

原 著

マウス実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染症に対する
ベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648 の *in vivo*
治療効果発現に及ぼすグリチルリチン投与の影響

¹清水 利朗 ¹富岡 治明 ¹佐藤 勝昌 ²赤木 竜也
³小笠原圭子 ⁴河原 伸

¹島根医科大学微生物・免疫学, ²同皮膚科, ³同耳鼻咽喉科, ⁴国立療養所南岡山病院内科

THERAPEUTIC EFFECTS OF BENZOXAZINORIFAMYCIN KRM-1648
ADMINISTERED ALONE OR IN COMBINATION WITH GLYCYRRHIZIN
AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX INFECTION IN MICE

¹Toshiaki SHIMIZU, ^{1*}Haruaki TOMIOKA, ¹Katsumasa SATO, ²Tatsuya AKAKI,
³Keiko OGASAWARA, and ⁴Shin KAWAHARA

^{1*}Department of Microbiology and Immunology, ²Department of Dermatology, ³Department of
Otorhinolaryngology, Shimane Medical University, and Department of Internal Medicine,
⁴National Sanatorium, Minami-Okayama Hospital

We previously examined the effects of a Chinese medicine "Mao-Bushi-Saishin-To" (MBST) which has anti-inflammatory activity on the therapeutic efficacies of a benzoxazinorifamycin, KRM-1648 (KRM), against *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection induced in mice. MBST potentiated the therapeutic activity of KRM against MAC infection. In the present study, we examined the effects of another anti-inflammatory drug Glycyrrhizin, which is effective for chronic hepatitis, on the therapeutic efficacy of KRM against MAC infection induced in mice. First, KRM significantly inhibited the bacterial growth in the lungs and spleen of MAC-infected mice. Glycyrrhizin exhibited no therapeutic activity against MAC infection and did not affect the expression of the therapeutic efficacy of KRM. Secondly, treatment of murine peritoneal macrophages (M ϕ s) with Glycyrrhizin caused no significant changes in the M ϕ anti-MAC activity.

Key words : *Mycobacterium avium* complex,
KRM-1648, Glycyrrhizin

キーワード : *Mycobacterium avium* complex,
KRM-1648, グリチルリチン

*〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

* 89-1 Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan.
(Received 10 Mar. 1999/Accepted 26 May 1999)

はじめに

抗酸菌特に *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染マウスの化学療法経過中には、感染初期に感染菌の一過性の減少をみた場合でも、感染 2~4 週以降の phase では、クラリスロマイシン (CAM) やベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648 (KRM) などの多剤併用投与群においても菌の再増殖が認められることが多い¹⁾²⁾。先にわれわれは、MAC 感染マウスでの抗炎症性サイトカインの発現動態について検討し、感染部位での菌の再増殖パターンと transforming growth factor- β (TGF- β) ならびに IL-10 の発現レベルとの間に密接な関連があることを見だしている³⁾。このことから、M ϕ 機能抑制作用を有する免疫抑制性サイトカインである TGF- β や IL-10^{4)~10)} などの働きにより、感染部位でのマクロファージ (M ϕ) や Th1 細胞からの TNF- α あるいは IFN- γ などの M ϕ 活性化サイトカインの産生が down-regulate されることが組織内での MAC 感染菌の再増殖の一因となっている可能性が考えられる。このような免疫抑制性サイトカインの産生誘導は、抗酸菌感染宿主における過剰な細胞性免疫反応の亢進、特に感染 M ϕ における過剰な活性化によりもたらされるものと考えられるので¹¹⁾¹²⁾、M ϕ の機能亢進を沈静化させ得るような何らかの抗炎症剤の投与により、そのような過剰な免疫反応を制御し、ひいては MAC 感染宿主におけるこれら免疫抑制性サイトカイン産生を抑制することによって、化療経過中での感染菌の再増殖を抑えることもあるいは可能ではないかも考えられる。因みに、われわれの検討では、抗炎症作用を有するとされる麻黄附子細辛湯を MAC 感染マウスに投与することにより、KRM の治療効果発現が有意に増強されることが明らかになっている¹³⁾。

そこで今回は、このような観点に立ち、KRM による MAC 感染マウスの治療に、副腎皮質ホルモン類似の抗アレルギー作用および抗炎症作用を有し、薬疹や慢性肝炎などに効果のある抗炎症剤であるグリチルリチン^{14)~18)} を供試して、実験的マウス MAC 感染モデル系での KRM の *in vivo* 治療効果の発現に及ぼす本剤投与の影響ならびにマウス腹腔 M ϕ の抗 MAC 殺菌能発現に及ぼす作用について若干の検討を加えた。また、グリチルリチンには、現在のところインターフェロン療法以外に特に有効な治療剤のない C 型肝炎に対して肝炎の沈静化作用、あるいはその長期投与によっては肝硬変や肝細胞癌への進展を抑制する効果が報告されており¹⁸⁾、わが国では C 型肝炎を併発した MAC 症患者へ本剤の投与を行うような場合も少なくはないように思われる。この場合、最も問題になるのはグリチルリチンと

抗 MAC 化学療法剤との薬物相互作用であり、したがって、今回の研究目的の一つには、KRM での治療下にグリチルリチンを併用投与した場合に MAC 症の化学療法に対して何らかの不利な影響がもたらされる可能性があるのか否かという問題についての解答を得ることも含まれている。

材料と方法

1) 供試菌：MAC 患者より分離された *M. intracellulare* N-260 株 (血清型 16) を用いた。本菌株はマウスに対して強いビルレンスを有しており¹⁹⁾、本菌株に対する KRM の 7H11 培地上での MIC は 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

2) 供試薬剤：グリチルリチン (グリチロン注一号：ミノファージェン製薬) および KRM (鍾淵化学工業) を供試した。なお、グリチロン注一号は 20mg/ml のグリチルリチンを含有する水性注射剤として入手している。また、KRM は M ϕ 培養実験ではまず dimethyl sulfoxide に溶解させ、これをさらに培地で希釈したものを、また *in vivo* 実験では 2.5% アラビアゴム加 0.2% Tween 80 水に懸濁させたものを用いている。

3) マウス実験的 MAC 感染：5 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本クレア) に MAC の 2×10^6 を静脈内感染させ、翌日より臨床投与量相当 (20mg/kg) の KRM をゾンデを用いて週 1 回あて 8 週間にわたって経口投与した。また、グリチルリチンは 1 日 1 回、週 6 回、2mg/kg 宛の皮下投与を行った。所定日にマウスを屠殺・剖検し、肺ならびに脾を摘出し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 寒天平板上で計測した。

4) マウス腹腔 M ϕ 内貪食 MAC 菌に対する抗菌作用

既報の方法¹³⁾ に準じて測定した。すなわち、Zymosan A 誘導マウス腹腔渗出細胞を型のごとく調製し、この細胞の 5% 牛胎児血清 (FBS: Bio Whittaker) 加 RPMI 1640 培地浮遊液 ($5 \times 10^6/\text{ml}$) の 8ml を 14mm 径の細胞培養用プラスチックシート (和光純薬工業) を敷き詰めた 90mm 径の細胞培養用プレート (Becton Dickinson) にまき、5% CO₂ 下 37°C で 2 時間培養後、プラスチックシートを 2% FBS 加 ハンクス氏液中で軽く濯ぐことにより、M ϕ 単層培養 (M ϕ モノシート) を得た。次いで、得られた M ϕ モノシートを 16mm 径の細胞培養用ウェル (Becton Dickinson) に入れ、所定濃度のグリチルリチンを含む培地中で 2 日間にわたり培養した後、一度 2% FBS-HBSS で洗い、次いで供試 MAC 菌の 1×10^6 CFU を加えた新鮮培地中 (0.5ml) で 2 時間インキュベートすることにより M ϕ 細胞に供

Table 1 Therapeutic effects of KRM, Glycyrrhizin, and KRM plus Glycyrrhizin against MAC infection in mice^{a)}

Drugs	Dose (mg/kg)	Log CFU/lungs		Log CFU/spleen	
		Day 1	Week 8	Day 1	Week 8
None	0	3.28 ± 0.10	6.43 ± 0.10	5.01 ± 0.05	7.55 ± 0.12
KRM	20	N.D. ^{c)}	5.12 ± 0.04 ^{d)}	N.D.	7.02 ± 0.05 ^{d)}
Glycyrrhizin	2	N.D.	6.18 ± 0.06	N.D.	7.43 ± 0.04
KRM+Glycyrrhizin	20/2	N.D.	4.96 ± 0.06 ^{d)}	N.D.	7.24 ± 0.04 ^{d)}

^{a)} Mice infected i.v. with MAC N-260 (2×10^6 CFU) were given or not given the indicated drugs by gavage either once weekly (KRM) or once daily, six times per week (Glycyrrhizin), from day 1 for up to 8 weeks.

^{b)} The mean ± S.E.M. (5 mice per regimen).

^{c)} Not determined.

^{d)} Significantly smaller than the value of untreated control mice. ($p < 0.05$; Student's *t*-test).

Table 2 Effects of KRM, Glycyrrhizin, and KRM plus Glycyrrhizin on Mφ anti-MAC activity^{a)}

Drugs	Concentration (μg/ml)	Log CFU/well ^{b)}	
		Day 0	Day 5
None		4.74 ± 0.07	5.39 ± 0.01
KRM	0.05	N.D. ^{c)}	4.51 ± 0.03 ^{d)}
Glycyrrhizin	5	4.86 ± 0.04	5.26 ± 0.00
KRM+Glycyrrhizin	0.05/0.5	N.D.	4.66 ± 0.09 ^{d)}
KRM+Glycyrrhizin	0.05/5	N.D.	4.41 ± 0.09 ^{d)}
KRM+Glycyrrhizin	0.05/50	N.D.	4.34 ± 0.10 ^{d)}

^{a)} Mφs were preincubated in the presence or absence of Glycyrrhizin at indicated concentrations for 2 days, thereafter infected with MAC for 2 hr, and further cultivated in the presence or absence of 0.05 μg/ml KRM with or without the addition of Glycyrrhizin at corresponding doses for up to 5 days.

^{b)} The mean ± S.E.M. (n=4).

^{c)} Not determined.

^{d)} Significantly smaller than that of control Mφs ($p < 0.01$; Student's *t*-test).

試菌を感染させた。次いで、非貪食菌を2% FBS-HBSSで洗浄除去した後、0.05 μg/mlのKRMおよび0.5~50 μg/mlのグリチルリチンを含む培地(1ml)中で5日間の培養を行った後、これに0.23% SDSの0.4mlを加え10分間静置してMφを溶解させた。これをあらかじめ0.6mlの20%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食水を入れた試験管へ移しSDSを中和した後、得られたMφ lysate中の生菌単位を7H11寒天平板上で計測した。なお、本実験では10μlの希釈菌液を7H11寒天上にスポットし、37°C、7日間の培養後に生じたマイクロコロニー数を実体顕微鏡(15×)下でカウントしている。

結 果

1. MAC感染症に対するKRMの治療効果に対す

るグリチルリチン投与の影響

Table 1は、MAC感染症に対するKRMの治療効果発現に及ぼすグリチルリチンの影響を、感染マウスの肺および脾内生菌数の推移を指標としてみたものである。KRM単独投与によって、肺および脾内での感染菌の増殖に感染8週後で各々1.3および0.5 log unitsの抑制が認められたが($p < 0.05$)、グリチルリチン単独投与では、各々0.3および0.1 log unitsの低下にとどまり有意な増殖抑制作用は認められなかった。また、グリチルリチンはKRMと併用した場合でも、KRMの*in vivo*抗MAC抗菌活性発現に有意な影響を及ぼしてはならず、KRMとグリチルリチンとの併用投与群での感染8週後での肺と脾でのbacterial loadは、KRM単独投与群でのそれに比べて各々0.2および-0.2 log unitsの減少を見たに過ぎなかった。このことより、グリチル

リチンはKRMの治療効果の発現を特に修飾するものではないことが分かった。

2. M ϕ 内感染MAC菌に対するKRMの抗菌活性発現に対するグリチルリチンの影響

Table 2は、M ϕ 内感染MAC菌に対するKRMの*in vitro*抗菌活性発現に対するグリチルリチンの作用について、M ϕ 内局在MAC菌の細胞内挙動を指標としてみたものである。MAC感染M ϕ を5日間にわたって培養したところ、MAC菌の0.7 log unitsの細胞内増殖が認められた($p < 0.05$)。他方、KRMを添加した系では細胞内菌数が培養開始時点に比べて約0.2 log unitsの減少がみられ、さらにKRM非添加の系に比べて5日目での細胞内CFU値に0.9 log unitsの低下が認められることから、KRMはM ϕ 局在MAC菌に対して増殖阻害活性のみならず若干程度の殺菌活性を示すことが分かった。これに対して、M ϕ をグリチルリチンで前処理後、MAC感染M ϕ をさらにグリチルリチン存在下で培養した場合では0.1 log unitsの抑制にとどまり、MAC菌の細胞内増殖に有意な影響は認められなかった。また、KRMとグリチルリチンとを併用した場合は、高濃度(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のグリチルリチンの併用で、KRM単独添加の場合に比べてわずかに0.2 log unitsの細胞内CFU減少を認めたに過ぎず、有意なものとは言えなかった。

考 察

難治性感染症としての抗酸菌症の特異な病像を規定するものは、おおむねMACを含む抗酸菌の持つ極めて強いM ϕ 内殺菌抵抗性と免疫原性の2つであり、これに起因して起こるTh2タイプの抑制性サイトカインカスケードの活性化が、抗酸菌感染症の難治化に重要な意味を持っているものと考えられる^{11) 12)}。このような観点に立ち、今回はKRMによるMAC感染マウスの治療に抗炎症作用を有することの知られるグリチルリチン^{14) ~ 18)}を併用投与する試みを行ったが、Table 1に示したように、グリチルリチンそのものにはMAC感染症に対する*in vivo*治療効果は認められず、さらにKRMの治療効果発現、あるいはM ϕ 内局在MAC菌に対するKRMの*in vitro*抗菌活性発現のいずれもが、グリチルリチンの併用によっては特に影響を受けないことが分かった。

ところで、われわれの別途行った検討では、ステロイド系および非ステロイド系の抗炎症剤や抗炎症作用を有する漢方製剤(ヨクイニン、麻黄附子細辛湯)およびsecretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)などの種々の薬剤のMAC感染M ϕ のTGF- β やIL-10産生能に及ぼす作用は各薬剤ごとにまちまちであり、はっ

きりとした一定の傾向は認められない^{13) 20) ~ 22)}。このことは、*in vivo*の系にも当てはまる訳であり、これら抗炎症性薬剤のMAC感染宿主への投与により、*in vivo*でのTGF- β やIL-10発現レベルを一律に制御することは極めて難しいものといえる。これに関連して、これらの抗炎症剤の中では今回検討したグリチルリチンを含めても、わずかに麻黄附子細辛湯のみにMAC感染マウスに対するKRMの治療効果の発現を増強する活性が認められているに過ぎないことは注目に値する^{13) 21) ~ 23)}。これらの成績は、MAC感染マウスへの抗炎症剤投与によりKRMの治療効果を感染菌の排除を助長する方向で修飾しようとするわれわれの試みは、期待された成績を得るには至らなかったということを意味している。

ところで、今回供試のグリチルリチンをはじめとしてジクロフェナクNa、ヨクイニンおよびSLPIなどの抗炎症性薬剤は、KRMの治療効果を助長する活性を示し得なかったものの、逆にKRMの治療効果に対して拮抗的に働くこともなかった^{13) 21) ~ 23)}。したがって、MAC感染患者のKRMを含むプロトコールによる化学療法施行中に、MAC症治療とは別の目的でこれらの抗炎症性薬剤を投与した場合でも、少なくともKRMの治療効果発現を減弱させるようなかたちでの薬物相互作用を引き起こすような可能性は低いものように思われる。

謝 辞

KRM-1648およびグリチルリチンを分与頂いた鐘淵化学工業株式会社および株式会社ミノファーゲン製薬に深謝します。また、この研究で供試した*M. intracellulare* N-260株は前任教授斎藤肇先生のご指導での研究中に分離されたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 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.
- 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) Tomioka H, Sato K, Shimizu T, et al.:

- Effects of benzoxazinorifamycin KRM-1648 on cytokine production at sites of *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 357-362.
- 4) Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C: Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med.* 1991; 174: 1549-1555.
 - 5) De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M-G, et al.: Interleukin-10. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4: 314-320.
 - 6) Wahl SM: Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a care. *J Clin Immunol.* 1992; 12: 61-73.
 - 7) Hausmann ES, Hao S, Pace J, et al.: Transforming growth factor β 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Infect Immun.* 1994; 62: 3625-3632.
 - 8) Bermudez LE, Champsi J: Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. *Infect Immun.* 1993; 61: 3093-3097.
 - 9) Denis M, Ghadrian EJ: IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. *J Immunol.* 1993; 151: 5425-5430.
 - 10) Bermudez LE: Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . *J Immunol.* 1993; 150: 1828-1845.
 - 11) 富岡治明: 抗酸菌感染症が難治性である理由を探る. *日本細菌学雑誌.* 1995; 50: 687-701.
 - 12) 富岡治明: 抗酸菌症と免疫. *臨床と微生物.* 1997; 24: 45-52.
 - 13) Shimizu T, Tomioka H, Sato K, et al.: Effects of the Chinese traditional medicine Mao-Bushi-Saishin-To on therapeutic efficacy of a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 514-519.
 - 14) 畔柳武雄, 栗栖 明, 杉山 始, 他: Prednisolone および Glycyron の実験的アレルギー性肝炎におよぼす影響. *日新医学.* 1957; 49: 458-465.
 - 15) 畔柳武雄: Glycyrrhizin の抗アレルギー作用機作に関する研究. *Minophagen Medical Review.* 1967; 12: 29-40.
 - 16) 熊谷 朗: 甘草, 特にグリチルリチンの薬理作用と臨床応用への問題点. *Minophagen Medical Review.* 1980; 25: 185-194.
 - 17) 大内和雄, 鶴藤 丞: ラット腹腔マクロファージによる Prostaglandin E₂ 産生に対する Glycyrrhizin の抑制効果. *Minophagen Medical Review.* 1982; 16: 188-192.
 - 18) 荒瀬康司, 池田健次, 茶山一彰: 慢性 C 型肝炎に対するグリチルリチン製剤の長期的効果. *Minophagen Medical Review.* 1998; 43: 114-115.
 - 19) Tomioka H, Saito H, Sato K, et al.: Comparison of the virulence for mice of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* identified by DNA probe test. *Microbiol Immunol.* 1993; 37: 259-264.
 - 20) 清水利朗, 佐野千晶, 富岡治明, 他: マウス腹腔マクロファージの *Mycobacterium avium* complex 菌体刺激によって誘導される IL-10 産生に及ぼす諸種ステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤の影響. *感染症学雑誌.* 1997; 71: 910-917.
 - 21) Sano C, Shimizu T, Tomioka H, et al.: Therapeutic effects of benzoxazinorifamycin KRM-1648 administered alone or in combination with a half-sized secretory leukocyte protease inhibitor or the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 360-364.
 - 22) Shimizu T, Tomioka H, Sato K, et al.: Effects of Yokuinin on the therapeutic efficacy of a new benzoxazinorifamycin KRM-1648 against *Mycobacterium avium* infection. *Int J Antimicrob Agents.* 1999; 11: 69-74.
 - 23) 佐藤勝昌, 清水利朗, 富岡治明, 他: マウス実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染に対する KRM-1648 の治療効果に及ぼす half-sized secretory leukocyte protease inhibitor, ヨクイニンおよび麻黄附子細辛湯の影響. *結核.* 1998; 73: 501-506.