抗生物質の腎毒性に関する研究 II

ヒト腎の蛋白代謝に及ぼす影響について

梅田 隆・小磯 謙吉
東京大学医学部泌尿器科教室

(昭和 52 年 3 月 31 日受付)

緒言

抗生物質が生体に投与された場合，病原体に対する作用機序を初めとして，抗生物質そのものの代謝などに関しては比較的解明されている面が多い。しかし，抗生物質が宿主に対してどのような影響を有するかに関しては生体全体としての観点から肝機能，腎機能[4~6]，造血機能などの機能面からの検討，および各臓器の組織学的研究[1~3]が主として行なわれて来ている。著者はこれから機能と形態の背後に存在する代謝面で抗生物質の宿主に対する影響を把握しようとする目的で蛋白代謝を取り上げ，検討を行なった。すなわち，著者は前編において，基礎実験としてシロネズミ腎の蛋白代謝，ライソゾーム膜への影響について観察した[7]。ここでは手術時に得られたヒト腎の蛋白代謝に及ぼす抗生物質の影響について検討したので報告する。

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），セフアロシン (CFT)，セフアロリジン (CER)，テトラサイクリン (TC)，カナマイシン (KM)，コリスチン (CL)，ゲンマイシン (GM)，クロラムフエニコール (CP) の 8 種類である。

材料は手術によって摘出した腎を使用した。すなわち腎盂乳頭腫および腎癌の正常の腎の部分を使用した。腎は摘出後 4°C の冷蔵庫に保存し，数時間以内に実験に用いた。

核標識物質および酵素基質

L-ロイシン-^{14}C (240 mCi/mmole, uniformly labeled)，オロチン酸-6-^{14}C (282 mCi/mmole)，ATP, GTP, グルタチオン(還元型)，フオスフオクレアチニン（ナトリウム塩)，クレアチニンカイネースはいずれも第 1 化学社製を使用した。

核分画の分離，核分画の RNA へのオロチン酸-6-^{14}C の取り込み，核分画の RNA の分離

それぞれ前編[7]に述べた方法によって行なった。

ポリソーム分画の RNA へのオロチン酸-6-^{14}C の取り込み

腎を厚さ 1 mm 程度にスライスし総量 1 g を使用した。抗生物質は終末濃度として SM, KM, CER, CET, CP, TC は 10 μg/ml, GM は 0.5 μg/ml, CL は 300 units/ml となるように加え，Krebs-Ringer 燐酸緩衝液 (pH 7.4) 10 ml にオロチン酸 20 μCi を加え，2 時間 37°C で恒温槽で振盪，加温した。加温後，腎スライスを冷した Krebs-Ringer 燐酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回洗い，3 倍量の 0.25 M の蔗糖溶液 (50 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM メルカプトエタノールを含む）でホモジナイズし，以下前編[7]に述べたとおり，膜付着型と遊離型ポリソーム分画に分離し，RNA を抽出し，260 mμ で吸光度を測定，比活性値を算出した。

無細胞蛋白合成系

ヒトの腎臓約 8 g を 3 倍量り前記 0.25 M 蔗糖溶液でホモジナイズし，遊離型と膜付着型ポリソーム分画を調製した。

L-ロイシン-^{14}C, 5 μCi, 各ポリソーム分画 0.1 ml(蛋白量 5～6 mg)，160,000 × g 上清 0.1 ml に 0.25 M 蔗糖溶液 (50 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.8, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM $KHCO_3$ を含む) 0.5 ml に最終濃度 ATP 1 mM, GTP 0.25 mM, グルタチオン(還元型) 10 mM, 燐酸クレアチニン 10 mM, クレアチニンカイネース 50～200 μg/ml なるように加えた。抗生物質は SM, KM, CP, CET, CER 10 μg/ml, GM 0.5 μg/ml, CL 300 units/ml となるように加え 37°C の恒温槽にて 1 時間加温した。蛋白に取り込まれた L-ロイシン-^{14}C の放射能，ポリソーム分画の RNA 量の測定は前編[7]のように行ない，一定量の RNA に対する蛋白に取り込まれた L-ロイシン-^{14}C の放射能を算出した。

結果

Fig. 1 にヒト腎の核 RNA へのオロチン酸-6-^{14}C の取り込みにおよぼす抗生物質の影響を示した。RNA 合成は KM, SM, CL により低下し，GM によっても軽度の低下が認められた。TC, CP, CET, CER によっては影響されなかった。

腎スライスの遊離型ポリソーム分画の RNA へのオロチン酸-6-^{14}C の取り込みは KM, SM, GM, CL, CP に

Fig. 1 Effects of various antibiotics on the incorporation of orotic acid-^{14}C into RNA of nuclear fraction from human kidney slices

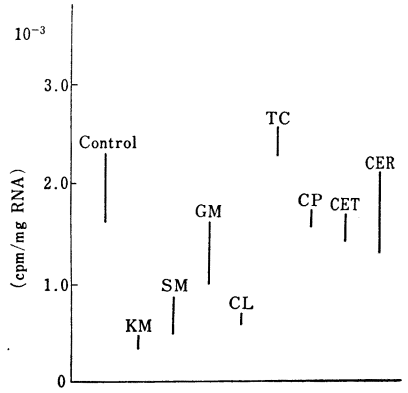
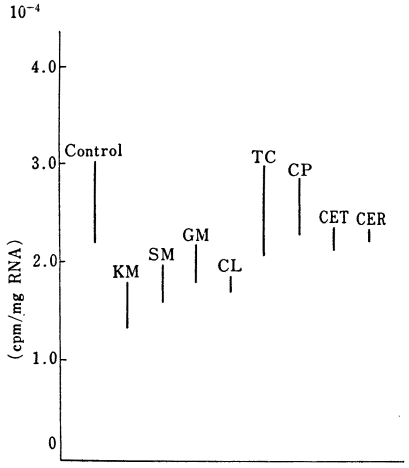


Fig. 2 Effects of various antibiotics on the incorporation of orotic acid-6-^{14}C into RNA of the free polysome fraction from human kidney slices



より阻害されていた (Fig. 2)。無細胞蛋白合成系に加えた KM, SM, GM は遊離型ポリソーム分画の蛋白への L-ロイシン-^{14}C の取り込みを抑制した (Fig. 3)。膜付着型ポリソーム分画の RNA へのオロチン酸-6-^{14}C の取り込みは KM, SM, GM, CL で抑制された (Fig.4)。無細胞蛋白合成系に加えた抗生物質のうち KM, GM, CL が L-ロイシン-^{14}C の (膜付着型ポリソーム分画の蛋白への) 取り込みを阻害していた (Fig.5)。

考　　按

著者が検討した抗生物質のうち有意の頻度で腎障害が報告されているのはアミノグルコシッド系の GM, KM, SM とセフアロスポリン系の CER であり，頻度の少いものとしては CET, TC, 腎毒性が殆んど無いものとしては CP であるとされている[8]。著者が行なった *in vitro* の実験系では KM, SM, GM, CL が核の RNA 合成に抑制的に作用していた。遊離型ポリソーム分画の RNA 合成は KM, SM, GM, CL, CP により阻害され，蛋白合成は KM, SM, GM により阻害されていた。遊離型ポリソーム分画は細胞自身に必要な蛋白を合成するとされるので[9]，KM, SM, GM は腎細胞の蛋白合成を，治療量投与した時に予想される血中濃度と同じ濃度で *in vitro* の系では阻害することを示唆している。膜付着型ポリソーム分画の RNA 合成は KM, SM, GM, CL で抑制され，蛋白合成は KM, GM, CL により抑制されていた。したがって KM, GM, CL は分泌型の蛋白を合

Fig. 3 Effects of various antibiotics on the incorporation of L-leucine-^{14}C into the free polysome fraction in the cell-free system

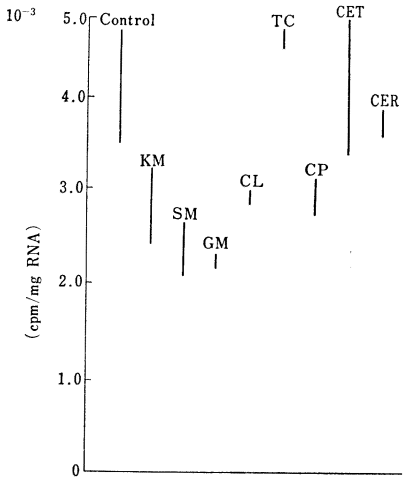


Fig. 4 Effects of various antibiotics on the incorporation of orotic acid-6-^{14}C into RNA of the bound polysome fraction from human kidney slices

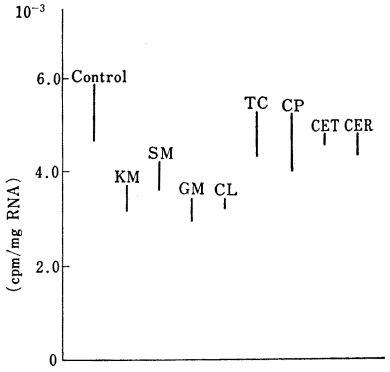
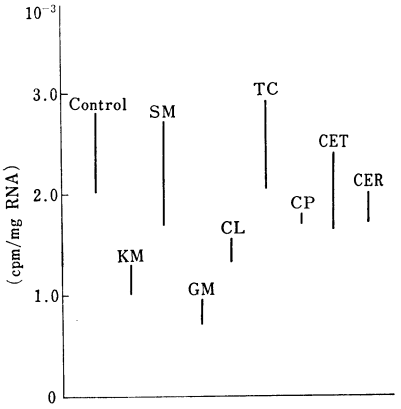


Fig. 5 Effects of various antibiotics on the incorporation of L-leucine-^{14}C into the human renal bound polysome fraction in the cell-free system



成する膜付着型ポリソーム分画の蛋白合成[10]を抑制する働きがあることを示唆していよう。

腎臓は抗生物質の主な排泄臓器であるが[10]，排泄様式は抗生物質の種類によって一様ではない。とくに抗生物質の腎への移行が問題とされ，腎組織内濃度は血中濃度の数倍となり，したがって尿細管腔の表面が抗生物質に高濃度に触れ，再吸収，排泄作用の結果，尿細管腔の障害は生体では *in vitro* で行なった著者の実験の結果と相違しているものと推定される。抗生物質が人体内から除去される速度あるいは体内で非活性化される度合は薬剤の物理的化学的特性によって異なっている。すなわち薬剤固有の安定性，腎における排泄様式[11]，排泄の程度，体内での血漿蛋白との結合度，化学反応や代謝機構による薬剤の非活性化，肝などの諸臓器への貯溜や肝汁や消化管内への排泄などがある[12]。著者の実験では以上述べた抗生物質の排泄，組織への移行の問題は考慮せずに行なった *in vitro* の実験なので，実際の人間の生体内の反応にどの程度類似するか問題が残る。

結　　論

各種抗生物質の治療量を投与したとき予想される血中濃度と同じ濃度の抗生物質を *in vitro* の系に加えて，ヒト腎組織のスライスの核酸代謝，無細胞系蛋白合成におよぼす影響を検討した。

腎細胞の核 RNA 合成を KM, SM, CL は抑制した。KM, SM, GM, CL, CP は遊離型ポリソーム分画のRNA合成に阻害的に作用し，KM, SM, GM は無細胞系の遊離型ポリソーム分画の蛋白合成を阻害した。KM, SM, GM, CL は膜付着型ポリソーム分画の RNA 合成に阻害的に作用し，KM, GM, CL は無細胞系の膜付着型ポリソーム分画の蛋白合成を阻害した。

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梅田隆が発表した。

文　　献

1) KOSEK, J. C. ; R. I. MAZZE & M. J. COUSINS : Nephrotoxicity of gentamycin. Lab. Invest. 30 : 48～57, 1974
2) ALI EN, A. C. : The Kidney, Medical and Surgical Disease, 2 nd ed, p. 350, Grune & Stratton, New York, 1962
3) KLEEMAN, C. R. & H. M. MAXWELL : Biology of pyclonephritis, edited by GUINN, E. L. & E. H. KASS, pp. 31～646, Little Brown & Co. Boston, 1960
4) WINFILLD, M. ; G. D. CRIPP, 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 : 75～78, 1968
6) ROTH, H. ; K. L. BECKER, R. J. SHALHOUB & S. KATZ : Nephrotoxicity of demethylchlor hydrochloride, a prospective study, Arch. Intern. Med. 120 : 433～435, 1967
7) 梅田　隆，小磯謙吉：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。Chemotherapy 25 (10) : 2978～2983, 1977
8) KOVNAT, P. ; E. LABOVITZ & S. P. LEVISON : Antibiotics and the kidney. Med. Clin. North Amer. 57 : 1045～1063, 1973
9) CAMPBELL, P. N. ; R. G. LAWFORD & N. F. G. CADAVID : Abstr., 7th Inter. Congr. Biochem. I : 123, 1967
10) SHILS, E. M. : Renal disease and the metabolic effects of tetracycline. Ann. Int. Med. 58 : 389～408, 1963
11) KUNIN, C. M. : Biology of pyelonephritis, edited by QUINN, E. L. & E. H. KASS, pp. 623～630, Little Brown & Co., Boston, 1959
12) 上田　泰，長谷川勢：抗生剤と腎臓。最新医学 17 : 1741～1750, 1962

EVALUATION OF POTENTIAL NEPHROTOXICITY OF ANTIBIOTICS. II

Effects on Protein Synthesis of Human Kidney

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

In order to assess the potential nephrotoxicity by various antibiotics with therapeutic concentration, effects of antibiotics administered to *in vitro* system were investigated in terms of protein synthesis and nucleic acid metabolism.

Kanamycin, streptomycin, gentamicin and colistin added to the incubation medium at the concentration of 10 μg/ml with kidney slices were demonstrated to inhibit the incorporation of orotic acid-6-^{14}C into nuclear RNA.

The incorporation of orotic acid-6-^{14}C into RNA of free polysomes prepared from human kidney slices was inhibited by kanamycin, streptomycin, gentamicin, colistin and chloramphenicol.

Significant reduction of the incorporation of L-leucine-^{14}C into free polysome fraction was noticed by kanamycin, streptomycin and gentamicin added directly to cell free protein-synthesis system.

The incorporation of orotic acid-6-^{14}C into RNA of bound polysome fraction prepared from human kidney slices was inhibited by kanamycin, streptomycin, gentamicin and colistin.

Inhibition of the incorporation of L-leucine-^{14}C into bound polysome fraction was noticed when kanamycin, gentamicin and colistin were added directly in cell-free system.