

原 著

Mycobacterium intracellulare 感染マウスに対する
 ベンゾキサジノリファミシン系薬剤
 KRM-1648 の効果
 — 治療開始時期の検討 —

富岡 治明・佐藤 勝昌・斎藤 肇*

島根医科大学微生物・免疫学教室

日 高 隆 義

鐘淵化学工業生物化学研究所

受付 平成5年4月21日

THERAPEUTIC EFFICACY OF A BENZOXAZINORIFAMYCIN, KRM-1648,
 ADMINISTERED AT THE DIFFERENT PERIODS OF INFECTION
 IN *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*
 -INFECTED MICE

Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO, Hajime SAITO*,
 and Takayoshi HIDAHA

(Received for publication April 21, 1993)

Therapeutic efficacy of a newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648, administered at the different periods of infection in *Mycobacterium intracellulare*-infected mice was studied. Mice were infected intravenously with *M. intracellulare* (9.8×10^6 CFU/mouse) and then were given 0.4 mg of KRM-1648 emulsified in 2.5% gum arabic-0.2% Tween 80 by gavage, once daily six times per week, from day 1 to week 4, week 2 to week 6, week 4 to week 8, and week 8 to the end of experiment (week 12). Judgement of the therapeutic efficacy of the drug against the infection was done on the basis of incidence and degree of gross lung lesions, % organ weight (organ weight/body weight $\times 100$), and bacterial loads in the lungs and spleen. The lung lesions were not observed in the control and KRM-treated mice at 4 weeks after infection (KRM treatment : day 1 to week 4). At 6 weeks after infection (KRM treatment : week 2 to week 6), the lung lesions were observed in all control mice, whereas 3 of the 5 mice given KRM-1648 did not show the lesions. At 8 weeks after infection (KRM treatment : week 4 to week 8), the lung lesions were observed in all control and KRM-1648-treated mice, but the degree of the lung lesions was much more slight in mice given KRM-1648 than in control mice. The incidence and the degree of the lung lesions at 12 weeks after infection (KRM treatment : week 8 to week 12) was not

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

different in both groups. The % spleen weight between control mice and KRM-1648-treated mice was found to be greatly different at 4 weeks after infection. The CFUs of organisms in the lungs and spleen were lower in mice treated with the agent than in control mice at 4 weeks after infection, but the rate of decrease became smaller with the lapse of time after infection. Thus, the chemotherapy started at 1 day to 2 weeks after infection with *M. intracellulare* was effective, but was not so in the advanced infection.

Key words : *Mycobacterium intracellulare*,
KRM-1648

キ ー ワ ー ズ : *Mycobacterium intracellulare*,
KRM-1648

はじめに

先にわれわれは、新たに開発されたリファマイシン系誘導体 KRM-1648 の *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium* および *M. intracellulare* などの遅発育抗酸菌に対する *in vitro* 抗菌活性は Rifampicin におけるよりも極めて強いこと¹⁾²⁾、また、本剤が *M. tuberculosis*³⁾, *M. marinum*⁴⁾, *M. avium* (未発表), *M. intracellulare*⁵⁾ および *M. leprae*⁶⁾ に対する実験的マウス感染並びに実験的 *M. avium* ウサギ感染⁷⁾ に対して極めて優れた治療効果を有することについても報告した。

今回は、実験的 *M. intracellulare* 感染マウスに対する KRM-1648 の投与開始時期を異にした場合の治療効果について検討したので、以下報告する。

材料と方法

(1) マウス

BALB/c 系 5 週齢雌マウス (日本クレア, 東京) を供試した。

(2) 薬 剤

2.5% アラビアゴム-0.2% Tween 80 水に懸濁した KRM-1648 (鐘淵化学工業, 大阪) を用いた。

(3) 感染と治療

M. intracellulare N-260 株の 7H9 broth (Difco) 中 37°C, OD_{540nm} = 0.15 に達した培養菌の遠心 (1,000 rpm, 5分) 上清を超音波処理後, 同 broth で OD = 0.1 になるように調整し, その 0.2 ml (9.8 × 10⁶ CFU/マウス) をマウス尾静脈内へ接種し, その翌日 (24 時間), 2, 4 および 8 週後より KRM-1648 (4 mg/ml) の 0.1 ml (0.4 mg/マウス) を 1 日 1 回, 週 6 回, 4 週間にわたって経口投与した。なお, 感染菌の Colony forming units (CFU) は 7H11 寒天平板を用いて 37°C, 5% CO₂ 環境下で 2 週培養後に算定した。

そして, 最終薬剤投与の翌日, 動物を屠殺・剖検し,

内臓の肉眼的病変の有無と程度を観察後, 肺, 肝, 脾および腎の重量を測定し, %臓器重量 (臓器重量/体重 × 100) を求めた。さらに, 肺および脾についてはガラスホモジナイザーを用いて 5 ml の生食水で均等化し, 2% NaOH 0.5 ml を加えて約 20 秒間処理後, 直ちに 0.5 N HCl で中和して, その 0.1 ml を 7H11 寒天平板に接種し, 37°C, 5% CO₂ 環境下で 2 週培養後の CFU を算定した。

結 果

(1) 内臓の肉眼的病変

Table 1 は, 薬剤非投与感染対照群 (対照群) 並びに感染後治療開始時期を異にした薬剤投与群における肺の肉眼的病変の有無と程度を示したものである。感染 4 週後では対照群と治療群とを問わず, 病変は認められなかった。ところで, 感染 6 週後になると, 対照群では全例に軽度 (1+) ないし中等度 (2+) の病変がみられたのに対して, 感染後 2 週から 6 週に至る薬剤投与群では 5 匹中 3 匹にはまったく肉眼的病変はみられず, 2 匹に軽度の病変がみられたにすぎなかった。

また, 感染 8 週後においては, 対照群では全供試動物 (5 例) に中等度の病変がみられたのに対して, 感染後 4 週から 8 週に至る薬剤投与群では全例に軽度の病変がみられたにすぎなかった。しかし, 感染 12 週後になると, 対照群と感染 8 週から 12 週に至る薬剤投与群とのいずれを問わず, 全供試マウスに中等度の病変が認められた。なお, 他臓器 (肝, 脾, 腎) に肉眼的病変のみられたものはなかった。

(2) 臓器重量

Table 2 は肺並びに脾の%臓器重量を示す。肺では, 感染後のいずれの時期においても対照群と薬剤投与群との間に大差はみられなかったが, 脾では, 感染 4 週後の対照群において薬剤投与群よりもその腫大がみられた。

(3) 臓器内 CFU

肺内 CFU は Table 3 に示すようである。これから分かるように, 薬剤投与群の CFU は, 感染の 24 時間後

Table 1 Macroscopic Lung Lesions in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648 at the Different Periods of Infection^{a)}

Weeks after infection	Administration of drug	Lung lesions ^{b)}		
		-	1+	2+
4	None	5	0	0
	1d-4w	5	0	0
6	None	0	2	3
	2-6w	3	2	0
8	None	0	0	5
	4-8w	0	5	0
12	None	0	0	5
	8-12w	0	0	5

a) Mice were infected intravenously with 9.8×10^6 CFU/mouse, and then were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily six times per week for 4 weeks at the different periods of infection. Results are indicated as Mean \pm SE (n=5). % Organ weight was calculated as organ weight/body weight \times 100.

Table 2 % Organ Weight in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648 at the Different Periods of Infection^{a)}

Weeks after infection	Administration of drug	% Organ weight	
		Lungs	Spleen
4	None	0.71 \pm 0.09	2.18 \pm 0.12
	1d-4w	0.90 \pm 0.09	0.69 \pm 0.05
6	None	0.81 \pm 0.05	1.76 \pm 0.06
	2-6w	0.84 \pm 0.06	1.55 \pm 0.08
8	None	0.90 \pm 0.03	1.92 \pm 0.07
	4-8w	0.81 \pm 0.03	1.84 \pm 0.06
12	None	1.20 \pm 0.03	2.52 \pm 0.10
	8-12w	1.08 \pm 0.07	2.07 \pm 0.05

a) Mice were infected intravenously with 9.8×10^6 CFU/mouse, and then were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily six times per week for 4 weeks at the different periods of infection. Results are indicated as Mean \pm SE (n=5). % Organ weight was calculated as organ weight/body weight \times 100.

より投薬した場合において対照群におけるよりも有意に少なかったが、感染後2、4週および8週より投薬を開始した場合には、その投薬開始時期が遅くなるとともに薬剤投与群と対照群との間のCFU差は少なくなっていった。しかし、いずれの場合においても、程度の差こそあれ薬剤投与群において対照群におけるよりも少ないCFU値を示した。

次に脾内CFUはTable 4に示すようであり、感染24時間後あるいは2週後より4週間にわたる薬剤投与群では、その減少は対照群におけるより明らかであった

が、感染後4週あるいは8週後より4週間にわたる薬剤投与群では、対照群との間のCFUにほとんど差はみられなかった。

考 察

実験的 *M. intracellulare* 感染マウスに対する KRM-1648 の投与効果は、肺の肉眼的病変、肺、脾よりの還元 CFU よりみて投薬を感染翌日より2週以内に開始すれば顕著であり、また感染4週後より投与を開始しても多少ともその効果が期待できるものと思われる。先にわ

Table 3 Number of Colony Forming Units in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648 at the Different Periods of Infection^{a)}

Weeks after infection	Administration of drug	Log CFU/lungs			Δ Log CFU (Control-KRM-1648)
		0 time ^{b)}	After 4 weeks		
			Control	KRM-1648	
4	1 d -4w	4.58±0.03	5.06±0.12	3.04±0.07	2.02
6	2 -6w	4.21±0.05	5.95±0.07	4.52±0.13	1.43
8	4 -8w	5.06±0.12	6.50±0.03	5.75±0.06	0.75
12	8 -12w	6.50±0.03	6.81±0.01	6.62±0.03	0.19

a) Mice were infected intravenously with 9.8×10^6 CFU/mouse, and then were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily six times per week for 4 weeks at the different periods of infection. Results are indicated as Mean \pm SE (n=5).

b) Before the administration of drug.

Table 4 Number of Colony Forming Units in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648 at the Different Periods of Infection^{a)}

Weeks after infection	Administration of drug	Log CFU/spleen			Δ Log CFU (Control-KRM-1648)
		0 time ^{b)}	After 4 weeks		
			Control	KRM-1648	
4	1 d -4w	6.11±0.02	6.94±0.04	5.84±0.07	1.10
6	2 -6w	6.54±0.03	7.43±0.06	7.00±0.07	0.43
8	4 -8w	6.94±0.04	7.65±0.01	7.55±0.02	0.10
12	8 -12w	7.65±0.01	7.99±0.02	7.91±0.07	0.08

a) Mice were infected intravenously with 9.8×10^6 CFU/mouse, and then were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily six times per week for 4 weeks at the different periods of infection. Results are indicated as Mean \pm SE (n=5).

b) Before the administration of drug.

れわれ⁶⁾は実験的 *M. leprae* 感染マウスにおいて KRM-1648 の 0.001~0.01 mg を感染 31 日目より 80 日目に至る 50 日間, 1 日 1 回, 週 6 回, 投与した場合, 感染 1 年後のマウス足趾内菌数は薬剤非投与感染対照群よりも 2~3 log 低かったことを報告した。これは *M. leprae* のように極めて緩徐な *in vivo* 増殖抗菌剤に対する本剤の投与は極めて有効であるが, より増殖の速い *M. intracellulare* に対しては, その感染の進行下の投与では満足のいく効果は期待できないことを示唆するものかもしれない。

先にわれわれは⁵⁾ MAC 感染マウスに対する KRM-1648 の治療効果について, 感染翌日より投薬を始めた場合のマウスの肺並びに脾内 CFU は, 感染後約 4 週間までは一過性の減少がみられ, KRM-1648 は有意な殺菌あるいは静菌作用を示したが, それ以後の phase では

薬剤投与あるいは非投与の別なく, ほぼ同様な速度での感染菌の増殖がみられることについて報告した。これは感染菌の対 KRM-1648 耐性の獲得に起因したものではなく (未発表), 感染宿主の免疫応答系の破綻によるものと考えられるが, こうした現象は KRM-1648 が感染後期の投与ではその効力が減弱するという今回の成績と軌を一にするものかと思われる。

結 語

実験的 *M. intracellulare* 感染マウスに対する KRM-1648 の治療効果を感染 24 時間, 2 週, 4 週および 8 週後より 1 日 1 回, 週 6 回, 4 週間にわたって経口投与する系で検討したところ, KRM-1648 の治療効果は感染 24 時間後より投与した場合が最もすぐれ, その後は感染の経過とともに減弱することが分かった。

文 献

- 1) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : *In vitro* antimycobacterial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991 ; 35 : 542-547.
- 2) Tomioka H, Saito H, Fujii K, et al. : *In vitro* antimicrobial activity of benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* complex, determined by the radiometric method, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 67-70.
- 3) 久世文幸, 山本 誉, 網谷良一, 他 : 新 rifamycin 誘導体の *Mycobacterium tuberculosis* と *M. avium* complex に対する *in vivo* 活性, *結核.* 1991 ; 66 : 7-12.
- 4) Yamamoto Y, Saito H, Tomioka H. et al. : *In vitro* and *in vivo* activities of KRM-1648, a newly synthesized benzoxazinorifamycin, against *Mycobacterium marinum*, *Zbl. Bakt.* 1992 ; 277 : 204-209.
- 5) 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.* 1992 ; 36 : 387-393.
- 6) Tomioka H, Saito H and Hidaka T. : *In vivo* antileprosy activity of the newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648, *Int. J. Lepr.* 1993 (in press).
- 7) Emori M, Saito H, Sato K, et al. : Therapeutic efficacy of a benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against experimental *Mycobacterium avium* infection induced in rabbits, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 722-728.