〔 衛 生 化 学 〕
EISEI KAGAKU
36 (5) 413-418 (1990)

マウスにおけるチアベンダゾール (TBZ) の体内挙動 (第3報) TBZ 経口投与による雌マウスの腎への影響

橋爪清松, 戸田千登世, 安井照代, 永納秀男
名城大学薬学部

Studies on the Fate of Thiabendazole (TBZ) in Mice. III. Effect of Oral Administration of TBZ on the Kidney of Female Mice

KIYOMATSU HASHIZUME, CHITOSE TODA, TERUYO YASUI and HIDEO NAGANO
Faculty of Pharmacy, Meijo University, Tenpaku-ku, Nagoya 468, Japan

(Received March 12, 1990)

Activities of alkaline phosphatase (ALP), leucine aminopeptidase (LAP) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), which were all present at high concentration in the proximal tubules, were determined for the serum and homogenate from kidney and liver of mice to assess nephropathy induced after oral administration of thiabendazole (TBZ), which was suspended in olive oil or in 3% gum arabic to female mice at a dosage of 350, 700 and 1300 mg/kg/d for 5 or 10 d. Kidney tissue preparations were also examined by microscopy.

The specific activities of both ALP and LAP in the liver increased after the repetitive administration of TBZ.

Specific activities of ALP, LAP and γ -GTP in the kidney increased at a dose level of 350 mg/kg/d for 10 d, but they decreased at a dose level of either 700 and 1300 mg/kg/d for 10 d, or 1300 mg/kg/d for 5 d.

Marked changes in kidney tissues were observed microscopically at a dose level of 1300 mg/kg/d. The brush border disappeared and the tubular lumen was dilated.

These results indicate an induction of nephropathy by TBZ which is accompanied by changes in the proximal tubules of mice.

Keywords — thiabendazole; female mouse; nephropathy; proximal tubule

緒 言

柑きつ類等の防かび剤として使用されている TBZ の妊娠マウスを用いた経口投与試験において、小縣らは懸濁溶媒としてオリーブ油を用いたときの有意な催奇形性の発現を報告しており、そのとき母体の腎に壊死を認めている。¹⁾ 著者らは妊娠マウスに TBZ を経口投与したときの血液、肝、腎、胎盤及び胎児中の TBZ 及びその代謝物の1つである5-ヒドロキシチアベンダゾール (5-OH TBZ) 体 (遊離型, グルクロン酸抱合体, 硫酸抱合体を含む) の経時的変化及び肝ミクロゾームの薬物代謝酵素活性の変動について報告したが,^{2,3)} この TBZ 大量経口投

与時に腎表面に白い変色部分を肉眼的に認めたので、今回、非妊娠マウスを用い、腎障害検索の1つとして腎組織内のアルカリ性ホスファターゼ (ALP)、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) 及びグルタミン酸・オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) 活性の測定及び血清中のクレアチン・クレアチニン量を測定した。また、腎組織の光学顕微鏡による観察も行った。

実 験 方 法

1. 試薬 チアベンダゾールは東京化成工業製、牛血清アルブミンはシグマ社製、フェノール試

薬は林純薬工業製の蛋白測定用試薬, クレアチンは和光純薬工業製の試薬特級, クレアチニンは和光純薬工業製の和光特級, アルカリ性フォスファトワコー, LAP C-テストワコー, γ -GTP-テストワコー及び GOT-UV テストワコーは和光純薬工業製の臨床検査薬〈キット〉を用いた。

2. 実験動物 Slc-ICR (SPF) 系雌マウスを8週令時に購入し, 飼料(日本クレア固型飼料 CE-2)及び水道水を自由に与え, 室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で飼育し, 10 週令に達した発育良好なものを使用した。

3. 投与方法及び測定試料 オリーブ油あるいは3%アラビアゴム溶液に懸濁させた TBZ の 350, 700 及び 1300 mg/kg/d 量を1日1回定時刻に胃ゾンデにより, 5日又は10日間連続投与した。なお投与量は初日の体重で定め, 溶媒のみ投与したものを対照とし, 各群5-6匹を1群とした。最終投与の24時間後, 肝及び腎を摘出した。血液は $1200 \times g$ で10分間遠心分離し, 血清を酵素活性測定及びクレアチン, クレアチニン定量用試料とした。肝及び腎は10倍量の0.25%サッカロース溶液を加えホモジナイズし, $600 \times g$ で10分間遠心分離し上清を酵素活性測定用試料とした。腎は中性ホルマリン液で固定し, 組織標本を作製した。

4. 測定法 ALP, LAP, γ -GTP 及び GOT 活性の測定は和光純薬製臨床検査薬キットの方法を準用し, 必要に応じて希釈した試料について行った。ALP 活性は生成する *p*-ニトロフェノールの量で, GOT 活性は消費される NADH の 340 nm における吸光度差で表した。LAP 活性は2時間当たりに

$1/12 \mu\text{g}$ の β -ナフチルアミンを遊離するときを1単位として, γ -GTP 活性は1分間に $1 \mu\text{mol}$ の α -ナフチルアミンを生成するときを1単位として, それぞれ単位蛋白当たりの値で示した。クレアチン・クレアチニン量は常法⁴⁾に従い除蛋白試料についてピクリン酸との反応により求めた。

ホルマリン固定した腎はパラフィン包埋し, 約 $2 \mu\text{m}$ の組織切片とし, 脱パラフィン後, ヘマトキシリン・エオジン染色及び PAS (periodic acid-Schiff) 染色し, 光学顕微鏡 (Olympas, BO 17) 下で観察した。

5. 統計学的処理 Student-*t* 検定で行った。

結果及び考察

TBZ 連続 (10 日間) 投与前の体重に対する屠殺時の体重比は, 無投与群 1.09 ± 0.05 , 対照群のオリーブ油 1.01 ± 0.05 , アラビアゴム 0.99 ± 0.03 に対して 700 mg/kg/d でそれぞれ 0.92 ± 0.03 , 0.93 ± 0.03 , 1300 mg/kg/d で 0.94 ± 0.03 , 0.93 ± 0.06 と有意に減少した。肝及び腎の体重に対する相対重量は, オリーブ油群の場合肝は対照群 5.11 ± 0.34 に対し, 350, 700 及び 1300 mg/kg/d はそれぞれ 5.92 ± 0.61 , 6.22 ± 0.54 及び 6.70 ± 0.52 , 腎は対照群 1.29 ± 0.13 に対し, 投与群はそれぞれ 1.50 ± 0.13 , 1.53 ± 0.14 , 1.70 ± 0.11 で有意に大きく, アラビアゴム群でも同様な傾向にあったが, 肝で有意差を認めたのは 1300 mg/kg/d のみであった。

腎表面には白い変色部分がオリーブ油群及びアラビアゴム群とも 350 mg/kg/d で被検体の半数以上

TABLE I. Specific Activity of Enzymes in the Serum and Liver of Mice after the Administration of TBZ 1300 mg/kg/d for 10 d

Group	Serum			Liver		
	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg}$ $\text{prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	GOT $\Delta 340 \text{ nm}/$ $\text{mg prot.}/$ $\text{min} \times 10^{-3}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg}$ $\text{prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	GOT $\Delta 340 \text{ nm}/$ $\text{mg prot.}/$ min
none	0.035 ± 0.013	2.80 ± 0.66	6.5 ± 1.5	0.060 ± 0.021	57.51 ± 5.19	3.64 ± 0.56
Oliv.	0.036 ± 0.014	2.52 ± 0.46	5.0 ± 1.0	0.043 ± 0.003	58.30 ± 5.01	3.86 ± 0.14
TBZ-oliv.	$0.020 \pm 0.007^b)$	3.25 ± 1.05	7.0 ± 0	$0.079 \pm 0.023^b)$	$104.17 \pm 7.19^b)$	3.71 ± 0.22
Arab.	0.030 ± 0.008	2.74 ± 0.53	7.4 ± 1.9	0.041 ± 0.017	56.82 ± 1.61	3.67 ± 0.51
TBZ-arab.	$0.016 \pm 0.010^a)$	2.95 ± 0.81	4.4 ± 0.4	0.058 ± 0.026	$76.04 \pm 4.53^b)$	3.68 ± 0.25

ALP: alkaline phosphatase, LAP: leucine aminopeptidase, GOT: glutamic-oxaloacetic transaminase,

Oliv.: olive oil, TBZ-oliv.: TBZ suspended in olive oil,

Arab.: 3% gum arabic, TBZ-arab.: TBZ suspended in 3% gum arabic,

Each value is the mean $\pm$ S. D. ($n=5-6$),

Significantly different from the control, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

TABLE II. Specific Activity of Enzymes in the Kidney of Mice after the Administration of TBZ 1300 mg/kg/d for 10 d

Group	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	γ -GTP $\text{mU}/\text{mg prot.}$	GOT $\Delta 340 \text{ nm}/\text{mg prot.}/\text{min}$
none	39.53 ± 6.72	251.44 ± 35.40	120.30 ± 6.72	1.99 ± 0.37
Oliv.	37.55 ± 3.90	275.40 ± 20.71	127.12 ± 13.79	2.11 ± 0.25
TBZ-oliv.	27.84 ± 5.54^a	242.61 ± 18.12^a	99.74 ± 18.66^b	1.90 ± 0.15
Arab.	35.69 ± 3.60	268.85 ± 30.95	130.13 ± 12.87	2.09 ± 0.19
TBZ-arab.	31.10 ± 2.39^a	254.57 ± 28.06	111.05 ± 8.78^a	1.98 ± 0.10

ALP: alkaline phosphatase, LAP: leucine aminopeptidase,
 γ -GTP: γ -glutamyltransferase, GOT: glutamic-oxaloacetic transaminase,
 Oliv.: olive oil, TBZ-oliv.: TBZ suspended in olive oil,
 Arab.: 3% gum arabic, TBZ-arab.: TBZ suspended in 3% gum arabic,
 Each value is the mean $\pm$ S. D. ($n=5-6$).
 Significantly different from the control, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

TABLE III. Specific Activity of Enzymes in the Serum, Liver and Kidney of Mice after the Administration of TBZ 1300 mg/kg/d for 5 d

Group	Serum		Liver		Kidney		
	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	γ -GTP $\text{mU}/\text{mg prot.}$
none	0.040 ± 0.012	1.65 ± 0.37	0.070 ± 0.032	26.59 ± 4.20	38.78 ± 6.12	224.38 ± 36.88	115.58 ± 26.82
Oliv.	0.041 ± 0.013	1.59 ± 0.55	0.075 ± 0.032	30.46 ± 5.42	37.53 ± 8.39	223.62 ± 32.22	123.89 ± 43.81
TBZ-oliv.	0.029 ± 0.008^a	1.84 ± 0.35	0.155 ± 0.072^a	61.52 ± 3.26^b	29.38 ± 8.01^a	178.16 ± 25.75^b	83.24 ± 24.79^a
Arab.	0.039 ± 0.010	1.55 ± 0.40	0.048 ± 0.015	27.02 ± 4.40	40.59 ± 5.37	217.29 ± 33.16	110.81 ± 25.59
TBZ-arab.	0.030 ± 0.010	2.34 ± 0.92	0.078 ± 0.039	45.93 ± 6.68^a	36.75 ± 7.61	201.52 ± 39.45	105.18 ± 21.40

ALP: alkaline phosphatase, LAP: leucine aminopeptidase, γ -GTP: γ -glutamyltransferase,
 Oliv.: olive oil, TBZ-oliv.: TBZ suspended in olive oil,
 Arab.: 3% gum arabic, TBZ-arab.: TBZ suspended in 3% gum arabic.
 Each value is the mean $\pm$ S. D. ($n=6-11$).
 Significantly different from the control, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

TABLE IV. Specific Activity of Enzymes in the Serum, Liver and Kidney after the Administration of TBZ 700 mg/kg/d for 10 d

Group	Serum		Liver		Kidney		
	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	γ -GTP $\text{mU}/\text{mg prot.}$
none	0.040 ± 0.002	2.18 ± 0.35	0.076 ± 0.022	67.16 ± 7.75	33.52 ± 3.72	252.96 ± 28.63	106.25 ± 10.14
Oliv.	0.042 ± 0.009	3.29 ± 0.41	0.080 ± 0.031	71.98 ± 2.56	30.07 ± 4.38	257.83 ± 21.04	119.82 ± 9.86
TBZ-oliv.	0.026 ± 0.008^a	3.34 ± 0.62	0.135 ± 0.063	98.56 ± 9.53^b	31.65 ± 3.74	278.27 ± 31.24	109.83 ± 9.40
Arab.	0.038 ± 0.006	2.43 ± 0.20	0.078 ± 0.024	60.45 ± 6.91	33.09 ± 4.35	255.11 ± 32.08	116.24 ± 11.33
TBZ-arab.	0.028 ± 0.006	2.54 ± 0.26	0.059 ± 0.008	86.48 ± 9.82^b	35.35 ± 3.12	270.82 ± 17.09	121.00 ± 9.08

ALP: alkaline phosphatase, LAP: leucine aminopeptidase, γ -GTP: γ -glutamyltransferase,
 Oliv.: olive oil, TBZ-oliv.: TBZ suspended in olive oil,
 Arab.: 3% gum arabic, TBZ-arab.: TBZ suspended in 3% gum arabic.
 Each value is the mean $\pm$ S. D. ($n=5-6$).
 Significantly different from the control, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

に, 1300 mg/kg/d では全検体に観察された。特にオリブ油群の場合が著しく, 700 mg/kg/d で10匹中8例に, 1300 mg/kg/d では17匹全例に腎表面

1/2以上の白変を認めた。

1300 mg/kg/d, 10日間投与の場合血清中ではALP活性が有意に低下し, LAP及びGOT活性に

TABLE V. Specific Activity of Enzymes in the Serum, Liver and Kidney of Mice after the Administration of TBZ 350 mg/kg/d for 10 d

Group	Serum		Liver		Kidney		
	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	ALP $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}/\text{h}$	LAP $\text{U}/\text{mg prot.}$	$\gamma\text{-GTP}$ $\text{mU}/\text{mg prot.}$
none	0.030 ± 0.007	3.51 ± 0.28	0.022 ± 0.001	67.01 ± 4.13	29.54 ± 1.02	252.74 ± 31.71	115.44 ± 7.71
Oliv.	0.035 ± 0.004	2.57 ± 0.25	0.036 ± 0.011	73.63 ± 1.18	23.67 ± 2.32	279.33 ± 27.16	112.94 ± 13.54
TBZ-oliv.	0.029 ± 0.009	3.29 ± 0.20^a	0.058 ± 0.032	92.70 ± 7.12^b	29.40 ± 3.30^a	283.73 ± 20.04	131.34 ± 4.14
Arab.	0.026 ± 0.002	2.91 ± 0.49	0.024 ± 0.007	73.38 ± 3.17	26.13 ± 1.21	272.70 ± 17.83	120.30 ± 18.48
TBZ-arab.	0.024 ± 0.013	3.70 ± 0.93	0.034 ± 0.014	89.05 ± 4.71^b	31.12 ± 1.80^a	270.87 ± 28.58	124.23 ± 17.08

ALP: alkaline phosphatase, LAP: leucine aminopeptidase, $\gamma\text{-GTP}$: γ -glutamyltransferase,

Oliv.: olive oil, TBZ-oliv.: TBZ suspended in olive oil,

Arab.: 3% gum arabic, TBZ-arab.: TBZ suspended in 3% gum arabic.

Each value is the mean $\pm$ S. D. ($n=5-6$).Significantly different from the control, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

TABLE VI. Creatine and Creatinine Contents in the Serum of Mice after the Administration of TBZ 350 or 1300 mg/kg/d for 10 d

Dose (mg/kg/d)		Creatine $\mu\text{g}/\text{ml}$	Creatinine $\mu\text{g}/\text{ml}$	Creatine Creatinine
TBZ-oliv.	none	20.07 ± 2.98	3.49 ± 0.45	5.97 ± 1.62
	cont.	22.14 ± 5.62	4.03 ± 0.56	5.70 ± 2.00
	350	14.03 ± 1.62^b	4.65 ± 0.70	3.14 ± 0.82^a
	1300	12.92 ± 1.84^b	3.76 ± 0.59	3.51 ± 0.66^a
TBZ-arab.	cont.	23.53 ± 3.78	3.66 ± 0.53	6.58 ± 1.04
	350	14.03 ± 4.25^b	4.34 ± 0.25^b	3.22 ± 0.90^b
	1300	12.68 ± 4.41^b	4.07 ± 1.15	3.45 ± 1.71^b

TBZ-oliv.: TBZ suspended in olive oil,

TBZ-arab.: TBZ suspended in 3% gum arabic.

Each value is the mean $\pm$ S. D. ($n=5-6$).Significantly different from the control, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

は変化は認められなかった。肝組織中では ALP 及び LAP 活性の上昇が認められ、特にオリーブ油群に顕著で対照群の約 2 倍の活性を示したが、肝でも GOT 活性の変化は認められなかった (Table I)。腎組織中の ALP, LAP 及び $\gamma\text{-GTP}$ 活性はオリーブ油群でいずれも有意な低下を示し、アラビアゴム群でも ALP, $\gamma\text{-GTP}$ 活性の低下は有意であった。GOT 活性は腎でも変化はなかった (Table II)。

1300 mg/kg/d, 5 日間投与では、血清中 ALP 活性の有意な低下はオリーブ油群にのみ認められ、肝の ALP 及び LAP 活性は 10 日間投与の場合と同様の上昇傾向を示した。また腎でも 10 日間投与と同様に ALP, LAP 及び $\gamma\text{-GTP}$ 活性は低下傾向を示し、オリーブ油群では有意差を認めた (Table III)。

700 mg/kg/d, 10 日間投与では血清中 ALP 活性は 1300 mg/kg/d の場合と同様に低下する傾向を示

したが、肝では ALP 活性の有意な上昇は認められず、LAP 活性のみ有意に上昇していた。腎ではオリーブ油群及びアラビアゴム群ともに各酵素活性は対照群に対しほとんど差は認められなかった (Table IV)。

350 mg/kg/d, 10 日間投与においては、LAP 活性の上昇が、血清中でオリーブ油群に、肝では両投与群ともに認められ、腎でも ALP 活性は両投与群とも有意に上昇し、 $\gamma\text{-GTP}$ 活性も上昇する傾向を示した (Table V)。

腎の近位尿細管刷子縁に局在することが知られている⁹⁾ ALP, LAP 及び $\gamma\text{-GTP}$ 活性は TBZ の低濃度投与では上昇する傾向を示した。しかし、肉眼的所見の著しい高濃度投与では活性の低下が認められ、近位尿細管上皮細胞の破壊が考えられた。

血清中のクレアチン濃度は低下し、クレアチニン

Fig. 1. Light Micrograph of the Kidneys from Mice after the Administration of TBZ

Hematoxylin and Eosine stain ($\times 400$).

1: normal, 2: TBZ-olive oil (1300 mg/kg/d, 10 d)—note necrosis of proximal tubular epithelial cells (N), casts formation (C), dilation of tubular lumen (D).

Fig. 2. Light Micrograph of the Kidneys from Mice after the Administration of TBZ

Periodic Acid-Schiff stain ($\times 400$).

1: normal, 2: TBZ-olive oil (1300 mg/kg/d, 10 d)—note short and detachment of brush border (S), destruction of mesangial stroma (M).

濃度には変化がなく、クレアチン/クレアチニン比が有意な低下を示した (Table VI).

一方、最終回投与後 25 時間に採取した尿のクレアチン/クレアチニン比は投与前の 3.17 ± 0.07 に比べ 1300 mg/kg/d, 10 日間のオリーブ油群で 4.53 ± 0.53 , アラビアゴム群で 5.14 ± 0.72 と高い値を示した。これは尿細管でのクレアチンの再吸収低下のためと思われる。

腎組織光顕所見でも特にオリーブ油の場合尿細管上皮細胞の壊死と再生、尿細管腔の拡張と円柱の存

在及び間質への細胞浸潤が観察された (Fig. 1)。また、尿細管刷子縁の短小化と剝離、糸球体の細胞核数減少とメサンジウム基質の破壊が認められた (Fig. 2)。

TBZ 投与による腎の酵素活性低下や異常所見は投与溶媒にオリーブ油を用いた時、同一溶媒では高濃度の時に、より顕著に現われた。連続投与においては、TBZ の薬物代謝誘導³⁾ の為と考えるが、オリーブ油とアラビアゴムで TBZ の体内分布濃度に差を認めていない。しかし、単回投与の初期値はオ

リーブ油を用いた方が高い値を示しており,²⁾肝及び腎の酵素活性や異常所見の溶媒による違いはこの濃度差が関係するとも考えられる。

ま と め

1. 雌マウスを用いた TBZ 投与試験において, TBZ 350 mg/kg/d, 10 日間で被検体の半数以上に, 1300 mg/kg/d では 5 日間で全検体に, 腎表面の白変が観察された。
2. 肝組織中の ALP 及び LAP 活性は上昇する傾向があった。また, 腎でも 350 mg/kg/d, 10 日間投与するとそれらは上昇する傾向を示した。しかし,

肉眼的所見の著しい 700, 1300 mg/kg/d では逆に活性の低下が認められた。

3. 腎組織の光学顕微鏡による所見では尿細管上皮細胞の壊死と再生が観察された。
4. 酵素活性の低下や光学顕微鏡による所見から, TBZ の大量投与による腎の異常は, 主として尿細管上皮細胞に対する毒性によるものと思われる。

謝辞 腎組織標本の作製及び光顕所見について御教示御協力頂きました本学薬理学教室の小島良二氏に深謝致します。

引 用 文 献

- 1) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾, 東京衛研年報, **29**, 112 (1978); *idem, ibid.*, **33**, 495 (1982); *idem, ibid.*, **33**, 506 (1982); A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, K. Hiraga, *Food Chem. Toxicol.*, **22**, 509 (1984).
- 2) 安井照代, 戸田千登世, 橋爪清松, 永納秀男, 藤井正美, 亀山義郎, 衛生化学, **33**, 25 (1987).
- 3) 橋爪清松, 戸田千登世, 安井照代, 永納秀男, 有吉敏彦, 衛生化学, **33**, 349 (1987).
- 4) 藤井達三, 渡辺富久子, 奥田 潤 (編), “臨床化学総論, [改稿版]” 廣川書店, 1983, p.148.
- 5) 遠藤 仁, 医学のあゆみ, **192**, 951 (1984), 古関千寿子, 遠藤 仁, 須藤純一, 島田 肇, 酒井文徳, 日薬理, **76**, 59 (1980).