

Rifampicin の抗結核作用に関する基礎的研究

豊原 希一

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎隴郎)

受付 昭和 46 年 2 月 5 日

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE ANTITUBERCULOUS
ACTIVITY OF RIFAMPICIN*

Mareichi TOYOHARA

(Received for publication February 5, 1971)

The antituberculous activities of rifampicin (RFP) were studied experimentally on the following five subjects:

1. the antituberculous activities in vitro of RFP, Rifamycin-RV & Desacetyl-RFP.
2. regrowth of tubercle bacilli contacted with RFP or INH in vitro.
3. electronmicroscopic changes of tubercle bacilli contacted with RFP.
4. uptake of ^{14}C -RFP by tubercle bacilli.
5. distribution of ^{14}C -RFP in the bodies of guinea pigs and mice.

1) The antituberculous activity in vitro of RFP, Rifamycin-SV and Desacetyl-RFP. 10^{-2} mg of seven days' culture of $H_{37}\text{Rv}$ in Dubos media was inoculated on three kinds of media and was observed at the third week after inoculation.

The results are shown in Tables 1, 2 and 3. Minimum inhibitory concentration (M.I.C.) depends on the kind of media. The inhibitory activity is much decreased on the egg media.

The significant difference of the antituberculous activity in vitro was not found among three drugs, but each drug proved to be highly inhibitive to tubercle bacilli.

- 2) Regrowth of tubercle bacilli contacted with RFP or INH.

When tubercle bacilli ($H_{37}\text{Rv}$) in Dubos liquid media were grown to 0.2 of optical density (O.D.) by photo-spectrometer, RFP or INH was added in media at the concentration of 5 mcg/ml. After 1, 4 and 24 hours of contact with each drug, tubercle bacilli were washed thoroughly by 5 ml of Dubos media three times in membrane filter holder according to Dickinson's method, and 0.1 ml of resuspended bacilli was added to 5 ml of Dubos media. Changes in O. D. was observed daily till the sixteenth day.

Growth ratio (ratio of O. D. of culture in the elapsed day to O. D. of culture at the inoculated time) is shown in Figs. 1 and 2 by the time of contact time for each drug.

As shown in these figures, non-treated bacilli grow rapidly, ca. one hundred fold, in two weeks.

Regrowth of tubercle bacilli contacted with RFP for one hour and four hours was similar with each other and as slow as one tenth of non-treated bacilli at the fourth day and only eight fold at the sixteenth day. Growth ratio of tubercle bacilli contacted with RFP for twenty-four hours did not increase till fourteenth day.

On the other hand, regrowth of bacilli contacted with INH for one hour and four hours

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

was more rapid than that with RFP.

3) Electronmicroscopic view of the morphological changes of tubercle bacilli contacted with RFP.

Photograph 1 shows the change of tubercle bacilli contacted with 10 mcg/ml of RFP for four hours.

The partial destruction of cytoplasm of tubercle bacilli was found.

Photograph 2 shows the change of bacilli contacted for twenty-four hours.

Cytoplasm became loose as a whole and vacuole-like change of nuclei was seen.

4) Uptake of ^{14}C -RFP by tubercle bacilli.

H_{37}Rv and the resistant strain to 100 mcg/ml of RFP ($\text{H}_{37}\text{RvRFPR}$) were cultivated in Dubos liquid media. After nine days ^{14}C -RFP was added at the concentration of 10 mcg per ml (80 m $\mu\text{Ci/ml}$) in media.

Bacilli were washed thoroughly and collected on a membrane filter one, six and twenty-four hours after adding ^{14}C -RFP.

Radioactivity of bacilli was measured by liquid scintillation counter.

Result is shown in Table 4.

Both sensitive and resistant bacilli take up ^{14}C -RFP rapidly in one hour. Difference of uptake between sensitive and resistant strains was not significant.

5) Distribution of RFP in the bodies of animals.

^{14}C -RFP was given perorally to mice or guinea-pigs to know the absorption and distribution of RFP. ^{14}C -RFP was given 20 μCi to a mouse, and 40 μCi to a guinea-pig. The animals were frozen in time lapse at two, six and twenty-four hours, and whole-body sections were made by Leitz microtome type 1300.

Macroautoradiography (ARG) was carried out on whole body sections. ARG of mice are shown in Photo 3 and that of guinea-pigs in Photo 4.

As shown in photographs, ^{14}C -RFP was absorbed rapidly from intestines of both mice and guinea-pigs, and distributed in liver, kidney and lung in 2 hours. Concentration of ^{14}C -RFP was the highest in liver. The concentration in each organ did not decrease after six hours, and relatively high concentration of ^{14}C -RFP remained in organs even after twenty-four hours.

The results are summarized as follows :

1) The antituberculous activities in vitro of RFP, Desacetyl-RFP and Rifamycin-SV were almost the same. M. I. C. of each drug was 0.05 mcg/ml in Dubos media, 0.2~0.5 mcg/ml in Kirchner semi-liquid agar media and 10~20 mcg/ml on 1% Ogawa's media.

2) Regrowth of tubercle bacilli contacted with RFP was delayed than that with INH.

3) The electronmicroscopic view revealed that RFP gave damage to cytoplasm of tubercle bacilli and finally pathological changes appeared in nuclei of bacilli.

4) The significant difference of ^{14}C -RFP uptake between sensitive bacilli and highly resistant bacilli to RFP was not proved.

5) ^{14}C -RFP was distributed rapidly in the whole body after the oral administration and the concentration of RFP in organs remained longer than INH from the result of the macroautoradiography of whole-body section.

I. 緒 言

Rifampicin (RFP と略) は Rifamycin-SV を母核とし、これに piperazin を合成化学的に結合させることに

より動物に対する抗結核作用が飛躍的に増強した半合成抗結核薬で、そのモルモット¹⁾およびマウス実験結核症²⁾に対する効果についてはすでに発表した。今回は RFP, Rifamycin-SV, Desacetyl-RFP の試験管内抗結核菌作

用をみるとともに RFP と結核菌との培地内接触時間と菌の再増殖との関係を見た。次に RFP の菌の形態に及ぼす影響を電子顕微鏡的に観察した。さらに RFP を ¹⁴C で標識し RFP 耐性菌の RFP とりこみが感性菌と異なるかをみるとともに ¹⁴C-RFP を用い RFP の体内分布をマウス、モルモットについてみた。

II. 実 験

1. RFP, Rifamycin-SV, Desacetyl-RFP の試験管内抗結核菌作用

a) 材料ならびに方法

培地および薬剤濃度：10% アルブミン加 Kirchner 半流動寒天培地では 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mcg/ml。Dubos 液体培地では 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mcg/ml。1% 小川培地では 1, 5, 10, 20, 50, 100 mcg/ml。

各薬剤は純メタノールで 10 mcg/ml 溶液をつくり、これを水で倍数希釈し所定の培地内濃度とした。

使用菌株および接種菌量：Dubos 培地 7 日培養 H₃₇Rv の 10⁻² mg 相当量を接種し 3 週後に観察した。

b) 成績

表 1, 2, 3 に示す。

表にみるごとく培地によつて MIC が異なる。RFP の MIC は Kirchner 半流動寒天培地では 0.5 mcg/ml, Dubos 培地では 0.05 mcg/ml, 1% 小川培地では 20 mcg/ml, Desacetyl-RFP のそれは、それぞれ 2 mcg/

Table 1. Antituberculous Activity of Rifampicin and its Derivatives *In Vitro* on Kirchner's Semiliquid Agar Media

mcg/ml	Rifampicin	Desacetyl-rifampicin	Rifamycin-SV
2	—	—	—
1	—	+ ₁	—
0.5	—	+ ₄	—
0.2	+ ₂	+	—
0.1	≡	≡	≡
0	≡	≡	≡

Table 2. Antituberculous Activity of Rifampicin and its Derivatives *In Vitro* on Dubos' Liquid Media

mcg/ml	Rifampicin	Desacetyl-rifampicin	Rifamycin-SV
2	—	—	—
1	—	—	—
0.5	—	—	—
0.2	—	—	—
0.1	—	—	—
0.05	—	—	—
0.01	≡	≡	≡
0	≡	≡	≡

Table 3. Antituberculous Activity of Rifampicin and its Derivatives *In Vitro* on 1% Ogawa's Media

mcg/ml	Rifampicin	Desacetyl-rifampicin	Rifamycin-SV
100	—	—	—
50	—	—	—
20	—	+ ₂	—
10	+ ₂	+ ₂₁	+ ₅
5	+ ₁₇	+ ₆₈	+ ₁₀₀
1	≡	≡	≡
0	≡	≡	≡

ml, 0.05 mcg/ml, 50 mcg/ml, Rifamycin-SV はそれぞれ 0.2 mcg/ml, 0.05 mcg/ml, 20 mcg/ml であつた。しかし各培地各薬剤とも MIC の 1~2 段階下の濃度で対照に比べると菌の発育を強く阻止しており試験管内抗菌力には大差ないと思われた。

2. RFP および INH と結核菌との培地内接触時間と菌の再増殖との関係

a) 材料ならびに方法

H₃₇Rv を Dubos 培地に培養し日立 101 型分光光度計 (470 mμ) で O. D. 0.2 になつた時点で RFP または INH を 5 mcg/ml に添加し 1, 4, 24 時間後にメンブランフィルターを用い Dickinson の方法³⁾に従い培養液を吸引濾過し菌体を Dubos 培地 5 ml で 3 回洗浄し洗浄菌液をよくかきまぜ、その 0.1 ml を 5 ml の Dubos 培地に加え分光光度計 (470 mμ) で 16 日まで毎日 O. D. をみる。また薬剤無添加培養液に同様の処置を行ない対照とする。また対照および薬剤接触洗浄直後の生菌数を小川培地により算定しておく。

b) 結果

洗浄後、培養当日と培養各日の O. D. の比を増殖比と

Fig. 1. Regrowth of Human Type Tubercle Bacilli after Contact with RFP

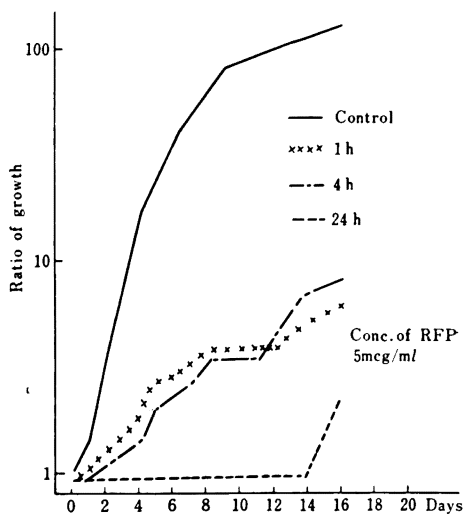
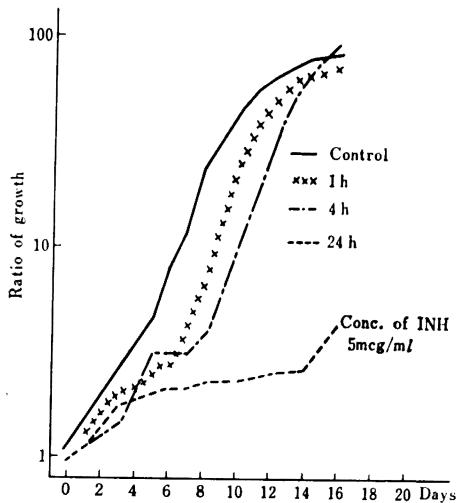


Fig. 2. Regrowth of Human Type Tubercle Bacilli after Contact with INH



よぶ。薬剤別、接触時間別増殖比の時間的変動を Fig. 1, 2 に示す。

対照および薬剤接触洗浄直後の生菌数は 4×10^4 /ml 前後で大差なかつた。

Fig. 1, 2 にみるごとく薬剤非添加の対照菌は急速に増殖し約2週間で100倍になる。

RFP に1時間、4時間接触させた菌の増殖はほぼ同じカーブを画き徐々に上昇し4日では対照の $1/10$ 、16日では最初の8倍弱になるにすぎない。24時間接触群は14日までは全く増殖せず16日にいたり急速に増殖した。

これに対し INH では1時間、4時間接触菌の再増殖は急速で対照群と比べ4日で $2/3$ 、14日後には対照群と同程度に増殖する。24時間接触になると菌の再増殖は緩やかで4日から14日までは、ほぼプラトーを続けるが、それ以後 RFP の場合と同様急速に増殖した。

3. RFP の結核菌の形態に及ぼす影響の電子顕微鏡的観察

a) 材料ならびに方法

$H_{37}Rv$ を Dubos 液体培地に培養し7日目に培地に 10 mcg/ml に RFP を添加し4時間、24時間後に pH 7.0 Tris buffer で洗浄遠沈し菌体を1% オスミウム酸で17時間固定しアルコール脱水しスチレン:正プチルメタクリレート(5:5)で包埋した後⁴⁾ Porter-Blum M-II 型電顕用ウルトラマイクロームで超薄切片をつくり JEM 100 U で観察した。

b) 結果

写真 1, 2 に示す。

4時間目で少数ではあるが菌体細胞質の部分的崩壊が起こり分画像を認めるものがあつた。さらに24時間後には細胞質は全体的に粗になり核の空胞化が認められた。

4. 結核菌の RFP とりこみに関する実験

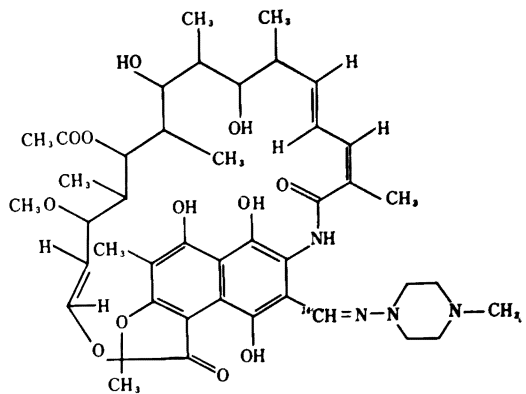
INH 耐性結核菌の INH とりこみが少ないことはすでによく知られているが⁵⁾ RFP 耐性菌の RFP とりこみが感性菌と異なるか否かを ^{14}C -RFP を用いて実験した。

a) 材料ならびに方法

菌株: $H_{37}Rv$ および $H_{37}Rv$ より分離した RFP 高度耐性菌 (Dubos 培地において RFP 100 mcg/ml 以上に耐性, $H_{37}RvRFPR$ と略)。

^{14}C -RFP: 第一化学薬品東海研究所において製造。構造式とラベル位置を Fig. 3 に示す。比放射能 6.7 mCi/mM 。使用時純メタノールで 10 mg/ml の ^{14}C -RFP 溶液をつくり、これを蒸留水で10倍に希釈し 1 mg/ml ($8 \mu\text{Ci/ml}$ 相当) の溶液をつくる。

Fig. 3. Chemical Formula of ^{14}C -RFP



$H_{37}Rv$ および $H_{37}RvRFPR$ を Dubos 培地に培養し培養9日目に両者の濁度を同一にし、それぞれ3等分し 10 mcg/ml ($80 \mu\text{Ci/ml}$) の割合に ^{14}C -RFP を添加し1, 6, 24時間後に菌をよく洗浄し遊離の ^{14}C -RFP を除きメンブランフィルターを用い菌を採集し菌の乾燥重量測定後、フィルターごと Dioxane 系液体シンチレーターに投入し、液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。

b) 結果

表4に示す。

感性菌、耐性菌ともに RFP 添加1時間で急速に RFP をとりこみ、その後、多少増加する程度である。また感

Table 4. Uptake of ^{14}C -RFP by Human Type Tubercle Bacilli ($H_{37}Rv$)

Hours	1	6	24
$H_{37}Rv$	718	748	887
$H_{37}RvRFPR$	699	750	831

$H_{37}RvRFPR$: $H_{37}Rv$ resistant to RFP at 100 mcg/ml
Media employed: Dubos liquid media
Added ^{14}C -RFP: 10 mcg/ml ($80 \mu\text{Ci/ml}$)
Number in table indicates cpm per 1 mg of dry weight bacilli.

性菌と耐性菌のとりこみの差もほとんどなかつた。

5. RFP の体内分布に関する実験

RFP を経口投与したとき、その体内吸収および分布の動態をみるためマウスおよびモルモットに ^{14}C -RFP を経口投与し経時的に動物を殺し薄切全身切片をつくりマクロオートラジオグラフィ (ARG) を行なつた。

a) 材料ならびに方法

動物：体重 20 g 前後の dd 系マウスおよび体重 150 g 前後のモルモット。

^{14}C -RFP をサラダ油で 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ に懸濁しマウスには 1 匹につき 0.1 ml すなわち 20 μCi 、モルモットには 0.2 ml すなわち 40 μCi を経口投与し 2, 6, 24 時間後に 1 匹ずつエーテル麻酔をし -78°C のアセトンドライアイス中で急速凍結し Leitz 大型マイクロトームを用い厚さ 20 μ の全身切片をつくり⁶⁾ Fuji 工業用 non screen type X 線フィルムを用いマクロ ARG を行なう。19 日間露出した後、型のごとく現像固定する。

b) 結果

マウスの ARG を写真 3、モルモットのそれを写真 4 に示す。

写真にみるごとく 2 時間でマウス、モルモットともに REP は腸より吸収され肝、腎、肺等の各臓器に分布しことに肝への分布濃度が高い。腸管にももちろん、RFP は多量に存在し、この時点で腸肝循環はすでに始まっていると考えてよからう。6 時間でもマウス、モルモットともにことにマウスにおいて各臓器の黒化度はほとんど低下していない。モルモットの腸管、肝にはとくに多量に残存する。24 時間になると各臓器の黒化度は低下するがまだかなり残存している。モルモットの胃では 6 時間より 24 時間のほうがむしろ黒化度が高いのは胃への再分泌が考えられる。

2 時間でマウス、モルモットの腎、6 時間でモルモットの膀胱に放射能が認められるので RFP は腎から排泄されることが分かる。しかし経時的にみても腸管における濃度は非常に高いので糞便からの排泄が泌尿器系からの排泄より多いと思われる。これらの所見は同一標本をフィルムシンチレーションカウンターで測定した放射能計数率の成績と一致した。

III. 考 察

まず RFP, Desacetyl-RFP, Rifamycin-SV の試験管内抗菌力をみた。いずれも小川培地では抗菌力の低下が認められ、MIC はほぼ 10~20 mcg/ml と考えてよい。これは他の多くの抗結核薬にみられるように鶏卵培地への薬剤の吸着によるものと考えられる⁸⁾。しかし Dubos 培地, Kirchner 半流動寒天培地では、いずれも強い抗菌力を示し 3 種類の類縁物質の間の差はほとんどないといつてよく Dubos 培地では 0.05 mcg/ml, 半流動寒天

培地では 0.2~0.5 mcg/ml で菌の発育を阻止する。

他の細菌、たとえばブドウ球菌、枯草菌等に対する試験管内抗菌力は RFP に比し Desacetyl-RFP は 1/10 程度という報告があるが⁹⁾ この点、結核菌に対してはやや趣を異にしているといえよう。

次に RFP と結核菌を *in vitro* で接触させると結核菌の再増殖が著明におくれるという報告¹⁰⁾があり、この事実がまた RFP の間欠療法を支持する 1 つの理由にもなっているので実験 2 において INH と比較検討した。Dickinson らは生菌数でみているが⁹⁾¹⁰⁾ 一定時間接触した直後、十分菌体を洗浄し一定量の生菌数を調べたところ接触時間による差は大きくなかつたので、その後は生菌数をとくに測らず Dubos 培地の濁度から増殖比を計算し比較した。

RFP 接触群は INH 接触群に比べ再増殖がかなりおくれる。いま、大まかな推論を試みれば 1 回投与で血中濃度がこの実験に用いた RFP の濃度 5 mcg/ml と同じになり、この濃度が少なくとも 1 時間持続したとすると 4 日間くらは、かなりの程度に菌の再増殖をおさえることができると思われるので病巣が新鮮で組織内あるいは病巣内濃度が血中濃度と大差なければ 1 週 2 回間欠投与も十分有効ということにならう。このような *in vitro* の知見はマウスおよびモルモット実験結核症に対する RFP の間欠投与効果¹¹⁾²⁾ と一致しており人の結核症に対する RFP の間欠治療の有効性を示唆するものと思う。

次に RFP を *in vitro* で結核菌と接触させ、その形態学的変化を電顕によつてみたところ 4 時間で細胞質的部分的崩壊が認められた。同様の報告¹¹⁾はすでにあるが 24 時間になると細胞質のみならず核の空泡化も起こる。これは CS による細胞壁、EB による核の変化¹²⁾とは異なり RFP に特徴的なものではないと思われる。また 10 mcg/ml の濃度で以上のような変化がみられることから RFP は長時間接触では静菌効果のみならず殺菌効果も期待できるように思う。

次に ^{14}C -RFP を用い RFP 感性結核菌 ($H_{37}\text{Rv}$) とその高度耐性菌の RFP とりこみをみたが、認むべき差はなかつた。この点、INH 耐性菌の INH に対するとりこみの著しい低下⁵⁾ からみられるような細胞壁の透過性の変化¹³⁾¹⁴⁾はみられず、むしろ SM 耐性菌の SM のとりこみ¹⁶⁾と同じような傾向であつた。

最後に ^{14}C -RFP を用いマウス、モルモットの全身マクロ ARG を行ない、RFP の体内分布の時間的変動をみたが秋元らの報告¹⁷⁾とはほぼ一致しており、 ^{14}C -INH を用いた全身マクロ ARG の成績¹⁸⁾とはかなり違つていた。すなわち RFP の体内貯留時間は INH よりかなり長く尿よりも糞便から排泄される量が多いようである。またモルモットはマウスよりさらに残留時間が長いようである。これらの所見も RFP の間欠治療の有用さを物

語っている。

ただ体内ことに肝に長時間 RFP は滞留するので肝に対する副作用については十分注意する必要がある。

IV. む す び

RFP の抗結核作用に関する基礎的実験を行ない次の結果を得た。

(1) RFP, Desacetyl-RFP, Rifamycin-SV の結核菌に対する試験管内抗菌力は大差なく、その MIC は Dubos 培地で 0.05 mcg/ml, Kirchner 半流動寒天培地で 0.2~0.5 mcg/ml, 1% 小川培地で 10~20 mcg/ml と考えられる。

(2) RFP と接触した結核菌の再増殖は INH と比較して、かなりおくれる。

(3) 電顕所見からみると RFP は結核菌の細胞質にまず傷害を与え、次いで核の変化も起こす。

(4) ¹⁴C-RFP を用いた実験からみると RFP 感性結核菌と RFP 耐性結核菌の間に RFP のとりこみの差はほとんどない。

(5) マウス, モルモットの全身マクロ ARG の所見からみると RFP は経口投与後、速やかに全身に分布し INH に比べ、より長く体内ことに肝に残留する。また動物差がありモルモットのほうがマウスより残留期間が長いようである。

岩崎所長のご助言, ご校閲を謝す。本研究遂行にあたり友野京子学士, 渋谷道夫君 (R. I. 部門), 望月テル技師 (細菌部門), 飯塚昭技師 (電顕部門) の技術的援助に負うところが大きかった。記して謝意を表す。

なお本論文の要旨は第 45 回結核病学会総会 (仙台) において発表した。

文 献

- 1) 豊原希一: 結核, 45: 375, 昭 45.
- 2) 豊原希一・岩崎龍郎: 結核, 46: 19, 昭 46.
- 3) Dickinson, J.M. and Mitchison, D.A.: *Tubercle*, 47: 370, 1966.
- 4) Kushida, H.: *J. Electronmicroscopy*, 10: 16, 1961.
- 5) Barclay, W. R. et al.: *Amer. Rev. Tbc.*, 67: 490, 1953.
- 6) 重松昭世・豊原希一・他 4: *Radioisotopes*, 17: 476, 1968.
- 7) 結核療法研究協議会: 第 45 回日本結核病学会総会発表 (川村達).
- 8) 工藤祐是・工藤禎: 結核, 43: 9, 昭 43.
- 9) 中沢昭三・石山正光・他 2: *Jap. J. of Antibiotics*, 23: 240, 1970.
- 10) Dickinson, J. M. and Mitchison, D. A.: *Tubercle*, 51: 82, 1970.
- 11) 山口淳二・有路文雄・他 2: *医学のあゆみ*, 72: 69, 昭 45.
- 12) 山口淳二・有路文雄・他 2: 結核, 44: 68, 昭 44.
- 13) Barclay, W. R. et al.: *Amer. Rev. Tbc.*, 70: 784, 1954.
- 14) 江田享: 結核, 38: 37, 昭 38.
- 15) 江田享: 結核, 38: 107, 昭 38.
- 16) 豊原希一・重松昭世: *Radioisotopes*, 15: 340, 1966.
- 17) 秋元健・小野健司・南保俊雄: *Jap. J. of Antibiotics*, 23: 250, 1970.
- 18) 豊原希一・重松昭世: 結核, 44: 357, 昭 44.

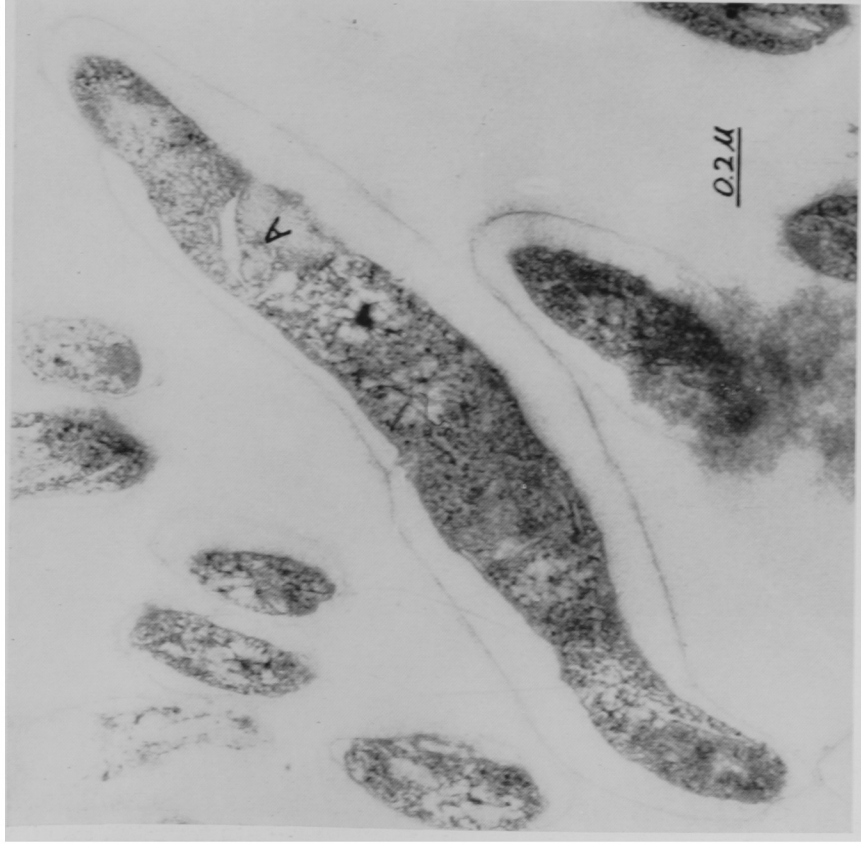


Photo 1. Contact with RFP for 1 hours.
A : desquamation of cytoplasm.

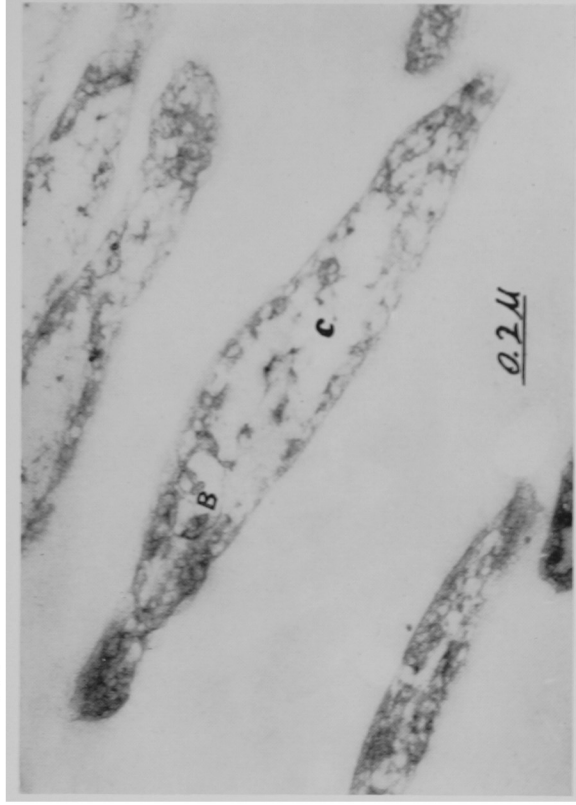


Photo 2. Contact with RFP for 24 hours.
B : deformation of mesosome. C : vacuole formation of nuclei.

Electron micrograph of the ultrathin sections of H₃₇Rv treated with 10 mcg/ml of RFP.

(Mareichi TOYOHARA) (II)
Autoradiograph of Whole Body Sections after the Oral Administration of Labelled RFP.

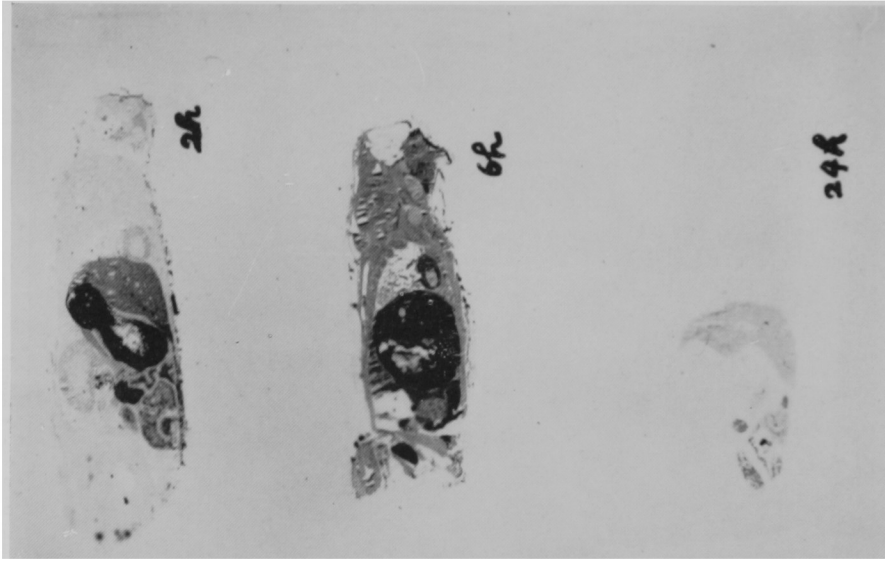


Photo 3. Mice.

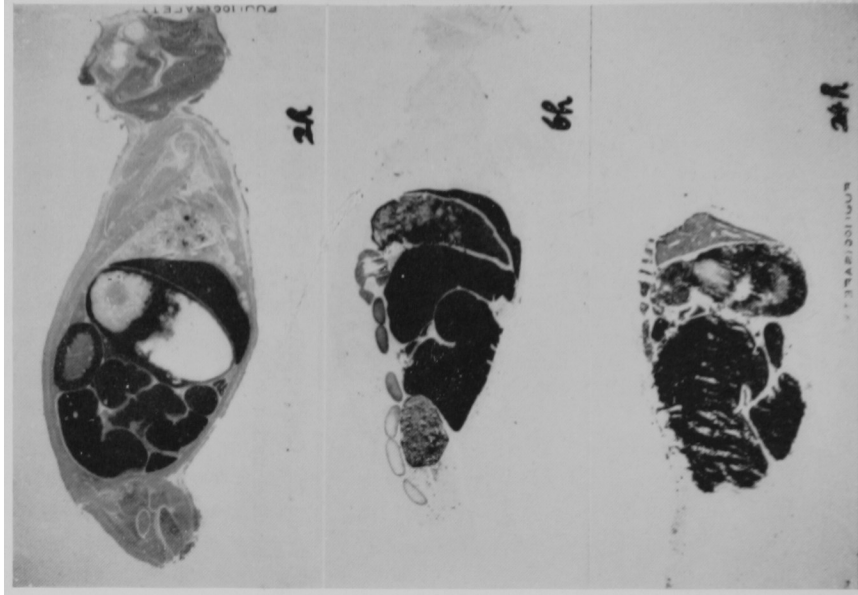


Photo 4. Guinea pigs.