抗生物質の多形核白血球遊走能に及ぼす影響

上山吉哉・石原吉孝・三崎昌和・松村智弘*

Effects of antibiotics on human polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro

We studied the effects produced *in vitro* by minocycline (MINO), aminobenzyl penicillin (ABPC) and cefotiam (CTM) on polymorphonuclear leukocytes (PMN) chemotaxis. PMN chemotaxis in the presence of these antibiotics was evaluated using the Boyden chamber technique and polarization assay.

The following results were obtained: CTM brought about a significant increase of PMN chemotaxis at the therapeutic dose (10, 100 μ g/ml), MINO already reduced PMN chemotaxis significantly at concentration as low as 1 μ g/ml and ABPC didn't influence PMN chemotaxis at concentration up to 100 μ g/ml in both methods. Furthermore according to checkerboard assay, it was proved that CTM worked as a chemokinetic factor.

Yoshiya Ueyama・Yoshitaka Ishihara・
Masakazu Misaki・Tomohiro Matsumura*

key words: polymorphonuclear leukocyte,
chemotaxis, Boyden chamber technique,
polarization assay, antibiotic

感染症治療に今日各種抗生物質が頻用され、治療成績の向上に貢献している。抗生物質の評価は、主に抗生物質の病原細菌に対する抗菌力(最小発育阻止濃度)と、宿主体内での薬剤の動態(血中濃度、病巣への移行性)についてなされてきたが、近年、宿主の生体防御能に及ぼす影響についても論じられるようになってきた^{1,2)}。

筆者らも、生体の感染防御機構のなかでも非特異的感染防御機構において、重要な役割を持つ多形核白血球(PMN)の機能に抗生物質が及ぼす影響を及ぼすかを検討してきた³⁾。

PMN 機能は一般に遊走能・貪食能・殺菌能にわけられるが、このうち遊走能は、炎症巣へ PMN が移動、集積するのに関与し、この機能低下を示す多くの症例が易感染性であること⁴⁾より、遊走能は感染に対する初期生体防御機構の主要な機能の一つとされている。今回、系統の異なる抗生物

質が PMN 遊走能に及ぼす影響を及ぼすかを、*in vitro* の遊走能検定法である Boyden 法、また PMN 遊走時の形態変化を観察する polarization assay を用い検討したので報告する。

材料と方法

(1) 抗生物質

臨床で比較的頻用されている系統の異なる 3 種の抗生物質、すなわち細菌の蛋白合成阻害剤であるテトラサイクリン系抗生物質より minocycline (MINO)、細菌細胞壁合成阻害剤であるペニシリン系抗生物質より aminobenzyl penicillin (ABPC)、ならびにセフェム系抗生物質 cefotiam (CTM) を実験に供した。

(2) ヒト PMN 浮遊液の作成

健康成人肘静脈より得たヘパリン加末梢血を、遠心管に加えた monopoly resolving medium (Flow Laboratories, Australia) 上に重層し、300×g で 30 分間遠心して PMN 層を分離採取した。これを Hanks balanced salt solution (HBSS) で所定の濃度となるように浮遊させた。なお、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により確かめた。

(3) ヒト PMN 遊走能の検定

PMN 遊走能は、遊走因子と反応するときの形態変化を観察する polarization assay と、*in vitro* の遊走能検定法である Boyden 法とを指標に検定した。

① polarization assay による遊走能の検定

血液より分離した PMN はほぼ球形の形態(図 1A)を示しているが、遊走因子と反応すると、遊走時に認められる偽足を出した形態、すなわち polarized cell (図 1B) に変化すると報告されている⁵⁾。本検定はこの細胞の形態変化を観察することにより行った。

i. 遊走因子

遊走因子として N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (Sigma Chemical, St. Louis,

* Department of Oral and Maxillofacial Surgery II,
Okayama University Dental School 岡山大学歯学
部口腔外科学第二講座

図1 polarization assay 後の正常細胞(A)ならびに polarize した細胞(B)

Mo., FMLP)を用いた。

ii. 検定方法

PMN 浮遊液(2.0×10^6 cells/ml)0.45 ml に各種濃度の抗生物質溶液(対照では HBSS のみ)0.45 ml を混和し 37°C で15分間振盪後、 10^{-7} M の FMLP 0.1 ml を加え、さらに 37°C で10分間反応させた。このあと10%ホルマリンを含む HBSS (pH 7.4)2.0 ml を加え反応を止め、氷水中に30分静置したあと、血球計算盤を用い count したすべての細胞のうち polarized した細胞数を顕微鏡下で算定した。

② Boyden 法による遊走能の検定

48穴走化チャンパー(Neuro Probe, Cabin John, Md., USA)を用い測定を行った^{6,7)}。すなわち、HBSS に溶解した抗生物質溶液 25 μl をチャンパーの bottom plate の凹み(下室)に満たし、次いで孔径 3 μm 、厚さ約 10 μm のポリカーボネート製メンブランフィルター(Neuro Probe)、およびシリコン製ガスケットを装着した。そして top plate を取り付け、各凹み(上室)に PMN 浮遊液を 50 μl ずつ加え、5% CO_2 -95%空気中で 37°C 1時間インキュベートした。なお対照は、下室に抗生物質を含まない HBSS を用い検定した。インキュベーション終了後、メンブランフィルターを染色し、光学顕微鏡を用いて遊走 PMN 数を数えた。

③ PMN の遊走促進が走化作用によるものかどうかの検討

Zigmond ら⁸⁾の checkerboard 法をもとに、HBSS で種々の濃度に溶解した抗生物質を走化チャンパーの上室、下室あるいは両室に入れ、抗生

図2 多形核白血球 polarization に及ぼす minocycline, aminobenzyl penicillin, ならびに cefotiam の影響

測定は各濃度ごとに1回3とおり行い、この実験を6回繰り返して、平均値と標準偏差を求めた。*は Wilcoxon 検定により、テスト群と対象群との間に5%以下の危険率で有意の差がみられたことを示す。

物質の濃度勾配が PMN の遊走にどのように影響するかを調べることによって検討した。

結果

(1) 各種抗生物質の PMN polarization に及ぼす影響

① minocycline

図2は、MINO の臨床血中濃度を反映する1および10 $\mu\text{g/ml}$ と、さらに濃度を上げた100 $\mu\text{g/ml}$ でその効果を検定したものである。1 $\mu\text{g/ml}$ で軽度 polarized cell の割合が減少し、さらに濃度依存性に減少傾向を示し100 $\mu\text{g/ml}$ で約35%まで polarized cell の割合が低下した。

② aminobenzyl penicillin

図2に示すように、ABPC は1および10 $\mu\text{g/ml}$ で PMN の polarization に影響を与えず、本剤の最高血中濃度に近い100 $\mu\text{g/ml}$ で約10%の polarized cell の割合が低下した。

③ cefotiam

CTM は図2に示すように、1 $\mu\text{g/ml}$ で polarization を有意に増大させ、10 $\mu\text{g/ml}$ で15%、さらに最高血中濃度に近い100 $\mu\text{g/ml}$ で20%と濃度依存性にその割合を増大させた。

(2) Boyden 法による各種抗生物質の PMN 遊走刺激作用の検定

① minocycline

図3aは Boyden チャンパーの下室に MINO を

図3 多形核白血球遊走能に及ぼす minocycline (a), aminobenzyl penicillin (b), ならびに cefotiam (c) の影響

測定は各濃度ごとに1回3とおり行い、この実験を6回繰り返す、平均値と標準偏差を求めた。*は Wilcoxon 検定により、テスト群と対象群との間に5%以下の危険率で有意の差がみられたことを示す。

添加することにより、上室のPMNの遊走がいか
に影響を受けるか検定したものである。図に示
すごとく、1 µg/ml で MINO 非添加群とくらべ
PMN 遊走細胞数が約20%減少し、10および100
µg/ml においてもそれぞれ25および55%と濃度依
存性に遊走細胞数は減少した。

② aminobenzyl penicillin

ABPC は図3bのごとく、今回検定を行った1
µg/ml から100 µg/ml の濃度で PMN の遊走に
影響を与えなかった。

③ cefotiam

図3cに示すごとく、CTM は、1 µg/ml の低
濃度で有意の差はないもののわずかに PMN 遊走
細胞数の増加を示し、さらに臨床血中濃度を反
映する10 µg/ml で25%、100 µg/ml で45%と、
有意差をもって PMN 遊走細胞数が濃度依存性
に増加した。

(3) cefotiam の PMN 遊走促進作用の checkerboard 法による検定

セフェム系抗生物質 CTM による PMN の遊走
の促進が、PMN の方向性を持たない随意運動の
亢進、すなわち chemokinesis によるものか、ある
いは作用因子の濃度勾配に方向づけられた運動で
ある chemotaxis によるものかを検索するために
checkerboard 法を行った。すなわち、Boyden チ
ャンバー上室にも CTM を入れ、上下室間に種々
の濃度勾配をつくった場合のフィルター下面に遊
走する PMN 数を数え、下室のみに CTM を入れ
た際にみられるそれと比較した。

表1 checkerboard 法による cefotiam の多形核
白血球遊走促進作用の解析

Conc. (µg/ml) of cefotiam in lower well	number of cells(mean±SD) at increasing conc. (µg/ml) of cefotiam in upper well			
	0	1	10	100
0	48.9 ± 7.9	57.7 ± 4.3	71.7 ± 5.6	82.3 ± 4.4
1	55.9 ± 3.3	67.3 ± 8.0	68.9 ± 5.0	79.1 ± 3.7
10	59.1 ± 3.8	67.6 ± 4.8	74.6 ± 1.3	82.0 ± 4.9
100	63.3 ± 2.2	71.6 ± 4.7	82.8 ± 8.2	95.0 ± 4.8

各検定は cefotiam の各濃度ごとに5とおり行い、
同一実験における平均遊走多形核白血球を算出
し、平均値と標準偏差を求めた。

その結果、表1に示すように、上室と下室の間
に CTM の濃度勾配が認められない部分、すなわ
ち表中の斜線で囲まれた部分で、濃度依存性に遊
走した PMN 数は亢進しており、また上室の濃度
が下室の濃度より高い負の濃度勾配である表の斜
線部より右上部の条件下でも、遊走能の亢進を認
めたことより、CTM による PMN 遊走の亢進は
chemokinesis によることが示唆された。

考 察

遊走能の *in vitro* の検査法として本研究では、
Boyden 法、polarization assay を用いた。polar-
ization assay は、Boyden 法や agarose 法のように
実際に遊走した PMN 数や遊走距離を測定して
いるのではなく、PMN が遊走因子に対してどの
ような反応を示すかを、細胞の形態変化を観察す

ることにより簡便に遊走能を測定する方法で、PMN の chemokinesis または遊走能の初期反応を反映しているといわれている⁹⁾。

一方、Boyden 法は、PMN が遊走因子の濃度勾配に従って milipore filter 内を通り、filter 下面に遊走してきた PMN 数を算定する方法である。Boyden 法を用いた抗生物質の PMN 遊走能に及ぼす効果については、報告者により検定方法が異なっている。

Majeskie ら¹⁰⁾ は、下室に血清と抗生物質を加え、上室に PMN ならびに下室と同濃度の抗生物質を加えて検定を行っている。この方法では、下室において血清からの遊走因子の発生に抗生物質が関与している可能性もあり、抗生物質の遊走能に及ぼす直接作用を検定しているとはいえないものと考ええる。

また Aho ら¹¹⁾ や Rodriguez ら¹²⁾ は、上室に PMN と抗生物質を加え、下室に遊走因子のみを加えて検定を行っているが、抗生物質が遊走因子と反応する可能性もあり、必ずしも得られた結果が抗生物質による遊走能への影響とは断定しがたい。

そこで筆者らは、抗生物質以外の因子による遊走能への影響を除外するため、また Boyden 法を使用する目的の一つである抗生物質が chemotactic factor として作用しているか否かを検討するために、下室に抗生物質のみを、上室には PMN 浮遊液を加えることにより抗生物質の PMN 遊走刺激作用を検定した。

抗生物質の PMN 遊走能に及ぼす影響については、1974 年 Martin ら¹³⁾ が Boyden 法を用い、tetracycline(TC)では 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ で 40~50% 抑制することを報告して以来、各種抗生物質の PMN 機能に与える影響について種々報告されている。一般に蛋白合成阻害剤で選択毒性が量的なものは、大量に使用すれば白血球の遊走能の低下や感染防御能を抑制する作用があるといわれている。蛋白合成阻害剤であるテトラサイクリン系抗生物質に関する報告では、*in vitro* の系で PMN 遊走能に抑制的に作用することはほぼ一致した見解が得られているが、それらの報告ではほとんど臨床血中濃度をはるかに超える量での結果であり、これらの成績をそのまま *in vivo* に適用するには無理がある。

しかし本検定では、Boyden 法、polarization assay とともに MINO の 1 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度ですでに PMN 遊走能を抑制する結果が得られ、*in vivo* での抑制作用の可能性も示唆するものと考ええる。

β -ラクタム系抗生物質は、遊走能に影響を与えないと報告されている¹⁴⁾。同系薬剤であるペニシリン系抗生物質に関する報告では、Aho ら¹¹⁾ が Boyden 法で phenoxymethylpenicillin の高濃度で遊走能の抑制を認めたが、250 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度では変化しなかったと報告している。また Majeski ら¹⁰⁾ は、Boyden 法にて nafcillin の 1 または 10 $\mu\text{g/ml}$ で亢進したことを示している。

本研究の結果では、ABPC は、Boyden 法、polarization assay とともに臨床血中濃度に近い 1~100 $\mu\text{g/ml}$ で遊走能に影響を与えなかった。

さらに同じ β -ラクタム系薬剤であるセフェム系抗生物質に関する報告では、Boyden 法において Majeski ら¹⁵⁾ は、cephalothin の 1 および 10 $\mu\text{g/ml}$ では変化なく、100 および 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度で 30% の抑制、Rodriguez ら¹²⁾ は、cefmetazole の 5 および 50 $\mu\text{g/ml}$ で 4~15% の亢進、cefoxitin 50 $\mu\text{g/ml}$ で 15% の亢進、500 $\mu\text{g/ml}$ で 23% の抑制を報告している。また、agarose 法において杉田ら¹⁶⁾ は、latamoxef 400 $\mu\text{g/ml}$ 、cefpimizole 200 および 400 $\mu\text{g/ml}$ で亢進を認めている。

本検定に用いた CTM でも、Boyden 法、polarization assay とともに 1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度より臨床血中濃度の 10 および 100 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度依存性に遊走能に亢進が認められ、Milatovic の報告¹⁴⁾ とは異なりセフェム系抗生物質のなかには遊走能を亢進させるものがあることが判明した。

Boyden 法は、ほかの遊走能検査法と同じく遊走能の亢進が chemotaxis によるものか、それとも chemokinesis によるものか不明であるが、抗生物質の濃度勾配が PMN 遊走に及ぼす影響を検定する checkerboard 法をさらに行うことにより、両者を区別することができる。本研究より CTM に PMN 遊走亢進作用を認めたが、このことを checkerboard 法でさらに検討した結果、CTM は負の濃度勾配においても PMN の遊走亢進を示したことより chemokinetic factor として作用することが判明した。

また本研究では、遊走能検定を PMN の形態変

化を指標にしている polarization assay でも行い、Boyden 法による成績と比較するとほぼ同様の結果を得ており、Boyden 法で得られた結果は polarization assay の形態変化に基づくものと考えられる。

抗生物質の遊走能に及ぼす影響は本研究で示されたごとく各薬剤でまちまちであるが、急性期の感染巣への PMN の集合は遊走能によることを考えると、遊走能に負の影響を与える薬剤は、生体防御において初期防御の役割を担っている PMN の機能に障害を与えることにより、感染防御機構に対し抑制的に働くと考えられる。このような薬剤を PMN の機能低下が認められる症例に使用することは、さらに機能低下を招く恐れがあるため合理的な治療とはいえず、一考を要すると思われる。

一方、今回検定した CTM のように PMN の機能を高める薬剤も存在することより、抗生物質の使用に当っては抗菌スペクトルのみならず、この観点からも考慮すべきと考える。

本研究の一部は文部省科学研究費、奨励研究(A)(研究課題番号62771693)の助成により行われた。

文 献

- 1) 町田豊平, 清田 浩: 感染防御機構と化学療法の協力. 日細菌誌 43: 971-980, 1988.
- 2) 高島俊夫: 抗菌薬と白血球機能. 感染症 14: 81-88, 1984.
- 3) 上山吉哉, 石原吉孝, 三崎昌和, 桜井信昭, 岸本晃治, 松村智弘: ルミノール依存性ケミルミネッセンスを指標とした抗生剤の多形核白血球機能に及ぼす影響. 岡山歯誌 8: 53-57, 1989.
- 4) 石田 貢, 平島光臣, 田代和弘: 好中球膜異常. 最新医学 38: 963-969, 1986.
- 5) Smith, C.W., Hollers, J.C., Patrick, R.A., Hassett, C.: Motility and adhesiveness in human neutrophils. J. Clin. Invest. 63: 221-229, 1979.
- 6) Falk, W., Goodwin, R.H., Leonard, E.J.: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J. Immunol. Methods 33: 239-247, 1980.
- 7) 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.
- 8) Zigmond, S.H., Hirsch, I.G.: Leukocyte locomotion and chemotaxis: New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. J. Exp. Med. 137: 387-410, 1973.
- 9) Tsuda, S., Miyasato, M., Iryo, K., Sasai, Y.: Polarization assay studies of human neutrophil motility. J. Dermatology 15: 116-122, 1988.
- 10) Majeski, J.A., Alexander, J.W.: Evaluation of tetracycline in the neutrophil chemotactic response. J. Lab. Clin. Med. 90: 259-265, 1977.
- 11) Aho, P., Mannisto, P.T.: Effects of two erythromycins, doxycycline and phenoxymethylpenicillin on human leucocyte chemotaxis *in vitro*. J. Antimicrob. Chemother. 21: 29-32, 1988.
- 12) Rodriguez, A.B., Pariente, J., Prieto, J., Barriga, C.: Effects of cefmetazol, cefoxitin and imipenem on polymorphonuclear leukocytes. Gen. Pharmac. 18: 613-615, 1987.
- 13) Martin, R.R., Warr, G.A., Couch, R.B., Yeager, H., Knight, V.: Effect of tetracycline on leukotaxis. J. Infect. Dis. 129: 110-116, 1974.
- 14) Milatovic, D.: Antibiotics and phagocytosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 2: 414-425, 1983.
- 15) Majeski, J.A., McClellan, M.A., Alexander, J.W.: Effect of antibiotics on the *in vitro* neutrophil chemotactic response. Am. Surg. Oct.: 785-788, 1976.
- 16) 杉田久美子, 西村忠史: 抗生物質の好中球運動機能に及ぼす影響について. Chemotherapy 37: 674, 1989.

*

*

*