

## Gentamicin 誘発性腎毒性に対する tazobactam/piperacillin の軽減作用

—ラットでの検討—

永井 章夫<sup>1)</sup>・長沢 峰子<sup>1)</sup>・三富 敦浩<sup>1)</sup>・河村 泰仁<sup>1)</sup>  
児玉 卓也<sup>1)</sup>・渡辺 泰雄<sup>1)</sup>・成田 弘和<sup>1)</sup>・清水喜八郎<sup>2)</sup><sup>1)</sup>富山化学工業株式会社総合研究所\*<sup>2)</sup>北里研究所

(平成6年12月16日受付・平成7年2月3日受理)

ラットを用い gentamicin (GM) 誘発性腎毒性に対する tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) の軽減作用を PIPC と比較した。ラット筋肉内に GM 70 mg/kg を 10 日間連続投与して腎毒性を誘発した。TAZ/PIPC は 1,000 mg/kg を、PIPC は TAZ/PIPC (1:4) の配合比から 800 mg/kg を静脈内に 10 日間併用投与した。GM 単独群で尿中 NAG, 尿中蛋白量, 尿中  $\beta_2$ -M の増加, BUN と血中クレアチニンの増加, 腎重量と腎重量体重比の増加, 腎の退色化, 組織学的に腎皮質尿細管上皮の壊死, 脱落, 再生, 皮質尿細管腔の拡張と硝子様円柱, 皮質間質の炎症性細胞浸潤がみられた。このような腎毒性は, TAZ/PIPC 併用で明らかに軽減し, その作用は PIPC とほぼ同程度であった。

**Key words:** gentamicin, piperacillin, tazobactam/piperacillin, 腎毒性軽減作用, ラット

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) は,  $\beta$ -lactamase 阻害剤の TAZ とペニシリン系の PIPC を 1:4 の割合で配合した静注用の新抗生物質である。ところで PIPC には cephaloridine (CER), gentamicin (GM), cisplatin (CCDP), vancomycin (VCM) 誘発性腎毒性に対する軽減作用が動物実験で認められている<sup>1-3)</sup>。臨床的にもアミノ配糖体薬の腎毒性に対して軽減作用を示すことが報告されている<sup>4-8)</sup>。今回, GM 誘発性腎毒性に対する TAZ/PIPC の軽減作用について, PIPC を比較薬剤としてラットを用いて検討したので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用薬剤

TAZ/PIPC は TAZ と PIPC の 1:4 (力価) の配合製剤であり, 富山化学工業(株)で製造された Lot No. VJ 15 YP 1 を使用した。PIPC は富山化学工業(株)製造の Lot No. WI 518 P, XB 618 Q (ペントシリン<sup>®</sup>注射用 1g) を使用した。GM は硫酸ゲンタマイシン注射液 [ゲンタシン<sup>®</sup>注, シェリング・プラウ(株), 1.5 ml 中 60 mg (力価) 含有, Lot No. C 609 M, D 601 B] を使用した。

## 2. 使用動物および飼育条件

日本クレア(株)より 4 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF 雄性ラットを購入し, 約 2 週間の検疫後, 6 週齢で使用した。投与開始時の体重は 176~201 g であった。動物は室温 23±2°C, 湿度 40~60%, 換気回数 15 回以上/時間, 人工照明 6:00~18:00 に設定したバリアー飼育室で金属製ブラケットケージに収容し, 固型飼料(日本ク

レア製: CE-2, オートクレーブ処理) と水 (紫外線殺菌処理) を自由に摂取させて飼育した。

## 3. 投与量設定と投与方法

投与量設定のための予備試験として, GM は腎毒性を誘発しうる量として 70 mg/kg を単独に, TAZ/PIPC は 1,000, 1,500, 2,000 mg/kg を GM 70 mg/kg と併用してラット (n=5) に 12 日間連続投与した。その結果, GM の 70 mg/kg 単独群でみられた BUN と血中クレアチニンの増加が, TAZ/PIPC のいずれの併用群でも軽減された。これらの結果を参考に本試験の GM の投与量を 70 mg/kg, TAZ/PIPC の投与量を 1,000 mg/kg, PIPC の投与量を TAZ/PIPC の 1,000 mg/kg に配合される量から 800 mg/kg に設定し, 投与期間は 10 日間とした。Na の影響をみるために 1.8%NaCl 溶液 (PIPC の 800 mg/kg を生理食塩液に溶解した時と同モルの NaCl 溶液) を併用投与した。実験群と投与量を Table 1 に示す。

TAZ/PIPC は生理食塩液 (大塚製薬) で 10%溶液に用時調製した。PIPC は生理食塩液で 8%溶液に用時調製した。1.8%NaCl 溶液は NaCl (和光試薬特級) を注射用水 (大塚製薬) で調製した。これらの注射液はそれぞれメンブランフィルター (孔径 0.22  $\mu$ m, イワキ製) で濾過滅菌して使用した。TAZ/PIPC, PIPC, 1.8% NaCl は体重 1 kg 当り 10 ml を注射速度毎分約 10 ml で尾静脈内に, GM は体重 1 kg 当り 1.75 ml を大腿部筋肉内に, それぞれ 1 日 1 回, 10 日間連日投与した。対照群には生理食塩液を大腿部筋肉内投与した。GM と

Table 1. Experimental design

| Exp. group (mg/kg) | Route | Concentration (%) | Volume (ml/kg) |
|--------------------|-------|-------------------|----------------|
| Control (0.9%NaCl) | im    | —                 | 1.75           |
| TAZ/PIPC           | iv    | 10                | 10             |
| GM                 | im    | 4                 | 1.75           |
| 1.8%NaCl           | iv    | —                 | 10             |
| +GM                | im    | 4                 | 1.75           |
| TAZ/PIPC           | iv    | 10                | 10             |
| +GM                | im    | 4                 | 1.75           |
| PIPC               | iv    | 8                 | 10             |
| +GM                | im    | 4                 | 1.75           |

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, GM: gentamicin

の併用群では TAZ/PIPC, PIPC, NaCl の静脈内投与後、ただちに GM を筋肉内投与した。

#### 4. 腎毒性軽減作用の検討

##### 1) 体重測定と症状観察

毎日全例について投与前に体重測定を行い、投与後に症状を観察した。

##### 2) 尿検査

薬剤投与 10 日目の投与直後よりラット (n=7) を非絶食下で個別代謝ケージに入れ、24 時間尿を採取した。尿量 (ml/24 時間) を測定し、遠心 (1,500 rpm×5 min) 後、上清液を用いて N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ (NAG, MCP-NAG 法), γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ-GTP, γ-グルタミル-CPA 基質法, 日立 705 形自動分析装置), 蛋白量 (ピロガロールレッド法), β<sub>2</sub>-マイクログロブリン (β<sub>2</sub>-M, EIA 法, アマシャム<sup>®</sup>) を測定した。

##### 3) 血液化学的検査

薬剤投与 10 日後にエーテル麻酔下のラット (n=7) の後大静脈より採血した血清を用いて BUN (ウレアゼ・インドフェノール法), クレアチニン (ヤッフエ法) を日立 705 形自動分析装置で測定した。

##### 4) 病理組織学的検査

薬剤投与 10 日後にラット (n=7) をエーテル麻酔下で放血死させた。腎について重量測定, 肉眼的観察後, 10%ホルマリン液固定, パラフィン包埋して HE 染色, 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色にて組織学的検査を行った。障害の程度を 4 段階で評価 (スコア 0; 変化のみられないもの, スコア 1; 20%以下の尿細管に変化のみられるもの, スコア 2; 20~50%の尿細管に変化のみられるもの, スコア 3; 50%以上の尿細管に変化のみられるもの) し, 平均スコアを算出した。

##### 5. 統計学的処理

各群の平均値および標準偏差を算出し, 対照群と各投与群との間で, さらに GM 単独群と各併用群との間で, それぞれ等分散性の検定 (F 検定) を行い, 等分散の場合は Student の t 検定, 不等分散の場合は Aspin-

Welch の検定により平均値の差の検定を行った。

## II. 結 果

### 1. 腎毒性軽減作用の検討

#### 1) 体重変化と症状観察

GM 単独群では投与 6 日後から投与終了時まで対照群に比べて有意な体重の増加抑制がみられた。これに対して TAZ/PIPC, PIPC の各併用群も投与 6 日後から対照群に比べて増加抑制傾向がみられたが, GM 単独群と比較すると有意な軽減がみられた。1.8%NaCl 併用群は GM 単独群と同様の変化を示した。GM 単独群の体重増加抑制に対する軽減作用は TAZ/PIPC と PIPC の各併用群ではほぼ同程度であった (Fig. 1)。

GM 単独群の症状には特に異常はみられなかったが, TAZ/PIPC 単独群および TAZ/PIPC, PIPC の各併用群で投与 2 日後から投与終了時まで軟便が観察された。

#### 2) 尿検査

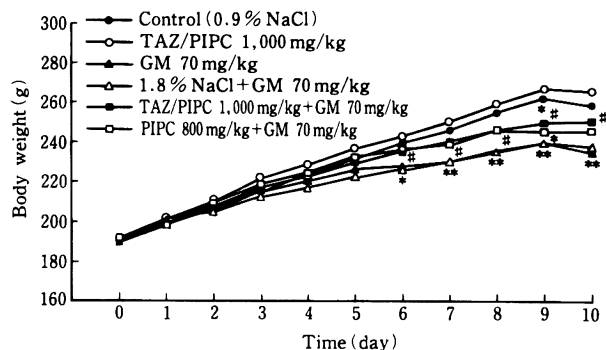
GM 単独群で尿中 NAG, 蛋白量, β<sub>2</sub>-M の明らかな増加がみられ, これに対して TAZ/PIPC, PIPC の各併用群では増加抑制がみられた。この軽減作用の強さは同程度であった。1.8%NaCl 併用群では尿中蛋白量のみ軽減作用がみられた (Table 2)。

#### 3) 血液化学的検査

GM 単独群で BUN とクレアチニンの明らかな増加がみられ, これに対して TAZ/PIPC, PIPC の各併用群では増加抑制がみられた。この軽減作用の強さは同程度であった。1.8%NaCl 併用群は軽度な増加抑制を示したが, TAZ/PIPC, PIPC の各併用群よりは弱い作用であった (Fig. 2)。

#### 4) 腎重量と腎重量体重比

GM 単独群の腎重量と腎重量体重比は増加し, これに対して TAZ/PIPC, PIPC の各併用群で増加抑制がみられた。この軽減作用の強さは同程度であった。1.8%NaCl 併用群では軽度な増加抑制がみられたが,



Significantly different from control \*p<0.05, \*\*p<0.01. Significantly different from GM group #p<0.05.

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, GM: gentamicin

Fig. 1. Body weight changes in rats given gentamicin alone and in combination with tazobactam/piperacillin or piperacillin.

Table 2. Urinalysis in rats given gentamicin alone and in combination with tazobactam/piperacillin or piperacillin

| Dose (mg/kg)          | Volume (ml/day) | NAG (mU/day) | Protein (mg/day) | $\gamma$ -GTP (U/day) | $\beta_2$ -M (mg/day) |
|-----------------------|-----------------|--------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| Control (0.9% NaCl)   | 23.8            | 242          | 8.00             | 6.24                  | 0.15                  |
|                       | 10.0            | 26           | 2.16             | 1.80                  | 0.07                  |
| TAZ/PIPC 1,000        | 13.4            | 190          | 4.27             | 3.38                  | 0.09                  |
|                       | 4.7             | 25           | 1.12             | 1.32                  | 0.03                  |
| GM 70                 | 30.6            | 1,751        | 45.12            | 5.13                  | 4.18                  |
|                       | 7.7             | 466          | 12.64            | 1.81                  | 1.18                  |
| 1.8%NaCl + GM 70      | 28.6            | 1,500        | 32.31            | 6.45                  | 4.31                  |
|                       | 12.2            | 406          | 8.13             | 1.75                  | 2.23                  |
| TAZ/PIPC 1,000 +GM 70 | 27.1            | 1,018        | 17.78            | 5.46                  | 2.05                  |
|                       | 14.3            | 319          | 12.27            | 1.89                  | 1.61                  |
| PIPC 800 + GM 70      | 36.8            | 1,198        | 18.60            | 6.31                  | 2.64                  |
|                       | 10.9            | 375          | 10.11            | 2.62                  | 1.11                  |

Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 7 rats. Significantly different from control \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. Significantly different from GM group # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01. TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, GM: gentamicin

TAZ/PIPC, PIPC の各併用群よりは弱い作用であった (Fig. 3)。

#### 5) 腎の病理組織学的検査

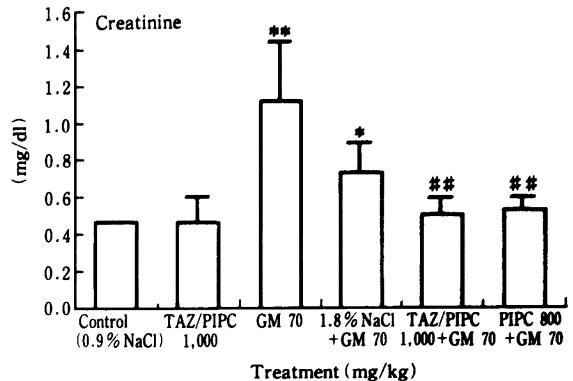
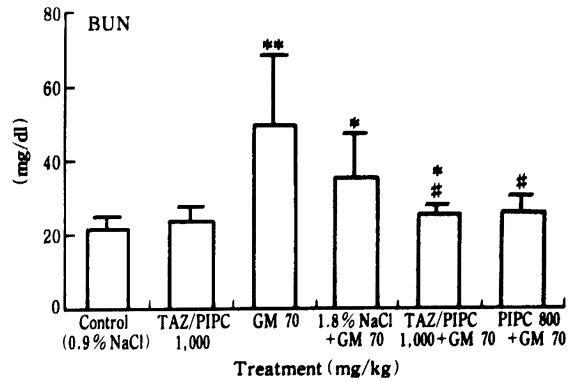
GM 単独群の全例に腎皮質の退色化がみられ、約半数例では腎周囲の脂肪組織の浮腫がみられた。これに対して TAZ/PIPC, PIPC の各併用群で腎の退色化は軽度となり、その程度は TAZ/PIPC, PIPC の各併用群で同程度であった。1.8%NaCl 併用群の腎退色化の程度は GM 単独群と差がみられなかった。

次に腎の組織学的検査の結果を Table 3, Fig. 4 に示す。GM 単独群では皮質尿管腔の拡張、皮質尿管上皮の壊死、脱落、再生、皮質尿管腔の硝子様円柱、皮質間質の炎症性細胞浸潤が軽度～高度 (スコア 0.7～2.4) に観察された。これに対して TAZ/PIPC 併用群では軽度な組織学的変化 (スコア 0～1.0) が観察されたが、その変化は明らかに軽減された (Fig. 4)。PIPC 併用群でも TAZ/PIPC 併用群とほぼ同程度に軽減された。1.8%NaCl 併用群では軽減されなかった。

### III. 考 察

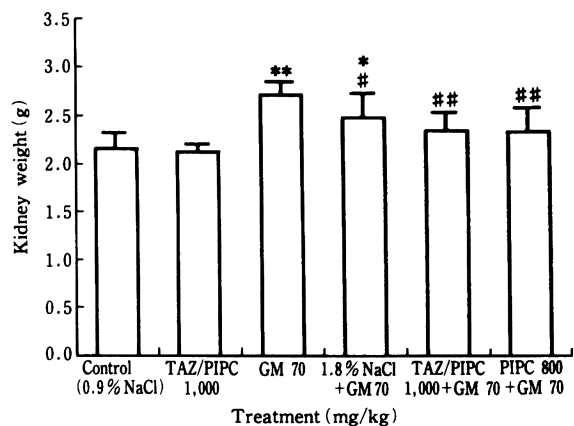
ラットを用いて GM 誘発性腎毒性に対する TAZ/PIPC の軽減作用を PIPC と比較検討した。

ラットに GM 70 mg/kg を 10 日間連続筋肉内投与した結果、腎毒性が誘発された。すなわち尿中 NAG, 尿中蛋白量, 尿中  $\beta_2$ -M の増加, BUN と血中クレアチニ



Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 7 rats. Significantly different from control \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. Significantly different from GM group # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01. TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, GM: gentamicin

Fig. 2. BUN and creatinine in rats given gentamicin alone and in combination with tazobactam/piperacillin or piperacillin.



Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 7 rats. Significantly different from control \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. Significantly different from GM group # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01. TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, GM: gentamicin

Fig. 3. Kidney weight in rats given gentamicin alone and in combination with tazobactam/piperacillin or piperacillin.

Table 3. Histological toxicity scores in rats given gentamicin alone and in combination with tazobactam/piperacillin or piperacillin

| Renal morphology  | Mean toxicity scores after dosing with (mg/kg) |                     |         |                      |                                 |                        |
|---|--|---------------------|---------|----------------------|---------------------------------|------------------------|
|   | Control  | TAZ/PIPC<br>(1,000) | GM (70) | 1.8%NaCl<br>+GM (70) | TAZ/PIPC<br>(1,000)<br>+GM (70) | PIPC (800)<br>+GM (70) |
| Dilatation of cortical tubular lumina                   | 0  | 0                   | 1.4     | 1.6                  | 1.0                             | 0.7                    |
| Necrosis and desquamation of cortical tubular epithelia | 0  | 0                   | 2.4     | 1.6                  | 0.1                             | 0.6                    |
| Vacuolar degeneration of cortical tubular epithelia     | 0  | 0                   | 0       | 0                    | 0.4                             | 0.6                    |
| Regeneration of cortical tubular epithelia              | 0  | 0                   | 1.1     | 1.0                  | 0.4                             | 0.6                    |
| Hyaline cast formation                                  | 0  | 0                   | 0.7     | 0                    | 0                               | 0                      |
| Interstitial inflammatory cell infiltration             | 0  | 0                   | 1.1     | 1.0                  | 0.1                             | 0.4                    |

Values are expressed as mean scores of 7 rats

TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, GM: gentamicin

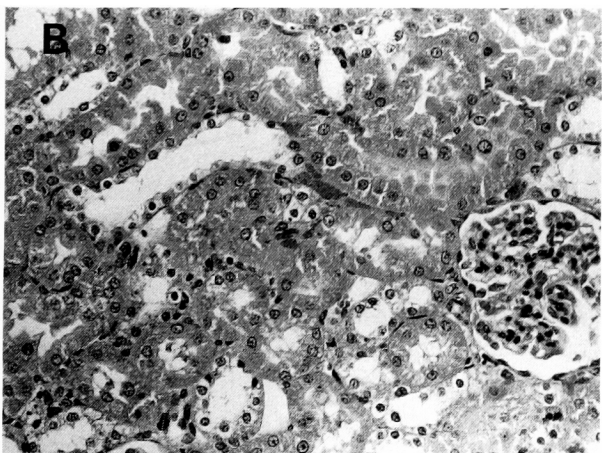
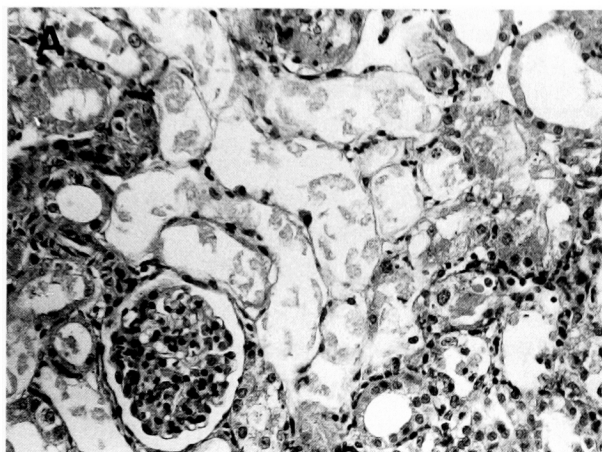


Fig. 4. Light micrograph of rat kidney. Rats received 70 mg/kg of gentamicin alone (A) and in combination with 1,000 mg/kg of tazobactam/piperacillin (B) for ten days. H. E. staining  $\times$  185

ンの増加, 腎重量と腎重量体重比の増加, 腎皮質の退色化, 組織学的には皮質尿細管上皮の壊死, 脱落, 再生, 皮質尿細管腔の拡張と硝子様円柱, 皮質間質の炎症性細胞浸潤がみられた。

しかしながら TAZ/PIPC の 1,000 mg/kg を GM の 70 mg/kg に併用投与すると GM 単独群の腎毒性は明らかに軽減された。その時の軽減作用の強さは PIPC の 800 mg/kg とほぼ同程度であった。GM, TAZ/PIPC, PIPC の臨床用量比は 1: 25~50: 20~40 であるが, 本試験では 1: 14: 11 の比率であり臨床用量比より少ない TAZ/PIPC および PIPC で軽減作用が認められた。なお薬剤中に含まれる Na もアミノ配糖体誘発性腎毒性に対して若干の軽減作用を有することが知られている<sup>9,10</sup>。今回の検討でも Na の軽度の軽減作用が認められたが, その程度は十分でなく PIPC より劣るものであった。

ところでアミノ配糖体薬の腎毒性発生機序については腎尿細管腔から尿細管上皮に再吸収された後, ライソゾーム中のリン脂質と結合し, phospholipase の活性を阻害することにより, リン脂質症を惹起して腎毒性が起きると言われている<sup>10,11-13</sup>。GM 誘発性腎毒性に対する PIPC の軽減機序は, 腎皮質内の GM 濃度が PIPC 併用により低下したことから, GM の尿細管上皮への取り込みを抑えることによると考えられている<sup>11</sup>。TAZ および PIPC とも尿細管分泌されることより<sup>14</sup>), TAZ/PIPC に軽減作用の相加あるいは相乗効果が考えられたが, TAZ/PIPC の軽減作用は PIPC と同じであることから, GM 誘発性腎毒性に対する軽減作用は Na の若干の影響はあるものの PIPC 自体による作用と考えられた。

#### 文 献

- 1) Hayashi T, Watanabe Y, Kumano K, Kitayama R, Yasuda T, Saikawa I, Katahira J, Kumada T, Shimizu K: Protective effect of piperacillin against nephrotoxicity of cephaloridine and gentamicin in animals. *Antimicrob Agents Chemother* 32(6): 912~918, 1988
- 2) Hayashi T, Watanabe Y, Kumano K, Kitayama R, Muratani T, Yasuda T, Saikawa I, Katahira J, Kumada T, Shimizu K: Protective effect of piperacillin against nephrotoxicity of cisplatin in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 33(4): 513~

- 518, 1989
- 3) 永井章夫, 他: Vancomycin 誘発性腎毒性に対する piperacillin の軽減作用。Chemotherapy 42: 699~706, 1994
  - 4) 片平潤一, 深田智子, 戸塚恭一, 熊田徹平, 清水喜八郎, 四反田都: Piperacillin による aminoglycoside 剤など各種抗菌薬の腎毒性軽減作用。Chemotherapy 36: 946~953, 1988
  - 5) 清水喜八郎, 戸塚恭一, 熊田徹平, 片平潤一, 深田智子: 化学療法の今後への展望。臨床と研究 65: 1~9, 1988
  - 6) 草深裕光, 岩山範久, 瀬奇良三, 大林孝彰, 吉田 浩, 伊豆原優子, 後藤光良: ピペラシリンのアミカシン誘発性腎毒性軽減作用に関する臨床的検討。TDM 研究 VII: 1 107~110, 1990
  - 7) 草深裕光, 大林孝彰, 岩山範久, 瀬奇良三, 伊豆原優子, 吉田 浩, 後藤光良, 前田憲志: Piperacillin による amikacin の腎障害軽減作用。日腎誌 34: 153~162, 1992
  - 8) 栗林裕二: ペニシリン系抗生物質とアミノ配糖体系抗生物質の併用療法に関する研究。久留米医学会雑誌 53(11): 1119~1131, 1990
  - 9) Akihiro O, Tanya D B, Kieran R B, Ramzi S, Robert A B: Role of sodium in the protective effect of ticarcillin on gentamicin nephrotoxicity in rats. Antimicrob Agents Chemother 33: 928~932, 1989
  - 10) 斎藤 篤: 抗菌剤に起因する腎毒性の病態とその対策。化学療法と腎臓 (上田 泰, 斎藤 篤編著), p. 51~66, 東京医学社, 1992
  - 11) Tune B M, Fravert D: Mechanism of cephalosporin nephrotoxicity: Comparison of cephaloridine and cephaloglycin. Kidney Int 18: 591~600, 1980
  - 12) Bore M E D, Paulus G J, Verpooten G A, Roels F, Buysens N, Wedeen R, Hoof F V, Tulkens P M: Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. Kidney Int 25: 643~652, 1984
  - 13) Tulkens P M: Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. Tox Lett 46: 107~123, 1989
  - 14) 嶋田基五郎: Tazobactam/Piperacillin. 第40回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム, 青森, 1993

### Protective effect of tazobactam/piperacillin against nephrotoxicity of gentamicin in rats

Akio Nagai<sup>1)</sup>, Mineko Nagasawa<sup>1)</sup>, Atsuhiko Mitomi<sup>1)</sup>, Yasuhito Kawamura<sup>1)</sup>,  
Takuya Kodama<sup>1)</sup>, Yasuo Watanabe<sup>1)</sup>, Hirokazu Narita<sup>1)</sup>  
and Kihachiro Shimizu<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan

<sup>2)</sup>The Kitasato Institute

The protective effect of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) against the nephrotoxicity of gentamicin (GM) was examined in rats. Nephrotoxicity was induced by the intramuscular administration of GM at a dose of 70 mg/kg/day for 10 days. TAZ/PIPC (1,000 mg/kg/day) and PIPC (800 mg/kg/day) were intravenously administered, and then GM was immediately administered. Rats receiving GM (70 mg/kg/day) for 10 days showed increases in urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), protein and  $\beta_2$ -microglobulin, elevation of serum urea nitrogen and creatinine concentration, and showed an increase in kidney weight in comparison with controls. Macroscopic fading in the color of the kidneys was seen. Histologically, cortical tubular necrosis, desquamation and regeneration, tubular dilatation, hyaline cast formation and interstitial inflammatory cell infiltration were seen. However, TAZ/PIPC and PIPC significantly reduced these toxicological parameters. These results suggest that TAZ/PIPC may have a protective effect against the nephrotoxicity of GM in rats, and the degree of this protective effect was equal to that of PIPC.