

## 好中球機能におよぼす化学療法剤の影響

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4年4月30日受付・平成4年7月29日受理)

ヒト好中球の粘着能、貪食能、 $H_2O_2$ 産生能および脱顆粒におよぼす piperacillin (PIPC) imipenem (IPM), flomoxef (FMOX), gentamicin (GM), amikacin (AMK), minocycline (MINO), josamycin (JM), lincomycin (LCM), chloramphenicol (CP), colistin (CL), rifampicin (RFP) および ciprofloxacin (CPFX) の影響を *in vitro* で調べた。好中球を各種薬剤存在下で  $37^\circ C$  1時間培養した場合、常用血中濃度範囲では粘着能、貪食能、 $H_2O_2$ 産生能および脱顆粒に有意に影響を与える薬剤はなかったが、FMOXは常用血中濃度の10倍濃度 ( $100 \mu g/ml$ ) 以上で粘着能を抑制した。また、高濃度のCP ( $2,500 \mu g/ml$ ) MINO ( $500 \mu g/ml$ ) およびCPFX ( $100 \mu g/ml$ ) は  $H_2O_2$ 産生能および貪食能を、JM ( $300 \mu g/ml$ ) はPMA刺激による  $H_2O_2$ 産生能を有意に抑制した。一方、PIPCは濃度依存的に  $H_2O_2$ 産生能および粘着能を促進する傾向が見られた。他の薬剤については常用血中濃度の100倍濃度においても好中球機能への直接作用は認められなかった。

**Key words:** 好中球, 粘着能,  $H_2O_2$ 産生能, 貪食能, 脱顆粒, 化学療法剤

感染症治療の目的で投与された抗菌剤は、生体内では感染部位に遊走した好中球やマクロファージによる微生物の貪食・殺菌作用と補完的に働く。したがって、抗菌剤と宿主の感染防御機構との協力作用は感染症治療において必要不可欠である。しかしながら、薬剤の抗菌力にかかわらず症状の改善がみられない場合、感染の治癒を左右する因子として薬剤の抗菌力以外に、抗菌剤の生体防御機構におよぼす作用も考慮する必要がある。この観点から、我々は、好中球機能におよぼす化学療法剤の影響について検討し、好中球機能の一つである走化性におよぼす汎用抗菌抗生剤12種の影響についてすでに報告した<sup>1)</sup>。

本報では、さらに好中球機能におよぼす化学療法剤の影響を総合的に評価するため、好中球の粘着能、貪食能、 $H_2O_2$ 産生能および脱顆粒について薬剤の影響を *in vitro* で比較検討した。

## I. 材料と方法

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, 日本レダリー), josamycin (JM, 山之内), lincomycin (LCM, アップジョン), chloramphenicol (CP, 三共), colistin (CL, 科

研), rifampicin (RFP, 第一) および ciprofloxacin (CPFX, バイエル) を用いた。なお、MINO, JM, CP, RFP は dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解した後、PBS (ニッスイ) 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で溶解して用いた。

膜刺激物質: Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP, Sigma Co.) および Phorbol myristate acetate (PMA, Sigma Co.) を用いた。FMLPはエタノールに溶解して1mMとし、ハンクス液で希釈して  $10^{-6} M$  とした。PMAはDMSOで溶解して1mM保存液とし、これをハンクス液で100nMに希釈した。

1. 好中球の調整<sup>2)</sup>

一回の実験につき健康人1名から10mlのヘパリン ( $5 U/ml$ ) 静脈血を採取した。これを等量の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 (第一薬品) に重層し、 $2,000 \times g$ , 20分間遠心分離して顆粒球画分を採取した。この顆粒球画分中の赤血球を低張処理で除き、 $4^\circ C$  で  $100 \times g$ , 10分間遠心分離によって3回洗浄後、2%ウシ血清アルブミンを含むハンクス液

\* 東京都大田区大森西 6-11-1

に懸濁し、好中球浮遊液 ( $1 \times 10^6$  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%は好中球であった。

## 2. 粘着能

好中球粘着能は Van der Auera ら<sup>3)</sup> の方法に準じて測定した。すなわち、96 ウェルマイクロプレートに好中球 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) 90  $\mu$ l と薬剤 10  $\mu$ l をいれ、37°C で1時間培養後、非付着細胞をハンクス液で洗浄除去した後、BCA タンパク質定量用試薬 (フナコシ薬品) を用いて蛋白濃度を測定し、付着した細胞数を蛋白濃度に換算し、コントロールに対する比率で表わした。

## 3. 食食能

好中球浮遊液 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) 0.1 ml を 8 ウェル HTC スライドの各ウェルにいれ、37°C、1時間培養した後、HBSS で2回洗浄し、非付着細胞を除去して好中球 monolayer を作成した。この好中球 monolayer に、10  $\mu$ l のオプソニン化ゼイモサン ( $5 \times 10^7$  cells/ml) を加え、37°C で1時間インキュベートした後、4% ホルムアルデヒドで固定し、ギムザ染色した。食食能は光学顕微鏡下で食食細胞を観察し、細胞当りの平均取り込み数および食食細胞の百分率をそれぞれ求め、その積を phagocytic index として表した<sup>4)</sup>。

## 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能

Pick と Mizel<sup>5)</sup> の方法に準じて測定した。すなわち、96 ウェルマイクロプレートを用い、1 ウェル当り 1.2 U の horseradish peroxidase、15  $\mu$ g の phenol red を含む PBS に  $1 \times 10^6$  cells の好中球を加え全量 135  $\mu$ l とした。これに刺激剤 ( $10^{-6}$  M FMLP または 100 nM PMA) を 15  $\mu$ l 加え、37°C で1時間培養後、1 N NaOH を 10  $\mu$ l 添加して反応を停止し、horseradish peroxidase によって酸化された phenol red を OD<sub>600 nm</sub> の吸光度を測定することにより定量した。なお、標準曲線は 1~200  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて作成し、試料中の遊離 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は標準曲線から算出し、 $10^6$  の好中球からの遊離 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> として示した。

## 5. 脱顆粒

好中球脱顆粒は specific granule のマーカーとして lysozyme を、azurophil granule のマーカーとして  $\beta$ -glucuronidase をそれぞれ測定した<sup>7)</sup>。好中球浮遊液 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) 90  $\mu$ l に各濃度の薬剤液 10  $\mu$ l をいれ、37°C で1時間培養後、氷冷し、1,870 $\times$ g、5分間遠心により上清を得た。上清中の lysozyme 活性は turbidimetric method<sup>8)</sup> を用いて、pH 6.2 における *M. lysodeikticus* の融解率を OD<sub>550 nm</sub> の濁度変化で測

定した。また、 $\beta$ -glucuronidase 活性は phenolphthalein glucuronidate を基質として用い、遊離した phenolphthalein を OD<sub>600 nm</sub> で測定した。なお、全酵素活性は 0.1% Triton X-100 処理した細胞浮遊液を用いて測定し、酵素遊離率は全活性の百分率 (%) として表わした。

## 6. 統計処理

有意差検定は 5 例以上の成績から Student の t 検定によって行った。

## II. 結 果

### 1. 好中球粘着能におよぼす薬剤の影響

プラスチックプレートへの好中球粘着におよぼす薬剤の影響を調べた (Table 1)。常用血中濃度範囲ではいずれの薬剤も粘着能には影響をおよぼさなかったが、FMOX は 10 倍濃度以上 (300  $\mu$ g/ml) で抑制作用を示した。常用血中濃度の 100 倍濃度では、JM、PIPC、IPM、CL がわずかな促進傾向を示し、逆に、CP (2,500  $\mu$ g/ml) および CPFX (100  $\mu$ g/ml) では抑制傾向がみられた。なお、MINO および RFP は原薬の発色のため 10 および 100 倍濃度では測定不能であった。

### 2. 食食能におよぼす薬剤の影響

好中球食食能におよぼす影響については Table 2 に示すように、常用血中濃度範囲では LCM、CP および RFP が促進傾向を示したが、有意なものではなかった。常用血中濃度の 100 倍の高濃度で、MINO (500  $\mu$ g/ml)、CP (2,500  $\mu$ g/ml) および CPFX (100  $\mu$ g/ml) は有意 ( $p < 0.01$ ) に食食能を抑制したが、トリパンプルー色素排除法により細胞生存率を調べた結果、対照群の生存率が 98.9% であったのに対し、MINO (500  $\mu$ g/ml) では 66.9%、CP (2,500  $\mu$ g/ml) では 75.3%、CPFEX (100  $\mu$ g/ml) では >5% と著明に生存率が低下していた。したがって、この食食能抑制作用は、薬剤による直接細胞傷害性の結果と考えられる。また、JM (300  $\mu$ g/ml) でもわずかな抑制 ( $p < 0.05$ ) が認められたが、細胞生存率が 93.8% とわずかに低値を示したことから、これも細胞傷害の結果と考えられる。他の薬剤については統計的有意差は認められなかった。

### 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能におよぼす薬剤の影響

好中球の活性酸素産生能におよぼす薬剤の影響を、FMLP および PMA 刺激による好中球の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能を指標として調べた。Table 3 に示すように、常用血中濃度およびその 10 倍濃度範囲では、FMLP 刺激による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能に影響をおよぼす薬剤は認められなかった。しかし、常用血中濃度の 100 倍濃度の場

Table 1. Effect of antibiotics on neutrophil adherence

Drugs	Adherence ratio			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	1.00			
Piperacillin (25 $\mu\text{g/ml}$ )		1.11 $\pm$ 0.04	1.38 $\pm$ 0.11	1.40 $\pm$ 0.14
Flomoxef (10 $\mu\text{g/ml}$ )		0.92 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.15	0.72 $\pm$ 0.06
Imipenem (10 $\mu\text{g/ml}$ )		1.13 $\pm$ 0.09	1.07 $\pm$ 0.07	1.33 $\pm$ 0.12
Gentamicin (10 $\mu\text{g/ml}$ )		1.06 $\pm$ 0.08	1.16 $\pm$ 0.14	1.12 $\pm$ 0.05
Amikacin (10 $\mu\text{g/ml}$ )		1.11 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.06	1.18 $\pm$ 0.12
Josamycin (3 $\mu\text{g/ml}$ )		1.08 $\pm$ 0.04	1.30 $\pm$ 0.15	1.52 $\pm$ 0.19
Lincomycin (5 $\mu\text{g/ml}$ )		1.15 $\pm$ 0.08	1.15 $\pm$ 0.13	1.15 $\pm$ 0.09
Minocycline (5 $\mu\text{g/ml}$ )		1.08 $\pm$ 0.05	ND	ND
Chloramphenicol (25 $\mu\text{g/ml}$ )		1.14 $\pm$ 0.10	1.23 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.02
Colistin (5 $\mu\text{g/ml}$ )		1.09 $\pm$ 0.07	1.26 $\pm$ 0.27	1.31 $\pm$ 0.09
Rifampicin (10 $\mu\text{g/ml}$ )		1.15 $\pm$ 0.10	ND	ND
Ciprofloxacin (1 $\mu\text{g/ml}$ )		1.01 $\pm$ 0.09	1.14 $\pm$ 0.14	0.44 $\pm$ 0.09

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

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

ND: Not determined.

Table 2. Effect of antibiotics on phagocytosis by human neutrophils

Drugs	Phagocytic index			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	146.7 $\pm$ 27.0			
Piperacillin (25 $\mu\text{g/ml}$ )		148.5 $\pm$ 3.2	164.8 $\pm$ 23.3	118.0 $\pm$ 37.2
Flomoxef (10 $\mu\text{g/ml}$ )		143.4 $\pm$ 8.3	141.7 $\pm$ 4.8	190.2 $\pm$ 7.6
Imipenem (10 $\mu\text{g/ml}$ )		90.9 $\pm$ 37.1	199.1 $\pm$ 11.4	162.2 $\pm$ 20.5
Gentamicin (10 $\mu\text{g/ml}$ )		136.0 $\pm$ 0.8	130.6 $\pm$ 6.3	82.3 $\pm$ 41.6
Amikacin (10 $\mu\text{g/ml}$ )		149.1 $\pm$ 27.3	172.5 $\pm$ 11.3	180.9 $\pm$ 21.0
Josamycin (3 $\mu\text{g/ml}$ )		146.7 $\pm$ 21.8	112.7 $\pm$ 4.6	37.1 $\pm$ 28.3*
Lincomycin (5 $\mu\text{g/ml}$ )		184.9 $\pm$ 21.7	165.0 $\pm$ 1.0	150.9 $\pm$ 26.1
Minocycline (5 $\mu\text{g/ml}$ )		129.8 $\pm$ 60.9	63.4 $\pm$ 59.7	6.3 $\pm$ 6.3**
Chloramphenicol (25 $\mu\text{g/ml}$ )		181.6 $\pm$ 7.8	93.6 $\pm$ 12.0	2.6 $\pm$ 0.2**
Colistin (5 $\mu\text{g/ml}$ )		150.1 $\pm$ 5.8	182.3 $\pm$ 27.8	131.4 $\pm$ 40.5
Rifampicin (10 $\mu\text{g/ml}$ )		185.4 $\pm$ 12.4	90.2 $\pm$ 29.1	123.3 $\pm$ 13.4
Ciprofloxacin (1 $\mu\text{g/ml}$ )		155.8 $\pm$ 27.3	171.3 $\pm$ 20.8	17.9 $\pm$ 12.7**

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

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

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

合, MINO (500  $\mu\text{g/ml}$ ), CP (2,500  $\mu\text{g/ml}$ ) および CPMX (100  $\mu\text{g/ml}$ ) でいずれも好中球の  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能を有意 ( $p < 0.05$ ) に抑制した。一方, PIPC は有

意ではないが  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能を濃度依存的に促進する傾向がみられた。PMA 刺激の場合は Table 4 に示すように, FMLP 刺激と同様に常用血中濃度範囲では

Table 3. Effect of antibiotics on FMLP-induced hydrogen peroxide generation from human neutrophils

Drugs	Hydrogen peroxide (nmol/10 <sup>6</sup> cells/60 min)			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	12.15±5.16			
Piperacillin (25 µg/ml)		11.81±5.72	15.17±10.80	21.70± 5.26
Flomoxef (10 µg/ml)		9.76±7.85	7.85± 5.38	8.59± 5.83
Imipenem (10 µg/ml)		8.28±4.67	11.68±10.12	13.00±11.32
Gentamicin (10 µg/ml)		9.74±5.66	8.10± 2.16	10.84± 4.33
Amikacin (10 µg/ml)		12.51±5.35	12.78± 7.94	9.13± 3.21
Josamycin ( 3 µg/ml)		9.47±6.28	9.36± 3.11	13.90± 6.46
Lincomycin ( 5 µg/ml)		11.20±3.83	11.40± 3.32	10.83± 7.58
Minocycline ( 5 µg/ml)		8.03±5.17	10.27± 5.94	4.45± 3.19*
Chloramphenicol (25 µg/ml)		6.36±2.36	7.20± 0.70	2.53± 1.14*
Colistin ( 5 µg/ml)		8.78±4.98	10.01± 1.49	11.39± 6.60
Rifampicin (10 µg/ml)		9.77±3.18	9.28± 6.37	6.50± 2.12
Ciprofloxacin ( 1 µg/ml)		12.92±7.00	4.46± 1.61	3.34± 2.77*

The values represent the means±SE of five experiments.

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

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

Table 4. Effect of antibiotics on PMA-induced hydrogen peroxide generation from human neutrophils

Drugs	Hydrogen peroxide (nmol/10 <sup>6</sup> cells/60 min)			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	19.17±5.67			
Piperacillin (25 µg/ml)		17.53±13.34	33.93±13.28	32.96±13.49
Flomoxef (10 µg/ml)		18.29±17.10	20.53± 0.25	21.82± 9.09
Imipenem (10 µg/ml)		15.03±12.19	10.07± 6.37	16.33±11.16
Gentamicin (10 µg/ml)		12.91± 6.95	13.06± 5.96	10.07± 1.43
Amikacin (10 µg/ml)		16.14±11.58	13.47± 7.63	9.31± 5.75
Josamycin ( 3 µg/ml)		15.87± 9.74	16.29± 7.56	7.58± 4.23*
Lincomycin ( 5 µg/ml)		15.63± 7.91	18.99± 9.34	12.01± 8.27
Minocycline ( 5 µg/ml)		13.06± 8.61	8.29± 5.41	6.69± 2.95*
Chloramphenicol (25 µg/ml)		14.20± 5.22	20.23± 9.93	7.86± 4.11*
Colistin ( 5 µg/ml)		16.67± 8.81	21.05± 4.84	11.37± 4.45
Rifampicin (10 µg/ml)		16.43± 9.77	11.15± 7.26	16.65±11.85
Ciprofloxacin ( 1 µg/ml)		15.12± 6.94	11.22± 3.42	6.16± 2.88*

The values represent the means±SE of five experiments.

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

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

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能に影響を与える薬剤は認められなかった。しかし、常用血中濃度の100倍濃度では、JM (300 µg/ml), MINO (500 µg/ml), CP (2,500 µg/ml)

および CFX (100 µg/ml) が好中球 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能を有意 (p<0.05) に抑制した。PIPC は常用血中濃度範囲では有意な作用はみられなかったが、10倍

Table 5. Effect of antibiotics on enzyme release from human neutrophils

Drugs	Beta-glucuronidase (%)			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	25.5±3.6			
Piperacillin (25 µg/ml)		34.0±7.0	30.8± 0.1	42.1± 8.0*
Flomoxef (10 µg/ml)		23.9±6.8	20.9± 2.1	52.1± 9.4*
Imipenem (10 µg/ml)		15.4±0.0	18.8± 3.4	ND
Gentamicin (10 µg/ml)		25.4±1.5	20.5± 5.1	47.1± 0.9*
Amikacin (10 µg/ml)		18.8±3.4	17.1± 1.7	41.9± 4.3*
Josamycin ( 3 µg/ml)		19.4±7.5	11.7± 0.2	29.8±27.9
Lincomycin ( 5 µg/ml)		18.8±3.4	14.6± 0.9	47.4± 6.4*
Minocycline ( 5 µg/ml)		28.7±9.9	26.5±11.1	ND
Chloramphenicol (25 µg/ml)		14.5±1.0	14.3± 2.8	47.0±14.6*
Colistin ( 5 µg/ml)		26.1±3.0	21.8± 1.3	51.7± 2.1*
Rifampicin (10 µg/ml)		27.2±0.3	31.2± 7.3	ND
Ciprofloxacin ( 1 µg/ml)		34.7±3.9	15.2± 3.7	51.1± 6.7*

The values represent the means±SE of five experiments.

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

ND: Not determined

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

Table 6. Effect of antibiotics on enzyme release from human neutrophils

Drugs	Lysozyme (%)			
	Relative concentration			
	0	1	10	100
Control	27.4±7.0			
Piperacillin (25 µg/ml)		40.5± 2.0	30.6± 0.3	38.3± 8.0
Flomoxef (10 µg/ml)		23.7± 0.6	37.5± 1.0	30.6± 0.3
Imipenem (10 µg/ml)		32.8± 9.7	28.9±13.5	20.7± 2.5
Gentamicin (10 µg/ml)		31.4± 7.2	32.8± 9.7	40.5± 2.0
Amikacin (10 µg/ml)		16.0± 8.3	36.6± 5.8	50.4± 4.2*
Josamycin ( 3 µg/ml)		35.0±19.6	25.1±17.4	27.5± 3.3
Lincomycin ( 5 µg/ml)		22.9± 7.5	32.8± 9.7	31.4± 7.2
Minocycline ( 5 µg/ml)		21.2±14.4	23.7± 0.6	23.7± 0.6
Chloramphenicol (25 µg/ml)		31.1±23.4	32.0±16.6	19.8± 4.4
Colistin ( 5 µg/ml)		49.6±11.1	47.7±24.6	30.6± 0.3
Rifampicin (10 µg/ml)		28.1±20.4	32.0±16.6	22.1±14.4
Ciprofloxacin ( 1 µg/ml)		24.5± 6.3	16.8± 1.4	85.6± 6.8*

The values represent the means±SE of five experiments.

The original concentrations of antibiotics are shown in parentheses.

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

濃度以上で濃度依存的に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能を促進する傾向が見られた。

#### 4. 脱顆粒におよぼす薬剤の影響

好中球を各薬剤存在下で1時間培養した後、その上清中のβ-glucuronidase活性およびlysozyme活性を測定した。β-glucuronidaseの遊離はTable 5に示す

ように常用血中濃度範囲で有意な変動は認められなかった。しかし、100倍濃度においては、PIPC, FMOX, GM, AMK, LCM, CP, CL および CPFY など多くの薬剤が酵素遊離を促進する傾向を示した。PIPC, FMOX, GM, AMK, LCM および CL 存在下での好中球生存率はいずれも >95% であることから、これらの薬剤については、細胞傷害によるものではなく、脱顆粒能の促進によるものと考えられる。なお、IPM, MINO および RFP は原薬の発色のため測定不能であった。

Lysozyme 遊離の場合、Table 6 に示すように、常用血中濃度範囲で著明な影響を与えるものは認められず、100倍濃度の AMK と CPFY に脱顆粒の促進が認められたにすぎなかった。

### III. 考 察

好中球は感染に対する生体防御機構の要の働きを担っている。したがって、生体内での抗菌剤の薬効を正しく評価するには、抗菌剤と好中球の協力作用を考慮する必要がある。特に、好中球機能が低下している immunocompromised host の治療においてはこの問題は重要である。この観点から、ヒト好中球機能、すなわち粘着能、食食能、 $H_2O_2$  産生能および脱顆粒におよぼす化学療法剤の影響を汎用抗菌抗生物質 12 種類について *in vitro* で調べた。

感染病巣に向かう食細胞の血管外への移動は血管内皮細胞の表面に食細胞が付着することから開始される。この付着は走化運動にさきだって起こる現象である。この段階における抗生物質の影響については、AMK および GM が  $0.25\sim 16 \mu\text{g/ml}^{7,8)}$ 、IPM が  $10\sim 50 \mu\text{g/ml}^{7)}$ 、PIPC<sup>9)</sup> が  $100 \mu\text{g/ml}$ 、RFP<sup>3)</sup> が  $6\sim 50 \mu\text{g/ml}$  の範囲で促進的に、また MINO は  $25 \mu\text{g/ml}^{7)}$ 、LCM は  $10\sim 20 \mu\text{g/ml}^{7)}$  で抑制的に作用することが報告されている。我々の成績では、常用血中濃度範囲では好中球の粘着能に影響を与える薬剤はみられず、PIPC だけが  $250\sim 2,500 \mu\text{g/ml}$  の範囲でわずかではあるが促進的傾向を示した。一方、CP, CPFY は 100倍濃度で抑制傾向を示したが、これは高濃度の薬剤による細胞傷害によるものと考えられる<sup>10)</sup>。FMOX については濃度依存的に粘着能の抑制が認められたが、この原因については現在不明である。FMOX は少なくとも食食能、 $H_2O_2$  産生能および脱顆粒には影響を与えなかったことから、この抑制作用は粘着能に特異的であると思われる。今後さらに細胞接着分子に対する作用やマトリックスの種類による粘着能の違いなどを詳細に検討する必要があると考える。

食食能については、PIPC<sup>11)</sup>、AMK<sup>12)</sup>、CPFY<sup>13)</sup> が血中濃度範囲では食食能に影響をおよぼさないことが報告されている。我々もこれらの報告と同様の結果を得た。

好中球の酸素依存性殺菌作用は、刺激にともなう  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  など一連の活性酸素放出に基づいている。Glette ら<sup>14)</sup> は MINO が  $10 \mu\text{g/ml}$  以上では好中球 chemiluminescence を阻害することを報告しており、Superoxide 産生能についても、TC は  $500 \mu\text{g/ml}$  の高濃度で著明な抑制を示すが、PIPC, GM, AMK, LCM および CP はほとんど無影響であることが報告されている<sup>15)</sup>。我々の膜刺激剤 FMLP および PMA による  $H_2O_2$  産生能の成績においても MINO が  $50\sim 500 \mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で抑制する傾向が見られた。このテトラサイクリン系薬剤の抑制作用は  $Ca^{2+}$  イオンとのキレート結合によるものと考えられる<sup>14)</sup>。一方、PIPC は 10倍濃度以上で濃度依存的に  $H_2O_2$  産生能を促進する傾向がみられ、これは我々の前報<sup>16)</sup> の成績と一致するものであった。

好中球は脱顆粒によって酸素非依存的に微生物を殺菌する能力を有する。Gabler ら<sup>17)</sup> はテトラサイクリン系は脱顆粒を抑制することを報告しており、これは前述の活性酸素産生の場合と同様、 $Ca^{2+}$  イオンとのキレート結合によるものと考察している。また、Labro<sup>18)</sup> は JM が azurophil granule である myeloperoxidase の遊離に  $1\sim 100 \mu\text{g/ml}$  の範囲でも影響しないことを報告している。我々の成績は、無刺激状態での好中球脱顆粒におよぼす抗菌剤の影響を調べたものであるが、常用血中濃度範囲で著明な作用を示すものはなかった。今後、異物食食時の脱顆粒におよぼす影響についても検討を加える必要がある。

一般に、細胞内移行性が高い薬剤ほど細胞毒性が強く発現される<sup>19)</sup>。したがって、MINO, CP, CPFY や JM などの細胞内移行性が優れた薬剤が高濃度において好中球機能を抑制したのは、特異的機能阻害ではなく細胞傷害の結果と考えられる。

以上の結果から抗菌抗生物質の好中球機能におよぼす影響を総合的に判断すると、FMOX は常用血中濃度の 10倍濃度以上で好中球粘着能を低下させること、逆に、PIPC は粘着能、酸化的殺菌機構を促進させる傾向を示すことがわかった。PIPC は走化能を促進させるという前報の成績と考え合わせると、PIPC は食細胞機能全般を増強させるものと思われる。これらの作用が実際の臨床応用上、どの程度薬効に反映されるのかは今後さらに検討を要するであろう。また、本実験で用いた他薬剤については常用血中濃度範囲での好

中球機能への直接作用は軽度でほとんど影響がないとみて差し支えないものと考えられる。

文 献

- 1) 安生紗枝子, 近藤由利子, 石橋芳雄, 新井俊彦: 好中球走化性に及ぼす抗生物質の影響。Chemotherapy 40: 11~15, 1992
- 2) Boyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes, and macrophages. Scand J Immunol suppl 5: 9~15, 1976
- 3) Van der Auera P, Husson M: Influence of rifampicin and ansamycin on motility and adherence of human neutrophils studied in vitro. J Antimicrob Chemother 24: 347~353, 1989
- 4) Ishibasi Y, Yamashita T: Effects of a phagocytosis stimulating factor on the phagocytic process of polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun 38: 825~833, 1982
- 5) Pick E, Mizel D: Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol Methods 46: 211~226, 1981
- 6) Takamori K, Yamashita T: Biochemical properties of polymorphonuclear neutrophils from venous blood and peritoneal exudates of rabbits. Infect Immun 29: 395~400, 1980
- 7) 国井乙彦: 抗生物質と食細胞。日本医事新報 No. 3449, 平成 2 年 6 月 2 日。p 3~15
- 8) Seklecki M M, Quintiliani R, Maderazo E G: Aminoglycoside antibiotics moderately impair granulocyte function. Antimicrob Agent Chemother 13: 552~554, 1978
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Fietta A, Sacchi F, Bersani C, Grassi F, Mangiarotti P, Grassi G G: Effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on migration and bactericidal activity of human phagocytes. Antimicrob Agent Chemother 23: 930~931, 1983
- 12) Burgaleta C, Moreno T: Effect of  $\beta$ -lactams and aminoglycosides on human polymorphonuclear leukocytes. J Antimicrob Chemother 20: 529~535, 1987
- 13) Boogaerts M A, Malbrain S, Scheers W, Verwilghen R L: Effects of quinolones on granulocyte function in vitro. Infection 14: s 258~262, 1986
- 14) Glette J, Sandberg S, Hopen G, Solberg C O: Influence of tetracyclines on human polymorphonuclear leukocyte function. Antimicrob Agent Chemother 25: 354~357, 1984
- 15) 原 耕平, 重野芳輝, 朝長昭光, 広田正毅: 抗生物質。臨床免疫 17 (S 9): 272~279, 1985
- 16) 安生紗枝子, 近藤由利子, 石橋芳雄, 新井俊彦: 好中球機能におよぼすペニシリン系抗生物質の影響。Chemotherapy 40: 737~742, 1992
- 17) Gabler W L, Creamer H R: Suppression of human neutrophil function by tetracyclines. J periodont Res 26, 52~58, 1991
- 18) Labro M T, Benna J EI, 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

## Effects of antibiotics on human neutrophil functions

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

The effects of antibiotics on human neutrophil functions such as adherence, phagocytosis, hydrogen peroxide production, and enzyme release were examined. Piperacillin (PIPC), imipenem (IPM), flomoxef (FMOX), gentamicin (GM), amikacin (AMK), minocycline (MINO), josamycin (JM), lincomycin (LCM), chloramphenicol (CP), colistin (CL), rifampicin (RFP), and ciprofloxacin (CPF) were used in this study. These drugs had no influence on neutrophil functions at their therapeutic concentrations. However, FMOX ( $>100 \mu\text{g/ml}$ ) was found to suppress neutrophil adherence to the plastic plate. High concentrations of CP ( $2,500 \mu\text{g/ml}$ ) and MINO ( $500 \mu\text{g/ml}$ ) significantly impaired hydrogen peroxide production and phagocytosis. JM ( $300 \mu\text{g/ml}$ ) also inhibited PMA-induced hydrogen peroxide production. In contrast, PIPC ( $>100 \mu\text{g/ml}$ ) slightly enhanced adherence and hydrogen peroxide production. Results indicated that these antibiotics had little influence on neutrophil functions in the clinically relevant range.