

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2報 マウス好中球・免疫担当細胞などに及ぼす作用

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 II. EFFECTS OF ERYTHROMYCIN ON MURINE POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES AND IMMUNOCOMPETENT CELLS

YOSHIHIKO YAGYU

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received September 29, 1989

Summary: The present study was carried out to analyze the effects of erythromycin on functions of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and immunocompetent cells in mice.

Administration of erythromycin (EM) reduced phagocytic activity as determined by chemiluminescence, although chemotaxis and elastase production of PMN were not affected. These were consistent with results obtained from PMN of EM-treated patients with chronic lower respiratory infections. However, serum of EM-treated mice exhibited suppressive activity to mitogenic activity of recombinant interleukin 1 (rIL-1), when serum was prepared from mice 2h after intravenous injection of heat-killed *Pseudomonas aeruginosa*. Inhibition of IL-1 activity by this serum was neutralized by anti-mouse α_1 -antitrypsin (α_1 -AT) antiserum to a significant extent.

Furthermore, mouse splenocytes cultured with several concentrations of EM produced higher levels of IL-2 upon stimulation with concanavaline A (Con A). IL-2 production by splenocytes increased in proportion to increasing doses of EM (2-5 μ g/ml), but EM suppressed IL-2 production at doses higher than 10 μ g/ml. These results were consistent with the results of Con A-induced blastogenesis of splenocytes. Additionally, IL-1 production by PMN and alveolar macrophage was also enhanced by EM in the dose range of 2-5 μ g/ml.

To analyze the kinetics of production of IL-1 suppressive factor in serum, supernatant fluids from cultures of mouse hepatocytes with EM were tested for α_1 -AT activity and IL-1 inhibitory activity. Upon stimulation with IL-1, cultured hepatocytes produced α_1 -AT in the presence of EM (5-10 μ g/ml) higher than did hepatocytes cultured without EM. Furthermore, supernatant fluids of hepatocytes cultured with EM exhibited suppressive activity to IL-1.

These results suggest that EM can exert regulatory functions in host defense mechanisms.

Index Terms

erythromycin, polymorphonuclear leukocyte (PMN), elastase, interleukin, α_1 -antitrypsin

Abbreviations

EM: erythromycin, PMN: polymorphonuclear leukocyte, α_1 -AT: α_1 -antitrypsin, AM: alveolar macrophage, IL-1: interleukin 1, IL-2: interleukin 2

緒 言

びまん性汎細気管支炎(Diffuse panbronchiolitis 以下 DPB)などの慢性下気道感染症に対し、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¹⁾。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も報告されている²⁾。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。そこで著者はその作用機序解明の糸口として第1報³⁾において宿主側の生体防御機構、特に好中球機能に着目し種々の検討を行ない報告した。

本報では正常個体における EM の作用について検討すべく、マウスにおける好中球ならびに肺胞マクロファージ (alveolar macrophage 以下 AM) 機能、さらに免疫担当細胞に及ぼす影響についての実験を行なった。

<実験材料および方法>

1) 実験動物

動物は、静岡実験動物農業協同組合より ddY マウス(雌, 6週齢, 27~33g)を購入し、固形飼料オリエンタル MF (オリエンタル酵母株式会社・東京) および水により飼育した。

2) EM 投与方法

EM は erythromycin stearate (ダイナボット) を金属製のハンマーで粉末状に破碎した後、蒸留水にて 3mg/ml の濃度の水溶液を作成し、その 0.1ml をステンレス製の経口ゾンデにて強制的に胃内へ1日1回、実験期間中毎日投与した。これは約 10mg/kg/day の投与量となり、成人1日 600mg に相当する。control 群には、EM 水溶液のかわりに蒸留水を同様の方法で投与した。

3) 好中球分離方法および AM 採取方法

好中球の採取は Thioglycolate (以下 TGC, Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 2.5ml をマウス腹腔内投与5時間後、4°C にしておいた HBSS (Hanks' balanced

salt solution) 5ml にて peritoneal lavage により腹腔浸出液 (peritoneal exudate cells 以下 PEC) を回収し、50xg にて5分間遠心した。沈渣をよくほぐしてから 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秒以内に10倍濃度の PBS(-) (phosphate buffered saline, Ca⁺⁺および Mg⁺⁺不含) を加えた。HBSS で2回洗浄した後 5mM HEPES-MEM (Eagles' minimum essential medium, phenol red 不含, 日水, 東京) にて 3x10⁶/ml に調整した(以下好中球浮遊液と呼ぶ)。好中球浮遊液中の好中球の割合は cytosmear analysis において 95% 以上で、trypan blue 染色による細胞の viability は 98% 以上であった。

AM は麻酔下で開腹し腹部大動脈を切開し脱血した後、気管部よりツベルクリン注射器にて温 PBS(-) 1ml を注入し、ゆっくり注入液を回収した。この操作を数回繰り返して洗浄液を pool し遠心洗浄を繰り返して得た細胞は 95% 以上が macrophage であり、viability は 95% 以上であった。

以下述べる方法のうち 4~8 は第1報³⁾とほぼ同じ方法であるので簡単に記す。

4) 遊走能 (chemotaxis) の測定

好中球の遊走能を EM 投与1週目, 2週目, 3週目, 4週目において各々4匹ずつについて測定した。走化性因子 (chemoattractant) として, 1x10⁻⁴mg/ml の fMLP (N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, Sigma)⁴⁾ を用いて agarose plate 法⁵⁾ により測定した。

評価は各週ごとに4匹の control マウスでの値から算出した stimulation index (SI) にて行なった。

5) 貪食・殺菌能の測定

好中球は遊走能測定に用いたものと同じものについて測定した。AM は EM 投与1ヵ月目, 3ヵ月目, 6ヵ月目において測定した。貪食・殺菌能の測定は luminol 依存性 chemiluminescence 法⁶⁾ を用いた。

6) 好中球 elastase 活性の測定

EM 投与1ヵ月目のマウス (n=8) から採取した好中球浮遊液の 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°C にて冷凍保存した。測定日にすべてのサンプルを解冻し、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、前報と同じく Congo Red elastin 法⁷⁾にて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、control マウス(n=8)での値との比による% control として表わした。

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

無処置のマウス (n=8) について実験を行なった。好中球の刺激には後述の IL-1 assay の方法で作成したマウス腹腔 macrophage ($M\phi$) 由来の IL-1 を用いた。

96 穴 tissue culture plate (Corning) に 100 μl の好中球浮游液 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) と 50 μl の IL-1 (10% v/v) 含有 MEM を入れ、5% CO_2 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 の放出を誘導した。

この放出に対する EM の効果を見るために、最終濃度として 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Erythromycin lactobionate (ダイナポット) を添加し合計 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ としたものを EM 添加群、EM のかわりに MEM を加え同じく 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ としたものを EM 非添加群とした。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、EM 添加群での値を EM 非添加群での値で除して求めた% control により比較した。

8) 血清の elastase 抑制活性の測定

EM 経口投与1ヵ月後のマウス (n=5) の retro-orbital venous plexus より採取した血液より血清を分離し elastin agar plate 法にて測定した。porcine pancreas elastase (Sigma) の作用による elastin fragment の融解によって生じる clear zone の血清による抑制率を% elastin inhibition として算出し評価を行なった。

9) Con A-induced blastogenesis

マウス脾細胞を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に RPMI complete medium (10% FBS, 10mM HEPES, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-ME, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin 含有) で調整した後、96 穴プレートに 100 μl ずつ加えた後、100 μl の medium に種々の濃度の EM を含有する medium を 100 μl ずつ加え (最終濃度 0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、さらに Concanavalin A を 1 μg 添加した後、 CO_2 incubator 内で72時間培養した。培養終了16時間前に [^3H] thymidine (specific activity 2 mCi/m mol, Amersham Japan, Tokyo) を 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 加え、16時間後に automated

cell harvester (Skatron, Sweden) にて細胞を集め、細胞内の DNA 中に取り込まれた [^3H] thymidine 量を liquid scintillation counter (Beckman) にて既知の方法⁹⁾に従って測定した。

10) IL-2 assay

RPMI 1640 complete medium に脾細胞 $10^6/\text{ml}$ に EM (0.2~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及び Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加後、tissue culture T-flask 内に 10ml 加え、up-right position にて CO_2 incubator 内で18時間培養した。cell-free の培養上清に α -methylmannoside を 20mg/ml の濃度で加えたものを IL-2 標品とした。IL-2 assay は、IL-2 dependent mouse T cell line の HT-2 cell を用いて、Oppenheim ら⁹⁾の方法に従って行なった。

11) IL-1 assay

Thioglycolate medium (Difco) 3ml を腹腔内投与4日後に、5 ml の cold HBSS にて PEC を回収し、HBSS にて3回洗浄後、RPMI complete medium にて $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整して、24 穴 tissue culture plate (Corning) の各 well に 1ml ずつ加え、 37°C , CO_2 incubator 内で2時間静置した。非附着性細胞を十分に洗浄除去した後、LPS (lipopolysaccharide) を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に添加した新しい medium を 500 μl 加え、さらに EM を 0.2~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に添加した後、 CO_2 incubator 内で一夜培養した。IL-1 活性の測定は、Mizel の co-stimulation assay の方法¹⁰⁾に従い、C3H/HeJ mouse の胸腺細胞を用いて以下の如く行なった。

IL-1 標品 100 μl に、RPMI complete medium にて $10^7/\text{ml}$ に調整した胸腺細胞浮游液 (0.4 μg phytohemagglutinin 含有) 100 μl を加え、組織培養用 96 穴プレートを用いて 37°C , 5% CO_2 の条件下で72時間培養した。培養終了18時間前に 1 μCi の [^3H] thymidine を添加し、胸腺細胞の DNA 中に取り込まれた radioactivity を測定した。

12) マウス血清の IL-1 抑制効果

正常マウス及び EM 投与マウスに非特異的な炎症を惹起するためにグラム陰性桿菌の加熱死菌として *P. aeruginosa* の加熱死菌体 5×10^6 を尾静脈内に投与し、2時間後に retro-orbital venous plexus より採血した血清を分離した。血清は非働化、ろ過滅菌後、上記の IL-1 活性測定系に10%の割合に添加し、IL-1 活性に対する抑制効果を調べた。IL-1 としては rIL-1 β (Texstar Monoclonals 社, Texas) 5ng/ml を用いた。

13) マウス肝細胞の培養

マウス肝細胞は、Berry & Friend¹¹⁾の方法に従い、collagenase 分散法にて採取した。麻醉下で開腹したマ

ウスの肝臓を下大静脈から 20ml の Ca^{++} , Mg^{++} -free Hanks' solution (CMFS) で灌流した後, 0.07% collagenase (type IV, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 及び 0.1% bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma) 及び 4mM $CaCl_2$ 含有の Hanks 液 20ml で灌流した。その後肝臓を摘出後, BSA 含有 Hanks 液中で肝臓をほぐし, 2 層の滅菌ガーゼでろ過した後, 50xg にて 2 分の遠沈を 3 回繰り返し肝実質細胞を得, 生細胞数を測定後 (生存率 90% 以上の標品のみ使用), 2×10^6 /ml の濃度に Williams E 培地 (0.075% sodium bicarbonate, 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 5U/ml heparin, 1 μ M Insulin, 1mM dexamethason phosphate, 5% fetal calf serum 及び penicillin 100U/ml, streptomycin 50 μ g/ml, gentamycin 50 μ g/ml 含有) にて調整後, collagen-coated tissue culture plate (24 穴, Corning) にて 3 時間, 5% CO_2 incubator 内で培養した。Non-adherent cell を除去し, EM を種々の濃度に添加した新しい medium を加えて 24 時間培養後実験に用いた。

14) IL-1 による肝細胞刺激

Kojら¹²⁾の法に従い, rIL-1 β 5ng/ml で 12 時間刺激後, HBSS にて十分洗浄し, 新しい medium を加え, 72 時間後まで経時的に培養上清を採取していった。上清中の α_1 -antitrypsin (以下 α_1 -AT) 量及び albumin 量は, Weeke の方法¹³⁾に従って electroimmunoassay により測定した。150 μ l の抗マウス α_1 -AT 抗体, あるいは 100 μ l の抗マウス albumin (Organo Teknika Corp.-Cappel Products) を混じて 55°C に保った 10ml 1% agarose 溶液 (Tris-barbital buffer pH8.6, イオン強度 0.02(2v/cm)) と混じり, 8x8cm のガラスプレートに撒き, 凝固した後, 一端にあげた穴の中に 5 μ l の sample を入

れ, 4°C で 20 時間 (20v/cm) 泳動を行なった後, 12 時間 8v/cm で泳動した。control に culture medium, standard mouse α_1 -AT 及び mouse albumin を泳動し, rocket の高さから量を求めた。さらに上清中の IL-1 活性抑制能も, 既に述べた方法に従って測定した。

成 績

1) 遊走能 (chemotaxis)

Table 1 に示す如く, control 群は 1~4 週の平均が stimulation index として 1.00 ± 0.23 であったのに対し, EM 処理群は投与後 1 週目 0.85 ± 0.26 , 2 週目 1.14 ± 0.18 , 3 週目 0.90 ± 0.18 , 4 週目 0.92 ± 0.07 といずれの場合においても, control 群との間にも, 各週ごとの群の間においても有意差は認めなかった。

2) 食食・殺菌能 (chemiluminescence)

同じく Table 1 に示す如く, control 群は 1~4 週の平均が stimulation index として 1.00 ± 0.59 であったのに対し, EM 投与後 1 週目で 0.35 ± 0.05 とかなりの低下を示したが, control 群との間には有意差は認めなかった。しかし, 2 週目 0.26 ± 0.09 , 3 週目 0.22 ± 0.09 , 4 週目 0.19 ± 0.25 と漸減傾向を示し, いずれも control 群と比較して有意な低値を認めた ($p < 0.01$)。

AM においても EM 経口投与後経月的に chemiluminescence 活性が低下し, 投与 6 ヶ月目では control マウスの chemiluminescence 値に対して 50% 以下にまで低下した (Fig. 1)。

3) 好中球 elastase 活性 (Fig. 2)

% control として control 群 $100 \pm 47.1\%$ に対して, EM 投与マウス群 $78.9 \pm 14.2\%$ control で, EM 投与したマウスの方が低値ではあったが, 両群間には有意差は認

Table 1. Altered functions of PMN obtained from EM-treated mice

Duration of treatment with EM	Chemotaxis	Chemiluminescence
Control group	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.59
1 week	0.85 ± 0.26	0.35 ± 0.05
2 weeks	1.14 ± 0.18	$0.26 \pm 0.09^*$
3 weeks	0.90 ± 0.18	$0.22 \pm 0.09^*$
4 weeks	0.92 ± 0.07	$0.19 \pm 0.25^*$

Data are expressed as the stimulation index (SI).

SI = Data on test day/means of control data over a certain period. Each group consisted of 4 mice.

Results were presented as mean \pm S.D.

* ; $p < 0.05$ versus control group.

めなかった。

4) 血清の elastase 抑制活性 (table 2)

% elastase inhibition として control 群 20.0±7.1% に対して EM 投与群 18.4±8.4% と、両者の間には有意差は認めなかった。これらの抑制活性は第 1 報の場合と同様に抗 α₁-antitrypsin (α₁-AT) 抗体でほぼ完全に阻止された。

5) IL-1 刺激による好中球からの elastase 放出に対する影響 (Fig. 3)

EM 非添加群 100±2.6% に対し EM 添加群では 1μg/ml の濃度で 68.2±20.3% (p<0.01), 5μg/ml の濃度で 80.9±15.8% (p<0.01) といずれも有意に抑制されていた

Table 2. % of elastase inhibition of serum from EM-treated mouse

EM-treated group	control group
18.4±8.4%	20.0±7.1%

Each group consisted of 5 mice.

% elastase inhibition was measured using the method of elastin agarose plate and calculated as follows ;

$$\left(1 - \frac{\text{elastase activity of serum}}{\text{elastase activity of Tris-buffer}}\right) \times 100\%$$

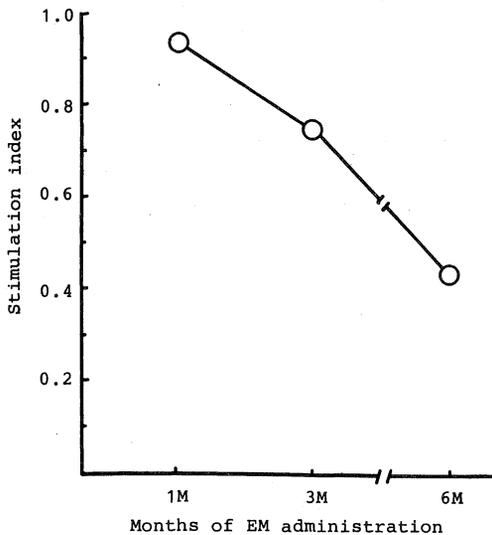


Fig. 1. Chemiluminescence of alveolar macrophages from mice orally given EM. Data were expressed as the stimulation index (chemiluminescence of macrophages from EM-treated mice / chemiluminescence of control macrophages).

が、EM 濃度の違いによる差は認められなかった。

6) Con A 刺激による脾細胞の blastogenesis に対する EM の影響 (Fig. 4)

5μg/ml の濃度までは EM を添加する事により Con

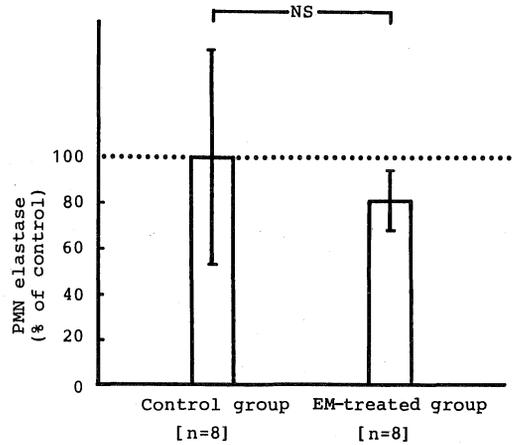


Fig. 2. Elastase activity of PMN from EM-treated mice.

PMN elastase activity was measured by Congo Red elastin method. Data were expressed as % of control responses.

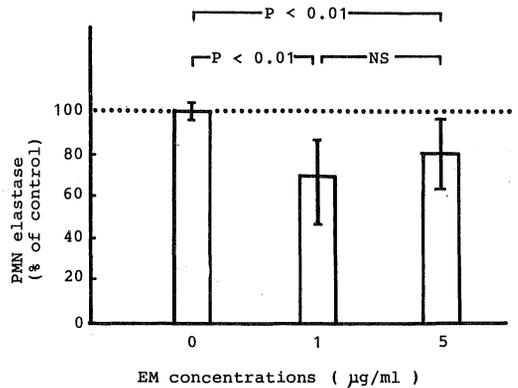


Fig. 3. Effects of EM on the release of elastase from PMN stimulated by IL-1.

The 100 μl of PMN (10⁶/ml) were cultured in wells of 96-well flat-bottomed culture plate with 25% (v/v) mouse IL-1, with or without EM, at 37°C in 5% CO₂ for 60 min. Elastase activity of each culture supernatant was measured with Congo Red elastin method. Eight mice were used in each group. Data were expressed as % of control responses.

A 刺激に対する blastogenesis は有意に上昇したが、それ以上の濃度では漸減傾向を示し、20 μ g/ml 以上では非添加時よりも抑制傾向を示した。

7) IL-2 assay (Fig. 5)

EM を 5 μ g/ml の濃度で添加した脾細胞培養溶液の上清中に最も強い IL-2 の産生が認められた。これは Con A 刺激に対する脾細胞の blastogenesis における成績と一致していた。

8) IL-1 assay (Fig. 6)

2 μ g/ml の濃度で EM を M ϕ 培養系に添加した時に、LPS 刺激に対して最も強い IL-1 の産生が観察された

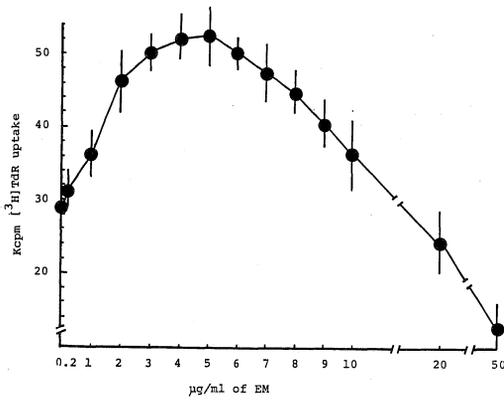


Fig. 4. Con A-induced blastogenesis of splenocytes cultured in the presence of EM.

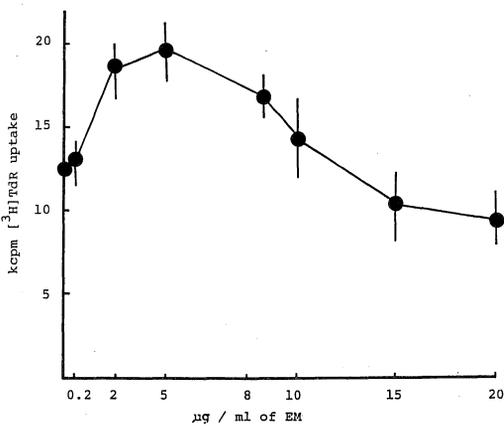


Fig. 5. IL2 assay. Splenocytes were stimulated with 5 μ g/ml of Con A in the presence of EM for 18 hr. Supernatants were tested for IL2 activity using IL2-dependent HT2 cells.

(0.2~2 μ g/ml). それ以上の濃度では漸減傾向を示し、10 μ g/ml で非添加とほぼ同じになり、15, 20 μ g/ml では非添加時より低値となった。

このことは AM においても同様の傾向であった。

9) EM 投与マウス血清による IL-1 抑制活性

Fig. 7 に示す如く、EM そのものには IL-1 抑制活性は認められなかった。正常マウス血清 (NMS) および EM 投与マウス血清 (EM-MS) 中の IL-1 抑制活性に差は認められなかったが、*P. aeruginosa* の死菌体静注による炎

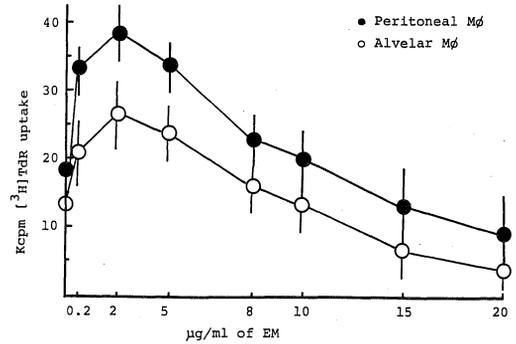


Fig. 6. IL-1 assay. PEC were stimulated with LPS (5 μ g/ml) for 24 h with EM and cell-free supernatants were tested for IL-1 activity. IL-2 activity was measured by the co-stimulation assay.

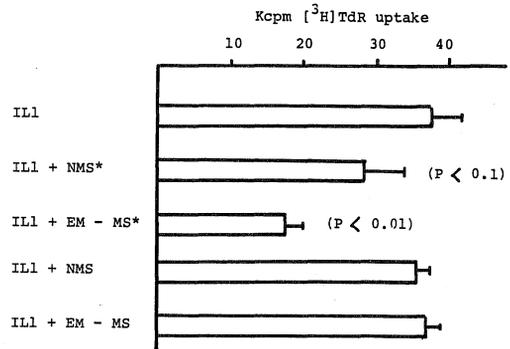


Fig. 7. Inhibitory effect of serum for mice that had been orally given erythromycin.

Serum (*) was prepared from mice 2 h after an intravenous injection of 5×10^6 heat-killed organisms of *P. aeruginosa*. IL-1 activity was measured by the co-stimulation assay.

NMS: normal mouse serum
EM-MS: serum of EM-treated mice.

症惹起後の血清で比較すると、EM 投与マウスの血清 (EM-MS*) で IL-1 抑制活性が顕著に上昇していた。この抑制活性は反応系に 10% (20 μ g/well) の抗マウス α_1 -AT ラビット血清を加えることで 70% 以上の中和が認められた (Fig. 8)。

10) IL-1 刺激による肝細胞の α_1 -AT 合成 (Fig. 9)
肝細胞を IL-1 刺激後 24 時間中に産生される α_1 -AT 量を、同時に産生された albumin 量との比で表わした。EM 非添加あるいは添加しても 2 μ g/ml の濃度では α_1 -AT よりも albumin の産生量のほうが多かったが、EM

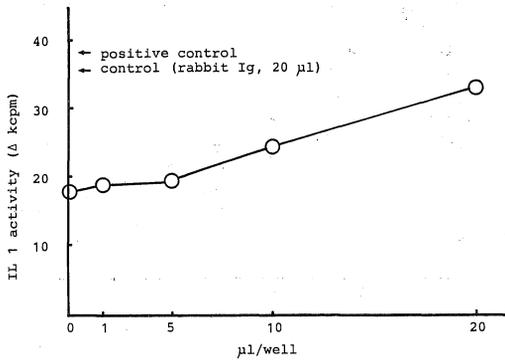


Fig. 8. Neutralization of suppressive activity to IL1 of EM-MS* by anti- α_1 AT antiserum.

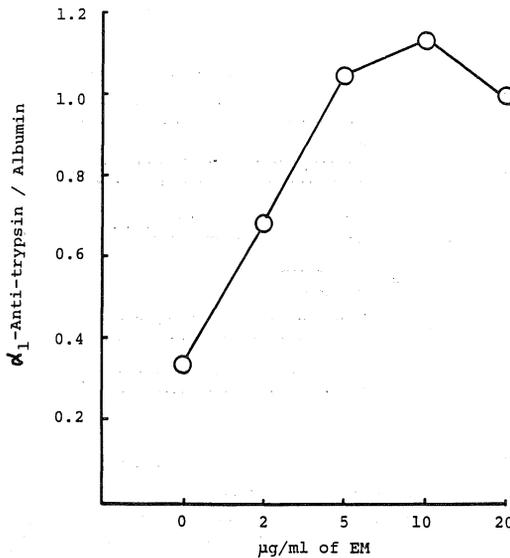


Fig. 9. Synthesis of α_1 -antitrypsin by hepatocytes after stimulation with IL1. Data were expressed as the ratio of α_1 -antitrypsin to albumin.

濃度が 5 μ g/ml 以上では α_1 -AT の産生量が上回り、10 μ g/ml での濃度において最も高値であった。

11) IL-1 活性抑制と α_1 -AT 量の関係 (Fig. 10)

肝細胞を 10 μ g/ml の EM 共存下で培養し、IL-1 刺激後 72 時間まで経時的に上清中の α_1 -AT/albumin 比および IL-1 抑制活性を測定した。EM (10 μ g/ml) 添加マウス肝細胞および非添加対照肝細胞共 rIL-1 5 μ g/ml で 12 時間刺激後、fresh medium に交換して 72 時間後までの上清中の IL-1 抑制効果と α_1 -AT 産生量とは相関傾向にあったが、EM 処置肝細胞の方が control 肝細胞よりも IL-1 抑制活性、 α_1 -AT 産生量共に上回っていた。

考 察

EM 投与マウスにおける好中球機能のうち遊走能 (chemotaxis) は EM 投与後 1 ヶ月まで不変であった。一方、食食・殺菌能 (chemiluminescence) は投与 2 週目より有意な低下を認めその後 4 週目まで漸減した。好中球 elastase 活性は EM 投与マウス群と control マウス群との間に有意差は認められなかった。以上はすべて第 1 報⁹⁾でのヒト末梢白血球で得られた成績と同様の結果であった。

しかし、血清による elastase 抑制効果は、第 1 報で EM 投与中の慢性下気道感染症患者の場合に見られた血清による elastase 抑制効果の有意な上昇は、正常マウスに EM を投与しただけでは見られなかった。慢性下気道感染症患者では慢性炎症が存在するということがこの差異の一因ではないかと思われたので EM 投与マウス、control マウスに *P. aeruginosa* の死菌体を投与し炎症を惹起したところ、EM 投与マウスの血清では IL-1 抑制活性は対照マウスに比して有意に上昇していた。血清中

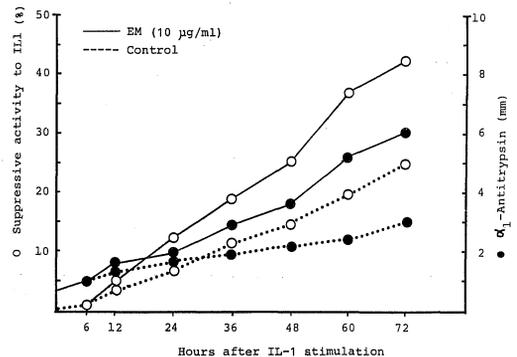


Fig. 10. Relationship between suppression of IL-1 activity and α_1 -antitrypsin in culture supernatant of hepatocyte stimulated by IL-1.

の IL-1 抑制物質として α_1 -AT はよく知られており^{14,15)}、また著者の実験でも抗 α_1 -AT 抗体によりこの抑制活性がほぼ有意に抑制されたことより、この作用は主として α_1 -AT によるものと考えられた。 α_1 -AT は acute phase reactant の一つとして知られているが、koj¹²⁾ は培養肝細胞を IL-1 刺激することにより上清中に α_1 -AT の産生増強が認められる一方で、albumin の肝細胞における合成低下が認められたと報告している。著者はこの培養系に EM を添加し検討したが、10 μ g/ml の濃度で α_1 -AT の有意の産生増強を認め、同時に上清中の IL-1 抑制効果もこれにともなって上昇した。このことは IL-1 が大量に産生される炎症時に肝細胞から IL-1 inhibitor が同時に産生され、しかも EM 共存下では、inhibitor の産生が高まることを示すものである。

一方、AM で産生される IL-1 の産生に関しても EM 投与マウスでは対照に比して有意に上昇するが、好中球での場合と同様に chemiluminescence は抑制されていた。EM 投与マウスの AM は正常マウスの AM に比して IL-1 の産生が高まることから炎症の場で好中球に作用して elastase などの組織傷害因子の放出を促進する可能性があるが、EM そのものがこの作用を block すると同時に血清中の IL-1 inhibitor の増加が IL-1 による target cell の過剰な活性化を抑制しているものと考えられる。このことは IL-2 と血清中の IL-2 inhibitor が同時に上昇するという報告¹⁶⁾ からも示唆される。リンホカインの target cell への作用を抑制するものとして、糖質ステロイドの存在がよく知られている¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ が、糖質ステロイドでは IL-2 の産生も抑制する²⁰⁾ のに対して、EM は IL-2 の産生は抑制させずむしろ亢進させていた。

以上のことより EM は一方では宿主の免疫応答を高め、同時に α_1 -AT などの抑制物質の産生を促しリンホカインの働き過ぎを抑制することにより生体防御を調整していると思われる。EM のこの様な生体防御に対して抑制的な作用はステロイドの持つ抗炎症作用に似ており、気道の炎症部位において抗炎症作用を発揮する。その反面宿主の抵抗力を高め病原菌に対する抵抗力を発現するというこの特異な作用が、慢性下気道感染症の臨床症状の改善につながるものと推察される。このことは EM では長期投与療法にかかわらず、ステロイド療法時に見られるような opportunistic infection などの合併をきたさない一つの理由とも考えられる。

EM をこのような観点から取り扱った例は今までになく、単なる抗生物質と言う範疇を超えた BRM (biological response modifier) としての作用に注目することは極めて重要で意義のあることと考えられる。

結 語

EM の宿主に対する作用を検討するために、マウスの好中球・免疫担当細胞などに対する影響を調べた。

1. EM を経口投与したマウスの腹腔由来の好中球においては、好中球由来 elastase の活性は正常マウスのそれらの活性と差は認められなかった。しかし腹腔好中球及び肺胞マクロファージの chemiluminescence は有意な低下を示した。これらは第 1 報において報告した EM 投与を受けた慢性下気道感染症患者の末梢血からの好中球での成績と同じ結果であった。

2. IL-1 刺激による好中球からの elastase 放出及び血清による % elastase inhibition では EM による影響は認められなかった。

3. Con A 刺激に対する脾細胞の blastogenesis、脾細胞からの IL-2 産生能、M ϕ からの IL-1 産生に対しては、いずれにおいても 2~5 μ g/ml の EM 濃度をピークとして亢進的に働いたが、10 μ g/ml 以上では抑制的に作用する傾向を認めた。

4. EM 投与したマウス血清には IL-1 抑制効果は認められなかったが、*P. aeruginosa* 死菌で炎症を惹起した EM 投与マウスの血清では IL-1 抑制活性が有意に亢進していた。

5. IL-1 刺激による培養肝細胞の上清中の α_1 -AT 産生量及び albumin 産生量は、EM 5 μ g/ml 以上の濃度で培養系に添加した時に α_1 -AT 産生量が albumin 産生量を上回り、10 μ g/ml で最高であった。また 72 時間までの上清中の IL-1 活性抑制と α_1 -AT 量との関係を見たところ相関傾向にあったが、EM 処置肝細胞の方が control 肝細胞よりも IL-1 抑制活性、 α_1 -AT 産生量共に上回っていた。

以上のような EM の作用、即ち一方では宿主の免疫応答を高めると同時に α_1 -AT の様な抑制物質の産生を促すことによって生体防御を調整するという BRM としての作用に注目することは極めて重要であると考えられた。

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樫葉周三教授、ならびに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に深謝致します。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 長期化学療法への検討—第一報: Amoxicillin との対比. 感染症誌. 60: 37, 1986.
- 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 長期化学療法への検討—第二報: *Pseudomonas* 感染例も含めて. 感染症誌. 60: 45, 1986.
- 3) 柳生善彦: 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. 奈医誌. 40: 694, 1989.
- 4) Schiffmann, E., Corcoran, B.A. and Wahl, S. M.: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 1059, 1975.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Hall, D.A.: The identification and estimation of elastase in serum and plasma. Biochem. J. 101: 29, 1966.
- 8) Kita, E., Emoto, M., Nishi, K., Katui, N. and Kashiba, S.: The role of interleukin 1 and 2 in generation of acquired resistance against mouse typhoid infection afforded by dializable factor from *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Immunol. 31(10): 1033, 1987.
- 9) Oppenheim, J.J., Mizel, S.B. and Meltzer, M.S.: Biological effects of lymphocyte and macrophage-derived mitogenic amplification factors. in Biology of the lymphokines (Cohen, S., Pick, E. and Oppenheim, J.J., eds.): Academic Press, New York, p291-323, 1979.
- 10) Mizel, S.B.: Studies on the purification and structure-function relationship of murine lymphocyte-activating factor (interleukin 1). Mol. Immunol. 17: 571, 1980.
- 11) Berry, M.N. and Friend, D.S.: High-yield preparation of isolated rat, liver parenchyma cells. A biochemical and fine structure study. J. Cell. Biol. 43: 506, 1969.
- 12) Koj, A., Gauldie, J., Sweeney, G.D., Regoeczi, E. and Sauder, D.N.: A simple bioassay for monocyte-derived hepatocyte stimulating factor: increased synthesis of α_2 -macroglobulin and reduced synthesis of albumin by cultured rat hepatocytes. J. Immunol. Methods 76: 317, 1975.
- 13) Weeke, B.: Rocket immunoelectrophoresis. Scand. J. Immunol. suppl. 1: 37, 1973.
- 14) Ades, E.W., Henson, A. and Amaud, P.: Modulation of the immune response by plasma protease inhibitors. I. Alpha-1-antitrypsin inhibit natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Scand. J. Immunol. 15: 109, 1982.
- 15) Arora, P.K., Miller H.C. and Aronson, L.D.: Alpha-1-antitrypsin is an effector of immunological stasis. Nature 274: 589, 1979.
- 16) Lelechuk, R. and Playfair, J.H.L.: Serum IL-2 inhibitor in mice. I. Increase during infection. Immunology 56: 113, 1985.
- 17) Werb, Z.: Biochemical actions of glucocorticoids on macrophages in culture. Specific inhibition of elastase, collagenase, and plasminogen activator secretion and effects on other metabolic functions. J. Exp. Med. 147: 1695, 1978.
- 18) North, R.J.: The action of cortisone acetate on cell-mediated immunity to infection. Suppression of host cell proliferation and alteration of cellular composition of infective foci. J. Exp. Med. 134: 1485, 1971.
- 19) Balow, J.E. and Rosenthal, A.S.: Glucocorticoid suppression of macrophage migration inhibitory factor. J. Exp. Med. 137: 1031, 1973.
- 20) Henriksen, O. and Frey, J.R.: Control of the expression of interleukin-2 activity. Cell. Immunol. 73: 106, 1982.