

第6号

出典：Arch Dermatol.Res.(1990);282,449-454 全文訳メトロニダゾールによる酒さ及びニキビ治療に於ける作用機序として。

(関西医科大)

土佐清水病院院長 丹羽勲負 他の研究

文献の中でメトロニダゾールが慢性リュウマチ疾患及び乾癬に有効であると指摘されている

抗炎症作用

The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: a possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acne

H.Akamatsu et al (関西医大) Arch. Dermatol. Res.(1990) ; 282,449~454

[Palmitoleic acid とメトロニダゾールの相乗効果によるヒト白血球のフリーラジカル産生の抑制：メトロニダゾールによる酒さ及びニキビ治療に於ける作用機序として]

要旨 メトロニダゾールは、臨床的に酒さの治療だけでなくニキビの炎症の治療でも使用され効果を上げている。しかし、嫌気性菌 *Propionibacterium acnes* の発育阻止に対しては、効果が今一つというのがこれまでの評価であった。今回、我々はメトロニダゾールが palmitoleic acid の共存下で *P. acnes* の生育に及ぼす影響、及びヒト好中球の活性酸素分子種(reactive oxygen species ROS)の産生に及ぼす影響について検討した結果を報告する。メトロニダゾールと palmitoleic acid は、それぞれを別々に使った場合には、*P. acnes* の生育をわずかに抑制するだけで ROS 産生などの白血球機能には有意の抑制を示さなかった。しかし、palmitoleic acid 存在下では、メトロニダゾールが *P. acnes* の嫌気性条件下の生育を著明に抑制し、好中球の ROS 産生も減少させた。一方、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で産生される ROS には影響を与えなかった。この結果は、メトロニダゾールがヒトの皮膚に常在する palmitoleic acid と一緒に働いて、炎症局所で好中球の ROS 産生を減少させることで臨床効果をあげている事を示している。In vivo で、メトロニダゾールは ROS による組織の損傷を阻止することによって酒さやニキビを著明に改善していると考えられる。

イミダゾール化合物の1つであるメトロニダゾールは、カビ、トリコモナス、嫌気性菌の生育を阻止することが知られている。最近では、メトロニダゾールが酒さの治療にも有効との報告がなされている(1976、1980)。また、メトロニダゾールはニキビの炎症に対しても臨床的に有効という報告もされている(1987)。その一方で、メトロニダゾールの in vitro における *Propionibacterium acnes* の生育阻止作用があまり強くないという事もまた広く知られている。

我々は、メトロニダゾールが炎症の強力なメディエーターの1つである活性酸素分子種(ROS)を軽度ながら減少させる事を以前に報告した。酒さの治療におけるメトロニダゾールの効果が、好中球からの ROS 産生の抑制によっている可能性もある。既に報告した我々の成績では、好中球の産生した ROS に対してメトロニダゾールはスカベンジャー作用を明確には示さなかったので、メトロニダゾールがどうして酒さに治療作用を示すのかについて十分な説明は出来ていない。

最近になり、遊離脂肪酸が炎症に関連した好中球の機能、例えば chemotaxis、phago-

cytosis、ROS production 等に色々と影響を及ぼしていることが報告されてきた。そこで、メトロニダゾールの *in vitro* と *in vivo* の薬効の違いが生じる原因を探る為に、ヒトの皮膚に常在している遊離脂肪酸とメトロニダゾールの間、どのような相乗作用があるかを検討した。

メトロニダゾールをいくつかの遊離脂肪酸 (C16、C16:1cis9、C18:1cis9) と組み合わせさせてその MIC を調べた後、*P.acnes* の生育阻止に対する相乗効果を調べた。その結果、palmitoleic acid (C16:1cis9) との組み合わせが、*in vitro* で *P.acnes* の生育と好中球の ROS 産生を著明に抑制した。

材料と方法

試薬

3 濃度 (5、50、100mic g / ml) のメトロニダゾールを 0.05、0.5、5 mic g / ml の palmitoleic acid、palmitic acid および oleic acid と組み合わせ、下に示す 3 種の好中球機能試験に用いた。

白血球の調製

好中球は健康ボランティアの静脈血から分離した。方法の詳細は既に報告した通りである。取り出した好中球の生存率は、トリパンプルーの排除テストの判定で常に 99% 以上、食食能の指標とした C¹⁴ インスリンの取り込みも常に 900dpm 以上であった。好中球はその後それぞれの試験にあった懸濁用液、agarose plate chemotactic activity 測定用は RPMI、食食能試験には Krebs Ringer Phosphate (KRP)、OH⁻ラディカル試験には 5mM グルコース加 KRP、O₂⁻ラディカルおよび H₂O₂ 産生系には 1mg / ml の割合にゼラチンを添加した 5mM グルコース加 KRP に再懸濁した。

好中球の走化性 (chemotaxis) 試験

好中球の走化性は、アガロースプレートを用いて測定した。アガロースプレートは 2.4% アガロース液 2.5ml と熱不活化子牛血清 10% 添加 2 倍濃度 PRMI1640 medium 2.5 ml を混合して作成した。径 3 mm の 3 本の well を 8mm に切り揃えた。好中球を PRMI 培地に 1x10⁸ cells / ml の濃度に懸濁したものを 10mic l、中央の well に注加した。外側の well には、10⁻⁷M の n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 10mic l を chemoattractant として注加した。内側の well には対照として PRMI1640 培地 10mic l を注加した。プレートは 5% CO₂ 加、加湿空气中で 37℃ 2 時間インキュベートした。外側の well に一番早く移動した好中球 10 個 (真の走化性) と内側の well に一番早く移動した好中球 10 個 (ランダム走) の移動距離をマイクロプロジェクター上で測定した。

好中球の食食能試験

Oil red-O を溶解したパラフィンオイルのエマルジョンを既報の如く作成した。但し、以前に使用したりポポリサッカライド (エンドトキシン) は正常血清に置き換えた。エ

マルジョンは、同容量の正常ヒト血清と 37°C 30 分インキュベートして opsonization を行った。好中球懸濁液 (2×10^7 cells / 0.9ml KRP) に、オプソニン処理したエマルジョンを 0.1ml 加え 37°C 5 分インキュベーションした。その後、氷冷 KRP 9 ml を加えて反応を停止させた。好中球は氷冷 KRP で 3 回洗浄し、付着しているパラフィンオイル滴を除去した。細胞内に取り込んだオイルレッド-O はクロロフォルム 1 : メタノール 2 を用いた Bligh and Dyer の方法で抽出し、クロロフォルム相の 525 nm の吸光度を測定した。

既に報告したように、抽出されるオイルレッド-O の量は好中球が取り込んだパラフィンオイルの量にほぼ比例することが確認されている。

好中球の ROS 産生試験

好中球の ROS 産生は既に報告した方法で測定した。

O_2 -ラディカルの形成試験では、 1×10^6 の好中球を 1mg/ml の opsonized zymosan と 37°C で 10 分間 pre-incubation した後、0.1mM ferricytochrome c とインキュベーションした。上清 (0.1ml) を使って還元型 cytochrome c を 550 nm の吸光度で測定した。計測結果は $\Delta \text{EnM} = 2.1 \times 10^4 / \text{M} / \text{cm}$ の式により還元型 cytochrome c の nM に変換した。

H_2O_2 の産生は、scopoletin の蛍光がペルオキシダーゼ作用下に H_2O_2 により減少するのを計測して定量した。Scopoletin (50mM 0.1ml) とペルオキシダーゼ (1mg / ml 0.05ml) は、オプソニン処理ザイモザンと室温で 10 分間プレインキュベーションした 2.5×10^6 個の好中球を含む懸濁液に加えた。ペルオキシダーゼ + H_2O_2 により減少する scopoletin の蛍光の減少率は、添加してから 30 分間蛍光測定器で測定した。 H_2O_2 の濃度は 1M H_2O_2 が 1 M の scopoletin を酸化すると仮定して計算した。

OH-ラディカルは、好中球の産生した OH-ラディカルと alpha-keto-methiolbutyric acid (KMB) が反応して出来るエチレンを定量する方法を採用した。1 mM の KMB とプレインキュベーションした 2×10^6 個の好中球を入れた試験管にオプソニン処理ザイモザンを加えて密栓した。反応終了後管内のガスを採取しガスクロマトによりエチレンを定量した。

キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系 ROS 産生試験

キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で産生される ROS の総量を測定した。好中球とオプソニン処理ザイモザンを加える代わりに 0.1mM ヒポキサンチン、1.25mM EDTA、16.5mic M ferricytochrome c を加えて総量 2ml (125mM phosphate buffer) とした。所定濃度のメトロニダゾール及び/或は palmitoleic acid を加えた後、透析したキサンチンオキシダーゼを約 0.006u / ml となるように加えて ROS を産生させた。各試験は 3 回行い、結果は Mean +/- SE で示した。統計処理は Student's t-test によった。

メトロニダゾールと *palmitoleic acid* の *P. acnes* に対する MIC 測定、ならびに生育阻止試験

MIC の測定は日本化療学会の方法に準じて実施した。10 株の *P. acnes* を 1 夜培養した液を GAM プロスで希釈し、約 10^6 cfu/ml とした後、2 倍濃度のメトロニダゾールと C16、C16:1cis9、C18:1cis9 を倍倍希釈していった。MIC 測定には 0.1% グルコース、0.002% L-システイン、1.5% 寒天を加えたハートインヒュージョンプロスを使用した。MIC は、嫌気性 (N_2 10%; CO_2 10%) 条件下、37°C 48 時間培養した結果から算定した。メトロニダゾールと C16、C16:1cis9、C18:1cis9 の *P. acnes* の嫌気性液体培養試験には、ATCC6919 を使用した。培地には 0.1% グルコースと 0.02% L-システインを補充したハートインヒュージョンプロスを使用した。倍倍希釈した、MIC 以下の濃度系列を作りその 2ml を滅菌試験管 (12x120mm) に注入した。そこに modified BAM プロスに懸濁 (10^6 cfu/ml) した *P. acnes* を 1 滴加えた。この試験管を嫌気性条件下に 37°C 3 日間培養後、定量培養法で生菌数を計測した。

結果

メトロニダゾールの炎症伝達物質に対する影響

表 1 に示した如く、メトロニダゾール単独では好中球の走化、或は貪食作用に有意の変化を起こさなかった ($P>0.05$)。好中球を用いた系、及び無細胞の系で産生される ROS レベルについては前報に詳しく述べたので、ここでは要点についてのみ記す。キサンチン-キサンチンオキシダゼ系で産生される O_2^- 、 H_2O_2 、OH-ラジカルは、メトロニダゾール存在下でも有意の影響を受けなかった (データ省略)。しかし、好中球の産生する H_2O_2 、OH-ラジカルは軽度ながら有意に低下させたのである。

Palmitoleic acid の炎症伝達物質に対する影響

アガロースプレートを使った走化性でも、貪食作用でも *palmitoleic acid* は有意の抑制作用を示さなかった ($P>0.05$ 、表 1)。好中球を用いた系、及び無細胞の系で産生される ROS レベルについても有意の抑制作用は見られなかった ($P>0.05$ 、表 2)。残る 2 つの遊離脂肪酸でも、同様に影響を認めなかった (データ省略)。

炎症伝達物質に対するメトロニダゾールと *palmitoleic acid* の相乗効果

Palmitoleic acid 共存下においても、メトロニダゾールは好中球の走化性や貪食作用には有意の抑制作用を示さなかった ($P>0.05$ 、データ省略)。一方、上述した如くメトロニダゾールは単独でも、 H_2O_2 と OH-ラジカルの産生を軽度に抑制しているが、メトロニダゾール単独の場合と比較して、*palmitoleic acid* との共存下では好中球からの O_2^- 、 H_2O_2 、OH-ラジカルの産生を用量依存性に有意に抑制した (図 1~3)。他方、キサンチン-キサンチンオキシダゼ系の ROS 産生には、*palmitoleic acid* とメトロニダゾール

ルの共存下でも影響が見られなかった（データ省略）。メトロニダゾールと palmitoleic acid の間に見られた ROS 産生に対する上記相乗効果は、palmitoleic acid とだけに見られ、他の 2 化合物、C16、C18:1cis9 との共存下では観察されなかった（データ省略）。

各化合物の *P. acnes* に対する MIC, 並びに *P. acnes* の生育阻害に見られたメトロニダゾールと palmitoleic acid の相乗効果

10 株の *P. Acnes* にたいする各化合物の MIC を以下に示す（単位は mic g/ml）。

C16	;	P>400
C16:1cis9	;	3.1~6.3
C18:1cis9	;	P>400
メトロニダゾール	;	P>400

表 3 に示した如く、palmitoleic acid とメトロニダゾールの相互作用を各々の MIC 以下の濃度で検討した。*P. acnes* ATCC6919 をメトロニダゾール 100mic g / ml、palmitoleic acid 2mic g / ml を加えて培養したときの cfu 数は、メトロニダゾール単独時が 2×10^7 、palmitoleic acid 単独時が 2×10^8 に対して、 1.4×10^4 と激減した。他の遊離脂肪酸（C16、C18:1cis9）とメトロニダゾールの相乗あるいは拮抗作用は、palmitoleic acid の場合ほど明確ではなかった。

考察

著者等は先の報告で、メトロニダゾールが好中球の系で ROS を軽度ながら抑制する事を報告した。しかし、この作用をもって、酒さの治療でメトロニダゾールが示す効果を説明することは出来なかった。今までの成績とは違って、本報告では好中球の産生する ROS の全ての種を著名に減少させた。この事は、メトロニダゾールが臨床で示している酒さに対する有効性は、palmitoleic acid との相乗効果に基づく事を示している。メトロニダゾールがヒトの皮膚に達すると、そこに存在している palmitoleic acid と協働して強力に炎症伝達物質の減少を来たすのである。

我々はまた、メトロニダゾールがニキビの炎症も抑制する事を臨床的に明らかにしているが、メトロニダゾールの *in vitro* に於ける *P. acnes* の生育阻害作用は決して強いものではない。これは、ヒトの皮膚には常に palmitoleic acid が存在しているのに対して、通常の *in vitro* 試験では、この遊離脂肪酸の存在しない条件で試験が実施されていることによるのであろう。Palmitoleic acid とメトロニダゾールを共存させた試験系は、ヒトの皮膚の *in vivo* 条件をよく再現したものと考えられる。従って、メトロニダゾールはそれ単独でニキビの治療効果を示すのではなく、せいぜい、培養される嫌気性の *P. acnes* の数をごく軽度に抑制する程度と考えられよう。

Propionibacterium による遊離脂肪酸の生成は、ニキビの病理発生上決して大きな位置を占めるものとは考えられていないが、我々は最近の研究の中で、ある種の遊離脂肪酸

は炎症伝達物質に抑制性の作用を示すことにより炎症に関係している事が明らかになった。ヒト皮膚組織中に存在する遊離脂肪酸は生体防御機構の重要な物理化学的要素と考えられる。

メトロニダゾールと palmitoleic acid の相乗作用により抑制される好中球 ROS の減少と、P.acnes の in vitro 嫌気性条件下の生育阻害との関係は不明である。更に、我々は ROS が、ニキビや酒さ患者の毛嚢上皮の正常構造の保持に対して化学的侵襲を及ぼすらしい事を見出している。テトラサイクリンは、ROS の産生を抑制することにより皮膚科疾患に効果を示すものの1つであり現在も広く使用されている。我々の研究でも、それらの薬剤がP.acnes の菌数を減らすだけでなく、好中球からの ROS の産生も抑制し、好中球由来の炎症伝達物質の減少がニキビの治療に有効に作用するだろうという考えを支持するものであった。

酒さやニキビだけでなく、慢性リュウマチ疾患及び乾癬に対しても、メトロニダゾールの有効性が報告されている。この両疾患についても、好中球で作られる ROS がその病理発生に関与する因子と考えられる事を我々も報告してきた。これまでの研究結果及び今回の成績から、メトロニダゾールの効果は単独で使用する場合であれ、併用で使用する場合であれ、ROS を減少させることにより ROS によって起こる、組織の酸化的障害作用を阻止することによると結論されよう。

酒さの炎症の病理発生はいまだ解明されていない。しかし、炎症伝達物質である ROS は酒さの炎症のスタートに関与するだけでなく、その増悪過程にも関わっていると考えられている。将来、酒さの病理発生が解明された時には、酒さの炎症と好中球の産生する ROS の病理発生上の関係もより正しく、より詳しく解明されると期待さきる

The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: a possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acne

H. Akamatsu¹, M. Oguchi¹, S. Nishijima¹, Y. Asada¹, M. Takahashi², T. Ushijima², and Y. Niwa¹

¹ Department of Dermatology, Kansai Medical University, Moriguchi 570

² Department of Microbiology, Shiga University of Medical Science, Otsu 520-21, Japan

Received March 10, 1990

Summary. Metronidazole is clinically effective in treating not only rosacea but also acne inflammation. Yet it is generally considered not to be very effective in inhibiting the growth of anaerobic *Propionibacterium acnes*. We report here our investigation into the synergistic effects of metronidazole and palmitoleic acid on the anaerobic growth of *P. acnes* as well as on human neutrophil functions, including the generation of reactive oxygen species (ROS). Both metronidazole and palmitoleic acid, when used alone, only slightly inhibited the growth of *P. acnes*, and no significant decrease in human neutrophil functions, including the generation of ROS, was observed. But metronidazole used in the presence of palmitoleic acid markedly inhibited the anaerobic growth of *P. acnes* and decreased ROS generation by neutrophils. However, ROS generated in the xanthine-xanthine oxidase system were not affected. Metronidazole was shown to be clinically effective by decreasing neutrophil-generated ROS at the sites of inflammation with the aid of palmitoleic acid, which is generally present in human skin. By inhibiting oxidative tissue injury under in vivo conditions, treatment with metronidazole results in remarkable improvement of rosacea and acne.

Key words: Metronidazole — Palmitoleic acid — Free radical inhibitory effect — Rosacea — Acne

that metronidazole is not very effective in inhibiting the growth of *Propionibacterium acnes* in vitro.

We have previously reported that metronidazole slightly decreases one of the most potent inflammatory mediators, reactive oxygen species (ROS) [12]. The clinical effectiveness of metronidazole in treating rosacea may possibly be attributed to its inhibition of ROS generation by neutrophils. However, since the data from our previous study did not clearly reveal the scavenging effects of metronidazole on neutrophil-generated ROS, no sufficient explanation was offered as to how metronidazole is effective in treating rosacea.

Recently, free fatty acids have been shown to have various effects on different inflammatory-mediating neutrophil functions, including chemotaxis, phagocytosis and ROS generation. In order, therefore, to investigate the difference in effectiveness of metronidazole between in vitro and in vivo conditions, we evaluated what synergistic role free fatty acids, which are generally present in human skin, may play.

Metronidazole was combined with several kinds of free fatty acids, including C₁₆, C₁₆:1 *cis*9, and C₁₈:1 *cis*9, and after determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of each agent, the synergistic effects on the anaerobic growth of *P. acnes* were analysed. The results revealed that metronidazole in the presence of palmitoleic acid (C₁₆:1 *cis*9) markedly inhibited the growth of *P. acnes* in vitro and reduced neutrophil-generated ROS.

Materials and methods

Chemicals

Three amounts of metronidazole (5, 50 and 100 µg/ml) (Shionogi Pharmaceutical Company, Osaka, Japan), were combined with 0.05, 0.5 and 5 µg/ml respectively of palmitoleic acid (C₁₆:1 *cis*9), palmitic acid (C₁₆) and oleic acid (C₁₈:1 *cis*9) (Nakarai Chemicals, Kyoto, Japan) and introduced to the three neutrophil function assay systems described below.

Metronidazole, an imidazole, is known to inhibit the growth of fungi, *Trichomonas* and anaerobic bacillus. Recently, the effectiveness of metronidazole in treating rosacea has been reported [20, 22]. In addition, it has been demonstrated clinically that metronidazole is effective in reducing acne inflammation [1]. However, it is well known

Offprint requests to: Yukie Niwa, M. D., Ph. D., Niwa Institute for Immunology, 4-4 Asahimachi, Tosashimizu, Kochi-ken, 787-03, Japan

Neutrophil preparation

Neutrophils were isolated from heparinized venous blood from healthy volunteers according to our previously described method [17], by which the viability of the harvested neutrophils was always greater than 99%, according to the trypan-blue exclusion test, and above 900 dpm for [^{14}C] inulin uptake which measures phagocytic activity [23]. The neutrophils were then resuspended in media appropriate for their subsequent use: RPMI for assay of agarose plate chemotactic activity; Krebs Ringer phosphate (KRP) buffer [6] for phagocytosis; KRP containing 5 mM glucose for OH \cdot generation; and KRP buffer containing 5 mM glucose and 1 mg/ml gelatin for the assaying of O $_2^-$ and H $_2$ O $_2$ generation.

Neutrophil chemotaxis assay

Neutrophil chemotactic activities were measured using agarose plates [15], which were prepared by mixing 2.5 ml of 2.4% agarose solution with 2.5 ml of twice normal RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Three wells, each with a diameter of 3 mm, were cut on a straight axis at 8-mm intervals. Neutrophil suspension (10 μ l) with RPMI medium containing 1×10^8 cells/ml was added to the centre well. To the outer well, 10 μ l of 10^{-7} M *n*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) was added as a chemoattractant. To the inner well, 10 μ l of the RPMI 1640 medium was added as a control. The plates were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO $_2$ in air for 2 h. The distance travelled by the ten fastest neutrophils toward the outer well (true chemotaxis) and the inner well (random migration) was measured with a microprojector.

Neutrophil phagocytosis assay

Emulsions of paraffin oil containing oil red O were prepared, as previously described [24], except that a lipopolysaccharide solution (endotoxin) was replaced with normal human serum. The emulsion was incubated with an equal volume of normal human serum at 37°C for 30 min for opsonization. Neutrophils (2×10^7 cells/0.9 ml KRP) were added with 0.1 ml of the opsonized emulsion and the mixture incubated for 5 min at 37°C. Ice-cold KRP (9 ml) was then added to the solution to stop the reaction. The cells were washed three times with ice-cold KRP to remove the paraffin oil droplets that had not been ingested. Paraffin oil containing oil red O was extracted from the cells by the method of Bligh and Dyer [3], using chloroform and methanol (1:2 v/v), and the optical density of the chloroform layer was determined at a wavelength of 525 nm.

It was confirmed as previously described [18] that most of the extracted oil red O represented droplets ingested by the neutrophils.

Neutrophil ROS generation assay

Neutrophil ROS generation was assessed according to our previous methods [16–18]. In O $_2^-$ formation, 1×10^6 neutrophils preincubated at 37°C for 10 min with 1 mg/ml opsonized zymosan (Sigma, St. Louis, MO, USA) were incubated with 0.1 mM ferricytochrome *c* (type III, Sigma). The supernatant (0.1 ml) was assayed for reduced cytochrome *c* by measuring absorbance at 550 nm [7, 10]. The results were converted to nanomoles of reduced cytochrome *c*, using $\Delta E_{550} \text{ nm} = 2.1 \times 10^4 / \text{M} / \text{cm}$ [21].

H $_2$ O $_2$ generation was measured by quantifying the decrease in fluorescence intensity of scopoletin (Sigma) due to its peroxidase-mediated oxidation by H $_2$ O $_2$ [21]. Scopoletin (0.1 ml, 50 mM) and 0.05 ml of 1 mg/ml horseradish peroxidase (type II; Sigma) were added to the suspensions of 2.5×10^6 neutrophils preincubated at room temperature for 10 min with 1 mg/ml opsonized zymosan.

The H $_2$ O $_2$ -plus-peroxidase-induced rate of decrease in fluorescence intensity of the scopoletin within 30 min was quantified using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). To calculate H $_2$ O $_2$ concentration, we assumed that 1 mol H $_2$ O $_2$ oxidized 1 mol scopoletin [21].

OH \cdot was quantified by taking the amount of ethylene formed from α -keto-methylbutyric acid (KMB) (Sigma) plus the OH \cdot generated by neutrophils [8]. Neutrophils (2×10^6) preincubated with 1 mM KMB in a stoppered tube were added with opsonized zymosan. Aliquots of gas in the tube were sampled using a gas-tight syringe, and the ethylene content was determined using a gas chromatograph (Hitachi).

ROS generation assay in the xanthine-xanthine oxidase system

All ROS were also measured in the xanthine-xanthine oxidase system. Instead of adding neutrophils and opsonized zymosan, 0.1 mM hypoxanthine, 1.25 mM EDTA and 16.5 μ M ferricytochrome *c* were mixed in a total volume of 2 ml (125 mM phosphate buffer). After the addition of the amounts of metronidazole and/or palmitoleic acid indicated above, approximately 0.006 units/ml dialysed xanthine oxidase were added to generate ROS [18].

Triplicate assays were performed in each experiment; the results are expressed as the mean \pm SE of replicate assays. Statistical significance was ascertained by Student's *t*-test.

Determination of MIC and synergistic effect of metronidazole with palmitoleic acid on the growth of *P. acnes*

The MIC was determined basically by the medium dilution method as described by the Japanese Society of Chemotherapy [5, 9]. Overnight cultures of 10 strains of *P. acnes* (ATCC 11827, K-33, K-11, K-15, ATCC 6919, VPI-23, K-10, K-43, K-27, K-29) were each diluted to a density of approximately 10^6 colony-forming units (cfu)/ml, in modified GAM broth (Nissui, Tokyo, Japan) and inoculated by a multiple inoculum replicator (Sakuma, Tokyo, Japan) to the test plates containing two-fold dilutions of metronidazole, C $_{16}$, C $_{16}$:1 *cis*9 or C $_{18}$:1 *cis*9. The medium used to determine the MIC was heart infusion broth (Nissui) supplemented with 0.1% glucose, 0.02% L-cysteine HCl-H $_2$ O, and 1.5% agar. The MICs of these agents were determined after anaerobic (N $_2$ 90%, CO $_2$ 10%) incubation at 37°C for 48 h.

The effect of metronidazole with C $_{16}$, C $_{16}$:1 *cis*9 or C $_{18}$:1 *cis*9 on the anaerobic growth of *P. acnes* in liquid medium was studied using *P. acnes* ATCC 6919. The medium used was heart infusion broth (Nissui) supplemented with 0.1% glucose and 0.02% L-cysteine HCl-H $_2$ O. Two-fold dilution of the agent lower than MIC was prepared and 2 ml of each dilution was dispensed into sterilized glass tubes (12 \times 120 mm). The tubes were inoculated with one drop of the cell suspension of *P. acnes* (10^6 cfu/ml) in modified GAM broth. The amount of the organism was determined by quantitative culture after anaerobic incubation at 37°C for 3 days.

Results

The effect of metronidazole on inflammatory mediators

As shown in Table 1, metronidazole used alone did not significantly affect either neutrophil chemotaxis or phagocytosis ($P > 0.05$). ROS levels generated in both neutrophil and cell-free systems are reported in detail in our previous study [12]. Briefly, the O $_2^-$, the H $_2$ O $_2$ and

Table 1. Effects of metronidazole or palmitoleic acid on neutrophil chemotaxis and phagocytosis

Assay	Metronidazole ($\mu\text{g/ml}$)			Palmitoleic acid ($\mu\text{g/ml}$)			Control
	5	50	100	0.05	0.5	5	
Neutrophil chemotaxis (agarose plate) (mm)	23.3 \pm 1.52	22.6 \pm 1.15	22.6 \pm 1.52	22.0 \pm 1.73	21.5 \pm 1.71	21.4 \pm 1.44	22.3 \pm 1.52
Neutrophil phagocytosis (uptake of oil red O) ($10^{-2} \times \text{OD}$)	4.13 \pm 0.31	4.11 \pm 0.28	3.9 \pm 0.33	4.3 \pm 0.58	3.9 \pm 0.79	4.16 \pm 0.18	4.4 \pm 0.29

Table 2. Effects of palmitoleic acid on reactive oxygen species levels generated in both neutrophil and xanthine-xanthine oxidase system

Palmitoleic acid ($\mu\text{g/ml}$)	Neutrophils			Xanthine-xanthine oxidase		
	O_2^-	H_2O_2	$\text{OH}\cdot$	O_2^-	H_2O_2	$\text{OH}\cdot$
0	2.67 \pm 0.25	894.3 \pm 35.7	27.7 \pm 6.28	1.21 \pm 0.03	516.7 \pm 50.3	166.6 \pm 12.17
0.05	2.75 \pm 0.39	909.3 \pm 38.0	28.0 \pm 5.29	1.21 \pm 0.02	506.7 \pm 58.6	171.4 \pm 1.02
0.5	2.79 \pm 0.39	923.7 \pm 34.4	28.9 \pm 6.30	1.21 \pm 0.04	533.7 \pm 41.7	164.2 \pm 5.16
5	3.02 \pm 0.17	863.7 \pm 118.7	28.0 \pm 4.69	1.21 \pm 0.01	526.3 \pm 69.8	178.3 \pm 11.99

the $\text{OH}\cdot$ generated in the xanthine-xanthine oxidase system were not significantly changed in the presence of metronidazole (data not shown). However, metronidazole slightly decreased H_2O_2 and $\text{OH}\cdot$ generated by neutrophils [12].

The effect of palmitoleic acid on inflammatory mediators

Neither agarose plate chemotaxis nor phagocytosis were significantly decreased in the presence of palmitoleic acid ($P > 0.05$) (Table 1). ROS generated in both cell and cell-free systems were also not reduced with addition of palmitoleic acid ($P > 0.05$) (Table 2). Other free fatty acids, including C_{16} and $\text{C}_{18}:1 \text{ cis}9$, did not decrease neutrophil chemotaxis and phagocytosis (data not shown).

The synergistic effect of metronidazole with palmitoleic acid on inflammatory mediators

Metronidazole in the presence of palmitoleic acid did not significantly inhibit neutrophil chemotaxis and phagocytosis ($P > 0.05$) (data not shown). However, although metronidazole alone, as described above, slightly decreased H_2O_2 and $\text{OH}\cdot$ [12], O_2^- , H_2O_2 and $\text{OH}\cdot$ generated by neutrophils were markedly decreased in a dose-dependent manner in the presence of both metronidazole and palmitoleic acid, compared to control (in the presence of 5, 50 or 100 $\mu\text{g/ml}$ metronidazole without palmitoleic acid) (Figs. 1–3). On the other hand, none of the ROS generated in the xanthine-xanthine oxidase system was affected by metronidazole together with palmitoleic acid (data not shown). These synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid observed on ROS levels

Table 3. Synergistic effects of metronidazole with free fatty acids on the inhibition of the growth of anaerobic ATCC 6919 expressed as the number of colony-forming units/ml cultured in vitro as described in the text

Metronidazole	Control*	C_{16} 100 mg/ml	$\text{C}_{16}:1 \text{ cis}9$ 2 $\mu\text{g/ml}$	$\text{C}_{18}:1 \text{ cis}9$ 100 $\mu\text{g/ml}$
100	2.0×10^7	5.8×10^6	1.4×10^4	1.2×10^7
50	3.2×10^7	2.6×10^7	7.8×10^6	3.6×10^7
0	2.2×10^8	1.0×10^8	2.0×10^8	2.1×10^9

* Without any free fatty acid

were not found when metronidazole was used together with the other free fatty acids (C_{16} and $\text{C}_{18}:1 \text{ cis}9$) (data not shown).

MIC of each agent and synergistic effect of metronidazole with palmitoleic acid on anaerobic growth of *P. acnes*

The MIC of each agent on ten strains of *P. acnes* was as follows: $\text{C}_{16} > 400 \mu\text{g/ml}$; $\text{C}_{16}:1 \text{ cis}9$: 3.1–6.3 $\mu\text{g/ml}$; $\text{C}_{18}:1 \text{ cis}9 > 400 \mu\text{g/ml}$; and metronidazole $> 400 \mu\text{g/ml}$.

As shown in Table 3, the synergistic effect of metronidazole with palmitoleic acid was tested using concentrations lower than the MIC. In the *P. acnes* ATCC 6919 culture containing 100 $\mu\text{g/ml}$ metronidazole and 2 $\mu\text{g/ml}$ palmitoleic acid, the number of colony-forming units was markedly decreased to 1.4×10^4 as compared to the number of units in the culture of metronidazole alone (2.0×10^7) and in the culture of palmitoleic acid alone (2.0×10^8). The synergistic and inhibitory effects of metronidazole with other free fatty acids (C_{16} and $\text{C}_{18}:1$

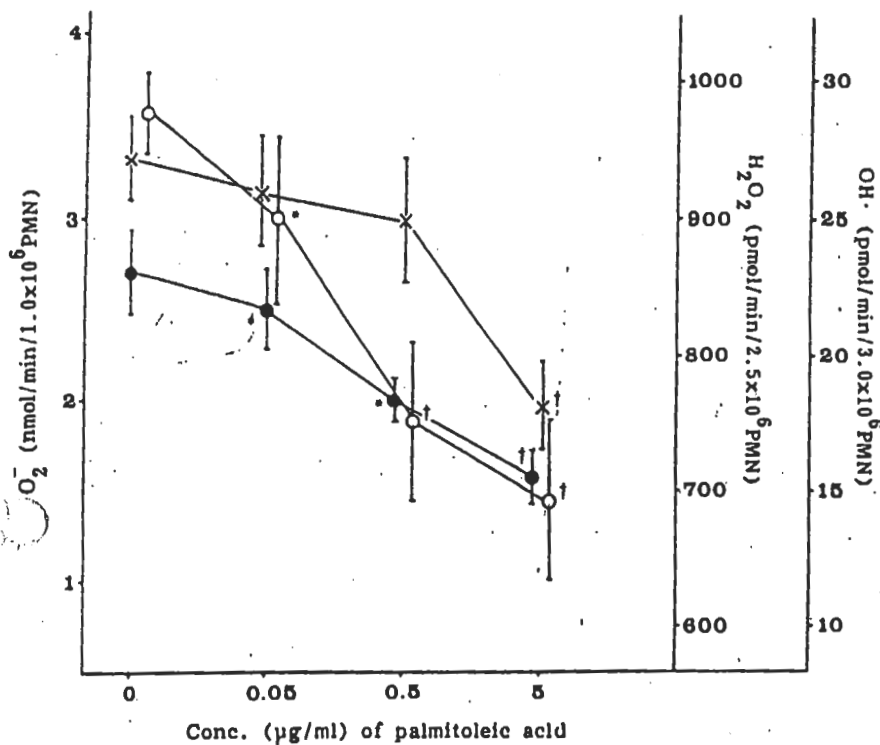


Fig. 1. Synergistic effect of 5 µg/ml metronidazole with various amounts of palmitoleic acid on reactive oxygen species (ROS) generated by neutrophils. The indicated amounts of palmitoleic acid were introduced into ROS assay medium in the presence of 5 µg/ml metronidazole, and each ROS was assessed as described in the text. (●), O_2^- levels; (○), H_2O_2 levels; (×), $OH \cdot$ levels, * $0.01 < P < 0.05$ versus control (in the presence of 5 µg/ml metronidazole without palmitoleic acid); † $P < 0.01$

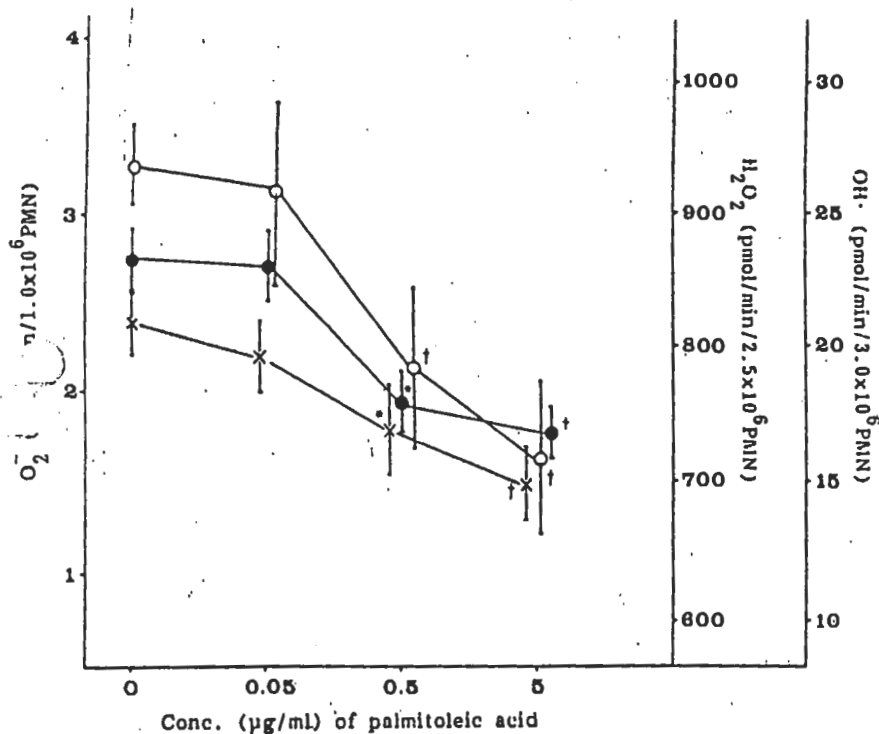


Fig. 2. Synergistic effect of 50 µg/ml metronidazole with various amounts of palmitoleic acid on ROS generated by neutrophils. The indicated amounts of palmitoleic acid were introduced into ROS assay medium in the presence of 50 µg/ml metronidazole, and each ROS was assessed as described in the text. ●, O_2^- levels; ○ H_2O_2 levels; ×, $OH \cdot$ levels. * $0.01 < P < 0.05$ versus control (in the presence of 50 µg/ml metronidazole without palmitoleic acid); † $P < 0.01$.

cis9) on the growth of *P. acnes* ATCC 6919 was not nearly so marked (Table 3).

Discussion

Although we have previously reported that metronidazole slightly decreased some ROS generated only in the neutrophil system [12], such a decrease is insufficient

to explain completely the remarkable effectiveness of metronidazole in treating rosacea. In contrast to our previous results, which demonstrated the inhibitory effects of metronidazole on the neutrophil system [12], the present study revealed marked decreases in all kinds of ROS generated by neutrophils. This suggests that the clinical effectiveness of metronidazole on rosacea, previously reported [20, 22], is due to its synergistic effects in combination with palmitoleic acid. When introduced

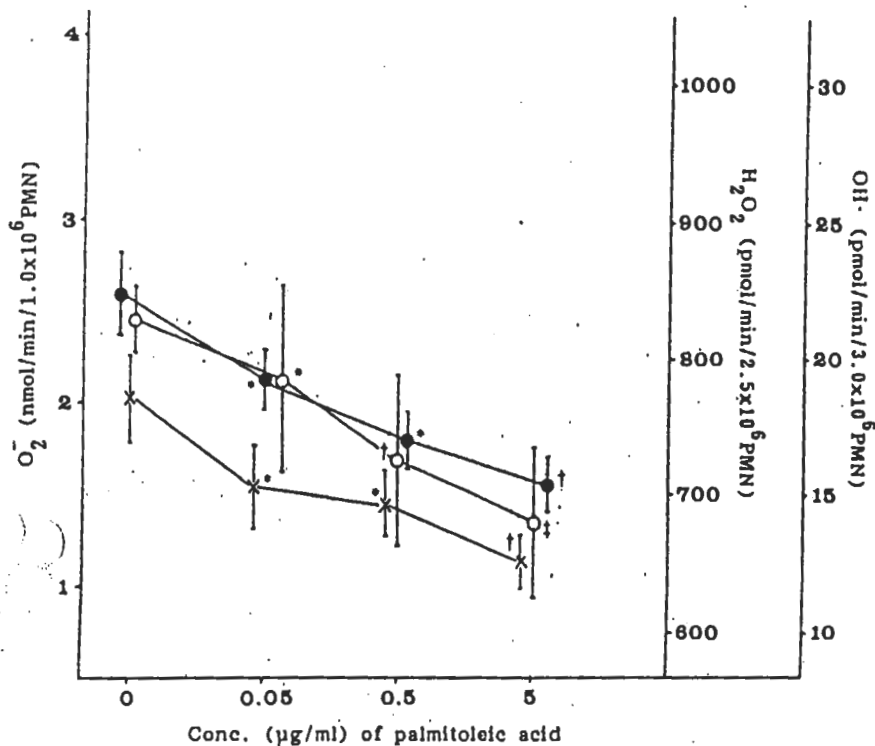


Fig. 3. Synergistic effect of 100 µg/ml metronidazole with various amounts of palmitoleic acid on ROS generated by neutrophils. The indicated amounts of palmitoleic acid were introduced into ROS assay medium in the presence of 100 µg/ml metronidazole, and each ROS was assessed as described in the text. ●, O₂⁻ levels; ○, H₂O₂ levels; ×, OH· levels. * 0.01 < P < 0.05 versus control (in the presence of 100 µg/ml metronidazole without palmitoleic acid); † P < 0.01; ‡ P < 0.001

into human skin tissue, in which palmitoleic acid is present, metronidazole causes a reduction in potent inflammatory mediators.

In addition, although we have clinically demonstrated the effectiveness of metronidazole in reducing acne inflammation [1], the drug is known to be not very effective in inhibiting the growth of *P. acnes* in vitro. It is considered that, while human skin tissue in vivo contains free palmitoleic acid, conventionally performed in vitro culture systems do not contain it. The experimental system using metronidazole together with palmitoleic acid mimics well the in vivo state of human skin. It is not unreasonable, therefore, that metronidazole alone is clinically effective in treating acne in human skin while only being slightly effective in reducing cultured anaerobic *P. acnes*.

Although the generation of free fatty acids caused by propionibacterium has been considered to play a lesser role in the pathogenesis of acne inflammation [19], one of our recent studies has found that some kinds of free fatty acids are implicated in inflammation through their inhibitory effect on certain inflammatory mediators. Free fatty acids present in human skin tissue seem to imply the physicochemical importance for a self-defence mechanism.

It remains unclear how decreases in neutrophil-generated ROS, induced by the synergistic effect of the two agents, is related to the inhibition of anaerobic growth of *P. acnes* in in vitro culture. Nonetheless, we have recently found that ROS may induce chemical insults to the integrity of the follicular epithelium in cases of acne [13, 14] and rosacea [12]. Tetracycline is one of the drugs that are effective in treating dermatological diseases through a decrease in ROS generation, and is widely used. Our

study shows that such drugs not only act to reduce the number of *P. acnes* but also to inhibit the generation of ROS by neutrophils, thus supporting the hypothesis that the inhibition of neutrophil-generated inflammatory mediators may result in effective acne treatment [13, 14].

It has been reported that, as well as rosacea and acne, rheumatoid diseases [2] and psoriasis [4] may be effectively treated with metronidazole. For both of these diseases, we have already demonstrated that neutrophil-generated ROS may be considered pathogenetic factors [11, 16]. From the results of previous studies [2, 4, 11, 12, 16] and those of the study reported here, it may be concluded that the effectiveness of metronidazole, whether used alone or synergistically, is ascribable to a decrease in ROS with a resultant inhibition of oxidative tissue injury.

The pathogenesis of rosacea inflammation has yet to be elucidated. It may, however, be considered that the inflammatory mediators, ROS, contribute both to the initiation of, and to an increase in, rosacea inflammation. It may be expected that future clarification of the pathogenesis of rosacea will elucidate further the exact and detailed pathogenetic relationship between neutrophil-generated ROS and rosacea inflammation.

References

1. Akamatsu H, Oguchi M, Asada M, Kubo K, Namura S, Shirai K, Nishijima S, Asada Y (1987) Treatment of acne with oral metronidazole. Proceedings of the 5th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, 6-7 Nov, Cheju, Korea; pp 137-140
2. Bingham R (1985) Anti-malarial and anti-protozoal drugs in the treatment of rheumatoid diseases. A preliminary report.

- 16th International Congress of Rheumatology, Sydney, Australia Excerpta Medica, Elsevier Science Publishers. BV, Amsterdam, p 22
3. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
 4. Ely PH (1985) Flagyl: beneficial in psoriasis? *Schoch Lett* 35:9-13
 5. Goto S, Kawakita T, Kozaki N, Mitsuhashi S, Nishino T, Osawa N, Tanami H (1981) Methods for determination of minimum inhibitory concentration (MIC). *Chemotherapy* 29:76-79
 6. Johnson AR, Erdos G (1977) Metabolism of vasoactive peptides by human endothelial cells in culture. *J Clin Invest* 59:684-695
 7. Johnston RB Jr, Lehmyer JE (1976) Elaboration of toxic oxygen by-products by neutrophils and a model of immune complex disease. *J Clin Invest* 57:836-841
 8. Klebanoff SJ, Rosen H (1978) Ethylene formation by polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 148:490-505
 9. Kosakai N, Ueno K, Goto S, Mihashi S, Nakayama K, Shimada K, Tamai K, Oguri T (1972) Agar dilution procedure for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Chemotherapy* 27:559-561
 10. Massey V (1959) The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome-c. *Biochim Biophys Acta* 34:255-256
 11. Miyachi Y, Niwa Y (1983) Effects of psoriatic sera on the generation of oxygen intermediates by normal polymorphonuclear leukocytes. *Arch Dermatol Res* 275:23-26
 12. Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y (1986) Anti-oxidant action of metronidazole: a possible mechanism of action in rosacea. *Br J Dermatol* 114:231-234
 13. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y (1986) Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol* 86:449-453
 14. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y (1987) Anti-inflammatory activities of tetracyclines are partly exerted by their anti-oxidant effect. *Proceedings of the 4th International Congress of Pediatric Dermatology*. Urabe H, Kimura M, Yamamoto K, Ogawa H (eds) University of Tokyo Press, Tokyo, pp 291-294
 15. Nelson RD, Quie PG, Simmons RL (1977) Chemotaxis under agarose. A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 115:1650-1656
 16. Niwa Y, Sakane T, Shingu M, Yokoyama MM (1983) Effect of stimulated neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis on lymphocytes - a possible role of increased oxygen radicals generated by the neutrophils. *J Clin Immunol* 3:228-240
 17. Niwa Y, Sakane T, Shingu M, Yanagida I, Komura J, Miyachi Y (1985) Neutrophil-generated active oxygens in linear IgA bullous dermatosis. *Arch Dermatol* 121:73-78
 18. Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, Kanoh T (1989) Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci* 44:1655-1664
 19. Puhvel SM, Sakamoto M (1977) A re-evaluation of fatty acids as inflammatory agents in acne. *J Invest Dermatol* 68:93-99
 20. Pye RJ, Burton JL (1976) Treatment of rosacea by metronidazole. *Lancet* i:1211-1215
 21. Root RK, Metcalf JA (1972) H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis. *J Clin Invest* 60:1266-1279
 22. Saihan EM, Burton JL (1980) A double-blind trial of metronidazole versus oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* 102:443-448
 23. Skosey JL, Damgaard E, Chow DC, Sorensen LB (1974) Modification of zymosan-induced release of lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes by cytochalasin B. *J Cell Biol* 62:625-634
 24. Stossel TP (1973) Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood* 42:121-130