

## RU 28965の健康成人の腸内細菌に及ぼす影響

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

新しいマクロライド系化学療法剤 RU 28965のヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響を、成人男子6名のボランティアを用いて検討した。

ボランティアに1回150 mg 1日2回の29回投薬を行い、投薬前、投薬中および投薬中止後4週目まで計8回にわたり糞便の定量培養を行った。ボランティアにより程度の差は認められたが、投薬開始後8日、投薬終了時または投薬終了後1週目をピークとする菌数の減少がみられた。その減少の程度は投薬前の嫌気性菌総菌数と好気性菌総菌数の1/10から1/1000程度にとどまった。細菌叢の質的变化では、特に *Bifidobacterium* spp. の早期消失と回復の遅れが観察された。本薬剤投薬による偽膜性腸炎の原因菌とされる *C. difficile* の異常増殖は、検査期間中は認められなかった。

RU 28965は、フランス、Roussel Uclaf社で開発された(エリスロマイシン(EM)類似の)経口マクロライド系の化学療法剤である。今回、著者らはRU 28965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ボランティア6名で、試験開始の3ヵ月前よりいかなる抗菌物質の投薬も受けていない者とした。対象者の年齢、体重はTable 1に示した。

## 2. 使用薬剤

RU 28965の1日300 mgを朝、夕2回に分けて15日間連続で経口投与した。

## 3. 糞便中細菌叢の検索

RU 28965の投薬開始後、連日便の性状を観察し、薬剤投薬6日前、投薬中2回(2日目と8日目)、投薬後5回(終了日、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後)の計8回にわた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、空気をできる限り追い出した後よく混合し、Anaerobic chamber内に持ち込んだ。その約1gをとり、上野の希釈液にて10倍糞便希釈液を作成し、これをさらに希釈液にて10倍希釈法にて $10^{-8}$ 倍まで希釈した<sup>1)</sup>。各々の糞便希釈液の0.05 mlまたは0.1 mlを非選択培地と *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布し、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* 選択培地ともAnaerobic chamber内で37°C、48~72時間嫌気培養した。

Anaerobic chamber (Forma社)は3種混合ガス(H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 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。

## 4. 培地

## 1) 好気性菌用培地

GAM 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。

PEA 血液寒天培地; グラム陽性球菌の菌数算定のための参考とした。

EF 培地(日水製薬); *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。

*Candida* GE 寒天培地; Yeast 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)およびGAM寒

Table 1 List of volunteers

Volunteer	Age	Body weight (kg)
A	21	63
B	22	62
C	21	61
D	22	56
E	24	61
F	22	60

天培地；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。

Lactobacillus selective agar；FINEGOLD らの処方に従った。*Lactobacillus* spp. の菌数を算定した<sup>2)</sup>。

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。

*Bifidobacterium* 寒天培地；*Bifidobacterium* spp. の存在の確認に用いた。

10%卵黄液(生理食塩水：卵黄 = 1:1)加 CW 寒天培地(Kanamycin 含有)；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<sup>1)</sup>。

Gentamycin-Vancomycin 加 Brucella 寒天培地も参考にした。

## 5. 同定

各選択培地上の集落の特徴，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所見に基づき属を決定した<sup>1)</sup>。

## 6. 糞便中の *C. difficile* 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. RU 28965の糞便内細菌叢への影響

RU 28965の経口投与による糞便内細菌叢の変化は Fig. 1～6 に示した。

#### 1) ボランティア A について

ボランティア A では本薬剤投薬開始後嫌気性菌は減少傾向にあり，また好気性菌でも1/1000程度の菌数の減少をきたし，投薬終了1週目に最低の菌数を示した。その後嫌気性菌および好気性菌数は増加傾向を示した。

投薬により *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. が比較的速やかに減少し，*B. fragilis* group は投薬中止後1～2週目に消失した。*Fusobacterium* spp. は投薬中止後速やかに出現し，ついで *B. fragilis* group, *Lactobacillus* spp. の順で出現した。*Bifidobacterium* spp. の回復は遅れた。

好気性菌では，投薬前に優位であった *Bacillus* spp. は

投薬終了時には消失し，その後終了2週目に一過性に出現した後，検出されなくなった。*Enterobacteriaceae* も投薬により速やかに減少したが，投薬中止により速やかに増加し，優勢菌種となった。*Enterococcus* spp. は投薬によりいったん1/1000に減少したが，その後その菌数を維持した。

#### 2) ボランティア B について

ボランティア B では本薬剤投薬開始後嫌気性菌は漸次減少し，投薬1週後に最低で1/100程度となり，その後回復傾向を示した。好気性菌では投与中1/100程度のわずかな菌数の減少をきたし，投薬終了とともに菌数は漸次投薬前の菌数に回復した。

投薬期間中，嫌気性菌では *B. fragilis* group は菌数の減少をきたしたが，常に優位で存在した。しかし，*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. は検出限界以下に減少した。また投薬終了時に *F. varium*-*F. mortiferum* group が一過性に検出された。一方，好気性菌では投薬期間中 *Enterobacteriaceae* が菌数の減少をきたしたが常に優位で存在した。また投薬終了直前に *Enterococcus* spp. の著しい減少が認められた。

#### 3) ボランティア C について

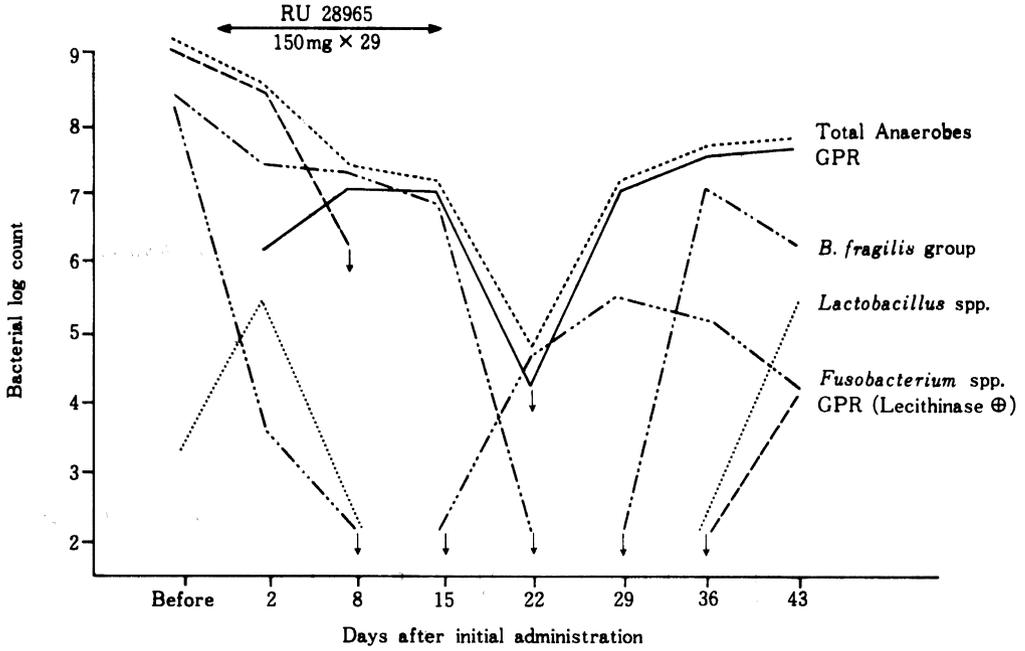
ボランティア C では本薬剤投薬開始後嫌気性菌が一時的に1/10程度増加したが，その後減少して投薬8日目に最低の菌数となり，その後は増加し，横這い状態の菌数推移となった。好気性菌では菌数の減少は認めなかった。投薬期間中，嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp. が検出限界以下となり，投薬終了後4週目にも依然回復しなかった。*F. varium*-*F. mortiferum* group は投薬とともに菌数が増加し，投薬終了時には最優勢菌種となった。*C. perfringens* が投薬終了3週目に出現し，4週目には10<sup>6</sup> cfu/gにも達した。好気性菌では投薬開始後8日と終了2週目に *Bacillus* spp. が最優勢菌種となったが，*Enterobacteriaceae* と *Enterococcus* spp. は常に安定した菌数を維持した。

#### 4) ボランティア D について

ボランティア D では本薬剤投薬開始後嫌気性菌の顕著な減少が認められ，投薬終了日に最低の菌数を示した。その後次第に増加傾向を示し，投薬終了後4週目には投薬前の菌数に戻った。しかし，好気性菌は一時的にわずかな菌数の減少をきたしたのみでほぼ横這い状態であった。投薬期間中，嫌気性菌では *B. fragilis* group が優位菌種であった。*Bifidobacterium* spp. や *Lactobacillus* spp. は投薬後速やかに検出限界以下になり，*Bifidobacterium* spp. は投薬終了4週目でも検出できなかった。投薬終了後2～3週目にかけて *Clostridium* spp.(lecithinase 陽性)が一過性に出現し，4週目でやや減少した。好気性菌では

Fig. 1 Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteer given RU 28965 (Volunteer A)

Anaerobes



Aerobes

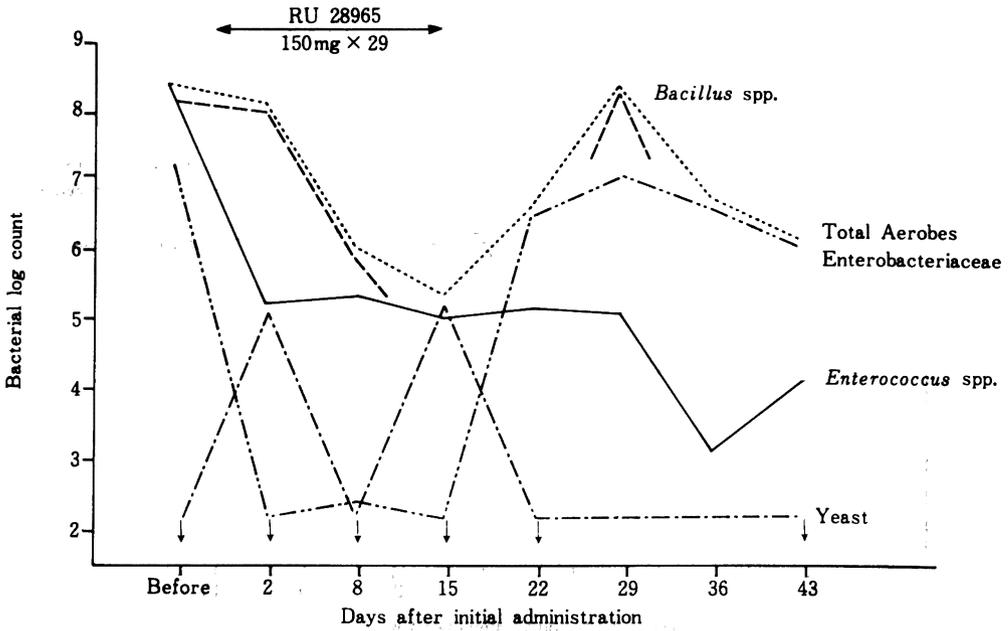


Fig. 2 Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteer given RU 28965 (Volunteer B)

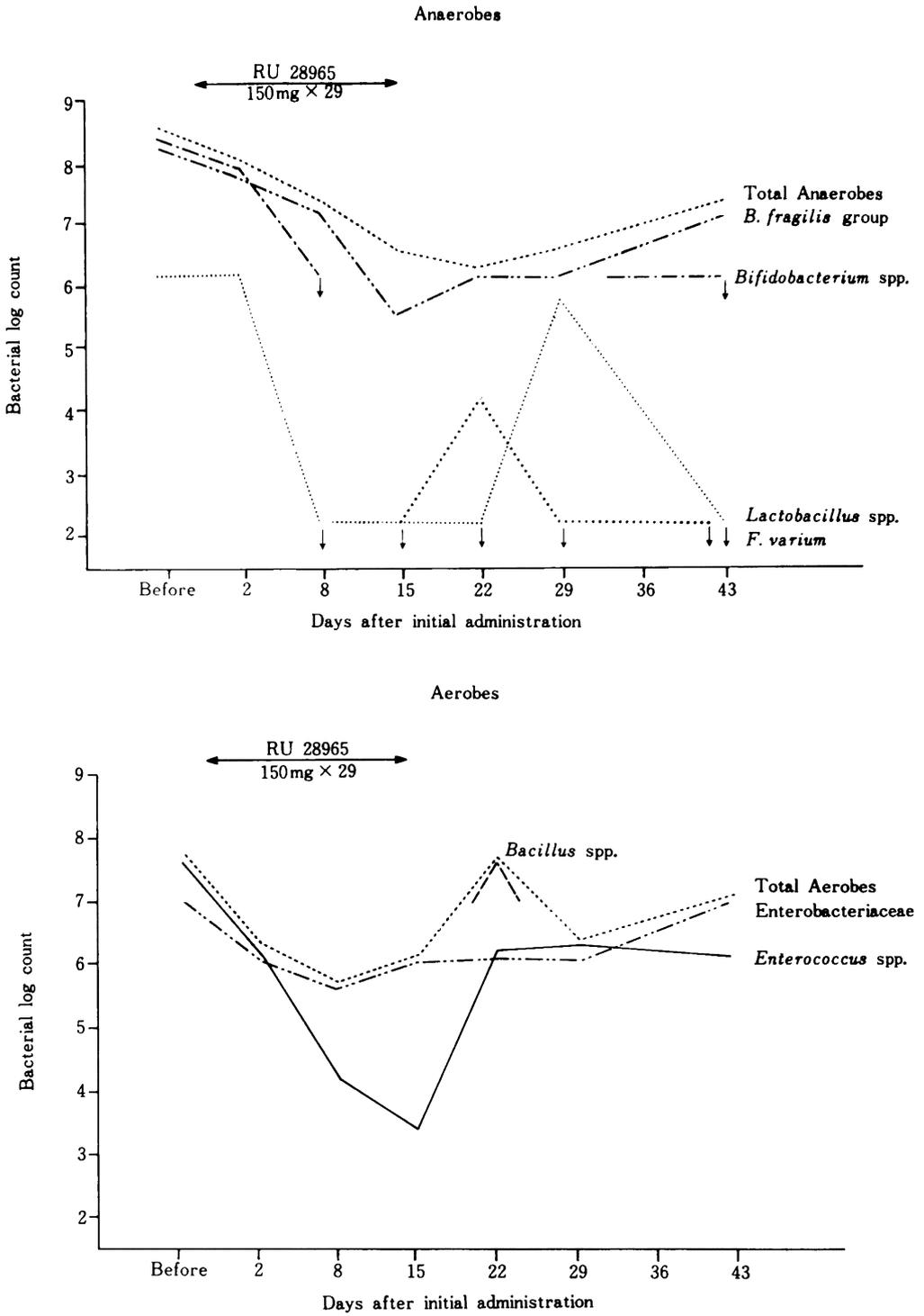


Fig. 3 Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteer given RU 28965 (Volunteer C)

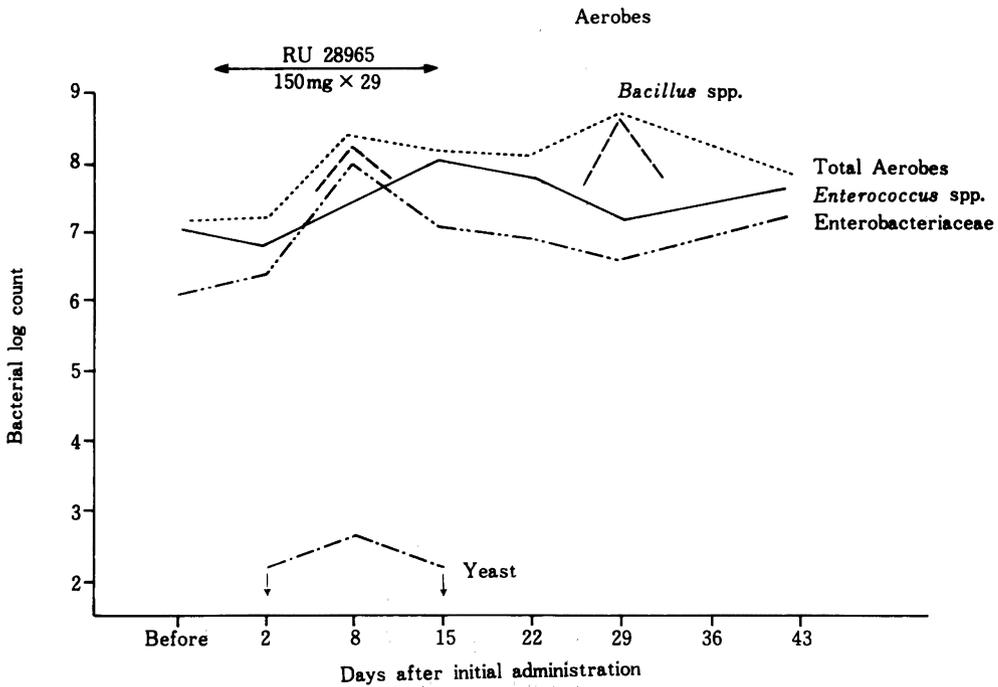
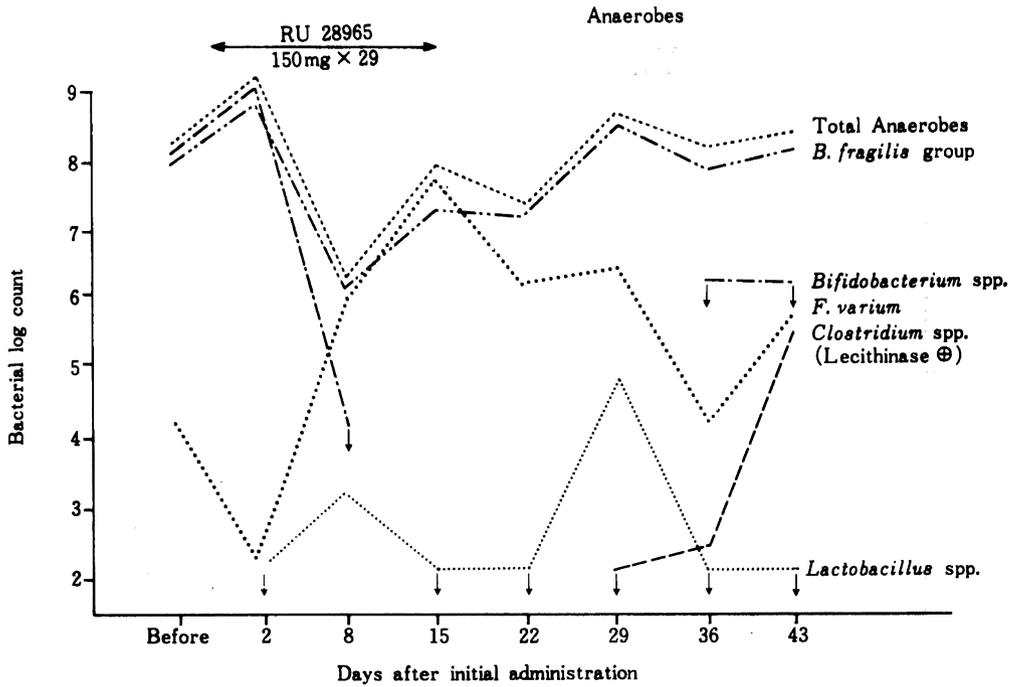


Fig. 4 Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteer given RU 28965 (Volunteer D)

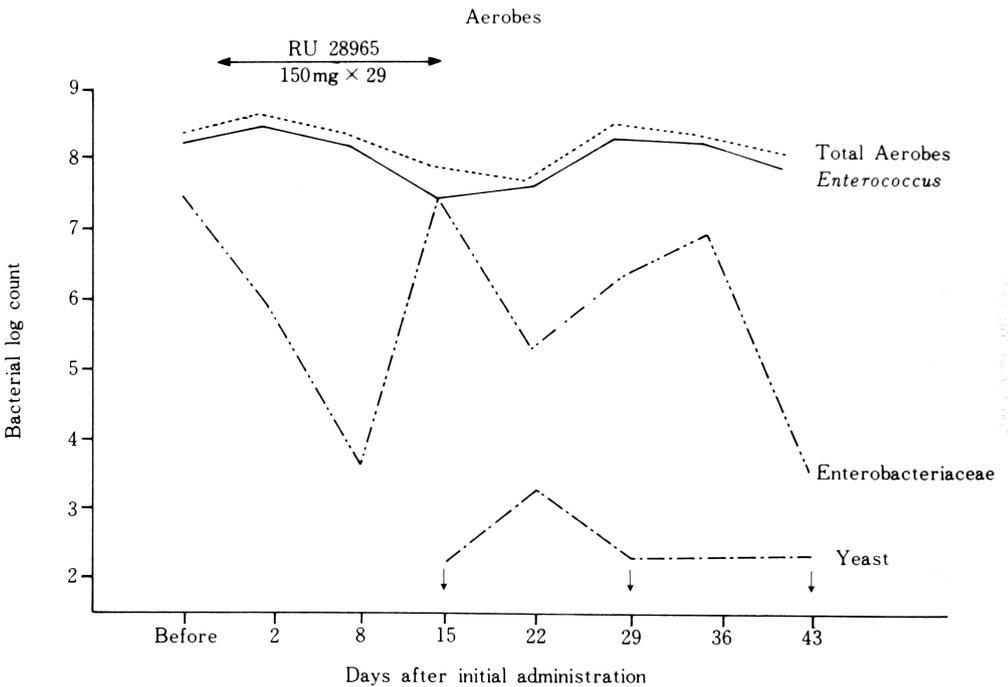
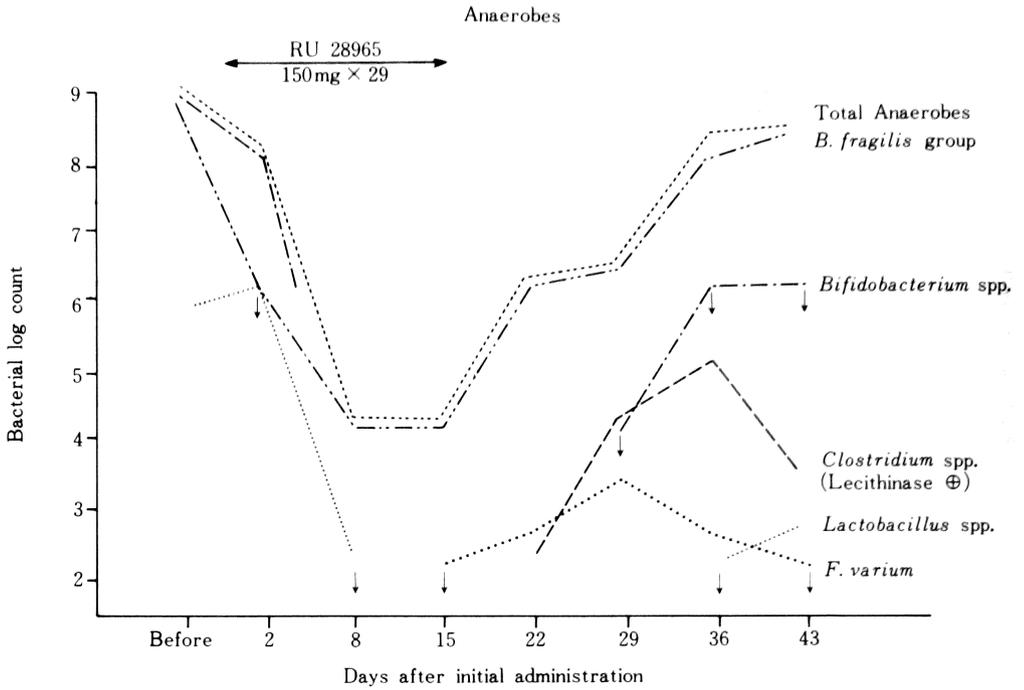


Fig. 5 Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteer given RU 28965 (Volunteer E)

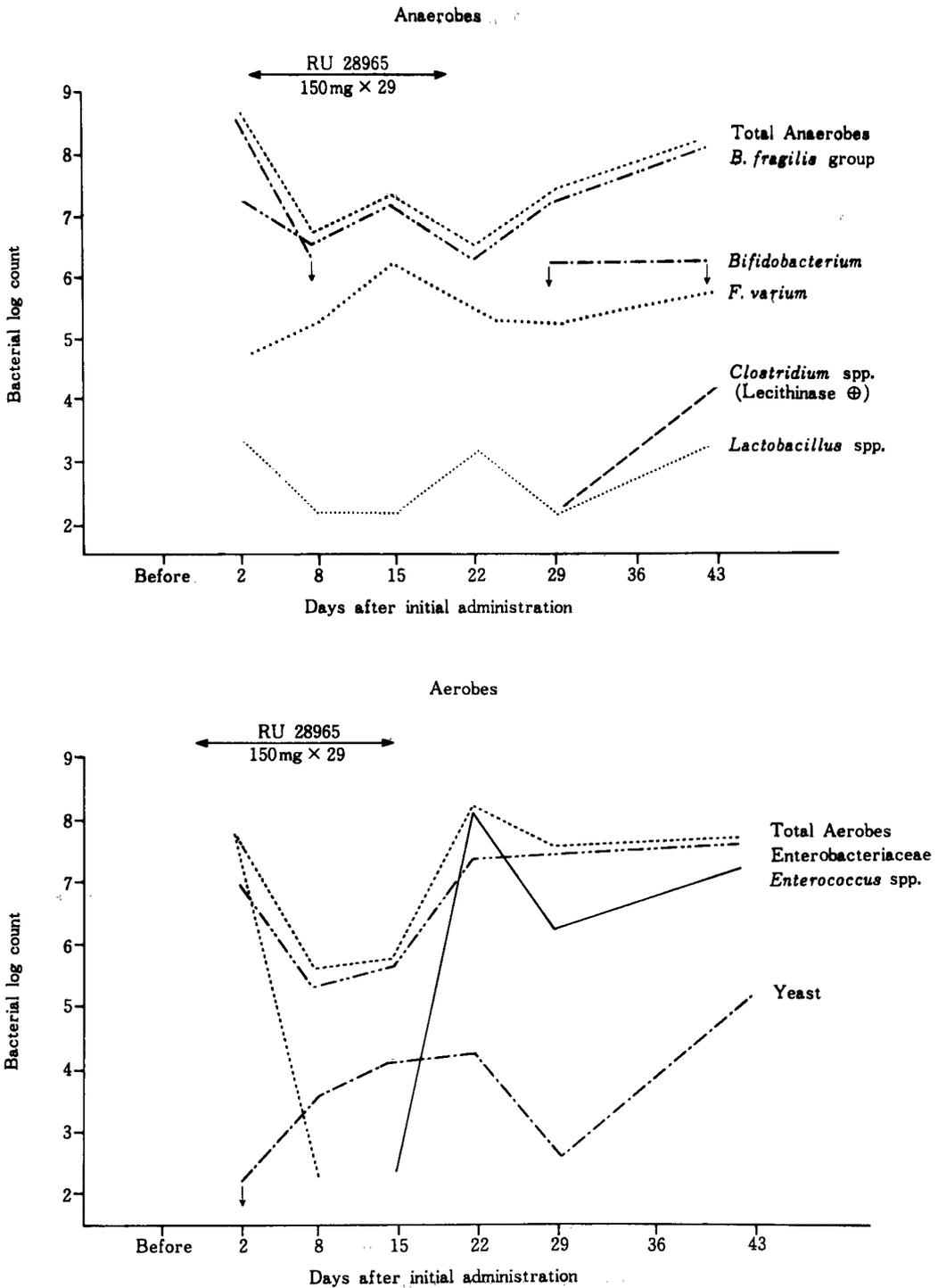
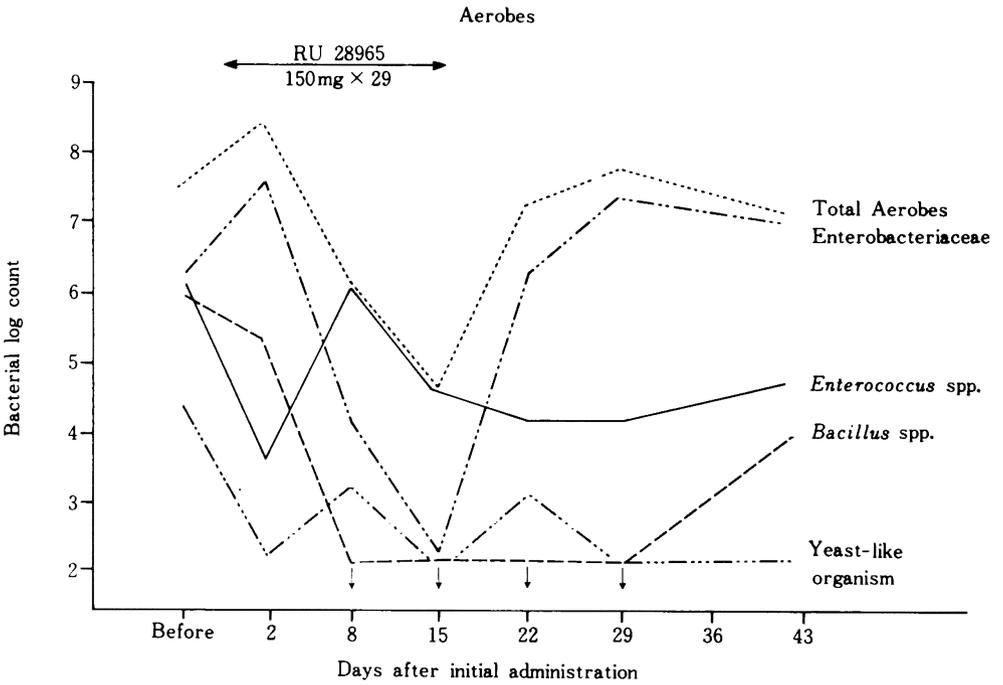
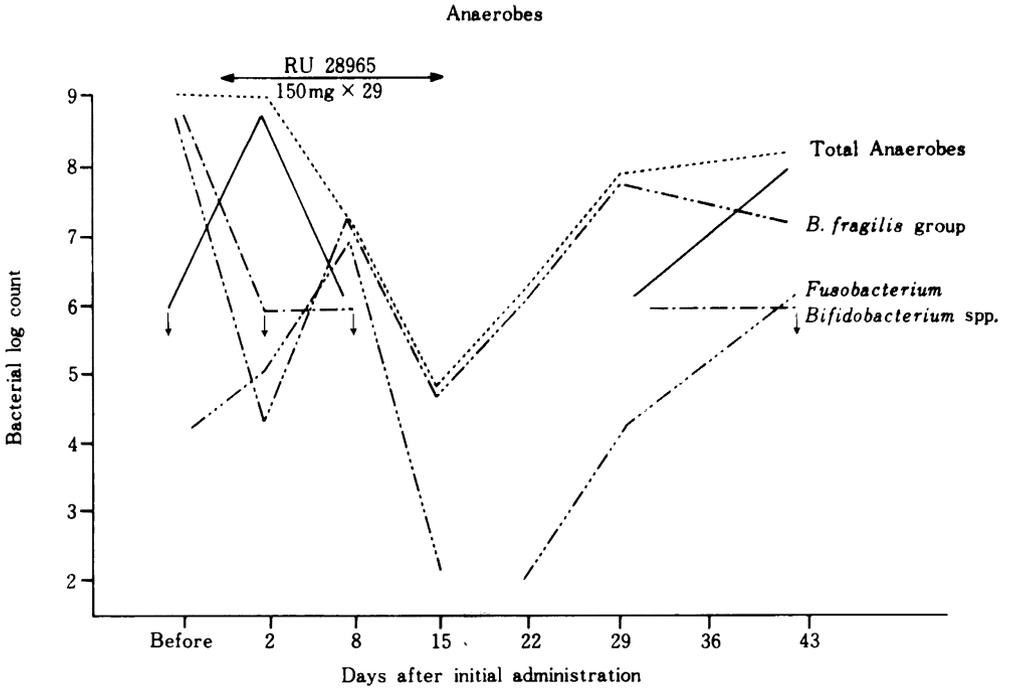


Fig. 6 Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteer given RU 28965 (Volunteer F)



*Enterococcus* spp. が常に優勢菌種の状態を維持し、逆に *Enterobacteriaceae* の著しい菌数の増減を見た。

#### 5) ボランティア E について

ボランティア E では投薬 8 日目から投薬終了にかけて嫌気性菌の総菌数が最低  $10^5$  cfu/g となり、その後投薬終了 1 週ころまで  $10^6 \sim 10^7$  cfu/g の菌数を維持した。しかし投薬終了 3 週目にはほぼ元の菌数に戻った。この間、*B. fragilis* group は常に最優勢菌であった。*Bifidobacterium* spp. は投薬 8 日目で優勢菌の中には見られなくなり、投薬終了 3 週目でも回復しなかった。*F. varium*-*F. mortiferum* group は検査期間を通して認められ、嫌気性菌総菌数が最低になる時期と一致し、反対に最高の菌数を示した。好気性菌の総菌数も投薬 8 日目から投薬中止時に最低  $10^5$  cfu/ml 程度となり、中止 1 週目で速やかに元の菌数に回復した。*Enterobacteriaceae* が常に優勢の菌種であった。*Enterococcus* spp. では投薬による顕著な菌数の減少が認められたが、投薬中止 1 週目で元に戻った。投薬による *Candida* の増加、定着が認められた。

#### 6) ボランティア F について

ボランティア F では本薬剤投薬終了時に嫌気性菌、好気性菌ともに菌数は最低となり、投薬終了後嫌気性菌数および好気性菌数は漸次増加の傾向を示した。投薬期間中、嫌気性菌では *Bifidobacterium* spp. が消失した。*B. fragilis* group は投薬 2 日目には一時激減したが、その後細菌叢の優位を占めた。*F. varium*-*F. mortiferum* group は投薬開始とともに増加したが、投薬終了時には検出限界以下となった。好気性菌では *Enterobacteriaceae*

が投薬開始とともに減少し、投薬中止とともに回復してきた。*Bifidobacterium* spp. も投薬終了 4 週目でも出現しなかった。

#### 2. RU 28965 投与による糞便の形状の変化と糞便内

##### *C. difficile* および *C. difficile* D-1 毒素の検出

すべてのボランティアにおいて、投薬中および投薬後の糞便が投薬前の状態より堅くなる現象が観察された。したがって、下痢便は全く認められなかった。ボランティア A から F まで投薬前から投薬後 4 週目まで、いずれの被験者の糞便からも *C. difficile* の分離および D-1 毒素の検出は陰性であった (Table 2)。

### 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。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。

RU 28965 はフランス、ルセル・ユクラフ研究所で創製された Erythromycin A の 9 位のケトン基を 2-メトキシ-エトキシ-メチルオキシムで置換したものである。本薬剤の特徴として、その胃酸抵抗性、良吸収性、半減期が長い点が挙げられ、エリスロマイシンと類似の抗菌スペクトラム、抗菌作用を示すことが知られている<sup>3)</sup>。著者らの検討では、RU 28965 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<sup>4)</sup>。特に糞便中に  $10^8$  cfu/g 以上存在する *B. adolescentis* を 0.05  $\mu$ g/ml 以下の濃度で発育阻止した。また *B. fragilis*

Table 2 Detection of *C. difficile* in fecal contents of healthy volunteers

Volunteer	Medication Organism	Before	During		After				
			day 2	day 8	day 1	day 8	day 15	day 22	day 29
A	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—
B	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—
C	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—
D	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—
E	<i>C. difficile</i>	N.D.	—	—	—	—	—	N.D.	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	N.D.	—	—	—	—	—	N.D.	—
F	<i>C. difficile</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>C. difficile</i> D-1 toxin	—	—	—	—	—	—	—	—

N.D. : Not done

groupの発育を1.56  $\mu\text{g/ml}$  から50  $\mu\text{g/ml}$  ( $10^8$  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3.13から6.25  $\mu\text{g/ml}$  ( $10^8$  cfu/ml 接種)で阻止した。しかし *F. varium*-*F. mortiferum* groupの発育を阻止するには100  $\mu\text{g/ml}$  以上 ( $10^8$  cfu/ml 接種)を必要とした。このRU 28965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*の投薬による速やかな減少、*Fusobacterium* spp.の投薬によるあるいは中止後の増加など、MICの成績から予測できる細菌叢の変化が観察された。特に本薬剤の *Bifidobacterium* spp.に対する著しく強い抗菌作用は、ボランティアの糞便中への *Bifidobacterium* spp.の回復が著しく遅れたことと関係しているように考えられた。

また *B. fragilis* groupは糞便内の薬剤濃度が高いと考えられる投薬中あるいは投薬中止時に最も少ない菌数を示し、投薬中止により速やかに菌数が増加する傾向を示した。RU 28965は糞便内に常在する *Enterobacteriaceae*の菌種に対しても弱い抗菌作用しか示さない。*Enterobacteriaceae*は投薬が進むにつれてやや菌数が減少し、投薬中止時に最低に菌数を示す傾向にあった。すなわち、糞便内薬剤濃度が高いと思われる時期に最低の菌数を示したが、投薬中止により速やかに元の菌数に戻る傾向を示した。データには示さなかったが、*B. fragilis* groupの菌種レベルの変化を検討したところ、各被験者において優位菌種がめまぐるしく変化し、菌交代現象が生じている事が予想された。しかし、すべての被験者にある特定の *B. fragilis* groupが変化するなどの共通した変化は確認されなかった。

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。ひとつは外因説であり、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、定着そして増殖することがきっかけとなるのが外因説であり、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のが内因説である<sup>5)</sup>。

今回のボランティアでは *C. difficile*の増殖が認められなかった。また下痢を訴えたボランティアは認められず、また送付された糞便の肉眼的所見でも、むしろ本薬剤投薬により糞便は固くなる印象を受けた。岡田らは、Sultamicillin投薬のヒト糞便内細菌叢の影響を検討した際、Sultamicillin投薬を受けたボランティアに軟便化傾向の

あったことを記載したが、この薬剤では逆の現象が観察された。著者らの Bay o 9867, Cefiximeにおける経験では、健康成人に各種化学療法剤を投薬することで、何等の自覚的症狀を伴わないで、その約半数に *C. difficile*が検出されるのが常であったが<sup>6-8)</sup>、この薬剤では検査期間中一度も *C. difficile*の検出はできなかった。

以上の成績から、RU 28965の1日300 mg 2分29日間経口投与は、投薬8日、投薬終了時および終了1週目をピークとする嫌気性菌総菌数および好気性菌総菌数の若干(1/100程度)の減少を引き起こすことが知られた。その菌叢の変化を見ると *Bifidobacterium* spp.の減少が顕著で、2週間の投薬では中止後3週目でも投薬前の状態に回復しなかった。また肉眼的に、この試験期間ボランティアの糞便が次第に固く(水分が少なく)なる傾向を観察した。*Fusobacterium* spp., *B. fragilis* group間の菌種レベルの複雑な変化も観察された。

## 文 献

- 1) 鈴木祥一郎, 上野一恵監修:臨床嫌気性マニユアル。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
- 2) V. L. SUTTER et al.: Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 4ed. Star Publishing Company, California, 1985
- 3) 第35回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウムIV. RU 28965, 盛岡, 1987
- 4) 加藤直樹他:RU 28965の嫌気性菌に対する *in vitro* および *in vivo* 抗菌力に関する研究。Chemotherapy 投稿中
- 5) 上野一恵, 渡辺邦友, 小林とよこ: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, 小林とよこ, 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, 他: 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, 他: 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) 岡田敬司, 他: Sultamicillin 連続投与時の体内動態および腸内細菌叢に及ぼす影響。感染症学雑誌 59(7): 749~765, 1985

## EFFECT OF RU 28965 ON INTESTINAL BACTERIAL FLORA IN HEALTHY ADULTS

KUNITOMO WATANABE, KAKUYO SAWA, HARUKI SAWAMURA, KAZUKIYO YAMAOKA, MAKOTO AOKI,  
NAOKI KATO and KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, School of Medicine, Gifu University

We investigated the effect of a new macrolide chemotherapeutic agent, RU 28965, on human intestinal bacterial flora in 6 male volunteers. The drug was administered at a daily dose of 300 mg in two doses, totalling 29 times. Quantitative culture of stools was conducted eight times altogether: at pre-administration, during treatment and up to the fourth post-administrative week.

Reduction in the bacterial count reached a peak 8 days after initiation of treatment, at completion of the treatment or one week later, though individual differences were observed. The reduction rate of the total anaerobic and aeromicrobial counts was from 1/10 to 1/1000 as compared with pre-administration. As a qualitative change in flora, early disappearance and delayed recovery of *Bifidobacterium* spp. was particularly observed.

No abnormal growth of *C. difficile*—regarded as a causal bacterium of pseudomembranous enteritis—was observed during the treatment.