

抗生物質の腎分画内濃度

国立病院医療センター泌尿器科

藤田 公生

ANTIBIOTIC CONCENTRATION IN KIDNEY CELL FRACTIONS

Kimio FUJITA

From the Department of Urology, National Medical Center Hospital

A two-compartment model of kidney cells is designed. The first compartment is the cytoplasm, the other is a large organelle fraction consisting of lysosomes and mitochondria. Drugs easily accumulated in the second compartment are considered to be harmful to the kidney. Although small molecular antibiotics move across membranes, they reach a certain equilibrium within 30 minutes. Therefore reproducible values of antibiotic concentrations in both fractions can be obtained. The two-compartment model provides a new approach to pharmacokinetic study at a subcellular level.

Key words: Antibiotics, Kidney, Pharmacokinetics, Subcellular fraction

緒 言

抗生物質の組織内濃度が高いのははたしてよいことなのであろうか。本研究^{1),2)}はこの素朴な疑問から出発した。最近、薬物動態的 (pharmacokinetic) な考え方が浸透して、血中濃度、組織内濃度、さらに病巣内組織、あるいは尿中濃度、胆汁内濃度など、目的とする組織ないし体液内濃度を高めるのが化学療法の目標であるといわれている。しかし他方では、腎毒性が高いとされるアミノ配糖体は腎に長期間、高濃度で蓄積されることが知られている。この相反するふたつの問題に対するひとつの解答の試みとして、本研究がなされた。

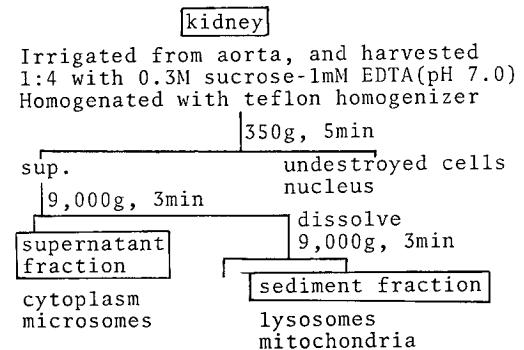
細胞の2・コンパートメント

アミノ配糖体の蓄積部位は、細胞分画でいうとリソゾームに特異的であるとされている。これはアミノ配糖体にラベルした放射性同位元素の位置が、連続勾配遠心法でリソゾームの指標酵素である酸性フォスファターゼと一致することを多くの研究者が認めている³⁾。また、テトラサイクリンはミトコンドリアに特異的に分布することを、テトラサイクリンのもつ蛍光を利用して組織学的に認めたという報告がなされている⁴⁾。これらの事実は本研究でも確認された⁵⁾。

しかしながら、リソゾームとミトコンドリアはたがいに近い比重に分布していて、完全な分離はむずかしい。本研究は純粋なピーク部分をとりだすのが目的ではなく、全量を回収して定量することをめざしている。しかも後に述べるような透過性の問題があるために、複雑な、時間を要する操作を加えていれば薬物はその間に移動してしまうのである。

そこで本研究ではリソゾームとミトコンドリアを分離せずひとつの沈渣分画として、これを sediment fraction、あるいはリソゾームをふくむ分画、large organelle 分画などと称することにした (Table 1)。このアイデアによってはじめて、細胞分画レベルでの

Table 1. Method to make kidney fractions



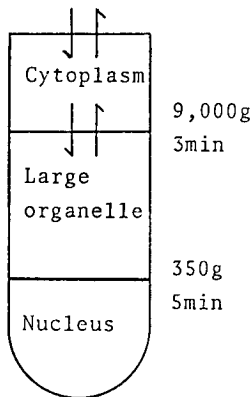


Fig. 1. Our system is, in short, a two-compartment model of a cell

薬物の動態の追求が可能になったといえる。

これはいわば細胞の Two-compartment model である (Fig. 1). Endocytosis のこと⁶⁾をぬぎにすれば、細胞外の物質はまずこの上清分画に分布し、ついで second compartment である沈渣分画にはいりこむとみなすことができる。

分画操作の問題

ところで遠心沈でんという操作をもういちどふり返ってみたい。この場合の遠沈操作は、純粋な一部分をとり出せばよいというのではなく、定量的な分離を意味している。

Fig. 2 に示したように、沈渣の粒子が大きければ、間隙には上清となるべき液体がはいりこんでいる。また、本来は上清分画に属すべき可溶性の物質が粒子の表面に附着していることもある。この部分を除くために、沈渣を洗うという操作が通常おこなわれる。

洗った溶液は、上述の理由によれば上清分画に属すべきものである。しかし本研究ではこの溶液を除外することにした。その理由はいくつかある。

つねに境界面できれいに分注できるとは限らず、手技的な誤差がともなうので、その危険を分散させるのもひとつの理由であった。つまり、本研究では上清分画濃度と沈渣分画濃度の比を問題にしているので、1

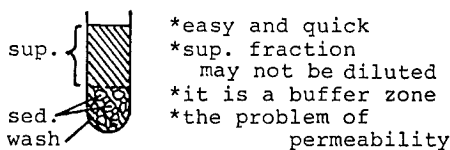


Fig. 2. We do not add the washing fraction to the supernatant fraction

回の操作で両者の境界線を引くと、一方の減量がただちに他方の増量を意味し、手技的なエラーによる境界線のずれがこの比に大きく影響することになる。1回目の操作で上清分画の境界を引き、2回目の操作で沈渣分画の境界を引くことによって、洗滌分画を buffer zone に利用することで手技的なエラーの影響を小さくしたのである。

しかしそれ以上に本質的な問題として、次項に述べるように、本来は沈渣分画に属すべき薬物が操作中に洗滌分画に移行する現象がある。

動的平衡

Fig. 3 の0点からはじまる曲線は、沈渣分画を抗生物質をふくむ緩衝液と混和し、分画内へのとりこみをみたものである。抗生物質は 37°C ではすみやかに、0°C ではやや遅れて沈渣分画にとりこまれ、いず

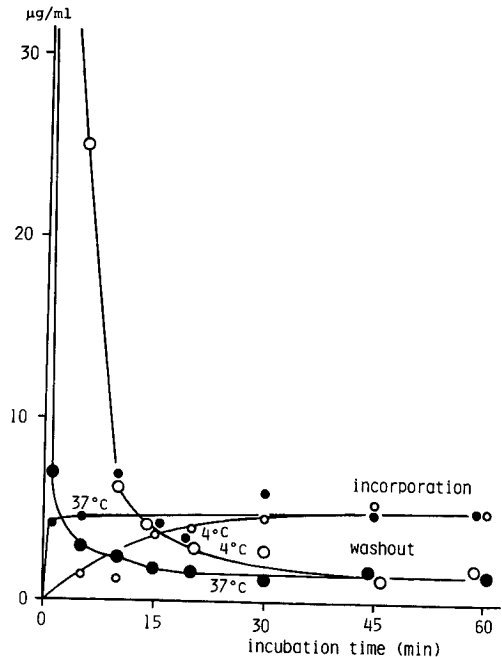


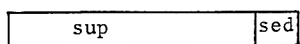
Fig. 3. Equilibrium of antibiotics between buffer and sediment fraction.

Incorporation : Sediment fraction was mixed with buffer containing cephaloridine. Cephaloridine gradually moved into the fraction. At a warm temperature the drug quickly reached an equilibrium level.

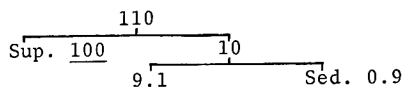
Washout : A sediment fraction with a high cephaloridine concentration was mixed with the buffer. Most of the drug moved to the buffer and reached a new equilibrium.

Table 2. What occurs during the procedure

Volume ratio at centrifuge is about 10:1



If the drug is evenly distributed,



れにしても30分もすれば平衡に達する。このような問題はあまりとりあげられることがないが、組織をホモジネートにした段階からすでにこの現象ははじまっているのである。

本実験系では上清と沈渣の体積比はほぼ10:1である。そこで、もし薬物が濃度勾配をもたず、単純に volume-dependent に分布するなら (Table 2), 1 回目の遠沈で10:1に分布し、2回目の遠沈でまた10:1に分布するので、比は 100:0.9 になる。これを一般式にしたのが Fig. 4 である。

もちろん実際には均質な液体系ではないが、ひとつのモデルとしてみていただきたい。細胞内では上清分画成分と沈渣分画成分が同じ体積を占めるとするならば、a/b の比に分布している。この物質が完全に平衡関係で動くのなら本実験によって得られる値は $a+9/b$ ($1+10/b$) となり、a も b も十分大きな値なら a/b に一致する。いずれにしてもこの値は a と b だけで規定されており、人為的な数値をふくんでいないことは本研究を進めるうえで重要な事実である。

測定の問題

本実験系で分画された検体中の抗生物質濃度の測定に関しては、どんな測定法によってもよいのであるが、費用が安価であり短期間に大量の検体の処理が可能で

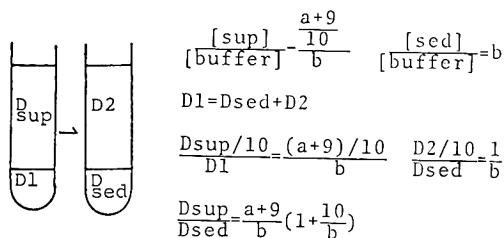


Fig. 4. The relationship between the *in vitro* ratio to *in vivo* ratio. With the beginning of homogenization drugs move to the large volume of buffer; i.e. supernatant. In the next washing procedure other additional drugs move to the washing buffer solution.

あるという理由によって細菌を用いた bioassay をおもにも利用した。

bioassay の場合、多くの研究者は 磷酸緩衝液を用いているが本研究では蔗糖密度を利用しているの、この系においても bioassay が成立するかどうか吟味することが要求された。Fig. 5 および Fig. 6 に示したように本系では阻止円もシャープで、標準物質についての直線性も満足すべきであった。

結 語

抗生物質の組織内濃度が高いのは望ましいことなの

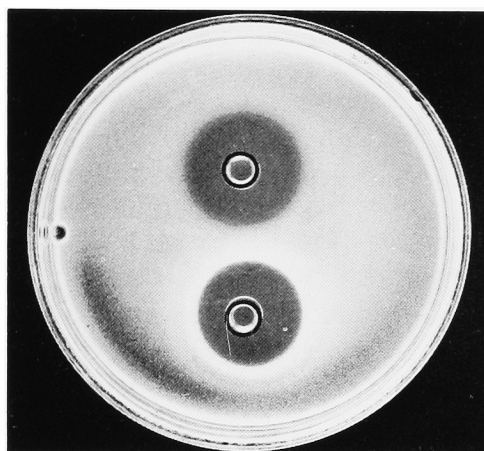


Fig. 5. An agar-plate used for bioassay. Above: Conventional method using phosphate buffer. Below: Our method. The margin of inhibition zone is clearer than that of the conventional method.

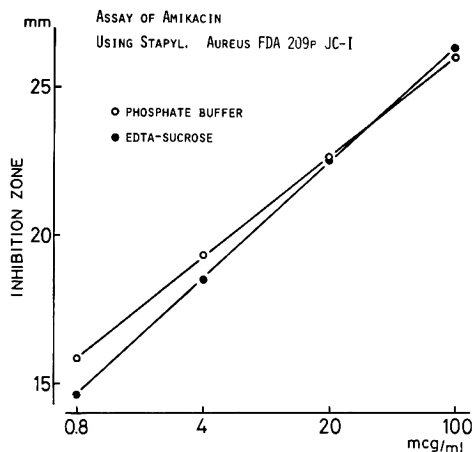


Fig. 6. Linearity of standard curves

であろうかという疑問から、細胞の two-compartment model を考案した。second compartment にあたるのはリソゾームなどをふくむ large organelle 分画である。両 compartment 間のダイナミックな薬物の行動の実際を確かめ、本実験系のもつ意味とその妥当性を示した。

本稿は第33回泌尿器科中部連合総会の特別講演の最初の部分をまとめたものであり、一連の研究の出発点となるものである。

本研究は浜松医大助教授時代におこなったものであり、本研究に助言と好意を頂き、また今回特別講演の機会を与えてくださった阿曾佳郎浜松医大教授に感謝する。

またこの方面に造詣が深く、本講演に司会の労をとってくださった西浦常雄岐阜大教授に感謝する。

最後に、測定を担当してくれた最愛の妻、藤田弘子女士に感謝する。

文 献

- 1) 藤田公生・藤田弘子・田島 惇・鈴木和雄・阿曾 佳郎：抗生物質の腎蓄積性検討の新しい方式の試み。日泌尿会誌 71：184～186, 1980
- 2) Fujita K, Suzuki K, Tajima A and Aso Y: Antibiotic concentration in subcellular fractions of the kidney. *Chemotherapy* 30: 1470～1475, 1982
- 3) 平田耕造・上田豊史・森田一喜朗：急性腎不全の発生病理に関する基礎的研究。日腎会誌 15: 371～391, 1973
- 4) De Buy HG and Showacre JL Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells. *Science* 133: 196～197, 1961
- 5) 藤田公生・藤田弘子・鈴木明彦：蔗糖密度勾配遠心法による抗生物質局在の検討。第25回日腎総会、東京、1982
- 6) 藤田公生：抗生物質の腎における動態。腎と透析 12: 411～417, 1982

(1983年12月20日受付)

1) 藤田公生・藤田弘子・田島 惇・鈴木和雄・阿曾