

原 著

Mycobacterium avium-intracellulare 症治療術式の検討

(1) 感染確立後から開始するマウス治療モデル

桜井 信男・久世 文幸

京都大学結核胸部疾患研究所内科1

受付 昭和61年2月20日

A STUDY ON DRUG REGIMENS AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM*-
INTRACELLULARE INFECTION

—(1) Delayed Therapy of Murine Infection—

Nobuo SAKURAI* and Fumiyouki KUZE

(Received for publication February 20, 1986)

A murine chronic model of *M. avium-intracellulare* infection was established in our laboratory and reported at the 58th annual meeting. The evaluation of therapeutic effects of some regimens against the murine chronic model has been studied, and the several multi-drug regimens including Kanamycin (KM) revealed to be effective.

In the previous experiments, however, the treatments were uniformly begun one week after infection. This time, the treatments were begun immediately, two weeks and four weeks after infection, and the evaluation of the effects was done by observing the macroscopic lesions of each organ, weighing the lungs, spleens, kidneys and livers, and counting the number of viable bacilli per lung and spleen. The regimens used in this experiment were KM-Rifampicin (RFP)-Ethambutol (EB) and KM-RFP-EB-Cycloerine (CS)-Ethionamide (TH).

The two regimens, even when they were given four weeks after infection, were found effective in the macroscopic lesions, weights and viable counts of bacilli of the organs. The effect of delayed treatments was almost the same as that of the immediate therapy. The difference between these two regimens was, however, not significant.

Key words : Bacterial infection, *Mycobacterium avium-intracellulare*, Murine experimental infection, Chemotherapy for *Mycobacterium avium-intracellulare* infection

キーワードズ : 細菌感染, *Mycobacterium avium-intracellulare*, マウス実験感染症, *Mycobacterium avium-intracellulare* 感染症の化学療法

* From the First Department of Internal Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

慢性感染症の1つとしての *M. avium-intracellulare* 症は特に肺における何らかの基礎疾患に併発もしくは続発しやすい opportunistic infection として、近年注目されるようになり、最近後天性免疫不全症候群 (AIDS) に本菌による高率の全身性合併感染¹²⁾ が報告されていることもあって、その治療の必要性がより緊急性をおびてきている。現在本症に対して抗結核薬を中心とした併用治療術式が試みられているが、いまだ十分な治療効果が得られていない。今後より有効な薬剤の検索が必要であるが、それには実験動物による感染モデルが是非とも必要である。私どものマウスを用いた感染モデル作成の経過については第58回の結核病学会総会で報告³⁾ し、作成した慢性感染モデルを用いた種々の抗結核薬の併用術式の検討⁴⁾ についても報告した。今回は感染から薬剤投与開始までの期間がその後の治療効果に及ぼす影響を含め、Kanamycin (KM) を含む抗結核薬の3剤および5剤併用術式の効果について再検討を試

みたので報告する。

I. 実験材料ならびに方法

(1) 実験動物

BALB/c 雄マウス (静岡実験動物より購入) を使用し、4週齢で経尾静脈感染を実施した。飼料は市販の固形飼料 (船橋農場) を用いた。

(2) 使用菌株

M. intracellulare 31F093T 株⁵⁾ を使用した。本菌は京大結核胸部疾患研究所附属病院入院患者 (*M. intracellulare* 症) の喀痰分離株で、分離時期は1973年である。この菌の寒天培地上のコロニー形態は translucent⁶⁻⁸⁾ で、抗結核薬に対する感受性は Table 1 のごとくである。本菌株の1%小川培地上の発育菌を Dubos Tween albumin 液体培地 (0.05% Tween 80 含有) に継代し、更に再度同培地に継代した2週間培養菌液を直接マウス感染菌液として使用した。感染菌量は使用時

Table 1. Susceptibility of *M. avium-intracellulare* 31F093T to Antituberculous Drugs (1% Ogawa medium)

Drug	RFP	EB	KM	TH	CS	INH
r/ml	10 25 50	2.5 5 10	25 100	25 100	20 40	0.1 1 5
	CR CR CR	CR CR S	PR PR	CR PR	PR S	CR CR CR

CR ; Complete Resistant PR ; Partially Resistant S ; Susceptible
 RFP=Rifampicin, EB=Ethambutol, KM=Kanamycin, TH=Ethionamid
 CS=Cycloserine, INH=Isoniazid

に感染菌液を滅菌生理食塩水で10倍稀釈系列を作成し、その0.1mlずつを1%小川培地に接種、培養することにより求めた。

(3) 実験方法

BALB/c 雄マウス155匹に、*M. avium-intracellulare* 31F093T の 1.8×10^7 v.u. を尾静脈内に感染させ、次の4実験群を作成した。

- 第1群 非治療感染群
- 第2群 感染直後治療開始群
- 第3群 感染後2週目治療開始群
- 第4群 感染後4週目治療開始群

第2, 第3, 第4群に KM・RFP・EB の3剤と、KM・RFP・EB・CS・TH の5剤併用術式の2術式をそれぞれ8週間継続し、その治療効果を臓器肉眼病変、肺、脾の平均重量、および生菌数などにより判定した。薬剤投与量は、マウス1匹当たり、KM 0.5mg, RFP 0.25mg, EB 0.5mg, CS 0.25mg, TH 0.25mg を連日 (週6日) 投与した。KM は 0.2ml (0.5mg) を背部皮下に

注射し、他の薬剤は1回投与量が0.2mlになるように各薬剤を含む混合液を調製し、直接胃内 (ゾンデ使用) に投与した。

治療開始直前、治療開始後2, 4, 6および8週にそれぞれ5匹のマウスを屠殺剖検し、各臓器の肉眼病変および肺・脾の平均重量を観察し、またそのうちの3匹について肺、脾内生菌数を定量培養により計測した。臓器定量培養では、3匹のマウスの肺、脾をそれぞれ一括し、2% NaOH で10倍の磨砕懸濁液 (日本精器ユニバーサルホモゲナイザーを使用) を作成のうえ、更に2% NaOH を用いた10倍稀釈系列を作成、その0.1mlずつを1%小川培地に接種、6週間培養し発育した集落数から臓器内平均生菌数を算定した。

II. 実験成績

Fig 1, 2, 3 に治療開始時期ごとに平均体重の推移を示した。非治療感染群は正常群より、感染後2週目で体重増加の抑制が見られた。治療開始から、体重が非治療感

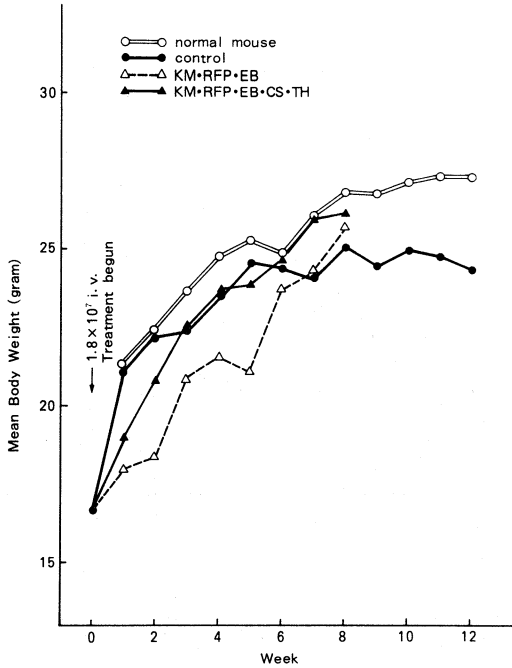


Fig. 1. Average body weights of three groups of mice infected with *M. avium-intracellulare* (31 F 093T) and treated immediately after infection. Average body weights of normal mice were plotted for comparison. Each point represents the average value for 5 mice.

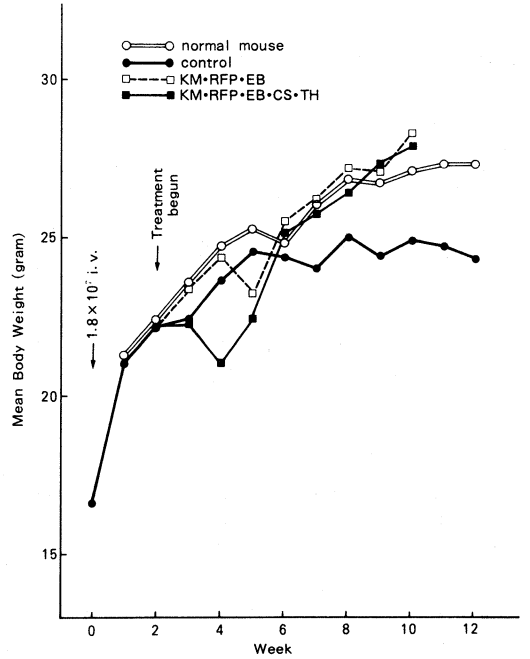


Fig. 2. Average body weights of three groups of mice infected with *M. avium-intracellulare* (31 F 093 T) and treated two weeks after infection. Average body weights of normal mice were plotted for comparison. Each point represents the average value for 5 mice.

Table 2. Macroscopic Findings of the Organs of Mice Infected with *M. avium-intracellulare* (31F 093T) and Treated Immediately, Two weeks and Four weeks after Infection with Two Regimens.

Treatment Period	Treatment Begun At (*) After Challenge																			
	* Immediately						* 2 weeks						* 4 weeks							
	Control		KM·EB·RFP		KM·EB·RFP·TH·CS		Control		KM·EB·RFP		KM·EB·RFP·TH·CS		Control		KM·EB·RFP		KM·EB·RFP·TH·CS			
	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid	Lung	Li.Kid		
Immediately Before	+	-	-	%	%															
2 weeks	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4
4 weeks	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4
6 weeks	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4
8 weeks	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4	+	+	+	1/2	3/4

‡ Symbols of gross pathology of lung: - = no macroscopic lesion; + = scattered small nodules; # = many small nodules; * = innumerable small nodules (miliary pattern); * = innumerable small nodules with a few big nodules.
 † Number of mice with macroscopic lesions
 Abbreviations: Li. = Liver, Kid. = Kidney

染群を越え、正常群に近づくまでの期間が感染直後治療群 (Fig 1) で6週から8週、感染後2週目治療開始群 (Fig 2) で4週、感染後4週目治療開始群 (Fig 3) で2週と、治療開始時期が遅れるほど短くなっていった。また、3剤と5剤併用術式の比較では、Fig 1の感染直

後治療開始群のみに5剤併用術式が優っているが、他の2群 (Fig 2, Fig 3) では逆に3剤併用術式がやや体重が早く増加する傾向があった。

Table 2に肺、肝、腎の肉眼所見を示した。3剤および5剤投与群とも、菌接種後2週、4週目と高度の肺

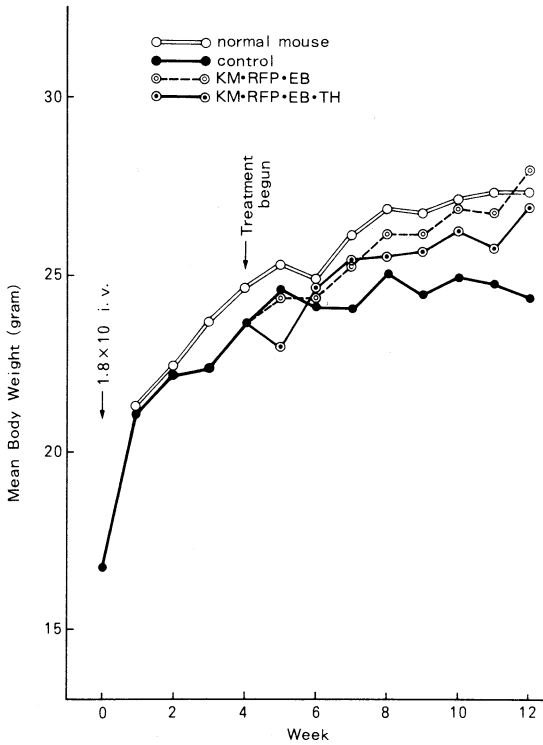


Fig. 3. Average body weights of three groups of mice infected with *M. avium-intracellulare* (31F 093T) and treated four weeks after infection. Average body weights of normal mice were plotted for comparison. Each point represents the average value for 5 mice.

病変成立後からの治療によっても、菌接種直後投与群と同程度の肺病変の抑制もしくは消退がみられた。また、5剤併用術式の方が病変発現がやや弱いようであった。Fig 4に肺重量の推移を示した。感染後4週目治療群にても重量増加抑制傾向は感染直後治療群と同様であった。また、感染直後治療を開始した群では、治療2週目で既に非治療感染群と比べ、肺重量の減少傾向が明らかになったが、感染後2週および4週投与開始群では肺重量の減少傾向が明らかになるまでに2週以上を要した。また、差は極めて少ないが5剤併用術式が3剤併用術式に比して肺重量は少ない傾向があった。Fig 5には肺の平均生菌数の推移を示したが、肺重量変化と同じく、感染後4週目からの薬剤投与群にても治療効果は認められた。また、菌接種直後治療群では2週目で既に非治療感染群と比べ、平均還元生菌数の抑制が見られるが、菌接種2週、4週目治療開始群では平均生菌数の抑制が見られるまで2週以上を要した。5剤併用術式が3剤併用術式に比較し、一時肺内生菌数の少ない時期が認められたが、両者の差は明らかでなかった。Fig 6では脾の重量変化を示

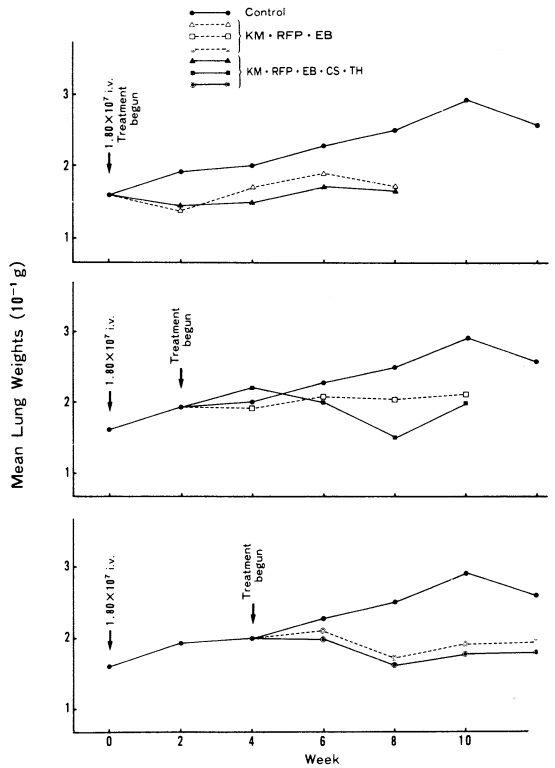


Fig. 4. Average lung weights of mice infected with *M. avium-intracellulare* (31F 093T) and treated immediately, two weeks and four weeks after infection with two regimens. Each point represents the average value for 5 mice.

しているが、同様に感染後4週目からの治療でも有効であった。肺の重量変化と比較して、感染後2および4週目治療開始群ではむしろ減少の速度は早かった。3剤併用術式と5剤併用術式の差は肺と同様に明らかでなかった。脾の還元生菌数の推移は Fig 7に示すが、肺重量と同様薬剤投与時期が遅れても治療効果は認められた。しかし、4週目治療開始群にて治療開始2週目で生菌数の減少傾向が他の2群よりやや鈍化した。3剤と5剤併用術式の差は明らかでなかった。

Fig 8に腎の重量変化の推移を示した。ここでは肺、脾の重量変化と異なり、治療開始時期の遅れに伴い、治療群の腎重量と非治療感染群の差がなくなる傾向がみられた。しかし、正常群の腎重量は非治療感染群とほぼ同様であって、これらの差は少なく、有意とは考えられなかった。3剤と5剤併用術式の差は腎重量でも明らかでなかった。Fig 9には肝の重量変化を示した。感染後2週目までの治療開始群では、ある程度の治療効果は見られるが、4週目治療開始群では、ごく軽度の治療効果しかみられなかった。また、3剤と5剤併用術式の差は認め

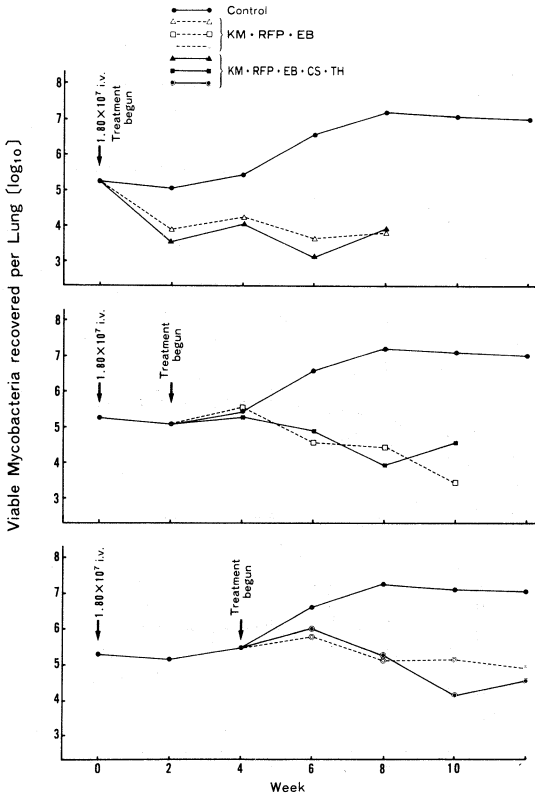


Fig. 5. Growth of *M. avium-intracellulare* in the lungs of mice treated immediately, two weeks and four weeks after infection with two regimens. Each point represents the average value for 3 mice.

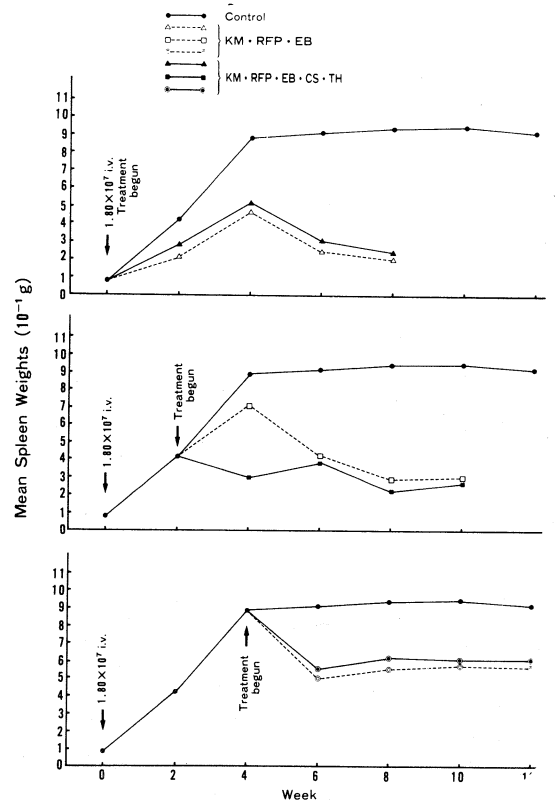


Fig. 6. Average spleen weights of mice infected with *M. avium-intracellulare*(31F093T) and treated immediately, two weeks and four weeks after infection with two regimens. Each point represents the average value for 5 mice.

られていない

III. 考 案

私どもは *M. avium-intracellulare* 症のマウス慢性感染モデルを、静脈内感染、腹腔内感染³⁾⁵⁾、吸入感染³⁾⁹⁾、で作成したことを既に報告し、これらを用いた、1, 2 の治療実験についても追加報告した⁴⁾。これらの検討で、KM および KM を含む RFP, EB の 3 剤併用術式、あるいはこれに 2 剤を加えた 5 剤併用術式などが、菌の根絶は得られないが、明らかに有効であったという結果を得ている。この際問題となるのは、① 薬剤の投与時期 (前回の報告⁴⁾ では一律に感染後 1 週後に治療を開始した)、② 感染経路がより人体の感染に近い吸入感染での治療実験ではどうなるかの問題、③ 使用菌株固有の感受性による治療効果判定時の特殊性、④ 一般抗菌薬その他の薬剤による治療実験の必要性などである。今回はこの ① の薬剤の投与開始時期を変えた場合の治療効果について検討したわけである。薬剤としては

KM · RFP · EB の 3 剤併用と、KM · RFP · EB · CS · TH の 5 剤併用の 2 併用術式を試みた。前回の報告⁴⁾ では ddY マウスを使用した、今回は BALB/c マウスを使用した。これは前回報告⁵⁾ したように、BALB/c 静脈感染系は、ddY 静脈感染系と比較し、治療実験のためのより良好な感染モデルとなりうると考えたからである。

今回の成績で示したように、各臓器の肉眼所見、脾、脾の重量および生菌数の観察では、感染と薬剤投与時期の間隔が 2 週、4 週となっても、効果発現がやや遅れる傾向はあるが、感染直後治療開始群とはほぼ同程度の治療効果がみられることが明らかになった。3 剤と 5 剤併用術式の差は肺重量でやや 5 剤併用群が少ない傾向がある以外明らかな差はみられなかった。肝重量変化では治療効果は 2 週、4 週後治療開始群にも同様認められているが、4 週後開始群では直後および 2 週後開始群ほどの治療効果はみられない印象を受けた。腎重量変化では、感染直後治療開始群で約 6 週間重量増加が抑制されたが、

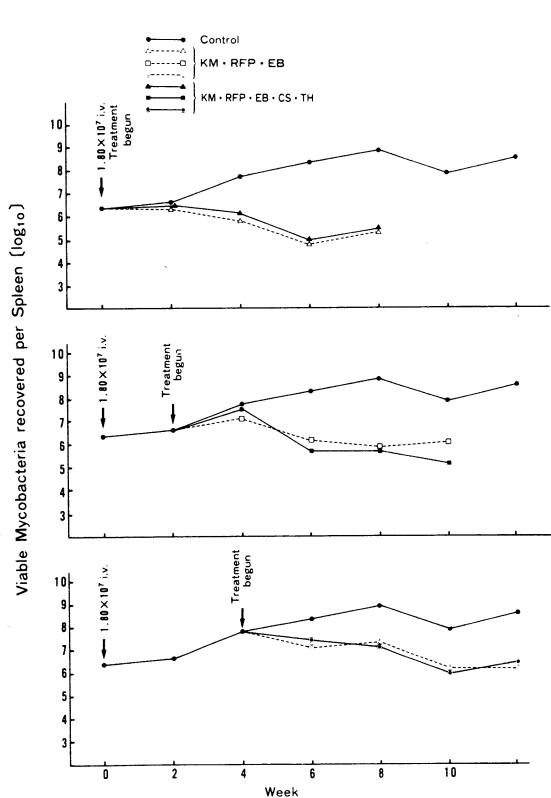


Fig. 7. Growth of *M. avium intracellulare* in the spleens of mice treated immediately, two weeks and four weeks after infection with two regimens. Each point represents the average value for 3 mice.

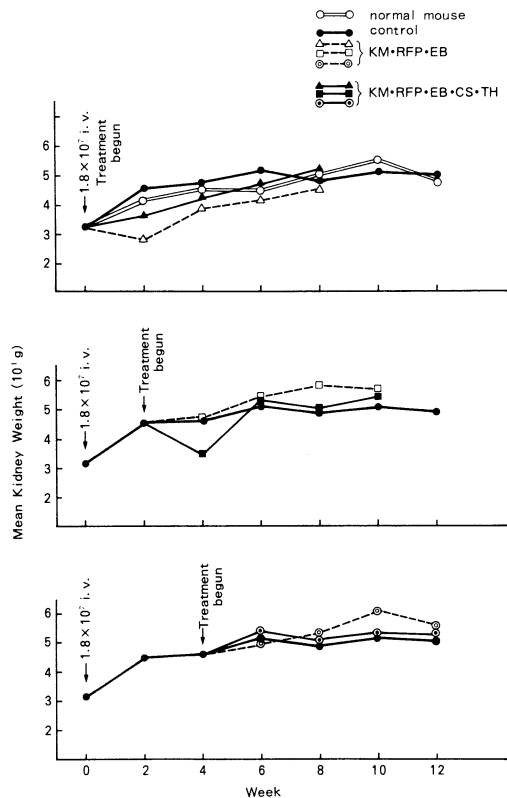


Fig. 8. Average kidney weights of mice infected with *M. avium-intracellulare* (31F 093T) and treated immediately, two weeks and four weeks after infection with two regimens. Each point represents the average value for 5 mice.

他の2群では抑制効果はなかった。しかし、正常マウス腎が感染マウス腎とほぼ同重量であることから、腎重量に関しては、治療効果の判定は困難であった。

平均体重の推移であるが、感染後2週、4週治療開始群の方が、感染直後治療開始群より早期に正常群の体重に近づいていること、3剤と5剤併用術式の比較では、感染直後治療開始群のみ3剤より5剤で体重の増加傾向があり、他の2群では3剤の方が体重の増加傾向があることの2点で、治療開始時期の差があらわれている。治療効果が正常群の体重に近づくことと考えると、感染直後より2～4週後治療開始群の方が早く治療効果がみられることになり、かつ3剤の方が治療効果がやや良いことになる。また、治療群が非治療感染群より体重が減少するのを薬剤投与の副作用と考えると、感染直後治療開始群では他の2群より薬剤の副作用が大きく、5剤より3剤でより体重増加が抑制されているのは、5剤が3剤併用より治療効果が副作用以上に大きいためと考えざるをえない。しかし、これら体重の推移のより詳細な解析は今回の成績のみでは結論できず、今後の再検討を要す

と考えている。

M. avium-intracellulare 感染モデルを使用した治療実験の報告は少ないが、J. S. Shrouts ら¹⁰がRFP, INH, SM, EBを使用して腎の還元生菌数より治療効果を検討し、RFP・SMの併用術式が有効と報告している。この場合感染7日目より治療を開始している。しかし、この成績は、非治療感染群の臓器内生菌数の増加も明らかでなく、良好な感染モデルを使用したとは言いがたい。私どもの作成した感染モデルはこの点臓器内生菌数の着実な増加と、肉眼病変を伴い、治療効果の判定に耐える慢性感染モデルであると考えている。今回の成績で、感染より治療開始までの期間を変更した場合、肺および脾の肉眼所見と重量、臓器内生菌数の推移から、4週日薬剤投与と開始群でも、感染直後薬剤投与群とほぼ同様の治療効果がみられたことは、本感染モデルを使用した治療実験では感染後1週目の治療開始にての判定で、充分治療効果の検討が可能なることをはじめ、本感染モデルの有用性を更に実証したものと考えている。

(本論文の要旨は第60回日本結核病学会総会において報告した。)

文 献

- 1) Brian, W., Fitzroy, F. E., et al. : Continuous High-Grade *Mycobacterium avium-intracellulare* Bacteremia in Patients with the Acquired Immune Deficiency Syndrome, *Am J Med*, 78 : 35, 1985.
- 2) Horsburgh, C. R., et al. : Disseminated Infection with *Mycobacterium avium-intracellulare* : A Report of 13 Cases and a Review of the Literature, *Medicine* 64 : 36, 1985.
- 3) 久世文幸他 : 実験的非定型抗酸菌症, *結核*, 58 : 469, 1983.
- 4) Kuze, F. : Experimental Chemotherapy in Chronic *Mycobacterium avium-intracellulare* Infection of Mice, *Am Rev Respir Dis* 129 : 453, 1984.
- 5) 久世文幸他 : 実験的非定型抗酸菌症に関する研究 7. *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complexのマウスに対する病原性 (ii) —mouse virulent strain (マウス毒力株)の検索—, *結核*, 59 : 13, 1984.
- 6) Fregnan, G. B., and Smith, D. W. : Description of various colony forms of *Mycobacteria* *J Bacteriol* 83 : 819, 1962.
- 7) Schaefer W. B., et al. : Pathogenicity of Transparent, Opaque, and Rough Variants of *Mycobacterium avium* in Chickens and Mice, *Am Rev Respir Dis*, 102 : 499, 1970.
- 8) Kuze, F., and Uchihira, F. : Various colony-formers of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Eur J Respir Dis*, 65 : 402, 1984.
- 9) 久世文幸他 : 実験的非定型抗酸菌症に関する研究 8. マウスを対象とした *Mycobacterium intracellulare* 吸入感染の試み (続報), *結核*, 59 : 115, 1984.
- 10) Shrouts, J. S., et al. : Rifampin Alone and Combined with Other Drugs in *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium intracellulare* Infection of Mice, *Am Rev Respir Dis.*, 104 : 728, 1971.

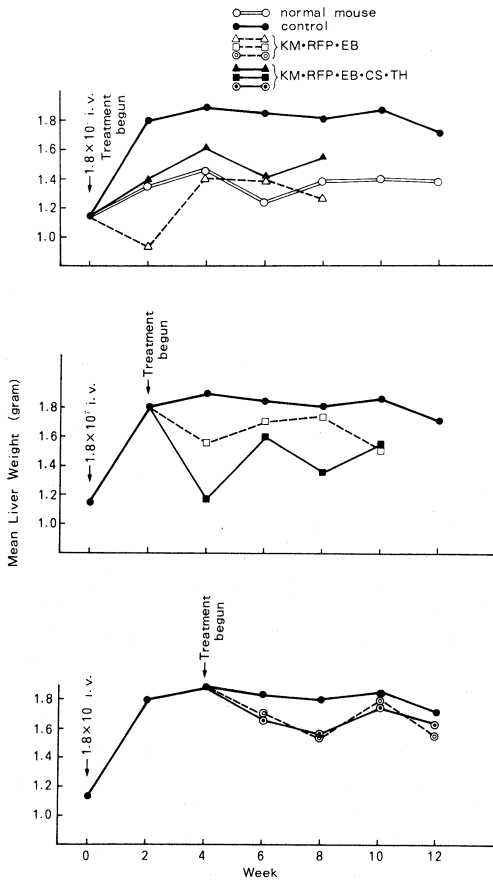


Fig. 9. Average liver weights of mice infected with *M. avium-intracellulare* (31F 093T) and treated immediately, two weeks and four weeks after infection with two regimens. Each point represents the average value for 5 mice.

IV. 結 論

M. avium-intracellulare 31F093T 株を用いたマウス慢性感染モデルに対し, KM・RFP・EBの3剤および, KM・RFP・EB・CS・THの5剤併用術式の2術式について, 感染から薬剤投与開始までの期間がその後の治療効果に及ぼす影響について検討し, 肺, 脾の肉眼所見, 重量, 生菌数より, 感染後4週目からの治療でも感染直後からの治療とほぼ同様の効果が得られることが判明した。今回の実験では3剤と5剤併用術式の差は明らかではなかった。