

Mycobacterium ulcerans 感染マウスに対する rifalazil および rifampicin の発症阻止効果の比較

¹中永 和枝 ²斎藤 肇 ¹石井 則久 ³後藤 正道

要旨：〔目的〕 Buruli 潰瘍の原因菌である *Mycobacterium ulcerans* の実験的感染マウスに対する rifalazil (RLZ) と rifampicin (RFP) の発症阻止効果を比較検討した。〔方法〕 5 週齢の BALB/c 系雌マウスの両後足蹠に、*M. ulcerans* 97-107 株の Middlebrook 7H9 培養菌液 25 μ l (CFU = 4×10^4) を接種し、翌日より RLZ あるいは RFP 懸濁液 2.5, 5 および 10 mg/kg を 1 日 1 回、週 5 回、6 週間にわたり経口投与した。足蹠の肉眼的病変を観察するとともに腫脹を計測し、さらに治療開始 2, 4 および 6 週後における足蹠と脾内 CFU を測定した。〔結果〕 対照群では、感染 4 週後より足蹠に発赤、腫脹が、6 週後にはさらに潰瘍もみられ、感染 1 日後、2, 4 および 6 週後の log₁₀ CFU はそれぞれ 5.22, 5.56, 6.29 および 7.33 と増加した。一方、RLZ 治療群では投与量にかかわらず足蹠に病変はみられず、また log₁₀ CFU は 2.5 mg/kg 投与でも 2 週後すでに 4.14 まで低下し、10 mg/kg 投与では 6 週後に検出限界 (< 1.7) 近く (< 2.1) にまで低下した。これに対して RFP 治療群では全経過観察中足蹠の病変抑制と CFU の有意な低下は 10 mg/kg 投与群のみにみられた。〔考察〕 これらの検討成績から、RLZ は RFP よりもはるかに優れた *in vivo* 抗 *M. ulcerans* 活性を有することが明らかにされた。

キーワード： *Mycobacterium ulcerans*, リファラジル, リファンピシン, マウス感染, 発症阻止

はじめに

Buruli 潰瘍は *Mycobacterium ulcerans* 感染によりひきおこされるヒトの壊死性皮膚潰瘍で、結核、ハンセン病に次ぐ第 3 番目の最も一般的な抗酸菌感染症と考えられている^{1)~3)}。本症はアフリカ、西太平洋地域、アジアおよび南アメリカの少なくとも 32 カ国における地域流行病であり、最も流行がみられているのはアフリカ、なかんずく西アフリカである^{1)~5)}。わが国では 1982 年御子柴らの報告⁶⁾がある。WHO は Buruli 潰瘍の流行の拡大とインパクトにこたえて、1998 年 1 月に“Global Buruli Ulcer Initiative”に着手した⁷⁾。*M. ulcerans* は唯一の菌体外毒素、マイコラクトン産生菌⁸⁾で、現時点では Buruli 潰瘍の化学療法はあまり期待できず、病巣の外科的切除と皮膚移植が第一選択治療法とされている²⁾。しかし、近年、諸種抗菌物質の抗 *M. ulcerans* 活性の研究が進められており、すでにその *in vitro*^{9)~13)} および *in vivo* (マウス)^{14)~17)}

試験ならびにヒトでのパイロット試験¹⁸⁾¹⁹⁾についての報告がみられる。

今回われわれは、新規ベンゾキサジノリファマイシン系薬剤 rifalazil (KRM-1648) と rifampicin の抗 *M. ulcerans* 活性をマウス足蹠感染系を用いて比較検討したので以下に報告する。

材料と方法

(1) マウス：5 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本クレア、東京) を用いた。なお、動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認をえておこなわれた。

(2) 薬剤：rifalazil (RLZ；鐘淵化学工業、高砂、兵庫) と rifampicin (RFP；第一製薬、東京) を用いた。薬剤は 0.01% Tween 80-2.5% アラビアゴムで種々濃度の懸濁液に調製し、-20℃に凍結保存した。

(3) 供試菌：Françoise Portaels 教授 (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium) より分与を受けた *M. ulcerans*

¹ 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部、² 広島県環境保健協会、³ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

連絡先：中永和枝、国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部、〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1 (E-mail: nakanaga@nih.go.jp)

(Received 20 Jan. 2004/Accepted 12 Mar. 2004)

97-107を用いた。供試菌はマウス足蹠を1代通過後 Middlebrook 7H11 寒天平板で培養し、発育集落を Middlebrook 7H9 プロスに浮遊させ、 -80°C に凍結保存した。

(4) マウス感染と薬剤投与：凍結保存菌液を新鮮な 7H9 プロスに接種し、1日2回手振りし 32°C にて2週間培養した。ボルテックス後室温に20分間静置し大きい菌塊を沈澱させ、その上清を新鮮な 7H9 プロスで希釈し $\text{OD}_{540} \approx 0.2$ ($\text{CFU} = 1.6 \times 10^6/\text{ml}$) に調整した均等菌液を感染菌とした。マウスの感染にはその $25 \mu\text{l}$ ($\text{CFU} = 4 \times 10^4$) を両後足蹠皮下に注射した。対照群には 7H9 プロスを同量注射した。薬剤投与群には感染翌日より 2.5, 5 および 10 mg/kg/日の RLZ を、または同濃度の RFP を経口ゾンデ(夏目製作所, 東京)で 0.2 ml, 1日1回, 週5回投与した。感染対照マウスには薬剤を含有しない懸濁液 0.2 ml を同様に投与した。

(5) 観察事項：感染マウスの両後足蹠の発赤と潰瘍の有無ないし程度の観察と腫脹の計測を週1回, 6週間行った。マウス足蹠の厚さは“dial thickness gauge” (尾崎製作所, 東京)で測定した。感染マウスの足蹠腫脹は, その実測値から無処置対照マウスの測定値を減じた値 ($\times 10^{-2}/\text{mm}$) で表した。

(6) CFUの測定：感染24時間後ならびに治療開始2, 4 および 6 週間後, 各群 5 匹のマウスを屠殺して両後足ならびに脾臓を採取し, CFUを測定した。後足をイソジンスクラブ(明治製菓, 東京)に3分間, 次いで70%エタノールに1.5分間2回浸漬し, 滅菌生食水で洗浄後細切し, ガラスホモジナイザー(岩城硝子, 東京)で生食水乳剤とした。脾臓は無菌的に採取し, ガラスホモジナイザーで生食水乳剤とした。各乳剤は冷滅菌生食水で $10^0 \sim 10^4$ 倍に至る10倍希釈系列をつくり, それらの

0.1 ml を選択 7H11 寒天平板²⁰⁾に接種し, 5% CO_2 環境下, 32°C , 8週間培養後の発育集落数より検体中の CFU を算定した。

(7) 統計学的検定：各動物群間の足蹠腫脹値ならびに CFU の有意差検定は, Student の t 検定により行った。

結 果

(1) 発赤と潰瘍 (Table 1)：感染対照マウスでは感染4週後に軽度の発赤が現れ, 5週後にはより顕著となり, 6週後では軽度ないし中等度の潰瘍も認められた。これに対し治療群では, RLZ 全投与群ならびに RFP の 10 mg/kg 投与群において, 全観察期間を通じて発赤のみられたものはなかったが, RFP の 2.5 および 5 mg/kg 投与群においては, 感染4週後以降感染対照群と同程度あるいはそれよりも弱い発赤を示すものがみられた。しかし, 全観察期間を通じ RLZ と RFP 治療群では潰瘍はみられなかった。

(2) 足蹠腫脹 (Table 2)：感染対照マウスでは感染3週後より腫脹が始まり, 4週後にはその約17倍にも腫大し, その後もさらに増大がみられた。一方, RFP 投与群では用量依存性に腫脹の軽減がみられたのに対して, RLZ 投与群では投与量の別なく全実験経過を通じて有意な腫脹のみられたものはなかった。なお, 2 および 3 週後の RLZ および RFP 投与群で無処置群より足蹠厚の小さくなっているものがある。これら動物群に体重の減少はなく, 薬剤投与の影響によるものかもしれないが, その理由については明らかではない。

いま, 感染マウスを同一用量の RLZ あるいは RFP で治療した際の足蹠腫脹値から両薬剤の治療効果を比較すると, RLZ の 2.5 mg/kg 投与3週後, 2.5 および 5.0 mg/kg 投与4週後, また 2.5, 5.0 および 10 mg/kg 投与6週後に

Table 1 Comparative therapeutic efficacy of rifalazil and rifampicin in superficial lesions in mouse hind footpads induced by *M. ulcerans*^a

Drug	Dose (mg/kg/day)	No. of mice used	Weeks after infection (No. of mice observed)					
			1 (15 mice)	2 (15 mice)	3 (10 mice)	4 (10 mice)	5 (5 mice)	6 (5 mice)
Control (infected)	0	15	-/- ^b	-/-	-/-	1+/-	2+/-	2+/-
RLZ	2.5	15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
RLZ	5	15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
RLZ	10	15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
RFP	2.5	15	-/-	-/-	-/-	-~1+/-	1~2+/-	2+/-
RFP	5	15	-/-	-/-	-/-	-~1+/-	-~2+/-	-~1+/-
RFP	10	15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

^a Five-week-old female BALB/c mice were infected subcutaneously with $25 \mu\text{l}$ (4.0×10^4 CFU) of the bacterial suspension into each hind footpad. Mice were treated with RLZ or RFP at a dose of 2.5, 5, or 10 mg/kg/day by gavage once daily 5 times per week from day 1 for up to 6 weeks after infection. Mice in each group were observed for the appearance and degree of gross skin lesions in one or both hind footpads. Five mice were sacrificed at 2, 4 and 6 weeks after initiation of drug administration, and used for counting the CFU.

^b The erythema (numerator) and ulcerative lesion (denominator) were graded from - to 2+ (-, none; 1+, slight; and 2+, moderate).

おける腫脹値はRFPにおけるよりも有意に低く ($P < 0.01 \sim 0.001$), RLZがRFPよりも優れているといえる。

Fig.に感染対照マウス (A), RLZ (B) あるいはRFP (C) の2.5 mg/kg投与マウスの6週後の後足蹠の肉眼的所見を示した。

(3) CFUの推移

①足蹠 (Table 3): 感染対照群では2週以降経過とともに漸増した。一方RFPの2.5および5 mg/kg投与群の2および4週後の \log_{10} CFUは感染対照群と同程度であったが、6週後では低下した。また、10 mg/kg投与の2および4週後ではほとんど増菌傾向はなく、6週後では顕著な低下がみられた。これに対してRLZ投与群では、投薬開始後経過と共に用量依存性に低下し、かつその程度はRFPに比べて顕著であった。

いま、感染マウスを同一用量のRLZあるいはRFPで治療した際の感染局所のCFUから両剤の効果を比較す

ると、治療開始2, 4および6週後のいずれの時期でも、RLZ投与群ではRFP投与群よりも有意に低く ($P < 0.001$), RLZがRFPよりも優れた抗*M.ulcerans*活性を有するといえる。

②脾: 治療6週後では、対照群全例の脾から生菌が検出されたが、 \log_{10} CFUは2.16~3.32と低値であった。一方RFP 2.5 mg/kg投与群では、5匹中3匹から1.76~2.49とより少ない菌しか検出されなかった。因みに、これらのマウスの足蹠からの \log_{10} CFUはそれぞれ7.18~7.44および6.80~7.04であった。

考 察

新 Benzoxazinorifamycin RLZ (KRM-1648) はわが国で Yamaneら²¹⁾により合成され、すぐれた *in vitro*ならびに *in vivo*抗マイコバクテリア活性を有することが久世ら²²⁾, Saitoら^{23)~29)}, Yamamotoら³⁰⁾によって報告され、

Table 2 Comparative therapeutic efficacy of rifalazil and rifampicin against hind footpad swelling induced by *M. ulcerans*^a

Drug	Dose (mg/kg/day)	No. of mice	Weeks after infection					
			1	2	3	4	5	6
Infected (control)	0	5	1.7±1.1	1.1±1.7	8.0±2.8	135.0±5.6	177.7±9.5	229.9±7.9
RLZ	2.5	5	3.2±1.2	-2.6±0.8	-5.1±1.6 ^{b,c}	4.1±1.6 ^c	7.2±1.6 ^c	5.2±0.8 ^c
RLZ	5	5	5.5±1.1	-5.1±1.2	-6.0±1.3 ^c	0.4±1.4 ^c	4.5±1.6 ^c	2.7±1.9 ^c
RLZ	10	5	2.8±1.1	-4.5±1.1	-8.9±1.5 ^c	2.9±1.5 ^c	4.4±1.2 ^c	3.7±1.2 ^c
RFP	2.5	5	2.2±1.2	3.6±1.7	12.6±2.1	124.4±9.2	162.8±13.3	178.7±8.0 ^c
RFP	5	5	0.3±0.6	-2.9±0.9	1.1±2.1	72.1±14.2 ^b	141.2±12.0	99.7±8.7 ^c
RFP	10	5	4.8±1.5	-2.1±1.7	-8.0±1.2 ^c	2.6±1.5 ^c	13.8±2.5 ^c	15.2±2.5 ^c

^aMice were infected with 25 μ l (4.0×10^4 CFU) of bacterial suspension in both hind footpads and treated with drugs by gavage once daily 5 times per week from day 1 for up to 6 weeks after infection. Thickness of both footpads was measured with "dial thickness gauge", and the swelling was figured out by subtracting the mean thickness of normal control from that of indicated week [mean swelling \pm SE ($\times 10^{-2}$ mm)]. Data on five mice in each group that could be observed for six weeks after initiation of drug administration were described.

^bSignificantly different from infected control group ($P < 0.01$)

^cSignificantly different from infected control group ($P < 0.001$)

^dSignificantly different between RLZ and RFP ($P < 0.01$)

^eSignificantly different between RLZ and RFP ($P < 0.001$)



Fig. Gross lesions of the hind footpads of *M. ulcerans*-infected mice treated or untreated with RLZ or RFP for 6 weeks. Erythema, swelling and ulcerative lesion with exudate were demonstrated in a footpad of untreated control mouse (A). No superficial gross lesions were found in a footpad of rifalazil (2.5 mg/kg/day) treated mouse (B). Erythema and swelling were observed in a footpad of RFP (2.5 mg/kg/day) treated mouse (C).

Table 3 Comparative therapeutic efficacy of rifalazil and rifampicin on the bacterial loads in hind footpads of *M. ulcerans*-infected mice^a

Drug	Dose (mg/kg/day)	No. of mice	Weeks after starting drug administration [log CFU/footpad (mean ± SE)]		
			2 (5 mice)	4 (5 mice)	6 (5 mice)
Infected (control) ^b	0	15	5.56 ± 0.04	6.29 ± 0.05	7.33 ± 0.05
RLZ	2.5	15	4.14 ± 0.02 ^d	3.28 ± 0.18 ^d	3.47 ± 0.18 ^d
RLZ	5	15	3.59 ± 0.11 ^d	3.28 ± 0.17 ^d	3.27 ± 0.28 ^d
RLZ	10	15	3.36 ± 0.11 ^d	2.35 ± 0.12 ^d	< 2.1 ^d
RFP	2.5	15	5.39 ± 0.08	6.26 ± 0.04	6.77 ± 0.10 ^d
RFP	5	15	5.65 ± 0.06	6.18 ± 0.07	6.22 ± 0.18 ^d
RFP	10	15	5.25 ± 0.07 ^c	5.31 ± 0.04 ^c	3.57 ± 0.19 ^d

^aMice were infected with 25 μ l (4.0×10^4 CFU) of bacterial suspension in both hind footpads and treated with drugs by gavage once daily 5 times per week from day 1 for up to 6 weeks after infection. Five mice in each group were sacrificed for bacterial load enumeration on every 2 weeks.

^bBacterial loads (logCFU/footpad) on day 1 after infection: 5.22 ± 0.03 (mean of 5 mice ± SE)

^cSignificantly different from infected control ($P < 0.01$)

^dSignificantly different from infected control ($P < 0.001$)

^eSignificantly different between RLZ and RFP ($P < 0.001$)

外国においても Bermudez³¹⁾, Klemens³²⁾³³⁾, Bao-hong³⁴⁾によって追認されている。

最近 Dhople¹⁵⁾は *M. ulcerans* 足蹠内感染マウスを RLZ ならびに RFP 各含有食餌で飼育し、感染局所の CFU を指標として RLZ が RFP よりもすぐれた抗菌活性を有することを報告している。実験には *M. ulcerans* ATCC 19423 が供試されているが、この菌株の RLZ および RFP 感受性やマウス足蹠内接種後の局所所見については記述されていない。今回われわれは *M. ulcerans* 足蹠内感染マウスに RLZ または RFP を経口ゾンデで投与し、感染局所病変(発赤、潰瘍、腫脹)の経過と局所および脾内 CFU の推移を追究し、両薬剤の抗菌活性を比較検討した。今回われわれが供試した *M. ulcerans* 97-107 は西アフリカの Benin で分離された卵培地継代株で、RLZ の本菌に対する MIC は 0.025 μ g/ml で、RFP の 0.78 μ g/ml をはるかに凌駕するものである。BALB/c 系雌マウス両足蹠内への本菌 4×10^4 CFU 接種により 4 週後には発赤と腫脹、6 週後には潰瘍が出現したが、RLZ は供試最小の 2.5 mg/kg の投与によってもこれら病変の出現を完全に阻止した。これらマウスの足蹠内 CFU は、2.5 mg/kg、2 週間の治療で、接種 1 日後の log₁₀ CFU/足蹠値 (5.22) より log₁₀ CFU が 1.1、治療 4 週後に 1.8 (感染対照より 3.9) 低く、また 10 mg/kg、2、4 および 6 週間の治療で接種 1 日後の log₁₀ CFU/足蹠値より 1.9、2.9 および > 3.1 (感染対照より 2.2、3.9 ならびに > 5.2) 低かった。如上の成績より、感染局所病変の出現抑制の点からも、また CFU の低下の点からも RLZ が優れた *in vivo* 抗 *M. ulcerans* 治療効果を有することは明らかである。Dhople の実験系では、感染対照マウス足蹠内における菌増殖は 6 週間で 6 ~ 8 倍にすぎず、1950 年分離の供試菌

ATCC 19423 株の継代培養によるマウスに対するビルレンスの低下がうかがえる。また CFU の検出限界値が明らかにされていないが、表に示されたもっとも小さい CFU 値は 0.19×10^7 で 0 とのギャップが大きく、CFU 値の比較検討実験としては必ずしも満足すべきではないものといえよう。

一方、RFP はマウスモデルを用いた *M. ulcerans* 感染に対してある程度の有効性が認められており¹⁷⁾、ヒトでは Ghana や Côte d'Ivoire で実施された Buruli 潰瘍治療のパイロット試験において streptomycin または amikacin¹⁹⁾、あるいは dapsone¹⁸⁾ との併用剤として用いられている。今回のわれわれの実験からも明らかのように、RFP の抗 *M. ulcerans* 活性は 2.5 および 5 mg/kg 投与では足蹠の潰瘍形成阻止、また感染 6 週後の足蹠の腫脹と足蹠内 CFU が感染対照群よりも低かったこと、10 mg/kg 投与では全観察期間中足蹠の肉眼的病変阻止と治療 6 週後の CFU の顕著な低下がみられたことから、RFP はある程度の抗 *M. ulcerans* 活性を有するといえてよいが、上述した RLZ の活性には、はるかに及ばないといえよう。

今回の検討は感染翌日より投薬を開始しており、真の意味での治療実験とはいえない。先にわれわれは *M. ulcerans* 3.25×10^4 CFU を両足蹠感染させ、局所に発赤、腫脹が現れた 33 日目から RLZ 5 および 10 mg/kg/日の経口投与を 15 週間行ったところ極めてすぐれた治療効果がみられたこと、また休薬 15 週後でも再発はみられなかったことについて報告している (H. Saito, N. Ishii, N. Nakanaga: Therapeutic Efficacy of Rifalazil (KRM-1648) against Experimental Buruli Ulcer Induced in Mice. 103rd General Meeting, American Society for Microbiology, Session No. 390/U. Abstract U-83, May 22, 2003, Washington,

D.C.)。これについては近く Antimicrob Agents Chemother. に投稿の予定である。

われわれの経験によれば、*M. ulcerans* 97-107株の実験的マウス両後足蹠感染 [接種 CFU = $(4 \times 10^4) \times 2$] での局所の肉眼的病変 (発赤・腫脹・潰瘍) は菌接種 3~4 週後に現れる。毒素産生菌である *M. ulcerans* の感染局所の CFU と病変成立との相関については、足蹠の \log_{10} CFU が 6 以上になると局所の発赤、腫脹が出現し、7 以上になると多量の浸出液をとまなう潰瘍を生じ、血液、脾臓、肝臓などからも菌が検出されるようになる (未発表データ)。今回の実験において、RLZ 2.5, 5 および 10 mg/kg ならびに RFP 10 mg/kg 投与群では発赤、腫脹、潰瘍が認められなかったが、このことはかかる病変をひきおこしうる菌量の閾値に達する以前に菌の増殖が抑制されたためであろう。しかし、例えば感染対照群と RFP 5 mg/kg 治療群の 4 週後の足蹠内 \log_{10} CFU 値は 6.29 と 6.18 であり、両者間に差は認められなかったにもかかわらず、これら 2 群の腫脹値間には有意差があり、しかも発赤は感染対照群より RFP 治療群のほうが軽微であったことから、足蹠の肉眼的病変の程度と CFU はおおむね平行するものの、細部においては必ずしも一致していない。この点に関しては、*M. ulcerans* の病原性と産生毒素、特にマイコラクトンとの関連性を示唆する報告^{8) 35)~38)} もあり、今回の薬剤治療実験においても CFU のみではなく、菌の毒素産生状況などが病変成立に深く関与していることが示唆される。従って、*M. ulcerans* に対する化学療法剤の有効性の検討に当たっては、単に CFU のみを指標とするにとどまらず、感染局所病変の経過観察をも加味した総合的判定が望まれよう。

ま と め

M. ulcerans 97-107株の Middlebrook 7H9 培養菌の 25 μ l (CFU = 4×10^4) を両後足蹠皮下に注射し、その翌日より RLZ または RFP の 2.5, 5 および 10 mg/kg/日 を週 5 回、6 週間にわたって経口投与し、感染局所の肉眼的所見と局所 CFU から両薬剤の抗 *M. ulcerans* 活性を検討した結果、RLZ が RFP よりもはるかに優れた効果を有することが明らかになった。

謝 辞

薬剤を提供いただいた鐘淵化学工業株式会社ならびに第一製薬株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) Horsburgh CR Jr., Meyers WM: Buruli ulcer. In: Pathology of Emerging Infections, Horsburgh CR Jr., Nelson AM, eds., American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 1997, 119-126.
- 2) van der Werf TS, van der Graaf WTA, Tappero JW, et al.: *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet. 1999 ; 354 : 1013-1018.
- 3) WHO: Buruli ulcer disease. *Mycobacterium ulcerans* infection. Wkly Epidemiol Rec. 2002 ; 77 : 271-275.
- 4) WHO: Buruli ulcer. *Mycobacterium ulcerans* infection. Wkly Epidemiol Rec. 2002 ; 77 : 165-166.
- 5) WHO: Buruli ulcer. Global Situation. Website: http://www.who.int/gtb_buruli/global-situation/index.html
- 6) 御子柴甫, 進藤泰子, 松本颯樹, 他: *Mycobacterium ulcerans* 類似菌による非定型抗酸菌症の 1 例. 日皮会誌. 1982 ; 92 : 557-565.
- 7) WHO: Buruli ulcer. Global Buruli Ulcer Initiative. Website: http://www.who.int/gtb_buruli/initiative/index.html
- 8) George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, et al.: Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. Science. 1999 ; 283 : 854-857.
- 9) Portaels F, Traore H, De Ridder K, et al.: *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42 : 2070-2073.
- 10) Thangaraj HS, Adjei O, Allen BW, et al.: *In vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. J Antimicrob Chemother. 2000 ; 45 : 231-233.
- 11) Dhople AM: *In vitro* activity of KRM-1648, either singly or in combination with ofloxacin, against *Mycobacterium ulcerans*. Int J Antimicrob Agents. 2001 ; 17 : 57-61.
- 12) Dhople AM: Antimicrobial activities of dihydrofolate reductase inhibitors, used singly or in combination with dapsone, against *Mycobacterium ulcerans*. J Antimicrob Chemother. 2001 ; 47 : 93-96.
- 13) Dhople AM, Namba K: *In vitro* activity of sitafloxacin (DU-6859a) alone, or in combination with rifampicin, against *Mycobacterium ulcerans*. J Antimicrob Chemother. 2002 ; 50 : 727-729.
- 14) Dega H, Robert J, Bonnafous P, et al.: Activities of several antimicrobials against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2000 ; 44 : 2367-2372.
- 15) Dhople AM: *In vivo* susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to KRM-1648, a new benzoxazinorifamycin, in comparison with rifampicin. Anti-mycobacterial activity of KRM-1648. Arzneimittelforschung. 2001 ; 51 : 501-505.
- 16) Bentoucha A, Robert J, Dega H, et al.: Activities of new macrolides and fluoroquinolones against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 3109-3112.
- 17) Dega H, Bentoucha A, Robert J, et al.: Bactericidal activity of rifampin-amikacin against *Mycobacterium ulcerans* in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2002 ; 46 : 3193-3196.
- 18) Espey DK, Djomand G, Diomande I, et al.: A pilot study of treatment of Buruli ulcer with rifampin and dapsone. Int J Infect Dis. 2002 ; 6 : 60-65.

- 19) WHO: Buruli ulcer disease. *Mycobacterium ulcerans* infection. Wkly Epidemiol Rec. 2003 ; 78 : 163-168.
- 20) McClatchy JK, Waggoner RF, Kanes W, et al. : Isolation of *Mycobacteria* from clinical specimens by use of selective 7H11 medium. Am J Clin Pathol. 1976 ; 65 : 412-415.
- 21) Yamane T, Hashizume T, Yamashita K, et al. : Synthesis and biological activity of 3'-hydroxy-5'-aminobenzoxazinorifamycin derivatives. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1993 ; 41 : 148-155.
- 22) 久世文幸, 山本 譽, 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.
- 23) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : *In vitro* antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins. Antimicrob Agents Chemother. 1991 ; 35 : 542-547.
- 24) 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.
- 25) Yamamoto Y, Saito H, Tomioka H, et al. : *In vitro* and *in vivo* activities of KRM-1648, a newly synthesized benzoxazinorifamycin, against *Mycobacterium marinum*. Zbl Bakt. 1992 ; 277 : 204-209.
- 26) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : *In vitro* and *in vivo* anti-leprosy activities of benzoxazinorifamycin (KRM-1648) and clarithromycin, Proceedings of Twenty-Seventh U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 1992 ; 38-42.
- 27) 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.
- 28) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : Therapeutic effect of KRM-1648 with various antimicrobials against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. Tuberc Lung Dis. 1995 ; 76 : 51-58.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Bermudez LE, Kolonboski P, Young LS, et al. : Activity of KRM-1648 alone or in combination with ethambutol or clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex in beige mouse model of disseminated infection. Antimicrob Agents Chemother. 1994 ; 38 : 1844-1848.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) George KM, Pascopella L, Welty DM, et al. : A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. Infect Immun. 2000 ; 68 : 877-883.
- 36) Pahlevan AA, Wright DJ, Andrews C, et al. : The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. J Immunol. 1999 ; 163 : 3928-3935.
- 37) Gomez A, Mve-Obiang A, Vray B, et al. : Biochemical and genetic evidence for phospholipase C activity in *Mycobacterium ulcerans*. Infect Immun. 2000 ; 68 : 2995-2997.
- 38) Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, et al. : Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans* : implications for virulence. Infect Immun. 2003 ; 71 : 774-783.

Original Article

COMPARISON OF INHIBITORY EFFECT OF RIFALAZIL AND RIFAMPICIN AGAINST *MYCOBACTERIUM ULKERANS* INFECTION INDUCED IN MICE¹Kazue NAKANAGA, ²Hajime SAITO, ¹Norihisa ISHII, and ³Masamichi GOTO

Abstract [Purpose] Buruli ulcer is a human skin disease caused by *Mycobacterium ulcerans* infection, which is characterized by massive skin ulceration and persistent necrotic change. In recent years Buruli ulcer has rapidly emerged as an increasingly important cause of human morbidity around the world. The disease is endemic at least 32 countries in Africa, Western Pacific, Asia and South America, and it is considered the third most common mycobacterial infection of humans after tuberculosis and leprosy. An effective chemotherapeutic regimen against Buruli ulcer disease has not been established to date. In this study, the inhibitory effect of rifalazil (RLZ) against *M. ulcerans* was assessed in experimentally infected mice and compared to that of rifampicin (RFP).

[Materials and Methods] Five-week-old BALB/c female mice were challenged with 25 μ l (CFU = 4×10^4) of *M. ulcerans* cultured in Middlebrook 7H9 broth in bilateral hind footpads. Mice were administered *per os* with a suspension of RLZ or RFP at 2.5, 5, or 10 mg/kg once daily 5 times per week starting from one day up to 6 weeks after infection. During the treatment, mice were observed weekly for footpad skin lesions and examined for footpad swelling. In addition, CFU enumeration was done on both hind footpads and spleen at 2, 4, and 6 weeks after initiating treatment.

[Results] In the infected control mice group, slightly erythematous lesions and moderate swelling of footpads were observed 4 weeks after the infection. Ulcerative lesion was observed 6 weeks after the infection. Mean log₁₀ CFU/footpad (FP) was 5.22 on day 1 after the infection and increased to 5.56, 6.29, and 7.33 at 2, 4, and 6 weeks after treatment was initiated in the treated groups. On the other hand, no visible ery-

thema, swelling or ulcerative lesion in footpads were observed in RLZ-administered groups. Furthermore, log₁₀ CFU/FP decreased to 4.14 after only 2 weeks of initiating treatment in 2.5 mg/kg administered group, i.e. the lowest dose employed group. Log₁₀ CFU/FP decreased to <2.1 in 6 weeks in the 10 mg/kg administered group, which was close to the detection limit (<1.7) of the CFU assay. By contrast, inhibitory effect on disease progression and reduction of CFU were observed only in the group of mice given 10 mg/kg among RFP-administered groups; the reduction of CFU was not observed in the early period but 6 weeks after initiating treatment.

[Conclusion] These results clearly demonstrate that the *in vivo* anti-*M. ulcerans* activity of RLZ is much higher than RFP. RLZ activity against *M. ulcerans* can be expected to control the disease progression in the clinical applications.

Key words: *Mycobacterium ulcerans*, Rifalazil, Rifampicin, Murine infection model, Inhibitory effect

¹Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, ²Hiroshima Environment and Health Association, ³Second Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kagoshima University

Correspondence to: Kazue Nakanaga, Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1, Aoba-cho, Higashimurayama-shi, Tokyo 189-0002 Japan. (E-mail: nakanaga@nih.go.jp)