

## マクロライド系抗生剤のヒト好中球内への移行に関する研究

真崎美矢子・道津 安正・増山 泰治・山下 京子  
古賀 宏延・須山 尚史・河野 茂・山口 恵三  
広田 正毅・斉藤 厚・原 耕平  
長崎大学医学部第二内科

(昭和62年2月27日受付)

マクロライド系抗生剤である EM, JM, TE-031, RKM, Ru-28965 の5薬剤について、ヒト多形核白血球内への移行性を radioisotope  $^{14}\text{C}$  をラベルした薬剤を用いて測定した。37°C 培養下での移行率(細胞内/外濃度比)は、EM; 6.6 倍, JM; 15.5 倍, TE-031; 16.4 倍, RKM; 30.5 倍, Ru-28965; 21.9 倍と、いずれも高値を示した。ホルマリン処理好中球および低温培養下での移行率は5薬剤ともに著明に低下した。また、pH が酸性になるほど移行率は低下し、pH 依存性が示唆された。細胞のエネルギー代謝阻害剤であるフッ化カリウムおよびシアン化ナトリウムを添加すると、それぞれ 2~47%, 4~38% 程度の移行率の低下が認められた。またマクレオンドの一種であるアデノシンの添加では EM 以外の4薬剤で 8~17% の移行率の低下がみられた。

細胞内へ移行した5薬剤は、細胞外の薬剤を除去するといずれも急速に細胞外へ流出し、5分後には 30% 以下に低下した。

今回我々が用いた5種類のマクロライド系抗生物質は、いずれも良好な細胞内移行性を示し、これらの細胞内への移行には能動輸送が関与していることが示唆された。

多くの微生物の中には、食細胞に貪食されたあとも生存しうる細胞内寄生性病原体といわれるものが存在する。結核菌<sup>1,2)</sup>、リステリア、サルモネラ菌<sup>3,4)</sup>、黄色ブドウ球菌<sup>5-7)</sup>、レジオネラ<sup>8)</sup>などが該当するが、これらのいわゆる細胞内増殖菌と呼ばれるものによる感染症の治療には、抗生剤の抗菌力に加えて、その細胞内への良好な移行性が要求される。

今回我々は、放射性同位元素 (radioisotope, 以下 RI と略) で標識した Erythromycin (EM), Josamycin (JM), Rokitamycin (RKM), TE-031, Ru-28965 の5つのマクロライド系抗生物質の、ヒト好中球内への移行性と細胞内移行に関するメカニズムについて検討したので、その成績を報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. ヒト多形核好中球 (PMN) の分離

健康成人より約 60 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., Australia) を用いて PMN のみを分離した。すなわち、M-PRM を 17×100 mm の滅菌プラスチックチューブ (Falcon Labware, USA) に 4.0 ml 入れ、その上に新鮮ヘパリン血を 5.0 ml 重層後、300 g にて 30 分間室温で

遠沈した。PMN の fraction を取り、Hank's balanced salt solution (以下、HBSS と略) で洗浄後、赤血球の混入があれば、0.2% 生食水にて約 20 秒間溶血させた後、1.6% 生食水を等量加えて等張液とした。HBSS にて 2 回洗浄後、細胞数が  $1.0 \times 10^7/\text{ml}$  になるように再浮遊させた。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

次の放射性同位元素標識抗生剤を使用した。 $^{14}\text{C}$  Erythromycin (3.68 mCi/mmol),  $^{14}\text{C}$  Josamycin (4.55 mCi/mmol) (いずれも第一化学薬品株式会社),  $^{14}\text{C}$  Rokitamycin (4.32 mCi/mmol) (東洋醸造株式会社),  $^{14}\text{C}$  TE-031 (55.1 mCi/mmol) (大正製薬株式会社),  $^{14}\text{C}$  Ru-28965 (54.5 mCi/mmol) (日本ルセル株式会社)。各抗生剤の濃度は 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように HBSS に溶解した。

前述の PMN 浮遊液 1.0 ml と上記の抗生剤溶液 1.0 ml を混合し (抗生剤の最終濃度は 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となる), 37°C で培養した後、一定時間ごとに培養液を取り出し、以下に示したシリコン油を用いた速度勾配遠心分離法<sup>9,10)</sup> によって細胞外液と PMN を分離した。Microcentri-

fuge tube の底に 88% 甲酸を 20  $\mu$ l 入れ、その上にシリコン油 (トーレ・シリコン株式会社, SH 550: SH 556=6:5 に混合) を 0.5 ml 加え、さらにその上に PMN 培養液 0.5 ml を重層した後、12,000 g にて 3 分間遠心した (日立微量高速遠心器, SCT 15 B)。

### 3. 放射活性の測定

PMN 層と細胞外液層はシリコン油をはさんで分離しているため、細胞外液 200  $\mu$ l を 10 ml のシンチレーション溶媒 (ACS-II, Amersham, Ltd.) 中へ移し、PMN 層は microcentrifuge tube をはさみで切断することによって取り出し、別の ACS-II 10 ml 中へ移した。それぞれの検体の放射活性を液体シンチレーションカウンタ (アロカ LSC 903) を用いて測定した。

### 4. PMN の体積

細胞内容積を  $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$  および  $[^{14}\text{C}]\text{Polyethylene glycol (PEG)}$  (New England Nuclear Corp.) を用いて測定した。両者をそれぞれ PMN と 2 分間反応させた後、前述の速度勾配遠心分離法を用いて細胞と細胞外液とを分離し、トリチウム水により沈下した全水分量を、PEG により細胞とともに沈下した細胞外液量 (trapped water) を測定した<sup>9,11,12)</sup>。

### 5. PMN による抗生剤取り込みの機構

マクロライド系抗生剤の PMN 内への移行のメカニズムを調べるために、培養条件の変化や、代謝阻害剤、ヌクレオシドの影響について検討した。

抗生剤と PMN を 4°C にて培養し、低温環境下における移行率の変化を調べた。また、PMN を 10% ホルマリンにて 30 分間処理することにより死滅させた後、HBSS にて 2 回洗浄後各抗生剤の移行率を測定した。

PMN の代謝エネルギー阻害剤としてのフッ化カリウム (以下、KF と略) とシアン化ナトリウム (以下、NaCN と略、いずれも和光純薬工業株式会社) をそれぞれ 1.0 および 5.0 mM の濃度で PMN とともに 37°C、30 分間培養し、その後各抗生剤を加えて移行率を測定した。また、ヌクレオシドの一つであるアデノシン (東京化成工業株式会社) による競合的阻害の程度についても検討した。

培養液の pH を 5.0 から 7.5 まで変化させて、PMN と抗生剤を 15 分間培養し、酸性域での取り込みの特徴を調べた。

### 6. 抗生剤の細胞外への流出

抗生剤の細胞内から細胞外への流出についての検討は、PMN と各抗生剤を 37°C にて 15 分間培養した後、抗生剤を含まない HBSS に再浮遊させ、一定時間ごとに細胞内抗生剤の濃度を測定することによって求め

Fig. 1 Uptake of macrolides by human PMN

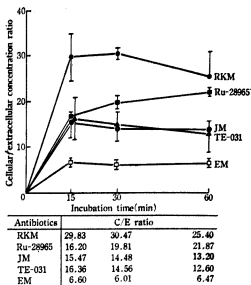
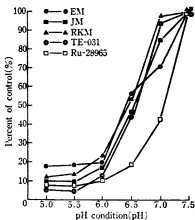


Fig. 2 Effect of pH on macrolide uptakes by human PMN



た。

## II. 実験成績

PMN の体積はトリチウム水と PEG により測定したが、 $1.0 \times 10^7$  の PMNs の体積は 2.15  $\mu$ l (trapped water を引いた値) であった。以後はこの値を用いて細胞内の薬液濃度を算出した。

### 1. 37°C 培養下での移行率

5 種のマクロライド系抗生剤に関する 37°C 培養下での移行率を Fig. 1 に示した。移行率のピーク値は EM が 6.6 倍、JM が 15.5 倍、TE-031 が 16.4 倍、

Table 1 Influence of cell viability and environmental temperature on macrolide uptake by human PMN

Incubation conditions (30 min)	C/E ratio				
	EM	JM	TE-031	RKM	Ru-28965
Viable cells (37°C)	6.0	14.5	14.6	30.5	19.8
Viable cells (4°C)	2.6	2.7	1.6	7.4	1.7
Dead cells (37°C)	1.6	2.6	2.6	4.7	2.4

Table 2 Influence of inhibitors of cellular metabolism and adenosine

Inhibitor (5mM)	% of control				
	EM	JM	TE-031	RKM	Ru-28965
Potassium fluoride	77.1	52.9	72.6	66.8	97.9
Sodium cyanide	64.5	61.8	83.8	95.9	88.8
Adenosine	100.0	82.5	86.0	91.7	88.6

After pretreatment with inhibitors (at 37°C, 30 min) PMNs were incubated at 37°C for 15 min.

Ru-28965 が 21.9 倍, RKM が 30.5 倍といずれの薬剤も高い値を示した。

#### 2. 低温およびホルマリン処理好中球への移行率

各抗生剤に関して 4°C の低温培養およびホルマリン処理好中球への移行性を検討したがいずれの抗生剤においても移行率は著明に低下した (Table 1)。すなわち, 4°C の培養条件下ではコントロールの 8.6~43.3% に低下, 死好中球内へは 12.1~26.7% に移行率が低下した。

#### 3. pH の違いによる移行率の変化

pH の違いによる好中球内への各抗生剤の移行率の変化は (Fig. 2), pH 7.4 を 100% とすると, pH が酸性になるほど移行率は低下した。

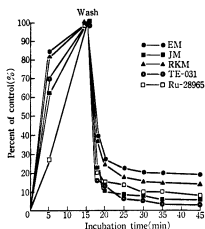
#### 4. 代謝阻害剤による影響

解糖系の代謝阻害剤である KF, ミトコンドリアの呼吸鎖の阻害剤である NaCN, およびアデノシンを作用させた時の移行率の変化を Table 2 に示した。KF により移行率は 2~47% 減少し, 特に JM はコントロールの 52.9% と著明な低下が認められた。また, NaCN の影響は EM および JM において強くみられ, それぞれ 64.5%, 61.8% に低下した。アデノシンでは EM 以外の薬剤に関して 8~17% の移行率の低下がみられた。

#### 5. 好中球からの抗生剤の流出

細胞外抗生剤除去後の好中球からの抗生剤の流出は極めて速く, 5 分後には 30% 以下となった (Fig. 3)。

Fig. 3 Efflux of intracellular macrolides from human PMN



### III. 考 察

抗生剤の細胞内濃度の測定には, 検体が微量であるため高感度の測定法が必要である。我々は RI を用いて, マクロライド系抗生剤のヒト好中球内への移行率を測定した。

我々はすでに HPLC を用いて各種抗生剤の好中球内への移行率を測定し報告した<sup>14)</sup>が, マクロライド系抗生剤に関しては HPLC での感度は低いと測定が困難であった。そこで, 今回は RI をラベルした薬剤を用いる

ことによって、その移行率を測定したが、この方法自体は諸外国において多くの報告がなされている<sup>9,11,12</sup>。

JOHNSONら<sup>9</sup>は RI でラベルした14種類の抗生剤のウサギ肺胞マクロファージ内への移行性を報告し、PROKESCHら<sup>12</sup>も同様に13種類の抗生剤のヒト好中球内への移行性を報告している。これらによると、ペニシリン系やセフェム系抗生剤の細胞内移行率は極めて低く、CLDM や EM の移行率は高いと述べている。

今回の私達の試験でも、EM を含む5種類のマクロライド系抗生剤はいずれも極めて高い細胞内移行率を示し、EM および JM の移行率は諸外国の報告とはほぼ同様の結果であった<sup>9,12,14</sup>。また、その他の RKM, TE-031, Ru-28965 に関しては未だ報告はなされていないが、今回の成績では EM, JM を上回る良好な移行率が得られた。

好中球内への抗生剤移行の特徴を検討したが、4°C の低温や、10% ホルマリン処理した死細胞では、いずれの抗生剤でも移行率は著明に低下した。すなわち、これらの薬剤の好中球内への移行には、細胞の viability と生理的環境温度が必要であると思われた。また、これらの抗生剤は、培養液の pH が酸性になるほど移行率は低下しており、pH 依存性があることも明らかにした。先に述べた変化と考え合わせると、これら薬剤の細胞内移行には、媒介透過のメカニズムが強く関与していることが示唆される。

さらに、これらの抗生剤の能動輸送機構を検討するために、解糖系の代謝阻害剤である KF, ミトコンドリアの呼吸鎖の阻害剤である NaCN, およびヌクレオシドの一つであるアデノシンを作用させてみた。その結果、程度の差は様々であったが、少なくとも部分的にはエネルギー代謝に依存していることが明らかとなり、能動輸送の関与が示唆される結果が得られた。KF を作用させると、特に JM において移行率は約半分にまで低下し、解糖系からのエネルギー要求性が大いことを示唆する結果と考えられた。また、NaCN の影響は EM と JM において強く現われ、ミトコンドリアからのエネルギーの関与も大きいことが示唆された。しかし、PROKESCHら<sup>12</sup>は、PMN にはミトコンドリアは少なく、エネルギーは主に解糖系に依存すると述べており、我々の結果とは若干の相違がみられた。また、アデノシンの存在下での競合的阻害をみると、EM 以外でその移行率は8~17% 低下しており、能動輸送の中でもヌクレオシド輸送系が関与していると考えられる結果であった。

DETTEら<sup>14</sup>も種々の代謝阻害剤を用いて EM の好中球内への移行に与える影響を調べているが、NaF で 21

%、NaCN で 28%、アデノシンで 43% の減少がみられたとし、やはり能動輸送の関与、なかでも解糖系とミトコンドリアの両方のエネルギー代謝が必要であると報告している。さらにアデノシンおよびウラビンで移行率の低下がみられたことから、EM も CLDM と同様にヌクレオシド輸送系を介していると述べている。しかし、我々の成績ではアデノシンによる EM の有意な移行率の低下はみられなかった。

また、細胞外の薬剤を除去すると、細胞内の抗生剤は速やかに細胞外へ流出する現象がみられたことより、細胞内の薬剤は細胞成分と強く結合しているわけではなく、細胞内外への移動は可逆性であることが明らかになった。

食細胞と抗生剤の相互作用は感染症治療において極めて重要なことであり、細胞内寄生菌に対しては、抗生剤が食細胞内へ移行しなければ微生物に作用することができない。今回検討した5種のマクロライド系抗生剤は、これまで報告されている成績と比較すると、ペニシリン系やセフェム系抗生剤に比べ、高い細胞内移行性を有し、細胞内細菌に対して優れた臨床効果が期待できるものと思われた。

#### 文 献

- 1) MACKANESS, G. B.: The action of drugs on intracellular tubercle bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 64: 429~446, 1952
- 2) SUTER, E.: Multiplication of tubercle bacilli within phagocytes cultivated *in vitro*, and effect of streptomycin and isonicotinic acid hydrazide. *Am. Rev. Tuberc.* 65: 775~776, 1952
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) PESANTI, E. L.: Protection of staphylococci ingested by macrophages from the bactericidal

- action of rifampicin. Antimicrob. Agent. Chemother. 18: 208~209, 1980
- 8) HORWITZ, M. A. & S. C. SILVERSTEIN: Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. J. Clin. Invest. 66: 441~450, 1980
- 9) JOHNSON, J. D.; W. L. HAND, J. B. FRANSIS, N. KING-THOMPSON & R. W. CORWIN: Antibiotic uptake by alveolar macrophages. J. Lab. Clin. Med. 95: 429~439, 1980
- 10) 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
- 11) KLEMPNER, M. S. & B. STYRT: Clindamycin uptake by human neutrophils. J. Infect. Dis. 144: 472~479, 1981
- 12) PROKESCH, R. C. & W. L. HAND: Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agent. Chemother. 21: 373~380, 1982
- 13) 古賀宏延, 中里博子, 長沢正夫, 渡辺勝一, 福田義昭, 田中光, 朝長昭光, 重野芳輝, 藤田紀代, 鈴山洋司, 山口憲三, 齊藤厚, 原耕平: 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. Chemotherapy 33: 688~695, 1985
- 14) DETTE, G. A. & H. KNOTHE: Kinetics of erythromycin uptake and release by human lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes. J. Antimicrob. Chemother. 18: 73~82, 1986

## POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE (PMN) PENETRATION OF MACROLIDES

MIYAKO MASAKI, YASUMASA DOHTSU, YASU HARU MASUYAMA, KYOKO YAMASHITA,  
HIRONOBU KOGA, NAOFUMI SUYAMA, SHIGERU KOHNO, KEIZO YAMAGUCHI,  
MASAKI HIROTA, ATSUSHI SAITO and KOHEI HARA

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

A radioisotopic method was used to determine the penetration of five macrolide antibiotics into human polymorphonuclear leukocytes (PMN). The penetration ratios (that is, of the cellular concentration to the extracellular concentration) of erythromycin, josamycin, rokitamycin, TE-031, and Ru-28965, all macrolides, were very high. Macrolide uptake by PMN was dependent on environmental temperature and cell viability. Also, the accumulation of these antimicrobials was inhibited by sodium cyanide, potassium fluoride, and adenosine. Based on our findings, we consider that macrolide uptake by human PMN is mediated by an active transport system, and more specifically a nucleoside transport system.