

新キノロン系経口抗菌剤 NY-198 剤投与による健康成人腸内菌叢の変動

稲垣 好雄・チャルアイ エカタクシン*・千田 俊雄・中谷林太郎

東京医科歯科大学医学部微生物学教室

*現所属：東京大学医科学研究所細菌感染研究部

高橋 悟・長山 義明・辻野大二郎・染谷 一彦

聖マリアンナ医科大学第三内科

新キノロン系抗菌剤 NY-198 を健康成人男子 7 名に 1 回 200mg, 1 日 3 回, 8 日間連続経口投与し, 各被験者の腸内菌叢の変動と, その糞便中薬剤濃度との関係について検討した。

さらに *Clostridium difficile* とその毒素の存在, 下痢等の副作用などについてもあわせて検討した。

1. 総菌数は実験期間中はほぼ一定していた。

2. NY-198 剤投与により好気性菌群が強く抑制された。特に *Enterobacteriaceae* は投薬開始後早期に消失し, 投薬終了後 6 日目にほぼ回復した。糞便中に活性薬剤濃度が高濃度に検出されるにしたがって減少, 消失が認められた。

3. 偏性嫌気性菌群では, *Eubacteria*, *Peptococcaceae* が投薬開始初期に減少したが, ただちに回復した。また, *Veillonella* およびレシチナーゼ陽性 *Clostridia* は投薬期間中減少傾向が認められた。

4. *C. difficile* はいずれの被験者からも分離されなかったが, 糞便中には *C. difficile* 毒素が被験者 No. 3 で投薬終了後 6 日目に, 被験者 No. 6 では投薬前に検出された。しかし, 便性状は正常であった。

5. NY-198 剤投与による腸内菌叢の乱れが投薬前の菌叢に復帰するまでには, 投薬終了後 20 日目でもまだ不完全で, さらに 1~2 週間を要すると考えられる。

6. 実験期間中, すべての被験者に下痢等の副作用は認められなかった。

NY-198 は北陸製薬株式会社と塩野義製薬株式会社が共同で開発したキノロン系の経口用合成抗菌剤である。その化学構造式は Fig. 1 に示すとおりで, 化学名は 1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride である。本剤は *in vitro* の抗菌力試験の結果, グラム陰性及び陽性の好気性菌に対して, 幅広い抗菌スペクトルと強い殺菌力を有し, さらに嫌気性菌に対しても優れた抗菌力を示すこと, また吸収・排泄試験の結果では, 本剤は経口投与により速やかに血中及び組織内に移行すること, 半減期が既存のキノロン系薬剤と比べ長いこと, 生体内でほとんど代謝されず 48 時間以内に尿中に約 80% が未変化体のまま排泄され, 連続投与での蓄積性もないことなどが報告されている¹⁾。

本剤のように広い抗菌スペクトルを有する抗菌剤をヒトに連続経口投与した場合, その正常腸内菌叢がどのような影響を受けるかを調べることは, ヒト腸内における各種腸内菌に対する本剤の抗菌力を知る上で有益であるばかりでなく, 菌交代現象による下痢あるいは薬剤関与腸炎等の副作用を検討する上でも意義あるものと思われる。

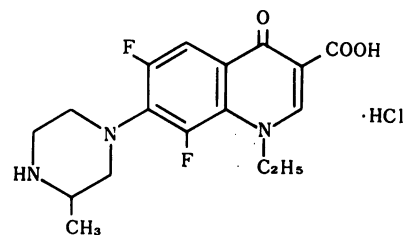


Fig. 1. Chemical structure of NY-198

今回, 我々は健康成人男子 7 名の被験者を対象として NY-198 を連続経口投与した際, その腸内菌叢の量的・質的变化, 投与終了後の腸内菌叢構成菌群の回復経過とその時期, 本剤に対する非感受性菌ないし耐性菌の動態を調べた。特に偽膜性大腸菌の起因菌である *Clostridium difficile* については, 菌の検索および糞便中の毒素の検出, 下痢等の副作用の有無の調査を行ない, 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。

NY-198 administration 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	22	23	24	25	26	27	28		
Oral administration	← 200mg×3/day 22 times →																														
Collection of feces																															
For microflora	○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○
For drug concentration			●		●		●		●		●		●		●		●		●		●		●		●		●		●		●

Fig. 2. Time sequence of NY-198 administration and fecal collection

I 材料と方法

1. 被験者

年齢26～45歳、体重58～87kgの健康成人男子7名(Na1～7)を被験者とした。

2. 使用薬剤と投与方法

NY-198 (北陸製薬、塩野義製薬) のカプセル剤を毎日、朝・昼・夜の定時に、1回200mg、1日3回(合計600mg)、8日間連続して経口投与した。

3. 腸内菌叢検査法

腸内菌叢の検査日程を Fig. 2 に示す。検査は投与開始前日(実験第0日)、投与開始2日目(第2日)、4日目(第4日)、6日目(第6日)、8日目(第8日)、投与終了後3日目(第11日)、6日目(第14日)、13日目(第21日)および20日目(第28日)の合計9回行なった。

1) 糞便採取と輸送: 検査当日の早朝排便後、約1gを還元処置した輸送用培地²⁾9mlの入った採便管の中に入れ、氷冷して輸送した。

検体は採便後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⁾に従って実施した。培地は Medium10 を除く3種類の非選択培地 [Trypticase soy blood agar (TS, BBL), EG 寒天培地 (EG, 栄研化学) および BL 寒天培地 (BL, 栄研化学)] と、10種類の選択培地 [DHL 寒天培地 (DHL, 栄研化学), PEES 寒天培地 (PEES), TATAC 寒天培地 (TATAC), Potato dextrose agar (P, Difco), BS 寒天培地 (BS), ES 寒天培地 (ES), 変法 LBS 寒天培地 (LBS, BBL), NBGT 寒天培地 (NBGT), Neomycin Nagler (NN) および変法 VS 寒天培地 (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5種類の培地 (TS, DHL, PEES, TATAC および P) を用い、糞便検体100倍階段希釈系列 (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}) のそれぞれ0.05mlを4分画した平板に塗布し、37℃、24時間(ただし、PEES 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種類の培地 (EG, BL, BS, ES, LBS, NBGT, NN および VS) を用い、このうち BS, ES, LBS, NBGT, NN および VS には上記同様に塗布し、さらに EG, BL には糞便検体希釈系列 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} のそれぞれ0.05mlを3分画した平板培地に塗布し、これら8種の平板を N_2 80% - CO_2 10% - H_2 10% の環境下の嫌気グローブボックス (Anaerobic System Model 1024, Forma Scientific 社) 内で37℃、48～72時間嫌気培養した。

3) 同定及び菌数算定: 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。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 ($\log_{10} N$) で示した。検出限界菌数(対数)は1グラム当たり2.3である。

4. 耐性菌数測定

糞便中の *Enterobacteriaceae* および *Bacteroidaceae* について、NY-198耐性菌の菌数を測定するために、NY-198試験用原末を12.5μg/mlの割合に加えた DHL 寒天培地および NBGT 寒天培地を用い、前記の腸内菌叢検査法と同様に菌数を算定した。

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 500μg/ml, cefoxitin 16μg/ml) を用いた。平板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、prereducer 処理した後使用した。菌種の同定は、CCFA 培地上に発育した果糖陽性の集落に対し、光岡の方法²⁾および VPI³⁾ の分類基準に従って行なった。

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、*C. difficile* より産生されるエンテロトキシン D-1 を検出した。希釈前の糞便中毒素検出濃度限界値は約5 μg/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

原則として薬剤投与開始1日後, 3日後, 5日後, 7日後, 投薬終了後3日目の計5回測定した(Fig. 2)。糞便中薬剤濃度は agar well 法により定量した。まず基層としてミューラー・ヒントン寒天培地(Difco)の平板をつくった。つぎに検定菌の *Escherichia coli* NIHJ JC-2を, 菌量約 10^7 CFU/mlになるようにミューラー・ヒントン寒天培地に混ぜ, その10mlを基層培地上に分注凝固させた。

糞便試料は約1gに4倍量の0.1N-HClを加えホモジナイズし, さらに4倍量の0.1N-HClを加え振盪した後, これに1/15Mリン酸緩衝液(PBS, pH7.0)を加え, 3,000r.p.m., 10分間遠心して, その上清を用いた。

上記の平板培地に well を作り試料をこの中にいれ37°Cで18~20時間培養し, 得られた阻止円直径から標準曲線により濃度を算出した。標準曲線作製には NY-198標準品 1mg力価/ml水溶液を用い PBS で希釈して行なった。

II 結 果

1. 腸内菌叢の総菌数および各菌数の変動

被験者7名の糞便1g当りの総菌数と各菌群数の経日変動を, 被験者ごとに Fig. 3~9の上段に示す。また, 7例の平均総菌数及び平均各菌群数の経日変動をそれぞれ Table 1および Fig. 10の上部に示す。また, 7例の各菌群検出率を Table 2に示す。

1) 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)についてみると, 被験者No. 1では投薬開始後2日目(実験第2日)に約10分の1に減少したが, その後投薬終了後3日目(実験第11日)まではほぼその状態を推移した。さらに投薬終了後6日目(実験第14日)までにはほぼもとの菌数に回復したが, 投薬終了後13日目(実験第21日)には若干の減少を示した。

被験者No. 2は, 投薬開始2日目に若干の減少がみられたが, 4日目(実験第4日)にはもとの菌数の10倍に増加し, 以後そのレベルで推移した。投薬終了後20日目(実験第28日)に減少傾向が認められた。

被験者No. 3では, 投薬開始2日目と4日目(実験第4日)に増減を繰り返したが, 6日目(実験第6日)にはほぼもとの菌数に回復しその後もその状態を維持した。

被験者No. 4は, 実験期間中ほとんど変化はみとめられず10.3/gで推移した。

被験者No. 5では, 被験者No. 1とは逆に投薬開始2日目に約10倍に増加し, その後減少傾向がみられ投薬終了後3日目には投薬前の菌数を下回る減少を示したが, その後6日目には逆にもとの菌数の10倍量にまで増加し, その後もそのレベルを保ったが, 20日目にはまた減少傾向

がみられた。

被験者No. 6では, 投薬開始とともに徐々に減少し投薬8日目(実験第8日)にはもとの10分の1に減少した。その後回復に向かい投薬終了後13日目にほぼ回復したが, 20日目には約100分の1にまで減少した。

被験者No. 7は, ほぼ被験者No. 5と同様な変動を示し投薬開始6日目まではほとんど変動しなかったが, 8日目には10分の1程度に減少した。投薬終了とともに増加し, 投薬終了後6日目には11.1/gにまで増加した。その後も増減を繰り返した。

総菌数の変動を7例の平均値でみると(Fig. 10), 投薬終了後13日目にわずかな増加がみられるがほとんど変動はなく一定であった。

2) 偏性嫌気性菌群: 被験者No. 1では *Bacteroidaceae* が投薬開始2日目に10分の1に減少し, その後もそのレベルで経過した。Eubacteria およびレシチナーゼ陰性の *Clostridia* [*Clostridia* (-)] は著明な減少を示し, とくに *Clostridia* (-) は消失にいたった。Eubacteria は投薬開始6日目に増加し, 8日目にはほぼもとの菌数にまで回復したが, その後も増減を繰り返した。Bifidobacteria と *Peptococcaceae* は投薬期間初期に減少を認めその後増加はしたが, さらに実験期間中増減を繰り返した。Veillonella は投薬前には検出されなかったが, 投薬終了後3日目に7.6/g 検出され, その後も持続し20日目には再び検出されなくなった。

被験者No. 2では *Bacteroidaceae* は投薬開始4日目にもとの菌数の10倍に増加し, その後もそのレベルで変動したが, 投薬終了後20日目にはほぼもとの菌数に回復した。Eubacteria および Bifidobacteria は, Eubacteria に投薬2日目に一時減少がみられたものの漸増傾向を示し, 投薬終了後6日目にピークに達しその後減少傾向にあった。*Peptococcaceae* および *Clostridia* (-) は投薬開始2日目に減少し, *Peptococcaceae* は消失にいたった。しかし投薬開始4日目には *Peptococcaceae* は投与前の菌数に, *Clostridia* (-) はその400倍にまで増加し菌数を維持したが, 投薬終了後3日目には再び減少した。その後も一時増加したが, それぞれ投薬終了後13日目, 20日目には消失した。Veillonella は被験者No. 1同様投薬前に検出されなかったが, 投薬開始6日目に一時出現し, 投薬終了後6日目には8.6/gにまで達しその後減少した。レシチナーゼ陽性の *Clostridia* [*Clostridia* (+)] も被験者No. 1同様ほとんど検出されず, 投薬終了後6日目に2.3/g 検出されたにすぎなかった。

被験者No. 3では, *Bacteroidaceae* は実験期間中ほぼ一定9.5/g前後で推移した。Eubacteria および *Peptococcaceae* は投薬開始2日目に増加し, 4日目には大きく減少した。特に *Peptococcaceae* は投薬開始2日目に約

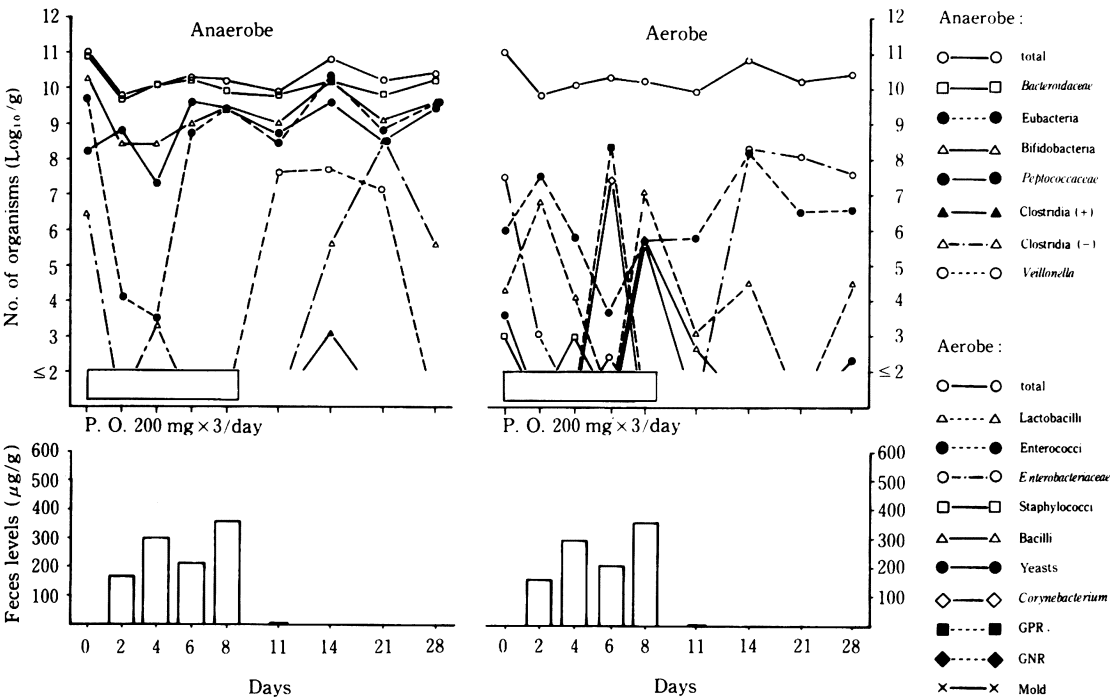


Fig. 3. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 1 and concentrations of drug in fecal specimens

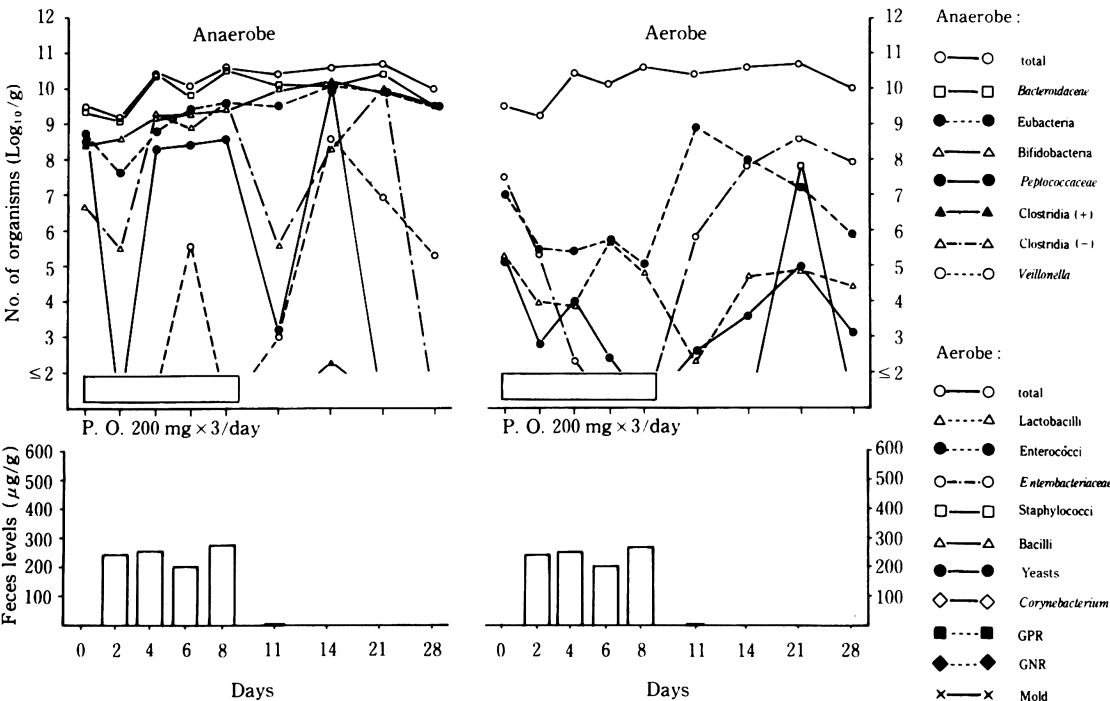


Fig. 4. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 2 and concentrations of drug in fecal specimens

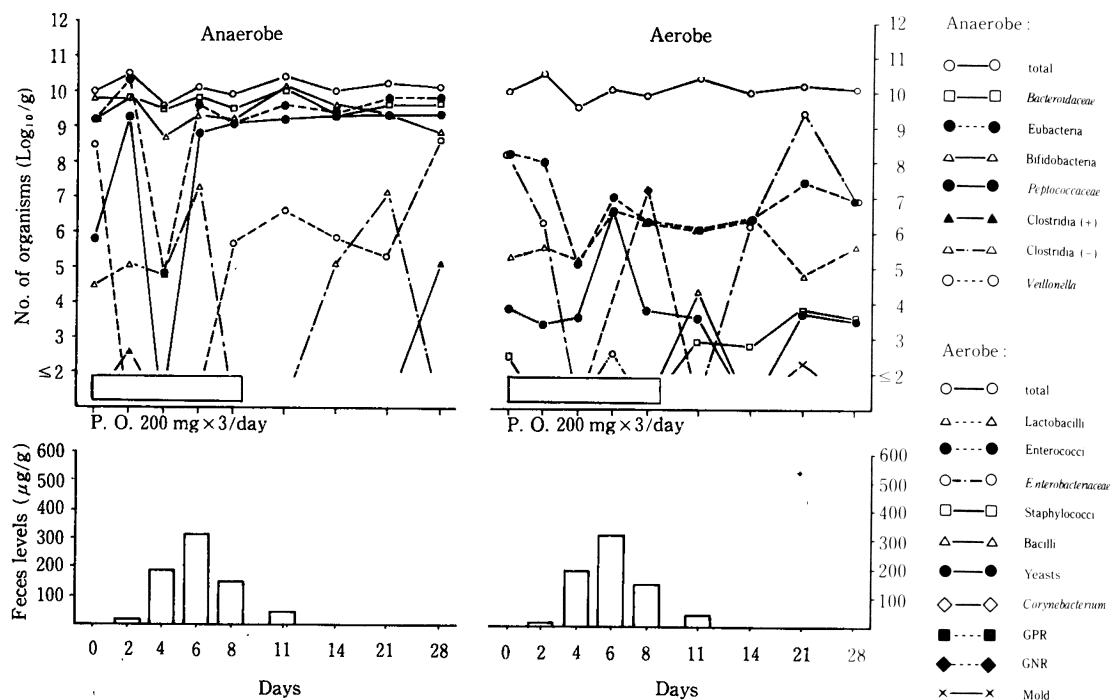


Fig. 5. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 3 and concentrations of drug in fecal specimens

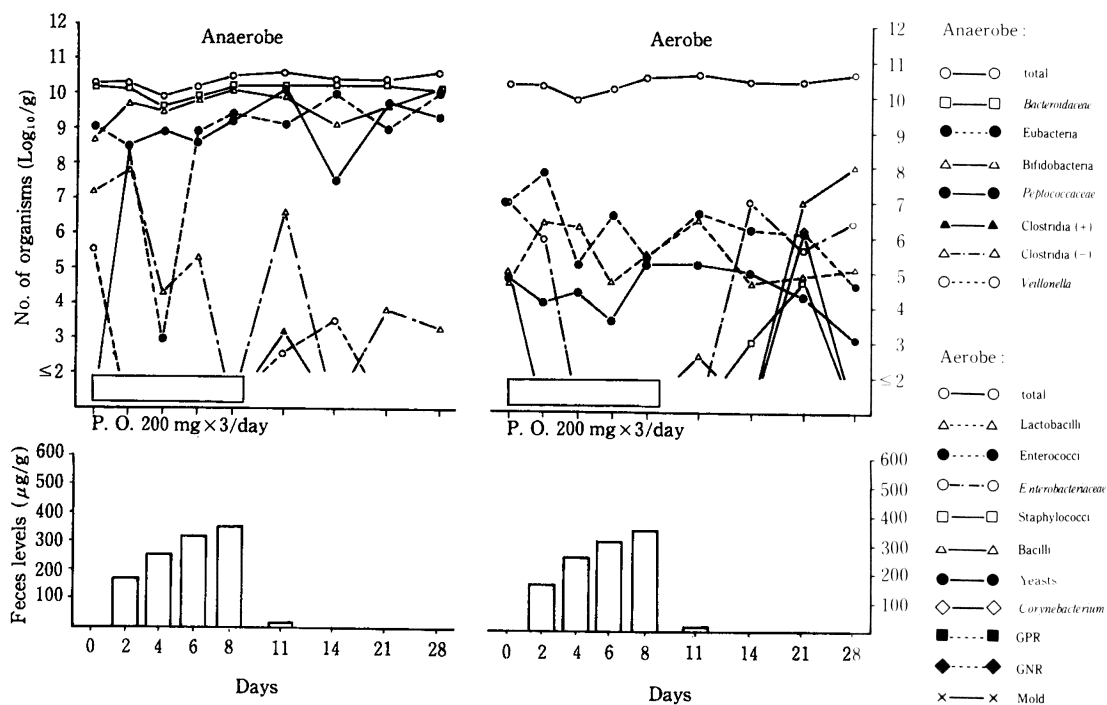


Fig. 6. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 4 and concentrations of drug in fecal specimens

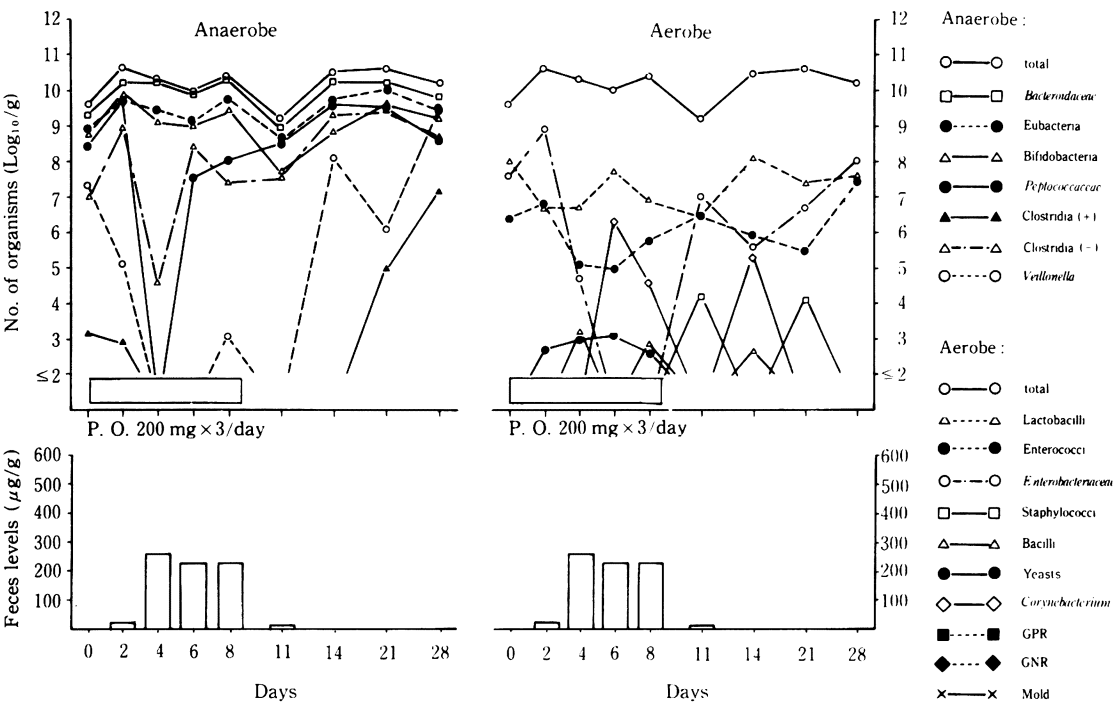


Fig. 7. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 5 and concentrations of drug in fecal specimens

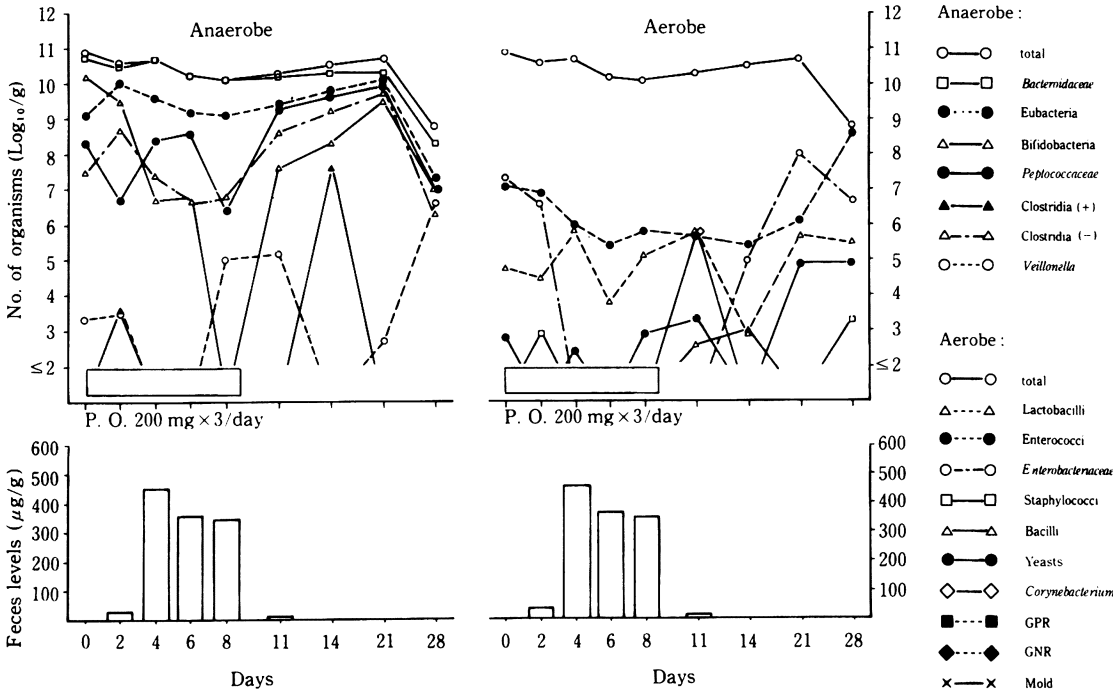


Fig. 8. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 6 and concentrations of drug in fecal specimens

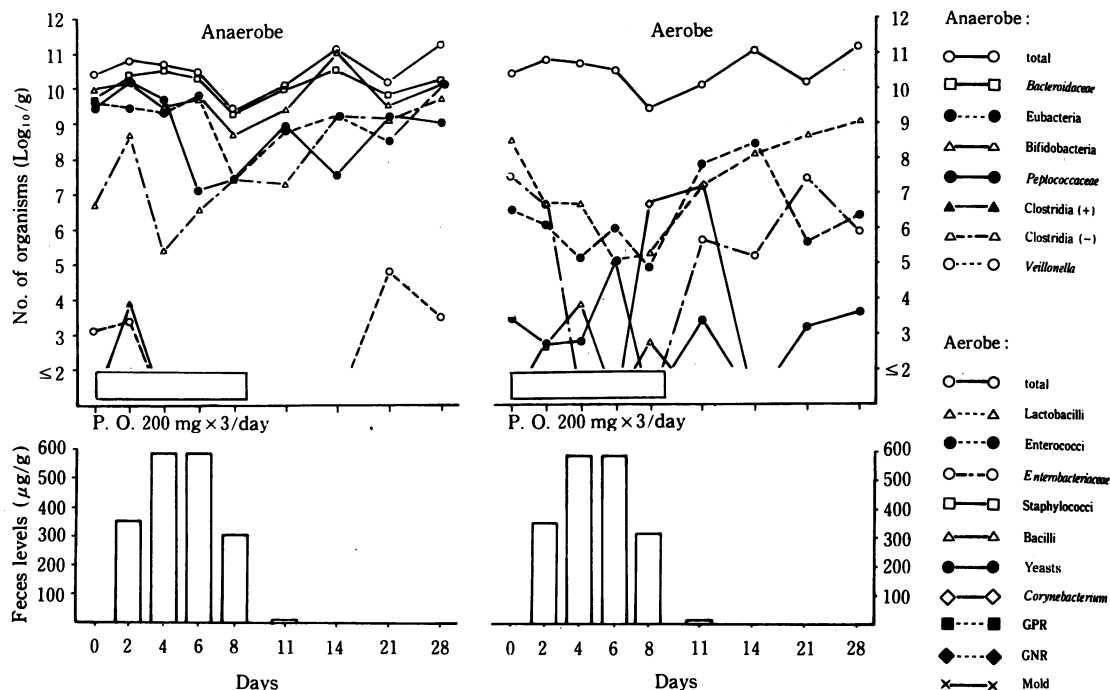


Fig. 9. Effect of NY-198 on fecal microflora of volunteer No. 7 and concentrations of drug in fecal specimens

3000倍に増加した菌数が4日目には消失した。その後6日目にはふたたび増加に転じ実験期間中おのおの9.5/gおよび9.2/g前後と安定化した。*Bifidobacteria*は投薬開始4日目に約10分の1に減少したが、その後増加に転じ、投薬終了後3日目にはほぼ投薬前の菌数となったがふたたび漸減傾向を示した。*Clostridia (-)*は変動が大きく投薬期間中増加傾向を示し投薬開始6日目には7.3/gとピークに達したが8日目には消失した。投薬終了後も13日目に一時ピーク時の菌数にまで達したが20日目にはふたたび消失した。*Veillonella*は投薬期間中消失したが、その8日目には投薬前の約600分の1程度検出され、投薬終了後そのレベルで推移したが、20日目にはさらに増加し投薬前の菌数にまで回復した。*Clostridia (+)*は投薬開始2日目に一時2.6/g検出され、その後は検出限界(2.3/g)以下であったが、投薬終了20日目には5.1/g検出された。

被験者No.4では、*Bacteroidaceae*は総菌数と同様に大きな変化は認められなかった。*Eubacteria*は、投薬開始4日目に投薬前の10万分の1に減少したが、6日目には投薬前の菌数にまで戻った。その後多少の変動を繰り返しながらもほぼ一定であった。*Bifidobacteria*は、投薬期間中に増加傾向を示し、投薬開始8日目には約20倍に達した。投薬終了とともに減少し、投薬終了後14日目に

はほぼ元の菌数に回復したが、その後は増加傾向を示した。*Peptococcaceae*は、投薬前には検出されなかったが、その後増加し投薬終了後3日目には、ピークの10.1/gにまで達した。その後大きな増減を繰り返し、投薬終了後20日目では9.3/gになった。*Clostridia (-)*は、投薬開始4日目より減少し、8日目には消失した。さらに投薬終了後3日目には、一時回復のきざしをみせたが、再び消失し、20日目でも3.3/gと、投薬前の約1万分の1に過ぎなかった。*Veillonella*は、投薬期間中には消失し、投薬終了後3日目と6日目に、回復のきざしをみせたが、13日目には再び検出されなくなった。*Clostridia (+)*は、投薬終了後3日目に検出されたのみであった。

被験者No.5では、*Bacteroidaceae*, *Eubacteria*, *Bifidobacteria*, *Clostridia (-)*は、総菌数の変動と並行して増減を繰り返した。*Peptococcaceae*は、投薬開始4日目に消失したが、被験者No.2, 3および4同様、直ちに回復に向かった。*Clostridia (-)*も投薬開始4日目に激減するなど増減を繰り返した。*Veillonella*と、*Clostridia (+)*は、投薬開始と同時に減少し、4日目には消失した。*Veillonella*は、8日目に一時3.1/g検出されたが、投薬終了後3日目にふたたび検出限界を下回った。さらに6日目には激増し投薬前とほぼ同じレベルにまで達し、その後も大きな増減の後、20日目には、投薬前の

Table 1. Intestinal microflora in seven human volunteers orally given NY-198

Organism	Mean [Log (viable counts/g of feces)] ± S. D. on day*:								
	0	2	4	6	8	11	14	21	28
Total	10.2±0.6	10.2±0.5	10.2±0.4	10.2±0.2	10.2±0.4	10.1±0.5	10.6±0.3	10.4±0.2	10.2±0.7
<i>Bacteroidaceae</i>	9.9±0.7	10.0±0.5	10.1±0.5	10.0±0.2	10.0±0.4	9.9±0.5	10.1±0.4	10.0±0.3	9.7±0.7
Eubacteria	9.2±0.4	8.5±2.2	6.9±3.0	9.3±0.4	9.1±0.8	9.1±0.5	9.8±0.4	9.6±0.5	9.4±1.0
Bifidobacteria	9.5±0.8	9.4±0.7	8.7±1.0	9.0±1.0	8.3±2.8	9.1±1.1	9.6±0.9	9.5±0.3	9.2±1.1
<i>Peptococcaceae</i>	7.2±2.6	7.9±2.8	6.7±3.3	8.4±0.8	8.3±1.0	8.2±2.4	9.0±1.1	8.3±2.8	7.6±2.8
Lactobacilli	5.8±1.7	5.8±1.2	5.5±1.2	5.1±1.9	5.9±0.9	5.4±1.9	5.6±2.0	5.5±2.1	6.4±2.0
Enterococci	6.9±0.7	6.9±0.9	5.4±0.4	5.6±1.1	5.6±0.5	6.8±1.2	7.0±1.2	6.3±0.7	6.3±0.9
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.5±0.4	6.1±1.7	2.4±1.0	2.1±0.3	<2	3.8±2.3	6.4±1.3	7.7±1.3	6.4±2.1
Clostridia (Lec+)**	2.2±0.5	2.7±0.7	<2	<2	<2	2.2±0.5	3.0±2.1	2.4±1.1	3.2±2.1
Clostridia (Others)	6.6±1.0	6.7±2.6	5.6±2.1	6.5±2.3	5.3±3.2	5.7±2.7	7.0±2.8	8.2±2.2	5.4±3.1
<i>Veillonella</i>	4.5±2.6	2.8±1.2	<2	2.5±1.4	3.1±1.6	4.1±2.3	5.4±2.9	5.0±2.0	5.4±3.0
Staphylococci	2.2±0.4	2.1±0.3	2.1±0.4	<2	<2	2.4±0.8	2.3±0.4	3.8±2.1	2.4±0.7
Bacilli	2.5±1.1	2.1±0.3	2.4±0.8	<2	2.7±1.4	2.6±0.8	2.2±0.4	2.7±1.9	2.9±2.3
Yeasts	3.7±1.1	2.8±0.8	3.2±0.9	3.5±1.7	3.5±1.5	3.2±1.1	2.7±1.2	3.6±1.3	3.2±1.0
<i>Corynebacterium</i>	<2	<2	<2	3.4±2.4	3.0±1.9	3.3±2.2	2.5±1.3	2.6±1.6	<2
GPR (aerobe)	<2	<2	<2	2.9±2.4	<2	<2	<2	<2	<2
GNR (aerobe)	<2	<2	<2	<2	2.7±2.0	<2	<2	<2	<2
Mold	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2.0±0.1	<2

*Day of study : see Fig. 2.

**Lec+ : lecithinase positive.

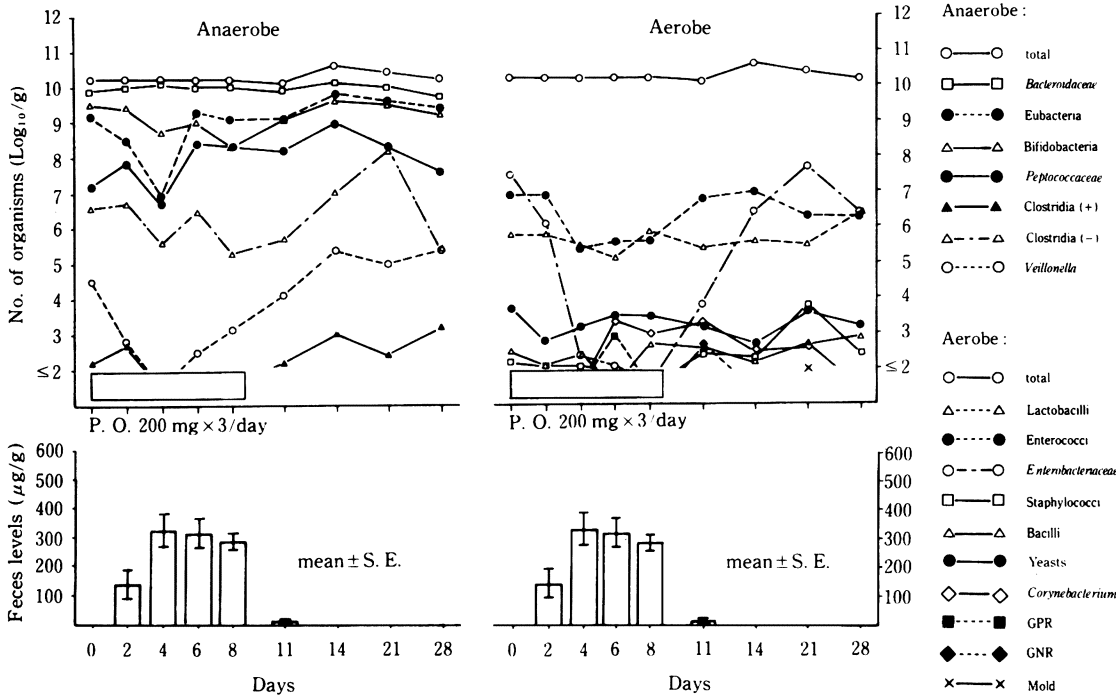


Fig. 10. Effect of NY-198 on fecal microflora and concentrations of drug in fecal specimens (Mean of 7 cases)

Table 2. Detection frequencies of intestinal microflora in seven volunteers orally given NY-198

Organism	Percentage of positive cases on day*:								
	0	2	4	6	8	11	14	21	28
<i>Bacteroidaceae</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Eubacteria	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Bifidobacteria	100	100	100	100	85.7	100	100	100	100
<i>Peptococcaceae</i>	85.7	85.7	71.4	100	100	100	100	85.7	85.7
Lactobacilli	100	100	100	85.7	100	100	100	85.7	100
Enterococci	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	100	100	28.6	28.6	0	42.9	100	100	100
Clostridia (Lec+)**	14.3	57.1	0	0	0	14.3	42.9	14.3	28.6
Clostridia (Others)	100	85.7	100	85.7	57.1	71.4	85.4	100	71.4
<i>Veillonella</i>	71.4	42.9	0	14.3	42.9	71.4	71.4	85.4	71.4
Staphylococci	28.6	14.3	14.3	0	0	28.6	28.6	57.1	28.6
Bacilli	28.6	14.3	28.6	0	42.9	57.1	28.6	14.3	14.3
Yeasts	85.7	71.4	85.7	71.4	71.4	71.4	28.6	71.4	85.7
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	28.6	28.6	28.6	14.3	14.3	0
GPR (aerobe)	0	0	0	14.3	0	0	0	0	0
GNR (aerobe)	0	0	0	0	14.3	0	0	0	0
Mold	0	0	0	0	0	0	0	14.3	0

*Day of study: see Fig. 2.

**Lec+: lecithinase positive.

100倍にまで増加した。Clostridia (+) も、13日目から激増し20日目には1万倍にまで達した。

被験者Na 6 は、*Bacteroidaceae*, Eubacteria および Clostridia (-) に、増減の程度の差はあるが、総菌数と同様に投薬期間中減少し、その後増加した。Bifidobacteria は、投薬期間中漸減し、投薬開始8日目には消失した。*Peptococcaceae* は、投薬期間中増減を繰り返し不安定であった。Clostridia (+) は、ほとんど検出されなかったが、投薬終了後6日目に7.6/g と多く検出された。また投薬終了後20日目には、すべての菌群が100~1000倍減少したが、この時期 *Veillonella* が、投薬前の100倍に増加していた。

被験者Na 7 は、被験者Na 5, Na 6 同様、*Bacteroidaceae*, Eubacteria, Bifidobacteria, 投薬終了後6日目をのぞく *Peptococcaceae* は、増減の程度の差はあれ、総菌数と同様な変化を示した。Clostridia (-) は、投薬開始2日目に投薬前の100倍に増加したが、4日目には激減し、その後徐々に増加し投薬終了後20日目には9.6/g とピークに達した。*Veillonella* は、投薬開始4日目に消失し投薬終了後13日目にやっと出現してきた。

7例の平均値を見ると、投薬開始4日目にEubacteria, *Peptococcaceae*, *Veillonella*, Clostridia (+) の減少と、投薬期間中 Bifidobacteria, Clostridia (-) の若

干の減少傾向が認められた。しかし、これらはすぐに増加し Eubacteria, Bifidobacteria, *Peptococcaceae* は、投薬終了後6日目には、Clostridia (-) は13日目にピークに達し、その後回復に向かった。Eubacteria, *Peptococcaceae* の減少は、被験者Na 2 およびNa 5 にみられる *Peptococcaceae* の消失、被験者Na 1, 3, 4 にみられる Eubacteria の大きな減少を認めた例と、若干の変動を認めたに過ぎない例の2通りの変動パターンが認められた。さらに Clostridia (-) においても投薬期間中に増加傾向を示す例 (被験者Na 2, 3) と、減少する例 (被験者Na 1, 4, 5, 6 および7) の2通りの変動パターンが認められた。被験者Na 1 および7においては、Bifidobacteria も大きく減少した。

3) 好気性菌群: 好気性菌群 (ここでは通性嫌気性菌群と好気性菌群を含めて呼ぶ) の変動についてみると、*Enterobacteriaceae* は7例すべてについて投与期間中に大幅な減少、消失が認められ、7例の平均値 (Fig.10) でみると、投薬前に7.5/g 認められた菌群が、投薬4日目には2.4/g とほとんど検出されなくなり、その後消失した。さらに投薬終了後にはすみやかに増加傾向をとった。Enterococci も同様、投薬期間中に減少傾向が認められた (Fig. 3, 4, 7, 8 および9)。しかし、被験者Na 3 および4 では一時減少したものの、投薬開始6日目

Table 3. Proportion of NY-198-resistant *Bacteroidaceae* in fecal flora of healthy adult volunteers

Volunteer	Day of study								
	0	2	4	6	8	11	14	21	28
No. 1	0.25*	1.6	49	31	40	25	25	40	40
No. 2	0.50	15	16	13	7.8	25	15	10	4.1
No. 3	3.1	21	31	100	7.8	40	40	50	25
No. 4	3.9	12	4	20	25	1.7	31	20	17
No. 5	0.50	5.0	3.9	50	25	10	13	6.3	2.5
No. 6	13	31	13	50	49	50	16	0.65	6.5
No. 7	1.3	0.64	3.1	32	13	50	25	10	20

* Percent of NY-198-resistant *Bacteroidaceae* in total *Bacteroidaceae*

には増加のきざしをみせた。Lactobacilliは、被験者Na1および7に見られるように投薬期間中減少傾向を示したものや、増加傾向にあったもの(Fig.5)、減少、増加したもの(Fig.4および7)、増加、減少したもの(Fig.6, 8)があり、7例の平均値(Fig.10)ではあたかも変動がないようにみられるが、各被験者によって様々な変動が認められた。Staphylococciは、ヒト腸内の少数定住菌であるが、今回の7例の場合も検出率が低く、傾向もはっきりしないが、被験者Na3, 4および5では、投薬終了後に大幅な増加が認められた(Fig.5, 6および7)。Bacilliも同様に被験者Na1および4では、投薬終了時および終了後に大量に出現したことが認められた(Fig.3および6)が、被験者Na7のように投薬期間中に認められた例もあった(Fig.9)。さらに、投薬期間後期から投薬終了後にかけて *Corynebacterium* が多数検出された例(被験者Na1, 5, 6および7)が認められた。

4) Yeasts: 7例の対象をみると、投薬により減少傾向が認められるもの(被験者Na2), 増加が認められるもの(被験者Na5), 投薬開始6日目にのみ大きく増加したもの(被験者Na3および7), 大きな変動を示さなかったもの(被験者Na1, 4および6)が認められ、特に被験者Na3および7では、好気性菌群中LactobacilliとならんでEnterococciに次ぐ、2番目に優勢な菌群となった。

5) 投薬終了後の腸内菌叢の回復

総菌数および各菌群の薬剤投与終了後の回復をみると、総菌数では被験者Na1では、投薬終了後6日目にほぼもとの菌数に戻った。被験者Na2では、投薬終了後20日目によりやく回復のきざしが現れた。被験者Na5とNa7では、それぞれ投薬終了後3日目及び13日目に投薬前の菌数に戻ったが、その後かえて増加し、実験期間中には回復にいたらなかった。被験者Na3, Na4およびNa6は、実験期間中総菌数に大きな変動はみとめられなかったが、被験者Na6では、投薬終了後20日目になって大きく減少

していた。

腸内菌叢構成菌群別についてみると、被験者Na1をのぞくすべての被験者で投薬終了後20日目でもまだもとの菌数まで戻らない菌群があった。すなわち被験者Na2では、*Peptococcaceae*とClostridia(-), 被験者Na3では、*Peptococcaceae*とClostridia(+), 被験者Na4では、*Bifidobacteria*, Clostridia(-), *Veillonella*, BacilliおよびEnterococci, 被験者Na5では、*Veillonella*, Clostridia(+)およびClostridia(-), 被験者Na6では、*Enterobacteriaceae*とLactobacilliをのぞくすべての腸内菌叢構成菌群, 被験者Na7では、Clostridia(-)と*Enterobacteriaceae*が投薬前の菌数レベルまで戻っていなかった。

2. 各対象例のEnterobacteriaceaeおよびBacteroidaceaeのNY-198耐性菌比率

NY-198のMICが12.5 μ g/mlより大きい菌の菌数を測定した。Enterobacteriaceaeは、7例すべて検出限界以下であった。Bacteroidaceaeの場合をみると、実験期間中全例に検出された。投薬開始前の被験者Na1, 2, 3, 4, 5, 6および7におけるBacteroidaceae中の本剤耐性菌の割合(Table 3)は、それぞれ0.25, 0.50, 3.1, 3.9, 0.50, 13および1.3%であった。これらの耐性Bacteroidaceaeは薬剤投与によりその比率は被験者Na1, 2, 3, 5および7で、それぞれおよそ200, 50, 30, 100および40倍に増進した。また被験者Na4および6でも8および4倍に増加した。この増加は投薬開始8日目、あるいは投薬終了後3日目まで続き、その後被験者Na1以外の被験者に減少傾向が認められた。しかし、被験者Na6を除くその他の被験者では投薬前の割合にまでは低下せず、投薬終了後でも被験者Na2, 3, 4, 5および7では、それぞれ4.1(8倍), 25(8倍), 17(4倍), 2.5(5倍), 20(16倍)%であった。

3. C. difficileの検索と糞便中毒素検出

C. difficileは、被験者7名すべてから検出されなかつ

た。*C. difficile* 毒素は、被験者Na3で投薬終了後6日目(実験第14日)に、被験者Na6で投薬前(実験第0日)に検出された。この時の便性状は正常であった。その他の被験者はすべて陰性であった。

4. 糞便中薬剤濃度

NY-198の被験者Na1～7に対する経口投与後の糞便中薬剤濃度を、それぞれFig.3～9の下段に示す。また、7例の平均濃度値およびその標準誤差値(S.E.)をFig.10の下部に示す。

各例における投薬開始2日目、4日目、6日目、8日目および投薬終了後3日目の合計5回の糞便中薬剤濃度は全例に検出され、それぞれ被験者Na1は、155, 287, 201, 349, 0.57 μ g/g, 被験者Na2では、238, 243, 199, 268, 0.60 μ g/g, 被験者Na3では、11, 188, 313, 139, 38.35 μ g/g, 被験者Na4では、166, 248, 309, 341, 11.12 μ g/g, 被験者Na5では、12, 254, 225, 229, 5.60 μ g/g, 被験者Na6では、22, 454, 360, 347, 5.64 μ g/g, 被験者Na7では、359, 581, 581, 309, 5.03 μ g/gであった。また対象7例の平均濃度値及びその標準誤差値は、それぞれ 137.6 ± 50.1 , 322.1 ± 53.5 , 312.6 ± 50.6 , 283.1 ± 29.4 , 9.6 ± 5.0 μ g/gであった。

5. 下痢等の副作用

実験期間中、下痢等の副作用は、対象7例とも認められなかった。

Ⅲ 考 察

今回我々は、健康成人男子7例を対象として、ニューキノロン系経口用抗菌剤NY-198を8日間連続投与し、腸内菌叢および糞便中薬剤濃度を経日的に測定し、正常腸内菌叢構成菌群の量的・質的变化、投薬終了後の腸内菌叢の回復経過、腸内菌叢の変動と糞便中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動態、偽膜性大腸炎の起因菌である*C. difficile*の検索とその糞便内毒素検出、さらに下痢等の副作用の有無についても検討した。対象7例の腸内菌叢の変動と糞便中薬剤濃度をみると、各人とも糞便中に薬剤がかなりの濃度に検出されていたにもかかわらず、総菌数は若干の変動を認めたにすぎずほぼ一定を示し、それぞれ平均10.3/g前後で推移した。これは腸内菌叢構成菌群で最優勢をしめる*Bacteroidaceae*が一定の菌数を維持したことによるためであるが、この菌群の変動が少なかったことの理由の一つとしてはNY-198耐性菌の増加が考えられる。実際、NY-198耐性*Bacteroidaceae*の投薬前の比率が0.25～12.6%であったのに対し、投薬開始6日目には12.5～100%を示したことからも裏づけられる。各構成菌群をみると、嫌気性菌ではEubacteriaと*Peptococcaceae*が投薬初期、あるいは投

薬終期または投薬終了後に激減、消失を認めた例があったが、この時期と糞便中薬剤濃度の推移をみると、同時期に濃度が高くなっていた。このことは、7例の平均値(Fig.10)からも同様に相関性のあることがわかるが、さらに投薬期間中であっても、その後これら菌群の菌数が増加していることから、*Bacteroidaceae*同様NY-198耐性菌種の増加が示唆される。*Veillonella*, *Clostridia*(+)も減少傾向を示し、投薬期間中に検出されないことが多かった。薬剤に対する感受性が高いといわれるBifidobacteriaは被験者Na6で著明な減少が認められた以外は、大きな変動を認めなかった。*Clostridia*(-)については、減少を示したものの(被験者Na1, 4)や、変動のなかったもの、増加傾向を示したものの(被験者Na2)と様々であった。これら変動を伴ったものについては、投薬終了後に増加あるいは減少しもとの菌数に回復していった。好気性菌群では、*Enterobacteriaceae*が投薬初期に激減・消失した。この時期の糞便中薬剤濃度と菌数減少とは相関関係が認められた。また回復時期においても同様相関性が得られた。また、Enterococciも投薬期間中、投薬前の約25分の1に減少した。さらにYeastsが増加する例(被験者Na3, 4)、投薬終了後に*Corynebacterium*が検出された例(被験者Na1, 4, 5, 6および7)などが存在した。これら腸内菌叢の変動と、糞便中薬剤濃度との関係は、我々が以前報告した本剤と同系の抗菌剤、PPAおよびDJ-6783をビーグル犬に連続投与した際の腸内菌叢の変動⁵⁾と、類似した変動を示した。すなわち、セフェム系抗菌剤による腸内菌叢の大きな変動と異なり*Enterobacteriaceae*のみを強く抑制していた。さらにEubacteriaの減少を伴っていた。また、近年報告したDL-8280(OFLX)におけるヒトの腸内菌叢の変動⁶⁾とも類似していた。DL-8280投与による腸内菌叢の変動は投薬期間中に詳細な検索が行われていないため、Eubacteriaについては比較できないが、*Enterobacteriaceae*, Enterococciを他の構成菌群を変動させることなく抑制する点で一致していた。しかし、DL-8280にみられたLactobacilliに対する抑制効果は、NY-198では認められなかった。このように、本剤もふくめてニューキノロン系薬剤が*Enterobacteriaceae*に対し選択的抑制を示すことは興味深い点である。薬剤からの回復をみると、投薬終了後20日目でもすべての被験者において菌群レベルでの回復が十分とは言えず、さらに1～2週間は必要であると考えられる。

本剤は、*in vitro*の抗菌力試験の結果では、グラム陰性菌及び陽性の好気性菌のみならず嫌気性菌に対しても優れた抗菌力を持つことが知られているが、本剤をヒトに連続経口投与した際の腸内菌叢の変動の結果では、一時嫌気性菌群の一部に対する抑制効果を示すが、投薬期

間中 *Enterobacteriaceae*, *Enterococci* に対して選択的に抑制効果を示したことが特徴づけられる。このことから *Enterobacteriaceae* による腸管感染症に対して十分効果が期待できると考えられる。なお, *C. difficile* は, 近年薬剤関与腸炎あるいは偽膜性腸炎の原因菌として問題視されているため, 本実験でも菌の検出を行ったが, 菌は検出されなかった。また糞便内毒素は, 被験者 No.3 で投薬終了後6日目に, 被験者No.6 で投薬前にそれぞれ1度検出されたが, 便性状その他異常は認められなかった。また副作用として, 便性状の異常及び下痢等は認めなかったが, 被験者No.6 で投薬後20日目に腸内菌叢構成菌群のほとんどが減少していた。しかし, これは, 時期的にみても薬剤の影響とは考えがたく, その他の影響であろうと推察される。

文 献

- 1) 第35回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム(3), NY-198. 盛岡, 1987
- 2) 光岡知足: 腸内菌の世界, 叢文社, 1984
- 3) HOLDEMAN, L.V.; E.P. CATO & W.E.C. MOORE (ED): *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977
- 4) 高橋 悟, 長山義明, 辻野大二郎, 内藤 悟, 染谷一彦: NY-198のヒトにおける薬物速度論的研究。Chemotherapy 36 (S-2): 240~250, 1988
- 5) NAKAYA, R.; T. CHIDA & H. SHIBAOKA: *Antimicrobial agents and intestinal microflora. Bifidobacteria Microflora* 1; 25~37, 1982
- 6) 千田俊雄, 柴岡はるみ, 石塚巖, 中谷林太郎: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 DL-8280のヒト腸内菌叢におよぼす影響。Chemotherapy 32 (S-1): 109-117, 1984

EFFECT OF NY-198, A NEW QUINOLONE DERIVATIVE, ON HUMAN INTESTINAL MICROFLORA

YOSHIO INAGAKI, TOSHIO CHIDA and RINTARO NAKAYA

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

CHARUAY EKATAKIN

Department of Bacterial Infection, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo

SATORU TAKAHASHI, YOSHIKI NAGAYAMA, DAJIRO TSUJINO and KAZUHIKO SOMEYA

Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, St. Marianna University, Kawasaki

A new quinolone derivative antibacterial agent, NY-198 was administered orally to seven healthy adult male volunteers for eight days, and changes in fecal microflora and their correlation to fecal drug concentration were investigated.

1. During the course of the experiment, the total viable count remained constant.
2. The numbers of aerobes, including facultative anaerobes, were drastically suppressed by NY-198. In particular, enterobacteriaceae were eliminated readily by the drug and recovered only after more than 6 days after termination of the administration.
3. Among obligate anaerobes, eubacteria and peptococcaceae decreased on the 1st to 3rd day of administration, but they immediately recovered, even during the course of administration. In many cases, veillonellae and lecithinase-positive clostridia decreased.
4. *Clostridium difficile* was not detected in any of the volunteers, while *C. difficile* toxin D-1 was detected in two volunteers, whose feces were normal.
5. Even on the 20th day after termination of administration of NY-198, the microflora of volunteers had not entirely recovered.
6. Diarrhoea or other side-effects were not noted in any of the volunteers throughout the experimental course.