

Grepafloxacinのヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響

上野一恵[#]・加藤直樹・渡辺邦友

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設*

([#]現 岐阜医療技術短期大学)

和田光一・渡辺恂子・水谷 潤

カルピス食品工業株式会社

新規キノロン薬であるgrepafloxacin (GPFX) 200mgを1日2回7日間経口投与した時のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を糞便中の細菌を検索することにより検討した。同時に*Clostridium difficile*の菌数の変動についても検討した。GPFX投与前後に便の性状を観察し、また薬剤投与前、投与4日目、最終投与翌日、7日目、14日目および28日目に糞便の定量培養を実施した。

GPFX投与による糞便中の好気性菌及び嫌気性菌共に総菌数の変動はほとんど見られなかった。GPFX投与後に変動が見られた菌種は主にEnterobacteriaceae, *Streptococcus*/*Enterococcus* spp.であったが、投与終了後元の腸内細菌叢に回復した。一部の被験者に一過性に*C. difficile*の出現が見られたが、1例を除き投与終了後に検出されなくなった。

Key words : grepafloxacin, ヒト糞便内細菌叢, 臨床第I相試験

Grepafloxacin (GPFX) は大塚製薬株式会社にて合成された新しいキノロン系合成抗菌薬である。本剤はグラム陽性菌・グラム陰性菌・嫌気性菌に幅広い抗菌スペクトラムを持ち、なかでもグラム陽性菌に強い抗菌作用を示す薬剤である¹⁾。本剤はまた、長い血中半減期をもち、主に胆汁を介して腸管内へ排泄される薬剤である²⁾。今回、著者らはGPFXの健康成人糞便内細菌叢へ及ぼす影響を検討したので報告する。

I. 材料および方法

1. 被験者

試験の目的、内容等の説明を受け、文章にて同意が得られた健康成人男性6名(年齢21歳～43歳:平均年齢21.8歳, 体重54.0kg～77.3kg:平均体重65.5kg)を対象とした(Table 1)。

2. 使用薬剤および投与方法

Fig. 1に示すスケジュールによりGPFX 200mgを1日2回7日間連続経口投与した。

3. 培地

好気性菌用培地

Trypticase Soy血液寒天培地; 好気性菌の総菌数を算定した。

DHL寒天培地(栄研化学); Enterobacteriaceaeの総菌数を算定した。

TATAC寒天培地; *Streptococcus* spp. および*Enterococcus* spp.の総菌数を算定した。

PEES寒天培地; *Staphylococcus* spp. の総菌数を算定した。

NAC寒天培地(栄研化学); *Pseudomonas aeruginosa*の総菌数を算定した。

ポテトデキストロース寒天培地; 真菌類の総菌数を算定した。

カンジダ培地(日水製薬); *Candida albicans*の総菌数を算定した。

変法 LBS寒天培地; *Lactobacillus* spp. の総菌数を算定し

Table 1. List of healthy volunteers

Subject no.	Age	Sex	Weight (kg)
1	21	male	54.5
2	29	male	58.1
3	26	male	64.7
4	25	male	59.7
5	31	male	68.3
6	31	male	64.6
Mean	27.2		62.1

Day	pre	1	4	7	8	14	35
Oral administration		←→					
Collection of fecal specimen	◎		◎		◎	◎	◎
Test for <i>C. difficile</i> toxin	◎		◎		◎	◎	◎

Fig. 1. Time sequence of grepafloxacin administration and fecal sample collection.

た。

嫌気性菌用培地

EG寒天培地(栄研化学)；嫌気性菌の総菌数を算定した。

BL寒天培地(日水製薬)；嫌気性菌の総菌数を算定した。

BS-2寒天培地；*Bifidobacterium* spp. の総菌数を算定した。

NBGT寒天培地；Bacteroidaceaeの総菌数を算定した。

BBE寒天培地(極東製薬)；*Bacteroides fragilis* groupの総菌数を算定した。

Neomycin Nagler寒天培地；Lecithinase(+) *Clostridium* の総菌数を算定した。

PMS寒天培地；*Clostridium*および*Megasphaera*などの総菌数を算定した。

ES寒天培地；*Eubacterium*の総菌数を算定した。

VS寒天培地；*Veillonella*, *Megasphaera*の総菌数を算定した。

変法FM培地(日水製薬)；*Fusobacterium*の総菌数を算定した。

CCMA培地(日水製薬)；*Clostridium difficile*の総菌数を算定した。

4. 糞便中細菌叢の検索

Fig. 1のスケジュールに従い、GPFXのヒト糞便内細菌叢に及ぼす影響を検討した。GPFX投与前後における便の性状を観察した。また、投与前、投与4日目、最終投与翌日(8日)、7日目(14日)、および28日目(35日)に糞便の定量培養を実施した。自然排泄便をポリ袋に採取し、形状を観察した後、空気を出来る限りおいだし、良く混和し、その一部をanaerobic chamber内に直ちに入れた。Anaerobic chamber内で1gを秤量し、直ちに9mlの嫌気性希釈液を含む試験管に移し、酸素不含、無菌炭酸ガス通気下で良く混和した。同様の操作で、 10^{-8} 倍まで希釈し、この希釈液を嫌気性菌用平板11種類および好気性菌用平板8種類に様に塗抹した。嫌気性菌用平板は還元スチールウールと共にジャーに入れ炭酸ガスで置換して、37℃72時間培養した。DHL, TS培地は37℃で24時間好気培養、TATAC, PEES, ポテトデキストロース寒天培地, NAC, カンジダ培地は、37℃72時間好気培養した。LBS培地は、ジャーに入れ、還元スチールウールを入れずに、炭酸ガスで置換して37℃72時間微好気培養した。培養終了後、各培地に発育した集落の形状およびその数を記録し、それぞれグラム染色を行ない集落の形状、グラム染色性、細胞の形態によって菌群を決定して集計した。NBGT, TATAC, DHL培地に生育した菌は、菌種同定を行なうために各集落形態毎に集計、釣菌した。NN培地上でLecithinase(+)の性状を示した集落については、乾燥ウエルシュ菌A型抗毒素濾紙(日水製薬)を用い卵黄加CW寒天培地上でLecithinase中和試験

を行ない、完全に中和反応の陽性を示す菌株を*Clostridium perfringens*として集計した。

II. 成 績

1. GPFXの経口投与による糞便内細菌叢の変化をFig. 2~7に示した。

1) 被験者Aの腸内細菌叢の変動(Fig. 2)

本例では好気性菌の総菌数、嫌気性菌の総菌数は、薬剤投与前、中、後いずれの場合でもほとんど変化は見られなかった。好気性菌ではEnterobacteriaceaeおよび*Streptococcus/Enterococcus* spp. の菌数は薬剤投与後に著しく減少したが、投与終了後7日または28日後には元の菌数に回復した。*Lactobacillus* spp. は薬剤投与による影響をほとんど受けなかった。嫌気性菌では、投与によるBacteroidaceae, *Bifidobacterium* spp. の菌数の変化は見られなかった。投与終了後*Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., Lecithinase(+) *Clostridium*の出現が見られた。

2) 被験者Bの腸内細菌叢の変動(Fig. 3)

被験者Bの場合も好気性菌の総菌数は薬剤投与による変化は見られなかった。Enterobacteriaceaeは薬剤投与により減少したが、投与終了28日後には投与前の菌数に回復した。*Streptococcus/Enterococcus* spp. の菌数は薬剤投与により減少したが、薬剤投与終了7日後には元の菌数に回復した。嫌気性菌でも総菌数は変化しなかったが、*Veillonella* spp., Lecithinase(+) *Clostridium*などの菌数に変動がみられた。本例では薬剤投与4日後より*Clostridium difficile*が検出された。

3) 被験者Cの腸内細菌叢の変動(Fig. 4)

本例では投与前よりEnterobacteriaceaeは検出されず、投与終了28日目になって 10^5 cfu/gに検出された。また*Lactobacillus* spp. は薬剤投与中には菌数の変動はみられなかったが、投与終了28日目には減少した。嫌気性菌では、薬剤投与による変動はほとんどなかったが、*C. difficile*が一過性に出現した。

4) 被験者Dの腸内細菌叢の変動(Fig. 5)

本例ではEnterobacteriaceaeが薬剤投与4日後より減少したが、投与終了28日後には 10^4 cfu/mlまで回復した。*Streptococcus/Enterococcus* spp. は一過性に菌数の減少が見られたが、薬剤投与終了により速やかに元の菌数まで上昇した。また*Lactobacillus* spp. は薬剤投与により菌数の変動はみられなかった。嫌気性菌の菌数の変動はほとんど認められなかった。

5) 被験者Eの腸内細菌叢の変動(Fig. 6)

本例では好気性菌の総菌数がわずかに減少したが、嫌気性菌の総菌数の変動は認められなかった。好気性菌ではEnterobacteriaceaeおよび*Streptococcus/Enterococcus* spp. が減少し、*P. aeruginosa*が薬剤投与により一過性の出現が観察された。嫌気性菌では*Veillonella* spp., *Megas-*

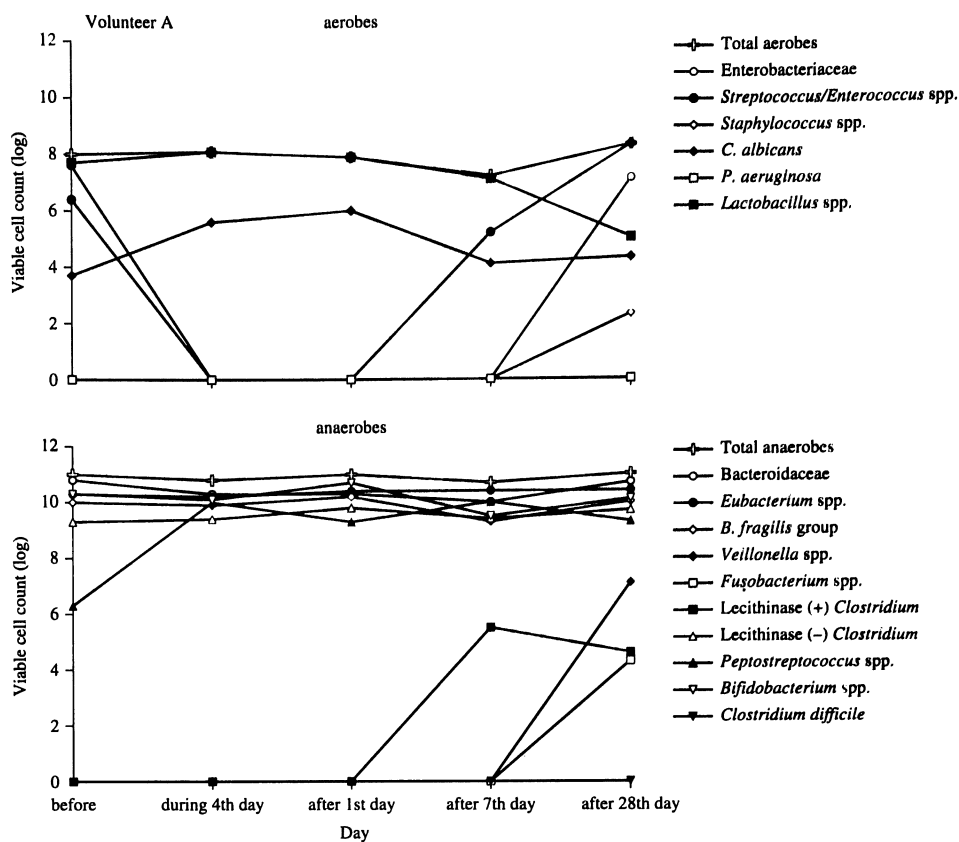


Fig. 2. Effect of grepafloxacin on fecal flora of a healthy volunteer.

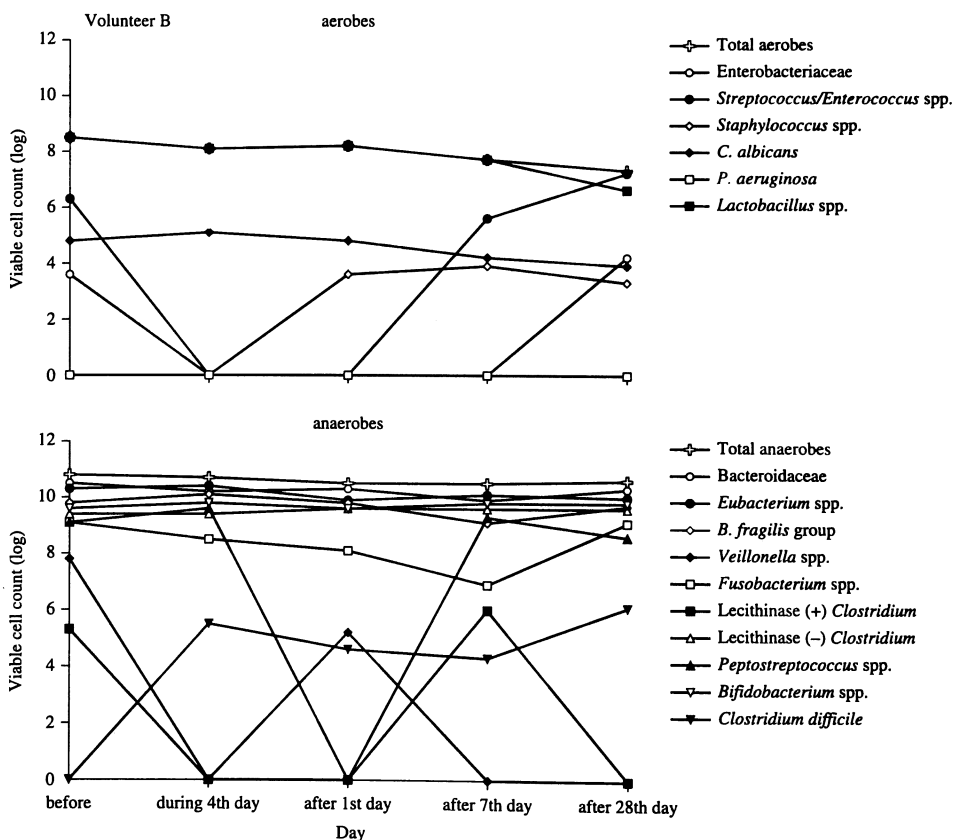


Fig. 3. Effect of grepafloxacin on fecal flora of a healthy volunteer.

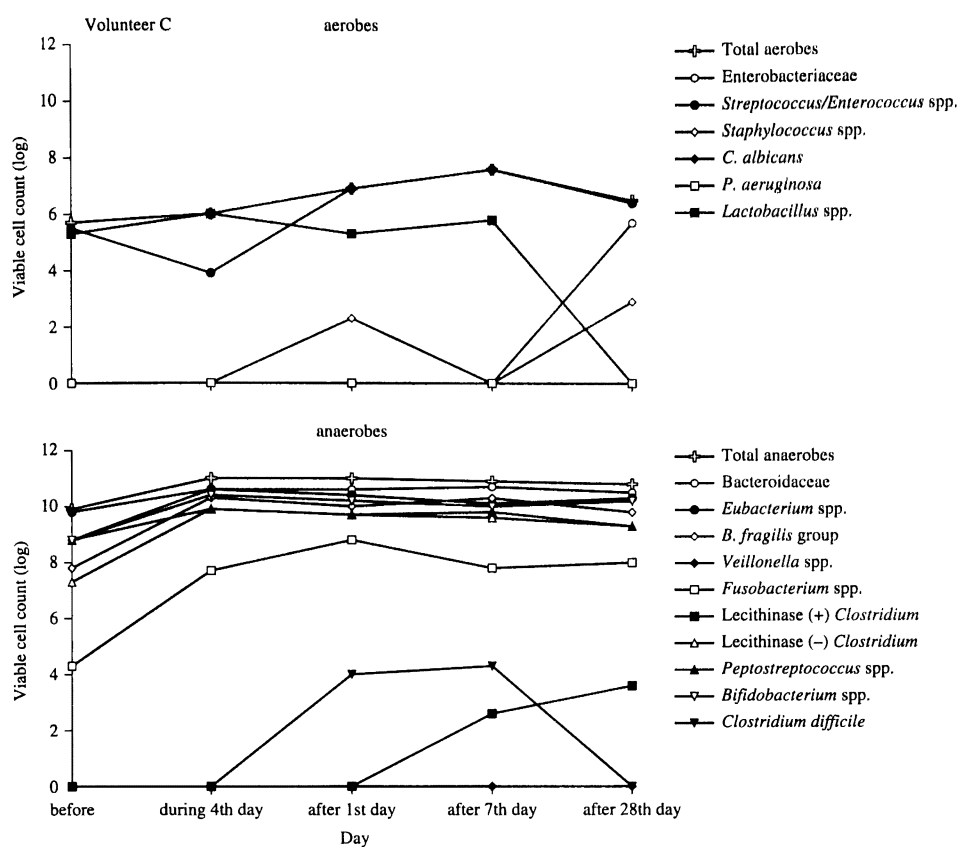


Fig. 4. Effect of grepafloxacin on fecal flora of a healthy volunteer.

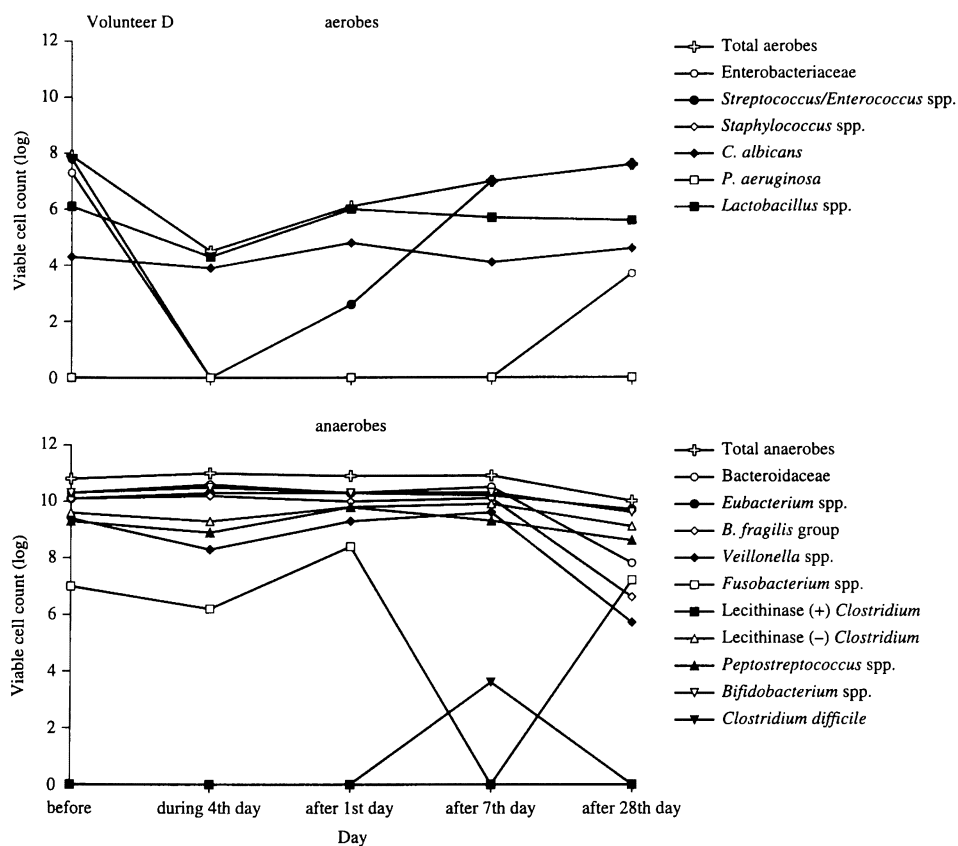


Fig. 5. Effect of grepafloxacin on fecal flora of a healthy volunteer.

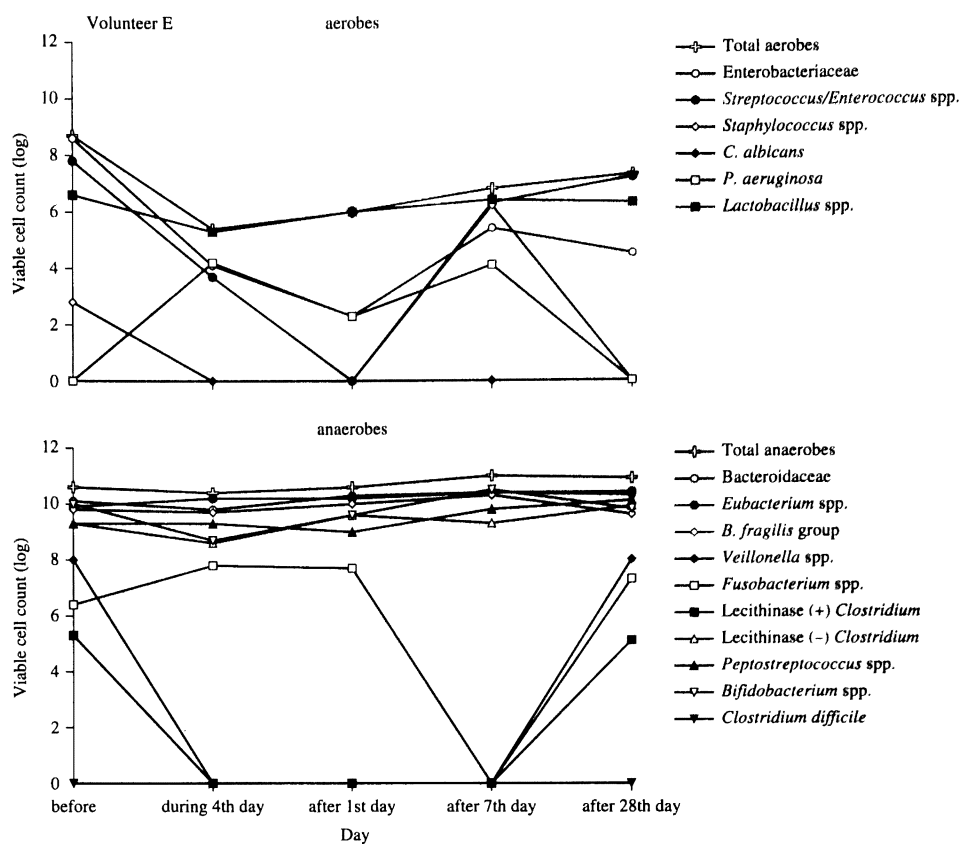


Fig. 6. Effect of grepafloxacin on fecal flora of a healthy volunteer.

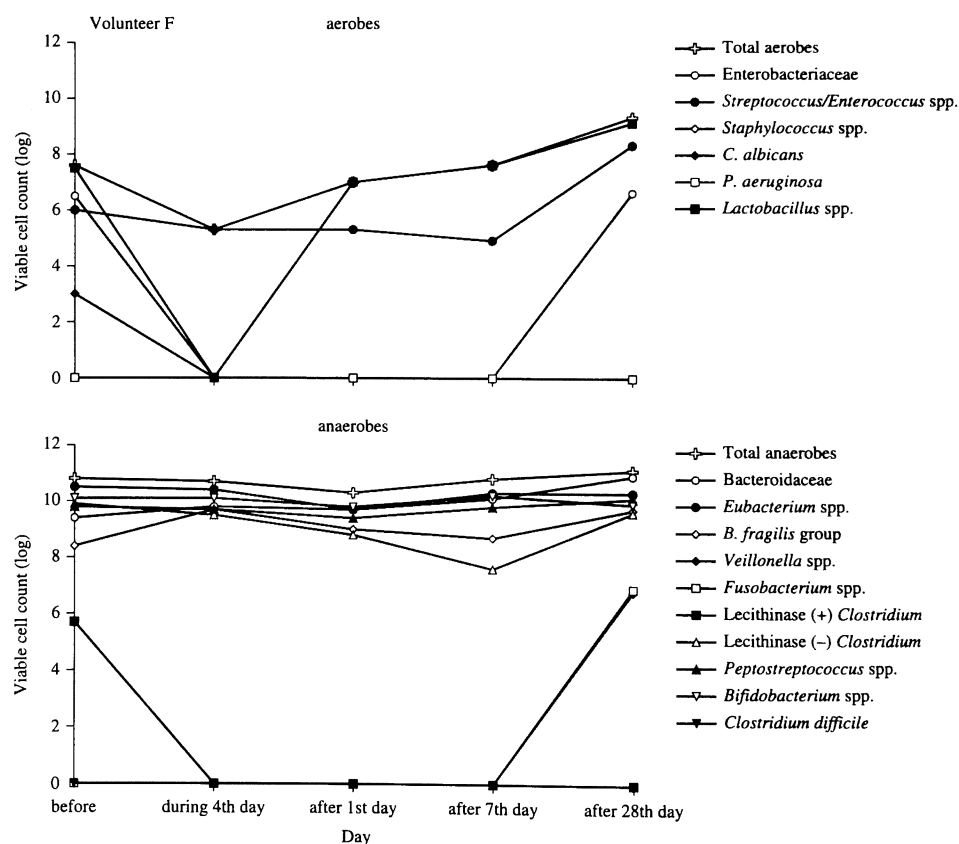


Fig. 7. Effect of grepafloxacin on fecal flora of a healthy volunteer.

bphaera spp. が減少したが、投与終了後元の菌数に回復した。

6) 被験者Fの腸内細菌叢の変動 (Fig. 7)

本例では好気性菌の総菌数は投与4日目にわずかに減少したが、投与終了1日ですでに元の菌数に回復した。嫌気性菌の総菌数は変化はみられなかった。好気性菌で変動したのは、薬剤投与により Enterobacteriaceae, *Bacillus* spp. の菌数減少が見られたが、投与終了後28日目には元の菌数に回復した。また嫌気性菌ではほとんどの菌で変動が認められなかった。

以上健康成人男性6名にGPFX 200mgを1日2回7日間経口投与した時の腸内細菌叢の変動をまとめたのが Table 2である。好気性菌および嫌気性菌の総菌数の変動は見られず、腸内細菌全体の菌数変動は見られなかった。GPFX 投与後に変動が見られた菌種は主に Enterobacteriaceae, *Streptococcus*/ *Enterococcus* spp. であったが、投与終了後早期に元の腸内細菌叢に回復した。一部の被験者に *C. difficile* の出現が見られたが、1例を除き投与終了後に検出されなくなった。

またいずれの被験者も薬剤投与中および投与後に下痢症状を訴えた者はいなかった。

Ⅲ. 考 察

抗菌薬の投与は、ヒトおよび動物の腸管内細菌叢の変

動をもたらす³⁾。この抗菌剤による腸内細菌叢の変動は、薬剤の抗菌スペクトラムおよび抗菌力、体内動態、安定性などにより、その程度は異なる。GPFXの抗菌スペクトラムは、グラム陽性菌、グラム陰性菌、嫌気性菌に幅広く強い抗菌力を示すことが報告されている^{1,4)}。GPFXのグラム陽性菌に対する抗菌力は強く *Enterococcus* groupの菌種に対し90%の菌株の増殖を1.56~12.5μg/mlの濃度で阻止している (MIC₉₀)。また、本薬剤は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* などの多くの Enterobacteriaceae に対して強い抗菌力を示し、そのMIC₉₀は1.56μg/ml以下であるが、*Proteus* groupの菌種に対してはやや抗菌力が劣り、そのMIC₉₀は0.39から12.5μg/mlであると報告されている¹⁾。またGPFXの嫌気性菌に対する抗菌力はBacteroidaceaeに対し0.78~50μg/mlにMICが分布しており、*C. perfringens*に対するMIC₉₀は0.39μg/mlであった。しかし、*C. difficile* に対してはMICが12.5~25μg/mlに分布しており、比較的弱い抗菌力であると報告されている⁴⁾。GPFXの多くは胆汁を介して糞便中へ排泄され、糞便内薬剤濃度は400mg単回経口投与で約500μg/gの高濃度に達することが知られているが⁵⁾、今回検討した腸内細菌叢の変動では総菌数はほとんど変動せず、ほぼ一定の菌数であった。これは腸内細菌叢を構成する菌群で、優性を占める Bacteroidaceae, *Eubacterium* spp. および

Table 2. Fecal microflora in six healthy volunteers orally given grepafloxacin

Organism	Pre	4	8	14	35
Enterobacteriaceae	6.7±1.89 ^{b)} (83%) ^{c)}	4.1 (17%)	2.3 (17%)	5.4 (17%)	5.3±1.38 (100%)
<i>Streptococcus</i> ^{a)}	6.6±0.94 (100%)	4.3±0.88 (50%)	4.9±2.17 (50%)	6.1±1.06 (100%)	7.5±0.73 (100%)
<i>Staphylococcus</i>	2.8 (17%)	(0%)	3.0±0.95 (33%)	5.1±1.63 (33%)	2.8±0.52 (50%)
Yeasts	3.9±0.77 (67%)	5.0±1.00 (50%)	5.3±0.65 (50%)	4.1±0.05 (50%)	4.4±0.46 (50%)
<i>Candida albicans</i>	3.9±0.77 (67%)	4.9±0.87 (50%)	5.2±0.71 (50%)	4.1±0.05 (50%)	4.3±0.36 (50%)
<i>Corynebacterium</i>	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Bacillus</i>	5.0±1.95 (33%)	(0%)	(0%)	3.9±0.80 (67%)	6.4±2.11 (50%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(0%)	4.2 (17%)	2.3 (17%)	4.1 (17%)	(0%)
<i>Lactobacillus</i>	7.0±1.16 (100%)	6.4±1.70 (83%)	6.7±1.16 (100%)	6.7±0.90 (100%)	6.5±1.58 (83%)
<i>Bifidobacterium</i>	9.9±0.58 (100%)	10.0±0.64 (100%)	10.0±0.43 (100%)	10.0±0.35 (100%)	9.9±0.25 (100%)
<i>Eubacterium</i>	10.2±0.27 (100%)	10.3±0.14 (100%)	10.2±0.30 (100%)	10.3±0.14 (100%)	10.2±0.26 (100%)
Bacteroidaceae	10.0±0.75 (100%)	10.2±0.36 (100%)	10.2±0.43 (100%)	10.3±0.31 (100%)	10.1±1.15 (100%)
<i>B. fragilis</i> group	9.3±0.97 (100%)	10.0±0.26 (100%)	9.8±0.43 (100%)	9.6±0.68 (100%)	9.3±1.31 (100%)
<i>Fusobacterium</i>	6.7±1.96 (67%)	7.6±0.97 (67%)	8.2±0.44 (67%)	7.3±0.63 (33%)	7.1±1.61 (100%)
<i>Megamonas hypermegas</i>	8.2±0.14 (33%)	8.6 (17%)	8.5±0.21 (33%)	9.3 (17%)	8.5±0.65 (33%)
<i>Mitsuokella</i>	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Peptostreptococcus</i>	8.8±1.25 (100%)	9.6±0.41 (100%)	9.4±0.31 (83%)	9.7±0.28 (100%)	9.3±0.68 (100%)
<i>Clostridium</i>	9.2±0.94 (100%)	9.4±0.42 (100%)	9.5±0.38 (100%)	9.2±0.82 (100%)	9.5±0.26 (100%)
Lecithinase (-)	9.2±0.94 (100%)	9.4±0.42 (100%)	9.5±0.38 (100%)	9.2±0.82 (100%)	9.5±0.26 (100%)
<i>C. difficile</i>	(0%)	5.5 (17%)	4.3±0.43 (33%)	4.1±0.40 (50%)	6.1 (17%)
Lecithinase (+)	5.4±0.28 (50%)	(0%)	(0%)	4.7±1.84 (50%)	4.4±0.78 (50%)
<i>C. perfringens</i>	5.4±0.28 (50%)	(0%)	(0%)	6.0 (17%)	4.4±0.78 (50%)
<i>Veillonella</i>	8.4±0.89 (50%)	8.3 (17%)	7.3±2.90 (33%)	9.6 (17%)	6.9±0.96 (67%)
<i>Megasphaera</i>	8.4 (17%)	(0%)	7.9 (17%)	(0%)	8.6±0.92 (33%)
Total aerobes	7.7±1.06 (100%)	6.2±1.55 (100%)	7.0±0.91 (100%)	7.3±0.38 (100%)	7.7±0.99 (100%)
Total anaerobes	10.6±0.39 (100%)	10.8±0.23 (100%)	10.7±0.28 (100%)	10.8±0.16 (100%)	10.7±0.38 (100%)
Total bacteria	10.7±0.39 (100%)	10.8±0.23 (100%)	10.7±0.28 (100%)	10.8±0.16 (100%)	10.7±0.38 (100%)

a): including *Enterococcus* spp.

b): mean (log viable count/g of feces) ± SD on day

c): percentage of positive cases on day

Bifidobacterium spp. が一定の菌数を維持したことによるためと考えられる。また *Lactobacillus* spp. の菌数も変動は見られなかった。Enterobacteriaceae に対する GPFX の抗菌力は強く、薬剤投与後 Enterobacteriaceae の菌数が検出限界以下にまで減少する被験者も認められたが、投薬終了後 28 日目にはほぼ元の菌数に回復した。*Streptococcus/Enterococcus* spp. の総菌数も薬剤投与により減少したが、投与終了後元の菌数に回復した。これらの菌種は 10^6 cfu/g 程度検出されるが、主要構成菌でないため、総菌数への影響は認められなかった。

今回 GPFX 200mg を 1 日 2 回 7 日間連続経口投与したとき、6 名の被験者のうち 3 名の被験者の糞便から *C. difficile* が検出されたが、特別な下痢症状等は認められなかった。一般的に日本人は、欧米人に比較し腸内細菌叢に *C. difficile* を有する割合が高く^{6,7)}、著者らの経験でも健康成人に ciprofloxacin⁸⁾ や cefixime⁹⁾ など抗生剤を投与することにより約半数に *C. difficile* が検出されている。これらのことから今回の *C. difficile* の消長は、特に GPFX 投与に特徴的な現象ではないと考えられた。

今回 GPFX を経口投与した場合、腸内細菌総数に変動は見られなかった。これは腸内細菌叢を構成する菌群の中で、優位を占める Bacteroidaceae, *Eubacterium* spp. および *Bifidobacterium* spp. が一定の菌数を維持したことによるものと考えられる。すでに市販されている ofloxacin¹⁰⁾、ciprofloxacin⁷⁾ などと同様に Enterobacteriaceae 等の菌数の減少が見られたが、薬剤投与後早い時期に元の菌数にまで回復した。

文 献

- 1) 守殿貞夫, 副島林造: 第 41 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。Grepafloxacin (OPC-17116), 神戸, 1993
- 2) 秋山 仁, 小富正昭, Stewart FP, Hopkins R, 堀勝行, 市毛一美: Grepafloxacin の体内動態 (Ⅲ)-サルおよびイヌにおける [14 C] Grepafloxacin の吸収排泄-。日化療会誌 43 (S-1): 125~130, 1995
- 3) Nord CE: Effect of antimicrobials on human flora. PP55 ~ 80, Anaerobic Infections in Humans (edited by Finegold SM, George WL), Academic Press, Inc, 1989
- 4) 加藤直樹, 加藤はる, 田中保知, 田中香お里, 渡辺邦友, 上野一恵: 新キノロン系抗菌薬 grepafloxacin の嫌気性菌に対する抗菌力。日化療会誌 43 (S-1): 42~49, 1995
- 5) 秋山 仁, 小池正己, 急式和代, 鈴木 敬, 楠本直俊, 森田清司, 小富正明: Grepafloxacin の体内動態 (IV) -ラット, サルおよびヒトにおける代謝-日化療会誌 43 (S-1): 131~149, 1995
- 6) Hentges DJ (Edit.): Human intestinal microflora in health and disease, pseudomembranous colitis (Bartlett JG) pp447 ~ 480, Academic Press, 1983
- 7) 小林とよ子: 抗菌剤投与と *Clostridium difficile* による下痢症に関する研究。Jap J Antibiotics 36: 464~476, 1983
- 8) 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対する影響。Chemotherapy 33 (S-6): 169~197, 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) 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

Effect of grepafloxacin on human fecal flora

Kazue Ueno[#], Naoki Kato and Kunitomo Watanabe

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

40 Tsukasa-cho, Gifu 500, Japan

([#] Present: Gifu College of Medical Technology)

Kouichi Wada, Junko Watabe and Jun Mizutani

The Calpis Food Industry Co., Ltd.

Grepafloxacin (GPFX) is a newly developed quinolone derivative. Fecal flora were studied in six healthy volunteers after the administration of 200 mg GPFX b.i.d. for seven days. Fecal samples were taken prior to and several times after administration, and quantitative and qualitative analyses of microorganisms in feces were performed. The total bacterial counts of aerobic and anaerobic bacteria did not change significantly.

Enterobacteriaceae and *Enterococcus* spp. were strongly suppressed during and after administration but these changes in fecal flora were temporary, and fecal flora returned to their former levels within 28 days after administration.

Transient appearance of *Clostridium difficile* was observed in some volunteers.