

【原著・基礎】

マクロライド系抗菌薬が好中球細胞内カルシウム濃度
および細胞機能に与える影響

進藤 奈邦子

東京慈恵会医科大学内科学講座第2* (主任: 酒井 紀教授)

(平成8年10月16日受付・平成8年11月20日受理)

近年マクロライド系抗菌薬の宿主免疫能に対する調節作用が注目を集めている。本研究は細胞機能を調節する因子として細胞内カルシウム濃度に着目し、マクロライド系抗菌薬のうち、エリスロマイシンとクラリスロマイシンが、*in vitro*においてヒト好中球細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) と細胞機能にどのような影響を与えるかを検討した。 $[Ca^{2+}]_i$ は fura 2-AM を用いて測定し、細胞機能は、貪食能と遊走能を観察した。エリスロマイシンとクラリスロマイシンは臨床的に到達可能な比較的低い細胞外液濃度 ($0.04 \mu\text{g/ml} \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$) で $[Ca^{2+}]_i$ を低下させ、貪食能と遊走能を亢進させた。比較的高濃度 ($1 \mu\text{g/ml}$) におけるデータは、クラリスロマイシンとエリスロマイシンで $[Ca^{2+}]_i$ の低下は軽度に抑えられ、クラリスロマイシンでは貪食能、遊走能は不変あるいは減少する傾向があるが、エリスロマイシンでは貪食能、遊走能は増加し続けており、両者の間に細胞機能に対する薬理作用の相異がみられた。クラリスロマイシンでは $[Ca^{2+}]_i$ の低下に伴い貪食能と遊走能の亢進が見られることから、クラリスロマイシンが好中球のカルシウムポンプを調節して $[Ca^{2+}]_i$ を低下させるだけでなく、細胞内貯蔵カルシウムにも何らかの影響を与えている可能性が示唆された。また、比較的高濃度のエリスロマイシンでは $[Ca^{2+}]_i$ を介さない他の薬理作用によって貪食能や遊走能が亢進している可能性が考えられた。本研究によりマクロライド系抗菌薬が、宿主の好中球に直接作用して細胞内カルシウム濃度の基礎値を下げ、細胞機能を亢進させることによって宿主の生体防御機構を賦活化している可能性が示唆された。また、カルシウムポンプの機能低下により好中球機能が障害されていると考えられる慢性病態におけるマクロライド系抗菌薬の作用機序について考察した。

Key words: cytosolic calcium level (細胞内カルシウム濃度), macrolides (マクロライド系抗菌薬), polymorphonuclear leukocytes (好中球), phagocytosis (貪食能), chemotaxis (遊走能)

マクロライド系抗菌薬は組織移行に優れ、細胞内濃度/細胞外濃度比が高い¹⁾。しかし、細胞内移行のメカニズムについては、拡散説、脂溶性説、能動的輸送説²⁻⁴⁾など諸説検討されており、その詳細は不明の点が多い。いずれにしても、細胞内に移行したマクロライドが、蓄積することによって高い細胞内濃度を獲得することに議論の余地はない。この蓄積は、マクロライドが弱塩基性であるためにライソソームや好中球 (多形核白血球: polymorphonuclear leukocytes; PMNL) 顆粒などの酸性の細胞コンパートメントへ移行するために起こるとい説^{1,5)}が有力である。

一方、Mtairag ら⁶⁾は、細胞外カルシウムの欠如によりマクロライド系抗菌薬の PMNL 細胞内取り込みがほぼ半減してしまうことを示し、さらにカルシウム拮抗剤である verapamil が時間-濃度依存性にマクロライドの PMNL 内への取り込みを減少させることから、マクロライドの細胞内移行がカルシウムチャンネルまたはカルシウムチャネル依存性機

構とリンクしている可能性を示唆した。また、マクロライド系抗菌薬は細胞外 pH の上昇により細胞内濃度が上昇することが知られている。アルカリ性の条件下ではカルシウムポンプ ($Ca^{2+}-nH^+ATPase$) の機能は低下しており、カルシウムとリンクして動く可能性のあるマクロライドの細胞外への汲み出しが減少して細胞内蓄積がおこることも考えられる。平田ら⁸⁾は、高濃度のエリスロマイシンが示す好中球の活性酸素産生抑制作用が刺激物質によって異なることから、エリスロマイシンが Ca^{2+} 依存性代謝過程を阻害する可能性があるとして述べている。これらの見解から、マクロライド系抗菌薬とカルシウムの密接な関係が想定される。

マクロライド系抗菌薬は免疫担当細胞に対し抑制的に働くという考え方が近年提唱されている⁹⁾。しかし、マクロライドは糖尿病や腎不全など免疫能低下状態にある患者にも投与されているケースが少なくない。本研究は、臨床的に到達可能な比較的低い抗菌薬濃度において、マクロライド系抗菌薬

がヒト PMNL 細胞内カルシウム濃度基礎値に与える影響を明らかにし、さらにカルシウム濃度と好中球細胞機能との関係を検討した。

I. 材料と方法

1. ヒト PMNL 浮遊液

薬物投与を受けていない健康成人男性の肘静脈より得たヘパリン加末梢血を MONO-POLY RESOLVING MEDIUM (大日本製薬) 上に重層し 300×g で 35 分間遠心した後、PMNL 層を回収した。混入した赤血球は低調溶血させた。これを HBSS (注 1) で 2 回、solution 1 (注 2)¹⁰⁾ で 1 回洗浄したのち、solution 1 に浮遊させた。また、全細胞の 98 % 以上が生細胞であることをトリパンブルー排除テストで確認した。

2. 抗菌薬溶液の調整

(1) 抗菌薬

マクロライド系抗菌薬はエリスロマイシン (EM) とクラリスロマイシン (CAM) を使用した。また、対照として新キノロン薬のオフロキサシン (OFLX) を用いた。抗菌薬の原末は、塩野義製薬よりエリスロマイシン (lot BP 5058), 大正製薬よりクラリスロマイシン (lot 01 PB 13), 第一製薬よりオフロキサシン (lot 125) の供与を受けた。

(2) 抗菌薬濃度の調整

成人の標準投与量で到達しうる最高血中濃度は、エリスロマイシン、クラリスロマイシンで 1.0 μg/ml 程度、オフロキサシンで 2.5 μg/ml 程度であり、これらの濃度を頂点とした 5 倍希釈系列で抗菌薬溶液を調製した。エリスロマイシンとクラリスロマイシンはメタノールで 1 mg/ml に調整し、solution 1 で希釈して、最終濃度を 0.008, 0.04, 0.2, 1 μg/ml とした。オフロキサシンは 0.1 N の NaOH で 5 mg/ml に調整し、同様に希釈して、最終濃度を 0.2, 1.0, 5.0, 2.5 μg/ml とした。

3. 細胞内カルシウム濃度の測定

Fura 2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて測定した。PMNL 5×10⁶個を 495 μl の solution 1 に浮遊させ、dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解した fura 2-AM を 5 μl 加えて攪拌し (fura 2-AM の最終濃度は 4 μmol/L), 37℃ で 30 分間インキュベーションした、これを solution 1 で 2 回洗浄し、それぞれの濃度に調整された抗菌薬溶液中で 37℃ 60 分間インキュベーションした後、洗浄後 solution 1 100 μl に浮遊させた。細胞内カルシウム濃度は CAF-100 型細胞内カルシウム測定装置 (日本分光) を使用し、励起波長 340 nm および 380 nm, 蛍光波長 500 nm とした。100 μl の PMNL 液を 1.9 ml の solution 2 (注 3)¹⁰⁾ が入った測定器のキュベット内に注入してカルシウム濃度を測定し、最大蛍光強度と最小蛍光強度をそれぞれ 0.05 % Triton-X, 5 mmol/L ethylene glycol tetra-acetic acid (1 M Tris-HCl, pH 8.0) で測定した。

細胞内カルシウム濃度は Grynkiewicz の計算式¹¹⁾ によって求めた。実験は、クラリスロマイシンを 6 人 (N=6), エリスロマイシンを 5 人 (N=5), オフロキサシンを 3 人 (N=3) の PMNL について行い、結果は平均±SD で表わした。

4. ヒト PMNL 貪食能の測定

Escherichia coli 標準株 (ATCC 25922) を 24 時間培養の後、0.1 M, pH 7.0 リン酸緩衝液 (phosphate buffer saline: 以下 PBS) にて 1×10⁶cfu/ml に調整して使用した。滅菌スピッツに、各濃度のマクロライド系抗菌薬と前培養し洗浄した好中球を 1×10⁶個、*E. coli* を 1×10⁶cfu, 25 % 被検者血清, 1 % ゼラチン加 Saline G (注 4) を入れ計 1 ml とし充分に混和した後、37℃ で 60 分間振盪培養した。ただちに氷冷して反応を停止させ、遠心洗浄した。沈渣にて塗抹標本を作成し、メタノール固定後 Giemsa 染色を行った。1,000 倍の光学顕微鏡下で好中球を観察し、100 個の好中球に食菌された菌数の合計を 3 視野の平均で算出し、貪食指数 (PI: Phagocytic Index) とした。

5. ヒト PMN 遊走能の測定

Boyden chamber 法^{12,13)} に従って測定した。すなわち、96 穴走化 chamber (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA) の下層に走化性因子として *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (Sigma, St. Louis, MO, USA. 以下 fMLP) 10⁻⁶M を入れ、孔径 3 μm のポリカーボネイト製フィルター (Neuro Probe) を装着した後、上層にマクロライド薬と共に 37℃ で 60 分間前培養し、solution 1 で洗浄した好中球 2.5×10⁶個を入れ、37℃ 5 % CO₂インキュベーター中で 60 分間培養した。培養後フィルターを Diff-Quick 染色液 (国際試薬社製) で固定、染色した。フィルターを光学顕微鏡下 1,000 倍の倍率にて観察し、遊走した好中球数を数えて 3 視野の平均値を chemotaxis 値とした。

貪食能、遊走能の測定実験は各々 3 回施行し、結果は平均±SD で表した。

統計処理: 統計処理は Student *t*-test を用いた。

(注 1) HBSS: Hank's Balanced Salt Solution without calcium chloride, without magnesium chloride, without magnesium sulfate (Gibco Laboratories)

(注 2) solution 1: 132 mmol/l sodium chloride, 3 mmol/l potassium chloride, 1 mmol/l magnesium sulfate, 1.2 mmol/l monosodium acid phosphate, 10 mmol/l glucose, 10 mmol/l HEPES, 0.02 mmol/l calcium chloride (1M Tris-HCl, pH 7.4)

(注 3) solution 2: 132 mmol/l sodium chloride, 3 mmol/l potassium chloride, 1 mmol/l magnesium sulfate, 1.2 mmol/l monosodium acid phosphate, 10 mmol/l glucose, 10 mmol/l HEPES, and 1 mmol/l calcium chloride (1M Tris-HCl, pH 7.4)

(注4) Saline G: 137 mmol/l sodium chloride, 5.4 mmol/l potassium chloride, 0.63 mmol/l magnesium sulfate, 0.1 mmol/l calcium chloride, 0.1 mmol/l disodium phosphate, 0.86 mmol/l monobasic potassium phosphate, 6.1 mmol/l glucose

II. 結 果

1. マクロライド系抗菌薬がヒト PMNL 細胞内カルシウム濃度に与える影響

エリスロマイシン (EM) と、クラリスロマイシン (CAM) がヒト PMNL 細胞内カルシウム濃度にどのような影響を与えるのか検討した。また、対照として既に好中球の食食能および遊走能を生理的濃度で亢進させることが確認されている新キノロン薬のオフロキサシン (OFLX)¹⁴⁾を用いた。Fig. 1 (A) にクラリスロマイシンがヒト PMNL 細胞内カルシウム濃度に与える影響を示す。コントロールの細胞内カルシウム濃度は 73.6 ± 12.7 nmol/l であった。クラリスロマイシン $0.008 \mu\text{g/ml}$ では 69.3 ± 9.1 nmol/l, $0.04 \mu\text{g/ml}$ では 55.8 ± 6.7 nmol/l ($p < 0.02$), $0.2 \mu\text{g/ml}$ では 46.4 ± 12.2 nmol/l ($p < 0.005$), $1.0 \mu\text{g/ml}$ では 54.6 ± 8.7 nmol/l であり, 0.04 から $0.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で有意に細胞内カルシウム濃度の低下が見られた。また, Fig. 1 (B) に示すごとくエリスロマイシンでも細胞内カルシウム濃度は同様に低下傾向を示した。コントロールの細胞内カルシウム濃度は 71.3 ± 15.3 nmol/l, エリスロマイシン $0.008 \mu\text{g/ml}$ では 62.7 ± 8.8 nmol/l, $0.04 \mu\text{g/ml}$ では 54.9 ± 9.9 nmol/l, $0.2 \mu\text{g/ml}$ では 49.3 ± 8.4 nmol/l, $1.0 \mu\text{g/ml}$ では 57.7 ± 6.8 nmol/l であった。対照として用いたオフロキサシンでは Fig. 1 (C) に示すごとく逆にむしろ濃度依存性に細胞内カルシウム濃度は増加する傾向を示した。

2. マクロライド系抗菌薬がヒト PMNL 機能に与える影響

細胞内カルシウム濃度が上昇することにより障害されると報告されている食食能¹⁰⁾と、細胞内カルシウム濃度には影響を受けないが細胞内カルシウム貯蔵オルガネラからの Ca^{2+} 放出が必要と報告されている遊走能¹⁶⁾にマクロライド系抗菌薬がそれぞれどのような影響を与えるかを検討した。

(1) 食食能

コントロールの食食指数 (phagocytic index) は 307.3 ± 160.9 であった。Fig. 2 (A) で示すようにクラリスロマイシン $0.008 \mu\text{g/ml}$ では 483.7 ± 102.3 , $0.04 \mu\text{g/ml}$ では 622.7 ± 110.9 ($p < 0.05$), $0.2 \mu\text{g/ml}$ では 646.3 ± 142.4 , $1.0 \mu\text{g/ml}$ では 655.0 ± 119.3 ($p < 0.02$) と食食能の亢進がみられたが, $0.04 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では食食能はむしろ plateau に達している。エリスロマイシンでは Fig. 2 (B) に示すように $0.008 \mu\text{g/ml}$ では 408.7 ± 16.9 , $0.04 \mu\text{g/ml}$ では 547.3 ± 94.4 , $0.2 \mu\text{g/ml}$ で

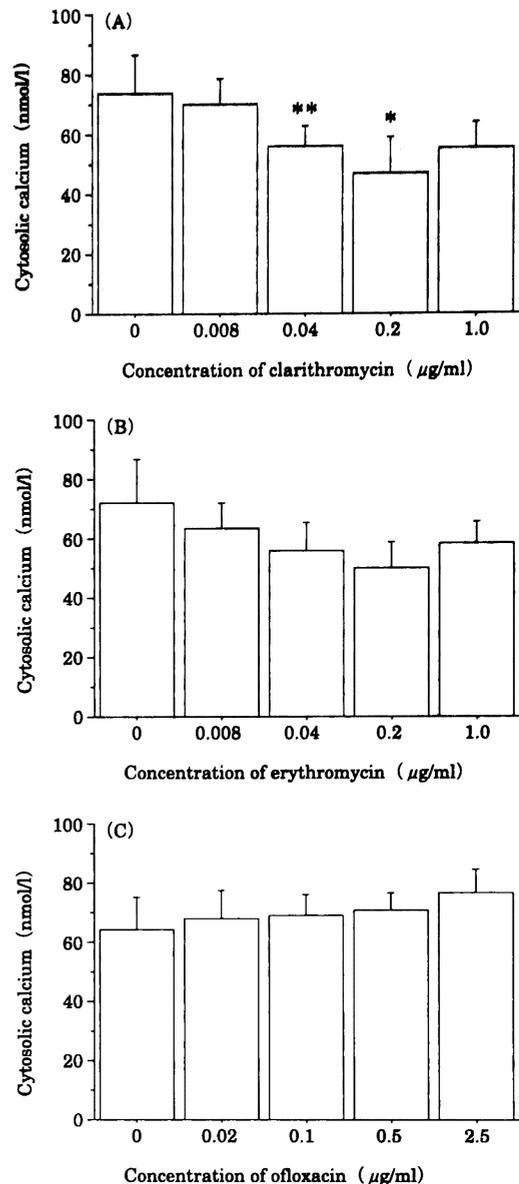


Fig. 1. Effects of antimicrobials on basal cytosolic calcium levels in human polymorphonuclear leucocytes (PMNLs).

(A) clarithromycin, * $p < 0.005$, ** $p < 0.2$, (B) erythromycin, (C) ofloxacin.

は 924.0 ± 81.0 ($p < 0.01$), $1.0 \mu\text{g/ml}$ では $1,182.7 \pm 88.5$ ($p < 0.05$) と濃度依存的な食食能の亢進を示し, クラリスロマイシンとは異なる薬剤反応性を示した。

(2) 遊走能

クラリスロマイシンおよびエリスロマイシンの PMNL 遊走能に対する影響をそれぞれ Figs. 3 (A), (B) に示す。対照の遊走能 (PMNL 数) は 17.6 ± 3.0 であったのに対して, クラリスロマイシン $0.008 \mu\text{g/ml}$ では 55.8 ± 8.17 ($p = 0.002$), $0.04 \mu\text{g/ml}$ では 69.4 ± 8.57 ($p < 0.001$), $0.2 \mu\text{g/ml}$ では 85.75 ± 12.75 ($p < 0.005$), $1.0 \mu\text{g/ml}$ では 76.67 ± 8.78 ($p < 0.001$) と $0.2 \mu\text{g/ml}$ を頂点とする食食能の亢進がみられた。一方,

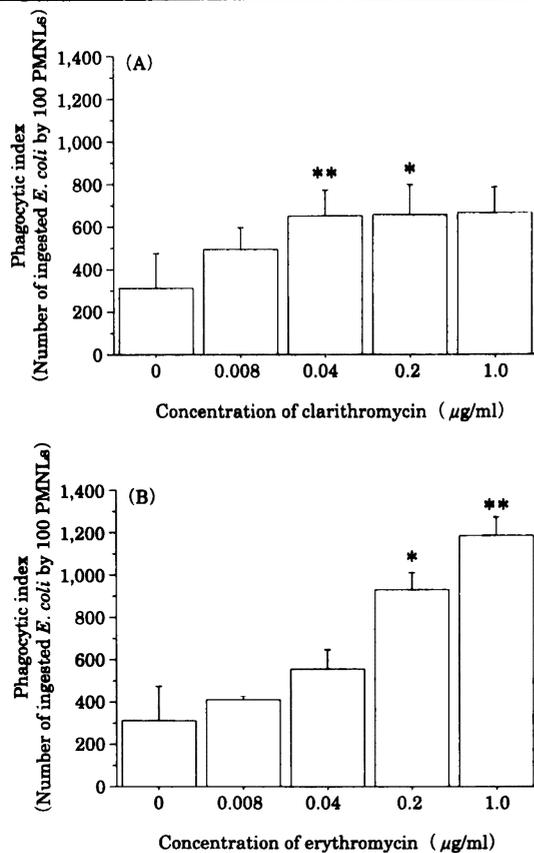


Fig. 2. Effects of macrolides on phagocytosis of human PMNLs.

(A) clarithromycin, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (B) erythromycin, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

エリスロマイシン 0.008 $\mu\text{g/ml}$ では 41.3 ± 4.3 ($p < 0.005$), 0.04 $\mu\text{g/ml}$ では 77.58 ± 8.52 ($p < 0.001$), 0.2 $\mu\text{g/ml}$ では 97.5 ± 3.19 ($p < 0.0001$), 1.0 $\mu\text{g/ml}$ では 123.8 ± 5.92 ($p < 0.0001$) と濃度依存性に遊走能の亢進が見られた。食食能と同様にクラリスロマイシンでは高濃度での遊走能が濃度依存性を示さなかったのに対し、エリスロマイシンでは濃度依存性に亢進した。

III. 考 察

エリスロマイシンをはじめとするマクロライド系抗菌薬は、びまん性汎細気管支炎 (DPB) やその他の慢性気道感染症、さらに副鼻腔炎や浸出性中耳炎にも有効性が報告され、気道系の慢性炎症病態に広く使用されるようになった⁹⁾。特に、びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシンの少量長期持続投与療法の前夜改善率はめざましく¹⁶⁾、その有効性の機序について多くの研究が活発に行われている。宿主側因子からの研究の多くは、エリスロマイシンが宿主の免疫に働きかけ、慢性炎症を抑制する効果を示している可能性を示唆している¹⁷⁻¹⁹⁾。エリスロマイシンが好中球機能自体に与える影響については、遊走能、食食能、活性酸素産生能などが検討されているが、実験系や使用濃度の違いにより相反するデータが報告されている。1~100 $\mu\text{g/ml}$

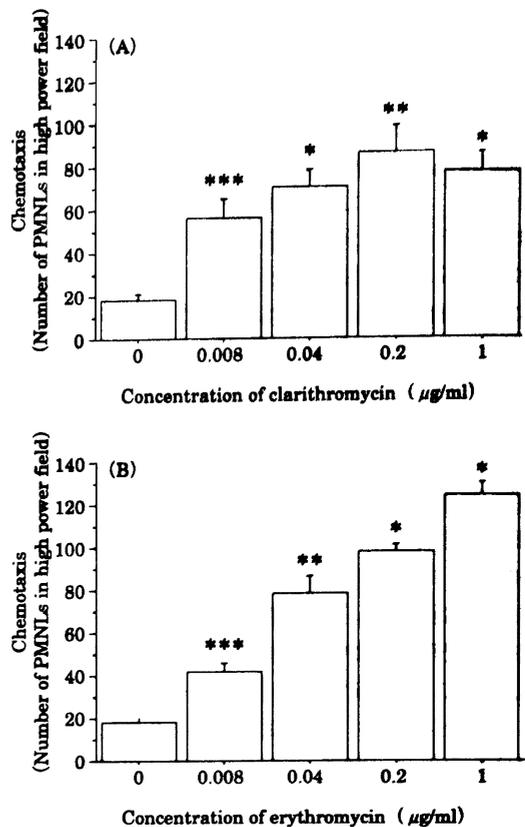


Fig. 3. Effects of macrolides on chemotaxis of human PMNLs.

(A) clarithromycin, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (B) erythromycin, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

では好中球機能になら直接的な影響を与えない²⁰⁾とする報告や、高濃度になれば抑制的に働くが、実際の治療濃度では直接的影響は少ない²¹⁾という報告がある。一方、除ら²²⁾は 0.008 $\mu\text{g/ml}$ ~0.2 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度で、しかも臨床的に到達可能な濃度で *in vitro* の実験を行い、マクロファージの食食能、遊走能、殺菌能がいずれも亢進することを報告した。

本研究は、マクロライド系抗菌薬のうち、エリスロマイシンとクラリスロマイシンを、*in vitro* でヒト PMNL に作用させた結果、臨床的に到達可能な比較的低い細胞外液濃度 (0.04 $\mu\text{g/ml}$ ~0.2 $\mu\text{g/ml}$) では、ヒト PMNL 細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を低下させ、食食能と遊走能を亢進させる作用があることを示した。一方で、高濃度 (1 $\mu\text{g/ml}$) におけるデータは、クラリスロマイシンとエリスロマイシンでは異なるパターンを示した。クラリスロマイシンでは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が 0.2 $\mu\text{g/ml}$ で最低値となり、1 $\mu\text{g/ml}$ で再び増加する傾向が見られ、これに伴って食食能、遊走能は不変あるいは減少する傾向が見られた。エリスロマイシンでは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はクラリスロマイシンと同様の変化を示したが、食食能、遊走能は濃度依存性に増加した。

Ca^{2+} の膜透過性は他のイオン同様きわめて低く、好

中球の $[Ca^{2+}]_i$ は主にカルシウム透過性陽イオンチャネルとカルシウムポンプ、そして小胞体やミトコンドリアなどの細胞内カルシウム貯蔵オルガネラにより調節されている²³⁾。好中球の細胞膜には L 型カルシウムチャネルに代表される電位依存性カルシウムチャネルは存在せず²⁴⁾、非刺激状態の好中球ではカルシウム透過性陽イオンチャネルや細胞内オルガネラはカルシウムの変化に関与せず²⁴⁾、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加はカルシウムポンプの機能低下によって起こることが示唆されている¹⁰⁾。一方で Kiersztejn ら²⁵⁾ は PMNL の食食能の障害が細胞内 ATP の減少によらず $[Ca^{2+}]_i$ の増加によること、カルシウム拮抗剤である verapamil によって $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を阻止すると食食能が回復することを示している。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が白血球の食食能を障害することは慢性腎不全のヒト²⁶⁾ および動物²⁷⁾ を用いた実験で示されており、いずれも $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を改善することで食食能の回復が得られている^{27,28)}。また、血糖値のコントロールが悪い糖尿病患者の PMNL の食食能は、空腹時血糖値が高ければ低下しており、 $[Ca^{2+}]_i$ はそれに伴って増加傾向を示す¹⁰⁾。本研究の、マクロライド系抗菌薬が PMNL $[Ca^{2+}]_i$ を低下させると同時に食食能を亢進させたという結果は、これらの報告を支持するものと考えられる。本研究において、比較的高濃度 ($1\mu\text{g/ml}$) におけるエリスロマイシンとクラリスロマイシンの反応は異なるパターンを示している。クラリスロマイシンでは $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と伴に PMNL の機能低下がみられるが、エリスロマイシンでは $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しているにもかかわらず食食能と遊走能が亢進し続けており、両者の間に細胞機能に対する薬理作用の相異がみられる。エリスロマイシンでは、比較的高濃度での $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる細胞障害作用も、 $[Ca^{2+}]_i$ が生理的範囲内であれば、カルシウムを介さない他の薬理作用によって食食能や遊走能が亢進しているのかもしれない。本実験で観察された比較的高濃度のエリスロマイシン前処理 ($1\mu\text{g/ml}$) が PMNL に与える影響は Hojo ら²⁰⁾ のデータと異なる結果を示している。遊走能は $[Ca^{2+}]_i$ にあまり影響を受けないと考えられているが、クラリスロマイシンを前処置した場合には食食能と同様に $[Ca^{2+}]_i$ の低下に伴って亢進する傾向が観察された。遊走能の亢進には細胞内オルガネラに貯蔵されているカルシウムが重要とされることから、本実験の結果はクラリスロマイシンが細胞内貯蔵カルシウムにも何らかの影響を与えている可能性を示唆するものである。

本実験のデータはマクロライド系抗菌薬が、宿主の好中球に直接作用して細胞内カルシウム濃度の基礎値を下げ、細胞機能を亢進させることによって宿主の生体防御機構を賦活化している可能性を明らかにした。この機序についての詳細は現時点で不明であるが、カルシウムポンプを調節して $[Ca^{2+}]_i$ を減少させている

とすれば、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によると考えられている腎不全患者や糖尿病患者の PMNL 機能の低下に対し、マクロライド系抗菌薬が奏功する可能性を示唆する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました酒井 紀教授に感謝の意を表します。また、御指導、御協力を頂きました柴孝也助教授、東京都老人総合研究所 白澤卓二先生はじめ、教室員の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Carlier M B, Zenebergh A, Tulkens P M: Cellular uptake and subcellular distribution of roxithromycin and erythromycin in phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 20 (suppl.B): 47~56, 1987
- 2) Hand W L, King-Thompson N, Holman J W: Entry of roxithromycin (RU965), imipenem, cefotaxime, trimethoprim, and metronidazole into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1553~1557, 1987
- 3) Dette G A, Knothe H: Kinetics of erythromycin uptake and release by human lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 18: 73, 1986
- 4) Ishiguro M, Koga H, Kohno S, Hayasi T, Yamaguchi K, Hirota M: Penetration of macrolides into human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 24: 719~725, 1989
- 5) MacIntyre A, Cutler D J: The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases. *Biopharm Drug Dispos* 9: 513~526, 1988
- 6) Mtairag E M, Abdelghaffar H, Douhet C, Labro M T: Role of Extracellular Calcium In Vitro Uptake and Intraphagocytic Location of Macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1676~1682, 1995
- 7) 平田健雄, 安場広高, 佐竹範夫, 松延政一, 木野稔也, 大島駿作: エリスロマイシンの好中球化学発光に及ぼす効果の *in vitro* における検討。日胸疾会誌 28: 1066~1090, 1990
- 8) Johnson J D, Hand W L, Francis J B, King-Thompson N, Corwin R W: Antibiotic uptake by alveolar macrophags. *J Lab Clin Med* 95: 429~439, 1980
- 9) 門田淳一, 河野 茂, 原 耕平: 慢性気道感染症とエリスロマイシン—病態と作用機序—。日胸疾会誌 54: 372~378, 1995
- 10) Alexiewicz J M, Kumar D, Smogorzewski M, Klin M, Massry S G: Polymorphonuclear Leukocytes in Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus: Abnormalities in Metabolism and Function. *Ann Intern Med* 123: 919~924, 1995
- 11) Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R Y: A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem* 260: 3440~3450, 1985
- 12) Boyden S V: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 115: 453~466, 1962

- 13) Harvath L, Falk W, Leonard E J: Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J Immunol Methods* 37: 39~45, 1980
- 14) 吉川見司: ニューキノロン薬の好中球機能に対する影響。日本化学療法学会雑誌 44: 723~730, 1996
- 15) Elferink J G R, Boonen G J J C, de Koster B M: The role of calcium in neutrophil migration: the effect of calcium and calcium-antagonists in electroporated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 864~869, 1992
- 16) 山本正彦, 泉 孝英, 稲富恵子, 他: びまん性汎細気管支炎の予後。厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班, 平成4年度研究報告書 235~238, 1993
- 17) Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K: Erythromycin inhibits neutrophil chemotaxis in bronchoalveoli of diffuse panbronchiolitis. *Chest* 106: 1116~1123, 1994
- 18) 松永信也: マクロライド系抗生物質が好中球の活性酸素産生へおよぼす影響。Therapeutic Res 15: 4687~4688, 1994
- 19) 有川圭介, 本田順一, 杉原栄一郎, 他: マクロライド抗菌薬のヒト末梢血における炎症性サイトカイン mRNA 発現に対する影響。感染症学雑誌 70: 696~701, 1996
- 20) Hojo M, Fujita I, Hamasaki Y, Miyazaki M, Miyazaki S: Erythromycin does not directly affect neutrophil functions. *Chest* 105: 520~523, 1994
- 21) 杉山 肇: ヒト好中球におよぼすマクロライド剤の影響。Therapeutic Res 15: 4691~4692, 1994
- 22) 徐 光, 藤田次郎, 根ヶ山清, 宮脇裕史, 北条聡子, 瀧川圭一, 大西隆行, 岡田宏基, 山地康文, 高原二郎: エリスロマイシンのマクロファージ機能に対する影響。感染症誌 69: 590~596, 1995
- 23) Tschärner V V, Prod' hom B, Baggiolini M, Reuter H: Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature* 324: 369~372, 1986
- 24) Simchowitz L, Cragoe E J Jr: Na⁺-Ca²⁺ exchange in human neutrophils. *Am J Physiol* 254 (Cell Physiol 23): C150~C164, 1988
- 25) Kiersztejn M, Chervu I, Smogorzewski M, Fadda G Z, Alexiewicz J M, Massry S G: On the mechanism of impaired phagocytosis in phosphate depletion. *J Am Soc Nephrol* 2: 1484~1489, 1992
- 26) Chervu I, Kiersztejn M, Alexiewicz J M, Fadda G Z, Massry S G: Impaired phagocytosis in chronic renal failure is mediated by secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 41: 1501~1505, 1992
- 27) Klin M, Smogorzewski M, Khilnani H, Michnowska M, Massry S G: Mechanism of PTH-induced rise in cytosolic calcium in adult rat hepatocytes. *Am J Physiol* 267: G754~G763, 1994
- 28) Alexiewicz J M, Smogorzewski M, Klin M, Akmal M, Massry S G: Effect of treatment of hemodialysis patients with nifedipine on metabolism and function of polymorphonuclear leucocytes. *Am J Kidney Dis* 25: 440~444, 1995

Effects of macrolide antimicrobials on the cytosolic calcium levels and functions of human polymorphonuclear leukocytes

Nahoko Shindo

The Second Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine (Director: Prof. Osamu Sakai, M.D.), 3-25-8, Nishi-Shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

Basal levels of cytosolic calcium ($[Ca^{2+}]_i$), phagocytic activity and chemotaxis in erythromycin (EM) or clarithromycin (CAM) pretreated human polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) were investigated *in vitro*. EM and CAM both lowered the basal levels of $[Ca^{2+}]_i$, enhanced the phagocytosis of *Escherichia coli* and fMLP-stimulated chemotaxis of PMNLs at therapeutically achievable concentrations (0.04-0.2 $\mu\text{g/ml}$). At the relatively higher concentration, however, EM and CAM only slightly reduced the $[Ca^{2+}]_i$ levels of PMNLs. At this concentration (1.0 $\mu\text{g/ml}$), CAM had less enhanced effects on phagocytosis and chemotaxis of PMNLs while EM activated phagocytosis and chemotaxis in a concentration-dependent manner. These findings suggest that EM and CAM can reduce $[Ca^{2+}]_i$ and enhance PMNL functions by activating calcium pumps and controlling intracellular Ca^{2+} stores. They also imply that macrolides may improve the impaired PMNL functions of patients with elevated $[Ca^{2+}]_i$ levels in PMNLs due to calcium-exchanging abnormalities.