原　著

新リファマイシン系薬剤KRM−1648の*in vitro*抗結核菌作用

佐藤勝昌・冨岡治明

島根医大微生物・免疫学

斎藤肇

国立多摩研究所

河原伸

国立療養所南岡山病院

日高隆義

鐘淵化学工業生化研

受付　平成8年4月10日
受理　平成8年5月24日

IN VITRO ACTIVITIES OF THE BENZOXAZINORIFAMYCIN KRM−1648 AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Katsumasa SATO*, Haruaki TOMIOKA, Hajime SAITO, Shin KAWAHARA and Takayoshi HIDAKA

(Received 4 October 1996/Accepted 24 May 1996)

In vitro antimicrobial activities of the benzoxazinorifamycin derivative KRM−1648 (KRM) against 50 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with mainly intractable pulmonary tuberculosis were studied. MIC_{90} values of KRM, rifabutin (RBT) and rifampicin (RFP) for RFP−sensitive strains (27 strains; defined as those with MIC_{RFP} values of $<1.56\mu g/ml$) were 0.013, 0.1 and $0.4\mu g/ml$, respectively, when determined by the agar dilution method using 7H11 medium. MIC_{90} values of KRM, RBT, and RFP for RFP−resistant strains (23 strains; defined as those having MIC_{RFP} values of $\geqq 1.56\mu g/ml$) were 100, 12.5 and $>100\mu g/ml$, respectively. MICs of KRM against 50 clinical isolates of *M. tuberculosis* distributed over a much lower range than those of RFP. KRM showed more potent antimicrobial activity than RBT against the organisms with low MIC values ($\leqq 1.56\mu g/ml$), while it was not so active as RBT against the organisms with high MIC values ($\geqq 3.13\mu g/ml$). Cross-resistance between KRM and RFP or RBT was observed for *M. tuberculosis*.

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo, Shimane 693 Japan.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, KRM−1648, Cross−resistance

キーワーズ : *Mycobacterium tuberculosis*, KRM−1648, 交差耐性

はじめに

先にわれわれは，結核菌をはじめとする諸種抗酸菌に対してベンゾキサジノリファマイシン系誘導体KRM−1648（KRM）がrifampicin（RFP）よりも強い*in vitro*抗菌活性を有すること[1)2)]，これはRFPよりも優れた菌体内への透過性に基づくRNAポリメラーゼ活性の阻害によるものであること[3)]，*Mycobacterium marinum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*および*M. leprae*のマウスあるいはウサギ感染モデル系において優れた治療効果を有することについて報告してきた[4)~14)]。同様な検討は他の研究者によっても行われ，KRMはRFPなどと比較して強い抗菌活性を有することが報告されている[15)~21)]。

KRMはRFPあるいはrifabutin（RBT）と同様なリファマイシン誘導体であることから，これら薬剤間には交差耐性の存在が考えられる。そこで，今回は主として長期排菌患者より分離された結核菌に対する，新リファマイシン誘導体であるKRMの*in vitro*抗菌活性を7H11寒天平板希釈法で測定するとともに，KRMが他のリファマイシン誘導体との間にどの程度の交差耐性を有するのかについて検討した。

材料と方法

(1) 供試菌

国療広島病院，国療松江病院，国療南岡山病院および大阪府立羽曳野病院で分離・継代された主として長期排菌患者喀痰よりの結核菌計50株（臨床分離株50株）の他に，教室保存の結核菌$H_{37}Rv$株ならびに結核予防会結核研究所より分与を受けた同Kurono株を併せ用いた。

(2) 薬 剤

RFP（第一製薬，東京），RBT（Farmitalia Carlo Erba，ミラノ），KRM（鐘淵化学工業，兵庫），INH（和光純薬，大阪），ethambutol（EB：第一製薬，東京），streptomycin（SM：明治製菓，東京），ofloxacin（OFLX：第一製薬，東京）およびsparfloxacin（SPFX：大日本製薬，東京）を用いた。各薬剤は10mg/mlの濃度になるように，リファマイシン系薬剤はdimethyl sulfoxideに，キノロン系薬剤は0.1N NaOHに，またその他の薬剤は蒸留水に溶解したのち供試した。

(3) MIC測定法

供試薬剤（100~0.0008μg/ml）の2倍階段希釈液を含有する7H11寒天平板上に，7H9 broth（Difco）中でOD_{540nm}＝0.1になるまで37℃で培養した菌液の0.1% Tween 80水による5倍希釈液（約10^6 CFU/ml）の5μlをミクロプランター（佐久間製作所，東京）でスポットし，37℃，5％CO_2環境下で2週培養後にMICを判定した[22)]。

結 果

結核菌に対するRFPの*in vitro*感受性試験とその臨床応答性との関係から決定されたbreak pointとしては，小川培地を用いて得られた場合では50μg/ml[23)]が，7H11寒天培地を用いた場合では1μg/ml[24)]が提唱されている。そこで，今回は結核菌に対するRFPのMIC値が1.56μg/ml以上のものをRFP耐性株と定義した。Table 1はその定義に従って，得られたRFPのMIC値より臨床分離株50株をRFP感受性株並びに耐性株に分類し，各薬剤の結核菌に対するMIC値を示したものである。まず，RFP感受性株の場合には，RFP

Table 1 MICs of KRM, RBT, and RFP for 50 clinical isolates of *M. tuberculosis* [a)]

Drugs	MIC (μg/ml)					
	Clinical isolate				Reference strains	
	RFP-sensitive (27 strains)		RFP-resistant (23 strains)		$H_{37}Rv$	Kurono
	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC_{50}	MIC_{90}		
KRM	0.006	0.013	6.25	100	0.013	0.006
RBT	0.013	0.1	3.13	12.5	0.025	0.013
RFP	0.1	0.4	>100	>100	0.1	0.1

a) MIC were determined by the agar dilution method using 7H11 medium.

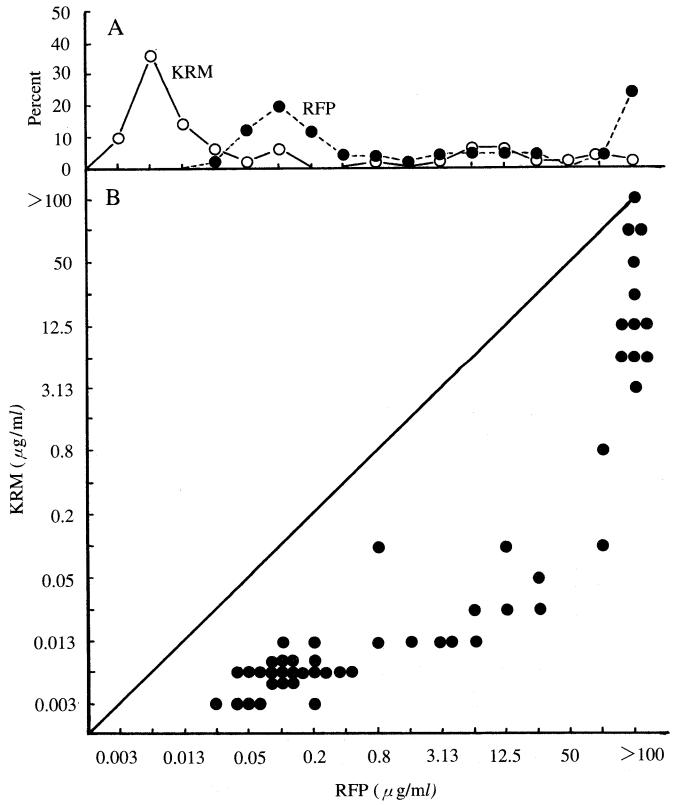

Fig. 1 Distribution of MICs of KRM and RFP for 50 clinical isolates of *M. tuberculosis*. (A) : Susceptibility distribution of the isolates to KRM (solid line) and RFP (dashed line). (B) : Correlation between MICs of KRM and those of RFP for the isolates. MICs were determined by the agar dilution method using 7H11 medium.

の MIC_{50} と MIC_{90} はそれぞれ0.1および0.4μg/mlであったのに対して，KRMではそれぞれ0.006並びに0.013μg/mlで，RFPのそれらの1/16～1/32，またRBTのそれらの1/2～1/8であった。他方，RFP耐性株の場合では，KRMの MIC_{50} 並びに MIC_{90}（各6.25および100μg/ml）はRFPのそれら（ともに>100μg/ml）よりも低かったが，RBTのそれらよりも2～8倍高かった（各3.13および12.5μg/ml）。

Fig. 1はTable 1に示した臨床分離株50株に対するRFPおよびKRMのMICの分布（A）並びにMICの相関（B）を示したものである。Fig. 1－Aより明らかなようにKRMのMIC値はRFPのそれに比べて低値側にシフトしており，MICのピーク値はKRMの0.006μg/mlであったのに対して，RFPでは0.1μg/mlであった。また，Fig. 1－Bから分かるようにKRMとRFPとの間には交差耐性が見られたが，KRMの各被検菌に対するMICは，いずれもRFPのそれよりも低値側に分布していた。

Fig. 2はKRMとRBTについて，Fig. 1に示したと同様の分析法による結果を示したものである。Fig. 2－Aに示したようにKRMとRBTの各MIC分布間には顕著な差はみられず，KRMおよびRBTのMICのピーク値はそれぞれ0.006および0.013μg/mlであり，わずかな違いがみられたに過ぎなかった。また，Fig. 2－Bに示したようにKRMとRBTとの間には交差耐性が認められたが，この場合RBTのMICが1.56μg/ml以下の場合ではKRMのMICはそれよりも常に低値側に分布したのに対して，RBTのMICが3.13μg/ml以上の場合はKRMのMICはそれとほぼ同等か，あるいはむしろそれよりも高値側に分布する場合が多くみられた。

Table 2にはKRM, RBTおよびRFP %に対して感受性を異にする臨床分離株（Fujii, Kurata, Watanabe）並びに結核菌保存株（H_{37} Rv, Kurono）に対する諸種抗菌剤のMICを示した。供試株数は少ないがKRMとINH, EB, SMおよびニューキノロン剤（OFLX, SPFX）との間には交差耐性は認められないことが分かった。

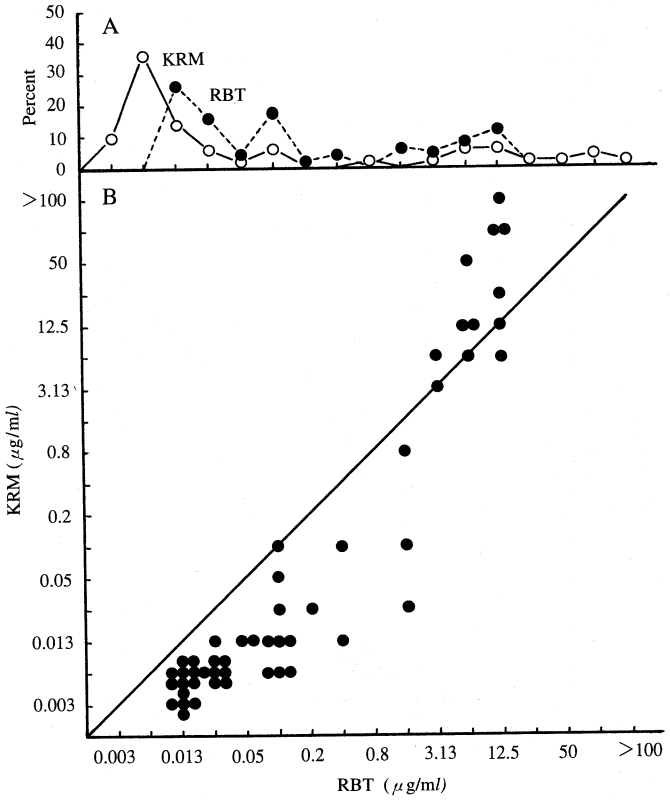

Fig. 2 Distribution of MICs of KRM and RBT for 50 clinical isolates of *M. tuberculosis*. (A) : Susceptibility distribution of the isolates to KRM (solid line) and RBT (dashed line). (B) : Correlation between MICs of KRM and those of RBT for the isolates. MICs were determined by the agar dilution method using 7H11 medium.

考 察

KRMの *in vitro* 抗菌活性についてはすでにKirchner液体培地を用いての山本らの報告[15]あるいはBACTEC 460 TB Systemを用いてのLuna－Herreraら[17]とわれわれの報告[14]がみられ，いずれもKRMがRFPよりも著しく優れたものであることが示されているが，今回のわれわれの7H11寒天培地を用いての検討でも，RFP感受性菌並びにRFP耐性菌を問わず，これらの知見を追認することができた。次にKRMの抗

Table 2 MICs of various drugs for reference strains and some clinical isolates of *M. tuberculosis* [a)]

Strain	MIC (μg/ml)							
	KRM	RBT	RFP	INH	EB	SM	OFLX	SPFX
Clinical isolates								
Fujii	0.006	0.013	0.05	0.4	3.13	>100	0.8	0.2
Kurata	0.1	0.1	12.5	12.5	6.25	3.13	6.25	1.56
Watanabe	100	12.5	>100	12.5	12.5	>100	12.5	3.13
Reference strains								
H_{37} Rv	0.013	0.025	0.1	0.05	3.13	0.8	0.8	0.2
Kurono	0.006	0.013	0.1	0.1	6.25	0.8	0.8	0.2

a) MICs were determined by the agar dilution method using 7H11 medium.

結核菌活性をRBTと比較した場合，KRMのMICが1.56μg/ml以下の菌株におけるKRMの抗菌活性はRBTよりも優れたものであったが，KRMのMICが3.13μg/ml以上の菌株に対してはこれとは逆にRBTの方がKRMよりも優れた抗菌力を示すという成績が得られた。その理由については明らかでないが，25μg/ml以上のKRM含有7H11寒天培地では，培養経過中に培地中に約0.05mmの針状突起を有するKRMの結晶が生じてくることを見ていることから，これよりもさらに低濃度域においても微細な結晶が析出している可能性もありうると考えている。したがって，KRMに対して3.13μg/ml以上のMICを示す菌では真のMICはこのような見かけ上の値よりもさらに小さくなる可能性が十分考えられる。このようなKRMの高濃度域における針状結晶生成現象は7H12B培地を用いたBACTEC法でのMIC測定の場合にもみられたが，高濃度域でのKRMとRBTのMICの逆転現象はみられなかった。その理由として，BACTEC法でのMIC測定では，培養期間が数日と短いこと，また測定MIC値自体も7H11寒天希釈法に比べて比較的低いことによるかもしれない。

先にわれわれは，結核菌に対してはKRMとRFPあるいはRBTとの間には交差耐性がみられることについて報告[14]したが，今回の検討でも同様の知見が得られた。このことよりすると，RFP高度耐性菌にはKRMの抗菌活性は期待し得ないもののように思われる。しかしながら，供試いずれの結核菌株に対してもKRMのMICはRFPのそれよりも常に低く，RFP感受性菌のみならず，軽度耐性菌にたいしてもその抗菌力が期待できるものと思われる。

先に，久世らのグループ[16)19)]は，結核菌$H_{37}Rv$株感染マウスに対して，KRMはRFPよりも優れた延命効果をもたらしたと報告している。われわれもKRM（MIC=0.006μg/ml）およびRFP（MIC=0.1μg/ml）感受性の結核菌を感染させたマウスを，これらの各薬剤で治療し，その効果を比較検討したところ[14]，久世らの報告と同様の知見を得ることができた。さらにわれわれのRFP耐性結核菌感染マウスに対するKRMの治療効果についての検討[14]では，RFP 25μg/ml耐性株（Kurata株）感染マウスの場合，RFPの0.4mg投与は無効であったが，同じ量のKRM（MIC=0.1μg/ml）投与では有意な治療効果を認めている。しかし，RFP≧100μg/mlのMICを示す耐性結核菌5菌株の各感染マウスに対するKRMの治療効果は，KRMのMIC値が0.1～0.8μg/mlと十分に低い菌株による感染の場合でも，上述の用量では全く効果はみられなかった[14]。

これらのことより，7H11寒天培地を用いて測定された結核菌に対するKRMの0.1μg/mlを実験的マウス結核症に対する有効性評価の一つの目安の濃度と考えてよいのではなかろうかと思われる。しかしながら，ヒトとマウスでは薬剤の体内動態が異なることから，この値をもって直ちにヒトに置き換えて考えることはできない。今後，KRMの臨床適用において本剤の臨床上での有用性を予測することができるような本剤の結核菌に対するMIC値を決定すること，あるいは他の何らかのシステムの開発が必要と思われる。これは結核菌のみならず*M. avium* complexについても同様であると考えられる。

結　語

主として長期排菌結核患者より分離された結核菌50株に対するKRM－1648（KRM），rifampicin（RFP）およびrifabutin（RBT）のMICを7H11寒天平板を用いて測定し，以下の知見を得た。

1）KRMの抗菌活性はRFPより優れ，RBTとほぼ同等か若干優れているようであった。

2）KRMはRFP並びにRBTと交差耐性を示したが，KRMのMICは，特にRFPのそれよりもいずれも低値に分布した。

文　献

1）Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: In vitro antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 542－547.

2）Tomioka H, Saito H, Fujii K, et al.: In vitro antimicrobial activity of benzoxazinorifamycin, KRM－1648, against *Mycobacterium avium* complex, determined by the radiometric method. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 67－70.

3）Fujii K, Saito H, Tomioka H, et al.: Mechanisms of action of antimycobcaterial activity of the benzoxazinorifamycin KRM－1648. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 1489－1492.

4）Tomioka H, Saito H, Sato K, et al.: Chemotherapeutic efficacy of a newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM－1648, against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36: 387－393.

5）Yamamoto Y, Saito H, Tomioka H, et al.: In vitro and in vivo activities of KRM－1648, a newly synthesized benzoxazinorifamycin,

against *Mycobacterium marium*. Zbl Bakt. 1992 ; 277 : 204－209.
6) Tomioka H, Saito H, and Hidaka T : In vivo antileprosy activity of the newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM－1648. Int J Lepr. 1993 ; 61 : 255－258.
7) 冨岡治明，佐藤勝昌，斎藤 肇，他：*Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン系薬剤KRM－1648の効果－治療開始時期の検討－．結核．1993 ; 68 : 631－635.
8) 冨岡治明，佐藤勝昌，斎藤 肇，他：*Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン系薬剤KRM－1648の効果－投与回数の検討－．結核．1993 ; 68 : 683－686.
9) 冨岡治明，佐藤勝昌，斎藤 肇，他：*Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン系薬剤KRM－1648と宿主免疫賦活剤LC9018の併用治療効果．結核．1993 ; 68 : 751－754.
10) Emori M, Saito H, Sato K, et al. : Therapeutic efficacy of a benzoxazinorifamycin, KRM－1648, against experimental *Mycobacterium avium* infection induced in rabbits. Antimicrob Agents Chemother. 1993 ; 37 : 722－728.
11) 斎藤 肇，冨岡治明，佐藤勝昌，他：*Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン系薬剤KRM－1648の長期治療．結核．1994. 69 : 59－63.
12) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : Therapeutic efficacy of benzoxazinorifamycin, KRM－1648, in combination with other antimicrobials against *Mycobacterium leprae* infection induced in mice. Int J Lepr. 1994 ; 62 : 43－47.
13) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : Therapeutic effect of KRM－1648 with various antimicrobials against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. Antimicrob Agents Chemothr. 1995 ; 76 : 51－58.
14) Hirata T, Saito H, Tomioka H, et al. : In vitro and in vivo activities of the benzoxazinorifamycin KRM－1648 against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1995 ; 39 : 2295－2303.
15) 山本 誉，網谷良一，久世文幸，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．1990 ; 65 : 805－810.
16) 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．1991 ; 66 : 7－12.
17) Luna-Herrera J, Reddy MV, and Gangadharam PRJ : In vitro activity of the benzoxazinorifamycin KRM－1648 against drug-susceptible and multidrugresistant tubercle bacilli. Antimicrob Agents Chemother. 1995 ; 39 : 440－444.
18) Klemens SP, and Cynamon MH : Activity of KRM－1648 in combination with isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. Antimicrob Agents Chemother. 1996 ; 40 : 298－301.
19) Yamamoto T, Amitani R, Suzuki K, et al. : In vitro bactericidal and in vivo therapeutic activities of a new rifamycin derivative, KRM－1648, against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1996 ; 40 : 426－428.
20) Yamamoto T, Amitani R, Suzuki K, et al. : Activity of KRM－1648 alone or in combination with both ethambutol and kanamycin or clarithromycin against *Mycobacterium intracellulare* infections in beige mice. Antimicrob Agents Chemother. 1996 ; 40 : 429－432.
21) Ji B, Lounis N, Truffot-Pernot C, and Grosset J. : How effective is KRM－1648 in treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice? Antimicrob Agents Chemother. 1996 ; 40 : 437－442.
22) 佐藤勝昌，斎藤 肇，冨岡治明：Rifabutin並びにRifampicinの7H10寒天培地並びに小川培地における抗マイコバクテリア活性の比較．結核．1988 ; 63 : 601－604.
23) 日本結核病学会治療専門委員会：結核化学療法に関する見解．結核．1974 ; 49 : 349-356.
24) McClatchy JK : Susceptibility testing of mycobacteria. Lab. Med. 1978 ; 9 : 47－52.