

ラット実験的尿路感染症モデルにおける Cinoxacin, Nalidixic acid ならびに Pipemidic acid の治療効果の検討

後藤直正・堀賢司・西野武志・谷野輝雄
京都薬科大学微生物学教室

ラットを用いて *Proteus mirabilis* による実験的尿路感染症モデルを作製し、Cinoxacin (CINX), Nalidixic acid (NA) および Pipemidic acid (PPA) の治療効果を検討した。

1. CINX は NA, PPA とほぼ同じ MIC 値を示したにもかかわらず、腎での CINX の効果は NA, PPA に比べて約 5 倍優れており、尿では約 9~16 倍優れていた。
2. CINX, NA および PPA の 3 mg/kg および 30 mg/kg 投与時の腎、尿中濃度を測定したところ、CINX が NA, PPA に比べて高いピークならびに持続性を示した。また正常ラットと感染ラットではほぼ同様な結果を示した。

はじめに

近年、感染症の起病因菌が変化すると共に、それにともなって薬剤の *in vivo* 抗菌力の検討方法も、実際の臨床により近い方法で評価されるべき必要性が大きくなってきているように思われる。その一例として従来の実験的マウス感染モデルを用いて薬剤の治療効果を検討する際に、単に一回だけの薬剤投与ではなく分割して投与した際の治療効果の検討^{1,2)}などが挙げられよう。また局所感染モデル³⁾としての呼吸器感染モデル、尿路感染モデル等も新しい評価の手段である。

尿路感染モデルを作製する方法は従来から多くの方法、多種の動物(マウス、ラット、家兎等)が用いられてきた。方法として、マウスの尾静脈から *Staphylococcus aureus* を接種する方法⁴⁾、開腹後、直接腎に菌を接種する方法⁴⁾、尿管結紮後尿管から菌を接種する方法⁵⁾、ラット⁶⁾およびマウス⁷⁾の外尿道口から菌液を注入する方法等がある。その他、感染を助長するために、給水制限⁸⁾、高濃度グルコースの投与、腎乳頭部分を特異的に障害する 2-bromoethylamine hydrobromide (BEA) 等を投与する方法⁹⁾などが併用されてきた。以上のように種々の方法が報告されているが、マウスの外尿道口から菌液を注入する、西、土屋⁷⁾らの方法が尿路における局所感染の実験として良いように考えられる。しかし、この方法は技術的困難さおよびマウスの遺伝系統による良し悪しがある。

今回、私共は Cinoxacin がラットの上行性腎盂腎炎の実験的モデルで治療効果が良かったという報告⁹⁾に基づき、松浦らのラットを用いた上行性腎盂腎炎実験モデル作成方法¹⁰⁾に従って検討を行ない、二、三の知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 使用薬

Cinoxacin (CINX), Nalidixic acid (NA) および Pipemidic acid (PPA) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

2. 使用菌株

教室保存の臨床分離株 *Proteus mirabilis* KC-11 を使用した。なお菌株の保存は Tryptosoya broth (ニッスイ) に 37°C, 18~20 時間培養後 10% の割で仔牛血清を添加、-80°C で凍結保存した。感染には Nutrient broth (ニッスイ) で希釈後使用した。

3. 使用菌株の感受性測定

P. mirabilis KC-11 の試験管内抗菌力は、前培養に Tryptosoya broth (ニッスイ)、感受性測定には Heart infusion broth (ニッスイ) を用いて液体希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

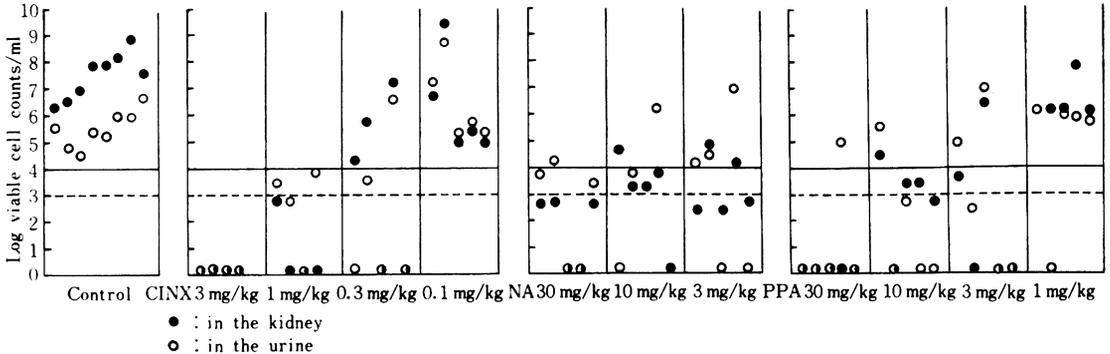
4. 使用動物

体重が 140~160 g で 6 週齢の SLC-SD 系雌ラットを使用した。

5. 感染方法

Thiopental Na と Pentobarbital Na の 2:1 の混液を 30 mg/kg の用量でラットに腹腔内投与し麻酔後、下腹部の毛を電気バリカンで刈り次にアルコール綿で消毒して腹壁に小さな傷口を開けて、そこより膀胱を露出させた。次に膀胱の頂点を切開して菌液を含んだ Cuti-

Fig. 1 Plots of viable cells in kidney and urine of *Proteus mirabilis*-induced urinary tract infection-rats treated by CINX, NA and PPA



na LE disc (Henkel International GmbH) を挿入した。次に膀胱の切り口を滅菌縫合糸 4 号で縛り、リングピンセットで軽く膀胱を押し disc を粉碎してから元の位置に膀胱を戻した後、皮膚表面の傷口を MICHEL 針で縫合した。この手術には器具などに出来るだけ汚染を避け清潔に扱うように注意した。

膀胱内に植め込んだ LE disc は径が 1.5~2.0 mm, 高さが 2~3 mm の軟膏性ワックス基剤で、菌液に浸す前に紫外線で滅菌しておいた。菌液の濃度は 10^5 cells/ml として調製し、各々の菌液中に LE disc を 1 時間浸してから実験に供した。

手術後の動物における給水は普通に与え、給餌には最初の 2 日間は 1% オキサミドを含む特殊飼料 (オリエンタル酵母工業製造) を与えた。その後、普通飼料に戻す方法をとった。

治療は感染後 6, 24, 32, 48, 60, 72, 84 時間の計 7 回行なった。感染および治療効果の評価方法は感染 5 日後に動物を殺し、腎および尿中の生菌数を常法に従って、10 倍希釈による寒天混釈法で培養後のコロニーを数えることにより腎の場合には cells/g また、尿の場合には cells/ml として求めた。なお一群 5 匹のラットを使用した。

6. 尿および腎内薬物濃度の測定

上記項目 5 と同一の方法で感染させたラット及び正常なラットを 1 群 3 匹として、6 および 24 時間目に各薬剤を 30 または 3 mg/kg 投与し薬剤投与後 3, 6, 9 および 12 時間目の尿と腎を、ラットをと殺した後採取した。なお尿は 0.05 M Phosphate buffer (pH 7.0) で 10 倍希釈し、腎は同一 buffer 8 ml 中でホモジネート後、500 rpm, 10 分間遠心後の上清を、検定菌に *Escherichia coli* X-161, 検定培地に Antibiotic medium No. 1 (Difco) を使用して disc 法により測定

Table 1 Therapeutic effects (ED_{50}) of CINX, NA and PPA against experimental *Proteus mirabilis*-induced urinary tract infection-rats

	MIC (μ g/ml)		ED_{50} * (mg/kg)	
	10^8	10^6	Kidney	Urine
CINX	6.25	3.13	0.43(0.64-0.23)	0.32(0.50-0.14)
NA	6.25	3.13	2.22(6.09-1.65)	5.34(8.23-2.34)
PPA	3.13	3.13	2.37(4.13-0.61)	2.94(5.08-0.80)

*: LITCHFIELD-WILCOXON Method
(): 95% confidence limits

した。なお濃度測定時の標準液については、CINX, NA, PPA のいずれも力価の明らかなものを用い、同じ 0.05 M Phosphate buffer で希釈して使用した。また disc については東洋坩紙株式会社製の paper disc <Thin> 8% DIA を使用した。

実験結果

1. 治療効果

感染 5 日目のラットの尿および腎中生菌数を無治療群, CINX, NA および PPA 治療群についてプロットしたものが Fig. 1 である。無治療群では個々の生菌数にバラつきは見られるが、尿で $10^4 \sim 10^7$ cells/ml, 腎で $10^8 \sim 10^9$ cells/g の菌数を示した。各薬剤で投与量に応じた生菌数の減少が見られるが、CINX が最も優れた治療効果を示した。この点を明確にするために UTI 薬効評価基準第 2 版 (UTI 研究会) に準じて尿は 10^3 cells/ml 以下を有効とし、腎は無治療群で常に 1 オーダー尿中より高かったので 10^4 cells/g 以下を有効として ED_{50} を LITCHFIELD-WILCOXON 法¹¹⁾ により

Fig. 2 The renal tissue level of CINX, NA and PPA in experimental *Proteus mirabilis*-induced urinary tract infection-rats

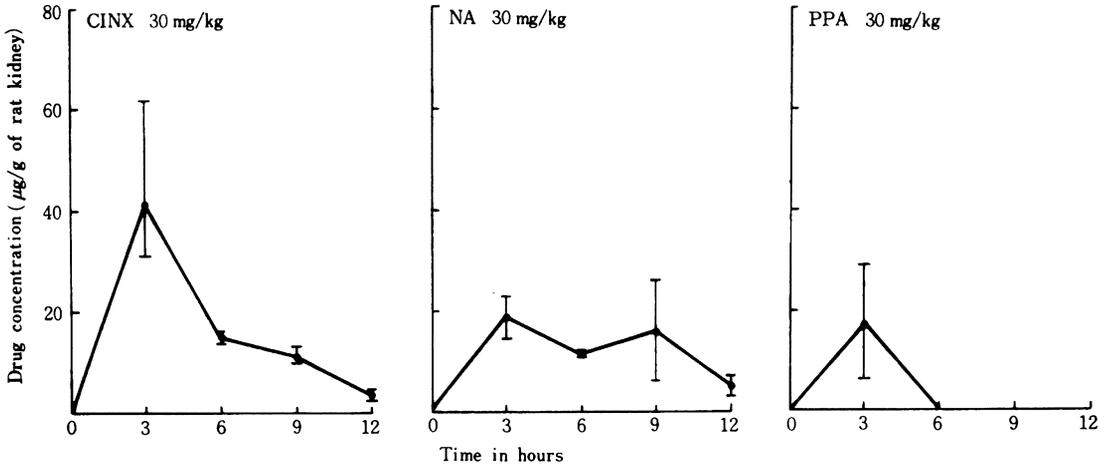


Fig. 3 The urinary level of CINX, NA and PPA in experimental *Proteus mirabilis*-induced urinary tract infection-rats

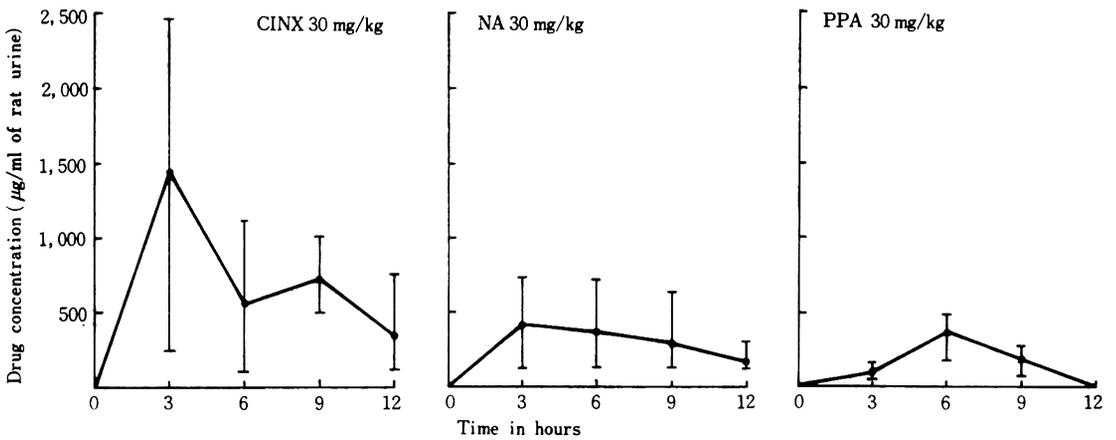


Fig. 4 The renal tissue level of CINX, NA and PPA in normal rats

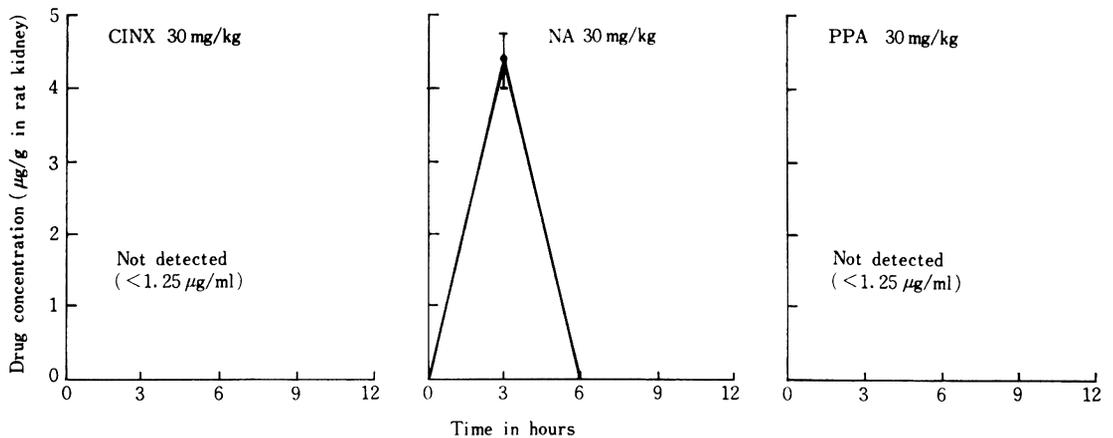
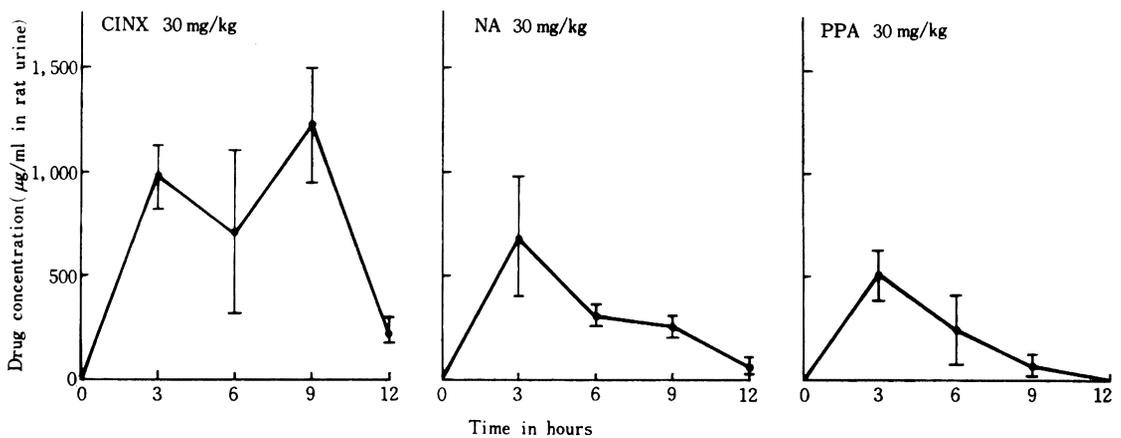


Fig. 5 The urinary level of CINX, NA and PPA in normal rats



算出した。その結果を Table 1 に示した。CINX, NA および PPA の いずれも MIC 値はほとんど変わらないにもかかわらず腎での CINX の効果は NA, PPA に比べて約 5 倍優れており、尿では約 9~16 倍優れていた。

2. 尿および腎中濃度

CINX, NA および PPA を 30 mg/kg 投与時の腎, 尿中薬剤の推移の測定結果を Fig. 2~5 に示した。CINX は腎, 尿中共に感染時の薬剤濃度は健康ラットよりかなり高く, NA, PPA は感染ラットと正常ラットでは, ほぼ同じか正常ラットの方が高く検出された。

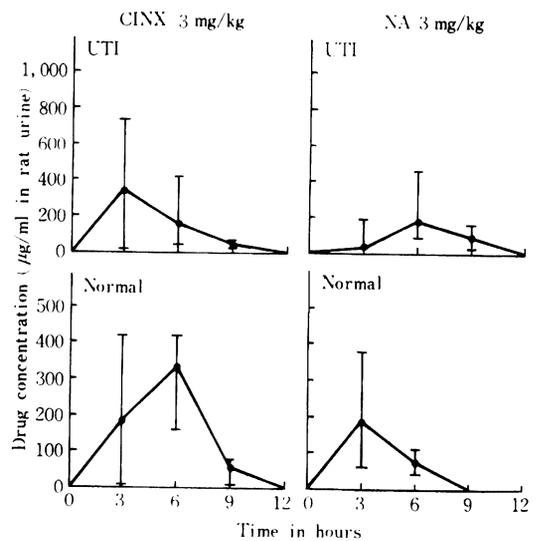
次に CINX および NA を 3 mg/kg 投与時の腎, 尿中薬剤の推移の測定結果を Fig. 6 に示した。尿中薬剤濃度は CINX および NA 共に最高値のずれがあるものの健康ラットと感染ラットでは差がほとんど認められなかった。また, 腎中薬剤濃度は両剤共に検出されなかった。

総括および考察

ラットを用いて実験的尿路感染症モデルを作製し CINX, NA および PPA の有効性を検討した結果 CINX は NA, PPA に比較して最も優れた効果を示した。この点を解析するために経時的に尿, 腎中薬剤濃度を測定した結果, CINX が NA, PPA に比べて高いピークならびに持続性を示した。この結果から CINX の効果が最も優れていることが理解できる。

CINX のマウス実験的腹腔内感染症の治療効果は前報¹²⁾で報告したように CINX が NA, PPA に比べ劣っていたが *P. mirabilis* を使用した本実験モデルでの

Fig. 6 The urinary level of CINX and NA in rats under various condition



効果は CINX が最も優れていた。これは両感染系で菌種の相異があるものの使用動物の種差ならびに感染モデル作製の方法が大きく影響すると考えられる。なお, 今回データは省いたが, モデル作製時に 1% オキサミド含有特殊飼料を与えた時の薬剤の尿, 腎中推移について検討した結果, 健康ラットの場合とほぼ同じパターンが得られた。これから 1% オキサミド含有飼料が薬剤の腎, 尿中推移に影響しているとは考えられない。今回はラットを使用し, しかも *P. mirabilis* のみの上行性尿路感染モデルで検討を行なったが, 使用した動物の種差により, 或いは菌種の違いにより治療効果も異なってくる可

能性もあるので、マウス、家兎等の他の動物あるいは他の菌種についても更に検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 岩日朋幸, 中沢昭三: 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析 I。Chemotherapy 26: 337~344, 1978
- 2) 尾花芳樹, 西野武志, 故中沢昭三: 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析 (8) 緑膿菌に対する AB-206 の効果。Chemotherapy 26 (Suppl. 4): 41~47, 1978
- 3) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武 毅, 穴戸春美, 鈴木寛, 野口行雄, 玉置公俊, 井手政利, 渡辺貴和雄: 肺炎桿菌性マウス実験肺炎を場とする Cefazolin による化学療法の解析。Chemotherapy 27: 109~114, 1979
- 4) 宮川正澄, 三橋 進, 石田名香雄: 実験感染学, 1977 朝倉書店
- 5) 川島尚志: 緑膿菌性腎盂腎炎の化学療法に関する実験的研究。Chemotherapy 25: 2371~2386, 1977

- 6) 松原秀三, 遠藤久界, 二本力夫, 小川春樹, 小山憲次郎: ラット腎盂腎炎モデル作成に関する研究 (とくに BEA の前処置について)。Chemotherapy 27: 269~274, 1979
- 7) 西 武・土屋統司: 緑膿菌による実験的マウス尿路感染症。日細誌 32: 191, 1977
- 8) 清水当尚, 久保雄嗣: Pipemidic acid の抗菌作用。Chemotherapy 23: 2659~2666, 1975
- 9) HOLMES, D. H. ; P. W. ENSMINGER & R. S. GORDEE: Cinoxacin: Effectiveness against experimental pyelonephritis in rats. Antimicrob. Agents & Chemoth. 6 (4): 432~436, 1974
- 10) 松浦真三, 三和秀明, 深尾 孝: Cinoxacin の *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 28(S-4): 66~72, 1980
- 11) LITCHFIELD, J.T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99~113, 1949
- 12) 西野武志, 後藤直正, 西田隆晴, 原口千恵, 谷野輝雄: 新しい合成化学療法剤 Cinoxacin に関する細菌学的評価。Chemotherapy 28(S-4): 14~36, 1980

STUDY OF THERAPEUTIC EFFECTS OF CINOXACIN, NALIDIXIC ACID AND PIPEMIDIC ACID AGAINST EXPERIMENTAL URINARY TRACT INFECTION IN RATS

NAOMASA GOTO, KENJI HORI, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The therapeutic effect of cinoxacin (CINX) on experimental *Proteus mirabilis* induced urinary tract infection-rats was compared with nalidixic acid (NA) and pipemidic acid (PPA). The results were as follows:

Although MICs of CINX, NA and PPA against *P. mirabilis* were 6.25, 6.25 and 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively, CINX showed superior therapeutic effect 5 times in the urine and 9~16 times in the kidney than NA and PPA.

The concentrations of CINX in the kidney and urine in UTI rats were higher than those of NA or PPA at the dose of 3 and 30 mg/kg respectively. The same result was obtained in the normal rat.