

## ラット及び HIT-T15 細胞の糖代謝に及ぼす Tacrolimus と Ciprofloxacin の影響

田山剛崇,<sup>a,b</sup> 三宅勝志,<sup>a</sup> 長藤多香美,<sup>c</sup> 郷原貴子,<sup>b</sup> 森田修之,<sup>a</sup>  
新井茂昭,<sup>d</sup> 佐藤英治,<sup>e</sup> 北浦照明,<sup>f</sup> 木平健治<sup>\*,b,d</sup>

## Influence of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Glucose Metabolism

Yoshitaka TAYAMA,<sup>a,b</sup> Katsushi MIYAKE,<sup>a</sup> Takami NAGAFUJI,<sup>c</sup>  
Takako GOUHARA,<sup>b</sup> Shushi MORITA,<sup>a</sup> Shigeaki ARAI,<sup>d</sup>  
Eiji SATO,<sup>e</sup> Teruaki KITAURA,<sup>f</sup> and Kenji KIHIRA<sup>\*,b,d</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Hiroshima International University, 5-1-1 Hirokoshingai, Kure City 737-0112, Japan, <sup>b</sup>Graduate School of Biomedical Sciences Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan, <sup>c</sup>Hiroshima City Hospital, 7-33 Moto-machi, Naka-ku, Hiroshima 730-8518, Japan, <sup>d</sup>Department of Pharmaceutical Services, Hiroshima University Hospital, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan, <sup>e</sup>Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Fukuyama University, 1 Gakuen-cho, Fukuyama City 729-0292, Japan, and <sup>f</sup>Department of Pharmaceutical Services, Hiroshima Seiyoin Mental Hospital, 3-1-11 Mikumari, Fuchu-cho, Aki-gun, Hiroshima 735-0003, Japan

(Received January 26, 2007; Accepted August 2, 2007)

Tacrolimus is an immunosuppressive drug that causes glucose intolerance. On the other hand, ciprofloxacin, which is widely used in the treatment of infectious diseases, is known to cause hypoglycemia as a side effect. We investigated the effects of tacrolimus and ciprofloxacin on serum glucose and insulin levels in rats, as well as on insulin secretion and the viability of HIT-T15 cells. The rats received intraperitoneal injections of tacrolimus and/or ciprofloxacin for 1 week, and their arterial blood was sampled after the administration of glucose. HIT-T15 cells were cultured in the presence of tacrolimus and/or ciprofloxacin, and the insulin level in the supernatant was measured. Ciprofloxacin did not show a significant effect on serum glucose and insulin levels after multiple administrations in the rats. In contrast, rats in the tacrolimus treatment group showed low serum insulin and high serum glucose levels. Moreover, the coadministration of ciprofloxacin and tacrolimus resulted in higher glucose levels compared with tacrolimus alone 0.5 h after glucose stimulation. In addition, we observed that the rats administered tacrolimus and/or ciprofloxacin had low body weight and food intake. Tacrolimus caused a dose-dependent decrease in the viability of the HIT-T15 cells. Furthermore, both drugs were highly toxic to HIT-T15 cells. In contrast, tacrolimus alone and coadministration of the drugs resulted in no significant difference in insulin secretion. These results suggest that the cytotoxic effects of ciprofloxacin and tacrolimus cause a decrease in insulin secretion, leading to glucose intolerance.

**Key words**—tacrolimus; ciprofloxacin; insulin; glucose tolerance

## 緒 言

Tacrolimus は cyclosporine A (CyA) とともに強力な免疫抑制剤であるが腎臓、脾臓、心臓、中枢及び消化器毒性など多種多様な副作用の報告がある。したがって、tacrolimus を有効かつ安全に使用する

ためには、血中濃度推移を中心とした Pharmacokinetic な薬物相互作用ばかりでなく、Toxicodynamic な観点からの検討を加える必要がある。

脾臓毒性は当初、ヒヒや、カニクイザルで認められ、ついで tacrolimus を服用している移植レシピエントで insulin 療法が必要な糖尿病患者が増加したことが報告された。<sup>1-3)</sup> また、tacrolimus を 14 日間ラットに経口投与することで耐糖能障害とランゲルハンス島の間質化が起こることも報告されている。<sup>4)</sup> さらに、耐糖能障害は interleukin-2 (IL-2) 産生抑制作用と同様に、FK506 binding protein (FK-

<sup>a</sup>広島国際大学薬学部, <sup>b</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科, <sup>c</sup>広島市立広島市民病院薬剤部, <sup>d</sup>広島大学病院薬剤部, <sup>e</sup>福山大学薬学部, <sup>f</sup>社会福祉法人広島静養院薬剤科

\*e-mail: kihirak@hiroshima-u.ac.jp

FKBP) 複合体がカルシニューリン活性を阻害し、核への核因子移行が妨げられ、それにより insulin mRNA の発現が抑制されるメカニズムが報告されている。<sup>5,6)</sup> 一方、ニューキノロン系抗菌剤はその広範な抗菌力より免疫抑制剤使用時における細菌感染症の予防及び治療薬として併用されることが多い。しかし、これらの抗菌剤は、臨床における副作用として低血糖の報告があり、近年、その機構が明らかにされつつある。<sup>7-9)</sup>

本研究では、ラットを用いて tacrolimus と ciprofloxacin の血糖値及び insulin 分泌に及ぼす影響を検討した。さらに、HIT-T15 細胞における insulin 産生及び分泌に及ぼす影響も検討した。

### 試薬と実験方法

**1. 試薬** Ciprofloxacin (ドイツ・バイエル社) 及び tacrolimus (藤沢薬品株) は、それぞれの製薬企業から提供を受けた。細胞培養液には 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO 社) を加えた Ham'F12 培養液 (日水製薬株) を用いた。生細胞数の評価には、2,3-Bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl] -5- [(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium Hydroxide (XTT, Sigma Chemical Company), 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (1-Methoxy PMS, 同仁化学研究所株) を用いた。その他一般試薬は特級レベルを使用した。

**2. 動物** 6 週齢の Slc: Wistar 系雄性ラットに各種薬物 (tacrolimus 2.5 mg/kg, ciprofloxacin 5.0 mg/kg) を 1 日 2 回、1 週間腹腔内に慢性投与した。食餌摂取量は 1 ゲージ (ラット 4 匹) における食餌消費量を測定した。1 週間薬剤を投与したのち、24 時間絶食し、グルコース (400 mM) を 1 mmol/kg body 経口投与し、糖負荷試験を行った。なお、採血はグルコースを投与 10 分前、0, 30, 60, 120, 240 分後に眼窩静脈より行った。その後、血漿中 insulin 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて、グルコース濃度を glucose oxidase (GOD) 法にて測定した。

**3. HIT-T15 細胞** ハムスター由来の膵  $\beta$  細胞である HIT-T15 細胞を検討に用いた。Trypsin/EDTA 溶液にて細胞を浮遊させ、培養液で洗浄を行ったのち、細胞懸濁液を  $2.5 \times 10^5$  cells/ml となるように調節し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間イ

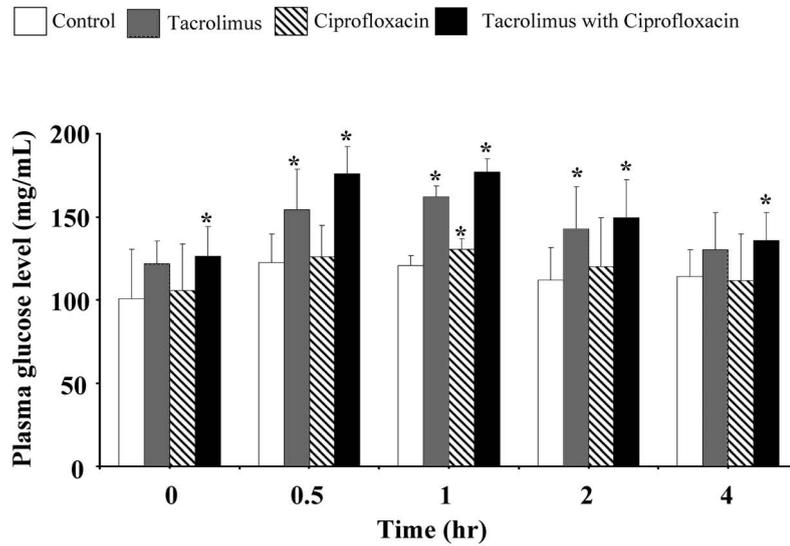
ンキュベートした。その後、tacrolimus を含有した培養液 (最終濃度が 1, 10, 100 nM) に変え、インキュベート (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 24 or 48 h) した。同様に、ciprofloxacin は最終濃度が 26, 130, 260  $\mu$ M (10, 50, 100  $\mu$ g/ml) となるように培養液にてインキュベートを行った。なお、tacrolimus と ciprofloxacin 併用投与の場合は、ciprofloxacin (最終濃度 130  $\mu$ M), tacrolimus (最終濃度: 1, 10, 100 nM) の順に添加した。採取した培養液上清中の insulin は、ELISA 法を用いて測定し、蓄積 insulin とした。一方、insulin 分泌能を検討するため、培養液上清を採取後、新鮮な培養液を添加し、1 時間インキュベート (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) し、その培養液中の insulin 量を測定した。

**4. 生細胞数の測定** 0.1% XTT 試薬に 1-methoxy PMS を添加した溶液を細胞とともに 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し 24 時間呈色反応を行った。XTT 法の吸光度測定は、試料波長 450 nm, 参照波長 600 nm にて行った。

**5. 統計処理** 得られた実験値は平均  $\pm$  SD で表示し、有意差の検定は ANOVA を用いて行い、分散に差を認めた場合は、post hoc test を用いた。なお、危険率両側 5% 以下 ( $p < 0.05$ ) を有意水準とした。

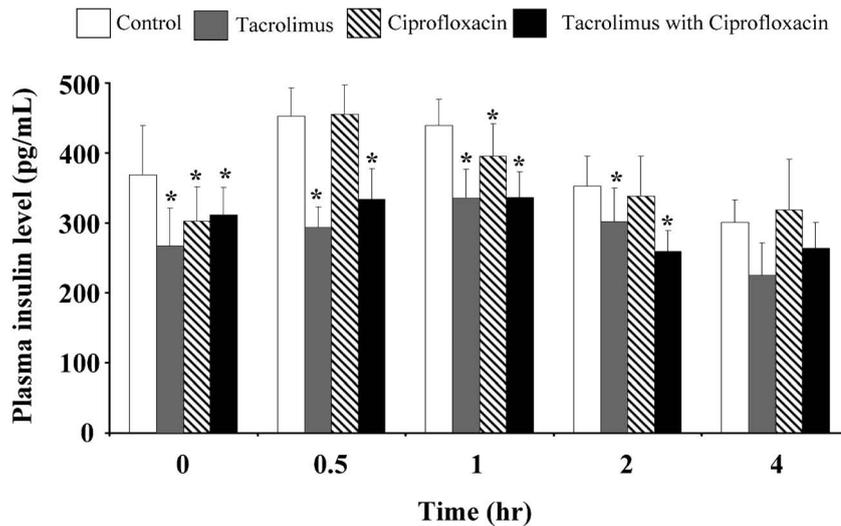
## 結 果

**1. ラットの耐糖能に及ぼす tacrolimus 及び ciprofloxacin の影響** 耐糖能試験における血中グルコース濃度の経時変化を Fig. 1 に示した。薬物の慢性投与により、耐糖能試験直前の血中グルコース濃度はコントロール、ciprofloxacin 単独群、tacrolimus 単独群及び両剤併用群の順に高い傾向が認められ、tacrolimus 単独群及び両剤併用群では、糖負荷後 2 時間まで、コントロールに比較して有意に高いことが観察された。また、糖負荷後 0.5 及び 1 時間において、両剤併用群のグルコース濃度は tacrolimus 単独群より有意に高いことが認められた。次に、耐糖能試験における血中 insulin 濃度の経時変化を Fig. 2 に示した。糖負荷前の insulin 濃度は、いずれの投与群もコントロールに比較して低値を示した。また、糖負荷後も 0.5-2 時間で tacrolimus 単独群及び両剤併用群はコントロールに比較して有意に低く、グルコース濃度変化の一因と



\*:  $P < 0.05$  compared with control

Fig. 1. Effect of Multiple Administrations of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Plasam Glucose Level in Glucose Tolerance Test  
Each bar presents the mean  $\pm$  S.D. of 13–17 experiments.



\*:  $P < 0.05$  compared with control

Fig. 2. Effect of Multiple Administrations of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Plasam Insulin Level in Glucose Tolerance Test  
Each bar presents the mean  $\pm$  S.D. of 13–18 experiments.

して、薬剤による insulin 分泌の抑制による耐糖障害が示唆された。

2. ラットの食餌摂取及び体重に及ぼす tacrolimus 及び ciprofloxacin の影響 薬物を慢性投与中のラット体重及び食餌摂取量の経日変化を Fig. 3 に示した。薬物投与開始 1 日目に tacrolimus 単独投与群及び両剤併用群ではコントロールに比較し有

意な体重減少が観察され、4 日目以降は、ciprofloxacin 単独投与群においても有意な体重減少が観察された。これ以降も耐糖能試験を行うまで同様の推移を示した。また、食餌摂取量に関しては、薬物投与開始 3 日目まで tacrolimus 単独投与群、両剤併用群において急激な食餌摂取量の低下が認められ、それ以降も低い食餌摂取量を示した。

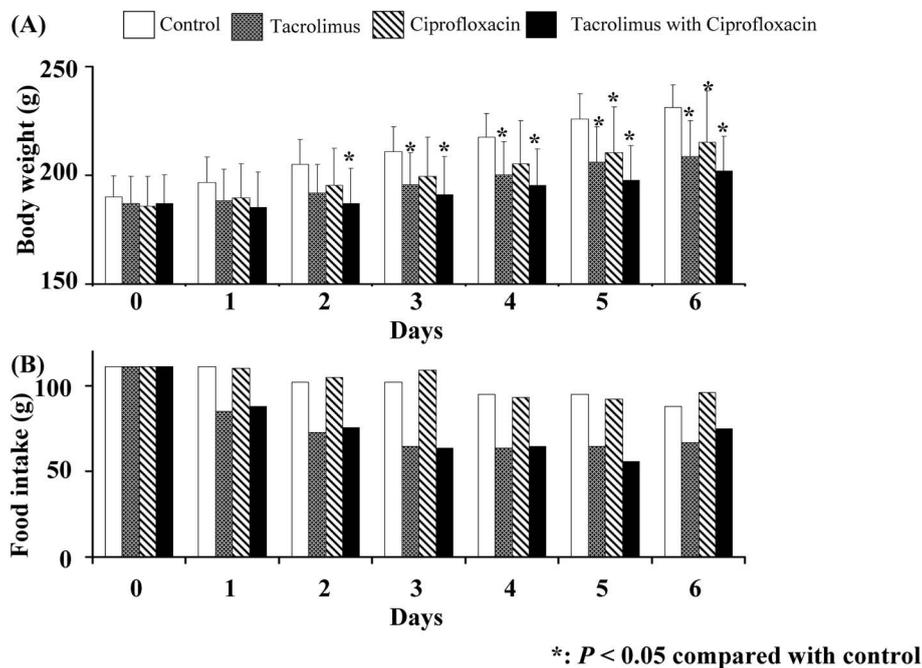


Fig. 3. (A) Effect of Multiple Administrations of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Body Weight. Each bar presents the mean  $\pm$  S.D. of 13–18 rats. (B) Effect of Multiple Administrations of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Food Intake in Each Group (4 rats)

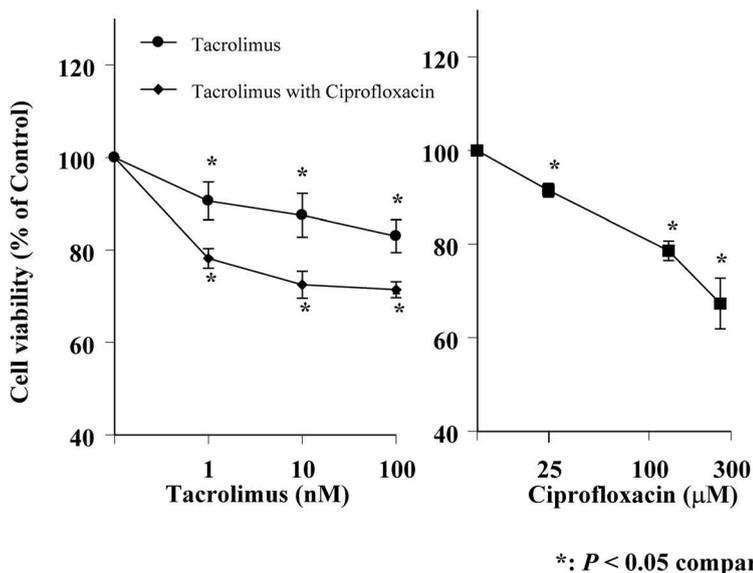


Fig. 4. Effect of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Cell Viability of HIT-T15 Cells after 72 h Incubation  
Each point presents the mean  $\pm$  S.D. of 5 experiments.

**3. Tacrolimus 及び ciprofloxacin の HIT-T15 細胞に対する細胞毒性** *In vitro* における tacrolimus 及び ciprofloxacin の毒性を検討する目的で、各薬剤及び両剤を併用暴露した際の HIT-T15 細胞の viability を比較した (Fig. 4). 24 時間の曝露で生細胞数は、ciprofloxacin を高濃度 (260  $\mu$ M) 曝露した場合を除き、いずれの投与群及び投与濃度

で顕著な細胞数の低下は観察されなかった (data not shown). 一方、72 時間の曝露により、いずれの薬物投与群もコントロールに比較して有意に生細胞数が低下することが認められた。その際、ciprofloxacin 単独投与群の細胞毒性は濃度の増加に伴って増大し、濃度依存性が認められたのに対して、tacrolimus 投与群では 10 nM 以上の曝露では細胞毒

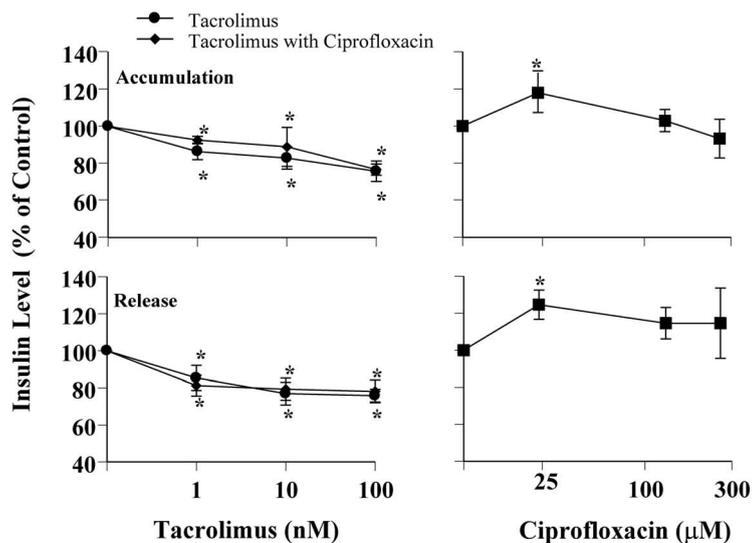
性に顕著な差は認められなかった。また, tacrolimus と ciprofloxacin (130  $\mu\text{M}$ ) を併用した群では tacrolimus 単独群に比較して, 相加的な細胞毒性の増加が認められた。

**4. HIT-T15 細胞の insulin 産生及び分泌に及ぼす tacrolimus 及び ciprofloxacin の影響** 累積 insulin 量は tacrolimus 単独及び ciprofloxacin 併用群ではコントロールに対して有意な insulin 量の低下が認められたが, tacrolimus 単独群と ciprofloxacin 併用群との間に有意な差は観察されなかった。一方, ciprofloxacin では 26  $\mu\text{M}$  の低濃度域でコントロールに比較して有意な insulin 量の増加を観察したが, 高濃度域では顕著な差は観察されなかった。1 時間当たりの insulin 分泌量は, 累積 insulin 量と同様な傾向を示した (Fig. 5)。

## 考 察

近年, ニューキノロン系抗菌剤である gatifloxacin を投与した際の血糖値異常が報告された。<sup>10)</sup> 一方, tacrolimus においてもその副作用に血糖値の変動が報告されている。<sup>1-4)</sup> 本研究では, tacrolimus と ciprofloxacin を併用投与した際の耐糖能に及ぼす影響について *in vivo*, *in vitro* の両面から検討を行った。

前述した通り, tacrolimus の耐糖能障害は, FK-FKBP 複合体がカルシニューリン活性を阻害し, 核への核因子移行が妨げられ, それにより insulin mRNA の発現が抑制されるメカニズムが報告されている。<sup>5,6)</sup> また, Ishiwata らはニューキノロン系抗菌剤である levofloxacin 投与による血糖上昇メカニズムは, histamine 遊離, 血中 epinephrine 濃度上昇を介したものであると報告している。<sup>11)</sup> 一方, Saraya らは gatifloxacin を投与した際, 膵臓  $\beta$ -細胞の K channel 阻害により insulin 分泌が促進され, 低血糖が生じることを報告している。<sup>12)</sup> 同じニューキノロン系抗菌剤である ciprofloxacin も同様の機序による血糖値の変動が考えられる。ラットに tacrolimus を単独投与, tacrolimus と ciprofloxacin を併用投与した際, 耐糖能障害が観察された。加えて, 糖負荷 0.5 h 後の血中グルコース濃度で, tacrolimus 単独投与と ciprofloxacin 併用投与群間に有意な差が観察された (Fig. 1)。また, ciprofloxacin 単独投与群は, コントロールと比較して血中グルコース濃度に変化はみられないものの, 血中 insulin 濃度は低値を示した (Fig. 2)。また, 本検討において tacrolimus 単独投与群及び tacrolimus と ciprofloxacin 併用投与群で体重減少が観察された。この体重減少は食物摂取量の低下によるものと考えら



\*:  $P < 0.05$  compared with control

Fig. 5. Effect of Tacrolimus and Ciprofloxacin on Insulin Level (normalized to Cell Viability) in HIT-T15 Cells

Each point presents the mean  $\pm$  S.D. of 5 experiments. Accumulation: the accumulated insulin content in the supernatants after HIT-T15 cells seeded in 96-well plates that were treated with test agents in culture medium for 72 h. Release: the insulin content in culture medium after washing out test agents followed by incubating with new culture medium for 1 h. For details, see Materials and Methods.

れ、その一因として耐糖障害に基づく最高血中グルコース濃度の上昇及び持続による摂食中枢の抑制が考えられる。そこで、食餌摂取量とグルコース最高濃度、さらには体重とグルコース最高濃度との相関を検討した。その結果、食餌摂取量と耐糖能試験で得られたグルコース最高濃度との間には有意な負の相関が得られた ( $r=0.994$ ,  $p<0.001$ )。また、同様に体重と耐糖能試験で得られたグルコース最高濃度との間にも有意な負の相関が得られた ( $r=0.957$ ,  $p<0.001$ )。したがって、観察された体重減少が耐糖能障害に伴う食物摂取量の低下に基づいている可能性も示唆された。これまで、HiranoらはCyAとtacrolimusで投与量依存的な体重減少と食物摂取量の低下が薬物投与開始初期に認められ、これらが薬物による消化器障害によることを報告している。<sup>4)</sup>一方、Madsenらはラットにおいて食物摂取量の低下を伴わない体重低下を報告し、これが腸管内ATPの減少に基づく食物の吸収低下によることを示している。<sup>13)</sup>本検討におけるtacrolimusの体重減少メカニズムについては断定できないがその成因には上記の要因を含めて種々の要素が複合的に関係しているもの考えられる。一方、ciprofloxacin投与群ではtacrolimusと同様に体重減少の傾向が観察されたが、その低下がtacrolimusでは投与早期から認められたのに対して、投与後期に認められた。さらに、食餌摂取量の減少も認められなかったことより、その成因がtacrolimusと異なっていることが考えられる。

次に、*in vitro*における耐糖能及びinsulin分泌に及ぼすtacrolimusとciprofloxacinの影響を詳細に検討する目的で、ハムスター由来の膵β細胞であるHIT-T15細胞を用いて、検討を行った。本研究において、tacrolimus投与によりHIT-T15細胞のviabilityの低下が観察され、ciprofloxacinとの併用投与により、viabilityの低下が増加した (Fig. 4)。また、細胞のviabilityで補正したinsulin分泌に関して、tacrolimus単独投与とciprofloxacin併用投与群は、コントロールに比して有意な低下が観察されたが、tacrolimus単独群及びciprofloxacin併用群の間に差は認めなかった (Fig. 5)。これらの結果より、ciprofloxacinはinsulin分泌よりも、むしろ、cell viabilityに影響を及ぼすと考えられ、tacrolimusとciprofloxacin併用投与により、その膵細胞

毒性が増大し、ラット*in vivo*で観察された耐糖障害の一因と考えられる。

また、低濃度のciprofloxacin単独投与により、insulin分泌量を増加させることが明らかにされた。今回、そのメカニズムを明らかにすることはできなかったが、今後、分子レベルにて、ciprofloxacin及びtacrolimusのインスリン分泌促進・抑制機構を詳細に検討する必要がある。

本研究において、*in vitro*実験においてciprofloxacin単独投与群の細胞毒性は濃度依存的に増加が観察されたが、ラットを用いた*in vivo*実験ではciprofloxacin投与によるinsulin分泌増加作用は、認められず、むしろ抑制の傾向を示した。この一因としてciprofloxacinの膵細胞に対する毒性が考えられる。すなわち、低濃度のciprofloxacin暴露によりinsulin分泌が増加してもその効果は細胞数の減少により相殺されるか、あるいは膵細胞障害がその作用を上回った可能性が考えられる。

本研究にて、tacrolimusの副作用である耐糖能障害はciprofloxacinにより増加される傾向が示され、その要因として膵細胞障害性の増強が関係していることが示唆された。臨床において、臓器移植を受ける糖尿病患者に、免疫抑制剤であるtacrolimusと抗菌剤であるニューキノロン系抗菌剤を併用する際は十分な血糖値のコントロールが必要である。

## REFERENCES

- 1) Calne R., Collier D. S., Thiru S., *Transplant. Proc.*, **Suppl 6**, 63 (1987).
- 2) Ericzon B. G., Wijnen R. M., Kubota K., Kootstra G., Groth C. G., *Transplantation*, **54**, 615-620 (1992).
- 3) Todo S., Fung J. J., Starzl T. E., Tzakis A., Demetris A. J., Kormos R., Jain A., Alessiani M., Takaya S., Shapiro R., *Ann. Surg.*, **212**, 295-305 (1990).
- 4) Hirano Y., Fujihira S., Ohara K., Katsuki S., Noguchi H., *Transplantation*, **53**, 889-894 (1992).
- 5) Tamura K., Fujimura T., Tsutsumi T., Nakamura K., Ogawa T., Atumaru C., Hirano Y., Ohara K., Ohtsuka K., Shimomura K., Kobayashi M., *Transplantation*, **59**, 1606-1612 (1995).
- 6) Tamura K., Fujimura T., Tsutsumi T., Naka-

- mura K., Ogawa T., Atumaru C., Hirano Y., Ohara K., Ohtsuka K., Shimomura K., Kobayashi M., *Transplant. Proc.*, **27**, 357–361 (1995).
- 7) Wang S., Rizvi A. A., *Am. J. Med. Sci.*, **331**, 334–335 (2006).
- 8) Bhasin R., Arce F. C., Pasmantier R., *Am. J. Med. Sci.*, **330**, 250–253 (2005).
- 9) Lin G., Hays D. P., Spillane L., *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **42**, 295–297 (2004).
- 10) Arce F. C., Bhasin R. S., Pasmantier R., *Endocr. Pract.*, **10**, 40–44 (2004).
- 11) Ishiwata Y., Itoga Y., Yasuhara M., *Eur. J. Pharmacol.*, **551**, 168–174 (2006).
- 12) Saraya A., Yokokura M., Gono T., Seino S., *Eur. J. Pharmacol.*, **497**, 111–117 (2004).
- 13) Madsen K. L., Yanchar N. L., Sigalet D. L., Reigel T., Fedorak R. N., *Gastroenterology*, **109**, 107–114 (1995).