

原 著

マウス実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染症に
 対する KRM-1648 の *in vivo* 治療効果ならびにサイトカイン
 遺伝子発現に及ぼす接種菌量の影響

¹清水 利朗 ^{1,2}小笠原圭子 ¹佐藤 勝昌 ¹佐野 千晶
¹富岡 治明

¹島根医科大学微生物・免疫学, ²耳鼻咽喉科

PROFILES OF EXPRESSION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF
 KRM-1648 IN MICE INFECTED WITH *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX
 AT DIFFERENT CHALLENGE DOSES

¹Toshiaki SHIMIZU, ^{1,2}Keiko OGASAWARA, ¹Katsumasa SATO,
¹Chiaki SANO, and ^{1*}Haruaki TOMIOKA

^{1*}*Department of Microbiology and Immunology and*
²*Department of Otorhinolaryngology, Shimane Medical University*

Studied were made on the profiles of the therapeutic efficacy of KRM-1648 (KRM) against *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection, which was induced in mice at different challenge doses, in reducing bacterial growth in the visceral organs and altering the profiles of cytokine mRNA expression at the sites of infection. First, bacterial growth in the lungs of mice infected with either high or low challenge doses of MAC, was reduced due to KRM treatment. This effect was noted even in the early phase of infection (week 4) in mice, that were given a high-dose infection. Second, marked therapeutic efficacy of KRM was observed in mice, that were given low-dose MAC infection, in terms of the reduction in bacterial loads in the spleen. However, in mice given a high-dose bacterial challenge, KRM did not exhibit such an efficacy. Third, the expression of both proinflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β) in mRNA levels were increased at 4 weeks after infection. Notably, all of the cytokines tested for the mRNA expression levels were higher in mice given a low-dose MAC infection as compared to those in mice given a high-dose infection. KRM treatment increased the mRNA levels of these cytokines at week 4, while TGF- β mRNA expression at week 8 was conversely decreased by KRM treatment. These findings suggest that the profiles of the therapeutic efficacy of KRM vary in mice given low- or high-dose MAC infection.

*〒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 Oct. 2000/Accepted 1 Mar. 2001)

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

キーワード: *Mycobacterium avium* complex, KRM-1648, サイトカイン

はじめに

われわれは先に、ベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648 (KRM) はマウスでの *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症に対して感染初期では優れた治療効果を示し、感染マウスの生存日数の著明な延長が認められるが、本薬剤の投与にもかかわらず死亡したマウスの臓器内生菌数は、かえって薬剤非投与マウスのそれよりも1~2オーダー多くなる傾向が認められることを報告した¹⁾²⁾。同実験では、比較的少量の MAC 菌 (約 10^7 CFU) を静脈内接種することにより MAC 感染症を惹起しており、上述のような不可思議な現象は、このようなところ (特に高接種菌量) に起因したものである可能性が考えられる。また、われわれは MAC 感染マウスの脾臓と肺における諸種のサイトカイン (CK) の発現の様相について調べたが³⁾⁴⁾、薬剤非投与マウスでの各種 CK 発現の様相に関しては再現性のよい成績が得られたものの、KRM 投与の影響についての成績は、実験条件 (特にマウスへの感染菌量) によりかなり変動する傾向が認められた⁵⁾。

今回は上述のような問題点についての考察を加えるべく、高・低両接種菌量で惹起した実験的マウス MAC 感染症における KRM の治療効果について比較検討するとともに、KRM 投与あるいは非投与の感染マウスの脾臓におけるサイトカイン遺伝子の発現の様相が接種菌量の違いによってどのような影響を受けるのかについても若干の検討を加えた。

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いる⁶⁾。
2. 供試薬剤: KRM (鐘淵化学工業) 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た。
3. マウス実験的 MAC 感染: 6 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本クレア) に MAC の 5×10^3 CFU あるいは 1×10^7 CFU を静脈内感染させ、感染 6 日後より臨床投与量相当 (50 mg/kg) の KRM をゾンデを用いて週 1 回宛て 8 週間にわたって経口投与した。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. 感染マウス脾臓での各種 CK の mRNA 発現

MAC 感染 4 および 8 週後のマウスより脾臓を摘出し、既報の方法⁴⁾に準じて、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、TGF- β の mRNA 発現を RT-PCR 法で測定した。すなわち、脾臓より total RNA を抽出し、oligo-dT primer と SUPERSCRIPIT II 逆転写酵素 (ライフテックオリエンタル) を用いて cDNA を調製し、次いで各 CK に特異的な primer を用いての PCR (94°C, 1分; 58°C, 2分; 72°C, 2分; 25 サイクル) を行い、2% agarose ゲル電気泳動により増幅バンドを検出した。なお今回は、下記の primer を使用した: TNF- α : AGC CCACGTCGTAGCAAACCACCAA/ACACCCAT TCCCTTACAGAGCAAT; IFN- γ : GAAAGCC TAGAAAGTCTGAATAACT/ATCAGCAGCGA CTCCTTTTCCGCTT; IL-10: TGACTGGCATGAGGATCAGCAG / ATCCTGAGGGTCTTCAGCT T; TGF- β : AGCCCTGGATACCAACTATTGCT TCAGCTCCACAG/AGGGGCGGGGCGGGGCG GGGCTTCAGCTGC。

結 果

1. 高ならびに低菌量感染マウスにおける KRM の治療効果発現

Fig. 1, 2 は、高ならびに低菌量の MAC を感染させたマウスに週 1 回宛て KRM の経口投与を行った場合の治療効果発現の様相を臓器内生菌数の推移を指標として比較したものである。肺内生菌数を指標とした場合、高菌量感染マウスでは KRM 投与による治療効果は既に感染 4 週後から認められるが (Fig. 1A)、低菌量感染マウスでは感染 8 週になって初めてそうした治療効果が認められることが分かった (Fig. 1B)。なお、感染 8 週後における非投与対照群の肺内生菌数に対する、KRM 投与マウスの同生菌数の減少率、すなわち KRM の治療効果発現の程度は、接種菌量の多寡により変わることはなかった (Fig. 1A, 1B)。

これに対して、脾内生菌数の推移を指標としてみた場合 (Fig. 2)、高菌量感染マウスでは感染 4 週後のみならず 8 週後においても KRM 投与による治療効果はほとんど認められなかったが (Fig. 2A)、他方、低菌量感染マウスでは感染 8 週後には KRM 投与による脾内生菌数の減少が明確に認められた (Fig. 2B)。

2. 高ならびに低菌量感染マウスの脾臓における諸種

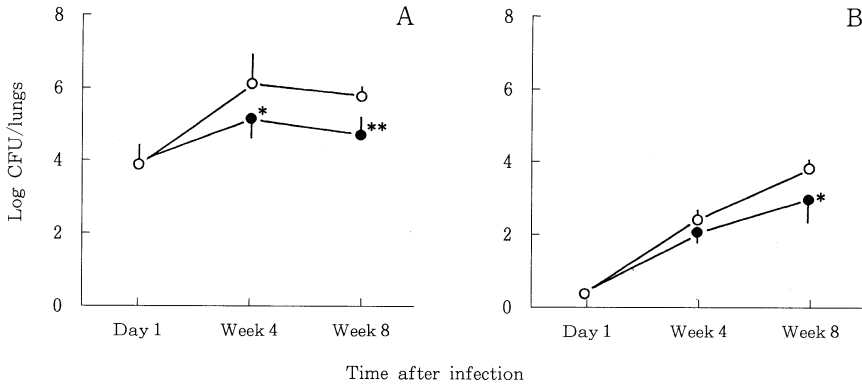


Fig. 1 Profiles of bacterial growth of MAC in the lungs of infected mice treated (●) or not treated (○) with KRM. Mice were infected with a high dose (1×10^7 CFU) (A) or a low dose (5×10^3 CFU) (B) of MAC. *, **: $P < 0.25$ and $P < 0.1$ vs the control mice (Student's *t*-test).

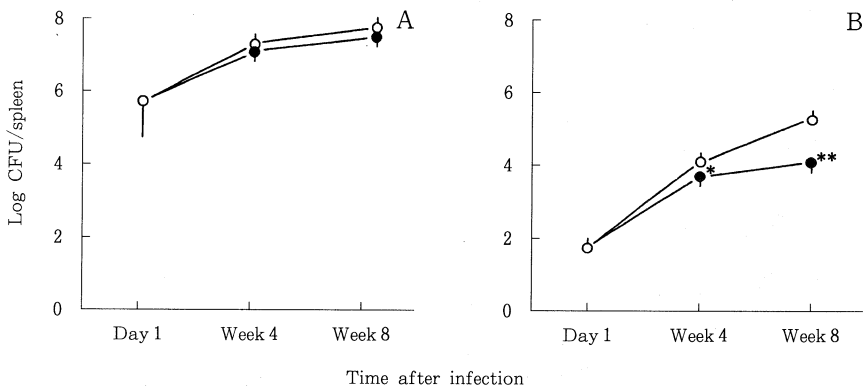


Fig. 2 Profiles of bacterial growth of MAC in the spleen of infected mice treated (●) or not treated (○) with KRM. Mice were infected with a high dose (1×10^7 CFU) (A) or a low dose (5×10^3 CFU) (B) of MAC. *, **: $P < 0.1$ and $P < 0.01$ vs the control mice (Student's *t*-test).

CK 発現と KRM 投与の影響

抗 MAC 免疫の誘導・発現に及ぼす KRM 投与の影響について調べる目的で、高ならびに低菌量の MAC を感染させたマウスの脾における炎症性 CK (TNF- α , IFN- γ) および抗炎症性 CK (IL-10, TGF- β) の mRNA 発現の様相について検討した。Fig. 3 には、RT-PCR 法によって得られた成績を示す。まず炎症性 CK については、(1) TNF- α mRNA は、特に感染 4 週目の低菌量感染マウスで多く発現すること、さらに接種菌量の多寡によらず KRM 投与は感染 4 週目での発現を増強させ、感染 8 週目では逆に低下させること、(2) IFN- γ mRNA の発現は、低菌量感染マウスの感染 4

週目の脾臓のみに認められ、上述の TNF- α の場合と同様、KRM 投与により増強されることが明らかになった。

また、抗炎症性 CK については、(3) IL-10 mRNA 発現は、接種菌量の多寡にかかわらず感染 4 週目に認められ、低菌量感染でより顕著であること、さらにいずれの場合とも KRM 投与による発現増強が認められること、(4) TGF- β mRNA は、いずれの接種菌量感染の場合とも、感染 4 週後から 8 週後にかけて発現増強が認められ、いずれの phase でもその程度は低菌量感染マウスでより著しいこと、さらに KRM 投与は接種菌量の多寡にかかわらず、感染 4 週目では遺伝子の発現増強を、逆に感染 8 週目では発現低下を引き起こすことが分

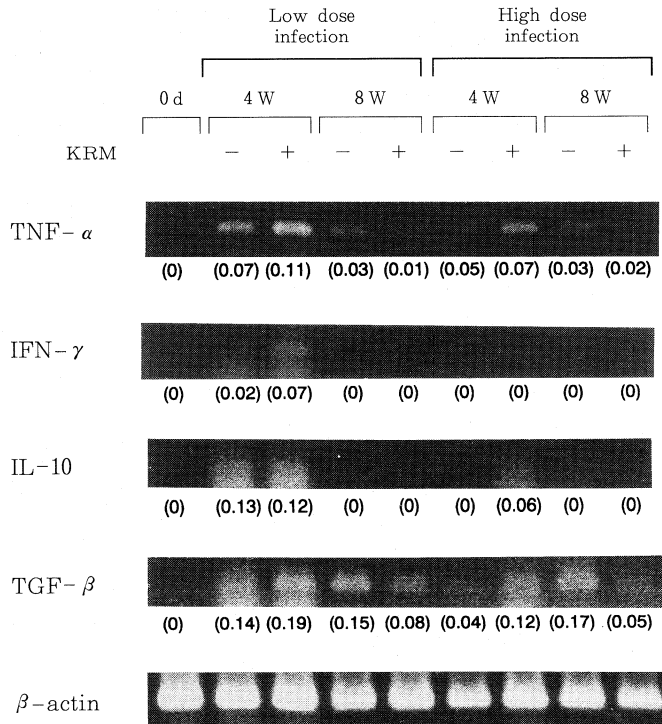


Fig. 3 Profiles of the expression of TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β mRNAs in the spleen of MAC-infected mice at different challenge doses. In parentheses, the ratio of each cytokine band/ β -actin band is indicated.

かった。

考 察

今回の検討により、MAC感染マウスに対するKRMの治療効果の発現の様相には、接種菌量の多寡により若干の差異が認められることが明らかになった。特に肺内生菌数を指標とした場合、低菌量感染では明確でなかった感染4週目におけるKRMの治療効果が高菌量感染においてははっきりと認められている。従って、肺内生菌数を指標とするならば、高菌量感染モデルを用いた方がKRMの治療効果を感染のより早期から評価できる。他方、脾内生菌数を指標とした場合には、感染8週においてもKRMの治療効果が明確ではなかった高菌量感染マウスに対して、低菌量感染マウスでは有意な治療効果を認めた。従って、脾内生菌数の推移を指標とする場合は、低菌量でのMAC感染モデルの方が高菌量での感染モデルに比べて、薬剤の治療効果をより鋭敏に反映しうるものと考えられる。なお、この成績は静脈内感染系

についてのものであるが、経気道感染モデルにおいても同様な可能性が考えられる。土井⁷⁾は経気道感染系と静脈内感染系とを用い、いずれの場合とも接種菌量を 10^6 CFUとしてKRMの*in vivo*抗結核菌活性を比較検討しているが、KRMの治療効果は経気道感染モデルにおいてより明確に認められると報告している。この場合、経気道感染モデルでの接種菌量を少なくした場合にはKRMの治療効果発現にはどのような影響が現れるのであろうか。興味深い問題である。

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、概ねMACを含む抗酸菌の持つ極めて強いマクロファージ内殺菌抵抗性と免疫原性の2つであり、これに起因する強力なTh1タイプの免疫誘導が宿主抵抗性発現と病態形成に重要な関わりを有しており、さらにはTh2タイプの抑制性CKネットワーク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^{8)~10)}。今回はこうした問題との関連で、接種菌量の異なるMAC感染マウスでの各種CKの発現

の様相, さらに, これら CK 発現に及ぼす KRM 治療の影響について比較検討した訳であるが, 興味深いことに, TNF- α や IFN- γ などの炎症性 CK のみならず IL-10 や TGF- β などの抗炎症性 CK の mRNA のいずれもが, 低菌量感染マウスの場合に高菌量感染マウスに比べて強く発現した。このことは, 高菌量感染系では, 何らかの原因による免疫不応性が感染のかなり早期に誘導されている可能性を示唆している。先に報告したように, $10^7 \sim 10^8$ という高菌量の MAC の静脈内感染を受けたマウスでは, 感染 2~3 週後に脾臓に強力なサブレッサーマクロファージの誘導とそれに起因した T 細胞のマイトゲン応答能の低下が認められるが^{11) 12)}, このような免疫抑制性マクロファージの働きによる免疫不応性も高菌量感染マウスでの感染病態を考える上で重要な問題となろう。因みに, MAC 感染後の各種サイトカイン mRNA の発現の推移について特に, TNF- α と IL-10 についてはいずれの接種菌量の場合も感染 4 週後に増強されるものの, 8 週後には低下するといった現象がみられており, 同様の成績が ELISA 法でこれら CK の蛋白レベルでの発現の推移を追跡した場合にも得られている³⁾。MAC 感染 4 週以後の phase でこうした現象が起こる原因としては, ①感染 4 週以降の phase に発現量を増す TGF- β あるいは感染後 2~4 週に発現量を増す IL-10 などの免疫抑制性サイトカインによるマクロファージ機能の抑制³⁾ や②MAC 感染後 2~4 週で誘導されるサブレッサーマクロファージによる抑制, 特に Th 1 応答の down-regulation^{11) 12)} などが考えられる。

今回の検討での MAC 感染マウスの脾臓における感染 4 週および 8 週後での各種 CK の mRNA 発現の様相は, 接種菌量の多寡を問わず, 先の ELISA を用いた蛋白レベルにおける発現成績^{3) 4)} と概ね軌を一にするものであった。しかしながら, 感染 4 週後のマウスにみられた各種 CK の mRNA 発現に及ぼす KRM 投与の影響については, 今回の検討で得られた成績と先の検討で得られたそれ^{3) 4)} との間に若干の乖離が認められている。現在この乖離現象を解明するために, 感染マウスの肺での各種 CK の mRNA 発現の測定のみならず, 別の抗 MAC 抗菌剤 (特にクラリスロマイシン) を供試しての検討を含めてさらに詳細な研究を進めつつあるが, その成績については別途報告したい。

ま と め

高・低両接種菌量 MAC 感染マウスでの KRM の治療効果発現の様相を臓器 (肺・脾) 内生菌数の推移と各種 CK 発現を指標として比較検討したところ, 以下の成績が得られた。(1) 感染マウスでの肺内生菌数を指標とした場合, 高菌量感染マウスでは KRM の治療効果が

低菌量感染マウスに比べてより早期に認められた。(2) 脾内生菌数を指標にした場合には, KRM の治療効果は低菌量感染系でのみ認められた。(3) 感染マウスにおける炎症性 CK (TNF- α , IFN- γ) および免疫抑制性 CK (IL-10, TGF- β) の mRNA 発現は, 感染 4 週後に増強したが, いずれの CK とも低菌量感染マウスでの発現が高菌量感染マウスでの発現に比べて著しく強いことが分かった。また, これらの CK の mRNA 発現は, KRM 投与により少なからず増強されたが, 感染 8 週後での TGF- β 発現は逆に減弱した。以上, MAC 感染モデルでは, 接種菌量の高低により KRM の治療効果発現の様相が若干異なる可能性が示唆された。

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) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs, with special reference to a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648. *Arch Immunol Ther Exp.* 2000; 48: 183-188.
- 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) 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.
- 5) 赤木竜也, 佐藤勝昌, 清水利朗, 他: マウス実験的 *Mycobacterium avium* 感染症に対するベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648, クラリスロマイシンおよびレボフロキサシンの *in vivo* 治療効果: 非ステロイド抗炎症剤ジクロフェナク Na 投与の影響. *結核.* 1997; 72: 491-497.
- 6) 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.
- 7) 土井教生: 実験的マウス結核症に対する benzoxazinorifamycin KRM-1648 の *in vivo* 治療効果. (1)経気道感染モデルと尾静脈感染モデルを用いた短期治療効果の検討. 結核. 1998; 73: 53-64.
 - 8) 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.
 - 9) 富岡治明: 抗酸菌症と免疫. 臨床と微生物. 1997; 24: 45-52.
 - 10) 富岡治明: らい菌により誘導されるサイトカイン産生異常. 臨床免疫. 2000; 34: 145-152.
 - 11) Tomioka H, Saito H, Yamada Y: Characteristics of immunosuppressive macrophages induced in spleen cells by *Mycobacterium avium* complex infection in mice. J Gen Microbiol. 1990; 136: 965-973.
 - 12) 富岡治明: 免疫抑制マクロファージ. 臨床免疫. 2000; 33: 29-36.