

ラット培養血管内皮細胞に対するマクロライドの影響

榎本冬樹 金隆澤 市川銀一郎

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

Effect of Macrolides on the rat cultured microvascular endothelial cells.

Fuyuki ENOMOTO MD, Ryutaku KIM MD, Ginichirou ICHIKAWA MD,
The Department of Otorhinolaryngology
Juntendo University, School of Medicine

To understand the mechanism of Macrolides on otitis media with effusion, we examined the effects of Erythromycine (EM) on leukocyte accumulation and expression of adhesion molecules L-selectin and Mac-1, using rat experimental model. Administration of EM inhibited leukocyte (neutrophil) accumulation in the middle ear cavity after LPS stimulation. Moreover, EM down-regulated L-selectin expression and inhibited interleukin (IL) -8-induced up-regulation of Mac-1 on peripheral blood neutrophils.

In this study, we investigated the role of the EM on cultured rat microvascular endothelial cells (WT-5). The neutrophil adherence to the WT-5 were up-regulated by TNF α stimulation. But the neutrophil adherence were down-regulated by EM stimulation. These observation suggest that EM may improve otitis media with effusion by inhibiting neutrophil accumulation in the middle ear cavity through modulating the expression of adhesion molecules on peripheral blood neutrophils.

はじめに

われわれはラット実験中耳炎において14員環系マクロライドが好中球の接着分子L-セレクチンとMac-1に影響を与え、好中球の中耳腔への浸潤が抑制されていることを報告した¹⁾。今回我々は実際に接着分子がラット実験中耳炎にどのようにかかわっているのか *in vitro* で検討する目的でラット血管内皮細胞のセルラインであるWK-5を用いて好中球の接着がエリスロマイシンによりどのように影響を受けるかを検討した²⁾。

対象と方法：SD系雄のラット(200-250g)10匹を用いた。5匹にEMを20mg/kg一日一回、腹腔内に実験の2週間前から投与した(EM腹腔投与群)。5匹には生理食塩水のみ投与した(対照群)。ペントバルビタールによる麻酔後に心腔採血を行い、末梢血を採取した。末梢血はPolymorphoprep(Nycomed pharm AS, Oslo, Norway)に重層し遠心後好中球を回収した。好中球はTNF α 1×10^6 U/mlにて刺激した³⁾。

ラット血管内皮細胞のセルラインである

WK-5はサイトシグナル研究所より提供された。24穴のコラーゲンコートマイクロプレートに培養細胞を散布し、約24時間後にコンフルエントの状態を実験に用いた。WK-5のICAM-1の発現量をTNF α 1×10^6 U/ml, EM $10 \mu\text{g/ml}$ をそれぞれくわえ、2時間培養したものについてFACS scanを用いて解析した。また、培養細胞にEMを $10 \mu\text{g/ml}$ とな

るように調整し培養液に添加し2時間培養したものについてラット好中球に対する接着も検討した(EM培養液投与群)。

末梢血好中球はCrにて標識しマイクロプレートに散布し、培養細胞に接着後、可溶化させ洗浄後 γ シンチレーションカウンターにてカウントした。

経過：ICAM-1の発現量はTNF α 刺激によ

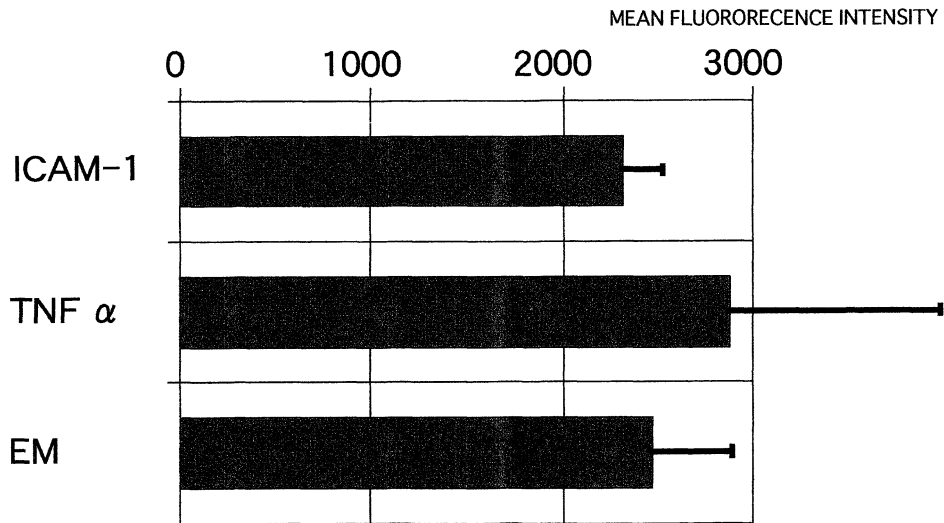


Fig.1 The expression of ICAM-1 on the rat cultured microvascular

n=5

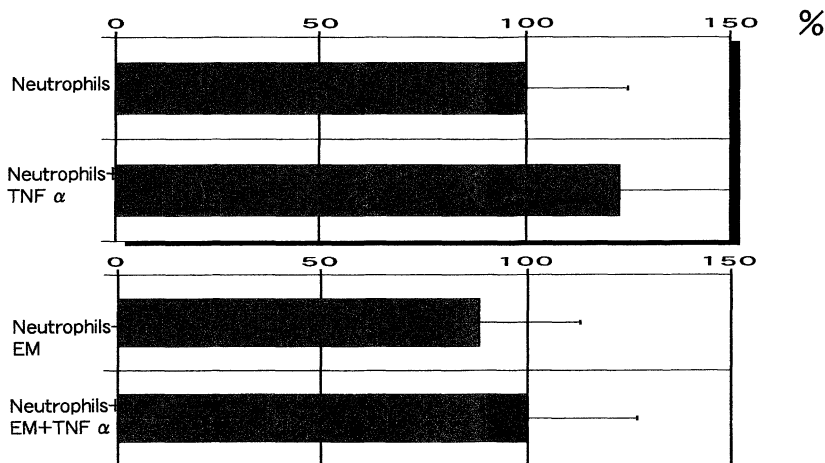


Fig.2 The adhesion cells number of rat cultured microvascular endothelial cells. Administration of EM to rat

り増加した。しかし EM 添加によっては発現量は変化しなかった (Fig.1).

次に WK-5 に対する末梢血好中球の接着は TNF α 刺激により約 30% 増強されることが分かった。またエリスロマイシンの腹腔内投与により WK-5 に対する末梢血好中球の接着は 15% 程度抑制される傾向にあった (Fig.2)。これに対し、WK-5 に EM を 10 μ g/ml 添加した群では好中球の接着はむしろ増強される傾向にあった (Fig.3)。

考察：ラットの培養血管内皮細胞には ICAM-1 の発現がみられこれは TNF α 刺激により増加した⁴⁾がし EM 添加によっては発現量は変化しなかった。これは培養細胞がサイトカインの刺激には反応し発現量を変化させたが EM には反応しなかったことを示しており本実験では EM は直接培養細胞の接着分子には影響を及ぼさないものと思われた。これに対して、エリスロマイシンを腹腔内に投与した末梢血好中球は培養細胞への接着が非投与群より低いことから、エリスロマイシンは好中球の接着に関与していることが示唆された。我々は以前に *in vivo* の実験で末梢血好中球の L-セレクチン

と Mac-1 はエリスロマイシンにより影響を受け発現が変化することを報告している。以上のことからエリスロマイシンは末梢血好中球の接着分子に影響を与え血管内皮への接着を阻害して炎症を和らげる作用があることが示唆された。

文 献

1. F.Enomoto, G.Ichikawa, I. Nagaoka, T.Yamashita; Effect of Erythromycin on Otitis Media with Effusion in Experimental Rat Model. *Acta Otolaryngol*; supp 539; 57-60. 1998
2. Y.Yamaguchi, F.Matumura, O.Ichikawa, T.Horiuchi, et al; Monocyte Chemoattractant Protein-1 Enhances Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 Following Ischemia-Reperfusion of the Liver in Rats. *Hepatology*; 27; 727-734. 1998.
3. H. Shijo, K. Iwabuchi, S. Hosoda, I. Angaoka, et.al: Evaluation of neutrophil function after experimental abdominal surgical trauma. *Inflamm. res.* 47: 67-74. 1998.
4. Hamilons DL, leung DYM, Wood R, Bean

n=5

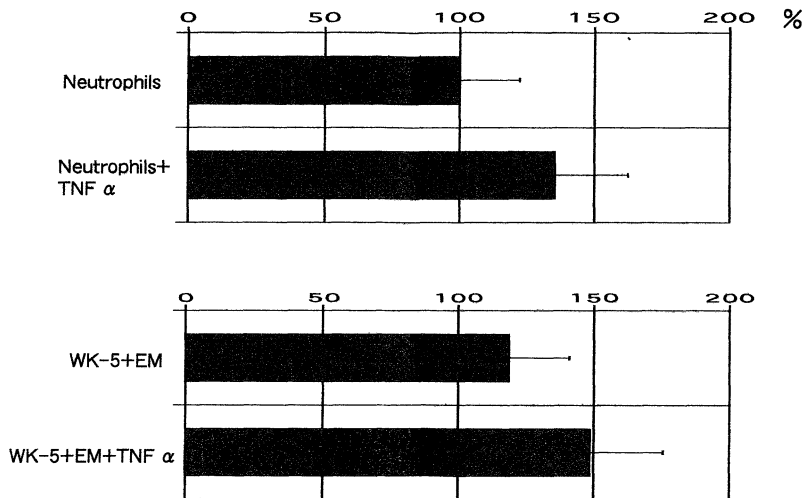


Fig.3 The adhesion cells number of rat cultured microvascular endothelial cells (WK-5). Cultured with EM to WT-5

DK, Song YL, et al. Eosinophil infiltration in non-allergic chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (CHS/NP) is associated with endothelial VCAM-1 up-

regulation and expression of TNF- α . Am J Respir Cell Mol Biol 15: 443-450. 1996

質 疑 応 答

質問 内菌明裕 (鹿児島)
EM の投与濃度, 及び濃度依存性の関係について教えてください。

応答 榎本冬樹 (順天堂大)
 $10 \times 10^{-6} \text{g/ml}$.

他の濃度では行っていません。

質問 宮本直哉 (名市大)
①好中球に対しては抑制効果, 血管内皮細胞に対しては促進効果があるのなら in vivo では相殺し合って作用が無くなるのではないか。

②クラリスロマイシンでも同様の実験をされていたらその結果はどうであったか。

応答 榎本冬樹 (順天堂大)

① vivo と vitro の反応は違ってくると思います。

②行ってません。

連絡先: 榎本冬樹

〒113-8421 文京区本郷 2-1-1

順天堂大学医学部

耳鼻咽喉科学教室

TEL 03-3813-3111 FAX 03-5684-0547