

原 著

Rifabutine 並びに Rifampicin の諸種抗酸菌, 特に
Mycobacterium tuberculosis と *Mycobacterium*
avium complex に対する *in vitro* 抗菌作用

斎 藤 肇 ・ 佐 藤 勝 昌 ・ 富 岡 治 明

島根医科大学微生物・免疫学教室

受付 昭和 62 年 9 月 18 日

IN VITRO ACTIVITIES OF RIFABUTINE AND RIFAMPICIN AGAINST
VARIOUS MYCOBACTERIA, ESPECIALLY *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

Hajime SAITO*, Katsumasa SATO and Haruaki TOMIOKA

(Received for publication September 18, 1987)

In vitro antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium* complex, *M. fortuitum* and *M. chelonae* (subsp. *abscessus* and subsp. *chelonae*) of rifabutine (RFB) and rifampicin (RFP) was evaluated by agar (7H10) dilution method. The activity of RFB was higher than that of RFP in all species tested, based on various MIC₉₀. RFB showed a higher activity against *M. kansasii* (MIC₉₀ = 0.1 µg/ml), *M. marinum* (0.1 µg/ml), *M. scrofulaceum* (1.56 µg/ml) and *M. avium* complex (1.56 µg/ml). All *M. tuberculosis* strains susceptible to RFP were susceptible to RFB and RFB was somewhat active against RFP-resistant *M. tuberculosis*. Incomplete cross-resistance between RFB and RFP against *M. tuberculosis* and *M. avium* complex was observed.

Microbicidal activity of RFB against *M. avium* complex growing in Dubos Tween-albumin medium was higher than that of RFP.

Key words : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, Rifabutine, Rifampicin, Cross-resistance

キーワード : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, Rifabutine, Rifampicin, 交差耐性

はじめに

Rifabutine (RFB) (Ansamycin, LM 427) は Farmitalia Carlo Erba によって開発された新しい抗

菌物質¹⁾²⁾で, *Mycobacterium tuberculosis* や *M. avium* complex に対してそのアナログである Rifampicin (RFP) よりも強い *in vitro* 抗菌活性を有することが報告されている¹⁾⁻⁵⁾。

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

ところで、ヒトの難治性の *M. avium* complex 感染症の治療には Kanamycin, Ethambutol, RFP その他を含む多剤併用療法^{6)~9)} が広く用いられているが、これらの薬剤のうち *in vitro* 抗菌力の点よりすれば、RFP に代わるに RFB を用いた方がよりよい効果が期待できるのではなからうかと思われる。そこで、我々は RFB の抗マイコバクテリア活性を評価する手始めとして、今回は、*M. tuberculosis* 並びに *M. avium* complex を始めとする主要な病原性抗酸菌に対する *in vitro* 抗菌力並びに *M. avium* complex に対する *in vitro* 殺菌能を RFP のそれらと比較検討したので以下報告する。

材料と方法

1. 菌株

M. tuberculosis 25 株 (業室株 3 株, 野生株 22 株), *M. kansasii* 19 株, *M. marinum* 10 株, *M. scrofulaceum* 19 株, *M. avium* complex 52 株, *M. fortuitum* 20 株, *M. chelonae* subsp. *abscessus* 20 株及び *M. chelonae* subsp. *chelonae* 20 株の計 185 株を、7H10 寒天あるいは 2% グリセリン加 Müller-Hinton 寒天平板に画線培養し、生じた単孤集落を Dubos Tween[®]-albumin 培地 (Difco) 中で培養後、4°C に保存¹⁰⁾、用に臨んで新鮮な同種培地へ移植し、37°C、ただし *M. marinum* 並びに *M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C、3~7 日培養したものを実験に供した。なお、*M. avium* complex の全株はいずれも本菌感染症患者よりの新鮮分離株で、7H10 寒天平板上で平滑、透明 (SmT) な集落形態を有するものである。

2. 薬剤

Rifabutine (Farmitalia Carlo Erba, Italy) 並びに Rifampicin (第一製薬) を供試した。

3. 薬剤感受性試験

供試薬剤の 100~0.0125 µg/ml に至る 2 倍階段希釈液を含む 7H10 寒天平板上に、Dubos 液体培地培養菌の約 10⁶ CFU/ml の 5 µl を Microplanter (Model MIT-P, 佐久間製作所) を用いて 1 枚の平板に最大 27 株の菌をスポットした。そして、5% CO₂ 環境下で遅発育抗酸菌は 37°C (*M. marinum* は 33°C)、14 日、また迅速発育抗酸菌は 37°C (*M. chelonae* subsp. *chelonae* は 33°C)、7 日培養後に発育が全くみられないか、5 個以下の集落発生しかみられなかった場合の薬剤の最小濃度をもって当該菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

4. 殺菌作用

RFB あるいは RFP の各 0.0125, 0.025 及び 0.05 µg/ml 含有あるいは非含有 Dubos 液体培地 5 ml を入れた試験管 (145 × 15 mm) に *M. avium* complex

N-260 株の Dubos 液体培地中 5 日培養菌の約 10⁴ を接種後、37°C、14 日間にわたって培養し、その間一定期日における CFU を 7H10 寒天平板を用いて計測した。なお、別途おこなった Dubos 液体培地を用いての RFB 並びに RFP の本菌株に対する MIC は、それぞれ 0.025 µg/ml 並びに 0.05 µg/ml であった。

結果

1. RFB 並びに RFP の抗 *M. tuberculosis* 作用

M. tuberculosis 業室株 (H₃₇ Rv, H₃₇ Ra 及び青山 B) に対する RFP の MIC はいずれも 0.1 µg/ml であったのに対し、RFB では ≤ 0.0125~0.025 µg/ml と低かった (Table 1)。これに対して *M. tuberculosis* の新鮮臨床分離株 22 株中には Fig. 1 の挿入表にみられるように、RFB 並びに RFP の両者に対して感受性の低い 6 菌株 (MIC₉₀ は各 12.5 及び 100 µg/ml) (A) と感受性の高い 16 菌株 (MIC₉₀ は各 0.05 及び 0.2 µg/ml) (B) があった。また、Fig. 1 に示すように、*M. tuberculosis* に対する両薬剤の MIC は、統計学的に有意 (P<0.005) な相関 (r=0.98) を示した。もし、*M. tuberculosis* に対する RFB と RFP との間に完全な交差耐性 (あるいは交差感受性) があるならば、両薬剤の *M. tuberculosis* に対する MIC の相関関係を表す回帰式は直線 C で表されるものであるが、実際に得られた回帰式は直線 D で示すようなものであった。従って、*M. tuberculosis* に対しては、RFB と RFP との間に完全な交差耐性は成立せず、RFB の抗菌活性の方が RFP のそれよりも勝っていることがわかった。

2. 非結核性抗酸菌に対する RFB と RFP の抗菌作用

これは一括して Table 2 に示した。これから分かるように、RFB はいずれの抗酸菌種に対しても RFP よりも強い抗菌作用を示した。即ち、RFB の遅発育菌である *M. kansasii*, *M. marinum* 並びに *M. scrofulaceum* に対する MIC₉₀ はそれぞれ 0.1, 0.1 及び 1.56 µg/ml であったのに対して、RFP ではそれぞれ 3.13, 0.39 及び 6.25 µg/ml であった。他方、迅速発育菌である *M. fortuitum* 並びに *M. chelonae* に対する RFB

Table 1. Susceptibility of stock cultures of *M. tuberculosis* to rifabutine or rifampicin

<i>M. tuberculosis</i>	MICs (µg/ml)	
	Rifabutine	Rifampicin
H ₃₇ Rv	≤0.0125	0.1
H ₃₇ Ra	0.025	0.1
Aoyama B	0.025	0.1

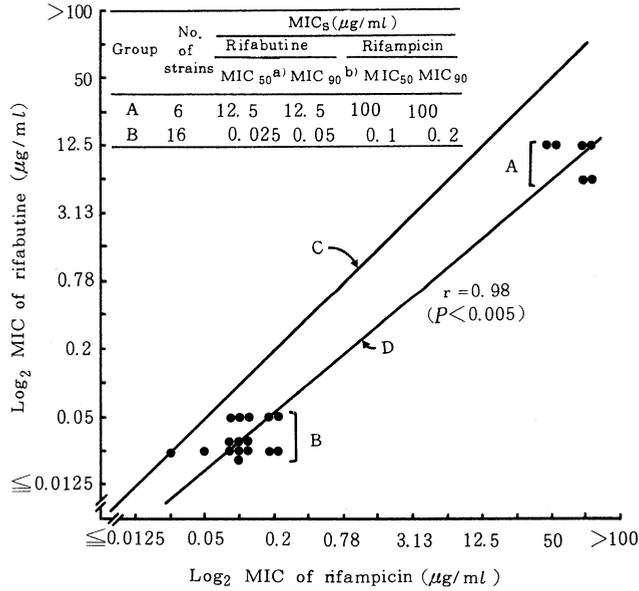


Fig. 1. Relationship between MIC of rifabutine and that of rifampicin to clinical isolates of *M. tuberculosis*
 a) MIC at which 50% of strains was inhibited.
 b) MIC at which 90% of strains was inhibited.

Table 2. Susceptibility of various mycobacteria to rifabutine and rifampicin

Drugs	Organisms	Number of strains	MICs (μg/ml)													MIC ₉₀ ^{a)}		
			≤ 0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50		100	>100
RFB	<i>M. kansasii</i>	19	5 ^{b)}	7	3	3	1											0.1
	<i>M. marinum</i>	10		2	3	4	1											0.1
	<i>M. scrofulaceum</i>	19		1	2	2	5	6	1	2								1.56
	<i>M. avium</i> complex	52		1	1	7	15	10	11	4	2						1	1.56
	<i>M. fortuitum</i>	20									8	8	4					6.25
	<i>M. chelonae (abscessus)</i>	20										1	6	11	2			25
	<i>M. chelonae (chelonae)</i>	20										3	6	3	4	4		50
RFP	<i>M. kansasii</i>	19		1	4	10		2		2								3.13
	<i>M. marinum</i>	10			2	4	4											0.39
	<i>M. scrofulaceum</i>	19			4	2	1	6		4	2							6.25
	<i>M. avium</i> complex	52							2	7	14	13	3	7	4	1	1	50
	<i>M. fortuitum</i>	20											2	4	8	6		100
	<i>M. chelonae (abscessus)</i>	20												1	2	17		>100
	<i>M. chelonae (chelonae)</i>	20												1	4	5	10	>100

a) MIC at which 90% of strains was inhibited.
 b) Number of strains showing the MIC.

の抗菌活性も RFP におけるよりも強かったが、RFB の迅速発育菌に対する抗菌活性は上述の遅発育菌に対するほど強いものではなかった。

ところで、RFB 並びに RFP の *M. avium* complex に対する抗菌作用については、次のような知見を得た。RFB 並びに RFP の *M. avium* complex 計 52 株に対

する MIC₉₀ はそれぞれ 1.56 並びに 50 μg/ml であり、従って RFB の抗菌活性は RFP のその 32 倍強いことになる。両剤に対する供試菌の累積感受性分布 (Fig. 2 挿入表) についてみると、RFB 0.78 μg/ml 感受性菌は 86.5% であったのに対して同濃度の RFP に対するそれは 3.8% にすぎず、また RFP 3.13 μg/ml 感受性

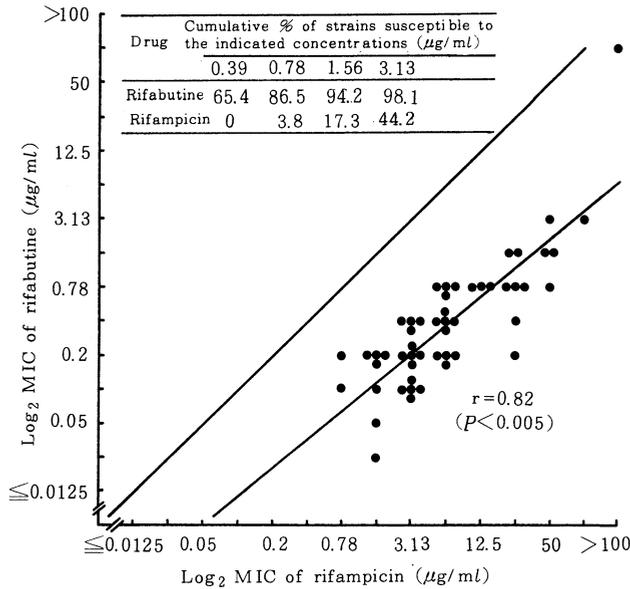


Fig. 2. Relationship between MIC of rifabutine and that of rifampicin to *M. avium* complex strains

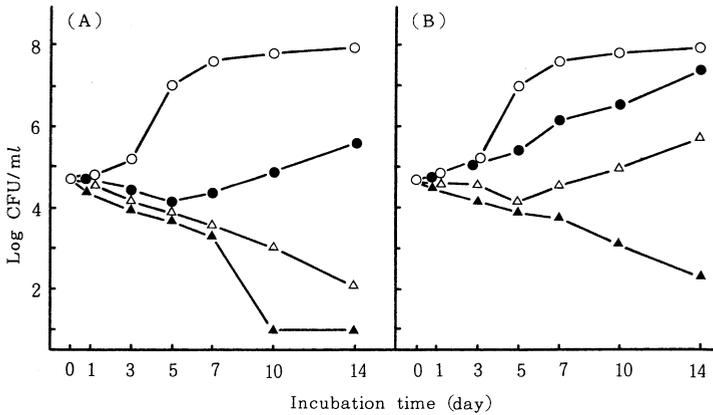


Fig. 3. Antimicrobial effects of rifabutine (A) and rifampicin (B) against *M. avium* complex growing in Dubos Tween-albumin medium.

Symbols: ○ Control; ● 0.0125 $\mu\text{g/ml}$; △ 0.025 $\mu\text{g/ml}$; ▲ 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

菌の占める比率はRFBのそれの1/2以下であった。本菌群に対するRFBとRFPの抗菌活性の間には*M. tuberculosis*でみられたと同様に有意 ($P<0.005$) な相関 ($r=0.82$) がみられた。しかし、両薬剤の供試菌に対するMICの相関関係より得られた回帰式は*M. tuberculosis*の場合におけると同様な様相を呈したことから、両薬剤間には完全な交差耐性は成立していない

といえよう。さらに、その回帰式は*M. tuberculosis*の場合におけるよりもさらにRFP側に寄っていることから、*M. tuberculosis*における場合よりも*M. avium* complexに対するRFBの抗菌活性はRFPのそれより著しく勝っていることがわかった。

3. *M. avium* complexに対するRFBとRFPの殺菌活性

Fig. 3 に示すように、RFB (A) は $0.0125 \mu\text{g/ml}$ で発育抑制的に、また 0.025 及び $0.05 \mu\text{g/ml}$ で殺菌的に働き、後者では培養 10 日目に完全な殺菌作用がみられた。これに対して、RFP (B) では $0.025 \mu\text{g/ml}$ で RFB の $0.0125 \mu\text{g/ml}$ にほぼ匹敵する発育抑制効果が、また $0.05 \mu\text{g/ml}$ で RFB の $0.025 \mu\text{g/ml}$ にほぼ匹敵する殺菌効果がみられたに過ぎなかった。

考 察

今回の検討により、RFB の *M. tuberculosis* に対する *in vitro* 抗菌活性は RFP よりも強いこと、RFP 感受性株は RFB に対してより感受性 (16 株中 15 株) であり、RFP 耐性株 (6 株) はその耐性度より低い耐性を示すことが分かり、先人の報告^{1)~5)} を追認することができた。更に、RFB 並びに RFP の *M. tuberculosis* に対する抗菌活性の間には有意な相関がみられたが、両薬剤間には完全な交差耐性は生じていないことも明らかとなった。

Woodley と Kilburn³⁾ は、*M. tuberculosis* 計 1,110 株の RFB 並びに RFP の各 $1 \mu\text{g/ml}$ に対する感受性を 7H10 寒天培地を用いて検討し、RFP 感受性株はすべて RFB にも感受性であったが、RFP 耐性の 44 株中 16 株は RFB 感受性であったことから、両薬剤間には完全な交差耐性は生じないと述べている。また、Heifets と Iseman⁴⁾ は 7H11 寒天培地を用いての検討で、RFP $1 \mu\text{g/ml}$ 感受性 *M. tuberculosis* は RFB $0.5 \mu\text{g/ml}$ に対してすべて感受性であったが、RFP $10 \mu\text{g/ml}$ 耐性株の 12% は RFB $0.5 \mu\text{g/ml}$ に感受性であったという。

Cynamon¹¹⁾ は、RFB の *M. avium* complex (20 株) に対する MIC を 7H10 寒天を用いて測定したところ、 $\text{MIC}_{50} = 0.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $\text{MIC}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$ であったといい、また Heifets ら¹²⁾ は 7H11 寒天を用いた場合、 $\text{MIC}_{50} = 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $\text{MIC}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$ であったという。我々が 7H10 寒天培地を用いて測定した結果では $\text{MIC}_{50} = 0.39 \mu\text{g/ml}$ 、 $\text{MIC}_{90} = 1.56 \mu\text{g/ml}$ でこれらの報告とほぼ同様であった。

ところで、今回の我々の実験成績によれば、*M. avium* complex 52 株のうち 96.2% は RFP $0.78 \mu\text{g/ml}$ に対して耐性であったが、86.5% はこれと同濃度の RFB に対して感受性であり、また $1.56 \mu\text{g/ml}$ の RFP と RFB に対してもそれぞれ 82.7% が耐性、94.2% が感受性であった。この成績は *M. avium* complex の約 94% は RFP $1 \mu\text{g/ml}$ に対して自然耐性であるのに対して、81~86% は RFB $1 \mu\text{g/ml}$ に対して感受性であったという先人の報告^{3)~4)} とほぼ同様のものである。また、我々は RFB 並びに RFP の *M. avium* complex に対する抗菌作用の間にも、*M. tuberculosis* における場

合同様、有意な相関があり、完全な交差耐性 (交差感受性) は成立していないことを明らかにした。

RFB は *M. kansasii*、*M. marinum*、*M. scrofulaceum* に対しても強い抗菌活性を有すること⁴⁾⁵⁾ を追認したが、その程度は、 MIC_{90} での比較において、RFP におけるよりも強いものであった。他方、迅速発育菌である *M. fortuitum* に対する RFB の抗菌活性は比較的強かった ($\text{MIC}_{90} = 6.25 \mu\text{g/ml}$) のに対して、*M. chelonae* に対しては弱かった ($\text{MIC}_{90} = \text{subsp. abscessus}$ で $25 \mu\text{g/ml}$ 、*subsp. chelonae* で $50 \mu\text{g/ml}$) が、これらの菌種に対する RFB の抗菌活性も RFP におけるよりも強かった。

RFB 並びに RFP の *M. avium* complex に対する殺菌作用をこれらの薬剤含有 Dubos 液体培地を用いて検討したところ、RFB の殺菌活性は RFP におけるよりも強いことが明らかにされた (Fig. 3)。興味あることは、RFB $0.05 \mu\text{g/ml}$ 含有培地中培養 10 日目において急激な CFU の低下がみられたことである。同様な現象は Perumal ら¹³⁾ の 7H9 broth を用いた実験でもみられているところであるが、その原因については明らかではない。あるいは彼らが述べているように培地中の栄養分の欠乏、あるいは何らかの毒性物質の蓄積によるものかもしれない。

RFB の抗マイコバクテリア活性が RFP のそれよりも強いことの一因として、RFB の高い脂肪親和性¹⁾ により本薬剤が RFP よりも細菌細胞壁内へより入り込みやすいことによるものかもしれない。

ま と め

代表的な病原性抗酸菌 7 菌種計 185 株に対する Rifabutine (RFB) 並びに Rifampicin (RFP) の抗菌作用について検討し、以下の知見を得た。

1) *in vitro* 抗菌作用を寒天 (7H10) 希釈法によって検討したところ、 MIC_{90} の比較において、いずれの菌種に対しても RFB において RFP におけるよりも強い抗菌力を示した。特に RFB は遅発育菌である *M. tuberculosis* (業室株)、*M. kansasii*、*M. marinum*、*M. scrofulaceum* 及び *M. avium* complex に対しては強い抗菌活性を示したが、迅速発育菌である *M. fortuitum* 及び *M. chelonae* に対する抗菌活性はこれらよりも劣った。

2) RFP 耐性 *M. tuberculosis* に対する RFB の耐性度は RFP よりも低かった。また、*M. tuberculosis* 並びに *M. avium* complex に対する RFB と RFP の間には完全な交差耐性は生じていないことが認められた。

3) *M. avium* complex に対する殺菌作用は RFB において RFP におけるよりも強かった。

謝 辞

供試薬剤の提供をいただいた Farmitalia Carlo Erba 並びに第一製薬に対して謝意を表します。

文 献

- 1) Sanfilippo, A. et al. : Biological activity of a new class of rifamycins spiro-piperidyl-rifamycins, *J Antibiot*, 33 : 1193, 1980.
- 2) Della Bruna, C. et al. : LM 427, a new spiro-piperidylrifamycin : *in vitro* and *in vivo* studies, *J Antibiot*, 36 : 1502, 1983.
- 3) Woodley, C. et al. : *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* strains to a spiro-piperidyl rifamycin, *Am Rev Respir Dis*, 126 : 586, 1982.
- 4) Heifets, L. et al. : Determination of *in vitro* susceptibility of mycobacteria to ansamycin, *Am Rev Respir Dis*, 132 : 710, 1985.
- 5) Tsukamura, M. : Two groups of *Mycobacterium avium* complex strains determined according to the susceptibility to rifampicin and ansamycin, *Microbiol Immunol*, 31 : 615, 1987.
- 6) Horsburgh, C. R., Jr. et al. : Response to therapy of pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* infection correlates with results of *in vitro* susceptibility testing, *Am Rev Respir Dis*, 135 : 418, 1987.
- 7) 喜多舒彦 : 非定型抗酸菌の化学療法—特に *M. intracellulare* 症を中心として, *結核*, 54 : 543, 1979.
- 8) 下出久雄 : 非定型抗酸菌の臨床的研究—第13報 多剤 (4~5剤) 併用療法による *M. intracellulare* 肺感染症の治療成績—, *日胸*, 40 : 669, 1981.
- 9) Davidson, P. T. et al. : Treatment of disease due to *Mycobacterium intracellulare*, *Rev Infect Dis*, 3 : 1052, 1981.
- 10) 斎藤 肇・佐藤勝昌他 : 諸種抗酸菌に対する norfloxacin, ofloxacin 及び ciprofloxacin の *in vitro* 並びに *in vivo* 抗菌活性, *結核*, 62 : 287, 1987.
- 11) Cynamon, M. H. : Comparative *in vitro* activities of MDL 473, rifampicin, and ansamycin against *Mycobacterium intracellulare*, *Antimicrob Agents Chemother*, 28 : 440, 1985.
- 12) Heifets, L. B. et al. : Determination of ansamycin MICs for *Mycobacterium avium* complex in liquid medium by radiometric and conventional methods, *Antimicrob Agents Chemother*, 28 : 570, 1985.
- 13) Perumal, V. K. et al. : Dynamic aspects of the *in vitro* chemotherapeutic activity of ansamycin (rifabutine) on *Mycobacterium intracellulare*, *Am Rev Respir Dis*, 132 : 1278, 1985.