

Sisomicin のサルにおける筋肉内投与亜急性毒性 — Gentamicin および Tobramycin との比較 —

田中寿子・渡辺満利・服部治子

(財)実験動物中央研究所附属 前臨床医学研究所 病理毒性部

Sisomicin は Schering 社で開発された新しいアミノ糖系抗生物質で, *Micromonospora inyoensis* より産生され, 化学的に単一成分である。Fig. 1 にその化学構造式および化学名を示したが, 化学構造式は Gentamicin C_{1a} によく類似しているといわれる^{1,2,3)}。

Sisomicin の腎毒性はラット, イヌ等ですでに証明されており^{4,5)}, またモルモット, サルにおいて内耳に対する毒性も検索され, Sisomicin がアミノ糖系抗生物質共通の腎および耳毒性を有することが知られている^{6,7)}。

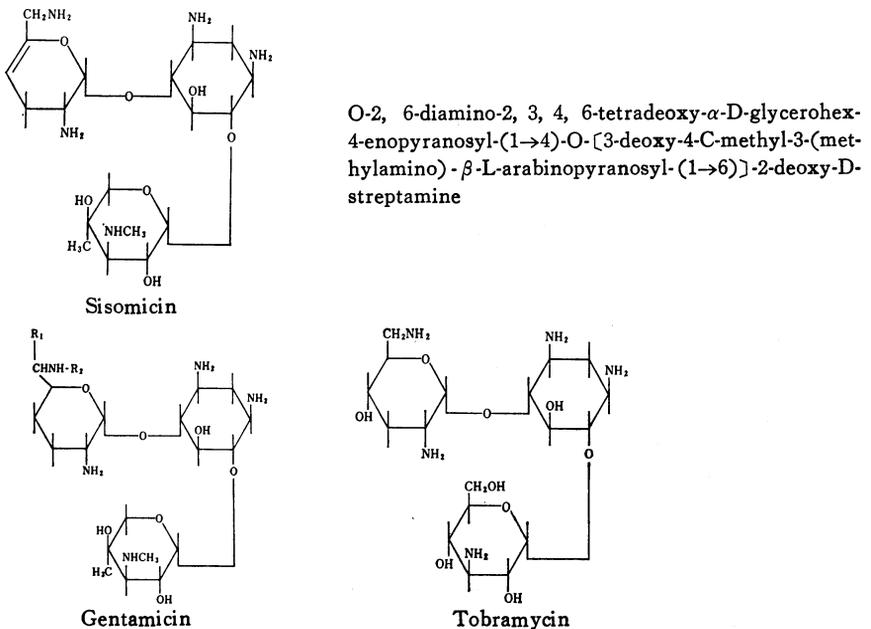
Sisomicin の毒性の種属差を検索することと, 他種アミノ糖系抗生物質の毒性と比較する目的で, アカゲザルを用いて21日間の亜急性毒性を腎を中心に検索した。対照薬剤としてはこの種の抗生物質で臨床的に広く用いられている Gentamicin (GM) と, 最近 Lilly 社で開発された Tobramycin (TOB) を用いた。それらの化学構造式を Fig. 1 に併記した。

I. 実験材料ならびに方法

米国での検疫を経て入手したアカゲザル (*macaca mulatta*) の雌を, 入手後室温 25±1°C の実験室内の個別ケージに飼育し, 1日1回 30 mg のビタミンCを添加した 100 g の固型飼料(オリエンタル サル用飼料)を与え, 水を自由に摂取させる飼育環境下に4か月以上馴化させた。この間に糞便, 血液および血清生化学検査等を行ない, 健康状態を管理した。入手直後から5日間ウイントマイロン (125 mg 力価/サル×2回/日) を飼料に添加し, INAH (75 mg/サル/日) を実験開始1か月前まで飼料に添加して与えた。また実験開始前2か月頃4ないし5日間にわたりコリマイシンS散 (40.08 mg 力価/サル×2回/日) あるいはリハンピシン (100 mg 力価/サル×2回/日) を投与した。しかし実験開始1か月前より一切の投薬を中止した。

以上のように実験環境に馴化させたサルの内, 一般症

Fig. 1 Chemical structure of Sisomicin, GM and TOB and chemical name of Sisomicin



状、体重増加、糞便、血液、血清生化学検査上は健康と判断された24頭 (2.95ないし 3.90 kg) を1群3匹の8群に分けた。

Table 1 Dosing schedule for subacute toxicity study of Sisomicin, GM or TOB in monkeys

Group	Drug	Concentration of drug (%)	Daily dose (mg/kg)
I	Vehicle	0	0
II	Sisomicin	5	6
III			30
IV			15 b. i. d.
V	GM	4	6
VI			30
VII	TOB	4	6
VIII			30

各薬剤は Table 1 のような濃度に調製された注射用製剤として投与に用いられた。投与量は各薬剤とも6および30 mg/kg とし、Sisomicin に関しては30 mg/kg を1日1回投与する群と、15 mg/kg を1日2回投与する群を設けた。薬剤は左右大腿筋に交互に21日間反復投与された。Sisomicin, GM (Schering 社) および TOB (NEBCIN; Lilly 社) はエッセクス日本株式会社より提供された。対照群には Sisomicin 注射用製剤の溶媒として用いられている下記の溶液を同様に投与した。

N-propyl p-hydroxybenzene	0.1 mg
Methyl p-hydroxybenzene	0.8 mg
Sodium pyrosulfite	3.0 mg
Sodium chloride	3.6 mg/ml

投与開始前、投与期間中および終了時に次のような諸検査を行なった。1) 症状観察、2) 体重測定 (週1回)、3) 摂餌量測定 (週1回)、4) 血液検査 (投与前および終了時): ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、白血球数、赤血球沈降速度、5) 血清生化学検査: 尿素窒素、クレアチニン、Na, K, Cl (投与前、1週、2週、および投与終了時)、GOT, GPT, LDH, コリンエステラーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、LAP、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン・グロブリン比、糖、総コレステロール、Ca (投与前および投与終了時)、6) 尿検査: 剖検時膀胱より採取した尿を用い、定性 (潜血、ケトン体、糖、蛋白、pH、ビリルビン、ウロビリノーゲン)、沈渣および比重について検査した。7) 剖検および

臓器重量測定 (肝、腎、副腎、脾、甲状腺)、8) 組織検査: 重量測定を行なった諸臓器と大腿骨髄を10%緩衝ホルマリンに固定し、パラフィン切片にはヘマトキシリン・エオジン、マッソントリクローム染色および PAS 染色を施し、肝、腎のホルマリン固定凍結切片には Sudan III 染色を行なった。9) 腎の電顕的検索: 各薬剤の30 mg/kg を投与した群および Sisomicin 6 mg/kg を投与した群の各2頭について検査した。剖検時脱血前に開腹し、腎動脈を結紮後腎を摘出し、腎動脈より生理食塩水を80 mmHg の圧で3分間灌流した。次いで0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶かした1.19% glutaraldehyde を同様に10分間灌流した後細切し、同じ固定液に2時間 (4°C) 固定した。固定後所定の方法に従い洗浄、1%四酸化オスミウム固定、脱水、包埋 (Epon 812) を行ない、超薄切片は Porter-Blum Ultramicrotome (MT-2B) で作製し、酢酸ウラニウム、鉛二重染色を施し、100 U 型電子顕微鏡 (日本電子) により3,300×~6,700×で鏡検および撮影した。

II. 実験結果

1. 一般症状

対照群、各薬剤の6 mg/kg を投与した群、Sisomicin 15 mg/kg を2回投与した群、(以下 SISO-15×2 と略記) および TOB 30 mg/kg 群 (以下 TOB-30 と略記) には投与期間中特記すべき症状は認められなかった。Sisomicin 30mg/kg 群 (以下 SISO-30 と略記) の3例中1例は投与終了日に急激に元気喪失し、一般状態が悪化した。GM 30 mg/kg 群 (以下 GM-30 と略記) では20日目より全例に顕著な平衡失調がみられ、顔面蒼白と

Table 2 Increase or decrease ratio of body weight and food intake in monkeys treated intramuscularly with Sisomicin, GM or TOB for 3 weeks

Drug	Daily dose (mg/kg)	Ratio of body weight gain (%)	Food intake (g/24 h)
Control	0	-0.1±1.6	100±0
	6	4.0±1.8*	100±0
	30	-5.9±6.5	91±16
Sisomicin	15×2	0.0±5.3	100±0
	6	1.9±2.2	98±3
GM	30	-8.7±0.6**	60±38
	6	2.0±0.9	100±0
TOB	30	0.6±3.6	100±0

*: P<0.05 **: P<0.01

Table 3 Hematology in monkeys treated intramuscularly with Sisomicin, GM or TOB for 3 weeks

Drug	Daily dose (m/kg)	Hemoglobin (g/dl)		Hematocrit (%)		Erythrocyte (X 10 ⁴)	
		0 w	3 w	0 w	3 w	0 w	3 w
Control	0	12.3±0.5	12.1±0.7	40±2	37±2	485±39	474±45
Sisomicin	6	11.8±0.4	11.4±0.6	38±2	36±1	470±23	448±44
	30	12.5±0.6	12.0±0.2	38±2	36±3	460±37	470±34
	15×2	12.6±0.3	12.0±0.7	41±1	38±2 _△	528±23	486±16
GM	6	11.8±0.1	11.6±0.5	37±1	36±2	467±15	469±29
	30	12.5±0.4	11.1±0.7 _△	40±2	33±1 _{△△} *	508±30	421±35 _△
TOB	6	12.0±0.5	12.3±1.2	38±2	38±2	492±20	478±28
	30	12.4±1.0	10.7±1.0	41±1	33±2 _{△△}	524±24	440±47

Ow : pretreatment 3w : end of treatment

* and ** mean statistical significance to the control values.

*, _△ : P<0.05

_△ and _{△△} mean statistical significance to the pretreatment values.

** , _{△△} : P<0.01

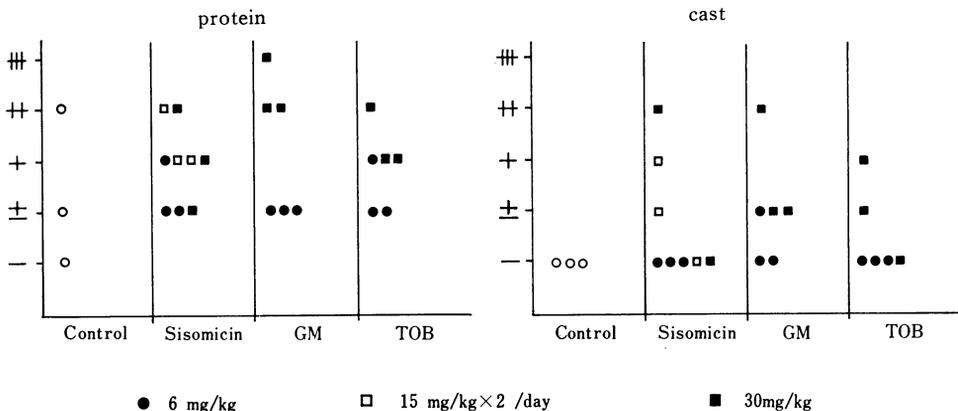
眼瞼下垂が目立つようになった。この群の2例は急激に瀕死状態に陥ったため21日目に剖検を行なった。

30 mg/kg を投与した群ではいずれの薬剤においても投与10日頃より、全例の投与部位に硬結が出現し、SISO-15×2 では14日頃より軽度の硬結が全例の投与部位に認められるようになり、その程度は徐々に増強した。

2. 体重および摂餌量 (Table 2)

SISO-30 では極めて軽度の進行性体重減少傾向がみられたが、一般症状が最後に悪化した1例では投与終了時に急激に体重が減少した。GM-30 では2ないし3週以後体重が減少しており、また摂餌量は15日頃より急激に減少し、3週目の測定では3例中2例の摂餌量が対照値の½ないし¼量に低下していた。その他の群の体重および摂餌量は対照群のそれと差異がなかった。

Fig. 2 Urinalysis and urine sediment in monkeys treated intramuscularly with Sisomicin, GM or TOB for 3 weeks



全例陰性であった。尿沈渣に関してはいずれの薬剤の 30 mg/kg を投与した群においても、円柱および小円形細胞と多形上皮細胞の出現頻度および程度が高く、対照群および 6 mg/kg を投与した群に比べ差異が明らかであった。しかし 30 mg/kg を投与した群を比較しても各薬剤間の差は明らかではなかった。

濃縮試験は行なわなかったが、尿比重に関しては群間の差は認められなかった。

5. 血清生化学検査 (Fig. 3, Table 4)

投与により著しい変動を示した項目は尿素窒素、クレアチニン、GOT、GPT、LDH であった。尿素窒素およびクレアチニンの上昇がもっとも著しかったのは GM-30 であり、第 2 週にそれぞれ 49~75 mg/dl, 1.55~2.86 mg/dl に、第 3 週には 62~280 mg/dl, 5.13~19.70 mg/dl であった。SISO-30 および TOB-30 における尿素窒素およびクレアチニンの上昇の程度はほぼ同じ位であり、第 2 週ではそれぞれの最高値が 50 mg/dl, 1.5 mg/dl 程度であり、第 3 週においても同程度の上昇であったが全

例に上昇が明らかであった。SISO-15×2 では第 3 週に 3 例中 2 例が 30 mg/dl 程度の尿素窒素の上昇を呈したが、クレアチニンには著変がなかった。GM-6 においては第 2 週まで変化がなかったが、第 3 週には全例の尿素窒素が 30 ないし 42 mg/dl に上昇し、クレアチニンも 1.34 mg/dl 程度まで上昇していた。SISO-6 および TOB-6 では両項目ともほとんど変化はなかった。第 3 週には GM-30 の 2 例の Na, Cl および Ca が中等度ないし著しく低下し、K が 1 例で低下、他の例で上昇していた。TOB-30 では Na と K が軽度に低下していたが、他の群には電解質の異常は認められなかった。GOT、GPT、LDH の上昇は GM-30 で最も著しく、コリンエステラーゼの軽度低下を伴っていたが、アルカリ性フォスファターゼ、LAP、ビリルビンには異常がみられなかった。TOB-30 および SISO-30, SISO-15×2 においても上記 3 項目の軽度上昇がみられたが、TOB-30 でやや強く、SISO-15×2 と SISO-30 ではほぼ同程度であった。

Fig. 3 Mean value of serum urea nitrogen and creatinine of monkeys treated intramuscularly with Sisomicin, GM or TOB for 3 weeks

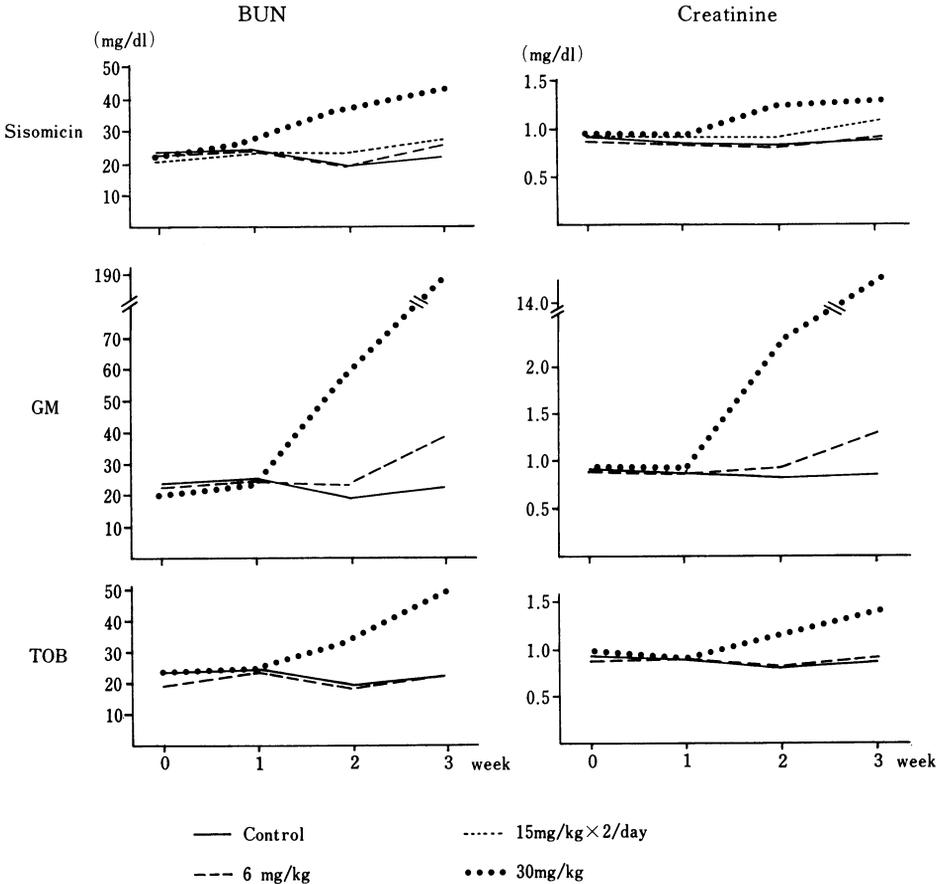


Table 4 Serum biochemistry of monkeys treated intramuscularly with Sisomicin, GM or TOB for 3 weeks

Serum Biochemistry	Weeks	Drug (daily dose mg/kg)											
		Control		Sisomicin			GM			TOB			
		0	6	30	15×2	6	30	6	30	6	30		
GPT (K unit)	0 w	17±1	18±2	14±3	18±6	17±1	20±4	18±6	18±8	18±6	18±8	18±8	
	3 w	17±4	14±6	33±14	33±6 Δ	18±1	116±67	26±2*	49±4 $\Delta\Delta$	26±2*	49±4 $\Delta\Delta$	49±4 $\Delta\Delta$	
GOT (K unit)	0 w	21±5	22±2	22±7	22±1	22±1	24±6	24±14	22±3	24±14	22±3	22±3	
	3 w	21±6	26±4	41±13	56±16 Δ *	32±6 Δ	173±164	30±2	67±26 Δ *	30±2	67±26 Δ *	67±26 Δ *	
LDH (LDH unit)	0 w	233±19	207±56	234±55	236±29	199±14	219±39	284±95	232±71	284±95	232±71	232±71	
	3 w	260±61	263±62	573±275	453±167	299±69	2422±1532	310±45	675±180 Δ *	310±45	675±180 Δ *	675±180 Δ *	
Ch. E. (Δ pH)	0 w	0.87±0.22	1.03±0.18	0.88±0.33	0.88±0.17	0.82±0.24	0.82±0.23	0.90±0.17	0.84±0.16	0.82±0.23	0.84±0.16	0.84±0.16	
	3 w	0.74±0.26	0.78±0.08	0.80±0.23	0.76±0.13	0.74±0.17	0.55±0.19	0.78±0.18	0.59±0.19	0.55±0.19	0.59±0.19	0.59±0.19	
Al. P. (B-L unit)	0 w	15.4±3.9	15.9±2.9	13.3±2.1	14.1±3.7	13.8±4.4	15.7±2.0	17.6±3.2	11.6±5.1	15.7±2.0	17.6±3.2	11.6±5.1	
	3 w	12.6±3.5	14.2±4.1	9.8±1.9	14.7±3.8	11.5±2.0	8.6±1.3 $\Delta\Delta$	21.2±6.8	9.7±5.2	8.6±1.3 $\Delta\Delta$	21.2±6.8	9.7±5.2	
LAP (G-R unit)	0 w	189±29	178±32	163±31	181±33	172±37	190±41	150±30	197±43	172±37	190±41	197±43	
	3 w	155±38	166±21	141±11	156±13	146±26	157±24	153±9	150±32	146±26	157±24	150±32	
Na (mEq/l)	0 w	153±4	153±3	153±3	153±6	150±3	156±1	155±2	155±3	150±3	156±1	155±3	
	3 w	146±4	150±1	148±2 Δ	146±3	148±1	137±5 $\Delta\Delta$	148±3 Δ	143±9	148±1	137±5 $\Delta\Delta$	143±9	
K (mEq/l)	0 w	5.3±0.4	4.8±0.3	4.9±0.3	4.9±0.4	4.5±0.5	4.9±0.6	5.4±0.3	5.3±0.3	4.5±0.5	4.9±0.6	5.3±0.3	
	3 w	4.7±0.2	4.5±0.3	4.5±0.2	4.0±0.2 Δ	4.4±0.2	4.3±1.0	4.6±0.2 Δ	3.8±0.3 $\Delta\Delta$	4.4±0.2	4.3±1.0	3.8±0.3 $\Delta\Delta$	
Cl (mEq/l)	0 w	113±3	111±3	111±1	114±2	111±1	111±2	113±2	111±2	111±1	111±2	111±2	
	3 w	108±3	109±3	105±1 $\Delta\Delta$	105±0 $\Delta\Delta$	107±1 $\Delta\Delta$	87±15	110±2	107±3	107±1 $\Delta\Delta$	87±15	107±3	
Ca (mg/dl)	0 w	10.5±0.5	10.2±0.4	10.4±0.6	10.2±0.7	10.5±0.7	10.7±0.3	10.9±0.5	10.8±1.0	10.5±0.7	10.7±0.3	10.8±1.0	
	3 w	9.8±0.1	9.7±0.3	10.0±0.2	9.7±0.7	10.1±0.3	7.5±2.0	10.1±0.2*	10.2±0.2	10.1±0.3	7.5±2.0	10.2±0.2	
T. Protein (g/dl)	0 w	7.9±0.6	7.5±0.2	7.4±0.6	7.6±0.3	7.5±0.7	7.9±0.5	7.5±0.6	7.9±0.4	7.5±0.7	7.9±0.5	7.9±0.4	
	3 w	7.7±0.5	7.3±0.3	7.3±0.6	7.3±0.2	7.4±0.4	8.0±0.5	7.2±0.3	7.3±0.3	7.4±0.4	8.0±0.5	7.2±0.3	
A/G	0 w	1.1±0.2	1.3±0.1	1.0±0.2	1.1±0.2	1.2±0.5	1.1±0.1	1.2±0.3	1.1±0.2	1.2±0.5	1.1±0.1	1.1±0.2	
	3 w	0.9±0.1	1.0±0.1 Δ	1.0±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2	1.1±0.2	1.2±0.2	1.1±0.3	1.2±0.2	1.1±0.2	1.1±0.3	

Ch. E. : Cholinesterase Al. P. : Alkaline phosphatase T. protein : Total protein A/G : Albumin/Globulin

* and ** mean statistical significance to the control values.

 Δ and $\Delta\Delta$ mean statistical significance to the pretreatment values.*, Δ : P<0.05**, $\Delta\Delta$: P<0.01

GM-30 のみに総コレステロールの軽度上昇が認められたが、血糖、総蛋白、A/G はいずれの群にも変動はなかった。

6. 剖検所見および臓器重量 (Table 5)

剖検時に目立った肉眼所見は腎と投与部位に認められた。各薬剤の 30 mg/kg を投与した群の腎は灰白色に腫大し、剖面では皮質の溷濁腫脹が目立ち、皮質紋理が部分的ないしびまん性に不明であった。このような腎の変化は GM-30 に最も強く認められた。TOB-30 では溷濁腫脹が最も著しかったが、皮質紋理は比較的良く保たれていた。SISO-30, SISO-15×2 および GM-6 では腎の腫脹は中等度であったが、皮質紋理が部分的に不明となっていた。SISO-6 および TOB-6 にも類似的所見がみられたが、いずれも部分的な変化であり、散発的な変化であった。

投与部位には壊死巣、硬結、筋組織の部分的欠除、出血巣、線維化巣等が認められた。出血および硬結は対照群にもみられたが、筋組織の傷害は 30 mg/kg を投与した群に多く、薬剤間の差は明らかではなかった。6 mg/kg を投与した群にも 30 mg/kg を投与した群に類似する変化がみられたが、その程度は全般に軽度であった。

肝、腎、脾、副腎の重量および体重比について調べた

が、腎重量および腎体重比は 3 薬剤の 30 mg/kg を投与した群と、SISO-15×2 において増加しており、特に GM-30 および TOB-30 において顕著であった。SISO-6 および GM-6 の腎重量も軽度の増加傾向を示した。肝および副腎重量は各群間にはほとんど差がなく、脾重量は GM-30 で低下していた。

7. 組織所見

組織学的に目立った変化は腎、肝および投与部位に認められた。

腎臓にみられた変化は近位主部尿管を中心としており、尿管の拡張、刷子縁の乱れがその初期像であり、ついで上皮胞体の好エオジン染色性の低下と空胞変性や腫大がみられ、他方部分的に上皮内の好エオジン性顆粒の増加、上皮細胞の壊死から脱落、再生への過程がうかがわれた (Photo. 1)。このような近位主部尿管上皮の変化の過程は 3 薬剤に共通してみられたものであったが、その程度および主要変化像は各薬剤により多少異なっていた。

最も壊死が著しかったのは GM-30 であった。近位主部尿管の大部分が全く壊死に陥った上皮または再生上皮に覆われ、内腔は壊死物で充満していた (Photo. 2~3)。またヘンレ係蹄から集合管に至るすべての尿管管内

Table 5 Organ weight and organ-body weight ratio of monkeys treated intramuscularly with Sisomicin, GM or TOB for 3 weeks

(): Organ-body weight ratio

Drug	Daily dose (mg/kg)	FBW (kg)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal (mg)
Control	0	3.37±0.43	91±26 (2.66±0.46)	15±2 (0.45±0.03)	6±1 (0.17±0.03)	726±55 (0.022±0.002)
	6	3.43±0.16	75±9 (2.19±0.17)	18±2 (0.53±0.03*)	4±1 (0.12±0.02)	663±67 (0.019±0.003)
Sisomicin	30	3.12±0.42	82±6 (2.65±0.19)	20±2* (0.65±0.14)	5±2 (0.15±0.04)	607±96 (0.020±0.004)
	15×2	3.22±0.21	77±4 (2.40±0.13)	19±1* (0.59±0.03*)	5±1 (0.15±0.02)	661±20 (0.021±0.001)
GM	6	3.60±0.18	84±10 (2.32±0.21)	21±4 (0.58±0.08)	6±0 (0.17±0.01)	670±207 (0.019±0.007)
	30	3.27±0.23	79±18 (2.41±0.41)	26±6* (0.78±0.13*)	3±0** (0.09±0.01*)	865±186 (0.027±0.006)
TOB	6	3.50±0.26	80±5 (2.28±0.23)	17±3 (0.49±0.10)	5±1 (0.14±0.04)	563±95 (0.016±0.003)
	30	3.32±0.49	84±13 (2.54±0.03)	25±7 (0.74±0.11*)	5±2 (0.14±0.02)	556±101 (0.017±0.005)

FBW : Final body weight

* : P<0.05

** : P<0.01

Photo. 1 Control. The brush border of the proximal convoluted tubules (PCT) are smooth. The nuclei stained evenly and the cytoplasm is slightly striated. HE $\times 33$

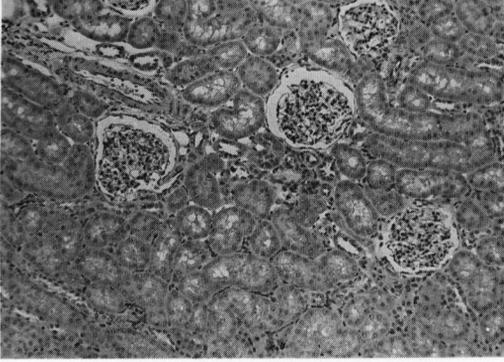


Photo. 2 Gentamicin 30 mg/kg. The most part of the PCT shows necrosis of epithelium with necrotic debris in the lumen. Regenerated epithelial cells are observed sporadically. HE $\times 33$

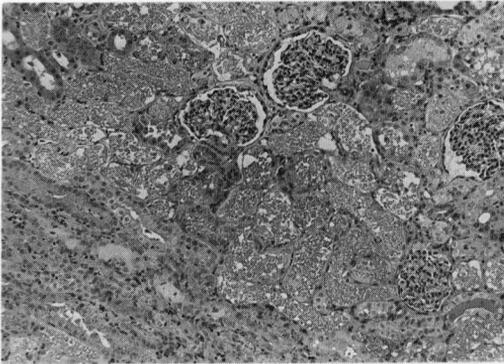


Photo. 3 Gentamicin 30 mg/kg. Necrosis of epithelium of PCT is prominent. Eosinophilic granules are remarkably noted in epithelia of a small number of PCT in which almost normal structure is preserved (arrow). HE $\times 66$

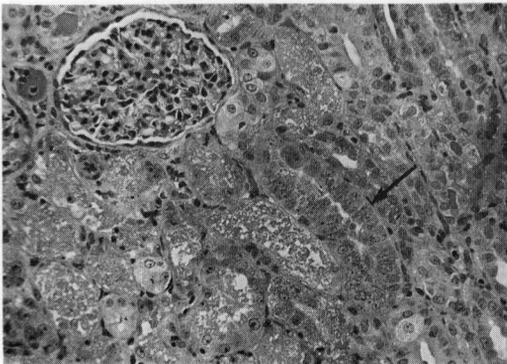


Photo. 4 Gentamicin 30 mg/kg. Necrotic debris has filled the collecting ducts of the renal papilla in which desquamation of epithelial cells is observed. HE $\times 33$

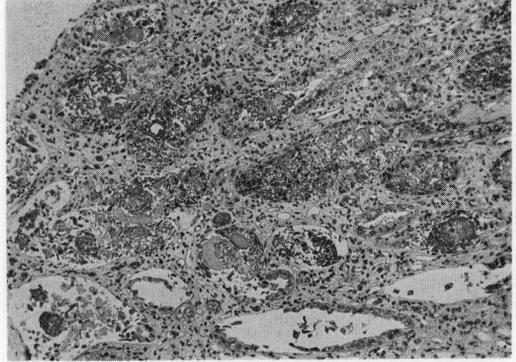


Photo. 5 Sisomicin 30 mg/kg. Remarkable necrosis and regeneration of epithelial cells of PCT are seen with necrotic debris in the lumen. Eosinophilic granules are seen in cytoplasm of epithelial cells of PCT in the upper part of the photograph (arrow). HE $\times 33$

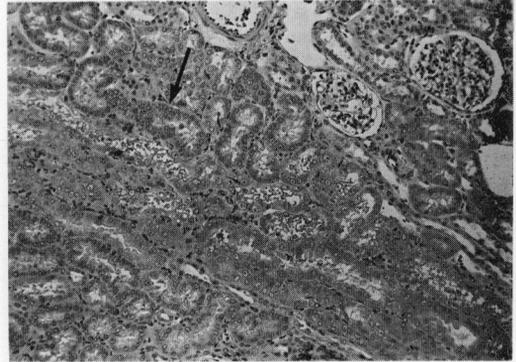


Photo. 6 Sisomicin 30 mg/kg. Epithelial cells of PCT are partly swollen, and large vacuoles are noted (arrow). Necrosis of the epithelial cells are scattered. HE $\times 66$

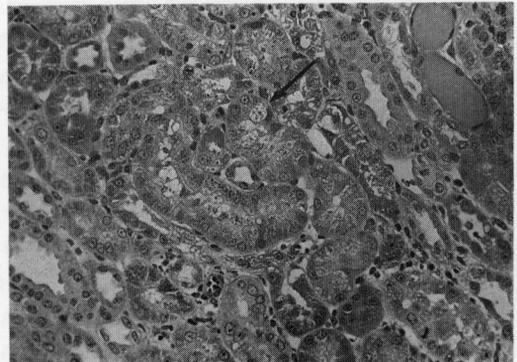


Photo. 7 Sisomicin 15 mg/kg $\times 2$. PCT's with necrotic epithelium are seen sporadically. HE $\times 33$

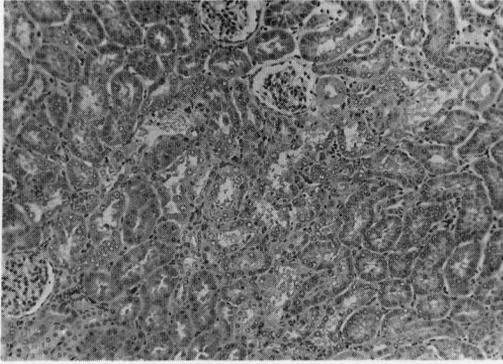


Photo. 10 Gentamicin 6 mg/kg. PCT's with regenerated epithelia and necrotic debris in the lumen are observed. HE $\times 66$

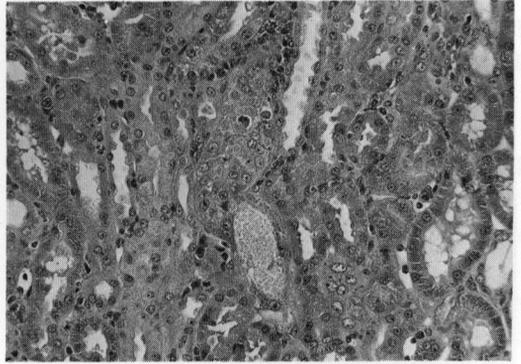


Photo. 8 Tobramycin 30 mg/kg. Dilatation of lumen of PCT and irregular brush border are prominent, but degeneration and necrosis of epithelial cells of PCT are hardly noted. HE $\times 33$

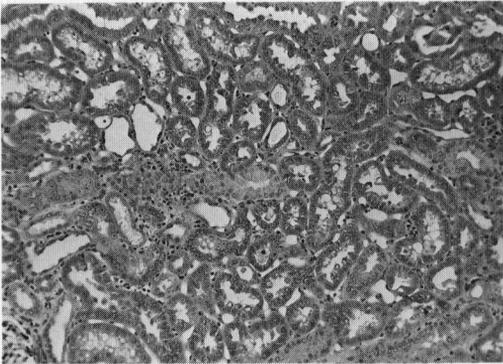


Photo. 11 Sisomicin 6 mg/kg. The PCT cells are partly swollen with apical parts protruding into the lumen. Nuclear clumping of chromatin is also noted. HE $\times 66$

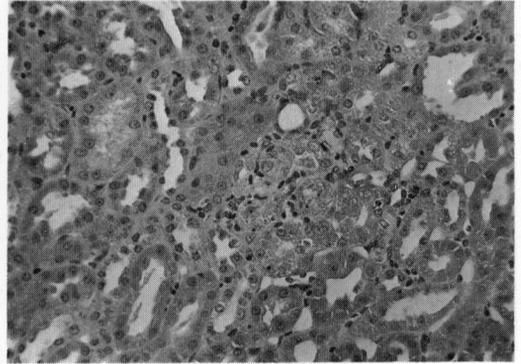


Photo. 9 Tobramycin 30 mg/kg. There are no remarkable alterations in the PCT structure. But eosinophilic granules are prominent in the cytoplasm of epithelial cells, and a small number of regenerated epithelia are noted (arrow). HE $\times 66$

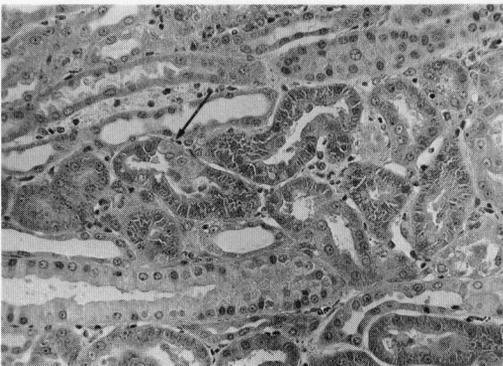


Photo. 12 Tobramycin 6 mg/kg. Although the PCT dilated slightly, neither degeneration nor necrosis of epithelia is observed. HE $\times 33$

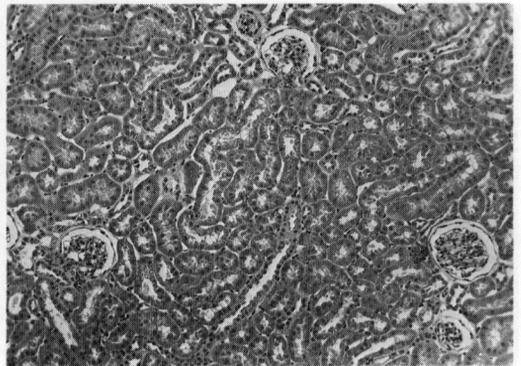


Photo. 13 Gentamicin 30 mg/kg. Severe vacuolar degeneration in the hepatocytes is noted, and acidophilic bodies appear in dilated sinusoid in the liver. Masson trichrome stain $\times 66$

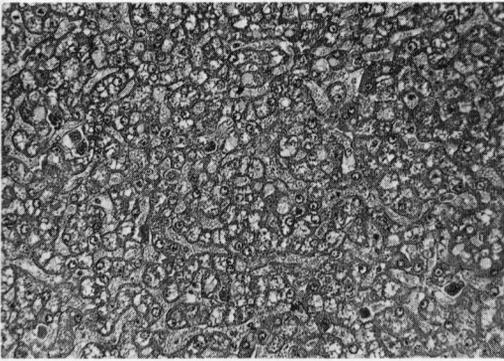


Photo. 14 Same liver as shown in Photo. 12 stained with Sudan III shows no fat in vacuoles of hepatocytes, but the sinusoidal cells show a small amount of fat (arrow). $\times 66$

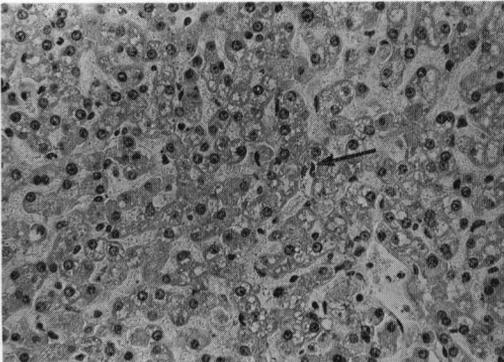


Photo. 15 Sisomicin 30 mg/kg. Degeneration of the muscular fibers of the injected site is seen in the upper part of the photograph. Loss of the sarcoplasm and prominent sarcolemma with nuclei of muscular fiber are noted in lower part. HE $\times 33$

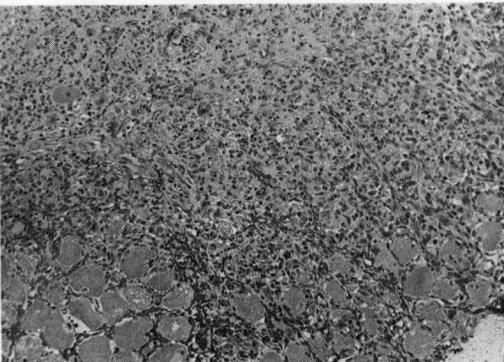


Photo. 16 Electron micrograph of PCT of control monkey. The microvilli are arranged in regular manner. Beneath the brush border, several apical tubules, vesicles and vacuoles are present. The mitochondria (M) are elongated. The rough surfaced endoplasmic reticulum consists of narrow cisternae. Several lysosomes (L) containing moderately electron dense material are noted. Several interdigitations are seen extending up into the cells from the basal lamina.

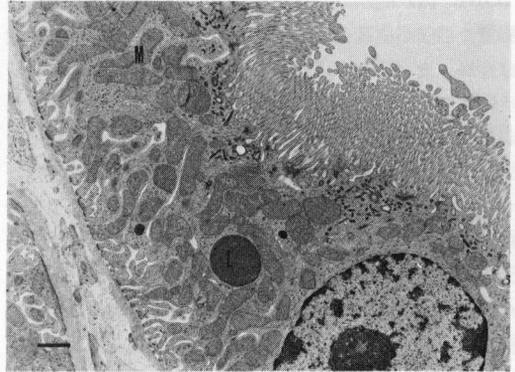
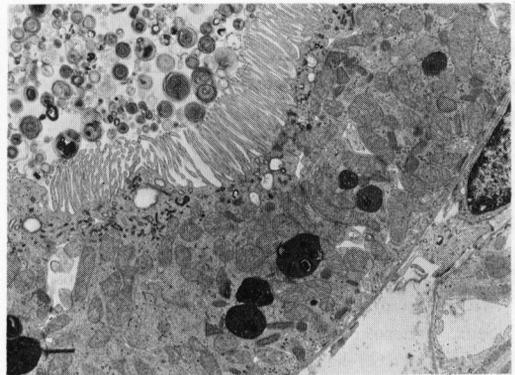


Photo. 17 PCT epithelia have preserved almost normal structure, but there are many lysosomes containing electron dense and homogenous contents and myeloid bodies. Numerous myeloid bodies appear in tubular lumen.



にも壊死物が充満し、集合管上皮の壊死もわずかながら散見された (Photo. 4)。しかし著しい上皮の壊死にもかかわらず、その基底膜は保たれ、また糸球体にも特記すべき変化は認められなかった。

SISO-30 では GM-30 とほぼ同じような病変が近位主部尿管に認められたが、その程度は GM-30 より軽度であり (Photo. 5~6)、SISO-15 \times 2 では SISO-30 よりも軽度であった (Photo. 7)。TOB-30 で最も目立ったのは近位主部尿管の拡張であり、その刷子縁は不規則または部分的に不明であった (Photo. 8)。このような尿管の間にはわずかに壊死に陥った上皮を有する尿管が

散見され、また好エオジン性の顆粒や空胞変性が目立つ上皮が認められた (Photo. 9)。さらに再生上皮に覆われた尿細管も散見された。

GM-6 では上皮の壊死がわずかではあるが全例に認められ、軽度ではあるが GM-30 と類似する病変がみられた (Photo. 10)。SISO-6 でも3例中1例にごわずかに壊死上皮がみられ、全例に上皮の染色性の低下と再生上皮が軽度ではあるが散見された (Photo. 11)。他方 TOB-6 では上皮の壊死は全く認められず、近位主部尿細管の拡張が主変化であり、再生上皮の存在も明らかではなかった (Photo. 12)。

GM-30 では3例中2例の肝細胞に空胞変性が中等ないし高度に認められた (Photo. 13)。空胞の一部にはマッソン染色により青色に染まる内容を有し、脂肪染色はすべて陰性であった (Photo. 14)。またこの内の1例では拡張した類洞内に好酸体が比較的多数散見された。TOB-30 の1例の肝細胞にも類似の空胞変性が認められたが、その程度は軽度であった。その他の群の肝には特記すべき変化は認められなかった。

投与部位には筋線維の変性、壊死、筋細胞の消失等が認められ、出血、小円形細胞の浸潤を伴っていた。その程度は投与量の増加に伴い増強していたが、薬剤間に差は認められなかった (Photo. 15)。

GM-30 で腎および肝の変化が最も強かった例では、副腎束状帯外側に腫大した胞体と濃縮核を有する細胞より成る類壊死巣が散見され、また骨髄の細胞成分の減少が軽度に認められた。GM-30 の他の1例では脾臓の汧胞が萎縮していた。

8. 腎臓の電顕所見

光顕的变化が認められた近位主部尿細管を中心に電顕

的観察を行なった。SISO-6 では上皮内に高電子密度の均一無構造の内容物とミエリン様物を含み、一部は単層の膜が明らかな phagosome が増加していた (Photo. 16)。またミエリン様小体が集簇し、細胞膜が不明になっている像もわずかに散見された。近位主部尿細管腔内にはミエリン様小体が多数認められた (Photo. 17)。しかし刷子縁およびその他の小器官には特記すべき変化は認められなかった。SISO-30 でもほぼ類似する所見がみられたが、その程度が強く、刷子縁の消失が著しかった。また多くの phagosome を含んだ上皮細胞が基底膜より脱落する像もみられた。さらに SISO-6 よりも大型のミエリン様小体の出現が高頻度であり、また低電子密度の

Photo. 19 Sisomicin 30 mg/kg. There are large residual bodies containing numerous myeloid bodies and electron translucent and homogenous material in PCT cells. The space between PCT cells are wide. And the junction of the basement membrane and epithelial cells are loose and interdigitation has disappeared.

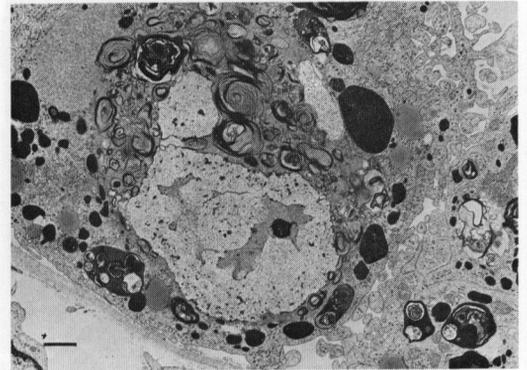


Photo. 20 Gentamicin 30 mg/kg. Most of microvilli of PCT cell has disappeared. There are many lysosomes containing myeloid bodies and electron dense material. Ribosomes in the stroma are prominent.

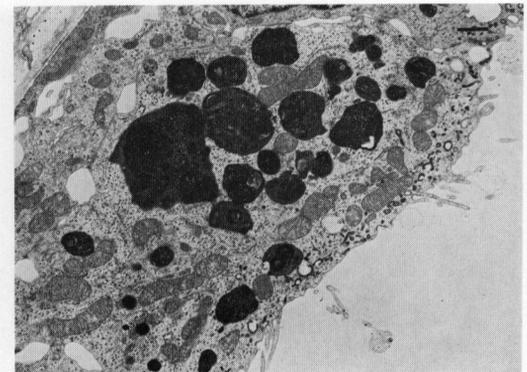


Photo. 18 Sisomicin 30 mg/kg. Many lysosomes with electron dense contents are noted in PCT cells. Microvilli are present but sparse, and Golgi apparatus (G) has developed well.

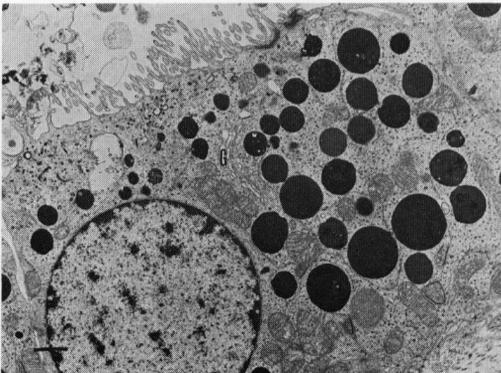


Photo. 21 Gentamicin 30 mg/kg. There are necrosis of epithelial cells on the left and the so-called "Shrivelled necrosis" degenerated epithelial cells on the right side of photograph.

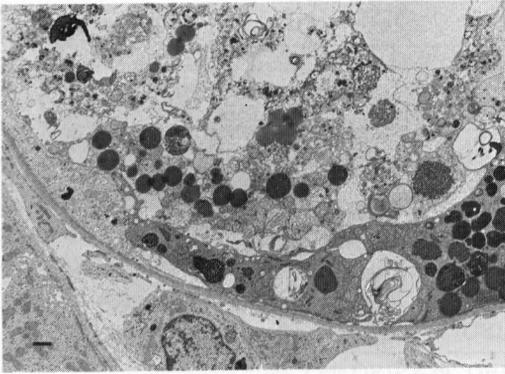
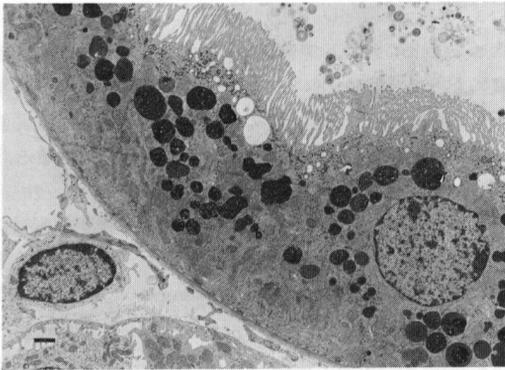


Photo. 22 Tobramycin 30 mg/kg. The structure of PCT seems almost normal, but many lysosomes containing electron dense material, apical cytoplasmic bleb protruding into the lumen (pocytosis) and dilatation of apical vacuoles are noted.



内容を有する phagosome 形成もみられた (Photo. 18, 19)。

GM-30 においても類似の所見が認められたが、細胞内の高電子密度の phagosome の大きさは大きく、またミエリン様小体が集簇して出来たような大型の phagosome も屢々認められた。上皮細胞が全く脱落してしまった尿細管も多く、一部には大きい核を有する再生上皮も散見された (Photo. 20, 21)。GM-30 では細胞の変化の程度と余りかゝりなく、細胞質間質に遊離リポソームが増加していた。TOB-30 においては上皮内の高電子密度の phagosome の出現頻度は SISO-30 と同じようであったが、刷子縁はほぼ保たれていた。しかし限局的には極めて大型の phagosome を有し、基底膜から遊離するような細胞が目立つ近位尿細管も観察された (Photo. 22)。

III. 考 察

アミノ糖系抗生物質の多くが腎毒性および耳毒性を有することは広く知られている^{8,9,10}。サルを用い新しいアミノ糖系抗生物質 Sisomicin の毒性を腎を中心として検索し、GM および TOB の毒性と比較した。3 薬剤ともに腎臓特に近位主部尿細管上皮に障害を惹起する作用を有していた。しかしその程度は各薬剤により相当差があった。30mg/kg を投与した群を比較すると、GM に血清尿素窒素およびクレアチニンの上昇が最も強く、血清電解質の変動も明らかであった。組織学的にも尿細管の障害像が最も著明であった。Sisomicin と TOB を投与したサルにおいては血清尿素窒素やクレアチニンの上昇は GM によるものより軽度であり、2 薬剤間に差はなかったが、血清電解質は TOB において軽度に変動していた。しかし組織学的には尿細管障害像は Sisomicin により強く、電顕的にも Sisomicin 投与例に刷子縁の消失が著しかった。TOB 投与例では上皮の壊死は乏しく、近位主部尿細管の拡張が主体を成し、光顕的にも電顕的にも上皮の形態は比較的良く保たれていた。尿糖の出現も TOB では全く認められず、尿細管上皮の糖再吸収機能は GM および Sisomicin 投与例に比べ良く保たれているものと考えられた。しかし電顕的観察では近位主部尿細管上皮細胞にミエリン様小体を有する phagosome の形成がいずれの薬剤にも顕著に認められた。ラットの腎に対する GM の影響を電顕的に調べた Kosekらの報告ではミエリン小体を含む lysosome の著しい増加を示している¹¹。私共の研究室で行なったラットおよびイヌにおける Sisomicin, GM および Kanamycin の毒性試験においてもほぼ同様の電顕像が得られており、また酸性フォスファターゼ活性が証明され lysosome であることが確認された。今回の TOB の結果を加えると、近位主部尿細管上皮内のミエリン様小体を含む lysosome 形成はアミノ糖系抗生物質により惹起される共通の所見と推察された。

このような lysosome の形成の機序については現在明らかでないが、Kosek は細胞の膜系に基因するリン脂質の含有を示唆し、GM が lysosomal degradation を障害する可能性を示している。しかし今回の検索範囲では上皮内の autophagic vacuole の形成はほとんど認められないにもかかわらず、ミエリン様小体を含む lysosome 形成が著しく、細胞小器官のこわれよりこのような lysosome が生じた可能性は少ないものと考えられた。むしろ細胞外よりの異物—例えば薬剤またはその代謝物等—と関連する heterolysosome の可能性もあるものと考えられた。高電子密度の内容を有する lysosome の分布が光顕的に尿細管上皮内の好エオジン顆粒と密接な関

Table 6 Summary of toxicity of Sisomicin in comparison with GM or TOB in rhesus monkeys

Toxic signs	GM 30>>>SISO 30
Induration of injected site	GM 30=SISO 30=TOB 30=SISO 15×2
Anemia	GM 30=TOB 30
Glycosuria	GM 30>SISO 30>SISO 15×2
BUN Creatinine ↑	GM 30>>>SISO 30=TOB 30>GM 6=SISO 15×2
Na, Cl ↓	GM 30>>>TOB 30
K ↓ or ↑	GM 30>TOB 30
Ca ↓	GM 30
GOT, GPT ↑	GM 30>>>TOB 30>SISO 30=SISO 15×2
Kidney weight	GM 30=TOB 30>SISO 30>SISO 15×2
Necrosis of proximal tubuli	GM 30>>>>SISO 30>SISO 15×2=TOB 30≥GM 6

SISO=Sisomicin

30: 30MG/KG/DAY

15×2: 15MG/KG×2/DAY

6: 6MG/KG/DAY

連を有しており、光顕的にはこのような顆粒を含有する細胞が破壊していく過程がうかがわれ、さらに電顕的にも多くのミエリン様小体を有するものが部分的に破壊されていく過程がみられ、大型の lysosome 形成が上皮障害に対し深いかゝわり合いを有するものと考えられた。

臨床的には GM および TOB による軽度肝障害が認められている^{12,13)}。GM-30 では血清 GOT, GPT および LDH が上昇し、肝細胞の空胞変性と好酸体の出現が著しかった。また Sisomicin, TOB によっても軽度の GOT, GPT, LDH の上昇を惹起したが、その程度は TOB を投与した群にやゝ強く、この群の1例では肝細胞の軽度の空胞変性が散見された。しかし SISO-30 の肝には形態的に特記すべき変化は認められなかった。

GM-30 および TOB-30 では軽度の貧血が認められ、赤血球系に影響することが示唆されたが、SISO-30 では赤血球系への作用は認められなかった。TOB のラットにおける毒性試験においても赤血球の減少が報告されており^{14,15)}、サルにおいてもほぼ同様の影響がみられた。

Sisomicin の 30 mg/kg/日投与群に関して、試みに1日1回投与する群と2回に分けて投与する群について、その毒性の現われ方を比較してみたが、30 mg/kg を1日1回投与した群に体重減少、一般症状、血清尿素窒素およびクレアチニンの上昇、腎の形態変化が強く、同じ1日量でも分割して投与する方が毒性の程度が弱かった。

ラット、イヌおよびサルの3種属で Sisomicin の毒性試験を行なったが^{4,5)}、いずれの種属においても腎障害が主要毒性所見であり、その障害の質も類似し、種属差は認められなかった。しかしラットでは本剤に対する感受性が他2種属に比べ低かった。

3薬剤によりサルに惹起された諸変化の程度を各項目について比較したのが Table 6 であるが、腎への影響は GM で最も強く、次いで Sisomicin であり、TOB の腎への影響は最も弱かった。他方肝および赤血球系への影響は Sisomicin に比べ GM および TOB でより強かった。耳毒性については検索しなかったが、GM-30 において実験末期に平衡失調が急激に出現した。このような一般症状からみて耳毒性も GM で最も強い可能性が示唆された。このことは腎障害が強く、GM の排泄が阻害されたことと関連するものと考えられた。

6 mg/kg を投与した群においても GM で最も腎変化が強く、Sisomicin ではごく軽度の尿管上皮の変化がみられたが、TOB では光顕的に明らかな変化はほとんど認められなかった。

投与部位の傷害に関しては3薬剤間に明らかな差はなかった。

IV. 結 語

新しいアミノ糖系抗生物質 Sisomicin の亜急性毒性をアカゲザルの雌を用いて検索した。1日の投与量は6および30 mg/kg とし、21日間筋肉内に投与を行なった。

1 日量 30 mg/kg に関しては 1 日 1 回投与する群と、15 mg/kg ずつ 2 回投与する 2 群を設けた。対照薬としては、Gentamicin および Tobramycin を用い Sisomicin と同様に 6 および 30 mg/kg の 2 投与群について検査した。

いずれの薬剤に関してもその主要毒性は腎臓近位主部尿細管上皮の障害であり、上皮の変性、壊死が認められ、それに伴って血清尿素窒素、クレアチニンの上昇、蛋白尿および糖尿の出現、尿沈渣の変化が認められた。このような腎変化は Gentamicin 30 mg/kg を投与した群に著しく、次いで Sisomicin 30 mg/kg 群であり、Tobramycin 30 mg/kg 群では比較的軽度であり、むしろ腎腫大、腎重量増加および近位主部尿細管の拡張が著明であった。電顕的には近位主部尿細管上皮にミエリン様小体を有する lysosome の著しい増加がみられ、上皮の障害との関連が示唆された。

肝機能障害は Gentamicin 30 mg/kg 群に強く、肝細胞の空胞変性と好酸体出現を伴っており、Tobramycin 30 mg/kg 群にも類似する軽度の変化が認められた。しかし Sisomicin 30 mg/kg 群の肝臓には形態学的に著変はみられなかった。また貧血も Gentamicin および Tobramycin の 30 mg/kg を投与した群に認められたが、Sisomicin 30 mg/kg 群では赤血球系には変化がなかった。

一般症状および体重の変動は腎変化とほぼ平行し、Gentamicin 30 mg/kg 群で最も強く、次いで Sisomicin 30 mg/kg 群であり、Gentamicin 30 mg/kg を投与したサルには著しい平衡失調が出現した。

Sisomicin 30 mg/kg を 1 日 1 回投与した群と、15 mg/kg ずつ 1 日 2 回投与した群を比較すると、腎毒性は後者の方が弱く、投与方法により毒性の程度は異なっていた。

6 mg/kg を投与したサルにおいても腎変化は Gentamicin 投与群に最も強く、次いで Sisomicin であり、Tobramycin を投与したサルの腎には光顕的に著変はみられなかった。

投与部位には筋線維の変性、壊死、線維化等がみられたが、その程度に関しては 3 薬剤間に差はなかった。

謝辞：本研究に御協力いただいた石丸経雄、鈴木修三、平田真理子諸氏に深謝します。

文 献

- 1) WEINSTEIN, M. J.; J. A. MARQUEZ, R. T. TESTA, G. H. WAGMAN, E. M. ODEN & J. A. WAITZ: Antibiotic 6640, a new Micromono-spora-produced aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiotics*. 23: 551~554, 1970
- 2) WAGMAN, G. H.; R. T. TESTA & J. A. MARQUEZ: Antibiotic 6640 II. Fermentation, isolation, & properties. *J. Antibiotics*. 23: 555~558, 1970
- 3) WAITZ, J. A.; E. L. MOSS JR., E. M. ODEN & M. J. WEINSTEIN: Antibiotic 6640 III. Biological studies with antibiotic 6640, a new broad-spectrum aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiotics*. 23: 559~565, 1970
- 4) 田中寿子, 服部治子: 小動物における Sisomicin の一般毒性。(未発表)
- 5) 渡辺満利, 服部治子, 田中寿子: イヌにおける Sisomicin の 3 か月間筋注毒性試験および回復試験。(未発表)
- 6) Guinea pig auditory & vestibular toxicity study. Schering Corporation.
- 7) IGARASHI, M.: Comparison of vestibular & renal toxicity of sisomicin (Sch 13475) and gentamicin in squirrel monkeys. (未発表)
- 8) DUKES, M. N.: Meyler's side effects of drug. *Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford*, vol. 8, p. 613, 1975
- 9) KOVNAT, P.; E. LOBOVITZ & S. P. LEVISON: Antibiotics & kidney. *Med. Clin. North Amer.* 57: 1045~1063, 1973
- 10) FALCO, F. G.; H. M. SMITH & G. M. ARCIERI: Nephrotoxicity of aminoglycoside & gentamicin. *J. Inf. Dis.* 119: 406~409, 1969
- 11) KOSEK, J. C.; R. I. MAZZE & M. J. COUSINS: Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab. Invest.* 30: 48~57, 1974
- 12) SHIMIZU, K.: Clinical experience with gentamicin in Japan. *J. Inf. Dis.* 119: 448~452, 1969
- 13) BENDUSH, C. L. & R. WEBER: Tobramycin sulfate: A summary of worldwide experience from clinical trials. *J. Infec. Dis.* 134: S219~234, 1976
- 14) 倉本昌明, 大久保孝明, 李 雄毅, 石村泰子, 森本順子: マウス, ラットでの Tobramycin の毒性に関する研究. *Chemotherapy* 23, 1470~1493 1975
- 15) WELLES, J. S.; J. L. EMMERSON, W. R. GIBSON, R. NICKANDER, N. V. OWEN & R. C. ANDERSON: Preclinical toxicology studies with tobramycin. *Tox. appl. Pharmacol.* 25: 398~409, 1973

SUBACUTE TOXICITY OF SISOMICIN ADMINISTERED
INTRAMUSCULARLY IN MONKEYS
— COMPARISON WITH GENTAMICIN AND TOBRAMYCIN —

HISAKO TANAKA, MITSUTOSHI WATANABE, HARUKO HATTORI
Pathology and Toxicology Department Preclinical Research Laboratories
Central Institute for Experimental Animals

Subacute toxicity of Sisomicin, a new aminoglycoside antibiotic, was examined in 24 female monkeys receiving intramuscular injections for 21 days. Daily doses were 6 mg/kg and 30 mg/kg; the latter was administered to two groups, one receiving 30 mg/kg once daily and the other 15 mg/kg twice daily. Gentamicin and Tobramycin were used as active controls at the same dose levels.

The main toxic signs in the high dose group of all drugs were epithelial lesions in the proximal convoluted tubuli of the kidney. Increase of serum urea nitrogen and creatinine and appearance of proteinuria and glycosuria progressed according to the degree of renal injury. These renal alterations were most prominent in monkeys treated with 30 mg/kg of Gentamicin and next in monkeys with 30 mg/kg of Sisomicin. Although lesions in the proximal tubular epithelium produced by 30 mg/kg of Tobramycin were relatively slight, swelling of the kidney, increase of kidney weight and dilatation of the proximal convoluted tubuli were remarkable.

Electron-microscopically, an increase in the number of large lysosomes containing myeloid bodies was noted in the epithelial cells of the proximal convoluted tubuli in monkeys treated with all three drugs.

Impairment of liver function, vacuolar degeneration and appearance of acidophilic bodies were marked in monkeys treated with 30 mg/kg of Gentamicin and slight in monkeys with 30 mg/kg of Tobramycin but not noted in monkeys with 30 mg/kg of Sisomicin. Anemia was noted in the groups of 30 mg/kg of Gentamicin or Tobramycin, however there were no alterations in the parameters concerned with erythrocytes in the group of 30 mg/kg of Sisomicin.

The severity of general symptoms and decrease of body weight paralleled with the degree of renal insufficiency and were most prominent in monkeys treated with 30 mg/kg of Gentamicin. In this group, disturbance of equilibrium appeared rapidly during the last few days of the experimental period.

Comparing the degree of renal toxicity in monkeys treated once daily with 30 mg/kg of Sisomicin with that in monkeys with 15 mg/kg twice daily, renal toxicity was less in the latter group.

Slight alterations were noted in the kidney of monkeys treated with 6 mg/kg of Sisomicin or Gentamicin but not in that of monkeys treated with 6 mg/kg of Tobramycin.

There were no differences in the degree of injury at the sites of injection in monkeys treated with the three drugs.