

培養細胞のニュートラルレッド取り込み減少を指標とした キノロン系抗菌薬の光毒性の検討

村木 優子¹⁾・山田 雅夫¹⁾・新居 志郎¹⁾・公文 裕巳²⁾・大森 弘之²⁾

¹⁾岡山大学医学部ウイルス学, ²⁾同 泌尿器科学

(平成6年10月18日受付・平成7年1月10日受理)

培養細胞のニュートラルレッド取り込みの減少を指標として試験管内で各種薬剤の光毒性を評価する方法を導入し、10種のキノロン系抗菌薬の光毒性を検討した。ヒト胎児肺線維芽細胞あるいはVero細胞を各種抗菌剤存在下に培養したのち、長波長紫外線(UVA)を照射したときの細胞毒性を、細胞のニュートラルレッド取り込みの減少として測定した。キノロン系薬剤の光毒性は、強い光毒性を持つことが知られている doxycycline に比べて、いずれもかなり低かった。これらの中で、enoxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, nalidixic acid では、比較的高い光毒性が認められたが、これらは臨床上光線過敏症が報告されているものである。一方, norfloxacin, balofloxacin (Q-35), AM-1155, T-3716 の光毒性は比較的低かった。以上より、本測定法は、光毒性の簡便で迅速な評価法として有用であることが示唆された。

Key words: 光毒性, キノロン系抗菌薬, ニュートラルレッド, UVA, 培養細胞

キノロン系抗菌薬は、ピリドンカルボン酸を最小の必須構造単位としておりピリドンカルボン酸系抗菌薬ともよばれる。nalidixic acid (NA) が臨床的に用いられた最初の薬剤であるが、キノリン環の6位にフッ素が導入された norfloxacin (NFLX) に強い抗菌活性が認められたことから、その後多くの薬剤が開発されてきている。NFLX 以降の薬剤はそれ以前のオールドキノロンに対してニューキノロン薬と呼ばれている。近年、これらキノロン系抗菌薬による光線過敏症の発生が増えてきており¹⁻³⁾、臨床的な問題に加えて、薬剤開発時における光毒性の予知の点からも検討すべき点が多い。

今回我々は、Lasarow ら⁴⁾が開発した、培養細胞を用いて光毒性を *in vitro* で定量的に測定する系を導入し、各種キノロン系抗菌薬の光毒性を検討した。またこれらを動物実験、臨床上の光線過敏症の発生頻度等と比較し、光毒性の予知がどの程度可能かについても考察した。

I. 材料と方法

1) 細胞

ヒト胎児肺由来2倍体細胞(HEL)細胞とVero細胞(ミドリザル腎由来株化細胞)を使用した。これらは、Eagle's Minimum Essential Mediumに、前者は10%の濃度に牛胎児血清(FCS)、後者は5%の濃度に牛新生児血清(NCS)を添加して培養した。

2) 薬剤

今回、光毒性を検討した薬剤は、以下の通りである: doxycycline (DOXY), minocycline (MINO), nalidixic acid (NA), norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX),

ciprofloxacin (CPFX), lomefloxacin (LFLX), enoxacin (ENX), sparfloxacin (SPFX), AM-1155, Du 6859 a, balofloxacin (Q-35), T-3761。前3者はSigma社より購入し、他は各製薬会社より供与された。薬剤は、製造元の指示に従って溶解し、0.22 μm のフィルター通過後 Hank's 緩衝塩類溶液 (HBSS) にて所定の濃度に希釈して使用した。

3) 光毒性の測定

基本的には、Lasarow ら⁴⁾の発表した方法に準じた。以下にその概略を示す。まず、3.5 cm プラスチック製培養ディッシュに、いずれかの細胞を用意し、所定の濃度(0~200 μg/ml)の抗菌剤を含む培地で、30分培養しリン酸緩衝塩類溶液(PBS)で洗浄後、20 mM HEPES 含有 HBSS を加え、東芝 BL-B ランプ(最大波長 352 nm)により UVA を 3 mW/cm² にて 40 分照射した。その後 0.005% ニュートラルレッド含有培地を加え 37°C で 3 時間培養し、ニュートラルレッドを細胞に取り込ませた。0.4% ホルマリン液で固定後、500 μl の酢酸・エタノール液で 10 分間抽出し、その 200 μl について、EIA リーダーを用いて 550 nm の吸光度 (OD₅₅₀) を測定した。

4) 光毒性の評価

各薬剤濃度のニュートラルレッド取り込みの減少率(%)を以下の式により算出し、光毒性の指標とした。

各濃度の取り込み減少率 (%)

$$= (1 - \text{各濃度の OD}_{550} / \text{薬剤 (-) コントロールの OD}_{550}) \times 100$$

II. 結 果

1) 光毒性測定の基本条件の検討

まずテトラサイクリン系の DOXY と MINO を用いて、光毒性測定の基本条件を検討した。Lasarow らの測定系では、20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で DOXY は高い光毒性を示し、MINO はほとんど光毒性を示さないことが報告されているので⁴⁾、この濃度の薬剤を用いて、Vero 細胞を用いて UVA の照射条件を検討した。その結果、1. UVA 非照射条件下では、両薬剤ともニュートラルレッドの取り込みの低下、すなわち細胞毒性をみとめなかった。2. UVA 照射のみで、薬剤を加えない系では、取り込みの低下をほとんど認めなかった（最大 60 分まで）。3. 薬剤濃度を 20 $\mu\text{g/ml}$ として照射時間を検討したところ (Fig. 1 a), DOXY では、取り込み減少率は比例的に増加し、20 分で 90% 以上に達し、それ以後ほぼ一定となった。MINO では、照射時間に応じて漸増したが、40 分後でも 5% 前後であった。このため以下の実験では、測定感度と再現性を考慮して、照射時間を 40 分とした。4. UVA の線源として、最大波長 369 nm の BL ランプと最大波長 352 nm の BL-B ランプの 2 者を比較したところ、両者に明らかな差を認めなかったため、以下の実験では、BL-B ランプを使用することとした。これらの照射条件設定ののち、薬剤の濃度を変え

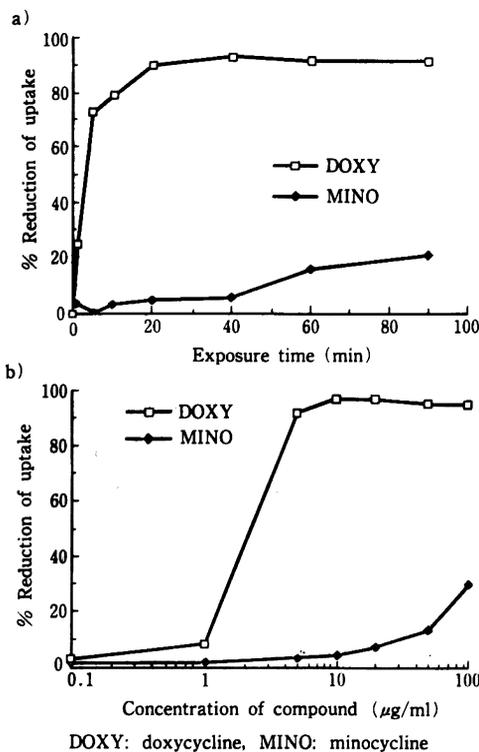


Fig. 1. Phototoxicity of tetracyclines to Vero cells. a) Effects of the exposure time of UVA. b) Effects of concentration of the compounds.

て、DOXY と MINO の光毒性を測定した結果を Fig. 1 b に示す。

以上より、細胞毒性を生じないレベルの濃度の薬剤処理と、単独では細胞毒性を生じない程度の UVA の照射を併用することによって、明らかな細胞毒性の出現 (光毒性) が薬剤濃度に依存性に認められること、この方法により、DOXY と MINO の光毒性の差が顕著に示されることが明らかになった。

2) 各種キノロン系抗菌薬の光毒性

次に、この方法を用いて、各種キノロン系抗菌薬の光毒性を Vero 細胞を用いて測定した結果を、Fig. 2 に示す。また、HEL 細胞での結果とあわせて各抗菌剤の光毒性を評価した結果を Fig. 3 にまとめて示す。

キノロン系抗菌薬の光毒性は、いずれも DOXY と比較すればかなり軽微であった。Vero 細胞を用いた検討では、ENX, OFLX, LFLX に比較的高い光毒性が認められ、SPFX, NA ではこれに次ぐ光毒性を示した。一方、NFLX, AM-1155 では MINO と同程度であった。HEL 細胞を用いた検討でも同様の傾向を認め、LFLX, OFLX, CPFX には、比較的高い光毒性が認められた。

III. 考 察

キノロン系抗菌薬の臨床応用上問題となる光線過敏症の発生頻度^{2,3)}と、今回我々が導入した培養細胞のニュートラルレッド取り込み減少率を指標とする光毒性試験の結果を比較してみたい。

これまで光線過敏症の発生が高率に報告されているものとして、わが国では ENX^{5,6)}, LFLX⁷⁾ が知られているが、外国では CPFX⁸⁾, OFLX⁹⁾ による発生も報告されている。今回の検討でも、これらはかなり高い光毒性を示し、培養細胞に対する光毒性の結果と光線過敏症の発生頻度とは、全体としてはかなり密接に関連すると考えられる。

しかし、キノロン系抗菌薬で光線過敏症が最初に報告された NA^{10,11)} については、Vero 細胞では、これらに次ぐ光毒性を示したものの、HEL 細胞では、むしろ低い光毒性を示した。一方、OFLX については、わが国

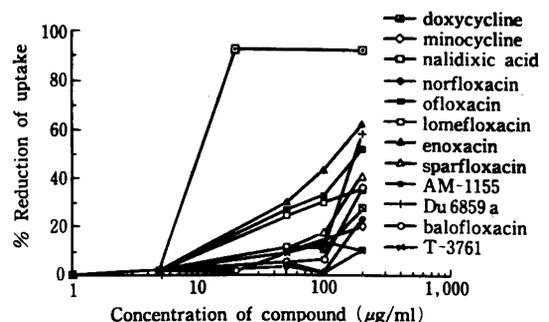
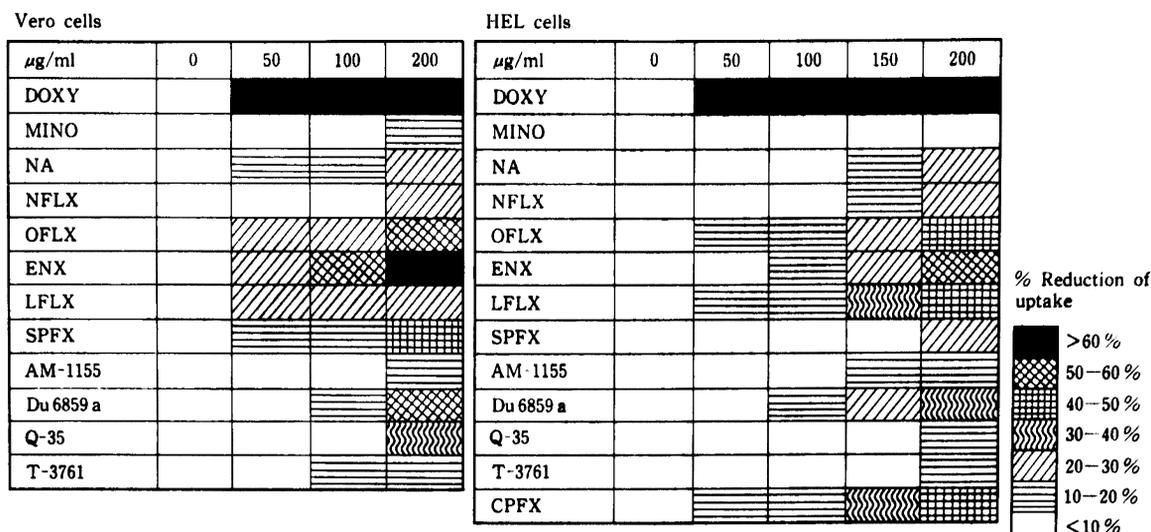


Fig. 2. Phototoxicity of quinolones to Vero cells.



DOXY: doxycycline, MINO: minocycline, NA: nalidixic acid, NFLX: norfloxacin, OFLX: ofloxacin, ENX: enoxacin, LFLX: lomefloxacin, SPFX: sparfloxacin, Q-35: balofloxacin, CPFXX: ciprofloxacin

Fig. 3. Relative phototoxicity of quinolones in Vero cells and human embryonal lung fibroblasts.

の常用量での光線過敏症の報告はきわめて少ないにもかかわらず¹²⁾、今回の検討ではかなりの光毒性を認めた。

今回、ヒト由来のHEL細胞とミドリザル由来のVero細胞を用いて検討し、両者ともほぼ同様の傾向を認めたが、細部を検討するとVero細胞の結果のほうが、臨床上的光線過敏症の頻度とよく相関している印象を得ており、培養の簡便さとあわせ考え、今後HEL細胞とならんで用いる価値のある細胞であると考えられる。

一方、動物を用いた光毒性の検討は、免疫機構の関与、薬物動態など培養細胞を用いた系では測定できない要素を含めて評価することができ、培養細胞法の結果と臨床上的光線過敏症を関連づけるものと考えられている。実際、Wagaiら^{13,14)}は、Balb/cマウスとこれに由来する3T3細胞を用いて、培養細胞を用いた光毒性試験と動物実験の結果がよく相関すること、活性酸素が光毒性の機序に関与すること、今回の検討でも比較的高い光毒性を示したLMFXとENXに比較的高い光毒性があることを報告している。

以上より、動物実験および臨床的副作用との相関について今後さらに検討を要すると考えられるが、今回検討したニュートラルレッド取り込み減少を指標としたキノロン系抗菌薬の試験管内光毒性試験は、簡便に行える光線過敏症の発生予知のスクリーニング法となる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 福田英三, 今山修平: 本邦における薬疹に関する統計(1984~1989年)。西日皮膚 53: 70~76, 1991
- 2) 上出良一: 光線過敏性薬疹。皮膚臨床 34: 1369~1377, 1992
- 3) 上出良一: 薬剤性光線過敏症。日皮会誌 101: 1541~

1543, 1991

- 4) Lasarow R M, Isseroff R R, Gomez E C: Quantitative in vitro assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay. J Invest Dermatol 98: 725~729, 1992
- 5) 河辺葉子, 榊原 茂, 水野信行: エノキサシンによる光アレルギー反応。皮膚臨床 29: 51~53, 1987
- 6) 野村佳弘, 高田 実: エノキサシンによる光線過敏症。皮膚臨床 33: 903~906, 1991
- 7) 尾山 智, 稲坂 博, 寺村正子, 杉浦功人, 上田宏: 塩酸ロメフロキサシンによる光線過敏型薬疹。皮膚 34: 457~461, 1992
- 8) Swedish Study Group: Therapy of acute and chronic gram-negative osteomyelitis with ciprofloxacin. J Antimicrobial Chemother 22: 221~228, 1988
- 9) Baran R, Brun P: Photoonycholysis induced by the fluoroquinolones pefloxacin and ofloxacin. Dermatologica 173: 185~188, 1986
- 10) Epstein J H, Wintroub B U: Photosensitivity due to drugs. Drugs 30: 42~57, 1985
- 11) Alexander S, Forman L: Which of the drugs caused the rash? or the lymphocyte transformation test in eruptions caused by nalidixic acid. Br J Dermatol 84: 429~434, 1971
- 12) 片岡葉子: オフロキサシン, アストモリジンM[®], 鎮咳液の内服中にみられた光線過敏症の1例。皮膚 30: 80~83, 1988
- 13) Wagai N, Tawara K: Possible direct roles of reactive oxygen in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. Arch Toxicol 66: 392~397, 1992
- 14) Wagai N, Yamaguchi F, Sekiguchi M, Tawara K: Phototoxic potentials of quinolone antibacterial agents in Balb/c mice. Toxicol Lett 54: 299~308, 1990

In vitro assessment of relative phototoxicity of quinolone
antibacterial agents by reduction of neutral red
uptake in cultured cells

Yuko Muraki¹⁾, Masao Yamada¹⁾, Shiro Nii¹⁾,
Hiromi Kumon²⁾ and Hiroyuki Ohmori²⁾

Departments of ¹⁾Virology and ²⁾Urology, Okayama University Medical School,
2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

The relative phototoxicity of ten antibacterial drugs in the quinolone group was determined by an *in vitro* assay, in which reduction of neutral red uptake was used as a marker of cell injury. Human embryonal lung fibroblasts or Vero cells derived from a green monkey kidney were incubated with potential phototoxins. The cell cultures were irradiated with long wave-length UV, and the capacity for neutral red uptake was determined. The phototoxicity of ten quinolones was much lower than that of doxycycline, a known photosensitizer. Among them, enoxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, and nalidixic acid demonstrated higher phototoxicity, suggesting a good correlation with the clinical occurrence of photosensitivity. Norfloxacin, balofloxacin (Q-35), AM-1155, and T-3761 had less potent phototoxicity. This methodology may provide a useful rapid method to quantitate the phototoxic potential of newly developed drugs.