

Vistamycin の聴器毒性に関する基礎的研究

齊藤 等・井上靖二・伊達敬一・安野友博・水越 治

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室

I. はじめに

三重県津市の土壌から分離された *Streptomyces ribosidificus* によつて生産されるアミノ配糖体抗生物質 Vistamycin (VSM) が明治製菓中央研究所において開発された。Neamine の5位に D-ribose の結合した化学構造を有する。構造上、聴器毒性を有する kanamycin (KM) などのアミノ配糖体と類似しているため、聴器毒性の有無を検討した(図1)。

II. 実験材料および方法

a. 実験材料

実験動物として体重 150~350 g の健康な Preyer 耳介反射正常域値の黒目のモルモット44匹を使用した。20匹を VSM 筋注用に、14匹を鼓室内注入実験用として、10匹をコントロールとして同一環境において飼育した。

b. 実験方法

1. 薬剤投与方法

VSM 筋注群には、400 mg/kg/日を10日間大腿筋内に注射した。KM を同量注射した場合、程度に差はあつてもほとんどすべてに聴器障害性が発現するからである¹⁾。

鼓室内注入実験として、VSM は 100 mg/0.1 ml と 10 mg/0.1 ml の2種類の濃度のものの他に、KM と oleandomycin (OM) をそれぞれ 10 mg/0.1 ml の濃度のもの、それに単に生理食塩水のみを注入したもの4群行なつた。抗生物質はすべて生理食塩水に溶解した。この鼓室内注入法によつて、正門窓經由による薬剤の直接的な影響と、臨床的に点耳薬として使用した場合の障害性を見ようとした。

2. 聴器毒性の検討方法

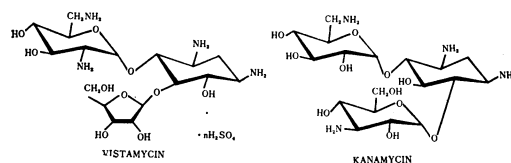
i) Preyer 耳介反射域値の測定

500, 1,000, 2,000, 4,000 の各ヘルツ (Hz) について、VSM 筋注前、5日目、注射完了後の11日目の合計3回測定した。

ii) 電気生理学的検索

蝸牛基底回転中央階に微小ガラス電極を刺入し、Endocochlear potential (EP), Cochlear microphonics (CM), Summating potential (SP) などの蝸牛内電位を記録し

図1 構造式



た¹⁾。刺激は 0.5 kHz, 1 kHz, 2 kHz, 4 kHz, 8 kHz の tone burst を closed sound system で負荷した。

iii) 組織化学的検索

蝸牛内電位を測定したのち、主として微小電極を刺入していない側の側頭骨を実験に供した。

Sudan black B (SBB) 染色³⁾ とコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性を指標として、Surface preparation 法⁴⁾ によつて基底回転から頭頂回転までラセン器有毛細胞の状態を観察した。

断頭後内耳骨胞を取り出し、基底回転と頭頂回転の膜蝸牛の一部を露出して、10%中性ホルマリンで1時間固定後水洗し、SBB 染色を行なつた。SBB 染色は Sudan black B の70%アルコール飽和溶液を用い、30分間染色した。これはラセン器の周囲の脂質に富んだヘンゼン細胞などを染色し、ラセン器有毛細胞を浮彫りにして、主としてその形態を観察した。

SDH 染色は以下のように行なつた。断頭後ただちに内耳骨胞を取り出し、SDH 反応液 (NACHLAS 法⁵⁾) に浸した。実体顕微鏡下に、骨蝸牛の各回転に小孔を開けライスネル膜を破つておいて、37℃で30分間反応させた。次いで10%中性ホルマリンで1~2時間固定した後、各回転のラセン器の Surface specimens を作成して光学顕微鏡で観察した。

III. 実験成績

a. 筋注群結果

VSM 筋注群20匹中、10回の注射完了までに12匹 (60%) が死亡した。いつぼう、コントロール群10匹中7匹 (70%) が死亡した。

1. Preyer 耳介反射域値の変動

表1 Preyer 耳介反射域値の変動

No.	体重(g)	500	1000	2000	4000 Hz
1	170	—	—	—	—
2	260	↘	↘	—	—
3	260	—	↘	—	—
4	280	—	—	—	—
5	290	—	—	—	—
12	310	↘	—	—	—
13	300	—	—	—	—
14	260	—	—	—	—

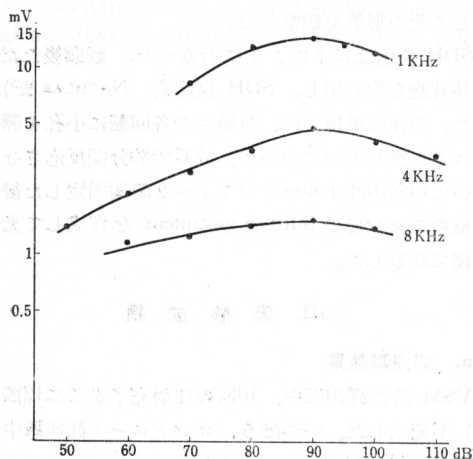
↘域値上昇 —無変化

注射10回終了後の生存8匹についての域値変動を調べた結果、著明な域値上昇はほとんど認められなかった。0.5kHzと1kHzの域値上昇が3例に認められたが、これは通常の聴器毒性物質による高音部障害のパターンと相異していた。詳細は表1に示した。

2. 電気生理学的検索結果

VSM 筋注後生存の8例につき、電気生理学的に検索した。その結果8例とも正常群とくらべ、差異のない電位が記録された。すなわち、VSMを400mg/kg/日の割合で10日間筋注しても聴器障害性は観察されなかった。その1例として、No. 3のモルモット蝸牛から得られた1kHz、4kHz、8kHzのCM入出力曲線を図2に示した。充分な大きさのCMが記録され正常のパターンを示している。No. 3はPreyer耳介反射では、1kHzでの域値上昇が認められていたが、電気生理学的検討により測定誤差であつたことがわかつた。

図2 No. 3 モルモット蝸牛から得られたCMの入力曲線



3. 組織化学的検索結果

Surface preparation 法により、生存8例すべての蝸牛の各回転、とくに高音感受部位である基底回転の有毛細胞を観察したが、形態的にもコハク酸脱水素酵素活性より見た好気代謝にも、対照と比較して、400mg/kg/日、10日間のVSM筋注投与では変化は認められなかった。

No. 5のSBB染色の基底回転部を図3に、第3回転部を図4に示した。いずれも変化は認められない。

No. 1の蝸牛基底回転部のSDH活性を図5に示した。正常のSDH活性を示している。いつぼう、400mg/kg/日、10日間のKM筋注投与では、大部分が図6のように、ラセン器有毛細胞の変性消失やSDH活性の乱れが観察される。

以上のように、VSM 400mg/kg/日、10日間の筋注では、聴器障害性は全く認められなかった。

b. 鼓室内注入群結果

ネンブター麻酔下に、モルモットを背位に固定し、清潔下に下顎骨にそつて約2cmの切開を加えた。血管を損傷しないように筋肉を剝離すると内耳骨胞が現われる。伝音系を傷害しないためになるべく骨胞の先端部へ微小バーで薬剤注入孔と、空気排泄孔の2孔を開けた。

図3 No. 5 モルモット蝸牛の基底回転部、SBB染色。正常。×400。

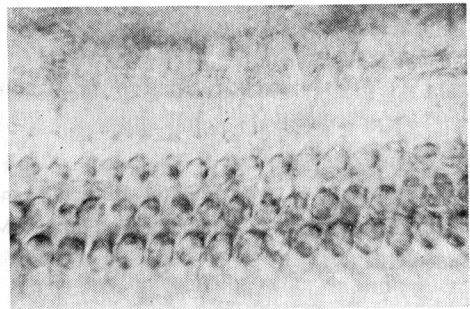


図4 No. 5 モルモット蝸牛の第3回転部、SBB染色。正常。×400。

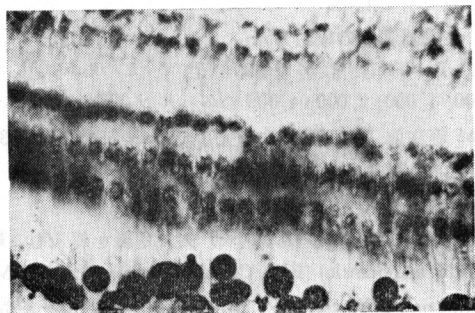


図5 No.1 モルモット蝸牛の基底回転部, SDH 染色. 正常. $\times 400$.

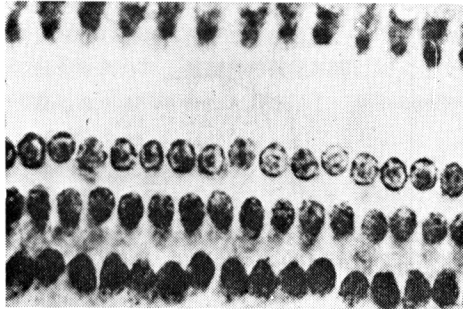


図6 KM 400 mg/kg/日, 10日間筋注後の基底回転部. SDH 染色. 外有毛細胞(下方)の変性消失. $\times 400$.

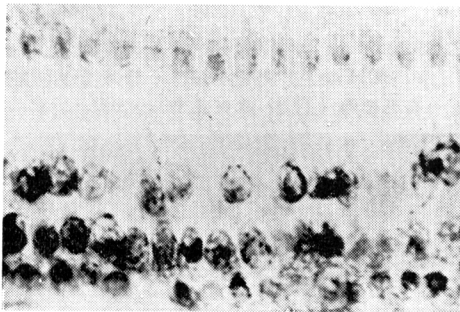


図7 VSM 100 mg 鼓室内注入, 基底回転部. 内外有毛細胞の消失. $\times 400$.

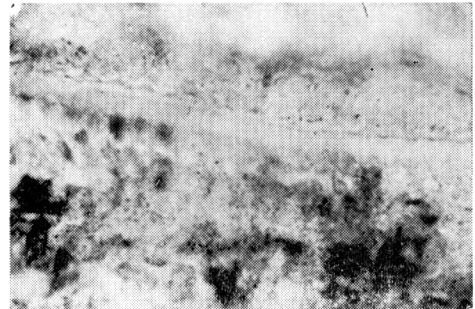
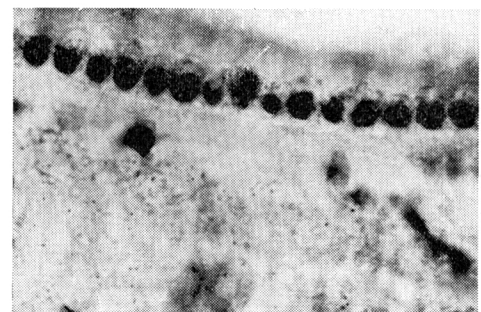


図8 VSM 100 mg 鼓室内注入, 第3回転. 内有毛細胞(上方)は残存, 外有細胞はほとんど消失. $\times 400$.



中耳伝音系を損傷しないように、鼓室粘膜に注射針で孔を開け、いつぼうの孔から薬剤を注入した。実容量は約 0.1 ml であったが、実際には平均 0.06 ml の注入で内耳骨腔が充満され、外部にあふれ出た。創面を消毒したのも縫合し、7日間飼育してから聴器障害性の有無を電気生理学的方法と組織化学的方法によつて検索した。頸部の術創の影響があるので、耳介反射は測定しなかつた。

VSM は 2 種類の濃度のもの 6 例, KM 2 例, OM 4 例, 生食水 2 例の合計 14 例に鼓室内注入実験を行なつた。

VSM は 100 mg/0.1 ml のもの 4 例と 10 mg/0.1 ml のもの 2 例の合計 6 例行なつた。1 週間後に中耳腔を開けてみると、6 例とも中耳炎があつた。これは VSM の粘膜刺激性によるものか、またはその抗菌力の弱さによるものか不明であつたが、VSM の聴器毒性の判定に思ひぬ障害となつた。

100 mg/0.1 ml 注入群では全例に強度の中耳炎があり、中耳腔に膿汁が存在していた。4 例とも電気生理学的には maximum input で CM, SP とともにほとんど no response であり、組織化学的にも第 2 回転の初めまで内外有毛細胞が消失していた(図 7)。第 3 回転になつてはじ

めて内毛細胞がところどころ消失膨化していたが存在し、SDH 活性も乱れていた。いつぼう外有毛細胞はところどころ残存していたが、膨化がみられ SDH 活性も低下していた(図 8)。

10 mg/0.1 ml 法入群 2 例においては、1 例は中耳炎が強度であり、電気生理学的に 1,000 Hz で、わずかな反応があるのみで、他は no response であつた。組織化学的にはほぼ 100 mg 注入群と同様で、基底回転部から第 2 回転にかけて内外有毛細胞が消失していた。他の 1 例は中耳腔に膿性でなく漿液性の分泌が存在する軽度の中耳炎を起こしていた。電気生理学的には、8,000 Hz においてのみ CM の軽度の域値上昇と、各 Hz の電位振幅の軽度減少が見られた。組織化学的に基底回転部の SDH 活性はコントロール(図 9)とくらべ、その活性は低下し、ところどころ細胞の膨化が観察された(図 10)のみで、有毛細胞の消失はみられなかつた。第 2 回転以上はほぼ正常であつた。

以上のように、VSM 鼓室内注入では、その中耳炎の炎症の程度に比例して障害が現われる傾向が見られたので、おそらく以上の聴器障害性は炎症の影響のほうが強いものと考えられた。しかし、炎症だけの影響にしては

図9 VSM 10 mg 鼓室内注入, 基底回転部. 対照側の SDH 染色. $\times 400$.

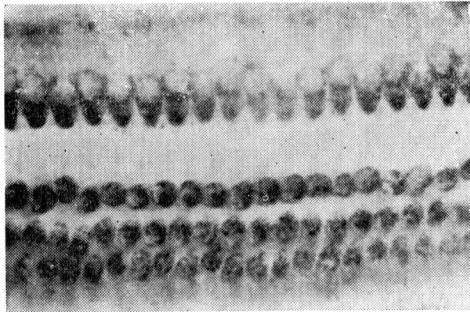
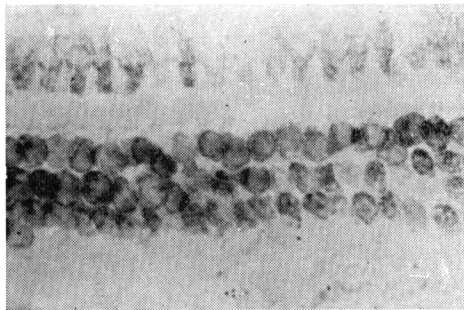


図10 VSM 10 mg 鼓室内注入側, 基底回転部の SDH 染色, 内外有毛細胞の消失はないが, SDH 活性の低下と, 細胞の膨化がみられる. $\times 400$.



障害が高度のため, その聴毒性は否定できなかつた。

KM は 10 mg/0.1 ml の濃度のものを2例に注入した。第1例は中耳炎はなく, 第2例には少しの膿性分泌物を伴う中耳炎があつた。抗菌力が強いいためか, 概して炎症は軽度であつた。

第1例の CM の入出力曲線を図11に示す。正常のパターン(図2)と比較するとわかるように, 2k, 4k, 8kHz の域値上昇と電位の減少が観察された。組織化学的には, 基底回転では内毛細胞には障害性は認められなかつたが, 外有毛細胞はほとんどすべて消失していた(図12)。第2, 第3回転は形態的にはほぼ正常のまま存在していたが, SDH 活性の低下傾向が観察された。以

図11 KM 10 mg 鼓室内注入, 第1例の CM 入出曲線。注入後7日目に記録したものであるが, 4kHz, 8kHz での障害が著明である。

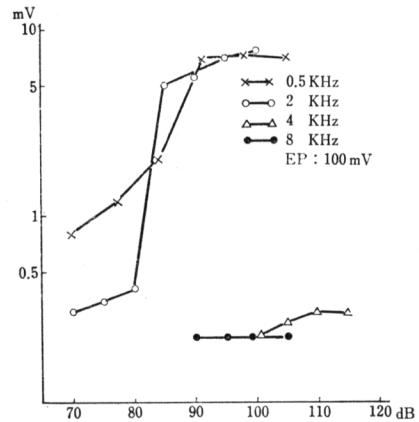
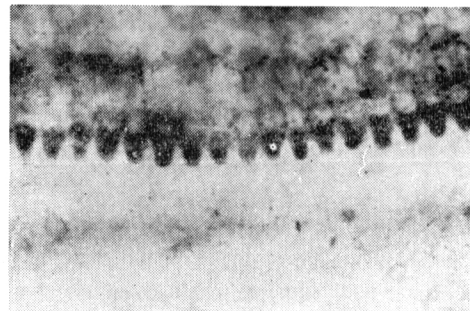


図12 KM 10 mg 鼓室内注入, 第1例の基底回転部の SDH 染色。外有毛細胞の消失(下方), 内毛細胞(上方)ほぼ正常. $\times 400$.



上のようにかなり強度の障害性を示していた。

第2例は中耳炎を伴っていたが, 電気生理学的にも組織化学的にも軽度のラセン器障害性が証明された。電気生理学的には, 8kHz の域値上昇および 0.5k, 1k, 2k, 4k, 8kHz における電位の低下が見られた。組織化学的には, 卵円窓から約1mmのところでは, 外有毛細胞がところどころ消失していた。SDH 活性の乱れも観察された。ところが卵円窓から約4mmより上方回転には,

表2 鼓室内注入後, 7日目の実験成績

	Vistamycin		Kanamycin	Oleandomycin	生理食塩水
濃度	100 mg/0.1 ml	10 mg/0.1 ml	10 mg/0.1 ml	10 mg/0.1 ml	0.1 ml
動物数	4	2	2	4	2
中耳炎	4	2	1	全例死亡	0 [セボラ]
障	4	2	2	—	0
害	4	1	2	—	0
性	4	2	2	—	0
電 気 生 理 上					
有 毛 細 胞 消 失					
組 織 化 学 上					

SDH 活性がやや低下している傾向がみられたのみで、形態的には正常であつた。概して軽度の障害であつた。

次に OM では鼓室内注入実験の4例とも1週間生存せず、3～6日目にすべて死亡した。このことは、薬剤の聴器毒性以外に、抗菌力や鼓室粘膜に対する反応性のようなものが影響することを暗示し、薬剤の聴器毒性の有無の判定を困難にさせた。

生理食塩水の注入群2例は、セボランの筋注で炎症をおさえたためか2例とも生存した。しかも鼓室には炎症もなく、聴器は電気生理学的にも組織化学的にも全く正常であつた。このことによつて、鼓室内注入による物理的な影響は除外されたわけである。

以上の鼓室内注入実験成績をまとめて、表2に示した。

IV. 考 察

VSM の投与量を 400 mg/kg/日、10日間としたのは、聴器毒性を従来の KM と比較するためであつた。現在までのわれわれの同量の KM 投与成績ではほぼ100%聴器障害が発現するからである。聴器障害性は、まず電気生理学的あるいは組織化学レベルに現われ、次いで形態に現われ、最後に耳介反射に現われるという傾向にある。したがつて、耳介反射や組織形態レベルで正常と見えても、すでに電気生理学的には障害性が発現している場合がしばしばみられる。

VSM 投与中に60%が死亡したが、対照群においても70%死亡したことから、VSM の中毒作用によるものではなくて、飼育環境状態の変化によるものと考えられる。

Preyer 耳介反射において、0.5 kHz, 1 kHz に域値上昇を見た例があつたが、蝸牛内電位が正常であつたことから、測定誤差であつたと考えられる。また通常の抗生物質性聴器障害が高音感受部位から現われるというパターンから考えても測定誤差であつたと考えられる。

VSM を 400 mg/kg, 10日間筋注投与で生存した8例すべてが VSM による聴器障害を示さなかつた。投与期間の延長の場合の聴器毒性には問題は残るが、筋注群で全然障害性がみられなかつたことから、あつても軽度であると考えられた。

以上のように KM の聴器毒性との比較はできたが、それでは VSM は全然聴器毒性はないのかどうかの問題が残っている。従来より聴器毒性の検定は、薬剤の投与量と投与期間を変えることにより云々され、しかも長期間投与して毒性がなくても、なお最終的に聴器毒性なしとは言いきれなかつた。その上、その間の時間と労力は実に大きい。

そこで薬剤を鼓室内に注入して、主として正円窓經由による薬剤の直接的な影響を見ようとする新しい聴器毒性検定法を試みた。この場合、臨床的に点耳薬として用いる場合の危険性も見ることができるといえる。うまくいけば、将来短期間に簡単に新薬の聴器毒性の有無が検定できるわけである。

結果は実験成績の項で示したように、1. 薬剤の抗菌力とそれに伴う感染、2. 鼓室粘膜の薬剤に対する反応性、などの因子のために聴器毒性の判定はかえつて困難な面もあつた。具体的には中耳炎の発生をいかに防止するかが重要な課題として残つた。

KM の鼓室内注入では、中耳炎のない例に聴器障害性が強く、中耳炎を伴つた例に軽度の障害性が観察された。したがつてこの場合は明らかに炎症の影響以外に KM の正円窓經由と思われる聴器毒性が証明されたわけである。この場合、注入後1週間目で各種の検定が行なわれたが、3～5日間の KM 鼓室内注入では電気生理学的検索によつても変化が証明されなかつたという報告がある⁹⁾。したがつて今度、この方法でも投与量にもよるが検定には1週間は必要であると思われる。また KM の場合から考えると、中耳炎によるラセン器障害性は否定はできないが少ないように思われるた。

VSM 鼓室内注入では6例とも中耳炎を併発した。100 mg/0.1 ml の高濃度群のほうが 10 mg/0.1 ml の低濃度群よりも、強度の中耳炎を伴つていた。このことは薬剤の粘膜刺激性、あるいは反応性というものが関与していることを示唆している。聴器障害性は全6例に観察されたが、KM の場合とは逆に、中耳炎の程度に比例してその障害性は強度であつた。したがつて炎症による聴器障害性が大であると考えられるが、1. KM の結果から考えると炎症の影響は割合に少ない、2. 炎症だけの影響にしてはその障害性が強度である、の2点からの聴器障害性は否定できない。

生食のみの鼓室内注入では、セボランを併用したとはいえ、炎症もなく無変化であつた。このことから、鼓室内注入操作などの生物物理学的影響は除外されたが、逆にまた薬剤の粘膜刺激性による中耳炎が示唆された。

モルモットの鼓室内注入実験は、鼓膜が正常に存在している閉鎖腔での結果を示している。したがつて、通常鼓膜穿孔を伴つている人体聴器へ点耳薬として外耳道からの応用の場合は、耳管機能と考え合わせてもその副作用は問題にならないと考えられる。しかも今回は低濃度でも10%という通常の抗生物質点耳薬の10倍以上の濃度を用いた。

V. ま と め

アミノ配糖体抗生物質 Vistamycin の聴器毒性の有無について検索した。実験動物はモルモットを用い、筋注投与法と、新しい試みとして鼓室内注入法とを用いた。

聴器障害性、とくにラセン器に対する障害性の有無を、Preyer 耳介反射の測定、電気生理学的検索、組織化学的検索の3方法によつて検定した。

その結果、モルモットに体重 kg 当り 400 mg の Vistamycin を10日間筋注投与しても全然聴器障害性を示さなかつた。この投与量では、kanamycin の場合はほとんど100%の聴器障害性を示すこと、および1日1gの通常成人投与量の約20倍であることから、急性炎症に対する1日1gの通常投与量では、聴器毒性に関してはまず心配ないといえる。

10%以上の高濃度の Vistamycin 鼓室内注入実験によつて、その聴毒性は否定されず、窮極における聴毒性が示唆された。鼓室内注入法という新しい検定方法では、中耳炎の併発が判定に対する重大な障害となつた。

鼓膜穿孔を伴つた人体中耳に点耳薬として用いる場

合も、通常使用濃度である1%以下ならば、その開放腔から考えて、その聴器毒性に対しては心配いらないと言える。

本論文の要旨は第18回日本化学療法学会西日本支部総会の新薬シンポジウムで口演した。

文 献

- 1) 竹上琢磨, 丸山良平, 志多享: Kanamycin の聴器障害性に関する2, 3の知見. *Audiology* 7: 163~165, 1964.
- 2) 安野友博: モルモットにおける Endocochlear Potential に関する実験的研究. *日耳鼻* 65: 193~219, 1962.
- 3) 佐野豊: 組織化学研究法. 南山堂. 480, 1965.
- 4) ENGSTRÖM, H., H. W. ADES & J. E. HAWKINS: Cytoarchitecture of the organ of Corti. *Acta Otolaryng. Suppl.* 188: 92~99, 1964.
- 5) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英, 水谷昭: 顕微鏡的組織化学. 医学書院. 598~599, 1965.
- 6) 山本馨, 中井義明, 志多享, 菅野享: 鼓室内手術的操作並に局所使用薬剤の内耳に及ぼす影響に関する実験的研究. *日耳鼻* 73: 940~941, 1970.

OTOTOXICITY OF VISTAMYCIN

HITOSHI SAITO, YASUJI INOUE, KEIICHI DATE, TOMOHIRO YASUNO and OSAMU MIZUKOSHI

Department of Otolaryngology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Vistamycin (VSM) is an aminoglycosidic basic antibiotic like kanamycin with a molecular formula $C_{17}H_{34}N_4O_{10}$, and the ototoxicity was examined with this antibiotic.

Forty-four healthy guinea pigs with normal Preyer's reflex were used for this investigation. Twenty animals were used for intramuscular injection, 14 for intratympanic application and 10 for control.

Eight animals were alive after the intramuscular injection of VSM 400 mg/kg for 10 days. Ototoxicity of VSM was investigated with the alive 8 guinea pigs by the following methods:

1. Preyer's reflex of 500, 1,000, 2,000 and 4,000 csp.
2. Electrophysiological investigation: Endocochlear potential, cochlear microphonics and summing potential were measured by 500, 1,000, 2,000, 4,000 and 8,000 cps of closed sound stimulation.
3. Morphological and histochemical investigations by Sudan black B staining and succinic dehydrogenase staining: Hair cells of the organ of Corti were observed by surface preparation from basal turn to apex.

The results showed no ototoxicity of VSM. On the contrary, the intramuscular injection of kanamycin 400 mg/kg for 10 days showed almost 100% ototoxicity.

Intratympanic application was divided into four groups. They were VSM (6 guinea pigs), kanamycin (2), oleandomycin (4) and saline solution (2). Ototoxicity was examined electrophysiologically and histochemically after 7 days. All of VSM application showed otitis media and strong ototoxicity. Although this ototoxicity seemed to be due to otitis media, ototoxicity of VSM in the final analysis was not denied. Two cases of kanamycin also showed ototoxicity, whereas saline solution showed no ototoxicity. Four cases of oleandomycin were dead.

In conclusion, ototoxicity of VSM was very slight in comparison with kanamycin. The ototoxicity was not yet elucidated distinctly with VSM.