

DKB の聴器毒性に関する基礎的研究

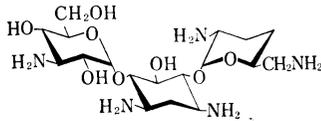
—ゲンタマイシンとの比較—

斎藤 等・井上靖二・伊達敬一・豊田弥八郎
 佐藤文彦・飯田武雄・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

Kanamycin (KM) の誘導体である、新しいアミノ配糖体抗生物質 3',4'-Dideoxykanamycin B (DKB) は KM を不活化する菌に対しても抗菌力を示し、とくに緑膿菌に対する抗菌力が優れていることが知られている。DKB の構造式を Fig. 1 に示した。しかし、従来の KM の聴器毒性から考えて、その誘導体である DKB の臨床使用に際しては、副作用として聴器毒性に充分注意する必要がある。

Fig. 1. Structural formula of DKB



そこで、DKB の聴器毒性の有無に関して、動物実験にて基礎的に検討したので報告する。また、緑膿菌に対してかなり強い抗菌力をもっている Gentamicin (GM) も聴器毒性のあることが知られているが、GM の聴器毒性と DKB のそれとを比較検討した。

II. 実験動物および方法

a. 実験動物および薬剤投与方法

実験動物として体重 260~500 g の健康な Preyer 耳介反射正常域値の赤目のモルモット 26 匹を使用した。10 匹に DKB 200 mg/kg 体重を 10 日間腹腔内に注射し、他の 10 匹に 100 mg/kg 体重の割合で 40 日間大腿に筋注射した。残り 6 匹に GM 100 mg/kg 体重の割合で、プライエル耳介反射消失するまで大腿に筋注射した。26 匹すべて温度調節のある同一動物飼育室にて飼育した。

b. 実験方法

聴器毒性の検討は以下の 3 方法で行なった。3 方法の結果を総括して聴器毒性の有無や程度を判定した。

i) プライエル耳介反射閾値の測定

簡易法と精密法の組合せによつて、日曜を除く毎日測定した。

簡易法としては、リオンの Infant audiometer (TB-

02 型) の 3 kHz, 90 dB と拍手の両者によつた。

精密法としては、0.5, 1, 2, 4, 8 の各 kHz について、薬剤投与前、投与期間中、投与終了後のプライエル耳介反射を 3~4 日に 1 回測定した。精密法の測定はオーディオメーターにスピーカーをつなぎ、一定の実験音場で測定し、便宜上 dB で記録した。ただし、各 Hz について、dB ごとの音圧 (SPL) は測定してあるので音圧レベルに換算できる。

上記の 2 方法によつて聴覚閾値変動の参考とした。

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) および Summating potential (SP) などの蝸牛内電位を記録し、蝸牛内の病変の有無を検討した。刺激は 0.5, 1, 2, 4, 8 kHz の tone burst を closed sound system で負荷した。

iii) 組織化学的検索

蝸牛の感覚有毛細胞の病変の有無を形態 (銀染色およびコハク酸脱水素酵素染色) と代謝活性 (コハク酸脱水素酵素活性) の面から、薬剤投与日数別に検討した。蝸牛内電位を測定した場合の蝸牛も用いて、組織化学的に検索し、両者を総合して聴器毒性の有無を判定した。

a) 銀染色

蝸牛感覚細胞の形態学的変化、とくに有毛細胞の毛の状態をこの方法により検索した。

検索すべき蝸牛の頂回転の骨蝸牛を一部除去したのち、少量の生食水でリンパ液を洗い去り、0.2% の硝酸銀水を正円窓経路で中央階に約 5 ml 注入し灌流する。その後、暗所にて 10% 中性ホルマリンで 1~2 時間固定後、血管条部を除去し、膜蝸牛に褐色の銀反応が現われるまで (約 10 分)、光を当てる。その後再び 10% 中性ホルマリンで暗所にて 24 時間以上固定し、surface preparation 法によつて観察した。

b) コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性

好気代謝の指標として SDH 活性を観察することによつて、感覚細胞の代謝レベルでの障害性の有無を検討した。同時にまた形態的变化も観察できるので便利であ

る。

断頭後直ちに内耳骨胞を取り出し、生食水中で実体顕微鏡下に骨蝸牛の各回転に小孔を開け、あぶみ骨を除去し、ライスネル膜を破つておいて、SDH 反応液 (NA-CHLAS 法) に浸して、37°C で1時間反応させた。次いで10% 中性フォルマリンで1時間以上固定したのち、ラセン器の surface specimen を作成して光学顕微鏡で観察した。

III. 実験成績

1) DKB 200 mg/kg 投与群

連日10日間、腹腔内に注射した。10匹で開始したが、6日目から腎毒性のため次々と死亡し、10日間注射完了したのはわずかに3匹であつて、7匹(70%)が死亡した。生存した3匹につき、前述の3方法で聴器毒性の有無を検討した。

i) プライエル耳介反射 (Table 1)

10匹の体重変動と簡易プライエル耳介反射の変化を

Table 1 に示した。簡易法では、高音障害などの部分障害では不確実となり判定がむづかしい(実験動物 No. 2)。やはり各 Hz での反射を観察しなければならない。全 Hz で scale out の場合に簡易法で (-) となる。耳介反射を経過を追つて観察すると、無くなつた翌日あたりに死亡する例が多かつたが (No. 6, 9, 10), 全身状態が悪くなつても (-) となる可能性が大きいので注意を要するし、また耳介反射だけの聴器障害性の有無の判定は危険である。

生存した3匹 (No. 2, 3, 4) の精密耳介反射は以下のとおりであつた。No. 2 は 0.5, 1, 2 kHz までは正常の下限範囲内であつたが、4, 8 kHz は scale out であつた。No. 3 は全ヘルツ正常範囲内であつた。No. 4 は全ヘルツ scale out であつた。

ii) 電気生理学的検索

実験動物 No. 3 だけ検索した。プライエル反射は正常であつたが、電気生理学的には、蝸牛内電位の EP, SP

Table 1. Variation in body weight and simplified Preyer's auricle reflex in animals receiving 200 mg/kg of DKB intraperitoneally

Day of treatment		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No.											
1	Body weight (g)	300	300	290	260	275	260	230	Died		
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+			
2	Body weight (g)	295	295	290	250	280	280	275	285	275	265
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
3	Body weight (g)	260	260	270	265	285	285	285	295	280	280
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Body weight (g)	270	270	280	260	265	265	265	275	245	235
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Body weight (g)	280	280	230	225	210	Died				
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+					
6	Body weight (g)	330	330	330	290	285	280	275	280	Died	
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	±	-		
7	Body weight (g)	300	300	290	285	270	260	250	250	225	Died
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8	Body weight (g)	330	330	290	270	285	265	280	270	270	Died
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	±	±	
9	Body weight (g)	280	280	270	250	250	Died				
	Preyer's reflex	+	+	+	+	-					
10	Body weight (g)	290	290	285	265	260	265	250	245	Died	
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	-	-		

Preyer's reflex : By Infant audiometer (3 kHz and 90 dB)

+ : Present. - : Absent. ± : Uncertain.

Fig. 2. Cochlear microphonics in Animal No. 3 receiving 200 mg/kg DKB for 10 days. Almost normal CM at 0.5 and 1 kHz; but maximal output of CM diminished at 4 and 8 kHz.

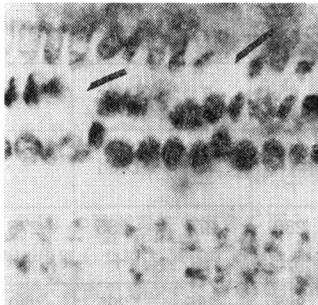
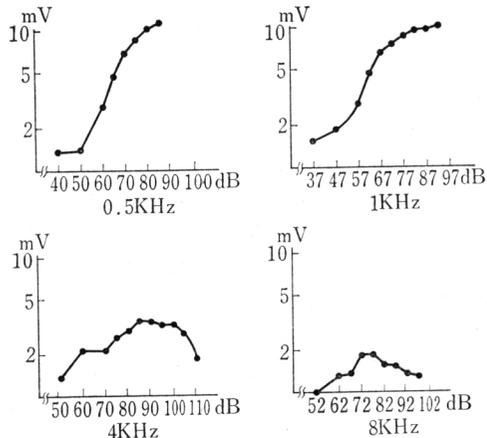


Photo. 1. Basal turn after 10 days' treatment with 200 mg/kg DKB i. p. (Animal No. 2). SDH stain. Arrows indicate disappeared cells. ($\times 120$)

には異常なく、CM は各ヘルツで記録されたが、4, 8 kHz ではその電位の大きさが減少していた (Fig. 2)。

iii) 組織化学的検索

実験動物 No. 2 は SDH 染色を行なった。基底回転では、外有毛細胞の第 2, 第 3 列の消失および SDH 活性の低下が観察され (Photo. 1), 第 2 回転でも、外有毛細胞の第 2 列の消失や膨化が観察され (Photo. 2), 明らかに聴器毒性を示していた。第 3, 第 4 回転では異常を発見できなかった。

実験動物 No. 3 も SDH 染色を行なった。基底回転のフックに近い部分では、ほとんど正常であるが所々有毛細胞の萎縮が観察された (Photo. 3)。第 2 回転では、所々有毛細胞の膨化がみられたが、第 3, 第 4 回転では異常所見はなかった。組織化学像からはほぼ正常といえる。

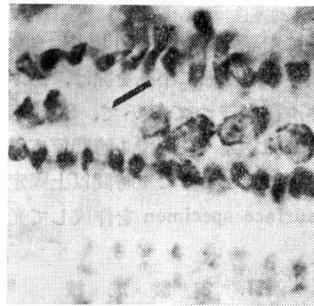


Photo. 2. Second turn after 10 days' treatment with 200 mg/kg DKB i. p. (Animal No. 2). SDH stain. Arrow indicates disappeared cells. ($\times 120$)

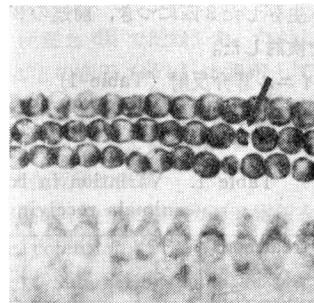


Photo. 3. Basal turn in the vicinity of the hook after 10 days' treatment with 200 mg/kg DKB i. p. (Animal No. 3). SDH stain. Arrow indicates an atrophied cell. ($\times 120$)

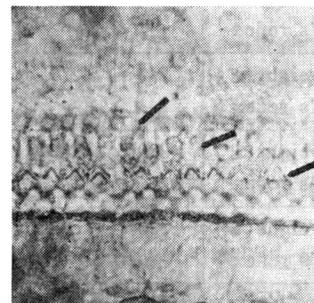


Photo. 4. Basal turn after 10 days' treatment with 200 mg/kg DKB i. p. (Animal No. 4). Silver stain. Arrows indicate degenerated cells without hairs. ($\times 120$)

実験動物 No. 4 は銀染色を行なった。基底回転では、外有毛細胞の第 1, 2, 3 列の変性消失が観察された。とくに毛の消失が顕著であった (Photo. 4)。第 2 回転では、外有毛細胞第 3 列が所々消失していた (Photo. 5)。

iv) 200 mg/kg 投与群の聴器毒性に関する総合判定 (Table 2)

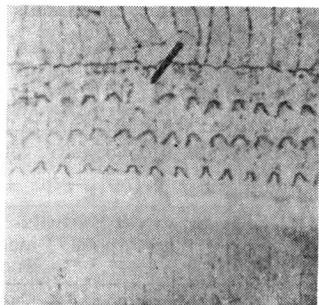


Photo. 5. Second turn after 10 days' treatment with 200 mg/kg DKB i.p. (Animal No. 4). Silver stain. Arrow indicates degenerated cell without hair. ($\times 120$)

前記の i), ii), iii) の3方法の結果をまとめて Table 2 に示した。実験動物 No.2 と No.4 は聴器障害性が明らかに認められた。No.3 は総合的にみると聴器障害性は無しと判定された。すなわち、3匹中2匹(66%)に聴器毒性が認められた。

2) DKB 100 mg/kg 投与群

DKB 100 mg/kg を日曜を除く連日、40日間大腿筋肉内に注射した。10匹で開始し、3匹(30%)が、8日目(No.7)、12日目(No.1)、15日目(No.2)に死亡した。この3匹はすべて体重増加が悪く、DKB 使用前の 84~111% に変化していた。他の7匹は順調に体重増加がみられ、DKB 使用前の 126~177% になっていた。この7匹の動物を下記の各時期に、前記の3方法によつて聴器毒性の有無を検討した。

i) 13日間投与, 14日目検査

実験動物 No.8。体重増加 42%。プライエル耳介反射は精密法で各ヘルツとも正常。電気生理学的にも蝸牛内電位の EP, SP, CM はすべて正常範囲内であつた。組織化学的に SDH 染色では、形態および SDH 活性ともに異常なかつた。総合判定で異常なし。

ii) 19日間投与, 20日目検査

実験動物 No.3。体重増加 42%。プライエル耳介反

射各ヘルツとも正常。電気生理学的にも正常。組織化学的にも形態的にも正常。総合判定で異常なし。

iii) 28日間投与, 29日目検査

実験動物 No.4。体重増加 52%。プライエル耳介反射は各ヘルツとも正常。電気生理学的にも、組織化学的にも正常。総合判定でやはり異常なし。

iv) 34日間投与, 35日目検査

生存中の残り4匹、すなわち実験動物 No.5 (体重増加 45%), No.6 (体重増加 50%), No.9 (体重増加 12%), No.10 (体重増加 44%) の各ヘルツのプライエル耳介反射を測定したところ、すべて正常範囲内であつた。

v) 40日間投与, 41日目検査

実験動物 No.5, 6, 9, 10 のプライエル反射は40日投与でもすべて異常なく、聴器障害性は、いちおうこの時点でも否定された。

vi) 40日間投与, 47日目検査

実験動物 No.9。体重増加 33%。プライエル耳介反射、電気生理、組織化学の3方法によつても、すべて異常はなかつた。

実験動物 No.10 (体重増加 62%) はプライエル耳介反射正常で、組織化学的にも正常であつた。No.10 の SDH 染色による蝸牛各回転の組織像を Photo. 6 に示したが、すべて異常なかつた。なお、No.10 は球形囊、卵形囊、半規管膨大部も組織化学的に異常はなかつた。総合判定として 47日目でも異常がない。

vii) 40日間投与, 55日目検査

実験動物 No.6。体重増加 77%。プライエル耳介反射(精密法)と組織化学的検討で異常はなかつた。

以上のように、DKB 100 mg/kg 体重当りの投与、40日間筋注では聴器毒性は現われなかつた。

3) ゲンタマイシン (GM) 100 mg/kg 投与群

モルモット 6匹に GM を 100 mg/kg 体重の割合で、日曜を除く連日大腿筋肉内に注射した。プライエル反射消失するまで注射し、適当な時期に聴器毒性の有無を観

Table 2. Overall judgement of ototoxicity of DKB given intraperitoneally at a dose of 200 mg/kg for 10 days

Method Animal	Preyer's auricle reflex	Electrophysiological exam.	Histochemical exam.	Overall judgement of ototoxicity
No. 2	Normal at 0.5, 1 and 2 kHz; scaled out at higher levels		Degeneration of hair cells on basal and 2nd turn	(+)
No. 3	Normal	EP and SP normal; CM reduced in size	Almost normal	(-)
No. 4	Scaled out at all levels		Degeneration of hair cells on basal and 2nd turn	(+)

Table 3. Variation in body weight and simplified Preyer's auricle reflex in animals receiving 100 mg/kg gentamicin intramuscularly in thigh

Day of treatment No. of animal		Day of treatment																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	Body weight (g)	500	500	505	520	530	535	530	540	550	550	530	530	515	510	505	505	505	485	465
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	Body weight (g)	500	485	480	500	500	505	510	515	505	485	445	415	395	370	345		Ex-		
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	am-		
3	Body weight (g)	350	340	335	345	340	345	345	330	325	325	305	305	300	295	300				
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-		-	-	-
4	Body weight (g)	370	370	370	380	380	390	405	395	400	400	395	395	385	390	390				
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±		±	-	-
5	Body weight (g)	355	340	345	355	350	370	355	350	340	340	320	320	315						
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	Body weight (g)	330	325	325	330	330	355	340	340	340	330	310	310	320						
	Preyer's reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Preyer's auricle reflex : By Infant audiometer (3 kHz and 90 dB).

+: Present. - : Absent. ± : Uncertain.

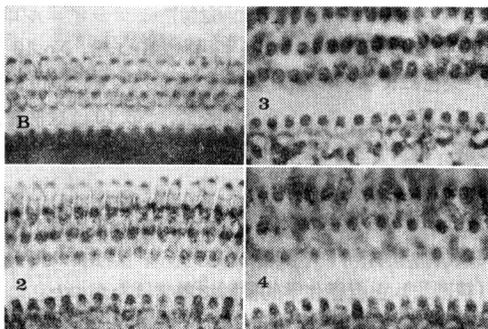


Photo. 6. Histologic picture by cochlear turn in Animal No. 10 on 47 th day after 40 days' treatment with 100 mg/kg DKB. SDH stain. B: basal; 2: 2nd; 3: 3rd; and 4: 4th turn. No abnormality at all turns. (×120)

察した。

i) プライエル耳介反射 (Table 3)

6匹の体重変動と簡易プライエル反射の変化を Table 3 に示した。ほとんどが体重減少を示していた。プライエル反射が消失したら追加注射を中止したため、GM による中毒死はなかつた。投与13日目に始まり19日目で、6匹ともすべてプライエル反射は消失した (Table 3)。

15日間注射、16日目の精密プライエル反射測定では、実験動物 No. 1 は 8 kHz の閾値上昇、No. 2 は全ヘルツ scale out、No. 3 は 2, 4, 8 kHz scale out、No. 4 は 8 kHz で scale out で他のヘルツは閾値上昇、

No. 5 と 6 は全ヘルツ scale out であつた。GM 100 mg/kg の 15 日間筋注でその程度に軽重はあるが、6匹すべてに聴器障害が現われたと考えられる。

ii) 実験動物 No. 2 の観察

GM 100 mg/kg、15 日間注射し、15 日目にプライエル反射消失したもので、17 日目に観察した。体重減少率は 21% であつた。

SDH 染色後、surface preparation 法で両蝸牛の各回転を観察した。

その結果、基底回転での外有毛細胞の障害が最も強く、外有毛細胞 3 列間では第 1 列 > 第 2 列 > 第 3 列の順に障害度が少なかつた。次いで第 2 回転の障害が強く、主として外有毛細胞の第 1 列、第 2 列に障害がみられた。第 3 回転では外有毛細胞第 1 列だけの障害が顕著であり、第 4 回転ではほぼ正常であつた。すなわち、基底回転 > 第 2 回転 > 第 3 回転の順に障害度が少なかつた (Photo. 7)。

前庭器官も同様に SDH 染色後、surface preparation 法で観察したところ、球形囊、卵形囊、半規管膨大部がともに強度に障害されていた。

iii) 実験動物 No. 1 の観察

GM 18 日間注射し、19 日目にプライエル反射消失した。この No. 1 が 6 匹中最も長い間プライエル反射が残っていた例である。プライエル反射消失以後は注射を中止したが、以後も回復はみられず、30 日目に検査した。

精密法によるプライエル反射は全ヘルツ scale out で

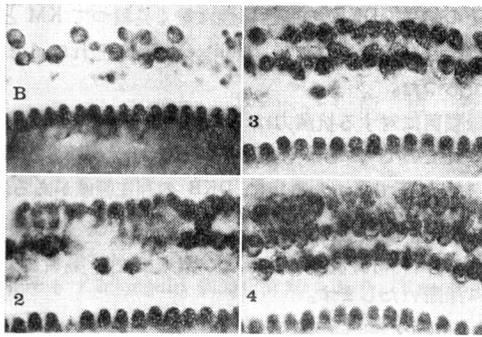


Photo. 7. Histologic pictures by cochlear turn in Animal No. 2 on 17th day after 15 days' treatment with 100 mg/kg GM. SDH stain. B: basal; 2: 2nd; 3: 3rd; and 4: 4th turn. There is evidence of histologic damage on turns from B to 3, with marked disappearance of cells on the first (the lowest) of 3 rows of outer hair cells (upper in each picture). ($\times 120$)

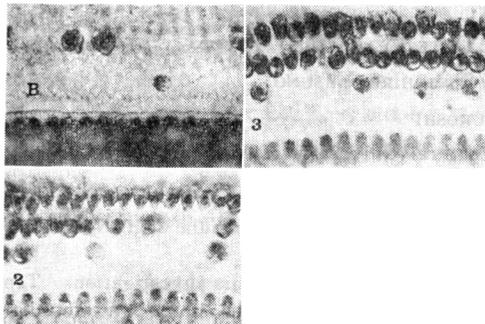


Photo. 8. Histologic pictures of the cochlea from basal (B) to 3rd turns in animal No. 1 on 30th day after 17 days' treatment of 100 mg/kg GM. In this animal, Preyer's reflex persisted for the longest period however hair cells disappeared remarkably. SDH stain. ($\times 120$)

あつた。蝸牛内電位の EP は正常範囲内であつた。CM は 0.5~4 kHz まで電位が取れず反応なしであつた。8 kHz でも CM は反応なしであつたが、SP は最大音圧でわずかに観察された。このことは、外有毛細胞の障害は強いが、内有毛細胞の障害は少ないことを示唆している。

SDH 染色による組織化学的検索では、No. 2 と同様に、基底回転>第 2 回転>第 3 回転の順に外有毛細胞が障害されており、細胞消失が著明であつた。外有毛細胞間では、第 1 列の障害が強く、上方回転にいたるほど第 2, 3 列の障害が少なくなつていたことも No. 2 と同様

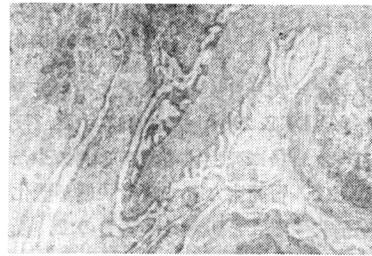


Photo. 9. Electron microscopic picture of glomerular epithelium. Basilar membrane is thickened and glomerular epithelium degenerated. ($\times 3200$)

であつた (Photo. 8)。

本例の腎臓を参考までに観察したところ、尿細管の変性が著明であり、光顕ではほぼ正常と思われた糸球体でも、電顕でみると基底膜の肥厚および糸球体上皮の変性が観察された (Photo. 9)。

IV. 考按および総括

DKB 200 mg/kg, 10 日間の投与では、腎毒性のためか 70% が死亡した。生存した 3 例中 2 例 (66%) に聴器毒性が証明されたので、DKB は副作用として聴器毒性をもっていることは間違いない。

いっぽう、DKB 100 mg/kg, 40 日間投与では聴器毒性は証明されなかつた。

以上の事実と KM と比較してみる。KM 200 mg/kg 投与ではだいたい 20 日目から聴器障害が現われ、100 mg/kg では 90 日間投与でも聴器障害は証明されていない¹⁾。すなわち、100 mg/kg では DKB, KM とともに 40 日目までは聴器に影響はないが、DKB は 200 mg/kg 10 日間で、KM より 10 日早く 66% に聴器毒性が今回の実験で証明された。従がつて、例数の少ないことや腎毒性による全身への影響などを考慮すれば、DKB の聴器毒性は KM と同等か、からく見てそれ以上と考えるべきであろう。

DKB の長所は緑膿菌に対する感受性の強いことである。従がつて、同じ緑膿菌に対して感受性の強い GM の聴器毒性と比較した。その結果、DKB は 100 mg/kg 40 日間投与でも異常なかつたのに対し、GM は 100 mg/kg を 13~19 日間投与しただけで、観察したモルモット 6 匹ともすべて強度の聴器毒性を示していた。従がつて、同一投与量による聴器毒性発現日数の割合から単純に考えると、DKB の聴器毒性は GM のその 1/2 以下といふことができる。従来から耳鼻咽喉科領域では、慢性中耳炎など緑膿菌感染症に悩まされているが、GM やポリミキシン B などはその聴器毒性のために、その使用が制限されていた。ところが DKB は緑膿菌に対して GM とほぼ同等の抗菌力を持つていて、しかもその聴器毒性

がGMの1/2以下ということであるから、その存在価値は大きい。

次に、ブライエル耳介反射で注意すべき事実があった。すなわち、DKB 200 mg/kg 投与中に、反射が消失してから1~2日後に死亡する例が3例あったことである。このことは、腎障害などで全身状態が悪化した場合にも反射が消失することが考えられるので、当然のことながら、聴器毒性の有無の判定はブライエル反射だけでなく、組織学的あるいは電気生理学的な検査によつて、総合的に判定しなければならない。

V. ま と め

Kanamycinの誘導体であるDideoxykanamycin Bの聴器毒性の有無に関して、1) ブライエル耳介反射、2) 蝸牛内電位の記録、3) 形態および組織化学的検索、の3方法によつて、総合的に判定した。

その結果、DKBの聴器毒性は重く見積つてKMと同等かそれ以上であつたが、Gentamicinのその1/2以下であつた。

緑膿菌に対する抗菌力はDKBのほうがGMよりやや優れていて²⁾、しかもその聴器毒性では、DKBがGMの1/2以下であつた事実にはDKBの存在価値がある。

腎臓の電顕標本作成に御協力下さいました守口市松下病院耳鼻科 町野満夫博士および臨床検査部 島村佳央技士に深謝いたします。

文 献

- 1) 堀 克孝, 河本和友: Lividomycinの聴器におよぼす影響について。内耳生化学3: 66~67, 1972
- 2) 新薬シンポジウム“DKB”。第19回日本治療学会東日本支部総会。昭和47年11月10日、於仙台

OTOTOXICITY OF DIDEOXYKANAMYCIN B COMPARED WITH GENTAMICIN

HITOSHI SAITO, YASUJI INOUE, KEICHI DATE, YAHACHIRO TOYODA,

FUMIHIKO SATO, TAKEO IDA, TOMOHIRO YASUNO

and OSAMU MIZUKOSHI

Department of Otolaryngology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Dideoxykanamycin B (DKB) is a derivative of kanamycin with a molecular formula $C_{18}H_{37}N_5O_8$. The ototoxicity of this antibiotic was examined.

Twenty-six healthy guinea pigs with normal Preyer's reflex were used for this investigation. Ten animals were used for intraperitoneal injection of DKB 200 mg/kg/day for 10 days, 10 for intramuscular injection of DKB 100 mg/kg/day for 40 days and 6 for daily intramuscular injection of gentamicin 100 mg/kg/day until getting the loss of Preyer's reflex.

The ototoxicity was investigated by the following methods.

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

The ototoxicity of DKB was almost equally severe as that of kanamycin, although it was about a half of that of gentamicin.