

第77回総会特別講演

新しい抗結核薬開発の展望

富岡 治明

キーワード：抗結核薬，薬剤スクリーニング，薬剤標的，結核菌，*Mycobacterium avium complex*

はじめに

肺結核の化学療法においては，多剤耐性菌による難治性肺結核の治療や短期化学療法あるいはそれに伴う再発の防止を考える上で，またAIDSなどでの宿主免疫能の低下に起因する結核や *Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症の増加や難治化に対処するためにも，既存のものよりも強力かつ交差耐性のない新しい抗菌薬の開発が急務である。今回は，主に結核に対する化学療法剤開発の現状とその展望について概説する。まず，抗マイコプラズマ抗生剤としてのリファマイシン，キノロン，マクロライドに関連した1999年以降の新知見を中心に述べるが，それ以前の知見については著者の別の総説^{1)~3)}を参照されたい。本稿では，主にその他の新規抗結核薬の開発の現状について詳しく触れ，さらにこうした新規抗結核薬の開発に関連しての教室の取り組みの一端を紹介したい。

1. リファマイシン，キノロンおよびマクロライドに関連した主な新知見

(1) リファマイシン

新リファマイシンとしては，rifabutin (RBT)，rifapentine (RPT)，rifalazil (RLZ: 旧名 KRM-1648)，ならびに FCE22250 などの種々の薬剤が開発されあるいはその途上にある。最近 RBT については，AIDS ウイルスに対する HAART 療法との併用レジメンが AIDS 患者での結核や MAC 症に有効であることが⁴⁾，また RLZ については，マクロファージ (Mφ) 内局在菌に対して優れた殺菌力を有しており，結核菌に対してはキノロンとの間に，MAC に対しては clarithromycin (CAM) との間に併用効

果が認められることが⁵⁾報告されている。RLZ については，現在米国で ActivBiotics 社により第Ⅱ相臨床試験が進められようとしている。なお，結核症に対する RLZ の臨床治療効果についての最近の報告では，RLZ の週1回投与+INH の1日1回投与レジメンは，RFP，INH 各1日1回投与レジメンに比べて，①喀痰中への排菌抑制効果が増強していること，②殺菌効果は同レベルであること，さらに，③副作用は軽度であることなどが明らかにされている⁶⁾⁷⁾。

(2) キノロン

近年，多くのフルオロキノロンが開発されてきているが，特に抗酸菌感染症への適用という観点からは，levofloxacin (LVFX)，ciprofloxacin (CPFX)，sparfloxacin (SPFX) などが挙げられる。これらキノロンは，米国を中心に多剤耐性結核などの難治性結核に対する併用療法に適用されている。最近では，moxifloxacin (MXFX)，gatifloxacin (GFLX)，sitafloxacin (STFX)，DQ-113，さらに MXFX と同様に 8 位に methoxy 基を導入し gyrase A 変異によるキノロン耐性菌に対する抗菌力を高めた PD161148 などの開発が進められている。ところが，①グラム陽性菌に対する抗菌力に優れる WQ-3034 や HSR-903 の抗酸菌に対する抗菌力は LVFX よりも劣っており，グラム陽性菌に対する抗菌力と抗酸菌に対する抗菌力は常に連動するという訳ではないこと⁸⁾⁹⁾，②同じキノロン間では交差耐性があり，薬剤耐性菌の出現が問題であること¹⁰⁾，③post antibiotic effect は，RFP の 1/10 以下であること¹¹⁾，④Mφ内局在結核菌に対しては，リファマイシンや INH との間に併用効果が認められるものの¹²⁾，MAC に対するキノロンの抗菌力は，リファマイシンや CAM との併用で減弱する傾向があること⁵⁾などが報告

されてきており、こうした抗結核薬・抗MAC薬としてのキノロンの問題点がやや気に掛かるところである。

なお実験的マウス結核症に対しては、INH+RPTにMXFXを加えたレジメンは、INH+RPT+SMのレジメンより優れた活性を有しており、治療終了後の再発率も低く、MXFXはSMの代わりにfirst line drugになり得る可能性があること¹³⁾、また最近、SPFX+KM+THのレジメンが、初回標準方式の治療に失敗したMDR-TBに有効であること¹⁴⁾が報告されているが、他方、MDR-TB患者よりの分離株の51%はCPFXやOFLXに耐性であり、これらのキノロンはもはや結核の2nd line drugとしても有用ではないのではないかと考える研究者もいる¹⁵⁾。いずれにしても、わが国を含めてキノロンの抗結核薬への応用研究は、抗結核薬としての需要の少なさ、薬価の低さ、さらに、一般に副作用は軽度であるとは言うものの、長期投与に伴って派生する耐性菌の出現や蓄積毒性などの問題も絡み、若干手詰まりな状況にあることも否めない。

(3) マクロライド

CAMをはじめとして、azithromycin (AZM)、roxithromycin (RXM)などが、MACに対する抗菌活性に優れており、AIDS患者での菌血症を伴う全身播種性MAC症の治療・予防に有効である。また後述するごとく、telithromycinやABT-773などのnew ketolideにも、マウスMAC感染症に対してCAMと同等あるいはそれ以上の治療効果が報告されている。

特に、CAMについては、①INH+RFP+EBの組み合わせにCAMと14-hydroxy CAMとを併用することにより、多剤耐性結核菌に対しての抗菌力が相乗的に増強されること¹⁶⁾、②M ϕ 内局在MACに対しては、CAMとリファマイシン (RFP, RLZ) との組み合わせでの優れた併用効果が認められること⁵⁾、③AIDS患者へのCAMまたはAZM単独、あるいはAIDSウイルスに対するHAART療法とAZMとの併用投与は、播種性MAC症の発症予防に有効であること¹⁷⁾などが報告されている。

2. その他の新規抗結核薬の開発状況

(1) 米国での抗結核薬 screening project

米国のTuberculosis Drug Screening Programグループが実施している大々的な新規抗結核薬 screening projectが注目に値する¹⁸⁾。このプロジェクトでは、その第1段階で*in vitro*系でのスクリーニングを行っているが、計46,633の化合物より出発し、培地中での菌の増殖阻害活性 (PI値: % inhibition)、次いでMIC値、さらにselectivity index (IC₅₀/MIC: IC₅₀はVero細胞に対する細胞毒性のパラメーター)を指標として、結核菌に対する抗菌力に優れ、かつ細胞毒性の少ない453種類の薬剤に絞り込み、

次のステップに進んでいる。第2段階では、M ϕ infection assay系でのスクリーニングで、結核菌感染M ϕ を供試薬剤を含む培地中で1週間培養し、M ϕ 内生残菌のCFUを2オーダー減少させるような薬剤濃度を測定し、次のステップへ進む薬剤を絞り込んでいる。さらに第3段階では、結核菌を経気道感染させたマウスを用いての*in vivo*スクリーニングで、感染3週後より薬剤を投与し、10週後での肺内CFUの減少が、0.7オーダー以上の場合を“active”と判定している。こうした方法で最終的に抗結核薬として有望な53種類の薬剤がスクリーニングされてきている。

このような大々的なスクリーニング以外にも、これまで多くの研究者により種々の新規抗結核薬のスクリーニング・開発が進められてきており、Medlineで調べたかぎりでも、結核やMACに抗菌力を有する30種類以上の化合物が報告されている。

(2) 開発中の新規抗結核薬および抗MAC薬

Table 1~3には、現在開発中の薬剤の中で抗結核薬あるいは抗MAC薬として有望そうなものをリストアップした。Table 1に挙げたものの中では、oxazolidinone, nitroimidazole, PZA誘導体 (特にpyrazinoic acid ester)などが特に有望な薬剤である。いずれも結核菌に有効 (MIC=0.08~1 μ g/ml)であるが、特にoxazolidinoneについては、①結核菌に対するMIC値ではeperezolidの0.25 μ g/mlからPNU-100480 (Fig. A)の1 μ g/mlと比較的抗菌力に優れること、②結核菌感染マウスに投与した場合は、PNU-100480 (100 mg/kg)が最も優れた治療効果を示し、これはINH (25 mg/kg)に匹敵すること、さらに、③PNU-100480とINH, RFPとの間には併用効果が認められることが報告されている¹⁹⁾。なお、nitroimidazole (CGI 17341) (Fig. B)は多剤耐性結核菌にも有効であり注目に値する。

次に、Table 2に挙げたものの中ではamoxicillin (AMPC)やceftriaxoneなどの β -ラクタム剤とclavulanic acid (CVA)やsulbactamなどの β -lactamase阻害剤との併用レジメンが多剤耐性結核菌に有効である (AMPC+EB [sub MIC]+CVA併用でのAMPCのMIC₉₇は \leq 0.5 μ g/ml²⁰⁾。さらに、2-pyridone, pyrrole誘導体 (BM212)や真菌や原虫に有効なmiconazole, niclosamideが、結核菌に対しても強い抗菌力を有しており有望である (MIC=0.016~6.2 μ g/ml)。特に2-pyridone (ABT-255) (Fig. C)については、RFP耐性菌結核菌に対してもMICが0.016~0.032 μ g/mlとかなり抗菌力が強く、またRFP耐性結核菌によるマウス結核症に対しても優れた治療効果を示しており²¹⁾、今後の動向が注目される。

Table 3に挙げたものの中では、新riminophenazineが、

Table 1 Promising new antimicrobial agents with activity against *M. tuberculosis* (MTB) and MAC (1)

Agents	Remarks	References
Oxazolidinone analogues		
DuP-105, DuP-721 U-101603	Active against MTB (MIC ₉₀ =0.5 µg/ml)	Ashtekar, 1991 Barbachyn, 1996
PNU-100480, linesolid (oral oxazolidinone)	Active against MTB (MIC=0.5-1 µg/ml) Active against MTB infection in mice (therapeutic efficacy: PNU-100480>linesolid) Active against <i>M. fortuitum</i> and <i>M. chelonae</i> (linesolid) (MIC ₅₀ =4-8 µg/ml)	Cynamon, 1999 Wallace, 2001
Phenothiazines (chlorpromazine, thiozidazine)	Combined effects with antituberculous drugs	Crowle, 1992 Amaral, 1996
2-Pyridinecarboxamidrazone derivatives	Active against MTB (MIC ₉₀ =32 µg/ml)	Mamolo, 1992 Banfi, 2001
5-Nitroimidazole (CGI 17341)	Active against MDR-MTB* (MIC=0.08-0.3 µg/ml) Ineffective against MAC	Ashtekar, 1993
Metronidazole	Active against dormant MTB (combined effects with RFP)	Wayne, 1994
Poloxamer (CRL8131)	Active against MTB Synergistic effects with INH, RFP, SM, PZA, TH, CS and AMK	Jagannath, 1995
Pyrazinamide analogues Pyrazinoic acid esters Pyrazine thiocarboxamide	Stronger anti-MTB activity than PZA	Yamamoto, 1995 Bergmann, 1996
Resorcinomycin A	Active against MAC (MIC=6 µg/ml)	Gomez-Flores, 1996

* MDR-MTB: multidrug-resistant MTB

MIC₉₀が0.12~0.25 µg/mlと結核菌に対する抗菌力に優れ、また clofazimine (CFZ) にみられる皮膚への色素沈着という副作用も軽減されている²²⁾。また、nitroimidazopyran (PA-824) (Fig. D) が有望視されている。この薬剤は、同じ nitroimidazole 系薬剤である metronidazole (Table 1) と同様に、嫌気性条件下で抗菌作用を発揮する性質があるため、休眠型の結核菌に対して強い抗菌作用を示すと言う²³⁾。こうした性質は、INH や同じ nitroimidazole 系薬剤である CGI 17341 には認められない。また PA-824 は、モルモットやマウスの結核症に対して INH とほぼ同程度の治療効果を示し、多剤耐性結核菌に対しても、MIC 値が0.03~0.25 µg/ml と優れた抗菌力を有している²³⁾。現在、この薬剤については、The Global Alliance for TB Drug Development が後押しをしての開発が進められつつあり今後の動向が注目される。

次に注目されるのは、EB 誘導体の new ketolide であるが⁵⁾ (Table 3)、なかでも ABT-773 (Fig. E) と telithromycin (Fig. F) が有望である。ABT-773 は、広い抗菌ス

ペクトラムを有し、マクロライド耐性菌に有効である。また telithromycin は多剤耐性 (特にマクロライド耐性) 肺炎球菌を含むグラム陽性菌、*Legionella*, *Toxoplasma* などに特に有効であり、貪食細胞内への移行性に優れている。これらの new ketolide の *in vitro* 抗 MAC 抗菌活性は、ABT-773 では MIC₅₀=8 µg/ml と CAM (MIC₅₀=2 µg/ml) よりもやや弱く²⁴⁾、telithromycin ではさらに MIC₅₀=128 µg/ml と劣っている²⁵⁾。しかしながら、マウス MAC 感染症に対してはかなり優れた治療効果を示し、high dose では殺菌作用が認められる²⁵⁾。また12週間の長期に及ぶ単独投与においても、耐性菌の出現頻度は低く²⁵⁾、この点では他のマクロライド系薬剤に比べて優れているようである。他方、ABT-773 もマウス MAC 感染症に対して、CAM よりもやや優れた治療効果を示している²⁴⁾。これらの new ketolide については、今後のより詳細な基礎研究と臨床試験が望まれるところである。

3. 新しい strategy での抗結核薬の開発状況

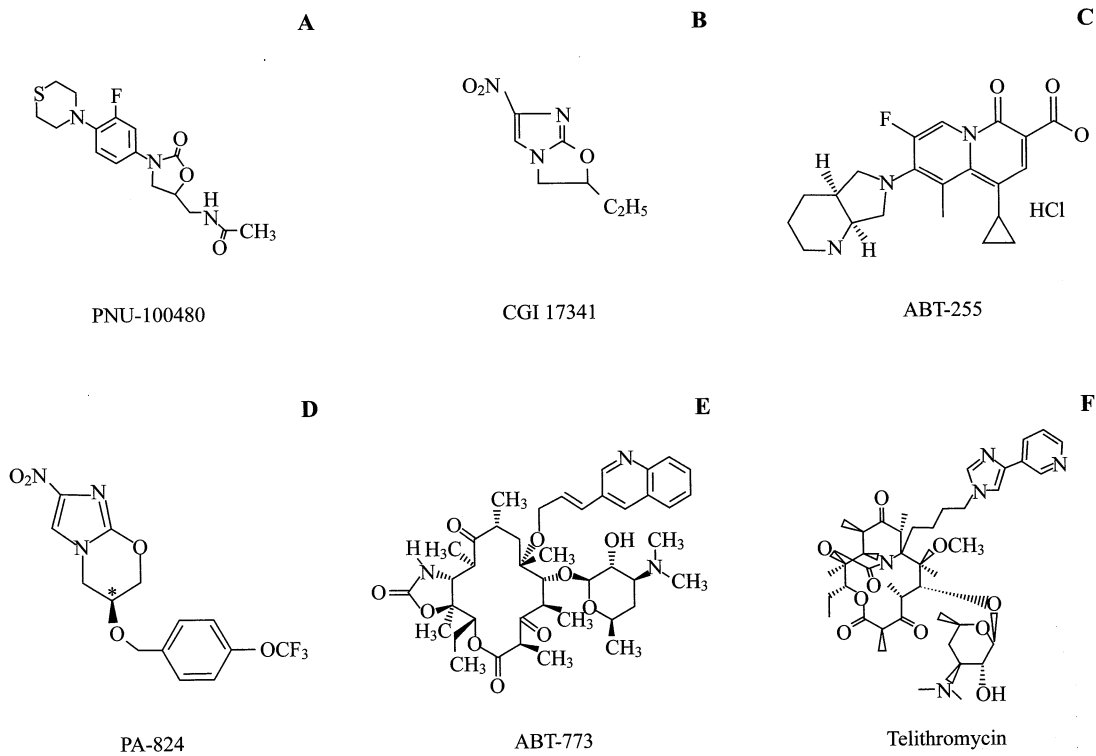


Fig. Chemical structures of promising new antituberculous and anti-MAC drugs

Table 2 Promising new antimicrobial agents with activity against MTB and MAC (2)

Agents	Remarks	References
Cyclic depsipeptides (Massetolides A~H)	Active against MTB and MAC	Gerard, 1997
Polyynes	Active against MTB and MAC	Kobaisy, 1997
Germacranolides	Active against MTB and MAC	Fischer, 1998
Amoxicillin + EB + clavulanic acid	Active against MDR-MTB (MIC ₉₀ =0.5 μg/ml)	Abate, 1998
Ceftriaxone + clavulanic acid	Active against MDR-MTB (MIC=2-16 μg/ml)	Segura, 1998
2-Pyridone (ABT-255)	Active against MTB (MIC=0.016-0.032 μg/ml) Active against MTB infection in mice	Oleksijew, 1998
Pyrrole derivative (BM212)	Active against MTB and MAC (MIC [MTB]=0.7-6.2 μg/ml) (MIC [MAC]=0.4-3.1 μg/ml)	Deidda, 1998
Pyrimidine derivatives (SoRI 8890)	Active against MAC (MIC=0.125-2 μg/ml)	Shoen, 1998
Deazapteridines	Active against MTB and MAC (MIC=1.28-12.8 μg/ml)	Suling, 1998 Suling, 2001
Melatonin	Combined effects with INH	Wiid, 1999
Miconazole	MIC (MTB)=2 μg/ml	Sun, 1999
Clotrimazole	MIC (MTB)=2-5 μg/ml	
Niclosamide	MIC (MTB)=0.5-1 μg/ml	
Mefloquine	MIC (MAC)=16 μg/ml	Bermudez, 1999

Table 3 Promising new antimicrobial agents with activity against MTB and MAC (3)

Agents	Remarks	References
Cerulenin	Active against MDR-MTB and MAC (MIC=1.5–12.5 $\mu\text{g/ml}$)	Parrish, 1999
New riminophenazines (B746, B4157)	Active against MTB (MIC ₉₀ =0.12–0.25 $\mu\text{g/ml}$) Stronger anti-MTB activity and less skin pigmentation than CFZ	Reddy, 1999
Nitrofurantoin, nitrofurazone	Active against dormant BCG	Murugasu-Oei, 2000
Nitroimidazopyran (PA-824)	Active against MDR-MTB (MIC=0.03–0.25 $\mu\text{g/ml}$) Active against dormant MTB	Stover, 2000
EM-derived new ketolide ABT-773	Active against MAC (MIC ₅₀ =8 $\mu\text{g/ml}$) Active against MAC infection in mice (ABT-773 \doteq CAM)	Cynamon, 2000
Telithromycin (HMR3647)	Active against MAC infection in mice Low frequency of emergence of resistance Weak <i>in vitro</i> activity against MAC	Bermudez, 2001
N-octanesulfonylacetamide	Active against MDR-MTB (MIC=6.25–25 $\mu\text{g/ml}$)	Parrish, 2001
Pro-Arg-rich peptide (PR-39)	Active against MDR-MTB	Linde, 2001
Tetramethylpiperidyl-phenazine (B4128)	Active against MTB and MAC	Matlola, 2001
New isonicotinoylhydrazones	Active against MTB Synergistic effects with EB, RFP and PAS	de Logu, 2002

結核菌の全ゲノムの決定²⁶⁾以後、Table 4, 5 に示すような新しい strategy での抗結核薬の開発研究が盛んになりつつある。

(1) 殺菌性ペプチド

殺菌性ペプチドが有望視されているが、特に defensin (HNP-1) は、結核菌に対して MIC 値が 2.5 $\mu\text{g/ml}$ とかなり抗菌力に優れ、マウス結核症にも有効であると報告されており²⁷⁾注目に値する。

(2) 新しいタイプの標的部位に働く薬剤

結核菌の全ゲノム情報²⁶⁾を利用して、結核菌の側の新しいタイプの標的部位に着目しての新抗結核薬開発を進めようとする試みが注目に値する。

第一に、dTDP-rhamnose 合成系を target にしての抗結核薬のスクリーニングが行われており、新しい試みとして評価できる。dTDP-rhamnose は結核菌の arabinogalactan の重要な構成成分であるが、このものの合成にかかわる α -D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase や dTDP-glucose dehydratase などの 4 つの酵素 (RmlA~RmlD) を標的にする抗結核薬は未だに開発されていない。

最近、8,000 種類の化合物からスクリーニングされた dTDP-rhamnose 合成阻害活性を示す薬剤の結核菌に対する抗菌力を調べた成績が報告されているが、化合物 No. 5372 が MIC 値で 16 $\mu\text{g/ml}$ とある程度の抗菌力を示している²⁸⁾。未だ不十分な結果ではあるが、この strategy でのスクリーニングにより、将来的にはかなり有望な抗結核薬が開発されることが期待される。

第二に、antisense oligo DNA (antisense DNA) の利用が有望である。Harth ら²⁹⁾の検討では、結核菌の glutamine synthetase を標的として、この蛋白をコードする遺伝子に対する antisense DNA を結核菌に作用させた場合、酵素活性と増殖能に弱いながらも有意なレベルの阻害が認められている。著者らも、M ϕ の抗酸菌に対する酸素依存性殺菌メカニズムからの菌のエスケープに重要な役割を果たすとされる *oxyR* 遺伝子と *ahpC* 遺伝子に対する antisense DNA で MAC 菌を処理することによって、M ϕ の殺菌エフェクターの 1 つである H₂O₂-halogenation system の殺菌作用に対する菌の感受性があるいは増強するのではないかと考え、若干の検討を行っているが、期待

Table 4 Screening for antituberculous drugs by new strategy (1)

Agents	Remarks	References
1. Bactericidal peptides		
1) Defensin (HNP-1) (chemically synthesized)	Active against MTB (MIC=2.5 $\mu\text{g/ml}$) Active against MTB infection in mice	Sharma, 2000 Sharma, 2001
2) Dermaseptin S4 (chemically synthesized)	Active against <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i> (MIC ₅₀ =1-4 $\mu\text{g/ml}$) Active against <i>P. aeruginosa</i> infection in mice Antimycobacterial activity?	Navon-Venezia, 2002
3) Human β defensin-2 mRNA (transfection to M ϕ)	Potential of M ϕ anti-MTB activity	Kisich, 2001
2. Screening for drugs acting against new targets		
1) Inhibitors for dTDP rhamnose synthesis (inhibition of cell wall structure formation)	Active against MTB	Ma, 2001
2) Antisense oligo DNA (target: glutamine synthetase)	Active against MTB	Harth, 2000
3) Promising targets in the future studies		
(1) <i>icl</i> gene (isocitrate lyase)	Screening for glyoxylate shunt inhibitors	McKinney, 2000
(2) <i>pcaA</i> gene (methyl transferase)	Screening for inhibitors of micolic acid synthesis	Glickman, 2000
(3) <i>mmaA4</i> gene (SAM-dependent methyl transferase)	Screening for inhibitors of oxygenated mycolic acid synthesis	Dubnau, 2000
(4) MmpL family proteins	Screening for PDIM* transport inhibitors	Cox, 1999

* PDIM: phthiocerol dimycocerosate

したような成績は得られていない (未発表データ)。

著者らの成績を含め、結核菌や MAC 菌を antisense DNA で処理した場合、標的遺伝子でコードされる蛋白質の発現抑制は十分なレベルには達しておらず、ひいては満足のいく菌の増殖阻害効果が得られていないようである。この原因としては、結核菌や MAC 菌の堅牢な細胞壁が antisense DNA に対するバリアーとして働いた可能性が考えられる。Harth ら²⁹⁾によれば、EB や polymyxin B による処理で細胞壁を “softening” させることや、antisense DNA を amikacin moiety に conjugate させることによって、antisense DNA の菌体内への移行性を高めようとする試みは功を奏さなかったということであるので、別の方法を開発していく必要がある。現在教室では、antisense DNA の菌体内への透過性を増すために、antisense DNA に RFP や RLZ などの lipophilic な抗結核薬を conjugate させて transporter としての働きを担わせる方法や、結核菌ファージを利用して antisense DNA を効率よく菌体内に取り込ませるといった方法などを検討中であるが、菌体内への up-take の問題が解決

できれば、antisense DNA は抗結核薬としてかなり有望なのではないかと考えられる。

第三に、今後有望な target としては、結核菌の glyoxylate shunt, ミコール酸合成系, あるいは phthiocerol dimycocerosate の transport などに関わり、菌の M ϕ 内での persistency や生体組織中での増殖能を左右する *icl*, *pcaA*, *mmaA4* 遺伝子や mmpL ファミリー蛋白などが挙げられる³⁰⁾³¹⁾。現在、一般細菌に対する抗菌薬の開発研究は、ゲノム情報をもとにジェネティック・フットプリンティング法や antisense RNA, あるいは DNA アレイを用いての薬剤標的候補の選択、ファージディスプレイ法による相互作用蛋白の同定といった新しい方法を駆使して精力的に進められている。今後は、抗結核薬の開発研究もこうした strategy の下に進められていくことになるものと思われる。

(3) Drug delivery を高める薬剤

次に有望な strategy として、Table 5 に示すような drug delivery を高める薬剤の開発がある。その 1 つに、抗菌薬の細胞壁透過のための shuttle vector として mycobactin

Table 5 Screening for antituberculous drugs by new strategy (2)

Agents	Remarks	References
3. Attempt for effective sustained and targeted drug delivery		
1) Utilization of siderophore (mycobactin, ferricrocin, etc.)	Shuttle vectors for potential drug delivery to Mφs	Schumann, 2001
2) Microsphere technology poly (DL-lactide-co-glycolide)	Potential drug delivery to Mφs (RFP-encapsulated microsphere)	Barrow, 1998
	Sustained release of drugs in sites of infection (visceral organs)	Dutt, 2001
	Active against MTB infection in mice (RFP, INH-encapsulated microsphere)	Quenelle, 2001
3) Drug delivery using aerosolized agents (tobramycin, cytokines)	Effective delivery of drugs with less toxicity	Condos, 1997 Schraufnagel, 1999
4. Immune response modifier (potentiation of host immunity against mycobacteria)		
1) GM-CSF	Active against disseminated MAC infection	Appelberg, 1993
	Potentiation of Mφ antimicrobial activity	Bermudez, 1994
IL-2	Adjuvant therapy of tuberculosis in combination with anti-MTB multidrug regimens	Johnson, 1995
2) ATP and its analogues	Potentiation of Mφ activity against mycobacteria via P2X ₇ or P2Y receptors	Lammas, 1997
		Sikora, 1999
		Kusner, 2000
		Stober, 2001 Fairbairn, 2001
3) Picolinic acid	Potentiation of Mφ activity against MAC: growth inhibition of intramacrophage MAC	Pais, 2000
4) Imidazoquinoline S28463	Increase in host resistance to BCG infection in <i>Nramp1</i> ' mice	Moisan, 2001

などのシデロフォアを利用するという試みがある³²⁾。また、Mφ内への移行性の増強、血中・臓器内薬剤濃度の高レベルでの維持を目的としての、ミクロスフェアの利用という試みも有望である。例えば、ミクロスフェア (poly [DL-lactide-co-glycolide]) (以下 PLG) に封入した RFP, INH では、投与後の臓器内レベルが長期間にわたって高レベルに保たれるようになるが、これに伴い、PLG 内に封入した INH や RFP は、free のもの比べてマウス結核症に対してより強い治療効果を示すようになる³³⁾。さらに、PLG 内封入 RFP は、free RFP に比べて、Mφ 内局在結核菌に対してより強力な抗菌作用を及ぼすことも報告されている³⁴⁾。

(4) Immune response modifier

IFN- γ 、IL-2、GM-CSF、IL-12などのサイトカインを用いての adjuvant clinical therapy の他に、Table 5 に示すような宿主感染免疫能の増強を目的としての新しいタイプの immune response modifier を併用するレジメンが有望である。なかでも、ATP がその作用の特殊性からみて注目に値する。ATP およびその誘導体は P2 レセプターを介して様々な細胞に作用しているが、例えば ATP は

血管内皮細胞に作用し NOS3 発現を増強し、ひいては nitric oxide 産生の亢進を介して血管平滑筋を弛緩させることにより、虚血性疾患における血流動態の改善に寄与することが知られている。ところで、この ATP とその誘導体には、P2 レセプターを介する Mφ の結核菌に対する殺菌能の増強作用が報告されている^{35)~39)}。ATP 処理を受けた Mφ では、細胞内に局在する BCG 菌が速やかに殺菌されていくが、この現象は ATP によって誘導される Mφ のアポトーシスと並行している³⁵⁾。また、このような Mφ 内での BCG 菌の殺菌と Mφ のアポトーシスは、ATP や P2X₇ レセプターとの結合能の高い P2X₇ レセプターの agonist である benzoylbenzoic ATP (BzATP) や ATP γ S により強く誘導されるが、その他のヌクレオチドでは誘導されない³⁵⁾。さらに、ATP による Mφ 抗菌活性の増強作用は、P2X₇ レセプターへの結合能の高い ATP⁴⁺ の除去に働く Mg イオンや P2X₇ レセプター阻害剤である oxidized ATP (oATP) により強くブロックされる³⁷⁾。以上の成績から、ATP 処理による Mφ の抗マイコバクテリア抗菌活性の増強には P2 レセプター、特に P2X₇ レセプターの関わりが重要であることが明らかで

ある。

著者らも、ATPのMφの抗MAC活性に及ぼす作用について同様な検討を試みているが、ATPまたはBzATPでMφを処理した場合、これらのヌクレオチド単独では効果はみられないが、さらにCa²⁺イオノフォアを併用して作用させることにより、Mφの抗MAC活性が有意に増強されることを明らかにしている。この成績は、Stoberら³⁸⁾の報告とよく符合している。また、培地中にCAMとRFPとを加えた系でのMφ内でのMAC菌の殺菌プロフィールについてみたところ、MφにCa²⁺イオノフォアとATPを作用させてもMφのMAC菌に対する抗菌活性が特に増強する傾向は認められなかったが、Ca²⁺イオノファとBzATPを作用させた場合では、Mφ抗菌活性がさらに増強されるという興味深い成績が得られている(未発表データ)。

さらに、マウスMAC感染症に対するCAM、RFPの治療効果が、ATPの併用投与でどのような影響を受けるのかについてみたところ、臓器内生菌数の変化を指標とした場合、感染4週目ではCAMとRFPとの合剤の治療効果が、ATPの併用投与で有意に増強することが、さらに脾では、ATP単独投与によっても生菌数の減少がみられることが明らかになった(未発表データ)。

以上の成績から考えて、ATPは抗酸菌症に対する抗菌薬の治療効果の増強を計る上で、有望な薬剤であるように思われる。ATPは血管拡張作用を有し、虚血性疾患の血流動態の改善に用いられているが、特に問題となるような副作用はなく、また安価な薬剤であるので、今後さらに詳細な検討を重ね、結核症やMAC症患者への適用の可能性を探っていきたいと考えている。

4. II型肺胞上皮細胞の抗酸菌感染症の発症における意義と治療との関連性

著者の教室では、新しい抗結核薬の開発との関連で、より有効な治療プロトコルの開発を目的として、抗酸菌感染の早期のステージでの菌の増殖の場としてのII型肺胞上皮細胞の果たす役割について検討を進めている。ヒトやマウスに限らず、結核や肺MAC症において、実際に感染菌がII型肺胞上皮細胞内にinternalizeしていることを示すような直接的な観察は未だなされていない。そこで、著者らは結核菌またはMACを経気道感染させたマウスの肺組織の透過電顕による観察を行ったところ、感染早期(2日後)では確かにII型肺胞上皮細胞に菌体を取り込まれている像が得られた。ところが、感染中期(14日後)になると、II型肺胞上皮細胞内には菌は認められず、肉芽腫性類上皮細胞内に多くの菌が認められることが分かった⁴⁰⁾。以上の電顕の成績より、結核菌およびMAC菌とも感染早期には、確かにII型肺胞上皮細胞

内に局在していることが明らかになった。

次に、dual chamber systemを用いての検討で、結核菌やMACに感染したA-549 II型肺胞上皮細胞(A-549細胞)からは、Mφの抗菌活性を増強させるような液性因子が産生されることが明らかになった⁴⁰⁾。そこで、この液性因子を同定すべく、A-549細胞での各種サイトカインおよびサーファクタント蛋白の産生動態について検討したところ、結核菌やMACに感染したA-549細胞ではTNF- α 、GM-CSF、MCP-1のmRNA発現が \uparrow up-regulateされるが、IFN- γ のmRNA発現は感染の有無にかかわらず認められないことが明らかになった⁴⁰⁾。

ところで、TNF- α とGM-CSFにはMφの抗菌活性増強作用が知られているので、次に、これらのサイトカインに対する抗体でのブロッキングテストを試みたところ、結核菌またはMACに感染したA-549細胞からの液性因子によるMφの抗菌活性増強作用は、抗TNF- α 抗体と抗GM-CSF抗体、特に後者により強くブロックされることが明らかになった⁴⁰⁾。従って、II型肺胞上皮細胞から産生されるMφ抗菌活性増強因子はGM-CSFとTNF- α であるものと考えられる。

次に、Mono Mac 6 Mφ(MM6-Mφ)とA-549細胞内に局在する結核菌とMACに対するRLZ、LVFX、CAMの抗菌活性発現プロフィールについてみたところ、結核菌の場合では、LVFXのA-549細胞内局在菌に対する抗菌活性が、Mφ内局在菌に対する活性に比べて減弱する傾向が認められた⁴¹⁾⁴²⁾。他方、MACの場合でも、RLZの抗菌活性発現のプロフィールについて同様な傾向が認められている⁴¹⁾⁴²⁾。このように、Mφ内あるいはII型肺胞上皮細胞内に局在する結核菌やMACの薬剤感受性は、部分的には互いにかなり異なったパターンを有しているものと思われる。従って、感染早期での治療のためのレジメンの決定に当たっては、こうした事情も勘案する必要があるものと考えられる。

次に、結核菌やMAC菌をMφに感染させ、Mφ内で増殖させることによりMφ内環境に適応させたI型菌を調製し、これをMM6-MφまたはA-549細胞に感染させた場合のRLZ、CAM、LVFXの抗菌活性発現のプロフィールについて検討した⁴³⁾。なお対照としては、液体培地中で培養することにより細胞外の環境に適応させたE型菌を用いた。まず、MM6-Mφ内局在菌に対する各薬剤の抗菌作用の発現プロフィールについてみたところ、いずれの薬剤ともI型菌に対する抗菌活性はE型菌に対する抗菌活性に比べて減弱する傾向を認めた⁴³⁾。次に、A-549細胞内局在菌についての同様な検討を行ったところ、CAMとLVFXの場合では、上記の結果と同様にI型菌に対する抗菌活性はE型菌に対する抗菌活性に比べて減弱していた。他方RLZの場合には、これとは全く逆

の成績, すなわち, E 型菌に対する抗菌活性の方が, I 型菌に対する抗菌活性よりも弱くなるという結果が得られた⁴³⁾。

以上の成績より明らかなごとく, MφやII型肺胞上皮細胞などの宿主細胞内に局在する抗酸菌については, 一部の例外を除けば, おおむねE型菌の方がI型菌よりも抗菌薬に対する感受性が高いという傾向が認められる。従って, 主にE型菌が抗菌薬治療のターゲットとなる有空洞性の肺結核や肺MAC症患者での化学療法による治療効果の予測を, 細胞内局在菌に対する抗菌力を指標として行う場合には, I型菌よりはむしろE型菌を供試するほうがより適切であるものと考えられる。

おわりに

以上, 新しい抗結核薬開発の現況と将来展望について概説したが, 多剤耐性結核やMAC症の治療には既存の薬剤に加えて, より強力で交差耐性のない新規の抗菌剤や免疫製剤などを加えた新しいレジメンの開発が, 今後ますます重要になるものと考えられる。ヒトゲノムや結核菌ゲノム, さらには抗酸菌の種々の病原遺伝子の解明に伴い, これらの遺伝子情報を利用した新しい strategy での抗結核薬や抗MAC薬の開発研究が, 一部の研究者によりいち早く進められつつあるが, 今後の研究の進展が大いに期待される場所である。

文 献

- 1) 富岡治明: 結核と非定型抗酸菌感染症に対する化学療法剤開発の現況と展望. 感染と抗菌薬. 1999; 2: 195-201.
- 2) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs. J Infect Chemother. 2000; 6: 8-20.
- 3) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs, with special reference to a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648. Arch Immunol Ther Exp. 2000; 48: 183-188.
- 4) Narita M, Stambaugh JJ, Hollender ES, et al.: Use of rifabutin with protease inhibitors for human immunodeficiency virus-infected patients with tuberculosis. Clin Infect Dis. 2000; 30: 779-783.
- 5) Tomioka H, Sano C, Sato K, et al.: Antimicrobial activities of clarithromycin, gatifloxacin and sitafloxacin, in combination with various antimycobacterial drugs against extracellular and intramacrophage *Mycobacterium avium* complex. Int J Antimicrob Agents. 2002; 19: 139-145.
- 6) Wallis RS, Phillips M, Johnson JL, et al.: Inhibition of isoniazid-induced expression of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 in sputum: potential surrogate marker in tuberculosis chemotherapy trials. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 1302-1304.
- 7) Dietze R, Teixeira L, Rocha LMC, et al.: Safety and bactericidal activity of rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 1972-1976.
- 8) Tomioka H, Sato K, Akaki T, et al.: Comparative in vitro antimicrobial activities of the newly synthesized quinolone HSR-903, sitafloxacin (DU-6859a), gatifloxacin (AM-1155), and levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 3001-3004.
- 9) Tomioka H, Sato K, Kajitani H, et al.: Comparative antimicrobial activities of the newly synthesized quinolone WQ-3034, levofloxacin, sparfloxacin, and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 283-286.
- 10) Berning SE: The role of fluoroquinolones in tuberculosis today. Drugs. 2001; 61: 9-18.
- 11) Chan CY, Au-Yeang C, Yew WW, et al.: Postantibiotic effects of antituberculosis agents alone and in combination. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 3631-3634.
- 12) Tomioka H, Sato K, Shimizu T, et al.: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activities of new fluoroquinolones in combination with other antituberculous drugs. J Infect. 2002 (in press).
- 13) Lounis N, Bentoucha A, Truffot-Pernot C, et al.: Effectiveness of once-weekly rifapentine and moxifloxacin regimens against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 3482-3486.
- 14) Singla R, Gupta S, Gupta R, et al.: Efficacy and safety of sparfloxacin in combination with kanamycin and ethionamide in multidrug-resistant pulmonary tuberculosis patients: preliminary results. Int J Tuberc Lung Dis. 2001; 5: 559-563.
- 15) Grimaldo ER, Tupasi TE, Rivera AB, et al.: Increased resistance to ciprofloxacin and ofloxacin in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients seen at a tertiary hospital in the Philippines. Int J Tuberc Lung Dis. 2001; 5: 546-550.
- 16) Cavalieri SJ, Biehle JR, Sanders WE: Synergistic activities of clarithromycin and antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 1542-1545.
- 17) Phillips P, Chan K, Hogg R, et al.: Azithromycin prophylaxis for *Mycobacterium avium* complex during the era of highly active antiretroviral therapy: evaluation of a provincial program. Clin Infect Dis. 2002; 34: 371-378.
- 18) Orme I, Tuberculosis Drug Screening Program: Search for new drugs for treatment of tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 1943-1946.
- 19) Cynamon MH, Klemens SP, Sharpe CA, et al.: Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 1189-1191.
- 20) Abate G, Miörner H: Susceptibility of multidrug-resistant

- strains of *Mycobacterium tuberculosis* to amoxicillin in combination with clavulanic acid and ethambutol. J Antimicrob Chemother. 1998 ; 42 : 735-740.
- 21) Oleksijew A, Meulbroek J, Ewing P, et al.: In vivo efficacy of ABT-255 against drug-sensitive and -resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42 : 2674-2677.
 - 22) Reddy VM, O'Sullivan JF, Gangadharam PRJ: Antimycobacterial activities of riminophenazines. J Antimicrob Chemother. 1999 ; 43 : 615-623.
 - 23) Stover CK, Warren P, VanDevanter DR, et al.: A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. Nature. 2000 ; 405 : 962-966.
 - 24) Cynamon MH, Capter JL, Shoen CM: Activity of ABT-773 against *Mycobacterium avium* complex in the beige mouse model. Antimicrob Agents Chemother. 2000 ; 44 : 2895-2896.
 - 25) Bermudez LE, Inderlied CB, Kolonoski P, et al.: Telithromycin is active against *Mycobacterium avium* in mice despite lacking significant activity in standard in vitro and macrophage assays and is associated with low frequency of resistance during treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 2210-2214.
 - 26) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998 ; 393 : 537-544.
 - 27) Sharma S, Verma I, Khuller GK: Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 639-640.
 - 28) Ma Y, Stern RJ, Scherman MS, et al.: Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzyme and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 1407-1416.
 - 29) Harth G, Zamecnik PC, Tang JY, et al.: Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 ; 97 : 418-423.
 - 30) McKinney JD, Bentrup KH, Munoz-Elias EJ, et al.: Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. Nature. 2000 ; 406 : 735-738.
 - 31) Glickman MS, Jacobs WR: Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. Cell. 2001 ; 104 : 477-485.
 - 32) Schumann G, Möllmann U: Screening system for xenosiderophores as potential drug delivery agents in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 1317-1322.
 - 33) Dutt M, Khuller GK: Therapeutic efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated antitubercular drugs against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 363-366.
 - 34) Barrow ELW, Winchester GA, Staas JK, et al.: Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42 : 2682-2689.
 - 35) Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, et al.: ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X₇) receptors. Immunity. 1997 ; 7 : 433-444.
 - 36) Sikora A, Liu J, Brosnan C, et al.: Purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X₇-independent mechanism. J Immunol. 1999 ; 163 : 558-561.
 - 37) Kusner DJ, Adams J: ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. J Immunol. 2000 ; 164 : 379-388.
 - 38) Stober CB, Lammas DA, Li CM, et al.: ATP-mediated killing of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes. J Immunol. 2001 ; 166 : 6276-6286.
 - 39) Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, et al.: ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X₇-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. J Immunol. 2001 ; 167 : 3300-3307.
 - 40) Sato K, Tomioka H, Shimizu T, et al.: Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. J Infect Dis. 2002 ; 185 : 1139-1147.
 - 41) Sato K, Tomioka H, Akaki T, et al.: Antimicrobial activities of levofloxacin, clarithromycin, and KRM-1648 against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex replicating within Mono Mac 6 human macrophage and A-549 type II alveolar cell lines. Int J Antimicrob Agents. 2000 ; 16 : 25-29.
 - 42) Tomioka H: Differential expression of the antimicrobial activities of clarithromycin and other antimycobacterial drugs against *Mycobacterium avium* complex replicating within macrophages and alveolar epithelial cells. Res Adv Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 2 : 11-27.
 - 43) Tomioka H, Sato K, Sano C, et al.: Intramacrophage passage of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex alters the drug susceptibilities of the organisms as determined by intracellular susceptibility testing using macrophage and type II alveolar epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2002 ; 46 : 516-521.

The 77th Annual Meeting Special Lecture

PROSPECTS FOR DEVELOPMENT OF NEW ANTITUBERCULOUS DRUGS

Haruaki TOMIOKA

Abstract Tuberculosis (TB) is a growing international health concern, since it is the leading infectious cause of death in the world today. Moreover, the resurgence of TB in industrialized countries and the worldwide increase in the prevalence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) infections in immunocompromised hosts have prompted the quest for new antimycobacterial drugs. In particular, the appearance of multidrug-resistant (MDR) strains of *M. tuberculosis*, which exhibit *in vitro* resistance to at least two major antituberculous drug (usually INH and RFP) and cause intractable TB, has greatly contributed to the increased incidence of TB. Because of the global health problems of TB, the increasing rate of MDR-TB and the high rate of a co-infection with HIV, the development of potent new antituberculous drugs without cross-resistance with known antimycobacterial agents is urgently needed.

In this article, I reviewed the following areas. First, I briefly reviewed some new findings (mainly reported after 2000) on the pharmacological status of rifamycin derivatives (rifabutin, rifapentine, and rifalazil), fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, sitafloxacin, moxifloxacin, and others), and new macrolides (clarithromycin, azithromycin, and roxithromycin).

Second, I described other types of agents which are being developed as antimycobacterial drugs. Some of the agents discussed are already under preliminary clinical investigation, and others appear to be promising candidates for future development. In this review, the status of the development of new antimycobacterial, especially antituberculous agents including oxazolidinone (PNU-100480), 5'-nitroimidazole (CGI 17341), 2-pyridone (ABT-255), new riminophenazines, nitroimidazopyran (PA-824), new ketolides (ABT-773, telithromycin) and defensins (human neutrophil peptide-1), was examined.

Third, the development of new antitubercular drugs was discussed according to the potential pharmacological target. New critical information on the whole genome of *M. tuberculosis* recently elucidated and increasing knowledge on various mycobacterial virulence genes will promote the progression in the identification of genes that code for new drug targets. Using such findings on mycobacterial genomes, drug development using quantitative structure-activity relationship may be possible in the near future. In this review, I described the screening of drugs that have an inhibitory activity against dTDP-rhamnose synthesis of *M. tuberculosis*, as a new drug target of the organism. In addition, I discussed the usefulness of antisense oligo DNAs specific to mycobacterial genes encoding certain metabolic enzymes or virulence factors that play roles in the bacterial escape from antimicrobial

mechanisms of host macrophages.

Fourth, I reviewed the drug vehicles which enable efficacious drug delivery to their target *in vivo*. The usefulness of poly (DL-lactide-co-glycolide) microsphere technology, which enables the encapsulated drugs to deliver the requested doses of them for prolonged time periods by a single shot without causing any toxicity and, moreover, enables the highly targeted delivery of the drugs to host macrophages, was discussed.

Fifth, I described adjunctive immunotherapy for the management of patients with mycobacterial infections by giving certain immunomodulators in combination with antimycobacterial drugs. Adjuvant clinical trials using IL-2 or GM-CSF have been found to be efficacious to some extent in improving patients with tuberculosis or disseminated MAC infections. However, it seems that these immunopotentiating cytokines as well as IFN- γ and IL-12 are not so promising for the therapeutic agents of mycobacterial infections because of the possible induction of immunosuppressive cytokines during adjuvant therapy and, in some cases, severe side-effect. Thus, the development of new classes of immunomodulators other than cytokines, particularly those with no severe side-effect, is needed. This review dealt with ATP and its analogues which potentiate macrophage antimycobacterial activity via a purinergic P2X₇ receptor.

Finally, I described the roles of type II alveolar epithelial cells in the establishment of mycobacterial infections in the host lungs and the profiles of drug susceptibilities of *M. tuberculosis* and MAC organisms replicating within the type II pneumocytes. These findings are useful to precisely assess or predict the *in vivo* therapeutic activity of a given antimycobacterial drug from its *in vitro* activity.

In this article, I have thoroughly reviewed the status of the development of new antimycobacterial drugs. There are a number of difficulties in the drug-design for the development of new drug formulations with increased potential for antimycobacterial effects, excellent pharmacokinetics, and tolerability. It should be emphasized that the most urgent goal of chemotherapy of tuberculosis and MAC infections, especially that associated with HIV infection, is to develop highly active, low-cost drugs which can be used not only in industrialized countries but also in developing countries, since the incidences of AIDS-associated intractable tuberculosis is rapidly increasing in the latter.

Key words: Antituberculous drugs, Drug screening, Drug targets, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex

Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

Correspondence to : Haruaki Tomioka, Department of Micro-

biology and Immunology, Shimane Medical University, 89-1, Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan. (E-mail: tomioka@shimane-med.ac.jp)