

原 著

マウス腹腔マクロファージの *in vitro* 培養に伴う
抗結核菌活性の変化について

^{1,2}赤木 竜也 ¹佐藤 勝昌 ¹清水 利朗 ¹富岡 治明

¹島根医科大学微生物・免疫学, ²同皮膚科

CHANGES IN ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MURINE PERITONEAL
MACROPHAGES AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
AFTER PROLONGED *IN VITRO* PRECULTIVATION

^{1,2}Tatsuya AKAKI, ¹Katsumasa SATO, ¹Toshiaki SHIMIZU, and ^{1*}Haruaki TOMIOKA

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

²Department of Dermatology, Shimane Medical University

We examined profiles of intramacrophagial growth of *M. tuberculosis* (MTB) when mouse peritoneal macrophages (M ϕ s) were infected with the organisms at day 0 or day 7 after *in vitro* precultivation, and obtained the following results. First, the growth rate of the virulent MTB H37Rv strain as well as attenuated H37Ra strain was slower in M ϕ s which had been precultured for 7 days (M ϕ s [day 7]) than in freshly prepared M ϕ s without precultivation (M ϕ s [day 0]). The doubling time of MTB H37Rv was 2.2 and 2.9 days in M ϕ s [day 0] and M ϕ s [day 7], respectively, and that of MTB H37Ra was 2.9 and 3.6 days in M ϕ s [day 0] and M ϕ s [day 7], respectively. Second, MTB-mediated cytotoxicity in terms of the LDH release from infected M ϕ s was less marked in M ϕ s [day 7] than in M ϕ s [day 0], when they were infected with MTB of either the H37Rv or H37Ra strain. MTB H37Ra strain exhibited much weaker cytotoxic effects on host M ϕ s than did H37Rv strain. Third, when M ϕ s [day 7] were infected with MTB of either the H37Rv or H37Ra strain, they showed markedly lowered levels of reactive oxygen intermediate (ROI) production than did M ϕ s [day 0]. In contrast, the reactive nitrogen intermediate (RNI) producing ability of M ϕ s in response to MTB infection was not so markedly reduced in M ϕ s [day 7] from that of M ϕ s [day 0]. As mentioned above, the M ϕ s [day 7] did not permit accelerated growth of infected MTB, compared to the MTB growth in the M ϕ s [day 0]. It thus appears that ROI played a trivial role in the antimicrobial activity against MTB of murine peritoneal M ϕ s which had been precultured for long periods. Although it is regarded that RNI played more critical roles in M ϕ anti-MTB activity than did ROI, the present results also suggest that other kinds

*〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

* 89-1, Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan.
(Received 28 Jan. 2000 / Accepted 28 Apr. 2000)

of antimicrobial effectors are required in M ϕ antimicrobial activity against MTB organisms, particularly in the case of M ϕ s after prolonged *in vitro* cultivation.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Macrophages, Reactive nitrogen intermediates, Reactive oxygen intermediates, Cytotoxicity

キーワードズ：結核菌，マクロファージ，活性酸化窒素，活性酸素，細胞毒性

はじめに

マクロファージ (M ϕ) の殺菌エフェクターとしては、主に活性酸素 (ROI), nitric oxide (NO) などの活性酸化窒素 (RNI), アラキドン酸やリノレン酸などの遊離脂肪酸 (FFA) および塩基性殺菌蛋白などが知られているが、それらが M ϕ 内の結核菌に対する殺菌メカニズムにおいて果たす役割については未解明な点が多い^{1)~3)}。われわれは、このような殺菌エフェクターが M ϕ 内での結核菌や *M. avium* complex (MAC) などの抗酸菌の殺菌や増殖抑制にどのような形でかかわっているのかについての諸検討を進めてきているが⁴⁾⁵⁾、その結果、結核菌や MAC 菌の M ϕ 内増殖は誘導型 NO synthase (iNOS) 阻害剤 (N^G-monomethyl-L-arginine, aminoguanidine), 並びに ROI scavenger (superoxide dismutase, catalase) により助長されることを見いだした⁴⁾⁶⁾。この成績は、M ϕ 内での結核菌や MAC に対する抗菌・殺菌メカニズムにおいては RNI, ROI といった殺菌エフェクターが重要な役割を演じていることを示唆している。

ところで、最近 Paul ら⁷⁾ により、ヒト単球を予め 5~8 日間 *in vitro* で前培養して誘導した M ϕ に結核菌を感染させた場合では、M ϕ 細胞内での菌の増殖が、donor より採取・調製したばかりの単球に結核菌を感染させた場合に比べて著しく抑制されることが報告されている。同様な現象は既に Douvas ら⁸⁾ によっても報告されているが、単球を *in vitro* で前培養した場合には O₂⁻ 産生能の有意な増強が認められており、単球を *in vitro* で前培養することによって培養 M ϕ に付与される結核菌に対する増殖抑制能の発現メカニズムにおける ROI の積極的なかわりには否定的である。

今回は、上述のように M ϕ を一定期間前培養した場合に認められる結核菌に対する増殖抑制能の発現メカニズムについて検討することを目的として、マウス腹腔 M ϕ を *in vitro* で 7 日間前培養した後に結核菌を感染させた場合の、M ϕ 内での結核菌の増殖動態および感染 M ϕ への細胞障害活性の発現の様相、並びに M ϕ 側のレ

スポンズとしての RNI, ROI 産生動態について検討した。

材料と方法

(1) 供試菌：結核菌 H37Rv 株および同 H37Ra 株を用いた。

(2) M ϕ 内での結核菌の増殖動態：BALB/c マウスよりの Zymosan A (1 mg を 4 日前に ip 投与) 誘導腹腔滲出細胞 (1 \times 10⁶) を 16 mm 径のプラスチック培養ウェルにまき、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベート後、2% 牛胎児血清 (FBS) 加ハンクス氏液 (HBSS) で洗浄して M ϕ 単層培養を得た。この調製直後の M ϕ 単層培養系、あるいはこれをさらに 1 ml の 5% FBS 加 Ham's F-12K 培地 (F-12K 培地) 中で 7 日間にわたり前培養して得られた M ϕ 細胞培養系に供試菌株を加え、2 時間インキュベートして菌を M ϕ に感染させた。なお、この場合供試結核菌の M ϕ への感染効率をそろえるために、接種菌量は H37Rv 株で 8 \times 10⁴ CFU/well, H37Ra 株で 2 \times 10⁵ CFU/well とした。次いで、M ϕ 単層培養を 2% FBS-HBSS で 3 回洗浄して非感染結核菌を除去した後、5% FBS 加 F-12K 培地中で 10 日間にわたり培養した。所定時間後に M ϕ 培養ウェルに 0.07% SDS を加え M ϕ を溶解させ、さらに牛血清アルブミンで SDS を中和した。その後 M ϕ 培養ウェル中の生残結核菌の CFU を 7H11 寒天平板上で計測し、0 time での CFU 数で割った増加倍率を growth index としてあらわした。

(3) 供試結核菌の M ϕ に対する細胞障害性：結核菌の感染と細胞内での増殖に起因した宿主 M ϕ の細胞障害の度合いは、感染 M ϕ からの乳酸脱水素酵素 (LDH) の遊離を指標として以下のごとくに測定した。すなわち、上述の結核菌感染後の M ϕ 培養上清を経時的に採取し、その培養上清中への LDH の遊離量を LDH-Cytotoxic Test Wako キット (和光純薬) を用い、添付のマニュアルの方法に従って測定した。本キットは、検体中の LDH 量を本酵素による乳酸の脱水反応に伴う NAD の還元リンクさせた NBT の還元によるフォルマザン

生成をOD_{550nm}値の増加を指標に測定するものであり、%細胞障害度(LDH release(%))は次式により算出される。

$$\%細胞障害度 = \frac{M\phi \text{培養上清の OD}_{550nm}}{M\phi \text{を溶解させた後の M}\phi \text{培養液の OD}_{550nm}} \times 100$$

(4) M ϕ のRNI産生能: 結核菌感染M ϕ のNO産生能は、H37Rv株あるいはH37Ra株(各 1×10^8 /ml)との接触およびその感染(内在化)で刺激した供試M ϕ を24時間培養し、その培養上清中へのNO₂⁻イオンの蓄積を、既報のごとく、Griess法で求めることにより測定した⁹⁾。

(5) M ϕ のROI産生能: 結核菌感染M ϕ のROI(O₂⁻)産生能は、供試M ϕ をH37Rv株あるいはH37Ra株(各 1×10^8 /ml)および80 μ MチトクロームCを含む10mM HEPES加HBSS(1ml)中で1時間インキュベートし、既報のごとく上清中のチトクロームCの還元を550nmでの吸光度の変化を指標に求めることにより測定した¹¹⁾。

結 果

1. *In vitro* 培養後の腹腔M ϕ 内での結核菌の増殖動態

Fig. 1には、調製直後のM ϕ (M ϕ [day 0])および、これを*in vitro*で7日間前培養後のM ϕ (M ϕ [day

7])に結核菌を感染させた場合の菌のM ϕ 内増殖動態を示した。なお、ウェル上のM ϕ 数はM ϕ [day 0]、M ϕ [day 7]で各々 7.5×10^5 、 4.9×10^5 であった。まず、強毒株であるH37Rv株を感染させたM ϕ についてみると、菌の増殖速度はM ϕ [day 0] > M ϕ [day 7] ($P < 0.05$)であり、その世代時間はM ϕ [day 0]で約2.2日、M ϕ [day 7]で2.9日であった。他方、弱毒株であるH37Ra株を感染させたM ϕ についてみると、菌の増殖速度は感染10日目での生菌数の比較ではM ϕ [day 0] \approx M ϕ [day 7]であったが、その増殖曲線から求めた世代時間でみるとM ϕ [day 0]で約2.9日、M ϕ [day 7]で3.6日であり、この場合もM ϕ [day 7]での菌の増殖速度はM ϕ [day 0]でのそれよりもやや遅くなる傾向が認められた。培養7日後の培地中の細胞外菌数は本実験で得られたCFU値の少なくとも1/100であり培地中での細胞外菌の増殖による菌数あるいは細胞障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った。なお成績は省略するが、臨床分離強毒株であるKurono株でも上述のH37Rv株の場合と同様な成績が得られている。

2. M ϕ [day 0]およびM ϕ [day 7]に及ぼす感染結核菌の細胞障害性

Fig. 2は、M ϕ [day 0]およびM ϕ [day 7]に結核菌H37Rv株あるいはH37Ra株を感染させた場合に感染菌の増殖に伴う細胞障害の度合いを、細胞よりのLDHの遊離を指標としてみたものである。M ϕ [day 0]、

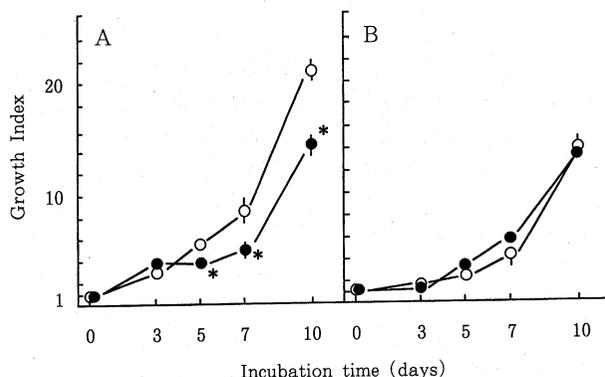


Fig. 1 Profiles of intracellular growth of MTB H37Rv (A) and H37Ra (B) strains in murine peritoneal M ϕ s, which were infected with the organisms at day 0 without precultivation (○) (M ϕ s [day 0]) or given bacterial challenge after 7-day precultivation *in vitro* (●) (M ϕ s [day 7]). Each plot indicates the mean \pm SEM (n=3). The SEM bar was omitted when it fell within a range of 0.01 to 0.2. The 0-time values of log CFU/well were as follows: M ϕ s [day 0], 4.25 (H37Rv) and 4.13 (H37Ra); M ϕ s [day 7], 4.53 (H37Rv) and 4.46 (H37Ra). *, Significantly smaller than the values of M ϕ s [day 0] ($P < 0.05$; Student's *t*-test).

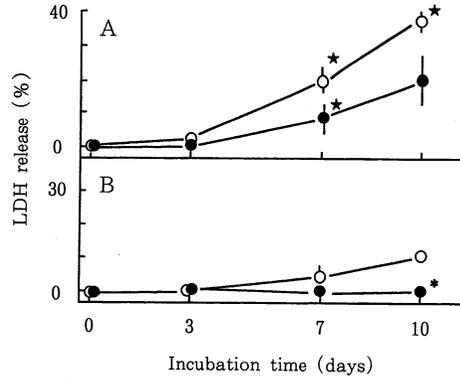


Fig. 2 Prolonged precultivation of murine peritoneal Mφs before MTB infection decreased their susceptibility to MTB-mediated cytotoxicity. Test Mφs were infected with either MTB H37Rv (A) or H37Ra (B) strain before (○) or after (●) 7-day precultivation. The MTB-infected Mφs were then cultivated for up to 10 days, and the degree of MTB-induced cytotoxicity was measured in terms of LDH release from the Mφs. The SEM bar was omitted when it fell within a range of 0.01 to 1.5. ★, Significantly larger than the value of MTB H37Ra strain. The other details are the same as in Fig. 1.

Mφ [day 7] いずれの場合とも感染 Mφ に及ぼす菌の細胞障害性は H37Rv 株 > H37Ra 株であった ($P < 0.05$)。なお Mφ [day 7] に結核菌を感染させた場合にみられる細胞障害性の程度は、H37Rv 株および H37Ra 株いずれの場合でも Mφ [day 0] でのそれに比べてやや低くなる傾向が認められた ($P < 0.05$)。

3. Mφ [day 0] および Mφ [day 7] の結核菌感染に応答しての RNI, ROI 産生

Fig. 3 は、Mφ [day 0] および Mφ [day 7] を結核菌 H37Rv 株あるいは H37Ra 株で感染させ刺激した場合の Mφ 細胞側のレスポンスを、Mφ の主要な殺菌エフェクターである RNI と ROI の産生能の変動を指標としてみたものである。供試 Mφ を H37Rv 株あるいは H37Ra 株で刺激したいずれの場合でも、RNI および ROI 産生能は Mφ [day 7] < Mφ [day 0] であった ($P < 0.01$)。この場合、Mφ [day 7] での ROI 産生能の低下が特に著しいことが分かった。なお、Mφ [day 0] に対する RNI, ROI 産生の誘導能は H37Ra 株 > H37Rv 株であった。

考 察

以上のごとく、マウスの腹腔内への Zymosan A の投与 4 日後に得られた stimulated Mφ を用いた今回の検討でも、既報のヒト単球の場合⁹⁾¹⁰⁾と同様に 7 日間の *in vitro* での前培養を経た Mφ (Mφ [day 7]) の場合には、Mφ に感染した結核菌の細胞内増殖速度が、

調製直後の Mφ (Mφ [day 0]) 内でのそれに比べて有意に低下することが明らかになった (Fig. 1)。この傾向は特に強毒株である H37Rv 株の感染 Mφ において顕著であった。従って、Zymosan A 誘導 Mφ においても 7 日間の *in vitro* 前培養の経過中に若干程度の Mφ のさらなる活性化が進み、ひいては弱いながらも感染結核菌の増殖抑制能の増強もたらされたものと考えられる。なお、今回の検討で観察された腹腔 Mφ の 7 日間培養に伴う Mφ 内感染結核菌の増殖速度の低下の度合いは、既報のヒト単球培養系で観察されたものに比べてはかなり軽度である。これは、今回用いた Zymosan A 誘導 Mφ では *in vitro* での前培養に伴う Mφ 細胞機能の亢進の度合いが、Paul ら⁷⁾ や Douvas ら⁸⁾ の報告のように元来 Mφ としての細胞機能が低い単球を用いた場合に比べては、かなり少なかったことによるものと思われる。この場合、Mφ [day 7] への結核菌感染とその細胞内増殖に伴って認められた Mφ 側の細胞障害の程度は、H37Rv 株および H37Ra 株いずれの場合でも Mφ [day 0] でのそれに比べてやや減弱する傾向が認められている (Fig. 2)。従って、Mφ [day 7] では結核菌の細胞毒性に対する Mφ 側の感受性が、Mφ [day 0] の場合に比べて低下している可能性が考えられる。しかしながら、先にわれわれはマウス腹腔 Mφ および供試菌として H37Rv 株、H37Ra 株および臨床分離 Kurono 株を用いた検討で、いずれの菌株とも Mφ に対して強い細胞障害性を示すものの、その障害活性は

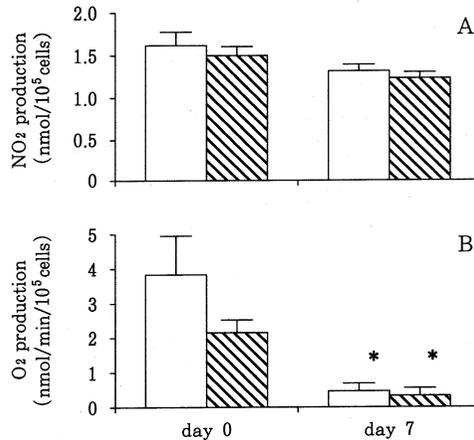


Fig. 3 Changes in the ability of murine peritoneal M ϕ s to produce RNI (A) and ROI (B) in response to MTB-infection during the course of prolonged *in vitro* cultivation. Test M ϕ s were measured for their RNI and O₂⁻ production in response to infection with MTB H37Rv (hatched bar) or H37Ra (open bar) strain at day 0 and day 7 after *in vitro* precultivation. Each bar indicates the mean \pm SEM (n=3). *, Significantly smaller than the values of M ϕ s which were given bacterial challenge at day 0 ($P < 0.01$; Student's *t*-test).

H37Rv株 > Kurono株 \approx H37Ra株の順であること、従って、最もビルレンスが強くM ϕ 内増殖の旺盛なKurono株においても弱毒のH37Ra株と同程度の細胞毒性を示すにすぎないことを見いだしている¹⁰⁾。このことは、M ϕ 内での結核菌の増殖にとっては感染菌の細胞障害性が必ずしも有利に働く訳ではないことを示している。

次に、結核菌感染に対するM ϕ 側のレスポンスとしての殺菌エフェクターの産生動態については、M ϕ [day 7]ではRNI, ROI産生能のいずれもがM ϕ [day 0]の場合に比べて低下することが分かった (Fig. 3)。ここで特記すべきは、この現象は特にROI産生能において顕著であり、M ϕ [day 7]ではROI産生能がほとんど消失してしまうことである (Fig. 3B)。ところが、M ϕ [day 7]では結核菌の細胞内増殖に対する抑制能がM ϕ [day 0]のそれに比べてやや増強されている訳であり (Fig. 1)、このことと上述の殺菌エフェクター産生動態についての成績とを併せ考えた場合、M ϕ 内での結核菌増殖抑制および殺菌メカニズムへのROIの積極的な関与は否定的である。

ちなみに、Chanら¹¹⁾やWarwick-Daviesら¹²⁾も同様にM ϕ の抗結核菌活性発現におけるROIの関与を否定する成績を報告している。またわれわれの以前の検討でも、マウス腹腔M ϕ をTNF- α のみで活性化した場合にはROI産生能の著しい増強が認められるものの、

その抗結核菌活性や抗MAC活性には有意な増強はみられていない⁹⁾。さらに、Adamsら¹³⁾もNADPH oxidase遺伝子をknockoutしたX-CGDマウスを用いた実験系で、ROI産生能(-), RNI産生能(+)¹³⁾のX-CGDマウスM ϕ をIFN- γ で活性化した場合でも、結核菌に対して正常レベルの増殖抑制能が発揮され得ることを報告しており、少なくともマウスM ϕ での抗結核菌活性発現にはRNIのかかわりが重要であり、ROIの果たす役割は少ないものと言えそうである。

次に、Fig. 3Bから明らかなように、M ϕ [day 7]ではRNI産生能がM ϕ [day 0]に比べて低下するものの、その程度はあまり顕著とは言えない。このことは培養マウス腹腔M ϕ の結核菌に対する増殖抑制能においても、依然としてRNIの果たす役割が大きいことを示している。しかしながら、M ϕ [day 7]ではRNI産生能がやや低下するにもかかわらず、逆にM ϕ 細胞内での結核菌増殖速度はM ϕ [day 0]に比べて低下しており、このようなM ϕ 内での抗結核菌活性発現にはRNI以外の殺菌エフェクター、例えばFFA⁴⁾や殺菌蛋白¹⁴⁾などの果たす役割も無視し得ないことを物語っている。従って、宿主M ϕ の抗酸菌に対する殺菌・抗菌メカニズムについて、既知のRNI, FFA, 殺菌蛋白依存のシステムのみならず、Nau¹⁵⁾らが最近報告したosteopontinなど今まで考えられていたものとは異なる機作によるM ϕ 内感染菌の増殖抑制といった側面か

らの検討も必要であるように思われる。

文 献

- 1) 富岡治明, 斎藤 肇: 非結核性抗酸菌症の発症要因に関する基礎的研究. 日本細菌学雑誌. 1991; 46: 827-837.
- 2) 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.
- 3) 富岡治明: 抗酸菌症と免疫. 臨床と微生物. 1997; 24: 45-52.
- 4) Akaki T, Sato K, Tomioka H, et al.: Effector molecules in expression of the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium avium* complex: roles of reactive nitrogen intermediates, reactive oxygen intermediates, and free fatty acids. J Leukocyte Biol. 1997; 62: 795-804.
- 5) Tomioka H, Sato K, Sano C, et al.: Effector molecules of the host defence mechanisms against *Mycobacterium avium* complex: the evidence showing that reactive oxygen intermediates, reactive nitrogen intermediates, and free fatty acids each alone are not decisive in expression of macrophage antimicrobial activity against the parasites. Clin Exp Immunol. 1997; 109: 248-254.
- 6) Akaki T, Tomioka H, Shimizu T, et al.: Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of macrophage antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Exp Immunol. 2000; 印刷中.
- 7) Paul S, Laochumroonvorapong P, Kaplan G: Comparable growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages *in vitro*. J Infect Dis. 1996; 174: 105-112.
- 8) Douvas GS, Berger EM, Repine JE, et al.: Natural mycobacteriostatic activity in human monocyte-derived adherent cells. Am Rev Respir Dis. 1986; 134: 44-48.
- 9) Sato K, Akaki T, Tomioka H: Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN- γ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). Clin Exp Immunol. 1998; 112: 63-68.
- 10) 富岡治明, 佐藤勝昌, 清水利朗, 他: 非定型抗酸菌症の現状と将来. 感染における生体防御機構. 結核. 1998; 73: 71-76.
- 11) Chan J, Xing Y, Magliozzo, et al.: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med. 1992; 175: 1111-1122.
- 12) Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ: Selective deactivation of human monocyte functions by TGF- β . J Immunol. 1995; 155: 3186-3193.
- 13) Adams LB, Dinauer MC, Morgenstern DE, et al.: Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. Tuberc Lung Dis. 1997; 78: 237-246.
- 14) Hiemstra PS, Eisenhauer PB, Harwig SS, et al.: Antimicrobial proteins of murine macrophages. Infect Immun. 1993; 61: 3038-3046.
- 15) Nau GJ, Liaw L, Chupp GL, et al.: Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. Infect Immun. 1999; 67: 4223-4230.