

T-3262 のヒト糞便内細菌叢におよぼす影響

渡辺邦友・加藤直樹・武藤吉徳
 沢 赫代・沢村治樹・上野一恵
 岐阜大学医学部付属嫌気性菌実験施設*

新ピリドンカルボン酸系の抗菌剤である T-3262 の1日 450 mg の7日間投与がヒト腸内細菌叢におよぼす影響を検討した。

本剤投与は、検査期間中常に嫌気性菌優位の細菌叢を呈し、総菌数に大きな影響を及ぼすことはなかった。しかし細菌叢の変動を見ると、好気性菌の細菌叢の変化が嫌気性菌のそれらの変化より顕著であった。嫌気性菌では、T-3262 投与による *Bacteroides fragilis* group の変動は殆どなく、*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. の菌数のわずかな減少が観察されたのみであった。好気性菌では *Enterobacteriaceae* の抑制が強く、*Micrococcaceae* が優勢に存在する傾向を示し、好気性菌の細菌叢の回復も遅れ、T-3262 の好気性菌叢への強い影響が示唆された。尚、本薬剤投与中および投与後の糞便中に *Clostridium difficile* (*C. difficile*) D-1 毒素は検出されず、また *C. difficile* も分離できなかった。

Key words: T-3262, ピリドンカルボン酸, ヒト糞便内細菌叢, Phase I 臨床試験

T-3262 は富山化学工業株式会社で開発された新しいピリドンカルボン酸系の抗菌剤である。著者らは本薬剤の経口投与がヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響を6名のボランティアを用いて検討した。

I. 材料と方法

1. 被験者

成人男子6名(年齢 34 歳~42 歳, 体重 58 kg~75 kg)を対象とした(Table 1)。

2. 使用薬剤

T-3262 の 150 mg を1日3回(合計 450 mg)を7日間連続食後経口投与した(Fig. 1)。

3. 糞便中 T-3262 濃度の測定

T-3262 投与中に2回(4/12 と 4/14)と投与終了後に3回(4/18 と 4/21 と 4/24)の計5回、糞便中の T-3262 の濃度を Bioassay 法および高速液体クロマトグラフィーにより測定した(Fig. 1)。

4. 糞便中細菌叢の検索

T-3262 の投与開始後、連日糞便の性状を観察し、薬剤投与前、投与中2回、投与後5回の計8回に亘り糞便の定量培養を実施した(Fig. 1)。

自然排出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 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、これをさらに希釈液で10倍希釈法にて 10^8 倍まで希釈した¹⁾。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 *Clostridium difficile* (*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した。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、その他の培地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 Microcult A (メルク, 関東化学扱い)を用いて嫌気的環境を作製した。

5. 培地

1) 好気性菌用培地

Trypticase Soy 血液寒天培地; 好気性菌の総菌数を

Table 1. List of healthy human volunteers

Volunteer	Age (years)	Weight (kg)
A	34	58
B	37	59
C	35	68
D	42	64
E	38	70
F	36	75

* 〒500 岐阜市司町 40

Date	4/9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	≈ 4/21	≈ 4/24	≈ 4/30	≈ 5/8	≈ 5/15
Oral administration 150mg×31day		↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑					
Collection of fecal specimens	○		○		○				○	○	○	○	○	○	○
Test for drug Concentration			○	○					○	○	○				
Test for microflora	○		○	○					○			○	○	○	○

Fig. 1. Time sequence of T-3262 administration and fecal collection.

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 aeruginosa* 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); 嫌気性菌総数と *Bifidobacterium* spp. の菌数を算定した。

Bacteroides Bile Esculin 寒天培地 (極東製薬); *Bacteroides fragilis* (*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²⁾。

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 産生性 *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¹⁾。

6. 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, Rap ID 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, ガスクロマトグラフィーによる代

謝産物の分析およびグラム染色にもとづき属を決定した¹⁾。

7. 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, 10,000 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。

8. 薬剤感受性試験

T-3262 投薬前の糞便と投薬後の糞便から分離した *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* および *B. fragilis* group の菌株を無作為に選び, T-3262 に対する感受性を化学療法学会標準法に準じて測定した。

II. 成績

1. T-3262 投与後の糞便中の薬剤濃度

ボランティア A~F について投薬中 (4/12 と 4/14) および投薬終了後 (4/18 と 4/21 と 4/24) の糞便中の T-3262 の濃度を測定しその成績を Table 2 に示した。

投薬中 (4/12) では, 全例で検出され, 最高 748.8 μg/g から最低 73.4 μg/g に分布した。同じく投薬中 (4/14) ではボランティア C を除く全例で検出され, 最高 627.8 μg/g~最低 280.2 μg/g に分布した。投薬後 (4/18) では, ボランティア C を除いたすべてから検出され, 最高 625.2 μg/g~最低 413.0 μg/g に分布した。投薬後 (4/21) では, ボランティア A の 1 例のみに検出され, その値は 10.8 μg/g であった。投薬後 (4/24) では全例で検出されなかった。

2. T-3262 の糞便内細菌叢への影響

T-3262 の経口投与による糞便内細菌叢の変化は Fig. 2~13 に示した。

1) ボランティア A について

この例では, 本薬剤投与により嫌気性菌の総菌数は殆ど影響を受けなかった。しかし好気性菌の菌数は投薬中 (4/14) に減少したが, 投薬中止とともに速やかに投薬前の菌数に戻った。 *B. fragilis* group は投薬による影響を殆ど受けなかったが, *Lactobacillus* spp., *Bifido-*

Table 2. Fecal concentration of T-3262

Administration Date Volunteer	During		After		
	4/12	4/14	4/18	4/21	4/24
A	73.4*	627.8	542.0	10.8	N.D.**
B	229.8	340.6	625.2	N.D.	N.D.
C	285.6	N.T.***	N.T.	N.T.	N.T.
D	748.8	496.8	578.8	N.D.	N.D.
E	131.2	280.2	459.8	N.D.	N.D.
F	298.6	283.0	413.0	N.D.	N.D.

* Fecal concentration ($\mu\text{g/g}$) of T-3262. T-3262 was given orally at a dose of 150 mg 3 times a day for 7 days.

** N.D. : Not detected

*** N.T. : Not tested

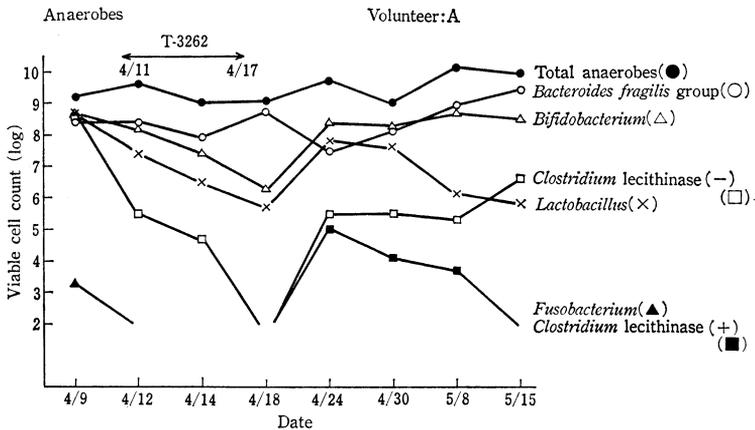


Fig. 2. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

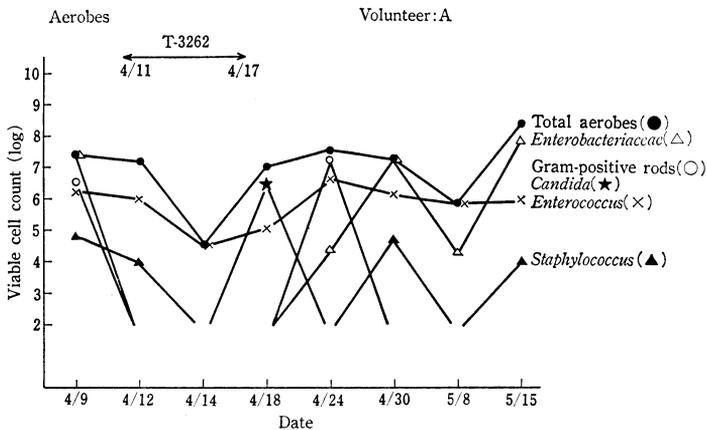


Fig. 3. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

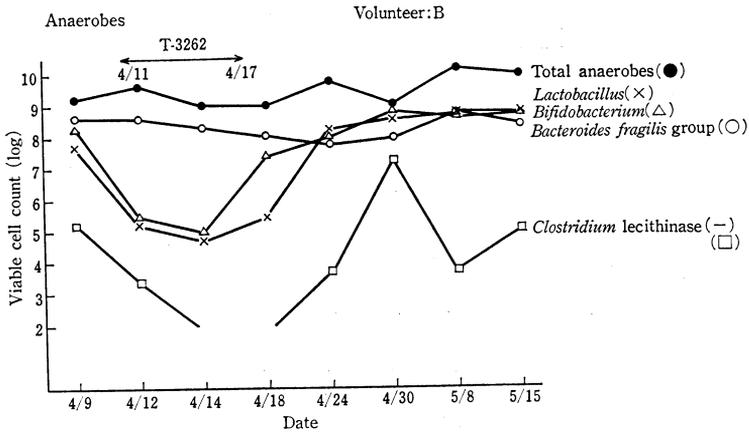


Fig. 4. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

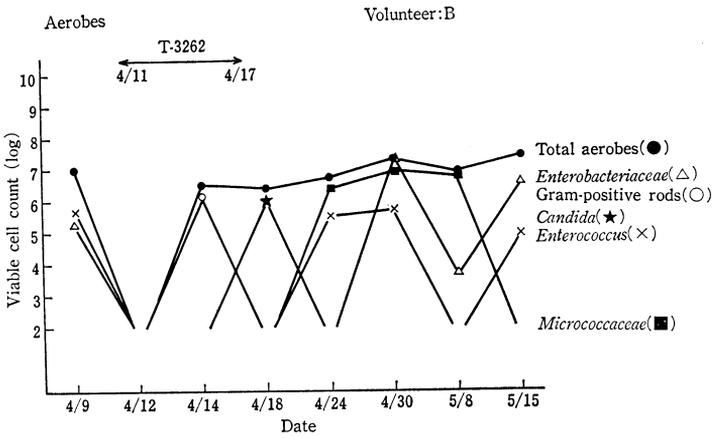


Fig. 5. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

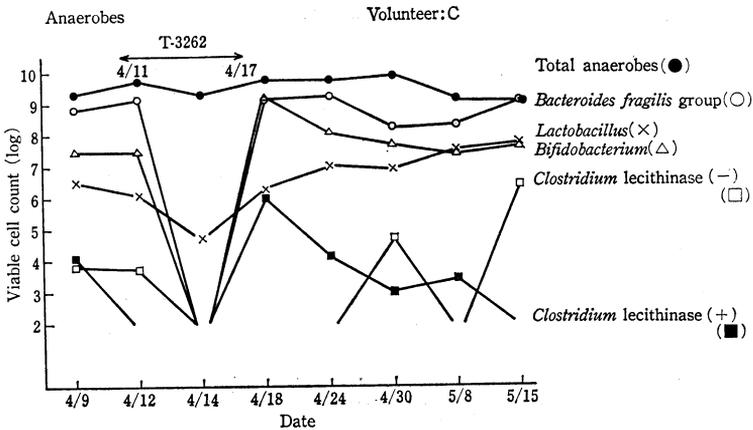


Fig. 6. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

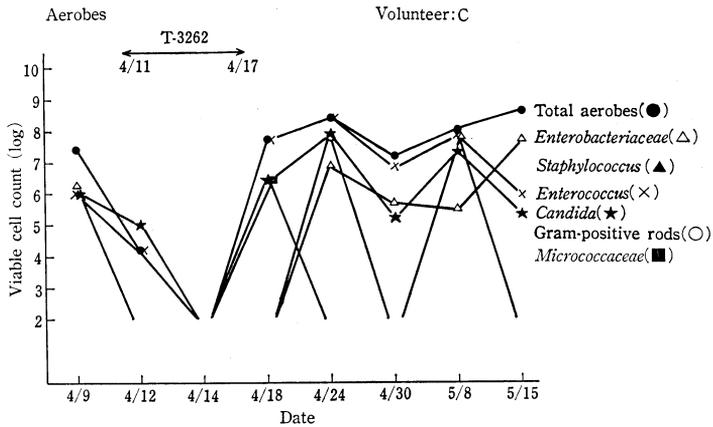


Fig. 7. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

bacterium spp. は投薬により僅かに減少傾向がみられ、投薬中止直後に最低の菌数を示した。しかし、これらはその後速やかに投薬前の菌数に戻った。さらに、*Clostridium* spp. (lecithinase+) が投薬後に新しく出現した。*Enterobacteriaceae* および *Staphylococcus* は、投薬により消失し、投薬中止後2週目に再度出現した。また *Enterococcus* spp. は投薬中にやや菌数が減少したが、検査期間をとおして検出された。

2) ボランティアBについて

この例では、本薬剤投与開始によっても嫌気性菌の総菌数には殆ど変動が認められなかった。好気性菌の総菌数は投薬開始後(4/12)に一時は検出限界以下となったが、さらに投薬を継続した2日後(4/14)にはほぼ元の菌数に戻った。追跡した菌種、菌群いずれも投薬による影響は少なかったが、*Lactobacillus* spp., *Bifidobacte-*

rium spp. は投薬により一時 1/10,000 程度の菌数の減少を来した。*B. fragilis* group の菌数の変化は軽微であった。投薬により *Enterobacteriaceae* は消失したが、投薬中止後2週目に再度出現した。*Enterococcus* spp. も *Enterobacteriaceae* と類似の変化を示したが、投薬中止1週目には再出現した。投薬中にグラム陽性桿菌、*Candida* spp. が、投薬後に *Micrococcaceae* の出現を見た。

3) ボランティアCについて

この例では、本薬剤投与開始によっても嫌気性菌の総菌数は殆ど変動しなかった。好気性菌の総菌数は投薬により減少し、投薬中(4/14)は検出限界以下の菌数であった。しかし投薬中止により、速やかに投薬前の菌数に戻った。

投薬中に、*B. fragilis* group, *Bifidobacterium* spp.

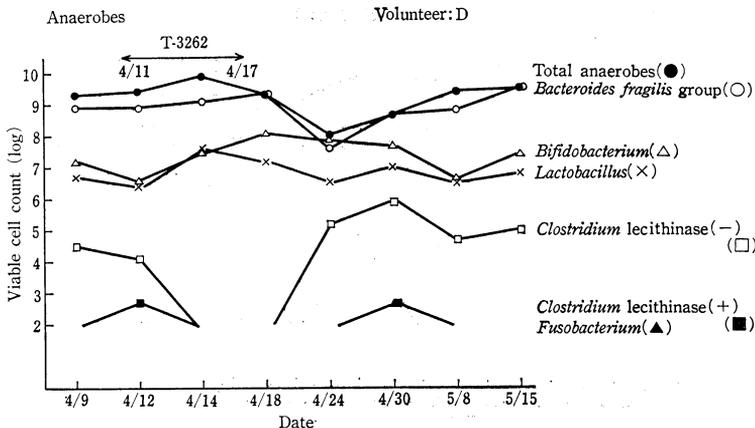


Fig. 8. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

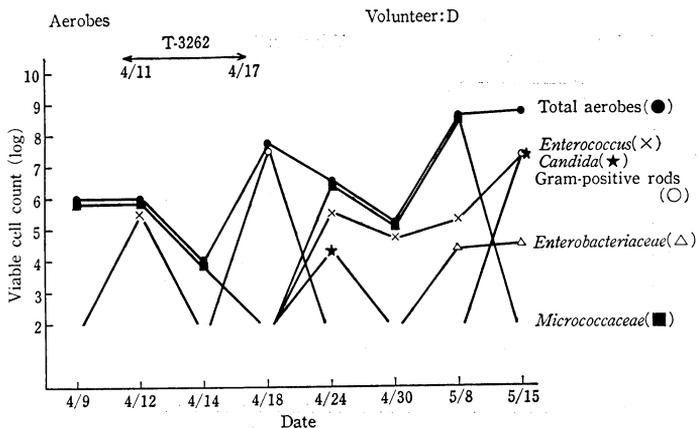


Fig. 9. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

の菌数はいずれも一時検出限界以下となった。また *Lactobacillus* spp. も減少したが、投薬中止により速やかに元の菌数に回復する傾向を示した。

この例では、投薬前存在した *Clostridium* spp. (lecithinase+) が投薬により減少消失し、投薬中止により再出現した。投薬により *Enterobacteriaceae* の菌数は検出限界以下となった。しかし中止後1週目には再出現した。*Enterococcus* spp. は、投薬開始直後に菌数が減少し、投与継続とともに検出限界以下となったが、投薬終了時には再度出現し、以後安定に存続した。

4) ボランティアDについて

この例では、本薬剤投与開始によっても嫌気性菌総数の明らかな変化は認められなかった。ただ、投薬中止後1週目の菌数が投薬中の菌数よりやや低い傾向を示した。好気性菌の総菌数は、投薬中の4/14に最も低い値

を示したが、投薬中止とともに菌数は再び増加した、*B. fragilis* group, *Lactobacillus* spp., および *Bifidobacterium* spp. のいずれもその菌数に大きな変動は見られなかった。*Enterobacteriaceae* の菌数は投薬前から検出限界以下の細菌叢を呈したが、投薬中止後3週目に検出された。投薬開始直後に検出された *Enterococcus* spp. は、投薬継続により消失した。しかし中止後1週目には出現し、その後の菌数は安定して存在した。投薬中や投薬後に、グラム陽性桿菌, *Candida* spp., *Micrococcaceae* が優勢になる時が認められた。

5) ボランティアEについて

この例では、本薬剤投与開始によっても嫌気性菌総数の大きな変化は観察されなかった。好気性菌の総菌数は投薬により減少し、そして消失した。しかし投薬中止とともに速やかに菌数は投薬前の状態に戻った。

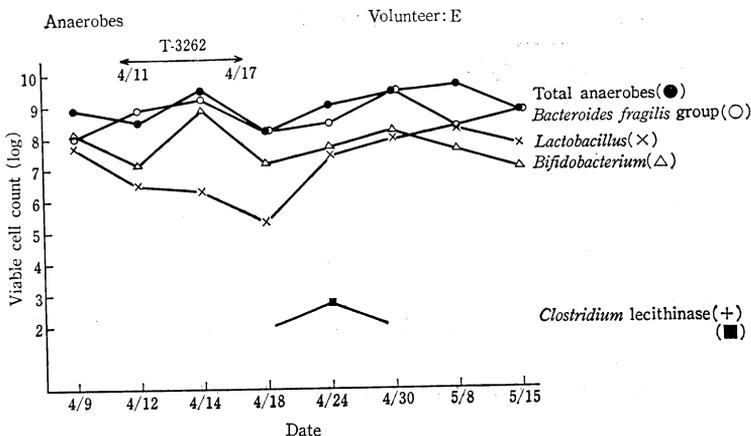


Fig. 10. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

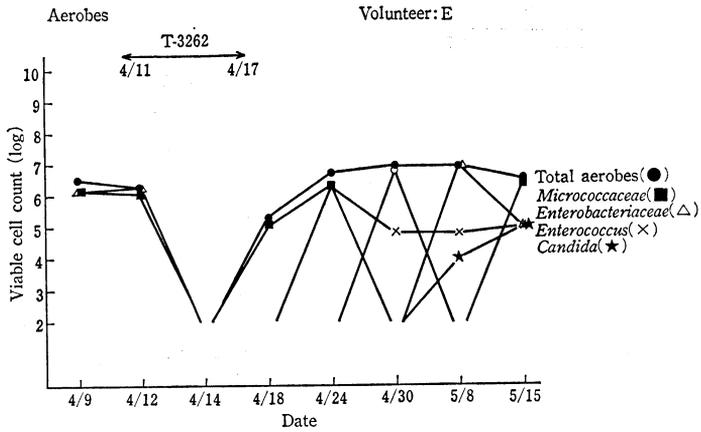


Fig. 11. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

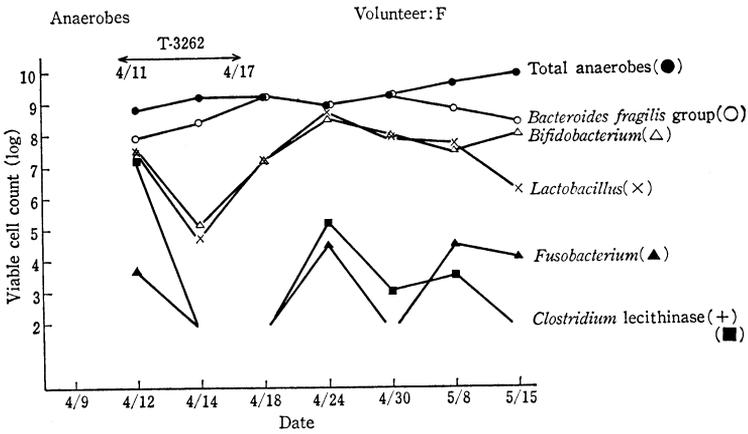


Fig. 12. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

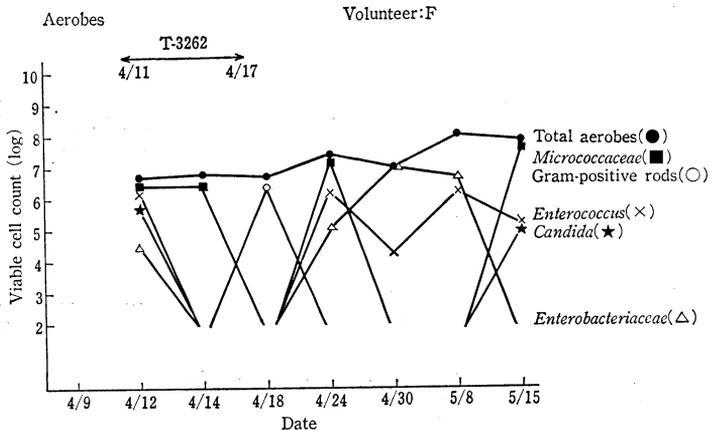


Fig. 13. Effect of T-3262 on fecal flora of healthy volunteers.

Table 3. Changing patterns of predominant *Bacteroides fragilis* organisms in feces

Administration Date Volunteer	Before	During		After			
	4/9	4/12	4/14	4/18	4/24	4/30	5/8
A	f f o t e	f f v v o	v v v u u	v v o t e	v d d x x	v d x x x	v v u u u
B	v v v d t	x x u u	x x x u u	d t o o o	f f f f d	x x x x u	f f v x x
C	v v t t t	v t t t t		v t t t t	d x t	f d x x x	v v v x x
D	f f v v t	v v t t t	f v v v t	v x x x t	v x o o	x x t	f v v x x
E		f f f f d	d t t t t	f d t t x	f v v	f x x x	
F	f v t t o	f v v t t	v v v x u	v v t t t	v v v u u	v v v v d	

f: *Bacteroides fragilis* v: *Bacteroides vulgatus* d: *Bacteroides distasonis*
 t: *Bacteroides thetaiotaomicron* o: *Bacteroides ovatus* u: *Bacteroides uniformis*
 e: *Bacteroides eggerthii* x: *Bacteroides* sp.

Table 4. Effect of T-3262 on outgrowth of *Clostridium difficile* in feces

Date Volunteer	Detection of <i>Clostridium difficile</i> and <i>Clostridium difficile</i> toxin							
	4/9	4/12	4/14	4/18	4/24	4/30	5/8	5/15
A	-* / -**	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
B	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
C	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
D	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
E	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
F	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

* Isolation of *Clostridium difficile* by CCMA media.
 ** Detection of *Clostridium difficile* toxin by CD check.

B. fragilis group, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. などいずれも投薬により僅かに減少中止直後には菌数は最低となり、再び速やかに投薬前のし、菌数に戻るという軽微な変化を呈した。投薬により *Enterobacteriaceae* は検出されなくなり、投薬中止後3週目には再度出現した。投薬中止後1週目に、それまで検出できなかった *Enterococcus* spp. が出現し、以後安定に存在した。

6) ボランティアFについて

この例では、本薬剤投与による嫌気性菌総菌数の変動は軽度であった。好気性菌の総菌数の変化も殆ど認められなかった。*Lactobacillus* spp. と *Bifidobacterium* spp. が投薬中に減少したが、*B. fragilis* group の菌数

の低下は顕著ではなかった。投薬中 *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. は検出限界以下となったが、両菌種とも投薬中止後1週目で再出現した。また中止後4週目に *Micrococcaceae* 優位の投薬前の状態に戻った。

3. *B. fragilis* group の菌種レベルの変化

各ボランティアの投薬前、中および後の糞便培養における BBE 寒天培地上の集落を5個とり菌種レベルの同定を実施し、その菌種レベルでの細菌叢の変化を Table 3 に示した。各ボランティアで *B. fragilis* group の菌種レベルでの質的な変動が認められた。

4. T-3262 投与による糞便内 *C. difficile* D-1 毒素の検出

6人のボランティアについて CCMA 寒天培地による

に対する MIC と今回の細菌叢の検索結果を比較すると、T-3262 の1日 450 mg 投与は、嫌気性菌の総菌数、優位菌群の一つである *B. fragilis* group をその糞便中濃度が最高となると考えられる投薬中止時に僅かに減少せしめたにとどまった。千田らは、すでに新ピリドンカルボン酸系の薬剤 ofloxacin について同様の検討を行い、ofloxacin は、好気性菌群を抑制したが、嫌気性菌の総菌数を殆ど変化させなかったと報告した⁵⁾。今回の T-3262 の結果はこれと同様の結果であった。

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の一つに化学療法剤で乱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^{6),7)}。著者らの検討では、T-3262 の *C. difficile* に対する MIC は、1.56~3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった⁹⁾。今回の5名のボランティアでは、いずれの時期においても *C. difficile* およびその毒素の検出は陰性であった。千田らは、ofloxacin の場合でも *C. difficile* は検出しなかったと報告したが、これと同様の結果であった⁵⁾。しかし同系統の薬剤である BAYo 9867 の健康成人の腸内細菌叢に及ぼす影響検討では7例中4例に、いずれも投薬中止後4日~28日の間に *C. difficile* が検出されている⁹⁾。また著者らの検討では、 β -ラクタム薬剤である cefixime でも5例中3例に *C. difficile* が投薬中止直後に、imipenem/cilastatin の場合でも4例中2例に投薬期間中または投薬終了後に *C. difficile* が分離されている^{6),10)}。これら *C. difficile* の異常増殖の有無と薬剤の特徴との関係については明らかではない。

近年いくつかの菌種において ofloxacin 耐性株の出現が問題になっている。著者らは、投薬前後の好気性菌および嫌気性菌の *B. fragilis* group の T-3262 に対する感受性を比較した。今回のボランティアでは、投薬前後で MIC の異なる同一菌種が分離された例が認められた。投薬後の分離菌株は投薬前の分離菌株に比して、いずれも MIC が高値となっていた。また投薬前に比較的 MIC の高い菌株が分離されていたボランティアが存在したが、その原因は明らかではない。

T-3262 の1日 450 mg 7日間経口投与は、嫌気性総菌数すなわち糞便内総菌数への影響は少なかった。嫌気性菌では *B. fragilis* group の菌数の変化は少なかった。*Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp. の変動は *B. fragilis* group のそれより強かったが、投薬中止

により速やかに投薬前の菌数にもどった。また投薬後に分離された *B. fragilis* group は、投薬前に分離された *B. fragilis* group より MIC が高いことが明らかになった。好気性菌の優勢菌種の変化は顕著であった。特に健康者あるいは正常便に最も優位に存在するのが普通である *Enterobacteriaceae* の菌数が薬剤投与により一時減少し、投与中止後その菌数の回復が遅れ、それによって *Enterobacteriaceae* より MIC が高い *Micrococccae* が出沒した。尚、投薬後に分離した *Enterobacteriaceae* の MIC はその殆どが 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。その理由は糞便内に投薬期間中、糞便内の T-3262 の濃度は、腸内に優位に存在する *Enterobacteriaceae* に対する MIC 値よりかなり高い値であり、中止後もその状態が継続していることが想像できた。

文 献

- 1) 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, 日水製薬株式会社, 東京, 1979
- 2) SUTTER V L, CITRON D M, EDELSTEIN M A C, FINEGOLD S M: Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 4 ed. Star Publishing Company, California, 1985
- 3) 第34回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム。T-3262, 東京, 1987
- 4) 加藤直樹, 武藤吉徳, 渡辺邦友, 上野一恵: 嫌気性菌に対するピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の抗菌力。Chemotherapy 36 (S-9): 59~67, 1988
- 5) 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 のヒト腸内細菌叢におよぼす影響。Chemotherapy 32 (S-1): 109~117, 1984
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 渡辺邦友, 青木 誠, 小林とよ子, 沢 赫代, 上野一恵: BAYo 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
- 9) 沢 赫代, 小林とよ子, 神野英毅, 渡辺邦友, 上野一恵: 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
- 10) 今朝洞忠孝, 渡辺邦友, 朝日良成, 宮内正幸, 上野一恵, 西浦常雄: Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791) のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響。Chemotherapy 34 (6): 504~510, 1986

EFFECT OF T-3262 ON HUMAN FECAL FLORA

KUNITOMO WATANABE, NAOKI KATO, YOSHINORI MUTO, KAKUYO SAWA,
HARUKI SAWAMURA and KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine
Tsukasa-cho 40, Gifu-city, Gifu 500, Japan

T-3262, a new quinolone carboxylic derivative, was orally administered to 6 healthy male volunteers 150 mg 3 times a day for 7 days. Changes in bacterial flora in feces were studied, and the following results obtained.

Anaerobic bacteria were continually dominant during the administration of T-3262 and the total bacterial counts did not significantly change. Changes in colonizing aerobic bacteria were more marked than in anaerobic bacteria. No change was noticed in the colonizing *Bacteroides fragilis* group and only a small decrease in colonizing *Bifdobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. Colonizing *Enterobacteriaceae* were strongly suppressed and *Micrococcaceae* tended to be dominant. The recovery of colonizing aerobic bacteria was delayed. These results showed a marked effect on the aerobic microflora.

Clostridium difficile (*C. difficile*) D-1 toxin was detected neither during nor after administration of the drug and no *C. difficile* strain was isolated.