

【原著・基礎】

Telithromycin の *in vitro* 殺菌作用

—MBC/MIC 比と殺菌曲線—

新井 進・岡本 博樹・野口 恵子・牛場 薫・矢口 理史

アベンティスファーマ株式会社開発研究所薬理研究室*

日本で臨床分離された *Staphylococcus aureus* (19 株), *Enterococcus faecalis* (20 株), *Streptococcus pneumoniae* (16 株) および *Haemophilus influenzae* (18 株) に対する telithromycin (TEL) の MIC および MBC を測定し, 既存のマクロライド系抗菌薬である erythromycin A (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM) および josamycin (JM) と比較した。その結果, すべての抗菌薬の *S. aureus* および *E. faecalis* に対する MBC_{50}/MIC_{50} および MBC_{90}/MIC_{90} は 32 以上であったが, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対する MBC_{50}/MIC_{50} および MBC_{90}/MIC_{90} は 2 以内であった。したがって, TEL は *S. aureus* および *E. faecalis* に対しては静菌的に, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対しては殺菌的に作用することが示唆された。さらに, *S. aureus*, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の標準菌株に対する TEL の殺菌曲線を求め, EM, CAM および AZM と比較検討した。その結果, TEL は *S. aureus* Smith に対して, CAM に若干劣るものの, EM および AZM と同様に, 1/2 MIC の濃度での増殖を抑制し, MIC の濃度から緩やかな殺菌作用が認められた。また, *S. pneumoniae* DP-1 に対して, 他の対照薬と同様に MIC より低い濃度で増殖を抑制し, MIC 以上の濃度で殺菌的に作用した。*H. influenzae* ATCC 49247 に対しては, 1/2 MIC の濃度で増殖を抑制し, MIC 以上の濃度で殺菌的に作用した。TEL は, 特に *S. pneumoniae* DP-1 および *H. influenzae* ATCC 49247 に対して, EM, CAM および AZM に比べて短期間で強力な殺菌作用を示し, さらに, これら抗菌薬で *S. aureus* Smith および *H. influenzae* ATCC 49247 においてみられた再増殖も認められなかった。

Key words: telithromycin, MBC, 殺菌力, 殺菌曲線, 殺菌作用

Telithromycin (TEL) はケトライド (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化合物) 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¹⁾で, 呼吸器感染症などの治療薬として現在開発中である。TEL は *Streptococcus pneumoniae* をはじめとするグラム陽性菌に対してマクロライド系抗菌薬よりも高い抗菌活性を有し, さらに, 14 員環マクロライド系抗菌薬に耐性が認められる臨床分離株に対しても高い抗菌活性を示すことが明らかとなっている²⁻⁴⁾。また, 市中呼吸器感染症の起炎菌であるグラム陰性菌の *Haemophilus influenzae* および *Mollaxella catarrhalis* に対しても抗菌活性を示す⁵⁾。

今回, グラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* および *Enterococcus faecalis* ならびに呼吸器感染症の主な起炎菌である *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の臨床分離株を用いて TEL の MIC および MBC を測定し, MIC と MBC の比から殺菌力を測定した。また, *S. aureus*, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の標準菌株を用い, TEL による生菌数の変化を経時的に検討した。これらの結果を既存のマクロライド系抗菌薬である erythromycin A (EM), clarithromycin

(CAM) および azithromycin (AZM) と比較した。なお, 殺菌力試験では josamycin (JM) を加えた。

I. 材料および方法

1. 使用抗菌薬と調整法

被験抗菌薬の TEL, 対照薬の EM, CAM および AZM をアベンティス (フランス) から, JM を和光純薬から入手した。いずれの抗菌薬も力価の明らかな原末を用いた。

TEL, EM, CAM, AZM および JM は, メタノール: エタノール: 注射用蒸留水 = 4.8 : 43.3 : 51.9 の溶媒に 2.56 mg/mL の濃度となるように用時溶解し, これを原液として用いた。

2. 使用菌株

MIC および MBC 測定試験では, TEL, EM, CAM, AZM および JM の MIC が各菌種に対する MIC_{50} 値⁶⁾の 1/4 倍から 4 倍の範囲にある臨床分離株 (*S. aureus* 19 株, *S. pneumoniae* 16 株, *E. faecalis* 20 株および *H. influenzae* 18 株) を選択し, 使用した。標準菌株として当研究室保存のマクロライド感受性の *S. aureus* Smith, *S. pneumoniae* DP-1 および *H. influenzae*

*埼玉県川越市南台 1-3-2

Table 1. Bactericidal activity of telithromycin and other macrolides against clinical isolates

	Antibi- otics	Range		MIC ₅₀ /MBC ₅₀		MIC ₉₀ /MBC ₉₀	
		MIC	MBC				
<i>Staphylococcus aureus</i> [19]	TEL	0.06 – 0.25	16 – 64	0.125 / 32		0.25 / 64	
	EM	0.25 – 1	64 – >128	0.5 / 128		0.5 / >128	
	CAM	0.25 – 0.5	32 – >128	0.25 / 128		0.5 / 128	
	AZM	1 – 2	>128	1 / >128		2 / >128	
	JM	2 – 4	128 – >128	2 / >128		4 / >128	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> [16]	TEL	0.008 – 0.125	0.008 – 0.125	0.03 / 0.06		0.06 / 0.125	
	EM	0.03 – 2	0.03 – 4	2 / 2		2 / 2	
	CAM	0.016 – 1	0.016 – 2	1 / 1		1 / 2	
	AZM	0.03 – 2	0.03 – 2	2 / 2		2 / 2	
	JM	0.06 – 1	0.125 – 1	0.25 / 0.25		0.25 / 0.5	
<i>Enterococcus faecalis</i> [20]	TEL	0.016 – 0.06	1 – 32	0.03 / 16		0.03 / 16	
	EM	0.25 – 1	64 – >128	1 / 128		1 / >128	
	CAM	0.125 – 1	32 – >128	0.5 / 64		1 / 128	
	AZM	0.5 – 4	>128	1 / >128		2 / >128	
	JM	1 – 4	>128	2 / >128		2 / >128	
<i>Haemophilus influenzae</i> [18]	TEL	1 – 2	1 – 4	2 / 2		2 / 4	
	EM	2 – 4	4 – 16	4 / 4		4 / 8	
	CAM	4 – 8	4 – 32	8 / 8		8 / 16	
	AZM	0.5 – 2	0.5 – 4	1 / 1		2 / 2	
	JM	16 – 64	16 – 64	32 / 32		32 / 32	

MIC: minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$), MBC: minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

The MIC was determined by the broth microdilution method.

For MBC determination, 1 μL aliquot of each of bacterial suspensions for MIC determination was applied to an antibiotic-free agar plate, which was incubated for 20 h. The lowest concentration of antibiotic giving none colonies was recorded as the MBC.

TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin, JM: josamycin

ATCC 49247 の 3 菌株を使用した。

3. 使用培地

殺菌力測定用培地として、*S. aureus* には Ca^{2+} , Mg^{2+} 調製 Muller-Hinton (MH, Difco) 液体培地 (CAMHB) を、*S. pneumoniae* および *E. faecalis* には 5% ウマ溶血液 (日本バイオテスト研究所) を添加した CAMHB を、*H. influenzae* にはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (ナカライテスク) 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 酵母エキス (Difco) 5 mg/mL および 5% ウマ溶血液添加 CAMHB を用いた。

殺菌曲線測定用培地として、*S. aureus* Smith に対して MH 液体培地を、*S. pneumoniae* DP-1 には 5% ウマ脱繊維血 (日本バイオテスト研究所) を添加した MH 液体培地を、*H. influenzae* ATCC 49247 には 5% フィルデス・エンリッチメント (Difco) を添加した Brain heart infusion broth (BHI, Difco) を用いた。

4. 実験方法

1) MIC および MBC の測定法

MIC 値の測定は、日本化学療法学会標準法^{7,8)}の示す微量液体希釈法にしたがい行った。すなわち、各抗菌薬の原液 (2.56 mg/mL) を感受性測定用培地で希釈して抗菌薬含有感受性測定用培地 (0.001~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を調製し、U 字型ウエルの 96 穴マイクロプレート

(Corning) に 1 ウエルあたり 100 μL 分注した。対照として、溶媒含有感受性測定用培地を用いた。寒天平板上に一夜前培養した集落を無菌的に掻き取り、これを *S. aureus* は滅菌生理食塩水に、*S. pneumoniae*, *E. faecalis* および *H. influenzae* は MH 液体培地に懸濁して 0.5 McFarland の濁度となるように調製し、さらにこれを 10 倍に希釈して接種菌液とした。この各菌液を各ウエルに 5 μL 接種 (約 5×10^5 CFU/mL) した後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間培養し、菌の発育が肉眼的に認められないウエルのうち、最小の抗菌薬濃度を MIC とした。MBC 値の測定は、MIC の測定に供した各ウエルの液体培地、すなわち菌液を接種して 20 時間培養した薬物含有感受性測定用培地を被験菌液とした。被験菌液 1 μL を、エーゼ (Nunc 社) を用いて、薬物を含まない寒天培地に接種した。37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間培養した後、菌の発育が肉眼的に認められない最小抗菌薬濃度を MBC 値 (99.8% 殺菌) とした。各菌種に対する抗菌薬の MIC₅₀ 値, MIC₉₀ 値, MBC₅₀ 値および MBC₉₀ 値を算出するとともに、MBC₅₀/MIC₅₀ 比および MBC₉₀/MIC₉₀ 比を求めた。

2) 殺菌曲線測定法

各菌種に応じた殺菌曲線測定用培地で 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 時間前培養した被験菌を、滅菌 L 字管に分注した新たな培地に、初発菌液濃度が約 10^8 CFU/mL, 培地の容量が 9.5

mLとなるよう接種した。37°Cで2時間振盪培養した後、被験薬物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0.5 mLずつ添加し、さらに振盪培養を続けた。薬物溶解液の代わりに溶媒を用いた対照群を設けた。生菌数は薬物添加時を0時間とし、-2, 0 (対照のみ), 2, 4, 6, 8および24時間後に各L字管より菌液を採取した。採取した菌液はBSG (buffered saline with gelatin; NaCl 8.5 g, KH₂PO₄ 0.3 g, Na₂HPO₄ 0.6 g, gelatin 0.1 gを蒸留水に溶解, 滅菌)を用いて10~10⁷倍に適宜希釈し、その0.1 mLを菌種に応じた生菌数測定用培地に塗布した。37°Cで20時間培養した後、コロニー数を計測し、1 mL中の生菌数 (CFU/mL)を求めた。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。また、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。

II. 結 果

1. 殺菌力試験

*S. aureus*に対するMBC₅₀は、MIC₅₀と比較して、TELで256倍、EMで256倍、CAMで512倍、AZMで>128倍およびJMで>64倍であった。また、MBC₉₀は、MIC₉₀と比較して、TELで256倍、EMで>256倍、CAMで256倍、AZMで>64倍およびJMで>32倍であった。なお、*S. aureus*に対するTELのMICおよびMBCはそれぞれ0.06~0.25および16~64 μg/mLの範囲にあった (Table 1)。

*S. pneumoniae*に対するMBC₅₀およびMBC₉₀は、試験に用いたいずれのマクロライド系抗菌薬でも、それぞれのMIC₅₀およびMIC₉₀の2倍以内であった。なお、*S. pneumoniae*に対するTELのMICおよびMBCはいずれも0.008~0.125 μg/mLの範囲にあった (Table 1)。

*E. faecalis*に対するMBC₅₀は、MIC₅₀と比較して、TELで533倍、EMで128倍、CAMで128倍、AZMで>128倍およびJMで>64倍であった。また、MBC₉₀は、MIC₉₀と比較して、TELで533倍、EMで>128倍、CAMで128倍、AZMで>64倍およびJMで>64倍であった。なお、*E. faecalis*に対するTELのMICおよびMBCはそれぞれ0.016~0.06および1~32 μg/

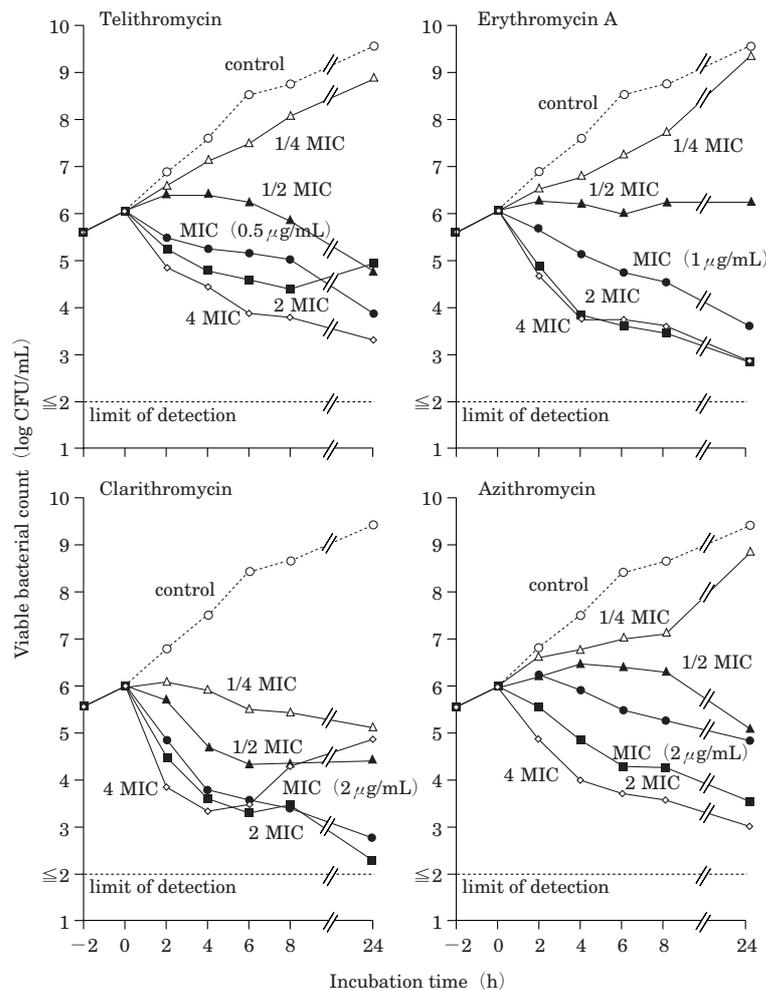


Fig. 1. Killing curves of telithromycin and other macrolides against *Staphylococcus aureus* Smith.

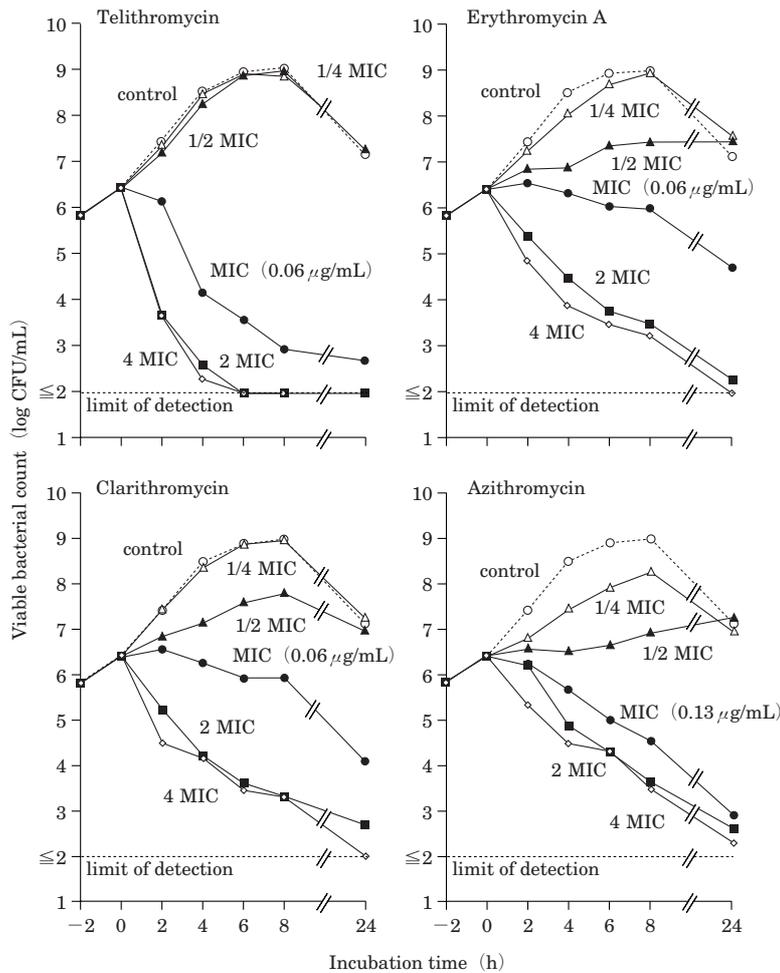


Fig. 2. Killing curves of telithromycin and other macrolides against *Streptococcus pneumoniae* DP-1.

mLの範囲にあった (Table 1)。

H. influenzae に対する MBC_{50} は、試験に用いたいずれのマクロライド系抗菌薬でも MIC_{50} と同じであった。また、 MBC_{90} は MIC_{90} の2倍以内であった。なお、*H. influenzae* に対する TEL の MIC および MBC はそれぞれ1~2および1~4 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった (Table 1)。

2. 殺菌曲線

S. aureus Smith に対し、TEL は EM および AZM と同様に、1/2 MIC の濃度で増殖を抑制した。MIC の濃度から緩やかな殺菌作用が認められ、24時間で生菌数を約2 log CFU/mL 減少させた。CAM は1/4 MIC の濃度で増殖を抑制したが、4 MIC の濃度において、6時間から1.5 log CFU/mL 以上の再増殖が認められた (Fig. 1)。

S. pneumoniae DP-1 に対し、TEL は MIC 以上の濃度から殺菌的に作用し、MIC 濃度の24時間では生菌数を約3 log CFU/mL 減少させた。さらに2および4 MIC の濃度では、6時間で検出限界以下 (2 log CFU/mL) としたのに対し、EM、CAM および AZM は約2 log CFU/mL まで生菌数を減少させるのに、2および4 MIC の

濃度で24時間必要とした (Fig. 2)。

H. influenzae ATCC 49247 に対し、TEL は1/2 MIC の濃度で増殖を抑制したが、EM および CAM は24時間でも抑制できなかった。TEL は MIC 以下の濃度で殺菌的に作用し、MIC の濃度で6時間、2および4 MIC の濃度では4時間で生菌数を検出限界以下とした。一方、EM および AZM は MIC の濃度において、8時間で検出限界以下としたが、24時間で再増殖が認められた。CAM は MIC の濃度で殺菌作用が認められず、2 MIC の濃度では殺菌的に作用したものの、24時間で再増殖が認められた (Fig. 3)。

III. 考 察

TEL の殺菌力を、MIC と MBC の比から検討した。グラム陽性菌の *S. aureus* および *E. faecalis* ならびに呼吸器感染症の重要な起炎菌である *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の臨床分離株を用い、既存のマクロライド系抗菌薬である EM、CAM、AZM および JM と比較した。その結果、各抗菌薬ともに *S. aureus* および *E. faecalis* に対する MBC_{50} はそれぞれの MIC_{50} の64倍以上であり、また MBC_{90} はそれぞれの MIC_{90} の32倍以上であり、 MBC_{50} と MIC_{50} あるいは MBC_{90} と

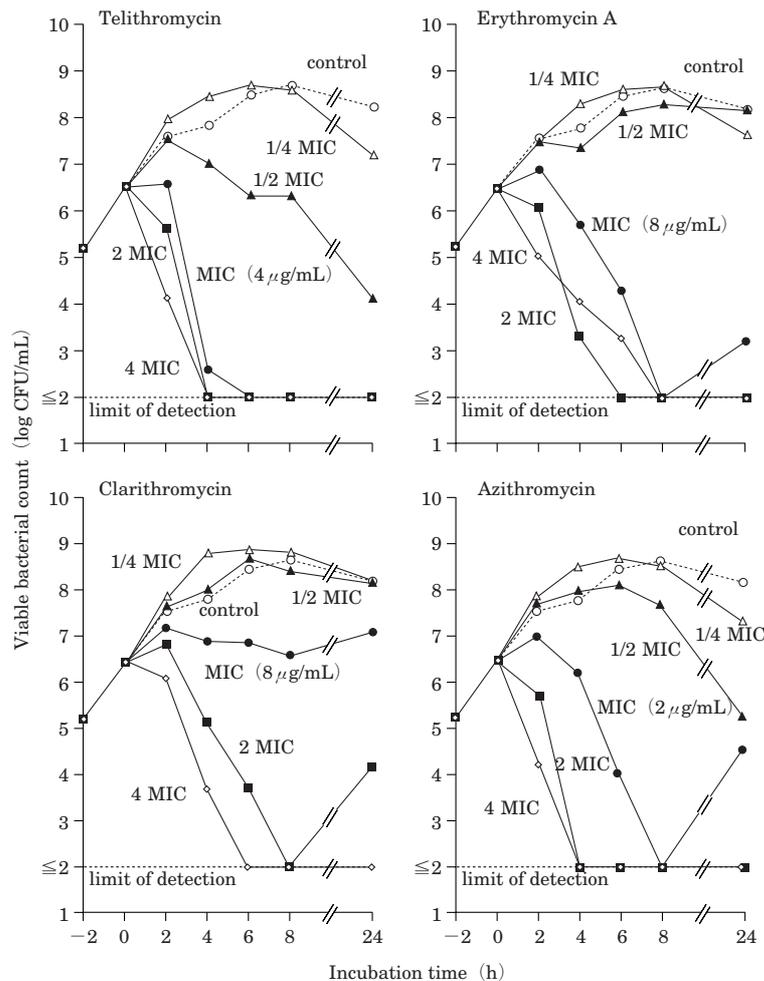


Fig. 3. Killing curves of telithromycin and other macrolides against *Haemophilus influenzae* ATCC 49247.

MIC₉₀の間には差が認められた。一方、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対する MBC₅₀ および MBC₉₀ は今回用いたマクロライド系抗菌薬においてもそれぞれの MIC₅₀ または MIC₉₀ の2倍以内であった。以上のことから、TELは *S. aureus* および *E. faecalis* に対しては静菌的に、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対しては殺菌的に作用することが示唆された。TELの *S. aureus* および *E. faecalis* に対する MBC の分布はそれぞれ 16~64 および 1~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、試験に用いたマクロライド系抗菌薬 (いずれも 32~>128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に比べて低かった。したがって、これらの菌種も含め、TELは主な呼吸器感染症の起炎菌に対し、既存のマクロライド系抗菌薬より低濃度で殺菌力を有すると考えられた。

TELの殺菌作用について、*S. aureus*、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* の標準菌株に対する殺菌曲線を既存のマクロライド系抗菌薬である EM、CAM および AZM と比較し検討した。TELは *S. aureus* Smith に対して、CAMには若干劣るものの、EM および AZM と同様に、MIC以上の濃度で殺菌的に作用したが、高濃度においても急激な生菌数の減少はみられず、緩やかな作用であった。一方、*S. pneumoniae* DP-1 および *H.*

influenzae ATCC 49247 に対して、TELは MIC以上の濃度で、他薬と比べて短時間で強力な殺菌作用を示した。これらの結果は、本報告でTELのMBC/MICの検討で示唆された、*S. aureus* への静菌的作用と *S. pneumoniae* および *H. influenzae* への殺菌的作用を裏づけていると考えられ、特にTELの *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対する殺菌作用は、抗菌薬添加後2~4時間という、早期での強力な作用に起因すると考えられた。また、*S. aureus* SmithでのCAM、*H. influenzae* ATCC 49247でのEM、CAM および AZMでは1 log CFU/mL以上の再増殖がみられたが、TELではいずれの菌種においても顕著な再増殖は認められなかった。以上のように、TELは *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対し、MIC以上の濃度で殺菌的に作用し、かつ、顕著な再増殖も認められなかった。特に *S. pneumoniae* および *H. influenzae* に対しては、EM、CAM および AZM と比べ、短時間で強力な殺菌作用を示した。したがって、TELは感染部位のこれら起炎菌に対しても、既存のマクロライド系抗菌薬より短時間で強力な殺菌作用が期待でき、呼吸器感染症に優れた治療効果を示すものと考えられた。

文 献

- 1) Bryskier A: New research 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 Microbiol Infect Dis* 27: 7~12, 1997
- 3) Biedenbach D J, Barrett M S, Jones R N: Comparative antimicrobial activity and kill-curve investigations of novel ketolide antimicrobial agents (HMR 3004 and HMR 3647) tested against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31: 349~353, 1998
- 4) Pankuch G A, Visalli M A, Jacobs M R, et al.: Susceptibilities of penicillin- and erythromycin-susceptible and -resistant pneumococci to HMR 3647 (RU 66647), a new ketolide, compared with susceptibilities to 17 other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 624~630, 1998
- 5) Reinert R R, Bryskier A, Lutticken R: *In vitro* activities of the new ketolide antibiotics HMR 3004 and MHR 3647 against *Streptococcus pneumoniae* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1509~1511, 1998
- 6) 新井 進, 岡本博樹, 野口恵子, 他: Telithromycin の *in vitro* 抗菌作用—嫌気性菌を含む標準菌株, 臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌力—. *日化療会誌* 51(S-1): 7~18, 2003
- 7) 日本化学療法学会: 微量液体希釈法による MIC 測定法 (微量液体希釈法)。 *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 8) 日本化学療法学会: 微量液体希釈法による MIC 測定法 (日本化学療法学会標準法) の一部修正。 *Chemotherapy* 41: 183~189, 1993

In vitro bactericidal activity of telithromycin

—MBC/MIC ratio and killing curve—

Susumu Arai, Hiroki Okamoto, Keiko Noguchi,
Kaoru Ushiba and Masafumi YaguchiPharmacology, Lead Optimization, Drug Innovation & Approval Division, Aventis Pharma Ltd.,
1-3-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama, Japan

MBC/MIC ratio of telithromycin (TEL) for clinical isolates of *Staphylococcus aureus* (19 strains), *Enterococcus faecalis* (20 strains), *Streptococcus pneumoniae* (16 strains) and *Haemophilus influenzae* (18 isolates) in Japan was compared with those of erythromycin A (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM) and josamycin (JM), existing macrolide antibiotics. As a result, MBC_{50}/MIC_{50} and MBC_{90}/MIC_{90} ratios of all compounds tested for *S. aureus* and *E. faecalis* were more than 32, but the ratios for *S. pneumoniae* and *H. influenzae* were less than 2. Therefore, this study suggested that TEL had bacteriostatic effects against *S. aureus* and *E. faecalis*, but bactericidal effect against *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. In addition, the bactericidal activity of TEL against standard strains of *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* was compared with those of EM, CAM and AZM on the basis of their killing curves. Against *S. aureus* Smith, TEL was slightly less potent than CAM. However, as in the case of EM and AZM, TEL inhibited the proliferation at 1/2 MIC and showed mild bactericidal activity at MIC. Against *S. pneumoniae* DP-1, TEL inhibited the growth at the concentration lower than MIC and showed bactericidal activity at the MIC or concentration higher than MIC as observed in other reference drugs. Against *H. influenzae* ATCC 49247, TEL inhibited the growth at the 1/2 MIC and showed bactericidal activity at the concentration higher than MIC. TEL showed strong short-term bactericidal activity in comparison with EM, CAM and AZM, especially against *S. pneumoniae* DP-1 and *H. influenzae* ATCC 49247. Furthermore, marked regrowth as observed in *S. aureus* and *H. influenzae* ATCC 49247 in case of EM, CAM and AZM, was not observed in TEL.