ON THE MECHANISM OF KANAMYCIN OTOTOXICITY (II):
—ALTERATION OF GLUCOSE METABOLISM IN COCHLEA AND KIDNEY—

MASAYOSHI TACHIBANA, M.D.

*Department of Oto-Rhino-Laryngology, Kyoto Prefectural
University of Medicine, Kyoto (Director: O. Mizukoshi, M.D.)*

Effect of intramuscular injection of kanamycin (KM) (400 mg/kg, for 10 successive days) on glucose metabolism in the cochlea, kidney, liver and brain of the guinea pig was investigated.

The results obtained were as follows:

(1) Histological studies demonstrated morphological damages occurring in hair cells of the organ of Corti, especially outer hair cells on basal end (hook), and proximal tubules of the kidney.

(2) Biochemical studies revealed that in the organ of Corti and kidney, activities of hexokinase and phosphofructokinase, regulatory enzymes of the activity of anaerobic glycolysis were reduced significantly, whereas those of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase, regulatory enzymes of the activity of hexosemonophosphate pathway, (HMP) were not altered.

(3) Histochemical studies demonstrated that the activity of succinate dehydrogenase, regulatory enzyme of the activity of TCA cycle, was reduced in the organ of Corti and the tubule of the kidney, respectively.

(4) The conversion of glucose into CO_2 via glycolysis and TCA cycle was significantly inhibited in the cochlea and kidney and this change was not compensated by HMP.

(5) The formation of oto- and nephro-toxic effects of KM may be explainable at least in part by these changes in the glucose metabolism observed selectively in the organ of Corti and kidney.

(6) The present results suggest that the administration of drugs involved and/or related to the glucose metabolism such as pantothenic acid, thiamine, ATP or NAD may be useful for the treatment of deafness caused by the KM administration.

A80—0055—23645

糖代謝よりみたカナマイシ難聴の発現機序

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任 水越 治教授）

橘 正 芳

1 緒 言

アミノ配糖体抗生物質の作用機序の一つとして糖代謝、ことに好気代謝の障害があげられている。Henry ら¹⁾(1948), Oginsky ら²⁾(1949), Barkulis ら³⁾(1952), Katagiri ら⁴⁾(1959), Gourevitch ら⁵⁾(1959), Aoki ら⁶⁾(1959), Dubin ら⁷⁾(1963) は細菌について、アミノ配

糖体系抗生物質による好気呼吸代謝の障害を直接、間接に証明している。また、Hancock⁸⁾⁹⁾(1960, 1961) は *Staphylococcus* においてストレプトマイシン (SM) は glucose 酸化能を低下せしめるが、さらに ¹⁴C-SM の細菌による取り込みが嫌気的条件やチクローム系の呼吸阻害物質の存在下で低下することから、SM が細菌に取

り込まれる現象に好氣的呼吸が関与していると報告している。

一方、内耳の糖、エネルギー代謝についてはすでに多くの研究がなされている。TCA 回路についていえば、この回路はイソクエン酸脱水素酵素 (isocitrate dehydrogenase) およびコハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase=SDH) の部位で律速されることが知られている (Goldberg ら¹⁰⁾ (1966)、この内 SDH については内耳においても多くの組織化学的研究がある。Vosteen^{11)~13)} (1956) は蝸牛毛細胞、血管条を中心に「いわゆる」SDH を検出しているし、水越¹⁴⁾ (1957)、芋川¹⁵⁾ (1959)、Gerhardt¹⁶⁾ (1959)、谷村¹⁷⁾ (1961)、小出¹⁸⁾ (1961)、Spoendlin ら¹⁹⁾ (1963) もほぼ同様の結論を得ている。しかしこれらは非特異的な oxidoreductase 全体の活性を見ているに過ぎぬという批判がある。これに対し特異的 SDH については吉川²⁰⁾ (1963)、星野²¹⁾ (1967)、藤田²²⁾ (1969)、浅野²³⁾ (1974) らの研究がある。

アミノ配糖体系抗生物質が好気代謝に及ぼす影響については、全身投与時に膜蝸牛の組織呼吸が抑制されることが知られている (梁川²⁴⁾ 1964、El-Mofty ら²⁵⁾ 1966、Mizukoshi ら²⁶⁾ 1967)。組織学的にはカナマシ (KM) 投与により毛細胞の SDH 活性の低下がみられたとの報告がある (秋吉²⁷⁾ 1997、柿崎²⁸⁾ 1967、小川²⁹⁾ 1975)。反面、Müsebeck ら³⁰⁾ (1962) はジヒドロストレプトマイシン (DHSM) の投与により血管条の SDH 活性は低下したが、毛細胞の SDH は低下しなかったとし、成績が一定しない。しかもここでの SDH は非特異的な oxidoreductase 全体を含むものと考えられ、特異的な SDH についての報告はない。

嫌気代謝については、狭義の解糖系 (Embden-Meyerhof Pathway, EMP) に関して、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase=LDH) について多くの組織化学的研究がなされている。Vosteen³¹⁾ (1961) は毛細胞に LDH 活性が強く血管条には僅かにしか認められないことを報告しており、Spoendlin ら (1963)³²⁾ も同様の結果を報告している。しかしこれらも非特異的 endogenous oxidoreductase の活性をみている恐れがある。これに対し藤田²²⁾ (1969) は特異的 LDH も毛細胞、なかでも基底回転のそれが強い活性を有し、血管条にはほとんど活性を認めないとしている。この他 Vinnikow ら³³⁾ (1963) は glycogenolysis の律速酵素である phosphorylase の活性を毛細胞およびダイテルス細胞に検出し、河田³⁴⁾ (1965) はこの酵素活性が血管条には認められないとしている。また解糖系

の主たるエネルギー源である glycogen については、Zorzoli ら³⁵⁾ (1953) は外毛細胞での存在を報告し、Falbe-Hansen ら³⁶⁾ (1963)、Ishii ら³⁷⁾ (1969) は上方回転程 glycogen が多いと報告している。EMP に対するアミノ配糖体系抗生物質の影響に関する組織化学的研究には現在のところ接し得ない。

Glucose 代謝系路の EMP-TCA 回路系の副路として五炭糖リン酸回路 (Warburg-Dickens-Horecker 回路, hexose monophosphate pathway, HMP) が知られている。HMP に関しては、調節酵素である glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) の活性が、組織化学的に Balogh ら³⁸⁾ (1965) により plexus cochlearis に、Nomura (1970) ら³⁹⁾ により外ラセン溝に検出されている。しかし蝸牛における HMP については、その生理機能についても、アミノ配糖体系抗生物質の影響についてもほとんど知られていない。

以上の組織化学的研究の結果を概括してみると、「蝸牛コルチ器においては比較的 EMP の活性が強く、TCA 回路の活性はさ程強くない。血管条においては TCA 回路の活性が強く、EMP の活性は弱い。HMP についてはほとんど知られていない」というおおよその結論が得られる。しかし組織化学的方法には非特異性、非定量性など種々の問題があり、アミノ配糖体系抗生物質の影響に関しても組織化学的研究のみを頼みとするならば、自ら限界があるものと思われる。

これに対し糖・エネルギー代謝に関する生化学的・定量的研究は LDH の研究 (Lotz ら⁴⁰⁾ 1968、石田⁴¹⁾ 1975) などいくつかの研究を除けばほとんどなかったといつてよい。しかるに最近 Thalmann らは Lowry らの開発した微量定量法を用いて蝸牛の糖・エネルギー代謝について詳細な検索を加え、成果を得ている。著者は、アミノ配糖体系抗生物質による蝸牛あるいは腎障害の発現機序を検討し、ひいてはその予防・治療法を見出す目的で、この Thalmann らの微量定量法、さらに放射性同位元素を用いた方法、および病理学的方法、組織化学的方法を用いて、KM の EMP, HMP, TCA 回路などの糖エネルギー代謝に及ぼす影響について、腎・肝・脳の場合と比較しながら検討したので、文献的考察を加えてここに報告する。

Ⅱ 実験動物および実験方法

実験には全てブライエル反射鋭敏な成熟ハートレイ系白色モルモットを用い雌雄を問わなかった。動物を無処置の正常対照群 (以下正常群とする) と KM 投与群 (以

下 KM 群とする)との二群に分けた。KM 群には1日 400 mg (力価)/kg 体重の硫酸カナマイシン(タケダ)を10日間連日背筋内に注射し、特記しない限り翌日使用した。この投与量・期間を選んだのは、後に示すように、この時期に蝸牛における形態的、機能的变化が出現しはじめるからである。

一部の動物については、体重およびプライエル耳介反射域値を測定した。プライエル耳介反射は、オージオメーター(小林理研 Model A-102)より発した純音を増巾器(Audio AMP, Pioneer, Model SA-50A)にて増巾、モルモットの前方 15 cm においたスピーカーより音を発せしめ、0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 kHz の各周波数純音について検査した。各動物について、KM 投与前の各周波数のプライエル耳介反射域値を測定し、その時の音圧を 0 dB SPL と定めた、従って各動物によって 0 dB SPL の音圧は若干異なっている。連日 KM 筋注直前にプライエル耳介反射域値を測定し、scale out となった場合は便宜上その周波数における、我々の装置で聴かせ得る最大音圧値に 5 dB を加えて算出することとした。

(1) 病理組織学的、組織化学的研究

蝸牛のみの病理組織学的研究に関しては、すでに多くの報告があるが、全身諸臓器と比較しながら検討した病理組織学的研究は少い。従って著者は蝸牛と腎・肝・脳とを比較しながら検討することとした。各群の動物6匹ずつを断頭後、腎・肝・脳を摘出、型のごとくエタノール系列にて脱水、パラフィンに包埋、薄切しヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を施して検鏡した。蝸牛については、各群の動物をネブタール麻酔下に開胸、左心より生食を全身灌流後、Wittmaack 固定液にて灌流固定、さらに新しい同固定液にて1週間、後固定し Plank-Rychlo の方法に従い脱灰、型のごとくエタノール系列にて脱水、ツエロイジンに包埋、薄切し H-E 染色を施して検鏡した。

TCA 回路の律速部位については Goldberg ら¹⁰⁾(1966)によれば、イソクエン酸脱水素酵素の段階および SDH の段階にあるとされている。したがって著者は、組織学的研究法としては、従来より最もよく検討されている SDH 活性を指標として選び、KM の影響を検討した。

蝸牛の SDH 活性については、従来からよく検討されているが、先に述べたように、厳密な意味での特異的な SDH 活性についての検討は少く、アミノ配糖体系抗生物質の影響については知られていないので、この点に焦点を絞った。蝸牛については藤田²²⁾(1969)の方法に従

い、無麻酔下断頭後直ちに側頭骨を摘出、0°C 生理的食塩水中で骨胞を開放、次いで 0°C アセトンにて15分間浸漬した。下記の SDH 反応液および基質を抜いた対照液中で、37°C 30分間振盪反応せしめ、10% 中性ホルマリンにて24時間以上 4°C にて固定、Engström⁴²⁾(1963)の方法に準じて surface specimen を作製、グリセリンに封入して検鏡した。

コハク酸脱水素酵素反応液

0.2 M	リン酸塩緩衝液 (pH 7.6)	2
0.2 M	コハク酸 2 ナトリウム溶液	2
0.1 %	Nitroblue Tetrazolium 溶液	4
0.2 %	Phenazine Methosulfate 溶液	0.1

対照液

0.1 M	リン酸塩緩衝液 (pH 7.6)	4
0.1 %	Nitroblue Tetrazolium 溶液	4
0.1 %	Phenazine Methosulfate 溶液	0.1

腎・肝・脳については 4~10 μ m の凍結切片を作製、前記反応液または対照液にて 37°C 15分間反応せしめた後、10%中性ホルマリンにて固定、脱水、バルサムに封入、検鏡した。

組織中の SDH により、コハク酸がフマル酸に転化するが、この際水素が放出され、人工中間受容体である phenazine methosulfate を担体として、人工水素受容体である nitroblue tetrazolium (NBT) に水素イオンとして送り込まれ、NBT 自体は還元型のホルマザンとなり発色する。したがって、各組織の細胞内に形成されるホルマザンの量を指標として SDH 活性の状態を判定した。

(2) 糖代謝の生化学的研究

(i) ^{14}C -Glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化

一般にある組織を glucose などの基質を含む溶液中におくと、適当な条件下ではその組織は組織呼吸により O_2 を消費し CO_2 を産生する。その際 $[1-^{14}\text{C}]$ glucose は EMP および HMP の両者を経て TCA 回路に入り、 $[6-^{14}\text{C}]$ glucose は HMP のみを経て TCA 回路入ることが知られている。HMP および TCA 回路では CO_2 が産出されるが、EMP では産生されない。したがって $[1-$ または $6-^{14}\text{C}]$ glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化を検討し、KM による影響を知れば組織呼吸全体への影響と同時に、どの部位で影響を受けたかがある程度推定できる。著者はこのことを利用して以下の実験を行った。

a) 蝸牛 無麻酔下断頭後直ちに側頭骨胞を露出, 0°C Krebs-Ringer-25 mM Tris-HCl (pH 7.4) (以下 KRT とする) 緩衝液中で膜蝸牛を完全に露出せしめた. 0.5 mM glucose を含む KRT 緩衝液 0.3 ml (0°C) を入れた ultramicrorespirometer (Misco) 用の microvessel 中 (図 1) にこの膜蝸牛を移し, 更に 1,050,000 cpm の $[1-^{14}\text{C}]$ glucose (specific activity, 57 m Ci/m mol) または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose (specific activity 53.7 m Ci/m mol) を溶液に加えた. シリコン製のキャップにて密封し, 側腕より 2 分間酸素ガスを通気して, 気相を置換後, 37.5°C にて 30 分間 incubate した. $50\ \mu\text{l}$ の 35% 過塩素酸をシリコンキャップより注入し反応を停止せしめた後, さらに 1 時間 afterincubate した. この間に発生した $^{14}\text{CO}_2$ をあらかじめキャップにつるしておいた,

図 1 Ultramicrorespirometer 用の Microvessel

- Inj: 反応停止のためこの部位より HClO_3 を注入する.
 F Hyamine をしみ込ませた汙紙.
 M: 反応液 (0.5 mM Glucose, KRT 緩衝液, ^{14}C -Glucose) この溶液中に膜蝸牛を入れる.
 S この側腕より O_2 を吹入, 反応中は密封する.

$25\ \mu\text{l}$ の hyamine hydroxide をしみ込ませた汙紙に吸着せしめ, これを Bray 氏液 (Bray⁴³⁾ 1960) 中に移しその放射活性を液体シンチレーションカウンタにて測定した. なお組織を入れない respirometer についても同様の手技にて実験を進め, 非特異的に発生した少量の $^{14}\text{CO}_2$ をブランク値としてさし引いた.

b) 腎 無麻酔下断頭後全腎スライスを作製, その湿重量約 100 mg を, ワールブルグ検圧計の主室中に入れた. 主室にはあらかじめ 5 mM glucose を含む KRT 緩衝液 2.8 ml を入れておき, さらに一側の側室に 550,000 cpm の $[1-^{14}\text{C}]$ glucose (specific activity, 57 m Ci/m mol) または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose (specific activity, 53.7 m Ci/m mol) を入れ他側の側室には 0.2 ml の 35% 過塩素酸を入れておいた. 副室には 0.2 ml の hyamine hydroxide を含む汙紙を入れた. 15 分間 37.5°C にて preincubate した後, ^{14}C -glucose を主室に移し 30 分間 incubate, 過塩素酸にて反応を停止した. さらに 1 時間 afterincubate した後, 蝸牛の場合と同様にして産生された $^{14}\text{CO}_2$ の放射活性を測定した.

(ii) 糖代謝関連酵素活性

EMP は hexokinase (HK) と phosphofructokinase (PFK) の段階で (Lowry ら⁴⁴⁾ 1964), HMP は glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) の段階で (Vallejo ら⁴⁵⁾ 1971) 調節されることが知られているので, これらの酵素活性を指標として EMP, HMP への KM の影響を検討した. また TCA 回路の関連酵素である malate dehydrogenase (MDH) についても同様に検討した.

a) 無麻酔下断頭, 側頭骨胞を摘出後直ちにドライアイス エタノール (-78.5°C) にて冷却, 2~3 日間凍結乾燥し, Thalmann らの方法に準じ⁴⁶⁻⁵⁰⁾ 室温実体顕微鏡下にコルチ器と蝸牛管側壁 (血管条+ラセン靱帯+ラセン隆起) を摘出した. 電気天秤 (島津 PMB-1, 最少可測域値 500 ng) にて乾燥重量を測定後, 各試料を, $10\ \mu\text{l}$ の 0.2% Lubrol® を含む fluorometer tube に移し, 0°C 30 分間静置して酵素を可溶化した. HK, PFK, G6PDH, 6PGDH, MDH の活性測定には Thalmann ら⁵⁰⁾ の方法に準じ表 1 に示す $500\ \mu\text{l}$ の各反応液を fluorometer tube に加え, 25°C にて表に示す時間振盪反応した後, 産生又は消費された NADPH_2 または NADH_2 の native fluorescence を分光蛍光光度計を用い ($\lambda_{\text{ex}} 360\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} 460\ \text{nm}$) 測定し, 定量した. なお試料を含ま

表 1 蝸牛における糖代謝関連酵素の活性測定条件

Enzyme	Substrate (mM)	Coenzyme (mM)	Auxiliary Enzyme (μ g/ml)	Buffer	Other Additions	Reagent Volume (μ l)	Incubation Time (min)	Standard used
HMP G6PDH	G6P 2	NADP 0.3	6PGDH 20	AMP ₂ -HCl 100 mM (pH 9.3)	BSA 0.05% EDTA 0.5 mM	510	40	NADPH ₂
6PGDH	6PG 3	NADP 0.5	None	Tris-HCl 100 mM (PH 8.2)	BSA 0.05% EDTA 1mM	510	30	NADPH ₂
EMP HK	Glucose 1	NADP 0.03 ATP 1	G6PDH 1.5	Tris-HCl 50 mM (pH 8.2)	BSA 0.02% MgCl ₂ 5mM Mercapto- ethanol 2mM	510	40	NADPH ₂
PFK	F6P 1	NADH ₂ 0.01 ATP 0.5	Aldolase 30 Triose-p- isomerase 10 α -GOPDH 5	Imidazol- HCl 50 mM (pH 7.0)	Potassium acetate 150 mM MgCl ₂ 5mM 5AMP 0.1mM Ammonium acetate 3mM	510	60	NADH ₂
TCA MDH	Malate	NAD 20	None	Tris-HCl 100 mM (pH 8.0)	BSA 0.02%	510	30	NADH ₂

Abbreviation used; AMP₂: 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, BSA: bovine serum albumin,
 α -GOPDH: α -glycero-phosphate dehydrogenase

ぬ各反応液についても同様の手技で実験を進め、非特異的に産生され NADPH₂ たまは NADH₂ をブランク値としてさし引いた。酵素活性は乾燥重量あたりの比活性として算出した。なお、蝸牛回転については、測定した酵素の活性には回転別差異がみられないとの報告がある (Thalmann ら⁵⁰⁾ 1970) ので、特別の留意なく主として採取し易い第 2, 第 3 回転のコルチ器または蝸牛管側壁について検討した。

b) 腎・肝・脳 各組織の湿重量を測定後、9 倍量の氷冷等張 KCl 溶液(0.15 MKCl, KHCO₃ にて pH 7.0 に中和)を含むガラスホモゲナイザーにて氷冷しながらホモゲナイズした。ただし MDH の場合は氷冷 1/15 M リン酸緩衝液(pH 7.4)を用いた。HK 活性については全ホモゲネートについて Galton ら⁵¹⁾ (1970) の方法に従い、70mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0), 10 mM glucose, 0.55mM NADP, 7.4 mM MgCl₂, 37 mM ATP, 5 mM mercaptoethanol, 2.5 μ g/ml の G6PDH を含む反応液を用いて NADPH₂ の産生を指標として分光光度計を用いて (340 nm における吸光度) 測定した。PFK 活性は全ホモゲネートについて蝸牛の場合と同様にして測定した。

G6PDH および 6PGDH の活性測定に際しては、全

ホモゲネートを 3,000 $\times$ g にて 4°C 10 分間遠沈、その上清を 0.6 mM EDTA を含む先の等張溶液に対して 4°C 12 時間透析したものについて活性を測定することとした。Lowry ら⁵²⁾ (1961) の方法に従い、0.05 M NADP, 1 mM EDTA, 0.05 mM Tris-HCl 緩衝液 (G6PDH の場合は PH 7.6, 6PGDH の場合は PH 9.0) を含む反応液を用い、NADPH₂ の産生を指標として、分光蛍光光度計を用い (λ ex 360 nm, λ em 460 nm) 測定した。

MDH 活性は全ホモゲネートについて、Ochoa⁵³⁾ (1955) の方法に従い、0.25 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.0015 M NADH₂, 0.0076 M オギザロ酢酸 (pH 7.4) を含む反応液を用い、NADH₂ の減少を指標として分光光度計を用い (340 nm における吸光度) 測定した。

全ての反応は適当量の試料を反応液に加えることにより開始し、酵素活性は各試料の蛋白含量を Lowry ら⁵⁴⁾ (1951) の方法により測定して、蛋白あたりの比活性として算出した。

III 実験結果

図 2, 3 にブライエル耳介反射域値の経時の変化を示す。10匹について 400 (力価)/kg 体重/日, 10日間連続

図2 プライエル耳介反射域値の経時的変化(低音部)
▲の部位で KM 400 mg/k 筋注。筋注直前に耳介反射域値を測定した。測定値は平均値±標準誤差であらわした。
第10日目 (solid column) に実験に供した。
測定した全周波数で第10日目頃より域値の上昇が顕著となる。

図3 プライエル耳介反射域値の経時的変化(高音部)
測定した全周波数で第10日目頃より域値の上昇が顕著となる。

図4 正常群および群の体重増加の経時的変化
値は 平均値±標準誤差 であらわした。
n は測定例数
5 日目以降、示された危険率で両群の間に有意差がみられる

筋注し、さらに2日間後まで域値を測定した。本研究では全て第10日目 (solid column にて図示してある) に動物を使用しており、この時期では丁度測定した全周波数、特に高音域においてプライエル耳介反射域値が上昇し始めており、さらに KM 投与を中止してもこの域値上昇が続いているところから、この時期が KM による蝸牛機能障害の臨界条件であることがわかる。この結果は、同一投与条件における久保ら⁵⁵⁾(1960)、Koide ら⁵⁶⁾(1966) の CM pseudothreshold を指標にした実験結果とほぼ一致している。

図4に正常群35匹、KM 群77匹の体重増加(注射前の体重に対する百分率増加)の経時的変化を示す。F 検定、t 検定により第3日目以後 KM 群において体重増加率が横這い状態となる。すなわち体重が増加しなくなり、第5日目以後では正常群との間に有意差がみられる。

(1) 病理組織学的・組織化学的研究

肉眼的には腎は、正常な暗赤色を失ない、くすんだ黄土色を呈し、浮腫状であった。肝、脳については特別な変化はみられなかった。

切片組織標本の観察結果は以下のとおりである。蝸牛については、全体の構造はよく保たれており、蝸牛管側壁、コルチ器、ライスネル膜などの消失はみられなかった(写真1)。コルチ器については基底回転下端、Hook 部において外毛細胞の一部消失、内毛細胞の変性、支持細胞とくにダイテルス細胞の膨化像がみられる例が多かった(写真2)。これらの変性像は主として基底回転、Hook 部にみられたが他の回転にも散見された(写真3)。外毛細胞の消失あるいは変性像は第1列(最内列)にみられることが多かったが、他の列にも散見された(写真3)。

ラセン神経節は細胞の脱落もなく、異常を認め難かった。また蝸牛管側壁についても血管条、ラセン隆起、ラセン頸帯ともに光顕レベルでは著変を認め難かった(写真4)。Plexus cochlearis についても同様であった。

腎は全例について、尿細管ごとに近位尿管の上皮細胞に浮腫・空胞変性像がみられ、尿細管腔部にヘマトキシリン好性の変性物質の貯留が認められた。これに対し糸球体、集合管では著変は認め難かった(写真5)。肝は全例について肝索の乱れや、細胞変性像はみられず、光顕レベルでは変化を認めなかった(写真6)。脳については主として蝸牛神経核について観察したが病理学的変化は認め難く、小脳・大脳についても同様であった(写真7)。

SDH 反応による組織化学的観察の結果は以下の通りである。蝸牛の surface specimen による検索の結果、コハク酸を除いた対照液と反応させたものはコルチ器についても血管条についても全く特異的なホルマザンの形成を認めなかった(写真 8, 9)。これは冷アセトン前処理等により, endogenous oxidoreductase による非特異的反応が抑制されたためと考えられ, 以下の結果に示すホルマザンの形成は特異的な SDH 活性をあらわしていると考えられた。冷アセトン前処理により, 基底回転以外の回転のコルチ器は形態的に artifact が多く, 正常群においても毛細胞の変形, 配列の乱れなどが観察されることがあり, この部位で SDH 活性の存否や分布の状態について論じるのは危険であると考えた。さらに KM によるコルチ器障害は一般に基底回転より始まる例が多いと考えられることから, 基底回転のみで SDH 活性を比較することとした。

正常群では全例の毛細胞にホルマザンの著明な形成がみられ, ことに外毛細胞において顕著であり, 最外列から順次弱くなり, 内毛細胞で最も弱かった(写真 10)。KM 群では 9 匹中 3 匹の基底回転コルチ器毛細胞において, 細胞崩壊がないにもかかわらず正常群に比しホルマザンの形成が抑制されており, SDH 活性の低下がうかがわれた(写真 11~13)。

血管条については, 一般に毛細胞よりホルマザン形成が強くしかも, 下方回転ほどホルマザンの形成が強く, また KM 群では殊に下方回転においてホルマザンの形成が抑制されているかのごとき例がみられたが, 切片標本での観察ではないので明確な結論を得ることはできなかった。

腎・肝・脳の諸組織についてもコハク酸を抜いた対照

液と反応させた切片では全くホルマザンの形成は認められず, 以下に示すホルマザンの形成は特異的 SDH 活性をあらわしていると考えられた。

腎については, 正常群, KM 群とも尿細管および集合管の上皮細胞のホルマザンの形成がみられ, 糸球体には認められなかった。KM 群ではこのホルマザン形成が著明に抑制され, SDH 活性の低下が認められた(写真 14, 15)。

肝については, 肝全般にわたって肝細胞内にホルマザンの形成が認められたが正常群, KM 群の間に有意の差は認められなかった(写真 16, 17)。

脳については主として蝸牛神経核について検討した。比較的大型の神経細胞にホルマザンの形成が認められたが, 正常群, KM 群の間に有意の差は認められなかった(写真 18, 19)。

(2) 糖代謝の生化学的研究

(i) ^{14}C -Glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化

表 2 に示すように, 蝸牛では正常群において $[1-^{14}\text{C}]$ または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化の比, すなわち $(\text{C-1})/[\text{C-6}]$ 比は 1.21 であった。このことは蝸牛においても僅かではあるが HMP が作働していることを意味する。KM 群では $[1-^{14}\text{C}]$ glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化は 76.4% に抑制され, F 検定および Student の t 検定で 2% の危険率で有意差があった。 $[6-^{14}\text{C}]$ glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化も 79.1% に抑制され, 5% の危険率で有意差があった。すなわち KM 群では, $[1-^{14}\text{C}]$ または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ への転化の両者が, ほぼ同じ割合で抑制された。したがって KM 群においても $(\text{C-1})/(\text{C-6})$ 比は 1.23 と正常群に比し著変はなかった。

表 2 ^{14}C -glucose よりの $^{14}\text{CO}_2$ への転化

	蝸 牛		腎	
	正・常 群	KM 群	正 常 群	KM 群
$1-^{14}\text{C}$ -glucose 由来の CO_2 [$1-^{14}\text{CO}_2$]	2,124 $\pm$ 98(5)	1,622 $\pm$ 86(4)**	8,179 $\pm$ 640(4)	5,489 $\pm$ 867(4)*
$6-^{14}\text{C}$ -glucose 由来の CO_2 [$6-^{14}\text{CO}_2$]	1,160 $\pm$ 98(4)	1,313 $\pm$ 16(3)*	6,126 $\pm$ 309(5)	4,141 $\pm$ 539(5)**
$(1-^{14}\text{CO}_2)/(\text{C-6})$ 比	1.21	1.23	1.34	1.33

各値は平均値 $\pm$ 標準誤差であらわす。() 内は例数。

* 正常群に比し $P<0.05$ で有意に抑制されている。

** 正常群に比し $P<0.02$ で有意に抑制されている。

腎についても正常群では (C-1)/(C-6) 比は 1.34 で、蝸牛の場合と同様に僅かではあるが HMP が作働していることが示唆された。KM 群では $[1-^{14}\text{C}]$ または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose から $^{14}\text{CO}_2$ への転化は両者とも約 67% に、有意に抑制された。従って (C-1)/(C-6) 比は 1.23 で正常群に比し著変はなかった。

(ii) 糖代謝関連酵素活性

蝸牛については、凍結乾燥により三列の外毛細胞、一列の内毛細胞およびヘンゼン細胞、ダイテルス細胞などを含むコルチ器が比較的容易に得られる。平均一つの蝸牛から 2 検体、このような試料が得られた。

諸酵素の活性については、表 3 に示すように正常群では、HK・PFK・G6PDH・6PGDH の活性はコルチ器の方が、蝸牛管側壁に比しやや高く、MDH については逆の結果であり、Thalmann ら¹⁸⁾ (1972) の報告とほぼ同様であった。

コルチ器では EMP 調節酵素である HK および PFK のいずれの酵素においても、KM 群において有意の酵素活性の低下が認められた。これに対し蝸牛管側壁については、上記のいずれの酵素についても活性の変化は認められなかった。

HMP 調節酵素である G6PDH, 6PGDH に関しては、コルチ器、蝸牛管側壁のいずれについても、また KM 群においても酵素活性の変化は認められなかった。

TCA 回路関連酵素である MDH についても、KM 群において、正常群に比し有意の活性の変化は認められなかった。

腎・肝・脳についての結果は表 4 に示す通りである。腎については HK および PFK の活性が KM 群で有意に低下したが、G6PDH・6PGDH および MDH の活性には有意の変化は認められなかった。

肝・脳については測定した全ての酵素について、KM 群において、正常群に比し有意の活性の変化は認められ

表 3 蝸牛における糖代謝関連酵素活性の測定結果

酵 素	コ ル チ 器		蝸 牛 管 側 壁	
	正 常 群	KM 群	正 常 群	KM 群
Hexokinase	1.3±0.1 (8)	0.9±0.05(8)*	0.85±0.06(15)	0.90±0.05(15)
Phosphofructokinase	3.3±0.3 (4)	2.0±0.2 (3)**	2.4±0.3 (13)	1.9±0.2 (18)
Glucose-6-P dehydrogenase	1.2±0.1 (6)	1.2±0.1 (5)	0.08±0.04(14)	0.72±0.04(14)
6-P-gluconate dehydrogenase	0.29±0.04(5)	0.27±0.02(6)	0.21±0.02(19)	0.18±0.01(22)
Malate dehydrogenase	5.1±0.6 (6)	4.9±0.1 (6)	5.9±0.3 (20)	5.7±0.2 (17)

活性は moles/kg 乾燥重量/時としてあらわした。

各値は平均値±標準誤差であらわす。() 内は例数。

* 正常群に比し $P<0.02$ で有意に抑制されている。

** 正常群に比し $P<0.05$ で有意に抑制されている。

表 4 腎・肝・脳における糖代謝関連酵素活性の測定結果

酵 素	腎		肝		脳	
	正 常 群	KM 群	正 常 群	KM 群	正 常 群	KM 群
HK	56.6±1.3 (3)	33.8±1.3 (3)*	18.5±0.1 (3)	18.3±0.4 (3)	26.9±1.3 (3)	26.7±0.9 (3)
PFK	4.95±0.27(6)	3.23±0.13(6)*	4.19±0.29(5)	3.48±0.38(5)	6.10±0.26(5)	6.21±0.42(4)
G6PDH	27.8±1.9 (7)	27.2±1.0 (7)	4.64±0.67(4)	4.71±0.96(4)	9.12±0.67(5)	9.92±0.69(5)
6PGDH	28.2±0.8 (7)	27.0±0.5 (7)	9.78±0.64(4)	9.90±0.24(4)	17.3±1.3 (4)	17.4±0.6 (4)
MDH	4.95±0.51(6)	4.34±0.37(6)	11.2±0.92(6)	11.9±0.77(6)	1.80±0.10(5)	1.77±0.05(5)

活性は moles/mg 蛋白/分としてあらわした。

各値は (平均値) ± (標準誤差), () 内は例数

* 正常群に比し $P<0.02$ で有意に抑制されている。

なかった。

Ⅳ 考 按

著者は別報⁵⁷⁾に述べたごとく、カナマイシン難聴の発現機序を、内耳蝸牛における (1) KM の貯留・停滞、(2) 呼吸、糖・エネルギー代謝の障害、(3) 蛋白・核酸代謝の障害、(4) 膜機能の障害、の 4 つに整理し検討を加えてきた。このうち (1) の KM の蝸牛への貯留・停滞については、すでに別報⁵⁷⁾にて明らかにした。すなわち、蝸牛外リンパ液中へ、かなりの濃度の KM が緩徐に入り緩徐に排出される、また蝸牛管側壁の酸性ムコ多糖減少による KM 排出機構の障害などにより、この傾向が増強され KM 難聴発現へと繋がるが、肝との比較により、内耳組織ことにコルチ器の KM 感受性も考慮しなければならないと結論した。そこで本研究では、主として (2) の呼吸・糖エネルギー代謝の面から検討を加え KM 難聴の発現機序を探ろうとした。

(1) KM 投与条件について

著者は KM 投与条件として、400 mg (力価)/kg 体重/日、10 日間連日投与翌日使用を選んだ。プライエル耳介反射域値の測定結果から判断すると、この投与条件は、内耳蝸牛の聴覚機能が大きく低下し始める丁度臨界条件であると考えられた。しかも形態学的には大多数の例では基底回転 Hook 部のコルチ器毛細胞を除いては、細胞の崩壊消失がみられず、KM による初期変化を組織化学、生化学的に究明するのに適していると考えられた。

(2) 病理組織学的研究について

(i) 蝸牛諸組織について

KM の蝸牛に及ぼす影響についての形態学的研究については、すでに多数あり枚挙の暇がない。著者の光学顕微鏡的観察の結果では、コルチ器については主として基底回転 Hook 部の毛細胞、ことに外毛細胞に変性が強く、同部位の支持細胞にも変化がみられた。

KM による蝸牛障害の主体が、コルチ器の外毛細胞にありとするのは現在の大勢で、例えば Hawkins⁵⁸⁾(1959, ネコ, 50 mg/Kg 体重/日, 75 日) は第 1, 第 2 回転の外毛細胞の消失を認めたとし、Ward ら⁵⁹⁾(1961, モルモット, 30~800 mg/kg 体重/日, 5~30 日), Beck ら⁶⁰⁾(1962, モルモット, 160~240 mg/kg 体重/日, 4~8 日), Jørgensen ら⁶¹⁾(1962, ヒト, 0.5 g×21 日, 計 11 g), Farkashidy ら⁶²⁾(1963, ネコ, 18~22 g), Engström ら⁶³⁾(1964, モルモット, 400 mg/kg 体重/日, 7~10 日), 大谷⁶⁴⁾(1968, ウサギ, 100 mg/kg 体重/日, 各種期間), 小川²⁹⁾(1975, モルモット, 400 mg/kg 体重/日, 10~

15 日) は、いずれも内毛細胞に比し、外毛細胞の方に障害が強く、この外毛細胞の障害は下方回転の方に強いとしている。

したがって、内毛細胞について言えば、外毛細胞に比し障害が少いとの報告が多いわけであるが、内毛細胞障害の蝸牛回転別差異については一定せず、基底回転に多いとするもの (Hawkins⁵⁸⁾ 1959, Ward ら⁵⁹⁾ 1961, Benitez ら⁶⁵⁾ 1962, 五十嵐⁶⁶⁾ 1963, Koide⁶⁶⁾ 1966), 頭頂回転より始まるとするもの (Engström ら⁶⁷⁾ 1964), 小川²⁹⁾ 1975), 弥漫性にはじまるとするもの (Matz ら⁶⁸⁾ 1965) などがある。

著者は連続切片にて観察していないので確定的な結論は出せなかったが、最近豊田⁶⁹⁾(1976) は KM による内耳障害を計量的に観察し、外毛細胞に関しては下方回転より障害される型が最も多く 35% (ただし全回転障害型または全回転正常型を除くと 58%), 内毛細胞に関しては上方回転より障害される型が最も多く 33% (ただし同じく 46%) であったと報告している。

支持細胞については、現在ほとんどの研究者が毛細胞変性に続いて二次的に変化すると考えているようであり、著者も同様の結論を得た。これに対し Reddy and Igarashi⁷⁰⁾(1962) は、クラウドイウス細胞、ヘンゼン細胞、ダイテルス細胞の順に細胞変性が進行し、しかも毛細胞変性に先行するとしている。しかし同じ五十嵐⁶⁶⁾(1963) もヒト側頭骨の所見で、毛細胞に変性がみられたのに、ダイテルス細胞・クラウドイウス細胞には変化がなかったとしている。やはり KM の内耳障害はコルチ器毛細胞が主体であり、それに次いで支持細胞の変化があらわれ、ことにダイテルス細胞はその貪食機能により破壊された毛細胞の処理にあたるのが妥当である。

ラセン神経節に関しては、著者の投与条件では光顕的には変化を見出せなかった。同様な結果は Hawkins⁵⁸⁾(1959), 五十嵐⁶⁶⁾(1963), Benitez ら⁶⁵⁾(1962), 秋吉²⁷⁾(1967), が報告するところである。これに対し Hawkins⁵⁸⁾(1959), Beck ら⁶²⁾(1962), Ward ら⁵⁹⁾(1961), Reddy ら⁷⁰⁾(1962), Jørgensen⁶¹⁾(1962), Matz⁶⁸⁾(1965), Koide ら⁶⁶⁾(1966), はいずれも主として基底回転のラセン神経節の細胞消失を認めた例があるとしている。しかしいずれもこれらは比較的大量に長期にわたり投与された例であり、コルチ器毛細胞変性に続く二次変性の結果であると考えられ、山本⁷¹⁾(1968) の電子顕微鏡的研究の結果とも一致するところである。すなわち、山

本は KM 400 mg/kg, 12日間腹腔内投与後, 2~3 日目のモルモットについて, 有髄神経細胞には全く変化が認められないが, 無髄神経細胞には軽度の粗面小胞体の拡大と分散傾向がみられ, これは chromatolysis の像, とくに恢復期における状態に相当するとしている. Spöndlin⁷²⁾(1971)によれば, 有髄神経細胞は内毛細胞とシナプスを形成する求心神経細胞であり, 無髄神経細胞はそのほとんどが外毛細胞とシナプスを形成する求心神経細胞である. したがって KM 投与により外毛細胞が変性し, それに伴って無髄神経細胞に軽度の可逆的な変化があらわれたと考えられる.

血管条については著者は著明な形態学的変化を見出さなかった. 同様な結論は Ward ら⁵⁹⁾(1961), 五十嵐ら⁶⁰⁾(1963), Koide ら⁵⁶⁾(1966)の報告するところである. これに対し Ruedi ら⁷³⁾(1952), Beck ら⁶⁰⁾(1962), Matz ら⁶³⁾(1965)は主として毛細胞変性の強い部位に対応して血管条に光顕レベルで変性がみられたとしている. セラン靱帯については, 光顕レベルでは変性を認め難く諸家の報告と一致している. しかし伊勢ら⁷⁴⁾(1973)は 400 mg/kg 体重/日, 20日間投与したモルモットのラセン靱帯を電顕的に観察し, 下方回転のラセン靱帯線維芽細胞の退行変性, 間質の拡大を認めている. さらに Saito ら⁷⁵⁾(1971)および著者が別報⁵⁷⁾に報告したように, 本実験と同一の投与条件で, 蝸牛管側壁の酸性ムコ多糖の含量が減少し, KMの外リンパ液からの排出遅延に関与している可能性が示唆されている. このように蝸牛管側壁でも KM により, ことに生化学的あるいは電子顕微鏡レベルで変化がおこっていることは十分考えられるが, やはり KM 難聴発現に対応する主要な障害部位は, 毛細胞にあり, 蝸牛管側壁は副次的な役割を持つにすぎないのではないかと考えられる.

その他 plexus cochlearis については, 光顕レベルでは変化を見出さなかったが, Mootz ら⁷⁶⁾(1972)が, 構成細胞のミトコンドリアを中心に変性が見られたとしており, 同部位が KM の外リンパ液への侵入経路に当るのではないかと考えられている点からも, 興味ある部位と言えよう.

(ii) 腎・肝・脳について

腎については, 主として近位尿細管上皮の膨化, 空胞変性, 管腔内の硝子様円柱の出現などの病理的变化を認めた. ほぼ同様な結果は Tisch ら⁷⁷⁾(1958), Berman ら⁷⁸⁾(1958), Koide ら⁵⁶⁾(1966), 武田⁷⁹⁾(1970)が報告しているところである. 電顕的には木下⁸⁰⁾(1968), 武

田⁷⁹⁾(1970), 江部⁸¹⁾(1972)の報告によると, 近位尿細管上皮細胞内にミエリン様封入体 (lysosome の一種)が増加する等の変化が出現する. Ishii ら⁸²⁾(1968)は KM投与モルモットの蝸牛外毛細胞においても lysosomal enzyme (例えば glucosaminidase) 活性が初期に増加, 次いで減少, 消失することを組織化学的に認めており, 腎と同様な現象がおこっていると考えられる.

肝については, 著者の光顕レベルでの観察では病理学的変化は認められず, Koide ら⁵⁶⁾(1966)の報告に一致するところである. また臨床的にも KM による肝障害の報告にはまだ接し得ない. 一方別報⁵⁷⁾に報告したごとく, 本実験と同一の投与条件で, KMは肝に, 内耳と同程度の濃度にまで集積し, しかも排出も蝸牛の場合と同様に遅い. それにもかかわらず, このように少くとも光顕レベルでは, 肝には病理的变化が認められないのは, 肝組織の KM 易傷性が蝸牛に比し低いためと考えられる. ただ Ismail ら⁸³⁾(1970)は光顕レベルでは形態に変化が認められなかったが, 肝機能の軽度障害を認めており, 障害が全くおこり得ないわけではなく, 易傷性の程度の差と考えられる.

脳については主として蝸牛神経核について観察したが, 光顕レベルでは全く変化を認めなかった. これは Koide ら⁵⁶⁾(1966)の報告と一致するところである. 他方, 蝸牛神経背側核 (Beck ら⁶⁰⁾1961), 小脳プルキンエ細胞 (Ward ら⁵⁹⁾1961), などの中枢神経組織に変化をみたという報告も散見する. しかし別報⁵⁷⁾にも述べたごとく, 脳実質への KM の移行は, 恐らくは血液脳関門にさえぎられて, 極く微量であることから考えても, 中枢神経核の変化は, もし有りとしても, 末梢神経の変性にともなう二次的なものであると考えられる.

(3) 組織化学的研究について

緒言において述べたごとく, Vosteen¹¹⁾(1956), 水越¹⁴⁾(1957)の報告以来, Tetrazolium 塩を用いる組織化学的方法により, 蝸牛の SDH に関して数多くの研究がなされている. しかしこれらの多くは新鮮標本と反応液を直接反応させる方法を採用しているため, コハク酸に対する基質特異性がなく, 現在では endogenous oxidoreductase 全体の活性をあらわしていると考えられている (浅野²³⁾1974). これら非特異的な“いわゆる SDH”に対して, “特異的 SDH”活性を組織化学的に証明するには, 次の二つが考えられる. 第一は凍結切片を用いる方法で第二は特殊な前処理により基質特異性が得られる条件を見出す方法である. 前者は吉川²⁰⁾(1963),

星野²¹⁾ (1967) らによって研究されており、吉川は毛細胞の SDH 活性に回転別差異はないとし、血管条は基礎回転ほど活性が強いとしている。星野は内外毛細胞とも基礎回転に SDH 活性が強いとしている。しかし両者とも基質特異性の検討はしておらず、また非脱灰凍結切片標本を得るのに特別の工夫がいるため、毎回良好な切片を得るのは困難であり、病理的变化を検索するには必ずしも適当な方法とは言えない。第二の方法は藤田²²⁾ (1969)、浅野²³⁾ (1975) によって研究されている。浅野はヒドロキシ・アデイプアルデヒドで、前固定することにより、蝸牛毛細胞・血管条に特異的 SDH 活性を証明している。藤田は 0°C アセトンで15分間前処理した後、SDH 反応液と反応せしめ、固定後脱灰切片標本を作製して観察することにより、特異的 SDH 活性を検出し、血管条に最も強い活性を認め、毛細胞にも活性を認めたとしている。さらに血管条では回転別差異は認め難く、毛細胞では基礎回転より上方回転に向かう程 SDH 活性が弱くなること、下方回転では外毛細胞の活性が内毛細胞のそれより強く、上方回転では逆となることなどを報告している。また酸素欠乏、音響負荷により基底回転の毛細胞の SDH 活性が低下し、これに対し乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase=LDH) 活性には変化を認め得ず、毛細胞では好氣的エネルギー獲得が障害された場合にも嫌氣的エネルギー産生がこれを補うと結論している。

KM 投与の SDH 活性に及ぼす影響については、秋吉²⁷⁾ (1967)、柿崎²⁸⁾ (1967)、小川²⁹⁾ (1975) らによって研究されており、彼らは外毛細胞を主体として SDH 活性の低下を認めている。しかしこれらはいずれも先述の非特異的な“いわゆる SDH 活性”についてであり、したがって endogenous oxidoreductase の全体としての活性が低下していると考えるべきであろう。これに対し著者は先の藤田²²⁾ (1969) の方法に従い、0°C アセトンにて15分間前処理し、さらに5日間 0°C 生食に浸漬してから、SDH 反応液と反応させることにより、基質に特異的な真の SDH 活性を検出し、さらに KM 投与の場合の変化を観察した。その結果、冷アセトン前処置により、形態を保存しながら、ある程度 endogenous oxidoreductase の活性を抑制し、さらに 0°C 生食浸漬により完全に endogenous oxidoreductase 活性を抑制することができたため、特異的な SDH 活性を検出できた。ただ形態保存に関しては、基底回転を除いては、全ての例において完全というわけにはいかず、正常群にお

いても毛細胞の配列の乱れ、細胞膜の破壊などがみられる場合があった。そこでこれらの部位で正常群と KM 群の SDH 活性を比較するのは危険であると考え、基底回転についてのみ比較検討した。その結果、血管条に最も強い活性が、次いで毛細胞に、強い SDH 活性が認められた。毛細胞では外毛細胞の方が内毛細胞に比し活性が強かった。KM 投与群においては、多くの例において正常群に比し、外毛細胞の SDH 活性の低下が認められた。Duvall⁸⁴⁾ (1963) は SM の蝸牛毛細胞への作用点がミトコンドリアにあると報告しており、SDH は主としてミトコンドリアに存在すると考えられることから、著者の結果と一致すると考えられる。

血管条の SDH に関しては、河本⁸⁵⁾ (1962) は Cartesian diver respirometer により生化学的に活性を測定し、下方回転ほど活性が強いと報告している。さらに柿崎²⁸⁾ (1968) は KM 投与動物の血管条について、同様の方法で SDH 活性を測定し、ブライエル反応消失後5日以上経過したモルモットについて活性の低下をみており、ことに下方回転ほどその活性低下が著しかったとしている。著者の実験にても、正常群では一般に下方回転程ホルマザンの沈着が強く、また KM 投与群で一部に SDH 活性の低下を思わせる例もあったが、その低下の程度は毛細胞ほどではなく、また結果にバラツキが多かったため、組織化学的方法の限界と考え、血管条については結論をさしひかえた。

蝸牛以外の臓器については、全ての臓器について特異的な SDH の活性が認められたが、KM 群での変化は腎においてのみ認められた。すなわち腎では主として尿細管および集合管上皮にホルマザンの形成が認められるが、KM 群では、形態学的にも障害が認められた部位である尿細管上皮でのホルマザン形成が減少することが観察された。

以上の組織化学的研究により KM 投与が、臓器の SDH 活性を低下せしめ、しかもこの活性低下が、KM 臓器障害の発現する蝸牛および腎、ことに各々毛細胞および尿細管に特異的に認められたこと、また SDH が TCA 回路の調節酵素の一つとして考えられていること (Goldberg¹⁰⁾ 1966) から、KM の蝸牛あるいは腎障害の発現機序の一つとして TCA 回路の阻害が考えられる。

(4) 生化学的研究について

i) ¹⁴C-glucose よりの ¹⁴CO₂ への転化

Glucose が酸化されて発生する CO₂ には、HMP か

図 5 $[1-^{14}\text{C}]$ glucose または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose を基質とした場合の $^{14}\text{CO}_2$ の産生

(文献⁸⁶⁾より引用)

$[1-^{14}\text{C}]$ glucose を基質とした場合 (上段) は、五炭糖リン酸回路 (C_5)・TCA 回路の両者から $^{14}\text{CO}_2$ が産生される。これに対し $[6-^{14}\text{C}]$ glucose を基質とした場合 (下段) は、TCA 回路のみから $^{14}\text{CO}_2$ が産生される。○は C を ●は ^{14}C をあらわす

ら発生するものと TCA 回路から発生するものがある (赤堀⁸⁶⁾ 1957)。図 5 に示すように glucose 中の炭素が ^{14}C でラベルされる位置によって、EMP または HMP を通過する時に発生する $^{14}\text{CO}_2$ の specific activity が異なってくる。すなわち $[1-^{14}\text{C}]$ glucose を基質とした場合は HMP, TCA 回路の両者から、 $[6-^{14}\text{C}]$ glucose を基質とする場合は TCA 回路のみから $^{14}\text{CO}_2$ が産生される。したがって HMP 活性が強い程、 $[1-^{14}\text{C}]$ glucose または $[6-^{14}\text{C}]$ glucose を基質にした場合の産生される $^{14}\text{CO}_2$ の放射活性の比、すなわち $(\text{C}-1)/(\text{C}-6)$ 比が大きくなることが予想される。

HMP の関連酵素は NADP^+ を補酵素とする特徴を有する。また HMP は purine の前駆体である ribose 5-phosphate を合成する能力を有する。したがって NADPH を必要とする系、例えば脂肪組織 (脂肪酸の合成に必要)、副腎皮質 卵巣・精巣・授乳時の乳腺 (steroid 合成に必要)、水晶体・角膜 (glutathione reductase とカップルしている) などに HMP の活性が強く、また核酸合成の盛んな系すなわち癌組織・骨髓などでも HMP 活性が高いとされている。神経組織における HMP の存否、機能的意義については未だ不明の点が多いが、Kimura ら⁸⁷⁾ (1974) は脳切片について検討し、非刺激状態では $(\text{C}-1)/(\text{C}-6)$ 比は 1.2 と HMP 活性はさ程強くなかったが、電気刺激により 3.0 に上昇

し、HMP がシナプス部における生理学的機能と深く関係しているとしている。

著者の実験結果では、 $(\text{C}-1)/(\text{C}-6)$ 比は蝸牛および腎でそれぞれ 1.21, 1.31 というれもさ程強い HMP 活性を示す値ではなかった。一方 Matschinsky ら⁴⁶⁾ (1967) は蝸牛コルチ器および血管条で NADP/NAD 比が小さく、これらの組織では synthetic capacity が小さいためであろうとしており、著者の結論と一致するところである。しかし蝸牛においては、先の脳の場合と同じように HMP がシナプス部において、音受容に際し重要な生理機能を果している可能性もあると考えられる。

KM 投与群については、蝸牛についても腎についても、 $[1-^{14}\text{C}]$ および $[6-^{14}\text{C}]$ glucose の両者からの $^{14}\text{CO}_2$ への転化が抑制され、その抑制率は両者でほぼ等しく、したがって $(\text{C}-1)/(\text{C}-6)$ 比には著しい変化は認められなかった。このことから KM 投与群の蝸牛および腎において、glucose 代謝が抑制されており、その部位は glucose 中間代謝産物が、HMP に入る前または HMP が再び EMP と合流してから後の段階、具体的に言えば glucose 6-phosphate 以前または fructose 6-phosphate 以後の段階であること、またこれらの KM による糖代謝系における抑制は、飢餓後にみられる $(\text{C}-1)/(\text{C}-6)$ 比の上昇 (Tepperman⁸⁸⁾ 1961) で示されるような、HMP の代償的亢進を惹起しないことが示唆される。

ii) 糖代謝関連酵素活性

Lowry とその一門は、分光蛍光光度計を用い、酵素的な方法を巧みに取り入れ、微量定量的組織化学法を開発し、主として脳・網膜について、糖エネルギー代謝を中心に多くの優れた業績をあげている^{89)~91)52)92)44)93)94)}。

Thalmann とその一門は、この方法を内耳の生化学的研究に取り入れ、エネルギー代謝を中心に詳細精緻な検討を加えている^{46)~50)95)~98)}。その結果、糖代謝関連酵素の面からは EMP, HMP の酵素 (HK, PFK, LDH, G6PDH, 6PGDH) はコルチ器、血管条に同じ程度に、脳の約 4 倍の活性があり、TCA 回路の酵素 (MDH, CS) はコルチ器では脳の 1/3 程度、血管条では 2/3 程度であるとしている。また糖代謝基質の面からは、glucose, glycogen, ATP, P-creatine の総和であらわされる energy reserve はコルチ器>ラセン神経節>血管条>蝸牛神経>脳、の順であるとしている。さらに ischemia の負荷時は血管条では metabolic level が急速に減少し、これに対しコルチ器では P-creatine, glucose は血管条より遅いとはいえ、比較的速く減少するが、ATP,

glycogen は非常に緩徐にしか減少しないとしている。これらの結果から彼らは、蝸牛組織は第一義的には酸化的エネルギー産生に依存しているが、血管条に比しコルチ器ではこれに加えて energy reserve が多く解糖系もよく発達しており、機能的負荷がかかった際、急速なしかも段階的なエネルギー補給に有利な条件を備えていて、エネルギーの使用量も少い、したがってコルチ器は比較的 ischemia に耐え得ると説明している。

著者も Thalmann らの開発した微量定量的組織化学法を応用して、糖代謝関連酵素の面から研究をすすめた結果、EMP および HMP の調節酵素 (HK・PFK; G6PDH・6PGDH) はコルチ器の方が血管条に比し活性がやや高く、これに対し TCA 回路の酵素 (MDH) は逆の結果であった。すなわち先の Thalmann らの結論に一致して、コルチ器では広義の解糖系 (EMP・HMP) が、血管条では TCA 回路が、よく発達していることが示唆された。したがってコルチ器の EMP・HMP に対する KM 投与の影響をみることには大きな意義があると考えられた。なお腎・肝・脳については、腎は肝・脳に比し HK・G6PDH・6PGDH の活性が高く、コルチ器とはほぼ同様の傾向であった。

KM 群においては、測定した酵素のうち、EMP の調節酵素である HK PFK のみに有意の活性低下が認められ、しかもこの低下は臓器障害のみられた腎およびコルチ器のみに出現した。すでに Popovici ら⁹⁹⁾(1971) は SM の in vivo 投与が動物臓器の糖代謝関連酵素のうち、EMP の HK および pyruvate kinase (PK) に及ぼす影響について検討し、腎の HK および PK、肝の PK を有意に抑制するとし、解糖系については細胞のエネルギー依存性代謝を抑制し膜透過性を変化させるとしている。

一方 HMP の調節酵素に関しては、EMP 調節酵素の活性低下の認められた KM 群の蝸牛あるいは腎においても、Schmidt ら¹⁰⁰⁾(1959) が肝機能障害時に報告しているような活性の上昇は認められず、先の ^{14}C -glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ への転化よりみた実験の結果と考え合わせると、KM による EMP および TCA 回路の代謝阻害に対応した、HMP の代償的代謝活性の上昇は招来されないと考えられる。

TCA 回路の酵素である MDH については、KM 群においても、有意の活性の変化は認められなかった。TCA 回路の酵素である MDH の活性に変化が認められなかったことは、先の組織化学的研究において、同じく

TCA 回路の酵素である SDH について、コルチ器で活性低下が認められたことと相反する結果であるが、これは SDH が TCA 回路の調節酵素であるのに対し、MDH はそうではなく比較的高い活性を有する酵素であることによる可能性があると考えられる。

(5) 実験結果全般について

形態学的研究から in vivo における KM 連続投与は蝸牛コルチ器および腎に対し選択的毒性をもつことが示唆された。次いで ^{14}C -glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ への転化についての実験から、これらの組織において glucose からの CO_2 への転化、すなわち換言すれば組織呼吸、糖代謝 エネルギー系が抑制されることが判明した。さらに組織化学的研究により、この抑制の少くとも一部が TCA 回路によることが判明した。さらに生化学的研究により、EMP も抑制されしかもこれらの抑制は HMP によっては代償されないことが判明した。すなわち TCA 回路・EMP を中心とする糖・エネルギー代謝の抑制、HMP による非代償が KM 投与群にみられ、しかもこの現象が、選択的に障害が認められた蝸牛コルチ器、腎のみに認められたことから、KM の臓器毒性、すなわち KM 難聴あるいは腎障害発現機序の一要因をなすと考えられた。

(6) 他の KM 難聴発現機序およびその他の問題点について

アミノ配糖体系抗生物質の作用機序については、以上述べてきた組織呼吸・糖代謝阻害以外に、タンパク合成阻害や、核酸との結合、細胞膜障害などが知られている(田中¹⁰¹⁾ 1963)。

タンパク合成阻害については、Nishimura ら¹⁰²⁾(1962) その他多くの人により研究がなされ、作用機序のうち最も重要なものとされている。田中¹⁰³⁾ (1972) によると、アミノ配糖体系抗生物質は細菌の 30 S リボゾーム・サブユニットに作用し、リボゾームと mRNA あるいはその相互作用に影響をあたえ、その結果コードンとアンチコードンとの相互作用に間接的に作用し、miscoding をおこし、タンパク合成の開始・ペプチド鎖の伸長を阻害する。ただしこれらは in vitro の系での実験結果であり、細菌の中で実際に miscoding がおこっているかは疑問であり、致死作用とは直接には関係がないと考えられるとしている。

細胞障害については、Davis らの一連の研究^{104)~108)}によると、SM はまず細菌細胞膜の外側に取り込まれ細胞膜の合成に障害を与え、permeability barrier に欠損を

おこすことが、一次作用点としたが、後にこの考を改め直接の関係はないことを認めている。超微細構造的な面からは Nishino ら¹⁰⁹⁾(1975) はアミノ配糖体系抗生物質により *P. aeruginosa* の細胞壁表面が破綻し菌体が外部に出ることを認めている。

しかしこれらの抗菌作用機序を直ちに副作用の発現機序に結びつけることは必ずしも適切とは思われない。例えばタンパク合成阻害に関しては、動物細胞には、細菌にみられるようなアミノ配糖体系抗生物質と親和性の強い 30S リボゾームは存在せず、このことが選択毒性(細菌に作用して動物細胞には作用しない性質)のもととなっているといわれ(田中¹⁰³⁾1972), したがって副作用の発現機序とタンパク合成阻害を直ちに結びつけることはできない。しかしやはり作用機序と副作用発現機序との一致点も多いと思われるので、蝸牛についてもこの点を検討する必要があると思われる。

先ず、タンパク合成阻害については、Nakamura¹¹⁰⁾(1957) は DHSM により蝸牛組織の DNA には変化がなかったが、コルチ器毛細胞の RNA に減少がみられたとしている。Kraus¹¹¹⁾(1969) はラセン神経節、血管条に比べコルチ器毛細胞ではタンパク合成能が高いことを証明し、このことが SM 聴器毒性の原因となっているとしている。

細胞膜障害に関しては、アミノ配糖体系抗生物質が細胞内に入りにくい(Robson ら¹¹²⁾1963, André¹¹³⁾1956) 点からも考えられるところであり、Schacht ら¹¹⁴⁾(1974) は neomycin 投与により、コルチ器において ³²P の phosphatidyl inositol diphosphate への取り込みが有意に抑制されることから、neomycin の聴器毒性には polyphosphoinositide 代謝の抑制が関与しているとしている。著者ら¹¹⁵⁾(1975) も ³H-glycerol を用いたオートラジオグラフィ的研究により、蝸牛では毛細胞に特異的にリン脂質代謝が盛んであることを知り、アミノ配糖体系抗生物質の影響についても検討中である。

毛細胞の細胞膜には別報¹¹⁶⁾で述べるごとく、酸性ムコ多糖の外衣が豊富なこと、側壁細胞膜には adenosine triphosphatase 活性が欠如していること(Nakai¹¹⁷⁾1967), 毛細胞内には他の細胞に比し比較的自由にアミノ配糖体系抗生物質が入り得るらしいこと(Ilberg ら¹¹⁸⁾1971, Portmann ら¹¹⁹⁾1974) などから考え、毛細胞細胞膜が特異的な性質を持ち、これがアミノ配糖体系抗生物質による聴器障害と関与しているのかも知れない。

最後に、著者があきらかにした糖代謝阻害という面か

らだけでは、アミノ配糖体系抗生物質による副作用の臓器あるいは組織選択性を一元的に説明することは、現在のところ困難であると思われる。解糖系の面からは、コルチ器は血管条に比べて活性が強く、また腎は肝・脳に比べて活性が強いので、この解糖系の阻害がコルチ器・腎の選択的障害に繋がり得るが、TCA 回路は血管条の方がコルチ器より活性が強いのでこの阻害からは、むしろ血管条の方が障害を受けやすいと考えられる。これらの点については、血管条とコルチ器における KM 濃度の相違を含め、上記の副作用の発現機序として考えられる全ての要因について、総合的に再検討する必要があると思われる。

(7) 予防および治療法について

著者は KM 投与が、コルチ器および腎の糖・エネルギー代謝を障害し、このことが KM 臓器障害の一因をなしていることを知った。この観点から KM 難聴の予防・治療法について考えてみたい。

糖・エネルギー代謝障害に対し、この系の中間代謝産物、補酵素などを投与し、これを阻止しようとする考え方はすでに多くの研究者の採用するところである。パントテン酸は、解糖系と TCA 回路を結合する重要な部位にある acetyl-CoA の構成成分として重要な物質である。Keller ら¹²⁰⁾(1955), Ducrot ら¹²¹⁾(1956), Kimmerle ら¹²²⁾(1956), 大沢¹²³⁾(1960) らはパントテン酸が SM または DHSM 難聴の予防または治療に有効であったとしており、小西¹²⁴⁾(1960) はモルモットによる電気生理学的研究から DHSM-panthionate は DHSM に比し、難聴の発現度が軽度であるとしている。

Lipoic acid (thioctic acid) は化学的にはイオウを含む脂肪酸、6, 8-dithio-octanoic acid, $\text{CH}_2(\text{SH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2(\text{SH})-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ (還元型) であるが、EMP においては pyruvate, TCA 回路では α -ketoglutarate の脱炭酸の部位で補酵素として働く重要な物質である。大沢¹²⁵⁾(1960), 中村¹²⁶⁾(1961) の報告は lipoic acid の、アミノ配糖体系抗生物質による難聴の予防または治療に対する有効性を示唆している。

Thiamine も lipoic acid と同じく pyruvate または α -ketoglutarate の脱炭酸の部位に補酵素として働く重要な物質である。金子¹²⁷⁾(1962), 大沢¹²⁸⁾(1963), 市原¹²⁹⁾(1961), 大谷¹³⁰⁾(1973) の報告は thiamine のアミノ配糖体系抗生物質による難聴の予防または治療に対する有効性を示唆している。さらに ATP については加藤¹³¹⁾(1960) が、NAD については河田¹³²⁾(1961)

がその可能性について報告している。現在著者らは Coenzyme Q についても検討をすすめている。

以上のあるいは他の、糖エネルギー代謝関連物質の効果は、本研究の実験結果からも十分期待し得るところであるが、今後検討すべき点も多々ある。第一にこれら薬物の併用がアミノ配糖体系抗生物質の細菌に対する抗菌力そのものを低下せしめることがないかを検討する必要がある。梁川²⁴⁾(1964)は大腸菌に対する DHSM の抗菌力が G6P, pyruvate, コハク酸などの in vitro 添加により低下することを報告しており、上記諸種薬物の投与においても同様の現象がおこる可能性があるからである。第二に上記諸種薬物が真に blood cochlear barrier を越えて、コルチ器さらに毛細胞内に入り得るかを検討する必要がある。ことに ATP, NAD などの核酸についてはこの検討を要するものと思われる。第三に二重盲検法などにより統計学的処理を施して、真の効果をみる必要があるし、基礎的動物実験による裏付けも不足していると思われる。さらに効果の程度もさ程著明とは思われないので、より効果的な薬剤の開発が望まれる。

根本的には現在なおアミノ配糖体系抗生物質の使用が不可避な症例がある以上、副作用発現機序をさらに検討し、副作用が弱くしかも抗菌力の優れたアミノ配糖体系抗生物質の開発が急務であろう。

V 結 語

カナマイシンの連続投与(400 mg 力価/kg 体重/日、10日間筋注)がモルモットの蝸牛・腎・肝・脳の主として糖・エネルギー代謝におよぼす影響を病理組織学的、生化学的、組織化学の見地から検討し、次の結論を得た。

(1) 蝸牛コルチ器毛細胞、ことに Hook 部の外毛細胞および腎近位尿管細管が障害を受けることが病理組織学的に証明された。

(2) 嫌氣的解糖系(Embden-Meyerhof pathway)の調節酵素である hexokinase, phosphofructokinase の活性が、蝸牛コルチ器および腎において有意に抑制されることが生化学的に証明された。

(3) 五炭糖リン酸回路(hexosemonophosphate pathway)の調節酵素である, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase の活性は、測定した全ての組織で有意の変化をみないことが生化学的に証明された。

(4) TCA 回路の調節酵素である succinate dehydrogenase の活性が、蝸牛コルチ器毛細胞および腎尿管

で抑制されることが組織化学的に証明された。

(5) 嫌氣的解糖系—TCA 回路を経由する glucose の CO₂ への転化が、蝸牛および腎において有意に抑制されること、またこの抑制は五炭糖リン酸回路によっても代償されていないことが生化学的に証明された。

(6) (2)~(5)の結果より、カナマイシンの連続投与が、糖・エネルギー代謝のうち嫌氣的解糖系および TCA 回路を抑制し、この際も五炭糖リン酸回路による代償がみられないことが判明した。しかもこれらの現象は、カナマイシン障害のみられた蝸牛コルチ器および腎に特異的に出現したことから、カナマイシン難聴または腎障害発現機序の一因をなしていると考えられた。

(7) したがって、KM 難聴の予防、治療に対する panthothenic acid, lipoic acid, thiamine, ATP, NAD, Coenzyme Q などの糖エネルギー代謝関連薬物の投与は検討に値するものと思われた。

参 考 文 献

- 1) Henry, J., Henry, R.J., Housewright, R.D. and Berkman, S.: Studies on streptomycin III. The effect of streptomycin on the metabolism of resting bacteria and on certain purified enzymes. J. Bacteriol. 56; 527-539, 1948.
- 2) Oginsky, E.L., Smith, P.H. and Umbreit, W. W.: The action of streptomycin I. The nature of the reaction. J. Bacteriol. 58; 747-759, 1949.
- 3) Barkulis, I.L.: Inhibition of anaerobic pyruvate metabolism of Escherichia coli by dihydrostreptomycin. J. Bacteriol. 65; 337-343, 1952.
- 4) Katagiri, H., Suzuki, Y. and Tochikura, T.: Studies on the action of antibiotics on bacterial metabolism I. Effect of dihydrostreptomycin or chloramphenicol on α -ketoglutarate fermentation by Escherichia coli or Pseudomonas fluorescens. J. Antibiotics. Ser A 12; 160-168, 1959.
- 5) Gourevitch, A., Tynda, J.M., Puglisi, T.A. and Levin, J.: Studies on the mechanism of action of kanamycin. Antibiotics Annal. 1958/1959; 784-789, 1959.
- 6) Aoki, T., Hayashi, A. and Ito, F.: On the mode of action of kanamycin. J. Antib. Ser A 12; 98-102, 1959.
- 7) Dubin, D.T., Hancock, R. and Davis, B.D.:

- The sequence of some effects of streptomycin in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 74; 476-489, 1963.
- 8) *Hancock, R.*: The bacteriocidal action of streptomycin on *Staphylococcus aureus* and some accompanying biochemical changes. *J. gen. Microbiol.* 23; 179-196, 1960.
 - 9) *Hancock, R.*: Reduced uptake of [^{14}C] streptomycin by bacteria in the presence of respiratory inhibitions and under anaerobic conditions. *Biochem. J.* 78; 7 p., 1961.
 - 10) *Goldberg, N. D., Passonean, J. V. and Lowry, O. H.*: Effects of changes in brain metabolism on the level of citric acid cycle intermediates. *J. biol. Chem.* 241; 3997-4003, 1966.
 - 11) *Vosteen, K. H.*: Die Darstellung der Bernsteinsäuredehydrogenase in der Schnecke Meerschweinchens. *Arch. Ohr., Nas.- u. Kehlk.-Heilk.* 168; 295-304, 1956.
 - 12) *Vosteen, K. H.*: Die Tetrazolreaktion in der Meerschweinchenschnecke nach Blockierung der Zellatmung durch Kaliumcyanide. *Arch. Ohr., Nas.- Kehlk.- Heilk.* 169; 415-419, 1956.
 - 13) *Vosteen, K. H.*: Untersuchungen über den Grundstoffwechsel im Innenohr des Meerschweinchens. *Z. Laryng. Rhinol.* 35; 400-402, 1956.
 - 14) 水越 治, 只木信和, 東条忠弘, 兵 行典, 宇野松雄, 林戸 博, 中井佳夫, 梁川吉彦: 内耳及び蝸牛神経中枢のコハク酸脱水素酵素に関する研究, 日耳鼻, 60; 第58回学術講演会講演集 342-343, 1957.
 - 15) 芋川正彦: 内耳代謝系の組織化学的研究, 耳鼻臨, 52; 348-362, 1959.
 - 16) *Gerhardt, H. J.*: Zur Methodik der Succinoxidase-darstellung in der Meerschweinchenschnecke. *Arch. Ohr., Nas.-, Kehlk.- Heilk.* 178; 158-162, 1959.
 - 17) 谷村 実: モルモット蝸牛のコハク酸脱水素酵素に関する研究, 耳鼻臨, 54; 814-827, 1961.
 - 18) 小出 靖: 蝸牛内酵素に関する研究補遺, 日耳鼻, 64; 588-589, 1961.
 - 19) *Spoendlin, H. and Balogh, K.*: Histochemical localization of dehydrogenase in the cochlea of living animals. *Laryngoscope.* 73; 1061-1083, 1963.
 - 20) 吉川由絵: 蝸牛内コハク酸脱水素酵素の組織化学的研究補遺, 日耳鼻, 56; 594-604, 1963.
 - 21) 星野 仁: コルチ器のコハク酸脱水素酵素分布に関する研究, 日耳鼻, 70; 1517-1521, 1967.
 - 22) 藤田謹司: 蝸牛のコハク酸脱水素酵素と乳酸脱水素酵素に関する研究——その組織化学的証明法の検討と音響による影響について——日耳鼻, 72; 1130-1155, 1969.
 - 23) 浅野 登: 蝸牛有毛細胞のいわゆるこはく酸脱水素酵素反応について, 耳鼻臨, 68; 1001-1024, 1975.
 - 24) 梁川吉彦: Dihydrostreptomycin 難聴における 2, 3 の基礎的現象, 日耳鼻, 67; 1694-1719, 1965.
 - 25) *El-Mofty, A. and El-Serafy, S.*: The effect of ototoxic antibiotics on the oxygen uptake of the membranous cochlea. *Ann. Otol.* 75; 216-224, 1966.
 - 26) *Mizukoshi, O. and Daly, J. F.*: Oxygen consumption in normal and kanamycin damaged cochlea. *Acta Otolaryng.* 64; 45-54, 1967.
 - 27) 秋吉正豊, 佐藤嘉一: モルモットにおける Gentamycin と Kanamycin の内耳毒性に関する病理組織学および酵素組織化学的研究, *Chemotherapy* 15; 501-512, 1967.
 - 28) 柿崎一郎: Kanamycin の蝸牛組織に及ぼす影響に関する実験的研究, 日耳鼻, 71; 68-83, 1967.
 - 29) 小川 明: 耳毒性物質による内耳障害に関する機能的組織化学的研究, *Audiology, Japan* 18; 1-19, 1975.
 - 30) *Müsebeck, K., und Schätzle, W.*: Experimentelle Untersuchungen zur Ototoxizität des Dihydrostreptomycins. *Arch. Ohr., Nas.- u. Kehlk.-Heilk.* 181; 41-48, 1962.
 - 31) *Vosteen, K. H.*: Neue Aspekte zur Biologie und Pathologie des Innenohres. *Arch. Ohr., Nas.- u. Kehlk.- Heilk.* 178; 1-104, 1961.
 - 32) *Spoendlin, H. und Balogh, K.*: Histochemische Darstellung von Dehydrogenasen in der Schnecke lebender Tier. *Arch. Ohr., Nas.- u. Kehlk.- Heilk.* 182; 579-582, 1963.
 - 33) *Vinnikow, J. A. and Titova, L. K.*: Cytophysiology and cytochemistry of the organ of Corti: cytochemical theory of hearing. *Int. Rev. Cytol.* 14; 157-191, 1963.
 - 34) 河田政一, 早田 武: モルモット蝸牛におけるフォ

- スフォリラーゼについて, 耳鼻, 11; 158-161, 1965.
- 35) *Zorzoli, G.C.*: Ricerche istochimiche sulle cellule acustiche dell' organo del Corti dell' orecchio interna. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 29; 966-968, 1953.
- 36) *Falbe-Hansen, J. and Thomsen, E.*: Histochemical studies on glycogen in the cochlea of the normal guinea pig. Acta Otolaryng. 56; 429-436, 1963.
- 37) *Ishii, D., Takahashi, T. and Balogh, K.*: Glycogen in the inner ear after acoustic stimulation. Acta Otolaryng. 67; 573-582, 1969.
- 38) *Balogh, K. und Koburg, E.*: Der Plexus cochlearis. Arch. Ohr., Nas.- u. Kehl.- Heilk. 185; 638-645, 1965.
- 39) *Nomura, Y. Ishii, T. and Ishii, D.*: The histochemistry of the spiral prominence. Arch. Ohr., Nas.- u. Kehl.- Heilk. 195; 266-275, 1970.
- 40) *Lotz, P. und Kuhl, K.D.*: Die Lactatdehydrogenase des Innenohres. Arch. Ohr., Nas.- u. Kehl.-Heilk. 192; 237-248, 1968.
- 41) 石田 稔: 騒音負荷下におけるモルモット内耳の乳酸脱水素酵素 (LDH) の変化について, 日耳鼻, 78; 249-258, 1975.
- 42) *Engström, H., Ades, H.W. and Hawkins, J.E. Jr.*: Cytoarchitecture of the organ of Corti. Acta Otolaryng. Suppl. 188; 92-99, 1963.
- 43) *Bray, G.A.*: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1; 279-285, 1960.
- 44) *Lowry, O. H., Passoneau, J. V., Hasselberger, F.X. and Schulz, D.W.*: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J. biol. Chem. 239; 18-30, 1964.
- 45) *Vallejo, C.G., Marco, R. and Sebastian, J.*: The glucose 6-phosphate metabolic crossroads in brain. Arch. Biochem. et Biophys. 147; 41-48, 1971.
- 46) *Matschinsky, F.M. and Thalmann, R.*: Quantitative histochemistry of the organ of Corti, stria vascularis and macula sacculi of the guinea pig. I. Sampling procedures and analysis of pyridine nucleotides. Laryngoscope 77; 292-305, 1967.
- 47) *Thalmann, R., Thalmann, I. and Comegys, T.H.*: Dissection and chemical analysis of substructures of the organ of Corti. Laryngoscope 80; 1619-1645, 1970.
- 48) *Thalmann, R., Thalmann, I. and Comegys, T.H.*: Quantitative cytochemistry of the organ of Corti. Dissection, weight determination and analysis of single outer hair cells. Laryngoscope 82; 2059-2078, 1972.
- 49) *Thalmann, R.*: Recent refinements of quantitative microchemical analysis of tissues and cells of the inner ear. Acta Otolaryng. 73; 160-174, 1972.
- 50) *Thalmann, I., Matschinsky, F.M. and Thalmann, R.*: Quantitative study of selected enzymes involved in energy metabolism of the cochlear duct. Ann. Otol. 79; 12-29, 1970.
- 51) *Galton, D.J. and Wilson, J.P.D.*: Glycolytic enzymes in adipose tissue of adult diabetics. British Med. J. 3; 444-445, 1970.
- 52) *Lowry, O. H., Passoneau, J. V., Schulz, D.W. and Rock, M.K.*: The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. J. biol. Chem. 236; 2746-2755, 1961.
- 53) *Ochoa, S.*: Malic dehydrogenase from pig heart. Methods in enzymology. I. pp. 735-729, Academic Press, New York, 1955.
- 54) *Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.*: Protein measurement with the folic phenol reagent. J. biol. Chem. 193; 265-275, 1951.
- 55) 久保正雄, 志多 享, 丸山良平, 牧本一男, 櫛田秀雄: カナマイシンの聴器障害性に関する実験的研究, 日耳鼻, 63; 550-553, 1960.
- 56) *Koide, Y., Stern, R., Rosesler, H.K. and Daly J.F.*: Studies on susceptibility to kanamycin. Laryngoscope. 76; 1769-1785, 1966.
- 57) 橋 正芳: 臓器内濃度および排出能よりみたカナマイシン難聴の発現機序, 日耳鼻, 80, 40-54, 1977.
- 58) *Hawkins, J.E.*: The ototoxicity of kanamycin. Ann. Otol. 68; 698-715, 1959.
- 59) *Ward, P. and Fernandez, C.*: The ototoxicity of kanamycin in guinea pig. Ann. Otol. 70; 132-

- 142, 1961.
- 60) *Beck, C. und Krahl, P.*: Experimentelle und feingewebliche Untersuchungen über die Ototoxizität von Kanamycin. Arch. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 179; 594-610, 1962.
- 61) *Jørgesen, M.B. and Schmidt, M.R.*: The ototoxic effect of kanamycin. Acta Otolaryng. 55; 537-544, 1962.
- 62) *Farkashidy, J., Black, R.G. and Briant T.D.R.*: The effect of kanamycin on the internal ear; An electrophysiological and electron microscopic study. Laryngoscope 73; 713-727, 1963.
- 63) *Engström, H. and Hawkins, J.*: Effect of kanamycin on cochlear architecture. Acta Otolaryng. Suppl. 188; 102-118, 1964.
- 64) 大谷 巖: Kanamycin の聴器毒性に関する慢性実験的研究, 日耳鼻, 71; 688-707, 1968.
- 65) *Benitez, J. and Schucknecht, H.*: Pathologic changes in human ear after kanamycin. Arch. Otolaryng. 75; 192, 1962.
- 66) 五十嵐 真, 吉信敏子: Kanamycin 聾の内耳病理学的所見, 耳鼻臨, 56; 301-308, 1963.
- 67) *Engström, H. and Kohonen, A.*: Cochlear damage from ototoxic antibiotics. Acta Otolaryng. 59; 171-178, 1964.
- 68) *Matz, G.J., Ward, P.H. and Wallace, T.M.*: The ototoxicity of kanamycin. Laryngoscope 75; 1690-1698, 1965.
- 69) 豊田弥八郎: カナマイシン内耳障害の計量的観察, 耳鼻臨, 69, 増1, 179-219, 1976.
- 70) *Reddy, J.B. and Igarashi, M.*: Changes produced by kanamycin. Arch. Otolaryng. 76; 146-150, 1962.
- 71) 山本直哉: Dihydrostreptomycin, Kanamycin がラセン神経節細胞に及ぼす影響に関する電子顕微鏡的研究, 日耳鼻, 71; 1541-1566, 1968.
- 72) *Spoendlin, H.*: Degeneration behavior of the cochlear nerve. Arch. klin. exp. Ohr.- Nas.- u. Kehlk.- Heilk. 200; 275-291, 1971.
- 73) *Ruedi, L., Furrer, W., Luthy, F., Nager, G. and Tschirren, B.*: Further observations concerning the toxic effects of streptomycin and quinine on the auditory organ of guinea pig. Laryngoscope 74; 333-351, 1952.
- 74) 伊勢郁夫, 金子 豊, 河本和友: ラセン隆起部の微細構造と同部位における KM の影響, 日耳鼻, 76; 332-337, 1973.
- 75) *Saito, H. and Daily, J.F.*: Quantitative analysis of acid mucopolysaccharides in the normal and kanamycin intoxicated cochlea. Acta Otolaryng. 71; 22-26, 1971.
- 76) *Mootz, W., Schöndorf, J. and G. Werner*: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Plexus cochlearis nach Kanamycinintoxikation. Acta Otolaryng. 73, 38-43, 1972.
- 77) *Tisch, D.E., Huftalen, J.B. and Dickerson, H. L.*: Pharmacological studies with kanamycin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 76; 44-65, 1958.
- 78) *Berman, L.B. and Katz, S.*: Kanamycin nephrotoxicity. Ann. N.Y. Acad. Sci., 76; 149-156, 1958.
- 79) 武田 元: 抗生剤の腎毒性にかんする研究, 第1編 Kanamycin と 0.4% sodium alginate との併用による腎毒性増強について. 日内会誌, 59; 509-511, 1970.
- 80) 木下康民: 薬剤による腎障害 Kanamycin と Plasma expander 併用例の検討, 最新医学 23; 1490-1505, 1968.
- 81) 江部達夫: 腎病変の電顕図譜, カナマイシンによる腎病変, 日本臨床, 30; 1378-1381, 1972.
- 82) *Ishii, T., Ishii, D. and Balogh, K.*: Lysosomal enzymes in the inner ear of kanamycin-treated guinea pigs. Acta Otolaryng. 65; 449-453, 1968.
- 83) *Ismail, N.A.F., El-Marri, A.M. and El-Denashary, E.S.M.*: Biochemical studies on the hepatotoxicity of kanamycin in rabbits. J. Egypt. Med. Assoc. 53; 798-802, 1970.
- 84) *Duvall, J.A., Wersäll, J.*: Site of action of streptomycin upon inner ear sensory cells. Acta Otolaryng. 57; 581-598, 1963.
- 85) 河田政一, 柿崎一郎: 血管に於ける呼吸酵素系に関する研究, 日耳鼻, 65; 179-183, 1962.
- 86) 赤堀四郎編: 酵素研究法 3. 第1章 糖代謝系, 朝倉書店(東京) 1957.
- 87) *Kimura, H., Naito, K., Nakagawa, K. and Kuriyama, K.*: Activation of hexosemonophosphate pathway in brain by electrical stimulation in

- vitro. J. Neurochem. 23; 79-84, 1974.
- 88) *Tepperman, J. and Tepperman, H.M.*: Metabolism of glucose-1-¹⁴C and glucose-6-¹⁴C by liver slices of refed rats. Am. J. Physiol. 200; 1069-1073, 1961.
- 89) *Lowry, O.H.*: The quantitative histochemistry of the brain. Histological sampling. J. Histochem. 1: 420-428, 1953.
- 90) *Lowry, O.H., Roberts, N.R. and Kapphahn, J.J.*: The fluorometric measurement of pyridine nucleotides. J. biol. Chem. 224; 1047-1064, 1957.
- 91) *Lowry, O.H., Roberts, N.R., Schultz, D.W., Clow, J.E. and Clark, J.R.*: Quantitative histochemistry of retina. II. Enzymes of glucose metabolism. J. biol. Chem. 236; 2813-2820, 1961.
- 92) *Lowry, O.H.*: The chemical study of single neurons. The Harvey Lectures, Series 58, 1-19, 1963.
- 93) *Matschinsky, F.M., Passonneau, J.V. and Lowry, O.H.*: Quantitative histochemical analysis of glycolytic intermediates and cofactors with an oil well technique. J. Histochem. Cytochem. 16; 29-39, 1968.
- 94) *Matschinsky, F.M. and Thalmann, R.*: Quantitative histochemistry of microscopic structures of the cochlea. II. Ischemic alterations of levels of glycolytic intermediates and cofactors in the organ of Corti and stria vascularis. Ann. Otol. 76; 638-646, 1967.
- 95) *Matschinsky, F.M. and Thalmann, R.*: Energy metabolism of the cochlea duct. Biochemical mechanism in hearing and deafness. M. Paparella, Editor. Charles C. Thomas. Springfield III. pp. 265-294, 1970.
- 96) *Thalmann, R.*: Metabolic features of auditory and vestibular systems. Laryngoscope 81; 1245-1260, 1971.
- 97) *Thalmann, R., Miyoshi, T. and Thalmann, I.*: The influence of ischemia upon the energy reserves of inner ear tissues. Laryngoscope 82, 2249-2272, 1972.
- 98) *Thalmann, R., Kusakari, J. and Miyoshi, T.*: Dysfunctions of energy releasing and consuming processes of the cochlea. Laryngoscope 82; 1690-1712, 1973.
- 99) *Popovici, G.G., Mungui, C., Trandafirescu, M., Botez, E., Cernatescu, D., Caraman, D. and Ababei, L.*: The influence of some antibiotics on hexokinase and pyruvatekinase activity in the rat and kidney. Arch. int. Pharmacodyn. 193; 80-86, 1971.
- 100) *Schmidt, E., Schmidt, F.W. and Wildhirt, E.*: Ferment-Aktivitäts-Bestimmungen in der Menschlichen Leber. VI Mitteilung. Klin. Wochenschr. 37; 1221-1229, 1959.
- 101) 田中信男: 抗生物質の作用機構, 生化学, 35; 345-368, 1963.
- 102) *Nishimura, T., Tanaka, N. and Umezawa, H.*: Inhibition of protein synthesis by kanamycin. J. Antibiotics 15A 210-215, 1962.
- 103) 田中信男: 「抗生物質の作用メカニズム」東大出版会, 1972.
- 104) *Roth, H., Amos, H. and Davis, B.D.*: Purine nucleotide excretion by *Escherichia coli* in the presence of streptomycin. Biochem. Biophys. Acta 37; 398-405, 1960.
- 105) *Anand, N. and Davis, B.D.*: Effect of streptomycin on *Escherichia coli*. Nature, 185; 22-23, 1960.
- 106) *Anand, N., Davis, B.D. and Armitage, A.K.*: Uptake of streptomycin by *Escherichia coli*. Nature 185; 23-24, 1960.
- 107) *Dubin, D.T. and Davis, B.D.*: The effect of streptomycin on potassium flux in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta 52; 400-402, 1961.
- 108) *Feinglod, D.B. and Davis, B.D.*: Paradoxical effect of streptomycin, kanamycin and neomycin on *Escherichia coli* ribonucleic acid. Biochem. Biophys. Acta 55, 787-789, 1962.
- 109) *Nishino, T. and Nakazawa, S.*: Morphological alteration of *Pseudomonas aeruginosa* by aminoglycoside antibiotics. J. Electron Microscope 24; 73-86, 1975.
- 110) *Nakamura, F.*: Electrophysiological and biochemical study on ototoxicity of dihydrostreptomycin. Ann. Otol. 66; 1080-1112, 1957.
- 111) *Kraus, H. und Doenning, G.*: Cytophoto-

- metriche RNA- und Eiweißstimmungen am häutigen Innenohr des Meerschweinchens als Grundlagen zur Beurteilung des Eiweißstoffwechsel und der Streptomycin-Ototoxizität. Arch klin. exp. Ohr., Nas.-u. Kehlk.-Heilk. 194; 551-557, 1969.
- 112) Robson, J.M. and Sullivan, F.M.: Antituberculous drugs. Pharmacol. Rev. 15; 169-223, 1963.
- 113) André, T.: Studies on the distribution of tritium-labeled dihydrostreptomycin and tetracyclin in the body. Acta Radiol. (Stockh.) Suppl. 142; 1-89, 1956.
- 114) Schacht, J.: Interaction of neomycin with phosphoinositide metabolism in guinea pig inner ear and brain tissues. Ann. Otol. 33; 613-618, 1974.
- 115) 西村秀夫, 橋 正芳: 内耳脂質代謝に関する研究 (第1報)— ^3H -glycerol 内耳灌流によるオートラジオグラフィ—, 内耳生化, 7; 4-6, 1976.
- 116) 橋 正芳: Freeze-Fracture 法・組織化学法による蝸牛の電顕的観察—アミノ配糖体系抗生物質による聴器障害理解のために. 日耳鼻, 80, 1977, 印刷中.
- 117) Nakai, Y. and Hilding, D.: Adenosine triphosphatase distribution in the organ of Corti. Histochemical study by light and electron microscopy. Acta Otolaryng. 64; 477-491, 1967.
- 118) Ilberg, C. von., Spoendlin, H. and Arnold, W.: Autoradiographical distribution of locally applied dihydrostreptomycin in the inner ear. Acta Otolaryng. 71; 159-165, 1971.
- 119) Portmann, M., Darrouzet and Coste, Ch.: Distribution within the cochlea of dihydrostreptomycin injected into the circulation. Arch. Otolaryng. 100, 473-475, 1974.
- 120) Keller, H., Krupe, W., Sous, H. und Mucker, H.: Versuche zur Toxizitätsminierung basischer Streptomycines Antibiotica. Arzneimittel-Forsch 5; 170-176, 1955.
- 121) Ducrot, R., Leav, O. and Casae, C.: Protective action of panthothenic acid against toxic effects of streptomycin and dihydrostoptomycin. Antibiotics and Chemotherapy 6; 404-410, 1956.
- 122) Kimmerle, G. u. Göswald, R.: Versuche zur Entgiftung von Streptomycin und Dihydrostreptomycin. Arzneimittel-Forsch 6; 379-384, 1956.
- 123) 大沢林之助: Streptomycin 難聴に対する Pancal の使用経験, 耳喉, 32; 838-845, 1960.
- 124) 小西輝三, 田中康夫, 竹之内智, 平子秀雄: DHSM-panthothenate の聴器に及ぼす影響, 耳鼻臨, 53; 1202-1207, 1960.
- 125) 大沢林之助, 中村正弥, 鈴木 敬, 須賀秋男: Streptomycin 難聴に対する Tioctan の使用経験, 耳喉, 32; 567-576, 1960.
- 126) 中村文雄, 水越 治, 梁川吉彦, 小田雅義, 吉弘 純一: ストレプトマイシン難聴と Thioctic acid: 京都医学会誌, 11; 172-176, 1961.
- 127) 金子善一, 大下富美代, 丹羽 修, 安田洋子: 内耳性難聴及び耳鳴に対する高単位 Alinamin 糖衣錠の使用経験, 耳喉, 34; 391-395, 1962.
- 128) 大沢林之助, 中村正弥: 感音難聴に対するノイビタの使用成績, 耳喉, 35; 857-861, 1963.
- 129) 市原正雄, 宮原 赴, 小松 晃, 神尾 鋭, 平良 憲一, 市原文彦, 佐久間義房, 村山知子, 国府田中, 塩川久子: 感音難聴に対する BTMP の使用経験, 耳喉, 33; 793-795, 1961.
- 130) 大谷 敏, 水野 茂, 真船信子, 大内 仁: KM の内耳移行に対する Vit B₁ 誘導体の影響について, 内耳生化, 4; 25-26, 1973.
- 131) 加藤智至: ストマイ難聴に対する ATP (アデホスコーワ) 使用経験, 耳喉, 32; 945-949, 1960.
- 132) 河田政一, 武田秀隆, 早田 武: DPN の内耳疾患に対する実験的ならびに臨床的研究, 耳鼻, 7; 227-234, 1961.
- 擱筆に臨み, 御指導御校閲を賜った恩師水越治教授, 栗山欣弥教授, 斎藤 等助教授, 御助言を戴いた島田信男教授に厚く感謝致します。また, 御協力を戴いた木村宏先生, 服部隆則博士, 西村秀夫先生ならびに教室員各位に深謝いたします。
- 本論文の一部は第45回日本薬理学会近畿部会, 第75回日本耳鼻咽喉科学会総会, 第22回内耳生化学研究会にて口演した。本研究の一部は昭和49年度文部省科学研究費の援助を受けた (No. 758-9021-677304)。

(原稿受付 昭和51.9.4日急載)

原著者住所 〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465 京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室 橋正芳

橘論文付図(1)

付 図 説 明

写真 1. KM 400 mg/kg, 10 日間筋注群 (KM 群) の
蝸牛 H-E 染色

コルチ器の消失, 血管条・ラセン靱帯の萎縮, ラセン神経節の異常などは認められない。

スケールは 100 μ m, $\times 80$

写真 2. KM 群基礎回転 Hook 部コルチ器, H-E 染色
外毛細胞の高度の変性 (➤印) および支持細胞の膨
化変性 (⊕印) を認める。

スケールは 50 μ m, $\times 560$

写真 3. KM 群第 2 回転コルチ器 H-E 染色

最外列外毛細胞の消失 (➤印), 最内列外毛細胞の
高度変性 (➤印) が認められる。

スケールは 50 μ m, $\times 720$

写真 4. KM 群基礎回転蝸牛管側壁 H-E 染色

何等の病理的变化は認められない。

スケールは 50 μ m, $\times 320$

写真 5. KM 群, 腎 H-E 染色

近位尿細管の高度変性, 崩解 (➤印) を認める。遠
位尿細管にも軽度の変性 (➤印) を認めるが, 糸球体
には病理的变化が認められない。

スケールは 50 μ m, $\times 460$

写真 6. KM 群, 肝 H-E 染色

何等の病理的变化は認められない。

スケールは 50 μ m, $\times 360$

写真 7. KM 群, 蝸牛神経核 H-E 染色

何等の病理的变化は認められない。

スケールは 250 μ m, $\times 64$

写真 8. 正常群, 基礎回転 surface specimen, SDH 反
応, コハク酸を抜いた対照液での反応。

特異的なホルマザンの形成は認められない。

スケールは 25 μ m, $\times 600$

写真 9. 正常群, 基礎回転蝸牛管側壁

SDH 反応, コハク酸を抜いた対照液での反応

特異なホルマザンの形成は認められない。

SV: 血管条

スケールは 25 μ m, $\times 660$

写真 10. 正常群, 基礎回転 surface specimen SDH 反
応

内外毛細胞にホルマザンの形成が認められ, SDH 活

性の存在を示す その強度は外毛細胞最外列>外毛細胞中列>外毛細胞最内列>内毛細胞である。

スケールは 25 μ m, $\times 800$

写真 11. KM 群, surface specimen. SDH 反応

内外毛細胞のホルマザンの形成は, 正常群に比し非常に少なく, SDH 活性が強く抑制されていることが判る。

スケールは 25 μ m, $\times 800$

写真 12. KM 群, surface specimen. SDH 反応

内外毛細胞の SDH 活性が強く抑制されている。毛細胞以外の支持細胞部に非特異的なホルマザンの沈着がみられる (➤印)。

スケールは 25 μ m, $\times 800$

写真 13. KM 群, surface specimen. SDH 反応

内外毛細胞の SDH 活性が抑制されている。毛細胞以外の支持細胞部に非特異的なホルマザンの沈着がみられる (➤印)。

スケールは 25 μ m, $\times 800$

写真 14. 正常群, 腎, SDH 反応

尿細管上皮に強い SDH 活性が認められる, 糸球体 (G) にはホルマザンの形成はほとんど認められない。

スケールは 50 μ m, $\times 300$

写真 15. KM 群, 腎, SDH 反応

尿細管上皮のホルマザンの形成は, 正常群に比し少なく, SDH 活性が抑制されていることが判る。

スケールは 50 μ m, $\times 300$

写真 16. 正常群, 肝, SDH 反応

肝細胞に SDH 活性が認められる。

スケールは 50 μ m, $\times 340$

写真 17. KM 群, 肝, SDH 反応

肝細胞に正常群と同程度のホルマザンの形成が認められ, SDH 活性の抑制は認められない。

スケールは 50 μ m, $\times 340$

写真 18. 正常群, 蝸牛神経核, SDH 反応

神経細胞に SDH 活性が認められる。

スケールは 50 μ m, $\times 420$

写真 19. KM 群, , 蝸牛神経核, SDH 反応,

神経細胞に正常群と同程度のホルマザンの形成が認められ, SDH 活性の抑制は認められない。

スケールは 50 μ m, $\times 420$