

Cefbuperazone による急性単純性膀胱炎患者の *E. coli* の形態変化について

安城更生病院泌尿器科（部長：和志田裕人）

和志田裕人・阪上 洋・岩瀬 豊・佐々木昌一

安城更生病院中検微生物検査室（主任：竹内賢次）

竹内賢次・犬塚和久

MORPHOLOGICAL STUDIES OF *ESCHERICHIA COLI* IN THE URINE OF PATIENTS WITH ACUTE SIMPLE CYSTITIS TREATED WITH CEFBUPERAZONE

Hiroto WASHIDA, Hiroshi SAKAGAMI, Yutaka IWASE and Shoichi SASAKI

From the Department of Urology, Anjo Kosei Hospital
(Chief: Dr. H. Washida)

Kenji TAKEUCHI and Kazuhisa INUZUKA

From the Central Laboratory, Anjo Kosei Hospital
(Chief: K. Takeuchi)

The effects of cefbuperazone (CBPZ) on the morphology of *Escherichia coli* in the urine of 10 patients with acute simple cystitis were studied by differential interference contrast microscopy and electron microscopy. The urine specimens were collected via catheter before, 5, 10, 15 and 30 minutes after intravenous administration of 0.25 g CBPZ. The minimum inhibitory concentrations for 8 *Escherichia coli* strains isolated from 8 patients against CBPZ were from 0.05 to 0.2 mcg/ml except one strain. The mean urinary concentrations at 5, 10, 15 and 30 minutes after administration of CBPZ were 274.8, 1181.5, 1343.4 and 931.5 mcg/ml, respectively. Urinalysis improved within 30 minutes after the administration. Filamentous cells of *Escherichia coli* were observed until 30 minutes after the administration. They had vacuole-like, and spheroplast and bulge formation were also observed in tested cases. CBPZ is suggested to have a high affinity for penicillin-binding protein (PBP) 3 and moderate affinity for PBP 1b and PBP 1a.

Key words: Morphological study, Acute simple cystitis, Cefbuperazone, *Escherichia coli*

はじめに

抗生剤の細菌に対する効果は、抗菌スペクトルと最小発育阻止濃度（MIC）、最小殺菌濃度（MBC）および形態変化のパターンなどにより評価されているが、われわれは尿中細菌の形態変化を追跡することにより、その薬剤が尿路感染症の起炎菌に対してどのような作用をしているのか、検討を加えてきている^{1,2)}。

Cefbuperazone (CBPZ) は新規開発のセフェム系抗生剤であり (Fig. 1)、各種グラム陰性桿菌に対する抗菌力、および腎からの排泄が良好であることなど

から、臨床初期成績では尿路感染症に対して優れた効果が報告されている¹⁻³⁾。しかし、CBPZ についての

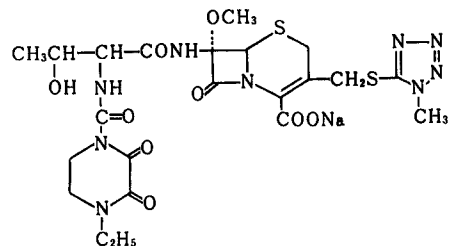


Fig. 1. Chemical structure of cefbuperazone (CBPZ).

Table 1. Summary of simple UTI cases tested with CBPZ.

Case No.	Time (min.)	CBPZ level ($\mu\text{g/ml}$)	Number of colony formation(CFU/ml)			WBC
			Dilution method	Spiral system	Dip slid method	
1. Y.S.	pre	<0.20	3.3×10^5	4.0×10^5	10^5	++
E.coli	5	726	—	—	—	+
0.1/0.1*	10	2075	—	—	—	+
	15	1550	—	—	—	10~20
	30	948	—	—	—	5~10
2. Y.K.	pre	<0.2	9.8×10^8	1.5×10^7	$>10^7$	+++
E.coli	5	121	2.1×10^8	1.1×10^5	—	++
0.05/0.05	10	1745	1.1×10^5	5.0×10^4	—	+
	15	1009	2.5×10^4	1.0×10^4	—	10~20
	30	447	2.5×10^4	5.6×10^3	—	10~20
3. K.Y.	pre	<0.2	4.9×10^7	1.0×10^7	$>10^7$	++
E.coli	5	238	—	—	—	+
0.05/0.05	10	767	—	—	—	5~10
	15	512	—	—	—	5~10
	30	216	—	—	—	5~10
4. S.T.	pre	<0.2	1.9×10^8	1.0×10^7	$>10^7$	++
E.coli	5	10.6	1.5×10^5	3.6×10^5	10^5	+
0.1/0.1	10	55.3	5.7×10^4	3.2×10^4	—	+
	15	103	5.0×10^2	1.0×10^4	—	+
	30	455	—	—	—	10~20
5. Y.Y.	pre	<0.2	1.4×10^8	1.5×10^7	10^7	+
E.coli	5	10.1	8.2×10^4	1.2×10^5	10^3	5~10
0.1/0.1	10	1066	—	—	—	5~10
	15	2446	—	—	—	5~10
	30	1800	—	—	—	5~10
6. I.I.	pre	<0.2	1.2×10^7	1.0×10^7	10^7	+++
E.coli	5	62.3	9.7×10^5	4.5×10^4	—	++
0.2/0.2	10	1091	2.0×10^4	1.5×10^4	—	+
	15	3840	—	—	—	+
	30	2975	—	—	—	+
7. T.S.	pre	<0.2	3.8×10^7	$>1.0 \times 10^7$	$>10^7$	++
E.coli	5	481	9.6×10^6	3.6×10^5	10^5	+
0.78/1.56	10	1890	4.2×10^6	3.2×10^4	—	+
	15	1796	3.3×10^6	1.0×10^4	—	+
	30	1484	1.4×10^5	—	—	10~20
8. M.S.	pre	<0.2	3.1×10^7	N.T.**	$>10^7$	++
E.coli	5	308	6.2×10^4	N.T.	—	+
25/50	10	985	1.0×10^4	N.T.	—	+
	15	555	1.0×10^4	N.T.	—	++
	30	230	2.0×10^5	N.T.	—	+
9. A.S.	pre	<0.2	4.5×10^5	2.7×10^5	10^8	++
P.rettgeri	5	365	9.0×10^4	1.3×10^4	—	+
0.78/1.56	10	820	—	—	—	+
	15	813	—	—	—	5~10
	30	295	—	—	—	5~10
10. K.A.	pre	<0.2	4.4×10^8	1.0×10^7	10^7	+
S.aureus	5	426	1.0×10^5	1.0×10^5	10^8	10~20
25/50	10	1321	2.5×10^4	2.4×10^4	$<10^3$	10~20
	15	783	2.9×10^4	2.1×10^4	$<10^3$	2~ 5
	30	465	1.7×10^4	3.2×10^3	10^3	2~ 5

*MIC($10^6/10^8$), **Not tested

in vivo における起炎菌の形態変化をみた報告はない^{4,5)}

今回, CBPZ を急性単純性膀胱炎に使用し, 尿中細菌形態変化を光顕的・電顕的に検討したので, その成績を報告する。

対象および方法

対象は当科受診の急性単純性膀胱炎と診断された女性の10例で, 年齢は42歳から63歳で平均56.5歳であった。

CBPZ の投与前に, 薬剤アレルギーの既往歴, CBPZ の皮内反応が陰性であることを確認したうえで, CBPZ 0.25 g を生理食塩液 20 ml に溶解し, one shot 静注投与した。投与前, 5, 10, 15, 30 分と経時的に経尿道的にカテーテルより採尿した。尿中菌量の測定は寒天培地希釈法, スパイラルシステムおよびディップスライド法の三種類で検討した。尿は1000回転/分にて遠心し, 上清を濃度測定に, 沈渣を形態変化の検討に供した。得られた沈渣をあらかじめスライドガラス上に作成したトリプトソイ薄層寒天培地に1白金耳を塗末し, 透過型微分干涉顕微鏡で観察, 撮影した。さらに沈渣を3%グルタルアルデヒド, 1%四酸化オスmiumで固定し, Epon 812 に包埋し, 超薄層切片を作成し, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛の二重染色をほどこして透過電子顕微鏡撮影した。MIC の測定は日本化学療法学会の標準法に従い, 尿中濃度は *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 を検定菌とした薄層カップ法により測定した。

成 績

Table 1 に示す通り, 対象とした急性膀胱炎10例の分離菌は *E. coli* 8例, *Proteus rettgeri* 1例, *Staphylococcus aureus* 1例の10株であった。CBPZ に対する感受性は *E. coli* では1株の25 $\mu\text{g/ml}$ を除いて0.2 から0.05 $\mu\text{g/ml}$ に分布していた。

CBPZ の尿中濃度 (平均 $\pm$ 標準偏差) は, 投与後5分, 10分, 15分, 30分でそれぞれ $274.8 \pm 220.96 \mu\text{g/ml}$, $1181.5 \pm 571.69 \mu\text{g/ml}$, $1343.4 \pm 1057.76 \mu\text{g/ml}$, $931.5 \pm 855.82 \mu\text{g/ml}$ の濃度が得られた (Table 1, Fig. 2)。

尿中細菌の消失は6例に認められ, そのうち *E. coli* では8株中5株が投与後10分にて消失した (Fig. 3)。また, *S. aureus* 1株は存続したが, *P. rettgeri* 1株は消失した。投与前の尿中菌量は本剤の効果に影響を受けないと思われた。なお, 尿中白血球数は全例において著減したが, 陰性化にはいたらなかった。

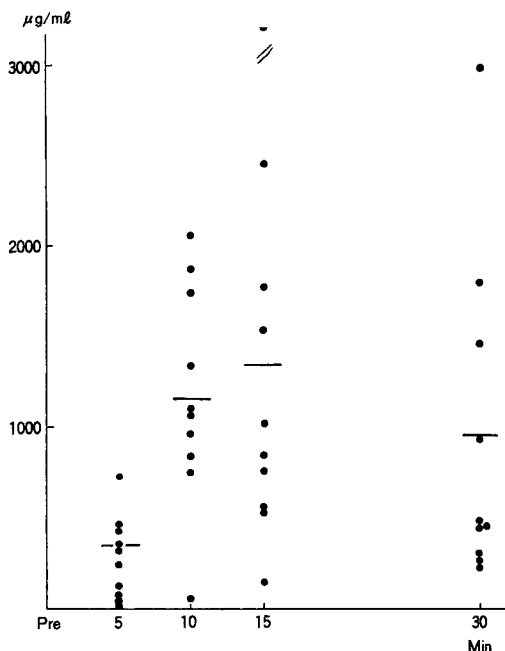


Fig. 2. Urinary levels of CBPZ. (CBPZ 250 mg iv)

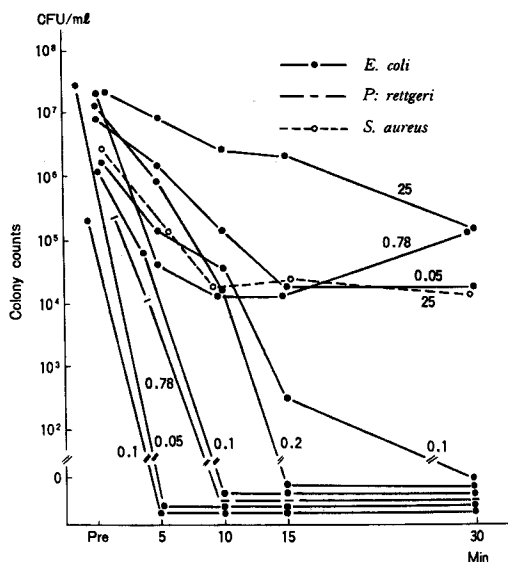


Fig. 3. Bacteriological effects after the administration of CBPZ.

尿中細菌と尿中濃度の推移, および細菌の形態変化について, 症例1, 8, 10の変化を示す。

症例1 Y.S. (*E. coli* MIC: 0.1 $\mu\text{g/ml}$)

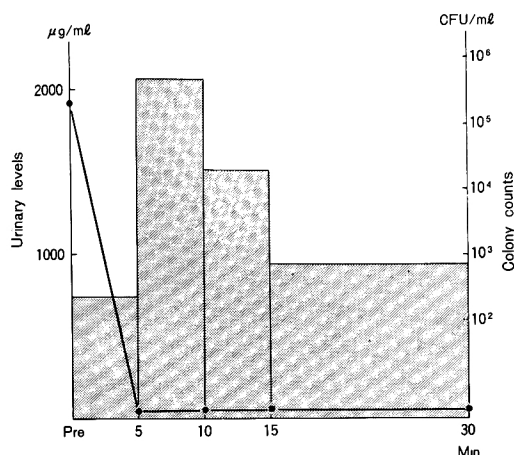


Fig. 4. Urinary levels and bacteriological effects in case Y.S. (CBPZ 250 mg iv *E. coli* 0.1 $\mu\text{g/ml}$)

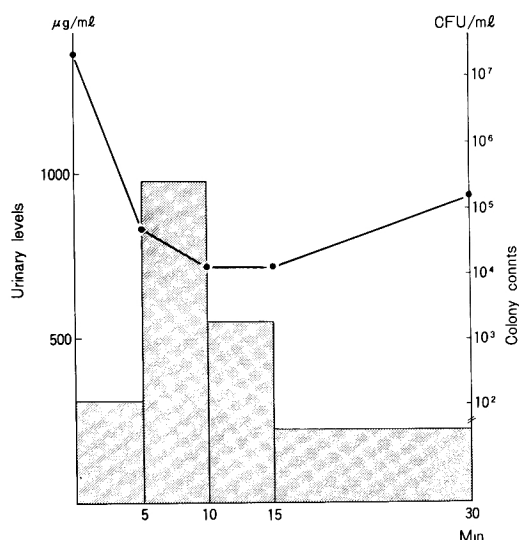


Fig. 6. Urinary levels and bacteriological effects of CBPZ in case M.S. (CBPZ 250 mg iv *E. coli* 25 $\mu\text{g/ml}$).

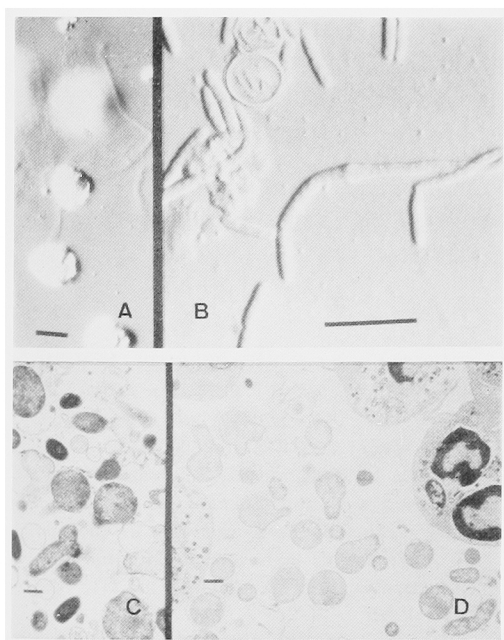


Fig. 5. Morphological changes of *E. coli* in urine at 10 minutes after intravenous administration of CBPZ (Case No. 1). The black lines in each photograph represent 10 μm . A: light microscope at 10 minutes, ($\times 800$) B: at 10 minutes, ($\times 2,000$) C: electron microscope at 5 minutes. D: at 10 minutes.

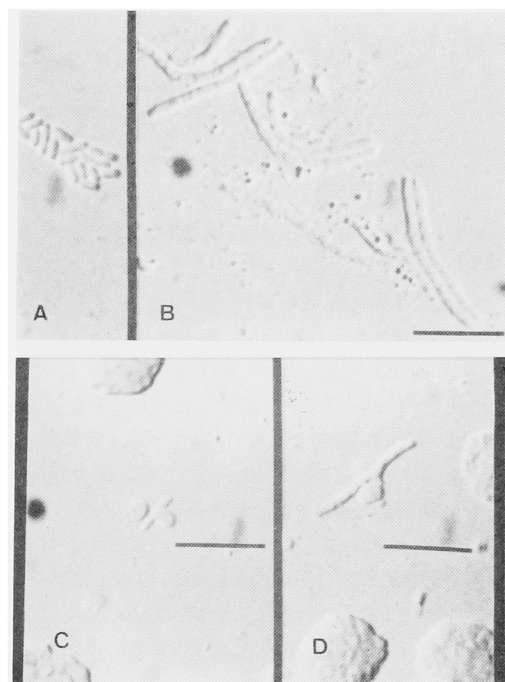


Fig. 7. Morphological changes of *E. coli* in urine after intravenous administration of CBPZ (Case No. 8). A: light microscope before administration. B, C, D: at 30 minutes.

投与前は 3.3×10^5 CFU/ml の菌量が CBPZ 投与後 5 分で陰性となった。尿中濃度は 5 分後 726 $\mu\text{g/ml}$ 、10 分後 2075 $\mu\text{g/ml}$ ときわめて良好であった (Fig. 4)。

10 分後の光顕像では菌体壁の薄くなった filament が観察された (Fig. 5-A, B)。電顕像では 5、10 分後 cell wall が破壊され、細胞質が流出している spheroid

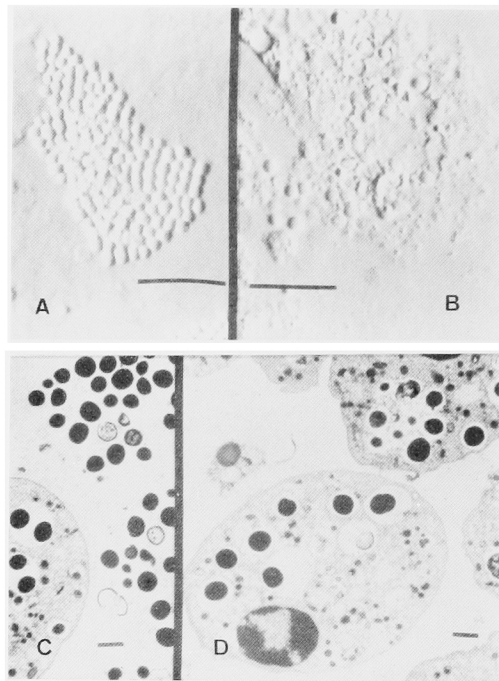


Fig. 8. Digestion of *S. aureus* by leucocyte in urine at 30 minutes after intravenous administration of CBPZ (Case No. 10). A: light microscope before administration. B: at 30 minutes. C: electron microscope before administration. D: at 30 minutes.

plast 形成が観察され、時間の経過により障害を受けた菌体が増加することが観察された (Fig. 5-C, D).

症例 8. M.S. (*E. coli* MIC: 25 μ g/ml)

CBPZ の尿中排泄は良好で、10分後 985 μ g/ml, 30分後 230 μ g/ml であったが、投与前 3.1×10^7 CFU/ml の菌量が一時的減少したに留まった (Fig. 6). 30分後の光顕像では著明に延長し (Fig. 7-B), 細胞質の空胞変性によると思われる表面不整の filament 形成とともに溶菌像も随所に認められた (Fig. 7-C, D).

症例 10. K.K. (*S. aureus* MIC: 25 μ g/ml)

30分後の光顕像では菌体の密集が粗になっており (Fig. 8-B), 電顕像ではほとんどが白血球により貪食されていたが、菌体には変化が認められなかった (Fig. 8-D).

考 察

β -lactam 系抗生剤の細菌に対する作用点は、細胞質膜に存在する酵素としての penicillin binding proteins (PBPs) であり、PBPs への親和性の違いにより細菌の形態変化が決定される⁶⁻⁸⁾. 抗生剤の抗菌活性の評価には同時に、細菌に対する感受性、 β -ラ

クタマーゼに対する安定性、細菌の細胞外膜への透過性⁹⁾ および生体の白血球との相乗作用¹⁰⁾ も重要な因子である。

西野ら⁴⁾, 才川ら²⁾ は *in vitro* における基礎的研究において、CBPZ の PBPs との親和性は PBP3 に最も強く、ついで PBP1b, PBP1a の順であると報告している。PBP3 は隔壁形成に必要であり、その形態変化は filament 形成であると考えられている。

われわれは *in vivo* の細菌の形態変化について検討を加えているが^{1,2)}, 今回検討した CBPZ は電子顕微鏡を用いた *E. coli* の形態変化では空胞変性を伴う filament 形成, spheroplast 化, bulge 形成などの溶菌にいたるさまざまな形態変化が観察されたが, filament 形成が主体であったことより, *in vitro* の成績が *in vivo* でも確認された。球菌については今後の検討が必要と思われた。

本剤の尿中殺菌力は大井ら¹¹⁾により検討され、グラム陰性桿菌では尿中 MIC 値が *in vitro* の MIC 値より小さく、また MIC と MBC との差が少なく、殺菌的であると報告している。

以上のことより、CBPZ は本剤感受性のグラム陰性桿菌に起因する尿路感染症に対し有用であると考えられた。

なお本論文の要旨は第34回日本化学療法学会西日本支部総会にて発表した。

文 献

- 1) 和志田裕人・津ヶ谷正行・平尾憲昭・蜂須賀祐介・竹内賢次・犬塚和久: Cefotiam の急性膀胱炎に対する臨床効果と尿中 *E. coli* の形態変化について. 泌尿紀要 29: 1373~1380, 1983
- 2) Tsugaya M, Washida H, Sakagami H, Iwase Y, Inuzuka K and Takeuchi K: Morphological studies of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute simple cystitis treated with aztreonam. Acta Urol Jpn 32: 1883~1886, 1986
- 3) 才川 勇・保田 隆・福岡義和・高畑正裕・松原信之・四辻 彰・岡本直子: T-1982 の細菌学的評価. Chemotherapy 30 (S-3): 112~126, 1982
- 4) 西野武志・大槻雅子・千田尚人・内藤睦子・南場典・谷野輝雄: 新しく開発されたセファマイシン系抗生物質 T-1982 に関する細菌学的評価. Chemotherapy 30 (S-3): 80~95, 1982
- 5) Minami S, Matsubara N, Yotsuji A, Araki H, Watanabe Y, Yasuda T, Saikawa I and Mitsuhashi S: Inactivation of cephamycins by various β -lactamases from gram-negative bacteria. J Antibiotics 37: 577~587, 1984
- 6) Noguchi H, Matsubashi M, Nikaido T, Itoh

- J, Matsubara N, Takaoka M and Mitsuhashi S: Affinities of β -lactam antibiotics to bind to penicilline-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in relation to their antibacterial potencies. In: Microbial Drug Resistance, vol 2ed. by Mitsuhashi, S., Japan Society Press, Tokyo and University Park Press, Baltimore, 1979. pp. 361~387
- 7) Spratt BG and Pardee AB: Penicillin binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* **254**: 516~517, 1979
- 8) 松橋通生・樺田清彦：ペニシリン結合蛋白質。医学のあゆみ **111**: 922~930, 1979
- 9) 紺野昌俊：抗菌剤の評価のあり方。医薬品研究 **9**: 1~35, 1978
- 10) 横田 健・関口玲子：T-1982 と血清・補体および白血球の協力的殺菌作用。Chemotherapy **30** (S-3): 20~28, 1982
- 11) 大井好忠・後藤俊弘・川島尚志・小島道夫・岡元健一郎：抗生剤の尿中抗菌力に関する研究（第2報）—尿中 MIC, MBC 値について—。Chemotherapy **30** (S-3): 96~106, 1982
(1987年4月27日迅速掲載受付)