

原 著

実験的 *Mycobacterium intracellulare* 感染に対する Kanamycin
 あるいは Clofazimine と Muramyl dipeptide
 誘導体との併用効果

富 岡 治 明・佐 藤 勝 昌・斎 藤 肇

島根医科大学微生物・免疫

受付 平成 3 年 6 月 10 日

THERAPEUTIC EFFICACY OF KANAMYCIN AND CLOFAZIMINE COMBINED
 WITH MURAMYL DIPEPTIDE AGAINST *MYCOBACTERIUM*
INTRACELLULARE INFECTION INDUCED IN MICE

Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO and Hajime SAITO *

(Received for publication June 10, 1991)

Therapeutic efficacy of kanamycin (KM) and clofazimine (CFZ) combined with N²-[(N-acetyl-muramoyl)-L-alanyl-D-isoglutaminyl]-N⁶-stearoyl-L-lysine, MDP-Lys (L18), against *Mycobacterium intracellulare* infection induced in mice was studied, based on suppression of incidence of gross lung lesions and bacterial growth at the sites of infection (lungs and spleen), and the following results were obtained.

Firstly, KM (0.5mg) was given sc to mice, daily six times per week in combination (or not) with sc injections of MDP-Lys(18) (0.1mg) either 1, 3 or 5 times weekly. In this case, KM alone markedly suppressed the incidence of pulmonary gross lesions and the growth of organisms in the lungs and spleen (2~2.5 log-decrease in CFU per organ at week 8) in infected mice. MDP-Lys(18) alone also exhibited similar effect but the efficacy was much lower than that of KM. No synergism was observed for combined use of KM with MDP-Lys(18) in any protocols tested.

Secondly, CFZ (0.5mg) was given to mice by gavage, daily six times per week in combination with or without injections of MDP-Lys(18) (0.1mg), either 1, 3 or 5 times weekly. In this case, CFZ alone decreased the incidence of gross pulmonary lesions in infected mice and the weaker suppressive effect was noted for MDP-Lys(18) alone. Moreover, CFZ alone suppressed bacterial growth in the lungs and spleen (1.5~2.0 log-decrease in CFU per organ at week 8), while MDP alone failed to cause such a marked reduction in bacterial CFU in the visceral organs. In this case, significant effect was not observed in combined use of CFZ with MDP-Lys(18) in all the test protocols, on the basis of change in CFU in the lungs.

The present study indicates that there was no appreciable combined effect against *M. intracellulare* infection, between either KM or CFZ and MDP-Lys(18), although KM and

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

CFZ alone exhibited considerable therapeutic efficacy.

Key words : *Mycobacterium intracellulare*, Kanamycin, Clofazimine, muramyl dipeptide

キーワード : *Mycobacterium intracellulare*, Kanamycin, Clofazimine, MDP

はじめに

非結核性抗酸菌症のうち *Mycobacterium avium-intracellulare complex* (MAC) 症は、最も重要視されているものであり、特に最近 AIDS における細胞性免疫低下に伴っておこる主要な日和見感染症の一つとして注目されているところである¹⁾。しかしながら、MAC は一般に抗結核剤やその他の諸種抗菌剤に対して耐性で、本症の治療には困難を伴うことが多く、有効な化学療法剤の探索あるいはその開発が望まれている。われわれも MAC 感染症に対する有効薬剤の探索を進めているところであるが、これまでのところ、実験的 *M. intracellulare* マウス感染症に対し、Kanamycin(KM)^{2),3)}、Clofazimine(CFZ)²⁾、およびリファマイシン系薬剤の

KRM-1648 に比較的優れた治療効果を見いだしている。他方、*in vivo* 活性の増強を企図して行ったリポソームに封入したこれら薬剤の治療効果についての検討では、薬剤単独投与における場合よりも臓器内 CFU が有意に減少したが、これとてもリポソーム封入薬剤の投与による感染部位よりの菌の完全な排除はみられず、いまだ満足すべき成績は得られていない^{3),4)}。

そこで今回われわれは、抗菌剤(KM,CFZ)と宿主免疫機能を亢進させることの知られている Muramyl dipeptide(MDP)⁵⁾の誘導体の一つである N²-[(N-acetyl-muramoyl)-L-alanyl-D-isoglutaminyl]-N⁶-stearoyl-L-lysine [MDP-Lys(L18)]⁶⁾との併用治療効果について検討することとした。MDP-Lys(L18) は 1 回投与ではエフェクター細胞が多形核白

Table 1. Regimens for *M. intracellulare*-Infected Mice

Exp.	Group	Regimen	Dose (mg)	Adminis- tration/week
1	1	Control	—	—
	2	KM	0.5	6
	3	MDP	0.1	1
	4	KM+MDP	0.5+0.1	6+1
	5	MDP	0.1	3
	6	KM+MDP	0.5+0.1	6+3
	7	MDP	0.1	5
	8	KM+MDP	0.5+0.1	6+5
2	1	Control	—	—
	2	KM	0.5	3
	3	MDP	0.2	3
	4	KM+MDP	0.5+0.2	3+3
	5	KM	0.5	6
	6	MDP	0.2	6
	7	KM+MDP	0.5+0.2	6+6
3	1	Control	—	—
	2	CFZ	0.5	6
	3	MDP	0.1	1
	4	CFZ+MDP	0.5+0.1	6+1
	5	MDP	0.1	3
	6	CFZ+MDP	0.5+0.1	6+3
	7	MDP	0.1	5
	8	CFZ+MDP	0.5+0.1	6+5

血球である感染症に対しては有効であるが、マクロファージである場合には無効であると報告されている⁶⁾。しかし、その頻回投与時の宿主免疫賦活作用についての検討はなされていないので、今回はそのような条件下での検討を試みた。

材料と方法

(1) 動物

日本 SLC (静岡) より購入した 4 週齢の ddY 系雌マウスを本学実験動物施設で 1 週間飼育したもの用いた。

(2) 薬剤

KM は明治製薬より、CFZ は日本チバガイギーより、また、MDP-Lys(L18) は第一製薬より分与を受けたものを用いた。

(3) 供試菌

MAC 症患者より分離され、DNA プローブによって同定された *M. intracellulare* N-260 株 (SmT variant) を用いた。本菌に対する KM 並びに CFZ の 7H10 寒天希釀法による MIC はそれぞれ 25 µg/ml 並びに 1.56 µg/ml であった。

(4) 感染治療実験

M. intracellulare N-260 株の 7H9 broth 中 37°C, OD_{540nm} = 0.15までの培養菌を超音波処理し、1,000 rpm, 5 分間遠心し、その上清を OD = 0.1 に調整したものの 0.2ml (5~7 × 10⁶ CFU) をマウスの尾静脈内へ接種した。そして、その翌日より生食水に溶解した KM (0.5 mg/0.1ml) の皮下投与、蒸留水に超音波処理で懸濁した CFZ (0.5 mg/0.1ml) の経口投与、あるいは PBS に溶解した MDP-Lys(L18) (100 µg/0.2 ml

または 200 µg/0.4 ml) の皮下投与を行った。この場合、抗菌剤および MDP-Lys(L18) 単独、あるいはこれら薬剤と MDP-Lys(L18) との併用投与のスケジュールは Table 1 に示すようである。そして、感染 1 日、4 および 8 週後に屠殺・剖検し、肺、肝、脾、腎の肉眼的病変の有無とその程度並びに肺と脾よりの CFU を算定することによって治療効果を判定した。

結果

(1) KM + MDP-Lys(L18) 投与群

1) MDP-Lys(L18) の 100 µg を週 1, 3 あるいは 5 回、KM を週 6 回、いずれも皮下投与し、それぞれの単独および併用投与による治療効果を検討した。

まず、肺の肉眼的病変 (Table 2) は KM 単独投与によって非治療対照群よりも著しく軽減され、また MDP-Lys(L18) 単独投与群ではその投与回数の別なく多少とも軽減傾向がみられたが、これら両剤の併用投与によって KM 単独投与時のそれよりもさらに軽減されるということはなかった。次に、肺および脾内 CFU (Table 3) は、KM 単独投与によって有意な減少がみられたが、これに MDP-Lys(L18) を併用投与してもその投与回数の別なく、感染 4 および 8 週後ともさらに有意に減少することはなかったものの、肺では多少とも減少の傾向がうかがわれた。

2) MDP-Lys(L18) の 200 µg と KM を週 3 回あるいは 6 回にわたって各単独並びに併用投与した場合の治療効果を検討した。

まず、肺の肉眼的病変 (Table 4) は、KM 単独投与によりその回数の別なく非投与対照群におけるよりも著しく軽減され、また MDP-Lys(L18) 単独投与でもそ

Table 2. Incidence of Lung Lesions in *M. intracellulare*-Infected Mice Treated with KM or MDP-Lys(L18) Alone and Their Combination

Regimen	Number of mice	Number of mice with lung lesions ^{a)}			
		-	1+	2+	3+
None	5	0	0	5	0
KM (6) ^{b)}	5	4	1	0	0
MDP (1)	5	0	2	3	0
KM(6)+MDP(1)	5	4	1	0	0
MDP (3)	5	0	1	4	0
KM(6)+MDP(3)	5	4	1	0	0
MDP (5)	5	0	2	3	0
KM(6)+MDP(5)	5	4	1	0	0

a) Symbols: -, no macroscopic lesion; 1+, less than 20 small nodules; 2+, more than 20 small nodules; 3+, many small nodules with a few confluent nodules.

b) The number of administrations per week.

Table 3. Number of Organisms in the Lungs and Spleen of *M. intracellulare*-Infected Mice Treated with KM or MDP-Lys (L18) Alone and Their Combination

Regimen	Log CFU/Lungs		Log CFU/Spleen	
	4 Weeks	8 Weeks	4 Weeks	8 Weeks
None	4.5±0.1	6.0±0.3	5.2±0.1	5.3±0.1
KM (6)	3.2±0.1 ^a	3.5±0.2 ^b	4.7±0.1	4.3±0.1 ^a
MDP (1)	4.1±0.1	5.8±0.1	5.2±0.1	5.2±0.1
KM(6)+MDP(1)	2.8±0.2 ^a	3.1±0.2 ^b	4.8±0.1	4.3±0.2 ^a
MDP (3)	4.5±0.1	5.8±0.2	5.2±0.1	5.1±0.1
KM(6)+MDP(3)	2.7±0.1 ^a	3.0±0.1 ^b	4.9±0.1	4.3±0.3 ^a
MDP (5)	4.1±0.1	5.7±0.2	5.1±0.1	5.2±0.1
KM(6)+MDP(5)	2.8±0.2 ^a	2.9±0.3 ^b	4.7±0.2	4.3±0.1 ^a

Significantly different from controls (nontreated mice) at $P<0.05$ (a) and at $P<0.01$ (b) but not significantly different between KM and KM+MDP at $P<0.05$.

Table 4. Incidence of Lung Lesions in *M. intracellulare*-Infected Mice Treated with KM or MDP-Lys (L18) Alone and Their Combination

Regimen	Number of mice	Number of mice with lung lesions ^{a)}		
		—	1+	2+
None	5	0	0	4
KM (3) ^{b)}	5	3	2	0
MDP (3)	5	0	1	3
KM(3)+MDP(3)	5	4	1	0
KM (6)	5	4	1	0
MDP (6)	5	0	1	3
KM(6)+MDP(6)	5	5	0	0

a) and b) See Table 2.

Table 5. Number of Organisms in the Lungs and Spleen of *M. intracellulare*-Infected Mice Treated with KM or MDP-Lys (L18) Alone and Their Combination

Regimen	Log CFU/Lungs		Log CFU/Spleen	
	4 Weeks	8 Weeks	4 Weeks	8 Weeks
None	3.8±0.1	4.1±0.2	5.2±0.1	4.6±0.1
KM (3)	2.9±0.1 ^b	3.1±0.2 ^a	5.0±0.1	4.4±0.3
MDP (3)	3.8±0.1	4.8±0.1	5.3±0.1	4.8±0.4
KM(3)+MDP(3)	2.8±0.2 ^b	2.8±0.1 ^b	4.8±0.1 ^a	4.3±0.3
KM (6)	2.7±0.1 ^b	2.8±0.1 ^b	4.9±0.1	4.2±0.2
MDP (6)	4.0±0.1	5.1±0.1 ^b	5.6±0.2	4.8±0.3
KM(6)+MDP(6)	2.6±0.1 ^b	2.8±0.1 ^b	4.8±0.1 ^a	3.9±0.1 ^b

See footnote of Table 3.

の回数の別なく、若干軽減傾向がみられたが、これら両者を併用しても KM 単独投与時を凌駕する治療成績は得られなかった。次に、上述の実験系における肺並びに

脾内 CFU は Table 5 に示すようであり、KM 単独投与（3回および6回）によって肺内 CFU は非治療対照群よりも有意な減少がみられたが、脾ではその程度は低

Table 6. Incidence of Lung Lesions in *M. intracellulare*-Infected Mice Treated with CFZ or MDP-Lys (L18) Alone and Their Combination

Regimen	Number of mice	Number of mice with lung lesions ^{a)}			
		—	1+	2+	3+
None	5	0	0	4	1
CFZ (6) ^{b)}	5	4	1	0	0
MDP(1)	5	1	2	2	0
CFZ(6)+MDP(1)	5	5	0	0	0
MDP(3)	5	0	2	3	0
CFZ(6)+MDP(3)	5	5	0	0	0
MDP(5)	5	1	1	3	0
CFZ(6)+MDP(5)	5	5	0	0	0

a) and b) See Table 2.

Table 7. Number of Organisms in the Lungs and Spleen of *M. intracellulare*-Infected Mice Treated with CFZ or MDP-Lys (L18) Alone and Their Combination

Regimen	Log CFU/Lungs		Log CFU/Spleen	
	4 Weeks	8 Weeks	4 Weeks	8 Weeks
None	4.3±0.3	6.0±0.3	5.0±0.1	5.2±0.4
CFZ (6)	3.2±0.1 ^a	4.1±0.3 ^b	4.5±0.2	3.8±0.4 ^a
MDP (1)	4.2±0.1	6.0±0.2	4.9±0.1	5.3±0.2
CFZ(6)+MDP(1)	3.2±0.1 ^a	3.3±0.3 ^b	4.9±0.2	3.7±0.5 ^a
MDP(3)	4.4±0.1	6.2±0.1	5.0±0.1	4.9±0.2
CFZ(6)+MDP(3)	3.1±0.1 ^a	3.7±0.3 ^b	4.8±0.1	4.0±0.2 ^a
MDP(5)	4.2±0.2	5.8±0.3	5.1±0.1	5.0±0.2
CFZ(6)+MDP(5)	2.9±0.1 ^a	3.2±0.3 ^b	4.6±0.2	4.0±0.3 ^a

See footnote of Table 3.

く、また両臓器において本剤に MDP-Lys(L18) の 3 回あるいは 6 回の併用投与によっても、感染 4 並びに 8 週後におけるその有意なる減少はみられなかった。

(2) CFZ + MDP-Lys(L18) 投与群

CFZ 並びに MDP-Lys(L18) は Table 1 に示すようなスケジュールで投与し、各単独並びに併用治療効果について検討した。

肺の肉眼的病変 (Table 6) は CFZ 単独投与群では非治療対照群に比べて著しく軽減され、また MDP-Lys(L18) 単独投与群でもその軽減されたものもみられたが、本剤に MDP-Lys(L18) を併用しても CFZ 単独投与を凌ぐ成績は得られなかった。

次に、上述の実験系における肺および脾内 CFU を Table 7 に示した。これから分かるように、これら両臓器内における CFU は CFZ 単独投与群では感染 4 並びに 8 週後のいずれにおいても非治療対照群におけるよりも有意な減少がみられたが、MDP-Lys(L18) 単独投与群では、その投与回数 (1, 3 および 5 回) の別

なく減少傾向は全くみられず、またこれら両剤の併用投与によっても、MDP-Lys(L18) の投与回数の別なく、CFZ 単独投与時におけるよりも菌の減少が有意に助長されるという成績は得られなかった。

考 察

近年、MAC 感染症の治療に対する有効薬剤の探索が鋭意進められてはいるが、未だ十分に満足しうる薬剤は開発されていない現状にある。今回、われわれは抗菌剤に宿主免疫賦活剤である MDP⁵⁾⁶⁾ を併用して宿主の殺菌機構を高めることによる実験的 MAC 感染に対する治療実験を試みた。

MAC 症における感染防御の主なエフェクター細胞はマクロファージであると報告されている⁷⁾⁸⁾。MDP は遅延型過敏症反応や抗体産生におけるアジュバント活性発現のための最小単位であり、マクロファージの活性化を介して T 細胞機能を活性化させると考えられており⁹⁾¹⁰⁾、本実験に用いた MDP-Lys(L18) も T 細胞や

B細胞機能を活性化させることができると報告されている¹¹⁾。MDP-Lys(L18)は宿主の感染防御免疫において、多形核白血球が関与する感染症に対しては防御効果を増強させるが、マクロファージが関与する感染症に対しては無効であると言われている。他方、MDP-Lys(L18)はマクロファージに対しては、その多形核白血球機能促進因子および幹細胞分化・増殖刺激因子などの産生能を亢進させることができると報告されている⁶⁾。

これらのことを考え合わせると、宿主の感染防御において主としてマクロファージが関与する MAC 感染症においては MDP-Lys(L18) の有効性はあまり期待できないように思われた。

今回の成績では、Table 2, 4 に示したように、MDP-Lys(L18) 単独投与によって、有意とはいえないものの肉眼的肺病変の程度が軽減される傾向が、さらに、特に Table 6 に示す実験では、MDP 単独投与マウスでの肺の肉眼的病変の程度は非投与対照群でのそれに比べてやや著しい軽減がみられているが、これは MDP-Lys(L18) による宿主免疫機能の亢進作用に起因したものと考えられる。また、この Table に示した成績では、MDP-Lys(L18) 単独投与マウスには肺病変のみられない 1 例があった。これは感染部位での菌の増殖が抑制され、遅延型過敏症反応から肉芽腫の形成へ至るような免疫応答が惹起されえず、ひいては肉眼的に判別可能な大きさの病変の形成に至らなかったことによるものと思われるが、この点については今後の検討に待ちたい。

また、MAC 感染では一般に、肺の肉眼的病変の程度と感染部位での bacterial load との間には、一定の相関がみられるが^{2)~4)}、その相関は常に厳密であるという訳ではなく、例えば、今回の成績でも Table 6, 7 との比較からも明らかのように、CFZ 投与群では肺の肉眼的病変の程度の著しい軽減と連関して、感染部位での bacterial load の 2 オーダーの低下がみられており、この場合は肺の肉眼的病変の程度と bacterial load との間には比較的高い相関性が存在するものようであったが、MDP-Lys(L18) 単独投与マウスでは、肺の肉眼的病変のみが若干軽減されたに過ぎない。

いずれにしても今回の成績では、肺の肉眼的病変および感染部位での bacterial load の程度の何れを指標とした場合でも、感染の程度が KM や CFZ と MDP-Lys(L18) との併用投与により各薬剤単独投与時に比べて有意に軽減されるような傾向はみられず、これら抗菌剤の *in vivo* 抗 MAC 活性が MDP-Lys(L18) との併用によって増強される可能性は低いもののように思われる。

先に、われわれは *M. intracellulare* 感染マウスに対する minocycline と宿主免疫賦活剤である

LC 9018¹²⁾¹³⁾ あるいは OK-432¹⁴⁾ との併用治療効果を検討したところ¹⁵⁾、これら両剤とも強いマクロファージ活性化剤である¹⁶⁾¹⁷⁾ にもかかわらず、有意な治療効果の亢進はみられなかった。これらの成績は MAC 感染症の治療の難しさを如実に物語るものであり、少なくとも、免疫機能の正常な宿主の MAC 感染に対しては、抗菌剤と免疫賦活剤の併用投与には残念ながら期待した効果はみられなかったといわざるをえないであろう。

ま と め

実験的 *M. intracellulare* 感染マウスに対する KM あるいは CFZ と MDP-Lys(L18) との併用治療効果をその肺病変並びに肺および脾内 CFU を指標として検討した結果、KM と CFZ の単独投与による治療効果は MDP-Lys(L18) を併用投与してもその亢進はみられなかった。

謝 辞

薬剤を御分与いただいた明治製薬株式会社、日本チバガイギー株式会社および第一製薬株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) Furio, M. A. and Wordell, C. J. : Treatment of infectious complications of acquired immunodeficiency syndrome, Clin Pharm, 4 : 539-554, 1985.
- 2) Saito, H. and Sato, K. : Activity of rifabutin alone and in combination with clofazimine, kanamycin and ethambutol against *Mycobacterium intracellulare* infections in mice, Tubercl, 70 : 201-205, 1989.
- 3) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. et al. : Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated kanamycin against *Mycobacterium intracellulare* infection induced in mice, Am Rev Respir Dis, 1991 (in press).
- 4) Saito, H., Tomioka, H. : Therapeutic efficacy of liposome-entrapped rifampin against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice, Antimicrob Agents Chemother, 33 : 429-433, 1989.
- 5) Matsumoto, K., Ogawa, H., Nagase, O. et al. : Stimulation of non-specific host resistance to infection induced by muramyl dipeptides, Microbiol Immunol, 25 : 1047-1058, 1981.
- 6) Otani, T., Une, T. and Osada, Y. : Stimula-

- tion of non-specific resistance to infection by muroctasin, Arzneim-Forsch/Drug Res, 38(II) : 969-976, 1988.
- 7) Saito, H., Tomioka, H. : The role of macrophages in host defence mechanisms against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice, Res Microbiol, 141 : 206-212, 1990.
- 8) Rastogi, N. : Killing intracellulare mycobacteria in *in vitro* macrophage system : what may be the role of known host microbicidal mechanisms ? Res Microbiol, 141 : 217-230, 1990.
- 9) Adam, A., Ciorbaru, R., Ellouz, F. et al. : Adjuvant activity of monomeric bacterial cell wall peptidoglycans, Biochem Biophys Res Commun, 56 : 561-567, 1974.
- 10) Nagao, S. and Tanaka, A. : Muramyl dipeptide induced adjuvant arthritis, Infect Immun, 28 : 624-626, 1980.
- 11) Akasaki, M. : Activation of immune responses by muroctasin, Arzneim-Forsch/Drug Res, 38 (II) : 976-977, 1988.
- 12) Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. et al. : Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice, Gann 72 : 517-523, 1981.
- 13) Sato, K. : Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei* : role of macrophages, Infect Immun, 44 : 445-451, 1984.
- 14) Mashiba, H., Gojobori, M. and Matsunaga, K. : Antitumor effect of combined use OK-432 and yeast cell wall with mitomycin-C in mice, Gann 68 : 703-708, 1977.
- 15) Saito, H., Nagashima, K. and Tomioka, H. : Effects of bacterial immunopotentiators, LC 9018 and OK-432, on the resistance against *Mycobacterium intracellulare* infection in mice, Hiroshima J Med Sci, 32 : 145-148, 1983.
- 16) Sato, K., Tomioka, H. and Saito, H. : Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei* : activation of liver macrophages and peritoneal macrophages by *Lactobacillus casei*, Microbiol Immunol, 32 : 689-698, 1988.
- 17) Tomioka, H. and Saito, H. : Hydrogen peroxide-releasing function of chemically elicited and immunologically activated macrophages : differential response to wheat germ lectin and concanavalin A, Infect Immun, 29 : 469-476, 1980.