

ケトライド系抗菌薬テリスロマイシンの T細胞サイトカイン産生に及ぼす効果

許 芳 行¹⁾ 渡 邊 莊¹⁾ 金 井 憲 一¹⁾

浅 野 和 仁²⁾ 洲 崎 春 海¹⁾

1) 昭和大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 同 第一生理学教室

Influence of Telithromycin on Cytokine Production from Human Peripheral Blood CD4+ T Cells *in vitro*

Yoshiyuki KYO¹⁾, So WATANABE¹⁾, Ken-ichi KANAI¹⁾, Kazuhito ASANO²⁾
and Harumi SUZAKI¹⁾

1) Department of Otorhinolaryngology, Showa University School of Medicine

2) Department of Physiology, Showa University School of Medicine

ABSTRACT

Objective

The present study was undertaken to examine the influence of telithromycin (TEL), roxithromycin (RXM) and azithromycin (AZM) on the production of T-cell cytokines from human peripheral blood CD4+ T cells under stimulation with co-stimulatory molecules.

Materials and Methods

CD4+ T cells from healthy donors were cultured in the presence of various concentrations of TEL, RXM and AZM on OKT-3 and anti-CD28 monoclonal antibody-coated wells. T cell proliferation, along with the concentrations of interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , IL-4 and IL-5 were measured.

Results

TEL, RXM and AZM did not affect T-cell proliferation by co-stimulatory stimulation as assessed by ³H-thymidine incorporation. TEL did not inhibit the production of IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-5 even when 2.0 μ g/ml, twice a therapeutic blood level, of TEL was added to cell cultures. On the other hand, although RXM did not inhibit the production of IL-2 and IFN- γ , the ability of cells produce IL-4 and IL-5 was suppressed in dose-dependent manner, when the agent was added to cell cultures at more than 5.0 μ g/ml. And AZM inhibited the production of IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-5 in dose-dependent manner.

Conclusion

These results suggest that TEL may not modulate the clinical condition of chronic inflammatory airway disease.

はじめに

エリスロマイシンをはじめとする14員環マクロライド系抗菌薬の少量長期投与（マクロライド療法）によりびまん性汎細気管支炎や慢性副鼻腔炎等の慢性炎症性気道疾患の治療成績が飛躍的に向上したことは周知の事実である¹⁾。これまでに、本マクロライド療法の治療機序については細菌学的あるいは免疫学的面からいくつかの検討が行われ、その結果、本療法は薬剤の抗菌作用ではなく免疫応答発現調節作用によっている可能性のあることが示唆されている¹⁻³⁾。

近年、耐性誘導の原因構造とされている14員環ラクトン8位のクラディノース糖鎖をケトン基に置換したケトライド系抗菌薬、テリスロマイシン（TEL）が開発され、優れた抗菌活性を有する薬剤として各種感染症の治療に使用されている⁴⁻⁶⁾。TELの抗菌活性以外の薬理作用については、本薬剤が炎症性サイトカイン刺激による好中球からの活性酸素の放出を抑制することが報告されているもの⁷⁾、免疫応答の発現に及ぼすTELの効果については全く検討されていない。そこで今回、健康成人から採取した末梢血T細胞を用いて同細胞からのサイトカイン産生に及ぼすTELの効果をもロキシスロマイシン（RXM）及びアジスロマイシン（AZM）のそれと比較検討したので報告する。

材料と方法

薬剤

本実験で使用した薬剤はAventis Pharm株式会社から供与されたRXM原末、Pfizer株式会社より供与されたAZM原末とヒト経口投与用製剤から抽出したTELである。TEL、RXM、AZMをエタノール（20mg/ml）に溶解後、10%の牛胎児血清をRPMI-1640培地で希釈、濾過滅菌し、実験に使用した。TELはInaro et al. (2000)⁸⁾ならびにTerao et al. (2003)⁹⁾の方法に準じて市販の製剤から抽出した。300mgのTELを含む薬剤を5.0mlのエタ

ノールの懸濁、超音波破碎機で5分間（4℃）破碎した。上清を採取後、RXM、AZMと同様に培地で希釈、濾過滅菌後実験に使用した。

モノクローナル抗体とその固相化

本実験ではヒトT細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体であるOKT-3とAnti-CD28抗体を使用した。PBSで20.0 μ g/mlに希釈したこれらの抗体100 μ lを96穴の細胞培養用プレートに分注、冷蔵庫内で一昼夜静置することによってプレート表面に抗体を付着させた。

ヒトCD4陽性T細胞の採取と細胞培養

健康成人から採取した末梢血から比重遠心法により単核細胞を採取した。次に、単核細胞とCD4モノクローナル抗体を標識した磁気ビーズを混合、マグネチックセルソーターを用いてCD4陽性T細胞を分離した。この細胞、1 \times 10⁴個（100 μ l）を各種濃度に調整した薬剤の存在下、固相化した抗体とともに培養、24時間後に培養上清を採取した。尚、血液の採取にあたっては昭和大学倫理委員会に申請、受理された内容を被験者に口頭ならびに文書で説明、理解が得られ、書面にて承諾していただいたヒトのみから血液を採取した。

CD4陽性T細胞の活性化の測定

上記方法によって細胞を72時間培養した。培養終了8時間前に1.0 μ Ci（10 μ l）の³H-thymidineを添加、型通りに細胞を採取し、liquid scintillation counterを用いてthymidineの取り込みを測定することによって細胞の活性化を調べた。

サイトカインの測定

細胞培養上清中のサイトカイン濃度を市販のヒトサイトカイン測定用ELISAキットを用いて測定した。対象としたサイトカインはIL-2、4、5そしてIFN- γ とした。

統計学的有意差の検討

本実験では6人の被験者から採取した血液からCD4陽性T細胞を分離した。これらの細胞を三重に培養し、得られた値から平均と標準誤差を計算、結果として表示した。統計学的有意差検定をANOVAとFisher's PLSD testを用いて行い、危険率(P)0.05以下を統計学的に有意と判定した。

結 果

T細胞の活性化に及ぼす薬剤の効果

CD4陽性T細胞の活性化に及ぼすTEL, RXM, AZMの効果を検討した。Fig. 1に示したように細胞培養系に血中濃度の2倍に相当する2.0 $\mu\text{g/ml}$ のTELを添加してもthymidineの細胞内への取り込みには何ら影響を及ぼさなかった。また、RXM, AZMも細胞へのthymidine取り込みに著明な変化をもたらさなかった。(Fig. 2, Fig. 3)

T細胞のサイトカイン産生に及ぼす薬剤の効果
TEL, RXM, AZMのT細胞サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。まず、IFN- γ 産生に及ぼす影響を観察したところ、Fig. 4に示したようにAZMは1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でIFN- γ の産生を有意に抑制したものの、ヒト血中濃度に相当する7.5 $\mu\text{g/ml}$ のRXMならびに2.0 $\mu\text{g/ml}$ のTELを培地に添加してもその産生は顕著な影響を受けなかった。次に、IL-2産生に及ぼす薬剤の効果を検討したところ、この場合もIFN- γ と同様にAZMは0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でIL-2の産生を有意に抑制したが、RXMとTELはIL-2の産生を抑制しなかった(Fig. 5)。CD4陽性T細胞からのIL-4産生は培養系へのRXMの添加によって抑制され、その最小抑制濃度はそれぞれ5.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。AZMもIL-4の産生を0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で有意に抑制した。しかし、TELは培養系への添加濃度が2.0 $\mu\text{g/ml}$ であってもIL-4産生

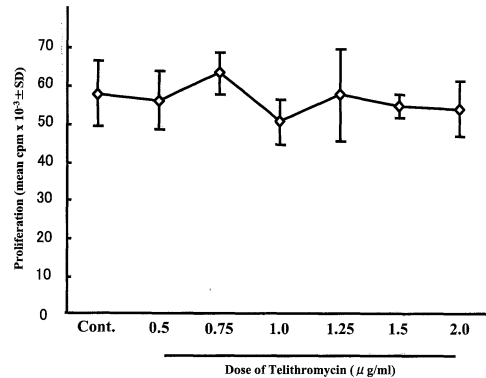


Fig. 1 CD4 陽性 T 細胞の活性化に及ぼす TEL の効果

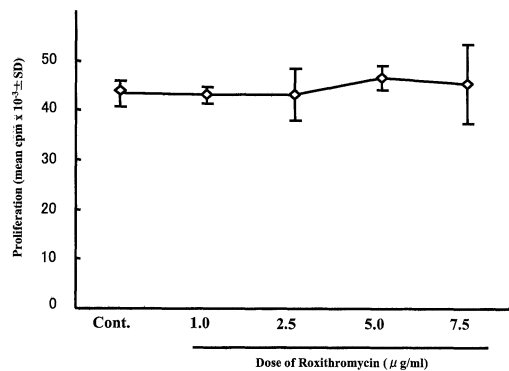


Fig. 2 CD4 陽性 T 細胞の活性化に及ぼす RXM の効果

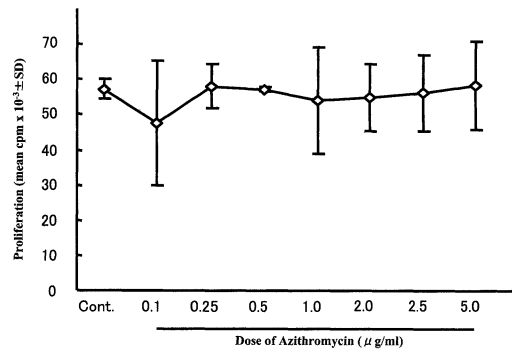


Fig. 3 CD4 陽性 T 細胞の活性化に及ぼす AZM の効果

を全く抑制しなかった(Fig. 6)。また、これと同様にRXMは7.5 $\mu\text{g/ml}$ 、またAZMは0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でIL-5の産生を有意に抑制したものの、TELはIL-5の産生に著明な影響を及ぼさなかった(Fig. 7)。

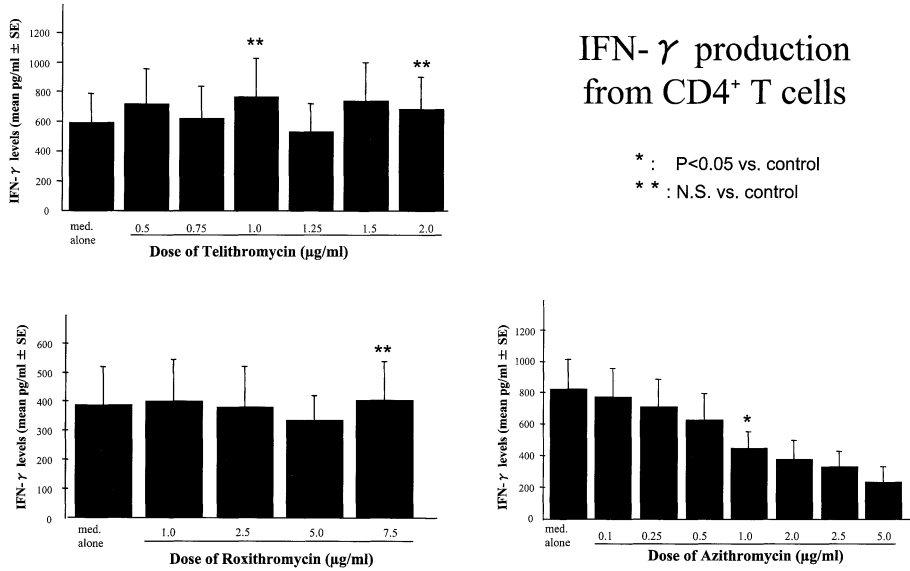


Fig. 4 IFN- γ production from CD4⁺ T cells

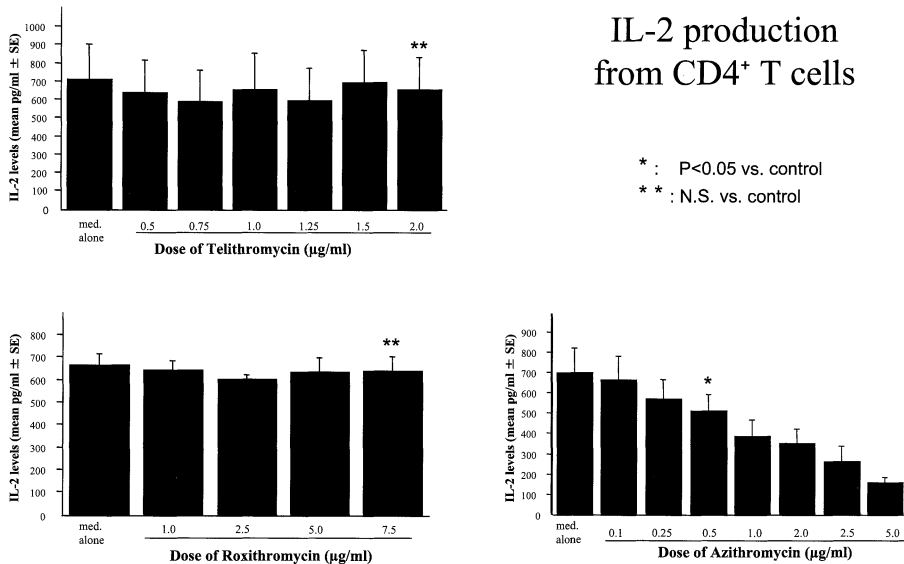


Fig. 5 IL-2 production from CD4⁺ T cells

考 察

エリスロマイシンをはじめとしてクラリスロマイシン, RXM の 14 員環マクロライド系抗菌薬の少量長期投与療法が各種治療に抵抗を示す上・下気道の炎症性疾患の治療に使用され良好な結果が報告されているものの, その治療機序に関しては不明な点が多い¹⁻³⁾. 免疫性疾患の発症や増悪化には CD4 陽性ヘルパー T 細胞

が重要な役割を果たしていることは周知の事実である. 近年, このヘルパー T 細胞は産生するサイトカインの種類の違いにより細胞性免疫の発現に寄与している Th1 と液性免疫を誘導する Th2 の二種類に分類され, 生体内では互いにバランスをとりながら免疫応答の発現を調節しているとされている^{9,10)}. T 細胞の活性化には T 細胞レセプター (TCR) を介した刺激

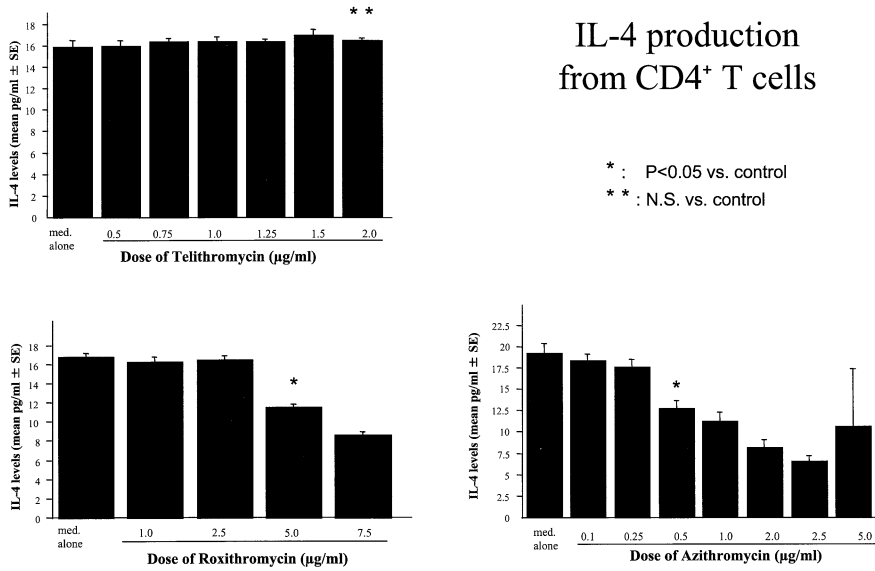


Fig. 6 IL-4 production from CD4⁺ T cells

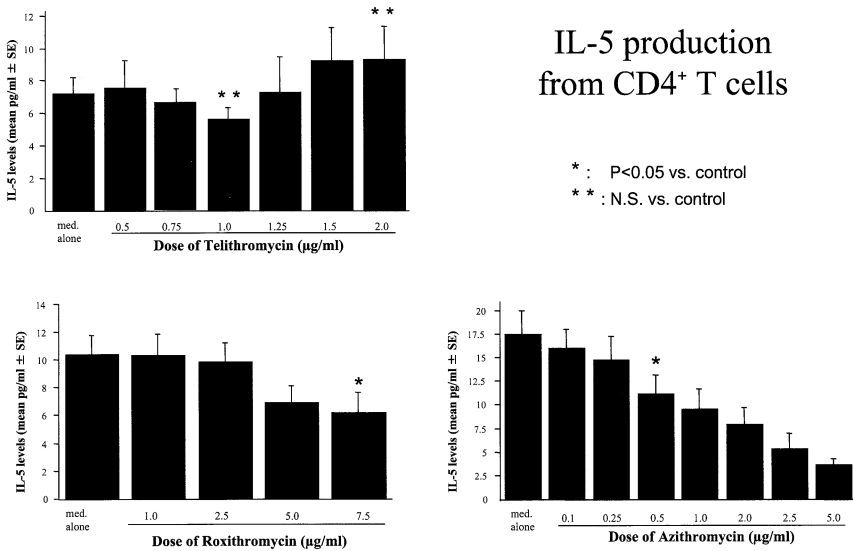


Fig. 7 IL-5 production from CD4⁺ T cells

伝達以外に副刺激分子の結合による第二の刺激が必須であるとされている¹¹⁾。そこで今回、TCR と副刺激分子に対する抗体によってこれらを同時に刺激した細胞を用いて 14 員環マクロライド系抗菌薬の RXM, 15 員環マクロライド系抗菌薬の AZM および既存のマクロライド系抗菌薬よりも強い抗菌活性を有するのみならず、マクロライド耐性菌に対しても強い抗菌

活性を示すことが報告されているケトライド系抗菌薬の TEL の T 細胞サイトカイン産生に及ぼす効果を検討した。まず、Th1 T 細胞のサイトカイン (IL-2, IFN- γ) 産生に及ぼす効果を検討したところ、RXM はその産生に何ら影響を及ぼさなかった。一方、近年優れた抗菌作用を有するケトライド系抗菌薬として開発された TEL³⁻⁶⁾ も CD4 陽性 T 細胞の Th1 サイトカ

イン産生に見るべき影響を及ぼさなかった。AZMはその血中濃度にほぼ等しい濃度(1.0-2.0 $\mu\text{g/ml}$)でサイトカイン産生を有意に抑制した。次に、CD4陽性T細胞からのTh2サイトカイン産生に及ぼすこれら薬剤の効果を検討したところ、RXMはその血中濃度とほぼ等しい濃度(5.0-7.5 $\mu\text{g/ml}$)¹²⁾でサイトカイン産生を抑制し、またAZMも0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でサイトカイン産生を抑制した。しかし、TELはその添加量がヒト血中濃度の二倍に相当する2.0 $\mu\text{g/ml}$ ¹³⁾であってもサイトカイン産生を全く抑制しなかった。IL-4はB細胞に作用して同細胞からのIgE産生を増強するのみならず、肥満細胞やマクロファージの機能を調節することが報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。また、生体の炎症応答の発現には末梢血からの炎症局所への多核白血球特に好中球や好酸球の浸潤が必須で、そのためには血管内細胞やこれら細胞表面での接着因子の発現が増強されることのみならずIL-8やRANTES等の各種細胞遊走因子の産生も必要であることも知られている。IL-4は上述したIgE産生調節作用のみならず血管内皮細胞に作用し、接着分子の発現や遊走因子の産生を増強するとされている¹⁷⁾。IL-5は好酸球の前駆細胞からの分化を促進するとともに同細胞の活性化を誘導することが知られている¹⁸⁾。そこでこれらの報告と本実験の結果を併せ考察すると、DPBならびに慢性副鼻腔炎患者にRXMを長期間にわたって投与するとこれら薬剤の作用によって抗原刺激あるいは炎症性刺激によるCD4陽性T細胞のIL-4、IL-5産生能が低下し、その結果炎症性免疫応答の発現が抑制され、このことが上記疾患の治療と密接に関連していることが推察される。

Th1 T細胞から産生されるIFN- γ はTh2 T細胞の分化・増殖を抑制するとともにIL-4刺激によるB細胞からのIgE産生を抑制することが報告されている^{19, 20)}。また、IFN- γ はヒトマクロファージやヒト急性単球性白血病細胞株

THP-1のマクロライド薬の細胞内取り込みならびにその蓄積を増強させることも示されている^{7, 21)}。生体に投与されたマクロライド薬はマクロファージ、好中球等の白血球や組織内に多量に移行し、蓄積することそしてこの薬剤の移行・蓄積がマクロライド療法的作用機序と関連している可能性が指摘されていることからRXMのIFN- γ 産生非抑制作用は本薬剤の抗炎症作用の一因となっている可能性も示唆される。また、本実験の結果はTELがIL-4、-5の産生抑制作用を全く有しないことを明示していることから、本薬剤は従来から行われているエリスロマイシン、クラリスロマイシンさらにはRXMを用いたマクロライド少量長期療法と同様な用法には適さない薬剤である可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Keicho N, Kudoh S. Diffuse Panbronchiolitis- Role of macrolides in therapy. *Am J Respir Med* 2002; 1: 119-131.
- 2) Nagai H, Shishido H, Yoneda R, Yamaguchi E, Tamura A, Kurashima A. Long-term, low-dose administration of erythromycin to patients with diffuse panbronchiolitis. *Respiration* 1991; 58: 145-149.
- 3) Terao H, Asano K, Kanai K, Kyo Y, Watanabe S, Hisamitsu T, Suzaki H. Suppressiveness of macrolide antibiotics on nitric oxide production by lipopolysaccharide stimulation in mice. *Med Inflamm* 2003; 12: 195-202.
- 4) Bryskier A. Ketolides-telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 661-669.
- 5) 井上松久, 賀来満夫, 西野武志, 平瀉洋一, 河野茂: 新規ケトライド系抗菌薬の細胞学的検討. *日本化学療法学会誌* 2003; 51: 278-288.
- 6) 馬場駿吉, 市川銀一郎, 夜陣紘治: Telithromycinの耳鼻咽喉科領域における組織移行性ならび

- に副鼻腔炎に対する臨床的検討. 日本化学療法学会誌 2003; 51 (S-1): 279-292.
- 7) Vazifeh D, Bryskier A, Labro MT. Effect of proinflammatory cytokines on the interplay between roxithromycin, HM 3647, or HMR 3004 and human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 44: 511-521.
- 8) Inaro A, Ialenti A, Maffia P. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 156-163.
- 9) Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12: 256-7.
- 10) Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
- 11) Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 304-311.
- 12) Noma T, Aoki K, Hayashi M, Yoshizawa I, Kawano Y. Effect of roxithromycin on T lymphocyte proliferation and cytokine production elicited by mite antigen. *Int Immunopharm* 2001; 1:201-210.
- 13) 保田国伸, 石原浪砂, 鈴木比紅江, 三橋晴美: Telithromycin の第 I 相臨床試験 単回及び反復経口投与. 日本化学療法学会誌 2003; 51 (S-1): 210-223.
- 14) Dokter WH, Esselink MT, Halie MR, Vellenga E. Interleukin-4 inhibits the lipopolysaccharide-induced expression of c-jun and c-fos messenger RNA and activator protein-1 binding activity in human monocytes. *Blood* 1993; 81: 337-343.
- 15) Sanderson CJ, Warren DJ, Strath M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro: its relationship to interleukin-3 and functional properties of eosinophil produced in cultures. *J Exp Med* 1985; 162: 60-74.
- 16) Worm M, Henz BM. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J Mol Med* 1997; 75: 440-7.
- 17) Gundel R, Lindell D, Harris P, Fouenel M, Jesmok G, Gerritsen ME. IL-4 induced leukocyte trafficking cynomolgus monkeys: correlation with expression of adhesion molecule and chemokine generation. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 719-29.
- 18) Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13: 501-6.
- 19) Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Guidizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993; 150: 353-60.
- 20) Frew AJ. Cytokines, chemokines, T cells and allergy. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 2-4.
- 21) Bermudez LE, Inderlied C, Young LS. Stimulation with cytokines enhances penetration of azithromycin into human macrophages. *Antimicrob Agent Chemother* 1991; 35: 262-9.

質 疑 応 答

質問 館田一博 (東邦大)

テリスロマイシンの臨床的有効性 (菌側への

作用) に関してもう少し検討する必要があるのでは?

応答 許芳行（昭和大）

テリスロマイシンに14員環マクロライド系抗菌薬と同様の作用が明らかになっていない現在，更なる耐性菌の増加を防ぐ意味でも使用法には十分注意すべきと考えます。

質問 榎本冬樹（順天堂大）

ケトライドにはサイトカイン産生抑制がない理由はどこにあるか？

応答 許芳行（昭和大）

構造上の違いが異なる作用の原因として考えられるが，詳細については不明です。

連絡先：許 芳行

〒142-8666

東京都品川区旗の台1丁目5-8

昭和大学医学部耳鼻咽喉科学教室

TEL 03-3784-8563 FAX 03-3784-0981