

TE-031の健康成人の腸内細菌叢に及ぼす影響

渡辺邦友・沢村治樹・沢 赫代・加藤直樹
山岡一清・青木 誠・上野一恵
岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

健康な男性の志願者5例にTE-031の200 mgを1日2回、7日間連続して経口投与し、腸内細菌叢に対する影響を糞便中の細菌を検索することにより検討した。TE-031の経口投与による嫌気性菌総菌数および好気性菌総菌数の減少は軽微であった。投与による若干の細菌叢の質的变化が観察された。投薬により *Bifidobacterium* の減少が認められたが、投薬中止により速やかに回復した。*B. fragilis* group 間では投薬により投薬前優勢菌種であった *B. vulgatus* の消失が認められ、また投薬前には少数グループであった *B. fragilis* と *B. thetaiotaomicron* の投薬による優勢化が認められた。*Fusobacterium* spp. の投薬による出現あるいは増加も観察された。*Enterobacteriaceae* では、投薬前に優勢であった *E. coli* が消失し、投与前には少数グループであった *E. aerogenes*, *C. freundii* などの投与中あるいは投与後の出現が認められた。

また5例中2例で下痢症状を伴わない *C. difficile* の一過性の増加が認められた。

TE-031は、大正製薬株式会社で開発された経口マクロライド系の化学療法剤である。今回、著者らはTE-031の健康成人糞便内細菌叢へ及ぼす影響を検討する機会を得たので報告する。

I. 対象および方法

1. 対象

対象者は健康成人の男性志願者5名で、試験開始の3カ月前よりいかなる抗菌物質の投与も受けていない。対象者の年齢、体重はTable 1に示すごとくである。

2. 使用薬剤

TE-031 1日4カプセル400 mgを朝夕2回に分けて7日間連続で経口投与した。

3. 糞便中細菌叢の検索

この試験は昭和61年1月から3月に実施された。

TE-031の投与開始後、連日便の性状を観察し、薬剤投与4日前、投与中2回、投与後3回の計7回に亘り糞便の定量培養を実施した。

自然排出した糞便をポリ袋に採取し、空気を出る限

り追い出した後よく混合し、Anaerobic chamberに持ち込んだ。その約1gをとり、上野の希釈液にて10倍糞便希釈液を作り、これを希釈液にて10倍希釈法にて 10^8 倍まで希釈した²⁾。各々の糞便希釈液の0.05 mlまたは0.1 mlを、Table 2に示した培地のなかで非選択培地と *C. difficile* 選択培地に塗布した。その後各希釈液を Anaerobic chamber から取り出し、好気性菌用培地および嫌気性菌用選択培地に塗抹、好気性菌用培地は37°Cで、24~48時間好氣的に、嫌気性菌用培地は非選択培地と *C. difficile* 選択培地とは Anaerobic chamber 内で37°C、48~72時間、その他は嫌気性ジャーを用いて72時間培養した。

Anaerobic chamber (Forma 社) は3種混合ガス(H₂ 10%, CO₂ 10%, N₂ 80%)と室温で働く触媒により嫌気性環境が保持されている。嫌気性ジャーは Microculto A (メルク、関東化学扱い)を用いて嫌気的環境を作製した。

4. 培地

1) 好気性菌用培地

Table 1 List of healthy volunteers

Subject #	Age	Sex	Body weight (kg)
1	57	Male	70
2	38	Male	62
3	37	Male	75
4	35	Male	92
5	34	Male	62

Trypticase Soy 血液寒天培地; 好気性菌の総菌数を算定した。

MacConkey 寒天培地; *Enterobacteriaceae* の菌数を算定した。5集落について菌種の同定を行った。

EF 培地(日本製薬); *Enterococcus* spp. の菌数を算定した。

ブドウ球菌用培地(日水製薬); *Staphylococcus* spp. の菌数を算定した。

NAC 寒天培地(栄研化学); *Pseudomonas* spp. の菌数を算定した。

2) 嫌気性菌用培地

5%羊血液加 BL 寒天培地(日水製薬); 嫌気性菌総菌数と *Bifidobacterium* spp. の菌数を算定した。

Bacteroides Bile Esculin 寒天培地(極東製薬); *B. fragilis* group の菌数を算定した。5集落について菌種の同定を行った。

Lactobacillus selective agar; FINEGOLD らの処方に従った。*Lactobacillus* spp. の菌数を算定した¹⁾。

Rifampicin(50 µg/ml)および5%羊血液加 *Brucella* 寒天培地(BBL); 嫌気性グラム陽性桿菌(*Clostridium* spp. および *Eubacterium* spp.)の菌数を算定した。

変法 FM 寒天培地(日水製薬); *Fusobacterium* spp. の菌数を算定した。

10%卵黄液(生理食塩水:卵黄=1:1)加 CW 寒天培地; lecithinase 生産性 *Clostridium* spp. の菌数を算定した。

CCMA 寒天生培地(日水製薬); 上野らの処方により作製された。*C. difficile* の菌数を算定した²⁾。

5. 同定

Enterobacteriaceae の同定は MacConkey 寒天培地で2回継代培養後, さらに Mueller Hinton 寒天培地に継代培

養し純培養菌を得た後, Enterotube(ロシュ)を用いて行った。

B. fragilis group の同定は BBE 寒天培地に2回継代培養後5%血液, ヘミン, メナジオン加 Columbia 寒天培地に継代培養し, RapID ANA system(アムコ社扱い)により同定した。

その他は, 選択培地上の集落の特徴とガスクロマトグラフィーによる代謝産物の分析とグラム染色にもとづき属を決定した²⁾。

6. 糞便中の *C. difficile* の毒素の検出

糞便に等量の0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)を加え, よく混合したのち, 10000 rpm 10分間遠心分離して得た上澄みを試料とした。D-1 Latex 試薬(ダイアトロン)を用いた。

II. 成 績

1. TE-031の糞便内細菌叢への影響

TE-031の経口投与による糞便内細菌叢の変化は Fig. 1~10に示した。但し, *Bifidobacterium* は, BL 寒天培地上での特徴的集落の存否を確認するにとどめ, 表には示さなかった。

1) Subject # 1について

Subject # 1では, 本薬剤投与開始後嫌気性菌で1/10程度, 好気性菌で1/100程度のわずかな菌数の減少をきたしたが投与継続にも拘わらず菌数は投薬前の菌数に復し, 投薬中止後には嫌気性菌数は横這い状態, 好気性菌数は漸次増加傾向を示した。

投薬期間中, 嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp., *C. perfringens* および *Fusobacterium* spp. が³⁾検出限界以下に, 好気性菌では投薬開始2日後に *Enterobacteriaceae* が³⁾一時

Table 2 Procedure for intestinal flora studies

	Medium	Purpose
Anaerobes	BL blood agar	Total anaerobic count and <i>Bifidobacterium</i>
	<i>Bacteroides bile esculin</i>	<i>B. fragilis</i> group
	<i>Lactobacillus selective agar</i>	<i>Lactobacillus</i>
	Rifampicin blood agar	Gram-positive rods(<i>Clostridium</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp.)
	modified FM agar	<i>F. varium-mortiferum</i> group
	CCMA medium	<i>C. difficile</i>
	Egg york agar	<i>C. perfringens</i>
Aerobes	TSA blood agar	Total aerobic count
	MacConkey agar	<i>Enterobacteriaceae</i>
	EF medium	<i>Enterococcus</i> spp.
	<i>Staphylococcus</i> No.110	<i>Staphylococcus</i> spp.
	NAC agar	Glucose non-fermenter

Fig. 1 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

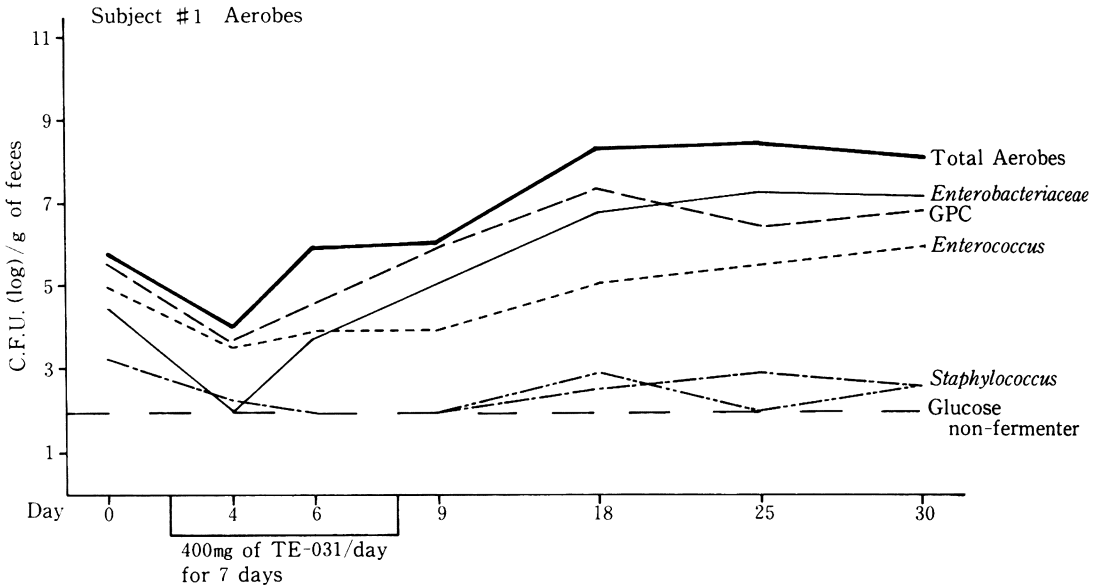


Fig. 2 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

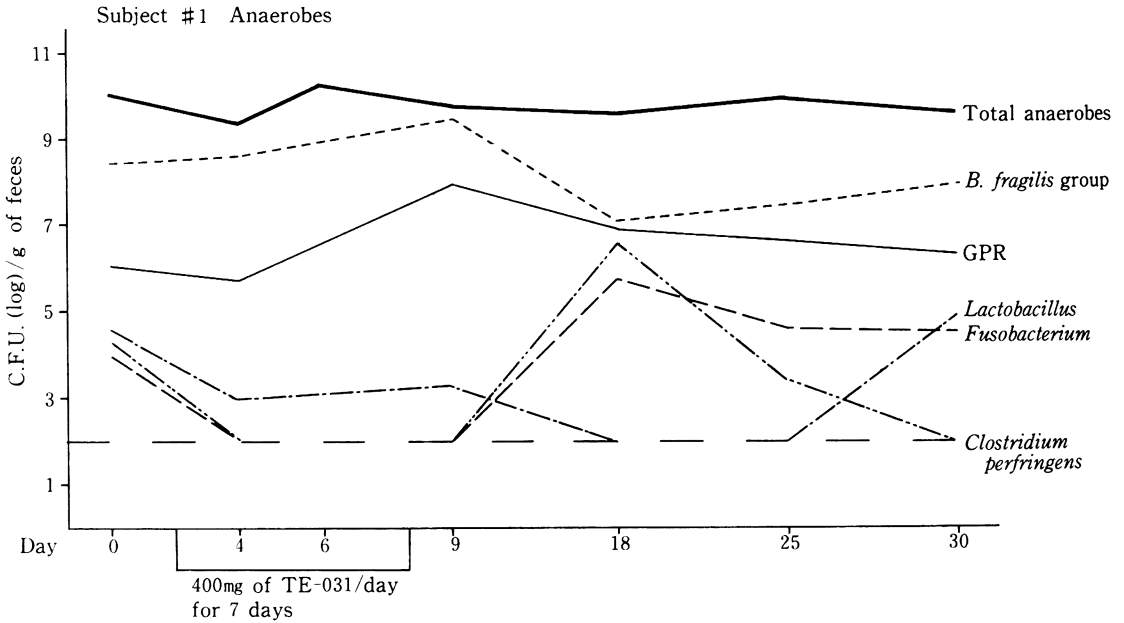


Fig. 3 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

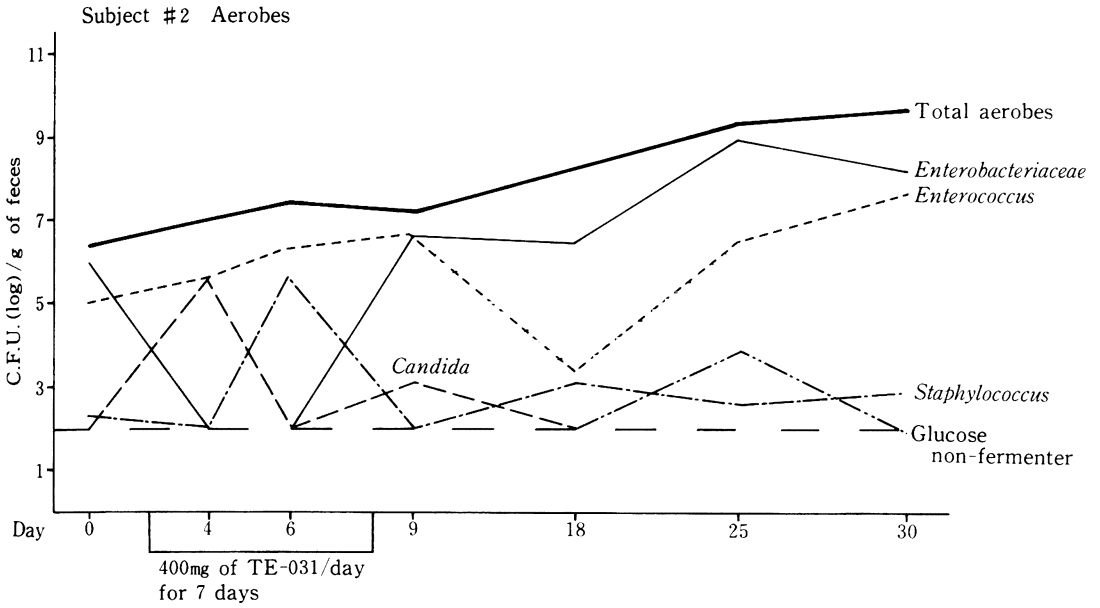


Fig. 4 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

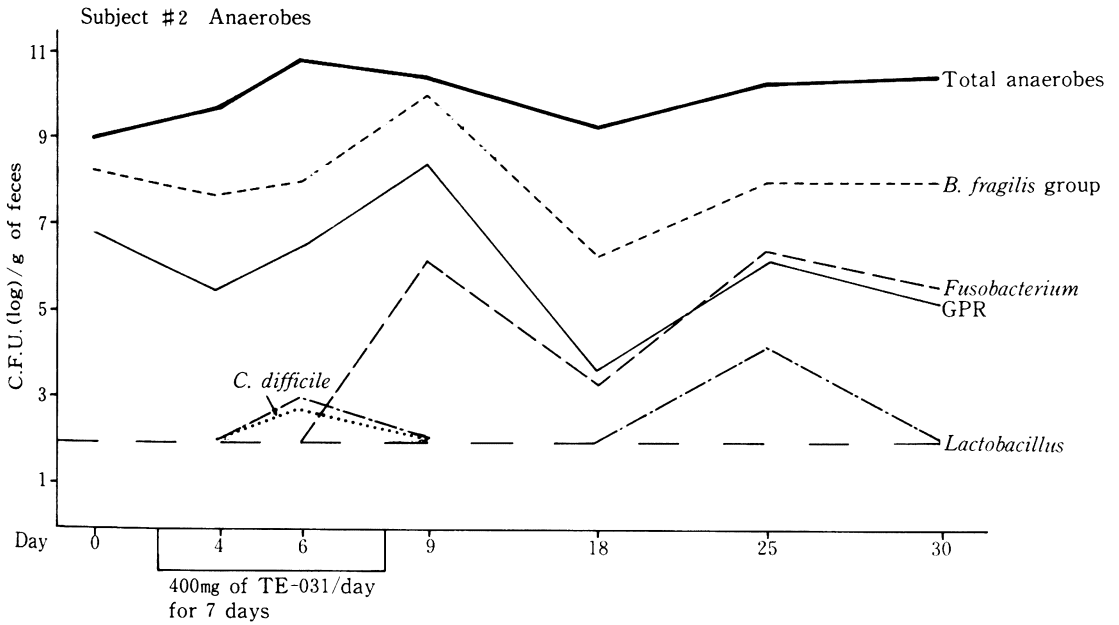


Fig. 5 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

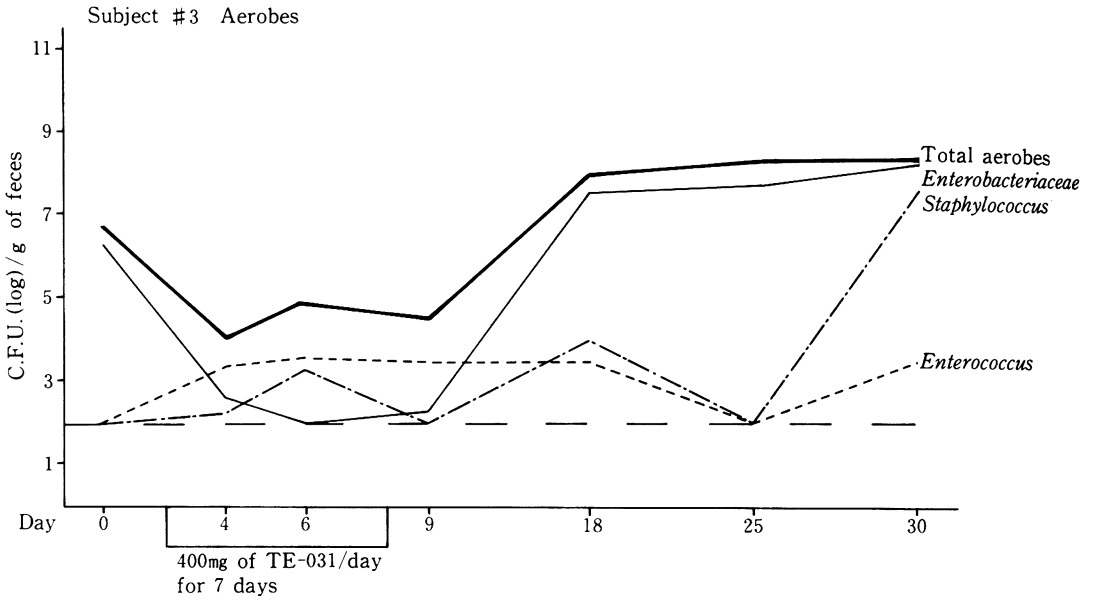


Fig. 6 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

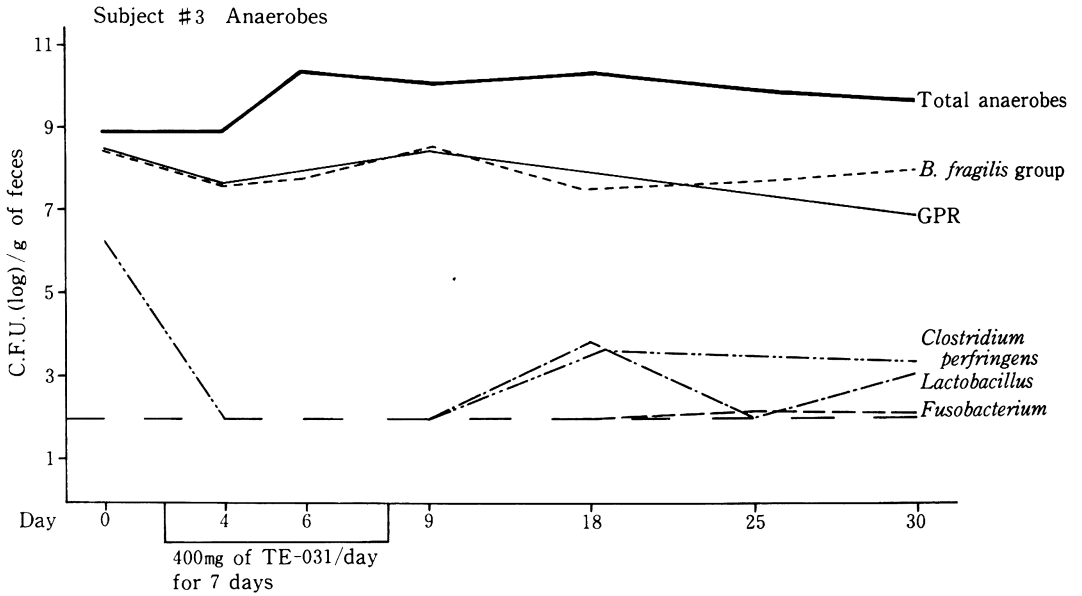


Fig. 7 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

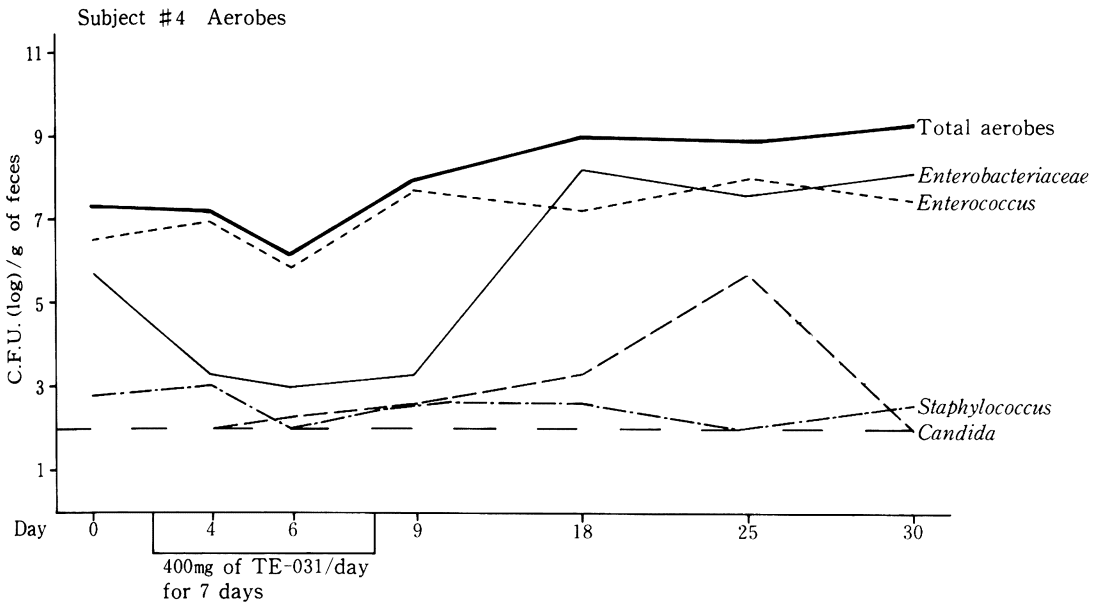


Fig. 8 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

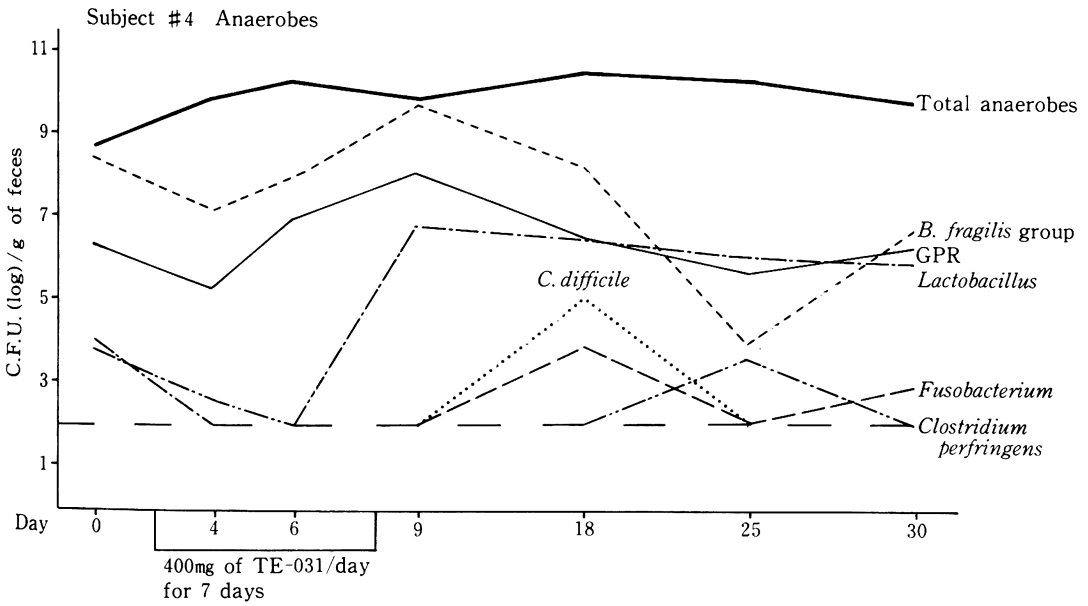


Fig. 9 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer

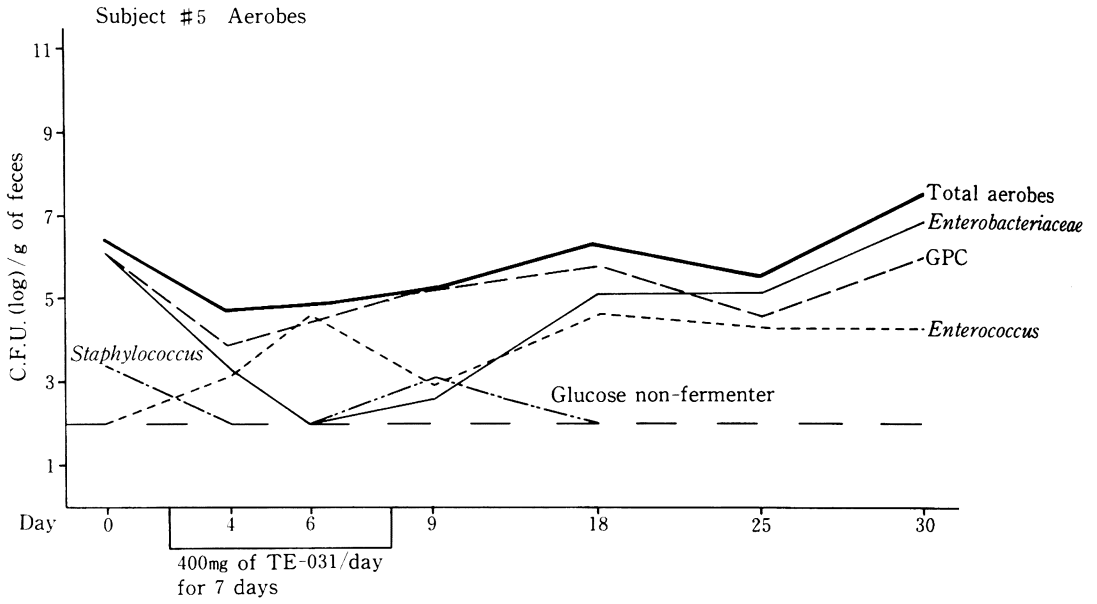
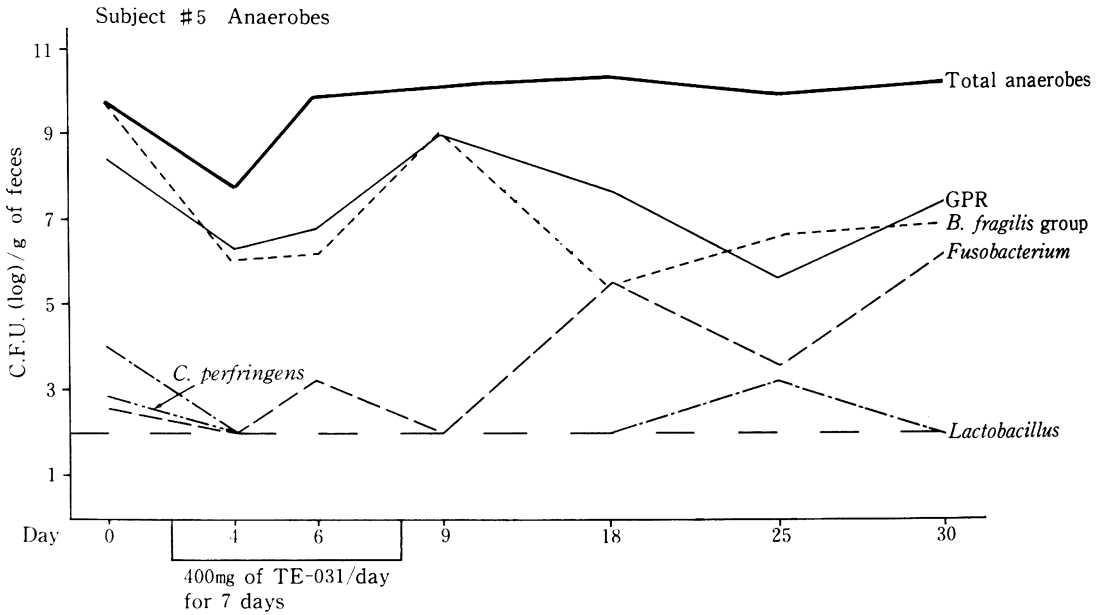


Fig. 10 Effect of TE-031 on fecal flora in a healthy volunteer



検出限界以下となった外, *Staphylococcus* spp. が検出限界以下となった。投薬終了後に嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp. が回復し, *C. perfringens* が一過性に異常に増加した。好気性菌では *Staphylococcus* spp. が1週後に再度出現, また同時期に *Pseudomonas* spp. の出現が見られた。

2) Subject # 2 について

Subject # 2 では, 本薬剤投与開始によっても嫌気性菌, 好気性菌とも菌数の減少傾向は認めず, 投与中そして投薬中止後と嫌気性菌数および好気性菌数は漸次増加傾向を示した。

投薬期間中, 嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp. が, 好気性菌では *Enterobacteriaceae* が投薬開始とともに検出限界以下となった。投薬中に *Staphylococcus* spp. が一過性に増加し, また *C. difficile* および *Candida* spp. が一過性に出現した。投薬中止後すみやかに, *Bifidobacterium* spp., *Enterobacteriaceae* は回復, また中止後2週目に一過性に *Pseudomonas* spp. の出現が見られた。

3) Subject # 3 について

Subject # 3 では, 本薬剤投与開始後嫌気性菌は増加傾向, 好気性菌で1/100程度のわずかな菌数の減少をきたした。好気性菌数は投薬中止後には増加傾向を示した。

投薬期間中, 嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp., *C. perfringens* が検出限界以下に, 好気性菌では投薬開始後に *Enterobacteriaceae* が減少一時検出限界以下となった。投薬中止後, *Bifidobacterium* spp. は回復し, *C. perfringens* も出現した。*Staphylococcus* spp. が投薬終了3週後に異常に増加した。

4) Subject # 4 について

Subject # 4 では, 本薬剤投与開始後嫌気性菌が増加, 好気性菌は一時わずかな菌数の減少をきたしたが, 投薬中止後には嫌気性菌数は横這い状態, 好気性菌数は漸次増加傾向を示した。

投薬期間中, 嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp., *C. perfringens* と *Lactobacillus* spp. が検出限界以下に, 好気性菌では投薬開始後に *Enterobacteriaceae* の著しい菌数の低

下を見たが, 投薬中止後 *Bifidobacterium* spp. と *Lactobacillus* spp. が速やかに増加した。この例では投薬開始後 *Candida* spp. が出現し, 中止後2週目に異常増加し, さらに中止後1週頃に *C. difficile* の一過性の異常増殖が認められた。

5) Subject # 5 について

Subject # 5 では, 本薬剤投与開始後嫌気性菌が一時的に1/10程度減少したが, 直ちに増加して元の菌数に復し, 好気性菌では1/10程度のわずかな菌数の減少をきたした。投薬中止後には嫌気性菌数は横這い状態, 好気性菌数は漸次増加傾向を示した。

投薬期間中, 嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp., *C. perfringens* および *Lactobacillus* spp. が検出限界以下に, 好気性菌では投薬開始2日後に *Enterobacteriaceae* が一時検出限界以下となった外, *Staphylococcus* spp. が検出限界以下に減少した。投薬終了後に嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp. が回復した。また *Fusobacterium* spp. が増加傾向を示した。好気性菌では投薬中止直後 *Pseudomonas* spp. の出現が見られた。

2. 菌種レベルの変化

1) *Enterobacteriaceae* について

TE-031による Subject # 1~5 における *Enterobacteriaceae* の最優勢菌種の変化を Table 3 に示した。Subject # 1~5 は投薬前の最優勢菌種として *E. coli* を有したが, 投薬中あるいは投薬中止時には検出限界以下になるか, あるいは *E. coli* と共に *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii* が出現した。また投薬中止直後には, 5例中3例で *C. freundii* のみが優勢の細菌叢となった。Subject # 1と2では投薬中止後1週目には *E. coli* と *K. pneumoniae* が出現, その後 *E. coli* のみが優勢の投薬前の細菌叢に回復した。Subject # 3では投薬中止後速やかに *E. coli* 優勢の細菌叢へと回復した。また Subject # 4と5では投薬中止後速やかに *E. coli* 優勢の細菌叢に回復したかにみえたが, その1週間後には # 4では *E. cloacae* と *K. pneumoniae*, # 5では *E. cloacae* が出現した。しかし

Table 3 Changing pattern of predominant aerobic species

Subject #	Day	During			After			
	Before	4	6	9	18	25	30	
1	E		E	C	C, E, K	E	E	
2	E	K, EN		C	E, K	E	E	
3	E	E		C	E	E	E	
4	E	E, K	E, C	E	E	EN, E, K	E	
5	E	E			E	EN, E	E	

E : *E. coli*

EN : *E. cloacae*

K : *K. pneumoniae*

C : *Citrobacter*

投薬終了3週目には#1~3と同様に *E. coli* 最優勢の細菌叢にと回復した。

2) *B. fragilis* group について

投薬前の *B. fragilis* group の出現菌種は *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* であり, 5例中3例で *B. vulgatus*, 5例中1例で *B. distasonis*, 残りの1例は菌種の確定が出来ない *Bacteroides* spp. が最優勢であった。しかし, 投薬中止後には, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* spp. が多く分離されるようになった。#1, 2および4で投薬前に最優勢であった *B. vulgatus*, *B. distasonis* は投薬中止後3週目にもまだ出現しなかった (Table 4)。

3. TE-031投与による糞便内 *C. difficile* D-1毒素の検出

Subject #1でTE-031の投薬中に, Subject #4でTE-031投薬後2週目に, *C. difficile* が, それぞれ 6×10^2 cfu/g, 1.5×10^3 cfu/g 分離された。投薬前から投薬後3週目まで, *C. difficile* が分離された2例も含めていずれのSubjectの糞便からも *C. difficile* D-1毒素は検出されなかった。

III. 考 察

抗菌剤の投与は動物の腸管内細菌叢の変化をもたらす。さて抗菌剤投与による腸内細菌叢の変動の程度は, 薬剤の抗菌スペクトラムと抗菌力, その体内動態, 薬剤の腸内での安定性などにより異なる。

TE-031は好気性グラム陽性菌, 陰性菌の一部, 嫌気性菌, *Campylobacter*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Ureaplasma* などに抗菌スペクトラムを有するとされている³⁾。著者らの検討では, TE-031は嫌気性菌の各菌種の発育をかなり低い濃度で抑制することが明らかになった⁴⁾。特に糞便中に 10^8 cfu/g 以上存在する *B. adolescentis* と *B. fragilis* group の発育を $0.05 \mu\text{g/ml}$, $0.78 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ (10^8 cfu/ml 接種)で阻止した。また比較的少数常在する

C. perfringens の発育を $0.78 \mu\text{g/ml}$ (10^6 cfu/ml 接種)で阻止したが, *F. mortiferum*-*F. varium* の発育を阻止するには $100 \mu\text{g/ml}$ 以上 (10^6 cfu/ml 接種)を必要とした。このTE-031の嫌気性菌に対するMICと今回の細菌叢の検索結果を比較すると, *B. adolescentis* と *C. perfringens* の投薬による速やかな減少, *Fusobacterium* spp. の投薬中止後の増加などMICの成績から予測できる細菌叢の変化が観察された。*B. fragilis* groupの菌数は影響を受けた個体と受けなかった個体があり, また *B. fragilis* groupでは投薬前に優勢であった *B. vulgatus* が投薬とともに消失し, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* が出現した現象は, *B. fragilis* group間の各菌種のMICの微妙な違い, すなわち *B. vulgatus* に対するMICは *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* のMICよりやや低い事実, を反映しているように思われる。TE-031は *Enterobacteriaceae* の多くの菌種に対して弱い抗菌作用しか示さない。しかし, TE-031は *E. coli*, *K. pneumoniae* には比較的低いMIC ($3.13 \sim 50 \mu\text{g/ml}$) を, *E. cloacae* には $100 \mu\text{g/ml}$ 以上のかなり高いMICを示している。細菌叢の変化の中に見られる投薬中あるいは投薬後の *E. cloacae*, *Citrobacter* の出現はこのMICの成績をよく反映している。投薬後, *Enterobacteriaceae* の菌数の増加傾向を見たが, この理由は明らかではない。

化学療法剤と関連しておこる *C. difficile* による下痢症および偽膜性腸炎は化学療法を行う際に注意しなければならない重要な問題の一つである。*C. difficile* による下痢症および偽膜性腸炎の発症機構には, 二通りの機構が考えられている。一つは外因説であり, もう一方は内因説である。化学療法剤によって攪乱された腸管内で経口的に侵入した *C. difficile* の芽胞が発芽, 定着して増殖することがきっかけとなるとする外因説があり, また化学療法剤により攪乱された腸管内で少数常在している *C. difficile* が異常増殖することがきっかけとなるとする内因説がある⁵⁾。

Table 4 Changing pattern of predominant *Bacteroides* species

Subject #	Day	During			After			
	Before	4	6	9	18	25	30	
1	V,O,X	V,D		T,X	F,T,D,X	F,X	F,T	
2	V,D	F,U,O	O,T	X	F,X	F,X	F,T,X	
3	V,O,U	V,U,X	V,O	V,U,F	V,T	F,X	V,T	
4	D,T,X	V	F,U,X	U,X	F,T	T	F,T,X	
5	X	T,X	T	V	T,X	F,T	T,X	

V : *B. vulgatus*

O : *B. ovatus*

D : *B. distasonis*

F *B. fragilis*

T : *B. thetaiotaomicron*

U : *B. uniformis*

X *Bacteroides* (unspecified)

今回の5名のうち2名に *C. difficile* の増殖が認められた。1名は投薬中であり、残りの1名は投薬中止後2週目の *C. difficile* の検出であった。なおこれら2名は特に下痢を訴えていない。著者らの経験では、健康成人に各種化学療法剤を投与することで、何等の自覚的症状を伴わないで、その約半数に *C. difficile* が検出される⁶⁾。BAY o 9867の健康成人の腸内細菌叢に及ぼす影響検討でも7例中4例に、いずれも投薬中止後4~28日の間に *C. difficile* が検出されている⁷⁾。また Cefixime でも5例中3例に *C. difficile* が投薬中止直後に分離されている⁸⁾。また FINEGOLD らは、*Enterococcus* spp. と *Lactobacillus* spp. が *in vitro* で *C. difficile* の増殖を阻止すると報告し、これらの菌種の減少が *C. difficile* の増殖の引き金になるかも知れないと報告したが⁹⁾、今回の *C. difficile* が分離された2症例においては、*Enterococcus* spp. と *Lactobacillus* spp. の減少は確認できなかった⁹⁾。

以上の成績から TE-031の1日400 mg 7日間経口投与は、嫌気性菌総菌数への影響は少なく、好気性菌総菌数の若干の減少を引き起こすのみであった。しかしその菌叢の変化を見ると *Bifidobacterium* spp., *C. perfringens* の減少と *Fusobacterium* spp., *C. difficile* の増加が観察され、*B. fragilis* group 間の菌種レベルの変化も観察された。しかし、これらの変化は投薬中止により速やかに投薬前の菌叢に近づく傾向が認められた。

文 献

- 1) SUTTER, V. L. ; D. M. CITRON, M. A. C. EDELSTEIN, S. M. FINEGOLD : Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 4 ed. Star Publishing Company, California, 1985
- 2) 鈴木祥一郎, 上野一恵監修: 臨床嫌気性マニュアル。ニッスイライブラリー No. 6, 日本製薬株式会社, 東京, 昭和54年
- 3) 小野武夫, 沼田和夫, 井上松久, 三橋 進: 新マクロライド系抗生物質 TE-031に関する細菌学的検討。Chemotherapy(投稿中)
- 4) 加藤直樹, 沢村治樹, 沢 赫代, 渡辺邦友, 上野一恵: 嫌気性菌に対する TE-031の細菌学的効果に関する研究。Chemotherapy(投稿中)
- 5) 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(12): 798~810, 1979
- 6) 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
- 7) 渡辺邦友, 青木 誠, 小林とよ子, 沢 赫代, 上野一恵: BAY o 9867 の健康成人の腸内細菌叢に対する影響。Chemotherapy 33(S-7): 88~99, 1985
- 8) 沢 赫代, 小林とよ子, 神野英毅, 渡辺邦友, 上野一恵, 中島光好: Cefixime(CFIX)の健康成人の腸内細菌叢に対する影響。Chemotherapy 33(S-6): 169~179, 1985
- 9) ROLFE, R. D. ; S. HELEBIAN and S. M. FINEGOLD : Bacterial interference between *Clostridium difficile* and normal fecal flora. J. Infect. Disease 143: 470~475, 1981

THE EFFECT OF TE-031 (A-56268) ON BACTERIAL FLORA IN THE INTESTINAL
TRACTS OF HEALTHY MALE VOLUNTEERS

KUNITOMO WATANABE, HARUKI SAWAMURA, KAKUYO SAWA, NAOKI KATO,
KAZUKIYO YAMAOKA, MAKOTO AOKI and KAZUE UENO
Institute of Anaerobic Bacteriology, School of Medicine, Gifu University, Gifu

We examined the effect of TE-031 (A-56268), a new macrolide, on the fecal flora of five healthy male volunteers given 400 mg of TE-031 b.i.d. for 7 days.

There was a slight decrease in the total number of anaerobic and aerobic bacteria in feces during the administration of TE-031. There was also a qualitative change in flora. *Bifidobacterium* spp. promptly disappeared following administration, but reappeared immediately after withdrawal of the drug. Among the *B. fragilis* group, *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* became dominant instead of *B. vulgatus* during and after administration.

Bacteria of the *Fusobacterium mortiferum*-*F. varium* group increased during or after drug administration. Among *Enterobacteriaceae*, *E. aerogenes* and *C. freundii* became dominant during or after administration instead of *E. coli*. In 2 of 5 cases, outgrowth of *C. difficile* was temporarily noted, though without diarrhea.