

原 著

*Mycobacterium intracellulare* 感染マウスに対する  
ベンゾキサジノリファミン系薬剤  
KRM-1648 の長期治療

齋 藤 肇\* · 富 岡 治 明 · 佐 藤 勝 昌

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7月15日

THERAPEUTIC EFFICACY OF A BENZOXAZINORIFAMYCIN, KRM-1648, IN  
*MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE* INFECTION INDUCED IN MICE

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

(Received for publication July 15, 1993)

Therapeutic efficacy of KRM-1648 was studied in BALB/c mice infected with *Mycobacterium intracellulare*. Mice were infected intravenously with  $1.0 \times 10^7$  CFU of the organisms /mouse and then given 0.2 mg or 0.4 mg of KRM-1648 emulsified in 2.5% gum arabic-0.2% Tween 80 by gavage, once daily, 6 days per week, from day 1 to the death of mice. The therapeutic efficacy of the drug was evaluated on the basis of survival times, incidence and degree of gross lung lesions and bacterial loads in the lungs and spleen. The lung lesions were not observed in any experimental groups at 4 weeks after the infection. At 8 weeks after the infection, the lung lesions were observed in all control mice, but 2 of 5 mice treated with 0.2 mg of KRM and 4 of 5 mice treated with 0.4 mg of KRM did not show any lung lesions, and the degree of the lesions was much milder in KRM-1648-treated mice than in the control mice. All mice of treated and untreated groups died, and median survival times were 141 days for the control mice, 216 days for mice treated with 0.2 mg of KRM-1648 and 220 days for mice treated with 0.4 mg of KRM-1648. At the death, lung lesions were observed in all mice. The CFUs of *M. intracellulare* in the lungs and spleen in mice treated with KRM-1648 were fewer than those in the control mice at 4 and 8 weeks after the infection. However, bacterial loads in the lungs of the dead mice treated with KRM-1648 were larger than those of the control mice, and the CFUs in the spleen at the death of mice given KRM-1648 were almost the same as those of the control mice. MICs of KRM-1648 against the organisms isolated from the lungs and spleen at the death of mice were

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

0.05~0.1  $\mu\text{g/ml}$ . In this case, the MIC of KRM-1648 against the parent strain used for the infection (*M. intracellulare* N-256) was 0.05  $\mu\text{g/ml}$ . Nevertheless, KRM-1648, which exhibited therapeutic efficacy against *M. intracellulare* at the early phase of infection, was not effective at the late phase of infection. Thus, this ineffectiveness of KRM-1648 on the later phase of *M. intracellulare* infection is not due to acquisition of resistance of the infected organisms to the agent.

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

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

## はじめに

先にわれわれはベンゾキサジノリファマイシン系薬剤 KRM-1648 は Rifampicin や Rifabutin よりも主要な病原性抗酸菌に対して強い *in vitro* 活性を有すること<sup>1)2)</sup>, また実験的 *Mycobacterium intracellulare*, *M. avium*, *M. marinum* 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<sup>3)~6)</sup>. 久世ら<sup>7)</sup> は, 本剤は実験的マウス *M. intracellulare* 感染にのみならず結核菌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。他方, われわれ<sup>4)</sup> は *M. intracellulare* 感染ベージュマウスに対して本剤の 0.2-0.4 mg 投与では, 感染 12 週間までは治療効果がみられたが, 最終的には死を免れ得ないことについても報告したが, これが, *M. avium* complex (MAC) 感染に対して感受性な NK 細胞欠損ベージュマウス<sup>8)9)</sup> に特徴的なものなのか, あるいは感染菌の KRM-1648 に対する耐性獲得によるものなのかの疑問が残された。そこで今回は, BALB/c 系マウスを用いて同様な検討を行うと同時に上述した点を解明する一助として感染内臓よりの還元培養菌の KRM-1648 に対する感受性の程度を親株に対するそれと比較検討したので以下報告する。

## 材料と方法

### 1) 動物

5 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本 SLC, 静岡) 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, 兵庫) を用いた。

### 3) 感染菌

*M. intracellulare* N-256 株の 7H9 broth (Difco) 中 37°C, OD<sub>540nm</sub> = 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 20 秒間超音波処理後, 同種培養液で OD<sub>540nm</sub> = 0.1 になるよ

うに調整した。菌の Colony forming units (CFU) は 7H11 寒天平板上 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 5 匹のマウスの尾静脈内へ接種 (1.0 × 10<sup>7</sup> CFU) した。KRM-1648 の 2 および 4 mg/ml 懸濁液の 0.1 ml (0.2 および 0.4 mg/マウス) を感染 24 時間後より 1 日 1 回, 週 6 回, 全供試マウスが斃死した最長 228 日後まで胃ゾンデを用いて経口投与した。そして, 感染 1 日, 4 週, 8 週後に動物を屠殺し, また死亡したものについてはそのつど, 剖検して肺, 肝, 脾および腎を摘出し, それらの肉眼的病変の有無ないし程度の観察並びに重量を測定した。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% CO<sub>2</sub> 環境下で 2 週培養後に生じた CFU を算定した。

### 5) MIC 測定法

薬剤非投与対照マウス (No.1-5), KRM-1648 0.2 mg 投与マウス (No.6-10) 並びに同 0.4 mg 投与マウス (No.11-15) の肺並びに脾よりの 7H11 寒天平板上に生じた集落の各 1 個を 7H9 broth 中へ移植し, 37°C で OD<sub>540nm</sub> = 0.1 になるまで培養し, その 0.1% Tween 80 水による 10 倍希釈液を接種菌液とした。そして, その 5  $\mu\text{l}$  をマイクロプランター (佐久間製作所, 東京) を用いて 100~0.0125  $\mu\text{g/ml}$  に至る KRM-1648 2 倍階段希釈液含有 7H11 寒天平板上へ接種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 2 週培養後における MIC を判定 (5 個以下の集落発生は陰性) した。また, 7H9 broth 中 OD = 0.1 になるまで培養した N-256 親株 (接種菌) についても上述の *in vivo* 菌におけると同様にしてその MIC 値を測定した。

## 結 果

Table 1 はマウスが死亡するまでの生存日数を示し

**Table 1** Survival Time in *M. intracellulare*-infected Mice with or without KRM-1648<sup>a)</sup>

Agent	Dose (mg)	Number of mouse	Survival time	
			Days	Median
None	-	1	143	
		2	158	
		3	141	141
		4	140	
		5	141	
KRM-1648	0.2	6	197	
		7	216	
		8	217	216
		9	222	
		10	141	
KRM-1648	0.4	11	226	
		12	228	
		13	141	220
		14	216	
		15	220	

a) Mice were infected intravenously with  $1.0 \times 10^7$  CFU/mouse and then were given KRM-1648 by gavage, once daily, 6 times per week, from day 1 to the end of the experiment.

たものである。薬剤非投与対照群並びに KRM-1648 0.2 mg 投与群および同 0.4 mg 投与群のいずれのマウスも感染後 140 日頃より斃死し始め、全例が死亡するにはさらに対照群で 18 日 (生存日数の中央値 141 日)、0.2 mg 投与群では 81 日 (生存日数の中央値 216 日)、0.4 mg 投与群では 87 日 (生存日数の中央値 220 日) を要した。

Table 2 は上述のマウスにおける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 週後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 週後では、対照群の全例 (5 匹) のマウス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 0.2 mg 投与群では 5 例中 3 匹、KRM 0.4 mg 投与群では 5 例中 1 匹のマウスにいずれも軽度 (1+) の病変がみられたにすぎなかった。注目すべきことは死亡した KRM 投与あるいは非投与の動物のいずれを問わず極めて強い (4+) 肺病変がみられたことである。

Table 3 はこれらの動物の肺並びに脾内 CFU を示す。感染 4 並びに 8 週後では KRM 0.2 および 0.4 mg 各投与群とも肺並びに脾内 CFU は対照群におけるよりも有意 ( $P < 0.05$ ) に少なかったが、両群間に有意差はみら

**Table 2** Macroscopic Lung Lesions in *M. intracellulare*-Infected Mice Administered with or without KRM-1648<sup>a)</sup>

Agent	Dose (mg)	Macroscopic lung lesions												
		4 weeks			8 weeks					Time of death				
		-	1+	2+	-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+
None	-	5	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	5
KRM-1648	0.2	5	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	5
KRM-1648	0.4	5	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	5

a) Experimental methods are the same as Table 1.

**Table 3** Number of Colony Forming Units in *M. intracellulare*-Infected Mice Administered with or without KRM-1648<sup>a)</sup>

Agent	Dose (mg)	Log CFU/organ <sup>b)</sup>							
		Lungs				Spleen			
		1 day	4 weeks	8 weeks	Time of death	1 day	4 weeks	8 weeks	Time of death
None	-	4.66	5.45	7.45	9.55	6.57	7.55	8.51	10.05
KRM-1648	0.2	-	4.61	6.01	9.79	-	6.90	8.08	10.02
KRM-1648	0.4	-	4.24	5.84	9.82	-	7.08	7.87	10.06

a) Experimental methods are the same as Table 1.

b) The mean values are indicated (n=5). The mean value of standard error was 0.08 and the value did not exceed 0.15.

**Table 4** MIC of KRM-1648 against Isolates from Dead Mice

Agent	Dose (mg)	Number of mouse	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
			Isolated from : Lungs	Spleen
None	-	1	0.05	0.05
		2	0.05	0.05
		3	0.05	0.05
		4	0.05	0.05
		5	0.05	0.05
KRM-1648	0.2	6	0.05	0.05
		7	0.1	0.1
		8	0.05	0.1
		9	0.05	0.1
		10	0.1	0.05
KRM-1648	0.4	11	0.05	0.05
		12	0.05	0.05
		13	0.05	0.05
		14	0.05	0.05
		15	0.05	0.1
Parent strain (N-256)			0.05	

れなかった。注目すべき点は KRM 0.2 および 0.4 mg 各投与マウスでは上述したように生存日数の延長がみられたにもかかわらず、斃死時の臓器内 CFU は対照マウスに比較して、肺ではむしろ増加の傾向にあり、また脾ではほとんど同じであったことである。

Table 4 は死亡マウスの肺並びに脾よりの *M. intracellulare* N-256 株還元培養菌並びに同菌親株 (接種菌) に対する KRM-1648 の MIC の比較成績を示したものである。KRM-1648 投与あるいは非投与由来菌の別なく、供試 30 株に対する同剤の MIC は接種菌と同一の 0.05  $\mu\text{g/ml}$  あるいは 1 濃度高い 0.1  $\mu\text{g/ml}$  を示したにすぎなかった。

### 考 察

先にわれわれ<sup>4)</sup>は *M. intracellulare* 感染ベージュマウスに対する KRM-1648 の治療効果の検討において、(1) 感染 4 週後頃までの肺並びに脾内 CFU は対照群のそれよりも有意に少なかったが、その程度は感染 1 日後におけるこれら臓器内 CFU とほとんど変わらなかったことより、*in vivo* における本菌に対する KRM-1648 の作用は静菌的であると考えられた。(2) 感染 4 週以降 12 週後頃までは、KRM-1648 0.2 並びに 0.4 mg 投与群の臓器内 CFU は対照群におけるよりも有意に少なかったが、その後の薬剤投与にもかかわらず菌は増殖を示した。(3) KRM-1648 投与によって生存日数の延長がみ

られたが、最終的には動物は死亡し、剖検時の臓器内 CFU は対照群よりもむしろ増加していた、などについて報告した。これらの所見は今回の BALB/c 系マウスを用いた実験においてもほぼ同様であり、したがってかかる所見は何もベージュマウスに限ってみられるものではないことが分かった。

そこで、これらの成績が感染菌の KRM-1648 に対する耐性獲得に起因したものかどうかについて検討した。その結果、Table 4 に示したように、本剤投与マウスの死亡時に感染臓器 (肺, 脾) より還元された被検菌に対する MIC は接種に用いた本菌に対するそれと変わるところはなく、感受性であったことより、上述の所見は感染菌の薬剤耐性獲得によるものではないことが分かった。

上述の成績より、*M. intracellulare* 感染マウスに対する本剤の投与は、一時的には臓器内菌数の減少や延命効果をもたらすものの、最終的には動物は死亡し、その原因があるいは宿主免疫応答系の破綻に起因したものかもしれない。この点、今後の興味ある検討課題といえよう。したがって、もしそうだとすれば MAC 感染症の治療には感染早期よりの強力な化学療法に宿主免疫応答系をコントロールする免疫療法を併せ用いることによって優れた治療効果が期待できるかもしれない。

### 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 の投与により、動物の生存日数の延長がみられたが、最終的には動物は死亡し、その時の還元菌数は対照群に比し、肺では増加、脾ではほぼ同等であった。これは還元菌の KRM-1648 耐性獲得によるものではなく、恐らくは宿主免疫応答系の破綻に基づくものであろうことが考えられた。

### 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, 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) Gangadharam JM, Edwards III CK, Murthy PS, et al. : An acute infection model for *Mycobacterium intracellulare* disease using beige mice : preliminary results. Am Rev Respir Dis. 1983 ; 127 : 648-649.
  - 9) Gangadharam JM, Perumal VK, Harhi DC, et al. : The beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease : optimal conditions for the host and parasite. Tubercle. 1989 ; 70 : 257-271.