原 著

抗酸菌のマクロファージ (Mφ) と肺胞上皮細胞への
感染性と細胞内増殖性: Mφ内順化菌を用いての検討

佐藤 勝昌 赤木 竜也 清水 利朗 佐野 千晶
小笠原圭子 富岡 治明

島根医科大学微生物・免疫学教室

INVASION AND INTRACELLULAR GROWTH OF *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX ADAPTED TO
INTRAMACROPHAGIC ENVIRONMENT WITHIN MACROPHAGES AND TYPE II
ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS

Katsumasa SATO, Tatsuya AKAKI, Toshiaki SHIMIZU, Chiaki SANŌ
Keiko OGASAWARA, and *Haruaki TOMIOKA

*Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

Profiles of the invasion and intracellular growth of *M. tuberculosis* (MTB) and *M. avium* complex (MAC), which had been adapted to intramacrophagic environment, within Mono Mac 6 human macrophages (MM6-Mφs) and A-549 human type II alveolar epithelial cells (A-549 cells) were studied. In this study, we used the organisms grown in MM6-Mφs (intracellularly-adapted: I-type) and those passaged in 7H9 liquid medium (extracellularly-adapted: E-type). First, I-type MTB was less efficient than E-type MTB in invading into MM6-Mφs, while I-type MTB invasion into A-549 cells was greater than of E-type MTB. On the other hand, I-type MAC was more efficient than E-type MAC in entering both into MM6-Mφs and A-549 cells. Second, the ability of MTB and MAC to replicate within MM6-Mφs was increased by intracellular passage of these organisms through MM6-Mφs. In contrast, the ability of these organisms to grow within A-549 cells was decreased to some extent by intramacrophagic passage. These findings suggest that growth within Mφs changes the efficiency of MTB and MAC in invading and replicating in Mφs and type II alveolar epithelial cells.

Key words: Invasiveness, Intracellular growth, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, Macrophages, Type II alveolar epithelial cells

キーワードズ: 感染性, 細胞内増殖, 結核菌, *Mycobacterium avium*, マクロファージ, II型肺胞上皮細胞

*〒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 Sep. 2000 / Accepted 30 Nov. 2000)

はじめに

結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) は宿主の肺胞内への侵入後すぐに肺胞マクロファージ (Mφ) や好中球などの貪食細胞や肺胞上皮細胞に接触するものと考えられる。肺内での primary な感染の場としての肺胞 Mφ の役割については、現在までに多くの知見が得られているが、肺胞上皮細胞については *in vivo* で結核菌がこの細胞内へ侵入するか否かも含めて、未だにその役割は明らかになっていない。他方、*in vitro* の実験系では結核菌や MAC は Mφ 系の細胞ばかりでなく、non-professional phagocyte である A-549 ヒト II 型肺胞上皮細胞 (A-549 細胞)^{1)~4)} や上皮細胞株へも侵入し、増殖することが報告^{5)~7)} されている。

ところで、従来結核症や MAC 症の基礎的検討で用いられている菌株のほとんどは培地中での培養菌、すなわち細胞外順化菌 (E 型菌) であり、Mφ 内で増殖して Mφ 内の環境に順化した菌 (I 型菌) を用いての検討はほとんど行われていない。ちなみに、このような I 型結核菌の *in vitro* での A-549 細胞への感染性や I 型 MAC 菌の Mφ への感染性は E 型菌におけるよりも高いことが報告されているが¹⁾⁸⁾、これらの菌の細胞内での増殖動態の違いについては未だ検討されていない。今回は I 型の結核菌や MAC 菌のヒト Mono Mac 6 Mφ 細胞 (MM6-Mφ) および A-549 細胞内への感染性と細胞内増殖性について E 型菌との比較検討を行った。

材料と方法

1. 供試菌：結核菌 Kurono 株および MAC (*M. avium*) N-444 株を用いた。
2. 供試細胞：成熟した単球の性状をもち、My4, M42, LeuM3, Mo2 などのマーカーを有する MM6-Mφ^{9)~11)} (German Collection Microorganisms and Cell Cultures, ドイツ) と A-549 細胞 (American Type Culture Collection, 米国) を供試した。
3. E 型菌の調製：結核菌あるいは MAC を各々 7H9 培地中、37℃ で 10 日あるいは 5 日間培養し、遠心・洗浄後に 1% 牛血清アルブミン (BSA)-PBS に浮遊させ、次いで超音波処理を施したものを E 型菌として実験に供した。
4. I 型菌の調製：5% FBS-RPMI 1640 培地中に浮遊させた MM6-Mφ に E 型結核菌 (MOI=5) あるいは MAC 菌 (MOI=50) を感染させ、37℃ で 24 時間培養後、2% FBS-HBSS で 5 回遠心・洗浄し非感染菌を除去した。次いで、この細胞を 1% FBS-RPMI 1640 培地中でさらに 5 日間培養後、PBS で 2 回遠心・洗浄 (150×g, 5 分) し、細胞を低張水中での超音波処理 (ト

ミー精工, Model UR-20P, 最大出力にて 20 秒) により溶解した。次いで、得られた細胞溶解液に 9 倍量の蒸留水を加えて遠心・洗浄 (2000×g, 15 分) し、さらに、同じ洗浄操作を再度行い、回収された菌を 1% BSA-PBS に浮遊させ、超音波処理を施したものを I 型菌として実験に供した。

なお、鏡検では、このようにして得られた I 型菌液中に未破壊細胞を認めなかった。

5. 感染菌の細胞内動態の測定：

(1) MM6-Mφ 内増殖動態

MM6-Mφ (4×10^5 cells/ml) に結核菌あるいは MAC 菌を各々 MOI=3 あるいは MOI=10 で 4 時間感染させた後、非感染菌を 5 回の遠心・洗浄 (150×g, 5 分) で除去し、得られた感染細胞を抗菌剤不含有 1% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させ、その 200 μl (4×10^4 cells) を 96 well culture plate (丸底) 中で 7 日間培養した。次いで、0.23% SDS の 80 μl を加えて培養細胞を溶解させ、さらに 20% BSA (120 μl) で SDS を中和した後に、得られた細胞溶解液中の CFU を 7H11 寒天培地上で計測した³⁾⁴⁾。

(2) A-549 細胞内増殖動態

96 well culture plate (平底) を用いて 5% FBS-Ham's F-12K 培地中で 18 時間前培養した A-549 細胞の単層培養 (4×10^4 cells/wells) に、結核菌あるいは MAC 菌を各々 MOI=3 または MOI=10 で加えた。3 時間培養後に、非感染菌を洗浄・除去 (3 回) して得られた感染細胞を抗菌剤不含有 1% FBS-Ham's F-12K (200 μl) 中で 7 日間培養し、MM6-Mφ の場合と同様な方法で細胞内局在菌の CFU を計測した。

結 果

Table 1, 2 は、結核菌および MAC の各々を 7H9 培地中で培養して得られた細胞外順化菌 (E 型菌)、ならびにこれらを MM6-Mφ 細胞内で増殖させて得られた細胞内順化菌 (I 型菌) を、各々 MM6-Mφ あるいは A-549 細胞に感染させた場合の供試菌の感染性および細胞内での増殖性をみたものである。まず結核菌についてみると、MM6-Mφ への感染性は I 型菌 < E 型菌である傾向であったのに対して、A-549 細胞への感染性は逆に I 型菌 > E 型菌であった (Table 1)。他方、MAC については、MM6-Mφ、A-549 細胞いずれの細胞への感染性も I 型菌 > E 型菌であることが分かった (Table 2)。次に、細胞内増殖性については、結核菌および MAC いずれの場合とも、MM6-Mφ 細胞内での増殖性は I 型菌 > E 型菌であるのに対して、A-549 細胞内での増殖性は逆に I 型菌 < E 型菌である傾向にあることが分かった (Table 1, 2)。

Table 1 Invasion of MM6-Mφs and A-549 cells by *M. tuberculosis* organisms adapted to extracellular (E-type) or intracellular (I-type) environment, and intracellular growth of the organisms in these cells

Expt No.	Invasiveness			Intracellular growth		
	No. of CFU/well at 0-time $\times 10^{-2}$ a)		I/E	CFU _{7d} /CFU _{0d} b)		I/E
	E-type	I-type		E-type	I-type	
I	6.95 ± 0.94	4.27 ± 0.81	0.61	18	41	2.3
II	7.50 ± 1.07	5.92 ± 0.40	0.79	334	563	1.7
III	8.50 ± 0.26	4.04 ± 0.21	0.48	71	215	3.0
I	5.85 ± 0.62	94.0 ± 6.98	16	82	64	0.78
II	7.38 ± 1.34	18.8 ± 0.29	2.5	113	78	0.69
III	15.7 ± 0.87	42.9 ± 4.72	2.7	37	36	0.97

a) Mean ± SE (n=3~4)

b) Mean (n=3~4)

Table 2 Invasion of MM6-Mφs and A-549 cells by *M. avium* organisms adapted to extracellular (E-type) or intracellular (I-type) environment, and intracellular growth of the organisms in these cells

Expt No.	Invasiveness			Intracellular growth		
	No. of CFU/well at 0-time $\times 10^{-2}$ a)		I/E	CFU _{7d} /CFU _{0d} b)		I/E
	E-type	I-type		E-type	I-type	
I	2.05 ± 0.40	6.80 ± 0.55	3.3	61	321	5.3
II	3.21 ± 0.34	13.6 ± 0.26	4.2	143	279	2.0
III	3.75 ± 0.72	20.5 ± 1.86	5.5	206	347	1.7
I	26.5 ± 1.42	162 ± 8.18	6.1	34	31	0.91
II	7.07 ± 0.71	43.5 ± 4.72	6.2	71	47	0.66
III	19.3 ± 2.15	75.9 ± 7.73	3.9	82	81	0.99

a) Mean ± SE (n=3~4)

b) Mean (n=3~4)

このように、結核菌および MAC の I 型菌と E 型菌とでは、その細胞感染性および細胞内増殖性に若干の差異がみられることが明らかとなった。

なお、E 型菌を MM6-Mφあるいは A-549細胞へ感染させる際に、I 型菌標品に残存していると同量の cell debris を加えてみたが、結核菌および MAC 菌のいずれともその感染性および細胞内増殖性には特に大きな影響は認められなかった。このことより、上述の I 型菌と E 型菌との MM6-Mφおよび A-549細胞への感染性や細胞内増殖性の差異が、I 型菌標品に残存している cell

debris の影響によるという可能性は否定された。

考 察

ヒト単球由来 Mφ に E 型あるいは I 型 MAC 菌を感染させた場合、Mφ へのそれらの感染性は I 型菌のほうが E 型菌よりも高いことが報告されているが⁸⁾、マウス J774.1Mφ細胞に E 型あるいは I 型結核菌を感染させた場合には、そのような差異は認められていない¹⁾。他方、ヒト A-549細胞の場合では、I 型結核菌は E 型結核菌よりも高い感染性を示すことが報告されている¹⁾。

今回のわれわれの検討では、ヒト MM6-M ϕ への結核菌の感染性はI型菌のほうがE型菌に比べて低いのに對して、MAC菌の場合では逆にI型菌のほうがE型菌よりも高いという成績が得られており、MAC菌についての成績は既報のもの⁸⁾と軌を一にしている。ところで、Bermudezら⁸⁾はMACのE型菌とI型菌ではヒト単球由来M ϕ への感染性にかかわるレセプターが異なることを見いだしている。すなわち、E型菌のM ϕ への侵入は周知のごとく主にCR1, CR3, mannoseレセプターを介するものであるが¹²⁾¹³⁾, I型菌の侵入にはtransferrinレセプターや β 1 integrinの果たす役割が大きいという。従って、今回の検討で見いだされた結核菌のE型とI型菌のヒトMM6-M ϕ への感染性の違いも、これらの菌のM ϕ 内への侵入にかかわるM ϕ 側のレセプターの違いに基づくものと考えられる。

A-549細胞では、MAC菌(E型菌)の細胞内への侵入についてはvitronectinレセプターやVLA-4以外の β 1 integrinがそのレセプターとして働いており、transferrinレセプターの関与は少ないことが報告されている²⁾。われわれも別の実験で、結核菌(E型菌)のA-549細胞への侵入は、主にCR3, β 1 integrinあるいはmannoseレセプターを介すること、ならびにMAC菌(E型菌)の侵入は、CR3やmannoseを介することを見いだしている(未発表)。今回の検討では、結核菌とMACの別なく、I型菌のA-549細胞への感染性はE型菌に比べて著しく高かったが、この差異もI型菌とE型菌のA-549細胞内への侵入にかかわるレセプターの違いに起因したものである可能性が高い。

さて、開放性結核患者よりの感染を考えた場合、感染菌は主に空洞の乾酪物質内で増殖したE型菌であろうから、Table 1に示す結果から考えて、肺胞M ϕ やII型肺胞上皮細胞への感染性は特に高いものではないが、肺胞M ϕ 中で増殖することによりM ϕ 内環境に順化したI型菌はII型肺胞上皮細胞への感染性が増強されるので、肺胞M ϕ からII型肺胞上皮細胞への感染カスケードが効率よく回転することになるものと考えられる。他方、こうしたI型菌はM ϕ への感染性が減弱するため、肺胞M ϕ から別の肺胞M ϕ への感染カスケードや、肺胞M ϕ から結核菌抗原に対する免疫応答の成立に深くかかわる間質M ϕ ¹⁴⁾への菌の受け渡しといったプロセスはあまり効率よくは進まないものと考えられる。なお、MAC菌の感染についても、そのほとんどは自然環境生存菌(アメーバ中で増殖している可能性を考えなければE型菌と見なし得る)の感染であろうから、そのようなMAC菌も一度肺胞M ϕ に取り込まれ、そのM ϕ 中で増殖しM ϕ 内環境に順化することによりII型肺胞上皮細胞への感染性が増強され、その結果として、肺胞M ϕ からII

型肺胞上皮細胞への感染カスケードが効率よく回転するというシエーマが考えられる。

以上、今回の検討よりM ϕ 内環境に順化した結核菌やMAC菌のM ϕ やII型肺胞上皮細胞への感染性と細胞内での増殖動態は、細胞外環境に順化したものとは異なる様相を呈することが明らかとなったが、この現象のメカニズムについては上述のレセプターとの関連を含め現在検討を進めつつあるので、別の機会に報告したい。

文 献

- 1) McDonough KA, Kress Y: Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1995; 63: 4802-4811.
- 2) Bermudez LE, Goodman J: *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. Infect Immun. 1996; 64: 1400-1406.
- 3) Sato K, Tomioka H: Antimicrobial activities of benzoxazinorifamycin, KRM-1648, and clarithromycin against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex residing in murine peritoneal macrophages, human macrophage-like cells, and human alveolar epithelial cells. J Antimicrob Chemother. 1999; 43: 351-357.
- 4) 佐藤勝昌, 小笠原圭子, 赤木竜也, 他: 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. 結核. 1999; 74: 655-660.
- 5) Bermudez LE, 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.
- 6) Bermudez LE, Shelton K, 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.
- 7) Reddy VM, Kumar B: Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. J Infect Dis. 2000; 181: 1189-1193.
- 8) Bermudez LE, Parker A, Goodman JR: Growth within macrophages increases the efficacy of *Mycobacterium avium* in invading other macrophages by a complement re-

- ceptor-independent pathway. *Infect Immun.* 1997; 65: 1916-1925.
- 9) Ziegler-Heitbrock HWL, Thiel E, Futterer A, et al.: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer.* 1988; 41: 456-461.
- 10) Shattock RJ, Friedland JS, Griffin GE: Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* modulates human immunodeficiency virus replication in human monocytic cells. *J Gen Virol.* 1994; 75: 849-856.
- 11) 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.
- 12) Ehlers MR, Daffe M: Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 1998; 6: 328-335.
- 13) Ernst JD: Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998; 66: 1277-1281.
- 14) Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, et al.: Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages *in vitro*. *J Immunol.* 1996; 157: 3097-3104.