Kanamycin の腎毒性に関する生化学的研究

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 中 菌 昌 明
(主任教授: 大越正秋)

BIOCHEMICAL STUDIES ON NEPHROTOXICITY OF KANAMYCIN

Masaaki Nakazono

Department of Urology, School of Medicine, Keio University

(Director: Prof. M. Ohkoshi)

It has been shown that nephrotoxicity of kanamycin is enhanced when administered with low molecular weight plasma expanders. Release of lysosomal enzyme (β -glucuronidase) in vitro, and release of soluble enzyme (lactic dehydrogenase) into blood stream were taken as the indicators of tissue damage caused by administration of drugs in this study.

Five groups of female albino rats weighing 180 to 200 g were treated by 1) dehydration, 2) dehydration and kanamycin* (abrv. Km), 3) dehydration and low molecular weight dextran (abrv. Dxt, 50 ml/kg of 10% solution), 4) dehydration, Km and Dxt, or 5) dehydration, Km, Dxt and hydrocortisone.

β -Glucuronidase study: Activity of the enzyme was measured in the supernatant fraction of tissue homogenate obtained by mechanical destruction and centrifugation, and in the medium containing the enzyme released from the lysosomal fraction during incubation at 37°C. Both experiments showed that the release of β -glucuronidase was most marked in group 4). The activity in groups 2), 3) and 5) was statistically lower than that in 1). These data indicated that the combination of Km and Dxt more labilized the kidney lysosome than the administration of either drug alone did, and that hydrocortisone partly restored the labilizing effect of these drugs.

Lactic dehydrogenase (LDH) study: 1) Serum LDH level was not increased by dehydration alone. Dxt caused a rapid and short-term rise. However, combination of Dxt and Km showed a gradual long-lasting increase of serum LDH activity. Cortisone incompletely inhibited the increase. 2) Kidney fraction of LDH (absorbed on DEAE cellulose) showed about 50% of the total activity on the average 6 hours after treatment with the combination. With Dxt alone, only a few per cent of the total was absorbed on DEAE cellulose, indicating that most LDH in serum was released from the liver. Cortisone did not affect the ratio of fractions greatly. 3) Electrophoretic separation of LDH isoenzymes showed that LDH-5 was dominant in the serum from animals treated with Dxt. However, in the animals treated with the combination, 5 bands (from LDH-1 to LDH-5) were visible. Cortisone did not affect the released isoenzyme pattern.

序 論

化学療法施行に当つては、種々の副作用の発現に留意しつつ投与量、間隔、期間等を決定、あるいは変更していくのが常識である。泌尿器科領域は感染症、特に腎盂腎炎に於ては感染腎自体が既に機能不全を起こしている、両側性疾患の場合に薬剤の排泄遅延(体内蓄積をまねく事、感染腎の既存の病変自体が薬剤の毒性に対する感受性を高めている事)等、一面では感染症治療に有利にみえながら、他方その副作用発現が促進されている場

合がある^{1)~6)}。その為、腎毒性を有する事が判明している polyenemacrolide 系薬剤 (amphotericin B nystatin 等)^{7)~10)}、poly peptide 系薬剤 (polymyxin B または colistin)^{11)~18)}、aminoglycoside 系薬剤 (streptomycin, kanamycin, neomycin, gentamicin, kasugamycin 等)の使用に当つては使用前に総腎機能の低下の無い事、使用期間中の腎機能は低下の無い事が、薬剤通常量の使用に当つての条件であり、また腎機能低下の存在する時は、その低下の程度に応じた投与量の決定が行な

われる。しかし最近、kanamycin とある種の plasma expander との併用時に強い腎障害が起こる事が明らかになって来た。Kanamycin を初めとする aminoglycoside 系抗生剤が、第Ⅷ脳神経に対する毒性、および腎に対する毒性を有する事は周知の事であるが、腎に対しては大量に使用するか、あるいは既存の腎疾患を有する患者に長期間連用せぬかぎり、重篤な腎不全を起こす事は稀である。しかるにここ2、3年来 kanamycin と低分子デキストラン、あるいは algin 酸ソーダとの併用時に高率に急性腎不全のみられるとの報告が相次ぎ、臨床例の検討^{27)~33)} および実験的検索^{34)~37)}が広くなされつつある。これらは形態学を主としたものであり、それらの報告によれば、光学顕微鏡を用いた観察では、近位尿細管の高度の空胞状変性が主な変化で、時に遠位尿細管にも同様のものが認められている。この空胞は、電子顕微鏡的には、明瞭な限界膜を有せず、空胞中は低分子デキストランと思われる小顆粒で充たされている。また、細胞質内におそらく lysosome を中心として出来たと思われる、不正形の密度の高い部分が認められるとしている^{38)~40)}。この様に形態学的観察はかなり進んだ点まで行なわれてはいるものの、この様な形態学的変化に伴う機能的変化については不明な点が多い。また、さらに一歩進んで個々の細胞機能の変化、あるいは細胞内 organelle の機能的変化もこの種の現象の解析に当つては検討を要するものである。著者は今回この点について生化学的方法論により検討を加えてみた。まず白鼠の腎皮質部分の lysosomal enzyme の代表として β -glucuronidase をとりあげ、核酵素の lysosomal membraneからの遊離について検討した。さらに cytoplasmic enzyme の血清中へ遊離するものの代表として lactate dehydrogenase (以下 LDH と略す) をとりあげ、その活性およびその isoenzyme の pattern の変化について検討を加えてみた。その結果、この様な低分子デキストラン投与時にみられる浸透圧性腎症を基盤とし、抗生

剤投与により発症する急性腎不全の診断上、LDH が有力な指標として使用し得る事が判つた。

実験材料及び方法

実験動物としては 180~200 g のウイスター系雌の鼠を使用した。

すべての動物は実験に際して 72 時間の脱水期間をおき、その間 24 時間毎に kanamycin を一定量、腹腔内に投与し、脱水 72 時間目に低分子デキストランと kanamycin を腹腔内に投与した。脱水期間中は飼料は自由に与え 25~26°C の定温に保つた。実験動物は処理の方法により下記のごとく 5 群に分類した。

第 1 群 脱水群

第 2 群 脱水 + Kanamycin 投与群

第 3 群 脱水 + Dextran 投与群

第 4 群 脱水 + Dextran + Kanamycin 投与群

第 5 群 脱水 + Dextran + Kanamycin + Cortisone acetate 投与群

Kanamycin, 硫酸カナマイシンを 10mg/ml になる様生食水にて溶解し、300mg/kg/day の割合にて腹腔内に投与した。

Cortisone acetate, 25mg/kg/day の割合に筋肉内投与した。

低分子 dextran, 大五栄養社製の平均分子量約 40,000 のものを 50mg/kg の割合で腹腔内投与した。

動物は低分子 dextran 投与後 12 時間目に屠殺した。但し第 4 群、および第 5 群では、dextran 投与後 12 時間目にさらに kanamycin 300mg/kg および、kanamycin 300mg/kg と cortisone acetate 25mg/kg をそれぞれ投与し、30 分後に屠殺した。

腎ホモジネイトの調製は Weissmann & Thomas⁴²⁾ に従い、次に示す方法で行なつた。

すなわち 0.25M 蔗糖溶液にてほぼ 10% 腎ホモジネイトを調製し、それを 800 × g 10 分間 5°C で遠沈し、細胞残渣および核を含む沈渣は廃棄した。上清部分はさらに、

表 1 Activity of Beta-glucuronidase in rat kidney

	group 1	group 2	group 3	group 4	group 5
Unsedimentable	616 ± 114	1430 ± 192	1364 ± 252	1692 ± 252	1110 ± 281~
Incubated	231 ± 27	339 ± 23	293 ± 140	638 ± 120	347 ± 198~

(units/wet. g sample)

(~Difference from group 4 significant at $P > 0.001$)

図1 Fractionation scheme for rat kidney granules

15,000 × g 20分間遠沈し，その上清部分を unsedimentable fraction として用いた。沈渣 (lysosomal fraction) は0.25Mの蔗糖溶液で一度洗浄後二分し，その一方を5分間ブレンダー処理した後37°C40分間 incubate して充分酵素をlysosome の膜面より遊離させ，その15,000 × g 20分遠沈上清を，酵素の全活性を測定する為に供した。残りの部分は0.25M蔗糖溶液に再浮遊後37°C 40分 incubate し，その15,000 × g 20分遠沈上清を溶出部分 (incubated) とした。

酵素活性の測定法

i) β -glucuronidase

β -glucuronidase の活性測定は Fishman, Springer および Bernetti⁴³⁾ の方法に従った。Phenolphthalein glucuronide は中外製薬より発売されているものを使用し，units/wet, g sample で活性を表現した。

ii) 血清中 LDH 活性測定は Bergmeyer, Bernt および Hess⁴⁴⁾ の方法に従った。

Reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH) Sodium Salt (DPNH- Na_2) は Sigma 社のものを使用した。腎臓型-LDH (主として LDH₁ および LDH₂) と肝臓型-LDH (主として LDH₅ および LDH₄) との分画は Hess⁴⁵⁾ の方法に従った。

すなわち，血清を 2×10^{-2} M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 1,000ml に 3ml の割合で氷室内にて2時間以上透析

後，DEAE—セルローズ懸濁液 (pH 6.0) と混和し，20分間4°Cに保ち，腎臓型-LDH を DEAE セルローズに吸着させた後，約 $4,000 \times g$ 5～10分遠沈し，DEAE—セルローズを除き，その上清に残った活性を肝臓型-LDH 活性として測定した。腎臓型-LDH 活性は DEAE—セルローズ処理前の全活性より，肝臓型活性に差引いて算出した。

DEAE—セルローズは生化学工業発売の (DEAE—TLC) を使用した。

電気泳動は菅野の方法⁴⁶⁾に従った。また支持体としては cellogel を使用した。

デントメーターはアタゴの Quick Densitometer を使用した。

結 果

第2図は腎皮質部分 unsedimentable fraction (lysosomal membraneより溶液中に遊離したと思われる) β -glucuronidase 活性をプロットとしたものである。Kanamycin 投与群 (第2群)，dextran 投与群 (第3群)，dextran+kanamycin 投与群 (第4群) および dextran+kanamycin+cortisone acetate 投与群 (第5群) はすべて脱水のみほどこした第1群に比較し強い活性を示している。

第4群と cortisone acetate を併用した第5群では危険率 0.001 で有意差が認められた。しかし第2群，第3

図 2. The activity of β -glucuronidase (unsedimentable)

群、第4群の間には有意差は認められなかった。

第3図は37°C40分間 lysosomal fraction を0.25M 蔗糖溶液にて incubation 後、15,000×g 20分遠沈した上清部分の β -glucuronidase 活性 (incubated) を示すものである。この実験系に於ても、第2図と同様の傾向を示しているが、第4群の活性が他の4群に比較明らかに高い事は注目に値する。特に cortisone を併用した第5群の活性値と、第4群のそれを比較すると著明な差異が認められる。第2群は活性値は殆んど同一であつたが、第3群のそれはすこしバラツキが大きかつた。第3群と第5群では有意差をみなかつたが、第4群と第5群では推計上 $P = 0.001$ で有意の差を認めた。

第1群より第5群に於て、該酵素の総活性値 (total) にはみるべき変化が無かつた。

第4図は第3群、第4群および第5群の血清中の LDH 活性を経時的に検討したものである。図の原点は72時間脱水後、dextran を投与した時点を示している。

72時間の脱水のみでは血清中の LDH 活性にはみるべき変化が無かつた。しかしながら dextran の投与は短時間のうちに急速な LDH 活性の上昇をもたらしている。

第4群は初めの6時間で急速な活性上昇をみ、その後はゆるやかに下降している。第5群は12時間目までゆるやかに上昇し、その後はあまり大きな変化を認めない。第3群は30分値で、ある程度急速な上昇をみせた後、緩慢な変化を示しているにすぎない。

図 3. The activity of β -glucuronidase(incubated)

図 4. The total activity of serum LDH

図 5. The percentage of kidney-LDH-activity

図 6

Kanamycin + Dextran 300mg/kg/day
Dextran 投与後 6 時間目の血清を使用した。

図 7

Dextran alone 50ml/kg
dextran 投与後 6 時間目の血清を使用した。

各群の差を概観すると血清中の LDH 活性の比較に於ても cortisone を併用した第 5 群が、第 4 群(kanamycin + dextran) よりも有意の差で低く、 β -glucuronidase の活性比較の場合に相応した傾向がみられた。

第 5 図は血清中の LDH を Hess の方法に従い腎臓型—LDH と肝臓型—LDH に分画し、その腎臓型—LDH 活性が全 LDH 活性に対する百分率を経時的に検討したものである。

第 4 群、第 5 群ともほぼ同様な変化を示している。第 3 群では腎臓型—LDH は経時的には殆んど変化を認めない。dextran のみでは腎実質に対する障害は低い様にみうけられる。

一方 kanamycin を dextran と併用する場合は、cortisone の使用の有無にかかわらず、腎臓型—LDH のしめる割合が経時的に増強している。第 7 図は kanamycin, dextran 併用群の dextran 投与後 6 時間目の血清 LDH の isoenzyme のデンストグラムである。LDH₁ より LDH₅ まですべてのピークが明瞭に認められる。

第 6 図は第 3 群の血清 LDH の isoenzyme のデンストグラムである。LDH₅ のピークが明瞭に認められるが、第 4 群でみられた LDH₁ LDH₂ のピークは認められない。

考 按

a) 白鼠腎皮質部分の β -glucuronidase について
Shibko および Tappel⁴¹⁾ の報告によれば β -gluc-

uronidase は他の lysosomal enzyme に比較し、腎皮質部分に強い局在を示すと同時に、種々の細胞分画に於る活性に於ても、arylsulfatase の 16%, acid ribonuclease の 17%, acid phosphatase の 16% に比較し、60% と一段と強い局在を lysosomal fraction に示している。それ故今回の実験では該酵素を lysosomal enzyme の代表とした。

Kanamycin の腎毒性については、1958 年以来臨床例に関するもの²⁰⁾²¹⁾、および薬理学的実施に関する報告等^{47)~49)}種々の報告がなされて来た。臨床的に腎障害発生の有無をみる parameter としては、糸球体濾過値の減少、尿細管機能の低下、蛋白尿の出現、顕微鏡的血尿等が挙げられている。Berman 等²¹⁾によれば kanamycin だけの投与により乏尿、BUN の上昇、および組織学的に急性腎不全の像を呈した症例のあつた事を報告している。Kleeman 等²²⁾は家兎を用い kanamycin 100mg/kg/day では腎障害の症候を認めなかつたが、100~200 mg/kg/day では近位尿細管壊死の起こる事、さらに 200 mg/kg/day の場合は蛋白尿、血尿、窒素血症、時として無尿を来し、組織学的には近位、および遠位尿細管壊死を認めた事を報告している。統計⁵⁰⁾では kanamycin 25~50mg/kg/day の割合で人体に投与された場合、10% に蛋白尿の出現が、20% に顕微鏡的血尿がみられるという。また、顆粒円柱および硝子様円柱の出現する場合も報告されている。

次に dextran は 1945 年 Grönwall⁵¹⁾ と Ingelman⁵²⁾ によつて初めて臨床的に応用された代用血漿で、今日まで広く臨床に用いられて来たグルコース多糖体で、 α -1-6 結合で主鎖を形成し、全体の約 10% は α -1-3 結合で分岐、側鎖を出しており、生体内に生理的に存在する糖原物質とは異なっている。現在本邦で一般的に使用されている臨床用 dextran 製剤は、平均分子量約 70,000 の高分子 dextran と称されるものと、約 40,000 の低分子 dextran と称されるものの 2 種類である。本製剤の投与に当つてはまず問題となる事は、本物質の生体内での消失過程であろう。生体内に投与された dextran は大部分腎によつて生体外に排泄されるものと考えられているが、高分子のもの程完全でない様である⁵³⁾⁵⁴⁾。従つて、本製剤の大量連続投与により、dextran が生体内に蓄積された後、細胞内で分解代謝される事により消失する過程が想像され、ある程度は確認もなされている^{55)~57)}。従来 dextran の生体内蓄積に関しては実験的に数多くの研究が試みられているが、人体例での詳細な

検索は極めて数少く、Johnston⁵⁸⁾、Zettergren⁵⁹⁾、Vickery⁶⁰⁾、Traenckner⁶¹⁾ および小島等の報告をみているにすぎない。従つて現在のところ、人体内における dextran の蓄積および消失過程に関する正確な検討は充分とはいへない様に見える。

小島等の報告によれば、人体に投与された dextran を全身各所の網内細胞が活発に摂取して胞体内に蓄積し、細胞自体は著しく腫大し、この様な網内系細胞の系統的腫大が腎における変化と並んで蓄積現象の基本的な変化であるとしている。腎臓の変化とは、糸球体メサンギウムに認められる膨化と肥厚、および稀に糸球係蹄にみられる細血管内皮に由来する少数の泡沫細胞等のびまん性ないし限局性の空胞変性である。この変化が高度な場合、Henle 係蹄、さらに遠位曲尿管にまでおよび、また稀に Bowmann 嚢の上皮細胞にも空胞変性と腫大を認める事がある。一般に尿管の空胞変性の程度は dextran の総投与量に左右されるが、最終投与後の経過日数とも密接に関連し、時期の経過に伴い漸次消褪の過程をたどる様である。また尿管上皮細胞の変化は混濁腫脹の程度から胞体内細管形成、微細空胞の出現、粗大空胞化を認めるまでに到る。一方動物実験では我々の教室の木村³⁹⁾が、(1) 片側腎動脈結紮、再開放、(2) 片側尿管血紮、(3) 脱水等、種々の条件下で実験し、前期の人体例におけると同様な変化を得ると同時に、電子顕微鏡を用いて lysosome 由来と思われる不正形の密度の高い部分の存在する事を、Tramp & Janigan³⁸⁾、Mausbach³⁹⁾、および Schöll⁴⁰⁾ 等と同様に認めている。これらの所見より著者は、上記の変化を一種の急性腎不全の準備状態（何らかの機転が加われれば急性腎不全に移行する様な状態）になり得ると考え、今回の抗生剤を用いた実験の急性腎不全の作製に応用した。

Lysosomal membrane の種々の酵素の遊離に関しては、de Duve 等の詳細な報告があり、それらによつて lysosomal membrane が水解酵素の活性化に重要な役割を果している事が明らかにされた⁶⁴⁾。彼等は凍結、粉碎等の機械的破壊、浸透圧の変化、表面活剤、分解酵素、ビタミン A、D、E 等、種々の方法により lysosomal membrane より種々の水解酵素を遊離する事に成功している^{42) 65) ~ 71)}。

Kanamycin の lysosomal enzyme の遊離作用に関する報告は T. Ishii、D. Ishii および K. Balogh TR⁷²⁾ による内耳に於ける報告をみているが白鼠腎 lysosome については未だ報告をみていないようである。

de Duve 等は彼等の一連の実験より、酵素は多少の相違はあつたにしても、ほぼ同一様式により膜面より遊離すると考えている⁶⁹⁾。すなわち、酵素は半透過性の膜におおわれた嚢内に含まれており、膜の透過性の変化により、嚢内より遊離して来るという仮説を提出した。これに対し Koenig および Jibil⁷³⁾ は、本来水解酵素はイオン結合により lysosomal membrane の構成物質の一つである糖脂質と結合しており、何らかのイオンの変動により、この結合が離解する事によつて遊離するという仮説を提唱している。

今回の実験では著者は kanamycin がいかなる条件、およびいかなる機序により腎皮質部分の lysosomal membrane より β -glucuronidase を遊離させたのか、また少くとも遊離し易い状態にさせたのか、また dextran がいかなる条件を lysosomal membrane に与えたのか、それらの事に関し明瞭な説明を与え得なかつたが、少くとも脱水時に投与された dextran が何らかの作用を lysosomal membrane におよぼし、膜面の性状を変化させ、その上に kanamycin が相加、または相乗的に働いて変化を膜面に起こさせたと考えている。何れにしろ dextran と kanamycin の作用が質的に異なるものか否かを何らかの方法で決定する必要がある事は明らかであろう。

Dextran の投与のみでは β -glucuronidase 活性に大きな変化をみなかつた事から考えてみても、また dextran の構造から考えても、細胞内に摂取された dextran が腎細胞内の pH を大きく変化させる事はない様に思われる。一方 de Duve 等の言う様な半透過性膜におおわれた一つの袋を考えた場合、細胞内に摂取された dextran により起こる現象は浸透圧の変化等幾つかあると考えられるがその現象だけでは酵素の遊離は起こらず、一つの準備状態を形成するだけに止まつていると考えられる。何故なら dextran は脱水時以外でも腎細胞内に摂取され、また脱水時であつても、その事が酵素の遊離と結び付かないからである。浸透圧による影響については Shibko & Tappel⁴¹⁾ の報告があるが、それによれば腎 lysosome は肝のそれよりも溶媒の浸透圧による影響に対し抵抗性が強いとされている。また今回の実験で dextran および kanamycin の投与により生体内に於て既に β -glucuronidase が lysosomal membrane より遊離していたのか、または単に遊離し易い状態になっていたのかについては、はつきりした解答を得るには到らなかつた。何故なら今回の実験では確かに incubation

により他の群に比較し第4群が高い活性を示してはいるが、生体内と生体外では酵素の動きに大きな相違がみられる事から考えてみても、簡単に結論は出来ない様に思われる。

病的に膨化した lysosomal membrane は非常にもろく、酵素はホモジネイトの調整の間や、組織分画中に溶媒中に遊離してしまっている事は充分考えられる。この点に関してさらに究明しようとすれば、腎の灌流実験が必要であろう。

Cortisone acetate の酵素の膜面からの遊離阻害作用 (stabilizer 作用) は Weissmann & Thomas⁴²⁾ の白鼠肝に於ける実験と同様、著者の実験に於いても stabilizer 作用を示した。

b) 血清中の Lactate dehydrogenase について

生体内に於いて臓器の破壊の病変の際にみられる血清中の種々の酵素活性の変化については、1954年 La Dae, Wroblewski および Korman⁷⁶⁾ が急性心筋硬塞の際に glutamic oxaloacetic transaminase (以下 GOT と略す) の血清中の活性上昇のみられる事を報告して以来、Nydic⁷⁷⁾ 等の実験により、臓器破壊の程度とよく相関する事が確認された。急性腎不全時の血清中の諸酵素の活性上昇については1959年 Kemp⁷⁸⁾ による、GOT や glutamic pyruvic transaminase (以下 GPT と略す) 等について阻血腎を用いた実験がある。Kemp によれば腎をトルエンや生理的食塩水で灌流した際、GOT はアルカリ phosphatase (以下 Alk-p と略す) および GPT よりもずっと早く腎より流出し、また阻血腎の血流を再開した場合でも GPT、Alk-p は流出をみないにもかかわらず、GOT はやはり活性上昇が認められたとしている。以上の様に同じ cyto-plasmic の酵素であつても、その動きは様でない。また腎疾患に於ける LDH の変動については、White⁷⁹⁾ が糸球体腎炎の患者で GOT 活性の上昇がみられないにもかかわらず LDH 活性の上昇を示した症例を報告したのが最初であると思われる。また Wacker, Ulmer および Valee⁸⁰⁾ は慢性糸球体腎炎による、“単純な”尿毒症の場合には LDH 活性の上昇はみられないのに反して、腎硬塞および亜急性糸球体腎炎の場合には該酵素の活性上昇が認められた事を報告している。一方1958年 West, Zimmermann⁸¹⁾ は、その論文に於いて、1) 血清LDH活性の上昇は窒素血症の程度とは直接相関関係が無い事、2) 尿管結紮および脱水等の条件では LDH 活性の上昇をみるとは限らない事、3) 腎疾患患者では GOT 活性の上

昇をみる事は非常に稀である事を報告している。また Kemp⁸²⁾ 等は馬杉腎炎および出血性ショックの際 LDH 活性の上昇がやはりみられる事を報告している。著者はこれらの報告から Nielsen⁸³⁾ の言っている様に、慢性腎不全に於いては腎組織の破壊は通常緩慢である為、腎よりたとえ LDH が遊離されたにしても測定出来る程の変化として現われて来ぬ事は当然で、この事は肝疾患に於いても同様と思う。急激な組織崩壊をみる場合のみ血清中の酵素活性上昇をみるとするのが当然であろう。糸球体腎炎の乏尿期、または腎障害に於ける血清 LDH 活性の上昇は、腎組織の膜透過性の変化、あるいは広汎な組織壊死によるものと考えられるが、この様な場合腎以外の組織 (臓器) からどの程度 LDH が血清中に遊離して来るかが問題になるのは当然である。

この点 LDH は臓器によりその isoenzyme のパターンに明瞭な相違のみられる点、および比較的簡単に isoenzyme を分離出来る点で marker enzyme として適当であると考えられる。

一方小島等⁶²⁾によれば dextran は生体内に投与された場合、肝臓に到達すると類洞内で kupffer 星細胞によつて摂取され、その結果、該細胞は泡沫状に腫大し増生する。Mowvy および Millican 法 PAS 反応では泡沫細胞内に多量の PAS 顆粒が証明されるほか、肝細胞内にも同種類の顆粒が認められ、一方泡沫細胞が部位によつては多数群在し時に肉芽様増殖を示す為、類洞は著しく拡張、肝細胞は変性、萎縮し一部消失する所見が認められたが、Traenkner⁸⁴⁾が報告している様な肝実質の小壊死、ならびに好中球、大単核細胞の浸潤巣は認め得なかつたとしている。また一方 West⁸⁵⁾は dextran はある種の鼠に対しアナフラクトイド反応を起こし、且つそれが遺伝因子によつて左右される事を報告しており、松本等⁸⁶⁾はアナフラクトイド反応に際して血清中に肝臓型 LDH が多量に遊離される事をみだしている。以上の点より白鼠に dextran 単独に投与した場合 (第3群) にみられた LDH₅ の上昇は肝臓由来のものと考えて差支えは無いであろう。

腎臓と同じ様な LDH isoenzyme を有する臓器として心筋があげられるが、心筋に対する dextran の作用は小島等⁶⁴⁾の報告によれば、心外膜、殊に脂肪組織の毛細管周囲、および心筋間質にも泡沫細胞が散見せられたが、大きな組織壊死および変性はみられなかつたとしている。今回 dextran kanamycin 併用群 (第4群) の LDH₁ および LDH₂ は腎臓に由来すると仮定出来る

のではないだろうか。

DEAE—セルローズによる肝臓型と腎臓型の分画による方法と、電気泳動による isoenzyme の分離による方法とでは若干量の相違がみられる。これは DEAE—セルローズによる分画では腎臓型 LDH は、DEAE—セルローズに完全に肝臓型 LDH が吸着されずに残ったとも考えられる。あるいは透析の際の透析液の量が脱水により蛋白濃度が上つている血清に対しては少なすぎたのか、この点に関しては今後検討を加えてみる必要があるようだ。

今回 dextran 投与後 6 時間目の血清を電気泳動用のサンプルに選んだのは、第 4 群が 6 時間目附近で一番高い活性を示した事、また他の群もこの附近でほぼピークを形成した事より考え最も適当と判断した為である。

Cortisone acetate がこの実験系に於いても β -glucuronidase の場合と同様な stabilizer 作用を示した事は今後に残された問題であろう。

以上今回の実験結果を考案してきたが、著者は腎由来の酵素（特に LDH）を検討する事により、抗生剤による腎毒性の発現を早期に認知出来るのではないかと考えている。今回の実験では投与量、投与期間、また脱水以外の実験条件等、まだまだ検討を要する所は多々あるが、血中 LDH の検討により、今日まで一般的に行なわれている腎機能検査より簡単に腎障害の発現を認知する方法が探究出来るのではないかと考えている。

結 語

Kanamycin, dextran 併用時にみられる急性腎不全について生化学的方法論を用いて検討した。腎皮質部分の lysosomal enzyme の代表として β -glucuronidase を、血清に遊離する cytoplasmic enzyme として LDH を選び、両者の活性の変化について観察すると同時に、血清 LDH についてはその isoenzyme を、DEAE—セルローズを用いる Hess の方法および電気泳動を用いてその pattern に検討を加えた。

(1) lysosomal membrane より機械的破壊により上清部分に遊離した該酵素活性を測定した。一番強い活性を示したのは、kanamycin, dextran を併用した第 4 群で、次いで第 5 群、3 群、2 群、1 群の順であつた。第 4 群と第 5 群の間には推計学上有意の差を認めたが、第 5 群、3 群、2 群の間にはそれは認められなかつた。脱水のみほどこした第 1 群とその他の群の間には明瞭な差を認めた。

さらに lysosomal fraction に 37°C 40 分の incubation を行ない該酵素の lysosomal membrane からの遊離について検討を加えた。Incubation により一番多くの酵素を遊離したのは第 4 群であつた。この実験に於いても前記の傾向がより強く認められた。

(2) LDH について

血清中の LDH 活性は脱水のみではその活性に変化を認めなかつたが dextran の投与により急速で一過性の活性上昇を示した。これに対し kanamycin と dextran を併用した第 4 群では該酵素の活性は投与後少くとも 24 時間は高い値を示した。DEAE—セルローズにより肝臓型—LDH と腎臓型—LDH を分画し、腎臓型—LDH の肝臓型—LDH に対する割合を経時的に検討したが、腎臓型—LDH のしめる割合が第 4 群、第 5 群で経時的に増加している事が認められた。

Cortisone はこの割合には殆んど変化を与えなかつた。

(3) 電気泳動を用いて第 3 群、および第 4 群の isoenzyme を比較してみると、第 3 群では LDH₅ の大きなピークを明瞭に認めるがその他のピークは殆んど認められなかつた。一方 kanamycin, dextran を併用した第 4 群では LDH₄ より、LDH₅ までの 5 本のピークを認めた。

以上の結果より kanamycin, dextran は単独に投与された場合でもある程度の影響を lysosomal membrane に与え、 β -glucuronidase を遊離させるが、両者を併用した場合には相加、または相乗的作用をおよぼす事が判明した。また cortisone acetate は kanamycin, dextran のこの作用をある程度阻止するものと思われる。また kanamycin, dextran の併用により血清 LDH 活性の上昇がみられる事が判明した。その血清に遊離した酵素の isoenzyme を検討した結果、腎臓型—LDH が経時的に増加し、この作用を cortisone がある程度阻止する事を見出した。

今後この実験系を用いて、種々の抗生剤の腎毒性の判定法としての有用性の有無を検討したいと考えている。

本実験の要旨は 1969 年第 6 回国際化学療法学会及び 1969 年第 12 回日本腎臓学会に於て報告した。

最後に稿を終るに当つて終始御指導を戴いた大越正秋教授、生理学教室塚田裕三教授に、深甚なる謝意を表すると共に、名出頼男講師初め研究室の諸兄に深謝致します。

文 献

- 1) Schlegel, J.U. and Burden, J.J.: J. Urol. **91**, 127, 1964.
- 2) Prát, V., Hatala, M. and Benešová, D.: Virchows Arch. Path. Anat. **339**, 37, 1965.
- 3) Málek, P., Zástava, V., Žák, F., Kočvara, S.V. and Kolc, J.: J. Urol. **89**, 784, 1963.
- 4) 大越正秋, 川村猛: 日本医師会誌, **60**, 999, 1968.
- 5) 大越正秋: 日泌尿会誌, **58**, 933, 1967.
- 6) 川村 猛: 日泌尿会誌, **60**, 555, 1969.
- 7) Bell, N.H., Androile, V.T., Sahasin, S.M. and Utz, J.P.: Am. J. Med. **64**, 1962.
- 8) Takacs F.J., Tomkiewicz, Z.M. and Merrill, J.P.: Ann. Int. Med. **59**, 716, 1963.
- 9) Butler, W.T.: Ann. Int. Med. **61**, 175, 1964.
- 10) Wertlake, P.T.: J. Lab. Clin. Med. **7**, 472, 1967.
- 11) Bryer, M.S., Schoenbach, E.B. and Lang, P.H.: Ann. New York Acad. Sci. **51**, 935, 1949.
- 12) Schoenbach, E.B., Bryer, M.S. and Lang, P.H.: Ann. New York Acad. Sci. **51**, 987, 1949.
- 13) Jawetz, E.: Am. J. Med. **10**, 111, 1951.
- 14) Moyer, J.H., Mills, L.C. and Yow, E.M.: Arch. Int. Med. **92**, 238, 1953.
- 15) Schreiner, G.E. and John, F.M.: Ann. J. Med. **38**, 409, 1965.
- 16) Petersdorf, R.G. and Hook, E.W.: Bull. Johns Hopkins Hosp. **107**, 133, 1960.
- 17) Wright, W.W. and Welch, H.: In Antibiotics Annual: 1959—1960 Proceedings of the seventh Annual Symposium on Antibiotics. pp 1034 New York, Antibiotics 1960 pp61.
- 18) Wolinsky, E. and Henis, J.D.: New England J. Med. **266**, 759, 1962.
- 19) Allen, A.C.: Medical and Surgical Disease, 2nd ed. New York, 1962. Grune and Stratton.
- 20) Winfield, M., Crisp, G.O., Maxwell, M.H. and Kleeman, C.R.: Ann. New York Acad. Sci. **76**, 140, 1958.
- 21) Berman, L.B. and Katz, S.: Ann. New York Acad. Sci. **76**, 149, 1958.
- 22) Kleeman, C.R. and Maxwell, M.H.: In: Biology of pyelonephritis Edited by Quinn, E.L. and Kass, E.H. Boston, 1960. Little, Brown & Co.
- 23) Karlson, A.G., Gainer, U.H. and Feldman, W.H.: Am. Rev. Tuberc. **62**, 345, 1950.
- 24) Wasbren, B.A. and Spink, W.W.: Ann. Int. Med. **33**, 1099, 1956.
- 25) Jao, R.N. and Jackson, G.G.: JAMA **189**, 817, 1964.
- 26) 上田 泰, 他: Chemotherapy **15**, 275, 1967.
- 27) 上田 泰: Chemotherapy **14**, 484, 1966.
- 28) 古屋暁一, 三沢 昶: Chemotherapy **14**, 506, 1966.
- 29) 木下康民, 他: 最新医学, **23**, 1490, 1968.
- 30) 加藤繁次, 神野 一, 宇都宮利善, 山村武夫: 第16回化学療法学会総会
- 31) 桜井叢人, 伊藤本男: 日泌尿会誌, **60**, 90, 1969.
- 32) 赤坂 裕, 他: 日泌尿会誌, **60**, 706, 1969.
- 33) 木村茂三: 日腎会誌, **11**, 605, 1969.
- 34) Morgan, T.O., Little, J.M. and Evans, W.A.: Brit. Med. J. **2**, 737, 1966.
- 35) Mailloux, L., Swartz, C.D., Capizzi, R., Kim, K.E., Onesti, G., Ramirez, O. and Brest, A.N.: New England J. Med. **277**, 1113, 1967.
- 36) 百瀬俊郎: 日泌尿会誌, **60**, 823, 1969.
- 37) 木下康民, 山作房之輔, 三上朝芳, 大沢源吾, 和田十次, 武田 元, 江部達夫: 日腎会誌, **11**, 209, 1969.
- 38) Trump, B.F. and Janigan, D.T.: Lab. Invest. Med. **11**, 395, 1962.
- 39) Maunbach, A.B., Madden, S.C. and Latta, H.: Lab. Invest. Med. **11**, 421, 1962.
- 40) Hazama, S.: Acta Path. Jap. **14**, 461, 1964.
- 41) Shibko, S. and Tappel, A.L.: Biochem. J. **95**, 731, 1965.
- 42) Weissmann, G. and Thomas, L.: J. Exp. Med. **116**, 433, 1962.
- 43) Fishman, W.H., Springer, B. and Brunetti, R.: J. Biol. Chem. **173**, 449, 1948.
- 44) Bergmeyer, H.U., Bernt, E. and Hess, B.: In: Methods of enzymatic analysis. pp 736. Academic Press New York and London 1965.
- 45) Hess, B.: Ann. New York Acad. Sci. **94**, 890, 1961.
- 46) 菅野剛史: in preparation
- 47) Tisch, D.E., Huftalen, J.B. and Dickson, H.L.: Ann. New York Acad. Sci. **76**, 44, 1958.
- 48) Welch, H., Wright, W.W., Weinstein, H.I. and Staffa, A.W.: Ann. New York Acad. Sci. **76**, 66, 1958.
- 49) 木下浩二: 広島医学, **7**, 1029, 1959.
- 50) Kuntz, E.: Klin. Wochschr. **40**, 830, 1962.
- 51) Grönwall, A. and Ingelman, B.: Acta Physiol. Scand. **7**, 97, 1944.
- 52) Ingelman, B.: Acta Chem. Scand. **1**, 731, 1947.
- 53) Arturson, G., Granath, K., Thoren, L. and Wallenius, G.: Acta Chir. Scand. **127**, 543, 1964.
- 54) Harrison, J.H.: Ann. Surg. **139**, 137, 1954.
- 55) Terry, R., Yuile, C.L., Colodetz, A., Clay, E.: J. Lab. Clin. Path. **42**, 939, 1947.

- 56) Gray, I., Süteti, P.K. and Pulaski, E.J.: Soc. Exper. Biol. Med. **17**, 626, 1953.
- 57) Gray, I., Süteri, P.K. and Pulaski, E.J.: J. Physiol. **174**, 426, 1953.
- 58) Johnston, E.V., Lundy, J.S., Bennett, W.A. and Jones, J.M.: Amer. J. Surg. **85**, 720, 1953.
- 59) Zettergren, L.: Acta Chem. Scand. **123**, 439, 1962.
- 60) Vickery, A.L.: Amer. J. Path. **32**, 161, 1956.
- 61) Traenckner, K.: Frankfurt Z. Path. **65**, 390, 1954.
- 62) 小島瑞, 高橋潔, 笠島武, 本田憲児: 日網会誌 **7**, 207, 1967.
- 63) Schöll, A.B.: Frankfurt Z. Path. **73**, 559, 1964.
- 64) de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Biochem. J. **60**, 604, 1955.
- 65) Gianetto, R. and de Duve, C.: Biochem. J. **59**, 433, 1955.
- 66) Wattiaux, R. and de Duve, C.: Biochem. J. **63**, 606, 1956.
- 67) Beaufay, H. and de Duve, C.: Biochem. J. **73**, 604, 1959.
- 68) Lucy, J.A., Dingle, J.T. and Fell, H.B.: Biochem. J. **79**, 500, 1961.
- 69) de Duve, C., Wattiaux, R. and Wibo, R.: Biochem. Pharmacol. **9**, 97, 1962.
- 70) Dingle, J.T.: Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, pp 384. Churchill London.
- 71) Dingle, J.T., Sharman, I.M. and Moore, T.: Biochem. J. **98**, 476, 1966.
- 72) Ishii, T., Ishii, D. and Balogh, K. Jr.: Acta Otolaryng. (Stockh.) **65**, 449, 1968.
- 73) Koenig, H. and Jibril, A.: Biochem. Biophys. Acta **65**, 543, 1962.
- 74) Weissman, G. and Dingle, J.T.: J. Exp. Med. **116**, 433, 1961.
- 75) Weissmann, G. and Thomas, L.: J. Clin. Invest. **42**, 661, 1963.
- 76) LaDue, J.S., Wroblewski, F. and Karmen, A.: Science **120**, 497, 1954.
- 77) Nydick, I., Wroblewski, F. and LaDue, J.S.: Circulation **12**, 161, 1955.
- 78) Kemp, E.: Acta path. microbiol. Scand. **45**, 7, 1959.
- 79) White, L.P.: New England J. Med. **255**, 449, 1956.
- 80) Wacker, W.E.C., Ulmer, D.D. and Vallee, B.L.: New England J. Med. **255**, 449, 1956.
- 81) West, M. and Zimmermann, H.J.: J. Lab. Clin. Med. **52**, 185, 1958.
- 82) Kemp, E. and Laursen, T.: Acta path. microbiol. scand. **54**, 85, 1962.
- 83) Nielsen, V.K., Kemp, E. and Laursen, T.: Acta med. Scand. **184**, 109, 1968.
- 84) West, G.B. and Harris, J.M.: Ann. New York Acad. Sci. **118**, 441, 1964.
- 85) 松本普三, 長友淳彦, 塩崎秀司, 渡辺盛雄, 小宗大三郎, 竹谷明, 柏崎修, 小関裕: アレルギ-
ー, **18**, 58, 1969.

(1970年7月6日受付)