

上皮細胞

エリスロマイシンによる気道上皮被覆液抗菌作用の促進

石沢興太 小林誠一 鈴木朋子 山谷睦雄 久保裕司 佐々木英忠

背景

気道上皮はhuman beta defensin (HBD) を含め、様々な抗菌物質を合成する。HBDsの内、気道上皮はHBD-1, HBD-2, HBD-3などの合成が報告されている。わたしたちもHBDsが培養気道上皮細胞から粘膜側に分泌され、抗菌効果を有することを報告している²⁾。最近の報告でHBDsが膿毒性線維症ではHBDsの抗菌効果が低下することが明らかにされている¹⁾。緑膿菌を含めた細菌感染はび慢性汎細気管支炎の病態や慢性閉塞性肺疾患の気道感染に関連する。マクロライド系抗生物質の少量長期投与はび慢性汎細気管支炎の生存率を改善し、マクロライドの抗緑膿菌作用も報告されている³⁾。以上のように、マクロライド系抗生物質はさまざまな生理活性を有するが、気道上皮におけるHBDsの合成に関してしらべられていないので検討した。

材料および方法

20例のひと培養気管上皮細胞をフィルター膜に

エアインターフェース法で培養した。7日後にそれぞれコントロール群とエリスロマイシン投与群に分けた。フィルターの外側の培養液に薬物介入を行った。タイムコースに従って粘膜側に1/4生理食塩水を加えて被覆液を回収し、実験の測定材料とした。

ヒト気道上皮の被覆液抗菌活性を観察するために、MRSAと緑膿菌のけん濁液を気道上皮被覆液と混ぜ、37℃、2時間混和、培養したのちそれぞれ寒天培地に巻き、37℃でインキュベートし、細菌を増殖させた。24h経過した後、それぞれのコロニー数を測定した。この方法を用いて、エリスロマイシンの有無で気道上皮被覆液の抗菌力を観察した。

次に培養した上皮細胞を用いて、HBD1, HBD2, HBD3 mRNAの量をReal-time RT-PCR法で測定した。また、気道上皮被覆液を用いてHBD1, およびHBD2のproteinの産生量をwestern blotting法で測定した。

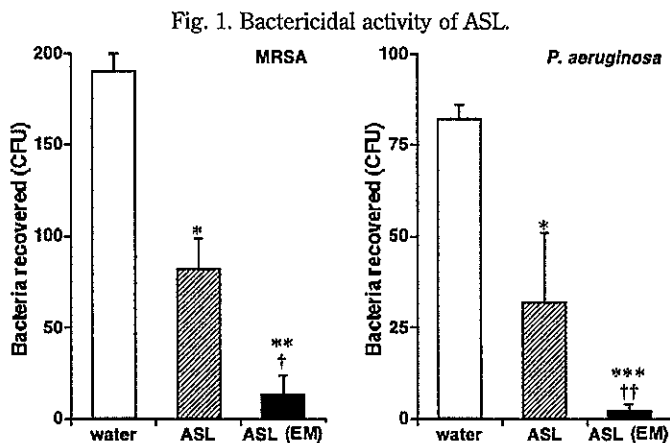


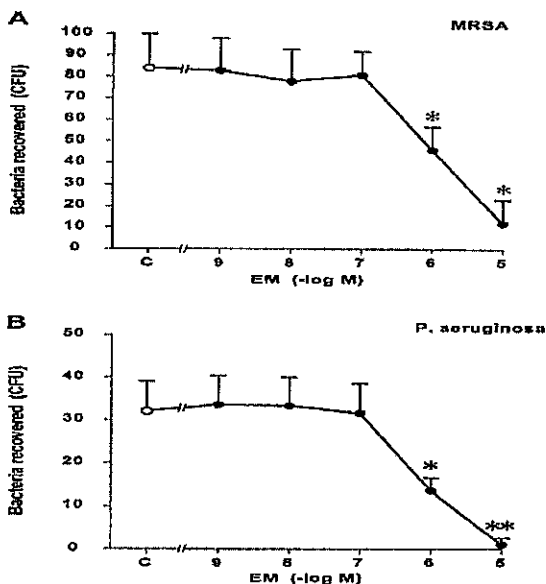
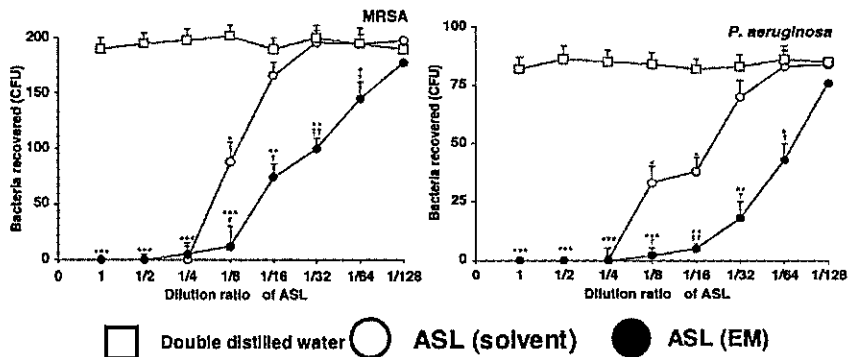
Fig. 2. Dose-response of EM on MRSA or *Pseudomonas aeruginosa* growth.

Fig. 3. Bacteria growth in dilute ASL.



結果

(1) 蒸留水を細菌と混合培養した場合、MRSAでは 202 ± 10 CFU、緑膿菌で 84 ± 5 CFUであった。気道上皮被覆液を細菌と混和した場合、細菌数の増殖が減少し、MRSAで 82 ± 17 CFU、緑膿菌で 33 ± 7 CFUであった。それに対して、エリスロマイシンを添加した培養液で培養したヒト気道上皮細胞の被覆液を細菌と混和した場合、細菌の増殖数はさらに減少し、MRSAで 13 ± 11 CFU、緑膿菌で 2 ± 2 CFUであった (Fig. 1)。

(2) エリスロマイシンの被覆液抗菌作用に対する促進効果は濃度依存性で $1 \mu\text{M}$ のエリスロマ

イシンで抗菌性促進効果を認め、 $10 \mu\text{M}$ で最大効果を認めた (Fig. 2)。また、この被覆液の倍々希釈を行った。その結果、MRSAでは32倍、緑膿菌では64倍で抗菌作用が低下したが、エリスロマイシン添加では希釈倍率が増加しても抗菌作用が低下しなかった (Fig. 3)。

(3) HBD-1、HBD-2の抗菌活性はナトリウム濃度依存性であり $1/4$ 生食では活性を示すが Na^+ 濃度が高くなると活性が消失する⁹⁾。そこでこのヒト気道上皮細胞被覆液の抗菌活性がデフェンシン由来かどうかを確かめるためにナトリウム濃度を変えたところ、 140mEq の高濃度ナトリウム存在下では抗

Fig. 4. Sodium concentration affects to the bactericidal activity of ASL.

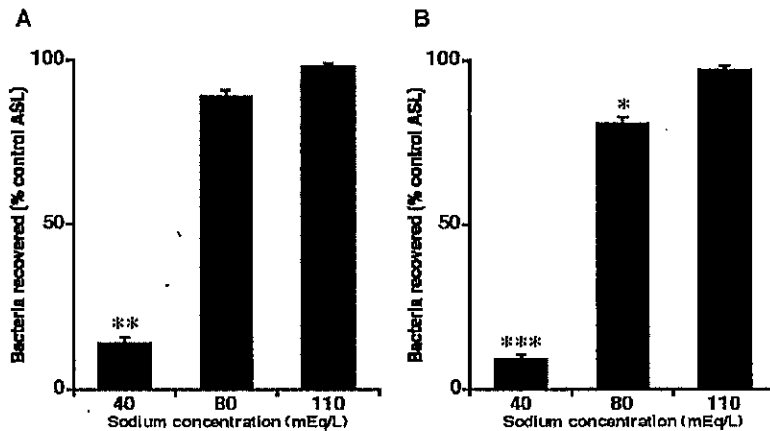
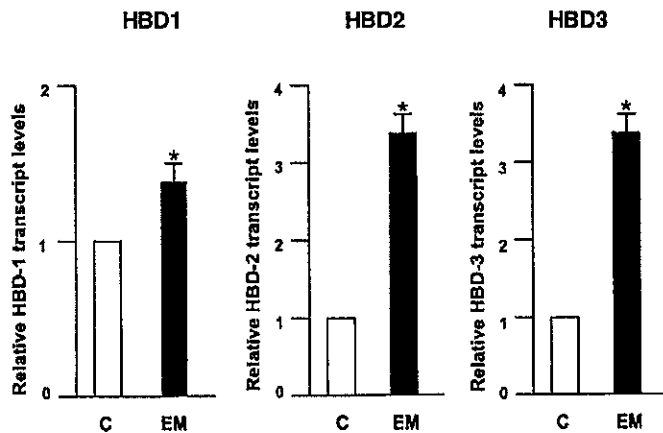


Fig. 5. mRNA expression of HBD 1, 2, and 3 after EM treatment.



菌活性が著明に低下した。この事からエリスロマイシンの抗菌力はデフェンシン由来の可能性が示唆された (Fig. 4)。

(4) さらにReal-time RT-PCR法を用いて、HBDs mRNAの発現量を測定した。その結果、エリスロマイシン添加した培養液で培養した気道上皮細胞ではコントロールに比べHBD-1で1.5倍弱、HBD-2およびHBD-3で約三倍に増加した (Fig. 5)。

(5) 同時に被覆液のHBDsの蛋白定量をも行った。Western blotting法によってHBD2タンパクの著明な増加が認められた (Fig. 6)。

結 論

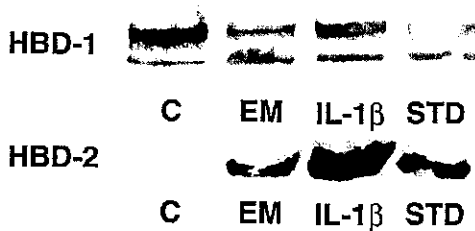
エリスロマイシンが気道上皮のHBDsを増加させ、人氣道被覆液の抗菌作用を促進すると考えられた。

これらの結果よりEMは人氣管上皮細胞の粘膜被覆液のMRSAおよび緑膿菌に対する抗菌作用はHBDs合成を介して発現していると考えられた。

考 察

この実験系に抗生剤が被覆液に混入しないようにフィルターを用いて、その外側に培養液を加えるようにした。また、被覆液中の抗生剤濃度を測定した結果、抗生剤成分が検出されなかった。

Fig. 6. Western blot analysis.



以上のことから、ヒト気道上皮の抗菌作用の増強はエリスロマイシンの直接作用ではなくHBDsの増加を介していると考えられた。この抗菌作用がエリスロマイシンを培養液に添加した場合と薬物無添加培養液と比べて著しく増強されていた。さらにこのヒト気道上皮被覆液の抗菌作用はdose dependentであった。生理食塩液阻害実験よりこの抗菌作用がナトリウム依存性であったことから、おそらくHBD-1, HBD-2によるものと考えられた。しかし、western blottingではHBD-1のバンドがコントロールと比べ変わらなかった。このことからHBD-1の蛋白の発現が有意に増加してはいなかったと考えられ、結果的に人気道上皮被覆液の抗菌作用が主にHBD-2によるものと考えられた。HBD-3 mRNAの発現が上昇していたが今現在、HBD-3抗体が発売されておらず、western blottingで確認することができなかった。

また、ヒト気道上皮細胞よりライソザイム、ラクトフェリンのなど様々の抗菌物質を分泌しているが⁵⁾、今回、被覆液中のライソザイム、ラクトフェリンの濃度を測定したがコントロール群とエリスロマイシン群では有意差が認められなかった。

今回の実験結果より、日常臨床ではcystic fibrosis, COPDの様な易感染患者では生理的な抗菌物質の分泌が低下していると考えられ、エリスロマイシン投与がこうした患者の気道上皮の抗菌物質を増加させ、感染予防には有用ではないかと考えられた。

参考文献

- 1) SMITH, J. J., S. M. TRAVIS, E. P. GREENBERG & M. J. WELSH : Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85 : 229~236, 1996
- 2) NAKAYAMA, K., X. Y. JIA, M. YAMAYA & H. SASAKI : Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol.* 26:105~113, 2002
- 3) SUZUKI, T., M. YAMAYA, K. SEKIZAWA & K. H. SASAKI : Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 165 : 1113~1118, 2002
- 4) GOLDMAN, M. J., G. M. ANDERSON, E. D. STOLZENBERG, & J. M. WILSON : Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88 : 553~560, 1997
- 5) WIDDICOMBE, J : Relationships among the composition of mucus, epithelial lining fluid, and adhesion of microorganisms. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151 : 2088~2093, 1995