

【原著・基礎】

Mycobacterium tuberculosis および *Mycobacterium avium* complex に対する
マクロファージの抗菌活性発現におよぼす ATP の作用佐野 千晶¹⁾・佐野 啓介^{1,2)}・佐藤 勝昌¹⁾・小笠原圭子^{1,2)}・清水 利朗¹⁾・富岡 治明¹⁾¹⁾島根医科大学微生物・免疫学*²⁾同 耳鼻咽喉科

(平成 14 年 8 月 16 日受付・平成 14 年 11 月 12 日受理)

ATP はヒトマクロファージ (MΦ) に P2 レセプターを介して作用し、MΦ のアポトーシスを誘導するが、このアポトーシスに連動して MΦ に感染した結核菌や BCG 菌の殺菌作用が認められることが報告されている。今回は、*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染 MΦ についても同様な現象が認められるか否かについての検討を試みた。その結果、(1) MΦ に結核菌を感染させ ATP を作用させた場合、ATP 濃度依存的に MΦ 内局在結核菌の増殖阻害作用が認められること、(2) MAC 感染 MΦ に ATP (0.15~6 mM) を作用させた場合の ATP による MΦ 内局在菌の増殖阻害作用は結核菌の場合 (ATP 3~5 mM) に比べては著しく弱いこと、(3) MAC 感染マウスに ATP を 1 日 1 回、週 5 回宛 40 mg/kg dose で投与した場合、感染早期の肺での MAC 菌の増殖が有意に抑制されるが、その後の phase での菌の再増殖は抑制されないこと、(4) 感染マウスの脾での MAC 菌増殖に対しては ATP 投与による影響は認められないことが明らかになった。以上の成績より、ATP による MΦ 殺菌能の up-regulation という現象は菌種特異的なものであり、MAC 菌に対する MΦ の抗菌活性の ATP 処理による増強の程度は、結核菌の場合に比べてはかなり低いものと考えられる。他方、感染早期のみに限局した現象ではあるものの、MAC 感染マウス肺での感染菌の増殖動態を指標とした場合には ATP による一過性の治療効果が認められており、ATP には MAC 感染症治療への応用がある程度は期待できるものように思われる。

Key words: マクロファージ, 結核菌, *Mycobacterium avium* complex, ATP, clarithromycin

わが国の非定型抗酸菌症の主要な起炎菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) は、細胞壁に多糖体からなる外膜を有し、薬剤透過性が低いこともあって抗結核薬や抗菌薬に対する感受性が低い¹⁻³⁾、本菌による肺感染症や AIDS 患者での全身播種性感染症はきわめて難治性であり³⁻⁵⁾、より有効な新規抗菌薬の開発が囑望されている。ところで clarithromycin (CAM), azithromycin, 新 ketolide などのマクロライド系薬剤や, rifabutin, rifapentine などのリファマイシン系薬剤には、MAC や MAC 感染症に対する抗菌力や治療効果はかなり期待できるが、それとておのずから限界があるうえに、その他の新規抗 MAC 抗菌薬の開発研究は遅々とした状況にあり、MAC 症に対するより有効な化学療法を考える上では、ここ当分は、既存の抗菌薬の *in vivo* 抗菌活性の発現を別の薬剤で増強させるような形での化療レジメンの開発に期待せざるを得ないように思われる^{4,5)}。

ATP は P2 レセプターを介して血管内皮細胞に作用し、nitric oxide synthase-3 (NOS 3) 発現の増強、ひいては nitric oxide 産生を介して血管平滑筋の弛緩をもたらす、虚血性疾患における血流動態の改善に寄与することが知られている⁶⁾。

また最近、ヒトマクロファージ (MΦ) を ATP 処理した場合、MΦ の結核菌や BCG 菌に対する殺菌活性が、ATP により誘導される MΦ のアポトーシス⁷⁾、ATP シグナルによる MΦ の phospholipase D 活性の亢進⁸⁾、細胞質内 Ca²⁺ の動員⁹⁾、あるいは MΦ 殺菌メディエーター産生能の亢進¹⁰⁾ に連動した形で強く増強されることが報告されている。

ところで、MAC 菌についても同様な現象が起こるのであれば、宿主 MΦ を ATP で処理することにより MΦ の MAC 菌に対する抗菌活性を増強させることが可能になるわけであり、抗 MAC 抗菌薬による化療を受けている MAC 患者に ATP を併用投与した場合、抗 MAC 抗菌薬の治療効果の発現を改善することもあるいは可能ではないかと期待される。そこで今回は、ATP の作用によりヒト MΦ の結核菌群の病原菌に対する抗菌活性が増強するという現象が、果たして MAC にも当てはまるものなのか否か、さらにはこうした現象がマウス MΦ にも共通した現象であるのか否かを知る目的で若干の検討を行った。

I. 材料と方法

1. 供試菌

結核菌 H 37 Ra 株および MAC 患者より分離された

MAC N-444株, MAC N-260株を供試した。なお上記MACの2菌株は, DNAプローブテストにより, それぞれ *M. avium* および *Mycobacterium intracellulare* と同定されている。

2. 供試細胞

① マウス腹腔MΦ: BALB/c系雌マウス(日本クレア)にZymozan A (1 mg)を腹腔内投与4日後に採取した腹腔細胞の 2×10^6 個を浮遊させた5%牛胎児血清(FBS)加RPMI 1640培地(0.15 mL)を6 mm径の組織培養ウェル(96-Well; Falcon)に撒き, 37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で2時間培養後, 次いで2% FBS加Hanks氏液(HBSS)で洗浄して非付着性細胞を除いたものを腹腔MΦとして用いた。②株化MΦ細胞: THP-1ヒト単球由来MΦ細胞株(THP-1 MΦ)およびRAW 264.7マウス単球由来MΦ細胞株(RAW-MΦ)を用いた。

3. 供試薬剤

CAMは大正製薬より分与を受けたものを, またATPとrifampicin (RFP)はそれぞれ市販の試薬(ICN, Sigma)を用いた。

4. 結核菌およびMACのMΦ内増殖動態

供試MΦを結核菌あるいはMAC菌を浮遊させた5% FBS-RPMI 1640培地中, MOI=1(結核菌)またはMOI=10(MAC菌)でそれぞれ所定時間感染させ, 2% FBS加HBSSで洗浄し非感染菌を除去した後, 感染MΦを1% FBS加RPMI 1640培地中で0.5~6 mM ATPの添加または非添加の系にて6日間にわたり培養した。また実験によっては培地中に5 μM Ca²⁺ ionophoreを添加した。所定時間後に感染MΦを0.07% SDSで溶解させ, さらに6%牛血清アルブミンでSDSを中和した後に, 得られたcell lysate中に回収された菌の生菌単位(CFU)を7 H 11寒天培地上で計測した。

なお実験によっては, ³H-uracil uptake法¹¹⁾によりMΦ内におけるMAC増殖動態を測定した。すなわち, RAW-MΦにMAC菌をMOI=20で18時間感染させ, 2% FBS加HBSSで洗浄し非感染菌を除去した後, 感染MΦを1% FBS加RPMI 1640培地中(0.2 mL)で0.075~4.8 mM ATP添加または非添加の系にて5日間培養した。次いで, 0.25% saponinを含む7 H 9培地の(0.2 mL)を加えMΦを溶解させて細胞内感染菌を遊離させた後, ³H-uracil (7.4 Mq) (Amersham Pharmacia)を加えさらに24時間培養し, ³H-uracilを取り込んだ菌体をglass fiber filterに回収し放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

5. マウス実験的MAC感染

5週齢のBALB/c系雌マウス(日本クレア)にMACの 1×10^7 を静脈内感染させ, 感染翌日より, 40 mg/kg宛のATP, あるいは臨床投与量相当のCAM(16 mg/kg)およびRFP(9 mg/kg)を, 1日1回, 週5回宛て, 8

週間にわたって皮下投与した。所定日にマウスを屠殺・剖検し, 肺ならびに脾を摘出し蒸留水中でホモジナイズし, その還元CFUを7 H 11寒天培地上で計測した。

II. 結 果

1. MΦ内局在結核菌の増殖動態におよぼすATPの作用

Fig. 1は, 結核菌感染MΦをATPを含む培地中で培養した場合, 細胞内局在菌の増殖動態がどのような影響を受けるのかについてみたものである。まずTHP-1ヒトMΦ細胞株では, 3~5 mM ATPの添加により弱いながらも有意なレベルの増殖阻害効果が認められた(Fig. 1 A)。同様にマウス腹腔MΦでも, 3 mM ATPの添加によりMΦ内結核菌の増殖が有意に抑制されることがわかった。すなわち今回の検討では, Kusnerら⁸⁾の報告にあるようなATPの作用によってMΦの結核菌に対する殺菌作用が強く誘導されるような現象は認められなかったが, 少なくともATPによりMΦ内結核菌の増殖阻害が起こるといふ現象は, Kusnerらの実験系で用いられたTHP-1 MΦのみならずマウス腹腔MΦの場合でも認められたわけである。したがって, ATP処理によるMΦの抗結核菌活性の増強作用については, 今回の成績はKusnerらのそれとおおむね軌を一にした成績といえる。

2. MΦ内局在MAC菌の増殖動態におよぼすATPの作用

Fig. 2は, MAC菌感染MΦをATPを含む培地中で培養した場合の細胞内局在菌の増殖動態がどのような影響を受けるのかについてみたものである。Fig. 2 Aに示すように, MAC感染マウス腹腔MΦを0.5~6 mM ATP

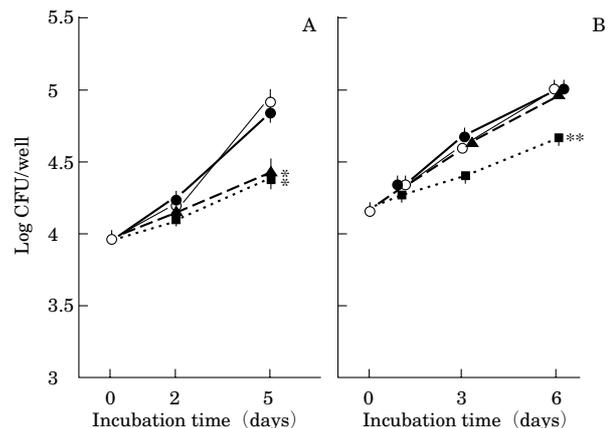


Fig. 1. Effects of ATP on the anti-MTB activity of MΦs. THP-1 MΦs (A) or mouse peritoneal MΦs (B) infected with MTB were cultured in a medium with or without ATP added. (A) ○, None; ● 1 mM ATP; ▲ 3 mM ATP; ■ 5 mM ATP (B) ○ None; ● 0.5 mM ATP; ▲ 1 mM ATP; ■ 3 mM ATP. Each symbol indicates the mean \pm SEM (n=3). ***Significantly smaller than the values of control MΦs ($P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Student's *t* test)

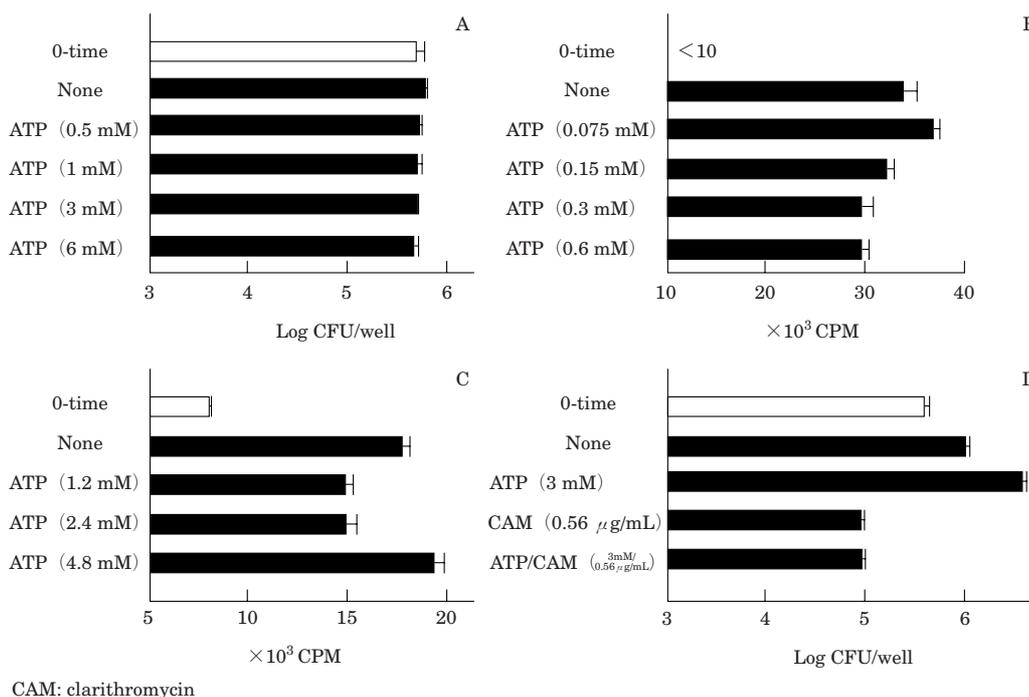


Fig. 2. Effects of ATP on the anti-MAC activity of MΦs. MAC infected RAW-MΦs were cultured in a medium with or without ATP added at the indicated concentrations. Intramacrophage MAC behavior was examined based on changes in the residual CFU of the organisms in MΦs (A, D) or ^3H -uracil uptake by intramacrophage organisms (B, C).

で処理した場合の培養 24 時間後での MΦ 内生残 CFU 数は, ATP で処理していない対照 MΦ のそれと変わるところはなかった。また Figs. 2 B, 2 C では, RAW-MΦ を用いた実験系で, 培養 5 日後に感染 MΦ より回収された MAC 菌の ^3H -uracil 取り込み能を指標として MΦ の抗 MAC 抗菌活性を測定しているが, この場合でも, 0.3~2.4 mM の ATP 添加で MΦ 内感染 MAC 菌の増殖能の 20% と程度の弱い阻害作用が認められたものの, 0.075, 0.15, または 4.8 mM ATP の添加によっては, MΦ 内局在 MAC 菌の増殖には, 特に有意なレベルの阻害は認められなかった。また Fig. 2 D に示すように, MAC 感染 MΦ を CAM に加えて ATP を添加した培地中で 5 日間培養した場合でも, CAM による MΦ 内局在 MAC 菌の増殖阻害効果が, MΦ の ATP 処理によりさらに増強されるといったような現象は認められなかった。しかしながら, Fig. 3 に示すように, 培地中に $5\mu\text{M}$ Ca^{2+} ionophore 添加といった MΦ 内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるような条件下においては, ATP (0.3 mM) による MΦ 内局在 MAC 菌の増殖抑制作用が認められた。

3. MAC 感染マウスでの感染菌の臓器内増殖動態におよぼす ATP 投与の影響

上述のように, 少なくとも *in vitro* の系では, ATP は MΦ 内局在結核菌の増殖抑制作用を示すものの, 他方, Ca^{2+} ionophore 添加により MΦ 内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるような特別な処置を加えない限り, ATP 単独では, MΦ 内局在 MAC 菌の増殖動態に対しては特に有意

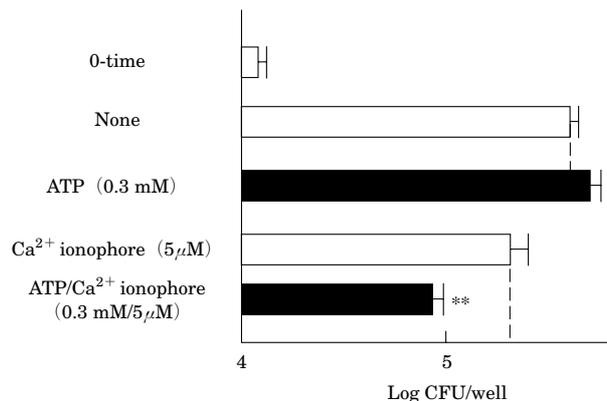


Fig. 3. Effects of ATP with Ca^{2+} ionophore on the anti-MAC activity of MΦs. MAC infected RAW-MΦs were cultured in a medium with or without ATP/ Ca^{2+} ionophore added at the indicated concentrations. Behavior of intramacrophage MAC was examined based on changes in the residual CFU of the organisms in MΦs. Each bar indicates the mean \pm SEM (n=4). **Significantly smaller than that in control MΦs (** $P < 0.01$; Student's *t* test)

な影響をおよぼさないことが明らかになった。そこで次に, ATP が *in vivo* での感染菌の増殖動態に対してはどのような作用をおよぼすのかについての検討を行った。Fig. 4 は, MAC 感染マウスに感染翌日より ATP を週 5 回投与した場合の肺および脾での感染菌の増殖動態をみたものであるが, この実験では ATP 投与によって, 感

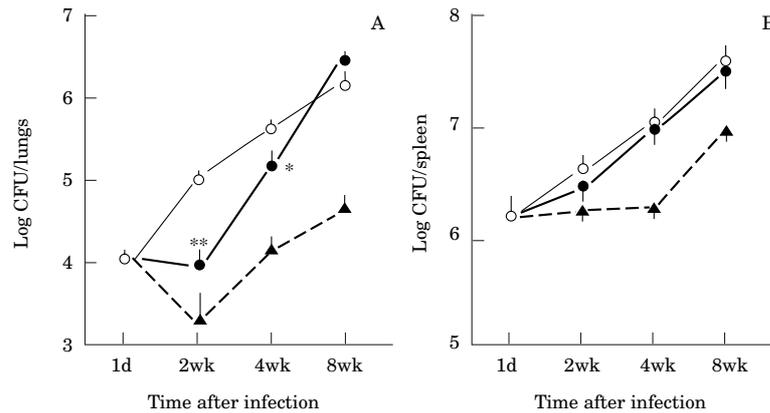


Fig. 4. Changes in bacterial loads in the lungs (A) and the spleens (B) of MAC-infected mice given either ATP (●) or in combination with CAM/RFP (▲). Control mice (○) were given saline instead of test agents. Mice infected intravenously with 1×10^7 CFU of MAC were subcutaneously injected with ATP (40 mg/kg) or CAM (16 mg/kg)/RFP (9 mg/kg). Each symbol indicates the mean \pm SEM (n = 5). **Significantly smaller than that in control mice (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Student's *t* test)

染早期 (~2 週)での肺での MAC 菌の増殖が抑制されることが明らかになった。しかしながら、この ATP の効果は一過性のものであり、感染 2 週以後では感染菌は非投与対照群よりも速やかに増殖し、8 週後には対照群と同レベルに復している。これに対して、抗菌薬投与の positive control としての CAM/RFP 投与群では、感染 2 週目までは殺菌作用が認められている。感染 2 週以後の phase では、CAM/RFP 投与によっては感染菌の再増殖は阻止し得なかったものの、感染後 2~8 週の phase での菌の増殖速度は非投与対照群のそれを上回るものではなく、感染 8 週後の CAM/RFP 投与群マウスの肺内 CFU は、非投与群マウスのそれより 1.5 オーダー低いレベルのままに保たれていた。なお、Fig. 4 B に示すように、脾での感染 MAC 菌の増殖動態については、ATP 投与マウスで特に強く抑制されるような傾向は認められなかった。

III. 考 察

今回の検討では、Kusner ら⁹⁾の報告のごとく、ATP は MΦ に作用して細胞内結核菌の増殖を阻害するような活性を有することが確かめられた (Fig. 1)。また、この ATP の作用は特にヒト MΦ に限られたものではなく、マウス腹腔 MΦ でも同様な作用が期待できることが明らかになった (Fig. 1)。これに対して、MAC 菌の場合にはそのような ATP の作用は認められないことから (Fig. 2)、MΦ の抗酸菌に対する殺菌活性の ATP による亢進は、菌種によってかなり左右されることの多い現象なのではないかと考えられる。

MΦ を ATP 処理した場合、P2X₇ や P2Y などの purinergic receptor を介して ATP の活性化シグナルが MΦ 細胞内に伝達され、ATP シグナルにより誘導される MΦ の phospholipase D 活性の亢進⁹⁾、細胞質内 Ca²⁺

の動員に起因する感染抗酸菌の局在するファゴソームの acidification⁹⁾、あるいは活性酸化窒素 (RNI) や活性酸素 (ROI) などの MΦ 殺菌メディエーター産生能の亢進¹⁰⁾に連動した形で、MΦ の結核菌や BCG 菌に対する抗菌活性が強く増強されることが報告されている。これに関連して、Fig. 3 に示したように、MΦ を ATP と Ca²⁺ ionophore で処理した場合には MAC 菌に対する抗菌活性が有意に増強されることが明らかになった。したがって、MAC 菌感染 MΦ の場合には、結核菌感染 MΦ の場合と異なり、感染菌と MΦ との TLR-2, 4, 9 および補体レセプターなどを介する interaction に起因したシグナルによる細胞内 Ca²⁺ 動員が不十分なのではないかと考えられるが、この点に関しては今後の検討が必要である。

Fig. 4 に示したように、MAC 感染マウスに ATP を投与した場合、実験によっては感染早期での肺での菌の増殖が有意なレベルで抑制されるという現象が認められた。同様の実験を 3 回行った結果、2 回の実験ではこのような ATP の感染早期での肺内 MAC 増殖抑制効果が認められたが、残りの 1 回の実験ではそうした効果は認められなかった (成績省略)。したがって、*in vivo* 系での ATP による宿主 MΦ の抗 MAC 抗菌活性に対する増強作用の発現は、実験条件によってかなり変動する傾向が強いものと考えられる。このことは、*in vitro* および *in vivo* 系のいずれにおいても、ATP 単独での MΦ 抗 MAC 抗菌活性の増強効果にはおのずから限界があることを示唆している。しかしながら、今回の供試菌よりも弱毒の MAC 菌株を用いて別途行った実験では、ATP 単独の効果はみられないものの、CAM/RFP 合剤に ATP を併用した場合には、これら抗菌薬の MΦ 内局在 MAC 菌に対する抗菌活性が強く増強される成績が得られており

(未発表成績), 一定の実験条件下では, こうした ATP による MΦ 抗菌活性の増強効果が明確に認められることもまた確かな事実である。

いずれにしても, 臨床では血行動態の改善薬として使用されている ATP 製剤が, 感染の比較的早期に局限されているとはいえ, MAC 感染症に対してある程度の治療効果を示すことは興味深い現象であり, 投与プロトコールの改良, 特に, 上述のごとく抗 MAC 抗菌薬と ATP とを併用することにより抗菌薬の薬効の著しい増強を図ることができれば, ATP そのものは細胞内エネルギー代謝で重要な役割を演ずる無害な物質であるだけに, その臨床応用も十分に可能なのではないかと思われる。

謝 辞

供試薬剤を分与いただいた大正製薬に深謝します。

文 献

- 1) Woodley C L, David H L: Effect of temperature on the rate of the transparent to opaque colony transition in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 9: 113~119, 1976
- 2) Rastogi N, David H L: Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie* 70: 1101~1120, 1988
- 3) Inderlied C B, Kemper C A, Bermudez L E M: The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 6: 266~310, 1993
- 4) 富岡治明: 結核と非定型抗酸菌感染症に対する化学療法剤開発の現況と展望。 *感染と抗菌薬* 2: 195~201, 1999
- 5) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs. *J Infect Dis* 6: 8~20, 2000
- 6) Dalziel H H, Westfall D P: Receptors for adenosine nucleotide and nucleosides. Subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* 46: 449~466, 1994
- 7) Lammas D A, Stober C, Harvey C J, et al.: ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P₂Z (P₂X₇) receptors. *Immunity* 7: 433~444, 1997
- 8) Kusner D J, Adams J: ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol* 164: 379~388, 2000
- 9) Stober C B, Lammas D A, Li C M, et al.: ATP-mediated killing of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes. *J Immunol* 166: 6276~6286, 2001
- 10) Sikora A, Liu J, Brosnan C, et al.: Purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P₂X₇-independent mechanism. *J Immunol* 163: 558~561, 1999
- 11) Denis M: Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells towards *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *Cell Immunol* 156: 529~536, 1994

Effects of ATP on the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of murine macrophages against *Mycobacterium avium* complex

Chiaki Sano¹⁾, Keisuke Sano¹⁾²⁾, Katusmasa Sato¹⁾, Keiko Ogasawara¹⁾²⁾,
Toshiaki Shimizu¹⁾ and Haruaki Tomioka¹⁾

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, ²⁾Department of Otorhinolaryngology,
Shimane Medical University, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

Extracellular ATP stimulates a wide variety of cell types, including macrophages (MΦs), by ligating of plasma membrane purinergic receptors. Treatment of human MΦs with ATP is reported to potentiate MΦ activity in killing *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). We studied the effects of ATP on the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of murine MΦs against *Mycobacterium avium* complex (MAC). While ATP at concentration of 3–5 mM up-regulated the antimicrobial activity of MΦs against MTB dose-dependently, this was not noted for MΦs infected with MAC organisms, although intramacrophage MAC growth was weakly inhibited in ATP-treated MΦs under certain conditions. When MAC-infected mice were subcutaneously given ATP at 40 mg/kg dose, once daily, 5 times per week, for up to 8 weeks after infection, bacterial growth in the lungs was inhibited significantly during the first 2 weeks compared to control mice without ATP administration. This effect on the intrapulmonary MAC growth was no longer observed after week 2, and MAC grew much more rapidly thereafter in mice given ATP than in the control mice. ATP did not, however, affect MAC bacterial growth in the spleen. These findings show that ATP affects MΦ antimicrobial activity against MAC negatively, in contrast to the positive effect against MTB. The finding that ATP administration inhibited MAC organism growth in the lungs of infected mice in the early stages of infection suggests that ATP may be useful in treating MAC infections when given in combination with anti-MAC antimicrobials.