

Benzylpenicillin のヒト腎 glutathione S-transferase への結合におよぼす organic anions の影響

芳賀敏昭

帝京大学医学部第2内科*

(平成4年9月14日受付・平成5年2月8日受理)

Benzylpenicillin (PCG) の近位尿細管排泄における、ヒト腎 glutathione S-transferase (GST) の役割を明らかにする目的で、ヒト腎 cytosol 分画、精製 GST, pI 5.0 の酸性 GST と PCG の結合について、centrifuge column 法を用い検討した。また、PCG のヒト腎 cytosol 分画、精製 GST への結合におよぼす、phenolsulfonphthalein (PSP), probenecid, *p*-aminosalicylic acid (PAS) の影響について、さらに、これら薬剤ならびに抗生剤の腎 GST 活性におよぼす影響についても検討した。

1. PCG は、添加量 (0.8~4.0 μ mol, 11.4~57.1 mM) に依存して、ヒト腎 cytosol (1.14 mg) に結合 (4.3~15.3 nmol) した。この結合は、PSP (0.26 μ mol, 3.7 mM), probenecid (5.15 μ mol, 73.9 mM), PAS (26.3 μ mol, 375.7 mM) の添加により阻害された。阻害剤単位量当たりでみると阻害の強さは、PSP>probenecid>PAS の順であった。

2. PCG (10 nmol, 0.15 mM) は、精製ヒト GST (6.5 nmol, 288 μ g) に対しても結合 (49.7 pmol) し、PSP (0.34 μ mol, 5.2 mM), probenecid (58.4 μ mol, 898.5 mM) 添加により、その結合は、それぞれ 38.8 pmol, 8.23 pmol に減少した。阻害剤単位量当たりでみると、PSP は probenecid に比べ、強い阻害を示した。また、PCG は酸性 GST (0.24 nmol, 10.56 μ g) に対しても結合 (3.6 pmol) した。

3. 有機陰イオン、 β -ラクタム抗生剤は、ヒト腎 GST 活性を阻害した。各薬剤の阻害定数 (K_i) は、阻害の強い順に PSP (0.23 mM), probenecid (0.93 mM), PAS (7.7 mM), PAH (23.6 mM) で、抗生剤の K_i は cefuzonam (CZON) (1.98 mM), flomoxef (FMOX) (14.0 mM), methicillin (DMPPC) (15.4 mM), imipenem (IPM) (19.2 mM), ceftriaxone (CTRX) (21.5 mM), PCG (28.0 mM) の順であった。近位尿細管より排泄されない gentamicin (GM), erythromycin (EM), fosfomycin (FOM) は、GST 活性をまったく阻害しなかった。

以上により、ヒト腎 GST は organic anion, β -ラクタム剤の近位尿細管細胞内での, carrier protein としての役割を持っている可能性が示唆された。

Key words: ヒト腎 glutathione S-transferase (GST), benzylpenicillin (PCG), organic anion, carrier protein, β -ラクタム剤

Benzylpenicillin (PCG) は、主として腎より排泄されるが、その腎排泄機構は probenecid を併用すると、PCG の血中濃度の上昇がみられることから、近位尿細管から排泄されると考えられている¹⁾。一方、glutathione S-transferase (GST) は、ヒトでは肝臓をはじめ腎、胎盤などに存在し²⁾、肝臓では肝細胞質内における organic anion の carrier protein としての役割を持つことが知られている³⁾。西谷らは、 β -ラクタム剤の肝細胞内移行にヒト、マウス

およびラットで肝 GST が重要な役割を持つと報告している⁴⁻⁶⁾。

ヒト腎においては、GST は近位尿細管の細胞質に局在している⁷⁾。肝 GST と同様に、腎 GST もまた近位尿細管細胞質内での carrier protein としての役割を持つことが推測されるが、ヒト腎 GST と β -ラクタム剤との結合を調べ、腎 GST と抗生剤の近位尿細管排泄との関連を検討した報告は、現在のところ見られていない。そこで今回、

* 東京都板橋区加賀 2-11-1

PCG とヒト腎 cytosol 蛋白ならびに精製 GST の結合と、その結合におよぼすヒト腎近位尿管から排泄されるといわれる probenecid, phenolsulfonphthalein (PSP), *p*-aminosalicylic acid (PAS) の影響を調べ、さらにこれら薬物や抗生剤の腎 GST の酵素活性におよぼす影響についても調べ、PCG の近位尿管排泄機構と腎 GST の関連について検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 以下の薬剤, 抗生剤を使用した。

Probenecid (科研製薬), phenolsulfonphthalein (PSP) (第一製薬), *p*-aminohippuric acid (PAH) (和光純薬工業), *p*-aminosalicylic acid (PAS) (半井化学薬品), benzylpenicillin (PCG) (明治製薬), methicillin (DMPPC) (萬有製薬), ceftriaxone (CTRX) (日本ロシュ), flomoxef (FMOX) (塩野義製薬), fosfomycin (FOM) (明治製薬), erythromycin (EM) (塩野義製薬), cefuzonam (CZON) (日本レダリー), imipenem (IPM) (萬有製薬), gentamicin (GM) (塩野義製薬), reduced glutathione (GSH) (Sigma chemical company, St. Louis, U.S.A.), 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (和光純薬工業)。

2. 方法

1) ヒト腎 GST の精製

腎腫瘍にて摘出された腎の正常実質部分を、ただちに -80°C に保存した。1~2 か月以内に、室温にて解凍し、細断後、3 倍容の 20 mM phosphate buffer (PB) pH 7.4, 1.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 M EDTA, 0.25 M saccharose を加え、テフロンホモジュナイザーで、20 回上下させた後、 4°C , 110,000 g, 90 分間遠心 (Hitachi 80 p) し、上清を得た (腎 cytosol 分画)。以下のステップは、すべて 4°C で行った。この腎 cytosol 120 ml を濾過後 (Whatman NO.2), 20 mM PB pH 7.0 で透析し、次いで、GSH で活性化した Epoxy activated sepharose 6 B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用い bed volume 133 cm^3 の affinity column を作成した⁹⁾。腎 cytosol 全量を、この affinity column に添加し、perfusion pump (Advantec, TMP-6 L) を用い、24 時間循環させたのち流出液中の GST 酵素活性を測定し、活性のないことを確認した後、2 l の 20 mM PB pH 7.0 で column を十分洗浄した。蛋白の流出のないことを確認後、50 mM Tris-HCl pH 9.6, 5 mM GSH を用い、GST を流出させフラクションコレクター (15 ml/fr./15 min.: BIO-RAD model 2110) にて GST 分画を採取した。この GST 分画を透析膜による陰圧吸引法に

て濃縮し、1.2 ml の精製 GST を得た。この GST は 10% SDS-PAGE で single band であることを確認した⁹⁾。酸性 GST の精製は、PBE 94 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) の column を用いた chromatofocusing (pH range 7-4) により行った。すなわち 25 mM imidazole-HCl pH 7.4 を starting buffer とし、polybuffer 74-HCl pH 4.0 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を添加後、精製 GST を加え、再び polybuffer 74 pH 4.0 を添加し、フラクションコレクターで採取し、等電点 (pI) 5.0 の GST 分画を得た。これも同様に濃縮し、 -80°C で保存した。

2) Centrifuge column 法による PCG 結合実験

[^{14}C] PCG (比活性: 58.5 mCi/mmol) (アマシャム・ジャパン) を用い、ヒト腎 cytosol, 精製 GST および酸性 GST (pI 5.0) と PCG の結合を、以下に述べる centrifuge column 法で測定した。また、ヒト腎 cytosol への PCG の結合におよぼす probenecid, PSP, PAS の影響と、精製 GST への PCG の結合におよぼす probenecid, PSP の影響についても検討した。

Centrifuge column 法: 1 ml 用ツベルクリンシリンジの先端に cotton plug をつめ、Sephadex G-25 superfine (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 1 ml を充填し、あらかじめ 150 g, 2 分間遠心 (Sakuma, RSL-05 A) し、水分を除去し centrifuge column とした。ヒト腎 cytosol 50 μl または精製 GST 40 μl と、あらかじめ溶解した薬剤 15 μl をそれぞれ混合し、 37°C , 30 分間 incubation した。その後 PCG 5 μl を加え、さらに、 37°C , 30 分間 incubation 後に、その全量を column へ添加し、150 g, 2 分間遠心後、20 mM PB pH 7.4 を 50 μl ずつ各 column に添加し、同様の遠心を行った。さらに同様の buffer 添加と遠心をもう一度繰り返し、計 3 回の遠心濾液を集めた。その濾液にシンチレーターを加え、シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-700) にて、結合 PCG 量を測定した⁹⁾。また酸性 GST (pI 5.0) 10 μl は、PCG 5 μl と結合させ、同様に結合量を測定した。

3) GST 酵素活性の測定

基質として、1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, 緩衝液に 0.1 M PB pH 6.5, 1 mM GSH を用いて Habig らの方法に従い¹⁰⁾、吸光度 340 nm (日立分光光度計 220 A) にて、室温で GST 活性測定を行った。各種薬剤の影響については腎 cytosol に、各々の薬剤を添加して検討し、Dixon plot, s/v-S plot により、阻害定数 (Ki), 阻害型を決定した。

4) 蛋白量の測定: Bradford らの方法に従い¹¹⁾、吸

Table 1. Purification of GST from human kidney

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor (n-fold)	Recovery of activity (%)
Homogenate	2,739.6	268.8	0.098	1	100
Affinity column	8.64	73.18	8.47	86.43	27.22

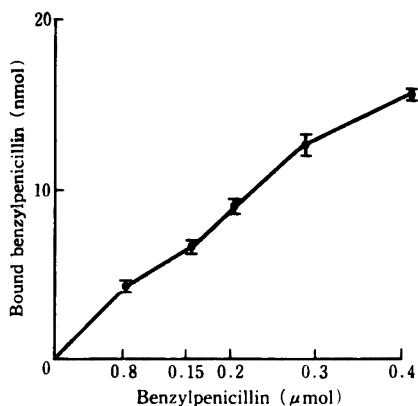


Fig. 1. Binding of benzylpenicillin (PCG) to human kidney cytosol.

The reaction mixture contained 1.14 mg of human kidney cytosol and various amounts of PCG (0.8 to 4.0 μmol) in 110 μl of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. The amounts of the bound PCG were measured by the centrifuge column procedure.

Each curve is on the average of duplicate or triplicate, and the vertical bars denote the standard deviation.

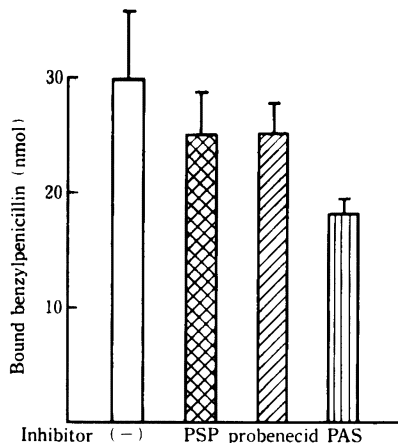


Fig. 2. Effects of organic anions on binding of benzylpenicillin (PCG) to human kidney cytosol.

Phenolsulfonphthalein (PSP) (0.17 μmol), probenecid (2.35 μmol) and *p*-aminosalicylic acid (PAS) (23.7 μmol) were added to 1.14 mg of human kidney cytosol. After 30 min, PCG (4.19 μmol) was added to the mixture. The amounts of bound PCG were measured by the centrifuge column procedure.

Each column is on the average of duplicate or triplicate, and the vertical bars denote the standard deviation.

光度 595 nm で測定し、あらかじめ作製した検量線により蛋白量を決定した。

II. 結 果

1. ヒト腎 GST の精製

Table 1 に、ヒト腎より GST を精製した過程を示す。GST の比活性は、cytosol 分画の 86.4 倍を示した。

2. ヒト腎 cytosol, GST への PCG の結合および PSP, probenecid, PAS 添加の影響

Fig. 1 に PCG の添加量を変化させた場合のヒト腎 cytosol への PCG の結合量の変化を示す。ヒト腎 cytosol 1.14 mg に、PCG 0.8~4.0 μmol (11.4~57.1 mM) を添加したところ、PCG の結合量は 4.26~15.3 nmol まで増加した。

Fig. 2 に、ヒト腎 cytosol への PCG 結合におよぼす PSP, probenecid, PAS の影響を示した。腎 cytosol 1.14 mg に、あらかじめ PSP (0.17 μmol , 2.4 mM), probenecid (2.35 μmol , 33.6 mM), PAS (23.7 μmol , 338.6 mM) を添加し、37°C, 30 分間 incubation 後に PCG (4.19 μmol , 59.9 mM) を添加し、同様に incubation したのち、PCG の腎 cytosol への結合量を centrifuge column を用いて測定し PSP, probenecid, PAS 無添加のものと比較した。無添加の PCG 結合量 (29.4 nmol) に比べ PSP 添加では、PCG 結合量は 25.0 nmol に減少し、14.5% の阻害が認められた。同様に、probenecid 添加では 25.1

nmol に減少し 14.4% の阻害を、PAS 添加では 17.9 nmol に減少し 38.7% の阻害を示した。各薬剤の添加濃度がそれぞれ異なるため、これら阻害率を各薬剤の単位量当たりで比べると、PSP > probenecid > PAS の順で強い阻害を示した。

Fig. 3 に、PCG の添加量をさらに減少させた場合の腎 cytosol への PCG 結合量の変化と、PSP, probenecid, PAS の阻害作用について示した。同量のヒト腎 cytosol にあらかじめ PSP (0.26 μ mol, 3.7 mM), probenecid (5.15 μ mol, 73.6 mM), PAS (26.3 μ mol, 375.7 mM) を添加し、同様に結合 PCG 量を測定した。各薬剤の阻害は、PCG 添加量を 1/5 まで減少させても認められ、PCG 0.8 μ mol 添加時、PSP, probenecid, PAS 無添加と比較し、PSP, probenecid, PAS の阻害率は、各々 6.3%, 32.4%, 14.8% であり、添加薬剤単位量当たりでみると、やはり PSP > probenecid > PAS の順で強い阻害を認めた。

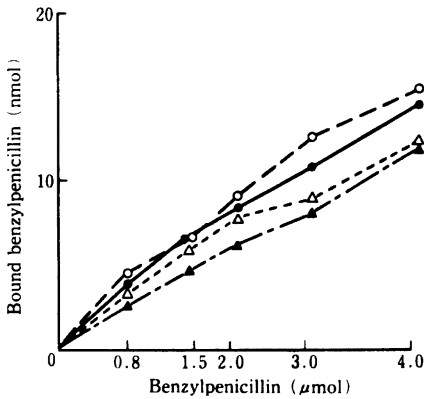


Fig. 3. Inhibitory effects of phenolsulfonphthalein (PSP), probenecid and *p*-aminosalicylic acid (PAS) on binding of benzylpenicillin (PCG) to human kidney cytosol.

PSP (0.26 μ mol), probenecid (5.15 μ mol) and PAS (26.3 μ mol) were added to 1.14 mg of human kidney cytosol. After 30 min, various amounts of PCG (0.8 to 4.0 μ mol) were added to the mixture. The amounts of the bound PCG were measured by the centrifuge column procedure.

Each curve, except for that of the control which showed in Fig. 1, is on the average of duplicate.

○---○ : no inhibitor ●---● : PSP
 ▲---▲ : probenecid △---△ : PAS

3. 精製ヒト腎 GST への PCG の結合および PSP, probenecid 添加による影響

Fig. 4 に、精製ヒト腎 GST (6.5 nmol, 288 μ g) と PCG (10 nmol, 0.15 mM) の結合および PSP (0.34 μ mol, 5.2 mM), probenecid (58.4 μ mol, 898.5 mM) 添加による影響を示す。PSP, probenecid 無添加では、GST 1 nmol 当たり 7.7 pmol の PCG が結合し、PSP, probenecid 添加により、それぞれ結合量は 6.0 pmol, 1.3 pmol に減少し、それぞれ 22%, 83% の阻害を認めた。添加 PSP, probenecid 単位量当たりで換算すると PSP は、probenecid に比べ強い阻害を示した。さらに酸性 GST (pI 5.0) 0.24 nmol (10.56 μ g) への PCG 10 nmol 添加時の結合量は 3.6 pmol であった。

4. ヒト腎 GST 活性におよぼす各種薬剤の影響

ヒト腎 GST が、PCG などの抗生剤の近位尿管細胞内輸送に関与しているとすれば、各薬剤が GST に結合し、その酵素活性を阻害すると考えられる。そこで、PSP, probenecid, PAS と各種抗生剤、すなわち近位尿管排泄型といわれている PCG, DMPPC, FMOX, IPM と糸球体濾過型の FOM, GM や脂溶性で肝排泄型の EM, 肝・腎排泄型の CTRX, CZON について、その GST 活性におよぼす影響について検討

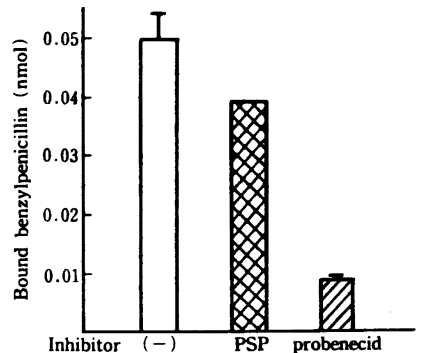


Fig. 4. Effects of organic anions on binding of benzylpenicillin (PCG) to human renal glutathione S-transferase (GST).

Phenolsulfonphthalein (PSP) (0.34 μ mol) and probenecid (58.4 μ mol) were added to 6.5 nmol of human renal GST. After 30 min, PCG (10 μ mol) was added to the mixture. The amounts of bound PCG were measured.

Each column is on the average of duplicate or triplicate, and the vertical bars denote the standard deviation. The column of PSP is from an experiment.

Table 2. Inhibition constants (K_i) and inhibitory types of human renal GST for antimicrobial agents and organic anions

Inhibitor	K_i (s/v-S plot) (mM)	K_i (Dixon plot) (mM)	Type of inhibition
Probenecid	0.42	0.94	competitive
Phenolsulfonphthalein	0.27	0.23	competitive
<i>p</i> -aminohippuric acid	67.0	23.6	competitive
<i>p</i> -aminosalicylic acid	6.32	7.7	noncompetitive
Benzylpenicillin	20.1	28.0	competitive
Methicillin	26.2	15.4	noncompetitive
Flomoxef	4.6	14.0	noncompetitive
Cefuzonam	1.05	1.98	noncompetitive
Ceftriaxone	19.2	21.5	noncompetitive
Imipenem	20.0	19.2	noncompetitive
Gentamicin			
Erythromycin	no inhibition		
Fosfomicin			

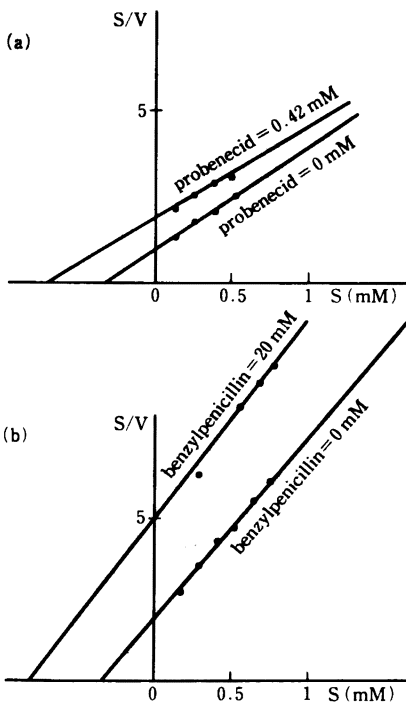


Fig. 5. s/v versus S plots of probenecid and benzylpenicillin (PCG).

The inhibitory effects of probenecid (a) and PCG (b) on human renal glutathione S-transferase (GST) were competitive. The K_i values of probenecid and PCG for the GST were 0.42 and 20.1 mM, respectively.

した。

Table 2 に、各種薬剤の K_i 値と阻害型を示す。また、Fig. 5 に、probenecid、PCG の s/v-S plot を示す。probenecid、PCG 共に拮抗型阻害を示し、Dixon plot で求めたそれぞれの K_i は、0.94 mM、28.0 mM であり、probenecid は PCG より K_i が小さく低濃度で GST 活性を阻害した。 β -ラクタム剤の K_i は 14~28 mM の間であり、PSP、probenecid に比べ 1/100~1/10 の活性阻害を示した。一方、そのほとんどが糸球体濾過により腎排泄される FOM や GM、また脂溶性胆汁排泄型の EM は、GST 活性をまったく阻害しなかった。

III. 考 察

GST は、ヒトでは肝をはじめ広く生体内に分布し、内因性および発癌物質を含む外因性異物と GSH との抱合を触媒する解毒酵素の機能をもち、さらに各種有機陰イオンと結合し、有機陰イオンの細胞内輸送を行っていると考えられている³⁾。GST は、等電点によって塩基性、中性、酸性に大別され、ヒト腎では中性 (pI 7.0 前後) のものは少なく、塩基性 (pI 9.0 前後)、酸性 (pI 5.0 前後) のものが多い特徴を持つ²⁾。また酸性 GST は肝にはみられないが、等電点の違いによる GST の特異性や機能的差異は明らかではない。一方ヒト肝においては、肝 GST と各種抗生剤・有機陰イオンが結合し、細胞内輸送の役割を果していることが報告されている^{3,4)}。ヒト腎における抗生剤の尿管排泄における細胞膜の役割は重要であるが、

細胞内輸送機序は現在のところ不明な点が多い。Penicillin, PAS は, probenecid を併用することにより, 近位尿細管分泌が競合的に阻害され, probenecid を併用しない場合に比べ, 2 倍以上の血中濃度上昇を認めることが知られている。また, ヒト腎 GST は腎近位尿細管細胞質内に局在していることもよく知られている⁷⁾。さらに Kaplowits ら¹²⁾ は, GST 活性阻害の面から検討し, ラット腎 GST と肝 GST が免疫学的・機能的に似ており, 腎 GST も細胞内の有機陰イオン輸送系に関与している可能性を示した。これらの事実は, 腎 GST が近位尿細管細胞内で PCG, PAS, probenecid などに対する共通な carrier protein として働いている可能性を示唆している。

そこで今回, PCG の尿細管細胞内移行にヒト腎 GST が関与しているか否かを検討した。まずヒト腎 cytosol と PCG の結合を調べたところ, PCG の添加量の増加に伴い, 用量依存的に腎 cytosol への PCG の結合量が増加した。次いで, 近位尿細管から選択的に排泄される物質として知られる PSP, probenecid, PAS の腎 cytosol への PCG 結合におよぼす影響について検討したところ, PSP>probenecid>PAS の順に, PCG の腎 cytosol への結合は強く阻害された。その阻害率は, PCG 添加量を 0.8~4.0 μmol で変化させても, 各濃度において, ほぼ一定していた。以上の事実は, PCG と PSP, probenecid, PAS は腎 cytosol に存在するある種の共通な蛋白に結合していることを示している。

次に, 精製 GST を用いて, PCG との結合および, その PCG 結合におよぼす PSP, probenecid の影響を検討したところ, GST と PCG とは, 明らかに結合し, さらにその結合も PSP, probenecid 添加により阻害された。次に, 肝には存在せず, 主に腎と胎盤に存在する比較的特異な酸性 GST にも PCG が結合するか否かを検討したところ, 明らかに PCG の結合が認められた。このことは, 腎 cytosol に存在する共通な結合蛋白にひとつとして GST が重要な役割を持っている可能性を示している。

さらに, 薬剤の GST への結合と Ki 値との関連については, Ki からみた GST への結合力は PSP>probenecid の順に強く, これは結合実験による阻害の強さの順と一致していた。腎 cytosol での結合実験でも, PSP>probenecid>PAS の順であり, これも Ki と同じ順であった。Ki 値は GST と 1-chloro-2,4-dinitrobenzene の結合をどの程度阻害するかを示すものであり, 拮抗型または拮抗型阻害を示した薬剤は, GST に結合することは間接的ではあるが明らか

である。さらにヒト肝 GST についての Ki と結合力の指標である Kd についての相関をみた我々の最近の知見では, PCG, cefazolin (CEZ), cefotetan (CTT), cefpiramide (CPM) の肝 GST に対する Ki と Kd はよく相関がみられた (未発表データ)。このことは腎 GST においても Ki と Kd の間に同様の相関がある可能性を示している。以上より, 各薬剤の Ki の比較は, 確かに PCG の腎 GST への結合におよぼす各薬剤の阻害の強さをある程度反映していると考えられた。また結合の強さは Ki 値から考えても強いものとは考えられず, 電気的非特異的結合と考えられた。

抗生剤については β -ラクタム剤のうち, 尿細管排泄型といわれる PCG, DMPPC, FMOX, IPM は, GST 活性を阻害し, 糸球体濾過型の FOM, GM や脂溶性で肝排泄型の EM は, GST 活性を阻害せず, 活性阻害と尿細管排泄の程度との関連を示唆する結果であった。

腎および肝からもよく排泄される CZON, CTRX は腎 GST 活性を阻害したが, その腎排泄機構は, 一般に probenecid 併用時にその尿中排泄量に変化のないことから, 主に糸球体濾過型と判断する場合がみられる。ラット肝 GST への PCG の結合を probenecid が阻害すること (投稿準備中) を考えると, CZON, CTRX に probenecid を併用した場合, 肝と近位尿細管の両方で probenecid と競合している可能性がある。すなわち, 今回 CZON, CTRX が腎 GST 活性を阻害したことは, probenecid 併用時に両剤とも尿細管排泄も行われているが, 肝でも probenecid と競合し代償的に腎糸球体からの排泄量が増加し, そのため尿細管排泄の減少の影響が小さくなり尿中排泄量としては変化がでなかった可能性も考えられる。この点については, さらに検討する必要があると考えられるが, 一般に probenecid 併用による抗生剤の血中濃度上昇をもってその腎排泄機構を近位尿細管排泄と決める従来の考え方に, 一考を要する可能性も示唆している。さらに, β -ラクタム剤や organic anion の活性阻害が腎 GST と肝 GST で異なるか否かについても今後検討する必要があると考える。

以上の成績から, ヒト腎 GST は近位尿細管細胞内における PCG をはじめとする近位尿細管排泄型の β -ラクタム剤や PSP, probenecid, PAS などの carrier protein としての役割を担っている可能性が示唆された。さらに GST が腎細胞内輸送に具体的にどのような働きをしているのか, 血中の albumin のように binding protein として腎細胞内に薬剤を単に保持

しているだけなのか、または血中から腎細胞内への取り込みにも関与しているのか、あるいはより積極的に血管側細胞膜から薬剤を受取り、細胞質内を運搬し尿管腔側細胞膜へ渡す役割を持っているのか否かについては今後さらに明らかにすべき点であると考え。

本論文の要旨は、第 87 回日本内科学会 (1990)、第 38 回日本化学療法学会総会 (1990) で発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を頂きました帝京大学第 2 内科宮下英夫主任教授ならびに直接御指導頂いた同内科国井乙彦教授、西谷 肇講師に深甚なる謝意を表します。また実験にあたり多大な協力を頂いた石沢希久子氏および感染化療研究室の皆様、深謝いたします。さらに、快く臓器の提供をして下さいました同大学泌尿器科矢崎恒忠助教授に感謝いたします。

なお、本論文は学位申請論文である。

文 献

- 1) Boger W P, Beatty J O, Pitts F W, Flippin H F: The influence of a new benzoic acid derivative on the metabolism of paraaminosalicylic acid (PAS) and penicillin. *Ann Intern Med* 33: 18~31, 1950
- 2) Singh S V, Leal T, Ansari G A S, Awasthi Y C: Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. *Biochem J* 246: 179~186, 1987
- 3) Litwak G, Kettere B, Arias I M: Ligandin: A hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234: 446~467, 1971
- 4) Nishiya H, Komatsu T, Kunii O: Binding of antibiotics to human liver glutathione S-transferases. *Japan J Exp Med* 51: 355~362, 1981
- 5) Nishiya H, Haga T, Nozue N, Komatsu T, Baba M, Ueda Y, Ono Y, Kunii O: Effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole pretreatment on cefpiramide binding to mouse glutathione S-transferases. *Pharmacology* 39: 213~223, 1989
- 6) 宮司厚子: Cefpiramide の胆汁内移行に及ぼす各種薬剤の影響。 *Chemotherapy* 40: 1418~1425, 1992
- 7) 小杉雅郎: 正常腎および腎細胞癌組織内の glutathione S-transferase の局在と病理組織学的検討。 *日泌尿会誌* 77: 31~37, 1986
- 8) Simon P C, Vander Jagt D L: Purification of glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 249: 7130~7139, 1974
- 9) Weber K, Osborn M: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406~4412, 1969
- 10) Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B: Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 249: 7130~7139, 1974
- 11) Bradford M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248~252, 1976
- 12) Kaplowitz N, Clifton G, Kuhlenkamp J, Wallin J D: Comparison of renal and hepatic glutathione S-transferases in the rat. *Biochem J* 158: 243~248, 1976

Effects of organic anions on benzylpenicillin binding
to human renal glutathione S-transferases

Toshiaki Haga

Second Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine,
2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173 Japan

The binding of benzylpenicillin (PCG) to human renal cytosol and glutathione S-transferases (GST) were investigated using the centrifuge column procedure to clarify the role of renal GST in transporting PCG through the renal proximal tubule. PCG bound to the cytosol dose-dependently, and the binding was inhibited by phenolsulfonphthalein (PSP), probenecid and *p*-aminosalicylic acid (PAS). PCG also bound to the GST, including the acidic GST characteristic to the kidney, and the binding was inhibited by PSP and probenecid. The organic anions and some β -lactam antimicrobial agents inhibited renal GST activity. The inhibition constants (K_i) were 0.23 for PSP, 0.93 for probenecid, 7.7 for PAS, 2.3.6 for *p*-aminohippuric acid (PAH), 1.98 for cefuzonam (CZON), 14.0 for flomoxef (FMOX), 15.4 for methicillin (DMPPC), 19.2 for imipenem (IPM), 21.5 for ceftriaxone (CTRX) and 28.0 mM for PCG. Gentamicin (GM), erythromycin (EM) and fosfomicin (FOM), which are not excreted by the renal proximal tubule, showed no inhibitory effects on GST activity. It is suggested that the human renal GST plays an important role as intracellular carrier proteins for transporting organic anions and some β -lactam antimicrobial agents through the renal proximal tubule.