

# ラット好中球遊走能に対する GRO, マクロライド剤の影響

榎本 冬樹 金 隆澤 片岡 丈志  
山崎 陽子 横井 秀格 藤森 正登 芳川 洋  
順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

## Effects of Macrolides on Neutrophil Migration Potency in Rats

Fuyuki ENOMOTO, Ryutaku KIN, Takeshi KATAOKA, Yoko SAKAI,  
Hidenori YOKOI, Masato FUJIMORI and Hiroshi YOSHIKAWA

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Juntendo University

To assess the effects of erythromycin and GRO, a rat chemokine, on neutrophil migration, we investigated the potency of migration of rat neutrophils. The migration potency of peripheral-blood neutrophils was not affected by clarithromycin (CAM) and roxithromycin (RXM) added directly. When Minomycin was added, neutrophil migration was inhibited. Neutrophil migration potency was increased by the addition of GRO in a dose-dependent manner. GRO-increased neutrophil migration potency was inhibited by anti GRO antibody. Increased neutrophil migration by GRO was significantly inhibited by CAM and RXM given for 2 weeks.

Discussion: The above results suggest that macrolides given for 2 weeks may inhibit the increase in neutrophil migration due to GRO and may thus inhibit neutrophil migration to an inflammatory lesion.

### 目 的

我々は、エリスロマイシン投与により末梢血好中球の接着分子、Lセレクトリンと Mac-1 の発現が影響を受けることを報告した。この影響は好中球の炎症局所へ浸潤を抑制する方向に作用していた。今回我々はマクロライド（クラリスロマイシン（以下 CAM）、ロキシスロマイシン（RXM）が好中球機能にどのように影響するか検討する目的で、ラット好中球遊走能を検討した。さらにラット好中球の遊走能にケモカインである GRO ならびに遊走能を抑制す

ることが知られているミノマイシン（以下 MINO）がどのような影響を与えるか検討した。

### 対象と方法

対象は SD 系のオスラット（200g）をもちいた。MINO, CAM, RXM 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。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。トリパンブルー染色による好中球 viability は 95% 以上であった。

得られた好中球をポイデンチャンバー法による好中球遊走能実験に用いた。

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、正常ラット血清を注入した。下室に血清、サイモザン活性化補体 C5a、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°C 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°C、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。CAM 溶液を上室、または下室に添加し

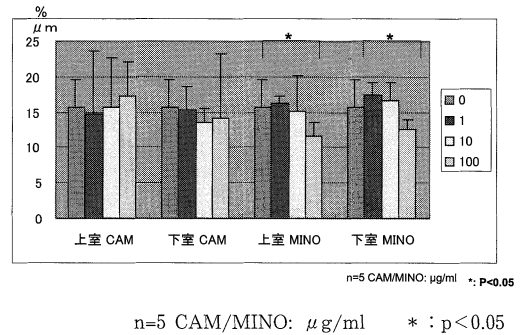


Fig. 1 Chemotactic activity of CAM/MINO added to the upper/lower chamber

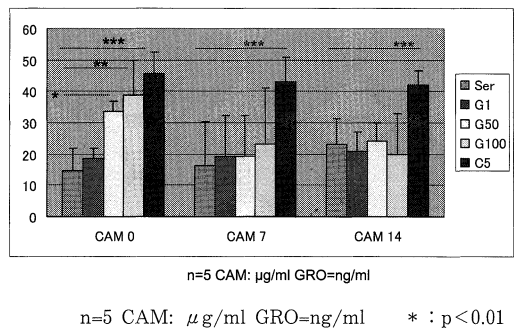


Fig. 2 Suppression of Chemotactic activity on CAM treated Group

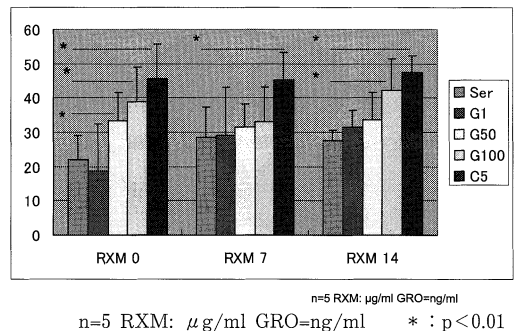


Fig. 3 Suppression of Chemotactic activity on RXM treated Group

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. 1) データ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。

CAM, RXM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向にあった。(Fig. 2, 3)

## 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>1)</sup>。CAM, RXMは14員環のマクロライド抗生物質である。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>2,3)</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<sup>4)</sup>。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により濃度依存的に上昇し、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。また、CAM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、CAM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（RXMは14日）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CAMの7日ないしは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。

## ま と め

1. 末梢血好中球の遊走能はGROにより濃度依存的に上昇した。
2. 末梢血好中球のGROによる遊走能上昇は抗GRO抗体により抑制された。
3. 末梢血好中球のGROによる遊走能上昇はCAMの7日、14日投与、RXMの14日投与により抑制された。

## 参 考 文 献

- 1) Enomoto F, Ichikawa G, Nagaoka I, Yamashita T, Evaluation of arachidonic acid metabolites in experimental rat otitis media with effusion. Nippon Jibiinkouka Gakai Zasshi (in Japanese). 98: 959-967. 1998.
- 2) 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
- 3) Enomoto F, Ichikawa G, Nagaoka I, Yamashita T: Effect of Erythromycin on Otitis Media with Effusion in Experimental Rat Model. Acta Otolaryngol. Sup 539: 57-60. 1998
- 4) Enomoto F, Andou I, Nagaoka I, Ichikawa G. Effect of new macrolides on the expression of adhesion molecules on neutrophils in chronic sinusitis, Auris Nasus Larynx 29:267-269.2002

---

### 質 疑 応 答

質問 鈴木秀明（東北大）

C5aの濃度を変化させて用量依存性をみた場合でも、好中球の遊走能に差はなかったか。

応答 榎本冬樹（順天堂大）

C5の濃度を変化しての実験は行っていない。

質問 鈴木賢二（藤田保衛大第2病院）

マクロライド投与が2週間以上にわたる長期刺激では好中球遊走能抑制に関していかなる影響を及ぼすと考えられているか。

応答 榎本冬樹（順天堂大）

2週間以上の検討は行っていない。

連絡先：榎本 冬樹

〒113-8421

東京都文京区本郷 2-1-1

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

TEL 03-3813-3111

E-mail fenomoto@med.juntendo.ac.jp