

## 【短 報】

Rifalazil, clarithromycin および levofloxacin の 7HSF 液体培地中の結核菌および *Mycobacterium avium* に対する抗菌作用発現パターン佐野 啓介<sup>1,2)</sup>・佐藤 勝昌<sup>1)</sup>・富岡 治明<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 島根医科大学微生物・免疫学教室\*<sup>2)</sup> 同 耳鼻咽喉科学教室

(平成 13 年 8 月 1 日受付・平成 13 年 10 月 29 日受理)

7HSF 液体培地中での培養結核菌 Kurono 株および *Mycobacterium avium* N-444 株に対する rifalazil (旧名: KRM-1648), clarithromycin (CAM) および levofloxacin (LVFX) の抗菌作用の発現パターンについて検討した。供試菌を浮遊させた 7HSF 培地 (200  $\mu$ L) に上記薬剤を最終濃度がヒトでの  $C_{max}$  相当濃度となるように加え、37°C で 10 日間にわたって培養し、経時的に供試菌の生残菌数 (CFU) を計測したところ、結核菌に対しては、rifalazil と LVFX とが強い抗菌力を示し、培養 3~5 日で生残菌数は検出限界以下になった。また CAM の場合は、5 日目までの緩徐な殺菌作用がみられたものの、その後の phase では菌の再増殖が認められた。次に、*M. avium* の場合、培養 3 日目までは rifalazil により速やかに殺菌されたが、その後は再増殖に転じた。他方、CAM や LVFX には *M. avium* に対する増殖阻害作用が認められたに過ぎず、*M. avium* のこれら薬剤に対する感受性の低さが浮き彫りにされた。

**Key words:** rifalazil, clarithromycin, levofloxacin, 結核菌, *Mycobacterium avium*

さきにわれわれは、benzoxazinorifamycin, rifalazil (旧名: KRM-1648) が、結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) などの抗酸菌に対して優れた *in vitro* 抗菌活性を有すること<sup>1, 2)</sup>、さらに実験的マウス結核症および MAC 感染症モデルを用いての検討で、rifampicin (RFP) 感受性あるいは中等度耐性結核菌や MAC 菌による感染症に対して RFP や rifabutin と比較して、より優れた *in vivo* 治療効果を示すことを報告したが<sup>3, 4)</sup>、最近 Shoen ら<sup>5)</sup>により結核菌感染マウスへの rifalazil と isoniazid (INH) の 12 週間わたる併用投与によって、肺や脾臓中の生菌数が検出限界以下にまで減少すること、さらに治療終了後の再発が完璧に抑えられることが報告されている。また rifalazil については、現在、phase II の臨床試験が進行中であるが、最近 Dietze ら<sup>6)</sup>により実施された塗抹陽性肺結核患者を対象としての臨床試験では、INH (5 mg/kg, 1 日 1 回) + rifalazil (10 または 25 mg, 週 1 回) との併用投与では、INH (5 mg/kg, 1 日 1 回) と rifalazil (10 mg, 1 日 1 回) に比べて統計的に有意ではないものの喀痰中への排菌数の減少がより速やかであること、いずれのレジメンでも特に問題となる副作用は認められないことなどが明らかになっている。ところで、rifalazil の結核菌に対する抗菌作用のキネティクスについては、これまでのところ薬剤感受性あるいは RFP 耐性結核菌に対する rifalazil の抗菌作用を RFP のそれと比較した成績<sup>7)</sup>や、

*M. avium* に対する rifalazil 単独あるいは ethambutol との併用による殺菌作用をみた成績<sup>8)</sup>、さらにはマクロファージや II 型肺胞細胞内局在結核菌に対する rifalazil の抗菌作用発現についてのわれわれの成績<sup>7, 9-11)</sup>などが報告されているに過ぎず、rifalazil が液体培地中の結核菌と *M. avium* に対してどのようなパターンの抗菌作用を示すのかに関して比較検討を行った報告例には接し得ていない。そこで今回は、rifalazil の 7HSF 液体培地中の結核菌さらには *M. avium* に対する抗菌作用発現パターンについて比較検討し、MAC 菌に対して優れた *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性を有し、特に全身播種性 MAC 症に著効を示すことの知られる clarithromycin (CAM)<sup>1, 12, 13)</sup>ならびに second-line の抗結核薬としての用途が期待される levofloxacin (LVFX)<sup>14)</sup>の抗菌作用発現の様相との比較を試みた。

供試菌株としては臨床分離株である結核菌 Kurono 株 (薬剤感受性株) と *M. avium* N-444 株 (血清型 8) とを用いた。これらは Middlebrook 7H9 培地で培養し、0.1 % 牛血清アルブミン加 PBS に浮遊した後、-80°C に凍結保存した。なお、rifalazil, CAM および LVFX のこれら供試菌に対する MIC 値は、結核菌 Kurono 株でそれぞれ 0.025, 6.25 および 0.39  $\mu$ g/mL, *M. avium* N-444 株でそれぞれ 0.05, 6.25 および 12.5  $\mu$ g/mL であった。

抗菌薬としては rifalazil (鐘淵化学工業), CAM (ダ

イナボット), LVFX (第一製薬) を供試した。Rifalazil と CAM は dimethylsulfoxide で, また LVFX は 0.1 N NaOH で 3 mg/mL の濃度に溶解し, 用時 7HSF 培地 (Middlebrook 7H11 から寒天と malachite green を除いた液体培地) で希釈した。

各薬剤の供試菌に対する抗菌活性は以下の方法によって測定した。臨床投与量の供試薬剤の経口投与後に得られる  $C_{max}$  値に相当する濃度の薬剤 (rifalazil, 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; CAM, 2.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; LVFX, 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含有する 7 HSF 培地の 200  $\mu\text{L}$  (丸底 microculture well) に供試菌 ( $5 \times 10^3$  CFU) を接種し, 10 日間にわたり 37°C で培養した。経時的に菌液を採取し, 0.05% Tween 80 添加 (結核菌) または非添加 (*M. avium*) 蒸留水で 20 倍に希釈後, 遠心集菌 (2,000 g, 30 分) を行い, さらに菌の遠心洗浄を 1 回繰り返して行った後, 得られた沈渣をそれぞれ 0.25 mL の Tween 80 添加あるいは非添加蒸留水に浮遊させ, さらに 10 倍段階希釈を行い, その 0.1 mL を 7H11 寒天平板に拡げ 37°C で培養して CFU 計測を行った。

Fig. 1 は, 7HSF 培地中の結核菌および *M. avium* に対する rifalazil の抗菌作用のキネティクスを比較したものである。結核菌では rifalazil による速やかな殺菌がみられ, 培養 3 日目には検出限界以下となり, その後の phase での菌の再増殖は認められなかった。他方 *M. avium* では, 培養 3 日目までは rifalazil による緩やかな殺菌を認めたが, その後は緩徐な再増殖に転じた。

Fig. 2 は, 同様の方法で結核菌および *M. avium* に対する CAM の抗菌作用の発現パターンを比較したものである。結核菌では, CAM による培養 5 日目までの緩

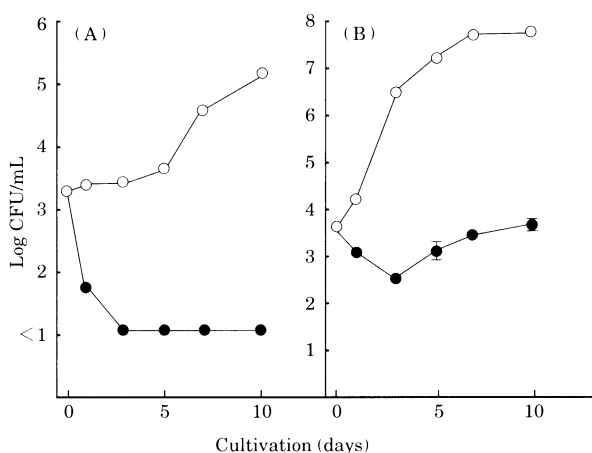


Fig. 1. Antimicrobial activity of rifalazil against *Mycobacterium tuberculosis* Kurono (A) and *Mycobacterium avium* N-444 (B) strains. Organisms were cultured in the presence (●) or absence (○) of rifalazil (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Each plot indicates mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ , error bars were omitted when S.E.M. was  $<0.1$ ). The detection limit in terms of "log CFU/well" was 1.1.

徐な殺菌がみられたが, 生残菌数が検出限界以下になることはなく, それ以降の phase では菌の再増殖が認められた。他方, *M. avium* では, CAM の殺菌作用は認められなかったが, 培養 10 日間にわたっての有意な増殖阻害作用を認めた。

Fig. 3 は, 上述と同様の条件下での結核菌および *M. avium* に対する LVFX の抗菌作用の発現パターンを比較したものである。結核菌では, rifalazil の場合と同じく速やかな殺菌がみられ培養 5 日目には検出限界以下となり, その後の phase での菌の再増殖は認められなかった。これに対して *M. avium* では, 培養全期間にわたっての LVFX による弱い増殖阻害を認めたに過ぎなかった。

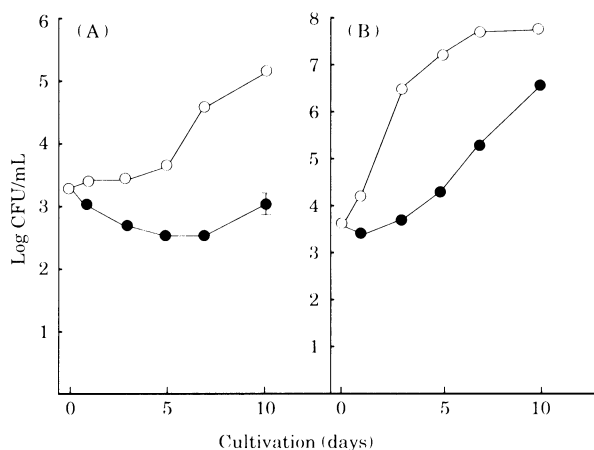


Fig. 2. Antimicrobial activity of clarithromycin against *Mycobacterium tuberculosis* Kurono (A) and *Mycobacterium avium* N-444 (B) strains. Organisms were cultured in the presence (●) or absence (○) of clarithromycin (2.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Other details are the same as in Fig. 1.

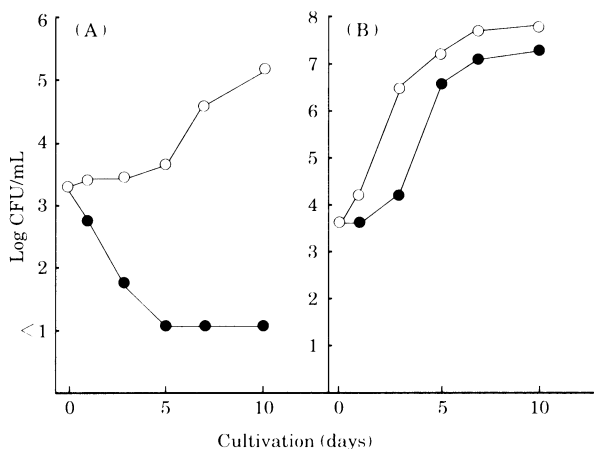


Fig. 3. Antimicrobial activity of levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* Kurono (A) and *Mycobacterium avium* N-444 (B) strains. Organisms were cultured in the presence (●) or absence (○) of levofloxacin (2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Other details are the same as in Fig. 1.

Rifalazil をはじめとして今回供試のリファマイシン、マクロライド、キノロン薬のいずれの場合も、7 HSF 培地中の *M. avium* に対する抗菌作用の発現は、同じ条件下での結核菌に対する抗菌作用発現の場合に比べて著しく弱く、*M. avium* のこれら薬剤に対する感受性の低さを浮き彫りにする結果といえる。特に first-line あるいは second-line の抗結核薬として期待される rifalazil や LVFX は<sup>1)</sup>、7HSF 培地中の結核菌に対してはいずれも強い殺菌作用を示したが、*M. avium* に対する抗菌作用のパターンには両剤の間で大きな違いが認められた。

すなわち、rifalazil では一過性であるとは言え、培養初期においては有意なレベルの殺菌作用を示したのに対して、LVFX では培養全期間を通して弱い増殖阻害能が認められたに過ぎず、このことからしても LVFX の *in vivo* 抗 *M. avium* 活性を期待することは難しいものと考えられた。また興味深いことに、現在は抗結核薬としては用いられていない CAM にあっても、その 7HSF 培地中増殖菌に対する抗菌力は結核菌の場合の方が *M. avium* の場合よりも優れていた。このことより、CAM には MAC 感染症に対する治療効果だけでなく、ある程度の *in vivo* 抗結核菌活性もあるいは期待できるのではないかと考えられる。

Rifalazil を *M. avium* に作用させた場合には、培養 3 日日以降に菌の再増殖がみられたが、今回は数回にわたりコロニー純化を行って得た供試菌を用いており、薬剤の作用に耐えて生き残った耐性菌が増殖したものは考え難い。このことを確かめる目的で、供試薬剤に接触前の菌株と薬剤接触後の再増殖時の菌株の MIC 値を 7H11 培地を用いての希釈法で求めたところ、1 結核菌 Kurono 株の薬剤接触後の再増殖 phase での MIC については rifalazil および LVFX では菌の再増殖が認められず測定できなかったが、CAM では薬剤接触前で 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、薬剤接触後の再増殖時で 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、他方、2 *M. avium* N-444 株では、薬剤接触前と薬剤接触後の再増殖 phase での MIC は、rifalazil でそれぞれ 0.05 および 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CAM でそれぞれ 6.25 および 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LVFX でそれぞれ 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。したがっていずれの供試菌株とも薬剤接触前と再増殖時の抗菌薬感受性には特に変化は認められないことより、今回の検討で認められた薬剤接触後にみられる菌の再増殖は主に培地中に添加した rifalazil の活性低下に起因したものではないかと考えられる。また、われわれは先の検討で、A-549 II 型肺胞上皮細胞内局在 MAC 菌に rifalazil を作用させたところ、培養 1 ないし 3 日日以降の phase で菌の再増殖が起こることを見だしているが、この場合も rifalazil 耐性菌の出現は認められていない<sup>10)</sup>。ところで MAC 菌については、*in vitro* 系の場合に限らず、感染マウスの肺や脾臓などでも rifalazil やその他の抗菌薬による化療施行中

に菌の再増殖が認められているが<sup>14)</sup>、この場合も薬剤耐性菌の出現は観察されていない。この *in vivo* 系でみられる MAC 菌の再増殖は、TGF- $\beta$  や IL-10 などの免疫抑制性サイトカインの産生に起因した宿主抗 MAC 抗菌免疫の低下にその原因を求め得るものであり<sup>15)</sup>、今回の *in vitro* 培養系での検討でみられた MAC 菌の再増殖のメカニズムとは本質的に異なるものと考えられる。

供試薬剤を分与いただいた鐘淵化学工業、ダイナボット、第一製薬に深謝します。

## 文 献

- 1) Tomioka H: Prospects for development of new antimicrobial drugs, with special reference to a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648. Arch Immunol Ther Exp 48: 183~188, 2000
- 2) 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 39: 2295~2303, 1995
- 3) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: In vitro antimycobacterial activity of newly synthesized benzoxazinorifamycins. Antimicrob Agents Chemother 35: 542~548, 1991
- 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 36: 387~393, 1992
- 5) Shoen C M, DeStefano M S, Cynamon M H: Durable cure for tuberculosis: rifalazil in combination with isoniazid in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Infect Dis 30: S 288~290, 2000
- 6) Dietze R, Teixeira L, Rocha L M C, et al.: Safety and bactericidal activity of rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 45: 1972~1976, 2001
- 7) Luna-Herrera J, Reddy M V, Gangadharam P R J: In vitro activity of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 against drug-susceptible and multidrug-resistant tubercle bacilli. Antimicrob Agents Chemother 39: 440~444, 1995
- 8) Inderlied C B, 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 38: 1838~1843, 1994
- 9) Sato K, Akaki T, Tomioka H: Antimicrobial activities of benzoxazinorifamycin KRM-1648, clarithromycin, and levofloxacin against intracellular *Mycobacterium avium* complex phagocytosed by murine peritoneal macrophages. J Antimicrob Chemother 41: 77~83, 1998
- 10) Sato K, Tomioka H: Antimicrobial activities of benzoxazinorifamycin (KRM-1648) and clarithromycin against *Mycobacterium avium*-intracellular complex within murine peritoneal macrophages, human macrophage-like cells and human alveolar epithelial cells. J Antimicrob Chemother 43: 351~357, 1999

- 11) 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* 16: 25~29, 2000
- 12) Dautenberg B: Clinical trials in *Mycobacterium avium* therapy: lessons to take home. *Res Microbiol* 145: 197~206, 1994
- 13) Heifets L: Clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infection. *Tuberc Lung Dis* 77: 19~26, 1996
- 14) 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* 76: 51~58, 1995
- 15) Tomioka H, Sato K, Shimizu T, et al.: Effects of benzoxazinorifamycin KRM-1648 on cytokine production at sites of *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 357~362, 1997

### Antimicrobial activities of rifalazil, clarithromycin, and levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* cultivated in 7HSF medium

Keisuke Sano, Katsumasa Sato and Haruaki Tomioka

Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University,  
89-1 Enya-cho, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

Profiles of the expression of antimicrobial activities of rifalazil (previously known as KRM-1648), clarithromycin (CAM), and levofloxacin (LVFX) against *Mycobacterium tuberculosis* Kurono and *Mycobacterium avium* N-444 strains were studied. The number of residual bacterial CFU was estimated after cultivation of test organisms in 7HSF medium containing these drugs at  $C_{max}$ , at 37°C for up to 10 days. Rifalazil and LVFX both displayed potent microbicidal effect against the *M. tuberculosis*, and the number of residual bacterial CFU declined to below detectable within 3 to 5 days after the start of cultivation. CAM exerted moderate bactericidal activity against the *M. tuberculosis* during the first 5 days but bacterial regrowth was observed thereafter. Rifalazil rapidly killed the *M. avium* within 3 days, but subsequent progressive regrowth of organisms was observed. Both CAM and LVFX exhibited no more than a growth-inhibitory action against *M. avium*. These findings emphasize that *M. avium* is evidently less susceptible to these antimycobacterial drugs, particularly LVFX, than *M. tuberculosis*.