

【短報】

マクロファージ内順化 *Mycobacterium tuberculosis* および *Mycobacterium avium* complex に対する各種抗菌薬の殺菌作用佐藤 勝昌¹⁾・富岡 治明¹⁾・清水 利朗¹⁾・佐野 千晶¹⁾・佐野 啓介¹⁾・松島 敏春²⁾¹⁾島根医科大学微生物・免疫学教室*²⁾川崎医科大学呼吸器内科学教室

(平成 14 年 1 月 15 日受付・平成 14 年 3 月 7 日受理)

結核菌と *Mycobacterium avium* complex (MAC) を Mono Mac 6 マクロファージ (MM 6-Mφ) 内で増殖させた後に細胞内より回収した菌 (Mφ内順化菌: I 型菌) を供試菌として, MM 6-Mφあるいは A-549 II 型肺胞上皮細胞 (A-549 細胞) に感染させた場合の rifalazil (RLZ), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX) に対する感受性プロフィールについて検討した。その結果, (1) MM 6-Mφ内に感染した供試菌の抗菌薬感受性はいずれの抗菌薬についても 7H9 培地中培養菌 (細胞外環境順化菌: E 型菌) > I 型菌であること, (2) A-549 細胞内に感染した供試菌に関しても, CAM と LVFX に対する感受性については (1) と同様な傾向を認めたが, RLZ に対する感受性は逆に I 型菌 > E 型菌であることがわかった。

Key words: rifalazil, clarithromycin, levofloxacin, 結核菌, *Mycobacterium avium* complex, マクロファージ, A-549 細胞

結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) は *in vitro* においてマクロファージ (Mφ) ばかりでなく, non-professional phagocyte である A-549 ヒト II 型肺胞上皮細胞株 (A-549 細胞) へも侵入し増殖することが報告されており¹⁻⁵⁾, われわれの最近行った電顕による検討でもこれらの菌は *in vivo* でも II 型肺胞上皮細胞に侵入することが明らかになっている⁶⁾。さらに, 結核菌や MAC が感染した A-549 細胞は好中球や Mφあるいは T 細胞を誘引するサイトカインを産生することが知られている⁷⁾。こうした事実は, 結核菌や MAC が生体内でも II 型肺胞上皮細胞へ侵入し増殖することにより, その後の感染病巣の形成に大きな影響を与えるとともに, これらの菌に感染した II 型肺胞上皮細胞が宿主感染抵抗性の発現においても何らかの役割を演じている可能性を示唆している。さきにわれわれは, 結核菌と MAC について, Mφ内で増殖させることにより Mφの細胞内環境に順化した菌 (I 型菌) と 7H9 培地中で培養することにより細胞外の環境に順化させた菌 (E 型菌) とを Mono Mac 6 ヒト Mφ様細胞 (MM 6-Mφ) および A-549 細胞に感染させた場合の, これら供試菌の両細胞への感染性と細胞内増殖性ならびに若干の抗菌薬に対する感受性について比較検討した。その結果, I 型菌と E 型菌とでは, これら細胞への感染性と細胞内での増殖動態, さらには rifalazil (RLZ), clarithromycin (CAM) および levofloxacin (LVFX) に対する感受性プロフィールがたがいに異なることが明らかになった^{8,9)}。またさきに行った検討で, 供試抗菌薬に対する I 型菌の感受性

の E 型菌の感受性に対する比の値を求めたところ, 一部の例外を除いては, 供試菌を MM 6-Mφおよび A-549 細胞内に感染したいずれの場合においても薬剤のいかによらず, その値は 1.0 以下であり, 供試 3 薬剤の I 型菌に対する抗菌活性は E 型菌に対する活性に比べて減弱する傾向を認めたが⁹⁾, 今回はその点を確認するためにさらに詳細な検討を行った。

供試菌としては臨床分離である結核菌 Kurono 株および MAC N-444 株 (血清型 8) とを用いた。なお, RLZ (鐘淵化学工業), CAM (大正製薬) および LVFX (第一製薬) のこれら供試菌の E 型菌に対する MIC 値 (7H11 寒天希釈法で判定) は, 結核菌 Kurono 株でそれぞれ 0.013, 12.5 および 0.4 μg/mL, MAC N-444 株でそれぞれ 0.05, 6.25 および 25 μg/mL であった。E 型菌としては 7H9 培地中 5~10 日間培養菌を, また I 型菌としては以下の方法で調製した MM 6-Mφ内増殖菌を用いた。すなわち, MM 6-Mφを E 型結核菌 (MOI=5) あるいは MAC 菌 (MOI=50) を 24 時間感染させ, 2% FBS-Hanks 氏液 (HBSS) で遠心・洗浄 (150×g, 5 分) し非感染菌を除去した後, 感染細胞を 1% FBS-RPMI 1640 培地中でさらに 5 日間培養後, 細胞を回収し, さらに遠心・洗浄を行い細胞外菌を除去した。回収された細胞を低張水中で溶解, 得られた細胞溶解液に 9 倍量の蒸留水を加えての遠心・洗浄 (2,000×g, 15 分) を 2 回行うことにより細胞内より回収した菌を I 型菌として供試した。なお, RLZ, CAM および LVFX のこれらの I 型菌に対する MIC 値 (7H11 寒天希釈法で判定)

は、結核菌 Kurono 株でそれぞれ 0.013, 12.5 および 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MAC N-444 株でそれぞれ 0.05, 6.25 および 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, E 型菌のそれと変わるところはなかった。

各薬剤の MM 6-M ϕ および A-549 細胞内感染菌に対する抗菌活性は以下の方法によって測定した。すなわち, MM 6-M ϕ (4×10^4) を microculture well (丸底) に seed し, これに結核菌あるいは MAC 菌をそれぞれ MOI=3 あるいは MOI=10 で 4 時間感染させ, 非感染菌を遠心・洗浄で除去した後, 所定濃度の抗菌薬を含む 1% FBS-RPMI 1640 培地 (200 μL) 中で 5 日間にわたり培養した。次いで, 培養細胞を 0.07% SDS で溶解させ, さらに 6% BSA で SDS を中和した後に, 細胞溶解液中の CFU を 7H11 寒天培地上で計測した。また, A-549 細胞 (4×10^4) を microculture well (平底) に seed し, これに結核菌あるいは MAC 菌をそれぞれ MOI=3 または MOI=10 で 3 時間感染させ, 非感染菌を洗浄・除去後, 感染細胞を所定濃度の抗菌薬を含む 1% FBS-Ham's F-12 K 培地 (200 μL) 中で 5 日間にわたり培養し, MM 6-M ϕ の場合と同様な方法で細胞内生細菌数を計測した。なお, 供試薬剤濃度はヒトへの臨床投与量投与時に得られる血中の C_{max} 値 (RLZ 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

LVFX 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAM 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とした。なお, E 型菌と I 型菌の供試抗菌薬に対する感受性は, $-\Delta\text{Log CFU}$, すなわち $\text{Log CFU}(-\text{drug}) - \text{Log CFU}(+\text{drug})$ 値で示した。

なお, 今回の実験系では, 供試菌に感染した細胞の 5 日間培養後の薬剤非添加対照群での細胞内 CFU は, MM 6-M ϕ の場合では結核菌および MAC とも I 型菌 > E 型菌 (2~3 倍の差) であり, 他方, A-549 細胞の場合では結核菌では I 型菌 > E 型菌 (約 2 倍の差), また MAC では I 型菌 = E 型菌であったが, いずれの場合も培養 5 日間で細胞内菌数は 50~100 倍以上に増加するので, I 型菌と E 型菌の細胞内での増殖速度の上述のような若干程度の違いは $-\Delta\text{Log CFU}$ 値には特に問題となるような影響はおよぼさないものと考えられる。

Table 1 には, 供試菌を MM 6-M ϕ に感染させ, 供試薬剤を含む培地中で感染 MM 6-M ϕ を培養した場合の $-\Delta\text{Log CFU}$ 値および I/E 値を示した。結核菌と MAC の別なく, I 型菌感染 MM 6-M ϕ を RLZ, CAM または LVFX 添加培地中で 5 日間培養した場合の $-\Delta\text{Log CFU}$ 値は, E 型菌の場合に比べて小さく, MM 6-M ϕ 内局在 I 型菌のこれら 3 薬剤に対する感受性は E 型菌のそれに比べて低下する傾向にあることがわかった。

Table 1. Changes in susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex replicating within MM 6-M ϕ s to, rifalazil, clarithromycin and levofloxacin after intramacrophage passage

Drug	$-\Delta\text{Log CFU}$					
	<i>M. tuberculosis</i>			<i>M. avium</i> complex		
	E-type	I-type	I/E	E-type	I-type	I/E
Rifalazil	2.77 \pm 0.10	2.54 \pm 0.07	0.92	3.14 \pm 0.14	2.86 \pm 0.10	0.91
Clarithromycin	1.37 \pm 0.09	1.05 \pm 0.03	0.77*	2.27 \pm 0.09	2.21 \pm 0.05	0.97
Levofloxacin	2.58 \pm 0.05	2.30 \pm 0.04	0.89*	0.30 \pm 0.04	0.16 \pm 0.03	0.53*

$-\Delta\text{Log CFU}$ and I/E were calculated as: $-\Delta\text{Log CFU} = \text{Log CFU}(-\text{drug}) - \text{Log CFU}(+\text{drug})$; $I/E = -\Delta\text{Log CFU}(I\text{-type}) / -\Delta\text{Log CFU}(E\text{-type})$. I/E is the log-unit ratio of the decrease in residual CFU of I-type organisms due to antimicrobial activity of test drugs to that in E-type organisms. This parameter correlates to relative activity of a given drug against I-type organisms to its activity against E-type organism. For $-\Delta\text{Log CFU}$, mean values \pm SEM of data (n=6) obtained by 2 independent experiments (3 incubations were done for each experiment) are indicated. In 2 cases, data on 1 experiment was omitted since bacterial CFU (+ drug) decreased below the CFU counting limit. *Significantly different from 1.00 ($P < 0.05$ Student's *t*-test).

Table 2. Changes in susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex replicating within A-549 cells to rifalazil, clarithromycin and levofloxacin after intramacrophage passage

Drug	$-\Delta\text{Log CFU}$					
	<i>M. tuberculosis</i>			<i>M. avium</i> complex		
	E-type	I-type	I/E	E-type	I-type	I/E
Rifalazil	2.30 \pm 0.30	3.23 \pm 0.21	1.40*	0.60 \pm 0.19	1.20 \pm 0.05	2.00*
Clarithromycin	1.34 \pm 0.04	1.32 \pm 0.02	0.99	1.46 \pm 0.25	1.32 \pm 0.06	0.90
Levofloxacin	1.86 \pm 0.05	1.27 \pm 0.03	0.68*	0.14 \pm 0.08	0.09 \pm 0.03	0.64

*Significantly different from 1.00 ($P < 0.01$; Student's *t*-test). Other details are the same as in Table 1.

他方, Table 2 には供試菌を A-549 細胞に感染させ、供試薬剤を含む培地中で感染 A-549 細胞を培養した場合の $-\Delta\text{Log CFU}$ 値および I/E 値を示したが、I 型菌感染 A-549 細胞を RLZ 添加培地中で培養した場合の $-\Delta\text{Log CFU}$ 値は、結核菌と MAC の別なく、E 型菌の場合に比べて大きく、A-549 細胞内局在 I 型菌の RLZ に対する感受性は E 型菌に比べて増加する傾向を認めた。これに対して、I 型菌感染 A-549 細胞を CAM または LVFX 添加培地中で培養した場合の $-\Delta\text{Log CFU}$ 値は、結核菌と MAC の別なく、E 型菌の場合に比べて小さく、A-549 細胞内局在 I 型菌のこれら 2 薬剤に対する感受性は E 型菌に比べて低下する傾向が認められた。

以上のごとく、今回の詳細な検討においても、(1)MM 6-M ϕ および A-549 細胞内感染の別なく RLZ, CAM, LVFX といった薬剤に対する感受性は、供試結核菌および MAC を M ϕ 内環境に順化させることによって多くの場合は有意に低下すること、また興味深いことに、(2) A-549 細胞内感染菌の RLZ に対する感受性については、結核菌および MAC のいずれの場合とも菌を M ϕ 内環境に順化させることによってかえって著しく高まるという著者らのさきの成績⁹⁾が追認された。上述したごとく、今回供試した抗菌薬の E 型および I 型結核菌および MAC に対する MIC 値には大きな差異は認められないことより、今回たしかめられた上述の現象は、供試菌を M ϕ 内環境に順化させることによってその薬剤感受性が変化したことに起因するものではないものと考えられる。こうした現象については、以下の説明が可能であろうかと思われる。すなわち、M ϕ 内での環境に順化した I 型菌では、M ϕ 殺菌メカニズムに対する抵抗性が増強した菌が dominant になっているものと考えられる。ところで、M ϕ 内局在菌に対する抗菌薬の抗菌作用は、薬剤それ自身の抗菌活性と M ϕ の抗菌作用との相加あるいは相乗効果として表現されてくるわけであるので、I 型菌の方が E 型菌に比べて、各抗菌薬の抗菌作用に対する抵抗性がより強く表現されるものと予想される。今回の検討でも、結核菌および MAC のいかににかかわらず、M ϕ 内局在菌に対する供試 3 薬剤、ならびに A-549 細胞内局在菌に対する CAM, LVFX の抗菌活性については、おおむねこの考え方に合致した成績が得られている。他方、A-549 細胞内局在菌に対する RLZ の抗菌活性に関しては、興味深いことに、これとはまったく逆の成績が得られているが、この理由については現時点では不明であり、今後 I 型菌あるいは E 型菌に感染した M ϕ および A-549 細胞内での drug delivery の様相などとの関連からの検討を進める予定である。

ところで、肺結核のみならず肺 MAC 感染症においても、肺内に存在する感染菌の多くは、主に E 型菌として空洞の乾酪物質内で増殖しているものと考えられる。したがって、有空洞性の肺結核や肺 MAC 症患者に対す

る化学療法では、M ϕ などの宿主細胞内に局在する I 型菌は抗菌薬のターゲットとしての意義はあまり大きくはないものと考えられる。むしろ、抗菌薬治療のターゲットとしては、空洞内の E 型菌や結節病巣内に浸潤した単球由来の M ϕ に貪食された E 型菌などの占める割合が大きいもののように思われる。

今回の検討では、M ϕ や肺胞上皮細胞などの宿主細胞内に局在する抗酸菌については、一部の例外を除けば、おおむね E 型菌の方が I 型菌よりも抗菌薬に対する感受性が高いという傾向を認めることから、上述のような状態の肺結核や肺 MAC 症患者での化学療法剤による治療効果の予測を、細胞内局在菌に対する抗菌力を指標として行う場合には、I 型菌よりはむしろ E 型菌を供試する方がより適切であるものと考えられる。

他方、これらの抗酸菌症の感染成立過程において外部より宿主肺内に侵入した菌（多くは E 型菌）は、肺胞 M ϕ に取り込まれ、その M ϕ のなかで増殖することにより速やかに M ϕ 内環境に順化し I 型菌へと変化し、間質 M ϕ や II 型肺胞上皮細胞などに受け渡されて行くことになるわけであり¹⁰⁾、このような感染初期においては、M ϕ などの種々の細胞内に局在する I 型菌の占める割合が、感染後の時間経過に応じて増加していくといった状況を想定しなくてはならない。したがって、こうした患者での抗菌薬による化学療法あるいは予防投薬の効果を考えるには、感染のごく初期には M ϕ などの細胞内に局在した E 型菌に対する抗菌活性発現を指標にすればよいが、それ以降空洞形成までの病期では I 型菌に対する抗菌力を中心に考えていく必要があるものと思われる。

今回の検討では、結核菌と MAC の別なく、M ϕ や II 型肺胞上皮細胞内に局在する菌の抗菌薬に対する感受性発現のプロフィールが、供試菌が I 型菌であるか E 型菌であるかによって大きく異なるという興味深い成績が得られたが、この現象のメカニズムについては今後の検討を待ちたい。

供試薬剤を分与いただいた鐘淵化学工業株式会社、大正製薬株式会社、第一製薬株式会社に深謝します。

文 献

- 1) McDonough K A, Kress Y: Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63: 4802~4811, 1995
- 2) Bermudez L E, Goodman J: *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 64: 1400~1406, 1996
- 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* 43: 351~

- 357, 1999
- 4) Sato K, Tomioka H, Akaki T, et al.: Antimicrobial activities of levofloxacin, clarithromycin, and KRM-1648 against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex replicating within Mono Mac 6 human macrophage and A-549 type II alveolar cell lines. *Int J Antimicrob Agents* 16: 25~29, 2000
 - 5) 佐藤勝昌, 小笠原圭子, 富岡治明, 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 74: 655~660, 1999
 - 6) Sato K, Tomioka H, Shimizu T, et al.: Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. *J Infect Dis* 185: 1139~1147, 2002
 - 7) Lin Y, Zhang M, Barnes P F: Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66: 1121~1126, 1998
 - 8) 佐藤勝昌, 赤木竜也, 富岡治明, 他: 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。結核 76: 53~57, 2001
 - 9) Tomioka H, Sato K, Sano C, et al.: Intramacrophage passage of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex alters the drug susceptibilities of the organisms as determined by intracellular susceptibility testing using macrophages and Type II alveolar epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 519~521, 2002
 - 10) Franke-ullmann G, Pfortner C, Walter P, et al.: Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol* 157: 3097~3104, 1996

Altered susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex to rifalazil, clarithromycin, and levofloxacin after adaptation to intramacrophage millieus as determined by intracellular susceptibility testing

Katsumasa Sato¹⁾, Haruaki Tomioka¹⁾, Toshiaki Shimizu¹⁾, Chiaki Sano¹⁾,
Keisuke Sano¹⁾ and Toshiharu Matsushima²⁾

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

²⁾Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School

Intracellular drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and *Mycobacterium avium* complex (MAC) replicating in macrophages (MM 6-Mφs) or type II alveolar epithelial cells (A-549 cells) was compared between organisms adapted to intracellular millieus inside macrophages (I-type) and those extracellularly adapted by passage in 7H9 liquid medium (E-type). We determined parameters, $-\Delta\text{Log CFU} [= \text{Log CFU} (-\text{drug}) - \text{Log CFU} (+\text{drug})]$ and $I/E [= -\Delta\text{Log CFU} (\text{I-type}) / -\Delta\text{Log CFU} (\text{E-type})]$. Parameter I/E means the log-unit ratio of the decrease in residual CFU of I-type organisms due to antimicrobial activity of test drugs seen in E-type organisms. This parameter correlates to relative activity of a given drug against I-type organism to its activity against the E-type organism. In most cases of intracellular MTB and MAC inside MM 6-Mφs, I/E of rifalazil (RLZ), clarithromycin (CAM), and levofloxacin (LVFX) was less than 1.0, indicating that the susceptibility of these organisms to these drugs decreased due to intramacrophage passage of the organisms. In intracellular MTB and MAC inside A-549 cells, results similar to the above were obtained for CAM and LVFX. However, I/E of RLZ was much higher than 1.0 for both MTB and MAC, indicating that the susceptibility of these organisms to RLZ markedly increased after intramacrophage passage of organisms.