

抗生物質の腎毒性に関する研究 I

シロネズミ腎の蛋白代謝およびリソゾーム膜に及ぼす影響を中心に

梅田 隆・小磯 謙吉

東京大学医学部泌尿器科学教室

(昭和 52 年 3 月 31 日受付)

緒 言

抗生物質の投与によって生じる腎障害の本態については、組織学的¹⁻³⁾、または腎機能の面からの探求が試みられていたが⁴⁻⁶⁾、未だ不明な点が多い。今回我々は抗生物質による腎障害の原因を追求する 1 つの方法として生化学的に、とくに抗生物質の腎の蛋白代謝およびリソゾーム膜の安定性に及ぼす影響について検討した。

実験方法

使用した抗生物質はストレプトマイシン (以下 SM と略す)、セファロシン (CET)、セファロリジン (CER)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、コリスチン (CL)、ゲンタマイシン (GM)、クロラムフェニコール (CP) の 8 種類である。

実験動物、抗生物質の投与方法

1 種類の抗生物質につきウイスター系雄シロネズミ (体重 280~300 g) 2 匹を使用した。腹腔内に CET 30 mg, TC 10 mg, 腎筋内に CER 30 mg, KM 10 mg, SM 10 mg, CP 10 mg, CL 3×10^4 単位, GM 0.5 mg を 5 日間連日注射した。抗生物質の投与中は水を自由に与え、食餌は餌育用ペレットを与えた。対照群には生水を腹腔内に注射した。6 日目に腎を摘出した。

核標識物質および酵素基質

L-ロイシン-¹⁴C (240 mCi/mmol, uniformly labeled), オロチン酸-6-¹⁴C (282 mCi/mmol), ATP, AFP, グルタミン酸, フォスホクレアチニン (ナトリウム塩), クレアチニン, カイネースは第 1 化学社製を使用した。ガニトロフェニール磷酸は F. C. ベーリンガー、ゼーネ社から購入した。

核分画の分離

シロネズミ腎 2 個 (約 4 g) を 0.003 M MgCl₂ を含む 0.25 M 蔗糖溶液 20 ml で 10 ストローク、ホモジナイズした。ホモジネートを 3 分間、1,000×g で遠心し、沈渣を上記溶液で 3 回洗ったのち、0.05 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ を含む 2.2 M 蔗糖溶液 7 ml を加え、3 ストローク、ホモジナイズしたのち、SW 25 ロータを用いて 4,000 回転で 25 分間遠心した。得られた沈渣を前記 2.2 M 蔗糖溶液 3 ml にサスペンドし、10% Tween 40,

10% DPC を 2:1 に溶かした溶液 0.45 ml を加え膜分画を溶かしたのち 1,000×g で遠心し沈渣を核分画として使用した。

核分画の RNA へのオロチン酸-6-¹⁴C の取り込み 5-mM メルカプトエタノール, 10 mM ATP 3 mM MgCl₂, 60 mM KCl を含む 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.2) 0.5 ml にオロチン酸-6-¹⁴C, 5 μ Ci を加え、核分画を蛋白量にして 5~6 mg を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。反応終了後、0.1 M NaCl 1 mM EDTA を含む 1 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加えたのち sodium dodecyl sulfate を最終濃度 0.5% となるように加え、30°C で透明となるまで攪拌した。次いで 22°C に保った 88% フェノール液を加えると、溶液は 2 層に分離し、上層に RNA が含まれた。さらに上層をトリス緩衝液中で 24 時間、4°C で透析した。透析後、溶液の 1/2 量の 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl を含む 1 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) を加え、2% になるように酢酸ナトリウム液を加え、それに 2 倍量の冷エタノールを加えた。5 分間 3,000 回転で遠心し RNA を沈澱させ、沈渣を 0.3 M KOH 溶液に溶解し、シンチレーション液 (PPO 4 g, POPO 1 g を 1 L のトルエン:エタノール, 2:1 の割合に溶かしたもの) を加えてから Tri-Carb 液体シンチレーション、カウンターで測定した。RNA の量は 260 m μ で吸光度を測定、比活性値を算出した。RNA の extinction coefficient は 34.2 mg/ml/cm とした。

遊離型および膜付着型ポリソーム分画の RNA へのオロチン酸-6-¹⁴C の取り込み実験

5 日間抗生物質を投与後、腎を摘出する 3 時間前に 100 μ Ci のオロチン酸-6-¹⁴C をシロネズミの腹腔内に注射した。取り出した腎 2 つ (約 4 g) を 3 倍量の 50 mM トリス-塩酸緩衝液 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM メルカプトエタノールを含む 0.25 M の蔗糖溶液 (pH 7.6) でホモジナイズした。15 分間 10,000×g で遠心し、ミトコンドリアを沈澱させた上清 3 ml を蔗糖濃度を 2 M にした上記溶液 1.5 ml と 0.5 M の蔗糖濃度にした上記溶液 1.5 ml の不連続蔗糖密度勾配の上に重層し 6 ml の遠心管で遠心した。超遠心器は日立製作所製 55 型を使

用し、4°Cで3時間半、160,000×gで超遠心した。遊離型ポリソーム分画は遠心管の底に透明な沈渣として沈澱した。膜付着型ポリソーム分画は0.5Mと2Mの蔗糖溶液の境界に混濁した層として得られた。膜付着型ポリソーム分画に終末濃度1.3%となるように5%デオキシコール酸を加え、ポリソーム分画から膜成分を離した。1M蔗糖を含む上記溶液3mlの上にデオキシコール酸処理後の膜付着型ポリソーム分画3mlを重ねし、160,000×gで1時間超遠心した。膜付着型ポリソーム分画は沈渣として得られた。遊離型および膜付着型ポリソーム分画の蛋白量にして5~6mgに冷やしたトリクロ酢酸を終末濃度5%となるように加え直ちに遠心した。沈渣を5%トリクロ酢酸でさらに2度洗滌し得られた沈渣に0.5N KOHを2.5ml加えて37°Cで60分加温し溶解した。3.0N HClを0.5ml加え15,000×gで30分間4°Cで遠心した⁷⁾。上清の0.1mlの放射能を測定した。また、上清のRNA量を260mμにおける吸光度から算出し比活性値を算出した。

遊離型および膜付着型ポリソーム分画へのL-ロイシン-¹⁴Cの取り込み実験

5日間抗生物質を投与後、腎を摘出する3時間前に100μCiのL-ロイシン-¹⁴Cをシロネズミの腹腔内に注射した。遊離型および膜付着型ポリソーム分画は上記のように行なった。各分画の蛋白量にして5~6mgに冷やしたトリクロ酢酸を終末濃度5%となるように加え直ちに遠心した。沈渣を5%トリクロ酢酸でさらに2度洗滌し得られた沈渣に0.5N KOHを2.5ml加えて37°Cで60分加温し溶解した。3N HClを0.5ml加え15,000×gで30分間4°Cで遠心した。RNA量は上清の260mμにおける吸光度から算出した。沈渣に0.5N KOHを0.5ml加え溶解し、0.1mlの放射能を測定し、一定量のRNAに対する蛋白に取り込まれたL-ロイシン-¹⁴Cの放射能を算出した。

無細胞蛋白合成系

0.5mlの50mM トリス-塩酸緩衝液、5mM MgCl₂、50mM KCl、10mM KHCO₃を含む0.25M蔗糖溶液(pH7.8)に終末濃度が各々1mM ATP、0.25mM GTP、10mM グルタチオン、10mM 磷酸クレアチニン、50~200μg/mlのクレアチニン、カイネース、5μCiのL-ロイシン-¹⁴C、上記の方法で取った0.1mlの遊離型、膜付着型ポリソーム分画(蛋白量5~6mg)、上記160,000×gの上清を加えて、1時間37°Cの恒温槽でインキュベートした。抗生物質は10μg/mlとなるように加えた。GMだけは2μg/mlとなるように加えた。インキュベート後冷やしたトリクロ酢酸を終末濃度5%となるように加え直ちに遠心した。以下、上記*in vivo*に投

与されたL-ロイシン-¹⁴Cを測定するのと同様に行なった。

リソゾーム膜の分離

DE DUVEの変法⁸⁾によりリソゾーム膜とその上清を分離し、それぞれの酸フォスファターゼ値、蛋白量をBESSEY-LOWRY法⁹⁾、LOWRY法¹⁰⁾で測定、リソゾーム膜および上清各々の一定量の蛋白量に対する酸フォスファターゼ値の比を算出した。上清について算出した値をリソゾーム膜分画について算出した比の値で割った。

実験成績

シロネズミ腎の核RNAへのオロチン酸-6-¹⁴Cの取り込みはKM, SM, GM, CL, CPで低下しているのが認められた(Fig.1)。

遊離型ポリソーム分画のRNAへのオロチン酸-6-¹⁴Cの取り込み率はKM, SM, CL, TCの投与で低下が認められた(Fig.2)。L-ロイシン-¹⁴Cの遊離型ポリソーム分画の蛋白への取り込みはSM, TC, CPの投与で低下していた(Fig.3)。膜付着型ポリソーム分画のRNA蛋白へのオロチン酸-6-¹⁴Cの取り込みはKM, SM, CL, TC, CP, CETで軽度の低下が認められたが(Fig.4) L-ロイシン-¹⁴Cの取り込みはSM, CL, で低下が認められた(Fig.5)。

無細胞蛋白合成系に直接添加した抗生物質の遊離型ポリソーム分画へのL-ロイシン-¹⁴Cの取り込みはKM, SM, GM, CPで著るしく低下していた(Fig.6)。膜付着型ポリソーム分画へのL-ロイシン-¹⁴Cの取り込みはKM, SM, GM, CLで同様に著るしく低下を示した(Fig.7)。

ライソゾーム膜とその上清の酸フォスファターゼ値の比はKMの投与で著るしい低下を示しSM, CLでも比の値は低下していた(Fig.8)。

考 按

蛋白合成の場であるリボゾームには遊離型のもの、小胞体に付着した膜付着型のもが存在し、一般に分泌型の蛋白は膜付着型リボゾーム上で合成されていると考えられている^{11,12)}。CAMPBELL¹³⁾は細胞外に放出される蛋白や膜、ミクロボディなどのオルガネラの蛋白は膜付着型リボゾームで、その他の蛋白は遊離型リボゾームで合成されているという考えを示している。腹腔内および腎筋内に注射した抗生物質のうち、腎の核のRNA代謝を障害するものはKM, SM, GM, CL, CPであった。遊離型ポリソーム分画のRNA代謝はSM, KM, CLの3者によって障害され、蛋白へのアミノ酸の取り込みはSM, TC, CPによって阻害された。膜付着型ポリソーム分画のRNA合成はKM, SM, CPで低下し、CETでも軽度の低下を認められたが、アミノ酸の蛋白への取

Fig. 1 Effects of antibiotics on the incorporation of orotic acid-6-¹⁴C into RNA of rat renal nuclear fraction *in vivo*

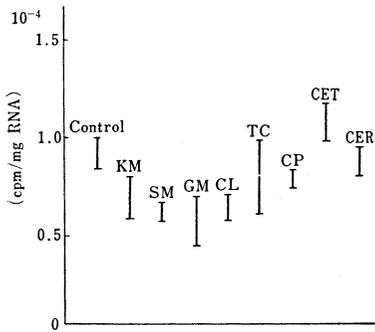


Fig. 3 Effects of various antibiotics on the incorporation of L-leucine-¹⁴C into rat renal free polysome fraction *in vivo*

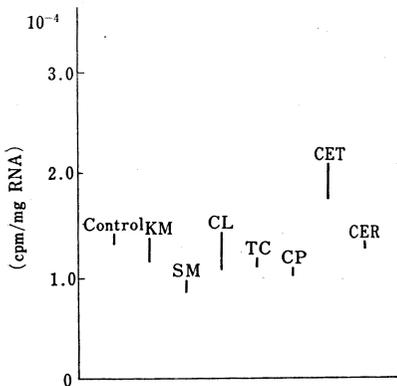


Fig. 5 Effects of various antibiotics on the incorporation of L-leucine-¹⁴C into the rat renal bound polysome fraction (antibiotics injected *in vivo*)

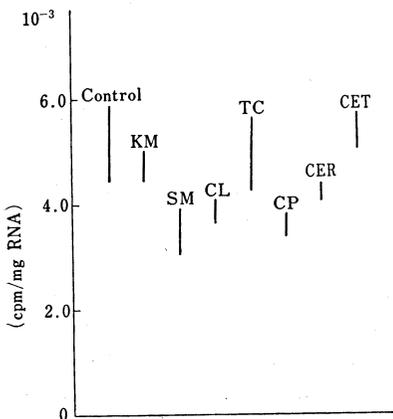


Fig. 2 Effects of various antibiotics on the incorporation of orotic acid-6-¹⁴C into RNA of free polysome fraction from rat kidney slices

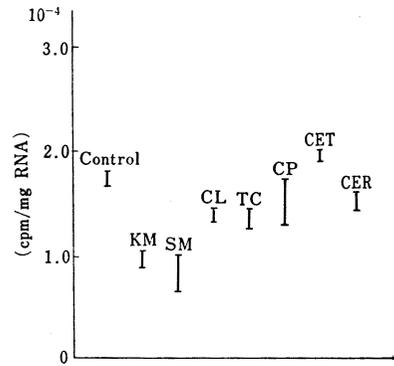
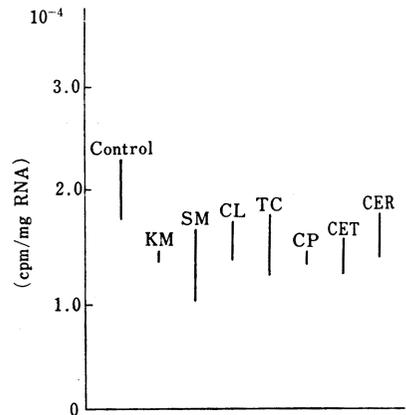


Fig. 4 Effect of antibiotics on incorporation rate of orotic acid-6-¹⁴C into RNA of rat renal bound polysomal fraction (antibiotics administered with rat kidney slices)



り込みは SM, CL で阻害されていた。すなわち抗生物質のうち腎のリボソームの核酸、蛋白合成を共に抑制するのは SM だけであった。In vivo の実験で同一の動物で抗生物質の核酸と蛋白合成への影響を検討しえなかったために他の抗生物質ではかならずしも平行しなかったのではないかと推量される。無細胞蛋白合成系に直接添加した KM, SM, GM, CP が腹腔に投与した場合よりも強く蛋白合成を阻害することが遊離型、膜付着型ポリソーム分画共に認められた。これは腹腔に核標識物質を投与すると体内で拡散されたこと、排泄された可能性と共に抗生物質の膜透過性、細胞内各分画への移行等に左右された結果と考えられる。

SM, KM, GM¹⁻³⁾ によって障害される部位は尿管上皮細胞であり、この選択的毒性は薬物の大部分が腎か

Fig. 6 Effects of various antibiotics on the incorporation of L-leucine- ^{14}C into rat renal free polysome fraction in cell-free protein synthesis system

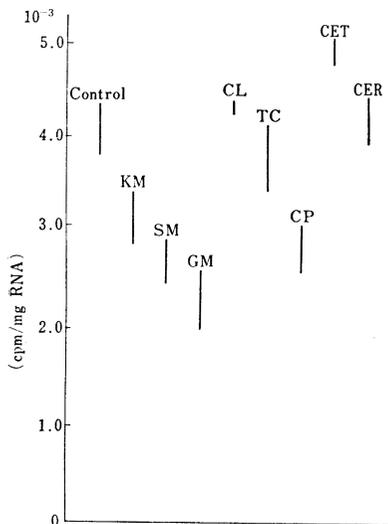
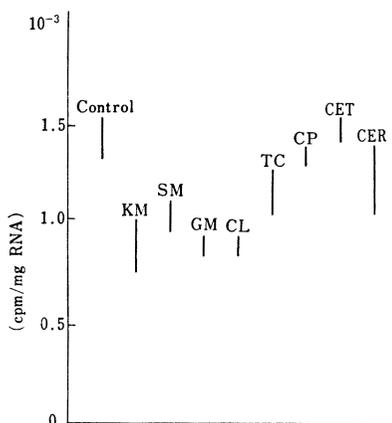
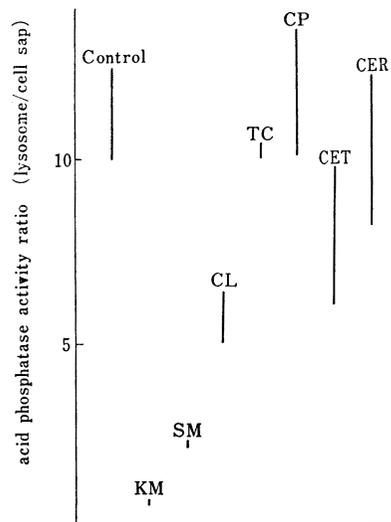


Fig. 7 Effect of antibiotics on incorporation rate of L-leucine into rat renal bound polysomal fraction (antibiotics administered directly in subcellular fraction)



ら排泄されることと関連している¹⁴⁾。すなわち腎が他の臓器に比較して抗生物質によって障害される頻度が高いのはその重量に比較して血液循環が盛んなこと、尿細管腔表面に排泄された物質が高濃度に触れること、代謝が亢進している尿細管細胞は再吸収、または排泄作用の結果、尿細管表面に触れる薬物の中毒作用に弱くなるためなどである¹⁵⁻¹⁷⁾。腎障害を考慮するに際して薬物の体内での代謝が重要な問題となってくる。CPは肝で代謝されて抗菌作用を持たない代謝産物となる。そのうち主なものは glucuronide であり、一部は deacylate されて

Fig. 8 Effects of various antibiotics on stability of rat renal lysosomes *in vivo*



尿中に排泄される^{18,19)}。活性形の CP の尿中濃度は成人に 1.5g を経口投与した場合、9 時間後 70~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度である¹⁸⁾。したがって活性な形で腎尿細管に達することが他の抗生物質に比較して少い。In vitro の系で CP が遊離型ポリソーム分画の amino 酸の取り込みを阻害するが in vivo の系では影響が認められなかったのは CP の活性形は蛋白合成系に阻害的に作用するが、肝で代謝された monoglucuronide の形のもは腎障害を及ぼさないものと推定される。

人間の治療量に相当する KM をシロネズミに投与すると、腎機能障害を認めないにもかかわらず、48 時間後に腎細胞質に封入体 (cystosegosome) の出現が報告されている²⁰⁾。この封入体の内にミエリン様物質が存在し、酸フォスファターゼ値の高値を示すのを特徴とする。光学顕微鏡下では軽度の酸フォスファターゼ値の上昇を近位尿細管細胞に認める他には病理学的異常所見を認めない。KM が細胞内に取り込まれて細胞質が限界膜で囲まれ、そこで酸フォスファターゼなどの酵素の作用を受け、細胞質基質のリン脂質が顕性化して出来たものが封入体であると説明されているが²¹⁾、その際 KM によりライソゾーム膜の安定性が障害され、酸フォスファターゼ値が細胞質にも高値を示しライソゾーム膜に対する細胞質の酸フォスファターゼ値の比が著しく低下した我々の結果と一致している。

抗生物質を投与する際に発生する腎障害の動物の種類による特異性について考察してみたい。WEINSTEIN²²⁾ は SM 40~50 mg/kg を連日人間に筋注しその 20% に一時的に中等度の蛋白尿と尿円柱を証明したと報告して

いる。しかし SM のこの腎障害が他の動物でみられず人間だけに限られることが EASTMAN²³⁾, FARRINGTON²⁴⁾, HEILMAN²⁵⁾ らによって証明されている。しかも人間においても正常の腎機能を有する症例では腎障害は起きないと報告している。しかし著者らの成績では正常シロネズミに治療量を短期間投与しても腎の蛋白代謝の低下が認められておりこの結果を人間に応用出来ないが、従来の臨床検査ではとらえ得られない変化が人間の腎に発生している可能性は否定出来ない。

従来の腎機能検査や組織学的には捉え得られない抗生物質の腎障害も生化学的方法によって極く軽度の代謝の変化も把握し得ることを我々の結果は示唆していよう。

結 論

各種抗生物質の治療量をシロネズミに投与しシロネズミの腎の核酸代謝, 蛋白代謝への影響を検討した。KM, SM, GM, CL は核の RNA 合成に阻害的に働いた。*In vivo* に投与された KM, SM, CL, TC は遊離型ポリソーム分画の RNA 代謝に阻害的に作用した。SM, CM, TC は遊離型ポリソーム分画の蛋白代謝を障害した。*In vivo* に投与された KM, SM, CM, CET は膜付着型ポリソーム分画の RNA 代謝に阻害的に働いた。無細胞蛋白合成系に直接加えられた抗生物質のうち KM, SM, GM, CP は遊離型ポリソーム分画の蛋白合成に阻害的に働き, 同様の方法で投与された KM, SM, GM, CL は膜付着型ポリソーム分画の蛋白合成に阻害的に作用した。

シロネズミ腎のリソゾーム膜の安定性を破壊する抗生物質としては KM が著るしく, SM がこれに次ぎその他の抗生物質は比較的軽度の障害しかおよぼさなかった。

本論文の要旨は昭和 47 年 10 月第 19 回日本化学療法学会東部部会において発表した。

文 献

- 1) KOSEC, J. C. ; R. I. MAZZE & M. J. COUSINS : Nephrotoxicity of gentamycin. *Lab. Invest.* 30 : 48~57, 1974
- 2) ALLEN, A. C. : *The Kidney, Medical and Surgical Disease*, 2nd ed. p. 350, Grune & Stratton. New York, 1962
- 3) KLEEMAN, C. R. & H. M. MAXWELL : *Biology of Pyelonephritis*, Edited by QUINN, E. L. & E. H. KASS, pp. 631~646, Little Brown & Co., Boston, 1960
- 4) WINFILLD, M. ; G. D. CRISP, M. H. MAXWELL & C. R. KLEEMAN : Nephrotoxic effects of kanamycin : A preliminary report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 76 : 140~148, 1958
- 5) PERKINS, R. L. ; M. A. APICELLA, LEE-IN-SUNG, F. E. CUPPAGE & S. SASLAW : Cephaloridine and cephalothin : Comparative studies of potential nephrotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 71 : 55~58, 1968
- 6) POTH, H. ; K. L. BECKER, R. J. SHALHOUB & S. KATZ : Nephrotoxicity of demethylchlortetracycline hydrochloride, a prospective study. *Arch. Intern. Med.* 120 : 433~435, 1967
- 7) WILSON, S. H. & M. B. HOAGLAND : Physiology of rat-liver polysomes. The stability of messenger ribonucleic acid and ribosomes. *Biochem. J.* 103 : 556~572, 1967
- 8) 織田敏次, 横野 靖 : 肝細胞のリソゾーム。代謝 5 : 828~834, 1968
- 9) BESSEY, O. A. ; O. H. LOWRY & M. J. BROCK : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, *J. Biol. Chem.* 164 : 321~329, 1946
- 10) LOWRY, O. H. ; N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265~275, 1951
- 11) SIEKEVITZ, P. & G. E. PALADE : A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. III. *In vivo* incorporation of leucine-1-¹⁴C into the protein of cell fractions. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 557~566, 1958
- 12) TAKAGI, M. ; T. TANAKA & K. OGATA : Functional differences in protein synthesis between free and bound polysomes of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 217 : 148~158, 1970
- 13) CAMPBELL, P. N. ; R. G. LAWFOED & N. F. G. CADARID : Abstr., 7th Inter. Congr. Biochem. 1 : 123, 1967
- 14) KUNIN, C. M. : Absorption, distribution, excretion and fate of kanamycin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 132 : 811~818, 1966
- 15) KUNIN, C. M. : Nephrotoxicity of antibiotics. *J. Amer. Med. Assoc.* 202 : 204~208, 1967
- 16) SCHREINER, G. E. : Toxic nephropathy. In BECKER, E. L., ed. : *Structural basis of renal disease*. New York, Harper and Rowe, pp. 703~756, 1968
- 17) SCHREINER, G. E. & J. F. MAHER : Toxic nephropathy. *Amer. J. Med.* 38 : 409~449, 1965
- 18) GLAZKO, A. J. ; L. W. WOLF, W. A. DILL & A. C. BRATTON : Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin). 11. Tissue distribution and excretion studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 : 445~459, 1949
- 19) GLAZKO, A. J. ; W. A. DILL & M. C. REBSTOCK : Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin). III. Isolation and identification of metabolic products in urine. *J. Biol. Chem.* 183 : 679~691, 1950
- 20) 江部達夫 : カナマイシンによる腎病変。日本臨床 30(6) : 93~95, 1972
- 21) 武田 元 : 抗生剤の腎毒性にかんする研究。第 1 編, Kanamycin と 0.4% sodium alginate 液と

- の併用による腎毒性増強について。日内会誌 59: 10~21, 1970
- 22) WEINSTEIN, L. & N.J. EHRENKRANZ: Antibiotics monographs. New York Medical Encyclopedia, Inc. 10: 1~116, 1958
- 23) EASTMAN, G.: Complications of antibacterial therapy. N.Y. State J. Med. 57: 3119~3124, 1957
- 24) FARRINGTON, R.E.; H. HULL-SMITH, P.A. BUNN & W. MCDERMOTT: Streptomycin toxicity, reactions to highly purified drugs on long-continued administration to human subjects. J. Amer. Med. Assoc. 134: 679~688, 1947
- 25) HEILMAN, D. H.; F. R. HEILMAN, H. C. HINSHAW, D. R. NICHOLS & E. W. HERRELL: Streptomycin: Absorption, diffusion, excretion and toxicity. Amer. J. Med. Sci. 210: 576~584, 1945

EVALUATION OF POTENTIAL NEPHROTOXICITY OF ANTIBIOTICS. I.

Effects on Protein Synthesis and Stability of Lysosome of Rat Kidney

TAKASHI UMEDA and KENKICHI KOISO
Department of Urology, Faculty of Medicine,
The University of Tokyo

In order to assess the potential nephrotoxicity exerted by various antibiotics with therapeutic doses, effects of antibiotics administered into Wistar rat *in vitro* and *in vivo* were investigated in terms of protein synthesis, nucleic acid metabolism and stability of lysosome.

Kanamycin, streptomycin, gentamicin, colistin as well as chloramphenicol inhibited the incorporation of orotic acid-6-¹⁴C into rat renal nuclear RNA.

The incorporation of orotic acid-6-¹⁴C into RNA of the free polysome fraction of the rat kidney slices was inhibited by kanamycin, streptomycin, colistin and tetracycline.

The incorporation of L-leucine-¹⁴C into the free polysome fraction was demonstrated to be reduced by streptomycin, chloramphenicol and tetracycline administered *in vivo*.

The incorporation of orotic acid-6-¹⁴C into RNA of the bound polysome fraction of rat kidney slices was reduced by kanamycin, streptomycin, chloramphenicol and cephalothin. The incorporation of L-leucine-¹⁴C into the bound polysomes from the same fraction was inhibited by streptomycin and colistin.

Marked reduction of the incorporation of L-leucine-¹⁴C into the free polysome fraction was noticed by kanamycin, streptomycin, gentamicin and chloramphenicol added directly to cell-free protein synthesis system. Also, marked reduction of the incorporation of L-leucine-¹⁴C into the bound polysome fraction was manifested by kanamycin, streptomycin, gentamicin and colistin.

Stability of lysosome was disturbed by either kanamycin or streptomycin.

Clinical implication of these nephrotoxicity of antibiotics was discussed.