

腎皮質糖新生能におよぼす β -ラクタム系抗生物質の影響

—加齢による変化—

仲田浄治郎・増田富士男・小野寺昭一

近藤 泉・古田 希・鈴木 英訓

慈恵医大泌尿器科*

(平成6年2月3日受付・平成6年3月25日受理)

幼若ラット (2~3か月齢) と成熟ラット (8~10か月齢) の Fischer 344 雄性ラットを用い、加齢に伴う腎皮質糖新生能の変化を検討した。腎皮質糖新生能は、飼育ラットを屠殺後、ただちに用手的に腎皮質スライスを作製し、10 mM ピルビン酸を基質として Krebs-Ringer buffer で incubation し新生された糖を測定した。さらに β -ラクタム系抗生物質による腎皮質糖新生能への影響を、幼若ラットと成熟ラットで比較した。 β -ラクタム系抗生物質非存在下45分、90分 incubation で新生される糖は、幼若ラット、成熟ラットの両群とも有意な差はみられなかった。しかし5mM β -ラクタム系抗生物質存在下での糖新生能の抑制の程度は抗生物質非存在下での糖新生能に対して幼若ラットでは cephaloridine (CER) で18.7%、penicillin G (PCG) では15.5%の抑制がみられた。一方、成熟ラットでは CER で28.2%、PCG で29.9%と成熟ラットにより強く抑制がみられた。加齢により β -ラクタム系抗生物質による腎皮質糖新生能におよぼす影響は強まることが示唆された。

Key words: renal gluconeogenesis, aging, β -lactum antibiotics

老化に関する生理学的な解析は、医学的にもまた社会的にもきわめて重要な問題の一つとなっており、すでに老化と身体諸臓器機能に関しての多くの論文がみられる。生体代謝の主要臓器の一つである腎臓、特にその糸球体の形態と機能的変化についての研究もすでに多面的な研究が行われている。しかし加齢の影響を腎の機能単位である尿細管の代謝からみたものは決して多くない。

本研究では尿細管の代謝の指標として、血糖の維持や酸塩基平衡に関与する糖新生¹⁻³⁾に注目し、ラット腎を用い加齢に伴う腎皮質糖新生能を比較検討した。一方、 β -ラクタム系抗生物質のなかでも cephaloridine は腎障害を起こす作用がみられ発現部位は近位尿細管であり、その障害によりラット腎の糖新生能が抑制される作用がみられることはすでに報告されている⁴⁾。加齢による β -ラクタム系抗生物質による糖新生能の抑制の程度も比較検討した。

I. 材料と方法

1. 実験動物

6週齢の Fischer 344 ラットを室温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル12時間で、1ケージに3~4匹ずつ動物を飼育した。

水分(水道水)と、飼料(CE-2, Japan Clea K.K.)は自由に摂取させた。2~3か月齢となったものを幼若ラットとして実験に使用し、また8~10か月齢になったものを成熟ラットとした。

2. 方法

腎皮質スライスによる糖新生の測定

ラットを屠殺後、腎を摘出し両刃用のカミソリを用い用手的に腎皮質スライスを作製した。30 ml 用三角フラスコを用い10 mM ピルビン酸を基質とした5 ml の Krebs-Ringer (K-R) bicarbonate buffer (NaCl 138 mM, CaCl_2 1.33 mM, KCl 5.6 mM, MgCl_2 1 mM, NaH_2PO_4 1 mM, NaHCO_3 11 mM, pH 7.4) に50~100 mg の腎皮質スライスを添加した。その三角フラスコを19G 針で好氣的に95% O_2 、5% CO_2 ガスで30秒間、十分に飽和した。ついで 37°C 下100回/分で45~90分 incubation した後、スライスの湿重量を測定した。新生された糖をヘキソキナーゼ/G 6 P 脱水素酵素法により吸光度計 (Shimadzu 社製, DOUBLE-BEAM SPECTROPHOTOMETER UV-150-02) を用いて測定した⁵⁾。10 mM ピルビン酸を

* 東京都葛飾区青戸 6-41-2

基質とした K-R bicarbonate buffer に β -ラクタム系抗生物質を 5 mM の条件で加え同様の実験を行った。ピルビン酸から産生される糖を β -ラクタム系抗生物質非存在下での糖新生能を対照として、5 mM 抗生物質存在下での糖新生能と比較検討した。また抗生物質存在下による糖新生能の抑制の程度を幼若ラットと成熟ラットの 2 群で比較検討した。 β -ラクタム系抗生物質として cephaloridine (CER), cephalexin (CEX), cephalothin (CET), penicillin G (PCG) を用いた。

以上の測定結果は、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) で求め、統計処理にあたっては *t* 検定にて $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

II. 結 果

幼若ラット (2~3 か月齢) の腎皮質糖新生能は、10 mM ピルビン酸を基質とした場合、45 分 incubation で 35.2 ± 2.2 nmoles/45 min/mg (N=6) であった。90 分 incubation では 54.5 ± 2.8 nmoles/90 min/mg (N=6) で、45 分値と比べてほぼ直線的に産生の増加がえられた。

成熟ラット群でも 45 分 incubation で 38.3 ± 0.82 nmoles/45 min/mg (N=6) の糖の産生がみられ、90 分 incubation では 53.4 ± 2.3 nmoles/90 min/mg (N=6) であり同様な傾向がみられ、2 群間では有為差はみられなかった (Fig. 1)。以上より incubation 時間は 45 分とした。

2~3 か月齢の幼若ラット腎では、抗生物質非存在下でのコントロールと比較して 5 mM 抗生物質存在下では、CET で 23%、CER で 19% と有意に糖新生

能の抑制がみられ、PCG や CEX でも軽度の抑制傾向がみられた (Fig. 2)。8~10 か月齢の成熟ラット腎では、PCG で 30%、CET で 29%、CER で 28% の抑制作用がみられ、2~3 か月齢の幼若ラットに比べてより強く糖新生能の抑制がみられた (Fig. 3)。Fig. 4 は、腎皮質糖新生能におよぼす β -ラクタム系抗生物質の抑制を 2 群間で比較したもので、PCG では 8~10 か月齢の成熟ラットの方が、2~3 か月齢の幼若ラットに比べ有意に抑制作用が強くみられ、また CET、CER でも同様の傾向が認められた。

III. 考 察

加齢に伴う腎臓の生理的变化については、特に尿細

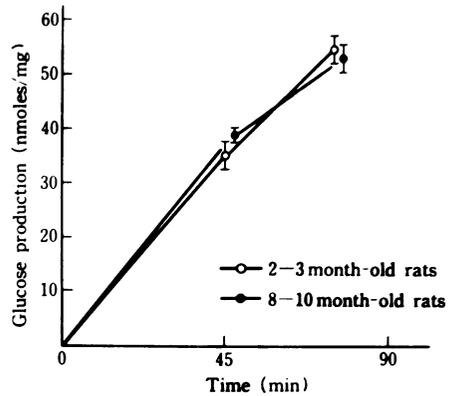


Fig. 1. Time course of renal cortical gluconeogenesis of young adult rats (2-3 months) and adult rats (8-10 months).

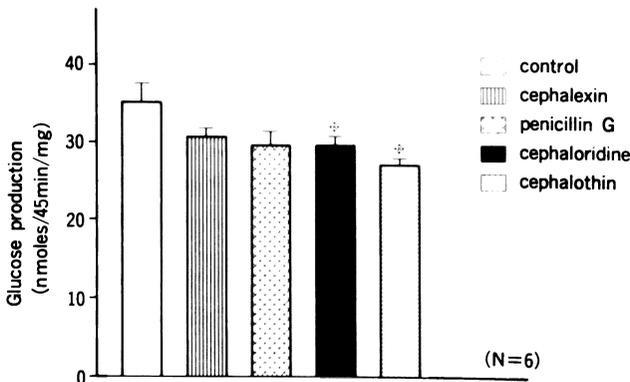


Fig. 2. Influence of beta-lactam antibiotics on renal cortical gluconeogenesis from 10 mM pyruvate in young adult rats (2-3 months).

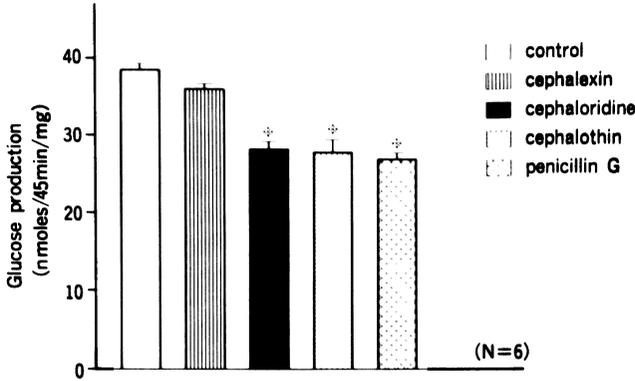


Fig. 3. Influence of beta-lactam antibiotics on renal cortical gluconeogenesis from 10 mM pyruvate in adult rats (8-10 months).

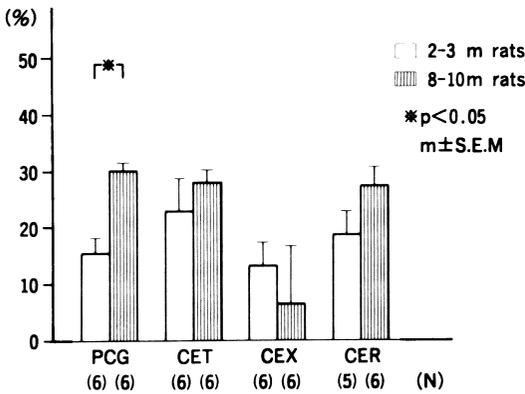


Fig. 4. Comparison of the degree of inhibition of renal gluconeogenesis by beta-lactam antibiotics in young adult rats and adult rats.

管では電解質、糖、アミノ酸の再吸収や分泌および vasopressin による尿濃縮力の生理学的な研究などを中心に行われてきた^{6,7)}。しかし加齢に伴うネフロンとしての尿細管代謝についての研究は少なく、糖新生能についての研究はほとんどみられていない。

加齢による腎の形態的变化は、ラットにおいては糸球体では3か月齢でメサンジウムや糸球体基底膜の肥厚がおこりはじめ19か月齢では著明にその肥厚が進行してくると報告されている⁸⁾。尿細管については1歳齢で近位尿細管の曲部で局所的に細胞の壊死や刷子縁の脱落等がみられるようになり、直部では曲部ほど

ではないが尿細管腔の拡張や空胞化がみられるようになる。遠位尿細管は年齢による著明な変化はみられないという⁹⁾。このように組織学的に近位尿細管は加齢により比較的早く変化がみられることから近位尿細管に限局する糖新生能は加齢により有意な差がみられると思われた。しかし本実験系での幼若ラット(2~3か月齢)と成熟ラット(8~10か月齢)ではピルビン酸からの糖新生能は変化はみられなかった。

腎皮質糖新生能が、 β -ラクタム系抗生物質の中でも腎障害の強いCERにより抑制作用がみられることはすでに指摘されている⁴⁾。CERの障害部位が組織学的に皮質、特に近位尿細管の曲部を中心にみられ¹⁰⁾、糖新生能の比活性も近位尿細管の曲部に強くみられることから¹¹⁾、CERにより腎皮質糖新生能が抑制されることは推察される。今回の検討で糖新生能そのものは幼若群と成熟群の2群間で有意な差はみられなかったが β -ラクタム系抗生物質存在下では、PCGで明らかに成熟ラット群で糖新生能の抑制率は高かった。CETやCERでも有意な差はみられないものの強く抑制される傾向が認められた。CERの障害部位と糖新生の主な部位は近位尿細管曲部であり、加齢による変化も尿細管の中では曲部がもっとも強く、局在が一致している。このような理由から幼若ラットと成熟ラットでの加齢による腎皮質糖新生能に対する薬剤の影響に有意な差がみられたものと思われた。しかし腎毒性が少ないとされているPCGでも糖新生の抑制作用がみられたことから、糖新生の抑制そのものが腎毒性発現機序に直接、関与するとはいえないが腎皮質代謝になんらかの影響をおよぼすものと思われた。

この加齢による薬剤と腎障害の影響について salicylate¹²⁾, acetaminophen¹³⁾, cephalexin¹⁴⁾等の薬剤をラットに投与して反応をみる *in vivo* 実験では一般的には老化するほどその障害が強い。その機序は吸収と排泄の違いによる Pharmacokinetics が主な原因とされている。すなわち投与後の血清中の薬剤の濃度が老化したラットほど高く、薬剤のクリアランスの低下により腎障害をきたしやすいと考えられている。

一方, *in vitro* 実験については阻血実験に準じてラット腎を摘出し, 100%N₂ で乏酸素状態とし加齢による影響を比較した報告がみられる¹⁵⁾。有機酸および有機塩基の腎皮質スライス内への蓄積が乏酸素状態により抑制されるが, 成熟ラット (37~38 か月齢) と幼若ラット (3~4 か月齢) で比較すると成熟ラットの方が抑制の程度は強い。このように加齢により *in vitro* 実験でも差がみられることから, *in vivo* 実験での腎血流や糸球体の濾過の影響の他に老化した尿細管細胞そのものの代謝の違いが重要な役割をなすと推測している¹⁵⁾。本実験系でも摘出した腎臓に直接, β -ラクタム系抗生物質を添加した *in vitro* 実験であり, 加齢による糖新生能への影響に変化がみられたことから β -ラクタム系抗生物質の細胞内の浸透度は老化した腎臓ほど強い可能性が示唆された。

(本論文の要旨は, 第34回日本腎臓学会総会, 第17回国際化学療法学会で発表した。本研究の一部は島原科学財団の補助を受けた。)

文 献

- 1) Sanchez-Medina F, Garcia-Ruiz J P, Lupianez J A, Faus M J, Hortelano P: Induction of rat kidney gluconeogenesis ability after impairment of liver gluconeogenesis. *Curr Probl Clin Biochem* 8: 310~317, 1977
- 2) Kida K, Nakajo S, Kamiya F, Toyama Y, Nishio T, Nakagawa H: Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J Clin Invest* 62: 721~726, 1978
- 3) Yamada H, Nakada J, Aizawa C, Endou H: Intra- and inter-nephron heterogeneity of gluconeogenesis in the rat: effect of chronic metabolic acidosis and potassium depletion. *Pflügers Arch* 407: 1~7, 1986

- 4) Goldstein R S, Contardi L R, Pasino D A, Hook J B: Mechanisms mediating cephaloridine inhibition of renal gluconeogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 87: 297~305, 1987
- 5) Bergmeyer H U, Bernt E, Schmidt F, Stork H: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, *Methods of enzymatic analysis* by Verlag Chemie, Weinheim, pp 1196~1201, 1974
- 6) Bengel H H, Mathias R S, Perkins J H, Alexander E A: Urinary concentrating defect in the aged rat. *Am J Physiol* 240: F 147~F150, 1981
- 7) Beck N, Yu B P: Effect of aging on urinary concentrating mechanism and vasopressin-dependent cAMP in rats. *Am J Physiol* 243: F 121~F125, 1982
- 8) Hirokawa K: Characterization of age-associated kidney disease in Wistar rats. *Mech Aging Dev* 4: 301~316, 1975
- 9) Haley D P, Bulger R E: The aging male rat: structure and function of the kidney. *Am J Anat* 167: 1~13, 1983
- 10) Silverblatt F, Turck M, Bulger R: Nephrotoxicity due to cephaloridine: a light- and electron-microscopic study in rabbits. *J Infect Dis* 122: 33~44, 1970
- 11) Nakada J, Yamada H, Endou H: Alpha-1-adrenergic stimuli specifically increase gluconeogenesis of the isolated proximal convoluted tubule in the rat. *Renal Physiol* 9: 213-222, 1986
- 12) Kyle M E, Koscis J J: The effect of age on salicylate-induced nephrotoxicity in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 81: 337~347, 1985
- 13) Beierschmitt W P, Keenan K P, Weiner M: Age-related susceptibility of male Fischer-344 rats to acetaminophen nephrotoxicity. *Life Sci* 39: 2335~2342, 1986
- 14) Goldstein R S, Pasino D A, Hook J B: Cephaloridine nephrotoxicity in aging male Fischer-344 rats. *Toxicology* 38: 43~53, 1986
- 15) Miura K, Goldstein R S, Morgan D G, Pasino D A, Hewitt W R, Hook J B: Age-related differences in susceptibility to renal ischemia in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 87: 284~296, 1987

Age-related variations in renal gluconeogenesis inhibition
by beta-lactam antibiotics

Jojiro Nakada, Fujio Masuda, Shoichi Onodera, Izumi Kondou,
Nozomu Furuta and Hidenori Suzuki

Department of Urology, The Jikei University Aoto Hospital,
6-41-2, Aoto, Katsushika-ku, Tokyo 125, Japan

These studies were designed to determine age-related variations in renal gluconeogenesis inhibition by beta-lactam antibiotics. The subjects were 2 groups consisting of 344 male young adult (2-3 months) and adult (8-10 months) Fischer rats. No significant inhibition in renal glucose production from 10 mM pyruvate was observed in either the group of young adult or adult rats. However, the degree of inhibition of gluconeogenesis with beta-lactam antibiotics was 18.7% with cephaloridine (CER) and 15.5% with penicillin G (PCG) in young adult rats, compared with the control, and 27.5% with CER and 29.9% with PCG, in adult rats, showing more potent inhibitory activity with age. In conclusion, the inhibition of gluconeogenesis with beta-lactam antibiotics in renal cortical slices of rat kidney was intensified by aging.