

【短 報】

Mycobacterium avium に対するマクロファージの殺菌能における抗菌薬と
キチン・キトサン・キトサンオリゴ糖の併用効果

佐藤 勝昌・佐野 千晶・清水 利朗・富岡 治明

島根大学医学部微生物・免疫学*

(平成 17 年 9 月 29 日受付・平成 17 年 12 月 1 日受理)

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症は抗菌化学療法に抵抗性であり、新しい治療レジメンの開発が望まれている。今回はキチン、キトサンおよびキトサンオリゴ糖のマウス腹腔マクロファージ(MΦ)内感染 MAC 菌に対する clarithromycin (CAM)/rifampicin (RFP) の抗菌活性発現に及ぼす効果について検討した。その結果、キチン単独では MΦ 内 MAC 菌の増殖能に影響を与えなかったが、キチンを CAM/RFP と併用した場合には CAM/RFP の殺菌能の増強がみられた。同様な効果はキトサンでも認められたが、キトサンオリゴ糖では認められなかった。次に、MAC 全身感染モデルマウスに対するキチン・キトサン(経口投与)と CAM/RFP(皮下投与)の感染治療実験を試みたが、CAM/RFP の *in vivo* 治療効果を増強させるような活性は認められなかった。したがって、別の治療レジメンを考える必要があるものと思われる。

Key words: *Mycobacterium avium*, macrophage, chitin, chitosan

肺非定型抗酸菌症の主要な起炎菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) は抗結核薬や多くの抗菌薬に対する感受性が低いため、本菌による感染症はきわめて難治性であり¹⁻⁴⁾、clarithromycin (CAM), azithromycin, 新 ketolide などのマクロライド系薬剤や rifabutin などのリファマイシン系薬剤を加えた強力な多剤併用レジメンによっても MAC 感染症に対する満足のいく治療効果は期待しがたい状況にある⁵⁾。したがって、MAC 感染症に対する有効な化学療法を考えるうえで、きわめて有効な抗菌薬が見出されるまでの間は、既存の抗菌薬による治療効果を別の薬剤で増強させるような形での治療レジメンの開発に期待せざるをえない現状にあるといえる⁵⁻⁹⁾。そのような薬剤としては、免疫調節薬が有望であるが、今回は厚生労働省から特定保健用食品としての許可を受けているキチン、キトサンおよびその誘導体のキトサンオリゴ糖をその candidate として取り上げた。キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが β-1,4 結合した多糖体で、エビやカニなどの甲殻類の殻、昆虫の甲皮、軟体動物の器官、真菌類の細胞壁を構成している。キトサンもまた真菌類の細胞壁構成成分であるが、キチンを N-脱アセチル化することによって調製することができ、キトサンオリゴ糖はキトサンをさらに加水分解して得られたものである¹⁰⁾。キチン・キトサンは難消化性の食物繊維で、いわゆる健康食品として腸内細菌叢改善作用、血中コレステロール改善作用、血圧調節作

用、脂肪吸収阻害作用などがあるとされ、広く市場に出ている^{10,11)}。さらに、これらはいずれも宿主の免疫能を調節する作用を有し、マウスへの腹腔内投与や経口投与などによって抗腫瘍効果や感染防御効果を示すことが報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。以上のように、キチン・キトサンには、緩和な形での宿主免疫調節作用が期待できるので、今回はこれらの特定保健用食品の宿主マクロファージ(MΦ)内での MAC 菌の殺菌作用発現に及ぼす影響について検討した。

マウス腹腔 MΦ 内 MAC 菌に対する抗菌薬と上記の免疫調節機能を有する特定保健食品との併用効果は以下のように検討した。すなわち、BALB/c 系雌マウスから得たペプトン誘導腹腔浸出細胞(PEC)を 5% FBS-RPMI 1640 培地 (RPMI 培地) に浮遊させ、その 200 μL (3 × 10⁵ cells) を 10 または 100 μg/mL キチン、キトサンおよびキトサンオリゴ糖(日本キレート)の存在下あるいは非存在下で平底 96 ウエル中 37°C で 3 日培養した後に非付着細胞を洗浄除去し、得られた付着細胞画分を MΦ として使用した。その後、この MΦ に MAC N-444 株 (*M. avium*) (6 × 10⁵ CFU) を 2 時間感染させた後、非感染菌を洗浄除去し、血中 Cmax 濃度(ヒトへの臨床投与量を経口投与した場合の値)の CAM (2.3 μg/mL; アボットジャパン) と RFP (6.2 μg/mL; 和光純薬) を含有する RPMI 培地中で 7 日間にわたって培養した。所定日に MΦ を 0.07% SDS で溶解した後、牛血清アルブミンで中

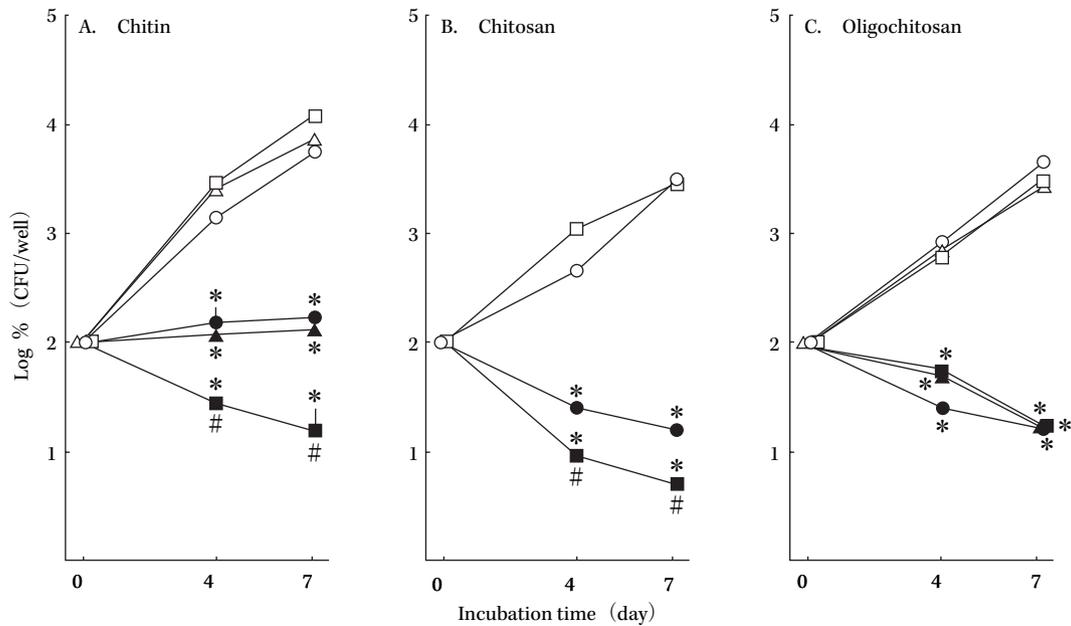


Fig. 1. Effects of chitin, chitosan and oligochitosan on the antimicrobial activities of CAM/RFP against intramacrophage MAC organisms. Murine PECs were cultured for 3 days with or without test adjuncts and the resulting M ϕ monolayers were infected with MAC. Infected M ϕ s were cultured in the presence or absence of CAM/RFP at Cmax doses. Symbols: ○, control; △, test adjuncts (10 μ g/mL); □, test adjuncts (100 μ g/mL); ●, CAM/RFP; ▲, test adjuncts (10 μ g/mL) + CAM/RFP; ■, test adjuncts (100 μ g/mL) + CAM/RFP. *: Significantly different from control at $P < 0.05$ [ANOVA with Bonferroni posttest]. #: Significantly different from CAM/RFP at $P < 0.05$ [ANOVA with Bonferroni posttest].

和し、次いで十分量の蒸留水で2回遠心洗浄した後、7 H11 寒天平板上でのコロニーカウントに供した。次に、MAC 感染マウスに対する抗菌薬とキチン・キトサンとの併用効果については以下の方法で検討した。すなわち、MAC N-444 株 (1×10^7 CFU) を iv 感染させた C3H/HeN 系雌マウスに、1 週後より次のレジメンで薬剤を投与した。すなわち、CAM/RFP は 20 mg/kg、10 mg/kg 用量を 1 日 1 回、週 6 回皮下投与し、キチン (1 mg/mL 溶液)、キトサン (6.25 mg/mL) は飲料水に混じて飲ませた (それぞれ、キチンは 0.19 g/kg/日の、キトサンは 1.07~1.29 g/kg/日の用量に相当)。感染 1 週後 (治療開始前) および 7 週後 (治療期間は 6 週間) にマウスの肺ならびに脾を摘出し、これらの臓器中の CFU を 7H11 寒天培地上で計測した。

Fig. 1 にはマウス腹腔 M ϕ の抗 MAC 抗菌活性に及ぼすキチン、キトサン、キトサンオリゴ糖の作用について示した。キチン単独では M ϕ 内の MAC 菌の増殖動態に有意な影響を与えなかったが、キチンには CAM/RFP の M ϕ 内 MAC に対する殺菌活性を増強させる効果が認められた (Fig. 1 A)。キトサンの場合にも同様な効果を認めたが (Fig. 1 B)、キトサンオリゴ糖の場合にはそのような効果は認められなかった (Fig. 1 C)。次に、MAC 感染マウスに対する感染治療実験を試みた。キチンおよびキトサンには感染マウスの肺ならびに脾における

MAC 菌の増殖をわずかに抑制する傾向を認めたものの有意なものとはいえなかった (Fig. 2)。さらに、CAM/RFP と併用投与を試みたが、CAM/RFP の治療効果を増強するような作用を認めることはできなかった (Fig. 2)。

今回の検討では、予備検討の段階で M ϕ をキチン・キトサンで直接処理した場合には、M ϕ 内 MAC に対する CAM/RFP の抗菌活性に影響を及ぼすことはなかったので (未発表データ)、PEC をキチン・キトサンで 3 日間処理した後、これより M ϕ 単層培養を調製し、その M ϕ に MAC を感染させ、CAM/RFP 存在下で培養するといった実験方法をとっている。したがって、キチン・キトサンは、M ϕ に直接作用することにより CAM/RFP の M ϕ 内 MAC 菌に対する抗菌力を増強させるような作用を有するというよりはむしろ、リンパ球の活性化を介して M ϕ の抗菌活性発現に関連した細胞機能の亢進に働いているといった可能性が高いもののように思われる。ところで、キトサンオリゴ糖にはこうした活性は認められなかったが、このことは、①このような M ϕ 機能増強活性発現にはある程度の分子量が必要になるのか、あるいは、②キチンからキトサンオリゴ糖を調製する過程で、キチンの活性発現に参与している何らかの moiety が失われているといった可能性が考えられる。今回の感染実験では、Fig. 2 に示すように、キチン・キトサンにはそれら単独での MAC 感染症に対する有意なレベルの治

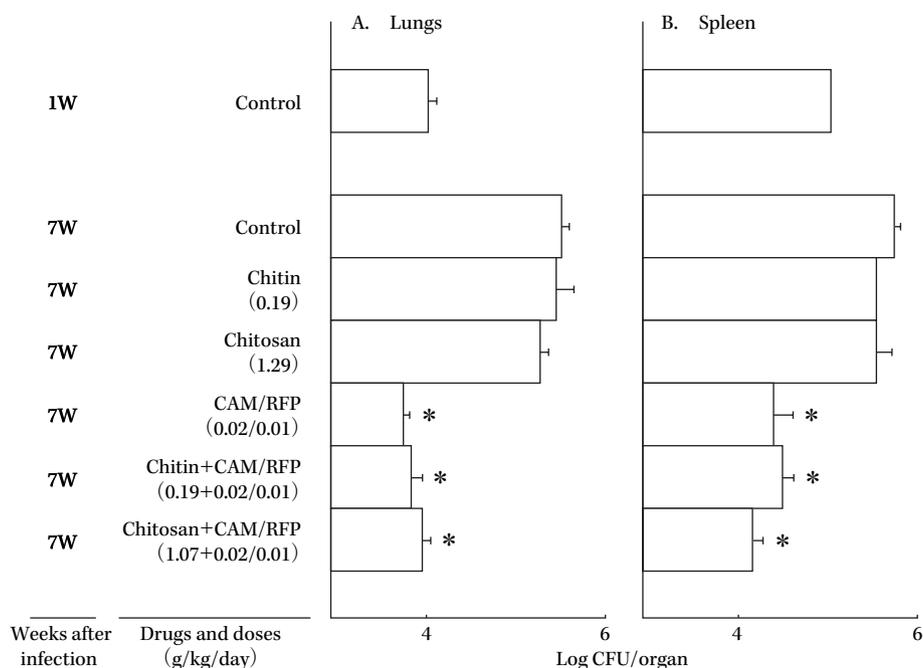


Fig. 2. Effects of chitin and chitosan on the antimicrobial activity of CAM/RFP in MAC-infected mice. Infected mice were given continuous access to distilled water or solutions containing the test adjuncts at concentrations of 1 mg/mL (chitin) or 6.25 mg/mL (chitosan) (internal doses, 0.19 g/kg/day and 1.07 to 1.29 g/kg/day, respectively). CAM/RFP were given subcutaneously once daily, six times per week.

*: Significantly different from 7-week control at $P < 0.05$ [ANOVA with Bonferroni posttest].

療効果,あるいはCAM/RFPとの併用治療効果は認められなかった。今回はキチン・キトサンを感染マウスに自由に飲水させる方法で摂取させているが、ゾンデを用いての経口投与方法により多量のキチン・キトサンを投与するか,あるいは別の治療レジメンを採用することにより,キチン・キトサンと抗菌薬との有意な併用効果が認められる可能性も残されているので,この点については今後さらに検討する予定である。

謝辞

供試薬剤を分与いただいた日本キレート株式会社ならびにアボットジャパン株式会社に深謝いたします。

文献

- 1) Inderlied C B, Kemper C A, Bermudez L E: The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 6: 266~310, 1993
- 2) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs. J Infect Chemother 6: 8~20, 2000
- 3) Benson C A: Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection: implications of recent clinical trials on prophylaxis and treatment. AIDS Clin Rev 98: 271~287, 1997
- 4) 富岡治明: 非結核性抗酸菌の分類と細菌学的特徴。呼吸と循環 52: 565~574, 2004
- 5) Tomioka H: Present status and future prospects of

chemotherapeutics for intractable infections due to *Mycobacterium avium* complex. Current Drug Discovery Technologies 1: 255~268, 2004

- 6) 富岡治明: 新しい抗結核薬開発の展望。結核 77: 573~584, 2002
- 7) Tomioka H: Adjunctive immunotherapy of mycobacterial infection. Curr Pharm Des 10: 3297~3312, 2004
- 8) 富岡治明: 抗酸菌の細菌学。化学療法の領域 21: 166~175, 2005
- 9) 富岡治明, 佐藤勝昌, 清水利朗, 他: 抗酸菌感染症の免疫補助療法。日本細菌学誌 60: 445~452, 2005
- 10) 次田隆志: キチン・キトサンの開発と利用。食品と開発 23: 66~69, 1988
- 11) 鈴木茂生: キチン, キトサンおよび低分子同族体オリゴ糖の生物活性。Biotherapy 14: 965~971, 2000
- 12) Maeda Y, Kimura Y: Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. J Nutr 134: 945~950, 2004
- 13) 木村善行, 畠中富生: 水溶性キトサンの抗腫瘍効果(第1報)—平均分子量 21,000の水溶性キトサンの抗腫瘍効果—。医学と薬学 49: 575~578, 2003
- 14) Tokoro A, Kobayashi M, Tatewaki N, et al: Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. Microbiol Immunol 33: 357~367, 1989

Effects of chitin, chitosan, and oligochitosan on the antimicrobial activity of clarithromycin in combination with rifampicin against *Mycobacterium avium* complex within mouse peritoneal macrophages

Katsumasa Sato, Chiaki Sano, Toshiaki Shimizu and Haruaki Tomioka

Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine,
89-1, Enya-cho Izumo, Shimane, Japan

Since *Mycobacterium avium* complex (MAC) infections are refractory, the development of new drugs with strong anti-MAC activity or therapeutic regimens using ordinary antimycobacterial drugs in combination with immunoadjuvants is urgently desired. In this study, we studied the effects of chitin, chitosan, and oligochitosan, which exhibit immunopotentiating activity, on the antimicrobial activity of clarithromycin (CAM) in combination with rifampicin (RFP) against MAC organisms replicating within murine peritoneal macrophages (MΦs). Murine peptone-induced peritoneal exudate cells were cultured for 3 days with or without chitin, chitosan, or oligochitosan at concentrations of 10 μg/mL to 100 μg/mL and washed with 2% FBS-HBSS; the resulting MΦs were then infected with MAC. When MAC-infected cells were cultured in the presence or absence of CAM/RFP at Cmax doses (CAM, 2.3 μg/mL; RFP, 6.2 μg/mL) for 7 days, CAM/RFP significantly eliminated the intracellular organisms within MΦs. Although chitin, chitosan and oligochitosan alone did not inhibit intramacrophage bacterial growth, chitin and chitosan, but not oligochitosan, potentiated the bactericidal activity of CAM/RFP against intracellular MAC organisms. Next, chitin and chitosan were examined for their effects on the therapeutic activity of CAM/RFP against MAC infection in mice. Chitin and chitosan did not increase the anti-MAC therapeutic activity of CAM/RFP.