

## MOLECULAR MECHANISM OF OTOTOXICITY OF AMINOGLYCOSIDES ANTIBIOTICS (THE SUMMERIZING REPORT)

Yoshio Nishizawa

The department of allergology, Shinseikai hospital    The department of anesthesiology, Shiga university  
of medical science

### SUMMARY

This paper reported the molecular mechanisms of ototoxicity of new type of aminoglycoside antibiotics (AGs) using with guinea pigs. Affinity chromatography was used to isolated AGs receptors from inner ear tissues. Fractionation of an inner ear tissue extract demonstrate two components with high affinity for AGs: phosphatidylinositol phosphate and phosphatidylinositol diphosphate (TPI).  $^{32}\text{P}$ -incorporation of TPI in the organ of corti was significantly decreased in guinea pigs previously treated with AGs for 21 days. The addition of AGs to the perfusion fluid resulted in a dose-dependent increase of tissue permeability to the radioactive precursors, and a specific decrease in

the  $^{32}\text{P}$ -incorporation into TPI in stria vascularis and organ of corti. Moreover, AGs caused the most rapid decline of cochlear microphonic potentials when perilymphatic spaces were perfused for 1hr with 'artificial perilymph' containing AGs lysotriphosphoinositide (LTPI), an oxidized product of TPI could form a  $\text{Ca}^{++}$ -regulated monovalent cation channel in planal membranes.

It was clearly shown that AGs profoundly suppressed the  $\text{K}^{+}$ -permeability of LTPI-channel and that the drugs were a competitor with  $\text{Ca}^{++}$  for LTPI-channel. The implications of these findings for the ototoxic molecular mechanisms of AGs are discussed.

## 新たなAminoglycosides系抗生物質(AGs)投与 時の耳毒性の分子生物学的研究

### I. Over Review

真生会病院・アレルギー科  
滋賀医科大学・麻酔学教室

西澤芳男

## 緒 言

近年, aminoglycosides antibiotics (AGs) 使用は外科領域に於て増加の傾向をしめしており<sup>1)</sup>, 一方, 腎, 耳毒性が低いとされている AGs が発売されるにおよんで AGs 使用は著しく増加する傾向がある<sup>1)</sup>。しかし, 外来刺激をうけ細胞内代謝活性化に密接な関係を有する phosphatidyl inositol-4, 5-diphosphate (TPI) は  $Ca^{++}$  ion のような 2 価陽 ion の他に低分子塩基性物質にも高い親和性を有しており, 特に AGs の amino 基は TPI の 2 つの phosphate 基を通じ強い親和性を有していることから AGs の耳毒性分子発生機構上 AGs の TPI 代謝に及ぼす影響は重要な問題である。

そこで, 今回, 新に耳毒性が低いとして開発された Astromicin (ASTM) や Netilmicin (NTL) 等が従来の AGs と比較し耳毒性の点から果して発生率が低いか否かに関して TPI を marker として検討し若干の知見をえたのでこれを報告する。

## 材料と方法

- 1) 動物は雄系 alubino guinea pig (BW, Ca250gr) を用いた。
- 2) 使用 AGs として Gentamicin (GM), Sisomicin (SISO), Dibekacin (DKB), Streptomycin (SM), Tobramycin (TOB), Micromomicin (MCR), Amikacin (AMK), Kanamycin (KM), ASTM, NTL の 10 種類, 対照とし Sulbenicillin (SBPC), Chloramphenicol (CP) をヒト常用使用量にあわせ投与もしくは各実験に用いた。
- 3) 実験手術に関しては今回報告が新に開発され耳毒性が低いとされている AGs が果して常用使用量では耳毒性を示めさないか否かを TPI を指票として総論的検討を加えたため極めて多岐に渡る。そこで, いずれ各論的報告を行うため実験手技詳細はそれら報告にゆずり, 本論文では実験手技概略のみを主に記載するにとどめる。即ち, (a)

guinea pigs 外リンパ液を  $^{32}P$ -orthophosphate を加えた人工外リンパ液に置換し各種 AGs と共に灌流内耳各組織より脂質分画を抽出  $^{32}P$  の取り込みを検討, 更に SDS-gel electrophoresis や DEAE-cellulose 法を用いて TPI への  $^{32}P$  取り込みをより詳細に検討した。この際各種 AGs を加え TPI への  $^{32}P$  取り込み抑制を検討した。

(b) さらに, guinea pigs を麻酔気道確保その他手術施行後, 各種 AGs を加えた人工外リンパ液を作製し内耳有毛細胞を灌流し ear phone を介して 20~4000 Hz の white noise 刺激を与え 200~300  $\mu$ v の反応がえられるようにし微少ガラス電極を挿入し cochlear microphonic potential を継続的に増幅記録した。また, 本実験系では TPI 単分子膜を phosphatidylinositol 混合液を n-hexane-ethanol-chloroform (80:5:15, v/v) で作製し teflon beaker にあらかじめ 70°C, 12 時間熱処理した sodium chloride で ion 強度を 0.2 にあわせた pH=7.0 の 50 mM sodium 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid (HEPES) と 1 mM  $Ca^{++}$  100 ml で作製した subphase 表面に張り, 単分子膜下 subphase に針付き 3 ml 注射器をおき液部分を magnetic bar で単分子膜を破壊しないようゆっくりと覚拌しつつ各種 AGs を注入し表面圧の変化を測定し, 各種 AGs による TPI 単分子膜の表面圧増加率と cochlear microphonic potential の各種 AGs 内耳有毛細胞灌流による変化の相関関係を検討した。(c) 各種 AGs と TPI が結合することは guinea pig に  $^{32}P$ -orthophosphate を混和した外リンパ液で内耳を灌流し内耳を摘出 1 ml の chloroform-methanol (1:2, v/v) で homogenized 後脂肪物質を抽出し各種 AGs を coupling した chromatography にかけたのち thin layer chromatography にかき各種操作により  $^{32}P$  を auto-radioauto-

graphyで検出し、この時各種操作を加えることでAGsがTPIと特異的に結合することを確かめる一方あらかじめ $^{32}\text{P}$ で標識したTPIに内耳有毛細胞よりえたmicrosomal分画(11000 g 30分遠心上清)を20分間作用させ $^{32}\text{P}$ の遊離を測定する系に種々AGsを加えAGsのTPI水解抑制作用からもTPIがAGsを結合することを確かめた。(d)TPIのoxidized productであるlysotriphosphoinositide(Lyso-TPI)を脂質二層膜にSokabe<sup>3)</sup>らの方法で組み込む(0.1mg/mlのLyso-TPIと1Mの $\text{CaCl}_2$ 含有),ために、5分間EGTAで $\text{Ca}^{++}$ ion濃度を調節した10mM Tris-maliate buffer(pH =6.8)内でincubateした。この際自然に $\text{Ca}^{++}$ ionにより調節をうける一価陽ion channelが形成された。なお、square pulseもしくはtriangular wave  $\pm 5\text{ mV}$ により膜電位を0として膜電位の変化より一価陽ionの流入量を測定した。実験は室温で行なった。(e)全実験はguinea pig最低一群5匹で行いその平均値あるいは典型的なpatternで結果をしめした。

### 結 果

1)内耳におけるAGs receptorの存在：あらかじめ $^{32}\text{P}$ でlabelしたTPIに内耳microsomal分画を作用させ水解率を検討する系に各種AGsを添加するとTPIの水解率は抑制をうけた。(結果省略)内耳を $^{32}\text{P}$ を加えた人工外リンパ液で灌流後内耳抽出物をNTLを結合させ各種chromatographyにかけた各種条件で溶出しthin layer chromatographyを用いていかなる物質が溶出もしくはNTLと結合残存するかを $^{32}\text{P}$ をautoradiography法で描出しNTLと結合するphospholipidesがいかなるものかを検討した結果600mMの高ion強度でも溶出されず塩酸もしくはammoniaによってのみ溶出されるbandがTPIに一致して出現した。(Fig. 1)本結果より内耳有毛細胞におけるAGsのreceptorはTPIではないかとい

う可能性が強く示唆された。

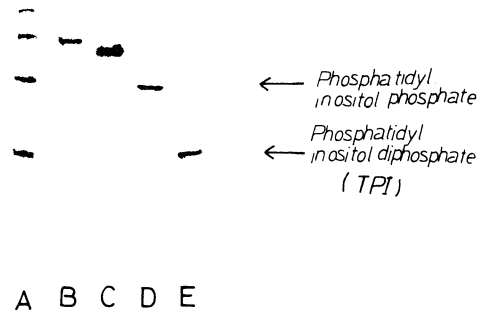


Fig. 1 The autoradiogram pattern of thin layer chromatography of cochlear lipids separated on immobilized NTL fractionated various ion strength solution. Cochlear tissue of a guinea pig were labeled with  $^{32}\text{P}$  by peri lymphatic perfusion.

A: Aliquots of the extract, and the column fraction (B - E) were separated by the thin layer chromatography and the above autoradiogram was obtained.  
 B: The sample was collected while the extract was applied to the column.  
 C: The sample was eluted with 150mM ammonium acetate in chloroform-methanol-water =3:6:1 (vol /vol)  
 D: The sample was eluted with solvent containing 600mM ammonium acetate.  
 E: The sample was eluted with Chloroform-methanol 15N  $\text{NH}_4\text{OH}$ =3:6:1 (vol / vol) The detail method was described in our separated paper.<sup>4)</sup>

2)各種AGsによる内耳TPIへの $^{32}\text{P}$ 取り込みの抑制: $^{32}\text{P}$ -orthophosphateを内耳外リンパ液とし灌流後コルチ器官(有毛細胞),血管条,らせん靭帯のTPIをはじめとするphospholipidesのいかなる種類のものが磷酸化を受けるかを検討したところTPIとphosphatidylinositol phosphateが特異的に磷酸化をうけた。(結果省略)コルチ器官のTPI磷酸化は各種AGs人工灌流液で外リンパを灌流させることで抑制をうけたがSBPCやCP灌流では抑

制をうけなかった。(Table 1)

Antibiotics	Dose (mg/kg)	32P-incorporation into TPI	
		Control animal (Lipid-dpm/HCl-soluble dpm × 10 <sup>2</sup> )	Drug treated animal
G M	0.8	7.4±2.1	5.6±0.4
SISO	2.0	7.5±1.8	6.2±0.3
DKB	1.0	7.4±1.8	5.8±0.5
S M	5.0	7.6±1.9	4.9±0.3
TOB	1.2	7.5±2.0	5.8±0.3
MCR	1.2	7.4±1.7	6.4±0.5
AMK	2.0	7.3±1.9	5.8±0.6
K M	5.0	7.5±1.8	5.0±0.2
ASTM	4.0	7.4±1.6	6.3±0.5
NTL	1.5	7.6±1.5	6.4±0.3
SBPC	100.0	7.5±2.0	7.5±2.4
C P	10.0	7.4±1.7	7.5±1.9
Control	(-)	7.6±2.1	7.7±3.0

**Table 1** Effect of in vivo AGs treatment on <sup>32</sup>P-labeled inner ear lipid. Each ten guinea pigs received various AGs (The clinical using dose/kg) for 7 days. Perfusion: 250μC <sup>32</sup>P/ml Incubation 45min. Data were showed the mean value ± S.D. from 10 guinea pigs

3) 各種AGsによる cochlear microphonic potential と TPI 単分子膜表面圧増加率間の相関関係

次に、NTL を含有した外リンパ液で内耳有毛細胞を灌流すると灌流時間の長さに応じて cochlear microphonic potential の低下が認められた。一方、対照として SBPC もしくは CP を含有した外リンパ液で同様に灌流した場合 cochlear microphonic potential の低下は全く認められず何ら薬剤を添加しなかった対照と比較し有意差は認められなかった。(Table 2) 次に、TPI で作製した単分子膜下に方法の項で記載した方法により各種AGs を添加すると TPI で作製した単分子膜の表面圧の増加は認められた。一方、SBPC, CP の添加では表面圧の増加は認められなかった。(結果省略) NTL を例にとると NTL を含有した外リンパ液で内耳内毛細胞を灌流した場合認められる cochlear microphonic potential の低下と TPI で作製した単分子膜の NTL 注入による表面圧増加は NTL 濃度に比例し正の相関関係を示めた。(結果省略)

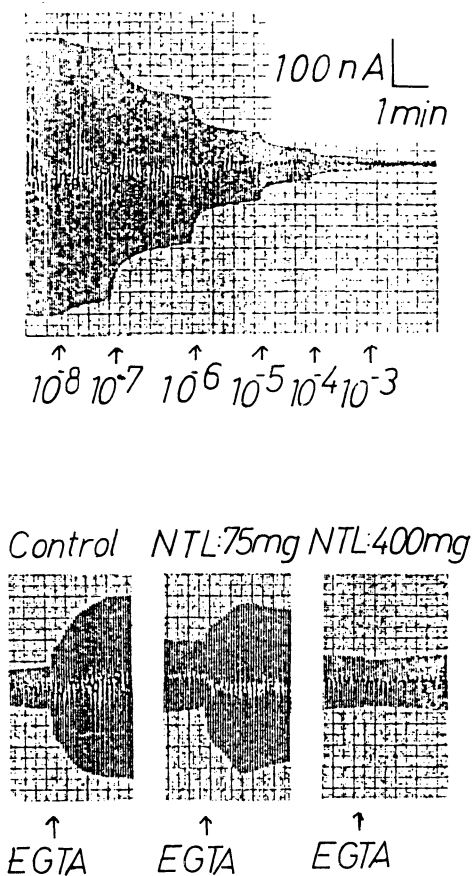
4) Lyso-TPI 含有脂質二層膜一価陽ion channel に対する各種AGs の影響

Antibiotics	Dose (mg/kg)	Δπ at 32μM (dynes/cm)	Loss of cochlear microphonic during perfusion (Percent loss at 30 min)
G M	0.8	6.8±0.2	48.2±3.7
SISO	2.0	5.8±0.3	42.6±2.1
DKB	1.0	6.3±0.5	44.1±2.4
S M	5.0	8.4±0.6	64.9±5.1
TOB	1.2	7.1±0.3	49.6±3.2
MCR	1.2	6.2±0.2	40.3±2.6
AMK	2.0	6.5±0.3	41.8±3.9
K M	5.0	8.6±0.5	65.3±5.4
ASTM	4.0	6.2±0.2	40.8±3.5
NTL	1.5	6.1±0.3	40.2±3.9
SBPC	100.0	not detectable	6.8±0.3
C P	10.0	not detectable	6.5±0.5
None	(-)	not detectable	6.9±0.3

**Table 2** Effects of AGs on monomolecular films of TPI ten experiments were repeated. Δπ was calculated by the figure obtained from the effects of AGs on surface pressure of TPI films. Increasing amounts of AGs were added to surface of mononuclear films of TPI. Displacement constants were calculated by Lineweaver-Burk analysis. The data were showed the mean value ± S.D.

先づ、Lyso-TPI 脂質二層膜における各種AGs の濃度と一価陽イオンである K<sup>+</sup>ion の透過性の関係に関して検討したところいずれのAGs も濃度依存的に K<sup>+</sup> の同膜の透過性を抑制した。(結果省略) 1例として NTL 各種濃度の Lyso-TPI 脂質二層膜に対する K<sup>+</sup>ion 透過性の典型例をしめす。(Fig. 2-a) 次に、Ca<sup>2+</sup>ion の各種AGs によりひきおこされる K<sup>+</sup>ion 透過性低下への影響に関して検討すると Ca<sup>2+</sup>ion の添加は各種AGs によりひきおこされる K<sup>+</sup>ion の透過性低下を Ca<sup>2+</sup>ion 濃度依存的に増大することが明らかとなった。(1 - relative conductance) × 100 で Ca<sup>2+</sup>ion による各種AGs による K<sup>+</sup>ion 透過性の %block をまとめると、%block 対 [各種AGs] 1/2 の double reciprocal relation は Ca<sup>2+</sup>ion が直線的な double reciprocal relation の傾斜を改善す

ることがわかった。(結果省略)



**Fig. 2-a** A typical example of NTL effect on the  $K^+$  current through the membrane modified with LTPI electrolytes, 200mM Kc1,  $1\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $1\mu\text{M}$  LTPI 10mM Tris-molate (pH 6.8). The current was recorded with applying  $\pm 5\text{mv}$  of triangular wave supplied from a function yenerator. Arrowed indicated the time when a small aliquot of concentrated NTL was added to the solution on the side of membrane.

**Fig. 2-b** Conductance enhancement induced by a release of channel bound  $\text{Ca}^{++}$  with an addition of EGTA. The added EGTA decreased the concentration of free  $\text{Ca}^{++}$  in the bulk solutions from 1mM to approx.  $1\mu\text{M}$ . The increment of the current was assumed to be aroportional to the member of  $\text{Ca}^{\#}$  bound LTPI channels.

この結果はAGsが膜結合 $\text{Ca}^{\#}$ と競合して生じたと考えられるため $1\mu\text{M}$  ~ 1mM の $\text{Ca}^{\#}$ 濃度となるようEGTAでfreeの $\text{Ca}^{\#}$ ion濃度を調節した。この場合 $\text{K}^+$ ionの膜透過性の上昇が $1\mu\text{M}$ のfree  $\text{Ca}^{\#}$ ionで認められたことによりfreeの $\text{Ca}^{\#}$ ionにより膜 $\text{K}^+$ ion透過性、即ち、 $\text{K}^+$ ion channelが調節されている可能性が示唆された。AGsの $\text{K}^+$ ionの膜透過性に及ぼす影響は膜に結合している $\text{Ca}^{\#}$ ionがAGsと競合的に置換された結果生じたものではないかと考えられたため、各種の濃度のAGsをEGTAでfree  $\text{Ca}^{\#}$ ion濃度を $1\mu\text{M}$ から1mMとした系に加え膜 $\text{K}^+$ 透過性を検討すると低濃度のAGsの添加ではEGTAでfree  $\text{Ca}^{\#}$ ionを除去することにより生じる膜 $\text{K}^+$ ion透過性を回復させるが、高濃度AGsでは $\text{K}^+$ ionの膜透過性を何ら変化させなかった。ここではNTLでの成績を1例として示す(Fig. 2-b)。

## 考 察

本実験では常用投与量の各種AGsを用いて各種AGsの分子生物学的なAGs聴毒性に関し検討を加えた。

TPIは一般的臓器では殆ど認められないが脳と腎臓には高濃度で含有されている<sup>2)</sup>。AGsは腎近位尿管細管刷子膜縁細胞を障害し腎毒性をしめすが同細胞膜に存在するTPIがAGsのreceptorとして作用している<sup>4)</sup>。このことからAGsの腎毒性発生機序が検討されている。腎におけるTPIとAGs結合能、即ちTPIの2個の磷酸基とAGsの2個のamino基が強い親和性を有することより<sup>2)</sup>AGsの耳毒性に関してAGsが内耳TPIに作用し耳毒性を発揮するのではないかと考えて今回の実験を行った。さらに、新に開発されたAGsは耳毒性が低いといわれているが<sup>5)</sup>腎で検討した場合、AGsによる腎組織変化が認められない時点、さらに血中BUN, creatinine上昇が認められない時点でAGs作用部位である腎近位尿管細管刷子

膜縁由来各種酵素の尿中逸脱が認められることより<sup>6)</sup>、これら新に開発され耳毒性が低いといわれるAGsも分子生物学的には既存のAGs同様内耳有用細胞に障害を与えているのではないかと考え検討を行った。

事実、AGs含有外リンパ液で内耳有毛細胞を灌流するとTPIへの<sup>32</sup>Pの取り込みの抑制、即ちTPIのturn overが抑制をうけた。(Table 1) この結果はin vivo犬腎で認められた実験結果と同一であることからAGsがTPIへの<sup>32</sup>P取り込みを抑制することがAGsの耳毒性に関与していることが示唆される<sup>7)</sup>。neomycinを用いた慢性耳毒性の研究からTPIへの<sup>32</sup>Pの取り込みの抑制の持続が聴力低下と相関するという実験結果<sup>8)</sup>や、neomycinの急性毒性の研究からTPIへの<sup>32</sup>P取り込み抑制とcochlear microphonic potentialの低下が極めてよく相関するという実験結果もこの考え方を裏付ける。さらに内耳有毛細胞灌流実験で各種AGsを灌流した場合のcochlear microphonic potentialの低下と、TPIで作製した単分子膜のAGsによる表面圧間に良好な正の相関が認められたこと (Table 2)はTPIがAGsの内耳障害に重要な役割を果たしていることを示唆する。

Lyso-TPIを組み入れた脂質二層膜中でCa<sup>#</sup>ionにより調節をうける一価陽ion channelが形成されるが、AGsはCa<sup>#</sup>ionと競合しK<sup>#</sup>ionの透過性を低下させ、AGsの本作用の強さと聴毒性が相関をもつことが分った。(Fig. 2)

以上の結果よりAGsとTPIを介して聴毒性の分子生物学的機構を考察すると、SchachtはAGsがTPIの代謝に作用し膜興奮、分泌能を抑制すること、AGsがTPIに結合したCa<sup>#</sup>ionと競合して聴毒性を発揮するという2種の仮説あげているが、Ca<sup>#</sup>ionがAGsの聴毒性を減少させることはよく知られた事実でありCa<sup>#</sup>ionとAGsが神経節結合部において

も内耳TPIで認められたのと同様の競合阻害作用をしめすこと<sup>11)</sup>、また、今回のLyso-TPI膜を用いたCa<sup>#</sup>ionとAGsの聴毒性への競合阻害 (Fig. 2)よりAGsは内耳有毛細胞TP-Iの2個の磷酸基とAGsの2個のamino基を介して強力なion結合をしめしTPIのturn overを停止させることにより、TPIのCa<sup>#</sup>ionを結合する能力がTPIとAGsが結合することにより失なわれCa<sup>#</sup>ionの減少が生じずCa<sup>#</sup>ion量の減少により生じる一価陽ion channelが開かずK<sup>#</sup>ionの有用細胞内流入が生じなくなり、これが慢性的となるか個人の感受性差で聴毒性へ到る可能性が強く示唆される。

新たなAGsは耳毒性が低いと報告されているが、それらの報告は耳毒性が完全に生じた時点での聴力や病理組織所見をみているにすぎず今回示したように分子生物学的には他のAGsと何ら変わらない変化をしめしていることが明らかとなった。この結果は新たなAGsが耳毒性の面から安全として長期投与された場合重篤な耳障害を明らかにひきおこす可能性を示唆している。

今後、これら新たなAGs耳毒性発生機序を更に分子生物学的に解明してゆくと共に細胞内にあるTPIに細胞膜を通過しないAGsがいかにして作用し耳毒性を発現してゆくかに関し検討を加えたいと考えている。

#### [ 文 献 ]

- 1) 田中信男：アミノグリコシド剤：日本臨床：44：831-834, 1986
- 2) Michell O. H : Inositol phospholipids and cell surface receptor function. Biochemical Biophysical Acta 415 : 81-147, 1975
- 3) Hayashi, F, et al, : Calcium-Sensitive univalent cation channel formed by lysotriphosphoinositide in bilayer lipid membranes. Biochem. Biophys. Acta

- 510 : 305 - 315, 1978
- 4) Nishizawa Y : Isolation of netilmicin receptor from guinea pig inner ear (manuscript in preparation )
  - 5) 秋吉正豊他 : ラット, モルモットにおける Netilmicin の耳毒性について : Chemotherapy : 29(Supl 3) 41 - 60, 1981
  - 6) Nishizawa Y. et al : Effect of aminoglycosides antibiotics on rat's kidney injury in anesthized conditions. Hiroshima, J. Anesthesiol 22 (Supl 1) (in press)
  - 7) Nishizawa Y. et al : Aminoglycosides antibiotics reduced  $^{32}\text{P}$  incorporation into TPI in dog kidney (Submitted to Acta Urol Jap.)
  - 8) Orsulakova, A. et al : Effect of neomycin of phosphoinositide labeling and Calcium binding in guinea pig inner ear tissues in vivo and in vitro. J. Neurochem. 26 : 285 - 290, 1976
  - 9) Stockharst, E. et al : Radioactive labelling of phospholipids and proteins by cochlear perfusion in the guinea pig and the effect of neomycin. Octa. Otolaryngol (Stockh) 83 : 401 - 409, 1977
  - 10) Schacht J : Interaction of neomycin with phospholipide metabolism in guinea pig inner ear and brain tissue : Ann. Otol. 83. 613 - 618. 1974
  - 11) Hawkins J. E. Jr : Auditory system. in Handbook of sensory physiology : Eds by keidel ; W.D. and Neff, W.D. Springer Stokhorm. Pp 707 - 716, 1976

### 質 疑 応 答

**質問** 佐藤 毘一 (金沢医大)

- 1) Ototoxicity の強弱に関する実験ですか ?
- 2) 膜障害があって Ototoxicity が惹起されるはず。分子生物学的にみてはいかがですか ?

**応答** 西澤芳男 (真正会病院)

① TPI と各種アミノグリコンド系抗生物質の結合により TPI の代謝が不可逆になることで耳毒性は生じる。これは TPI が、いかなる AGs も同程度に常用換算量で結合することから、もし新たな AGs と従来の AGs との間に耳毒性の差があるとすれば TPI と AGs の構造によって  $\text{Ca}^{2+}$  との間で TPI と結合する  $\text{Ca}^{2+}$  間で  $\text{K}^{+}$  と差があるのか、又 TPI との AGs との距離度に差があるためか

と思われる。

② いかなる AGs でも TPI と結合する以上 TP-I はリンパ球, 内分泌細胞等種々細胞の活性化と密接な関係があるので AGs が TPI と長く結合するならば NTL は 75mg, GM は 40mg がつかわれるがこの量の差により NTL と GM の TPI への結合能は差が少いと考えられる。よって、TPI と AGs が結合する限り NTL, ASTM もやはり TPI との結合を介して病理学変化をおこすと考えられる。例えば NTL 使用によって erythrocyte colony forming factor 産生が抑制されるのも同様の機構と考えられるため安易に NTL の量と GM の量の関係のみで AGs の TPI の分子生物学的な変化から生じる耳毒性を論じるべきでないと考えられる。

**質問** 石井哲夫（東女医大）

耳鼻咽喉科医としてはアミノ配糖体系の抗生物質の大量、連続投与は行う人はいないと思うが、これに先生が麻酔科として他科医師にこのような濫用がみられるから行なった研究ですか。

**応答** 西澤芳男（真正会病院）

外科領域で術前感染防止のためにアミノグリコシド系抗生物質が使用された場合 AGs は腎近位尿細管刷子膜縁細胞のTPIに結合し同部にある  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase が消失する。このため、今日麻酔時にハロゲン化麻酔薬が多用されているがハロゲン化麻酔薬より遊離したFが同じ腎近位尿細管刷子膜縁細胞に作用しますます  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase を損失させ、このため糸球体を漏過したglutathione の回収が不能となり腎内、肝腎グルタチオンサイクルが低下し肝内環元型グルタチオンが低下するため肝で産生される活性化酵素の処理が不能となり腎起因性の肝障害(Lipoperoxide endoperoxide 処理が上記理由で低下するため)肝細胞膜障害を生じる。即ち、肝腎症候群を生じ、ひいては同じ理由より多臓器不全により死亡、重篤化する例が多いと考えられるため、腎毒性の低い新たなAGsに関しても十分注意すべきである。(後述の論文で詳細を述べる)

**質問** 原田康夫（広大）

ネチルマイシンの耳毒性は低い事はたしかだが、100mg/kgをモルモットに筋注し18日間行った場合には内耳の前庭器にも軽度の障害を起こしていた。また摘出蝸半規管に直接ネチルマイシンを作用させた時、300 $\gamma$ /mgで電位が低下がみられた。しかし、ゲンタマイシンなどに比し、はるかに低い電位変化であった。

**応答** 西澤芳男（真正会病院）

①長期に使用した場合(1ヶ月)guinea pigへの投与量をヒト投与量と同様にした場合N-TL, ASTM等の耳毒性の低いといわれてい

るaminoglycosides系抗生物質においてもT-PIのリン酸化、脱リン酸化が抑制されTPIの作用が不可逆的になりこのため内耳有毛細胞の活性化が生じず不可逆的となってくる。

②大量にNTLを投与した場合当然形態学的な変化が生じてくるが、GMとNTLでは通常使用量差が2倍あり、耳毒性が低いということで長期使用するとTPIとの結合が不可逆的となり病理学的変化を生じることが示唆される。

③常用量NTLで病理学的な変化がでる以前に生化学的な変化が生じていることがいずれ不可逆的な病理変化へ移行することを意味しており、NTLやASTMが決して従来のGM DKB TOB AMK等との差はないと考えられ、表現された病理的变化という結果だけで新たなAGsの耳毒性を論ずるべきでないと考えておる。今回の実験はあくまで病理、生理学的に変化を与える以前の分子レベルではNTLが従来のAGsと同様に何らかの変化を内耳にひきおこしているというレベルでの話である。

NTLが安全であるということでの長期使用が、こうした分子レベルの変化をへて最終的には耳毒性をひきおこすのではないかとということである。

事実腎でもここで示したのと同様の分子レベルでの結果をえており、最近臨床的に当初いわれていたよりはるかに多い腎毒性が報告されているのが、今回の結果をよく示唆していると思う。