

抗結核薬のマウス内因性グルココルチコイドレベルにおよぼす影響

佐藤 淳子^{1,2}・中澤 靖²・堀 誠治¹・柴 孝也²・川村 将弘¹

¹東京慈恵会医科大学薬理学講座第1*, ²同 内科学講座

*現: 国立医薬品食品衛生研究所

(平成13年6月13日受付・平成13年7月5日受理)

近年、抗微生物薬が抗微生物活性以外の作用を有する可能性が示されつつあり、注目されている。抗結核薬のひとつである rifampicin (RFP) が、グルココルチコイド (GC) 受容体と結合し、抗炎症作用を発揮する可能性が報告されている。そこで、われわれは、RFP, isoniazid (INH) をはじめとする抗結核薬の内因性 GC (corticosterone, CCS) におよぼす影響をマウスを用いて検討し、これら薬物の生体反応調節作用の可能性について検討した。RFP は、投与量依存的に血清 CCS レベルを上昇させた。INH, L-cycloserine でも血清 CCS レベルの上昇が認められたが、その程度は、RFP にくらべ弱いものであった。一方、D-cycloserine, pyrazinamide では、CCS 上昇作用は認められなかった。これらの成績より、RFP は、内因性 GC を上昇させることにより、生体反応を調節する可能性が示された。

Key words: 抗結核薬, rifampicin, isoniazid, glucocorticoid, マウス

近年、抗微生物薬が、抗微生物活性以外にも、多彩な生体反応調節作用を有している可能性が明らかとなりつつあり、注目されている。そのなかで、マクロライド (ML) 薬、特に 14 員環 ML 薬が、種々の生体反応を調節する可能性が報告されている^{1,2}。われわれは、14 員環 ML 薬が内因性グルココルチコイド (GC) レベルを上昇させ、抗炎症作用を示す可能性を示してきた^{3,4}。

Rifampicin (RFP) は、抗結核薬として汎用されているもののひとつであり、その構造としてマクロサイクリックな構造をもっている。さらに、RFP は、GC 受容体と結合し、生体反応を調節している可能性が報告されている⁵。しかし、RFP をはじめとする抗結核薬の内因性 GC に対する作用を検討したものはほとんどない。そこで、今回、われわれは、マクロサイクリック構造を有する RFP をはじめとして、各種抗結核薬の血清 GC レベルにおよぼす影響を検討し、これらの薬物が生体反応調節作用を有する可能性について検討した。

I. 材料および方法

1. 材料

マウス (ddY 系, 5 週齢, ♂) は、三協ラボサービス (東京) より購入した。RFP, isoniazid (INH), D-および L-cycloserine (CS), pyrazinamide (PZA) は、Sigma Chemical Co. (MO, USA) より購入した。acetanilide は HPLC 用を、その他の試薬は特級を用いた。

2. 薬物投与

RFP は DMSO に、その他の抗結核薬は生理食塩水に

溶解し、マウス腹腔内に投与した。投与量は、DMSO 溶液では 2 mL/kg, 生理食塩水溶液では 10 mL/kg とした。薬物投与後、所定の時間にマウスを断頭・採血し、血清を分離した。

Dexamethasone (DEXA) 前処理に際しては、RFP 投与 2 時間前に DEXA (5 mg/kg, 10% ethanol/saline に溶解) をマウス腹腔内 (投与量は 10 mL/kg) に投与した。RFP 投与 1 時間後に採血し、血清を分離した。

3. 血清 corticosterone (CCS) レベルの測定

血清中 CCS レベルは、DEXA を内部標準とした HPLC 法により定量した。血清 100 μ L に内部標準物質として、DEXA (60 nmol) を添加し、脱イオン・蒸留水を用いて全量を 500 μ L とした。n-Hexane で洗浄後、dichloromethane 3 mL を用いてステロイドを抽出した。抽出液を、蒸発・乾固させた。その後、HPLC の移動相 200 μ L に溶解し、その 100 μ L を注入し、Wong らの方法⁷に従い、CCS を分離・定量した。

DEXA 処理群の測定には、fluorocortisone を内部標準物質として用いた。

II. 結果

1. RFP の血清 CCS レベルにおよぼす影響と DEXA 前処理の効果

RFP (100 mg/kg) をマウス腹腔内投与後、0.5, 1, 2, 4, 6 時間後に、血清 CCS レベルを測定した。RFP 投与により、1 時間をピークとする血清 CCS レベルの上昇が認められた (Fig. 1)。この血清 CCS レベルの上昇は、投与後 4 時間では、vehicle 投与群と差が認めら

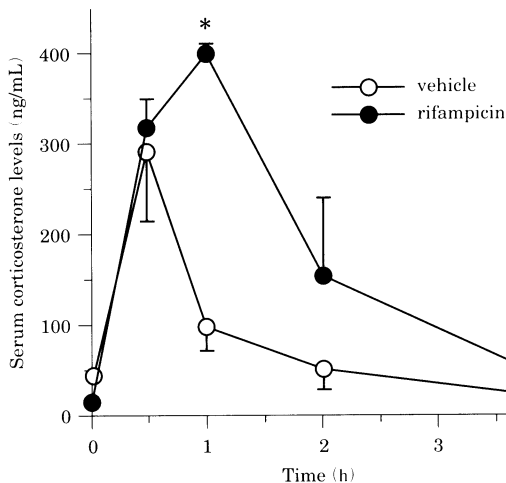


Fig. 1. Serum corticosterone levels after the intraperitoneal administration of rifampicin (100 mg/kg) in mice. Corticosterone levels were determined at the time shown in the figure using HPLC. Each value represents the mean \pm SD for 3 mice.

* $p < 0.01$ compared to the serum corticosterone levels in mice receiving the vehicle only.

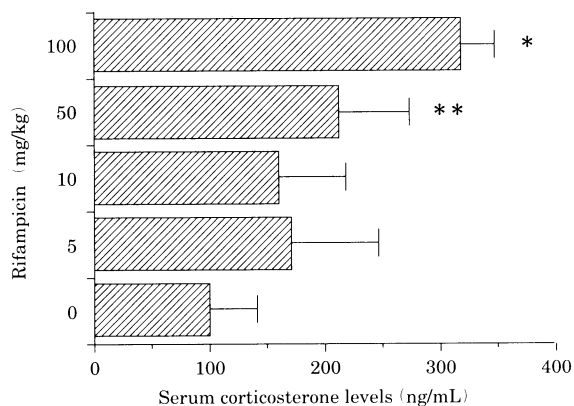


Fig. 2. Effect of rifampicin on serum corticosterone levels in mice. Serum corticosterone levels were determined 1 hour after the intraperitoneal administration of rifampicin (5, 10, 50 and 100 mg/kg). Each value represents the mean \pm SD for 4 mice.

* $p < 0.01$ compared to the serum corticosterone levels in vehicle (0 mg/kg)-injected mice.

** $p < 0.05$ compared to the serum corticosterone levels in vehicle (0 mg/kg)-injected mice.

れなくなった。

そこで、RFP投与1時間後の血清 CCS レベルを指標として、RFPの投与量依存性を検討した。RFP(5, 10, 50, 100 mg/kg)をマウス腹腔内に投与したところ、RFPは、その投与量 10, 50, 100 mg/kgにおいて、投与量依存的に血清 CCS レベルを上昇させた (Fig. 2)。

RFP投与2時間前に DEXA (5 mg/kg) をマウス腹腔内に投与し、RFP (100 mg/kg) 腹腔内投与1時間後に血清 CCS レベルを測定した。RFPによる血清 CCS レベルの上昇は DEXA の前処理により抑制された (Fig. 3)。

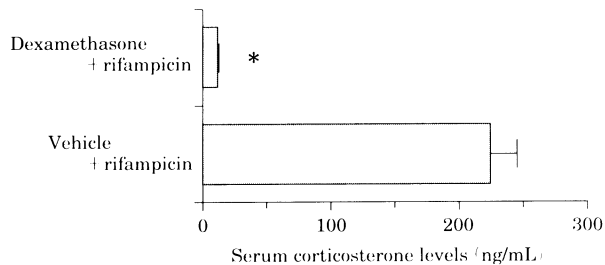


Fig. 3. Effect of dexamethasone on rifampicin-induced steroidogenesis in mice. Dexamethasone (5 mg/kg) was intraperitoneally injected in mice 2 hours before the intraperitoneal administration of rifampicin (100 mg/kg). Serum corticosterone levels were determined 1 hour after the administration of rifampicin.

* $p < 0.01$ compared to rifampicin-administered mice.

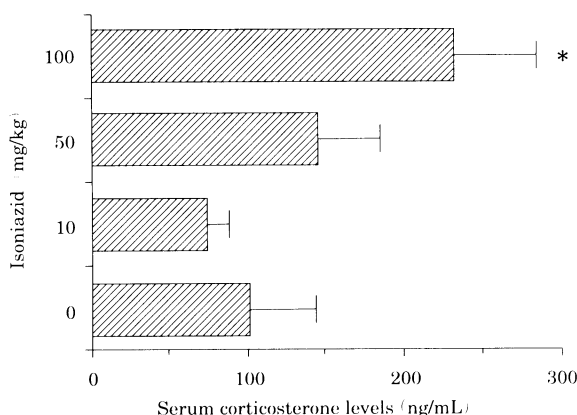


Fig. 4. Effect of isoniazid on serum corticosterone levels in mice. Serum corticosterone levels were determined 1 hour after the intraperitoneal administration of isoniazid (10, 50 and 100 mg/kg). Each value represents the mean \pm SD for 4-5 mice.

* $p < 0.01$ compared to the serum corticosterone levels in vehicle (0 mg/kg)-injected mice.

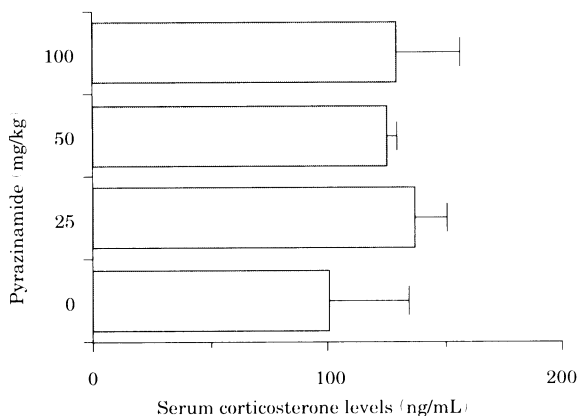


Fig. 5. Effect of pyrazinamide on serum corticosterone levels in mice. Serum corticosterone levels were determined 1 hour after the intraperitoneal administration of pyrazinamide (10, 50 and 100 mg/kg). Each value represents the mean \pm SD for 3-5 mice.

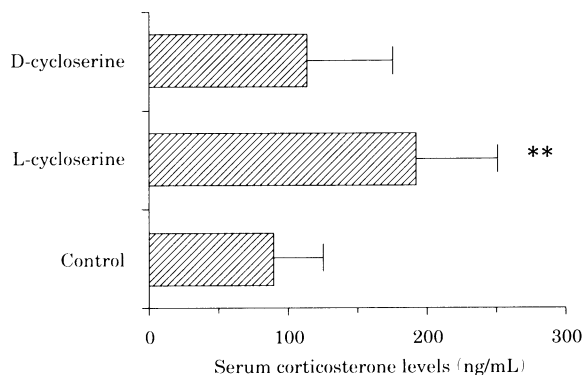


Fig. 6. Effect of D- and L-cycloserine on serum corticosterone levels in mice. Serum corticosterone levels were determined 1 hour after the intraperitoneal administration of D- or L-cycloserine (50 mg/kg). Each value represents the mean \pm SD for 3-5 mice. ** $p < 0.05$ compared to the serum corticosterone levels in control mice.

2. INH, CS, PZA の血清 CCS レベルにおよぼす影響

各抗結核薬をマウス腹腔内に投与し、1時間後に血清 CCS レベルを測定した。INH (10, 50, 100 mg/kg) の腹腔内投与により、投与量依存的に血清 CCS レベルの上昇が認められた (Fig. 4)。一方、PZA (25, 50, 100 mg/kg) では、血清 CCS レベルに変化を認めなかった (Fig. 5)。さらに、CS (50 mg/kg) のマウス腹腔内投与では、L-体では血清 CCS レベルの上昇を認めたが、D-体投与ではほとんど血清 CS 上昇作用を認めなかった (Fig. 6)。

III. 考 察

近年、抗微生物薬をはじめとする種々の薬物が、その主作用以外に多彩な生体に対する作用を有する可能性が示され、注目されている。抗菌薬では、ML 薬、特に 14 員環 ML 薬が、種々の抗菌活性以外の作用を有することが知られている。われわれは、14 員環 ML 薬が、内因性 GC を上昇させることを明らかとし、これらの薬物が生体反応、特に炎症反応を調節する可能性を示してきた³⁻⁵。

一方、抗結核薬である RFP は、GC 受容体と結合し生体反応を調節する可能性が報告されている。しかし、RFP をはじめとする抗結核薬の内因性 GC におよぼす影響を検討したものはほとんどない。そこで、われわれは、RFP, INH をはじめとする抗結核薬の血清 GC レベルにおよぼす影響をマウスを用いて検討した。

内因性 GC では、cortisol と CCS が主な活性物質となっているが、cortisol と CCS の含有率は動物種により異なっている。マウスでは、CCS が優位となっており、今回用いた測定系においても、血清中の CCS/cortisol はほぼ 10/1 であり、薬物投与により変動するのは CCS であった (data not shown)。マウスにおける主な内因性活性は、CCS であり、CCS レベルの変動

が生物反応を変化させることが考えられる。そこで、今回の検討では、HPLC 法を用いて CCS を分離・定量した。

RFP の腹腔内投与により、投与後 1 時間を中心に血清 CCS レベルの上昇を認めた。その上昇作用は、投与後 4 時間では認めなくなっていた。この上昇作用持続時間は、われわれがさきに報告した erythromycin によるもの³⁾とほぼ同等であった。さらに、RFP 投与 1 時間後の血清 CCS レベルを用いて、RFP の投与量依存性を検討したところ、RFP は、投与量依存的に血清 CCS レベルを上昇させた (Fig. 2)。次に、RFP による血清 CCS レベルの上昇が、副腎皮質細胞が直接刺激されたためのものか、または、視床下部—下垂体系を介するものかが問題となる。そこで、DEXA 前処理したマウスに RFP を投与し、血清 CCS レベルを測定した。DEXA 前投与したマウスでは、RFP による血清 CCS 上昇作用は抑制された。DEXA は視床下部—下垂体系に負のフィードバックをかけ、内因性 GC 産生を抑制すると考えられている⁸⁾。DEXA 処理により RFP の血清 CS 上昇作用が抑制されたことより、RFP の内因性 GC 上昇作用は、副腎皮質細胞に対する直接作用ではなく、視床下部—下垂体系を介していることが示唆された。

さらに、他の抗結核薬について検討すると、INH で血清 CCS レベルの上昇が認められた。さらに、CS では、L-体に血清 CS 上昇作用が認められた。しかし、それらによる血清 CS 上昇作用は、RFP によるものにくらべ、弱い可能性が示唆された。一方、PZA および D-CS 投与では、血清 CCS レベルに変化を認めなかった。

以上の成績より、RFP は、視床下部—下垂体—副腎皮質系を介して内因性 GC を上昇させることが示唆された。さらに、内因性 GC を上昇させることにより、RFP は生体反応、特に炎症反応を調節する可能性が示唆された。

文 献

- 1) 工藤翔二編: 炎症・免疫とマクロライド。医薬ジャーナル, 大阪, 1996
- 2) マクロライドの新作用研究 2000。日本抗生物質学術協議会, 東京, 2001
- 3) 堀 誠治, 佐藤淳子, 川村将弘: 視床下部—下垂体—副腎系におよぼす erythromycin の影響。日化療会誌 44: 82~84, 1996
- 4) 佐藤淳子, 堀 誠治, 川村将弘: Roxithromycin の血清中 glucocorticoid に及ぼす影響。日化療会誌 45: 165~167, 1997
- 5) Hori S, Sato J, Kawamura M: Effect of clarithromycin on endogenous glucocorticoid levels in mice. J Infect Chemother 3: 198~201, 1997
- 6) Calleja C, Pascuss J M, Mani J C, et al.: The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. Nature Med 4: 92~95, 1998

- 7) Wong Y N, Chien B M, D'mello A P : Analysis of corticosterone in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 661: 211~218, 1994
- 8) 清水直容: 副腎皮質ホルモンとその作用。内科学(第4版)。(上田英雄, 武内重五郎, 阿部 裕, 他 編), p.1091~1094, 朝倉書店, 東京, 1989

Effect of anti-tuberculous agents on endogenous glucocorticoid levels in mice

Junko Sato^{1, #}, Yasushi Nakazawa², Seiji Hori¹,
Kohya Shiba² and Masahiro Kawamura¹

¹Department of Pharmacology (I) and ²Department of Internal Medicine, Jikei University
School of Medicine, 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

²Present address: National Institute of Health Sciences

We previously demonstrated that 14-membered macrolides increase endogenous glucocorticoid levels in mice and suggested that the macrolides may modulate host biological responses. We therefore studied the effect of anti-tuberculous on serum glucocorticoid levels in mice. Intraperitoneal administration of rifampicin increased serum corticosterone levels in a dose-dependent manner in mice, as did isoniazid and D-cycloserine. However, the enhancing activities of isoniazid and D-cycloserine were weaker than that of rifampicin. The intraperitoneal administration of pyrazinamide did not affect serum corticosterone levels. The enhancing activity of rifampicin on serum corticosterone levels was completely suppressed by pre-treatment with dexamethasone. These results suggest that rifampicin enhances endogenous glucocorticoid production through the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Rifampicin may modulate host biological responses through the activation of this axis.