, *Eubacteria*, *Bifidobacteria*, *Peptococcaceae* およびレンチナーゼ陰性 *Clostridia* が対照群に比べて薬剤投与群で著減していた。しかも、投与用量の増加に応じて減少の程度が強くなる傾向がみられた。一方、好気性菌群では、薬剤投与群の *Streptococci* が対照群のそれに比べて約 200 倍増加していた。また *Enterobacteriaceae* は各薬剤投与群間に多少の相違が認められたものの、対照群に比べやや増加していた。このことは好気性菌群総菌数と偏性嫌気性菌群総菌数の比率をみても顕著に示された。すなわち、好気性菌総菌数と偏性嫌気性菌総菌数の比が、対照群、200 mg/kg 投与群、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群で、それぞれ 10^{-1} 、 7.7×10^4 、 1.6×10^4 および 6.3×10^4 となり、薬剤投与群において嫌気性菌の著しい減少が認められた。

また、各実験群において検出された *Enterobacteriaceae* 総数のうちの T-2525 耐性 (MIC > 12.5 $\mu\text{g/ml}$) *Enterobacteriaceae* 総数の割合をみると (Fig. 2), 個体間の変動は認められるものの、対照群、200 mg/kg 投与群、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群、それぞれの平均値は 0.03%, 59%, 98% および 62.5% となり、T-2525 耐性 *Enterobacteriaceae* が薬剤投与群で高頻度に検出された。これは T-2588 の長期連続投与により、感受性菌は減少ないしは消失し、代って少数定住していた耐性菌が選択作用により優勢に増加するようになったと考えられる。また、糞便中の *C. difficile* 毒素を

検査したが、全例とも陰性を示した。しかし、薬剤投与群7頭全例とも *C. difficile* が 3.4~4.3/g 検出され、しかもこれらの菌群すべてが毒素産生性を示していた。それにもかかわらず、糞便中には毒素が検出されなかった。この理由としては、検査糞便を採取直後に 10 倍希釈したために、希釈前の糞便中に存在していたかもしれない低濃度の毒素(約 250 ng/ml から約 1,250 ng/ml まで)を検出できなかったことによるのではないかと考えられる。なお、この時の便性状はすべて正常であった。

以上を総括すると、T-2588 をビーグル犬に長期間連続投与した場合、その腸内菌叢に強い変動を与えることが明らかにされた。しかも、薬剤投与量と菌数減少率との間に、偏性嫌気性菌群ではっきりした用量一応答関係が認められた。一方、本剤の長期連続投与は耐性の *Enterobacteriaceae* および *Streptococci* の増加を招き、しかも、偽膜性大腸炎の起原菌とされる *C. difficile* を生残させるために、使用時にはこのことを念頭におき、臨床に應用されるべきと考えられる。

謝 辞

T-2525 の分与に際し御協力を戴きました富山化学工業株式会社に感謝致します。また、菌株の同定に際し、御指導を戴きました理化学研究所動物薬理研究室光岡知足博士ならびに辨野義己博士に感謝致します。

文 献

- 1) 第 33 回日本化学療法学会総会、新薬シンポジウム、T-2588, 1985
- 2) 光岡知足：腸内菌の世界。叢文社, 1980
- 3) HOLDEMAN, L. V. & W. E. C. MOORE (ed.): *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977
- 4) 千田俊雄, 留奥はるみ, 岡村 登, 中谷林太郎, 中川圭一, 小山 優, 田井 賢, 杉本由美子: 新セフェム系抗生物質 T-2588 剤経口投与による健康成人腸内菌叢の変動^o *Chemotherapy* 34(S-2): 98~108, 1986

THE EFFECT OF T-2588, A NEW CEPHEM ANTIBACTERIAL
AGENT, ON THE INTESTINAL MICROFLORA
OF BEAGLE DOGS

TOSHIO CHIDA, HARUMI TOMBOKU, KIYOSHI HASEGAWA,
NOBORU OKAMURA and RINTARO NAKAYA

Department of Microbiology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine

- 1) After oral administration of T-2588 to three groups of beagle dogs (200, 400 and 800 mg/kg/day) for 79 consecutive days, simplification of the intestinal microflora was observed. The simplification occurred in parallel with the increase in dosage.
- 2) A dose-response relationship was observed between the number of obligate anaerobes and the dosage of the drug.
- 3) Among the aerobes, the members of Streptococci and *Enterobacteriaceae* were increased.
- 4) *C. difficile* was detected in average of $10^{8.9}$ per gram of feces in the groups administered the drug, whereas it was not detected in the feces of the control group.
- 5) All of the *C. difficile* isolates showed toxin production *in vitro*. The toxin was, however, not detected in any of the fecal samples. Diarrhea or abnormal stools were not observed.