アミノ配糖体系抗生物質の腎毒性に関する実験的研究

第1報 ラット腎細胞内取り込みおよび蛋白合成阻害作用

 平
 田
 耕
 造

 国立福岡中央病院泌尿器科

上 田 豊 史・百 瀬 俊 郎 九州大学医学部泌尿器科学教室 (主任:百瀬俊郎教授)

 平
 田
 寿
 恵

 九州大学薬学部生理化学教室
 (主任:加藤敬太郎教授)

(昭和 56 年 11 月 14 日受付)

aminoglycoside 抗生剤の腎細胞内分布について, tritium 標識 Kanamycin, Dibekacin を用い て subcellular level での検討を試み,またその結果として示唆された, これら薬剤の腎皮質細胞 内蛋白合成作用の阻害について検討し,以下の結果を得た。

1. aminoglycoside 抗生剤は、 ラットの腎皮質内にとりこまれ蓄積される。

2. 腎皮質細胞内では, rough microsome 分画, 特に ribosome に高濃度に分布し, 投与 24 時 間後でも蓄積が顕著である。

3. aminoglycoside 抗生剤と ribosome との結合は, *in vitro* の実験系でも同様に観察され, 肝, 腎いずれの ribosome にも強固に結合し, 臓器による特異性は認めなかった。

4. aminoglycoside 抗生剤と submicrosome 分画中の RNA との比は、どの分画中でも一定であり、これら薬剤は蛋白よりも RNA に対応して結合していることが示唆された。

5. aminoglycoside 抗生剤により前処置を行なったラットでは, *in vivo* において <sup>3</sup>H-leucine のとりこみが抑制され, この合成抑制には薬剤濃度依存性が認められた。

6. Kanamycin 投与ラットの肝では、<sup>3</sup>H-leucine のとりこみ阻害は認められず、薬剤の臓器内 濃度の差による結果が顕著であった。

7. ラット腎皮質 ribosome 分画を用いた *in vitro* での蛋白合成 実験 では, aminoglycoside 抗生剤の阻害作用は各薬剤の腎毒性にほぼ比例し, その阻害 の 強 さは Dibekacin, Gentamicin, Netilmicin, Kanamycin の順であった。

aminoglycoside 抗生剤(以下 AGs と略す)は、強 力かつ広範囲な抗菌力をもつ優れた化学療法剤である。 しかしながら、この薬剤には腎障害という重大な副作用 があり、臨床使用上いくつかの問題を提起している。こ の副作用についての理解をすすめ、薬剤のより安全な使 用法を考えることは、今日の治療医学にとってきわめて 有意義であろう。

AGs の腎毒性についてはいろいろな報告があるが, 形態学的には腎の主な病理学的変化は,近位尿細管上皮 細胞の変性壊死であり,超微細構造的,細胞化学的な研 究では, AGs は,尿細管上皮細胞の lysosome に集ま り、この lysosome の障害により細胞の変性壊死を起こ すのではないかとされている $^{1-4}$ 。

われわれも数年来,各種抗生剤および,血漿増量剤に よる腎障害の研究を続けてきたが,AGs および Dextran, Sodium alginate などは, lysosome に集積し, その障害を起こすことを確認した<sup>5,6)</sup>。

しかしながら,一方 AGs の抗菌力について考えてみ ると, AGs の抗菌作用は細菌細胞の ribosome に対す る作用であり, ribosome での蛋白合成阻害により抗菌 作用を発揮するものとされている。ヒトなどの真核細胞 は細菌などの前核細胞とは ribosome の subunit が異 VOL. 30 NO. 8

なっており,AGs の作用を受けない。すなわち AGs は 選択毒性を持っているといわれてきた<sup>7)</sup>。

われわれは、AGs の腎細胞内の動態について、2,3 の検索をすすめるう ちに、AGs は lysosome に集まる のは勿論であるが、このほかに ribosome とも関係があ ることを見出した。この知見は AGs の腎障害を追求す る上で、まことに興味あるものと思われるので、報告す る。

I. AGs の細胞内とりこみ (in vivo)

1. 実験材料および方法

生後 12~16 週令の Wistar 系雄性ラット (九大純系 動物飼育室)を1 群4~5 匹とし、水分投与 Kanamycin (以下 KM) 投与群, 48時間脱水 KM 投与群, 48 時間脱水 Dibekacin (以下 DKB) 投与群, 無処置対照 群の4群に分けて用いた。抗生剤の投与量は <sup>3</sup>H-KM 300 mg/kg (120  $\mu$ Ci/kg), <sup>3</sup>H-DKB 150 mg/kg (120  $\mu$ Ci/kg) で,各抗生剤の比放射能はそれぞれ <sup>3</sup>H-KM 32.9  $\mu$ Ci/mg, <sup>3</sup>H-DKB 29.9  $\mu$ Ci/mg であり, 各原末 と混和して生理食塩水に溶解し大腿筋に投与した。ラッ トは、薬剤投与後直ちに水分を補給し、屠殺前 24 時間 絶食とした。

断首屠殺後, 腎を氷冷した 0.45M ショ糖液約 30 ml

で灌流し、直ちに皮質髄質を分離し、髄質はホモジナイ ズ後放射活性,蛋白の測定に供した。腎皮質は Waring blender を用い 0.45M ショ糖液 pH7.0 中でホモジナ イズし、綿布で沪過し、Table 1 に示したように分画違 心を行ない各顆粒を分離した。heavy mitochondria(以 下 Mt. 分画), crude lysosome (以下 Ly. 分画) はそ れぞれピペットで分取し、0.45M ショ糖液に懸濁して 5,900×g 5分間遺心を2度くり返して Mt. と Ly. を 分離し, それぞれ Mt. 分画, Ly. 分画とした。また, light mitochondria 分画中には、かなりの畳の小胞体、 形質膜,刷子緑などの混入が認められたため、data よ り省略した。さらに microsome 分画(以下 s-Ms., r-Ms.) は、DALLNER<sup>6)</sup>の方法により Table 2 に示すよう に、DOC 処理を行ない、内容物、膜成分、ribosome 分 画に細分画した。この方法により分画を行なった対照群 について、各顆粒の標識酵素の分布を測定し、実験条件 の可否について検討を行なった。

活性の測定

acid phosphatase 活性は, p-nitrophenyl phosphate を基質として, alkaline phosphatase は同基質を用いて 0.1M-glycine-NaOH buffer pH 9.5 を用いて活性を測 定した。glucose-6-phosphatase は glucose-6-phos-









phate を基質とし、加水分解によって生成した遊離の無 機リンを、FISKE 6<sup>9</sup>の方法により測定した。cytochrome oxidase は  $1.7 \times 10^{-6}$ M の還元型 cytochrome C を 基質として、COOPERSTEIN 6<sup>10)</sup>の方法で測定した。蛋白 質は、牛血清アルブミンを標準とし、LOWRY 6<sup>11)</sup>の方 法に従って定量した。RNA は5%過塩素酸溶液中で、 80°C, 20 分加温して抽出した後、オルシノール法で比 色定量した。放射活性の測定は溶解補助剤として、 Amersham/Searle 製 NCS を添加して蛋白を溶解した 後、toluen シンチレーター (POPOP 0.1g、DPO 4g/ toluen 1,000 ml) 15 ml を加えてよく混和 し Packard 3375 型液体シンチレーションカウンターにて放射活性 を測定した。

BUN の測定は小野薬品製ユーグラフを用いた。

3. 実験成績

Fig. 1 Serum concentration of <sup>a</sup>H-KM and <sup>a</sup>H-DKB. KM 300 mg/kg (120 μCi/kg), DKB 150 mg/kg (120 μCi/kg) i.m.



Table 3 は無処置対照群腎皮質の分画違心後の各酵素 の分布を示すもので、各酵素の比活性の上昇をそれぞれ ホモジネートの比活性と比較検 計 す る と、acid phosphatase 活性は Ly. 分画 で 約 5 倍、cytochrome oxidase 活性は Mt. 分画で約 8 倍、glucose-6-phosphatase 活性は、s-Ms., r-Ms. 分画でいずれも3倍以上, RNA 含量は ribosome 分画で約 25 倍の上昇を示し、 今後の実験に充分用いられる分離法であると考えられ る。したがってこれら分画中の KM, DKB 濃度を濃定 することにより、各顆粒内に分布する薬剤濃度を得たも のと考えてよいであろう。

#### 1) 血中濃度

<sup>3</sup>H-KM, <sup>3</sup>H-DKB 投与後の血中濃度の推移は, Fig1

Table 3	Specific activities of some enzymes of rat kidney homogenate	
	and subcellular fractions (Control)	

Enzymes	Homogenate	Lysosomes	Mitochondria	Smooth- microsomes	Rough- microsomes	Ribosomes
Protein*	100	1.0	1.2	4.4	4.9	0.7
Acid- phosphatase**	75.6	384.7	48.8	130.3	45.4	-
Cytochrome- oxidase***	0.0511	0.1150	0.4145	-	—	-
Glucose-6- phosphatase**	99.7	-	_	368.3	331.3	-
Alkaline- phosphatase**	64.7	-	-	174.7	130.7	-
RNA****	23.6	-	_	36.1	251.8	590.3

\* : % of total homogenate

\*\* : mμ moles of substrate hydrolysed/min./mg of protein

\*\*\* : mµ moles of reduced cytochrome C oxidized/min./mg of protein

\*\*\*\* : µg RNA/mg of protein

Fig. 2(a) Concentration of <sup>3</sup>H-KM in rat kidney (Water ad libitum)







Fig. 3 Concentration of <sup>a</sup>H-DKB in rat kidney (Dehydrate)



に表わしたように投与1時間後まではほぼ投与量に比例 し、DKB は KM の約 1/2 量の濃度を示している。また 水分投与群(非脱水群)では KM は速やかに排泄され、 24時間後 では  $13 \mu g/ml \ge 30 分値の約 1/45 に減少し$ ているが、脱水群では 3時間後より排泄の阻害が認めら $れ、KM 投与群では 24時間後も <math>36 \mu g/ml \ge 非脱水群$ の2倍以上の高値を示している. この現象は脱水 DKB 投与群で顕著に認められ、投与 24時間後も 30 分値の約1/3 程度の高濃度を保ち、明らかな排泄の阻害が認められた。

## 2) 腎内濃度

<sup>8</sup>H-KM 投与後の腎内濃度は, Fig.2a), b) にみら れるように, 非脱水群では時間の推移とともに KM 濃

Table 4 Distribution of <sup>3</sup>H-KM in rat kidney subcellular fractions (Water ad libitum)

• <u> </u>	Time (hr.)										
Fractions	0	.5		1		3		24			
•	μg*	%**	μg*	%**	μg*	%**	μg*	%**			
Homogenate	5.4	100	7.0	100	4.9	100	4.0	100			
Nuclei	5.5	4.0	8.8	9.0	7.9	11.5	7.3	9.3			
.Lysosomes	3.2	0.4	11.4	0.9	16.6	1.2	13.3	2.3			
Mitochondria	1.8	0.3	3.1	0.4	3.5	0.8	2.2	0. <del>6</del>			
Smooth-Ms.	8.4	3.3	6.0	1.2	4.2	1.4	2.2	1.3			
Contents	5.8	1.9	5.7	0.8	2.5	0.6	1.2	0.5			
Membranes	5.7	0.3	5.0	0.1	3.7	0.2	1.7	0.2			
Rough-Ms.	14.0	6.2	17.5	4.5	10.3	5.5	12.6	7.2			
Contents	3.9	1.0	4.9	0.7	2.3	0.5	2.4	0.8			
Membranes	13.1	0.7	25.3	0.4	8.1	0.7	7.5	0.4			
Ribosomes	47.2	4.5	47.5	3.4	41.5	4.3	35.8	6.1			
Supernatant	6.1	21.2	5.5	16.3	3.4	12.4	1.4	6.5			
Serum***	602.8		530.1		68.4		13.3				

 $\mu g^*$  :  $\mu g \text{ KM/mg of protein}$ 

%\*\* : Recovery of total homogenate

Serum\*\*\* : µg KM/ml

度が漸減するのに比べて, 脱水 KM 投与群では臀皮質 内の KM の蓄積が著明であり, 21時間後も高値で残存 している。脱水 DKB 投与群でも同様に臀皮質内 DKB の蓄積が認められ, 脱水による薬剤の腎皮質内滞留が明 らかであった (Fig.3)。

3) BUN

川脱水 KM 投与群では,軽度の臀障害を示し 24 時 間後の BUN 値は平均 54.6 mg/dl であった。脱水 KM 投与群は,24時間後の BUN の上昇が著しく,15 匹中 5 匹は 150 mg/dl 以上を示し,他のテットもすべて 60 mg/dl 以上と高値を示した。脱水 DKB 投与群ではこの 傾向はさらに強く認められ, 仁例 100 mg/dl 以上の高 値を示し,12 例中 8 例は 150 mg/dl 以上となり明らか な急性臀障害を認めた。



4) 細胞内小顆粒への分布

\*H-KM 投与後の細胞内小器官への分布は、Table 4, Fig. 4 にみられるように、非脱水群では投与1時間でビ ークに達し、以後漸減するが、特に注目すべきことは r-Ms.中に早期に、高濃度に分布することであり、これ は 24 時間後にもほとんど変化せず高値を保っている。 また Ly. 分両では3時間後にピークに達し、やはり 24 時間後でも蓄積されている。さらに、この Ms. 分画を細 分両した結果 では、Table 4, Fig. 5 にみられるように 0.5% DOC 不溶性分画 (ribosome 分画)中に非常に 高濃度に分布し、投与 24 時間後でも血中濃度の減少に もかかわらずなお高値を保っている。この際の酵素の分 布バターンは、Table 5 に示したように、Ly. 分画での acid phosphatase 活性の低下、Ly. 分画, Mt. 分画中





Table 5 Specific activities of some enzymes of rat kidney homogenate and Subcellular fractions 24 hr. after the administration of KM (Water ad libitum)

Fractions	Homogenate	Lysosomes	Mitochondria	Smooth- microsomes	Rough- microsomes	Ribosomes
Protein*	100	0.6	1.0	2.4	2.3	0.7
Acid- phosphatase**	62.4	249.8	50.5	191.9	54.3	_
Cytochrome- oxidase***	0.0538	0.0252	0.1043	_	· · -	_
Glucose-6- phosphatase**	86.4		_	260.9	3 <b>48.4</b>	_
Alkaline- phosphatase**	47.5	_		131.6	77.3	-
RNA****	16.0		—	26.5	119.2	373.2

\* : 20 of total homogenate

\*\* : mµ moles of substrate hydrolysed/min./mg of protein

\*\*\* :  $m\mu$  moles of reduced cytochrome C oxidized/min./mg of protein

\*\*\*\* : µg RNA/mg of protein

での cytochrome oxidase 活性の低下が顕著であるが, これは細胞の変性による顆粒の比重の変化, 凝集の結 果を表わしたものと考えられ, Ms. 分画中での acid phosphatase 活性の上昇とともに,大部分の cytochrome oxidase 活性が 150×g の沈渣および核分画中に回収さ れた。また ribosome 分画中の RNA 含量も低下してい るが、まだ障害は軽度であった。脱水 KM 投与群では、 KM 濃度は Table 6 のような分布を示すが、腎皮質ホ モジネート内 KM 濃度の増加が認められる。KM 投与 1時間後まではほぼ非脱水群と同様のパターン を示す

Table 6 Distribution of <sup>3</sup>H KM in rat kidney subcellular fractions (Dehydrated)

	Time (hr.)										
Fractions	0	5		1		3		24			
	μg•	°••	μg•	0.0 <b>*</b> •	μg*	0	μg•	<i>σ</i> _ <b>•</b> •			
Homogenate	7.8	100	11.0	100	12.5	100	19.5	100			
Nuclei	7.3	5.9	10.5	3.7	16.0	7.6	18.8	6.9			
Lysosomes	4.8	0.4	17.1	0.5	19.7	0.8	12.3	0.1			
Mitochondria	1.9	0.4	3.6	0.3	5.0	0.4	12.0	0.4			
Smooth-Ms.	8.1	2.5	8.9	1.9	11.0	1.9	17.0	1.0			
Contents	5.8	1.0	10.0	1.3	10.7	1.3	15.3	0.8			
Membranes	6.8	0.7	11.8	0.4	14.2	0.4	17.5	0.2			
Rough-Ms.	17.1	5.1	26.8	5.5	23.8	5.4	11.6	0.5			
Contents	3.8	0.5	11.2	1.8	13.1	1.4	11.8	0.4			
Membranes	11.6	1.0	47.5	0.8	41.5	0.9	20.9	0.1			
Ribosomes	47.8	3.7	62.0	3.6	60.0	3.1	5.3	0.1			
Supernatant	8.2	22.9	11.7	21.2	11.0	17.5	18.3	20.8			
Serum***	537.8		524.4		313.2		36.0				

 $\mu g^*$  :  $\mu g \text{ KM/mg of protein}$ 

%\*\* : Recovery of total homogenate

Serum\*\*\* : µg KM/ml

Values are expressed the average of three experiments

Table 7	Specific activities of some enzymes of rat kidney homogenate and
	subcellular fractions 24 hr. after the administration of KM
	(Dehydrated)

Enzymes	Homogenate	Lysosomes	Mitochondria	Smooth- microsomes	Rough- microsomes	Ribosomes
Protein*	100	0.2	0.7	1.1	0.8	0.3
Acid- phosphatase**	63.9	90.0	59.1	318.3	118.1	
Cytochrome- oxidase***	0.0271	0.0587	0.1158			
Glucose-6- phosphatase**	56.9	_	_	85.1	36.4	
Alkaline- phosphatase**	48.6	_	-	160.6	124.0	
RNA****	18.7	_	_	24.0	30.2	48.5

\* : % of total homogenate

\*\* :  $m\mu$  moles of substrate hydrolysed/min./mg of protein

\*\*\* :  $m\mu$  moles of reduced cytochrome C oxidized/min/mg of protein.

\*\*\*\* : µg RNA/mg of protein

か、3時間後ではすでに腎障害によると思われる細胞の 変性の影響が現われ、酵素の分布パターンに変化が生 じ、24時間後ではさらに激しい変動を示した(Table 7)。 この時点では 60% 以上の KM が 150×g 沈高およひ核 分画中に回収され、ribosome 分画での KM 濃度が激減 しているが、これは顆粒からの KM が消失ではなく、 細胞の変性により顆粒の分布パターンに変化を生じた結 果であり、このような障害腎ではすでに正常な顆粒の分 離が不可能となっている。すなわち各酵素の全活性は径 とんど対照群に比べて低下し、 acid phosphatase 活性

Table 8	Distribution	of	<sup>3</sup> H-DKB	in	rat	kidney	subcellular	fractions	(Dehydrated)	)
---------	--------------	----	--------------------	----	-----	--------	-------------	-----------	--------------	---

	Time (hr.)										
Fractions	0	.5		1		3		24			
	μg•	0,0 • •	μg•	20.00	μg•	°	μg.	%••			
Homogenate	5,0	100	9.4	100	9.0	100	15.1	100			
Nuclei	8,3	3.0	9.8	4.4	13.2	6.4	15.9	20.6			
Lysosomes	5.5	0.7	9.0	0.8	18.3	1.3	15.3	0.2			
Mitochondria	4.3	0.6	5.2	0.8	6.5	1.1	15.4	1.0			
Smooth-Ms.	10.9	2.9	10.1	3. <b>1</b>	8.3	3. <b>6</b>	16.3	0.9			
Contents	5.6	1.3	6.8	1.5	5.1	1.5	8.4	0.3			
Membranes	7.0	0.5	12.2	0.8	10.2	1.1	23.0	0.2			
Rough-Ms.	23.8	9.3	28.2	8.4	26.8	8.2	7.4	0.3			
Contents	5.4	1.6	ô.4	1.2	5.1	1.1	5.7	0.1			
Membranes	8,8	0.6	26.4	0.7	17.1	1), <b>H</b>	16.4	0.1			
Ribosomes	56.0	7.1	76.2	6.5	66. <b>8</b>	6.4	5.6	0.2			
Supernatant	2.8	8.9	3.9	8.2	3.2	7.5	10.5	17.4			
Serum***	322.6	•••••••••••	254.7		223.9		107.8				

 $\mu g^*$  :  $\mu g DKB/mg$  of protein

%\*\* : Recovery of total homogenate

Serum\*\*\* : µg DKB m!

Values are expressed the average of three experiments

#### Table 9 Specific activities of some enzymes of rat kidney homogenate and subcellular fractions 24 hr. after the administration of DKB (Dehydrated)

Enzymes	Homogenate	Lysosomes	Mitochondria	Smooth- microsomes	Rough- microsomes	Ribosomes
Protein*	100	0.3	1.0	0.8	0.7	0.4
Acid- phosphatase**	61.7	93.2	87.4	126.5	282.0	_
Cytochrome- oxidase***	0.0311	0.0516	0.0891	-	_	—
Glucose-6- phosphatase**	50.6	-	_	39.2	40.2	-
Alkaline- phosphatase**	39.8	—	_	95.7	62.4	-
RNA****	15.8	_	_	27.8	33.9	22.4

\* : % of total homogenate

\*\* : mµ moles of substrate hydrolysed/min./mg of protein

\*\*\* : mµ moles of reduced cytochrome C oxidized/min./mg of protein

\*\*\*\* µg RNA/mg of protein

を指標とする Ly、顆粒の変性 (s-Ms., r-Ms. での同群 素の活性の上昇), Mt., Ms. 分画などの凝集が顕著であ った。

脱水 DKB 投与群でもこの 傾向は同様に認められ (Table 8, 9), 酵素分布パターンの変動とともに<sup>3</sup>H-DKB の分布も異常を示し, DKB による細胞の 変 性, 崩壊を示唆する結果を得た。

しかし KM, DKB, いずれの薬剤も投与後 30 分です でに ribosome 分画中に高濃度に分布し、少なくとも細 胞変性が軽度であった 3 時間後までは他の細胞内顆粒に 比べて著しい高値を保っている。またこの 分 画 は 0.26 % DOC, 0.5% DOC 処理によって得られた 沈 渣 で あ り、このような厳しい条件下においても遊離せず残存し ていることから、 KM および DKB は腎 ribosome と かなり強固な結合をしているものと考えられる。

Table 10 は KM, DKB 投与1 時間後の各薬剤の細胞 内分布を比較したものであるが, KM は 300 mg/kg, DKB は 150 mg/kg 投与で あり, 血中濃度はそれに比 例して KM は DKB の2倍値を示しているにもかかわ らず, 腎皮質内とりこみは両薬剤ともほぼ等しく, 各分 画中にも Ly. 分画を除いてほぼ同程度に分布し, ribosome との結合量は KM よりも DKB がより高値を示 した。当然の結果として細胞質可溶性分画中の DKB 濃 度は KM に比べてはるかに低く, 1/2 以下の低値であ った。このことは DKB は KM よりも腎皮質内にとり こまれやすく, 蓄積の程度も激しいことを意味するもの

Table 10 Comparison of <sup>3</sup>H-KM and <sup>3</sup>H-DKB concentration in kidney subcellular fractions after the administration at 1 hr.

Enertian	К	M	DKB					
Fractions	µg*	%**	μg*	%**				
Homogenate	11.3	100	9.4	100				
Nuclei	10.5	3.7	9.8	4.4				
Lysosomes	17.1	0.5	9.0	0.8				
Mitochondria	3.6	0.3	5.2	0.8				
Smooth-Ms.	8.9	1.9	10.1	3.1				
Rough-Ms.	26.8	5.5	28.2	8.4				
Ribosomes	62.0	3.6	76.2	6.5				
Supernatant	11.7	21.2	3.9	8.2				
Serum***	524.4		254.7					
μg*     : μg KM and DKB/mg of protein       %**     : Recovery of total homogenate       Serum***     : μg KM and DKB/ml       Dosage     : KM 300 mg/kg (120 μCi/kg)       DKB 150 mg/kg (120 μCi/kg)								

であり、前述した血中濃度の排泄阻害と併せ考えて非常 に興味ある結果を得たと考えられる。

また肝臓中の<sup>®</sup>H-DKB 濃度も検討したが, 投与1時 間後においてホモジネートで 0.17 µg/mg 蛋白質 であ り, 腎皮質ホモジネートの約 1/50 の濃度であった。分 面後の各分画内分布は, 腎と同様 ribosome 分画中でホ モジネートの約 14 倍と最高値を示したが, 腎に比べて はるかに低値であった。

II. in vitro における AGs と microsome との結合 前述のように、in vivo 実験系では KM, DKB は、 r-Ms.特に ribosome と強く結合しているが、in vitro の実験系で、はたして同様の現象が起こりちるかどうか

について検討を行なった。 1. 実験材料および方法

正常 ラット腎皮質を 0.45M ショ糖液中でホモジナイ ズし, 10,000×g 20 分間遠心後の上清(以下 10,000×g 上清)をさらに 105,000×g 60 分間遠心して全 microsome(以下 Ms.分画)を得た。この Ms.分画に, Table 11 に示したように <sup>3</sup>H-KM を添加し, 105,000 ×g 60 分の遠心をくり返して吸着した <sup>3</sup>H-KM を除い た後,沈渣を 0.45M ショ糖液に懸濁して <sup>3</sup>H-KM 結 合Ms.分画とした。反応系には肝細胞可溶性分画を添 加し, RNA ase inhibitor の供給源とした。

2. 実験成績

1) KM と microsome との結合

Fig.6 は添加した KM 量と Ms. 蛋白への KM の結合 量を表わしたもので、両者の間には明らかな相関関係が 認められた。

Table 11 Preparation of <sup>8</sup>H-KM bound microsomes

Reaction mixtur	e					
Kidney mic	l protein	10 mg				
Liver supe	rnatant	protein	1 mg			
<sup>3</sup> H-KM so	lution (	0.8µCi′ml)	0.1 ml			
KM solutio	on (23)	0mg/ml/	0.1 - 0.3 ml			
0.45M suc	rose-E	DTA	0.5-0.7 ml			
To	ıme	2.0 ml				
Incubated	at 37°C	for 20 min.				
		105,000×g (	30 min.			
Pell	et	Superna	tant(first)			
Suspended in 0.45M sucrose- EDTA	Suspended in 0.45M sucrose- EDTA 105,000×g 60 min.					
Pellet Supernatant (second)						
Suspended in 0.45M sucrose-EDTA <sup>3</sup> H-KM bound microsomes						





2) pH および KCl 溶液による KM の遊離

KM 結合 Ms. 分画において, KM の結合様式を検討 する手段の一つとして, pH による KM の Ms. 分画 からの遊離について検討を行なった。Table 12 に示す ように, 分離した Ms. 分画 中に, Table 11 の方法で <sup>3</sup>H-KM を添加し, 過剰の KM を除いた KM 結合 Ms. 分画を BRITTON-RIBINSON<sup>12)</sup>の広域緩衝液 pH4~ 10 に懸濁し,二度遠心をくり返して上清,沈渣中の <sup>3</sup>H-KM 濃度を測定した。同様の実験を 1.14% KCI 溶





液,次いで 7.5% KCl 溶液を用いて行ない,塩による Ms. 分画からの KM の遊離について検討した。結果は Fig.7 に示すように,KM-Ms. の結合は pH5~6で最 も強く,pH がアルカリ側に傾くにつれて KM の遊離 が増加することが認められた。対照として示 した結果 は,0.45M ショ糖液 pH7.0 中で同じ操作を行なった ものであり、等張ショ糖液中では KM はほとんどMs. より遊離しないことがわかった。また塩による洗浄の結

Table 12 Preparation of <sup>3</sup>H-KM bound microsomes

Kidney (12.5%	cortex homogenate:	w v)	
(	650×g 1	0 min.	
Pellet (discarded)	Supe 1	rnatant 10,000×g 20 min.	
Pellet (discarded)		Supernatant   105,000×   60 min.	Śg
Suspended in 0.45M sucrose-0.68mM EDTA Suspended in 0.45M sucrose-EDTA added <sup>3</sup> H-KM solution	Pellet 105,000× Pellet 105,000× 60 min.	g 60 min. Superna Superna (discard	itant led) atant led)
0.016µCi/mg of protein Suspended in 0.45M sucrose-EDTA	Pellet 105,000×	Superna g 60 min. <sup>(discard</sup>	atant led)
Suspended in buffers (pH 4-10)	Pellet 105,000× 60 min.	Superna g (discard	atant led)
Suspended in buffers (pH 4-10)	Pellet 105,000× 60 min. Pellet	Supernatant -	-Soluble fraction
Suspend sucrose <sup>3</sup> H-KM	ed in 0.45M -EDTA bound microson	mes	

Fig.8 Effect of pH on the release of <sup>8</sup>H-KM from microsomes



果でも、7.5% と高濃度の KCl 液を用いたにもかかわ らず、沈渣中の KM 濃度は全 Ms. 分画中の 16% 程度 も残存していた。また pH 10 の緩衝液で処理した結果 でも、沈渣中の KM 量は全 Ms. 分画中の 15% を示 し、かなり強固な結合であること、単なるイキン結合の みでないことが明確になった。Fig.8 は、 KM-Ms. 蛋 白の結合に及ぼす pH の影響を図にまとめて表わしたも のである。

3) 臓器特異性について

前述のような KM-Ms. の結合が, 腎 ribosome に特 有なものか, またはある程度の濃度があればどの臓器で も起こりうるかどうかについて以下の検討を 加え てみ た。

比較する臓器として、 ラットの腎臓および 肝臓 を用 い、両臓器の Ms. 分画について KM の結合を検討し た。腎皮質、肝臓はそれぞれ 0.45M ショ糖液, 0.25M ショ糖液 pH 7.0 中でホモジナイズし、10,000×g 上清 を得、この中に<sup>3</sup>H-KM を 4  $\mu$ g/mg-蛋白となるよう に添加し、Table 1, 2 に示したよう な方法 で s-Ms., r-Ms. の分離、および ribosome の分離を行 ない、各

#### Table 13 Comparison of <sup>3</sup>H-KM concentration in submicrosomal fractions of rat kidney and liver

··· ··································	Kid	ney	Liver		
Fractions	µg•	0 <sub>0</sub> ++	μκ.	20**	
Smooth-microsomes	2.21	3.9	1.69	2.8	
Contents	1.01	0.9	0.61	0.6	
Membranes	1.76	1.2	1.73	1.2	
Rough-microsomes	12.58	20.3	13.27	26.2	
Contents	1.36	1.1	0.81	0.9	
Membranes	5.94	2.1	8.43	6.8	
Ribosomes	41.58	17.1	45.52	18.4	

 $\mu g^*$  :  $\mu g \text{ KM/mg of protein}$ 

 $\mathcal{D}_{0}^{**}$ : Recovery of 10,000 × g supernatant

分画中の<sup>8</sup>H-KM 濃度を測定した。Table 13 はその結 果を示したものであるが, *in vitro* においては腎, 肝, いずれの臓器でも KM は同等に ribosome と結合し, 臓器による特異性は認められなかった。

4) KM と RNA

前述のようにして得られた腎 Ms. 細分画中の KM と RNA 含量の比を検討すると, Table 14 に示したよ うに, KM は Ms. の蛋白質ではなく RNA に対して 一定の割合で結合していることが明らかになった。この 結果をさらに確認するため,得られた KM 結合 Ms. 分画について,蛋白と KM との関係を検討してみた。 Table 15 に示すように,DOC, KCI 液などの処理を行 なうにつれて,蛋白は可溶性分画へ移行し,ribosome 分画ではわずかに 17%程度残存するのみであるが,KM はこれに反し,このような操作によっても容易に遊離せ ず,全 r-Ms. 結合 KM の約 70% が ribosome 分画中 に残存していた。

III. AGs による蛋白合成阻害 (in vivo)

AGs と ribosome との結合は前述した実験により明 らかとなったが、このように AGs と結合した ribosome

Table 14 Distribution of <sup>3</sup>H-KM in submicrosomal fractions

Fractions	$\begin{array}{c} Protein \\ \begin{pmatrix} \% & of \ 10,000 \times g \\ supernatant \end{pmatrix} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KM} \\ \left( \begin{array}{c} \mu g / mg & \text{of} \\ \text{protein} \end{array} \right) \end{array}$	$ \begin{array}{c} \text{RNA} \\ \left( \begin{array}{c} \mu g \ / mg \ of \\ \text{protein} \end{array} \right) \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{KM} \\ \left( \begin{array}{c} \mu \text{g}/\text{mg of} \\ \text{RNA} \end{array} \right) \end{array} $
Smooth-microsomes	6.8	2.21 (1)	32.6 (1)	61.0 (1 )
Rough-microsomes	6.5	12.58 (5)	162.8 ( 5.7)	73.1 (1.2)
Ribosomes	1.6	41.58 (22)	713.7 (21 )	63.4 (1 )

Radioactivity (% of total)	Protein (% of total)	
100	100	
6.0	52,6	
16.3	30.3	
6,9	0.4	
70.6	<b>16</b> .7	
	Radioactivity (% of total) 100 6.0 16.3 6.9 70.6	

#### Table 15 Release of <sup>3</sup>H-KM and protein from rough microsomal fraction

Values are expressed the average of five experiments

が正常な蛋白合成機能を保っているかどうかについて以 下の実験を行なった。

1. 実験方法

48時間脱水したラットに、KM 300 mg/kg を大腿筋 内に投与し、直ちに水分を補給し、KM 投与 30 分、1 時間、3 時間、12 時間後に <sup>3</sup>H-leucine 50  $\mu$ Ci/kg を腹 腔内投与し、30 分後に 屠殺、腎は in situ で水冷した 0.45M ショ糖液 pH7.0 で灌流した後摘出した。 肝は 摘出後、門脈より 0.25 M ショ糖液 pH7.0 で灌流し, それぞれショ糖液中で 12.5% ホモジネートを作成し、 常法により Ms. 分画を分離した。

また Gentamicin (以下 GM) を 150 mg/kg 腹腔内, 120 mg/kg, 80 mg/kg を大腿筋内に 投与し, 同様に Ms. 分画を分離した。<sup>3</sup>H-leucine のとりこみについて は腎皮質ホモジネート 0.5 ml, Ms. 分画 1.0 ml を分取 し、10% TCA 溶液 1.0 ml を添加, 氷中で 30 分間放置 した後, 3,000 rpm 15 分間遠心して沈渣を得,再び 10 % TCA, 次いで氷冷した精製水 2.0 ml に懸濁して遠 心し沈渣を得た。精製水による洗浄を二度くり返して吸 着した leucine を除いた後, 0.1 N NaOH 1.0 ml を加 えて加温溶解し, この 0.2 ml を分取して toluen シン チレーター, NCS の系を加えて混和し放射活性の 測定 に用いた。一部は蛋白量の測定に供し,前述の操作によ る蛋白の回収を検定したが,いずれも 95% 以上の回収 を認めた。

腎, 肝における<sup>8</sup>H-leucine のとりこみに及ぼす
 KMの影響

Table 16 に示したように、KM 投与ラットの腎にお いては、経時的に<sup>3</sup>H-leucine のとりこみが阻害され、 Ms. 分画の TCA 不溶性分画への<sup>3</sup>H-leucine のとり こみは、12 時間後で対照群の約 1/2 程度に 減少 した (Fig. 9)。これに 反し、同ラットから摘出した肝におい ては全くとりこみ阻害が認められず (Fig. 10)、KM 投

#### Table 16 Effects of KM on the incorporation of <sup>3</sup>H-leucine into rat kidney and liver (% of control values)

ł	Kidney	Liv	/er	
Cortex	Microsomes	Homogenate	Microsomes	
81.1	66.5	100.1	<b>9</b> 0.0	
68,3	58.3	104.0	97.4	
79.5	59.9	106.2	100.6	
64.7	44.6	102.3	102.0	
	F Cortex 81.1 68,3 79.5 64.7	Kidney           Cortex         Microsomes           81 1         66.5           68,3         58.3           79.5         59.9           64.7         44.6	Kidney         Liv           Cortex         Microsomes         Homogenate           81 1         66.5         100.1           68.3         58.3         104.0           79.5         59.9         106.2           64.7         44.6         102.3	

Values are expressed the average of three experiments

Fig. 9 Effect of KM on the incorporation of <sup>4</sup>Hleucine into rat kidney after the administration of 300 mg/kg



Fig. 10 Effect of KM on the incorporation of <sup>3</sup>Hleucine into rat liver after the administration of 300 mg/kg



与後の KM の 臓器内濃度の差による影響が明確に認め られた。

 2) 腎における <sup>3</sup>H-leucine とりこみに及ぼす GMの 影響

GM 投与ラットにおいても、KM 投与ラットと同様

Time	80	) mg/kg i.1	n.	120 mg/kg i.m.		150 mg/kg i.p.			
(hr.)	Whole kidney	Cortex	Micro- somes	Whole kidney	Cortex	Micro- somes	Whole kidney	Cortex	Micro- somes
0.5	108.0	109.9	100.4	90.4	87.6	74.3	56.6	57.4	50.6
1	95.8	95.9	80.6	71.0	75.2	67.5	61.2	53.0	46.9
3	97.1	96.0	82.7	54.0	54.8	54.8	74.7	66.5	56.0
12	100.5	94.0	102.5	91.5	88.8	84.0	63.6	58,0	49.3

Table 17 Effects of GM on the incorporation of <sup>3</sup>H-leucine into rat kidney (% of control values)

Values are expressed the average of three experiments





に<sup>3</sup>H-leucine のとりこみ阻害が認められ、濃度依存性 がみられるようであった。

Table 17, Fig. 11 で示すように, GM 80 mg/kg 投 与群では投与 30 分後ではまだ対照群に比べて変化は認 められず, 1時間後においてやや変化が認められた。す なわち Ms. 分画で対照群の約 80% と軽度のとりこみ 阻害を示したが, 12 時間後ではすでに回復していた。 GM 120 mg/kg 投与群では 30 分後ですでにとりこみ阻 害が認められ, 3時間後で最高の阻害程度を示したが, 12 時間後ではほぼ同様の傾向を示した。

これに対し、150 mg/kg 投与群では 30 分後ですでに 対照の約 50% と強いとりこみ阻害を示し、12 時間後に いたっても回復の傾向を認めなかった。また 120 mg/kg 投与群と 150 mg/kg 投与群との間で、<sup>3</sup>H-leucine とり こみ阻害の peak の時間的ずれが認められるが、これは 投与経路の違いによる GM の吸収速度の時間的 ずれ を 示すものであろう。

IV. AGs による蛋白合成阻害 (in vitro)

1. 実験材料および方法

## Table 18 Preparation of rat kidney ribosomes



雄性 Wistar 系ラット4匹を1群とした。実験に使用 するショ糖は、RNA ase を含まない、Sigma 製 grade 1 のものを用い、50 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol を含む 0.25M ショ糖液 pH7.4 で分画を行なった。

1) ラット肝からの可溶性分画の調製

==、トを断首放血した後, 肝を摘出し, 氷冷した 0.25 M ショ糖液で灌流し, 2.5 容 (w/v) のショ糖液中で Waring blender の最高スピードで, 30秒間ホモジナイ ズし, 約 30% ホモジネートとした。これを 650×g 10 分間遠心し, 上清をさらに 10,000×g, 20 分間遠心し た。得られた 10,000×g 上清を 105,000×g, 120 分間 遠心して肝細胞可溶性分画を分離した。

2) ラット 腎からの ribosome 分画の分離

ラットを断首放血し, in situ で動脈より 0.25M ショ 糖液約 30 ml を注入して灌流し腎を摘出する。摘出した 腎を肝細胞可溶性分画中で細切し, Waring blender の 最高スピードで 30 秒間ホモジナイズし, Table 18 に示

Kidney ribosome	$12.5 A_{260}$ unit
Liver cell supernatant	4.0 mg protein
ATP	2.5 $\mu$ mole
GTP	$0.4 \mu mole$
Phosphoenolpyruvate	10.0 $\mu$ mole
Dithiothreitol	$0.5 \mu mole$
Pyruvate kinase	50.0 µg
Tris-HCl buffer pH7.6	50.0 $\mu$ mole
$MgCl_2$	10.0 $\mu$ mole
KCl	25.0 µmole
Sucrose (RNAase free)	250.0 µmole
<sup>3</sup> H-leucine	1.0 μCi
Antibiotics solution	q.s.
Final volume	1.0 ml

した方法で分画遠心し, 沈渣を 0.25M ショ糖液に懸濁 して ribosome 分画とした。表中の 0.5M ショ糖液に懸濁 50 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol を含む pH7.4 の溶液である。このよう にして得られた ribosome 分画は, A<sub>260</sub> と A<sub>280</sub> (RNA の吸収と蛋白の吸収) の比が 1.3~1.4 であり, 充分実 験に用いられる条件であった。A<sub>260</sub> の吸収を測定し, 50 unit/ml となるように 0.25M ショ糖液で希釈して実 験に用いた。

3) 反応系の検討

分離した ribosome 分画を用いて, cell free 系<sup>13</sup>) で <sup>3</sup>H-leucine を基質として蛋白合成を行なわせた。37℃ で振とうしながらインキュベートし, Table 19 に示し た反応系を用い, leucine 添加後 1 分から 30 分まで経 時的に反応を停止させ, 各時点での <sup>3</sup>H-leucine のとり こみ量について検討した。反応停止は 10% TCA 2.0 ml を加えて、3,000rpm 20 分間遠心して沈渣を得た。 この沈渣をさらに5% TCA 1回, エタノール3回, アセトン3回, 熱5% TCA 1回, 精製水1回の順で 遠心操作をくり返して吸着した leucine を除いた後, 溶解補助剤として Amersham/Searle 製 NCS を 1 ml 加えてよく攪拌して沈渣を溶解する。溶液をバイアルに 移し toluen シンチレーター (POPOP 0.1g, PPO 4g/ toluen 1,000 ml) 10 ml を3回に分けて遠心管をよく 洗いながらバイアル中に加え混和する。試料はPackard Model 3375 型液体シンチレーションカウンターで放射 能を測定した。

また ribosome 量と <sup>3</sup>H-leucine のとりこみ量につい ても, ribosome 2.5 unit から 40 unit を用い,反応時 間 10 分間として同様の検討 を 加え た。この 結果, ribosome 12.5 unit を用いての <sup>3</sup>H-leucine のとりこみ は, 添加後 5 分までは直線的に増加するが以後はゆるや かとなり, 10 分後 に peak に達し以後平衡状態となっ た。

ribosome 量との関係では, ribosome 15 unit までは <sup>3</sup>H-leucine のとりこみと相関関係を示し, 直線的にと りこみが増加するが, 15 unit 以上の量では平衡に達し た。したがって Table 19 に示したように ribosome 12.5 unit とし, 反応時間を 10分間として実験を行なっ た。使用した薬剤は AGs 系抗生剤の, KM, GM, Netilmicin (以下 NTL), DKB であり, 対照群として cephalosporin 系抗生剤のうち, Cephaloridine (以下 CER) を, それぞれ注射用蒸留水に溶解して反応系に添 加した。

2. 実験成績

1) 蛋白合成に及ぼす AGs の影響

腎 ribosome を用いての上述の蛋白合成系では、薬剤 を加えない control での <sup>3</sup>H-leucine のとりこみは、 1,113.8 dpm/1  $A_{260}$  unit±S.E. 180.1 であった。この値 を 100 として、各薬剤の <sup>3</sup>H-leucine のとりこみを%で 表わしたものが Table 20 である。この表で明らかなよ うに、<sup>3</sup>H-leucine のとりこみ阻害は、いずれの AGs

Table 20	Effects of antibi	otics on	the bios	synthesis -	of	protein	of	rat
	kidney ribosome	s (% of	control	value)				

µg/ml	KM	NTL	GM	DKB	CER
10	$102.2 \pm 3.2$	$97.4 \pm 7.7$	$92.3 \pm 7.1$	$76.0\pm 6.5$	$98.7 \pm 8.9$
40	$97.2 \pm 6.9$	$81.6 \pm 10.4$	$52.5 \pm 10.1$	$31.5\pm9.8$	$96.1 \pm 8.9$
80	$82.6\pm9.8$	$60.8\pm~6.3$	$26.4\pm$ 3.6	$17.5 \pm 4.2$	$99.2\pm4.2$
400	$41.7 \pm 6.4$	$22.1\pm~4.7$	$10.3\pm~2.4$	$10.2 \pm 4.1$	$102.3\pm4.2$
800	$23.7\pm3.0$	$17.0\pm~4.7$	$7.9\pm~1.8$	$9.6 \pm 3.3$	$95.2 \pm 9.1$
1,600	$17.2 \pm 5.2$	$15.0\pm~5.8$	$7.0\pm~2.1$	$9.5 \pm 4.2$	$97.8 \pm 1.6$

Values are expressed the average  $\pm$  S.E. of five experiments



でも濃度依存性を示し、その強さはほぼ腎毒性と一致し て DKB, GM, NTL, KM の順であった。これに対し CER は in vivo では強い<sup>3</sup>H-leucine のとりこみ抑制 を示したにもかかわらず, in vitro では全く阻害作用を 認めなかったが, この事実についてはさらに別方面から の検討が必要であろう。以上を図にまとめたものが, Fig 12 であり, 横軸は片対数を用いて薬剤濃度を表わ し、縦軸は各濃度における<sup>3</sup>H-leucine のとりこみをコ ントロールの%として表わしたものである。このような ラット腎由来の ribosome 分画を用いる検索方法は, わ れわれが開発した方法であるが, 少なくとも AGs 系薬 剤においては, 腎毒性の強さと蛋白合成阻害作用に相関 関係があり, 今後の腎毒性の検討に興味ある一つの条件 を得たといえよう。

## V. 考 察

われわれは、かつて KM と Dextran の同時投与に よる腎障害を検討し、その腎障害は近位尿細管上皮細胞 の変性、壊死であることを見出したが、さらに細胞内小 器官レベルでは、これらの薬剤は近位尿細管上皮細胞の lysosome に集まり、lysosome は phagolysosome とし て巨大な空胞状の所見を呈することを報告した<sup>5,6)</sup>。この phagolysosome はかなり脆弱になっており、この phagolysosome の崩壊にともない、lysosome 酵素が 遊出 し、次いで細胞自体が自家融解的過程により障害される 可能性を、われわれは同時に提唱した。しかし、このよ うに phagolysosome が巨大化する理由は不明であり、 lysosome による Dextran の処理が KM によって障害 されるのか、または KM によって lysosome 酵素の形 成そのものが阻害されるのか、いろいろの過程が考えら

れるであろう。 一般に AGs 単独の場合でも, 腎障害の部位は尿細管 上皮細胞であり<sup>1~4)</sup>, この毒性は薬物の大部分が腎から 排泄されることと関連している。そして、この排泄され るべき薬剤が腎に蓄積することはよく知られている。 ALFTHANS 614) (1973), 26K LUFT 616) (1974) 4, AGs が血清中よりも腎内にはるかに長く残ることを認 めたが、この現象は Streptomycin で最も弱く KM, Tobramycin が中等度であり、GM がもっとも強かった。 彼らはイスに 10 mg/kg の GM を投与した後 11 日日 までの腎内薬物動態を観察し、腎組織内での 半 減 期 が 109 時間であることを認めた。また FABRE ら<sup>16</sup>は, Wistar 系雌性ラットに 4 mg/kg の GM および Sisomicin を腹腔内に1回注射し、以後経時的に血清、尿、 腎などの濃度を測定した。その血清濃度は、1時間後に 6.3±1.8µg/mlに達するが、その後急速に減少し、半 減期は約 90 分であり、6時間後にはほとんど認められ なくなる。しかし腎では全く異なり腎皮質濃度は6時間 後に最高になり、123±20 µg/g と血清濃度の 20 倍にも 達し、以後ゆるやかに下降するが 28 日目においても、 平均7µg/gの濃度を示し、半減期は166時間にも達す ることを見出した。

この蓄積は、腎皮質の細胞内ではどこに起こるのであ ろうか。SILVERBLATT ら<sup>17)</sup> (1979) は SD 雌ラットに <sup>8</sup>H-GM を静注し、その後 10 分、1 時間、24 時間の薬 剤の腎内動態を観察したが、光顕的には GM はほとん どすべて近位尿細管に集まっているようにみえたと報告 している。さらにオートラジオグラフィーで追求した結 果、GM は投与 10 分後には、近位尿細管上皮細胞の apical vesicle に認められ、1 時間および 24 時間後に は lysosome に認められたとしている。彼らはこの所見 は GM が pinocytosis によって近位尿細管上皮細胞に 入り、lysosome 内に蓄積されるのであろうと考えてい るが、同様の所見が Just ら<sup>18)</sup>によっても報告されてい る。

AGs は、投与後比較的早期に、まだ腎機能になんらの 異常のない時期においても、尿細管上皮細胞にミエリン 様物質をもった cytosegresome を出現させる<sup>1,2,4~6)</sup>。 この cytosegresome は HRUBAN ら<sup>19)</sup> (1972) によれ ば、細胞内形質の分解によって形成された secondary lysosome と考えられている。この多数の lysosome の 出現、またさらにその崩壊が細胞の障害をもたらすのか どうかが問題であるが、TULKENS ら<sup>20)</sup>はラット線維芽 細胞の培養細胞を用いた実験において、細胞に蓄積した AGs は、細胞内でほとんど lysosome に集積しており、 他の核、mitochondria、ribosome などには認められ なかったとしている。そしてこの lysosome に蓄積した 薬剤が lysosome 酵素を抑制し、lysosome 機能を障害 するのではないかというのである。

われわれも、先に述べた KM, Dextran 同時投与に よる腎障害では、2次性の phagolysosome が脆弱とな っており、この lysosome の崩壊とそれに伴う lysosome 酵素の遊出が自家融解的細胞障害を起こす可能性を示唆 した<sup>5,6)</sup>。以上のようにある時間的経過のなかで AGs が lysosome に集積することは確実であるが、この集積の 過程に問題があるであろう。これにはおおよそ2つの基 本的絕路が考えられる。 第一は pinocytosis または, basolateral membrane を通して細胞内に入った AGs は、他の mitochondria, endoplasmic reticulum など の細胞内小器官に何らの影響も与えず無変化のまま直接 lysosome に入り、そこで蓄積 され、lysosome 酵素を 阻害する。という考えであり、またこれと反対に、何ら かの方法で組織内にとりこまれた AGs は直接 lysosome に入るのではなく、他の細胞内小器官に結合し、そこに おいて障害を起こし、それによって崩壊した遺残物質と ともに lysosome にとりこまれ、そこに蓄積するという ことも考えられる。そして以上2つの経路が両者とも存 在する可能性もあるわけである。この経路を考える場 合,第一の経路を主張する報告は多いようである<sup>15,18,20</sup>。 第二の考え方は AGs によって完全に lysosome 外で 障害が起こった場合、その崩壊物の消化器官として、 lysosome が機能し、その機能が障害されて、 lysosome 内に異常な蓄積を起こすと考えるのであるが、これだけ を薬剤の唯一の細胞内の動きと考えるのは無理かも知れ ない。しかし AGs が lysosome だけでなく, 他の小器 官、細胞質内蛋白と結合する可能性は充分にあるのであ り、われわれの実験もそれを支持するものである5.6%。

われわれは AGs を投与した動物の腎を, 通常の細胞 分画法に従って分画し, その lysosome 分画ばかりでな く microsome 分画にも AGs の結合を 認め, また in vitro では分離調製した microsome と AGs が比較的 容易に結合し, その結合は, かなり強固なものであるこ とを認めた。この AGs は microsome の なか で も, ribosome と結合していると考えられ, 単なる吸着とは 違っている。この結合によって細胞はどのような影響を 受けているか, また受ける可能性があるか, これが AGs の腎毒性追求のうえで重要な問題であるが, この点につ いての検討は従来ほとんどなされていない。

一般に AGs は細菌の ribosome における蛋白合成を 阻害し、それによって抗菌力を発揮するとされている。 そしてこれらの抗生物質は細菌の ribosome には作用す るが、動物の ribosome には作用しにくいというのであ る。これは両者の ribosome の構造の差によるもので、 薬剤の選択毒性はこの差に由来するとされている<sup>70</sup>。 細 菌の ribosome は沈降定数 70 S、分子量約 2.7×10<sup>6</sup> で、 30 S と 50 S の subunits よりなる。これに対し、動物の ribosome は、他の真核細胞と同じく、沈降定数 80 S, 分子量約 3.4×10<sup>6</sup> のものが多く、40 S と 60 S の subunits からなる。しかし、KURTZ<sup>21)</sup> は、chicken embryo の mitochondrial ribosome での蛋白合成が、 AGs で阻害されると報告している。

さらに WILLIELM ら<sup>22</sup>は小麦胚芽から得た無細胞蛋白 合成系を用いて、AGs の蛋白合成阻害について検討し、 いくつかの AGs が蛋白合成の阻害を起こすことを認め ている。

われわれも通常の蛋白研究法に従い、ラットの肝およ び腎より得た無細胞蛋白合成系を用い検討した結果、 <sup>3</sup>H-leucine のとりこみについてみれば、AGs は、<sup>3</sup>Hleucine のとりこみについてみれば、AGs は、<sup>3</sup>Hleucine のとりこみを抑制する結果を得た。梅田らは<sup>30)</sup> ラット腎より作製した無細胞蛋白合成系において、各種 抗生剤の ribosome に及ぼす影響を検討し、AGs による 蛋白合成の阻害を認めている。われわれは *in vivo* にお いて AGs による <sup>3</sup>H-leucine の腎細胞内とりこみ抑制 を認めたが、これは CER においても認められ、この結 果のみでは、<sup>3</sup>H-leucine の腎細胞内とりこみ抑制が1 次的なものか、または他の原因による細胞障害からの2 次的な現象であるかの判別はつかない。しかし無細胞蛋 白合成系を用いた場合、CER は ribosome に全く障害 を与えず、AGs では はっきりと蛋白合成の抑制が認め られた。

われわれは、このように AGs が腎細胞 ribosomeの 蛋白合成を阻害する可能性があることを認めたが、 VERA-ROMAN ら<sup>3</sup>はラット腎に対する GM の毒性につ いて、蛋白合成が関与することには否定的な見解を出し ており、より詳細な検討が必要であろう。しかしなが ら、われわれの使用した実験系においては AGs のラッ ト腎 ribosome への影響は否定し難いものと考えられ る。

この蛋白合成抑制作用は dose-response があり、ま た AGs の種類により程度の差があった。そして従来よ り強い毒性をもつと考えられていたものは、低い毒性の ものより強い抑制作用を示した。in vitro での結果が、 in vivo での毒性の強弱に比例するとすれば、この種の in vitro 実験は AGs の腎毒性を比較する際に、おおい に役立つであろう。新しい抗生剤、より毒性の低い抗生 剤の出現は常に望まれているが、 続出 する抗生剤の screening test として、このような in vitro 実験に一 つの方向を示すものと考えられる。

先に述べたように、AGs の腎毒性について、もっと も重要な役割を演じているのは、細胞内小器官 $\nu^{n}$ では lysosome のようである。しかし、この lysosome だけが関与しているのか, または ribosome などの他の 障害も存在するのか,これらについては不明の点が多く, 今後のより詳細な研究が必要であろう。

文

## 綪

- HOUGHTON, D. C.; M. HARTNETT, M. CAMPBELL-BOSWELL, G. A. PORTER & W. M. BENNETT: A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. Am. J. Path. 82: 589~602, 1976
- KOSEK, J. D.; R. I. MAZZE & M. T. COUSINS: Nephrotoxicity of gentamicin. Lab. Invest. 30:48~57, 1974
- VERA-ROMAN, J.; T. P. KRISHNAKANTA & F. E. CUPPAGE: Gentamicin nephrotoxicity in rat. Lab. Invest. 33: 412~417, 1957
- WELLWOOD, J. M.; D. LOVELL, A. E. THOMPSON & J. R. TIGHE: Renal damage caused by gentamicin; A study of the effects on renal morphology and urinary enzyme excretion. J. Path. 118:171~182, 1976
- 5) 平田耕造、上田豊史, 森田一喜朗, 平田 弘, 高 松忠二, 後藤宏一郎, 平田寿恵, 荒牧鈴子, 甲斐 美恵子, 石川豊子:急性腎不全の発生病理に関す る基礎的研究。日腎誌 15:371~391, 1973
- 6) HIRATA, K.; T. UEDA, I. MORITA, S. MOMOSE, H. HIRATA, T. ISHIKAWA & K. KATO: Cytochemical studies of acute tubular necrosis caused by simultaneous administration of dextran and kanamycin. Contributions to Nephrology 6:94~113, 1977
- 7) 田中信男:抗生物質の作用メカニズム(第2版)。 東京大学出版会,255~258,1981
- DALLNER, G.: Studies on the structural and enzymic organization of the membranous elements of liver microsomes. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 116:22~23, 1963
- FISKE, C. H. & Y. SUBBAROW: Method of Fiske and Subbarow for the estimation of phosphate. Methods in Enzymology 3: 843~844, 1957
- COOPERSTEIN, S. J. & A. LAZAROW: A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. J. Biochem. 189: 665~670, 1950
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1961
- 12) 千谷晃一,近藤洋一:緩衝液,実験化学講座(日

本化学会編)24卷。生物化物II,224~225,1958

- 13) 祝 昭,大高忠彦, 紀 日出子:タンバク質の 生合成(上), 無細胞系における特異タンバク質の 生合成。生化学実験講座(日本生化学会編)7 巻,19~21,61~63,1975
- 14) ALFTHAN, O.; O. V. RENKONEN & A. SIVONEN : Concentration of gentamicin in serum, urine and urogenital tissue in man. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) 81 (Supple. 241): 92 ~94, 1973
- LUFT, F.C. & S. A. KLEIT: Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. J. Infect. Dis. 130:656~659, 1974
- 16) FABRE, J.; M. RUDHARDT, P. BLANCHARD & C. REGAMEY: Persistence of sisomicin and gentamicin in renal cortex and medulla compared with other organs and serum of rats. Kidney Int. 10: 444~449, 1976
- 17) SILVERBLATT, F. J. & C. KUEHN: Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. Kidney Int. 15: 335~ 345, 1979
- 18) JUST, M.; G. ERDMANN & F. HABERMANN: The renal handling of polybasic drugs 1. Gentamicin and aprotinin in intact animals. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300: 57~ 66, 1977
- HRUBAN, Z.; A. SLESERS & E. HOPKINS: Drug-induced and naturally occurring myeloid bodies. Lab. Invest. 27:62~70, 1972
- 20) TULKENS, P. & A. TROUET: The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultured rat fibroblasts. Biochem. Pharmacol. 27:415~ 424, 1978
- KURTZ, D. I.: Fidelity of protein synthesis with chicken embryomitochondrial and cytoplasmic ribosomes. Biochemistry 13: 574~577, 1974
- 22) WILHELM, J. M.; S. E. PETTITT & J. J. JESSOP: Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: Structure-function relationships in the stimulation of misreading with a wheat embryo system. Biochemistry 17: 1143~1153, 1978
- 23) 梅田 隆,小磯謙吉:抗生物質の腎毒性に関する 研究1,シロネズミ腎の蛋白代謝およびリソゾー ム膜におよぼす影響を中心に。Chemotherapy 25:2978~2983, 1977

# EXPERIMENTAL STUDIES ON THE NEPHROTOXICITY OF AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS IN RATS

I. DRUG INCORPORATION INTO THE RENAL CORTICAL CELLS AND THE INHIBITION OF PROTEIN BIOSYNTHESIS

# KOZO HIRATA

Section of Urology, National Fukuoka Central Hospital

TOYOFUMI UEDA and SHUNRO MOMOSE

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyushu University

(Director : Prof. SHUNRO MOMOSE)

# HISAE HIRATA

Laboratory of Physiological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University (Director : Prof. KEITARO KATO)

Distribution of aminoglycoside antibiotics in the renal cells was examined at the subcellular level using tritium labeled kanamycin and dibekacin. Inhibition of protein biosynthesis within the renal cortex was suggested, as the result, by these antibiotic agents, and the result of the examination of protein biosynthesis is also reported:

1. Aminoglycoside antibiotics were incorporated in the renal cortex in rats, and accumulated there.

2. They were distributed in high concentration in the rough microsome fraction in the renal cortex, particularly in the ribosome, and the accumulation was notable even after 24 hours of the administration.

3. Similar combination of aminoglycoside antibiotics and ribosome was observed in *in vitro* experiment, and they combined with ribosome in the liver and kidney firmly in the same degree, and no organ specificity was observed.

4. Ratio of RNA in the submicrosome fractions and aminoglycoside antibiotics was a constant in any fractions, suggesting that the antibiotics combine with RNA rather than protein.

5. In pretreated rats with aminoglycoside antibiotics, incorporation of  ${}^{3}H$ -leucine was suppressed, and the suppression was antibiotics concentration dependent.

6. Inhibition of <sup>3</sup>H-leucine incorporation was not shown in the liver of kanamycin administered rats, and concentration difference of kanamycin in various organs was notable.

7. In vitro experiments of protein biosynthesis in the renal cortex ribosome in rats showed that effect of protein biosynthesis inhibition was nearly proportional to the renal toxicity of antibiotics, and the degree of inhibition was in the order of dibekacin, gentamicin, netilmicin and kanamycin.