骨塩によるテトラサイクリンの Uptake

九州大学整形外科 (主任 : 天児民和教授)

真	角	昭	吾
江	口	正	雄
角	田	信	昭

Studies on Binding of the Tetracycline with Bone Salt

By

S. Masumi, M. Eguchi & N. Tsunoda

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University

It is well known that tetracycline (TC) and TC derivatives accumulate in the mineralizing tissues particularly in the newly formed bone tissue.

This effect has been utilized as tetracycline labelling of the osseous tissue. However, those drugs cause the disagreeable yellow pigmentation of the bone and teeth in clinically administered doses for the young patients as antibiotics.

In the present study, we examined the deposition in vivo of TC to bone, and the fixation in vitro with calcium phosphate and the human bone powder.

The binding ability of each TC was compared.

In comparison of the macroscopic staining, macroscopic fluorescence and histological labelling, less staining ability was confirmed in young rats given intraperitoneally deoxy-oxytetracycline than those receiving an equivalent dosage of oxytetracycline and demethylchlortetracycline.

To check whether there might be the difference also in vitro, after shaking each TC with tribasic calcium phosphate and the bone powder, the residual TC in supernatant and the adsorbed TC in precipitate were measured by ultraviolet resorption at wave length of 370 to 380 m μ and fluorometry at 510 m μ .

The results were consistent with the observation in vivo; the percentage of TC fixed to calcium phosphate and the bone powder were lower in deoxy-oxytetracycline than the others.

It seems to show a primary importance of calcium salt in TC-bone complex that TC uptake of the bone powder decalcified by ethylenediaminetetraacetate decreased remarkably.

テトラサイクリン系薬剤が骨塩と結合して硬組織に沈着し、特有な螢光を発するのは周知の事実で、この結合はテトラサイクリン (TC) と Ca^{++} との chelating によるといわれている。

この現象は TC 標識法として骨や歯牙への病態生理の研究に広く利用されるとともに、一方では感染症に対して TC 剤を長期投与した場合、とくに骨発育期では硬組織の黄染という不快な作用が起こることも知られている。

我々は TC 剤のちがいにより骨塩との結合状態に

どのような差異が生ずるかを知らるため、また結合の機序を検討せんとし、次のごとき実験を行った。

実験材料と方法

(1) in vivo における骨標識

実験動物は生後 5 週、体重 100 g 前後の Wistar 系雌性ラットを用いた。

使用薬剤は deoxy-oxytetracycline (DOTC) oxytetracycline (OTC) demethylchlortetracycline (DMCT) の各塩酸塩純末である。

この純末を生食にとかし→次の各群に10日間隔にて腹腔内に注射→最終注射日より48時間後に断頭脱血→摘出大腿骨を methyl methacrylate 包埋→研磨薄片作製→螢光顕微鏡により観察した。

	第1回	第2回	第3回	第4回
I 群	DOTC 5	DOTC 10	DOTC 50	DOTC 100
II 群	OTC 100	DOTC 10	DOTC 100	
III 群	DOTC 100	DMCT 100	DOTC 10	

注：単位はラット体重 kg あたりの
テトラサイクリン mg

(2) in vitro における骨標識の観察

ラットの摘出大腿骨および手術により摘出したヒト膝関節鼠を抗生物質として使用する際の生体内条件に近い 5 mcg/ml TC 溶液 (0.2 M リン酸緩衝液 pH 7.4) 中に入れ、4°C、48 時間放置した後、流水にて24 時間洗滌し、研磨切片として生体外における TC 結合状態を観察した。

(3) TC 剤と $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ との adsorption

用いた TC の水溶液はいずれも波長 270 m μ と 360 ~ 380 m μ に2つの吸収ピークを有し、1~40 mcg/ml の範囲では紫外外部吸収で濃度測定が可能である。以後の TC 測定は長波長域における紫外外部吸収によつた。

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を乳鉢で粒子の等しい粉末とした後、0.3~20 mg/10 ml の濃度に調製した DOTC OTC

DMCT 水溶液 10 ml に、200 mg の $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を添加し、10 分間激しく振盪してから、遠心沈澱を行ない、上清に残存する TC 量を測定した。また沈査に adsorb された量は 0.1 N-HCl にて溶出させて吸着度を検討した。

(4) TC 剤とヒト骨粉との binding に関する実験

ヒト大腿骨骨皮質を電動骨鋸により細粉し、蒸留水で洗滌、遠沈を繰返した後、凍結乾燥を行ない、乳鉢で更に細かい一様の粒子として骨粉を調製した。

a) ヒト骨粉との吸着度の相異 0.3~20 mg/10 ml の濃度に調製した DOTC OTC DMCT 各 10 ml に骨粉 200 mg を加え、(3) に述べた方法により吸着度を比較した (図1)。

b) 熱処理を行つたヒト骨粉との結合 骨粉 200 mg を 100°C、30 分間加熱し、冷却後、遠心沈澱を用いて (4)—a) と同様の実験を行なつた。

c) EDTA 処理を行つた骨粉との結合 骨粉 200 mg に 0.1 M EDTA disodium 液 10 ml を加え、4°C、72 時間置いた後、遠心沈澱を脱灰骨として (4)—a) と同様の実験に供した (図2)。

(5) 螢光々度計による TC—骨粉吸着度の測定

先づ DOTC OTC DMCT を 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 に溶解し 365 m μ で励起した場合の螢光スペクトラムからいづれの薬剤も 510~520 m μ にピークがあること、更に 0.5~2.0 mcg/ml の濃度で TC 濃度と螢光強度の間に直線性の存することを確認した上

Fig. 1 Tetracycline Binding with Bone Powder

...x... DOTC in Supernatant —x— DOTC in Precipitate
 ...△... DMCT in Supernatant —△— DMCT in Precipitate
 ...○... OTC in Supernatant —○— OTC I in Precipitate

Fig. 2 Tetracycline Uptake by Decalcified Bone Powder

—●— TC. in Supernatant
—×— TC. in Precipitate

..... TC. in Supernatant
(untreated bone powder)

で次の実験を行った。

骨粉 200 mg をあらかじめ 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 で洗滌遠心を繰返し、非特異的蛍光物質を可及的に除去せしめ、この沈渣に 5.0 mcg/ml の各 TC 液 (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) 10 ml を加え、10 分間激しく振盪した後、その上清を蛍光強度測定に供した。TC を加えなかつた上清 (ブランク) の蛍光は殆んど 0 に近い。

(6) DOTC と Ca^{++} との結合比に関する実験

Job の変法に従がつて DOTC 溶液と CaCl_2 溶液を段階的にモル比を変えて混合し、各モル比液の pH の低下 (-4pH) を正確に測定し、pH が最大変化を示す両液の混合比を求めた。

実験結果

(1) in vivo における TC 骨標識

肉眼的黄染：DOTC のみの投与では 歯牙および摘出大腿骨は殆んど黄染していないか、あるいは極めて軽微な黄色調を呈する。DOTC 110 mg/kg の他に OTC 100 mg/kg または DMCT 100 mg/kg を追加投与した場合には骨、歯牙は明らかに黄染し、同一量の DOTC 投与群と比較して明確な差異を認める。OTC DMCT の間では黄染の程度にはつきりした差はない。

肉眼的蛍光：TC 系薬剤は一時的には肝、腎、脾などの組織にも貯溜されうるが、注射後 48 時間を経た

ラットを -20°C に凍結して body section の肉眼的蛍光をみると、美しい蛍光を発するのは骨格のみで、他の組織、器官には蛍光を認めえない。次に歯牙、大腿骨の肉眼的蛍光をみると、DOTC 群ではきわめて軽く、OTC 群では黄色蛍光がやや強くみられ、DMCT 群では最も強い橙黄色の蛍光を認める。

組織学的な TC 標識状況：DOTC 100, 50, 10, 5 mg/kg 投与 (I 群) の場合に pale yellow の 3 重の蛍光リングを認め、100, 50 mg/kg でははつきりとラベルされている。10 mg/kg ではわずかに細い蛍光を発し、5 mg/kg ではわずかに細い蛍光を発し、5 mg/kg ではラベルされていない。

II 群でも 3 重の蛍光リングがあり、その強度は OTC 100 mg > DOTC 100 mg > DOTC 10 mg の順であつた。III 群では DMCT 100 mg/kg は黄金色の幅広い蛍光を発し、細い蒼黄色を呈する同一量の DOTC と著しく対照的である。

(2) iv vitro における骨標識

後述のごとく TC 剤と骨粉との結合に関してある程度の機構がわかつたので、更にこれらの結合に高次の生体機構が関与しているかどうかをみる目的で、生体内条件に近い TC 溶液中に摘出骨組織を入れ、標識状況を観察した。この結果 TC は試験管内においても骨組織に沈着し、ラベリングは生体内におけるほとんど変わらない。また表面が完全に軟骨組織で覆われた関節鼠 (osteochondromatosis) を同様に試験管内

でラベルした場合でも、表面より約 300 μ 内部に線状の螢光を認めることが出来た。

(3) TC 剤と $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ との adsorption

DOTC の場合は薬剤の量の変化にも拘らず上清中には添加した量の 80% 前後が検出され、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ に吸着された DOTC は約 20% である。

OTC の場合には添加量 10 mg/10ml 以下の濃度では上清中に 80~55% が検出され、10 mg/10ml 以上の濃度では 80% が検出された。添加量から上清中に検出された量を差引いたもの、すなわち $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ への吸着量は 10 mg/10 ml 以下の濃度では 20~45% であり、添加量の少ない方が吸着量 (%) は大きい。10 mg/10ml 以上の濃度では添加量の 20% 前後であった。

DMCT の場合には 20 mg/10 ml 以下の濃度では上清中に約 30~70% が検出され、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ との吸着量は濃度に反比例して減少する。次に以上の結果を確かめるため、0.1N-HCl により沈渣中より TC を溶出して測定すると、

$$\begin{aligned} & \text{〔添加量〕} = \text{〔上清に検出された量〕} \\ & \quad + \text{〔沈渣から溶出された量〕} \end{aligned}$$

で回収率はほぼ 100% であつた。

以上の実験結果から試験管内において TC 剤は $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ に吸着されること。また吸着度は薬剤によつて異なり、DMCT>OTC>DOTC の順であることが明らかとなつた。

(4) TC 剤とヒト骨粉との binding に関する実験
a) ヒト骨粉との吸着度の相異 (図 1)

DOTC の場合は上清中に検出される量は薬剤の量によつて異なり、低濃度では 10% 前後であるが、高濃度では約 90% が検出された。OTC は DOTC の場合と殆んど同様の傾向にある。

DMCT では低濃度の場合 10% 前後であるが高濃度の場合にも 25% 程度しか検出されず、前 2 者の薬剤とは異つた態度を示している。沈渣に吸着された TC の回収実験では DOTC OTC は 100% 回収出来たが、DMCT では回収率が悪かつた。以上から TC 剤は試験管内においてヒト骨粉に吸着されること、各薬剤とも $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の場合に比して骨粉の方がより多く吸着されること、更に薬剤による吸着強度の差は DMCT > OTC $\approx$ DOTC の順であることが明らかとなつた。

b) 熱処理を行つたヒト骨粉との結合

骨有機基質を変性させるため熱処理を行つた骨粉を

用いて (4)—a) と同様の実験を行つたが、いずれの薬剤においても未処理骨粉と熱処理骨粉の間の吸着状態に有意差を見出しえなかつた。

c) EDTA 処理を行つた骨粉との結合 (図 2)

(非処理) 骨粉の場合には 2.5 mg/10 ml 以下の濃度ではどの薬剤も添加量の 10~25% しか上清中に検しえなかつたが、前もつて骨粉の EDTA 処理を行なつて脱灰せしめた場合には添加量の 80~90% を上清中に検出することが出来る。即ち未処理骨粉と脱灰骨粉との間には TC 剤の吸着状態に明らかな差異が認められ、脱灰により TC 結合は著しくわるくなる。

(5) TC—骨粉結合度の螢光々度計による測定

非生理的な高濃度における TC と骨粉との結合は前述のごとくであるが、生理的血中濃度における結合度を螢光々度法により測定した。この方法による TC—骨粉結合度は DOTC 34%, OTC 58%, DMCT 80% であり、血中レベルにおいても各薬剤により結合度が異なり、DMCT>OTC>DOTC なることが明らかとなつた。

次に各 TC の等モル溶液の螢光度を比較してみると総螢光量は DMCT 100, OTC 94, DOTC 28 であり、510 m μ における螢光強度は DMCT 100, OTC 53, DOTC 24 であつた。

(6) DOTC と Ca^{++} との結合比

前述の方法によると -4pH が最大となるのは DOTC 溶液と CaCl_2 溶液の混合モル比が 5:5 の場合であり、この濃度においては両者は 1:1 の chelate compound を作つていることがわかる。

総 括

3 種の TC 系薬剤 DOTC OTC DMCT と骨塩との吸着度を in vivo, in vitro の実験により比較するとともに結合機構に関する 2, 3 の実験を行つた。硬組織による TC 摂取は肉眼的黄染、肉眼的螢光、組織学的ラベリングの所見から DMCT に最も強く、OTC DOTC の順に弱い。この場合同一量でも螢光の幅および螢光色調に差があるので 2~3 重の標識では TC 剤の種類をかえた方が判断に便利である。

TC は不溶性の Ca 塩、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ にも吸着され、吸着度は DMCT>OTC>DOTC の順である。なまの骨粉ではどの薬剤も $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 以上のとり込みを示すが、各 TC 剤の比較では in vivo の標識と同様な結果であつた。

骨を煮沸して有機基質を変性させた場合には生の骨粉と同様のとり込みを示すが、一方 EDTA により脱灰を行なった場合には TC 摂取は著しく減少する。これは骨組織への TC 沈着には骨カルシウムが一義的な

役割を果していることを示す。また生体外に取出したラット骨やヒト関節鼠も試験管内でラベルされるので TC 沈着には生体の高次な機構は無関係で、物理化学的な因子に基づく。

骨 端 軟 骨 の 微 細 構 造

鳥取大学整形外科 (主任: 西尾篤人教授)

木 村 巧

Fine structure of epiphyseal cartilage

By

I. Kimura

Department of Orthopedic Surgery, Tottori
University School of Medicine

An examination of the fine structure of proximal tibia-epiphyseal cartilage (3-5 weeks-old rabbit) has revealed the following information.

1) Chondrocytes of epiphyseal cartilage contain numerous cytoplasmic processes, and in their cytoplasm many vacuoles. The so called cartilage lacuna, like a halo, which gradually proceeds to the cartilagenous matrix is seen around the cell to a certain extent.

2) The matrix appears to be irregularly intricated, possessing a felt-like structure, with fibre and then small fibres appear, without demonstrable periodicity, on the longitudinal septa.

It is assumed that these fibres develop from the granules in the cartilage lacuna, in the cytoplasmic vacuoles.

3) Chondrocytes involve changes in cytoplasmic hydration rather than changes in the organelles. After maximum hydration, chondrocytes undergo death and degeneration.

4) Calcification initiates on the longitudinal matrix with relative electron-dense granules, gradually, forming itself into islets and granular specks. As they increase in number and volume, they fuse with each others to complete the formation of calcified cartilage.

Pease & Scott が骨端軟骨の電顕的研究について報告して以来、それに関する研究が時折見受けられる。私も病的骨端軟骨の研究の一貫として正常の場合について電顕的に観察したので報告する。

に薄切する部位を決定するのに役立てた。骨端軟骨中心部を対象とし、静止層、増殖層、泡状層、変性層と区分し各々について観察した。

観 察 結 果

実験材料および方法

生後3～5週目の正常家兎 (300g 前後) の脛骨近位骨端軟骨を用いた。グルタルアルデヒド、オスミウム酸重固定、Epon 包埋、薄切後、酢酸鉛、酢酸ウラニールで電子染色を施した。なお光顕用標本は電顕用のブロックをそのまま電顕用ウルトラマイクログラムで薄切し、トルイジンブルーで染色して、電顕用

軟骨細胞について

静止層: 形は扁平である。核は偏心性で細胞端に位置を占め、電子密度の比較的高い物質で充満する。ミトコンドリアは円形、楕円形であるが、クリスタは Fig. 1 で明瞭にみとめられる。粗面小胞体が主に細胞端において細長く伸びた細胞内小器官として認められるが疎である。ゴルジ装置が核の近くに認められ、ゴ