

原 著

抗酸菌貪食に伴うマウス腹腔マクロファージの
スーパーオキシド産生および抗酸菌の細胞内増殖に
及ぼすスーパーオキシドの影響

李 啓 充

京都大学結核胸部疾患研究所第一内科

受付 昭和 59 年 8 月 10 日

SUPEROXIDE ANION (O_2^-) RELEASE FROM MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES ASSOCIATED WITH INGESTION OF MYCOBACTERIA AND EFFECTS OF O_2^- ON INTRACELLULAR MULTIPLICATION OF MYCOBACTERIA

Kaechoong LEE*

(Received for publication August 10, 1984)

The superoxide anion (O_2^-) production of mouse peritoneal macrophages associated with the phagocytosis of mycobacteria was measured by superoxide dismutase (SOD)-inhibitable cytochrome C reduction. O_2^- release was significantly higher following exposure to the mouse avirulent strain of *M. avium-intracellulare* complex (KMC3211) than to the mouse virulent strain (31F093T). However, there was no significant difference in O_2^- release between by resident and by LPS-elicited macrophages following exposure to various mycobacteria. Heat-treatment of mycobacteria did not alter O_2^- release from macrophages. Exogenous SOD increased intracellular multiplication of mycobacteria (KMC3211 and 31F093T), and this effect was more conspicuous on the avirulent strain (KMC3211) than on the virulent strain (31F093T). Virulence of mycobacteria may be related to their capacity of triggering O_2^- release from macrophages, and O_2^- produced by macrophages may play an important role in the host defense mechanisms against mycobacterial infections.

Keywords : Atypical mycobacteria, Macrophages, Superoxide anion, Intracellular multiplication

キーワードズ : 非定型抗酸菌, マクロファージ, スーパーオキシド, 細胞内増殖

はじめに

抗酸菌感染に対する宿主の防衛反応の担い手として

マクロファージが重要な役割を果たしていることはよく知られているが、その防衛機序の詳細については不明な点が多い。一方、諸種細菌の感染に際し、貪食細

* From the First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

胞より産生される活性酸素が殺菌機序の中で大きな位置を占めていることが明らかとされてきた¹⁾。著者は、抗酸菌の貪食に伴うマウス腹腔マクロファージのスーパーオキシド・アニオン (以下 O_2^-) 産生を抗酸菌の病原性とに関連で検討するとともに、抗酸菌の細胞内増殖に及ぼす O_2^- の影響を検討した。

材料と方法

1) マクロファージ

4週齢の雌 ICR マウスの腹腔を滅菌生食水5mlで洗浄し腹腔内細胞を採取、PBSで2回洗浄後、10% FCS 加 Eagle's MEM 培地に浮遊させた。径16mmのdish (Nunc[®]) に 1×10^6 cells/well で plating し、5% CO_2 -Air, 37°C で90分培養後、PBSにて各dishを3回洗浄し非附着性細胞を除き、更に16時間培養した。同様の手技により、lipopolysaccharide (LPS) 30 μ g 腹腔内投与後4日目の LPS-elicited マクロファージを得た。

2) 使用菌株と菌液の作製

Mycobacterium tuberculosis (H37Rv), *M. kansasii* (KMC1113), *M. avium-intracellulare* complex (KMC3211, 31F093, 31F059) の5菌株を使用した。*M. avium-intracellulare* complex に含まれる2菌株 (31F093, 31F059) では transparent colony を示す substrains (31F093T, 31F059T) と、opaque dome-shaped colony を示す substrains (31F093D, 31F059D)²⁾ で比較した。なお、*M. kansasii* (KMC1113) と *M. avium-intracellulare* complex の 31F093T, 31F059T は ddY マウスに対し病原性が強く、*M. avium-intracellulare* complex の KMC3211 (TMC 1467), 31F059D, 31F093D の3株は病原性が弱い³⁾ (31F093Dの病原性については未発表)。

各菌株とも4°Cで保存されている Dubos Tween albumin 10日培養菌液より、実験の都度、新たなDubos

Tween albumin液体培地50mlを含む100ml用コルベんに0.1mlずつ継代し、37°C培養10日目に実験に供した。実験直前に菌を3,000rpm×10分で遠心分離し、培地を除去した後 KRPD (Krebs-Ringer phosphate buffer, ブドウ糖2mg/ml含有) で稀釈し、菌浮遊液を作製した。実験の都度、Klett-Summerson photoelectric colorimeterにより、各菌液が同一濁度となるよう調整した。

3) O_2^- の測定

Superoxide dismutase (SOD)-inhibitable cytochrome C reduction により測定した⁴⁾。各試薬の濃度は cytochrome C 80 μ mole/ml, SOD 30 μ g/ml, PMA (phorbol myristate acetate) 2 μ g/ml とし、所定量の菌液を加えた全反応量を0.5mlとした。PMAあるいは菌液を加え所定時間の経過後反応液を採取、遠沈 (15,000rpm×5分) し、上澄の550nmにおける吸光度を測定した。各測定は triplicate で行ない吸光係数 $\Delta E_{550} = 21.0 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ により還元型 cytochrome C量を求めた。Lowry法により各dishの蛋白量を求め、マクロファージ蛋白量当りで O_2^- 産生量を表わした。

4) 抗酸菌の細胞内増殖に及ぼす O_2^- の影響

Zlotnikらの方法⁵⁾に準じ、31F093T および KMC3211 の2菌株について検討した。マウス腹腔細胞を10% FCS 加 RPMI1629培地 (LMOX 0.2 μ g/ml含有) に 1×10^7 cells/ml で浮遊させ、径35mmのpetri dish (Falcon[®]) の5点に各点200 μ lずつ plating した。5% CO_2 -Air, 37°C で90分培養後非附着性細胞を除き、1mlの培地を加え更に16時間培養した。上記の要領で作製した菌液各2 μ lを加え90分 incubate した後、PBSで5回洗浄し、1日おきに培地を更新しつつ培養を継続した。培養終了後、3%グルタルデヒドで固定、PBS・蒸留水で各2回洗浄し、乾燥させた後、Ziehl-Neelsen染色 (cold stain)、メチレン青後染色を行なった。鏡検下 (油浸、×

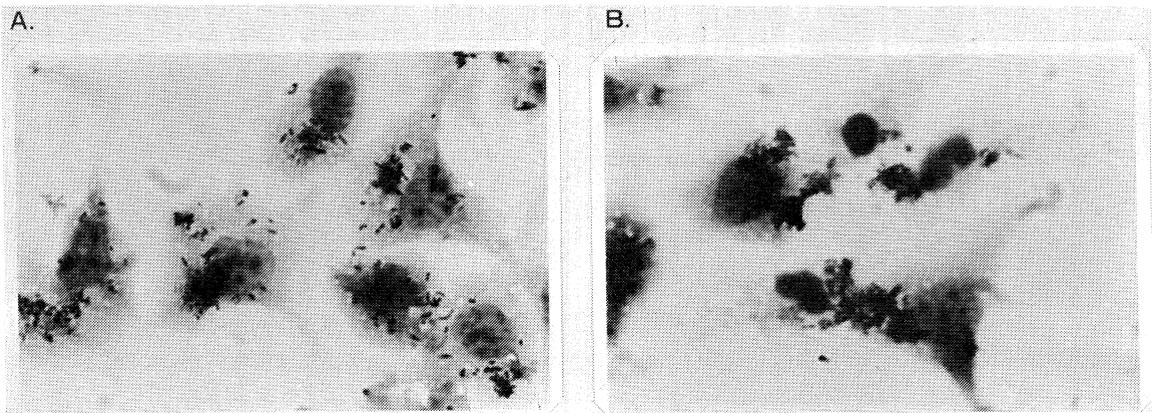


Fig. 1. Phagocytosis of *M. avium-intracellulare* by mouse peritoneal macrophages (A : 31F093T, B : KMC3211, turbidity : 126).

1,000)に各細胞内に含まれる抗酸菌数を計測した。1dish中の5点について、各点200個の細胞について細胞内菌数を計測した上でscore化し、そのscoreによりマクロファージ200個当りの細胞内菌数を算出した(細胞内菌数:score; 0個:0, 1個:1, 2~5個:3.5, 6~10個:8, 11~20個:15.5, 21個以上:21)。O₂⁻の影響は、培地へのSODの添加の有無による差違により検討した。SOD濃度は30μg/mlとし、SODは菌の添加直前に培地中に加えられた。

実験成績

1) 抗酸菌食食に伴うマクロファージのO₂⁻産生
M. avium-intracellulare の2株, 31F093Tおよび

KMC3211の各菌液100μlを加え、90分incubateした際の鏡検像(油浸, ×1,000)を図1に示したが、マウス腹腔マクロファージの貪食能には両菌株で大きな差違を認めなかった。

31F093T, KMC3211の菌液を各100μl加えた際にマクロファージから放出されるO₂⁻量の時間経過を図2に示した。挿入図には細胞浮遊液を用い、貪食早期のO₂⁻放出を検討した結果を示したが、毎分当りのO₂⁻放出量はKMC3211で31F093Tの約5倍であった。また、O₂⁻放出量は、両菌株とも90分でピークあるいはプラトーに到達した。

図3に、31F093T, KMC3211の添加菌液量を変え、90分incubateした際のO₂⁻放出量を示した。いずれの菌

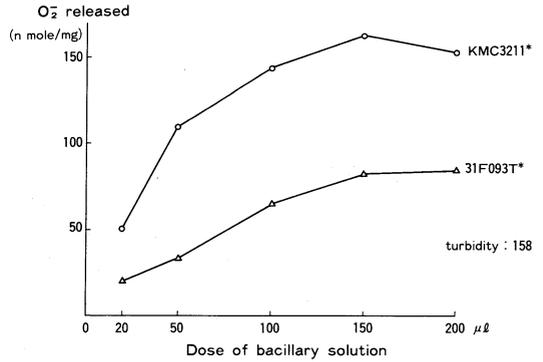
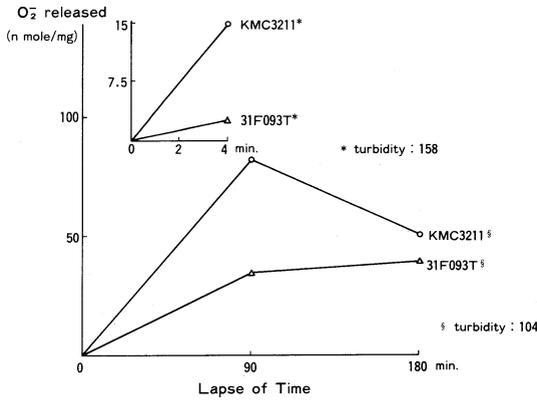


Fig. 2. Time-course of macrophage O₂⁻ release by two strains of *M. avium-intracellulare*(31 F 093 T and KMC 3211). In the inset, O₂⁻ release was studied with suspended peritoneal cells.

Fig. 3. Macrophage O₂⁻ release with changing dose of bacillary solution.

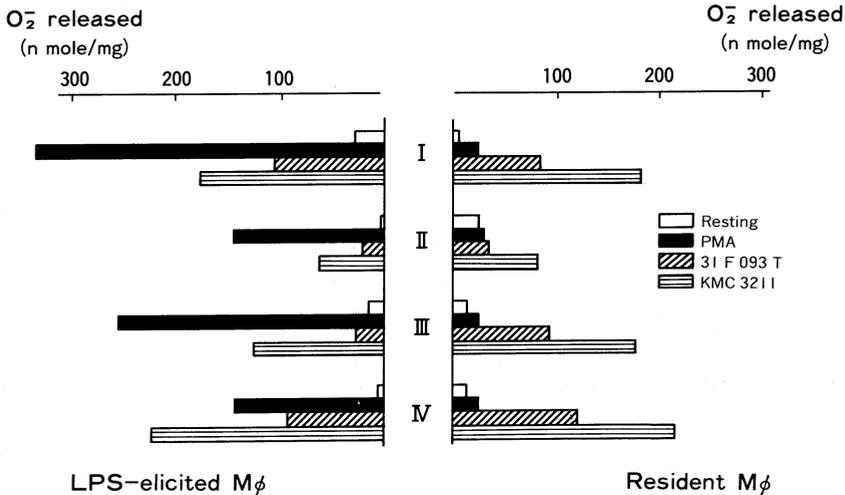


Fig. 4. Macrophage O₂⁻ release by PMA and two strains of *M. avium-intracellulare* (31F093T and KMC3211).

液量においても KMC3211 の方が 31F093T に比べ、高い O_2^- 放出を促した。また、菌液量 $100\mu l$ を超える点で O_2^- 放出量はプラトーに達した。

これらの結果により、以下の実験では添加菌液量 $100\mu l$, incubation time 90 分で行なった。図 4 に PMA あるいは 31F093T, KMC3211 の各菌液を加えた際の O_2^- 放

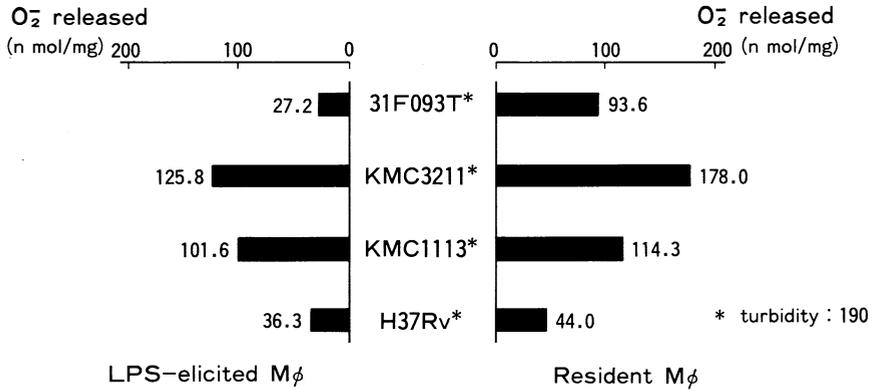


Fig. 5. Macrophage O_2^- release by various strains of mycobacteria.

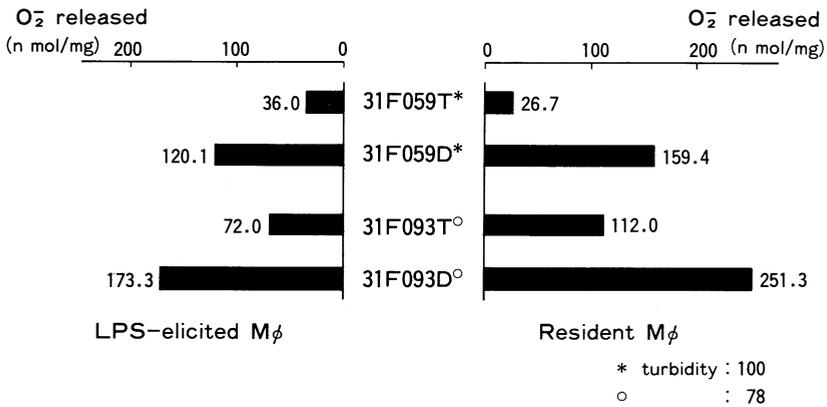


Fig. 6. Macrophage O_2^- release by different colony-formers of *M. avium-intracellulare* (T : transparent colony-former, D : dome-shaped colony-former).

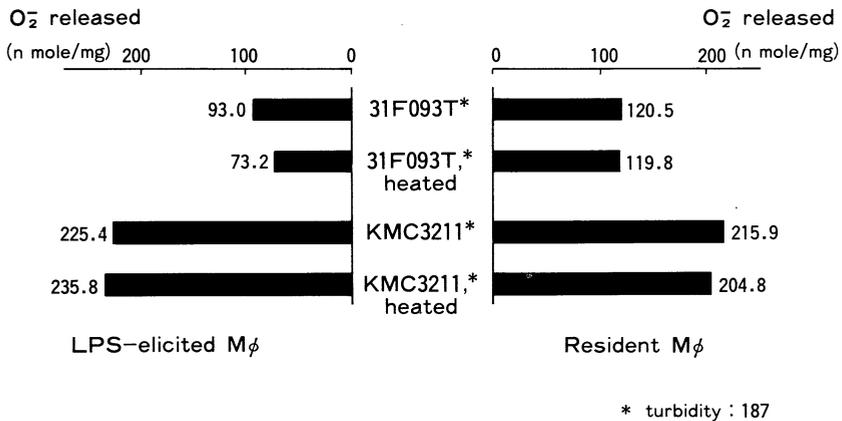


Fig. 7. Macrophage O_2^- release by heat-treated *M. avium-intracellulare* (31F093T and KMC3211).

出を検討した結果を示した。実験は4回行なったが、 O_2^- 放出はPMAによる刺激ではresidentマクロファージに比べ、LPS-elicitedマクロファージで有意に高かったが、両菌液の貪食に際し、マクロファージから放出される O_2^- 量はマクロファージのelicitationの有無による差を認めなかった(31F093T: $P < 0.4$, KMC3211: $P > 0.5$; paired t-test, 以下同じ)。また、両菌株の比較では、KMC3211によるマクロファージの O_2^- 放出量が31F093Tに比べ有意に高かった(residentマクロファージ: $P < 0.025$, LPS-elicitedマクロファージ: $P < 0.01$)。

図5にKMC1113, H37Rv, 31F093T, KMC3211 4菌株による O_2^- 放出を検討した結果を示したが、病原性の弱いKMC3211による O_2^- 放出が、病原性の強いH37Rv, 31F093Tに比べ高い傾向を認めた。

M. avium-intracellulare 2株についてのコロニー形態別のsubstrain間の比較では(図6), 病原性の強いT-substrainよりも病原性の弱いD-substrainで O_2^- 放出が高い傾向を認めた。

31F093T, KMC3211 両菌株を 80°C , 15分間加熱処理した際の O_2^- 放出を検討したが(図7), 両菌株とも加熱処理による差は認められなかった。

2) 抗酸菌の細胞内増殖に及ぼす O_2^- の影響

31F093T, KMC3211の2菌株について検討したが、両菌株とも培養5日後には著しい細胞内菌数の増加を認めた(図8)。

図9に、SOD添加の有無による細胞内菌数scoreの推移を示したが、両菌株とも培養5日後の細胞内菌数scoreはSODの添加により有意に増加した(31F093T: $P < 0.05$, KMC3211: $P < 0.005$; student's t-test)。培養5日後のscoreを培養初日のscoreとの比で表わすと、31F093TではSODを含まない系で12.1倍, SODを含む系で18.6倍であり, KMC3211ではそれぞれ4.6倍, 14.2倍であった。SODを含まない系での細胞内菌数の増加はKMC3211に比し, 31F093Tで高く, 細胞内菌数の増加に及ぼすSODの影響は31F093Tに比し, KMC3211で大きかった。

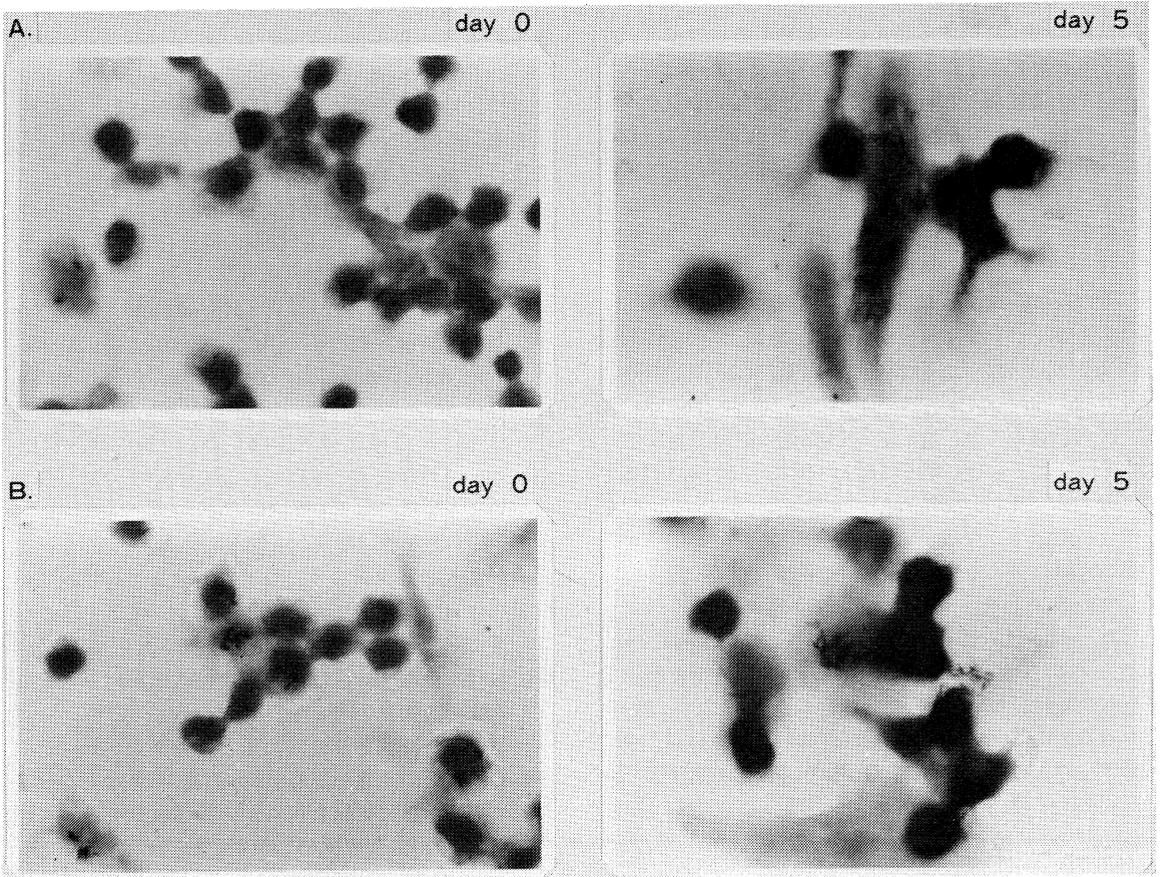


Fig. 8. Intracellular multiplication of *M. avium-intracellulare*. (A : 31F093T, B : KMC3211)

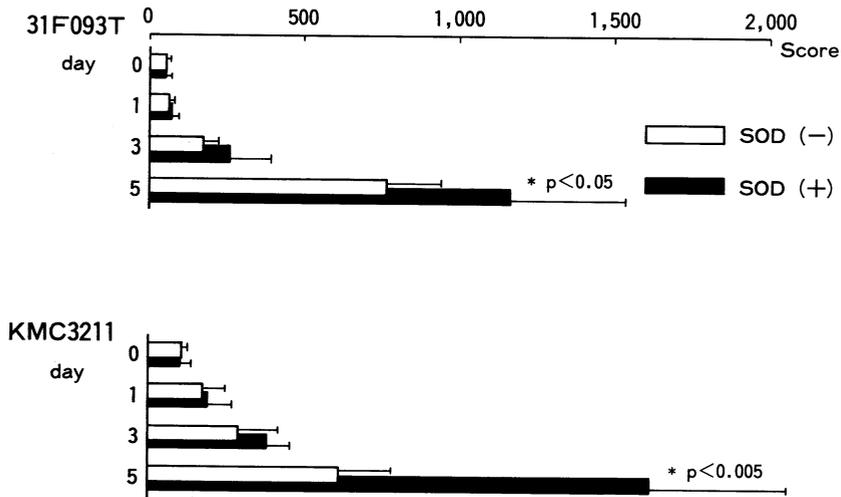


Fig. 9. Effect of O_2^- on intracellular multiplication of *M. avium-intracellulare* (31F093T and KMC3211).

考 察

抗酸菌感染に対する宿主の防衛機序の中でマクロファージが重要な役割を果たしていることは明らかであるが、その防衛機序の詳細についてはまだ不明な点が多い。今回、著者は主に病原性の異なる *M. avium-intracellulare* の2菌株 (31F093T および KMC3211) を用い、これら2菌株の食食に際しマクロファージから放出される O_2^- 量およびこれら2菌株の細胞内増殖に及ぼす O_2^- の影響を検討した。

M. avium-intracellulare の2菌株の食食に際するマウス腹腔マクロファージからの O_2^- 放出は、病原性の強い 31F093T に比し、病原性の弱い KMC3211 で有意に高く、*M. tuberculosis* (H37Rv) においても O_2^- 放出の低い傾向が認められ、これらの抗酸菌の病原性とマクロファージによる O_2^- 放出刺激との間に相関のあることが示唆された。Gangadharam らも⁶⁾、*M. intracellulare* を用いた成績で、マウスに対する病原性が強い程マウス腹腔マクロファージからの O_2^- 放出量が低くなると報告している。

M. kansasii, KMC1113; *M. avium-intracellulare*, 31F093T と *M. tuberculosis*, H37Rv 3 菌株相互間の病原性の比較については、前に報告した著者らの成績⁷⁾ があるが、ddY マウスの尾静脈感染の結果、体重、肺・脾重量ならびに臓器の病理組織学的所見の推移より、H37Rv が最も病原性が強く、次いで 31F093T, KMC1113 の順に病原性が弱くなる傾向を示した。しかし、この実験では 31F093T の接種生菌単位数が KMC1113 の接種生菌単位数よりかなり大きく、両菌株の病原性の比較については再度検討を要すると考えて

いる。

著者の成績では、病原性の強い T-substrain に比べ病原性の弱い D-substrain で O_2^- 放出が高かったが、Gangadharam らは⁶⁾ コロニー形態別の substrains の間ではマクロファージの O_2^- 放出に差がないとしている。著者と Gangadharam らとの成績が解離した原因としては、T および D-substrain を純粋に継代維持することが困難である点などが考えられるが、コロニー形態別の substrain による O_2^- 放出の差違については、今後更に検討を重ねる必要がある。

Resident マクロファージと LPS-elicited マクロファージとで抗酸菌食食に伴い、放出される O_2^- 量に差違を認めなかったが、Gangadharam らは⁶⁾、*M. intracellulare* による O_2^- 放出は activated マクロファージで有意に高いとしている。一般に他の菌種を用いた系においても、resident マクロファージに比し、activated マクロファージで活性酸素の産生が亢進するとする報告⁸⁾⁹⁾ が多く、著者が用いた菌株に特異的な現象であるか否か、今後更に検討する必要がある。いずれにせよ、病原性の低い菌株においては resident マクロファージからもかなりの量の O_2^- が放出されることは事実であり、抗酸菌感染における免疫感作成立前の宿主の防衛反応を考える上で興味ある知見と考える。

加熱処理した菌と無処理の菌とでマクロファージによる O_2^- 放出に差違を認めなかったが、菌側の O_2^- 放出を促す因子が熱に安定な何らかの菌体成分である可能性も考えられる。菌自体の SOD 活性を検討するとともに、 O_2^- 放出を促す (あるいは妨げる) 菌体側の因子が存在する可能性を検討することが今後の課題となろう。

病原性の強い 31F093T, 病原性の弱い KMC3211 両

株とも、培養系に SOD を加え O_2^- の影響を除去することで細胞内菌数は有意に増加し、この影響は病原性の弱い KMC3211 で顕著であった。これまで O_2^- が抗酸菌の細胞内増殖に抑制的に働くことを直接に証明した報告はなく、病原性の弱い菌株でマクロファージからの O_2^- 放出が大きく、且つ O_2^- による細胞内増殖の抑制効果が大きいという結果は、抗酸菌感染に対する宿主の防衛反応においてマクロファージによる O_2^- 産生が重要な役割を果たしていることを示唆するものであろう。

O_2^- の他に、抗酸菌感染におけるマクロファージの防衛機序に関与する因子として、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシル・ラディカル ($\cdot OH$) などの活性酸素に加え、免疫グロブリンなどの液性因子の関与も考慮されなければならない。*M. tuberculosis* の病原性と菌の catalase 活性との関連は古くから論じられているが¹⁰⁾、Lowrie¹¹⁾ は、*M. tuberculosis* については O_2^- よりむしろ H_2O_2 がその防衛機序の中で重要な役割を果たしている。また安藤ら¹²⁾ は、肺洗浄液に含まれる液性因子により BCG の細胞内増殖が抑制されることを報告している。

しかし、今回得られた SOD 添加の有無による 31F093T と KMC3211 両菌株の態度からは、(i) O_2^- と他の酸素代謝産物がマクロファージの抗酸菌に対する殺菌機構に何らかの関与をしているであろうこと、(ii) 病原性の強い 31F093T はマクロファージの O_2^- 産生を阻害する何らかの機構を持っているであろうことの 2 つを推測するに止った。

著者の今回の成績では抗酸菌の病原性とマクロファージの O_2^- 放出との間に相関のある可能性が示唆されたが、*Salmonella typhi* では病原性の強い株で多核球の酸素消費が減少し¹³⁾、*Candida* では病原性の強い *C. albicans* に比べ、*C. parapsilosis* でマクロファージの O_2^- 放出が高く⁸⁾、*Nocardia asteroides* では病原性が強い株でマクロファージの acid-phosphatase 活性が低下し¹⁴⁾、*Leishmania donovani* では細胞内増殖型の amastigotes に比し、promastigotes で H_2O_2 放出が高い⁹⁾とされている。Parasites の病原性の差違により host cells の反応が異なることは、一般的な現象である可能性も考えられよう。

M. avium-intracellulare の病原性の強弱によってマクロファージの O_2^- 産生が異なる機序については現在のところ明らかでない。*M. avium-intracellulare* においては、一般的に病原性の強い菌株は、corn meal glycerol agar などの寒天培地上で透明集落 (transparent) を作り、病原性の弱い菌株は不透明集落 (opaque) を作ることが知られている。また *M. avium* を用いたこれら両菌株の電顕による観察で、透明集落を形成する菌体は polysaccharide よりなる outer layer を持っているとした成績¹⁵⁾がある。著者らはこの layer の存在を病原性

と関連づけて論じているが、この layer の存在が一方でマクロファージの接触時における O_2^- 産生の差を生ぜしめた要因である可能性は考えられる。

最後に、*M. intracellulare* は、catalase 活性は低いにもかかわらず、 H_2O_2 に対して、*M. tuberculosis* よりも強い抵抗性を示すという成績¹⁶⁾が最近報告されており、*M. avium-intracellulare* の殺菌機構の今後の解析に示唆を与えるものであることを追加したい。

総 括

病原性の異なる諸種抗酸菌株を用い、これら菌株の O_2^- 産生を検討したところ、病原性が強い株で O_2^- 放出が低く、病原性が弱い株で O_2^- 放出が高い傾向を認めた。また、抗酸菌の細胞内増殖は O_2^- により抑制され、病原性の弱い株でその傾向が顕著であった。抗酸菌の病原性とマクロファージの O_2^- 放出との間に関連があり、抗酸菌感染に対する宿主の防衛機序の中でマクロファージによる O_2^- 産生が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

謝 辞

有益な御教示を賜った京都大学医学部第一内科・笹田昌孝先生、ならびに、懇切な御指導を賜った教室の主任教授・久世文幸先生、京都大学名誉教授・前川暢夫先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Klebanoff, S.J. : Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes, *Ann Int Med*, 93 : 480, 1980.
- 2) Kuze, F. and Uchihira, F. : Various colony-formers of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Eur J Respir Dis*, 65 : 402, 1984.
- 3) 久世文幸 : 実験的非定型抗酸菌症, *結核*, 58 : 469, 1983.
- 4) Johnston, R.B. : Secretion of superoxide anion, in *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, Academic Press, Inc, 489, p. 1981.
- 5) Zlotnik, A. and Crowle, A.J. : Lymphokine-induced mycobacteriostatic activity in mouse pleural macrophages, *Infect Immun*, 37 : 786, 1982.
- 6) Gangadharam, P.R.J. et al. : Pathogenicity of *Mycobacterium intracellulare* in relation to superoxide anion release and susceptibility to hydrogen peroxide, *Am Rev Respir Dis*, 125 (4, part 2) : 177, 1982.
- 7) 久世文幸・李 啓充 : 実験的非定型抗酸菌症に関する研究 7. *Mycobacterium avium-M. intracel-*

- lulare* complex のマウスに対する病原性(ii) — mouse virulent strain (マウスの毒力株) の検索 —, 結核, 59 : 13, 1984.
- 8) Sasada, M. and Johnston, R.B. : Macrophage microbicidal activity ; correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages, *J Exp Med*, 152 : 85, 1980.
 - 9) Murray, H.W. and Cartelli, D.M. : Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes ; evidence for oxygen-dependent and independent leishmanicidal activity, *J Clin Invest*, 72 : 32, 1983.
 - 10) Mitchison, D.A. et al. : Virulence in the Guinea-pig, susceptibility to hydrogen peroxide, and catalase activity of isoniazid-sensitive tubercle bacilli from south Indian and British patients, *J Path Bact*, 86 : 377, 1963.
 - 11) Lowrie, D.B. : How macrophages kill tubercle bacilli, *J Med Microbiol*, 16 : 1, 1983.
 - 12) Ando, M. et al. : Superoxide production in pulmonary alveolar macrophages and killing of BCG by the superoxide-generating system with or without catalase, *Infect Immun*, 24 : 404, 1979.
 - 13) Miller, R.M. et al. : Lack of enhanced oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes on phagocytosis of virulent *Salmonella typhi*, *Science*, 175 : 1010, 1972.
 - 14) Black, C.M. et al. : Effect of virulent and less virulent strains of *Nocardia asteroides* on acid-phosphatase activity in alveolar and peritoneal macrophages maintained in vitro, *J Infec Dis*, 148 : 117, 1983.
 - 15) Rastogi, N. et al. Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium* : Is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20 : 666, 1981.
 - 16) Gangadharam, P. R. J. and Pratt, P. F. : Susceptibility of *Mycobacterium intracellulare* to hydrogen peroxide, *Am Rev Respir Dis*, 130 : 309, 1984.