

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2報 *in vitro* における Gentamicin と Netilmicin の比較

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 抗生物質のうち、特に Gentamicin と Netilmicin の腎毒性について比較検討するため、*in vitro* において、正常ラットから分離した ribosome の機能、および lysosome 膜に及ぼす影響について検討を試み、以下の結果を得た。

1. Gentamicin, Netilmicin いずれも ribosome の機能に影響を及ぼし、 ^3H -leucine のとりこみを抑制する。
2. この阻害作用は薬剤濃度に依存し、特に Gentamicin は高濃度では ^3H -leucine のとりこみを 90% 以上抑制する。
3. Gentamicin と Netilmicin の阻害作用を比較すると、前者は後者に比べてほぼ 3 倍程度の強い抑制作用を示す。
4. lysosome 膜に対しては、lysosome の light-scattering property を指標として lysosome 顆粒の変性を検討した場合、Gentamicin は Netilmicin よりやや強い作用を示した。
5. 両薬剤ともに添加直後に lysosome 膜に変性を起こし、lysosome 顆粒からの蛋白の遊離を促進するが、Gentamicin は Netilmicin に比べて 2～3 倍程度の強い作用を示した。
6. acid phosphatase, β -N-acetylglucosaminidase を指標として、lysosome 膜の損傷について検討したが、両薬剤ともに濃度に依存して強い作用を示し、lysosome の available activity の増大をもたらすが、soluble activity では、濃度変化による有意の差は認められなかった。
7. lysosome 顆粒の膜の変性 (available activity の変動) に及ぼす作用は、Gentamicin は Netilmicin に比べて 2～3 倍程度の強い障害を示すことが認められた。

アミノ配糖体系抗生物質 (以下 AGs) は強力な抗菌作用をもつ、優れた薬剤であり、Streptomycin (SM), Kanamycin (KM) の臨床使用以降、Gentamicin (GM), Amikacin (AMK), Dibekacin (DKB), Sisomicin (SISO) など、現在すでに数種の薬剤が使用され、それぞれ優れた治療効果をあげている。しかし AGs には腎毒性と聴器毒性があり、臨床使用上細心の注意が必要である。もし AGs 系列のなかで、抗菌力が優れており、しかも毒性の少ない薬剤が開発されるならば、AGs の有用性はさらに増加するであろう。このために現在もさまざまな

努力がなされている。

一般に薬剤の開発過程においては、抗菌力、毒性、その他について種々の screening が行なわれるが、毒性試験は実験動物に対する急性および慢性試験が主であり、多大の時間と労力を要し、また、その成績の判定には、いろいろな制約がある。したがって抗菌力と同じように *in vitro* での試験が可能であれば、非常に有用な方法となるであろう。

薬剤の腎障害については、その障害部位および病理過程はさまざまであるが、AGs の腎障害では、従来より

Table 4 Effects of GM and NTL on the biosynthesis of protein of rat kidney ribosomes

$\mu\text{g/ml}$	GM (% of control)	NTL (% of control)
10	92.3 $\pm$ 7.1	97.4 $\pm$ 7.7
20	76.9 $\pm$ 3.3	93.1 $\pm$ 6.6
40	52.5 $\pm$ 10.1	81.6 $\pm$ 10.4
60	32.9 $\pm$ 4.0	78.2 $\pm$ 7.4
80	26.4 $\pm$ 3.6	60.8 $\pm$ 6.3
120	23.6 $\pm$ 4.9	50.0 $\pm$ 2.9
160	17.6 $\pm$ 3.4	37.7 $\pm$ 4.4
400	10.3 $\pm$ 2.4	22.1 $\pm$ 4.7
800	7.9 $\pm$ 1.8	17.0 $\pm$ 4.7
1,600	7.0 $\pm$ 2.1	15.0 $\pm$ 5.8

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

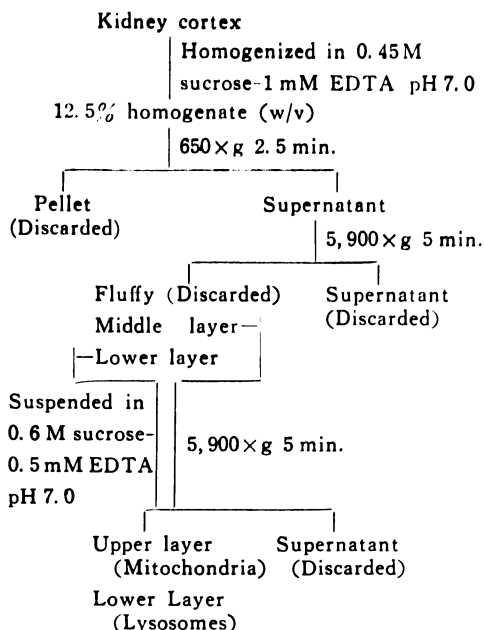
得る。混在する ^3H -leucine を除去するため、5% TCA で1回、ethanol で3回、acetone で3回、加熱5% TCA で1回、精製水で1回と遠心操作をくり返して洗浄した後、Amersham/Searle 製 NCS 1 ml を加えてよく攪拌し、沈渣を溶解する。溶液をバイアルに移し、toluen シンチレーター (POPOP 0.1 g, DPO 4 g/toluen 1,000 ml) 10 ml で遠心管をよく洗ってバイアル中に加えて混和する。試料は Packard Model 3375 型液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、常法により d. p. m. を算出した。

GM, NTL は、各純末を注射用蒸留水に溶解して反応系に添加した。

2. 実験成績

腎 ribosome を用いた *in vitro* の蛋白合成能は、薬剤を加えない control での ^3H -leucine のとりこみは 1,113.8 dpm/1 A₂₆₀ unit $\pm$ 180 であった。GM および NTL は、10 μg ~1,600 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度 10 点を反応

Table 5 Preparation of rat kidney lysosomes



系に添加し、各濃度における ^3H -leucine のとりこみ量を測定し、control に対する%で表示した。

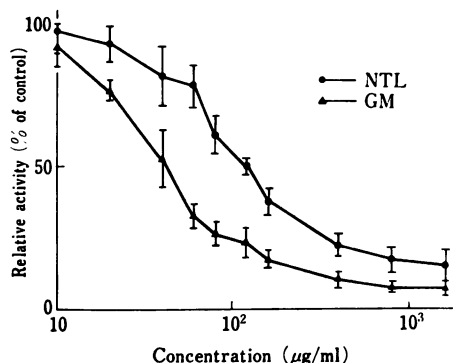
結果は Table 4 に示すように、GM, NTL いずれも濃度に比例してとりこみ抑制効果を示し、GM はどの濃度においても NTL より強い阻害作用を表わすことがわかった。また表で明らかのように、GM と NTL はほぼ 1 : 3 の濃度比で同程度の阻害作用を示し、NTL は GM に比べて約 1/3 程度の毒性を有するものと考えられる。Fig. 1 はこの関係を図にまとめたものであり、横軸は片対数を用いて薬剤濃度を、縦軸は各濃度における ^3H -leucine のとりこみを、control に対する%で表わしたものであり、薬剤濃度と蛋白合成阻害との間に、明瞭な相関関係が認められる。

II. ラット腎 lysosome 膜に及ぼす GM, NTL の影響

1. 実験材料および方法

前項と同じ雄性 Wistar 系ラット 10~12 匹を 1 群として用いた。ラットは断首放血により屠殺し腎を摘出し、皮質、髓質を分離する。皮質は 7 容 (w/v) の 0.45 M ショ糖液-1 mM EDTA pH 7.0 中で、Waring blender の最高スピードで 20 秒間ホモジナイズし、綿布で濾過して 12.5% ホモジネートとした。lysosome (以下 Ly.) の分離は、SHIBKO, TAPPEL ら¹³⁾の方法に準じ、Table 5 に示すような分画遠心を行なった。5,900 $\times$ g 5 分間の遠心により、Ly. と mitochondria (以下 Mt.) が一緒に層積して沈殿してくるが、これは両者の

Fig. 1 Effects of GM and NTL on the biosynthesis of protein of kidney ribosomes



比重が非常に近いためであり、単なる分画遠心のみでは分別しがたい。したがって Ly. と Mt. をその固有の色で分別し、同じ遠心操作をくり返して、できるだけ Mt. の混入を少なくした Ly. rich 分画を分離した。この操作では、滲透圧による Ly. の開裂を防ぐため、0.6M ショ糖液-0.5mM EDTA を用いた。この Ly. 分画の蛋白量を測定し、以後の実験操作ではすべて 0.5 mg 蛋白/ml となるように希釈して使用する。このようにして得た Ly. 分画は、酵素の比活性の上昇度をホセジネートと比較すると、acid phosphatase で 6~8 倍、 β -N-acetylglucosaminidase で 15~18 倍となり、比較的 Ly. に富む分画である。

GM, NTL はそれぞれ 10 mg/ml の濃度に 0.6M ショ糖液-0.5mM EDTA に溶解し、Ly. 分画中に種々の濃度に添加し、0°C、25°C、37°C にて一定時間インキュベートした後、酵素活性の測定を行なった。活性測定の実験系では、全量 1.0 ml 中に Ly. 懸濁液 0.1 ml を加えて測定するため、この際の GM, NTL の終濃度はそれぞれ添加した濃度の 1/10 となる。

2. 活性の測定

acid phosphatase 活性は、p-nitrophenylphosphate を基質とし、 β -N-acetylglucosaminidase 活性は、p-nitrophenyl β -D-N-acetylglucosamine を基質として測定した。

Ly. 酵素の諸活性は、SHIBKO, TAPPEL ら¹³⁾の方法に従って測定した。すなわち triton X-100 を終濃度 0.1% に添加して Ly. 膜を破壊して測定した活性値を total 活性とし、次に述べる available 活性、soluble 活性は、この total 活性に対する%として表わしている。available 活性は、Ly. 膜の損傷を防ぐため、buffer、基質液ともに 0.6M ショ糖液中で調製し、滲透圧の低下による膜の開裂を防いで 10 分間インキュベーション後に測定した値であり、膜の基質透過性を表わしている。soluble 活性は、Ly. 分画を 15,000 rpm、20 分間遠心して顆粒を除いた上清（可溶性分画）中の活性を表わすものである。

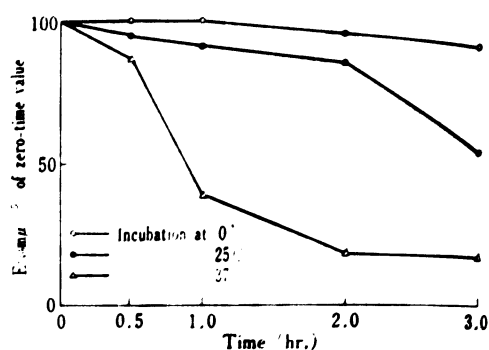
われわれは、0.5 mg 蛋白/ml の Ly. 分画中に、GM NTL を添加してインキュベートし、経時的にこれら諸活性を測定し、Ly. 顆粒の変性の程度について検討した。

蛋白の定量は牛血清 albumin を標準として、Lowry 法¹⁴⁾により測定した。

3. lysosome の熱安定性について

SHIBKO, TAPPEL らによる Ly. の light-scattering property について検討を加えた。これは Ly. の安定性を示す一つの指標であり、540 m μ での吸収の減少を測

Fig. 2 Changes in the light-scattering properties of rat kidney lysosomes



定し、顆粒の変性、崩壊の程度を知るもので、Ly. の availability, Ly. からの酵素や蛋白の遊離と相関関係をもっている。すなわち一定温度で Ly. をインキュベートすると、経時的に 540 m μ の吸収が減少し、それに伴って酵素の available 活性が上昇し、少し遅れて soluble 活性の上昇、遊離蛋白の増加が認められる。このことは、まず Ly. 膜の性質に何らかの変化が生じ、膜の透過性が増大するが、さらに変性が進むと Ly. が崩壊するものと考えられる。

方法は蛋白濃度を 0.5 mg/ml に調製した Ly. 分画を、0°C、25°C、37°C でインキュベートし、経時的に 540 m μ における吸収を測定し、さらに 15,000 rpm 20 分間の遠心を行ない、各時点における Ly. からの遊離蛋白量の測定を行なった。また、この Ly. 分画中に GM, NTL を添加した際の変化についても同様の検討を行なった。

4. 実験成績

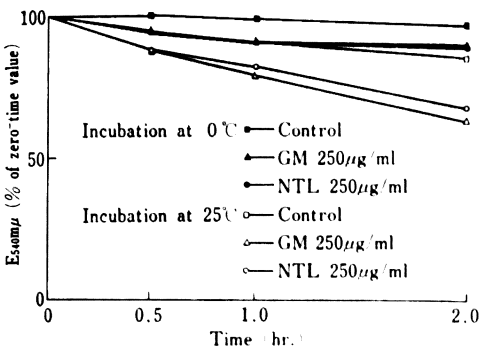
1) light scattering property の変動

Ly. 懸濁液の 540 m μ における吸収は、Fig. 2 に示したように、0°C インキュベーションではほとんど変化せず、3 時間後でわずかに 7% の減少をみるのみで、顆粒は比較的よく保たれている。25°C では、2 時間後で 14%、3 時間後で 46% の吸収の減少を認めた。37°C では 1 時間後ですでにほぼ 60% 近くの吸収の減少を示し、顆粒の変性が高度であることが認められ、この時点での酵素の活性変化をみると、acid phosphatase の available 活性は、0-time での 35% から 63% へ、soluble 活性は 3.8% から 17.6% へと著しく増加し、明らかに顆粒の崩壊が起こっているものと考えられる。

このような条件下では、薬剤による比較実験は無意味であると考え、以後は 0°C または 25°C で、2 時間以内のインキュベーションで行なうことを条件とした。

Fig. 3 は GM, NTL をそれぞれ 250 μ g/ml の濃度で Ly. 分画に添加した際の 540 m μ の吸収減少を経時的に

Fig.3 Effects of GM and NTL on the light-scattering properties of rat kidney lysosomes



みたものである。両薬剤とも添加 30 分後ですでに影響が認められ、control に比べて吸収の減少が大であるが、0℃では薬剤による差はみられない。25℃ インキュベーション 1 時間後で、やや両薬剤間の作用の差が現われ、2 時間後で明瞭になるが、この結果、GM は NTL よりも Ly. 膜に対して強い作用を持ち、膜の変性をうながすものと考えられる。

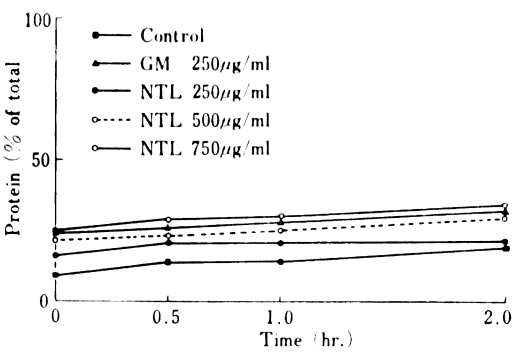
2) Ly. 顆粒からの蛋白の遊離

Ly. 分画中に GM, NTL を添加し、25℃ インキュベーション後の経時的遊離蛋白の変動について検討したが、Table 6 に示すように、蛋白の遊離と薬剤濃度の間に相関関係が認められ、また経時的に増加している。この結果で明らかなように、GM, NTL とともに添加直後に Ly. 膜に作用して膜を損傷し、蛋白の遊離を惹起するが、この作用は GM は NTL に比べてはるかに強く、ほぼ 1/2~1/3 の濃度で NTL と同程度の損傷を与えている。

以上を簡単に図示したのが Fig. 4 であり、GM 250 μg 添加群は、NTL 500 μg 添加群と 750 μg 添加群の中間の値を示し、Ly. 膜に対する作用は、NTL は GM の 1/2~1/3 程度と考えられる。

3) 酵素活性から検討した GM, NTL の比較

Fig.4 Effects of GM and NTL on the release of protein from kidney lysosomal suspensions into a soluble form during incubation at 25 °C



蛋白濃度を調製した Ly. 分画中に、GM, NTL を添加して 25℃ でインキュベートし、経時的に acid phosphatase の諸活性を測定した。この条件下では、total 活性の低下は認められなかった。GM, NTL いずれも添加直後に影響が現われ、available 活性、soluble 活性ともに上昇し、経時的に増加する傾向を示している (Table 7)。薬剤濃度依存性については、NTL 25 μg 以下の濃度と 50 μg 以上の濃度で明確な差が認められた。GM では 12.5 μg と 25 μg との間で有意の差は認められない。

Fig. 5 (a)(b) はこの結果を図にまとめたものであるが、GM は NTL に比べて明らかに強い障害を示し、1/2 量でも NTL より強い影響を与え available 活性の上昇を認めた。soluble 活性については、GM, NTL とともにコントロールと有意の差を認めなかった。

β-N-acetylglucosaminidase 活性についても同様の検討を加えたが、Table 8 に示すように、薬剤添加後の available 活性の上昇は認めるが、NTL では短時間では薬剤濃度との相関がみられなかった。GM 添加群では、やや available 活性の薬剤濃度依存性が認められる。しかし NTL 添加群でも、2 時間インキュベーション

Table 6 Effects of GM and NTL on the release of protein from lysosomes into a soluble form during incubation at 25°C

Time (hr.)	Control	Netilmicin (μg/ml)				Gentamicin (μg/ml)	
		125	250	500	750	125	250
0	8.9±1.8	16.1±1.6	16.2±0.1	21.8±2.0	25.1±0.1	20.8±3.2	24.2±0.9
0.5	13.7±2.6	18.3±2.4	20.3±1.7	23.1±1.4	28.8±0.6	23.9±5.0	24.4±1.7
1	14.2±2.3	17.5±3.0	20.7±1.3	24.9±1.4	30.3±0.3	27.0±1.7	28.6±3.8
2	19.8±1.8	19.5±0.1	21.2±2.7	29.4±1.4	33.9±1.1	27.6±0.6	31.7±9.7

All values are expressed a mean±S. E. of three experiments

Table 7 Effects of GM and NTL on available and soluble activities of acid phosphatase in lysosomes during incubation at 25°C

Time (hr.)		Control	Netilmicin ($\mu\text{g/ml}$)				Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$)	
			12.5	25	50	75	12.5	25
0	1)	29.6 $\pm$ 3.3	35.8 $\pm$ 2.7	37.3 $\pm$ 3.1	47.7 $\pm$ 3.2	48.1 $\pm$ 1.6	40.3 $\pm$ 1.6	40.5 $\pm$ 1.3
	2)	5.3 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 1.6	8.2 $\pm$ 0.9	10.0 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.8	9.4 $\pm$ 0.9
0.5	1)	26.8 $\pm$ 2.8	40.2 $\pm$ 1.6	46.8 $\pm$ 4.2	58.2 $\pm$ 0.9	59.4 $\pm$ 1.7	49.1 $\pm$ 3.6	54.9 $\pm$ 4.0
	2)	9.4 $\pm$ 1.6	12.9 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 0.1	14.3 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 0.3	12.9 $\pm$ 0.7
1	1)	36.5 $\pm$ 4.2	57.6 $\pm$ 0.1	57.5 $\pm$ 3.9	73.1 $\pm$ 4.1	72.7 $\pm$ 4.3	62.8 $\pm$ 6.1	70.5 $\pm$ 3.1
	2)	10.3 $\pm$ 2.4	13.2 $\pm$ 1.8	12.8 $\pm$ 1.1	16.1 $\pm$ 1.5	15.8 $\pm$ 1.7	13.6 $\pm$ 3.4	14.0 $\pm$ 0.8
2	1)	50.8 $\pm$ 4.4	71.5 $\pm$ 3.4	73.6 $\pm$ 2.0	89.1 $\pm$ 7.5	89.8 $\pm$ 2.4	80.9 $\pm$ 1.5	84.9 $\pm$ 6.2
	2)	17.3 $\pm$ 2.0	17.8 $\pm$ 0.6	17.0 $\pm$ 0.9	19.1 $\pm$ 0.7	19.6 $\pm$ 0.3	21.0 $\pm$ 2.5	20.5 $\pm$ 1.6

1) : Available activity (% of total)

2) : Soluble activity (% of total)

All values are expressed a mean $\pm$ S. E. of three experiments

Table 8 Effects of GM and NTL on available and soluble activities of β -N-acetylglucosaminidase in lysosomes during incubation at 25°C

Time (hr.)		Control	Netilmicin ($\mu\text{g/ml}$)				Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$)	
			12.5	25	50	75	12.5	25
0	1)	20.3 $\pm$ 2.0	23.5 $\pm$ 0.2	25.8 $\pm$ 2.4	24.3 $\pm$ 2.4	24.5 $\pm$ 0.2	26.4 $\pm$ 0.6	33.8 $\pm$ 2.6
	2)	2.2 $\pm$ 0.9	2.5 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 1.3
0.5	1)	23.1 $\pm$ 2.4	28.8 $\pm$ 1.8	31.7 $\pm$ 5.1	31.8 $\pm$ 0.7	30.9 $\pm$ 0.1	34.2 $\pm$ 0.6	38.1 $\pm$ 3.5
	2)	3.6 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 2.1	3.7 $\pm$ 1.2	4.8 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.9
1	1)	26.9 $\pm$ 2.4	31.8 $\pm$ 1.8	37.8 $\pm$ 0.4	37.1 $\pm$ 3.2	37.1 $\pm$ 3.4	34.0 $\pm$ 0.6	52.1 $\pm$ 1.0
	2)	4.7 $\pm$ 1.7	4.1 $\pm$ 1.4	4.4 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 1.0	9.4 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.6
2	1)	36.0 $\pm$ 3.1	38.3 $\pm$ 3.3	55.1 $\pm$ 3.2	56.5 $\pm$ 5.5	63.9 $\pm$ 5.8	47.7 $\pm$ 3.0	67.1 $\pm$ 1.1
	2)	6.7 $\pm$ 1.0	7.1 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 2.6	10.1 $\pm$ 0.9	13.3 $\pm$ 0.8	12.9 $\pm$ 0.9

1) . Available activity (% of total)

2) : Soluble activity (% of total)

All values are expressed a mean $\pm$ S. E. of three experiments

Fig. 5a Effects of GM and NTL on acid phosphatase activity of rat kidney lysosomes during incubation at 25°C

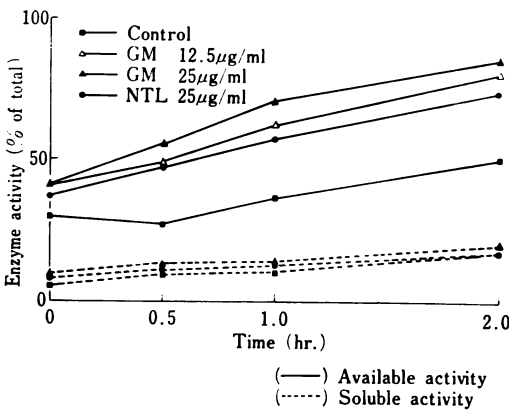


Fig. 5b Effects of GM and NTL on acid phosphatase activity of rat kidney lysosomes during incubation at 25°C

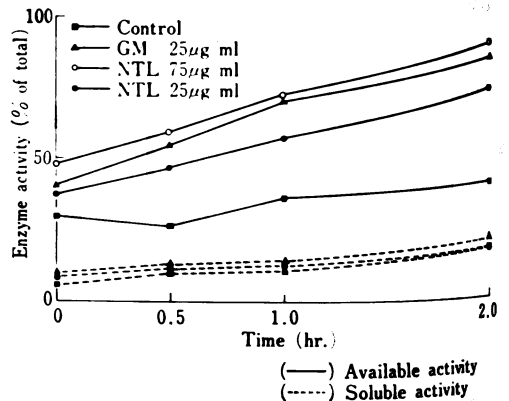


Fig. 6a Effects of GM and NTL on β -D-N-acetylglucosaminidase activity of rat kidney lysosomes during incubation at 25°C

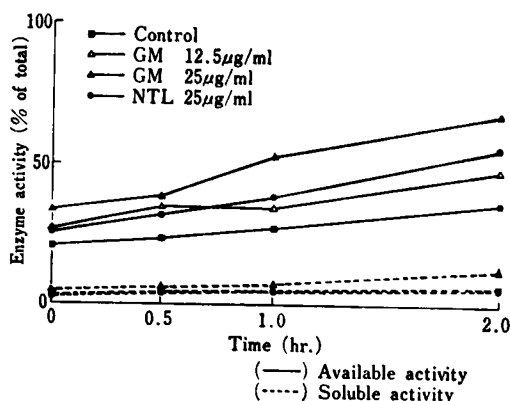
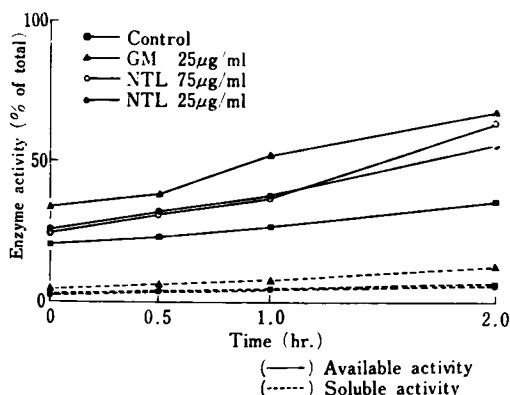


Fig. 6b Effects of GM and NTL on β -D-N-acetylglucosaminidase activity of rat kidney lysosomes during incubation at 25°C



ン後では available 活性の上昇と薬剤濃度との相関関係が認められる。soluble 活性については、両者ともに明確な濃度依存性を認めなかった。Fig. 6 (a)(b) はこの結果をまとめたものであるが、この酵素に対して、GM は同濃度では NTL よりはるかに作用が強く、Ly. の available 活性の上昇を示している。しかし顆粒の崩壊の程度はまだ軽度であり、acid phosphatase 活性からみても、GM 25 μ g 添加 2 時間インキュベーション後でも、まだ 80% 近くの顆粒が残存しているものと思われる。

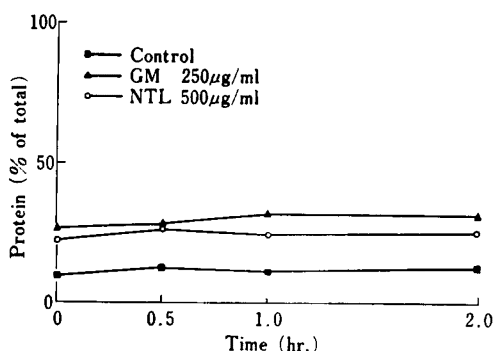
同様の検討を 0°C インキュベーションにおいて試みてみた。GM は 250 μ g、NTL は 500 μ g をそれぞれ添加し、Ly. からの蛋白の遊離について比較検討した。Table 9 はその結果を表わしたもので、両薬剤とも添加

Table 9 Effects of GM and NTL on the release of protein from lysosomes during incubation at 0°C

Time (hr.)	Control	Netilmicin 500 μ g/ml	Gentamicin 250 μ g/ml
0	9.2 $\pm$ 1.7	23.1 $\pm$ 1.9	25.8 $\pm$ 2.1
0.5	11.9 $\pm$ 1.7	25.6 $\pm$ 0.6	26.5 $\pm$ 1.5
1	10.5 $\pm$ 0.2	23.9 $\pm$ 0.4	31.4 $\pm$ 0.3
2	12.0 $\pm$ 1.0	24.7 $\pm$ 0.2	30.7 $\pm$ 1.4

Values are expressed a mean $\pm$ S.E. of three experiments

Fig. 7 Effects of GM and NTL on the release of protein from lysosomal suspensions into a soluble form during incubation at 0°C



後直ちに遊離蛋白が増大し、顆粒の損傷を示唆するが、経時的な変化はほとんど認められない。Fig. 7 はこの結果を簡単に図示したものである。

酵素活性に及ぼす影響については、Table 10 に示すように、GM、NTL とともに添加直後から available 活性、soluble 活性の上昇を認め、経時的に増加する傾向を示した。

また NTL 500 μ g 添加群は、GM 250 μ g 添加群と同程度もしくはやや軽度の障害を示し、NTL は 0°C においても、GM よりも Ly. 膜に対する作用が弱いことがわかった (Fig. 8)。

III. 考 察

薬剤の腎障害を検討するには、通常、臨床的に薬剤投与後の腎機能の変化、尿所見の異常などを追求し、また血液理化学所見の変化なども一般に用いられる指標である。薬剤の開発段階においても、いろいろな実験動物について、以上のような観点から腎毒性を評価しているのが現状である。しかし実験的研究および臨床的な資料が豊富となり、ある薬剤の腎障害が、腎の特定部位または特定小器官に局限されていることが明らかになれば、より微視的な方法で障害の機序、病理過程、障害程度を追

Table 10 Effects of GM and NTL on available and soluble activities of acid phosphatase and β -N-acetylglucosaminidase in lysosomes during incubation at 0°C

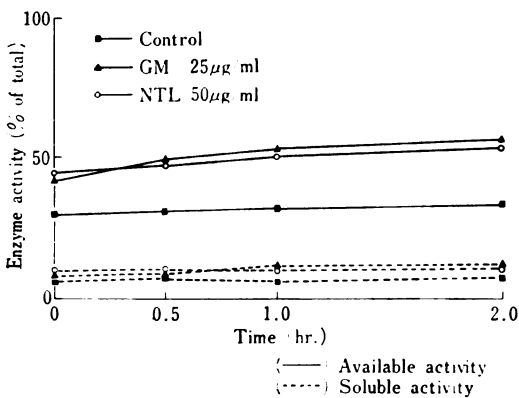
Time (hr.)	Acid phosphatase			β -N-acetylglucosaminidase		
	Control	NTL (50 μ g/ml)	GM (25 μ g/ml)	Control	NTL (50 μ g/ml)	GM (25 μ g/ml)
0 1)	29.5 $\pm$ 3.0	44.6 $\pm$ 3.9	41.7 $\pm$ 1.8	29.1 $\pm$ 1.0	24.5 $\pm$ 1.9	33.8 $\pm$ 3.0
2)	5.5 $\pm$ 0.7	9.3 $\pm$ 1.0	8.1 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.7	4.2 $\pm$ 0.6
0.5 1)	39.3 $\pm$ 1.1	47.3 $\pm$ 2.6	49.2 $\pm$ 2.4	20.6 $\pm$ 1.5	33.3 $\pm$ 6.9	32.3 $\pm$ 0.8
2)	6.2 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 0.7	9.1 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.1
1 1)	32.0 $\pm$ 1.5	50.4 $\pm$ 1.2	53.6 $\pm$ 2.5	27.6 $\pm$ 0.7	34.9 $\pm$ 4.2	39.4 $\pm$ 0.7
2)	5.8 $\pm$ 0.7	10.2 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 1.1	6.0 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.1
2 1)	33.6 $\pm$ 0.7	53.6 $\pm$ 0.9	56.3 $\pm$ 1.0	29.1 $\pm$ 2.0	37.7 $\pm$ 4.0	41.1 $\pm$ 0.7
2)	6.7 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.1	11.8 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 1.0	6.4 $\pm$ 0.2	7.4 $\pm$ 0.1

1): Available activity (% of total)

2): Soluble activity (% of total)

All values are expressed as mean $\pm$ S.E. of three experiments

Fig. 8 Effects of GM and NTL on acid phosphatase activity of rat kidney lysosomes during incubation at 0°C



求することも可能となるであろう。

薬物の腎障害も、腎血管、糸球体、尿細管、間質などいろいろな部位での変化から誘発されるものであり、その部位はある程度薬剤ごとに明らかになっている。尿細管の病変だけについても、近位、遠位の相違があり、また細胞内の変化については、核、endoplasmic reticulum, mitochondria, lysosome などに特徴的な変化を認めうるであろう。それらの病変は時間的にも、また空間的にもそれぞれ関連性があり、細胞レベルでの変化を一元的に説明することはかなり困難である。しかし、いろいろな data の集積によって、薬剤のある細胞内や器官への作用が、比較的確実に推測される場合には、その小器官を指標として腎毒性を検討することも可能であろう。われわれが今回試みた実験も、この考え方に沿って行なったものである。

われわれは前報で、AGs が細胞内で microsome 分画にも存在しており、microsome の蛋白、特に ribosome と強固に結合していることを報告した¹¹⁾。従来 AGs の抗菌作用は、前核細胞である細菌細胞の ribosome の障害であり、ribosome における蛋白合成阻害が抗菌作用の基本とされている。しかも AGs は哺乳動物などの真核細胞の ribosome とは結合せず、そのため真核細胞に対しては毒性が低いとされてきた¹²⁾。しかし真核細胞においても、microsome 蛋白と AGs の結合がある以上、AGs が真核細胞においても蛋白合成を阻害する可能性はあるわけである。われわれは前報において AGs を投与したラットでは、³H-leucine の腎細胞内とりこみが抑制されることを認めたが、さらにラット腎皮質 ribosome 分画を用いた *in vitro* での蛋白合成実験では、AGs の阻害作用は各薬剤の腎毒性にほぼ比例することを報告した¹¹⁾。梅田ら¹⁰⁾も、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、KM, SM, GM, CP などは遊離型 polysome 分画の蛋白代謝を阻害し、また KM, SM, GM, CL は膜付着型 polysome 分画の蛋白合成を阻害することを認めている。しかし Vera-Roman ら⁷⁾は、雄性 Sprague-Dawley ラットに GM を腹腔内投与し、20 分後に ³H-leucine をさらに腹腔内に投与、その 60 分後に腎を摘除し、腎皮質の ³H-leucine のとりこみを検討したが、GM による抑制はみられなかったと報告している。これはわれわれの報告と異なる成績であり、実験動物、投与方法、時間などより詳細な検討が必要であるが、前報でも報告したように、われわれが用いた方法では、*in vivo*, *in vitro* とともに AGs の腎 ribosome に対する影響は明白であり¹¹⁾、この *in*

vitro の方法を AGs 相互間の薬物学的特性の screening に応用することは可能であろう。

AGs による腎障害において、近位尿細管上皮細胞の lysosome の変化がみられることはすでに多くの研究者によって報告されている^{1-3,5)}。

KOSEK ら⁵⁾は GM をラットに投与すると、近位尿細管上皮細胞において著明な lysosome の変化が起こり、lysosome 内に myelin body が出現することを報告した。KOSEK ら⁵⁾、および HOUGHTON ら⁴⁾は、この myelin body の出現は endoplasmic reticulum など細胞内の膜構造が GM によって破壊され、それが lysosome にとりこまれて消化を受ける際、lysosome 酵素も GM によって機能抑制を受けているため、autophagocytosis の増強と共同して、lysosome 内に遺残物質の蓄積が起こり、myelin body を形成すると考えている。また VERA-ROMAN ら⁷⁾も同様の変化を認め、myelin body についても、これは GM によって障害を受けた細胞内小器官が lysosome によってとりこまれ、消化される際の脂質遺残物であるとしている。しかし SILVERBLATT ら¹⁷⁾は、GM は投与後 1 時間ですでに lysosome 内に入り、lysosome 以外では apical vesicle に GM を認めるだけであったことから、GM は直接に lysosome 内に入り、そこで lysosome 機能に影響すると推論している。JUST ら¹⁸⁾もマウス腎で autoradiography を用いて検討し、GM は近位尿細管の apical part に入り、20 分後には lysosome に集まってくることを認め、またラット腎皮質より作製した lysosome 分画を用い *in vitro* の実験を行ない、AGs の腎毒性は lysosome に対する直接作用であることと結論している⁹⁾。また HARRISON ら¹⁾も GM 障害腎では尿細管上皮細胞の lysosome 以外、他の小器官の変化が少ないことから、GM は直接腎 lysosome に作用するものであり、myelin body は GM などの塩基性物質と lysosome 基質の酸性 lipoprotein の相互作用により生じるものであろうとしている。この 2 つの過程のどちらが優位であるかは不明であるが、いずれにしても、このような myelin body の出現から尿細管上皮細胞の壊死へと進展して行き、また、その程度は AGs 系薬剤相互間の毒性の強さに比例することは認められている^{1,18)}。

われわれもかなり以前に KM と Dextran 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^{2,3)}。この phagolysosome 膜はかなり脆弱になっており、こ

の phagolysosome の崩壊によって遊出する lysosome 酵素が、自家融解的に細胞自身を障害する可能性も、われわれは同時に主張したのである。その後 lysosome を中心として尿細管上皮細胞の変性壊死を考える報告もみられるようになった。TULKENS ら¹⁹⁾は培養したラット線維芽細胞を用いて AGs の細胞内分布を細胞化学的に検討し、AGs は lysosome 内にほとんどがとりこまれることを認め、AGs が腎でも lysosome に集積し、その機能障害を起こす可能性を示唆した。また MORIN ら¹⁰⁾は AGs の腎 lysosome に及ぼす影響を *in vivo* と *in vitro* において研究し、その両者において AGs 投与により lysosome 機能に変化のあることを認めている。このように多くの報告で lysosome 酵素による細胞障害の可能性が認められているが、しかし VERA-ROMAN ら⁷⁾は腎皮質の GM 局在を知るため、核、mitochondria, microsome, cytosol の 4 分画に分けて GM の分布を測定し、cytosol に近く、他の分画には平等に分布することを認めた。また acid phosphatase の動態からみる限りでは、lysosome 酵素の遊出による細胞障害を否定している。しかし、この方法では分画の精製度が不確実であり、lysosome の異型性のために各分画への混入が考えられ、また腎病変の局在性と lysosome 酵素の多様性のために、このような結論を出すのは尚早であろう。

われわれは lysosome 膜に対しては、lysosome の light-scattering property, lysosome 顆粒からの蛋白の遊離、および acid phosphatase, β -N-acetylglucosaminidase を指標として、AGs による lysosome 膜の損傷について検討したが、AGs は濃度に依存して強い作用を示し、lysosome の available activity の増大をもたらすことを認めた。この程度は薬剤相互間においてかなりの差があり、AGs の腎障害に関する *in vitro* の screening test となる可能性が考えられよう。

以上のように AGs は腎皮質の ribosome, また lysosome の両者に、*in vivo* でもまた *in vitro* でも、ある種の障害作用をもっていることは確実のようである。この 2 つの障害が、互いにどのように相関するのか、この点はまだ不明であるが、このような現象を AGs の *in vitro* での毒性比較に利用することは可能であろう。

AGs の各薬剤について腎毒性を比較する場合、従来より腎組織像の変化、血液理化学所見の変動を比較したり²⁰⁻²²⁾、また Dextran や Sodium alginate と同時投与した際の毒性を比較したりする方法がよく用いられている²³⁾。その他薬剤投与時の尿中酵素活性の異常を指標とすることも可能である²⁴⁾。しかし、これらの方法は、いずれも動物の個体差により、その毒性の発現、検査所

見に変動があることはよく経験することであり、また組織所見の判定には主観的要素を排除する工夫が必要である。この点からみて AGs 相互間の毒性比較, screening の方法として *in vitro* の方法があれば, *in vivo* 実験の繁雑さと、不確実さを補い、大量、迅速な、また計量的な実験処理が可能となるかも知れない。

Netilmicin (NTL) は米国シエリング社の開発した AGs の一つであり、Sisomicin の1位のアミノ基をエチル化して得られた半合成物質である。これは従来の AGs と比較すると抗菌作用の特異性と、腎毒性、聴器毒性が少ない点で特徴をもっている。EDELSTEIN ら¹²⁾ は 25 例の重篤なグラム陰性桿菌感染症に使用して、優れた成績をおさめているが、比較的有效性の高い AGs である。この薬剤の腎毒性を GM と比較検討するために、われわれは上述した方法で、ラット腎の ribosome および lysosome に及ぼす影響を追求した。ラット腎 ribosome の蛋白合成に対する阻害作用を比較検討した成績は、前述のように GM はどの濃度においても NTL より強い阻害を示し、GM:NTL がほぼ 1:3 の濃度比で同じ程度の阻害作用を認めた。すなわち、GM は約 3 倍量の NTL を投与した場合と同様の影響があり、NTL は GM に比べ、約 1/3 の毒性をもつものと考えられた。

lysosome に対する影響を *in vitro* で検討した結果も前述したように、lysosome 顆粒の膜の変性 (available activity の変動) に及ぼす作用は、GM は NTL に比べ 2~3 倍程度の強い障害を示すことが認められた。このように *in vitro* の実験成績は ribosome, lysosome 両者に対する影響とも、ほぼ同様の結果を示したが、これはわれわれの方法の信頼性を示すものといえよう。

KALOYANIDES ら²⁰⁾ はラットで GM と NTL の腎機能に及ぼす影響を比較しているが、両薬剤を 50mg/kg から 150mg/kg まで毎日、8 日~14 日間投与し、両薬剤とも尿管管性蛋白尿は同程度に認めたが、尿濃縮力の減少、尿量増加は NTL が GM より軽度であることを報告している。また斉藤²⁵⁾ は成熟雄性 SD ラットに 30, 90, 120, 150 mg/kg/日の GM, NTL を 21 日間筋注射し、尿所見, BUN, SCr. の測定、組織学的な検索を行ったが、NTL は GM よりかなり腎毒性が弱いとしている。SOBERON ら²²⁾ も SD ラットで GM, NTL, TOB の毒性比較を行ない、NTL, TOB は GM より毒性が少ないことを認めた。

MORIN ら¹⁰⁾ はラット腎 lysosome に対する AGs の影響を、*in vivo* および *in vitro* で検討したが、その結果、SISO, TOB, GM は強度、NM, LVDM は中等度、KM, AMK, NTL, SM, PRM は軽度の作用を認め

たと報告している。この成績は従来より認められている臨床的、または実験的な成績と大体一致しており、またわれわれの結果ともよく合致するものであった。

文 献

- 1) HARRISON, W.O.; F.J. SILVERBLATT & M. JURCK: Gentamicin nephrotoxicity: Failure of three cepharosporins to injury in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 209~215, 1975
- 2) 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
- 3) 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
- 4) HOUGHTON, D.C.; M. HARTNETT, M. CAMPBELL-BOSWELL, G. PORTER & W. BENNETT: A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am. J. Pathol.* 82: 589~612, 1976
- 5) KOSEK, J.D.; R.I. MAZZE & H.T. COUSINS: Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab. Invest.* 30: 48~57, 1974
- 6) LUFT, F.C.; MOO NAHM YUM, P.D. WALKER & S.A. KLEIT: Gentamicin gradient patterns and morphological changes in human kidneys. *Nephron* 18: 167~174, 1977
- 7) VERA-ROMAN, J.; T.P. KRISHNAKANTA & F.E. CUPPAGE: Gentamicin nephrotoxicity in rat. *Lab. Invest.* 33: 412~417, 1975
- 8) 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
- 9) JUST, M. & E. HABERMANN: The Renal Handling of Polybasic Drugs. 2. *In vitro* studies with Brugh Border and Lysosomal Preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 300: 67~76, 1977
- 10) MORIN, J.-P.; J. FRESEL, J.-P. FILASTRE & R. VAILLANT: Aminoglycoside actions on rat kidney lysosomes «*in vivo*» and «*in vitro*». *Nephrotoxicity* edit. J.-P. FILESTRE, pp. 254~263.
- 11) 平田耕造, 上田豊史, 百瀬俊郎, 平田寿恵: 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。Chemotherapy 30: 910~938, 1982
- 12) EDELSTEIN, P.H. & R.D. MEYER: Netilmicin

- therapy of serious Gram-negative bacillary infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 4: 495~502, 1978
- 13) SHIBKO, S. & A. L. TAPPEL: Rat kidney lysosomes; isolation and properties. *Biochem. J.* 95: 731~741, 1965
- 14) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1961
- 15) 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
- 16) 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
- 17) SILVERBLATT, F. C. & C. KUEHN: Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int.* 15: 335~345, 1979
- 18) JUST, M.; G. ERDMANN & E. HABERMANN: The Renal Handling of Polybasic Drugs 1. Gentamicin and Aprotinin in Intact Animals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 300: 57~66, 1977
- 19) TULKENS, P. & A. TROUET: The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultured rat fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 27: 415~424, 1978
- 20) KALOYANIDES, G. J.; R. BOWNAN & F. SILVER-BLOTT: Effect of gentamicin and netilmicin on renal function in the rat. *Clin. Res.* 25: 138 A, 1977
- 21) LUFT, F. C.; V. PATEL, M. N. YUM, B. PATEL & S. A. KLEIT: Experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 86: 213~220, 1975
- 22) SOBERON, L.; R. L. BOWMAN, E. P. MUNOZ & G. J. KALOYANIDES: Comparative nephrotoxicities of gentamicin, netilmicin and tobramycin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 210: 334~343, 1979
- 23) 山作房之輔, 武田 元, 庭山昌俊, 川島士郎, 岩永守登, 土谷知子, 和田十次, 下条文武, 木下康民: Tobramycin の基礎的, 臨床的研究。 *Chemotherapy* 23: 934~945, 1975
- 24) PATEL, V.; F. C. LUFT, M. N. YUM, B. PATEL, W. ZEMAN & S. A. KLEIT: Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 7: 364~369, 1975
- 25) 上田 泰, 斉藤 篤, 島田甚五郎, 大森雅久, 柴孝也, 山路武久, 井原裕宣, 北村敏夫, 三枝幹文, 宮原 正: Netilmicin の腎毒性に関する実験的研究。 *Chemotherapy* 29 (S-3): 61~70, 1981

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE NEPHROTOXICITY OF AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS IN RATS

II. COMPARATIVE NEPHROTOXICITY OF GENTAMICIN AND NETILMICIN *IN VITRO* EXPERIMENTS

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)

Renal toxicity of aminoglycoside antibiotic agents, particularly gentamicin and netilmicin, was examined for the comparison. The toxic effect, *in vitro*, of these antibiotic agents on the ribosomal function and lysosomal membrane was examined in isolated ribosome from normal rats, and the following results were observed.

1. Gentamicin and netilmicin exerted effects on ribosomal functions, and incorporation of ^3H -leucine was suppressed.

2. The suppression was dependent on the concentration of antibiotic agents, and, particularly, high gentamicin concentration inhibited more than 90% of the ^3H -leucine incorporation.

3. Comparing the inhibitory action of gentamicin and netilmicin, the former showed 3 times greater inhibition than the latter.

4. Denaturation of lysosomal granules was examined by means of light-scattering property to see the effect on the lysosomal membrane, and the effect of gentamicin was slightly stronger than netilmicin.

5. Lysosomal membrane was denatured immediately after the addition of the both antibiotic agents, and isolation of protein from the lysosomal granules was stimulated, and gentamicin exerted 2-3 times larger effects than netilmicin.

6. Damage of lysosomal membrane was examined using acid phosphatase activity and β -N-acetylglucosaminidase activity as indices, and the both antibiotic agents exerted concentration dependent effect, and available activity of lysosome was increased but soluble activity did not show significant change.

7. Effect of gentamicin on the denaturation of membrane of lysosomal granules (change of available activity) was 2-3 times larger than that of netilmicin.