

## 好中球走化性におよぼす抗生物質の影響

安生紗枝子<sup>1)</sup>・近藤由利子<sup>1)</sup>・石橋 芳雄<sup>2)</sup>・新井 俊彦<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 東邦大学医学部付属大森病院薬剤部\*<sup>2)</sup> 明治薬科大学微生物学教室

(平成3年8月28日受付・平成3年11月8日受理)

ヒト好中球走化性におよぼす12種類の抗生物質の影響について検討した。Boyden チャンバー法により、ヒト好中球走化性を調べた結果、ciprofloxacin (CPFX) は、常用血中濃度 (1 µg/ml) でザイモサン活性化血清による好中球走化性を約30%抑制したが、FMLP による走化性には影響を与えなかった。Piperacillin (PIPC) は、血中濃度の10倍 (250 µg/ml) で FMLP による好中球走化性を約30%促進することがわかった。常用血中濃度の100倍濃度を用いた場合、chloramphenicol (2,500 µg/ml) は FMLP およびザイモサン活性化血清による好中球走化性を、minocycline (500 µg/ml) は FMLP による好中球走化性をそれぞれ抑制した。一方、flomoxef, imipenem, gentamicin, amikacin, josamycin, lincomycin, colimycin, rifampicin は、血中の100倍濃度でも FMLP およびザイモサン活性化血清による好中球走化性に影響を与えなかった。調べた12種の抗生物質のうち、CPFX と PIPC だけが治療域濃度で好中球走化性に影響をおよぼすことがわかったが、その作用はわずかであり、臨床応用上問題ないと考えられる。

**Key words:** 抗生物質, 好中球, 走化性

好中球 (PMN) は、細菌感染に対する生体防御において重要な役割を演じており、抗生物質による感染症治療においても、この好中球との協働作用が不可欠である。好中球は、formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) などの細菌由来ペプチド<sup>1)</sup> や、C5a<sup>2)</sup>, leukotriene B4 (LTB4)<sup>3)</sup> などの生体由来の走化性因子の濃度勾配にしたがって感染部位に遊走し、感染局所に動員されてはじめてその殺菌機能を発揮する。したがって、この好中球走化性におよぼす抗生物質の作用を調べることは、生体内における抗生物質の薬効を評価する上できわめて重要であると考ええる。そこで、本実験では、臨床的に広く使用されている各系統の抗生物質12種について、それら薬剤の常用血中濃度を基準とし、ヒト好中球の走化性におよぼす影響を比較検討した。

## I. 材料と方法

## 1. 使用薬剤

Piperacillin (PIPC, 富山化学), imipenem (IPM, 万有), flomoxef (FMOX, 塩野義), gentamicin (GM, 塩野義), amikacin (AMK, 万有), minocycline (MINO, 日本レダグリー), josamycin (JM, 山之内), lincomycin (LCM, ア

ップジョン), chloramphenicol (CP, 三共), colimycin (CL, 科研製薬), rifampicin (RFP, 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX, パイエル) を用いた。なお、MINO, JM, CP, RFP は dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解した後、PBS で希釈し、最終濃度が5% DMSO になるようにして用いた。その他の薬剤は PBS (ニッスイ) で溶解して用いた。

## 2. 走化性因子

Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) (Sigma, Co.) は1mM になるようエタノールに溶解し、これをハンクス液で希釈して $10^{-7}$  M とした。ザイモサン活性化血清は、1ml の血清に Zymosan (Sigma, Co.) 10mg を加え、37°C, 30分間インキュベートした後、1,000×g, 10分間の遠心により上清を取り、PBS で希釈して20%溶液として用いた。

3. 好中球の調製<sup>4)</sup>

ヘパリン (5 u/ml) を含む健常人静脈血を等量の3%デキストラン溶液と混合し、室温で30分間静置して血漿画分を分離した後、これを Lymphoprep に重層し、2,000×g, 20分間遠心分離して顆粒球画分を

\* 東京都大田区大森西6-11-1

採取した。この顆粒球画分から赤血球を低張処理で除き、4°Cで100×g、10分間遠心分離によって3回洗浄後、2%牛血清アルブミンを含むハンクス液に懸濁し、好中球浮遊液(1×10<sup>6</sup> cells/ml)とした。なお、ライトギムザ染色で白血球百分率を求めた結果、得られた細胞の95%以上は好中球であった。

4. 好中球走化性の測定

好中球走化性は Boyden チャンバー法により測定した<sup>9)</sup>。すなわち、下部チャンバーには200 μlの走化性因子を入れた後、ポアサイズ5 μmのフィルターを装着した。上部チャンバーには180 μlの好中球浮遊液(1×10<sup>6</sup> cells/ml)を入れ、ただちに20 μlの薬剤液を上部チャンバーに添加後、37°Cで1時間培養した。培養後、フィルターを3%ホルマリンで固定、ヘマトキシリンで染色した後、Leading front法<sup>9)</sup>により好中球のフィルター内遊走距離(μm)を光学顕微鏡下で測定した。

II. 結 果

1. FMLPによる好中球走化性におよぼす各抗生物質の影響

FMLPによる好中球走化性におよぼす各抗生物質の影響を、各抗生物質の常用血中濃度、およびその

10倍、100倍濃度について調べた。Table 1に示すごとく、FMLPを走化性因子として用いた場合、常用血中濃度では好中球走化性を抑制するものはなかったが、10倍および100倍濃度のCPF(10~100 μg/ml)で有意な抑制が見られた。しかしながら、トリパンプルー色素排除法<sup>7)</sup>により細胞生存率を調べたところ、1 μg/mlのCPFは対照群と同様95%以上の生存率を示したが、10 μg/mlでは75%、100 μg/mlでは10%以下と著明に生存率が低下していることがわかった。したがって、高濃度のCPFで認められた走化性抑制作用は、薬剤による細胞障害の結果と考えられる。その他の抗生物質については、血中濃度の100倍という高濃度でMINO(500 μg/ml)、CP(2,500 μg/ml)が抑制を示すにすぎなかった。一方、PIPCは常用血中濃度の10倍(250 μg/ml)で好中球走化性を23.9%促進(p<0.05)することがわかった。

2. ザイモサン活性化血清による好中球走化性におよぼす各抗生物質の影響

ザイモサン活性化血清による好中球走化性におよぼす各抗生物質の影響を、同様な濃度で調べた(Table 2)。ザイモサン活性化血清を走化性因子として用いた

Table 1. Effect of antibiotics on neutrophil chemotaxis toward formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

Drugs	Migration distances (μm)			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	38.1±3.63			
PIPC (25 μg/ml)		44.88±5.89	47.22±4.21*	44.76±4.93
FMOX (10 μg/ml)		38.28±2.49	35.92±3.35	33.49±1.98
IPM (10 μg/ml)		40.84±4.48	38.39±4.93	33.82±4.14
GM (10 μg/ml)		42.11±5.05	41.15±3.58	34.89±4.24
AMK (10 μg/ml)		42.10±5.40	41.04±3.99	34.47±3.35
JM (3 μg/ml)		42.21±4.72	38.12±4.83	45.56±6.53
LCM (5 μg/ml)		38.15±4.67	40.65±4.50	40.79±4.64
MINO (5 μg/ml)		41.96±6.55	38.31±7.68	19.54±5.92*
CP (25 μg/ml)		44.34±2.91	35.17±6.12	9.03±4.74**
CL (5 μg/ml)		38.87±4.41	41.12±5.09	33.43±2.86
RFP (10 μg/ml)		38.68±5.53	34.27±6.12	34.13±9.05
CPF (1 μg/ml)		42.46±3.50	28.29±5.69*	2.12±2.12**

Random migration of control PMNs was 16.27±1.52.

The values represent the means ± SE of five experiments.

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

\* p<0.05, \*\* p<0.01.

PIPC, piperacillin; FMOX, flomoxef; IPM, imipenem; GM, gentamicin; AMK, amikacin; JM, josamycin; LCM, lincomycin; MINO, minocycline; CP, chloramphenicol; CL, colimycin; RFP, rifampicin; CPF, ciprofloxacin.

Table 2. Effect of antibiotics on neutrophil chemotaxis toward zymosan activated serum

Drugs	Migration distances ( $\mu\text{m}$ )			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	42.24 $\pm$ 4.76			
PIPC (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		39.17 $\pm$ 1.78	48.17 $\pm$ 3.97	56.83 $\pm$ 6.93*
FMOX (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		41.73 $\pm$ 5.91	44.68 $\pm$ 4.67	41.77 $\pm$ 2.49
IPM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		37.65 $\pm$ 3.27	40.27 $\pm$ 2.60	40.40 $\pm$ 5.81
GM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		41.53 $\pm$ 2.90	41.26 $\pm$ 5.98	43.54 $\pm$ 3.20
AMK (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		40.64 $\pm$ 1.75	44.67 $\pm$ 4.97	36.90 $\pm$ 1.62
JM (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		41.83 $\pm$ 7.88	41.83 $\pm$ 5.69	45.13 $\pm$ 4.35
LCM (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		40.07 $\pm$ 6.16	43.80 $\pm$ 4.98	45.93 $\pm$ 4.54
MINO (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		44.13 $\pm$ 2.55	40.77 $\pm$ 3.42	40.13 $\pm$ 9.24
CP (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		46.17 $\pm$ 9.15	42.93 $\pm$ 9.65	2.30 $\pm$ 1.39**
CL (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		42.77 $\pm$ 8.59	46.10 $\pm$ 8.00	50.36 $\pm$ 7.56
RFP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		39.00 $\pm$ 8.66	40.08 $\pm$ 3.81	31.97 $\pm$ 3.09
CPFEX (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		27.80 $\pm$ 2.61*	27.00 $\pm$ 2.70*	0.00 $\pm$ 0.00**

Random migration of control PMNs was 15.52 $\pm$ 1.58.

The values represent the means  $\pm$  SE of five experiments.

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

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

PIPC, piperacillin; FMOX, flomoxef; IPM, imipenem; GM, gentamicin; AMK, amikacin; JM, josamycin; LCM, lincomycin; MINO, minocycline; CP, chloramphenicol; CL, colimycin; RFP, rifampicin; CPFEX, ciprofloxacin.

場合、CPFEX を 34.2% 抑制 ( $p < 0.05$ ) した。また、10 倍、100 倍濃度の CPFEX でも抑制が認められたが、これは前述のごとく、薬剤による細胞障害の結果と考えられる。その他の抗生物質では、常用血中濃度範囲で走化性抑制作用は認められず、CP が 100 倍濃度 (2,500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で抑制を示すにすぎなかった。なお、PIPC は常用血中濃度の 100 倍 (2,500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で、有意 ( $p < 0.05$ ) に好中球走化性を促進した。

### III. 考 察

好中球と抗生物質との協合作用は感染症治療において必要不可欠であり、好中球機能におよぼす抗生物質の直接作用を知ることは、生体内における抗生物質の有効性を評価する上で重要である。本実験では好中球遊走能におよぼす 12 種の抗生物質の影響を Boyden チャンバー法を用いて検討した。

今回調べた 12 種の薬剤のなかで、常用血中濃度で好中球走化性を抑制したのは CPFEX だけであった。しかもこの抑制作用は走化性因子に特異性が見られ、ザイモサン活性化血清による走化性だけが抑制され、FMLP による走化性は影響されなかった。しかしながら、Boogaerts ら<sup>9)</sup> は、CPFEX, norfloxacin (NFLX), および pefloxacin (PFLX) は、0.1~10

$\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度範囲で好中球走化性に影響をおよぼさないという、我々の結果とは異なる報告をしている。この矛盾は、我々の研究が抗生物質存在下での好中球遊走能を測定しているのに対し、彼らは、これらニューキノロン剤と好中球を 1 時間前処理し、洗浄後に遊走能を測定しており、このような実験系の違いによると思われる。In vivo でも薬剤の存在下で遊走が起こるのであるから、薬剤の評価には我々の成績のほうが大切であると考えられる。CPFEX による好中球走化性の抑制は可逆的である可能性も考えられるため、この点についても今後さらに検討する必要がある。好中球の遊走能は、好中球膜表面のレセプターによる遊走因子の認識と、それに続くアクチン、ミオシンなどの細胞内骨格への細胞内情報伝達連関によって惹き起されるものである<sup>9)</sup>。CPFEX は、ザイモサン活性化血清による走化性だけを抑制し、FMLP による走化性には影響をおよぼさなかったことから、CPFEX は、好中球の細胞内情報伝達系や細胞内骨格に作用しているのではなく、ザイモサン活性化血清すなわち C5a の認識段階に作用している可能性が示唆される。今後、さらに LTB4 などの走化性因子についても調べ、作用機序について詳細な検討を加える必要があると考え

る。

さらに今回、PIPCは常用血中濃度の10倍(250  $\mu\text{g/ml}$ )でFMLPによる好中球走化性を有意に促進する結果を得た。Burgaletaら<sup>10)</sup>も、PIPC(100  $\mu\text{g/ml}$ )が好中球遊走能をわずかではあるが賦活化する傾向を認めており、我々の結果もこの報告と一致している。ただ、サイモサン活性化血清による好中球走化性の場合、走化性促進作用を発揮するのにFMLPの場合と比べて高濃度のPIPCを要することがわかったが、この原因については現在不明である。好中球遊走能は粘着能と密接に関連していることが知られており<sup>11)</sup>当然、サイモサン活性化血清には走化性因子だけでなくフィブロンectinなどの粘着促進物質も含まれている<sup>12)</sup>。したがって、これらの血清成分が好中球遊走能に対するPIPCの作用にも影響をおよぼしているのかもしれない。

アミノグリコシド系のGMとAMK、マクロライド系のJM、LCM、カルバペネム系のIPM、セファマイシン系のFMOX、およびRFPについても好中球遊走能におよぼす影響を検討したが、これらの抗生物質は血中濃度の10~100倍でも好中球遊走能にほとんど影響を与えないことがわかり、従来の報告<sup>13~18)</sup>と一致する結果が得られた。

テトラサイクリン(TC)系の薬剤は、一般に低濃度(>10  $\mu\text{g/ml}$ )でも種々の好中球機能を抑制することが知られている<sup>19~20)</sup>。しかしながら、その抑制作用はTC系薬剤の脂溶性、2価陽イオンキレート活性等によって異なり、MINOは好中球の化学発光やglucose oxidationを強く抑制するが、遊走性におよぼす影響は少ないことが報告されている<sup>20)</sup>。我々の実験でも、MINOは高濃度(500  $\mu\text{g/ml}$ )においてFMLPによる好中球走化性を抑制したが、低濃度(5~50  $\mu\text{g/ml}$ )では有意な抑制を示さなかった。また、Gablerら<sup>21)</sup>は、TC系薬剤が好中球機能を著明に抑制するには、好中球を薬剤で前処理する必要があることから、TCによる機能抑制には、薬剤の細胞内移行過程も重要であることを指摘している。したがって、我々の実験系では前処理を行っていないため、走化性の抑制作用が顕著ではなかった可能性も考えられる。

CPは100倍濃度(2,500  $\mu\text{g/ml}$ )でFMLPおよびサイモサン活性化血清による遊走能を著明に抑制したが、これはCPによる細胞傷害性によるものと思われる<sup>22)</sup>。いずれにしても、これらの薬剤は、治療域濃度においては好中球走化性にならん影響をおよぼさないことがわかった。

今回、*in vitro*の実験において、CPFXは常用血中

濃度範囲でFMLPによる好中球走化性を抑制し、PIPCは100倍濃度で逆に走化性を亢進させることが明らかになった。この現象が*in vivo*での生体防御機構にどのような影響を与えるのかは現在まだ不明であるが、その作用はわずかであり、臨床応用上問題となるものではないと思われる。しかしながら、今後、食能、粘着能、脱顆粒、活性酸素放出など他の好中球機能におよぼす影響についても検討を加え、総合的に評価する必要があると考える。

謝 辞

実験に際して協力した明治薬科大学学生松井謙一および平林文子に感謝する。

#### 文 献

- 1) Marasco W A, Phan S H, Krutzsch H, Showell H J, Felner D E, Nairn R, Becker E L, Ward P A: Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 259: 5430~5439, 1984
- 2) Chenveth D E, Erickson B W, Hugli T E: Human C5a-related synthetic peptides as neutrophil chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 86: 227~234, 1979
- 3) Ford-Hutchinson A W, Bray M A, Doig M V, Shipley M E, Smith M J H: Leukotriene B<sub>4</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264~265, 1980
- 4) Boyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes, and macrophages. *Scand J Immunol suppl.* 5: 9~15, 1976
- 5) Ishibashi Y, Yamashita T: Effects of a phagocytosis stimulating factor on the phagocytic process of polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 38: 825~833, 1982
- 6) Zigmond S H, Hirsch J G: Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leukocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp Cell Res* 73: 383~393, 1972
- 7) Welch W D, Davis D, Thrupp L D: Effect of antimicrobial agents on human polymorphonuclear leukocyte microbicidal function. *Antimicrob Agent Chemother* 20: 15~20, 1981
- 8) Boogaerts M A, Malbrain S, Scheers W, Verwilghen R L: Effects of quinolones on granulocyte function *in vitro*. *Infect* 14: 258~262, 1986
- 9) 越尾 修, 柴田道男: 多形核白血球/好中球のはたらき(上); 多形核白血球の走化性因子刺激による情報伝達機構. *Cell Science* 6: 43~52, 1990
- 10) 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
- 11) Kleizer G D, TeVelde A A, Schwarting R, Figdor C G, DeVries J E: Role of p 150.95, in adhesion, migration, chemotaxis and phagocytosis of human monocytes. *Eur J Immunol* 17: 1317~1322, 1987
  - 12) Wight S D, Craigmyle L, Silverstein S: Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* 158: 1338, 1983
  - 13) Goodhart G: Effect of aminoglycosides on the chemotactic response of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agent Chemother* 12: 540~542, 1977
  - 14) Labro M T, Benna E L, Babin-Chevaye C: Comparison of the in vitro effect of several macrolides on the oxidative burst of human neutrophils. *J Antimicrob Chemother* 24: 561~572, 1989
  - 15) Seklecki M M, Quintiliani R, Maderazo E G: Aminoglycoside antibiotics moderately impair granulocyte function. *Antimicrob Agent Chemother* 13: 552~554, 1978
  - 16) Fietta A, Sacchi F, Bersani C, Grassi F, Man-  
giarotti P, Grassi G G: Effect of beta-lactam antibiotics on migration and bactericidal activity of human phagocytes. *Antimicrob Agent Chemother* 23: 930~931, 1983
  - 17) Majeski J A, McClellan M A, Alexander J W: Effect of antibiotics on the in vitro neutrophil chemotactic response. *Am Surg* 9: 785~788, 1976
  - 18) Auwera P V, Husson M: Influence of rifampicin and ansamycin on motility and adherence of human neutrophils studied in vitro. *J Antimicrob Chemother* 24: 347~353, 1989
  - 19) Forsgren A, Schmeling D, Quie P E: Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. *J Infect Dis* 130: 412~415, 1974
  - 20) Glette J, Sandberg S, Hopen G, Solberg C O: Influence of tetracyclines on human polymorphonuclear leukocyte function. *Antimicrob Agent Chemother* 25: 354~357, 1984
  - 21) Gabler W L, Creamer H R: Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *J periodont Res* 26: 52~58, 1991
  - 22) 安生紗枝子, 近藤由利子: 各種抗生物質の好中球に対する細胞傷害性. *Chemotherapy* 39: 1104~1109, 1991

## EFFECT OF ANTIBIOTICS ON CHEMOTAXIS OF HUMAN NEUTROPHILS

Saeko Anjo<sup>1)</sup>, Yuriko Kondo<sup>1)</sup>, Yoshio Ishibashi<sup>2)</sup> and Toshihiko Arai<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pharmacy, Toho University Omori Hospital,  
6-11-1 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143, Japan

<sup>2)</sup> Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy

We examined the effect of antibiotics on chemotaxis of human neutrophils. Chemotaxis was assessed by the Boyden-chamber method, using zymosan-activated serum and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) as chemotactic factors. Treatment of neutrophils with a clinically relevant concentration of ciprofloxacin (CPFX, 1  $\mu$ g/ml) resulted in a slight suppression of chemotaxis toward the zymosan-activated serum but not toward FMLP. In contrast, piperacillin (PIPC) enhanced chemotaxis toward FMLP at 10-fold (250  $\mu$ g/ml) higher than therapeutic level. Chloramphenicol (CP) markedly suppressed chemotaxis toward the zymosan-activated serum and FMLP at a 100-fold (2,500  $\mu$ g/ml) higher than a therapeutic level. In addition, minocycline (MINO, 500  $\mu$ g/ml) was found to impair chemotaxis toward FMLP. On the other hand, flomoxef (FMOX), imipenem (IPM), gentamicin (GM), amikacin (AMK), josamycin (JM), lincomycin (LCM), colistin (CL), and rifampicin (RFP) had no effect on neutrophil chemotaxis even at 100-fold higher than their therapeutic levels. It seemed likely that these antibiotics might hardly influence chemotaxis of neutrophils in the clinically relevant range.