

## 【原著・基礎】

## Ceftizoxime alapivoxil の腸内細菌叢におよぼす影響

## —4 菌種定着マウスにおける検討—

岩田 敏<sup>1)</sup>・佐藤 吉壮<sup>2)</sup>・秋田 博伸<sup>3)</sup>、砂川 慶介<sup>4)</sup>  
 小林 寅詰<sup>5)</sup>・徳岡 寛子<sup>6)</sup>・矢野 一男<sup>6)</sup>、山路 真也<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>国立病院東京医療センター小児科\*, <sup>2)</sup>富士重工業健康保険組合総合大田病院小児科,

<sup>3)</sup>聖マリアンナ医科大学西部病院小児科, <sup>4)</sup>北里大学医学部感染症学講座,

<sup>5)</sup>三菱化学ピーシーエル化学療法研究室, <sup>6)</sup>旭化成株式会社医薬臨床・調査センター

(平成 14 年 3 月 8 日受付・平成 14 年 5 月 23 日受理)

新しいプロドラッグ型経口セフェム系薬 ceftizoxime alapivoxil (CZX-AP) について 4 菌種定着マウスの腸内細菌叢におよぼす影響を検討した。*Escherichia coli* 北研 M, *Enterococcus faecalis* 北研 M, *Bacteroides fragilis* GKP 0001, *Bifidobacterium breve* YIT 4006 の 4 菌種を腸管内に定着させた 4 菌種定着マウスに CZX-AP 20 mg/kg を 1 日 1 回, 連続 5 日間経口投与した結果, *E. coli* では減少を認めしたが, 他の 3 菌種では変動を認めなかった。また, 薬剤最終投与 4 時間後の消化管各部 (胃, 小腸上部, 小腸中部, 小腸下部, 大腸) の内容物中の生菌数も, 糞便内菌数の変動と同様, *E. coli* の減少を認めしたが, 他の 3 菌種では変動を認めなかった。糞便中および消化管内容物中  $\beta$ -lactamase 活性は薬剤投与前後の全検体で陽性であった。実験に使用した菌株に対する CZX-AP の活性体 ceftizoxime (CZX) の  $10^6$ CFU/mL 接種における最小発育阻止濃度 (MIC) は, *E. coli* 北研 M で  $0.005 \mu\text{g/mL}$ , *E. faecalis* 北研 M で  $12.5 \mu\text{g/mL}$ , *B. fragilis* GKP 0001 で  $3.13 \mu\text{g/mL}$ , *B. breve* で  $12.5 \mu\text{g/mL}$  であった。いずれの菌種においても薬剤の投与に伴う MIC 値の上昇は認められなかった。

**Key words:** ceftizoxime alapivoxil, 経口セフェム系薬, 4 菌種定着マウス, gnotobiotte, 腸内細菌叢

抗菌薬の開発にはめざましいものがあり, 感染症治療の強力な手段となり, 医療の進歩に大きく貢献してきたことは論をまたない。しかし, 反面, 抗菌薬が常在細菌叢にも影響をおよぼし, 菌交代や副作用の発現などの予期せぬ結果を引き起こし, 患者に負担を強いてきたことも否定できない。われわれはこうした問題に関連し, 抗菌薬の投与に伴う腸内細菌叢の変動に注目し, これまで種々の薬剤について検討を行ってきたが<sup>1-9)</sup>, 今回新しいプロドラッグ型経口セフェム系薬である ceftizoxime alapivoxil (CZX-AP)<sup>10)</sup> (Fig. 1) について, 4 菌種定着マウスを用いた検討を行ったので報告する。CZX-AP は, 修飾基として脂溶性と水溶性の両極性基を有する初のプロドラッグ型セフェム系薬で, 活性体はすでに上市されている注射用セフェム系薬 ceftizoxime (CZX)<sup>11)</sup> である。消化管内での溶解性ならびに安定性に優れると共に, 消化管吸収性にも優れた薬剤で, 消化管吸収に影響をおよぼす胃酸分泌抑制剤併用, 加齢, 食事, 服薬水量, 胃切除などのさまざまな因子影響を受け難く<sup>12-15)</sup>, 良好かつ確実な血中薬物濃度が期待できる薬剤である。消化管吸収量の増大に伴い, 腸内細菌叢への影響が軽微になることが期待されている。一方, 使用した 4 菌種定着マウスは, ヒトの乳児期の腸内細菌叢を想定して, 乳児期の腸内細菌叢の主要構成菌種である *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*,

*Bifidobacterium breve* の 4 菌種を無菌マウスの腸管内に定着させた gnotobiotte であり, 同一の腸内細菌叢が形成された条件下で, 抗菌薬の腸内細菌叢におよぼす影響を比較検討することが可能である<sup>1)</sup>。

## I. 材料および方法

## 1. 対象および投与方法

日本クレアから購入した生後 4~6 週齢の雄の ICR 系 IQI 無菌マウスを用いて, *E. coli* 北研 M, *E. faecalis* 北研 M, *B. fragilis* GKP 0001, *B. breve* YIT 4006 を経口投与し腸管内に定着させた 4 菌種定着マウスを作成し, CZX-AP 20 mg/kg を 1 日 1 回, 5 日間経口投与し, 連日糞便中の生菌数を測定した。糞便採取は薬剤の投与直前, すなわち投与開始前および投与開始後は前回投与 24 時間目に行った。また, 薬剤最終投与後 4 時間目にマウスを屠殺して, 消化管各部 (胃, 小腸上部, 小腸中部, 小腸下部, 大腸) の内容物中の生菌数を測定した。

糞便の希釈および 4 菌種の分離, 同定, 菌数測定は, 光岡の方法<sup>16)</sup>にしたがって行った。使用した培地は, Trypticase soy agar (BBL), DHL agar (Nissui), EF agar (Nissui), マウス脱繊維血 5% 加 BL agar (Nissui), BBE agar (Kyokuto) であった。消化管各部の細菌数

\*東京都目黒区東が丘 2-5-1

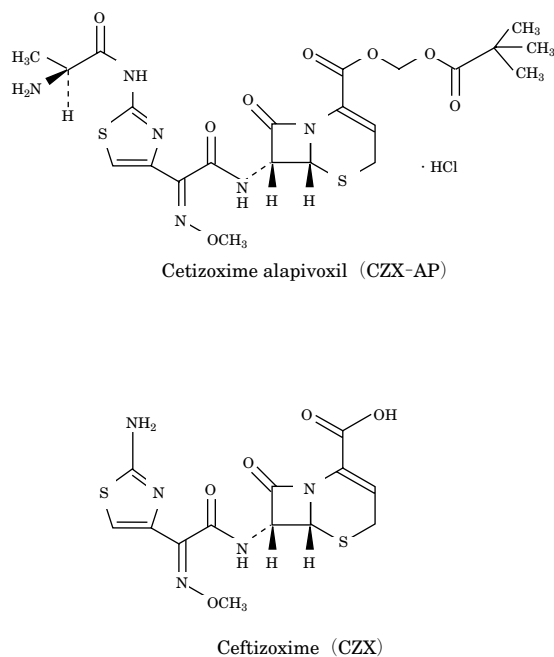


Fig. 1. Chemical structures of ceftizoxime alapivoxil and ceftizoxime.

の測定は、消化管各部を約 1 cm 切除し、内容物を無菌的に絞り出して、糞便中の細菌数の測定と同様の方法で行った。

マウスの飼育は TREXLER 型<sup>17)</sup>に多少改良を加えたニッコー社製のアイソレーター内で、原則として 1 ゲージ 1 匹宛の条件で、佐々木らの方法<sup>18)</sup>と同様に行った。マウスの無菌試験は Wagner の方法<sup>19)</sup>に準じて行った。

使用した菌株は *E. coli* 北研 M, *E. faecalis* 北研 M は北里研究所から, *B. fragilis* GKP 0001 は岐阜大学微生物学教室から, *B. breve* YIT 4006 はヤクルト本社研究所から, それぞれ分与を受けたものである。

投与量については, CZX-AP はマウス, ラットなどのげっ歯類においては, 腸管内で分解を受けやすく, そのため投与量は, 小児における通常用量 6 mg/kg/日よりも多い, 20 mg/kg を設定した。

## 2. 糞便中および消化管内容物中 $\beta$ -lactamase 活性の測定

糞便を秤量し, 9 倍量の 0.05 M PBS (pH 7.0) を加えてよく攪拌し, 4°C, 10,000 rpm, 20 分間遠心分離後, 上清を 0.4  $\mu$ m の Millex フィルター HA (ミリポア) でろ過し, そのろ液を検液として用い, ニトロセフィン溶液 (500  $\mu$ g/mL) を反応させ, 10 分間で黄色から赤色に変化したものを陽性とした。

## 3. 最小発育阻止濃度の測定

各検体から分離された菌株について, CZX の  $10^6$ CFU/mL 接種時における最小発育阻止濃度 (MIC) を, 日本化学療法学会標準法<sup>20)</sup>および同学会の嫌気性菌感受性測定法<sup>21)</sup>により測定した。

## II. 結 果

### 1. 糞便内 4 菌種の生菌数の変動

*E. coli* は CZX-AP 投与翌日より菌数の減少を認め, 2 日目では 5 匹中 2 匹, 3 日目以降で 5 匹中 3 匹が検出限界以下 ( $10^4$ CFU/g 以下) となり, 5 匹中 *E. coli* の検出されたマウスの割合は, それぞれ 60% および 40% と低下した (Table 1)。しかし, 最終的に菌が残存した 2 匹では  $10^5 \sim 10^6$ CFU/g の菌数を認め, 平均菌数では  $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 程度を維持した。*E. faecalis*, *B. fragilis* および *B. breve* では菌数の変動を認めなかった (Figs. 2, 3)。

### 2. 消化管各部の 4 菌種の生菌数

*E. coli* の糞便内生菌数が検出限界以下となったマウスでは, 消化管各部位においても生菌数は検出限界以下であり, 消化管各部における平均菌数はコントロール群に比較して低値を示した。しかし, *E. coli* が検出限界以下となったマウスにおいても, *E. faecalis*, *B. fragilis* および *B. breve* の生菌数にはコントロール群との間に差がなく, これらの 3 菌種は消化管各部位においても菌数の変動が認められなかった (Fig. 4)。

### 3. 分離菌株の CZX 感受性

薬剤投与前の各菌株に対する CZX の MIC は, *E. coli* で 0.005  $\mu$ g/mL, *E. faecalis* で 12.5  $\mu$ g/mL, *B. fragilis* で 3.13  $\mu$ g/mL, *B. breve* で 12.5  $\mu$ g/mL であった。い

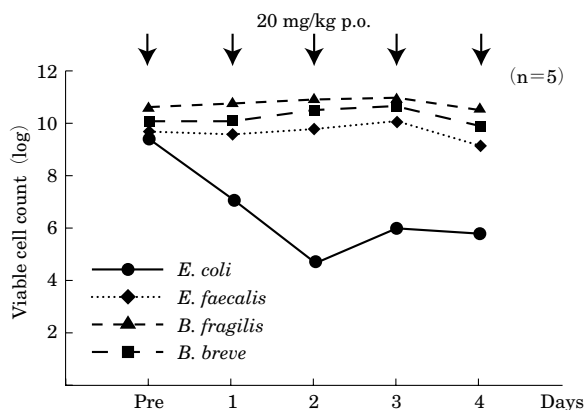


Fig. 2. Changes of viable cell counts in feces following ceftizoxime alapivoxil administration to tetracontaminated mice.

Table 1. Detection frequencies of intestinal bacterial flora following ceftizoxime alapivoxil administration to tetracontaminated mice

Organism	Percentage of positive cases by day				
	Pre	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	100	100	60	40	40
<i>E. faecalis</i>	100	100	100	100	100
<i>B. fragilis</i>	100	100	100	100	100
<i>B. breve</i>	100	100	100	100	100

ずれの菌種においても薬剤の投与に伴う MIC 値の上昇は認めなかった。

4. 糞便中および消化管内容物中  $\beta$ -lactamase 活性  
 薬剤投与前の糞便は全マウスで  $\beta$ -lactamase 活性が陽性であった。薬剤投与後も、全マウスの全糞便および全消化管部位で  $\beta$ -lactamase 活性は陽性であった (Table 2)。

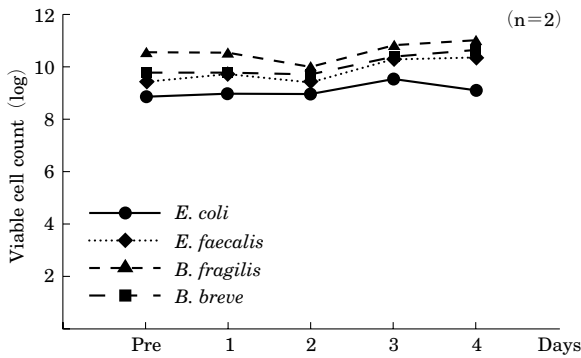


Fig. 3. Changes of viable cell counts in feces in tetracontaminated mice (control).

III. 考 察

CZX-AP は、旭化成株式会社が開発中の新しいタイプのプロドラッグ型セフェム系薬であり<sup>10)</sup>、脂溶性の修

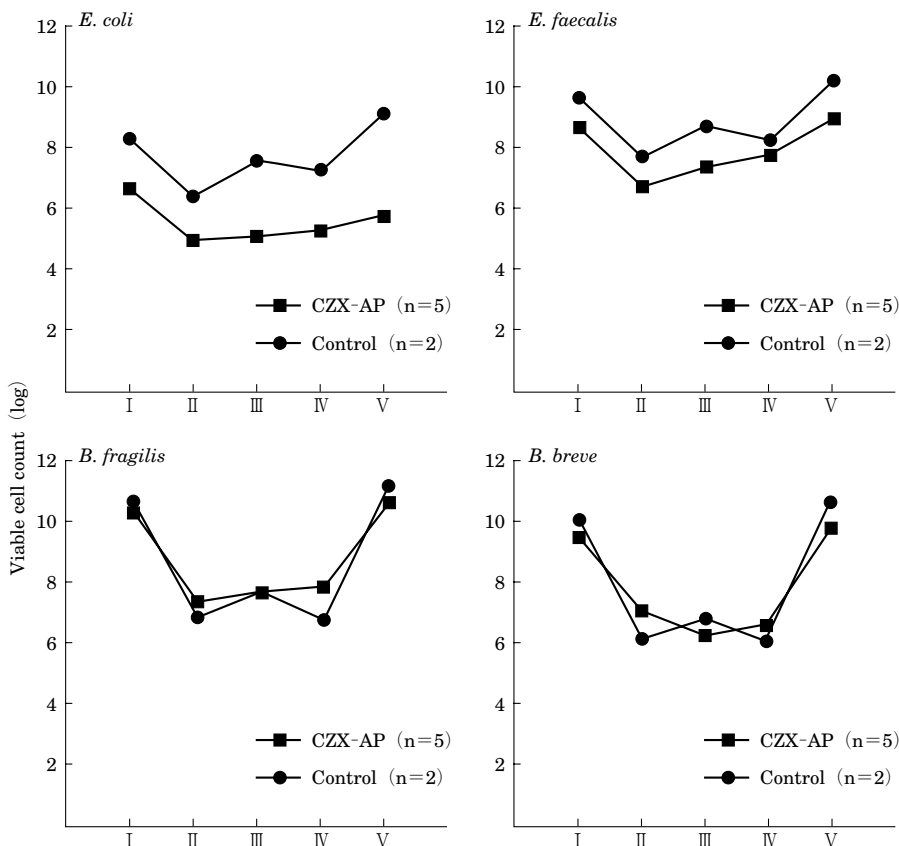
Table 2.  $\beta$ -Lactamase activity in feces before, during, and after ceftizoxime alapivoxil administration to tetracontaminated mice

	Mouse no.	pre	1 day	2 days	3 days	4 days				
						I	II	III	IV	V
CZX-AP	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ :  $\beta$ -lactamase positive

CZX-AP: ceftizoxime alapivoxil

I : Stomach, II : Upper intestine, III : Middle intestine, IV : Lower intestine, V : Colon



CZX-AP: ceftizoxime alapivoxil

I : Stomach, II : Upper intestine, III : Middle intestine, IV : Lower intestine, V : Colon

Fig. 4. Distribution of intestinal bacterial flora following ceftizoxime alapivoxil administration to tetracontaminated mice.

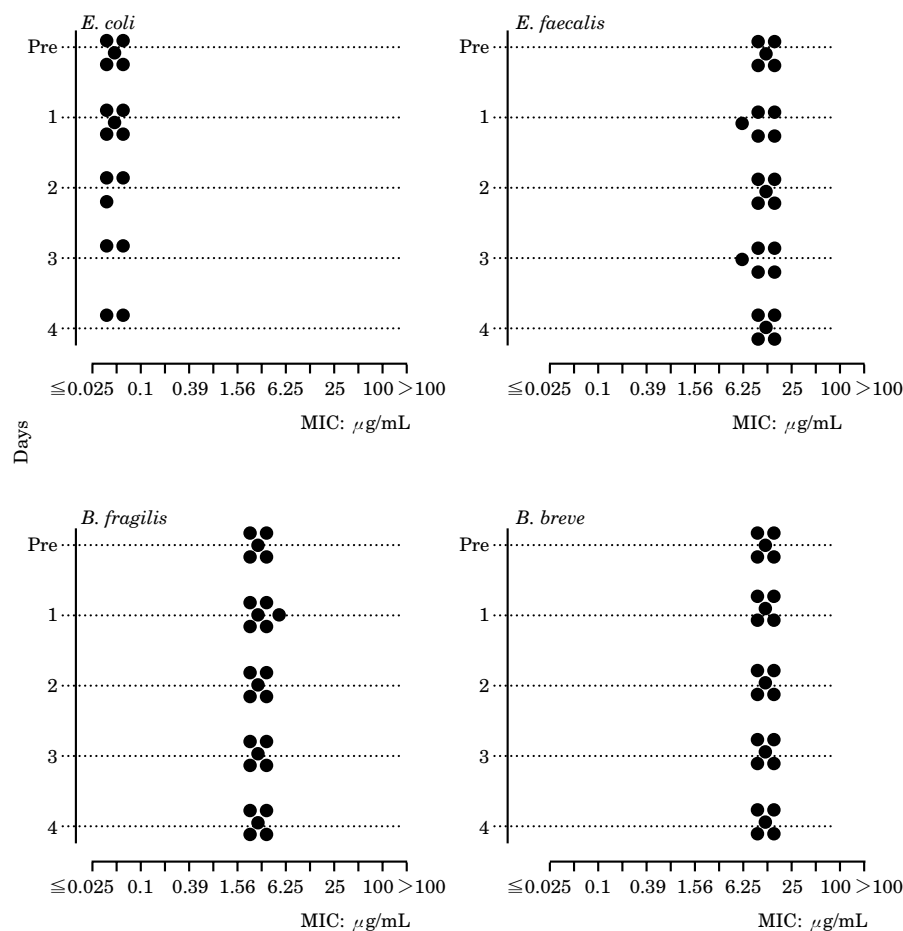


Fig. 5. MICs of ceftizoxime against isolated bacteria in feces following ceftizoxime alapivoxil administration to tetracontaminated mice.

飾基に加え、新たに水溶性の修飾基を導入し、両極性をバランスよく保持させることにより消化管吸収性の向上を図っている。消化管吸収量の増大と消化管吸収における諸因子の影響を少なくすることを意図した薬剤であり、ヒト体内動態試験においてその特徴はすでに確認されている<sup>12-15)</sup>。

CZX-APのヒト腸内細菌叢におよぼす影響については、健康成人を用いた臨床第一相試験において検討され、本薬の腸内細菌叢に対する影響は、従来の経口セフェム薬に比し同等もしくはやや少ないものと推察されている<sup>22)</sup>。CZX-APは従来のプロドラッグ型セフェム薬に比し、消化管吸収率が高率で、そのうえ、消化管内での一次代謝物、Ala-CZXの抗菌活性が弱いため、腸内細菌叢に対する影響が少なくなることが予測されている。

今回、われわれは、本薬の小児腸内細菌叢におよぼす検討にさきだち、4菌種定着マウスでの検討を実施した。CZX-AP 20 mg/kgを1日1回、連続5日間経口投与した結果、*E. coli*では減少を認めたが、他の3菌種では変動を認めなかった。また、薬剤最終投与4時間後の消化管各部(胃、小腸上部、小腸中部、小腸下部、大腸)の内容物中の生菌数も、糞便内菌数の変動と同様、*E. coli*

の減少を認めたが、他の3菌種では変動を認めなかった。CZXの*E. coli*に対する抗菌力の強さが反映してか、cefditoren pivoxil (CDTR-PI)<sup>7)</sup>や cefcapene pivoxil (CFPN-PI)<sup>8)</sup>の成績に比し*E. coli*の減少がやや大きかったが、他の菌種は類薬と同様ほとんど変動を認めず、腸内細菌叢に対する影響は少ないものと推察された。同時に検討を行った糞便中および消化管内容物中 $\beta$ -lactamase活性は、薬剤投与前後の全検体で陽性を示して変化は認められなかったが、これは菌数に変動が認められなかった*B. fragilis*に由来するものと考えられる。

実験に使用した菌株に対する活性体CZXのMICの変動についても検討したが、本薬投与前後で4菌種共にMIC値の上昇は認めず、本薬投与による耐性菌の出現の心配は少ないものと思われる。

CZX-APでは体内動態の動物種差が大きく、尿中排泄率から推定した消化管吸収率は、マウスではヒトの数分の1である。また、今回のマウスにおける投与量は、小児の臨床常用量6 mg/kg/日の3倍強の20 mg/kgであり、マウスの腸管での薬物濃度はヒトの臨床使用時に比しかなりの高濃度と推定される。以上の結果から、CZX-APの4菌種定着マウスの腸内細菌叢に対する影

響は比較的少ないものと考えられ、本薬を小児に臨床使用しても腸内細菌叢におよぼす影響はそれほど大きいものではないものと推察される。

#### 文 献

- 1) 南里清一郎: 抗生物質経口投与の腸内細菌叢に及ぼす影響。第一編。Germ-free マウスを用いた実験的検討。感染症学雑誌 54: 766~779, 1980
- 2) 南里清一郎: 抗生物質経口投与の腸内細菌叢に及ぼす影響。第二編。腸内細菌叢の変動と尿路感染症。感染症学雑誌 54: 780~788, 1980
- 3) 秋田博伸: 各種抗生物質投与による腸内細菌叢の変動。無菌動物を用いた実験。感染症学雑誌 56: 1203~1215, 1982
- 4) 秋田博伸: 各種抗生物質投与による腸内細菌叢の変動。小児領域にみられる影響について。感染症学雑誌 56: 1216~1224, 1982
- 5) 岩田 敏, 横田隆夫, 楠本 裕, 他: Cefixime (CFIX) の腸内細菌叢に及ぼす影響。感染症学雑誌 60: 549~573, 1986
- 6) 岩田 敏, 山田健一朗, 金 慶彰, 他: Cefpodoxime proxetil の腸内細菌叢に及ぼす影響。Jap. J. Antibiotics 42: 1667~1684, 1989
- 7) 岩田 敏, 川原和彦, 磯畑栄一, 他: Cefditoren pivoxil の腸内細菌叢に及ぼす影響。Chemotherapy 41: 358~374, 1993
- 8) 岩田 敏, 川原和彦, 磯畑栄一, 他: S-1108 細粒の腸内細菌叢に及ぼす影響。Jap. J. Antibiotics 46: 1045~1062, 1993
- 9) 岩田 敏, 山本敬一, 磯畑栄一, 他: SY 5555 dry syrup の腸内細菌叢に及ぼす影響。Chemotherapy 42: 939~951, 1994
- 10) Kasai M, Hatano S, Kitagawa M, et al.: AS-924, a Novel Bifunctional Prodrug of Ceftizoxime. J. Antibiotics 52: 491~500, 1999
- 11) Kamimura T, Matsumoto Y, Okuda N, et al.: Ceftizoxime (FK-749), a new parenteral cephalosporin: In vitro and in vivo antibacterial activities. Antimicrob. Agents Chemother. 16 (5): 540~548, 1979
- 12) Totsuka K, Shimizu K, Mori N, et al.: Effects of antacid pretreatment on the pharmacokinetics of AS-924, a novel ester-type cephem antibiotics. — Comparison with ceftoram pivoxil. Int. J. of Antimicrobial Agents 18: 477~482, 2001
- 13) Totsuka K, Shimizu K, Mori N, et al.: Effects of food intake and age on the pharmacokinetics of AS-924, a novel ester-type cephem antibiotics. — Comparison with cefpodoxime proxetil. Int. J. of Antimicrobial Agents 18: 463~469, 2001
- 14) Matsumoto F, Sakurai I, Morita M, et al.: Effects of the quantity of water and milk ingested concomitantly with AS-924, a novel ester-type cephem antibiotics, on its pharmacokinetics. Int. J. of Antimicrobial Agents 18: 471~476, 2001
- 15) Fujimoto M: Pharmacokinetics of CFPN-PI and AS-924 in gastrectomized patients. Int. J. of Antimicrobial Agents 18: 489~494, 2001
- 16) 光岡知足: 腸内細菌叢の検索手段。感染症学雑誌 45: 406~419, 1971
- 17) Trexler P C: The use of plastics in the design of isolator systems. Ann. N.Y.Acad. Sci. 78: 29~36, 1959
- 18) Sasaki S, Onishi M, Nishikawa T, et al.: Monocontamination with bacteria in the intestines of germfree mice. Keio J. Med. 19: 87~101, 1970
- 19) Wagner M: Determination of germ free status. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78: 89~101, 1957
- 20) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改正について (1968年制定, 1974年改定)。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 21) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 27: 559~560, 1979
- 22) 中島光好, 金丸光隆, 森 信博, 他: 新規エステル型経口セフェム剤 AS-924 の第一相臨床試験。投稿準備中

## Influence of ceftizoxime alapivoxil on intestinal bacterial flora: a study in gnotobiotic mice inoculated with 4 bacterial strains

Satoshi Iwata<sup>1)</sup>, Yoshitake Sato<sup>2)</sup>, Hironobu Akita<sup>3)</sup>, Keisuke Sunakawa<sup>4)</sup>,  
Intetsu Kobayashi<sup>5)</sup>, Hiroko Tokuoka<sup>6)</sup>, Kazuo Yano<sup>6)</sup>  
and Shinya Yamaji<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, National Tokyo Medical Center, 2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Fuji Heavy Industries Ltd. Health Insurance Society, General Ota Hospital

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital

<sup>4)</sup>Department of Infectious Diseases, Kitasato University School of Medicine

<sup>5)</sup>Chemotherapy Research Laboratory, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories

<sup>6)</sup>Clinical Development and Surveillance Center, Asahikasei Corporation

We studied the influence of ceftizoxime alapivoxil (CZX-AP), a new prodrug oral cephem agent, on intestinal bacterial flora in gnotobiotic mice inoculated with 4 bacterial strains. We administered 20 mg/kg of CZX-AP once daily for 5 consecutive days to mice inoculated with bacterial strains, *Escherichia coli* Hokken M, *Enterococcus faecalis* Hokken M, *Bacteroides fragilis* GKP 0001 and *Bifidobacterium breve* YIT 4006. We found a decrease in *E. coli*, but no change in the other 3 bacteria. We also found a decrease in the number of viable *E. coli* in the contents of each part of the digestive tract (stomach, upper intestine, middle intestine, lower intestine, colon) 4 hours after the last dose was administered, but no change in the other 3 bacteria. This agrees with results we found on changes in the number of fecal flora. All specimens from the stool or digestive tract contents tested for  $\beta$ -lactamase activity before and after drug administration were positive. The minimum inhibitory concentration (MIC) of ceftizoxime (CZX), the active moiety of CZX-AP we used, with inoculum size of  $10^6$ CFU/mL, was 0.005  $\mu$ g/mL for *E. coli*, 12.5  $\mu$ g/mL for *E. faecalis*, 3.13  $\mu$ g/mL for *B. fragilis* and 12.5  $\mu$ g/mL for *B. breve*. We found no MIC increase concomitant to drug administration for any bacterial strains.