

Azithromycinの *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* に対する *in vitro* 抗菌作用

香本晃良・大槻雅子・西野武志

京都薬科大学微生物学教室*

マクロライド系抗生物質 azithromycin (AZM) のグラム陰性菌に対する *in vitro* 抗菌作用について、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* を試験菌種として、erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), cefoperazone (CPZ) および ciprofloxacin (CPFX) と比較検討した。

AZMは *E. coli*, *K. pneumoniae* および *H. influenzae* に対して濃度依存的な殺菌作用を示した。形態学的変化について位相差顕微鏡で観察したところ、AZMは *E. coli*, *K. pneumoniae* および *H. influenzae* に対し、MIC付近では伸長化および膨化を、高濃度では溶菌を引き起こすことが分かった。AZMは *E. coli*, *K. pneumoniae* および *H. influenzae* に対し、CPFXと同様に postantibiotic effect を有していた。そして、*E. coli* の ATP 量に及ぼす影響について検討した結果、AZM 1MIC の作用で ATP 量は減少した。また、その効果は EM 4MIC および CAM 4MIC と同程度で、CPFX 4MIC および CPZ 4MIC より明らかに強かった。

Key words : azithromycin, 殺菌作用, 形態変化, postantibiotic effect, ATP

Azithromycin (AZM) は米国ファイザー社において開発された、15員環の経口用マクロライド系抗生物質である。本剤の特徴としてはグラム陰性菌に対する強い抗菌力が挙げられ、AZMの *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* および *Neisseria gonorrhoeae* に対する MIC₉₀ はそれぞれ 0.78, 0.05 および 0.10 μg/ml であり、erythromycin (EM) の 1/2~1/4 の値である¹⁾。また、*Escherichia coli* に対する EM, clarithromycin (CAM), josamycin, rokitamycin の MIC₉₀ が 100 μg/ml 以上であるのに対し、AZM のそれは 3.13 μg/ml と既存のマクロライド剤に比べ大幅に抗菌力が向上している¹⁾。

今回、我々は AZM のグラム陰性菌に対する *in vitro* 抗菌作用について、殺菌作用、形態学的変化像、postantibiotic effect (PAE)、また薬剤を作用させることによる菌体の ATP 量への影響を検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

教室保存の標準株である *E. coli* K-12, *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 および *H. influenzae* ATCC 10211 を使用した。

2. 使用薬剤

AZM (ファイザー製薬), EM (塩野義製薬), CAM (大正製薬), cefoperazone (CPZ, ファイザー製薬) および ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品工業) のいずれも力価の明らかな原末を用いた。なお、マクロライド剤はメタノールに、CPZ, CPFX は滅菌水に溶解し、適宜使用濃度まで

リン酸緩衝液 (PBS) で希釈した。また、メタノールの最終濃度が 1% 以下となるように薬液を調製した。

3. 使用培地

前培養には Mueller-Hinton broth (MHB: Difco) を、MIC, 殺菌作用, PAE および ATP 量の測定には Ca⁺⁺ 50mg/l ならびに Mg⁺⁺ 25mg/l となるように調製した MHB^{2,3)} を使用した。形態変化の観察には Mueller-Hinton agar (MHA: Difco) を使用した。なお、*H. influenzae* には、これらの前培養および測定用培地に Fildes enrichment (Difco) を 5% 添加して用いた。

4. 感受性測定法

MIC の測定は、日本化学療法学会標準法^{2,3)} に従い、微量液体希釈法により行った。接種菌液を約 10⁷ CFU/ml に調製し、薬剤含有 MHB の入った 96 穴プレート中に 1~2 μl 接種し、37℃ で 24 時間培養後、肉眼的に MIC を判定した。また、MBC は heart infusion agar (HIA: ニッスイ) および *H. influenzae* には Fildes enrichment を 5% 添加した HIA を用いて、MIC 判定時にプレートから 1~2 μl 接種した後、37℃ で 24 時間培養し発育の認められなかった最小薬剤濃度とした。

5. 殺菌作用

37℃ で 2 時間振盪培養して得た対数増殖期の菌液 (約 10⁶ CFU/ml) に所定濃度の薬剤を添加し、37℃ で振盪培養を行い、1, 2, 4, 8 および 24 時間後の生菌数を測定した。生菌数は適宜希釈した菌液を寒天平板上に塗布することにより求めた。なお、薬剤の影響を完全に取り除

* 〒607 京都市山科区御陵中内町5

く目的で生理食塩水で100倍に希釈したサンプルの生菌数から測定したため、検出限界は $>100\text{CFU/ml}$ となった。

6. 位相差顕微鏡による形態観察

37°Cで2時間振盪培養して得た対数増殖期の菌液(約 $5 \times 10^7\text{CFU/ml}$)を1白金耳カバーガラスに塗抹し、スライドガラス上の薬剤含有および不含有フィルム寒天にのせた後、パラフィンで封入した。こうして作製した標本を37°Cで培養し、所定の時間に位相差顕微鏡で菌の形態を観察した。

7. PAEの測定

37°Cで2時間振盪培養して得た対数増殖期の菌液(約 10^8CFU/ml)に、各薬剤をそれぞれの試験菌の2MIC濃度になるように添加し、直ちに37°Cで1時間振盪培養した。その培養菌液を37°CのMHBで100倍に希釈することで薬剤を除去し、さらに37°Cで振盪培養を続け、前記と同様の方法で経時的に生菌数を測定した。なお、PAEは次の式により求めた。

PAE=薬剤除去後に薬剤処理菌が1 log増加するの要した時間-薬剤無処理菌が1 log増加するのに要した時間

8. ATP量に及ぼす影響

37°Cで2時間振盪培養して得た対数増殖期の菌液(約 10^8CFU/ml)に所定濃度の薬剤を添加し、37°Cで振盪培養を行い、1, 2, 4, 8および24時間後のATP量を測定した。ATP生物発光量はサンプル2mlにEXTRACTANT® (Promega) 250 μl を添加し、25°Cで10分間菌体内ATPの抽出を行った後、100 μl を採取してLuciferin/Luciferase試薬(Promega) 100 μl を添加し、ただちにルミノメーターLB9501 (Berthold)で10秒間測定した。また、ATP量はATP標品(Sigma)の10倍希釈系列を用いて作成した検量線を基に換算した。

II. 結 果

1. MICとMBC

E. coli K-12, *K. pneumoniae* ATCC29665および*H. influenzae* ATCC10211に対するAZMならびに対照薬のMICおよびMBCをTable 1に示す。

AZMのMBCは対照薬と同様に、いずれの菌株に対してもMICと同じ値を示した。AZMのそれらの値は0.78~6.25 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、EMおよびCAMの1/4~1/8の大きさであった。また、CPZおよびCPFXのMICとMBCはともに0.10 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。

2. 殺菌作用

殺菌作用について検討した結果をFig. 1~3に示す。

E. coli K-12 (Fig. 1) に対し、AZMは6.25 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)以上の濃度では4時間後に、1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1MIC)では24時間後に検出限界以下に菌数を減少させた。一方、EM 50 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC) およびCAM 50 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)では、24時間後に約2.5 logの菌数の減少であった。CPZ 0.05 $\mu\text{g/ml}$

(1MIC)では1 logの菌数減少を示した後、24時間後に再増殖が認められた。CPFX 0.20 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)では、1時間で菌数が検出限界以下に達する強力な殺菌作用を示した。

K. pneumoniae ATCC29665 (Fig. 2) に対し、AZMは100 $\mu\text{g/ml}$ (16MIC)で24時間後に菌数を検出限界以下に減少させたが、25 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)では菌数は24時間後に初期菌数の約1/1000となった。AZM 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1MIC)では8時間目まで菌数が減少したものの24時間後には再増殖が認められた。4MICのCPZ (0.20 $\mu\text{g/ml}$) およびCPFX (0.10 $\mu\text{g/ml}$)では、4時間目まで殺菌作用を示したが、8時間後から再増殖が認められた。

H. influenzae ATCC10211 (Fig. 3) に対して、AZMは3.13 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)以上の濃度では添加4時間後に、1.56 $\mu\text{g/ml}$ (2MIC)では8時間後までに検出限界以下に菌数を減少させた。EM 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC) およびCAM 25 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)もまた、8時間後までに菌数を検出限界以下に減少させた。4MIC濃度のCPZ (0.10 $\mu\text{g/ml}$) およびCPFX (0.05 $\mu\text{g/ml}$)の殺菌作用は、AZM 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (2MIC)よりも弱かった。

3. 形態学的変化像の観察

E. coli K-12にAZMを作用させたときの1, 2, 3, 4および5時間後の形態に及ぼす影響をFig. 4に示す。

AZM 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1MIC)を作用させた場合、菌体は1時間後に一部伸長化を示したが、その後5時間まで膨化ならびに溶菌像を認めなかった。3.13 $\mu\text{g/ml}$ (2MIC)では、1時間の作用で細胞は膨化し、2時間後には膨化を伴う伸長化を示した。5時間後の観察では一部溶菌像が認められた。6.25 $\mu\text{g/ml}$ (4MIC)では、膨化した細胞が認められ、12.5 $\mu\text{g/ml}$ (8MIC)以上の濃度では、膨化および溶菌像が確認された。

Table 1. Antibacterial activities of azithromycin and reference antibiotics

Organism	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> K-12	Azithromycin	1.56	1.56
	Erythromycin	12.5	12.5
	Clarithromycin	12.5	12.5
	Cefoperazone	0.05	0.05
	Ciprofloxacin	0.05	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC29665	Azithromycin	6.25	6.25
	Erythromycin	50	50
	Clarithromycin	50	50
	Cefoperazone	0.10	0.10
	Ciprofloxacin	0.05	0.05
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC10211	Azithromycin	0.78	0.78
	Erythromycin	3.13	3.13
	Clarithromycin	6.25	6.25
	Cefoperazone	0.025	0.025
	Ciprofloxacin	≤ 0.0125	≤ 0.0125

Fig. 5 ~ Fig. 7 には, *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* ATCC29665 および *H. influenzae* ATCC10211 の位相差顕微鏡像を示す。

E. coli K-12 (固定視野) (Fig. 5) において, AZM 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC) では, 2時間後に伸長化した菌体が確認された。4時間後までさらに伸長化したが, それ以降大き

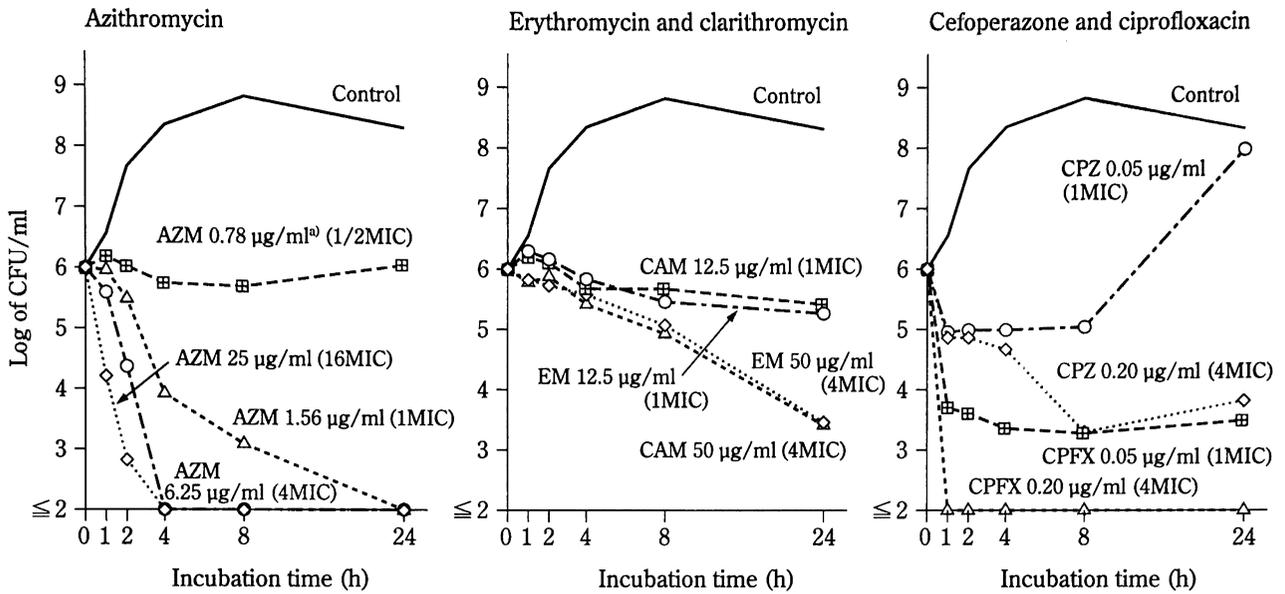


Fig. 1. Effects of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, cefoperazone and ciprofloxacin on the viability of *Escherichia coli* K-12.

AZM : azithromycin, EM : erythromycin, CAM : clarithromycin, CPZ : cefoperazone, CPFX : ciprofloxacin.
a) : Drug concentration

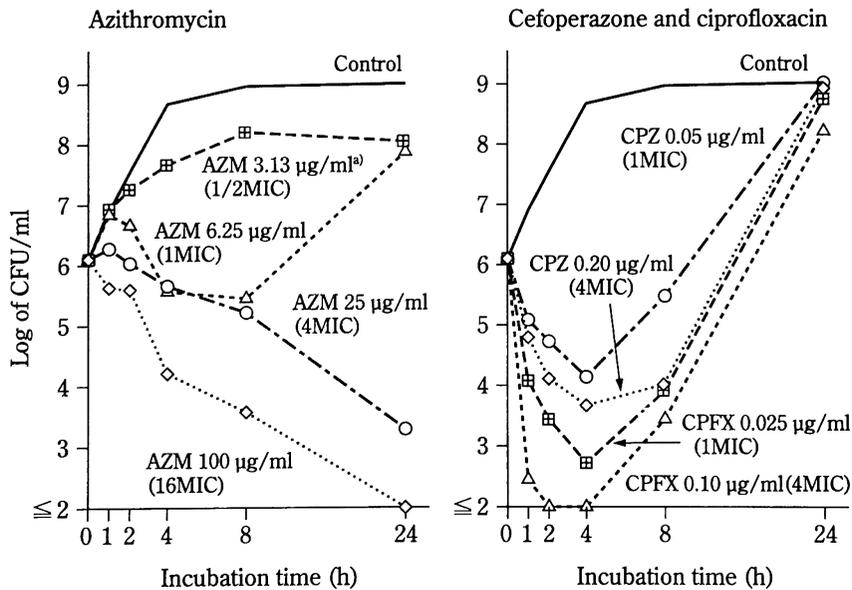


Fig. 2. Effects of azithromycin, cefoperazone and ciprofloxacin on the viability of *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665.

AZM : azithromycin, CPZ : cefoperazone, CPFX : ciprofloxacin.
a) : Drug concentration

な変化を示さず、24時間後の観察においても明確な溶菌像および増殖した細胞は認められなかった。また、*E. coli* K-12にEM 12.5 μ g/ml (1MIC)を4時間作用させるとAZMの場合と同様に菌体の伸長化が認められ、50 μ g/ml (4MIC)では菌体の膨化が観察された。CAMの場合、

12.5 μ g/ml (1MIC)および50 μ g/ml (4MIC) 4時間の作用で菌体の膨化が確認された(成績未発表)。

K. pneumoniae ATCC29665 (4時間後) (Fig. 6)の場合、AZM 25 μ g/ml (4MIC)の作用で菌体が膨化した後溶菌した像が観察された。6.25 μ g/ml (1MIC)では、菌の伸長化、

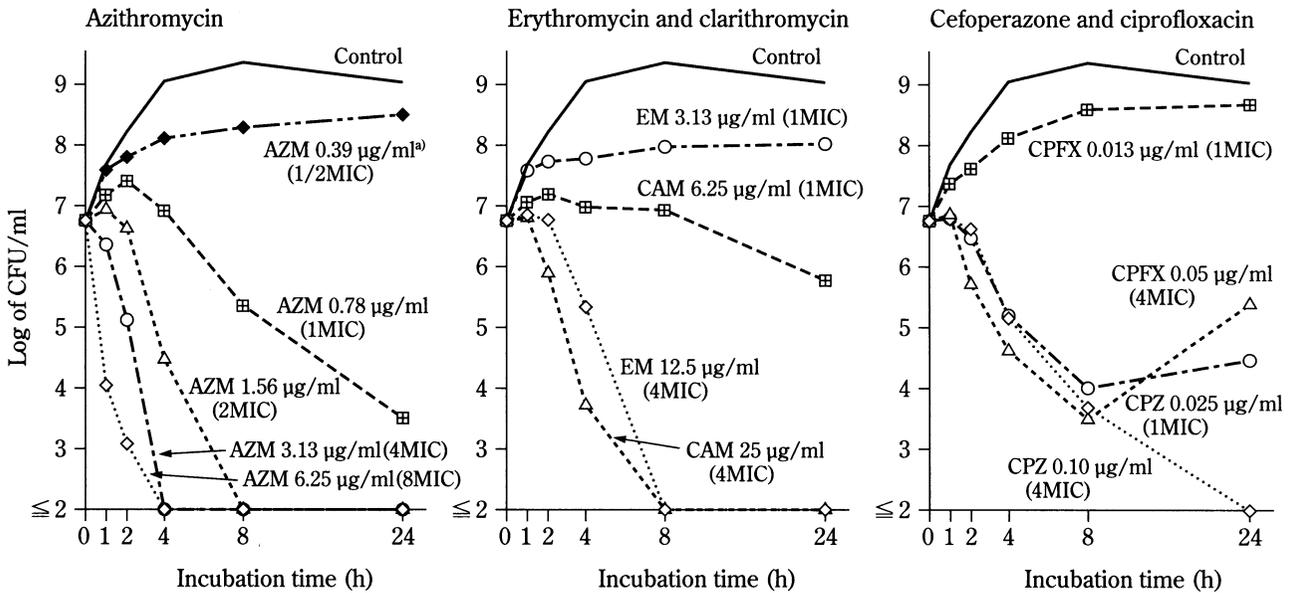


Fig. 3. Effects of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, cefoperazone and ciprofloxacin on the viability of *Haemophilus influenzae* ATCC10211.

AZM : azithromycin, EM : erythromycin, CAM : clarithromycin, CPZ : cefoperazone, CPF : ciprofloxacin.
^{a)} : Drug concentration

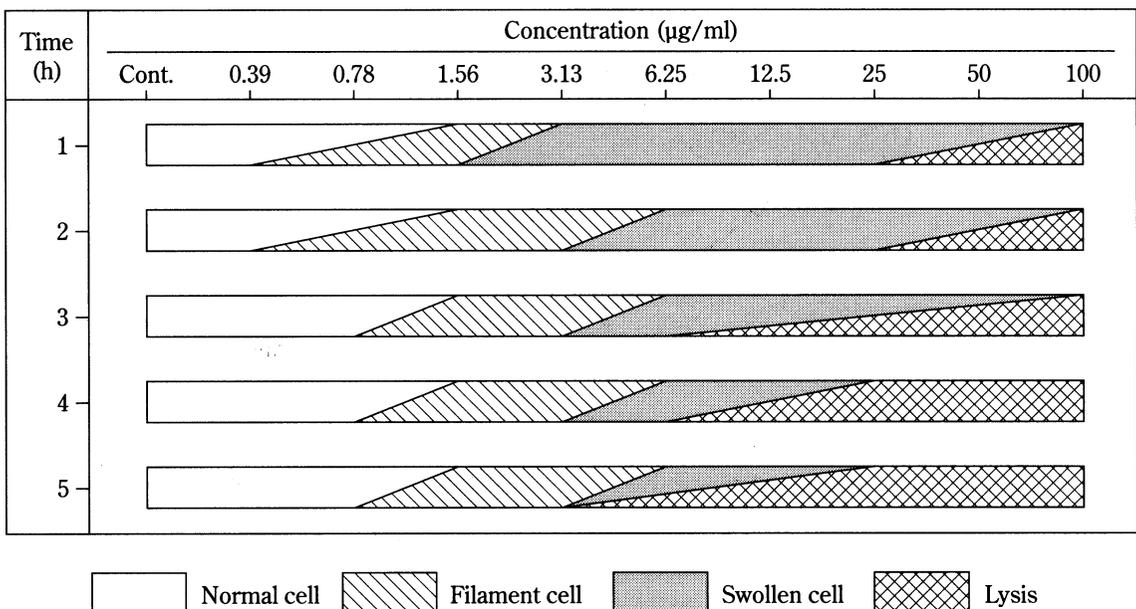


Fig. 4. Morphological effect of azithromycin on *Escherichia coli* K-12.

膨化および溶菌像が認められた。3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1/2MIC)でも、菌の伸長化および膨化が確認された。一方、1MICのCPZでは溶菌像が、CPFXでは伸長化した像が観察された。

H. influenzae ATCC10211 (3時間後) (Fig. 7) の観察では、AZM 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC) で膨化および溶菌像が、0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC) では菌体の伸長化が確認された。また、1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2MIC) では菌体の伸長化および溶菌像が確認

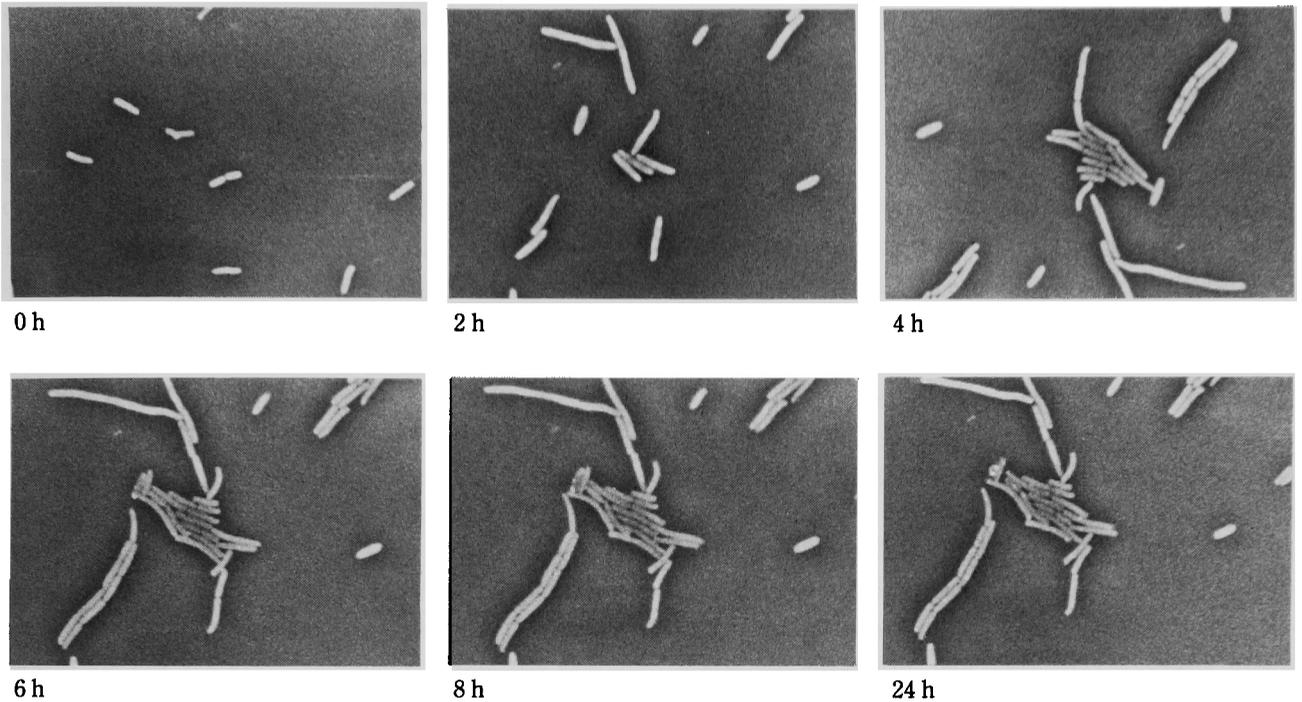


Fig. 5. Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* K-12 exposed to 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of azithromycin.

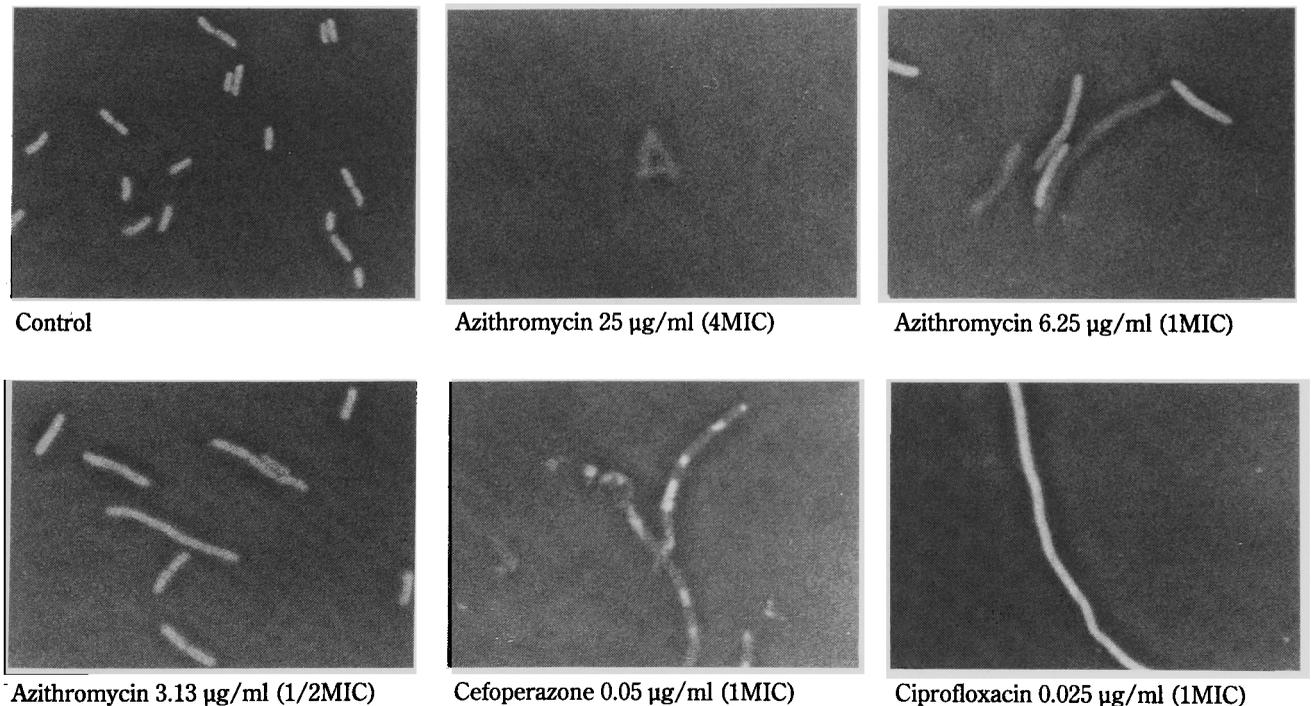


Fig. 6. Phase-contrast micrographs of *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 exposed to azithromycin, cefoperazone and ciprofloxacin for 4 hours.

された(成績未発表)。一方, EM 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)においては, 菌の増殖は認められず, 若干膨化した。EM 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC)ではcontrolと同様の増殖が認められた。また, CAM 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC)において菌は伸長化し, 一部溶菌像が確認されたが, CAM 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)では菌体の大きな変化は認められなかった。

4. PAE

AZM, CPZおよびCPFAXのPAEについて検討した結果をTable 2に示す。

AZMはCPFAXと同様に*E. coli* K-12に対してPAEを示し, 1.05時間であった。CPFAXのPAEは2.8時間であり, AZMに比べ2.7倍大きい値であった。*K. pneumoniae* ATCC29665および*H. influenzae* ATCC10211に対して, AZMはCPFAXより約1.2~6倍長いPAEを示し, それぞれ1.8および1.2時間であった。一方, CPZはいずれの菌に対してもPAEを示さなかった。

5. ATP量

E. coli K-12にAZMを作用させたときのATP量へ及ぼす影響について検討した結果をFig. 8に示す。

AZM 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)以上で, 添加1時間以後ATP量は減少した。AZM 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC)では4時間後から24時間後までATP量が減少したが, 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1/2MIC)では8時間以後増加した。一方, CAM, EMおよびCPFAXではATP量は4時間後から減少し, 24時間後においても増加は認められなかった。CPZ (4MIC)では2時間

後から減少したが, 24時間後に増加が認められた。また, ATP量に対するAZM 1MICの影響は, EM 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)およびCAM 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)の効果と同程度で, CPZ 4MICおよびCPFAX 4MICより明らかに強かった。

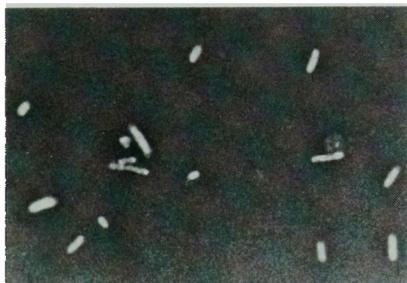
Ⅲ. 総括および考察

AZMの抗菌力は既存のマクロライド剤と比べてグラム陰性菌に対する抗菌力が大幅に改善されている。*H. influenzae*, *M. catarrhalis*および*N. gonorrhoeae*に対するMIC₉₀は0.05~0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に分布し, EMおよびCAMよりも2~4倍優れている¹⁾。一般的にマクロライド剤は, 薬剤の高い疎水性に基づいた菌体外膜の透過障害のため

Table 2. Postantibiotic effects of azithromycin and reference antibiotics

Organism	Drug	PAE (h)*
<i>Escherichia coli</i> K-12	Azithromycin	1.05
	Cefoperazone	-0.20
	Ciprofloxacin	2.80
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC29665	Azithromycin	1.80
	Cefoperazone	-0.05
	Ciprofloxacin	1.50
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC10211	Azithromycin	1.20
	Cefoperazone	-0.75
	Ciprofloxacin	0.20

* The bacteria were exposed to 2 × the MIC of drugs for 1 hour.



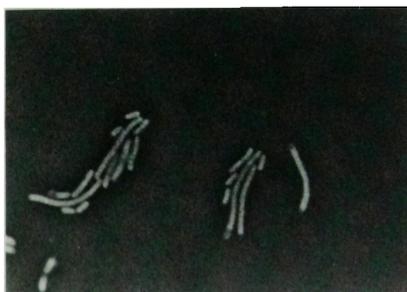
Azithromycin 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)



Erythromycin 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)



Clarithromycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4MIC)



Azithromycin 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC)



Erythromycin 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC)



Clarithromycin 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1MIC)

Fig. 7. Phase-contrast micrographs of *Haemophilus influenzae* ATCC10211 exposed to azithromycin, erythromycin and clarithromycin for 3 hours.

に⁹⁾、グラム陰性桿菌に対する抗菌活性は、著しく低いことが知られている⁹⁾。しかし、AZMは*E. coli*および*K. pneumoniae*に対して、MIC₉₀がそれぞれ3.13および6.25 $\mu\text{g/ml}$ であり¹⁾、マクロライド剤としては抗菌力の改善が認められた。AZMのグラム陰性菌に対する抗菌力向上の理由として、Farmerら⁶⁾はマクロライド環上に導入されたN-メチル基により生成した陽電子と、lipopolysaccharide (LPS)上に存在するself-promoted uptake pathwayとの相互作用により、外膜透過性が向上したためであると報告している。

殺菌作用の検討において、AZMは*E. coli*、*K. pneumoniae*および*H. influenzae*に対し、1MIC濃度で殺菌的作用を示したが、EMおよびCAMの1MIC濃度における作用は静菌的であった。AZM作用時の*E. coli*の形態変化像の観察の結果、1MIC濃度付近では菌体の伸長化が、高濃度では膨化および溶菌化が認められた。マクロライド剤などのタンパク合成阻害剤は、通常自己融解酵素を阻害するため、溶菌に影響を及ぼすことが知られている。しかし、高濃度のAZMで溶菌が確認されたことは、少なくとも自己融解酵素を阻害しないことが示唆される。一方、1MIC濃度で伸長化した菌は、4時間以後形態変化を示さなかった。しかしながら、その濃度での作用が殺菌的であることを考えると、伸長化した菌体は溶菌することなく、その形態を維持したまま殺菌されたと推測される。また、ATP量に及ぼす影響を検討した結果、殺菌作用との関連性は認められたが、菌数が大きく減少して

いたにもかかわらず、培地中に多量の残存ATPが確認された。Ishiharaら⁷⁾は液体培地中で、殺菌的作用を示す薬剤を細菌に作用させた時、短時間での溶菌および生菌数の減少が確認されたが、同時に多量のATPは残存していたと報告しており、我々の実験結果と一致した。形態変化の検討において、薬剤作用により溶菌されず殺菌されたと推測される細胞の残骸が多数確認されていることから、この殺菌作用とATP量への影響の相違は、細胞残骸中のATPによるものではないかと推測された。

また、AZMは*E. coli*、*K. pneumoniae*および*H. influenzae*のいずれに対してもCPFXと同様にPAEを示した。グラム陰性菌に対してPAEを示す薬剤としてニューキノロン薬、アミノ配糖体等の蛋白合成阻害剤およびカルバペネム剤が知られている^{8,9)}。PAEの作用機序は各種薬剤により異なるが、マクロライド剤のPAEはターゲットであるリボソームの50sサブユニットと薬剤の結合が解離されるまでの時間と考えられている。菌体が薬剤により受けたダメージから回復するまでの時間もPAEに関連すると考えられていることより、AZMの示した強力な殺菌作用による菌体へのダメージもPAEの要因であると考えられる。また、Kuenziら¹⁰⁾はマクロライド剤はグラム陽性菌および*H. influenzae*に対しPAEを有すると報告している。今回の検討で*H. influenzae*の他に*E. coli*および*K. pneumoniae*に対してもPAEを有することが確認された。一方、セフェム剤であるCPZはPAEを示さなかった。Hanbergerら^{11,12)}は β -lactam剤において、菌体の形態変化、

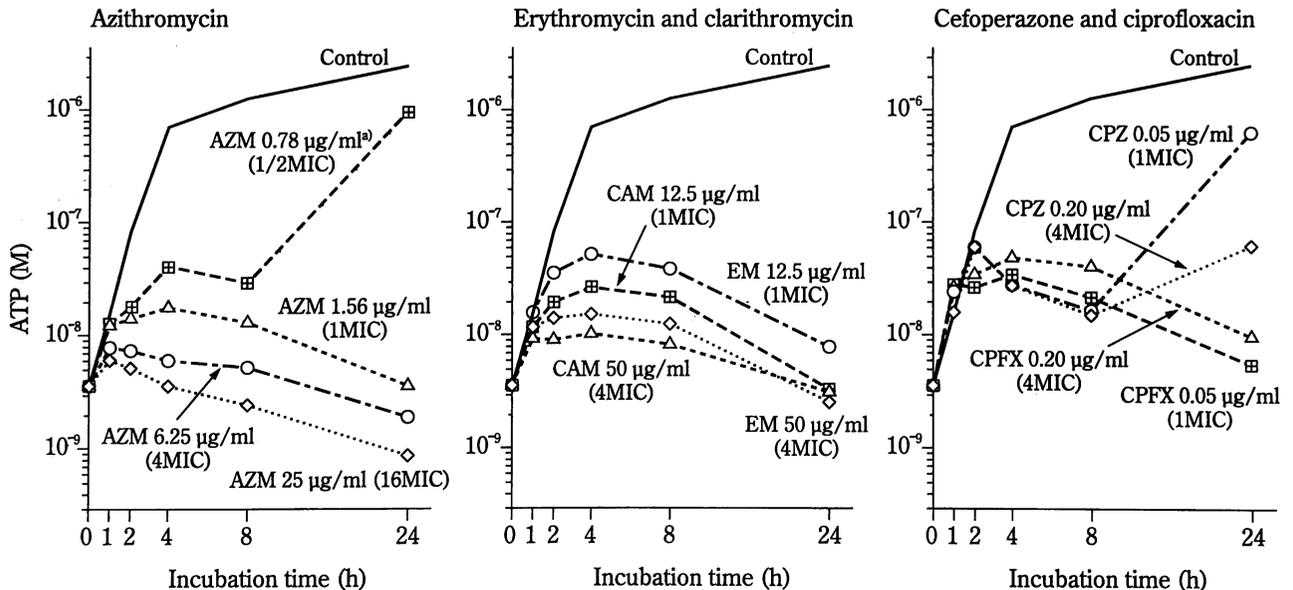


Fig. 8. Effects of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, cefoperazone and ciprofloxacin on the ATP of *Escherichia coli* K-12.

AZM : azithromycin, EM : erythromycin, CAM : clarithromycin, CPZ : cefoperazone, CPFX : ciprofloxacin.

a) : Drug concentration

菌体内ATP量およびPAEの間に明確な関連性を示しており、グラム陰性菌に対しPAEを有する β -lactam剤は、強力な殺菌作用を有し、菌体のspheroplast化を引き起こすと報告している。CPZの場合、大腸菌のPBP3に対する親和性が強く¹³⁾、菌の分裂に必要な隔壁の形成を阻害し、菌の伸長化を引き起こす。しかしながらこの伸長化には正常な細胞壁の伸長を伴うため、細胞のATP量が増加し、PAEを示さなかったと考えられる。一方、AZMの作用による菌体の形態変化は、タンパク合成阻害に伴うAZMあるいはマクラロイド剤特有のメカニズムにより引き起こされたと考えられ、CPZの場合のように細胞の形態変化に伴うATP量の増加は起こらないと推測された。

これらの結果より、AZMのグラム陰性菌に対する作用として以下のことが推察される。1) AZMは速やかに外膜を透過し、1MIC以上の濃度でATP量の減少を伴う強力な殺菌作用を示す。2) AZMはMIC付近で菌体の伸長化および膨化を引き起こし、高濃度で菌体は膨化し溶菌する。3) AZMはCPFXと同様にグラム陰性菌に対してPAEを示す。

今回の検討により、AZMの*E. coli*, *K. pneumoniae*および*H. influenzae*に対する作用機序の一部が明らかになった。しかしながら、AZM作用後のグラム陰性菌が伸長化する原因など不明な点も多く、さらに検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 西野武志, 香本晃良, 大槻雅子: Azithromycinの*in vitro*および*in vivo*抗菌力。日本化学療法学会雑誌 43(S-6): 40~54, 1995
- 2) 日本化学療法学会: 微量液体希釈法によるMIC測定法(微量液体希釈法)。Chemotherapy 38: 103~105, 1990
- 3) 日本化学療法学会: 微量液体希釈法によるMIC測定法(日本化学療法学会標準法)の一部修正。Chemotherapy 41: 184~185, 1993
- 4) Nikaido H: Outer membrane of *Salmonella typhimurium* transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. Biochem Biophys Acta 433:

118~132, 1976

- 5) Kirst H A, Sides G D: New direction for macrolides antibiotics: Structural Modifications and In Vitro Activity. Antimicrob Agents Chemother 33: 1413~1418, 1989
- 6) Farmer S, Li Z, Hancock R E W: Influence of outer membrane mutations on susceptibility of *Escherichia coli* to the dibasic macrolide azithromycin. J Antimicrob Chemother 29: 27~33, 1992
- 7) Ishihara S, Oguchi K, Yamada S, Hayashi H, Yamaha M, Kanematsu M, Ban Y, Kawada Y: ATP bioluminescence assay for rapid antibacterial susceptibility testing. Chemotherapy 39: 66~70, 1991
- 8) 戸塚恭一: 抗菌薬のPAE。感染症 19: 283~288, 1987
- 9) 戸塚恭一, 清水喜八郎: アミノ配糖体のPAE。Medico: 7797~7800, 1987
- 10) Kuenzi B, Segessenmann C, Gerber A U: Postantibiotic effect of roxithromycin, erythromycin, and clindamycin against selected gram-positive bacteria and *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 20 Suppl B: 39~46, 1987
- 11) Hanberger H, Nilsson L E, Kihlstrom E, Maller R: Postantibiotic effect of β -lactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. Antimicrob Agents Chemother 34(1): 102~106, 1990
- 12) Hanberger H, Nilsson L E, Maller R, Nilsson M: Pharmacodynamics of β -lactam antibiotics on gram-negative bacteria: initial killing, morphology and post antibiotic effect. Scand J Infect Dis Suppl 74: 118~123, 1990
- 13) Matsubara N, Minami S, Matsushashi M, Takaoka M, Mitsushashi S: Affinity of cefoperazone for Penicillin-Binding Proteins. Antimicrob Agents Chemother 18: 195~199, 1980

In vitro antibacterial activity of azithromycin against *Escherichia coli*,
Klebsiella pneumoniae and *Haemophilus influenzae*

Akira Komoto, Masako Otsuki and Takeshi Nishino

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

The *in vitro* activity of azithromycin (AZM), a macrolide antibiotic, against gram-negative bacteria was evaluated in comparison with those of erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), cefoperazone (CPZ) and ciprofloxacin (CPFX). In this study, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* were used as test strains.

AZM showed concentration-dependent bactericidal activity against all the strains tested. Morphological observation with a phase-contrast microscope demonstrated that AZM produced elongation and swelling of cells in *E. coli*, *K. pneumoniae* and *H. influenzae* at around each MIC. At high concentrations, bacteriolysis was observed. AZM had a postantibiotic effect against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *H. influenzae*, similar to CPFX. The bacterial ATP of *E. coli* was reduced after exposure to 1 MIC of AZM, and its activity was similar to that of 4 MIC of EM and 4 MIC of CAM and superior to that of 4 MIC of CPZ and 4 MIC of CPFX.