アミノ配糖体抗生物質投与の腎毒性の電顕的観察

済生会神奈川県病院泌尿器科 木 村 茂 三
慶応大学医学部泌尿器科学教室 中 蘭 昌 明
(主任: 田崎 寛教授) 田 崎 寛

ELECTRON MICROSCOPIC EVALUATION OF THE RENAL TUBULAR DAMAGE IN RATS AFTER AMINOGLYCOSIDE ADMINISTRATION

Shigezo Kinura, Masaaki Nakazono* and Hiroshi Tazaki*

Department of Urology, Saiseikai Kanagawa-ken Hospital

*Department of Urology, Keio University Hospital

Nephrotoxicity of Sisomicin, a recently developed aminoglycoside, was studied in the sequence of proximal tubular damage and repair after administration of the agent based on light and electron microscopic observations and biochemical evaluations using over 50 Wistar strain rats weighing 200–250 gr.

Sisomicin was administered intramuscularly at a dose of either 60 or 100 mg/kg/day for 7 days continuously and during the first 3 administration days, the animals were kept dehydrated.

The animals were sacrificed on 3, 7, and 12th days to study damage processes in the proximal tubular epithelium and the recovery was evaluated in the animals sacrificed in 2, 3, and 4th week after discontinuation of the injection. As a control study, Ceftizoxime was administered to rats intraperitoneally at a dose rate either 800 or 1200 mg/kg/day under the same conditions to those of the experimental series.

The most dramatic and characteristic morphological change in the proximal tubular epithelium after aminoglycosides administration is that myeloid bodies can be observed under electron microscopy.

Appearance of the myeloid bodies has been confirmed a common morphological change in the epithelium after administration of either amphiphilic or cationic amphiphilic agents. Both formation and degenerative processes of the myeloid body were studied through electron microscopic observation.

After aminoglycoside administration, lysosomal enzymes which concern with fat metabolism, namely sphingomyelinase, are kept in inhibitory conditions, so that it is difficult for the enzymes to digest the substances completely which configure the myeloid body in a certain period and they are stored in the lysosomes.

Our conclusion is that renal insufficiency develops clinically at the point when the accumulated myeloid body is over the maximum capacity of lysosome. In other words, the accumulation process reaches the stage of lysosomes overloading.

要旨: 新しく開発されたアミノ配糖体抗生物質 Sisomicin の腎毒性について検討した。実験は体重 200~250g の約50匹の Wistar 系ラットを使用した。Sisomicin 投与時の近位尿細管上皮の障害過程および回復過程について光学および電子顕微鏡にて観察, また生化学的検査も施行した。

実験動物は最初の3日間は脱水状態にて飼育し, その後は自由に水分を摂取させた。Sisomicin 60および100mg/kg/day 7日間連続筋注した。動物は注射後, 3, 7, 12日目に屠殺して近位尿細管上皮の障害過程を調べ, また回復過程を調べるため筋注中止後2, 3, 4週目に屠殺した。対照群として, Ceftizoxime 800および1,200mg/kg/day 腹腔内注射をして同様の実験を行った。

すべてのアミノ配糖体抗生物質投与時に近位尿細管上皮に出現する, きわめて特徴的な電顕像はミエリン様小体 myeloid body の出現である。

ミエリン様小体は Amphiphilic あるいは Cationic Amphiphilic 薬剤投与時にも出現することが指摘

されている。ミエリン様小体の形成および変性過程について電顕的観察を行った。

アミノ配糖体投与により、膜脂質成分である磷脂質が主に lysosome 内でアミノ配糖体と磷脂質の複合脂質であるミエリン様小体を形成する。これらは投与量の増加とともに lysosome 内でミエリン様小体の過形成がおり、消化酵素の低下もあり、lysosome overloading の問題が起り、細胞内恒常性が失われ、また一部では lysosome 膜は崩壊しミエリン様小体が上皮細胞内へ放出され、同時に lysosome 酵素が放出されて、上皮細胞内で自家融解作用を起し、尿細管壊死をきたし急性腎不全を招来する原因の一つになると考えられる。

I. 結 論

アミノ配糖体抗生物質（以下アミノ配糖体と略記）は、緑膿菌をはじめ、広く好気性グラム陰性桿菌に強い抗菌力を持つ抗生物質であるが、副作用として腎毒性および聴器毒性が強いことが知られている。

薬物の主要排泄経路の1つは腎であり、腎では糸球体の濾過および尿細管の分泌、再吸収により薬物の代謝、排泄が行われている。そのなかで尿細管、特に近位尿細管上皮の直部 (pars recta) は薬物による変性をもっとも発現しやすい部位とされている。

アミノ配糖体の腎毒性については欧米を中心に数多くの研究がなされてきているが、電子顕微鏡（以下電顕と略記）による観察では、すべてのアミノ配糖体投与時に共通して、特徴的にみられる所見はミエリン様小体、myeloid body の出現である。ミエリン様小体と腎不全との関連については、細胞内異物処理機構としての lysosome が overloading となった時点で急性腎不全が発現するとする考え方¹⁾とミエリン様小体の出現は単にアミノ配糖体投与の指標にしか過ぎず、腎の有機イオン輸送障害、糸球体濾過値の減少、排泄機能、濃縮機能の低下、尿細管機能低下などもっと広い腎生理の面の異常から考えるべきである^{2)~7)}とする2つの考え方がある。

今回の動物実験ではアミノ配糖体を投与して、腎機能および腎、肝、肺、大動脈の平滑筋につき、経時の変化を主に電顕で観察したが、本報告では諸臓器における経時的な観察結果のうち、腎、特に近位尿細管上皮の細胞変化を中心にミエリン様小体の発生および消失過程、腎障害との関係を考察するとともに磷脂質蓄積症についても文献的考察を行った。

アミノ配糖体としては Sisomicin（以下 SISO と略記）を使用した。SISO は比較的新しい製品であり、Gentamicin（以下 GM と略記）の改良型とされ、化学構造式は類似しており、ほぼ同一の作用機序を持つとされている⁸⁾。また、対照群として第3世代セフェム系抗生物質 Ceftizoxime（以下 CZX と略記）を使用した。

アミノ配糖体に関する報告は GM に関するものが多く、新製品である SISO に関する報告は、ほとんどみられないので SISO 投与の文献的考察については GM に関する報告を参考にした。

II. 材料および方法

体重200~250gのwistar系ラット約50匹を用い、前提条件として3日間脱水状態にした。これは木村⁹⁾¹⁰⁾が既に報告したように、動物実験において薬物投与による腎障害を起しやすいう前提条件は、脱水、尿停滯、腎乏血の順であることがわかっているからである。脱水開始と同時に7日間連続してSISO群は60mgおよび100mg/kg/dayを筋注、CZX群は800mgおよび1,200mg/kg/dayを腹腔内注射、注射後3, 7, 12日目および回復過程をみるため、2, 3, 4週目に屠殺した。各群とも2匹ずつを用いた。すべての動物の主要臓器はホルマリン固定後、常法に従って光学顕微鏡（以下光顕と略記）で観察した。光顕用組織片は10%中性緩衝ホルマリン固定後、H-E, PAS, Malloryの各染色を施行した。電顕の観察は腎、肝、肺、大動脈の平滑筋について行った。2.5%グルタルアルデヒド(pH 7.4)緩衝液で2時間前固定、同緩衝液で洗浄後、1%4酸化オウムウムで1時間固定、後処理は通常の方法で行った後、JEM-100B型電顕で観察した。また、電顕組織化学としては、Gomori-Novikoff変法によるAcid phosphatase反応を施行した。また、急速凍結置換固定法¹¹⁾を行った。この対照群としては4,4'-diethyl aminoethoxy hexestrol（以下コラルジルと略記）を投与して、腎、肝につき検索した。

III. 所 見

a) 血清生化学的検査

血清生化学的検査では腎機能測定のため、各群とも2匹ずつの平均値をとり、血清BUN, Creatinine値とした。Wistar系ラットの血清BUNの平均値は20mg/dl前後、Creatinineは0.5~1.0mg/dlであり、表1のようにSISO 60mg/kg/dayでは投与開始後7日目ではBUN, Creatinineの有意の上昇は認められないが、

表 1

SISO 100mg/kg/day では、既上昇している。投与開始後12日目（中止後5日目）では、SISO 両群とも明らかな BUN, Creatinine の上昇があり、急性腎不全を惹起している。これに対し、対照群の CZX 800mg および1,200mg/kg/day では、投与開始後7日目、12日目いずれにおいても正常範囲内の数値であった。SISO 60mg および100mg/kg/day により惹起された急性腎不全は投与開始後3週目（中止後2週目）で、ほぼ正常範囲内の数値になり、投与開始後4週目（中止後3週目）で、ほぼ正常値になった。本実験では対照群も含めて中止後も死亡例はなかった。

b) 光顕所見

腎では、糸球体にはいずれの時点でも特記する変化はなく、変化のみられたのは近位尿細管で、特に直部（pars recta）に強かった。

SISO 60mg および100mg/kg/day 投与開始3日目では尿細管腔の拡張、刷子縁の乱れが見られる。投与開始7日目では、上皮細胞の好エオジン性の低下、腫大、空胞変性が出現し、また、部分的には核の崩壊、消失がみられ、細胞の極性（polarity）の喪失もみられた。投与開始12日目（中止後5日目）が変性像がもっとも強く、写真1のように、上皮細胞の壊死、尿細管腔の著明な拡大および腔内に蛋白円柱、細胞壊死物が充満している部位が散見され、いわゆる中毒性急性尿細管壊死（toxic acute tubular necrosis）に相当す

る像を示した。回復期の所見としては投与後3週（投与中止後2週）では、まだ上皮の変性像が認められるが、円柱は見られず、上皮細胞の好エオジン性の増加、上皮細胞の再生への過程が見られた。投与後4週（中止後3週）では一部には尿細管腔の拡張、刷子縁の乱れなど軽微な変化は見られたが、全体的には、ほぼ正常に近い像を示した。

対照群の CZX 800mg および1,200mg/kg/day では、投与12日目（投与中止後5日目）に部分的に尿細管の拡張、上皮細胞の好エオジン性の低下、空胞変性が散見される以外ほとんど変性像はみられなかった。他の日時の光顕所見はほぼ正常であった。

c) 電顕所見

光学的変化がみられた近位尿細管上皮特に直部（pars recta）を中心に電顕的観察を行った。なお SISO 100mg/kg/day 群は変性像が激しく、電顕像の検討には不適當であったため、SISO 60mg/kg/day 投与群を中心にして、その所見を記述する。

1) 近位尿細管、特に直部の変化

SISO 投与開始後3日目には、尿細管特に近位尿細管上皮にミエリン様小体の形成がみられた。この小体の初期形成像では尿細管上皮細胞内にある既存の dense body 内に1から数個のミエリン様小体が認められ、一部にはこれらのミエリン様小体の癒合像もみられた（写真2）。これら dense body 内に出現したミエリン様小体は一層の限界膜に囲まれた電子密度の高い小体で、一見無構造にみえるが、倍率を上げて観察すると、約30~50Å前後の規則正しい周期性のある明暗交互の層状構造がみられる。これらの層状構造は部分的にほぐれて lattice pattern を示したり（写真3）、また、一部には癒合像を認めた（写真4）。

一方、近位尿細管上皮細胞の上部、すなわち、刷子縁直下には小型から中等度の apical vesicle, vacuole の増加がみられ、一部の vacuole 内には小型の不規則な形のミエリン様構造物がしばしばみられた（写真5）。このような像は、SISO の化学成分が尿細管腔から apical canaliculi を通って、apical vacuole 内に取り込まれ、ここにおいても、ミエリン様小体の形成が開始されていることを示しているものと考えられる。

投与日数の経過とともに、近位尿細管上皮細胞内のミエリン様小体を含む dense body は数および大きさを増してくる（写真6）。著しく増大した dense body 内には多数のミエリン様小体を含み、大きさも大小さまざまなで、それらの癒合像や一部には dense body 内

で消化されている像もみられる(写真7)。このように増大して多数のミエリン様小体を含むdense bodyの一部には限界膜が崩壊することにより内部にあったミエリン様小体は細胞内に放出され単体ないし数個癒合した形で細胞内にみられるようになる(写真3)。

SISO投与開始後12日目(中止後5日目)が最も強い変化がみられた。近位および遠位尿細管上皮は腫大し、ミエリン様小体が全体を占めるdense body、数個が癒合したミエリン様小体、細胞内の崩壊物を取り込んだ大型食空泡などが細胞内を占め、細胞小器官は圧排される傾向を示していた(写真8)。これらの変化とともに、一部の尿細管上皮細胞には崩壊がみられ、多数の崩壊物とともに多数のミエリン様小体が尿細管腔内にみられた。一部の近位尿細管腔内において刷子縁に囲まれている尿細管腔内に多数のミエリン様小体が放出されて、刷子縁に引っかかっている像もみられ(写真9)、また遠位尿細管腔内にも多数のミエリン様小体や細胞の崩壊物の集簇がみられた(写真10)。

SISO投与開始後3週目(中止後2週目)頃では、ミエリン様小体の消失過程を示してくる。食空泡に取り込まれたミエリン様小体は強い消化性変化(lytic change)を受け、さらに経過とともに食空泡は大きさや数に減少がみられ、電子密度が一段と低くなり、一部には膜様物質が残存し(写真11)、さらに消化が進むと内部の構造が徐々に無構造になっていき、一部ではほぼ正常に近いdense bodyに回復し、その内部に膜様物質の残存がみられる像も存在した(写真12)。

SISO投与開始後4週目(中止後3週目)頃になると、ほぼ修復過程が完成する。すなわち、小さく分割された食空泡は一見lysosome様の構造を示し上皮細胞基底側へ転送されるか、または、これらの食空泡は徐々に尿細管腔内に放出されるものと思われる(写真13)。

ミエリン様小体の組織化学的性状の検索として電顕レベルでのAcid phosphatase反応はdense bodyの一部および基質と思われる部位に強い反応産物の沈着が認められた。ただし、層状構造物は陰性を示した(写真14)。

2) 近位尿細管以外の変化

近位尿細管上皮以外では、糸球体の上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞、ボーマン囊上皮細胞などにはミエリン様小体の形成はみられなかった。

ミエリン様小体は遠位尿細管および集合管上皮細胞にもみられるが、近位尿細管のものより小型で電子密

度が高く、低倍率では無構造なdense bodyを思わせた(写真10)。しかし、高倍率で観察すると密につまった層状構造を呈する小体が主体を占めた。

3) 腎以外の部のミエリン様小体

ミエリン様小体の出現について腎以外の臓器について検討した。腎では尿細管上皮細胞の他に血管の平滑筋細胞に少数出現した(写真15)が、肝ではごく少数、肝細胞とkupper細胞にみられ、肺、大動脈の平滑筋にはミエリン様小体の出現はみられなかった。

4) 急速凍結置換固定法

ミエリン様小体について急速凍結置換固定法¹¹⁾を行って検討した。市川ら¹²⁾は急速凍結置換固定法の像がより生体に近いと考えている。

アミノ配糖体投与によるdense body内にみられる複数のミエリン様小体は肺胞のII型細胞内にみられるミエリン様小体のようにスリガラス状の変化ではなく、通常の化学固定を行ったものと同様の像を示した。すなわち、電子密度の高い顆粒で、高倍率で観察すると、明瞭な層状構造を示した(写真16)。対照として使用したコラルジルによるミエリン様小体は一見スリガラス状のものとして観察された(写真17)。これは両者の脂質成分の相違を示している可能性がある。

5) 対照群

対照群のCZX 800mgおよび1,200mg/kg/day 7日間腹腔内注射群では、光顕でも変化が軽微であったが電顕上でも大量投与にもかかわらず脂肪変性が散見される以外ほとんど所見はみられなかった(写真18)。

IV. 考 按

1. アミノ配糖体投与とミエリン様小体の出現

SISOはGMの改良品でありSISOに関する報告はほとんどみられないので、まずGMに関して文献的考察を行う。

GM投与による腎毒性についての動物実験は短期投与¹³⁾と長期投与^{3)4)7)14)~16)}の報告がある。これらの実験で、ほぼ共通の組織学的変化として、変化は主として近位尿細管にあり、糸球体には変化がないこと、また、それらの変化は投与量ならびに期間に依存していることである。投与量の増加とともに光顕では最初に集簇壊死が、次に広範囲な壊死が近位尿細管上皮を中心に生じ、やがて皮質全体に及んでくるとされている。その過程で壊死に並行して尿細管上皮が活発に再生し、この再生は投与継続にも拘らず進行するとされている。このことはGMの投与がすべての尿細管上皮に一樣に作用しているのではなく、もっとも強く作用を受け

写真説明

実験群はすべて7日間のみ連続注射を施行した。

写真1 SISO 60mg/kg/day 投与12日目の光顕像

上皮細胞の広範囲な壊死，尿管腔の拡大，内腔内に蛋白円柱，細胞壊死物が充満している部位がみられる。

写真2 SISO 60mg/kg/day 投与3日目の近位尿管上皮の電顕像

ミエリン様小体の形成初期像

dense body 内に1から数個のミエリン様小体が認められ，一部には癒合像もみられる ($\times 20,000$)。

写真3 同上，投与7日目の近位尿管上皮の電顕像

ミエリン様小体は部分的にはぐれて lattice pattern を示す ($\times 32,000$)。

写真4 同上，投与7日目の近位尿管上皮の電顕像

本文説明を参照 ($\times 30,000$)。

写真5 同上，投与3日目の近位尿管上皮の電顕像

ミエリン様小体の形成初期像

近位尿管上皮細胞の刷子縁直下には apical vesicle の増加，特異空胞の増加がみられ，それらの一部にはミエリン様小体の前駆物質もみられた ($\times 20,000$)。

写真6 同上，投与7日目の近位尿管上皮の電顕像

ミエリン様小体を含む dense body は数および大きさを増してくる ($\times 3,000$)。

写真7 同上，投与7日目の近位尿管上皮の電顕像

小ささまざまなミエリン様小体の融合像が dense body 内にみられ，dense body の膜の崩壊もみられる ($\times 15,000$)。

写真8 同上，投与12日目の近位尿管上皮の電顕像

ミエリン様小体の融合したもの，大型食空胞などが細胞内を占め，細胞小器官などの圧排像を示す ($\times 6,000$)。

写真9 同上，投与12日目の近位尿管上皮の電顕像

近位尿管上皮細胞の刷子縁に囲まれた尿管腔には放出された多数のミエリン様小体がみられた ($\times 21,000$)。

写真10 同上, 投与12日目の遠位尿細管上皮の電顕像

遠位尿細管腔にも多数のミエリン様小体や細胞崩壊物の集簇がみられた。矢印のように、融合傾向の少ない、小型のミエリン様小体がみられた (×3,000)。

写真11 同上, 投与3週目の近位尿細管上皮の電顕像

消化性変化をうけた食空胞で、一部に高電子密度の膜様物質の残存がみられる (×24,000)。

写真12 同上, 投与3週目の近位尿細管上皮の電顕像

ほぼ正常に近い大きさの dense body に回復してきているが、一部に膜様物質が存在している (×24,000)。

写真13 同上, 投与4週目の近位尿細管上皮の電顕像

食空胞は基底側において intra lysosomal digestion をうけるか、または一部は尿細管腔内へ放出される (×6,000)。

写真14 同上, 投与7日目の電顕組織化学 (Acid phosphatase)

矢印は基質に一致して鉛の強い沈着を示す。ミエリン様小体は ACP 陽性であり, lasosome の性状を有する (×24,000)。

写真15 同上, 投与7日目の腎臓の血管の平滑筋の電顕像

腎の血管の平滑筋細胞にミエリン様小体が出現した (×15,000)。

写真16 同上, 投与7日目の近位尿細管上皮の電顕像, 急速凍結置換固定法

矢印のようにミエリン様小体は通常の化学固定と同様な像であった (×9,000)。

写真17 コラルジル投与の電顕像, 急速凍結置換固定法

矢印のようにコラルジルによるミエリン様小体は層状構造がみられず、均一でスリガラス状の内容を示すビッド顆粒として認められる (×20,000)。

写真18 CZX 800mg/kg/day 投与12日目の近位尿細管上皮の電顕像

脂肪変性が散見される以外変化はみられなかった。矢印は脂肪変性を示す (×15,000)。

た細胞は急速に壊死を起こし、GM による傷害をより受け難い抵抗力を持つ若い細胞とおきかわっているのであろうと推測されている。しかし、アミノ配糖体投与の動物実験および人体例¹⁷⁾¹⁸⁾で共通して指摘されることは、投与初期から、電顕上、主に近位尿細管上皮に出現するミエリン様小体であり投与量の増加とともに尿細管上皮細胞全体を占めるほどに増加するとされている。

GM の腎毒性に関する動物実験はヒトに用いる量の10倍から40倍の高用量を用いたものがほとんどである⁴⁾¹³⁾¹⁵⁾が、治療範囲内の用量(1~5mg/kg/day)を使用した実験では、Kosek ら¹⁴⁾は、わずか1mg/kg/day 1回投与48時間後の電顕像で、すでにラットの近位尿細管上皮にミエリン様小体を生じたと述べている。また、Baylis ら⁷⁾の実験では4mg/kg/day の GM 投与でラットに同様のミエリン様小体の出現および糸球体濾過値 (GFR) の48%の減少を認めている。これらの投与量では、当然、腎機能異常は起こらず、その時点でミエリン様小体が出現していることはミエリン様小体の出現は単なる GM 投与の指標にしか過ぎず、腎毒性とは無関係ではないかとの理論の根拠になっている。

GM 起因性のヒトの急性腎不全は投薬を中止すれば、ほとんどの場合、回復するとされている。Hought-

on ら¹⁷⁾は腎切除および腎生検を施行した109例中19例に近位尿細管上皮にミエリン様小体が存在し、その19例中15例が GM の投与を受けた患者で、そのうち1例のみが腎不全の臨床症状を示したと報告している。

すべてのアミノ配糖体投与により共通して生ずる特徴的な電顕レベルの変化はミエリン様小体の出現であり、これ以外の変化は非特異的なものとされている。

2. ミエリン様小体の形成と消失

SISO 投与群ではアミノ配糖体投与に共通して電顕上ミエリン様小体がみられたが、この形成、消失過程に関する報告は少ない。

今回の検索からミエリン様小体は写真2のように、上皮細胞内にある dense body 内に1から数個のミエリン様小体がみられた。このことは、dense body すなわち lysosome そのものでミエリン様小体が形成されていて、lysosome が形成過程の中心と考えられる。電顕組織化学 (Acid phosphatase) でも、写真14のようにミエリン様小体の基質に一致して鉛の強い沈着がみられ、ミエリン様小体は lysosome の性状を有していることが判明した。

また一方、写真5のように、刷子縁直下に pinocytotic vesicle の増加、大小の拡張した空胞がみられ、その中にミエリン様構造物が癒合し、より大き

なミエリン様小体の形成へと移行する像がみられた。これは、おそらく、SISOの化学成分が尿細管腔から pinocytosis の形式で、apical canaliculi を通って apical vacuole 内に取り込まれ、その過程で膜脂質成分である磷脂質と結びついて、ミエリン様小体を形成してくるものと考えられる。つまり、ミエリン様小体の形成過程は lysosome そのものの形成を主とし、それとは別に pinocytosis が関与したもの2通りあるように思われた。

ミエリン様小体の消失過程については、換言すれば、近位尿細管上皮の修復過程でもあるが、食空腔内に蓄積されたミエリン様小体は写真11のように徐々に lysosome 内の酸性水解酵素による消化性変化 (lytic change) を受けるようである。はじめは無構造な電子密度の高い物質となり、これが大きさ、数ともに減少しつつ、電子密度も次第に低くなり小さく分割されていく。写真13のように、小空腔は主に上皮細胞基底部に転送され、最後に主として lysosome により処理され、一部は尿細管腔内へ排出されると考えられる。

3. 磷脂質蓄積症について

薬剤投与により出現するミエリン様小体は病理学的には薬剤起因性磷脂質蓄積症, drug-induced phospholipidosis^{(19)~(22)}と解釈される。従ってアミノ配糖体投与による本実験も実験的磷脂質蓄積症の一つと考えられる。

薬剤起因性磷脂質蓄積症 (ミエリン様小体の形成) については、すでに、Lüllmann ら⁽²⁰⁾⁽²¹⁾が詳細な報告をしているので、本実験と比較検討してみたい。

表2、表3はLüllmannらの原図を参考にして判りやすく書いた表であり、表2のようにミエリン様小体を形成する薬剤は数十種類にも及んでおり、なかでも代表的なものは磷脂質脂肪肝を起こす Anti anginal drug としての4,4'-diethylaminoethoxy hexestrol (コラルジル) および網膜症を起こす Antimalarial drug としての chloroquine である。これらの薬剤は Amphiphilic 或いは Cationic amphiphilic drug という言葉で一括されており⁽²⁰⁾⁽²¹⁾、これらの薬剤には磷脂質と反応する2, 3の共通した化学的性質が認められる。

① いずれの薬剤も塩基性であり、塩基性 amine グループに属している。② 同一分子中に親水基と疎水基の両者の性質を有している。③ 1ないし数個の芳香環を有している。以上3項目が共通した化学的性質と考えられる。しかし、アミノ配糖体では①の塩基性 amine グループであることは同じであるが②, ③は親

表2 磷脂質蓄積症惹起薬剤

Amphiphilic drugs	
1) Antianginal drug	3) Antimalarial drug
4,4'-diethylaminoethoxyhexestrol	Chloroquine
Aminodarone	Mepacrine
Perhexiline	4) Antihistaminic drug
2) Antidepressant drug	Chlorcyclizine
Imipramine	5) Anorectic drug
Clomipramine	Chlorphentermine
Ipindole	Fenfluramine
1-Chloro-amitriptyline	6) Hypcholesterolemic drug
Zimeldine	Triparanol
Amitriptyline	Azasterol
Noxiptiline	7) Neuroleptic drug
	Clozapine
	Chlorpromazine
	8) Psychotropic drug
	Lysergic acid

表3 Amphiphilic 薬剤の Lysosome 内蓄積および複合脂質との結合

水基が主であり、芳香環はなく、Amphiphilic 薬剤とは別のグループであると思われる。ただ、両薬剤とも、ミエリン様小体の形成はいずれも可逆性であり、投与中止とともに細胞は回復に向かう性質を有するなど類似した点も認められる。

磷脂質蓄積の発生機序について、Lüllmann らは、表3のように Amphiphilic 薬剤である中性型塩基性薬剤 (B) は固有の疎水性の性質のため、膜透過性が非常に高く、容易に細胞膜や lysosome 膜を通過し得る。その後、プロトン (H⁺) に出会い、特に lysosome 内では高濃度の H⁺に出会い、直ちに、プロトン付加型塩基性薬剤 (BH⁺) となり、これは逆に膜透過性が著しく低下するため、一度、細胞質内や lysosome 内へ透過

した BH^+ はそれらの内部に蓄積しやすくなってくる。ここで問題とされるのは、pH の差であり、lysosome 内の pH=4.5 であり、細胞質の pH=7.2 と比較して極端に差があるため細胞質に比し、約1,000倍に近い付加速度で B が lysosome 膜を透過して、lysosome 内に取り込まれ、表3において、大部分が④のコースを通して lysosome 内に蓄積され、ごく少量が⑤のコースで細胞小器官内に蓄積されるものと考えられる。lysosome 内へ蓄積された BH^+ は、主に lysosome 膜および細胞小器官などの膜脂質成分である磷脂質 (PL) と結びついて複合脂質 (BH^+-PL) を形成し、既存の lysosome 内の phospholipase によって、それ以上分解されることが不可能となり薬剤—磷脂質複合体の型で蓄積され、磷脂質蓄積症となり、その時点で、ミエリン様小体として電顕的に可視化されるのではないかとされている。そして、 BH^+-PL は理論的には可逆性であるが投与量の増加とともに、何らかの不可逆的な secondary degeneration が惹起されるのではないかとされている。

Lüllmann らは、ミエリン様小体の形成の主座は、以上のように、あくまで lysosome 内が中心であるとしている。

本実験でもアミノ配糖体のミエリン様小体の形成は lysosome が中心と考えるが、その形成機序について生化学的な明確な考え方がない現在、Lüllmann らの、このような考え方は十分、参考にすべきであろうと思われる。

Amphiphilic 薬剤投与の動物実験で全身諸臓器の電顕上の観察が報告されているのはコラルジルだけであり、コラルジル投与ではラットの全身諸臓器にミエリン様小体の出現がみられた¹⁹⁾。しかし、本実験では、アミノ配糖体投与によるミエリン様小体は腎尿細管上皮にのみみられ、他臓器では、ほとんど出現しないと云う臓器特異性があることが判明した。この事実と腎毒性と何らかの関連性があると思われる。また、急速凍結置換固定法では写真16、17のようにコラルジル投与とアミノ配糖体投与によるミエリン様小体は両者の間に明らかに差があり、ミエリン様小体を形成する磷脂質成分の差異ではないかと考えられる。以上のようにアミノ配糖体投与によるミエリン様小体の本態は不明な点が多く今後、更に形態学的、薬理学的検討が必要であろうと思われる。

4. アミノ配糖体投与と腎毒性

アミノ配糖体投与による急性腎不全は投与量依存性

であり、多尿、低浸透圧尿、糸球体濾過値 (GFR) の減少を伴った nonoliguric な急性腎不全であるとされている³⁾⁷⁾¹⁴⁾¹⁶⁾²³⁾²⁴⁾。また動物実験では GM を投与するとラットの腎では、その85%が皮質に集中し²⁵⁾、オートラジオグラフィーの研究により、GM 投与の大部分は近位尿細管上皮細胞内へ取り込まれ、lysosome 内に蓄積されるとされている²⁶⁾。

以上のように、アミノ配糖体は、ほとんどが近位尿細管上皮細胞の lysosome 内に蓄積されるものと考えられる。本実験でも電顕所見から SISO—磷脂質複合脂質であるミエリン様小体は lysosome がその形成の中心であると考えられる。

ミエリン様小体の形成機序について、Kosek ら¹⁴⁾は GM 投与によるミエリン様小体について、細胞内外の膜脂質成分の磷脂質が GM と結びついた lysosome 内消化の産物であろうとしており、ほぼ大筋においては前述した Lüllmann ら²⁰⁾²¹⁾の説と同様である。また、Jao ら²⁷⁾は GM 投与によるミエリン様小体は薬剤投与による上皮細胞の恒常性を保護しようとする生体の防御反応であり、この作用が限界を越えた時、細胞内機能異常がおこり、不可逆的なダメージを受けるのではないかと考按している。

我々も、これらの考え方とほぼ同様であり、SISO の化学成分が主に lysosome 内で、膜脂質成分の磷脂質と結びついてミエリン様小体を形成し、投与量の増加とともに、脂質代謝に関与する酵素活性の低下も起こり、ミエリン様小体の過度の形成で上皮細胞の機能異常を起こしてくるものと考えられ、いわゆる lysosome over loading の問題が起こってくると考えられる。しかし、ミエリン様小体の過度の形成だけで尿細管壊死が起こるとは考え難い。つまり、百瀬²⁸⁾がすでに報告しているように、lysosome 酵素の放出による上皮細胞の自家融解的過程を考えないと尿細管壊死、腎毒性の問題は解決しない。

この点を電顕所見から考察していくと、前述したように、写真5で示すように SISO の化学成分が pinocytosis の形式で取り込まれ apical vacuole を中心にして、単体または融合した形でミエリン様小体を形成し、投与量とともに、その数も増加していく、また、一方、写真2のように dense body すなわち lysosome そのものであるが、その内でミエリン様小体が形成され、投与量の増加とともに、dense body 内でミエリン様小体の過形成がおこり、写真7のように、しばしば dense body の限界膜が破れて、ミエリン様

小体が細胞内へ放出されるものと思われる。これらは写真14で示すように lysosome 酵素の性状、つまり酸性水解酵素を有している。そして変性像の極期では写真8のように、さまざまな形のミエリン様小体やその融合像や大型の食空胞がみられ、上皮細胞内の細胞小器官の圧排像がみられるが興味深いことは、どの上皮細胞においても細胞内小器官の圧排像までであり細胞崩壊像はみられなかった。それにもかかわらず、写真9、写真10のように尿細管腔内にはミエリン様小体を主とする細胞崩壊物がみられた。この事実は lysosome 酵素の放出による上皮細胞の自家融解作用による細胞崩壊の過程があると考えざるを得ない。つまり、dense body の崩壊によりミエリン様小体が細胞内へ放出されるとともに lysosome の酵素の放出も起こり、一部の細胞では自家融解作用が始まってくるものと考えられる。

結局、アミノ配糖体投与による腎毒性の出現は形態学的には尿細管壊死の形式で出現するが、それには薬剤投与量の増加によるミエリン様小体の過形成と lysosome overloading の問題、さらに、lysosome 酵素が上皮細胞内に放出され上皮細胞の自家融解作用を起こしてくると云う二つの面から考えるのが適当であると思われる。

V. 結 語

SISO 投与により惹起されるラットの腎におけるミエリン様小体の形成過程、推移、消失過程および腎機能との関係、薬剤起因性磷脂質蓄積症について考察した。

1) CZX 800mg および1,200mg/kg/day 7日間腹腔内注射では腎機能は正常であったが SISO 60mg および100mg/kg/day 7日間筋注では急性腎不全が起きた。

2) ミエリン様小体は電顕組織化学 (Acid phosphatase) にて lysosome の性状を有することが判明した。また、ミエリン様小体は電顕上、腎以外では肝でごく少数みられたほか、肺、大動脈の平滑筋ではみられなかった。

3) ミエリン様小体は、アミノ配糖体の化学成分が pinocytosis の形式で刷子縁から取り込まれ、apical vacuole 内で形成されるものと lysosome 内部で形成されるものと二通りの形成過程が考えられ、主に lysosome 内部で形成されるものと思われる。

4) ミエリン様小体の消失過程には、① ミエリン様小体の細胞内消化、分解、いわゆる intra lysosomal

digestion, ② 食空胞となり、尿細管腔内へ放出, ③ ミエリン様小体の尿細管上皮細胞における細胞充填による腫大、崩壊の3つの機序が考えられる。

5) SISO 投与による尿細管障害は、投与量増加とともに主に lysosome 内を中心にしてミエリン様小体の過形成が起こり、lysosome overloading の問題が起こり、細胞内恒常性が失われ、また、lysosome 膜は崩壊して lysosome 酵素を上皮細胞内へ放出、細胞の自家融解作用を起こしてきて、尿細管壊死を惹起するものと思われる。

6) Amphiphilic 薬剤であるコラルジル投与によるミエリン様小体は全身諸臓器に出現するのに対し、アミノ配糖体のそれは主に腎の尿細管上皮に出現し、臓器特異性があり、この点と腎毒性との関係は今後、さらに検討の必要がある。

以上のように、アミノ配糖体投与の腎毒性の作用機序に関しては、まだ、不明の点が多いが今後は生化学および薬理学的研究を併せ行い、機能と形態の両面からの検討が必要であると考えられる。

稿を終るに臨み、本論文の御校閲を賜りました慶応大学医学部病理学教室坂口弘教授に心から感謝の意を表します。また終始技術的御援助を頂いた同病理学教室榎本康弘先生に感謝致します。

本論文の要旨は第14回日本臨床電子顕微鏡学会、第71回日本泌尿器科学会総会に於いて報告した。

文 献

- 1) Houghton, D.C., Hartnett, M., Campbell-Boswell, M., Porter, G.A. and Bennett, W.M.: A Light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am. J. Pathol.*, 82, 589-599, 1976.
- 2) Bennett, W.M., Plamp, C.E., Parker, R.A., Gilbert, D.N., Houghton, D.C. and Porter, G.A.; Renal transport of organic acids and bases in aminoglycoside nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1979, in press.
- 3) Cohen, L., Lapkin, R. and Kaloyndides, G.J.: Effect of gentamicin on renal function in the rat. *J. pharmacol. Exp. Ther.*, 193, 264-273, 1975.
- 4) Cuppage, F.E., Setter, K., Sullivan, L.P., Reitzes, E.J. and Melnykovich, A.O.: Gentamicin nephrotoxicity. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 24, 121-138, 1977.
- 5) Kluwe, W.M. and Hook, J.B.: Functional nephrotoxicity of gentamicin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45, 163-175, 1978.

- 6) Lapkin, R., Bowman, R. and Kaloyanides, G.J.: Effect of gentamicin of p-aminohippurate metabolism and transport in rat kidney slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 201, 233—242, 1977.
- 7) Baylis C., Rennke, H.R. and Brenner, B.M.: Mechanisms of the defect in glomerular ultrafiltration associated with gentamicin administration. *Kidney Int.*, 12, 344—353, 1977.
- 8) シセブチン文献集: Chemotherapy 特集号, 26, Supplement, p.1, 1978.
- 9) 木村茂三: 低分子デキストランによる浸透圧性腎症の臨床病理学的研究. *日腎会誌*, 11, 605—627, 1969.
- 10) 木村茂三: 低分子デキストランによる浸透圧性腎症回復期の病理学的研究. *日腎会誌*, 12, 669—681, 1970.
- 11) 市川 厚: 急速凍結置換法, *電子顕微鏡*, 16, 47, 1981.
- 12) 市川 厚, 池田大忠: 日本電子顕微鏡学会第36回学術講演会予稿集, p.30, 1980.
- 13) Vera-Roman, J., Krishnakantha, T.P. and Cuppage, F.E.: Gentamicin nephrotoxicity in rats. *Lab. invest.*, 33, 412—417, 1975.
- 14) Kosek, J.C., Mazze, R.I. and Cousins, M.J.: Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab. Invest.*, 30, 48—57, 1974.
- 15) Gilbert, D.N., Houghton, D.C., Bennett, W.M., Plamp, C.E., Reger, K. and Porter, G.A.: Reversibility of gentamicin nephrotoxicity in rats: Recovery during continuous drug administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 160, 99—103, 1979.
- 16) Gilbert, D.N., Plamp, C.E., Starr, P., Bennett, W.M., Houghton, D.C. and Porter, G.A.: Comparative nephrotoxicity of gentamicin and tobramycin in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13, 34—40, 1978.
- 17) Houghton, D.C., Campbell-Boswell, M.V., Bennett, W.M., Porter, G.A. and Brocks, R.E.: Myeloid bodies in the renal tubules of humans: Relationship to gentamicin therapy. *Clin. Nephrol.*, 10: 140—145, 1978.
- 18) Bennett, W.M., Gilbert, D.N., Houghton, D.C. and Porter, G.A.: Gentamicin nephrotoxicity-morphologic and Pharmacologic features. *West. J. Med.*, 126, 65—68, 1977.
- 19) 渡辺陽之輔, 田代征夫: DH (4-4'-diethylaminoethoxy hexestrol)投与による脂質蓄積症の形態学—実験的研究を中心として—. *慶応医学*, 51, 151—164, 1974.
- 20) Lüllmann, H., Lüllmann-Rauch, R. and Wasserman, O.: Drug induced phospholipidosis. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 4, 185—218, 1975.
- 21) Lüllmann, H., Lüllmann-Rauch, R. and Wasserman, O.: Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 1103—1108, 1978.
- 22) Aubert-Tulkens, G., Van Hoof, F. and Tulkens, P.: Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts: Quantitative ultrastructural and biochemical study. *Lab. Invest.*, 40, 481—491, 1979.
- 23) Luft, F.C., Patel, V., Yum, M.N., Patel, B. and Kleit, S.A.: Experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *L. Lab. Clin. Med.*, 86, 213—220, 1975.
- 24) Luft, F.C., Bloch, R., Sloan, R.S., Yum, M.N., Costello, R. and Maxwell, D.R.: Comparative nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 138, 541—545, 1978.
- 25) Luft, F.C. and Kleit, S.A.: Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J. Infect. Dis.*, 130, 656—659, 1974.
- 26) Silverblatt, F.J. and Kuehn, D.: Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int.*, 15, 335—345, 1979.
- 27) Jao, W., Manaligod, J.R., Gerardo, L.T. and castillo, M.M.: Myeloid bodies in drug-induced acute tubular necrosis. *J. Pathology*, 139, 33—40, 1983.
- 28) 百瀬俊郎: 急性腎不全の発生病理. *日泌尿会誌*, 60, 823—833, 1969.

(1983年4月9日受付, 特別掲載)