

合成抗菌剤 DL-8280 のウサギにおける 10 日間腎毒性

古濱和久・赤羽浩一・加藤道幸・山田明甫・小野寺威

第一製薬株式会社中央研究所

合成抗菌剤 DL-8280 の腎毒性を評価する目的で、雄ウサギに本薬剤 50 mg/kg または 200 mg/kg を 10 日間経口投与した。投与期間中腎機能検査を行い、投与終了後に病理学的検索を実施した。その結果、いずれの用量でも血清 creatinine, 血清尿素窒素, 尿蛋白, 尿 lysozyme, 尿酸素など各種の腎機能パラメータや腎の内眼のおよび組織学的所見において悪影響は認められなかった。一方、同じ条件下で cephaloridine (CER) の 150 mg/kg を 10 日間静注したウサギでは 1 例が腎障害により死亡するとともに生存例でも腎の機能的、形態的な変化が顕著で腎障害が明らかであった。以上、DL-8280 の 50 または 200 mg/kg を 10 日間経口投与したウサギでは腎に対して悪影響はみられなかった。

DL-8280 は新規合成されたオキサジン系抗菌剤である。一般的に抗菌剤では腎毒性が安全性評価上の重要な課題となっており、とくに本薬剤は経口投与後主として尿中にほとんど未変化体のまま排泄されることから腎に対する影響を把握しておく必要がある。抗菌剤の腎毒性に対し、各種実験動物のうちウサギが高い感受性を示すとされ、腎毒性の評価にしばしば用いられている。そこで、われわれはウサギに DL-8280 を 10 日間経口投与し腎に対する影響を機能、形態の両面から検討した。

I. 実験材料および方法

1. 被験薬物

DL-8280 (第一製薬中央研究所合成の Lot No. 109) および陽性対照薬 cephaloridine (CER, 塩野義, Lot No. KD 0515) を用いた。

2. 使用動物

実験には 14~16 週齢の雄性日本白色ウサギ (体重 2.5~3.0 kg) 16 匹を用いた。これらの動物は市川屋 (株) より購入し、1 ヶ月間環境に馴化させたのち、外観上健康良好と認められたものを選んで用いた。飼育はすべて室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の動物室内でウサギ用個別ケージに収容して行い、ウサギ用飼料 (GB-1, 船橋農場) および水 (水道水) を自由に摂取させた。

3. 薬物投与

1) 用量の設定

実験に先立ち、DL-8280 の 100, 200, 400 および 800 mg/kg を 4~7 日間ウサギに経口投与した。その結果、100~200 mg/kg では何ら毒性の発現はなかったが、400~800 mg/kg では体重の減少が認められた。そこで DL-8280 の用量は 50 および 200 mg/kg に設定した。CER の用量は確実に腎障害を起こすと考えられる 150 mg/kg とした¹⁾。

2) 実験群の構成

実験群は上記各投薬群に対照群を加えた 4 群とし、各群に 4 匹ずつを平均体重がほぼ均一になるように配分した。

3) 薬液の調整および投与方法

DL-8280 は 0.5% CMC 溶液で懸濁し、各用量とも 3 ml/kg の一定量をゴム製カテーテルにより経口投与した。CER は生理食塩水に溶解後 millipore filter で濾過滅菌し、3 ml/kg の一定量を 3 ml/min の注入速度で耳静脈内に注射した。対照群には 0.5% CMC 溶液を経口投与した。投与期間は昭和 56 年 9 月 1 日から 9 月 10 日までの 10 日間とし 1 日 1 回午前中に投与した。

4. 検査

1) 一般観察

投与期間中毎日、症状観察および体重測定を行った。

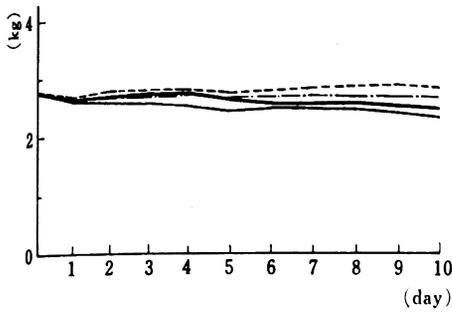
2) 腎機能検査

投与開始前および投与後 1, 5, 10 日にウサギを個別代謝ケージに移して 24 時間尿を採取し、ついで耳静脈より採血した。血清については creatinine および尿素窒素 (UN) を日立 716 型分析装置で測定した。また尿については尿量、浸透圧 (氷点降下法)、蛋白 (KINGSBURY-CLARK²⁾ 法)、lysozyme (lyso-plate³⁾ 法)、 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP, γ -GTP テストキット, 三共)、N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG, HASEBE⁴⁾ 法)、pH、糖、潜血 (Hemacombistix II, Ames 社) を検査した。

3) 腎の病理学的検査

投与期間中に死亡したウサギは発見後速やかに剖検するとともに腎を採取した。投与期間終了時まで生存したウサギはペントバルビタール麻酔下で放血屠殺し、左右

Fig. 1 Body weight changes in rabbits treated with DL-8280 or cephaloridine (CER)



— Control, --- DL-8280 50mg/kg, p.o.,
 --- DL-8280 200mg/kg, p.o., — CER 150mg/kg, i.v.

の腎を摘出して肉眼的に観察した後、重量を測取した。これらの腎は10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した後パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い組織学的に検索した。

II. 実験成績

1. 一般観察

1) 一般症状

DL-8280の50mg/kgおよび200mg/kgでは投薬に関連すると思われる一般状態の異常は認められなかった。CER群では4例中3例に食欲不振が投与3日より認められた。これらの動物のうち1例は自発運動の低下および削瘦が著明となり投与5日の採血中に死亡した。他の2例でも投与終了時に削瘦が著明であった。

2) 体重 (Fig. 1)

投与前後および対照群との比較において、DL-8280の50mg/kg群および200mg/kg群では投薬による影響は認められなかった。CER群では投与2日より減少傾向が観察された。

2. 腎機能検査 (Fig. 2, Fig. 3)

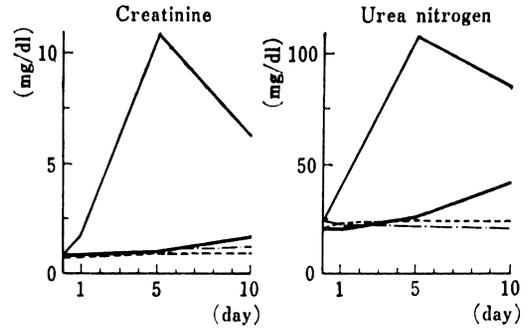
1) 血清生化学的検査

DL-8280の50mg/kgおよび200mg/kg群の血清creatinineおよびUNには投与期間を通じて変化はみられなかった。CER群では1例を除き投与初期より血清creatinineおよびUNに増加傾向がみられ投与終了時まで持続した。

2) 尿検査

DL-8280の50mg/kgおよび200mg/kgでは、いずれの検査値にも腎機能への悪影響を示唆する変化は認められなかった。CER群では投与1日後に蛋白の増加、 γ -GTPの増加傾向、尿糖陽性例の出現、投与5日後に浸透圧の低下、蛋白の増加傾向、lysozymeの増加、pHの酸性化傾向、投与10日後に浸透圧の低下傾向、蛋白の

Fig. 2 Serum creatinine and urea nitrogen values in rabbits treated with DL-8280 or cephaloridine (CER)



— Control, --- DL-8280 50mg/kg, p.o.,
 --- DL-8280 200mg/kg, p.o., — CER 150mg/kg, i.v.

増加傾向、lysozymeの増加、 γ -GTPおよびNAGの増加傾向、pHの酸性化、潜血の陽性例の出現が認められた。

3. 腎の病理学的検査

1) 腎重量 (Table 1)

DL-8280の50mg/kgおよび200mg/kg群の腎重量は、ともに対照群に比べて有意の変化を示さなかったが、CER群の腎重量は絶対および相対重量ともに対照群の約2倍となり増加傾向を示した。

2) 病理所見 (Table 2)

対照群、DL-8280の50mg/kgおよび200mg/kg群では、いずれの例にも腎に肉眼的および組織学的な変化が認められなかった (Photo. 1, Photo. 2)。一方、CER群では、2例において肉眼的に左右の腎に腫大、褪色、硬化および皮膚の微細白色点、白色線条が認められ、1例において腎皮質の微細白色点が認められた。これらの腎では、組織学的に近位尿管上皮の軽度ないし中等度の壊死および石灰化が認められた (Photo. 3)。

3) 途中死亡例

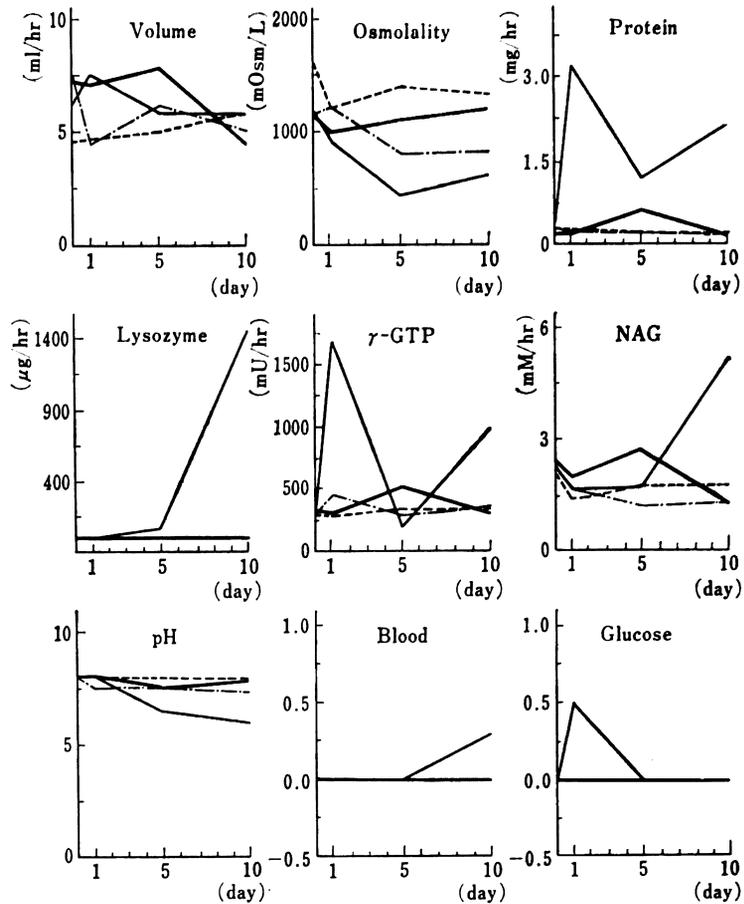
死亡したCER群の1例では剖検の結果、左右の腎に顕著な褪色および硬化が認められ、組織学的には近位尿管上皮細胞の強度の壊死および石灰化が認められた。これらの所見より強度の腎不全が死因と考えられた。

III. 総括および考察

オキサジン系合成抗菌剤DL-8280の腎に対する影響を評価する目的で、本薬剤50mg/kgまたは200mg/kgを雄ウサギに10日間経口投与し腎の機能および形態を検査した。また同じ条件下でcephaloridine (CER)の150mg/kgを10日間静注し同様の検査を行った。

その結果、一般観察ではDL-8280の50mg/kgおよ

Fig. 3 Urinalysis in rabbits treated with DL-8280 or cephaloridine (CER)



—Control, ---DL-8280 50mg/kg, p.o.,

---DL-8280 200mg/kg, p.o., — CER 150mg/kg, i.v.

Grades of urinary blood and glucose: 0 -, 0.5 ±, 1 +, 2 #, 3 #

Table 1 Group mean body and kidney weights in rabbits treated with DL-8280 and cephaloridine (CER)

Group	Control	DL-8280		CER
		50	200	
Dose (mg/kg)	0	50	200	150
No. of rabbits	4	4	4	3
Body weight (kg)	2.42 ± 0.01 ^{a)}	2.80 ± 0.16	2.65 ± 0.23	2.29 ± 0.14
Kidney (g)	14.57 ± 1.03	16.49 ± 0.97	13.98 ± 1.42	29.76 ± 6.33
(g/kg)	6.03 ± 0.45	5.90 ± 0.10	5.27 ± 0.16	13.42 ± 3.45

^{a)} Mean ± S.E.

び 200 mg/kg においては、一般状態および体重とも DL-8280 投与の影響は認められなかった。また投与 1, 5, 10 日後に行った血清および尿の各種腎機能パラメータの検査においても薬物の影響は認められず、10 日投

与後の腎の病理学的検査でも異常は観察されなかった。DL-8280 の類縁抗菌剤の腎毒性に関しては cinoxacin でラット尿路系に析出した結晶の機械的刺激に起因する腎盂、尿管および膀胱における粘膜上皮の増殖、腔の拡張、

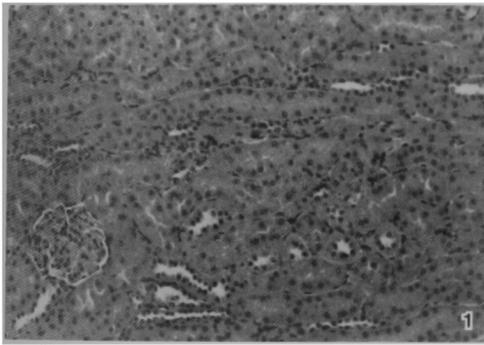
Table 2 Summary of pathological findings on kidneys in rabbits treated with DL-8280 and cephaloridine (CER)

Group	Control	DL-8280		CER
Dose (mg/kg)	0	50	200	150
No. of rabbits	4	4	4	3
Macroscopic findings				
Swelling, pale, harder consistency and many white streaks in cortex	0 ^{a)}	0	0	2
Many white spots in cortex	0	0	0	3
Microscopic findings				
Necrosis and calcification of proximal tubular epithelial cells	0	0	0	3 (1.7) ^{b)}

a) No. of rabbits showing change

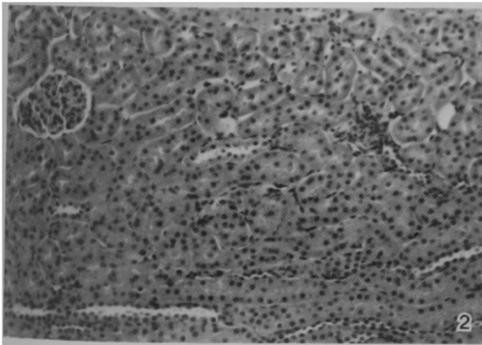
b) Group mean histopathological score

Photo. 1 Kidney from a control rabbit (H-E stain, $\times 100$)



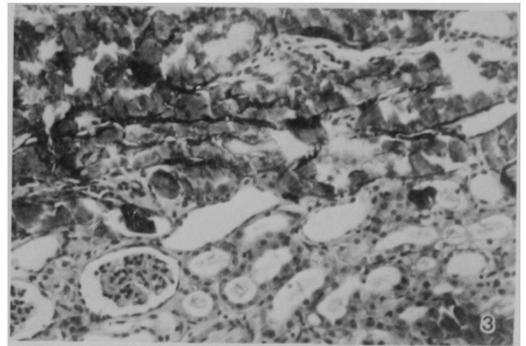
No noticeable change

Photo. 2 Kidney from a rabbit treated orally with 200 mg/kg of DL-8280 for 10 days (H-E stain, $\times 100$)



No noticeable change

Photo. 3 Kidney from a rabbit treated intravenously with 150 mg/kg of cephaloridine for 10 days (H-E stain, $\times 100$)



Remarkable necrosis and calcification of proximal tubular epithelial cells

比べて著しく高く、ラット、イヌへの高用量連投時にも尿路系に結晶の形成がみられないことから、結晶析出に起因する腎障害は起らないものと考えられた。

一方、CER 投与では投与5日に1例の死亡がみられ、また、血清 creatinine および UN も最高値を示したことから、この時期が本実験では、最も腎障害が強いことが推測された。尿検査では浸透圧の低下、蛋白、lysozyme, γ -GTP および NAG の増加ないし増加傾向、糖および潜血の陽性例の出現が認められたが、これらの変化は腎組織学的検査でみられた重篤な近位尿細管上皮の壊死を裏づける所見であった。すなわち、尿浸透圧は尿細管における濃縮能の指標として、尿蛋白は尿細管および糸球体の障害の指標として、尿 lysozyme は近位尿細管の再吸収能の指標として、尿 γ -GTP は近位尿細管上皮刷子縁の剝離、脱落の初期指標として、また、尿

腎尿細管細胞壊死などの報告があるが^{5,6)}、本薬剤は水への溶解度 (pH 7~8 では約 2,000 μ g/ml で、その前後では急激に溶解度が増す) が cinoxacin (57 μ g/ml) に

NAG は細胞崩壊時の指標として、それぞれ用いられており^{7,8)}、投与期間中の種々の変動は CER による腎の障害過程をよく表現していると考えられた。尿検査における他の所見として、pH の酸性化がみられたが、これは CER 投与ウサギでみられた削瘦または重篤な腎障害に付随した代謝性アシドーシスによると推測されたが、本態は明らかではない。なお、死亡例は食欲不振、削瘦、自発運動の低下が著明となり死亡したが、病理学的には腎は褪色、硬化し、近位尿管上皮の強度の壊死、石灰化がみられ、腎不全が死因と考えられた。CER のウサギ腎に対する影響については、これまでの報告^{1,9)}および本実験結果から近位尿管を中心とした上皮細胞の変性、壊死、管腔への硝子円柱の沈着、石灰化に要約されるが、DL-8280 では、このような腎毒性の徴候は全く認められなかった。

以上のごとく、DL-8280 の 50 mg/kg および 200mg/kg の用量ではウサギ腎に悪影響はみられず、ヒト臨床用量が 12 mg/kg であることを考慮に入れると、實際上 DL-8280 の腎毒性は無視し得るものと考えられた。

なお、本研究は昭和 56 年 8 月より昭和 57 年 4 月に実施した。

文 献

- 1) ATKINSON, R.M.; J.R. CURRIE, D.A. DAVIS, A.H. PRATT, H.M. SHARPE & E.G. TOMICH: Acute toxicity of cephaloridine, on antibiotic derived from

- cephalosporin C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 8: 398~406, 1966
- 2) KINGSBURY, F.B.; C.P. CLARK, G. WILLIAMS & A.L. POST: The rapid determination of albumin in urine. *J. Lab. Clin. Med.* 11: 981~989, 1926
- 3) OSSERMAN, E.F. & D.P. LAWLOR: Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 124: 921~955, 1966
- 4) HASEBE, K.: Biochemical studies on synovial fluid. I. Mucopolysaccharase activities in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Fukushima J. Med. Sci.* 15: 35~44, 1968
- 5) 奈良間功, 土谷 稔, 佐野正樹, 斉藤 実, 原田喜男: Cinoxacin の急性 および 亜急性毒性試験. *Chemotherapy* 28 (S-4): 406~439, 1980
- 6) GEMBA, M.; T. KOMAMURA, Y. MATSUSHIMA, T. ITOH, K. MIYATA & M. NAKAMUKA: Effect of cinoxacin on cellular metabolism and p-aminohippurate transport in kidney cortical slices in terms of its nephrotoxic action. *Toxicol. Lett.* 15: 49~56, 1983
- 7) 小林千鶴子: 抗生剤の腎毒性にかんする実験的研究. *慈医誌* 89: 46~61, 1974
- 8) PIPERNO, E.: Detection of drug induced nephrotoxicity with urinalysis and enzymuria assessment. *In Toxicology of the Kidney* (J.B. Hook, Ed.), Raven Press, pp. 31~55, 1981
- 9) SILVERBLATT, F.; M. TURCK & R.E. BULGER: Nephrotoxicity due to cephaloridine: a light- and electron- microscopic study in rabbits. *J. Infect. Dis.* 122: 33~44, 1970

TEN-DAY ORAL NEPHROTOXICITY STUDY ON DL-8280 IN RABBITS

KAZUHISA FURUHAMA, KOUICHI AKAHANE, MICHUYUKI KATO,
AKIMOTO YAMADA and TAKESHI ONODERA
Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

In order to evaluate the nephrotoxic potential, DL-8280 was administered by gavage at doses of 50 and 200 mg/kg for 10 days. A comparative study was performed by intravenous injection of 150 mg/kg of cephaloridine (CER) under the same condition. Serum and urinary biochemistry parameters were determined prior to dosing and after 1, 5, and 10 days of dosing.

Pathologic examinations on the kidney were performed following the terminal dosing.

The administration of DL-8280 had no effects on renal functional parameters such as serum creatinine and urea nitrogen, and urinary protein, lysozyme and enzymes. There were also no morphological abnormalities in kidneys from rabbits treated with DL-8280.

On the other hand, rabbits receiving CER showed renal injuries; elevation of serum creatinine and urea nitrogen, proteinuria, lysozymuria and enzymuria; necrosis and calcification of the proximal tubular epithelial cells. One rabbit given CER died of marked nephropathy on Day 5 of dosing.

These results suggest that DL-8280 has no nephrotoxic potential under the present experimental condition.