

HAPA-Bのラットにおける腎毒性試験

松本 一彦・藤井 博子・三宅 博子・白岩 和已
三浦 昌己・山本 宏

東洋醸造株式会社リサーチセンター安全性研究所

斎藤 篤

東京慈恵会医科大学第二内科

新規アミノ配糖体系抗生物質、HAPA-Bのラットにおける腎毒性をAmikacin (AMK) 及びGentamicin (GM) を対照薬として比較検討した。HAPA-B及びAMKは50, 150, 300 mg/kg, GMは25, 50, 100 mg/kgを1日1回, Slc-Wistar ラット(雄)に7日間, 14日間及び21日間連続筋肉内投与した。また, 21日間投与後, 28日間の回復試験も併せて行った。

その結果, 死亡例は21日間投与でAMK投与群の場合20例中18例, GM投与群の場合20例中19例であったが, HAPA-B投与群では死亡例はみられなかった。また, HAPA-B投与群の体重減少は他剤より少なかった。摂水量及び尿量はHAPA-300群, AMK-150群, GM-25群より用量相関をもって増加した。一方, 尿浸透圧は摂水量及び尿量と正反対の動態を示し, 個体間変動も小さく, これらの検査の中では最も鋭敏な変化を示した。尿中酵素の中でもNAG活性はいずれの薬剤においても低投与量群で投与翌日より有意な増加を示し, 活性ピークも用量依存的に投与期間の早期に移動し, 型も, よりシャープになった。これらの変化はGM-50群, AMK-150群, HAPA-300群がほぼ等しかった。また, LDH活性もNAGとほぼ同じ動態を示したが鋭敏度がやや劣った。ALP及びLAP活性はHAPA-300群, AMK-150群, GM-50群より用量相関をもって増加し, 活性ピークも早期に移動したがNAGやLDHと異なり, 投与期間中に対照群より低い活性を示した。

尿試験紙によるpH, 潜血, 蛋白, 糖の定性試験では, いずれの薬剤も投与期間及び投与量に比例して変化がみられたが, なかでもGMが最も強い変化を示し, 次いで, AMK, HAPA-Bの順であった。尿中電解質において, Kの低下とPの増加がHAPA-300群, AMK-150群, GM-50群より投与期間に比例して, 著明にみられたがNa, Clの変化は投与量, 投与期間に関係なく散見された。クレアチニンクリアランスはHAPA-B, AMKとも高投与量群に, GMでは中投与量群より低下がみられた。血清尿素窒素及びクレアチニン値は7日間投与試験でGM-100群のみ, 14日間投与試験ではHAPA-300群, AMK-300群, GM-50, 100群に著明な増加がみられたが, 21日間投与試験では投与継続中にもかかわらず14日間投与試験時の値より低値を示した。また, 回復試験でもHAPA-300群, AMK-150群で軽度な上昇を示した。腎重量はいずれの薬剤でも低投与量群より有意な増加がみられ, 7日間投与試験ではHAPA-300群, AMK-150群, GM-50群がほぼ同じ値を示した。肉眼的所見ではいずれの薬剤とも腎臓の褪色, 腫大, 腎表面の粗造化がみられた。病理組織学的所見ではいずれの薬剤においても近位尿細管上皮細胞の好酸性顆粒状変性, 腫大, 空胞変性(脂肪滴沈着を含む), 壊死, 尿細管腔の拡張, 尿細管基底膜の肥厚などが主な病変であった。電子顕微鏡所見では, いずれの薬剤とも, ミエリン様小体を取込んだlysosome顆粒の出現がみられた。腎臓でみられたこれらの病変はその出現時期と程度において, 薬剤間に差が認められ, HAPA-Bの障害性は3薬剤の中で最も弱いものであった。

以上の結果を総合するとHAPA-Bの腎毒性はGMはもとよりAMKよりさらに弱いと言える。

新規アミノ配糖体系抗生物質, HAPA-B{1-N-(S-3-amino-2-hydroxypropionyl)-gentamicin B}はGentamicin-Bの1位のアミノ基をhydroxyaminopropionyl化したものであり, 種々のアミノ配糖体不活化酵素に対して安定で, *S. marcescens* や *P. aeruginosa* などのAmikacin (AMK) やGentamicin

(GM)の耐性菌にも有効であることが知られている¹⁾。一方, アミノ配糖体系抗生物質はその強い殺菌作用と広い抗菌スペクトルをもつ反面, 神経-筋遮断作用, 腎障害及び聴器障害などの副作用があり, これらの副作用の少ないアミノ配糖体系抗生物質の開発が待たれている。

Table 1 Schedule of study and number of animals.

Drug	Dose mg/kg	Experimental periods			
		7 day	14 day	21 day	recovery*
Control	Saline	6	6	10	10
	50	6	6	10	10
	150	6	6	10	10
HAPA-B	300	6	6	10	10
	50	6	6	10	10
	150	6	6	10	10
AMK	300	6	6	10	10
	25	6	6	10	10
	50	6	6	10	10
GM	100	6	6	10	10

* 28 days after treatment for 21 days

pH, 蛋白質, ブドウ糖, 潜血の定性試験を行った。なお, 尿中クレアチニン, P, LDH, ALP, LAP については, Centrif Chem System 600 を用いて測定した。クレアチニンクリアランス (Ccr: ml/min) は尿中クレアチニン濃度 $\times$ 1分間尿量/血清中クレアチニン濃度より求めた。

投与終了または回復試験終了の翌日に, いずれの動物も放血致死後, 腎臓を摘出し, 肉眼的観察及び重量測定後ただちに切り出しを行い, 10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した後, 常法に従いパラフィン切片を作成し, ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。なお, 一部はズダンIII, PAS, マッソントリクロム染色の特殊染色を施し, 病理組織学的検査を行った。さらに, 21日間投与試験ならびに回復試験の各群数例について腎臓の一部を2.45%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで二重固定後, 常法に従ってエボン樹脂包埋, 超薄切片を作成し, 酢酸ウランと鉛の重染色を施し, 電子顕微鏡の検査を行った。

途中死亡例あるいは切迫屠殺例に関しては病理組織学的検査のみを行った。

5. データの解析に使用された統計学的手法

各測定値は, 平均値及び標準偏差を求めて対照群との間で平均値の差の検定を Student の t 検定により行った。尿定性試験及び病理組織所見の離散量データについては統計処理は行わず傾向をとらえるに留めた。なお, 危険率は1%と5%有意水準を用いた。

II. 結 果

1. 死亡及び切迫屠殺例

AMK 投与群では 300 mg/kg 群(以下 AMK-300 群と略す。他の群も同様)の 14 日間投与試験で 2/6 例, 21 日間投与試験では回復試験群を含め 18/20 例の死亡がみられた。また, GM 投与群では GM-100 群の 14 日間投与試験で 3/6 例, 21 日間投与試験では回復試験群を含め 19/20 例の死

亡がみられた。一方, HAPA-B 投与群では死亡例はみられなかった(Table 2)。

2. 体重及び摂水量

体重及び摂水量は, 7, 14, 21 日間のいずれの試験群においても回復試験群(21 日間投与し, その後 28 日間回復)とほぼ同様な推移を示した。以下に回復試験群の結果を示す(Fig. 2, 3)。体重はいずれの薬剤も低投与量群では対照群との間に有意差を示さなかったが, GM-25 群はやや増加抑制を示した。HAPA-150 群では回復 4 日目より, AMK-150 群では投与 17 日目より体重減少がみられ始めたが, 回復 7 日目以降, 徐々に増加した。一方, GM-50 群は 10 日目より体重減少を示したが HAPA-B, AMK とは異なり, 回復期間に入る直前より体重増加を示した。この現象は HAPA-B, AMK の 300 mg/kg 群においてもほぼ同様に認められた。GM-100 群は投与 6 日目で既に対照群と有意差がみられ, 17 日までに 10 例とも死亡するまで著しい体重減少を示した。

摂水量はいずれの薬剤も低投与量群では特記すべき変化はみられなかったが, GM-50 群では投与 20 日目より回復 4 日目まで著明に増加した。AMK-150 群では投与期間中に増加はみられず, 回復 7 日目より増加し始めた。一方, HAPA-150 群は対照群と同様に推移した。AMK-300 群では投与 13 日目より低下がみられたが, 20 日目以降急激な増加を示し, 回復期間中も増加し続けた。同様な傾向は HAPA-300 群でもみられたが, その程度は AMK-300 群よりも軽度であった(Fig. 3)。

3. 尿定量試験

尿量, 尿浸透圧, 尿中酵素, 尿電解質は, 7, 14, 21 日間のいずれの試験群においても回復試験群とほぼ同様な推移を示した。以下に回復試験群の結果を示す。

1) 尿量: GM-25 群では投与 7 日目より増加傾向を示し, 投与 11 日目より回復 1 日目まで対照群との間に有意差がみられた。一方, GM-50 群では投与 7 日目より増加傾向

Table 2 Mortality in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM.

mg/kg/day		Experimental periods			
		7 day	14 day	21 day	recovery*
Control	Saline	0/6	0/6	0/10	0/10
	50	0/6	0/6	0/10	0/10
HAPA-B	150	0/6	0/6	0/10	0/10
	300	0/6	0/6	0/10	0/10
	50	0/6	0/6	0/10	0/10
AMK	150	0/6	0/6	0/10	0/10
	300	0/6	2/6* ¹	9/10* ²	9/10* ³
	25	0/6	0/6	0/10	0/10
GM	50	0/6	0/6	0/10	0/10
	100	0/6	3/6* ⁴	9/10* ⁵	10/10* ⁶

* 28 days after treatment for 21 days

Time of death (number of animals)

* 1 day 14(2)

* 2 day 13(1), day 14(2), day 15(2), day 16(2), day 18(2).

* 3 day 12(1), day 15(4), day 17(4).

* 4 day 11(1), day 13(1), day 14(1).

* 5 day 11(1), day 13(1), day 14(2), day 15(1), day 16(3), day 18(1).

* 6 day 11(3), day 14(1), day 15(1), day 16(3), day 17(2).

がみられ、投与13日目をピークとし、以後、漸次減少しはじめ、投与19日目より再び増加し、回復1日目を再ピークとして、以後減少していくパターンを示した。このような二峰性パターンの尿量増加はGM群ばかりではなく、AMK-150, 300群、HAPA-300群でもみられた(Fig. 4)。

2) 尿浸透圧：低投与量群のAMK-50, HAPA-50群では対照群と同様であったが、GM-25群で投与9日目より回復5日目まで尿浸透圧の減少がみられた。中投与量群のGM-50群では投与5日目より回復5日目まで、AMK-150群では投与7日目より回復15日目まで、HAPA-150群では投与19日目より回復15日目まで減少した。また、高投与量群のGM-100群、AMK-300群では投与5日目より、HAPA-300群では投与11日目よりいずれも回復期間終了時まで減少した(Fig. 5)。

3) 尿中酵素

(1) NAG：いずれの薬剤も低投与量群より投与翌日から用量依存的に活性の増加がみられ、GM-50群では投与11日目、AMK-150群では15日目、HAPA-150群では回復1日目に活性ピークを示した。また、高投与量群の活性ピークはGM-100群で7日、AMK-300群で11日、HAPA-300群では13日であった(Fig. 6)。

(2) LDH：いずれの薬剤とも低投与量群を除きNAGとほぼ同じ活性動態を示した。しかし、低投与量群のGM-25群では投与5日目より、AMK-50群では投与15日目より活性上昇を示したが、NAGと異なりHAPA-Bでは活性の上昇はみられなかった。また、中投与量群のGM-50群では投与5日目、AMK-150群では投与9日目及び

HAPA-150群では投与11日目より活性上昇に有意差が認められ、投与11日目、15日目及び回復1日目にそれぞれ活性ピークがみられた。なお、高投与量群の活性ピークはGM-100群の場合、投与7日目、AMK-300群及びHAPA-300群の場合11日目にそれぞれみられた(Fig. 7)。

(3) ALP：いずれの薬剤も低投与量群では対照群とほぼ同様の推移を示した。中投与量群のGM-50群では投与9日目に、AMK-150群では投与15日目に活性ピークを示したが、後者の場合19日目以降、対照群より低活性を示し、回復5日目及び8日目では有意差がみられた。この活性低下は回復8日目を最低に再び上昇しはじめ投与終了時点では対照群とほぼ等しい値を示した。なお、HAPA-150群は対照群とほぼ同じ動態を示した。高投与量群のGM-100群では投与7日目、AMK-300群では投与9日目、HAPA-300群では投与11日目に活性ピークを示した後、それぞれ投与9日目、13日目、17日目から有意差をもって対照群より低い活性を示した(Fig. 8)。

(4) LAP：ALPとほぼ同じ動態を示したが、活性パターンはよりシャープであった(Fig. 9)。

4) 尿中電解質

(1) Na及びCl：いずれの薬物においても投与量及び投与時期に関係なく、対照群との間で有意差が散見された(Table 3, 4)。

(2) K：HAPA-300群、AMK-150, 300群、GM-50, 100群において低下がみられ、とくにGM-100群は投与9日目で対照群の約1/2の値を示し、投与15日目では約1/5の値を示した。また、回復試験ではHAPA-300群で回復1日

Fig. 2 Body weights in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

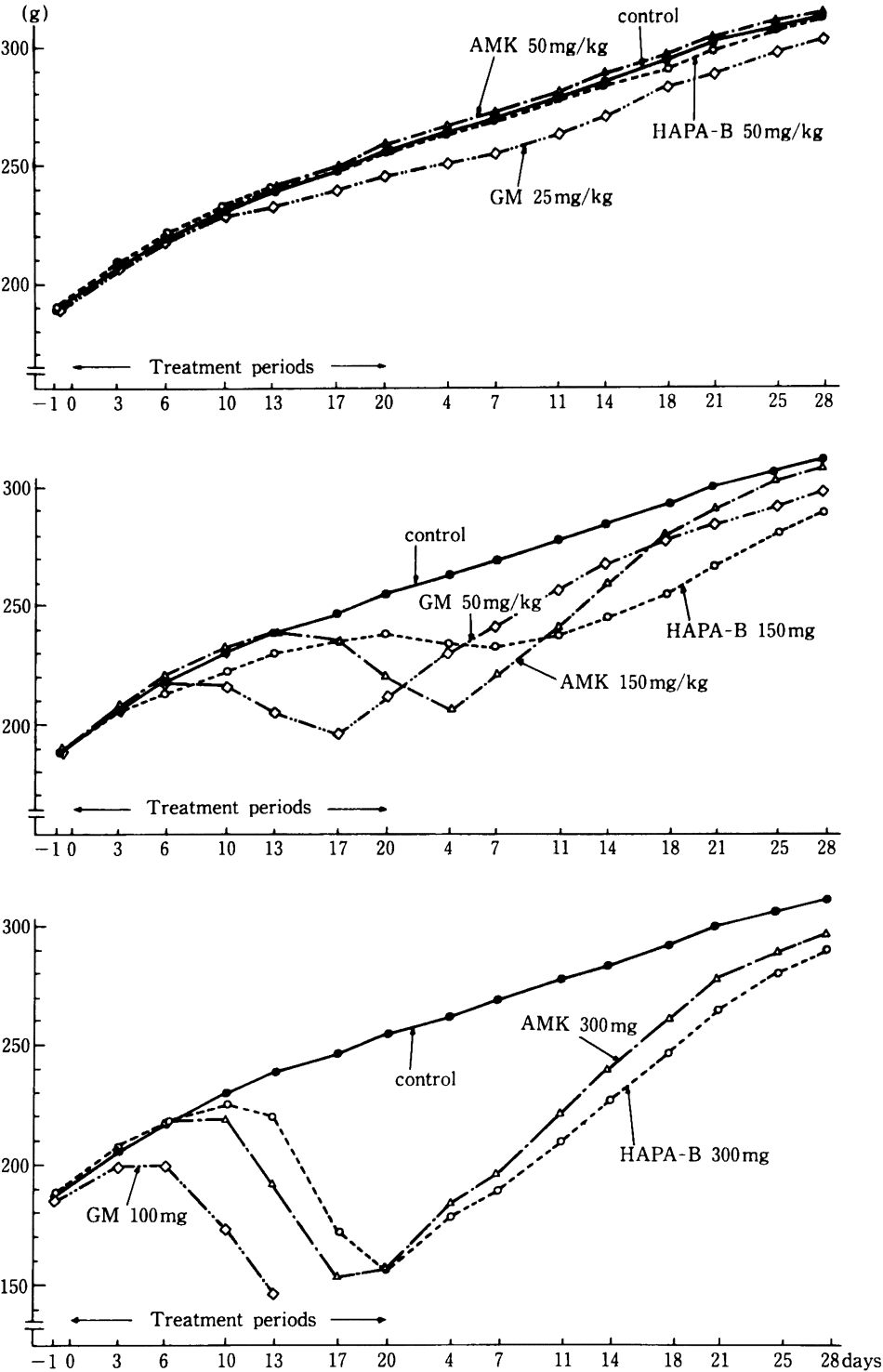


Fig. 3 Water consumption in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

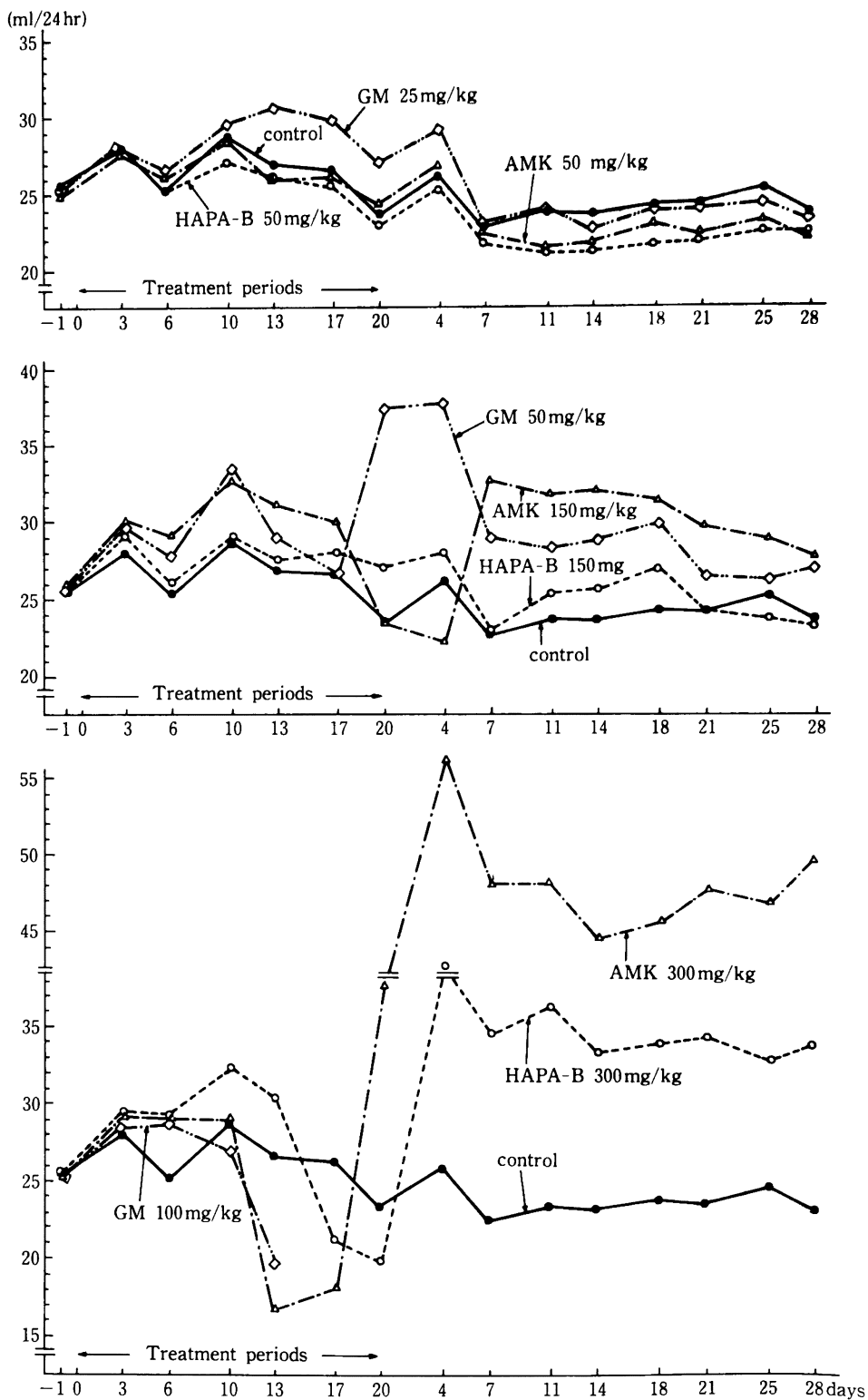


Fig. 4 Urine volume in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

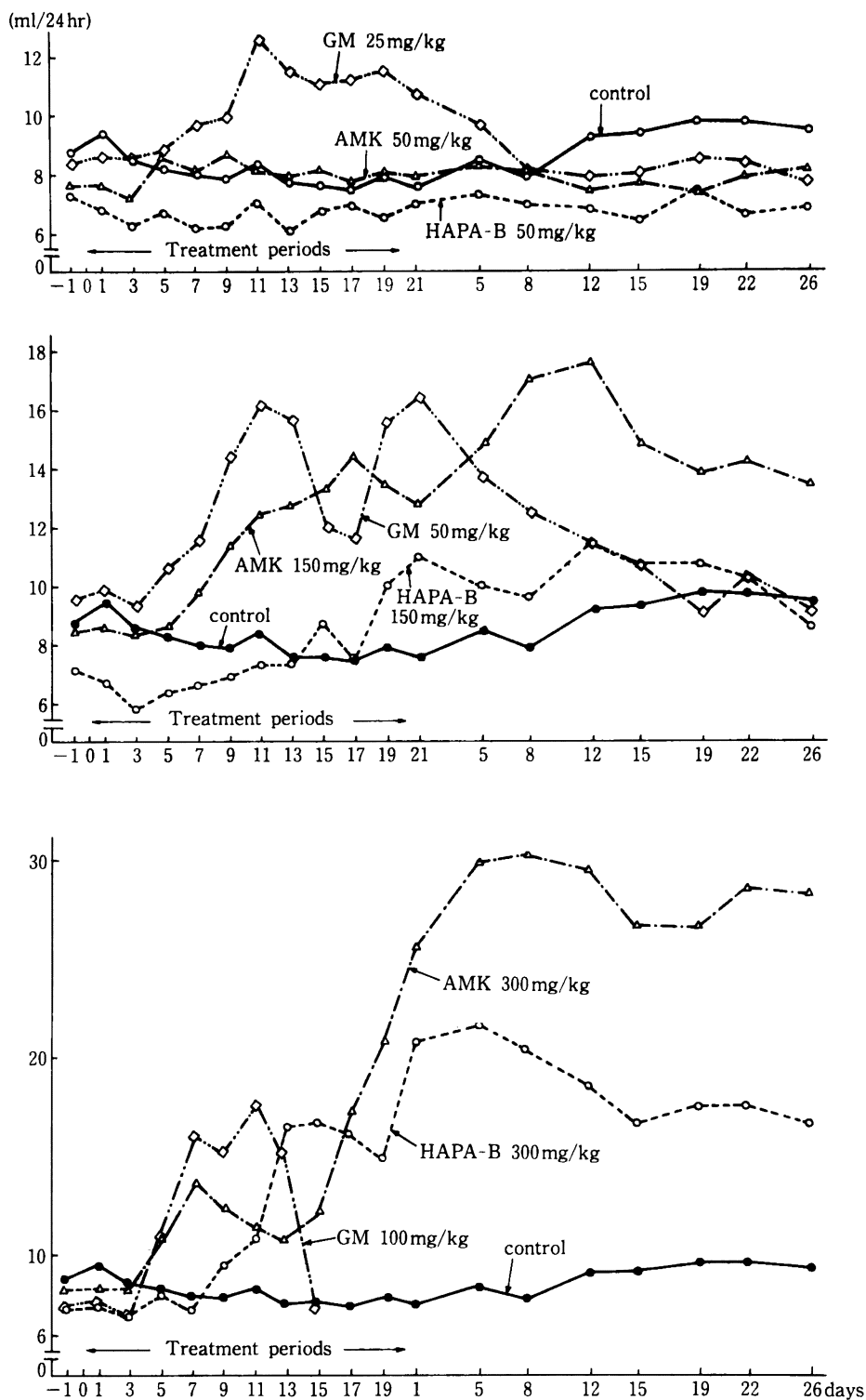


Fig. 5 Urine osmolality in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

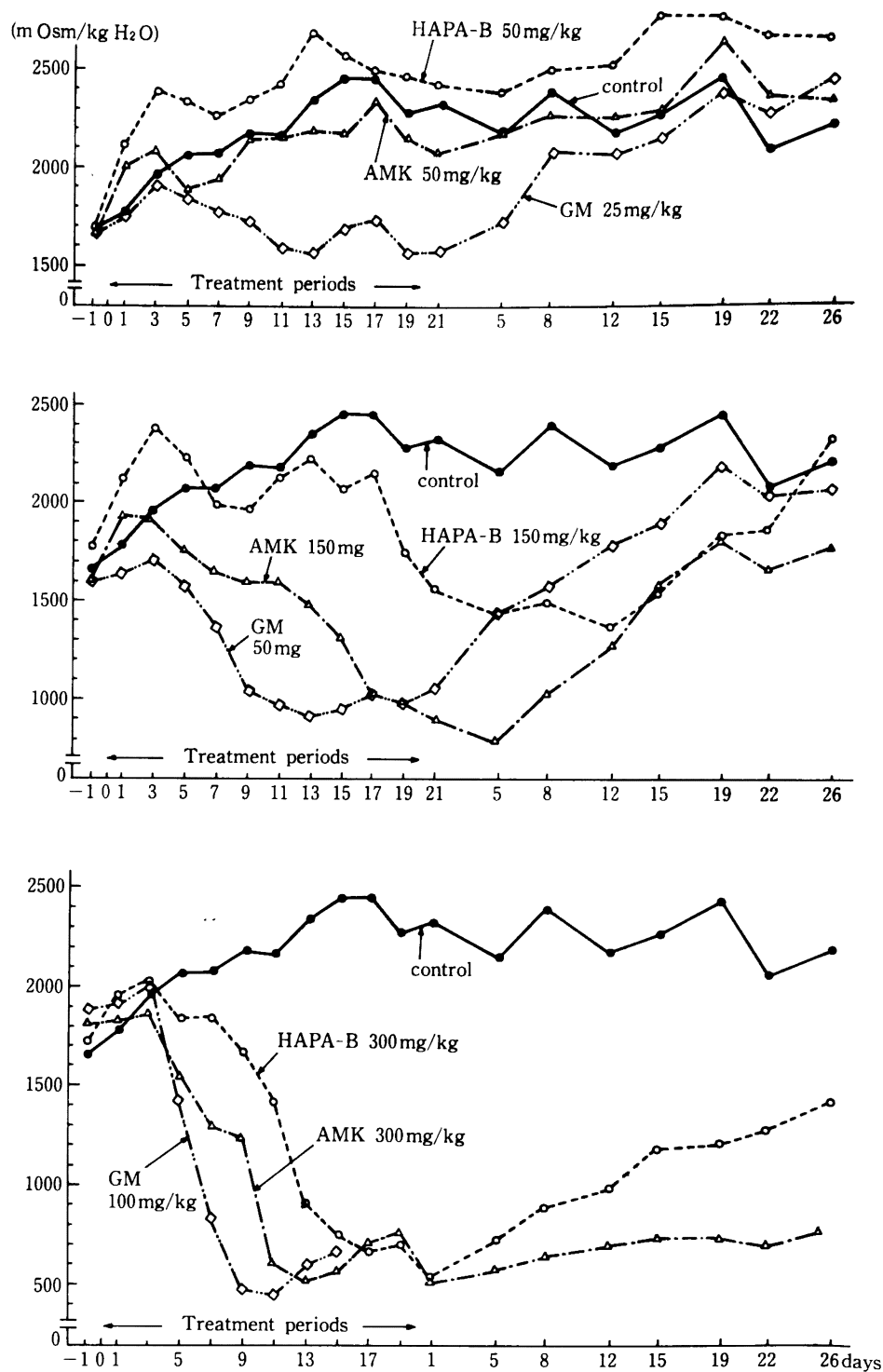


Fig. 6 Urine NAG activity in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

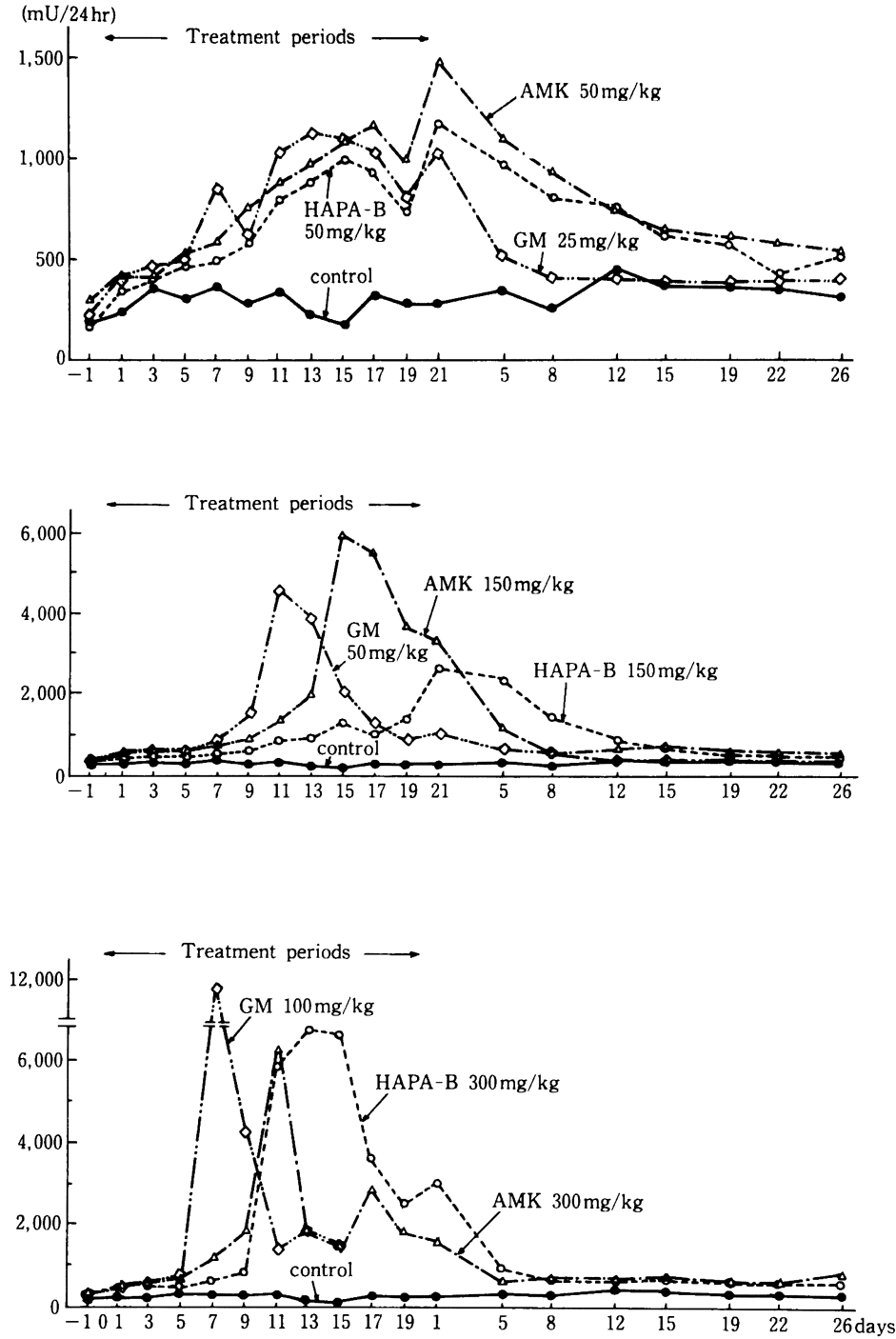


Fig. 7 Urine LDH activity in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

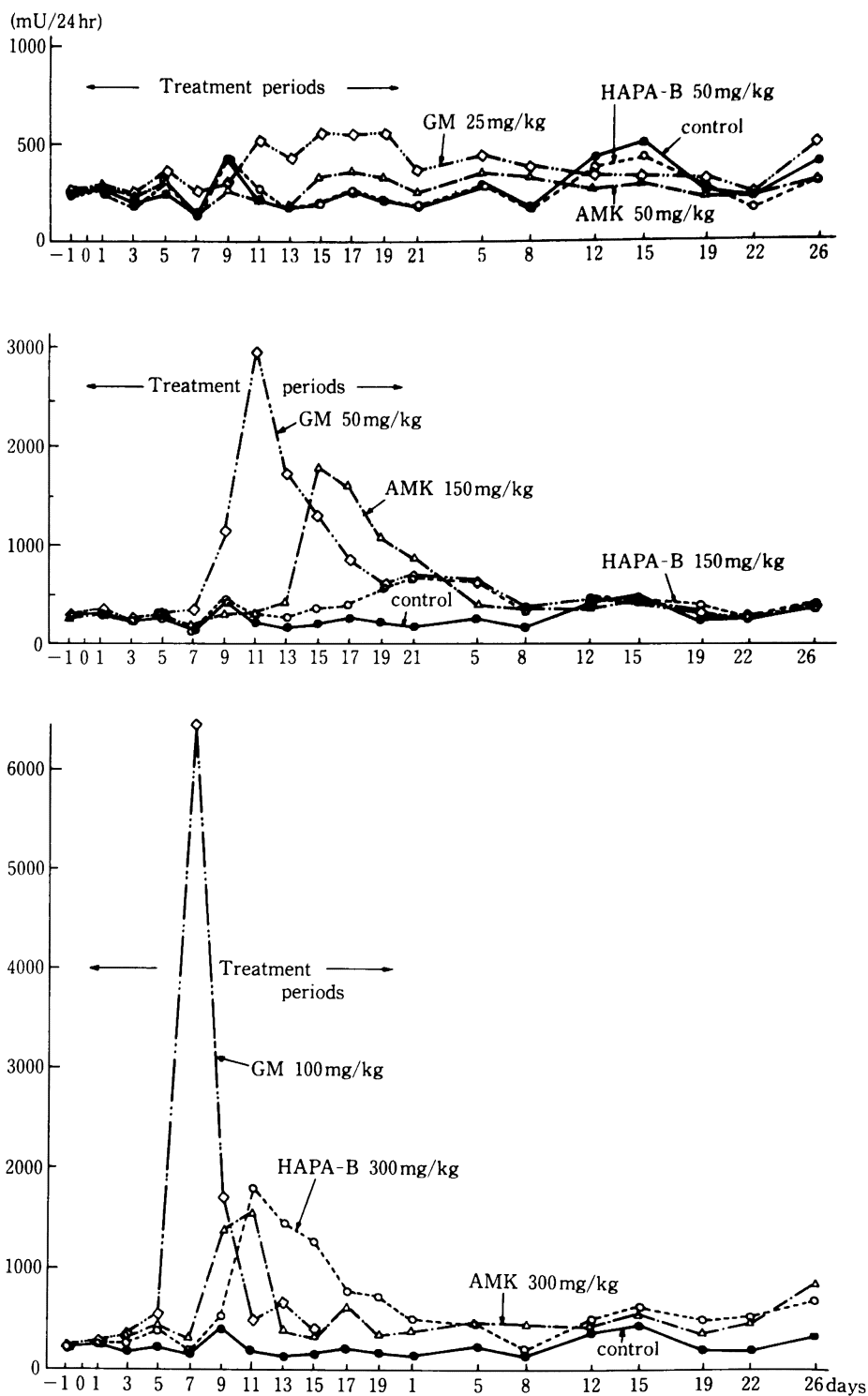


Fig. 8 Urine ALP activity in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM.

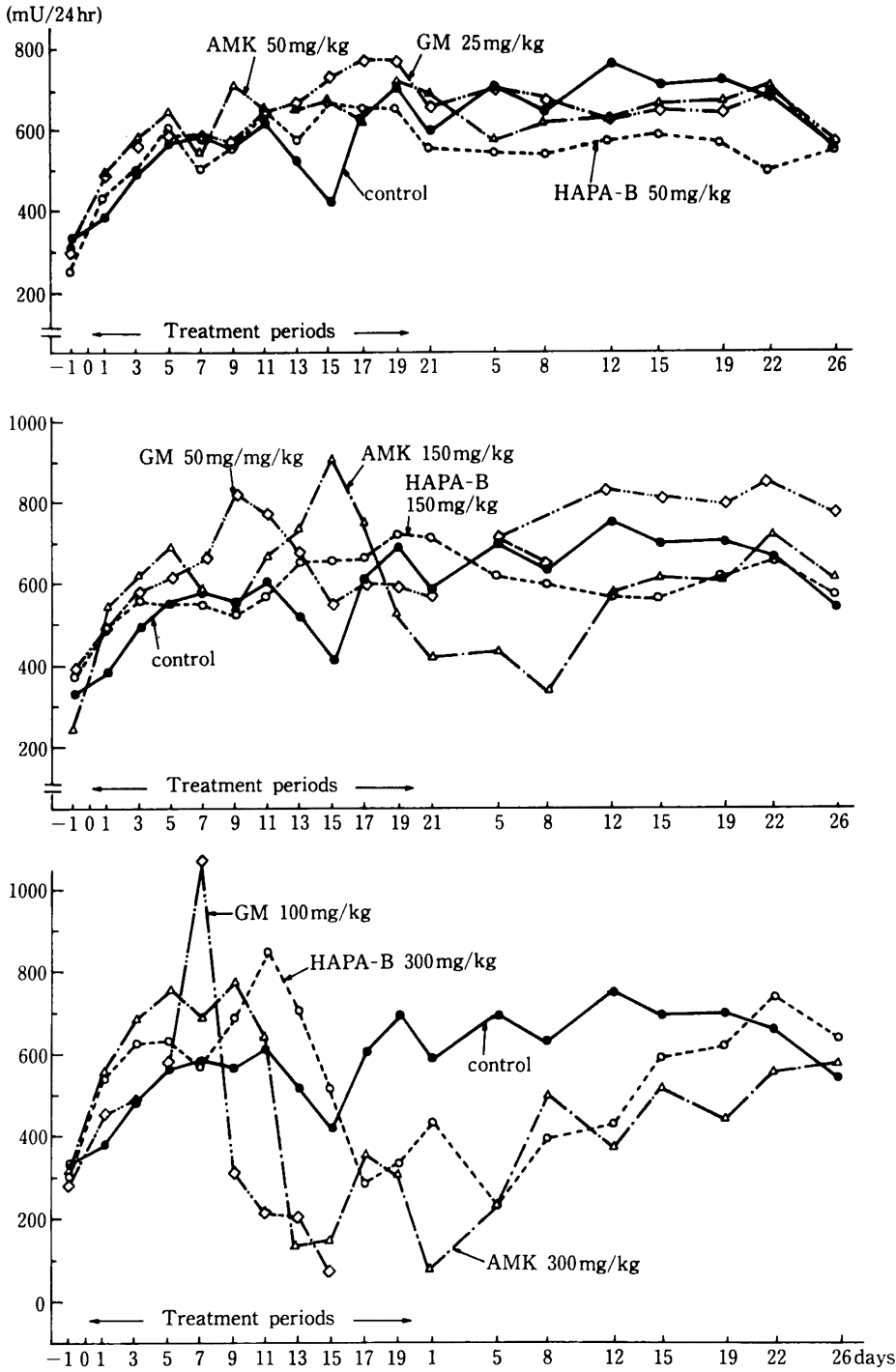


Fig. 9 Urine LAP activity in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

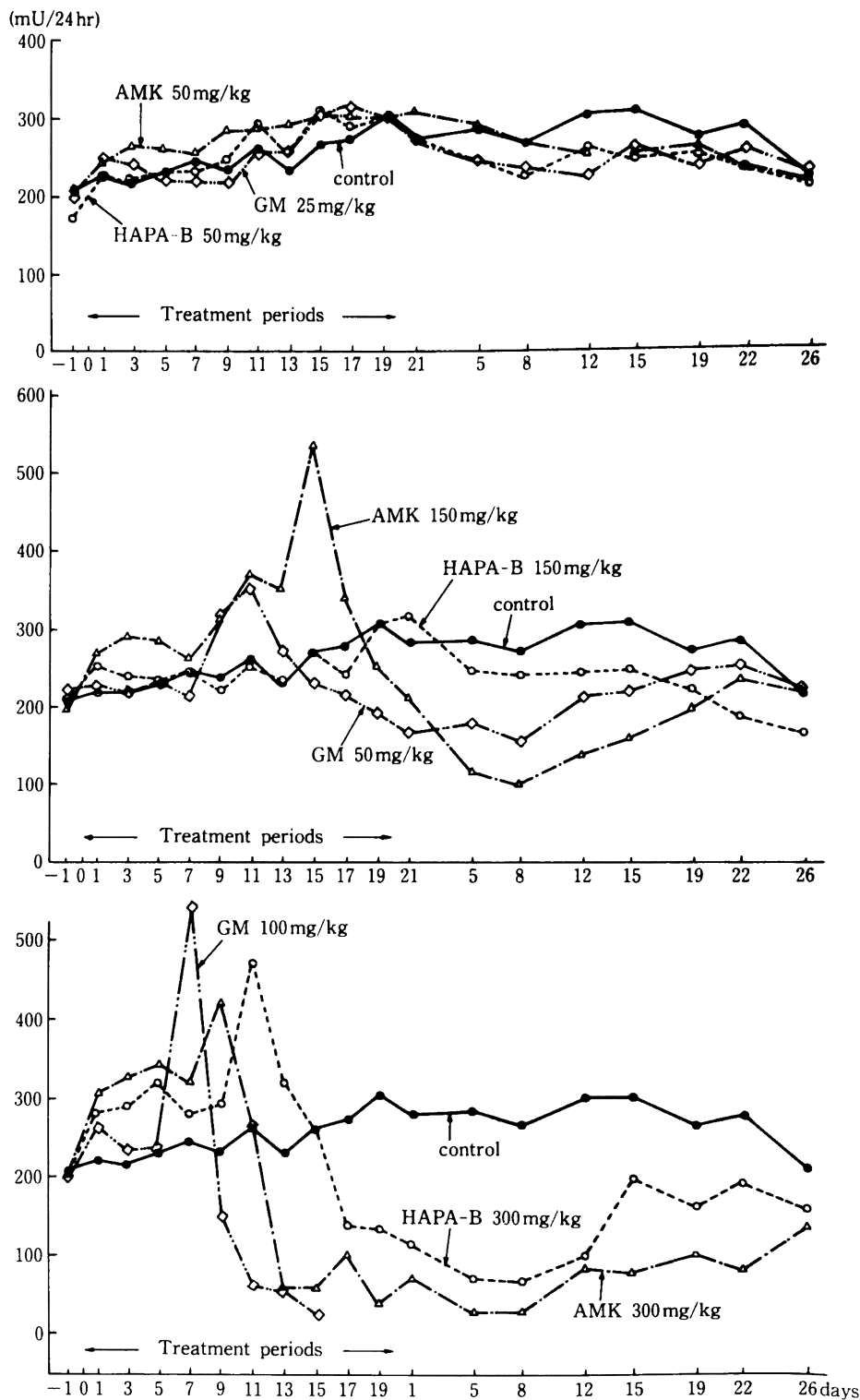


Table 3-1 Urine sodium in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

Treatment Periods

		Na ⁺ (nEq/24 hr)																					
Day	n	-1	n	1	n	3	n	5	n	7	n	9	n	11	n	13	n	15	n	17	n	19	
Control	6	1.154 ±260	6	1.453 ±173	6	1.413 ±310	6	1.429 ±163	6	1.352 ±355	6	1.464 ±401	6	1.381 ±396	6	1.213 ±273	6	1.291 ±255	6	1.317 ±203	6	1.338 ±196	
	50	1.057 ±167	6	1.093** ±209	6	1.087 ±241	6	1.145 ±302	6	1.081 ±267	6	1.204 ±133	6	1.324 ±289	6	1.101 ±101	6	1.209 ±131	6	1.145 ±233	6	1.097* ±107	
HAPA-B (mg/kg)	150	1.167 ±218	6	978** ±221	6	988* ±267	6	970** ±209	6	1.029 ±348	6	1.079 ±340	6	1.233 ±369	6	1.105 ±290	6	1.392 ±374	6	1.112 ±262	6	1.305 ±429	
	300	1.154 ±109	6	1.165* ±182	6	1.052* ±204	6	1.144* ±167	6	1.150 ±257	6	1.380 ±201	6	1.330 ±430	6	1.994* ±713	6	1.446 ±347	6	1.070 ±215	6	956 ±408	
AMK (mg/kg)	50	1.205 ±211	6	1.132* ±206	6	1.145 ±245	6	1.386 ±298	6	1.340 ±262	6	1.514 ±271	6	1.351 ±350	6	1.250 ±203	6	1.372 ±259	6	1.242 ±200	6	1.317 ±339	
	150	1.241 ±206	6	1.281 ±378	6	1.356 ±410	6	1.372 ±565	6	1.402 ±708	6	1.663 ±457	6	1.787 ±524	6	1.782** ±339	6	1.710 ±451	6	1.625 ±333	6	1.295 ±257	
	300	1.238 ±275	10	1.174* ±242	10	1.156 ±203	10	1.489 ±400	6	1.867* ±331	10	1.473 ±309	10	1.300 ±363	9	1.002 ±370	5	1.034 ±315	1	1.148 —	1	1.218 —	
	25	1.330 ±131	6	1.298 ±295	6	1.266 ±222	6	1.348 ±267	6	1.582 ±250	6	1.772 ±484	6	1.824* ±257	6	1.601 ±358	6	1.561 ±566	6	1.416 ±293	6	1.627 ±291	
GM (mg/kg)	50	1.433 ±278	6	1.447 ±256	6	1.324 ±231	6	1.541 ±223	6	1.628 ±222	6	1.767 ±167	6	1.704 ±483	6	1.785* ±367	6	1.180 ±345	6	1.038 ±492	6	1.396 ±314	
	100	1.190 ±133	10	1.135** ±201	10	1.008** ±135	10	1.432 ±359	6	1.742 ±325	10	1.390 ±458	7	1.649 ±679	6	1.253 ±287	5	402** ±236	0	—	0	—	

*Significant difference from control : P < 0.05, ** : P < 0.01, X ± S.D.

Table 3-2 Urine sodium in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM
—Recovery Periods—

Day	Na ⁺ (nEq/24 hr)													
	n	1	n	5	n	8	n	12	n	15	n	19	n	22
Control	6	1,227 ±155	6	1,012 ±131	6	1,008 ±67	6	1,026 ±105	6	1,138 ±143	6	1,092 ±195	6	1,130 ±73
	50	1,181 ±147	6	892 ±76	6	925 ±126	6	869* ±106	6	936* ±131	6	903 ±175	6	953 ±205
	150	1,232 ±298	6	718* ±197	6	827 ±253	6	940 ±220	6	991 ±136	6	951 ±134	6	1,143 ±126
HAPA-B (mg/kg)	300	767** ±180	6	1,204 ±272	6	1,376* ±342	6	1,342 ±348	6	1,333 ±288	6	1,313 ±211	6	1,560* ±336
	50	1,185 ±200	6	939 ±146	6	1,006 ±138	6	911 ±105	6	998 ±166	6	957 ±84	6	1,102 ±104
	150	1,046 ±474	6	751 ±463	6	1,306** ±203	6	1,540** ±316	6	1,400 ±325	6	1,337 ±215	6	1,414* ±235
AMK (mg/kg)	300	1,382 —	1	1,555 —	1	2,114 —	1	2,360 —	1	1,809 —	1	1,649 —	1	1,945 —
	25	1,430 ±236	6	973 ±154	6	933 ±121	6	879 ±193	6	971 ±151	6	934 ±138	6	1,053 ±132
	50	1,563 ±352	6	1,198 ±233	6	1,261* ±196	6	1,191 ±193	6	1,162 ±201	6	996 ±149	6	1,220 ±364
GM (mg/kg)	100	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—

* Significant difference from control : $P < 0.05$.

** : $P < 0.01$.

$\bar{X} \pm S.D.$

Table 4-1 Urine chloride of rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

—Treatment Periods—

Cl ⁻ (nEq/24 hr)																						
Day	n	-1	n	1	n	3	n	5	n	7	n	9	n	11	n	13	n	15	n	17	n	19
Control	6	1,398 ±330	6	1,469 ±208	6	1,298 ±256	6	1,796 ±113	6	1,211 ±234	6	1,155 ±236	6	1,067 ±246	6	1,083 ±237	6	1,067 ±244	6	1,090 ±141	6	1,098 ±140
	50	1,094 ±140	6	1,056** ±197	6	944* ±199	6	1,414* ±311	6	861* ±169	6	856* ±90	6	852 ±120	6	827* ±85	6	931 ±85	6	881 ±189	6	846** ±90
	150	989* ±235	6	1,002** ±203	6	872* ±253	6	1,229** ±262	6	813* ±236	6	884 ±283	6	862 ±198	6	894 ±240	6	1,038 ±292	6	883* ±172	6	1,189 ±337
HAPA-B (mg/kg)	300	982* ±147	6	1,092** ±133	6	997* ±187	6	1,416** ±259	6	883* ±165	6	1,136 ±221	6	1,358 ±400	6	1,578** ±273	6	1,241 ±211	6	982 ±98	6	858 ±249
	50	1,043* ±154	6	1,204 ±288	6	1,052 ±237	6	1,610 ±320	6	1,069 ±220	6	1,229 ±513	6	950 ±231	6	975 ±199	6	1,002 ±162	6	1,018 ±192	6	1,021 ±197
	150	1,112 ±282	6	1,218 ±352	6	1,196 ±353	6	1,620 ±434	6	1,148 ±595	6	1,319 ±463	6	1,343 ±358	6	1,348 ±288	6	1,456 ±472	6	1,430* ±273	6	1,154 ±143
AMK (mg/kg)	300	1,081* ±205	10	1,181* ±263	10	1,156 ±214	10	1,726 ±347	6	1,535 ±286	10	1,168 ±328	10	1,192 ±338	9	828 ±345	5	894 ±283	1	1,009 —	1	1,344 —
	25	1,114 ±103	6	1,222 ±256	6	1,192 ±255	6	1,576 ±344	6	1,243 ±196	6	1,187 ±293	6	1,439* ±295	6	1,284 ±238	6	1,385* ±246	6	1,470 ±521	6	1,318 ±232
	50	1,197 ±217	6	1,359 ±229	6	1,403 ±422	6	1,688 ±253	6	1,267 ±157	6	1,584 ±440	6	1,465* ±250	6	1,424* ±208	6	1,075 ±288	6	1,057 ±491	6	1,485 ±403
GM (mg/kg)	100	988** ±102	10	1,113** ±178	10	976** ±134	10	1,726 ±533	6	1,233 ±314	10	1,216 ±359	7	1,602 ±561	6	879 ±163	5	473** ±284	0	—	0	—

* Significant difference from control : P < 0.05. ** : P < 0.01. $\bar{X} \pm S.D.$

Table 4-2 Urine chloloride of rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

Recovery Periods

Cl ⁻ (nEq/24 hr)																	
Day	n	1	n	5	n	8	n	12	n	15	n	19	n	22	n	26	
Control	6	985 ±142	6	1,708 ±175	6	1,552 ±161	6	1,552 ±266	6	1,599 ±338	6	1,552 ±303	6	1,484 ±269	6	1,391 ±230	
	50	860 ±70	6	1,423* ±153	6	1,290* ±170	6	1,240* ±190	6	1,156* ±199	6	1,231 ±211	6	1,106* ±190	6	1,029** ±124	
	150	1,081 ±258	6	1,243** ±286	6	1,188** ±228	6	1,370 ±251	6	1,306 ±117	6	1,405 ±165	6	1,398 ±150	6	1,211 ±166	
	300	1,239 ±577	6	1,945 ±227	6	2,077** ±292	6	2,067* ±352	6	1,957 ±285	6	2,036* ±332	6	2,102** ±385	6	1,812* ±394	
AMK (mg/kg)	50	997 ±107	6	1,557 ±204	6	1,358 ±142	6	1,242* ±160	6	1,220* ±189	6	1,148* ±100	6	1,226* ±77	6	1,157 ±160	
	150	974 ±337	6	1,015* ±551	6	1,871* ±216	6	2,197* ±569	6	1,947 ±458	6	1,822 ±419	6	1,810 ±452	6	1,572 ±368	
	300	2,099 —	1	2,213 —	1	2,658 —	1	3,068 —	1	2,607 —	1	2,607 —	1	2,517 —	1	2,087 —	
GM (mg/kg)	25	1,168 ±216	6	1,509 ±225	6	1,299 ±237	6	1,151* ±237	6	1,200* ±231	6	1,236 ±220	6	1,243 ±225	6	1,045* ±198	
	50	1,614** ±244	6	1,833 ±209	6	1,716 ±271	6	1,628 ±318	6	1,420 ±288	6	1,223* ±179	6	1,343 ±340	6	1,114* ±166	
	100	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	

* Significant difference from control : P < 0.05. ** : P < 0.01. $\bar{X} \pm S.D.$

Table 5-2 Urine potassium in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM
—Recovery Periods—

Day	K ⁺ (nEq/24 hr)													
	n	1	n	5	n	8	n	12	n	15	n	19	n	22
Control	6	2,863 ±216	6	2,728 ±357	6	2,896 ±197	6	2,906 ±420	6	2,939 ±298	6	3,110 ±544	6	2,814 ±363
	50	2,693 ±444	6	2,530 ±366	6	2,522* ±256	6	2,497 ±287	6	2,469* ±320	6	2,662 ±363	6	2,500 ±356
	150	2,621 ±494	6	2,010* ±559	6	1,995** ±407	6	2,261* ±450	6	2,356* ±346	6	2,620 ±269	6	2,712 ±398
HAPA-B (mg/kg)	300	1,284** ±543	6	2,400 ±208	6	2,892 ±263	6	3,083 ±415	6	3,214 ±352	6	3,551 ±540	6	3,596** ±460
	50	2,843 ±335	6	2,530 ±346	6	2,680 ±253	6	2,411* ±244	6	2,510* 258	6	2,592* ±130	6	2,690 ±165
	150	1,530** ±823	6	1,406** ±775	6	2,722 ±180	6	3,344 ±523	6	3,437 ±509	6	3,543 ±603	6	3,357 ±628
AMK (mg/kg)	300	2,181 —	1	2,799 —	1	3,316 —	1	3,575 —	1	3,399 —	1	3,846 —	1	3,964 —
	25	2,663 ±386	6	2,428 ±430	6	2,340** ±334	6	2,283* ±276	6	2,415** ±243	6	2,723 ±326	6	2,661 ±258
	50	2,752 ±328	6	3,128 ±364	6	2,858 ±372	6	3,038 ±351	6	2,992 ±485	6	2,798 ±267	6	2,920 ±475
GM (mg/kg)	100	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—

* Significant difference from control : P < 0.05. ** : P < 0.01. $\bar{X} \pm S.D.$

Table 6-1 Urine organic phosphate in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM
—Treatment Periods—

		P (mg/24 hr)																					
Day	n	-1	n	1	n	3	n	5	n	7	n	9	n	11	n	13	n	15	n	17	n	19	
Control		—	6	3.07 ±2.11	6	2.90 ±2.12	6	3.94 ±1.54	6	4.31 ±2.29	6	2.86 ±1.64	6	3.31 ±1.90	6	3.43 ±2.04	6	5.31 ±2.47	6	4.80 ±1.75	6	5.39 ±2.80	
	50	3.74 ±1.49	6	7.85** ±2.64	6	7.61** ±1.61	6	7.33* ±2.18	6	5.91 ±2.20	5	5.90* ±1.99	6	8.56** ±2.96	6	6.53* ±1.73	6	5.89 ±1.80	6	5.81 ±1.11	6	5.82 ±1.91	
	HAPA-B (mg/kg)	—	6	7.32* ±2.79	6	6.55* ±1.93	6	4.39 ±2.34	6	5.62 ±1.68	6	5.02 ±2.10	6	5.47 ±1.64	6	5.98 ±2.48	6	6.10 ±1.89	6	8.07* ±1.96	6	8.95* ±1.60	
	300	4.70 ±1.25	6	7.31** ±1.68	6	8.03** ±1.84	6	8.01** ±2.73	6	9.58* ±3.41	6	10.68** ±4.01	6	13.33** ±1.72	6	15.68** ±1.09	6	16.44** ±1.08	6	19.04** ±2.75	6	13.60** ±5.11	
	50	3.64 ±1.41	6	5.27 ±1.55	5	4.81 ±1.18	6	5.59 ±2.74	6	5.23 ±1.18	6	4.99 ±2.05	6	5.85 ±3.24	6	5.62 ±1.94	6	5.10 ±1.32	6	4.55 ±1.00	6	5.24 ±1.86	
AMK (mg/kg)	150	—	6	7.69** ±2.66	6	6.84* ±2.57	6	8.12 ±5.02	6	8.36* ±3.49	6	8.68** ±2.43	6	10.26** ±3.59	6	10.58** ±1.39	6	10.43** ±2.52	6	14.30** ±3.90	6	11.15** ±2.61	
	300	4.40 ±1.04	9	7.85** ±2.09	10	8.48** ±2.44	6	9.79** ±3.33	10	11.88** ±2.29	10	6.19** ±1.12	8	9.44** ±3.06	5	10.82** ±2.84	1	16.36	1	15.4	1	2.05	
		25	5.15 ±1.96	6	8.08* ±3.27	6	7.75** ±2.21	6	8.17** ±2.55	5	8.21 ±3.60	5	8.09* ±4.51	6	9.08** ±3.64	6	8.17** ±2.65	6	6.82 ±3.23	6	6.42 ±2.26	6	5.78 ±1.01
GM (mg/kg)	50	—	6	6.60** ±1.70	6	7.04** ±1.56	6	10.07** ±1.68	6	11.30** ±1.94	6	10.40** ±1.13	6	9.26** ±2.85	6	5.74 ±4.82	6	6.56 ±3.83	6	6.00 ±2.34	6	5.32 ±2.50	
	100	4.78 ±1.69	10	10.45** ±2.72	10	14.89** ±4.92	5	17.62** ±2.57	10	9.42** ±1.20	7	7.99** ±1.61	6	17.55** ±6.03	5	8.35* ±3.99		—	0	—	0	—	

* Significant difference from control : P < 0.05, ** : P < 0.01, $\bar{X} \pm S.D.$

Table 6-2 Urine organic phosphate in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM
—Recovery Periods—

		P (mg/24 hr)													
Day		n	1	n	5	n	8	n	12	n	15	n	19	n	22
Control		6	5.51 ±1.75	6	7.11 ±3.56	6	5.77 ±4.16	3	6.21 ±3.82	6	6.29 ±2.35	6	5.89 ±1.88	6	5.22 ±2.42
	50	6	6.18 ±1.79	5	5.50 ±1.21	6	5.44 ±1.37	4	5.59 ±1.67	6	6.13 ±2.35	5	4.96 ±1.62	6	5.02 ±2.64
	150	6	7.19 ±2.89	6	4.55 ±2.85	6	3.15 ±2.54	5	1.78 ±1.06	6	1.76** ±0.88	5	3.57 ±1.57	6	2.51 ±1.92
HAPA-B (mg/kg)	300	5	1.16** ±1.00	4	2.94 ±1.51	4	3.54 ±2.46	6	4.18 ±2.80	6	5.11 ±3.47	4	6.84 ±4.37	6	6.14 ±3.35
	50	6	5.15 ±1.00	6	6.42 ±1.86	6	3.97 ±1.95	6	3.42 ±1.44	6	4.18 ±1.65	5	5.19 ±1.11	6	4.71 ±1.40
	150	6	5.02 ±4.45	4	3.76 ±3.26	6	3.68 ±2.42	4	6.35 ±5.63	6	5.99 ±2.97	3	7.58 ±2.24	6	6.90 ±3.70
AMK (mg/kg)	300	1	—	1	7.25 —	1	3.54 —	1	7.98 —	1	9.04 —	1	10.87 —	1	11.28 —
	25	6	5.86 ±4.54	4	4.92 ±2.00	6	2.08 ±1.05	6	2.55 ±1.31	6	4.17 ±2.15	6	4.73 ±1.65	6	5.51 ±1.93
	50	5	3.97 ±1.93	6	12.25 ±5.10	6	3.65 ±2.29	6	3.96 ±2.50	6	3.79 ±1.49	6	5.37 ±1.91	6	5.87 ±4.02
GM (mg/kg)	100	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—

* Significant difference from control : P<0.05, ** : P<0.01, $\bar{X} \pm S.D.$

Table 7 Creatinine clearance in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

Day	Treatment Periods										Recovery Periods								
	7					14					21					28			
	n	Urine Crea. (mg/dl)	Serum Crea. (mg/dl)	Ccr (ml/min)	n	Urine Crea. (mg/dl)	Serum Crea. (mg/dl)	Ccr (ml/min)	n	Urine Crea. (mg/dl)	Serum Crea. (mg/dl)	Ccr (ml/min)	n	Urine Crea. (mg/dl)	Serum Crea. (mg/dl)	Ccr (ml/min)			
Control	6	75.4 ±23.8	1.00 ±0.06	0.51 ±0.12	6	90.3 ±30.5	1.01 ±0.04	0.64 ±0.08	10	93.8 ±37.4	1.03 ±0.04	0.59 ±0.12	10	95.6 ±29.1	1.09 ±0.08	0.81 ±0.11			
	50	74.0 ±22.6	1.09* ±0.05	0.50 ±0.07	6	77.8 ±31.9	0.99 ±0.06	0.70 ±0.07	10	100.4 ±32.2	1.00 ±0.13	0.65 ±0.12	10	120.5 ±41.3	1.08 ±0.06	0.93 ±0.14			
	150	61.7 ±13.5	1.07 ±0.10	0.56 ±0.08	6	79.6 ±30.5	1.08* ±0.05	0.63 ±0.05	10	50.1** ±14.4	1.19** ±0.09	0.51 ±0.04	10	128.8* ±36.5	1.01* ±0.07	0.89 ±0.19			
	300	73.0 ±26.1	1.00 ±0.16	0.59 ±0.15	6	50.2* ±13.6	2.21** ±0.57	0.34** ±0.13	10	34.3** ±16.5	1.46** ±0.37	0.26** ±0.10	10	116.3 ±25.2	1.14 ±0.13	0.87 ±0.11			
AMK (mg/kg)	50	78.7 ±15.9	0.94 ±0.06	0.61 ±0.07	6	88.4 ±14.6	0.91* ±0.07	0.76* ±0.08	10	71.1 ±15.9	1.01 ±0.06	0.67 ±0.07	10	116.6 ±30.2	0.96** ±0.04	0.95** ±0.08			
	150	63.8 ±15.4	1.04 ±0.13	0.63 ±0.07	6	76.4 ±21.8	1.15* ±0.14	0.60 ±0.07	10	48.7** ±10.1	1.31** ±0.16	0.50 ±0.10	10	135.4** ±29.5	1.06 ±0.11	0.90 ±0.11			
	300	68.2 ±15.7	1.08 ±0.07	0.61 ±0.05	3	30.0* ±8.3	7.59** ±3.23	0.08** ±0.06	1	23.3 —	1.29 —	0.35 —	1	79.9 —	1.44 —	1.04 —			
GM (mg/kg)	25	51.9 ±21.7	1.11* ±0.07	0.55 ±0.07	6	82.6 ±31.8	1.16* ±0.13	0.65 ±0.10	10	54.1** ±11.3	1.04 ±0.04	0.63 ±0.07	10	118.6 ±34.1	1.05 ±0.09	0.88 ±0.10			
	50	56.8 ±13.3	1.09 ±0.08	0.64 ±0.12	6	45.7** ±13.8	1.49** ±0.26	0.50* ±0.12	10	70.0 ±17.6	1.02 ±0.07	0.65 ±0.11	10	121.2 ±38.9	1.06 ±0.05	0.90 ±0.13			
	100	53.3 ±10.6	2.16** ±0.32	0.29** ±0.05	3	32.7* ±7.1	3.69** ±0.81	0.11** ±0.04	0	—	—	—	0	—	—	—			

* Significant difference from control : P < 0.05, ** : P < 0.01, $\bar{X} \pm S. D.$

Crea. : Creatinine Ccr : Creatinine Clearance

目、AMK-150群で回復5日目まで対照群と比べ約1/2の値を示した他、回復期間終了までに各投与群で対照群との間で有意差が散見された(Table 5)。

(3) P: いずれの投与群においても投与翌日より上昇がみられ、経日的に高値を示した。なお、HAPA-300群及びAMK-150群では投与17日目、AMK-300群では投与15日目、GM-50群では投与7日目、GM-100群では投与5日目に最高値を示し、いずれも、対照群の最高値の約2倍である10 mg/24 hr以上の値を示した。回復試験では投与量あるいは回復期間に関係なく低値あるいは高値を示す群が散見された(Table 6)。

5) クレアチニンクリアランス: 7日間投与試験においてGM-100群で、14日間投与試験においてHAPA-300群、AMK-50, 300群、GM-50, 100群で、21日間投与試験ではHAPA-300群で低下がみられた。ただし、21日間投与試験のAMK-300群とGM-100群は、ほとんどの例が死亡した為、測定不可能であった。なお、回復試験ではAMK-50群を除きいずれの投与群においても低下は認められなかった(Table 7)。

4. 尿定性試験:

1) 尿pH: 7日間投与試験の場合、対照群では全例がpH 8ないしpH 9を示したが、薬剤投与群では投与量に関係なくpH 6を示す個体がGM群では14/18例、AMK群で2/18、HAPA-B群で3/18例にみられ、pH 8以上を示す個体はまったくみられなかった。14日間投与試験ではHAPA-B、AMKともpH 6を示す個体が11/18例及び8/17例に増加した。21日間投与試験では対照群にも1例のみpH 6を示す個体がみられ、投与群ではいずれの薬剤とも約70%がpH 6を示した。また、HAPA-300群の1例にpH 8を示す個体がみられたのみで、その他の薬剤投与群ではpH 8以上を示す個体はみられなかった。なお、回復試験では対照群でも4/10例がpH 6を示し、また、投与群の中にもpH 8ないしpH 9を示す個体が散見された (Table 8~11)。

2) 潜血: 7日間投与試験ではGM-100群が全例(±)を示した他、AMK-300群の1例に(+)がみられた。14日間投与試験ではいずれの薬剤とも高投与量群で(±)ないし(+)がみられた他、中投与量群のGM-50群でも全例が(±)ないし(+)を示した。21日間投与試験ではHAPA-300群、AMK-150, 300群、GM-25群以上で(±)ないし(+)を示す例がみられた。回復試験群ではいずれの薬剤も潜血はみられなかった(Table 8~11)。

3) 尿蛋白: 7日間投与試験でGM-100群にのみ(+)ないし(++)の出現がみられた。14日間、21日間投与試験及び回復試験ではいずれの投与群においても(+)ないし(++)の出現がみられたが、(+++)の出現は認められなかった(Table 8~11)。

4) 尿糖: 7日間投与試験でGM-100群にのみ(±)の出現がみられたが、14日間投与試験ではHAPA-300群、AMK-300群、GM-50, 100群で(±)ないし(+)の出現がみられた。さらに、AMK-300群では(++)及び(+++)の出現が各々1例ずつ認められた。21日間投与試験ではHAPA-300群、AMK-150群、GM-25, 50群で(±)が出現した。また、HAPA-300群で(++)が1例のみ認められた。なお、回復試験群ではいずれの投与群においても尿糖の出現はみられなかった(Table 8~11)。

5. 血清生化学検査

1) 尿素窒素: 7日間投与試験でGM-100群が56.4 mg/dlを示し、14日間投与試験ではHAPA-300群で67.5 mg/dl、AMK-300群で105.5 mg/dl、GM-50群で28.6 mg/dl及びGM-100群で149.6 mg/dlを示した。また、21日間投与試験では、それらの値は、それぞれ、63.1, 54.9, 21.7, 89.9 mg/dlに低下した(Table 12)。回復試験では対照群との間に有意差がみられたが、いずれも回復傾向を示していた。

2) クレアチニン: 7日間投与試験でGM-100群が2.16 mg/dlを示した。14日間投与試験ではHAPA-300群で2.21 mg/dl、AMK-300群で7.59 mg/dl、GM-50群で1.49 mg/dlを示したが、これらの値は21日間投与試験では、それぞれ1.45, 1.29, 1.02 mg/dlに低下した。回復試験ではAMK-300群の生存した1例で1.44 mg/dlがみられた以外、いずれの投与群においても上昇はみられなかった(Table 12)。

6. 腎重量

7日、14日及び21日間投与試験において、いずれの薬剤とも低投与量群より用量相関をもって増加がみられた。とくに7日間投与試験ではHAPA-300群、AMK-150群、GM-50群がほぼ同値を示した。また、いずれの投与群においても投与期間が長くなるにつれて重量が増加し回復試験ではHAPA-50群、AMK-50群を除き、いずれの投与群においても依然、対照群との間で有意差がみられた(Table 13)。

7. 肉眼的所見

1) 7日間投与試験: いずれの薬剤とも低投与量群より腎臓の褪色が散見され、その程度は用量相関をもって増強した。また、HAPA-B及びAMKの300 mg/kg群、GM-50, 100群では腫大もみられた。

2) 14日間投与試験: 上記所見に加え、腎臓の腫大はいずれの薬剤とも低投与量群より散見され、その程度は用量相関をもって増強した。GM-150群では腎表面の粗造化が観察された。

3) 21日間投与試験: 上記所見が増強し、さらに、HAPA-300, AMK-150, 300群においては腎表面の粗造化がみられた。なお、GM-50群の1例に左腎の腎門部に白色

Table 8 Urinalysis in rats treated intramuscularly HAPA-B for 7 days

n = 6

Drug	Dose (mg/kg)	Control	HAPA-B			AMK			GM		
			50	150	300	50	150	300	25	50	100
pH	6		2		1	1	1		4	4	6
	7		4	6	5	5	5	6	2	2	
	8	3									
	9	3									
Protein	—										
	±										
	+	5	6	6	6	6	6	6	6	6	1
	++	1									5
Glucose	—	6	6	6	6	6	6	6	6	6	2
	±										4
	+										
	++										
Occult Blood	—	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6
	±										
	+										
	++						1				

Table 9 Urinalysis in rats treated intramuscularly HAPA-B for 14 days

n = 6

Drug	Dose (mg/kg)	Control	HAPA-B			AMK			GM		
			50	150	300	50	150	300	25	50	100
pH	6		2	3	6	3		5	5	4	3
	7	2	4	3		3	6		1	2	
	8										
	9	4									
Protein	—										
	±										
	+	3	5	6	3	6	2	4	6	5	2
	++	3	1		3		4	1		1	1
Glucose	—	6	6	6	2	6	6		6	2	
	±				2			1		4	2
	+				2			2			1
	++							1			
Occult Blood	—	6	6	6	1	6	6	2	6		
	±				5			2		5	3
	+							1		1	
	++										

の結節が観察された。

4) 回復試験：いずれの投与群においても腎臓の褪色が見られ、HAPA-50 群を除き腫大も観察された。さらに、腎表面の粗造化も HAPA-300、AMK-150、-300 群、GM-50 群でみられた。21 日間投与試験と比べ、いずれの薬剤においても、褪色及び腫大は減弱していたが、腎表面の粗造化については、その出現頻度及び程度とも、むしろ増強する傾向にあった。

なお、14 日、21 日投与試験群および回復試験群の、いずれの死亡例および切迫屠殺例でも腎臓の腫大および褪色がみられた。

8. 病理組織学的検査

病理組織所見を Table 14～17 に示した。

1) 7 日間投与試験

HAPA-B 投与群：いずれの投与群においても、近位尿

Table 10 Urinalysis in rats treated intramuscularly HAPA-B for 21 days

		n=10								
Drug		HAPA-B			AMK			GM		
Dose (mg/kg)	Control	50	150	300	50	150	300	25	50	100
pH	6	1	6	6	8	4	10	5	9	1
	7	3	4	4	1	6	1	5	1	
	8	2			1					
	9	4								
Protein	—			1						
	±									
	+	7	9	9	10	9	1	10	10	1
	++	3	1	1		1				
Glucose	—	10	10	10	6	9	1	8	8	1
	±				3	1		2	2	
	+									
	++			1						
Occult Blood	—	10	10	10	2	10		2	6	
	±				8		1	8	4	
	+									1
	++									

Table 11 Urinalysis in rats treated intramuscularly HAPA-B for 21 days and recovered for 28 days

		n=10								
Drug		HAPA-B			AMK			GM		
Dose (mg/kg)	Control	50	150	300	50	150	300	25	50	100
pH	6	4	6	7	9	2	5	1	2	3
	7	2	2	3		3	3		6	4
	8	2	2			3			2	1
	9	2		1	2	2			2	2
Protein	—									
	±	3	2	2	5	1		1	2	4
	+	6	5	7	4	9	9		8	4
	++	1	3	1	1		1			2
Glucose	—	10	10	10	10	10	1	10	10	
	±									
	+									
	++									
Occult Blood	—	10	10	10	10	10	1	10	10	
	±									
	+									
	++									

細管上皮細胞の好酸性顆粒状変性及び腫大がみられた (Photo. 1, 2)。HAPA-150 群では、さらにボーマン嚢基底膜の肥厚が 1 例みられた。HAPA-300 群では、脂肪滴沈着を主体とする空胞変性及び尿細管腔の拡張が観察された (Photo. 3)。

AMK 投与群：AMK-50 群で、近位尿細管上皮細胞の好酸性顆粒状変性及び腫大がみられた。AMK-150 群では

AMK-50 群で見られた変化に加え、尿管腔の拡張及びボーマン嚢基底膜の肥厚がみられた。AMK-300 群では上記所見に加え、近位尿細管上皮細胞の空胞変性、軽微な壊死も認められた (Photo. 4)。

GM 投与群：GM-25 群では好酸性顆粒状変性及び腫大ならびに尿管腔の拡張が観察された。GM-50 群では上記所見に加え、近位尿細管上皮細胞の軽微な壊死、空胞変性、

間質における小円形細胞浸潤などがみられた(Photo. 5)。GM-100 群では上記所見はいずれも増強し特に壊死は顕著となった。さらに、石灰化、近位尿管上皮細胞の硝子滴変性、扁平化、尿管腔及び集合管内に硝子円柱が観察された(Photo. 6)。

2) 14 日間投与試験

HAPA-B 投与群：7 日間投与試験でみられた所見に加え、HAPA-150 群では近位尿管上皮細胞の空胞変性がみられた。HAPA-300 群ではボーマン囊の拡張、ボーマン囊基底膜の肥厚および 7 日間投与試験で GM-50, 100 群でみられたものと、ほぼ同様な病変と尿管上皮細胞に再生像が観察された(Photo. 7~9)。

AMK 投与群：7 日間投与試験の AMK-150 群でみられた尿管腔の拡張が本試験では AMK-50 群でみられ、さらに、AMK-150 群では近位尿管上皮細胞の脱落、壊死、再生、空胞変性及び尿管腔内硝子円柱なども認められた(Photo. 10)。AMK-300 群ではこれらの所見はいずれも著明となり、HAPA-300 群でみられたものと、ほぼ同様な病変が観察された。また、壊死がみられた上皮細胞の石灰化及び尿管基底膜の肥厚も観察されたが(Photo. 11~12)、好酸性顆粒状変性はむしろ AMK-150 群と比べ、減少傾向を示した。なお、切迫屠殺及び死亡例は生存例とほぼ同様な所見であった。

GM 投与群：GM-25 群では近位尿管上皮細胞の軽微な壊死、再生像、尿管及びボーマン囊基底膜の肥厚が散見された他、7 日間投与試験の GM-100 群でみられたものとほぼ同様な変化が認められた(Photo. 13)。GM-50 群では上記所見の増強がみられ、壊死及び再生像の程度も軽微から軽度になった。さらに、近位尿管上皮細胞の硝子滴変性もみられた(Photo. 14)。GM-100 群では GM-50 群と同様な変化がみられたが、尿管腔の拡張、尿管上皮細胞の扁平化及び硝子円柱の存在は顕著となり、さらに、壊死がみられた上皮細胞の石灰化及びボーマン囊の拡張もみられた(Photo. 15, 16)。しかし、間質の小円形細胞浸潤及びボーマン囊基底膜の肥厚は GM-50 群よりもむしろ減少していた。なお、尿管上皮細胞の好酸性顆粒状変性は GM の全投与群において、ほとんど認められなかった。切迫屠殺及び死亡例は生存例とほぼ同様な所見であったが、生存例と比べ尿管上皮細胞の腫大、硝子滴変性、壊死及び間質の小円形細胞浸潤などはより著しく、反対に、尿管腔及びボーマン囊の拡張、尿管上皮細胞の扁平化及び石灰化、さらに、尿管基底膜及びボーマン囊基底膜の肥厚などはより軽度であった。

3) 21 日間投与試験

HAPA-B 投与群：HAPA-50 群では近位尿管上皮細胞の腫大、好酸性顆粒状変性がみられた。HAPA-150 群では上記変化に加え、近位尿管上皮細胞の壊死、扁平化、再

生及び空胞変性、尿管腔の拡張、間質の小円形細胞浸潤、ボーマン囊基底膜の肥厚なども加わり、さらに、僅かながら、尿管腔及び集合管内に硝子円柱が散見された(Photo. 17, 18)。HAPA-300 群では上記所見が増強し(Photo. 19, 20)、さらに、軽微な壊死上皮細胞の石灰化もみられた。また、硝子滴変性や尿管基底膜の肥厚、ボーマン囊の拡張も認められた。なお、好酸性顆粒状変性は HAPA-50 群あるいは 150 群よりもむしろ減少していた。

AMK 投与群：AMK-50 群では HAPA-50 群とほぼ同様な変化がみられ、さらに、近位尿管上皮細胞の空胞変性もみられ、1 例ではあるが軽微な壊死も認められた。また、AMK-150 群では上記所見の程度はより増強し、HAPA-150 群と比べ、近位尿管上皮細胞の壊死及び再生像はほとんど差が認められないが、その他の所見はより顕著な変化を示した(Photo. 21)。さらに、近位尿管上皮細胞の硝子滴変性やボーマン囊の拡張、尿管基底膜の肥厚などもみられたが、好酸性顆粒状変性はむしろ減少していた。AMK-300 群ではこれらの所見に加え、特に尿管腔の拡張及び尿管上皮細胞の扁平化は、より著明となり、さらに、壊死がみられた上皮細胞の石灰化も観察された。しかし、いずれの変化も HAPA-300 群との間に差は認められなかった(Photo. 22)。

GM 投与群：GM-25 群では HAPA-150 群とほぼ同様な所見が得られ、さらに、尿管基底膜の肥厚(Photo. 23)や 1 例ではあるが軽微な壊死上皮細胞の石灰化も認められた。GM-50 群ではこれらの所見が増強してみられた他(Photo. 24)、1 例にウイルス腫瘍が観察された(Photo. 25)。GM-100 群では 1 例ではあるが上記所見に加え、特に尿管腔の拡張及び尿管上皮細胞の扁平化は顕著となり(Photo. 26, 27)、さらに、硝子滴変性も認められた。なお、GM 投与群ではいずれの投与群においても、尿管上皮細胞における好酸性顆粒状変性は認められなかった。

4) 回復試験

HAPA-B 投与群：HAPA-50 群では 21 日間投与試験においてみられた近位尿管上皮細胞の好酸性顆粒状変性や腫大などの変化は認められなかった。HAPA-150 群では 21 日間投与試験でみられた尿管上皮細胞の壊死、再生、好酸性顆粒状変性、扁平化及び尿管腔の拡張などは観察されず、上皮細胞の腫大も減弱したが反対に尿管及びボーマン囊基底膜の肥厚は増強した(Photo. 28)。HAPA-300 群では 21 日間投与試験でみられた所見と比べ、いずれの変化もその程度は減弱しており尿管上皮細胞の好酸性顆粒状変性、壊死、再生、硝子滴変性及びボーマン囊の拡張は認められなかった。しかし、尿管及びボーマン囊基底膜の肥厚ならびに間質の小円形細胞浸潤が顕著になり、さらに、尿管上皮細胞の過形成や間質の線維化がみられた(Photo. 29)。

Table 12 Serum urea nitrogen and creatinine values in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM

Day	Treatment Periods						Recovery Periods		
	7			14			21		
	n	Urea-N (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	n	Urea-N (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	n	Urea-N (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Control	6	18.7 ±2.5	1.00 ±0.06	6	17.9 ±2.2	1.01 ±0.05	10	18.7 ±1.6	1.03 ±0.04
	50	17.4 ±1.3	1.09* ±0.05	6	18.0 ±0.9	0.99 ±0.06	10	18.1 ±2.0	1.00 ±0.13
	150	16.9 ±1.2	1.07 ±0.10	6	18.7 ±1.5	1.08* ±0.05	10	21.5** ±2.2	1.19** ±0.09
HAPA-B (mg/kg)	300	18.5 ±1.2	1.00 ±0.16	6	67.5** ±15.0	2.21** ±0.57	10	63.1** ±35.9	1.45** ±0.37
	50	18.4 ±1.8	0.94 ±0.06	6	18.2 ±2.0	0.91* ±0.07	10	17.5 ±0.9	1.01 ±0.06
	150	17.3 ±1.2	1.04 ±0.13	6	20.4 ±4.8	1.15* ±0.14	10	33.2** ±8.5	1.31** ±0.16
AMK (mg/kg)	300	17.9 ±1.4	1.08 ±0.07	3	105.5** ±14.5	7.59** ±3.23	1	54.9 —	1.29 —
	25	17.5 ±0.7	1.09* ±0.07	6	20.4 ±2.5	1.16* ±0.13	10	19.2 ±1.5	1.04 ±0.04
	50	18.2 ±0.9	1.09 ±0.08	6	28.6* ±8.5	1.49** ±0.26	10	21.7* ±3.9	1.02 ±0.07
GM (mg/kg)	100	56.4** ±9.4	2.16** ±0.32	3	149.6** ±9.6	3.69** ±0.81	1	89.9 —	—
							0	—	—

*Significant difference from control : P < 0.05, ** : P < 0.01, $\bar{X} \pm S.D.$

Table 13-1 Kidney weights in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM
—Absolute Weights—

Day	Treatment Periods										Recovery Periods							
	7					14					21				28			
	n	B. W. (g)	Kidney weights (g)		n	B. W. (g)	Kidney Weights (g)		n	B. W. (g)	Kidney weights (g)		n	B. W. (g)	Kidney Weights (g)			
Kidney (L)			Kidney (R)	Kidney (L)			Kidney (R)	Kidney (L)			Kidney (R)	Kidney (L)			Kidney (R)			
Control	6	198.3 ±9.6	0.79 ±0.07	0.77 ±0.02	6	223.2 ±13.8	0.85 ±0.05	0.85 ±0.05	10	235.0 ±14.8	0.88 ±0.04	0.86 ±0.05	10	289.6 ±22.5	1.02 ±0.08	1.02 ±0.05		
	50	200.0 ±7.6	0.85 ±0.06	0.83* ±0.05	6	218.7 ±7.0	0.87 ±0.04	0.87 ±0.04	10	227.7 ±9.92	0.92* ±0.04	0.89 ±0.03	10	287.6 ±8.1	1.03 ±0.03	1.04 ±0.05		
	150	196.0 ±8.6	0.89** ±0.03	0.86** ±0.05	6	217.5 ±9.5	1.03** ±0.05	1.00** ±0.02	10	219.8* ±13.2	1.20** ±0.10	1.18** ±0.12	10	264.9* ±22.5	1.19** ±0.09	1.16** ±0.06		
	300	193.6 ±7.5	0.93** ±0.04	0.91** ±0.03	6	199.8** ±11.0	1.24** ±0.06	1.30** ±0.08	10	150.7** ±22.4	1.57** ±0.19	1.55** ±0.19	10	261.9** ±13.2	1.20** ±0.05	1.20** ±0.08		
AMK (mg/kg)	50	200.4 ±8.4	0.86* ±0.03	0.83** ±0.04	6	219.6 ±6.9	0.90 ±0.03	0.90 ±0.04	10	237.1 ±12.2	0.96** ±0.06	0.94** ±0.06	10	288.8 ±17.6	1.04 ±0.05	1.01 ±0.05		
	150	201.9 ±7.3	0.97** ±0.05	0.92** ±0.05	6	210.5 ±12.3	1.05** ±0.09	1.05** ±0.09	10	209.3** ±7.6	1.38** ±0.06	1.34** ±0.09	10	280.3 ±19.1	1.16** ±0.08	1.16** ±0.06		
	300	193.1 ±6.2	1.01** ±0.04	0.98** ±0.04	4	188.9** ±17.7	1.19** ±0.10	1.20** ±0.08	1	153.3 —	1.90 —	1.90 —	1	262.2 —	1.21 —	1.27 —		
GM (mg/kg)	25	190.9 ±7.5	0.85 ±0.01	0.81* ±0.03	6	208.1* ±8.8	0.99** ±0.08	1.00** ±0.08	10	225.5 ±11.8	0.96** ±0.08	0.95** ±0.07	10	277.5 ±14.1	1.05 ±0.06	1.04 ±0.06		
	50	193.8 ±9.2	0.93** ±0.05	0.91** ±0.04	6	180.8** ±7.8	1.00** ±0.07	0.95* ±0.07	10	186.0** ±23.8	0.98** ±0.03	1.01** ±0.13	10	272.2* ±11.4	1.09 ±0.07	1.09** ±0.05		
	100	177.2** ±6.2	0.96** ±0.01	0.93** ±0.03	3	137.7** ±2.8	1.12* ±0.10	1.15** ±0.01	1	122.1 —	1.44 —	1.47 —	0	—	—	—		

* Significant difference from control : P<0.05, ** : P<0.01, $\bar{X} \pm S.D.$

Table 13-2 Kidney weights in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM
 —Relative Weights—

Day	Treatment Periods								Recovery Periods							
	7				14				21				28			
	n	B. W. (g)	Relative kidney weight (mg/100 g B. W.)		n	B. W. (g)	Relative kidney weight (mg/100 g B. W.)		n	B. W. (g)	Relative kidney weight (mg/100 g B. W.)		n	B. W. (g)	Relative kidney weight (mg/100 g B. W.)	
Kidney (L)			Kidney (R)	Kidney (L)			Kidney (R)	Kidney (L)			Kidney (R)	Kidney (L)			Kidney (R)	
Control	6	198.3 ±9.6	397.7 ±204	390.1 ±13.8	6	223.2 ±13.8	382.5 ±15.7	381.3 ±9.9	10	235.0 ±14.8	374.0 ±17.0	367.7 ±17.7	10	289.6 ±22.5	352.3 ±11.2	351.2 ±12.1
	50	200.0 ±7.6	425.3 ±23.8	413.1* ±16.0	6	218.7 ±7.0	399.1 ±21.3	398.7 ±21.0	10	227.7 ±9.9	405.7** ±20.3	390.0** ±11.8	10	287.6 ±8.1	357.4 ±13.1	363.3 ±14.9
	150	196.0 ±8.6	456.0** ±11.1	438.7** ±7.7	6	217.5 ±9.5	473.1** ±16.2	462.4** ±18.4	10	219.8* ±13.2	545.7** ±28.2	536.3** ±37.7	10	264.9* ±22.5	451.9** ±33.7	439.0** ±21.9
	300	193.6 ±7.5	483.1** ±24.7	470.2** ±18.2	6	199.8** ±11.0	622.6** ±18.5	651.5** ±19.1	10	150.7** ±22.4	1,066.4** ±215.8	1,053.7** ±226.5	10	261.9** ±13.2	457.3** ±24.8	458.2** ±28.1
AMK (mg/kg)	50	200.4 ±8.4	430.7** ±14.8	416.5** ±8.1	6	219.6 ±6.9	412.4* ±17.7	409.0* ±21.1	10	237.1 ±12.2	406.3** ±24.5	395.0** ±12.1	10	288.8 ±17.6	359.5 ±11.3	350.7 ±15.9
	150	201.9 ±7.3	479.9** ±26.9	454.0** ±20.9	6	210.5 ±12.3	498.5** ±22.7	497.4** ±18.6	10	209.3** ±7.6	662.3** ±44.3	644.0** ±60.4	10	280.3 ±19.1	414.6** ±19.1	415.3** ±20.7
	300	193.1 ±6.2	522.6** ±14.6	506.0** ±13.3	4	188.9** ±17.7	629.7** ±9.1	636.8** ±27.3	1	153.3 —	1,238.1 —	1,240.7 —	1	262.2 —	461.5 —	482.8 —
	25	190.9 ±7.5	445.1** ±13.8	422.7** ±12.1	6	208.1* ±8.8	475.4** ±26.0	478.6** ±33.6	10	225.5 ±11.8	427.3** ±15.4	422.4** ±19.9	10	277.5 ±14.1	378.2** ±21.2	376.4** ±10.6
GM (mg/kg)	50	193.8 ±9.2	478.7** ±29.2	471.2** ±21.0	6	180.8** ±7.8	552.2** ±39.5	525.4** ±34.6	10	186.0** ±23.8	533.0** ±81.6	553.0** ±106.2	10	272.2* ±11.4	400.2** ±23.1	400.8** ±14.2
	100	177.2** ±6.2	541.4** ±20.2	524.5** ±25.5	3	137.7** ±2.8	816.4** ±84.9	831.9** ±23.4	1	122.1 —	1,179.4 —	1,200.7 —	0	—	—	—

* Significant difference from control : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, $\bar{x} \pm S.D.$

Table 15 Pathological findings of kidney in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM for 14 days

Dose (mg/kg)	Control	HAPA-B						AMK						GM					
		50	150	300	50	150	300	50	150	300	25	50	100						
	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +
Tubular epithelium swelling	6	4 2	6	6	4 2	6	1 3	5 1	6	1 3	5 1	6	3						
Eosinophilic granular degeneration	6	2 4	6	5 1	4 2	1 5	1 3	5 1			5 1	5 1	3						
Vacuolation	6	6	3 3	6	6	3 3	4	6			6		1 2						
Flattened	6	6	6	6	6	6	4	6			1 5	2 3 1	3						
Hyalin droplets degeneration	6	6	6	2 3 1	6	6	1 3	6			6	3 2 1	1 2						
Necrosis	6	6	6	4 2	6	1 3 2	2 2	4 2			4 2	5 1	1 2						
Calcification	6	6	6	6	6	6	1 1 1 1	6			6	6	2 1						
Regeneration	6	6	6	1 5	6	4 2	1 3	3 3			3 3	1 5	3						
Dilatation of renal tubule	6	6	5 1	4 2	3 3	2 4	3 1	6			6	5 1	3						
Thickening of tubular basement membrane	5 1	5 1	5 1	5 1	4 2	5 1	3 1	5 1			5 1	5 1	1 2						
Dilatation of Bowman's capsule	6	6	6	2 4	6	6	1 3	5 1			5 1	6	3						
Thickening of Bowman's capsule	6	6	5 1	3 3	5 1	6	1 3	3 3			3 3	4 2	3						
Cell infiltration	5 1	6	6	6	6	5 1	2 1 1	2 3 1			2 3 1	3 3	1 2						
Hyalin cast	6	6	6	3 3	6	4 2	1 3	3 3			3 3	1 4 1	2 1						

Table 16 Pathological findings of kidney in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM for 21 days

Dose (mg/kg)	Control	HAPA-B						AMK						GM					
		50		150		300		50		150		300		25		50		100	
		-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	-	±	+	±
Tubular epithelium swelling	9 1	7 3		10		5 5	5 5	5 5		10		1		2 8	2 8			1	
Eosinophilic granular degeneration	10	5 5		2 8	6 4			6 4		10		1		10		10		1	
Vacuolation	10	10		10			6 4	6 4		1 9		1		10		9 1		1	
Flattened	10	10	8 2		2 2	4 2		10		8 2		1		3 7	6 2	1 1			1
Hyalin droplets degeneration	10	10	10		10			10		4 5	1	1		10		10		1	
Necrosis	10	10		8 2		7 3		9 1		8 2		1		9 1	5 5			1	
Calcification	10	10	10			2 8		10		10		1		9 1	8 2			1	
Regeneration	10	10		6 4		10		10		8 2		1		7 3	7 2	1		1	
Dilatation of renal tubule	10	10	1 9		2 2	4 2		10		7 3			1	10	8 1	1			1
Thickening of tubular basement membrane	5 5	7 3	6 4		8 2			3 7		8 2		1		1 9	3 7			1	
Dilatation of Bowman's capsule	10	10		10		3 7		10		6 4		1		9 1	10			1	
Thickening of Bowman's capsule	9 1	9 1	5 5		6 4			8 2		6 4		1		5 5	1 8	1		1	
Cell infiltration	8 2	8 2	4 6		1 9			7 3		1 6	3	1		7 3	4 6			1	
Hyalin cast	9 1	9 1	2 8		1 6	3		10		7 3		1		5 5	8 2			1	

Table 17 Pathological findings of kidney in rats treated intramuscularly with HAPA-B, AMK or GM for 21 days and recovered for 28 days

Dose (mg/kg)	Control	HAPA-B						AMK						GM		
		50	150	300	50	150	300	50	150	300	25	50				
	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +	- ± +			
Tubular epithelium swelling	10	10	7 3	5 5	10	5 5	10	5 5	1	10	7 3	10	7 3			
Eosinophilic granular degeneration	10	10	10	10	10	10	10	10	1	10	10	10	10			
Vacuolation	10	10	10	10	2 8	10	10	7 3	1	7 3	7 3	10	7 3			
Flattened	10	10	10	4 6	10	4 6	10	7 1 2	1	10	10	10	9 1			
Hyalin droplets degeneration	10	10	10	10	10	10	10	10	1	10	10	10	10			
Necrosis	10	10	10	10	10	10	10	10	1	10	10	10	10			
Calcification	10	10	10	10	10	10	10	4 6	1	10	10	10	9 1			
Regeneration	10	10	10	10	10	10	10	10	1	10	10	10	10			
Hyperplasia	10	10	10	3 7	10	3 7	10	5 3 1 1	1	10	10	10	10			
Dilatation of renal tubule	10	10	10	5 5	10	5 5	10	6 4	1	10	10	10	8 2			
Thickening of tubular basement membrane	6 4	5 5	4 6	3 7	3 7	3 7	3 7	1 6 3	1	10	10	10	1 8 1			
Dilatation of Bowman's capsule	10	10	10	10	10	10	10	10	1	10	10	10	10			
Thickening of Bowman's capsule	7 3	8 2	10	3 7	8 2	3 7	8 2	7 2 1	1	10	10	10	10			
Cell infiltration	9 1	8 2	4 6	2 7 1	8 2	2 7 1	8 2	3 5 2	1	3 7	4 6	3 7	4 6			
Hyalin cast	8 2	6 4	1 9	1 9	8 2	1 9	8 2	8 2	1	10	10	10	10			
Fibrosis	10	10	10	4 6	10	4 6	10	7 3	1	10	9 1	10	9 1			

Photo. 1, No abnormal findings
control H. E. $\times 100$

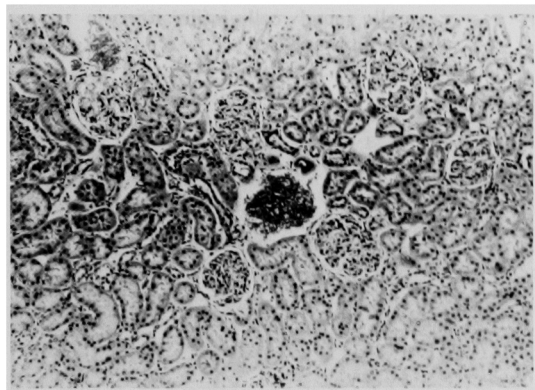


Photo. 2, Eosinophilic granular
degeneration and swelling of tubular
epithelium.
HAPA-B 300 mg/kg, 7 days,
H. E. $\times 200$

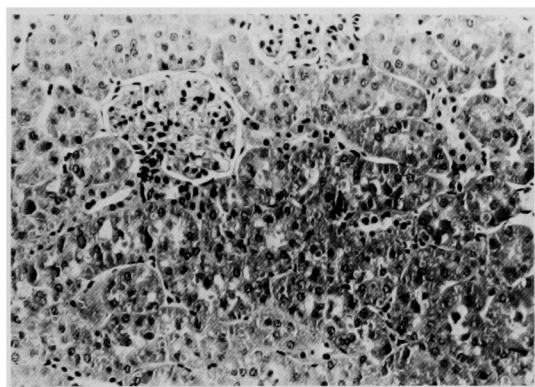


Photo. 3, Vacuolar degeneration of
tubular epithelium.
HAPA-B 300 mg/kg, 7 days,
H. E. $\times 200$

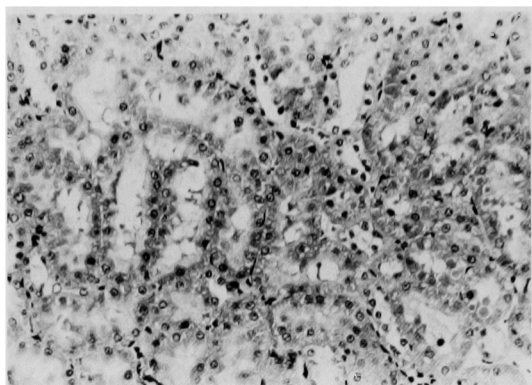
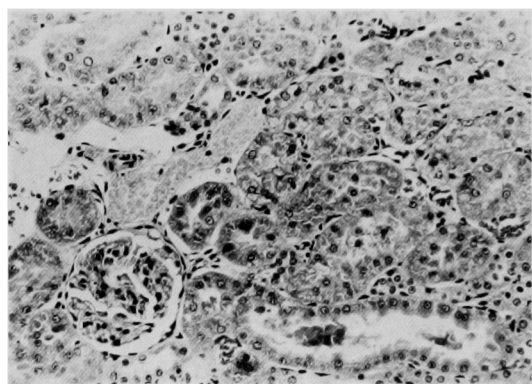


Photo. 4, Necrosis, swelling, eosino-
philic granular degeneration and
vacuolar degeneration of tubular
epithelium.
AMK 300 mg/kg, 7 days,
H. E. $\times 200$



AMK 投与群：AMK-50 群では 21 日間投与試験でみられた変化は、いずれも認められなかった。AMK-150 群では HAPA-150 群と同様な変化を認めたが、いずれもその程度は強く、さらに、尿細管腔の拡張、尿細管上皮細胞の扁平化及び石灰化が観察され、基底膜の肥厚した尿細管上皮細胞の過形成や間質の軽微な線維化が認められた (Photo. 30)。AMK-300 群の生存した 1 例では HAPA-300 群と同様な変化が認められた。

GM 投与群：GM-25 及び 50 群とも 21 日間投与試験でみられた変化のほとんどが減弱ないし消失したが、GM-25 群ではボーマン嚢基底膜の肥厚及び硝子円柱の出現が増加し (Photo. 31)、GM-50 群ではさらに間質の軽微な線維化もみられた。

9. 電子顕微鏡的検査

電子顕微鏡的観察で認められた尿細管上皮細胞の変化は各薬剤の投与量あるいは病態の進行度により差がみられる

ものの、3 薬剤とも共通した変化を示した。すなわち、近位尿細管上皮細胞では高電子密度の均一無構造物質ミエリン様小体の出現ならびに、刷子縁の消失、細胞質の空胞化、phagosome を含んだ上皮細胞の基底膜脱落像及び大きな核を有する再生上皮細胞が認められた (Photo. 32~35)。なお、ミエリン様小体は近位尿細管管腔内にも多数みとめられ (Photo. 36)、また、糸球体ではメサンギウム細胞における基質の増加が認められた。間質では間葉系細胞や血管内皮細胞の細胞質にミエリン様物質を含む lysosome 顆粒などの出現が目立ち、膠原線維などの線維成分の増加と間質の幅の拡大も認められた (Photo. 37)。しかし、いずれの薬剤も、投与量の増加と共に、その障害部位は近位尿細管からヘンレ係蹄や遠位尿細管へと移行した。回復試験群ではいずれの投与群においても回復傾向は見られるものの、近

Photo. 5, Necrosis of tubular epithelium.
GM 50 mg/kg, 7 days, H. E. $\times 200$

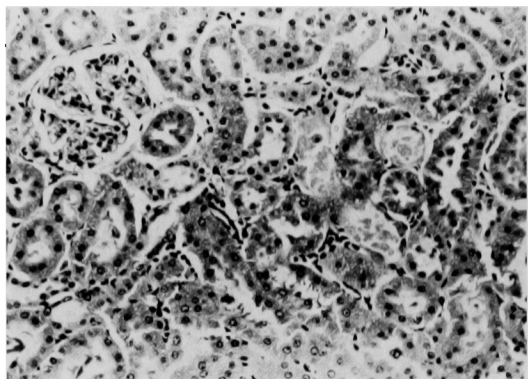


Photo. 6, Necrosis of tubular epithelium.
GM 100 mg/kg, 7 days,
H. E. $\times 200$

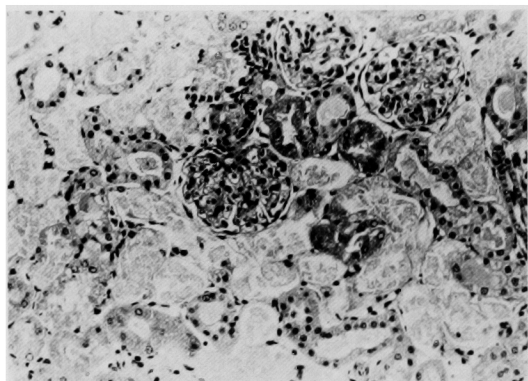


Photo. 7, Necrosis of tubular epithelium, dilatation of tubuli and small round cell infiltration in interstitium.
HAPA-B 300 mg/kg, 14 days,
H. E. $\times 50$

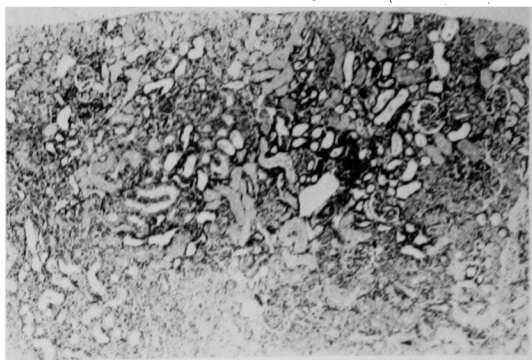
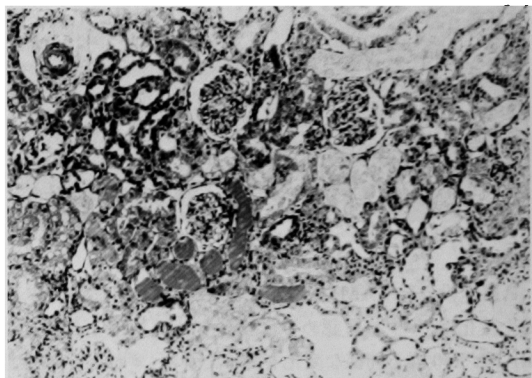


Photo. 8, Necrosis, regeneration, eosinophilic granular degeneration, vacuolar degeneration of tubular epithelium and hyalin casts in tubular lumina.
HAPA-B 300 mg/kg, 14 days,
H. E. $\times 100$



位尿管上皮細胞の高電子密度の均一無構造物質の出現やミトコンドリアの変化及び再生上皮細胞なども認められた (Photo. 38~40)。

III. 考 察

HAPA-B, AMK 及び GM をラットに 7 日, 14 日, 21 日間筋肉内投与し, さらに, 21 日間投与後 28 日間の回復試験を行い, 3 薬剤の腎毒性について比較検討した。

AMK 及び GM ともに高投与量群で 21 日間投与の間に, 各々 20 例中 18 例及び 19 例の死亡及び切迫屠殺例が出現したが, HAPA-B 投与群では 1 例の死亡も認められなかった。これら, 死亡, 切迫屠殺例ではいずれも肉眼的所見で腎臓の腫大ならびに褪色がみられ, 病理組織学的にも尿管上皮細胞の腫大, 硝子滴変性, 壊死及び間質の小円形細胞浸潤等が観察され, アミノ配糖体系抗生物質の副作用

の一つである腎障害による死亡と推察された。

体重はいずれの薬剤とも低投与量群では対照群とほぼ同じ推移を示したが, 中投与量群からは増加抑制ないし減少がみられた。しかし, GM-50 群, HAPA-B 及び AMK の 300 mg/kg 投与群では投与継続中にもかかわらず再び増加傾向を示した。その理由として, 後に述べる再生上皮細胞の出現が考えられた。

摂水量と尿量の増加が AMK 及び GM の中投与量群及び高投与量群と HAPA-B の高投与量群でみられているが, いずれも投与期間中より, むしろ, 回復期間中で増加していた。この回復期間における尿量の増加は, 腎機能が充分回復していないことを示唆しており, 病理組織学的所見に

Photo. 9, Necrosis, regeneration and vacuolar degeneration of tubular epithelium.

HAPA-B 300 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 200$

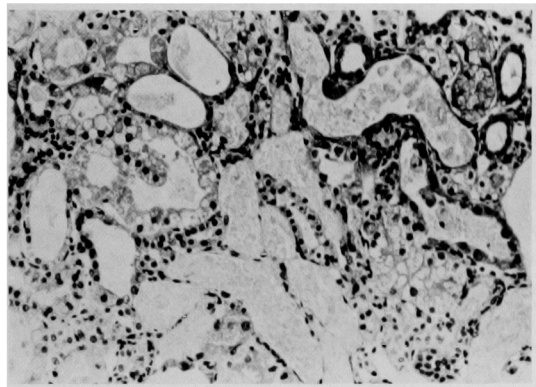


Photo. 12, Necrosis, calcification of tubular epithelium and dilatation of tubuli.

AMK 300 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 100$

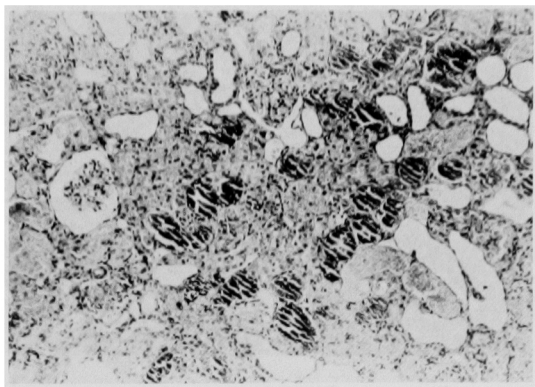


Photo. 10, Necrosis and eosinophilic granular degeneration of tubular epithelium.

AMK 150 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 200$

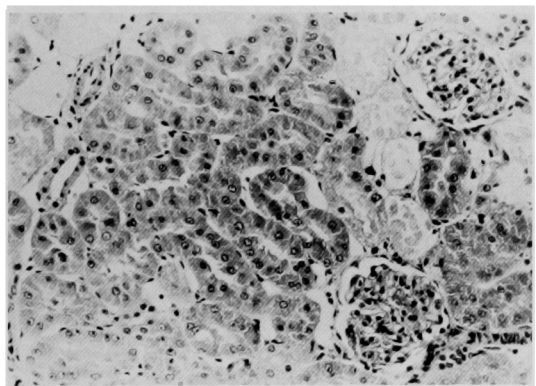


Photo. 13, Necrosis of tubular epithelium.

GM 25 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 200$

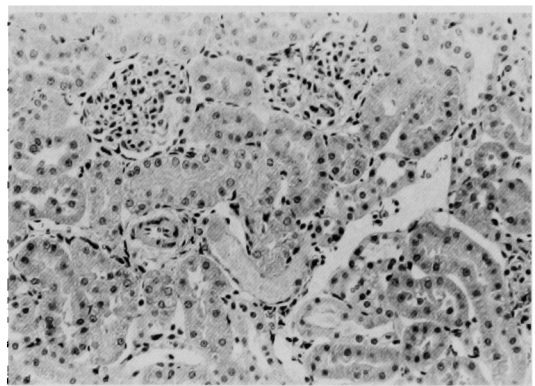


Photo. 11, Necrosis, calcification of tubular epithelium and dilatation of tubuli and Bowman's capsule.

AMK 300 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 50$

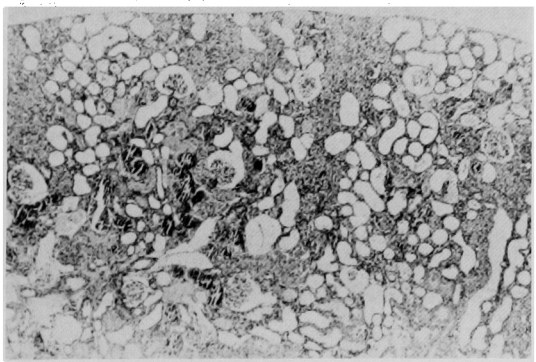


Photo. 14, Hyalin droplets and vacuolar degeneration of tubular epithelium.

GM 50 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 200$

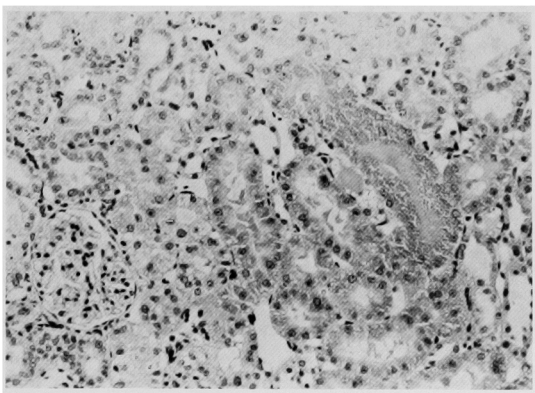


Photo. 15, Dilatation of tubuli and
hyalin casts in tubular lumina.
GM 100 mg/kg, 14 days,

H. E. $\times 50$

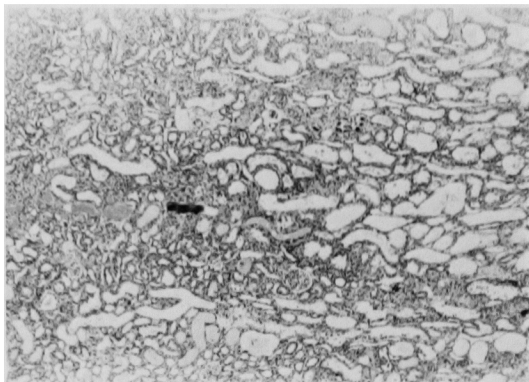


Photo. 18, Regeneration of tubular
epithelium.
HAPA-B 150 mg/kg, 21 days,
H. E. $\times 200$

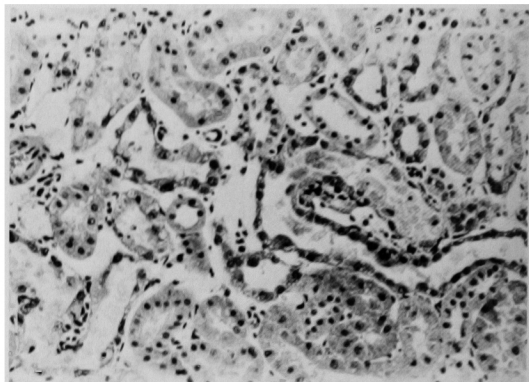


Photo. 16, Dilatation of tubuli and
flattened epithelium.
GM 100 mg/kg, 14 days,
H. E. $\times 100$

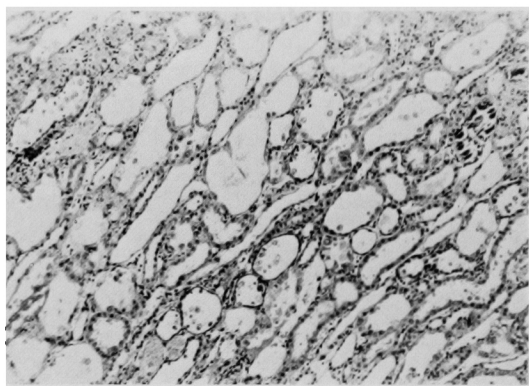


Photo. 19, Dilatation of tubuli and
hyalin casts in tubular lumina.
HAPA-B 300 mg/kg, 21 days,
H. E. $\times 50$

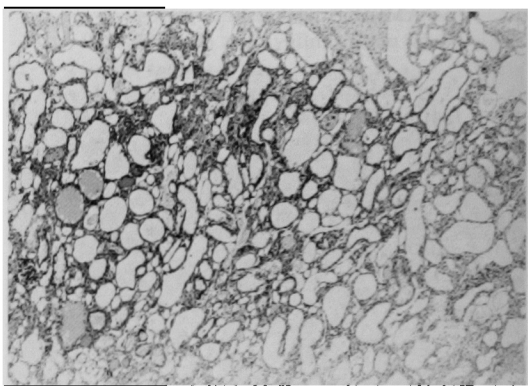


Photo. 17, Necrosis, eosinophilic
granular degeneration and swelling
of tubular epithelium.
HAPA-B 150 mg/kg, 21 days,
H. E. $\times 200$

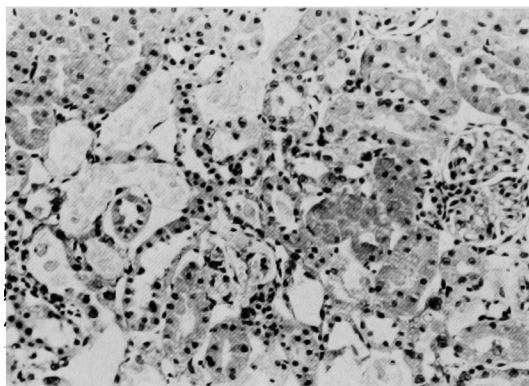


Photo. 20, Swelling and vacuolar
degeneration of tubular epithelium.
HAPA-B 300 mg/kg, 21 days,
H. E. $\times 200$

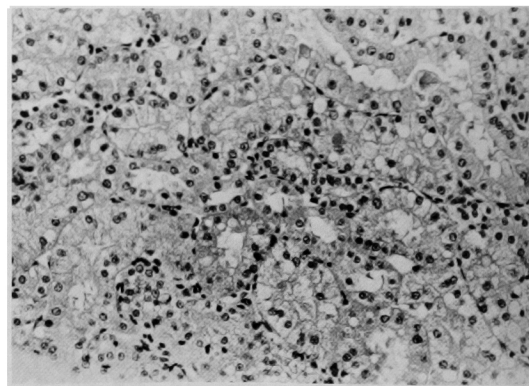


Photo.21, Vacuolar degeneration of tubular epithelium.
AMK 150 mg/kg, 21 days,
H. E. ×200

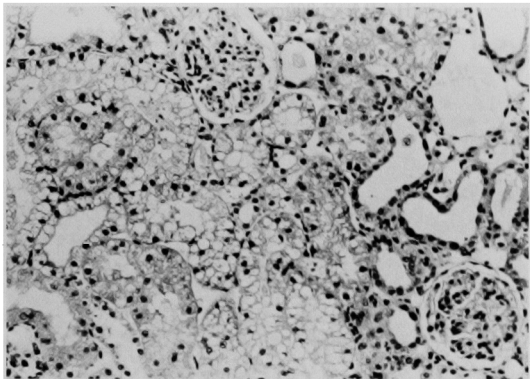


Photo.24, Dilatation of tubuli and flattened epithelium.
GM 50 mg/kg, 21 days,
H. E. ×100

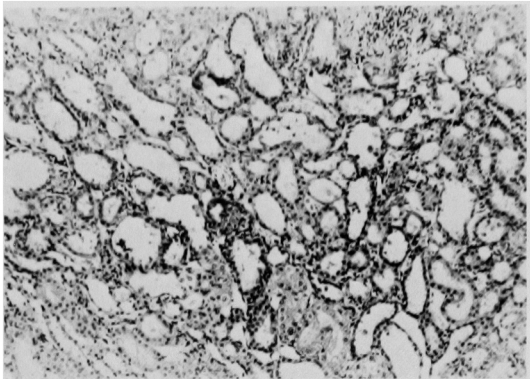


Photo.22, Dilatation of tubuli and flattened epithelium.
AMK 300 mg/kg, 21 days,
H. E. ×50

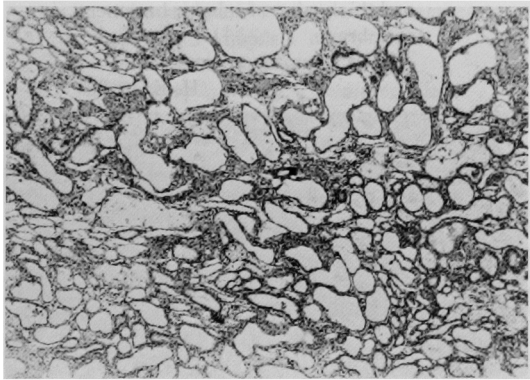


Photo.25, Wilms tumor.
GM 50 mg/kg, 21 days,
H. E. ×100

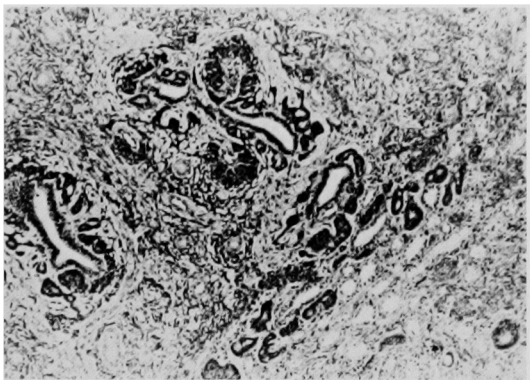


Photo.23, Thickening of tubular basement membrane.
GM 25 mg/kg, 21 days,
H. E. ×200

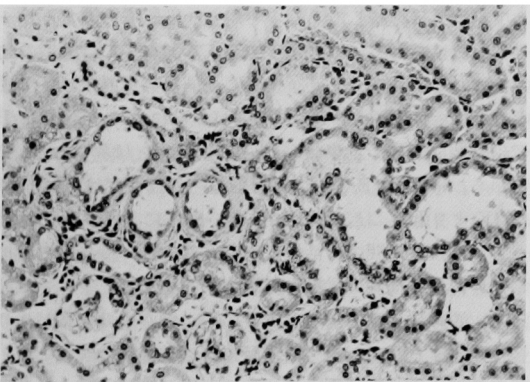


Photo.26, Dilatation of tubuli and Bowman's capsule and flattened epithelium.
GM 100 mg/kg, 21 days,
H. E. ×50

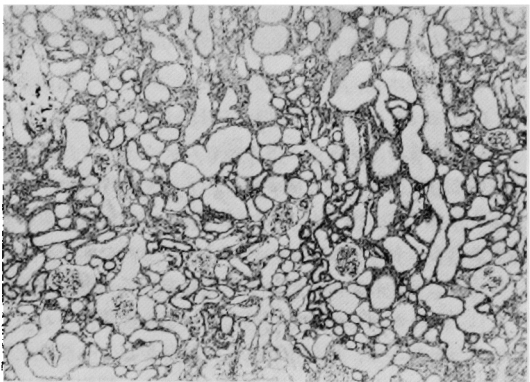


Photo. 27, Dilatation of tubuli and flattened epithelium.
GM 100 mg/kg, 21 days,

H. E. $\times 200$

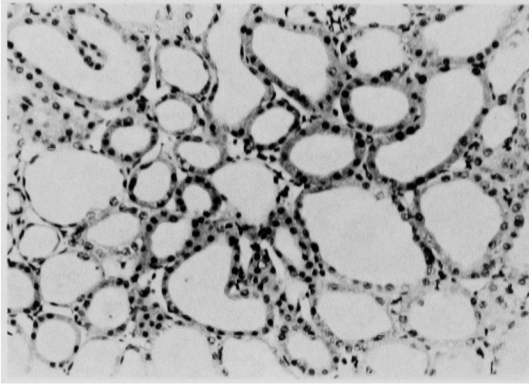


Photo. 28, Thickening of tubular basement membrane and Bowman's capsule.

HAPA-B 150 mg/kg, recovery,

H. E. $\times 200$

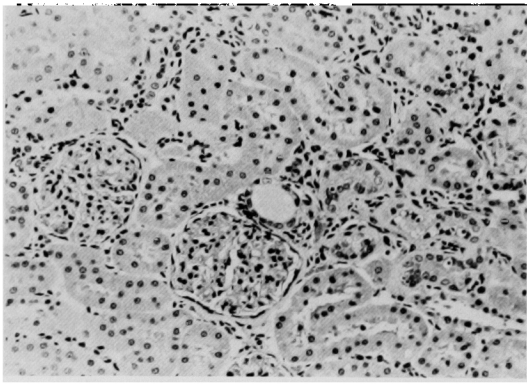


Photo. 29, Hyperplasia and vacuolar degeneration of tubular epithelium and thickening of tubular basement membrane.

HAPA-B 300 mg/kg, recovery,

H. E. $\times 200$

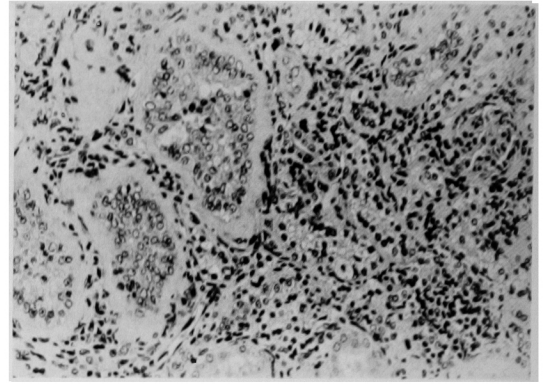
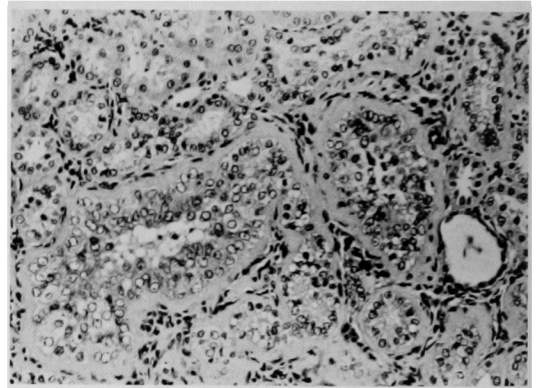


Photo. 30, Hyperplasia and vacuolar degeneration of tubular epithelium and thickening of tubular basement membrane.

AMK 150 mg/kg, recovery,

H. E. $\times 200$



においても、尿細管上皮細胞の石灰化、基底膜の肥厚、再生像などの病態像が確認されている。なお、摂水量の増加は尿量増加に伴う変化と思われる。

尿浸透圧は尿量と正反対の動態を示し、かつ、薬剤間の差も、より明瞭であり、個体間のバラツキも小さかった。このように摂水量、尿量、尿浸透圧からみると、3薬剤のうち、GM-25群、AMK-150群及びHAPA-300群が、ほぼ等しい障害性を示すものと考えられた。

尿中NAG活性上昇の機序は、アミノ配糖体系抗生物質のような化合物が腎臓内に取り込まれ、lysosome顆粒が誘導されることにより、lysosomal enzymeが尿中に逸脱してくると言われている^{3,4)}。本試験においても尿中酵素の中ではNAGが最も感受性が高く、いずれの薬剤においても低投与量群から、用量依存的に、投与翌日より活性上昇がみられた。一方、LDHは細胞質に存在し、細胞破壊に伴

って細胞外に逸脱してくることから、細胞障害のマーカーとして用いられている酵素である。本試験でこの酵素の動きをみたところ、GM及びAMKの低投与量群では各々投与5日目と15日目より活性上昇がみられたが、HAPA-Bでは対照群と全く差がなく、NAGの変化とは異なった。すなわち、HAPA-Bの腎尿細管細胞への障害度はGM及びAMKより低いことが推察された。さらにNAG、LDHとともに、投与期間中に活性ピークがみられ、投与量の増加に伴い、投与期間の早期に出現し、その形はシャープになった。この現象は障害度が大きい程、細胞中の酵素がより多く逸脱するため、投与終了時点では枯渇現象が起こり、投与期間中より低活性を示すものと思われる。

Photo. 31, Thickening of tubular basement membrane and Bowman's capsule.

GM 25 mg/kg, recovery,
H. E. $\times 200$

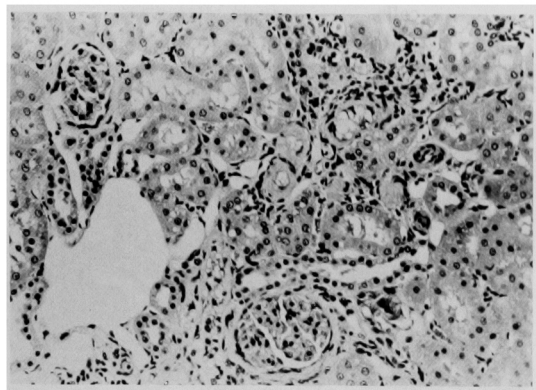


Photo. 32, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. The microvilli are arranged in regular manner.

The mitochondria are ovoidal or elongated figure.

Several lysosome containing electron dense materials are noted.

Control $\times 4500$

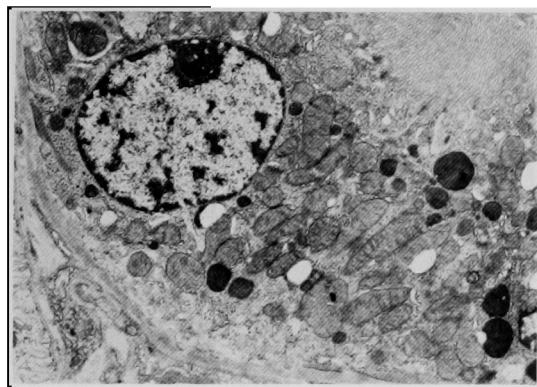


Photo. 33, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. There are homogeneous contents with numerous myeloid bodies.

Most of microvilli have disappeared.

HAPA-B 300 mg/kg, 21 days.
 $\times 300$

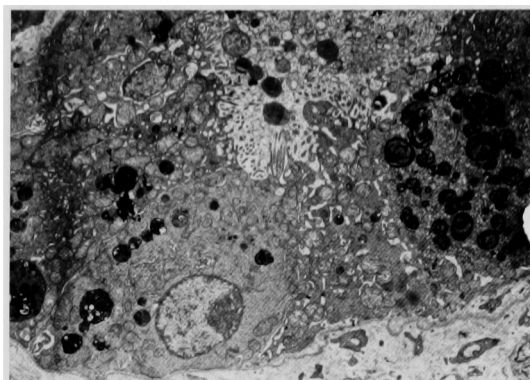
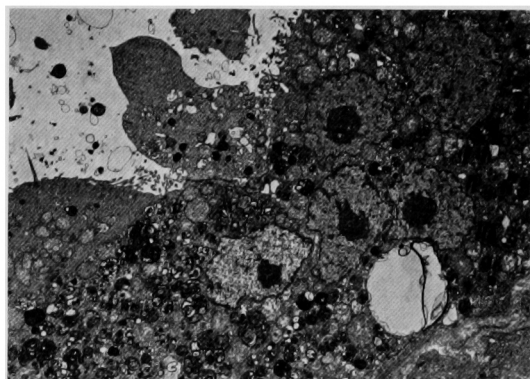


Photo. 34, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. There are many homogeneous contents containing numerous myeloid bodies and fatty droplets in proximal tubular cell.

Most of microvilli have disappeared.

AMK 300 mg/kg, 21 days. $\times 3000$



尿中酵素の中でも ALP と LAP はいずれも Brush border enzyme と呼ばれ、近位尿細管上皮細胞の刷子縁に局在しており、先の NAG, LDH と同様、投与期間中に活性ピークが出現したが、その後、対照群より、著しく低下する点がそれらと異なっていた。また、ALP, LAP とともに活性ピークは LDH, NAG と同じように GM > AMK > HAPA-B の順に早期より出現した。

尿 pH は尿細管障害により酸性化を示すといわれており⁹⁾、本試験においても薬剤投与群で、腎障害の程度にほぼ比例して pH 6 を示す個体が増加した。しかし、週を経るにしたがい、対照群にも pH 6 を示す個体が出現し、他の検査

のように 3 薬剤間で明瞭な差異は得られなかった。

潜血は対照群ではいずれの投与試験においても 1 例もみられなかったが、GM-100 群では 7 日間投与試験で、既に(±)となり、投与期間が長くなるにつれて、低投与群でもみられるようになった。21 日間投与試験では AMK-150 群で潜血がみられたが、HAPA-150 群ではみられず、AMK の方が障害度が高いことが示唆された。

ラットにおける尿蛋白は、正常状態でも(+)ないし(++)の出現がみられるが、(++)を示すことは少ない。本試験に

Photo. 35, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. There are residual bodies containing numerous myeloid bodies. The microvilli are arranged in unsystematic manner.
GM 50 mg/kg, 21 days. $\times 7500$

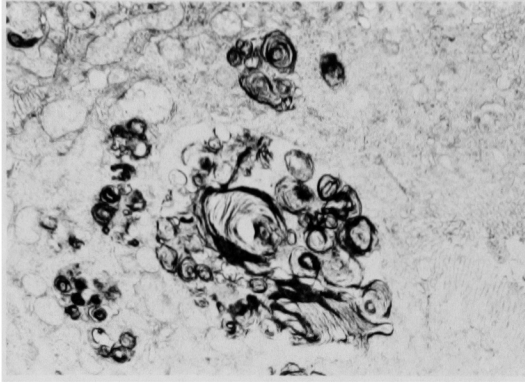


Photo. 36, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. Numerous myeloid bodies and large vacuoles containing endoplasmic reticulum are noted in tubular lumen.
AMK 150 mg/kg, 21 days. $\times 4500$



Photo. 37, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. The space between renal tubular cells is wide and appeared connective tissue and primitive reticular cells.
AMK 300 mg/kg, 21 days. $\times 3000$

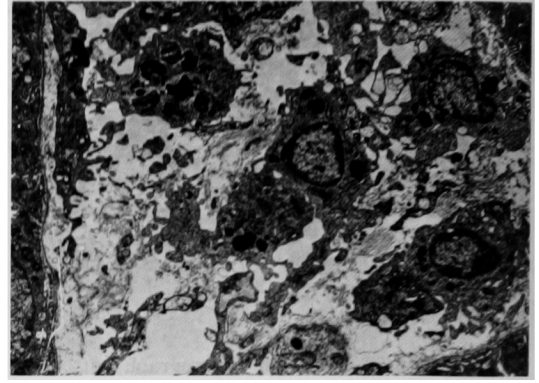
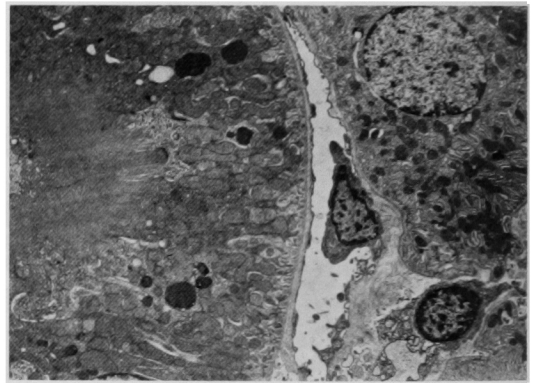


Photo. 38, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell. Large or small lysosome contain myeloid bodies and electron dense materials.
HAPA-B 50 mg/kg, recovery. $\times 3000$



において(卅)の出現は7日間投与試験におけるGM-100群のみにみられており、他の検査とはやや異なった動態を示した。

尿糖の出現は、正常ラットでは全くみられないが本試験ではGMでは25 mg/kg群より、AMKでは150 mg/kg投与群よりみられた。また、HAPA-Bでは300 mg/kg投与群のみに認められており、他の検査の障害度と同じ傾向を示した。一方、回復試験ではいずれの投与群でも尿糖はみられず、機能は回復に向っていることが示唆された。したがって、先の尿量、尿浸透圧の変化のように、回復期に入って増強する変化は病態の悪性化を示しているのではなく、

回復に向かう生体の活性状態を示しているとも考えられる。

尿中電解質のうち、Pは、NAGと同様に投与翌日より用量依存的に増加し、反対にKは用量及び投与期間に従って、低値を示した。尿中に排泄されるKの70%は遠位尿細管から分泌されると言われており、Kの低下は尿細管障害が遠位まで及んでいることを示唆している。一方、Na及びClは明瞭な用量相関はみられず、3薬剤間の腎毒性を比較することはできなかった。

クレアチニンクリアランスは14日目よりHAPA-B及びAMKの高投与量群、GMの中投与量群より低下がみられ、他の検査項目の変化と一致していた。このクレアチニ

Photo. 39, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell.

Numerous large or small lysosomes contain electron dense materials. The microvilli are arranged in unsystematic manner.

GM 25 mg/kg, recovery. ×3000

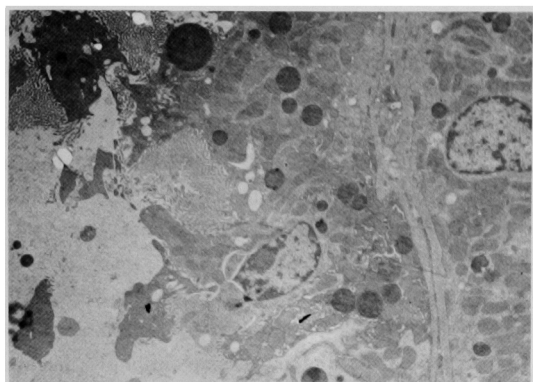
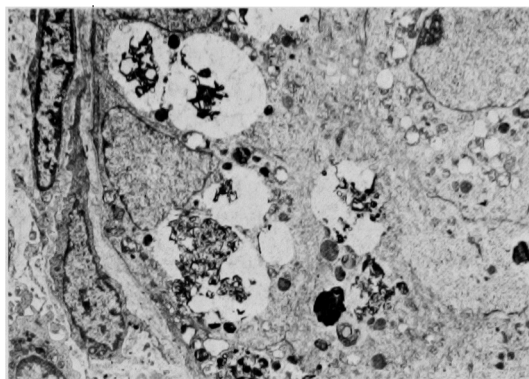


Photo. 40, Electron micrograph of the renal proximal tubular cell.

Numerous lysosome and small homogenous materials contain myeloid bodies. The space between proximal tubular cells is wide. The junction of the basement membrane is loose and interdigitation have disappeared.

HAPA-B 300 mg/kg, recovery.

×3000



シクリアランスの低下は糸球体障害を示唆しており、GM投与により生じることはよく知られている⁹⁾。本試験においても各薬剤とも14日間投与試験の高投与量群ではボーマン嚢基底膜の肥厚もみられていることから、いずれの薬剤も糸球体に影響するものと思われる。KALOYANIDES G. Jら⁸⁾もGMの腎障害が進行すると糸球体濾過率(GFR)が低下することを報告しており、本試験からもアミノ配糖体系抗生物質を大量投与することにより尿管障害を生ずると二次的に糸球体が障害されることが推察された。

血清尿素窒素及びクレアチニンはGILBERT D. N.ら³⁾の報告と同様、いずれの薬剤も14日間投与試験の値が21日間投与試験の値より高値を示していた。これは、病理組織学的検査において、14日間投与試験群の方が21日間投与試験群より、尿管上皮細胞の壊死像が強いことと一致しており、さらに尿中酵素が投与10日目後に活性ピークを示すことも関連していると思われる。すなわち、血清尿素窒素及びクレアチニン値がこのような投与継続中にもかかわらず、正常に向かっていくことは、障害が修復に向かった為の変化ではなく、一時期、腎機能が正常に働くために生じる現象と推察される。このことは病理組織学的にも壊死のみられた尿管上皮細胞の基底膜には断裂像はみられず、再生上皮が出現していることから推察できる。この再生細胞がアミノ配糖体系抗生物質に感受性が低いということはLUFT F. C.らも報告しており⁴⁾、一時的に再生細胞により腎機能が正常に働くものと思われる。この著しい上皮の壊死にもかかわらず基底膜が保たれていることは田中ら⁹⁾も報告しており、アミノ配糖体系抗生物質による腎毒性の特徴の1つとも考えられる。腎組織病変のうち、壊死像は最も熾烈な病態像の1つとして考えられるが、7日間

投与試験において、この壊死像はAMKでは300 mg/kg群、GMでは50 mg/kg以上の投与群からみられているにもかかわらず、HAPA-Bでは全く観察されず、14日間投与試験の高投与量群ではじめて観察された。また、7日間投与試験で観察された好酸性顆粒状変性はSisomicin, Tobramycinなどの他のアミノ配糖体系抗生物質でも観察されており¹⁰⁾、電顕所見におけるミユリン様物質を有するlysosomeの分布と密接な関係があると考えられている¹¹⁾。しかし、14日間投与試験ではこの好酸性顆粒状変性が減弱する傾向にあり、さらに、21日間投与試験のGM投与群では全く消失しており、電顕所見におけるミユリン様物質の出現とは必ずしも一致しなかった。この好酸性顆粒が消失することは、尿管上皮における崩壊と脂肪滴沈着や石灰化など、他の病変が増強したことにより検出しにくくなるためと考えられるが詳細なことは不明である。14日間投与試験ではHAPA-Bの高投与量群、AMK中投与量群、GMの低投与量群においても尿管上皮細胞の壊死が認められた。なお、GM-100群における14日間投与試験の壊死像は7日間投与試験より減弱していたが、これは7日間投与試験時に壊死のみられた尿管は再生上皮細胞に置き変わったため、壊死の程度が低くなったものと思われる。21日間投与試験ではいずれの薬剤も尿管腔の拡張、尿管上皮細胞の空胞変性、扁平化が主体を占め、壊死像も14日間投与試験時より、さらに低投与量群よりみられはじめた。なお、HAPA-B、AMKの高投与量群、GMの中投与量群では14日間投与試験時よりも壊死の程度は弱かったが、それ

は、先の GM-100 群でみられた変化と同様の理由によるものと思われる。回復試験ではいずれの薬剤においても尿管基底膜の肥厚や、尿管上皮細胞の過形成などがみられ回復期間終了時においてもまだ完全修復には至っていなかった。

電顕所見では尿管上皮細胞に、アミノ配糖体系抗生物質に特徴的なミエリン様小体がいずれの薬剤でもみられ、腎障害の作用機序は同様なものと推察される。また、いずれの投与群においても電顕的に回復傾向は見られるものの障害像は依然、残存していた。

以上の結果より、HAPA-B で見られた腎障害は AMK, GM と質的には同様と考えられる。すなわち、近位尿管上皮細胞の好酸性顆粒状変性、空胞変性および腫大等の変化からはじまり、次いで上皮細胞の壊死、尿管腔の拡張さらに尿管基底膜の肥厚へと進行していくものと思われる。しかし、それぞれの変化は薬剤により、その出現時期と程度に差がみられ、とくに、尿管上皮細胞の壊死や尿管腔の拡張について、3 剤を比較すると GM 投与群が最も早く認められ、程度も強く、次いで AMK 投与群、HAPA-B 投与群の順と考えられる。

文 献

- 1) 横井山繁行, 鳥屋 実, 諸星俊郎, 尻谷善則, 高島朋子, 早野和夫, 五島峻智子, 辻 明良: 新しいアミノ配糖体系抗生物質, HAPA-B の細菌学的研究。本紙投稿中
- 2) RANKIN, I. J. ; F. C. LUFT, M. N. YUM, R. S. SLOAN, C. B. DINWIDDIE, J. R. & L. I. ISAACS : Comparative nephrotoxicity of SCH-21420 and Amikacin in rats. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 16 : 491~494, 1979
- 3) GILBERT, D. N. ; D. C. HOUGHTON, W. A. BENETT, C. E. PLAMP, K. REGER & G. A. POTER : Reversibility of gentamicin nephrotoxicity in rats. Recovery during continuous drug administration. *Proceed. Soc. Exp. Biol. & Med.* 160 : 99~103, 1979
- 4) LUFT, F. C. ; N. YUM & A. KLEITS : The effect of concomitant mercuric chloride and gentamicin on kidney function and structure in the rats. *J. Lab. Clin. Med.* 89 : 622~631, 1977
- 5) 高橋日出彦: くすりの毒性, 230~233 頁, 南江堂, 1975
- 6) SACK, K. & D. FREISLEBEN ; Experimental studies on the functional nephrotoxicity of tobramycin, gentamicin and sisomicin. *Infection* 3 : 540~549, 1975
- 7) LUFT, F. C. ; R. BLOCH, R. S. SLOAN, M. N. YUM, R. COSTELLO & D. R. MAXWELL ; Comparative nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics in rats. *J. Infect. Dis.* 138 : 541~545, 1978
- 8) KALOYANIDES, G. J. & E. POSTORIZA -MUNOZ : Aminoglycosides nephrotoxicity. *Kidney Int* 18 : 571~582, 1980
- 9) 田中寿子, 桐野有爾, 石本二見男: 薬物による腎障害, 病理と臨床 1 : 859~869, 1983
- 10) 田中寿子, 渡辺満利, 服部治子: Sisomicin のサルにおける筋肉内投与垂急性毒性, —Gentamicin 及び Tobramycin との比較。 *Chemotherapy* 26 : S-3, 85~98, 1978
- 11) BLOCH, R. ; F. C. LUFT, L. I. RANKIN, R. S. SLOAN, N. YUM & D. R. MAXELL ; Protection from gentamicin nephrotoxicity by cephalothin and carbenicillin. 15 : 6~49, 1979

NEPHROTOXICITY STUDY OF HAPA-B IN RAT

KAZUHIKO MATSUMOTO, HIROKO FUJII, HIROKO MIYAKE, KAZUMI SHIRAIWA
MASAMI MIURA and HIROSHI YAMAMOTO

Toxicological Research Laboratories
TOYO JOZO, CO., LTD.

ATUSHI SAITO

The Second Department of Internal Medicine
The Jikei University School of Medicine

Renal toxicity in male rats of HAPA-B, a new aminoglycoside antibiotic, was examined in comparison with Amikacin (AMK) and Gentamicin (GM). These drugs were given intramuscularly daily for 7, 14, 21 days to the rat at 50, 150 and 300 mg/kg of HAPA-B and AMK or 25, 50 and 100 mg/kg of GM. A recovery test was performed for 28 days after the last injection following 21 days treatment. There were no deaths in rats which received HAPA-B but the high dose group with AMK and GM showed a high incidence of mortality. Water consumption increased in rats which received 300 mg/kg of HAPA-B, 150 mg/kg and 300 mg/kg of AMK and 50 mg/kg of GM. Urine volume increased in rats which received 150 mg/kg and 300 mg/kg of HAPA-B but it was less than those with AMK. Osmolality showed a dose-related decrease, in contrast to urine volume with all drugs. Urine NAG activity indicated a significant increase after the first day of treatment at the lowest dose group with all drugs. The peak of NAG activity was observed early during treatment and sharply in a dose-dependent manner. Its peak of 300 mg/kg of HAPA-B was similar to 150 mg/kg of AMK.

Urine LDH activity also showed similar changes with NAG during treatment but sensitivity was less than NAG. Urine ALP and LAP activity also showed a dose-related increase, but unlike NAG and LDH, enzyme activities of treatment groups turned less than those of the control group during treatment. Serum urea-nitrogen and creatinine levels increased markedly at day 14 than day 21 of treatment with 300 mg/kg of HAPA-B and AMK.

With the dependence on the duration and the dose of treatment with all drugs, discoloration, swelling and increase of organ weight in kidney were noted. Moreover, in histopathological findings, dilatation, eosinophilic granular degeneration and necrosis of the epithelial cells of the proximal convoluted tubuli were observed. These changes were dose-related and dependent on the duration of treatment with all drugs. Changes with HAPA-B were slight and were the least of all drugs tested. Electron microscopic findings indicated an increase in the number of large lysosomes containing myeloid bodies in the epithelial cells of the proximal convoluted tubuli with all drugs. It was concluded from these results that the order of severity of nephrotoxicity was $GM > AMK > HAPA-B$.