



Master's Lectures – 11

1. 腸内細菌叢、 2. 抗生物質の用法、用量と効果に 対する宿主因子

元 東京専売病院 院長

しま だ かおる
島 田 馨
Kaoru SHIMADA

この Master's Lectures は「ライフワークとなった研究」や「研究の思い出に残るエピソード」などを書く欄とある。私は内科の教室に入って 1960 年代後半に UCLA に留学し、帰国後は養育院（現 東京都長寿健康医療センター）で老人の感染症を、東大医科研に移ってからは日本でも患者が出始めたエイズの診療を行ったので、一つのテーマを追い求めたとは程遠いキャリアであった。そこで留学中の研究テーマの嫌気性菌、特に腸内細菌叢と、養育院の診療の中で行った抗生物質の用法、用量と宿主因子の二つを取り上げてみた。

I. 嫌気性菌

私の居た内科の主要テーマが腎臓だったので、留学先を探すとき、米国で行われた腎盂腎炎のシンポジウムの記録集をみて、演者で教授と肩書きのあった十数名の先生に application を送り、来て良いと最初の手紙がきた UCLA の Dr. Finegold のところに決めてしまった。その後 Dr. Finegold の専門が嫌気性菌と分かったが、当時の細菌学の教科書に載っている嫌気性菌は破傷風とガス壊疽くらいで、検査室でも嫌気性菌培養にはほとんど手を付けていなかったし、私も虫垂炎後に発熱が続いて横隔膜下膿瘍を疑った受け持ち患者で、横隔膜下を穿刺して採取した膿から好気性培養陰性のグラム陽性球菌が検出されたのが、唯一の経験であった。

Dr. Finegold の Anaerobic LaB での嫌気性菌のトレーニングは糞便の定量培養から始まった。嫌気性の条件下で便を秤量して、 10^{-8} まで 10 倍希釈系列を

作り、12 種類の培地に目的とする菌に応じて 3 - 4 段階の希釈液 0.1cc を接種し集落を数える。細菌叢は腸管の部位によって異なり、回腸瘻や横行結腸瘻の患者でも調べたが、回腸瘻では大腸菌など好気性菌数が嫌気性菌数より多く、横行結腸瘻は好気性菌と嫌気性菌数はほぼ同程度で、腸管下部ほど嫌気性菌が多いことが分かった（表 1, 2）。

腸内細菌叢の働きについては、炭水化物や脂質の消化吸収、ビタミン K 産生、胆汁酸などの腸管内代謝と腸肝循環への関与があり、マウスに抗生物質を投与して腸内細菌叢を攪乱すると Salmonella 感染が成立しやすくなる実験から生体防護作用が、また無菌動物は腸管壁が菲薄なので細菌叢は壁の肥厚に関係していること程度しか判っていなかった。腸内細菌叢への食事による影響を見るため、同じ Finegold の研究室に留学された岐阜大の上野一恵先生は、ご自身でハンバーガーなどのアメリカ食を続けた時と日本食のときの腸内細菌叢を比較し、日本食の時には沢庵の臭いのする Fusobacterium の菌種が増えたと言っておられた。

表 1 糞便の細菌

Anaerobes		Aerobes	
Bacteroides fragilis	$10^{10}/g$	E.coli	$10^6/g$
Fusobacterium	$10^5/g$	Enterococci	$10^5/g$
Bifidobacterium	$10^5/g$	Lactobacillus	$10^3/g$
Clostridium	$10^3/g$		

表 2 糞便 横行結腸瘻 回腸瘻の細菌

	糞便	横行結腸瘻	回腸瘻
嫌気性菌	$10^{10}/g$	$10^8/g$	$10^5/g$
好気性菌	$10^5/g$	$10^7/g$	$10^8/g$
総菌数	$10^{10}/g$	$10^8/g$	$10^8/g$

腸内細菌による胆汁酸代謝

トレーニングが終わると、腸内細菌による胆汁酸代謝の仕事を始めた。コレステロールは肝臓で一次胆汁酸である chol 酸と chenodeoxychol 酸に変換され、glycin や taurin と抱合されて胆汁中に排泄される。しかし糞便中には chol 酸から変化した deoxychol 酸と chenodeoxychol 酸から変わった lithochol 酸などの二次胆汁酸が主体となる。つまり肝臓でできた抱合胆汁酸は、腸管内で細菌による脱抱合と 7 位の脱水酸化を受けている。盲係蹄管症候群の脂肪吸収障害の成因は、盲管内で腸内細菌が過増殖して胆汁酸が脱抱合され、脂肪のミセル化が低下することにある。腸管内での胆汁酸代謝に関与する細菌については、腸管内の嫌気性菌についての知識が乏しかったこともあって断片的な知見しか記載されて無かった。それまで嫌気性菌の同定は形態学的所見を基にしていたが、留学したころからブドウ糖の最終発酵産物の短鎖脂肪酸のパターンを基にした分類体系に代わり、研究室では保存の嫌気細菌株をガスクロや生化学的検査で再同定の作業の最中で、新しい体系できちんと同定された株はディープフリーザーに整理されていた。この菌株を使って抱合胆汁酸を添加した液体培地に接種、培養して薄層クロマトグラフィーで展開して脱抱合能の有無を検討した。脱抱合能をもつ菌のほとんどは嫌気性菌であり、好気性菌では腸球菌だけで大腸菌群は脱抱合に関与していなかった(表 3)。この結果を米国感染症学会で報告したら推薦論文に選ばれ、J. Infect. Dis に掲載された。次に一次胆汁酸の母核 7 位の水酸基に dehydroxylation をおこして deoxychol 酸や lithochol 酸の二

表 3 胆汁酸脱抱合能を有する細菌

	検討 菌株数	脱抱合能の ある菌株数
Anaerobes		
Bacteroides fragilis	22	17
Fusobacterium sp.	16	10
Bifidobacterium	16	16
Clostridium perfringens	1	1
Aerobes		
E.coli	5	0
Klebsiella-Enterobacter	6	0
Enterococcus	5	5
Lactobacillus sp.	2	1

次胆汁酸に変換する菌の数は $10^5/g$ 程度で、腸内細菌叢の中の $1/10^5$ と極めて少ないため分離に苦勞したが、Cl. Bifermentans, Cl.sordelli などの Clostridium と、同定困難な Eubacterium と思われる菌であった。面白いことに二次胆汁酸は一次胆汁酸より毒性が強い。Deoxychol 酸は chol 酸よりグラム陽性球菌の発育抑制作用が強く選択培地に使われるし、lithochol 酸は chenodeoxychol 酸より組織障害性が強い。生体は自己保存のため、毒性の強いものをより安全なものに変える解毒機構を持っているのが普通であるが、腸管内でより抗菌性の強い胆汁酸に変換されるのは、細菌叢の組成を一定に保つのに必要な機構なのかもしれないと思ったりした。また二次胆汁酸に変換する細菌は、腸内細菌叢のなかでも少数な菌であるが、その役割をきちんと果たしていることは、人間社会と通ずるものがあるように思えた。

帰国後に勤務した養育院(現 東京都長寿健康医療センター)の細菌検査室で嫌気性菌検査もルーチンワークに取り入れた。1972年に日本医学会で腸内細菌叢のシンポジウムがあったが、抗菌薬内服時の腸内細菌叢の変化の発表にも好気性菌の変動だけで、嫌気性菌には触れておらず、片手落ちの感が否めなかった。しかし間もなく順天堂大の小酒井望教授や日大の石山俊次教授らによって嫌気性菌研究会が発足し、岐阜大の嫌気性菌研究施設のグループが検査技師を対象に毎年講習会を行うなど検査の普及に努められ、日本の嫌気性菌の検査レベルは急速に向上した。

Cl.difficile 腸炎

養育院で肺炎や尿路感染の入院患者で抗生物質が効いて熱は下がったが、再度発熱するので抗生物質を替えて踏ん張ってみても死亡する例が年間に数例あり、剖検では偽膜性腸炎であった。調べてみると日本では十数例の報告しかない。そんな少ないはずはなく、大腸内視鏡検査が行われず見落とされていたのである。偽膜性腸炎の原因は黄色ブドウ球菌の腸管毒とされていたが、Finegold の研究室の同僚だった Bartlett が Cl.difficile と訂正し、この菌の分離同定は菌名のように difficult であったが、養育院の症例から本邦最初に分離できた。治療はバンコマイシン

内服であるが、当時は骨髄移植の前処置の腸管内殺菌に認められているだけで偽膜性腸炎には使えなかったもので、取り扱っているメーカーや厚生省と相談し、養育院だけで治験を行って適応の承認を得た。

1990年代に入り、細菌学にも分子生物学的手法が導入されて腸内細菌叢の研究は大きく進歩した。16S rRNAにはすべての細菌で高度に保存された領域 (constant region) と、その間に各細菌を特徴づける9つの可変領域 (variable region) が存在するが、constant region にプライマーを設定することで、細菌叢全体の16S rRNA情報を確認できるようになり、それによると腸内細菌の99%は Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria の4つの門に属しており、1000種類近くの細菌で構成されることが分かったが、主なものは30～40種類程度で、これで全体の大半をしめている。また腸内細菌叢と関係のある疾患として肥満、糖尿病の他、潰瘍性大腸炎や Crohn 病などの炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、非アルコール脂肪肝炎などの消化器疾患、さらにはリウマチ、喘息などの免疫・アレルギー疾患に加えてギランバレー症候群、Parkinson 病、自閉症などの脳神経疾患などが判明してきた。最近では難治性の Cl.difficile 腸炎に正常糞便細菌叢移植が試みられて、良好な成績を挙げている。これらについてはモダンメディアの60巻10月号から12月号に腸内細菌叢がシリーズで取り上げてあり、また日本内科学会雑誌の104巻1号に、腸内細菌と内科疾患の特集が組まれているので参照していただきたい。

II. 抗生物質の用法、用量と効果に対する宿主因子

留学中は研究室の research work だけでなく、感染症の回診や症例検討会にも参加した。ここで驚いたのは米国と日本の抗生物質の使い方の違いであった。日本では起炎菌が判らぬ例でも単剤投与が原則で、3日間投与して効果がみられない場合は他剤に切り替え、2剤併用は健康保険で厳しく査定されていた。これに対して UCLA では起炎菌不明の例に最初からセフェム、テトラサイクリンにカナマイシンかポリミキシン B を加えた3剤のカクテルが使用

されていたし、投与量も大量投与に傾いていて、十分な効果の挙がる最少量を目指す日本と大きな違いがみられた。この頃日本で使われていた抗生物質のほとんどが海外メーカーからの導入品で、ケフリン (CET) やケフロジン (CER) はリリー社から塩野義が導入したが、ケフリンは米国で1日量2～6g、最大12gであり、日本で当初に承認された1日量1～2gは少量過ぎて効果が保証できないとリリー社から発売中止を求められたほどであった。投与量は抗生物質の血中濃度のデータと臨床的な満足度という経験的なもので設定されていたので、投与量の問題をより科学的に検討すべく、私と旧知の塩野義の伊藤昌男さん (当時の開発部長) は Shah や Eagle の論文にヒントを得て、血中濃度に加えて抗生物質と菌の接触時間の要素にも注目し、塩野義の研究室でペニシリン G と溶連菌を用いた *in vitro* の実験に着手された。

先ず溶連菌を液体培地に接種し、これに最少発育阻止濃度 (MIC) のペニシリン G を1.5時間作用させたのち、ペニシリナーゼでペニシリン G を破壊して生菌数を計算すると溶連菌の10～50%が生き残っており、この生存菌はペニシリン G との接触を断っても直ちに再増殖することはなく、3時間後に増殖を再開した。この1.5時間ペニシリン G に接触した溶連菌をマウス大腿に接種すると、生菌数は接種後もしくは減少傾向を示し、6時間後に増殖を再開した。ケフリンと大腸菌などの組み合わせでも同様の成績が得られたので (図1)、これに基づいて

- 1) ケフリンやケフロジンの血中濃度が MIC を上回る時間を1.5時間以上維持すること。
- 2) ケフリンやケフロジンの血中濃度が最少発育阻止濃度を下回る時間を宿主の抵抗力が零の場合は3時間以内、抵抗力が正常の場合は6時間以内にする。

とするケフリンの投与理論を考えだされた (図2, 3)。この投与理論を臨床的に実証するには敗血症が最も適した疾患である。私の勤務していた養育院では、当時入院患者100人に対し3.9人が敗血症患者であったので、投与理論の臨床的検討を伊藤部長から依頼された。

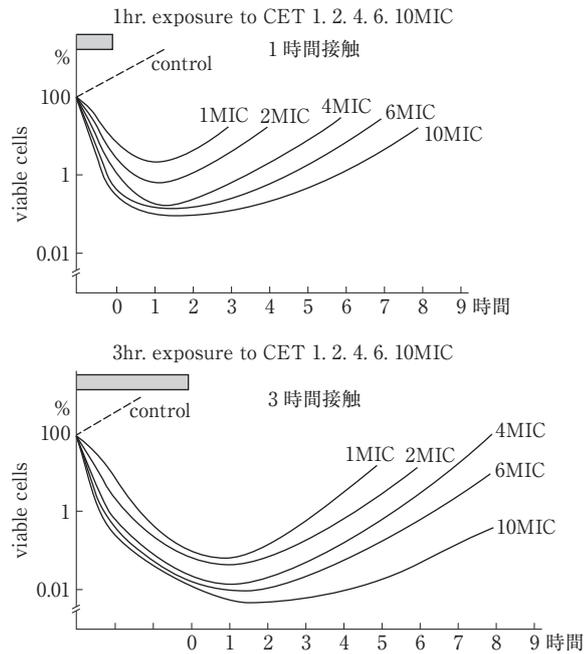


図1 *In vitro* における CET の殺菌効果
(*E. coli* 6 株平均)

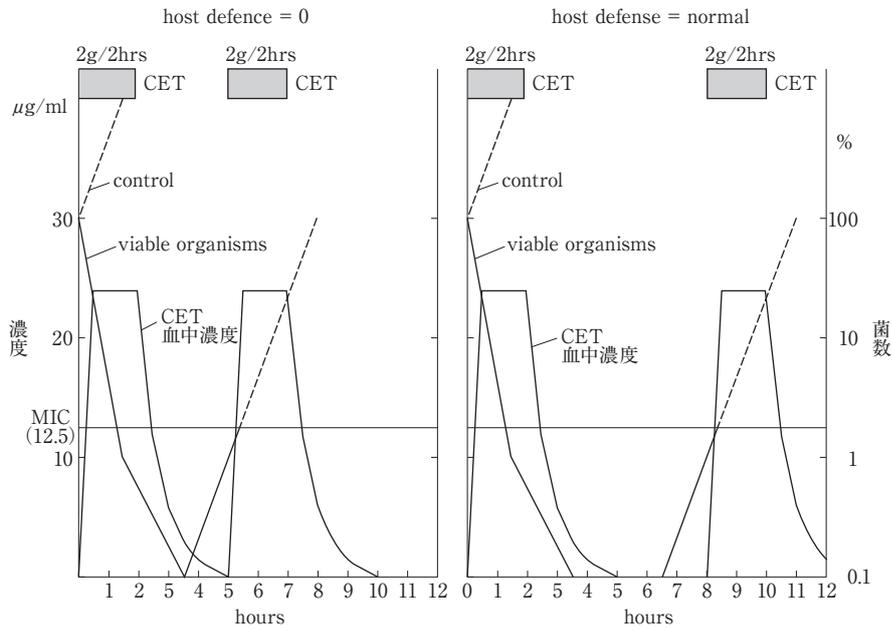


図2 CET 2g/2hrs 投与時の血中濃度と想定 viable cell
(MIC 12.5µg/ml の細菌感染の場合)

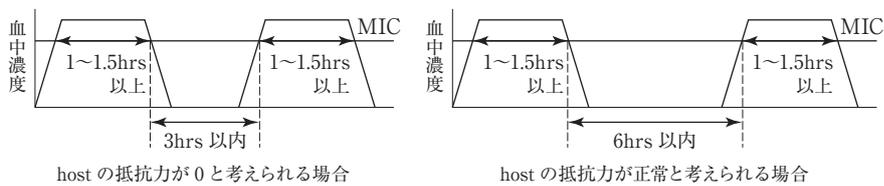


図3 CET, CER の理論的な 1 回投与量・投与間隔

養育院の入院患者は皆老人なので、まず老人14例にケフリンを点滴投与した時の血中濃度を測定し、血中半減期と最高血中濃度は健常成人のほぼ2倍であることを確認した。また筋注投与のケフロジンでも同様な結果が得られたので、これを基に敗血症患者の病歴に記載してあるケフリン、ケフロジンの投与量、投与時間から各患者の血中濃度曲線を作図し、この図に血中分離菌のMICを上回る時間と下回る時間を求め、臨床効果と対比した。

43例の敗血症例で、この理論に合致した症例の有効率は70%、合致しなかった症例のそれは30%

CET (IVD)	×	○	×	×××	××××
CER (IM IVD)	××	○		×××	×××
谷間時間	0~4	4~6	6~10	10~	∞ (MIC ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$)
有効率	70% (14/20)		26% (6/23)		

○: 著効 ○: 有効 ×: 無効
P < 0.05

図4 谷間時間と臨床効果

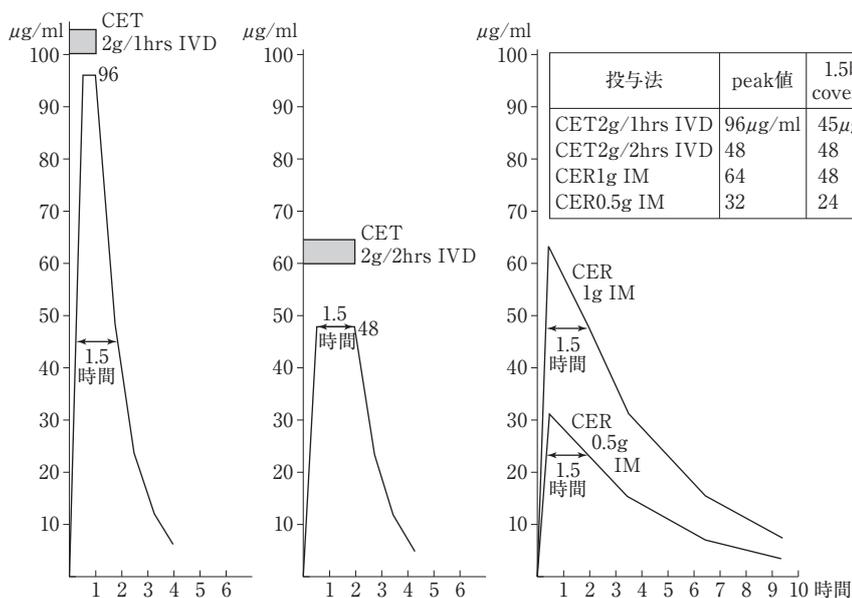


図6 最高血中濃度と1.5時間 cover濃度(老人)

と有意差がみられ、この投与理論の正当性が証明された。これを少し詳しく見ると

谷間時間と臨床効果(図4) 谷間時間が投与理論の6時間以内の例の有効率は70%、投与理論から外れた6時間以上の例の有効率26%で両群間に有意差がみられた。

最高血中濃度/起炎菌のMICと臨床効果(図5) 最高血中濃度がMICを上回った例の有効率は70%、MICを下回った例の有効率は20%で両群間に有意差がみられた。

Cover時間と臨床効果(図6) ケフリン点滴では30

CET (IVD)	×	○	×	××××
CER (IM IVD)	×××	○	×	×××
peak BL/MIC	≥ 5	5~1	< 1	
有効率	70% (16/23)		20% (4/20)	

P < 0.01

◎: 著効 ○: 有効 ×: 無効

図5 最高血中濃度/MIC比と臨床効果

分で血中濃度が最高に達し、点滴終了までその濃度がプラトウに維持されるので、最高血中濃度がMICを超えていた例は cover 時間が1.5時間を超えていたことになる。セファロリジン筋注の半減期は高齢者で3時間と長いため、1.5時間を cover する濃度は最高血中濃度の75%であった。最高血中濃度がMICを超えている例の有効率は70%、MIC以下の例の有効率は20%で、有意差が得られた。

投与理論と臨床効果(図7) cover時間が1.5時間以上で、かつ谷間時間が6時間の条件を満たしたものを dosage 適とすると、適と不適の間に有意差が示された。なおケフリンやケフロジンのMICが100μg/ml以上である起炎菌の例は、元来が本剤に対する適応外であるため、この投与理論と臨床効果の解析からは除外した。

血清総蛋白濃度と臨床効果(図8) 敗血症発症時の血清総蛋白濃度と臨床効果の関係を示す。総蛋白5.4g/dl以下の例では dosage 適、不適群間に抗生物質の有効率の差はなかったが、5.5g/dl以上の例では5%以下の危険率で dosage 不適群の有効率が低く、また dosage の適否と無関係に、総蛋白が5.4g/dl

dosage		適		不適			
cover時間		○		○		×	
谷間時間		○		×		×	
臨床効果	CET例	○	●	○	●	○	●
		○	●	○	●	○	●
		○	●	○	●	○	●
		○	●	○	●	○	●
	IM例	○	●	○	●	○	●
		○	●	○	●	○	●
		○	●	○	●	○	●
		○	●	○	●	○	●
計	14	4	2	1	1	6	
有効率	78%		30%				

P=0.02

○ 著効・有効 △ } MIC ≥ 100 μg/ml
● 無効 ▲ }

図7 投与量、投与間隔と臨床効果

以下の群の有効率25%と5.5g/dl以上の群の有効率60%の間に有意差がみられ、低蛋白血症は抗生物質の効果を妨げる宿主側のマイナス因子と解された。**マイナス因子(図9, 10)** dosage 不適に加え、宿主に低蛋白血症のほか、悪性腫瘍、反復性嚥下肺炎を伴う脳血管障害、褥瘡感染(敗血症の原因となる)をそれぞれ1因子とすると、因子数0では抗生物質の有効率100%、1では77%、2では43%、3以上では全例無効であった。

敗血症CET・CER投与例

T.P dosage	≤4.9	5.0~5.4	5.5~5.9	6.0~6.4	6.5~6.9	7.0≤
適	× × ×	○ ○	○ × ○ ○	○ ○ ○ ○	○ × ○	○ ○
不適	× × × × ×	○ × ○ × × ×	○	○ × × × ×	○ × ○ × ×	×

〔 ○ 著効 × 無効 〕
〔 ○ 有効 × 敗血症死 〕

図8 血清総蛋白と治療効果

〔有効例〕					〔無効例〕				
症例	dosage	T. P.	原発巣	合併症	症例	dosage	T. P.	原発巣	合併症
246	○	6.1	尿		146	○	5.7	?	
264	○	6.5	尿		139	○			
33	○	5.8			221	○	6.6		
173	○	5.6	?		112	○		?	
185	○		胆		212		6.2	尿	
215	○	6.2	?		168		6.0	尿	
195	○	7.2	尿		256		6.4	尿	
31	○		尿		161			?	
64	○	7.8	呼		50		6.5	胆	
288	○	6.2	?		23		7.5		
47	○	6.1	呼		132				
60	○	5.9	呼						
57	○	6.7	?						
41	○	6.6	?						
78			尿						
230		6.7	尿						
149		5.5	尿						

dosage 不適

〔 CET (IVD) CER (IM) 投与敗血症 (起点菌MIC 100 μg/ml未満例) 〕

dosage : 不適
T. P. : <5.5g/dl
原発巣 : 褥瘡
合併症 : 悪性腫瘍
 中枢神経障害

図9 マイナス因子と効果

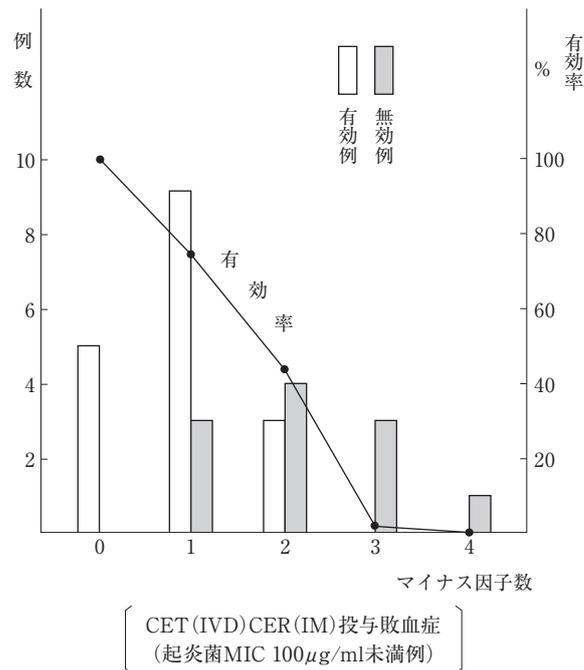


図10 マイナス因子と効果

この研究を行った頃は、漫然と抗生物質 1g 1日 1～2回筋注で治療が行われている例がほとんどだったが、この研究は投与方法を科学的に掘り下げたものであり、その後はさらに進化してPK-PD理論に行きついた。また dosage が適切であっても無効の場合、宿主側の要因は免疫能低下で括られていたが、低蛋白血症、悪性腫瘍、重度の褥瘡感染、脳血管障害で嚥下性肺炎の反復などが、効果を妨げるマイナス因子であることを具体的に指摘した。

文 献

- 1) Finegold S.M. et al, The normal flora of ileostomy and transverse colostomy effluents. J Infect Dis. 1970 ; 122 : 737.
- 2) Shimada K, et al, Deconjugation of Bile acids By intestinal Bacteria ; Review of literature and additional studies. J Infect Dis. 1969 ; 119 : 273.
- 3) 島田馨、他。敗血症における抗生物質の投与理論とその臨床効果。とくにCephalosporin系抗生物質について。最新医学。1977 ; 32 : 1497.