

シンポジウム 1 「新規マクロライド誘導体EM703の生物評価」

新規マクロライド誘導体EM703のT細胞サイトカイン産生に及ぼす効果

浅野和仁¹⁾ 金井憲一²⁾ 砂塚敏明³⁾ 許 芳行²⁾ 渡辺 莊²⁾
久光 正¹⁾ 洲崎春海²⁾ 大村 智³⁾

1. はじめに

エリスロマイシン (EM) をはじめとする14員環マクロライド系抗生物質の少量長期投与療法が慢性副鼻腔炎やびまん性汎細気管支炎等の慢性炎症性気道疾患に使用され、その有効性が報告されている^{1,2)}。しかし、本療法の汎用による抗菌薬の副作用や菌叢の消長さらには耐性菌の出現等が危惧され、抗菌活性を示さないマクロライド剤の開発が望まれている。このような観点からいくつかのEM誘導体が合成され、それら物質の免疫反応に及ぼす効果が検討されてはいるものの³⁻⁵⁾、不明な点が多い。そこで今回、EM誘導体の1つであるEM703のサイトカイン産生に及ぼす効果をヒト末梢血CD4陽性T細胞を用いて検討した。

2. 材料と方法

1) 薬剤

本実験で使用した誘導体は砂塚らによって合成されたEM703であった。7.0 μ gのEM703をDMSOに溶解後、10%の牛胎児血清を含有するRPMI-1640培地で所定の濃度に希釈し、実験に使用した。また、上記と同様にRPMI-1640培地に溶解したEMを対照薬剤として使用した。

2) 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OKT3ならびにAnti-CD28を使用した。PBSで希釈した上記抗体100 μ l(タンパク量20.0 μ g/ml)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⁶⁾。

3) ヒト末梢血CD4陽性T細胞の分離と細胞培養

健康成人から分離した末梢血から比重遠心法に

よって単核細胞を分離した。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(0.1ml)を各種濃度に調整したEMあるいはEM703の存在下、固相化したモノクローナル抗体で刺激した。

4) サイトカインの測定

培養24時間後に採取した上清中のサイトカイン量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IFN- γ 、IL-2、IL-4ならびにIL-5であった。

3. 結果

1) T細胞サイトカイン産生に及ぼすEMの効果

Fig. 1に示したように、EMは培養系に添加する薬剤濃度に関係なくTh1サイトカインであるIFN- γ とIL-2の産生を全く抑制しなかった。しかし、Th2サイトカインであるIL-4とIL-5の産生は培養系へのEM添加によって抑制され、その最小抑制濃度は25 μ Mであった (Fig. 2)。

2) T細胞サイトカイン産生に及ぼすEM703の効果

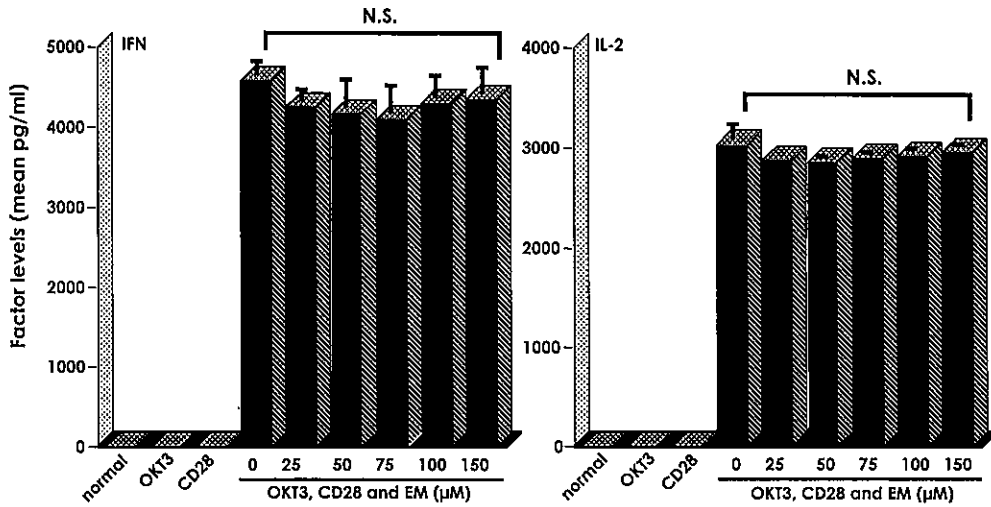
EMと異なりEM703を細胞培養系に添加したところCD4陽性T細胞からのIFN- γ 並びにIL-2の産生が抑制され、その最小抑制濃度はそれぞれ7.0 μ M、1.4 μ Mであった (Fig. 3)。これと同様にEM703はCD4陽性T細胞からのTh2サイトカイン、IL-4、IL-5の産生をも抑制、それぞれの最小抑制濃度は3.5 μ Mと1.4 μ Mであった (Fig. 4)。

考 察

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、さ

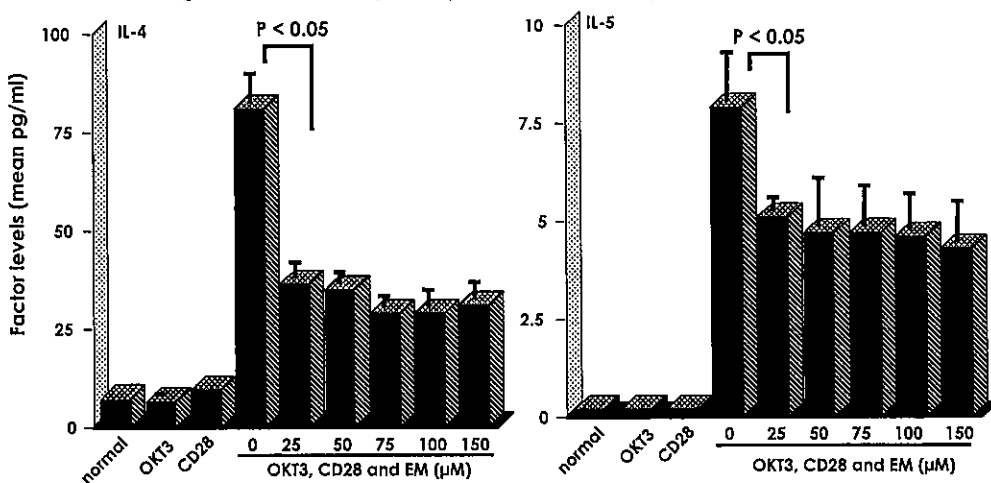
¹⁾ 昭和大学医学部第一生理学教室, ²⁾ 昭和大学医学部耳鼻咽喉科学教室, ³⁾ 北里大学北里生命科学研究所

Fig. 1. Influence of erythromycin (EM) on Th1 cytokine production



IFN : Interferon- γ ; N. S. : not significant.

Fig. 2. Influence of erythromycin (EM) on Th2 cytokine production

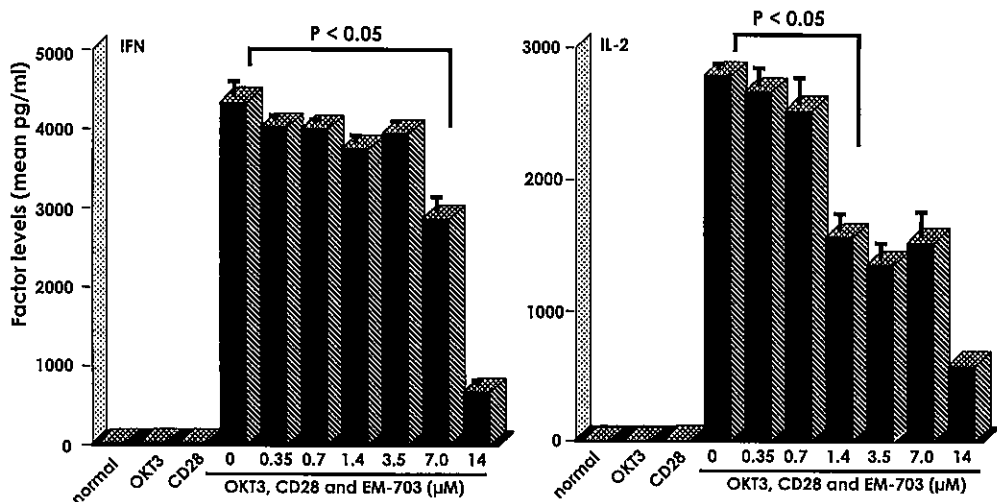


らにはこのヘルパー T細胞はそのサイトカイン産生能の違いにより Th1 と Th2 の 2 種類に分類されていることは周知の事実である。また、T細胞の正常な活性化には T細胞レセプター (TCR) を介した刺激のみならず副刺激分子の結合による第 2 の刺激伝達が必須であるとされている⁶⁾。そこで今回、TCR と副刺激分子、それぞれに対する抗体を用いて同時に刺激した細胞からのサイトカイン産生を指標に EM703 の CD4 陽性 T細胞に及ぼす効果を検討した。

EM のサイトカイン産生に及ぼす効果を検討したところ、副刺激分子刺激によって誘導される CD4 陽性 T細胞からの Th2 サイトカイン (IL-4 ならびに IL-5) 産生は、培養系への EM の添加によって抑制されたものの、Th1 サイトカイン産生は全く影響を受けなかった。一方、EM703 は CD4 陽性 T細胞からの Th1 サイトカインのみならず Th2 サイトカインの産生をも抑制した。

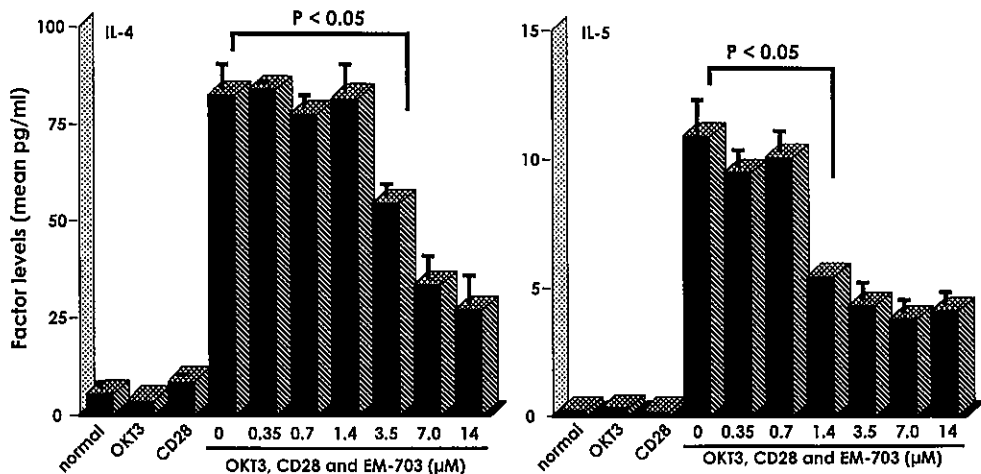
IL-4 並びに IL-5 は炎症性反応の effector 細胞として重要な役割を果たしている好酸球、肥満細胞の

Fig. 3. Influence of EM-703 on Th1 cytokine production



IFN : Interferon- γ .

Fig. 4. Influence of EM-703 on Th2 cytokine production



活性化や増殖, さらにはこれら炎症性細胞やT細胞, B細胞の血管内皮への接着能を増加させることが知られている⁶⁾。一方, Th1サイトカイン, 中でもとりわけIFN- γ はTh2細胞の増殖を抑制するのみならず, B細胞にも作用し, 同細胞からのIgE産生を抑制することが報告されている⁶⁾。したがって, ここに示した結果はEMの長期投与を受けた生体では抗原刺激によるTh2細胞の活性化が特異的に抑制され, 炎症反応の発現が調節されてい

る可能性のあることを示唆している。

インフルエンザウイルス感染マウスにEMを投与すると被験マウスの生存率が飛躍的に向上すること, さらにはウイルス感染による体重減少が有意に抑制されることが報告されている^{5,7)}。また, 上述したようなマウスの致死性インフルエンザウイルス肺炎に対し, EM703はEMと同等の生存率改善効果さらには体重減少抑制効果を示すことも観察され, このEM703の効果はウイルス感染によっ

で誘導されるマウスの異常な免疫応答の発現を当該薬剤が是正したことによっている可能性が推察されている⁵⁾。EMを経口投与すると胃酸によって修飾されたEMが生体に吸収され、循環中に流入、薬剤特有の効果を発現するとされていることから、これらの報告は胃酸によって修飾されたEM703が生体に吸収されるとEMと同様の優れた免疫調節作用を発現する可能性があることを示唆しているのかもしれない。今後、炎症性サイトカイン産生に及ぼすEM703の効果をより詳細に検討するためには同薬剤を経口投与した動物を用いての*in vivo*実験を行う必要があるであろう。

文 献

- 1) 工藤翔二, 木村 仁, 植村健司:びまん性汎細気管支炎に対するマクロライド系抗生剤の少量長期投与の臨床効果。日胸疾会誌 22 (増):254, 1984
- 2) 洲崎春海:慢性副鼻腔炎に対するマクロライド療法。化学療法の領域 11:79~84, 1995
- 3) 赤川清子, 砂塚敏明, 大村 智:免疫担当細胞(マクロファージ, リンパ球)に対する作用について。Jpn. J. Antibiotics 57 (Suppl. A):117~119, 2004
- 4) 出崎真志, 岡崎 仁, 滝沢 始, 他:気道上皮細胞の転写因子の活性化に及ぼす影響。Jpn. J. Antibiotics 57 (Suppl. A):120~122, 2004
- 5) 佐藤圭創, 高橋利弘, 岡本真一郎, 他:インフルエンザウイルス肺障害に対する作用について。Jpn. J. Antibiotics 57 (Suppl. A):126~128, 2004
- 6) ASANO K., KAMAKAZU K., Hisamitsu T., Suzuki H.: Modulation of Th2 type cytokine production from human peripheral blood leukocytes by a macrolide antibiotic, roxithromycin, *in vitro*. Int. Immunopharmac. 1:1913~1921, 2001
- 7) SATO K., SUGA M., AKAIKE T., *et al.*: Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:853~857, 1998