

T-1982 の毒性試験 (第6報)

—フロセミド併用によるラット腎毒性試験—

中川重仁・柴田哲夫・佐藤 盛・永井章夫

稲場淳子・米田豊昭・高井 明

富山化学工業株式会社総合研究所

新規 Cephamycin 系抗生物質 T-1982 を Glycerol (G) と Furosemide (F) で前処理したラットに 250 mg/kg, 1,000 mg/kg 静注し, 24時間後の腎障害作用を, CET, CEZ と比較検討した。同時に T-1982 1,000 mg/kg 単独投与, F 併用投与した場合についても検討し以下のような結果を得た。

- 1) T-1982 1,000mg/kg 単独投与およびF併用投与群では腎障害は発現しなかった。
- 2) G + F で前処理したラットに T-1982 を 250 mg/kg, 1,000 mg/kg 併用投与すると G + F で起こる軽い腎障害が投与量に比例して増強された。
- 3) このことは尿検査での尿蛋白の出現, 血液化学検査での BUN, クレアチニン値の上昇, さらに腎の組織学的検査での皮質尿管管上皮壊死増強などの変化として現われていた。また, 電顕的観察によっても近位尿管上皮の変性壊死像が確認された。
- 4) 比較対照薬として使用した CET, CEZ の G + F 併用投与でも, T-1982 の場合と同様の変化がみられた。三剤の 1,000 mg/kg + G + F 併用群で腎障害増強作用を比較した場合, その強さは $CET \approx CEZ \geq T-1982$ の順であった。

抗生剤, 特に Cephalosporin 系抗生物質では, 動物に対する単独投与で腎毒性がほとんど認められない場合でも, その薬剤をラットに Glycerol と利尿剤 (Furosemide) とともに投与すると, 高度の腎障害を起こすものがあることが知られている¹⁻³⁾。

新規 Cephamycin 系抗生物質である T-1982 については, ラットに対する最高 2,000 mg/kg の 3 カ月間連続皮下投与試験⁴⁾ をすでに行なっているが腎障害作用は特に認められなかった。

今回, LAWSON ら⁵⁾ の方法を参考にして, T-1982 の Glycerol と Furosemide 併用投与によるラットに対する腎毒性試験を, CET と CEZ を対照薬として行なったので結果を報告する。

I. 実験材料および方法

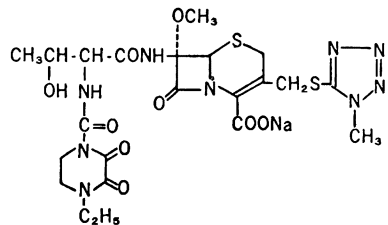
1) 使用動物と飼育環境

Wistar 系雌性ラット (日本クレア産) 100 匹を使用し実験を行なった。動物は 9 週齢で購入し, 1 週間予備飼育した後, 10 週齢 (体重 210 g ~ 250 g) に達したものを使用した。ラットは室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $60 \pm 10\%$, 固型飼料 (日本クレア, CE-2), 水 (水道水) 自由摂取, 6:00~18:00 人工照明環境下で飼育した。

2) 使用薬剤

T-1982 は Fig. 1 に示す化学構造と化学名を有する

Fig. 1 Chemical structure of T-1982



Sodium 7β-[(2R, 3S)-2-(4-ethyl-2, 3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)-3-hydroxybutanamido]-7α-methoxy-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylate

白色の粉末であり, 水にきわめて溶けやすく, メタノールに溶けやすく, エタノールに溶けにくく, アセトンにはきわめて溶けにくく, 酢酸エチル, エチルエーテル, ヘキサン, ベンゼンにはほとんど溶けない。本実験には Lot No. W 1018 を使用した。

対照薬剤として CET (Cephalothin, Lot No. 698 塩野義製薬株式会社), CEZ (Cefazolin, Lot No. ZK 5992 藤沢薬品工業株式会社) を, また利尿剤として, Furosemide (富山化学工業株式会社) を使用した。Glycerol は市販の試薬特級を使用した。

3) 実験群の設定と個体識別

Table 1 Experimental design of nephrotoxicity test of T-1982 in combination with diuretic (furosemide) and glycerol in rats

Exp. group	No. of rats	Rat numbers
Saline control	10	1~10
Glycerol (G)+Furosemide (F)	10	11~20
T-1982 250 mg/kg+G+F	10	21~30
T-1982 1,000 mg/kg+G+F	10	31~40
CET 250 mg/kg+G+F	10	41~50
CET 1,000 mg/kg+G+F	10	51~60
CEZ 250 mg/kg+G+F	10	61~70
CEZ 1,000 mg/kg+G+F	10	71~80
T-1982 1,000 mg/kg	10	81~90
T-1982 1,000 mg/kg+F	10	91~100

Saline : 5ml/kg, i. v.

Glycerol : 50% sol., 4ml/kg, s. c.

Furosemide : 1% suspension, 50 mg/kg, s. c.

T-1982, CET, CEZ : 5% or 20% sol., i. v.

Table 1 に示すように実験群を設定し、各群に10匹ずつラットを配分した。個体識別は耳パンチにより行なった。

4) 薬剤の調製と投与方法

Glycerol (以下Gと略) は、生理食塩水で50%に希釈したものを4 ml/kg, Furosemide (以下Fと略) は1%生理食塩水懸濁液(乳鉢で十分に粉碎)を50 mg/kg, おのおのラット背部皮下に注射した。

T-1982 は、生理食塩水に溶解し、250 mg/kg 投与の場合は5%溶液を、1,000 mg/kg 投与の場合は、20%溶液をおのおの5 ml/kg 尾静脈より注射した。対照薬として用いた CET, CEZ についても T-1982 と同様に調製し投与を行なった。

T-1982 あるいは対照薬をGおよびFと併用投与する場合は、まずラットにGとFを背部皮下に注射した後、各薬剤を尾静脈に約20 ml/min. の速度で注射した。生理食塩水投与対照群には、生理食塩水のみを5 ml/kg 注射した。

5) 検査

投与後、ラットをただちに個別代謝ケージに入れ、絶食下で採尿を開始し、摂水量も同時に測定した。採尿は0~5時間と5~22時間の2回に分けて行ない、摂水量は0~22時間通算の飲水量として測定した。

おのおのの尿について尿量とpH, 蛋白, 糖, ケトン体, 潜血(multistix®, マイルス三共)を測定し、さらにLITWACK⁵⁾ および OSSERMAN⁶⁾ の変法により尿中リゾチーム濃度を測定した。

薬剤投与と24時間後に採血と剖検を行なった。体重測定の後、ラットをペントバルビタールで麻酔し、後大静脈よりヘパリン処理した注射筒で採血した。この血漿を使用して血中尿素窒素(ジアセチルモノオキシムチオセミカルバジド直接法), クレアチニン(Folin-Wu法)の測定を行なった。

採血後ただちに左側腎の腎動静脈を結紮し、同腎を摘出(重量測定)した後、左心室側壁より10%リン酸緩衝ホルマリン(pH 7.2)を注入して灌流固定を行なった。灌流固定後、右側腎を摘出し、常法に従ってパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して組織学的検索を行なった。なお、各群三匹のラットについては灌流固定した右側腎の皮質の一部を1%オスミウム酸固定、エポキシ樹脂包埋、酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色を施して電子顕微鏡による検索を行なった。

II. 実験結果

1) 尿検査と摂水量

尿量と摂水量の関係をFig. 2に示す。利尿剤(F)を投与していない生食対照群やT-1982の1,000 mg/kg 単独静注群と、FあるいはG+Fを併用投与した群とを比較すると、後者ではフロセミドの利尿作用による尿量増加と摂水量増加が全体的に認められた。G+F群を基準にしてT-1982あるいは各対照薬剤1,000 mg/kg+G+F群をみると、尿量、摂水量ともG+F群より若干少なくなる傾向が共通してみられたが、ばらつきが大きいため有意差は認められなかった。

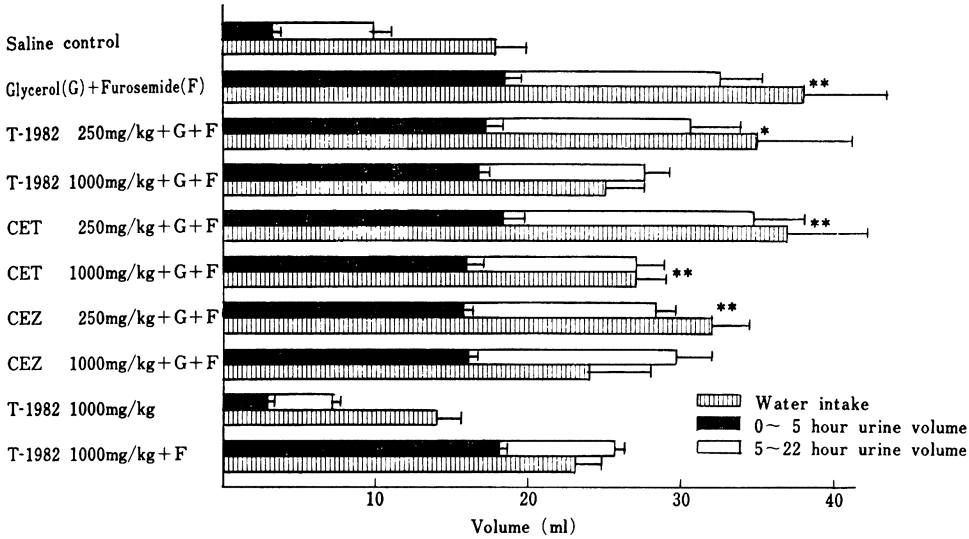
尿のmultistix®(マイルス三共)による検査結果をTable 2に示す。生食対照群、T-1982 1,000 mg/kg 単独投与群、およびT-1982 1,000 mg/kg+F群には全例異常が認められなかった。G+F群と、T-1982あるいは対照薬剤をG+Fと併用投与したすべての群の0~5 hr. 尿では、Gによるintravascular hemolysisの影響⁷⁾を受けて尿潜血反応が全例陽性を示していたほか、尿蛋白がほぼ同程度に出現していた。腎障害の程度を比較よく反映していると思われる5~22 hr. 尿では、尿蛋白の出現に差が現われていた。すなわち、T-1982あるいは対照薬剤250 mg/kg+G+F群の尿蛋白量はG+F群と同程度であったが、T-1982あるいは対照薬剤1,000 mg/kg+G+F群では尿蛋白の出現頻度、程度とも250 mg/kg+G+F群より増加していた。

糖の出現がCEZ 1,000 mg/kg+G+F群の2例に軽度⁸⁾に認められた。

2) 尿中リゾチーム濃度

尿中リゾチーム濃度を0~5 hr. 尿と5~22 hr. 尿に分けて測定した。0~5 hr. 尿では各群全例検出限界⁵⁾

Fig. 2 Urine volume and water intake in rats treated with T-1982 or other cephalosporins alone or in combination with furosemide and glycerol



Statistically significant difference from control *P<0.05 **P<0.01

Table 2 Urinalysis of 0~5 hr. urine and 5~22 hr. urine in rats treated with T-1982 or other cephalosporins alone or in combination with furosemide and glycerol

Exp. group	0~5 hr. urine					5~22 hr. urine				
	pH	Pro.	Glu.	Ket.	Bld.	pH	Pro.	Glu.	Ket.	Bld.
Saline control	6(4) 7(4) 8(2)	-~+(10)	-	-	-(10)	6(10)	-~+(10)	-	-	-(10)
Glycerol(G)+Furosemide(F)	5(2) 6(8)	+(8) #(2)	-	-	##(10)	5(1) 6(8) 7(1)	-~+(7) +(3)	-	-	+(3) +(6) #(1)
T-1982 250 mg/kg+G+F	5(1) 6(9)	-~+(1) +(9)	-	-	##(10)	5(1) 6(9)	-~+(6) +(2) #(2)	-	-	+(2) +(6) #(2)
T-1982 1,000 mg/kg+G+F	6(10)	-~+(1) +(7) #(2)	-	-	##(10)	5(1) 6(9)	-~+(1) +(4) #(5)	-	-	+(1) +(8) #(1)
CET 250 mg/kg+G+F	5(3) 6(7)	-~+(2) +(8)	-	-	##(10)	5(1) 6(9)	-~+(7) #(3)	-	-	+(1) +(8) #(1)
CET 1,000 mg/kg+G+F	5(1) 6(9)	-~+(2) +(8)	-	-	##(10)	5(1) 6(9)	+(2) #(8)	-	-	+(6) #(4)
CEZ 250 mg/kg+G+F	5(5) 6(5)	-~+(1) +(9)	-	-	##(10)	5(3) 6(7)	-~+(6) +(4)	-	-	+(2) +(5) #(3)
CEZ 1,000 mg/kg+G+F	5(4) 6(6)	+(10)	-	-	##(10)	6(9) 7(1)	+(4) #(6)	-(8) ±(1) +(1)	-	+(4) #(6)
T-1982 1,000 mg/kg	6(1) 7(8) 8(1)	-~+(10)	-	-	-(10)	6(10)	-~+(10)	-	-	-(10)
T-1982 1,000 mg/kg+F	5(1) 6(8) 7(1)	-~+(10)	-	-	-(10)	5(3) 6(7)	-~+(10)	-	-	-(10)

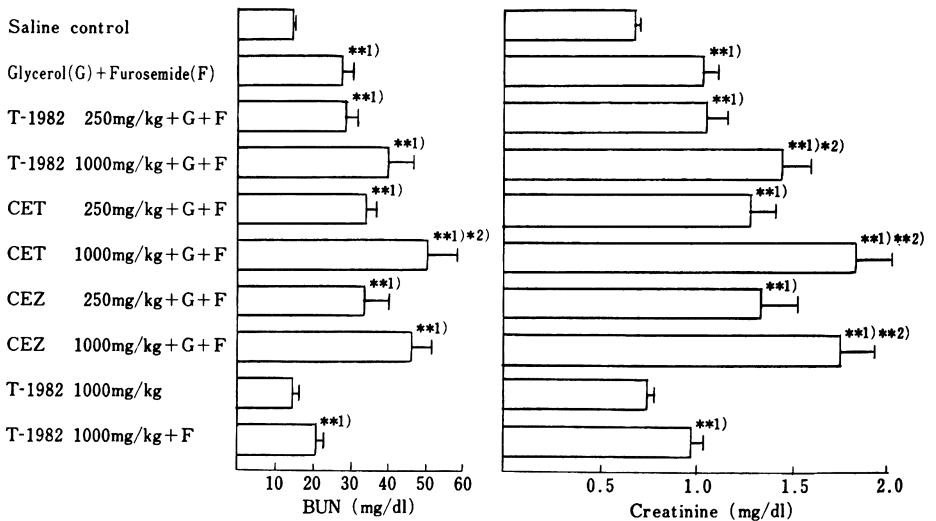
Pro. : Protein, Glu. : Glucose, Ket. : Ketone bodies, Bld. : Blood, - : Negative, ± : Very slight, + : Slight, ++ : Moderate, ## : Severe, () : Number of rats

Table 3 Lysozyme concentration of 5~22 hr. urine in rats treated with T-1982 or other cephalosporins alone or in combination with furosemide and glycerol

Exp. group	Rat No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Saline control	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Glycerol(G)+Furosemide(F)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
T-1982 250 mg/kg+G+F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
T-1982 1,000 mg/kg+G+F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
CET 250 mg/kg+G+F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
CET 1,000 mg/kg+G+F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	8.5	10.2	n. d.
CEZ 250 mg/kg+G+F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
CEZ 1,000 mg/kg+G+F	n. d.	n. d.	n. d.	6.6	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
T-1982 1,000 mg/kg	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
T-1982 1,000 mg/kg+F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n. d. : Not detectable (<5), unit : $\mu\text{g/ml}$

Fig. 3 Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine in rats treated with T-1982 or other cephalosporins alone or in combination with furosemide and glycerol



1) Statistically significant difference from control **P<0.01
 2) Statistically significant difference from group G+F *P<0.05, **P<0.01

$\mu\text{g/ml}$) 以下であった。5~22 hr. 尿のリゾチーム濃度は Table 3 に示す通りであり、これも T-1982 投与の各群とも $5 \mu\text{g/ml}$ 以上の尿リゾチームは検出できなかった。しかし、CET 1,000 mg/kg+G+F 群の 10 例中 2 例と、CEZ 1,000 mg/kg+G+F 群の 10 例中 1 例に尿リゾチーム増加が認められた。

3) 血中尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン

24 時間後に測定した各投与群の BUN およびクレアチニン値を Fig. 3 に示した。T-1982 1,000 mg/kg 単独

投与群は BUN, クレアチニン値とも生理食塩水投与対照群と差を認めなかった。しかし、T-1982 に F のみを併用投与することにより BUN とクレアチニン値は若干増加し、生食対照群との間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

G+F 前処置ラットに対する T-1982 投与の影響を G+F 群と比較してみると、250 mg/kg+G+F 投与群では、BUN, クレアチニンとも G+F 群との間に明瞭な差はみられなかったが、1,000 mg/kg+G+F 群では

Table 4 Body weight change and kidney weight in rats treated with T-1982 or other cephalosporins alone or in combination with furosemide and glycerol

Exp. group	Body weight's change (g) (at autopsy-before administration)	Left kidney weight	
		Absolute (g)	Relative (%)
Saline control	-21.1±1.0	0.822±0.023	0.399±0.009
Glycerol(G)+Furosemide(F)	-22.4±1.1	0.975±0.028**1)	0.468±0.011**1)
T-1982 250 mg/kg+G+F	-21.3±0.9	0.970±0.021**1)	0.464±0.011**1)
T-1982 1,000 mg/kg+G+F	-20.2±1.2	1.008±0.019**1)	0.493±0.011**1)
CET 250 mg/kg+G+F	-23.6±0.7	1.004±0.024**1)	0.485±0.011**1)
CET 1,000 mg/kg+G+F	-18.8±2.2	0.981±0.014**1)	0.478±0.007**1)
CEZ 250 mg/kg+G+F	-19.9±1.4	1.011±0.046**1)	0.482±0.021**1)
CEZ 1,000 mg/kg+G+F	-24.7±1.1	1.016±0.026**1)	0.503±0.010**1) 2)
T-1982 1,000 mg/kg	-15.1±1.6**1)	0.805±0.017	0.385±0.009
T-1982 1,000 mg/kg+F	-19.6±1.5	0.891±0.022*1)	0.430±0.009*1)

1) Statistically significant difference from control *p < 0.05, **p < 0.01

2) Statistically significant difference from group G+F *p < 0.05,

Table 5 Histological observations of the kidney in rats treated with T-1982 or other cephalosporins alone or in combination with furosemide and glycerol

Histological findings	Saline control	Glycerol (G) + Furosemide (F)	T-1982		CET		CEZ		T-1982 1,000 mg/kg	T-1982 1,000 mg/kg + F
			250 mg/kg + G+F	1,000 mg/kg + G+F	250 mg/kg + G+F	1,000 mg/kg + G+F	250 mg/kg + G+F	1,000 mg/kg + G+F		
Necrosis of the cortical tubular epithelium	0	4	8	12	15	18	9	15	0	0
Desquamation of brush border in the proximal tubular epithelium	0	7	11	21	12	13	11	17	0	0
Swelling or hydropic degeneration of the cortical tubular epithelium	0	7	9	8	6	2	12	3	0	0
Hyaline droplet degeneration in the proximal tubular epithelium	0	2	1	2	1	0	4	1	0	0
Hyaline casts in the tubular lumina	0	3	1	10	6	4	4	11	0	0
Calcium deposition in the cortical tubular lumina	0	2	0	4	3	6	0	8	0	0

Renal histological changes were divided individually into slight change (score 1), moderate change (score 2) and marked change (score 3).

A figure in this table was indicated the total score of ten rats in each group.

BUN, クレアチニンとも増加しており, クレアチニン値にはG+F群と有意差 (P < 0.05) が認められた。

対照薬として使用した CET, CEZ でも G+F との併用投与で BUN, クレアチニンの増加がほぼ投与量に比例して認められた。1,000 mg/kg 併用投与における BUN, クレアチニン増加の強さを三薬剤間で比較する

と, ほぼ CET ≥ CEZ ≥ T-1982 の順であった。

4) 体重変化と腎重量

薬剤投与前後の体重の変動幅と, 剖検時に測定した左側腎の重量および重量体重比を Table 4 に示した。F や G+F を併用投与した各群では, 尿量が著しく増加し, それを補う摂水量増加があったにもかかわらず, その体

重変動幅には生食対照群との間に差がみられなかった。しかし、G+F群をはじめ T-1982あるいは対照薬剤+G+F群では、すべて腎重量および腎重量体重比が増加しており、生食対照群との間に有意差 ($P < 0.01$) を認めた。G+Fを併用投与した三薬剤間の差は明らかではなく、また投与量相関もみられなかったが、CEZ 1,000 mg/kg+G+F群の腎重量体重比だけは、G+F群と比較しても有意 ($P < 0.05$) に増加していた。T-1982 1,000 mg/kg+G+F群でも腎重量と腎重量体重比が若干増加しており、生食対照群との間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたが、その程度はG+F群と比較すると軽度であった。

5) 剖検時肉眼所見

摘出した腎の肉眼的観察結果には、全例特に異常を認めなかった。

6) 組織学的検査

結果を Table 5 に示す。腎障害作用を比較するために、腎の形態変化を下記の6種類に分類し、各ラットの腎の変化をその広がりや障害の強さをもとにスコア 0 (一): 異常なし, スコア 1 (+): 軽度の変化, スコア 2 (二): 中等度の変化, スコア 3 (三): 高度の変化の4段階で評価した。Table 5 の数値は各群10匹のラットのスコアの合計を記載したものである。

〈腎の組織学的変化の分類〉

① 皮質尿細管上皮の壊死——皮質尿細管上皮細胞の好酸性濃染, 核崩壊, 核消失, 上皮細胞の基底膜からの剝離, 内腔への脱落などの変化。

② 近位尿細管上皮の刷子縁脱落——形態的に近位尿細管上皮細胞であることが識別できる細胞で刷子縁の脱落が観察される場合。

③ 皮質尿細管上皮の膨化または水腫変性——尿細管上皮が膨化したために尿細管腔が閉じており、一部細胞質が淡明化しているものもある。

④ 近位尿細管上皮の硝子滴変性。

⑤ 尿細管腔内の硝子円柱出現。

⑥ 皮質尿細管腔のカルシウム沈着——尿細管腔内に脱落、壊死した細胞にカルシウム沈着がみられる場合。

生食対照群の腎 (Photo. 1) と比較すると、G+F群では、すでに一部のラットの腎で軽度の皮質尿細管壊死や近位尿細管上皮の硝子滴変性あるいは膨化などの変化が観察された (Photo. 2, 3)。

T-1982をG+Fと併用投与した場合の腎障害作用を皮質尿細管壊死を基準にして、G+F群と比較してみると、G+F群の合計スコア4に対して250 mg/kg+G+F群は8、1,000 mg/kg+G+F群は12であり、投与量

に比例して障害作用が増強する傾向が認められた。この傾向は対照薬剤として使用したCETやCEZのG+F併用投与群でも現われており、三薬剤の腎障害増強作用を皮質尿細管壊死の合計スコアで単純に比較するとCET \geq CEZ \geq T-1982の順であった。しかし、その差は著しくなかった。

各薬剤ともG+F併用投与による皮質尿細管壊死 (Photo. 4, 5) の増加と並行して尿細管腔のカルシウム沈着 (Photo. 6) や硝子円柱 (Photo. 7) は増加していたが、尿細管上皮の硝子滴変性、水腫変性などの比較的軽度の変化は逆に少なくなり、全体的にみて投与量に比例して腎障害はより高度になっていた。

T-1982 1,000 mg/kg 単独投与群には、全例異常がみられなかった。また、T-1982 1,000 mg/kg+G+F群では、軽度のBUN、クレアチニンの増加と、軽度の腎重量増加をみたが、腎の組織学的異常は認められなかった。

なお、糸球体については各薬剤投与群とも組織学的変化を認めなかった。

7) 電子顕微鏡的観察

各群3匹のラット腎を電子顕微鏡で観察した。近位尿細管上皮細胞の形態を生食対照群 (Photo. 8) と比較してその変化をみた場合、G+F投与ラットでは光学顕微鏡レベルで特に異常を認めなかった例でも電顕的には、細胞質内のミトコンドリアがわずかに増加し、apical vesicleと思われる空胞が拡大して、その数が増加している像 (Photo. 9) が認められた。

T-1982 1,000 mg/kg をG+Fと併用したラットのうち、光顕レベルで中等度の皮質尿細管壊死をみた例では多くの近位尿細管上皮に種々の障害像が認められた。ある部位では、細胞質全体が暗調をおび、ミトコンドリアは腫脹し、多くのlysosomeと思われるcytosomeが出現していたほか、刷子縁がほとんど脱落していた。さらに、核ではクロマチンが凝集して核膜に付着し、核膜の一部に断裂が認められた (Photo. 10)。また、他の部位では細胞質が淡明化して刷子縁を全く欠いており、細胞質内にはapical vesicle様の空胞と少数のミトコンドリアをわずかに含むだけで小器官がほとんどみられない細胞があった (Photo. 11)。しかし、一部の部位には正常像に近い形態を示している近位尿細管上皮細胞も認められた (Photo. 12)。観察しえた限りの糸球体には、特に形態的な異常が認められなかった (Photo. 13)。

CET, CEZ の1,000 mg/kg をG+Fと併用投与したラットの腎近位尿細管上皮細胞における障害像も、その程度に差はあるものの基本的には前述のT-1982併用群でみられたものと同様であった (Photo. 14)。

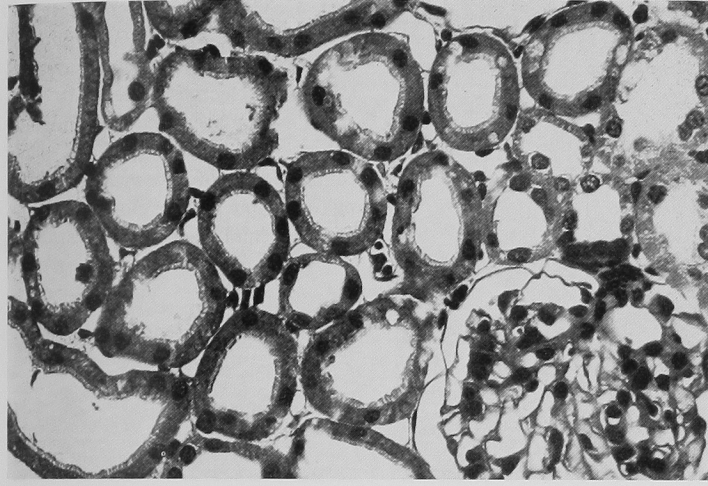


Photo. 1 The kidney from a control rat given physiological saline solution (No. 4). No significant changes are seen. $\times 230$ H. E staining

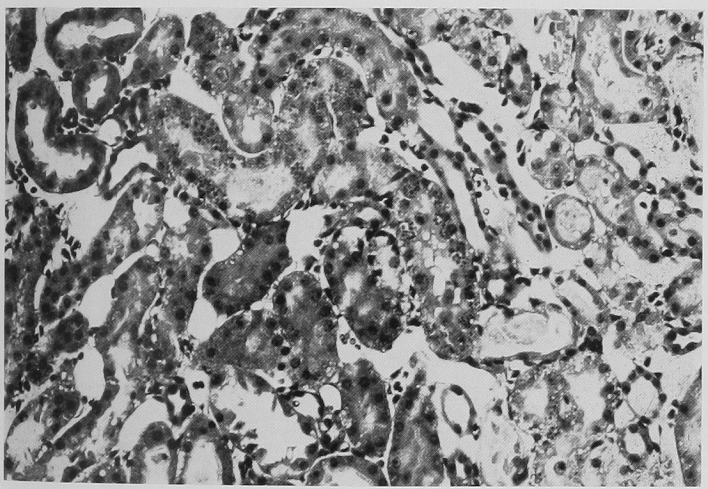


Photo. 2 The kidney from a rat given glycerol and furosemide (No. 14). Hyaline droplet degeneration of the proximal tubular epithelia (central portion) and desquamated epithelia (right lower portion) are seen. $\times 230$ H. E staining

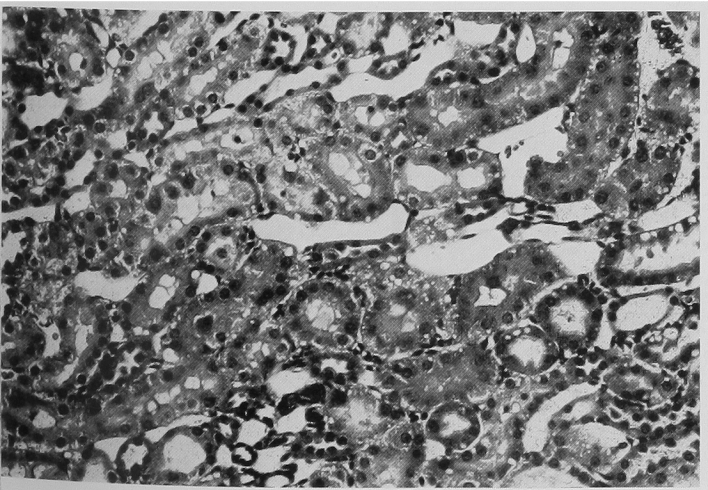


Photo. 3 The kidney from a rat given glycerol and furosemide (No. 11). Swelling with hydropic changes of the cortical renal tubular epithelia is scattered. $\times 230$ H. E staining

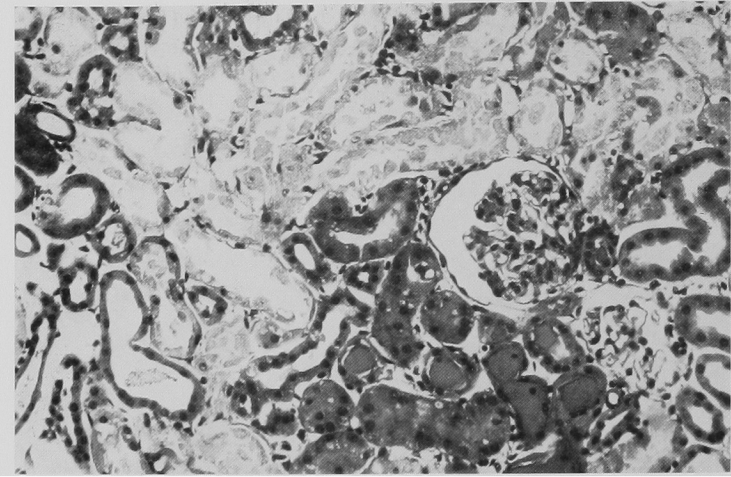


Photo. 4 The kidney from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 37). Necrotic epithelial cells are desquamated in the lumina. Other renal tubular epithelia show condensation of the cytoplasm and pyknotic nuclei. A glomerulus appears normal. $\times 230$ H. E staining

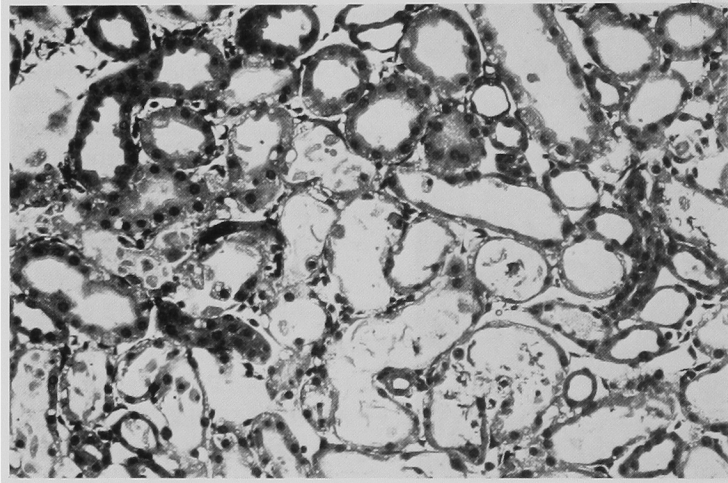


Photo. 5 The kidney from a rat given 1,000mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 32). Cortical renal tubular epithelia show extensive necrosis, and some of them are detached from the basal lamina. $\times 230$ H. E staining

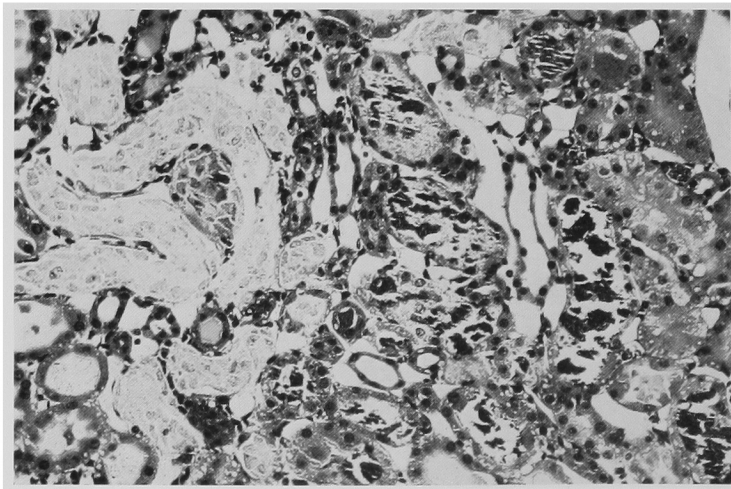


Photo. 6 The kidney from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 37). Tubular necrosis is extensive and widespread, and calcium is deposited in the desquamated and necrotic cells. $\times 230$ H. E staining

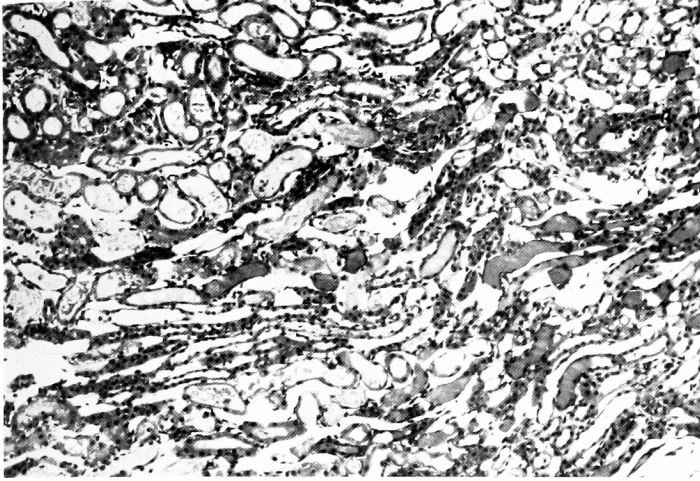
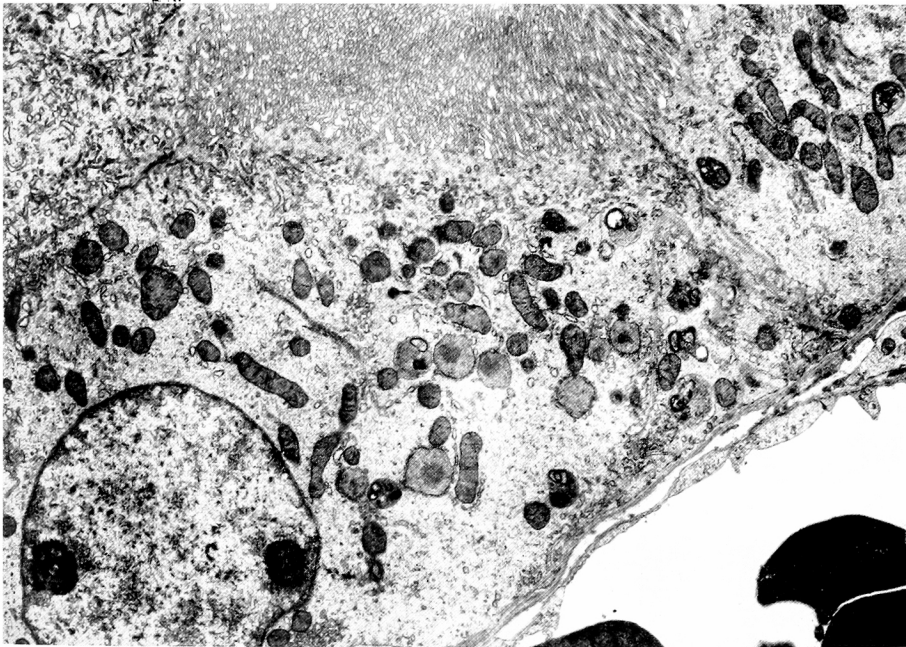


Photo. 7 The kidney from a rat given 1,000 mg/kg of CEZ in combination with glycerol-furosemide (No. 74). There are many hyaline casts within the lumina of the cortical and medullary tubules. ×115 H. E. staining

Photo. 8 Proximal renal tubular epithelium from a rat given physiological saline solution (No. 1).

Electronmicroscopically, no significant changes are seen. ×3500



T-1982 1,000 mg/kg 単独投与ラットおよび T-1982 1,000 mg/kg+F 群ラットの近位尿細管上皮には特記すべき異常は認められなかった (Photo. 15)。

III. 総括と考察

新しい Cephamycin 系抗生物質である T-1982 を G+F の皮下投与で前処置したラットに静注し、24 時間後の腎障害作用を CET, CEZ と比較検討した。同時に T-1982 1,000 mg/kg を単独静注した場合と T-1982 1,000 mg/

kg (i. v.) と F (s. c.) を併用投与した場合についても同様に検討した。

G+F を投与したラットの腎では、すでに若干の腎障害が出現しており BUN, クレアチニンの上昇や尿細管上皮の変性あるいは限局性の尿細管壊死が軽度に認められた。

G+F にさらに T-1982 の 250 mg/kg または 1,000 mg/kg を投与したラットの BUN, クレアチニン, 腎の

Photo. 9 Proximal renal tubular epithelium from a rat given glycerol and furosemide (No. 12).

Numerous vacuoles of various size with few flocculent materials are seen, and numbers of mitochondria are increased. $\times 10,000$

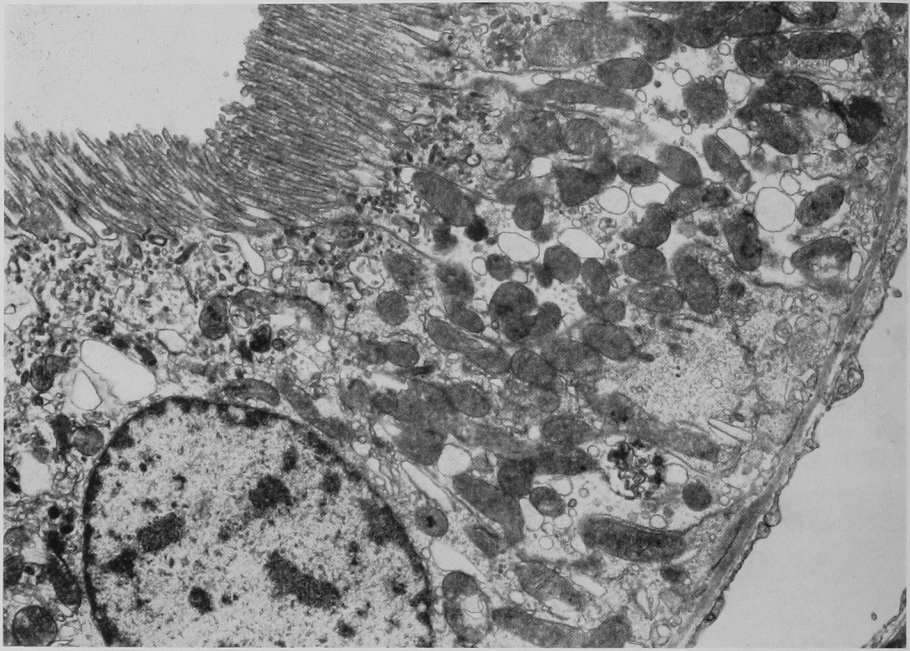


Photo. 10 Proximal renal tubular epithelium from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 32).

In this dark epithelial cell, swelling of mitochondria, increase of cytosomes and loss of brush border are seen. While in the nucleus, chromatin particles condense near the nuclear membrane. Shape of nucleus is irregular. $\times 7,500$

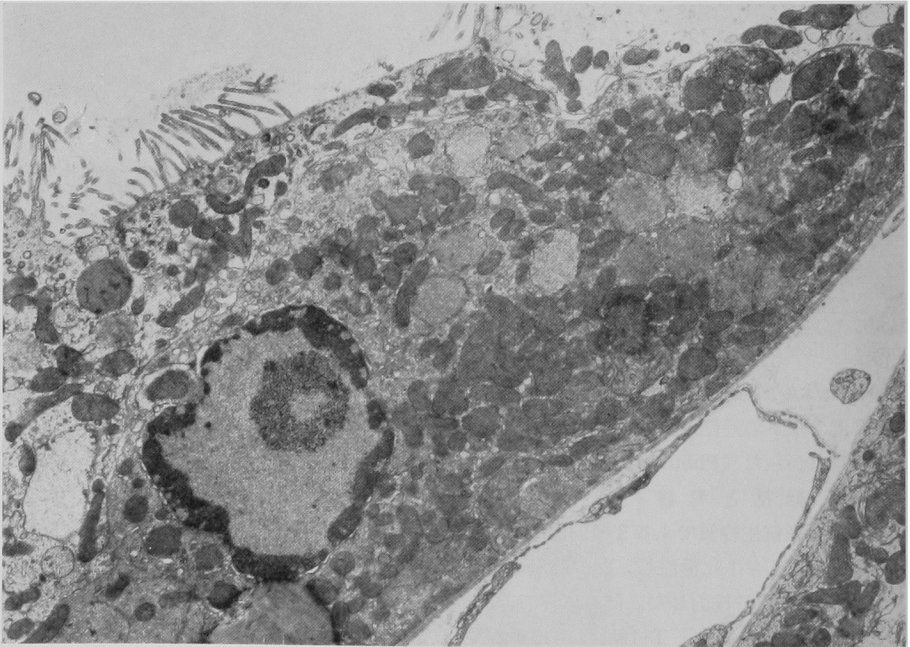


Photo. 11 Proximal renal tubular epithelium from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 31). The cytoplasm is swollen and appeared clear, and the brush border is disappeared in the left. The marked condensed epithelial cell contains several apical vesicle-like vacuoles and a few mitochondria, but few other organelle in the right. $\times 7,500$

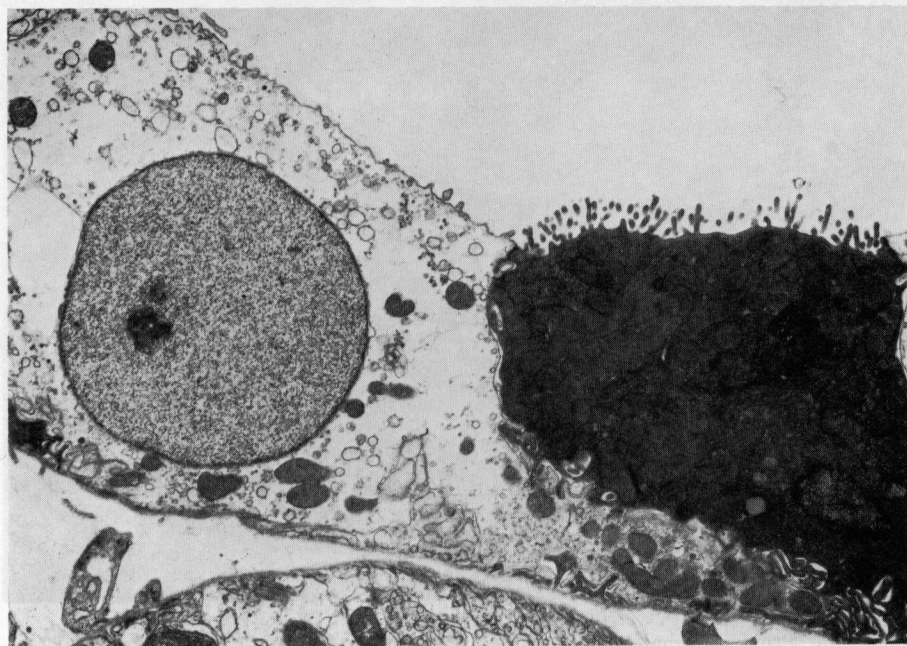


Photo. 12 Proximal renal tubular epithelium from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 32). Mitochondria are slightly increased in number, but other organelle appeared normal. $\times 6,400$



Photo. 13 Glomerulus from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 in combination with glycerol-furosemide (No. 31).
No significant changes are seen. $\times 6,400$

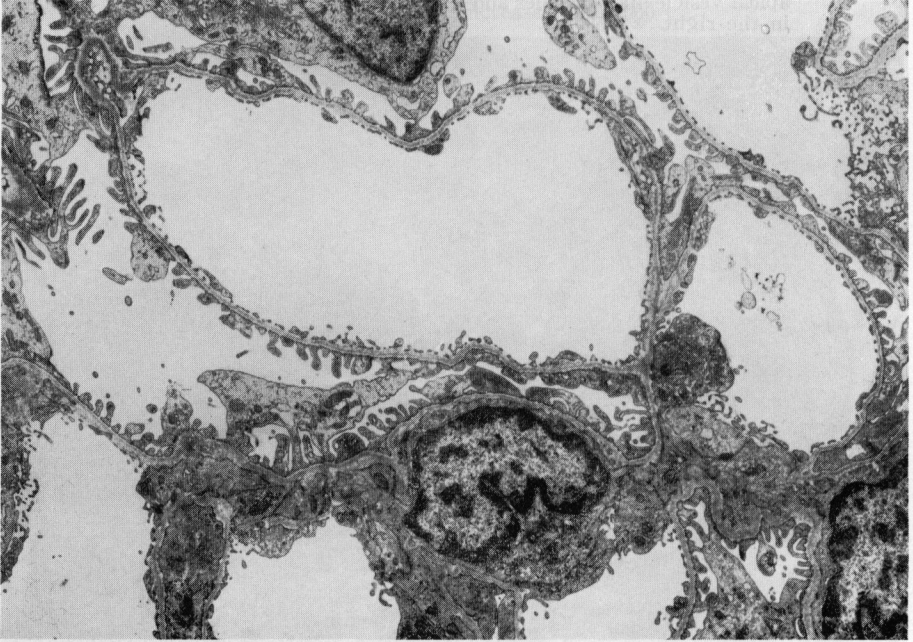


Photo. 14 Proximal renal tubular epithelium from a rat given 1,000 mg/kg of CEZ in combination with glycerol-furosemide (No. 71).

In the right cell facing the basement membrane, increase in number of mitochondria, enlarged apical vesicle-like vacuoles are observed. While, the left cell appears pale and there are only a few mitochondria and endoplasmic reticulum. $\times 5,000$

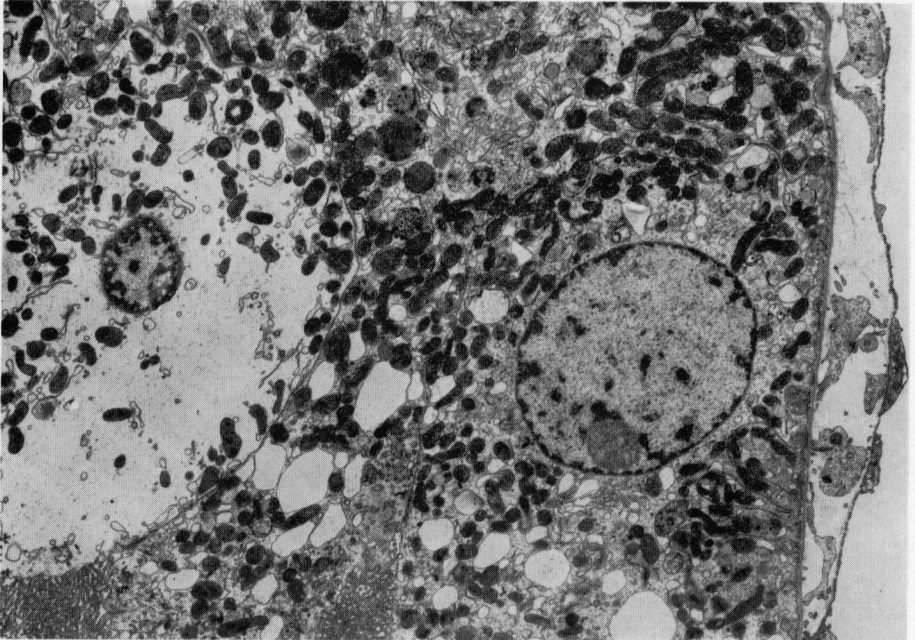
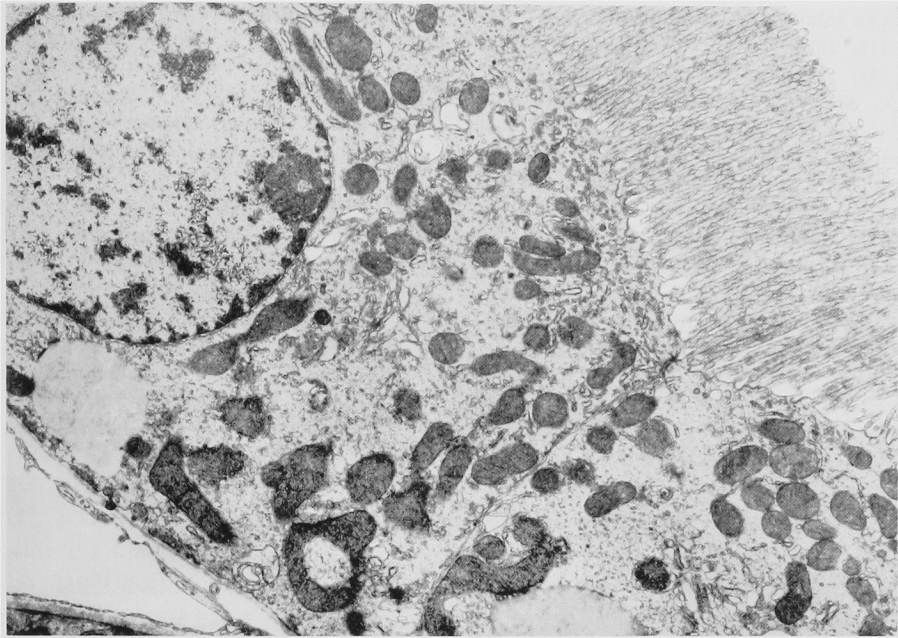


Photo. 15 Proximal renal tubular epithelium from a rat given 1,000 mg/kg of T-1982 (No.81).
No significant changes are seen. $\times 10,000$



組織学的変化をみると、250 mg/kg 併用群ではわずかに、1,000 mg/kg 併用群では明らかにG+Fによる腎障害が増強されていた。この変化は、T-1982のみならず、対照薬剤として使用した CET, CEZ でも認められた。三薬剤の腎障害増強作用の強さを検査結果を総合してみた場合、 $CET \approx CEZ \geq T-1982$ であろうと思われるがその差は明瞭ではなかった。

T-1982 1,000 mg/kg の単独静注では、機能検査結果、組織学的電顕の検査結果に異常を認めなかった。

T-1982 1,000 mg/kg をFのみと併用投与した群では、BUNとクレアチニンが生食対照群と比較すると若干増加し、腎重量もわずかに増加を示していたが、組織学的あるいは電顕的には異常を認めなかった。

腎障害の指標として行なった尿検査結果では、5~22 hr. 尿の尿蛋白が腎の障害を比較的よく反映していたが、近位尿細管障害を知るために有用な指標であることが知られている⁸⁾尿中リゾチームの測定では、その増加が CET, CEZ 1,000 mg/kg + G + F 群の一部のラットに認められただけであった。

Cephaloridine^{1-3,9)}, Cephalothin^{2,9,10)}, Cefazolin^{9,10)}, Cephacetrile⁹⁾, Cefoperazone¹⁰⁾ などの Cephalosporin 系抗生剤や、Colistin¹¹⁾, Kanamycin¹¹⁾ などの抗生物質をG+Fを前処置したラットに併用投与すると、単

独投与では何ら腎に障害を及ぼさない量でもG+Fによって引き起こされた軽度の腎障害を著しく増強し、BUN, クレアチニンの上昇、広範な尿細管壊死が発現することが知られている。しかし、一方では、Cephalosporin 系薬剤の中でも Cephalexin²⁾ や Cephapirin²⁾ を同様に投与した場合には、腎障害増強作用がみられず、Gentamicin¹¹⁾ でも同様であることからみて、すべての抗生物質に共通した作用ではないようである。また、Cephaloridine では、ラットにFと併用投与した場合にも CER の腎毒性が単独投与よりも強く現われることが報告されている^{2,11)}。

今回行なった T-1982+G+F 併用投与によるラット腎毒性試験では、CET や CEZ と同程度かあるいは若干弱いながらもG+Fによる腎障害が増強した。

本実験の遂行にあたり、組織標本の診断とご校閲を賜りました金沢大学医学部病理学第2講座、太田五六教授に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) LAWSON, D. H. ; R. F. MACADAM, H. SINGH, H. GAVRAS, S. HAROZ, D. TURNBULL & A. L. LINTON: Effect of furosemide on antibiotic-induced renal damage in rats. J. Infect. Dis. 126 : 593~600,

- 1972
- 2) LINTON A. L. ; R. R. BAILEY & D. I. TURNBULL : Relative nephrotoxicity of cephalosporin antibiotics in an animal model. *Can. Med. Asso. J.* 107 : 414~416, 1972
 - 3) 上田 泰, 齊藤 篤, 松本文雄, 嶋田甚五郎, 大森雅久, 柴 孝也, 山路武久, 三枝幹文, 井原裕宣 : 抗生剤の腎毒性にかんする研究 (続報), Furosemide との併用の腎に及ぼす影響について. *Chemotherapy* 25 : 633, 1977
 - 4) 岩崎信一, 柴田哲夫, 佐藤 盛, 中川重仁, 米田豊昭, 高井 明 : T-1982 の毒性試験 (第2報) ラット3カ月間皮下投与と重急性毒性試験. *Chemotherapy* 30 (S-3) : 242~261, 1982
 - 5) LITWACK, G : Photometric determination of lysozyme activity. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 89:401~403, 1955
 - 6) OSSERMAN, E. F. & D. P. LAWLOR : Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 124 : 921~955, 1966
 - 7) CAMPBELL, J. A. H. : Subcutaneous fat necrosis, hemolysis without siderosis and renal tubular atrophy following repeated glycerol injections. *J. Path. Bact.* 76 : 473~481, 1958
 - 8) 小林千鶴子 : 抗生剤の腎毒性に関する実験的研究. *慈医誌* 89 : 46~61, 1974
 - 9) LUSCOMBE, D. K. & P. J. NICHOLLS : Possible interaction between cephaetrile and furosemide in rabbits and rats. *J. Antimicrob. Chemother.* 1 : 67~77, 1975
 - 10) 米田豊昭, 岩崎信一, 佐藤 盛, 中川重仁, 林智栄, 高井 明 : Cefoperazone (T-1551) の利尿剤併用時における腎障害作用. *Chemotherapy* 28 (S-6) : 292~306, 1980
 - 11) 古浜和久, 高山 敏, 加藤道幸, 山田明甫, 小野寺威, 秋元 建 : Cefoxitin の安全性に関する研究 (第3報) Cefoxitin, Cephalothin, Cephaloridine の利尿剤または血漿增量剤併用時における腎障害性. *Chemotherapy* 26 (S-1) : 195~203, 1978

TOXICITY TESTS OF T-1982 (VI)

Influence of T-1982 in combination with furosemide on the kidney

SHIGEHITO NAKAGAWA, TETSUO SHIBATA, SHIGERU SATO,
AKIO NAGAI, JUNKO INABA, TOYOAKI YONEDA and AKIRA TAKAI
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

T-1982, a newly developed cephamycin antibiotic, was injected intravenously at dose levels of 250 mg/kg and 1000 mg/kg to rats which were pretreated by glycerol (4 ml/kg, s.c.) and furosemide (50 mg/kg, s.c.). At 24 hrs after treatment, the influence of T-1982 on the kidney was examined in comparison with CET and CEZ by the urinalysis, the plasma urea nitrogen and creatinine and the renal morphological observations. In addition, T-1982 at 1000 mg/kg was given alone or in combination with furosemide (s.c.) to rats intravenously.

The following results were obtained.

- 1) Renal damage was seen neither in rats given T-1982 at 1000 mg/kg alone nor in rats given T-1982 at 1000 mg/kg + F.
- 2) Renal damage was severer in rats given T-1982 at 250 or 1000 mg/kg in combination with G + F. This tendency was clearer at the high dose level.
- 3) Toxic signs of the above renal damage was shown by the following observations; proteinuria, elevation of the plasma urea nitrogen and creatinine, necrosis of the renal tubular epithelium in microscopic findings and degenerative or necrotic changes of the proximal tubular epithelial cells in electron-microscopy.
- 4) Similar stretched renal damage was revealed by an additional injection of CET or CEZ to G + F pretreated rats.
- 5) In this experiment, the influence on the kidney appeared to be $CET \cong CEZ \cong T-1982$.