

新セフェム系抗生物質 T-2588 経口投与による健康成人腸内菌叢の変動

千田 俊雄・留奥はるみ・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

中川 圭一・小山 優

東京共済病院内科

田井 賢・杉本由美子

富山化学工業株式会社総合研究所

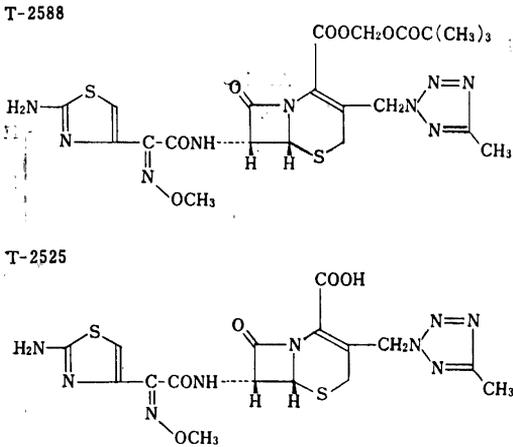
新経口用エステル型セフェム系抗生物質 T-2588 を健康成人男子 4 名に 1 回 200 mg, 1 日 3 回, 14 日間連続経口投与した。その際, 各個体の腸内菌叢がどのように変動し, それが各個体の糞便中薬剤濃度の変化といかなる関係にあるのかを調べた。また *Clostridium difficile* および糞便中毒素の検出, 下痢等の副作用の有無についてもあわせて検討した。

1. T-2588 剤を被験者 4 名に連続経口投与した際, その腸内菌叢の変動と糞便中薬剤濃度の変動は個人差が大であった。
2. 腸内菌叢の変動は糞便中薬剤濃度とよく相関し, 糞便中に活性薬剤が高濃度に検出されるにしたがって, 本剤感受性菌群の消失ないしは減少傾向が認められた。
3. 腸内菌叢構成菌群中, *Bacteroidaceae*, レンチナーゼ陰性 *Clostridia*, *Streptococci*, *Pseudomonas* および *Yeasts* が比較的抵抗性を示し, 投薬期間中増加傾向を示した。
4. 被験者 No.1 と No.3 では, 本剤を不活化すると思われる菌を含む耐性菌叢がすでに投与前に形成されていたことが示唆された。
5. 投薬によって変動した腸内菌叢が, 各人本来の腸内菌叢へ復帰するには投薬終了後 35 日目ではまだ不完全であった。
6. *C. difficile* はいずれの対象からも検出されなかったが, 被験者 No.2 では投薬終了後 3 日目に *C. difficile* 毒素が糞便中より検出された。しかし, 便性状は正常であった。
7. 実験期間中, 被験者 No.1 では投薬開始 7 日目に, 被験者 No.2 では投薬開始 4 日目から 7 日目までの 3 日間それぞれ軟便が認められた。その他はすべて正常便であった。

T-2588 (富山化学工業株式会社) は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である。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抗菌活性を示す T-2525 に加水分解される。T-2588 および T-2525 の化学構造式を Fig.1 に示す。T-2588 の化学名は pivaloyloxymethyl (+)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate で, T-2525 の化学名は (+)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid である。本剤は試験管内抗菌力試験の結果, グラム陽性菌および陰性菌に対して広範囲な抗菌スペクトルを有し, 強い抗菌力を示すこと, また, 吸収, 排泄

試験の結果, 本剤は経口投与後速やかに血中に移行し, その血中濃度は持続的で, 主に尿中に排泄されることなどが報告されている¹⁾。本剤をヒトに連続経口投与した場合, ヒトの正常腸内菌叢がどのような影響を受けるのか, また, それによる副作用が認められるのかどうか。これらを検討することは, 本剤の腸管内各種菌に対する抗菌活性を知るだけでなく, 臨床面での応用に際しても意義あるものと思われる。本研究において, 我々は健康成人男子 4 名を被験者として, T-2588 を連続経口投与した際, その腸内菌叢の変動を経日的に測定した。また, 本剤非感受性菌および耐性菌の出現とその動態, 特に偽膜性大腸炎の起因菌である *Clostridium difficile* について, 菌の検索および糞便中の毒素検出, 下痢等の副作用の有無, さらに糞便中活性薬剤濃度を測定し, 腸内菌叢の変動との相関関係等について検討したので報告する。

Fig. 1 Chemical structure of T-2588 and T-2525



I. 対象と方法

1. 対象

健康成人男子 4 名 (年齢 33~38 歳, 体重 59~78 kg) の被験者 (No. 1, 2, 3 および 4) を対象とした。

2. 使用薬剤と投与方法

T-2588 (富山化学工業) のカプセル剤を, 毎日定時に 1 回 200 mg, 1 日 3 回 (合計 600 mg/日), 14 日間連続して経口投与した。その投与期間および投与量を Fig. 2 に示した。

3. 腸内菌叢検査法

腸内菌叢の検査日程を Fig. 2 に示す。その検査は投薬開始前 (実験第 0 日), 投薬開始 2 日目 (実験第 2 日), 4 日目 (実験第 4 日), 7 日目 (実験第 7 日), 11 日目 (実験第 11 日), 投薬終了後 1 日目 (実験第 15 日), 3 日目 (実験第 17 日), 7 日目 (実験第 21 日), 14 日目 (実験第 28 日) および 35 日目 (実験第 49 日) の合計 10 回行なった。

1) 糞便採取と輸送: 検査当日の早朝排便, 約 1g を還元処置した輸送培地 9 ml の入った採便管の中に入れ, 氷冷して輸送した。検体は採取後 6 時間以内に培養検査を完了した。

2) 培地および培養方法: 培地および培養は光岡の方法²⁾にしたがって実施した。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 11 種類の選択平板培地 (DHL, PEES, TATAC, NAC, P, BS, ES, LBS, NBGT, NN および VS) を用いた。以上の培地のうち, 好気性菌群の検査には主に 6 種類の平板培地 (TS, DHL, PEES, TATAC, NAC および P) を使い, 糞便検体 100 倍階段希釈系列 (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁷) のそれぞれ 0.05 ml を 4 分画した平板培地に塗布し, 37°C, 24 時間 (ただし, PEES, NAC および P は 48~72 時間) 好気培養した。また, 嫌気性菌群の検査には 8 種類の平板培地 (BL, EG, BS, ES, LBS, NBGT, NN および VS) を使い, 上記同様に塗布し, N₂ 80%-CO₂ 10%-H₂ 10% の環境下の嫌気グループボックス (Anaerobic System Model 1024, Forma Scientific 社) 内で, 37°C, 48 時間嫌気培養した。

3) 同定および菌数算定: 各種平板培地上の集落形態, 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。一部の好気性菌は常法により同定した。また, 菌数算定は, 平板上の類似集落を数え, 糞便 1 グラム中の菌数を求めた。菌数 (N) はすべて対数 (log₁₀N) 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。

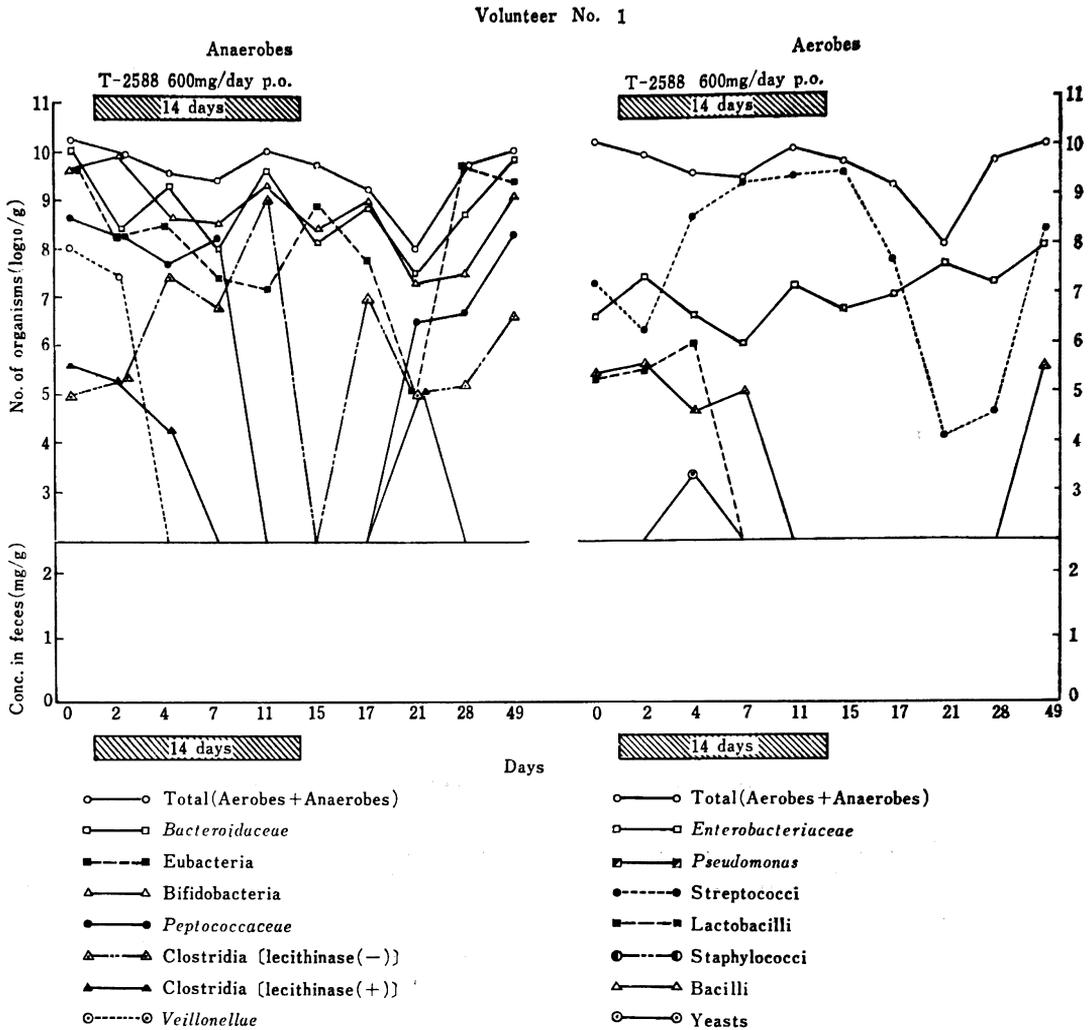
4. 耐性菌数測定

T-2525 耐性 *Enterobacteriaceae*, T-2525 耐性 *Streptococci* および T-2525 耐性 *Bacteroidaceae* の糞便 1 グラム中の菌数を測定するために, T-2525 純末を 1/15 M リン酸緩衝液に溶解後, 12.5 μg/ml の割合に DHL 寒天

Fig. 2 Time sequence of T-2588 administration and fecal collection (Healthy human adult volunteers No. 1, No. 2, No. 3 and No. 4)

Administration of T-2588 and fecal collection	Day of study																															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	≈ 28	≈ 49								
Oral administration 200mg × 3/day		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Collection of fecal specimens	○		○		○			○				○				○		○				○		○		○						
Test for microflora	●		●		●			●				●				●		●				●		●		●						
Test for drug concentration	◎		◎		◎			◎				◎				◎		◎				◎		◎		◎						

Fig. 3 Effects of T-2588 on fecal microflora of volunteer No. 1 and concentration of the drug in the fecal specimens



培地, TATAC 寒天培地および NBGT 寒天培地に加え, 平板培地とした。これを用い前記の腸内菌叢検査法と同様に行ない, 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. *C. difficile* の検索と糞便中毒素検出

1) *C. difficile* の検索: 選択培地として CCFA 培地 (cycloserine 500 μg/ml, cefoxitin 16 μg/ml) を用いた。平板培地はあらかじめ嫌気グローブボックス内で1日から2日間静置し, prereduce 処理した後, 前記の腸内菌叢検査法と同様に行なった。菌種の同定は, 光岡の方法²⁾および VPI の分類基準³⁾に従った。

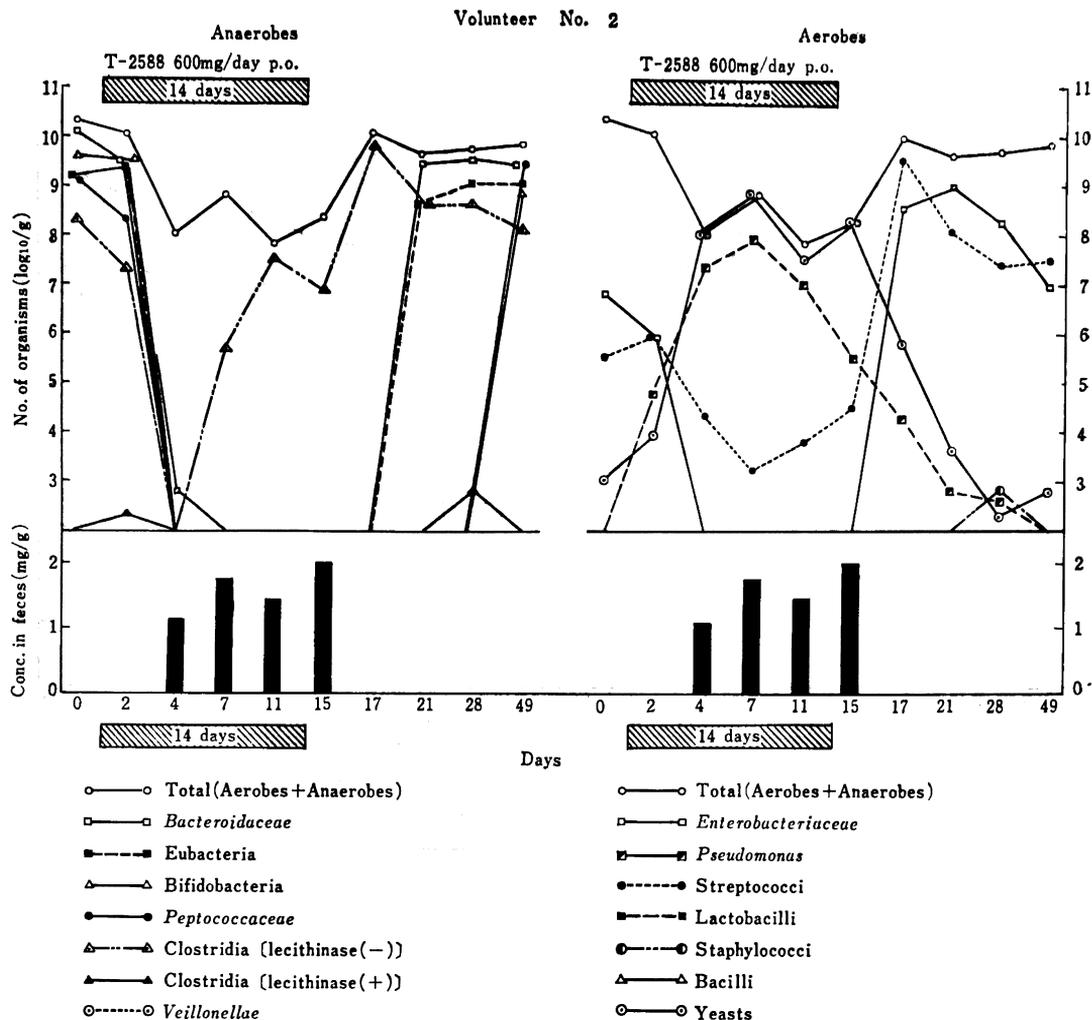
2) 糞便中毒素の検出: 糞便 10 倍希釈サンプルに対

し C. D. CHECK-D-1 (ダイアヤトロン) を用いて行なった。したがって, 希釈前の糞便中毒素検出濃度限界値は約 1,250 ng/ml であり, これ以上を陽性とした。

6. 糞便中薬剤濃度測定法

糞便中薬剤濃度測定日程を Fig. 2 に示す。測定は投薬開始 2 日目 (実験第 2 日), 4 日目 (実験第 4 日), 7 日目 (実験第 7 日), 11 日目 (実験第 11 日) および投薬終了後 1 日目 (実験第 15 日) の合計 5 回行なった。その方法は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で測定した。抗菌活性を示さない T-2588 および T-2588 A (化学名: pivaloyloxymethyl(+)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-

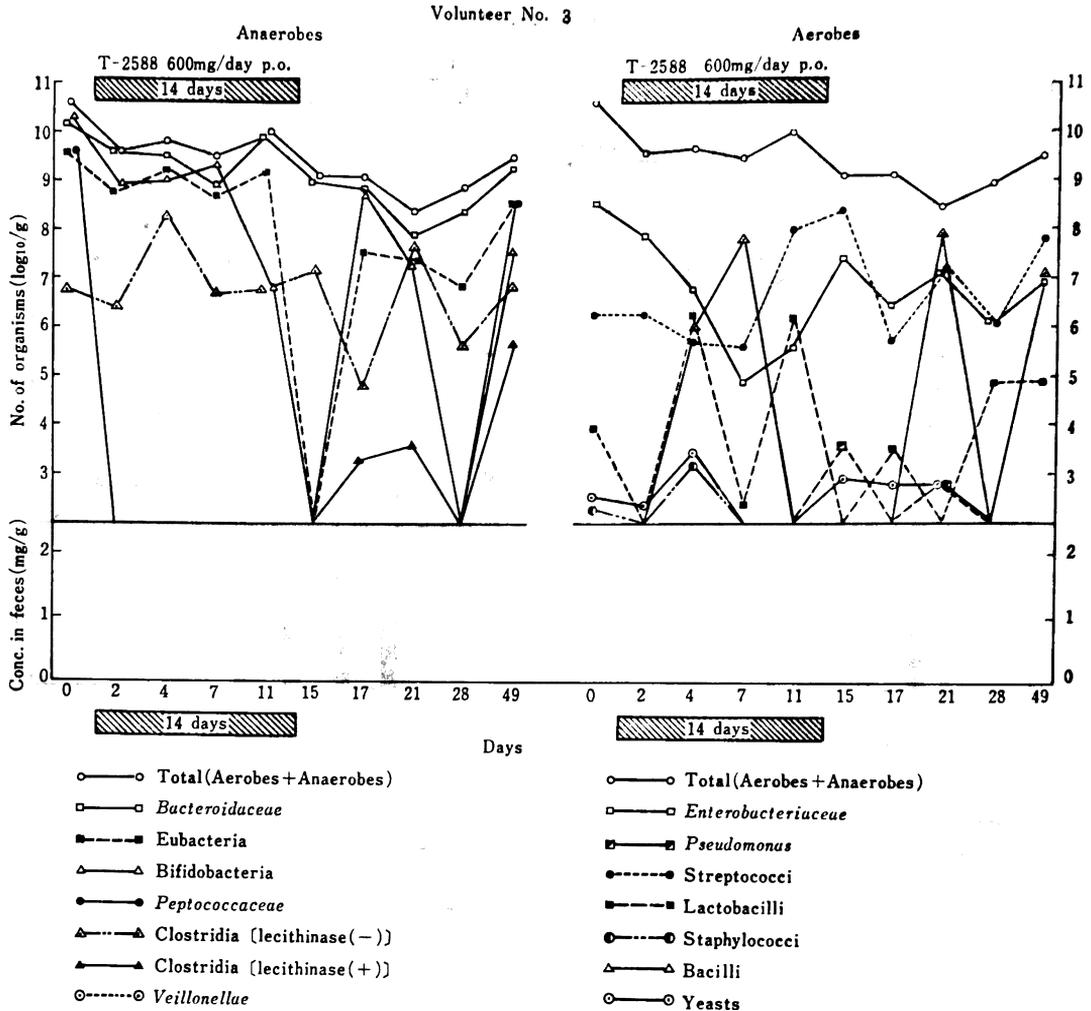
Fig. 4 Effects of T-2588 on fecal microflora of volunteer No. 2 and concentration of the drug in the fecal specimens



[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ene-2-carboxylate) の濃度は、糞便に4倍量の0.1N-HCl/50% CH₃CNを加え、氷冷下ホモジナイズし、遠沈(3,000 rpm, 15分間)した後、上清20μlをHPLCに注入して測定した。抗菌活性を示すT-2525と抗菌活性を示さないT-2525A(化学名:(+)-(6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ene-2-carboxylic acid)の濃度は、上記の上清を、さらに0.1N-HClで5倍希釈した後、その20μlをHPLCに注入して測定した。HPLCの装置はLC-3(島津製作

所)を使用した。T-2588およびT-2588Aの測定条件は、カラム:Nucleosil₁₀C₁₈(4mmφ×25cm)、プレカラム:Nucleosil₁₀C₁₈(4mmφ×5cm)、溶離液:CH₃CN 425ml, 1M酢酸緩衝液(pH 5.0) 100mlに水を加えて1,000mlとした。流速:1.5ml/min、カラム温度を室温にし、波長254nmで検出した。T-2525およびT-2525Aの測定条件は、カラム:Lichrosorb RP-18(10μm, 4mmφ×25cm)、プレカラム:Lichrosorb RP-18(10μm, 4mmφ×25cm)、溶離液:CH₃CN 105ml, 1M酢酸緩衝液(pH 5.0) 150mlに水を加えて、1,000mlとした。流速:1.5ml/min、カラム温度を室温にし、波長254nmで検出した。検出濃度限界値は2μg/mlで

Fig. 5 Effects of T-2588 on fecal microflora of volunteer No.3 and concentration of the drug in the fecal specimens



ある。

II. 結 果

1. 腸内菌叢の総菌数および各菌群菌数の変動

被験者 No.1, 2, 3 および 4 の総菌数と各菌群菌数の経日変動を、それぞれ Fig.3, 4, 5, および 6 の上段に示す。また、それら 4 例の各菌群検出率を Table 1 に示す。

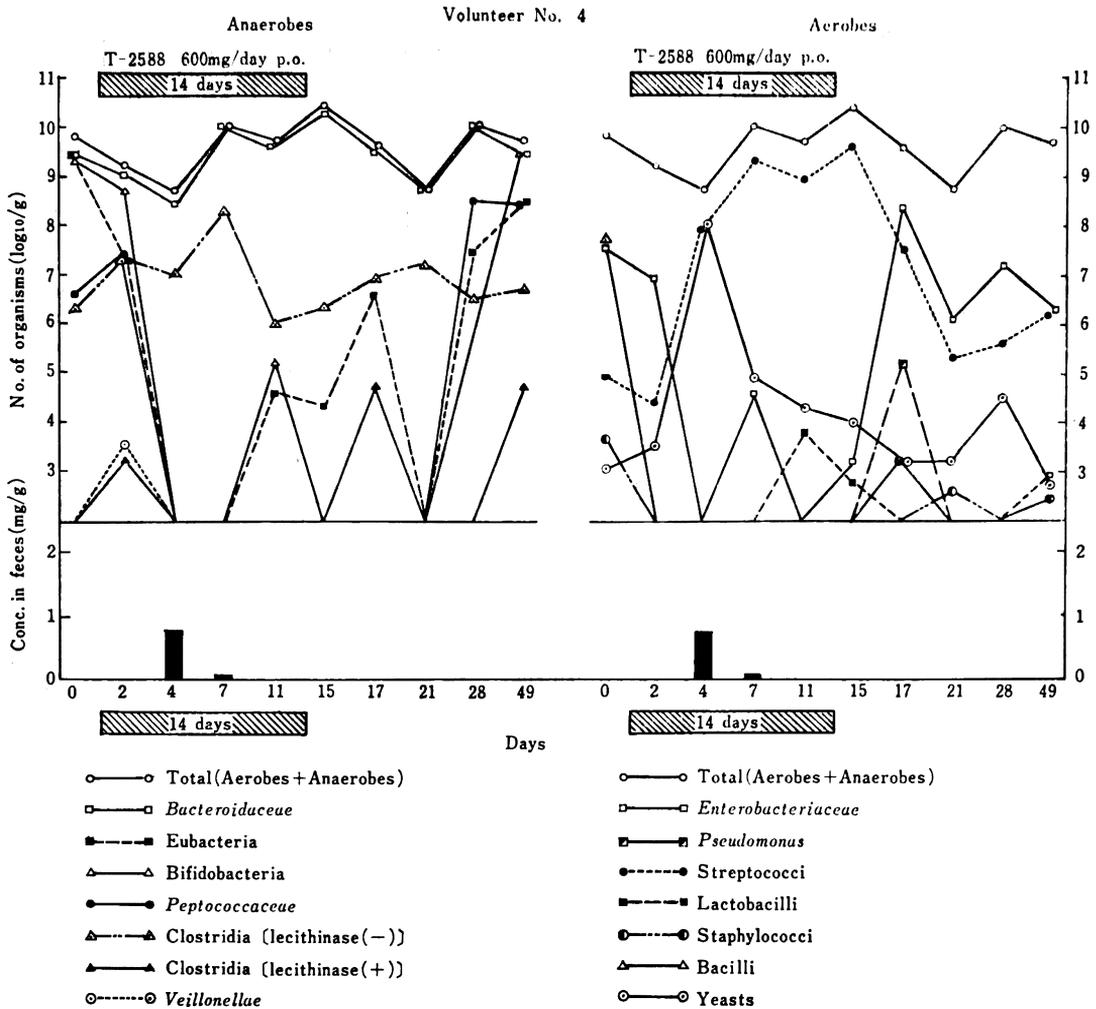
総菌数：各被験者の総菌数（偏性嫌気性菌群と好気性菌群の総計を意味する）についてみると、被験者 No.1 と No.3 では、投薬開始後わずからず減少し、この傾向は投薬終了後も引き続き、投薬終了後 7 日目には投薬前

の約 100 分の 1 に減少した。その後増加したが、被験者 No.3 は 35 日目でもまだ投薬前の菌数には戻らなかった。

被験者 No.2 は、投薬開始 2 日目（実験第 2 日）ではほとんど減少が認められなかったが、4 日目（実験第 4 日）には約 200 分の 1 にも減少し、投薬終了後 1 日目（実験第 15 日）までほぼその状態を維持した。3 日目（実験第 17 日）には 10/g まで回復し、その後そのレベルで推移した。

被験者 No.4 では、投薬開始後 4 日目まで減少（約 10 分の 1）したが、7 日目に再び増加し、投薬終了後 1 日

Fig. 6 Effects of T-2588 on fecal microflora of volunteer No. 4 and concentration of the drug in the fecal specimens



目には 10.4/g とピークに達した。その後再び減少し、投薬終了後 7 日目には、ピーク時の約 50 分の 1 に減少した。投薬終了後 14 日目にはほぼ元の菌数に回復した。

偏性嫌気性菌群：被験者 No.1 では *Veillonellae*、レンチナーゼ陽性 *Clostridia*、および *Peptococcaceae* が、それぞれ、投薬開始後 4 日目、7 日目および 11 日目には検出されなくなった。*Peptococcaceae* は投薬終了後 7 日目に 6.5/g 検出され、その後増加し、35 日目には元の菌数に回復した。レンチナーゼ陽性 *Clostridia* は投薬終了後 1 回のみ検出（投薬終了後 7 日目）され、*Veillo-*

nellae は投薬終了後 35 日目に至っても検出されなかった。*Bifidobacteria* と *Eubacteria* は投薬期間中減少傾向を示した。*Bacteroidaceae* は投薬期間中および投薬終了後も小刻みな変動が認められた。しかし、これらの菌群は連続投与後も消失することなく 8~9/g とかなりの菌数を占めていた。また、レンチナーゼ陰性 *Clostridia* が投薬期間中増加した。

被験者 No.2 では、投薬開始後 4 日目に *Bacteroidaceae* が 2.8/g に激減し、その他の偏性嫌気性菌はすべて消失した。投薬開始 7 日目には、*Bacteroidaceae* も消失した。しかし、レンチナーゼ陰性 *Clostridia* が 5.7/g

Table 1 Frequency of occurrence of microorganisms in the fecal floras of 4 healthy adult volunteers orally given T-2588, 600mg per day

Organism	Day of study									
	0	2	4	7	11	15	17	21	28	49
<i>Bacteroidaceae</i>	100 ^{a)}	100	100	75	75	75	75	100	100	100
Eubacteria ^{b)}	100	100	50	50	75	50	75	75	100	100
Bifidobacteria	100	100	50	50	75	25	50	50	50	100
<i>Peptococcaceae</i>	100	75	25	25	0	0	0	25	25	100
Lactobacilli	50	25	50	25	50	25	25	0	25	75
Streptococci	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	100	100	50	75	50	75	100	100	100	100
<i>Pseudomonas</i>	0	25	25	25	25	50	50	50	25	0
Clostridia (lecithinase(+))	25	75	25	0	0	0	50	50	25	50
Clostridia (lecithinase(-))	100	100	75	100	100	75	100	100	100	100
<i>Veillonellae</i>	25	50	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococci	50	0	25	0	0	0	0	25	25	0
Bacilli	50	0	50	50	0	0	0	25	25	50
Yeasts	75	75	100	50	50	75	75	75	50	50
Mold	0	0	0	0	0	0	25	0	0	25

^{a)} %

^{b)} Include anaerobic lactobacilli

検出され、その後激増し、投薬終了後3日目には9.8/gにも増加した。しかし、7日目には減少し、この時期に*Bacteroidaceae* および Eubacteria が、それぞれ、9.4/g および 8.6/g 検出された。投薬終了後35日目には*Peptococcaceae* および Bifidobacteria も、それぞれ、9.4/g および 8.8/g 検出された。

被験者 No. 3 では *Peptococcaceae* が投薬開始後2日目に消失したのに対し、*Bacteroidaceae*, Bifidobacteria および Eubacteria は投薬期間中やや減少傾向を認めた程度であり、レンチナーゼ陰性 Clostridia はむしろ一過性に増加傾向を示した。投薬終了後1日目には Bifidobacteria と Eubacteria が一過性に消失した。

被験者 No. 4 では、*Bacteroidaceae* とレンチナーゼ陰性 Clostridia 以外が投薬開始4日目に消失した。*Bacteroidaceae* は投薬開始4日目までやや減少したが、その後増加に転じた。レンチナーゼ陰性 Clostridia は投薬中増加傾向を示した。投薬終了後35日目には投薬前の各種偏性嫌気性菌群が検出され、その菌数も元に戻りつつあった。

好気性菌群：被験者 No. 1 では、Lactobacilli および Bacilli が、それぞれ、投薬開始7日目および11日目に消失したのに対し、*Enterobacteriaceae* は実験期間中あまり変動しなかった。また、Streptococci は投薬開始2日目にやや減少したが、その後増加に転じ、投薬中増加傾向を示した。

被験者 No. 2 では、投薬開始4日目に *Enterobacteri-*

aceae は消失し、Streptococci は減少した。その後、投薬期間中これらの菌群は消失ないしは減少し続けたのに対し、投薬前には検出されなかった *Pseudomonas* がこの期間7.0~8.0/g と激増した。しかし、Streptococci の増加、*Enterobacteriaceae* の出現(投薬終了後3日目)と共に *Pseudomonas* の減少が認められた。

被験者 No. 3 では、*Enterobacteriaceae* が投薬開始2日目から徐々に減少し、7日目(実験第7日)には投薬前の約5000分の1にも減少したが、その後増加に転じた。Streptococci は投薬開始後7日目まであまり変動は認められなかったが、11日目には約200倍の増加が認められ、投薬終了後1日目までそれが持続した。Lactobacilli は投薬期間中大きな変動が認められた。

被験者 No. 4 では、*Enterobacteriaceae* が被験者 No. 2 と同様に投薬開始4日目に消失した。しかし、7日目に少数(4.6/g) 検出され、11日目には再び消失した。Streptococci は被験者 No. 1 と同様、投薬期間中増加し、好気性菌群中最優勢を占めた。

Yeasts：被験者 No. 1 および No. 3 では、実験期間中あまり検出されなかったが、検出されても約3/g程度であった。被験者 No. 2 および No. 4 では、投薬期間中、すなわち他の菌群が消失ないしは減少している時期に増加傾向を示した。特に、被験者 No. 2 は著明で、投薬前は3.0/g と少数しか検出されなかったが、投薬開始後増加し、レンチナーゼ陰性 Clostridia 以外のすべての偏性嫌気性菌群、*Enterobacteriaceae* および Strepto-

cocci の消失ないしは減少時期（投薬開始 4 日目）には 8.0/g と激増し、投薬終了後 1 日目までそのレベルで推移し、すべての菌群中最優勢を占めた。しかし、投薬終了後 3 日目頃から、他の菌群が出現しはじめる時期に呼応して、Yeasts の菌数も減少した。

2. 各対象例の *Enterobacteriaceae*, Streptococci および *Bacteroidaceae* の T-2525 耐性菌比率

被験者 4 例の各糞便 1 グラム当りの Streptococci および *Bacteroidaceae* 総数に対する T-2525 耐性 (MIC > 12.5 µg/ml) Streptococci および T-2525 耐性 (MIC > 12.5 µg/ml) *Bacteroidaceae* 総数の割合を Table 2 と Table 3 に示す。なお、Streptococci, *Bacteroidaceae* および *Enterobacteriaceae* 総数については各対象例ごとに Fig. 3, 4, 5 および 6 に示した。T-2525 耐性 (MIC > 12.5 µg/ml) *Enterobacteriaceae* は被験者 No. 3 で投薬開始 2 日目（実験第 2 日）に 2.4/g、被験者 No. 4 で投薬開始前に 2.3/g 検出されただけで、その他はすべて検出限界値 (2.3/g) 以下であった。この 2 例の T-2525 耐性 *Enterobacteriaceae* の割合は被験者 No. 3 および No. 4 でそれぞれ、 $4 \times 10^{-4}\%$ 、 $6 \times 10^{-4}\%$ であった。一方、Streptococci の場合をみると (Table 2)、被験者 No. 1, No. 2 および No. 3 では投薬開始前の T-2525 耐性 Streptococci の割合が比較的少なかったが、投薬開始後、特に、投薬期間後期および投薬終了後数日間にはほぼ 100% を示した。被験者 No. 4 では投薬開始前からその割合が高く、その後も高頻度に検出された。し

かし、投薬終了後 3 日目頃から徐々にその割合が低下し、14 日目（実験第 28 日）には 4 例とも、ほぼ投薬前のレベルないしはそれ以下になった。しかし、被験者 No. 2 は 35 日目に再び増加していた。*Bacteroidaceae* の場合 (Table 3) をみると、被験者 No. 1, No. 3 および No. 4 では、その耐性菌の割合が投薬開始後徐々に増加し、投薬開始後後期および終了後早期（実験第 11 日, 15 日, 17 日および 21 日）に高く認められた。しかしその後、被験者 No. 1 および No. 4 では投薬終了後 14 日目に、被験者 No. 3 では 35 日目にほぼ投薬前の割合に戻った。被験者 No. 2 では、投薬前および投薬開始 2 日目の T-2525 耐性 *Bacteroidaceae* の割合は、他の被験者 3 名とほぼ同程度であったが、糞便中に本剤が高濃度に検出されるとすべての *Bacteroidaceae* が消失した。その後、投薬終了後 7 日目には再び検出されたが (9.4/g)、耐性菌は投薬終了後 14 日目まで検出されなかった。

3. *C. difficile* 検索とその糞便中毒素検出

C. difficile は被験者 4 名のすべてから検出されなかった。*C. difficile* 毒素は被験者 No. 2 で投薬終了後 3 日目（実験第 17 日）に検出された。この時の便性状は正常であった。その他はすべて陰性であった。

4. 糞便中薬剤濃度

T-2588 の被験者 4 名に対する経口投与後の糞便中薬剤濃度を Table 4 に示す。測定薬剤は T-2588, T-2588 A および T-2588 代謝物質の脱 pivaloyloxymethyl 体で

Table 2 Proportion of T-2525-resistant Streptococci in the fecal flora of healthy adult volunteers

Volunteer	Day of study									
	0	2	4	7	11	15	17	21	28	49
No. 1	19 ^{a)}	100	100	100	100	100	100	100	39	0.01
No. 2	4.0	1.6	55	11	100	100	22	1.9	0.03	33
No. 3	0.6	6.8	66	100	100	100	100	0.09	0.2	0.1
No. 4	50	40	100	55	100	68	66	12	3.3	0.07

^{a)} Percent of T-2525-resistant Streptococci in total Streptococci

Table 3 Proportion of T-2525-resistant *Bacteroidaceae* in the fecal flora of healthy adult volunteers

Volunteer	Day of study									
	0	2	4	7	11	15	17	21	28	49
No. 1	0.7 ^{a)}	13	2.0	4.2	13	2.2	20	30	0.6	0.05
No. 2	0.7	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0.001
No. 3	0.05	1.5	5.5	5.1	20	86	2.5	84	15	0.4
No. 4	1.2	3.5	2.3	37	89	100	23	41	0.5	0.7

^{a)} Percent of T-2525-resistant *Bacteroidaceae* in total *Bacteroidaceae*

Table 4 Concentrations of T-2525 and T-2525A in the feces of volunteers orally given T-2588, 600mg/day

Volunteer	Drug detected	Day of study				
		2	4	7	11	15
No. 1	T-2525	<2.0	6.8	<2.0	<2.0	<2.0
	T-2525A	<2.0	<2.0	54.3	<2.0	2.3
No. 2	T-2525	10.5	1,108.3	1,741.8	1,452.5	2,001.3
	T-2525A	7.8	148.8	198.5	248.3	282.0
No. 3	T-2525	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
	T-2525A	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
No. 4	T-2525	4.5	761.3	85.0	<2.0	<2.0
	T-2525A	46.5	165.3	27.3	10.0	3.0

^{a)} T-2588 changes to T-2588A, T-2525, and T-2525A in the intestinal tract: only T-2525 has antibacterial activity, while the others not¹⁾

T-2588 and T-2588A were not detected (<5 µg per gram of wet stool)

^{b)} µg per gram of wet stool

ある T-2525 と 2525 A を対象とした。これらの中で抗菌活性を示すものは T-2525 のみである。

この T-2525 の糞便中薬剤濃度は Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, および Fig. 6 にも示した。T-2588 および T-2588 A の検出濃度は被験者 4 名すべて 5 µg/g 以下であった。T-2525 の糞便中薬剤濃度をみると、被験者 No. 1 と No. 3 ではほとんど検出限界値以下であった。被験者 No. 2 では、投薬開始 2 日目(実験第 2 日)は 10.5 µg/g と低濃度であった。しかし、投薬開始 4 日目には 1,108.3 µg/g、7 日目には 1,741.8 µg/g、11 日目には 1,452.5 µg/g、投薬終了後 1 日目には 2,001.3 µg/g と高濃度に検出された。被験者 No. 4 では、投薬開始 4 日目に 761.3 µg/g と高濃度に検出されたが、投薬開始 7 日目には 85 µg/g、その後は検出限界値以下となった。

5. 腸内菌叢の薬剤の影響からの回復

総菌数および各菌群の薬剤からの影響をみると、総菌数では、被験者 No. 1 と No. 4 が投薬終了後 35 日目にはほぼ投薬前の菌数に戻った。しかし、被験者 No. 2 と No. 3 は投薬終了後 35 日目でもまだ元の菌数まで戻らなかった。腸内菌叢各構成菌群についてみると、被験者 4 名とも投薬終了後 35 日目でもある種類の菌群は投薬前の菌数レベルまで戻らなかった。すなわち、被験者 No. 1 では *Veillonellae* とレンチナーゼ陽性 Clostridia、被験者 No. 2 では *Bacteroidaceae* と Bifidobacteria、被験者 No. 3 ではほとんどの偏性嫌気性菌群と *Enterobacteriaceae*、被験者 No. 4 では Eubacteria と *Enterobacteriaceae* が投薬前の菌数レベルまで戻っていなかった。

6. 下痢等の副作用

実験期間中、軟便が被験者 No. 1 で投薬開始 7 日

に、被験者 No. 2 で投薬開始 4 日目から 6 日目までの 3 日間認められた。しかし、便性状には特別な異常は認められなかった。これ以外は他の対象 2 例ともすべて正常便であった。また、その他下痢等の副作用は対象 4 例とも認められなかった。

III. 考 察

今回の実験は、健康成人男子 4 名を対象として、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 T-2588 を 14 日間連続投与した際、その腸内菌叢および糞便中活性薬剤濃度を経日的に測定し、腸内菌叢の変動と糞便中活性薬剤濃度との相関性について検討した。また、本剤耐性菌および非感受性菌の出現とその動態、偽膜性大腸炎の起原因菌である *C. difficile* の検索とその糞便中毒素検出、さらに、下痢等の副作用の有無等について検討した。腸内菌叢の変動および糞便中薬剤濃度には個人差がかなりあったが、被験者 4 名の腸内菌叢の変動および糞便中薬剤濃度を大別すると 3 型に分かれた。第 I 型は被験者 No. 1 と No. 3 の場合で、本剤投与後糞便中に薬剤がほとんど検出されず、腸内菌叢の変動も両者ほぼ類似していた。すなわち、本剤投与期間中、*Veillonellae*、レンチナーゼ陽性 Clostridia および *Peptococcaeae* の一部の偏性嫌気性菌は消失したのに対し、腸内菌叢菌群中最優勢を占める偏性嫌気性菌群の *Bacteroidaceae*、Eubacteria および Bifidobacteria はやや減少傾向を示したものの消失することなく、8~10/g とかなりの菌数を維持していた。また、レンチナーゼ陰性 Clostridia が投薬中激増していた。しかし、*C. difficile* は検出されず、その糞便中毒素も陰性であった。一方、好気性菌群では、投薬期間中 *Bacillus* および *Lactobacillus* が消失し(被験者 No. 1)、Yeasts もほとんど検出されず、

検出されても 3/g 程度であった。それに対し Streptococci は投薬期間中増加傾向を示した。Enterobacteriaceae はほとんど変動せず (被験者 No. 1) ないしは減少傾向を示したもののなお残存 (5/g) し、投薬中再び増加を示した (被験者 No. 3)。第Ⅱ型は被験者 No. 2 の場合で、投薬開始後糞便中、活性薬剤 (T-2525) 濃度が徐々に上昇し、投薬開始 4 日目に 1,108.3 $\mu\text{g/g}$ になると、すべての偏性嫌気性菌群および好気性菌群の Enterobacteriaceae と Streptococci が激減ないしは消失した。しかし、その時期に投薬前に少数定住していた Yeasts および Pseudomonas が激増した。その後、糞便中に活性薬剤が高濃度に存在しているのにもかかわらずレンチナーゼ陰性 Clostridia が再び出現して激増し、投薬終了後 3 日目には 10/g にも達した。この時期の糞便中に C. difficile 毒素が検出された。しかし、C. difficile は検出されなかった。また、便性状も正常であった。第Ⅲ型は被験者 No. 4 の場合で、第Ⅰ型と第Ⅱ型の中間型を示した。すなわち、糞便中活性薬剤が、投薬開始 4 日目に 761.3 $\mu\text{g/g}$ と高濃度に検出されただけで、その後はほとんど検出されなかった。腸内菌叢の変動も、第Ⅰ型と第Ⅱ型の中等度の変動を示し、Bacteroidaceae とレンチナーゼ陰性 Clostridia 以外の偏性嫌気性菌群および Enterobacteriaceae は激減ないしは消失した。また、投薬中 Yeasts および Streptococci が激増した。

以上のように本剤をヒトに連続投与した際、その腸内菌叢の変動と糞便中薬剤濃度は個人差が大であったが、各人の腸内菌叢の変動はその糞便中薬剤濃度とよく相関し、糞便中に活性薬剤が高濃度に検出されるにしたがって、本剤感受性菌群の消失ないしは減少傾向が認められた。しかし、腸内菌叢構成菌群中、Bacteroidaceae, レンチナーゼ陰性 Clostridia, Streptococci, Pseudomonas および Yeasts が比較的抵抗性を示し、投薬期間中に増加傾向を示した。これらの菌群も投薬中には属ないしは種レベルでの菌交代現象が示唆された。

これは投薬期間中および投薬終了後数日間では T-2525 耐性 Bacteroidaceae および耐性 Streptococci の割合が高くなっていったこと (Table 2 および 3)、さらには *in vitro* の感受性試験でもこれらの菌群には MIC の高い菌属ないしは菌種が認められる¹⁾ことから推測される。T-2588 は経口投与後、小腸で吸収されその腸管壁のエステラーゼによりすみやかに T-2525 に分解されるが、その血中濃度および尿中濃度は対象 4 例ともほぼ等しく²⁾、しかも、消化器、肝臓機能に異常が認められなかった³⁾にもかかわらず、被験者 No. 1 と No. 3 では、投薬後ほとんど活性薬剤 (T-2525) が糞便中に検出されなかった (Table 4)。

この理由としては、胆汁より腸管に排泄あるいは腸管上皮より漏出した T-2525 が、大腸内に生息していた本剤を不活化する菌によって速やかに不活化されたためではないかと推測される。本剤は他の β -lactam 剤よりも *in vitro* で各種細菌の β -lactamase に対して抵抗性を示すことが報告されている¹⁾。しかし、本剤は *B. fragilis* group の β -lactamase に対しては多少加水分解される傾向を示すこと¹⁾、しかも、本実験において Bacteroidaceae の変動が投与期間中も少なかった (被験者 No. 1 および No. 3) ことを考慮すると、これらの菌属あるいは菌種が腸管内に優勢に存在し本剤を不活化した可能性もある。

また、本剤が直接 β -lactamase により不活化されるのではなく、腸内菌叢中のある種の菌により本剤の化学構造の一部が修飾あるいは分解されて分子構造的に β -lactamase により不活化されやすくなったためと考えられなくもない。これは今後実証を要する仮説である。被験者 No. 1 と No. 3 の腸内には本剤を不活化する菌が存在していたために投薬中でも、本剤に比較的感受性の Enterobacteriaceae (MIC $\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$), Bifidobacteria, Eubacteria 等が生残することができたと考えられる。同様な現象は中谷らが報告した cefpiramide (SM-1652) 投与によるヒト腸内菌叢の変動⁴⁾においても観察されている。この被験者 2 名 (No. 1 と No. 3) は本実験開始前 6 カ月間に数回の本剤投与歴があったことと、今回の投与で腸内菌叢の変動が少なかった事実を考慮すると、その腸内菌叢中には、本剤を不活化する菌および耐性菌が潜在していた可能性がある。

被験者 No. 2 で、レンチナーゼ陰性 Clostridia が 10/g に達した投薬終了後 3 日目には C. difficile 毒素が糞便中から検出された。さらに、この時期、Klebsiella oxytoca が 8.6/g 検出されたが、便性状は正常であった。C. difficile が何故検出されなかったのか。一つの理由としては CCFA 培地に含まれている cefoxitin, あるいは cycloserine の濃度が高いために、存在していたかもしれない C. difficile が発育できなかったのかもしれない。また C. difficile が芽胞型になっていたために胆汁酸を含まない CCFA 培地では分離できなかった可能性も考えられる。

投薬によって変動した腸内菌叢が、個人本来の腸内菌叢構成菌群菌数に復帰するには投薬後 35 日目ではまだ不完全で、特に、偏性嫌気性菌群の回復に遅延傾向が認められ、さらに 1~2 週間を要するものと考えられる。

以上を総括すると、T-2588 をヒトに連続投与した場合、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。このことは T-2588 をビーグル犬に長期連続投与

した場合⁴⁾でも同様な結果であった。

本剤は、各種の感染症に有効であると報告されている¹⁾。しかし、本剤は腸管内ではかならずしも安定ではないことが本研究で明らかにされた。これは腸管内に生息する菌の中に、本剤の代謝をより複雑にしているものがあるためかもしれない。本研究の結果は、本剤が腸管感染症、少なくとも大腸粘膜の病変を主体とする感染症に対してはかならずしも有効ではないことを推測させる。

また、本剤の使用に際しては、被験者 No. 2 で示されたように、偽膜性大腸炎の起因为物質とされている *C. difficile* 毒素を誘導する場合があることを十分考慮し、臨床に応用されるべきと考えられる。

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) HOLDMAN, L. V. & W. E. C. MOORE (ed.): Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977
- 4) 小山 優, 中川圭一: T-2588 の臨床第 1 相試験。Jap. J. Antibiotics 投稿予定
- 5) 中谷林太郎, 千田俊雄, 柴岡はるみ, 相楽裕子: 新セファロスポリン系抗生物質 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
- 6) 千田俊雄, 留奥はるみ, 長谷川潔, 岡村 登, 中谷林太郎: 新セフェム系抗生物質 T-2588 の長期連続投与後のビークル犬腸内菌叢に及ぼす影響。Chemotherapy 34 (S-2): 92~97, 1986

THE CHANGE IN HEALTHY ADULT INTESTINAL MICROFLORA BY ADMINISTRATION OF T-2588, A NEW CEPHEM ANTIBIOTICS

TOSHIO CHIDA, HARUMI TOMEOKU, NOBORU OKAMURA and RINTARO NAKAYA

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

KEIICHI NAKAGAWA and MASARU KOYAMA

Department of Internal Medicine, Tokyo Kyosai Hospital

MASARU TAI and YUMIKO SUGIMOTO

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

1. When T-2588 was administered orally to 4 volunteers for 14 days, the degrees of changes observed in the fecal microflora and drug concentrations were dependent on individual volunteers.
2. Degrees of alteration in the flora correlated well to the concentrations of the drug in the fecal contents. T-2525 caused reduction and elimination of the sensitive bacteria in parallel with the increase in concentrations in the fecal contents.
3. Among the members of microflora, *Bacteroidaceae*, lecithinase-negative Clostridia, *Streptococcaceae*, *Pseudomonas*, and Yeasts were relatively resistant to this drug, resulting in an increase in number during the period of drug administration.
4. In volunteers No.1 and No.3, there were no great changes in their fecal flora during the period of study, suggesting that the drug-resistant bacterial flora, including beta-lactamase-producing bacteria, had already been formed.
5. More than 35 days after the withdrawal of the drug were required to recover the normal fecal flora.
6. In volunteer No.2, *C. difficile* toxin, but not the organisms, was once detected in his feces during the period of study, although there were no abnormalities of stool character.
7. Loose stool was observed once in each of the two volunteers during the period of study.