

Glucaron による dibekacin 毒性量投与後の体内蓄積抑制効果

遠藤 久男・松原 秀三・岡崎 博司・小川 春樹

中外製薬株式会社・総合研究所

(昭和 55 年 7 月 18 日受付)

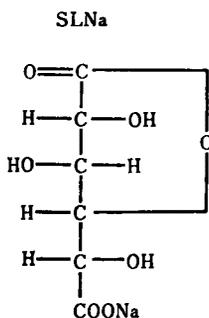
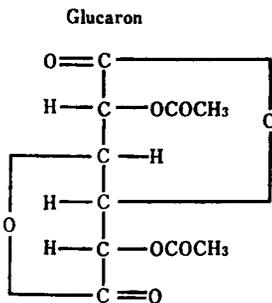
240 mg/kg 以上の DKB を 24 時間給水制限ラットに筋注すると、急性腎機能障害を惹起した。しかし、glucaron を DKB 投与 1 時間前に経口投与すると、その腎障害の発現を有意に抑制した。glucaron の最小有効量は 75~150 mg/kg であった。また、DKB 130 mg/kg の頻回投与毎に glucaron 600 mg/kg を併用すると DKB の体内蓄積を顕著に抑制した。しかし、glucaron は DKB の感染治療効果や試験管内抗菌活性に全く影響しなかった。

序 文

7-β-配糖体抗生物質 (AGs) は他系統の抗生物質で補填しえない優れた抗菌活性を有するため^{1,2)}、単独あるいは β-lactam 抗生物質などの併用で使用される機会が多い。しかし、AGs は程度の差こそあれ腎や聴器に対する毒性が強い³⁻⁵⁾。AGs の一部には耐性菌にも有効な誘導体が開発されてきたが⁶⁾、毒性面で改善されたものはなく、今日でもなお新規に低毒性 AG の発見が期待される現状である。ところが FURUNO ら⁷⁾はグルコ糖酸類の生体膜安定化作用を検討する過程で、Fig. 1 に示す

Sodium D-glucaro-1,4-lactone (SLNa) や 2,5-dimethyl-D-glucaro-(1→4) (6→3)-dilactone (glucaron) が AGs の毒性量投与によって誘起されるラットの腎障害を有意に抑制することを見出した。glucaron は経口投与可能な白色粉末で、すでに膀胱癌再発防止剤として臨床使用されている^{8,9)}。そこで我々は、dibekacin (DKB) によって誘発されるラットの急性腎障害を抑制する glucaron の効果をより詳細に検討するとともに、DKB の体内蓄積や治療効果におよぼす影響も併せて検討した。

Fig. 1 Structure of glucaron and SLNa



実験材料と方法

1. 使用薬剤

DKB (3',4'-dideoxykanamycin B sulfate: 明治製薬) を滅菌生理食塩水に溶解後、その 0.5 ml をラット大腿部筋肉内に注射した。glucaron (中外製薬) は実験直前に滅菌水に懸濁し、その 1.0 ml を DKB 投与 1 時間前に経口投与した。対照群には水だけを与えた。また、glucaron の試験管内抗菌活性を調べる実験では、まず dimethylformamide (DMFA) で 50 mg/ml に溶解したのち、培地で 100 倍以上希釈した。

2. 実験動物

当社、実験動物センターにおいて SPF 飼養された体重 250~350 g の Wistar 系ラットを用いた。通常飲水を充分に与えたが、DKB の頻回投与実験を除いて、DKB 投与 24 時間前から投与 2 時間後まで給水を止めた。

3. 腎障害の誘発と判定法

給水制限ラットに毒性量の DKB を筋注投与し、急性腎障害を誘発した。その障害度を判定するため、断頭放血または眼底静脈叢から連続的に採取した血清中の尿素窒素含量 (BUN) を Uni-graph (Warner-Lambert) を用いて測定した。

4. DKB の体内分布濃度の測定

DKB 投与後経時的にラットを断頭屠殺し、血清および腎を採取した。腎は直ちに4倍量の滅菌磷酸緩衝液(PBS, pH 7.4)を加えてホモゲナイズし、その遺心上清液をさらに適宜希釈した。これらの試料中のDBK濃度は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするディスク拡散法によって定量した。標準線はラット血清および5倍腎ホモジネートで作成し、それぞれ対応する試料の測定に用いた。

5. 炎症 pouch の作成法と感染治療実験

前報に準じ¹⁰⁾、結核死菌体浮遊油液(1.5 mg/ml of olive oil) 1.0 ml をラット背部皮下空嚢内に注入して限局性浸出性炎症巣を作成した。6日後に感染治療実験を行なった。感染菌には当研究所保存株の *Escherichia coli* C-11 を用いた。すなわち、1夜培養菌 5×10^7 コを pouch 内に接種したのち、30分後に glucaron 1,000 mg/kg または水を経口投与し、さらに60分後に DKB 100 mg/kg を筋注投与した。DKB 投与 3, 6 および 24 時間後に浸出液 0.5 ml づつを採取し、直ちに滅菌 PBS で10段階希釈し、その0.5 ml を普通寒天培地に混釈した。48時間培養後集落数を測定した。

6. 試験管内抗菌活性の測定

試験菌には前述の *E. coli* C-11 の他、*pseudomonas aeruginosa* J-166 および *Staphylococcus aureus* 209 P を用いた。治療法に準じ¹¹⁾、予め適当濃度の DKB と glucaron を混釈した Heart infusion 寒天平板上に、各菌株の1夜培養菌 10^6 /ml を画線塗抹し、24時間培養後の増殖の有無で DKB の最小発育阻止濃度(MIC)を比較した。

実験成績

1. 腎障害を誘発する DKB の投与量と給水制限の効果

ラットを、充分給水を受けた群と24時間給水制限群にわけ、それぞれ120~300 mg/kg の DKB を筋注投与した。24時間後に放血屠殺し BUN 濃度を測定すると、給水制限ラットは180 mg/kg 以上の DKB 投与で高値を示し、腎の排泄障害が示唆された(Table 1)。しかし、十分に給水を受けたラットでは個体差を生じ、また腎機能を障害するのに比較的大量の DKB を要した。

そこで、ラットを24時間給水制限して DKB 180~300 mg/kg を投与後、経時的に BUN 濃度を測定すると、240 mg/kg 以上の投与群で BUN の不可逆的な蓄積が認められた(Fig. 2)。すなわち、DKB は240 mg/kg 以上の投与で腎障害を誘発した。

2. glucaron の腎障害誘発抑制効果

まず glucaron 懸濁液または水 1.0 ml を経口投与し、

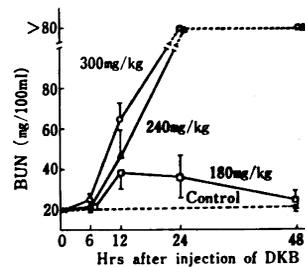
Table 1 Dose effect of DKB on induction of acute renal damage in rats

Supply of water	BUN (mg/100 ml)*				
	Dose of DKB (mg/kg)				
	0	120	180	240	300
yes	22	20	45	80	>150
	27	22	27	32	45
	20	27	22	22	27
no**	27	22	65	126	>150
	25	30	47	90	>150
	22	32	42	65	>150

* Determined 24 hrs after an intramuscular injection of DKB.

** Deprived drinking water for 24 hrs.

Fig. 2 Kinetics of BUN accumulation after an intramuscular injection with toxic doses of DKB in dehydrated rats



1時間後に DKB 240 mg/kg を筋注した。

对照群のラットは DKB 投与 24 時間後に、すでに 100 mg/dl の高い BUN 濃度を示したが、glucaron 150 mg/kg 以上を前投与した群ではその蓄積が明らかに抑制された(Table 2)。このような glucaron の効果は DKB 投与の後処置では明確ではなかった。

3. glucaron による DKB の体内蓄積抑制

DKB 240 mg/kg を筋注する 60 分前に、glucaron 600 mg/kg または水 1.0 ml を経口投与し、DKB の体内分布に及ぼす glucaron の影響を検討した。Fig. 3 に示すとおり、両者のピーク値は変わらないが、glucaron 投与群では速やかに血中濃度が減少した。

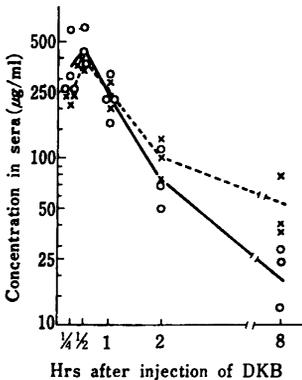
そこで次の実験として、給水制限しないラットに 130 mg/kg の DKB を 12 時間毎 5 回連続投与し、それぞれの 30 分前に glucaron 600 mg/kg または水を経口投与して、glucaron が DKB の体内蓄積を予防しうるかどうかが検討した(Fig. 4)。

Table 2 Protective effect of glucaron on induction of acute renal damage by DKB

Dose of glucaron* (mg/kg)	BUN (mg/100 ml)			
	Hrs after injection of DKB			
	0	24	48	72
Water	22	100	190	180
	27	124	145	250
	25			
600		27	36	27
		35	32	27
		35	27	34
300		27	27	27
		45	30	32
		58	47	42
150		50	54	74
		72	64	90
		75	70	158
75		75	54	40
		90	70	180
		90	180	250

* The increasing doses of glucaron were administered orally 60 min before an intramuscular injection with 240 mg/kg of DKB.

Fig.3 Effect of glucaron on serum level of DKB after an intramuscular injection of toxic dose A 600 mg/kg dose of glucaron (—) or 1.0 ml of water (.....) were administered orally 60 min before injection with 240 mg/kg of DKB.



DKB 投与一定時間後の血中 DKB 濃度を比較すると、対照群では投与回数を増すほど次第に血中濃度が増加した。しかし、glucaron 併用群では 5 回連続投与後も初回投与時のレベルと変わらなかった。また、5 回投与後の最終採血時に腎内濃度を測定したところ、glucaron 併用群は有意に低い濃度を示した。

Fig.4 Protective effect of glucaron on serum and renal accumulation of DKB by the repeated injections in rats

Two groups of 5 rats were injected 5 times every 12 hrs with 130 mg/kg of DKB. Thirty min before each injection the rats received orally 600 mg/kg of glucaron (-O-) or 1.0 ml of water (-X-). Serum specimens were obtained from infraorbital plexus 15 min and 5 hrs after DKB injection.

Bars show the mean concentration of DKB in kindneys of glucaron-combined (▨) and control rats (■) 5 hrs after final injection of the antibiotic.

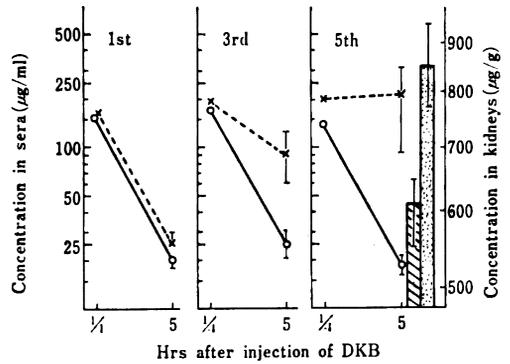


Fig.5 Effect of glucaron on antibacterial activity of DKB against *E. coli* inoculated into granuloma pouches

Rats, inoculated with 5×10^7 *E. coli* into granuloma pouches, were given an oral administration with 1,000 mg/kg of glucaron (-O-) or 1.0 ml of water (-△-) 30 min after inoculation, and then given an intramuscular injection with 100 mg/kg of DKB 90 min later. Exudates were obtained to count the viable *E. coli* 3, 6 and 24 hrs after injection of DKB. Control rats (-X-) were given no drugs.

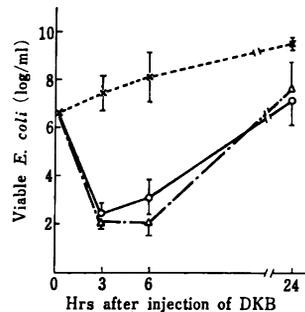


Table 3 Effect of glucaron on antibacterial activity of DKB *in vitro*

Strains	Concentration of glucaron ($\mu\text{g/ml}$)	Bacterial growth on plates with DKB ($\times\text{MIC}$)				
		0	0.25	0.5	1	2
<i>E. coli</i> C-11 (6.25)*	0	+++	+++	+	-	-
	50	+++	+++	+	-	-
	100	+++	+++	+	-	-
	500	+++	+++	+	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i> J-166 (3.14)	0	+++	+++	+	-	-
	50	+++	+++	+	-	-
	100	+++	+++	+	-	-
	500	+++	+++	++	-	-
<i>St. aureus</i> 209P (0.08)	0	+++	+++	+	-	-
	50	+++	+++	+	-	-
	100	+++	+++	+	-	-
	500	+++	+++	+	-	-

Both glucaron dissolved in dimethylformamide and DKB were previously plated with heart infusion agar medium. One loop of each suspension with 10^6 bacteria/ml was inoculated on the plates. Determination was carried out 48 hrs after incubation. * Number in parenthesis presents the MIC of DKB in HI agar medium without the antibiotic.

4. DKB の感染治療効果に及ぼす glucaron の影響
gronuloma pouch モデルを用い、glucaron が DKB の感染治療効果に影響するかどうか検討した。

Fig. 5 に示すとおり、感染に用いた *E. coli* C-11 は炎症浸出液中で旺盛に増殖した。この実験条件下で DKB 投与群は glucaron 1,000 mg/kg の併用および非併用にかかわらず顕著に生菌数を減少したが、両者間で有意の差を認めなかった。

5. DKB の試験管内抗菌力に及ぼす glucaron の影響

glucaron を含有しない寒天平板上での DKB の MIC は *E. coli* C-11 に対して 6.25 $\mu\text{g/ml}$, *Ps. aeruginosa* J-166 に対して 3.12 $\mu\text{g/ml}$, *St. aureus* 209P に対して 0.09 $\mu\text{g/ml}$ であったが、glucaron を 500 $\mu\text{g/ml}$ 含有してもこの抗菌力に全く影響しなかった (Table 3)。

考 案

AGs は抗菌スペクトラムや治療効果に関し他系統の抗生物質にない利点を有するため¹²⁾、副作用の面で厳重な臨床管理を要求されるにもかかわらず使用される機会が多い。とくに、AGs 投与の対象は尿路や呼吸器、胆道に難治性感染症を有する症例が多く、そのような症例の AGs の投与量と投与方法は、副作用の発現が推測される限界と治療効果を期待する限界との妥協点にたつて施行される場合が多いため、AGs による障害発生の可能性は今日でも少なくない²⁻⁵⁾。AGs は DKB や amikacin のように耐性菌にも作用する誘導体の開発が盛ん

であるが⁶⁾、毒性面での改善はまだ未開拓であるといつて過言ではない。従って、その抗菌活性を変えず、副作用を軽減しうれば化学療法領域における大きな進歩といえるかもしれない²⁾。

今回の実験で我々は glucaron が DKB の毒性量投与によって誘起される腎障害を有意に抑制することを証明した。その最小有効量は 75~150 mg/kg であったが、ラットでは腸管吸収率が投与量の約 25% であるのに対し、ヒトでは 50~80% と高いので^{8,9)}、臨床的には比較的少ない投与量で同様の効果を期待しうるかもしれない。この glucaron 効果の発現機序に関し詳細は不明であるが、現象的には DKB の体外排泄促進作用であると思われ、我々はすでに glucaron の DKB に対する初期尿中排泄促進効果を認めている¹²⁾。このことは DKB 投与後に glucaron を投与すると無効である事実からも推知できる。また、今回の実験では注目すべき結果は、DKB の治療量に近い投与量 (130 mg/kg) を 12 時間毎に頻回投与すると、非併用群では投与回数に応じて血中濃度が増加するのに対し、glucaron 併用群では初回投与とほとんど変わらない濃度推移を示したことである。これは glucaron が DKB の体外排泄を促進することによって DKB の異常な腎への蓄積を予防するものと考えられる。

古野ら⁷⁾は多くのグルコ糖酸をスクリーニングし glucaron や SLNa のように、その構造にラクトン環を有する誘導体は AGs 誘発腎障害を強く抑制することを示し

た。また同時に利尿剤 (Furosemide) を併用しても無効であることも示した。利尿剤の併用はむしろ AGs の副作用を増悪することが知られるので^{4,11)}, glucaron の効果は他の機序を考えるべきであろう。但し、このような効果は DKB だけでなく kanamycin, gentamicin あるいは kanendomycin を用いた場合でも確認されているので¹²⁾, glucaron は特定の AGs に対してでなく腎機能を改善する作用を有するものと思われる。

文 献

- 1) 斎藤 篤：新しい抗生物質療法—アミノ酸糖系製剤, 総合臨床 28 : 1519~1523, 1979
- 2) JACKSON, G. G.: Antimicrobial chemotherapy—present and future. *Chemotherapy* 22 : 35~42, 1974
- 3) 中富昌夫, 原 耕平：アミノグルコシド系抗生剤。臨床と研究 57 : 42~45, 1980
- 4) 大谷 敏, 大槻好正, 尾股丈夫, 大内 仁, 斎藤武郎：Furosemide とアミノ配糖体薬剤との併用による内耳, 腎障害の激化について。Chemo-therapy 25 : 2348~2360, 1977
- 5) MARZA, M. & R. T. SCHEIFE : Drug therapy reviews : Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics Part

- 4 : aminoglycosides. *Am. J. Hosp. Pharm.* 34 : 723~737, 1977
- 6) 梅沢浜夫：抗生物質の将来の展望。Chemo-therapy 22 : 24~34, 1974
- 7) FURUNO, K.; K. ANDO.; S. SUZUKI & K. HIRATA : Effect of D-glucarates on basic antibiotic-induced renal damage in rats. *J. Antibiotics* 29 : 187~194, 1976
- 8) 膀胱腫瘍再発抑制剤グルカロン文献集, 中外製薬株式会社, 1973
- 9) 米瀬泰行：膀胱腫瘍への Glucarolactone の臨床的応用, 1. Local Application について。日本泌尿器科学会雑誌 59 : 243~261, 1968
- 10) 松原秀三, 遠藤久男, 岡崎博司, 小川春樹：組織液内抗生物質濃度の簡易測定法—ラット granuloma pouch モデルの応用。Chemo-therapy 28 : 589~593, 1980
- 11) MIC測定法改定委員会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について。Chemo-therapy 22 : 1126~1128, 1974
- 12) 遠藤久男, 松原秀三, 岡崎博司：D-glucaro-lactone によるアミノ酸糖体抗生物質誘発腎症の抑制, 第1報：尿中排泄の促進, 第26回日本化学療法学会東日本支部総会要旨集 : p.19~20, 1979

PROTECTIVE EFFECT OF A D-GLUCAROLACTONE, GLUCARON, ON DIBEKACIN-INDUCED RENAL DAMAGE IN RATS

HISAO ENDO, SHUZO MATSUBARA, HIROSHI OKAZAKI and HARUKI OGAWA

Research Laboratories of Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

An intramuscular injection of dibekacin (DKB) of more than 240 mg/kg induced remarkable acute renal damage in dehydrated rats deprived drinking water for 24hrs. When such rats previously received an oral administration of glucaron of more than 75 mg/kg, the induction of the dysfunction was significantly inhibited as measured the blood urea nitrogen contents. Accumulation of DKB in the blood and kidneys of rats receiving the repeated injections of the chemotherapeutic dose (130 mg/kg) was also inhibited by the combination with 600 mg/kg glucaron. In spite of such effects, antibacterial activity of DKB *in vivo* and *in vitro* was not quite influenced by the inhibitor.