

原 著

肺胞上皮細胞およびマクロファージ内での結核菌と
Mycobacterium avium complex の増殖能について

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

INTERNALIZATION AND REPLICATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
AND *M. AVIUM* COMPLEX WITHIN TYPE II ALVEOLAR EPITHELIAL CELL LINE

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

*Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

Profiles of internalization and replication of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) or *M. avium* complex (MAC) within A-549 human type II alveolar epithelial cell line (A-549 cells) were studied and the results were compared with the mode of internalizing and proliferative behaviors of the organisms within murine peritoneal macrophages (M ϕ s) and various M ϕ -like cell lines (murine J774A. 1, human THP-1, and human MONO-MAC-6). First, MTB and MAC internalized not only in peritoneal M ϕ s and M ϕ -like cell lines but also in A-549 cells. Secondly, MTB and MAC replicated within A-549 cells and these organisms displayed much more vigorous intracellular multiplication in A-549 cells than in murine peritoneal M ϕ s and J774A. 1 M ϕ -like cell line. Human M ϕ -like cell lines (THP-1, MONO-MAC-6) allowed the growth of MTB and MAC equally or occasionally more rapidly, as compared to the case of A-549 cells.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*,
Mycobacterium avium complex, Type II al-
veolar epithelial cells, Macrophages

キーワード : 結核菌, *Mycobacterium avium*
complex, 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)
などの抗酸菌は貪食細胞によって貪食されるのみならず、

non-professional phagocyteである培養上皮細胞株
(HeLa, HT-29, HEP-2)へも内在化することが知ら
れており^{1)~5)}, Shepard²⁾は結核菌のHeLa細胞へ
の内在化とヒトおよび動物に対する病原性との間には相

*〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

* 89-1 Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan.
(Received 23 Mar. 1999/Accepted 3 Jun. 1999)

関がみられることを報告している。結核菌の HeLa 細胞への内在化をコードする DNA 断片はすでにクローニングされ⁴⁾, *mce* 遺伝子として登録されているが (GenBank/EMBL, accession no. X70901), この遺伝子は HeLa 細胞への菌の内在化を付与するのみならず, マクロファージ (Mφ) による菌の取り込み能とその後の菌の生存性のいずれをも高めることが大腸菌の形質転換体を用いた実験で明らかにされている⁴⁾。また, MAC の HEp-2 細胞への内在化に関与するクローニング DNA 断片についても報告されている⁵⁾。

最近, 結核菌や MAC がヒト II 型肺胞上皮細胞株 (A-549細胞) へも内在化し, 増殖することが報告された^{6)~10)}。これらの菌が実際に *in vivo* でも II 型肺胞上皮細胞へ内在化し, その中で増殖しているという確証は得られていないが, *in vitro* 実験系での結果は, 抗酸菌症の発症と進展において II 型肺胞上皮細胞が何らかの関わりを有している可能性を示唆している。結核菌や MAC の II 型肺胞上皮細胞への内在化については, 電顕によって証明されているが^{6)~8)}, これら抗酸菌の II 型肺胞上皮細胞と他の Mφ 系細胞内での増殖性についての詳細な比較検討は行われていない。そこで今回は, 主として結核菌および MAC のこれら細胞内での増殖性についての検討を試みた。

材料と方法

(1) 供試菌: 結核菌 Kurono 株, H37Rv 株, H37Ra 株; *M. avium* N-444株および *M. intracellulare* N-260株を用いた。いずれも 7H9 培地中, 37°C で 7~10 日間培養し, 遠心・洗浄後に 1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有リン酸緩衝生理食塩液に浮遊させた。次いで, 超音波処理によって可能な限り単個菌液とした後に -80°C に保存した。用時にこれら菌液を溶解し, 再度の超音波処理後に実験に供した。

(2) 細胞: 以下の細胞を供試した。

マウス腹腔 Mφ (腹腔 Mφ): BALB/c 系メスマウス (8~12週齢: 日本クレア) の腹腔に Zymosan A の 1 mg を腹腔内投与して誘導した。

J774A.1 マウス Mφ 様細胞株 (J774-Mφ): American Type Culture Collection (ATCC) (米国) より入手した。

THP-1 ヒト Mφ 様細胞株 (THP-Mφ): ATCC より入手した。

MONO-MAC-6 ヒト Mφ 様細胞株 (MM6-Mφ): German Collection Microorganisms and Cell Cultures (ドイツ) より入手した。

A-549ヒト II 型肺胞上皮細胞株 (A-549細胞): ATCC

より入手した。

付着性細胞である腹腔 Mφ, J774-Mφ および A-549細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS; Bio Whittaker, 米国) を添加した 2 mM L-グルタミン含有 Ham's F-12K (大日本製薬, 大阪) 培地中で, 浮遊性細胞である THP-Mφ は 10% FBS を添加した 2 mM L-グルタミン含有 RPMI 1640 (日水製薬, 東京) 培地中で, また同じ浮遊性細胞の MM6-Mφ はこの 10% FBS-RPMI 1640 培地にさらに 1% non-essential amino acids (Bio Whittaker), 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Bio Whittaker) および 9 μg/ml 牛インシュリン (和光純薬, 大阪) を添加した培地中で, それぞれ 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で前培養した。

(3) 感染菌の細胞内動態の測定: 細胞内生菌数の計測は以下のように行ったが, 本実験系で得られた値は細胞内菌数を反映したものであることが確かめられている¹⁰⁾。

腹腔 Mφ の場合: 腹腔細胞を 5% FBS-Ham's F-12K 培地に 1 × 10⁶ 細胞/ml となるように浮遊させ, その 1 ml を 24 ウェルプレート (平底) に加え, 2 時間培養した。細胞の単層培養を 2% FBS 加ハンクス氏液 (HBSS) で 3 回洗浄後 (この時の付着細胞を腹腔 Mφ とし, ギムザ染色して細胞数を計測したところ 1~2 × 10⁵ 細胞/ウェルであった), 供試菌を浮遊させた培地 (500 μl) 中で 2 時間培養した。次いで, 2% FBS-HBSS で細胞外非感染菌を洗浄・除去後, 1 ml の 1% FBS-Ham's F-12K 培地を添加し (0-day), 7 日間にわたって培養した。所定日に各ウェルに 0.23% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の 400 μl を加えて細胞を溶解した後, これを 20% BSA (600 μl) と混じることにより SDS を中和させた。次いで, 結核菌の場合は 0.05% Tween 80 水で, MAC の場合は, Tween 80 を使用する と集落が diffuse 型となり, 顕微鏡下での CFU 計測が困難になるので蒸留水で, 10 倍階段希釈を行い, その 10 μl を 7H11 寒天培地上にスポットし, 5~10 日培養後に細胞内菌数を計測した。

J774-Mφ と A-549細胞の場合: 細胞を 5% FBS-Ham's F-12K 培地に 2 × 10⁵ 細胞/ml となるように浮遊させ, その 1 ml を 24 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, 供試菌を浮遊させた培地 (500 μl) 中で 2 時間培養した。次いで, 2% FBS-HBSS で洗浄し細胞外非感染菌を除去した後に, 1% FBS-Ham's F-12K 培地 (1 ml) 中で 7 日間にわたって培養した。所定日に前述の腹腔 Mφ の場合と同様の方法で, 細胞内菌数を計測した。

THP-Mφ と MM6-Mφ の場合: 細胞を 5% FBS-

RPMI 1640培地に浮遊 (8×10^5 細胞/ml) させた後、このものの5 mlを同培地での供試菌浮遊液の等量とともに75cm²の組織培養用フラスコ (Corning, 米国) に加えた。これらを3時間培養後に回収し、細胞外の菌を除去するために2% FBS-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 2×10^5 細胞/mlに調整した。次いで、これらの200 μlを96ウェルプレート (U底) へ加え、7日間にわたって培養し、前述の付着性細胞の場合と同様の方法で (SDS, 80 μl; 20% BSA, 120 μl), 細胞内菌数を計測した。

なお、細胞当たりの感染菌数 (MOI) は細胞と感染菌の組合せ毎に異なっている。

結 果

1) 結核菌と MAC の A-549細胞への内在化

結核菌と MAC の A-549細胞への内在化については McDonough ら⁶⁾, Bermudez ら⁷⁾, Mehta ら⁸⁾ の電顕的検討により確かめられているが、今回はこの点について生菌数算定により検討した。

その結果、結核菌 H37Rv 株 (MTB Rv) と同 H37Ra 株 (MTB Ra) および *M. avium* N-444 株 (MA) と *M. intracellulare* N-260 株 (MI) を MOI=

10で A-549細胞と腹腔 Mφへ感染させた場合の細胞内生菌数 (CFU/100細胞: n=3, 平均値±SEM) は、A-549細胞におけるよりも腹腔 Mφにおけるほうが多く、それぞれ、A-549細胞; 22.2 ± 2.20 (MTB Rv), 12.9 ± 0.72 (MTB Ra), 0.93 ± 0.05 (MA), 0.95 ± 0.05 (MI); 腹腔 Mφ; 322 ± 21.9 (MTB Rv), 86.2 ± 11.2 (MTB Ra), 11.8 ± 0.25 (MA), 37.2 ± 1.59 (MI) のごとくであった。なお、別の実験で、結核菌 Kurono 株を A-549細胞と J774-Mφへ感染させた場合にも、A-549細胞に対する MOI (0.25) は J774-Mφへの MOI (0.045) より多いにもかかわらず細胞内生菌数は少なかった (A-549細胞; 2.35 ± 0.14 ; J774-Mφ; 36.5 ± 2.02)。

次に、*M. avium* N-444株 (MA) と *M. intracellulare* N-260株 (MI) を MOI=25で A-549細胞と J774-Mφへ感染させた場合はそれぞれ、A-549細胞; 5.27 ± 0.97 (MA), 5.17 ± 0.43 (MI); J774-Mφ; 188 ± 8.34 (MA), 55.3 ± 0.83 (MI) のごとくであった。

以上の成績は、結核菌と MAC は A-549細胞に内在化することを示しているが、professional phagocyte である他の Mφ系細胞株へのそれと比較してその程度は弱いものであった。なお、この関係は供試した Mφ系細胞がプラスチックウェルへの付着性をもった細胞の場合にのみ成立するものであり、Mφが浮遊性である THP-

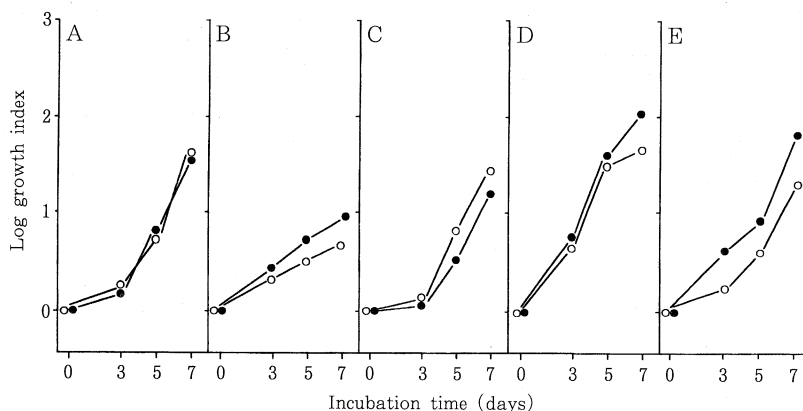


Fig. 1 Growth of *M. tuberculosis* in A-549 human type II alveolar epithelial cells (A), Zymosan A-induced murine peritoneal Mφs (B), J774A.1 murine Mφ-like cells (C), THP-1 human Mφ-like cells (D), and MONO-MAC-6 human Mφ-like cells (E). Results are shown in log units increase in the growth index of intracellular organisms. Each plot shows the mean (n=3). The SEM fell within a range of 0.01 to 0.10 (average SEM, 0.03). The values of Log CFU/well at 0-time of the organisms residing in tested cells were as follows, respectively (the value in the parenthesis shows MOI): H37Ra (○); A: 4.21 ± 0.01 (10), B: 4.13 ± 0.01 (2), C: 4.73 ± 0.07 (1), D: 2.80 ± 0.07 (37.5), E: 3.50 ± 0.01 (50). Kurono (●); A: 3.62 ± 0.05 (0.25), B: 3.68 ± 0.03 (0.032), C: 4.73 ± 0.07 (0.045), D: 2.84 ± 0.04 (0.5), E: 3.25 ± 0.01 (0.5).

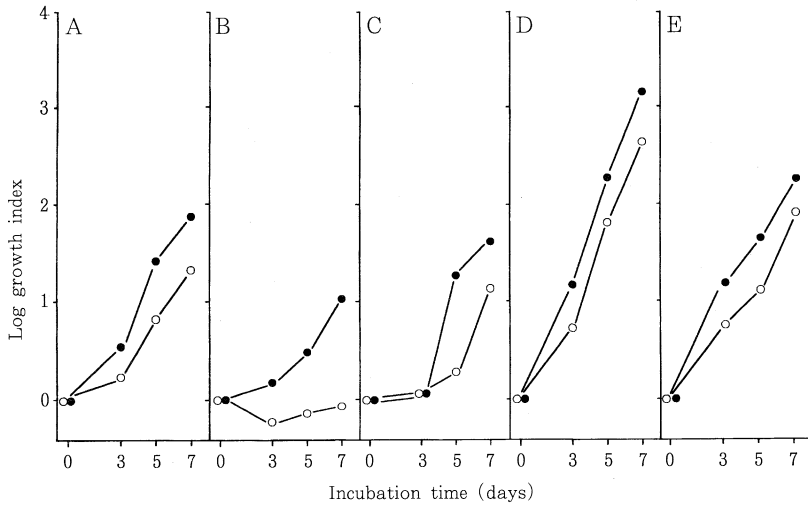


Fig. 2 Growth of *M. avium* complex in A-549 human type II alveolar epithelial cells (A), Zyosan A-induced murine peritoneal Mφs (B), J774A.1 murine Mφ-like cells (C), THP-1 human Mφ-like cells (D), and MONO-MAC-6 human Mφ-like cells (E). Results are shown in log units increase in the growth index of intracellular organisms. Each plot shows the mean (n=3). The SEM fell within a range of 0.01 to 0.12 (average SEM, 0.04). The values of Log CFU/well at 0-time of the organisms residing in tested cells were as follows, respectively (the value in the parenthesis shows MOI): *M. avium* N-444 (○); A: 4.97 ± 0.01 (100), B: 4.86 ± 0.04 (7), C: 5.24 ± 0.01 (3.5), D: 2.40 ± 0.10 (50), E: 2.69 ± 0.06 (25). *M. intracellulare* N-260 (●); A: 4.61 ± 0.02 (100), B: 4.84 ± 0.03 (20), C: 5.00 ± 0.04 (10), D: 2.40 ± 0.06 (50), E: 2.58 ± 0.03 (50).

MφとMM6-Mφの場合では、抗酸菌のこれらへの内在化はむしろA-549細胞における方が高い傾向にあった。すなわち、結核菌Kurono株をMOI=0.5で感染させた場合はそれぞれ、A-549細胞; 5.58 ± 0.43 : THP-Mφ; 1.77 ± 0.16 : MM6-Mφ; 4.41 ± 0.12 のごとくであり、*M. intracellulare* N-260株をMOI=50で感染させた場合は、A-549細胞; 9.83 ± 0.96 : THP-Mφ; 0.72 ± 0.16 : MM6-Mφ; 1.05 ± 0.08 のごとくであった。

2) 供試菌の細胞内での増殖動態

次に、結核菌とMACのA-549細胞内での増殖能を他のMφ系細胞での場合と比較検討した。この場合、培養開始時点での細胞内菌数を可能なかぎりそろえるために、感染菌のMOIは各供試菌と細胞の組合せごとに調整している。なお、以下の実験では結核菌H37Rv株よりもマウスに対してより強毒であるKurono株を供試した¹¹⁾。

Fig. 1には結核菌の細胞内増殖動態についての成績を示した。結核菌Kurono株およびH37Ra株のいずれの場合も、A-549細胞内での菌の増殖は腹腔Mφや

J774-Mφ内でのそれに比べてより旺盛であるが、MM6-Mφ内でのそれとはほぼ同程度であった。供試細胞中、THP-Mφ内での結核菌の増殖が最も旺盛であった。次に、結核菌の強毒株(Kurono)と弱毒株(H37Ra)の各細胞内での増殖性について比較してみたところ、いずれの結核菌株ともA-549細胞内ではそのビルレンスの別なくほぼ同程度の増殖能を示した。他方、Mφ系細胞内では、腹腔Mφでは強毒株のKurono株の増殖能は弱毒株のH37Ra株のそれの約2倍であり、同様な傾向はTHP-MφとMM6-Mφの場合にも認められた。これに反して、J774-Mφの場合では逆に弱毒株の方が強毒株よりも細胞内増殖性が高かった。

Fig. 2にはMACの細胞内増殖性についての成績を示した。いずれのMAC菌株ともA-549細胞内での増殖は腹腔MφやJ774-Mφ内でのそれよりも旺盛であるが、THP-MφやMM6-Mφ細胞内における増殖と比べてより緩徐であった。次に、マウスに比較的ビルレンスの弱い*M. avium* N-444株とビルレンスの強い*M. intracellulare* N-260株¹²⁾の各種細胞内増殖性の違いについてみてみると、感染細胞の如何にかかわらず、後

者は常に前者よりも旺盛な細胞内増殖性を示した。

考 察

今回の検討では、結核菌およびMACはnon-professional phagocyteであるA-549ヒトII型肺胞上皮細胞株へある程度内在化することが確かめられたが、その程度はプラスチックウェルへの付着性を有するMφ系細胞内への内在化に比べてより低いことが分かった。この成績は、結核菌のII型肺胞上皮細胞への内在化の際に働く細胞レセプターは、Mφ系の細胞へのそれに関わるレセプターとは異なる、というこれまでの知見によってある程度の説明が可能と思われる^{7)13)~15)}。しかしながら、A-549細胞とプラスチックウェル非付着性の浮遊性Mφ系細胞について比較すると、前者への抗酸菌の内在化の程度は後者へのそれよりもかえって高く、上述したA-549細胞とプラスチックウェル付着性のMφ系細胞との間で認められたものとは逆の関係が成立していた。これは、A-549細胞および腹腔MφとJ774-Mφが付着細胞であることから細胞表面の面積が大きいのに対して、THP-MφとMM6-Mφは付着能を有さない浮遊細胞であることから細胞表面の面積がかなり小さく、単位細胞当たりの菌の接触数は前者の方が後者より多くなることに起因するものと思われる。Wrightら¹⁶⁾のMM6-MφとJ774-Mφについての研究でも同様な傾向が認められている。

Bermudezら⁵⁾は、HEp-2細胞への結核菌の内在化能はMACのそれよりも弱く、これは供試した結核菌株(H37RvとH37Ra)が業室株であり、野生株をもちいればさらに内在化能は高まるであろうと報告しているが、今回のわれわれのA-549細胞を用いた検討では逆に結核菌H37Rv株とH37Ra株における方がMACより強いことが分かった。こうした成績の違いは供試MAC菌株のビルレンスの差に起因するかもしれない。あるいはビルレンスに差がない場合、HEp-2細胞は咽頭上皮細胞に由来するのに対して、A-549細胞は肺胞上皮細胞に由来すること、また結核菌のほとんどの感染部位が肺であることなどを考えると、両細胞の結核菌に対する感受性の差に起因した可能性もあるように思われる。

結核菌やMACのA-549細胞への内在化後の細胞内増殖動態については、THP-Mφを除くMφ系細胞における場合と比較して、概して旺盛かあるいは同等であることがわかった。したがって、*in vivo*でもII型肺胞上皮細胞に内在化したこれらの抗酸菌は、旺盛な細胞内増殖を示すものと考えられる。ところで、今回はヒトMφとしてTHP-MφとMM6-Mφを供試して、それらの中に局在する供試抗酸菌の増殖動態についても比較してみたが、結核菌とMACのいずれでもTHP-Mφ内

の菌の増殖性はMM6-Mφ内でのそれよりも高いことが分かった。このことは、MM6-Mφの方がTHP-Mφよりも殺菌活性が強いこと、すなわち、より成熟したMφであることを示唆している。

われわれは以前よりMM6-MφとA-549細胞を用いて、KRM-1648などのリファマイシン誘導体では、MAC感染マウスに投与した場合、その*in vitro*抗菌力から期待されるほどの治療効果は得られないという現象^{17)~19)}の原因解明の一環として、それら細胞内での結核菌とMACに対する抗菌剤の抗菌活性の発現の様相についての比較検討を行っている。この一連の検討により、リファマイシン系薬剤のA-549細胞内に局在するMAC菌に対する抗菌活性の発現は、MM6-Mφ内に局在するMAC菌に対するものよりも著しく減弱してしまうことが見出されている¹⁰⁾。この現象はリファマイシン系薬剤の*in vitro*抗菌活性と*in vivo*治療効果との乖離現象を解くための一つのキーポイントとなる可能性が考えられる。現在、これら2つの細胞をモデルとしてリファマイシン系薬剤のみならず他の薬剤を供試しての詳細な検討を進めつつある。

文 献

- 1) Shepard CC: Growth characteristics in HeLa cells of the rapidly growing acid fast bacteria, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei*, and *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 1957; 73: 722-726.
- 2) Shepard CC: Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in HeLa cells. J Exp Med. 1957; 105: 39-48.
- 3) Bermudez LE, and Young LS: Factors affecting invasion of HT-29 and HEp-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* complex. Infect Immun. 1994; 62: 2021-2026.
- 4) Arruda S, Bomfim G, Knights R, et al.: Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science. 1993; 261: 1454-1457.
- 5) Bermudez LE, Shelton K, and Young LS: Comparison of the ability of *Mycobacterium avium*, *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* to invade and replicate within HEp-2 epithelial cells. Tuberc Lung Dis. 1995; 76: 240-247.
- 6) McDonough KA, and Kress Y: Cytotoxicity

- for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; 63: 4802-4811.
- 7) Bermudez LE, and Goodman J: *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun.* 1996; 64: 1400-1406.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 佐藤勝昌, 小笠原圭子, 赤木竜也, 他: 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. *結核.* 1999; 74: 571-577.
 - 11) 土井教生: 実験的マウス抗酸菌症の経気道感染モデルの開発: 尾静脈感染モデルとの比較. *結核.* 1998; 73: 339-347.
 - 12) 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.
 - 13) Bermudez LE, Young LS, and Enkel H: Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: Roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect Immun.* 1991; 59: 1697-1702.
 - 14) Ernst JD: Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998; 66: 1277-1281.
 - 15) Zaffran Y, Zhang L, and Ellner JJ: Role of CR4 in *Mycobacterium tuberculosis*-human macrophages binding and signal transduction in the absence of serum. *Infect Immun.* 1998; 66: 4541-4544.
 - 16) 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.
 - 17) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇: *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.
 - 18) 佐藤勝昌, 富岡治明: 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.
 - 19) Sato K, Akaki T, and Tomioka H: Antimicrobial activities of benzoxazinorifamycin KRM-1648, clarithromycin, and levofloxacin against intracellular *Mycobacterium avium* complex phagocytosed by murine peritoneal macrophages. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41: 77-83.