

Cefclidinのウサギにおける単回静脈内投与による腎毒性試験

細川 暁, 岡田文弘, 見上 孝, 西村 修, 大角 勇, 松原孝雄
エーザイ株式会社安全性研究部*

新しいcephalosporin系抗生物質であるcefclidin (CFCL)の腎障害性を, ウサギを用いてcefazolin (CEZ) およびcephalothin (CET) と比較検討した。6カ月齢の雄ウサギにCFCL 500および2,000mg/kg, CEZ 2,000mg/kg およびCET 2,000mg/kg を1回静脈内投与した。

CFCL 500mg/kgでは腎障害は認められなかった。CFCL 2,000mg/kg では, 内因性クレアチニンクリアランスの低下, 病理組織学的には近位尿細管上皮細胞の空胞化が認められた。CET 2,000mg/kgでは, 病理組織学的に少数例で近位尿細管上皮細胞の空胞化が認められた。CEZ 2,000mg/kgでは明らかな腎障害が認められ, 尿蛋白の増加, 内因性クレアチニンクリアランスの低下, 尿中 γ -GTP排泄の増加, 尿中 PSP排泄率の低下が認められた。病理組織検査では, 近位尿細管上皮細胞の空胞化および壊死を主体とした変化が認められた。

以上の結果から, CFCLの腎障害性の程度は, CEZと比較して明らかに弱く, CETよりやや強いものと考えられた。

Key words : ウサギ, 単回静脈内投与, 腎毒性

Cefclidin (CFCL) は, エーザイ株式会社にて新たに開発されたcephalosporin系抗生物質である。一般的にcephalosporin系抗生物質の副作用として腎障害性が広く知られているが, これら抗生物質の開発に際してその腎障害性を把握する事は重要な課題の一つである。CFCLの腎障害性についてはすでにラットを用いた腎毒性試験¹⁻²⁾において, その腎障害性は軽微である事が明らかとなっている。一方, Atkinsonら³⁾は, cephalosporin系抗生物質の腎障害性にはイヌやラットに比べウサギが最も感受性が高い種である事を報告している。

そこで今回, ウサギを用いてCFCLの腎障害性を検討するとともに, その腎障害性についてcefazolin (CEZ) およびcephalothin (CET) と比較した。

I. 材料および方法

1. 被検物質

CFCLは5%および20% (w/v), CEZ (藤沢薬品工業) およびCET (塩野義製薬) は20% (w/v) になるように生理食塩液を用いて溶解した。いずれも溶解後は0.45 μ mのミリポアフィルターを用いて濾過後使用した。

2. 供試動物および飼育環境

当社で自家繁殖したJW-NIBS雄ウサギを5カ月齢で搬入し, 約1カ月間予備飼育し, 6カ月齢の体重

2.37~2.88kgで実験に使用した。

実験は温度21~25 $^{\circ}$ C, 湿度45~60%, 照明時間7:00~19:00, 換気回数10回以上/hrに設定された環境下で行った。飼料はオリエンタル酵母(株)製のウサギ用固型飼料RC-4, 飲水は紫外線照射滅菌水をいずれも自由に摂取させた。なお, 被検物質投与後は水のみを与えて絶食とした。

3. 投与量および投与方法

投与量および群構成はTable 1に示した。投与は臨床での投与ルートに準じ静脈内投与とし, それぞれの所定量を耳静脈より1回投与した。投与容量は10ml/kgとし, 投与直前の体重を基に算定した。なお, 対照群には生理食塩水を投与した。

4. 検査項目および方法

1) 一般観察

投与日と投与後1日に一般状態, 死亡の有無, 体重および摂餌量を測定した。

2) 血液生化学的検査

投与日と投与後1日にヘパリン添加注射器を用いて耳静脈より採血し, 得られた血漿についてBUN(酵素法) およびクレアチニン (Jaffé法) を測定した。

3) 尿検査

投与日と投与後1日に, 代謝ケージおよびカテーテルを用いて24時間尿を採取し, 尿量, pH・蛋白・ケト

*〒501-61 羽島郡川島町竹早町1

Table 1. Experimental design

| Antibiotics | Dose (mg/kg) | No. of animals |
|-------------|--------------|----------------|
| Control | 0 | 6 |
| Cefclidlin | 500 | 6 |
| Cefclidlin | 2000 | 6 |
| Cefazolin | 2000 | 6 |
| Cephalothin | 2000 | 6 |

Table 2. Plasma BUN and creatinine of the rabbits after single intravenous administration with cefclidlin, cefazolin and cephalothin

| Group | BUN (mg/dl) | Creatinine (mg/dl) |
|------------------|--------------|--------------------|
| Control | 18.65 ± 0.91 | 1.168 ± 0.047 |
| Cefclidlin 500 | 19.63 ± 1.13 | 1.068 ± 0.037 |
| Cefclidlin 2000 | 21.35 ± 1.19 | 1.201 ± 0.066 |
| Cefazolin 2000 | 21.83 ± 1.54 | 1.281 ± 0.069 |
| Cephalothin 2000 | 21.61 ± 1.23 | 1.320 ± 0.032* |

*0.01 < p < 0.05 compared with control

Table 3. Urinalysis of rabbits after single intravenous administration with cefclidlin, cefazolin and cephalothin

| | Control | Cefclidlin 500 | Cefclidlin 2000 | Cefazolin 2000 | Cephalothin 2000 |
|----------------------|----------------------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|
| No. of rabbits | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Volume (ml/24hr) | 133.6 ± 25.2 ¹⁾ | 110.8 ± 24.3 | 161.3 ± 31.4 | 159.6 ± 30.5 | 156.6 ± 14.4 |
| γ-GTP (IU/24hr) | 4.30 ± 1.05 | 2.96 ± 0.50 | 6.07 ± 0.77 | 7.44 ± 0.72* | 2.37 ± 0.29 |
| Creatinine (mg/24hr) | 123.9 ± 6.0 | 87.9 ± 7.7** | 59.9 ± 7.2** | 105.9 ± 4.8 | 176.7 ± 9.2** |
| pH | 6 | 3 | 5 | 3 | 4 |
| | 7 | 2 | 1 | 3 | 0 |
| | 8 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| | | | | | |
| Protein | - | 4 | 3 | 2 | 0 |
| | ± | 1 | 2 | 4 | 0 |
| | + | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | # | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | ## | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Glucose | - | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Ketone bodies | - | 6 | 6 | 4 | 5 |
| | + | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Occult blood | - | 2 | 4 | 3 | 4 |
| | ± | 2 | 0 | 1 | 0 |
| | + | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | # | 2 | 0 | 1 | 1 |
| | ## | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Bilirubin | - | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Urobilinogen | NR ²⁾ | 6 | 6 | 6 | 6 |

1) Mean ± S.E. 2) NR: normal *0.01 < p < 0.05, **p < 0.01 compared with control

Table 4. PSP excretion and Ccr₂₄ in rabbits after single intravenous administration of cefclidlin, cefazolin and cephalothin

| Group | PSP excretion (%) | Ccr ₂₄ (ml/min) |
|------------------|-------------------|----------------------------|
| Control | 77.03 ± 7.65 | 7.388 ± 0.350 |
| Cefclidlin 500 | 64.53 ± 4.96 | 5.715 ± 0.457* |
| Cefclidlin 2000 | 69.76 ± 7.37 | 3.591 ± 0.585** |
| Cefazolin 2000 | 47.83 ± 1.87* | 5.775 ± 0.237** |
| Cephalothin 2000 | 70.36 ± 8.63 | 9.296 ± 0.444** |

*0.01 < p < 0.05, ** p < 0.01 compared with control

Table 5. Kidney weight of rabbits after single intravenous administration with cefclidlin, cefazolin and cephalothin

| Group | Absolute (g) | Relative (weight/100g bw) |
|------------------|--------------|---------------------------|
| Control | 14.44 ± 0.50 | 5.686 ± 0.154 |
| Cefclidlin 500 | 14.65 ± 0.61 | 5.800 ± 0.140 |
| Cefclidlin 2000 | 14.94 ± 0.40 | 5.783 ± 0.111 |
| Cefazolin 2000 | 15.71 ± 0.29 | 6.435 ± 0.258* |
| Cephalothin 2000 | 13.61 ± 0.41 | 5.388 ± 0.070 |

*0.01 < p < 0.05 compared with control

Table 6. Macroscopic and microscopic findings on kidneys of rabbits after single intravenous administration with cefclidin, cefazolin and cephalothin

| Findings \ Dose | Control | Cefclidin 500 | Cefclidin 2000 | Cefazolin 2000 | Cephalothin 2000 | |
|--|---------|---------------|----------------|----------------|------------------|---|
| Macroscopy | | | | | | |
| Swelling | - | 6 | 6 | 6 | 2 | 6 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Discoloration of cortex | - | 6 | 6 | 2 | 0 | 5 |
| | ± | 0 | 0 | 4 | 2 | 1 |
| | + | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | # | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Microscopy | | | | | | |
| Swelling of proximal tubular epithelium | - | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Vacuolization of proximal tubular epithelium | - | 6 | 6 | 0 | 0 | 4 |
| | ± | 0 | 0 | 5 | 6 | 2 |
| | + | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Necrosis of proximal tubular epithelium | - | 6 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| | + | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| Dilatation of tubular lumen | - | 6 | 6 | 5 | 2 | 6 |
| | ± | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | + | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Hyaline cast | - | 6 | 6 | 6 | 5 | 6 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Round cell aggregate, focal | - | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 |
| | ± | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

- ; negative, ± ; slight, ± ; moderate, # ; marked

ン体・潜血・グルコース（ラプスティックスIII，マイルス三共），ビリルビン・ウロビリノーゲン（BMテストBU，BM社）を測定した。さらに γ -GTP総排泄量（Szasz法）およびクレアチニン総排泄量（Jaffè法）についても測定した。

4) クレアチンクリアランス

血漿および尿についてクレアチニン濃度を測定し、24時間内因性クレアチンクリアランス（Ccr24）を算出した。

5) PSPテスト

投与後1日に各群の半数例について以下の手順でPSPテストを実施した。

カテーテルを用いて完全に排尿させた後、水（50ml/匹）を強制経口投与した。約30分後0.6% PSP（phenolsulfonphthalein injection，第一製薬）0.2mlを耳静脈より投与した。PSP投与60分後にカテーテルを用いて膀胱尿を採取した。尿中PSP濃度は採取した尿に10%NaOHを数的加え発色させ比色定量（545nm）

し、PSP投与絶対量に対する排泄絶対量の割合（PSP排泄率）を算出した。

6) 病理学的検索

投与後1日に屠殺銃を用い致死せしめ、諸臓器の肉眼観察を行うとともに腎を採取し、腎の湿重量を測定した。10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後H-E染色およびPAS染色を施し組織学的観察を実施した。

また、各群の半数例については腎皮質の一部を2%グルタルアルデヒドおよび2%オスミウム酸による二重固定を実施し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片作製後、酢酸ウラニルおよび鉛混合液による二重染色を実施し、透過型電子顕微鏡（日本電子JEM-100S）を用いて観察した。

7) 統計学的処理

各検査項目について対照群と薬物投与群との間でStudent t-検定を行った。

II. 結 果

1. 一般観察

一般状態および体重の変化は、いずれの群においても認められなかった。摂水量はCET2,000mg/kg群で有意な増加を示し、CFCL2,000mg/kgおよびCEZ2,000mg/kg群で増加傾向を示した。

2. 血液生化学的検査 (Table 2)

BUNはいずれの群でも変化は認められなかった。クレアチニンはCET2,000mg/kg群で有意な増加が認められた。

3. 尿検査 (Table 3)

尿量はCFCL 500mg/kg群で減少傾向を示した。 γ -GTP排泄量では、CFCL2,000mg/kg群で増加傾向、CEZ2,000mg/kg群で有意な増加が認められた。尿中クレアチニンに関してはCFCL2,000mg/kg群で尿量の減少に依存した総排泄量の低下が認められ、CFCL2,000mg/kg群では有意な低下、CEZ2,000mg/kg群では低下傾向が認められた。尿蛋白はCEZ2,000mg/kg群で増加する個体が多く認められた。その他、CFCL、CEZおよびCET2,000mg/kg群の少数例でケトン体陽性を示す個体が認められた。pH、グルコース、潜血およびビリルビンについては、対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。

4. PSP テストおよびクレアチンクリアランス (Table 4)

PSP排泄率はCEZ2,000mg/kg群で有意な低下が認められたが、他の投与群では影響は認められなかった。クレアチンクリアランスは、CFCL 500, 2,000mg/kgおよびCEZ2,000mg/kg群で有意な低下が認められた。また、CET2,000mg/kg群では有意な上昇を示した。

5. 病理学的所見

1) 腎重量 (Table 5)

CEZ2,000mg/kg群で相対重量の有意な増加が認められたが、その他の薬物投与群では異常はみられなかった。

2) 腎の肉眼所見 (Table 6)

CFCL 500mg/kg群の1例に腎の白色腫瘍(腎芽腫)が認められたが、その他の個体には異常は認められなかった。CFCL2,000mg/kg群では、腎皮質の軽度な退色を示す個体が認められた。CEZ2,000mg/kg群では、全例が軽度～高度に腎皮質の退色を呈し、さらに腫大を伴う個体も認められた。CET2,000mg/kg群では、1例に腎皮質の退色が軽度に認められた。

3) 光顕による腎の組織所見 (Table 6)

CFCL 500mg/kg群では異常は認められなかった(Photo 1)。CFCL2,000mg/kg群では、近位尿細管

上皮細胞の空胞化が軽度～中等度に認められ(Photo 2)、尿細管の拡張を示す個体もみられた。CEZ2,000mg/kg群では、近位尿細管上皮細胞の空胞化、壊死、尿細管拡張さらに尿円柱など強い腎障害が認められた(Photo 3)。CET2,000mg/kg群では、少数例に近位尿細管上皮細胞の腫大、空胞化を認めたのみであった(Photo 4)。

4) 腎の電顕所見

CFCL 500mg/kg群では異常は認められなかった。CFCL2,000mg/kg群では、近位尿細管上皮細胞におけるapical vacuoleの拡張と増加、種々の電子密度のlysosomal dense body (Photo 5)の増加およびゴルジ装置の肥大が認められ、さらに細胞間隙の拡張および小胞体の拡張を示す尿細管も認められた。CEZ2,000mg/kg群では、上記変化に加え刷子縁の脱落、ミトコンドリアの膨化、basal infoldingの消失、核クロマチンの凝集と核膜の断列、さらにcytosegresomeの出現も認められた(Photo 6)。また、比較的障害の少ない尿細管では、lysosomal dense bodyの破壊像を示すと思われる電子密度が不均一で膜構造の不明瞭な小体も認められた(Photo 7)。CET2,000mg/kg群では、apical vacuoleの拡張と増加、lysosomal dense bodyの増加およびゴルジ装置の肥大が認められ、一部の尿細管では小胞体の拡張もみられた(Photo 8)。

III. 考 察

一般的にcephalosporin系抗生物質の毒性として、腎障害が知られている。その腎障害性についてはcephaloridin (CER)が最も強く、CETは比較的弱いものとされており、CEZはその中間に位置するものと考えられている⁹⁾。今回、CFCLの腎障害性を把握する目的で、cephalosporin系抗生物質の腎障害に対し感受性が高いとされているウサギを用いてCEZおよびCETとの腎障害性の比較を行った。

CEZをウサギに単回大量投与した場合、近位尿細管上皮細胞の壊死を招来し、機能的にも異常を起こすことが報告されている^{5,6)}。本試験においても、CEZ2000mg/kgの単回投与により高度な腎障害が認められた。即ち、腎重量増加、PSP排泄率低下、尿中 γ -GTP排泄増加等が認められ、組織学的にも近位尿細管上皮細胞の変性・壊死を主体とした変化が認められた。抗生物質による腎障害の病理発生についてはWatanabe⁷⁾は以下の様に推察している。抗生物質をラットに投与した場合、近位尿細管上皮においてendocytosisあるいはpinocytosisにより取り込まれ、heterolysosomeを形成するが、腎障害性の強いGentamycinやCERはlysosomeの破壊を招来し細胞死に到らしめる。しかし、腎障害性の弱いCETやcephacetrileではlysosome

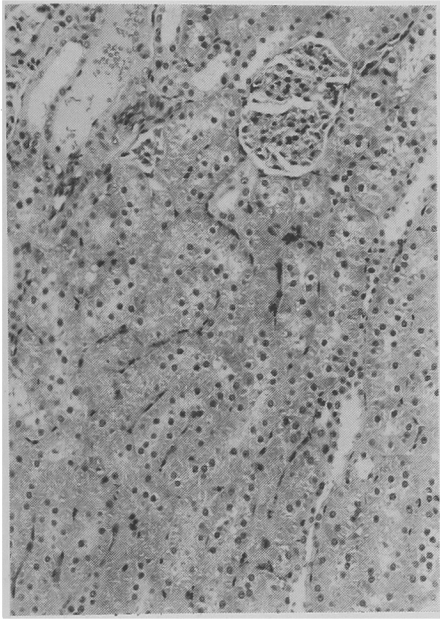


Photo 1. No remarkable changes are seen.
Cefclidin 500mg/kg, $\times 150$

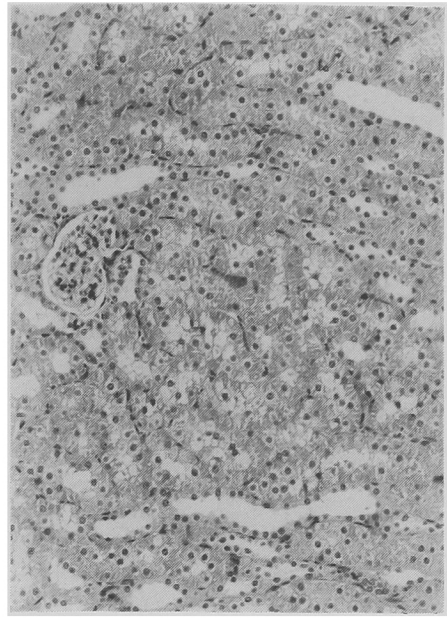


Photo 2. Vacuolization of proximal tubular
epithelium.
Cefclidin 2,000mg/kg, $\times 150$

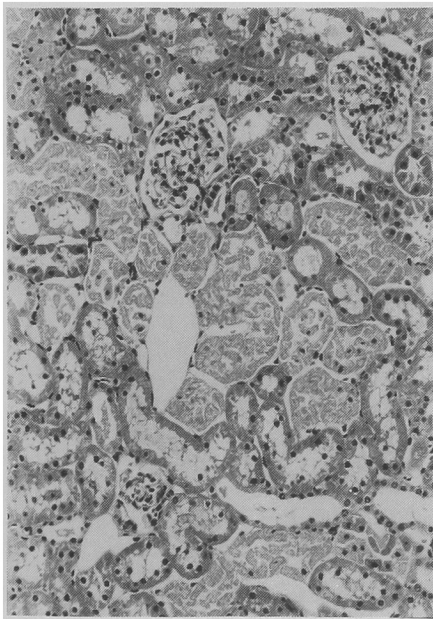


Photo 3. Necrosis of proximal tubular
epithelium.
Cefazolin 2,000mg/kg, $\times 150$

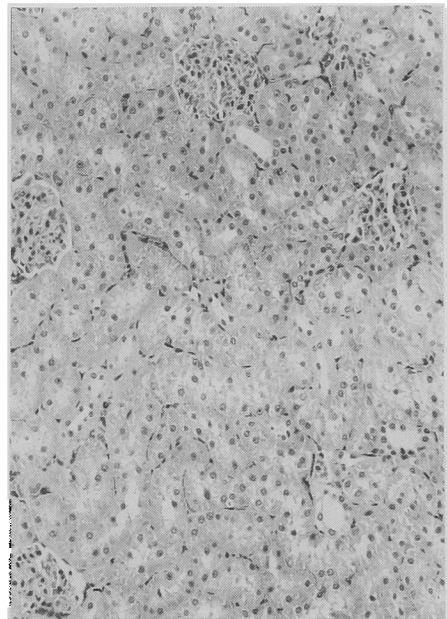


Photo 4. Mild vacuolization of proximal
tubular epithelium.
Cephalothin 2,000mg/kg, $\times 150$

の破壊は認められないことから、lysosomeの破壊の有無が腎障害の一要因となっているとしている。今回の試験においても、CEZ 2,000mg/kg群において高度な近位尿細管上皮細胞の壊死、さらにlysosomal dense body (heterolysosome)の破壊像と考えられるdensity

の不均一で膜構造の不明瞭な小体が認められたことから、CEZ投与による近位尿細管上皮細胞の壊死はlysosomeの破壊が一因となっているものと考えられた。

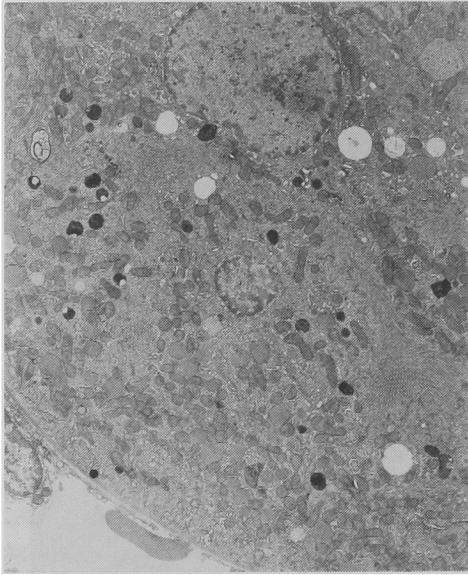


Photo 5. Dilatation of apical vacuole and increase of lysosomal dense bodies in proximal tubular epithelium.
Cefaclidin 2,000mg/kg, $\times 3,900$

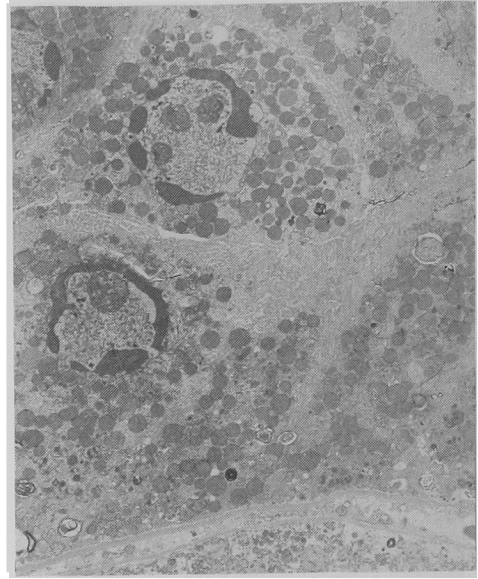


Photo 6. Aggregation of nuclear chromatin, swelling of mitochondria and deformation of brush border in proximal tubular epithelium.
Cefazolin 2,000mg/kg, $\times 3,900$

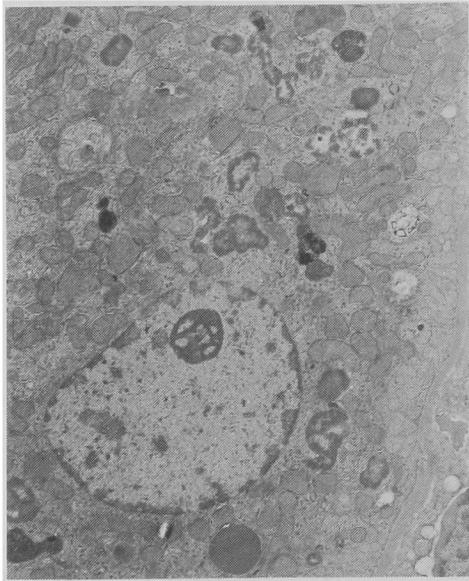


Photo 7. Destruction of lysosomal dense body in proximal tubular epithelium.
Cefazolin 2,000mg/kg, $\times 6,500$

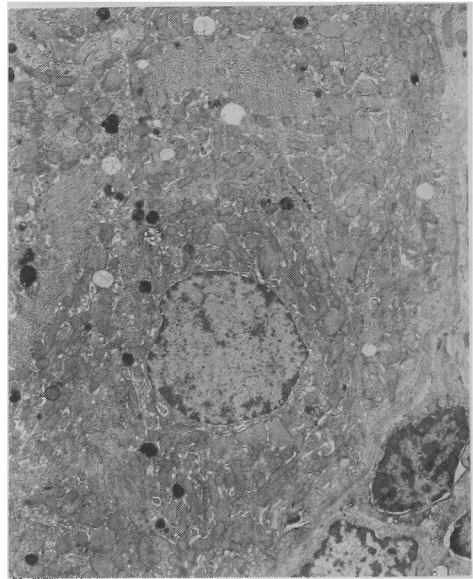


Photo 8. Dilatation of apical vacuole and increase of lysosomal dense bodies in proximal tubular epithelium.
Cephalothin 2,000mg/kg, $\times 3,900$

一方、CFCL 2,000mg/kg群においては、Ccr24の低下、尿中 γ -GTP排泄の増加傾向、組織学的には近位尿細管上皮細胞の空胞化などが認められ、軽度な腎障害性が示唆された。また、電顕的には細胞間隙の拡張と小胞体の拡張、さらに endocytosis を示す apical

vacuoleの拡張と増加、heterlysosomeと考えられる lysosomal dense bodyの増加が認められた。しかし、lysosomal dense bodyの破壊像やそれに由来する細胞崩壊像は認められず、CFCLの腎障害の機序はCEZのそれとは異なるものと考えられた。なお、CECL 500

mg/kg群においてCcr24の低下が認められたが、尿量の偶発的な低下がみられること、さらに血中クレアチニン濃度に差のないことから、尿量の減少により見かけ上Ccr24が低下したものであり、CFCLのtoxicな作用を示すものではないと判断された。

CET 2,000mg/kg群では、血液生化学検査および尿検査では腎の異常を示唆する所見は認められなかったが、光顕的に近位尿細管上皮細胞の空胞化と電顕的に小胞体の拡張が認められたのみであり、その障害性は軽微であった。なお、CET 2,000mg/kg群で認められた血中および尿中クレアチニン増加とCcr24の増加については測定法(Jaffe法)に対する干渉によるものであり⁹⁾、CETの腎障害性を示唆するものではないと判断された。

以上の結果より、CFCLをウサギに大量単回静脈内投与した場合の腎障害性の程度はCEZより明らかに弱く、CETよりやや強いものと考えられた。

文 献

- 1) 岡田文弘, 川口 隆, 細川 暁, 松原孝雄: Cefclidineのラットにおける単回静脈内投与による腎毒性試験—FurosemideおよびGlycerol併用による腎障害増強効果—. *Chemotherapy* 40(S-4) 154-161, 1992.
- 2) 岡田文弘, 川口 隆, 後藤 公孝, 松原孝雄: Cefclidineのラットにおける連続静脈内投与による腎毒性試験. *Chemotherapy* 40(S-4) 162-172 1992.
- 3) Atkinson R M, Currie J P, Davis B, Pratt D A H, Sharpe H M & Tomich E G Acute toxicity of cephaloridine, an antibiotic derived from cephalosporin C. *Toxico Appli Pharmacol* 8 398-406, 1966
- 4) 上田 泰, 斉藤 篤, 内浦玉堂: 抗生剤の腎障害性について. *月刊薬事* 17:1867-1871, 1975
- 5) 原田喜男, 岡本孝夫, 豊島久美子: 腎毒性を指標にしたCefamandoleの家兎における毒性試験—単回および7日間連続投与試験とその回復生試験. *Chemotherapy* 27 701-738, 1979
- 6) 二木力夫, 柿本守夫, 宇佐美正義, 鈴木繁生, 高垣喜男: Ceftezoleのウサギ腎臓に対する影響, とくに Cefazolinとの比較検討を中心に. *Chemotherapy* 24 703-721, 1976
- 7) Watanabe M Drug-induced lysosomal changes and nephrotoxicity in rats. *Acta Path Jap* 28 867-889, 1978.
- 8) 高山 敏, 古浜和久, 小野寺威, 秋本健: Cefoxitinの安全性に関する研究 第2報 Cefoxitin, Cephalothin, Cefazolinのビーグル犬血液生化学的検査値への影響. *Chemotherapy* 26 176-184, 1978

NEPHROTOXICITY STUDY OF CEFCLIDIN BY SINGLE INTRAVENOUS INJECTION IN RABBITS

Satoru Hosokawa, Fumihiko Okada, Takashi Mikami, Isao Osumi and Yoshio Matsubara

Department of Drug Safety Research, Eisai Co., Ltd.

1 Takehaya-cho, kawasima-cho, Hashima-gun 501-61, Japan

Nephrotoxicity of cefclidine (CFCL), a new cephalosporin antibiotic, was studied in 6 months-old male rabbits, using two reference drugs, cefazolin and cephalothin. Test doses of 500 and 2,000 mg/kg for CFCL, and 2,000 mg/kg for cefazolin and cephalothin, were administered intravenously.

CFCL was non-nephrotoxic at 500 mg/kg. CFCL reduced endogenous creatinine clearance and induced some pathological changes such as proximal tubular vacuolization at 2000 mg/kg. Cephalothin induced only pathological changes such as proximal tubular vacuolization at 2,000 mg/kg. The nephrotoxicity of cefazolin was most obvious. Cefazolin induced proteinuria, decreased endogenous creatinine clearance and PSP excretion rate, increased relative kidney weight, and induced some pathological changes such as proximal tubular vacuolization and necrosis at 2,000 mg/kg.

In conclusion, CFCL was less nephrotoxic than cefazolin, but slightly more nephrotoxic than cephalothin in rabbits.