

## NM394 の尿中抗菌力、白血球殺菌能に及ぼす影響

後藤 博一・大石 幸彦・小野寺昭一・清田 浩  
川原 元・五十嵐 宏・細部 高英・斑目 旬  
東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室\*

尿路感染症に対する NM441 の有用性を明らかにするため、NM394 の尿中抗菌力と白血球殺菌能に及ぼす影響を検討し、さらに慢性複雑性尿路感染症 4 例に NM441 を投与した。

1) 尿中抗菌力：健常人から得た尿を用いて、NM394 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について検討した。その結果、NM394 の MBC は尿の pH が酸性に傾くほど、また尿中マグネシウム濃度が高いほど、抗菌力は低下した。尿中カルシウム濃度は抗菌力に影響を及ぼさなかった。

2) 白血球殺菌能に及ぼす影響：健常人の静脈血から分離した好中球および単球を、NM394 存在下と非存在下にて phorbol myristate acetate で刺激し、白血球殺菌能の指標である活性酸素産生能を chemiluminescence 法により測定した。好中球の活性酸素産生能は NM394 の存在下で抑制され、その度合いは低濃度ほど強かった。単球については 1 $\mu$ g/ml の NM394 存在下では影響されず、10 $\mu$ g/ml で抑制され、100 $\mu$ g/ml では増強された。

3) 慢性複雑性腎盂腎炎 1 例と慢性複雑性膀胱炎 3 例に本剤 1 回 100mg を 1 日 2 回、5～9 日間経口投与し、その有効性を UTI 薬効評価基準により判定し、副作用と血液・生化学検査異常の有無をみた。その結果、「著効」1 例、「無効」3 例で、自他覚的副作用および臨床検査値の異常変動は認められなかった。

以上、NM441 について主として基礎的検討を行った。NM441 は尿路感染症に対して、さらに検討を重ねるに値する薬剤であると考えられた。

**Key words** : NM441, 尿中抗菌力, 白血球殺菌能

NM441 は日本新薬株式会社で合成され、日本新薬株式会社および明治製菓株式会社で共同開発中のチアゼトキノリン骨格を有するプロドラッグ型のキノロン系合成抗菌薬である。本剤は経口投与後小腸上部より吸収され、抗菌活性本体 NM394 として体内に分布する。

抗菌活性本体 NM394 はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、特に緑膿菌をはじめとするグラム陰性菌に対する抗菌力に優れ<sup>1)</sup>、subMIC においても強い殺菌力を示す<sup>2)</sup>。この作用を反映し、NM441 は緑膿菌に対する実験的マウス全身感染モデルおよび局所感染モデルに対して優れた治療効果を示す<sup>3)</sup>。

今回我々は、NM441 の尿路感染症に対する有用性を明らかにする目的で、本剤の *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する尿中抗菌力と白血球殺菌能に及ぼす影響を検討し、さらに慢性複雑性尿路感染症患者 4 例に本剤を投与した。

## I. 対象と方法

### 1. 尿中抗菌力

#### 1) 検討薬剤

NM394 を検討薬剤とした。

#### 2) 被験菌株

標準株である *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa*

18s の 2 菌株を被験菌株とした。

#### 3) 培地

試験参加の同意の得られた健常成人男子 1 名の 24 時間尿に 1/4 重量の chelating resin (Sigma 社) を加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌し、2 価陽イオンを除去した。これを 0.45 $\mu$ m のミリポア・フィルターで濾過滅菌し、1N HCl, 1N NaOH, MgCl<sub>2</sub> および CaCl<sub>2</sub> を適宜加え、Table 1 に示すような pH (A, B および C)、マグネシウム濃度 (D, E および F)、カルシウム濃度 (G, H および I) の異なる 8 種類の尿培地を作製した。対照には Mueller-Hinton 培地を用いた。

#### 4) 抗菌力の測定

各培地中の NM394 の試験管内抗菌力の測定は、日本化学療法学会の標準法<sup>4)</sup>に従い、最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration: MBC) をもって試験管内抗菌力とした。各菌株とも、接種菌量は 10<sup>6</sup> CFU/ml, 37 $^{\circ}$ C で 18 時間培養した。

以上により求めた各種尿培地における MBC を比較し、NM394 の *E. coli* および *P. aeruginosa* に対する試験管内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について検討した。

## 2. 好中球および単球の活性酸素産生能に及ぼす影響

## 1) 好中球および単球の調製

試験参加の同意の得られた健常成人男子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および単球を分離した。これらをSaline G溶液により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) 好中球および単球の活性酸素産生能の測定

10 $\mu$ g/mlおよび100 $\mu$ g/mlのNM394存在下および非存在下にて10<sup>6</sup> cellsの好中球および単球を100ng/mlのphorbol myristate acetate (Sigma社, PMA)で刺激し、活性酸素産生能を測定した。この時、NM394非存在下での好中球および単球の活性酸素産生能を対照として、これらとNM394存在下でのそれらと比較することにより、NM394の好中球および単球の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 $\mu$ g/mlのluminol存在下でのMulti-Biolumat LB9505C System (Berthold社)を使用したchemiluminescence法により測定し、peak chemiluminescence値をもって活性酸素の産生量とした。各実験は5回行い、対応のないt-検定で比較検討した。

## 3 臨床

## 1) 対象

平成5年7月から平成5年9月までの期間に東京慈恵会医科大学附属病院泌尿器科を受診した患者のうち、本試験参加の同意の得られたカテーテル非留置の慢性複雑性尿路感染症4例(慢性複雑性腎盂腎炎1例,慢性複雑性膀胱炎3例)を対象とした。対象症例は男性3例,女性1例で、年齢は50~79歳(平均67.8歳)であった。基礎疾患の内訳は、左腎結石および神経因性膀胱がそれぞれ1例、前立腺肥大が2例であった。

## 2) 投与方法

本剤1回100mgを1日2回、5~9日間経口投与した。

## 3) 検討項目

本剤投与前後の検尿、尿沈渣および尿の定量培養を実施し、UTI薬効評価基準(第3版)<sup>5)</sup>による薬効評価と主治医による判定を行った。また、本剤投与による自他覚的副作用発現の有無を観察するとともに、投与前後の血液・生化学的検査を実施して、臨床検査値の異常変動の有無についても検討した。

## II. 成績

## 1. 尿中抗菌力 (Table 1)

Mueller-Hinton培地でのNM394のMBCは、*E. coli*に対しては0.20 $\mu$ g/ml、*P. aeruginosa*に対しては0.80 $\mu$ g/mlであった。尿培地中でのNM394のMBCは、pH 7.0および8.0ではほとんど影響を受けなかったが、pH 5.5では被験菌2株のMBCはそれぞれ1.6 $\mu$ g/ml、6.25 $\mu$ g/mlと低下が認められた。

マグネシウム濃度のMBCに対する影響では、尿培地中のマグネシウム濃度が50 $\mu$ g/mlおよび100 $\mu$ g/mlでは影響はみられなかったが、500 $\mu$ g/mlではMBCは*E. coli* 0.8 $\mu$ g/ml、*P. aeruginosa* 3.13 $\mu$ g/mlと2菌種とも低下した。

MBCに対する尿培地中のカルシウム濃度の影響は認められなかった。

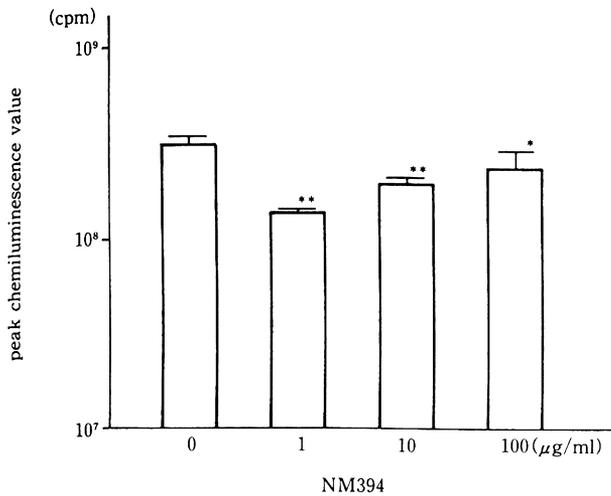
## 2 好中球および単球の活性酸素産生能に及ぼす影響

PMA刺激による好中球の活性酸素産生能に及ぼすNM394の直接的影響は、本剤の濃度が1 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/mlのいずれの濃度においてもcontrolに比して有意な抑制を認めた (Fig. 1)。その度合いは低濃度の場合ほど強かった。

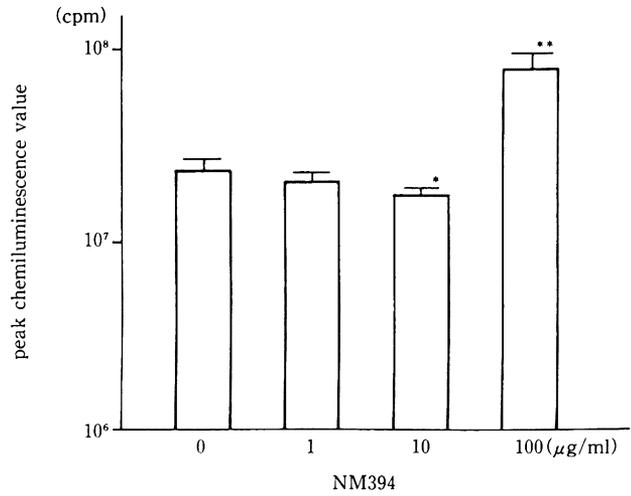
一方、PMA刺激による単球の活性酸素産生能に及ぼすNM394の直接的影響は、本剤の濃度が1 $\mu$ g/mlでは認められず、10 $\mu$ g/mlではcontrolに比し有意な抑制が認められた。100 $\mu$ g/mlでは活性酸素産生能の有意な上昇が認められた (Fig. 2)。

Table 1. Minimum bactericidal concentrations of NM394 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] ( $\mu$ g/ml)	[Ca] ( $\mu$ g/ml)	MBC ( $\mu$ g/ml) against		
				<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 18s	
urine media	A	5.5	50	100	1.6	6.25
	B	7.0	50	100	0.1	0.8
	C	8.0	50	100	0.1	0.8
	D	7.0	50	100	0.1	0.8
	E	7.0	100	100	0.2	0.8
	F	7.0	500	100	0.8	3.13
	G	7.0	50	10	0.1	0.8
	H	7.0	50	50	0.05	0.8
	I	7.0	50	150	0.2	0.8
Mueller-Hinton broth	6.5	4	4		0.2	0.8



Significant differences were seen compared with control. (\*; p<0.05, \*\*; p<0.02)



Significant differences were seen compared with control. (\*; p<0.05, \*\*; p<0.02)

Fig. 1. Influence of NM394 on superoxide generation by polymorphonuclear leukocytes

Fig. 2. Influence of NM394 on superoxide generation by monocytes

Table 2. Clinical summary of complicated UTI patients treated with NM441

No.	Age Sex	Diagnosis Underlying condition	UTI group	Treatment (mg × /day)	Symptom*	Pyuria*	Bacteriuria*			Evaluation		Abnormal laboratory findings	Side effects
							count	species	MIC (µg/ml)	Dr	UTI		
1	75 M	CCP	G-3	100×2	(-)	(#)	10 <sup>7</sup>	<i>E. coli</i>		poor	poor	(-)	(-)
		I-renal stone			(-)	(±)	10 <sup>4</sup>	<i>E. coli</i>	0.39				
2	50 F	CCC	G-4	100×2	Pollakisuria (+)	(#)	10 <sup>7</sup>	<i>E. coli</i>	≤0.025	excellent	excellent	(-)	(-)
		neurogenic bladder			(-)	(-)	0	(-)					
3	79 M	CCC	G-6	100×2	(-)	(#)	10 <sup>7</sup>	<i>E. avium</i>	1.56	poor	poor	(-)	(-)
		BPH			(-)	(+)	10 <sup>7</sup>	<i>E. cloacae</i>	0.39				
					(-)	(+)	10 <sup>7</sup>	<i>E. cloacae</i>	6.25				
4	67 M	CCC	G-6	100×2	(-)	(+)	10 <sup>7</sup>	<i>E. faecalis</i>	0.78	poor	poor	(-)	(-)
		BPH			(-)	(+)	10 <sup>7</sup>	<i>E. aerogenes</i>	12.5				
					(-)	(+)	10 <sup>7</sup>	<i>E. aerogenes</i>	25				

CCP: chronic complicated pyelonephritis, . before treatment  
 CCC: chronic complicated cystitis after treatment  
 BPH: benign prostatic hypertrophy, CNS: coagulase negative *Staphylococcus*

\*\*UTI: criteria proposed by the Japanese UTI Committee  
 Dr: doctor's evaluation

3. 臨床成績

本剤が投与された4例は全例、UTI薬効評価基準(第3版)を満足した症例であった。UTI薬効評価基準(第3版)による総合臨床効果は、「著効」1例および「無効」3例であった(Table 2, 3)。細菌学的には5菌種6株が分離され、*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium* および *E. coli* のそれぞれ1株が消失し、*E. coli* の1株、*Enterobacter aerogenes* および *Enterobacter cloacae* のそれぞれ1株の3株は存続した(Table 4)。

NM441によると考えられる自他覚的副作用および臨床検査値の異常変動は認められなかった。

III. 考 察

今回我々は、NM441の尿路感染症に対する有用性を明らかにする目的で、主として基礎的検討を行った。

抗菌薬による尿路感染症に対する化学療法に際しては、一般に起炎菌に対する試験管内抗菌力に優れ、腎排泄型の抗菌薬が選択される。しかし、尿路感染症では薬剤の作用する場は主として尿中と考えられ、尿そのものは起炎菌にとって良い培地となる。従って、抗菌薬の尿中抗菌力を測定することは、その抗菌薬の尿路感染症に対する有効性を推察する上で重要なことと考えられる。

以上の観点に立って、我々はこれまで尿中抗菌力について検討してきた。その結果、キノロン薬の *E. coli* に対

Table 3. Overall clinical efficacy of NM441 in complicated UTI

Bacteriuria	Pyuria	Cleared	Decreased	Unchanged	Effect on bacteriuria
Eliminated		1			1
Decreased					
Replaced					
Unchanged			2	1	3
Effect on pyuria		1	2	1	Patient total 4
<input type="checkbox"/>	Excellent	1			Overall efficacy rate 1/4
<input type="checkbox"/>	Moderate				
<input type="checkbox"/>	Poor	3			

Table 4. Bacteriological response to NM441 in complicated UTI

Isolates	No. of strains	Eradicated	Persisted
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	
<i>Enterococcus avium</i>	1	1	
<i>Escherichia coli</i>	2	1	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1		1
Total	6	3	3

する尿中抗菌力は、尿の pH が高いほど、また尿中のマグネシウム濃度が低いほど優れていることを見出し、報告してきた<sup>9)</sup>。

今回得られた成績では、*E. coli* および *P. aeruginosa* に対する尿中抗菌力 (MBC) は尿培地の pH5.5 および尿培地中のマグネシウム濃度 500 $\mu$ g/ml において低下が認められた。なお、尿培地中のカルシウム濃度による大きな影響は認められなかった。Ofloxacin, ciprofloxacin, pazufloxacin における同様の検討成績を本剤と比較して Table 5 に示してあるが、本剤の成績は他の 3 剤とほぼ同様の傾向であった。一般に感染尿はアルカリ尿であることから、尿路感染症に対して NM441 などのキノロン薬を投与することは起炎菌の殺菌に有利であると考えられる。さらに、尿中のマグネシウム濃度を低下させることが治療上有利と考えられた。

尿路の感染防御機構としては、尿道括約筋による菌の侵入ブロック<sup>7)</sup>、尿流による菌の wash out<sup>8)</sup> といった機械的感染防御機構、尿路への菌の粘着防止<sup>9)</sup> あるいは尿素の殺菌作用<sup>10)</sup> などの他に、尿中に遊出する多形核好中球 (polymorphnuclear leucocytes: PMN) と単球からなる細胞性因子や補体などの体液性因子が菌に抵抗する非特異的感染防御機構<sup>11)</sup> として明らかにされつつある。従って、抗菌薬と非特異的感染防御機構との協力作用を明らかにすることは、尿路感染症の治療に際して重要な

問題と思われる。

このような観点から我々は、好中球殺菌能に及ぼすニューキノロン薬の影響を、活性酸素産生能を指標として検討してきた。その結果、1 $\mu$ g/ml 濃度では control に比して変動を認めないが、10 $\mu$ g/ml 濃度では有意な活性酸素産生能の増強を認め、100 $\mu$ g/ml では逆に有意な抑制が認められることを報告した<sup>12)</sup>。

今回得られた成績では、NM394 の濃度が 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml のいずれの濃度においても好中球の活性酸素産生能は抑制され、その影響は低濃度ほど大きかった (Table 6)。また、単球の活性酸素産生能は NM394 の濃度が 1 $\mu$ g/ml ではそれほど影響を受けなかったが、10 $\mu$ g/ml では有意に抑制され、100 $\mu$ g/ml では有意に増強された。この点については、本剤は他のキノロン薬とは異なっていた。

非特異的感染防御機構は、さらに複雑な要素が絡み合って作用していると考えられるので、以上の成績のみから推論するのは難しいが、NM441 については尿中濃度を高めることが治療上有利であることが示唆された。

臨床的には、慢性複雑性腎盂腎炎 1 例、慢性複雑性膀胱炎 3 例に本剤を 1 回 100mg, 1 日 2 回、5~9 日間投与した。UTI 薬効評価基準 (第 3 版) による総合臨床効果では、「著効」1 例、「無効」3 例の成績であった。基礎的検討成績を勘案すると、200mg $\times$ 2 回/日または 300

Table 5. Influence of urin pH, Mg concentration and Ca concentration on MBCs of new quinolones against *Escherichia coli* NIHJ JC-2 and *Pseudomonas aeruginosa* 18s

Strain	Drug	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
		MHB <sup>*1</sup>	urin pH <sup>**2</sup>			Mg concentration <sup>**3</sup>			Ca concentration <sup>**4</sup>		
			5.5	7.0	8.0	50	100	500	10	50	150
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	NM394	0.2	1.6	0.1	0.1	0.1	0.2	0.8	0.1	0.05	0.2
	ofloxacin <sup>6)</sup>	1.6	0.2	<0.05	<0.05	<0.05	0.2	0.8	0.8	0.2	0.2
	ciprofloxacin <sup>6)</sup>	0.8	0.2	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.2	<0.05	<0.05	<0.05
	pazufloxacin <sup>13)</sup>	0.2	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4	3.13	6.25	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18s	NM394	0.8	6.25	0.8	0.8	0.8	0.8	3.13	0.8	0.8	0.8
	ofloxacin <sup>6)</sup>	3.13	>100	25	12.5	12.5	12.5	100	6.25	12.5	12.5
	ciprofloxacin <sup>6)</sup>	0.8	12.5	3.13	0.8	1.6	1.6	6.25	0.8	1.6	3.13
	pazufloxacin <sup>13)</sup>	0.8	25	12.5	6.25	12.5	12.5	100	12.5	12.5	12.5

\*<sup>1</sup>: Mueller-Hinton broth (pH7.2)\*<sup>2</sup>: pH7.0, Mg 50 $\mu\text{g/ml}$ , Ca 100 $\mu\text{g/ml}$ \*<sup>3</sup>: pH7.0, Ca 100 $\mu\text{g/ml}$ \*<sup>4</sup>: pH7.0, Mg 50 $\mu\text{g/ml}$ 

Table 6. Influence of new quinolones on superoxide anion generation of polymorphonuclear leucocyte stimulated with phorbol myristate acetate

Drug	Concentration of drug ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	1	10	100
NM394	44.2**	63.3**	76.3*
ofloxacin <sup>12)</sup>	113.1	382.4*	6.4**
ciprofloxacin <sup>12)</sup>	116.1	422.0*	24.7**

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.02$ 

Significant differences were seen compared with control (100).

mg $\times$ 2回/日投与についても検討すべきであったかもしれない。

以上、NM441 について主として基礎的検討を行った。NM441 は尿路感染症に対して、さらに検討を重ねるに値する薬剤であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Ozaki M, et al: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2490~2495, 1991
- 2) 名出頼男, 副島林造: 第42回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム。NM441, 名古屋, 1994
- 3) Ozaki M, et al: *In vivo* evaluation of NM441, a new thiazeto-quinoline derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2496~2499, 1991
- 4) 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  
日本化学療法学会: 微量液体希釈による MIC 測定法(微量液体希釈法)。 *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 5) UTI 研究会(代表: 大越正秋): UTI 薬効評価基準(第

3版)。 *Chemotherapy* 34: 408~441, 1986

- 6) 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
- 7) Mayo M, Hinman F: Role of midurethral high pressure zone in spontaneous bacterial ascent. *J Urol* 109: 268~272, 1973
- 8) Hinman F Jr, Cox C E: The voiding vesical defence mechanism; the mathematical effect of residual urine, voiding interval and volume on bacteriuria. *J Urol* 96: 491~498, 1966
- 9) 栗山 学: 尿中分泌型 IgA の研究 [ I ] 尿路における局在性について。 *日泌尿会誌* 70: 1129~1141, 1979
- 10) Shlegel J U, Cuellar J, O'Dell R M: Bactericidal effect of urea. *J Urol* 86: 819~822, 1961
- 11) 野本亀久雄: 生体防御機構と感染成立のかかわりあい。 *日本細菌学会雑誌* 37: 479~495, 1982
- 12) 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
- 13) 後藤博一, 他: 尿路・性器感染症に対する pazufloxacin の基礎的・臨床的検討。 *日化療雑誌* 43(S-2): 324~331, 1995

## Antimicrobial activity of NM394 in human urine, influence of NM394 on bactericidal activity of leukocytes

Hirokazu Goto, Yukihiko Oishi, Shoichi Onodera, Hiroshi Kiyota,  
Motoshi Kawahara, Hiroshi Igarashi, Takahide Hosobe and Jun Madarame

Department of Urology, The Jikei University, School of Medicine  
3-25-8, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

We fundamentally investigated antimicrobial activity of NM394 in urine medium and influence of NM394 on bactericidal activity of leukocytes in order to clarify NM441 *in vivo* effects against urinary tract infections (UTI). We also investigated clinical efficacy and safety of NM441 for UTI in order to clarify its usefulness for UTI.

1) Antimicrobial activity of NM394 in human urine: Antimicrobial activity of NM394 was reduced in the presence of high concentration of magnesium or low pH of urine. However, there was no influence of calcium concentration of urine on antimicrobial activity of NM394.

2) Influence of NM394 on superoxide generation by leukocytes: The superoxide generation of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) was suppressed by NM394. The superoxide generation of monocyte was not influenced in the presence of  $1\mu\text{g/ml}$  of NM394. It was significantly suppressed in the presence of  $10\mu\text{g/ml}$  of NM394. It was significantly enhanced in the presence of  $100\mu\text{g/ml}$  of NM394.

3) Clinical study of NM441: We orally administered 100mg of NM441 twice a day for 5~9 days to 4 patients with chronic complicated UTI. The clinical efficacy was evaluated as excellent in 1 case and poor in 3 cases. No side effects or no abnormal laboratory findings were caused by NM441.