

原 著

Lipid A アナログ, JTP3309 のマイコバクテリア感染マウスに  
 対する効果並びに感染マクロファージ  
 内菌動態に及ぼす影響

鈴木 秀 和

日本たばこ産業(株)医薬総合研究所  
 島根医科大学微生物免疫学教室

斎 藤 肇

島根医科大学微生物免疫学教室  
 国立多摩研究所

佐 藤 勝 昌 ・ 富 岡 治 明

島根医科大学微生物免疫学教室

受付 平成 6 年 10 月 17 日

受理 平成 6 年 12 月 19 日

IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITIES OF CHEMICALLY SYNTHESIZED LIPID  
 A-SUBUNIT ANALOGUE, JTP3309, AGAINST MYCOBACTERIAL  
 INFECTIONS IN MICE AND IN MOUSE PERITONEAL  
 MACROPHAGES

Hidekazu SUZUKI\*, Hajime SAITO, Katsumasa SATO  
 and Haruaki TOMIOKA

(Received 17 October 1994/Accepted 19 December 1994)

JTP3309, a newly synthesized lipid A-subunit analogue, was examined for *in vitro* and *in vivo* antimycobacterial activities. Firstly, the effect of JTP3309 on the *in vitro* antimycobacterial activity of murine peritoneal macrophages (M $\phi$ s) was studied. When resident peritoneal M $\phi$ s from CBA mice which had phagocytosed *Mycobacterium avium* were treated with JTP3309 once from 0hr to 24hr after the initiation of M $\phi$  cultivation or three times from 0hr to 24hr, 48hr to 72hr and 96hr to 120hr of culture period, there was no increase in the anti-*M. avium* activity of the treated M $\phi$ s. On the other hand, the bacterial growth was slightly inhibited in peritoneal M $\phi$ s from mice which had been injected with JTP3309, in comparison with that seen in resident M $\phi$ s. Secondly, protective and therapeutic efficacies of JTP3309 against *M. avium* and *M. fortuitum* infections in mice were studied,

\* From the Japan Tobacco Inc. Central Pharmaceutical Research Institute, 1-1 Murasaki-cho, Takatsuki, Osaka 569 Japan.

based on the suppression of the bacterial growth in the visceral organs including the lungs, kidneys and spleen. BALB/c mice infected i.v. with *M. avium* were given JTP3309 i.v. at the doses of 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  according to the following protocols ; protocol A, two injections 4 and 1 day(s) before the infection ; protocol B, once daily at days 1, 3, 5, 12, 19, 26, 33, 40, 47 and 54 after the infection ; protocol C, once daily at days 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 and 50 after the infection. Only protocol A could reduce the number of CFU recovered from the spleen of infected mice. A/J mice infected i.v. with *M. fortuitum* were given JTP3309 i.v. at doses of 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , in the same administration schedules as above except for mice killed on day 28. Only mice given JTP3309 in the protocol A were protected from the death and the number of CFU recovered from their spleen on day 28 were significantly reduced. These results show that JTP3309 possesses protective but not therapeutic activity against *M. avium* or *M. fortuitum* infection.

**Key words :** *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, lipid A-analogs, JTP3309

**キーワードズ :** *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, lipid A アナログ, JTP3309

## はじめに

lipid A はマクロファージの TNF, IFN および CSF の産生, 好中球, マクロファージ, NK 細胞機能および宿主感染抵抗性の増強ないし活性化などの多様な免疫薬理作用を有する<sup>1)~4)</sup>が, その反面, 毒性や発熱原性などが強く, 副作用の少ない誘導体を開発しようとする研究が盛んにおこなわれている<sup>5)~7)</sup>。

近年, lipid A の免疫薬理作用を維持し, かつその毒性を抑えた lipid A-subunit 誘導体 (GLA27 および GLA60) が合成され, その諸性状が報告されている<sup>8)9)</sup>。先に鈴木らは GLA60 よりも優れた免疫薬理作用を有しかつ毒性の低い誘導体, JTP3309 を合成し, これが免疫不全並びに正常マウスの細胞外寄生菌に対する感染抵抗性のみならず, *Candida albicans* や *Listeria monocytogenes* などの細胞内寄生菌に対する感染抵抗性をも増強させることを見いだした (投稿準備中)。

ところで, 近年, AIDS 患者での細胞性免疫低下に起因した主要な日和見感染症の一つとして *Mycobacterium avium*-intracellular complex (MAC) 症が注目されている<sup>10)</sup>が, 本菌群の多くは抗結核剤および抗菌剤に対して耐性であり, より優れた化学療法剤の開発が望まれている。他方, 一般に MAC 感染症は免疫不全患者に発症することが多く, 生体応答調節物質 (BRM) の使用も試みられつつある。そこで, 今回われわれは JTP3309 のマウス腹腔マクロファージ (M $\phi$ ) の *M. avium* 殺菌能に及ぼす効果, さらに実験的 *M. avium* および *M. fortuitum* 感染マウスに対する防御

並びに治療効果を検討したので以下報告する。

## 材料と方法

1. 供試薬剤: JTP3309 (日本たばこ産業, 高槻)。
2. 供試菌株: 教室保存の *M. avium* N-444 株 (SmT) 並びに *M. fortuitum* ATCC23010 株。
3. 供試動物: 感染実験には日本 SLC の A/J 系 (6 週齢) および BALB/c 系 (5 週齢) 雌マウスを, また M $\phi$  採取には日本チャールスリバーの CBA 系 (8 週齢) 雌マウスを用いた。
4. マウス腹腔マクロファージ (M $\phi$ ) 内被貪食 *M. avium* に対する抗菌活性: M $\phi$  は既報の方法<sup>11)</sup>により調製した。すなわち, 10% proteose peptone (Difco) 水溶液 2 ml の腹腔内投与 4 日後に 2% 牛胎児血清加 Hanks' balanced salt solution (FBS-HBSS; 日水製薬) で腹腔浸出細胞を採取し, 遠心洗浄後, 10% FBS 加 RPMI 1640 培地 (FBS-RPMI; 日水製薬) に浮遊した。そして, その 1 ml ( $7.5 \times 10^5$  cells) を径 16 mm の組織培養用 well (Corning Glass Works, USA) に入れ, CO<sub>2</sub> 孵卵器内で 37°C, 2 時間培養後 FBS-HBSS で洗浄して非付着細胞を除去し, 単層培養 M $\phi$  を得た。

この単層培養 M $\phi$  に *M. avium* N-444 株の FBS-RPMI 培地浮遊液 1 ml ( $7.0 \times 10^6$  CFU) を加え, CO<sub>2</sub> 孵卵器内で 37°C, 1 時間培養後, FBS-HBSS で洗浄して非貪食菌を除去した。次いで JTP3309 添加または非添加 FBS-RPMI 培地 1 ml を加え, 37°C, 5 日間培養した (この間 1 日 1 回培地交換)。この菌貪食培養

MφのJTP3309処理は以下の2つのプロトコールに従って本剤含有FBS-RPMI培地中で培養することによってなされた。すなわち、プロトコールI：Mφを培養0～24、48～72、96～120時間の計3回にかぎってJTP3309処理し、他は薬剤非添加培地中で培養。プロトコールII：Mφを培養0～24時間にJTP3309処理し、その後は薬剤非添加培地中で培養。そして感染菌のCFUは得られたMφを既報の方法<sup>11)</sup>により洗浄、溶解させたのち、7H11寒天培地に培養して計測、結果は、同一条件下で得られた他のwellの単層培養MφをGiemsa染色し、well上のMφ数を顕微鏡下で計測し、Mφ1個あたりのCFUで表した。また、別途JTP3309(10あるいは20μg)をMφ採取日の4および1日前に尾静脈より投与したマウスの腹腔から採取、調製したMφについても上述したと同様な方法で*M. avium*に対する抗菌作用を検討した。なお、この実験では*M. avium*貪食Mφは薬剤非添加培地中で5日間培養した。

5. 実験的*M. avium*感染マウスに対する予防および治療効果：*M. avium* N-444株を7H9培地中37°CでOD<sub>540</sub> = 0.15に達するまで培養し、超音波処理後、1,000 rpm、5分間遠心して大きい菌塊を除去した後、これを滅菌生食水でOD<sub>540</sub> = 0.10に調製したものの0.2 ml (2.6 × 10<sup>7</sup> CFU)をBALB/c系雌マウス(5週齢)へ尾静脈内接種した。供試マウスはJTP3309投与群並びに非投与対照群に分け、前者は(A)感染の4および1日前投与、(B)感染翌日より1週間は隔日、週3回、その後は週1回、7週間投与、(C)感染翌日より週1回、8週間投与の計3群とし、1% meglumine 溶液0.2 mlに溶解させたJTP3309の10ある

いは20μgを尾静脈内に投与した。そして、感染1日後、4および8週後に動物を屠殺、剖検して、肺、肝、脾、腎の重量の測定、肉眼的病変の有無とその程度を観察後、肺、脾ホモジネートを調製し、7H11寒天培地上で肺および脾内還元CFUを計測した<sup>12)</sup>。

6. 実験的*M. fortuitum*感染マウスに対する予防および治療効果：上述した方法に準じて調製した*M. fortuitum* ATCC 23010株の菌浮遊液の0.2 ml (1.33 × 10<sup>7</sup> CFU)をA/J系雌マウス(6週齢)へ尾静脈内接種した。感染マウスはJTP3309投与群並びに非投与対照群に分け、前者は(A)感染の4および1日前投与、(B)感染翌日より1週間は隔日、週3回、その後は週1回、3週間投与の2群とし、1% meglumine 溶液0.2 mlに溶解させたJTP3309の10あるいは20μgを尾静脈内に投与した。感染マウスについてはspinning disease<sup>13)</sup>発現の有無を毎日観察し、死亡マウスについてはその都度、また生存マウスでは感染の2および4週後に屠殺、剖検して、脾重量の測定、肺、肝、脾、腎の肉眼的病変の有無とその程度の観察、さらに腎および脾内還元CFUを7H11寒天培地を用いて計測した<sup>14)</sup>。

## 結 果

### 1. Mφ内被貪食*M. avium*に対する抗菌活性

Mφ内に貪食された*M. avium*の発育に及ぼすJTP3309添加の影響はTable 1に示すようであり、I、IIいずれのプロトコールの処理でもJTP3309 1μg/wellの添加ではMφ内の菌の増殖には特に有意な影響はみられなかったが、10μg/wellの添加ではプロトコールIでの培養3日目並びにプロトコールIIでの培養3およ

Table 1 Effect of JTP3309 on the Growth of *M. avium* N-444 Phagocytosed in Murine Peritoneal Macrophages

Agent	Protocol	Time of addition <sup>a)</sup> (hrs)	Concentration (μg/ml)	CFU/macrophage		
				Incubation time (days) <sup>b)</sup>		
				0	3	5
None	-	-	-	0.67 ± 0.15	0.87 ± 0.17	0.81 ± 0.28
JTP3309	I	0, 48, 96	1	N.T.	0.98 ± 0.17	0.58 ± 0.10
	I	0, 48, 96	10	N.T.	1.43 ± 0.31 <sup>c)</sup>	1.31 ± 0.77
JTP3309	II	0	1	N.T.	0.73 ± 0.28	0.67 ± 0.05
	II	0	10	N.T.	1.91 ± 0.29 <sup>d)</sup>	3.53 ± 0.67 <sup>e)</sup>

a) At indicated time, treatment of Mφs with JTP3309 was started by cultivating the Mφs in the medium containing the agent for 24 hr, subsequently followed by change with fresh medium free from the agent.

b) After Mφs were allowed to phagocytize *M. avium* at 37°C for 1 hr, Mφs were rinsed and thereafter cultivated for up to 5 days.

c)~e) Significant difference was found from the value in control culture.

c) P < 0.05, d) P < 0.025, e) P < 0.01

**Table 2** Growth of *M. avium* N-444 in Peritoneal Macrophages from Mice Injected with JTP3309<sup>a)</sup>

Agent	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )	CFU/macrophage		
		Incubation time (days) <sup>b)</sup>		
		0	3	5
None	—	0.82 $\pm$ 0.05	2.13 $\pm$ 0.10	1.91 $\pm$ 0.17
JTP3309	10	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>c)</sup>	2.66 $\pm$ 0.12 <sup>d)</sup>	1.47 $\pm$ 0.20
	20	1.39 $\pm$ 0.13 <sup>e)</sup>	2.84 $\pm$ 0.03 <sup>e)</sup>	1.26 $\pm$ 0.09 <sup>d)</sup>

a) JTP3309 was given i.v. to mice 4 and 1 day(s) before harvest of M $\phi$ s.

b) After M $\phi$ s were allowed to phagocytize *M. avium* at 37°C for 1hr, M $\phi$ s were rinsed and thereafter cultivated for up to 5 days.

c)~e) Significant difference was found from the value in control culture at each time point. c)  $P < 0.05$ , d)  $P < 0.025$ , e)  $P < 0.01$

**Table 3** Effects of JTP3309 in Terms of Reducing Splenomegaly and the Bacterial Load in the Visceral Organs of *M. avium*-Infected Mice<sup>a)</sup>

Agent	Protocol <sup>b)</sup>	Dose ( $\mu\text{g}$ )	Log CFU/organ				Spleen/body weight (%)	
			Lungs		Spleens		4W	8W
			4W	8W	4W	8W		
None	—	—	5.44 $\pm$ 0.27	6.63 $\pm$ 0.22	7.85 $\pm$ 0.11	8.39 $\pm$ 0.08	2.84 $\pm$ 0.03	3.24 $\pm$ 0.16
JTP3309	A	10	5.31 $\pm$ 0.21	6.53 $\pm$ 0.19	7.15 $\pm$ 0.04 <sup>c)</sup>	7.62 $\pm$ 0.14 <sup>c)</sup>	2.17 $\pm$ 0.25 <sup>c)</sup>	2.15 $\pm$ 0.16 <sup>c)</sup>
		20	5.45 $\pm$ 0.24	6.65 $\pm$ 0.23	7.17 $\pm$ 0.12 <sup>c)</sup>	7.80 $\pm$ 0.20 <sup>c)</sup>	2.17 $\pm$ 0.11 <sup>c)</sup>	2.43 $\pm$ 0.27 <sup>c)</sup>
	B	10	5.38 $\pm$ 0.51	6.96 $\pm$ 0.20	7.91 $\pm$ 0.15	8.57 $\pm$ 0.22	3.35 $\pm$ 0.15 <sup>c)</sup>	4.29 $\pm$ 0.36 <sup>c)</sup>
		20	5.49 $\pm$ 0.52	7.10 $\pm$ 0.29	7.98 $\pm$ 0.19	9.04 $\pm$ 0.16 <sup>c)</sup>	3.63 $\pm$ 0.31 <sup>c)</sup>	4.81 $\pm$ 0.21 <sup>c)</sup>
	C	10	5.33 $\pm$ 0.20	7.02 $\pm$ 0.21	7.96 $\pm$ 0.16	8.60 $\pm$ 0.06 <sup>c)</sup>	3.50 $\pm$ 0.35 <sup>c)</sup>	4.28 $\pm$ 0.22 <sup>c)</sup>
		20	5.55 $\pm$ 0.37	6.86 $\pm$ 0.30	7.84 $\pm$ 0.13	8.48 $\pm$ 0.18	3.46 $\pm$ 0.25 <sup>c)</sup>	4.57 $\pm$ 0.37 <sup>c)</sup>

a) Mice were infected at day 0.

b) Mice were given i.v. injections of JTP3309 4 and 1 day(s) before infection (Protocol A), or 1, 3, 5, 12, 19, 26, 33, 40, 47 and 54 days after infection (Protocol B), or 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 and 50 days after infection (Protocol C).

c) Significant difference was found from the value in infected control mice at  $P < 0.005$ .

The CFU/organ at day 1 was 4.36 $\pm$ 0.10 and 6.17 $\pm$ 0.04 in the lungs and spleens respectively.

The spleen/body weight (%) at day 1 was 0.47 $\pm$ 0.03.

び5日目において菌の増殖がかえって促進されていた。

他方、あらかじめ10あるいは20 $\mu\text{g}$ のJTP3309を尾静脈より投与したマウスの腹腔M $\phi$ では、Table 2に示すように培養開始時におけるM $\phi$ の*M. avium*貪食能に有意な促進がみられたが、培養3日目までの菌の増殖率は非投与マウスM $\phi$ と変わるところはなく、また培養5日目では、菌の増殖の抑制傾向が特に20 $\mu\text{g}$ 投与群M $\phi$ にみられた。

2. 実験的*M. avium*感染マウスに対する防御および治療効果

JTP3309の*M. avium*感染防御および治療効果は以下のようであった(Table 3)。

1) JTP3309の感染防御効果

JTP3309の10あるいは20 $\mu\text{g}$ を感染4および1日前にマウスの尾静脈内に投与した場合(Protocol A)の*M. avium*感染に対する防御効果を検討した。その結果、JTP3309投与群では感染後4および8週目のいずれにおいても投与量に関係なく非投与対照群におけるよりも有意な脾重量:体重比の低下がみられたが、肺、肝および腎重量:体重比(データ略)では両群間にほとんど

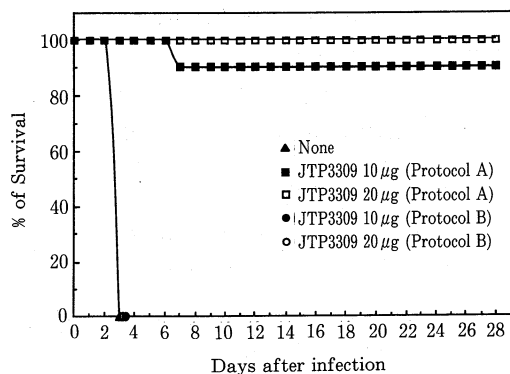


Fig. Protective and therapeutic efficacies of JTP3309 in terms of increasing survival rate of *M. fortuitum*-infected mice.

A/J mice were infected i.v. with *M. fortuitum* ATCC23010 at day 0. The mice were given i.v. injections of JTP3309 4 and 1 day(s) before infection (Protocol A), or 1, 3, 5, 12, 19, 26 days after infection (Protocol B).

ど差はみられなかった。また臓器内還元 CFU についてみると JTP3309 投与マウスでは感染後 4 および 8 週目のいずれにおいても脾内還元 CFU は非投与対照群よりも有意に低かったが、肺内還元 CFU では両群間に特に

差はみられなかった。

## 2) JTP3309 の治療効果

JTP3309 の 10 あるいは 20  $\mu\text{g}$  を *M. avium* 感染マウスの尾静脈内に感染翌日より 1 週間は隔日、週 3 回投与し、その後は週 1 回ずつ 7 週間投与した場合 (Protocol B) 並びに感染翌日より週 1 回ずつ 8 週間にわたり投与した場合 (Protocol C) の治療効果について検討した。その結果、Protocol B および C のいずれのマウスにおいても JTP3309 の投与量の別なく有意な脾重量: 体重比の増大がみられたが、肺重量 (データ略) ではその影響はみられなかった。また、臓器内還元 CFU についてみると Protocol B および C のいずれのマウスにおいても特に感染 8 週目での肺および脾内還元 CFU に対照群に比し若干の増加傾向がみられた。

## 3. 実験的 *M. fortuitum* 感染マウスに対する防御および治療効果

JTP3309 の 10 あるいは 20  $\mu\text{g}$  を感染 4 日前および 1 日前にマウス尾静脈内に投与した群 (Protocol A), 感染翌日より 1 週間は隔日、週 3 回投与し、その後は週 1 回ずつ 3 週間投与した群 (Protocol B) 並びに非投与対照群の感染後 4 週間にわたる生存率の推移についてみたところ Fig. 1 に示すようであった。すなわち、対照群並びに Protocol B 群 (治療投与群) では感染 3 日目に全例のマウスが死亡したのに対して、Protocol A 群 (予防投与群) では投与量に関係なく生存率の著

Table 4 Effects of JTP3309 on the Change in Body Weight, the Incidence of Spinning Disease and the Gross Renal Lesions of *M. fortuitum*-infected Mice<sup>a)</sup>

Agent	Protocol <sup>b)</sup>	Dose ( $\mu\text{g}$ )	No. of mice	Fate	Survival time (day)	Increase in body weight (g)	Spinning disease <sup>c)</sup>			Renal lesions <sup>d)</sup>			
							-	+	(day)	-	1+	2+	3+
None	-	-	5	killed	$\geq 1$	$0.30 \pm 0.27$	5	0		5	0	0	0
			5	died	3	$-3.80 \pm 0.27$	5	0		0	0	1	4
JTP3309	A	10	1	died	8	$-6.50 \pm 0.00$	0	1	(8)	0	0	0	1
			4	killed	$\geq 14$	$0.00 \pm 1.83$	3	1	(7)	0	3	1	0
	A	10	5	killed	$\geq 28$	$1.00 \pm 0.79$	0	5	(12)	0	2	1	2
			5	killed	$\geq 14$	$-1.10 \pm 0.42$	4	1	(7)	0	3	2	0
	A	20	5	killed	$\geq 28$	$2.00 \pm 0.71$	3	2	(11)	0	4	1	0
			5	killed	$\geq 28$	$2.00 \pm 0.71$	3	2	(11)	0	4	1	0
	B	10	5	died	3	$-3.50 \pm 0.71$	5	0		0	0	0	5
				died	3	$-3.50 \pm 0.35$	5	0		0	0	0	5

a) Mice were infected at day 0.

b) Mice were given i.v. injections of JTP3309 4 and 1 day(s) before infection (Protocol A), or 1, 3, 5, 12, 19, 26 days after infection (Protocol B).

c) Figures in parenthesis indicate the average days required for the onset of the spinning disease.

d) 1+, small discrete lesions covering <25% of surface; 2+, confluent lesions covering 25~50% of surface; 3+, confluent lesions covering more than 50% of surface.

**Table 5** Effects of JTP3309 in Terms of Reducing Splenomegaly and the Bacterial Load in the Visceral Organs of *M. fortuitum*-Infected Mice<sup>a)</sup>

Agent	Protocol <sup>b)</sup>	Dose ( $\mu$ g)	No. of mice	Fate	Survival time (day)	Log CFU/organ		Spleen /body weight (%)
						Spleen	Kidneys	
None	-	-	5	killed	$\geq 1$	6.31 $\pm$ 0.11	6.07 $\pm$ 0.14	0.51 $\pm$ 0.02
			5	died	3	5.55 $\pm$ 0.42	7.23 $\pm$ 0.18	0.51 $\pm$ 0.05
JTP3309	A	10	1	died	8	4.95	7.38	0.29
	A	10	4	killed	$\geq 14$	3.06 $\pm$ 0.04	5.40 $\pm$ 0.70	1.53 $\pm$ 0.71
	A	10	5	killed	$\geq 28$	<1.77 $\pm$ 0.00	3.98 $\pm$ 0.43	1.03 $\pm$ 0.41
	A	20	5	killed	$\geq 14$	2.98 $\pm$ 0.25	5.46 $\pm$ 0.50	1.89 $\pm$ 0.31
	A	20	5	killed	$\geq 28$	<1.77 $\pm$ 0.00	3.96 $\pm$ 0.63	0.63 $\pm$ 0.30
	B	10	5	died	3	5.47 $\pm$ 0.32	7.54 $\pm$ 0.13	0.46 $\pm$ 0.08
	B	20	5	died	3	5.24 $\pm$ 0.17	7.26 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.13

a) Mice were infected at day 0.

b) Mice were given i.v. injections of JTP3309 4 and 1 day(s) before infection (Protocol A), or 1, 3, 5, 12, 19, 26 days after infection (Protocol B).

しい上昇がみられ、感染4週目での生存率は10 $\mu$ g投与群で90%、20 $\mu$ g投与群では100%であった。

次に上記マウスの体重の推移、腎の肉眼的病変の有無とその程度並びに spinning disease 発現の様相は Table 4 に示すようである。すなわち、JTP3309 の10あるいは20 $\mu$ gの予防投与群中の生存マウスでは観察期間中わずかな体重の増加がみられたが、全例に腎病変がみられた。しかし、その程度は非投与対照群あるいは Protocol B による投与群での死亡マウスにおけるよりも軽微であった。spinning disease は JTP3309 投与群と非投与対照群の別なく感染早期に死亡したマウスではみられたものはなかったが、JTP3309 予防投与群における長期生存マウスでは、感染後平均12日目に発現し、本剤の投与量が多くなるほどその頻度は低くなる傾向がみられた。

次に、JTP3309 の予防投与群、治療投与群並びに非投与対照群での臓器内還元 CFU の推移についてみると Table 5 に示すようである。すなわち、JTP3309 の予防投与により観察期間中生存したマウスの脾および腎内還元 CFU は感染早期に死亡した非投与対照群におけるものよりも著しく低かったが、明らかな投与量依存性はみられなかった。また感染後3~8日目までに死亡したマウスでは、非投与対照群、JTP3309 の治療投与群および予防投与群の別なく、臓器内還元 CFU には有意な差はみられなかった。なお、JTP3309 の20 $\mu$ g 予防投与群では感染後一過性の脾の腫大がみられたが、28日目までには感染直後の脾重量：体重比とほぼ同程度にま

で軽減した。

## 考 察

近年、MAC 症に対する有効薬剤の探索が鋭意進められてはいるが、既存の薬剤よりも有効な薬剤は未だに得られておらず、既存の薬剤の組み合わせによる多剤併用療法や BRM との併用療法が試みられているというのが現状であろう。今回、われわれは毒性の低い lipid A-subunit 誘導体として新しく開発された宿主免疫賦活剤 JTP3309 の実験的 MAC 並びに *M. fortuitum* 感染マウスに対する防御並びに治療効果についての一連の検討を試みた。

MAC 感染に対する防御の主なエフェクター細胞はマクロファージであるとされている<sup>15)~18)</sup>。JTP3309 は M $\phi$  を含む各種の細胞表面上に存在する LPS 受容体を介して標的細胞を活性化し、サイトカインなどの産生を亢進する。また JTP3309 は好中球の活性酸素産生能やマクロファージの MCSF や IL-1 などのサイトカイン産生能の亢進作用を有し、M $\phi$  を介した T 細胞機能の活性化能を有するものと考えられる。

最近、鈴木らは宿主の感染抵抗性発現に主として多形核白血球や M $\phi$  が関与する感染に対して JTP3309 が防御効果を有することを見いだした(投稿準備中)。したがって、今回われわれは主にマクロファージが宿主の感染防御に関与することの知られている MAC 感染に対しても JTP3309 の有効性が期待できるのではないかと思われたのでその点について検討した。

Table 1, 2 に示したように *M. avium* を貪食した Mφ を JTP3309 で処理してもその抗 MAC 活性が特に増強される傾向はみられなかったが, JTP3309 の静脈内投与により誘導された Mφ では *M. avium* の貪食能のみならず, 培養経過中における抗 MAC 活性が有意に増強されることが分かった。このことは, JTP3309 による宿主 Mφ の抗 MAC 活性の亢進には予防的投与が必要であり, 治療効果はあまり期待できないこと, また JTP3309 それ自体の Mφ 活性化能はさほど強いものではないと考えられた。事実, Table 3, 4 に示したように治療投与についてみると *M. avium* 並びに *M. fortuitum* 感染の別なく JTP3309 には有意な効果がみられなかったのみではなく, プロトコールによっては増悪傾向すらみられた。これに対して JTP3309 を予防投与した場合にはいずれの菌による感染マウスでも臓器内還元 CFU に若干の低下が認められた。これは JTP3309 による Mφ の活性化, ひいては宿主免疫機能の増強作用に起因するものと考えられる。Saito ら<sup>19)20)</sup> は宿主免疫賦活剤である LC9018<sup>21)22)</sup>, OK-432<sup>23)</sup> あるいは MDP-Lys (18)<sup>24)</sup> では *M. intracellulare* 感染マウスに対して有意な治療効果を示さず, また Minocycline と併用投与した場合でも特に有意な治療効果の亢進はみられなかったという。したがって, 今回供試した JTP 3309 もまたこれら免疫強化剤の域を出ないものと言えよう。

#### ま と め

1) JTP3309 静脈内投与マウスより誘導されたマクロファージでは *M. avium* 貪食能, 抗 MAC 抗菌能の有意な増強がみられたが, JTP3309 非投与マウスにおいては *M. avium* を貪食させたマクロファージを JTP3309 で処理しても抗 MAC 抗菌活性は増強されなかった。

2) JTP3309 には *M. avium* 感染マウスに対して有意な治療効果は認められず, 逆に増悪効果すら認められる場合もあったが, 予防投与した場合には臓器内還元 CFU に若干の低下が認められた。

3) JTP3309 は *M. fortuitum* 感染マウスに対しても有意な治療効果は認められなかったが, 予防的投与した場合には臓器内還元 CFU の若干の減少および生存率の著しい上昇が認められた。

#### 文 献

- 1) Kotani S, Takada H, Tsujimoto M, et al. : Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from *Escherichia coli* re-
- mutant. *Infect Immun.* 1985 ; 49 : 225-237.
- 2) Galanos C, Luderitz O, Rietschel E T, et al. : Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* 1985 ; 148 : 1-5.
- 3) Homma JY, Matsuura M, Kanegasaki S, et al. : Structural requirement of lipid A responsible for the functions ; A study with chemically synthesized lipid A and its analogues. *J Biochem. (Tokyo)* 1985 ; 98 : 395-406.
- 4) Kotani S, Takada H, Takahashi I, et al. : Low endotoxic activities of synthetic *Salmonella*-type lipid A with an additional acyloxyacyl group on the 2-amino group of  $\beta$  (1-6) glucosamine disaccharide 1, 4-bisphosphate. *Infect Immun.* 1986 ; 52 : 872-884.
- 5) Imoto M, Yoshimura H, Yamamoto M, et al. : Chemical synthesis of a biosynthetic precursor of lipid A with phosphorylated tetraacyl disaccharide structure. *Bull Chem Soc Jpn.* 1987 ; 60 : 2197-2204.
- 6) Lehmann V : Isolation, purification and properties of an intermediate in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid-lipid A biosynthesis. *Eur J Biochem.* 1977 ; 75 : 257-266.
- 7) Strain SM, Armitage IM, Anderson L, et al. : Location of polar substituents and fatty acyl chains on lipid A precursors from a 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid deficient mutant of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* 1985 ; 260 : 16089-16098.
- 8) Kiso M, Ishida H, Hasegawa A : Synthesis of biologically active, novel monosaccharide analogs of lipid A. *Agr Biol Chem.* 1984 ; 48 : 251-252.
- 9) Kiso M, Tanaka S, Fujita M, et al. : Synthesis of the optically active, 4-O-phosphono-D-glucosamine derivatives related to the nonreducing-sugar subunit of bacterial lipid A. *Carbohydr Res.* 1987 ; 162 : 127-140.
- 10) Furio MA, Wordell CJ : Treatment of infections complications of acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharm.* 1985 ; 4 : 539-554.

- 11) Saito H, Sato K, Tomioka H : Comparative *in vitro* activity of rifabutine and rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle*. 1988 ; 69 : 187-192.
- 12) 斎藤 肇, 佐藤勝昌, 富岡治明 : *Mycobacterium avium* complex 感染マウス並びに感染マクロファージ内菌動態に及ぼす Rifabutine 並びに Rifampicin の効果. *結核*. 1988 ; 63 : 173-179.
- 13) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇 : ニューキノロン系薬剤, Y-26611 の *in vitro* 並びに *in vivo* 抗マイコバクテリア活性. *結核*. 1992 ; 67 : 515-520.
- 14) Saito H, Sato K, et al. : Activities of ceftiofime and cefotetan against *Mycobacterium fortuitum* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984 ; 26 : 270-271.
- 15) Saito H, Tomioka H : The role of macrophages in host defence mechanisms against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Res Microbiol*. 1990 ; 141 : 206-212.
- 16) Rastogi N : Killing intracellular mycobacteria in *in vitro* macrophage system : What may be the role of known host microbicidal mechanisms? *Res Microbiol*. 1990 ; 141 : 217-230.
- 17) Benson CA, Ellner JJ : *Mycobacterium avium* complex infection and AIDS ; Advances in theory and practice. *Clin Infect Dis*. 1993 ; 17 : 7-20.
- 18) Orme IA : Immunity to mycobacteria. *Curr. Opin Immunol*. 1993 ; 5 : 497-502.
- 19) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇 : 実験的 *Mycobacterium intracellulare* 感染に対する Kanamycin あるいは Clofazimine と Muramyl dipeptide 誘導体との併用効果. *結核*. 1991 ; 66 : 811-817.
- 20) Saito H, Nagashima K, Tomioka H : Effects of bacterial immunopotentiators, LC9018 and OK-432, on the resistance against *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *Hiroshima J Med Sci*. 1983 ; 32 : 145-148.
- 21) Kato I, Kobayasi S, Yokokura T, et al. : Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann*. 1981 ; 72 : 517-523.
- 22) Sato K : Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei* : role of macrophages. *Infect Immun*. 1984 ; 44 : 445-451.
- 23) Mashiba H, Gojobori M, Matsunaga K : Antitumor effect of combined use of OK-432 and yeast cell wall with mitomycin-C in mice. *Gann*. 1977 ; 68 : 703-708.
- 24) Otani T, Une T, Osada Y : Stimulation of nonspecific resistance to infection by muroctasin. *Arzneim. Forsch. Drug Res*. 1988 ; 38(II) : 969-976.