

原 著

Rifapentine の抗酸菌にたいする試験管内発育阻止作用
(Rifampicin との比較)

束 村 道 雄・水 野 松 司・外 山 春 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和61年8月13日

IN-VITRO ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF RIFAPENTINE
(COMPARISON WITH RIFAMPICIN)

Michio TSUKAMURA *, Shoji MIZUNO and Haruo TOYAMA

(Received for publication August 13, 1986)

The *in-vitro* antimycobacterial activity of a new derivative of rifamycin SV, rifapentine, was compared with that of rifampicin which is a derivative of rifamycin SV. Rifapentine and rifampicin were dissolved in propylene glycol at concentration of 4 mg/ml and then diluted with distilled water. One volume of antibiotic solution was added to 100 volumes of Ogawa egg medium before sterilization. The composition of Ogawa egg medium is as follows: Basal solution (1% KH_2PO_4 and 1% sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% aqueous solution of malachite green, 6 ml. Seven millilitre of the medium was poured into tubes with 165 mm in length and 16.5 mm in size, and made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes. Unless specially noted, test mycobacterial strains were suspended in a 0.9% NaCl solution at concentrations of 5 mg/ml (wet weight) and a 0.02 ml-sample of these suspensions was inoculated onto each medium by a spiral loop. The tubes inoculated were stoppered by gum cap with a slit of 3 mm in the bottom and incubated at 37°C (*M. xenopi* at 42°C and *M. marinum*, *M. ulcerans* and *M. haemophilum* at 28°C). The growth was read after incubation for 7 days (rapidly growing mycobacteria), 14 days (slowly growing mycobacteria) or 21 days (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans* and *M. haemophilum*).

1) The *in-vitro* growth-inhibitory activity of rifapentine against *M. tuberculosis* strains was ca. 2-times stronger than that of rifampicin. All rifampicin-susceptible strains were susceptible to rifapentine, and all rifampicin-resistant strains were resistant to rifapentine (Tables 1 and 2).

2) About 80% of *M. avium* complex strains, which were isolated from patients who did not receive administration of rifampicin were resistant to rifampicin, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more. Of these naturally rifampicin-resistant strains, ca. 75% were resistant to rifapentine, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more. However, the remaining 25% of the strains were more or less susceptible to rifapentine (Table 4).

* From the National Chubu Hospital, Departments of Internal Medicine, Obu, Aichi 474 Japan.

3) The strains of *M. avium* complex that had the serotypes 1 and 2 were often resistant to rifapentine, whereas those having the serotype 16 were often susceptible to rifapentine (Table 5).

4) Antimycobacterial spectra of rifapentine and rifampicin were almost similar to each other. However, the growth-inhibitory activity of rifapentine against *M. tuberculosis*, *M. kansasii* and *M. szulgai* was about 2-times stronger than that of rifampicin against these mycobacteria.

We thank Prof. F. Parenti for his kind supply of rifapentine used in this study.

Key words : Rifapentine, Mycobacteria, Growth inhibition

キーワード : Rifapentine, 抗酸菌, 発育阻止作用

緒 言

Rifapentine (RFT) は, Gruppo Lepetit (Milano) によって新たに作られた Rifamycin SV の新しい誘導体で, 次の化学構造をもつ: 3-[4-(4-Cyclopentyl-1-piperazinyl) iminomethyl] rifamycin SV¹⁾。この RFT は, 同じく Rifamycin SV の誘導体である Rifampicin (RFP) よりも, 試験管内実験及びマウスの実験結核症において有効であると報告されている^{1) 2)}。また, RFT の *Mycobacterium kansasii*, *M. xenopi* 及び *M. avium* complex にたいする試験管内発育阻止作用は, RFP とほぼ同等と報告されているが³⁾, *M. avium* complex にたいして RFP よりも, より有効と言う報告もある⁴⁾。人体での使用経験は, まだ公式には発表されていない。我々は, Gruppo Lepetit の Prof. F. Parenti の御好意により RFT を入手し, 試験管内実験を行い, 新たに若干の知見を追加し得たので報告する。

実験方法

RFT 及び RFP は, まず Propylene glycol に 4 mg/ml の割合に溶解し, これを蒸留水で希釈し, 2 倍希釈列を作った。原液及び 2 倍希釈列の 1 容を, 滅菌前の「1%小川培地」100容に添加し, RFT または RFP 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 及び 0 µg/ml の培地を作った。小川培地は, 165×16.5mm の試験管に 7 ml ずつ分注し, 90°C 60分間の滅菌により斜面培地とした。接種には, 小川培地に 14 日 (遅発育抗酸菌) または 7 日培養 (迅速発育抗酸菌) の集落から湿菌量約 5 mg/ml の菌液を作り, これを渦巻白金耳 (0.02ml 接種用) で 1 白金耳ずつ各培地に接種した。接種後の培地の入った試験管には, 底に 3 mm の切れ目のあるダブルゴム栓をかぶせ, 37°C に培養した (*M. xenopi* は 42°C, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum* は

28°C)。発育の判定は, 迅速発育抗酸菌では 7 日後, 遅発育抗酸菌では 14 日後, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. xenopi*, *M. haemophilum* 及び *M. ulcerans* では 21 日後に行った。

表 1 に示した *M. tuberculosis* 株では, 感受性試験を 'actual count' 法で行った^{5) 6)}。即ち, 培地あたりの接種生菌数を 20~100 に調整して発育阻止濃度を測定した。

研究成績

1. *M. tuberculosis* H₃₇R_v 株及びその耐性変異株にたいする RFT と RFP の発育阻止作用の比較 ('Actual Count' 法による比較)

H₃₇R_v-RFP 耐性株を除く, H₃₇R_v 株原株及びその耐性株, 及び青山 B 株にたいする RFT の発育阻止濃度は, 1.25~5 µg/ml であった。一方, これらにたいする RFP の発育阻止濃度は, 2.5~10 µg/ml で, いずれの株にたいしても, RFT の方が 1/2 の濃度で発育を阻止した。INH 耐性株の RFT 及び RFP にたいする感受性は若干低かった。RFP 耐性株は, RFT にたいしても耐性であった (表 1)。

2. *M. tuberculosis* 患者分離株にたいする RFT と RFP の発育阻止作用の比較

RFP 未使用の患者から分離した 20 株にたいする発育阻止濃度は, RFT が 1.25~2.5 µg/ml, RFP が 2.5~5 µg/ml で, 20 株中 10 株にたいしては, RFT の発育阻止作用が 2 培強い結果が得られた。RFP 使用 6 ヶ月以上で, なお排菌が持続した患者の株は, RFT にも RFP にも 40 µg/ml 耐性であった (表 2)。

3. 種々の抗酸菌にたいする RFT と RFP の発育阻止作用の比較

RFT と RFP の抗酸菌にたいする抗菌スペクトラムは, ほぼ同一である結果が得られた (表 3)。RFT が 5 µg/ml 以下の濃度で発育阻止を示した菌種は, *M.*

Table 1. Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations of Rifapentine and Rifampicin Against Laboratory Strains of *Mycobacterium tuberculosis*

Strain	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
	Rifapentine	Rifampicin
H ₃₇ Rv	1.25	2.5
Aoyama-B	2.5	5
H ₃₇ Rv-Streptomycin-resistant	2.5	5
H ₃₇ Rv-Kanamycin-resistant	1.25	2.5
H ₃₇ Rv-Isoniazid-resistant	5	10
H ₃₇ Rv-Viomycin-resistant	1.25	2.5
H ₃₇ Rv-p-Aminosalicylate-resistant	1.25	1.25
H ₃₇ Rv-Capreomycin-resistant	1.25	2.5
H ₃₇ Rv-Rifampicin-resistant	>40	>40
H ₃₇ Rv-Ofloxacin-resistant (a)	1.25	2.5
H ₃₇ Rv-Ofloxacin-resistant (b)	2.5	5

The minimal inhibitory concentrations were determined by the actual count method (6). The resistant strains were isolated by inoculating the parent H₃₇Rv strain onto Ogawa egg medium containing antituberculosis agent. The strains were resistant to Streptomycin >1,000 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin >1,000 $\mu\text{g/ml}$, Isoniazid 10 $\mu\text{g/ml}$, Viomycin 200 $\mu\text{g/ml}$, p-Aminosalicylate 10 $\mu\text{g/ml}$, Capreomycin 200 $\mu\text{g/ml}$, Rifampicin 200 $\mu\text{g/ml}$ and Ofloxacin 5 $\mu\text{g/ml}$ (a) or 100 $\mu\text{g/ml}$ (b), respectively, in Ogawa egg medium.

Table 2. Minimal Inhibitory Concentrations of Rifapentine and Rifampicin Against *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Patients, who Received Administration of Rifampicin or did not Receive it

		Number of strains						
		Rifapentine concentration ($\mu\text{g/ml}$)						
		1.25	2.5	5	10	20	40	More than 40
Rifampicin concentration ($\mu\text{g/ml}$)	1.25							
	2.5	5	10					
	5		5					
	10							
	20							
	40							
	More than 40							10

The strains resistant to both Rifapentine and Rifampicin, more than 40 $\mu\text{g/ml}$, were isolated from the sputa of patients who received the administration of Rifampicin and did not show the negative conversion of sputum cultures.

bovis, *M. kansasii*, *M. gastri*であった。RFTがRFPよりも、強い発育阻止作用を示すと思われたのは、前記の *M. tuberculosis* の他に、*M. kansasii*, *M. szulgai* 及び *M. terrae* であった。ただし、*M. terrae* は非病原性菌で、RFTの発育阻止濃度も40 $\mu\text{g/ml}$ と高かった (RFPは40 $\mu\text{g/ml}$ でも発育した (表3))。

4. *M. avium* complex 株にたいするRFTとRFPの発育阻止作用の比較
55株のRFPに触れたことがない *M. avium* complex

株の中で、44株 (80%) は、RFPに「自然耐性」を示した。この44株中33株は、RFPにもRFTにも高耐性であった。しかし、11株はRFTにたいして多少の感受性を示した。RFPに感受性のあった11株は、すべてRFTにも感受性を示した (表4)。

5. *M. avium* complex の血清型とRFT感受性の関係

前に、農林省家畜衛生試験場の根本久、柚木弘之両博士ならびに Dr. David J. Dawson, Laboratory of

Table 3. Comparison of Growth-Inhibitory Activities of Rifapentine and Rifampicin Against Various Mycobacteria

Species	No. of strains	Number of strains showing the minimal inhibitory concentration at :															
		Rifapentine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								Rifampicin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
		>40	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	>40	40	20	10	5	2.5	1.25	
<i>M. bovis</i>	10					7	3							7	3		
<i>M. kansasii</i>	10					10											
<i>M. marinum</i>	10	1	3	5	1					7							
<i>M. avium</i>	10	6			2	2				9					1		
<i>M. intracellulare</i>	10	4				5	1			5					4	1	
<i>M. szulgai</i>	10			2		5	3			3				5	2		
<i>M. xenopi</i>	10			4	4		2			1	1	4	1	1	1		
<i>M. scrofulaceum</i>	10		1	1	5	1	2			2		3	2	1	2		
<i>M. gordonae</i>	10	2		3	4	1				2		2	3	3			
<i>M. gastri</i>	5					1	2	1	1				2	2	1		
<i>M. nonchromogenicum</i>	10	10								10							
<i>M. terrae</i>	10	2	8							10							
<i>M. triviale</i>	10		1	1	8					7		2	1				
<i>M. haemophilum</i>	5	5								5							
<i>M. ulcerans</i>	5				5								5				
<i>M. fortuitum</i>	10	10								10							
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	10	10								10							
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	10	10								10							

Table 4. Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations of Rifapentine and Rifampicin Against *Mycobacterium avium* Complex Strains

		Number of strains					
		Minimal inhibitory concentration of Rifapentine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		1.25	2.5	5	10	20	40 or more
Minimal inhibitory concentration of Rifampicin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.25						
	2.5		4				
	5		3	3			
	10			1			
	20						
	40 or more	2	6	2	1		33

All 55 strains were isolated from different patients who had not yet received administration of Rifampicin.

Microbiology and Pathology, Queensland, Australia によって血清型を決められた *M. avium* complex 株60株の RFT 感受性を表5に示す。RFT 感受性と血清型間に明確な相関関係は認められなかった。しかし、被検株が比較的多かった血清型、1、2及び16の株についてみると、血清型1及び2の株には RFT 高耐性の株が多く、血清型16の株には少ない。

血清型1及び2の24株中には、RFT 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性

の株が18株(75%)ある。一方、血清型16の株11株中には、RFT 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性の株は3株(27%)しかない。両者の差の有意性を χ^2 -test で検定すると、 $\chi_0^2 = 5.25$ で $p < 0.05$ 水準で有意であった。

考 察

Arioli et al.¹⁾ は、Difco TB Broth で *M. tuberculosis* H₃₇R_v 株と臨床分離株23株との RFT 及び

Table 5. Relationship Between the Serotype and the Rifapentine Susceptibility to *Mycobacterium avium* Complex Strains

Serotype	Number of strains								
	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)								
	>40	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	Total
1	8			1	2	1			12
2	10				1	1			12
4				1	1	2			4
6						1			1
7						1	1		2
8					1	1	1		3
9	1					1			2
10						2			2
12	1								1
13	1					1			2
14								1	1
15	1								1
16	3			1	4	3			11
18	3						1		4
20	1				1				2
Total	29			3	10	14	3	1	60

RFPにたいする感受性を比較し、RFTの方がRFPよりも2~10倍強い発育阻止作用を示したと報告している。また、マウスの実験結核症にたいして、RFTの方がRFPよりも有効であったと述べている。また、Truffot-Pernot et al.²⁾は、マウスの実験的結核症で、RFTの週1日投与(10mg/kg)はRFPの週6日投与(10mg/kg)に匹敵する効果を示したと報告している。Yates and Collins³⁾は、*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium* complex及び*M. fortuitum*にたいする発育阻止作用をLöwenstein-Jensen培地を用いて比較し、RFTとRFPとはほぼ同等の効力であったと述べている。ただし、*M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium* complex及び*M. fortuitum*は、“opportunistic and environmental mycobacteria”として一括して検査され、個々の菌種別の比較は行われていない。また、Cynamon⁴⁾は、最近、*M. avium* complexの臨床分離株21株にたいするRFT及びRFPの発育阻止作用を、“7H10 agar containing OADC enrichment”と“7H10 broth”を用いて比較している。“7H10 agar”使用の場合、RFTの最小発育阻止濃度は $< 0.125 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ 、RFPのそれは $2 \sim 16 \mu\text{g/ml}$ 。“7H10 broth”使用の場合、RFTの最小発育阻止濃度が $0.125 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 、RFPのそれは $0.125 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ であった。結局、被検株の90%の発育を阻

止する濃度は、“7H10 agar”で、RFTが $2 \mu\text{g/ml}$ 、RFPが $4 \mu\text{g/ml}$ であったと報告している。

以上のように、抗酸菌にたいするRFTとRFPの阻止作用については、まだ十分研究されてはいない。特に、RFTとRFPの交叉耐性の関係及び結核菌以外の抗酸菌にたいする効果については知られていない。我々は、本報の研究で、次の点を明らかにし得た。

1. *M. tuberculosis*にたいするRFTとRFPの発育阻止作用と交叉耐性

*M. tuberculosis*にたいするRFTの発育阻止作用はRFPの2倍である。*in vitro*または*in vivo*でRFPによる選択で得られたRFP耐性菌はRFT耐性であり、RFP感受性菌はRFT感受性である。即ち、*M. tuberculosis*のように、元来、RFP感受性であり、RFP使用によってのみ耐性菌が得られる場合は、RFP感受性菌はRFT感受性であり、RFP耐性菌はRFT耐性であり、RFTとRFPの間には交叉耐性が見られる(表1, 2)。

2. *M. avium* complexにたいするRFTとRFPの発育阻止作用と交叉耐性

M. avium complex株は、RFPに接触(使用)していなくても、その80% (44/55)はRFPにたいして自然耐性($40 \mu\text{g/ml}$ 耐性またはそれ以上耐性)を示す。このRFP自然耐性株の大部分((33/44)=75%)はRFTにも耐性である。しかし、一部((11/44)=25%)

は、RFTの1.25~10 μ g/mlによって発育を阻止される。一方、RFP感受性の11株は、いずれもRFT感受性である。

即ち、*M. avium* complexの「RFP自然耐性株」の態度は、*M. tuberculosis*の「獲得耐性株」のようにclear-cutなresponseを示さない。RFP感性株はRFTにも感性である。しかし、RFP耐性株の大部分(75%)はRFTにも耐性であるが、一部(25%)の株はRFTにたいして感受性を示す(表4)。

3. *M. avium* complexの血清型とRFT感受性の関係

血清型とRFT感受性の間には若干関係があるらしいことが分かった。血清型1及び2の株にはRFT耐性のものが多く、血清型16の株にはRFT感性のものが多い(表5)。

4. *M. tuberculosis*以外の抗酸菌にたいするRFTとRFPの発育阻止作用の比較

RFTとRFPの抗酸菌にたいする発育阻止スペクトラムはほぼ同一であった。しかし、*M. tuberculosis*、*M. kansasii*及び*M. szulgai*にたいする抗菌力は、RFTの方が約2倍優れていた。

Cynamon⁴⁾は、*M. avium* complex 21株について、“7H10 agar”でRFTの最小発育阻止濃度を0.125~2 μ g/ml、RFPのそれを2~16 μ g/ml、“7H10 broth”でRFTの最小発育阻止濃度を0.125~1 μ g/ml、RFPのそれを0.25~2 μ g/mlと報告している。被検21株の感受性の振幅は1:8である。これにたいして、我々が*M. avium* complex 60株について、「1%小川培地」を用いて測定した最小発育阻止濃度の幅は0.63~>40 μ g/ml(1:64以上)(表5)、または、55株についてRFPの最小発育阻止濃度2.5~>40 μ g/ml(1:16以上)、RFTのそれは1.25~>40 μ g/ml(1:32以上)と大きい。この差は、恐らく培地の差と考えられる。Cynamonが使用した“7H10 agar”または“7H10 broth”では、RFPの発育阻止濃度は2~16 μ g/mlまたは0.25~2 μ g/mlである。“7H10 agar”を使用しても、被検株の90%がRFP 4 μ g/mlにより阻止されたと言う。1日1回0.45gの使用量でRFPの血中濃度は5~10 μ g/mlに達することを考えると⁷⁾⁻¹⁰⁾、彼の成績が事実即しているのなら、*M. avium* complexにたいして人体内でRFPが奏功してよい。しかし、RFPが*M. avium* complex 症の治療にあまり有効でないことが、すべての臨床家が周知するところである。即ち、“7H10 agar”や“7H10 broth”による感受性測定が実際にそぐわないことは明らかである。この点、小川培地による測定値の方が実際に即していると思われる。*M. avium* complexの80%(44/55)はRFP 40 μ g/ml耐性で、RFPの臨床効果は期待できない。残りの20%

(11/55)には若干の効果が期待できる(表4)。この方が、実際に近いのではなからうか。

また、“7H10 agar”または“7H10 broth”で、菌株間の差が縮小されて測定されることも、RFTとRFPの感受性の関係が、Cynamonによって見逃された原因ではなからうかと思われる。

*M. tuberculosis*のRFP耐性と臨床効果の関係についても、RFP 25 μ g/ml耐性をもって耐性出現とみなされる¹¹⁾¹²⁾。この面からも、小川培地の抗菌力の方が実際に即している。

結 論

1. *M. tuberculosis*にたいするRifapentine (RFT)の発育阻止作用は、Rifampicin (RFP)よりも約2倍強い。*M. tuberculosis*のRFP感性株は、RFTにも感性である。そして、RFP使用により得られるRFP耐性株は、RFTにも耐性である。

2. *M. avium* complex株の約80%は、RFPに自然耐性を示す。*M. avium* complexの約20%は、RFPにたいして多少の感受性があり、このRFP感性株は、RFTにも感受性がある。RFP自然耐性株の大部分(75%)はRFTにも耐性であるが、一部(25%)はRFTにたいして感受性がある。

3. *M. avium* complex株の血清型とRFT感受性の間には、若干の関係がありそうである。血清型1及び2の株には、RFT耐性株が多く、血清型16の株には、RFT感性株が多い。

4. RFTとRFPとの抗酸菌にたいする抗菌スペクトラムは、類似している。しかし、*M. tuberculosis*、*M. kansasii*及び*M. szulgai*にたいする発育阻止作用は、RFTの方がRFPよりも約2倍強い。

文 献

- 1) Arioli, V. and Berti, M. E. et al.: Antibacterial activity of DL 473, a new semisynthetic rifamycin derivative, J Antibiotics, 34: 1026, 1981.
- 2) Truffot-Pernot, C. and Grosset, J. et al.: Activit  de la rifampicine administr e de mani re intermittente et de la cyclopentyl rifamycine (ou DL 473) sur la tuberculose exp rimentale de la souris, Rev Franc Mal Respir, 11: 875, 1983.
- 3) Yates, M. D. and Collins, C. H.: Comparison of the sensitivity of mycobacteria to the cyclopentyl rifamycin DL 473 and rifampicin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 10: 147, 1982.

- 4) Cynamon, M. R. : Comparative *in vitro* activities of MDL 473, rifampin, and ansamycin against *Mycobacterium intracellulare*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28 : 440, 1985.
- 5) 東村道雄 : Kanamycin の耐性検査, *医学と生物学*, 49 : 87, 1958.
- 6) Tsukamura, M. : 'Actual count' method for the resistance test of tubercle bacilli, *Japan J Tuberc*, 12 : 46, 1964.
- 7) Furesz, S. and Scotti, R. et al. : Rifampicin : a new rifamycin. III. Absorption, distribution, and elimination in man, *Arzneimittel-Forschung*, 17 : 534, 1967.
- 8) Porven, G. and Canetti, G. : Les taux de rifampicine dans le sérum de l'homme, *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, 32 : 707, 1968.
- 9) Verbist, L. and Gyselen, A. : Antituberculous activity of rifampicin *in vitro* and *in vivo* and the concentrations attained in human blood, *Am Rev Respir Dis*, 98 : 923, 1968.
- 10) 東村道雄他 : 食前, 食後服用による 'Rifampicin 血中濃度の比較', *結核*, 47 : 69, 1972.
- 11) 東村道雄 : 結核菌の Rifampicin 耐性の境界値, *結核*, 47 : 113, 1972.
- 12) 東村道雄 : 結核菌の Rifampicin 耐性形式ならびに耐性の臨床的境界値について, *医療*, 26 : 1116, 1972.