

原 著

実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染マウスの
化学療法経過中にみられる菌の再増殖のメカニズムに
関する研究 (第1報)

佐藤 勝昌・富岡 治明・Win Win Maw

島根医科大学微生物・免疫学教室

斎藤 肇

国立多摩研究所

受付 平成7年6月19日

受理 平成7年8月16日

MECHANISM OF BACTERIAL REGROWTH AT THE SITES OF INFECTION IN
MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX-INFECTED MICE DURING
TREATMENT WITH CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

Katsumasa SATO, Haruaki TOMIOKA^{*}, Win Win MAW
and Hajime SAITO

(Received 19 June 1995/Accepted 16 August 1995)

Although various antimicrobial drugs show appreciable bactericidal activity in the early phase (2 to 4 weeks after infection) of *Mycobacterium avium* complex (MAC) infections in mice, no drug, as far as we know, can continue to exert the growth inhibiting activity against the bacteria at the site of infection in the progressed stage. Here, we studied the mechanisms of the bacterial regrowth which usually starts around 2~4 weeks after infection. First, the changes in the level of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-10 in the lungs and spleen during the course of MAC infections was examined. Tissue levels of TNF- α and IL-10 increased around weeks 2 to 4, then rapidly decreased thereafter, and returned to the normal levels by week 8, while levels of IFN- γ and IL-6 remained very low throughout the observation period. In this experiment, the bacterial CFUs rapidly decreased during the first 2 weeks of the treatment with a rifamycin derivative, KRM-1648, and thereafter the regrowth of the organisms was observed even in mice treated continuously with KRM-1648, although the rate of bacterial growth in the treated mice was much lower than in untreated control mice. Second, effect of either anti-TGF- β or anti-IL-10 antibody on intracellular growth of MAC in human monocytes cultured *in vitro* in the medium with or without addition of TNF- α or IFN- γ were examined. Anti-TGF- β and

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

anti-IL-10 antibodies potentially reduced the bacterial growth in monocytes. Effects of TNF- α and IFN- γ in reducing the bacterial growth was potentiated by the addition of either anti-TGF- β or anti-IL-10 antibody. Third, anti-IL-10 antibody augmented to some extent the chemotherapeutic efficacy of KRM-1648 against MAC infection, when the drug was given to mice at weeks 2 and 4 after infection. From these results, it is suggested that IL-10 derived from MAC-infected macrophages in response to stimulation with some bacterial components, such as lipoarabinomannan, might downregulate the antimicrobial function of host macrophages against MAC.

Key words : *Mycobacterium avium* complex, Bacterial regrowth, IL-10, TGF- β , Macrophage deactivating cytokines

キーワード : *Mycobacterium avium* complex, 菌の再増殖, IL-10, TGF- β , マクロファージ不活化サイトカイン

はじめに

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染マウスの化学療法経過中、たとえ感染初期に有効性が認められ、感染菌がいったん減少した場合でも、菌の投与薬剤に対する耐性獲得がないにもかかわらず、感染2~4週以降になると再増殖する現象が、単剤投与のみならず多剤併用投与の場合においてもまま認められる¹⁾²⁾。したがって、こうした菌の再増殖を何らかの方法でもってコントロールすることができれば、本菌感染症の化学療法においてより優れた治療効果が期待できるものと思われる。本研究では、このような現象の機序解明を企図して、免疫学的観点、特に IL-10 や IL-6 あるいは transforming growth factor β (TGF- β) などの Th2 タイプのサイトカイン³⁾⁻⁶⁾ とのかかわりの面から検討した。

材料と方法

1) 実験的マウス MAC 感染における臓器内 CFU とサイトカインの推移: 5週齢の BALB/c 系雌マウス(日本クレア)に MAC N-260 株 (SmT 集落形成株) (Gen-Probe テストによって *M. intracellulare* と同定) の $2.4 \sim 2.9 \times 10^7$ CFU を iv 感染させ、翌日より新ベンゾキサジノリファマイシン誘導体 KRM-1648 (KRM ; 2.5%アラビアゴム-0.2% Tween 80 水に懸濁) (0.4 mg/マウス) を 1日1回、週6回、8週間にわたって経口投与した。また、実験によっては抗 IL-10 単クローン抗体の 50 μ g ずつを感染2および4週後の計2回 ip 投与した場合もある。所定日にマウスを屠殺・剖検し、肺ならびに脾を摘出して生理食塩水中でホモジナイズし、その還元生菌単位 (CFU) を 7H11 寒天平板上で計測するとともに、実験によっては、これら臓器

のホモジネイトよりの遠心上清中の各種サイトカイン [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), IL-6, IL-10] レベルを各々のサイトカインに対する捕捉抗体およびビオチン標識キャッピング抗体を用いる逆 ELISA 法で測定した⁷⁾。

2) ヒト単球の抗 *M. avium* 抗菌活性の測定: Ficoll 法で調製した PPD 反応陰性の健康人の末梢血単核球 (PBMC) を丸底 microtiter well 上に附着させて単球の単層培養を得た。これに *M. avium* LR114F 株 (SmT 集落形成株) を貪食させた後、5% 自己血清および TNF- α または IFN- γ ならびに抗 IL-10 または抗 TGF- β 抗体のいずれかあるいはその組合せを添加した RPMI-1640 培地中で7日間培養し、細胞内 CFU を 7H10 寒天平板上で計測した⁸⁾。

成績

1) KRM 投与および非投与 MAC 感染マウスの肺内サイトカインレベルの変動

MAC 感染マウスの肺内 CFU は、KRM 投与の有無の別なく、感染2週後では一過性の菌の排除が認められたが、それ以降では菌の再増殖がみられた (Fig. 1-A)。そこで感染後一定期日における KRM 投与ならびに非投与マウス群の各種サイトカインレベルを測定したところ、以下の成績が得られた。

すなわち、(1) 両マウス群において、TNF- α は感染早期に顕著に増加し、非投与群では感染4週後にピーク値を示し、以後減少したのに対して、KRM 投与群では感染2週目では非投与対照群とほぼ同程度の増加を示したが、以後は漸減するパターンが認められ、非投与マウス群にみられる感染4週での TNF- α レベルの上昇は KRM 投与によって抑制されることが分かった (Fig. 1-B)。(2) IFN- γ は、非投与群では感染4週後をピーク

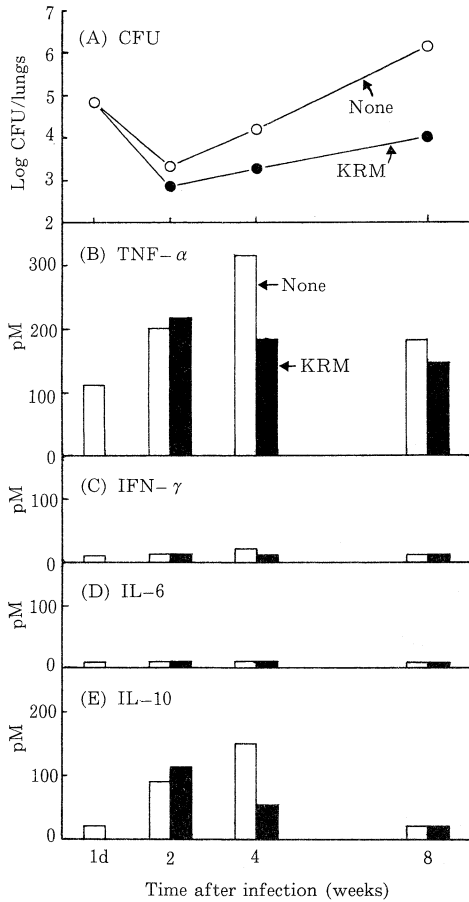


Fig. 1 Changes in CFU (A) and TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-6 (D) and IL-10 (E) levels in the lungs during the course of MAC infection in mice with or without administration of KRM-1648. Normal cytokine levels (pM) were as follows : TNF- α , <106 ; IFN- γ , 12.5 ; IL-6, <8.7 ; IL-10, <13.5. Detectable limits (pM) were as follows : TNF- α , 106 ; IFN- γ , 9.7 ; IL-6, 8.7 ; IL-10, 13.5.

クとして僅かな増加がみられたが、KRM投与群では全観察期間を通してほとんど検出限界を超えることはなかった (Fig. 1-C)。(3) IL-6はKRM投与群、非投与群のいずれのマウスでも全観察期間を通してほとんど検出限界を超えることはなかった (Fig. 1-D)。(4) IL-10はTNF- α におけるものと同様な推移を示した (Fig. 1-E)。

2) KRM投与および非投与MAC感染マウスの脾内サイトカインレベルの変動

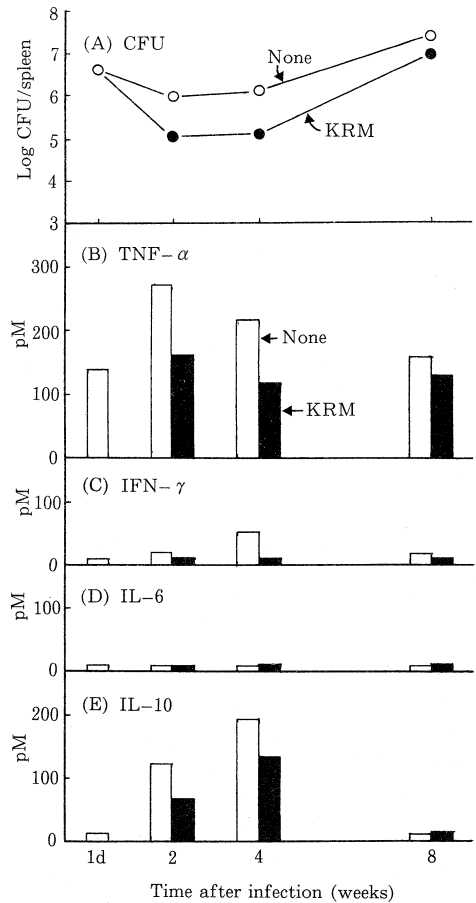


Fig. 2 Changes in CFU (A) and TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-6 (D) and IL-10 (E) levels in the spleen during the course of MAC infection in mice with or without administration of KRM-1648. Normal cytokine levels (pM) were as follows : TNF- α , <106 ; IFN- γ , <9.7 ; IL-6, <8.7 ; IL-10, <13.5. Detectable limits (pM) were as follows : TNF- α , 106 ; IFN- γ , 9.7 ; IL-6, 8.7 ; IL-10, 13.5.

MAC感染マウスの脾内CFUは肺内CFUの場合と同様な推移を示し、KRM投与の有無の別なく、感染2週後では一過性の菌の排除が、また、それ以降は再増殖がみられたが、感染4週後での菌の再増殖の立ち上がりは肺内CFUにおけるよりもやや遅い傾向がみられた (Fig. 2-A)。次に、感染後の各々の時点での各種サイトカインレベルを測定したところ、特にTNF- α とIL-10では肺におけると同様に感染早期で一過性に上昇し、その後は低下するパターンがみられたが、細部に

ついてみると両臓器間ではやや異なる面もみられた。すなわち、(1) TNF- α は非投与マウス群では感染2週後に高いピーク値を示し、以後低下したのに対して、KRM 投与群では感染2週後に増加が認められたものの、その増加は非投与マウス群に比べ僅かであった (Fig. 2-B)。(2) IFN- γ は非投与群で感染4週後をピークとした軽度ながら有意な増加がみられたが、KRM 投与群では全観察期間を通してほとんど検出限界を超えることはなかった (Fig. 2-C)。(3) IL-6 は KRM 投与群・非投与群のいずれのマウスでも全観察期間を通してほとんど検出限界を超えることはなかった (Fig. 2-D)。(4) IL-10 は KRM 投与群・非投与群とも感染4週後に顕著な増加がみられたが、KRM 投与群では非投与群に比べてその上昇の程度がやや低い傾向がみられた (Fig. 2-E)。

3) 内因性 IL-10 および TGF- β によるマクロファージの抗 MAC 殺菌活性の抑制

マクロファージ自らが産生する IL-10 および TGF- β によりマクロファージ自身の抗 MAC 殺菌活性がどのような影響を受けるのかについて知る目的で、*M. avium* を貪食したヒト単球を IL-10 や TGF- β あるいはこれらのサイトカインに対する特異単クロン抗体を添加した培地中で培養した場合の単球内での菌の挙動について検討したところ、以下のような成績が得られた。(1) *M. avium* を貪食した単球を IL-10 あるいは TGF- β の 0.1~10 ng/ml を含む培地中で培養した場合、単球内での菌の増殖が特に亢進するかあるいは抑制されたといったような傾向はみられなかった。他方、300 units/ml の IFN- γ の添加によっては単球の抗 *M. avium* 活性は有意に亢進したとする Shiratsuchiら⁶⁾ の成績が追認された (図省略)。(2) 抗 IL-10 または抗 TGF- β 抗体を加えた場合、特に前者において *M. avium* の単球内増殖の強い抑制がみられ、このことよ

りして単球からのこれら内因性サイトカインにより単球自身の抗 *M. avium* 活性の発現が down-regulate される可能性が示唆された (Fig. 3-A)。(3) TNF- α の添加により非添加対照群に比べて *M. avium* の単球内増殖の低下、すなわち単球の抗 *M. avium* 殺菌能の亢進が認められ、この効果は抗 TGF- β あるいは抗 IL-10 抗体の併用によってさらに増強された (Fig. 3-B)。また、IFN- γ の添加によっても TNF- α の添加の場合と同様に、単球の抗 *M. avium* 殺菌能の亢進が認められたが、この効果もまた抗 IL-10 あるいは抗 TGF- β 抗体の併用によってさらに増強された (Fig. 3-C)。

4) MAC 感染マウスに対する KRM の治療効果に及ぼす抗 IL-10 抗体投与の影響

Table は、MAC N-260 株感染マウスに抗 IL-10 抗体 (50 μ g) を感染後 2 および 4 週の計 2 回にわたって ip 投与した場合の KRM の治療効果に及ぼす影響を、感染 6 週後での肺・脾内 CFU を指標としてみたものである。これから分かるように、肺および脾内 CFU は抗 IL-10 抗体投与により、有意とは言えないまでもやや減少する傾向がみられた。これは、今回の検討では抗 IL-10 抗体投与量が Denis および Ghadrian の報告⁸⁾ のそれよりもかなり少なかったため、内因性 IL-10 のブロッキングがやや不十分であったことに起因するよう思われるので、現在、その投与量を増加して再検討を進めている。

考 察

以上の成績より、以下のような考察が可能である。すなわち、(1) MAC 感染マウスの肺および脾内 IL-10 レベルは、マクロファージ活性化サイトカインである TNF- α や IFN- γ ⁹⁾⁻¹²⁾ の組織内レベルの上昇と並行するか、やや遅れて一過性に上昇し、さらにこれら臓器内での IL-10 レベルの上昇と感染菌の再増殖の開始の

Table Effect of Anti-IL-10 Antibody on the Expression of *in vivo* Activity of KRM against MAC Infection

KRM treatment ^{a)} (0.4 mg/mouse)	Anti-IL-10 ^{b)} (50 μ g \times 2)	CFU/organ (6W) ^{c)}	
		Lungs	Spleen
-	-	1.3×10^6	1.7×10^7
+	-	1.7×10^4	1.0×10^7
+	+	1.0×10^4	8.1×10^6

a) KRM was given po to mice (3 mice per regimen) daily from day 1 for up to 6 weeks.

b) Anti-IL-10 antibody was given ip to mice at weeks 2 and 4.

c) CFU (1d): lungs, 3.1×10^4 ; spleen, 1.4×10^6 .

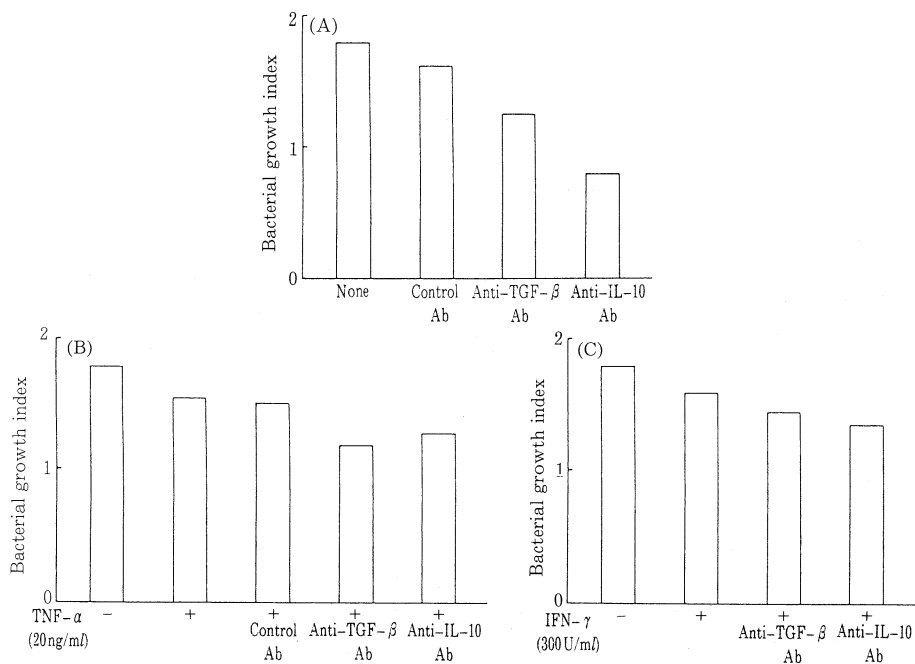


Fig. 3 Effects of anti-TGF- β and anti-IL-10 antibodies (10 μ g/ml) on the growth of MAC in human monocytes. Intracellular bacterial growth was studied for monocytes cultured in the medium with or without addition of indicated cytokines. (A) None added, (B) + TNF- α , and (C) + IFN- γ . The representative data of repeated experiments using monocytes from different donors are indicated.

時期とが比較的良好に一致していること、また、(2) *in vitro* 実験系で、免疫抑制性サイトカインとして知られている IL-10⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ および TGF- β ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ のいずれにもヒト単球の抗 MAC 抗菌活性を down-regulate する作用が認められること、を併せ考えた場合、IL-10 をはじめとする抗炎症性サイトカインが、感染部位でのマクロファージや Th1 細胞からの TNF- α あるいは IFN- γ などのマクロファージ活性化サイトカインの産生を down-regulate する⁽³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ ことによって、組織内での MAC 感染菌の再増殖を誘導している可能性が示唆されるものように思われる。

ところで、KRM 投与マウスでは、肺・脾いずれの臓器内においても TNF- α 、IL-10 ならびに IFN- γ レベルの感染後 2~4 週での上昇が非投与マウスに比べて低かったが、これは薬剤投与により感染菌の殺菌・排除が促進され、組織内での bacterial load が非投与マウスに比べて著しく減少したために、マクロファージや Th1 細胞の活性化の程度が減じたことによるものと思われる。また、IL-10 の場合では TNF- α の場合とは

異なり、肺・脾いずれの臓器においても、薬剤の投与・非投与のいかんを問わず感染部位での組織内レベルの顕著な上昇が認められており、このことは IL-10 が組織内での MAC 感染菌の再増殖に極めて密接に関わっていることを示唆するものと思われる。

Fig. 3 に示した成績より、抗 IL-10 と抗 TGF- β 抗体とを併用した場合、これらの抑制性サイトカインの作用をより有効にブロックすることが可能かと考えられるが、この点については今後さらに検討を進めていきたい。

まとめ

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染マウスの化学療法経過中に、薬剤耐性菌の出現に起因しない感染菌の再増殖のメカニズムを、免疫学的観点から検討し、以下の知見を得た。

(1) MAC 感染マウスの肺および脾内 IL-10 レベルは、TNF- α や IFN- γ の上昇と並行するかやや遅れて一過性に上昇し、また IL-10 レベルの上昇と感染菌の再増殖の開始の時期とがよく一致した。

(2) *in vitro* 実験系で, IL-10 および TGF- β のいずれにもヒト単球の抗 MAC 抗菌活性を down-regulate する作用が認められた。

(3) 如上の成績より, IL-10 をはじめとする抗炎症性サイトカインが, 感染部位でのマクロファージや Th1 細胞からの TNF- α あるいは IFN- γ などのマクロファージ活性化サイトカインの産生を down-regulate することにより, MAC 感染菌の再増殖を誘導する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究にあたり貴重な助言ならびにご指導を頂いた Dr. J. J. Ellner (Case Western Reserve University, Cleveland, U. S. A.) に深謝します。また, 多大のご援助を頂いた鐘淵化学工業株式会社生物化学研究所 日高隆義博士に深謝します。

文 献

- 1) Tomioka H, Saito H, Sato K : Chemotherapeutic efficacy of a newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992 ; 36 : 387-393.
- 2) Saito H, Tomioka H, Sato K : Therapeutic effect of KRM-1648 with various antimicrobials against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. *Tuberc. Lung Dis.* 1995 ; 76 : 51-58.
- 3) Mosmann TR, Moore KW : The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol. Today.* 1991 ; 12 : A49-A53.
- 4) De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M-G, et al. : Interleukin-10. *Opinion Immunol.* 1992 ; 4 : 314-320.
- 5) Blanchard DK, Micheleni-Norris MB, Pearson CA, et al. : *Mycobacterium avium-intracellulare* induced interleukin-6 from human monocytes and granular lymphocytes. *Blood.* 1991 ; 77 : 2218-2224.
- 6) Shiratsuchi H, Johnson JL, Ellner JJ : Bidirectional effects of cytokine on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. *J Immunol.* 1991 ; 146 : 3165-3170.
- 7) Tossi Z, Young TG, Averill LE, et al. : Induction of transforming growth factor β -1 by purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995 ; 63 : 224-228.
- 8) Denis M, Ghadrian E : IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. *J Immunol.* 1993 ; 151 : 5425-5430.
- 9) Phillip R, Epstein LB : Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature.* 1986 ; 323 : 86-88.
- 10) Denis M : Modulation of *Mycobacterium avium* growth *in vivo* by cytokines : involvement of tumor necrosis factor in resistance to atypical mycobacteria. *Clin Exp Immunol.* 1991 ; 83 : 466-471.
- 11) Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF : Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon- γ . *J Immunol.* 1985 ; 134 : 1619-1622.
- 12) Murray HW : Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med.* 1988 ; 108 : 595-608.
- 13) Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C : Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med.* 1991 ; 174 : 1549-1555.
- 14) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, et al. : IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991 ; 147 : 3815-3822.
- 15) Wahl SM : Transforming growth factor Beta (TGF- β) in inflammation : a cause and a cure. *J Clin Immunol.* 1992 ; 12 : 61-73.
- 16) Hausmann ES, Hao S, Pace J, Parmely MJ : Transforming growth factor β 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Infect Immun.* 1994 ; 62 : 3625-3632.