

新抗生物質 Rifamycin SV に対する抗酸菌の感受性

東 村 純 雄・東 村 道 雄

国立療養所大府荘（荘長 勝沼六郎博士）

受 付 昭 和 37 年 5 月 11 日

Rifamycin SV（旧名 Rifomycin SV，以下 RM と略す）はイタリアの Sensi ら¹¹⁻⁷⁾によつて *Streptomyces mediterranei* の培養濾液から分離された新抗生物質で主としてグラム陽性菌に作用する。RM は *in vitro* 実験で結核菌の発育を抑制し⁵⁾⁸⁾¹⁰⁾，マウス⁶⁾¹³⁾ およびモルモット¹²⁾の実験結核に有効で，人体でも有効であることが予報的に報告されている⁹⁾。RM は経口投与では吸収されにくく，注射局所に壊死を生じる欠点を有していたが，Curci⁸⁾により Polyvinylpyrrolidone に溶解して注射する方法が採用されてから安全に使用可能となった。その毒性はきわめて少ない⁷⁾。

RM の抗結核菌作用に関しては Nitti ら¹⁰⁾の報告があり，種々の既知抗結核剤耐性菌も感性菌同様の感受性を有することが知られるが，その逆の RM 耐性菌の性状については知られていない。そこで本報では種々の RM 耐性菌の他抗結核剤感受性を検するとともに，最近問題になっているいわゆる「非定型抗酸菌」の RM 感受性について検討することとした。

実験方法

Rifamycin SV (RM) はナポリ大学結核科の Curci 博士の好意によつて入手した。RM はまず Propylene-glycol に 40 mg/ml の割合に溶解し，ついで蒸留水でうすめたのち，滅菌前の培地に添加した。培地は 1% 小川培地で，その構成は次のごとくである。基礎液（1% KH_2PO_4 および 1% グルタミン酸ソーダ）100 ml，全卵 200 ml，グリセリン 6 ml，2% マラヒット緑 6 ml (pH 6.8)。培地は 90°C 60 分滅菌後斜面とした。滅菌により力価は 1/16 に低下したが，これは熱による RM の分解によるものではなく，凝固蛋白への吸着による¹³⁾。

抗酸菌の RM 感受性はいわゆる actual count 法¹⁴⁾によつた。この方法は，培地当りの接種生菌数を 20～100 (10～150) に調整したときに，集落発生可能の最高濃度で耐性度を表わす方法であるが，本法では便宜

上，上述のごとく接種生菌数を調整したときの最小発育阻止濃度で薬剤感受性を表わした。

具体的にいえば，被検菌をガラス玉とともに 10 分間振盪して生理食塩水に浮游し，まず 10～50 mg/ml の菌液を作り，これを 10 倍単位で希釈して $10^0\sim10^{-6}$ 液を作つた。培地は種々の薬剤濃度の希釈列を 4 組つくり，各組に $10^{-3}\sim10^{-6}$ 菌液を渦巻白金耳で 1 白金耳ずつ接種した。接種後ゴム栓をして 37°C 4 週培養して集落数を数えた。

実験結果ならびに考察

1) 人型結核菌と牛型結核菌の RM 感受性の比較

表 1 に actual count 法による RM の最小発育阻止濃度を示す。人型菌の最小発育阻止濃度は，6.3～12.5 $\mu\text{g/ml}$ ，一方牛型菌のそれは 1.6～3.2 $\mu\text{g/ml}$ で，概して牛型菌のほうが人型菌より感受性が高い。

この人型菌と牛型菌との RM 感受性の差は注目すべき所見と思われる。あるいは，これを両者の区別の一助となしうるかもしれない。

Table 1. Comparison of Sensitivity to Rifamycin SV between *M. tuberculosis* var. *hominis* and *M. tuberculosis* var. *bovis*

Strain	Minimal inhibitory concentration of rifamycin SV
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>hominis</i>	
H37Rv	6.3 $\mu\text{g/ml}$ (37)*
H37Ra	6.3 (97)*
Aoyama-B	12.5 (134)*
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>bovis</i>	
Denken	3.2 (62)*
BCG	3.2 (24)*
Ravencl	1.6 (35)*

* Inoculum size (number of viable cell units) used for determination of the minimal inhibitory concentration.

2) RM と他の抗結核剤との交叉耐性

Sumio TSUKAMURA and Michio TSUKAMURA (The Obuso National Sanatorium, Obu-cho, Chita-gun, Aichi-prefecture, Japan): Susceptibility of Various Mycobacterial Strains to a New Antibiotic, Rifamycin SV—Kekkaku, 37 (9・10): 586～590, 1962.

人型結核菌 H₃₇Rv 株および青山 B 株の種々の耐性株の RM 感受性を actual count 法で検すると、表 2 のごとく、いずれも原株と同じ感受性を示す。

次に、H₃₇Rv 株および青山 B 株から種々の濃度で RM 耐性株を分離して、既知抗結核剤に対する感受性を検討した。その結果は、表 3 のごとくであつて、青山 B 株では原株と RM 高耐性株の間に抗結核剤感受性の差がみられず、H₃₇Rv 株の RM 耐性株についても他抗結核剤感受性の著明な差は認められなかつた。しかし、H₃₇Rv 株から分離した RM 耐性株は一般に若干 SM 感受性および KM 感受性が高まる傾向があるように思われた。(表 3)

なお、これらの RM 耐性株は RM 400 ~25 $\mu\text{g/ml}$ 培地による one-step selection で得られた単個集落に由来するものであるが、これらの耐性株は薬剤なし培地に 1 代継代しただけであるが、RM 400 $\mu\text{g/ml}$ および 200 $\mu\text{g/ml}$ で分離したもののみが 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 以上耐性で、他の 100~25 $\mu\text{g/ml}$ で分離したものは原株とほとんど同じ耐性を示した。すなわち、RM 耐性菌の安定なものは高濃度選択による高耐性菌のみで、遺伝的に安定した中間耐性型は存在しないように思われた。

以上の結果から、RM と他抗結核剤との間には交叉耐性はまず存在しないと考えられた。

3) 「非定型抗酸菌」の RM 感受性—Mycobacterium tuberculosis と他の抗酸菌との区別

近時問題となつている非定型抗酸菌が RM に感受性を有するか否かを検討したが、その結果は表 4 に示すとおりで、大部分の非定型菌は RM に対する感受性が低い。とくに Photochromogen の RM 感受性は低い。したがつて、RM は非定型菌感染症の治療剤としてはまず意義をもたないものと思われる。M. avium (トリ型菌) も RM 感受性は低い。

以上のごとく、RM は非定型菌に対してはほとんど発育阻止能力をもたないことが知られたが、この検討の結果、人型および牛型結核菌以外の抗酸菌はほとんど発育阻止を受けぬことが分かつたので、これを用いて人型および牛型菌の screening が可能であることを知つた。著者は前に RM 100 $\mu\text{g/ml}$ を用いて同じ試みを行なつたが¹⁶⁾、その後の検討で RM 50 $\mu\text{g/ml}$ のほうがきれいな区分けができることが分かつたので、ここにはその成績を掲げる。

人型および牛型結核菌は RM 50 $\mu\text{g/ml}$ 含有 1 %

Table 2. Sensitivity to Rifamycin SV of Various Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*

Strain	Minimal inhibitory concentration of rifamycin SV
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>hominis</i> H37Rv	
Parent strain	6.3 $\mu\text{g/ml}$ (146)*
SM-resistant strain	6.3 (88)*
KM-resistant strain	6.3 (35)*
VM-resistant strain	6.3 (60)*
INH-resistant strain	6.3 (39)*
PAS-resistant strain	6.3 (96)*
Amithiozone-resistant strain	6.3 (75)*
Thioamide-resistant strain	6.3 (54)*
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>hominis</i> Aoyama-B	
Parent strain	12.5 (121)*
SM-resistant strain	12.5 (131)*
INH-resistant strain	12.5 (93)*
PAS-resistant strain	12.5 (80)*
Amithiozone-resistant strain	12.5 (90)*

* Inoculum size (number of viable cell units) used for determination of the minimal inhibitory concentration.

(H37Rv: resistant to more than 10,000 μg of streptomycin per ml ; resistant to 100 μg of kanamycin per ml ; resistant to 50 μg of viomycin per ml ; resistant to 10 μg of isoniazid per ml ; resistant to 1,000 μg of PAS per ml ; resistant to 10 μg of amithiozone per ml ; resistant to 125 μg of thioamide (1314Th) per ml . Aoyama-B: resistant to 10,000 μg of streptomycin per ml ; resistant to 200 μg of isoniazid per ml ; resistant to 500 μg of PAS per ml ; resistant to 50 μg of amithiozone per ml .)

小川培地に 1 白金耳塗抹するとき、少数の単離集落としてでる耐性菌を除いては、ほとんど発育が認められない。これに対して、他の抗酸菌はほとんど全部この培地に膜状の豊富な発育を示す。しかし例外も少数発見できる。今のところ、この例外は、人体分離の非定型菌で、その中でも Nonphotochromogen に多い。人体由来の Nonphotochromogen 中、100,616 株 (U. S. A. 由来)、上田株および宮田株 (名大日比野内科より分与された¹⁷⁾) が RM 50 $\mu\text{g/ml}$ に感性であり、Scotochromogen では、安田株 (国療大府荘分離) が RM 50 $\mu\text{g/ml}$ に感性であつた。

著者は人体分離の非定型菌には、人型菌と土壌非定型菌との中間的なものと単に環境から迷入したものとがあるという考えに賛意を表するものであるが、ここに得られた成績は、人体由来の Nonphotochromogen の一部の菌は RM 感受性の点で人型結核菌と似た性質をもつことを暗示しているように思われる。土壌由来の非定型菌中にも RM 感受性が高いものがあるらしいが、その頻度は人体由来非定型菌よりも著明に低いことが注目される。こうしてみると、人体由来の非定型菌は単に環境から迷入したもののばかりではなく、特別な性質をもつ一群 (人型菌と土壌由来非定型の中間型) を含むものと考

Table 3. Susceptibilities of Various Rifamycin-Resistant Mutants to Various Antituberculous Drugs

Strain**	Minimal inhibitory concentration of antituberculous drugs (μg/ml)								
	SM	KM	VM	INH	PAS	1314Th	Tbl	CM	V.C.①
H37Rv									
RM 400 R	5	10	10	0.02	0.05	10	0.2	10	112.0
RM 200 R	5	10	10	0.04	0.05	10	0.3	20	22.0
RM 100 R	5	10	10	0.03	0.05	10	0.3	20	15.2
RM 50 R	5	10	10	0.03	0.05	10	0.3	10	12.8
RM 25 R	5	10	10	0.04	0.05	10	0.3	20	52.1
Parent	10	20	10	0.04	0.05	10	0.2	20	74.4
Parent	10	20	20	0.03	0.05	10	0.2	10	48.3
Aoyama-B									
RM 400 R	10	20	20	0.03	0.05	10	0.4	20	26.4
Parent	10	20	20	0.03	0.05	5	0.3	20	48.2

* SM: dihydro-streptomycin sulfate; KM: kanamycin sulfate; VM: viomycin sulfate; Tbl: amithiozone; CM: chloramphenicol.

** RM 400, 200, 100, 50, and 25 R represent clones isolated on the concentrations of 400, 200, 100, 50 and 25 μg of rifamycin SV per ml, respectively. Population of RM 400 R and RM 200 R are resistant to more than 1,000 μg of rifamycin SV per ml, but that of other clones are almost as sensitive as that of the parent clone (strain). This marked phenomenon will be described elsewhere.

① Number of viable cell units inoculated per medium for determination of the minimal inhibitory concentrations of the test antituberculous drugs.

Drug concentrations used:

SM: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0 μg/ml.

KM: 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0 μg/ml.

VM: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0 μg/ml.

INH: 0.1, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.005, 0 μg/ml.

PAS: 1, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0 μg/ml.

1314Th: 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 0 μg/ml.

CM: 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0 μg/ml.

Table 4. Sensitivity to Rifamycin SV of "Unclassified Mycobacteria"

Strain	Growth on medium containing 50 μg of rifamycin SV per ml	
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>hominis</i>	0/4	(0 %)
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>bovis</i>	0/3	(0 %)
<i>M. avium</i>	2/2	(100 %)
Unclassified mycobacteria (human origin)		
{ Photochromogen	4/4	(100 %)
{ Nonphotochromogen *	11/14	(79 %)
{ Scotochromogen **	37/38	(97 %)
Unclassified mycobacteria (soil origin)		
{ Nonphotochromogen	9/9	(100 %)
{ Scotochromogen	16/16	(100 %)
Saprophytic mycobacteria	6/6	(100 %)

* Growth of 100616, Ueda and Miyata strains was inhibited.

** Growth of Yasuda strain (Obuso National Sanatorium) was inhibited. Growth was observed after 4 weeks of incubation. Growth showing several discrete colonies was regarded as "no growth" and only membranous growth was regarded as "positive growth".

結 論

1) 新抗生物質 Rifamycin SV (RM) に対する抗酸菌の感受性を 1% 小川培地による actual count 法で検討した。

2) 牛型結核菌は人型結核菌より一般に RM 感受性が高い。

3) RM と Streptomycin, Kanamycin, Viomycin, P A S, INH, Amithiozone, Alpha-ethylthioisonicotinamide (1314 Th), Chloramphenicol の間には交叉耐性がない。

これら既知抗結核剤耐性菌は原株同様に RM に感受性であり、また RM 耐性菌の既知抗結核剤に対する感受性も原株とほぼ同じである。

4) 「非定型抗酸菌」は例外を除いては、一般に RM 感受性が低い。非定型菌のみならず、人型および牛型結核菌以外の抗酸菌は RM 感受性が低いので、この差を利用して人型菌および牛型菌の screening が可能である。人型および牛型結核菌は RM 50 μg/ml 培地に発育不能であるが(自然耐性菌の少数の単離集落は生じる)、他の抗酸菌は一般に豊富な発育が可能である。

RM 50 μg/ml 培地で例外的に発育を抑制されるものは、人体由来の非定型菌とくに Non-photochromogen に多い。

References

1) Sensi, P., Margalith, P., & Timbal, M. T.: II Farmaco, 14: 146, 1959.
2) Sensi, P., Greco, A. M., & Ballotta, R.: Antibiotics annual, 1959~1960: 262.
3) Sensi, P., Timbal, M. T., & Maffii, C.: Experientia, 16: 412, 1960.

4) Sensi, P.; Ballotta, R., Greco, A. M., &

- Gallo, G.G.: Il Farmaco, 16: 165, 1961.
- 5) Timbal, M.T., Pallanza, R., & Carniti, G.: Il Farmaco, 16: 181, 1961.
 - 6) Timbal, M.T., & Brega, A.: Il Farmaco, 16: 191, 1961.
 - 7) Maffii, G., Schiatti, P., Bianchi, G., & Serralunga, M.G.: Il Farmaco, 16: 235, 1961.
 - 8) Monaldi, V., Curci, G., e Nitti, V.: Arch. Tisiol., 16: 361, 1961.
 - 9) Monaldi, V.: Arch. Tisiol., 16: 1013, 1961.
 - 10) Nitti, V., Virgilio, R., e Ninni, A.: Arch. Tisiol., 16: 1023, 1961.
 - 11) Curci, G., e Ninni, A.: Arch. Tisiol., 16: 1079, 1961.
 - 12) Blasi, A., Curci, G., e Ninni, A.: Arch. Tisiol., 16: 1124, 1961.
 - 13) Tsukamura, M., & Tsukamura, S.: J. Antibiotics, A., in press., 第37回日本結核病学会, 昭37.
 - 14) 東村道雄: 医学と生物学, 49: 87, 昭33.
 - 15) 東村道雄: 安保孝・勝沼六郎: 結核, 34: 625, 昭34.
 - 16) 東村道雄: 医学と生物学, 62: 131, 昭37.
 - 17) 日比野進: 第37回日本結核病学会特別講演, 昭37.

Susceptibility of Various Mycobacterial Strains to a New Antibiotic, Rifamycin SV.

Rifamycin SV is a new antibiotic discovered by Sensi et al.¹⁻⁷⁾. It inhibited the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in *in vitro* experiments^{5, 8, 10)} and was active against tuberculosis of mice^{6, 13)}, guinea pigs¹²⁾ and human beings⁹⁾. It could be safely administered by a combined use of polyvinylpyrrolidone as adjuvant¹¹⁾.

Nitti et al.¹⁰⁾ demonstrated that *M. tuberculosis* was highly sensitive to this antibiotic and various drug-resistant mutants also are as sensitive as the parent strain. In the present paper, the present authors deal with the sensitivity of rifamycin-resistant strains to various antituberculous drugs and the sensitivities to this antibiotic of various mycobacterial strains including "unclassified mycobacteria".

Methods

Rifamycin SV was supplied through the courtesy of Dr. G. Curci, Tuberculosis Clinic of Naples University. It was dissolved in propylene-glycol at a concentration of 40 mg/ml, diluted with distilled water and then added to egg medium before sterilization. The medium used was Ogawa egg medium and its composition was as follows: Basal solution (1 % KH_2PO_4 and 1 % sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2 % malachite green, 6 ml (pH 6.8). The medium was slanted by sterilization at 90°C for 60 minutes. After the sterilization, the activity of the antibiotic was reduced until

one-sixteenth the original activity. This reduction was shown to be due to adsorption of the antibiotic to protein¹³⁾.

The sensitivity of various mycobacterial strains was expressed as the minimal concentration of the antibiotic on which small inocula can not grow as visible colonies. The inoculum size was adjusted to 20 to 150 viable units per medium. The count was made after 4 weeks of incubation at 37°C.

Results

1) Comparison of rifamycin SV sensitivity between *M. tuberculosis* var. *hominis* and *M. tuberculosis* var. *bovis*.

M. tuberculosis var. *bovis* tended to be more sensitive to this antibiotic than *M. tuberculosis* var. *hominis* (Table 1).

2) Cross resistance relationship in respect to rifamycin SV.

Various drug-resistant strains proved to be as sensitive to the antibiotic as the parent strains (Table 2) and rifamycin-resistant strains, isolated on various concentrations of rifamycin SV, were as sensitive to various antituberculous drugs as the parent strains (Table 3). Thus, it was shown that there was no cross resistance relationship between rifamycin SV and other antituberculous drugs.

3) Sensitivity to rifamycin SV in various mycobacterial strains—Differentiation of *M. tuberculosis* from other mycobacteria by rifamycin SV sensitivity.

M. tuberculosis var. *hominis* and *M. tuberculosis* var. *bovis* could not grow on medium containing 50 μ g of rifamycin SV per ml with the exception of a few colonies of rifamycin-resistant mutants occurring spontaneously in the original population not exposed to the antibiotic previously, when the rifamycin-containing medium was inoculated with one loopful of the stock cultures. On the other hand, most strains of the other mycobacteria could grow abundantly on the same medium (Table 4).

It was supposed that *M. tuberculosis* could be differentiated from other mycobacteria by rifamycin sensitivity. A few exceptional cases were found in unclassified mycobacteria isolated from human beings. These exceptional cases were found mostly in nonphotochromogens from human origins. This suggests that some nonphotochromogens from human origins may have a property resembling *M. tuberculosis*.

(The authors thank to Dr. G. Curci for his kind help in the conduct of the present study.)