

新しいマクロライド系抗生物質 RU 28965の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用

西野武志・武田文彰・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

RU 28965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。

RU 28965は他のマクロライド系抗生物質と同様、グラム陽性菌および一部のグラム陰性菌に対し抗菌スペクトルを有し、その抗菌力はEMやRKMとはほぼ同じであった。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もRU 28965はEMとほぼ同様の抗菌力を示し、その感受性のピーク値はそれぞれ0.1~0.2, 0.1, 6.25, 0.1, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

抗菌力におよぼす諸因子の影響はアルカリ側のpH、また血清の添加によりそれぞれ抗菌力が良好となった。一方、培地の影響は認められなかったが、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* の増殖におよぼす影響では、*S. aureus* に対しては静菌的な作用が、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RU 28965の作用により細胞壁の顕著な膨隆像が観察された。

*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* を用いたマウス実験的腹腔内感染症に対するRU 28965の治療効果では、*in vitro* 抗菌力が同じEMあるいはJM, RKMに比べて3~6倍優れた治療効果を示した。また *S. aureus* を用いたマウス実験的皮下膿瘍に対してもRU 28965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、RU 28965はEMに比べて、3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RU 28965の優れた *in vivo* 効果に反映されたものと思われる。

RU 28965はフランス、ルセル・ユクラフ社で合成された新しいマクロライド系抗生物質である。本剤はErythromycin(EM)の9位を2-Methoxy-ethoxymethyl-oximeで置換したものであり、その化学名を9-[O-[(2-Methoxy-ethoxy)methyl]oxime]erythromycinといい、分子式は $\text{C}_{41}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{15}$ で、分子量837.07の白色結晶性の粉末

である。その化学構造式をFig. 1に示した。本物質はエタノールまたはアセトンに溶けやすく、エーテルにやや溶けやすく、水にほとんど溶けない。RU 28965の特徴は胃酸抵抗性に優れ、従来のマクロライド系抗生物質よりも吸収が良く、半減期が長く、その *in vitro* 抗菌力はEMとほぼ同じであるが<sup>1,2)</sup>、*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<sup>3)</sup>。また *Legionella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* に対しても良好な抗菌活性を示す<sup>4)</sup>。

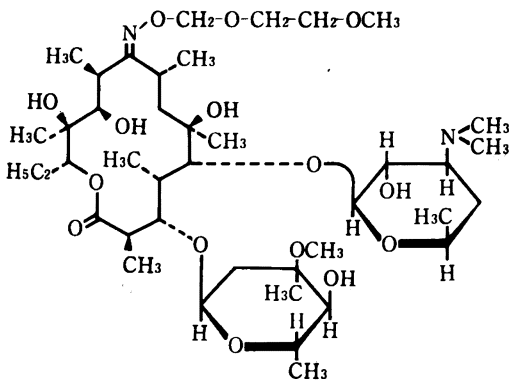
今回、私どもはRU 28965の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について、EM, JM, RKM<sup>5)</sup>を比較薬として用いて検討を行ったので報告する。

## I. 実験材料および実験方法

## 1. 使用菌株および使用薬剤

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1983年から1985年に分離された臨床分離の *Staphylococcus aureus* 90株、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) 50株, *Streptococcus pyogenes* 36株, *Branhamella catarrhalis* 11株, *Haemophilus influenzae*

Fig. 1 Chemical structure of RU 28965



38株, *Acinetobacter calcoaceticus* 43株である。

RU 28965は日本ルセル株式会社より提供されたものを使用した。Rokitamycin(RKM), 9, 3'-diacetyl-mycamycin(MOM), 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 Tryptosoya 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<sup>6)</sup>に準じて行った。なお *Streptococcus* 属, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis* には10%馬脱纖維血液, *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

被検菌として *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検討した。また抗菌力におよぼす培地の影響を, Sensitivity disk agar(SA, ニッスイ), Muller Hinton agar(MHA, Difco), HIA, Brain heart infusion agar(BHIA, Difco), Tryptosoya agar(TSA, Difco)および Nutrient agar(NA, Difco)の6種類の培地を用いて検討した。

## 4. 増殖におよぼす影響

TSB で前培養した *S. aureus* 209-P JC, *S. aureus* SMITH および *B. catarrhalis* No. 5 の菌液を Heart infusion broth(HIB, ニッスイ)で希釈後振とう培養を行い, 対数期途上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* 209-P 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% OsO<sub>4</sub> で固定後, アルコール系列で脱水を行い, LUFT の方法<sup>7)</sup>によりエポキシ樹脂に包埋した。これを LKB ultra-microtome 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, 1200 EX)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, *S. pneumoniae* III および *S. 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。ED<sub>50</sub> 値

は感染後7日目までの生存率から, LITCHFIELD-WILCOXON 法<sup>8)</sup>により求めた。なお Std: ddY 系雄性マウス(体重18~20 g)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18~20 g のマウスを1群5匹として使用した。感染菌株は *S. aureus* 0265 および *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。この菌液のそれぞれ0.1 ml をマウス背部皮下に接種し(1.8×10<sup>8</sup> cfu/mouse および2.9×10<sup>7</sup> cfu/mouse), 感染直後あるいは感染2時間後に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<sup>9)</sup>。

## 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18 g)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時間および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 を被験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 RU 28965 の MIC を EM, JM, RKM および MOM を比較薬として検討し, その結果を Table 1~4 に示した。RU 28965 は EM, JM, RKM や MOM などの他のマクロライド系抗生物質と同様, グラム陽性菌に対してのみ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* や *S. epidermidis* に対する RU 28965 の抗菌力は EM よりやや劣るものの, JM や MOM より優れており, RKM とほぼ同等であった。また *Streptococcus* 属に対する抗菌力は EM より若干劣り, JM や MOM より優れていた。

### 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 RU 28965, EM, JM, RKM の感受性分布および累積百分率を Fig. 2~6 に示した。

#### 1) *S. aureus* の場合

Fig. 2 に示したように, *S. aureus* に対して RU 28965 のピーク値は0.1~0.2 μg/ml であり, JM, RKM は0.2~0.39 μg/ml, EM は0.05 μg/ml であった。RU 28965 の抗菌力は JM や RKM よりもやや優れていたが, >100 μg/ml 以上の耐性株が11株認められ, これらの株は EM

と交差耐性を示した。しかしJMとは9株、RKMとは3株が交差耐性を示したにすぎなかった。また表には示さなかったが、MRSA 50株に対してRU 28965はEMと同様すべて耐性であった。

#### 2) *S. pyogenes* の場合

*S. pyogenes* に対するRU 28965のピーク値はFig. 3に示したように0.1  $\mu\text{g/ml}$ であり、EMは0.05  $\mu\text{g/ml}$ 、JMは0.2  $\mu\text{g/ml}$ 、RKMは0.05  $\mu\text{g/ml}$ であり、RU 28965の抗菌力はJMより優れており、EMやRKMよりも劣っていた。>100  $\mu\text{g/ml}$ の耐性株が8株存在し、*S. aureus*の場合と同様EMと交差耐性を示した。しかしJM、RKMとの交差耐性の割合はEMに比べ低かった。

#### 3) *B. catarrhalis* の場合

*B. catarrhalis* に対する感受性分布をFig. 4に示した。RU 28965は0.1  $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示し、その抗菌力はJMより優れており、RKMと同等であった。

#### 4) *H. influenzae* の場合

*H. influenzae* に対する感受性分布をFig. 5に示した。RU 28965は6.25  $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する一峰性の分布

を示し、その抗菌力はEMより劣っていた。しかしJM、RKMに比べ優れていた。

#### 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、RU 28965はRKMなどと同様0.05~>100  $\mu\text{g/ml}$ に幅広く分布し、12.5~50  $\mu\text{g/ml}$ にピークを有する分布を示した。

#### 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、培地pH、馬血清添加および接種菌量の影響について*S. aureus* 209-P JC, *S. aureus* SMITH, *S. aureus* NEUMANN, *S. aureus* E-46, *S. aureus* No. 50774, *S. epidermidis*, *M. luteus* ATCC 9341, *M. luteus* ATCC 10240, *B. subtilis* ATCC 6633を試験菌として検討した結果をTable 5~8に示した。

6種類の培地を用いて検討した結果をTable 5に示したが、NA培地で若干抗菌力が悪くなる傾向が見られた。培地pHの影響ではTable 6に示したようにRU 28965、EMともに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25%および50%の血清存在下でRU 28965はEMと

Table 1 Antibacterial spectrum of Gram-positive bacteria

( $10^8$ cells/ml)

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	RU 28965	EM	JM	RKM	MOM
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.78	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.39	0.39	1.56	0.78	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.78	0.39	1.56	0.78	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> TERADIMA	0.78	0.39	1.56	0.78	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.78	0.39	1.56	0.78	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 50774	0.78	0.39	1.56	0.78	3.13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.56	0.78	3.13	1.56	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.20	0.05	0.20	0.05	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.10	0.05	0.20	0.05	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.10	0.05	0.20	0.05	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.20	0.10	3.13	0.78	1.56
Viridans group <i>Streptococcus</i> sp.	0.20	0.10	3.13	0.78	3.13
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I	0.05	$\leq 0.025$	0.10	$\leq 0.025$	0.10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II	0.10	0.05	0.20	0.10	0.20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III	0.05	$\leq 0.025$	0.10	0.05	0.10
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	0.10	0.05	0.10
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	0.05	0.05	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.10	0.78	0.39	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.39	0.78	0.78	0.39	1.56

Medium : HIA

Table 2 Antibacterial spectrum of Gram-positive bacteria

(10<sup>6</sup>cells/ml)

Organism	MIC ( $\mu$ g/ml)				
	RU 28965	EM	JM	RKM	MOM
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P JC	0.39	0.20	0.20	0.20	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> SMITH	0.39	0.20	0.78	0.39	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> NEUMANN	0.39	0.20	0.78	0.39	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> TERAJIMA	0.39	0.20	0.78	0.39	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> E-46	0.39	0.20	0.78	0.39	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 50774	0.39	0.20	0.78	0.39	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.78	0.39	1.56	0.78	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> S-23	0.10	0.05	0.20	0.05	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> COOK	0.05	$\leq 0.025$	0.20	$\leq 0.025$	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.10	0.05	0.20	0.05	0.10
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.20	0.10	1.56	0.78	1.56
Viridans group <i>Streptococcus</i> sp.	0.20	0.10	1.56	0.78	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> I	0.05	$\leq 0.025$	0.10	$\leq 0.025$	0.05
<i>Streptococcus pneumoniae</i> II	0.10	0.05	0.20	0.05	0.20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> III	0.05	$\leq 0.025$	0.05	$\leq 0.025$	0.10
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	0.10	0.05	0.10
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	0.10
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.10	0.39	0.39	0.78
<i>Bacillus anthracis</i>	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78

Medium : HIA

Table 3 Antibacterial spectrum of Gram-negative bacteria

(10<sup>8</sup>cells/ml)

Organism	MIC ( $\mu$ g/ml)				
	RU 28965	EM	JM	RKM	MOM
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> K-12	>100	100	>100	>100	>100
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	>100	50	>100	100	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	>100	50	>100	100	>100
<i>Shigella flexneri</i> 2a-EW-10	>100	>100	>100	50	>100
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	100	25	>100	50	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	25	12.5	>100	50	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus morganii</i> KONO	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1	>100	>100	>100	>100	>100

Medium : HIA

Table 4 Antibacterial spectrum of Gram-negative bacteria

(10<sup>6</sup>cells/ml)

Organism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	RU 28965	EM	JM	RKM	MOM
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	>100	50	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> K-12	100	25	>100	100	>100
<i>Citrobacter freundii</i> NIH 10018-68	100	25	>100	100	>100
<i>Salmonella typhi</i> T-287	100	25	>100	100	>100
<i>Shigella flexneri</i> 2a-EW-10	>100	>100	>100	50	>100
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	25	12.5	100	25	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	12.5	6.25	100	50	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	>100	100	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>100	100	>100	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	>100	>100	100	>100
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus morganii</i> KONO	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus inconstans</i> NIH 118	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1	>100	>100	>100	100	>100

Medium : HIA

Fig. 2 Sensitivity distribution of clinically isolated *S. aureus* to RU 28965, EM, JM and RKM (90 strains, inoculum size : 10<sup>6</sup> cfu/ml)

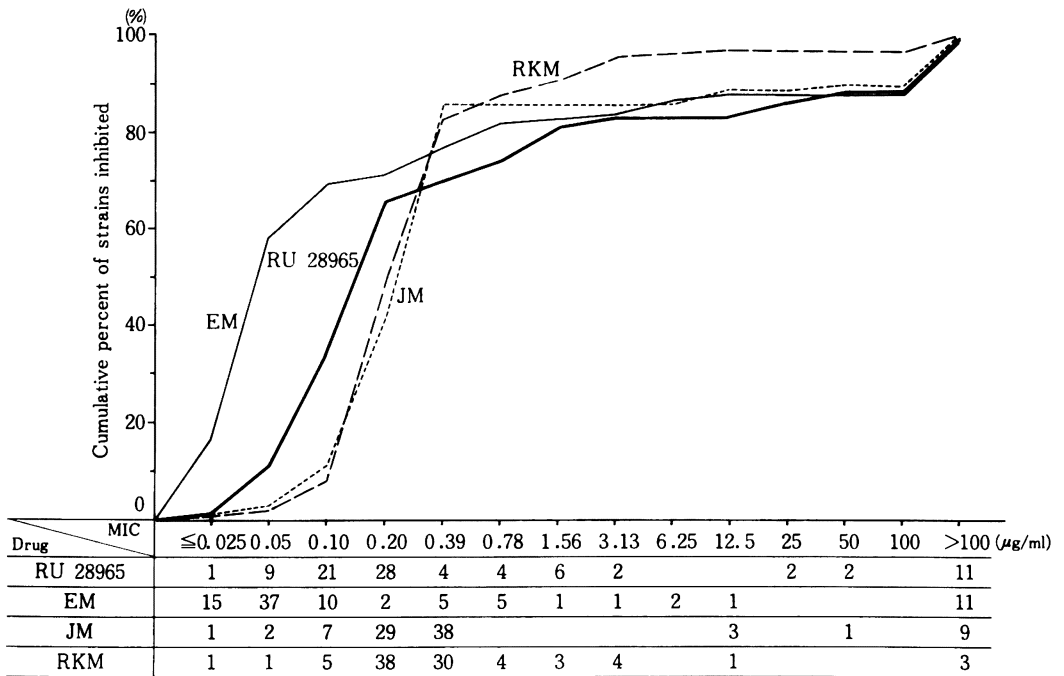




Fig. 5 Sensitivity distribution of clinically isolated *H. influenzae* to RU 28965, EM, JM and RKM (38 strains, inoculum size :  $10^6$  cfu/ml)

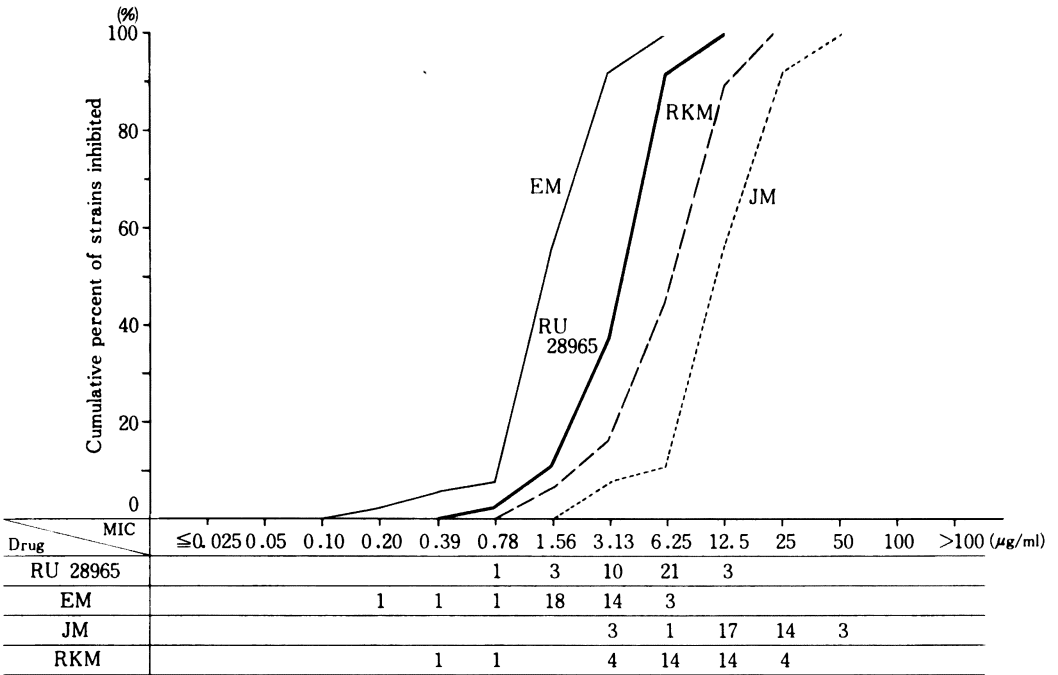
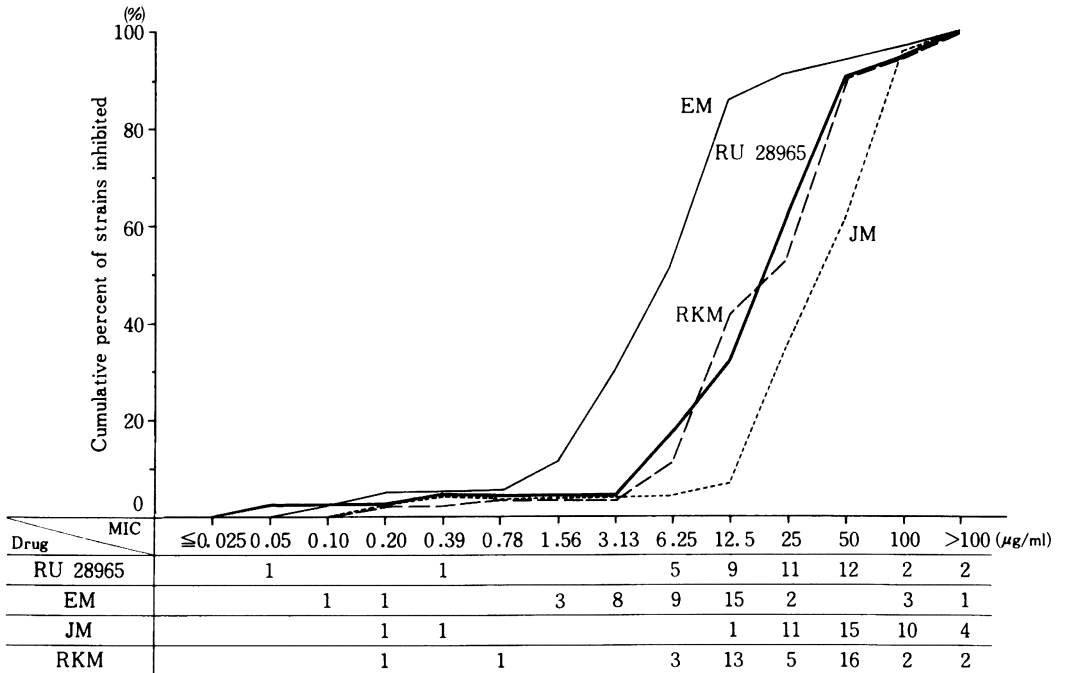


Fig. 6 Sensitivity distribution of clinically isolated *A. calcoaceticus* to RU 28965, EM, JM and RKM (43 strains, inoculum size :  $10^6$  cfu/ml)



ともに若干抗菌力が良好となる傾向が認められた(Table 7)。接種菌量の影響では Table 8 に示したように、菌株により菌量の減少とともに2~4倍抗菌力が良好となった。

#### 4. 増殖におよぼす影響

*S. aureus* SMITH, *S. aureus* 209-P JC および *B. catarrhalis* No. 5 の増殖菌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。

RU 28965 は EM と同様 *S. aureus* SMITH および *S. aureus* 209-P JC に対しては主として静菌的な作用を示した。一方、*B. catarrhalis* に対しては MIC (0.39  $\mu$ g/ml) 以上の濃度で殺菌作用が見られ、EM の場合も同様であった。

#### 5. 透過型電子顕微鏡による形態変化の観察

RU 28965 を *S. aureus* 209-P 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~

12 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)およびメソソームなどが観察される。Fig. 11 は RU 28965 の 0.78  $\mu$ g/ml 作用後 2 時間目の電顕像で、周辺の細胞壁の肥厚化が観察される。Fig. 12 は作用 4 時間後の電顕像で、抗菌作用がさらに進み細胞壁の顕著な肥厚が観察される。

#### 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 9 に示した。*S. aureus* の場合、RU 28965 の ED<sub>50</sub> 値は 0.8 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、RU 28965 の ED<sub>50</sub>

Table 5 Influence of medium on antibacterial activity of RU 28965

Organism	MIC ( $\mu$ g/ml)					
	SDA	MHA	HIA	BHIA	TSA	NA
<i>S. aureus</i> TERAJIMA	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78
<i>S. aureus</i> 209-P	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78
<i>S. aureus</i> SMITH	0.20	0.20	0.20	0.39	0.39	0.78
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.78
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.05
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.39
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	0.39

(10<sup>6</sup>cells/ml)

Medium : HIA

Table 6 Influence of medium pH on antibacterial activity of RU 28965

Organism	pH	MIC ( $\mu$ g/ml)			
		RU 28965	EM	JM	RKM
<i>S. aureus</i> 209-P	6	1.56	1.56	0.78	0.39
	7	0.39	0.20	0.20	0.20
	8	0.05	0.05	0.20	0.20
<i>S. aureus</i> SMITH	6	3.13	1.56	6.25	1.56
	7	0.39	0.20	0.78	0.39
	8	0.05	0.025	0.78	0.39
<i>S. epidermidis</i>	6	3.13	1.56	6.25	0.78
	7	0.78	0.39	1.56	0.78
	8	0.20	0.10	1.56	0.78

(10<sup>6</sup>cells/ml)

Medium : HIA



値は2.2 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, RU 28965の ED<sub>50</sub> 値は0.7 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, RU 28965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3~6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* 0265および *S. aureus* BB 株を用いたマウス実験的皮下膿瘍においても観察され, Fig. 13, 14に示したようにいずれの菌株においてもRU 28965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

RU 28965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. 15に示した。

RU 28965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。

### Ⅲ. 考 察

RU 28965は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 *in vitro* 抗菌力はEM よりやや劣るもののRKM とほぼ同じであるが, *in vivo* におけるRU 28965の治療効果はEM よりも3~6

Table 7 Influence of horse serum on antibacterial activity of RU 28965

(10<sup>6</sup>cells/ml)

Organism	Horse serum	MIC (μg/ml)			
		RU 28965	EM	JM	RKM
<i>S. aureus</i> 209-P JC	0%	0.39	0.20	0.20	0.10
	10%	0.20	0.10	0.20	0.20
	25%	0.20	0.10	0.20	0.20
	50%	0.10	≤0.025	0.20	0.39
<i>S. aureus</i> SMITH	0%	0.39	0.20	0.78	0.39
	10%	0.20	0.10	0.78	0.39
	25%	0.20	0.10	0.78	0.78
	50%	0.10	≤0.025	0.78	3.13
<i>S. aureus</i> NEWMANN	0%	0.39	0.20	0.78	0.39
	10%	0.39	0.20	0.78	0.78
	25%	0.20	0.10	0.78	1.56
	50%	0.10	0.05	0.78	3.13
<i>S. aureus</i> E-46	0%	0.39	0.20	0.39	0.20
	10%	0.39	0.20	0.39	0.20
	25%	0.20	0.10	0.39	0.39
	50%	0.10	0.05	0.78	0.78
<i>S. aureus</i> No. 50774	0%	0.39	0.20	0.78	0.39
	10%	0.20	0.10	0.78	0.78
	25%	0.20	0.05	0.78	0.78
	50%	0.10	≤0.025	0.78	3.13
<i>S. epidermidis</i>	0%	0.39	0.20	1.56	0.39
	10%	0.20	0.20	1.56	0.78
	25%	0.20	0.10	1.56	0.78
	50%	0.10	0.05	1.56	3.13

Medium : HIA



Fig. 8 Effect of RU 28965, EM, JM and RKM on the viability of *S. aureus* 209-P JC

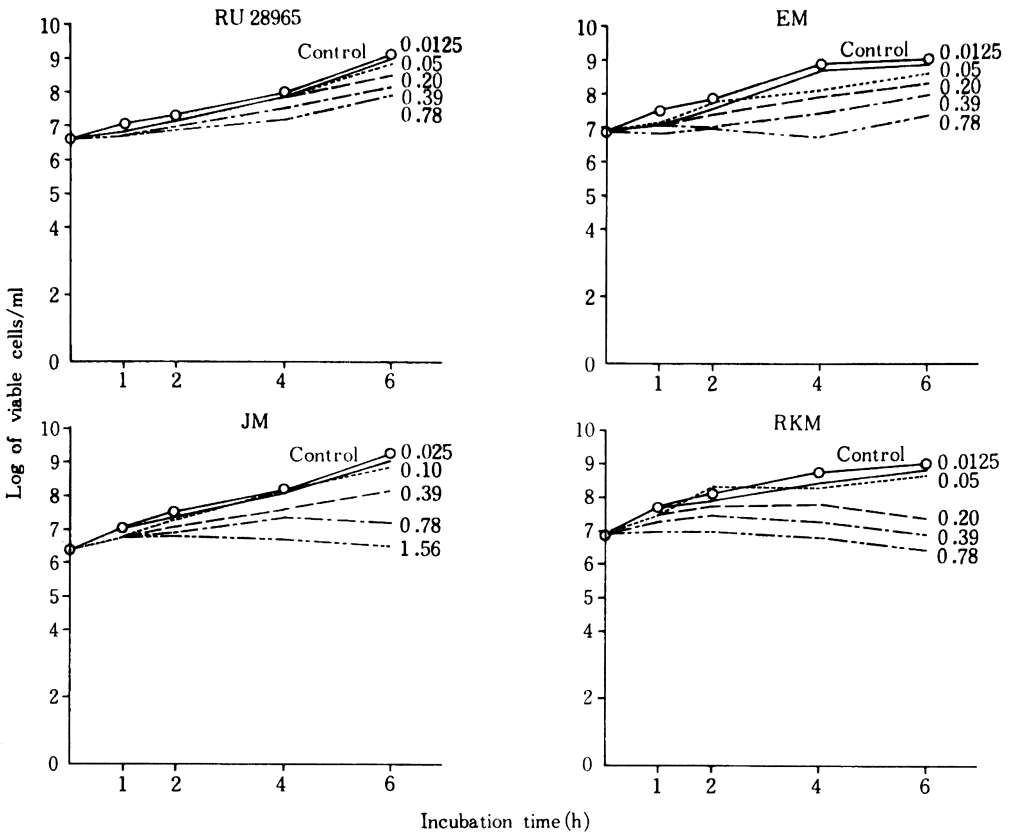
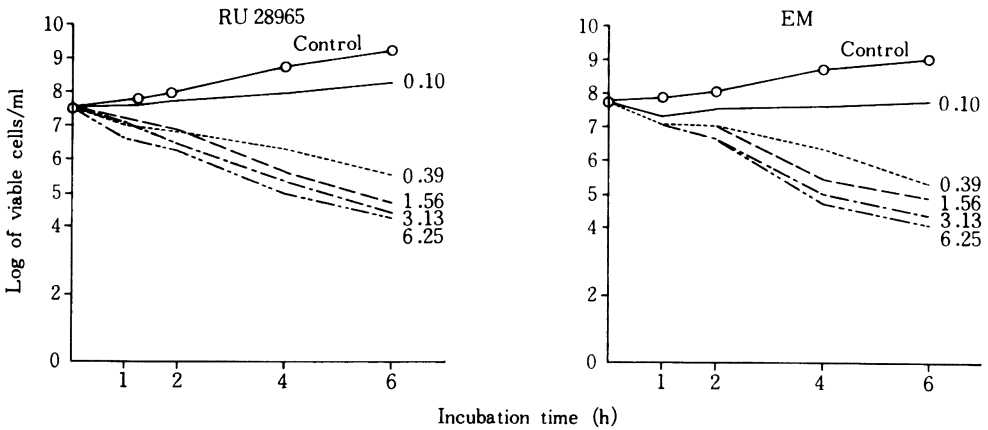


Fig. 9 Effect of RU 28965 and EM on the viability of *B. catarrhalis* No. 5



倍優れていた。RU 28965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、RU 28965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。CHANTOTらは<sup>3)</sup> これを実際裏付ける結果を報告している。

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* に対して比較的良好な抗菌力を示したことは注目される。

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、このようなことから考えると *B. catarrhalis* や *H. influenzae* は、他のグラム陰性菌とは異なった外膜構造を有するのかもしれない。今後、RU 28965の *B. catarrhalis* に対する優れた殺菌作用が何故発揮されるのか解析する予定である。

また、RU 28965を *S. aureus* 209-P JC に作用させた時

Fig. 10 Transmission electron micrograph of normal *S. aureus* 209-P JC cell

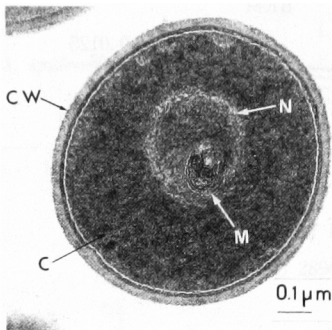


Fig. 11 Transmission electron micrograph of *S. aureus* 209-P JC cell exposed to 0.78 μg/ml of RU 28965 for 2 hours

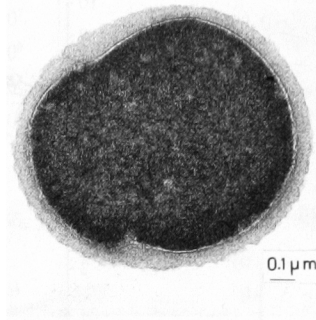


Fig. 12 Transmission electron micrograph of *S. aureus* 209-P JC cell exposed to 0.78 μg/ml of RU 28965 for 4 hours

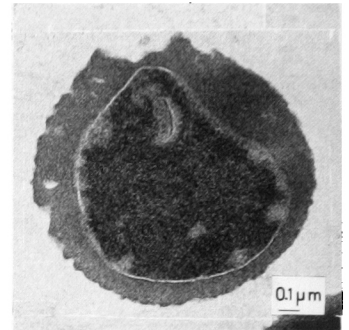


Table 9 Protective effect of RU 28965 against experimental infections in mice

Organism	Challenge size (cells/mouse)	Compound	MIC		ED <sub>50</sub> (mg/mouse)
			10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	
<i>S. aureus</i> SMITH	*7.0×10 <sup>6</sup>	RU 28965	0.39	0.78	0.8 (0.6~1.0)
		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 <sup>2</sup>	RU 28965	≤0.025	≤0.025	2.2 (1.6~2.9)
		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 <sup>3</sup>	RU 28965	0.10	0.10	0.7 (0.4~1.3)
		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, 0.5 ml/mouse, i.p.

\*\*Infection: 0.5 ml/mouse, i.p., without mucin

Fig. 13 Protective effects of RU 28965 and EM against abscess formation by subcutaneous infection with *S. aureus* 0265 ( $1.8 \times 10^8$  cfu/mouse) in mice (n=5)

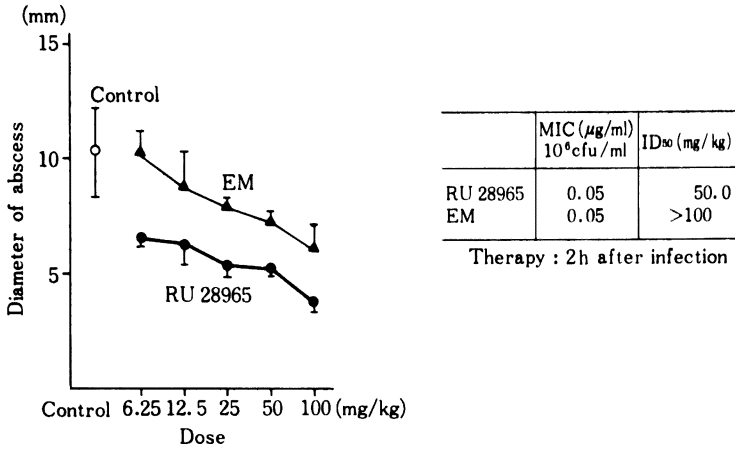


Fig. 14 Protective effects of RU 28965 and EM against abscess formation by subcutaneous infection with *S. aureus* BB ( $2.9 \times 10^7$  cfu/mouse) in mice (n=5)

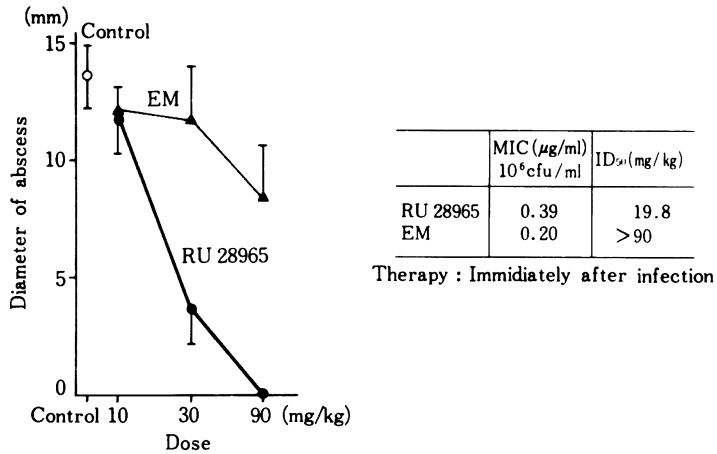
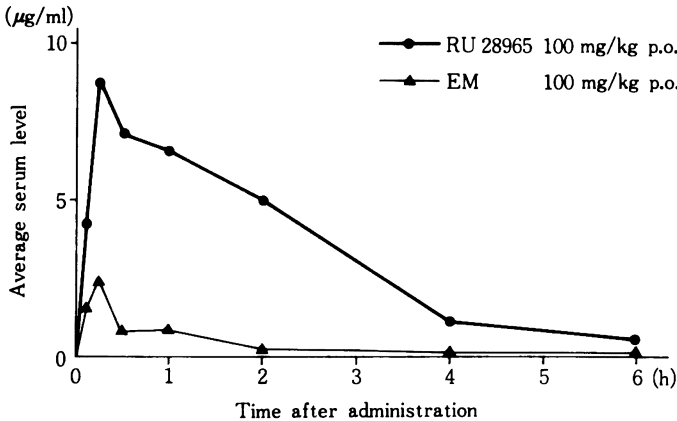


Fig. 15 Serum levels of RU 28965 and EM in mice (n=5) after single oral administration (100 mg/kg)



の形態変化を観察したところ、私どもがすでに報告<sup>9)</sup>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RU 28965の作用により蛋白合成が阻害され、自己融解酵素(Autolysin)が活性化されてこないために起こった現象と考えられる。

以上、RU 28965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) JONES, R. N. ; A. L. BARRY & C. THORNSBERRY : *In vitro* evaluation of three new macrolide antimicrobial agents, RU 28965, RU 29065 and RU 29702 and comparisons with other orally administered drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24 : 209~215, 1983
- 2) BARLAM, T. & H. C. NEU : *In vitro* comparison of the activity of RU 28965, a new macrolide, with that of erythromycin against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25 : 529~531, 1984
- 3) CHANTOT, J. F. ; A. BRYSKIER & J. C. GASC : Antibacterial activity of roxithromycin : a laboratory evaluation. *J. Antibiotics* 39 : 660~668, 1985
- 4) VAN DER WILLIGEN, A. H. & K. H. TIJAM : Evaluation of roxithromycin in the treatment of non-gonococcal urethritis in males. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5 : 612~614, 1986
- 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 epoxyresin 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。 *モグンメディア* 13 : 110~118, 1967

*IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF RU 28965,  
A NEW MACROLIDE ANTIBIOTIC

TAKESHI NISHINO, FUMIAKI TAKEDA and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto

The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of RU 28965 was compared with that of erythromycin (EM), josamycin (JM) and rokitamycin (RKM). The following results were obtained.

RU 28965 had an antibacterial spectrum against Gram-positive organisms similar to that of other macrolide antibiotics. Its antibacterial activity was generally equal to that of EM and RKM. In the sensitivity distribution of clinically isolated *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *B. catarrhalis* and *A. calcoaceticus* to RU 28965, the peak MICs were 0.1~0.2, 0.1, 6.25, 0.1 and 25  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Its antibacterial activity against these organisms was similar to that of EM. It is noteworthy that RU 28965 showed good antibacterial activity against *B. catarrhalis*, a Gram-negative bacterium.

The antibacterial activity of RU 28965 was enhanced in an alkaline medium and by the addition of horse serum, but was not affected by different culture media and was slightly reduced by increase in inoculum size.

RU 28965 showed bacteriostatic action against *S. aureus* and bactericidal action against *B. catarrhalis*. As for the morphological response of *S. aureus* to RU 28965 by transmission electron microscopy, RU 28965 induced the formation of a remarkably thick cross-wall.

Although the *in vitro* antibacterial activity of RU 28965 was similar to that of EM, the therapeutic efficacy of RU 28965 against intraperitoneal infection with *S. aureus*, *S. pneumoniae* or *S. pyogenes* in mice was 3 to 6 times more active than that of EM and superior to that of JM and RKM. Against experimental subcutaneous infections induced by *S. aureus*, the therapeutic efficacy of RU 28965 was also superior to that of EM.

We investigated the serum concentrations of RU 28965 in mice. Levels were several times higher and more durable than for EM. It seems that this high bioavailability caused the good *in vivo* therapeutic efficacy of RU 28965.