

原 著

新抗菌物質 DL8280の抗結核菌作用

—発育阻止作用, 殺菌作用, 交叉耐性および
他抗結核剤との併用効果—

東 村 道 雄・水 野 松 司・外 山 春 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 59 年 1 月 7 日

IN VITRO ANTITUBERCULOUS ACTIVITY OF DL8280 ON
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS—The Mode of Bacteriostatic Activity, Bactericidal Activity, Cross-Resistance and Combined Effect with
Other Antituberculous Agents—

Michio TSUKAMURA*, Shoji MIZUNO, and Haruo SOTOYAMA

(Received for publication January 7, 1984)

In vitro antituberculous activity of a new antibiotic DL8280 was studied using *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv and the Ogawa egg medium, and the following results were obtained: 1) The antibiotic inhibited the growth of *M. tuberculosis* strain H37Rv and *M. tuberculosis* strains isolated from patients at concentrations of 0.63 to 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 2) Subinhibitory concentrations of DL8280, 0.2 to 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, delayed the growth rate of *M. tuberculosis* H37Rv. 3) The antibiotic acted bacteriocidally at concentrations higher than the growth-inhibitory concentration. 4) Cross-resistance relationships with other antituberculous agents were not observed. 5) The antibiotic showed additive action with other antituberculous agents.

Keywords: DL8280 (A new antibiotic), *In vitro* antituberculous activity **キーワードズ:** DL8280 (新抗菌物質), 試験管内抗結核菌作用

緒 言

DL8280は第一製薬株式会社(東京)によって発見開発された新抗菌物質で次の構造式を持つ。(±)-9-fluoro-2, 3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1, 2, 3-de][1, 4]benzoxazine-6-carboxylic acid., 分子式は $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$, 分子量は361.37である。本剤の種々の抗酸菌に対する発育阻止作用については既報した¹⁾。本報では, *Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) 対す

る発育阻止作用, 殺菌作用, 他抗結核剤との交叉耐性, 他抗結核剤との併用効果について報告する。これらの作用の研究は, 本剤が人間の肺結核の治療に実用されない限り, その臨床的意義は少ない。著者は現在このDL8280を肺結核患者に試験投与中であるが, 最近に至り臨床的に有効とみられるに至ったので, この基礎的研究の成績をここに発表する。

研究 方法

被検株として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

* The National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

株を使用した。H37Rv 株から分離した各種抗結核剤耐性株については表 1 に記してある。一部の実験には新

たに患者の喀痰から分離した結核菌を使用したか、その同定法は既報の方法によった²⁾。

Table 1. Growth-Inhibitory Activity of DL8280 on *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv and Its Various Resistant Mutants

Strain ^a	Degree of resistance ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of viable organisms inoculated per medium	Minimal inhibitory concentration of DL8280 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^b
H37Rv, parent		20× 20×10 20×10 ²	0.63 0.63 0.63
H37Rv, streptomycin-resistant	1,000	10 10×10 10×10 ²	1.25 1.25 1.25
H37Rv, isoniazid-resistant	10	20 20×10 20×10 ²	0.63 0.63 1.25
H37Rv, p-aminosalicylate-resistant	100	15 15×10 15×10 ²	0.63 0.63 1.25
H37Rv, rifampicin-resistant	200	33 33×10 33×10 ²	0.63 0.63 0.63
H37Rv, ethambutol-resistant	5	54 54×10 54×10 ²	0.63 0.63 1.25
H37Rv, kanamycin-resistant	200	46 46×10 46×10 ²	1.25 1.25 1.25
H37Rv, hexuple-resistant	1,000	33 33×10 33×10 ²	0.63 0.63 0.63
H37Rv, ethionamide-resistant	30	15 15×10 15×10 ²	1.25 1.25 1.25
Patient H.I.		21	0.63
Patient Y.M.		36	0.63
Patient T.H.		18	0.63
Patient M.T.		28	0.63
Patient K.M.		49	0.63

a Drug-resistant strains, except for the PAS-resistant strain, were isolated in one step on drug-containing Ogawa egg medium. The PAS-resistant strain was isolated by two step-selection. The hexuple-resistant strain was isolated by one step-selection with paromomycin, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and resistant to all of enviomycin, viomycin, capreomycin, kanamycin, lividomycin, and paromomycin.

b Ogawa egg medium was used, and the growth of colonies was observed after incubation at 37°C for 4 weeks.

発育阻止作用の測定は、接種生菌数の影響を除くために、“actual count 法”によった³⁾⁴⁾。Generation time の測定は Youmans and Youmans の方法によった⁵⁾。殺菌作用の測定は既報の方法によった⁶⁾。

併用効果の測定は DL8280 のみの希釈系列を対照とし、ここに阻止濃度を僅かに下回る濃度の抗結核剤を添加し、DL8280 の発育阻止作用が影響を受けるかどうか観察した。添加濃度は前に行なった実験から決定した⁷⁾。接種に用いる菌液は 3 種類を用い、実験結果から “actual count 法” に相当する接種方法の成績を呈示した。成績として呈示した実験の接種生菌数は各培地当り 76 ± 23 (平均値 \pm 標準偏差) ($n=40$) であった (表 5)。

培地は 1% 小川培地を使用し、DL8280 は滅菌前に添加した。DL8280 は先ず 10mg/ml の割合に propylene glycol に溶解し、これを蒸留水で希釈し、その 1 容を 1% 小川培地 100 容に添加した。培地は $165 \times 16.5\text{mm}$ の試験管に 7ml ずつ分注し、 90°C 60 分滅菌して斜面培地とした。菌接種後の培地には、底に 3 mm の切れ目のあるダブルゴム栓をかぶせ、 37°C に 4 週培養後、集落数を数えた。

使用薬剤の製造会社：Streptomycin sulfate および kanamycin sulfate, 明治製薬 (東京)；enviomycin sulfate および kitasamycin, 東洋醸造 (静岡)；Isoniazid および *p*-aminosalicylate, 第一製薬 (東京)；ethionamide, 塩野義製薬 (大阪)；rifampicin, Lepetit (Milano)；ethambutol, 科研化学 (東京)；sulfadimethoxine, 中外製薬 (東京)；minocycline, Lederle (東京)；cycloserine および tibione, 塩野義製薬 (大阪)。

研究成績

1. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株およびその抗結核剤耐性株に対する DL8280 の発育阻止作用
M. tuberculosis H37Rv 株および H37Rv 株由来の各種抗結核剤耐性株の発育は DL8280 $0.63-1.25\mu\text{g}/$

ml によって完全に阻止された (Table 1)。患者分離株 5 株も “actual count 法” で測定した場合、DL8280 $0.63\mu\text{g}/\text{ml}$ によって発育を阻止された (Table 1)。また、別の患者分離株 20 株の DL8280 に対する感受性を非定量的方法で測定すると、20 株中 18 株は $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ で、残りの 2 株も $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で阻止された (Table 2)。これら 20 株中 5 株は抗結核剤に耐性を示さぬ株であり、15 株は streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol を含む 4 剤以上に耐性の株であった。

2. DL8280 耐性菌の種々の抗結核剤に対する感受性

DL8280 耐性菌は H37Rv 株の生菌数 10^6-10^7 に 1 個の割合で見出された。DL8280 $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地に発育した集落は、原株生菌数 10^6 に 1 個の割合で見出され、これを DL8280 なし培地に継代した株は DL8280 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ に耐性であった。この菌の種々の抗結核剤に対する感受性を原株の感受性と比較すると、両者の間に差はなかった (Table 3)。

3. 阻止下濃度の DL8280 の Generation Time 遅延作用

DL8280 の H37Rv 株に対する完全発育阻止濃度は $0.63\mu\text{g}/\text{ml}$ と測定されたが、これ以下の濃度の DL8280 の存在下でも、結核菌の発育は遅延される。発育遅延は $0.2-0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で起こった (Table 4)。

4. DL8280 と他の抗結核剤との併用効果

阻止濃度を少しく下回る発育遅延濃度域の他の抗結核剤の共存が、DL8280 の発育阻止作用に及ぼす影響を与えるかを観察したが、著明な影響は認められなかった (Table 5)。この結果は、DL8280 と他の抗結核剤との間に拮抗も相乗もないことを示す。DL8280 と他抗結核剤の併用効果は相加的 (additive) であると認められた。

5. DL8280 の結核菌に対する殺菌作用

DL8280 は対数期の終りの発育期にある菌に対して 24 時間の浸漬により、かなり強い殺菌効果を示した (Figure 1)。

Table 2. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Sputa of Patients

Number of strains showing growth				
Concentration of DL8280 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
10	5	2.5	1.25	0
0	0	0	2	20

Bacterial suspensions, 5 mg wet weight per ml, were prepared from a four-week-old culture of the test strains, and their 0.02ml sample each was inoculated onto each medium containing DL8280 or not containing DL8280 by a spiral loop. The growth was observed after incubation at 37°C for 3 weeks, and the number of strains which showed similar growth to that on the control medium was recorded.

考 察

本報では、主として *M. tuberculosis* H37Rv 株に対する DL8280 の抗結核菌作用の様式を研究した。

DL8280 は *M. tuberculosis* H37Rv 株の発育を 0.63

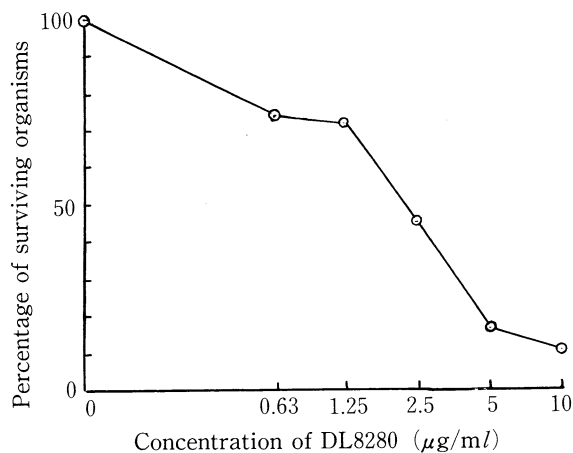


Fig. 1. Bactericidal activity of DL8280 on *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv growing in dubos liquid medium for 14 days. As to details of the method, refer to Tsukamura, M., and Mizuno, S.: *In vitro* antituberculous action of minocycline on *Mycobacterium tuberculosis*, *Kekkaku* 58 : 379-384, 1983.

μg/ml の濃度で完全に阻止した。また、患者から分離した *M. tuberculosis* 株の発育を約 1 μg/ml で阻止した。この発育阻止濃度は、200~300mg の経口投与で期待される血中濃度 2~3 μg/ml と対比して(未発表成績)、十分有効性を期待できるものである。

Table 4. Generation Time of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv on Various Concentrations of DL8280

Concentration of DL8280 (μg/ml)	Generation time (hours)
0	10.9
0.1	10.9
0.2	14.4
0.3	18.0
0.4	25.2
0.5	43.0

The generation time was measured by the method of Youmans and Youmans using the Ogawa egg medium (Youmans, G. P., and Youmans, A. S.: A method for the determination of the rate of growth of tubercule bacilli by the use of small inocula. *J. Bacteriol.* 58 : 247-255, 1949).

Table 3. Susceptibility of DL8280-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Strain to Various Antituberculous Agents

Antituberculous agent	Minimal inhibitory concentration of agent, measured by the actual count method (μg/ml) ^a	
	H37Rv, Parent	H37Rv, DL8280-resistant ^b
Streptomycin sulfate	5.	5.
Isoniazid	0.05	0.05
p-Aminosalicylate	0.1	0.1
Kanamycin sulfate	25.	25.
Enviomycin sulfate	12.5	12.5
Ethionamide	20.	20.
Rifampicin	2.5 - 3.0	2.5 - 3.0
Ethambutol	1.25	1.25
Tibione	0.32	0.32

a The growth of colonies was observed after incubation at 37°C for 4 weeks.

b The DL8280-resistant strain was isolated from the parent H37Rv strain at a rate of one per 10⁶-10⁷ viable organisms by inoculating the parent strain onto an Ogawa egg medium containing DL8280, 1.25 μg/ml, and was resistant to 5 μg of DL8280 per ml.

種々の抗結核剤耐性株も感染株と同じ濃度で阻止される。逆に、DL8280耐性株の発育も、種々の抗結核剤によって、感性株と同じ濃度で阻止される。従って、DL8280と既知の抗結核剤の間に交叉耐性は存在しないと云える。

また、DL8280は発育阻止濃度以下でも決して無影響ではなく、0.2~0.5 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度でも結核菌の発育を遅延させる。この作用形式は大多数の抗結核剤と同じで、INHとは異なっている⁷⁾。

DL8280と他の抗結核剤との間には、拮抗も相乗もない。従って、本剤と他結核剤の併用効果は相加的(addi-

tive)と考えられ⁸⁾、どの抗結核剤と併用しても差支えないと思われる。

DL8280は結核菌に対して殺菌作用を示す。但し、この殺菌作用は、期待される投与量200~300mgから得られる血中濃度2~3 $\mu\text{g/ml}$ では、あまり著明ではない。しかし、DL8280がRFP, INH, SMのような有力な抗結核剤と匹敵するような殺菌作用を有することは注目値する。

結 論

1. DL8280は *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Table 5. Combined Effect of DL8280 with Various Antituberculous Agents on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv

Medium containing: ^a	Minimal concentration of DL8280 which caused complete inhibition of growth when used singly or in combination with another agent ($\mu\text{g/ml}$)
DL8280 alone	0.63
DL8280 + Streptomycin, 1 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Streptomycin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Isoniazid, 0.02 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Isoniazid, 0.01 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + <i>p</i> -Aminosalicylate, 0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + <i>p</i> -Aminosalicylate, 0.02 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Kanamycin 10 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Kanamycin, 5 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Ethionamide, 5 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Ethionamide 2.5 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Rifampicin, 2 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Rifampicin, 1 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Ethambutol, 1 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Ethambutol 0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Minocycline, 1 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Sulfadimethoxine, 2 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Sulfadimethoxine, 1 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Kitasamycin, 10 $\mu\text{g/ml}$	0.63
DL8280 + Kitasamycin, 5 $\mu\text{g/ml}$	0.63

The concentrations of DL8280 tested were as follows : 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, and 0 $\mu\text{g/ml}$. The media with or without DL8280 were inoculated with one loopful (0.02ml) of three different bacterial suspensions, 1mg wet weight/ml, and its 10^{-3} and 10^{-4} suspensions. The media inoculated were incubated at 37°C for 4 weeks, and the minimal growth-inhibitory concentration was read on a series of media showing discrete colonies in control medium. In this experiment, the inoculation of a 10^{-4} bacterial suspension gave 76 ± 23 colonies on drug-free medium. The data in this table were observed in the media, each of which was inoculated with this amount of viable bacteria.

株およびそれから分離した種々の抗結核剤耐性株の発育を $0.63\mu\text{g/ml}$ の濃度で完全に阻止した。また、H37Rv株から分離したDL8280耐性株の発育は、既知抗結核剤によって原株と同じ濃度で発育を阻止された。従って、DL8280と既知抗結核剤の間には交叉耐性はないことがわかった。

2. 患者から分離された *M. tuberculosis* 23株も $1.25\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下で発育を阻止された。2株のみは $2.5\mu\text{g/ml}$ で発育を阻止された。

3. DL8280は発育完全阻止濃度以下 ($0.2\sim 0.5\mu\text{g/ml}$) でも *M. tuberculosis* H37Rv 株の発育を遅延させた。

4. DL8280と他の抗結核剤との併用効果は相加的 (additive) で、どの抗結核剤と併用しても差し支えがないと思われた。

5. DL8280は *M. tuberculosis* H37Rv 株に対して、発育阻止濃度を超える濃度では殺菌的に作用した。

文 献

1) Tsukamura, M.: In-vitro antimycobacterial activity of a new antibacterial substance DL-8280. Differentiation between some species of

mycobacteria and related organisms by the DL8280 - susceptibility, *Microbiol, Immunol*, 27: 1129-1132, 1983.

- 2) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, p. 1-75, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan, 1975.
- 3) 東村道雄: Kanamycin の耐性検査, *医学と生物学*, 49: 87-90, 1958.
- 4) Tsukamura, M.: "Actual count" method for the resistance test of tubercle bacilli, *Japan J Tuberc*, 12: 46-54, 1964.
- 5) Youmans, G. P. and Youmans, A. S.: A method for the determination of the rate of growth of tubercle bacilli by the use of small inocula, *J Bacteriol*, 58: 247-255, 1949.
- 6) 東村道雄・水野松司: Minocycline の抗結核菌作用 (試験管内実験), *結核*, 58: 379-384, 1983.
- 7) 東村道雄・水野松司: 抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較, *結核*, 55: 365-370, 1980.
- 8) Tsukamura, M. and Noda, Y.: The mechanism of the combined effect of antituberculous drugs, *Am Rev Tuberc Respir Dis*, 78: 121-126, 1958.