

ロキシシロマイシンの好中球機能に与える影響

間宮 紳一郎 高木 一平 羽柴 基之 馬場 駿吉

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

西村 穰

名古屋第二赤十字病院耳鼻咽喉科

THE EFFECT OF ROXITHROMYCIN ON THE FUNCTIONS OF NEUTROPHILS

Shinichiro Mamiya, Ippei Takagi, Motoyuki Hashiba, Shunkichi Baba
Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

Joh Nishimura
Department of Otorhinolaryngology, Nagoya Daini Red Cross Hospital

It is often reported that macrolides are effective against several kinds of chronic inflammatory diseases of respiratory tract, but there remains many unclear points in its mechanism. In this study, we investigated the effect of roxithromycin on the functions of neutrophils by long term (2 weeks or 11 weeks) oral medication to Guinea pigs. The functions of neutrophils are evaluated by the view points of chemotaxis and oxygen radical production against N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-

alanine. After both 2 weeks and 11 weeks of medication, chemotactic reaction was suppressed significantly in contrast to negative control. However, the dose dependency to roxithromycin was not observed. Oxygen radical productivity was also suppressed, but the differences were not significant. These results suggest that suppression of the neutrophil functions plays some important roles in the efficacy of roxithromycin in chronic inflammatory diseases.

緒 言

エリスロマイシンのびまん性汎細気管支炎への効果が確認されて以後、マクロライド系抗生物質の各種の慢性炎症性疾患に対する効果が各科領域で確認されている。特に気道系疾患に対して著効を示し、耳鼻咽喉科領域においても慢性副鼻腔炎に対してマクロライド系、特にニューマクロライド系の抗生物質が

著効を示す症例が多く見られている。しかしその作用機序については未だ不明な点が多い。今回我々はニューマクロライド系抗生物質の一つであるロキシシロマイシン (RXM) をハートレイ系オスのモルモットに長期間経口投与し、その好中球機能に対する作用を検討した。

方 法

1. 被験細胞

被験動物としてオスのハートレイ系モルモットを用い、RXM（エーザイ(株)より供与）を2.5%アラビアゴムを担体として1日1回反復強制経口投与した。RXMの投与量は10mg/kg B.W. および5 mg/kg B.W. に設定し、同時に対照として担体のみを投与した群を設定した。2週間あるいは11週間の投与期間の後、絶食下に2%カゼイン含生理的食塩水の腹腔内注射を行い、15時間後に麻酔下に失血死させ、腹腔内に滲出した細胞を採取した¹⁾。この滲出細胞は95%以上が好中球細胞であり、生理的食塩水にて洗浄後、ハンクス液（日水製薬）に浮遊させたものを好中球浮遊液として以下の実験に供した。

好中球機能は遊走能および活性酸素産生能を指標として検討し、好中球刺激物質としてはN-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine (f-MLF) を用いた。

2. 遊走能測定

好中球遊走能はBoydenの方法²⁾に準じ96穴ケモタキシスチャンパー（Neuro Probe社）を用いて測定した。チャンパーの上室と下室はポリカーボネイト膜フィルター（孔径5 μm ）により分けられており、上室には 2×10^6 個/mlの濃度に調整した好中球浮遊液を、下室には10 μM から1 nMまでの各濃度のf-MLF溶液を入れ、37°C、5%CO₂下で30分間温置した。温置終了後、フィルターをチャンパーからはずし、ディフ・クイック染色液（国際試薬）にて固定染色した。遊走した細胞の付着している部分は核が染色される事により付着細胞数に比例して650nmでの吸光度が大きくなるため、Tmaxマイクロプレートリーダー（Molecular Devices社）により650nmにおける吸光度を測定し、これをもって好中球の

遊走度とした。

3. 活性酸素産生能測定

活性酸素産生能はシトクロムc還元法を用いて測定した¹⁾。すなわち 5×10^5 個の細胞を含む好中球浮遊液と最終濃度10 μM から100 pMまでのf-MLF各濃度の希釈液および0.1 mM シトクロムcを96穴マイクロプレート内で混和し、好中球細胞より産生された活性酸素(O₂⁻)によるシトクロムcの還元量を測定した。シトクロムcは酸化型では550 nmに吸収を持たず、還元される事により550 nmでの吸収があらわれるため、550 nmでの吸光度の変化をマイクロプレートリーダーにより経時的に2分間測定し、初速度法にて還元量を決定した。これより好中球細胞 1×10^6 個あたり1分間あたりのシトクロムcの還元量を計算し、活性酸素産生量を評価した。

遊走能に関しては2週投与群と11週投与群について、活性酸素産生能に関しては11週投与群について検討した。またRXMの投与量は、2週投与群では5 mg/kg投与、11週投与群では5 mg/kgおよび10 mg/kg投与について検討した。

検定はStudent t検定を用い、棄却率5%をもって有意とした。

結 果

1. 遊走能測定結果

Fig. 1に2週投与群における遊走能の実験結果を示す。対照群、5 mg/kg投与群共にf-MLF 100nMに対する遊走能が最も強く、対照群に対し5 mg/kg投与群では1 nMから100nMの範囲で遊走能は有意に低値を示した。

Fig. 2には11週投与群における遊走能の実験結果を示す。2週投与群と同様に100nMに対する遊走能が最も強く、対照群に対し5 mg/kg投与群および10 mg/kg投与群で10nMから1 μM の範囲で遊走能は

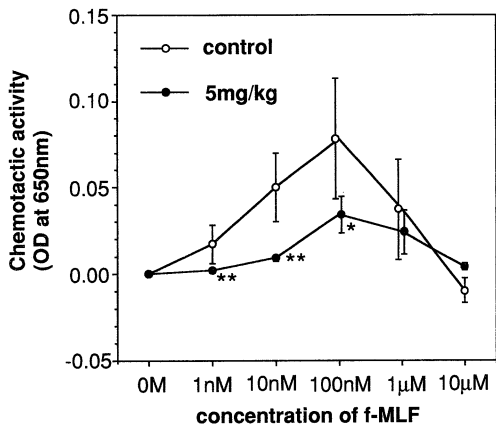


Fig. 1 Effect of 5 mg/kg of RXM relative to control systems on chemotactic activity of neutrophils against f-MLF after 2 weeks medication. Each value is expressed as the mean ± SD of optical density at 650 nm. *p<0.05 **p<0.01

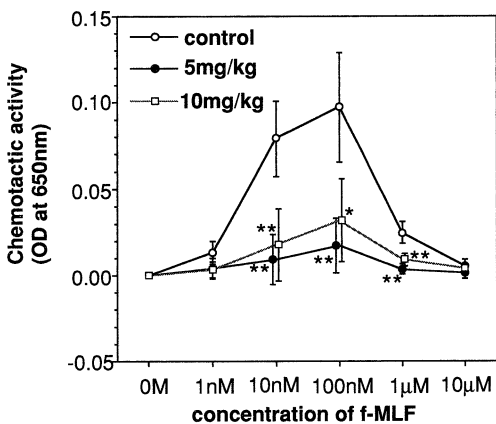


Fig. 2 Effect of 5 and 10mg/kg of RXM relative to control systems on chemotactic activity of neutrophils against f-MLF after 11 weeks medication. Each value is expressed as the mean ± SD of optical density at 650 nm. *p<0.05 **p<0.01

有意に低値を示した。ただし 5 mg/kg 投与群と 10mg/kg 投与群の間では統計学的有意差は見られず、今回の検討では RXM に対する用量依存性は認めなかった。

2. 活性酸素産生能測定結果

Fig. 3 に活性酸素産生能についての実験結果を示す。各群とも 1 μM にピークを認め、対照群に対し 5 mg/kg 投与群および 10mg/kg 投与群で活性酸素産生は低値を示したが、有意な差は認めなかった。

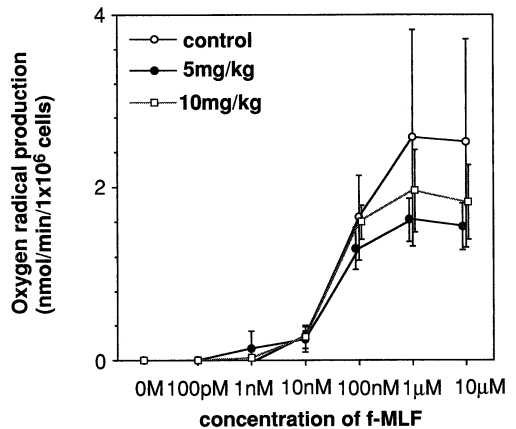


Fig. 3 Effect of 5 and 10mg/kg of RXM relative to control systems on oxygen radical production of neutrophils against f-MLF after 11 weeks medication. Each value is expressed as the mean ± SD in nmol/min/1 × 10⁶ cells.

考 察

マクロライド系抗生剤の慢性副鼻腔炎に対する有効性は臨床的には確認されているが³⁾、その作用機序については未だ明らかになっていない点が多く残されている。

マクロライドの作用として、抗菌剤としての側面は第一に考えられなければならない。しかし慢性副鼻腔炎やびまん性汎細気管支炎に対して、その起炎菌ないし病変部位から検出された菌の種類にかかわらずマクロライドが有効な場合があり、本来マクロライドが抗菌力を持たない緑膿菌感染症に対しても有効であったという報告もある³⁾。このことよりマクロライドの抗菌力以外の作用がその有効性に寄与している可能性が考えられる。

最近難治性慢性感染症の病変部位に細菌性バイオフィルムの形成を認めたという報告があり、これが細菌の病変部位への付着性を強化し、同時に抗生剤の菌体への移行を妨げているといわれている⁴⁾。マクロライドの作用の1つとしてバイオフィルムの産生抑制作用あるいは破壊作用が報告されており⁵⁾、この作用により細菌の排除が容易となった結果として、感染症の軽快化が起きていると考えられている。

一方生体側への作用として、マクロライドには免疫系の細胞、即ち好中球、リンパ球⁶⁾などへの修飾作用が認められており、この事が慢性感染症の軽快化に寄与している可能性が考えられる。

ただし特に好中球作用については、マクロライドが好中球機能を抑制する⁷⁾⁸⁾事により過剰な炎症反応を軽快させているという報告が多い一方で、逆に好中球機能を活性化する⁹⁾¹⁰⁾事により細菌の排除が容易となっている可能性も報告されており、現在も定説は得られていない。

今回の結果からは以下の様な事項が考えられた。

1. 好中球遊走能に対する影響はRXMの2週間投与から認められ、5 mg/kg投与群、10mg/kg投与群共に抑制作用を示したが、抑制の程度については両群間で有意な差を示さなかった。

2. 活性酸素産生能についてはRXM投与群では対照群に比べ抑制作用を示したが有意な差は示さなかった。これは各個体における測定値のばらつきが大きかったためと思われる。

3. 遊走能、活性酸素産生能共に最大反応を示したf-MLFの濃度は対照群、投与群ともに同じであり、このことより好中球機能抑制はf-MLFに対する拮抗的な阻害ではなく、細胞自体の反応性を抑制していると考えられ

る。

びまん性汎細気管支炎患者の気管支洗浄液中の好中球の機能は健常人に比べ亢進しており、マクロライドの投与により好中球機能が抑制されたという報告⁷⁾があるが、慢性副鼻腔炎においても病変部位への過剰な好中球浸潤とそれによる組織障害が起きている可能性が考えられている。今回の検討ではモルモット腹腔内好中球を検体として用いたが、これはカゼインにより誘導されていることから、ある程度活性化されている状態と思われる。末梢血好中球に比べ実際の病変局所における活性化された好中球の状態により近いと考えられる。その意味で今回の実験系は炎症局所における好中球動態に対する薬剤の作用検討モデルとして有用と考えられ、また実験結果よりRXMは好中球機能抑制作用を持つことが確認された。

以上、今回の実験結果から、RXMの好中球機能抑制作用が示され、RXMによる慢性副鼻腔炎の改善には抗菌作用に加えて好中球機能抑制作用も役立っている可能性が示唆された。

要 約

1. RXMをモルモットに長期間経口投与し、その好中球機能に対する作用を検討した。

2. 好中球遊走能における影響はRXMの2週間投与から認められ、5 mg/kg投与群、10mg/kg投与群ともに抑制作用を示した。

3. 活性酸素産生能についてはRXM投与群では抑制作用を示したが有意差は示さなかった。

4. 好中球機能抑制はf-MLFに対する拮抗的な阻害ではなく、細胞自体の反応性を抑制していると考えられた。

5. RXMによる慢性副鼻腔炎の改善には好中球機能抑制作用も役立っている可能性が示唆された。

文 献

- 1) 西村 穰: カルシウム依存性システインプロテアーゼN末端ペプチドの好中球活性化能に関する研究. 名市大医誌, 43: 477, 1992.
- 2) Boyden S: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med, 115: 453, 1962.
- 3) 羽柴基之, 宮本直哉, 木村利男, 他: 慢性副鼻腔炎に対するエリスロマイシン誘導体(クラリスロマイシン)の効果. 日鼻誌, 31: 269, 1992.
- 4) 馬場駿吉: 耳鼻咽喉科慢性感染症とglyco-calyx. 化学療法の領域, 8: 272, 1992.
- 5) Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, et al.: Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother, 37: 1749, 1993.
- 6) Konno S, Adachi M, Asano K, et al.: Anti-allergic activity of roxithromycin: inhibition of interleukin-5 production from mouse T lymphocytes. Life Science, 52: 25, 1992.
- 7) Kadota J, Sakito O, Kohno S, et al.: A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchitis. Am Rev Respir Dis, 147: 153, 1993.
- 8) Nelson S, Summer W R, Terry P B, et al.: Erythromycin-induced suppression of pulmonary antibacterial defenses. A potential mechanism of superinfection in the lung. Am Rev Respir Dis, 136: 1207, 1987.
- 9) 赤松浩彦, 佐々木浩子, 的場容子, 他: ロキシスロマイシンの好中球遊走能, 貪食能に及ぼす影響. 炎症, 14: 59, 1994.
- 10) Anderson R: Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion *in vitro* by inhibition of leukoattractant - activated superoxide generation and autooxidation. J Infect Dis, 159: 966, 1989.