

原 著

新 rifamycin 誘導体の *Mycobacterium tuberculosis* と
M. avium complex に対する *in vivo* 活性

久世文幸・山本 誉・網谷良一

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 VIVO ACTIVITIES OF NEW RIFAMYCIN
DERIVATIVES AGAINST MYCOBACTERIAFumiyuki KUZE*, Takashi YAMAMOTO,
Ryoichi AMITANI and Katsuhiko SUZUKI

(Received for publication May 18, 1990)

Therapeutic effects of new rifamycin derivatives, 3'-hydroxy-5'-(4-alkylpiperazinyl) benzoxazinorifamycins, KRM 1648, 1657, 1668, 1674 and 2312 (kindly supplied by Kanegafuchi Chem. Ind. Co. Japan), were evaluated on experimental tuberculosis and *Mycobacterium avium* complex infection in mice.

I. Experimental tuberculosis in mice

Male ddY mice were inoculated via tail vein with ca. 1×10^9 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv suspended in 0.2 ml medium.

Treatment of the mice with the new rifamycin derivatives or rifampicin (RFP : as a control drug) was performed by daily oral administration of 10 mg/kg of the drugs, starting at the 24th hour of infection and continuing until the 40th day of infection. Therapeutic effect of each drug was assessed by mortality of the treated mice. All control mice which did not receive any drug died within the 20th day (in Exp. 1) and the 22nd day (in Exp. 2) of infection, while 25% (in Exp. 1) and 40% (in Exp. 2) of RFP-treated mice and 100% (in Exp. 1 and 2) of mice treated with any of the KRMs survived on the 40th day of infection.

II. Experimental *M. avium* complex infection in mice

Female beige mice (8-12 weeks old) were inoculated via tail vein with ca. 1×10^8 CFU of *M. avium* complex strain 31F093T, a mouse-virulent strain, suspended in 0.2 ml medium. Treatment of the mice with each drug (daily oral administration of 20 mg/kg) was started 24 hours after the inoculation, and was continued throughout 12 weeks of infection.

For evaluation of the therapeutic effect of the drug, CFUs of the infecting organisms recovered from the lungs and spleen of mice were determined following the course of infec

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

tion.

The treatment of the infected mice with RFP resulted in only a slight reduction in the numbers of CFU from the lungs and spleen compared with those in control mice.

In contrast, treatment of the infected mice with any of the five KRMs reduced markedly the numbers of CFU of the organisms recovered from the lungs and spleen throughout 12 weeks of infection.

These results suggest that KRMs could be promising drugs in the treatment of both *M. tuberculosis* and *M. avium* complex infections in humans.

Key words : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, rifampicin, new rifamycin derivatives *in vivo* antimycobacterial activity

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

Mycobacterium avium complex は opportunistic pathogen として近年注目されており、特に欧米では AIDS 患者における全身播種性感染は重要な問題となっている^{1)~3)}。現在本症に対しては抗結核薬を中心とした併用治療が試みられている⁴⁾が、臨床分離菌の抗結核薬に対する感受性が低い⁵⁾⁶⁾ことから、いまだ十分な治療効果は得られていない。一方、初回肺結核の治療においては、RFP, INH の併用と、これに多くの場合 SM あるいは EB を組み合わせる 3 剤併用療法が確立されている⁷⁾が、RFP などを凌駕するより強力な抗菌力を有する新薬剤開発への期待は依然として大きいと考えられる。前回の報告⁸⁾で私どもは、鐘淵化学工業で開発された新 rifamycin 誘導体 (KRM) に、優れた試験管内抗 mycobacteria 活性が認められることを明らかにした。その抗菌力は、*M. tuberculosis* に対し、RFP よりも 16~32 倍強く、また *M. avium* complex に対しても RFP の 1/128 程度の MIC ($\mu\text{g/ml}$) を示した。

このたび私どもは、前回の *in vitro* 抗菌力評価に引き続き、新 rifamycin 誘導体である KRM 5 化合物の実験的マウス結核症および *M. avium* complex 症における治療効果について検討を行ったのでここに報告する。

実験方法

I. 菌 株

M. tuberculosis H37Rv 株と *M. avium* complex 31F093T 株⁹⁾¹⁰⁾を用いた。これらはいずれも modified Dubos Tween albumin 液体培地⁵⁾中で 4°C に保存していたものを使用し臨んで新たな同培地へ継代し、*M. avium* complex は 3 週間、*M. tuberculosis* は 4 週間培養したものを実験に供した。

なお、使用した *M. avium* complex 31F093T 株

(*M. intracellulare*) は modified cornmeal agar medium⁵⁾上で、transparent colony を dominant に示すマウス毒力株である。

II. 実験的マウス結核症

M. tuberculosis H37Rv 株を modified Dubos Tween albumin 液体培地中で 4 週間培養後、上清を除去した濃厚菌液を作成し、その 0.2 ml (ca. 1×10^9 CFU) を ddY 5 週齢♂マウスの尾静脈内接種により感染させた。翌日から 40 日間治療を行い、その間のマウスの生死を観察し、治療効果の判定は死亡率で行った。実験は 2 回実施し、各実験で使用した薬剤は、実験 1 では KRM 1648 および RFP、実験 2 では KRM 1657, 1668, 1674, 2312 および RFP であった。治療に用いた薬剤濃度は、すべて 10 mg/kg/day とし、1 回投与量が 0.2 ml になるように調整し、経口投与した。なお、実験 1 では 1 群 20 匹のマウスを、実験 2 では 1 群 10 匹のマウスを使用した。

III. 実験的マウス *M. avium* complex 症

M. avium complex 31F093T 株を modified Dubos Tween albumin 液体培地中で 3 週間培養後、その 0.2 ml (ca. 1×10^8 CFU) を 8~12 週齢♀ベージュマウスに尾静脈内接種し感染させた。

ベージュマウスは、ddY マウス¹⁰⁾と比較すると *M. avium* complex により高度の感受性を示し、肺、脾、肝における病変もより早期に出現し、臓器内生菌数の増加も早い¹¹⁾¹²⁾。

ベージュマウスは、本症のマウスモデルとして薬剤の治療効果の評価により適すると考え本実験に用いた。

感染翌日から治療を開始し、治療開始直前、治療開始後 1, 3, 6, 9, 12 週に肺、脾内の生菌数を定量培養により求めた。臓器定量培養では、各群 3 匹のマウスの肺、脾をそれぞれ一括し、2% NaOH で 10 倍のホモジネート (日本精器ユニバーサルホモジナイザーを使用) を

作成の上、さらに2% NaOHを用いた10倍希釈系列を作成、その0.1 ml ずつを1%小川培地に接種、6週間培養し、発育した集落数から臓器内平均生菌数を算定した。

2回の実験を行い、各実験で使用した薬剤は、実験1では KRM 1648, 2312, rifabutin (RBU), および rifampicin (RFP), 実験2では KRM 1657, 1668, 1674, 2312 および RFP であった。治療に用いた薬剤濃度は各薬剤とも 20 mg/kg/day とし1回投与量が0.2 ml になるように調整し、経口投与した。

実験成績

実験的マウス結核症の実験1では、無処置対照群で感

染後10日目から死亡が認められ、19日までに20匹すべてが死亡した。一方、治療群では、RFP治療群で感染後12日目から死亡し始め、治療最終日の40日目における生存率は25%であったのに対し、KRM 1648治療群では40日目で全例が生きている (Fig. 1-A)。

また実験2では、無処置対照群で感染後14日目から死亡が認められ22日目までに10匹すべてが死亡したのに対し、RFP治療群では21日目から死亡し始め、治療最終日の40日目における生存率は40%であったが、KRM 1657, 1668, 1674, 2312の各治療群では40日目でいずれの群においても死亡例はまったく認められなかった (Fig. 1-B)。

マウス実験 *M. avium* complex 症に対する2回の

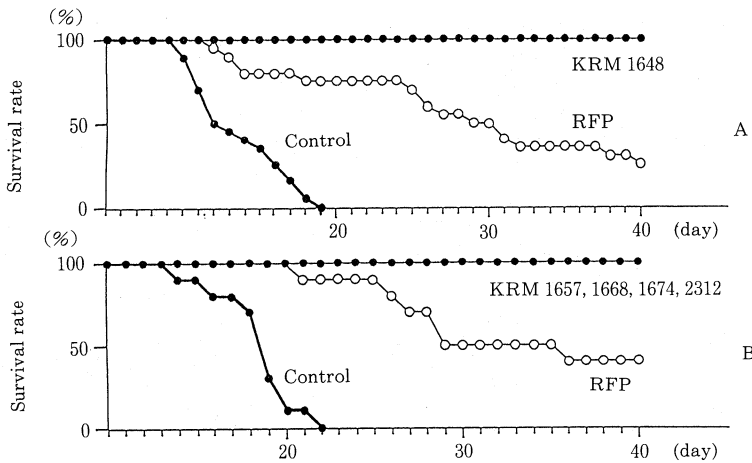


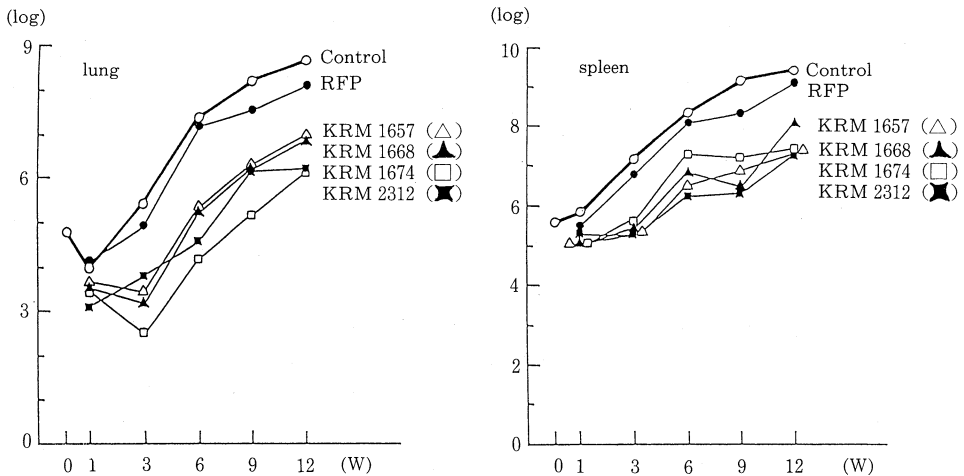
Fig. 1. Effects of Rifamycin Derivatives on Percent Survival of Mice Infected with *M. tuberculosis* H37Rv

Table 1. Therapeutic Effects of Rifamycin Derivatives on *M. avium* Complex Infection in Beige Mice (Experiment 1)

Organ	Compound	Log CFU from lung and spleen at various periods after infection					
		0	1	3	6	9	12 (w)
Lung	Control	4.35	4.13	5.23	7.13	7.30	8.18
	RFP		3.40	4.29	6.49	6.66	7.74
	RBU		3.96	4.13	6.27	7.15	7.54
	KRM 1648		3.21	3.25	3.27	5.37	5.51
	KRM 2312		3.45	3.19	4.11	4.78	6.19
Spleen	Control	6.10	6.19	6.94	8.25	8.50	9.26
	RFP		5.84	6.70	7.75	8.27	8.53
	RBU		5.84	6.49	8.13	8.21	8.54
	KRM 1648		5.19	6.10	7.10	7.31	7.50
	KRM 2312		5.27	5.62	6.21	6.78	7.35

Table 2. Therapeutic Effects of Rifamycin Derivatives on *M. avium* Complex Infection in Beige Mice (Experiment 2)

Organ	Compound	Log CFU from lung and spleen at various periods after infection					
		0	1	3	6	9	12 (w)
Lung	Control	4.83	3.96	5.40	7.36	8.18	8.68
	RFP		4.12	4.95	7.19	7.56	8.11
	KRM 1657		3.66	3.41	5.30	6.27	6.95
	KRM 1668		3.55	3.18	5.24	6.22	6.86
	KRM 1674		3.49	2.49	4.17	5.15	6.12
	KRM 2312		3.12	3.77	4.56	6.19	6.15
Spleen	Control	5.58	5.83	7.20	8.36	9.17	9.43
	RFP		5.45	6.77	8.15	8.38	9.12
	KRM 1657		5.12	5.40	6.51	6.90	7.40
	KRM 1668		5.11	5.44	6.84	6.43	8.11
	KRM 1674		5.14	5.60	7.31	7.19	7.41
	KRM 2312		5.25	5.29	6.25	6.30	7.30

**Fig. 2.** Effects of Rifamycin Derivatives on Log CFU Recovered from the Lungs and Spleen of Mice Infected with *M. avium* Complex 31F093T

治療実験のうち、まず実験1ではKRM 1648, 2312, RBUおよびRFPについて評価を行った (Table 1)。肺における還元生菌数でみると、無処置対照群で感染後1週目でわずかな菌の減少が認められたが、その後6週まで急激な生菌数の増加があり、9~12週にかけても菌はさらに増加を続け、感染から12週間で肺における生菌数は約 10^4 倍に増加した。

RFP, RBU 各治療群では、1~12週間を通じて還元生菌数は無処置対照群よりもわずかに少ないものの、この間に菌は約 10^4 倍に増加しており、対照群と同様の

増加傾向を示した。一方、KRM 1648, 2312 各治療群では、1週目における肺の還元生菌数では、RFP, RBU 治療群と大差はないが、3週目以降著明な差が認められ、12週目における還元生菌数はRFP, RBU 治療群の約1/100であった。

脾においては、感染後12週間で対照群で約 10^9 倍の生菌数の増加があり、RFP, RBU 治療群でもこれと同様の推移が認められた。しかしKRM 1648, 2312 治療群では肺ほどではないが、RFP, RBU 治療群と比較し、明らかな還元生菌数の減少が認められた (Table 1)。

実験2においても、実験1と同様にRFP治療群が対照群と同様の肺、脾の還元生菌数の推移を示したのに対し、KRMの各治療群ではいずれも全治療期間を通じてRFP治療群よりも明らかに還元生菌数が少なく、治療効果が認められた(Table 2, Fig. 2)。

考 察

新 rifamycin 誘導体である KRM 1648, 1657, 1668, 1674, 2312 はいずれも強い *in vitro* 抗 mycobacteria 活性を有しており、*M. tuberculosis* に対して RFP よりも 16~32 倍低濃度の MIC を有することと、また *M. avium* complex に対して RFP よりも 100 倍以上強い抗菌力を有することが明らかであった⁸⁾ ので、今回これら KRM 5 化合物について動物感染モデルを用いた *in vivo* 治療効果について検討を行った。

まず、実験的マウス結核症における治療効果についてみると、KRM 投与群ではいずれの化合物においても治療期間中の死亡例はまったく認められず、RFP の臨床投与量である 10 mg/kg/day の薬剤濃度で治療した場合、RFP よりもはるかに優れた治療効果が得られることが明らかとなった。

RFP の実験的マウス結核症に対する治療効果については、豊原¹³⁾、久世彰彦¹⁴⁾ の報告があり、使用菌株、治療スケジュールは異なるが、私どもが用いた方法と同様に生存率で治療効果を評価した結果によると、RFP は 25 mg/kg では生存率 90 % 以上の優れた治療効果を示すが、10 mg/kg では生存率は 50 % 以下で治療効果は激減している。

私どもの系でも RFP 10 mg/kg では生存率は 25~40 % と先人の報告と同様であり、同じ系で評価した KRM 各化合物の 10 mg/kg で死亡がまったく認められなかったことは、KRM の治療効果が RFP のそれをはるかに凌駕していることを示唆している。

マウス実験 *M. avium* complex 症では、2 回の実験とも RFP 治療群が無処置対照群とほぼ同様の菌の増加を示し、治療効果がほとんど認められなかったのに対し、KRM 投与群ではいずれの化合物投与でも肺、脾の還元生菌数は RFP 投与群よりも少なく、その差は特に肺で顕著であった。また実験1で対照薬として用いた RBU の投与群は RFP 投与群と同等の還元生菌数を示し、この実験系に関する限り、RBU の治療効果は RFP と差は認められなかった。

マウス実験 *M. avium* complex 症を用いた治療実験に関しては数々の報告があるが、以前私どもは今回使用したのと同じ *M. avium* complex 31F093T 株を用いて RFP と RBU のマウス実験 *M. avium* complex 症に対する治療効果について検討し、RFP と RBU は還元生菌数の推移からはほぼ同等の活性を示し、肺では

対照群に比べわずかに還元生菌数の減少を示すが、脾ではほとんど差がないこと、しかし、臓器の肉眼所見の比較では、RBU が RFP より治療効果が優れている印象を得たことを報告した¹⁵⁾。一方、斎藤ら¹⁶⁾によると、RBU は RFP よりもわずかに強い治療効果を示すが、対照群と比較した場合、肺では有意な還元生菌数の減少が認められるが脾では有意な差は認められないとされている。

これらの報告を考慮すると、今回私どもが対照薬として用いた RFP と RBU についての結果は、私どもの成績¹⁵⁾ を再確認するとともに、従来の報告とよく一致し、今回実施した KRM の治療効果は評価できるものであると考えられる。新 rifamycin 誘導体 (KRM) は *M. tuberculosis*, *M. avium* complex に対し強い *in vitro* 抗菌力を有し、動物感染実験においても *in vitro* 抗菌力を反映した優れた治療効果が認められた。

特に、*M. avium* complex 症に対して優れた治療効果を示したことは KRM が現在重要な問題となっている *M. avium* complex 感染症の効果的な治療薬となる可能性を秘めており、今後、他の抗結核薬との併用効果などの検討を行うことにより、その特徴を明確にしていく必要がある。なお、KRM と RBU との *in vivo* 治療効果の比較は不十分であり、今後の検討継続が必要と考えられる。

結 論

新 rifamycin 誘導体である KRM 5 化合物について、実験的マウス結核症とマウス実験 *M. avium* complex 症を用いた *in vivo* 治療効果の検討を行った結果、

1) KRM 5 化合物はいずれも実験的マウス結核症において RFP よりも優れた延命効果を示した。

2) マウス実験 *M. avium* complex 症において KRM 5 化合物の各投与群は、いずれも RFP 投与よりも明らかに少ない肺および脾からの還元生菌数を示し、KRM 5 化合物の優れた治療効果が示唆された。

(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、鐘淵化学工業株式会社に感謝致しますとともに、rifabutin [ansamycin LM427] 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、ファルミタリア カルロエルバ株式会社に深謝致します。)

文 献

- 1) Horsburgh, C. R., Mason, U. G., Farhi, D. C. et al. : Disseminated infection with *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Medicine*, 64 : 36-48, 1985.

- 2) Young, L. S., Inderlied, C., Berlin, O. G. et al. : Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex, Rev Infect Dis, 8 : 1024-1033, 1986.
- 3) Horsburgh, C. R. and Selik, R. M. : The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Am Rev Respir Dis, 139 : 4-7, 1989.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Woodly, C. L. and Kilburn, J. O. : *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* strains to a spiro-piperidyl rifamycin, Am Rev Respir Dis, 126 : 586-587, 1982.
- 7) 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.
- 8) 山本 誉, 鈴木克洋, 網谷良一他 : 新 rifamycin 誘導体の *Mycobacterium tuberculosis* と *M. avium* complex に対する *in vitro* 抗菌作用, 結核, 65 : 805-810, 1990.
- 9) 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.
- 10) Kuze, F. : Experimental chemotherapy in chronic *Mycobacterium avium*-*intracellulare* infection of mice, Am Rev Respir Dis, 129 : 453-459, 1984.
- 11) Kuze, F., Amitani, R., Sakurai, N. et al. : Murine models of *Mycobacterium avium* complex infection, 5th Annual Congress of European Society of Pneumology, (Sept. 3-6, Paris), Abst. 67, p. 10, 1986.
- 12) Gangadharam, P. R., Edwards III, C. K., Murthy, P. S. et al. : An acute infection model for *Mycobacterium intracellulare* disease using beige mice : preliminary results, Am Rev Respir Dis, 127 : 648-649, 1983.
- 13) 豊原希一, 岩崎龍郎 : マウス実験結核症に対する Rifampicin の抗結核作用に関する研究, 結核, 46 : 19-22, 1971.
- 14) 久世彰彦, 松原 徹, 大平昌好 : Rifampicin の結核菌に対する試験管内抗菌力と実験的結核症における治療効果, 日胸, 29 : 912-918, 1970.
- 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) Saito, H., Sato, K., Tomioka, H. : Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of Rifabutin and Rifampicin against *Mycobacterium avium* complex, Tubercle, 69 : 187-192, 1988.