

## 実験的マウス尿路感染症におけるピリドンカルボン酸抗菌剤3種の 治療効果に関する研究

大森康男・小川正俊・宮崎修一・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 57 年 3 月 11 日受付)

グラム陰性桿菌を用いたマウス実験的尿路感染症に対するピリドンカルボン酸抗菌剤 (Norfloxacin, Pipemidic acid および Nalidixic acid) の治療効果を、腎内生菌数の変動を指標として検討した。

死亡に至らない比較的穏やかな急性期の実験的尿路感染症に対し Norfloxacin を用いて治療した場合、*E. coli* KU 3 株、*K. pneumoniae* KU 2 株および *P. aeruginosa* KU 1 株感染マウスでは、腎に肉眼的病変が認められる以前、すなわち、各々感染 48, 24, 24 時間後までに治療を開始することにより顕著な治療効果を認めることができた。また *S. marcescens* KU 21 株尿路感染マウスでは肉眼的病変が認められる感染 48 時間後までに治療を開始すれば治療効果が認められた。しかし、いずれの菌種を用いた尿路感染マウスにおいても、この時期を過ぎ病態が進行した時期から治療を始めた場合は効果が少なく、初期治療の重要性が示唆された。

このグラム陰性桿菌 4 株を用いたマウス実験的尿路感染症に対する 3 種のピリドンカルボン酸抗菌剤の治療効果を比較したところ、Norfloxacin が最も優れた成績を示した。

抗菌剤の *in vivo* 評価は抗菌力と共に実験的感染症における薬物の代謝、臓器分布および毒性などの総合結果によらなければならない。動物における実験感染モデルは、操作の簡便さ、効果判定の容易さからマウス全身感染系が一般に用いられている。しかし薬物により薬動力学的パターンが著しく異なる場合があり、全身感染系のみでの評価では薬物の特性を充分に見極められない場合がある。そのため近年種々の局所感染モデルが考案され応用されている<sup>1-3)</sup>。

われわれは先にグラム陰性桿菌を用いたマウス実験的尿路感染モデルにおける菌種間の感染惹起能力を多数の株を用いた実験により検討した成績を報告した<sup>4)</sup>。その中で治療効果判定に最も適当と考えられた菌株による感染系を用いて、3種のピリドンカルボン酸抗菌剤の治療効果を検討したのでその成績を報告する。

### I. 材料および実験方法

#### 1. 使用菌株

前報<sup>4)</sup>で使用した尿路感染症患者由来株の中から比較的穏やかなマウス急性尿路感染症を惹起する菌株、*Escherichia coli* KU 3 株、*Klebsiella pneumoniae* KU 2 株、*Serratia marcescens* KU 21 株および *Pseudomonas aeruginosa* KU 1 株を用いた。

#### 2. 使用薬剤

Norfloxacin (杏林製薬)、Pipemidic acid (大日本製薬) および Nalidixic acid (第一製薬) を 0.5% carboxymethyl cellulose 懸濁液として経口的に投与した。

#### 3. 使用動物

ICR 系雌マウス、4 週齢、体重  $17 \pm 1$ g のものを用い、1 群 5 匹として使用した。

#### 4. 実験的尿路感染症マウスの作製

前報<sup>4)</sup>に準じて尿路感染症マウスを作製した。感染菌量は *E. coli* KU 3 株の場合、 $8 \times 10^8$  CFU/mouse、*K. pneumoniae* KU 2 株、 $4 \times 10^6$  CFU/mouse、*S. marcescens* KU 21 株、 $2 \times 10^8$  CFU/mouse および *P. aeruginosa* KU 1 株の場合  $3 \times 10^6$  CFU/mouse とした。

#### 5. 尿路感染マウスに対する化学療法

治療開始時期の影響を検討するために、各 4 種のグラム陰性桿菌を用いた実験的尿路感染症マウスに対し、感染後 6, 24, 48 あるいは 72 時間目より、Norfloxacin を 6.25, 25 および 100 mg/kg、1 日 2 回 3 日間経口的に投与した。

治療実験では、*P. aeruginosa* KU 1 株および *K. pneumoniae* KU 2 株感染では感染 24 時間後より、*E. coli* KU 3 株および *S. marcescens* KU 21 株感染では感染 48 時間後より治療を開始した。投与方法は、*E. coli* KU 3 株を除く 3 菌株に対して Norfloxacin は

100 mg/kg から、Pipemidic acid と Nalidixic acid は 200 mg/kg から 2 倍段階希釈系列, *E. coli* KU 3 株感染では, Norfloxacin 25 mg/kg, Pipemidic acid と Nalidixic acid は 50 mg/kg からの 2 倍段階希釈系列の投与量を用い, 1 日 2 回 3 日間経口投与した。

## 6. 治療効果判定

治療効果は無治療群に対する治療群での腎内生菌数の減少率で判定した。生菌数は薬剤の最終投与 20 時間後両側腎を摘出し, 両腎共に生理食塩液 2 ml を加えホモジナイズし, これを原液として 10 倍段階希釈し, 各々の 0.1 ml を *E. coli* KU 3 株, *K. pneumoniae* KU 2 株および *P. aeruginosa* KU 1 株では BTB 寒天培地 (栄研), *S. marcescens* KU 21 株では 0.01% トルイジンブルー添加 DNase 寒天培地 (Difco) に塗布し, 37°C, 18 時間培養し測定した。

## II. 実験成績

### 1. 治療効果に対する治療開始時間の影響

Norfloxacin を用い, 実験的尿路感染症マウスに対する薬剤投与時期による治療効果への影響を検討し, その結果を Fig. 1 に示した。

*E. coli* KU 3 株感染マウスでは感染 6, 24 時間後から治療を開始した場合, いずれの投与量においても同程度の治療効果を認めた。48 時間後から治療を行なうと, 25 および 100 mg/kg 投与群では 24 時間後までに治療開始した群と同等の効果が認められたが, 6.25 mg/kg 投与群では治療効果が低下した。しかし腎に肉眼的病変

の認められる感染 72 時間後からの治療開始では投与量に関係なく, 24 時間目までに治療を始めた群より治療効果が低下した。

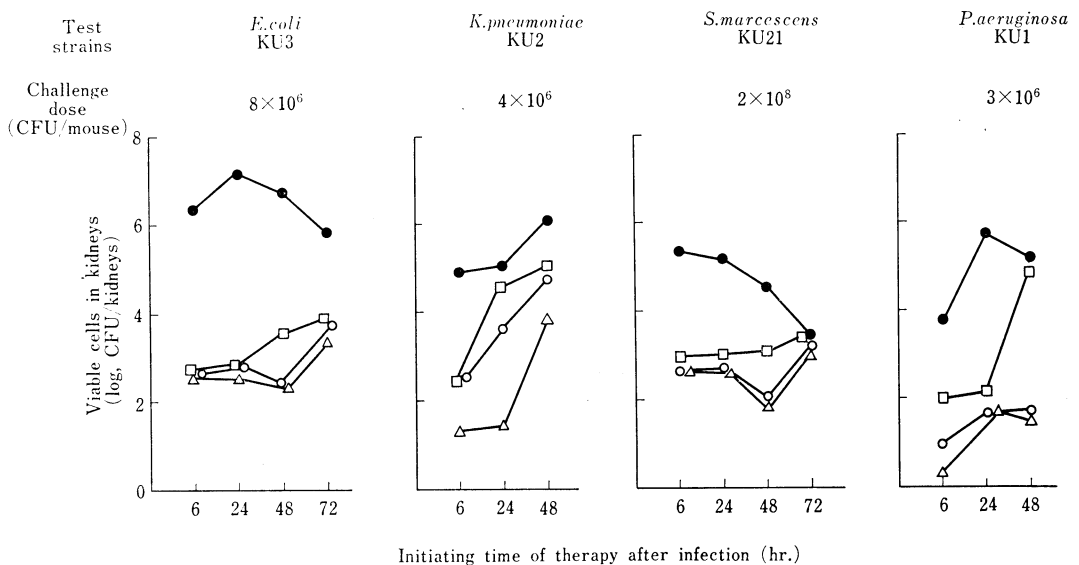
*K. pneumoniae* KU 2 株感染マウスでは, いずれの投与量を用いても治療開始時期が遅れるに従い顕著に治療効果が低下した。感染 24 時間後の投与では 6 時間後投与に比べ, 6.25 mg/kg, 25 mg/kg 投与群で著しく多量の腎内生菌数が認められ, 腎病変が肉眼的に認められる感染 48 時間後から治療を始めた場合, 腎内生菌数は 100 mg/kg 投与群で 24 時間後治療開始群より約 100 倍多くなり, 治療効果が著しく減少した。

*S. marcescens* KU 21 株感染マウスでは, いずれの投与量においても肉眼的病変の認められ始める 48 時間目までに治療を開始すれば無治療群に対し 100 分の 1 以下に生菌数が減少したが, 72 時間目から治療を行なってもほとんど生菌数の減少はなく, 効果は認められなかった。

*P. aeruginosa* KU 1 株感染では, 感染 24 時間後までに治療を開始すると, いずれの投与量でも腎内生菌数が  $10^2$  CFU/kidneys 以下となり治療効果が顕著であった。しかし肉眼的病変の認められ始める 48 時間目から 25 あるいは 100 mg/kg の投与量で治療を行えば充分効果が認められるのに対し, 6.25 mg/kg 投与群では無治療群とほぼ同じ生菌数を認め全く治療効果がみられなかった。

### 2. Norfloxacin, Pipemidic acid および Nalidixic

Fig. 1 Variation of viable cells in kidneys by initiating time of therapy (● : Control, Norfloxacin □ : 6.25 mg/kg, ○ : 25 mg/kg, △ : 100 mg/kg)



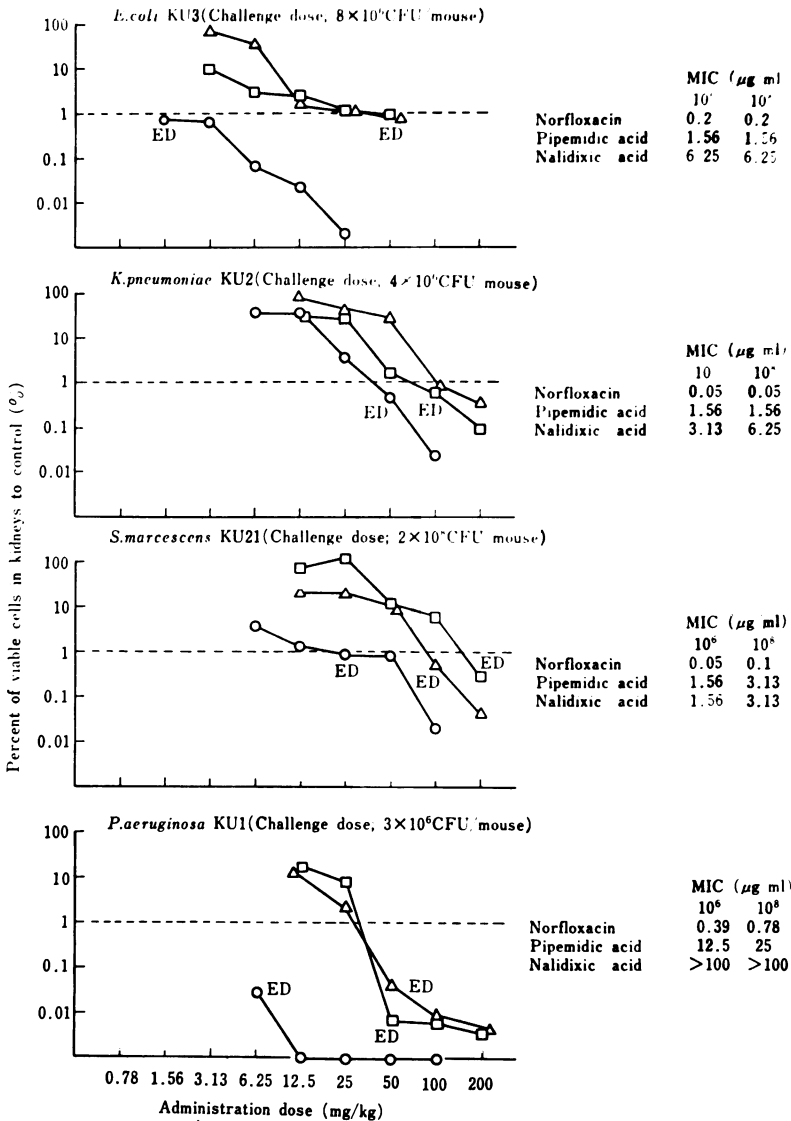
acid による治療効果の比較

前記の実験成績から治療効果に及ぼす薬剤投与開始時期の重要性が明らかとなったので、治療開始時期を *K. pneumoniae* KU 2 株および *P. aeruginosa* KU 1 株尿路感染症では感染 24 時間後、*E. coli* KU 3 株および *S. marcescens* KU 21 株感染では 48 時間後とし、Norfloxacin, Pipemidic acid あるいは Nalidixic acid を 1 日 2 回 3 日間経口的に投与した。治療効果は最終投与 20 時間後の腎内生菌数を測定し、無治療群の生菌数に対する百分率で Fig. 2 に示した。腎内生菌数

が無治療群の 1% 以下に減少した場合を有効とし、そのために必要な最少投与量を effective dose として比較した。

*E. coli* KU 3 株感染マウス ( $8 \times 10^6$  CFU/mouse) の場合、effective dose は Norfloxacin では 1.56 mg/kg であるのに対し、Pipemidic acid および Nalidixic acid では Norfloxacin の約 30 倍の投与量 50 mg/kg であった。接種菌量  $10^8$  cells/ml での Norfloxacin, Pipemidic acid, Nalidixic acid の抗菌力は、Fig. 2 に示すように 0.2, 1.56, 6.25  $\mu\text{g/ml}$  であった。

Fig. 2 Therapeutic effects of norfloxacin, pipemidic acid and nalidixic acid (○ : Norfloxacin, □ : Pipemidic acid, △ : Nalidixic acid, --- : Effective line, ED : Effective dose)



*K. pneumoniae* KU 2 株感染マウスの場合、*E. coli* KU 3 株感染に比べ感染菌量は2分の1 ( $4 \times 10^6$  CFU/mouse) であり、Norfloxacin, Pipemidic acid, Nalidixic acid の *in vitro* 抗菌力も  $10^6$  cells/ml 接種時 0.05, 1.56, 3.13  $\mu\text{g/ml}$  とやや優れているにもかかわらず、effective dose は Norfloxacin では *E. coli* KU 3 株感染の場合の約 30 倍の 50 mg/kg, Pipemidic acid および Nalidixic acid では 2 倍量の 100 mg/kg と *E. coli* KU 3 株での effective dose より大きい値を示した。

*S. marcescens* KU 21 株感染マウスでは、*K. pneumoniae* KU 2 株と同等の薬剤感受性(Norfloxacin 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , Pipemidic acid 1.56  $\mu\text{g/ml}$ , Nalidixic acid 1.56  $\mu\text{g/ml}$ ) を示しているが、感染菌量を 50 倍 ( $2 \times 10^8$  CFU/mouse) にしても effective dose は Norfloxacin では 25 mg/kg と *K. pneumoniae* KU 2 株感染の2分の1量であり、Pipemidic acid と Nalidixic acid では各々 200, 100 mg/kg と *K. pneumoniae* KU 2 株感染治療とほぼ同等であった。

*P. aeruginosa* KU 1 株感染では *K. pneumoniae* KU 2 株感染と比較し感染菌量はほぼ同量 ( $3 \times 10^6$  CFU/mouse) で、 $10^6$  cells/ml 接種時の Norfloxacin, Pipemidic acid, Nalidixic acid の抗菌力は 0.39, 12.5, 100  $\mu\text{g/ml}$  以上と 10 分の 1~30 分の 1 に低下しているにもかかわらず、effective dose は Norfloxacin では *K. pneumoniae* KU 2 株感染の約 10 分の 1 量の 6.25 mg/kg, Pipemidic acid および Nalidixic acid では共に2分の1量の 50 mg/kg であり、いずれの薬剤においても *K. pneumoniae* KU 2 株感染マウスより少ない投与量であった。

### III. 考 察

実験的尿路感染症モデルに対するピリドンカルボン酸抗菌剤の治療効果の評価を目的とし、先に報告した比較的穏やかな急性のマウス尿路感染症を惹起するグラム陰性桿菌 4 株<sup>4)</sup>を用い、Norfloxacin, Pipemidic acid および Nalidixic acid の効果を比較した。

実験的尿路感染の化学療治の開始時期と治療効果に関して、坂本<sup>5)</sup>は *E. coli* NIHJ JC-2 株を用いた1側性尿管狭窄家兎実験的腎盂腎炎において、腎盂腎炎成立期である感染 48 時間後から Ampicillin 20 mg/kg を投与しても不十分な治療効果しか得られないが、40, 100 mg/kg と投与量を増加すると良好な成績が得られた。しかし炎症完成期である感染 72 時間後からでは 100 mg/kg 投与でも治療効果は低下すると報告している。上田<sup>6)</sup>は抗菌剤の体内移行について、<sup>14</sup>C-Cefazolin は急性炎症細胞の浸潤部へは速かに高濃度に移行するが、

壊死巣または慢性炎症巣への移行はきわめて低いと報告している。このように化学療法の効果は治療開始時期や投与条件の設定方法により大きく左右される。マウスを用いたわれわれの実験成績でも、Norfloxacin を用いて治療した場合、*E. coli* KU 3 株、*K. pneumoniae* KU 2 株および *P. aeruginosa* KU 1 株感染では肉眼的な腎病変が認められない時期から治療を開始すると少ない投与量でも治療効果が充分認められ、また少ない投与量では効果が不十分な場合でも投与量を増加すれば治療効果は充分認められた。しかし肉眼的に腎病変が認められる時期から治療を開始しても効果はあまり認められなかった。一方 *S. marcescens* KU 21 株感染では治療を肉眼的病変が認められ始める感染 48 時間後までに始めると、腎内生菌数は有意に無治療群より減少し効果が認められるが、この時期より遅れ、感染 72 時間後からでは無治療群の生菌数と差がなく、急激に治療効果が低下した。以上のことから感染病態の初期の急性期に適正な治療を行なうことが治療効果を高めかつ治療の行ない難い慢性病態への進行を防止すると考えられた。

マウス実験的尿路感染症モデルに対するピリドンカルボン酸抗菌剤の治療効果を比較したところ、*E. coli* KU 3 株、*K. pneumoniae* KU 2 株、*S. marcescens* KU 21 株および *P. aeruginosa* KU 1 株のいずれの菌株を用いた場合でも Norfloxacin の治療効果が Pipemidic acid および Nalidixic acid に比べ優れていることを認めた。

この4菌種を用いた尿路感染症マウスに対する治療効果成績から、薬剤感受性が *K. pneumoniae* KU 2 株とほぼ同等の *E. coli* KU 3 株感染マウスの治療では *K. pneumoniae* KU 2 株より治療開始が遅れても低い投与量で効果があり、また *K. pneumoniae* KU 2 株より薬剤感受性の低い *P. aeruginosa* KU 1 株感染マウスでも *K. pneumoniae* KU 2 株感染マウスより少ない投与量で効果が認められた。各薬剤の *in vitro* 抗菌力が最も優れている *K. pneumoniae* KU 2 株感染マウスの治療に大量の薬剤を必要としたことは、マウス腎に対して菌種による病原性の強弱があることをうかがわせ、*K. pneumoniae* KU 2 株は使用した菌株の中で最もマウス腎に対する病原性が強いと考えられる。この病原性の内容には組織への定着性や病変を起こす毒性物質などの他に、生体の防御能に対する抵抗性も考えられるが、前報<sup>4)</sup>に記したように、*K. pneumoniae* KU 2 株が他菌株に比べマウス腎病変を起こし易いことは明らかである。したがって、この種の菌では尿路感染時に、*in vitro* 抗菌力に比べ大量の投与が必要と考えられ、しかも投与をなるべく早い時期に行なう必要性も他の菌株よ

り大きいと考えられた。このように *in vitro* の薬剤感受性から期待されるような *in vivo* 治療効果が得られないという現象は感受性試験成績からのみ薬剤選択を行なう危険性を示唆しており、尿路感染においても、感染症状が重く、治療しにくい菌種には相当する投与方法を行なうことが重要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 田中紀子, 采 孟, 小河秀正: 尿路感染症の新しい展開。実験的尿路感染症。臨床と細菌 7: 15~24, 1980
- 2) BERENDT, R. F.; G. G. LONG & J. S. WALKER: Treatment of respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in mice with aerosols of

kanamycin. Antimicrob. Agents & Chemother. 8: 585~590, 1975

- 3) 村川武雄, 西田 実: ラットの炎症 Pouch 内感染実験系とセファロスポリン類の効果。Jap. J. Antibiotics, 26: 449~453, 1973
- 4) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島瑛智子: 各種グラム陰性桿菌による実験的尿路感染症に関する基礎的研究。Chemotherapy 30: 66~76, 1982
- 5) 坂本日朗: 腎盂腎炎の化学療法にかんする実験的研究。大腸菌性閉塞性腎盂腎炎による検討。Chemotherapy 28: 31~48, 1980
- 6) 上田 泰: 実験的腎盂腎炎の化学療法に関する研究, 発症と進展に関して。Chemotherapy 22: 1474~1478, 1974

## STUDIES ON THERAPEUTIC EFFECTS OF THREE PYRIDONECARBOXYLIC ACID AGENTS AGAINST EXPERIMENTAL URINARY TRACT INFECTION IN MICE

YASUO OOMORI, MASATOSHI OGAWA, SHUICHI MIYAZAKI,  
and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

Therapeutic effects of pyridonecarboxylic acid agents (norfloxacin, pipemidic acid and nalidixic acid) against experimental urinary tract infections in mice induced by gram negative bacilli were studied with comparing the reduction of renal viable bacterial number.

The marked therapeutic effect was obtained when therapy with norfloxacin was initiated against the relatively mild and acute experimental urinary tract infection in mice before renal gross lesion being observed, that is 48, 24 and 24 hrs after infection with *E. coli* KU 3, *K. pneumoniae* KU 2 and *P. aeruginosa* KU 1, respectively. In mice infection with *S. marcescens* KU 21, therapeutic effect was sufficiently observed when therapy was initiated at 48 hrs after infection, at that time, renal gross lesion was limited. But little therapeutic effect was observed when therapy was initiated after renal lesion expanded. The results of these experiments suggested that primary therapy was essential.

In these experiments, norfloxacin showed best therapeutic effect than others did against experimental urinary tract infection in mice induced by every four gram negative bacillus.