

## 各種抗生剤のヒト多形核好中球内への移行に関する研究

古賀 宏延・中里 博子・長沢 正夫・渡辺 謙一・福田 義昭  
 田中 光・朝長 昭光・重野 芳輝・藤田 紀代・鈴山 洋司  
 山口 恵三・斎藤 厚・原 耕平

長崎大学医学部第2内科

小笠原 正良

同 薬剤部

(昭和 59 年 11 月 8 日受付)

われわれは 10 種類の抗生剤に関して、ヒト多形核好中球内への移行性を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。

ペニシリン系抗生剤の ABPC と PIPC, それにセフェム系抗生剤の CEZ と CZX は移行率 (細胞内濃度と細胞外濃度の比) が低く, 0.5 倍以下であった。

抗結核剤の RFP と INH はそれぞれ 1.27 倍, 1.32 倍の移行率であった。

マクロライド系抗生剤の LCM は 2.65 倍と良好な移行率を示し, 同系統の CLDM は, 10 種類の抗生剤のなかでは最も優れた 10 倍以上の移行率であった。

新しい抗生剤の AC-1370 と OFLX はそれぞれ 1.18 倍, 8.10 倍の移行率を示した。

また CLDM と RFP に関しては, 経時的な移行率の変化を測定した。CLDM は 30 分以内の培養時間では移行率は不変であったが, 60 分から 120 分にかけては低下がみられた。一方 RFP のほうは, 全経過を通じて移行率は不変であった。

今回われわれが行なった, HPLC を応用した抗生剤の食細胞内への移行の測定は, 諸家にみられる放射性同位元素 (RI) を用いた報告と, その成績はよく一致したために有用な方法であることが示唆された。

今日の化学療法めざましい発達により, 感染症の治療は大きく進歩しつつある。しかし一方では耐性菌の出現や菌交代症, あるいは複数菌感染症などの難治性感染症の出現が問題となり, 抗生剤の発達だけでなく, 菌側の要因や宿主側の要因も非常に重要でかつ無視できないものとなってきている。

多くの微生物のなかには, 食細胞 (マクロファージや好中球) に貪食されたあとも生存し (細胞内寄生性病原体), 食細胞の殺菌作用から身を守ると同時に, ある種の抗生剤からもその攻撃をまぬがれて, 感染を遷延化させたり, 再燃, 再発をおこしやすいものが知られている<sup>1)</sup>。このような細胞内の微生物に対しては, たとえ試験管内で優れた抗菌力をもつ抗生剤であっても, それが細胞内へ移行できなければ臨床的な効果は期待できないことになる。

したがって各種抗生剤の食細胞内への移行性を知るとは, 細胞内で生存しうる微生物を治療する際には必須のことである。

抗生剤の体液中濃度あるいは組織内濃度の測定には, バイオアッセイ法をはじめとして多くの方法があるが, 細胞内の濃度測定は検体量が微量なこともあって, 諸外国での放射性同位元素 (radioisotope, 以下 RI と略) を用いた測定法の報告が散見されるのみである<sup>2-4)</sup>。

著者らは, 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, 以下 HPLC と略) の手技を応用し, 各種抗生剤の細胞内移行を, ヒト多形核好中球 (polymorphonuclear leukocyte, 以下 PMN と略) を用いて測定した。このようにヒト食細胞内の抗生剤濃度を, HPLC を用いて測定した報告はみられない。本法は従来の RI を用いた方法に比べて, 取り扱い上の困難さや人体への影響などがなく, 操作が簡単であることを明らかにしたので, その具体的手技に関して報告する。

## I. 材料および方法

## 1. ヒト多形核好中球 (PMN) の採集

健康成人より約 30 ml の静脈血をヘパリン加採血し

(ヘパリン 10~20 u/ml), Mono-Poly Resolving Medium (以下 M-PRM と略, Flow Laboratories Ltd.) を用いて PMN のみを分離した。

M-PRM を 17×100 mm の滅菌プラスチックチューブ (Falcon Labware) に 3 ml 入れ, その上に新鮮ヘパリン血を 3.5 ml 重層後, 300×g にて 30 分間, 室温 (15~30°C) で遠心した。PMN の fraction を取り, HANKS balanced salt solution (以下 HBSS と略) で洗浄後, もし赤血球の混入があれば 0.2% NaCl にて溶血させ (約 20 秒間), ただちに 1.6% NaCl を同量加えて等張液とした。最終的に細胞濃度が約  $2\sim5\times 10^8$ /ml になるように HBSS 液 10 ml に再浮遊させた。

なお PMN fraction は 95% 以上の PMN を含有し, trypan blue exclusion による viability は 99% 以上であった。

## 2. PMN 内への抗生剤の移行

下記に示した各種抗生剤を HBSS 液に, 濃度が 20 あるいは 100  $\mu$ g/ml になるように溶解させた。

Ampicillin (ABPC), Piperacillin (PIPC), Cefazolin (CEZ), Ceftizoxime (CZX), Lincomycin (LCM), Clindamycin (CLDM), Rifampicin (RFP), Isoniazid (INH), AC-1370, Ofloxacin (OFLX)。

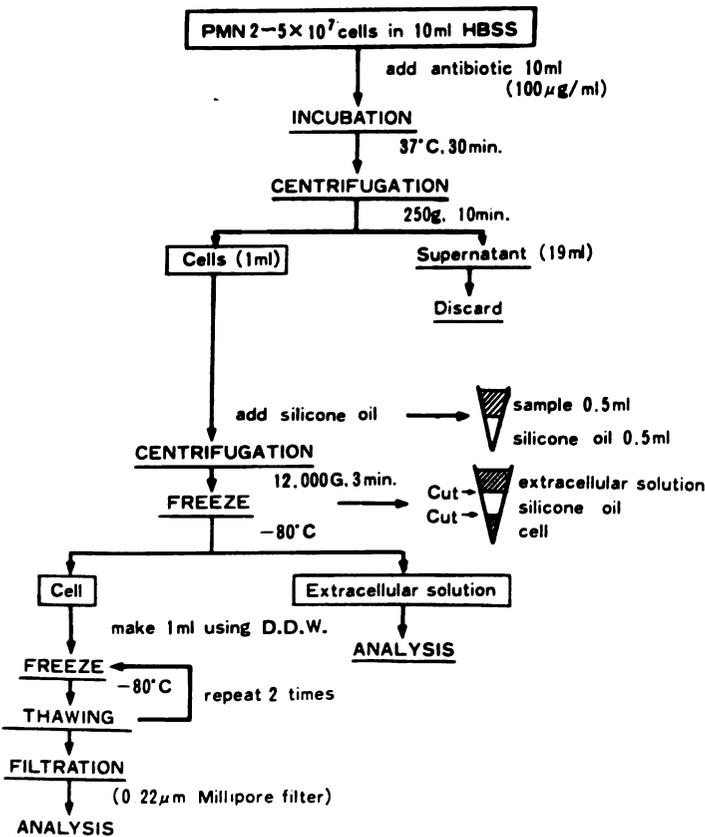
1. の PMN 浮遊液 (10 ml) と, 2. の抗生剤溶液 (10 ml) を混合し (抗生剤の最終濃度は 10 あるいは 50  $\mu$ g/ml となる), 37°C にて 30 分間振盪培養した。PMN の debris があればそれを除去した後, 250×g にて 10 分間, 4°C で遠心した。上清を 1 ml 残して PMN を再浮遊させた後, 再度細胞数を測定した。

また, CLDM と RFP については PMN と抗生剤の培養時間を 15 分, 30 分, 60 分, 120 分と経時的に測定した。

## 3. PMN と細胞外液との分離

抗生剤が移行した PMN と, 細胞外の抗生剤とを分離するために, FEEDMAN ら<sup>9)</sup>や JOHNSON ら<sup>8)</sup>が用いた velocity gradient technique (速度勾配遠心分離法) を利用した。

Fig. 1 Procedure for measurement of intracellular and extracellular antibiotic concentrations



microcentrifugation tube にシリコン油 (William F. Nye, Inc., New Bedford, Mass. No. DC 550 : No. DC 556=6:5 に混合) を 0.5 ml 入れ, その上に PMN 浮遊液を 0.5 ml 重層した後, 12,000×g にて 3 分間, 4°C で遠心した (微量高速遠心機, MR-15 A, TOMY Seiko Co., LTD.). この操作により, PMN のみが tube の底部に集積したのを確認した後, -80°C に凍結保存した。

Fig. 1 に示したように, PMN 層と細胞外液層はシリコン油を挟んで分離しているために, メスを用いて両者を切断した。細胞外液層はそのまま解凍したのち抗生剤の濃度を測定した (細胞外抗生剤濃度)。PMN 層は 1 ml の蒸留水に浮遊させ, 凍結-解凍を 2 回繰り返すことにより PMN を完全に破壊した。その後 0.22 μm の Millipore filter (Millipore Co.) を通過させて debris の除去を行なったのち, 抗生剤の濃度を測定した (細胞内抗生剤濃度)。

#### 4. PMN の体積

流血中の PMN の直径は 7.0~9.0 μm (平均 8.0 μm) とされており<sup>20)</sup>, PMN を球状と仮定して直径 8.0 μm で計算すると, 10<sup>7</sup> 個の PMN の体積は約 2.7 μl となった。一方, KLEMPNER ら<sup>7)</sup>の報告によると, [<sup>3</sup>H] H<sub>2</sub>O を用いた PMN の体積測定では, 5×10<sup>6</sup> PMN の体積は 1.02±0.02 μl であったとしており, この結果はわれわれが算出した上記の PMN 仮定体積とほぼ一致していた。したがって本稿における PMN 内抗生剤濃度の計算には, われわれが求めた仮定体積の値を使用した。

#### 5. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Waters 社の ALC/GPC model 206 を使用した (Model 6000 A pump, U 6 K injector, Model 441 de-

tector)。

Table 1 に示したように, カラムは μBondapak C<sub>18</sub> を使用し, 検出器の紫外線波長はそれぞれの抗生剤により, 214 nm または 254 nm を用いた。移動相はアセトニトリルまたはメタノールを, 0.05 モルのリン酸-カリウム (pH 6.0) と, 表に示したような割合で混合して用いた。抗生剤のピークが出現するまでの時間 (retention time) と流速 (ml/min) も同時に Table 1 に示した。

ここで具体的に CLDM を例にとり, その測定方法を示す。Fig. 2 は 50 μg/ml の濃度の CLDM 溶液を 20 μl 注入 (CLDM 1.0 μg に相当) した時のクロマトグラムを示した。CLDM のピークは検体を注入後 8.19 分後 (retention time, RT : 8.19) に現われ, そのピーク面積 (peak area) は 427260 を示した。

このように外部標準にて, いくつかの既知の濃度の CLDM 溶液を作り, 得られたピーク面積と CLDM の絶対量より標準曲線を作成した。

Fig. 3 は 4.18×10<sup>7</sup> の PMN を, 50 μg/ml の濃度の CLDM 溶液と 30 分間振盪培養し, その後前述したような処理を施した検体で, これを 200 μl 注入した時のクロマトグラムを示した。注入後, 細胞成分の幅広いピークが現われたあと, CLDM のピークが 8.10 分後に出現し (RT : 8.10), この時のピーク面積は 562239 を示した。

この結果と前もって作成した CLDM の標準曲線により, PMN 内の CLDM 濃度を計算した。

他の抗生剤に関してもまったく同様の方法にて, PMN 内抗生剤濃度を測定した。

## II. 成 績

各種抗生剤とヒト PMN を培養したあとの, それぞれ

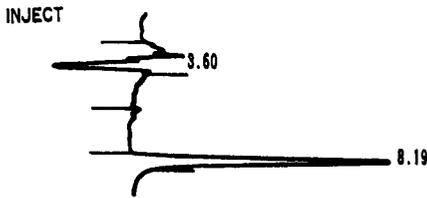
Table 1 High performance liquid chromatography (HPLC) apparatus and conditions

	Reversed phase column	UV wavelength (nm)	Mobile phase acetonitrile : phosphate buffer*	Retention time (min)	Flow rate (ml/min)
clindamycin	μ-Bondapak C <sub>18</sub>	214	50 : 50	8.2	1.0
lincomycin	"	214	20 : 80	10.0	1.0
rifampicin	"	254	50 : 50	5.5	1.0
ampicillin	"	214	10 : 90	11.2	1.0
piperacillin	"	214	15 : 85	12.0	1.0
ofloxacin	"	254	93 : 7**	5.7	1.8
cefazolin	"	254	methanol : PB 30 : 70	9.8	0.8
ceftizoxime	"	254	20 : 80	9.0	0.8
AC-1370	"	254	20 : 80	9.0	0.6
isoniazid	"	254	20 : 80	11.0	0.5

\* 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.0

\*\* 0.04 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.0

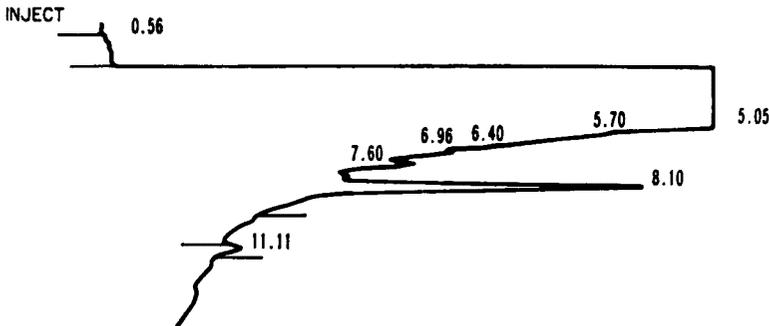
Fig.2 Standard curve of clindamycin by HPLC (1.0  $\mu$ g of clindamycin injected). The peak concentration (427.6) appears 8.19 minutes after injection and has an area of 427260.



## EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF	
	2.10300	2.11		2103	F	0.000000E0
	9.71600	2.25		9716	F	0.000000E0
	28.33600	2.59		28336	F	0.000000E0
	17.97900	2.79		17979	F	0.000000E0
	427.26000	8.19		427260	L	0.000000E0
TOTAL	485.39400					

Fig.3 Sampling of intracellular concentration of clindamycin (200  $\mu$ l injection). The peak concentration appeared 8.10 minutes after injection and had an area of 562239.



## EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF	
	66564.50000	2.63		66565021	F	0.000000E0
	127652.00000	2.96		127653583	HL	0.000000E0
	123750.00000	3.28		123751277	S	0.000000E0
	36.95800	5.05		36958	T	0.000000E0
	5.65000	5.70		5650	T	0.000000E0
	19.78300	6.40		19783	T	0.000000E0
	46.84200	6.96		46842	T	0.000000E0
	16.65500	7.60		16655	F	0.000000E0
	562.23900	8.10		562239	T	0.000000E0
	30.99900	11.11		30999	L	0.000000E0
TOTAL	318687.00000					

の細胞外濃度 (extracellular concentration, E. conc.) および細胞内濃度 (cellular concentration, C. conc.) を Table 2 に示した。また、細胞内濃度と細胞外濃度の比 (細胞内移行率, cellular/extracellular ratio: C/E ratio) も同時に示した。

ペニシリン系抗生剤は ABPC と PIPC を、セフェム

系抗生剤は CEZ と CZX を用いたが、いずれも C/E ratio は 0.5 以下で、細胞内濃度は細胞外濃度よりも低く、PMN への移行は悪い結果であった。しかし、新しいセフェム系抗生剤である AC-1370 は 1.18 倍の移行率を示し、この系統の抗生剤のなかでは比較的良好な移行率であった。

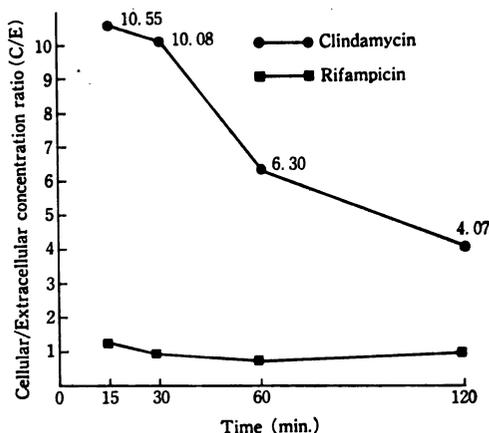
Table 2 Cellular and extracellular concentrations of antibiotics after 30 min. incubation in human PMN

Antibiotic	E. conc.	C. conc.	C/E ratio
clindamycin	50.0 $\mu\text{g/ml}$	634.9 $\mu\text{g/ml}$ †	12.70 (5)*
	10.0	103.2	10.32 (2)
lincomycin	50	132.5	2.65 (2)
rifampicin	50	63.5	1.27 (3)
isoniazid	50	66.0	1.32 (2)
ampicillin	50	23.1	0.46 (2)
piperacillin	50	10.5	0.21 (2)
cefazolin	50	20.0	0.40 (2)
ceftizoxime	50	19.0	0.38 (2)
AC-1370	50	59.0	1.18 (2)
ofloxacin	50	405.1	8.10 (2)

† : Mean

\* : Number of experiments

Fig. 4 The intracellular penetration of clindamycin



抗結核薬の RFP と INH は、いずれも 1 倍以上の移行率を示した。

マクロライド系抗生剤である LCM は移行率が良く、2.65 倍であった。同じ系統の CLDM は、今回の実験に用いた 10 種類の抗生剤のなかでは最も移行率が良好で、細胞外濃度を 50  $\mu\text{g/ml}$  と 10  $\mu\text{g/ml}$  の 2 種類で施行したが、いずれも 10 倍以上の高い移行率であった。

キノリン系の新しい抗生剤である OFLX は CLDM に次ぐ、8.10 倍という高い移行率を示した。

Fig. 4 に CLDM と RFP の経時的 (15 分から 120 分) な PMN 内移行率を示した。CLDM は 15 分および 30 分間の培養では、ほぼ同じ 10 倍以上の移行率であったが、60 分から 120 分間へと培養時間が長くなるにつれて、それぞれ 6.30 倍から 4.07 倍へと移行率が低下した。これに対して RFP は、15 分培養で 1.28 倍

の移行率を示したあと、120 分培養まではほぼ同じ 1 倍前後の移行率で、大きな変動はみられなかった。

### III. 考 察

数多くの病原微生物のなかでも、あるものは食細胞 (マクロファージや PMN) に貪食されたあとも、細胞内で生存することができる。そのために、これらの微生物は時として慢性的、あるいは再発性の感染症をおこすことが知られている<sup>1)</sup>。

食細胞内で生存することができる細菌には、*Mycobacterium tuberculosis*<sup>8,9)</sup>, *Listeria*, *Salmonella*<sup>10,11)</sup>, *Brucella*<sup>12)</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>13-15)</sup>, *Legionella pneumophila*<sup>16)</sup> などがある<sup>17-21)</sup>。これらの細菌に *in vitro* で有効な抗生剤を投与した場合、その抗生剤の細胞内への移行性が低ければ、細胞外に存在する細菌は死滅させても、細胞内に存在する細菌に対しては抗菌作用は発揮できないか、できても不充分である<sup>22,23)</sup>。

MANDELL と VEST<sup>18)</sup> は、数種の抗生剤の細胞内黄色ブドウ球菌に対する効果について検討した。彼らは RFP が細胞内に 2.2 倍も移行し、そのために唯一、細胞内ブドウ球菌に有効であったと報告している。同様なことは、細胞内の *E. coli*<sup>24)</sup> や *Salmonella*<sup>19)</sup> に対する各種抗生剤の有効性についても報告されている。このように各種抗生剤がどの程度細胞内に移行するのを知ることは、食細胞に貪食されてもその中で生存し、さらには増殖し得るような細菌による感染症を治療する際には非常に重要なことである。

抗生剤の体液中あるいは組織内濃度の測定には、バイオアッセイ法をはじめとしているいろいろな方法があるが、細胞レベルでの濃度測定は、検体量が非常に微量であるために、より高感度な測定法が必要となる。われわれは

このような理由から、今回の実験には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を応用した。

諸外国では、放射性同位元素 (RI) を薬剤に結合させ、その放射線量を測定することによって細胞内移行性をみた報告が散見される<sup>2-9)</sup>。JOHNSON ら<sup>2)</sup>は 14 種類の RI でラベルした抗生剤の、ウサギ肺胞マクロファージへの移行性を報告し、PROKESCH ら<sup>3)</sup>も同様に、13 種類の RI でラベルした抗生剤の、ヒト PMN への移行性を報告している。

このような RI を用いた方法に比べて、われわれが応用した HPLC は、RI のような取り扱い上の困難さや人体への影響、あるいは廃棄物の処理などの問題がなく、しかも操作が簡単であることが大きな利点である。さらに *in vitro* の実験のみでなく、*in vivo* に対しても応用できる可能性が示唆される。

また、細胞内に移行した薬剤の濃度を測定するためには、細胞外に存在する薬剤を完全に分離しなければならない。この目的のためにわれわれは、FREEDMAN ら<sup>4)</sup>や JOHNSON ら<sup>2)</sup>が用いた、velocity gradient technique (速度勾配遠心分離法) を利用した。これはシリコン油の中を細胞は通過するが、液体成分 (水分) は通過できないことを利用したもので、JOHNSON ら<sup>2)</sup>により、<sup>[3H]</sup>イヌリンを用いた実験で、水分は全体の 0.2~0.3% しか通過しないことが確かめられている。このようにシリコン油を用いた方法は、細胞と細胞外液とを非常に効率よく分離するために、本実験に充分利用できるものと思われる。

抗生剤の細胞内移行が、単なる生体膜あるいは粒子への非特異的付着であるかどうかは重要なことである。KLEMPNER ら<sup>7)</sup>は CLDM を用いて、赤血球と Sephadex G-50 beads による抗生剤の取り込みを調べた。その結果、CLDM は PMN へは 43.4 倍の移行を示したのに対し、赤血球と Sephadex beads へは、いずれも培養直後に 1.44 倍の移行を示した後、徐々に低下して約 1 倍程度の移行にとどまったとしている。このように微量ではあるが、抗生剤の生体膜への付着は CLDM 以外の抗生剤でも充分考えられるために、今回のわれわれの実験における細胞内抗生剤の濃度測定は、細胞膜に付着した抗生剤も含んでいるものと考えた。

今回の実験に用いた 10 種類の抗生剤のうち、PMN 内への移行が悪かったのは、ペニシリン系抗生剤の ABPC と PIPC、それにセフェム系抗生剤の CEZ と CZX であった。いずれも移行率は 0.5 倍以下であり、この結果は諸家の報告<sup>2,3)</sup>とも一致している。そしてこれらの抗生剤の細胞内移行が悪い理由として、彼らはこれらの薬剤の脂溶性が低いために細胞膜を通過できないこと

を示唆している。

また逆に、脂溶性の高い抗生剤として、RFP、LCM、CP (Chloramphenicol) などがあるが、これらの薬剤は容易に細胞膜に侵入し、細胞内の細菌を殺すことが知られている<sup>22,23-27)</sup>。われわれの成績でも RFP が 1.27 倍、LCM が 2.65 倍と良好な移行率を示した。

最も細胞内移行性が優れていたのは CLDM で、10 倍以上の移行率を認めた。CLDM が細胞内へ高濃度に移行するメカニズムについての報告はいくつかみられるが、JOHNSON ら<sup>2)</sup>や PROKESCH ら<sup>3)</sup>によると、細胞の viability や周囲の温度環境、あるいは pH の影響が大きいことを認めている。つまり CLDM の細胞内移行には、少なくとも能動的代謝を必要とし、とくに解糖系の関与が大きいことを示唆している。

次にわれわれは CLDM と RFP の細胞内移行を経時的に観察した。RFP は 15 分から 120 分までの間で、とくに大きな移行率の変化はみられなかった。それに対して CLDM のほうは、15 分から 30 分までは 10 倍以上の移行率であったが、60 分から 120 分にかけて移行率が漸減し、4 倍まで低下が認められた。JACOBS ら<sup>8)</sup>も同様の観察を試みているが、やはりわれわれの成績と同じく、120 分後に最低値を示している。このように培養時間が長くなると CLDM の細胞内移行率が低下する原因は不明であるが、前述したような食細胞内移行のメカニズムから推定すると、おそらく PMN の viability や培養液の pH などが関与していると思われる。

このようにして細胞内へ移行した抗生剤の生物活性が保たれているかどうかは重要なことであるが、CLDM の場合はバイオアッセイ法により、その生物活性は保たれたままであることが証明されている<sup>7)</sup>。

このほかわれわれは新しい抗生剤である、AC-1370 と OFLX の細胞内移行率を測定したが、両者とも良好な移行率を示し、とくに OFLX では CLDM に次ぐ 8 倍という高い移行率であった。これらの薬剤の細胞内移行のメカニズムについては今後の検討が必要であろう。

今回われわれが行なった、HPLC を応用して食細胞内抗生剤の濃度を測定した成績は、従来の RI を用いた成績に非常によく一致したために、今後も広く利用できるものと思われる。

抗生剤が食細胞内に侵入した時の問題点として、食細胞の機能にどのような影響を与えるかも重要である。また細胞内移行性を利用して、炎症部位へ薬剤を運搬する、いわゆる広義のターゲティング療法に応用するのも可能であろう。このように抗生剤の食細胞内への移行に関しては、多くの問題点や応用が考えられると同時に、感染症の治療には、生体側の防御因子としての食細胞

と、それを補助する抗生剤の関係は必要かつ不可欠のものであり、両者の利点を生かしながら今後も検討を進めていく必要がある。

### 文 献

- 1) Report of a WHO scientific group: Cell-mediated immunity and resistance to infection. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 44: 589~648, 1973
- 2) JOHNSON, J. D.; W. L. HAND, J. B. FRANCIS, N. KING-THOMPSON & R. W. CORWIN: Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *J. Lab. Clin. Med.* 95: 429~439, 1980
- 3) PROKESCH, R. C. & W. L. HAND: Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 21: 373~380, 1982
- 4) HAND, W. L.; N. KING-THOMPSON & T. H. STEINBERG: Interactions of antibiotics and phagocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 12: 1~11, 1983
- 5) JACOBS, R. F. & C. B. WILSON: Intracellular penetration and antimicrobial activity of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 12: 13~20, 1983
- 6) FREEDMAN, M. H.; M. C. RAFF & B. GOMPERS: Induction of increased calcium uptake in mouse T lymphocytes by concanavalin A and its modulation by cyclic nucleotides. *Nature* 255: 378~382, 1975
- 7) KLEMPNER, M. S. & B. STYRT: Clindamycin uptake by human neutrophils. *J. Infect. Dis.* 144: 472~479, 1981
- 8) SUTER, E.: Multiplication of tubercle bacilli within phagocytes cultivated *in vitro*, and effect of streptomycin and isonicotinic acid hydrazid. *Am. Rev. Tuberc.* 65: 775~776, 1952
- 9) MACKANESS, G. B.: The action of drugs on intracellular tubercle bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 64: 429~446, 1952
- 10) SHOWACRE, J. L.; H. E. HOPPS, H. G. DU BUY, J. E. SMADEL: Effect of antibiotics on intracellular *Salmonella typhosa*. 1. Demonstration by phase microscopy of prompt inhibition of intracellular multiplication. *J. Immunol.* 87: 153~161, 1961
- 11) RHODES, M. W. & H. S. HSU: Effect of kanamycin on the fate of *Salmonella enteritidis* within cultured macrophages of guinea pigs. *J. Reticuloendothel. Soc.* 15: 1~12, 1974
- 12) SHAFFER, J. M.; C. J. KUCERA & W. W. SPINK: The protection of intracellular *Brucella* against therapeutic agents and the bactericidal action of serum. *J. Exp. Med.* 97: 77~91, 1953
- 13) MANDELL, G. L. & T. K. VEST: Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampicin: *in-vitro* and *in-vivo* studies. *J. Infect. Dis.* 125: 486~490, 1972
- 14) EASMON, C. S. F.: The effect of antibiotics on the intracellular survival of *Staphylococcus aureus in vitro*. *Br. J. Exp. Pathol.* 60: 24~28, 1979
- 15) PESANTI, E. L.: Protection of staphylococci ingested by macrophages from the bactericidal action of rifampicin. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 18: 208~209, 1980
- 16) HORWITZ, M. A. & S. C. SILVERSTEIN: Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Invest.* 66: 441~450, 1980
- 17) HOLMES, B.; P. G. QUIE, D. B. WINDHORST, B. POLLARA & R. A. GOOD: protection of phagocytized bacteria from the killing action of antibiotics. *Nature (London)* 210: 1131~1132, 1966
- 18) ALEXANDER, J. W. & R. A. GOOD: Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 71: 971~983, 1968
- 19) SOLBERG, C. O.: Protection of phagocytized bacteria against antibiotics. *Acta Med. Scand.* 191: 383~387, 1972
- 20) VANDAUX, P. & F. A. WALDVOGEL: Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 16: 743~749, 1979
- 21) ROUS, P.; F. S. JONES: The protection of pathogenic microorganisms by living tissue cells. *J. Exp. Med.* 23: 601~612, 1916
- 22) BONVENTRE, P. F. & J. G. IMHOFF: Uptake of <sup>3</sup>H-dihydrostreptomycin by macrophages in culture. *Infect. Immun.* 2: 89~95, 1970
- 23) MANDELL, G. L.: Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics. *J. Clin. Invest.* 52: 1673~1679, 1973
- 24) LOBO, M. C. & G. L. MANDELL: The effect of antibiotics on *Escherichia coli* ingested by macrophages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 1048~1050, 1973
- 25) EZER, G. & J. F. SOOTHILL: Intracellular bactericidal effects of rifampicin in both normal and chronic granulomatous disease polymorphs. *Arch. Dis. Child.* 49: 463~466, 1974
- 26) KORNGUTH, M. D. & C. M. KUNIN: Uptake of antibiotics by human erythrocytes. *J. Infect. Dis.* 133: 175~184, 1976
- 27) MCLEOD, T. E.; D. R. MANYAN & A. A. YUNIS:

The cellular transport of chloramphenicol and thiamphenicol. *J. Lab. Clin. Med.* 90: 347~353, 1977

28) 水上茂樹, 柿沼カツ子: 白血球と食作用, 講談社, 9~81, 1979

## POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE (PMN) PENETRATION OF ANTIBIOTICS

HIRONOBU KOGA, HIROKO NAKAZATO, MASAO NAGASAWA,  
KOICHI WATANABE, YOSHIAKI FUKUDA, HIKARU TANAKA,  
AKIMITSU TOMONAGA, YOSHITERU SHIGENO, KIYO FUJITA,  
YOJI SUZUYAMA, KEIZO YAMAGUCHI, ATSUSHI SAITO and  
KOHEI HARA

The Second Department of Internal Medicine,  
Nagasaki University School of Medicine

MASAYOSHI OGASAWARA

Department of Pharmacy, Nagasaki University Hospital

We have studies on the penetration of ten kinds of antibiotics into human polymorphonuclear leukocytes (PMNs) by the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The penetration into PMNs of some of the beta-lactam antibiotics, such as ampicillin, piperacillin, cefazolin, and ceftizoxime was poor whereas the penetration of AC-1370, a new cephem antibiotic was somewhat superior to cepheims above mentioned ( $C/E=1.18$ ). The intracellular concentrations of these antibiotics remained much lower than the extracellular concentrations ( $C/E<0.5$ ).

Rifampicin and isoniazid attained slightly higher intracellular antibiotic concentration ( $C/E=1.27$  and  $1.32$ , respectively). The intracellular concentration of lincomycin was approximately three times higher than the extracellular concentration ( $C/E=2.65$ ).

In contrast, the intracellular concentration of clindamycin was ten times higher than the extracellular concentration ( $C/E=12.70$ ). The  $C/E$  ratio, however, gradually decreased after reaching a maximum value at 15 to 30 minutes, but that of rifampicin kept in almost same level in each time during two hours. The intracellular concentration of ofloxacin was eight times greater than the extracellular concentration ( $C/E=8.10$ ).

The  $C/E$  ratios of antibiotics obtained in our study were very similar to the results reported by the radioisotope technique.