

## 【原著・基礎】

## Explant 培養法を用いた鼻粘膜上皮の増殖分化に対するマクロライド系薬の影響

藤原 啓次・山中 昇

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室\*

(平成 12 年 6 月 28 日受付・平成 12 年 7 月 10 日受理)

マクロライドの少量長期投与は副鼻腔気管支症候群や慢性副鼻腔炎に対して広く用いられ、その臨床的有効性については多数報告されているが、作用機序については依然説明されていない点も多い。特に上皮に対しての直接の作用についてはほとんど検討されていないのが現状である。今回われわれは鼻粘膜上皮小片から周囲に伸び出す上皮 (Outgrowth) を用いた Explant 培養法により roxithromycin (RXM) による鼻粘膜上皮の増殖度、分化度について検討した。方法は手術時に採取した鼻粘膜、副鼻腔粘膜 (10 名) の繊毛細胞の多い部分を小片に細切り、4 週間培養した。培養後 3~4 日目の培養上皮に培養液中の RXM 濃度が  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L となる群と、なにも加えない群で検討した。上皮の増殖部は Outgrowth 部位の面積を RXM 添加前の面積との差で算出した。上皮の分化は Outgrowth 部位の繊毛細胞数をカウントし、RXM 添加前の繊毛細胞数との差で算出した。上皮の伸び率は第 1 週から第 4 週にかけて RXM  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L と  $10^{-6}$  mol/L 添加群ではなにも加えない群、 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L と  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L 添加群に比べて大きい増殖を認めた。繊毛細胞の出現率においては  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L の濃度の RXM を加えた群で他の群に比べて多い傾向を認めた。今回の結果では低濃度の RXM において、抗生剤本来の作用以外に直接上皮の増殖および分化を促す作用が示唆された。またこの結果は RXM による副鼻腔炎に対する作用機序の一部であり、濃度特異性が認められたことは、少量投与の濃度を決定する上でも役立つものである。

**Key words:** roxithromycin, 初代鼻粘膜上皮培養, 上皮増殖, 上皮分化

マクロライドの少量長期投与は副鼻腔気管支症候群や慢性副鼻腔炎に対して広く用いられている。その臨床的有効性については多数報告されている<sup>1,2)</sup>が、実際にどれだけ少量であればいいのか用量は不明確な点もある。また、マクロライドの少量長期投与の作用機序については薬剤感受性に関係なく、低用量で効果を示すことから、菌自体のみならず、菌のレセプター側の粘膜や免疫系に作用すると考えられる。粘膜上皮に対する作用としては、呼吸上皮の  $\text{Cl}^-$  チャンネル阻害による水分分泌抑制とムチン産生抑制による過剰分泌抑制作用、気道上皮および好中球自身の IL-8 など好中球遊走因子の遊離抑制による好中球集積抑制作用と、その結果もたらされる好中球エラスターゼやデフェンシンなどの気道上皮傷害因子の減少がある。これらは、気道の持続感染と炎症の悪循環を断ち切って、疾患を改善に導くと考えられる<sup>3)</sup>が、依然説明されていない点も多い。

粘膜上皮を用いた研究において、Explant 培養法では外側へ伸び出した上皮 (Outgrowth) 部位においては基底細胞と上皮細胞の多層性となっている。このことが上皮に分化、増殖を促していることから、*in vivo* に非常に近い状況で *in vitro* の実験を行うことができる<sup>4)</sup>。Explant 培養法では非常に分化した組織が得られることから、Outgrowth 部位における繊毛を観察することにより、erythromycin, RXM 添

加<sup>5)</sup>あるいは Ca 添加<sup>6)</sup>による繊毛運動の変化についての報告や Outgrowth 部の上皮増殖についても報告されている<sup>7,8)</sup>。今回は鼻粘膜の Explant 培養法<sup>9)</sup>を用いることにより、鼻粘膜上皮小片から周囲に伸び出す Outgrowth とそこに認められる繊毛上皮への分化について、ニューマクロライドの 1 つである roxithromycin (RXM) を添加することにより、鼻粘膜上皮の増殖度、分化度の変化について観察し、RXM の作用機所およびその有効濃度について検討し、興味深い成績が得られたので報告する。

## I. 対象と方法

対象は当院および関連病院で平成 8 年 12 月から平成 10 年 3 月までに行った手術症例から採取した鼻粘膜、副鼻腔粘膜を用いた。症例は慢性副鼻腔炎 7 例、上顎骨骨折 3 例である。年齢は 16 歳から 53 歳、男性 9 名、女性 1 名である。それぞれの症例は鼻内所見でアレギー所見を認めず、鼻汁中好酸球は陰性であった。末梢血検査でも好酸球の増多を認めなかった。採取粘膜を実験に用いるにあたり、患者の同意を得て行った。採取した鼻粘膜、副鼻腔粘膜は Transfer medium へ 3 時間浸け滅菌を行った。Transfer medium は Eagle's minimal essential medium, 10% fetal calf serum (FCS), vancomycin hydrochloride (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), amphotericin B

(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), gentamicin (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), penicillin G (200 U/mL), 0.05 mol/L HEPES からなる。採取した鼻粘膜、副鼻腔粘膜の繊毛運動の認められる部位から、約 1 mm 四方の粘膜上皮 (Explant) を採取し、culture plate に置き、4 週間培養を行った (Fig. 1)。培養液は Ham's F-12 medium, 10% FCS, insulin 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , transferrin 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , epidermal cell growth factor 10 ng/mL, hydrocortisone  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L, Penicillin G 50 U/mL, streptomycin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を用いた。この Explant からその周囲に伸びだした上皮について観察を行った。RXM 濃度に関する検討として、培養後 3~4 日目の培養上皮に培養液中の RXM 濃度が  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L となる群と RXM 非添加群 (コントロール) で検討した。上皮の増殖は Outgrowth 部位の面積から各濃度の RXM を添加前の培養上皮の Outgrowth 部位の面積を差し引いた面積とした。上皮の分化は Outgrowth 部位の繊毛細胞 (顕微鏡下に繊毛運動が確認できた細胞) 数をカウントし、各濃度の RXM を添加前の培養上皮の Outgrowth 部位の繊毛細胞数を差し引いた繊毛細胞数とした。観察は第 1, 2, 3, 4 週目に位相差顕微鏡を用い、画像解析により検討した。統計方法は ANOVA 法を用い、危険率 0.05 未満を有意差ありとした。

## II. 結 果

上皮の増殖では、コントロール群で第 1 週で  $44.0 \pm 7.6 \times 10^{-2}$  (mean  $\pm$  standard error)  $\text{mm}^2$  と伸びますが、第 2 週で  $44.0 \pm 6.8 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ , 第 3 週で  $37.0 \pm 8.1 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ , 第 4 週で  $41.5 \pm 8.5 \times 10^{-2} \text{mm}^2$  と 2 週から 4 週までほとんど増殖を認めなかった。RXM  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L 添加群

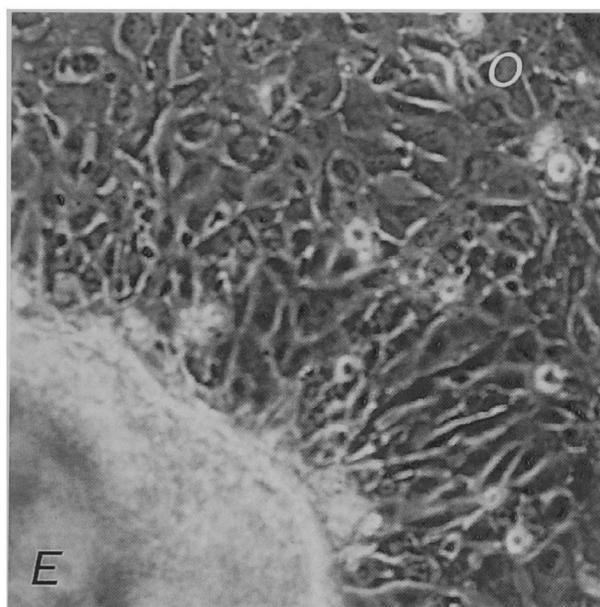


Fig. 1. Explant culture.  
E: Explant, O: Outgrowth.

では第 1 週で  $45.3 \pm 6.3 \times 10^{-2} \text{mm}^2$  であるが、第 2 週で  $75.4 \pm 35.1 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ , 第 3 週で  $107.5 \pm 80.2 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ , 第 4 週で  $100 \pm 73.5 \times 10^{-2} \text{mm}^2$  と 2 週から 3 週にかけてもっとも大きい増殖を認めた。RXM  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 添加群でも RXM  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L 添加群と同様の増殖を認めた。しかし、 $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L よりも高い濃度の  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L よりも低い濃度の  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L の RXM 添加群では第 1 週目までの増殖を認めるが、以降の第 2 週, 3 週, 4 週では上皮の増殖を認めず、コントロール群とほぼ同様の傾向を認めた (Fig. 2)。

繊毛細胞の出現数は、コントロール群において第 1 週で  $44.1 \pm 20.4$  と増加するが、第 2 週で  $57.7 \pm 41.8$ , 第 3 週で  $51.4 \pm 42.6$ , 第 4 週で 0 という結果であった。繊毛細胞数は 1, 2, 3 週まで繊毛細胞数は一定であり、第 4 週では消失していた。RXM  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 添加群は第 1 週で  $220.1 \pm 112.5$  と急激に増加するが、第 2 週で  $205.5 \pm 110.6$ , 第 3 週で  $131.7 \pm 65.8$ , 第 4 週で  $97.1 \pm 62.6$  という結果であった。第 1 週で急激に繊毛細胞数は増加し、その後減少するが、第 4 週でもかなり多数の繊毛細胞を観察することができた。第 1, 2, 3, 4 週において、他群に比べて有意差を認めた。RXM  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L 添加群は第 1 週で  $54.5 \pm 26.5$  と増加するが、第 2 週で  $45.1 \pm 26$ , 第 3 週で  $11.7 \pm 6.6$ , 第 4 週で  $12.2 \pm 7.4$  という結果であり、上皮の増殖に比べて、繊毛細胞数は増加しなかった。 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L の RXM 添加群では第 1 週でも繊毛細胞の増加を少数認めるのみで、2 週以降は繊毛細胞を認めなかった (Fig. 3)。

## III. 考 察

びまん性汎気管支炎に対してマクロライド系抗生剤の少量長期投与の効果が報告されて以来<sup>1)</sup>, 耳鼻咽喉科領域でも 14 員環系マクロライドの少量長期投与療法が行われるようになった<sup>2)</sup>。しかし、慢性副鼻腔炎の治療では抗菌作用は同等であるが、吸収性に優れた clarithromycin (CAM) や RXM などのいわゆるニューマクロライドが多く使用されており、鼻茸が消失するなどの効果が報告されている<sup>10-12)</sup>。これらのマクロライドの効果は抗菌作用以外の作用が知られており、モチリン類似作用や抗炎症・免疫作用が報告されている<sup>13,14)</sup>。サイトカインに対する効果として線維芽細胞の増殖を抑制し、間接的に IL-8 の産生を抑える<sup>15,16)</sup>, IL-8 の分泌を抑制し好中球が粘膜上皮に接着するのを抑制する<sup>17,18)</sup>, 鼻粘膜への効果としては、繊毛機能の効果を高める<sup>5,19)</sup>, 電解質分泌に対する効果<sup>20)</sup>, 杯細胞分泌の抑制<sup>21)</sup>, などが報告されている。しかし、上皮への直接の効果は現在まで確認されていなかった。今回の実験では  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L と  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L の濃度で RXM を添加した場合に上皮の増殖が 3 週と 4 週と長期培養で多くなる傾向が認められ、繊毛細胞では  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L で有意に多く認めら

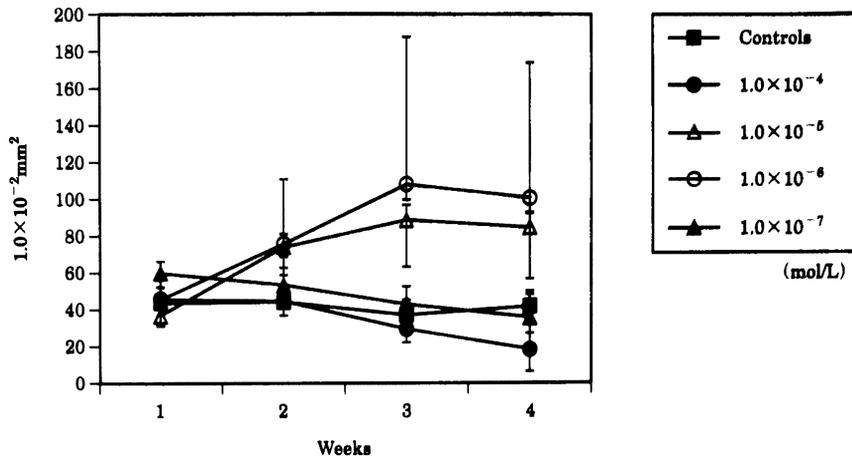


Fig. 2. Area of outgrowth with roxithromycin.

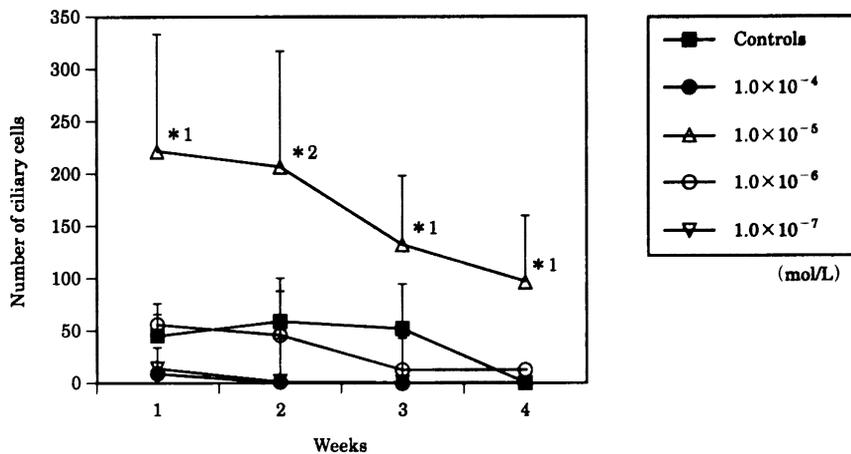


Fig. 3. Number of ciliary cells with roxithromycin.

\*1  $p < 0.05$  vs. controls,  $1.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-6}$  and  $1.0 \times 10^{-7}$  (mol/L).

\*2  $p < 0.05$  vs.  $1.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-6}$  and  $1.0 \times 10^{-7}$  (mol/L).

れた。この濃度はそれぞれ  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L が  $8 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L が  $0.8 \mu\text{g/ml}$  にあたり, RXM 1錠を服用直後および24時間後の血中濃度にあたる。石戸谷ら<sup>22)</sup>は副鼻腔粘膜組織中の濃度は0.5から1.5  $\mu\text{g/g}$ で主たる起炎菌の *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* に対して十分な抗菌力を発揮する濃度ではなかったということから, 上皮への作用は抗菌力を示す濃度よりも低濃度で出現すると考えられる。しかし, 高濃度の  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L と低濃度の  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L では上皮の増殖効果は認められなかった。このような上皮の増殖効果は臨床的には鼻内手術の術後にRXM併用群は非併用群に比べて, 鼻内所見, 内視鏡所見において有意に高い改善度として認められている<sup>23)</sup>。

鼻粘膜の初代培養法は鼻茸基部の粘膜や上顎洞粘膜を採取し, 約1mm四方に細切し, culture plate上で移植片(explant)から周囲へ伸びだす平坦化した上皮を位相差顕微鏡下に観察することから, 細胞数のカウント

は容易となり, 上皮の分化度を検討することができた。また, 多数の繊毛が周囲の繊毛細胞と連動して運動するのが観察された<sup>9)</sup>(Fig. 1)。Outgrowth上で繊毛細胞を観察することができたが, Heckmanら<sup>24)</sup>は気管粘膜の初代培養法を行い,  $^3\text{H}$ -チミジンを用いて, 上皮細胞の増殖部位を検討したが, 移植片と周囲に伸びだした部位で均一に増殖部位が認められたと報告していることから, 上皮での繊毛細胞の出現率は移植片の本来の繊毛細胞数に左右されないといえる。観察できた繊毛細胞出現数は  $10 \times 10^{-5}$  mol/Lの濃度のみで有意に高い出現率が認められた。田代ら<sup>25)</sup>は鼻粘膜初代培養細胞を用いた研究で, 繊毛運動において  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/Lに比べて  $10 \times 10^{-5}$  mol/Lの方が線毛運動が有意に増加しており, 森ら<sup>26)</sup>もマクロライドによる繊毛運動の賦活作用は高濃度より低濃度の方が著明であったと報告していることから, 繊毛上皮への分化, 繊毛運動の賦活作用に対する効果には至適濃度が存在することが示唆され興味深い。臨床的にも

宮本ら<sup>27)</sup>はCAM長期投与について用量設定試験で自覚症状および他覚所見について検討した結果では、CAM 100 mg 投与が常用量に比べて、高い有効性を認めたとしており、上皮の増殖、分化という二面から考えるとRXMにおいても低用量で高い効果を示すことが示唆された。

#### 文 献

- 1) 工藤翔二, 植竹健司, 萩原健司, 他: びまん性汎細気管支炎にたいするエリスロマイシン少量長期投与の臨床的効果に関する研究—4年間の治療成績。日胸疾会誌 25: 632~642, 1987
- 2) 菊池 茂, 洲崎春海, 青木彰彦, 他: 副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与。耳鼻臨床 84: 41~47, 1991
- 3) 工藤翔二: マクロライド少量長期投与の発端と現状。JOHNS 12: 207~211, 1996
- 4) Merchant D J: Terminally differentiating epithelial tissues in primary explant culture: a model of growth and development. In Vitor Cell. Dev. Biol. 26: 543~553, 1990
- 5) 田代 享, 竹野幸夫, 夜陣紘治, 他: マクロライド系抗生剤のヒト副鼻腔粘膜繊毛運動に及ぼす影響。Jpn. J. Antibiot. 52 (SA): 5~7, 1999
- 6) Girard P R, Kennedy J R: Calcium regulation of ciliary activity in rabbit tracheal epithelial explants and outgrowth. Eur J Cell Biol. 40: 203~209, 1986
- 7) Stoner G D, Harris C C, Connor R D, et al.: Putrescine stimulates growth of human bronchial epithelial cells in primary culture. In Vitro. 16: 399~406, 1980
- 8) Mahan J T, Donaldson D J: A serum-free primary culture system for studying cell-substrate interactions during newt epidermal cell migration. In Vitro Cell Dev Biol 24: 1023~1030, 1988
- 9) Fujihara K, Yamanaka N, Hard R, et al.: Morphologic and motility changes of nasal cilia in primary culture caused by Haemophilus influenzae. Ann Otol Rhinol Laryngol 105: 452~457, 1996
- 10) 羽柴基之, 宮本直哉, 馬場駿吉, 他: 慢性副鼻腔炎に対するエリスロマイシン誘導体(クラリスロマイシン)の効果。日鼻科 31: 269~280, 1993
- 11) 真崎正美, 森山 寛, 柳 清, 他: 慢性副鼻腔炎に対するロキシスロマイシン長期投与の臨床効果。耳展 37: 245~253, 1994
- 12) 山田武千代, 藤枝重治, 斉藤 等, 他: 薬物療法の適応と限界。日鼻科 38: 175~176, 1999
- 13) Itoh Z, Suzuki T, Inoue M, et al.: Gastrointestinal motor-stimulating activity of macrolide antibiotics and analysis of their side effects on the canine gut. Antimicrob Agents Chemother 26: 863~869, 1984
- 14) 小林正和: マクロライド系免疫系免疫抑制剤とT細胞シグナル伝達系。炎症・免疫とマクロライド。清水喜八郎, 大村 智, 工藤翔二: 医業ジャーナル社: p. 49~80, 1996
- 15) Nonaka M, Pawankar R, Yagi T, et al.: Effect of roxithromycin on IL-8 synthesis and proliferation of nasal polyp fibroblasts. Acta Otolaryngol. 539 (S 1): 71~72, 1998
- 16) 野中 学, Pawankar R, 八木聡明, 他: マクロライド抗生物質の線維芽細胞に対する影響について(第2報)。Jpn. J. Antibiot. 51 (SA): 112~115, 1998
- 17) Kawasaki S, Takizawa H, Yamamoto K, et al.: Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1499~1502, 1998
- 18) 鈴木秀明, 下村 明, 高坂知節, 他: 培養ヒト鼻粘膜上皮細胞のIL-8分泌とマクロライドによる抑制効果。Jpn. J. Antibiot. 50 (SA): 68~70, 1997
- 19) Sugiura Y, Ohashi Y, Nakai Y: Roxithromycin stimulates the mucociliary activity of the eustachian tube and modulates neutrophil activity in the healthy guinea pig. Acta Otolaryngol. 531: 34~38, 1997
- 20) 平野光芳, 岩田重信, 岡田泰申, 他: 気道繊毛上皮細胞の電解質分泌に対するマクロライドの効果。Jpn. J. Antibiot. 51 (SA): 152~154, 1998
- 21) 中田潤子, 玉置 淳, 金野公郎, 他: 気道杯細胞分泌に対するエリスロマイシン及びロキシスロマイシンの効果。Jpn. J. Antibiot. 50 (SA): 62~64, 1997
- 22) 石戸谷淳一, 飯野ゆき子, 鳥山 稔, 他: RXMの少量長期療法と鼻粘膜への組織移行。耳鼻臨床 88: 535~542, 1995
- 23) 佐伯忠彦, 湯本英二, 柳原尚明, 他: 鼻内視鏡手術の術後経過とRXM投与。耳鼻咽喉科展望, 40(補2): 114~120, 1997
- 24) Heckman C A, Marchok A C, Nettesheim P: Respiratory tract epithelium in primary culture: concurrent growth and differentiation during establishment. J. Cell Sci. 32: 269~291, 1978
- 25) 田代 享, 竹野幸夫, 夜陣紘治, 他: マクロライド系抗生剤のヒト副鼻腔粘膜繊毛運動に及ぼす影響。Jpn. J. Antibiot. 52 (SA): 5~7, 1999
- 26) 森 繁人, 斎藤 等, 山田武千代, 他: マクロライド系抗生剤の鼻粘膜線毛運動に及ぼす影響。耳展 38(補3): 220~227, 1995
- 27) 宮本直哉, 羽柴基之, 馬場俊吉: 慢性副鼻腔炎に対するクラリスロマイシン長期投与療法の用量設定試験(最終報告)。Jpn. J. Antibiot. 52(SA): 81~84, 1999

## Roxithromycin antibiotic induces outgrowth and differentiation in nasal mucociliary epithelia

Keiji Fujihara and Noboru Yamanaka

Department of Otorhinolaryngology Wakayama Medical College,  
811-1 Kimiidera, Wakayama city 641-0012, Japan

We evaluated the mechanism behind the efficacy of roxithromycin (RXM) in chronic infection to determine the influence of RXM on mucociliary epithelization by the outgrowth of mucociliary epithelial culture. We focused on the degree of epithelization by measuring the outgrowth of explant culture and on the degree of differentiation by counting the number of beating ciliary cells in the outgrowth epithelial sheet. The area of outgrowth cells with  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L and  $10^{-6}$  mol/L of RXM was higher than that of controls,  $10^{-4}$  mol/L and  $10^{-7}$  mol/L of RXM. The number of ciliary cells with  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L of RXM was significantly higher than in other groups. Based on the above data, we concluded that nasal epithelial cells were sensitive to RXM in growth and differentiation but in some optimal concentration.