

原 著

試験管内感受性試験からみた Rifampicin の
非定型抗酸菌感染症に対する有効性の推定

束 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和63年11月2日

EVALUATION OF CLINICAL EFFICACY OF RIFAMPICIN IN THE TREATMENT
OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIOSIS FROM
IN VITRO SUSCEPTIBILITY TESTING

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication November 2, 1988)

In vitro susceptibility testing of various mycobacteria (a total of 295 strains) to rifampicin was carried out using Ogawa egg medium and inoculation of 0.02 ml-samples from 10 mg wet weight per ml suspensions, which were prepared from 10 day-old cultures (*M. tuberculosis*, 21 day-old cultures; *M. fortuitum*, 3 day-old cultures). The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined after incubation at 37°C for 14 days (*M. tuberculosis* and *M. xenopi* 21 days and *M. fortuitum* 5 days). MIC of *M. tuberculosis* strains, which were isolated from patients who were untreated previously by any antituberculosis drugs, was in the range of 3.13 to 12.5 µg/ml, thus the critical concentration of rifampicin, in which the clinical efficacy of rifampicin could be expected, was determined as 12.5 µg/ml. The percentage of strains of each species which are susceptible to this critical concentration is shown in Table 1. In *M. avium* complex strains, 50% of the strains were inhibited by rifampicin equal to or lower than the critical concentration. However, it is considered to be difficult to cure the disease completely even in these cases, because of the lack of other effective combination drugs with rifampicin. Monotherapy with rifampicin or that with less effective combined drugs would result in development of rifampicin-resistant population and failure of treatment. In successive studies, we will try to find out best possible combination drugs. From this study, the highest efficacy of rifampicin treatment was expected in the disease due to *M. kansasii* and the lowest efficacy in the disease caused by *M. fortuitum*.

Key words : Rifampicin, *In vitro* susceptibility testing, Nontuberculous mycobacteriosis, Clinical efficacy

キーワード : Rifampicin, 試験管内感受性, 非定型抗酸菌症, 有効性

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

緒言

Rifampicin (RFP) は、今日、非定型抗酸菌症 (nontuberculous mycobacteriosis) の治療に最も頻繁に使用されている抗結核剤であるといえる。しかし、頻繁に使用される理由は、確たる根拠があつてのことではなく、この薬が肺結核の治療に最も頻繁に使用されるが故に、たんに、その延長として非定型抗酸菌症にも用いられるということのように思われる。われわれが本報の研究を思い立ったのは、RFP が非定型抗酸菌症に本当に利く根拠があるのか、ないのか、今一度改めて、感受性テストの結果を見直してみようということにある。

RFP は、いうまでもなく、rifamycin SV の誘導体である。rifamycin SV の非定型抗酸菌に対する試験管内発育阻止作用について最初に報告したのは、東村・東村¹⁾で、rifamycin SV 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (小川培地) によって阻止されるのは、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) だけであり、*Mycobacterium kansasii* を含む他の抗酸菌は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に耐性であると報告した。しかし、その後、誘導体である RFP が作られると、RFP が *M. tuberculosis* のみならず、*M. kansasii* に対しても、かなり低濃度 (小川培地では 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で阻止) で発育阻止作用を示すことが分かった。また、*Mycobacterium avium* complex の中でも、一部の株は、RFP に対してかなり高い感受性を示すものがあることが分かった^{2)~8)}。その後の臨床経験で、*M. kansasii* 症に対する RFP の効果は、多くの臨床家が認めるところとなったが⁹⁾¹⁰⁾、*M. avium* complex 症に対する効果は確実とはいへなかった¹¹⁾。しかし、RFP を含む治療がかなり有効であることは、ほぼ確実となった^{12)~15)}。最近、東村¹⁶⁾は、*M. avium* complex の RFP および ansamycin 感受性を検して、*M. avium* complex の分離株が、耐性群と感受性群とによってよい 2 群に分かれることを見出した。RFP の感受性については、以前に検査したことがあるが⁷⁾、最近になって、日本の *M. avium* complex 感染株の biotype に疫学的変化が起こっていることが分かったので¹⁷⁾、最近の分離株を中心として、RFP 感受性を再検討してみることにした。また、他の抗酸菌の RFP 感受性についても、併せて検討してみることにした。過去の研究で未検の菌種も若干残っているからである^{2)~7)}。

実験方法

菌株：次の菌株を使用した。*Mycobacterium tuberculosis* (20 株)；*M. avium* complex (64 株)；*M. kansasii* (30 株)；*M. marinum* (26 株)；*M. fortuitum* (20 株)；*M. szulgai* (23 株)；*M. malmoense* (13 株)；*M. xenopi* (12 株)；*M. simiae* (7 株)；*M. non-*

chromogenicum (20 株)；*M. gordonae* (30 株)；*M. scrofulaceum* (30 株)、合計 295 株。これらの菌株は、既報の方法により同定した¹⁸⁾。この中で、*M. simiae*、*M. marinum*、*M. nonchromogenicum*、*M. gordonae* 以外の株は、感染症を起こした患者の喀痰、リンパ腺、膿瘍から、治療前に分離された。*M. simiae* は J. Weiszfeiler により猿から、*M. marinum* の半数 (13 株) はヒトの皮膚病変から、他の半数は魚の病変から、*M. nonchromogenicum* は土壌から、*M. gordonae* は患者喀痰から“casual isolates”として分離された。菌株は、使用まで凍結乾燥または -20°C で保存された。

感受性測定：被検株は、「1%小川培地」に 10 日培養して、これから菌液を作った。ただし、*M. tuberculosis* は 21 日、*M. fortuitum* は 3 日培養して使用した。菌株は、ガラス玉コルペン中で 5 分間振盪して均一化し、これに 0.1% Tween 80 水溶液を加えて、約 10 mg/ml (湿菌量) 菌液とし、その 0.02 ml ずつを渦巻白金耳 (1 白金耳で 0.02 ml 接種可能) で各培地に接種した。RFP (Lepetit, Milano, Italy) は、まず propylene glycol に溶解し、その 1 容を滅菌前の「1%小川培地」100 容に添加して所要の濃度とした。使用した濃度は、200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.6, 0.8, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10 本 1 組) である。被検株を接種した試験管には、底に 3 mm の切れ目の入ったダブルゴム栓を覆せ、 37°C に 14 日間培養した後、発育を観察した。ただし、*M. marinum* は 28°C に培養した。また、*M. tuberculosis* と *M. xenopi* は発育が遅いので、21 日後に判定した。*M. fortuitum* は、5 日後に判定した。最小発育阻止濃度 (MIC) は、完全阻止濃度として判定した。ただし、ある濃度で、痕跡の発育 (培地から盛り上がらない微量発育が小範囲にみられる場合) が起こり、それより 1 段階低い濃度で、対照とほぼ同等の全面的な豊富な発育がみられた場合は、完全発育阻止でなくても前者の濃度を MIC と判定した。一般的にいって、痕跡の発育が見られたのは、MIC 値 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の場合で、MIC 値が低い場合は、判定は非常に容易であった。ある濃度まで豊富な全面発育が見られた後、1 段階上の濃度では、急に完全発育阻止となった。

実験成績

成績を Fig. 1~3 に示す。*M. tuberculosis* 20 株に対する MIC の分布は、3.2~12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。*M. avium* complex 64 株に対する MIC の分布は、0.8~>200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で菌株により著明な差があった。MIC の頻度が高いのは、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 附近、6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 附近、および >200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 附近であった。*M. scrofulaceum* 30 株に対する MIC の分布も、同じく幅が広く、0.8~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に及んだが、*M. avium* complex と異なる

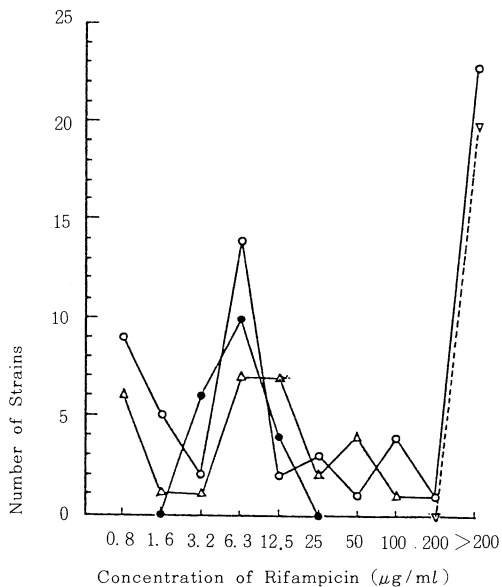


Fig. 1. Comparison of the minimal inhibitory concentrations of rifampicin against 20 strains of *M. tuberculosis* (●-●), 64 strains of *M. avium* complex (○-○), 30 strains of *M. scrofulaceum* (△-△), and 20 strains of *M. fortuitum* (▽-▽).

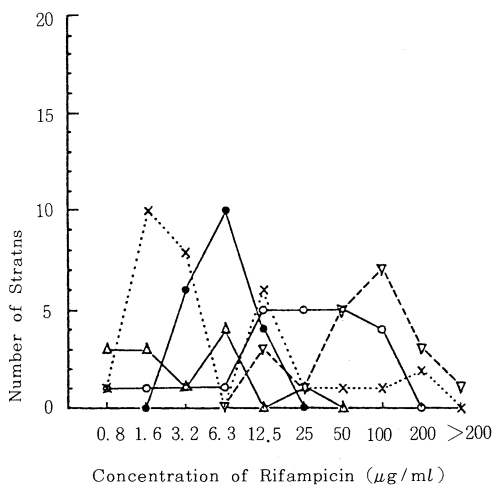


Fig. 3. Comparison of the minimal inhibitory concentrations of rifampicin against 20 strains of *M. tuberculosis* (●-●), 23 strains of *M. szulgai* (○-○), 12 strains of *M. xenopi* (△-△), 20 strains of *M. nonchromogenicum* (▽-▽), and 30 strains of *M. gordonae* (×-×).

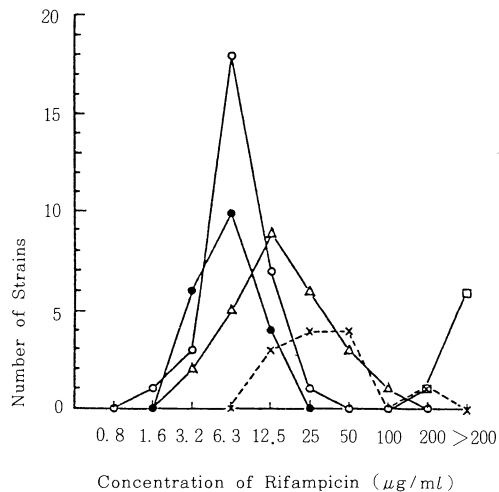


Fig. 2. Comparison of the minimal inhibitory concentrations of rifampicin against 20 strains of *M. tuberculosis* (●-●), 30 strains of *M. kansasii* (○-○), 26 strains of *M. marinum* (△-△), 13 strains of *M. malmoense* (×-×), and 7 strains of *M. simiae* (□-□).

点は、 $>200 \mu\text{g/ml}$ の高耐性株がないことであった。分布の中心は、おおよそ、 $6.3 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ にあった。*M. fortuitum* 20株は、全株が、 $>200 \mu\text{g/ml}$ の高耐性であった。

M. kansasii 30株のMIC分布は、 $1.6 \sim 2.5 \mu\text{g/ml}$ 、*M. marinum* 26株のそれは、 $32 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 、*M. malmoense* 13株のそれは、 $12.5 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ 、そして、*M. simiae* 7株のそれは、 $200 \mu\text{g/ml}$ またはそれ以上であった。

次に、*M. szulgai* 23株のMICは、 $0.8 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 、*M. xenopi* 12株のMICは、 $0.8 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ 、*M. nonchromogenicum* 20株のMICは、 $12.5 \sim >200 \mu\text{g/ml}$ 、*M. gordonae* 30株のMICは、 $0.8 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ の間に分布した。

考 察

非定型抗酸菌に対するRFPの臨床効果を推定するにあたって、まず、考慮すべきことは、*M. tuberculosis* に対するRFPのMIC値である。結核症に対するRFPの臨床効果は、万人の容認するところである故、非定型抗酸菌の中で、*M. tuberculosis* に対するMICとほぼ同等または、それ以下のMICを示すものがあれば、その抗酸菌に対するRFPの臨床効果は、ほぼ確実に期待できるといえる。ただ、*M. tuberculosis* に対する

Table Percentage of Strains Susceptible to the Critical Concentration (12.5 $\mu\text{g/ml}$) of Rifampicin

Species	No. of strains tested	Percentage of strains susceptible to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin
<i>M. tuberculosis</i>	20	100 %
<i>M. avium</i> complex	64	50
<i>M. kansasii</i>	30	97
<i>M. marinum</i>	26	62
<i>M. scrofulaceum</i>	30	73
<i>M. xenopi</i>	12	92
<i>M. szulgai</i>	23	39
<i>M. gordonae</i>	30	83
<i>M. malmoense</i>	13	23
<i>M. nonchromogenicum</i>	20	15
<i>M. simiae</i>	7	0
<i>M. fortuitum</i>	20	0

The critical concentration (12.5 $\mu\text{g/ml}$) is the concentration, in which all *M. tuberculosis* strains which were isolated from patients who were not treated previously by any antituberculosis drugs, are inhibited in Ogawa egg medium.

MIC と、他の抗酸菌に対する MIC を比較する場合、注意を要するのは、前者の判定を 21 日培養で、後者の判定を 14 日培養で行ったことである。培地中の RFP の力価は、自然分解のために、7 日毎に 50 % に落ちてゆく¹⁹⁾。したがって、21 日後に判定した MIC 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$ は、14 日後判定に読みかえると、1.6~6.25 $\mu\text{g/ml}$ としなければならぬのかもしれない。しかし、このような換算を行ってゆくと、RFP は培養何日後頃に最も発育阻的であるかということを考えなければならなくなり、事態はまことに複雑となる。しかし、本報のように、*in vitro* 実験から薬剤の臨床効果を推定しようとする事自体、かなり大ざっぱな試みであるから、少々誤差が起こることは当然のことかもしれない。そのように考えると、ここでは、簡単に割り切って、表示された *M. tuberculosis* に対する MIC 以下の濃度で、他の抗酸菌の発育阻止が起これば、RFP の臨床的有効性が期待できるものとする。

なお、参考までに述べると、21 日後に MIC 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$ を示した培地の実際の RFP 活性は、その 1/8、すなわち、0.4~1.6 $\mu\text{g/ml}$ と推定される¹⁹⁾。RFP 0.45 g 内服後の最高血中濃度は、報告により若干異なるが、4~10 $\mu\text{g/ml}$ で^{20)~23)}、血中濃度の点からも有効性は十分期待できる。

以上のように考えて、*M. tuberculosis* 20 株に対する MIC の上限 12.5 $\mu\text{g/ml}$ を、有効性の“critical concentration”と考えると、各菌種で、この有効範囲

に含まれる菌株の%は、Tableのごとくなる。例えば、*M. avium* complex では、64 株中 32 株 (50 %) が、この範囲に含まれる。したがって、*M. avium* complex 感染症の約半数の症例では、RFP が有効であると期待される。このような有効可能性の%は、*M. kansasii* および *M. xenopi* では、それぞれ、97 %、92 % と高く、これらの菌の感染症の大部分に RFP が有効なことを示している。*M. scrofulaceum* に対する有効の可能性は、73 % と、*M. avium* complex の場合よりも高い。一方、*M. malmoense*、*M. simiae*、*M. fortuitum* に対する有効の可能性は、23 %、0 %、0 % と低い。

以上のように、最も問題となる *M. avium* complex の場合、その症例の 50 % で RFP の有効性が期待されるわけであるが、有効性が直ちに感染症の治癒につながるわけではないことに注意すべきである。それは、結核症の場合と同様に、RFP 単独治療では、容易に耐性菌集団が発生して治療が失敗に終わる可能性が高いからである。しかも、*M. avium* complex の場合、RFP 耐性菌の自然突然変異による発生率は、*M. tuberculosis* の場合よりも高いことがあるので²⁴⁾、RFP 耐性の発現は、より速やかであるとも考えられる。したがって、治療を奏功させるためには、結核症の場合と同様に、有力な併用薬剤が必要である。結核症の場合には、INH という強力な協力者があり、さらに SM、EB、EVM などの併用も可能である。しかるに、*M. avium* complex

の場合、INHの有効性をほとんど期待できないし、他の併用薬剤も結核症の場合ほど有効性を期待できない。このため、RFPが有効であるはずの症例でも、併用薬剤の力量不足のために治療が失敗に終わることが多いと思われる。それでは、われわれは、手持ちの抗結核剤という持駒の中で、いかなる組合せを行えば、よりよい治療ができるのであろうか。この問題に取り組むために、本報に引き続いて、各薬剤の有効性を検討していくつもりである。

総 括

種々の抗酸菌に対するRFPのMICを測定し、これを*M. tuberculosis*に対するMICと比較し、いかなる抗酸菌に対し、いかなる比率でRFPの有効性が期待できるかを計算した。その結果、*M. avium* complex感染症では、約50%の症例でRFPの有効性が期待できると分かった。最も高い有効率を示したのは、*M. kansasii* (97%)、最も低い有効率を示したのは、*M. fortuitum* (0%)で、大方の臨床経験の結果と一致した。

文 献

- 1) 東村純雄・東村道雄：新抗生物質 Rifamycin SV に対する抗酸菌の感受性，結核，37：586～590，1962.
- 2) Clark, J. and Wallace, A. : The susceptibility of mycobacteria to rifamide and rifampicin, *Tubercle*, 48 : 144-148, 1967.
- 3) Hobby, G. L. and Lenert, T. F. : The antimycobacterial activity of rifampin, *Am Rev Respir Dis*, 97 : 713-714, 1968.
- 4) McClatchy, J. K., Waggoner, R. F. and Lester, W. : *In vitro* susceptibility of mycobacteria to rifampin, *Am Rev Respir Dis*, 100 : 234-236, 1969.
- 5) Ryneerson, T. K., Shronts, J. S. and Wolinsky, E. : Rifampin : *in vitro* effect on atypical mycobacteria, *Am Rev Respir Dis*, 104 : 272-274, 1971.
- 6) Stottmeier, K. D., Kubica, G. P. and Woodley, C. L. : Antimycobacterial activity of rifampin under *in vitro* and simulated *in vivo* conditions, *Appl Microbiol*, 17 : 861-865, 1971.
- 7) Tsukamura, M. : Susceptibility of *Mycobacterium intracellulare* to rifampicin : a trial of ecological observation, *Japan J Microbiol*, 16 : 444-446, 1972.
- 8) Tsukamura, M. : Differentiation between *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gastri*, *J Gen Microbiol*, 74 : 193-194, 1973.
- 9) 下出久雄：非定型抗酸菌症の臨床的研究（第3報），*M. kansasii* の肺感染症について，日本胸部臨床，30：128～134，1971.
- 10) Harris, G. D., Johanson, W. G. and Nicholson, D. P. : Response to chemotherapy of pulmonary infection due to *Mycobacterium kansasii*, *Am Rev Respir Dis*, 112 : 31-36, 1975.
- 11) 東村道雄： *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* 感染症（その2），医療，38：955～963，1984.
- 12) Ahn, C. H., Ahn, S. S., Anderson, R. A. et al. : A four-drug regimen for initial treatment of cavitary disease caused by *Mycobacterium avium* complex, *Am Rev Respir Dis*, 134 : 438-441, 1986.
- 13) Tsukamura, M. : Evidence that antituberculosis drugs are really effective in the treatment of pulmonary infection caused by *Mycobacterium avium* complex, *Am Rev Respir Dis*, 137 : 144-148, 1988.
- 14) Tsukamura, M. and Ichiyama, S. : Comparison of antituberculosis drug regimens for lung disease caused by *Mycobacterium avium* complex, *Chest*, 93 : 821-823, 1988.
- 15) 喜多舒彦：非定型抗酸菌症の化学療法一特に *M. intracellulare* 症を中心として，結核，54：543～546，1979.
- 16) Tsukamura, M. : Two groups of *Mycobacterium avium* complex strains determined according to the susceptibility to rifampicin and ansamycin, *Microbiol Immunol*, 31 : 615-623, 1987.
- 17) Miyachi, T., Shimokata, K., Dawson, D. J. and Tsukamura, M. : Changes of the biotype of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex causing disease in Japan, *Tubercle*, 69 : 133-137, 1988.
- 18) Tsukamura, M. : Numerical classification of slowly growing mycobacteria, *Int J Syst Bacteriol*, 26 : 409-420, 1976.
- 19) 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.
- 20) Furesz, S., Scotti, R., Palanza, R. and Mapelli, E. : Rifampicin : a new rifamycin.

3. Absorption, distribution, and elimination in man, *Arzneimittel-Forschung*, 17 : 534-537, 1967.
- 21) Porven, G. and Canetti, G. : Les taux de rifampicine dans le sérum de l'homme, *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, 32 : 707-716, 1968.
- 22) 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 : 923-932, 1968.
- 23) 東村道雄, 横内寿八郎, 三輪太郎・小池和夫 : 食前, 食後服用による rifampicin 血中濃度の比較, *結核*, 47 : 69~73, 1972.
- 24) 東村道雄 : *Mycobacterium avium* complex の抗結核剤に対する耐性形式, *結核*, 62 : 445~458, 1987.