항결핵제 Rifampicin에 관한 기초적 연구

결핵 결핵연구원 세균부

김 성 진·김 상 재

(대한결핵협회회장 이 재 규)
(결 핵 연 구 원 장 송 달 호)

— Abstract —

Antimicrobial Activity of Rifampicin in Vitro and in Established Tuberculosis in Mice

Sung Chin Kim, M. D. and Sang Chae Kim, M. P. H.

Dept. of Bacteriology, Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association

A study was made of antimicrobial activity of rifampicin in vitro against 31 clinical isolates from Korean TB patients without previous antituberculous chemotherapy. Also the strains were tested, the standard strain $H_{37}Rv$, M. bovis, M. avium and 6 strains of mycobacteria other than M. tuberculosis including 11 additional strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Also studied in vivo were the therapeutic effects of rifampicin on established tuberculosis mice. Mice weighing 14±1 gm were inoculated intravenously with M. tuberculosis ($H_{37}Rv$). The treatment was oral and the following drugs were given daily, isoniazid (10 mg per kg), rifampicin (10 mg per kg), and isoniazid (5 mg per kg) combined with rifampicin (10 mg per kg).

The results obtained are as the followings.

1) Of the 27 strains tested on Löwenstein-Jensen medium, all 27 were inhibited by 10 mcg/ml concentration, 23 were inhibited by 5 mcg/ml concentration, and 12 were inhibited by 2.5 mcg/ml concentration.

2) Of the 31 strains tested in Kirschner's medium, 23 strains were inhibited at 1 mcg/ml concentration, 10 strains were inhibited at 0.5 mcg/ml concentration, and 4 strains were inhibited at 0.1 mcg/ml concentration. All 31 strains were resistant at 0.05 mcg/ml.

3) Of the 31 strains tested in Dubos broth medium, all 31 were sensitive at 1 mcg/ml concentration, while 30 strains, 26 strains, 21 strains, and 1 strains showed sensitiveness at 0.5 mcg/ml, and 0.1 mcg/ml, 0.05 mcg/ml, and 0.01 mcg/ml concentrations respectively.

4) Incidence of naturally resistant mutants in the $H_{37}Rv$ of M. tuberculosis was 20 per 10^4 bacilli at 5 mcg/ml and 66 per 10^8 bacilli at 10 mcg/ml concentrations on L-J medium after 6 weeks incubation.

5) The strains of M. bovis, M. thamnopheos, Photochromogen and Scotochromogen showed remarkable susceptibility but M. avium and M. platypoecilus showed a growth even at 20 mcg/ml concentration.

6) In an additional study of Gram-positive and Gram-negative bacteria susceptibility to rifampicin, Gram-negative strains showed resistance at 1 mcg/ml concentration while Gram-positive strains were

inhibited at 0.05 mcg/ml concentration.

7) After 10 weeks of therapy for established tuberculosis in mice, the combination of isoniazid with rifampicin was most effective, and isoniazid alone, next effective, and rifampicin alone, least effective on the basis of reduction of viable units in lung. But there was no significant differences among the three regimens in death rate, lung-body weight ratio, spleen-body weight ratio, and Aoki's standard observation of lung lesions.

8) The strains reisolated from established tuberculosis mice did not show resistance to rifampicin during the 10 weeks therapy.

序　　論

Rifampicin은 1966년에 Rifamycin SV로부터 개발된 最新 抗菌劑로 이미 많은 나라에서 환자치료에 이용하고 있고 그리고 현재 우리 나라에서도 수입 市販하고 있다. 일반적으로 결핵균은 그들의 毒力을 비롯한 여러 가지 性狀이 지역적 차이를 나타내기 때문에 어떠한 抗結核劑가 수입 市販되기 전에 그 지역의 환자로부터 분리된 결핵균으로 시험관내 및 생체내 실험을 통해 抗菌力 및 治療效果를 조사해야 하고 그리고 실제 환자의 임상적 치료효과도 선행되어 관찰해야 할 것이다.

저자 등은 우리 나라의 결핵환자로부터 분리된 결핵균 중 약물 접촉이 전혀 없었던 균주와 標準菌株 $H_{37}Rv$ 및 기타 抗酸菌 그리고 항산균 외의 一般細菌類에 대한 Rifampicin의 抗菌力을 관찰하고 그리고 실험적 白鼠結核症에 대한 치료 효과를 관찰하였다.

研　究　史

1957년 Streptomyces mediteranei n. sp의 액체배양물에서 분리된 Rifamycin을 Sensi 등[1,2] 여러 학자들이 臨床的으로 이용 가능한 Rifamycin SV로 개발하여 Gram 陽性菌 감염 및 膽囊管의 감염증과 결핵 치료에 이용하였다[3]. Rifamycin SV의 抗菌力은 Gram 陽性菌에 대한 MIC(最低菌發育抑制濃度)는 0.005~0.01 mcg/ml이고 그리고 抗酸菌에 대해서는 0.01~0.1 mcg/ml로 대단히 우수한 抗菌劑로 알려졌으나 불행히도 이는 투여한 후 곧 肝에 모여 膽汁으로 배설되는 결함을 가지고 있었다[2].

1966년에 Sensi, Maggi 등[4,5,6] 여러 학자들이 위의 결함을 제거한 Rifampicin (3-4-methyl-1-piperazinyl-iminomethyl)을 Rifamycin SV로부터 半合成抗生物質로 개발하는데 성공하였다.

Rifampicin (R/AMP)이 經口投與로 흡수가 잘 되고 血中濃度도 높고 體內擴散도 잘 되며 배설이 적고 毒性도 낮다는 사실은 이미 많은 학자들[3,7,8,9,14]에 의해 증명되었는데 대체로 空腹에 복용하는 것이 식사 후 보다 血中濃度가 다소 높다[7]고 한다. Verbist는 R/AMP 600 mg을 투여한 결과 1~3시간후 血中濃度가 9.5~7 mcg/ml라 하고 Constans 등은 14.5 mg/kg로 투여한 결과 3시간 후 血中濃度가 16.2 mcg/ml이고, 8시간 후는 12.4 mcg/ml, 16시간후는 3 mcg/ml 그리고 24시간 후는 0.7 mcg/ml라고 하였다. 그러나 R/AMP의 흡수는 消化管의 기능상태에도 영향[11]을 받고 그리고 血中濃度의 차는 肝기능상태에도 영향[9]을 받는다고 하며 肝에 도달한 R/AMP는 肝細胞內 microsome의 酵素에 의해 desacetylation[9,10,11,13] 되고 그리고 주로 膽汁을 통해 배설되지만 尿를 통해서도 배설된다고 한다. 膽汁으로 배설된 R/AMP는 재흡수가 일어나고 desacetylation된 R/AMP라도 抗菌力을 가진다고 한다[10,11,13]. 흡수된 R/AMP의 體內擴散은 우수한 편인데 Canetti 등[12]은 사람의 健康肺組織實質과 結核病巢의 R/AMP 농도를 관찰한 결과 肺組織實質의 농도는 血淸보다 높고 空洞벽과 섬유성病巢는 血淸과 비슷하다고 하며 Hussels[7]은 R/AMP 투여 환자의 객담에서 1~2 mcg/ml의 R/AMP를 검정할 수 있었다고 한다. R/AMP 毒性은 일반적으로 낮은데[4,5,10,15,23,31] 白鼠에 대한 LD_{50}는 860 mg/kg/os이고 rat에 대한 LD_{50}는 1600 mg/kg/os라고 한다[31]. 환자의 耐藥力도 우수하며 부작용도 거의 없다고 한다[16-22,24-26]. 그러나 간혹 肝臟장애를 가져온다는 報告[21]가 있다.

R/AMP의 抗菌力에 관한 연구는 이 藥劑가 개발되면서부터 오늘에 이르기까지 많은 학자들에 의해 시험관내[2,3,10,25-53], 생체내 및 실제 환자치료[16-22,24,26,54-76]를 통해 이루어져 왔다. 시험관내의 抗菌力을 보면 일반적으로 他抗菌劑보다 우수한 편인데 Füresz[10]는 Gram 陽性菌에 대한 MIC는 0.002~0.5 mcg/ml이고 Gram 陰性菌에 대해서는 5~50 mcg/ml이며 Kirschner's 培養基내에서의 결핵균에 대한 MIC는 0.1~1 mcg/ml라고 하였다. 결핵균에 대한 R/AMP의 MIC는 배양기의 종류에 따라 다양한데 TB broth 培養基[29] 내에서는

0.05 mcg/ml, Proskauer-Beck 배양기[53]내에서는 0.002~0.05 mcg/ml Tween 80 含有 Dubos broth 배양기[42]내에서는 0.01 mcg/ml 이고 그리고 Verbist와 Gyselen[31], Pallanza[53]등 및 Hobby와 Lennert[38] 등에 의하면 Löwenstein-Jensen 배양기에서는 5 mcg/ml 라고 한다. 그리고 Dubos broth 배양기내에서는 Tween 80의 含有 여부에 따라 R/AMP에 대한 感受性의 차가 대단히 크다[36,38,42]. R/AMP는 또한 他抗結核劑와의 交叉耐性이 전혀 없다고 한다[10,29,37,41]. 정도의 차는 있지만 인형결핵균 외의 항산균에 대해서도 상당한 抗菌力을 나타낸다고 한다[33,39].

대체로 시험관내의 抗菌力이 비록 동일한 배양기라도 다소 다양한 경우를 볼 수 있는데 이는 R/AMP가 비교적 불안전한 화합물이어서[77] 배양기내에서 不活性化가 많이 일어나고[35,39] 그리고 접종하는 균의 수가 사용하는 R/AMP의 농도보다 중요하다는 사실[38]에 起因한다.

균에 대한 R/AMP의 作用機轉은 DNA dependent RNA의 합성을 방해함으로서 균이 死滅하게 된다고[13,78,79,80] 하는데 Füresz[13]가 rat cell의 RNA 합성은 방해하지 않는다고 한 사실로 보아 동물세포에는 영향을 주지 않는다고 본다.

Clini와 Grassi[52]는 R/AMP의 抗菌力을 monocyte culture를 통해 관찰한 결과 보통 배양기내에서의 抗菌力과 비슷하다는 사실을 밝혔다.

각종 실험동물의 實驗的 結核症에 대한 R/AMP의 치료효과가 매우 우수하다는 보고가[25,43,44,45,47,49,50] 많은데 일반적으로 單獨療法 보다 併合療法이 더 우수하다고 한다. Kradolfer[47]에 의하면 白鼠結核症에 대한 ED 50가 INH는 3 mg/kg, EMB는 44 mg/kg, SM과 1321은 90 mg/kg 인데 비해 R/AMP는 5.6 mg/kg 라고 하였다. Verbist[45]는 INH 보다 R/AMP의 치료효과가 더 우수한 것 같다고 하였다.

실제 결핵환자의 치료효과도 많은 학자[16-22,24,26,54-76]들에 의해 관찰되었는데 그 결과를 종합해 보면 실험동물의 結核症 치료에서와 같이 우수함을 보여 주었는데 역시 單獨療法보다 併合療法이 더 우수하다고 한다. 單獨療法에서는 耐性出現의 위험성을 나타내는데 실험동물 結核症의 치료에서 보면 INH 보다는 위험성이 낮다고[47,49] 한다. 併合療法은 대체로 INH와의 併合이 우수하다고[20,22,74,75]. 한다 ethambutol과의 併合도 우수한 治療效果를 나타낸다는 보고[17,26,63,67]가 많다.

實驗材料 및 方法

Ⅰ. 細菌學的 檢査

1) 使用菌株

a) 試驗菌株 : 과거 抗結核劑를 전혀 사용한 일이 없는 결핵환자로부터 분리된 결핵균 중 一次耐性이 없는 人型菌株 31株.

b) 標準菌株 : 美國 Trudeau Laboratory로부터 分讓받은 標準人型結核菌株 $H_{37}Rv$.

c) 參考菌株 : 國立醫療院으로부터 분양받은 Staph. aureus, Enterococcus, β-hemolytic Streptococcus, Streptococcus(virulent), Pneumococcus sp, Coryn. diphtheriae, Esh Coli, Prot. mirabilis 등 抗酸菌 외의 細菌類와 M. bovis, M. avium, Photochromogen, Scotochromogen, M. thamnopheos, M. platypoecilus 및 標準菌株 $H_{37}Rv$로부터 인위적으로 만든 Rifampicin 1000 mcg/ml 耐性菌 등을 參考菌株로 供試하였다.

2) 藥劑感受性檢査

CIBA 회사로부터 供與받은 Rifampicin(Rimactane)을 Löwenstein-Jensen 배양기에는 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mcg/ml로 Dubos 및 Kirschner's 액체배양기에는 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mcg/ml로 각각 함유시켜 만든 배양기에 L-J 배양기에 3주간 배양하여 형성된 균의 集落을 1白金耳量(22 SWG, 外經 3 mm) 취해 6~7개의 硝子球가 든 1/4 Oz 瓶에 10% Tween 80 1滴과 함께 넣고 진탕한 후 滅菌生理食鹽水로 균량이 1 mg/ml 되게 희석하여 균등화 한 다음 1白金耳量(27 SWG, 外經 3 mm)씩 접종하였다. 균을 접종한 배양기는 37°C 孵卵器에 L-J 배양기는 3주간, Dubos 및 Kirschner's 배양기는 2주간 배양하여 균발육 여부를 보아 판정하였다. R/AMP 1000 mcg/ml 耐性菌에 대해서는 INH, PAS, SM, Thiacetazone, Capreomycin, Kanamycin, Ethambutol, Ethionamide, Cycloserine, Viomycin 등에 대한 感受性檢査를 실시하였다. 그리고 R/AMP 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mcg/ml에서의 $H_{37}Rv$의 耐性菌 출현율을 L-J 배양기로 6주 배양후 관찰하였다.

參考菌株 중 一般細菌類는 Blood Agar에 R/AMP를 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mcg/ml로 함유시켜 滅菌生理食鹽水에 1白金耳量의 균집락을 懸濁시킨 균액을 접종하여 37°C에 48시간 배양한 후 균발육을 관찰하여 판정하였다.

Ⅱ. 實驗的 白鼠結核症에 대한 Rifampicin의 治療試驗

1) 使用菌株 : 標準人型結核菌株 $H_{37}Rv$

2) 接種菌量 : L-J 배양기에 3주간 배양한 균의 集落을 滅菌生理食鹽水와 硝子球가 든 Flask(50 ml 들이)에 넣어 균등화하여 濁度를 Spectrophotometer(Bausch and Lomb)로 660 mμ에서 OD:0.18 되게 희석하여 白鼠尾靜脈內에 tuberculin 주사기로 0.2 ml씩 접종하였다.

3) 使用動物 : SM系 male mouse(체중 14±1 gm)를 사용하고 ABCDE 등 5群으로 나누어 각군에 30首씩 사용하였다. 단 E군만은 菌을 접종하지 않았다.

4) 投藥 : 아래의 投藥量에 맞추어 만든 藥劑溶液을 매일 經口的으로 金 등[81]의 방법으로 투여하였다.

A군 : Rifampicin 10 mg/kg/day

B군 : Rifampicin 10 mg−INH 5 mg/kg/day

C군 : INH 10 mg/kg/day

D군 : Distilled water only

E군 : Distilled water only

5) 觀察

a) 體重曲線 : 각 군별 매주 1회 측정

b) 死亡率 : 균접종 후 mouse의 사망상태를 8주까지 관찰함.

c) 肉眼的 病變度 : 2주 1회씩 각군에서 3首씩 屠殺하여 靑木 등[82]의 방법으로 剖檢當時의 소견을 記入하여 관찰함.

d) 比肺重 및 比脾重 : 2주 1회씩 각군에서 3首씩 屠殺하여 肺 및 脾의 무게를 측정하고 다음 式에 의해 比肺重 및 比脾重을 구하였다.

$$比肺重=\frac{肺重量(mg)}{體\quad 重(gm)}\times 10$$

$$比脾重=\frac{脾重量(mg)}{體\quad 重(gm)}\times 10$$

e) 肺臟內 生菌檢査 : 2주 1회씩 각군에서 3首씩 屠殺하여 肺의 전량을 Universal homogenizer로 15000 rpm에서 균등화하여 定量培養을 행했다.

f) 動物通過菌의 藥劑感受性檢査 : 屠殺白鼠의 肺臟에서 분리된 균중 ABC군의 것을 A군은 R/AMP에 B군은 R/AMP와 INH에 그리고 C군은 INH에 대해 각각 藥劑 感受性檢査를 실시하였다.

實 驗 結 果

Ⅰ. 細菌學的 檢査結果

供試菌株의 Rifampicin에 대한 感受性檢査結果를 보면 標準人型結核菌株 $H_{37}Rv$는 Löwenstein-Jensen 배양기에서는 5 mcg/ml에 Dubos 액체배양기에서는 0.1 mcg/ml에 각각 감수성을 나타내었으나 Kirschner 액체배양기에서는 1 mcg/ml에서도 耐性을 나타내었다. 試驗菌株는 L-J 배양기에서는 5 mcg/ml에 85.2%가 2.5 mcg/ml에 44.4%가 감수성을 나타내었고 1.25 mcg/ml에는 모두 耐性을 그리고 10 mcg/ml에는 모두가 감수

Table 1. Rifampicin susceptility of M. tuberculosis isolated from Korean TB patients and reference acid fast bacilli

Media / Drug concentr. (mcg/ml) / Name of strains		L-J Medium					Dubos Broth Medium					Kirschner's Liquid Medium				
		1.25	2.5	5	10	20	0.01	0.05	0.1	0.5	1	0.01	0.05	0.1	0.5	1
$H_{37}Rv$(M. tuberculosis)		CR	CR	—	—	—	CR	PR	—	—	—	CR	CR	CR	CR	PR
M. bovis		CR	CR	—	—	—										
M. avium		CR	CR	CR	CR	CR										
Photochromogen		CR	CR	CR	—	—										
Scotochromogen		CR	CR	CR	CR	—										
M. thamnopheos		CR	CR	CR	CR	—										
M. platypoecilus		CR	CR	CR	CR	CR										
M. tuberculosis isolated from Korean TB patients	Complete resistance (CR)	24	13	1	0	0	26	9	5	0	0	31	28	27	19	6
	Partial resistance (PR)	3	2	3	0	0	4	1	0	1	0	0	3	0	2	2
	Sensitive	0	12	23	27	27	1	21	26	30	31	0	0	4	10	23
	%	—	44.4	85.2	100.0	100.0	3.2	67.7	83.9	96.8	100.0	—	—	12.9	32.3	74.2

Note; Number of strains tested:
on L-J Medium: 27
in Dubos Broth Medium: 31
in Kirschner's Liquid Medium: 31

Table 2. Rifampicin susceptibility of various bacteria isolated by the National Medical Center in Korea (on Blood Agar)

Name of strains \ Drug concentr.	control	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1 mcg/ml
Bacillus sp.	+	+	+	+	+	−	−
Stap. aureus	+	+	+	+	−	−	−
β-hemolytic Streptococcus	+	+	+	+	−	−	−
Streptococcus	+	+	+	−	−	−	−
Coryn. diphtheriae	+	+	+	−	−	−	−
Pneumococcus sp.	+	+	+	−	−	−	−
Diphtheroid	+	+	+	−	−	−	−
Enterococcus sp.	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomonas sp.	+	+	+	+	+	+	+
E. coli	+	+	+	+	+	+	+
Prot. mirabilis	+	+	+	+	+	+	+

성을 나타내었다. Dubos 액체배양기에서는 0.01 mcg/ml에 3.2%가, 0.05 mcg/ml에 67.7%가, 0.1 mcg/ml에 83.9%가, 0.5 mcg/ml에 96.8%가, 1 mcg/ml에는 모두가 각각 감수성을 나타내었다. Kirschner 액체배양기에서는 1 mcg/ml에 74.2%가, 0.5 mcg/ml에 32.3%가, 0.1 mcg/ml에 12.9%가 각각 감수성을 나타내었다.

參考菌株 중 牛型 결핵균은 5 mcg/ml에 photocromogen은 10 mcg/ml에 Scotochromogen과 M.thamnopheos는 20 mcg/ml에 각각 감수성을 나타냈으나 鳥型 결핵균과 M. platypoecilus는 20 mcg/ml에도 耐性을 나타내었다. (Table 1)

參考菌株 중 一般細菌은 Table 2에서 보는 바와 같이 Gram 陽性菌인 Bacillus sp.는 0.5 mcg/ml에 Staph. aureus와 β-hemolytic Streptococcus는 0.1 mcg/ml에 Streptococcus, Coryn. diphtheriae, Pneumococcus 및 Diptheroid 등은 0.05 mcg/ml에 감수성을 나타내나 Gram 陰性菌인 Enterococcus sp, Pseudomonas sp, E. coli 및 Prot. mirabilis 등은 1 mcg/ml에도 耐性을 나타내었다.

R/AMP 1000 mcg/ml 내성균의 他抗結核劑에 대한 感受性檢査 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 사용된 모든 약제에 대해 감수성을 나타내었다.

L-J 배양기에서 R/AMP 각 농도에 대한 標準人型結核菌株 $H_{37}Rv$의 내성균 출현율은 Fig.1에서 보는 바와 같이 1.25 mcg/ml에 10^2당 33, 2.5 mcg/ml에 10^3당 16.5 mcg/ml에 10^4당 20, 10 mcg/ml에 10^8당 66 이었다.

Ⅱ. 實驗的 白鼠結核症의 治療實驗 成績

體重曲線의 변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 菌接種治療群인 ABC군과 균을 접종하지 않은 E군은 11주에서 차이를 보이나 대체로 大同小異하였다. 그러나 균접종 非治療群인 D군은 다른 군에 비해 현저한 차를 나타내었다.

Mice 死亡率을 비교해 보면 Fig. 3에 나타난 바와 같이 균접종 非治療群은 대단히 높지만 치료군(ABC)은 낮았다. ABC군 사이의 사망율에는 有意한 차가 없었다.

Mice 肺臟의 肉眼的 病變度를 보면 Fig. 4에 나타난 바와 같이 치료군과 비치료군 사이에는 현저한 차가 있지만 치료군인 ABC군 사이에는 유의한 차를 볼 수 없

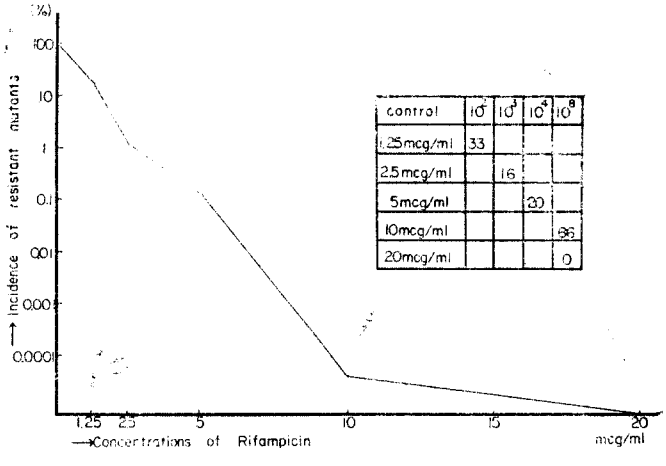

Fig. 1. The incidence of naturally resistant mutants in the $H_{37}Rv$ strain of M. tuberculosis. (on Löwenstein-Jensen medium)

Table 3. Sensitivities of rifampicin 1000 mcg/ml resistant strain of M. tuberculosis to other anti TB drugs.

Strains / Concentrations (mcg/ml) / Drugs	R/AMP 1000 mcg/ml resistant strain													
	0.2	0.25	0.5	0.625	1	1.25	2	2.5	4	5	10	20	40	80
INH	−				−					−				
PAS					−		−		−					
SM											−	−	−	
TBI		+	−		−		−		−					
CM								+		+	+	−	−	
KM										+	−	−	−	−
EMB				+		−		−		−	−			
1321 Th.										+	+	+	−	−
CS										+	+	−	−	−
VM										+	−	−	−	−

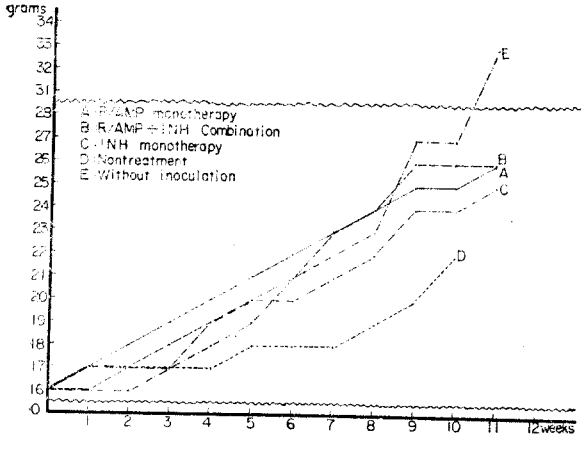

Fig. 2. Comparison of body weight in grams.

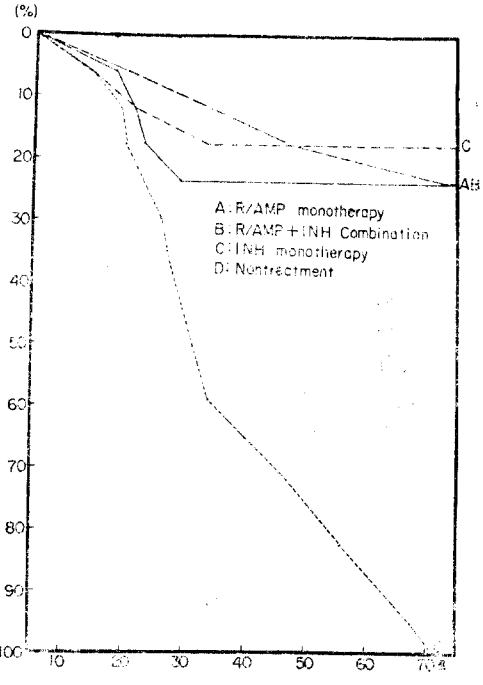

Fig. 3. Cumulative percentage of mice dying due to intravenous infection with tubercle bacilli

었다.

比肺重의 變化는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 균을 접종하지 않은 군 및 균접종 치료군과 균접종 非治療群 사이에는 현저한 차를 나타내었지만 치료군인 ABC군 사이에는 유의한 차를 볼 수 없었다.

比脾重의 변화를 보면 균접종군과 비접종군 사이에는 현저한 차가 있고 그리고 Fig 6에서 보는 바와 같이 균접종군의 치료군과 비치료군 사이에도 다소의 차를 볼 수 있고 치료군의 ABC군 사이에는 比脾重이 最大値에 달하는 시간에 다소의 차를 볼 수 있었다.

Mice 肺臟內 結核菌의 消長을 보면 Fig. 7에 나타난 바와 같이 치료군과 비치료군 사이에는 현저한 차를 나타내었다. 치료군을 비교해 보면 접종후 2주에서는 C군의 生菌數가 가장 많았으나 점차 감소하고 10주에서는 A군이 370으로가장 많고 다음은 C군으로 17이고, 그리고 B군은 1.6으로 가장 적었다.

治療群에서 每 2주 1회식 屠殺한 白鼠의 肺臟에서 분리된 균의 藥劑感受性檢査結果를 보면 A군은 10주까지 모두 R/AMP에 감수성을 나타내었고 그리고 B군도 역시 10주까지 모두 R/AMP 및 INH에 감수성을 나타내었다. C군은 10주에서 3株 중 1株가 INH에 耐性을 나

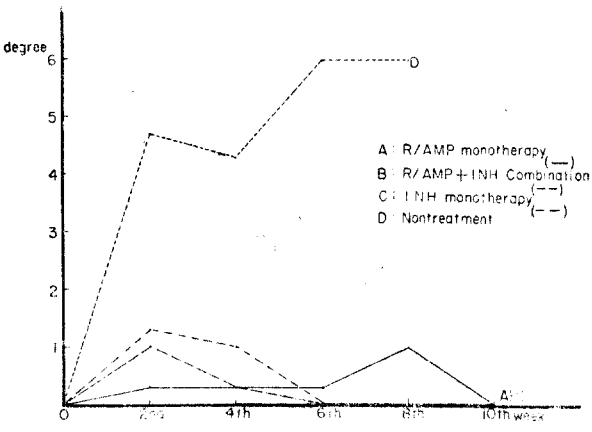

Fig. 4. Involvement of lesions in lungs of tubercle bacilli inoculated mice as observed by Aokis' Classification

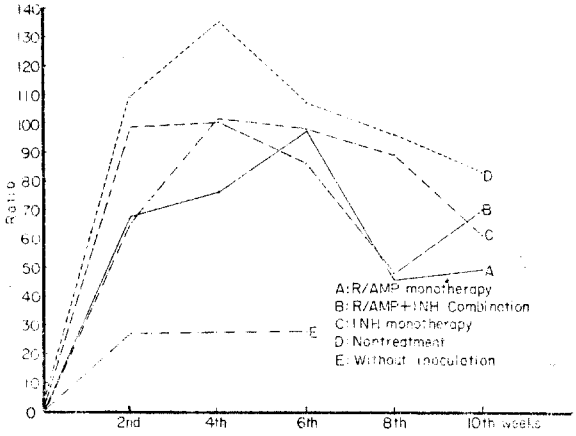

Fig. 6. Comparison of spleen and body weight ratio

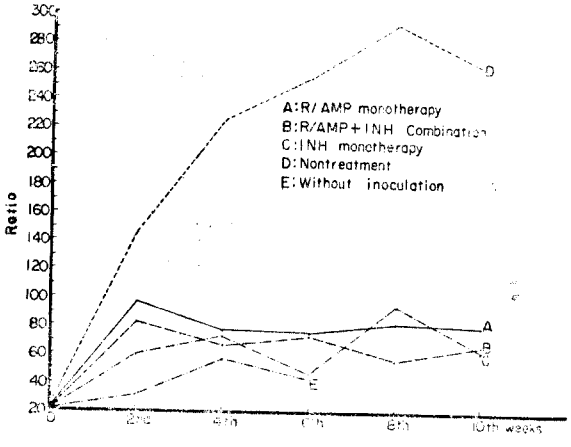

Fig. 5. Comparison of lung and body weight ratio

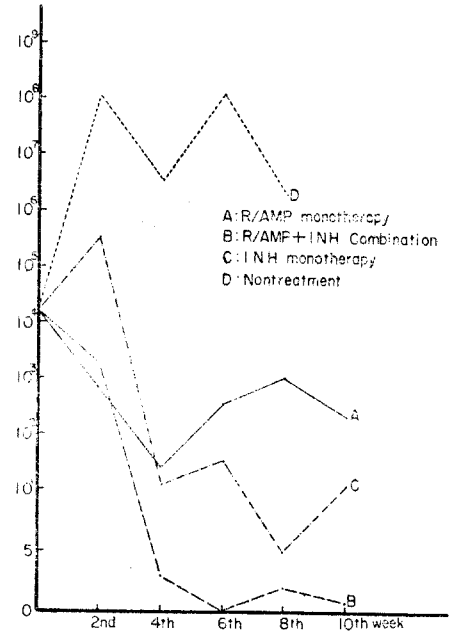

Fig. 7. Viable units of tubercle bacilli in lungs of tubercle bacilli inoculated Mice.

타낼 뿐 그밖에는 모두 감수성을 나타내었다. (Table 4)

考　　察

전에 抗結核劑를 전혀 사용한 일이 없는 우리나라의 결핵환자로 부터 분리된 인형결핵균 중 一次耐性이 없는 菌株 27株의 R/AMP에 대한 L-J배양기내에서의 感受性檢査 결과는 5 mcg/ml에 대부분(23株) 감수성을 나타내는데 Verbist와 Gyselen[31], Pallanza[53]등 및 Hobby와 Cennert[88]는 供試菌株 全株가 5 mcg/ml에 감수성을 나타낸다고 하였다. 그러나 Lucchesi[51]는 MIC를 1~10 mcg/ml로 報告하고 있어 대체로 다양한 편인데 이는 Manten[39]등과 Stottmeier[35]등이 R/AMP가 배양기내에서 많은 양이 不活性化되고 그리고 Hobby와 Lennert[38]가 R/AMP의 感受性檢査에 있어 藥劑의 濃度보다 접종하는 균의 수가 더 중요하다는 사실등을 비추어 볼때 實驗條件에 따라 감수성의 정도가 다양할 것으로 생각된다. 이와같이 R/AMP의 感受性檢査는 배양기의 종류

Taable 4. Drug sensitivity of animal passed tubercle bacilli during the treatment.

		2nd Week		4th Week		6th Week		8th Week		10th Week	
		Sen.	Res.	Sen.	Res.	Sen.	Res.	Sen.	Res.	Sen.	Res.
A	to R/AMP	3		3		3		3		3	
B	to R/AMP	3		3		3		3		3	
	to IHN	3		3		3		3		3	
C	to INH	3		3		3		3		2	1

Sen. : Sensitive
Res. : Resistant

배양시간 및 접종균수에 따라 그 결과가 다양하므로 앞으로 그 기술적인 문제를 많이 연구해야 할 것으로 생각한다. 그리고 Table 1에 나타난 바와 같이 Dubos 액체배양기(Tween 80含有)에서의 감수성이 Kirschner 액체배양기에서의 감수성 보다 훨씬 높은데 이는 Lorian과 Finland[36], Hobby와 Lennert[38], Hennebert[42]등이 밝힌 바와 같이 Tween 80의 含有與否에 따른 차이라고 본다.

R/AMP는 대체로 Gram 陽性菌에 대해서는 본실험의 결과와 같이 작용력이 강한데 비해 Gram 陰性菌은 그들의 MIC가 상당히 높고 다양하다.[3, 8, 10]

인형결핵균 외의 抗酸菌의 R/AMP에 대한 感受性은 Sensi등[6], MaClatchy등[33], Manten등[39], Tacquet등[43], Arioli등[29]에 의해서 많이 관찰 되었지만 대체로 다른 抗結核劑에 대해서 보다 더 높은 감수성을 갖는다. 본실험에서 관찰된 결과는 鳥型결핵균과 M. platypoecilus가 20 mg/ml에도 내성을 나타내지만 그외의 供試菌은 비교적 높은 감수성 나타내고 있다.

Füresz[10], Arioli등[29], Bals와 Filipescu[37], Zierski등[41]이 이미 R/AMP는 다른 抗菌劑와 交叉耐性이 없다는 사실을 밝혔지만 본실험의 결과에서도 R/AMP 高度耐性菌인 1000 mcg/ml 내성균이 INH, SM, PAS, TBI, CM, KM, 1321, EMB, CS 및 VM등에 모두 감수성을 나타내고 있음을 관찰했다.

L-J 배양기에서 R/AMP 각 농도에 대한 標準人型結核菌株 $H_{37}Rv$의 耐性菌 출현율을 보면 5 mcg/ml에는 10^4당 20, 10 mcg/ml에는 10^8당 66으로 나타났는데 Verbist와 Gyselen[31]은 5 mcg/ml에 $\pm 10^{-8}$으로 보고하고 있어 그 차이가 대단히 큰데 이는 위에서도 지적한 바와 같이 실험조건으로 인한 차라고 생각한다.

實驗的 白鼠結核症을 R/AMP 單獨, R/AMP+INH 併合 및 INH 單獨으로 치료한 결과 체중변화, 사망율, 肺臟의 病變度, 比肺重등은 위의 3치료군 사이에 유의한 차를 볼수 없을 정도로 모두 우수함이 인정되었고 比脾重은 그 최대치에 달하는 시간에 다소 차가 있다. 치료군 사이의 差가 비교적 뚜렷한 것은 肺臟內 生菌數인데 대체로 併合療法에서 殘溜生菌數가 가장 적었고 그 다음은 INH 單獨療法이며 R/AMP 單獨療法에서는 가장 많이 남아 있는 것으로 보아 R/AMP는 INH에 比해 Mice에 對해 치료효과가 약간 뒤떨어진다고 볼수 있다. R/AMP가 INH보다 우수하거나 또는 동일한 치료효과를 나타낸다는 사실은 이미 많은 학자들[28, 30, 31, 34, 35, 44, 45, 47, 48, 49, 50]에 의해 주장되고 있는데 본실험의 결과도 대체로 유의한 차가 없을 만큼 동일한 치료성적을 나타내었지만 肺臟內 殘溜生菌數의 差는 볼수 있었고 INH 또는 R/AMP의 단독요법 보다 병합요법이 우수하다고 본다. INH는 지금까지 출현한 많은 抗結核劑 중 가장 우수하다는 사실은 부인할수 없으며 R/AMP가 이와 동등한 우수성을 갖고 있다는 것은 앞으로 結核治療에 밝은 전망을 갖게 한다고 보겠다. 특히 Daddi와 Lucchesi[20], Constans등[22], Kraan등[44], Gyselen등[75]이 실제 임상적 치료에 있어 INH와 R/AMP 併合療法의 우수성을 주장하고 있다. 대체로 어떠한 抗結核劑의 治療效果를 관찰함에 있어서 체중변화, 사망율, 臟器의 病變度 및 臟器의 重量變化등이 중요하지만 치료효과의 차에 가장 예민하고 뚜렷한 것은 臟器內 菌의 消長이다.

각군 치료중에 발생하는 내성균은 10주간에 INH 단독요법군에서만 1주가 출현 했는데 이는 관찰기간이 짧은 탓으로 보며 향후 더욱 長期間의 관찰을 행해야 할 것으로 생각한다.

結 論

抗結核劑를 사용한 일이 전혀 없는 결핵환자로 부터 분리된 인형결핵균 중 一次耐性이 없는 菌株 31주, 標準人型菌株 $H_{37}Rv$, 牛型 및 鳥型菌을 포함한 기타 抗酸菌 6주와 抗酸菌 외의 一般細菌 11주등에 대해 Rifampicin

(R/AMP)感受性檢査를 실시하였고 그리고 實驗的 白鼠結核症에 대하여 R/AMP 10 mg/kg/day, R/AMP10mg+INH5 mg/kg/day, INH 10 mg/kg/day로 각각 치료한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Löwenstein-Jensen 배양기에 供試한 인형균 27주는 R/AMP 2.5 mcg/ml에 12株(44.4%) 5 mcg/ml에 23株(85.2%) 10 mcg/ml에는 全株가 각각 감수성을 나타내었다.

2) Dubos 액체배양기에 供試한 인형균 31주는 0.01 mcg/ml에 1株(3.2%) 0.05 mcg/ml에 21株(67.7%) 0.1mcg/ml에 26株(83.9%) 0.5 mcg/ml에 30株(96.8%) 1 mcg/ml에 全株가 각각 감수성을 나타내었고 그리고 Kirschner 액체배양기에서는 0.1 mcg/ml에 4株(12.9%) 0.5 mcg/ml에 10株(32.3%) 1 mcg/ml에 23株(74.2%)가 각각 감수성을 나타내었다.

3) 標準菌株 $H_{37}Rv$는 L-J 배양기에서 5 mcg/ml에, Dubo액체배양기에서 0.1 mcg/ml에 감수성을 나타내나 Kirschner 액체배양기에서는 1 mcg/ml에 部分耐性을 나타내었다. 그리고 L-J 배양기에서 6주배양후의 自然耐性菌 출현율이 5 mcg/ml에 10^4당 20, 10 mcg/ml에 10^8당 66이었다.

4) 參考菌株 중 牛型菌, photochromogen, Scotochromogen, M. thamnopheos 등은 높은 감수성을 나타내나 鳥型 및 M. platypoecilus는 20 mcg/ml에서도 내성을 나타내었다.

5) 參考菌株 중 一般細菌의 Gram 陽性菌은 MIC가 <0.5 mcg/ml로 높은 감수성을 나타내나 Gram 陰性菌은 1 mcg/ml에서도 耐性을 나타내었다.

6) 白鼠結核症의 치료효과는 대체로 R/AMP와 INH의 단독 및 併合療法 모두 同等하게 우수한 편이나 肺臟內 菌의 消長을 보면 併合療法이 가장 우수했고 다음은 INH 단독요법이며 R/AMP 단독요법은 殘溜生菌數가 가장 많았다.

7) 白鼠結核症을 R/AMP 단독 및 INH와의 併合으로 치료했으나 10주간에 내성균의 발생이 전혀 없었다.

References:

1) Sensi, P., Margalith, p.c., Timbal, M.T, *Farmaco Ed Sci., 1959, 14:146.*

2) Sensi, P., *A family of new antibiotics: the rifamycins. Res Progr Org Biol Meg Chem., 1964, 1:337.*

3) Sensi, P., *Structure-activity relationships of rifamycin derivatives. Acta Tuberc Pneum Belg., 1969. 3-4:258*

4) Maggi, N., Pallanza, R., and Sensi, P., *New derivatives of rifamycin SV. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1965, pp. 765*

5) Maggi, N., et al, *Rifampicin: anew orally active rifamycin. Chemotherapia(Basel), 1966, 11:285*

6) Sensi, P., et al, *Chemical modifications and biological properties of rifamycins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1966, pp. 699*

7) Hussels, H., *Comparison of rifampicin serum concentrations in man, following drug administration before or after breakfast. Acta Tuberc Pneum Belg, 1959, 3-4:270.*

8) Verbist, L., *Rifampicin blood levels in man. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:288.*

9) Constans, P., et al, *Etude des taux plasmatiques de rifampicine et de leurs vaiations(440 dosages). Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:299.*

10) Füresz, S., *Chemical and biological properties of rifampicin. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:*

11) Curci, G., Ninni, A., et Iodice, F., *Quelques considerations sur la pharmacocinetique de la rifampicine. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:276*

12) Canetti, G., Parrot, R., Porven, G., et Le Lirzin, M., *Les taux de rifampicine dans le poumon et dans les lesions tuberculoses de l'homme. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:315*

13) Füresz, S., *Recent investigations on the biological properties of rifampicin. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:266*

14) Füresz, S., et al, *Rifamycin, a new rifamycin:III, absorption, distribution and elimination in man. Arzneimittel Forschung, 1967, 17:534*

15) Kluyskens, P., *Recherches experimentales de toxicite otovestibulaire des rifampicines. Acta Tuberc Pneum Belg, 3-4:323*

16) Grassi, C., et al, *Traitement de la tuberculose chronique par l'ethambutol et la prothionamide associès a la rifampicine ou la capreomycine. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:450*

17) Nitti, V., et al, *La rifampicine dans le traitment des tuberculoses chroniques a bacillus rèsistant*

aux médications standard. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:455

18) Favez, G., et Willa, C., *Premier bilan provisoire du traitement des rechutes de la tuberculose pulmonaire active parla rifampicine, l'éthambutol et la thiocarlide associés. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4-496*

19) Destexhe, G.E., *Reprise de traitement par la rifampicine de cas résistants de tuberculose pulmonaire. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:501*

20) Daddi, G., et Lucchesi, M., *Résultats cliniques obtenus par le traitement a la rifampicine chez des sujets atteints d'une tuberculose récente. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:521*

21) Tacquet, A., et al, *La rifampicine dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:529*

22) Constans, P., et al, *Le traitement de la tuberculose pulmonaire récente par l'association rifampicine-isoniazide. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:545*

23) Felgenhauer, F., and Lagler, F., *Experimental animal investigations with rifampicin on the question of its influence on the vestibular system and its period of retention in the perilymph of the inner ear. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:361*

24) Gyselen, A., *Rifampicin in retreatment and original treatment cases of pulmonary tuberculosis. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:424*

25) Nitti, V., *Experimental and clinical studieson the antituberculous activity of rifampicin alone or combined with other drugs. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:444*

26) Virchow, C., and Flemming, J., *Clinical results of rifampicin treatment. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:471*

27) Furesz, S., Arioli, V., and Pallanza, R., *Antimicrobial properties of new derivatives of rifamycin SV. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1966, 9:770*

28) Nitti, V., et al, *Activity of rifampicin in experimental tuberculosis of the guinea pig. Chemotherapia(Basel), 1967, 12:369*

29) Arioli, V., et al, *Rifampicin: a new rifampicin, I, bacteriological studies. Arzneim-Forsch. (Drug Res), 1967, 17:523*

30) Verbist, L., *Tuberculostatic activity of rifampicin in vitro and in vivo. Proc Vth Int Congr Chemother. (Vienna), 1967, 1112:521*

31) Verbist, L., and Gyselen, A., *Antituberculous activity of rifampicin in vitro and in vivo and concentration attained in human blood. Am Rev Resp Dis, 1968, 98:923*

32) Hobby, G.L., Lenert, T.F., and Maier-Engaelena, J., *In vitro activity of rifampicin against the $H_{37}Rv$ strain of Myc. tuberculosis. Am Rev Resp Dis, 1969, 99:453*

33) MaClatchy, J.K., Waggoner, R.F., and Lester, W., *In vitro susceptibility of mycobacteria to rifampicin. Am Rev Resp Dis, 1969, 100:234*

34) Batten, J., *Rifampicin in treatment of experimental tuberculosis in mice. Tuberc(Lond), 1969, 50:294*

35) Stottmeier, K.D., et al, *Antimycobacterial activitv of rifampicin under in vitro and simulated in vivo conditions. Appl Microbiol, 1969, 17:861*

36) Lorian, V., Finland, M., *In vitro effect of rifampicin on mycobactera. Appl Microbiol, 1969, 17:202*

37) Bals, M.G., and Filipescu, *The antistaphylococcal activity of rifampicin. Arzneim-Forsch (Drug Res), 1969, 19:1285*

38) Hobby, G.L., and Lenert, T.F., *The antimycobacterial activity of rifampicin. Am Rev Resp Dis, 1968, 97:713*

39) Manten, A., et al, *Rifampicin-Susceptibility and rifampicin-resistance in mycobacteria. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:327*

40) Schröder, K.H., *Sensitivity test of M. tuberculosis against rifampicin. A short report. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:335*

41) Zierski, M., et al, *The antimycobacterial activity of rifampicin (in vitro). Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:341*

42) Hennebert, A., *Activite antimycobactérienne de la rifampicine (in vitro) dans différents milieux. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:348*

43) Tacquet, A., et al, *Activite antimycobacterienne de la rifampicine. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:366*

44) Grumbach, F., *La rifampicine dans les traitments associes, continus et intermittents de la tuberculose experimentale de la souris. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:390*

45) Verbist, L., *Rifampicin activity (in vitro) and in established tuberculosis in mice. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:397*

46) Steinbrück, P. W., *The (in vitro) activity of rifampicin compared with ethambutol, capreomycin and Isoniazid. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:413*

47) Kradolfer, F., *Rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide and streptomycin in murine tuberculosis: comparative chemotherapeutic studies. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:352.*

48) Grumbach, F., *L'activite de la rifampicine sur la tuberculose experimentale de la souris. Developpement de la resistance a la rifampicine. Effects therapeutiques des associations de differents medicaments a la rifampicine. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:392.*

49) Havel, A., et al., *Rifampicin in experimental investigations on mice. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:406*

50) Yoshida, F., *Experimental therapy with rifampicin. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:416.*

51) Luccesi, M., and Mancini, *Antimycobacterial activity of rifampicin. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:431*

52) Clini, V., and Grassi, C., *The action of new antituberculous drugs on intracellular tubercle bacilli. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:20*

53) Pallanza, R., et al, *Rifampicin, a new rifamycin. II, Laboratory studies of the antituberculous activity and preliminary clinical observation. Arzneim-Forsch. 1967, 17:529*

54) Verbist, L., et al., *Prelinary results with rifampicin in the treatment of multiresistant pulmonary tuberculosis in ten salvage cases. Pro Int Congr Chemother(Vienna), 1967, 1112:591*

55) Gyselen, A., et al, *Rifampicin and ethambutol in the retreatment of advanced pulmonary tuberculosis. Am Rev Rep Dis, 1968, 98:923*

56) Baront, A., and Lukinovich, N., *A pilot trial of rifampicin in tuberculosis. Tuberc (Lond), 1968, 49:180*

57) Hobby, G. L., et al, *Primary drug resistance; a continuing study of tubercle bacilli states: VI, Initial observations on the incidence of resistance to rifampicin and ethambutol. Am Rev Resp Dis, 1969, 99:777*

58) Wilia, C., and Favez, C., *Preliminary results of a comparative trial of isoniazid-rifampicin-thiocarlide and isoniazid-streptomycin-thiocarlide in untrated active pulmoary tuberculosis. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:577-582*

59) Wäre, M., et al, *Clinical experience of the treatment of drug resistant pulmonary tuberculosis with rifampicin combined with ethambdtol and capreomycin. Scand J Resp Dis, Sdppl 69:59 1969*

60) Radenabch, K. L., *Results of clinical studies with capreomycin, ethambutol and rifampicin in the Heckschorn hospital, Berlin. Scand J Resp Dis, 1969, suppl 69:43*

61) Augier, J., et al, *Frequence et signification des bacilloscopies positives en fluorescence associes a des cultures negatives au cours de traitement a base d'isoniazid ou de rifampicine chez des tuberculeux traites en sanatorium. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:417*

62) Trendelenburg, F., *Method of clinical evaluation of rifampicin activity. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:432*

63) Schütz, I., *A comparison of rifampicin, ethambutol and PAS in short term monotherapy. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:437*

64) Daddi, G., et Lucchesi, M., *La rifampicine dans le traitement de la tuberculose a mycobacteries polyresistants. Observations cliniques et de laboratoire. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:442*

65) Virchow, C., and Flemming, J., *Combined treatment with rifampicin-ethambutol-capreomycin in chronic open pulmonary tuberculosis. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:466*

66) Boszörmenyi, M., et al., *Nos premieres experiences cliniques sur la rifampicine. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:471*

67) Tousek, J., *First experience with rifampicin in retreatment of resistant cases. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:478*

68) Meissner, G.. *Rifampicin in chronic polyresistant cases of pulmonary tuberculosis. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:482*

69) Prignot, J., et al., *Etude comparative sur la rifampicine dans les reprises de traitement des cas de tuberculose pulmonaire a bacilles polyresistants. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:487*

70) Hennebert, A., *Trois observations de traitement de tuberculose ancienne a bacilles multiresistants par l'association rifampicine-ethambutol. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:507*

71) Pickroth, G., et al., *Rifampicin in the treatment of chronic pulmonary tuberculosis. Investigations on clinical activity and side effects. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:513*

72) Brouet, G., *Essais de la rifampicine on monotherapie. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:527*

73) Meissner, G., *Rifampicin in newly detected, untreated cases of pulmonary tuberculosis. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:554*

74) Kraan, J. K., et al, *Controlled study on rifampicin in first treatment of fresh cases of pulmonary tuberculosis. Acta Tuberc Pneum Belg, 1669, 3-4:557*

75) Gyselen, A., et al., *A cooperative study on rifampicin in original treatment of advanced pulmonary tuberculosis. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969 3-4:563*

76) Böszörmenyi, M., *Report on the therapeutic results obtained with rifampicin. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:487*

77) Seydel, J. K., *Physico-chemical studies on rifampicin. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:380*

78) Trnka, L., *Mechaism of rifamicin action on mycobacterial cells. Consideration to the potentiation problem of antimycobacterial treatment. Acta Tuberc Pneum Belg, 1969, 3-4:356*

79) Trnka, L., and Smith, D. W., *Proteosynthetic activity of isolated ribosomes of mycobacteria and its alteration by rifampicin and related tuberculostatic drugs. Antibiotica et Chemotherapia, 1970, 16:369*

80) Lill, H., et al, *The inhibition of the RNA polymerase reaction by rifampicin.* (*Personal publication*)

81) 金成鎭外 : 마우스결핵증에 있어서 *INH* 治療方式에 관한 실험. 結核 및 呼吸器疾患 *1965, 19:53~79.*

82) 青木正和外 : *Kekkaku, 1961, 36:355.*