

## ラット好中球遊走能に対する エリスロマイシン, GROの影響

榎本冬樹 山崎陽子 横井秀格

藤森正登 市川銀一郎

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

金隆澤 片岡丈志

順天堂大学医学部附属浦安病院耳鼻咽喉科

### Effects of Erythromycin and GRO on Neutrophil Chemotaxis in Rats

Fuyuki ENOMOTO, Yoko YAMAZAKI, Hidenori YOKOI, Masato FUJIMORI,  
Ginichiro ICHIKAWA

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Juntendo University

Ryutaku KIN, Takeshi KATAOKA

Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University Urayasu Hospital

To investigate the mechanism of the antiinflammatory action of the 14-membered macrolides, we conducted experiments in rat models of otitis media. Administration of the 14-membered macrolides for 2 weeks demonstrated an inhibitory effect on neutrophils exuded to the auris media in rat models, suggesting the involvement of adhesion molecules, L-selectin and Mac-1. In the present study, we measured neutrophil chemotaxis to investigate the effect of the 14-membered macrolides on neutrophil function. We used neutrophils obtained from experimental otitis media lesions, and from peripheral blood to measure neutrophil chemotaxis. Results revealed neutrophil chemotaxis to be unaffected by direct addition of erythromycin. With reference to changes in the effects on GRO, neutrophil chemotaxis was elevated in a dose-dependent manner in the untreated group, and in the group treated with erythromycin for one week, but it was significantly suppressed in the group treated with erythromycin for 2 weeks. The chemotaxis of neutrophils exuded to the auris media tended to be suppressed by treatment with erythromycin.

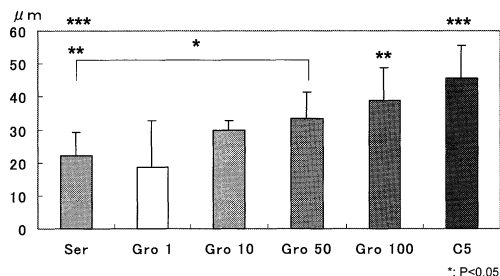


Fig. 1 Chemotactic activity of GRO added to the lower chamber

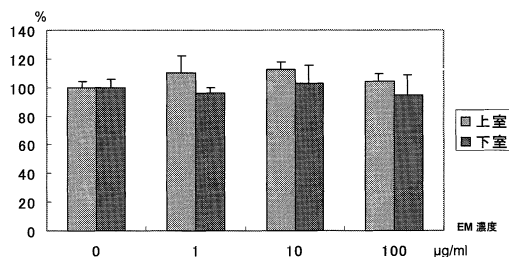


Fig. 2 Chemotactic activity of EM added to the upper/lower chamber

### 目 的

我々は、14員環マクロライド剤の抗炎症作用の作用機序を検討する目的でラット実験中耳炎モデルを用いて実験を行ってきた。その結果、14員環マクロライド剤は2週間投与において好中球の中耳への抑制効果をもとめ、接着分子であるL-セレクチンとMac-1の関与が示唆された。今回我々は好中球機能に対する14員環マクロライド剤の影響を検討するために好中球の遊走能を測定した。

### 対象と方法

対象はSD系のオスラット(200g)をもちいた。エリスロマイシンは10mg/kgを1日1回腹腔内に投与した。投与期間は7日間または14日間とした。対象として生理食塩水を腹腔投与した群についても検討を行った。採血はペントバルビタールの腹腔投与による麻酔後に、心臓から採血した。採血にヘパリン添加注射器にて行った。心臓採血後、ラットはペントバルビタール大量投与により安楽死させた。得られた末梢血はポリモルフォプレップに重層し、1580回転にて30分間遠心分離した。分離した好中球層を回収し、低張処理により赤血球を溶血した。溶血後、遠心分離し好中球を単離した。得られた好中球は純度98%以上であった。トリパンプルー染色による好中球viabilityは95%以上であった。

得られた好中球はボイデンチャンバー法によ

る好中球遊走能実験に用いた<sup>1)</sup>。

好中球遊走能は過去に報告されたごとく、上室に好中球浮遊液、正常ラット血清、PBS+、を注入した。下室に血清、サイモザン活性化補体C5、PBS、ラットケモカインであるGROを各種濃度で添加したものをを用いた。GROによるラット走化性の阻止実験として、抗ラットGRO/CINCポリクローナル抗体であるAnti N-terminal抗体とAnti C-terminal抗体をあらかじめGROと混合させ37℃1時間反応させたものについても検討した。フィルターはセルロース製フィルターを用いた。下室に試料を注入し、フィルターを装着した。上室に細胞浮遊液を注入し、37℃、30分間培養した。その後、フィルターを取り出し、固定液で10分間固定後、3回脱イオン水にて水洗いした。Meyer's Hematoxylin染色液で20分間染色後、蒸留水にて3回洗浄した。フィルターは乾燥後、スライドガラスに乗せ、キシレンにて透明化した。400倍の光学顕微鏡にて遊走した細胞数をカウントした。

### 統 計

統計処理はWilcoxon t検定を行い、5%水準以下を棄却水準とした。

### 結 果

コントロール群ラット末梢血好中球の遊走能はサイモザン活性化C5a添加にて有意に上昇

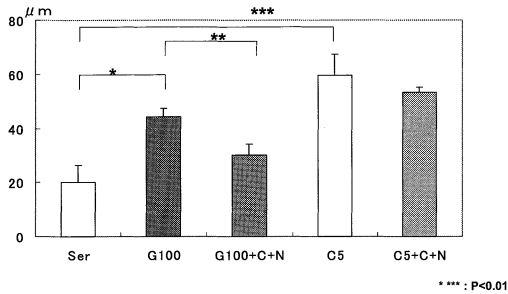


Fig. 3 Chemotactic activity of GRO with anti-rat GRO

した。また GRO 添加にて濃度依存的に遊走能は上昇した。GRO 50ng/ml, 100ng/ml 添加の遊走能は血清添加に比較して有意な上昇を認めた。(Fig. 1) エリスロマイシン溶液を上室, または下室に添加しても  $1 \mu\text{g/ml}$  から  $100 \mu\text{g/ml}$  の濃度では遊走能には影響を与えなかった。(Fig. 2) また, データーは示さないが生理食塩水を腹腔内に投与したラットの好中球遊走能はコントロール群ラット遊走能と差が認められなかった。

GRO による遊走能亢進が GRO 添加によることを確認するために, 抗ラット GRO/CINC ポリクローナル抗体をあらかじめ GRO とインキュベートし, 下室に添加し, 実験を行った。この結果, GRO 添加により認められていた遊走能の亢進は抑制されることが確認された。好中球遊走能のサイモザン活性化 C5a 添加による有意な上昇は, GRO 抗体添加によっても変化を受けなかった。(Fig. 3)

エリスロマイシンを7日間投与した群(以下7日群)と14日間投与した群(以下14日群)の好中球遊走能は, 血清添加のみの遊走能はコントロールラット群と差が認められなかった。7日群, 14日群とも C5a 添加の遊走能は血清添加のみに比較してそれぞれ有意な上昇を認めた。しかし, 7日群, 14日群の GRO 50ng/ml, 100ng/ml 添加による遊走能は有意な上昇を示さず, コントロール群に比較して抑制される傾

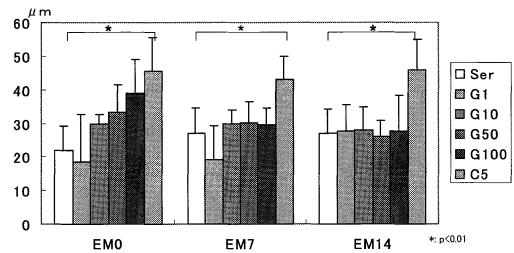


Fig. 4 Suppression of Chemotactic activity on EM treated Group

向にあった。(Fig. 4)

## 考 察

エリスロマイシン (EM) の少量長期投与が DPB に有効であると報告されてのち, 同様の有効性が慢性副鼻腔炎や滲出性中耳炎においても報告されている<sup>2,3)</sup>。EM は 14 員環のマクロライド抗生物質であるが, DPB や慢性副鼻腔炎や滲出性中耳炎に対する効果は抗生物質以外に抗炎症作用があると考えられている。我々は以前, ラット実験中耳炎において, EM や CAM が中耳に滲出する細胞を有意に抑制していることを報告した<sup>4)</sup>。抑制効果は好中球の抑制が中心であった。また, 我々は好中球の接着分子である Mac-1 の IL-8 による発現増強が EM 投与により抑制されていることを報告している。EM は好中球の機能に影響を与え, 炎症局所に浸潤するのを抑制していることが示唆された。

そこで今回我々は, 好中球の遊走能が EM や好中球活性化因子である GRO によってどのような影響を受けるか検討を行った。その結果, 好中球遊走能は GRO により濃度依的に上昇し, サイモザン活性化 C5a 添加によっても上昇することがわかった。また, GRO ポリクローナル抗体を添加することによって好中球遊走能の GRO による上昇は抑制された。この抑制効果はサイモザン活性化 C5a 添加による遊走能

上昇には影響を与えなかった。このことから好中球遊走能はGROの受容体とサイモザン活性化C5aの受容体は別あることが示唆された。

EMを添加しても好中球の遊走能には影響がなかった<sup>5)</sup>。また、EMを7日間投与した群や14日群の好中球遊走能はコントロールラットの遊走能と差が認められなかった。このことから、EMは直接的には好中球遊走能に影響しないと思われた。これに対し7日群と14日群の好中球遊走能はC5a添加による遊走能が上昇したのに対し、GRO添加による遊走能の上昇は抑制された。このことは以前報告したMac-1のIL-8による発現増強がEM投与により抑制されていたことと同様の結果である。すなわち、好中球はEMの7ないしは14日間投与によりCXCケモカインであるIL-8やGROに対する反応性が減弱していた。

好中球をあらかじめC5aにより前処置するとGROに対する反応は減弱することが報告されている<sup>6)</sup>。また、好中球のケモカイン受容体の一つであるCXCR2を介するIL-8刺激によりC5aに対する反応が抑制されていることも報告されている<sup>7)</sup>。好中球はIL-8やGROなどのケモカインからの刺激とそれ以外の白血球遊走因子C5aなどより受ける刺激を微妙に調節している可能性が示唆されている。EMは、好中球のサイトカインIL-8、GROなどの刺激に対する反応を弱めている可能性が今回の実験により示唆された。

### 参 考 文 献

- 1) Honda M, Hayashi H. Characterization of three macrophage chemotactic factors from PDD-Induced delayed hypersensitivity reaction sites in guinea pigs, with special reference to a chemotactic lymphokine. *Am J Pathol*: 102 171-183. 1982
- 2) Kadota J, Sakito H, Sawa H, Mukae H, Oda H. A mechanism of erythromycin treatment in-

- patient with diffuse panbronchitis. *Am Rev Respir Dis* 147: 153-159, 1993.
- 3) Iino Y, Sugita K, Tomiyama M, Kudo K. Erythromycin therapy for otitis media with effusion in sinobronchial syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 199:646-651, 1993.
- 4) 榎本冬樹, 市川銀一郎, 長岡 功, 山下辰久: 実験的滲出性中耳炎に対するエリスロマイシンの作用機序の検討. *日耳鼻* 99: 1126-1135, 1996
- 5) Sugita K, Nishimura T: Effect of Antimicrobial agents on chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes. *J. Chemotherapy*: 7 118-125. 1995.
- 6) Richardson RM, Ali H, Tomhave E Et al: Cross-desensitization of chemoattractant receptors occurs at multiple levels. Evidence for inhibition of phospholipase C activity. *J Biol chem*. 270: 27829-27833. 1995.
- 7) Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M: Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natol Acad Sci USA* 93: 6682-6686. 1995

連絡先：榎本 冬樹

〒143-0024

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 03-5689-0547