

シンポジウム1 「新規マクロライド誘導体EM703の生物評価」

ラット鼻粘膜上皮の粘液（ムチン）産生に対するEM703の作用

清水猛史¹⁾ 服部玲子²⁾ 間島雄一²⁾

はじめに

マクロライド系抗生物質の気道上皮からの粘液産生・分泌に及ぼす影響について、私たちは、ラット鼻粘膜上皮での*in vivo*の粘液産生モデルを利用して検討を行った。クラリスロマイシン(CAM)は濃度依存的にLPS刺激による鼻粘膜上皮での粘液産生と好中球浸潤を抑制し、さらにovalbumin(OVA)を用いて作成したアレルギー性炎症による粘液産生と好中球浸潤も抑制したが、好酸球浸潤には影響は見られなかった¹⁾。16員環系のジョサマイシン(JM)や、アンピシリン(ABPC)にはこうした作用は認められなかった。

次いで、*in vitro*で培養気道上皮細胞での粘液分泌に対する影響も検討した。まず、mucoepidermoid carcinomaの細胞株であるNCI-H292細胞を利用した細胞培養モデルにおいて、CAMやEMは 10^{-6} ~ 10^{-7} Mの低濃度で粘液分泌やムチンのコア蛋白であるMUC5ACのmRNAの発現を抑制したが、ABPCにはこうした作用は認められなかった。次に、分泌細胞へ分化させた正常なヒト鼻粘膜上皮の細胞培養モデルでも、CAMやEMが 10^{-4} ~ 10^{-5} Mの高濃度で粘液分泌やMUC5ACのmRNAの発現を抑制することを確認した¹⁾。なお、正常なヒト鼻粘膜上皮の培養はAir-liquid interfaceで行うことで、分泌細胞への分化と極性のある分泌が得られ、NCI-H292細胞に比べて約30倍の粘液分泌を得ることに成功している。より*in vivo*の条件に近い状態を反映していると考えられる²⁾。

さらに、15員環マクロライドであるアジスロマイシン(AZM)もCAMと同様に、ラット鼻粘膜上皮でのLPS刺激やアレルギー性炎症による粘液産生を抑制し、NCI-H292細胞やヒト鼻粘膜上皮の細胞培養で粘液分泌やMUC5ACのmRNAの発現

を抑制することを確認している³⁾。

新しいエリスロマイシン(EM)の誘導体であるEM703の*in vitro*での粘液分泌に及ぼす影響については、前回の研究会で報告した。NCI-H292細胞による細胞培養モデルにおいて、EM703は 10^{-6} M濃度でCAMと同様にLPS刺激による粘液分泌を有意に抑制した⁴⁾。そこで今回は、EM703の*in vivo*での粘液産生に及ぼす影響を、LPSとアレルギー性炎症のラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルを用いて検討した。

方法

LPS刺激はエーテル麻酔下にラット(F344, 雄, 7週齢)鼻腔に大腸菌由来のLPS 0.1mg(100 μ l)を3日間連日投与して行った⁵⁾。最終点鼻24時間後に検体を採取し、ラット鼻腔のincisive papillaの位置で冠状断切片を作成しAB-PAS染色後、鼻中隔上皮内の粘液顆粒の占める面積を画像分析装置を用いて測定した。

鼻アレルギーモデルはOvalbumin(OVA) 200mgとAlum 10mg/bodyによる全身感作を第1, 2, 3, 11日目に腹腔内に行い、19日目より局所感作としてOVA 5 mg/body(100 μ l)の点鼻を3日間連日行って作成し、24時間後に検体を採取した。第1日目には百日咳死菌混濁液を足底部に皮下注射した。このアレルギーモデルにおいて、抗原刺激後のくしゃみ回数は有意に増加し、鼻粘膜への著明な好酸球浸潤と血清中のOVA特異的IgE抗体の上昇が認められた⁶⁾。

コントロールとしての生食点鼻群では、鼻中隔粘膜上皮にほとんど杯細胞は認められないが、LPS刺激と鼻アレルギーモデルでは、いずれも著明な杯細胞の増加と粘液産生が認められた。そこ

¹⁾ 滋賀医科大学耳鼻咽喉科, ²⁾ 三重大学耳鼻咽喉科

図1. LPS刺激によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生に対する作用

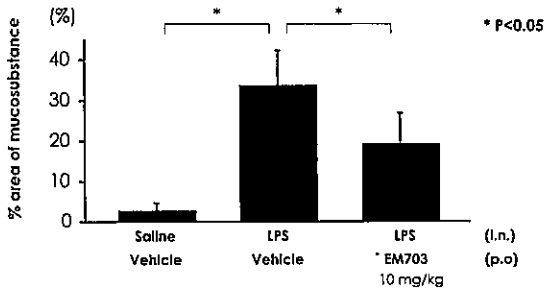
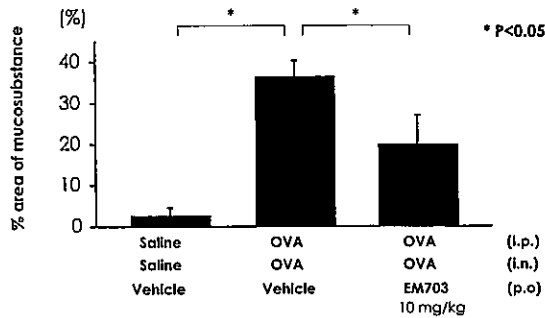


図3. アレルギー性炎症によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生に対する作用



で、LPSあるいはOVAの鼻腔内投与の1時間前に、EM703 (10mg/kg weight) を点鼻前日から4日間、経口投与してその影響を検討した。

結果

LPS刺激によるラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生や粘液産生は、EM703の経口投与により抑制された。定量的な検討においても、上皮内の粘液顆粒の占める面積はEM703 (10mg/kg weight) の投与により有意に減少し (図1)、EM703はLPS刺激による粘液産生に対してCAMやAZMと同等の抑制作用を有すると考えられた。

LPS刺激では鼻粘膜に著明な好中球浸潤が生じるが、EM703はCAMやAZMとは異なり、こうしたLPS刺激による好中球浸潤に対しては影響を与えなかった (図2)。

アレルギー性炎症における杯細胞化生や粘液産生もEM703の経口投与により抑制された。定量的な検討においても、上皮内の粘液顆粒の占める面

図2. LPS刺激による好中球浸潤に対する作用

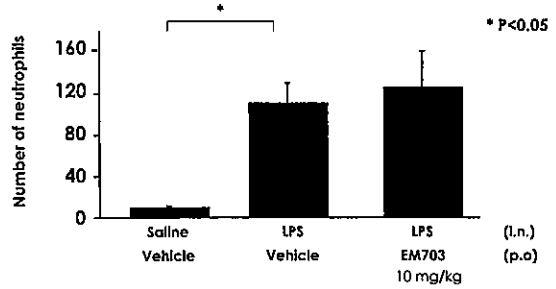
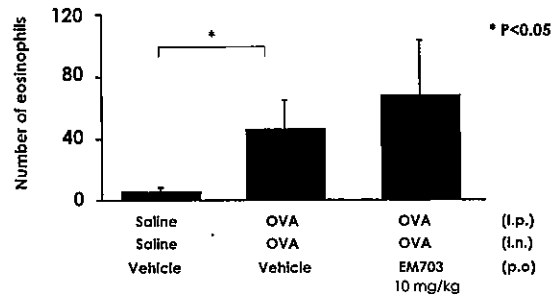


図4. アレルギー性炎症における好酸球浸潤に対する作用



積はEM703の投与により有意に減少し (図3)、EM703はアレルギー性炎症における粘液産生に対してもCAMやAZMなどと同等の抑制作用を有すると考えられた。

アレルギー性炎症における鼻粘膜上皮の好酸球浸潤に対してEM703は、CAMやAZMと同様に影響を与えなかった (図4)。

考察

今回の実験では、EM703はCAMやAZMと同様にラット鼻粘膜上皮における、LPS刺激やアレルギー性炎症での粘液産生を有意に抑制した。今回行った10mg/kg weightの投与では、CAMやAZMを同量投与したときと同等の作用が認められた。その作用の強弱を比較するためには、今後1mgや0.1mgなど低濃度での有効性を比較検討する必要がある。一方、臨床的に少量長期投与の有効性が得られない16員環系のJMや、ABPCにはこうした作用は認められず、EM703にはマクロライド療法としての臨床的な有効性が期待できると考えられた。

LPS刺激による粘液産生には好中球浸潤が重要である。抗好中球血清によって作成した好中球欠乏状態では、LPS刺激による粘液産生は著明に抑制され⁴⁾、好中球エラストーゼの阻害剤の投与でも粘液産生は抑制される⁵⁾。CAMやAZMはLPS刺激によるラット鼻粘膜上皮の好中球浸潤を抑制した¹⁾。14員環マクロライドは好中球機能を直接抑制することも報告されていて、CAMやAZMの粘液産生に対する抑制作用のひとつに、好中球浸潤の抑制を介した機序が考えられる。

一方今回の検討で、LPS刺激による好中球浸潤に対して、EM703はCAMやAZMと異なり影響を与えなかった。EM703はCAMやAZMと作用機序が異なっている可能性も考えられる。他の作用機序として、前回の研究会において、EM703が気道上皮細胞からの粘液分泌を直接抑制することを報告したが、CAMやAZMにもこうした作用は確認されている。EM703の好中球浸潤に対する作用の有無については、その再現性を含めてさらに検討する必要がある。

アレルギー性炎症における好酸球浸潤に対しては、EM703はCAMやAZMと同様に影響を与えなかった。アレルギー性炎症では好酸球浸潤や好中球浸潤を抑制しても、粘液産生に影響を与えないことから⁶⁾、好酸球を介した作用機序は考えにく

い。

参考文献

- 1) SHIMIZU T., SHIMIZU S., HATTORI R., *et al.* : *In vivo* and *in vitro* effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168 : 581~587, 2003
- 2) USUI S., SHIMIZU T., KISHIOKA C., *et al.* : Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells : use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 109 : 271~277, 2000
- 3) 清水猛史, 清水志乃, 服部玲子, 他 : 気道上皮細胞からの粘液分泌に対するアジスロマイシンの影響。 *Jpn. J. Antibiotics* 56 (Suppl. A) : 25~28, 2003
- 4) 服部玲子, 清水猛史, 清水志乃, 他 : 新規マクロライド誘導体EM703の生物活性—気道上皮細胞からの粘液分泌に及ぼす影響。 *Jpn. J. Antibiotics* 57 (Suppl. A) : 123~125, 2004
- 5) SHIMIZU T., TAKAHASHI Y., KAWAGUCHI S., *et al.* : Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153 : 1412~1418, 1996
- 6) SHIMIZU T., HIRANO H., MAJIMA Y., *et al.* : A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 : 1648~1654, 2000