

## 【原著・基礎】

## グラム陽性菌の細胞および細胞下レベルにおける telithromycin の作用機構の検討

—耐性誘導能からリボソーム親和性まで作用機序の検討—

中 島 良 徳・遠 藤 菊 太 郎

北海道薬科大学微生物学研究室\*

新規ケトライド系抗菌薬 telithromycin (TEL) について *Staphylococcus aureus* に対する耐性誘導能, *S. aureus* における 50% 発育阻害濃度 ( $ID_{50}$ ), 蛋白質合成阻害効果および耐性菌由来リボソームとの親和性について検討した。ディスク拡散法による TEL の耐性誘導能について erythromycin A (EM) と比較検討した。TEL は, EM とは異なり, マクロライド系抗菌薬 (Mac) 誘導型耐性の *S. aureus* に対して, 耐性誘導活性をまったく示さなかった。また感受性および耐性菌株を問わず EM より強い抗菌活性を示した。*S. aureus* における 50% 発育阻害濃度 ( $ID_{50}$ ) を EM および rokitamycin (RKM) と比較検討した。Mac 感性株に対して TEL は EM, RKM より 5.3~5.5 倍強い阻害活性を示し, さらに, 一部 Mac に構成型 PM (Partial macrolide) 耐性株に対して TEL は RKM の 1.5 倍, EM の 124 倍強い抗菌活性を示した。Poly (A) 依存 polylysine 合成系を用いて TEL の蛋白質合成阻害効果を検討した。TEL は感受性菌株および耐性誘導前の Mac 誘導型耐性菌株 (*erm* (A) 保有 *S. aureus* および *Streptococcus pneumoniae* HL-3120) 由来リボソームにおける蛋白質合成を強く阻害したものの, 耐性誘導後の Mac 耐性菌由来リボソームに対しては阻害効果を示さなかった。TEL の *S. aureus* および *S. pneumoniae* 由来リボソームとの親和性を検討したところ, 従来の Mac と同様に 50 S リボソームサブユニットと結合し, 30 S サブユニットとは結合しなかった。TEL は Mac 感受性 *S. aureus* 由来 50 S サブユニットに対する結合量に比べ, 低いながらも, PM 耐性菌由来リボソームにも結合した。TEL は, 感受性およびリンコサマイドやストレプトグラミン B 型抗菌薬 (MLS) にも誘導型耐性を示す耐性誘導前 *S. pneumoniae* 由来のリボソームとも結合し, さらに, 従来の 14 員環 Mac とは異なり, 耐性誘導後の *S. pneumoniae* 由来 50 S サブユニットと感受性菌由来のサブユニットに比べ, 結合量は低下するものの特異的に結合した。

**Key words:** telithromycin, 耐性誘導, 50% 発育阻止濃度, 蛋白質合成阻害, リボソーム親和性

自然界ならびに臨床由来の macrolide (Mac) 耐性 *Staphylococcus aureus* の多くは, その耐性表現型により, 構成型耐性 (constitutive resistant, double type または group A) および誘導型耐性 (inducible resistant, dissociate type または group B や C) 菌群に 2 大別される。いずれの菌群も, Mac に化学構造上関係ないと考えられるリンコサマイドやストレプトグラミン B 型抗菌薬 (MLS) にも交叉耐性を示すことが知られている<sup>1-3)</sup>。さらに誘導型耐性菌群においては低濃度 erythromycin A (EM), oleandomycin などの 14 員環 Mac により耐性が誘導される。そこで今回, 14 員環マクロライド環を有し, 8 位クラディノース基がケトン基で置換され, 1 位にアミノプテリダゾール側鎖を有するケトライドのひとつ<sup>4)</sup>, telithromycin (TEL) が *S. aureus* に対して耐性誘導能を有するか否かを検討した。

次に, *S. aureus* を用い TEL の Mac 感性株および一部の Mac (PM: partial macrolide) に構成的に耐性を示す株 (構成型 PM 耐性株) の発育阻害の強さを従来の 14 員環 Mac

の EM および 16 員環 Mac の rokitamycin (RKM) と比較検討した。

Mac は細菌の 50 S サブユニットに結合し, 蛋白質合成を阻害することが知られている<sup>5-9)</sup>。EM, spiramycin (SPM) などは無細胞蛋白質合成系において, ポリペプチド合成反応, 特にペプチジル tRNA の転移反応およびペプチド転移反応を阻害するとされている<sup>7,10-12)</sup>。そこで, TEL の作用点であると考えられる蛋白質合成阻害の過程を 14 員環 Mac にも阻害効果が強く現れる poly (A) 依存 polylysine 合成系を用いて検討した。

MLS はリボソームの 50 S サブユニットと 1:1 で特異的且つ安定に結合し, その結合は可逆的であるとされている<sup>13-15)</sup>。そこで, TEL のリボソームとの結合親和性を *S. aureus* の感性株と耐性株および *Streptococcus pneumoniae* の耐性株を用いて検討した。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

\*北海道小樽市桂岡町 7-1

研究室保有の *S. aureus* から、MLS 感受性 NCTC 8325 株、MLS 誘導型 (*erm* (A) 保有) 耐性 ISP 447 株、PM に構成型耐性を示す臨床分離株より PM 耐性因子を形質導入して得られた構成型 PM 耐性 8325 MMT 7 株、および PM に誘導型 (*msr* (A) 保有) 耐性を示す 8325 (pEP 2104) 株を使用した。*S. pneumoniae* は、アベンティスファーマより分与された MLS 耐性 HL-3120 株を使用した。無細胞蛋白質合成系では S 100 画分供給のため *Escherichia coli* Q 13 を用いた。

## 2. 使用薬物

被験抗菌薬として TEL (アベンティスファーマ) を、対照抗菌薬として EM (Sigma), RKM (旭化成), mycinamicin (MCM, 旭化成), midekamycin (MDM, 明治製菓), miocamycin (MOM, 明治製菓), josamycin (JM, 山之内製菓), YM 133 (メルシャン), SPM (Sigma), rosamicin (RSM, Sigma), tylosin (TS, Sigma), lincomycin (LCM, 日本アップジョン) および clindamycin (CLDM, 日本アップジョン) を用いた。mikamycin (MKM, 萬有製菓) は、MKM-A および B の混合物から HPLC により MKM-B を分離精製して用いた。使用薬物はすべて力価の明らかなものを用いた。

ラベル化合物は、 $^{14}\text{C}$ -TEL (1.95 GBq/mmol) および  $^{14}\text{C}$ -EM (2.0 GBq/mmol) をそれぞれアベンティスファーマおよび NEN より分与されたものを用いた。

TEL はメタノールに、EM, RSM, RKM, MCM, JM, MDM および MOM はエタノールに、TS, LCM および CLDM はミリ Q 水に約 1 mg/mL の濃度となるように溶解し、同溶媒で希釈調製した。SPM, YM 133 および MKM-B はエタノールで約 2.5 mg/mL の濃度に溶解し、調製した。抗菌薬はすべて用時調製した。

## 3. 実験方法

### 1) ディスク拡散法による耐性誘導能の検討

*S. aureus* NCTC 8325, *S. aureus* ISP 447, *S. aureus* 8325 pEP 2104 および *S. aureus* 8325 MMT 7 を Heart infusion (HI, Difco) 寒天平板上で 37°C, 一夜培養し、生理食塩水 0.5 mL に McFarland 0.5 標準に懸濁した (約  $10^8$  CFU/mL)。この菌液に種層寒天培地 (基層寒天培地の agar を 5 g/L としたもの) 8~9 mL を加えて混合後、8 mL をあらかじめ作製した基層寒天培地 (peptone 5: yeast extract 5:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1: glucose 2: agar 20 g/L, いずれも BBL を栄研 1 号角シャーレ 73×220 mm に 40 mL 固化した) 上に均一に拡げ固めた。その寒天平板上の中央位置に、TEL (2.5  $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) または EM (10  $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) 含有ディスクを一行に一定間隔で置き、これを挟んで平行に各種抗菌薬含有ディスク、すなわち、MKM-B, YM 133, SPM は 25  $\mu\text{g}/\text{disk}$ , TS, JM, MDM, MOM, MCM, RSM, RKM は 10  $\mu\text{g}/\text{disk}$ , LCM は 5  $\mu\text{g}/\text{disk}$ , CLDM は 1  $\mu\text{g}/\text{disk}$  含有ディスクを置いた。なお、各ディスクの薬物濃度は過去の結果<sup>16,17)</sup>

および MIC 値<sup>18)</sup>を参考に設定した。37°C, 18 時間培養後、各ディスク周囲の阻止帯の有無により抗菌活性を、形状 (円形阻止帯; 誘導能なし, D 型阻止帯; 誘導能あり) により誘導能を判定した<sup>19~22)</sup>。

### 2) 50% 発育阻害濃度 (ID<sub>50</sub>) の測定

*S. aureus* NCTC 8325 および *S. aureus* 8325 MMT 7 の前培養培地として NBY (0.1%) すなわち 0.1% yeast extract 添加 Nutrient broth (BBL) を用いた。ID<sub>50</sub> 測定用として NBY (0.1%) 培地に 50 mM K-HEPES (半井化学) buffer (pH 7.6) を添加した medium H (pH 7.6) を用いた。

*S. aureus* NCTC 8325 および *S. aureus* 8325 MMT 7 を NBY (0.1%) 5 mL で 37°C 一夜培養した。この菌液を medium H で OD<sub>620</sub> 約 0.10 になるように調製後、37°C で対数増殖期 (約 3 時間培養) まで振盪培養した。さらに、この菌液を OD<sub>620</sub> 約 0.11~0.12 になるように調製後、2/3 または 3/4 段階希釈濃度の各抗菌薬を含む medium H に懸濁 (OD<sub>620</sub> 約 0.10) し、37°C で振盪培養した。培養液の OD<sub>620</sub> を経時的に (1 時間ごと 6 時間まで) に測定した。

Mac の *S. aureus* に対する発育阻害は、対数期の蛋白質合成を抑制することにある。したがって、対数増殖期 (培養 4 時間後) における発育速度の比をもって阻害率とした。すなわち、下式に従い抗菌薬の存在しない被験菌株の最大発育速度 (OD<sub>620</sub>/h) に対し、各種抗菌薬の段階希釈濃度存在下における最大発育速度との比より阻害度 (%) を求めた。

$$H_0 = 100 (1 - \text{Kg}/\text{K})$$

H<sub>0</sub>: 対数期増殖作用に対する発育阻害度 (%)

K: 抗菌薬の存在しないときの最大発育速度

Kg: 抗菌薬存在下における最大発育速度

得られた阻害度のプロビットを求め、段階希釈濃度-プロビット相関から ID<sub>50</sub> を算出した<sup>23,24)</sup>。

### 3) 無細胞蛋白質合成系における TEL の影響

*S. aureus* NCTC 8325, *S. aureus* ISP 447, *S. aureus* 8325 MMT 7 および *Escherichia coli* Q 13 の前前培養用培地には Trypticase soy broth (TSB, BBL) を用い、前培養および大量培養用培地には 0.1% glucose 添加 NBY (0.2%) すなわち 0.2% yeast extract 添加 Nutrient broth (BBL) を用いた。また、*S. pneumoniae* HL-3120 の場合、前および前前培養用培地として、5% ヒツジ脱繊維血含有 Trypticase soy agar (TSA, BBL), および大量培養用培地として 0.1% glucose 添加 Infusion broth (IB, Difco) を用いた。

*S. aureus* および *E. coli* の場合、TSB 5 mL で 37°C, 一夜培養 (前前培養) した。この培養液を 0.1% glucose 添加 NBY (0.2%) 400 mL×4 本に 1 mL ずつ加え、37°C で一夜培養した (前培養)。9 L の 0.1% glucose 添加 NBY (0.2%) にこの前培養菌液 800 mL と、あらかじめ

め別滅菌した glucose 10 g/200 mL, さらに滅菌済みアデカノール 2 滴を無菌的に加え, 37°C で通気培養した (大量培養)。なお, EM 耐性の誘導は, 前培養時に 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , 大量培養時に 10  $\mu\text{g/mL}$  の EM を添加することにより行った。菌液の OD<sub>620</sub> が 0.35~0.5 になった時点で速やかに 10°C 以下に急冷, 培養を停止した。4°C, 9,500 rpm (RPR 10-2, 日立), 30 分間遠心集菌した。菌体重量の約 2 倍量の HEPES-A 緩衝液 (10 mM HEPES-KOH, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 16 mM MgAc<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.1 mM DDT, pH 7.6) で 2 回, 菌体を洗浄後, 細胞内成分調製時まで -80°C で保存した。S. pneumoniae の場合, 5% ヒツジ脱繊維血含有 TSA 平板に被験菌を植菌し, 37°C で 10~12 時間培養した (前前培養)。培養した菌を 5% ヒツジ脱繊維血含有 TSA 平板全面に接種し, 37°C で 12 時間培養した (前培養)。その後, 平板 2 枚分を 400 mL の 0.1% glucose 添加 IB に移植し, 37°C で 4 時間培養した。EM 耐性を誘導させる場合は, ここに 10  $\mu\text{g/mL}$  の EM を添加し作用させた。集菌, 菌体の洗浄および保存は, S. aureus の場合と同様に行った。

リボソームおよび S 100 画分の調製は中島らの方法<sup>25,26)</sup>にしたがった。すなわち, 冷凍保存した被験菌体 (S. aureus 3 株, S. pneumoniae および E. coli) に細胞磨砕用酸化アルミニウムを菌体重量の 2.5 倍量徐々に加え, 乳棒を用い乳鉢を保冷しながら菌体を破碎した。これに HEPES-A 緩衝液 (菌体重量の 1.5 倍量), DNase I [(菌体重量 + HEPES-A 量)  $\times$  3  $\mu\text{g/g}$ ] を加えよく混和し, 4°C, 10,000 rpm (RPR 10-2, 日立), 10 分間冷却遠心した。以下の操作はすべて 4°C で行った。この上清を 30,000  $\times$ g, 30 分間遠心後, 2/3 上清を同条件で再度遠心した。さらに 3/4 上清を 105,000  $\times$ g, 2 時間遠心し, 1/3 上清を S 100 画分, 沈殿をリボソーム画分とした。この S 100 画分は HEPES-A 緩衝液で 1 L  $\times$  3 回, 3 L  $\times$  3 回, さらに一夜透析後 (Cellulose Tubing; 三光純薬), 30,000  $\times$ g で 30 分間遠心し, 液体窒素中に保存した。S. aureus の 105,000  $\times$ g 沈殿は, HEPES-A 緩衝液で約 5 mL に懸濁し, 一夜攪拌後, 30,000  $\times$ g, 30 分間遠心した。この上清を HEPES-B (HEPES-A の NH<sub>4</sub>Cl を 1 M とした) でホモジナイズし, 105,000  $\times$ g, 2 時間遠心し得られた沈殿を HEPES-A 緩衝液約 0.5~1 mL に懸濁, ホモジナイズし, 再び同条件で遠心した。この沈殿を HEPES-A 緩衝液で一夜透析した後, A<sub>260</sub> を測定し, リボソーム画分として, 250 A<sub>260</sub>/1 mL ずつ液体窒素中に保存した。一方, S. pneumoniae の 105,000  $\times$ g 沈殿は HEPES-A 緩衝液約 0.5~1 mL に懸濁, ホモジナイズし, 105,000  $\times$ g, 2 時間遠心した。得られた沈殿を HEPES-A 緩衝液で一夜透析した後, S. aureus と同様に A<sub>260</sub> を測定し, 液体窒素中に保存した。

Poly (A) 依存 polylysine 合成は以下のごとく行った。Energy Mix [1 mM ATP (CALBIOCHEM), 0.05 mM GTP (ヤマサ醤油), 5 mM PEP-K (ペーリンゲインゲルハイム一山之内), 40  $\mu\text{g/mL}$  PEP-kinase (ペーリンゲインゲルハイム一山之内)] を調製し, 各薬物 (S. aureus の場合 TEL, S. pneumoniae の場合 EM および TEL), 塩化アンモニウム (50 mM), 酢酸マグネシウム (S. aureus の場合 16 mM, S. pneumoniae の場合 12 mM), HEPES-K (10 mM, pH 7.6), DTT (0.1 mM) をこの順に加え, あらかじめ調製したりボソーム (2.5 A<sub>260</sub>/100  $\mu\text{L}$ ), poly (A) (62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), S 100 画分 (蛋白質量として 2 mg/mL) を加え全量 90  $\mu\text{L}$  とした。この溶液をあらかじめ 37°C, 5 分間加温し, これに <sup>14</sup>C-lysine を 10  $\mu\text{L}$  加え反応を開始させ, さらに 30 分間 37°C でインキュベートした。この反応液の 80  $\mu\text{L}$  を円形ろ紙 (ワットマン 3 MM, 22 mm) に吸着させ<sup>27)</sup>, 30 秒間風乾させた。このろ紙を 150 mL の 0.25% タングステン酸ナトリウムを含む 5% トリクロロ酢酸溶液 (W-TCA) 中で 0°C, 60 分間放置し試料を固定した<sup>28)</sup>。別の 1 試料あたり 3 mL の W-TCA 液で 0°C, 5 分間放置後, 新たな W-TCA 液で 90°C, 30 分間加熱した。さらに同量の W-TCA 液で室温にて洗浄後, 150 mL のエタノールとエーテルの 1:1 混合液中に浸し, 37°C, 30 分間放置後, 1 試料あたり 3 mL の同混液でさらに洗浄後, エーテル中に 15 分間室温放置, ペーパータオル上で乾燥した。乾燥した円形ろ紙を, トルエンシンチレーター (PPO 4 g, POPOP 0.1 g をトルエン 1 L 中に含む) 約 10 mL とともにバイアル中に入れ液体シンチレーションカウンター (LSC-6100 型, アロカ) で測定した。蛋白質合成 ID<sub>50</sub> の算出は, 抗菌薬を加えない場合における放射活性と抗菌薬添加群におけるそれとの比から阻害度 (%) を求めた。得られた阻害度 (%) のプロビットを求め, 段階希釈濃度-プロビット相関から ID<sub>50</sub> を算出した<sup>23,24)</sup>。

#### 4) 耐性菌由来リボソームとの親和性

<sup>14</sup>C Mac-リボソーム亜粒子複合体のシヨ糖密度勾配遠心は以下のごとく行った。3) で調製したりボソーム (20 A<sub>260</sub> 単位) および <sup>14</sup>C-Mac (S. aureus NCTC 8325 および S. aureus 8325 MMT 7 は TEL のみ, S. pneumoniae HL-3120 は TEL または EM) 約 3,000 pmol/100  $\mu\text{L}$  を HEPES-A (pH 7.6) 中で 37°C, 30 分間反応後, 10 mM Tris-塩酸緩衝液 (0.1 mM 酢酸マグネシウム, 50 mM 塩化アンモニウム含有) で作成した 10~28% シヨ糖密度勾配で 4°C, 20,000 rpm (RPS-28, 日立), 15 時間遠心した<sup>13)</sup>。遠心後 BIO-MINI UV MONITOR (ATTO) を用い A<sub>260</sub> を測定するとともに 0.5~1.5 mL ずつ分取した。その画分の 200  $\mu\text{L}$  (S. aureus) または 250  $\mu\text{L}$  (S. pneumoniae) を放射活性測定用液体シンチレーター ACS II (アマーシャム) 4 mL と混和後, 放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC-6100,

アロカ)で測定した。

## II. 結 果

### 1. ディスク拡散法による耐性誘導能の検討

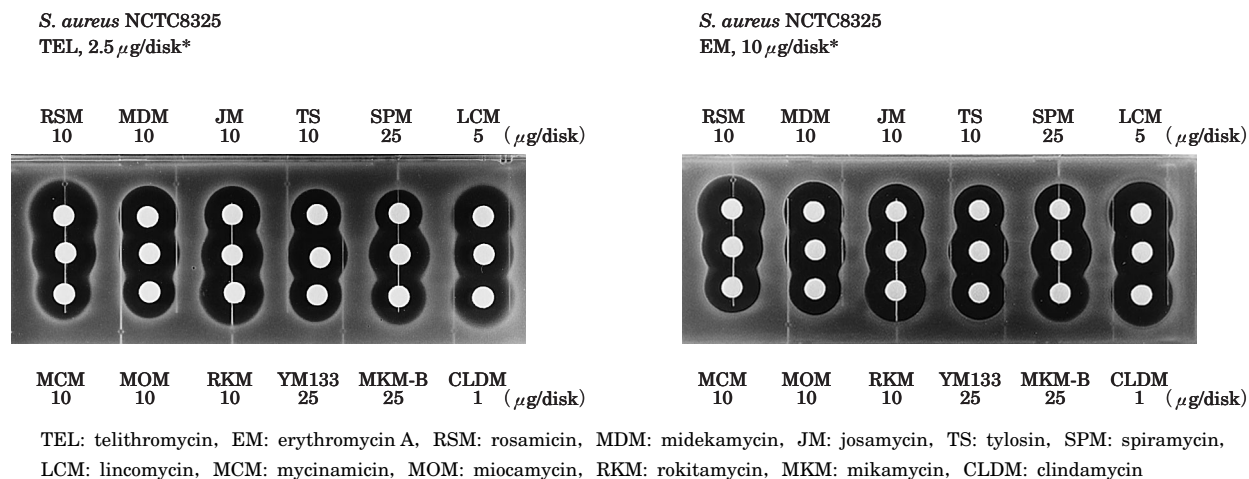
TELはMLS感受性 *S. aureus* NCTC 8325 株に対して、EMと同様にディスク周囲に円形の阻止帯を形成し、抗菌活性を示した (Fig. 1)。Mac誘導型耐性株 *S. aureus* ISP 447 株および *S. aureus* 8325 (pEP 2104) 株のいずれの場合も、TEL含有ディスクにとり合う製剤含有ディスク周囲の発育阻止帯は円形であり、耐性誘導活性をまったく認めなかった。一方、EMは *S. aureus* ISP 447 株において耐性誘導が認められたが、*S. aureus* 8325 (pEP 2104) 株では発育阻止帯は認められなかった (Figs. 2, 3)。一部のMacに構成型耐性を示す *S. aureus* 8325 MMT 7 株の場合、TEL含有ディスクによる発育阻止帯はやや縮小するものの円形であった。これに対しEMによる発育阻止帯は認められなかった (Fig. 4)。

### 2. 50% 発育阻害濃度 (ID<sub>50</sub>) の測定

*S. aureus* NCTC 8325 株に対するTEL, EMおよびRKMの発育阻害効果を Fig. 5 に示した。すなわち、横軸に抗菌薬濃度の対数、縦軸には阻害率から変換したプロビットを示した。各抗菌薬のID<sub>50</sub>はTELが0.024 μg/mLに対し、EMおよびRKMはそれぞれ0.132, 0.127 μg/mLであった。同様に *S. aureus* 8325 MMT 7 に対する上記3抗菌薬の発育阻害効果を Fig. 6 に示した。TEL, EMおよびRKMのID<sub>50</sub>はそれぞれ0.88, 108.91 および1.36 μg/mLであった。TELは感性株 *S. aureus* NCTC 8325 に対してEM, RKMより5.3~5.5倍強い阻害活性を示し、さらに構成型PM耐性 *S. aureus* 8325 MMT 7 株に対してもTELはRKMの1.5倍、EMより124倍強い抗菌活性が認められた。

### 3. 無細胞蛋白合成系におけるTELの影響

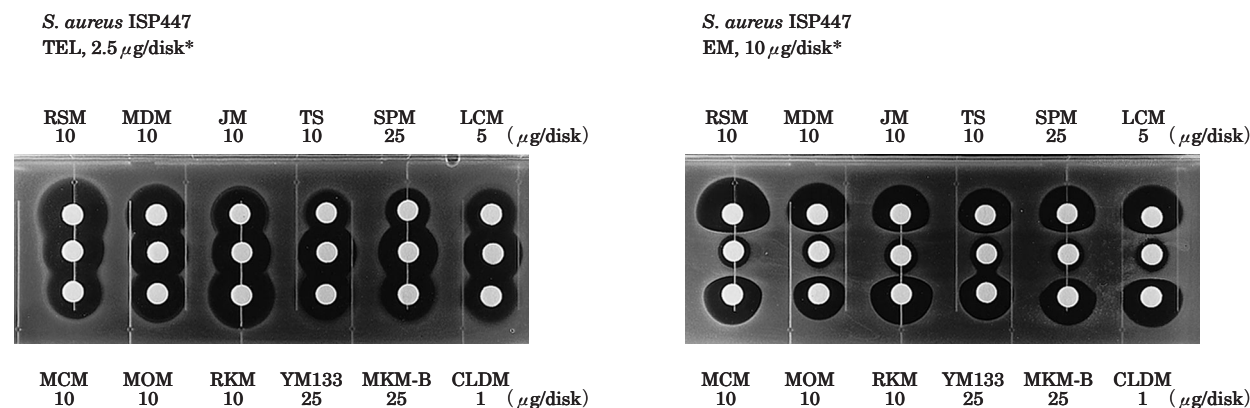
TELのMLS感受性 *S. aureus* NCTC 8325 株に対するID<sub>50</sub>は0.27 μg/mLであり、EMの0.46 μg/mL<sup>29)</sup>に



TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, RSM: rosamicin, MDM: midekamycin, JM: josamycin, TS: tylosin, SPM: spiramycin, LCM: lincomycin, MCM: mycinamicin, MOM: miocamycin, RKM: rokitamycin, MKM: mikamycin, CLDM: clindamycin

\*Disks immersed with drugs were laid onto the central row of seed agar containing a susceptible strain NCTC 8325

Fig. 1. Effects of telithromycin and erythromycin A against *Staphylococcus aureus* NCTC 8325.



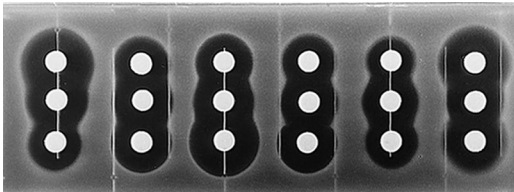
TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, RSM: rosamicin, MDM: midekamycin, JM: josamycin, TS: tylosin, SPM: spiramycin, LCM: lincomycin, MCM: mycinamicin, MOM: miocamycin, RKM: rokitamycin, MKM: mikamycin, CLDM: clindamycin

\*Disks immersed with drugs were laid onto the central row of seed agar containing an EM-inducible resistant strain ISP 447

Fig. 2. Effects of telithromycin and erythromycin A against *Staphylococcus aureus* ISP 447.

*S. aureus* 8325 (pEP2104)  
TEL, 2.5  $\mu\text{g}/\text{disk}^*$

RSM 10 MDM 10 JM 10 TS 10 SPM 25 LCM 5 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )



MCM 10 MOM 10 RKM 10 YM133 25 MKM-B 25 CLDM 1 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )

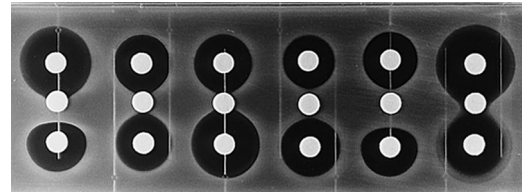
TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, RSM: rosamicin, MDM: midekamycin, JM: josamycin, TS: tylosin, SPM: spiramycin, LCM: lincomycin, MCM: mycinamicin, MOM: miocamycin, RKM: rokitamycin, MKM: mikamycin, CLDM: clindamycin

\*Disks immersed with drugs were laid onto the central row of seed agar containing a resistant strain that harbors plasmid pEP 2104 bearing *msrSA* gene.

Fig. 3. Effects of telithromycin and erythromycin A against *Staphylococcus aureus* 8325 (pEP 2104).

*S. aureus* 8325 (pEP2104)  
EM, 10  $\mu\text{g}/\text{disk}^*$

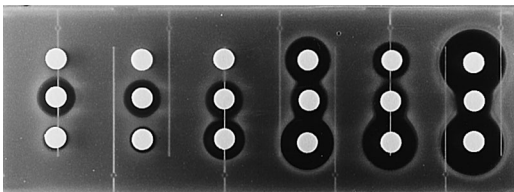
RSM 10 MDM 10 JM 10 TS 10 SPM 25 LCM 5 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )



MCM 10 MOM 10 RKM 10 YM133 25 MKM-B 25 CLDM 1 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )

*S. aureus* 8325MMT7  
TEL, 2.5  $\mu\text{g}/\text{disk}^*$

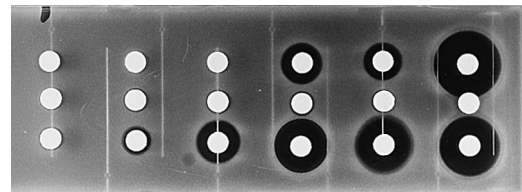
RSM 10 MDM 10 JM 10 TS 10 SPM 25 LCM 5 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )



MCM 10 MOM 10 RKM 10 YM133 25 MKM-B 25 CLDM 1 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )

*S. aureus* 8325MMT7  
EM, 10  $\mu\text{g}/\text{disk}^*$

RSM 10 MDM 10 JM 10 TS 10 SPM 25 LCM 5 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )

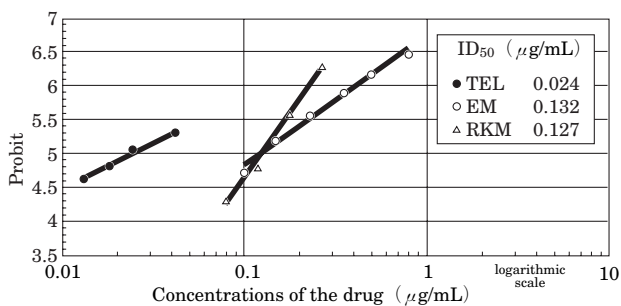


MCM 10 MOM 10 RKM 10 YM133 25 MKM-B 25 CLDM 1 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )

TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, RSM: rosamicin, MDM: midekamycin, JM: josamycin, TS: tylosin, SPM: spiramycin, LCM: lincomycin, MCM: mycinamicin, MOM: miocamycin, RKM: rokitamycin, MKM: mikamycin, CLDM: clindamycin

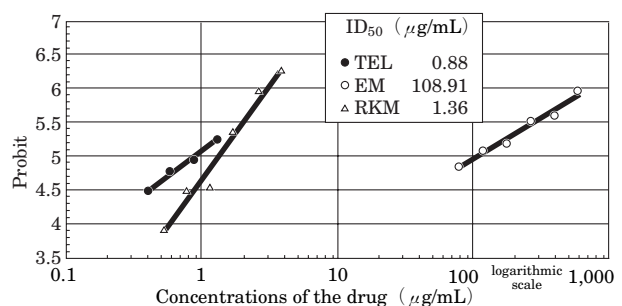
\*Disks immersed with drugs were laid onto the central row of seed agar containing a novel partial-macrolide (PM) resistant strain 8325 MMT 7.

Fig. 4. Effects of telithromycin and erythromycin A against *Staphylococcus aureus* 8325 MMT 7.



TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, RKM: rokitamycin

Fig. 5. Effects of telithromycin on the growth of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325.



TEL: telithromycin, EM: erythromycin A, RKM: rokitamycin

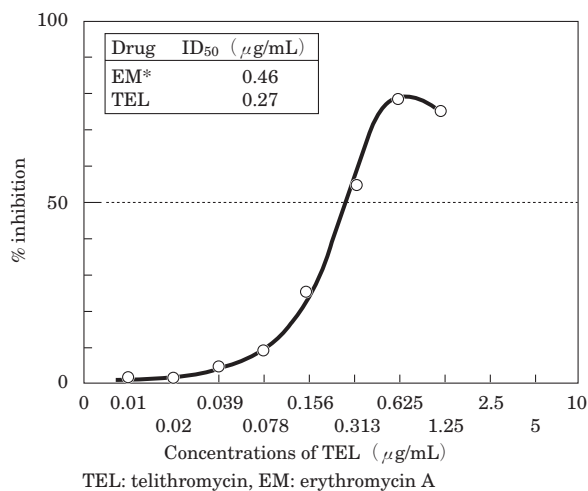
Fig. 6. Effects of telithromycin on the growth of *Staphylococcus aureus* 8325 MMT 7.

比べ約 1.7 倍の阻害を示した (Fig. 7)。Mac 誘導型耐性株 *S. aureus* ISP 447 株において、EM 耐性誘導後のリボソームを用いた場合、polylysine への取り込み活性に対する TEL の阻害は認められなかった (Fig. 8)。しかし、EM 耐性誘導前のリボソームを用いた場合、当該取り込み活性を強く阻害した (Fig. 9)。構成型 PM 耐性を示す *S. aureus* 8325 MMT 7 株の場合、50% 取り

込み阻害濃度が EM では 7.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>29)</sup>であったのに対し、TEL では 1.93  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (推定)であった (Fig. 10)。

TEL は *S. pneumoniae* HL-3120 株由来リボソームを用いた場合、*S. aureus* の場合と同様に低濃度 (ID<sub>50</sub>: 0.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で polylysine への取り込みを阻害したが (Fig. 11), EM の ID<sub>50</sub> は 17.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 12)。一方、あらかじめ EM (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 存在下に 4





\*Proceeding of the 27th Symposium on Microbial Resistance 27~30, 1988

Fig. 7. Effect of telithromycin on poly(A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.

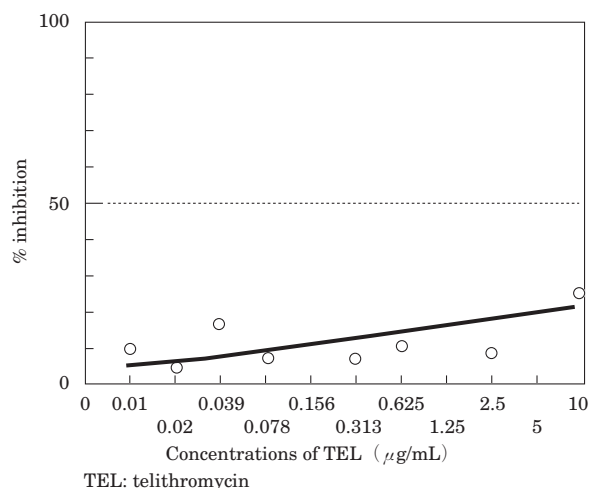
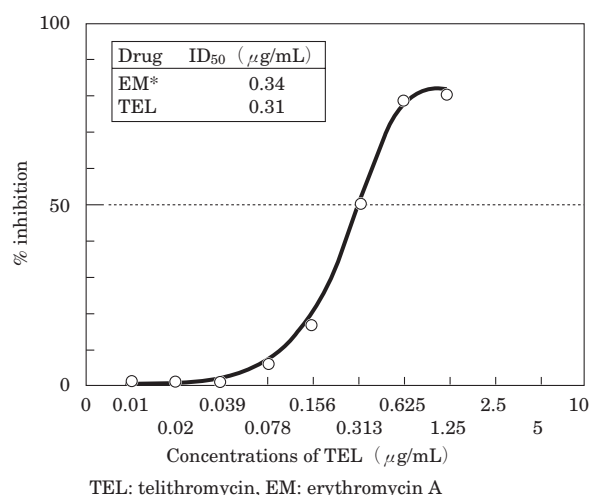


Fig. 8. Effect of telithromycin on poly(A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from erythromycin A-induced *Staphylococcus aureus* ISP 447 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.

時間培養した *S. pneumoniae* HL-3120 由来リボソームを含む polylysine 合成系では TEL の阻害活性は著しく減少した (Fig. 13)。

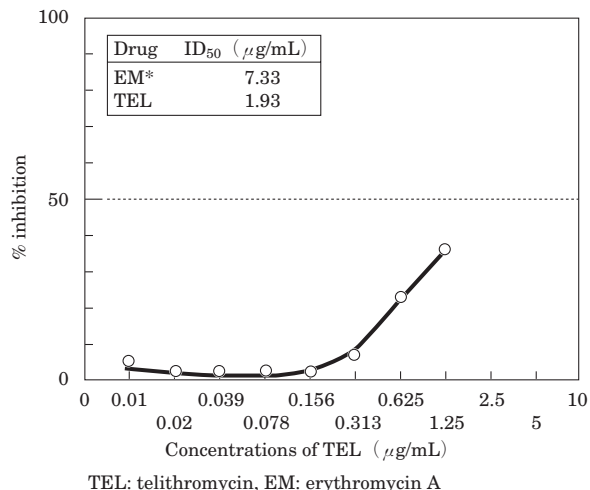
#### 4. 耐性菌由来リボソームとの親和性

低濃度  $Mg^{2+}$  (0.1 mM) 存在下ショ糖密度勾配遠心法で各 *S. aureus* 由来リボソームをサブユニット (30 S と 50 S) に解離させ、 $^{14}C$ -TEL と亜粒子との結合を検討した。*S. aureus* NCTC 8325 株由来 50 S 亜粒子は、 $^{14}C$ -TEL,  $^{14}C$ -RKM<sup>(30)</sup> いずれとも結合した (Fig. 14)。PM 耐性 *S. aureus* 8325 MMT 7 株由来 50 S サブユニットは  $^{14}C$ -EM とほとんど結合しなかったが、 $^{14}C$ -TEL および  $^{14}C$ -RKM<sup>(30,31)</sup> は感性株に比べ、やや弱いものの結



\*Biol. Pharm. Bull. 16 (12) 1288~1290, 1993

Fig. 9. Effect of telithromycin on poly(A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from *Staphylococcus aureus* ISP 447 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.



\*Proceeding of the 27th Symposium on Microbial Resistance 27~30, 1988

Fig. 10. Effect of telithromycin on poly(A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from *Staphylococcus aureus* 8325 MMT 7 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.

合した (Fig. 15)。

*S. pneumoniae* HL-3120 株を (1) EM 存在下および (2) 非存在下の条件で培養した菌体由来 50 S サブユニットは、いずれも  $^{14}C$ -TEL と結合した (Fig. 16 A, B)。しかし、上記条件 (1) で培養した菌体リボソーム (Fig. 16 A) と  $^{14}C$ -TEL の結合量は、条件 (2) で得られたリボソーム (Fig. 16 B) との結合量の約 30% に減少していた。一方、 $^{14}C$ -EM は条件 (1) で培養した菌体由来のリボソーム 50 S サブユニットとはまったく結合しなかったが、条件 (2) で培養した菌体由来 50 S サブユニットとは  $^{14}C$ -TEL の結合量よりは少ないもの

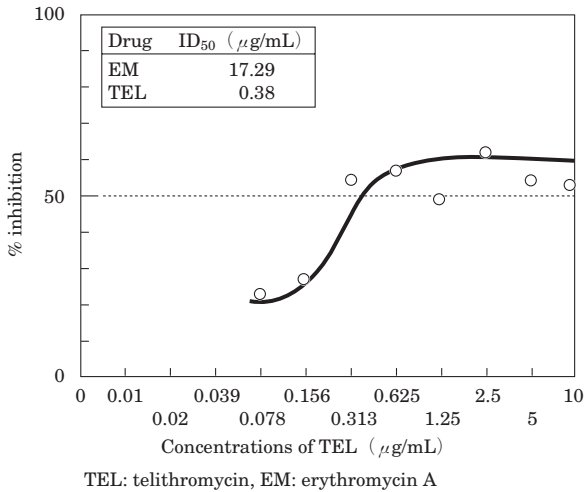


Fig. 11. Effect of telithromycin on poly (A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from *Streptococcus pneumoniae* HL-3120 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.

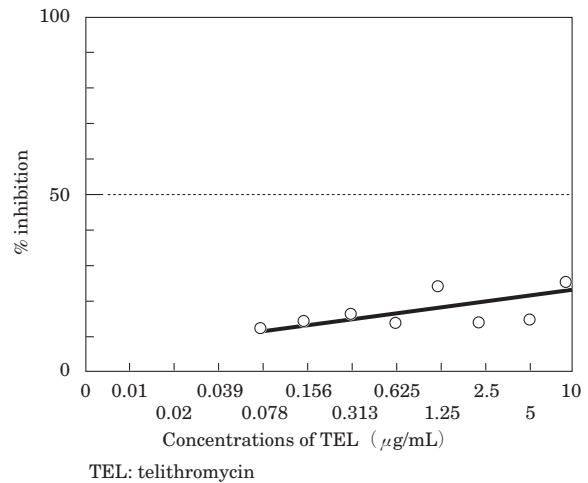


Fig. 13. Effect of telithromycin on poly (A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from erythromycin A-induced *Streptococcus pneumoniae* HL-3120 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.

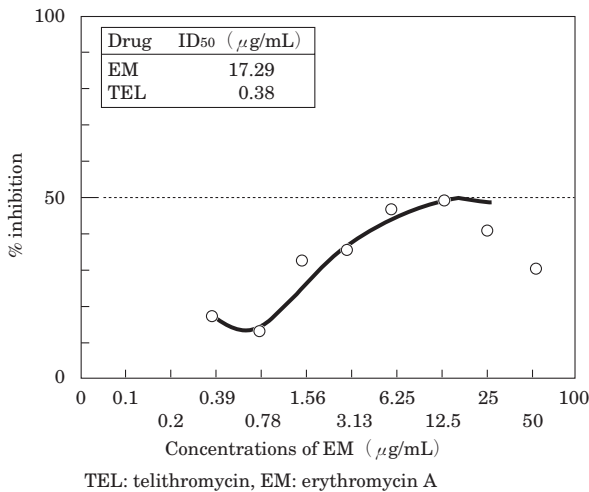
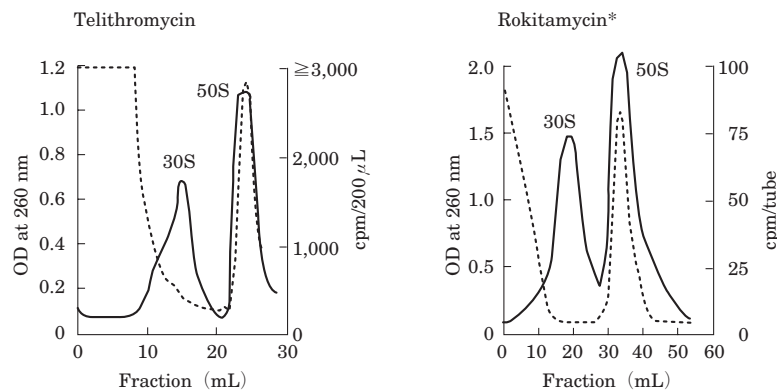


Fig. 12. Effect of erythromycin A on poly (A)-directed polylysine synthesis by cell-free extracts containing ribosomes from *Streptococcus pneumoniae* HL-3120 and S 100 from *Escherichia coli* Q 13.

の結合を示した (Fig. 16 C, D)。

### III. 考 察

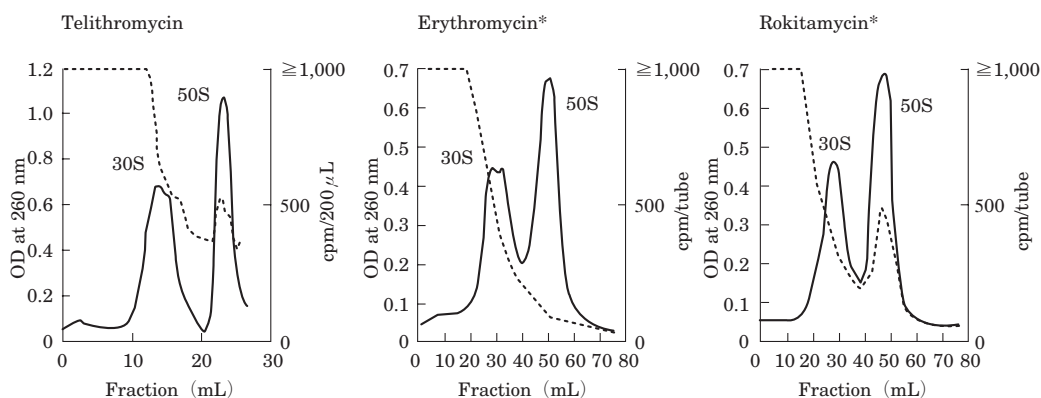
*S. aureus* NCTC 8325 (抗菌薬感受性) 株に対して TEL は EM より 1/4 の濃度で、同程度の発育阻止帯を形成した。このことは感受性 *S. aureus* に対して TEL は EM より高い抗菌活性を有することを示している。これは、発育阻害の ID<sub>50</sub> 値における差 (約 5.7 倍) とほぼ対応していた。*S. aureus* ISP 447 株は染色体上に *erm* (A) 遺伝子を有する典型的な MLS 誘導型耐性株である。また、*S. aureus* 8325 (pEP 2104) 株は抗菌薬排出にもとづくと考えられる *msr* (A) 遺伝子を有するプラスミドを *S. aureus* NCTC 8325 株に形質転換したものである。*S. aureus* ISP 447 株は EM によって MLS 耐性が誘導 (D 型阻止帯形成) されるが、TEL ディスク周囲におかれた他の抗菌薬を含むディスク阻止帯は円形のままであった。*S. aureus* 8325 (pEP 2104)



Dotted and solid lines indicate, respectively, radioactivity of <sup>14</sup>C-TEL, and <sup>14</sup>C-RKM, and absorbance of ribosomal subunits from *S. aureus* NCTC 8325.

\*The Journal of Antibiotics 46 (3) 478~485, 1993

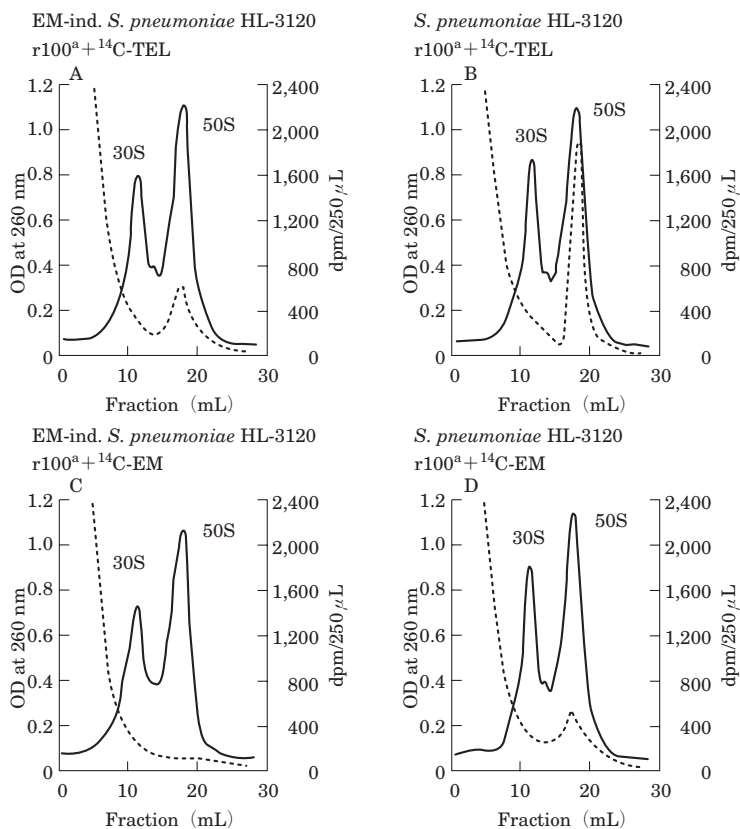
Fig. 14. Binding of radioactive antibiotics to the dissociated ribosomes from *Staphylococcus aureus* NCTC 8325.



Dotted and solid lines indicate, respectively, radioactivity of  $^{14}\text{C}$ -TEL,  $^{14}\text{C}$ -EM, and  $^{14}\text{C}$ -RKM, and absorbance of ribosomal subunits from *S. aureus* 8325 MMT 7.

\*Biol. Pharm. Bull. 16 (3) 328~330, 1993

Fig. 15. Binding of radioactive antibiotics to the dissociated ribosomes from *Staphylococcus aureus* 8325 MMT 7.



TEL: telithromycin, EM: erythromycin A

Dotted and solid lines indicate, respectively, radioactivity of  $^{14}\text{C}$ -TEL,  $^{14}\text{C}$ -EM and absorbance of ribosomal subunits from *S. pneumoniae* HL-3120.

Fig. 16. Binding of radioactive antibiotics to the dissociated ribosomes from *Streptococcus pneumoniae* HL-3120.

株においても同様な結果が得られた。このことは、TELは既知14員環Macとは異なり、*erm* 遺伝子、*msr* 遺伝子を有する誘導型MLS、PM耐性菌に対してそれぞれ耐性誘導能をもたないと考えられるだけでなく、抗菌活性もEMより高いことが明らかになった。*S. aureus* 8325 MMT 7株は一部のMac、すなわち、EM等の14

員環MacおよびSPM, JM, MDM, RSMに構成型(PM)耐性を示す。この菌株に対しTELは円形の発育阻止帯を形成した(Fig. 4)。このことはTELが構成型PM耐性*S. aureus*に対しても感性株にやや劣るものの、EMより高い抗菌活性を有することを示している。以上のことより*S. aureus*に対して、TELは耐性誘導能を有し



ていないこと、および感受性、耐性菌株を問わず EM より強い抗菌活性を有していると考えられた。

*S. aureus* の各菌株由来リボソームを用いた無細胞蛋白質 (polylysine) 合成に対する TEL の阻害活性は、EM よりも強かった。Douthwaite ら<sup>32)</sup>は、フットプリンティング法により、TEL の細菌リボソームへの親和性は、野生株由来 (EM 感受性) 株の細菌リボソームでも、EM よりも約 10 倍強いことを報告している。TEL および EM は、細菌リボソームに結合してペプチド鎖の伸長反応を物理的に抑制することから、細菌リボソームへの親和性が、蛋白合成阻害活性に相関すると考えられる。

*S. pneumoniae* HL-3120 株由来リボソームを用いた場合、TEL の阻害活性は EM に比べ、約 46 倍強かった。また、MLS 耐性 *S. pneumoniae* HL-3120 株にあらかじめ EM (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を触れさせた当該菌株由来リボソームは TEL に耐性を示すようになり、その低感受性プロファイルは、耐性誘導後の *S. aureus* ISP 447 由来リボソームが示すそれとほぼ同じ傾向を示した (未発表資料) (Fig. 16)。このことは *S. pneumoniae* HL-3120 株は誘導型耐性に属する可能性を示している。

しかし EM に暴露前の *S. pneumoniae* HL-3120 株由来リボソームを用いた場合、EM が polylysine 合成系において比較的高い ID<sub>50</sub> (17.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示すことより (Fig. 11)、リボソーム集団の中に構成的に耐性を示すリボソーム (EM 低親和性リボソーム、たとえば 23 S rRNA がメチル化されたりボソーム) が存在する可能性が示唆され、今後さらなる検討を要すると考えられた。

<sup>14</sup>C-TEL は *S. aureus* および *S. pneumoniae* 由来リボソームに結合する場合、いずれも 50 S サブユニットと結合し、30 S サブユニットとは結合せず、従来の Mac と同様な結果であった。しかし TEL は EM 耐性誘導後の *S. pneumoniae* 由来リボソーム 50 S サブユニットに対しても、耐性誘導前に比べ 30% に減少するものの結合した。この結果は、TEL が従来の Mac には見られない 50 S サブユニットに対する結合特異性を有することを強く示唆するものであり、TEL が 50 S サブユニットの 23 S rRNA の domain V に加え domain II にも結合するとの報告<sup>33)</sup>を支持しているのかも知れない。*S. pneumoniae* HL-3120 株由来リボソームは、考察の項で触れたように、当該菌株リボソーム集団のなかにはリボソームの質的变化したもの (低親和性リボソーム) が一部存在することを示唆する。このことが EM の ID<sub>50</sub> が 17.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と TEL の ID<sub>50</sub> 0.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  より約 46 倍も低感受性であることを反映しているものと考えられる (Fig. 11)。他方、EM 誘導、非誘導の *S. pneumoniae* HL-3120 リボソームに対する <sup>14</sup>C-EM および <sup>14</sup>C-EM 結合試験の結果から (Fig. 16)、2つの解釈 (a, b) が考えられる。つまり (a) *S. pneumoniae* HL-3120 株の Mac 耐性が EM により誘導された結果、リボソーム

のさらなる質的变化を遂げたことによる結合量の減少、(b) EM 存在下で培養中に cold EM が 50 S サブユニット上における hot TEL の結合部位の近傍を占め立体的に変化させたことによる結合量の減少である。このどちらかは明らかでないが、後者の仮説に立てば、EM が 50 S サブユニットに結合する以外の部位に TEL は結合する可能性があるのかも知れない。今後の検討が待たれる。

#### 文 献

- 1) Weaver J R, Pattee P A: Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 88: 574~580, 1964
- 2) Kono M, Hashimoto H, Mitsuhashi S: Drug resistance of Staphylococci III. Resistance to some macrolide antibiotics and inducible system. Japan J. Microbiol. 10: 59~66, 1966
- 3) Garrod L P: The erythromycin group of antibiotics. Br. Med. J. 2: 57~63, 1957
- 4) Bryskier A: New research in macrolides and ketolides since 1997. Expert Opinion on Investigational Drugs. 8: 1171~1194, 1999
- 5) Brock T D: Similarity in mode of action of chloramphenicol and erythromycin. Biochim. Biophys. Acta, 33: 274~275, 1959
- 6) Jordan D C: Effect of chalconomycin on protein synthesis by *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol. 9: 129~132, 1963
- 7) Mao J C, Robishaw E E: Effect of macrolides on peptide-bond formation and translocation. Biochemistry. 10: 2054~2061, 1971
- 8) Mao J C-H, Wiegand R G: Mode of action of macrolides. Biochim. Biophys. Acta. 157: 404~413, 1968
- 9) Teraoka H, Tamaki M, Tanaka K: Peptidyl transferase activity of *Escherichia coli* ribosomes having an altered protein component in the 50 S subunit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 328~332, 1970
- 10) Cundliffe E, McQuillen K: Bacterial protein synthesis: The effects of antibiotics. J. Mol. Biol. 30: 137~146, 1967
- 11) Igarashi K, Ishitsuka H, Kaji A: Comparative studies on the mechanism of action of lincomycin, streptomycin, and erythromycin. Biochim. Biophys. Res. Commun. 37: 499~504, 1969
- 12) Cerna J, Rychlik I, Pulkrabek P: The effect of antibiotics on the coded binding of peptidyl-tRNA to the ribosome and on the transfer of the peptidyl residue to puromycin. Eur. J. Biochem. 9: 27~35, 1969
- 13) Mao J C-H: The stoichiometry of erythromycin binding to ribosomal particles of *Staphylococcus aureus*. Biochem. Pharmacology. 16: 2441~2443, 1967
- 14) Tanaka K, Teraoka H, Nagira T, et al.: [<sup>14</sup>C] Erythromycin-ribosome complex formation and non-enzymic binding of aminoacyl-transfer RNA to ribosome-messenger RNA complex. Biochem.

- Biophys. Acta. 123: 435~437, 1966
- 15) Oleinick N L, Corcoran J W: Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic-sensitive and -resistant *Bacillus subtilis* 168. T J. Biol. Chem. 244: 727~735, 1969
  - 16) Nakajima Y, Janosi L, Endou K, et al.: Inducible resistance to a 16-membered macrolide, mycinamicin, in *Staphylococcus aureus* resistant to 14-membered macrolides and streptogramin B antibiotics. J. Pharmacobio-Dyn. 6: 319~324, 1992
  - 17) Kobayashi H, Endou K, Nakajima Y: A quantitative determination of inducibility by 14 membered ring macrolide antibiotics in inducible resistant *Staphylococcus aureus* to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. Yakugaku zasshi. 114: 1015~1020, 1994
  - 18) MIC testing supplemental tables.: NCCLS, January; M 100-S 10 (M 7), 2000
  - 19) Matsuoka M, Endou K, Nakajima Y: Localization of a determinant mediating partial macrolide resistance in *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 34: 643~652, 1990
  - 20) Weisblum B, Demohn V: Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: Survey of antibiotic classes involved. J. Bacteriol. 98: 447~452, 1969
  - 21) Nakajima Y, Abe H, Endou K, et al.: Resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus* susceptible to lincomycin and mikamycin B. J. Antibiot. 37: 675~679, 1984
  - 22) Weisblum B, Siddhikol C, Lai C J, et al.: Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: Requirements for induction. J. Bacteriol. 106: 835~847, 1971
  - 23) Finney D J: Probit analysis. 2nd ed. Cambridge University Press 1952
  - 24) 馬屋原敬民: 生物試験法。p. 159, 講談社, 1977
  - 25) Nakajima Y, Takeda R, Tani K, et al.: Greatly improved activity of staphylococcal ribosomes in polyadenylate directed polylysine synthesis: As an assay system for investigating their sensitivity to macrolide antibiotics. J. Pharmacobio-Dyn. 13: 378~383, 1990
  - 26) Nakajima Y, Tani K, Yamagishi S: Requirement of a large amount of polyuridylylate for efficient polyphenylalanine synthesis by staphylococcal ribosomes. Chem. Pharm. Bull. 32: 762~766, 1984
  - 27) Mans R J, Novelli G D: Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method. Arch. Biochem. Biophys. 94: 48~53, 1961
  - 28) Griffin A C, Ward V, Canning L C, et al.: Effect of precipitating reagent upon amino acid incorporation by in vitro mammalian systems. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15: 519~524, 1964
  - 29) 遠藤菊太郎, 松岡真由美, 中島良徳: Non-MLS型 macrolide系薬剤耐性機構: 耐性 *Staphylococcus aureus* ribosomeの macrolide親和性について。第17回薬剤耐性菌シンポジウム講演記録, 27~30, 1988
  - 30) Endou K, Matsuoka M, Taniguchi H, et al.: Implication of cohesive binding of a macrolide antibiotic, rokitamycin, to ribosomes from *Staphylococcus aureus*. J. Antibiot. 46: 478~485, 1993
  - 31) Endou K, Endoh S, Matsuoka M, et al.: Labile 50 S ribosome from partial macrolide-resistant *Staphylococcus aureus*. Biol. Pharm. Bull. 16: 328~330, 1993
  - 32) Douthwaite S, Hansen L H, Mauvais P: Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23 S rRNA. Mol. Microbiol. 36: 183~193, 2000
  - 33) Hansen L H, Mauvais P, Douthwaite S: The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23 S ribosomal RNA. Mol. Microbiol. 31: 623~631, 1999

## Mode of action of telithromycin at the cellular and subcellular levels of gram-positive bacteria

Yoshinori Nakajima and Kikutaro Endo

Department of Bacteriology, Hokkaido College of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, Japan

The inability to induce resistance in *Staphylococcus aureus*, the 50% inhibitory concentrations ( $ID_{50}$ ) for *S. aureus*, the inhibitory effect on protein synthesis and the affinity for ribosomes from resistant bacteria, of telithromycin (TEL), a novel ketolide antibiotic, were investigated. Macrolide resistance inducibility by TEL was compared with erythromycin A (EM) by disc diffusion method. TEL, unlike EM, did not show any resistance inducibility in macrolide (Mac)-susceptible, inducibly resistant and constitutively partial macrolide (PM) resistant *S. aureus*. TEL exhibited more potent antibacterial activities than EM on both susceptible and resistant strains. Fifty (50)% inhibitory activity ( $ID_{50}$ ) of TEL for *S. aureus* was compared with EM and rokitamycin (RKM). TEL showed 5.3 to 5.5 times more potent inhibitory activity than EM and RKM against Mac-susceptible strains, and 1.5 times stronger inhibitory activity than RKM and 124 times stronger than EM against constitutively EM-resistant strains. The inhibitory effect of TEL on protein synthesis was studied using poly (A)-dependent polylysine synthesis system. TEL strongly inhibited protein synthesis in ribosome derived from susceptible strains and Mac-resistant strains before resistance induction (*erm* (A)-carrying *S. aureus* and *Streptococcus pneumoniae* HL-3120), but did not inhibit protein synthesis in ribosome derived from Mac-resistant strains after resistance induction. As for the affinity of TEL with ribosomes derived from *S. aureus* and *S. pneumoniae*, it bound with 50 S ribosome subunit but not 30 S subunit as well as existing Mac. TEL also bound with ribosome derived from PM-resistant strains, though less potent than that with 50 S ribosome derived from Mac-susceptible *S. aureus*. TEL bound with ribosome derived from susceptible *S. pneumoniae* and inducible-type resistant *S. pneumoniae* to both lincosamide and streptogramin B type antibiotic (MLS). TEL, but not existing 14-membered Macrolides, specifically bound with ribosome 50 S subunit derived from *S. pneumoniae* after resistance induction though weaker than susceptible strains.