

マクロライド剤のインターロイキン-1, 腫瘍壊死因子産生刺激作用

第2報 ヒト末梢血単球への作用

片平 潤一・菊池 賢・柴田 雄介
長谷川裕美・戸塚 恭一・清水喜八郎
東京女子医科大学内科*

(平成3年2月5日受付・平成3年4月18日受理)

我々はすでに、エリスロマイシンを経口投与すると末梢血中単核細胞と肺胞マクロファージからのインターロイキン-1 (IL-1) や腫瘍壊死因子 (TNF) の産生を刺激することを見いだした。そこで、エリスロマイシンや他のマクロライド剤の *in vitro* における免疫賦活作用のカイネティクスを検討した。健康成人の末梢血中単核細胞をエリスロマイシン, クラリスロマイシン, ジョサマイシンと共に培養すると, 容量依存的に IL-1 と TNF の産生を刺激した。この作用は培養細胞数に依存しており, 培養後 8~12 時間でピークになった。マクロライド剤は同様にリポポリサッカライドによる IL-1 の産生をプライムする作用も持っていた。これらの作用は Na^+, K^+ -ATPase の選択的阻害剤の ouabain, protein kinase C の選択的阻害剤の H-7, calmodulin の選択的阻害剤の W-7 によって部分的に抑制された。したがって, マクロライド剤のサイトカイン産生作用には Na^+, K^+ -ATPase, protein kinase C, calmodulin が関与していることが示唆された。

Key words: マクロライド剤, IL-1, TNF, *in vitro*

マクロライド剤はグラム陽性菌などに対する抗菌作用の他に *in vivo*, *in vitro* において様々な免疫学的作用を有していることが知られている¹⁻⁸⁾。 *Candida albicans* に対する非特異的な感染防御作用も報告されている⁹⁾。最近のび慢性汎細気管支炎に対するエリスロマイシンの有効性^{9,10)}も何等かの免疫学的作用が大きい役割を果たしていることが考えられる。しかし, それがマクロライド剤のどのような作用とかがわっているのかはまったく不明である。

一方, マクロライド剤のサイトカインの産生に対する影響についてはほとんど報告がない¹¹⁻¹³⁾。我々はエリスロマイシンを投与すると, 末梢血中単核細胞と肺胞マクロファージからのインターロイキン-1 (IL-1) と腫瘍壊死因子 (TNF) の産生が増強することを示した¹⁴⁾。また *in vitro* においても IL-1 の産生を高めることを中間報告した¹⁵⁾。そこで *in vitro* においてエリスロマイシンを始めとするマクロライド剤が末梢血中単核細胞からのサイトカインの産生にどのようなカイネティクスで影響を与えるのか, さらにその機序はどのようなものなのかを検討した。

I. 材料と方法

薬 剤

Josamycin は山之内製薬株式会社から, erythromycin は日本ダイナボットから, clarythromycin は大正製薬株式会社から供与を受けた。これらの薬剤はエタノールまたは 0.1 NHCl で 5 mg/ml に溶解したのち, RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA) で適当な濃度に希釈した。ouabain, H-7[1-(5-isoquinoliny)sulfonyl]-2-methylpiperazine dihydrochloride], W-7[N-(6-amino-hexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide], polymyxin B, *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide (LPS) は Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) から入手した。ウシ胎児血清 (FCS) は日本バイオテストから入手した。組み替え型ヒトガンマインターフェロン (rHuIFN γ) は武田薬品工業株式会社から供与を受けた。

サイトカインの産生刺激

非喫煙者で健康な成人男性から承諾を得たうえで, 末梢血を採取し, Ficoll-Conray 液 (比重 1.077 g/ml) に重層して, 比重遠心法で単核細胞を分離した。これを RPMI 1640+10% FCS に浮遊して, 一部は

* 東京都新宿区河田町 8-1

60 mm Petri dishに37°Cで2時間孵置した。非付着細胞をRPMI 1640で洗って除去した後、rubber policemanで付着細胞を得た。 α -naphthylacetate esteraseとnaphthol-ASD-chloroacetate esteraseの二重染色を施すと、98%以上が単核マクロファージであることが確認された。1~3×10⁶/mlの単核細胞または付着細胞と諸濃度のマクロライド剤をRPMI 1640+10% FCSに浮遊して培養した。24から48時間後に細胞成分と上清を共に取り出し、-20°Cに凍結した。MTTアッセイはDenizotらの方法で、48時間培養後の細胞を用いて行った¹⁹⁾。

プライミング効果

1×10⁶/mlの付着細胞を一部はエリスロマイシン1 μ g/ml, またはrHuIFN γ 300 U/mlと共に37°C 1時間孵置し、RPMI 1640で洗った後、一部を1 μ g/ml エリスロマイシンまたはLPSと23から47時間培養した。

サイトカインの産生機序

付着細胞の1×10⁶/mlをエリスロマイシン1 μ g/ml, LPS 1 μ g/ml, rHuIFN γ 300 U/ml, 1×10⁻³ M

のouabain, 3×10⁻⁶ MのH-7, 1×10⁻⁶ MのW-7などと共に37°Cで2時間培養した後、RPMI 1640で洗浄して22時間培養した。

サイトカインのアッセイ法

IL-1 α とIL-1 β は大塚製薬株式会社から供与を受けた assay kitにより、sandwich enzyme immunoassayで測定した。測定限界は7.8~5,000 pg/mlである。TNFは大日本製薬株式会社から供与を受けたPT 050 EIA Kitによりenzyme immunoassayで測定した。測定限界は7.25~232 JRU/mlである。1 JRU/mlは0.33 ng·protein/mlに相当する。IFN γ は市販のキットにより(Centocor, Malvern, FA, USA), radioimmunoassayでBiomedical Laboratoriesにて測定した。

サイトカイン産生のプライミング効果

1×10⁶/mlの付着細胞をポリミキシンB 10 μ g/ml, エリスロマイシン1 μ g/ml, またはrHuIFN γ 300 U/mlと共に37°C 1時間孵置し、RPMI 1640で洗った後、ポリミキシンB 3 μ g/ml, 1 μ g/mlのエリスロマイシンまたは10 ng/mlのLPSと23から47時間培養

Table 1. Stimulatory effects of macrolides on the production of IL-1 α

Erythromycin								
(μ g/ml)	0	0.1	0.2	0.5	1	5	10	50
Exp. 1	550*	ND§	540	900	1,260	1,080	ND	ND
2	164	ND	192	197	202	362	212	ND
3	245	312	262	280	294	234	ND	ND
4	1,850	5,700	9,300	7,700	6,500	ND	ND	ND
5	1,060	ND	1,630	1,600	1,860	ND	ND	ND
6	1,900	ND	2,300	2,150	2,000	2,100	2,800	1,100
7	2,800	ND	3,800	2,950	ND	2,400	2,450	ND
Clarithromycin								
Exp. 1	245	ND	284	246	217	245	ND	ND
2	275	290	ND	360	235	195	ND	ND
3	1,850	10,100	8,400	4,800	7,600	3,200	ND	ND
4	720	ND	680	720	820	770	ND	ND
5	185	ND	170	220	265	235	185	ND
Josamycin								
Exp. 1	84	ND	108	66	125	330	600	ND
2	720	ND	810	590	815	930	1,050	1,070
3	1,400	ND	1,400	1,460	1,700	2,620	2,600	ND
4	1,060	ND	1,160	1,180	1,270	ND	ND	ND
5	185	ND	235	285	425	195	370	ND

1×10⁶ ml adherent cells were incubated with the indicated concentrations for 24 h.

* IL-1 α pg/ml; § not done.

した。

サイトカインの産生機序

付着細胞の 1×10^6 /ml をエリスロマイシン $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ポリミキシン B $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、rHuIFN γ $300 \text{ U}/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の ouabain、 $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ の H-7、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ の W-7 などと共に 37°C で 1 から 4 時間培養後、RPMI 1640 で洗浄してポリミキシン B $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ と共に 20 から 23 時間培養した。また、ouabain の濃度を 10^{-2} M から 10^{-5} M まで、H-7 の濃度を $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ から $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ まで、W-7 の濃度を 10^{-4} M から 10^{-7} M まで変化させて上記のように 2 時間培養した。

II. 結 果

マクロライドのサイトカイン産生刺激作用

末梢血中付着細胞を RPMI 1640+10% FCS に浮遊させて、諸濃度のマクロライド剤と 24 時間培養した。各実験毎に、つまり末梢血を採取した個人毎に基礎産生量と反応性は異なるものの、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ジョサマイシンは容量依存的に IL-1 α の産生を刺激した。産生の至適濃度は各々の薬剤で異なっていた (Table 1)。IL-1 α の産生量は植え込んだ細胞数に依存しており、 4×10^6 /ml 以上でプラトーになった (Fig. 2)。IL-1 β の産生に対して

も同様の結果であった。また、付着細胞をエリスロマイシンと 4 時間から 72 時間培養して、時間毎にサイトカインを測定した。その結果、IL-1 の産生は培養後 8 から 12 時間頃に最高値をとり、以後は減少した (Fig. 1)。また、エリスロマイシンとクラリスロマイシンの TNF の産生への影響を検討したが、その刺激作用は弱く、LPS 存在下で初めて容量依存的に産生を刺激した (Table 2)。また、MTT アッセイによって、リンパ球および単球/マクロファージ増殖能への影響を検討した。 $5 \sim 10 \times 10^5$ /ml の付着細胞または 1×10^6 /ml の非付着細胞と LPS $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに一部ではエリスロマイシン、クラリスロマイシン、ジョサマイシンの各 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を加えて、48 時間培養し、MTT アッセイを行った。その結果、付着細胞、非付着細胞のどちらでも、MTT 活性は濃度依存性に低下するか、または変化しなかった (Fig. 3)。

サイトカイン産生に対するプライミング効果

付着細胞を RPMI 1640+10% FCS+polymyxin B $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 中で、一部は、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシン、またはクラリスロマイシンと共に 37°C 1 時間孵置してから、洗浄して LPS と 23 時間培養すると、あらかじめエリスロマイシンを加えて孵置した方が、IL-1 の産生は増加した (Table 3)。したがって、エ

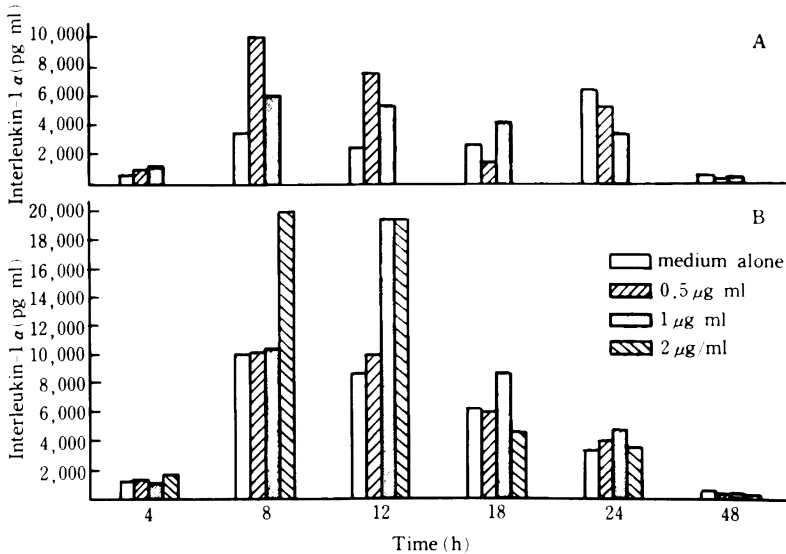


Fig. 1. Sequential analysis of the effect of macrolides on the production of IL-1 α .

2×10^6 /ml adherent cells were incubated with clarithromycin (A: 0, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or erythromycin (B: 0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 4–8 h. Both A and B are representative cases of three experiments, respectively.

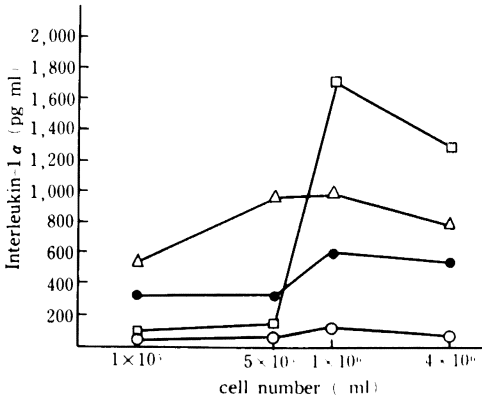


Fig. 2. Stimulatory effect of erythromycin on the production of IL-1 α .

Representative case of three experiments: 1×10^5 ml— 4×10^6 ml adherent cells were incubated with medium alone (○—○), 1 μ g/ml (●—●), 2 μ g/ml (△—△), 10 μ g/ml (□—□) erythromycin.

リスロマイシンは付着細胞に作用してIL-1を産生させると共に、その後のIL-1産生刺激に対して強く反応するようにプライミングする作用もあることが示唆された。クラリスロマイシンではこのような作用は見られなかった。

マクロライドのサイトカイン産生機序

エリスロマイシンのIL-1産生がどのような機序によって起こるかを検討するために、選択的Na⁺/K⁺ ATPase阻害剤であるouabainと、選択的protein kinase C阻害剤のH-7、選択的calmodulin阻害剤のW-7を用いた。付着細胞をエリスロマイシンと培養する際に、これらを種々の濃度で添加した。その結果、2時間培養して洗浄後22時間培養したところ、いずれにおいても濃度依存性にIL-1 α の産生量は減少した (Table 4)。同様に、各々 10^{-3} M, 3×10^{-5} M, 1×10^{-5} Mの濃度で各時間培養して洗浄して計24時間培養したところ、いずれにおいても培養時間依存性にIL-1 α の産生量は減少した。LPSとrHuIFNでも同様にこれらの阻害剤でIL-1 α の産生

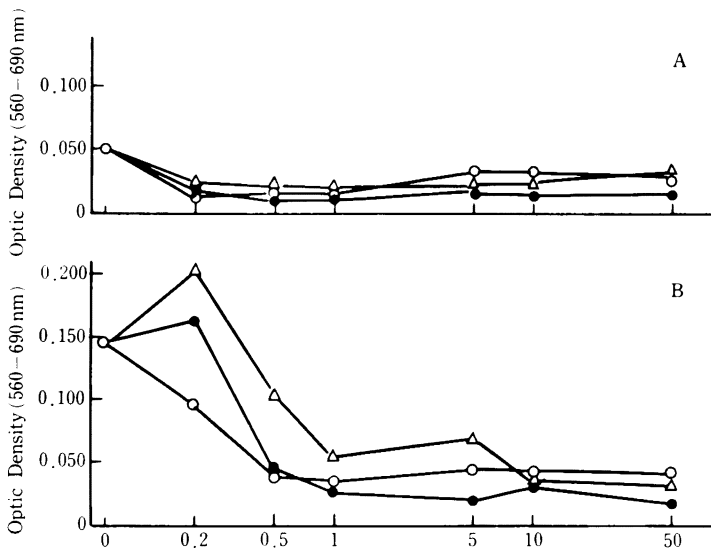


Fig. 3. Influence of macrolides on the proliferative activity of lymphocytes and monocytes.

A: 5×10^5 ml adherent cells were incubated with 1 μ g/ml LPS and a concentration of erythromycin (○—○), clarithromycin (●—●) or josamycin (△—△) for 48 h, and an MTT assay was performed. Representative case of six experiments. B: 1×10^6 ml nonadherent cells were incubated with 1 μ g/ml LPS and a concentration of erythromycin (○—○), clarithromycin (●—●) or josamycin (△—△) for 48 h, and an MTT assay was performed. Representative case of six experiments.

Table 2. Stimulatory effects of macrolides on the production of TNF

$\mu\text{g/ml}$	0	0.2	0.5	1	2	5	10
Erythromycin	<1.0*	3.0	5.6	4.2	1.7	<1.0	<1.0
Clarithromycin	<1.0§	1.7	1.9	2.3	2.0	1.9	ND

1×10^6 /ml adherent cells were incubated with 10 ng/ml lipopolysaccharide and erythromycin or clarithromycin at the indicated concentrations for 24 h.

* JRU/ml. mean value of three experiments. § JRU/ml. mean value of two experiments.

Table 3. Priming effect of macrolides on the production of IL-1 α

Cells+medium	1 h inc. → cells+medium	23 h inc. → IL-1	115 pg/ml
Cells+medium	1 h inc. → cells+LPS	23 h inc. → IL-1	1,120 pg/ml
Cells+erythromycin	1 h inc. → cells+medium	23 h inc. → IL-1	148 pg/ml
Cells+erythromycin	1 h inc. → cells+LPS	23 h inc. → IL-1	1,650 pg/ml
Cells+clarithromycin	1 h inc. → cells+medium	23 h inc. → IL-1	140 pg/ml
Cells+clarithromycin	1 h inc. → cells+LPS	23 h inc. → IL-1	940 pg/ml

1×10^6 /ml adherent cells were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ polymyxin B with/without 1 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin or clarithromycin in RPMI 1,640+10% FCS for 1 h washed twice, and then incubated with 3 $\mu\text{g/ml}$ polymyxin B with/without LPS for 23 h. Representative case of three experiments.

Table 4. Dose-dependent inhibition with ouabain, H-7 or W-7 on the erythromycin effect

ouabain (M)	(-)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
IL-1 α (%)*	100	59	42.9	34.9	6.9
H-7 (M)	(-)	3×10^{-7}	3×10^{-6}	3×10^{-5}	3×10^{-4}
IL-1 α (%)*	100	102.5	74.8	49.2	34.4
W-7 (M)	(-)	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
IL-1 α (%)*	100	64	76.8	55.8	20.8

1×10^6 /ml adherent cells were incubated with 1 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin for 3 min, and ouabain, H-7 or W-7 of each concentration were added for 2 h, washed twice, and then cells were incubated with 3 $\mu\text{g/ml}$ polymyxin B for 22 h.

* mean value of three experiments.

Table 5. Time-dependent inhibition of ouabain, H-7 or W-7 on the erythromycin effect

	medium	ouabain 10^{-3}M				H-7 $3 \times 10^{-5}\text{M}$			
Inc. time		1 h	2 h	3 h	4 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Erythromycin 1 $\mu\text{g/ml}$	430	380	210	135	94	340	135	135	40
LPS 10 ng/ml	450	ND	ND	ND	70	ND	ND	ND	35
rHuIFN 300 U/ml	2,000	ND	ND	ND	725	ND	ND	ND	620

1×10^6 adherent cells were incubated with 1 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin/10 ng/ml LPS/300U/ml rHuIFN γ and 10 $\mu\text{g/ml}$ polymyxin B for 3 minutes, and 10^{-3} M ouabain or 3×10^{-3} M H-7 were added for each time, washing twice, and then cells were incubated with 3 $\mu\text{g/ml}$ polxmyxin B for 23, 22, 21 or 20 h.

Representative case of four experiments.

が減少した (Table 5)。

なお、マクロライド剤のIL-1産生に与える影響を検討する際に、RPMI 1640+10% FCSにpolymyxin B 10 µg/mlを加えて37°Cで2時間解置した後、洗浄して細胞を加えて培養すると、polymyxin Bを添加しないよりもIL-1の産生量は1/2~1/3に減少した。したがって、RPMI 1640+10% FCS中にはLPSが混入していることが推定される。そこで実際にエンドトキシン測定キット(エンドスペース、生化学工業製)でFCS中のエンドトキシン量を測定したところ、411.2 pg/mlの混入が見られた。

III. 考 察

マクロライド系抗生物質は*in vitro*において、末梢血中単核細胞から、容量依存的にIL-1の産生を刺激することが示唆された (Table 1)。IL-1は多くの細胞群から産生されていることが知られている。詳細は省略するが、末梢血中単核細胞と付着細胞からのIL-1 α とIL-1 β の産生量を比較すると、付着細胞からののが約2倍であり、また付着細胞1 $\times 10^6$ /mlにヒツジ赤血球とのロゼット法で分離したT細胞を5 $\cdot 10^5$ /ml加えると産生量は逆に1/3に減少したことから、マクロライド剤によって産生が刺激されたIL-1の細胞起源は付着細胞であることがわかった。また、TNFの産生をも容量依存的に刺激することが分かったが、その作用はIL-1に対してよりも弱く、10 ng/ml以上のLPSの存在が必要であった (Table 2)。RocheらはEMは*in vitro*でIL-1の産生に影響しないと主張しているが、彼らの実験での濃度は10~100 µg/mlとかなり高い¹⁴⁾。実際我々もこのように高い濃度では産生しないか抑制することを確認している (Table 1)。これは高い濃度では細胞増殖能を抑制すること (Fig. 3)と関連しているだろう。

マクロライド剤はサイトカインの産生を直接刺激するのみならず、IFN γ などと同様にLPSなどの刺激によるサイトカインの産生をプライミングすることも考えられた (Table 3)。我々は、さきにエリスロマイシンを経口投与すると、末梢血中単核細胞と肺泡マクロファージからのIL-1とTNFの産生が増強することを示したが¹⁵⁾、その際に細胞をPHAやIFN γ と共に培養するとエリスロマイシン非投与時よりも産生はさらに増強した。さらに、*in vitro*でエリスロマイシンがcytokineの産生を刺激した末梢単核細胞の本体は上記のように付着細胞であると考えられること、およびエリスロマイシン投与時の血中濃度は*in vitro*で用いた濃度と近似していることなどからも、エリスロマイシンはサイトカイン産生を*in vitro*のみならず、

体内でもプライミングすることが示唆される。

*In vitro*での産生刺激作用はエリスロマイシンに限らず、同じ14員環系マクロライドのクラリスロマイシンや16員環系マクロライドのジョサマイシンなど、他のマクロライド剤にも共通のものであったが、16員環系マクロライド剤の場合、かなり高濃度でないと刺激が起こらない (Table 1)。ジョサマイシンを1,000 mg経口投与した場合、最高血中濃度は2.6 µg/mlである¹⁶⁾。したがって、16員環系マクロライド剤のジョサマイシンでは通常の投与量ではサイトカイン産生刺激は弱いと思われる。

各実験で示したように、実験毎にIL-1の基礎的産生量(RPMI+FCSの存在のみ)と各種刺激因子への反応性はかなり異なっていた。これはすでに多くのIL-1産生に関する研究で指摘されているごとく¹⁹⁻²¹⁾、採取した細胞の反応性の個人差が大きく関与しているものと考えられる。またデータは示さないが、同じ個人からの細胞でもその時によって反応性が異なっていた。何故反応性の個人差が強いのかは不明である。また、FCSにはかなりのエンドトキシンが混入しているので、用いたFCSのロット間の差も影響していると思われる。したがって、より多くの実験の集積が望まれる。

マクロライド剤によるIL-1の産生刺激の時間的推移はLPSでみられるそれと²²⁾ほとんど同じである。単球は刺激を受けて初めてIL-1遺伝子が発現されるといわれるが²³⁾、我々の実験系ではマクロライド剤無添加で培養してもIL-1が産生された。polymyxin Bを培養系に加えるとIL-1の産生量は減少した。また実験に用いたFCS中にエンドトキシンが400 pg/ml程度混入していた。したがって、マクロライド剤の産生刺激はエンドトキシンによる刺激への上乗せ効果と考えられる。polymyxin Bを加えても基礎的な産生量は50 pg/ml程度あるので、完全に中和できていないと思われる。したがって、マクロライド剤が単独でサイトカインを産生するかどうかは今後の課題である。しかし、エリスロマイシンとクラリスロマイシンは、10 ng/mlから1 µg/mlの濃度のLPS存在下で、LPS無添加時と同様に濃度依存性にIL-1の産生を刺激したので、LPSとは異なる機序によって産生を刺激していると考えられる。

マクロライド剤がサイトカインを産生する機序について若干の検討を試みたところでは、エリスロマイシンの産生刺激はNa⁺,K⁺-ATPase, protein kinase C, calmodulinのそれぞれ選択的阻害剤であるouabain, H-7, W-7によって部分的に抑制された。

マウスのマクロファージでは、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF), LPS が Na^+ , K^+ -ATPase を刺激し²⁴⁾, LPS による IL-1 の産生刺激は PKC, calmodulin を介する経路で起こっている²⁵⁾. calmodulin はカルシウム依存性反応を媒介して PG の産生を起こしたり, クッパー細胞の貪食能を促進する²⁶⁾. 予備的にエリスロマイシンで付着細胞を刺激したところ, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で PGE₁ が 1,050 pg/ml から 1,650 pg/ml に増加した。もちろん, エリスロマイシンによって産生された IL-1 を介して PGE₁ が産生された可能性も否定できない。また, エリスロマイシンは貪食能を高める^{5,6,16)}。マクロライド剤の産生刺激機序を解明するには, 実際に Na^+ , K^+ -ATPase や, PKC, calmodulin を測定することが必要であるが, 少なくともこれらの経路が関与していることが示唆される。

我々は, マクロライド剤がマクロファージ系幹細胞の分化増殖を高めることをすでに報告している²⁷⁾。この作用はエリスロマイシン, ロキシスロマイシン, クラリスロマイシンなど 14 員環系に特有であり, ジョサマイシンやミデカマイシンなどの 16 員環系はむしろ抑制した。サイトカイン産生における 14 員環系と 16 員環系の作用の比較からすると, マクロファージ系幹細胞分化増殖作用と IL-1 産生刺激作用とは同じ局面で考えることはできないかも知れない。しかし, エリスロマイシンのみならず, 14 員環系マクロライド剤は *in vitro* において単球/マクロファージ系の幼若細胞と成熟細胞の双方に刺激的に働くことが示唆された。これはマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と同様の作用であり²⁸⁻³⁰⁾, エリスロマイシンの非特異的感染防御作用とどのようにかかわっているのか興味深い。また, IL-1 は非特異的な感染防御作用を持つことが報告されている³¹⁻³⁷⁾。これは IL-1 が *in vivo*, *in vitro* で GM-CSF を産生させる³⁸⁻⁴²⁾ こととの関連が報告されている³⁸⁾。今回の研究で示したマクロライド剤のサイトカイン産生作用や直接的なマクロファージへの作用が, 感染防御作用とどの程度かかわっているのかは今後の課題である。

文 献

- 1) Ras G J, Anderson R, Eftychis H A, Koch U, Theron A, Vanwyk H A, Oliver L R: Chemoprophylaxis with erythromycin stearate or amoxicillin in patients with chronic bronchitis-effects on cellular and humoral immune functions. SA Med J 66: 955~958, 1984
- 2) Ras G J, Anderson R: An *in-vitro* study of oral therapeutic doses of co-trimoxazole and erythromycin stearate on abnormal polymorphonuclear

- clear leukocyte migration. J Antimicrob Chemother 17: 185~193, 1986
- 3) Aho P, Mannisto P T: Effects of two erythromycins, doxycycline and phenoxymethyl-penicillin on human leukocyte chemotaxis *in vitro*. J Antimicrob Chemother 21 (Suppl 1): 29~32, 1988
- 4) Anderson R: Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion *in vitro* by inhibition of leukoattractant activated superoxide generation and autooxidation. J Infect Dis 159: 966~973, 1989
- 5) Frascini F, Scaglione F, Ferrara F, Marelli O, Braga P C, Teodoli F: Evaluation of the immunostimulating activity of erythromycin in man. Chemotherapy 32: 286~290, 1986
- 6) Capelli A, Capelli O, Azzolini L, Richeldi L, Prandi E, Velluti G: Activities of human alveolar macrophages (HAMs). Note 1: Observations on phagocytosis and bacterial killing in the presence of miocamycin. Chemioterapia 7: 89~95, 1988
- 7) Fernandes A C, Anderson R, Theron A J, Joone G, Van Rensburg C E J: Enhancement of human polymorphonuclear leukocyte motility by erythromycin *in vitro* and *in vivo*. SA Med J 66: 173~177, 1984
- 8) Lavro M T: Macrolide et immunité. Rev Med Interne 8: 519~525, 1987
- 9) 沢木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 伊藤新作, 成田亘啓: 慢性下気道感染における Erythromycin 長期化学療法法の検討—第 1 報: Amoxicillin との対比—感染症誌 60: 37~44, 1986
- 10) 工藤翔二, 植竹健司, 荻原弘一, 平山雅清, 許栄宏, 木村 仁, 杉山幸比古: びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン少量長期投与の臨床効果に関する研究。日胸疾会誌 25: 632~643, 1987
- 11) Ghione M, Pugliese A, Valpreda A, Salomone C, Martinetto P, Tovo P A: The effect of some antibiotics on interferon production. In: Antibiosis and host immunity (Szentivanyi A, Friedman H, Gillissen G ed.), p 133~139, Plenum Press, NY, 1987
- 12) Biglino A, Forno B, Pollono A, Busso M, Mascolo M, Pugliese A, Tovo P, Giannini P: Effect of erythromycin on the immune response and interferon production. Immunopharmacology 14: 101~106, 1987
- 13) Roche Y, Pocardalo J J, Gougerot-Pocardalo M-A: Effet des antibiotiques sur la production *in vitro* d'IL-1 par les monocytes humains. Path Biol 35: 1422~1425, 1987
- 14) 片平潤一, 春木宏介, 柴田雄介, 菊池 賢, 長谷川裕美, 戸塚恭一, 清水喜八郎: エリスロマイシンのインターロイキン-1, 腫瘍壊死因子産生刺激作用, 第一報 *in vivo* での作用。Chemotherapy 39: 320~

- 328, 1991
- 15) 片平潤一, 清水喜八郎: エリスロマイシンのマクロファージ増殖・機能刺激作用. 医学のあゆみ 147: 209~210, 1988
- 16) Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 89: 271~277, 1986
- 17) 川島正好, 酒井克治, 中尾純一: Josamycin の基礎的研究ならびに臨床試用成績について. Chemotherapy 17: 694~700, 1969
- 18) Hazuda D J, Lee J C, Young P R: The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. J Biol Chem 263: 8473~8479, 1988
- 19) Arend W P, Gordon D F, Wood W M, Janson R W, Foslin F G, Jammal S: IL-1 β production in cultured human monocytes is regulated at multiple levels. J Immunol 143: 118~126, 1989
- 20) Peppoloni S, Bossu P, Boraschi D, Tagkiabue W: A short synthetic peptide fragment of human interleukin-1 β increase both human and murine natural killer activity. Nat Immun Cell Growth Regul 8: 10~19, 1989
- 21) Bailly S, Mahe Y, Ferrua B, Fay M, Tursz T, Wakasugi H, Gougerot-Posicalo M-A: Quinolone-induced differential modification of IL-1 α and IL-1 β production by LPS-stimulated human monocytes. Cell Immunol 128: 277~288, 1990
- 22) Durum S K, Schmidt J A, Oppenheim J J: Interleukin-1: An immunological perspective. Ann Rev Immunol 3: 263~287, 1986
- 23) Vairo G, Hamilton J A: Activation and proliferation signals in murine macrophages: Stimulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity by hemopoietic growth factors and other agents. J Cell Physiol 134: 13~24, 1988
- 24) Brandwein S R: Differential regulation of soluble interleukin 1 release and membrane expression by pharmacologic agents. Agents Actions 30: 381~392, 1990
- 25) Watanabe S, Hirose M, Miyazaki A, Tomono M, Takeuchi M, Kitamura T, Namihisa T: Calmodulin antagonists inhibit the phagocytic activity of cultured Kupffer cells. Lab Invest 59: 214~218, 1988
- 26) Katahira J, Hasegawa H, Shibata Y, Kikuchi K, Watanabe T, Totsuka K, Shimizu K: The effect of macrolides on the proliferation of hemopoietic progenitor cells. Int J Exp Clin Chemother 3: 10~18, 1990
- 27) Cheers C, Stanley E R: Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. Infect Immun 56: 2972~2978, 1988
- 28) Hume D A, Pavli P, Donahue R E, Fidler I J: The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF 1) on the murine mononuclear phagocyte system *in vivo*. J Immunol 141: 3405~3409, 1988
- 29) Wang M, Friedman H, Djeu J Y: Enhancement of human monocyte function against *Candida albicans* by the colony-stimulating factors (CSF): IL-3, granulocyte-macrophage CSF, and macrophage-CSF. J Immunol 143: 671~677, 1989
- 30) Ozaki Y, Ohashi T, Minami A, Nakamura S: Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 α . Infect Immun 55: 1436~1440, 1987
- 31) Czuprynski C, Brown J F: Recombinant murine interleukin-1 α enhancement of nonspecific antibacterial resistance. Infect Immun 55: 2061~2065, 1987
- 32) Van der Meer J W M, Barza M, Wolfe S, Dinarello C A: A low dose of recombinant interleukin-1 protects granulocytopenic mice from lethal Gram-negative infection. Proc Natl Acad Sci USA 85: 1620~1623, 1988
- 33) Gladue R, Girard A, Newborg M: Enhanced antibacterial resistance in neutropenic mice treated with human recombinant interleukin-1 beta. Agents Actions 24: 130~136, 1988
- 34) Nakamura S, Minami A, Fujimoto K, Kojima T: Combination effect of recombinant interleukin-1 α with antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 33: 1804~1810, 1989
- 35) Pecyk R, Fraser-Smith E B, Mattherws T R: Efficacy of interleukin-1 β against systemic *Candida albicans* infections in normal and immunosuppressed mice. Infect Immun 57: 3257~3258, 1989
- 36) McKintyre K W, Unowsky J, Delorenzo W, Benjamin W: Enhancement of antibacterial resistance of neutropenic, bone marrow-suppressed mice by interleukin-1 α . Infect Immun 57: 48~54, 1989
- 37) Campanile F: Antibacterial resistance induced by rIL-1 in myelosuppressed mice: effect of treatment schedule and correlation with CSF in the bloodstream. Cellular Immunol 128: 250, 1990
- 38) Kaushansky K, Lin N, Adamson J W: Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hemopoietic response to inflammation. J Clin Invest 81: 92~97, 1988
- 39) Herrmann F, Oster W, Meuer S C, Lindemann A, Mertelsmann R H: Interleukin 1 stimulates T

- lymphocytes to produce granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *J Clin Invest* 81: 1415~1418, 1988
- 40) Lee M, Segal G M, Bagby G C: Interleukin-1 induces human bone marrow-derived fibroblasts to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Exp Hematol* 15: 983~988, 1987
- 41) Zsebo K M, Yuschenkoff V N, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello C A, Brown M A, Altrock B, Bagby G C: Vascular endothelial cells and granulopoiesis: Interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood* 71: 99~103, 1988

KINETIC STUDIES ON THE EFFECTS OF MACROLIDES ON CYTOKINE PRODUCTION

Jun'ichi Katahira, Ken Kikuchi, Yusuke Shibata,
Hiromi Hasegawa, Kyoichi Totsuka and Kihachiro Shimizu
Department of Medicine, Tokyo Women's Medical College,
8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo, Japan

We described in the last paper how erythromycin given orally enhanced the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by both peripheral blood mononuclear cells and alveolar macrophages. Thus we investigated the kinetics of the immunological action of erythromycin and other macrolides *in vitro*. When peripheral blood adherent cells from normal volunteers were incubated with erythromycin, clarithromycin or josamycin, the production of interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor was enhanced dose-dependently. This stimulatory effect depended on the number of cells cultured, and peaked around 8 to 12 h after incubation. These macrolides also had a priming effect, producing interleukin-1 α . The production of interleukin-1 was partially blocked by ouabain, H-7 and W-7. We therefore hypothesize that Na⁺, K⁺, -ATPase, protein kinase C and/or calmodulin play a role in the stimulatory effect of macrolides.