

マクロライド系抗生物質 TE-031の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用

西野武志・石田信生・大槻雅子・谷野輝雄
京都薬科大学微生物学教室

TE-031の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について Erythromycin(EM), Josamycin(JM), Rokitamycin(RKM)を比較薬として検討し、以下の結果を得た。

TE-031はEM, JM, RKMと同様、グラム陽性菌に対して抗菌スペクトルを有し、その抗菌力はEMとほぼ同じであった。臨床分離の *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *B. catarrhalis*, *A. calcoaceticus* に対する感受性分布では、TE-031のピーク値はそれぞれ ≤ 0.025 , ≤ 0.025 , 3.13, ≤ 0.025 , 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、グラム陰性菌の *H. influenzae* や *B. catarrhalis* にも良好な抗菌力を示した。

抗菌力におよぼす諸因子の影響では、アルカリ側のpHで、また血清の添加により抗菌力が良好となった。一方、接種菌量の増加により、抗菌力が若干低下した。

S. aureus および *B. catarrhalis* の増殖曲線におよぼす影響では、*S. aureus* では静菌的な作用が、また *B. catarrhalis* では殺菌的な作用が見られた。透過型電子顕微鏡により形態変化を観察したところ、*S. aureus* ではTE-031の作用により細胞壁の顕著な膨隆像が観察された。

EM感受性の *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* を用いたマウス実験の腹腔内感染症に対する治療効果では、TE-031は *in vitro* 抗菌力が同じEMに比べて5~7倍優れた治療効果を示し、JM, RKMよりも優れていた。また *S. aureus* を用いたマウス実験的皮下膿瘍感染症に対しても、TE-031はEMよりも優れた治療効果を示した。

マウスにおける血清中濃度を検討したところ、TE-031はEMに比べて数倍高くても持続性の良好な血中濃度の推移を示した。このことがTE-031の優れた *in vivo* 効果に反映されたものと思われる。

TE-031は大正製薬株式会社で Erythromycin(EM)より合成された新しいマクロライド系抗生物質である。TE-031はEMの6位の側鎖-OH基を-OCH₃で置換したものであり、その化学名を(-)-(3R,4S,5S,6R,7R,9R,11R,12R,13S,14R)-4-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-14-ethyl-12,13-dihydroxy-7-methoxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]oxacyclotetradecane-2,10-dione といひ、その分子式はC₃₈H₆₉NO₁₃である。その化学構造式をFig. 1に示した。本物質はクロロホルムに溶けやすく、アセトン、酢酸エチルにやや溶けやすく、エーテル、エタノール、メタノールに溶けにくく、水にほとんど溶けない。その抗菌力は、EMとほぼ同等であるが、*in vivo* ではEMに比べて数倍優れた治療効果を示すことが報告されている^{1,2)}。また *C. trachomatis* や *L. pneumophila* に対しても良好な抗菌力を示す^{3,4)}。

今回、私どもはTE-031の教室保存の標準株と臨床分離株に対する抗菌力、殺菌作用、抗菌力におよぼす諸因子の影響、電子顕微鏡による形態観察およびマウス実験的感染症に対する治療効果を、比較薬としてEM, JM,

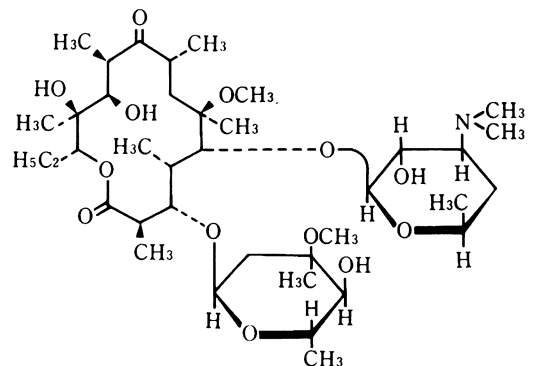
RKM⁵⁾を用いて検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株および使用薬

使用した菌株は教室保存の標準株であるグラム陽性菌19株、グラム陰性菌14株および臨床分離(1982~1985年)の *Staphylococcus aureus* 90株、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) 50株、*Streptococcus pyogenes* 36株、*Branhamella*

Fig. 1 Chemical structure of TE-031



catarrhalis 11株, *Haemophilus influenzae* 38株, *Acinetobacter calcoaceticus* 43株である。

TE-031は大正製薬株式会社より提供されたものを使用した。Rokitamycin(RKM), Erythromycin(EM)およびJosamycin(JM)はいずれも力価の明らかな標品を用いた。

2. 感受性測定法

前培養に trypto-soya broth(TSB, ニッスイ), 測定用培地に heart infusion agar(HIA, ニッスイ)を用い, 日本化学療法学会感受性測定法⁶⁾に準じて行った。なお *Streptococcus* 属, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis* には10%馬脱繊維血液, *Haemophilus influenzae* には5% bacto fildes enrichment(Difco)を含有する上記培地を用いた。

3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

試験菌として *S. aureus* 5株, *S. epidermidis* 1株を用いて, 抗菌力におよぼす培地 pH, 馬血清添加, 接種菌量の影響を HIA による寒天平板希釈法により各薬剤の MIC 値を求め比較した。

4. 増殖曲線におよぼす影響

TSB で前培養した *S. aureus* 209P-JC, *S. aureus* SMITH

および *B. catarrhalis* No.5の菌液を heart infusion broth (HIB, ニッスイ)で希釈後振盪培養を行い, 対数期途中で種々の濃度の薬剤を作用させ, 以後経時的に生菌数の測定を行った。

5. 透過型電子顕微鏡による観察法

HIB に *S. aureus* 209P-JC を培養し, 培養約3時間後の対数期途上に各薬剤を作用させ, 経時的に試料を取り出した。2.5%グルタルアルデヒドで前固定し, 1%OSO₄で固定後, アルコール系列で脱水を行い, LUFTの方法⁷⁾によりエポキシ樹脂に包埋した。これを LKB ultramicrotome を用いて切片を作製し, 酢酸ウラニール, クエン酸鉛で二重染色を行った後, 透過型電子顕微鏡(JEOL, 1200EX)で観察した。

6. マウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果

S. aureus SMITH の場合は nutrient broth(NB, ニッスイ)で37℃18時間培養後, 同培地で希釈し, *Streptococcus pneumoniae* III および *Streptococcus pyogenes* C-203の場合には10%馬血清添加 HIB で37℃18時間培養後, 0.9%生理食塩水で希釈した。これらの菌液を6% Gastric mucin(Orthana-Kemisk Fabrik-A/S)と等量混合し, そ

Table 1 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria

| Organism | Inoculum size : 10 ⁸ cells/ml | | | |
|---------------------------------------|--|--------|------|--------|
| | MIC (μg/ml) | | | |
| | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P-JC | 0.20 | 0.39 | 0.39 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SMITH | 0.20 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> E-46 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> No.50774 | 0.39 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0.39 | 0.78 | 3.13 | 1.56 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> S-23 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.20 | 0.10 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> COOK | ≤0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> C-203 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.20 | 0.05 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 0.05 | 0.05 | 1.56 | 0.78 |
| Viridans group <i>Streptococcus</i> | 0.05 | 0.05 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> I | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | 0.05 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> II | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.20 | 0.10 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> III | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | ≤0.025 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | ≤0.025 |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.05 | 0.05 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 0.10 | 0.10 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0.20 | 0.78 | 0.78 | 0.39 |

Medium : HIA

の0.5 ml をマウス腹腔内へ接種した。接種2時間後に1回、経口投与により治療を行い、7日間生死の観察を行った。ED₅₀値は感染後7日目までの生存率から、LITCHFIELD-WILCOXON法⁸⁾により求めた。なおStd: ddY系雄性マウス(体重18~20g)を1群10匹として使用した。

7. マウス実験的皮下膿瘍に対する治療効果

Std: ddY系雄性、体重18~20gのマウスを1群5匹として使用した。感染菌株は*S. aureus* BBを用いHIAに18時間培養したものより菌液を調整した。この0.1 mlを背部皮下に接種し(3.4×10⁶ cfu/mouse および2.9×10⁷ cfu/mouse)、感染2時間後および直後に1回各薬剤をCMCに懸濁して経口投与した。感染48時間後に背部皮膚を静かにはがし、膿瘍の長径と短径を測定し、その和の1/2を膿瘍径とした⁹⁾。

8. マウス血中濃度の測定法

1群5匹のStd: ddY系雄性マウス(体重18g)に各薬剤の100 mg/kgを経口投与し、投与後7.5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間そして6時間目にそれぞれ血清を採取した。

薬剤濃度は*Micrococcus luteus* ATCC 9341を被検菌とした薄層ペーパーディスク法により測定した。

II. 実験結果

1. 抗菌スペクトル

教室保存の各種グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対するTE-031のMICをEM, JM, RKMを比較薬として検討し、その結果をTable 1~4に示した。TE-031はEM, JM, RKMなどの他のマクロライド系抗生物質と同様、主としてグラム陽性菌に対して抗菌スペクトルを有しており、グラム陰性菌に対する抗菌力は弱かった。

S. aureus, *S. epidermidis* および⁸⁾*Streptococcus* 群に対するTE-031の抗菌力はJMやRKMより優れており、EMと全く同様のMIC値であった。

2. 臨床分離株に対する感受性分布

臨床材料から分離された*S. aureus* 90株, MRSA 50株, *S. pyogenes* 36株, *B. catarrhalis* 11株, *H. influenzae* 38株 および*A. calcoaceticus* 43株に対するTE-031, EM, JM, RKMの感受性分布および累積百分率をFig. 2~6に示

Table 2 Antibacterial spectrum of gram-positive bacteria

| Organism | Inoculum size : 10 ⁶ cells/ml | | | |
|---------------------------------------|--|--------|--------|--------|
| | MIC (μg/ml) | | | |
| | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P-JC | 0.10 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SMITH | 0.10 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> E-46 | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> No.50774 | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0.20 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> S-23 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | 0.05 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> Cook | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | 0.05 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> C-203 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | 0.05 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ≤0.025 | 0.05 | 1.56 | 0.78 |
| Viridans group <i>Streptococcus</i> | ≤0.025 | 0.05 | 1.56 | 0.78 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> I | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.05 | ≤0.025 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> II | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.20 | 0.10 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> III | ≤0.025 | ≤0.025 | ≤0.025 | ≤0.025 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.10 | ≤0.025 |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 | ≤0.025 | ≤0.025 | ≤0.025 | ≤0.025 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 0.05 | 0.10 | 0.39 | 0.39 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0.10 | 0.39 | 0.39 | 0.39 |

Medium HIA

Table 3 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria

| Organism | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|--|--------------------------|------|------|------|
| | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>Escherichia coli</i> NIH JC-2 | 100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 | 100 | 100 | >100 | >100 |
| <i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68 | 50 | 50 | >100 | 100 |
| <i>Salmonella typhi</i> T-287 | 50 | 50 | >100 | 100 |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a-EW-10 | >100 | >100 | >100 | 50 |
| <i>Shigella sonnei</i> EW-33 | 25 | 25 | >100 | 50 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632 | 25 | 12.5 | >100 | 50 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Serratia marcescens</i> IFO 3736 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Proteus mirabilis</i> 1287 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Proteus vulgaris</i> OX-19 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Providencia inconstans</i> NIH 118 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Morganella morganii</i> KONO | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1 | >100 | >100 | >100 | >100 |

Medium : HIA

Table 4 Antibacterial spectrum of gram-negative bacteria

| Organism | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|--|--------------------------|------|------|------|
| | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>Escherichia coli</i> NIH JC-2 | 50 | 50 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 | 50 | 25 | >100 | 100 |
| <i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68 | 50 | 25 | >100 | 100 |
| <i>Salmonella typhi</i> T-287 | 25 | 25 | >100 | 100 |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a-EW-10 | 50 | >100 | >100 | 50 |
| <i>Shigella sonnei</i> EW-33 | 6.25 | 12.5 | 100 | 25 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632 | 3.13 | 6.25 | 100 | 50 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394 | 100 | 100 | >100 | >100 |
| <i>Serratia marcescens</i> IFO 3736 | 100 | 100 | >100 | >100 |
| <i>Proteus mirabilis</i> 1287 | 100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Proteus vulgaris</i> OX-19 | 100 | >100 | >100 | 100 |
| <i>Providencia inconstans</i> NIH 118 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Morganella morganii</i> KONO | 100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1 | 100 | >100 | >100 | 100 |

Medium : HIA

した。

1) *S. aureus* の場合

Fig. 2 に示したように、*S. aureus* に対して TE-031 のピーク値は $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ であり、JM, RKM は $0.20 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$, EM は $0.05 \mu\text{g/ml}$ であった。TE-031 の抗菌力は JM や RKM よりも優れていたが、 $>100 \mu\text{g/ml}$ 以上の TE-031 耐性株が 10 株認められ、これらの株は EM と交差耐性を示した。一方、RKM はこれらの耐性株に対して 3 株のみが $>100 \mu\text{g/ml}$ 以上であったが、他は感受性であった。また表には示さなかったが、MRSA 50 株に対して TE-031 は EM と同様すべて耐性であった。しかし、RKM はこれらの株に対しても一部感受性を示した。

2) *S. pyogenes* の場合

S. pyogenes に対する TE-031 のピーク値は Fig. 3 に示したように、 $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ であり、EM は $0.05 \mu\text{g/ml}$, JM は $0.20 \mu\text{g/ml}$, RKM は $0.05 \mu\text{g/ml}$ であり、TE-031 の抗菌力は JM より明らかに優れており、EM や RKM よりもやや優れていた。しかし、 $>100 \mu\text{g/ml}$ の TE-031 耐性株が 8 株存在し、*S. aureus* の場合と同様 EM と交差耐性を示したが、RKM はすべて $100 \mu\text{g/ml}$ 以下であり、交差耐性は成立せず、JM との間にも一部交差耐性が成立しない株が認められた。

3) *B. catarrhalis* の場合

B. catarrhalis に対する感受性分布を Fig. 4 に示した。TE-031 は 11 株すべてに対して $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ の感受性を示し、その抗菌力は EM, JM, RKM よりも優れていた。

4) *H. influenzae* の場合

H. influenzae に対する感受性分布を Fig. 5 に示した。TE-031 は $3.13 \mu\text{g/ml}$ にピークを有する一峰性の分布を示し、その抗菌力は EM のピーク $1.56 \mu\text{g/ml}$ に比べ 1 管程やや劣っていたが、JM や RKM よりも優れた抗菌力を示し、 $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性株は *S. aureus* や *S. pyogenes* の場合と異なりいずれの薬剤も存在しなかった。

5) *A. calcoaceticus* の場合

Fig. 6 に示したように *A. calcoaceticus* に対する抗菌力はあまり良好でなく、TE-031 と EM はともに $12.5 \mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示した。また、中には $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以下の菌株もみられた。

3. 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, 馬血清添加および接種菌量の影響について *S. aureus* 209P-JC, *S. aureus* SMITH, *S. aureus* NEUMANN, *S. aureus* E-46, *S. aureus* No. 50774, *S. epidermidis* を試験菌として検討した結果を Table 5 ~ 7 に示した。

培地 pH の影響では Table 5 に示したように、TE-031

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates to TE-031, EM, JM and RKM

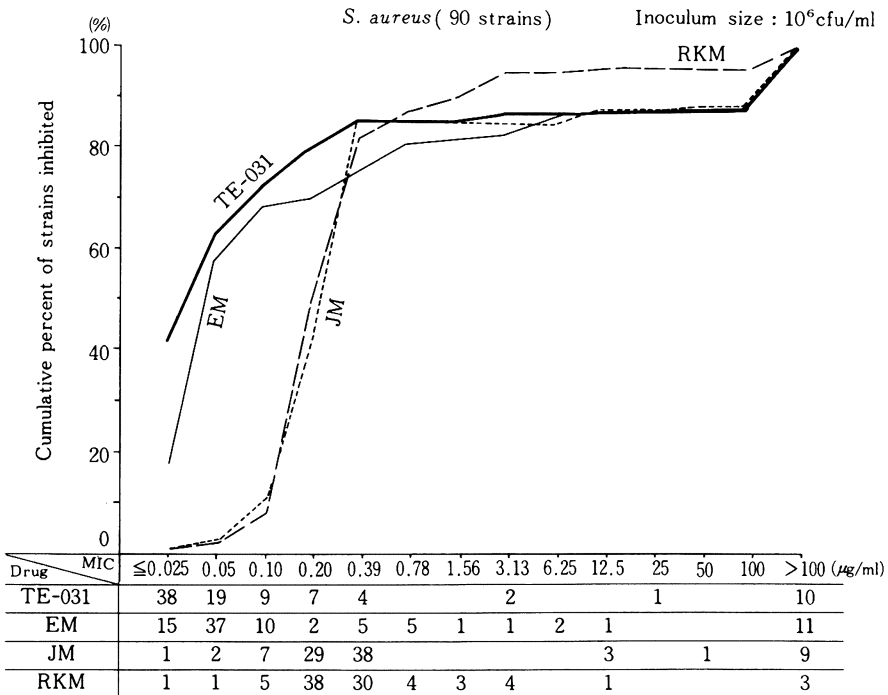


Fig. 5 Sensitivity distribution of clinical isolates to TE-031, EM, JM and RKM

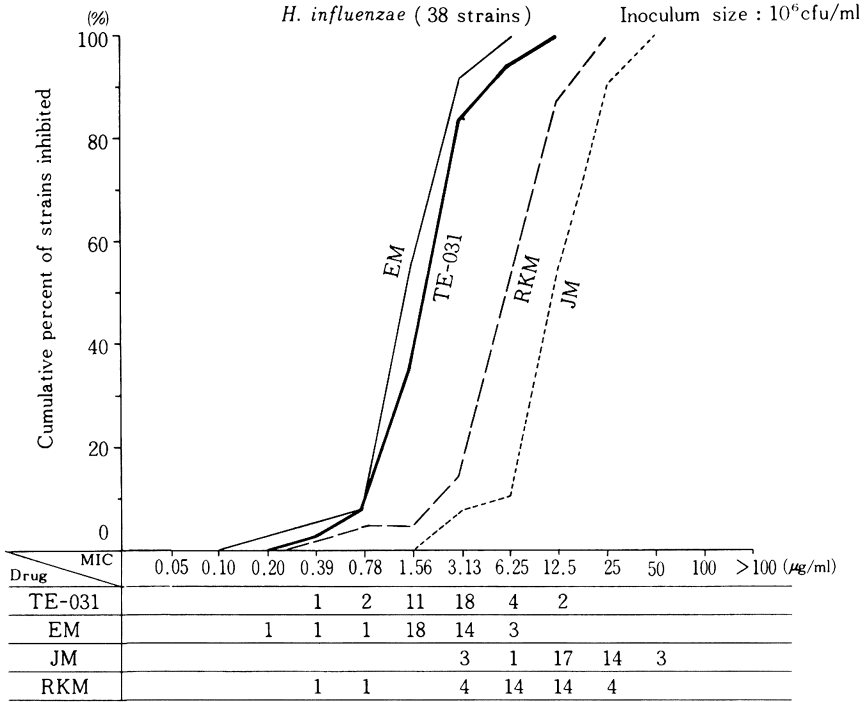


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates to TE-031, EM, JM and RKM

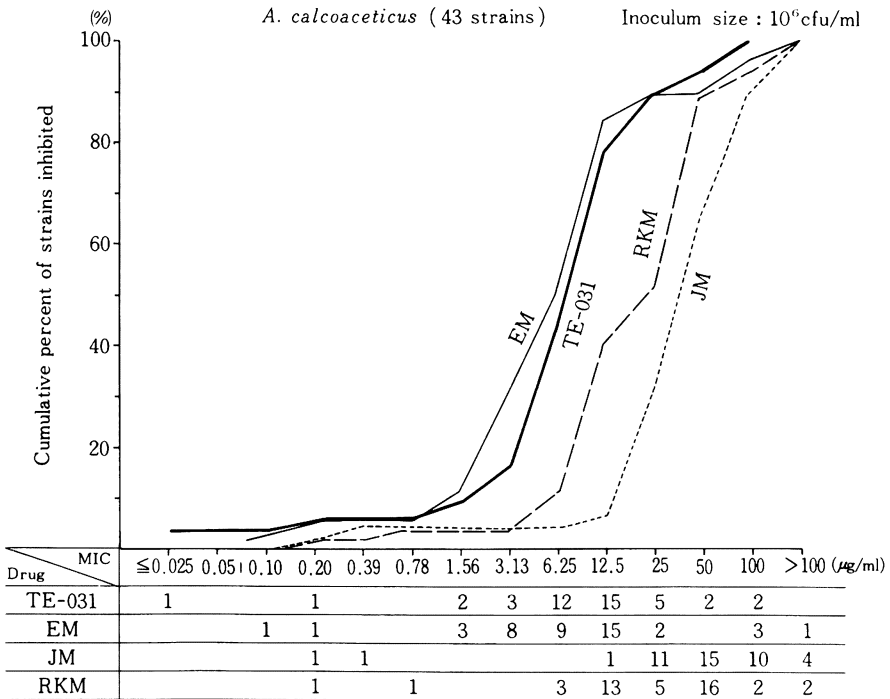


Table 5 Influence of medium pH on the antibacterial activity of TE-031

| Organism | pH | Inoculum size : 10 ⁶ cells/ml | | | |
|--------------------------|----|--|-------|------|------|
| | | MIC (μg/ml) | | | |
| | | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>S. aureus</i> 209P-JC | 6 | 0.78 | 1.56 | 0.78 | 0.39 |
| | 7 | 0.10 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| | 8 | 0.025 | 0.05 | 0.20 | 0.20 |
| | 9 | 0.006 | 0.012 | 0.39 | 0.20 |
| <i>S. aureus</i> SMITH | 6 | 0.78 | 1.56 | 6.25 | 1.56 |
| | 7 | 0.10 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| | 8 | 0.025 | 0.025 | 0.78 | 0.39 |
| | 9 | 0.006 | 0.012 | 0.78 | 0.39 |
| <i>S. epidermidis</i> | 6 | 1.56 | 1.56 | 6.25 | 0.78 |
| | 7 | 0.20 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| | 8 | 0.05 | 0.10 | 1.56 | 0.78 |
| | 9 | 0.025 | 0.05 | 1.56 | 0.78 |

Medium : HIA

Table 6 Influence of horse serum on the antibacterial activity of TE-031

| Organism | Serum concentration (%) | Inoculum size : 10 ⁶ cells/ml | | | |
|----------------------------|-------------------------|--|--------|------|------|
| | | MIC (μg/ml) | | | |
| | | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>S. aureus</i> 209P-JC | 0 | 0.05 | 0.20 | 0.20 | 0.10 |
| | 10 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.20 |
| | 25 | ≤0.025 | 0.10 | 0.20 | 0.20 |
| | 50 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.20 | 0.39 |
| <i>S. aureus</i> SMITH | 0 | 0.05 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| | 10 | 0.05 | 0.10 | 0.78 | 0.39 |
| | 25 | ≤0.025 | 0.10 | 0.78 | 0.78 |
| | 50 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.78 | 3.13 |
| <i>S. aureus</i> NEUMANN | 0 | 0.05 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| | 10 | 0.05 | 0.20 | 0.78 | 0.78 |
| | 25 | 0.05 | 0.10 | 0.78 | 1.56 |
| | 50 | ≤0.025 | 0.05 | 0.78 | 3.13 |
| <i>S. aureus</i> E-46 | 0 | 0.10 | 0.20 | 0.39 | 0.20 |
| | 10 | 0.05 | 0.20 | 0.39 | 0.20 |
| | 25 | 0.05 | 0.10 | 0.39 | 0.39 |
| | 50 | ≤0.025 | 0.05 | 0.78 | 0.78 |
| <i>S. aureus</i> No. 50774 | 0 | 0.05 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |
| | 10 | 0.05 | 0.10 | 0.78 | 0.78 |
| | 25 | ≤0.025 | 0.05 | 0.78 | 0.78 |
| | 50 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.78 | 3.13 |
| <i>S. epidermidis</i> | 0 | 0.10 | 0.20 | 1.56 | 0.39 |
| | 10 | 0.05 | 0.20 | 1.56 | 0.78 |
| | 25 | 0.05 | 0.10 | 1.56 | 0.78 |
| | 50 | ≤0.025 | 0.05 | 1.56 | 3.13 |

Medium : HIA

およびEMはアルカリ側で抗菌力が良好となり、酸性側で抗菌力の低下を認めた。馬血清添加による影響では、TE-031およびEMともに25%および50%の血清存在下で若干抗菌力が良好となる傾向が認められた(Table 6)。接種菌量の影響ではTable 7に示したように、*S. aureus*の場合菌量の減少とともに、TE-031および対照薬すべてにおいて2~4倍抗菌力が良好となった。

4. 増殖曲線におよぼす影響

S. aureus SMITH, *S. aureus* 209P-JC および *B. catarrhalis* No. 5 の増殖曲線におよぼす影響を検討し、それらの結果をFig. 7~9に示した。TE-031はEMと同様*S. aureus* SMITH および *S. aureus* 209P-JC に対しては主として静菌的な作用を示した。JM, RKMも同様にほぼ静菌的な作用を示したが、RKMの16 MIC作用において菌数が若干減少する傾向が見られた。一方、*B. catarrhalis* に対してはMIC濃度で静菌的な作用が見られたが、4 MIC(0.20 $\mu\text{g/ml}$)以上の濃度で*S. aureus*の場合と異なり殺菌作用が観察された。また表には示さなかったが、他の薬剤でも同様な傾向を認めた。

5. 透過型電子顕微鏡による形態変化の観察

TE-031を*S. aureus* 209P-JCに作用させ、その時の形態変化を透過型電子顕微鏡により観察しFig.10~14に

示した。

Fig.10は正常な*S. aureus*の電顕像で、細胞壁(CW)、細胞質(C)、核(N)およびメソソーム(M)などが観察される。Fig.11~14はTE-031の0.78 $\mu\text{g/ml}$ を作用後6時間目の電顕像で細胞壁の顕著な肥厚が観察されたが、RKM作用時⁹⁾に観察された様な分裂異常像は観察されなかった。また細胞壁の隔壁部分に於いて顕著な肥厚が観察された(Fig.13, 14)。

現在、検討中であるが*B. catarrhalis*の場合、外膜に特徴ある変化が観察されており、次回に報告したいと考えている。

6. マウス実験的腹腔内感染症および実験的皮下膿瘍に対する治療効果

S. aureus SMITH, *S. pneumoniae* III および *S. pyogenes* C-203を用いてマウス実験的腹腔内感染症に対する治療効果を検討しTable 8に示した。

*S. aureus*の場合、TE-031のED₅₀値は0.4 mg/mouseであり、EMは2.2 mg/mouse, JMは2.5 mg/mouse, RKMは4.5 mg/mouseであった。また*S. pneumoniae* IIIの場合、TE-031のED₅₀値は1.1 mg/mouse, EMは6.1 mg/mouse, JMは12.2 mg/mouse, RKMは13.2 mg/mouseであった。さらに*S. pyogenes* C-203の場合、TE-

Table 7 Influence of inoculum size on the antibacterial activity of TE-031

| Organism | Inoculum size (cells/ml) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|------|------|------|
| | | TE-031 | EM | JM | RKM |
| <i>S. aureus</i> 209P-JC | 2.2×10^8 | 0.20 | 0.39 | 0.39 | 0.39 |
| | 2.2×10^7 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| | 2.2×10^6 | 0.10 | 0.10 | 0.20 | 0.20 |
| | 2.2×10^5 | 0.10 | 0.10 | 0.20 | 0.10 |
| | 2.2×10^4 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.05 |
| <i>S. aureus</i> SMITH | 3.3×10^8 | 0.20 | 0.20 | 1.56 | 0.78 |
| | 3.3×10^7 | 0.10 | 0.20 | 0.78 | 0.78 |
| | 3.3×10^6 | 0.10 | 0.10 | 0.39 | 0.78 |
| | 3.3×10^5 | 0.10 | 0.10 | 0.39 | 0.39 |
| | 3.3×10^4 | 0.10 | 0.10 | 0.39 | 0.39 |
| | 3.3×10^3 | 0.05 | 0.05 | 0.20 | 0.39 |
| <i>S. epidermidis</i> | 1.2×10^8 | 0.20 | 0.78 | 6.25 | 1.56 |
| | 1.2×10^7 | 0.20 | 0.39 | 3.13 | 0.78 |
| | 1.2×10^6 | 0.20 | 0.39 | 3.13 | 0.78 |
| | 1.2×10^5 | 0.20 | 0.39 | 1.56 | 0.78 |
| | 1.2×10^4 | 0.20 | 0.39 | 1.56 | 0.39 |
| | 1.2×10^3 | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 0.39 |

Medium : HIA

Fig. 7 Effect of TE-031, EM, JM and RKM on viability of *S. aureus* SMITH

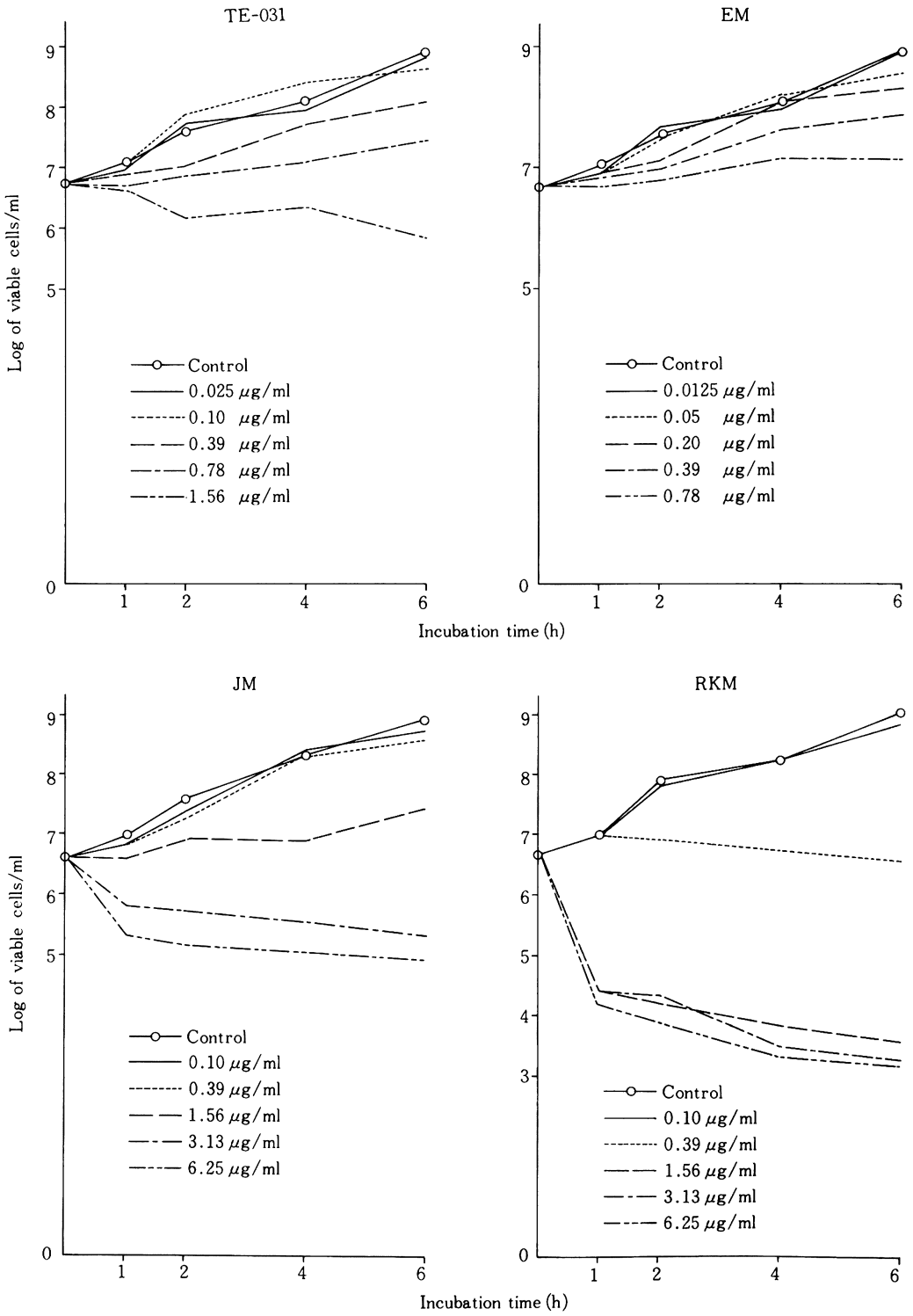
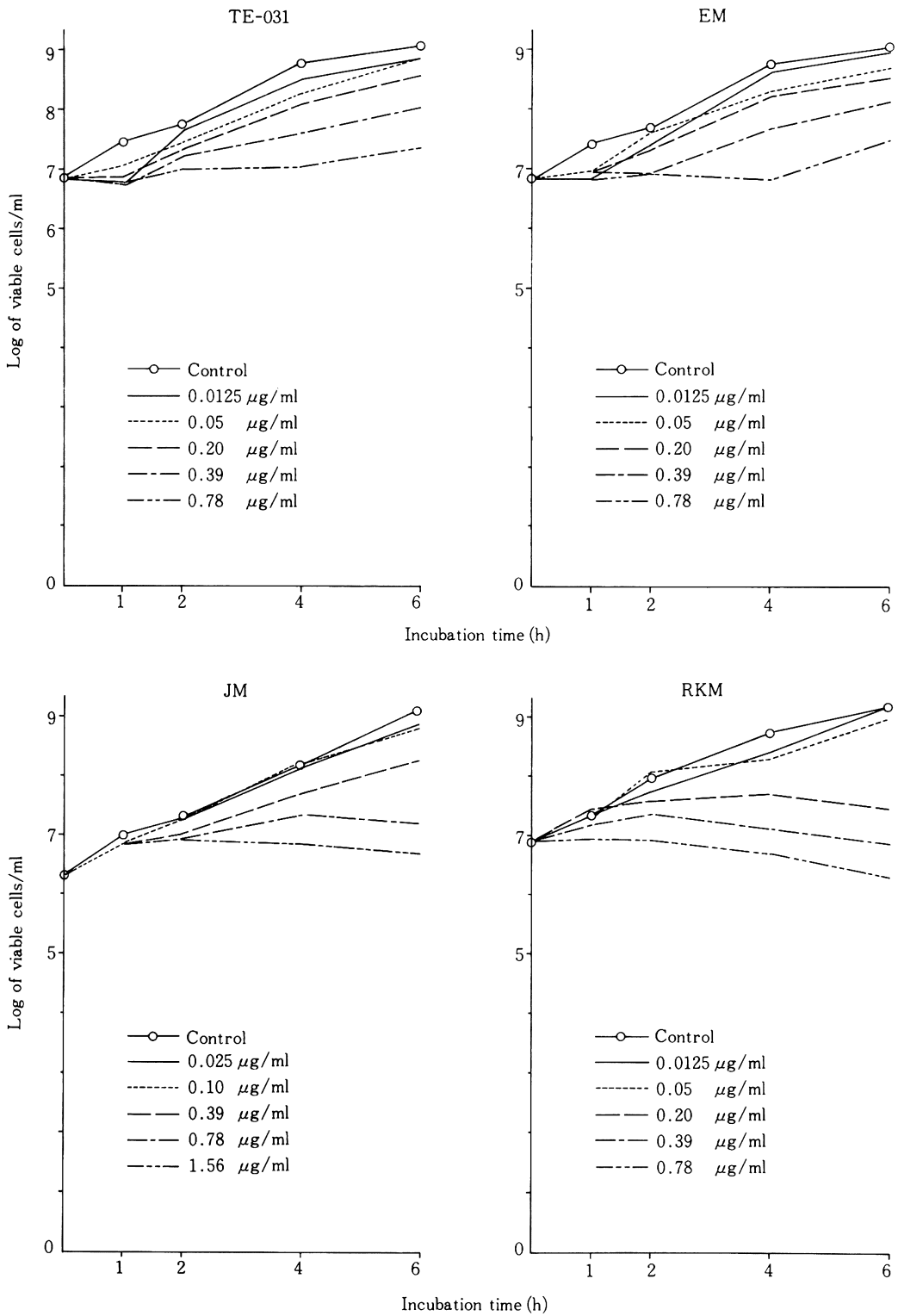


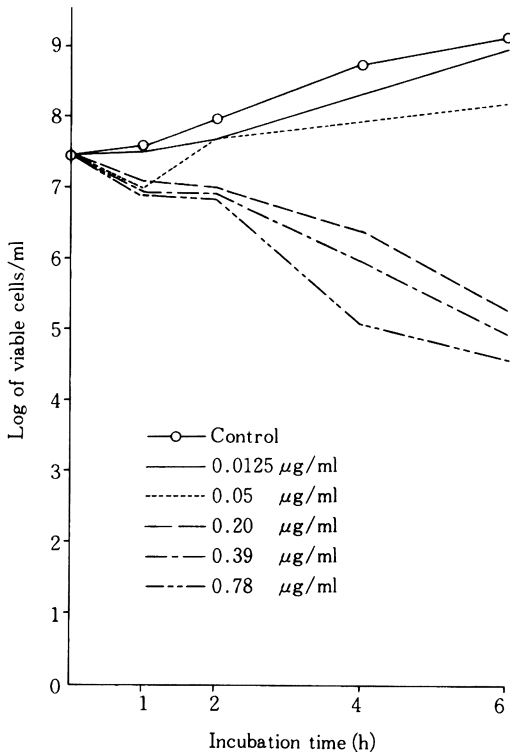
Fig. 8 Effect of TE-031, EM, JM and RKM on viability of *S. aureus* 209P-JC

031のED₅₀値は0.6 mg/mouse, EMは4.2 mg/mouse, JMは4.8 mg/mouse, RKMは4.3 mg/mouseであった。以上の結果より, TE-031の*in vivo*における治療効果は*in vitro*抗菌力がほぼ同じであるEMに比べて5~7倍優れていることが判り, またJMやRKMよりも優れた治療効果を示した。すなわち, *in vitro*抗菌力で予想されるよりも*in vivo*における治療効果が優れていた。この様な傾向は*S. aureus* BB株を用いたマウス実験の皮下膿瘍においても観察され, Fig.15, 16に示したように, いずれの接種菌量およびいずれの投与時期においてもTE-031はEMより優れた治療効果を示した。またその治療効果はdose responseのあるものであった。

7. 血中濃度

TE-031およびEMの100 mg/kgをマウスに経口投与した時の血中濃度をFig.17に示した。TE-031は投与15分後に最高血中濃度(約10 μg/ml)に達し, その値は比較薬のEMよりも3倍高かった。またEMよりも持続的であった。この吸収の良好さが*in vivo*の治療効果に反映されたものと考えられた。

Fig. 9 Effect of TE-031 on viability of *B. catarrhalis* No.5



Ⅲ. 考 察

TE-031は大正製薬株式会社で開発された新しいマクロライド系抗生物質であり, EMなどと同様主としてグラム陽性菌に対して抗菌スペクトルを有する。その抗菌力はEMとほぼ同様であり, JMやRKMより優れていた。TE-031の*in vitro*抗菌力はEMとほぼ同じであるにもかかわらず, *in vivo*におけるTE-031の治療効果はEMよりも5~7倍優れていた。TE-031のグラム陽性菌に対する抗菌作用がEMと同様ほぼ静菌的な作用であることから, TE-031を経口投与した時の吸収の良好さが*in vivo*における治療効果に反映されたものと思われる。これを実際裏付けるdataとしてP. B. FERNANDES²⁾らはマウス実験的感染症に対するTE-031およびEMの治療効果は, これらの薬剤を経口投与した場合, TE-031の方がEMよりも4~10倍優れた効果を示すが, 皮下投与の場合はTE-031はEMと同様の効果を示すことを報告している。

マクロライド系抗生物質は一般的にグラム陰性菌に対して抗菌力を示さないが, *B. catarrhalis*や*H. influenzae*に対して良好な抗菌力を示したことは注目される。特にTE-031は*B. catarrhalis*に対して優れた抗菌力を示した。マクロライド系抗生物質がグラム陰性菌に対して抗菌力を示さないのは, 外膜が透過障壁になっているからであり, そのような点から考えると*B. catarrhalis*や*H. influenzae*は他のグラム陰性菌とは異なった外膜構築を形成しているのかもしれない。今後, TE-031の*B. catarrhalis*に対する優れた抗菌作用および殺菌作用が何故発揮されるのか解析する予定である。

TE-031を*S. aureus* 209P-JCに作用させた時の形態変化を観察したところ, 私どもがすでに報告⁵⁾しているように細胞壁の顕著な肥厚が観察された。これはTE-031の作用により蛋白合成が阻害され, 自己融解酵素(Autolysin)が活性化されないために起こった現象と考えられる。

以上, TE-031の優れた*in vivo*効果が, 臨床でどのように反映されるか興味を持たれる。

文 献

- 1) MITSUHASHI, S. ; T. ONO, T. NAGATE, T. SUGITA & S. OMURA : A new macrolide antibiotic, TE-031 (A-56268), *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. 26th Interscience conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, LA, Sep., 1986
- 2) FERNANDES, P. B. ; R. BAILER, R. SWANSON, C. HANSON, E. McDONALD, N. RAMER, D. HARDY, N. SHIP-

Fig. 10 Transmission electron micrograph of normal *S. aureus* 209P-JC cell ($\times 100,000$)

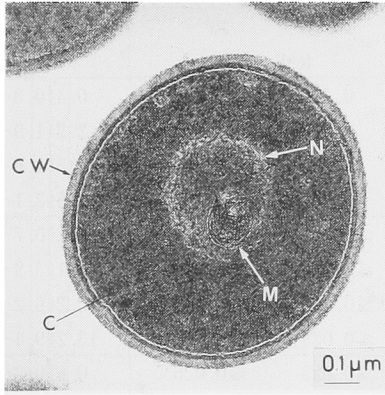


Fig. 13 Transmission electron micrograph of *S. aureus* 209P-JC cell exposed to $0.78 \mu\text{g/ml}$ of TE-031 for 6 hours ($\times 125,000$)

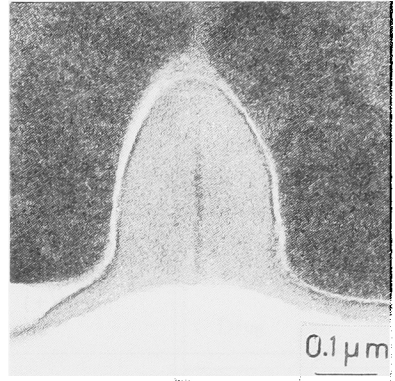


Fig. 11 Transmission electron micrograph of *S. aureus* 209P-JC cell exposed to $0.78 \mu\text{g/ml}$ of TE-031 for 6 hours ($\times 45,000$)

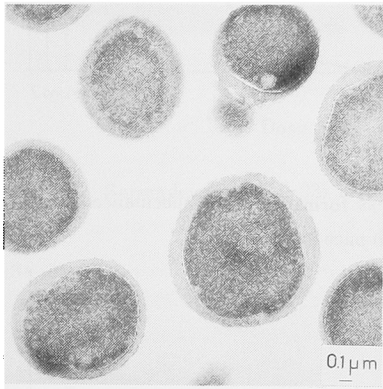


Fig. 14 Transmission electron micrograph of *S. aureus* 209P-JC cell exposed to $0.78 \mu\text{g/ml}$ of TE-031 for 6 hours ($\times 134,000$)

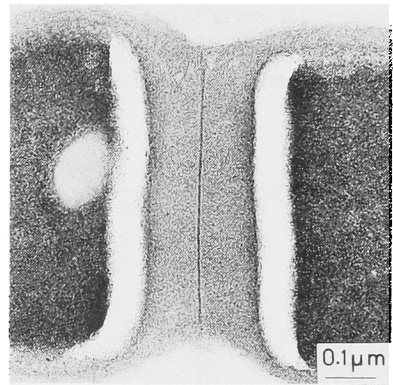


Fig. 12 Transmission electron micrograph of *S. aureus* 209P-JC cell exposed to $0.78 \mu\text{g/ml}$ of TE-031 for 6 hours ($\times 75,000$)

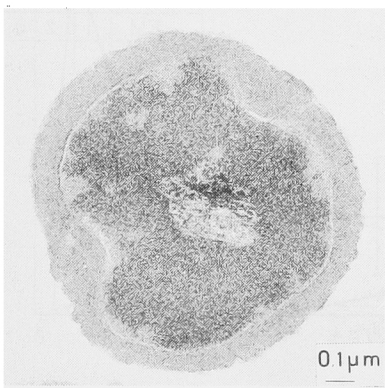


Table 8 Protective effect of TE-031 on experimental infections in mice

| Organism | Challenge dose (cells/mouse) | Drug | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | ED ₅₀ (mg/mouse) |
|--------------------------|-----------------------------------|--------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | 10 ⁶ (cells/ml) | 10 ⁸ (cells/ml) | |
| <i>S. aureus</i> SMITH | 7.0 × 10 ⁶ Mucin(+) | TE-031 | 0.10 | 0.20 | 0.4(0.3~0.6) |
| | | EM | 0.20 | 0.39 | 2.2(1.9~2.7) |
| | | JM | 0.78 | 1.56 | 2.5(1.8~3.4) |
| | | RKM | 0.39 | 0.78 | 4.5(3.1~6.6) |
| <i>S. pneumoniae</i> III | 4.5 × 10 ² Mucin(+) | TE-031 | ≤0.025 | ≤0.025 | 1.1(0.7~1.6) |
| | | EM | ≤0.025 | ≤0.025 | 6.1(3.9~9.6) |
| | | JM | ≤0.025 | 0.10 | 12.2(9.2~16.2) |
| | | RKM | ≤0.025 | ≤0.025 | 13.2(9.4~18.6) |
| <i>S. pyogenes</i> C-203 | 4.0 × 10 ³ Mucin(-) | TE-031 | ≤0.025 | ≤0.025 | 0.6(0.3~1.3) |
| | | EM | ≤0.025 | ≤0.025 | 4.2(2.7~6.6) |
| | | JM | 0.10 | 0.20 | 4.8(3.1~7.5) |
| | | RKM | 0.05 | 0.05 | 4.3(1.5~12.1) |

Mice : ddY strain, male, 4 weeks old, about 18 g, 10 mice/group

Infection : 3% mucin suspension, 0.5ml/mouse ip.

Therapy : 2 hours after challenge, p.o.

ED₅₀ : 7 days after infection

Fig. 15 Protective effect of TE-031 and EM against abscess formation after subcutaneous infection with *S. aureus* BB (3.4 × 10⁶cfu/mouse) in mice (n=5)

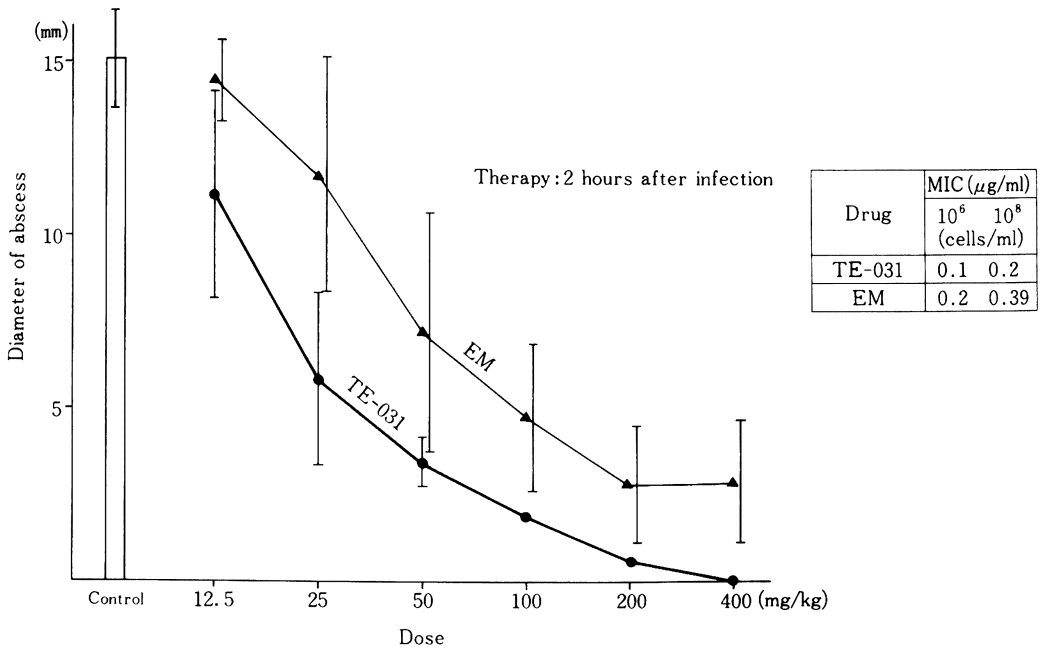


Fig. 16 Protective effect of TE-031 and EM against abscess formation after subcutaneous infection with *S. aureus* BB (2.9×10^7 cfu/mouse) in mice (n=5)

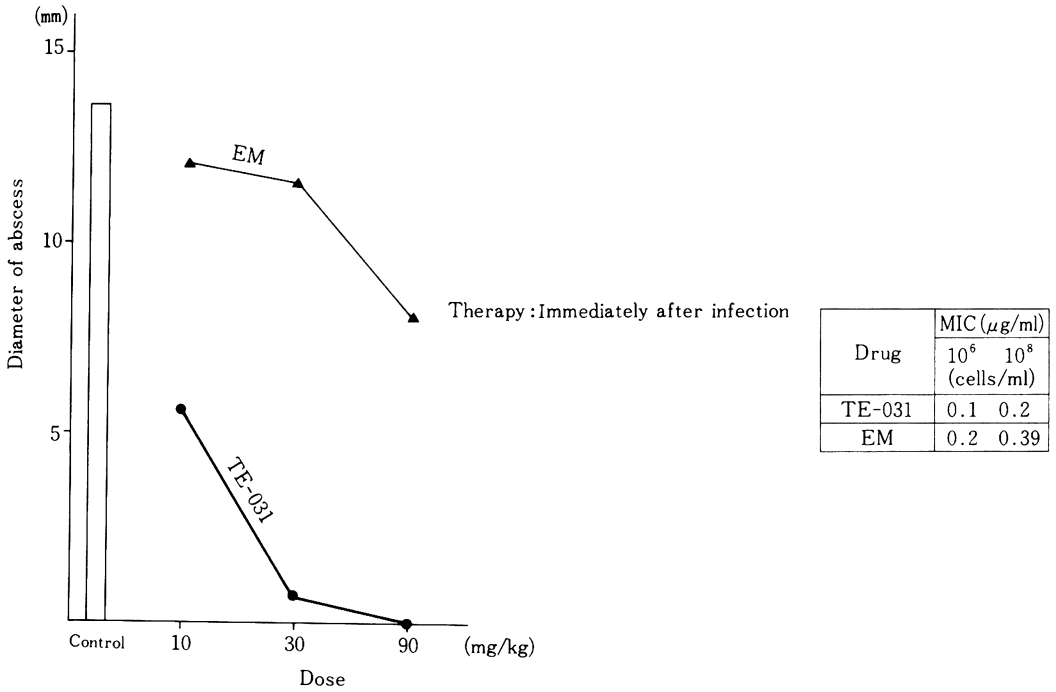
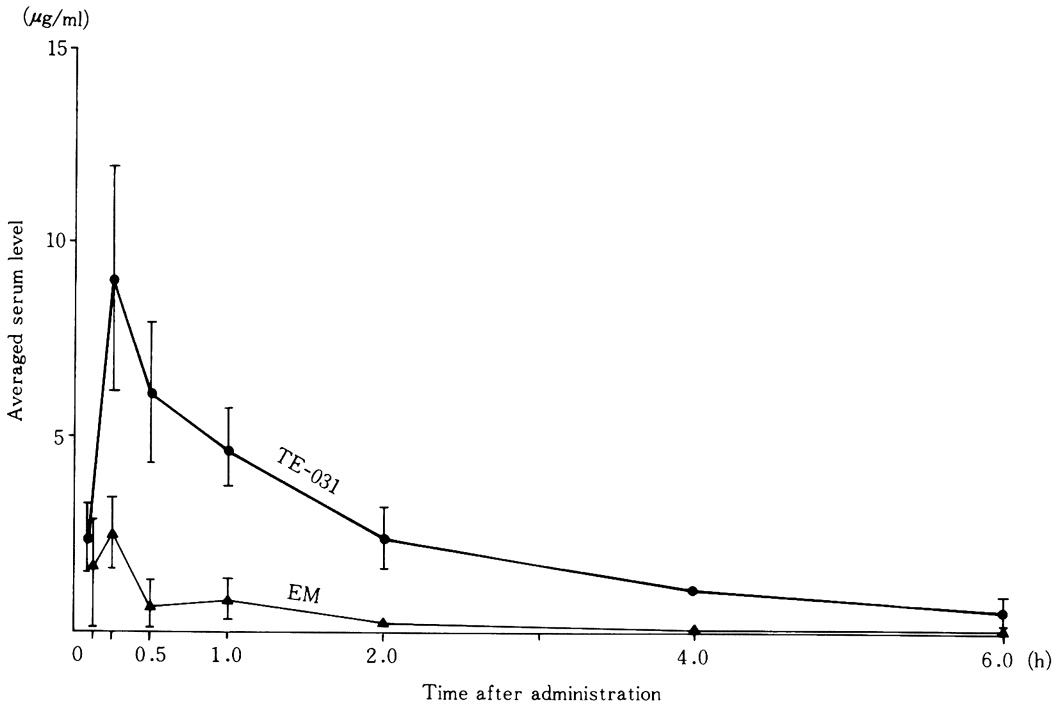


Fig. 17 Serum levels of TE-031 and EM in mice (n=5) after single oral administration (100 mg/kg)



- KOWITZ, R. R. BOWER & E. GADE : *In vitro* and *In vivo* evaluation of A-56268(TE-031), a new macrolide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 : 865~873, 1986
- 3) SEGRETI, J. ; H. A. KESSLER, K. S. KAPPELL & G. M. TRENHOLME : *In vitro* activity of A-56268(TE-031) and four other antimicrobial agents against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 100~101, 1987
- 4) FLOYD-REISING, S. ; J. A. HINDLER & L. S. YOUNG : *In vitro* activity of A-56268(TE-031), a new macrolide antibiotic, compared with that of erythromycin and other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 640~642, 1987
- 5) 諸星俊郎, 西野武志, 谷野輝雄 : 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。 *Chemotherapy* 32(S-6) : 12~25, 1984
- 6) 日本化学療法学会 : 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 7) LUFT, J. H. Improvement in epoxy resin embedding method. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409~414, 1961
- 8) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON A simplified method of evaluating dose-effect experiment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 : 99~113, 1949
- 9) 田所一郎 : ブドウ球菌のマウス皮下実験法。 *モダンメディア* 13 : 110~118, 1967

IN VITRO AND IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TE-031(A-56268), A NEW MACROLIDE ANTIBIOTIC

TAKESHI NISHINO, NOBUO ISHIDA, MASAKO OTSUKI and TERUO TANINO
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of TE-031 (A-56268) was compared with those of erythromycin (EM), josamycin (JM) and rokitamycin (RKM). The following results were obtained.

TE-031 had an antibacterial spectrum against Gram-positive organisms, like EM, JM, or RKM ; its antibacterial activity was generally equal to that of EM.

In the sensitivity distribution of clinically isolated strains of *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *B. catarrhalis* and *A. calcoaceticus* to TE-031, MIC peaks were ≤ 0.025 , 0.025, 3.13, ≤ 0.025 and 12.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. It is noteworthy that TE-031 showed good antibacterial activity against Gram-negative *H. influenzae* and *B. catarrhalis*.

The antibacterial activity of TE-031 was enhanced in an alkaline medium and by the addition of horse serum, but was slightly reduced by increase in inoculum size.

TE-031 showed bacteriostatic action against *S. aureus* and bactericidal action against *B. catarrhalis*.

As to the morphological response of *S. aureus* to TE-031 examined by transmission electron microscopy, TE-031 induced the formation of a remarkably thick cross-wall.

Although the *in vitro* antibacterial activity of TE-031 was similar to that of EM, its therapeutic efficacy against intraperitoneal infections with *S. aureus*, *S. pneumoniae*, and *S. pyogenes* in mice was 5~7 times more effective than that of EM and superior to those of JM and RKM. Against experimental subcutaneous infection induced by *S. aureus*, the therapeutic efficacy of TE-031 was also superior to that of EM.

We also investigated serum concentrations of TE-031 in mice. The serum level of TE-031 was several times higher and longer-lasting than that of EM. We believe that this high bioavailability was responsible for the good *in vivo* therapeutic efficacy of TE-031.