

気管支喘息患児リンパ球のダニ抗原特異的 IL-2反応性 誘導に与える Roxithromycin 前処置の効果

埼玉医科大学小児科

中島 忠 吉沢いづみ 川野 豊 野間 剛

気管支喘息患児における末梢血リンパ球のダニ抗原特異的 interleukin 2 (IL-2) 反応性誘導に与えるロキシスロマイシン, roxithromycin (RXM) の抑制作用を検討した。10~400 μ g/ml 濃度の RXM 添加にてダニ抗原, *Dermatophagoides farinae* (Df) 刺激で誘導される IL-2反応性が濃度依存性に抑制された。これらの抑制作用を示す RXM の標的細胞は, T 細胞よりはむしろ抗原提示細胞であると考えられた。同様に PPD で誘導される IL-2反応性の誘導も RXM 処理にて抑制されたが, Con A 刺激で誘導される IL-2反応性の誘導においてはそのような抑制作用は認められなかった。また RXM 単独処理では非刺激リンパ球の IL-2反応性を誘導しなかったことから, RXM にはマイトージェンとしてのリンパ球刺激作用はないと考えられた。以上から, RXM には, 軽微な免疫抑制作用により, IL-2に反応して増殖するアレルゲン活性化ヘルパーT 細胞を抑制することにより, サイトカインネットワークの進展を防ぐ作用があると考えられた。これらの作用は RXM のもつ抗アレルギー作用を *in vitro* で示したものと考えられた。

Key words: antigen presenting cells — bronchial asthma — *Dermatophagoides farinae* — IL-2 responsiveness — roxithromycin

緒 言

ダニ誘発気管支喘息や食物摂取で増悪を認めるアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患患児末梢血リンパ球を病因抗原で刺激すると, リンパ球は特異的に活性化され, autocrine, paracrine に産生される IL-2(T リンパ球増殖因子)に対する反応性を獲得する^{1)~3)}。これらの *in vitro* の反応系の測定は病因抗原の検索や, 病勢の把握に有用である⁴⁾。またこれらの反応系において Df 抗原はマクロファージをはじめとする抗原提示細胞 (antigen presenting cells; APC) により T 細胞に表示される。抗原提示細胞を HLA class II に対するモノクローナル抗体で処理すると, この反応が阻止されることから, Df 抗原特異的に IL-2反応性の誘導は APC 上の class II 抗原に依存する³⁾。

一方, RXM はニューマクロライド系抗生剤 (Fig. 1) で好中球の貪食・殺菌能の賦活作用をもち, 感染症の治療薬として広く使用される⁵⁾⁶⁾ほか, ヒトリンパ球の増殖反応抑制作用を有し⁷⁾, 近年ではアレルギー疾

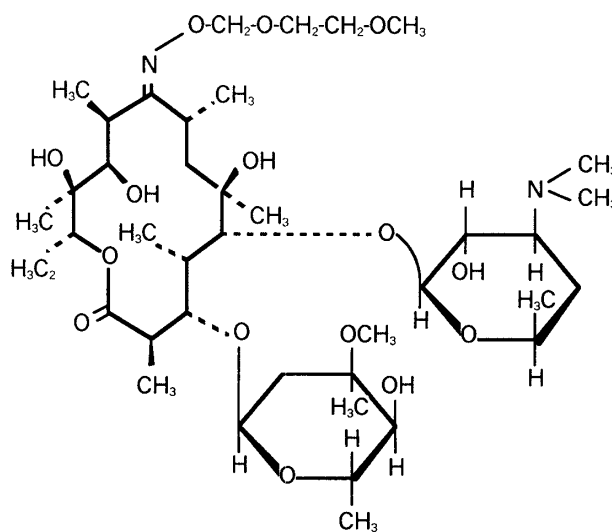


Fig. 1. Structure of roxithromycin.

患での臨床的投与効果が報告されている^{8)~10)}。これら RXM の臨床的有効性に対し免疫アレルギー学的解析を加えるため, アレルギー反応のサイトカイン・カスケード, において中心的な役割をもつと考えられるアレルゲン活性化リンパ球に対する IL-2の反応性の誘導に与える RXM の処理効果について検討を加えたので報告する。

Received: July 17, 1995

Accepted: May 7, 1996

Abbreviations: Df *Dermatophagoides farinae*;

IL-2 interleukin-2; RXM roxithromycin

対 象

気管支喘息患児 (BA: bronchial asthma) あるいは他のアレルギー疾患を合併している気管支喘息患児の末梢血単核細胞を用いた。診断は臨床症状, 特異的 IgE RAST スコア, 皮膚試験, 抗原負荷テストの結果を用いて総合的に行った。対照として相当年齢の上記諸検査項目が陰性である, あるいはアレルギー症状を示さずかつまたその既往のない健康小児及び健康成人を用いた。

方 法

1. リンパ球の IL-2 反応性の測定

比重遠心法¹¹⁾にて分離, 採取した 1×10^6 /ml の単核細胞に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のダニ抗原 (Df: *Dermatophagoides farinae*) (鳥居), $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の purified protein derivative (PPD), あるいは $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の concanavalin A (Con

A) (シグマ) を添加し, 5ml 培養チューブ (Falcon) を用いて 10% 非働化ヒトプール血清加培養液 RPMI 1640 中にて 5 日間培養したのち, 培養チューブ中で沈んでいる細胞を底に残して培養液を捨て, さらに二次培養の為の培養液を一定量添加してよく攪拌後 4 等分し, その 2 等分ずつを 96 穴平底マイクロプレート (ヌンク) に分配したのち, 2 穴に 0.1 units recombinant IL-2 (武田) を添加して IL-2 非添加群と共にさらに 3 日間培養したのち, LSQ medium [lysing staining quenting medium: 2 倍希釈 PI stock 液 ($1 \text{mg}/\text{ml}$ propidium iodide in 4.9% EDTA; シグマ) 1.5ml, EDTA 液 (4.9% pH 7.0; 和光純薬) 7.5ml, Triton X100 (8% v/v; 和光純薬) 1.5ml, 2^{10} 希釈 drawing ink (LEITZ) 0.1ml からなる] を $50 \mu\text{l}$ 添加後遠心し 37°C , 30 分間静置したのち蛍光顕微光度計 (Leitz PATIMED) を用いて各穴中の検体の蛍光強度を測定することにより生細胞数を定量し, IL-2 非添加群と比較することにより以下のごとく IL-2 反応性 (SI) を評価した⁴⁾¹²⁾。

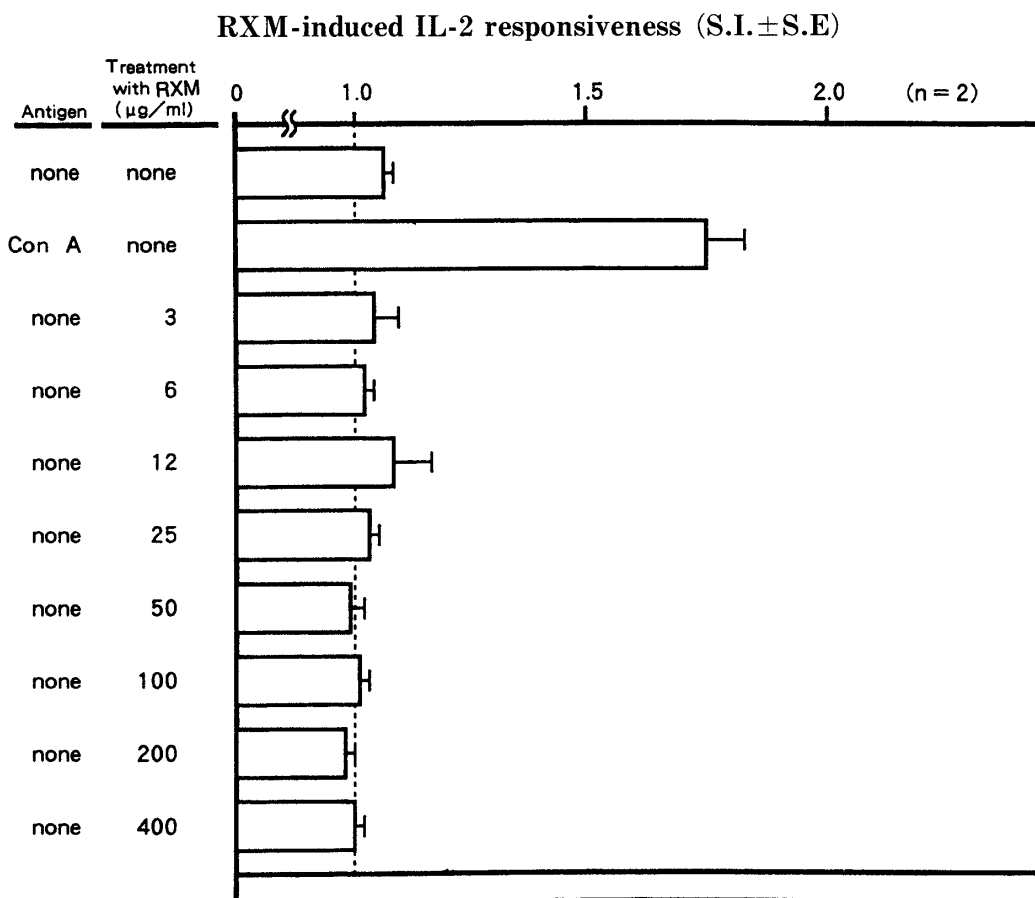


Fig. 2. RXM alone failed to stimulate lymphocytes to respond to IL-2. Data are mean $\pm$ SE of a representative data from 2 independent experiments.

IL-2反応性 (stimulation index : SI) =

$$\frac{\text{IL-2添加時蛍光強度} - \text{細胞非添加時蛍光強度}}{\text{IL-2非添加時蛍光強度} - \text{細胞非添加時蛍光強度}}$$

また、他の特異抗原あるいは、mitogen によって誘導される IL-2反応性に与えるこれらの RXM の処理効果について比較検討するため、喘息患児 (ツベルクリン反応陽性) の単核細胞を同様にして concanavalin A (Con A) 及び pure protein derivatives (PPD) で刺激し、IL-2反応性を誘導し評価した。

2. RXM の処理法

pH 7.4に調製した RPMI 1640培養液で希釈した RXM を0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、単核細胞 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に添加したのち、抗原または Con A を添加し、前記のごとく IL-2反応性誘導に与える影響を検討した。一部の実験では種々の濃度の RXM にて18時間、37°Cで前処理したのち洗浄し、Df 抗原を添加し、IL-2反応性誘導に与える影響を検討した。また、RXM の標的細胞を決定するため、IL-2反応性を誘導する抗原提示細胞に与える処理効果を検討す

るため RXM で前処理或いは非処理のプラスチック付着細胞を RXM 非処理または前処理したプラスチック非付着細胞 (主として T 細胞から構成されている) と組合せ、10 $\mu\text{g/ml}$ Df で刺激し IL-2反応性に及ぼす RXM の作用を評価した。

3. 統計学的処理

得られた成績は対照と比較することにより analysis of variance (ANOVA) -Bonferroni により検定した。IL-2反応性 (SI) は抗原刺激をしない群と比較し、統計学的に有意のものを陽性とした。また IL-2反応性 (SI) の疾患 (抗原) 特異性は健康者群と比較して有意に高いものを陽性とした。

結 果

1. RXM のリンパ球に与える影響

RXM を添加して5日間培養したリンパ球の IL-2に対する反応性獲得について検討した結果、IL-2反応性の誘導を認めなかった (Fig. 2)。よって、RXM には

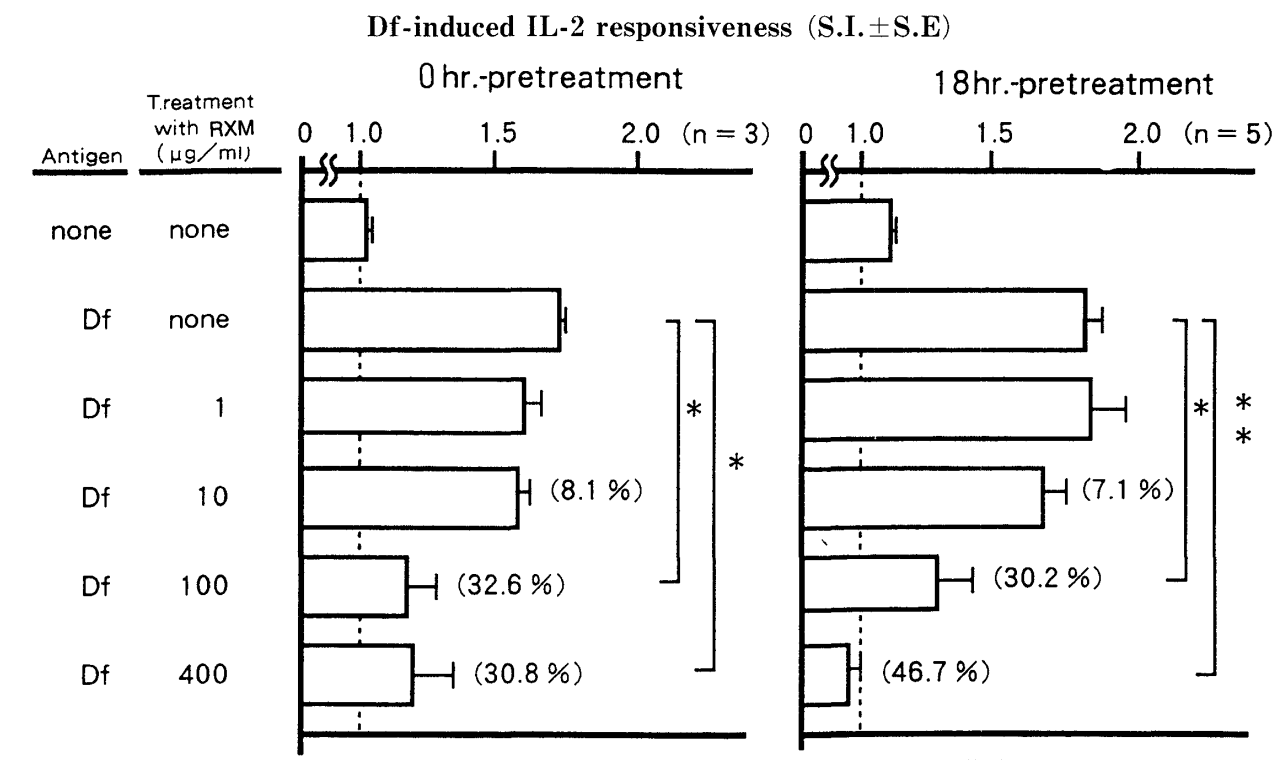


Fig. 3. RXM, simultaneously added with Df antigen suppressed the Df antigen-induced IL-2 responsiveness in patients' lymphocytes in a dose-dependent manner. Data are mean $\pm$ SE of three independent experiments. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

リンパ球に対する幼若化作用はないと考えられた。

2. RXM の Df 特異的 IL-2 反応性誘導に与える影響についての検討

各濃度の RXM で処理した患児リンパ球に $10\mu\text{g/ml}$ の Df を添加して、5 日間培養し、さらに rIL-2 を添加して IL-2 反応性の誘導を検討したところ、50, 100, 200, $400\mu\text{g/ml}$ の RXM で反応の抑制が認められた (Fig. 3, 4). 18 時間の RXM 前処理では 100, $400\mu\text{g/ml}$ の濃度でほぼ濃度依存性に抑制作用が認められた (Fig. 3).

次に、抗原提示付着細胞あるいは T 細胞をこれらの抑制が認められる条件で同様に 18 時間前処理したのち、それぞれ、非処理の T 細胞または抗原提示付着細胞と再構築して IL-2 反応性を検討したところ (Fig. 5), 抗原提示細胞を前処理した場合に IL-2 反応性の抑制が認められた。抑制を認める RXM の濃度は、10, 100, $400\mu\text{g/ml}$ で濃度依存性であった (Fig. 5). 一方、T 細胞を前処理した場合には濃度依存性の抑制傾向を認めたが、統計学的に有意差は認めなかった (Fig. 5). 以上から、RXM には抗原提示細胞に作用して Df

特異的 IL-2 反応性を抑制する作用が存在すると考えられた。

3. PPD 及び Con A 刺激で誘導される IL-2 反応性に与える RXM の影響についての検討

PPD あるいは Con A で誘導される IL-2 反応性に与える RXM の効果を検討した。PPD で誘導される IL-2 反応性は RXM 処理にて濃度依存性に抑制されたが、Con A 刺激の場合は抑制されなかった (Fig. 6). よって、RXM は特異抗原刺激で誘導される IL-2 反応性に対する抑制作用を示すが、Con A などのマイトージェン刺激による反応には影響を与えないと考えられた。

考 察

生体内に抗原が侵入すると、局所の炎症細胞は即時型のアレルギー反応を惹起すると同時に抗原提示細胞は T 細胞を活性化する。活性化されたヘルパー T 細胞は、IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ など種々のサイトカインを分泌し、IgE 産生に対するヘルパー細

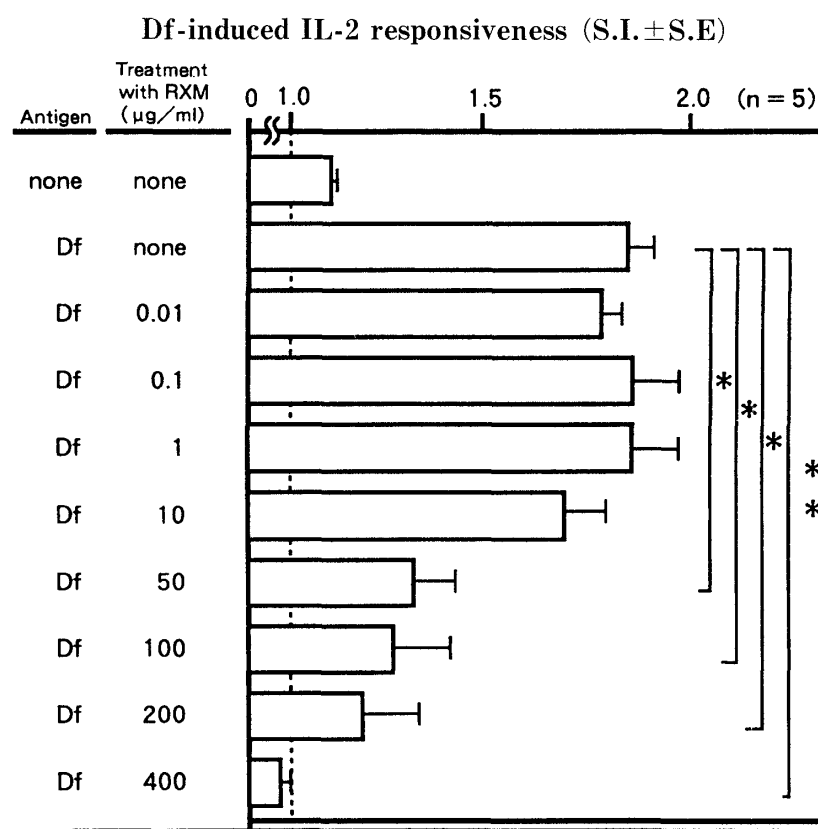


Fig. 4. Pretreatment of RXM also inhibited the induction of Df-specific IL-2 responsiveness in patients' lymphocytes. Data are mean $\pm$ SE of five experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

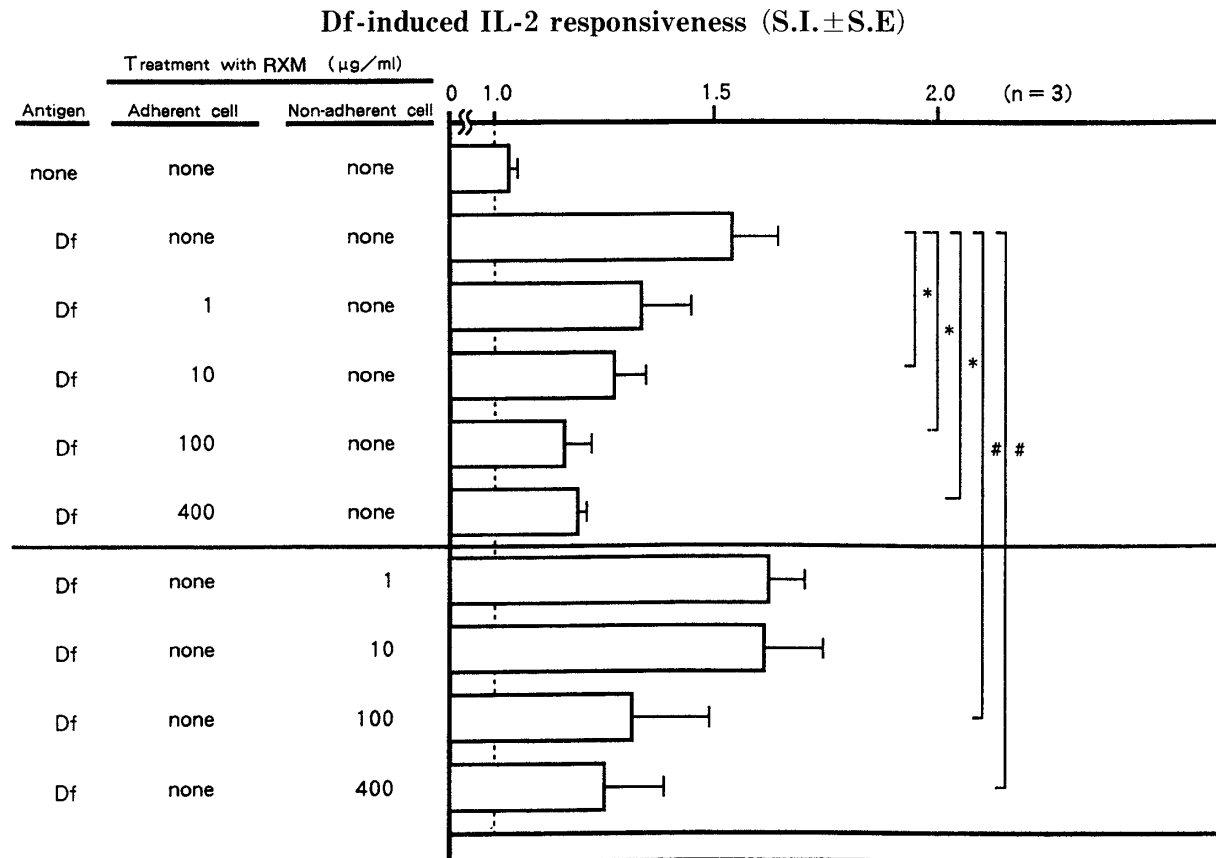


Fig. 5. RXM effected on antigen-presenting adherent cells rather than IL-2 responding non-adherent cells enriched for T cells to prevent the induction of Df-induced IL-2 responsiveness. Data are mean±SE of three independent experiments. * $p < 0.05$, # not significant.

胞として、あるいは遅延型過敏反応の effector T 細胞として作用する。また一方、これらのサイトカインが直接、肥満細胞や好酸球の分化誘導や延命を促進することによりアレルギー性炎症反応を遷延させることが知られている¹³⁾⁻¹⁵⁾。このようにアレルギー反応における抗原提示細胞からはじまる一連のサイトカイン・カスケードのなかで T 細胞は中心的役割を果している。

我々はアレルギー反応のカスケードにおける免疫担当細胞に与える RXM の作用について検討を加えた。RXM には、それ自体がリンパ球の IL-2 反応性を誘導する有意な作用を認めなかったことから芽球化反応をおこすような強いマイトジェンの作用は存在しないと考えられた。Df で活性化され、芽球化したリンパ球の IL-2 反応性の獲得に対する RXM の影響を検討するため、各濃度の RXM でリンパ球を処理し、Df 抗原で誘導される IL-2 反応性を検討したところ、50, 100, 200, 400 μg/ml の濃度で、IL-2 反応性の抑制が認められた。しかしながら、この反応は Con A などのマイ

トジェンによる芽球化反応を抑制しなかったことから、強い免疫抑制作用を示すものではないと考えられる。PPD など他の抗原で刺激した場合にも RXM は抑制作用を示したことから、RXM の抑制作用は抗原特異的ではなかったが、RXM にはアレルギー患者に特異的にみられるアレルギー刺激で誘導されるリンパ球の活性化を抑制する作用が存在すると考えられた。これらの抑制作用を示す RXM の標的細胞の検討では、RXM は反応細胞である T 細胞よりもむしろ抗原提示細胞に作用することが示唆された。非分画単核細胞を一括して処理した場合、50 μg/ml (同時処理) または 100 μg/ml (前処理) の RXM により Df 抗原特異的 IL-2 反応性が抑制されたが、抗原提示細胞の処理の場合 1 μg/ml の RXM で軽微の、10 μg/ml の RXM で有意な抑制作用が認められた。RXM の血清中の最高濃度は 150 mg 単回投与では 6.8 μg/ml であることを考え合わせると、今回の RXM の服用により、Df 抗原で誘導されるリンパ球の活性化及び IL-2 反応性の獲得は、生

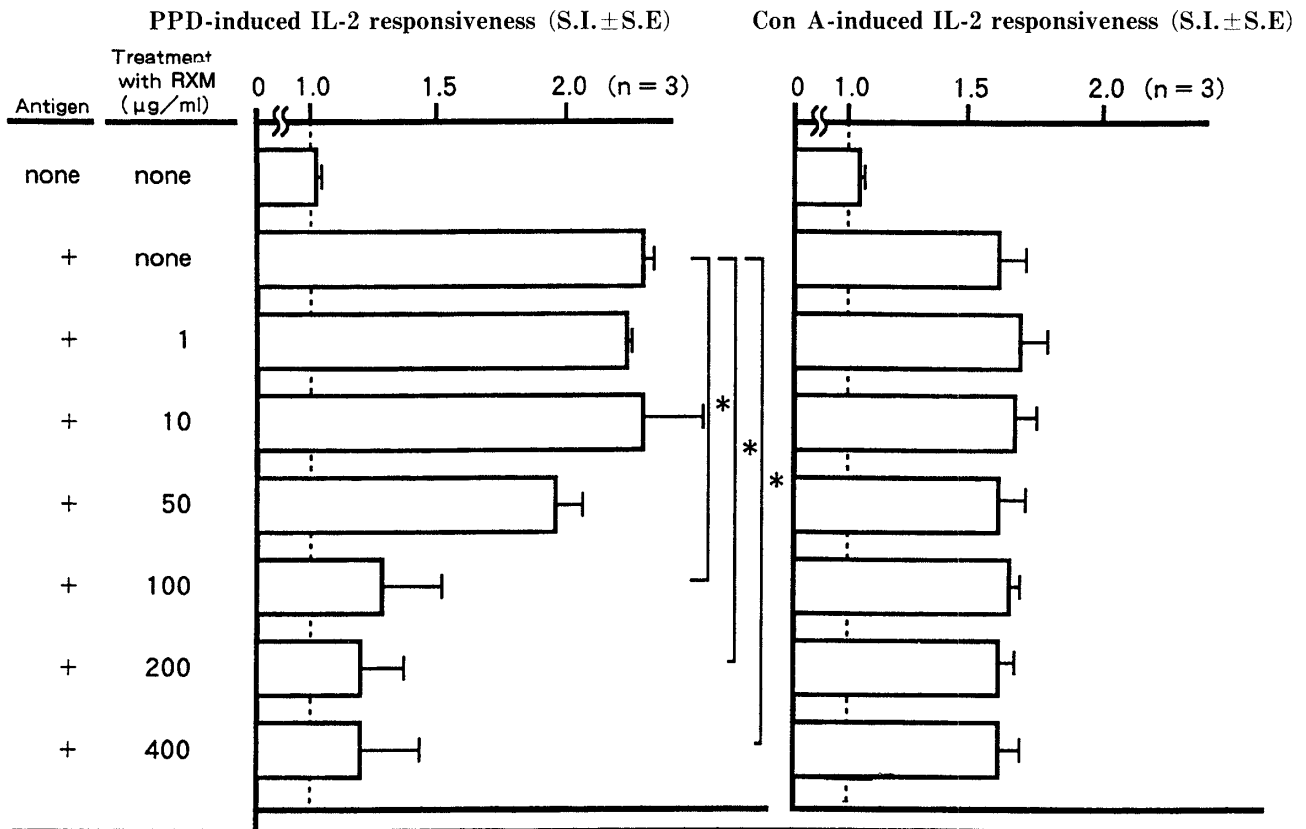


Fig. 6. RXM significantly suppressed the induction of IL-2 responsiveness in normal lymphocytes stimulated with PPD antigen but not with Con A. Data are mean $\pm$ SE of three experiments. * $p < 0.05$.

体内で抑制されうると考えられた。

今回の研究では RXM の抗原提示細胞に対する作用機序は十分に解析することはできなかった。予想される機序としては、ダニ抗原刺激により単球から産生される IL-1 が、T 細胞の IL-2 反応性誘導に関与することから、RXM の IL-1 産生の抑制、また抗原特異的 IL-2 反応性誘導は抗原提示細胞の細胞表面上の HLA class II 抗原 (DR, DQ, DP) に拘束されることや T 細胞と抗原提示細胞の相互作用は一部細胞接着因子 (ICAM-1 等) に依存することから、RXM のこれらの細胞表面分子の表出に対する影響などが上げられる。これらに関する解析は RXM のさらに詳細な免疫薬理学的作用を解明する際、今後引き続いて検討される必要があると考えられる。今回の研究において RXM は軽微な免疫抑制作用によりマクロファージなどの抗原提示機能に影響を与えていると考えられたが、ケトチフェン¹⁶⁾、アゼラスチン¹⁷⁾、オキサトマイド¹⁸⁾も抗原提示細胞に作用することを考え合わせると、RXM の抑制効果はこれらの抗アレルギー剤と類似していると

考えられた。

また、Con A などのマイトージェンにより誘導される IL-2 反応性は抑制されなかったことから、RXM は強い免疫抑制作用を有する薬剤ではなく、その長期連用は生体にとって比較的安全なものであると推測された。RXM には抗原により活性化された T リンパ球の分化増殖を抑制し、引続いて誘導されるアレルギー反応のサイトカイン・カスケードを構成する種々のサイトカインの産生を抑制する作用が存在すると推測される。これらの作用が I 型のみならず、T 細胞を介する一連のアレルギー反応の誘導及び発現を阻止している可能性が示唆された。

文 献

- 1) 野間 剛, 吉沢いづみ, 川野 豊, 伊藤雅彦, 馬場 実, 他: アレルゲンに対するアトピー患者リンパ球の応答性年齢による変動。健康児との比較および診断的意義。アレルギー 36, 1075-1085, 1987.

- 2) Noma, T., Kawano, Y., Yoshizawa, I., Mukouyama, T., Baba, M., et al.: Ovalbumin antigen specific induction of IL-2 responsiveness in lymphocytes from patients with hen egg allergy and its regulation by the culture supernatant of normal lymphocytes. *Ann. Allergy* 64, 33-41, 1990.
- 3) Yoshizawa, I., Noma, T., Kawano, Y. and Yata, J.: Allergen specific induction of IL-2 responsiveness in lymphocytes from asthmatic children. I. Antigen specificity and initial events of the induction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 246-255, 1989.
- 4) Noma, T., Yoshizawa, I., Kou, K., Nakajima, T., Kawano, Y., et al.: Pattern of cytokine production by T cells from adolescents with asthma in remission, after stimulation with *Dermatophagoides farinae* antigen. *Pediatr. Res.* 38, 187-193, 1995.
- 5) 門田淳一, 崎戸 修, 河野 茂, 阿部 航, 白井亮, 他: 慢性下気道感染症に対するロキシスロマイシン長期治療—臨床効果とサイトカインに及ぼす影響—. *感染症誌* 68, 27-33, 1994.
- 6) 岡本美孝, 更級則夫, 松崎全成, 桃生勝巳, 松木千加子, 他: 慢性副鼻腔炎へのロキシスロマイシン療法. *耳鼻臨床* 87, 997-1005, 1994.
- 7) Konno, S., Adachi, M., Asano, K., Okamoto, K. and Takahashi, T.: Inhibition of human T-lymphocyte activation by macrolide antibiotic, roxithromycin. *Life Science* 51, 231-236, 1992.
- 8) Shimizu, T., Kato, M., Mochizuki, H., Tokuyama, K., Morikawa, A., et al.: Roxithromycin reduces the degree of bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *Chest* 106, 458-461, 1994.
- 9) 岡本秀樹, 大橋淑宏, 大野義春, 杉浦欣一, 阪本浩一, 他: 花粉症に対するロキシスロマイシンの効果. *耳鼻臨床* 87, 1591-1599, 1994.
- 10) 岸本卓巳, 高橋 清: 喀痰過分泌型気管支喘息患者に対するロキシスロマイシンの臨床効果に関する検討. *日本胸部臨床* 53, 138-144, 1994.
- 11) Böyum, A.: Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 31-50, 1968.
- 12) 野間 剛, 吉沢いづみ, 中村 靖, 川野 豊, 中島忠, 他: PI 蛍光色素を用いたヒト末梢血リンパ球の抗原特異的 IL-2 反応性の迅速測定とアレルギー性疾患における病因抗原の検索. *アレルギー* 41, 1354-1366, 1992.
- 13) Yokota, T., Arai, N., de Vries, J., Spits, H., Banchereau, J., et al.: Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells. *Immunol. Rev.* 102, 137-145, 1988.
- 14) Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 145-173, 1989.
- 15) Finkelman, F.D., Holmen, J., Katona, I.M., Urban, J.F.J., Beckmann, M.P., et al.: Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* 8, 303-330, 1990.
- 16) Noma, T., Yoshizawa, I., Baba, M., Yata, J., Akasaka, T., et al.: Effect of ketotifen on antigen-induced interleukin 2 (IL-2) responsiveness in lymphocytes from patients with atopic dermatitis and/or bronchial asthma. *Int. J. Immunopharmacol.* 12, 269-277, 1990.
- 17) 轟伊佐雄, 吉沢いづみ, 川野 豊, 野間 剛: ヒト末梢血リンパ球の抗原特異的 interleukin 2 (IL-2) 反応性に与える azelastine の処理効果. *アレルギー* 39, 1509-1514, 1990.
- 18) 吉沢いづみ, 中島 忠, 川野 豊, 野間 剛: 気管支喘息児リンパ球のダニ抗原特異的 IL2 反応性誘導に与える oxatomide の処理効果. *アレルギー* 43, 535-543, 1994.

SUPPRESSIVE EFFECT OF ROXITHROMYCIN ON THE INDUCTION OF IL-2
RESPONSIVENESS BY DF-STIMULATED LYMPHOCYTES FROM
PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Tadashi Nakajima, Izumi Yoshizawa, Yutaka Kawano and Takeshi Noma
Department of Pediatrics, Saitama Medical School

Roxithromycin (RXM) is a new macrolide antibiotics, with anti-allergic properties, the mechanisms of which action has not been well understood. The effect of RXM-treatment on the induction of interleukin 2 (IL-2) responsiveness by *Dermatophagoides farinase* (Df)-stimulated lymphocytes was studied in patients with bronchial asthma. RXM alone has almost no effect on lymphocyte activation. Patient's lymphocytes treated with 10 to 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doses of RXMs failed to generate Df-induced IL-2 responsiveness in a dose-dependent manner. The target cells for suppressive effect of RXM were antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells rather than responder T cells. PPD-induced IL-2 responsiveness was also suppressed by the treatment, but the Con A-induced response was not. The results suggest that RXM is a slight immunosuppressant to block the induction of IL-2 responsiveness by Df-stimulated patient's lymphocytes, resulting in the interruption of a cytokine cascade of allergic responses.
