

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 — 投与回数 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

出来尾 哲

同 ・ 皮膚科学教室

日 高 隆 義

鐘淵化学工業生物化学研究所

受付 平成5年5月14日

THERAPEUTIC EFFICACY OF A BENZOAZINORIFAMYCIN, KRM-1648,
ADMINISTERED IN VARIOUS FREQUENCIES PER WEEK IN
MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE-INFECTED MICE

Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO, Hajime SAITO*,
Satoshi DEKIO and Takayoshi HIDAKA

(Received for publication May 14, 1993)

Mice were infected intravenously with *M. intracellulare* (5.2×10^6 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 1, 3 or 6 times per week, from 24h after infection to the end of experiment (week 8). Evaluation 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 ($\sqrt{\text{organ (mg)}/\text{body (g)}} \times 10$), and bacterial loads in the lungs and spleen. The lung lesions were not observed in all experimental groups at 4 weeks after infection. At 8 weeks after infection, the lung lesions observed in all control and solute (2.5% gum arabic-0.2% Tween 80) control mice, whereas 3 of the 5 mice given KRM-1648, 3 times per week and all of 5 mice given KRM-1648, 6 times per week showed no lung lesions. Although lung lesions were observed in all mice given KRM-1648 only once per week, the degree of the lesions was much more milder in KRM-1648-treated mice than in solute control mice. The spleen weight of solute control mice and KRM-treated mice differed from each other 4 and 8 weeks after infection, especially in mice administered 6 times per week. The CFUs of

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

organisms in the lungs and spleen were lower in mice treated with the agent than in mice given solute at 4 and 8 weeks after infection, in orders of administration of 6, 3 and 1 times per week.

Key words : *Mycobacterium intracellulare*, KRM-1648

キーワード : *Mycobacterium intracellulare*, KRM-1648

はじめに

非結核性抗酸菌, なかなく *Mycobacterium avium* complex (MAC) に対する新しい有効薬剤の探索は国の内外を問わず鋭意進められているが, 未だ満足すべきものは見いだされていないのが現状である。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 の代表的病原性抗酸菌に対する *in vitro* 抗菌活性は Rifampicin や Rifabutin におけるよりも強いこと¹⁾²⁾, また *M. marinum*³⁾, *M. avium* (未発表), *M. intracellulare*⁴⁾ および *M. leprae*⁵⁾ による実験的感染マウス並びに実験的 *M. avium* 感染ウサギ⁶⁾ に対して優れた治療効果を有することについて報告した。他方, 久世ら⁷⁾ は, 本剤はマウスの実験的 MAC 症のみならず結核症に対しても優れた治療効果を示すことについて報告している。

今回は KRM-1648 の投与回数を異にした場合の本剤の実験的 *M. intracellulare* 感染マウスに対する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) 上清を菌の均等化を計るため超音波処理後, 同 broth で OD_{540nm} = 0.1 になるように調製した。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。感染には調製菌液の 0.2 ml (5.2 × 10⁶ CFU/マウス) をマウス尾静脈内へ接種し, その 24 時間後より KRM-1648 (4 mg/ml) の 0.1 ml (0.4 mg/マウス) を 1 日 1 回ずつ, 週 1, 3 あるいは 6 回, 8 週間にわたって経口投与した。他方, それぞれの実験群の対照マウス

には薬剤非含有 2.5% アラビアゴム-0.2% Tween 80 水 (Solute) の 0.1 ml ずつを実験群と同一スケジュールで与えた。そして, 感染後週 1 回体重を測定し, 感染 1 日, 4 および 8 週後に動物を屠殺, 剖検し, 肺, 肝, 脾および腎を摘出してそれらの肉眼的病変の有無と程度の観察, 重量測定を行い, 肺および脾のルート比重量 $\left(\sqrt{\frac{\text{肺重量 (mg)}}{\text{体重 (g)}} \times 10} \text{ および } \sqrt{\frac{\text{脾重量 (mg)}}{\text{体重 (g)}} \times 10} \right)$ 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生食水 5 ml で均等化後, 2% NaOH の 0.5 ml を加えて約 20 秒間処理し, 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 週間培養後に CFU を読み取った。

結 果

(1) 内臓の肉眼的病変

Table 1 は 1, 3 および 6 回薬剤投与群および Solute 投与群並びに非処置感染対照群の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 週後では実験群の別なくいずれの動物でも病変のみられたものはなかった。感染 8 週後になると, 非処置感染対照群およびいずれの投与回数の Solute 群においても全例に中等度 (2+) の病変がみられたのに対して, KRM 1 回投与群では 5 匹中 3 匹に軽度 (1+) の, 2 匹に中等度の病変が, 3 回投与群では 5 匹中 3 匹には全く病変はみられず, 2 匹に軽度の病変がみられたにすぎず, さらに 6 回投与群になると全供試動物 (5 例) に病変のみられたものはなく, 投与回数とともに肺の肉眼的病変の軽減がみられた。なお, 肝, 脾および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, 肺並びに脾のルート比重量を示したものである。肺では, 感染 4 および 8 週後とも各投与回数における薬剤投与群と Solute 投与群間に大差はみられなかったが, 脾では感染経過に伴う脾の腫大は KRM の投与回数に依存して軽減する傾向にあった。

(3) 臓器内 CFU

肺並びに脾内 CFU は Table 3 に示すようである。こ

Table 1 Macroscopic Lung Lesions in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648^{a)}

Agent	Administration (times/week)	Macroscopic lung lesions					
		4 weeks			8 weeks		
		-	1+	2+	-	1+	2+
None	0	5	0	0	0	0	5
KRM-1648	1	5	0	0	0	3	2
Solute	1	5	0	0	0	0	5
KRM-1648	3	5	0	0	3	2	0
Solute	3	5	0	0	0	0	5
KRM-1648	6	5	0	0	5	0	0
Solute	6	5	0	0	0	0	5

a) Mice infected intravenously with 5.2×10^6 CFU/mouse were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily 1, 3 or 6 times per week for 8 weeks.

Table 2 Organ Weight in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648^{a)}

Agent	Administration (times/week)	Organ weight ratio			
		4 weeks		8 weeks	
		Lungs	Spleen	Lungs	Spleen
None	0	9.17±0.72	13.7±0.79	8.60±0.41	13.7±0.82
KRM-1648	1	8.54±0.16	12.0±1.52	8.84±0.47	12.6±0.72
Solute	1	8.63±0.24	13.7±0.47	8.63±0.46	13.9±1.14
KRM-1648	3	8.71±0.47	12.3±0.46	9.16±0.77	12.3±0.49
Solute	3	8.86±0.36	13.9±0.63	9.07±0.61	14.1±0.68
KRM-1648	6	9.35±0.78	9.2±0.54	9.19±0.32	9.8±0.25
Solute	6	9.62±0.47	13.6±0.33	9.19±0.31	13.7±0.55

a) Mice infected intravenously with 5.2×10^6 CFU/mouse were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily 1, 3 or 6 times per week for 8 weeks. Results are indicated as Mean ± SE (n=5). Organ weight ratio was calculated as

$$\sqrt{\text{organ weight (mg)/body weight (g)} \times 10.}$$

れから分かるように、両臓器において非処置感染対照群と1, 3および6回投与 Solute 群との間のCFUにはほとんど差はみられなかった。これに対して、薬剤投与群の肺および脾内CFUは、感染後4および8週のいずれにおいてもKRM-1648の投与回数依存性に還元CFUの減少がみられた。すなわち、感染8週後のKRM1, 3および6回投与群よりの肺内CFUはそれぞれのSolute群におけるよりも0.47, 0.78および1.89 Log unitsの減少が、また脾内CFUはそれぞれ0.16, 0.21および0.48 Log unitsの減少がみられた。

考 察

今回の実験より、*M. intracellulare* 感染マウスに対

するKRM-1648の治療効果は肺の肉眼的病変、肺並びに脾内CFUよりみて週6回の投薬よりも劣りはしたが週3回の投薬でも多少とも期待でき、また週1回の投与でもわずかながらもその効果がみられた。しかしながら、本剤の単独投与群の宿主感染臓器よりのCFUと対照群との比較から明らかなように、感染菌は増殖が抑制されているが殺菌的作用を受けて標的臓器から排除されるものではないことが分かった。先にわれわれ⁴⁾は、*M. intracellulare* 感染マウスに対してKRM-1648を1日1回、週6回投薬することによる本剤の治療効果を検討したところ、マウスの肺並びに脾内CFUは、感染後約4週までは一過性に減少し、KRM-1648は有意な殺菌あるいは静菌作用を示すが、それ以降は薬剤投与群で

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

Agent	Administration (times/week)	Colony forming units			
		4 weeks		8 weeks	
		Lungs	Spleen	Lungs	Spleen
None	0	4.52±0.06	6.88±0.15	6.02±0.14	7.60±0.05
KRM-1648	1	4.03±0.14	6.74±0.04	5.65±0.18	7.46±0.06
Solute	1	4.56±0.03	6.91±0.09	6.12±0.09	7.62±0.04
KRM-1648	3	3.99±0.13	6.63±0.04	5.26±0.59	7.43±0.02
Solute	3	4.55±0.04	6.86±0.09	6.04±0.15	7.64±0.05
KRM-1648	6	3.46±0.29	6.39±0.04	4.14±0.07	7.11±0.07
Solute	6	4.55±0.04	6.98±0.05	6.03±0.11	7.59±0.07

a) Mice infected intravenously with 5.2×10^6 CFU/mouse were given KRM-1648 (0.4 mg/mouse), once daily 1, 3 or 6 times per week for 8 weeks. Results are indicated as Mean ± SE (n=5).

も非処置対照群におけるとほぼ同様に増加がみられることについて報告した。これは感染菌の KRM-1648 に対する耐性獲得に起因したのではなく(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。これに関連して別途われわれが行った検討では, *M. intracellulare* 感染マウスを 4 あるいは 8 週目より本剤で治療を行った場合には, その効果はほとんど望めなかった⁸⁾。これらのことは, *M. intracellulare* 感染に対しては感染早期より強力な化学療法を行うことが必要であることを示唆しているものであろう。他方, われわれは実験的 MAC 感染マウスに対して KRM-1648 を主軸とした多剤併用療法が感染菌の排除に優れたものであることをみており(未発表), 今後, 薬剤の間欠投与方式による多剤併用効果実験を含めてさらに検討を進めていきたい。

結 語

実験的 *M. intracellulare* 感染にマウスに対する KRM-1648 の治療効果を感染 24 時間後より週 1, 3 および 6 回, いずれも 1 日 1 回ずつ 8 週間にわたって経口投与する系で検討したところ, その投与回数依存性の治療効果がみられた。

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) 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.
- 4) 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.
- 5) Tomioka H, Saito H and Hidaka T : *In vivo* antileprosy activity of the newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648. *Int. J. Lepr.* 1993 (in press).
- 6) Emori M, Saito H, Sato K, et al. : Therapeutic efficacy of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 against experimental *Mycobacterium avium* infection induced in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 722-728.
- 7) 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.
- 8) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇, 他 : *Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン系薬剤 KRM-1648 の効果—治療開始時期の検討—, 結核. 1993 ; 68 : 631-635.