

## 原 著

ブレオマイシン急性肺傷害における好中球接着浸潤に関わる分子の発現  
ならびに 14 員環マクロライドの抑制作用李 英姫 吾妻安良太 臼杵 二郎  
松田久仁子 青山 昭徳 工藤 翔二  
日本医科大学内科学第 4 教室Attenuated mRNA Induction of Molecules Associated with Neutrophil Migration by 14-Membered Ring  
Macrolides Inhibits Bleomycin Induced Acute Lung Injury in MiceYingJi Li, Arata Azuma, Jiro Usuki, Kuniko Matsuda,  
Akinori Aoyama and Shoji Kudoh  
Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

## Abstract

Background: Although the pathogenesises of interstitial pneumonia are not well understood, it has been reported that inflammatory cells, especially neutrophils, and their injurious substances play important roles in the progression of interstitial pneumonia. Erythromycin and other 14-membered ring macrolides ( 14-MRMLs ) have been reported to inhibit chronic airway inflammation by mechanisms of anti-neutrophil and several other anti-inflammatory activities. The present study was undertaken to investigate the effects and mechanisms of 14-MRMLs ( erythromycin: EM; clarithromycin: CAM; roxithromycin: RXM ) on an experimental model of bleomycin ( BLM )-induced acute lung injury in mice.

Methods: BLM was administered intravenously to ICR mice. For the evaluation of early-phase inflammation, cell populations in broncho-alveolar lavage fluid ( BALF ) and induction of mRNA of adhesion molecules ( E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1 ) and TNF- $\alpha$  tested by RT-PCR in lung tissues were examined at 0 to 13 days after BLM. These parameters were also compared with those of the control ( NS alone ), 14-MRMLs-untreated ( BLM alone ) and pre-treated ( BLM + pre 14-MRMLs ) groups.

Results: The number of neutrophils, macrophages, and lymphocytes significantly increased in BAL. Neutrophils especially increased with two peaks after BLM administration. 14-MRMLs significantly inhibited both peaks of neutrophil. The increase in number of macrophages in BALF was significantly attenuated by EM and RXM, and slightly attenuated by CAM. Number of lymphocytes in BALF was significantly attenuated by EM and CAM, and slightly attenuated by RXM. Changes in mRNA expression of E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and TNF- $\alpha$  were associated with the number of neutrophils migrating into the airspace. 14-MRMLs clearly inhibited the induction of VCAM-1 mRNA, and tended to attenuate the induction of ICAM-1 and TNF- $\alpha$  mRNA, but did not inhibit the induction of E-selectin and P-selectin mRNA.

Discussion: These findings show that 14-MRMLs clearly attenuated the expression of VCAM-1 mRNA, and tended to attenuate the induction of ICAM-1 and TNF- $\alpha$ mRNA, and

subsequently inhibited leucocyte, especially neutrophil migration into the airspace during the early phase of BLM-induced lung injury and finally inhibited lung fibrosis. This might be one potent mechanism of the anti-inflammatory effects of 14-MRMLs in BLM-induced acute lung injury. The findings suggest that prophylactic administration of 14-MRMLs may be clinically efficacious in preventing acute exacerbation of interstitial pneumonia and acute lung injury.

(J Nippon Med Sch 2002; 69: 252-261)

Key words: macrolides, bleomycin, acute lung injury, adhesion molecule, TNF- $\alpha$

## 緒言

ブレオマイシン (BLM) 誘発肺傷害動物モデルはヒトの急性肺傷害・特発性間質性肺炎のモデルとして広く使われている<sup>1-3</sup>。BLM 肺傷害・肺線維症の発症機序はいまだ不明であるが、肺傷害・肺線維症の病態には好中球が重要な役割を果たしていることが確認されている<sup>4-7</sup>。BLM 急性肺傷害の病理組織学的特徴は肺実質における好中球とマクロファージの集積である<sup>8</sup>。これまで我々は実験的 BLM 肺傷害モデルにおいて、好中球の細胞浸潤には好中球と血管内皮間接着分子関与が不可欠であることを報告してきた<sup>10</sup>。一方、慢性気道炎症性疾患の一つであるびまん性汎細気管支炎 (DPB) にエリスロマイシン (EM) を経口投与することにより、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球数が著明に減少することが報告され<sup>11</sup>、この作用が従来の抗菌作用によらず、EM を始めとする 14 員環マクロライド (14-MRMLs) に共通した抗炎症作用により DPB の患者の生存時間を改善することが報告されている<sup>11-13</sup>。これまで、我々は BLM 肺傷害急性期に BALF 中の好中球エラストラーゼが重要な役割を果たし、EM 投与により抑制されることを報告した<sup>7</sup>。以上の研究結果を踏まえて、今回は BLM 急性肺傷害マウスモデルを用い、好中球の役割、ならびに好中球と血管内皮細胞間接着分子の E-selectin, P-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) および好中球組織浸潤に関わるサイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA 発現に関して経時的に検討した。さらに、EM, および同様の 14-MRMLs であるニューマクロライドのクラリスロマイシン (CAM) とロキシスロマイシン (RXM) の抗炎症作用について経時的に検討した。

## 対象と方法

### (1) 動物

7 週齢, ICR 雄マウスは Nippon CLEA (Tokyo) から購入した。平均体重は 30 g, ランダムに各群に分け入れた。この研究は日本医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

### (2) 薬剤

ブレオマイシン (BLM; Nippon Kayaku Co Ltd; Tokyo, Japan) は生食水に溶解し, 100 mg/kg, 0.3 ml/mouse, 尾静脈より 1 回投与した<sup>10</sup>。エリスロマイシン (EM; Dainabott Co Ltd; Osaka, Japan), クラリスロマイシン (CAM; Dainabott Co Ltd; Osaka, Japan), ロキシスロマイシン (RXM; Aventis Pharma Ltd; Tokyo, Japan) は 5% アラビアゴム (AG; Wako Pure Chemical Industries Ltd; Tokyo, Japan) に溶解して懸濁液を作製し, EM: 50 mg/kg, CAM: 8.9 mg/kg, RXM: 10 mg/kg, 0.3 ml/mouse をゾンデにて 1 日 1 回連日強制経口投与した。EM, CAM, RXM の投与量は BLM 肺線維症予防効果が認められた量で設定した<sup>14,15</sup>。

### (3) BLM 急性肺傷害モデル作製投与スケジュール (Fig. 1)

生食投与群: N 群, BLM 単独投与群: B 群, 14-MRMLs 併用投与群: BE (BLM + EM), BC (BLM + CAM), BR (BLM + RXM) を設定し, Day 0 に, N 群では生食, B 群と 14-MRMLs 併用投与群では BLM を経尾静脈的に 1 回投与した。BLM 投与前 3 日 (Day-3) から sacrifice までに N 群と B 群ではアラビアゴム懸濁液を 1 日 1 回連日経口投与した。14-MRMLs 併用投与群では EM, CAM, RXM のアラビアゴム懸濁液をそれぞれ経口投与した。

Day	-3	...	0	6h	12h	1	2	3	...	5	6	7	...	9	...	11	...	13
N	AG		↓S	S	S	S	S	S		S	S	S		S		S		S
B	AG		↓S	S	S	S	S	S		S	S	S		S		S		S

(A)

Day	-3	...	0	6h	12h	1	2	3	...	5	6	7	...	9
BEpre	EM		↓			S								S
BCpre	CAM		↓			S								S
BRpre	RXM		↓			S								S

(B)

- Oral administration of arabic gum      ↓ Intravenous administration of normal saline  
 — Oral administration of macrolides      ↓ Intravenous administration of bleomycin  
 S Sacrifice

Fig. 1 (A) Schedule of evaluation of early-phase inflammation over time after BLM injection.  
 (B) Schedule of evaluation on effects of 14-MRMLs on the early-phase inflammation after BLM injection.

#### (4) 実験プロセス

N群とB群では、BLM投与後0h, 6h, 12h, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13日にエーテル麻酔下にて脱血 sacrifice し (Fig. 1A), 気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い, 肺組織を取り出し, -80℃フリーザーに保存し, 接着分子とTNF- $\alpha$  mRNA発現検討に提供した。回収したBALFの総細胞数はBALの当日, 血球計算板でカウントし, サイトスピン (Labsystems Japan) 法で細胞標本を作製し, ギムザ染色 (Merck Japan) を行い, 細胞分画を算定した。各群のフリーズサンプルを用い, RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) 方法により E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1, および TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を経時的に検討した。14-MRMLs 併用投与群では, NとB群の実験結果により, BLM投与後1日と9日にエーテル麻酔下にて脱血 sacrifice し (Fig. 1B), BAL を行い, 接着分子とTNF- $\alpha$  の mRNA 発現を検討した。各群において, 同様の実験を3回繰り返して行い, 各時点でマウスをそれぞれ4匹, 3匹, 3匹ずつ経時的に sacrifice し, 実験に供した。

#### (5) 気管支肺胞洗浄 (BAL)

マウス主気管支内に適当なカテーテルを留置固定し, 生食 1 ml を注入後, 両肺から洗浄液を回収し, 3回洗浄を行った。回収率は65%から75%までの範囲で, 各群で差異はなかった。

#### (6) RNA 単離と RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

Total RNA は肺組織から ISOGEN (Nippon GENE) で単離した。Single-strand cDNA の合成は reverse transcriptase (GIBCO BRL, Rockville, MD) と oligo (dT) 12-18 primer を利用して行った。目的 cDNA の増幅は TaKaRa PCR thermal cycler 480 と TaKaRa Ex TaqTM, および目的 cDNA の特異プライマを用い, 反応液は 94℃ 2分間インキュベーション後, 94℃ 30秒, 55℃ 30秒, 72℃ 30秒の反応を至適サイクル数行った。PCR プライマの配列は以下の通りである<sup>16-20</sup>。

E-selectin: sense (EL-11) 5'-gattggacactcaatggatc-3'  
 antisense (EL-9) 5'-cctagacgttgaagaaggc-3'  
 P-selectin: sense 5'-acgagctggacggaccg-3'  
 antisense 5'-ggctggcactcaaatttacg-3'

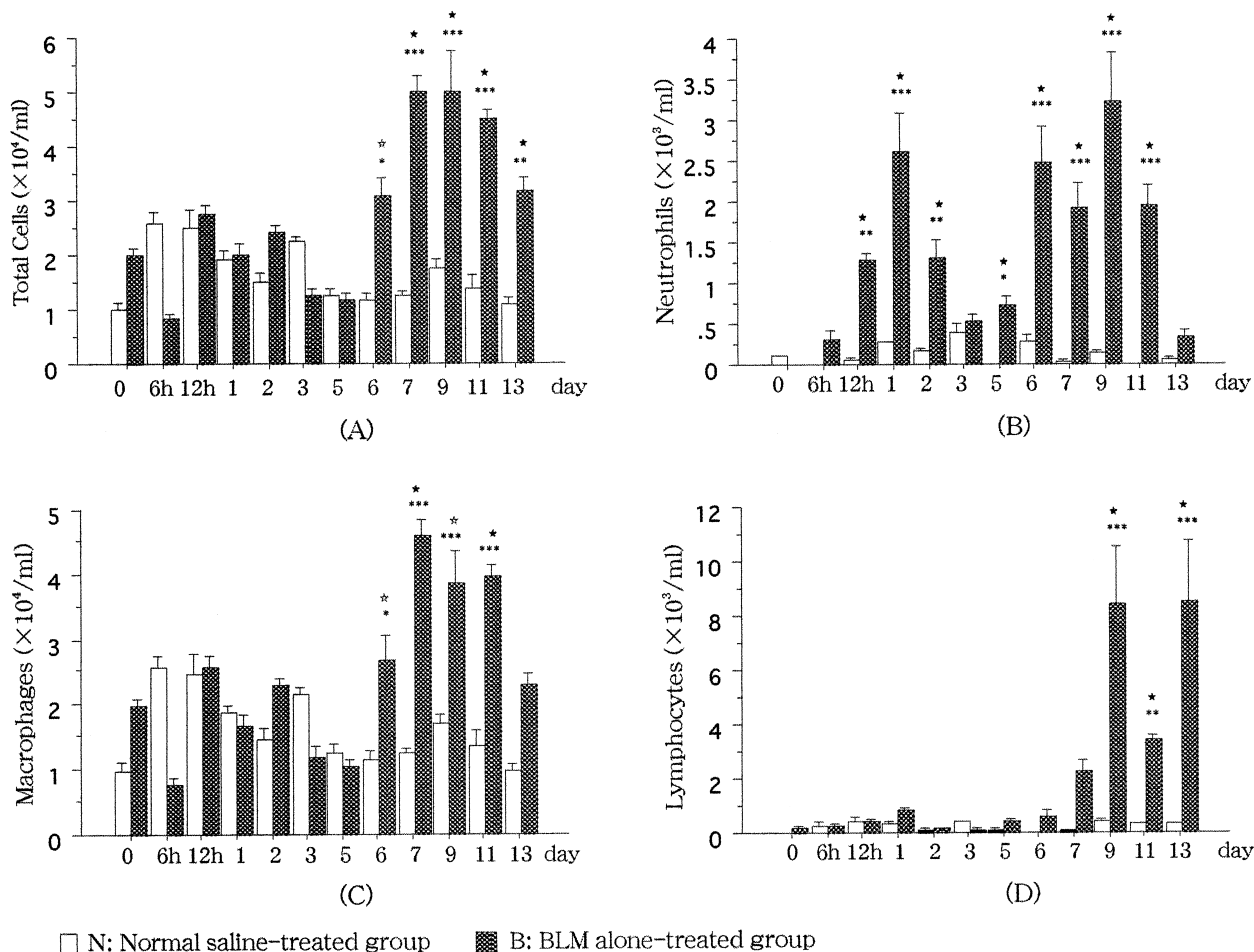


Fig . 2 Time course of changes in cell numbers in BALF . ( A ) Total cell number . ( B ) number of neutrophils . ( C ) number of macrophages . ( D ) number of lymphocytes . Significantly different from Normal saline-treated group in each time by Mann-Whitney ' s U test ,  $p < 0.0004$  ,  $p < 0.01$  . significantly different from the first time point ( 0 hr ) after BLM administration by repeated-measures analysis of variance ( ANOVA ) \*\*\*  $p < 0.0001$  \*\*  $p < 0.01$  , \*  $p < 0.05$  . Values are means Bars . SE ,  $n = 10$  .

ICAM-1: sense 5 'tcggaggatcacaacgaagc-3 ' antisense 5 'aacataagaggctgccatcacg-3 ' VCAM-1: sense( VC-14 ) 5 'aagcagagacttgaatgcc-3 ' antisense( VC-13 ) 5 'cccttgaacagatcaatctcc-3 ' TNF- $\alpha$  : sense 5 'ggcaggtctactttggagtcattgc-3 ' antisense 5 'acattcgaggctccagtgaattcgg-3 ' PCR products は 2%アガロースゲルで電気泳動後 , ethidium bromide にて発色した . NIH imaging system で Intensity 解析を行い , G6PD mRNA の発現の強度を標準とし 接着分子 , TNF- $\alpha$ mRNA の発現の比較検討を行った .

( 7 ) 統計学検討

BALF 中細胞数のデータの両組間比較は Mann-Whitney ' s U test で検討した . Repeated-measures

は分散解析 ( ANOVA ) で評価した .

結 果

1. BALF 中細胞数の経時的変化

BALF 中の総細胞数は BLM 投与後 6 日から 13 日まで有意に上昇した ( Fig. 2A ) . 好中球数は BLM 投与後 1 日をピークに有意に上昇し , 一旦減少したが , 5 日から 11 日まで再び有意に上昇し , 13 日目に投与前のレベルに復帰した ( Fig. 2B ) . マクロファージは BLM 投与後 6 日から 11 日まで有意に上昇し ( Fig. 2C ) , リンパ球は BLM 投与後 9 日から有意に上昇した ( Fig. 2D ) .

2 . 接着分子と TNF- $\alpha$ mRNA 発現の経時的変化

E-selectin( Fig. 3A ) , P-selectin( Fig. 3B ) , および

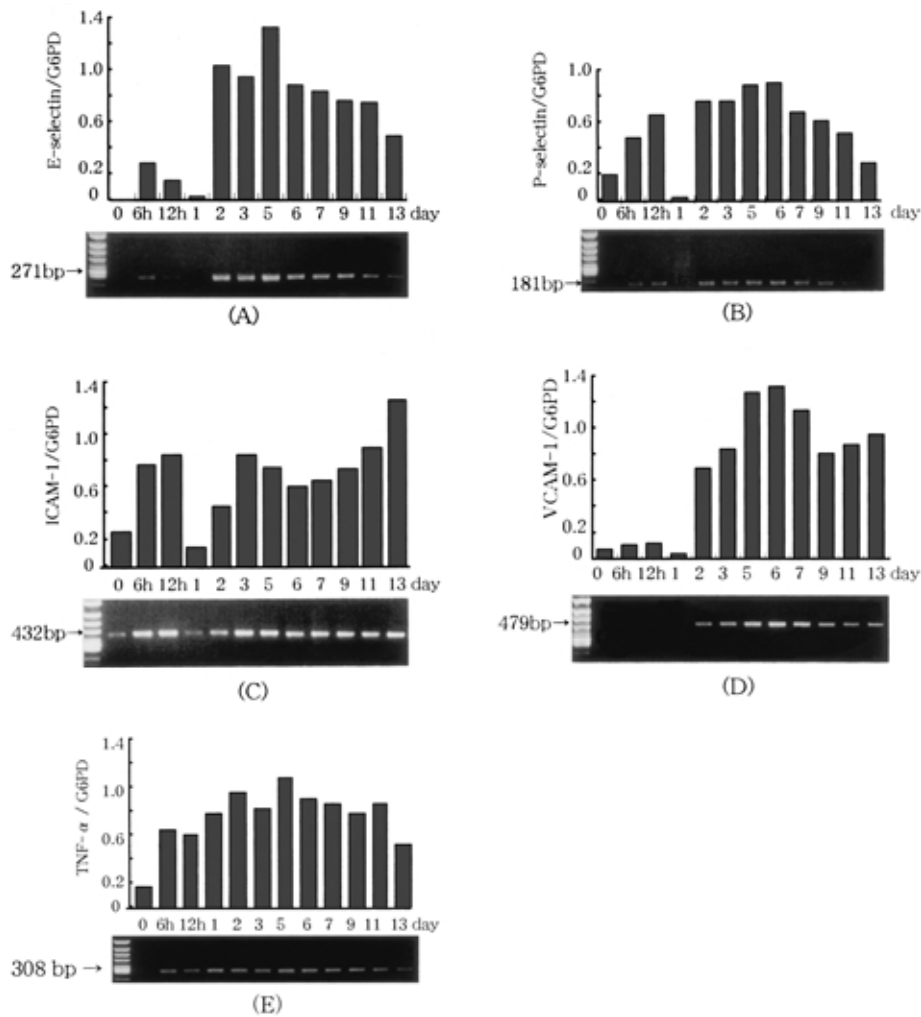


Fig. 3 Time course of E-selectin (A), P-selectin (B), ICAM-1 (C), VCAM-1 (D), and TNF- $\alpha$  (E) mRNA inductions in lung tissue after BLM administration. The Photograph shows typical results. Each density of PCR products was measured using NIH imaging system. G 6 PD was measured as an internal control. The ratio of each adhesion molecule and TNF- $\alpha$  against G 6 PD was shown by histogram.

ICAM-1 (Fig. 3C) の mRNA 発現は BLM 投与後 6 時間と 12 時間に誘導され、1 日では消退したが 2 日から再び増強され、E-selectin、P-selectin の発現は 13 日に減少する傾向が認められた。一方、VCAM-1 の mRNA 発現は BLM 投与後 2 日目から誘導された (Fig. 3D)。TNF- $\alpha$  の mRNA 発現は BLM 投与後 6 時間から誘導され、13 日には発現が減少する傾向が認められた (Fig 3E)。

### 3. 接着分子 mRNA 発現の経時的変化と BALF 中白血球数の経時的変化 (Fig. 4)

好中球数の 2 回の上昇は接着分子の発現の誘導よりやや遅れて平行して上昇した。マクロファージ数の上昇は BLM 投与後 2 日以後から誘導された接着分子

の発現よりやや遅れて平行して上昇した。リンパ球は接着分子の発現と相関はほとんど認められなかった。

### 4. BALF 中白血球数増加に対する 14 MRMLs の抑制効果

BLM 投与後 1 日と 9 日の好中球数の上昇は 14-MRMLs のいずれの薬剤の併用投与より有意に抑制された (Fig. 5A)。BLM 投与後 9 day のマクロファージは EM と RXM 投与より有意に抑制され、CAM 投与より抑制傾向が認められた (Fig. 5B)。リンパ球の上昇は EM と CAM の投与により有意に抑制され、RXM 投与よりは抑制傾向が認められた (Fig. 5C)。

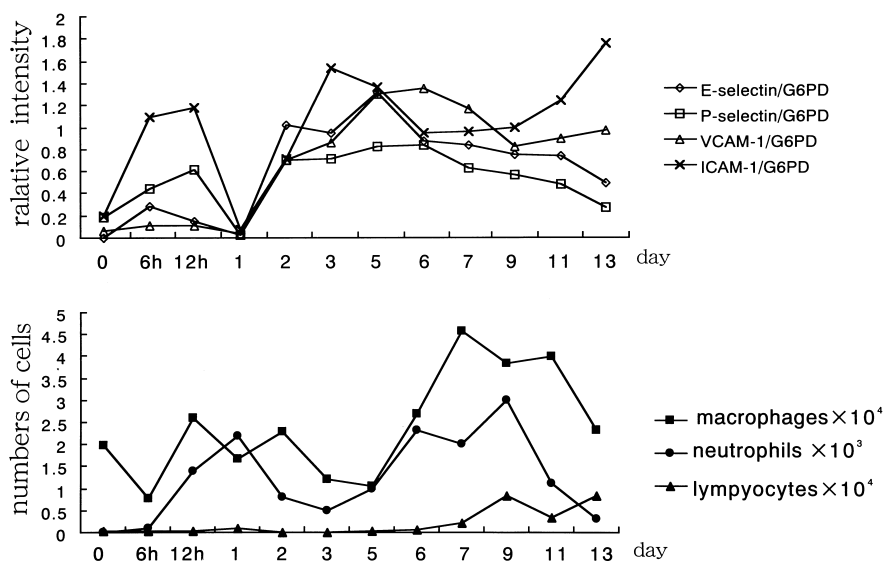


Fig. 4 Relationship between time courses of E-selectin, P-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 mRNA expression in lung tissue and neutrophil, macrophage, and lymphocyte numbers in BALF treated with BLM.

#### 5. 接着分子と TNF- $\alpha$ mRNA 発現誘導に対する 14-MRMLs の抑制効果

BLM 投与後 9 日の VCAM-1 mRNA 発現は 14 員環マクロライド投与より著明に抑制された (Fig. 6D). ICAM-1 mRNA 発現は抑制される傾向が認められた (Fig. 6C). しかし, E-selectin (Fig. 6A), P-selectin (Fig. 6B) の mRNA 発現に対し, 14-MRMLs の抑制効果は認められなかった. BLM 投与後 9 日の TNF- $\alpha$  mRNA 発現は 14 員環マクロライド投与より抑制される傾向が認められた (Fig. 6E).

#### 考 察

特発性間質性肺炎の原因は不詳であるが, その発症には先行する肺傷害における好中球の役割が注目されている<sup>21,22</sup>. 成人呼吸窮迫症候群 (ARDS) で死亡した患者の剖検肺組織や ARDS 症例の BALF 所見から肺内への好中球の著明な浸潤が確認されている<sup>23,24</sup>. 急性肺傷害の初期には, 肺内の種々の細胞から産生・放出された走化性物質である IL-8, TNF- $\alpha$  などが好中球を全身循環から肺血管床へ集積させる役割を果たしている<sup>25</sup>. 引き続き好中球と血管内皮細胞間接着分子を介した好中球の血管内皮への接着過程は好中球の組織内への浸潤に重要な役割を果たし<sup>10</sup>, さらに活性化された好中球はエラスターゼ, 酸素ラジカルなどの産生・放出を介して肺傷害を惹起する<sup>4,7</sup>. 本研究では, BLM 急性肺傷害マウスモデルにおいて, 発症機序お

よび 14 員環マクロライド (14-MRMLs) の抑制作用について検討した.

BLM 経尾静脈投与後, BALF 中の好中球など炎症細胞の変化 (Fig. 2), およびその浸潤に関わる接着分子, TNF- $\alpha$  の mRNA の発現 (Fig. 3) に関して経時的に検討した. 好中球数の上昇は 2 回ピークを形成し (Fig. 2B), 接着分子の発現の誘導 (Fig. 3A, 3B, 3C) よりやや遅れて平行して上昇した (Fig. 4). 好中球数の 2 回の上昇は E-selectin, P-selectin, および ICAM-1 の発現と関わり, 2 回の上昇は VCAM-1 の発現とも関わると考えられる (Fig. 2B, 3D, 4). マクロファージ数は BLM 投与後 6 日から 11 日まで上昇し (Fig. 2C), BLM 投与後 2 日以後から誘導された接着分子の発現 (Fig. 3A, 3B, 3C, 3D) よりやや遅れて平行して上昇したが (Fig. 4), 主に VCAM-1 との関わりがあると考えられる. リンパ球は接着分子の発現と著明な関与は認められないが (Fig. 4), ICAM-1 (Fig. 3C), VCAM-1 (Fig. 3D) の mRNA 発現は 13 日後も引き続き発現が上昇する傾向が認められ, その変化と同様にリンパ球数は 13 日後も引き続き上昇する傾向が認められた (Fig. 2D). TNF- $\alpha$  mRNA 発現は BLM 投与後早期から発現され, 13 日には減少する傾向が認められた (3E). 以上の結果より, BLM 急性肺傷害モデルにおいて, 炎症細胞と肺血管内皮細胞間の接着分子発現を介した好中球, マクロファージ浸潤に伴い肺傷害が惹起され, 炎症細胞によるメディエーターである TNF- $\alpha$  が肺傷害誘導因子として役割を果たしている可能性が示唆された.

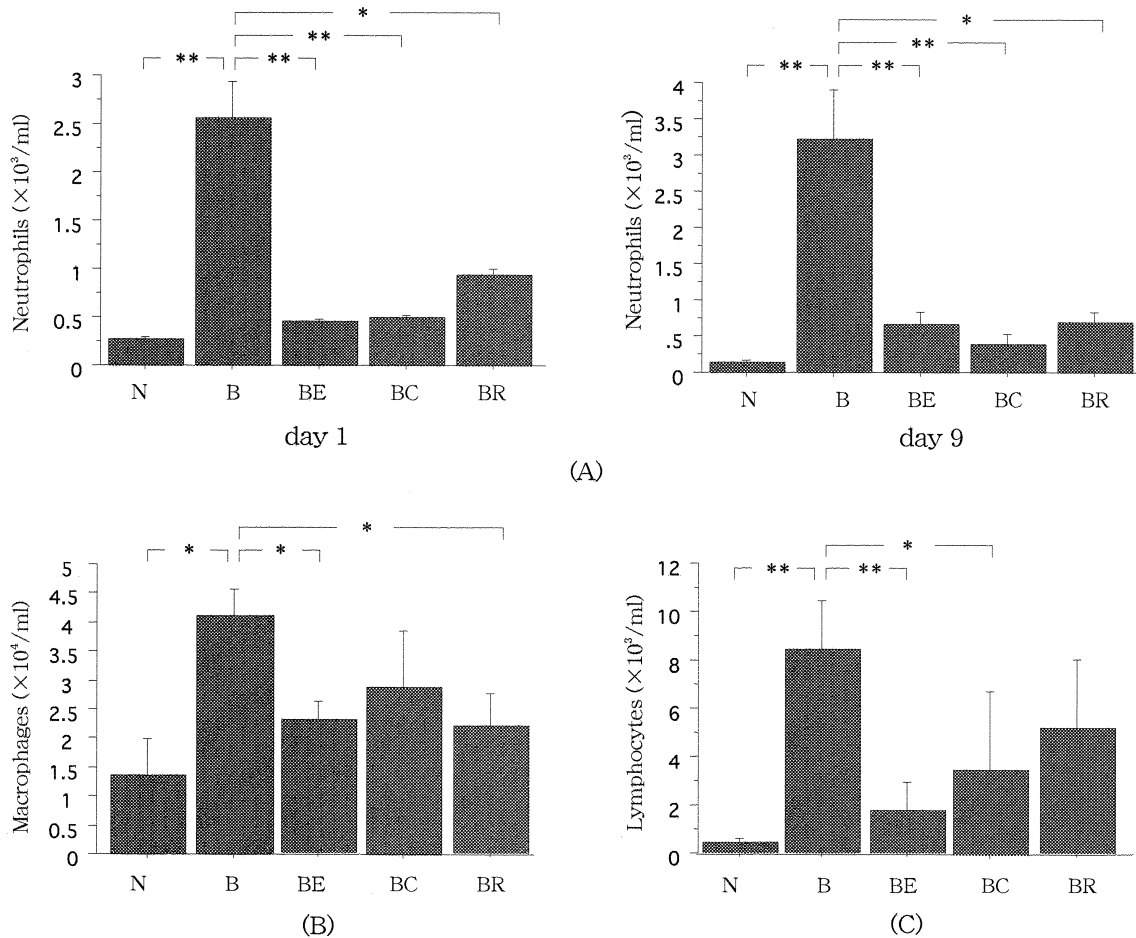


Fig. 5 Effects of 14-MRMLs on leucocyte number in BALF on days 1 and 9 after injection of BLM. N: Normal saline-treated group; B: BLM-alone treated group; BE: BLM-and EM-treated group; BC: BLM-and CAM-treated group; BR: BLM-and RXM-treated group (A) number of neutrophils in BALF on days 1 and 9 after injection of BLM (B) number of macrophages in BALF on day 9 after injection of BLM (C) number of lymphocytes in BALF on day 9 after injection of BLM. Significantly different from BLM alone-treated group by Mann-Whitney's U test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . Values are means  $\pm$  SE,  $n = 10$ .

エリスロマイシン (EM) を始めとする 14-MRMLs は抗炎症作用により DPB の患者の病態を改善し、かつ予後を改善することが報告されている<sup>11-13</sup>。本研究では、BLM 急性肺傷害マウスモデルにおいて、血管内皮細胞接着分子である VCAM-1 mRNA の発現は 14-MRMLs 投与より著明に抑制され (Fig. 6D), ICAM-1 (Fig. 6C), TNF- $\alpha$  (Fig. 6E) の mRNA 発現は抑制される傾向が認められた。BALF 中好中球数の増加 (Fig. 5A) は 14-MRMLs 投与より有意に抑制され、マクロファージ数 (Fig. 5B) とリンパ球数 (Fig. 5C) の上昇も抑制された。E-selectin (Fig. 6A), P-selectin (Fig. 6B) の mRNA 発現については、14-MRMLs の抑制効果は認められなかった。

VCAM-1 のリガンドである  $\alpha 4/\beta 1$  integrin は主に

マクロファージ、リンパ球及び好酸球に発現されると報告されているが<sup>19,26</sup>、最近では、血管内皮の VCAM-1 と好中球の  $\alpha 9/\beta 1$  integrin の相互作用より好中球の炎症組織への浸潤を促進することも報告されている<sup>27</sup>。VCAM-1 に対する 14-MRMLs の作用に関してはいまだ報告されていないが、本研究の結果より、14-MRMLs は VCAM-1 mRNA の発現抑制を介してマクロファージの  $\alpha 4/\beta 1$  と好中球の  $\alpha 9/\beta 1$  integrin との接着を共に減少させているものではないかと考えられる。ICAM-1 は白血球の  $\beta 2$  Integrin family (CD11/CD18) と反応し、白血球と内皮の接着を促進する<sup>28</sup>。EM は好中球の CD11b/CD18 発現を抑制し<sup>29</sup>、また ICAM-1 発現を抑制する報告も見られ<sup>30</sup>、同様に RXM, CAM にも ICAM-1 の抑制効果が報告されている<sup>31,32</sup>。本研

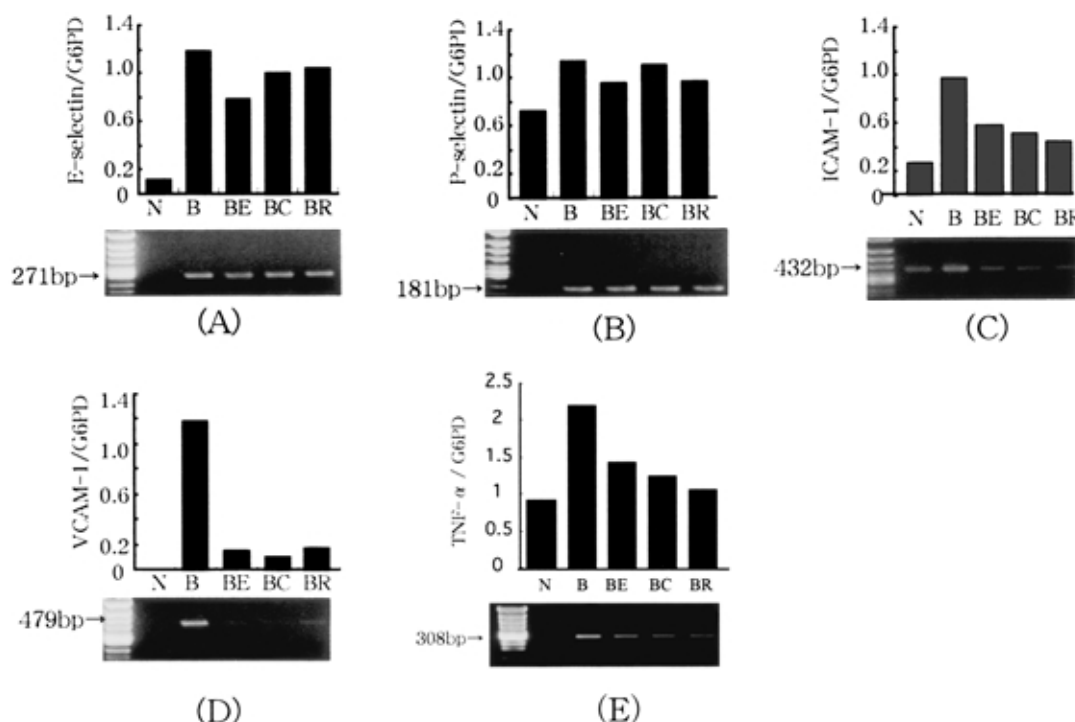


Fig. 6 Effects of 14-MRMLs on expression of adhesion molecules such as E-selectin (A) P-selectin (B) ICAM-1 (C) VCAM-1 (D) and TNF- $\alpha$  (E) mRNA in lung tissue on day 9 after BLM administration. N: Normal saline-treated group; B: BLM, alone treated group; BE: BLM- and EM-treated group; BC: BLM- and CAM-treated group; BR: BLM- and RXM-treated group. The Photograph shows typical results. Each density of PCR products was measured using NIH imaging system. G 6 PD was measured as an internal control. The ratio of each adhesion molecules and TNF- $\alpha$  against G6PD was shown by histogram.

究のモデルにおいて、ICAM-1 mRNA 発現は 14-MRMLs 投与により抑制される傾向が認められ、14-MRMLs がそのリガンド分子に対して抑制効果を有するかどうかについて、さらなる検討を要する。TNF- $\alpha$  はマウスの BLM 肺線維症において mRNA レベルで重要なメディエーター役割を果たしている<sup>33</sup>。本研究においては、14-MRMLs は肺組織の TNF- $\alpha$  mRNA を抑制する傾向が認められ (Fig. 6 E), それは好中球の気腔内へ浸潤過程抑制の一つの役割を果たしている可能性が示唆された。

一方、エリスロマイシンは気道上皮細胞、好中球などの IL-8 分泌を抑制することにより好中球の遊走浸潤を抑制すると報告されている<sup>29,34-40</sup>。EM はさらに、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 活性を抑制することにより炎症細胞の組織内への浸潤を抑制することも報告されている<sup>41</sup>。本研究の BLM 急性肺傷害実験系においても、白血球の組織浸潤に対する 14-MRMLs の抑制メカニズムには VCAM-1, ICAM-1, および TNF- $\alpha$  mRNA を介した抑制にとどまらず、様々な白血球の走化性物質及び血管内皮細胞の接着分子の

リガンドなど多因子関与するものと考えられる。

急性肺傷害の発症には好中球エラスターゼが重要な役割を果たしていると報告されているが<sup>7</sup>, 好中球脱顆粒機能欠損 Beige マウスを用いた実験では、BLM 投与後、もっと重篤な肺線維化を起こしていると報告され<sup>42</sup>, 好中球由来活性酸素の役割や線維化を形成する再構築に関わる因子がもっとも重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、ARDS の発症には好中球関与が重要である<sup>23-25</sup>とする報告が多いが、好中球減少症 (neutropenic) 患者の ARDS 実例も報告され<sup>43</sup>, 肺傷害に好中球が必須だとは言えないとも言われている<sup>25</sup>。

現在、特発性間質性肺炎に対し、有効な薬剤は存在しない、その治療は炎症が損傷や線維化を誘発するという概念に基づいている<sup>44</sup>。好中球エラスターゼ阻害薬 ONO-5046<sup>5</sup>, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)<sup>9</sup>,  $\alpha$ -1 proteinase inhibitor ( $\alpha$ 1Pi)<sup>9</sup>, スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)<sup>45</sup> など好中球エラスターゼや活性酸素産生を抑制する薬剤、および抗接着分子療法<sup>46</sup>, 抗 TNF- $\alpha$  抗体<sup>33</sup> などは特発性間質性肺炎



に対する治療戦略として注目されている。14-MRMLsは過去の研究より、IL-8<sup>29,34-40</sup>、MMP-9<sup>41</sup>などの抑制を介した好中球の組織浸潤と好中球エラストラーゼ<sup>7</sup>や活性酸素産生<sup>29</sup>に対して抑制することが確認されている。本研究結果より、14-MRMLsはBLM肺傷害惹起時の炎症細胞と血管内皮細胞間接着分子であるVCAM-1、ICAM-1および好中球組織浸潤に関わるサイトカインであるTNF- $\alpha$ のmRNA発現抑制により好中球など炎症細胞の気腔内への集積を抑制する一つの役割を果たしていると考えられる。以上より、14-MRMLsは特発性間質性肺炎の肺傷害を予防できる安全な薬剤として有望であるのではないかと考えられる。

### 結 論

BLM急性肺傷害に対し、14-MRMLsはVCAM-1、ICAM-1、およびTNF- $\alpha$ のmRNA発現に対して抑制することにより、好中球など炎症細胞の気腔内への浸潤、および引き続く肺傷害を予防する一つの役割を果たしていると考えられる。本研究の結果より臨床で間質性肺炎の急性増悪或いはARDSなど急性肺傷害を起こしやすい検査と治療を受ける患者に対し、14-MRMLsの予防効果が期待できるため、さらに詳細な検討を行いたい。

### 文 献

1. Adamson IYR, Bowden DH: The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 1974; 77: 185-198.
2. Aso Y, Yoneda K, Kikkawa Y: Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 1976; 35: 558-568.
3. Weidner WJ, Quam DA, McClure DE, DeFouw DO: Effect of acute administration of bleomycin on lung fluid balance in sheep. *Exp Lung Res* 1995; 21: 617-630.
4. Henson PM, Johnston RB Jr: Tissue injury in inflammation, oxidants, proteinase and cationic proteins. *J Clin Invest* 1987; 79: 669-674.
5. Sakamaki F, Ishizaka A, Urano T, Sayama K, Nakamura H, Terashima T, Waki Y, Tasaka S, Hasegawa N, Sato K, Nakagawa N, Obata T, Kanazawa M: Effect of specific neutrophil elastase inhibitor, ONO 5046, on endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 391-397.
6. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Peterson VM, Silliman CC, Goode AW: Sequential systemic platelet-activating factor and interleukin 8 primes neutrophils in patients with trauma at risk of multiple organ failure. *Br J Surg* 1996; 83: 1407-1412.
7. Azuma A, Furuta T, Enomoto T, Hashimoto Y, Uematsu K, Nukariya N, Murata A, Kudoh S: Preventive effect of erythromycin on experimental bleomycin-induced acute lung injury in rats. *Thorax* 1998; 53: 186-189.
8. Mitsuhashi H, Asano S, Nonaka T, Hamamura I, Masuda KI, Kiyoki M: Administration of truncated secretory leukoprotease inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 369-374.
9. Nagai A, Aoshiba K, Ishihara Y, Inano H, Sakamoto K, Ymaguchi E, Kagawa J, Takizawa T: Administration of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 651-656.
10. Azuma A, Takahashi S, Nose M, Araki K, Araki M, Takahashi T, Hirose M, Kawashima H, Miyasaka M, Kudoh S: Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. *Thorax* 2000; 55: 147-152.
11. Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K: Erythromycin inhibits neutrophil chemotaxis in bronchoalveoli of diffuse panbronchiolitis. *Chest* 1994; 106: 1116-1123.
12. Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M: Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1829-1832.
13. Kudoh S: Erythromycin treatment in diffuse panbronchiolitis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 1998; 4: 116-121.
14. 橋本恭士, 吾妻安良太, 村田 朗, 古田知行, 真才洋子, 岡本一也, 渋谷久雄, 工藤翔二: プレオマイシン肺臓炎に対するエリスロマイシンの抑制効果。日胸疾会誌, 1995; 33(増) 232.
15. 李 英姫, 松田久仁子, 青山昭徳, 阿部信二, 新原礼子, 榎本達治, 宮本晴子, 高橋卓夫, 臼杵二郎, 高橋 智, 吾妻安良太, 工藤翔二: プレオマイシン肺線維症に対する14員環マクロライドの抑制作用の検討。Jpn J Antibiotics 2001; 54(Suppl. A) 87-91.
16. Araki M, Araki K, Miyazaki Y, Iwamoto M, Izui S, Yamamura KI, Vassalli P: E-selectin binding promotes neutrophil activation in vivo in E-selectin transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 825-830.
17. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL: Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992; 80: 795-800.
18. Araki M, Araki K, Vassalli P: Cloning and sequencing of mouse VCAM-1 cDNA. *Gene* 1993; 126: 261-264.
19. Oran A, Marshall JS, Kondo S, Paglia D, Mckenzie RC: Cyclosporin inhibits intercellular adhesion molecule-1 expression and reduces mast cell numbers in the asebia mouse model of chronic skin inflammation. *Br J Dermatol* 1997; 136: 519-526.
20. Kawakami K, Tohyama M, Qifeng X, Saito A: Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase mRNA in the lungs of Mice infected with cryptococcus neoformans: Effects of interleukin-12. *Infect Immun* 1997; 65(4): 1307-1312.
21. Henson PM: Mechanisms of cellular injury in interstitial lung disease. *Chest* 1986; 89: 108-115.

- 22 . Hunninghake GW, Gadek JE, Lawley TJ, Crystal RG: Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1981; 68: 259 269.
- 23 . Bachofen M, Eeibel ER: Structural alterations of lung parenchyma in adult respiratory syndrome. *Clin Chest Med* 1982; 3 : 35 56.
- 24 . Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G: Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1981; 304: 192 196.
- 25 . Spragg RG, Smith RM: Biology of acute lung injury. *The Lung: Scientific Foundations* ( Cristal RG, West JB, eds ), 1991; pp 2003 2017, Raven Press, New York
- 26 . Beekhuizen H, van Furth R: Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 363 378.
- 27 . Taooka Y, Chen J, Yednock T, Sheppard D: The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 1999; 145: 413 420.
- 28 . Ward PA, Hunninghake GW: Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 123 129.
- 29 . Lin HC, Wang CH, Liu CY, Yu CT, Kuo HP: Erythromycin inhibits  $\beta$  2-integrins ( CD11b/CD18 ) expression, interleukin-8 release and intracellular oxidative metabolism in neutrophils. *Respir Med* 2000; 94: 654 660.
- 30 . Miyajima M, Suga M, Nakagawa K, Ito K, Ando M: Effects of erythromycin on experimental extrinsic allergic alveolitis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 253 261.
- 31 . Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, Takeuchi N, Kohyama T, nakamura H, Kasama T, Kobayashi K, Nakahara K, Morita Y, Yamamoto K: Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1499 1502.
- 32 . Miyahara T, Ushikai M, Matsune S, Ueno K, Katahira S, Kurono Y: Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. 2000; 110: 126 131.
- 33 . Piguet PF, Vesin C: Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur Respir J* 1994; 7 : 515 518.
- 34 . Kadota JI, Sakito O, Kohno S, Sawa H, Mukae H, Oda H, Kawakami K, Fukushima K, Hiratani K, Hara K: A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 153 159.
- 35 . Sakito O, Kadota JI, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K: Interleukin 1  $\beta$ , tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: A potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* 1996; 63: 42 48.
- 36 . Sugiyama Y, Yanagisawa K, Tominaga SI, Kitamura S: Effects of long-term administration of erythromycin on cytokine production in rat alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1999; 14: 1113 1116.
- 37 . Fujii T, Kadota JI, Morikawa T, Matsubara Y, Kawakami K, Iida K, Shirai R, Taniguchi H, Kaseda M, Kawamoto S, Kohno S: Inhibitory effect of erythromycin on interleukin 8 production by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3-stimulated THP-1 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1548 1551.
- 38 . Oishi K, Sonoda F, Kobayashi S, Iwagaki A, Nagatake T, Matsushima K, Matsumoto K: Role of interleukin-8 ( IL-8 ) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airways of patients with chronic airway diseases. *Infect Immun* 1994; 62: 4145 4152.
- 39 . Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M, Tanaka M, Kasama T, Kobayashi K, Nakajima J: Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 266 271.
- 40 . Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, Kasama T, Kobayashi K, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Ito K: Erythromycin suppresses nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 124 128.
- 41 . Hashimoto N, Kawabe T, Hara T, Imaizumi K, Wakayama H, Saito H, Shimokata K, Hasegawa Y: Effect of erythromycin on matrix metalloproteinase-9 and cell migration. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 176 183.
- 42 . Phan SH, Schrier D, McGarry B, Duque RE: Effect of the beige mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 456 459.
- 43 . Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE: Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 1986; 315: 547 551.
- 44 . McAnulty RJ, GJ Laurent: Pathogenesis of lung fibrosis and potential new therapeutic strategies. *Exp Nephrol* 1995; 3 : 96 107.
- 45 . Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB: Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J Clin Invest* 1999; 103( 7 ) : 1055 1066.
- 46 . Piguet PF, Rosen H, Vesin C, Grau GE: Effective treatment of the pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica with anti-CD-11 antibodies. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 435 441.

( Received, November 12, 2001 )

( Accepted, December 11, 2001 )