

原 著

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 と
宿主免疫賦活乳酸菌製剤 LC9018 の
併用治療効果

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6月21日

THERAPEUTIC EFFICACY OF A BENZOXAZINORIFAMYCIN, KRM-1648,
COMBINED WITH A IMMUNOPOTENTIATOR, LC9018, IN
MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE INFECTION
INDUCED IN BEIGE MICE

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

(Received for publication June 21, 1993)

A study was performed on the therapeutic efficacy of KRM-1648 combined with LC9018 in beige mice infected with *Mycobacterium intracellulare*. Each mouse was intravenously infected with 3.9×10^6 CFU, and then given 0.2 mg of KRM-1648 emulsified in 2.5% gum arabic-0.2% Tween 80 by gavage once a day, six times per week, beginning 24h after infection for up to eight weeks. A sc injection of 0.1 mg LC9018 in saline was given once or twice per week, beginning two weeks before infection to the end of experiment. An evaluation of the therapeutic efficacy of these drugs against the infection was performed on the basis of incidence and degree of gross lung lesions and bacterial loads in the lungs and spleen. Lung lesions were not observed in all experimental groups at four weeks after infection. However, at eight weeks after infection, although lung lesions were observed in all experimental groups, the degree of lesions was much milder in those mice receiving KRM-1648 than in the control mice. The degree of lesions in the mice receiving LC9018 was much the same as that in the control mice. Moreover, the degree of lung lesions in mice treated with a combination of KRM-1648 and LC9018 was more severe than in those mice treated with KRM-1648 alone. The CFUs of organisms in the lungs and spleen of the mice treated with KRM-1648 were considerably lower than those of the control mice ($P < 0.05$), but the

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

CFUs in the mice treated with KRM-1648 and LC9018 were nearly the same as those mice treated with KRM-1648.

Key words : *Mycobacterium intracellulare*, KRM-1648, LC9018

キーワーズ : *Mycobacterium intracellulare*, KRM-1648, LC9018

はじめに

先にわれわれは、新たに開発されたベンゾキサジノリファマイシン系薬剤 KRM-1648 の代表的病原性抗酸菌である *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium* および *M. intracellulare* に対する *in vitro* 抗菌活性は Rifampicin や Rifabutin よりも強いこと¹⁾²⁾, また実験的 *M. intracellulare*, *M. avium* および *M. leprae* 各感染マウスあるいは *M. avium* 感染ウサギ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^{3)~6)}。他方、久世ら⁷⁾は本剤の実験的マウス *M. intracellulare* 感染のみならず、結核感染に対しても優れた治療効果を有することについて報告している。しかしながら、われわれの実験的マウス *M. intracellulare* 感染についての詳細な検討によれば、本剤の投与によって感染4週目頃に一過性の殺菌あるいは静菌作用がみられるが、その後は対照群におけると同程度の増菌を示し、宿主よりの菌の完全な排除はみられず、これが宿主免疫系の破綻に起因するものではないかと考えられた⁴⁾。

そこで、今回は宿主免疫賦活剤である *Lactobacillus casei* の菌体製剤 LC9018⁸⁾⁹⁾ と KRM-1648 の併用による実験的 *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) 動物

鐘淵化学工業(兵庫)で自家繁殖した C57BL/6 (bg/bg) 系雌マウス(7~8週齢)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)並びに生食水懸濁 LC9018(ヤクルト本社中央研究所, 東京)を用いた。

3) 供試菌

M. intracellulare N-256 株の 7H9 broth (Difco) 中 37°C, OD_{540nm} = 0.15 に達した培養菌を 1,000 rpm, 5分遠心し、その上清を菌の均等化を計るために超音波処理(20秒)後、同種培養液で 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。

4) 感染と治療

調製菌液の 0.2 ml を 1 群 4 匹のマウス尾静脈内へ接種 (3.9 × 10⁶ CFU) した。LC9018 (1 mg/ml) は感染 2 週間より感染 8 週間まで週 1 回あるいは 2 回、いずれの投与マウスにも各 0.1 ml (0.1 mg/マウス) あてを皮下注射した。KRM-1648 (2 mg/ml) は 0.1 ml (0.2 mg/マウス) を感染 24 時間後より 1 日 1 回, 週 6 回, 8 週間にわたってゾンデを用いて経口投与した。なお, LC9018 並びに KRM-1648 各単独投与群を用意した。そして, 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ないし程度の観察および重量測定を行った。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 NHC1 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 を算定した。

結 果

Table 1 は肺の肉眼的病変の有無ないし程度を示したものである。感染 4 週間では実験群の別なくいずれの動物においても肉眼的病変のみられたものはなかった。感染 8 週間では, 対照群の 4 匹のマウスの全例に中等度ないし高度 (2+~4+) の病変がみられたのに対して, KRM 単独投与群ではいずれも軽度 (1+) の病変がみられたが, LC9018 の週 1 回, 2 回単独投与群ではともに, このような病変の軽減はみられなかった。また, KRM-1648 と LC9018 との併用投与群では対照群におけるよりも病変の軽減はみられたが, KRM 単独投与群よりもむしろ病変の増悪がみられた。なお, いずれの動物群においても肝, 脾および腎には肉眼的病変のみられたものはなかった。

次に, これらの動物の肺並びに脾内 CFU は Table 2 に示すようである。感染 4 並びに 8 週後の KRM 単独投与群ではともに両臓器内 CFU の減少がみられ, 対照群との間に有意差 ($P < 0.05$) があったが, 対照群と LC9018 投与群との間には有意差はなく, 両臓器内 CFU は対照群と同等あるいはむしろ多かった。また, KRM-1648 に LC9018 を併用投与した場合には,

Table 1 Macroscopic Lung Lesions in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648 and/or LC9018^{a)}

Agent	Dose (mg)	Administra- tion (times/week)	Macroscopic lung lesions							
			4 weeks			8 weeks				
			–	1+	2+	–	1+	2+	3+	4+
None	–	–	4	0	0	0	0	1	2	1
KRM–1648	0.2	6	4	0	0	0	4	0	0	0
LC9018	0.1	1	4	0	0	0	0	0	3	1
LC9018	0.1	2	4	0	0	0	0	0	4	0
KRM/LC	0.2/0.1	6/1	4	0	0	0	0	4	0	0
KRM/LC	0.2/0.1	6/2	4	0	0	0	0	4	0	0

a) Mice were infected intravenously with 3.9×10^6 CFU/mouse and then given KRM-1648 by gavage, once daily, 6 times per week, from 24 h after infection for up to week 8. LC9018 was given by sc injection, once or twice a week, from 2 weeks before the infection to the end of experiment.

Table 2 Number of Colony Forming Units in *M. intracellulare*-infected Mice Given KRM-1648 and/or LC9018^{a)}

Agent	Dose (mg)	Administra- tion (times/week)	Colony forming units			
			4 weeks		8 weeks	
			Lungs	Spleen	Lungs	Spleen
None	-	-	5.76±0.25	6.85±0.08	7.06±0.19	7.86±0.11
KRM-1648	0.2	6	3.87±0.09	5.95±0.06	5.45±0.28	6.56±0.07
LC9018	0.1	1	5.90±0.11	6.56±0.13	7.66±0.29	7.56±0.18
LC9018	0.1	2	6.14±0.16	6.90±0.14	7.66±0.22	7.57±0.07
KRM/LC	0.2/0.1	6/1	4.31±0.10	6.02±0.06	6.11±0.06	6.65±0.14
KRM/LC	0.2/0.1	6/2	4.03±0.20	5.84±0.04	5.95±0.09	6.30±0.06

a) Experiment is the same as Table 1. Results are indicated as Mean ± SE (n=4). CFUs of 1 day after infection : Lungs 4.05 ± 0.05, Spleen 5.45 ± 0.09.

KRM-1648 単独投与による両臓器内 CFU が LC9018 の併用によって、LC9018 単独投与群におけるよりも多少とも少ないようではあったが、KRM-1648 単独投与群よりも多少多いか、ほぼ同等であった。

考 察

先にわれわれ⁴⁾は *M. intracellulare* 感染マウスに対する KRM-1648 の治療効果の検討において、マウスの肺並びに脾内 CFU が、感染後 4 週頃までは一過性に減少し、有意な殺菌あるいは静菌作用がみられたが、それ以降になると薬剤投与群でも対照群におけると同様に増加傾向がみられることについて報告した。今回の実験においてもこれと同様の臓器内 CFU の推移を

示した。このことは分離感染菌の KRM-1648 に対する感受性は接種菌と同じであったことから、耐性獲得に起因したものではなく、恐らくは感染宿主の免疫応答系の破綻によるものではないかと考えられた。さらに、別途行った実験で *M. intracellulare* 感染マウスに対して感染 4 あるいは 8 週目より KRM-1648 による治療を開始した場合ではその効果はほとんど望めなかった¹⁰⁾ が、このことは *M. intracellulare* 感染に対してはその早期より強力な化学療法剤の投与、あるいはそれと免疫強化剤との併用投与を行うことの必要性を示唆しているものかと思われた。

そこで、今回は非特異的宿主免疫増強活性を有することの明らかにされている *L. casei* の菌体制剤 LC

9018⁸⁾⁹⁾と、現在開発途上にある強い *in vitro* 並びに *in vivo* 抗 MAC 活性を有する KRM-1648¹⁰⁾¹¹⁾との併用効果について検討した。しかし、得られた成績は意に反し、KRM-1648の抗菌活性が LC9018の併用投与によって増強されることはなく、むしろ LC9018の併用投与が臓器内 CFUを増加させる場合すらあった。これは *M. intracellulare* 感染宿主の免疫応答系の破綻を LC9018がさらに助長したことを示すものであり、恐らくは LC9018の長期投与によって感染宿主の免疫抑制性細胞の誘導が促進されたことによるものと考えられる。

MAC 感染 AIDS 患者への IFN- γ と抗菌剤との併用投与が有効であったとする報告¹¹⁾がみられることから、実験的 MAC 感染の治療法の一つの試みとして各種サイトカインと KRM-1648 との併用治療効果の検討も試みられるべき研究課題かと思われる。

結 語

実験的 *M. intracellulare* 感染マウスに対するベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648 と宿主免疫賦活乳酸菌製剤 LC9018 の併用治療効果は認められなかった。

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) 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 and Saito H : *In vivo* antileprosy activity of the newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648. *Int. J. Lepr.* 1993 ; 61 : 255-258.
- 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 啓, 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) Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, et al. : Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann.* 1981 ; 72 : 517-523.
- 9) Saito H, Tomioka H and Nagashima K : Protective efficacy of *Lactobacillus casei* against experimental murine infections due to *Mycobacterium fortuitum* complex. *J. Gen. Microbiol.* 1987 ; 133 : 2843-2851.
- 10) 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.
- 11) Squires KE, Murphy WF, Madoff LC, et al. : Interferon- γ and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. *J Infect Dis.* 1989 ; 159 : 599-600.