

原 著

マクロファージおよびⅡ型肺胞上皮細胞内の結核菌あるいは
Mycobacterium avium complex に対する各種薬剤の抗菌効果

佐藤 勝昌 小笠原圭子 赤木 竜也 富岡 治明

島根医科大学微生物・免疫学教室

MICs AND MBCs OF LEVOFLOXACIN, CLARITHROMYCIN, AND KRM-1648 FOR
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AND *M. AVIUM* COMPLEX RESIDING IN
MONO-MAC-6 HUMAN MACROPHAGE-LIKE CELL AND A-549 HUMAN TYPE II
ALVEOLAR EPITHELIAL CELL LINES

Katsumasa SATO, Keiko OGASAWARA, Tatsuya AKAKI, and *Haruaki TOMIOKA

*Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

In this study, we determined the MICs and MBCs of levofloxacin (LVFX), clarithromycin (CAM), and KRM-1648 (KRM) for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strain Kurono and *M. avium* complex (MAC) strain N-444 residing in MONO-MAC-6 human macrophage-like cells (MM6-M ϕ s) and A-549 human type II alveolar epithelial cells (A-549 cells). First, the MICs of LVFX for MTB replicating in MM6-M ϕ s (1 μ g/ml) and A-549 cells (2 μ g/ml) were 4 to 8 times higher than its MICs for extracellular MTB growing in 7HSF medium. In contrast, the MICs of CAM for intracellular MTB residing in both the cells (2~4 μ g/ml) were 4 to 8 times less than its MICs for extracellular MTB organisms. On the other hand, the MICs of KRM for extracellular MTB were nearly the same as its MICs for intracellular MTB residing in both types of the cells. Secondly, the MICs of LVFX and CAM for extracellular MAC were not significantly different from their MICs for intracellular MAC residing in MM6-M ϕ s and A-549 cells. The MIC of KRM for MAC residing in A-549 cells was 0.25 μ g/ml, and this value was 32 times higher than its MIC for MAC residing in MM6-M ϕ s (0.008 μ g/ml). Thirdly, the MBCs of test drugs for intracellular MTB and MAC residing in both types of the cells were somewhat longer than their MBCs for extracellular organisms. These findings indicate that, in the case of pulmonary infections with MTB or MAC, the therapeutic efficacy of a given drug, especially KRM, is more or less influenced by the bacterial location in the host lung tissues where the mycobacterial pathogens survive and multiply, i. e., either alveolar M ϕ s, type II alveolar epithelial cells, or surrounding environment.

*〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

* 89-1 Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan.
(Received 14 Dec. 1998/ Accepted 25 Mar. 1999)

Key words : Levofloxacin, Clarithromycin, KRM-1648, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, Type II alveolar epithelial cells, Macrophages

キーワーズ : レボフロキサシン, クラリスロマイシン, KRM-1648, 結核菌, *Mycobacterium avium*, II型肺胞上皮細胞, マクロファージ

はじめに

結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) による肺感染時においては、これらの菌が最初に接触する宿主細胞は肺胞マクロファージ (Mφ) と肺胞上皮細胞であると考えられる。これらの菌による肺感染症における感染の場としての Mφ の役割については多くの知見が得られているが、肺胞上皮細胞の役割については未解明なところが多い。最近、これらの抗酸菌が Mφ のみならず、A-549ヒトII型肺胞上皮細胞株 (A-549細胞) にも侵入し増殖することが相次いで報告されて来ている^{1)~3)}。また、Mehtaら³⁾はA-549細胞内結核菌はアミカシンの殺菌作用に対してヒト単球あるいはJ774マウスMφ様細胞株内の結核菌に比べてより抵抗性であることを見出している。他方、われわれの検討でもA-549細胞内MAC (*M. intracellulare*) に対するベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648 (KRM) の抗菌活性は、マウス腹腔Mφ内の菌に対する抗菌活性に比べて著しく低いことが明らかになっている⁴⁾。そこで、今回はA-549細胞と成熟したMφ機能を有するとされるMONO-MAC-6ヒトマクロファージ様細胞株 (MM6-Mφ)⁵⁾を用いて、それらの細胞内に局在する結核菌およびMAC (*M. avium*) に対するレボフロキサシン (LVFX)^{6)~9)}、クラリスロマイシン (CAM)^{7)~11)} およびKRM^{4)7)~9)12)~14)}のMICとMBCを測定することによって、II型肺胞上皮細胞内の抗酸菌に対する上記薬剤の抗菌力発現の様相について検討した。

材料と方法

(1) 供試菌

結核菌Kurono株とMAC (*M. avium*) N-444株を用いた。いずれも7H9培地中で培養し、遠心・洗浄後に1%牛アルブミン (BSA) 含有リン酸緩衝生理食塩液に浮遊させ、-80℃に保存した。

(2) 抗菌剤

LVFX (第一製薬), CAM (大正製薬) およびKRM (鐘淵化学工業) を供試した。

(3) 細胞

MM6-Mφ (German Collection Microorga-

nisms and Cell Cultures, ドイツ) とA-549細胞 (American Type Culture Collection, 米国) を用いた。MM6-Mφは10%牛胎児血清 (FBS; Bio Whittaker, 米国), 1% Nonessential amino acids (Bio Whittaker), 1mM ビルビン酸ナトリウム (Bio Whittaker) および9μg/ml牛インシュリン (和光純薬) を添加した2mM L-グルタミン含有RPMI 1640 (日水製薬) 培地中で、またA-549細胞は10%FBSを添加した2mM L-グルタミン含有Ham's F-12K (大日本製薬) 培地中で、それぞれ37℃, 5% CO₂ インキュベーター内で前培養し、実験に供した。

(4) 細胞外増殖菌に対する抗菌剤のMICとMBC

概略、以下のようにして求めた¹⁵⁾。2倍階段希釈した抗菌剤を含有する7HSF液体培地¹⁶⁾ (7H11寒天にほぼ相当する組成の培地) の100μlを加えた96ウェル組織培養用プレート (U底) に、1×10⁵ CFUの同培地での菌浮遊液 (1×10⁶ CFU/ml) の等量を添加した。37℃で14日培養後に肉眼的に菌の増殖のみられない最小の薬剤濃度をMICとして判定した。次に、MBCを求めるために、菌の増殖のみられないウェル内の培養液の10μlを薬剤不含の7H11寒天培地上にスポットし、14日培養した後にCFUを計測した。薬剤の供試菌に対するMBCは接種菌数の99.9%以上を殺菌する最小濃度とした。

(5) 細胞内局在菌に対する抗菌剤のMICとMBC

MM6-Mφを用いた場合では、細胞を5%FBS-RPMI 1640培地に8×10⁵細胞/mlとなるように浮遊させ、このものの5mlを同培地での菌浮遊液 (結核菌, 2.4×10⁷ CFU/ml; MAC, 4×10⁸ CFU/ml) の等量とともに75cm²の組織培養用フラスコ (Corning, 米国) に加えた。これを3時間培養後に回収し、細胞外非感染菌を除去するために2%FBS加ハンクス氏液 (HBSS) で5回遠心 (150×g, 5分)・洗浄した後、最終的に得られた細胞を1%FBS-RPMI 1640培地に浮遊させて細胞数を4×10⁵細胞/mlに調整した。次いで、この細胞浮遊液の100μlを、あらかじめ同培地での供試薬剤の2倍階段希釈液の各100μlを加えておいた96ウェルプレート (U底) へ添加した (0-day)。7日間培養後に各ウェルに0.23%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の80μlを加えて細胞を溶解した後、20%BSA (120μl)

を加えることにより SDS を中和させた。次いで、結核菌の場合は 0.05% Tween 80 水を、MAC の場合は蒸留水の各 4.5ml を洗浄液として加え、遠心・洗浄 (200 × g, 30分) を行い培養液中に含まれる抗菌剤を除去した (MAC の場合は、Tween 80 水を使用すると集落が diffuse 型となり、CFU 計測が困難であるので洗浄液としては蒸留水を用いた)。この場合、第 1 回目の遠心後、下層部の 250 μl と洗浄液 (4.5 ml) とを混合した後に再度の遠心を行い、下層部 (250 μl) を採取した。これを各洗浄液で 10 倍階段希釈した後、得られた菌希釈液の各 10 μl を 7H11 寒天培地の上にスポットし、5 ~ 9 日培養後に顕微鏡下 (×15) で細胞内生残菌数を計測した。なお、培養開始時点での CFU 値に比べて、薬剤添加培地中での培養 7 日後の CFU が同じかあるいは減少を来した最小薬剤濃度を MIC として、また培養開始時点での CFU に比べて、培養 7 日後の CFU 値が 2 log ユニット以上の減少を来した薬剤の最小濃度を MBC として判定した。

次に A-549 細胞を用いた場合では、供試細胞の 5% FBS-Ham's F-12K 培地中浮遊液 (2 × 10⁵ 細胞/ml) の 200 μl を 96 ウェルプレート (平底) に加え、18 時間培養した。細胞の単層培養を 2% FBS-HBSS で 3 回洗浄後、結核菌 (4 × 10⁵ CFU) あるいは MAC (4 × 10⁶ CFU) を浮遊させた同培地 200 μl 中で 2 時間培養した。次いで、細胞外の非感染菌を洗浄・除去した後に、感染細胞に 2 倍階段希釈濃度の薬剤を含む 1% FBS-Ham's F-12K 培地 (200 μl) を加えて (0-day) 7 日間培養し、上述の MM6-Mφ の場合と同様の方法で細胞内生残菌数を計測並びに MIC と MBC の判定を行った。

なお、本実験では各細胞の供試菌取り込み数 (0-day) をほぼ同じにするために、予備実験の成績から割り出した各々の系に最適な感染菌数を用いている。

本実験系で得られた値は、以下の理由で細胞内局在菌の菌数を反映したものと考えられる。(1) 感染細胞の培養時点で培地中に残存していた菌数は、検出限界

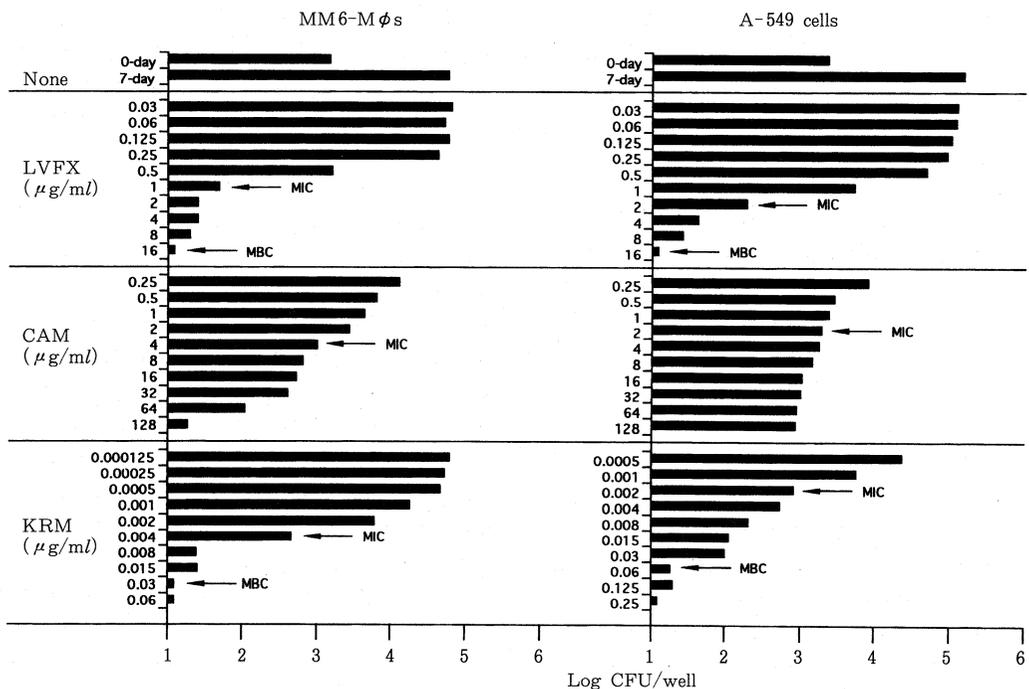


Fig. 1 Determination of the MICs and MBCs of LVFX, CAM, and KRM for *M. tuberculosis* Kuroko residing in MM6-Mφs and A-549 cells. Each bar indicates the mean (n=3) and the SEM which fell within a range of 0.01 to 0.28 (average SEM, 0.09). MIC value was defined as the lowest concentration of a given drug added in culture medium which caused complete inhibition of the organisms. MBC was defined as the lowest concentration of the drugs which gave more than 2-log unit reduction of bacterial CFU after 7-day cultivation of infected cells.

Table 1 MICs and MBCs of LVFX, CAM, and KRM for extracellular (7HSF medium) or intracellular (MM6-M ϕ s, A-549 cells) *M. tuberculosis* Kurono

Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
	7HSF	MM6-M ϕ s	A-549 cells	7HSF	MM6-M ϕ s	A-549 cells
LVFX	0.25	1	2	0.5	16	16
CAM	16	4	2	>128	>128	>128
KRM	0.004	0.004	0.002	0.004	0.03	0.06

(20CFU/well) 以下である。(2) 培養7日間では有意なレベルの細胞傷害が認められないことから、細胞内局在菌の培地中への遊離の可能性は低い。(3) 薬剤添加あるいは非添加を問わず、培養7日後の培地中の細胞外菌数は本実験系で得られたCFU値の少なくとも1/40以下であり、これは培養開始時点で培地中に残存していたかもしれないわずかな数(検出限界値)の菌が細胞外で増殖したと仮定した場合の予測値(結核菌: 2×10^2 CFU/well; MAC: 3×10^3 CFU/well)を越えるものでもない。したがって、培地中での細胞外菌の増殖による菌数あるいは細胞傷害により培地中へ遊離した菌数は無視し得る程度のものである。(4) 菌感染細胞のZiehl-Neelsen染色像から計算したウェル当たりの菌数と実際のCFU値はほぼ一致する。

結 果

Fig. 1には、結核菌感染細胞(MM6-M ϕ , A-549細胞)を各濃度のLVFX, CAMおよびKRMを含む培地中で培養した場合の7日間培養後の生残菌数、並びにこれらの成績より求められた上記3薬剤の細胞内局在菌に対するMICとMBC(MBCが特定できないものについては図示していない)を示した。また、Table 1には7HSF培地中の結核菌に対するこれら3薬剤のMICとMBC値を示すとともに、Fig. 1より得られた値も併記した。KRMでは細胞外結核菌(7HSF)あるいは細胞内結核菌(MM6-M ϕ , A-549細胞)の別なく同程度のMIC値が得られたが、LVFXの細胞内結核菌に対するMIC値(1~2 $\mu\text{g/ml}$)は、細胞外結核菌に対するMIC値(0.25 $\mu\text{g/ml}$)よりも4~8倍高い値になること、他方CAMでは逆に細胞内結核菌に対するMIC値(2~4 $\mu\text{g/ml}$)に比べて細胞外結核菌に対するMIC値(16 $\mu\text{g/ml}$)は4~8倍と若干高いことが分かった。一方、MBCについても、CAMを除く他2剤の細胞内結核菌に対するMBC値(LVFX: 16 $\mu\text{g/ml}$; KRM: 0.03~0.06 $\mu\text{g/ml}$)は、細胞外結核菌に対するMBC値(LVFX, 0.5 $\mu\text{g/ml}$; KRM, 0.004 $\mu\text{g/ml}$)

よりも8~32倍高値側に傾くことが分かった。

ところでFig. 1から明らかなごとく、LVFXとKRMはMM6-M ϕ 並びにA-549細胞内結核菌のいずれに対してもほぼ濃度依存性の殺菌作用を示した。しかしながら、CAMの場合では、いずれの細胞内結核菌に対してもMBC値(>128 $\mu\text{g/ml}$)は高く、MM6-M ϕ 内結核菌に対してはある程度の殺菌作用を示すものの、A-549細胞内結核菌に対しては静菌的作用を示すに留まった。CAMはMM6-M ϕ およびA-549細胞内結核菌のいずれに対してもほぼ等しいMIC値を有するという成績からすると、この現象が単にこれら細胞内に取り込まれた薬剤濃度の違いに起因したものに過ぎないという可能性は薄いように思われるが、その詳細は不明である。

次にMAC N-444について検討した。Fig. 2およびTable 2には先の結核菌の場合と同様な検討を行って得られた成績を示した。LVFXやCAMの場合では、細胞外MAC菌およびMM6-M ϕ , A-549細胞内MAC菌に対するこれら薬剤のMIC値は、LVFXでは16~32 $\mu\text{g/ml}$, CAMでは1~8 $\mu\text{g/ml}$ に分布しており、互いに大きな差はみられなかった。他方、KRMの場合では、A-549細胞内MAC菌に対するMIC値(0.25 $\mu\text{g/ml}$)は、細胞外MAC菌やMM6-M ϕ 内MAC菌に対するMIC値(0.06~0.008 $\mu\text{g/ml}$)に比べて4~32倍と高まることが分かった。また、MBCについても同様な成績が得られたが、特に両細胞内MAC菌に対する供試薬剤のMBC(LVFX, 128 $\mu\text{g/ml}$; CAM, >64 $\mu\text{g/ml}$; KRM, 1~>4 $\mu\text{g/ml}$)は細胞外MAC菌に対するMBC(LVFX, 32 $\mu\text{g/ml}$; CAM, 32 $\mu\text{g/ml}$; KRM, 1 $\mu\text{g/ml}$)に比べて若干高まる傾向が認められた。

なお、Fig. 2から明らかなごとく、いずれの細胞内MAC菌に対しても各薬剤はほぼ濃度依存性の抗菌活性を示すことが分かった。

考 察

今回の成績より、MM6-M ϕ 内に局在する結核菌や

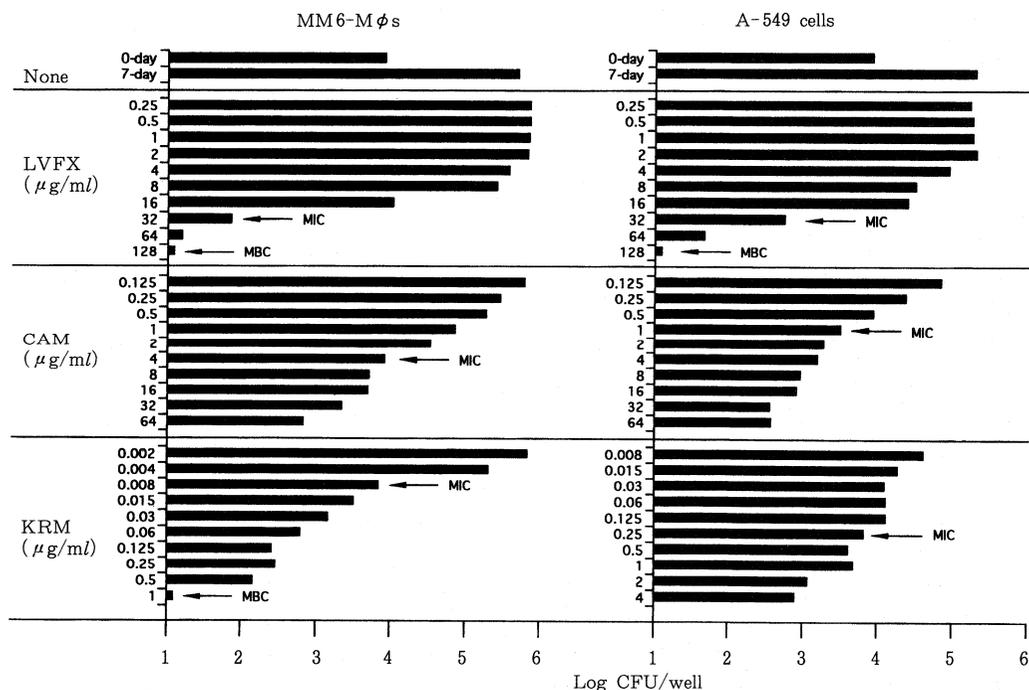


Fig. 2 Determination of the MICs and MBCs of LVFX, CAM, and KRM for MAC N-444 residing in MM6-M ϕ s and A-549 cells. Each bar indicates the mean ($n=3$) and the SEM which fell within a range of 0.01 to 0.22 (average SEM, 0.07). Other details are the same as in Fig. 1.

Table 2 MICs and MBCs of LVFX, CAM, and KRM for extracellular (7HSF medium) or intracellular (MM6-M ϕ s, A-549 cells) MAC N-444

Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
	7HSF	MM6-M ϕ s	A-549 cells	7HSF	MM6-M ϕ s	A-549 cells
LVFX	16	32	32	32	128	128
CAM	8	4	1	32	>64	>64
KRM	0.06	0.008	0.25	1	1	> 4

MACに対するLVFXとCAMの抗菌活性をMICを指標としてみた場合には、A-549細胞内における場合と大差ないことが分かった。しかしながら、A-549細胞内に局在するMAC菌に対するKRMのMIC値($0.25\mu\text{g/ml}$)はMM6-M ϕ 内MAC菌に対するMIC値($0.008\mu\text{g/ml}$)と比べて32倍と著しく高まることが明らかになった。他方、結核菌の場合ではこのような現象は認められなかった。したがって、A-549細胞内MAC菌に対するKRMのMIC値上昇という現象は、

A-549細胞内へのKRMの取り込みの低さに起因したものと考え難く、これらの菌のA-549細胞内での局在部位の違いに起因する可能性が高いように思われる。

これに関連して、MM6-M ϕ とA-549細胞内結核菌に対するLVFX、CAMおよびKRMの抗菌活性を細胞内CFUの推移を指標として詳細に検討した場合には、上述のMACに対するKRMのMIC値の上昇という現象に加えて、LVFXのA-549細胞内結核菌に対する抗菌活性についても、MM6-M ϕ 内結核菌に対する抗菌

活性に比べて低下するという現象を認めている(未発表)。また、われわれ⁴⁾や Mehta ら³⁾により、II型肺胞上皮細胞内局在結核菌や MAC (*M. intracellulare*) に対するアミカシンや KRM の抗菌作用が Mφ 内の結核菌に対するよりも低下するという事も見いだされている。

以上の成績などを勘案するに、ある種の抗菌剤では、II型肺胞上皮細胞内へ侵入し増殖している抗酸菌に対する抗菌作用は Mφ 内の菌に対する抗菌力に比べて著しく低下してしまうような現象が、生体内でも普遍的にみられる可能性が高い。したがって、KRM が極めて強力な *in vitro* 抗 MAC 抗菌力を有しているにもかかわらず、MAC 感染症に対する治療効果は CAM よりもかえって弱い場合があるという一見奇異な現象⁷⁾⁸⁾の理由の一つとして、あるいはこのような説明が可能であるのかもしれない。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費並びに厚生省科学研究費によった。

レボフロキサシン、クラリスロマイシンおよび KRM-1648 を提供頂いた第一製薬株式会社、大正製薬株式会社および鐘淵化学工業株式会社に深謝します。

文 献

- Bermudez LE, and Goodman J: *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun.* 1996; 64: 1400-1406.
- McDonough KA, and Kress Y: Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; 63: 4802-4811.
- Mehta PK, King CH, White EH, et al.: Comparison of *in vitro* models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. *Infect Immun.* 1996; 64: 2673-2679.
- Sato K, and Tomioka H: Antimicrobial activities of benzoxazinorifamycin (KRM-1648) and clarithromycin against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex within murine peritoneal macrophages, human macrophage-like cells and human alveolar epithelial cells. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43: 351-357.
- Wright EL, Quenelle DC, Suling WJ, et al.: Use of Mono Mac 6 human monocytic cell line and J774 murine macrophage cell line in parallel antimycobacterial drug studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2206-2208.
- Saito H, Sato K, Tomioka H, et al.: *In vitro* antimycobacterial activity of a new quinolone, levofloxacin (DR-3355). *Tuberc Lung Dis.* 1995; 76: 377-380.
- 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇: 第71回総会シンポジウム. II. 非定型抗酸菌症の化学療法 —ニューマクロライド剤とニューキノロン剤—. 2. *Mycobacterium avium* complex 症に対する治療薬剤の基礎的検討—ニューマクロライド剤とニューキノロン剤を中心として—. *結核.* 1996; 71: 531-535.
- 佐藤勝昌, 富岡治明: 第73回総会シンポジウム. II. 結核治療における新薬の展望. 3. キノロン, リファマイシン, マクロライド剤の *in vitro* 抗結核菌および抗 MAC 抗菌活性, 特に *in vivo* 治療効果との関連から. *結核.* 1999; 74: 63-70.
- 佐藤勝昌, 赤木竜也, 富岡治明: *Mycobacterium avium* complex に対する KRM-1648, クラリスロマイシンおよびレボフロキサシンの臨床投与後の血中濃度に相当する *in vitro* 濃度での抗菌活性. *結核.* 1997; 72: 449-452.
- Heifets LB: Clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infections. *Tuberc Lung Dis.* 1996; 77: 19-26.
- Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: *In vitro* and *in vivo* activities of clarithromycin against the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrob Agents.* 1994; 4: 175-181.
- Tomioka H, Saito H, Fujii K, et al.: *In vitro* antimicrobial activity of benzoxazinorifamycin, KRM-1648 against *Mycobacterium avium* complex, determined by the radiometric method. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37: 67-70.
- 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.
- 佐藤勝昌, 富岡治明, 斎藤 肇, 他: 新リファマイシン系薬剤 KRM-1648 の *in vitro* 抗結核菌作用. *結核.* 1996; 71: 459-464.
- Sato K, Akaki T, and Tomioka H: Antimi-

crobial activities of benzoxazinorifamycin KRM-1648, clarithromycin, and levofloxacin against intracellular *Mycobacterium avium* complex phagocytosed by murine preitoneal macrophages. J Antimicrob Chemother. 1998 ; 41 : 77-83.

16) Yajuko DM, Nassos PS, and Hadley WK : Broth microdilution testing of susceptibilities to 30 antimicrobial agents of *Mycobacterium avium* from patients with acquired immune deficiency syndrome. Antimicrob Agents Chemother. 1987 ; 31 : 1579-1584.