

第24回日本耳鼻咽喉科感染症研究会シンポジウム

繊毛および分泌機能とマクロライド

花牟礼 豊 王 振海 吉次 政彦
上野 員義 大山 勝

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

EFFECTS OF MACROLIDE ANTIBIOTICS ON CILIARY AND SECRETORY FUNCTIONS

Yutaka Hanamura, Zhen Hai Weng, Masahiko Yoshitsugu,

Kazuyoshi Ueno, Masaru Ohyama

Department of Otolaryngology, Kagoshima University Faculty of Medicine

Effects of macrolide antibiotics (roxithromycin and erythromycin) on ciliary and secretory functions were studied using cultured ciliated epithelial cells from human nasal polyps and lectin staining of nasal mucosa of sinusitis patients. We measured the ciliary beat frequency using a high speed video system. Both erythromycin and roxithromycin solution in a concentration of 10^{-4} M had no effect on ciliary beat frequency. Lectin staining study has

revealed that subepithelial glands of nasal mucosa from chronic sinusitis patients contain abnormal glycoconjugates that lost sialic acid and fucose residues and that the macrolide antibiotics treatment increase the glycoconjugate containing sialic acid and fucose residues. These results suggest that macrolide antibiotics can normalize the sugar structure of mucin type glycoprotein of secretory glands.

はじめに

慢性副鼻腔炎の薬物療法として、エリスロマイシン (EM) や、ロキシスロマイシン (RXM) など、14員環系マクロライドの長期投与は、従来の薬剤にない顕著な治療効果が認められ、慢性副鼻腔炎の薬物療法剤の中で確固たる位置を占めるようになって来ている。しかし、その作用メカニズムについては、抗菌作用以外の薬理作用が指摘されているが、未だ不明な点が多い。今回、我々は、繊毛機能および分泌機能に対するマクロライドの作

用について、臨床材料を使った実験系にて検討した結果、若干の知見を得たので文献的考察を加えて報告する。

材料および方法

1. 繊毛運動数測定

慢性副鼻腔炎患者の手術時に摘出した鼻茸を用いて、粘膜上皮細胞のみを遊離培養し、微分干涉顕微鏡下、High Speed Video System (nac) にて繊毛運動数の測定を行った¹⁾²⁾。すなわち、0.1% Pronase (Type XIV, Sigma) にて細胞を遊離させ、Plastic

dish上で1時間培養し、先に線維芽細胞を附着させ、浮遊している上皮細胞を type I collagen をコートしたカバーガラスを装着したローズチャンバーに移し、CO₂ incubator (95% air, 5% CO₂) にて培養した。培養繊毛細胞は、培養後5~10日目の細胞を用いた。微分干渉顕微鏡下30℃にて観察し、High Speed Video System (nac) にて繊毛運動を録画し、スロー再生にて繊毛打数 (ciliary beat frequency, CBF) の測定を行った。

エリスロマイシン (EM) およびロキシスロマイシン (RXM) による繊毛打数の変化を記録するため、以前に報告されている最大促進濃度である10⁻⁴Mの濃度にて20分間測定した³⁾。コントロールとしてEMとRXMの溶媒として用いたジメチルスルフォキシドを等量添加したものをを用いた。

2. 複合糖質染色

鼻アレルギー患者5例、マクロライド投与を行っていない慢性副鼻腔炎患者6例および1カ月以上のEMあるいはRXM投与を行った慢性副鼻腔炎患者3例について、手術時に摘出した中甲介あるいは下甲介粘膜を用いた。複合糖質染色には、糖鎖特異的結合能を持つレクチンを用いた (Table 1)。

レクチン	糖特異性
Wheat germ agglutinin (WGA)	N-acetylglucosamine (GlcNAc) Sialic acid (Neu5Ac)
Sabucus nigra agglutinin (SNA)	Neu5Ac (α-2-6)Gal / GalNAc
Ulex europaeus agglutinin (UEA-1)	α-L-fucose
Concanavalin-A (ConA)	α-D-mannose

Table 1 Specificity of Lectins

すなわち、組織を2% glutaraldehyde にて固定後 EPON に包埋し、2μm切片を脱EPONし、ビオチン化レクチンを用い、ABC法にて染色した⁴⁾。

上皮下分泌腺のレクチン染色性を比較す

るため、染色の強さおよび腺細胞中の染色陽性細胞の割合をスコア化し、各レクチンにおける漿液細胞及び粘液細胞の染色の強さと陽性細胞の割合のスコアを加算したものを“レクチン染色スコア”とした (Table 2)。

A ; 染色の強さ : 0 ~ 4

- 0 : 染色されない
- 1 : 薄く染色される
- 2 : 中等度に染色される
- 3 : やや濃く染色される
- 4 : 強染される

B ; 染色細胞の割合 : 1 ~ 4

- 1 : 0 ~ 25%
- 2 : 25 ~ 50%
- 3 : 50 ~ 75%
- 4 : 75 ~ 100%

レクチン染色性スコア=

粘液細胞 (A+B) + 漿液細胞 (A+B)

Table 2 Score of Lectin Staining

結 果

1. 繊毛運動数に対するマクロライドの影響

EM (10⁻⁴M) を medium 内に投与することにより5分、10分、20分後において特に繊毛打数に変化を認めなかった (Fig. 1)。また、RXM (10⁻⁴M) にても同様の結果で、投与後も特に変化を認めなかった (Fig. 2)。

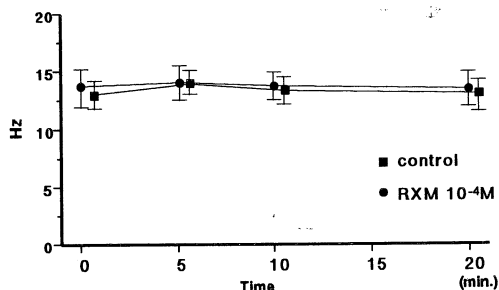


Fig. 1 Time-course of the effects of RXM (10⁻⁴M) on ciliary beat frequency.

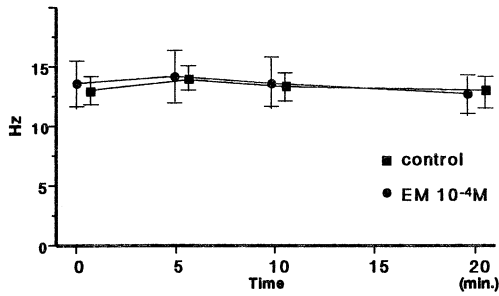


Fig. 2 Time-course of the effects of EM (10⁻⁴M) on ciliary beat frequency.

2. 分泌機能に対するマクロライドの影響

粘膜下分泌腺は、漿液細胞と粘液細胞より構成されるが、鼻アレルギー患者の粘膜においては、粘液細胞の分泌顆粒が、UEA-1, WGA, SNA にて強く染まり、漿液細胞は、UEA-1, WGA にて弱く染色された。また、ConA にて漿液細胞は陽性を示すが、粘液細胞は、陰性であった。一方、マクロライド非投与の慢性副鼻腔炎患者鼻粘膜では、WGA, SNA の染色性は粘液細胞において極度に低下し、UEA-1 の染色性は、粘液細胞にて低下するが、漿液細胞では不規則に亢進した。ConA にての染色性は低下した。ところが、マクロライド投与を行った慢性副鼻腔炎患者鼻粘膜では、UEA-1, WGA, SNA にて染色される粘液細胞が出現していた。ConA においては、非投与群同様、染色性は認められなかった。

それぞれのレクチンにおけるレクチン染色性スコアを各疾患において比較すると、鼻アレルギーにおいて UEA-1, WGA, SNA, ConA のいずれでもスコアが高く、慢性副鼻腔炎では、UEA-1, WGA, SNA, ConA のいずれでもスコアの低値が認められた。特に、WGA, SNA において顕著であった。一方、マクロライド投与群の慢性副鼻腔炎では、UEA-1, WGA, SNA において、鼻アレルギーと慢性副鼻腔炎

のスコアの間中値を示した。ConA においては、慢性副鼻腔炎のスコア値と変化なかった (Fig. 3)

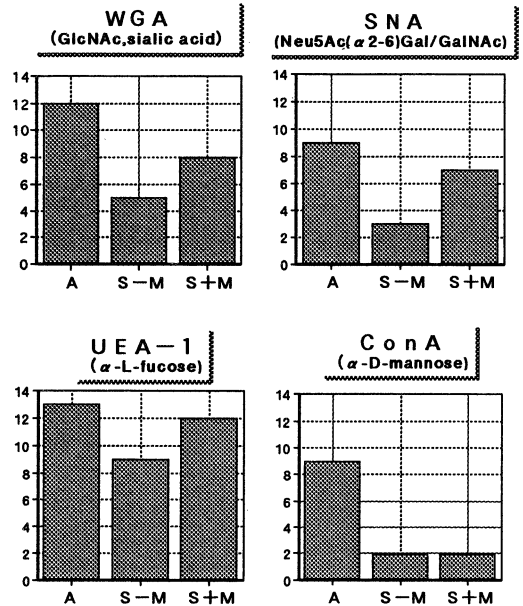


Fig. 3 Total score of lectin staining. A : nasal allergy patients, S-M : sinusitis patients treated without macrolide, S+M : sinusitis patients treated with macrolide.

考 察

慢性副鼻腔炎粘膜においては、粘膜上皮細胞を含めて、細菌、好中球、マクロファージ、リンパ球などがお互いに、サイトカインや化学伝達物質、神経ペプチド、活性酸素等を介して、繊毛細胞や分泌細胞へ作用し、繊毛運動障害、繊毛細胞減少、異常繊毛出現などの繊毛機能障害を生じ、また、分泌過多、異常粘液分泌などの分泌機能障害を来している。その結果、粘液繊毛輸送系の障害を生じ、鼻汁過多や鼻汁貯留、停滞などに至る。マクロライドの慢性副鼻腔炎におけるその作用機序を考える上で、繊毛機能及び分泌機能に対する作用を検討することは、その作用部位如何にかかわらず重要であり、慢性副鼻腔炎の病

態解明にもつながると考える。

繊毛運動に対するマクロライドの作用は、家兎気管粘膜上皮の explant culture を用いた in vitro 実験で、 10^{-4} ~ 10^{-6} M の EM および RXM において投与後10分以内に有意の繊毛運動亢進作用があることが報告されている³⁾⁶⁾。今回、我々は、慢性副鼻腔炎患者から摘出した鼻茸を用いて上皮細胞のみを遊離、培養し、より病態に近い状態と考えられる繊毛細胞でのマクロライドの影響を観察した。その結果、EM、RXM にて繊毛運動の亢進はみられず、慢性副鼻腔炎患者の繊毛上皮細胞に対する直接作用は認められないと考えられた。

呼吸上皮の分泌機能に対するマクロライドの作用として、Glycoconjugate の分泌抑制作用⁶⁾や、マクロフェージ由来粘液分泌促進因子の抑制作用⁷⁾、上皮細胞の C l 分泌抑制による水分分泌抑制作用⁸⁾が報告されている。慢性副鼻腔炎における鼻汁量の増加は、杯細胞より、分泌腺細胞の増加に大きく依存しており、その変化は、副鼻腔のみならず、鼻粘膜にも同様の変化が生じていることが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。そこで我々は、上皮下分泌腺に注目し、分泌液の主成分である複合糖質のレクチン染色を行い、分泌腺レクチン染色性をスコア化し、各疾患での比較を行った。

鼻アレルギー患者の粘膜では、シアル酸結合様式を認識する SNA と WGA およびフコースに特異性を持つ UEA-1 にて高スコア、ならびに、血清型糖蛋白に豊富なマンノースに反応する ConA でも、比較的高いスコアを示した。すなわち、鼻アレルギーでは、シアロムチン、フコムチン、血清型糖蛋白ともに分泌され、正常な糖鎖構成を持つ粘液が分泌されることが分かる。一方、慢性副鼻腔炎患者の粘膜では、SNA、WGA、ConA 共、非常に低いスコアで、UEA-1 でもやや低いスコア値を示した。すなわち、慢性副鼻腔炎では、

ムチン産生時に糖鎖末端へのシアル酸やフコースの転移、特にシアル酸転移が減少し、血清型糖蛋白量も減少しており、異常な糖鎖構成を持つ粘液産生が行われていることが伺える⁴⁾。このことは、慢性副鼻腔炎下甲介粘膜のシアル酸転移酵素活性が、鼻アレルギー下甲介粘膜に比較し、低値であることと一致する¹¹⁾。また、マクロライド投与を行った慢性副鼻腔炎患者では、WGA、SNA、UEA-1 ともスコアが上昇しており、血清型糖蛋白量減少は不変であるが、ムチンの糖鎖末端へのシアル酸やフコースの転移が回復傾向を示すものと考えられる。

分泌液中の糖蛋白の糖鎖構造は、分子生物学的機能を決定すると共にそのレオロジー的特性に大きく影響している。アレルギー鼻粘膜においては、過剰ではあるが、正常な糖鎖構成を持つ粘液産生が行われているため、粘液繊毛輸送機能は正常に保たれている。慢性副鼻腔炎では、異常な糖鎖構成を持つ異常粘液産生が行われるため、粘液繊毛輸送機能障害を来す。マクロライドは、シアル酸やフコースの糖転移を改善し、正常糖鎖構成を持つ粘液産生を促すことにより、粘液繊毛輸送機能を改善すると考えられる。事実、エリスロマイシン誘導体であるクラリスロマイシン投与にて、慢性副鼻腔炎患者の粘液繊毛輸送機能(サッカリタイム)の改善が報告されている¹²⁾。しかし、マクロライドの分泌腺に対する作用は、分泌細胞への直接作用か、あるいは、他の上皮細胞や好中球、マクロフェージ、リンパ球等を介する間接作用かは明らかでなく、今後の研究課題といえる。

ま と め

1. 慢性副鼻腔炎患者の繊毛上皮細胞に対し、EM と RXM の直接作用による繊毛運動亢進作用は、認められなかった。
2. 慢性副鼻腔炎患者の鼻粘膜上皮下分泌腺において、ムチン型糖蛋白の糖鎖末端での

シアル酸やフコース, 特にシアル酸の減少, および, 血清型精蛋白の減少が認められた.

3. マクロライド投与慢性副鼻腔炎患者において, マクロライド非投与患者に比べ, ムチン型糖蛋白糖鎖末端のシアル酸やフコース量の増加が認められた.

参 考 文 献

- 1) Hanamura Y, et al : Ultrastructure of cultured human nasal epithelial cells. *J. Clin. Electron Microscopy* 23 : 916-917, 1990.
- 2) Rautiainen M, et al : Ciliary beat of cultured human respiratory cells studied with differential interference microscope and high speed video system. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 11 : 2845-851, 1992.
- 3) Takeyama K, et al : Effect of macrolide antibiotics on ciliary motility in rabbit airway epithelium in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 45 : 756-758, 1993.
- 4) 上野員義, 他 : 鼻疾患と鼻汁分泌 : 複合糖質の変化とケミカルメディエーター, *日鼻誌* 33 : 287-292, 1994.
- 5) Tamaoki J, et al : Effect of erythromycin on ciliary motility in rabbit airway epithelium in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 29 : 173-178, 1992.
- 6) Goswami SK, et al : Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis*, 14 : 72-78, 1990.
- 7) Sperber K, et al : Mucus secretagogue production by a human macrophage hybridoma, *J Allergy Clin Immunol*, 87 : 490-498, 1991.
- 8) Tamaoki J, et al : Erythromycin inhibits C ℓ secretion across canine tracheal epithelial cells. *Eur Respir J*, 5 : 234-238, 1992.
- 9) 坂倉康夫 : 鼻腔・副鼻腔の分泌細胞の定量組織化学, 上気道液の生理と病態, 協和企画通信, 東京, 1989.
- 10) Tos M, et al : Mucus production in chronic maxillary sinusitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 97 : 151-159, 1984.
- 11) 大山 勝 : 複合糖質と生合成, 分解酵素, 上気道粘膜の病態生化学—診断と治療への結びつき—, 斯文堂, 鹿児島, 1984.
- 12) 羽柴基之, 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 : 269-280, 1993.