

## ラット好中球の血管内皮への接着に対する マクロライド剤の影響

榎本冬樹 金隆鐸 岡添眞介

藤森正登 市川銀一郎

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科

### Effects of Macrolides in Rat Experimental Otitis Media:

#### — In vitro Investigation —

Fuyuki ENOMOTO<sup>1</sup>, Ryutaku KIM<sup>1</sup>, Shinsuke OKAZOE<sup>1</sup>, Masato FUZIMORI<sup>1</sup>, and  
Ginichiro ICHIKAWA<sup>1</sup>,

Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine.

2-1-1 Hongou Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

We have reported rat experimental otitis media, erythromycin (EM) have effects on L-selectins and Mac-1, the adhesion molecules of neutrophils, inhibiting the infiltration of neutrophils into the middle ear cavity (1). In the present study, to clarify the action of the adhesion molecules in vitro in a rat model of otitis media, we investigated the effects of erythromycin (EM) and/or clarithromycin (CAM) on adhesion of neutrophils to rat vascular endothelial cell WK-5. The adhesion of neutrophils, obtained from rats treated with EM and CAM, to WK-5 tended to be inhibited. However, no effects of the macrolides were seen when EM and/or CAM were administered to the culture medium of WK-5.

#### 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<sup>1)</sup>。今回我々は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WK-5を用いて好中球の接着がエリスロマイシン(EM)・クラリスロマイシン(CAM)によりどのように影響を受けるかを検討した。

#### 対象と方法

SD系雄のラット(200-250g)を用いた。EMは20mg/kgを一日一回、腹腔内に中耳炎作成の2週間前から投与した。CAMは10mg/kgを一日一回、経口的に中耳炎作成の2週間前から投与した。実験中耳炎の作成は従来の報告のごとくLPS 50μg/mlをラットの鼓室に注入して作成した<sup>2)</sup>。中耳炎作成24時間後に中耳内の浸出液、浸出細胞を回収した。同時に心腔採血を行い、末梢血好中球を分離した。好中球はIL-8, TNF-αにて刺激した<sup>3)</sup>。

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。中耳内、末梢血好中球は  $^{51}\text{Cr}$  にて標識しマイクロプレートに散布し、static condition または flow condition にて接着、洗浄後  $\gamma$  シンチレーションカウンターにてカウントした。また、WK-5 の接着分子 ICAM-1 の発現を FACS にて解析した。

結 果

WK-5 の接着分子 ICAM-1 の発現は  $1 \times 10^{-10}\text{M}$  の  $\text{TNF-}\alpha$  を添加したところ有意に発現が増強した。しかし EM/CAM を  $1 \times 10^{-6}\mu/\text{ml}$  添加した場合の投与した接着分子 ICAM-1 の発現は変化なかった (Fig. 1)。EM/CAM を 2 週間腹腔に投与したラットの好中球は WK-5 に対する接着は static condition, flow condition とともに抑制される傾向にあった (Fig. 2)。中耳炎局所に進出した好中球は対照群、EM/CAM を 2 週間腹腔に投与した群ともに WK-5 に対する接着は増強した (static condition, flow condition とともに) (Fig. 3)。さらに、CAM を 2 週間腹腔に投与したラットの好中球の WK-5 に対する接着は  $1 \times 10^{-8}\text{M}$  の IL-8 刺激下では抑制される傾向にあったが、 $1 \times 10^{-10}\text{M}$  の  $\text{TNF-}\alpha$  刺激では変化が認められなかつ

た (Fig. 4)。

考 察

ラット培養血管内皮細胞 WK-5 の接着分子 ICAM-1 の発現量は通常の血管内皮と同様に  $\text{TNF-}\alpha$  により増強されることから WK-5 は接

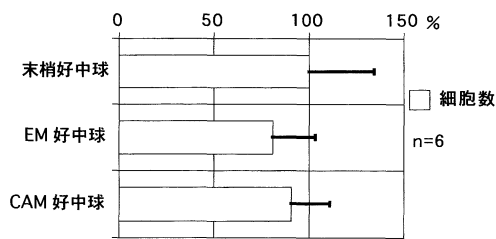


Fig. 2 Effect of macrolides to WK-5 adhesion in peripheral blood neutrophil-flow condition-

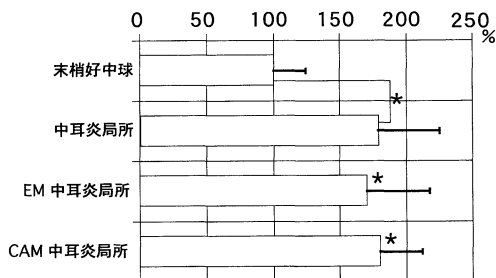


Fig. 3 The effect of macrolides on MEE-exudated neutrophil adhesion to WK-5

細胞数 \* < 0.05

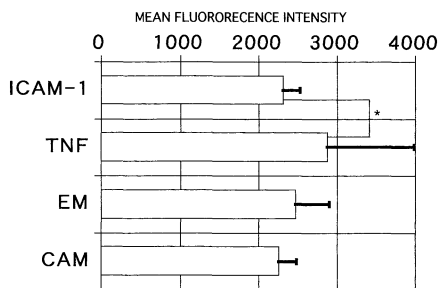


Fig. 1 Experssion of ICAM-1 in WK-5 \* < 0.05

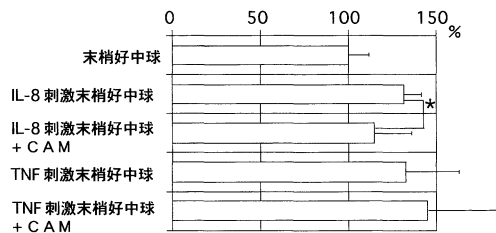


Fig.4 Effect of cytokines to WK-5 adhesion in peripheral blood neutrophil- flow condition- 細胞数 \* < 0.05

Fig.4 Effect of cytokines to WK-5 adhesion in peripheral blood neutrophil- flow condition- 細胞数 \* < 0.05

着実験に用いることが可能であることが確認された。EM, CAM を培養液に添加した場合は ICAM-1 の発現量は通常発現量と変化なかったことから血管内皮自体の接着分子は EM, CAM によって影響されない可能性が示唆された。これに対し、EM, CAM を投与した末梢血好中球は培養細胞への接着がコントロール群より低いことから、EM, CAM は好中球の接着に関与していることが示唆された。われわれは以前に中耳内に滲出した好中球の接着分子 L-セレクチンと Mac-1 の発現量の変化は抹消血好中球の発現量の変化と比較して有意に高かったことを報告している。今回の実験にて中耳内へ浸出した好中球の血管内皮への接着はより高いことから接着分子の発現の変化が大きいほど血管内皮により多く接着することが推測された。さらに IL-8 刺激下では接着は抑制される傾向にあったが、TNF- $\alpha$  刺激では変化が認められなかったことからある一定以上の強い刺激を

受けた好中球は EM や CAM の接着の抑制効果がキャンセルされる可能性が推測された。

### 参 考 文 献

- 1) Enomoto F, Ichikawa G, Nagaoka I, et al : Effect of Erythromycin on Otitis Media with Effusion in Experimental Rat Model. Acta Otolaryngol (Stockh) Supple 539 : 57-60, 1998.
- 2) 榎本 冬樹, 市川 銀一郎, 長岡 功, 山下 辰久 : ラット実験的滲出性中耳炎中のアラキドン酸代謝産物の変動. 日耳鼻 98 : 959-967, 1995.
- 3) Shijo H, Iwabuchi K, Watanabe H, et al : Evaluation of neutrophil function after experimental abdominal surgical trauma. Inflamm Res. 47 : 67-74, 1998.

### 質 疑 応 答

質問 川内秀之 (島根医科大学)

先生のデータから考えると炎症局所に動員された炎症細胞の接着分子に対するリガンドは、マクロライド系抗生剤の投与より抑制されないと考えて差し支えないでしょうか。

回答 榎本冬樹 (順天堂大学)

局所へ浸出した好中球は末梢血好中球にみちた EM, CAM の効果はキャンセルされると考えるが、さらなる検討を要する。

質問 黒野祐一 (鹿児島大学)

血管内皮細胞からの VCAM-1 の発現に対する効果はどうか。

好中球接着能に対するマクロライドの抑制効果の作用機序はどのように考えますか。

回答 榎本冬樹 (順天堂大学)

VCAM-1 の検討は行っておりません。

培養細胞に対する CAM, EM の効果は

TNF 添加, 非添加とも同様の結果であった。

ICAM-1 の発現は EM, CAM により変化なかったが、好中球の接着分子の MAC-1 L-セレクチンの発現は変化していた。これらを介する機序と考えます。

連絡先：榎本 冬樹

〒113-8421

文京区本郷 2-1-1

順天堂大学耳鼻咽喉科

TEL 03-3813-3111 FAX 03-5689-0547

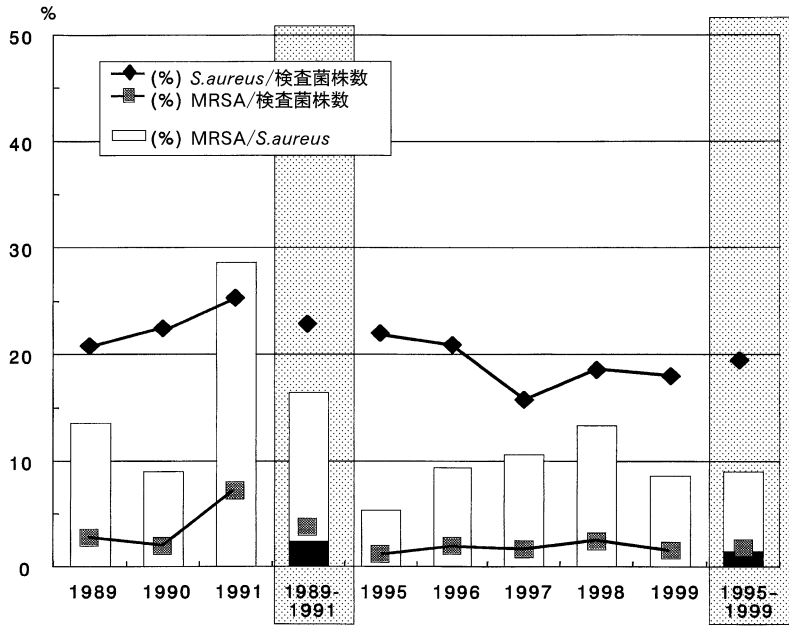


Fig. 5 Detection rate of S.aureus and MRSA in pharynx on tonsil.

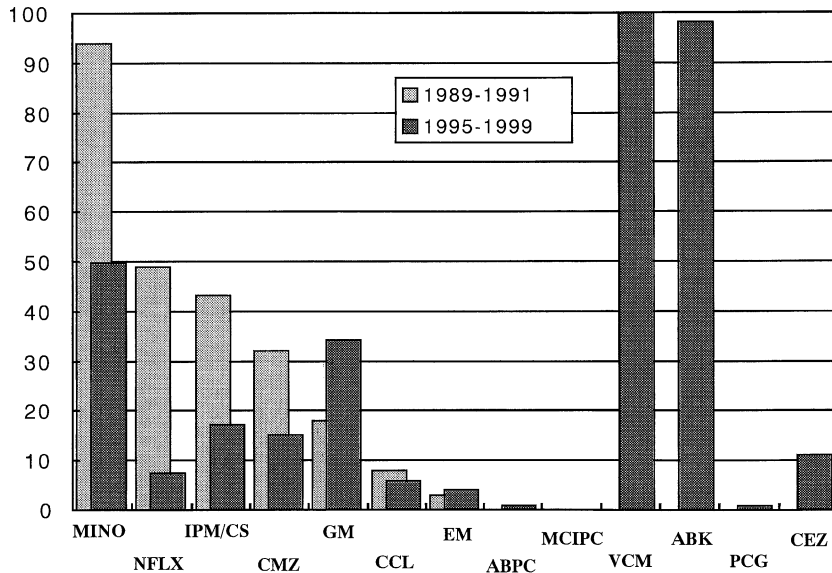


Fig. 6 Drug susceptibilities of MRSA.