

## FK037 の尿中抗菌力と好中球活性酸素産生能に及ぼす影響

清田 浩・町田 豊平・小野寺昭一・鈴木 博雄  
後藤 博一・三谷比呂志・高見澤重教・川原 元  
五十嵐 宏・遠藤 勝久・細部 高英・斑目 旬  
東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室\*

FK037 の生体内効果を明らかにする目的で、FK037 の尿中抗菌力と好中球活性酸素産生能に及ぼす影響について検討した。

1) 尿中抗菌力：健康人から得た尿を用いて FK037 の抗菌力に及ぼす尿の pH, マグネシウム濃度, そしてカルシウム濃度の影響について検討した。その結果, FK037 の MBC は尿の pH, マグネシウム濃度あるいはカルシウム濃度に影響されず, *Escherichia coli* に対しては 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以下, *Pseudomonas aeruginosa* に対しては 3.13~6.25  $\mu\text{g/ml}$  であった。

2) 好中球活性酸素産生能に及ぼす影響：健康人の末梢血より好中球を分離し, FK037 存在下あるいは非存在下にてこれら好中球を phorbol myristate acetate で刺激し, luminol 存在下における chemiluminescence 法により好中球の活性酸素産生能を測定した。好中球活性酸素産生能は 10  $\mu\text{g/ml}$  の FK037 存在下では影響されず, 100  $\mu\text{g/ml}$  で有意に抑制された。また, sublethal dose の FK037 存在下あるいは非存在下で *E. coli* あるいは *P. aeruginosa* の生菌刺激を行い, 好中球活性酸素産生能を同様に検討したところ, sublethal dose の FK037 存在下で好中球活性酸素産生能の変化は認められなかった。

以上より, FK037 の尿中抗菌力は尿の性状に影響されないことから, 尿路感染症の際にはその試験管内抗菌力が臨床効果に反映されると考えられた。また, FK037 は高濃度で好中球活性酸素産生能を直接抑制することから, その感染防御機構の十分な協力は期待できないと考えられた。

**Key words** : FK037, 尿中抗菌力, 白血球活性酸素産生能

FK037 は藤沢薬品工業株式会社が開発した新しい注射用セフェム剤である。その抗菌スペクトルは *Staphylococcus aureus* をはじめとするグラム陽性菌から *Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陰性菌まで幅広く分布すること, また, そのほとんどが腎より尿中に排泄されることから, 尿路感染症に対する優れた治療薬となることが期待される<sup>1-4)</sup>。

尿路感染症では, 尿が起炎菌にとって良い培地となるが, その際, キノロン剤あるいは一部のカルバペネム剤の抗菌力が尿の pH, マグネシウム濃度あるいはカルシウム濃度の影響を受けることを我々は既に報告してきた<sup>5,6)</sup>。また, 尿路感染症では, 尿路上皮から血中へと起炎菌の侵入があり, これに対する補体あるいは白血球からなる感染防御機構との攻防が尿路感染症の重症度を決定すると考えられる。従って, 尿路感染症に対し抗菌剤を投与した場合, 抗菌剤の試験管内抗菌力, 体内動態のほかに, 抗菌剤と感染防御機構

との協力, すなわち生体内効果の有無が抗菌剤の尿路感染症に対する臨床効果を左右する一因となることが推測される。この点に関して, 我々は既にキノロン剤あるいはカルバペネム剤がある濃度下で好中球殺菌能の一指標となる活性酸素産生能を増強することを報告し<sup>7,8)</sup>, セフェム剤についても cefpimizole (CPIZ)<sup>9)</sup>に同様の効果があるとの報告がある。

以上の観点より, 今回我々は, FK037 の尿路感染症に対する有用性を類推する目的で, その尿中抗菌力と好中球活性酸素産生能に及ぼす影響について検討した。

## I 材料と方法

### 1 抗菌剤

FK037 を対象薬とした。

### 2 被験菌

標準株である *Escherichia coli* NIHJ JC-2 と *P. aeruginosa* 18 s を被験菌とした。

\* 〒105 東京都港区西新橋 3-25-8

## 3 尿中抗菌力の測定

## 1) 培地

試験の参加に同意の得られた健康人男子 1 名の 24 時間尿に 1/4 容の chelating resin (Sigma 社) を加え、4°C で 1 時間攪拌し、2 価陽イオンを除去した。これを 0.45  $\mu\text{m}$  のミリポア・フィルターで濾過滅菌し、1 N HCl, 1 N NaOH, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> を適宜加え、Table 1 に示すような pH, マグネシウム濃度, カルシウム濃度の異なる 9 種類の尿培地を作製した。対照には Mueller-Hinton broth を用いた。

## 2) 抗菌力の測定

各培地中の FK037 の試験管内抗菌力の測定は、National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>10)</sup> に準じて行った。その際、pH 8 の尿培地は、37°C, 18 時間後に沈澱を生じるため、最小発育阻止濃度の判定は行わず、最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration; MBC) をもって試験管内抗菌力とした。接種菌量は  $1 \times 10^6$  CFU/ml として各菌株を 37°C, 18 時間培養した。そして、各培地からの菌液 0.1 ml を Trypticase soy agar plate に撒き、37°C, 一夜培養後生菌数を決定した。この生菌数より、接種菌量の 99.9% 以上を殺菌する最小薬剤濃度を MBC とした。

## 3) FK037 の抗菌力に及ぼす尿の pH, マグネシウム濃度, カルシウム濃度の影響

以上により求めた異なる pH, 異なるマグネシウム濃度, そして異なるカルシウム濃度の尿培地における

MBC を比較し、FK037 の *E. coli*, *P. aeruginosa* に対する試験管内抗菌力が尿の pH, マグネシウム濃度, カルシウム濃度に影響されるか否かを検討した。

## 4 好中球活性酸素産生能に及ぼす影響

## 1) 好中球の調製

試験の参加に同意の得られた健康人男子 1 名の静脈血から、Mono-Poly Resolving Medium (Flow 社) を用いた比重遠心法により好中球と単球を分離した。これらを Saline G により 2 回洗浄後、再浮遊し、trypan blue (Sigma 社) 染色により生細胞数を求めた。

## 2) 好中球活性酸素産生能の測定

まず、10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  の FK037 存在下および非存在下にて  $10^6$  cells の好中球を 100 ng/ml の phorbol myristate acetate (Sigma 社; 以下 PMA と略す) で刺激し、その活性酸素産生能を測定した。このとき、FK037 非存在下での好中球活性酸素産生能を対照とし、これらと FK037 存在下でのそれらを比較することにより、FK037 の好中球活性酸素産生能に及ぼす直接的影響について検討した。活性酸素産生能は 33  $\mu\text{g/ml}$  の luminol 存在下での Multi-Biolumat LB 9505 C system (Berthold 社) を使用した chemiluminescence 法により測定した。次に、*E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* 18s に対する sublethal dose の FK037, すなわち、*E. coli* に対しては 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , *P. aeruginosa* に対しては 1.0  $\mu\text{g/ml}$  存在下および非存在下にて  $10^6$  cells の好中球を  $10^6$  CFU の *E. coli* あるいは *P. aeruginosa* で刺激したときの活性酸素産生量を同様に測

Table 1. Minimum bactericidal concentrations of FK037 against *Escherichia coli* NIHJ JC-2 and *Pseudomonas aeruginosa* 18s in nine urine media with various pH and magnesium and calcium concentrations and Mueller-Hinton broth.

Media	pH	[Mg] ( $\mu\text{g/ml}$ )	[Ca] ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ ) against	
				<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18s
urine media					
A	5.5	50	100	0.10	3.13
B	7.0	50	100	<0.05	3.13
C	8.0	50	100	<0.05	6.25
D	7.0	50	100	<0.05	3.13
E	7.0	100	100	<0.05	6.25
F	7.0	500	100	<0.05	6.25
G	7.0	50	10	<0.05	6.25
H	7.0	50	50	<0.05	3.13
I	7.0	50	150	<0.05	3.13
Mueller-Hinton broth	8.0	4	4	<0.05	12.5

定した。このときには、白血球の donor から得た 10% 血清 (3.6 CH<sub>50</sub>U/ml) を測定系に添加した。そして、FK037 非存在下での生菌刺激時の活性酸素産生量と sublethal dose の FK037 存在下でのそれらを比較することにより、FK037 の好中球活性酸素産生能に及ぼす間接的影響について検討した。各実験は 5 回行い、対応のない T-検定で比較検討した。

## II. 結 果

### 1 尿中抗菌力

FK037 の *E. coli* に対する各培地での MBC は、pH 5.5 の尿培地 A で 0.1 μg/ml である以外、他のすべての培地において 0.05 μg/ml 以下であった。また、FK037 の *P. aeruginosa* に対する各尿培地での MBC は、3.13~6.25 μg/ml であり、Mueller-Hinton broth での 12.5 μg/ml に比しやや低値であったものの、尿の性状による影響はなかった (Table 1)。

### 2. 好中球活性酸素産生能に及ぼす影響

1) 直接的影響: FK037 非存在下で好中球を PMA で刺激した時の peak chemiluminescence 値は、 $(1.56 \pm 0.12) \times 10^8$  cpm であった。これに対し、10 μg/ml の FK037 存在下でのそれらは  $(1.42 \pm 0.15) \times 10^8$  cpm と FK037 非存在下と変わらなかった。しかし、100 μg/ml の FK037 存在下での好中球の peak chemiluminescence 値は  $(1.28 \pm 0.12) \times 10^8$  cpm と非

存在下でのそれらに比し有意に抑制された (Table 2)。

2) 間接的影響: *E. coli* で好中球を刺激した時の peak chemiluminescence 値は、FK037 非存在下で  $(2.08 \pm 0.27) \times 10^8$  cpm であるのに対し、*E. coli* に対する sublethal dose である 0.01 μg/ml の FK037 存在下では  $(2.33 \pm 0.20) \times 10^8$  cpm と、両者に有意差は認められなかった。また、*P. aeruginosa* で好中球を刺激したときの peak chemiluminescence 値も、FK037 非存在下で  $(7.43 \pm 0.77) \times 10^7$  cpm であるのに対し、*P. aeruginosa* に対する sublethal dose である 1.0 μg/ml の FK037 存在下では  $(8.56 \pm 0.64) \times 10^7$  cpm と、やはり両者に有意差を認めなかった (Table 3)。

## III. 考 察

FK037 は藤沢薬品工業株式会社で開発された新しい注射用セフェム剤である。本剤は *S. aureus* を含むグラム陽性菌から *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌まで幅広い抗菌スペクトルを有し、各種 β-lactamase に安定である。また、本剤は腎排泄型であることから、尿路感染症に対する有用性が期待される<sup>1-4)</sup>。

尿路感染症に対する抗菌化学療法の際に選択される抗菌剤は、その体内動態が腎排泄型であること、起炎菌に対し優れた抗菌力を有することが必要条件とな

Table 2. Superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in the presence or absence of FK037: Superoxide generation is expressed as peak chemiluminescence value stimulated with 100 ng/ml of phorbol myristate acetate. Superoxide generation by PMNs was significantly reduced in the presence of 100 μg/ml of FK037 compared with that in the absence of FK037.

Concentration of FK037 (μg/ml)	Peak chemiluminescence value (cpm)
0	$(1.56 \pm 0.12) \times 10^8$ *
10	$(1.42 \pm 0.15) \times 10^8$
100	$(1.28 \pm 0.12) \times 10^8$ *
(mean ± SD) *; p < 0.02	

Table 3. Influence of FK037 at subMICs on superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes stimulated with *Escherichia coli* NIHJ JC-2 or *Pseudomonas aeruginosa* 18s; Superoxide generation is expressed as peak chemiluminescence value

Strain stimulated	Concentration of FK037 (μg/ml)	Peak chemiluminescence value (cpm)
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0	$(2.08 \pm 0.27) \times 10^8$
	0.01	$(2.33 \pm 0.20) \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18s	0	$(7.43 \pm 0.77) \times 10^7$
	1.0	$(8.56 \pm 0.64) \times 10^7$
(mean ± SD)		

る。しかし、尿路感染症では尿そのものが良い培地となることから、尿中での抗菌力が投与される抗菌剤の尿路感染症に対する有効性を規定する一因子となると考えられる。このような観点からこれまで我々はキノロン剤の *E. coli* に対する尿中抗菌力が尿の pH が高いほど、また尿のマグネシウム濃度が低いほど優れ<sup>5)</sup>、また、カルバペネム剤についても *E. coli* あるいは *P. aeruginosa* に対し pH が高いほど、カルシウム濃度が低いほど優れていることを報告してきた<sup>6)</sup>。これらの事実は、一般に感染尿がアルカリ尿であることから、尿路感染症に対してキノロン剤やカルバペネム剤が治療上有利であること、そして、尿路感染症の際には水負荷による利尿をはかることが尿のマグネシウム濃度とカルシウム濃度を低くし、これらの薬剤の有効性を高めることを意味するものである。一方、今回得られた結果では、*E. coli* と *P. aeruginosa* に対する本剤の尿中抗菌力は尿の pH、マグネシウム濃度、そしてカルシウム濃度の影響を受けなかった。従って、本剤を尿路感染症に対し投与する際には、その尿路感染症の起炎菌に対する Mueller-Hinton 培地での試験管内抗菌力が尿路感染症に対する有効性にそのまま反映されると考えられた。

好中球の殺菌能の一指標となる活性酸素産生能に及ぼす抗菌剤の影響については、我々は既にキノロン剤<sup>7)</sup>やカルバペネム剤<sup>8)</sup>が特定の濃度で好中球の活性酸素産生能を増強することを報告してきた。また、セフェム剤では CPIZ に同様の作用があること<sup>9)</sup>も知られている。しかし、今回の結果からは、本剤が好中球

活性酸素産生能を増強させることはなく、100  $\mu\text{g/ml}$  という高濃度でむしろ抑制することから、好中球の殺菌能を増強させるような生体内効果はないと考えられた。

#### 文 献

- 1) Mine Y, et al: *In vitro* antibacterial activity of FK037, a novel parenteral broad-spectrum cephalosporin. J Antibiot 46: 71~87, 1993
- 2) Mine Y, et al: *In vivo* antibacterial activity of FK037, a novel parenteral broad-spectrum cephalosporin. J Antibiot 46: 88~98, 1993
- 3) 東 康之, 宮崎修一, 金子康子, 山口恵三, 五島瑳智子: 新しい注射用セフェム剤 FK037 の細菌学的評価. Chemotherapy 41: 841~858, 1993
- 4) 松本文夫: 第 41 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム. FK037, 神戸, 1993
- 5) 遠藤勝久, 清田 浩, 小野寺昭一: 抗菌剤の尿中抗菌力測定の意義. 感染症誌 66: 522~528, 1992
- 6) 清田 浩, 他: ペネム剤の抗菌力に及ぼす尿の pH, 二価陽イオンの影響. 感染症誌 67: 435~439, 1993
- 7) 三谷比呂志, 清田 浩: 白血球殺菌能に及ぼすニューキノロン剤の影響. 感染症誌 66: 59~65, 1992
- 8) 清田 浩, 他: 複雑性尿路感染症に対する Mero-penem の基礎的・臨床的検討. Chemotherapy 40 (S-1): 582~588, 1992
- 9) 朝長昭光, 他: AC-1370 の好中球機能に及ぼす影響. Chemotherapy 32(S-9): 114~119, 1984
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. NCCLS Document M26-P, Vol. 7, No. 2, Villanova, 1987

Antimicrobial activity of FK037 in human urine and influence of FK037  
on the superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes

Hiroshi Kiyota, Toyohei Machida, Shoichi Onodera,  
Hiroo Suzuki, Hirokazu Goto, Hiroshi Mitani,  
Shigenori Takamizawa, Motoshi Kawahara, Hiroshi Igarashi,  
Katsuhisa Endo, Takahide Hosobe and Jun Madarame  
Department of Urology, the Jikei University School of Medicine  
3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

We investigated the antimicrobial activity of FK037 in human urine and the influence of FK037 on superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes.

1) Antimicrobial activity of FK037 in human urine: MBCs of FK037 were not influenced by urine pH, urinary magnesium concentration, or urinary calcium concentration; MBCs of FK037 against *Escherichia coli* were  $\leq 0.1 \mu\text{g/ml}$ , and those against *Pseudomonas aeruginosa* ranged between 3.13 and 6.25  $\mu\text{g/ml}$ .

2) Influence of FK037 on superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes (PMNs): Superoxide generation by PMNs stimulated with phorbol myristate acetate was not influenced in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  of FK037. However, it was significantly reduced in the presence of 100  $\mu\text{g/ml}$  of FK037. Superoxide generation by PMNs stimulated with bacterial cells in the presence of sublethal dose of FK037 were not different from those in the absence of FK037.

These results indicate that FK037 does not enhance the bactericidal activity of PMNs.