

第 66 回総会会長講演

リファマイシン誘導体の抗菌活性

久 世 文 幸

京都大学胸部疾患研究所感染・炎症学, 第 1 内科

受付 平成 3 年 7 月 4 日

The 66th Annual Meeting President Lecture

ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF RIFAMYCIN DERIVATIVES

Fumiyuki KUZE, M.D.,

(Received for publication July 4, 1991)

The Standard Initial Chemotherapy, chemotherapeutic activity of which depends mostly on the two potent bactericidal drugs, INH and RFP, has made a remarkable progress in the treatment of tuberculosis.

However, certain difficult situations still remain in the treatment of resistant diseases, mostly in retreatment cases especially resistant to INH and/or RFP, and of the patients who are not able to continue the Standard Regimens because of side effects and/or severe complications with various organ dysfunctions.

It is evident that presently available antituberculosis drugs are not potent enough to deal satisfactorily with the above situations, and besides, there has been unsatisfactory chemotherapeutic efficacy against infections caused by *Mycobacterium avium* complex.

The above matters strongly urge our effort to develop new antimycobacterial agents. In the present review, *in vitro* and *in vivo* activities of newly synthesized rifamycin derivatives (3'-hydroxy-5'-alkylpiperazinyl-benzoxazinorifamycins, KRMs) were discussed.

Of a total of 158 newly synthesized compounds, five (KRM-1648, KRM-1657, KRM-1668, KRM-1674, KRM-2312) were selected due to significantly lower MICs than those of RFP against *M. tuberculosis* H37Rv and *M. intracellulare* 31F093T. The MIC₉₀s of these compounds were 16 to 32 times lower than MIC₉₀ of RFP against RFP-susceptible clinical isolates (20 strains) of *M. tuberculosis*, and 100 times or more lower than MIC₉₀s of RFP against 20 disease-associated *M. avium* complex strains. Daily oral single administration (10mg/kg) of all these compounds demonstrated 100% survival of 20 ddY male mice infected with an intravenous lethal dose of *M. tuberculosis* H37Rv for 40 days, while only 40% or less of the mice treated with 10mg/kg/day of RFP survived at 40 days of infection. All of the untreated mice died within 22 days of infection. Consecutive viable counts of bacilli in lung and spleen of the female beige mice infected intravenously with ca. 10⁸ cfu of *M. intracellulare* 31F093T were significantly lower in the KRM-1648-treated

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

(20mg/kg/day) group than the untreated, although KRM-1648 could not eradicate the disease in single usage. There was no significant difference between RFP-treated and untreated groups.

Preliminary data also suggest superior bactericidal activity of KRM-1648 against H37Rv to that of RFP *in vitro*, and *in vivo* chemotherapeutic superiority of KRM-1648 to RFP in murine tuberculosis is being confirmed by the administration of smaller doses. In experimental murine *M. intracellulare* model, an encouraging result was obtained for the usefulness of KRM-1648 in combination chemotherapy of *M. intracellulare* infections.

The above results all suggest that KRM-1648 could be a promising drug of both *M. tuberculosis* and *M. intracellulare* infections in humans, and future plans for further evaluations were discussed.

Key words : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. intracellulare*, New Rifamycin Derivatives, Antimycobacterial Activity

キーワード : *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. intracellulare*, 新リファマイシン誘導体, 抗ミコバクテリア活性

はじめに

1960年代後半に結核化学療法に導入されたリファンピシン(RFP)は、当時初回肺結核に対する標準的な化学療法術式であったSM・PAS・INH 3剤を補う“二次抗結核薬”として検討された一時期を経て、その強力な治療効果から初回治療への位置付けが積極的に考慮され、現在、INHとRFPの併用を主軸とするさらに強力な初回化学療法の標準方式¹⁾²⁾における必須の薬剤となっている。

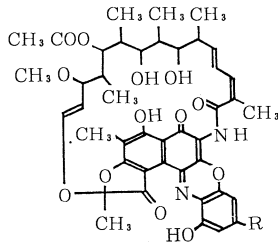
この新しい標準方式が結核医療の基準として公に採用³⁾されたのはかなり後のことであるが、結核医療の現場では既に10年にわたる治療実績を持ち、RFPの抗結核薬としての優秀性はゆるぎないものとなっている。

しかしながら私どもは、この新しい標準化学療法の優秀性を日常如実に体験しつつも、常に新しい薬剤開発の必要性を痛感しているのが実状である。本講演は新薬開発を目指したリファマイシン誘導体の基礎検討が主題であり、前置きとして新薬開発の必要性の根拠を今一度整理し、今後の方向付けを探ってみる必要があると考える。

まず、わが国の初回肺結核の治療に限って、現有の抗結核薬での治療の現状を考えてみたい。標準方法の主役は、INH、RFP、SM、EBの4薬剤であるが、感染菌の側からはこれらの薬剤に耐性がなく、一方、宿主の側では、患者のcomplianceに関わる問題はさておいても、これらの薬剤の投与を阻む臓器障害、あるいは副作用の発現が無い場合にはじめて治療が完遂できる。現在到達できた治療効果の卓越性と治療期間の短縮化は、一にかかってINHとRFPの同時併用に依存していることから、INHとRFPのいずれかが使用できない症

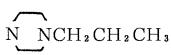
例では、これら2薬剤に比べ治療効果の劣る薬剤の選択を余儀なくされ、標準治療においては9~12カ月である治療期間が2、3年と倍以上になる可能性も大きい。言葉を換えれば、優秀な治療術式の選択性は極度に限られている。SMあるいはEBのいずれかが使用できない場合であれば、INH・RFP・EBあるいはINH・RFP・SMが使用でき、標準方式が完遂できるとしても、INHが使用できない場合はRFP・EB・SM、RFPが使用できない場合はINH・SM・EBと、既にやや治療効果の劣る可能性のある術式を選択せざるをえなくなる。INHとRFP両剤共に使用不能となるにいたっては、SM・EBに加えどの薬剤を組合せるかで難波の度は次第に増してくる。TH、PZA、PAS、CSのいずれかを選択せざるをえないと考えられるが(残念ながらTHは製造中止で入手が困難になりつつある)、いずれも高頻度の副作用と治療効果が劣るという両面から問題点は多い。日常の臨床で経験するように、INHとRFPなどの使用できない状況はそれほど稀なものではなく、患者によっては、現在結核治療が到達した、最強力な治療術式と短期治療の恩恵を受けることなく、依然として長期の治療が必要で、場合によってはcomplianceの低下も懸念される。また、杞憂かもしれないが、「短期化学療法」という言葉が広く普及している現在では、万一医療従事者の側に標準治療術式についての正確な理解を欠くことでもあれば、これら患者の治療が不十分に放置されるという事態もないとはいえない。

既治療の薬剤に耐性が高頻度に予想される再治療においての術式選択には、上に述べた薬剤選択の可能性がさらに大きく限られることは明らかである。現実には結核の医療に携わるものが、多剤耐性を示す患者など難治の症



Rifampicin

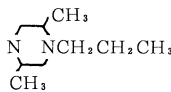
R : KRM 諸化合物の置換構造



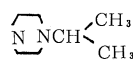
KRM-1657



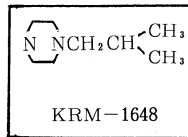
KRM-1668



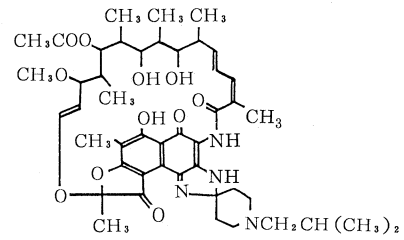
KRM-1674



KRM-2312



KRM-1648



Rifabutin (LM427)

図1 リファマイシン誘導体 (KRM) の構造式

例に遭遇した時、INH あるいは RFP に匹敵する新しい薬剤がせめて 2 種類でもあればと考えるのは当然の願いであると思われる。

また、新薬開発は、INH とか RFP よりさらに強力な薬剤の必要性からも要請される。すなわちこれら 2 薬剤に換え得るより強力な薬剤が出現すれば、現在の標準化学療法術式の治療効果を凌ぐ術式の確立も可能になり、ひいては結核治療のより短期化も夢ではない。9～12 か月という治療期間をさらに短縮できれば、わが国のみならず全世界の結核の撲滅に大きく貢献するであろうことは疑いがない。私どもは、結核の治療が長期間を要するという固定観念に引き続き挑戦する必要がある。

もう一つの緊急な課題として非定型抗酸菌症に対する治療術式の確立がある。特に *M. avium* complex 症の治療のため新しい薬剤の開発が必要であることは多言を要しない。

前置きが長くなったが、今回新しいリファマイシン誘導体の基礎検討をするにあたって念頭にあったのはおよそ上述のことがらであった。

検討化合物について

今回の基礎検討で対象になったリファマイシン誘導体は、3'-hydroxy-5'-alkylpiperazinyl-benzoxazinorifamycin に含まれる化合物 (KRM) が主体となっている。いずれも鐘淵化学工業株式会社、生物化学研究

所で合成⁴⁾されたものであり、基礎実験用として原末で提供を受けたものである。代表的な 5 化合物の構造が rifampicin (RFP) と rifabutin (LM 427) と対比して図 1 に示されている。数年間にわたり計 158 化合物がスクリーニングの対象となった。基礎検討の順序としては次のごとくである。まず、全 158 化合物を対象として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv と *M. avium* complex 31F093T に対する試験管内制菌力の検討を行い、次いで制菌力の強力な化合物について予備的な薬剤動態並びに毒性の検討成績 (上記生物化学研究所で実施) を勘案の上、以後検討の価値がある 5 化合物を選択した。

これらの化合物について *M. tuberculosis* 並びに *M. avium* complex の臨床分離多数株で試験管内制菌力を再確認し、続いて *M. tuberculosis* H37Rv 並びに *M. avium* complex 31F093T を用いた実験感染症で単独治療効果を検討した。次いで、並行して継続実施 (生物化学研究所) されたより詳細な薬剤動態と予備毒性検査結果を勘案しながら 2 薬剤をその後の検討対象とし、さらに現在では、合成に関わる問題点も考慮の上、1 化合物 (KRM-1648) を対象に基礎検討が継続されている段階である。

試験管内制菌力について

今回提供を受けた全化合物の試験管内制菌力 (MIC) の分布を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。MIC の判定

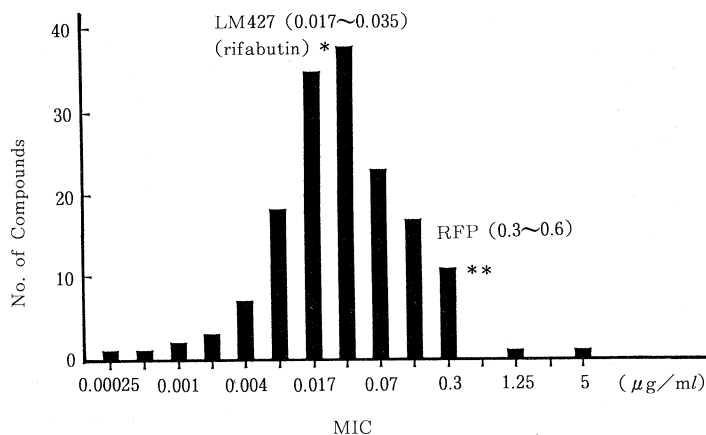


Fig. 2. MIC Distribution of 158 New Rifamycin Derivatives (KRM_s) against *M. tuberculosis* H37Rv

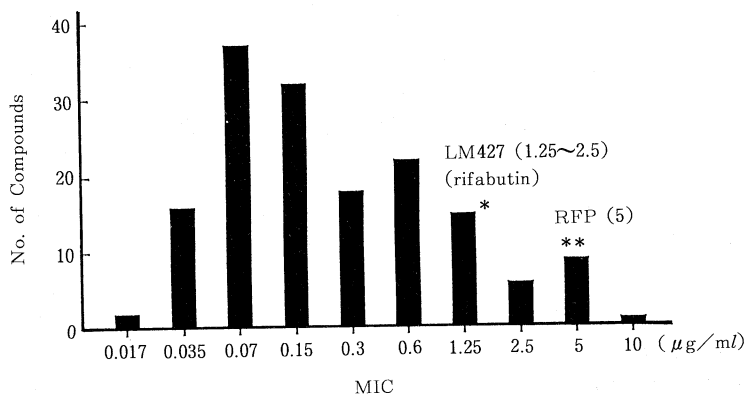


Fig. 3. MIC Distribution of 158 New Rifamycin Derivatives (KRM_s) against *M. avium* complex 31F093T

には、10%牛血清加 Kirchner 液体培地（培地量 2 ml）を用い、初管の薬剤濃度は、*M. tuberculosis* H37Rv には 10 µg/ml、*M. avium* complex 31F093T では 160 µg/ml と設定し、倍数希釈系列を 19 管作成した（20 管目は薬剤非含有培地）。接種菌量は両菌種共に ca. 0.01mg（1.0mg/ml の菌液を 10 倍希釈したものを 0.1 ml 滴下）であるが、判定は、*M. tuberculosis* では 4 週後、*M. avium* complex では 2 週後に実施している。MIC には、肉眼的に菌の発育の認められない最低薬剤濃度を採用している。

Fig. 2 で *M. tuberculosis* H37Rv に対する MIC の分布を見ると、対象として検討した RFP は 0.3~0.6 µg/ml、rifabutin (LM 427, RBU) は 0.017~0.035 µg/ml であり、H37Rv に対しては今回検討したほとんどの化合物が RFP より低い MIC を示す結果が得ら

れている。31F093T に対しても同様、ほとんどの化合物が RFP より低い MIC を示していた。LM427 との比較では、特に 31F093T に対してより強い制菌力を示す化合物が多数存在することが注目された。結論として、検討化合物の中には、*M. tuberculosis* と *M. avium* complex に対して RFP の制菌力を大幅に凌駕する多数の化合物の存在が示唆されたのである。

以上の結果を得て、H37Rv と 31F093T 両菌株に対して可及的に強い制菌力を持つ化合物の選択に進んだが、予備的な薬剤動態あるいはマウスにおける簡易な毒性検討の結果も考え合わせ、KRM-1648, KRM-1657, KRM-1668, KRM-1674, KRM-2312 の 5 化合物を以後の検討対象として選択することになった。

次にこれら 5 化合物についての臨床分離 20 株に対する制菌力 (MIC)⁵⁾ のまとめを Table に示したが、前述

Table In vitro Activities of Rifamycin Derivatives (KRM_s) against Mycobacteria

compounds	MIC		MIC ₉₀	MIC ₉₀
	MTB (H37Rv)	MAC (31F093T)	MTB (20 strains)	MAC (20 strains)
RFP	0.6	5	1.25	40, 80
RBU	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 MTB : *M. tuberculosis*
RBU : Rifabutin (LM427) MAC : *M. avium* complex
(山本他, 結核, 65 : 808, 1990, 再掲)

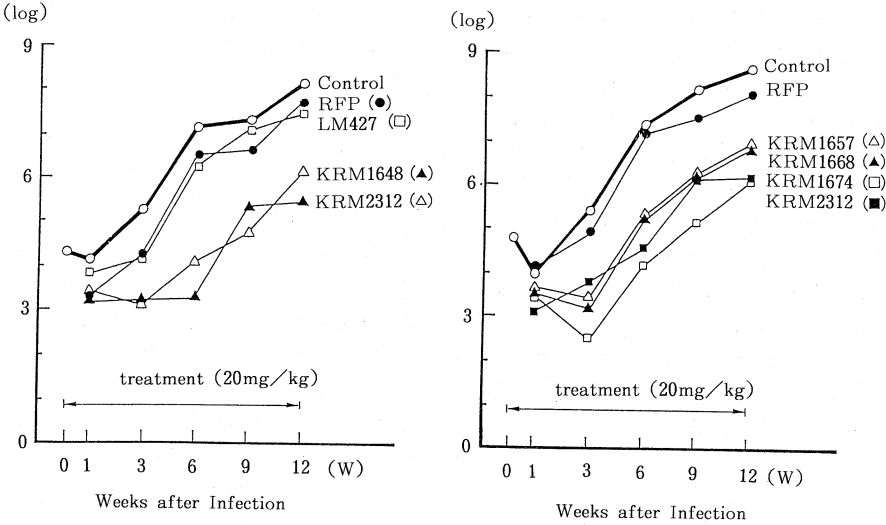


Fig. 4. Log CFU Recovered from the Lung of Mice Infected with *M. avium* complex 31F093T

(久世他, 結核, 66 : 10, 1991, 右図再掲)

の成績と同様, 5化合物共に臨床分離株に対しても優れた制菌力を確認することができた。即ち結核菌に対しては5化合物共0.07 $\mu\text{g/ml}$ 以下で全菌株の90%の発育を阻止し, この濃度は, 同時に得られているRFPのMIC 1.25 $\mu\text{g/ml}$ の約1/16になる。なお, RBU (LM427) も5化合物と同程度のMICが確認された。一方, *M. avium* complex に対してもRFPのMICが40~80 $\mu\text{g/ml}$ を示しているのに比べ, 90%の菌株を0.3 $\mu\text{g/ml}$ (1/100以下) で発育を阻止している。

結論として, KRM 5化合物の両菌種に対する試験管内制菌力はRFPと比べ有意に優れており, この時点で

これらの化合物を抗酸菌感染症の有力な候補新薬として継続検討の価値があると考えた。なお, RFPとの比較の上で, 制菌力の差がむしろ*M. avium* complexにおいて顕著であることは特筆すべきことと考えた。また, rifabutin (LM 427, RBU) が結核菌に対して今回検討した化合物と同程度の勝れた制菌力を示したことも注目したい。

実験感染症に対する治療効果

試験管内制菌力の検討成績を踏まえ, 上記5化合物の*in vivo*での抗菌活性の検討に進んだ。実験結核症のモ

デルには、H37Rvの尾静脈接種によるマウス実験結核症⁶⁾を、*M. avium* complex (Gen-Probe[®]で *M. intracellulare* と判明している) 感染モデルには、マウス毒力株⁷⁾⁸⁾ 31F093Tの同様尾静脈接種による慢性感染症を用いた。治療効果の指標として、前者では生存率を、後者では治療開始後経時的に実施した肺、脾からの還元菌数の推移を採用した。

5化合物それぞれの単独投与の治療成績については、すでに報告⁹⁾しているが、要約すると以下のごとくである。

H37Rvの約10⁹生菌単位を接種したマウスはすべて感染後19~22日までに死亡したが、感染直後からKRMを10mg/kg経口投与すると全マウスが観察終了時(感染後40日)まで生存した。RFP 10mg/kg投与では、感染後40日にはすでに60~75%が死亡していた。LM427治療群も全例の生存が見られ、優れた治療効果を示している。*M. intracellulare* 31F093T感染マウスの治療成績⁹⁾については、肺からの還元生菌数の推移をFig. 4に再掲したが、KRM 5化合物のそれぞれの20mg/kg単独経口投与で有意な治療効果が示されている。

31F093T感染マウスを用いたRFP並びにLM427の単独投与の治療成績については既に報告⁸⁾¹⁰⁾しているが、非治療群と比較するとRFP, LM427治療群共にごく僅かの臓器内生菌数の減少に止まり、LM427投与群でRFP投与群よりは肉眼的臓器病変がやや軽度であったなどの結果を得ている。今回の成績も臓器内還元菌数の推移は全く同様な傾向を示している。私どもの実験系における結論として、RFPとLM427の単独治療効果は極めて弱いと考えざるをえないが、これに比べKRM諸化合物は単独投与でも治療効果は明らかである。

その後の検討成績

これまで述べてきた成績から、KRM 5化合物の抗菌活性は*in vitro*, *in vivo*共にほぼ確認されたと考えられる。その後、より詳細な薬剤動態あるいは毒性の検討成績、さらに合成の難易などを総合勘案して、現在では、KRM-1648 1化合物を対象に、臨床使用の可能性を念頭に置き基礎検討を継続している。成績については逐次報告の予定であるが、2, 3の検討結果についての概略を以下に述べたい。

1) KRM-1648の結核菌に対する殺菌力

一般に感染症に対する化学療法剤の優劣を論じるには、殺菌力の検討が欠かせない。私どもの研究室で開発されたSilicone Coated Slide Culture Method (SSC) (シリコン被覆スライド培養法)^{11)~13)}を使用し、KRM-1648とRFPとの結核菌に対する殺菌力の優劣について検討を開始した。現在、短時間(2時間)接触時の両薬剤の殺菌力では、KRM-1648がRFPを大幅に凌駕

する予備的な成績が得られている。

2) KRM-1648少量投与時の*in vivo*治療効果

KRM-1648の結核菌に対する殺菌力が優れているのが事実とすれば、*in vivo*でそれを実証するために、(1)少量投与時の治療効果の比較と、(2)間歇投与時の治療効果の比較、の2項目の検討が必要と考えた。マウス実験結核症での生存率を指標として、現在(1)の検討を進めているが、KRM-1648 3mg/kgの治療効果は、RFP 10mg/kgの治療効果を明らかに凌ぐ結果が得られている。(2)についても検討を開始している。

3) 実験的 *M. intracellulare* 症を用いた KRM-1648を含む多剤併用治療効果

前述のように、31F093T(*M. intracellulare*)を用いたマウス感染モデルの治療効果は明らかではあるが、単独投与の限界も示されていると考えられるので、KRM-1648を含む多剤併用の有用性についての検討が不可欠である。RFP・KM・EB 3剤併用と、RFPをKRM-1648に変更したKRM-1648・KM・EB 3剤併用との治療効果の比較を予備検討したが、肺と脾の還元菌数の推移は観察期間中KRM-1648を含む3剤治療群に有意に少なく、*M. intracellulare* 症に対する併用薬剤としてのKRM-1648の有用性が期待し得る。

おわりに

さて、上述の結果を踏まえ、現在継続検討している新リファマイシン誘導体(KRM-1648)について、その成績を臨床的な有用性という観点から、抗酸菌感染症の化学療法剤としての可能性を探ってみたい。

まず、結核治療に対する新薬としての可能性は、この化合物が、RFPより制菌力(恐らくは殺菌力も)が優れ、*in vivo*においても治療効果の優位性が確認されていることである。今後の検討で殺菌力の優位性が確認されれば、RFPに替えて初回化学療法より強力化と短期化を期待し得る可能性がある。また、今後の検討で間歇接触時の殺菌力の優秀性が証明されることにでもなれば、投与間隔の延長、ひいては間歇投与方式の可能性も考慮されることになる。この課題の検討には今後のKRM-1648の薬剤動態の検討成績に待つところが多い。

予備的な検討(生物化学研究所)では、KRM-1648の肺内濃度のピーク値はほぼRFPと同様であるが、濃度の経時的な減衰はKRM-1648においてより緩徐であることが示されている。わが国ではRFPの間歇投与は、アレルギー発現の問題もあってほとんど行われないうが、developing countryにおける結核治療においては、患者のcomplianceと関連して本剤について再検討を要する事項であろう。RFP耐性結核に対する有用性については、予備的な検討成績でRFPとの交叉耐性の存在を示唆する成績が得られつつあり、RFPの初回耐性例

あるいは再治療の耐性例における有用性は期待し難いと考えられる。

さて、*M. avium* complex 症についてであるが、KRM-1648 は、現在までの成績では、*M. intracellulare* 症の治療における併用薬剤の一つとしての RFP に替わる薬剤として治療効果の改善に期待し得ると考えられる。私どものマウスの実験感染症の治療成績⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾では、現在までのところ単独投与で有意な治療効果の得られているのはアミノグリコシド系薬剤のみであり、KRM-1648 が単独で治療効果が得られたことは特筆すべきことである。しかしながら *M. avium* を対象としての検討は、*in vitro*, *in vivo* 共に私どもはほとんど未検討である。最近の Saito らの報告¹⁶⁾によると、KRM-1648 の MIC₉₀ は *M. avium* において *M. intracellulare* よりも大きく、抵抗性のある菌株の存在が示唆されており、*in vivo* での検討を含め今後の課題である。

最後に鐘淵化学工業株式会社生物化学研究所各位の永年にわたる新リファマイシン誘導体合成の努力に敬意を表し、原末の提供を頂いたことを深謝し、合わせて京都大学胸部疾患研究所感染・炎症学および第 1 内科の共同研究者に謝意を述べたい。

文 献

- 1) 日本結核病学会治療専門委員会、木野智慧光：結核化学療法に関する見解と最近における結核化学療法の考え方、進め方、財団法人結核予防会、東京、1974.
- 2) 日本結核病学会治療専門委員会：専門委員会報告結核化学療法の期間に関する見解、結核、55：189~193, 1980.
- 3) 厚生省保健医療局結核難病感染症課編：昭和 61 年度改正 結核医療の基準とその解説、財団法人結核予防会、東京、1986.
- 4) 山根毅彦、橋爪卓士、山下勝治：新規 3'-ヒドロキシー 5'-アミノベンゾキサジノリファマイシンの合成と抗菌活性、日本薬学会第 110 年会講演要旨集 2：289, 1990.
- 5) 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.
- 6) 浜田浩司：結核マウスの生存日数を指標とする化学療法剤の効果、京大結研紀要、7 (2) 増刊号：315~340, 1959.
- 7) 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-M. intracellulare* complex のマウスに対する病原性 (ii) — mouse virulent strain (毒力株) の検索一、結核、59：13~25, 1984.
- 8) Kuze, F.: Experimental chemotherapy in chronic *Mycobacterium avium-intracellulare* infection of mice, Am Rev Respir Dis, 129：453~459, 1984.
- 9) 久世文幸、山本 誉、網谷良一他：新 rifamycin 誘導体の *Mycobacterium tuberculosis* と *M. avium* complex に対する *in vivo* 活性、結核、66：7~12, 1991.
- 10) Sakurai, N., Kuze, F.: *In vitro* and *in vivo* chemotherapeutic activity of rifabutin (LM 427) on *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, 京大胸部研紀要、20：50~60, 1985.
- 11) Higashi, K., Tsukuma, S., Naito, M.: Silicone-coated slide culture method for tubercle bacilli, Am Rev Respir Dis, 85：392~397, 1962.
- 12) 内藤益一、津久間俊次、池田宣昭他：Silicone-Coated Slide への結核菌の附着に影響する諸因子の検討補遺、京大結研紀要、12 (2)：112~128, 1964.
- 13) 池田宣昭：主要抗結核薬の性能比較に関する試験管内実験的検討、結核、61：285~292, 1986.
- 14) 桜井信男、久世文幸：*Mycobacterium avium-intracellulare* 症治療術式の検討 (2) マウス吸入感染モデルに対する aminoglycoside の治療効果、結核、62：369~374, 1987.
- 15) 桜井信男：*Mycobacterium avium-intracellulare* 症治療術式の検討 (3) マウス尾静脈内感染モデルに対する諸種薬剤の治療効果、結核、63：447~460, 1988.
- 16) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. et al.: *In vitro* antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins, Antimicrob Agents Chemother, 35：542~547, 1991.