

マクロライド系抗生物質 TE-031の *Mycoplasma pneumoniae* に対する 発育阻止作用

洲崎 健・今野多助

東北大学抗酸菌病研究所小児科

Erythromycin(EM)の6位に methoxy 基を導入した新規マクロライド系抗生物質 TE-031の *Mycoplasma pneumoniae* に対する抗菌力を EM, Josamycin(JM)を対照薬として検討した。

1. TE-031の MIC 測定の際の接種菌量による影響を検討するため、当教室保存の *M. pneumoniae* FH 株を用い、10倍段階希釈した菌液を用いて検討した。その結果、 10^{-1} 希釈液では $0.00625 \mu\text{g/ml}$ 、 10^{-5} 希釈液では $0.00312 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し、TE-031の抗マイコプラズマ活性は接種菌量による影響を殆ど受けないことが認められた。

2. 試験管法とマイクロタイター法により TE-031の抗マイコプラズマ活性を測定した結果、両測定法には有意差は認められなかった。そこで本研究においてはマイクロタイター法により感受性測定試験を行った。

3. 当教室保存の *M. pneumoniae* 臨床分離株50株に対する TE-031の MIC を測定した結果、1株が $0.00156 \mu\text{g/ml}$ 、29株が $0.00312 \mu\text{g/ml}$ 、20株が $0.00625 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し、TE-031は当教室でこれ迄に検討してきたマクロライド系抗生剤のなかで最も優れた抗マイコプラズマ活性を示した。

4. 臨床分離の EM 耐性株及び試験管内で耐性を獲得させた各種マクロライド耐性株に対する TE-031の抗マイコプラズマ活性を測定した結果、これら耐性株は TE-031に耐性を示し、TE-031と各種マクロライド系抗生剤の間では交叉耐性が成立する事が認められた。

TE-031は大正製薬株式会社で合成、開発された新規のエリスロマイシン誘導体(6-OCH₃ Erythromycin A)で Fig. 1 に示す化学構造式を有する。著者らは、当教室保存の *M. pneumoniae* の標準株、臨床分離株を用いて TE-031の抗マイコプラズマ活性を他のマクロライド系抗生剤と比較検討したので、ここに報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

TE-031, Erythromycin Base(EM, アボット社)は大正製薬から提供された標準品を、また、Josamycin(JM, 山之内製薬)は市販品から抽出精製したものを使用した。それぞれの薬剤の力価は

TE-031	: 990 $\mu\text{g/mg}$
JM	: 950 $\mu\text{g/mg}$
EM	: 938 $\mu\text{g/mg}$

2. 使用菌株

標準株は *M. pneumoniae* FH 株を、臨床分離株は東北大学抗酸菌病研究所小児科において患者より分離した株を用いた。また、マクロライド耐性臨床分離株¹⁾としては *M. pneumoniae* 佐藤株、入江株を、人工耐性株としては著者ら²⁾が試験管内で耐性を獲得させた試験管内耐性獲得株を用いた。

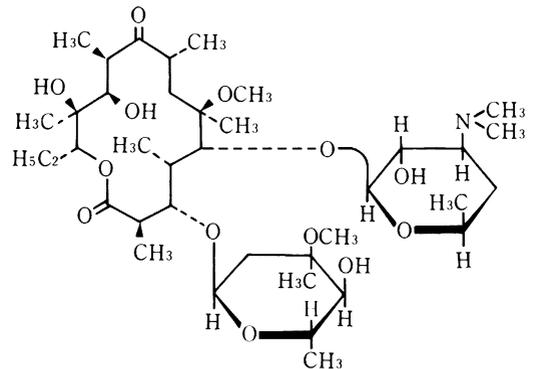
3. 使用培地

ペニシリン無添加のフェノールレッド含有標準マイコプラズマ液体培地(pH 7.6)を使用した²⁾。

4. 薬剤感受性測定法

薬剤は一定量を秤量後、メタノールを加えて溶解し2000 $\mu\text{g/ml}$ とした後、この薬剤溶液を蒸留水で希釈し、液体培地の最終希釈濃度が100 $\mu\text{g/ml}$ から0.00156 $\mu\text{g/ml}$ の2倍希釈液系列となるように調整した。

Fig. 1 Chemical structure of TE-031



1) 試験管法

久保田³⁾の方法に従い、各濃度の薬剤を含有する液体培地 1 ml を小試験管に分注して 2 系列を作り、*M. pneumoniae* 液体培養液 (10^6 cells/ml) 0.1 ml を接種して 37°C で培養した。

MIC 値の測定は、薬剤を含まない対照群が黄変し (pH 6.4)、菌の成育が十分に認められた日に判定し、変色が認められない薬剤濃度をもって MIC 値とした。

2) マイクロタイター法¹⁾

マイクロタイター U プレート (Cook 社製) を用い、各濃度の 2 倍希釈系列の薬剤を含む培地 0.025 ml を well に入れて 3 系列を作り、各 well に 0.15 ml の培地を加えた後、2 系列には *M. pneumoniae* の液体培養液 (10^6 cells/ml) 0.025 ml を、他の 1 系列には液体培地 0.025 ml を加えて対照群とした。プレートはセロファンテープでシールした後 37°C で培養し、判定は試験管法と同様の方法にて行った。

3) 接種菌量による MIC 値への影響

試験管法、マイクロタイター法により接種菌量の MIC 値測定に与える影響を検討した。使用した菌量は、*M. pneumoniae* FH 株の培養液を 10^{-1} ~ 10^{-8} 迄 10 倍希釈した系列を作成して使用した。また、1 ヶ月間培養した後黄変しない薬剤濃度をもって最終発育阻止濃度 (FMIC) とした。

4) 臨床分離株の MIC 値測定

当教室保存の *M. pneumoniae* 50 株を用いて、MIC 値をマイクロタイター法により測定した。

5) TE-031 と他のマクロライド系抗生剤との交叉耐性の検討

EM 投与中に EM 耐性を獲得した臨床分離耐性株の佐藤株、入江株と、著者ら¹⁾が *M. pneumoniae* FH 株を用い

各マクロライド含有培地を用いて人工的に作成した耐性株を用いて、マイクロタイター法により MIC 値を測定して交叉耐性の有無を検討した。

II. 実験結果

1. 接種菌量による MIC 値への影響

試験管法で検討した結果、接種菌量を full growth の 10^{-1} ~ 10^{-3} に希釈した菌液を用いた時は Table 1 に示すように 0.00625 μ g/ml、 10^{-4} ~ 10^{-5} 希釈液では 0.00312 μ g/ml、 10^{-6} ~ 10^{-7} 希釈液では \leq 0.00156 μ g/ml であった。

マイクロタイター法では 10^{-1} ~ 10^{-2} 希釈液で 0.00625 μ g/ml、 10^{-3} ~ 10^{-6} 希釈液では 0.00625~0.00312 μ g/ml であり、 10^{-7} では発育は認められなかった。

これらの結果は、TE-031 の MIC 値測定において接種菌量による影響が殆ど認められない事を示しており、また、試験管法とマイクロタイター法においても顕著な測定値の差が認められない事を示していた。FMIC 値においても MIC 値測定の際と同様、接種菌量による顕著な差は認められなかった。

2. 臨床分離株の MIC 値

Fig. 2 に示すように、TE-031 の臨床分離 50 株に対する MIC 値は 1 株 (2%) が \leq 0.00156 μ g/ml、29 株 (58%) が 0.00312 μ g/ml、20 株 (40%) が 0.00625 μ g/ml であった。

EM では 1 株 (2%) が 0.00312 μ g/ml、26 株 (52%) が 0.00625 μ g/ml、23 株 (46%) が 0.0125 μ g/ml であった。

JM では 38 株 (76%) が 0.00625 μ g/ml、12 株 (24%) が 0.0125 μ g/ml であった。これらの結果から、TE-031 は他の 2 薬剤に比べて優れた抗マイコプラズマ活性を有している事を示した。

Table 1 Comparison of MIC of TE-031 between test tube and microtiter method

FH strain Inoculum size	Test tube method			Microtiter method		
	MIC (μ g/ml)	Incubation days before reading	FMIC (μ g/ml)	MIC (μ g/ml)	Incubation days before reading	FMIC (μ g/ml)
10^{-1}	0.00625	5	0.0125	0.00625	8	0.00625
10^{-2}	0.00625	7	0.0125	0.00625	8	0.00625
10^{-3}	0.00625	8	0.0125	0.00312	9	0.00625
10^{-4}	0.00312	9	0.00625	0.00312	10	0.00625
10^{-5}	0.00312	12	0.00625	0.00625	10	0.00625
10^{-6}	0.00156	14	0.00625	0.00312	14	0.00312
10^{-7}	<0.00156	14	<0.00156	—	—	—
10^{-8}	—	—	—	—	—	—

3. EM 耐性臨床分離株に対する TE-031 の MIC 値

Table 2 に示すように、*M. pneumoniae* 佐藤株に対する TE-031 の MIC 値は 200 $\mu\text{g/ml}$ 、入江株に対する TE-031 の MIC 値は 100 $\mu\text{g/ml}$ であり、TE-031 は EM と交叉耐性を示す事が認められた。

4. 試験管内マクロライド耐性獲得株に対する TE-031 の MIC 値

マクロライド系抗生剤を用いて試験管内で耐性を獲得させた *M. pneumoniae* に対する TE-031 の MIC 値は Table 3 に示すように、原株の *M. pneumoniae* FH 株に対

Fig. 2 MIC of TE-031, EM base, and JM against 50 isolates of *M. pneumoniae*

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	TE-031	EM base	JM
0.00156	1 (2%)	0	0
0.00312	29 (58%)	1 (2%)	0
0.00625	20 (40%)	26 (52%)	38 (76%)
0.0125	0	23 (46%)	12 (24%)
0.025	0	0	0

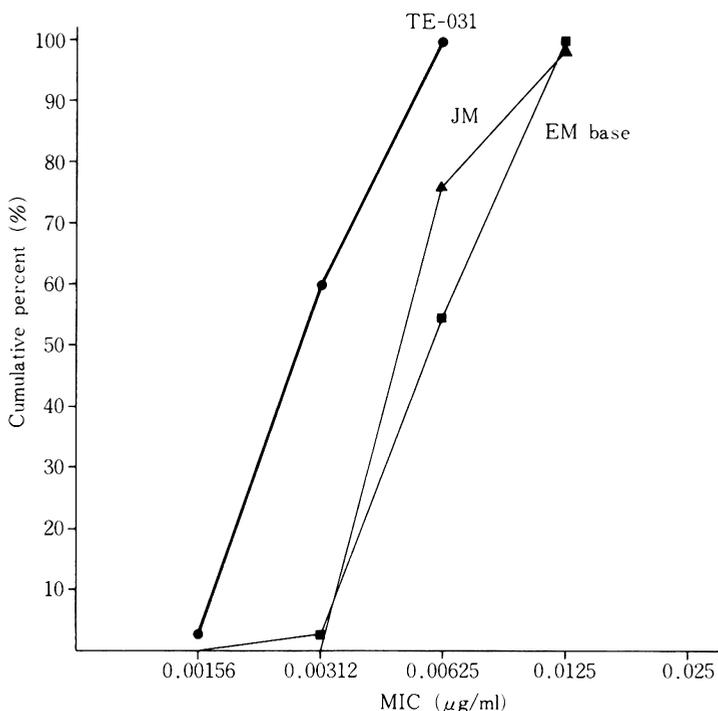


Table 2 Susceptibility of EM-resistant strains of *M. pneumoniae* to TE-031

Strain	TE-031	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FMIC ($\mu\text{g/ml}$)
SATO	200	400
IRIE	100	200

Table 3 Cross-resistance to TE-031 in *M. pneumoniae* FH strains resistant to macrolides and analogous antibiotics

Strain	Erythro- mycin	TE-031	Oleando- mycin	Mideca- mycin	Acetyl- spiramycin	Kitasa- mycin	Rokitamycin	Josamycin	Tylosin	Linco- mycin	Clinda- mycin	Verna- mycin B.	Verna- mycin A
Parent strain	0.00625	0.00625	0.1	0.05	0.05	0.05	0.00625	0.025	0.025	6.25	0.78	50	0.4
Erythromycin-resistant	800 (128,000)	200	1,600 (16,000)	6.25 (128)	1.56 (32)	3.125 (64)	0.2 (32)	3.125 (128)	1.56 (64)	400 (64)	200 (256)	50 (1)	0.4 (1)
Oleandomycin-resistant	200 (32,000)	50	400 (4,000)	200 (4,000)	200 (4,000)	200 (4,000)	12.5 (2,000)	100 (4,000)	12.5 (500)	12.5 (2)	3.125 (4)	6.25 (0.125)	0.2 (0.5)
Midecamycin-resistant	0.025 (4)	0.0125	0.39 (4)	200 (4,000)	12.5 (256)	25 (500)	1.56 (250)	6.25 (250)	1.56 (64)	1.56 (0.25)	0.78 (1)	200 (4)	0.4 (1)
Acetylspiramycin-resistant	0.05 (8)	0.2	0.78 (8)	200 (4,000)	50 (1,000)	50 (1,000)	6.25 (1,000)	25 (1,000)	0.78 (32)	3.125 (0.5)	0.39 (0.5)	200 (4)	0.2 (0.5)
Kitasamycin-resistant	0.05 (8)	0.2	0.78 (8)	200 (4,000)	50 (1,000)	100 (2,000)	6.25 (1,000)	12.5 (500)	1.56 (64)	3.125 (0.5)	0.78 (1)	400 (8)	0.8 (2)
Josamycin-resistant	0.78 (125)	3.125	400 (4,000)	1,600 (32,000)	800 (16,000)	400 (8,000)	50 (8,000)	400 (16,000)	12.5 (500)	25 (4)	3.125 (4)	200 (4)	0.8 (2)
Tylosin-resistant* (MIC : 6.4 µg/ml)	400 (64,000)	≥400	1,600 (16,000)	1.56 (32)	0.78 (16)	3.125 (64)	0.2 (32)	1.56 (64)	3.125 (128)	50 (8)	100 (128)	50 (1)	0.2 (0.5)
Tylosin-resistant* (MIC : 1,600 µg/ml)	800 (128,000)		1,600 (16,000)	400 (8,000)	800 (16,000)	400 (8,000)	200 (32,000)	400 (16,000)	1,600 (64,000)	100 (16)	50 (64)	200 (4)	0.4 (1)
Lincomycin-resistant	400 (64,000)	≥400	1,600 (16,000)	1.56 (32)	0.78 (16)	3.125 (64)	0.2 (32)	3.125 (128)	1.56 (64)	100 (16)	25 (32)	50 (1)	0.4 (1)
Clindamycin-resistant	400 (64,000)	400	800 (8,000)	3.125 (64)	1.56 (32)	6.25 (128)	0.2 (32)	1.56 (64)	1.56 (64)	100 (16)	100 (128)	50 (1)	0.4 (1)

() : MIC ratio

* MIC determined by test tube method

して0.0625 $\mu\text{g/ml}$ であったが、EM 耐性株では200 $\mu\text{g/ml}$ 、Oleandomycin(OL)耐性株では50 $\mu\text{g/ml}$ 、Midecamycin(MDM)耐性株では0.0125 $\mu\text{g/ml}$ 、Acetylspiramycin(Ac SPM)耐性株では0.20 $\mu\text{g/ml}$ 、Kitasamycin(LM)耐性株では0.20 $\mu\text{g/ml}$ 、JM 耐性株では3.125 $\mu\text{g/ml}$ 、Tylosin(TS)耐性株では400 $\mu\text{g/ml}$ 以上、Lincomycin(LCM)耐性株では400 $\mu\text{g/ml}$ 以上、Clindamycin(CLDM)耐性株では400 $\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示した。

これらの結果は、TE-031が各種マクロライドと交叉耐性を有する事を示した。

Ⅲ. 考 察

Mycoplasma pneumoniae は上気道炎や肺炎の重要な原因菌であるが、細胞壁を欠くため、抗菌剤のなかで広く用いられている細菌の細胞壁合成阻害剤であるペニシリン系、セフェム系抗菌剤ではその増殖は阻止されない。一方、蛋白合成阻害剤であるマクロライド系、テトラサイクリン系抗菌剤は *M. pneumoniae* の増殖を阻止し、マイコプラズマ感染症の第一選択剤として用いられている。

われわれは、大正製薬が開発した新マクロライド系抗菌剤 TE-031について、*M. pneumoniae* に対する抗菌活性を検討した。

久保田ら³⁾は、*M. pneumoniae* に対する抗生物質のMICは、接種菌量により差のある抗生物質と著明な差のない抗生物質があること、MICとFMICの間にも差のある抗生物質と著明な差のない抗生物質があることを報告している。今回の検討では、TE-031のMICは接種菌量により著明な差は認められず、FMICとの間にも差は認められなかった。

著者ら⁴⁾は *M. pneumoniae* のマクロライド系抗菌剤に対する感受性の測定にマイクロタイター法が有用であることを報告したが、TE-031の測定においても、マイクロタイター法は試験管法と同様の成績が得られ、マイクロタイター法が簡便で有用な方法であることを認めた。

著者ら⁵⁾は先に、*M. pneumoniae* の各種抗菌剤に対する感受性をMac株について測定し、各抗菌剤のMICはEM、MDM、JM、LMが0.01 $\mu\text{g/ml}$ オーダーのMICを、Minocycline(MINO)、OL、Tetracycline(TC)、Spiramycin(SPM)が0.10 $\mu\text{g/ml}$ オーダーのMICを、LCM、Chloramphenicol(CP)が1 $\mu\text{g/ml}$ オーダーのMICを示すことを報告した。今回使用した標準株はFH株であったが、FH株もMac株と同様のMICを示した。TE-031の各種接種菌量のFH株に対するMICは0.00312~0.00625 $\mu\text{g/ml}$ であり、従来のマクロライド系のなかで最も優れた抗マイコプラズマ活性を示したEMより、更に優れた活性を有することが認められた。これらの結果は臨床分離株においても同様であり、TE-031がマイコプラズマに起因する疾患に対して有用な抗菌剤となることが期待できよう。

マクロライド耐性 *M. pneumoniae* は、マクロライド系およびリンコマイシン系薬剤に交叉耐性を示すことが報告されている。そこで、TE-031がこれらマクロライド耐性株に対しても交叉耐性を示すか否かを検討したが、EM耐性臨床分離株、および著者ら⁴⁾が試験管内で作成した各マクロライド耐性株に対しても、他のマクロライド系抗菌剤同様TE-031は交叉耐性を示すことが認められた。

文 献

- 1) SUZAKI, K. : Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide and analogous antibiotics. Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. [Med] 26(3~4) : 71~91, Dec, 1979
- 2) 新津泰孝: 肺炎マイコプラズマ(甲野, 石田, 沼崎編)。臨床ウイルス学, 手技編, 講談社サイエンティフィック, p 298, 1978
- 3) 久保田秀雄: *Mycoplasma pneumoniae* の試験管内抗生物質感受性, 1継代株および152株の分離株の感受性。抗研誌 25 : 1, 1973
- 4) 新津泰孝, 長谷川純男, 久保田秀雄, 小松茂夫, 堀川雅浩, 末武富子: 小児の *Mycoplasma pneumoniae* 感染をめぐって。抗菌誌 26 : 1, 1974
- 5) 新津泰孝, 長谷川純男, 洲崎健, 堀川雅浩, 小松茂夫, 末武富子, 寺沢政彦, 長山英男: 肺炎マイコプラズマの抗生物質耐性。最新医学, 34 : 2595, 1979

GROWTH INHIBITORY EFFECT OF A NEW MACROLIDE ANTIBIOTIC,
TE-031(A-56268), AGAINST *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

KEN SUZAKI and TASUKE KONNO

Department of Pediatrics, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Miyagi

We examined the antibacterial activity of a new macrolide antibiotic, TE-031(A-56268), produced by introducing a methoxy group at the 6-position of the ring in erythromycin(EM), against *Mycoplasma pneumoniae*, using EM and josamycin(JM)as controls.

1. The effect of the inoculum size on the MIC of TE-031 was examined, using serial 10-fold dilutions of *M. pneumoniae* FH strain, which had been stored in our laboratory. The MIC of TE-031 against the 10^{-1} dilution was $0.00625 \mu\text{g/ml}$ and that against the 10^{-5} dilution was $0.00312 \mu\text{g/ml}$, showing that the anti-mycoplasma activity of TE-031 was little affected by the inoculum size.

2. The anti-mycoplasma activity of TE-031 was measured by test tube and microtiter methods and showed no significant difference. Then the microtiter method was used in a sensitivity study.

3. The MICs of TE-031 against 50 strains of *M. pneumoniae* isolated clinically and stored in our laboratory were $0.00156 \mu\text{g/ml}$ against 1 strain, $0.00312 \mu\text{g/ml}$ against 29 strains and $0.00625 \mu\text{g/ml}$ against 20 strains. The anti-mycoplasma activity of TE-031 was the most effective of the macrolide antibiotics examined in laboratory.

4. The anti-mycoplasma activity of TE-031 against clinically isolated EM-resistant strains and strains which gained resistance *in vitro* to various macrolides was measured. These resistant strains showed resistance to TE-031, that is, cross-resistance existed between TE-031 and various macrolide antibiotics.