

ニューキノロン系抗菌薬の *in vivo* sub-MIC 効果に関する基礎的解析

高橋孝行

東邦大学医学部微生物学教室*

(平成8年1月17日受付・平成8年2月1日受理)

尿路感染症患者由来の *Escherichia coli* TUH 9501 による上行性尿路感染惹起能におよぼす sub-MIC 効果を *in vitro* および *in vivo* 双方から検討し、以下の成績を得た。各抗菌薬 1/4 MIC 処理菌のマウス尿路感染惹起能は無処理菌のそれに比べ低下し、特に fleroxacin, levofloxacin 処理群でこの傾向が著明であった。この原因を sub-MIC 処理菌を用い *in vitro* で解析した結果、成人膀胱上皮細胞への付着能およびヒト由来 PMNs の貪食・殺菌能に対する抵抗性が sub-MIC 処理群では無処理群に比べ低下しており、この成績が尿路感染惹起能の低下と一致していた。また、尿路感染マウスにおいて、levofloxacin 投与群では投与間隔の延長に伴い治療効果が悪くなったが、floxacin 投与群はその影響をもっとも受けなかった。抗菌薬の腎内動態パラメーター解析から、sub-MIC 領域での AUC がこの結果に影響していることが示唆された。

Key words: ニューキノロン剤, sub-MIC 効果, 線毛, 投与間隔, 尿路感染モデル

抗菌薬療法の目的は、生体内で原因菌を死滅またはその増殖を抑制することによって優れた臨床効果を得ることにある。抗菌薬の有用性の指標として、minimum inhibitory concentration (MIC) や minimum bactericidal concentration (MBC) が重要視されているが、これらの成績から推測される以上の臨床効果が得られる場合があり、このことはすでにペニシリンの開発当初から知られている¹⁾。この現象からペニシリンを間欠的に投与しても有効な臨床効果が得られるという Eagle の理論が導かれた²⁾。その主な要因として、1) 抗菌薬投与後の血清中濃度が検出限界以下に低下しても、組織内濃度は有効濃度を維持するという考え方³⁾ と 2) *in vitro* postantibiotic effect (PAE) と sub-minimum inhibitory concentration (sub-MIC) との相加作用により菌の増殖が抑制され、かつ生体防御システムの作用が加わり殺菌作用が起こるという2つの考え方がある⁴⁻⁶⁾。

長谷川らおよび渡辺ら⁷⁻¹¹⁾ は、*in vitro* および *in vivo* PAE について多数の抗菌薬で検討し、PAE 期における sub-MIC による殺菌力の増強を postantibiotic sub-MIC effect, また sub-MIC の抗菌薬による増殖抑制時間の延長を postantibiotic sub-MIC enhancement と定義して解析を行っている。また、Craig ら¹²⁾ は肺感染や大腿感染モデルを用いて、*in vivo* PAE が長くなると postantibiotic leucocyte enhancement が大きくなり、治療効果がよくなると報告している。

一方、sub-MIC 効果については *in vitro* での形態変化、産生物質の量的変化、貪食・殺菌抵抗性、血清殺菌抵抗性および付着能の低下などの現象が報告されている^{13,14)}。しかし、sub-MIC の臨床的意義を確認するためには *in vivo* の検討

が必要であるにもかかわらず、実際にこれを検討した成績がみあたらない。

本論文では、尿路感染症から分離頻度の高い *Escherichia coli* によるマウス尿路感染モデルを用いて、尿路感染症で多用されるニューキノロン系抗菌薬を被験薬として、その sub-MIC 効果を解析し、その臨床的意義について考察した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

東邦大学医学部付属大森病院の尿路感染症患者から分離した *Escherichia coli* TUH 9501 を用いた。本菌は、抗 type I 線毛抗体 (友近博士 (岡山大) より分与を受けた) で凝集する mannose-sensitive 線毛を保有していた。

2. 使用薬剤

Ciprofloxacin (CPFX; バイエル薬品), fleroxacin (FLRX; 杏林製薬), sparfloxacin (SPFX; 大日本製薬) および levofloxacin (LVFX; 第一製薬) を用いた。

3. Minimum inhibitory concentration (MIC) の測定
使用菌株に対する各抗菌薬の MIC は日本化学療法学会の定めた微量液体希釈法に準じて測定した¹⁵⁾。基礎培地としては Mueller Hinton broth (MHB, Difco) を用いて所定の濃度の抗菌薬含有培地を作製後、最終濃度 10^4 cells/well になるように菌を接種した。37°C, 18 時間培養後、肉眼的に菌の発育していない最小濃度を MIC とした。

4. Sub-MIC 処理菌の調整

供試各抗菌薬 1/4 MIC 添加 MHB に、抗菌薬を含まない MHB 中で 37°C, 18 時間培養した菌を培地量の

1/100 加え (最終濃度; 10^6 cfu/ml), 37°C , 5 時間培養した菌液を以下の実験に用いた。なお同一条件下で抗菌薬非添加培地で培養した菌液を対照として用いた。

5. マウス尿路感染惹起能実験

本実験には 4 週齢の雌マウス (Slc/ICR, 静岡実験動物) を 1 群 5 匹づつ用いた。抗菌薬処理および無処理の菌液 $50 \mu\text{l}$ を 18 時間絶水したマウス膀胱内へ先端を丸くした針を用いて尿道より注入後, 尿道口を 1 時間クリップで閉塞した¹⁶⁾。クリップ解除後, 給水を開始し, 以後通常の飼育とした。菌接種 5 日後麻醉下で両腎を摘出し, ホモジナイズ後, 10 倍希釈し, 各希釈液 $100 \mu\text{l}$ を BTB 寒天平板に塗布・培養後, 生菌数を測定した。腎臓からの菌検出限界は 100 cfu/kidneys であった。1 群の平均値, 標準偏差の算出に際しては, 検出限界以下の検体の菌数を 99 cfu/kidneys として求めた。

6. 膀胱上皮細胞への付着実験

健常成人女子 (22~28歳) 5 名の間中尿を $100\sim 150 \text{ ml}$ 採取し, $300\times\text{g}$, 10 分間の遠心により膀胱上皮細胞を得た。細胞は Hanks 液にて 3 回遠心洗浄後, 同じ液に $2\times 10^6 \text{ cells/ml}$ になるよう懸濁した。なお, グラム染色により, 細胞に細菌が付着していないことを確認した。この膀胱上皮細胞液 0.5 ml と抗菌薬処理菌液または非処理菌液 0.5 ml を混合し, 室温で 30 分間反転させた。付着していない菌を除去した後, Hanks 液にて遠心洗浄を 3 回行い, メタノール固定, ギムザ染色し, 顕微鏡下で 20 個の膀胱上皮細胞に付着した菌数を測定した。

7. 線毛産生量の測定

Mannose-sensitive な type I 線毛の量はサンドイッチ ELISA 法により測定した¹⁷⁾。培養菌を集菌後, phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 に懸濁し, 超音波破碎後の遠心上清を被検材料とした。抗 type I 線毛抗体 (IgG)F(ab)² 画分を carbonate buffer, pH 9.6 にて $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈し, その $100 \mu\text{l}$ を各 well に加え, 4°C , 18 時間静置した。洗浄後, blocking buffer (1% アルブミン含有 PBS) $200 \mu\text{l}$ を添加し, 再び 4°C 18 時間静置した。洗浄後, 調整した上清を blocking buffer で 10 倍希釈し, その $100 \mu\text{l}$ を各 well に加え, 37°C , 2 時間静置した。洗浄後, 抗 type I 線毛抗体 (IgG) を PBS にて最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ になるよう希釈し, その $100 \mu\text{l}$ を各 well に加え, 37°C , 2 時間静置した。洗浄後, blocking buffer で 500 倍希釈した alkaline phosphatase を結合した抗 IgG Fc 抗体 (Zymed, Lab., INC., San Francisco, CA. USA) を $100 \mu\text{l}$ 加え, 37°C , 2 時間静置した。洗浄後, 基質液 (4.5 mM phenolphosphoric acid, 2.0 mM aminoantipyrine in 0.025 M carbonate buffer, pH 10.2) を $100 \mu\text{l}$ 加え, 37°C , 30 分静置後, 0.8% metaperiodate 溶液 $50 \mu\text{l}$ 加え, 490 nm で吸光度 (OD) を測定した。

8. 外膜蛋白の SDS-PAGE

外膜タンパクは, Inokuchiらの方法¹⁸⁾にしたがって調整した。すなわち, 菌体を超音波破碎した後, $8,000\times\text{g}$, 4°C , 15分間遠心により上清を得た。さらに, この上清は $100,000\times\text{g}$, 4°C , 30分間超遠心を行い, 得られた沈澱を膜面分とした。この沈澱を 1% sodium N-lauroyl sarcosinate 加 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 に懸濁後, 再度上記の条件で超遠心後に得られた沈澱を外膜タンパクとした。この外膜タンパク画分を Sodium dodecyl sulfate (SDS) およびグリセリンを含む 0.05 M phosphate buffer, pH 6.8 でタンパク濃度 1 mg/ml となるように調整した後, 2-mercaptoethanol を添加して 2 分間沸騰水中で還元処理した。その $5 \mu\text{l}$ を 6 M urea 加 10% SDS polyacrylamide gel に加え, Laemmli の方法¹⁹⁾に準じて電気泳動後, 0.25% coomassie brilliant blue R 250 にて染色した。

9. ヒト好中球の chemiluminescence

ヒト好中球の調整は Ficoll-Conray 重層法に準じた²⁰⁾。すなわち, 健常成人 (23~28歳) 4 名よりヘパリン採血した血液各 8 ml を 2% デキストラン生理食塩液 2 ml と混和し, 1 時間室温にて放置後, 好中球画分を得た。これに当量の PBS を加えた液を 3 ml の Ficoll-Conray の入った試験管に重層し, $300\times\text{g}$, 45 分間遠心した。沈澱に 0.87% NH_4Cl 液 4 ml を加え, 10 分間ゆるやかに混和した後, 遠心により得た好中球を Hanks 液にて洗浄後, $1\times 10^7 \text{ cells/ml}$ になるように Hanks 液に浮遊させた。この調整好中球の chemiluminescence (CL) 活性の測定は楊井らの方法²¹⁾に準じた。ルミノール液 ($100 \mu\text{l}$, 0.2 mg/ml), 好中球浮遊液 ($100 \mu\text{l}$, 10^7 cells/ml) に好中球刺激物質として菌液 ($200 \mu\text{l}$, 10^8 cells/ml) を混合後, Automatic Luminescence Analyzer (ベルトールド社, ドイツ) にて CL を測定した。

なお, 相対比較のために, 抗菌薬処理菌添加時の CL ピーク値を非処理菌添加時の CL ピーク値で除した値を CL index として求めた。

10. 生化学的性状の判定

一晚平板培養した菌を滅菌生理食塩液に MacFarland No. 0.5 に調整後, 100 倍希釈した菌液 (最終濃度: 10^6 cfu/ml) に $1/4 \text{ MIC}$ になるように各抗菌薬を添加し, この菌液を VITEK 自動細菌検査装置専用の Gram-Negative Identification Card (GNI) の各ウエルに注ぎ, 18 時間後 VITEK 自動細菌検査装置 (bioMerieux Vitek, INC, USA) により各性状を判定した。なお, 検討した性状は, リジン, オルニチンおよびアルギニンの脱炭酸反応, インドールピルビン酸, β -ガラクトシダーゼおよび硫化水素産生, マロン酸, アセトアミドおよびクエン酸利用, エスクリン加水分解, ブドウ糖, 乳糖, マルトース, マンニトールおよ

びキシロースの酸化と酸産生、ラフィノース、ソルビトール、スクロース、イノシトール、アドニット、ラムノース、L-アラビノースおよびグルコースの利用と酸産生、尿素分解である。

11. 尿路感染モデルにおける投与間隔の影響

抗菌薬無添加培地で培養した菌を5)項で述べた方法でマウスに尿路感染を惹起させた。抗菌薬投与方法は1日の投与回数および投与期間は異なるが、総投与量と同じとした。具体的には、感染翌日から各薬剤(50 mg/kg/1回)を3群のマウスに1日1回6日間、1日2回3日間および1日3回2日間投与し、最終投与20時間後にマウスの両腎を摘出し、残存生菌数を測定した。腎臓での検出限界および平均値などの算出方法は項目5)と同じである。

12. マウス腎内濃度測定

マウス(Slc/ICR, 4週齢, 雄)に各抗菌薬50 mg/kg投与後、1/4, 1/2, 1, 2, 4 および6時間目の腎内濃度をディスク法で測定した。なお、標準曲線は0.05 M phosphate buffer, pH 7.2 に溶解した抗菌薬で作成した。CPFX, LVFX および SPFX の検定菌として *E. coli* Kp, FLRX には *E. coli* NIHJ JC 2 を用いた。

II. 成績

1. *E. coli* TUH 9501 に対する使用抗菌薬の MIC

E. coli TUH 9501 に対する CPFX, FLRX, SPFX および LVFX の MIC はそれぞれ 0.016, 0.063, 0.008 および 0.032 $\mu\text{g/ml}$ であり, SPFX の抗菌力がもっとも強く, FLRX の8倍であった。

2. 1/4 MIC 処理 *E. coli* TUH 9501 のマウス尿路感染惹起能の変動

無処理菌感染群では $1 \times 10^3 \sim 2.9 \times 10^4$ cfu/kidneys 検出されたのに対し, LVFX 処理群ではいずれのマウスからも菌は検出限界以下であり, 対照群との間に有意差が認められ ($p < 0.05$), FLRX 処理群では5匹中1匹から 2.9×10^4 cfu/kidneys 検出された (Fig. 1)。SPFX 処理群では2匹からそれぞれ 7×10^2 および 1.4×10^4 cfu/kidneys, CPFX 処理群では3匹から 3×10^3 , 7×10^2 および 1.3×10^5 cfu/kidneys 検出された。以上のように無処理菌を感染させた場合, すべてのマウスの両腎から $\geq 10^3$ cfu/kidneys 以上の菌が回収されたが, 1/4 MIC 処理菌を感染させた群では5匹中2匹以上の両腎からの菌回収は検出限界以下であった。抗菌薬間で比較すると, LVFX および FLRX 処理菌の尿路感染惹起能が他の2剤より低下していた。

3. 膀胱上皮細胞への *E. coli* TUH 9501 の付着能におよぼす sub-MIC 処理の影響

成人膀胱上皮細胞への付着能を比較した場合, 無処理群 (control) に比べ各抗菌薬 1/4 MIC で処理した群では付着細菌数が $22 \pm 5 \sim 27 \pm 10$ cfu/cell であり, 37.2 ~ 48.8% の減少を認めた (Table 1)。抗菌薬処理群にお

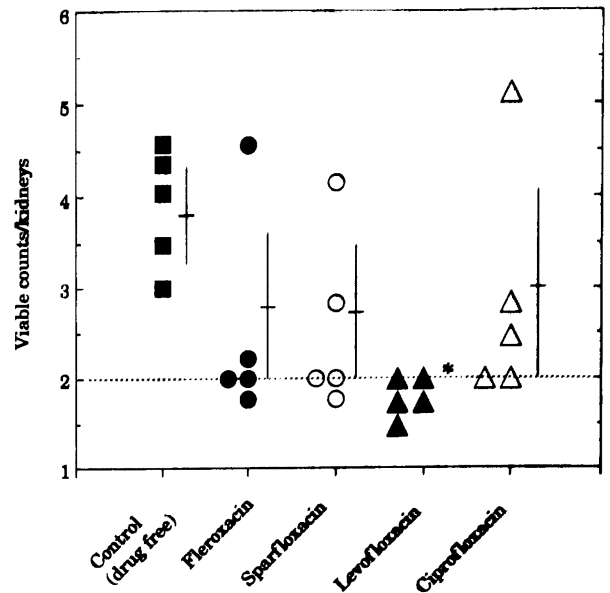


Fig. 1. Effect of treatment with new quinolones at sub-MIC on the pathogenicity of *Escherichia coli* TUH 9501 in murine pyelonephritic infection.

*: $p < 0.05$, versus control by the method of Bonferroni/Dunn

Table 1. Adherence activity of *Escherichia coli* TUH 9501 organisms treated with various quinolones at 1/4 MIC to bladder epithelial cells from healthy adults

Drug	Adherence activity to bladder epithelial cells	
	Number of organisms bound/cell ^a	(%) ^b
Control (drug free)	43 \pm 9	
Ciprofloxacin	26 \pm 6*	(39.5)
Fleroxacin	24 \pm 7**	(44.1)
Sparfloxacin	27 \pm 10*	(37.2)
Levofloxacin	22 \pm 5**	(48.8)

^a average \pm standard deviation ($n = 5$). ^b The decreased percent of average as compared to control

* $p < 0.05$ as compared to control by the method of Bonferroni/Dunn

** $p < 0.01$ as compared to control by the method of Bonferroni/Dunn

ける付着能の低下は無処理群との間に有意差が認められたが ($p < 0.05$ または $p < 0.01$), 抗菌薬間では有意差を認めなかった。

4. *E. coli* TUH 9501 の線毛形成能への 1/4 MIC 処理の影響

上皮細胞への付着に関わる本菌の線毛が sub-MIC 処理後も形成維持されているか否かを ELISA 法により線毛抗原量として測定したが, LVFX および FLRX 処理菌の線毛抗原量をもっとも減少し, 次いで CPFX, SPFX の順であった (Fig. 2)。なお, 用いた試料中の菌数を測定した結果, 無処理で 5.4×10^8 cfu/ml, 各抗菌薬処理群では $3.5 \sim 7.0 \times 10^8$ cfu/ml とほぼ同じ菌数であった。

5. *E. coli* TUH 9501 の外膜蛋白への 1/4 MIC 処理の影響

各抗菌薬 1/4 MIC 処理による *E. coli* TUH 9501 外膜

蛋白構成成分または量の変動について、SDS-PAGE で検討したが、量的、質的変動は認められなかった (Fig. 3)。

6. 健康成人由来 PMNs の CL 活性におよぼす sub-MIC 処理 *E. coli* TUH 9501 の影響

ニューキノロン系抗菌薬 1/4 MIC 添加培地で培養した *E. coli* TUH 9501 を刺激物質とした場合、成人由来 PMNs の CL 活性上昇がみられ、特に FLRX および LVFX 処理群では CL index で 2 倍以上の著明な上昇を認め、この値は対照に比べ有意に大きかった ($p < 0.05$) (Table 2)。

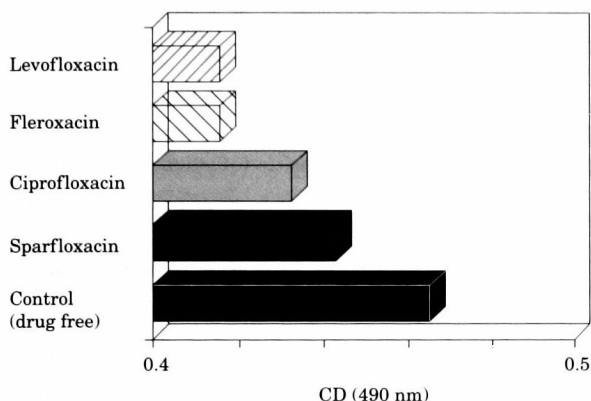


Fig. 2. Effect of treatment with sub-MIC of various quinolones on pili production of *Escherichia coli* TUH 9501.

The content of pili was assayed by ELISA method, using the centrifuged supernatant after sonication of 6 h-incubated organisms in 10 ml of MH broth containing each new quinolone at 1/4 MIC.

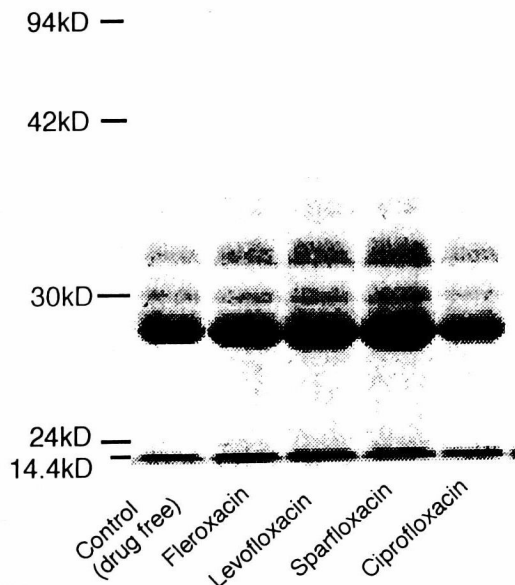


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of outer membranes obtained from *Escherichia coli* TUH 9501 treated with various new quinolones.

The outer membranes' proteins were obtained by sonication of 6 h-incubated organisms in 200 ml of MH broth containing each new quinolone at 1/4 MIC.

7. 1/4 MIC 抗菌薬処理の *E. coli* TUH 9501 株の生物学的性状への影響

各抗菌薬 1/4 MIC 存在下で本菌の生物学的性状を調べたところ、各抗菌薬処理によりソルビトール非分解となり、CPFX および LVFX 処理群ではキシロースも非分解、さらに CPFX 処理群ではマルトースも非分解となった (Table 3)。しかし、調べた他の性状には変化がみられなかった。

8. *E. coli* TUH 9501 株による尿路感染マウスに対する治療効果におよぼす投与間隔の影響

1 日 3 回投与群において、無処理群の両腎から回収された平均菌数は 2.1×10^6 cfu/kidneys であり、治療群では FLRX (平均; 1.2×10^3 cfu/kidneys), SPFX (平均; 1.4×10^4 cfu/kidneys), LVFX (平均; 4.4×10^2 cfu/kidneys) および CPFX (平均; 2.7×10^2 cfu/kidneys) であり、FLRX, LVFX および CPFX 投与群の腎内生菌数は無治療群に比べ有意差を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 4)。1 日 2 回投与群では、無治療群 (平均; 1.3×10^4 cfu/kidneys), FLRX (平均; 2.5×10^2 cfu/kidneys), SPFX (平均; 3.7×10^4 cfu/kidneys), LVFX (平均; 2.4×10^3 cfu/kidneys) および CPFX (平均; 7.9×10^2 cfu/kidneys) であり、FLRX 投与群は無治療群に比べ有意差をもって菌数減少が認められた ($p < 0.05$)。1 日 1 回投与群では、無治療群 (平均; 4.0×10^4 cfu/kidneys), FLRX (平均; 4.2×10^2 cfu/kidneys), SPFX (平均; 1.0×10^3 cfu/kidneys), LVFX (平均; 9.6×10^2 cfu/kidneys) および CPFX (平均; 1.4×10^3 cfu/kidneys) であった。以上の結果から、各投与抗菌薬の投与間隔が治療効果にもっとも影響しなかったのは FLRX 投与群であり、明ら

Table 2. Peak value and CL index of PMNs stimulated by organisms preincubated with each new quinolone

Drug	Mean \pm SD of integrated CL ($\times 10^3$ cpm) ^{a)}	CL index
Control (without drug)	3.1 ± 0.2	1.0
Ciprofloxacin	4.4 ± 0.3	1.4
Fleroxacin	6.6 ± 1.9	2.1
Sparfloxacin	3.8 ± 0.4	1.2
Levofloxacin	8.2 ± 1.6	2.6*

^{a)} average \pm standard deviation (n=4)

* $p < 0.05$ as compared to control by Bonferroni/Dunn

Table 3. Metabolic alteration of *Escherichia coli* THU 9501 in the presence of each new quinolone at 1/4 MIC

Drug	GC	MLT	MAN	XYL	SOR
Control (without drug)	+	+	+	+	+
Ciprofloxacin	+	-	+	-	-
Fleroxacin	+	+	+	+	-
Sparfloxacin	+	+	+	+	-
Levofloxacin	+	+	+	-	-

GC: growth control, MLT: maltose, MAN: mannitol, XYL: xylose, SOR: sorbitol

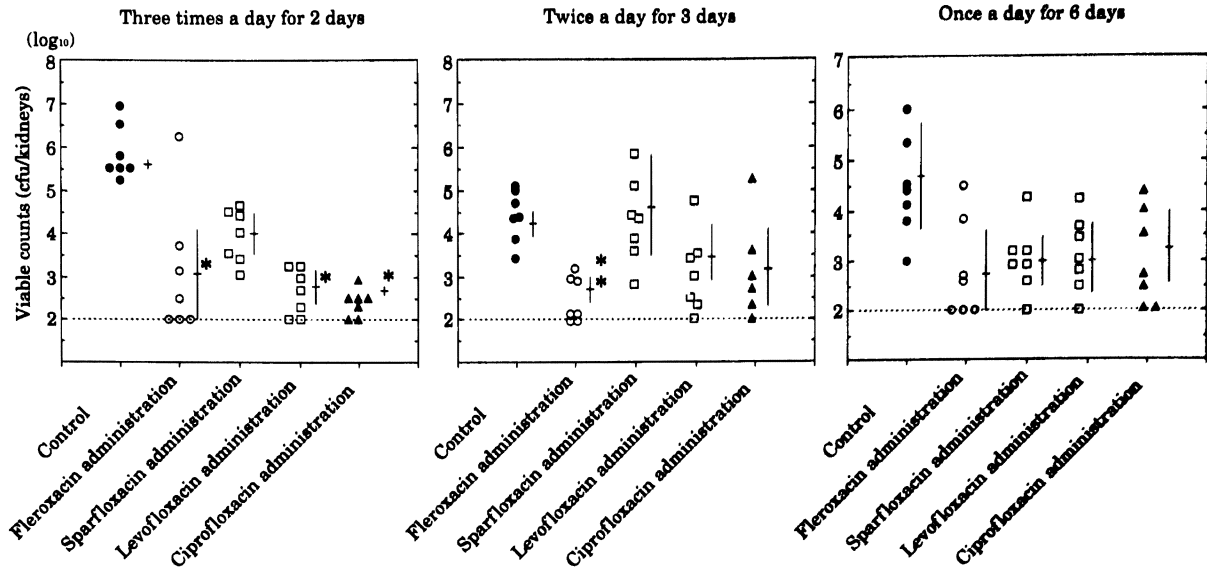


Fig. 4. Effects of the intervals of drug administration on the efficacy against pyelonephritic infection caused by *Escherichia coli* TUH 9501 in mice.

The horizontal bar indicates average and the vertical bar dose standard deviation. The dotted line indicates the lower detection limit.

*: $P < 0.05$, versus control by the method of Bornferroni/Dunn. **: $P < 0.05$, versus control and sparfloxacin by the method of Bornferroni/Dunn.

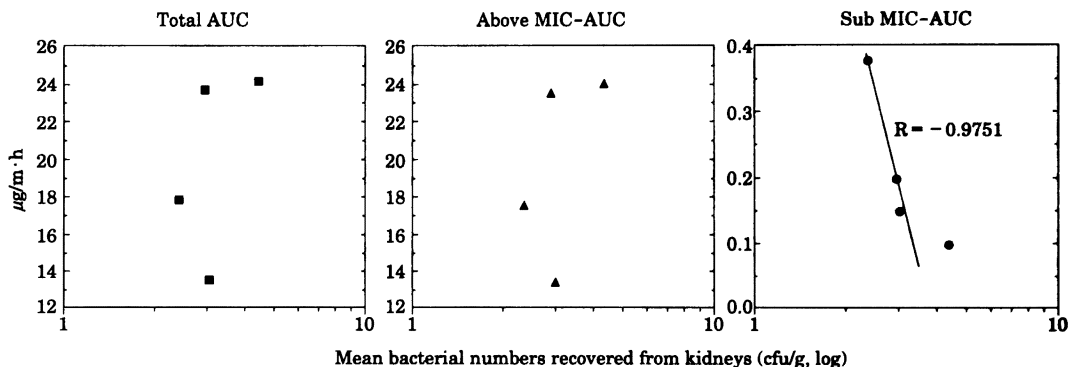


Fig. 5. Correlation between the mean bacterial numbers recovered from the infected kidneys and total AUC, above MIC-AUC or sub-MIC-AUC in mice.

かに投与間隔の影響が認められたのは LVFX と CPFX であった。

9. マウス腎内濃度の経時的推移

抗菌薬投与後のマウス腎内濃度推移におけるパラメーター解析を行った結果, total AUC は FLRX, LVFX, SPFX ではほぼ同等であり, C_{max} は FLRX, LVFX がもっとも高く, 半減期は CPFX が 6.76 h ともっとも長かった (Table 4)。sub-MIC 領域の AUC がもっとも高かったのは FLRX であった。

また, 抗菌薬の腎内濃度推移パラメーターと投与間隔の治療効果への影響との関係について調べたところ, sub-MIC 領域での AUC と治療効果の間に負の相関性 ($R = -0.9751$) が認められた (Fig. 5)。

III. 考 察

現在ニューキノロン系抗菌薬が尿路感染症に対する

Table 4. Parameters of new quinolones in mouse kidneys

Drug	Parameters of drugs in kidneys ^{a)}			
	total AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	C_{max} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	$T_{1/2}$ (h)	sub-MIC AU ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)
Fleroxacin	24.11	9.60	4.77	0.378
Levofloxacin	24.19	9.54	3.97	0.146
Sparfloxacin	24.75	7.05	5.57	0.196
Ciprofloxacin	13.09	6.27	6.76	0.048

Each drug (50 mg/kg) was orally administered in three mice.

^{a)} Each parameter was calculated by Simple method.

第一選択抗菌薬であることを考慮し, 尿路感染症患者由来の *E. coli* TUH 9501 を用いて *in vitro* および *in vivo* の双方から検討を加えたところ, sub-MIC 処理菌のマウス尿路感染惹起能は非処理菌に比べ明らかに低下していた。感染症成立の第一ステップである細菌の

膀胱上皮細胞への付着能を *in vitro* で解析した結果、従来の報告と同様 sub-MIC 処理菌では付着能が低下することが確認された²²⁻²⁶⁾。この成績は抗菌薬投与後、次回投与までに生ずる sub-MIC 下における感染拡大防止に sub-MIC 効果が有効に働いていることを示唆している。さらに、付着能低下の原因について電子顕微鏡による解析結果では、1 個の細菌細胞の持つ線毛の数が減少したとの報告がある²⁶⁾。一方、type I 線毛のモルモット赤血球凝集能を利用した解析では、抗菌薬非処理菌と同様の凝集能が維持されており、線毛数の減少ではなく、線毛の短小化がその原因であるとの報告もある²⁷⁾。著者は線毛数を電子顕微鏡下で観察する方法は試料作成過程で人為的变化を生ずる可能性があることを考慮し、ELISA 法により線毛の抗原量を測定した。*in vivo* 実験と同一条件で培養した抗菌薬処理菌の線毛抗原量は非処理菌より少なく、特に LVFX および FLRX 処理菌での減少が著明であった。この成績は *in vivo* におけるマウス尿路感染惹起能の低下と一致していた。また、*E. coli* の外膜を構成する 94 kDa の蛋白質が adhesin として働いているという報告がある^{28,29)}、本検討では外膜蛋白の量的、質的変動は認められなかった。以上の成績から、今回用いた尿路感染症患者由来の *E. coli* TUH 9501 の主な adhesin は線毛にあり、sub-MIC 処理により線毛の抗原量が減少し、その結果、線毛の adhesin が減少し、本菌の上行性尿路感染惹起能が低下したと推測された。

一方、マクロライド系抗菌薬で sub-MIC 処理した菌では、glycocarix など菌体外物質の産生が抑制され、ニューキノロン系抗菌薬で処理した菌では逆に産生が増加したという報告がある^{30,31)}。これらの成績は少なくとも sub-MIC 処理された細菌は代謝系に変化が生ずることを示している。Lorian¹⁴⁾ は細菌を sub-MIC 処理すると細菌の表層構成成分の合成・発現が抑制または阻止されると報告している。これらの報告を考慮すると本研究で得られた sub-MIC 処理 *E. coli* の炭水化物分解能の変化（代謝系の変化）は菌体構成成分の変化の可能性を残している。

In vivo PAE は *in vitro* PAE と sub-MIC 効果、さらに宿主感染防御能が相互作用した結果である。ニューキノロン系抗菌薬の *in vitro* および *in vivo* PAE はグラム陽性菌から陰性菌まで幅広い菌種で認められ、Craig¹²⁾ が本系抗菌薬の *in vivo* PAE には AUC がもっとも影響すると指摘している。本研究では *in vivo* PAE における sub-MIC 効果の役割をより明らかにする目的で、投与間隔を変えて検討した。FLRX と LVFX の sub-MIC 処理時の線毛形成能および好中球による貪食殺菌に対する抵抗性の低下は被検抗菌薬の中でもっとも著明であり、一方 FLRX 投与群では 1 日 3 回投与群と 1 日 1 回投与群間の治療効果の差が他剤に比べ少な

かった。そこで、治療効果と抗菌薬の腎内動態パラメーターとの関係を解析したところ、治療効果と sub-MIC 領域における腎内 AUC との間にもっとも高い相関性が認められた。この成績は、sub-MIC 領域の AUC が大きい抗菌薬ほど次回抗菌薬が投与されるまでの期間における *in vivo* PAE 効果がより大きいものと推測された。

以上 sub-MIC 効果、特に細菌の付着能への影響について、*in vitro* および *in vivo* で検討し、*in vitro* での sub-MIC 効果が *in vivo* でも反映されることがマウス尿路感染モデルで明確となった。本論文成績は、実際の臨床に際し、sub-MIC 効果を考慮した抗菌薬の選択が必要であることを示唆するものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と論文の御校閲を賜りました東邦大学医学部微生物物化学教室山口恵三教授に厚く感謝いたしますとともに、東京慈恵医科大学上田泰名誉教授、東京慈恵医科大学第二内科松本文夫客員教授、桜井 馨講師に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導いただいた東邦大学医学部微生物学教室宮崎修一講師はじめ御協力をいただいた微生物学教室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Parker R F, Luse S: Action of penicillin on staphylococcus: further observations on the effect of short exposure. *J. Bacteriol.* 56: 75~81, 1948
- 2) Eagle H, Musselman A D: Slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Bacteriol.* 58: 475~490, 1949
- 3) Kunin C M: Dosage schedules of antimicrobial agents: a historical review. *Rev. Infect. Dis.* 3: 4~11, 1981
- 4) McDonald P J, Wetherall B L, Prual H: Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics of activity leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 3: 38~44, 1981
- 5) Milatovic D: Antibiotics and phagocytosis. *Europ. J Clin. Microbiol.* 2: 414~425, 1983
- 6) van der Auwera P: Interactions between antibiotics and phagocytosis in bacterial killing. *Scand. J. Infect. Dis S-74:* 42~48, 1990
- 7) 長谷川裕美: MRSA 感染症に対する vancomycin の投与方法の検討—*In vitro* 実験における投与量および投与時間について—。 *Chemotherapy* 41: 329~337, 1993
- 8) 渡辺忠洋, 長谷川裕美, 深田智子, 菊池 賢, 柴田雄介, 片平潤一, 戸塚恭一, 清水喜八郎: *Mycoplasma pneumoniae* に対するマクロライド系, テトラサイクリン系, ニューキノロン系薬剤の Postantibiotic effect (PAE)。 *Chemotherapy* 39: 222~227, 1991
- 9) 菊池 賢, 春木宏介, 柴田雄介, 長谷川裕美, 江成唯子, 片平潤一, 戸塚恭一, 清水喜八郎, 渡辺忠洋: 緑膿菌に対する各種抗菌薬の postantibiotic sub-MIC effect. *Chemotherapy* 41: 948~954, 1993
- 10) 菊池 賢, 清水喜八郎: PAE と臨床的意義。 *日本臨床* 50: 1165~1172, 1989
- 11) 戸塚恭一, 他: 抗菌薬療法の再検討—ファルマコキネ

- ティックパラメーターからの検討。化学療法の領域 5: 1056~1062, 1989
- 12) Craig W: Postantibiotic effects in experimental infection models: relationship to in-vitro phenomena and to treatment of infections in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 (S-D): 149~158, 1993
 - 13) McDonald P J, Craig W A, Kunin C M: Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 135: 217~223, 1977
 - 14) Lorian V: Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 31(S-D): 137~148, 1993
 - 15) 日本化学療法学会抗菌薬感受性検討委員会: 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1989年)。*Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
 - 16) 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: 1237~1250, 1982
 - 17) 井上 栄: 抗体 (石川榮治, 河合 忠, 宮井 潔編), p.394~404, 医学書院, 東京, 1987
 - 18) Inokuchi K, Ito K, Mizushima S: Domains involved in osmoregulation of the ompF gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164: 585~590, 1985.
 - 19) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680~685, 1970
 - 20) Böyum, A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* S97: 77~89, 1968
 - 21) 楊井正紀, 森 剛一, 福田友子, 辻 芳郎: ヒト多核白血球のルミノール添加によるchemiluminescence測定の検討。 *医学のあゆみ* 112: 594~596, 1980
 - 22) Gorby G, McGee Z A: Antimicrobial interference with bacterial mechanisms of pathogenicity: effect of sub-MIC azithromycin on gonococcal piliation and attachment to human epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2445~2448, 1990
 - 23) Stephens D S, Krebs J W, McGee Z A: Loss of pili and decreased attachment to human cells by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* exposed to subinhibitory concentrations of antibiotics. *Infect. Immun.* 46: 507~513, 1984
 - 24) Svanberg-Eden C, Sandberg T, Stengvist K, Ahlstedt S: Decrease in adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells in vitro by subinhibitory concentrations of ampicillin. *Infection* 6: 5121~5124, 1978
 - 25) 松本文夫, 今井健郎, 高橋孝行, 田浦勇二, 国分勝弥, 桜井 馨, 加藤伸朗, 村田定三: Sub-MICにおける β -lactam剤の抗菌効果。 *Chemotherapy* 37: 1321~1326, 1989
 - 26) Braga P C, Piatti G: Favourable effects of sub-MIC rufloxacin concentrations in decreasing the pathogen-host cell adhesion. *Pharmacol. Res.* 28: 11~19, 1993
 - 27) Karam D, Amgar A, Bourlioux P: Inhibition of bacterial adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* strains by the urine of patients treated with nitroxoline. *Pathl. Biol.* 36: 452~455, 1988
 - 28) Knutton S, Baldwin T, Williams P, Manjarrez-Hernandez A, Aitken A: The attaching and effacing virulence property of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Intern. J. Med. Microb. Virol. Parasitol. Infectious Dis.* 278: 209~217, 1993.
 - 29) Leying H, Suerbaum S, Kroll H-P, Karch H, Opferkuch W: Influence of β -lactam antibiotics and ciprofloxacin on composition and immunogenicity of *Escherichia coli* outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 475~480, 1986
 - 30) Kita E, Sawaki M, Oku D, Hamuro A, Mikasa K, Konishi M, Emoto M, Takeuchi S, Narita N, Kashiba S: Suppression of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by erythromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 273~284, 1991
 - 31) McKenney D, Willcock L, Trueman P A, Allison D G: Effect of sub-MIC antibiotics on the cell surface and extracellular virulence determinants of *Pseudomonas cepacia*. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 190~195, 1994

Effect of treatment with various quinolones at sub-MIC on infectivity in murine pyelonephritic infection

Takayuki Takahashi

Department of Microbiology Toho University School of Medicine

Ohmori-nishi, 5-21-16, Ohta-ku, Tokyo 143, Japan

The effect of a sub-minimum inhibitory concentration (sub-MIC) on infectious activity of type I pili-bearing *Escherichia coli* in murine pyelonephritic infection was studied. The infectivity dropped when the TUH 9501 strain of *E. coli* was incubated with 1/4 MIC of quinolones such as ciprofloxacin, fleroxacin, sparfloxacin and levofloxacin. The level of decrease in infectivity was highest following treatment with fleroxacin and levofloxacin. A significant reduction in the level of type I pili and in resistance to phagocytosis and the killing activity of human polymorphonuclear leucocytes were associated with these drug treatments at sub-MIC, which decreased in murine pyelonephritic infectivity comparing to untreated control. In murine pyelonephritic infection the therapeutic effect of levofloxacin was decreased due to longer administration interval, however, the therapeutic effect of fleroxacin was almost unaffected by an increase in the administration interval. Analysis of the pharmacokinetic parameters of 4 test drugs in kidneys indicates that area under the curve in sub-MIC area may influence the therapeutic effect.