

原 著

実験的マウス結核症に対する benzoxazinorifamycin
KRM-1648の *in vivo* 治療効果

(1) 経気道感染モデルと尾静脈感染モデルを用いた短期治療効果の検討

土 井 教 生

結核予防会結核研究所基礎研究部

THERAPEUTIC EFFICACY OF BENZOXAZINORIFAMYCIN KRM-1648
AGAINST EXPERIMENTAL MURINE TUBERCULOSIS :

(1) A Study on the Efficacy of Short Course Treatment with
the Intratracheal and Intravenous Infection Models

Norio DOI*

Objectives : This study aims to compare *in vivo* activity of benzoxazinorifamycin KRM-1648 (KRM) with those of rifampicin (RFP) and rifabutin (RBT) against experimental murine tuberculosis.

Study design : Mice were infected with *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis* by the intratracheal (IT) or intravenous (IV) routes, and treated for 10 days with various doses of each drug starting from the 8th or 11th day after the TB-infection.

Results : (A) A rapid test for *in vivo* evaluation of three rifamycins was conducted by examining the survival days of treated mice infected with 10^6 cfu of *M. bovis* Ravenel. Mice treated with KRM exhibited 2.1~3.7 times longer survival times, in comparison with those treated with RFP or RBT. (B) In the IT-model of *M. bovis* Ravenel infection, three rifamycin derivatives gave "distinctive dose-response curves" in the correlation of dose sizes with the mean survival times or " \log_{10} CFU/lungs reductions". (C) In *M. tuberculosis* Kurono infection models, the ranking of the anti-TB activity of the three rifamycins in each organ was as follows : IT- and IV-lungs : KRM \gg RFP \approx RBT, IV-spleen : KRM \approx RBT $>$ RFP, IV-liver : KRM \approx RBT $>$ RFP. (D) Based on the results of " \log_{10} CFU reductions" in different organs in *M. tuberculosis* Kurono infection models, "characteristic *in vivo* activity patterns of each rifamycin" were obtained. (E) The therapeutic efficacy of KRM in lungs was greater than in spleen and liver with any dose. In contrast, RBT exhibited more remarkable *in vivo* activity in the spleen and liver than in lungs.

Conclusion : The prominent *in vivo* activity of KRM may allow small dose for effective therapy ; 1/3 dose or less in comparison with those of RFP or RBT, or intermittent therapy of tuberculosis.

別刷り請求先 :
土井 教生
結核予防会結核研究所基礎研究部
〒204-0022 東京都清瀬市松山 3-1-24

* From the Department of Basic Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022 Japan.

(Received 26 Sep. 1997 / Accepted 26 Nov. 1997)

Key words : Intratracheal infection, *Mycobacterium tuberculosis*, Mouse, KRM-1648, Rifampicin, Rifabutin

キーワード : 経気道感染, 結核菌, マウス, KRM-1648, リファンピシン, リファブチン

緒言

Rifampicin の出現によって結核短期強化化学療法の基本が定式化されてほぼ四半世紀が過ぎようとしている。この間、多剤耐性結核菌と非結核抗酸菌の検出率が増加傾向を示し続けているのはすでに周知の事実である。加えて、免疫不全症候群における結核発病例の顕在化とその高い致死率を背景に、近年の結核対策はこれまでとは一線を画する難しい局面を迎えている。これに対し、臨床の現場で適用されている抗結核薬剤は依然として実質僅か10薬剤にも満たないというのが現状である。なかでも決め手となる治療薬を欠く *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 慢性感染症例に対する化学療法の実状は深刻である。新しい強力な抗酸菌治療薬の開発が渴望されるゆえんである。

新薬開発の分野で、現在最も有望視されているのはニューマクロライド系、ニューキノロン系、そしてリファマイシン系の新薬である。今回の報告の中心である KRM-1648化合物 (KRM) は、(株)鐘淵化学工業によって開発されたリファマイシン誘導体のひとつで、3'-hydroxy-5'-(4-isobutylpiperazinyl)-benzoxazinorifamycin の構造を有する^{1)~3)}。この KRM については、国内外の研究者達の基礎研究により、結核菌および MAC に対して既存の類縁化合物 rifampicin (RFP), rifabutin (RBT) を凌ぐ試験管内抗菌力を有し、実験感染モデル動物に対して優れた治療効果を示すことが明らかになりつつある^{4)~20)}。

本報告では、KRM の抗結核薬剤としての可能性を追究するため、別報²¹⁾で報告した「経気道感染モデル系 (IT)」と従来からの「尾静脈感染モデル系 (IV)」とを用いて短期治療実験を行い、(1) マウス生存日数の比較、(2) 短期治療における臓器内菌数の経時的推移を観察した。これらの実験結果の検討から、[1] 3種類のリファマイシン誘導体が各薬剤に特徴的な「用量-反応曲線」を示すこと、[2] 感染経路の異なる実験感染モデル系では同一薬剤の *in vivo* 治療効果においても顕著な差異が生ずること、[3] KRM, RBT, RFP は、同じリファマイシンのグループに属するにもかかわらず、各薬剤固有の「臓器特異的な治療効果」を示すことを見出した。これらの結果について報告する。

材料と方法

感染菌 : *M. bovis* Ravenel 株 (NIHJ 1607) は国立予防衛生研究所細胞免疫部 (現国立感染症研究所) 高橋宏博士 (当時) より分与された。 *M. tuberculosis* Kurono 株は結核研究所で凍結乾燥保存の菌株を使用した。

菌液の調製 : Youmans の方法に従い²²⁾, Proskauer & Beck の液体培地で早期に発育する薄い菌膜を採取した。調製した菌液は、一度マウスを通過後、7H10培地 (Difco) で回収し、次に Dubos 培地 (Difco) で同調培養後セラムチューブに分注し-80℃で凍結保存した。

動物 : BALB/c CrSlc 6 週齢雌マウス (日本エスエルシー) を用いた。

IV 感染 : 26番ゲージ 1/2 インチの注射針と 1ml 容量のシリンジを用いて、尾静脈から菌液 0.2ml を注入した。

IT 感染 : 麻酔条件は、(a) ketamine (Park-Davis 社) と xylazine (Bayer 社) を 80 : 16 mg の割合で混和し²³⁾、10倍希釈後、200 μ l/マウスを腹腔内投与、または (b) pentobarbital (Abott Lab.) を 50 μ g/10 μ l/マウス体重 g の割合で腹腔内投与、のいずれかにより行った。肺内への菌液注入は、長さ25mmのポリエチレンチューブ (SP37, 夏目製作所) を装着した 25番ゲージ 5/8 インチの注射針をマウス気管内に挿入し、次いで予め菌液 0.1ml を吸引した 1ml 容量のシリンジを接続して菌液を定量的に肺内に注入した。

薬剤 : KRM, RFP, RBT の 3 薬剤はそれぞれ(株)鐘淵化学工業、(株)第一製薬、(株)Pharmacia & Upjohn より供与を受けた。

薬液の調製 : 所要量の薬剤原末と最終濃度 2.5% (w/v) になる量のアラビアゴム末 (和光純薬工業) とを 0.2% Tween-80 水溶液を加えつつ瑪瑙乳鉢中で少量ずつ混和懸濁させて調製。調製した薬剤懸濁液はセラムチューブに分注し-20℃で保存。毎日新しい凍結チューブを溶解して使用した。

動物の感染 : 第 1 実験では *M. bovis* Ravenel 株 1.0×10^6 cfu を IT または IV 感染させ、第 2 実験では *M. tuberculosis* Kurono 株 2.14×10^6 cfu を IT または IV 感染させた。両実験とも IT 感染と IV 感染は同時に並行して同一菌液により行った。

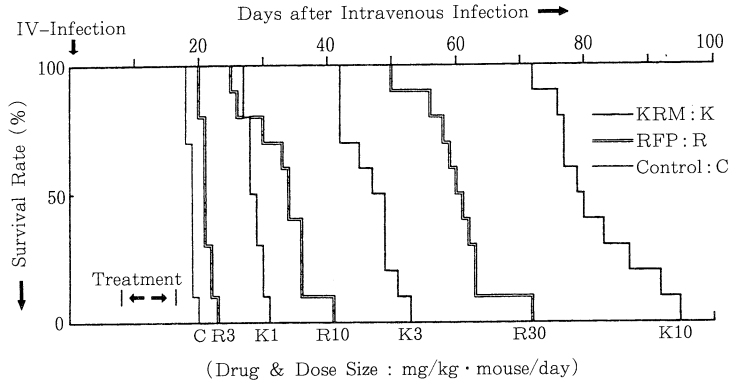


Fig. 1 Comparative evaluation of KRM and RFP in the survival days of the IV-model mice that received oral treatment for 10 days. BALB/c mice were infected with 1.0×10^6 cfu of *M. bovis* Ravenel. Treatment was started from the 8th day post-infection.

治療：第1実験では、IV感染群はKRM, RFPで、IT感染群はKRM, RFP, RBTで治療を行った。KRMとRBTは1, 3, 10mg/kg/day, RFPは3, 10, 30mg/kg/dayの各用量を感染第8日から連続10日間投与した。第2実験では、KRM, RFP, RBTの3薬剤を、KRMとRBTは、3, 10mg/kg/day, RFPは10, 30mg/kg/dayの各用量で、感染第11日から連続10日間投与した。各薬剤は上述の方法で調製した薬液0.2ml/マウスを経口ゾンデ(φ0.9×L70mm; 夏目製作所)を用いて毎日経口投与した。無治療対照群には薬剤を含まないアラビアゴム・Tween-80懸濁液を同様に投与した。

臓器内菌数の算定：第1実験では、IT感染動物について、対照群は感染1日目、治療開始直前にあたる7日目および約半数が死亡した15日目に、各治療群は投薬終了後3日目(感染20日目)にそれぞれ2匹ずつ解剖し、肺内菌数を測定した。第2実験では、IT, IV感染動物について、対照群は感染1日目、治療開始直前にあたる10日目およびIV感染動物では投薬終了後3日目にあたる感染23日目、IT感染動物では死亡の始まった感染19日目に、各治療群は治療終了後3日目、20日目、40日目に各3匹を解剖し、肺、肝、脾の臓器内菌数を測定した。摘出した臓器は秤量後ガラスホモジナイザー(岩城硝子)で摩砕し、冷却滅菌精製水で10倍希釈系列を作成した。各希釈系列を2本の1%小川培地にそれぞれ0.1mlずつ接種し、3~4週間37℃水平位置で培養後、各2本の培地の検出コロニーの平均値を基に臓器内総cfuを算定した。

“減少 \log_{10} CFU”：投薬開始直前対照群の臓器内総菌数の対数値の平均から、各治療群の治療終了後3日目の

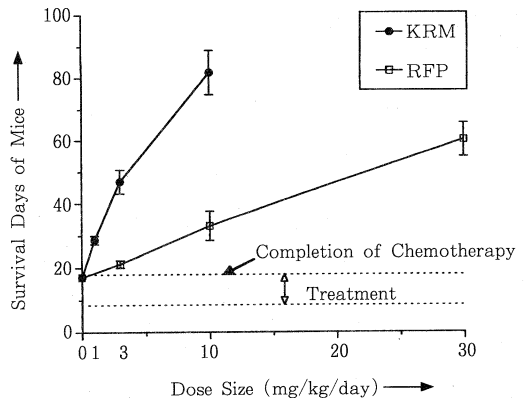


Fig. 2 Dose-response curves of KRM and RFP based on the correlation between dose sizes and mean survival days of the IV-model mice (mean \pm SD; n=10) of *M. bovis* Ravenel infection.

臓器内総菌数の対数値の平均を引いた値を“減少 \log_{10} CFU”(菌減少指数)と定義し、各薬剤の効果判定の指標とした。

結果

第1実験：*M. bovis* Ravenel株をITまたはIV感染し、感染第8日目からKRM, RFPまたはRBTを毎日10日間経口投与し、生存日数を無治療対照群と比較した。またIT感染系では対照群と治療各群との肺内cfuを比較した。

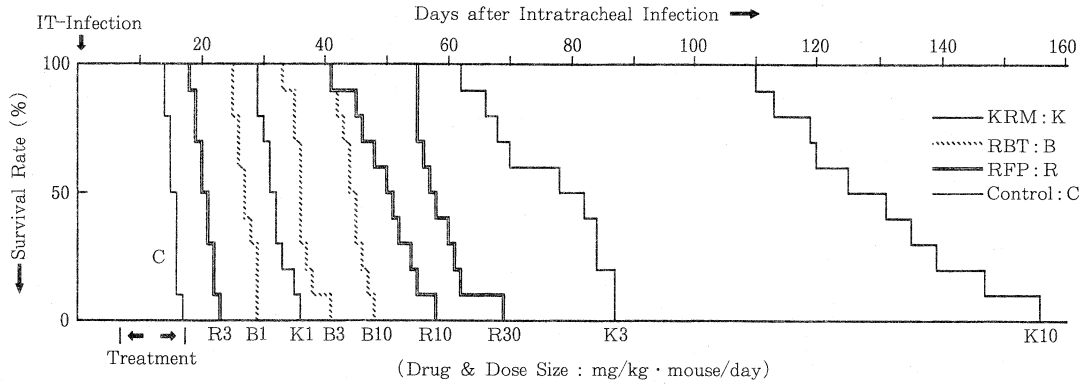


Fig. 3 Comparative evaluation of KRM, RFP and RBT in the survival days of the IT-model mice that received oral treatment for 10 days. BALB/c mice were infected with 1.0×10^6 cfu of *M. bovis* Ravenel. Treatment was started from the 8th day post-infection.

Table Correlation between the mean survival days and CFU counts in the lungs of the IT-model mice

Drug	Dose (mg/kg-mouse/day)	Mean survival days (mean \pm SD; n=10)	Log ₁₀ cfu/lungs (n=2) ^{a)}
KRM	10	129.5 \pm 14.2	3.45
KRM	3	76.8 \pm 8.9	4.31
RFP	30	58.8 \pm 4.2	5.06
RFP	10	50.0 \pm 4.9	6.00
RBT	10	44.5 \pm 2.1	5.67
RBT	3	36.3 \pm 2.0	6.00
KRM	1	31.8 \pm 2.2	6.37
RBT	1	27.1 \pm 1.5	6.77
RFP	3	20.6 \pm 1.7	7.48
Early control ^{b)}		—	5.90
Late control ^{c)}		15.4 \pm 0.9	7.04

a) Two mice of each treatment group were sacrificed three days after the termination of chemotherapy.

b) Untreated control mice at the 7th day post-infection.

c) Mortality in the late control mice during chemotherapy were 90%.

(1) IV系

感染後の無治療対照群および各治療群マウスの生存曲線を Fig. 1 に示した。

各群のマウス平均生存日数 (mean \pm SD; n=10) は、KRM 1, 3, 10mg/kg/day 群でそれぞれ 28.7 \pm 1.3, 46.9 \pm 3.8, 81.8 \pm 7.0日; RFP 3, 10, 30mg/kg/day 群でそれぞれ 21.2 \pm 0.9, 33.1 \pm 4.6, 60.4 \pm 5.4日; 無治療対照群で 18.8 \pm 0.6日であった。

ヒト投与量にほぼ相当する 10mg/kg 治療群の比較では、KRM は RFP の 2.47 倍、3mg/kg 治療群では

RFP の 2.21 倍の生存日数を示した。3 薬剤間の優劣順位は、KRM \gg RFP \geq RBT であった。「投薬用量と平均生存日数の相関」を Fig. 2 に示した。KRM は 1~3 mg/kg の低用量でも高い治療効果を示し、RFP は 3~30mg/kg を通じて濃度依存的で直線的な相関を示した。

(2) IT系

感染後の各治療群マウスの生存率の推移を Fig. 3 に示した。また、薬剤用量別に平均生存日数と log₁₀cfu/

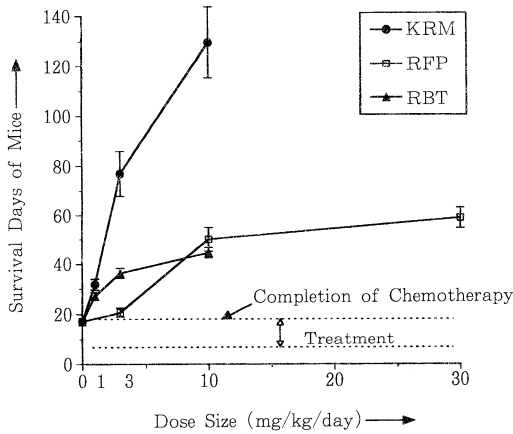


Fig.4 Dose-response curves of KRM, RFP and RBT based on the correlation between dose sizes and mean survival days of the IT-model mice (mean \pm SD; n=10) of *M. bovis* Ravenel infection.

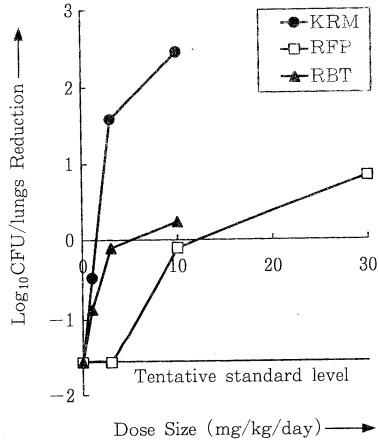


Fig.5 Dose-response curves of KRM, RFP and RBT based on the correlation between dose sizes and "log₁₀CFU reductions" in the lungs (n=2) of the IT-model mice of *M. bovis* Ravenel infection. The whole results were plotted according to the tentative standard level of the result at 3mg/kg dose of RFP.

肺とを Table に示した。10mg/kg 治療群で比較すると、KRM は RFP の 2.59 倍、RBT の 2.91 倍；3mg/kg 治療群では KRM は RFP の 3.73 倍、RBT の 2.12 倍の生存日数を示した。3 薬剤間の優劣順位は、KRM \gg RFP \geq RBT であった。また、KRM 10mg/kg は 2.45 log₁₀ cfu の菌数を減少させたが、RBT 10mg/kg 0.23 と RFP 10mg/kg -0.10 は 1/10 以内の cfu 減少にすぎなかった。

マウス平均生存日数と治療終了後 3 日目の肺内菌数との相関 (Table) では、RFP 10mg/kg と RBT 10mg/kg 治療群を例外として、生存日数の長さの順と肺内 cfu の少ない順とは一致した。

また、「投薬用量と平均生存日数の相関」および「投薬用量と「減少 log₁₀CFU」の相関」をそれぞれ Fig. 4 と Fig. 5 に示した。Fig. 5 では最も治療効果の低かった RFP 3mg/kg 治療群の「減少 log₁₀CFU」の位置を仮の基準に設定し全体の相関を求めた。

3 種類のリファマイシン誘導体についての 2 種類の相関を示す Fig. 4 と Fig. 5 は相似の形態となり、各薬剤に特徴的な「用量-反応曲線」が成立することが明らかになった。

KRM は IT と IV (Fig. 2) とともに同様の曲線を示し、感染経路の違いに関わらず 1~3mg/kg の低用量から高い肺内治療効果を示した。RFP は IV での直線的な相関 (Fig. 2) と異なり、IT では「S 字型 (sigmoid curve)」の曲線を示した。RBT は 1~3mg/kg の低用量では RFP を上回ったが、3~10mg/kg 用量では

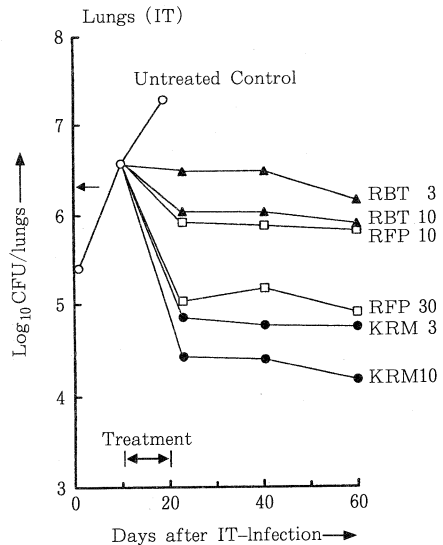


Fig.6 Bacterial loads of *M. tuberculosis* Kurono in the lungs of the IT-model mice treated with KRM, RFP or RBT. The standard deviations (SD; n=3) were less than 0.13 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

横這い傾向を示し、RBT 10mg/kg と RFP 10mg/kg はほぼ同等の治療効果を示した。

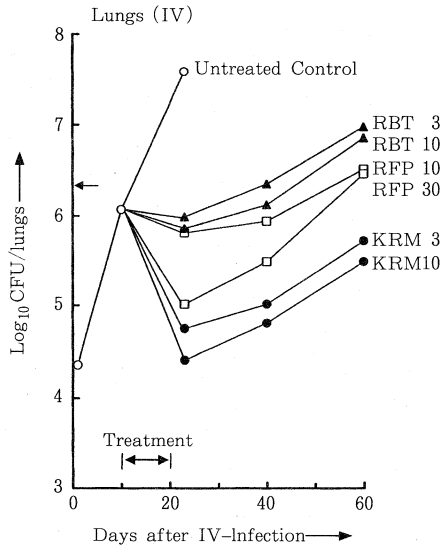


Fig. 7 Bacterial loads of *M. tuberculosis* Kuroko in the lungs of the IV-model mice treated with KRM, RFP or RBT. The standard deviations (SD; n=3) were less than 0.14 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

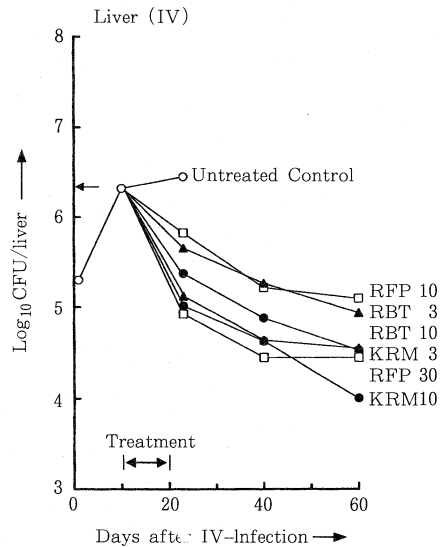


Fig. 8 Bacterial loads of *M. tuberculosis* Kuroko in the liver of the IV-model mice treated with KRM, RFP or RBT. The standard deviations (SD; n=3) were less than 0.13 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

第2実験：*M. tuberculosis* Kuroko 株を IT または IV 感染し、感染第11日目から KRM, RFP または RBT を毎日10日間経口投与し、治療終了3日目、20日目、40日目の肺、肝、脾の臓器内 cfu を治療開始前の各臓器内 cfu と比較した。

(1) 臓器別の3薬剤の治療効果の比較

以下の結果で括弧内に示した数値は“減少 \log_{10} CFU” (菌減少指数) である。

① IT 肺 (Fig. 6)

感染10日目の \log_{10} cfu/肺 6.57 ± 0.6 に対し、マウスが死亡し始めた19日目の対照群の \log_{10} cfu/肺は 7.28 ± 0.13 と増加していた (-0.71)。投薬終了後3日目の \log_{10} cfu は、KRM 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 4.85 ± 0.05 (1.72), 4.43 ± 0.12 (2.14); RFP 10mg/kg, 30mg/kg 群でそれぞれ 5.92 ± 0.12 (0.65), 5.03 ± 0.12 (1.54); RBT 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 6.48 ± 0.12 (0.09), 6.04 ± 0.02 (0.53) であった。

治療群間の優劣順位は、KRM10 > KRM 3 > RFP 30 > RFP10 \approx RBT10 > RBT 3 \approx 投薬前対照群であった。

10mg/kg 治療群の比較では、KRM は $2.14 \log_{10}$ cfu の菌数を減少させたが、RBT では 0.53, RFP では 0.65 の減少に留まった。

RBT 3mg/kg では投薬開始直前の cfu 値と差がなく静菌的な効果しか認められなかったのに対し、KRM 3mg/kg は RFP30mg/kg を僅かに上回る高い cfu 減少を示した。また、長期持続効果を比較する目的で、治療終了後20日目と40日目にマウス (n=3) の臓器内 cfu を測定したが、どの治療群でも肺内菌数は横這い状態を維持し、再増加は見られなかった。

② IV 肺 (Fig. 7)

投薬開始直前の \log_{10} cfu/肺は 6.07 ± 0.04 に対し、投薬終了後3日目の \log_{10} cfu/肺は、対照群で 7.58 ± 0.14 (-1.51); KRM 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 4.74 ± 0.09 (1.33), 4.40 ± 0.11 (1.67); RFP10mg/kg, 30mg/kg 群でそれぞれ 5.81 ± 0.06 (0.26), 5.01 ± 0.06 (1.06); RBT 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 5.99 ± 0.12 (0.08), 5.86 ± 0.03 (0.21) であった。

治療群間の優劣順位は、KRM10 > KRM 3 > RFP 30 > RFP10 \approx RBT10 \approx RBT 3 \approx 投薬前対照群。

10mg/kg 治療群の比較では、KRM は $1.67 \log_{10}$ cfu の菌数を減少させたが、RBT では 0.21, RFP では 0.26 の菌数減少に留まった。

RBT 3mg/kg では投薬開始直前の cfu 値と差がなく静菌的な効果しか示さなかったのに対し、KRM 3mg/kg は RFP30mg/kg を上回る治療効果を示した。

各治療群ともに治療終了後、菌は再び増殖を始め実験終了まで再増殖過程を持続した。

③ IV 肝 (Fig. 8)

投薬開始直前の \log_{10} cfu/肝は 6.32 ± 0.07 に対し、投薬終了後3日目の \log_{10} cfu/肝は、対照群で 6.45 ± 0.09 (-0.13); KRM 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 5.37 ± 0.04 (0.95), 5.01 ± 0.13 (1.31); RFP10mg/kg, 30mg/kg 群でそれぞれ 5.82 ± 0.06 (0.50), 4.92 ± 0.04 (1.40); RBT 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 5.65 ± 0.06 (0.67), 5.12 ± 0.06 (1.20) であった。

治療群間の優劣順位は、RFP30 \approx KRM10 \approx RBT10 > KRM3 > RBT3 > RFP10 > 投薬前対照群であった。

KRM 3mg/kg は RBT 3mg/kg と RFP10mg/kg を上回ったが、KRM10mg/kg と RBT10mg/kg, RFP30mg/kg は同等の治療効果を示した。

各治療群とも治療終了後も菌数は漸減傾向を持続したが、RFP10, KRM3, RFP30では治療終了後20日と40日では横這い状態となった。

④ IV 脾 (Fig. 9)

投薬開始直前の \log_{10} cfu/脾は 6.05 ± 0.02 に対し、投薬終了後3日目の \log_{10} cfu/脾は、対照群で 6.23 ± 0.15 (-0.18); KRM 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 4.99 ± 0.15 (1.06), 4.62 ± 0.15 (1.43); RFP10mg/kg, 30mg/kg 群でそれぞれ 5.64 ± 0.04 (0.41), 4.77 ± 0.07 (1.28); RBT 3mg/kg, 10mg/kg 群でそれぞれ 5.37 ± 0.09 (0.68), 4.66 ± 0.07 (1.39) であった。治療群間の優劣順位は、RFP30 = KRM10 \approx RBT10 > KRM3 >

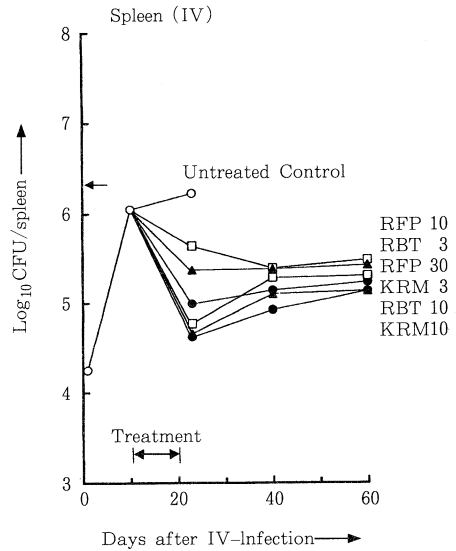


Fig. 9 Bacterial loads of *M. tuberculosis* Kuroko in the spleen of the IV-model mice treated with KRM, RFP or RBT. The standard deviations (SD; n=3) were less than 0.15 in every experiments. Arrow indicates the size of infection.

RBT3 > RFP10 > 投薬前対照群であった。

KRM 3mg/kg は RBT 3mg/kg と RFP10mg/kg を上回ったが、KRM10mg/kg と RBT10mg/kg,

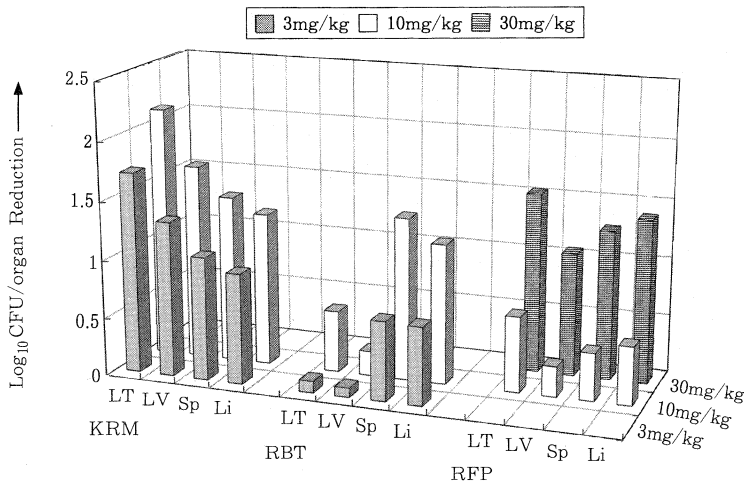


Fig. 10 Characteristic *in vivo* activity patterns of each rifamycin, observed irrespective of the doses. Each bar represents " \log_{10} CFU reduction" in organs (n=3) after three days of completion of chemotherapy. LT: lungs of the intratracheal infection model; LV: lungs, Sp: spleen and Li: liver of the intravenous infection model.

RFP30mg/kg はほぼ同等の治療効果を示した。

治療終了後、菌は再び増加ないし横這い状態となり、治療終了40日目にはどの治療群でも $\log_{10}cfu$ が 5.0~5.5 付近に収束し、各治療群の間ではほとんど差が認められなかった。

(2) 薬剤別の治療効果の比較 (Fig. 10)

各薬剤の肺、肝、脾での“減少 $\log_{10} CFU$ ”の結果に基づき、薬剤別の *in vivo* 活性を Fig. 10 に示した。各リファマイシン誘導体に特徴的な臓器特異的な治療効果が認められた。

① KRM は 3mg/kg, 10mg/kg 群ともに肺内治療効果が最も高く、IT 肺 > IV 肺 > IV 脾 > IV 肝の順位であった。

② RBT は 3mg/kg, 10mg/kg 群ともに脾、次いで肝での治療効果が最も高く、IV 脾 \geq IV 肝 \gg IT 肺 > IV 肺の順位であった。

③ RFP は IV 系の内部では肝 > 脾 > 肺の順位で、肺内治療効果が最も低かったが、IT 肺は 10mg/kg, 30mg/kg 群ともに IV 肝を上回り、IT 肺 > IV 肝 > IV 脾 > IV 肺の順位であった。

考 察

(1) リファマイシン誘導体について

KRM は、他のリファマイシン系の新薬 rifabutin (RBT)^{24)~28)}、FCE-22807²⁹⁾ 等が RFP よりも優れている菌数減少の達成レベルをさらに大幅に上回っており、現在最も有望視されている抗酸菌治療薬のひとつである。

これまでの報告によると、KRM は、結核菌に対しては RFP の少なくとも 10 倍以上の *in vitro* 抗菌力活性を示し^{4) 6) 14) 15) 17) 20)}、*M. avium-intracellulare* complex に対しては結核菌に対するよりも強い試験管内抗菌力を有すること^{4) 6) 8) 10)}、実験感染モデル動物に対する *in vivo* 治療実験でも、結核菌^{5) 12) 15) 16)} および *M. avium-intracellulare* complex^{5) 7) 9) 11) 13) 18) 19)} に対し RFP よりも優れた治療効果を示すことが明らかにされている。また、Hirata 等は、KRM は RFP と交叉耐性があるが、RFP 低度耐性の結核菌に対してはその発育を阻止し得ることを報告している¹⁵⁾。

体内動態に関しては、KRM は肺内での半減期が長く、長期持続型の治療効果を示す点が特徴とされているが、KRM の肺への移行濃度は RFP と比較して必ずしも高値を示すわけではない^{1)~3)}。それに関わらず、KRM が強力な肺内抗菌力を発揮する理由として、何よりも KRM の MIC 値の低さが挙げられる^{4) 6) 14) 15)}。

また、マウス経口投与後、RFP は肝へは肺の 6 倍^{1) 30)}、KRM は脾へ肺の 2 倍濃度以上移行することがすでに知

られているが¹⁾、Fig. 10 に示した通り KRM は明らかな「肺重点型」の治療効果を示し、RFP も IT 系では肺内治療効果の高い薬剤である。すなわち、臓器内での薬剤濃度の高低と当該臓器における薬剤の *in vivo* 治療効果とは必ずしも相関しないことになる。

KRM, RFP, RBT の 3 薬剤が同じリファマイシン誘導体に属するにも関わらず、*in vivo* においては全く異なる「臓器特異的な治療効果パターン」を示し、特に KRM が感染経路に関わらず明らかな「肺重点型」の治療薬であることを見出した今回の結果は、肺結核を主対象とする結核化学療法において、KRM が今後重要な地位を占める可能性を示唆している。同時に、KRM が RFP, RBT 対比 1/3 の投与量で同等以上の治療効果を示した事は、Dickinson が RFP の間欠投与実験で示したような「増量間欠投与」³¹⁾ではなく、「少ない投薬用量による間欠治療」実現の可能性を示唆しており、さらには治療期間短縮の可能性についても期待が持たれる。

また、今回の実験結果から、RBT が開発後 10 余年を経てもいまだに評価が確定されず、治療薬としての地位が定まらない背景要因のひとつは RBT が「脾臓・肝臓重点型」の治療薬であり、肺内治療効果においては RFP と同程度であることによることを指摘することができたと考える。それに関わらず RBT も数少ない優れた抗酸菌治療薬のひとつであり、各薬剤の抗菌力の特徴を活かした臨床応用が望まれる。近年、AIDS 患者を主対象に、MAC 発病予防あるいは播種型 MAC の治療のために、単独または他剤との併用で RBT を適用した臨床治験報告が散見されるようになった^{32)~36)}。こうした全身播種型の抗酸菌症に対しては、RBT は有効な治療薬となる可能性が高いと思われる。

(2) 短期治療実験の結果について

Yamamoto ら¹⁷⁾ は H37Rv の IV 感染モデルに対する 40 日間治療後のマウス生存日数の比較で、KRM は 1~3mg/kg の低濃度でも RFP 3, 10mg/kg を凌ぐ延命治療効果を示し、KRM 10mg/kg が RFP 30mg/kg を上回ったことを報告している。Yamamoto らの結果¹⁷⁾ は、今回の Ravenel 株を用いた IV 系の結果と多く的一致点が認められ、KRM が RFP 対比で 1/3 以下の投与量で同等の治療効果を示すという結論についても同様であった。

Fig. 4 と Fig. 5 に示した各薬剤に特徴的な用量-反応曲線は; (a) Table に示した RFP 10mg/kg と RBT 10mg/kg の例外的な順位が、RFP と RBT に特徴的な 2 種類の用量-反応曲線に基づく現象であったこと、(b) 投薬用量の設定条件によっては RBT と RFP の優劣順位が逆転する場合があります、(c) RBT は

1mg/kg/day 付近の少ない投薬用量では比較的 KRM に近い肺内治療効果を示すこと、(d) RFP が IV 系と IT 系で示した異なる用量-反応曲線は、感染経路の異なる実験系では投薬用量と治療効果が必ずしも同一の相関を示さないことを示唆している。

この RFP の IV 肺「直線的な相関」と IT 肺「S 字型の相関」の用量-反応曲線を特徴付けているのは、RFP 3mg/kg 投与の治療効果の有無である。経気道感染に近いモデル実験の例として、吸入感染装置を用いた Erdman 株の微量菌 (10^3 cfu/マウス) 感染モデルで KRM, RBT, RFP, RPT (rifapentine) の肺内治療効果を比較した Kelly 等³⁷⁾ は、RFP2.5, 5.0mg/kg 治療群が無治療対照群と差がないことを示している。他方、IV 感染モデルを用いた Yamamoto¹⁷⁾, Hirata¹⁵⁾ らの報告では、RFP2.5~5mg/kg 治療群が有意の治療効果を示している。以上の報告を照合すると、RFP が示した 2 種類の「用量-反応曲線」は感染経路の異なるモデル実験系それぞれについてのかかなり正確な傾向を反映していると考えられる。

第 2 実験の Kurono 感染系において、肺内治療効果で KRM が最も優れ、RBT が RFP を僅かに下回るほぼ同等の肺内治療効果を示したが、この結果は強毒結核菌 Erdman 株の IV 感染モデルを用いた Klemens¹²⁾ らの報告と一致した。

この Kurono 株を用いた実験結果では、IT 系において IV 系に比べ肺内治療効果が高かったこと、また治療終了後の肺内 cfu の経時的推移が IT 系と IV 系で明らかに異なるという 2 つの点で特徴的であった。これら 2 つの特徴は、Ravenel 実験系の IT モデルが平均生存日数の比較において全体的に IV モデルを上回った傾向と符号する。すなわち、Ravenel 感染系の治療終了後における IT と IV の肺内 cfu も、Kurono 感染系の IT と IV の肺内 cfu と同じように推移していたと推定される。IT は肺を律速段階とする感染系であるので、IV に比べ薬剤相互の肺内治療効果の違いがより明確に反映されると考えられる。

Kurono 感染モデルの脾臓で、投薬終了後 20~40 日目に 3 薬剤計 6 種類の治療群が同一菌数 $5.0 \sim 5.5 \log_{10}$ cfu に収束した理由は不明である。従来、IV 感染モデルにおいて脾臓は最も薬剤に対する応答性の悪い臓器のひとつとされ、またそれ故に persister を模したモデル実験系として用いられてきた経緯がある。今回の治療終了後の IV 脾内 cfu の推移は Cornell モデルに代表される既存の方法論^{38) 39)} の背景を再確認する結果となった。なお、IT 系の脾と肝での治療効果については、KRM 治療群が検出限界以下を示し、3 薬剤相互の比較評価が成り立たないので詳細なデータは示さなかったが、IV

の脾・肝とはほぼ同様の cfu の推移を示した。

今回のように IT モデルと IV モデルを同時並行で実施し、複数のパラメーター相互の相関を基にして各薬剤に特徴的な「用量-反応曲線」を求め、“減少 \log_{10} CFU/臓器” (菌減少指数) に基づいて「各薬剤の *in vivo* 活性の特徴」の全体像を追究する方法は、化学療法剤の *in vivo* 評価の方法として新しい試みとして積極的な意義があると考えられる。

今回示した、各リファマイシン誘導体に特徴的な「用量-反応曲線」、「*in vivo* 活性パターン」は、ともに 10 日間という極めて短期間の投薬条件下で見られる特徴であり、長期治療実験では異なる結論が得られる可能性もある。Klemens らは Erdman 株感染マウスに対する週 5 回 4 週間のリファマイシン投与の結果、脾内の治療効果の優劣順位が $KRM > RBT > RFP$ であることを報告しており¹²⁾、本報告の内容 ($KRM = RBT > RFP$) と違っていた。これは感染菌株と治療期間の違いによるものと推定される。

(3) 治療実験系のデザインについて

今回の第 1 実験では、まず、同時並行で実施した IT と IV の対照群マウスの平均生存日数に有意差が出ない最も強力な「急性感染モデル」を作成する必要があったため、マウスに対する毒力がヒト型結核菌よりも明らかに強いウシ型結核菌 Ravenel 株を使用した⁴⁰⁾。続く第 2 実験では、KRM がヒトへの臨床応用を目的とする抗結核薬なので本来の目的に沿ってヒト型結核菌を使用した。予備実験でマウスに対し強い毒力を発揮する結核菌株ほど治療効果が高く出る傾向があることを把握していたので、長年の継代保存で弱毒化した H37Rv 株⁴¹⁾ ではなく、強毒のヒト型結核菌 Kurono 株を採用した^{15) 42)}。

これら強毒結核菌株を大量に感染させた実験系で、ごく短期間の治療を行い、薬剤相互の *in vivo* 治療効果を比較して適切な投薬用量を求める方法論は、かつて Kradolfer が RFP 開発の基礎研究段階で定式化した報告⁴³⁾ を参考に独自にデザインしたものである。

化学療法剤の治療効果を追究するための実験系としては、近交系マウスの尾静脈感染モデルを用いた報告例が多いが^{11) ~ 13), 15) ~ 19), 25) 26) 28) 29) 39) 40)}、本来は可能な限りヒトの肺結核を模した「肺感染モデル」の実験系で実施すべきであろう。特に、脾臓と肝臓に大量の菌が分布する IV 感染モデル系を用いて脾臓内の治療効果に重点を置く実験系を組んだ場合、Fig.10 で示した通り、RBT のように脾内で優れた抗菌力活性を示す薬剤が脾内でも同様の優れた治療効果を示すとは限らないので、時として薬剤相互の比較評価を誤る可能性がある。

本報告で用いた経気道感染の方法は、エロゾル吸入感染法と比較して、特別な設備を要することなく、動物を簡易麻酔後、口腔内から気管支經由で菌液を直接肺内に定量的に注入する安全性の高い方法である。この方法と尾静脈感染モデルとの比較については別報²¹⁾にて詳述した。

ま と め

(1) *M. bovis* Ravenel 感染モデル系

- ① 10日間治療後のマウス平均生存日数：KRMはIV系でRFP対比2.21~2.47倍、IT系でRFP対比2.59~3.73倍、RBT対比2.12~2.91倍の生存日数を示した。
- ② IT系の「投薬用量と平均生存日数」, 「投薬用量と“減少log₁₀CFU/肺”」との相関：KRM, RFP, RBTは各薬剤に特徴的な「用量-反応曲線」を示した。

(2) *M. tuberculosis* Kurono 感染モデル系

- ① 肺における治療効果は、IT, IVともにKRMが最も優れ、KRMはRFPおよびRBT対比1/3の投与量で同等もしくはそれ以上の治療効果を示した。RFPとRBTの治療効果は同等だった：KRM ≧ RFP ≧ RBT。
- ② 脾臓と肝臓における治療効果では、KRMとRBTともにRFPを上回ったが、KRMとRBTの治療効果は同等だった：KRM=RBT>RFP。
- ③ 各臓器における“減少log₁₀CFU”の結果を基に、「各リファマイシン誘導体に特徴的な *in vivo* 抗菌力パターン」が得られた。
KRM : IT肺 > IV肺 > IV脾 > IV肝
RBT : IV脾 > IV肝 > IT肺 > IV肺
RFP : IT肺 > IV肝 > IV脾 > IV肺
- ④ KRMは感染モデル系の違いに関わらず「肺重点型」、RBTは「脾臓・肝臓重点型」の治療効果を示した。

謝 辞

本研究は大阪市立大学医学部細菌学教室 矢野郁也教授の御指導のもとに行われた。矢野教授の終始変わらぬ御指導と御鞭撻に深甚な感謝を捧げます。

適切な助言を与えて下さった結核予防会結核研究所 故岩崎龍郎名誉所長、故豊原希一博士、薬剤を御提供頂いた(株)鐘淵化学工業、(株)Pharmacia & Upjohn、(株)第一製薬の各社に感謝いたします。

本研究の要旨は、第67, 68, 69回日本結核病学会総会、および28th World Conference of IUATLD/UICT MR (1994年6月; ドイツ, マインツ) で発表した⁴⁴⁾。

文 献

- 1) Yamane T, Hashizume T, Yamashita K, et al.: Synthesis and biological activity of 3'-hydroxy-5'-aminobenzoxazinorifamycin derivatives. *Chem Pharm Bull.* 1993; 41: 148-155.
- 2) Hosoe K, Konishi E, Hidaka T, et al.: High-performance liquid chromatographic determination of 3'-hydroxy-5'-(4-isobutyl-1-piperazinyl) benzoxazinorifamycin (KRM-1648) and its deacetyl metabolite in plasma, whole blood, urine and tissue samples in rats. *J Chromatogr B.* 1994; 653: 177-186.
- 3) Hosoe K, Mae T, Konishi E, et al.: Pharmacokinetics of KRM-1648, a new benzoxazinorifamycin, in rats and dogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2749-2755.
- 4) 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: 31-36.
- 5) 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.
- 6) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: *In vitro* antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 542-547.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Emori M, Saito H, Sato K, et al.: Therapeutic efficacy of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 against experimental *Mycobacterium avium* infection induced in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37: 722-

- 728.
- 10) Inderlied CB, Barbara-Burnham L, Wu M, et al.: Activities of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 and ethambutol against *Mycobacterium avium* complex in vitro and in macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 1838-1843.
 - 11) Bermudez LE, Kolonoski P, Young LS, et al.: Activity of KRM-1648 alone or in combination with ethambutol or clarithromycin against *Mycobacterium avium* in beige mouse model of disseminated infection. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 1844-1848.
 - 12) Klemens SP, Grossi MA, Cynamon MH: Activity of KRM-1648, a new benzoxazinorifamycin, against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 2245-2248.
 - 13) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: Therapeutic effect of KRM-1648 with various antimicrobials against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. Tubercle and Lung Dis. 1995; 76: 51-58.
 - 14) Luna-Herrera J, Reddy MV, Gangadharam PRJ, et al.: In vitro activity of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 against drug-susceptible and multidrug-resistant tubercle bacilli. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 440-444.
 - 15) 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.
 - 16) Klemens SP, Cynamon MH: Activity of KRM-1648 in combination with isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 298-301.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) Baohong JI, Lounis N, Truffot-Pernot C, et al.: How effective is KRM-1648 in treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 437-442.
 - 20) Mor N, Simon B, Heifets L: Bacteriostatic and bactericidal activities of benzoxazinorifamycin KRM-1648 against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in human macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 1482-1485.
 - 21) 土井教生: 実験のマウス抗酸菌症の経気道感染モデルの開発, 尾静脈感染モデルとの比較. 結核. ; 現在投稿中.
 - 22) Youmans GP: Subsurface growth of virulent human tubercle bacilli in a synthetic medium. Proc Soc Exp Biol Med. 1944; 57: 122-125.
 - 23) Green CG, Knight J, Precious S, et al.: Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. Laboratory Animals. 1981; 15: 163-170.
 - 24) Brogden RN, Fitton A: Rifabutin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs. 1994; 47: 983-1009.
 - 25) Orme IM: Antimycobacterial activity *in vivo* of LM427 (rifabutin). Am Rev Respir Dis. 1988; 138: 1254-1257.
 - 26) Klemens SP, Grossi MA, Cynamon MH: Comparative *in vivo* activities of rifabutin and rifapentine against *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 234-237.
 - 27) Heifets LB, Lindholm-Levy PJ, Flory MA: Bactericidal activity *in vitro* of various rifamycins against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis. 1990; 141: 626-630.
 - 28) Saito H, Sato K, Tomioka H: Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and

- rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle*. 1988; 69: 187-192.
- 29) Dhillon J, Dickinson JM, Guy JA, et al.: Activity of two long-acting rifamycins, rifapentine and FCE 22807, in experimental murine tuberculosis. *Tubercle and Lung Dis*. 1992; 73: 116-123.
- 30) 長崎泉吉, 岸 俊子, 高島俊弘, 他: Rifampicin (RFP) の吸収, 排泄および体内分布に関する研究. 診療. 6月臨時増刊号. 1970; 23: 961-968.
- 31) Dickinson JM, Mitchison DA: Suitability of rifampicin for intermittent administration in the treatment of tuberculosis. *Tubercle*. 1970; 51: 82-94.
- 32) Nightingale SD, Cameron DW, Gordin FM, et al.: Two controlled trials of rifabutin prophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. *N Engl J Med*. 1993; 329: 828-833.
- 33) Gonzalez-Montaner LJ, Natal S, Yongchaiyud P, et al.: Rifabutin for the treatment of newly-diagnosed pulmonary tuberculosis: a multinational, randomized, comparative study versus rifampicin. *Tubercle and Lung Dis*. 1994; 75: 341-347.
- 34) Schwander S, Rüscher-Gerdes S, Mateega A, et al.: A pilot study of antituberculosis combinations comparing rifabutin with rifampicin in the treatment of HIV-1 associated tuberculosis. *Tubercle and Lung Dis*. 1995; 76: 210-218.
- 35) Havlir DV, Dube MP, Sattler FR, et al.: Prophylaxis against disseminated *Mycobacterium avium* complex with weekly azithromycin, daily rifabutin, or both. *N Engl J Med*. 1996; 335: 392-398.
- 36) Dautzenberg B, Castellani P, Pellegrin JL: Early bactericidal activity of rifabutin versus that of placebo in treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 1722-1725.
- 37) Kelly BP, Furney SK, Jessen MT, et al.: Low-dose aerosol infection model for testing drugs for efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 2809-2812.
- 38) MacCune RM, Tompsett R: The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique II. *J Exp Med*. 1956; 104: 763-802.
- 39) Dhillon J, Dickinson JM, Sole K, et al.: Preventive chemotherapy of tuberculosis in Cornell model mice with combinations of rifampin, isoniazid, and pyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 552-555.
- 40) Dunn PL, North RJ: Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect Immun*. 1995; 63: 3428-3437.
- 41) Steenken W, Gardner LU: History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc*. 1946; 54: 62-66.
- 42) 豊原希一: マウス実験結核症による短期化学療法のモデル実験. 結核. 1979; 54: 369-374.
- 43) Kradolfer F, Schnell R: Incidence of resistant pulmonary tuberculosis in relation to initial bacterial load. Rifampicin and INH in experimental tuberculosis. *Chemotherapy*. 1970; 15: 242-249.
- 44) Doi N, Aoki M: Benzoxazinorifamycin KRM-1648, therapeutic efficacy against experimental murine tuberculosis. *Tubercle Lung Dis. Suppl 1*. 1994; 75: 35.