Fleroxacinのヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響

渡辺邦友・加藤直樹・武藤吉徳・板東香お里 沢 赫代・上野一恵 岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設*

Fleroxacinは、新しく開発されたピリドンカルボン酸系合成抗菌剤で、これまで知られている同系 統の薬剤と比較し、抗菌力の点ではほぼ同等であるが、体内動態でその血中半減期が長いという特徴 を有する薬剤である。

著者らは、fleroxacinのヒト糞便内細菌叢への影響、特に偽膜性腸炎、抗生物質関連下痢症の原因 微生物のひとつClostridium difficileの出現の有無を検討した。

成人男子5名(26歳~36歳)に、fleroxacin 1日800mgを2回に分けて7日間投与し、投与前、投与中、投与終了日および投与後の糞便内細菌数および細菌叢の質的変化を検討した。糞便中のC. difficile D-1毒素の検出は、市販のLatex凝集試薬を用いた。本薬剤投与開始により、糞便内総細菌数は減少し、投与終了時に最低となった。しかし、投与中止後比較的速やかに投与前の菌数に回復した。腸内細菌科の細菌は、本薬剤投与により最も強く影響をうけ、投薬終了時には検出限界以下となった。しかし、投与中止後1週目には再出現していた。Enterococcus spp.とBacteroides fragilis groupなど嫌気性菌への影響は、より軽度であった。C. difficile とそのD-1毒素は投与中および投与後のいずれの検体からも、検出されなかった。投与前と投与後に分離された腸内細菌科およびB. fragilis groupの菌株のfleroxacinおよびnorfloxacinに対する感受性を比較したが、差は認められなかった。

Key words: Fleroxacin, ピリドンカルボン酸, ヒト糞便細菌叢, Phase I 臨床試験

ヒトの腸管内細菌叢に最も強いインパクトを与えるもののひとつは、化学療法剤の投与である。Fleroxacinは杏林製薬株式会社で開発された経口用ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤である。本薬剤は好気性グラム陽性、陰性菌や嫌気性菌にも広い抗菌作用を示す薬剤として知られる。これまでの同系統の薬剤に比し、その長い血中半減期が特徴的である。また胆汁中にも血清濃度を上回る濃度に達することが知られているい。今回、著者らはfleroxacin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(26~36歳)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ことを条件とした。

この試験は昭和61年9月16日から9月28日に実施された。

2. 使用薬剤

Fleroxacin 1回400mgを1日2回, 合計800mgを7日間 連続で経口投与した。

3. 糞便中細菌叢の検索

Table 1に従いfleroxacinのヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響を検討し、同時に糞便中のClostridium difficile D-1 毒素、糞便中薬剤濃度の測定および投与前後の分離菌のfleroxacinおよびnorfloxacinに対する感受性を測定した。投与開始後、連日便の性状を観察し、薬剤投与4日前、

Table 1. Time sequence of fleroxacin administration and fecal collection

Day	1	5	10	20	38
Oral administration		ļ			
Collection of fecal specimen	0	0	0	0	0
Test for C. difficile toxin	0	0	0	0	0
Test for MIC determination	0				0
Test for drug concentration		0	0		

^{* 〒500} 岐阜市司町40

投与中2回,投与後2回の計5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、市販の嫌気性培 養袋を利用し嫌気的に検査室に輸送し, anaerobic chamber(Forma)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、さらにこれを希釈液 を用いて10倍希釈法にて108倍まで希釈した2)。各々の 糞便希釈液の0.05mlまたは0.1mlを, 下記の培地のなか 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℃で、24~48時間好気的に、嫌気性菌用培地の うち非選択培地とC. difficile選択培地はanaerobic chamber内で37℃、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、嫌気性ジャーはMicrocultoA(メルク)を用いて嫌気的環境を作製した。

4. 培地

好気性菌用培地

Trypticase Soy血液寒天培地;好気性菌の総菌数の算定用非選択培地として用いた。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 spp. の菌数を算定した。

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); Bacteroides 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³)。

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反応陽性を示す*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²¹。

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、Rap ID ANA system(アムコ扱い)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. 糞便中薬剤濃度の測定

投与中および投与直後の糞便内薬剤濃度をbioassay法 により測定した⁴⁾。

7. 糞便中のC. difficile D-1毒素の検出

糞便に等量の0.1M Tris-HCI緩衡液(pH8.0)を加え, よく混合したのち, 10000rpm 10分間遠心分離して得 た上清を試料とし, D-1 Latex試薬 (ダイアトロン)を 用いて検出した。

8. 薬剤投与前後分離菌のfleroxacinおよびnorfloxacin に対する感受性の検討

投薬前後に分離されたEnterobacteriaceaeおよびB. fragilis groupの菌株のfleroxacinとnorfloxacinに対する感受性の変化の有無を検討した。MIC測定は、化学療法学会標準法に従った5)。

Ⅱ. 成 績

1. Fleroxacinの糞便内細菌叢への影響

Fleroxacinの経口投与による糞便内細菌叢の変化を Fig. 1に示した。

1) Case 1について

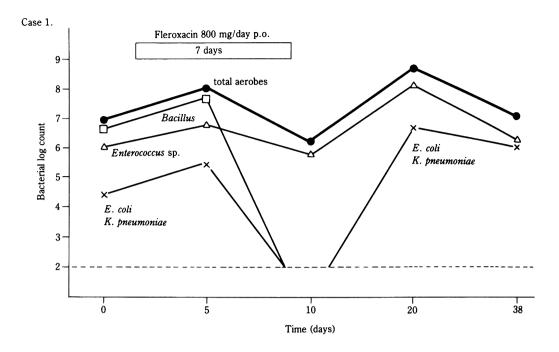
投与中止直後には、Enterobacteriaceaeは全く検出されなくなった。Enterococcus spp. のみが優勢の菌叢を示した。さらに10日経過した後の糞便中にはEnterobacteriaceaeが再出現していた。出現した菌種は、投与前の菌種と同一であった。嫌気性細菌叢への影響は、好気性細菌叢への影響に比し軽度で、中止直後にやや菌数の低下を認めたが、菌叢の顕著な変化は認められなかった。

2) Case 2について

投与中止直後に、Enterobacteriaceae は消失した。Enterococcus faeciumの菌数も著しく減少した。しかし中止10日目には回復した。この場合は嫌気性細菌叢への影響もかなり顕著で、中止直後のB. fragilis groupおよびFusobacteriumの菌数はかなり減少した。

3) Case 3について

投与中,投与前優勢であったEnterobacteriaceaeが減少,



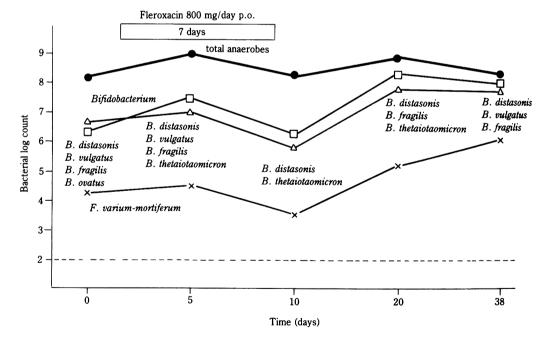
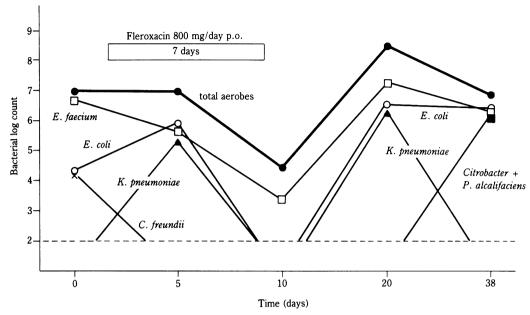


Fig. 1-1. Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteers.





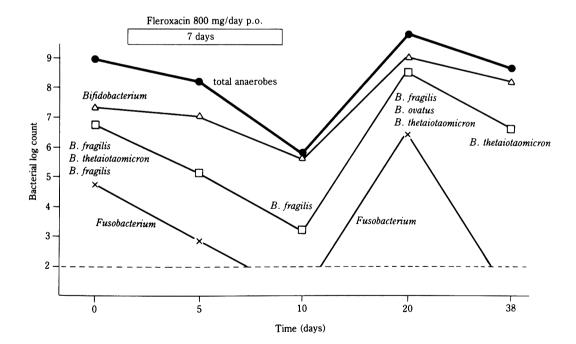
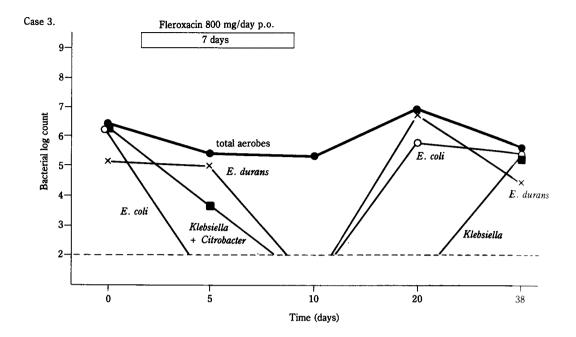


Fig. 1-2. Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteers.



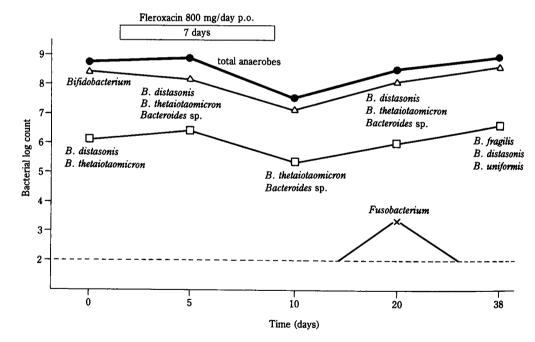


Fig. 1-3. Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteers.

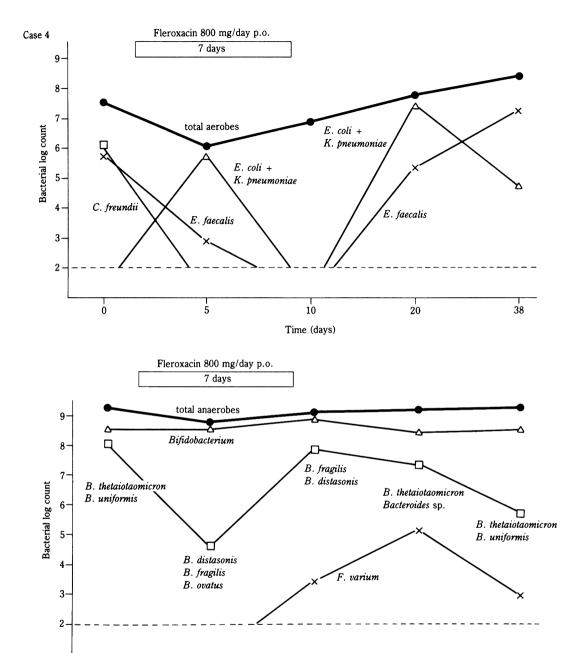


Fig. 1-4. Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteers.

10

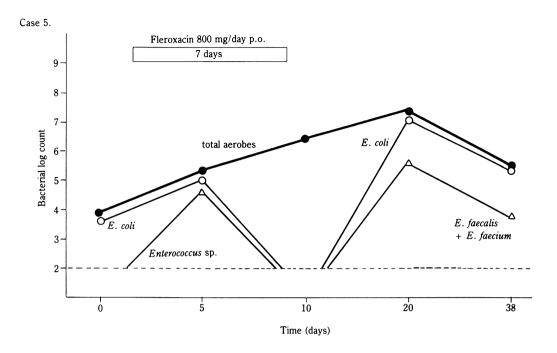
Time (days)

20

38

5

Ó



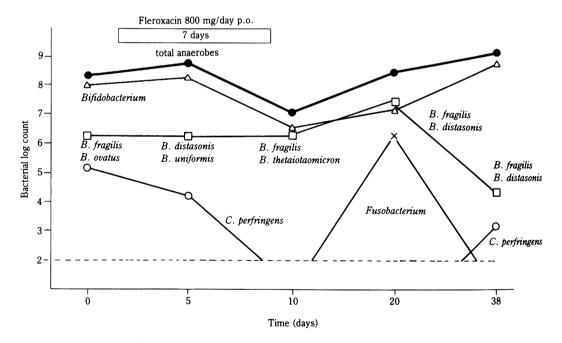


Fig. 1-5. Changes in bacterial flora in feces of healthy volunteers.

中止直後には検出されなくなった。中止後10日目には、 投薬前に分離されたEscherichia coliが再出現した。嫌気 性細菌叢への影響は非常に軽度で、中止直後に僅かに菌 数の減少が認められただけで、菌叢の質的変化は観察さ れなかった。

4) Case 4について

投与中止直後には、Enterobacteriaceae と Enterococcus spp. は検出されなかった。投与中B. fragilis groupの菌数が一時顕著に低下したが、中止直後には投薬前のレベルに回復した。投薬中止後にFusobacterium variumが出現した。

5) Case 5について

投与中止直後には、Enterobacteriaceae、Enterococcus は 検出されなかった。中止後10日目には再出現した。 Clostoridium perfringensは、投与により消失し、Fusobacterium sp. は投与中止後出現した。B. fragilis groupの変 化は軽微であった。

2. Fleroxacin投与による糞便内C. difficile D-1毒素の 検出

検査期間を通じて, 糞便中からC. difficileおよびそれが産生するD-1毒素は, 全く検出されなかった。

3. 糞便内薬剤濃度

投与後2日目および投与終了時の糞便内薬剤濃度を Table 2に示した。2日目で $97.3\pm33.6~\mu g/g$, 投与終了時で $159\pm64~\mu g/g$ であった。

4. 投与前後に分離されたEnterobacteriaceaeとB. fragilis groupのfleroxacinおよびnorfloxacinに対する感受性の変化

投与前後に分離されたこれらの菌群の内訳をTable 3 および4に示した。これらの菌株のfleroxacinおよびnor-floxacinに対する感受性分布をTable 5および6に示した。投与前後に分離された菌株の両薬剤に対する感受性には、顕著な変化は認められなかった。

Ⅲ.考察

抗菌剤の投与はヒトおよび動物の腸管内細菌叢の変化をもたらす。この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

Table 2. Fecal concentration of fleroxacin

Administration	During	After
Volunteer	9/21	9/26
A	98.7 ± 13.7*	134 ± 27
В	88.1 ± 1.3	109 ± 50
С	139 ± 3	246 ± 22
D	113 ± 3	206 ± 21
E	47.9 ± 3.1	102 ± 16
Mean ± SD	97.3 ± 33.6	159 ± 64

^{*}μg/g

Table 3. List of *Enterobacteriaceae* organisms isolated before and after fleroxacin administration

Organism	No. of isolates			
Organism	before	after		
E. coli	6	10		
C. freundii	7	1		
K. pneumoniae	3	5		
K. oxytoca	1			
E. aerogenes	1			
C. deversus	1			
C. amalonaticus		2		
P. alcalifaciens		1		
Total	19	19		

Table 4. List of *B. fragilis* group organisms isolated before and after fleroxacin administration

Organism	No. of isolates		
Organism	before	after	
B. distasonis	5	3	
B. fragilis	3	5	
B. thetaiotaomicron	3	4	
B. ovatus	2		
B. vulgatus	1	2	
B. uniformis	1	5	
Others		1	
Total	15	20	

Table 5. MIC distribution of fleroxacin and norfloxacin against Enterobacteriaceae organisms

Group	Desca	MIC (μg/ml)						
Group ,	Drug	≤ 0.025	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78≦	
Before	fleroxacin norfloxacin		1	15 8	1 9	2 2		
After	fleroxacin norfloxacin			16 7	2 12	1		

Group	Drug	$MIC (\mu g/ml)$						
		3.13	6.25	12.5	25	50	100	200≦
Before	fleroxacin norfloxacin		1	8	5	1 7	3	5
After	fleroxacin norfloxacin		4	8	3 4	5 5	5	6

Table 6. MIC distribution of fleroxacin and norfloxacin against B. fragilis group organisms

態,薬剤の腸内での安定性などにより異なる6.7)。

Fleroxacinの抗菌スペクトラムは好気性グラム陽性. 陰性菌,嫌気性菌と広くに及んでいる¹゚。本薬剤とヒト 腸内細菌叢主要構成菌との関係を見てみると,特にfleroxacin は, Enterobacteriaceae (特にE. coli や Klebsiella pneumoniae)に対し強力な抗菌作用を示し、その90%を 1.56 μg/mlあるいはそれ以下の濃度で発育を阻止する。 しかしEnterococcusに対してはやや弱く、その発育を阻 止するのに3.13 μg/ml程度が必要である。著者らの検討 によると、fleroxacin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8)。特に糞 便中に優勢に存在するB. fragilis groupの発育を3.13~ 25 μg/ml (10°CFU/ml接種) で阻止した。また比較的 少数ではあるが常在菌として持つことが多いC. perfringensの発育を1.56 μg/ml (10°CFU/ml接種) で阻止した が、F. mortiferumやF. variumの発育を阻止するには6.25 ~25 µg/ml (106CFU/ml接種)を必要とした。

Fleroxacinの好気性菌および嫌気性菌に対するMICと今回の細菌叢の検索結果を比較すると、本薬剤の1日800mgの7日投与で、全例にEnterobacteriaceaeの消失が認められた。しかし、Enterococcus spp. やB. fragilis groupのfleroxacinによる菌数減少はなく、あってもごく軽度であった。またF. mortiferumは、投与中止後に出現する傾向が見られた。

抗菌剤投与は、フローラ中の抗菌剤に耐性の菌の出現を引き起こす。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ひとつである⁹⁾。C. difficileの本薬剤に対する感受性は低い。従って、本薬剤投与により選択される可能性が推測された。しかし今回の検討ではC. difficileの増殖が認められた例は皆無であった。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。例えばciprofloxacin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、いずれも投与中止後4日~28日の間にC. difficile

が検出されている¹⁰⁾。またcefiximeでも5例中3例にC. difficileが投与中止直後に分離されている¹¹⁾。しかしoflo-xacinやtosufloxacin投与の場合には、今回のfleroxacinの場合と同様にC. difficileの出現は認められていない。

千田らは、5名のボランティアを用いて、ofloxacinの 200mg 5日投与のfecal floraへの影響を検討し、Enterobacteriaceaeは、投与開始後速やかに消失し、その回復に 1週間以上を要したこと、嫌気性菌は、一部lecithinase 反応陰性のClostridiaを除いて、大きな変化が無いこと を報告した¹²⁾。またPacquetらは、さらにdoseを上げ、 400mg 5日間投与で同様の検討を実施し、Enterobacter・ iaceaeは、投薬開始とともに速やかに消失し、4日目で 回収不能となったこと、さらに投与中止後6日経過して も、その菌数は投薬前のレベルに達しなかったことを報 告している⁷⁾。また渡辺らは,tosufloxacinの1日450mg の7日間投与の影響を検討し、嫌気性細菌叢への影響の 少ないことおよびEnterobacteriaceaeへの強い影響につい て報告した¹³⁾。Fleroxacinの1日800mg 7日間投与は, これまですでに市販されているofloxacin, tosufloxacin などと同様、B. fragilis groupなど嫌気性細菌叢への影響 は比較的少ないが、好気性細菌叢、特にEnterobacteriaceaeへの影響は比較的強力であることが明らかとなっ た。しかし、薬剤投与により一旦消失したEnterobacteriaceaeは投与中止後10日目には再出現した。また、再出 現したEnterobacteriaceaeや投与後に分離されたB. fragilis groupには、試験菌株数は少ないが、fleroxacinに耐性を 示す株は認められなかった。

文 献

- 1) 谷村 弘,副島林造:第37回日本化学療法学会 西日本支部総会,新薬シンポジウム。AM-833 (Fleroxacin),和歌山,1989
- 2) 鈴木祥一郎,上野一恵監修: 臨床嫌気性菌マニュアル。ニッスイライブラリーNo. 6, 日水製薬株式会社,東京, 1979
- 3) SUTTER VL, CITRON DM, EDELSTEIN MAC, FINEGOLD SM: Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 4th

- ed., Star Publishing Company, California, 1985
- 4) 大森康男, 村山 哲, 阿部泰夫, 入倉 勉: BioassayによるAM-715の体液濃度測定法に関す る研究。 Chemotherapy 29(S-4): 91~97, 1981
- 5) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度(MIC)測 定法再改訂について。Chemotherapy 29:76~ 79.1981
- 6) Nord CE, KAGER L and HEIMDAHL A.: Impact of antimicrobial agents on the gastrointestinal microflora and the risk of infection. Am J Med 76: 99~106, 1984
- Nord CE: Effect of Antimicrobials on Human Flora. P.55 ~ 80, in Anaerobic Infections in Humans (Eddited by S.M. Finegold and W.L. George), Academic Press, Inc. 1989
- 8) 加藤直樹, 沢 赫代, 板東香お里, 田中保知, 武藤吉徳, 渡辺邦友, 上野一恵: Fleroxacinの嫌 気性菌に対する抗菌力について。Chemotherapy 38 (S-2): 47~54, 1990

- 9) 上野一恵,渡辺邦友,小林とよ子: 偽膜性腸炎 とClostridium difficile, モダンメヂア25:798~ 810,1979
- 10) 渡辺邦友,青木 誠,小林とよ子,沢 赫代, 上野一恵 : Bayo9867の健康成人の腸内細菌叢 に及ぼす影響。Chemotherapy 33(S-7):88~99, 1985
- 11) 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
- 12) 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):109~117,1988
- 13) 渡辺邦友,加藤直樹,武藤吉徳,沢 赫代,沢 村治樹,上野一恵: T-3262のヒト糞便内細菌 叢におよぼす影響。Chemotherapy 36(S-9): 126~136,1988

IMPACT OF ORAL FLEROXACIN ON THE FECAL FLORA OF HEALTHY VOLUNTEERS

Kunitomo Watanabe, Naoki Katoh, Yoshinori Muto, Kaori Bandoh, Kakuyo Sawa and Kazue Ueno Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine 40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

Fleroxacin is a newly developed quinolone derivative, with a broad spectrum of activity against Gram-negative and positive bacteria, including aerobes and anaerobes. It has the longest serum half-life of all the new quinolones.

Fecal flora were studied in five healthy adult male volunteers after the administration of 400 mg fleroxacin b.i.d. for seven days. Stool samples were taken prior to and several times after the initiation of therapy, and qualitative and quantitative analyses of microorganisms were performed.

Enterobacteriaceae were eliminated in all volunteers by the end of therapy. No resistant Enterobacteriaceae were observed. The number of CFU of the Bacteroides fragilis group remained unchanged or changed only slightly during the trial. There was no selective growth of Clostridium difficile and resistant B. fragilis group organisms.