

原 著

Mycobacterium avium–*Mycobacterium intracellulare* Complex
に対する Rifampicin, Ethambutol, Enviomycin
および Streptomycin の殺菌作用

東 村 道 雄 ・ 矢 守 貞 昭

藤田学園保健衛生大学医学部微生物学教室

国立療養所中部病院呼吸器科

受付 平成元年12月27日

BACTERICIDAL ACTIVITIES OF RIFAMPICIN, ETHAMBUTOL, ENVIOMYCIN
AND STREPTOMYCIN ON *MYCOBACTERIUM AVIUM*–*MYCOBACTERIUM*
INTRACELLULARE COMPLEX STRAINS

Michio TSUKAMURA * and Sadaaki YAMORI

(Received for publication December 27, 1989)

Bacteriostatic and bactericidal activities of rifampicin, ethambutol, enviomycin and streptomycin on *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex (MAI complex) strains were determined. The susceptibility testings were made in Ogawa egg medium, and minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined as the lowest concentration of drugs, in which the growth of 20 to 100 colony-forming units was completely inhibited. The MICs correspond to the MICs that can inhibit the growth of 95 to 99 % of bacterial population. Bactericidal activity was determined in a modified Dubos liquid medium (1.3 g of Dubos TB Broth Base were dissolved in 180 ml of distilled water and this solution was supplemented by 20 ml of bovine serum). A one ml-sample of bacterial suspensions (10 mg wet weight per ml) was added to 9 ml of the Dubos liquid medium, and the medium was incubated at 37°C for 0, 1, 3 and 7 days under shaking condition (56 strokes per minute ; 8 cm amplitude). The bactericidal activity was measured as the number of colony-forming units contained in a 0.02 ml-sample of the medium.

The bactericidal activities of rifampicin and ethambutol were weak or absent even in strains 13008 and 13016, which were very susceptible to all four drugs. However, the bactericidal activities of streptomycin and enviomycin could be observed in these strains. In contrast, the bactericidal activities of all four drugs were absent or, if any, very weak in strains 13022, 13034 and 11004, which were naturally resistant to these drugs in the susceptibility testings, although the strains were isolated from patients who were untreated previously by any antituberculosis drugs or from fowl (strain 11004). On the other hand, the bactericidal activities of rifampicin, streptomycin and enviomycin were evident in *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Only ethambutol was not bactericidal on this

* From the Department of Microbiology, Fujita Gakuen Health University Medical School, Toyoake, Aichi 470-11 Japan.

M. tuberculosis strain.

Key words : *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex, Rifampicin, Ethambutol, Enviomycin, Streptomycin, Bactericidal activity

キーワード : *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex, Rifampicin, Ethambutol, Enviomycin, Streptomycin, 殺菌作用

緒 言

Mycobacterium avium–*Mycobacterium intracellulare* complex (MAI complex) に対する抗結核剤の殺菌作用についての研究は少ない。Heifets およびその共同研究者^{1)~3)} は、MAI complex に対する Rifampicin, Ethambutol, Streptomycin, Kanamycin および Capreomycin に対する最小殺菌濃度を測定し、これら抗結核剤の血中濃度よりもはるかに高い値を報告している。果たして、抗結核剤は、常用投与量で得られる血中濃度では殺菌作用がないのであろうか。われわれは、本報で、この問題を取り扱った。

研究 方 法

使用した菌株は Table に示した。われわれは、前に、MAI complex には、抗結核剤に比較的感受性のある株とはじめから耐性の株の 2 群があることを示したが⁴⁾、前者から 2 株、後者から 3 株を選んで研究に使用した。他に、対照として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株も使用した。菌株は、いずれも単個集落に由来する。

発育阻止濃度（感受性）の測定

最小発育阻止濃度の測定 (MIC=Minimal inhi-

bitory concentration の測定) は、「1%小川培地」を使用し、“Actual count 法”^{5) 6)} によって測定した。測定法は、Canetti et al.⁷⁾ の“Proportion method”とまったく同じであるが、成績の提示法のみが異なっている⁸⁾。すなわち、われわれの方法では、20~100 colony-forming units (CFU) を接種した場合に得られる MIC で示した。換言すれば、bacterial population の 95~99% を完全に阻止する MIC である。

菌株を小川培地に 10 日間培養し、集落をガラス玉コルペン中で 5 分間振盪して均一化し、0.1% Tween 80 水溶液に、10 mg 湿菌量/ml となるように浮遊させた。この濃度の Tween 80 は、菌に対して殺菌的に働くことはなく、また感受性を変えることもないことを確認した。この菌液を、同じく 0.1% Tween 80 水溶液で 10 倍希釈していき、10⁻⁷ に至った。接種には、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ および 10⁻⁷ 菌液の 4 種を用いた。各菌液から、渦巻白金耳で 0.02 ml ずつを小川培地に接種し、試験管にダブルゴム栓（底に 3 mm の切れ目がある）を覆せ、37°C に培養した。MIC の測定は、菌株の発育速度に応じて、14~28 日後に行った。MIC は、対照培地（薬剤なし）に 20~100 集落を示した接種系列で判定した。MIC の判定は、極めて clear-cutly に行い得た。

薬剤は、滅菌前の小川培地に、次の濃度を得るように

Table Minimal inhibitory concentrations of rifampicin, ethambutol, enviomycin and streptomycin against *M. tuberculosis* and *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex.

Strain	Minimal inhibitory concentration (μg/ml)			
	Rifampicin	Ethambutol	Enviomycin	Streptomycin
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3.2	1.6	12.5	6.3
MAI complex 13008 (20)	0.8	0.4	3.2	0.8
MAI complex 13016 (4)	0.8	0.4	6.3	3.2
MAI complex 13022 (20)	> 200.	12.5	200.	100.
MAI complex 13034 (18)	200.	3.2	50.	50.
MAi complex 11004 (1)	200.	3.2	12.5	25.

The numbers in brackets show the serotypes (serovars).

添加した。Rifampicin (RFP) および Streptomycin sulfate (SM), 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8 および $0\mu\text{g/ml}$; Ethambutol (EB), 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 および $0\mu\text{g/ml}$; Enviomycin sulfate (EVM), 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6 および $0\mu\text{g/ml}$ 。RFP のみは propylene glycol に溶かし, 他は蒸留水に溶かし, その1容を滅菌前の小川培地 100 容に加えて所要の濃度を得た。培地は, 7 ml ずつ試験管 (165×16.5 mm) に分注し, 90°C 60 分間滅菌して斜面培地とした。

殺菌作用の測定

殺菌作用は, 菌を Dubos liquid medium に浮遊させて測定した。Difco TB Broth Base (Difco, Detroit, Michigan, USA) 1.3 g を蒸留水 180 ml に溶解し, 120°C 15 分間滅菌した。これに, 牛血清 (栄研) 20 ml を無菌的に加えた。抗結核剤は, 薬剤により, 0, 1.25, 2.5, 5 および $10\mu\text{g/ml}$ (RFP), または, 0, 1.25, 2.5 および $5\mu\text{g/ml}$ (EB), または, 0, 5, 10 および $20\mu\text{g/ml}$ (SM および EVM) の濃度になるように無菌的に添加した (ミリポアフィルターで濾過)。培地は, 9.0 ml ずつ 16.5×165 mm の試験管に入れ, これに 10 mg/

ml の菌液 (調製法は感受性測定の場合と同じである) 1.0 ml を加え, よく混合し, 37°C に培養した。培養は, 毎分 56 strokes, 振幅 8 cm の振盪培養器で行った。0 日 (直後), 1 日, 3 日, 7 日培養後に, 試験管を 1 本ずつ取って, 10^{-6} まで 0.1 % Tween 80 水溶液で希釈し, $10^{-2}\sim 10^{-6}$ 菌液の各々から, 0.02 ml ずつを渦巻白金耳で, 薬剤を含みぬ小川培地に接種した。集落数は, 37°C 21~28 日培養後に数え, Dubos liquid medium 0.02 ml 中に含有される CFU 数で殺菌作用を表した。

研究成績

Table に示すように, MAI complex 13008 株および 13016 株の MIC 値は, *M. tuberculosis* H37Rv 株よりも小さい。これに対して, 13022 株, 13034 株および 11004 株の MIC 値は, これらが化学療法前の患者またはニワトリ (11004 株) から分離されたにもかかわらず, はなはだ大きい。

これらの株に対する殺菌作用を Fig. 1~6 に示す。*M. tuberculosis* H37Rv 株に対しては, RFP, SM, EVM は著明な殺菌作用を示した。しかし, EB だけは, 殺菌作用がみられなかった (Fig. 1)。

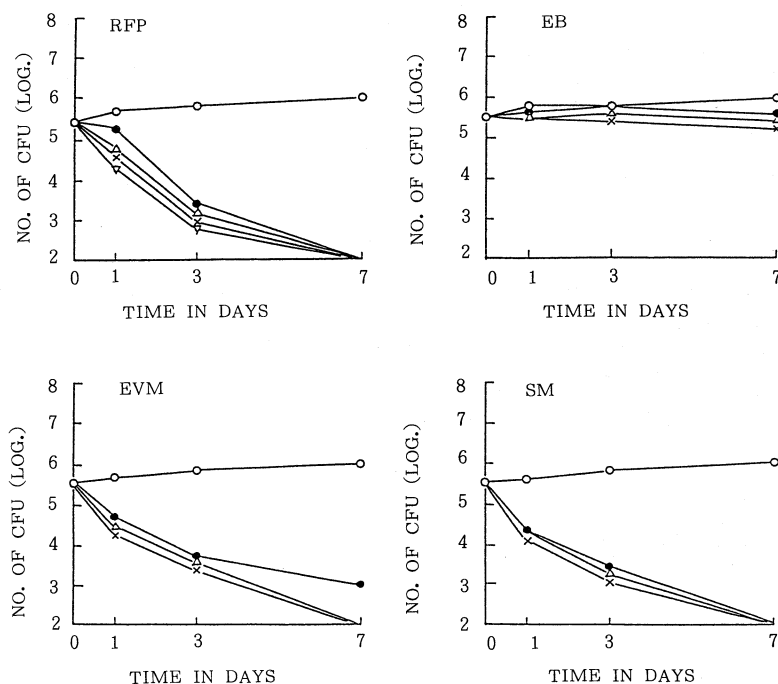


Fig. 1. Bactericidal activity of rifampicin (RFP), ethambutol (EB), enviomycin (EVM) and streptomycin (SM) against *M. tuberculosis* strain H37Rv.

RFP: ○—○ $0\mu\text{g/ml}$; ●—● $1.25\mu\text{g/ml}$; △—△ $2.5\mu\text{g/ml}$; ×—× $5\mu\text{g/ml}$; ▽—▽ $10\mu\text{g/ml}$. EB: ○—○ $0\mu\text{g/ml}$; ●—● $1.25\mu\text{g/ml}$; △—△ $2.5\mu\text{g/ml}$; ×—× $5\mu\text{g/ml}$. EVM and SM: ○—○ $0\mu\text{g/ml}$; ●—● $5\mu\text{g/ml}$; △—△ $10\mu\text{g/ml}$; ×—× $20\mu\text{g/ml}$;

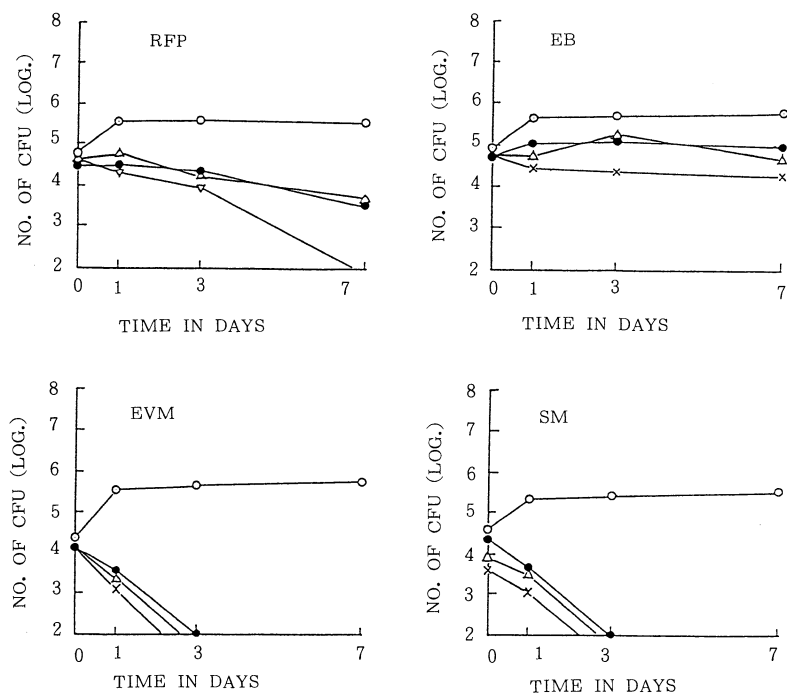


Fig. 2. Bactericidal activity of rifampicin (RFP), ethambutol (EB), enviomycin (EVM) and streptomycin (SM) against MAI complex strain 13008.

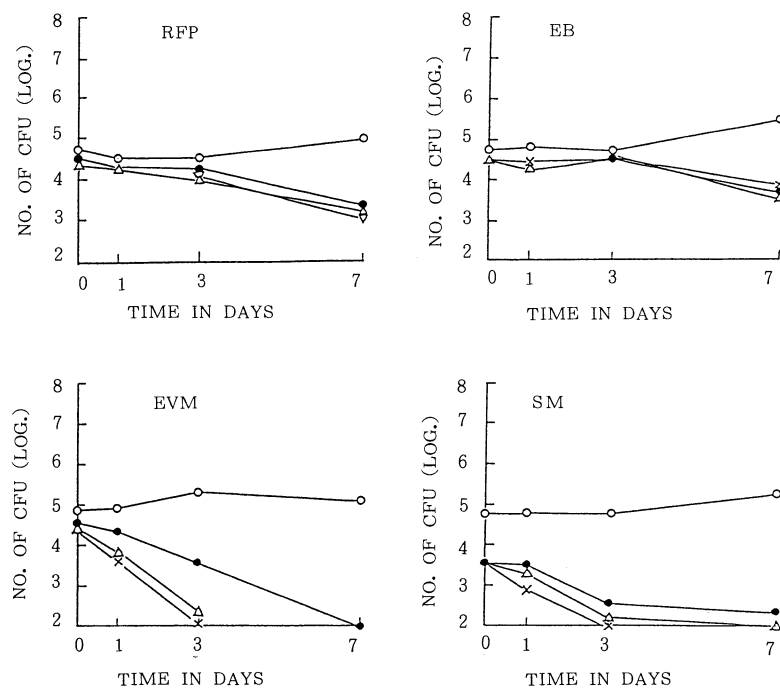


Fig. 3. Bactericidal activity of rifampicin (RFP), ethambutol (EB), enviomycin (EVM) and streptomycin (SM) against MAI complex strain 13016.

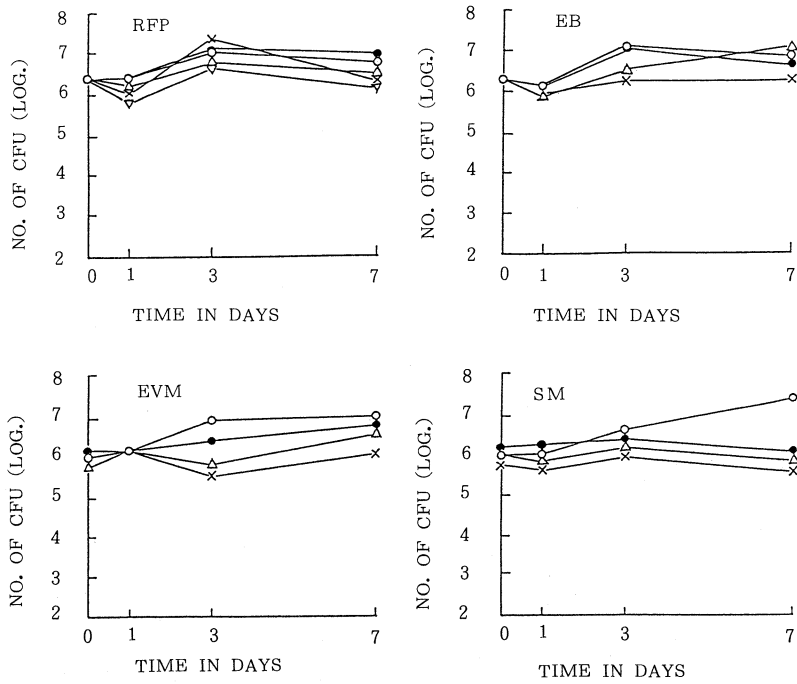


Fig. 4. Bactericidal activity of rifamicin (RFP), ethambutol (EB), enviomycin (EVM) and streptomycin (SM) against MAI complex strain 13022.

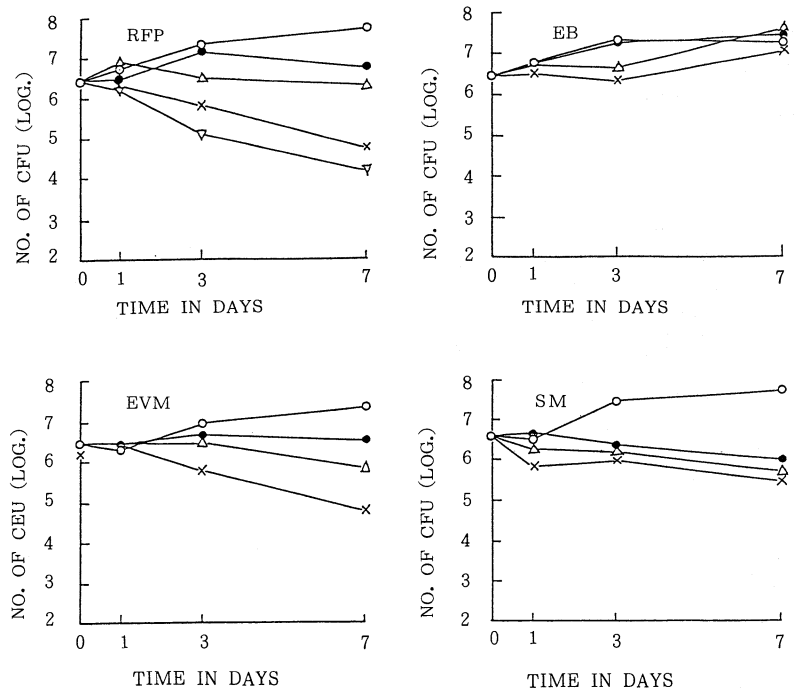


Fig. 5. Bactericidal activity of rifampicin (RFP), ethambutol (EB), enviomycin (EVM) and streptomycin (SM) against MAI complex strain 13034.

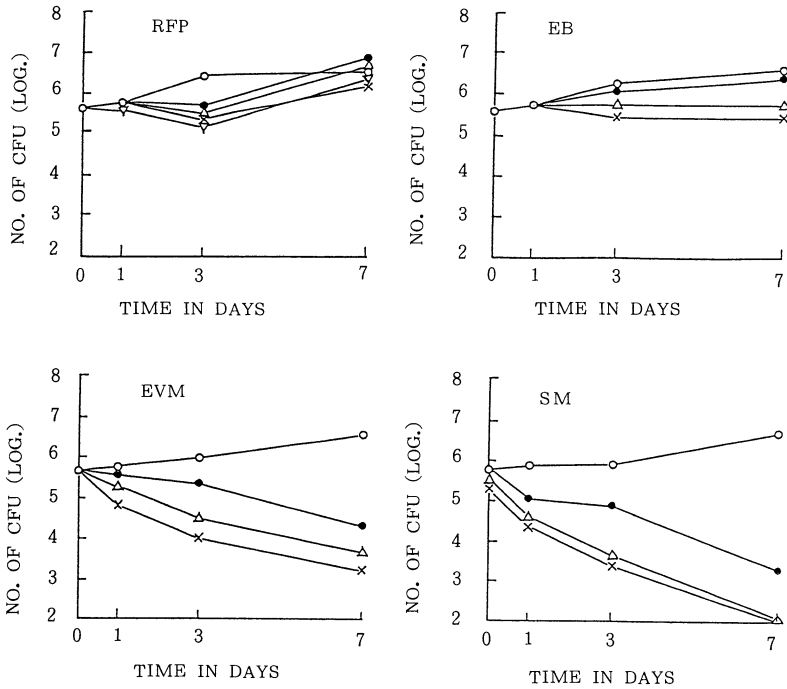


Fig. 6. Bactericidal activity of rifampicin (RFP), ethambutol (EB), enviomycin (EVM) and streptomycin (SM) against MAI complex strain 11004.

感性株の13008株および13016株に対し、SMとEVMは、かなり強い殺菌作用を示した。しかし、RFPの殺菌作用ははるかに弱く、EBはさらに弱かった(Fig. 2および3)。これに対して、当然のことながら、耐性株の3株に対しては、どの薬剤も著明な殺菌作用を示さなかった。ただし、13034株に対してRFPが、また、11004株に対してはSMとEVMがかなりの殺菌作用を示した(Fig. 4~6)。

考 察

本報で使用したMAI complexの感性株、13008株および13016株に対する抗結核剤の殺菌作用については、最近、24時間の浸漬で効果の観察を行ったが(結核、1990年1月号)、本報では、改めて7日間までの接触の効果を観察した。SMおよびEVMがかなり著明な殺菌作用を示したのは同じであったが、13008株に対してRFPは24時間では無効であったが、10 μ g/mlで7日間作用させると殺菌効果が認められた。しかし、EBは5 μ g/mlで7日間作用させても、さしたる殺菌作用は認められなかった。13016株に対しては、RFP、EBとも7日間作用では、僅少ながら殺菌効果があったが、3日間の作用では無効であった。一方、耐性株に対しては、13022株に対しては、4剤とも無効、13034株に対してはRFP 5、10 μ g/mlのみがやや有効、11004株に対し

ては、SMとEVMのみがやや有効と思われた。

ところで、常用投与量で到達し得る最高血中濃度は、RFP(0.45g経口)5~10 μ g/ml^{9)~11)}、EB(0.75g経口)2~5 μ g/ml¹²⁾¹³⁾、EVM(1g筋注)36 μ g/ml(東洋醸造研究所成績)およびSM(1g筋注)30 μ g/ml¹⁴⁾である。これらは最高濃度であるから、実際には、これより低い濃度が数時間持続するだけである。したがって、3日以上持続的浸漬実験は、臨床のモデルとしては実際的ではないかもしれない。まして、高濃度に10日以上接触させて殺菌効果を見ることは^{1)~3)}、実際にそぐわない。要するに、MAI complexに対する抗結核剤の殺菌効果は、一部の感性株に対するSMおよびEVMの効果が期待できるだけであろう。この点が、結核菌に対する場合との著明な差である。MAI complexの感染症が治癒しにくく、再発が多い理由も、菌の絶滅が起こりにくいため、殺菌効果の欠如と関係があると思われる。最近、われわれは、実際の臨床で、RFP+INHと併用した場合のSM、EVMおよびEBの臨床効果を比較したが、SMおよびEVMに比較してEBの効果が劣っていた¹⁵⁾¹⁶⁾。これも、SMとEVMが、ある程度殺菌効果があるのに対し、EBには、それが無いことが関係しているかもしれない。

結 論

結核菌 (*M. tuberculosis*) に対しては, RFP, SM, EVM は, 血中濃度で到達し得る濃度でも, *in vitro* 実験で殺菌作用を示した。これに対して, MAI complex の感性株に対しては, SM と EVM のみが, 若干の殺菌効果を示し, RFP と EB は, 殺菌作用がないか, あっても弱かった。MAI complex の耐性株に対しては, 僅少の殺菌効果が, RFP, SM, EVM に認められることはあったが, 実際的には, 殺菌効果を期待することはできないと思われた。

文 献

- 1) Heifets, L. B., Iseman, M. D. and Lindholm-Levy, P. J. : Ethambutol MICs and MBCs for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 30 : 927-932, 1986.
- 2) Heifets, L. B., Iseman, M. D. and Lindholm-Levy, P. J. : Combinations of rifampin of rifabutine plus ethambutol against *Mycobacterium avium* complex. Am Rev Respir Dis, 137 : 711-715, 1988.
- 3) Heifets, L. B. and Lindholm-Levy, P. J. : Comparison of bactericidal activities of streptomycin, amikacin, kanamycin and capreomycin against *Mycobacterium avium* and *M. tuberculosis*, Antimicrob Agents Chemother, 33 : 1298-1301, 1989.
- 4) 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.
- 5) 東村道雄 : Kanamycin の耐性検査, 医学と生物学, 49 : 87-90, 1958.
- 6) Tsukamura, M. : "Actual count" method for the resistance test of tubercle bacilli, Japan J Tuberc, 12 : 46-54, 1964.
- 7) Canetti, G., Rist, N. and Grosset, J. : Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Methodology, critères de résistance, résultats, interpretation, Revue Tuberc Pneumol, 27 : 217-272, 1963.
- 8) Canetti, G., Armstrong, A. R., Bartman, K. et al. : Recent progress in drug resistance test for tubercle bacilli (major and minor drugs), Bull Int Union Tuberc, 37 : 185-225, 1966.
- 9) Furesz, S., Scotti, R., Palanza, R. et al. : Rifampicin : a new rifamycin. 3. Absorption, distribution, and elimination in man, Arzneimittel-Forschung, 17 : 534-537, 1967.
- 10) Porven, G. and Canetti, G. : Les taux de rifampicine dans le sérum de l'homme, Revue Tuberc Pneumol, 32 : 707-716, 1968.
- 11) 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.
- 12) 山本和男, 桜井 宏, 下村康夫他 : 2, 2'-(Ethylenediimino)-di-1-butanol の抗結核菌作用と臨床成績について, 日本胸部臨床, 22 : 797-803, 1963.
- 13) Place, V. A. and Thomas, J. P. : Clinical pharmacology of ethambutol, Am Rev Respir Dis, 87 : 901-904, 1963.
- 14) Black, H. R., Griffith, R. S. and Peabody, A. M. : Absorption, excretion and metabolism of capreomycin in normal and diseased states, Ann New York Acad Sci, 135 : 974-982, 1966.
- 15) Tsukamura, M. and Ichiyama, S. : Comparison of antituberculosis drug regimens for lung disease caused by *Mycobacterium avium* complex, Chest, 93 : 821-823, 1988.
- 16) Tsukamura, M., Ichiyama, S. and Miyachi, T. : Superiority of enviomycin or streptomycin over ethambutol in initial treatment of lung disease caused by *Mycobacterium avium* complex, Chest, 95 : 1056-1058, 1989.