

リボスタマイシンの毒性学的研究

—急性毒性と薬動学的解析—

小枝 武美・須野 貴美子・堀坂 和敬

神戸女子薬科大学大学院薬理学講座

小 宮 泉

明治製菓株式会社中央研究所

(昭和 59 年 6 月 8 日受付)

アミノ配糖体系抗生物質であるリボスタマイシン (RSM) をラットの後肢大腿部の筋肉内に投与し、毒性学的検討を行なった。LD₅₀ は 1,850 mg/kg であり、死亡原因は呼吸麻痺と思われ、まず呼吸が停止し、次に心臓が停止するという経過をたどった。そこで呼吸筋として働く横隔膜および内・外肋間筋と、呼吸に関与しない前腕三頭筋に対する RSM の移行濃度を測定し、薬動学的解析を行なった。ラットに対し、RSM の 20 (臨床量)、200、1,000 および 3,000 mg/kg を筋肉内投与し、経時的に血清および上記の 3 種の筋肉内の RSM の濃度を円筒平板法により測定した。

薬動学的解析は、血清については one-compartment open model に、筋肉については deconvolution 法に従って行なった。その結果、20 と 200 mg/kg の投与ラットの筋肉では、投与後約 10 分に最高筋肉内濃度に達し、その濃度は横隔膜が最も高値であり、次いで肋間筋、前腕三頭筋であった。1,000 mg/kg の投与ラットでは、肋間筋が最高値を示し、次いで横隔膜、前腕三頭筋であった。また、組織移行性パラメーター (K_1/K_2) を求め、3 種の筋肉への RSM の移行を比較したところ、前腕三頭筋へは、他の 2 種の呼吸筋より RSM がやや移行しにくいという傾向がみられ、RSM の急性毒性としての呼吸抑制の発現との関連が示唆された。

リボスタマイシンは、*Streptomyces ribosidificus* の産生するアミノ配糖体系抗生物質であり、広範囲の抗菌スペクトラムを有する¹⁾。また副作用として、動物摘出臓器を用いた実験で端ブロックによる筋弛緩が報告されている²⁾。さらに急性毒性実験において、筋弛緩のため呼吸筋麻痺が起り、呼吸抑制の可能性が考えられる。

今回、ラットにおいて、リボスタマイシンの筋肉内投与による LD₅₀ を算出するとともに、呼吸運動に関与する横隔膜および内・外肋間筋と、呼吸運動に関与しない前腕三頭筋とについて、投与後のこれら筋肉へのリボスタマイシン移行濃度を測定し、薬動学的解析を行なったので報告する。

I. 実験材料と方法

使用したリボスタマイシン (ribostamycin, 以下 RSM と略) は、リボスタマイシン・二硫酸塩 (力価 683 μg/mg, 以下 RSM の投与量および濃度は力価に換算して示した) である。

実験動物には静岡県実験動物農協から購入した Wistar 系雄性ラットを用い、室温 24±1°C、湿度 55±

5% の環境下で、ラット・マウス用固型飼料 (ラボ MR ストック、日本農産工業) と市水を自由に摂らせ飼育した。

1. ラット筋肉内投与における LD₅₀

ラットは、体重 100±5g のものを 1 群 10 匹として用いた。

RSM は、生理食塩液に溶解し 30% 溶液とし、汙過滅菌を行なった。RSM の投与量は 1,200~3,000 mg/kg の範囲において 7 段階とし、左右の後肢大腿部筋肉内に等量ずつ分注した。投与後 7 日間にわたり生死を確認し、その間の死亡例数により Litchfield-Wilcoxon 法に基づき LD₅₀ を算出した。

2. 呼吸筋への移行

ラットは体重 160±10g のものを用いた。

1) 投与方法: RSM を生理食塩液に溶解し、20、200、1,000、および 3,000 mg/kg を左右の後肢大腿部筋肉内に等量ずつ分注した。

2) 採血および筋肉の採取と試料の調製: 20、200 および 1,000 mg/kg の各投与群では、投与後 5、15、30、60、90、120 および 180 分のそれぞれの時間ごとに、1

群 12 匹として採血し、次いでその都度頸動脈を切断することにより放血致死させ、筋肉の採取を行なった。即ち、各々の投与後の時間に、腋窩部分を腹側部から切開することより、腋窩動・静脈およびその周辺の血管から流出する血液をスピッツロールに採取し、2,000 rpm, 10 分で遠心分離を行ない血清を得た。充分に放血させた後、開腹し横隔膜を取り出し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) の中で数回振り洗い、血液を除去したのち、乾燥したろ紙の上で水分を除き、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で適度に湿したろ紙の上に置いた。次に胸郭を取りはずし、横隔膜と同様に、左右の第 1~7 肋骨間の内肋間筋と外肋間筋を両者区別なく採取した。前腕三頭筋は左右の前肢より摘出し、同様の操作を行なった。次に横隔膜では 2 匹分をひとまとめにし、また肋間筋および前腕三頭筋では 1 匹より筋 1 g 宛をとり 2 匹分で 2 g とし、2 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、ホモジナイズし、12,000 rpm, 20 分、0°C で遠心分離し上清を得た。

3,000 mg/kg (致死量) の投与群については、6 匹のラットを用い、死亡直後に開腹し、ディスポーザブル注射筒を使用し後大静脈より採血し、2,000 rpm, 10 分で遠心分離を行ない血清を得た。筋肉の採取は 1,000 mg/kg 以下の投与群の場合と同様に行ない、1 匹分の筋肉に、その重量の 3 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、同様の操作を行ない上清を得た。

3) 定量方法：血清および筋抽出液は、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈して検定試料を調製し、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を試験菌として、円筒平板法に基づき抗菌力価を検定した。

4) 薬動力学的解析

薬動力学定数の算出——投与後の血清中濃度について、one compartment open model (Fig. 1) に従って、ダンピング付 Gauss-Newton 法による繰返し最小二乗法により薬動力学定数を決定した。

血清中濃度のシミュレーション：得られた薬動力学定数を式③に代入して血清中濃度 $C(t)$ を求めた。

$$\frac{dA}{dt} = -K_a A \tag{1}$$

$$\frac{dB}{dt} = K_a A - K_{e1} B \tag{2}$$

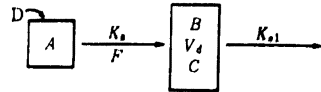
①, ②式を B について解くと

$$B = \frac{K_a D F}{K_a - K_{e1}} (e^{-K_{e1} t} - e^{-K_a t})$$

血清中濃度 $C(t)$ は

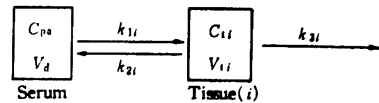
$$C(t) = \frac{K_a D F}{V_d (K_a - K_{e1})} (e^{-K_{e1} t} - e^{-K_a t}) \tag{3}$$

Fig. 1 One compartment open model



- D : Dose
- A : Amount of drug in administration site
- B : Amount of drug in the body
- V_d : Volume of distribution
- C : Serum level
- F : Absorbed fraction after intramuscular administration
- K_a, K_{e1} : First order rate constant

Fig. 2 Model of drug transport between serum and tissue



- C_{pa} : Serum level
- V_d : Volume of serum
- C_{ti} : Concentration of tissue (i)
- V_{ti} : Weight of tissue (i)
- k_{1i}, k_{2i}, k_{3i} : First order rate constant

横隔膜、肋間筋および前腕三頭筋内の濃度のシミュレーション：血清と筋肉間の薬物移行に関して Fig. 2 のようなモデルを立てて、次式の関係を得た。

$$\frac{d(V_{ti} \cdot C_{ti})}{dt} = k_{1i} \cdot V_c \cdot C_{pa} - (k_{2i} + k_{3i}) V_{ti} \cdot C_{ti} \tag{4}$$

$$C_{ti}(t) = \int_0^t \left\{ C_{pa}(t-\theta) \frac{V_c}{V_{ti}} \cdot k_{1i} \cdot e^{-(k_{2i} + k_{3i})\theta} \right\} d\theta$$

$$C_{ti}(t) = \int_0^t C_{pa}(t-\theta) \cdot K_1 \cdot e^{-K_2 \theta} d\theta \tag{5}$$

$$K_1 = k_{1i} V_c / V_{ti} \quad K_2 = k_{2i} + k_{3i}$$

積分方程式⑤において、入力関数 $C_{pa}(t)$ には投与後の血清中濃度を、出力関数 $C_{ti}(t)$ には筋肉 i の薬物濃度を代入し、UMEMURA らの方法によって、パラメーター K_1, K_2 をダンピング付 Gauss-Newton 法を用いた繰返し最小二乗法により求めた⁹⁾。

次に式⑤を使用して、種々の投与量における筋肉内濃度のシミュレーションを行なった。即ち、前に得られた薬動力学定数を使って、種々の投与濃度における血清中濃度の理論値を計算し、これを入力関数 $C_{pa}(t)$ とし、これに K_1 および K_2 を加えて、式⑤に代入して出力関数 $C_{ti}(t)$ を求めた。

II. 成 績

1. ラット筋肉内投与における LD₅₀

Table 1 に示した各投与群において、ほとんどの動物

が投与後 3~7 分より自発運動が軽度で減退し、歩行時には後肢をひきずり、呼吸は時に不規則となり腹式呼吸を示した。1,500 mg/kg 以上の投与群では、投与後 10~20 分に正向反射の消失した動物があったが、死に至らないものでは、投与後 30 分前後に反射は再現し、投与後約 1 時間には、おおよそ投与前の状態に回復した。死亡例数を Table 1 に示した。死亡例は、投与後 5~10 分前後より四肢をばたつかせるなど苦悶状態を呈し、呼吸は不規則となり時に浅衰かつ促迫あるいは減少し、次いで正向反射が消失し、投与後約 15~20 分に呼吸停止により死亡した。LD₅₀ は 1,850 (1,595~2,146) mg/kg であった。

2. 呼吸筋への移行

血清中濃度：1,000 mg/kg 以下の投与群の実測値および計算曲線を Table 2, および Fig. 3 に示した。さらに最高血清中濃度と解析によって得られた薬動学定数を Table 3 に示した。

3,000 mg/kg 投与群では、投与後 4~15 分に全例が呼吸麻痺により死亡し、死亡時における平均血清中濃度は 4,392.4 μg/ml であった (Table 4)。

筋肉内濃度：1,000 mg/kg 以下の投与群の実測値および計算曲線を Table 5 および Fig. 4 に示した。20 mg/kg 投与群では、3 種の筋肉ともに最高筋肉内濃度は投与後約 10 分に現われ、横隔膜において約 5.1 μg/g、肋間筋においては約 4.4 μg/g、前腕三頭筋においては約 2.7 μg/g であった。200 mg/kg 投与群でも、3 種の筋肉

Table 1 The number of died rats and LD₅₀ value in the rat by RSM administration

Dose (mg/kg)	1,200	1,500	1,800	2,100	2,400	2,700	3,000
The number of died rats (n=10)	0	0	6	9	9	10	10
LD ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)	1,850 (1,595~2,146)						

Table 2 Serum concentration of RSM in rat after i.m. of 20, 200, and 1,000 mg/kg RSM (μg/ml, mean±S.E.)

Dose(mg/kg) \ Time(min)	5	15	30	60	90	120	180
20	43.3 ± 1.80	41.9 ± 1.52	28.8 ± 0.80	9.6 ± 0.54	9.6 ± 0.73	5.0 ± 0.29	—
200	450.1 ± 36.68	336.6 ± 7.21	248.0 ± 8.65	96.3 ± 3.91	40.5 ± 2.93	19.7 ± 1.30	11.5 ± 1.18
1,000	1,385.9 ± 51.81	1,912.9 ± 84.44	1,775.0 ± 42.58	928.5 ± 33.08	427.3 ± 23.58	236.1 ± 22.58	41.6 ± 4.72

Table 3 Maximal serum concentration and pharmacokinetic parameters in rat

Dose (mg/kg)	C _{max} (μg/ml)	V _d (l/kg)	K _{el} (min ⁻¹)	T _{1/2} (min)	AUC(mg min/l)	CL _{tot} (l/min kg)
20	46.2	0.3534	2.523×10 ⁻²	27.46	2.243×10 ³	8.916×10 ⁻³
200	513.9	0.3892	2.661×10 ⁻²	26.05	1.931×10 ⁴	1.036×10 ⁻²
1,000	2,010.6	0.3473	2.225×10 ⁻²	31.15	1.294×10 ⁵	7.727×10 ⁻³

C_{max} : Maximal serum concentration.

V_d : Volume of distribution.

K_{el} : First order rate constant.

T_{1/2} : Elimination half time.

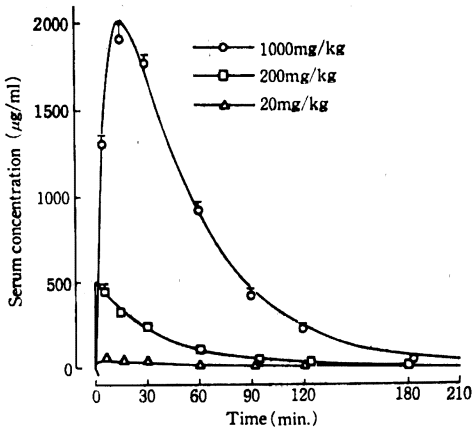
AUC : Area under the serum concentration.

CL_{tot} : Total body clearance.

Table 4 Time of death and the serum concentration after administration of 3,000 mg/kg RSM

Rat number	1	2	3	4	5	6	Mean
Time of death (min)	9	14	8	11	4	15	—
The serum concentration (μg/ml)	4,599.4	4,670.9	5,076.7	4,595.7	3,584.0	3,827.8	4,392.4

Fig. 3 The serum concentration of RSM



とも最高筋肉内濃度は投与後約 10 分に現われ、横隔膜においては約 52 µg/g、肋間筋においては約 47 µg/g、前腕三頭筋においては約 42 µg/g であった。1,000 mg/kg 投与群での最高筋肉内濃度は、横隔膜においては投与後

約 18 分に現われ約 210 µg/g、肋間筋においては投与後約 30 分に現われ約 250 µg/g、前腕三頭筋においては投与後約 18 分に現われ約 160 µg/g であった。

3,000 mg/kg 投与群の死亡時における 3 種の筋肉内濃度を Table 6 に示した。

また、deconvolution 解析によって得られた各筋肉内への移行パラメーター (K_1/K_2) を Table 7 に示した。血流速度の条件において、理論的に K_1/K_2 は定常状態におけるみかけの組織/血清間分配率を表わす。

定常状態においては

$$\textcircled{4} \text{式} : \frac{d(V_{it} \cdot C_{it})}{dt} = 0$$

となり、

$$k_{it} \cdot V_c \cdot C_{pb} - (k_{21} + k_{31}) V_{it} \cdot C_{it} = 0$$

故に

$$\frac{C_{it}}{C_{pb}} = \frac{k_{it} \cdot V_c}{(k_{21} + k_{31}) \cdot V_{it}} = \frac{K_1}{K_2}$$

となる。

Table 5 The muscle concentration of RSM after administration of 20, 200 and 1,000 mg/kg RSM

(µg/g, mean ± S.E.)

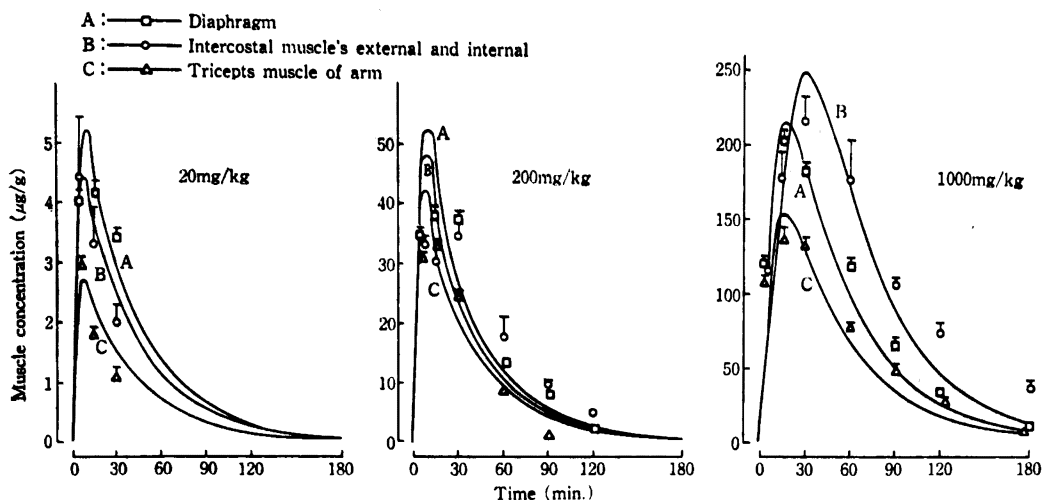
Muscle	Dose (mg/kg)	Time (min)	Time (min)						
			5	15	30	60	90	120	180
Diaphragm	20	20	4.08 ± 0.20	4.12 ± 0.19	3.45 ± 0.14	—	—	—	—
	200	20	34.79 ± 1.04	37.74 ± 1.37	37.28 ± 1.35	13.47 ± 0.29	7.66 ± 0.47	2.53 ± 0.16	—
	1,000	20	118.99 ± 5.05	202.37 ± 10.48	181.03 ± 5.74	119.72 ± 6.02	64.92 ± 4.71	33.98 ± 2.95	11.81 ± 1.18
Intercostal muscle's external and internal	20	20	4.42 ± 1.12	3.32 ± 0.68	2.05 ± 0.36	—	—	—	—
	200	20	33.23 ± 2.79	30.96 ± 0.71	35.08 ± 4.97	17.50 ± 4.65	8.17 ± 1.22	4.10 ± 0.47	—
	1,000	20	116.74 ± 6.64	177.20 ± 18.61	217.86 ± 17.07	177.00 ± 28.51	106.11 ± 5.91	74.02 ± 7.76	35.38 ± 4.80
Triceps muscle of arm	20	20	2.96 ± 0.12	1.80 ± 0.13	1.09 ± 0.15	—	—	—	—
	200	20	30.92 ± 1.10	32.40 ± 1.81	23.92 ± 1.15	8.40 ± 0.26	1.26 ± 0.12	—	—
	1,000	20	108.04 ± 5.54	136.74 ± 9.26	132.66 ± 5.99	77.34 ± 1.76	47.06 ± 4.32	26.05 ± 2.78	8.92 ± 1.36

Table 6 The muscle concentration of RSM after administration of 3,000 mg/kg RSM

(µg/g)

Rat number	1	2	3	4	5	6	Mean
Diaphragm	359.03	417.89	343.17	402.08	266.55	339.04	354.63
Intercostal muscle's external and internal	205.55	279.64	183.14	263.34	124.40	285.50	223.59
Triceps muscle of arm	233.94	276.30	177.50	234.54	92.75	300.63	219.28

Fig. 4 The muscle concentration of RSM

Table 7 Tissue distribution parameter (K_1/K_2) obtained by deconvolution analysis

Dose (mg/kg)	20	200	1,000
Diaphragm	0.1026	0.1102	0.1064
Intercostal muscle's external and internal	0.0879	0.0992	0.1461
Triceps muscle of arm	0.0530	0.0863	0.0757

III. 考 察

今回、RSMの毒性学的検討を行なったが、特にアミノ配糖体系抗生物質の副作用として知られる端板遮断⁴⁾による呼吸筋麻痺に注目した。

LD₅₀の算出においても死亡動物は呼吸停止後に心臓が停止するという経過をたどり、RSMの脳への移行が少ないこともあり⁵⁾、死亡原因は呼吸筋麻痺による呼吸抑制と考えられる。左右の後肢大腿部の筋肉内投与によるLD₅₀は1,850(1,595~2,146)mg/kgであり、小枝ら⁶⁾によるDonryu系ラットを用いた実験のLD₅₀の2,030(1,781~2,314)mg/kgに比べ大差はなかった。

またRSMの呼吸運動に関与する筋肉と呼吸運動に関与しない筋肉の分布について検討した。20, 200 および 1,000 mg/kgの各投与量ともに呼吸運動に関与する横隔膜および肋間筋に対しては、呼吸運動に関与しない前腕三頭筋に対してより、RSMは多く移行する傾向がみられた。Deconvolution解析の結果得られた組織移行の良否を示すパラメーター(K_1/K_2)の比較より、前腕三頭筋が横隔膜および肋間筋に比べ移行の低い傾向がうかがわれた。

このようにRSMを筋肉内投与した時の骨格筋への移

行は呼吸運動に関与する横隔膜と肋間筋への移行が呼吸運動に関与しない前腕三頭筋への移行よりわずかに大きいようであり、3,000 mg/kg投与群においても横隔膜への移行が高値を示しており、RSMの急性毒性として呼吸抑制の発現の可能性が考えられる理由の一端をうかがい得た。

文 献

- 1) 小池聖淳, 永山在明, 飯田恭子, 中島幸一: Vistamycinの試験管内抗菌力およびKanamycin, Fradiomycin, Streptomycinとの比較。Chemotherapy 20: 255~259, 1972
- 2) 小枝武美, 柴田右一, 中沢 正, 浅岡安康, 山上清明: Vistamycinの一般薬理作用に関する研究。Clinical Report 4: 2489~2501, 1970
- 3) UMEMURA, K.; I. KOMIYA, T. SHOMURA & S. MURATA: A modified method for deconvolution and its application for pharmacokinetics. (abstr. 5 E 11-1, 5 E 11-2) 98th Ann. Meeting of Pharm. Soc. of Japan, Okayama
- 4) KOEDA, T.; K. UMEMURA & M. YOKOTA: Toxicology and Pharmacology of Aminoglycoside Antibiotics. Handbook of Experimental Pharmacology, 62: 293~356, 1982
- 5) Vistamycin (基礎編): 明治製薬株式会社
- 6) 小枝武美, 小滝益三, 新里鉄太郎, 渡辺 宏: Vistamycinの毒性に関する研究。Clinical Report 4: 2464~2487, 1970

TOXICOLOGICAL STUDIES ON RIBOSTAMYCIN

—acute toxicity and pharmacokinetics—

TAKEMI KOEDA, KIMIKO SUNO and KAZUYOSHI HORISAKA

Department of Pharmacology and Toxicology, Graduated School,
Kobe Women's College of Pharmacy, Higashinada-ku, Kobe, 658, Japan

IZUMI KOMIYA

Central Research Laboratories, Meiji Seika Kaisha Ltd.,
Kohoku-ku, Yokohama, 222, Japan

The toxicity of ribostamycin (RSM) which belongs to aminoglycosidic antibiotics was studied using rats, and the following results were obtained.

The LD₅₀ value which RSM was intramuscularly injected to the femoral region of posterior leg of rat was 1,850 mg/kg. The cause of death on acute toxicity was thought to be respiratory paralysis. The concentrations of RSM to the muscles of different 3 regions were determined employing respiratory muscle (intercostal muscle and diaphragm) and triceps muscle of arm, and then the pharmacokinetic analysis was conducted.

Namely, 20 mg/kg (clinical dose), 200 mg/kg, 1,000 mg/kg and 3,000 mg/kg of RSM were intramuscularly injected in the femoral region of posterior leg, and the intramuscular RSM's concentrations in serum and above-mentioned 3 regions with time lapse were determined according to the cup method. The pharmacokinetic analysis was conducted according to one compartment open model and deconvolution model for serum and muscle, respectively. The maximal intramuscular concentration showed in approx. 10 minutes following administration on the administrations of 20 mg/kg and 200 mg/kg. The diaphragm showed the maximal value and intercostal muscle, triceps muscle of arm in order. In the administration of 1,000 mg/kg, the intercostal muscle revealed the maximal concentration, and diaphragm, triceps muscle of arm in order.

The tissue distribution parameter (K_1/K_2) was obtained by deconvolution analysis, and the transfer of RSM into the muscle of 3 regions was compared. RSM was noted a tendency to be easy for the transfer in respiratory muscle rather than triceps muscle of arm.

From the above-mentioned results, RSM was suggested to be an influential drug against respiratory muscle.