

DKB(3',4'-Dideoxykanamycin B) の内耳毒性に関する実験的研究

中井義明・山本 馨・岩本 勉

金子 実・久我隆一

大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室(主任:山本馨教授)

緒 言

薬物中毒による難聴についてはかなり昔から臨床的に知られていたが、WAKSMAN (1943) の Streptomycin 発見後、HINSHAW, FELDMANN⁽¹⁾(1945)¹⁾によりこれに聴器毒性があることが報告されて以来、聴器毒性薬物中毒に関する多数の臨床的、実験的研究が行なわれている。昭和 40 年の臨床的統計によれば、感音性難聴の 6.3% は薬物中毒性のものであったと報告されている²⁾が、その治療法については今日なお適確なものがないのが現状である。

一般に聴器に毒性を示す薬物は数多く存在し、臨床的に難聴として発現するが、その薬物の種類によつて内耳の障害様式が異なることが判明している³⁻⁶⁾。中でもアミノ配糖体系に属する薬物は、内外リンパの分泌吸収に関係する血管条、ラセン靱帯よりもラセン器への障害が著明であることもその特徴の 1 つとされている^{3,6,7)}。

今回私共の行なっている一連の聴器毒性薬物による難聴研究の一部として DKB を使用し、その内耳障害性について形態的観察を行なつた。この DKB は梅沢博士が Kanamycin B の化学的処理によつて得られた抗生物質で 3',4'-Dideoxykanamycin B と称せられ、Kanamycin B の 3' および 4' の水酸基が水素で置換された化学構造式をもっている。これは広い抗菌スペクトルを持つと同時に、Kanamycin に耐性である菌 *E. coli* K-12, R-6 に対しても感受性をもち、また緑膿菌に対して強い阻害を示すのが特徴とされている⁸⁾。

実験材料および方法

体重 16~25 g, プライエル反射正常マウス 50 匹を使用し、DKB 50, 100, 200, 300 mg/kg を 20~30 日間各 10 匹に連日筋注した。一部は対照群とし同量の生食水を筋注した。これらの動物は体重、プライエル反射、その他全身状態の観察を連日行なつた。それぞれ最終投与翌日、断頭、蝸牛および前庭半規管を採取し、燐酸緩衝 2% オスミック酸で固定後、常法により漸進エタノール脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。この試料を蝸牛の各回転別、あるいは卵形囊、球形囊、半規管膨大部を分離し、これらを必要な方向にエポンプラック上に再包埋した。これを数 μ の切片に作製後、位相差顕微鏡で、あるいはトリイジンブルー染色後光顕的観察を行なつた

後、Porter blum MF-1, MT-2 で超薄切片作製、酢酸ウラニル、鉛重染色を行ない、JEM-7 型電子顕微鏡で観察した。

なお試料の一部はエタノール脱水後乾燥し、カーボン、金の二重蒸着後 JSM II 型走査型電子顕微鏡で観察した。

実験成績

50, 100 mg/kg 投与群では全身状態、プライエル反射および蝸牛前庭半規管内微細構造は正常無処置群と変わりなかつた (Fig. 1, 2, 3)。

200, 300 mg/kg 投与群では注射開始後数日間は体重の減少を示し、200 mg/kg 投与群で 3 匹 (30%)、300 mg/kg 投与群で 5 匹 (50%) が投与開始 7~10 日後に死亡した。しかし生存例で 2 週以後は徐々に体重の増量がみられ 2 週間以上投与でプライエル反射は低下した。これらの動物内耳はその感覚細胞に種々の程度の変性が認められた。

蝸牛内ラセン器の変性は Streptomycin, Kanamycin 等のアミノ配糖体系抗生物質による障害と同様、下部

Fig. 1. Administration of DKB, 100 mg/kg, for 30 days. Phasecontrast microscopy shows no changes of the organ of Corti.



Fig. 2. Administration of DKB, 100 mg/kg, for 30 days. The scanning electron microscopic picture of the surface of the outer hair cells shows normal arrangement of the hairs.

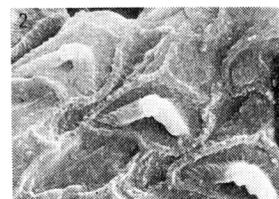


Fig. 3. DKB, 100 mg/kg for 30 days. The photomicrograph of the lower part of the first row of the outer hair cells of the basal coil reveals normal sensory cells (H), nerve fibers (N) and their endings (E). D: Deiters' cells. The line represents 1 micron (The same scale is used in the succeeding figures).

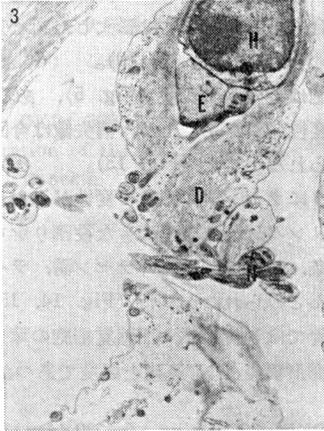


Fig. 4. DKB, 200 mg/kg, for 30 days. Degeneration of the mitochondria in the inferior part of the cuticle layer of the outer hair cells and the appearance of lysosome are seen.



Fig. 5. DKB, 300 mg/kg, for 20 days. The tips of the hairs of the inner hair cells of the middle coil show drumstick-like swelling.

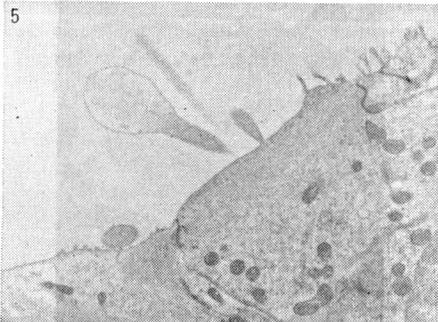


Fig. 6. DKB, 200 mg/kg, for 20 days. The hairs of the sensory cells have lost their rigidity and are bent.



Fig. 7. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. Most of the nerve fibers between the Deiters' cells at the lower part of the basal coil of the Corti's organ have disappeared.

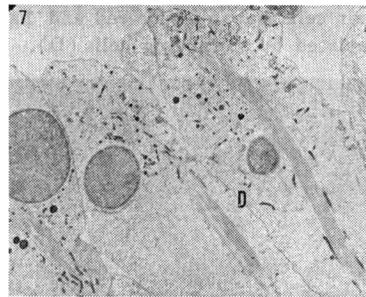
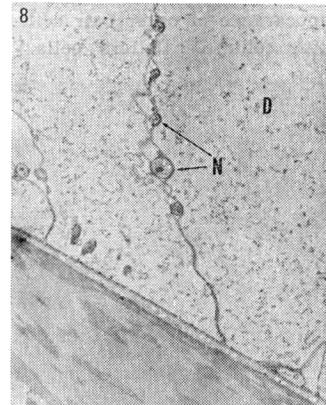


Fig. 8. Showing the presence of nerve fibers (N) between the Deiters' cells in a normal organ of Corti.



回転に強度にみられ、上部回転にいくに従って軽度であつた。

先ず外有毛細胞の蓋板下部の糸粒体の変性、ライソゾームの増量、感覚毛の rigidity の減少が初発所見であつた (Fig. 4, 6)。変形の特徴としてタイコのパチ様にその上部の膨隆がみられることもあつた (Fig. 5)。

ついで感覚細胞全体の崩壊が急速に起こり消失する (Fig. 7~12)。その際、神経線維および感覚細胞下部に付着している神経終末は遺残していることが多いが、変性の高度の部位ではこれら神経成分も消失していた

(Fig. 7)。感覚細胞が消失した上部は周囲の支持細胞であるダイテルス細胞によつて補充され、内リンパとコルチリンパの混合は防止されていた (Fig. 9, 10, 11)。ダイテルス細胞内に崩壊した感覚細胞片がとりこまれている像もみられた (Fig. 12)。

有毛細胞が消失したコルチリンパ腔は空間のまま残されている場合もあるが、多くは膨大したダイテルス細胞によつて埋められる (Fig. 9, 10)。

内有毛細胞はその毛の変形 (Fig. 5)、あるいは細胞の糸粒体の変性像が存在したが、消失像は今回の実験条件では認められなかつた (Fig. 13)。

以上のようにラセン器に強度の変性がみられたにも拘らず、内外リンパ分泌吸収に大きな役割をもつ蝸牛管側壁の血管条、ラセン靭帯、外ラセン溝、ラセン隆起等の変化は殆んどみられなかつた (Fig. 14, 15)。

前庭半規管では半規管膨大部感覚細胞の障害が強度で、ついで卵形囊斑、球形囊斑と軽度であつた (Fig. 16,

Fig. 9. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. Phase-contrast microscopy shows marked degeneration of the organ of Corti.

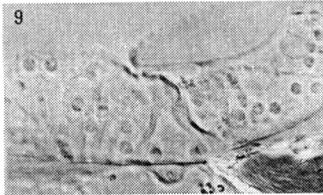


Fig. 10. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. The outer hair cells have disappeared and have been replaced by supporting cells (D).

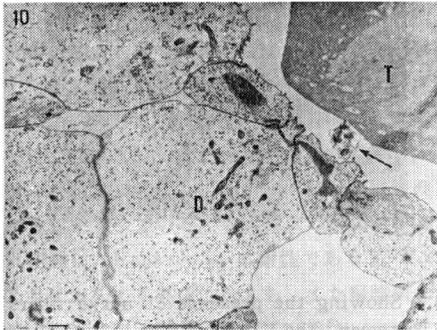


Fig. 11. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. Complete disappearance of outer hair cells. P: supporting cells; D: Deiters' cells.

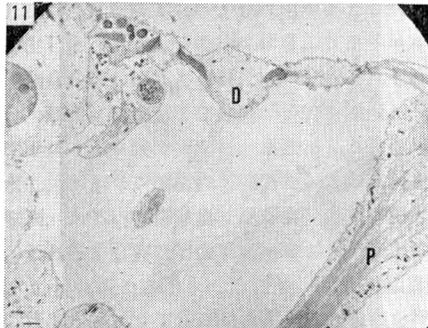


Fig. 12. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. Remnants of the degenerated outer hair cells (shown by arrow) appear as if engulfed by the Deiters' cells (D).

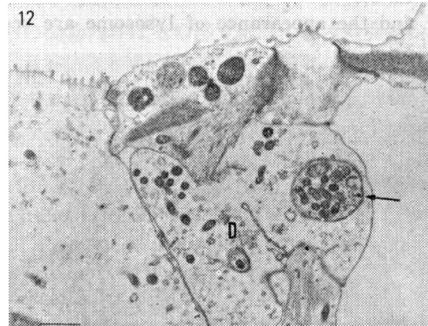
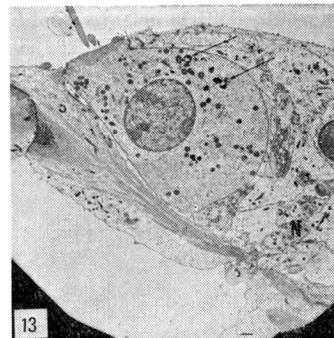


Fig. 13. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. The mitochondria of the inner hair cells (shown by arrow) show degeneration but no change in the nerve fibers and nerve endings is observed.



17)。膨大部後感覚上皮は中心部が辺縁部よりも障害され易く、球形囊、卵形囊斑では Striola の部が障害が大であった。

感覚細胞核上部のライソゾームの増大、糸粒体の変性、感覚毛の変形融合にはじまり (Fig. 18, 19), 空胞形成、蓋板の稀薄化、細胞質の内リンパ腔への膨隆、ついで崩壊した細胞の大部分は内リンパ腔に圧出され、消失する (Fig. 20)。この消失した細胞の存在していた部分

Fig. 14. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. No degeneration of the stria vascularis of the basal coil is seen.

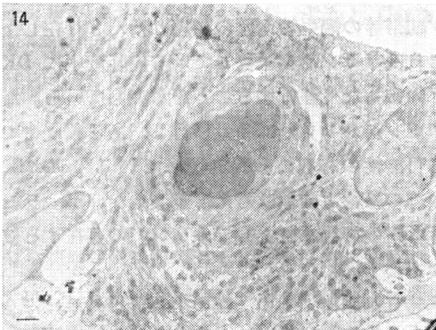


Fig. 15. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. The spiral sulcus and prominence are shown, which appear normal.

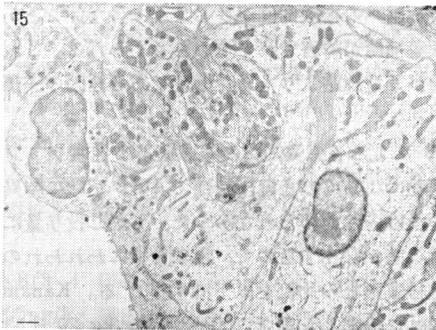


Fig. 16. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. Light microscopy of the crista ampullares of the semicircular canal shows vacuolization of the sensory cells and degeneration of the nerve endings.

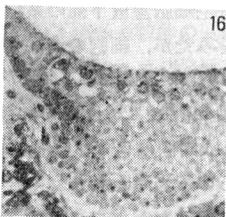


Fig. 17. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. Photomicrograph of the macula utriculi, showing swelling of the sensory cells into the endolymphatic duct and degeneration of the mitochondria.

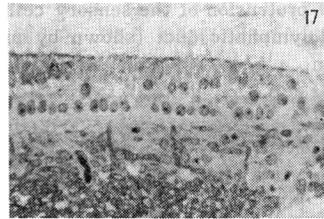


Fig. 18. DKB, 200 mg/kg, for 30 days. The cristae ampullares showing type 1 sensory cells (H), degeneration and fusion of the hairs, and numerous vacuoles in the cells.

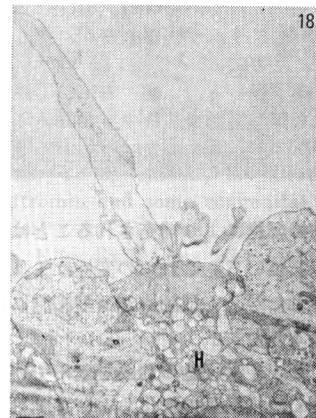


Fig. 19. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. The cristae ampullares of the semicircular canal showing degeneration of mitochondria in the type 1 sensory cells (shown by arrow), and separation of the nerve chalice (N) from the sensory hair cells.

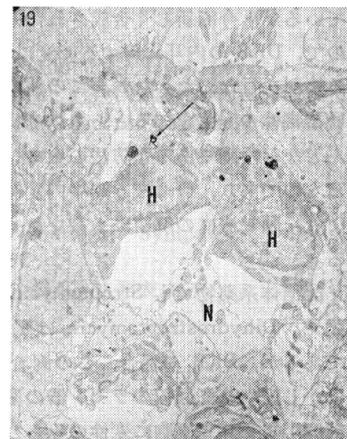
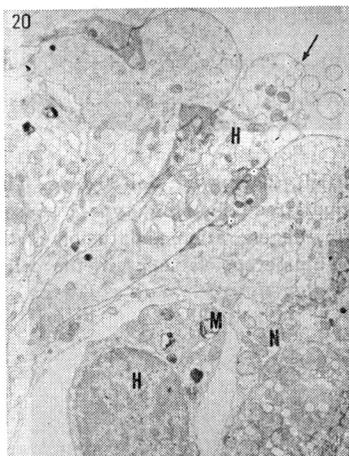


Fig. 20. DKB, 300 mg/kg, for 30 days. The apex of the cristae ampullares. Degeneration of the mitochondria (M) in the sensory cells (H) with detachment and degeneration of the nerve chalice from around the cells, and protrusion of the sensory cells into the endolymphatic duct (shown by arrow) are seen.



は隣接する支持細胞により補充されることはラセン器におけると類似している。これらの変性はI型、II型両感覚細胞にみられたが、I型細胞がII型細胞に比し障害の受け方が大であった。

神経成分では、I型細胞の周囲を包んでいる神経蓋の抵抗性が少なく、神経蓋の膨化および感覚細胞と神経蓋の離開が多くみられた (Fig. 19, 20)。

なおラセン器とくに下部回転の変性が膨大部稜のそれよりも大であり、この薬物による障害は聴力低下が平衡障害に先行することを示していた。

考 按

アミノ配糖体系薬物が聴器に障害をおよぼすことは、よく知られているが、今回新しく合成されたDKBもこれに属するので、DKBの内耳に対する態度について動物実験による検討を行なった。なお、この種の実験的観察は薬物の聴器毒性の程度を知るとともに今日なお適確なもの殆んどない段階である予防法の糸口を見出す最も基礎となるものであり、いつばう蝸牛内変性の様式をみることにより、聴覚機構の解明にも役立たせ得ることに意義がある。

同じアミノ配糖体系薬物でも Streptomycin は前庭半規管に毒性強く、Dihydrostreptomycin は蝸牛への障害発現が大であるが、DKBの場合、この両者に障害をおよぼす。しかし蝸牛基底回転のラセン器の変性がみられた場合も前庭半規管感覚細胞に変性のみられなかつた

場合もあることから聴器毒性が平衡感覚器に対する毒性よりも大であるといえる。

この薬物による障害はラセン器の外有毛細胞が他部位の感覚細胞に比し高度であった。

これは他種原因による障害に共通した所見である。外有毛細胞はその上端、下端が支持細胞に接触しているが、中部はコルチリンパ腔に遊離して存在する。他方、内毛細胞あるいは前庭感覚細胞は周囲を支持細胞に取り囲まれ存在するという解剖的關係、あるいは外有毛細胞が他種細胞よりも代謝が活発であること等が外有毛細胞の受傷性が高い原因であろう。ラセン器の変性が高度にみられた場合も内外リンパ分泌吸収に関与する血管系、ラセン靱帯等の蝸牛管側壁の障害は殆んど存在しなかつた。これはラセン器を栄養している内耳液中にDKBが殆んど障害もなく移行することを示唆している。なおカナマイシンが外リンパに多量移行し、ある程度まで蓄積される可能性の有ることが知られている⁹⁾。DKBの内耳液中への移行も同様に考えて差支えないが、ラセン器へのDKBの移行は主として外リンパの存在する鼓室階經由であろう。

前庭感覚細胞にはその上端の小部分以外はほぼ全周を神経蓋により囲まれているI型細胞とラセン器感覚細胞と同じく、神経終末がボタン状に付着しているII型細胞に分類されている¹⁰⁾。これら感覚細胞への栄養経路は周囲の支持細胞經由であろうが、II型細胞に比しI型細胞は支持細胞への接触部位がひじょうに少ないことから、その栄養補給が障害されやすいと考えられる。これがI型細胞がII型細胞よりも易受傷性である原因の一部であるといえる。

DKBによる各感覚細胞の障害様式は他種アミノ配糖体系薬物によるものとほぼ同様でDKBだけに特異的な障害の受け方は認められなかつた。しかし投与量により受傷性の差が存在するので、現在までにわれわれの行なつた他種薬剤との比較を以下に略述する。Kanamycinをマウスに投与した場合200~300 mg/kg 20日間以上投与で高度のラセン器の変化がみられた。

Vistamycinではこれよりかなり長期大量投与でないとラセン器の変性はみられず、これの聴器毒性は軽微であった⁹⁾。Gentamicinをマウスに100 mg/kg 40日間投与した場合、有毛細胞蓋板下部の糸粒体の変性、ライソゾームの増量をみたが、細胞の消失までには至らなかつた³⁾。LUNDQUIST & WERSÄLL(1967)¹¹⁾はモルモット腹腔内への100 mg/kg 20日間Gentamicin投与でKanamycinとほぼ同様のラセン器有毛細胞の完全消失像を報告しているので当時われわれもそれと同様の成績を期待して投与を続けたがマウスではこの量で有毛細胞

の消失像がみられなかつた。これは動物差によると考えざるを得ない。現在モルモットを使用して DKB の作用を観察中であるが¹¹⁾、上記成績のように感覚細胞への障害様式はマウスのそれと同様であるが、投与量に関してはマウスのときよりも少量でプライエル反射の低下がみられ、その感覚細胞の変性がみられている。これらの点から、われわれの動物実験成績を直ちに人のそれに結びつけて考えることの危険性、すなわち種差、個体差等の因子を常に念頭において成績の考察を進める必要のあることを再認識させられる。

以上のように動物実験の成績では DKB の内耳障害性は Vistamycin よりも高度であり、Kanendomycin とほぼ同様かあるいはやや強度である。しかし Gentamicin よりもかなり軽度であることが知られた。

ただし DKB の実際臨床で使用量は成人標準 1 日量約 100 mg であり、これは Kanamycin の 1 日平均使用量の約 10 分の 1 の量であることから、臨床上的には DKB による内耳毒性は余り考慮に入れなくてよいと考えられる。

ただし前述の例にみられるように、動物種差による感受性の差、とくに高等動物ほど聴器薬物による感受性の高い傾向にあること、あるいは個体差等も絶えず考慮に入れるべきである。いつぼうモルモット中耳腔内に DKB を注入した場合、ただ 1 回の投与によつても内耳感覚細胞に高度の変性がみられるので¹²⁾、とくに点耳薬としての中耳腔の局所使用は避けるべきであろう。

DKB の臓器内分布は一般に血液、腎に濃度が高く、肺がこれに次ぎ、肝は低い。いつぼうこの腎毒性については Kanamycin より強く、Gentamicin, Kanendomycin と同じ程度である⁸⁾。このように腎に障害性の存在することも考慮に入れ、とくに肝腎障害時には薬物の聴器毒性も倍加することも忘れてはならない。

総 括

DKB(3',4'-Dideoxykanamycin B) を、マウスに 50~300 mg/kg 連日筋肉内投与を 20~30 日間行ない、その蝸牛、前庭、半規管におよぼす影響を光顕、透過型および走査型電子顕微鏡により検索した。

変性は蝸牛下部回転ラセン器感覚細胞に高度にみられ、ついで半規管膨大部稜、卵形囊、球形囊斑にもみられた。

各感覚細胞は蓋板下部の糸粒体の変性、ライソゾームの増量、小胞体の配列の乱れが初発所見であり、ついで毛の変性融合、空胞形成、細胞体の崩壊、消失がみられ

た。進行したものはその神経線維の変性、一部消失が観察された。

DKB は Kanamycin, Kanendomycin とほぼ同様、あるいはやや強度の聴器毒性を示し、Gentamicin よりも毒性は僅少であり、Vistamycin よりも強度であつた。

以上の成績から、DKB の聴器毒性の判定に関する諸因子、あるいは臨床上使用の際の注意すべき点等について考察した。

本論文の要旨は第 162 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方会(昭和 47 年 9 月)、第 2 回 DKB 研究会(昭和 47 年 10 月)において報告した。

文 献

- 1) HINSHAW, G. C. & FELDMAN, W. H.: Streptomycin in the treatment of clinical tuberculosis. A preliminary report. *Mayo Clin. Proc.* 20: 313~318, 1945
- 2) 内藤 倘: 中毒性難聴をめぐる諸問題. *Audiology Japan* 14: 481~483, 1971
- 3) 中井義明, 山本 馨, 岩本 勉: 薬物中毒および先天ろう動物蝸牛の成立機転に関する電子顕微鏡的研究. *Audiology Japan*, 14: 504~512, 1971
- 4) NAKAI, Y. & NAKAI, S.: Ototoxic effects of nitromin and some congenital deaf animal cochlea. An electron microscopical study. *Arch. Klin. Exp. Ohr., Nas., -u Kehl. Heilk.* 198: 325~338, 1971
- 5) NAKAI, Y.: Electron microscopic study of the inner ear after ethacrynic acid intoxication. *Pract. Otorhinolaryng. (Basel)* 33: 366~376, 1971
- 6) 中井義明, 山本 馨, 岩本 勉: Kanendomycin, Vistamycin の聴器におよぼす影響に関する電子顕微鏡的研究. *Audiology Japan* 15: 202~210, 1972
- 7) 和吉正豊, 佐藤喜一, 庄司 侃, 菅広 敬: 耳毒性抗生物質によるコルチ器有毛細胞の障害の拡がりかた. *Audiology Japan* 14: 530~541, 1971
- 8) DKB 検討会要約集. 1972
- 9) 中島武士, 小田隆造, 三好敏之: ビタミン B₁ 投与下のカナマイシン内耳移行に関する実験的研究. *Audiology Japan* 14: 519~523, 1971
- 10) NAKAI, Y.: Ultrastructural organization and development of vestibular sensory epithelia. *Equilibrium Res., Suppl.* 4, 1972
- 11) LUNDQUIST, P. G. & WERSALL, J.: The ototoxic effect of gentamicin. *Gentamicin First International Symposium, Paris* p. 26~46, 1967
- 12) 中井義明: 未発表

THE TOXIC EFFECT OF DKB (3',4'-DIDEOXYKANAMYCIN B)
ON THE INNER EAR

YOSHIKI NAKAI, KAORU YAMAMOTO, TSUTOMU IWAMOTO,
MINORU KANEKO and RYUICHI KUGA

Department of Otolaryngology, Osaka City University Medical School

The toxic action of DKB on mice was studied with special regard to the ototoxic action. DKB was found to be more toxic than vistamycin, same toxic as kanamycin, kanendomycin, but less toxic than gentamicin with regard to toxicity/g/body weight.

Toxic reactions were observed in the cochlear and vestibular sensory epithelia with more severe reactions in the cochlear than the vestibular system.

Degeneration appeared first in the outer hair cells in the basal turn of the cochlea starting with the increasing of lysosomes, degeneration of *mitochondria* in the subcuticle area and resulting in the complete loss of hair cells, but stria vascularis and spiral ligament showed little change.

Severe changes were observed in the sensory epithelium of the cristae ampullares and utricular maculae. Early changes with hair swelling and fusion, degeneration of *mitochondria* and ballooning of the cell surface were observed leading to complete degeneration first of the type I and later of the type II hair cells.