

原 著

新 rifamycin 誘導体の *Mycobacterium tuberculosis* と
M. avium complex に対する *in vitro* 抗菌作用

山 本 誉 ・ 網 谷 良 一 ・ 久 世 文 幸

京都大学胸部疾患研究所 感染・炎症学

鈴 木 克 洋

同 第1内科
受付 平成2年5月18日IN VITRO ACTIVITIES OF NEW RIFAMYCIN DERIVATIVES AGAINST
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AND *M. AVIUM* COMPLEXTakashi YAMAMOTO*, Ryoichi AMITANI,
Fumiyuki KUZE and Katsuhiro SUZUKI

(Received for publication May 18, 1990)

The *in vitro* anti-*M. tuberculosis* and anti-*M. avium* complex activities of five new rifamycin derivatives, KRM1648, KRM1657, KRM1668, KRM1674 and KRM2312, provided by Kanegafuchi Chem. Ind. Co. Japan were evaluated and compared with those of rifampicin (RFP) and rifabutin (RBU).

Antimycobacterial activity was tested by broth dilution method using Kirchner's liquid medium supplemented with 10% bovine serum. The MICs 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of all five KRMs and RBU for 20 clinical isolates of *M. tuberculosis* were 0.035~0.07, whereas that of RFP was 1.25. The new rifamycin derivatives showed 16 to 32 times lower MICs than those of RFP against *M. tuberculosis*.

All five KRMs inhibited 100% of 20 clinical isolates of *M. avium* complex at a concentration of 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, while only 35% and 10% of the strains were inhibited by the same concentration of RBU and RFP, respectively. The MICs 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) for the strains tested were 0.07~0.3 for all five KRMs, and 5 and 40~80 for RBU and RFP, respectively. The new rifamycin derivatives were 16 times more active than RBU, which was 8 times more active than RFP.

The new rifamycin derivatives were far more effective against *M. tuberculosis in vitro* than RFP, and their superiority to RBU which showed the effect superior to RFP was notable in *in vitro* anti-*M. avium* complex activities.

* From the Department of Infection and Inflammation, First Clinic of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

Key words : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, Rifampicin, New rifamycin derivatives, *In vitro* antimycobacterial activity

キーワード : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, リファンピシン, 新 rifamycin 誘導体, 試験管内抗ミコバクテリア活性

緒 言

結核に対する化学療法については、INH と RFP を主軸とし、これに SM あるいは EB を組み合わせる 3 剤併用療法が確立され、肺結核の初回化学療法の標準方式¹⁾として広く使用されている。この標準方式による結核化学療法における飛躍的な進歩は、INH と、その強力な抗菌力に匹敵し、分裂休止菌にも有効な RFP とを併用することによって、治療効果の増大と治療期間の大幅な短縮が可能になったことに基づいている。しかし、一般細菌感染症などの抗菌薬と比較すると、抗結核薬の種類は極めて限られており、今後とも新しい薬剤開発の努力は必要である。

これに加え、最近増加している非定型抗酸菌症²⁾に対する化学療法、特に *Mycobacterium avium* complex 感染症を対象とした抗菌薬の開発も急務であると思われる。このたび、鍾淵化学工業株式会社より新しい rifamycin 誘導体 [3'-hydroxy-5'-(4-alkylpiperazinyl) benzoxazinorifamycin] に属する 5 化合物 (KRM1648, 1657, 1668, 1674, 2312) の提供を受けたのを機会に、これら化合物の *M. tuberculosis* および *M. avium* complex に対する試験管内抗菌力を rifampicin (RFP), rifabutin (RBU) と比較検討した。その結果、これら新 rifamycin 誘導体に強力な *in vitro* 抗菌活性が認められたので以下に報告する。

研究方法

I. 菌 株

Modified Dubos Tween albumin 液体培地³⁾に継代し、4℃で保存していた抗結核薬に感受性を示す *M. tuberculosis* 臨床分離菌 20 株と H37Rv 株および *M. avium* complex 臨床分離菌 20 株を使用しに臨んで新たな同培地へ継代し、2 週間培養したものを実験に供した。なお、使用した *M. avium* complex 20 株は modified cornmeal agar medium³⁾上で、transparent colony を dominant に示す株である。

II. 試験管内抗菌力試験

培地は 10% 牛血清加 Kirchner 液体培地と上述した modified Dubos Tween albumin 培地を使用し、初管の薬剤濃度を 10 $\mu\text{g/ml}$ (*M. tuberculosis*) ないし 160 $\mu\text{g/ml}$ (*M. avium* complex) とした各薬剤の倍数希釈系列を 19 管作成し、第 20 管は薬剤を含まない対

照とした。なお、培地量は 2 ml とした。

接種菌液の作成は、上述の培養菌液を滅菌生理食塩水で希釈し、硫酸バリウムを用いた肉眼的な比濁で 1.0 mg/ml の菌液とし、その 10 倍希釈液の 0.1 ml をそれぞれ薬剤含有培地と対照培地に接種した。判定は 37℃ 培養 2 週後 (*M. avium* complex), 4 週後 (*M. tuberculosis*) に行い、*in vitro* 抗菌力の比較は、肉眼的に菌の発育の認められない管の最小薬剤濃度 (最小発育阻止濃度, MIC) を用いた。

III. 薬 剤

新 rifamycin 誘導体 : KRM 1648, 1657, 1668, 1674, 2312 の 5 化合物 (薬剤) は、いずれも鍾淵化学工業株式会社、生物化学研究所で合成されたものである。これら 5 剤と比較対照する薬剤としては、rifampicin (RFP) 並びに rifabutin (RBU) を用いた。各薬剤とも、まず dimethylsulfoxide (DMSO) で 1 mg/ml (*M. tuberculosis*) あるいは 16 mg/ml (*M. avium* complex) に溶解後、さらに滅菌蒸留水にて所定濃度に希釈して倍数希釈系列作成に用いた。

研究結果

まず、10% 牛血清加 Kirchner 液体培地を使用して得られた結果について述べる。Table 1 に *M. tuberculosis* 20 株に対して各 MIC を示した菌株数を薬剤別に示した。実験は同一条件で 2 回実施し、実験 1 では KRM 1648, RFP, RBU の 3 剤について、実験 2 では KRM 1657, 1668, 1674, 2312, RFP, RBU の 6 剤について行った。

実験 1 で KRM 1648 は、0.035 $\mu\text{g/ml}$ で 20 株すべての発育を阻止しているのに対し、同じ濃度における RFP, RBU が発育を阻止した菌株数は、それぞれ 1 株 (5%), 17 株 (85%) であった。

実験 2 では、KRM 1657, 1668, 1674, 2312 と RBU はいずれも 0.15 $\mu\text{g/ml}$ で全 20 株の発育を阻止しているのに対し、同濃度で RFP は 3 株 (15%) の発育を阻止したに過ぎなかった。

また、各薬剤の MIC 90 ($\mu\text{g/ml}$) は、RFP : 1.25 (実験 1, 実験 2), RBU : 0.07 (実験 1), 0.035 (実験 2) であったのに対し、KRM 1648 は 0.035, KRM 1657, 1668, 1674, 2312 はいずれも 0.07 であり、RBU とは同等であったが、RFP と比較すると 16~32 倍優れた抗菌力が認められた (Table 3)。

Table 1. MICs of Rifamycin Derivatives against 20 Clinical Isolates of *M. tuberculosis* in Kirchner's Medium

MIC [μg/ml]	RFP		RBU		KRM1648		KRM1657	KRM1668	KRM1674	KRM2312
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)
2.5	1									
1.25	3	5								
0.6	9	10								
0.3	4	2								
0.15	0	2	1				1	1	1	1
0.07	2	1	2	2			6	6	6	6
0.035	1		3	7	7		6	5	5	5
0.017			7	8	7		1	5	4	2
0.008			2	1	3		4	1	0	0
0.004			1	1	0		0	0	2	3
0.002			2	1	1		1	0	1	0
0.001			2		2		0	1	0	0
0.0005							1	1	1	1
0.00025										0
0.000125										1
0.00006										1

() : Experiment No.

Table 2. MICs of Rifamycin Derivatives against 20 Clinical Isolates of *M. avium* complex in Kirchner's Medium

MIC [μg/ml]	RFP		RBU		KRM1648		KRM1657	KRM1668	KRM1674	KRM2312	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(3)	(3)	(3)	(2)	(3)
80	6	1									
40	7	11									
20	2	2									
10	0	0		1							
5	2	3	6	5							
2.5	1	1	7	7							
1.25	2	0	2	3		1	1		1		
0.6		2	0	0		0	0	1	0	1	2
0.3			1	1		1	3	2	3	1	5
0.15			0	1	1	3	6	9	8	0	6
0.07			4	1	6	9	5	4	4	5	2
0.035				0	7	3	4	1	3	4	4
0.017				1	4	1	1	2	1	6	1
0.008					0	1		1		1	
0.004					1	0				1	
0.002					1	0				0	
0.001						1				1	

() : Experiment No.

M. avium complex 20 株に対する各薬剤の抗菌力の結果を、前述した形式に従って Table 2 に示した。実験 1 では KRM 1648, RFP, RBU について、実験 2

では KRM 1648, 2312, RFP, RBU について、実験 3 では KRM 1657, 1668, 1674, 2312 について比較検討を行い、各実験では他の実験で検討した薬剤を必ず 1 つは

Table 3. *In vitro* Activities of Rifamycin Derivatives against Mycobacteria in Kirchner's Medium

compound	M I C		M I C 90	M I C 90
	MT B (H37Rv)	MAC (31F093T)	MT B (20strains)	MAC (20strains)
RFP	0.6	5	1.25	40, 80
RB U	0.035	1.25	0.035, 0.07	5
KRM1648	0.017	0.07	0.035	0.07, 0.15
KRM1657	0.035	0.07	0.07	0.3
KRM1668	0.017	0.035	0.07	0.3
KRM1674	0.017	0.07	0.07	0.3
KRM2312	0.017	0.07	0.07	0.07, 0.3
MIC : $\mu\text{g/ml}$	RFP : Rifampicin RB U : Rifabutin	MTB : <i>M. tuberculosis</i> MAC : <i>M. avium</i> complex		

含むようにして再現性を確認した。実験により MIC の範囲に多少の差は認められるものの、KRM 5 化合物はいずれも 0.6~1.25 $\mu\text{g/ml}$ で 20 株すべての発育を阻止していた。これに対し、同濃度において RFP はわずか 2 株 (10%)、RB U は 7 株 (35%) の発育の阻止を示したに過ぎず、KRM 5 化合物の優れた抗菌力が認められた。

また、各薬剤の MIC 90 ($\mu\text{g/ml}$) についてみると KRM 1648 : 0.07 (実験 1)、0.15 (実験 2) KRM 1657, 1668, 1674 : 0.3 (実験 3)、KRM 2312 : 0.07 (実験 2)、0.3 (実験 3) であったのに対し、RFP は 40, 80, RB U は 5 であり、KRM 各化合物は少なくとも RFP よりも 128 倍、RB U よりも 16 倍強い抗菌力を有していた (Table 3)。Table 3 にはまた、*M. tuberculosis* の標準毒力株である H37Rv 株と、*M. avium* complex のマウス毒力株⁹⁾ で私どもが感染実験に使用している 31F093T 株 (*M. intracellulare*) に対する各薬剤の MIC を示した。

次に、modified Dubos Tween albumin 培地を用いた成績であるが、*M. tuberculosis* を対象とした場合、RFP の MIC は、0.002~0.017 $\mu\text{g/ml}$ で 10%牛血清加 Kirchner 液体培地の 1/100 以下の値を示し、MIC は大幅に低下した。また、KRM の各薬剤および RB U ではいずれも最大希釈濃度 (3×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$) で菌の発育が阻止され、KRM の全薬剤の強力な制菌力は確認できたが、各薬剤相互間の比較はなしであった。

M. avium complex を対象とした場合でも同様に、Dubos 培地の使用により Kirchner 培地よりも強い抗菌力 (1/64~1/32 の MIC) が認められた。

考 察

今回評価した新 rifamycin 誘導体である KRM 1648, 1657, 1668, 1674, 2312 はいずれも *M. tuberculosis*, *M. avium* complex の両方に対し、RFP よりもはるかに優れた *in vitro* 抗菌力を有することが明らかとなった。

特に *M. avium* complex に対して、多くの研究者の注目を集めている同じ rifamycin 誘導体の RB U よりも 10 倍以上強い抗菌力を有することは、新しい rifamycin 誘導体である KRM の特徴として興味深く、今後より詳細な検討の価値があると考ええる。

KRM については、1987 年に new benzoxazino-rifamycin derivatives として類似の誘導体が学会に発表され⁵⁾、RFP よりも *M. tuberculosis* に対し 4 倍、*M. intracellulare* に対して 4~8 倍低濃度の MIC を有することが明らかになっていた。その後合成された数多くの誘導体について *M. tuberculosis* H37Rv 株と *M. avium* complex 31F093T 株⁶⁾ に対する *in vitro* 抗菌力試験を実施し、より強い抗菌力を有する誘導体が多数発見されたので、今回その代表として 5 化合物について菌株数を増やして検討を行った次第である。

M. tuberculosis 臨床分離菌 20 株に対する抗菌力の評価では、KRM 5 化合物は RB U と同等の抗菌力を示し、MIC 90 ($\mu\text{g/ml}$) が 0.035~0.07 であったのに対し、RFP では 1.25 であり、その差は 16~32 倍であった。また *M. tuberculosis* の標準毒力株である H37Rv 株に対する MIC でも各 KRM 化合物は RB U と同等であり、RFP との比較では少なくとも 16 倍の差が認められた。

RFP と RB U の *M. tuberculosis* に対する *in vitro* 抗菌力に関しては Sanfilippo et al.⁷⁾、Bruna et al.⁸⁾、

Heifets et al.⁹⁾, 束村ら¹⁰⁾, 斎藤ら¹¹⁾などの報告があり, これらによると RBU は *M. tuberculosis* に対し, RFP よりも 2~4 倍強い *in vitro* 抗菌力を有するとされ, 今回私どもが得た結果とは若干の差が認められた。しかし Dickinson et al.¹²⁾ によって RBU が RFP よりも 8 倍抗菌活性が優れているという報告もみられ, 私どもの結果は決して過大評価ではないと思われる。

M. tuberculosis に対して KRM 各化合物は RFP よりはるかに優れた *in vitro* 抗菌力を示したが, RBU との比較ではこれを凌駕することはできなかった。しかし注目すべき点は, *M. avium complex* に対する抗菌力で, 臨床分離菌 20 株に対し KRM の 5 化合物はいずれも 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で全株の発育を阻止したのに対し, 同濃度において RFP は 2 株 (10%), RBU は 7 株 (35%) の発育を阻止したにすぎず, KRM の有する優れた特徴が明らかになった。

M. avium complex に対する RFP と RBU の *in vitro* 抗菌力については諸家の報告があり^{9)~16)}, 使用培地や菌株の違いにより MIC の範囲に多少の差はあるが, 抗菌力の強さについてみると, RBU は RFP よりも 2~4 倍¹³⁾¹⁴⁾, 16~32 倍¹⁰⁾¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ 優れているとされている。私どもの得た結果では, *M. avium complex* 20 株に対する MIC 90 で RFP が 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったのに対し, RBU は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, 1/8 の MIC を示した。このことは私どもが本実験で対照薬として用いた RFP と RBU の評価が, 私どもの前回の報告¹⁵⁾をはじめ先人の報告によく一致しており, 同じ条件で実施した新 rifamycin 誘導体である KRM 5 化合物の評価は信頼性の高いことを示している。

結核の化学療法は, RFP の発見により飛躍的な進歩を遂げ, 現在では RFP, INH を主軸として SM あるいは EB を併用する肺結核の初回標準治療方式が確立されている。しかし, その治療になお 9~12 カ月を要することから, さらに治療期間を短縮する上でより強力な抗菌力を有する薬剤開発への期待は大きいと考えられる。また, 非定型抗酸菌症, 特に *M. avium complex* 症については, 結核の治療に準じた化学療法が実施され, 多剤併用効果²⁾¹⁷⁾は臨床的にもある程度有効であるとはされるものの, 難治の症例が多いことは周知のことであり, 有効な薬剤の開発が急務である。

今回, 私どもが評価した新 rifamycin 誘導体である KRM 5 化合物は *M. tuberculosis*, *M. avium complex* に対して RFP をはるかにしのぐ *in vitro* 抗菌力を有していることから, 結核の治療期間をさらに短縮し, また *M. avium complex* 症の効果的な治療薬となる可能性を秘めており, 今後の研究に多大の期待がもたれる。

結 論

新 rifamycin 誘導体である KRM 5 化合物について *M. tuberculosis* と *M. avium complex* の臨床分離菌各 20 株に対する試験管内抗菌力を調べ, 対照薬として用いた rifampicin (RFP), rifabutin (RBU) と比較検討し, 以下の知見を得た。

1) *M. tuberculosis* 臨床分離菌 20 株に対する各薬剤の MIC 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は, RFP: 1.25, RBU: 0.035~0.07, であったのに対し, KRM 1648 は 0.035, KRM 1657, 1668, 1674, 2312 の 4 化合物はいずれも 0.07 であり, RBU とは同等であったが, RFP と比較すると 16~32 倍優れた抗菌力が認められた。

2) *M. avium complex* 臨床分離菌 20 株に対する各薬剤の MIC 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は, RFP: 40~80, RBU: 5 であったのに対し, KRM 1648 は 0.07~0.15, KRM 1657, 1668, 1674 はいずれも 0.3, KRM 2312 は 0.07~0.3 であり, KRM 5 化合物は少なくとも RFP よりも 128 倍, RBU よりも 16 倍強い抗菌力が認められた。

(本論文の要旨は, 第 65 回日本結核病学会総会において報告した。)

新 rifamycin 誘導体 KRM 5 化合物の提供に対し, 鍾淵化学工業株式会社に感謝致しますとともに, rifabutin (ansamycin LM 427) を提供いただき, この化合物についての継続検討の機会を得たことについて, フェルミタリア カルロエルバ株式会社に深謝致します。)

文 献

- 1) 日本結核病学会治療専門委員会: 肺結核化学療法の期間に関する見解, 結核, 55: 189~193, 1980.
- 2) 日本結核病学会治療専門委員会: 非定型抗酸菌症の治療に関する見解, 結核, 62: 77~80, 1987.
- 3) Kuze, F., Kurasawa, T., Bando, K. et al.: *In vitro* and *in vivo* susceptibility of atypical mycobacteria to various drugs, Rev Infect Dis, 3: 885~897, 1981.
- 4) 久世文幸, 李 啓充: 実験的非定型抗酸菌症に関する研究 7. *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex のマウスに対する病原性 (ii) —mouse virulent strain (マウス毒力株) の検索, 結核, 59: 13~25, 1984.
- 5) Yamane, T., Yamashita, K., Hosoe, K. et al.: Synthesis and antimicrobial activity of a new series of rifamycins, 27th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, (Oct 4~7, New York), Abst. 279, 1987.

- 6) Kuze, F. : Experimental chemotherapy in chronic *Mycobacterium avium-intracellulare* infection of mice, Am Rev Respir Dis, 129 : 453-459, 1984.
- 7) Sanfilippo, A., Della Bruna, C., Marsili, L. et al. : Biological activities of a new class of rifamycins spiro-piperidyl-rifamycins, J Antibiot, 33 : 1193-1198, 1980.
- 8) Della Bruna, C., Schioppacassi, G., Ungheri, D. et al. : LM 427, a new spiropiperidyl rifamycin : *in vitro* and *in vivo* studies, J Antibiot, 36 : 1502-1506, 1983.
- 9) Heifets, L. and Iseman, M. D. : Determination of *in vitro* susceptibility of mycobacteria to ansamycin, Am Rev Respir Dis, 132 : 710-711, 1985.
- 10) 束村道雄, 水野松司, 外山春雄他 : Ansamycin と rifampicin の抗 *Mycobacterium* 作用の比較, 結核, 61 : 497-503, 1986.
- 11) 斎藤 肇, 佐藤勝昌, 富岡治明 : 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, 結核, 63 : 167-172, 1988.
- 12) Dickinson, J. M. and Mitchison, D. A. : *In vitro* activity of new rifamycins against rifampicin-resistant *M. tuberculosis* and Mais-complex mycobacteria, Tubercle, 68 : 177-182, 1987.
- 13) Cynamon, M. H. : Comparative *in vitro* activities of MDL 473, rifampicin and ansamycin against *Mycobacterium intracellulare*, Antimicrob Agents Chemother, 28 : 440-441, 1985.
- 14) Traxler, P., Batt, A., Costapereira, R. et al. : CGP 7040. A new benzylpiperazinylrifamycin, highly active against *Mycobacterium avium* complex (MAC), 27th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother (Oct 4-7, New York), Abst. 276, 1987.
- 15) Sakurai, N. and Kuze, F. : *In vitro* and *in vivo* chemotherapeutic activity of rifabutin (LM 427) on *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, Bulletin of the Chest Disease Research Institute, Kyoto University, 20 : 50-60, 1987.
- 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) 束村道雄, 一山 智, 宮地卓也他 : *Mycobacterium avium* complex の抗結核剤感受性と抗結核剤の臨床効果との比較—抗結核剤が *M. avium* complex に有効であることを示す所見—, 結核, 63 : 227-231, 1988.