

Temafloxacinに関する基礎的・臨床的検討

山本和英・林 嘉光・山田保夫・武内俊彦
名古屋市立大学第一内科*

加藤政仁
NTT東海総合病院内科

花木英和・伊藤 剛
名古屋市立東市民病院第四内科

Temafloxacin(TMFX)の抗菌力および臨床効果について検討し、以下の成績を得た。

1. 抗菌力：臨床分離*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*各27株, *Serratia marcescens* 19株, *Pseudomonas aeruginosa* 27株に対するTMFXの抗菌力は、接種菌量 10^6 cells/mlにおいてMIC₉₀値がそれぞれ0.2, 1.56, 0.2, 0.78, 6.25, 0.78, 25, $>100\mu\text{g/ml}$ であった。

2. 臨床効果：呼吸器感染症24例に本剤を1回150あるいは300mg, 1日2回経口投与した。臨床効果は急性扁桃炎1例は有効, 急性気管支炎9例中5例, 慢性気道感染症の急性増悪5例中4例, 肺炎9例中6例が有効以上の結果を得た。細菌学的効果では*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*各1株は除菌されたが, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus parainfluenzae*各1株は存続した。副作用は発疹1例と薬剤熱が2例にみられたが使用中により軽快した。臨検値異常はGOT, GPTの上昇が1例に, 好酸球の上昇が2例にみられ, GOT, GPT, ALP, γ -GTP, LDHの上昇が1例にみられた。

Key words : temafloxacin, 抗菌力, 臨床効果

Temafloxacin(TMFX)はアボット社において開発された新しいニューキノロン系抗菌剤で、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して広範な抗菌スペクトルを有している。今回、私どもは本剤の抗菌力について検討し、臨床的には呼吸器感染症24例において臨床効果ならびに安全性について検討した。

I. 材料ならびに研究方法

1. 基礎的検討

1981年1月より1988年11月までに臨床材料より分離した*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*各27株, *Serratia marcescens* 19株, *Pseudomonas aeruginosa* 27株に対するTMFXの最小発育阻止濃度(MIC)を日本化学療法学会標準法¹⁾に準じて測定し、ofloxacin(OFLX), ciprofloxacin(CPFX), enoxacin(ENX), norfloxacin(NFLX)と比較検討した。接種菌量は 10^6 cells/mlである。

2. 臨床的検討

対象は1990年6月より1991年2月までの9ヶ月間に当科および関連の施設において治療した急性扁桃炎1例, 急性気管支炎9例, 慢性気道感染症の急性増悪5例, 肺炎9例の計24例である。性別は男性13例, 女性11例で年齢は18歳から81歳まで平均55歳であった。

薬剤の投与は1回150mgあるいは300mgを1日2回経口投与した。使用期間は4日から14日で平均9.3日であった。なお、抗菌剤の併用は行なわなかった。

臨床効果の判定は本剤使用後3日以内に下熱しその他の自覚的所見が改善したものを著効, 4日から14日で改善したものを有効, 14日以内に軽度の改善がみられたものをやや有効, 3日以後も自覚所見の改善傾向がみられなかったものを無効とした。さらに安全性についても検討し、副作用の認められた場合は、慎重に判定した。

細菌学的効果は本剤使用前後の検出菌の消長から消失, 減少, 不変, 菌交代, 不明と判定した。

安全性については発熱, 発疹, 消化器症状などの副

*〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町宇川澄1

作用と本剤の使用前後血液像, 血小板数, 肝, 腎機能などをTMFXの投与前後で観察した。

II. 成績

1. 抗菌力(Table 1)

各種臨床分離株に対するTMFX, OFLX, CPFX, ENX, NFLXのMICのrange, MIC₅₀, MIC₉₀値を測定しTable

1に示した。*S. aureus* 27株に対するTMFXのMICは全株が0.2 μ g/ml以下に分布していた。この成績はOFLX, CPFX, ENX, NFLXより優れていた。

E. coli 27株ではMIC分布は \leq 0.05~3.13 μ g/mlに分布し, 27株中26株(96%)が1.56 μ g/ml以下で発育を阻止された。NFLX, CPFXより1~2段階劣る成績であ

Table 1. Bacteriological responses to quinolones classified by isolated organisms

Organism (No. of strains)	Drug	MIC (μ g/ml)		
		range	50%	90%
<i>S. aureus</i> (27)	temafloxacin	\leq 0.05~0.20	0.10	0.20
	ofloxacin	0.2~0.78	0.39	0.78
	ciprofloxacin	0.2~1.56	0.39	0.78
	enoxacin	0.78~1.56	0.78	1.56
	norfloxacin	0.78~3.13	0.78	3.13
<i>E. coli</i> (27)	temafloxacin	\leq 0.05~3.13	0.20	1.56
	ofloxacin	0.1~3.13	0.20	3.13
	ciprofloxacin	\leq 0.05~1.56	\leq 0.05	0.78
	enoxacin	0.1~6.25	0.20	3.13
	norfloxacin	\leq 0.05~1.56	0.10	1.56
<i>K. pneumoniae</i> (27)	temafloxacin	0.1~0.78	0.20	0.20
	ofloxacin	0.2~0.78	0.20	0.39
	ciprofloxacin	\leq 0.05~0.20	0.10	0.20
	enoxacin	0.1~0.78	0.39	0.78
	norfloxacin	0.1~0.20	0.20	0.20
<i>P. mirabilis</i> (27)	temafloxacin	0.39~6.25	0.78	0.78
	ofloxacin	0.1~3.13	0.20	0.39
	ciprofloxacin	0.1~0.78	0.20	0.20
	enoxacin	0.39~0.78	0.78	0.78
	norfloxacin	3.13~3.13	3.13	3.13
<i>P. vulgaris</i> (27)	temafloxacin	0.2~12.5	0.78	6.25
	ofloxacin	0.2~6.25	0.39	3.13
	ciprofloxacin	0.1~1.56	0.10	0.78
	enoxacin	0.39~3.13	0.39	3.13
	norfloxacin	\leq 0.05~1.56	0.10	1.56
<i>M. morgani</i> (27)	temafloxacin	0.39~0.78	0.78	0.78
	ofloxacin	0.1~0.39	0.20	0.39
	ciprofloxacin	\leq 0.05~0.10	\leq 0.05	0.10
	enoxacin	0.2~0.78	0.39	0.78
	norfloxacin	\leq 0.05~0.20	\leq 0.05	0.20
<i>S. marcescens</i> (19)	temafloxacin	0.1~>100	1.56	25
	ofloxacin	0.1~50	1.56	12.5
	ciprofloxacin	\leq 0.05~25	0.78	6.25
	enoxacin	0.39~25	6.25	25
	norfloxacin	3.13~>100	3.13	12.5
<i>P. aeruginosa</i> (27)	temafloxacin	0.2~>100	1.56	>100
	ofloxacin	1.56~>100	3.13	>100
	ciprofloxacin	\leq 0.05~>100	0.78	>100
	enoxacin	0.2~>100	3.13	>100
	norfloxacin	0.2~>100	1.56	>100

inoculum size: 10⁶ CFU/ml

ったがOFLX, ENXとほぼ同等の抗菌力であった。

K. pneumoniae 27株に対するTMFXのMICは0.1~0.78 μ g/mlにあり, CPFXより1段階劣るもののOFLX, NFLX, ENXと同等であった。

P. mirabilis 27株ではTMFXのMICは0.39~6.25 μ g/mlに分布し, ENXとほぼ同等でOFLX, CPFXより2~3段階劣っていたがNFLXより2段階優れていた。

P. vulgaris 27株に対するTMFXのMICは0.2~12.5 μ g/mlに広く分布し, OFLX, ENXとほぼ同等で, NFLX, CPFXに比べ3段階ほど劣っていた。

M. morgani 27株ではTMFXのMICは0.39~0.78 μ g/mlでOFLX, NFLX, ENX, CPFXに比べ2~4段階

劣っていた。

S. marcescens 19株に対するTMFXのMICは0.1~100 μ g/mlに広く分布し, OFLX, ENX, NFLXとほぼ同等の抗菌力であったがCPFXより1段階劣っていた。

P. aeruginosa 27株ではTMFXのMICは0.2~100 μ g/mlで, NFLX, ENXとほぼ同等であり, OFLXより1段階優れていたがCPFXより2段階劣っていた。

2. 臨床的検討

TMFXを投与した24例の試験成績をTable 2-1, 2-2に, 本剤投与前後の臨床検査成績をTable 3-1, 3-2に示した。臨床効果判定では急性扁桃炎1例は有効, 急性気管支炎9例中有効5例, やや有効3例, 無効1例で,

Table 2-1. Clinical effects of temafloxacin

Case no.	Age (yr)	Diagnosis	Underlying disease complication	Isolated organism	Administration			Clinical effect	Bacteriological effect	Side effects
					daily dose (mg \times times)	duration (day)	total dose (mg)			
1	34 M	acute tonsillitis	(-)	<i>S. pyogenes</i> (+) <i>H. parainfluenzae</i> (++) ↓ <i>S. pyogenes</i> (+) <i>H. parainfluenzae</i> (++)	300 \times 2	7	4200	good	persisted	-
2	64 F	acute bronchitis	lung cancer	not done	150 \times 2	9	2700	good	unknown	-
3	42 M	acute bronchitis	malignant lymphoma	NF	150 \times 2	8	2400	good	unknown	-
4	28 M	acute bronchitis	(-)	not done	150 \times 2	8	2100	good	unknown	GOT \uparrow GPT \uparrow
5	61 M	acute bronchitis	(-)	NF	150 \times 2	7	2100	good	unknown	-
6	34 F	acute bronchitis	(-)	not done	300 \times 2	7	4200	good	unknown	-
7	67 F	acute bronchitis	(-)	NF	150 \times 2	8	2100	fair	unknown	eosino \uparrow
8	32 F	acute bronchitis	(-)	NF	300 \times 2	7	4200	fair	unknown	-
9	78 M	acute bronchitis	old pulmonary tuberculosis	NF	150 \times 2	13	3900	poor	unknown	-
10	72 F	acute bronchitis	bronchial asthma	NF	150 \times 2	8	2100	fair	unknown	eosino \uparrow
11	66 M	acute exacerbation of chronic bronchitis	nasal polyp	NF	150 \times 2	7	2100	good	unknown	-
12	76 F	acute exacerbation of chronic bronchitis	old pulmonary tuberculosis, diabetes, anemia	NF	150 \times 2	8	2400	fair	unknown	-

NF: normal flora

Table 2-2. Clinical effects of temafloxacin

Case no.	Age (yr)	Diagnosis	Underlying disease complication	Isolated organism	Administration			Clinical effect	Bacteriological effect	Side effects
					daily dose (mg × times)	duration (day)	total dose (mg)			
13	81 M	bronchiectasis	(-)	NF	150 × 2	14	4200	good	unknown	-
14	77 M	bronchiectasis	(-)	NF	150 × 2	13	3900	good	unknown	-
15	68 F	bronchiectasis	hypertension	<i>H. influenzae</i>	150 × 2	14	4200	good	eradicated	-
16	18 F	pneumonia	(-)	NF	150 × 2	8	2400	good	unknown	-
17	55 F	pneumonia	(-)	NF	150 × 2	8	2400	good	unknown	-
18	79 M	pneumonia	anemia	not done	150 × 2	7	2100	good	unknown	-
19	73 M	pneumonia	(-)	NF	150 × 2	14	4200	fair	unknown	-
20	46 M	pneumonia	(-)	NF	150 × 2	11	3300	fair	unknown	drug fever eruption
21	45 F	pneumonia	(-)	<i>S. pneumoniae</i>	300 × 2	4	2400	excellent	eradicated	-
22	56 M	pneumonia	(-)	NF	300 × 2	12	7200	fair	unknown	drug fever S-GOT↑, S-GPT↑ Al-Pase↑, LDH↑ γ-GTP↑
23	38 F	mycoplasmal pneumonia	(-)	not done	300 × 2	7	4200	good	unknown	-
24	26 M	mycoplasmal pneumonia	NANB hepatitis	NF	150 × 2	14	4200	good	unknown	-

NF: normal flora

慢性気道感染症の急性増悪5例では有効4例、やや有効1例、マイコプラズマ肺炎を含む肺炎9例では著効1例、有効5例、やや有効3例で、計24例における有効率は67%であった。

分離した菌は4株で、内訳は*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*各1株であった。*S. pneumoniae*と*H. influenzae*は消失したが*S. pyogenes*と*H. parainfluenzae*は存続した。これらの検出菌についてはMICは測定できなかった。

副作用として薬剤熱が2例に発疹が1例にみられたが、本剤の投与中止と解熱剤の使用(症例20)により軽快した。本剤投与前後の臨床検査値ではGOT, GPTの上昇が1例に、好酸球の増加が2例に、GOT, GPT, ALP, γ-GTP, LDHの上昇が1例にみられた。

Ⅲ. 考 察

TMFXはキノロン環の1位に2, 4-ジフロロフェニル基, 6位にフッ素原子, 7位に3-メチルピペラジニル基を持つ新しい合成抗菌剤である。

TMFXの試験管内抗菌力については、私どもの成績からは既に市販されている同系統の抗菌剤と比較してグラム陰性菌ではほぼ同等で、グラム陽性菌なかでも*S. aureus*に対する抗菌力は他の抗菌剤よりも優れている。

呼吸器感染症の起炎菌は市中発症肺炎では*S. pneumoniae*, *H. influenzae*について*S. aureus*が重要である²⁾。今回の検討では*S. pneumoniae*, *H. influenzae*に対するMICは測定していないが五島らによればTMFXの両者に対するMIC₉₀はそれぞれ0.78, ≤0.025 μg/mlで³⁾、黄色ブドウ球菌感染症も含め本剤の優れた抗菌

Table 3-1. Laboratory findings

Case no.		RBC (10 ⁴ /mm ³)	Hb (g/dl)	Ht (%)	WBC (/mm ³)	Stab (%)	Seg (%)	Eosino (%)	Baso (%)	Lymp (%)	Mono (%)	Plate. (10 ⁴ /mm ³)	S-GOT (IU)	S-GPT (IU)	ALP (IU)	LDH (IU)	BUN (mg/dl)	S-Cre (mg/dl)
1	B	503	15.1	43.7	19300	24	55	1	1	16	3	18.3	15	17	164	275	13	1.0
	A	516	15.0	44.7	9700	10	58	1	1	27	3	26.3	15	17	174	280	16	1.0
2	B	383	12.0	34.6	7700	12	56	1	0	19	10	25.6	15	8	192	126	12	0.9
	A	383	11.7	34.2	5200	3	34	1	0	57	5	27.9	19	11	174	122	14	1.0
3	B	486	16.5	47.0	10900	18	64	1	0	13	4	20.3	13	9	174	108	11	0.9
	A	490	16.3	46.8	6800	11	59	2	0	8	0	24.1	14	14	169	121	11	0.9
4	B	475	15.1	42.9	5700	20	35	1	0	39	5	32.9	18	25	147	129	10	0.9
	A	477	15.1	42.7	6000	12	33	0	0	47	8	38.6	47	96	162	115	16	1.1
5	B	421	15.5	42.5	5200	10	50	5	1	31	3	17.9	19	12	143	478	17	1.1
	A	399	14.5	40.2	5600	12	50	4	1	31	2	25.1	17	10	134	500	15	1.1
6	B	410	11.7	35.7	2100	15	30	0	1	43	11	24.7	17	13	142	275	9	0.7
	A	412	11.8	35.2	6200	10	50	2	1	23	8	38.1	24	29	161	323	12	0.8
7	B	400	12.5	36.0	6000	15	50	6	0	25	4	26.6	20	13	176	156	11	0.8
	A	382	11.9	34.4	6300	2	27	13	1	50	7	28.2	21	15	154	154	11	0.8
8	B	485	15.1	43.8	14300	17	48	0	1	30	4	34.5	12	6	143	391	7	0.7
	A	477	14.9	42.8	10500	10	52	2	1	30	5	30.5	13	6	143	376	10	0.7
9	B	484	14.4	43.0	9400	6	48	4	0	32	10	28	26	21	198	151	10	1.1
	A	530	15.0	45.1	11500	6	62	2	0	23	7	53.7	—	—	—	—	—	—
10	B	421	13.0	38.0	4900	5	52	5	3	25	9	17.5	22	12	126	171	18	1.0
	A	426	12.8	38.6	4400	5	40	10	0	34	11	17.4	22	16	121	152	16	1.0
11	B	478	15.5	44.7	7700	10	49	2	0	30	9	23.9	12	7	167	107	11	1.0
	A	514	16.5	47.8	7300	11	44	4	0	33	8	24.4	18	13	177	128	18	1.1
12	B	268	8.6	25.4	7400	7	48	2	0	34	9	24.9	16	8	276	122	15	0.8
	A	262	8.3	24.7	5500	6	43	1	1	39	10	30.3	18	6	281	121	12	0.9
13	B	287	9.3	27.5	5200	13	51	2	1	26	7	16.6	17	4	197	109	20	1.2
	A	286	9.2	27.4	4400	2	39	4	0	52	3	15.3	20	7	160	102	11	1.2
14	B	420	13.1	39.8	15000	4	72	0	0	24	0	17.3	15	6	221	314	14.4	0.9
	A	392	12.5	36.6	6500	0	83	1	0	16	0	18.8	14	6	196	328	15.9	0.8
15	B	462	13.0	38.5	12700	—	—	—	—	—	—	—	17	7	176	377	14.6	0.6
	A	461	12.5	38.2	5900	0	61	1	1	37	0	39.6	25	11	163	380	14.6	0.7
16	B	439	11.8	35.6	9400	27	47	0	0	23	3	21.6	22	8	112	226	7	1.0
	A	418	11.5	33.7	5800	7	36	3	1	49	3	39.6	22	21	114	190	17	0.9
17	B	399	12.6	37.0	12700	15	61	1	1	15	7	37.7	17	11	139	164	11	0.9
	A	383	12.2	35.3	5700	5	50	2	0	38	5	43.3	16	11	134	133	17	0.8
18	B	381	10.7	32.2	3300	24	36	1	0	29	10	27.6	30	50	365	146	11	1.2
	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28	28	251	135	15	1.0

B: before A: after

Table 3-2. Laboratory findings

Case no.		RBC (10 ⁴ /mm ³)	Hb (g/dl)	Ht (%)	WBC (/mm ³)	Stab (%)	Seg (%)	Eosino (%)	Baso (%)	Lymph (%)	Mono (%)	Plate. (10 ⁴ /mm ³)	S-GOT (IU)	S-GPT (IU)	ALP (IU)	LDH (IU)	BUN (mg/dl)	S-Cre (mg/dl)
19	B	463	14.9	44.7	5400	4	39	1	0	42	14	43.1	31	40	141	135	19	1.3
	A	434	14.0	41.8	5200	13	56	1	0	22	8	17.1	19	24	122	116	15	1.2
20	B	441	14.4	42.1	9600	6	72	0	2	11	9	26.5	26	19	198	117	11	1.1
	A	465	15.1	43.4	5300	22	51	1	0	17	9	27.1	44	51	214	198	13	1.1
21	B	419	14.2	40.9	13800	4	70	0	0	26	0	31.6	21	14	198	346	10.8	0.7
	A	440	14.4	42.8	5900	1	36	2	0	60	1	33.6	23	13	197	280	15.1	0.8
22	B	504	15.3	45.5	7100	3	65	1	0	31	0	34.1	14	13	154	300	24.7	1.5
	A	473	14.4	42.3	5200	2	61	3	0	34	0	24.4	75	102	403	439	16.2	1.3
23	B	452	13.4	41.2	5700	16	40	5	1	34	4	23.7	10	6	100	286	12	0.8
	A	401	11.8	35.5	7100	10	55	2	1	28	4	32.8	13	6	106	302	22	1.0
24	B	537	16.5	47.3	10500	0	57	4	0	39	0	33.7	53	113	176	237	9.8	0.9
	A	530	15.4	46.1	9700	1	38	2	0	59	0	33.7	48	94	158	238	10.3	1.0

B: before A: after

力を反映するものである。一方、院内発症肺炎の起炎菌として重要な腸内細菌群に対しても *S. marcescens*, *P. aeruginosa* を除いて優れた抗菌活性を有す。従ってこれらのグラム陰性桿菌を除いて各種細菌性呼吸器感染症に対し本剤は優れた臨床効果が期待できる。

臨床的には急性気管支炎9例中3例がやや有効であった。起炎菌は判明していないが、前医により抗生剤の投与がなされた症例や、あるいはクラミジアなどが考えられる。これら3例のうち2例は発熱、咳、痰などの自覚症状は明らかに改善したが炎症反応が本剤投与開始時より陰性であったこと、1例は白血球数の改善が軽度であったためやや有効と判定した。慢性気道感染症の急性増悪では5例中1例はやや有効であった。本例は痰量の減少を認めたにもかかわらず軽度の炎症所見が持続したためやや有効とした。一方、肺炎の9例では3例がやや有効でうち2例は発疹と薬剤熱のため肺炎は軽快したがやや有効にとどめた。マイコプラズマ肺炎の2例は有効であり、本剤の抗菌活性の幅広さを示すものである。

副作用および臨床検査値異常として薬剤熱2例、発疹1例、好酸球増加2例およびGOT、GPT等の上昇が2

例にみられた。頻度としてはやや多いと考えられるが、重篤なものではなくいずれも一過性であり、臨床的には安全な薬剤と考えられる。

以上の成績によりTMFXは抗菌力での基礎的検討から従来の新キノロン剤と同等もしくはそれ以上に優れた薬剤であり、臨床効果は67%の有効率で陳旧性肺結核、糖尿病などの基礎疾患の存在、あるいは起炎菌不明の気管支炎などのため有効率が既存のキノロン薬に比較しやや低かったが、臨床的には軽症から中等症の呼吸器感染症に対し経口剤として有用な薬剤と考えられた。

文 献

- 1) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 2) 山本俊幸：老年者肺炎、難治要因と治療。Mebio 5: 48~52, 1988
- 3) 五島瑳智子：第39回日本化学療法学会西日本支部総会、新薬シンポジウム。Temafloracin (TA-167), II. 抗菌力, 大分, 1991

Fundamental and clinical studies on temafloxacin

Kazuhide Yamamoto, Yoshimitsu Hayashi, Yasuo Yamada and Toshihiko Takeuchi
First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Nagoya City University
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

Masahito Kato
Department of Internal Medicine, NTT Tokai General Hospital

Hidekazu Hanaki and Tsuyoshi Ito
Department of Internal Medicine, Nagoya City Higashi General Hospital

We evaluated the *in vitro* antimicrobial activity and the clinical efficacy of temafloxacin (TMFX), and obtained the following results.

1. Antimicrobial activity: The MIC_{90S} (inoculum size: 10⁶ CFU/ml) of TMFX against clinically isolated *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* (27 strains each), *Serratia marcescens* (19 strains) and *Pseudomonas aeruginosa* (27 strains) were 0.2, 1.56, 0.2, 0.78, 6.25, 0.78, 25 and >100 µg/ml, respectively.

2. Clinical efficacy: TMFX was administered orally to 24 patients with respiratory infections at a daily dose of 150 or 300 mg divided into two administrations. The clinical response was good in 1 case of acute tonsillitis, and excellent or good in 5 of 9 acute bronchitis cases, in 4 of 5 cases with acute exacerbation of chronic respiratory infections and in 6 of 9 pneumonia cases. One strain each of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* was eradicated, one each of *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus parainfluenzae* was unchanged. One patient had a rash and two patients developed drug fever, but recovered upon withdrawal of the agent. Elevations in GOT and GPT in one patient, eosinophils in two patients and GOT, GPT, ALP, γ-GTP and LDH in one patient were observed.