

# 慢性下気道感染症に対する Erythromycin 長期投与療法の 作用機序に関する研究

## 第1報 ヒト好中球機能などに及ぼす作用

奈良県立医科大学細菌学教室

柳 生 善 彦

### ANALYSIS OF THE LONG-TERM TREATMENT WITH ERYTHROMICIN IN CHRONIC LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS I. EFFECTS ON HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE FUNCTIONS

YOSHIHIKO YAGYU

*Department of Bacteriology, Nara Medical University*

Received September 29, 1989

*Summary:* The present study was carried out to analyze functions of polymorphonuclear leukocyte (PMN) in the peripheral blood of patients with chronic infections in the lower respiratory tract after long-term treatment with erythromycin (EM).

The number of total leukocytes was significantly higher in patients than in healthy controls before treatment, and it returned to normal levels after a 3-month treatment. Phagocytic activity of PMN was determined by measuring the intensity of luminol-mediated chemiluminescence. EM treatment reduced chemiluminescence of PMN in patients to a significant extent, in proportion to the improvement of clinical symptoms.

Intracellular production of elastase, which was recognized as one of the predisposing factors in tissue damage of the respiratory tract, did not increase in PMN of patients throughout observation, but extracellular release of elastase from PMN upon stimulation with interleukin 1 (IL-1) was much reduced by EM treatment.

Furthermore, serum obtained from EM-treated patients exhibited significantly higher levels of anti-elastase activity as compared with serum of healthy controls. The anti-elastase activity in EM-treated patients was completely neutralized by monoclonal antibody to human  $\alpha_1$ -antitrypsin.

These results suggest that EM can modify PMN functions and also increase the anti-elastase activity in serum.

#### Index Terms

chronic lower respiratory tract infections, erythromycin, polymorphonuclear leukocyte (PMN) functions, elastase

#### Abbreviations

DPB: diffuse panbronchiolitis, CB: chronic bronchitis, BE: bronchiectasis, EM: erythromycin, PMN: polymorphonuclear leukocyte,  $\alpha_1$ -AT:  $\alpha_1$ -antitrypsin, BALF: bron-

## choalveolar lavage fluid, IL-1: interleukin 1.

## 緒 言

びまん性汎細気管支炎 (Diffuse panbronchiolitis, 以下 DPB), 慢性気管支炎 (Chronic bronchitis, 以下 CB), 気管支拡張症 (Bronchiectasis, 以下 BE) などの慢性下気道疾患における細菌感染は慢性下気道感染症と総称される。これらの疾患における細菌感染は疾患の直接原因ではないが, その病態の形成に大きな役割をはたしており, 予後にまで関与することがしばしば見られ臨床問題となっている<sup>1)</sup>。感染の形式は一過性の場合もあるが, 難治例の多くは年余にわたる持続感染の型をとり, 患者は通年性の多量の膿性痰, 咳嗽, 労作時呼吸困難とを訴える。このような病態, 特に DPB 症例などでは, 従来の短期化学療法では十分な治療効果が得られない。

難治性慢性下気道感染症に対する新しい治療法として, erythromycin (以下 EM) 長期投与療法が導入され, その有効性は臨床的には証明されてきている<sup>2)</sup>。さらにこの療法は *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* (以下 *P. aeruginosa*) などの感染菌の種類に関係なく有効であるとされている<sup>3)</sup>。しかし, EM には *P. aeruginosa* に対する抗菌力はなく, 従来の抗生物質の抗菌作用では説明できない。

近年, 各種呼吸器疾患における好中球 (polymorphonuclear leukocyte: PMN) 由来の elastase とその inhibitor の意義の重要性が報告されている<sup>4)</sup>。一方, 慢性下気道感染症患者の気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid, 以下 BALF) や, cystic fibrosis 患者の喀痰中での好中球 elastase 活性が高値であり, これが肺組織破壊に関与しているとする報告があり<sup>5,6)</sup>。慢性下気道感染症などの持続感染例の病状進行における好中球由来 elastase の重要性が示唆されている。そのような観点から, EM 長期投与療法の有効性の作用機序解明においても宿主の好中球に着目することは極めて重要であると思われる。

今回, 慢性下気道感染症患者に対し EM を投与することによる好中球機能 (遊走能, 貪食・殺菌能), 好中球 elastase 活性ならびに血清中の elastase inhibitor への影響と interleukin 1 (以下 IL-1) 刺激による好中球からの elastase 放出に対する EM の影響について検討を行なった。

## 対象および方法

## I) 好中球機能検査

## A) 対象

慢性下気道感染症の 14 例で, 男性 11 例, 女性 3 例, 平均年齢は  $61.0 \pm 17.8$  歳 (mean  $\pm$  SD) であった。疾患の内訳は DPB 3 例, CB 7 例, BE 4 例で全例 EM 初回治療例であった。DPB は厚生省特定疾患調査研究班の診断基準<sup>7)</sup>により, BE は気管支造影ならびに胸部 X 線により, CB は Fletcher の診断基準<sup>8)</sup>に該当する症例から DPB と BE を除外したものとした。

EM は erythromycin stearate (ダイナポット) を使用し投与量は  $600\text{mg}/\text{day}$  (1 例のみ  $1200\text{mg}/\text{day}$ ) を 3 回に分けて経口投与した。投与期間は 3 ヶ月以上とし, 以下の検査を EM 投与前と投与 3 ヶ月後において測定し比較を行なった。

健常対照群は男性 12 例, 女性 4 例, 平均年齢は  $28.5 \pm 6.5$  歳であった。

## B) 測定方法

## a) 白血球数, 白血球分画の測定

末梢血中の白血球数とその分画 (differential count) を多項目自動血球計算装置 Sysmex M-2000 (東亜医用電子株式会社) にて測定した。なお分画は, LCR (Large Cell Ratio; 好中球に相当), MCR (Medium Cell Ratio; 単球・好酸球・好塩基球に相当), SCR (Small Cell Ratio; リンパ球に相当) とに分けて測定した。

## b) 好中球分離方法

末梢血よりヘパリン加静脈血 10ml を採血し, さらに注射器のまま 3% dextran-PBS(-) (phosphate buffered saline,  $\text{Ca}^{++}$  および  $\text{Mg}^{++}$  不含) 溶液を 2ml 吸引し, 注射器を倒立した状態で室温にて放置。30 分後,  $90^\circ$  に曲げた 18 ゲージの注射針を注射器に取り付け, 注射器を倒置したまま赤血球が沈澱した後の上清を, 滅菌スピッツ (東洋器材科学) に移した。生理食塩水にて比重を 1.10 と 1.075 に調整した Percoll (Parnacia) をスピッツ中に 3ml ずつこの順に重層し, その上に前述の上清 3ml をさらに重層させ,  $240\text{xg}$  にて 20 分遠沈の後, 分離された各層のうち好中球層だけを採取し, HBSS (Hanks' balanced salt solution) にて 2 回洗浄した。その沈渣をよくほぐした後, 4.5ml の蒸留水を加えすばやく攪拌し残存赤血球を溶血せしめ, 20 秒間以内に 10 倍濃度の PBS (-) を 0.5ml 加えた。続いて HBSS で 2 回洗浄した後,

5mM HEPES-MEM (minimum essential medium, phenol red 不含) にて  $3 \times 10^6$  /ml に調整した。このものを以下好中球浮游液と呼ぶ。好中球浮游液中の好中球の割合は cytospin analysis において 95~98% で、trypan blue 染色による細胞の viability は 99% 以上であった。

c) 遊走能 (chemotaxis) の測定 (Fig. 1)

好中球の遊走能の測定は agarose plate 法<sup>9)</sup>を用いた。0.8% agar と 5% bovine serum albumin とを含有した 5mM HEPES-MEM の 3ml を 35mm/tissue culture dish (Corning) 内で固めた後、パンチャーにて直径 1.5mm の well を図のように等間隔 (1.5mm) にあけた。走化性因子 (chemoattractant) として、 $1 \times 10^{-4}$  mg/ml の fMLP (N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, Sigma)<sup>10)</sup> を図の a の well に、好中球浮游液 ( $3 \times 10^6$  /ml) を b の well に、negative control として HBSS を c の well に各々  $10 \mu\text{l}$  ずつ注入し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で 2 時間培養した後速やかに乾燥させ methanol にて 30 分間固定、さらに 80% formalin 溶液にて 30 分固定した後 agarose を除去し、底面の dish に付着した好中球をギムザ染色した。測定は光学顕微鏡 (NIKON) に接続した microprojector (OLYMPUS) 上に 400 倍に拡大された像を実測し、chemotactic locomotion の値 A と ran-

dom locomotion の値 B の値から chemotactic index (A/B) を算出した。評価は健康人好中球を用いて同様の操作を行い測定して得た chemotactic index 値で除し求めた stimulation index (SI) にて比較した。

d) 貪食・殺菌能の測定

貪食・殺菌能の測定は luminol 依存性 chemiluminescence 法<sup>11)</sup>を用いた。 $3 \times 10^6$  /ml の好中球浮游液  $400 \mu\text{l}$  を専用のマイクロチューブに入れ、 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間 preincubation した後  $2 \times 10^{-8}$  M の luminol (Boehringer) を  $30 \mu\text{l}$  注入した。zymosan A (Sigma) を健康人プール血清で  $37^\circ\text{C}$ 、30 分間オプソニン化した後十分に洗浄し、 $37^\circ\text{C}$  に保温しておいた opsonized zymosan (4mg/ml) の  $170 \mu\text{l}$  を直ちにに加え静かに攪拌し、ルミフォトメーター TD-4000 (Laboscience) にて peak 値、peak time を測定した。評価は peak 値を peak time で除した微分値を求めた後、chemotaxis と同様 stimulation index (SI) にて比較した。

II) 好中球 elastase 活性の測定

A) 対象

対象は慢性下気道感染症の 22 例、男性 16 例、女性 6 例、平均年齢  $62.4 \pm 15.1$  歳で、DPB6 例、BC6 例、BE10 例であった。このうち EM 未投与患者は 9 例で、この中の 5 例については EM 投与を行ない EM 投与前と投与

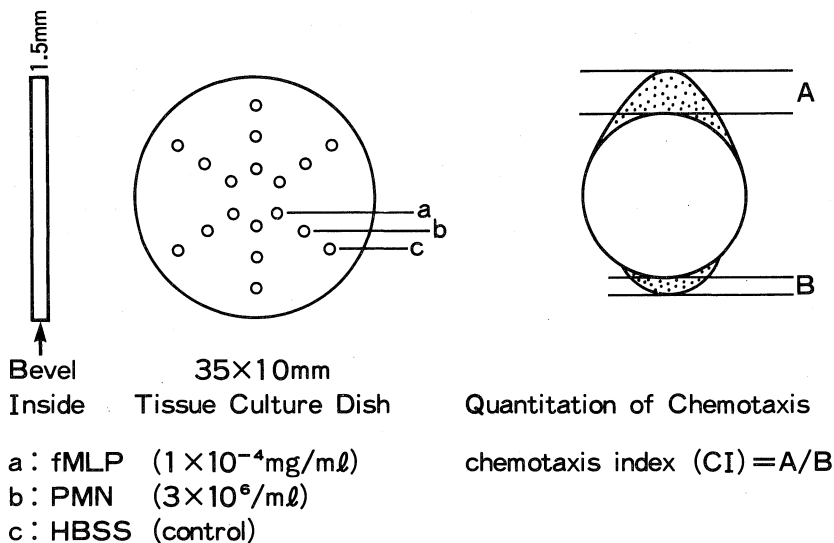


Fig. 1. Measurement of chemotaxis (Agarose plate method).

fMLP : N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

PMN : polymorphonuclear leukocyte

HBSS : Hanks' balanced salt solution

3ヵ月後に採取した好中球 elastase を測定し比較を行った。EM 投与患者の平均投与期間は  $18.3 \pm 19.2$  ヶ月であった。健常対照として男性 2 例、女性 2 例、平均年齢  $29.3 \pm 5.1$  歳の好中球を用いた。

## B) 材料と方法

### a) 好中球 elastase の抽出

好中球分離方法の項で述べた如く、Percoll 比重遠沈法により得た好中球浮游液 ( $3 \times 10^6$ /ml) の 1ml を 100xg にて 5 分間遠心し、その上清を捨て沈渣をよくほぐした後、acetate buffer (pH4.2) を 1ml 加え、そのまま測定日まで  $-80^\circ\text{C}$  にて冷凍保存した。測定日に全てのサンプルを解凍し、超音波破碎を 30 秒間行なった後、100xg にて 5 分間遠心してその上清を好中球 elastase 抽出画分として実験に用いた。即ち全てのサンプルについて同一日に同一条件下で測定した。

### b) Congo Red elastin の作成

elastase 活性は Congo Red elastin 法<sup>12)</sup> により測定した。elastin powder (Advance Biofacture Corporation) 1g を 100ml の 2% Congo Red 溶液に懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  にて 3 時間静かに攪拌した後、蒸留水にて 3 回洗浄し、続いて 100% acetone にて 3 回洗浄した。最後に 100% ether を加え、吸引ポンプにてろ紙上に乾燥させ、さらに desiccator 内にて 3 日間ろ紙ごと乾燥させ Congo Red

elastin 標品とした。Congo Red elastin を Tris-HCl buffer (pH8.2, 2mM  $\text{CaCl}_2$  含有) にて 1mg/ml に調整し、これを Congo Red elastin 溶液として用いた。

### c) elastase 活性の測定

サンプルキャップ (アシスト) に Tris-HCl buffer (pH8.2, 2mM  $\text{CaCl}_2$  含有) を  $200\mu\text{l}$ 、Congo Red elastin 溶液を  $250\mu\text{l}$ 、elastase 抽出画分を  $50\mu\text{l}$  入れ  $37^\circ\text{C}$  にて 30 分振盪させた。30 分後あらかじめ  $4^\circ\text{C}$  に冷却保存しておいた acetate buffer (pH4.2) を  $250\mu\text{l}$  入れ反応を停止させ、不溶性の Congo Red elastin を除去するため  $1800 \times g$  にて 10 分間遠心した。その上清の  $300\mu\text{l}$  を 96 穴底マルチプレート (住友ベークライト) に入れ、クロマトスキャナー CS-930 (島津製作所) により、485nm での吸光度を測定し好中球 elastase 活性を求めた。同時に elastase 抽出画分の蛋白量を標準蛋白として human serum albumin を用いた Lowry 法で測定し、elastase 活性は蛋白量 (mg) 当りの unit 数として算出した。unit 数は porcine pancreas elastase (Sigma) を標品として作成した検量線より算出した。PH8.8,  $37^\circ\text{C}$  の条件下において 20 分間で 1mg の elastin を融解させ得る elastase 活性を 1 unit と定義した。

III) IL-1 刺激による好中球からの elastase 放出に対する EM の影響

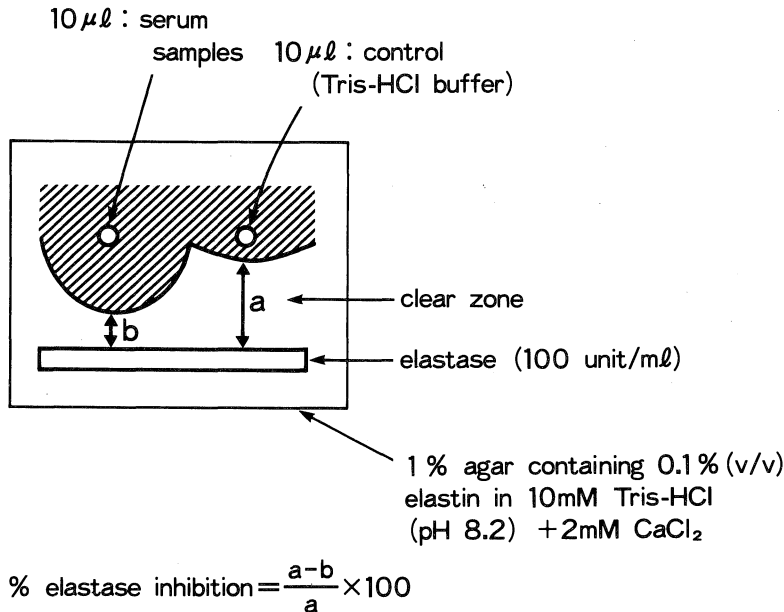


Fig. 2. Measurement of anti-elastase activity of serum obtained from EM-treated patients by the elastin agar plate method.

A) 対象

EM 投与中の慢性下気道感染症患者 5 例, 男性 4 例, 女性 1 例, 平均年齢は 62.4±15.1 歳で DPB2 例, CB2 例, BE 1 例であった。EM の平均投与期間は 25.0±21.4 ヶ月であった。健常対照として男性 5 例, 平均年齢 28.6±3.6 歳の好中球を用いた。

B) 材料と方法

好中球 HEPES-MEM 浮游液 (1x10<sup>6</sup>/ml) 100μl/well を 96 穴 tissue culture plate (Corning) 内で 40pg/ml の recombinant human interleukin-1 beta (rh IL-1β, Collaborative Reseach Incorporated) を 50μl 加え, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 1 時間作用せしめ, 好中球を刺激することにより elastase 放出を誘導した。この放出に対する EM の効果を見るために, Erythromycin lactobionate (ダイナボット) を最終濃度 5μg/ml となるように添加し, 合計 200μl/well としたものを EM 添加群とし, EM のかわりに MEM を加え同じく 200μl/well としたものを EM 非添加群とした。37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 60 分間培養し, 上清中の elastase 活性を, 好中球 elastase 活性と同様 Congo Red elastin 法により測定した。

IV) 血清の elastase 抑制活性の測定

A) 対象

EM 投与中の慢性下気道感染症患者 21 例, 男性 14 例, 女性 7 例, 平均年齢は 66.9±11.2 歳で, DPB 10 例, CB 5 例, BE 6 例であった。このうち EM 未投与患者は 4 例で, EM 投与患者の平均投与期間は 29.2±25.4 ヶ月であ

った。健常対照として男性 3 例, 女性 1 例, 平均年齢 32.5±1.9 歳の好中球を用いた。

B) 測定方法 (Fig. 2)

elastin agar plate 法にて測定した。0.1% (v/v) elastin 含有 agar plate にあけた well のうち中央の矩形の well (50x3mm) に 100unit/ml の porcine pancreas elastase (Sigma) を 750μl 注入し, さらに 1.5cm の等間隔にあけた直径 1.5mm の円形の well に検体 (患者および健常人血清) と negative control として 10mM Tris-HCl buffer (pH8.2, 2mM CaCl<sub>2</sub> 含有) を 10μl ずつ入れ 24 時間室温にて反応させた。elastin fragment の融解によって生じる clear zone の血清による抑制率を図の a, b の値から % elastase inhibition を算出し評価を行なった。

統計学的検定

以下に示した統計学的検定はすべて Student の t-検定により行なった。

成 績

I) 白血球数, 白血球分画ならびに好中球機能検査

1) 全白血球数並びに分画の変動 (Table 1)

全白血球数は健常人 5617±1109/μl あったのに対し, 慢性下気道感染症患者群 (以下患者群) では EM 投与前が 8186±4088/μl と有意に高値であった (p<0.05)。しかし EM 投与後は 6814±1988/μl と低値となり, 健常群との有意差は認められず, EM 投与前後の比較でも有意差は認めなかった。

Table 1. Comparison of total white blood cell count and its differential counts in the peripheral blood of patients between before treatment and at 3-month-treatment of EM in patients with chronic lower respiratory infections

Diseases	Before treatment		At 3-month of treatment			
	Cell counts/μl	Differential counts (%)	Cell counts/μl	Differential counts (%)		
Chronic lower respiratory infections (n=14)	8186±4088*	LCR	62.7±11.4	6814±1988	LCR	59.2±9.7
		MCR	10.5±4.9		MCR	9.8±6.6
		SCR	27.2±9.2		SCR	31.1±8.1
Healthy controls (n=18)	5617±1109	LCR	56.1±8.5			
		MCR	8.9±3.7			
		SCR	35.0±7.5			

LCR : Large Cell Ratio (%). (polymorphonuclear leukocyte)

MCR : Middle Cell Ratio (%). (monocyte, eosinocyte, basocyte)

SCR : Small Cell Ratio (%). (lymphocyte)

Results were expressed as mean±S.D.

\* : P<0.05 versus cell counts of healthy controls.

次に分画について健常群では LCR (好中球に相当) 56.1±8.5%, MCR (単球・好酸球・好塩基球に相当) 8.9±3.7%, SCR (リンパ球に相当) 35.0±7.5% に対し, 患者群では EM 投与前が LCR 62.7±11.4%, MCR 10.5±4.9%, SCR 27.2±9.2% で, EM 投与後が LCR 59.2±9.7, MCR 9.8±6.6, SCR 31.1±8.1 でいずれにおいても健常

群との間に有意差は認めず, また EM 投与前後においても有意差は認めなかった。

## 2) 遊走能 (chemotaxis) (Table 2)

健常群は stimulation index として 1.00±0.27 であつたのに対し, 患者群では EM 投与前において 1.02±0.26, EM 投与後において 1.11±0.37 と, いずれの場合も健常

Table 2. Effects of EM on PMN functions in patients with chronic lower respiratory infections

Diseases	Chemotaxis		Chemiluminescence	
	pre-treatment	post-treatment	pre-treatment	post-treatment
Chronic lower respiratory infections (n=14)	1.02±0.26	1.11±0.37	1.16±0.62	0.58±0.39*
Healthy controls (n=18)	1.00±0.27		1.00±0.77	

Data of both chemotaxis and chemiluminescence are expressed as the stimulation index (SI). SI=Data on test day/means of control data during certain period. Results are expressed as mean±S.D.

\* ; P<0.01 versus patients at pretreatment.

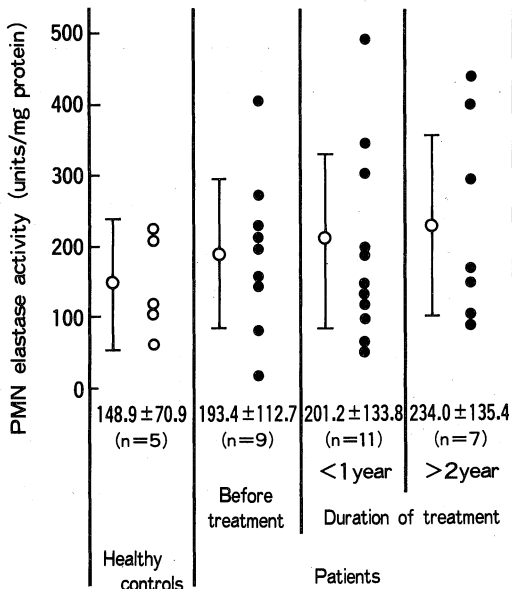


Fig. 3. Effects of EM treatment on PMN elastase activity.

PMN elastase activity was measured by Congo Red elastin method. Mean value of elastase activity of PMN obtained from EM-treated patients was 213.9±131.5 units/mg protein (n=18).

(○ ; healthy controls, ● ; patients)

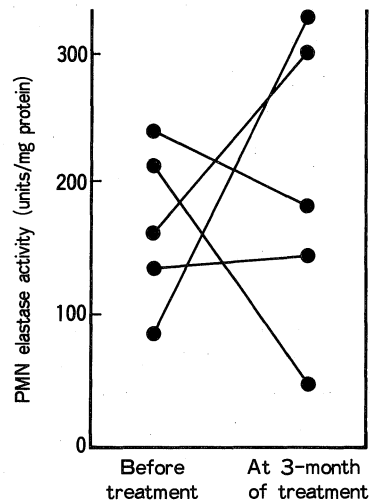


Fig. 4. Changes of PMN elastase activity in patients with chronic lower respiratory infections during the 3-month treatment of EM.

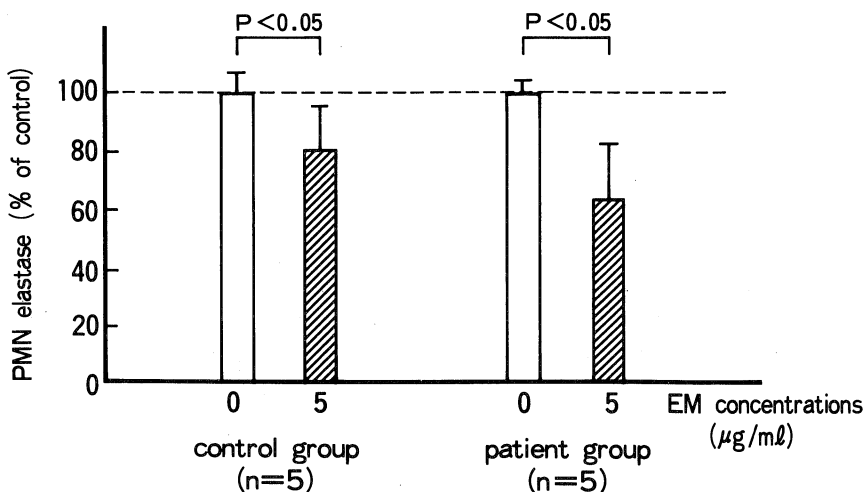


Fig. 5. Effects of EM on the release of elastase from PMN stimulated by IL-1. The 100µl of PMN (10<sup>6</sup>/ml) were cultured in wells of 96-well flat-bottomed culture plate with 25% (v/v) rh IL-1, with or without EM, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 60min. Elastase activity of each culture supernatant was measured with Congo Red elastin method. Data were expressed as % of control responses.

群との間に有意差は無く、EM 投与前後での比較においても有意差は認めなかった。

3) 貪食・殺菌能 (chemiluminescence) (Table 2)

健常群は stimulation index として 1.00±0.77 であったのに対し、患者群は EM 投与前 1.16±0.62, 投与後 0.58±0.39 といずれにおいても健常群との間に有意差は認めなかったが、EM 投与前後での比較においては EM 投与前に比較して EM 投与後が有意に低値であった (p<0.01)。

II) 好中球 elastase 活性 (Fig. 3, Fig. 4)

患者群では EM 投与前 193.4±112.7unit/mg protein, EM 投与後 213.9±131.5unit/mg protein でいずれも健常対照群の 148.9±70.9unit/mg protein と比較して高値を示す傾向は認められたが有意差は認めず、また EM 投与前後でも有意差はなかった。これを EM 投与期間によって分けて見てみると、1年未満 201.2±133.8unit/mg protein, 2年以上 234.0±135.4unit/mg protein と投与期間が長期であるほど elastase 活性も高値である傾向を示したが、各投与期間群間には有意差は認めなかった。

次に EM 投与前と投与3ヵ月後の前後について elastase 活性が測定できた5例では、低下傾向を示したもの2例, 上昇傾向を示したもの2例, ほぼ不変であったもの

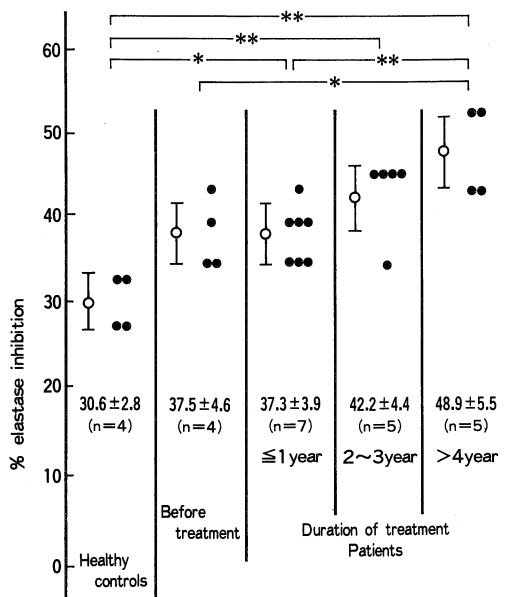


Fig. 6. Percent elastase inhibition of serum from patients with chronic lower respiratory infections treated with EM.

The mean value obtained from treated groups was 42.1±6.8% (n=17, P<0.05 versus healthy controls).

\* : p<0.05  
\* \* : p<0.01

1例と一定の傾向は見られなかった。

III) IL-1 刺激による PMN からの elastase 放出に対する EM の影響 (Fig. 5)

Fig. 5 に示す如く IL-1 添加による好中球の elastase 放出量を比較すると、EM 添加群が健常群は  $80.7 \pm 16.8\%$  control, EM 投与患者群では  $65.2 \pm 32.6\%$  control といずれにおいても EM 無添加群より有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。このことから EM は IL-1 刺激による好中球からの elastase 放出に対しては抑制的に作用していることが明らかとなった。

IV) 血清の elastase 抑制活性 (Fig. 6)

患者群は EM 投与前  $37.5 \pm 4.6\%$ 、EM 投与後  $42.1 \pm 6.8\%$  と EM 投与前後での有意差は認めなかったが、健常対照群  $30.6 \pm 2.8\%$  と比較して EM 投与後では有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

次にこれを EM 投与期間別に見てみると 1 年未満  $37.3 \pm 3.9\%$ 、2-3 年  $42.2 \pm 4.4\%$ 、4 年以上  $48.9 \pm 5.5\%$  で、健常群と比較して 1 年未満 ( $p < 0.05$ )、2-3 年 ( $p < 0.01$ )、4 年以上 ( $p < 0.01$ ) が有意に高値であった。また各投与期間ごとの間では投与前と 4 年以上 ( $p < 0.05$ )、1 年未満と 4 年以上 ( $p < 0.01$ ) とそれぞれ投与期間が長い程 elastase 抑制活性は有意に高値であった。またこれらの抑制活性は抗  $\alpha_1$ -antitrypsin (以下  $\alpha_1$ -AT) 抗体でほぼ完全に阻止された。

## 考 察

DPB, CB, BE などの慢性下気道感染症に対する EM 長期投与療法の有効性は、*P. aeruginosa* 感染例も含めて、臨床的には報告されてきたが<sup>2,3)</sup>、その作用機序は従来の MIC (minimum inhibitory concentration) を中心とした抗生物質の抗菌作用では説明できない。実際、EM 投与により臨床症状の改善をみた状態においても、*P. aeruginosa* の消失は認められないことなどから考えても、*P. aeruginosa* への直接作用と言うよりも、宿主 (Host) 側の生体防御能を介して作用している可能性が推定される。事実、三笠ら<sup>13)</sup> は EM 投与により NK (natural killer) 細胞活性が上昇することを報告している。

そこで著者は生体防御において重要な役割を担う好中球に注目した。EM 投与が好中球機能に作用を及ぼし、その結果感染様式に何らかの変化が生じ *P. aeruginosa* による宿主への傷害が抑制されているのではないかと推定したからである。このような観点から、今回 EM 投与患者における好中球機能の測定を試みた。

白血球数は慢性下気道感染症患者群 (以下患者群) で

は EM 投与前において健常対照群に比べ有意に高値であった。白血球分画について EM 投与前後において健常人の白血球分画と著明な差異はなく、急性感染症において好中球の比率が増えるのとは異なっていた。EM 投与前後での比較では白血球数、分画とも著明な変化は認めなかった。

好中球機能検査では、遊走能は EM 投与前  $1.02 \pm 0.26$ 、投与後  $1.11 \pm 0.37$  と投与前後で有意差はなく、またいずれも健常群との間にも有意差は認めなかった。Ras ら<sup>14)</sup> は CB 3 例のみではあるが、3 ヶ月間の EM 投与で遊走能が著明に亢進したとしている。しかし測定方法が異なるので著者の成績とは単純には比較し得ないものと思われる。

これに対し食食・殺菌能は投与前  $1.16 \pm 0.62$ 、投与後  $0.58 \pm 0.39$  と有意な低下を認めた ( $p < 0.01$ )。luminol-dependent chemiluminescence は luminol が酸化される際に光を放出することを利用したもので、好中球内で産生される活性酸素群 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH \cdot$ ,  $^1O_2$ ) の量が測定される<sup>15)</sup>。著者の成績から EM は好中球の食食にもなって産生される活性酸素群の量を抑制することが示唆された。過剰に産生されたこれらの活性酸素群は、細胞外において正常組織に傷害を与えると言われており<sup>16)</sup>、EM による活性酸素群の産生低下は局所での宿主細胞の二次的傷害の阻止につながるものと考えられる。

一方、宿主の好中球由来の elastase が末梢気道や肺胞壁の障害を惹起することが注目されている。EM 治療を受けていない慢性下気道感染症患者の BALF が高い elastase 活性を示し、その主体は好中球由来のものであるという報告<sup>5)</sup> や、発生機序は異なるが DPB などと同様に *P. aeruginosa* 感染などの難治性慢性下気道感染症を呈する cystic fibrosis においても、患者の喀痰から抽出された elastase は好中球由来のものが中心であるという報告<sup>6)</sup> がある。そこで著者は末梢血中の好中球由来の elastase 活性に及ぼす EM の影響を in vivo と in vitro の両方において検討した。その結果は健常群  $148.9 \pm 70.9$  mg/protein に対し EM 未投与患者群  $193.4 \pm 112.7$  mg/protein と高値であり投与期間が長いほど高値となる傾向はあったが、各投与期間群間において有意差はなく好中球の細胞質内に存在する elastase 量は EM 投与によって変化は認められないという結果であった。

しかし、炎症場においては局所に集合してきた macrophage から産生される IL-1 によって刺激を受けた好中球から、種々の lysozomal enzyme が放出されることが知られている<sup>17)</sup>。そこで次に、IL-1 刺激による好中球 elastase 放出に対する EM の直接的な影響を in



vitroにおいて検討した。5 $\mu$ g/mlの濃度でEMを添加した場合、健常対照群 80.7 $\pm$ 16.8% control, EM投与患者群 65.2 $\pm$ 32.6% controlともにEM無添加群に比べ有意に放出が抑制されていた( $p < 0.05$ )。健常対照群よりも患者群の方が抑制率が大きい傾向にあったが両者間に有意差は認めなかった。薬剤による好中球からのelastase放出に対する影響を調べた報告は他になく、このEMによるelastase放出抑制の機序については不明であり今後検討を要すると思われる。

好中球より放出されたelastaseは血清中ではほとんどfreeの状態では存在せず、 $\alpha_1$ -ATなどのelastase inhibitorと1:1の割合で結合することにより不活化されていると言われている<sup>19)</sup>。そこでEM投与患者血清のelastase活性抑制作用について検討した。EM未投与患者群 37.5 $\pm$ 4.6%, EM投与患者群 42.1 $\pm$ 6.8%と両者間に有意差はなかったもののいずれも健常対照群と比べて高値を示し、その後投与期間が長くなるにつれて有意に高値となっていた。elastase inhibitorには $\alpha_1$ -ATの他 $\alpha_2$ -macroglobulin( $\alpha_2$ -MG), inter- $\alpha_1$ -trypsininhibitorなどがあるが、好中球elastaseに対する阻害作用はその90%以上が $\alpha_1$ -ATであると言われている<sup>19)</sup>。著者の実験でも抗 $\alpha_1$ -AT抗体によりほぼ完全に抑制活性が消失したことから、EM投与患者の血清中にみられた抗elastase活性は $\alpha_1$ -ATに担われているものと考えた。

以上のことから、EMの作用機序の一端として、好中球内での活性酸素群産生抑制、好中球からのelastase放出の抑制、さらに抗elastase活性を有する $\alpha_1$ -ATの産生亢進が認められた。これらのことが慢性炎症の場における宿主側の二次的な組織傷害の緩和に寄与し、持続感染の状態においても臨床床の改善が現われうるものと考えられた。

今回は宿主側の生体防御、特に好中球に注目したので、予後と重要な関係のある*P. aeruginosa*感染についての検討は行なわなかったが、EMが*P. aeruginosa*のelastase産生をも抑制しているという報告<sup>20)</sup>があり、EMが宿主生体および寄生体の両者に対する抑制的作用の解析が今後の課題であると思われる。

しかし、今回の報告は今まで全く不明であった慢性下気道感染症に対するEM長期化学療法の作用機序解明の一端となり得る新しい知見を得たものであり、極めて意義のあることと考えられた。

## 結 論

慢性下気道感染症に対するEM長期投与療法の作用機序解明のため、EM投与患者の生体防御機構、特に好中

球に注目し検討を行なった。

1. 慢性下気道感染症患者の末梢血中の白血球数および分画はEM投与前後において有意な変化は認めなかった。

2. EM投与患者においては遊走能(chemotaxis)には著明な変化は認めなかったが、貪食・殺菌能(chemiluminescence)は低値であった( $p < 0.01$ )。

3. 好中球elastase量はEM投与前後において有意差は認めなかったが、in vitroにおけるIL-1刺激による好中球からのelastase放出に対してはEMは有意な抑制作用を示した( $p < 0.05$ )。

4. EM投与患者血清によるelastase抑制活性は投与期間が長期であるほど有意に高値であった。

以上から、慢性下気道感染症患者にEMを投与することにより好中球などによる宿主側の病変部での組織傷害を抑制することにより、臨床的改善がもたらされているものと考えられた。

本論文の要旨は、第63回日本感染症学会総会(盛岡)に於て発表した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました榎葉周三教授に深謝致します。また御校閲、御助言を賜りました奈良医大第2内科学教室成田亘啓教授、奈良医大病態検査学教室中野 博教授に心より感謝致します。本研究を進めるにあたり日々細かなことまで懇切なる御指導をして頂きました奈良医大細菌学教室喜多英二講師ならびに臨床的観点からの御指導を仰ぎました奈良医大第2内科学教室澤木政好講師、三笠桂一助手に感謝の意を捧げます。さらに終始御協力頂いた細菌学教室の諸兄姉に感謝致します。

## 文 献

- 1) 澤木政好, 三笠桂一: 慢性気道感染症の病態と治療 4. 細菌学的検討. 第31回日本感染症学会中日本地方会総会サテライトシンポジウム抄録, p6, 1988.
- 2) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 伊藤新作, 成田亘啓: 慢性下気道感染症におけるErythromycin長期化学療法の検討—第一報: Amoxicillinとの対比. 感染症誌, 60: 37, 1986.
- 3) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 伊藤新作, 成田亘啓: 慢性下気道感染症におけるErythromycin長期化学療法の検討—第二報: *Pseudomonas*感染例も含めて. 感染症誌, 60: 45,

- 1986.
- 4) 一和多俊男, 黒須 洋, 中部伸悟, 飯村二三男, 金沢和則, 小林茂三郎, 木許一良, 竹内重雄, 飯土用誠也, 内山照雄, 岡安大仁: 各呼吸器疾患における Elastase とそのインヒビターの意義. 日胸疾会誌. 22: 636, 1984.
  - 5) 山田穂積, 黒木茂高, 加藤 収, 山口常子, 日浦研哉, 鐘ヶ江秀明: 慢性気道感染症患者の BALF に見られるエラスターゼ活性とその臨床的意義. 日胸疾会誌. 26: 260, 1988.
  - 6) Suter, S., Schaad, U.B., Tegner, H., Ohlsson, K., Desgrandchamos, D. and Waldvogel, F.A.: Levels of granulocyte elastase in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis: Effect of antimicrobial treatment against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Dis. 153: 902, 1986.
  - 7) 厚生省特定疾患・間質性肺疾患調査研究班(本間日臣班長), 昭和55年度報告書. p.13, 1981.
  - 8) Fletcher, M.C.: American emphysema and bronchitis. Am. Rev. Resp. Dis. 90: 2, 1964.
  - 9) Nelson, R.D., Quie, P.G. and Simmons, R.L.: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J. Immunol. 115: 1650, 1975.
  - 10) Schiffmann, E., Corcoran, B.A. and Wahl, S. M.: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 1059, 1975.
  - 11) Allen, R.C., Stjernholm, R.L. and Steele, R.H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 679, 1972.
  - 12) Hall, D.A.: The identification and estimation of elastase in serum and plasma. Biochem. J. 101: 29, 1966.
  - 13) 三笠桂一, 澤木政好, 古西 満, 江川信一, 米田尚弘, 柳生善彦, 藤村昌史, 浜田 薫, 国松幹和, 成田亘啓: 慢性下気道感染症患者におけるエリスロマイシン治療の Natural Killer 細胞活性に与える影響について. 感染症誌. 63: 811, 1989.
  - 14) Ras, G.J., Anderson, R., Eftychis, H.A., Koch, U., Theron, A., Vanwyk, H.A. and Olivier, L. R.: Chemoprophylaxis with erythromycin stearate or amoxycillin in patients with chronic bronchitis-effects on cellular and humoral immune functions. SA Medical J. 66: 955, 1984.
  - 15) 上野範博, 松本隆任, 大川正人, 中山雅之, 外岡立人: 全血利用による chemiluminescence-全血食能の簡易・迅速測定法. 医学のあゆみ 121: 968, 1982.
  - 16) Evans, R.: Macrophage-mediated cytotoxicity: its possible role in rheumatoid arthritis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 256: 275, 1975.
  - 17) Werb, Z. and Gordon, S.: Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. J. Exp. Med. 142: 361, 1975.
  - 18) 櫻林郁之助, 飯村康夫, 石井周一, 本間寿美子, 河合 忠: 新しい顆粒球由来エラスターゼ測定法に関する基本的検討. 臨床検査 28: 725, 1984.
  - 19) Ohlsson, K.: Neutral protease of human granulocyte. III. Interaction between human granulocyte elastase and plasma protease inhibition. Scand. J. Lab. Invest. 34: 349, 1974.
  - 20) 三笠桂一: Erythromycin 長期治療に関する臨床的検討. 奈医誌. 40: 490, 1989.