

各種抗生物質の好中球に対する細胞傷害性

安生 紗枝子・近藤 由利子

東邦大学医学部付属大森病院薬剤部*

(平成3年7月16日受付・平成3年8月28日受理)

代表的抗生物質の多形核白血球 (PMN) に対する直接の細胞傷害性を ^{51}Cr 標識マウス PMN を用いて定量的に比較検討した。 β -ラクタム系の ampicillin, carbenicillin, piperacillin, cephalexin および latamoxef, アミノグリコシド系の gentamicin, マクロライド系の erythromycin, リンコマイシン系の clindamycin, およびクロラムフェニコール系の chloramphenicol は、いずれも常用血中濃度の範囲では傷害性を示さず、その 100~1,000 倍の濃度で初めて傷害性を現わすことが分った。テトラサイクリン系の minocycline, ポリペプチド系の colistin, polymyxin B およびポリエン系の amphotericin B は濃度依存的に細胞傷害性を現わす傾向が見られたが、その PMN 細胞傷害性を現わす濃度は、抗菌抗生物質では常用血中濃度の 50 倍以上であり、抗真菌抗生物質の AMPH でも 10 倍以上であった。細胞傷害性発現が高濃度で出現するものと濃度依存性に出現するものでは PMN 傷害惹起機構が異なることが示唆された。また、抗腫瘍抗生物質では、mitomycin, bleomycin および pepleomycin の直接の PMN 細胞傷害性は低かった。Daunorubicin (DNR), actinomycin D, doxorubicin および aclarubicin の傷害性はかなり高く、特に DNR の PMN に 50% の Cr 遊離を起こす濃度、PMN₅₀ 値は常用血中濃度に近いことが分った。これらの *in vitro* の成績を直接 *in vivo* に当てはめることには問題があるが、報告されているこれらの薬剤の LD₅₀ 値が PMN₅₀ 値に平行することから、PMN₅₀ 値がこれら薬剤の毒性評価の基準となりうるということが示唆された。

Key words: 抗生物質, 好中球, 細胞傷害性

感染症では、多形核白血球 (PMN) が細菌感染抵抗の初期生体防御機構として重要な働きを担っている。したがって、抗生物質は単にそれ自体の殺菌効果のみならず、PMN と協力的に働くことが望ましい^{1,2)}。しかし、このような協力作用についてはまだ不明なことが多く、むしろ、その毒性によると思われる免疫抑制作用を有する薬剤の報告が多い³⁻⁶⁾。この PMN 機能の抑制は、近年問題視されている immunocompromised host での弱毒菌感染症の薬剤選択に重要であると考えられる。

PMN は長時間にわたる培養が困難であるために、薬剤の直接の細胞傷害性を調べた報告は少ない。そこで、代表的抗生物質の PMN 傷害性を定量的に比較検討することを試みることにした。本報では、薬剤の PMN に対する直接の細胞傷害性を、 ^{51}Cr 標識マウス PMN からの薬剤処理による Cr の遊離によって *in vitro* で測定した結果を報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Ampicillin (ABPC, 明治製菓), carbenicillin (CBPC, ファイザー), piperacillin (PIPC, 富山化学) ceftizoxime (CZX, 藤沢), cefotiam (CTM, チバガイギー), latamoxef (LMOX, 塩野義), gentamicin (GM, 塩野義), minocycline (MINO, 日本レダリー), chloramphenicol (CP, 三共), erythromycin (EM, 大日本製菓), clindamycin (CLDM, 日本アップジョン), fosfomycin (FOM, 明治製菓), colistin (CL, 科研製菓), polymyxin B (PL-B, ファイザー), amphotericin B (AMPH, 日本スクイブ), mitomycin (MMC, 協和発酵), actinomycin D (ACT-D, 万有製菓), daunorubicin (DNR, 明治製菓), aclarubicin (ACR, 山之内製菓), doxorubicin (DXR, 協和発酵), bleomycin (BLM, 日本化薬), pepleomycin (PEP, 協和発酵)

* 東京都太田区大森西 6-11-1

を用いた。なお、各薬剤は市販の注射剤を使用直前に RPMI 1640 培地 (日水製薬) または注射用蒸留水で溶解し、10 倍系列に希釈して用いた。CL, PL-B は国際単位によって表示されているが、重量に換算して用いた。

また、薬剤によっては、溶解のために最初アルカリ性あるいは酸性溶液にする必要があった。そこで、薬剤添加時の培地の pH を測定した。薬剤無添加時の RPMI 1640 培地の pH は 7.4 であった。ABPC と MINO を除いた薬剤では、実験に用いた最高濃度で、pH は 7.0~7.4 の範囲内に入り、その多くは 7.2~7.6 以内であった。ABPC では、50 mg/ml で 8.2, 5 mg/ml で 7.9, 0.5 mg/ml で 7.7 であった。MINO では、10 mg/ml で 5.0, 1 mg/ml で 7.2 であった。

2. PMN の採取

生理的食塩水中に懸濁した 8% カゼインナトリウム 2 ml を 3~6 週齢の C3 H/He 雄マウスの腹腔内に投与し、PMN が増加する 6 時間後に等張リン酸緩衝液 (PBS(-)) 5 ml を腹腔内に注入して腹腔浸出液を RPMI 培地中に無菌的に採取した⁷⁾。この腹腔細胞 (約 95% PMN) を 4°C, 1,100 rpm, 5 分間遠心分離によって 3 回洗浄後、RPMI 培地に再浮遊させた。次いで turk 染色を行い、Burker-turk 血算板を用いて細胞数をカウントした。

3. PMN の ⁵¹Cr 標識

PMN (最終濃度 2×10^5 cells/ml) を $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (100 $\mu\text{Ci/ml}$) を含む 10% 牛胎児血清 (FCS) 添加 RPMI 培地に加え、37°C, 5% CO_2 存在下で 2 時間培養して標識した。

4. 細胞傷害性の測定⁸⁾

⁵¹Cr-PMN は 4°C, 1,500 rpm, 5 分間遠心によって 4 回洗浄後、最終 FCS 濃度が 5% になるように調整した RPMI 培地に再浮遊させた。この PMN 浮遊液 180 μl と希釈薬剤添加培地液 20 μl を平底マイクロプレート (Nunc) の well (直径 7 mm) に分注し、37°C, 5% CO_2 存在下で培養した。14 時間後に、マイクロプレートのまま 4°C で 1,500 rpm, 5 分間遠心し、上清液 100 μl を取り、遊離した ⁵¹Cr をシンチレーションカウンター (Packard Japan Co. Ltd) で測定した。一回の実験は duplicate で行い、3 回の実験の平均値を求めた。薬剤を含まない培地 20 μl を加えた試料の値を対照値とした。また、⁵¹Cr-PMN 液 180 μl を遠沈管にとり、凍結融解後 3% H_2O_2 を加え細胞を完全に破壊し、同様に遊離した ⁵¹Cr をシンチレーションカウンターで測定して最大遊離量とした。

PMN 細胞傷害率は次式によって求めた。

$$\% \text{ PMN Cytolysis} = \frac{\text{測定値} - \text{対照値}}{\text{最大遊離値} - \text{対照値}} \times 100$$

なお、⁵¹Cr の標識量は実験ごとにばらついたが、薬剤無添加検体での 14 時間培養後の PMN からの ⁵¹Cr 遊離量 (対照値) は最大遊離量の 15.5~22.2% であった。

5. PMN 毒性の評価

50% の PMN が Cr の遊離をおこす濃度を PMN₅₀ 値として求め、これを一般に毒性評価の指標とされる急性毒性試験の 50% 致死量 LD₅₀ 値と比較した。これによって PMN 傷害率の毒性評価における位置づけを検討した。LD₅₀ 値はできるだけ医薬品集⁹⁾に記載されている静脈投与時の雄マウスでの値を用いた。ただし、静脈投与が不可能なものはそれぞれの方法で得られている値を用いた。

II. 結 果

1. 抗菌抗生物質の PMN 傷害性

各種抗菌抗生物質の PMN 傷害性を Fig. 1 および 2 に示した。 β -ラクタム抗生物質および CP, CLDM および EM は 0.05 mg/ml まで PMN に傷害を起

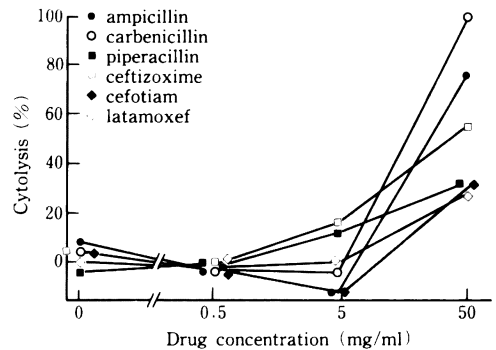


Fig. 1. Cytolysis of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by β -lactam antibiotics. ⁵¹Cr release from prelabelled murine PMN cultured in RPMI medium with various concentrations of the test drugs for 14 h was counted. Percent PMN cytolysis was calculated as the percentage of ⁵¹Cr release by the test drug out of the release from mechanically lysed PMN. See details in the test. The test drugs-ampicillin (ABPC), carbenicillin (CBPC), piperacillin (PIPC), ceftizoxime (CZX), cefotiam (CTM) and latamoxef (LMOX)-are abbreviated as ABPC, CBPC, PIPC, CZX, CTM and LMOX.

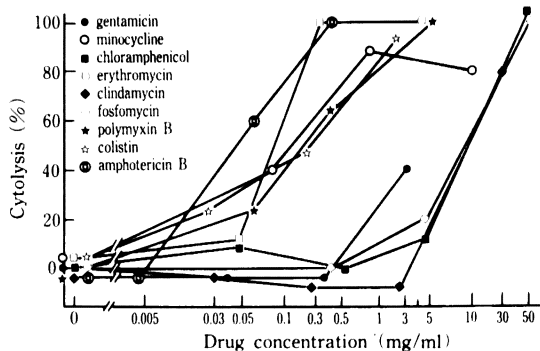


Fig. 2. Cytolysis of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by other antibacterial and antifungal antibiotics.

Method: as in Fig. 1. The test drugs-gentamicin (GM), minocycline (MINO), chloramphenicol (CP), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), fosfomycin (FOM), polymyxin B (PL-B), colistin (CL) methanesulfonate and amphotericin B-(AMPH)-are abbreviated as GM, MINO, CP, EM, CLDM, FOM, PL-B, CL and AMPH.

さず、それ以上の濃度で急激に傷害が出現した。MINOおよびFOMでは、それぞれ0.01および0.5 mg/ml以上の濃度で濃度依存性に傷害の増加する傾向が見られた。また、PL-B、CLでも0.005 mg/ml以上の濃度で濃度依存性にPMN傷害性の増加が見られた。

2. 抗真菌抗生物質のPMN傷害性

代表的抗真菌剤であるAMPHのPMN傷害性をFig. 2に示した。0.005 mg/ml以上の濃度で濃度依存性にPMN傷害性の増加が見られた。

3. 抗腫瘍剤のPMN傷害性

代表的抗腫瘍剤のPMN傷害性をFig. 3に示した。MMC, BLM, PEPは10 μ g/mlまで、DXMは0.1 μ g/mlまで、DNR, ACRは0.02 μ g/mlまで、ACT-Dは0.01 μ g/mlまでPMN傷害性を現わさず、それ以上の濃度で濃度依存性の傷害性が増加する傾向が見られた。

4. PMN毒性とその評価

50%のPMNにCr遊離を起こさせる薬剤濃度をPMN₅₀値としてFigs. 1~3の結果から計算した(Table 1)。そこで、この値と医薬品集に公示されているLD₅₀値との相関を調べた(Fig. 4)。すべての薬剤で一般毒性の指標であるLD₅₀値とPMN 50値にかなり良い相関のあることが明らかになった。

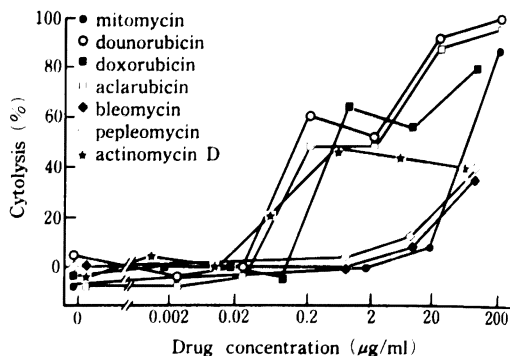
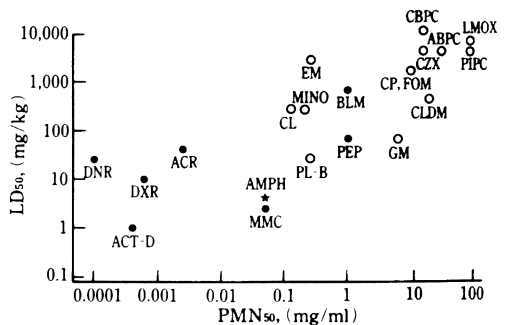


Fig. 3. Cytolysis of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by anti-neoplastic antibiotics. Method: as in Fig. 1. The test drugs-mitomycin C (MMC), daunorubicin (DNR), doxorubicin (DXR), aclarubicin (ACR), bleomycin (BLM), pepleomycin (PEP) and actinomycin D (ACT-D)-are abbreviated as MMC, DNR, DXR, ACR, BLM, PEP and ACT-D.



ABPC, ampicillin; CBPC, carbenicillin; PIPC, piperacillin; CZX, ceftizoxime; LMOX, latamoxef; GM, gentamicin; MINO, minocycline; CP, chloramphenicol; EM, erythromycin; CLDM, clindamycin; FOM, fosfomycin; CL, colistin; PL-B, polymyxin B; AMPH, amphotericin B; MMC, mitomycin; DNR, daunorubicin; DXR, doxorubicin; ACR, aclarubicin; BLM, bleomycin; PEP, pepleomycin; ACT-D, actinomycin D.

Fig. 4. Correlation between the 50% lethal dose in mice and 50% cytolysis of polymorphonuclear leukocytes (PMN).

The 50% lethal dose (LD₅₀) in mice of the test drug and 50% cytolysis of murine PMN (PMN₅₀) by the test drug were plotted, and their correlation for test drugs was examined. The abbreviations for the test drugs are as in Figs. 1~3.

Table 1. Concentrations of antibacterial, antifungal and anti-neoplastic antibiotics necessary for 50% cytolysis of polymorphonuclear leukocytes (PMN₅₀)

Group of drugs	Drug	PMN ₅₀ , mg/ml
Antibacterial antibiotics		
Penicillins	ABPC	25
	CBPC	16
	PIPC	>100
Cephalosporins	CZX	15
	CTM	8.6
	LMOX	>100
Aminoglycoside	GM	6
Tetracycline	MINO	0.22
Chloramphenicol	CP	13
Macrolide	EM	0.17
Lincomycin	CLDM	18
Fosfomycin	FOM	12
Peptides	CL	0.18
	PL-B	0.3
Antifungal antibiotic		
Polyene	AMPH	0.05
Anti-neoplastic antibiotics		
	MMC	0.06
	DNR	0.0001
	DXR	0.0006
	ACR	0.002
	BLM	0.6
	PEP	1.0
	ACT-D	0.0004

ABPC, ampicillin; CBPC, carbenicillin; PIPC, piperacillin; CZX, ceftizoxime; CTM, cefotiam; LMOX, latamoxef; GM, gentamicin; MINO, minocycline; CP, chloramphenicol; EM, erythromycin; CLDM, clindamycin; FOM, fosfomycin; CL, colistin; PL-B, polymyxin B; AMPH, amphotericin B; MMC, mitomycin; DNR, daunorubicin; DXR, doxorubicin; ACR, aclarubicin; BLM, bleomycin; PEP, pepleomycin; ACT-D, actinomycin D.

III. 考 察

PMN 機能におよぼす抗生物質の影響については、粘着能、走化能、貪食能などに対する報告¹⁰⁻¹⁷⁾は多いが、特に PMN に対する直接の細胞傷害性を検討した報告はない。

本実験に用いた抗生物質には、当然のことではあるが、いずれも血中濃度の範囲内では PMN 傷害性は

認められなかった。しかし、高濃度での細胞傷害には、薬剤の濃度に依存して増加するものと、一定の濃度以上で生じるものに分けられ、薬剤の化学構造によって違うことが分った。すなわち、PMN 傷害を現わすそれぞれの薬剤の濃度は、 β -ラクタム剤の ABPC, CBPC, PIPC, CZX, CTM, LMOX, クロラムフェニコール系の CP, およびリンコマイシン系の CLDM でいずれも血中濃度の 1,000 倍以上であり、それ以上の濃度で強い傷害が出現した。マクロライド系の EM では細胞傷害を現わす濃度は血中濃度の約 100 倍であった。

一方、細胞傷害を現わす濃度には相違があるが、テトラサイクリン系の MINO, フォスホマイシン系の FOM, ペプタイド抗生物質の PL-B, CL は濃度依存的に PMN 傷害を現わすことが分った。それぞれの薬剤の細胞傷害を現わす濃度と血中濃度との比は、MINO, PL-B, CL で約 50 倍, FOM で 100 倍であった。抗真菌剤の AMPH ではさらにこの傾向が強くなり、血中濃度の 10 倍ですでに PMN 傷害を現わすことも分った。

抗腫瘍抗生物質では、BLM およびその誘導体である PEP は骨髓抑制作用が無く、白血球減少もほとんど起こさないことが知られているが¹⁸⁾、この実験の結果でも PMN 傷害が少なく、2 μ g/ml まで細胞傷害をまったく起こさないことが確認された。また、MMC も 2 μ g/ml までまったく細胞傷害性の無いことも分った。これらは masked compound であるためとも考えられる。

本実験に用いた抗腫瘍抗生物質中、血中濃度の範囲で 50% の PMN 傷害を示した薬剤は DNR のみであった。*In vitro* での成績をそのまま *in vivo* に当てはめることには問題があるが、血中濃度範囲での影響をみると DNR の PMN 50% 細胞傷害濃度の 0.1 μ g/ml は血中濃度の範囲内にあり、治療濃度範囲での PMN 傷害の可能性が予測される。

本実験は市販製剤を用いて影響を検討したものであり、純品そのものの他に添加剤の影響も考えられる。事実、EM は溶解補助剤としてベンジルアルコールが含まれるが、これが PMN の走化性を阻害する報告¹⁶⁾もある。また、AMPH にはデオキシコール酸ナトリウムが含まれており、これが AMPH の成績で細胞傷害性を高めるのに関与している可能性は否定できない。さらに、薬剤によっては溶解のためにアルカリ性あるいは酸性の溶液になっているものもある。しかし、これらは他の同系薬剤の成績との比較あるいは各濃度での細胞傷害の傾向から大きな影響は無いように

思われる。

また、PMN 傷害性の指標として計算した PMN_{50} を公示されている一般毒性の指標である LD_{50} と比較すると、これらがかなり良く相関することが分った。これも、添加剤の影響はそれほど大きくはないことを示唆する。また、mg/ml と mg/kg とディメンジョンの異なるファクターの比較ではあるが、これらが相関することは、 PMN_{50} が毒性の指標として使えることを示唆する。しかも、 PMN_{50} は mg/ml と血中濃度と対比して考えられるので有用であろう。

抗腫瘍剤の多くは骨髄抑制作用があることは知られている¹⁸⁾。この実験でも抗腫瘍抗生物質は抗生物質の中でも PMN 傷害性が強いことが示された。これらの PMN の傷害は不可逆的であるから、生体の受ける傷害因子として重要であると考えられる。

抗生物質の PMN 内移行性は β -ラクタム系薬剤は低く、RFP, CP, EM, CLDM は高いことが報告されている¹⁹⁻²²⁾。我々の実験でも、これらの PMN 内移行性の良い薬剤は比較的低濃度で PMN 傷害性を示した。本報では、PMN 傷害の機構については明らかにしなかったが、PMN 傷害性の程度が薬剤の種類に依存することから、薬剤の細胞内移行性の関与も考えられる。さらに、他の PMN 機能の影響と合わせて評価する必要があると考えられる。

謝 辞

本実験に際して協力下さった元東邦大学医学部付属大森病院薬剤部の仲村裕子氏および御指導賜わった国立公衆衛生院薬学部森川馨博士に深謝します。

文 献

- Ohnishi H, Kosuzume H, Inaba H, Okura M, Mochizuki H, Suzuki Y, Fujii R: Effect of AC-1370, a new semisynthetic cephalosporin, on phagocyte functions. *Antimicrob Agent Chemother* 23: 874 ~ 880, 1983
- 町田豊平, 清田 浩: 感染防御機構と化学療法の協力。日誌 43: 971 ~ 980, 1988
- Goodhart G L: Further evidence for the role of bivalent cations in human polymorphonuclear leukocyte locomotion: recovery from tetracycline-induced inhibition in the presence of cation ionophores. *J Reticuloendothel Soc* 26: 545 ~ 554, 1979
- Sacchi F, Marseglia G, Fietta A, Marchi A, Siccardi A G: Effect of aminoglycoside antibiotics on neutrophil chemotaxis. *Antimicrob Agent Chemother* 20: 258 ~ 259, 1981
- Elewski B E, Lamp B A, Sams W M Jr, Gammone W R: *In vivo* suppression of neutrophil chemotaxis by systemically and topically ad-

ministrated tetracycline. *J Am Acad Dermatol* 8: 807 ~ 812, 1983

- Lehrer R I: Inhibition by sulfonamides of the candidacidal activity of human neutrophils. *J Clin Invest* 50: 2498 ~ 2505, 1971
- Morikawa K, Kikuchi Y, Abe S, Yamazaki M, Mizuno D: Early cellular responses in the peritoneal cavity of mice to antitumor immunomodulators. *Gann* 75: 370 ~ 378, 1984
- Morikawa K, Takeda R, Yamazaki M, Mizuno D: Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear β -1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. *Cancer Res* 45: 1496 ~ 1501, 1985
- 日本医薬情報センター編: 医療薬 日本医薬品集 1991. 薬業時報社 東京 1991
- Fietta A, Sacchi F, Bersani C, Grassi F, Mangiarotti P, Grassi G G: Effect of β -lactam antibiotics on migration and bactericidal activity of human phagocytes. *Antimicrob Agent Chemother* 23: 930 ~ 931, 1983
- Forsgren A: Antimicrobial agents and host defence. *Scand J Infect Dis Suppl* 43: 24 ~ 33, 1984
- Burgaleta C, Sanchez R, Moreno T, Soria H, Bouza E, Martinez F: *In vitro* effects of ureidopenicillins on human polymorphonuclear leukocytes. *Arzneimittelforschung* 35: 958 ~ 960, 1985
- Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y: Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol* 86: 449 ~ 453, 1986
- Van der Auwera P, Petrikos G, Husson M, Klastersky J: Influence of various antibiotics on superoxide generation by normal human neutrophils. *Arch Int Physiol Biochem* 94: 23 ~ 28, 1986
- Burgaleta C, Moreno T: Effect of β -lactams and aminoglycosides on human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 20: 529 ~ 535, 1987
- Naess A, Solberg C O: Effects of two macrolide antibiotics on human leukocyte membrane receptors and functions. *APMIS* 96: 503 ~ 508, 1988
- Van der Auwera P, Meunier F: *In vitro* effects of cilofungin (LY 12019), amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate on human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 24: 747 ~ 763, 1989
- 藤原元始, 大森義仁, 吉利 和, 高木敬一郎, 上条一也 (監訳): グッドマン・ギルマン薬理書 (下), p.1535 ~ 1600, 広川書店, 東京, 1988
- Prokesch R C, Leehand W: Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agent Chemother* 21: 373 ~ 380, 1982

- 20) 古賀宏延, 他: 各種抗生剤のヒト多形核白血球内への移行に関する研究。Chemotherapy 33: 688 ~ 694, 1985
- 21) Easmon C S F, Crane J P: Cellular uptake of clindamycin and lincomycin, Br J Exp Path 65: 725 ~ 730, 1984
- 22) 真崎美矢子, 他: 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。Chemotherapy 35: 709 ~ 713, 1987

CYTOLYSIS OF POLYMPHONUCLEAR LEUKOCYTES BY VARIOUS ANTIBIOTICS

Saeko Anjo and Yuriko Kondo

Department of Pharmacy, Toho University Omori Hospital, 6-11-1
Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143, Japan

We quantitatively determined direct cytolysis of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) by various antibiotics measuring their release of prelabelled ^{51}Cr *in vitro*. The β -lactam antibiotics ampicillin, carbenicillin, piperacillin, ceftizoxime, cefotiam and latamoxef, the aminoglycoside gentamicin, the macrolide erythromycin, the lincomycin clindamycin, and the chloramphenicol chloramphenicol, were found to cause no cytolysis of PMN within the range of their usual blood concentrations. But the cytolytic concentrations of these drugs were 100 to 1,000 times higher. Moreover, their cytolytic effects appeared suddenly at certain concentrations. In contrast, the cytolytic effects of the tetracycline minocycline, fosfomycin (fosfomycin), peptides (colistin, polymyxin B), and the polyene amphotericin B on PMN appeared gradually in a dose-dependent manner, and their cytolytic concentrations were over 50 times higher than their usual blood concentrations for antibacterial antibiotics and over 10 times higher for the antifungal antibiotic. The cytotoxic mechanisms of the above two groups also seemed to be different. Anti-neoplastic antibiotics could be divided into two groups by their cytotoxic effects on PMN. The cytolytic effects of mitomycin, bleomycin and pepleomycin were found to be low. In contrast, those of daunorubicin, actinomycin D, doxorubicin and aclarubicin were markedly high and especially the 50% cytolytic concentration of DNR on PMN (PMN_{50}) was close to the usual blood concentration. The PMN_{50} was in good correlation with the LD_{50} , one of the general toxicity indices. These results suggest that our PMN_{50} is a possible index of toxicity for these drugs.