

【原著・基礎】

Telithromycin の抗菌力試験

—各種菌株に対する抗菌力・諸因子の影響・形態変化—

西野 武志・大槻 雅子・原田 秀明

京都薬科大学微生物学教室*

Telithromycin (TEL) の標準菌株に対する抗菌スペクトル、臨床分離株に対する抗菌力を既存のマクロライド薬である clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM), セフェム薬の cefdinir (CFDN), ニューキノロン薬の levofloxacin (LVFX) と比較した。さらに、その抗菌力におよぼす諸因子の影響、TEL の細菌増殖曲線におよぼす影響、および TEL による細菌の形態変化を検討した。TEL は既存のマクロライド薬と同様に、グラム陽性菌と一部の陰性菌 (*Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*) に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、その抗菌力はグラム陽性菌群において、すべての対照薬剤と同等以上であり、グラム陰性菌群では CAM および AZM と同等以上であった。臨床分離株 (1997 年分離, 488 株) に対しては、グラム陽性菌において優れた抗菌活性が認められ、特に *Streptococcus* 属および *Enterococcus* 属に対しては、試験薬剤中、もっとも強い抗菌力を示し、さらにマクロライド耐性を示したこれらの菌に対しても、TEL は有効であった。しかし、methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA), ニューキノロン耐性 *S. aureus*, methicillin 耐性 *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) に対しては他の対照薬と同様に抗菌力は弱かった。グラム陰性菌においては、既存のマクロライドが抗菌力を示す *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *H. pylori* に対して AZM, CAM と同等以上であったが、その他の菌株に対しては、CFDN および LVFX に劣る抗菌力であった。TEL の抗菌力におよぼす諸因子の影響は、*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* および *Escherichia coli* の標準菌株を用いて erythromycin (EM) および CAM と比較、検討した。培地 pH による影響では、アルカリ性側で抗菌力の増強が、酸性側で低下が認められ、馬脱繊維血液 (DHB) の添加による影響では、添加量の増加に伴い抗菌力が良好となり、また、接種菌量については軽微な影響であり、いずれも対照薬と同等の変化であった。標準菌株の増殖曲線に及ぼす TEL の影響を検討した結果、*S. aureus* に対しては比較的静菌的な作用であったが、*S. pneumoniae* では 2 MIC 以上、*H. influenzae* では 1 MIC 以上の濃度から殺菌的に作用し、さらに、その作用は迅速で強力なものであった。TEL 作用後の形態変化を微分干渉顕微鏡で観察したところ、*S. aureus* および *S. pneumoniae* においては 4 MIC 以上の濃度で菌体の膨化、8 MIC 以上で溶菌像が観察された。さらに、透過型電子顕微鏡像においては、*S. aureus* で細胞壁の著明な肥厚、空洞化様構造および溶菌が認められた。*H. influenzae* では 1 MIC 以上の濃度で伸長化が観察され、4 MIC 以上の濃度で、原形質分離および溶菌が観察された。

Key words: telithromycin, *in vitro* 抗菌力, 諸因子の影響, 増殖曲線, 形態変化

Telithromycin (TEL) は 14 員環マクロライド骨格の 11 位水酸基をメトキシ化し、8 位クラディノース基をケトン基で置換した、ケトライドと称される化合物群に分類される新しいタイプの抗菌薬である¹⁾。現在、呼吸器感染などの治療薬として開発中であり、これまでに、既存のマクロライド薬よりも強い抗菌活性を有するのみならず、各種のマクロライド耐性菌に対しても抗菌活性を示すことがすでに報告されている²⁻⁵⁾。

そこで今回、TEL の当教室保存の標準菌株に対する抗菌スペクトルおよび臨床分離株 (1997 年分離) に対する抗菌活性 (最小発育阻止濃度 (MIC)) を検討し、既存のマクロ

ライド薬である clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM), セフェム薬の cefdinir (CFDN) およびニューキノロン薬の levofloxacin (LVFX) と比較した。さらに、その抗菌力におよぼす諸因子 (培地 pH, ウマ脱繊維血液添加, 接種菌量) の影響を、グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) およびグラム陰性菌 (*Escherichia coli*) の標準菌株を用いて検討し、erythromycin (EM) および CAM と比較した。また呼吸器感染症の主な原因菌である *S. aureus*, *S. pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* の標準菌株を用いて、TEL の細菌増殖曲線におよぼす影響、細菌の形態変化におよぼす影響を

*京都府京都市山科区御陵中内町 5

検討した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤と調製方法

1) 使用薬剤

被験薬剤として TEL (アベンティスファーマ) を、対照薬剤として EM (アベンティスファーマ), CAM (大正製薬), AZM (アベンティスファーマ), benzylpenicillin (PCG, 明治製薬), methicillin (DMPPC, 萬有製薬), ampicillin (ABPC, 萬有製薬), CFDN (藤沢薬品) および LVFX (第一製薬) を用いた。抗菌薬はすべて力価の明らかなものを用いた。

2) 薬剤溶液調製法

TEL, AZM, CAM および EM は metanol: ethanol: distilled water=4.8:43.3:51.9 液に 1,280 µg/mL の濃度となるように用時溶解して原液とし、さらに 0.9% 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いて希釈した。PCG, DMPPC, ABPC および CFDN は 1% リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) に 1,280 µg/mL の濃度となるように用時溶解して原液とし、さらに同緩衝液により希釈した。LVFX は 0.1 N NaOH: distilled water = 50:50 液に 1,280 µg/mL の濃度となるように用時調製して原液とし、蒸留水により希釈した。

2. 使用菌株

標準菌株として京都薬科大学微生物学教室保存の好気性グラム陽性菌 19 株, 好気性グラム陰性菌 28 株を用いた。また、臨床分離株として 1997 年に分離された methicillin 感受性 *S. aureus* (MSSA) 30 株, MRSA 30 株, ニューキノロン耐性 *S. aureus* 30 株, methicillin 感受性 *S. epidermidis* (MSSE) 30 株, MRSE 30 株, *Streptococcus pyogenes* 30 株, *Streptococcus agalactiae* 29 株, *S. pneumoniae* 52 株, *E. faecalis* 30 株, *Enterococcus faecium* 28 株, *Enterococcus avium* 15 株, *Enterococcus raffinosus* 15 株, *E. coli* 30 株, *Klebsiella pneumoniae* 30 株, *H. influenzae* 27 株, β -lactamase 産生 *H. influenzae* 12 株, *M. catarrhalis* 26 株および *Helicobacter pylori* 14 株を用いた。精度管理株には, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, および *H. influenzae* ATCC 10211 を使用した。

3. 感受性測定法

MIC の測定は, NCCLS 標準法⁶⁾に準じた薬剤 2 倍希釈系列の寒天平板希釈法で実施し, 前培養には Tryptsoya broth (TSB, ニッスイ) を, MIC 測定には Sensitivity test agar (STA, 栄研) を使用した。なお, *Streptococcus* 属, *Enterococcus* 属には 10% ウマ脱繊維血液 (DHB, 日本バイオテスト研究所) 加 Brain heart infusion agar (BHIA, Difco) を, *M. catarrhalis* には 5% DHB 加 チョコレート寒天培地を MIC 測定に用いた。*H. influenzae* では, 5% Fildes enrichment (FILDES

Difco) 加 BHIA および STA を前培養および測定に用いた。*H. pylori* は前培養は実施せず, 保存菌株を直接調製して使用し, MIC 測定には 0.1% β -シクロデキストリン (日本食品加工) 加 BHIA を用いた。各薬剤希釈液を添加し, 終濃度 0.001~128 µg/mL の薬物を含む MIC 測定用寒天培地を使用した。すべての菌種において, TEL, CAM, AZM, CFDN および LVFX の抗菌力を検討した。また, 臨床分離株においては, 菌の性質を調べるため, MRSA, MRSE では DMPPC, *S. pneumoniae* では PCG, *H. influenzae* では ABPC, *H. pylori* では EM および ABPC の抗菌力も追加検討した。

接種菌液はあらかじめ液体培地または平板培地により 37°C, 20 時間前培養した後, 0.5 McFarland の濁度 (約 10^8 CFU/mL) に調製したものを, MIC 測定培地で 10 倍に希釈して用いた。各薬剤含有寒天培地にミクロプランター (MIT-P, 佐久間製作所) を用いて菌液 5 µL を接種 (spot) し (5×10^4 CFU/spot), 37°C で 20 時間培養した。なお, *H. pylori* はアネロパック (スギヤマゲン) を用いて 37°C で 6 日間, 嫌気培養した。培養終了後, 肉眼的にコロニーの発育の有無を判定し, 各菌について発育が認められなかった最小薬物濃度を MIC 値とした。

各菌株の MIC 値を測定し, 臨床分離株においては, さらに各菌種に対する薬剤の MIC₅₀ 値 (試験菌株数の 50% 以上で菌の発育が認められない最小薬剤濃度), MIC₉₀ 値 (試験菌株数の 90% 以上で菌の発育が認められない最小薬剤濃度) を算出した。

4. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす培地 pH, DHB 添加および接種菌量の影響を検討するため, *S. aureus* 209-P JC, *S. epidermidis* ATCC 14990, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* NIHJ JC-2 を被験菌として使用した。培地 pH による影響は, pH を 5, 6, 7, 8 および 9 に HCl または NaOH で調製した Mueller Hinton Agar (MHA, Difco) を用い, また DHB 添加による影響は DHB を MHA に 0, 5, 25 および 50% 添加して MIC を測定した。すべての条件において 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 および 10^8 CFU/mL の接種菌量で検討したが, 培地 pH および DHB 添加試験においては接種菌量 10^7 CFU/mL 時の MIC 値を採用した。

5. 増殖曲線におよぼす影響

S. aureus Smith は TSB で 37°C, 18 時間前培養し, STB (Sensitivity test broth, 栄研) を測定培地に使用した。*S. pneumoniae* Type III については 10% DHB 加 BHIB および 5% DHB 加 STB を前培養および測定に, *H. influenzae* ATCC 10211 については 5% FILDES 加 TSB と STB を前培養および測定に使用した。37°C で 20 時間 (*S. pneumoniae* Type III は 12 時間) 前培養した被験液を, 増殖培地に初発菌液が約 $10^5 \sim 10^6$

CFU/mL (*S. pneumoniae* Type III は 10^4 CFU/mL) となるように接種した。37℃で2時間振盪培養した後、TEL溶解液を、終濃度が被験菌に対するMIC値の1/4, 1/2, 1, 2および4倍になるように添加した。さらに振盪培養を続け、-2, 0, (対照のみ) 1, 2, 4および6時間後に100 μ L採取し、生菌数を測定した。生菌数は $10 \sim 10^9$ 倍に適宜希釈した菌液を生菌数測定培地に塗布し、37℃で20時間培養後、コロニー数を計測することにより、1 mL中の生菌数(CFU/mL)を求めた。培養時間を横軸に、得られた生菌数を縦軸にプロットした増殖曲線を作成し、0時間における生菌数と比較して、次の基準で評価した。菌の増殖が認められず、菌数が1 log CFU/mL以上減少した場合を殺菌作用とした。菌の増殖が1 log CFU/mL未満で、かつ持続的に増殖していない場合や、一時的に1 log CFU/mL以上の増殖があっても、最終的に菌数が1 log CFU/mL以上減少した場合を増殖抑制とした。

6. 形態変化像の観察

1) 微分干渉顕微鏡による形態観察

微分干渉顕微鏡による観察には*S. aureus* 209-P JC, *S. pneumoniae* Type IIIおよび*H. influenzae* ATCC 10211の3菌種を、増殖培地としてSTB, TSBおよび5% FILDES加STBをそれぞれ使用した。37℃で20時間前培養した被験菌を、1.0 McFarlandの濁度(約 2×10^8 CFU/mL)に調製し、増殖培地で10倍(*S. pneumoniae* Type IIIは5倍)に希釈後、37℃で2.5時間(*S. pneumoniae* Type IIIは3時間)振盪培養を行った。TEL溶解液で、終濃度が被験菌に対するMIC値の1, 2, 4, 8および16倍になるように調製した薄層観察培地をスライドガラス上に作製し、被験菌を白金耳で塗抹後、カバーガラスで覆いパラフィン封入した。この標本を37℃で0, 1, 2, 4および6時間後に微分干渉顕微鏡下で観察した。

2) 透過型電子顕微鏡による形態観察

透過型電子顕微鏡による観察には*S. aureus* 209-P JCおよび*H. influenzae* ATCC 10211を、増殖培地としてSTBおよび5% FILDES加STBをそれぞれ使用した。37℃で20時間前培養した被験菌を、1.0 McFarlandの濁度(約 2×10^8 CFU/mL)に調製し、増殖培地で50倍希釈後、37℃で2.5時間振盪培養を行った。TEL溶解液を、*S. aureus* 209-P JCの場合、終濃度がMIC値の1, 4および16倍になるように、また、*H. influenzae* ATCC 10211の場合、MIC値の1, 2, 4および8倍になるように添加した。さらに培養を続け、2および4時間後に菌液を採取し、1.5% glutaraldehyde溶液にて前固定を行い、4℃, 6,000 rpmで20分遠心分離後、Kellenberger緩衝液で洗浄し、1% osmic acidで16~18時間本固定を行った。洗浄後、2% Bact agarに懸濁・固化し、寒天ブロックを作製後、2% ウラニル

緩衝液で2時間ブロック染色を行った。次にアルコール系列で脱水し、Luft⁷⁾の方法に準じてエポン樹脂に包埋した。放熱・乾燥後、これをultramicrotome 480 IA (LKB)を用いて超薄切片を作製し、酢酸ウラニル飽和溶液、クエン酸鉛溶液を用いて二重染色⁸⁾を行った後、透過型電子顕微鏡JEM 1200 EX (JEOL)で観察した。

II. 結 果

1. 抗菌スペクトル

TELおよび対照薬の標準菌株(好気性グラム陽性菌19株、好気性グラム陰性菌28株)に対する抗菌スペクトルをTable 1に示した。

TELは既存のマクロライド薬と同様に、グラム陽性菌と一部の陰性菌*H. influenzae*, *H. pylori*に対して幅広い抗菌スペクトルを有し、その抗菌力はグラム陽性菌群において、すべての試験薬剤と同等以上であり、グラム陰性菌群ではCAMおよびAZMと同等以上であった。すなわち、好気性グラム陽性菌(*S. aureus* No. 80は除く)に対するTELのMICは0.002~0.125 μ g/mLで、その抗菌力はCAM (0.002~0.5 μ g/mL), AZM ($\leq$ 0.002~2 μ g/mL), CFDN (0.016~64 μ g/mL)およびLVFX (0.06~2 μ g/mL)より優れており、特に、*S. pneumoniae* および*S. pyogenes*に対して強い抗菌活性を示した(0.004~0.03 μ g/mL)。しかし、ペニシリン耐性、マクロライド耐性とされている*S. aureus* No. 80に対しては、マクロライド系抗生物質と同様、抗菌活性を示さなかった。

TELの好気性グラム陰性菌(*H. pylori*は除く)に対するMICは1~64 μ g/mLであり、CFDN (0.008~>128 μ g/mL)およびLVFX (0.008~1 μ g/mL)に劣るものの、マクロライド薬のAZM (1~128 μ g/mL)とほぼ同様、CAM (8~>128 μ g/mL)よりやや優れた抗菌活性であった。しかし、*H. pylori* 2株に対しては、CAMがもっとも優れた抗菌力を示し(0.002および0.06 μ g/mL)たのに比べ、TELのMICは両株とも0.25 μ g/mLであった。

2. 臨床分離株に対する抗菌力

TELの臨床分離株(14菌種、488株、接種菌量: 10^7 CFU/mL)に対する抗菌力(MIC range, MIC₅₀, MIC₉₀)を対照薬とともにTable 2に示した。

MSSA (30株)に対するTELのMIC rangeは0.03~0.125 μ g/mLであった。MIC₅₀, MIC₉₀はともに0.125 μ g/mLを示し、LVFXの2倍、AZM, CAM, CFDNの2~16倍小さかった。一方、MRSA (30株)およびニューキノロン耐性(30株)*S. aureus*に対するMIC rangeはそれぞれ0.125~>128, 0.06~>128 μ g/mLであり、一部の菌株に抗菌活性を示すものの、マクロライド薬同様、MIC₅₀およびMIC₉₀はともに>128 μ g/mLと、抗菌力は弱かった。MSSE (30株)に対しては、TELのMIC₅₀は0.06 μ g/mLであり、AZMの0.5 μ g/mL,

Table 1. Antibacterial spectra of telithromycin and reference antibiotics against standard strains

Gram-positive bacteria	MIC (μg/mL)				
	TEL	CAM	AZM	CFDN	LVFX
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.06	0.125	0.5	0.125	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.125	0.125	1	0.125	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> Terajima	0.06	0.125	0.5	0.25	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> Neumann	0.125	0.125	1	0.25	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.125	0.25	1	0.125	0.06
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 80 (PC-R)	>128	>128	>128	0.06	0.125
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.06	0.25	1	1	0.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.008	0.5	0.5	0.016	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.016	0.03	0.03	0.03	0.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.016	0.03	0.03	0.016	1
<i>Viridans</i> group <i>Streptococcus</i>	0.06	0.06	0.06	64	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.125	0.25	0.5	64	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type I	0.008	0.03	0.03	0.125	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type II	0.03	0.06	0.06	64	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type III	0.004	0.016	0.03	0.06	0.5
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.002	0.002	≤0.002	0.25	0.125
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.016	0.03	0.03	0.03	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.06	0.125	1	0.25	0.06
<i>Bacillus anthracis</i>	0.125	0.125	2	0.5	0.06
Gram-negative bacteria	MIC (μg/mL)				
	TEL	CAM	AZM	CFDN	LVFX
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	32	>128	32	0.5	0.06
<i>Escherichia coli</i> NIHJ NIH	16	128	8	0.25	0.03
<i>Escherichia coli</i> NIHJ K-12	2	128	16	0.25	0.008
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	8	64	2	16	0.125
<i>Salmonella typhi</i> T-287	16	128	8	0.03	0.016
<i>Salmonella typhi</i> O-901	8	32	2	0.06	0.008
<i>Salmonella paratyphi</i> A	64	>128	16	0.125	0.03
<i>Salmonella parathphi</i> B	64	>128	32	0.25	0.03
<i>Salmonella enteritidis</i>	8	128	8	0.06	0.03
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	2	32	2	0.25	0.06
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	8	32	2	0.25	0.03
<i>Shigella boydii</i> EW-28	2	32	2	0.25	0.03
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	2	32	1	0.125	0.03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	8	32	4	0.25	0.03
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	32	>128	32	16	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	32	>128	32	128	0.25
<i>Hafnia alvei</i> NCTC 9540	4	64	16	8	0.03
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	32	64	16	32	0.5
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	64	>128	64	0.125	0.03
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	16	64	32	0.125	0.016
<i>Morganella morganii</i> Kono	32	128	64	8	0.06
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	64	64	64	0.008	0.03
<i>Providencia alcalifaciens</i> NIH 118	64	128	64	2	0.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	16	64	32	>128	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	32	128	128	>128	1
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	1	8	2	0.5	0.016
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43526	0.25	0.002	0.125	0.5	0.125
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43629	0.25	0.06	0.25	0.25	0.125

Inoculum size: 10⁷ CFU/mL

TEL: telithromycin, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, CFDN: cefdinir, LVFX: levofloxacin

CAM および CFDN の 0.125 μg/mL, LVFX の 0.25 μg/mL に比べて小さかったが, MIC₉₀ では >128 μg/mL と抗菌力は弱かった。また, MRSE (30 株) に対しては MRSA と同様, ほとんど抗菌活性は認められなかった。

S. pyogenes (30 株) に対する TEL の MIC range は 0.002~0.016 μg/mL であり, MIC₅₀ および MIC₉₀ はともに 0.016 μg/mL で, CAM, AZM および LVFX より優れ, CFDN と同等であった。また, *S. agalactiae* (29 株) に対する TEL の MIC range も 0.002~0.016 μg/mL

Table 2-1. Antibacterial activities of telithromycin and reference antibiotics against clinical isolates

Organs	Antibiotics	MIC (μg/mL)		
		range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) n = 30	TEL	0.03 – 0.125	0.125	0.125
	CAM	0.125 – 0.5	0.25	0.5
	AZM	0.5 – 2	2	2
	CFDN	0.25 – 0.5	0.25	0.5
	LVFX	0.125 – 16	0.25	0.25
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) n = 30	TEL	0.125 – >128	>128	>128
	CAM	0.25 – >128	>128	>128
	AZM	1 – >128	>128	>128
	DMPPC	128 – >128	>128	>128
	CFDN	64 – >128	>128	>128
Quinolones-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> n = 30	LVFX	1 – 1	16	32
	TEL	0.06 – >128	>128	>128
	CAM	0.125 – >128	>128	>128
	AZM	0.5 – >128	>128	>128
	CFDN	0.25 – >128	>128	>128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MSSE) n = 30	LVFX	8 – >128	64	>128
	TEL	0.03 – >128	0.06	>128
	CAM	0.06 – >128	0.125	>128
	AZM	0.25 – >128	0.5	>128
	CFDN	0.06 – 16	0.125	4
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE) n = 30	LVFX	0.125 – 32	0.25	8
	TEL	0.06 – >128	>128	>128
	CAM	0.25 – >128	>128	>128
	AZM	0.5 – >128	>128	>128
	DMPPC	>128	>128	>128
<i>Streptococcus pyogenes</i> n = 30	CFDN	>128	>128	>128
	LVFX	0.25 – >128	8	128
	TEL	0.002 – 0.016	0.016	0.016
	CAM	0.016 – 0.03	0.03	0.03
	AZM	0.03 – 0.125	0.06	0.125
<i>Streptococcus agalactiae</i> n = 29	CFDN	0.008 – 0.016	0.016	0.016
	LVFX	0.5 – 16	1	4
	TEL	0.002 – 0.016	0.008	0.016
	CAM	0.008 – >128	0.03	0.03
	AZM	0.016 – >128	0.03	0.03
<i>Streptococcus pneumoniae</i> n = 52	CFDN	0.03 – 0.06	0.06	0.06
	LVFX	0.5 – 2	1	1
	TEL	≤0.001 – 0.125	0.016	0.06
	EM	0.016 – >128	1	128
	CAM	0.008 – >128	1	128
<i>Enterococcus faecalis</i> n = 30	AZM	0.016 – 128	2	128
	PCG	0.016 – 1	0.06	0.25
	CFDN	0.016 – 4	0.125	0.5
	LVFX	0.5 – 32	1	2
	TEL	0.008 – 16	0.25	4
<i>Enterococcus faecalis</i> n = 30	CAM	0.016 – >128	>128	>128
	AZM	0.06 – >128	>128	>128
	CFDN	0.25 – 64	16	64
	LVFX	1 – >128	1	32

Inoculum size: 10⁷ CFU/mL

TEL: telithromycin, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, CFDN: cefdinir, LVFX: levofloxacin, DMPPC: methicillin,

EM: erythromycin, PCG: benzylpenicillin, ABPC: ampicillin

Table 2-2. Antibacterial activities of telithromycin and reference antibiotics against clinical isolates

Organs	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		range	50%	90%
<i>Enterococcus faecium</i> n = 28	TEL	0.03 – 64	8	64
	CAM	0.06 – >128	>128	>128
	AZM	0.25 – >128	>128	>128
	CFDN	2 – >128	>128	>128
	LVFX	1 – >128	16	128
<i>Enterococcus avium</i> n = 15	TEL	0.008 – 2	0.125	2
	CAM	0.03 – >128	>128	>128
	AZM	0.125 – >128	>128	>128
	CFDN	4 – 128	8	128
	LVFX	1 – 8	2	8
<i>Enterococcus raffinosus</i> n = 15	TEL	0.016 – 4	0.5	4
	CAM	0.03 – >128	>128	>128
	AZM	0.06 – >128	>128	>128
	CFDN	1 – >128	>128	>128
	LVFX	0.5 – 4	1	2
<i>Escherichia coli</i> n = 30	TEL	1 – >128	16	32
	CAM	16 – >128	128	>128
	AZM	1 – >128	8	16
	CFDN	0.25 – 4	0.5	1
	LVFX	0.016 – 64	0.06	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n = 30	TEL	16 – >128	128	>128
	CAM	>128	>128	>128
	AZM	16 – 64	32	64
	CFDN	0.06 – >128	0.25	16
	LVFX	0.06 – 4	0.125	1
<i>Haemophilus influenzae</i> n = 27	TEL	0.125 – 4	1	2
	CAM	0.5 – 16	8	16
	AZM	0.06 – 4	2	4
	PCG	0.25 – >128	0.5	8
	CFDN	0.25 – >128	0.25	2
β -lactamase producing <i>Haemophilus influenzae</i> n = 12	LVFX	0.016 – 0.03	0.016	0.03
	TEL	0.125 – 4	0.5	1
	CAM	0.5 – 16	2	8
	AZM	0.125 – 2	1	2
	PCG	0.5 – >128	128	>128
<i>Moraxella catarrhalis</i> n = 26	CFDN	0.125 – 2	0.25	1
	LVFX	0.008 – 2	0.016	0.25
	TEL	0.03 – 0.25	0.125	0.125
	CAM	0.016 – 0.5	0.125	0.125
	AZM	0.016 – 1	0.03	0.06
<i>Hericobacter pylori</i> n = 14	CFDN	0.125 – 0.5	0.25	0.5
	LVFX	0.03 – 0.5	0.06	0.06
	TEL	0.004 – 4	0.06	1
	EM	0.03 – >128	0.125	128
	CAM	≤ 0.001 – 8	0.016	2
	AZM	0.06 – >128	0.06	>128
	ABPC	0.004 – 0.25	0.03	0.25
	CFDN	0.125 – 1	0.25	0.5
	LVFX	0.125 – 1	0.125	0.25

Inoculum size: 10^7 CFU/mL

TEL: telithromycin, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, CFDN: cefdinir, LVFX: levofloxacin, DMPPC: methicillin, EM: erythromycin, PCG: benzylpenicillin, ABPC: ampicillin

mL, MIC₅₀ は 0.008 µg/mL であり, 他の対照薬より強い抗菌活性を示した。 *S. pneumoniae* (52 株) に対する TEL の MIC range は ≤0.001~0.125 µg/mL, その MIC₅₀ は 0.016 µg/mL であり, CAM および EM の 1 µg/mL, AZM の 2 µg/mL だけでなく, マクロライド薬以外の CFDN (0.125 µg/mL), PCG (0.06 µg/mL) および LVFX (1 µg/mL) も含めたすべての対照薬と比較してもっとも優れていた。さらに, AZM, CAM, EM の MIC₉₀ がいずれも 128 µg/mL であるこれらマクロライド薬の耐性菌にも TEL の MIC₉₀ は 0.06 µg/mL と低い値を示し, 強い抗菌活性を示した。

E. faecalis (30 株) に対する TEL の MIC range は 0.008~16 µg/mL であり, MIC₅₀ は 0.25 µg/mL, MIC₉₀ は 4 µg/mL を示し, マクロライド薬の MIC₉₀ は, すべて 128 µg/mL 以上の低い抗菌力であり, TEL はいずれの対照薬よりも優れていた。 *E. faecium* (28 株) に対する TEL の MIC range は 0.03~64 µg/mL であり, MIC₅₀ は 8 µg/mL であり, LVFX とほぼ同等で, AZM, CAM, CFDN より優れていた。さらに, *E. avium* (15 株) および *E. raffinosus* (15 株) に対しても MIC₅₀ は 0.125 および 0.5 µg/mL, MIC₉₀ は 2 および 4 µg/mL と, LVFX とほぼ同等, その他の対照薬より優れた抗菌活性であった。

E. coli (30 株) に対する TEL の MIC range は 1~>128 µg/mL, MIC₉₀ は 32 µg/mL であり, CFDN および LVFX に劣っていたが, AZM とほぼ同等, CAM より優れていた。 *K. pneumoniae* (30 株) に対する TEL の MIC range は 16~>128 µg/mL, MIC₉₀ は >128 µg/mL であり, CFDN および LVFX に劣っていたが, AZM, CAM と同等であった。

H. influenzae (27 株) に対する TEL の MIC range は 0.125~4 µg/mL, MIC₉₀ は 2 µg/mL であり, LVFX (0.03 µg/mL) に劣るものの, AZM (4 µg/mL) および CFDN (2 µg/mL) と同等, CAM (16 µg/mL) および PCG (8 µg/mL) より優れていた。また, β-ラクタマーゼ産生株 (12 株) に対する TEL の MIC₉₀ は AZM, CAM, LVFX および CFDN と同様に, β-ラクタマーゼの影響を受けず, 抗菌力に大きな変動はみられなかったが, PCG では >128 µg/mL と, 非産生株から 16 倍もの抗菌力の低下が認められた。 *M. catarrhalis* (26 株) に対する TEL の MIC range は 0.03~0.25 µg/mL, MIC₉₀ は 0.125 µg/mL であり, CAM, AZM および LVFX と同等, CFDN より優れていた。 *H. pylori* (14 株) に対する TEL の MIC range は 0.004~4 µg/mL, MIC₉₀ は 1 µg/mL であり, ABPC および LVFX に劣るものの, CAM および CFDN と同等, EM および AZM よりも優れていた。

3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

S. aureus 209-P JC, *S. epidermidis* ATCC 14990,

Table 3. Influence of media pH, horse blood and inoculum size on antibacterial activities of telithromycin and other macrolides

Organisms	Drugs	MIC (µg/mL)									
		pH			horse blood (%)			inoculum size (CFU/mL)			
		5	6	7	8	9	0	5	25	50	
<i>S. aureus</i> 209 P-JC	TEL	32	1	0.25	0.06	—	0.25	0.06	0.016	0.016	10 ⁶
	EM	>128	4	1	0.06	—	1	0.5	0.125	0.125	10 ⁴
	CAM	64	2	0.25	0.06	—	0.25	0.25	0.06	0.06	0.03
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	TEL	8	0.5	0.125	0.06	—	0.125	0.06	0.06	0.06	0.03
	EM	>128	8	0.5	0.016	—	0.5	0.25	0.125	0.125	0.06
	CAM	64	4	0.125	0.06	—	0.125	0.125	0.125	0.125	≤0.001
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	TEL	1	0.25	0.05	0.03	0.004	0.06	0.06	0.03	0.016	0.016
	EM	32	2	0.5	0.25	0.125	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5
	CAM	8	2	0.5	0.125	0.06	0.5	0.5	0.125	0.125	0.125
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	TEL	>128	>128	64	4	0.5	64	16	4	4	16
	EM	>128	>128	>128	128	8	>128	128	32	32	128
	CAM	>128	>128	>128	16	8	>128	128	32	16	128

—: no growth on control media

TEL: telithromycin, EM: erythromycin, CAM: clarithromycin

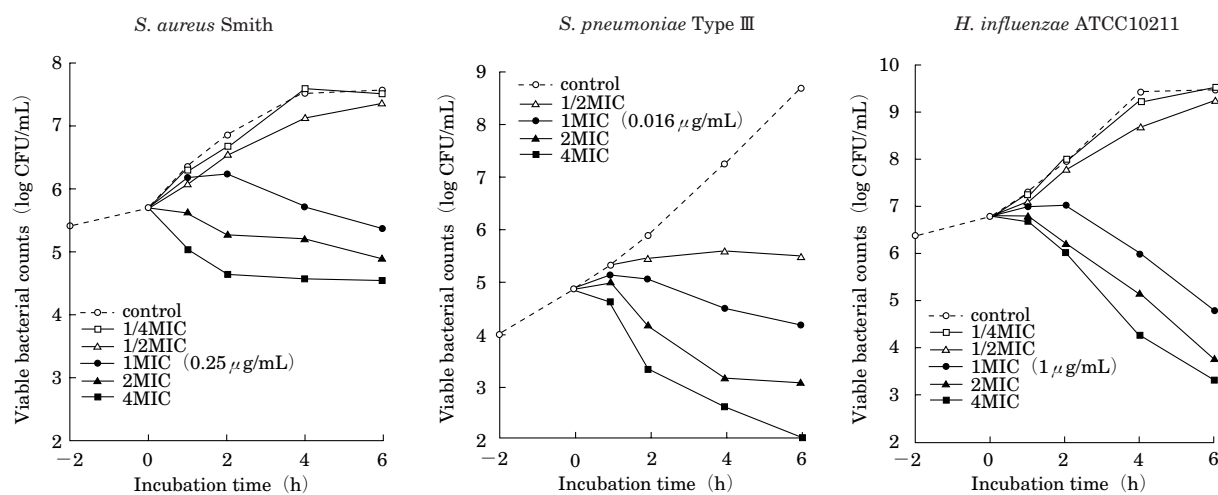


Fig. 1. Bactericidal activities of telithromycin against standard strains.

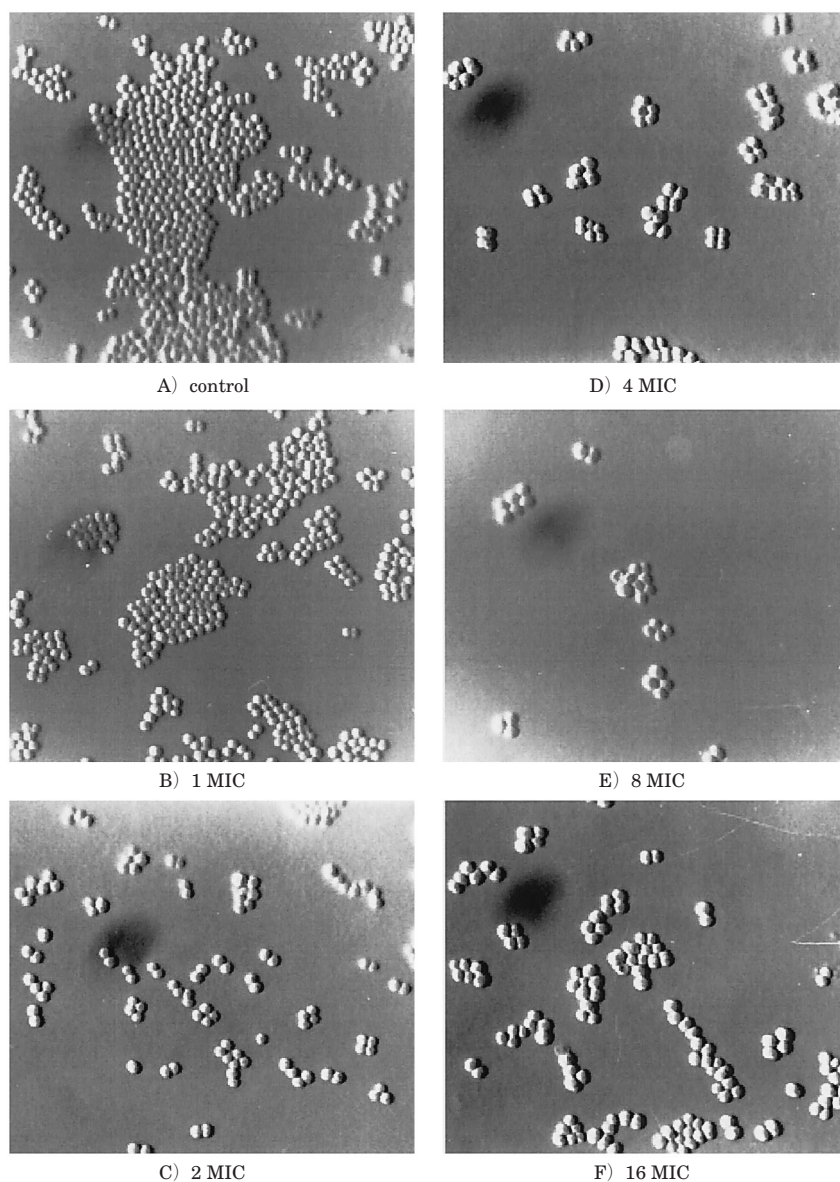


Fig. 2. Differential interference micrographs of *Staphylococcus aureus* 209 P-JC exposed to telithromycin for 6 hours (MIC: 0.06 $\mu\text{g/mL}$).

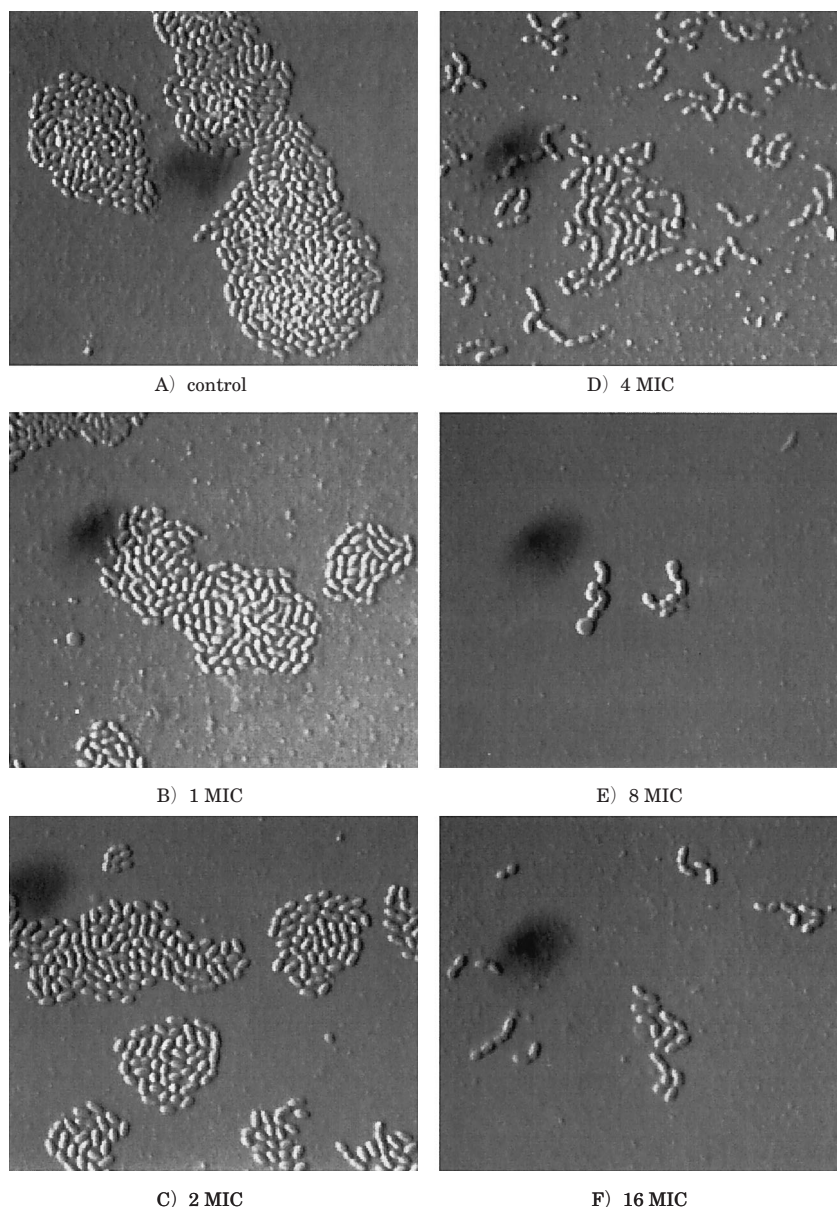


Fig. 3. Differential interference micrographs of *Streptococcus pneumoniae* Type III exposed to telithromycin for 6 hours (MIC: 0.004 $\mu\text{g/mL}$).

E. faecalis ATCC 29212 および *E. coli* NIHJ JC-2 に対する TEL, EM および CAM の抗菌力におよぼす培地の pH, DHB 添加および接種菌量の影響について検討した結果を Table 3 に示した。

培地 pH を 5, 6, 7, 8 および 9 として抗菌力に与える影響を検討した結果, TEL は対照薬と同様に, 検討したすべての菌株に対して, アルカリ性側で抗菌力が良好となり, 酸性側で抗菌力の低下が確認された。なお, *S. aureus* 209-P JC および *S. epidermidis* は pH 9 の条件において, 対照群の発育が認められなかった。

培地に 0, 5, 25 および 50% の DHB を添加した結果, TEL は検討したすべての菌株において, DHB 添加量とともに MIC の低下傾向が認められ, 50% の DHB 添加により抗菌力が無添加時の 2~16 倍良好となった。

この傾向は対照薬においても同様に認められた (1~>8 倍)。

接種菌量を 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 および 10^4 に変化した結果, 検討した全菌株において, TEL は接種菌量の増加とともに抗菌力が 1~8 倍低下した。この傾向は対照薬においても同様に認められた (>1~ ≥ 256 倍)。

4. 増殖曲線におよぼす影響

S. aureus Smith, *S. pneumoniae* Type III および *H. influenzae* ATCC 10211 の増殖曲線におよぼす TEL の影響を Fig. 1 に示した。

TEL は *S. aureus* Smith に対して 1/2 MIC 以下では増殖を抑制しなかったが, 1 MIC の濃度から増殖を抑制し, 4 MIC の濃度で 2 時間後から 1 log CFU/mL 以上の生菌数を減少させた。*S. pneumoniae* Type III に

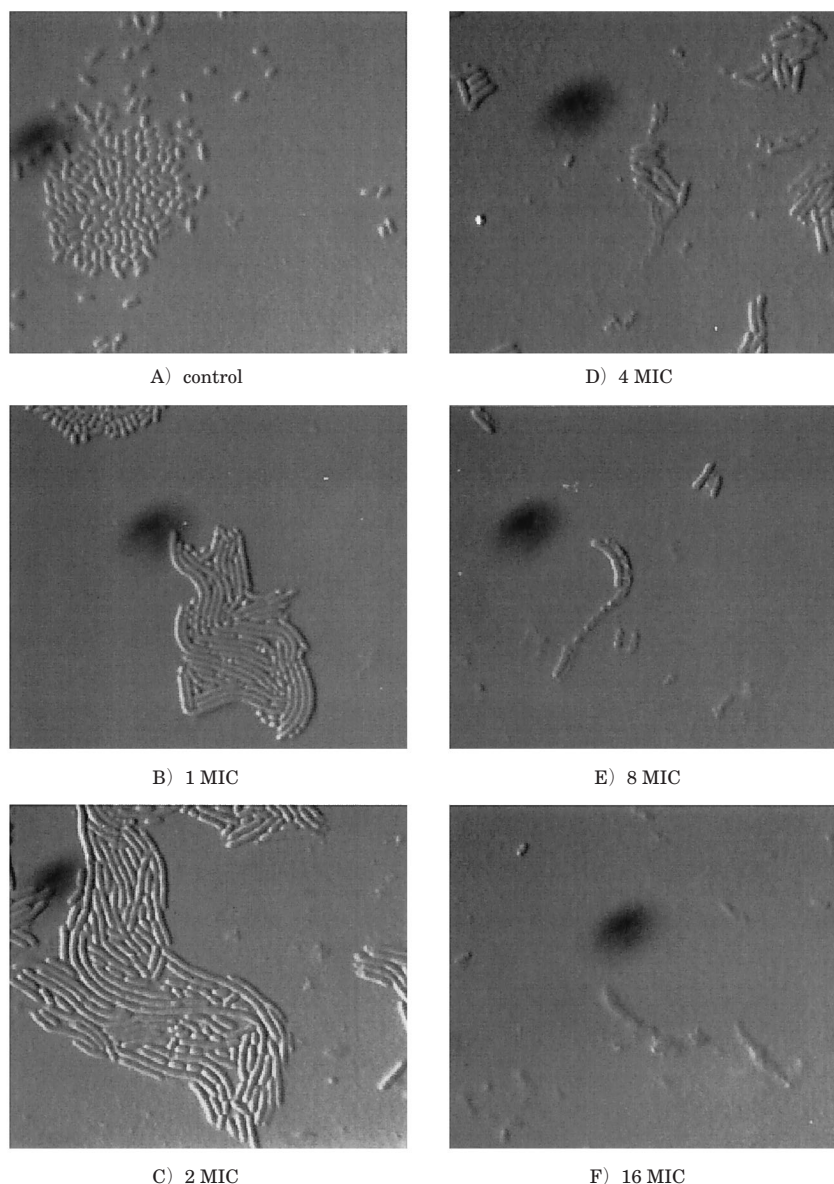


Fig. 4. Differential interference micrographs of *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 exposed to telithromycin for 6 hours (MIC: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

対し、1/2 MIC 以上の濃度で増殖を抑制し、2 MIC 以上の濃度で殺菌的に作用した。4 MIC の TEL は 2 時間後に 1 log CFU/mL 以上、6 時間後には検出限界 (2 log CFU/mL) 以下にまで生菌数を減少させ、強い殺菌作用が認められた。*H. influenzae* ATCC 10211 に対して、TEL は 1/2 MIC の濃度まで増殖を抑制できなかったが、1 MIC の濃度では 6 時間後、2 および 4 MIC の濃度では 4 時間後から殺菌作用が認められた。

5. 形態学的変化像の観察

S. aureus 209-P JC, *S. pneumoniae* Type III および *H. influenzae* ATCC 10211 に 1 MIC~16 MIC の濃度の TEL を 6 時間作用させた時の微分干渉顕微鏡像を Figs. 2~4 に示した。*S. aureus* 209-P JC においては、増殖抑制とともに 4 MIC の濃度から菌の膨化、8 MIC

以上の濃度では溶菌像が観察された。*S. pneumoniae* Type III においても、増殖抑制とともに 4 MIC の濃度から菌の膨化、8 MIC 以上の濃度で溶菌像も観察された。*H. influenzae* ATCC 10211 においては、1 MIC の濃度から菌体の伸長化が観察され、4 MIC 以上の濃度では溶菌像も観察された。

S. aureus 209-P JC および *H. influenzae* ATCC 10211 に 1 MIC~16 MIC および 1 MIC~8 MIC の TEL を作用させた時の透過型電子顕微鏡像を Figs. 5, 6 に示した。薬剤未処理の *S. aureus* 209-P JC においては、中央部に隔壁が形成され、正常に分裂・増殖する像が認められたが、1 MIC の TEL を作用 4 時間後には、隔壁形成が阻害され、著明な細胞壁の肥厚、細胞内の空洞化様構造、および溶菌が観察された。*H. influenzae* ATCC

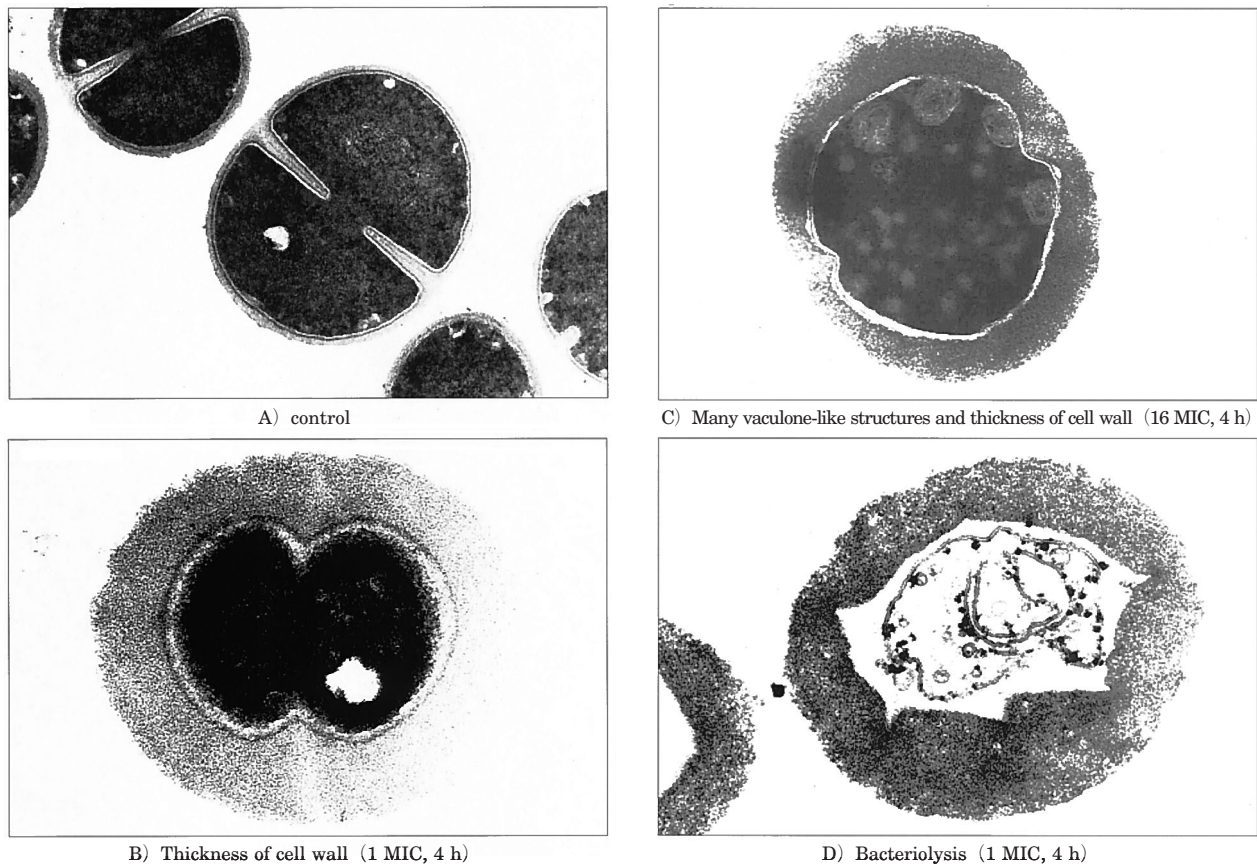


Fig. 5. Transmission electron micrograph of *Staphylococcus aureus* 209 P-JC exposed to telithromycin (MIC: 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

10211においては、2 MICのTELを作用4時間後から、著明な菌の伸長化が認められ、4 MIC以上では原形質分離、および溶菌も観察された。

III. 考 察

マクロライド薬は一般にグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示し、*H. influenzae*, *M. catarrhalis* および *H. pylori* など、一部のグラム陰性菌に対して抗菌活性をもつことが知られている^{9~11)}。TELも同様に、グラム陽性菌と一部の陰性菌に対して、幅広い抗菌スペクトルを有しており、グラム陽性菌に対する抗菌力は、マクロライド薬のCAMおよびAZMだけでなく、ニューキノロン薬のLVFX、セフェム薬のCFDNと比較しても同等以上であることが確認された。また、グラム陰性菌に対してはLVFX、CFDNに劣っていたものの、マクロライド薬のなかでは比較的グラム陰性菌に対して抗菌活性が良好といわれているAZM¹⁰⁾と同等、CAMより優れた抗菌力であった。

臨床分離株に対する抗菌力を、既存のマクロライド薬、ニューキノロン薬および β -ラクタム薬と比較すると、TELはグラム陽性菌に対して、優れた抗菌活性を示した。*S. pneumoniae*, *S. pyogenes* および *S. agalactiae* に対しては、MIC₅₀において同等~125倍もの強い抗菌力であり、さらに、既存のマクロライド薬のMIC₉₀が

128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったマクロライド耐性の *S. pneumoniae* に対しても、TELのMIC₉₀は0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と優れた抗菌活性を示し、本薬の特徴が確認された。また、一般にマクロライド薬およびセフェム薬に耐性を示す *Enterococcus* 属に対してもTELのMIC₅₀は0.125~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、比較したマクロライド薬の>128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より優れていた。しかし、MRSA、ニューキノロン耐性 *S. aureus*, MRSEに対しては対照薬と同様に、抗菌力は弱かった。グラム陰性菌に対しても、既存のマクロライド薬が抗菌力を示す *H. influenzae*, *M. catarrhalis* および *H. pylori* に対して、TELのMIC₉₀はそれぞれ2, 0.125および1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示し、CAMおよびAZMと同等以上であった。TELは呼吸器感染症の主な原因菌とされる *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* および *M. catarrhalis* などに対して、強い抗菌力を有し、また、一部のマクロライド耐性菌への抗菌力も認められ、臨床での優れた治療効果が示唆された。

抗菌力に与える諸因子の影響について、一般にマクロライド薬はアルカリ性側で抗菌力が良好になり、酸性側で抗菌力が低下することが知られている^{10,11)}。本試験においてもTELは比較したマクロライド薬と同様に、培地pHの影響を受けることが確認された。また、培地へのDHB添加の影響は、DHBの増加に伴い、抗菌力が

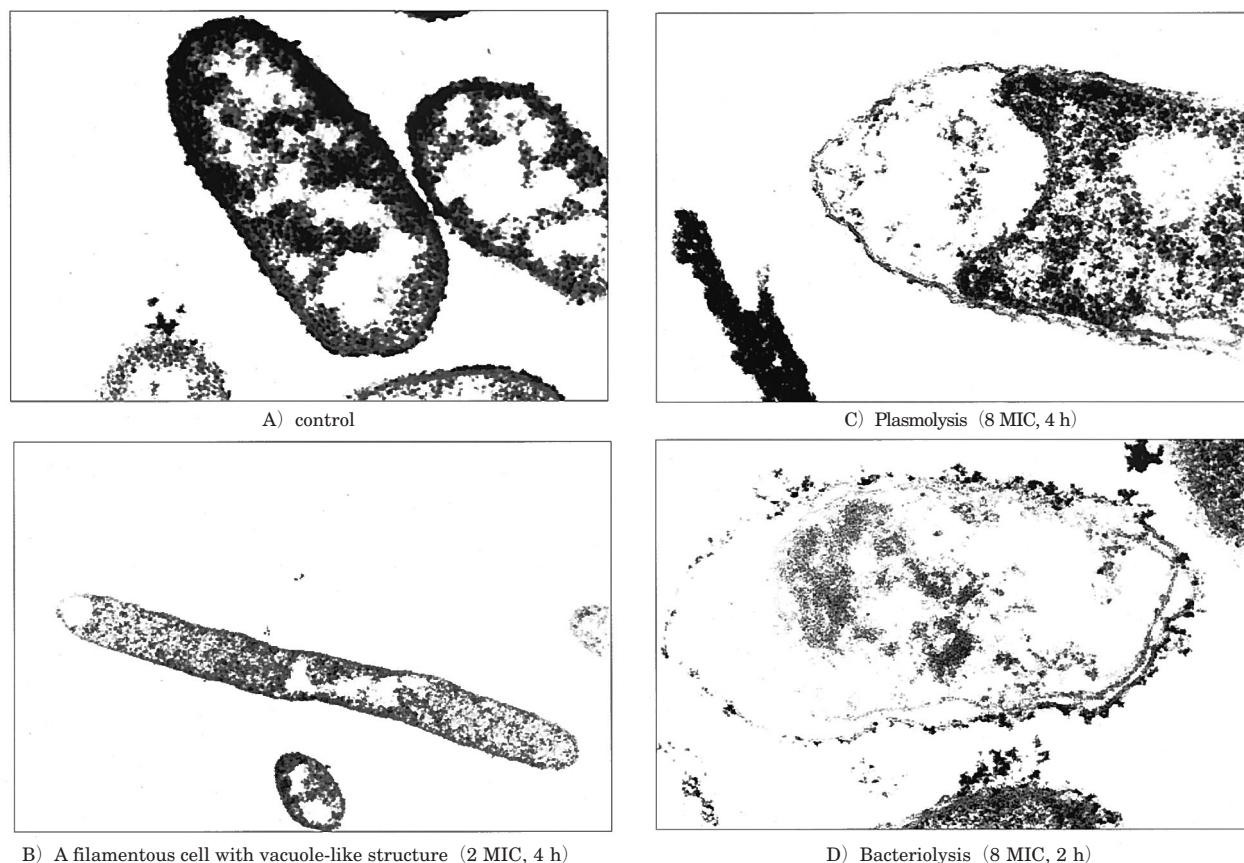


Fig. 6. Transmission electron micrograph of *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 exposed to telithromycin (MIC: 1 μ g/mL).

良好となった。接種菌量の影響については $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL と 10,000 倍の変化においても、MIC は 1~8 倍程度の変動であったことから、菌量の影響は対照薬と同等に軽微なものと考えられた。

増殖曲線によらず TEL の影響からみた経時的な殺菌曲線は、*S. aureus* Smith に対して比較的殺菌的であり、*S. pneumoniae* Type III に対しては 2 MIC 以上、*H. influenzae* ATCC 10211 では 1 MIC 以上の濃度から殺菌的に作用し、その効果は濃度依存的であった。また、薬剤添加後 2~4 時間後には菌数を 1 log CFU/mL 以上減少させる、迅速で強力な殺菌作用が認められ、これらの菌による感染部位においても同様な殺菌効果が期待された。

微分干渉顕微鏡による菌体の形態変化の観察により、グラム陽性菌では膨化および溶菌、*H. influenzae* では膨化、伸長化および溶菌が認められた。また、透過型電子顕微鏡像においては、*S. aureus* は細胞壁の著明な肥厚、空洞化様構造および溶菌が、*H. influenzae* では伸長化、原形質分離および溶菌が観察された。このような形態学的な変化は AZM、CAM でも報告^{10,11)}されており、グラム陽性菌では蛋白合成が阻害され、自己溶解酵素 (autolytic enzyme) が不活化されたため、グラム陰性菌では蛋白合成が阻害され、細胞分裂に必要な酵素が産

生されないため起こった変化と考えられた。

以上示したごとく、TEL は既存のマクロライド薬より優れた抗菌力および殺菌力を備え、さらに一部のマクロライド耐性菌に対しても、強い抗菌活性を示すことから、臨床での本薬の良好な効果が期待できると考えられた。

文 献

- 1) Bryskier A: New research in macrolides and ketolides since 1997. Expert Opinion on Investigational Drugs. 8: 1171~1194, 1999
- 2) Jones R N, Biedenbach D J: Antimicrobial activity of RU-66647, a new ketolide. Diagn Microbial Infect Dis. 27: 7~12, 1997
- 3) Pankuch G A, Visalli M A, Jacobs M R, et al.: Susceptibilities of penicillin- and erythromycin-susceptible and -resistant pneumococci to HHR 3647 (RU 66647), a new ketolide, compared with susceptibilities to 17 other agents. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 624~630, 1998
- 4) Hamilton-Miller J M T, Shah S: Comparative *in-vitro* activity of ketolide HMR 3647 and four macrolides against Gram-positive cocci of known erythromycin susceptibility status. J. Antimicrob. Chemother. 41: 649~653, 1998
- 5) Pankuch G A, Hoellman D B, Lin G, et al.: Activity of HMR 3647 Compared to those of five agents

- against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* by MIC determination and time-kill assay. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 3032~3034, 1998
- 6) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Fourth Edition; Approved Standard. NCCLS, January; M 7-A 4, Vol. 17 No. 2, 1997
- 7) Luft J H: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys Biochem. Cytol. 9: 409~414, 1961
- 8) Reynolds E S: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208~212, 1963
- 9) 諸星俊郎, 西野武志, 谷野輝男: 新しいマクロライド系抗生物質 TMS-19-Q に関する細菌学的研究。日化療会誌 32 (S-6): 12~25, 1984
- 10) 西野武志, 香本晃嶺, 大槻雅子: Azithromycin の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性。日化療会誌 43 (S-6): 40~53, 1995
- 11) 西野武志, 石田信生, 大槻雅子, 他: マクロライド系抗生物質 TE-031 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性。日化療会誌 36 (S-3): 95~110, 1988

Antibacterial activities of telithromycin

—Antibacterial activities against various species, influence of various factors and morphological changes—

Takeshi Nishino, Masako Ohtsuki and Hideaki Harada

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi,
Yamashina-ku, Kyoto, Japan

Antibacterial spectrum against standard strains and antibacterial activities against clinical isolates of telithromycin (TEL) were examined in comparison with clarithromycin (CAM) and azithromycin (AZM)—existing macrolides—, cefdinir (CFDN)—a cephem— and levofloxacin (LVFX)—a new quinolone—. Furthermore, influence of various factors on the antibacterial activities, influence of TEL on the growth curve and morphological changes by TEL were also investigated. TEL has a broad antibacterial spectrum covering gram-positive bacteria and some gram-negative bacteria such as *Haemophilus influenzae* and *Hericobacter pylori*, similar to existing macrolides. The antibacterial activity of telithromycin was comparable to or more potent than all reference drugs on gram-positive bacteria and was comparable to or more potent than CAM and AZM on gram-negative bacteria. Concerning 488 strains clinically isolated in 1997, TEL exhibited excellent antibacterial activities on gram-positive bacteria. Its antibacterial activities against *Streptococcus* spp. and *Enterococcus* spp. were the most potent among test drugs, and TEL was also active against macrolide-resistant strains of *Streptococcus* and *Enterococcus*. However, antibacterial activities of TEL against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), new quinolones-resistant *S. aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) were weak as well as other reference drugs. Against gram-negative bacteria, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *H. pylori*, telithromycin was active and comparable to or more potent than AZM and CAM, but against other species were inferior to CFDN and LVFX. Influence of various factors on the antibacterial activity of telithromycin was investigated in comparison with erythromycin (EM) and CAM using standard strains of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Its antibacterial activity of telithromycin was potentiated in alkaline culture media and weakened in acidic culture media. The antibacterial activity of telithromycin became higher with the addition of horse defibrinated blood. Slight influence of inoculum size was comparable to reference drugs. As for the influence on growth curves of standard strains of *S. aureus*, TEL was bacteriostatic. In the concentrations not less than 2 MIC in *S. pneumoniae* and 1 MIC in *H. influenzae*, TEL was bactericidal and the action was rapid and strong. Concerning the morphological changes after TEL action observed with differential interference contrast microscope, *S. aureus* and *S. pneumoniae* became swollen in the concentrations not less than 4 MIC were lyzed in not less than 8 MIC. Further, in the transmission electron micrographs, marked hypertrophy of cell wall, vacuole-like structure and bacteriolysis were observed in *S. aureus*. On *H. influenzae*, in the concentrations not less than 1 MIC, elongation was observed and in not less than 4 MIC plasmolysis and bacteriolysis were recognized.