

## 石松祐二 論文内容の要旨

### 主論文

Macrolide antibiotics induce apoptosis of human peripheral  
lymphocytes in vitro  
(ヒト末梢血リンパ球に対する in vitro でのマクロライド系抗菌薬の  
アポトーシス誘導能)

Yuji Ishimatsu, Jun-ichi Kadota, Tetsuji Iwashita, Towako Nagata, Hiroshi  
Ishii, Chieko Shikuwa, Hideyuki Kaida, Hiroshi Mukae, and Shigeru Kohno

International Journal of Antimicrobial Agents, 2004 Vol. 24(3), pp247-253.

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻

(指導教授：河野 茂教授)

### 緒言

臨床上びまん性汎細気管支炎(DPB)などに有効であるマクロライド系抗菌薬(MCL)は抗菌活性以外に抗炎症性作用なども報告されている。我々は以前 DPB の気管支肺胞洗浄液(BALF)中のリンパ球数が MCL 投与で減少する事を報告した。また、肺の慢性炎症の終息にアポトーシスによるリンパ球除去の重要性も最近報告されている。その為、今回、我々は MCL が DPB 患者の慢性気道炎症を改善させる機序の一つにリンパ球に対するアポトーシス誘導能の可能性を考え検討した。

### 方法

1) 抗菌薬：MCL は、クラリスロマイシン(CAM)、アジスロマイシン(AZM)、ジョサマイシン(JM)を、MCL 以外の抗菌薬は、セファゾリン(CEZ)、ピペラシリン(PIPC)、レボフロキサシン(LVFX)を用いた。

2) 単核球分離培養：健常ボランティアよりヘパリン採血し、単核球を FicoII 密度勾配遠心法にて単離した。その細胞を各種抗菌薬 2~200 µg/ml の存在下および抗菌薬なし、またコントロールとして 0.01%の DMSO を用いて培養した。

3) フローサイトメトリー解析：単核球を 12- 72 時間培養後、Annexin V と PI に

て、また FITC-Fas 抗体、FITC-FasL 抗体にて処理し、FACScan を用いて解析した。

### 結果と考察

各々の MCL 200  $\mu\text{g/ml}$  で 72 時間培養したリンパ球は、Annexin V 陽性細胞が有意に増加した。しかし、MCL 低濃度、MCL 以外の抗菌薬においては、Annexin V 陰性で、アポトーシスに影響しなかった。各 MCL200  $\mu\text{g/ml}$  濃度で 12 から 72 時間培養し、そのリンパ球を FITC- Annexin V と PI の二変量によるフローサイトメトリーで解析してみると、MCL 200  $\mu\text{g/ml}$  を加えることで早期のアポトーシス細胞群 (PI 陰性 Annexin V 陽性) は増加し、培養 12 時間から 48 時間に最高に達した。また、後期のアポトーシス及び壊死細胞群 (PI 陽性 Annexin V 陽性) は時間とともに徐々に増加し、培養 48- 72 時間後が最高に達した。また、アポトーシスを誘導する Fas-Fas ligand 系の検討でも、各々 MCL 高濃度でのみ Fas や FasL の発現が誘導された。

呼吸細気管支領域でのリンパ球を中心とした炎症細胞による慢性炎症が特徴である DPB 患者において MCL 長期投与が著効する。また、DPB 患者の BALF 中のリンパ球数も非感染下より細菌感染下の方が有意に多く、MCL 投与で BALF 中のリンパ球が減少することを我々は報告してきた。また、潜在的刺激性を有する粘膜抗原に暴露され活性化した粘膜固有層 T 細胞は、アポトーシスによって除去されることで粘膜の免疫反応が調節されることが最近明らかとなっている。さらに、ヒト腸上皮内リンパ球やマウス肺内のリンパ球は粘膜免疫システムを維持するために、Fas、Fas リガンドを発現し、アポトーシスを起こすことで、免疫制御がされることも報告されている。これらより、MCL 少量長期投与が DPB 患者の気道慢性炎症を改善させる機序の一つとして、MCL がリンパ球のアポトーシスを直接誘導する可能性を考えたが、今回の Annexin V と PI を用いた検討において、高濃度 MCL がヒト末梢血リンパ球に対して直接アポトーシスを誘導する作用を持つことが明らかとなった。さらにこのアポトーシスの誘導には Fas-Fas ligand 系が重要である可能性が示唆された。これらの誘導は MCL が高濃度においてのみ認められたが、MCL 濃度は血漿中より気道粘液において著明に高く、また、特に炎症部位で高値となる特徴を考慮すると、ここで示した高い薬剤濃度も、DPB での炎症部位においては十分上昇するものと考えられた。