

Tobramycin の聴器毒性について (第2報)

聴器の安全性, 妊娠モルモットと在胎モルモットの聴器の変化

秋吉正豊・佐藤喜一・中田穂出美・奈良哲次

田島たよ子・佐々木和則*・小川幹男*

東京医科歯科大学難治疾患研究所機能病理学部門

* 塩野義製薬株式会社研究所

(昭和 50 年 8 月 11 日受付)

われわれは、既報の「TOB の聴器毒性について (第1報)」において、モルモットについての、(1) 短期間の大量投与実験 (TOB 50, 100 mg/kg/日, GM 40, 100 mg/kg/日, KM 100, 200 mg/kg/日, 4 週間投与)、(2) 長期間の少量投与実験 (TOB 3, 6 mg/kg/日, 90 日間投与)、(3) 妊娠期間中の投与実験 (TOB 50, 100 mg/kg/日, 妊娠前半期, 後半期 4 週間投与) などの成績の一部を報告した¹⁾。今回は、第1報発表後にえられた、TOB の長期間の少量投与実験での内耳の病理組織学的所見と、妊娠期間中の投与実験における、母モルモットと新生モルモットの内耳の病理組織学的所見とについて報告し、これらの場合の TOB の聴器障害について検討を加えてみた。

実験材料および方法

1. 長期間の少量投与実験

Hartley 系白色モルモット (雄, 体重 300~350 g, 7~8 週令) の 3 匹ずつに、TOB を 3 mg/kg/日 と 6 mg/kg/日の投与量で、それぞれ 90 日間連日筋肉内注射した。これらの動物での耳介反射試験の結果については、すでに第1報で報告した。今回はこれらの動物について

の内耳の病理組織学的所見を、第1報で述べた方法に従いがい、各動物の内耳の水平断面でのセロイジン連続切片を作り、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し検索した。

2. 妊娠期間中の投与実験

今回は、第1報で耳介反射試験の成績を報告した下記モルモットについて、同じ方法により内耳の病理組織学的検索を行なった。

(i) TOB 50 mg/kg/日を、妊娠 2 週目から 5 週目まで投与した妊娠モルモット 5 匹と、新生モルモット 15 匹。

(ii) TOB 50 mg/kg/日を、妊娠 7 週目から 10 週目まで投与した妊娠モルモット 9 匹と、新生モルモット 20 匹。

(iii) TOB 100 mg/kg/日を、妊娠 2 週目から 5 週目まで投与した妊娠モルモット 6 匹と、新生モルモット 11 匹。

(iv) TOB 100 mg/kg/日を、妊娠 7 週目から 10 週目まで投与した妊娠モルモット 8 匹と、新生モルモット 18 匹。

Table 1 Incidence of ototoxic damage in guinea pigs received TOB 3 mg/kg for 90 days, I. M.

No.	Incidence & frequency range of pinna reflex loss (20~0.5 kHz)	Incidence of histopathologic changes in inner ears				
		Damage of cochlea in extent from basal end to apex			Damage of cristae & maculae	
		Loss of outer hair cell	Loss of spiral ganglion cells	Loss of str. vas.	Loss of hair cells	Loss of vest. ganglion cells
3	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)

Table 2 Incidence of ototoxic damage in guinea pigs received TOB 6 mg/kg for 90 days, I. M.

No.	Incidence & frequency range of pinna reflex loss (20~0.5 kHz)	Incidence of histopathologic changes in inner ears				
		Damage of cochlea in extent from basal end to apex			Damage of cristae & maculae	
		Loss of outer hair cells	Loss of spiral ganglion cells	Loss of str. vas.	Loss of hair cells	Loss of vest. ganglion cells
3	0% (0/3)	0% (0/3)	100% (3/3) (in 4 P)	100% (3/3) (in 4 P)	0% (0/3)	0% (0/3)

実験結果

1. 長期間の少量投与実験

最高 20 kHz から最低 0.5 kHz までの周波数域で行なった周波数別耳介反射試験の成績はすでに第 1 報に報告してあるが、3 mg/kg/日、6 mg/kg/日投与群ともに耳介反射消失は、いずれの周波数においても起らなかった。今回行なった内耳の連続切片による病理組織学的検査の結果を Table 1, Table 2 に示した。

1) TOB 3 mg/kg/日を 90 日間連日筋肉内注射した場合 (Table 1)

3 匹のモルモットの、蝸牛の 1 回転下端部から頂回転上端部までの蝸牛管では、ラセン器には外有毛細胞の消失も、内有毛細胞の消失も認められなかった (Fig. 1, 2)。

また、ラセン器に関係をもつラセン神経節およびその末梢神経線維にも減少はみられなかった。さらに、血管条も生理的に欠如の起る頂回転を除く、1 回転下端部か

Fig. 1 Left cochlea without any remarkable change in guinea pig received TOB 3 mg/kg/day for 90 days. $\times 50$. 3 A: anterior portion of third turn, 3 P: posterior portion of third turn, 4 A: anterior portion of fourth turn, 4 P: posterior portion of fourth turn.

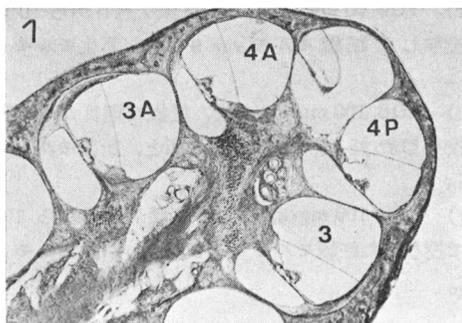
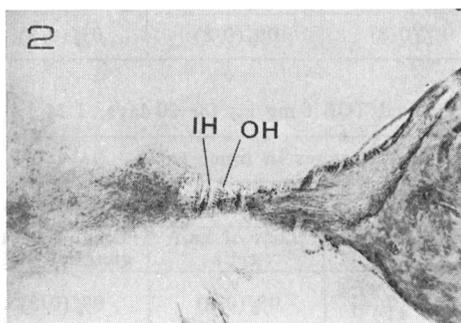


Fig. 2 Spiral organ consisting of normal inner hair cells (IH), outer hair cells (OH) and supporting cells at the basal end of the cochlea in the same guinea pig as in Fig. 1. $\times 120$



4 回転後半部まで存在していた。いっぽう、前庭器の半規管膨大部稜および斑にも、明らかな有毛細胞の消失はみられなかったし (Fig. 3, 4), それらに関連している前庭神経節にも、神経細胞ならびに末梢神経線維の減少は認められなかった。

Fig. 3 Normal crista ampullaris lateralis in the same guinea pig as in Fig. 1, 2. $\times 120$

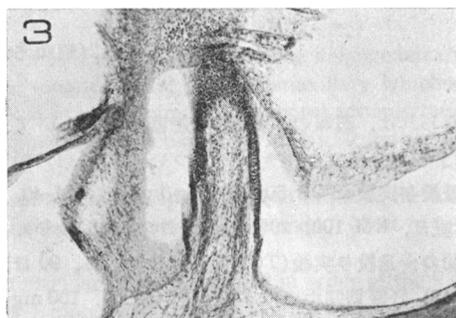


Fig. 4 Normal macula utriculi in the same guinea pig as in Fig. 1, 2, 3. $\times 120$

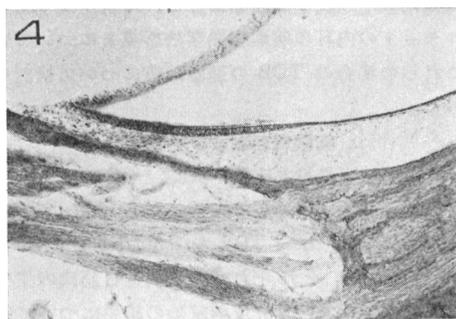
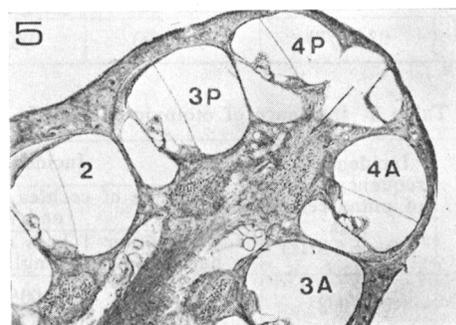


Fig. 5 Decrease in number of spiral ganglion cells and their dendrites (arrow) relating to regional spiral organ with normal cellular architecture in posterior portion of fourth turn (4P) of the cochlea in guinea pig received TOB 6 mg/kg/day for 90 days. $\times 50$



2) TOB 6 mg/kg/日を 90 日間連日筋肉内注射した場合 (Table 2)

3 匹のモルモットの、蝸牛の 1 回転下端部から頂回転上端部までの蝸牛管では、ラセン器には外有毛細胞の消失も、内有毛細胞の消失も認められなかった (Fig. 5, 6)。しかし、ラセン神経節には、4 回転後半部において著しい神経細胞の減少と、それらの末梢神経線維の明らかな減少とが認められた (Fig. 5)。この部分の神経線維と関連しているラセン器には、外有毛細胞も内有毛細胞も存在していて、細胞体の消失はみられなかった。また、血管条では、生理的には存在しているはずの 4 回転後半部には、部分的または完全な消失が 3 匹全例に認められた。その他の回転では、ラセン神経節および血管条に著変はなかった。前庭器の半規管膨大部後および斑には、有毛細胞の明らかな消失は認められなかった (Fig. 7)。また、前庭神経節にも神経細胞の減少はみられなかった。

2. 妊娠期間中の投与実験

妊娠期間中の TOB 投与による聴覚への影響については、妊娠モルモットと新生モルモットの、最高 20 kHz から最低 0.5 kHz までの周波数域で行なった、周波数別耳介反射試験の成績を第 1 報で報告した。その耳介反

射消失の周波数域と、今回行なった内耳の病理組織学的変化とを対比して Table 3~6 に表示した。

1) TOB 50 mg/kg/日、妊娠前半期投与実験 (Table 3)

TOB 50 mg/kg/日を、妊娠前半期の 2 週目から 5 週目までの 4 週間投与した 5 匹の妊娠モルモットと、それから生れた 15 匹の新生モルモットでは、耳介反射消失はいずれの動物にも起こらなかった。

今回行なった、上記の母モルモットおよび新生モルモットの、内耳の連続切片による病理組織学的検索では、母モルモット 5 匹の蝸牛の 1 回転下端部から頂回転上端部までの蝸牛管で、ラセン器の 1 回転下端部に局限した外有毛細胞だけの消失が片耳性に 2 例にみられたが、そのほかには外有毛細胞の消失も内有毛細胞の消失も認められなかった。ラセン神経節とその末梢神経線維には、いずれの回転においても数の減少はみられなかった。血管条については、生理的に存在する 34 回転後半部の血管条の萎縮が、1 例に認められた以外には著変はなかった。いっぽう、前庭器においては、半規管膨大部後にも斑にも有毛細胞の明らかな消失はみられなかった。また、前庭神経節にも数の減少はなかった。

次に、新生モルモットの内耳では、蝸牛管の 4 回転後

Fig. 6 Spiral organ consisting of normal inner hair cells (IH), outer hair cells (OH) and supporting cells at the basal end of the cochlea in the same guinea pig as in Fig. 5. $\times 120$

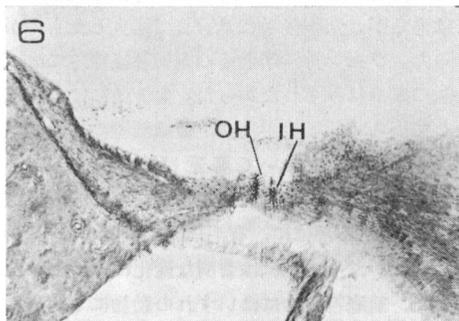


Fig. 7 Formal crista ampullaris lateralis in guinea pig received TOB 6 mg/kg/day for 90 days. $\times 120$

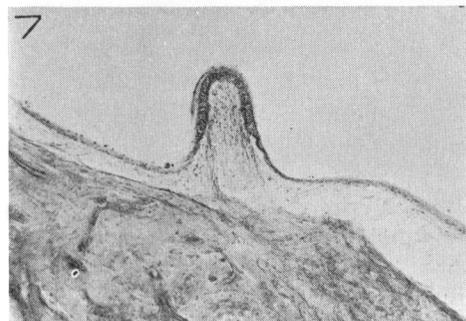


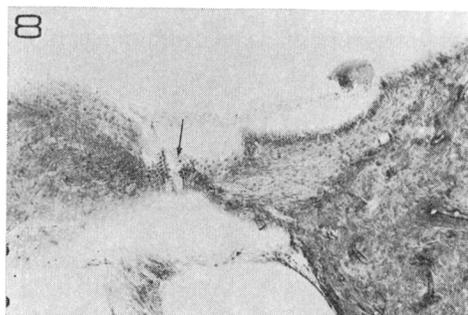
Table 3 Incidence of ototoxic damage in intramuscular administration of TOB 50 mg/kg to pregnant guinea pigs during period from 2 to 5 weeks of gestation

No.	Incidence & frequency range of pinna reflex loss (20~0.5 kHz)	Incidence of histopathologic changes in inner ears				
		Damage of cochlea in extent from basal end to apex			Damage of cristae & maculae	
		Loss of outer hair cells	Loss of spiral ganglion cells	Loss of str. vas.	Loss of hair cells	Loss of vestib. ganglion cells
Mother guinea pigs (5)	0% (0/5)	40% (2/5) (in BE uni)	0% (0/5)	13% (2/15) (in 4 P)	0% (0/15)	0% (0/5)
Newborn guinea pigs (2 wks old) (15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	20% (1/5) (in 4 P)	0% (0/5)	0% (0/15)

Table 4 Incidence of ototoxic damage in intramuscular administration of TOB 50 mg/kg to pregnant guinea pigs during period from 7 to 10 weeks of gestation

No.	Incidence & frequency range of pinna reflex loss (20~0.5 kHz)		Incidence of histopathologic changes in inner ears					
			Damage of cochlea in extent from basal end to apex			Damage of cristae & maculae		
			Loss of outer hair cells	Loss of spiral ganglion cells	Loss of str. vas.	Loss of hair cells	Loss of vest. ganglion cells	
Mother guinea pigs (9)	20 kHz	1	BE	1	0	0	0	0
	20 kHz	1	BE-HL(150 μ)	1	0	0	+	0
	20 kHz	1	BE-HL	1	0	±	0	0
	20~15 kHz	1	BE	1	0	0	0	0
	20~15 kHz	1	BE-HU(1000 μ)	1	0	0	0	0
	20~2, 0.5 kHz	1	BE-HL, 3/4~21/4, 23/4	1	0	±	0	0
	positive reflex		BE	1	0	0	0	0
	positive reflex	0			0	0	0	0
	positive reflex	0			0	±	0	0
	66%(6/9)		77%(7/9)	0%(0/9)	33%(3/9)	11%(1/9)	0%(0/9)	
Newborn guinea pigs (2 wks old) (20)	0%(0/20)		10%(2/20) (in BE uni)	0%(0/20)	35%(7/20) (in 4 P)	0%(0/20)	0%(0/20)	

Fig. 8 Outer hair cell loss (arrow) of spiral organ at the basal end of the cochlea in mother guinea pig received TOB 50 mg/kg/day for 21 days in later half period of gestation. ×120



半部に血管条の消失をきたしたものが2例あった以外には、ラセン器の有毛細胞にも、ラセン神経節にも、また、前庭器の有毛細胞および前庭神経節にも、細胞の消失または明らかな減少は、1例もみられなかった。

2) TOB 50 mg/kg/日、妊娠後半期投与実験 (Table 4)

TOB 50 mg/kg/日を、妊娠後半期の7週目から10目までの4週間投与した9匹の妊娠モルモットと、それから生れた20匹の新生モルモットについて、Table 4に示した。

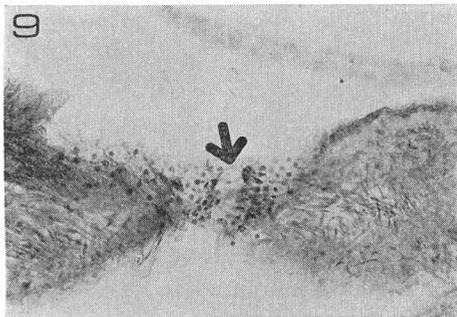
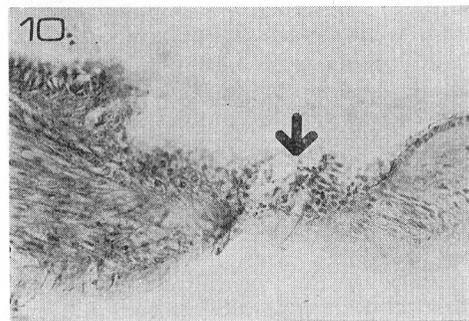
今回の内耳の病理組織学的所見では、まず母モルモット

トについてみると、蝸牛管では、ラセン器の外有毛細胞の消失が9匹中7匹(77%)に認められ、その消失範囲は1回転下端部(BE)に限局したものが3例に、Hookの下部(HL)まで拡大したものが2例、Hookの上部(HU)まで拡大したものが1例(Fig. 8)、下端部から不連続ではあるが2回転後半(2 3/4)まで拡大したものが1例であった。ラセン神経節とその末梢神経線維には、明らかな数の減少はみられなかった。血管条には、生理的に存在している4回転後半部に、辺縁細胞の部分的消失が3例にみられたのを除いて著変はなかった。いっぽう、前庭器では、半規管膨大部稜の頂部と卵形囊斑のstriolaに相当する部位に、有毛細胞の軽度の減少が1例にみられたが、その他には著明な変化は認められなかった。また、前庭神経節にはいずれの動物にも明らかな減少はみられなかった。

次に、20匹の新生モルモットについてみると、ラセン器の外有毛細胞の消失が1回転下端部に限局して片耳性にみられた2例(Fig. 9, 10)を除いて、外有毛細胞の消失をきたしたものはなかった。上述の2例は、周波数別耳介反射試験では、耳介反射消失はいずれの周波数においても認められなかった。また、ラセン神経節とその末梢神経線維には著変はなかった。血管条では、生理的に存在する4回転後半部に辺縁細胞の消失を示したものが7例(35%)あった。いっぽう、前庭器にあっては、半規管膨大部稜の頂部にも、卵形囊斑のstriolaに相当

Table 5 Incidence of ototoxic damage in intramuscular administration of TOB 100 mg/kg to pregnant guinea pigs during period from 2 to 5 weeks of gestation

No.	Incidence & frequency range of pinna reflex loss (20~0.5 kHz)		Incidence of histopathologic changes in inner ears					
			Damage of cochlea in extent from basal end to apex			Damage of cristae & maculae		
			Loss of outer hair cells	Loss of spiral ganglion cells	Loss of str. vas.	Loss of hair cells	Loss of vest. ganglion cells	
Mother guinea pigs (6)	20~15 kHz	1	BE-HL	1	0	+(4P)	+	0
	20~15 kHz	1	BE-1/4	1	0	0	+	0
	20~15 kHz (otit. med.)		BE-1/4	1	0	0	+	0
	20~15, 3~0.5 kHz	1	BE-1/4	1	0	0	0	0
	20~1 kHz	1	BE-2P	1	0	0	?	0
	20~1 kHz	1	BE-1/4	1	0	0	+	0
	100% (6/6)		100% (6/6)		0% (0/6)	16% (1/6)	66% (4/6)	0% (0/6)
Newborn guinea pigs (2 wks old) (11)		0% (0/11)		0% (0/11)		0% (0/11)		0% (0/11)

Fig. 9 Unilateral outer hair cell loss (arrow) of spiral organ at the basal end of the cochlea in newborn guinea pig born of pregnant guinea pig received TOB 50 mg/kg/day for 26 days in later half period of gestation. $\times 300$ Fig. 10 Unilateral outer hair cell loss (arrow) of spiral organ at the basal end of the cochlea in newborn guinea pig born of pregnant guinea pig received TOB 50 mg/kg/day for 21 days in later half period of gestation. $\times 300$ 

する部位にも、明らかな有毛細胞の消失はみられなかった。また、前庭神経節にも減少はなかった。

3) TOB 100 mg/kg/日, 妊娠前半期投与実験 (Table 5)

TOB 100 mg/kg/日を, 妊娠前半期の2週目から5週目までの4週間投与した6匹の妊娠モルモットと, それから生れた11匹の新生モルモットについて Table 5 に示した。

まず母モルモットの内耳の病理組織学的所見についてみると, 蝸牛管では, ラセン器の外有毛細胞の消失が100%にみられており, 消失の範囲は, 1回転下端部 (BE) から Hook 下部 (HL) までのもの1例 (Fig. 11), 1回転前半部 (1/4) まで拡大していたもの4例 (Fig. 12, 13), 1回転下端部から2回転後半部 (2P) まで拡大していたものが1例であった。しかし, ラセン神経節とそ

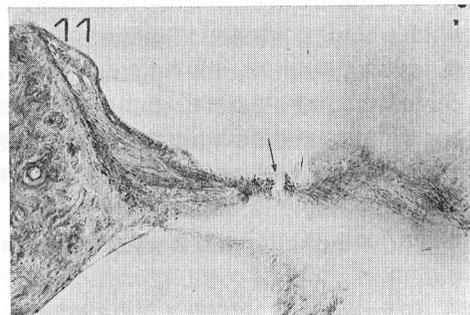
Fig. 11 Outer hair cell loss (arrow) of spiral organ at the basal end of the cochlea in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in early half period of gestation. $\times 120$ 

Fig. 12 Outer hair cell loss (arrow) of spiral organ involving the basal end (1B) and anterior portion of first turn (1A) in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in early half period of gestation. $\times 7$

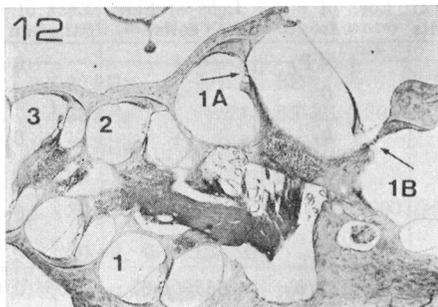
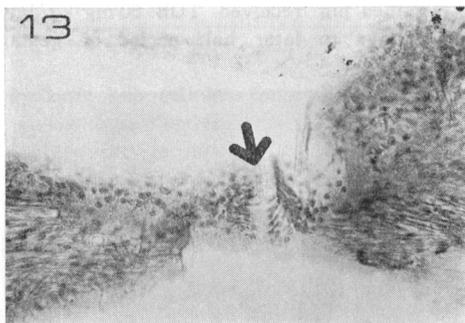


Fig. 13 Outer hair cell loss (arrow) of spiral organ at the basal end of the cochlea in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in early half period of gestation. $\times 300$



の末梢神経線維には明らかな減少は1例もみられなかった。血管条には、4回転後半部で辺縁細胞の消失をきたしたものが1例あったが、その他のものには著変はみられなかった。いっぽう、前庭器においては、半規管膨大部稜の中央部にあたる頂部 (Fig. 14) と、卵形囊斑の striola に相当する部位 (Fig. 15, 16) とに、それぞれ有毛細胞の消失をきたしたものが6匹中4例 (66%) にみられた。しかし、前庭神経節には著変はなかった。

次に、これらの母モルモットから生れた新生モルモットについてみると、蝸牛管のラセン器、ラセン神経節、血管条にも、また、前庭器の半規管膨大部稜および斑、さらに前庭神経節のいずれの部位にも著変を示したものは、1例もなかった。

4) TOB 100 mg/kg/日、妊娠後半期投与実験 (Table 6)

TOB 100 mg/kg/日を、妊娠後半期の7週目から 10

Fig. 14 Hair cell loss (arrow) of crista ampullaris in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in early half period of gestation. $\times 300$

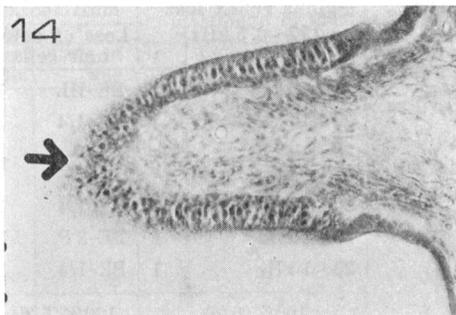
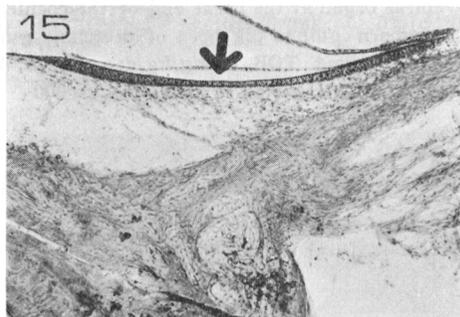


Fig. 15 Hair cell loss (arrow) in striola of utricular macula in guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in early half period of gestation. $\times 120$

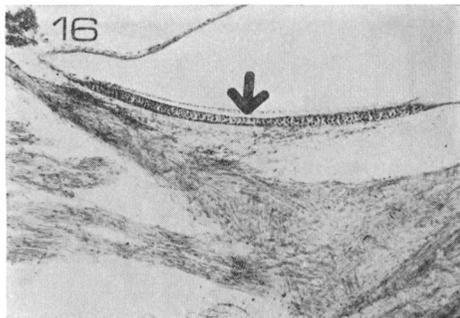


週目までの4週間投与した8匹の妊娠モルモットと、それから生れた18匹の新生モルモットについて Table 6 に示した。

まず母モルモットの内耳の病理組織学的所見についてみると、蝸牛管では、ラセン器の外有毛細胞の消失が100%にみられており、その消失範囲は1回転下端部に限局した部分的有毛細胞消失が1例、1回転前半部 (1/4) まで拡がったもの2例、それ以外はすべて連続的あるいは不連続的に、下端部から2回転後半部 (2P) (Fig. 17, 18) あるいはそれ以上にわたる広範な有毛細胞の消失をきたしていた。しかし、ラセン神経節とその末梢神経線維には、明らかな減少はなかった。血管条については、4回転後半部で辺縁細胞の消失をきたしたものが5例 (62%) にみられた以外には著変はなかった。いっぽう、前庭器においては、半規管膨大部稜の中央部にあたる頂部 (Fig. 19) および卵形囊斑の striola にあたる部位 (Fig. 20, 21) に、有毛細胞の消失が100%にみられた。しかし、これらの前庭神経節には、明らかな

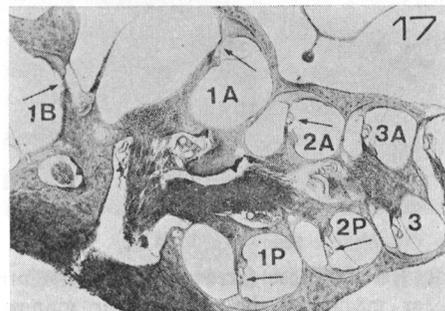
Table 6 Incidence of ototoxic damage in intramuscular administration of TOB 100 mg/kg to pregnant guinea pigs during period from 7 to 10 weeks of gestation

No.	Incidence & frequency range of pinna reflex loss (20~0.5 kHz)		Incidence of histopathologic changes in inner ears					
			Damage of cochlea in extent from basal end to apex			Damage of cristae & maculae		
			Loss of outer hair cells	Loss of spiral ganglion cells	Loss of str. vas.	Loss of hair cells	Loss of vest. ganglion cells	
Mother guinea pigs (8)	20~15 kHz	1	BE-1/4	1	0	+ (4 P)	+	0
	20~6, 1~0.5 kHz	1	BE-1/4, 21/4-Ap	1	0	+ (4 P)	+	0
	20~2 kHz	1	HL-3 P	1	0	+ (4 P)	+	0
	20~1 kHz	1	BE-3 P	1	0	0	+	0
	20~0.5 kHz	1	BE-2 P	1	0	+ (4 P)	+	0
	20~0.5 kHz	1	BE-2 P	1	0	0	+	0
	?		BE-1/4	1	0	0	+	0
	positive reflex		BE(partial loss)		0	+ (4 P)	±	0
	87% (7/8)		100% (8/8)	0% (0/8)	62% (5/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	
Newborn guinea pigs (2 wks old) (18)	20 kHz	1	BE(uni)	2	0	+4 P	0	0
	5% (1/18)		11% (2/18)		0% (0/18)	22% (4/18)	0% (0/18)	0% (0/18)

Fig. 16 Hair cell loss (arrow) of utricular macula in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in early half period of gestation. $\times 120$ 

減少は1例も認められなかった。

次に、これらの母モルモットから生れた新生モルモットについてみると、蝸牛管では、ラセン器の外有毛細胞の消失 (Fig. 22, 23) が、1回転下端部に局限して、片耳性に2例 (11%) で認められたほかは、外有毛細胞と内毛細胞の消失は残りのどの動物にもみられなかった (Fig. 24)。ラセン神経節とその末梢神経線維にも明らかな減少はなかった。しかし、血管条では、4回転後半部に辺縁細胞の消失をきたしたものが4例 (22%) にみられた。残りの動物では、血管条に著変は認められなかった。前庭器においては、半規管膨大部稜の頂部にも、卵形囊斑の striola にも明らかな有毛細胞の消失は認められなかった (Fig. 25, 26)。また、前庭神経節にも明

Fig. 17 Extensive outer hair cell loss (arrows) of spiral organ involving the basal end (1B), anterior portion (1A) and posterior one (1P) of first turn, anterior portion (2A) and posterior one (2P) of second turn of the cochlea in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in later half period of gestation. $\times 7$ 

かな減少は認められなかった。

以上の妊娠期間中の投与実験を小括してみると、TOBを 50 mg/kg/日あるいは 100 mg/kg/日の投与量で、妊娠モルモットに 28日間投与した場合の母モルモットの聴器に対する障害を、それぞれの同じ投与量レベルと比較すると、妊娠前半期 (2週目から5週目まで) に投与した場合よりも、妊娠後半期 (7週目から10週目まで) に投与した場合のほうが強く現われることが、耳介反射消失の周波数の拡がりからも、また、内耳の蝸牛管ラセン器の外有毛細胞の消失の拡がりからも明らかにされ

た。また、妊娠後半期投与の母モルモットでは、前庭器の半規管膨大部稜の頂部と卵形囊斑の striola に相当する部位に有毛細胞の消失が認められた。このような前庭器の有毛細胞の消失は、100 mg/kg/日の投与量を妊娠後半期に 28 日間～14 日間投与した 8 匹の全例に現われて

Fig. 18 Outer hair cell loss (arrow) of spiral organ at the basal end of the cochlea in the same mother guinea pig as in Fig. 17. $\times 300$

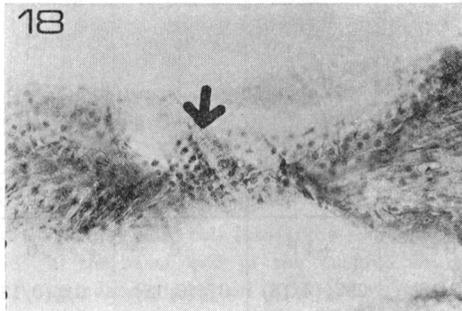


Fig. 19 Hair cell loss (arrow) of crista ampullaris lateralis in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in later half period of gestation. $\times 300$

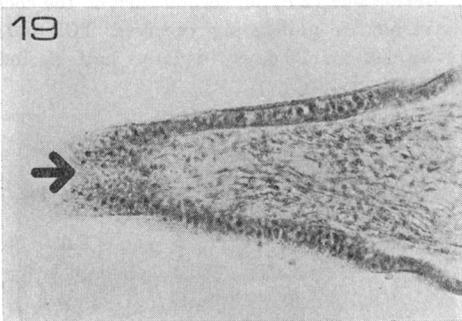
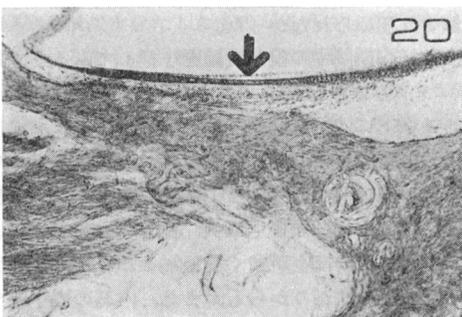


Fig. 20 Hair cell loss (arrow) of striola of utricular macula in the same mother guinea pig as in Fig. 19. $\times 120$



いた。なお、第 1 報に報告したように、非妊娠幼若モルモットに TOB 100 mg/kg/日を 28 日間筋肉内注射した場合には、前庭器には明らかな有毛細胞の消失は認めら

Fig. 21 Hair cell loss (arrow) of striola of utricular macula in mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in later half period of gestation. $\times 120$

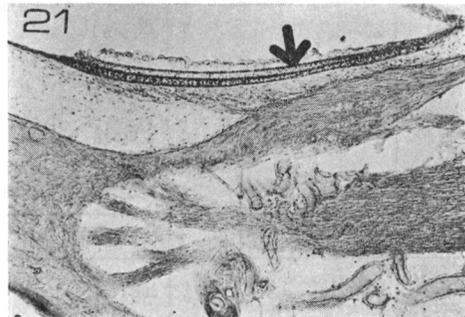


Fig. 22 Well differentiated ear in 2 weeks old newborn guinea pig born of mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 24 days in later half period of gestation. Unilateral outer hair cell loss (arrow) confined to the basal end of the cochlea. $\times 7$

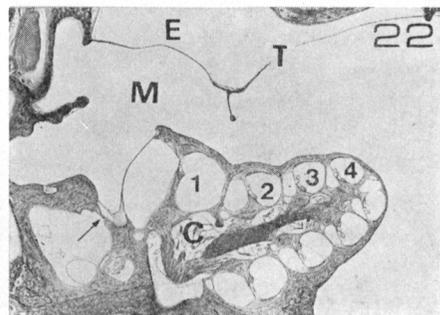
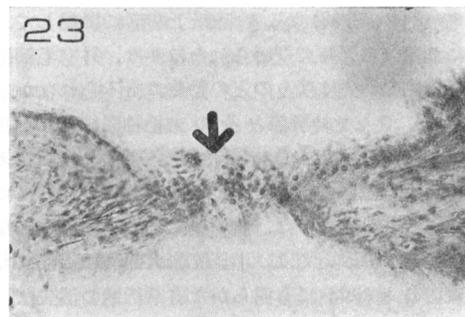


Fig. 23 Unilateral outer hair cell loss (arrow) confined to the basal end of cochlea in the same newborn guinea pig as in Fig. 22. $\times 300$



れなかった。

次に、上記の妊娠モルモットから生れた新生モルモットの聴器に起きた障害についてみると、周波数別耳介反射試験において、TOB 50 mg/kg/日を投与された母モ

Fig. 24 Normal spiral organ with inner hair cell (IH) and outer hair cells (OH) of the basal end of cochlea in newborn guinea pig born of mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in later half period of gestation. $\times 300$

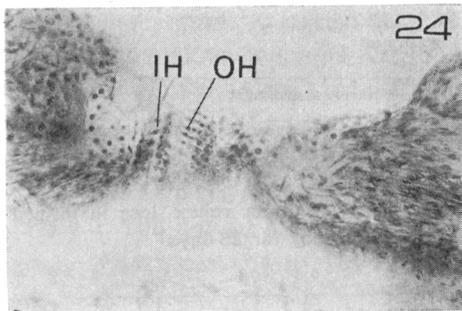


Fig. 25 Normal crista ampullaris lateralis in newborn guinea pig born of mother guinea pig received TOB 100 mg/kg/day for 28 days in later half period of gestation. $\times 300$

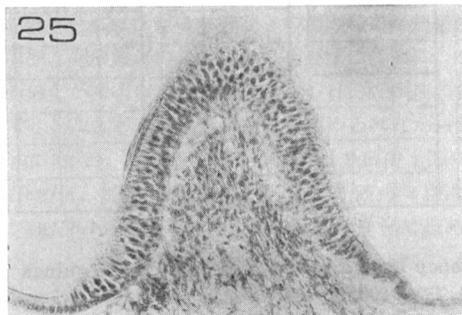
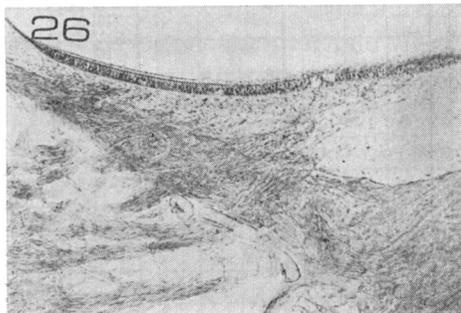


Fig. 26 Almost normal utricular macula in the same newborn guinea pig as in Fig. 25. $\times 120$



ルモット 14 匹では、耳介反射消失頻度は 42%(6/14 匹)であったが、新生モルモット 35 匹では 0% であった。また、TOB 100 mg/kg/日を投与された母モルモット 14 匹では、耳介反射消失頻度は 92%(13/14 匹)であるのにかたし、新生モルモット 29 匹では 3%(1/29 匹)であった。このような聴器障害の差異は、耳介反射消失頻度のうえで認められるばかりでなく、耳介反射消失の周波数の拡がりからも認められていて、新生モルモットの耳介反射消失は、最高周波数の 20 kHz に限局していた。内耳の病理組織学的検索のうえからみると、新生モルモットの内耳障害としては、妊娠前半期に 28 日間、TOB 50 mg/kg/日あるいは 100 mg/kg/日をそれぞれ投与した妊娠モルモットから生れた新生モルモット 26 匹には、1 例もラセン器および前庭器の有毛細胞の消失をきたしたものはなかった。いっぽう、妊娠後半期に、TOB 50 mg/kg/日あるいは 100 mg/kg/日をそれぞれ 28 日～14 日間投与した妊娠モルモット 17 匹から生れた新生モルモット 38 匹では、蝸牛管のラセン器の外有毛細胞の 1 回転下端部に限局した消失が、片耳性に 10%(4/38 匹)に認められた。これら新生モルモットの内耳の障害は、母モルモットに比較すると、頻度のうえでも、障害の拡がりのうえでも著明な差異があって、母モルモットにおける内耳障害よりもはるかに軽いことが明らかにされた。

今回の実験条件では、内耳の前庭器やラセン器の発生期にあたる妊娠前半期に、TOB を 28 日間投与した場合の新生モルモットの内耳には、前庭器およびラセン器に奇形や異常はみられなかった。新生モルモットの内耳のラセン器の外有毛細胞の消失は、妊娠前半期に投与された母モルモットから生れた新生モルモットにはみられないで、妊娠後半期に投与をうけた母モルモットから生れた新生モルモットだけにみられた。

考 案

1. 長期間の少量投与時における TOB の聴器に対する影響

TOB の臨床試験推奨用量に相当する 3 mg/kg/日と、その倍量の 6 mg/kg/日とをそれぞれ 90 日間筋肉内投与したモルモットでは、20 kHz から 0.5 kHz までの周波数別耳介反射試験で、いずれの周波数にも耳介反射消失は認められていない。また、これらのモルモットの内耳の病理組織学的検索でも、ラセン器には外有毛細胞の消失も、内有毛細胞の消失もみられなかった。ただ、TOB 6 mg/kg/日を 90 日間投与したモルモットの蝸牛の 4 回転後半部のラセン神経節と、その樹状突起にかなり著しい数の減少が 3 匹全例にみられた。しかし、これらのモルモットでは、上記部位に関連ある 1 kHz と 0.5

kHzの低周波数での耳介反射は、いずれも陽性を示して聴覚障害は認めなかった。以上の蝸牛4回転後半部における、ラセン器の有毛細胞の消失を伴わないラセン神経節の減少は、一般に、アミノ配糖体系抗生物質の短期間の大量投与実験の場合にみられる、ラセン器の有毛細胞の消失に続発するラセン神経節の萎縮とはかなり異なっていた。また、ラセン神経節だけのこのような変化は、TOBの50 mg/kg/日あるいは100 mg/kg/日を4週間投与した場合のモルモットでは認められなかったので、はたして抗生物質の長期投与による1次的障害であるかどうかについて、今後さらに検討を加えるべきことと考えられる。

抗生物質の臨床投与量の聴器に対する安全性を、動物試験レベルで正確に評価することは、現状ではまだ困難であって、検討を要する問題が残されている。モルモットとヒトとのラセン器の有毛細胞の耳毒性抗生物質に対する感受性の差異や、有毛細胞の障害の起こりかたの差異は、まだ充分明らかにはされていないので、今回の動物試験の結果から、ただちにTOBの臨床試験推奨用量の聴器に対する安全性を評価するには慎重でなければならない。しかし、モルモットでの耳介反射試験および内耳の組織学的所見でみる限りでは、3 mg/kg/日の投与量では90日間投与した場合でも聴力障害はみられず、安全性は高いと評価できる。

2. 妊娠モルモットにおけるTOBの聴器におよぼす影響

モルモットにおける妊娠期間はだいたい10週間、すなわち70日前後である。TOBの妊娠モルモットの聴器に対する影響を、妊娠前半期に投与した場合と妊娠後半期に投与した場合に分けて考えてみると、妊娠後半期に投与した場合のほうが、耳介反射消失の頻度と拡がりからみても、内耳の蝸牛管ラセン器の外有毛細胞の消失の拡がりからみても、障害を受けやすいことが明らかにされた。

この点についてRHODES(1970)²⁾は、ヒトでは妊娠中に母体に水分の増加が起り、この増加は妊娠40週では20週の5倍近

Table 7 Correlation between frequency ranges in human audiometry and in differential frequency pinna reflex test in guinea pig

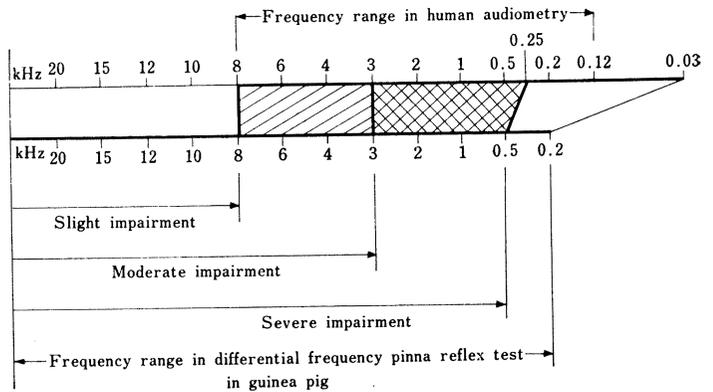


Table 8 Frequency range of pinna reflex loss in guinea pigs received TOB 50 mg/kg for 28 days

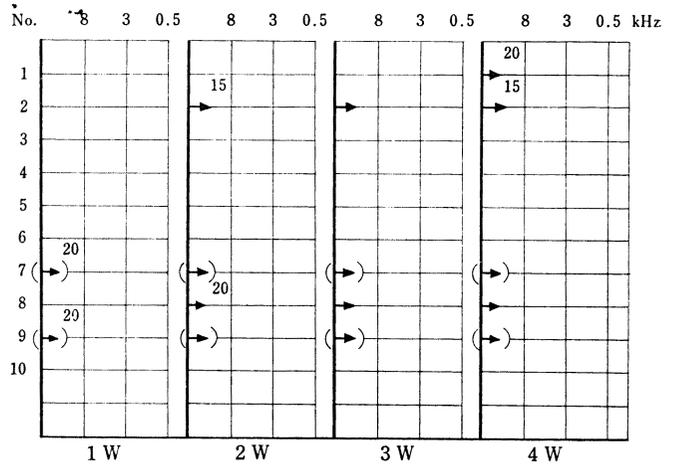
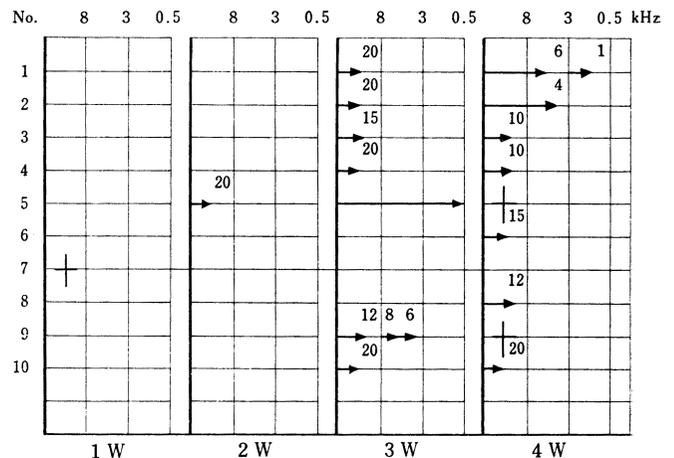


Table 9 Frequency range of pinna reflex loss in guinea pigs received TOB 100 mg/kg for 28 days



くになること、妊娠中には母体の血漿蛋白が減少し、そのために血液の浸透圧が低下し、母体内の組織液の増加をきたすことを述べている。妊娠モルモットにおいても、同じように母モルモット内に組織液の停滞が増加するために、内耳液へ移行した抗生物質が血液へもどりにくくなり、強い聴器障害が起こされたものと考えられる。このような妊娠の前半期と後半期とに投与した場合の TOB の聴器毒性の現われかたの差異は、後に述べるように、それぞれの時期の投与群の妊娠モルモットから生れた新生モルモットの内耳の障害の現われかたにも影響を与えていた。すなわち、妊娠後半期に投与された TOB は、母体の聴器に強い障害を与えるだけでなく、同時に在胎モルモットの内耳に対しても、軽度ではあっても障害を起しうること示すものであろう。このような妊娠後半期に抗生物質の聴器毒性が増強されることについては、これまで検討されていなかったことであるが、妊娠中に TOB を投与する場合、とくに大量投与の場合には、聴器障害について充分注意する必要がある。

いっぽう、前庭器の障害をみとみると第 1 報で報告したように、非妊娠モルモットに TOB 50 mg/kg/日、100 mg/kg/日を 28 日間投与した場合には、前庭器には明らかな有毛細胞の消失は認められなかった。しかし、妊娠中に TOB 50 mg/kg/日、100 mg/kg/日を 28 日間投与した場合には、母モルモットの前庭器の半規管膨大部稜頂部と卵形囊斑の striola に相当する部位に、有毛細胞の消失が認められた。50 mg/kg/日、妊娠前半期投与群では 5 匹とも有毛細胞の消失は認められなかったが、50 mg/kg/日、妊娠後半期投与群では 9 匹中 1 匹に、100 mg/kg/日、妊娠前半期投与群では 6 匹中 4 匹に、100 mg/kg/日、妊娠後半期投与群では 8 匹全例に認められていた。これらの前庭器の有毛細胞の消失は、比較的軽度であったためか、明らかな平衡機能障害を認めることはできなかったが、妊娠という生理的環境の変化によって、TOB が前庭器に対しても障害を起しうること示した点で注意すべきであろう。モルモットにおける妊娠中の母体および在胎モルモットの聴器におよぼす TOB の障害は、ヒトの妊娠の場合とは異なっているので、今回の結果から断定的なことをいうわけにはいかない。けれども、妊娠中の場合には、妊娠をしていない場合とは聴器障害の現われかたが異なり、とくに妊娠後半期には、聴器障害が増強される可能性のあることを充分考慮すべきであろう。

3. 妊娠モルモットに投与した TOB の在胎モルモットの聴器におよぼす影響

妊娠中に TOB 50 mg/kg/日、100 mg/kg/日を投与し

た母モルモットから生れた新生モルモットについて、生後 1 週目で行なった周波数別耳介反射試験では、64 匹全例が最高 20 kHz から最低 0.5 kHz までの周波数で 100% 陽性の耳介反射を示したが、生後 2 週目で行なった周波数別耳介反射試験では、1 匹だけが 20 kHz に限局した耳介反射消失をきたしていた。

今回行なった、これら新生モルモットの内耳の病理組織学的検索では、64 匹中 4 匹 (6%) にラセン器の 1 回転下端部に限局した外有毛細胞の消失が、片耳性に認められたにすぎなかった。いっぽう、母モルモット 28 匹におけるラセン器の外有毛細胞の消失は 24 匹 (85%) であって、消失の拡がりも広範であった。また、前庭器の有毛細胞の消失も、母モルモットでは 13 匹 (46%) にみられているのに、新生モルモットでは 1 例もみられなかった。すなわち、内耳の有毛細胞の消失の頻度と拡がりのうえからみても、新生モルモットの内耳障害の頻度はひじょうに低く、拡がりもラセン器では 1 回転下端部に限局しており、しかも片耳性にしか認められなかった。これらラセン器の外有毛細胞の消失をきたした 1 回転下端部のラセン神経節と、その樹状突起には減少は起っていない。

今回の検索では、内耳の発生期である妊娠前半期に投与した場合の新生モルモットにも、内耳の发育障害は認められなかった。このように内耳の发育障害を起さなかった理由として、妊娠前半期では、妊娠母体内の体液の停滞が妊娠後半期ほど著しくないため、妊娠モルモット内における抗生物質の停滞が、妊娠後半期ほど起らないためであろうと考えられる。さらに、内耳リンパの分泌や吸収、あるいはリンパの流れや血液供給なども、蝸牛管の发育途上の妊娠前半期では、蝸牛管の发育が完了した妊娠後半期とはかなり異なるために、ラセン器の 1 回転下端部の外有毛細胞であっても、妊娠前半期では抗生物質の障害を受けにくく、妊娠後半期のほうが受けやすいことなども考えられる。

すなわち、今回の結果では、母モルモットに明らかに聴力障害を現わすような大量の TOB を投与して、在胎モルモットの聴器におよぼす影響について検討したが、胎生モルモットの聴器の发育、および发育し終えた聴器に対する TOB の安全性は大きいと考えられる。

4. 大量短期間投与時の TOB の聴器に対する安全性

抗生物質の聴器に対する安全性を、動物実験レベルで評価するための一般的な基準は、なお確立されていない。しかし、第 1 報で述べたように、抗生物質によるヒトでの難聴の発現と進展様式の特徴と、モルモットでの蝸牛ラセン器の機能的ならびに組織的な障害の発現と進展とが、比較的よく対応する。このことから、アミノ配

糖体系抗生物質の聴器毒性を動物実験レベルで評価するには、モルモットを対象動物として、耳介反射消失の拡大様式と、ラセン器の外有毛細胞消失の拡大様式を検索することによって、かなり正確に判定できると考えられる。

すなわち、モルモットの蝸牛管の基底板の振動は、最高 20 kHz (JOHNSTON & TAYLOR 1970)³⁾から最低 200 Hz (BÉKÉSY 1960)⁴⁾の範囲内で起こることが明らかにされている。いっぽう、ヒトの基底板の振動範囲は、最高 20 kHz から最低 25~30 Hz (BÉKÉSY 1960)⁵⁾であることが明らかにされている。われわれがこれまで行なった周波数別耳介反射試験の測定では、抗生物質を投与していない幼若モルモット 102 匹の耳介反射は、20 kHz から 0.5 kHz までの周波数域では 100% 陽性であり、0.2 kHz では 98% が陽性を示し、残りの 2 匹 (2%) だけが陰性であった。したがって、モルモットでの聴覚は、20 kHz から 0.2 kHz の周波数範囲にあることがわかる。ヒトの聴覚応答は、オーディオメーターを用いると、8 kHz から 125 Hz までの周波数域で測定されており、2 kHz 以下の周波数域が会話音域になっている。ラセン器の乗っている基底板に振動を起す周波数からみると、最高の周波数はヒトでもモルモットでも 20 kHz であるが、最低の周波数はヒトでは 25~30 Hz であるのに対して、モルモットでは 200 Hz でかなり高い。したがって、モルモットでの 2 kHz 以下の音域を、ヒトでの 2 kHz 以下の会話音域と同じような機能的意味に解することはできないかもしれない。しかし、これまで行なってきたわれわれの検索では^{6,7)}、モルモットでの耳介反射の消失は、ほとんど常に 20 kHz に始まり、そこからより低い周波数へと次第に拡大していく場合が多い (88%)。そして耳介反射消失が広範になると、1 kHz 以下まで拡大する。抗生物質の投与を受けたヒトでの聴覚障害は、オーディオメーターの測定では、ほとんど常に 8 kHz に始まり、そこから次第に低い周波数へ拡大し、最後には 2 kHz 以下の会話音域まで広がっていく (森山, 1959)⁸⁾。このように、抗生物質による聴覚障害の拡がりかたには、周波数のうえではほとんど常に最高周波に始まり、次第に低周波へと拡大する傾向が、ヒトでもモルモットでも共通してみられる。そこで、安全性を評価するための 1 基準として、Table 7 に示すように、モルモットでの耳介反射消失の拡がりかたが、20 kHz から 3 kHz 以下まで拡大した場合を高度の聴器障害とみなし、8 kHz から 3 kHz の範囲まで拡大した場合を中等度の聴覚障害とみなし、20 kHz から 10 kHz までの範囲のものを軽度障害とみなしてみることにした。このようなモルモットでの聴覚障害の程度の分けかたが、抗生

物質の聴器に対する安全性の評価のために、どれだけ役立つかについては今後の検討を必要とするであろう。このような聴覚障害の程度の分けかたを、既報の第 1 報での TOB 短期間の大量投与実験 (50 mg/kg/日と 100 mg/kg/日の 4 週間投与) の成績にあてはめてみて、この面から TOB のモルモットの聴器に対する安全性を、もう一度評価してみることにした。

まず、TOB 50 mg/kg/日を 4 週間投与した 10 匹のモルモットについて、耳介反射消失の現われた時期とその経過をみると、Table 8 のようである。投与開始前に行なった最高 20 kHz から最低 0.5 kHz までの周波数域での周波数別耳介反射試験で、20 kHz で陰性の耳介反射を示した No. 7 と 9 とは 1 週目で耳介反射消失を意味する矢印を、カッコでかこんである。この 2 匹は、その後の経過でも変化していないし、4 週間投与後に行なった蝸牛の病理組織学的検索でも、20 kHz に対応する 1 回転下端部にラセン器の有毛細胞の消失を認めなかったため、TOB による耳介反射消失として扱わないことにした。No. 2 と 8 は、2 週目で 20 から 15 kHz までと 20 kHz とでそれぞれ耳介反射消失が現われているが、4 週目までの経過をみると、耳介反射消失範囲はそのまま変化していない。また No. 1 は、4 週目に 20 kHz で耳介反射消失をきたしている。TOB 投与後に起った耳介反射消失の範囲は、20 kHz または 20 から 15 kHz までに限局していて、軽度障害が認められるだけである。4 週目での頻度も 30% であるので、TOB 50 mg/kg/日を 4 週間投与した場合の聴器に対する安全性は大きいと評価できるであろう。これらのモルモットの内耳の障害は、病理組織学的にも 20 kHz または 20 から 15 kHz に対応する、1 回転下端部に限局したラセン器の外有毛細胞の消失をきたしていただけである。

次に、TOB 100 mg/kg/日を 4 週間投与した 10 匹のモルモットについて、耳介反射消失の現われた時期とその経過をみると、Table 9 に示すとおりである。投与前に行なった周波数別耳介反射試験では、全例が陽性を示していたが、1 匹は 1 週目で死亡した。TOB 投与後に起った耳介反射消失は、2 週目では 1 例 (No. 5) で 20 kHz に限局して現われているだけである。しかし、3 週目では耳介反射消失は 20 kHz で 4 例、20 から 15 kHz で 1 例現われており、さらに不連続的に 20 から 6 kHz まで拡大したものが 1 例と、20 から 3 kHz 以下の 0.5 kHz までの広範な拡がりを示したものが 1 例現われている。すなわち、軽度の聴力障害が 5 例、中等度と高度の聴覚障害が 1 例ずつ出ている。4 週目になると、さらに障害の頻度と範囲は拡大している。これらの 4 週間投与後の内耳の障害は、病理組織学的にもラセン器の外有毛

細胞の消失が、2回転1/4あるいは3回転1/4まで拡大していた。したがって、TOBの聴器に対する安全性の評価のうえでは、TOB 100 mg/kg/日をモルモットに投与する場合には、2週目までは安全性は大きいですが、3週目以後では聴覚障害を起す危険性が増すことになる。

このような、モルモットでのTOBの聴器の安全性に対する評価の結果を、ただちにヒトの場合にそのままあてはめることは、もちろんできないが、TOBをヒトに投与する場合に、聴器の安全性を考えるための有力な参考資料にはなりうると考えられる。

総 括

TOBを投与したモルモットの聴器について、生前最高20 kHzから最低0.5 kHzまでの範囲で、周波数別耳介反射試験を行ない、耳介反射消失の周波数域の広がりやを測定した。それと同時に、投与終了後に内耳の連続切片による病理組織学的検索により、ラセン器の外有毛細胞の消失の広がり、および前庭器の有毛細胞の消失について明らかにして、次のような結果をえた。

1. TOBの3 mg/kg/日と6 mg/kg/日との投与量で、90日間モルモットに筋肉内注射した場合には、耳介反射消失も、ラセン器の外有毛細胞の消失も、前庭器の有毛細胞の消失もなかった。ただ、6 mg/kg/日投与群には、4回転後半のラセン神経節とその樹状突起に1次的減少がみられたが、その意義および薬剤投与との関係については、今後の検討が必要である。

2. 妊娠モルモットにTOBの50 mg/kg/日あるいは100 mg/kg/日を、妊娠の前半期と後半期にそれぞれ4週間投与した場合には、母モルモットの聴器に対する障害は、妊娠後半期に投与した場合のほうが強く現われ、妊娠前半期投与に比較して安全性は低くなった。

また、100 mg/kg/日を投与した妊娠モルモットでは、かなり高頻度で前庭器の有毛細胞の消失がみられ、妊娠期の高用量投与では、前庭障害の起る可能性が考えられる。

3. 上記妊娠モルモットから生れた新生モルモットの聴器の検索からみると、母モルモットに明らかに聴力障害を現わすような大量のTOBを投与した場合でも、在

胎モルモットの聴器に対する安全性は高いと評価される。

4. TOBの50 mg/kg/日を、モルモットに4週間筋肉内投与した場合には、軽度の聴力障害が認められるだけで、安全性は高いと評価される。これに対して、TOBの100 mg/kg/日を投与した場合には、2週目までは軽度の障害が認められるだけであるが、3週目以後は中等度あるいは高度の障害へ進展するものもみられた。したがって、この場合の聴器に対する安全性は、2週目までは大きいですが、3週目以後は著しく低下すると評価される。

文 献

- 1) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 中田穂出美, 奈良哲次, 田島たよ子, 佐々木和則, 小川幹男: Tobramycinの聴器毒性について(第1報)。Chemotherapy 23(3): 1522~1543, 1975
- 2) RHODES, P.: Fluid balances. from Scientific Foundations of Obstetrics and Gynecology. (E. E. PHILIPP, J. BARNES & M. NEWTON eds.): 443~444, F. A. Davis, Philadelphia, 1970
- 3) JOHNSTONE, B. M. & K. J. TAYLOR: Mechanical aspects of cochlear functions. from Frequency Analysis and Periodicity Detection in Hearing (R. PLOMP & G. SMOORENBURG, eds.): 81~93, Sijthoff, Leiden, The Netherland. 1970
- 4) BÉKÉSY, G. VON: Experiments in Hearing.: 502~504, McGraw-Hill, New York, 1960
- 5) BÉKÉSY, G. VON: Experiments in Hearing.: 509, McGraw-Hill, New York, 1960
- 6) AKIYOSHI, M. & K. SATO: Simple valuable audiometry in high frequency range in guinea pigs for screening of ototoxicity of antibiotics. Program and abstract of the 14th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16, 1974
- 7) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 庄司 侃, 菅広 敬, 中田穂出美, 奈良哲夫, 矢野三郎: モルモットを実験動物に用いた場合の抗生物質の聴器毒性の判定基準の検討。Audiology Japan 17(5): 365~366, 1974
- 8) 森山静也: ストマイ難聴の初期像に関する研究。日本耳鼻咽喉科学会会報 62(5): 982~992, 1959

OTOTOXICITY OF TOBRAMYCIN IN GUINEA PIGS. II.

Evaluation of Safety and Ototoxic Changes of the Inner Ears in Mother Guinea Pigs received Tobramycin during Pregnancy Period and Newborn Animals

MASATOYO AKIYOSHI, KIICHI SATO, HOZUMI NAKADA, TETSUJI NARA,

TAYOKO TAJIMA, KAZUNORI SASAKI* and MIKIO OGAWA*

Department of Pathology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

* Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

The ototoxic injuries of the inner ears in guinea pigs received tobramycin (TOB) were investigated by differential frequency pinna reflex test in frequency range from 20 kHz to 0.5 kHz and histopathologic examination of the whole extent of cochlear duct and vestibular organs.

The following results were obtained:

1) In the intramuscular administration of TOB at the dose of 3 mg/kg/day and 6 mg/kg/day, respectively for 90 days, there was neither pinna reflex loss in any frequencies tested nor hair cell loss both in spiral and vestibular organ. However, in the 3 guinea pigs received TOB 6 mg/kg/day for 90 days primary decrease in number of spiral ganglion cells and their dendrites always occurred in the posterior portion of the 4th turn of the cochlea. Regional spiral organs consisted of normal inner and outer hair cells. These results suggest that administration of TOB at dose of 3 mg/kg/day (equivalent to expected clinical dose of TOB) for 90 days was much safer.

2) In the intramuscular administration of TOB at the dose of 50 mg/kg/day or 100 mg/kg/day for 4 weeks in gestation period, the ototoxic injuries of the inner ears of mother guinea pigs administered at the later half period of gestation were much more severe than those administered at the early half period of gestation.

In the mother guinea pigs received TOB (100 mg/kg/day) for 4 weeks in gestation period, hair cell loss occurred more frequently both in the cristae ampullares and maculae. The result indicates that administration of TOB at the dose of 100 mg/kg/day for 4 weeks in a period of gestation can cause ototoxicosis in the vestibular organs in association with the cochlea damage.

3) Newborn guinea pigs from the remaining pregnant guinea pigs received TOB did not show pinna reflex loss in the frequencies tested, and a few animals showed histopathological outer hair cell loss confined to the basal end of the unilateral cochlea.

These results indicate that TOB did not induce ototoxic effect on the inner ears in the newborn guinea pigs even at such toxic dose to the pregnant guinea pigs.

4) In the intramuscular administration of TOB at the dose of 50 mg/kg/day for 4 weeks to non-pregnant guinea pigs, the ototoxic injuries of the inner ears occurred only at the slight degree of impairment. At the dose of 100 mg/kg/day for 4 weeks, the injuries remained at only slight impairment by the second week of administration, but they progressed to moderate or severe impairment after the third week of administration.

These results indicate that administration of TOB at the dose of 100 mg/kg/day is less ototoxic by the second week of administration, but more ototoxic after the third week of administration.