

原 著

Mycobacterium avium-intracellulare 症治療術式の検討

(2)マウス吸入感染モデルに対する aminoglycoside の治療効果

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62年2月7日

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

(2) The Therapeutic Effects of Aminoglycosides to Murine Airborne Infection Model

Nobuo SAKURAI* and Fumiyuki KUZE

(Received for publication February 7, 1987)

The therapeutic effects of four aminoglycosides—kanamycin (KM), gentamicin (GM), sisomicin (SISO) and tobramycin (TOB)—were evaluated *in vivo* for ddY mice infected aerogenically with *Mycobacterium avium-intracellulare*, 31F093T strain. The four aminoglycosides were all administered to the animals five days a week in dosages roughly comparable with clinical use from 6 weeks after infection. The macroscopic lesions, the weights of organs and the counts of viable bacilli in lungs and spleens were observed every three weeks during treatment (12 weeks).

The observation of macroscopic lesions of the lung confirmed the suppression of the disease in the treated mice through 12 weeks of infection. In the control untreated mice, the counts of viable units of bacilli recovered from lung increased a 1000-fold value and the lung weight reached a 3-fold value after 6 weeks of infection. In the treated mice, the counts of viable bacilli in lungs and the lung weights were considerably reduced until 12 weeks of treatment. And also these aminoglycosides suppressed the increase in counts of viable bacilli in spleen.

In this experiment, usability of the murine airborne infection model of *M. avium-intracellulare* was again confirmed and even in this model, KM was effective and other aminoglycosides—GM, SISO and TOB—could also exerted therapeutic effect. The high degree of potency of GM, SISO and TOB might permit the use for a short period of time in acute exacerbation in human *M. avium-intracellulare* infection. Furthermore, since chemotherapy for *M. avium-intracellulare* demands simultaneous use of three or more drugs, the role of these aminoglycosides in therapy may possibly increase the efficacy of treatment.

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

はじめに

結核症の減少に伴い、非定型抗酸菌症、即ち結核菌以外の諸種抗酸菌による慢性肺感染症が注目されるようになった。その中で本邦における原因菌の70%前後を占める *Mycobacterium avium-intracellulare* は諸種抗菌薬に感受性が低く、本菌による感染症に卓効を示す治療術式は未だ確立されていない。現在、kanamycin (KM) などの aminoglycoside を含む抗結核薬の多剤併用術式が臨床的に使用され、併用効果を期待している現状である。私共の作成した *M. avium-intracellulare* マウス経尾静脈感染モデル¹⁾ を用いた治療実験²⁾ では KM-rifampicin (RFP)-ethambutol (EB) の3剤、及び KM-RFP-EB-cycloserine (CS)-isoniazid (INH) の5剤併用術式が菌の根絶には至っていないまでも、現在までに検討した治療術式の中では最も良好な肺内生菌数の抑制効果を示した。また単独薬による治療では KM がかなりの治療効果を示すことも見出している。今回は感染経路がより人体の感染に近い吸入感染を使用し、KM を含む aminoglycoside (KM), gentamicin (GM), sisomocin (SISO), tobramycin (TOB) によるそれぞれの単独治療効果について検討したので報告する。

1. 実験材料並びに方法

(1) 実験動物

ddY 雄普通マウス(静岡実験動物より購入)を使用し、3週齢で吸入感染を実施した。飼料は市販の固形飼料(船橋農場)を用いた。

(2) 使用菌株

M. avium-intracellulare 31 F 093 T 株³⁾ を使用した。本菌は京都大学結核胸部疾患研究所付属病院入院患者(肺 *M. avium-intracellulare* 症)の喀痰より1973年に分離した株である。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。吸入時に使用した菌液に含まれる生菌数は、感染操作と同時に、同一の菌液を滅菌生理的食塩水で10倍希釈系列を作成し、その0.1 ml ずつを1%小川培地に接種、培養することにより算定した。感染菌量は吸入感染後1日目の肺内生菌数で示した。

(3) 実験方法

ddY 雄マウス113匹に、*M. avium-intracellulare* 31 F 093 T の上記のごとく作成した菌液(1.4×10⁹ v. u. /ml)を用いて、吸入感染させた。吸入感染には、TRI-R Airbone Infection Apparatus Model A42 (TRI-R Instruments, Inc., N. Y. 11570 U. S. A)

を使用し、preheat period 15分、nebulizing time 60分、cloud decay time 30分、decontamination time 20分で操作し、mean air flow 28L/min、compressor air flow 4 L/min の条件で行った。吸入感染させたマウス113匹を5群に分け、更に正常マウス(非感染非治療群)1群を加え、次の6実験群を作成した。

第1群 非感染非治療群(正常群)

第2群 感染非治療群

第3群 感染 KM 治療群

第4群 感染 GM 治療群

第5群 感染 SISO 治療群

第6群 感染 TOB 治療群

各薬剤の1回投与量はマウス1匹当たり KM 0.5 mg, GM 0.06 mg, SISO 0.075 mg, TOB 0.09 mg で、いずれも滅菌生理的食塩水0.2 ml に上記の投与量が含まれるよう注射液を作成し、背部皮下に注射した。投与方法は、週5日連日1日1回で、吸入感染後6週目より、18週目までの12週間投与した。

感染後1日目、3週目、6週目(治療開始直前)に第1群の正常群及び第2群の感染非治療群を、また治療開始後3週、6週、9週、12週目に第1~6群の正常群、感染治療群を各々5匹ずつ屠殺剖検し、各臓器の肉眼病変及び臓器重量を観察し、またその3匹について肺、脾、腎内生菌数を定量培養により算定した。臓器定量培養では、3匹のマウスの各臓器をそれぞれ一括し、2% NaOH で10倍の臓器磨砕懸濁液(日本精器ユニバーサルホモゲナイザーを使用)を作成し、更に2% NaOH を用いた10倍希釈系列を作成、その0.1 ml 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。

2. 実験成績

Fig. 1 に各群の平均体重の推移を示した。感染非治療群は正常群と比較し、14週まで差はみられなかった。治療群4群では、GM が治療開始直後から体重増加の抑制傾向を示したが、他の3剤では感染非治療群との差は明らかでなかった。感染後16週以降で、感染非治療群で体重の減少傾向が認められた。

Table には肺、脾、腎の肉眼所見の推移を示した。KM, GM, SISO, TOB 各薬剤とも肺病変の抑制もしくは、消退をもたらした。実験終了時には各薬剤間の差は明らかでなかった。脾臓病変としては脾腫(脾臓重量が同時期の正常群の平均脾重量より大)の場合を病変ありとした。吸入感染では経静脈感染に比べ脾腫の程度は軽度のため、各群の差は明らかではなかった。また腎病変としては腎膿瘍、腎萎縮及び腎被膜の炎症所見(癒着及び繊維化)が見られ、感染治療群の4群では腎萎縮及び腎被膜の炎症所見が感染非治療群に比べ高頻度に見られた。

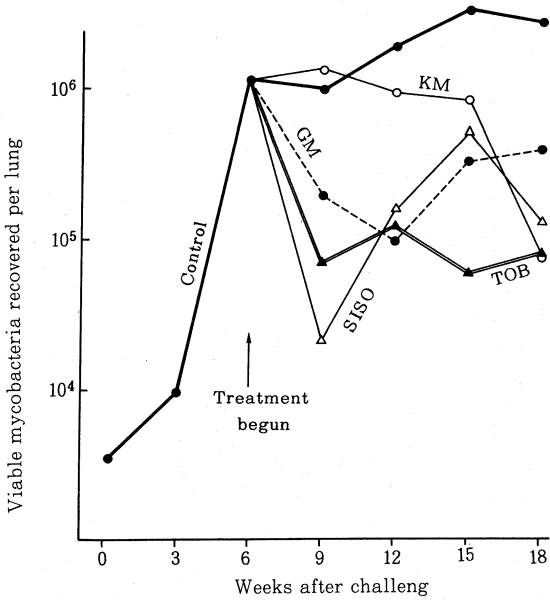


Fig. 3. Viable units of *M. avium-intracellulare* (31F093T) recovered from the lung of mice. Each point represents the average value for three mice.

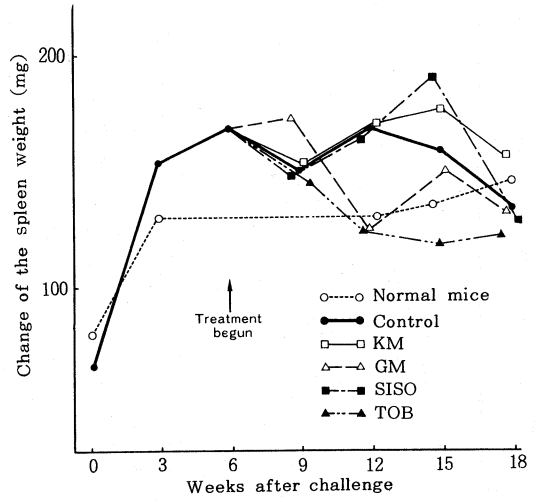


Fig. 4. Average spleen weights of mice. Each point represents the average value for five mice.

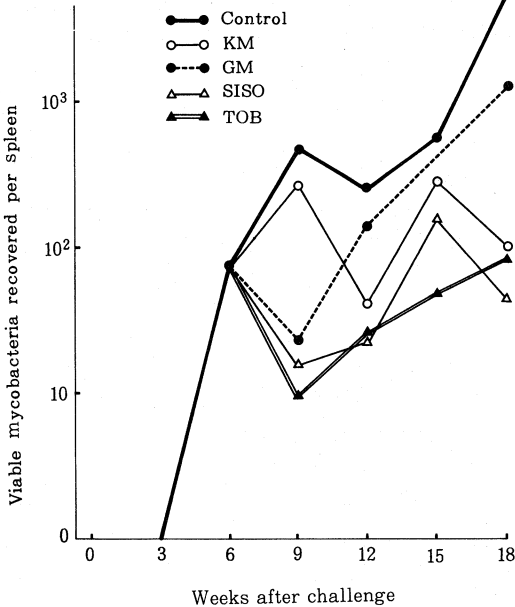


Fig. 5. Viable units of *M. avium-intracellulare* recovered from the spleen of mice treated with KM, GM, SISO and TOB starting six weeks after infection. Each point represents the average value for three mice.

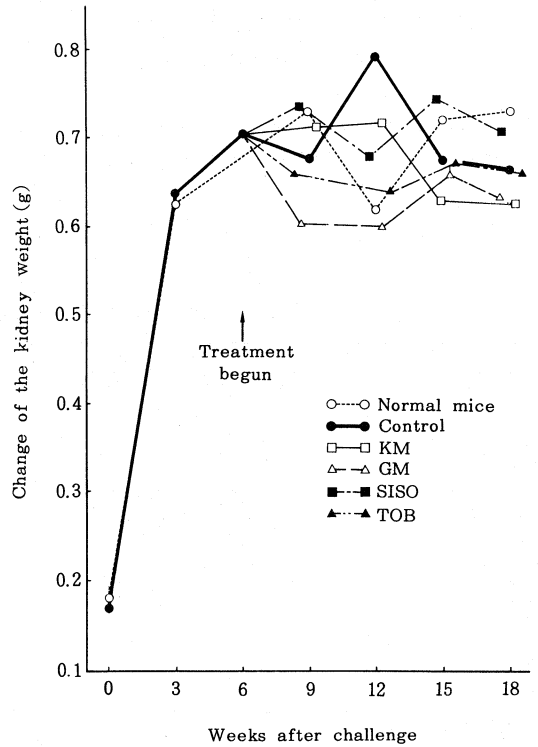


Fig. 6. Average kidney weights of mice. Each point represents the average value for five mice.

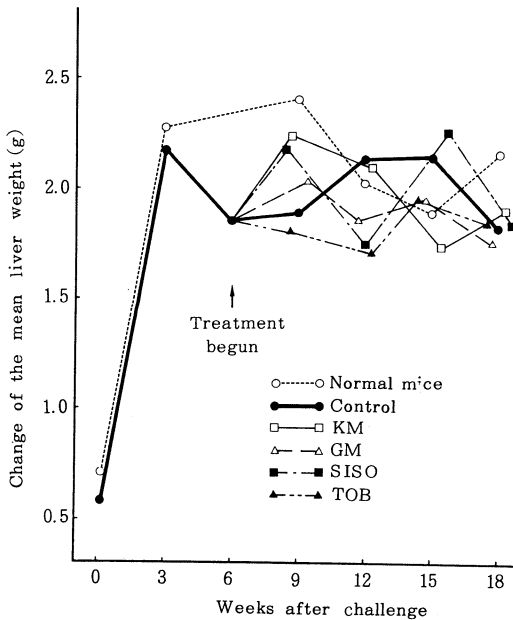


Fig. 7. Average liver weights of mice. Each point represents the average value for five mice.

この原因としては、(1)これら aminoglycoside の副作用、(2)薬剤投与(背部皮下注射)による損傷が考えられるが、薬剤投与量から考えて(2)の薬剤の背部皮下注射による損傷の可能性が強く、今後病理組織学的考察をふまえた検索が必要と思われる。

Fig. 2, 3 に肺の平均重量の推移と肺内生菌数の変化を示した。肺重量は感染後6週で約3倍、肺内生菌数は1,000倍と増加、Table の肉眼所見とも考え合わせ、吸入感染による慢性進行性の実験的感染モデルの有用性を再確認した。KM 投与群では、GM, SISO, TOB に比較し、肺内生菌数の減少効果の発現が遅れたが、実験終了時にはいずれの薬剤にもともに治療効果が認められた。

Fig. 4, 5 に脾の重量変化、生菌数の変化を示した。検討した aminoglycoside はいずれも肺におけると同様治療効果を示し、その中でも SISO, TOB に他の2剤よりもやや良好な成績がみられた。

Fig. 6, 7 に腎及び肝の重量変化を示すが各群間の差は明らかでなかった。なお腎では感染後15, 18週目に感染非治療群に2~5×10⁶ v. u. の還元生菌数を認めたが、薬剤投与群では18週目まで生菌は認められなかった。

3. 考 案

M. avium-intracellulare 症のマウス尾静脈感染モデル¹⁾を使用して私共が既に報告してきた治療実験²⁾では、静脈内感染に対し、KM 単独及び KM を含む KM, RFP, EB 等の抗結核薬の併用術式が比較的有効であった。実験感染治療実験において問題になると思われるのは、(1)薬剤の投与開始時期による治療効果の差異、(2)感染経路を変更した場合の治療効果の差異、(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等である。(1)については前回報告⁴⁾したように、*M. avium-intracellulare* 31 F 093 T 株を用いたマウス慢性感染モデルに対し、感染直後、感染後2週目、4週目治療開始群の3群間には、KM・RFP・EBの3剤及び KM・RFP・EB・CS・THの5剤併用術式の2術式では、感染直後治療を開始した群で、治療開始2週目で既に治療効果が見られ、感染後2週目及び4週目治療開始群より早期に治療効果が見られる傾向はあるが、いずれの群においても治療効果が見られたことより、少なくとも経尾静脈マウス感染モデルにおいては感染後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ことが示唆された。また(3)の使用菌株の問題であるが、現在までのところ私共の施設では31 F 093 T 株のみがマウスに安定した慢性の進行性肺病変を作成するのに成功した菌株であるため、この菌株固有の感受性による治療効果判定時の特殊性の問題は依然解決されず、今後、更に本菌株以外のマウス毒力株の検索が重要な課題である。今回は、(2)の、感染経路がより人の感染に近い吸入感染における治療実験について検討した。

吸入感染モデルについては ddY 雄普通マウスを使用し、マウス毒力株 31 F 093 T 株を吸入感染させ、慢性進行性の実験的肺 *M. avium-intracellulare* 症を作成することができたことを既に報告している⁵⁾。*M. avium-intracellulare* のマウス吸入感染モデルは他に Collins ら⁶⁾が D673 株を用いた吸入感染で、6カ月後に肺内生菌数が約100倍になった成績を報告している。また Waggle ら⁷⁾は自然感染した C57 BL/6 N マウスより分離した *M. avium-intracellulare* complex を B6C3F1 hybrid mice に経気道感染させたが、感染後31週で肺内生菌数陰性、病理組織学的検索にても病変が認められないと報告している。現在までのところ、吸入感染モデルとしては私共の31 F 093 T 株を使用したモデルと Collins らの D673 株使用モデルのみが肺の進行性の慢性感染モデルとして報告されている。今回の吸入感染においても、感染後6週で、肺内生菌数は1,000倍、肺重量は3倍と増加し、有用な実験吸入感染モデルの作成を再確認した。

Aminoglycoside を使用した治療実験については、

Sanders ら⁸⁾が amikacin (AMK) が *in vitro*, *in vivo* (murine tuberculosis) とともに結核菌に対し, SM, KM より有効であり, atypical mycobacteria に対しては, *M. kansasii* と rapid grower に *in vitro* で有効であると報告しているが, *M. avium-intracellulare* 実験感染を用いた *in vivo* での検討はない。また Nozawa ら⁹⁾は *in vitro* であるが細胞内で dibekacin (DKB) が *M. intracellulare* の増殖抑制効果があることを報告している。*M. avium-intracellulare* の *in vivo* での治療実験では, Shronts ら¹⁰⁾が経静脈感染マウスで SM の有効性を RFP との併用術式で報告しているのみである。私共も SM については経静脈感染モデルではあるが検討したことがあり¹¹⁾, 肺内生菌数の増加抑制を示したが, KM に比較すると軽度の抑制であった。また AMK についても経静脈感染モデルで検討したが¹¹⁾, KM とほぼ同様の有効性を得ている。DKB については *in vitro* での検討¹²⁾のみしかなく, 80% の *M. avium-intracellulare* の菌株の発育を 12.5 ~ 25 µg/ml の濃度で阻止しており, *in vitro* の成績としては AMK と同様であるため, 今後 *in vivo* での検討を要する薬剤の1つと考えられる。今回検討した GM, SISO, TOB は KM に比較して, 肺内生菌数の抑制効果が優れている印象があった。しかしながら, GM, SISO, TOB は副作用の面から投与期間が制限されるので, 臨床的に使用できる可能性としては, *M. avium-intracellulare* 症の急性増悪期—結核症のシュープに類似した状態—に, ごく短期間の使用が考慮されるべきだと思われる。

4. 結 論

M. avium-intracellulare 31 F 093 T 株を用いたマウス吸入感染モデルの有用性を再確認し, KM 以外の aminoglycoside ; GM, SISO, TOB に KM とほぼ同程度の治療効果が認められた。これら aminoglycoside の臨床的使用は, その適応, 使用量, 使用期間などに十分の考慮を払う限り, 検討すべきだと思われた。

文 献

- 1) 久世文幸 : 実験的非定型抗酸菌症, 結核, 58 : 469, 1983.
- 2) Kuze, F. : Experimental chemotherapy in chronic *Mycobacterium avium-intracellu-*

lare infection of mice, Am Rev Respir Dis, 129 : 453, 1984.

- 3) 久世文幸他 : 実験的非定型抗酸菌症に関する研究 7. *Mycobacterium avium-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.
- 4) 桜井信男他 : *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, 結核, 61 : 333, 1986.
- 5) 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.
- 6) Collins, F. M. and Watson, S. R. : Immune responses to atypical mycobacterial lung infections, Rev Infect Dis, 3 : 981, 1981.
- 7) Waggle, K. S. et al. : Experimental murine infections with a *Mycobacterium avium-intracellulare* complex organism isolated from mice, Lab An Sci, 33 : 254, 1983.
- 8) Sanders, W. E., Jr. et al. : Activity of amikacin against mycobacteria *in vitro* and in murine tuberculosis, Tubercle, 63 : 201, 1982.
- 9) Nozawa et al. : Intra- and extra-cellular susceptibility of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex to aminoglycoside antibiotics, Antimicrob Agents Chemother, 26 : 841, 1984.
- 10) Shronts, 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.
- 11) 桜井信男 : *Mycobacterium avium-intracellulare* 症治療術式の検討(3)マウス感染モデルに対する諸種薬剤の治療効果, 結核, 投稿予定.
- 12) 内藤祐子他 : 非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性. V. *Mycobacterium intracellulare* に対する主としてアミノグリコシド系抗生物質の試験管内制菌作用, 結核, 54 : 423, 1979.