マクロライド系抗生剤のヒト副鼻腔粘膜線毛運動に及ぼす影響

田代 亨・竹野 幸夫・上田 直之
工田 昌矢・平川 勝洋・夜陣 紘治

Stimulatory Effect of Macrolides on Mucociliary Activity in Cultured Human Sinus Ciliated Cells

Toru Tashiro, Sachio Takeno, Naoyuki Ueda,
Masaya Takumida, Katsuhiro Hirakawa and Koji Yajin

(Hiroshima University School of Medicine)

A number of recent reports have demonstrated that long-term low-dose macrolide therapy is effective on in the treatment of chronic sinusitis as well as diffuse panbronchiolitis. In this study, we focused on the in vitro effects of macrolides on the ciliary beat frequency (CBF) of cultured human sinus epithelial cells. Sinus mucosal explants were successfully cultured on poly-L-lysine coated dishes with abundant outgrowth ciliated cells. CBF measurements were carried out by a photoelectric method at specific predetermined sites on the 7 to 14 day cultured specimens. Both erythromycin (EM) and roxithromycin (RXM) had no significant effects on CBF at a relatively high concentrations (10^{-4} M). However, EM and RXM, at a concentration of 10^{-5} M, significantly increased CBF by 20% and 19% respectively four hours after administration. The cilio-stimulatory effects continued to the same degree for 24 hours. We further subdivided the ciliated cells into two groups on the basis of their mucociliary activity, predetermined before drug administration. The faster group included cells with a CBF of more than 630 beat/min and the slower group included those with a CBF of less than 630 beat/min. Interestingly, both EM and RXM at concentrations of 10^{-4} M and 10^{-5} M showed no effect in the faster group. On the other hand, these drugs significantly increased the CBF of the ciliated cells in the slower group at both concentrations tested by a maximum of 34% with EM and 55% with RXM. These results suggest that macrolide antibiotics augment the ciliary clearance of human paranasal sinuses, and that this effect might be more pronounced when the epithelial ciliated cells are in somewhat disturbed conditions.

Key words : macrolide antibiotics, paranasal sinus, ciliary beat frequency, outgrowth culture, photoelectric method

はじめに

現在の抗生物質の開発と進歩には、めざましいものがある。1952年に、McGuire らによって発見されたエリスロマイシンが、ペニシリンが無効である細菌感染症に対する抗生物質として登場してから、既に40年の歳月を経た。このエリスロマイシンを代表とする14員環マクロ

ライド系抗生剤は、難治性の肺疾患であるびまん性汎細気管支炎 (DPB) に対する有効性が工藤らにより報告されて以来¹⁾、同じ上気道感染症である慢性副鼻腔炎にも同療法が応用されて広く現在に至っている²⁾³⁾。その有効機序としては、抗菌作用の他に、炎症性サイトカイン産生の制御と浸潤するリンパ球への作用、鼻汁の過分泌

に対する抑制効果、線毛運動の賦活化作用など、さまざまな作用が提唱されている^{4)~6)}。この中でも線毛運動の賦活化作用は、副鼻腔粘膜を含む上気道粘膜上皮におけるバリアーを構成する因子として非常に重要であると言える。今回我々はこの作用に着目し、本機序の解明を目的として培養副鼻腔粘膜上皮を用いて実験を行った。すなわち14日環マクロライド系抗生剤であるエリスロマイシン (EM) ならびにロキシスロマイシン (RXM) を、初代培養線毛細胞に作用させ、その単一線毛細胞における線毛打頻度 (CBF) の変化を経時的に観察した。同時に薬物添加前の CBF の値により、線毛細胞を“早い”群と“遅い”群に二分し、それぞれの群において CBF の変化がどのようなものであるかを比較検討した。

実験方法

慢性副鼻腔炎手術時に採取した、ヒト上顎洞または篩骨洞粘膜 7 例を用いた。採取した粘膜は生理食塩水で付着した血液を洗い、phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄した後、約 5 mm 四方にトリミングした。これを移植片 (explant) として、上皮側が上向きになるように poly-L-lisine コーティングしたプラスチックシャーレ上で初代培養を行った。培地組成は 300 mOsm に浸透圧を調整した D-MEM (GIBCO BRL, 東京) に 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO) と抗生物質を添加したものをを用いた。また細胞接着の促進のため培養支持器材には poly-L-lysine をコーティングしたシャーレ (セルタイト C-I, PL, スミロン, 東京) を用いた。95% air, 5% CO₂ 条件下で培養を行い、explant 周囲に派生した outgrowth 上皮が観察される 5~7 日のものを実験対象とした。Outgrowth 細胞における上皮の同定は、試料の一部を 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、上皮のマーカーであるサイトケラチンに対する免疫染色を施行することにより行った。

outgrowth sheet 上に存在している線毛細胞の CBF の測定は NIKON photometry system P100 を用いて行い、20 倍の対物レンズを用い位相差顕微鏡下にて、同一の単一細胞における薬剤負荷前後の CBF 変化を継時的に計測した (図 1)。温度設定は 37°C の恒温条件下とした。薬剤刺激としてはエリスロマイシン並びにロキシスロマイシン (Sigma) を 10⁻⁴ M と 10⁻⁵ M の最終濃度になるように培地に添加し、添加直前、1 時間後、4 時間後、24 時間後の単一線毛細胞の CBF を測定した。コン

トロールとしては同量の PBS を添加したものをを用いた。また今回の検討では、線毛細胞群を処置前の CBF が 630 beat/min 未満の遅い線毛細胞群と、CBF が 630 beat/min 以上の早い線毛細胞群の 2 群に分類し、それぞれの群においてマクロライド薬剤がどのように影響するか比較検討した。また予備実験として outgrowth 上の線毛細胞の部位による CBF の相違、すなわち explant 周囲から離れるに従って CBF 平均がどのように変化しているかの検討も行った。

結 果

図 1 (a) は代表的な outgrowth sheet 上の培養細胞のサイトケラチンに対する蛍光免疫染色画像、図 1 (b) は outgrowth 上の線毛細胞の各部位における CBF の相違を示したものである。培養細胞は敷石状配列を呈し、そのほとんどがサイトケラチンに対して陽性所見を示した。また予備実験として検討した、コントロール群における outgrowth 部位における線毛細胞の CBF の変化に関しては、explant 周囲の領域に比較して outgrowth 中央部と辺縁部では、有意に CBF の低下が観察された。今回は explant 周囲の線毛細胞を対象とし、薬剤刺激後の変化を検討した。

次に線毛細胞の CBF の薬剤刺激前後における経時的变化について検討した。図 2 にはコントロール群における CBF の継時的变化を示している。本群において CBF は 24 時間後まで平均 610~682 beat/min とほぼ安定しており、統計的に有意差を認めなかった。図 3 と図 4 には、EM (10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M) および RXM (10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M) にて薬剤刺激を行った後の CBF の経時的变化を示している。なお縦軸は、薬剤刺激直前を 100% とした相対的变化率で表している。EM, RXM とともに 10⁻⁴ M の濃度では 24 時間後に至るまで、CBF 変化率に有意差を認めなかった。しかしながら 10⁻⁵ M の濃度では、EM, RXM とともに 4 時間後より約 20% の割合で有意の CBF の上昇を認め 24 時間後においてもこの作用は持続していた。

今回の実験では、刺激前の線毛細胞における線毛運動活性の状態により、マクロライドの影響がどのように異なるかについての検討も行った。すなわち、刺激前の CBF が 630 beat/min 未満の“遅い”線毛細胞群と、630 beat/min 以上の“早い”線毛細胞群の 2 群にあらかじめ分類し、EM および RXM による賦活作用の違いを比

a

b

図1 a) 培養篩骨洞粘膜 outgrowth 上皮におけるサイトケラチン免疫染色像(培養7日目, 共焦点レーザー顕微鏡写真).
b) outgrowth 上の単一線毛細胞の培養部位における CBF の変化(培養5日目, 無処置状態).

較した. 図5には(a) EM 10^{-4} M, (b) EM 10^{-5} M による CBF の変化率を示している. この中で早い線毛細胞群は, 24時間後に至るまで CBF に有意な変化を認めなかった. しかしながら遅い線毛細胞群は EM 10^{-4} M では24時間後で, EM 10^{-5} M では4時間後より線毛活性の上昇が認められており, 図3で示した全体の CBF の賦活作用は主として遅い線毛細胞に対する作用であることが推察された. 図6には同様に (a) RXM 10^{-4} M, (b)

図2 コントロール群における CBF の経時的変化.

RXM 10^{-5} M による CBF の変化率を示している. EM と同様に早い線毛細胞群は, 24時間後に至るまで CBF に有意な変化を認めなかった. しかしながら遅い線毛細胞群は RXM 10^{-4} M, 10^{-5} M ともに4時間後より線毛活性の上昇が認められており, 24時間後もその作用の持続が認められた.

考 察

マクロライド系抗生剤と CBF に関する過去の報告では, 1991年に玉置らが家兎培養気管上皮において, RXM は用量依存的に CBF の増加を認め, 特に $10^{-4.5}$ M の投与により, 最大34.6%の増加を認めたと報告している. その際, 気道上皮細胞内の cAMP 濃度の上昇を伴っており, これらの作用はシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメサシンで抑制されたと述べている⁵⁾. また, 1995年に森らは正常ヒト篩骨洞粘膜より採取した線毛細胞において, 10^{-5} M の EM で最大27.5%, RXM は最大21.2%の CBF の増加作用を認めている. またこの賦活作用は薬剤刺激後1~2時間後に最大となり, 高濃度よりむしろ低濃度のマクロライドで亢進作用は著明であったと報告している⁷⁾. 一方, 慢性副鼻腔炎による粘液線毛輸送系の障害について, 1991年 Ohashi らは採取し

図3 a) EM 10^{-4} M と b) EM 10^{-5} M による CBF の変化。

図4 a) RXM 10^{-4} M と b) RXM 10^{-5} M による CBF の変化。

た粘膜の走査電顕による観察と CBF の測定により評価を行っている⁸⁾。それによると CBF が 400 beat/min 未満の症例では、形態学的にも上皮細胞の高度脱落や構築の変化が生じており、保存的治療による可逆性は期待できず手術適応と考えられるが、CBF が 400 beat/min 以上の場合は上皮細胞の形態学的な変化は少なく、マクロライドなどの薬物療法によっても、病態が改善される可

能性があると述べている。

今回の我々の検討では、慢性副鼻腔炎時の副鼻腔粘膜においても、先に述べた玉置、森らの報告と同様にマクロライドによる CBF の亢進作用があり、この亢進作用は、EM、RXM とともに 10^{-4} M よりむしろ 10^{-5} M で顕著であった。この 10^{-5} M という濃度は、実際の臨床における薬剤の組織移行性とほぼ矛盾しないものと考えら

図5 遅い線毛細胞群と早い線毛細胞群のそれぞれに対する a) EM 10^{-4} M と b) EM 10^{-5} M の効果.

れる⁹⁾. さらに Ohashi らの報告も含めて考察すると、個々の線毛細胞において、CBF が少なくとも 630 beat/min に達しないものであっても、病態の障害は可逆的であり、マクロライドによる線毛運動の賦活作用が期待できることを示しているものと思われる。

またこれらの亢進作用は、薬剤刺激後 4 時間以降に認められた。効果発現までに長時間を要したのは、線毛上皮の外層粘液における網状構造が、投与された薬物と短時間に混和することなく長時間をかけて徐々に混和し、その網状構造内に溶媒を取り込むという性質も関与して

(a) RXM 10^{-4} M群 (b) RXM 10^{-5} M群

図6 遅い線毛細胞群と早い線毛細胞群のそれぞれに対する a) RXM 10^{-4} M と b) RXM 10^{-5} M の効果。

いると考えられる。またこの気道表面液のゾル層の調節には、気道上皮細胞の管腔側に存在するクロライドチャンネルが深く関与していると言われている。興味深いことに、マクロライドはクロライドチャンネルを直接的に抑制するとされており、これにより気道過分泌の制御に働く

作用も有している¹⁰⁾。また、この CBF の亢進作用は、処置前の CBF が遅い線毛細胞群に限られており、CBF の早い線毛細胞群には有意差が認められなかった。この理由に関しては現在の所ははっきりしていないが、マクロライド剤の慢性副鼻腔炎に対する有効機序の本質に関わ

るものと思われるため、今後更に検討していきたいと考えている。

結 語

エリスロマイシン (EM) 並びにロキシスロマイシン (RXM) を 10^{-4} M, 10^{-5} M の濃度にて、副鼻腔炎患者より採取した培養ヒト上顎洞または篩骨洞粘膜の線毛細胞に作用させ、線毛打頻度 (CBF) の経時的变化を、薬剤刺激直前を100%とした経時的变化率の形で検討し、以下の結果を得た。

1) EM, RXM とともに 10^{-4} M では CBF の変化率では有意差を認めなかったが、EM, RXM 10^{-5} M では薬剤添加後、4 時間後と24時間後で有意な CBF の上昇を認めた。

2) さらに全線毛細胞を、CBF が 630 beat/min 未満の遅い線毛細胞群と、630 beat/min 以上の早い線毛細胞群の2群に分類し、マクロライドの影響を検討したところ、早い線毛細胞群ではすべての濃度において CBF の変化を認めなかった。一方、遅い線毛細胞群では EM 10^{-4} M で24時間後に EM 10^{-5} M で4時間後より CBF の上昇が観察された。また RXM では 10^{-4} M, 10^{-5} M とともに4時間後より CBF の上昇が認められ、1) で観察された変化は主として遅い線毛細胞群に対する作用によるものであることが、明らかとなった。

参考文献

- 1) 工藤翔二, 木村 仁, 植竹健二, 他: びまん性汎細気管支炎にたいするマクロライド系抗生剤の少量長期投与の臨床。

日胸疾会誌 増22: 252, 1984.

- 2) 菊地 茂, 洲崎春海, 青木彰彦, 他: 副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与. 耳鼻臨床 84: 41~47, 1991.
- 3) 高北晋一, 北村薄之, 大八木章博, 他: 慢性副鼻腔炎と少量エリスロマイシン療法. 耳鼻臨床 84: 489~498, 1991.
- 4) 三輪正人, 岩田重信, 高須昭彦, 他: 培養気道上皮細胞管腔側のクロライドチャンネル活性に対するロキシスロマイシンの抑制効果. 耳展 39 補1: 23~27, 1996.
- 5) 玉置 淳, 武山 廉, 千代谷厚, 他: 気道粘膜上皮の線毛運動に対するロキシスロマイシンの効果とその作用機序に関する検討. 呼吸と循環 39: 481~485, 1991.
- 6) Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, et al: Inhibitory effect of macrolides on interleukin-8 secretion from cultured human nasal epithelial cells. Laryngoscope 107: 1661~1666, 1997.
- 7) 森 繁人, 斎藤 等, 木村有一, 他: マクロライド系抗生剤の鼻粘膜線毛運動に及ぼす影響. 耳展 38 補3: 220~227, 1995.
- 8) Ohashi Y and Nakai T: Functional and morphological studies on chronic sinusitis mucous membrane (2); functional and morphological pathology of chronic sinusitis mucous membrane. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 397: 11~48, 1983.
- 9) 石戸谷淳一, 増田哲也, 中井淳仁, 他: RXM の少量長期療法と鼻粘膜への組織移行. 耳鼻臨床 88: 535~542, 1995.
- 10) 高崎賢治, 吉見龍一郎, 高村博光, 他: 鼻茸組織内の浸潤細胞と RXM の影響. 耳鼻臨床 87: 1643~1649, 1994.

(別刷請求先: 田代 亨
〒734-8551 広島市南区霞1-2-3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)