

Tobramycin の聴器毒性について (第一報)

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

Tobramycin (TOB) は, *Streptomyces tenebrarius* から分離された抗生物質複合物質である Nebramycin の第6因子 (Nebramycin factor 6) であって (STARK, *et al.* 1967)¹⁾, 新しいアミノ配糖体抗生物質である。

Nebramycin の聴器毒性については, すでに WICK & WELLES (1967)²⁾ のネコでの実験があって, 前庭機能障害を起こすことが指摘されている。また, Nebramycin factor 6 である TOB の聴器毒性についても, BRUMMETT, *et al.* (1971)³⁾, BRUMMETT, *et al.* (1972)⁴⁾ などによるモルモットについての実験がなされていて, 電気生理学的検査と蝸牛迷路の剥離標本の位相差顕微鏡観察とによって, TOB が蝸牛迷路に対する毒性をもち, その毒性は, 同じくアミノ配糖体抗生物質である Gentamicin (GM) よりも軽いことが報告されている。

われわれは, 今回, 500 Hz から 20 kHz までの検査周波数帯域を有するオージオメーターによる耳介反射測定と, 内耳の病理組織学的検索とによって, TOB の短期間の大量投与時に起こる聴器障害を, GM および Kanamycin (KM) による聴器障害と比較するとともに, 臨床試験推奨用量に相当する TOB を長期間投与したさいの聴器に対する影響を検索し, さらに妊娠時における母モルモットと在胎モルモットの聴器に及ぼす TOB の影響を検討したので, これらの結果のうち, 今までに明らかにされた点を報告したい。

実験材料ならびに方法

1. 短期間の大量投与実験

体重 300~350 g の 60 匹の Hartley 系白色モルモットを用いて, 各抗生物質を次表のように連日筋肉内に投与した。

実験投与量の設定にあたっては, BRUMMETT, *et al.* による TOB と GM の耳毒性比較試験の報告を参考とした。すなわち, BRUMMETT, *et al.* (1972)⁴⁾ は, 白色モルモットに GM の, 50, 100 および 150 mg/kg/日を 4 週間筋注投与した場合には, とくに 150 mg/kg/日投与群の動物の衰弱が著しく, GM では 100 mg/kg/日が 4

試験薬剤	投与量	投与日数	動物数	備考
TOB	50 mg/kg/日	28日	10匹	
	100 mg/kg/日	28日	10匹	1匹死亡
GM	40 mg/kg/日	28日	10匹	1匹死亡
	100 mg/kg/日	28日	10匹	1匹死亡
KM	100 mg/kg/日	28日	10匹	
	200 mg/kg/日	28日	5匹	
	400 mg/kg/日	14日	5匹	1匹死亡

週間投与時の実験可能な最高投与量と考えられると報告している。このことから, TOB と GM の比較においては, 100 mg/kg/日を最高投与量とした。なお, TOB 50, 100 mg/kg/日は, 臨床試験推奨用量 (3~5 mg/kg/日) の最大量の 10 倍および 20 倍に相当するものである。KM については, 本剤の臨床投与量 (20 mg/kg/日) の 5 倍, 10 倍, 20 倍量に相当する投与量とした。

モルモットの耳介反射の測定には, 最低 500 Hz から最高 20 kHz までの検査周波数帯域をもつオージオメーターを用いて, 注射前, 注射期間中は 1 週毎, 最終注射後の各時期に, 各周波数の純音刺激に対する耳介反射の出現と消失とを観測した。

最終注射終了後に, 実験動物を Nembutal 麻酔下に正中線上で開胸し, 心嚢をピンセットで破り, 左心室の側壁に小切開を加え, そこから細いガラス管を挿入し, 大動脈上行部まで押しこみ, その部に結紮固定した。約 40 cm の落差で 37°C に加温した生理的食塩水を流し, 右心房に作った小孔から血液を流出させ, 透明な液が出てきたら, WITTMACK 固定液を流し, モルモットを灌流固定した。モルモットの粘膜, 結膜が WITTMACK 固定液で黄色に着色したのを確認した後に, 断頭し, 両側の側頭骨を 1 塊とし切除し, さらに同じ固定液をいれた容器内で 7~14 日間固定した。固定後, PLANK and RYCHLO (1952) の迅速脱灰液で脱灰, 余分の組織を切除し, 流水中で水洗, 脱水, セロイジン包埋とした。側

Table 2 Frequency range of pinna reflex loss in 9 guinea pigs received TOB 100 mg/kg for 28 days

Animal No.	Frequency (kHz) of pure tone used in pinna reflex test										
	20 kHz	15	12	10	8	6	4	3	2	1	0.5
1	→							→			
2	→							→			
3	→										
4	→										
5	→										
6	→										
(†) 7											
8	→										
9	→				→						
10	→										

以下の低周波音域におよぶ広範な耳介反射消失をきたしたものは、4匹であった。

なお、前庭機能障害については、耳介反射測定時に注意深く観察したが、いずれの投与量においても、障害を思わせる症状は何ら認められなかった。

GM 40 mg/kg/日を28日間投与した10匹のモルモットのうち、途中で死亡した1匹を除いた9匹では (Table 3), 耳介反射消失は、20 kHz のもの3匹, 20 kHz から4 kHz までのもの1匹, 20 kHz から0.5 kHz までのもの1匹に認められ、残りの4匹には耳介反射の消失は起こらなかった。すなわち、この群での耳介反射消失は9匹中5匹 (55.6%) にみられ、そのうちの3匹では20 kHz に限局しており、他の2匹では4 kHz 以下まで拡大していた。

GM 100 mg/kg/日を28日間投与した10匹のモルモッ

トのうち、1匹は注射開始後1週目に死亡したが、すでに死亡前に20 kHz から0.5 kHz にわたる広範な周波数帯域の耳介反射消失をきたしていた。28日間生存した9匹のうち、1匹は耳介反射消失をきたしなかったが、残りの8匹 (88.8%) は耳介反射消失を示した (Table 4)。耳介反射消失の拡がりには、20 kHz に限局するもの1匹, 20 kHz から15 kHz までのもの1匹で、他の6匹は20 kHz から1 kHz または0.5 kHz までの広範な周波数帯域の耳介反射消失を起こしていた。

KM 100 mg/kg/日を28日間投与した10匹のモルモットのうち、3匹は20 kHz に限局した耳介反射の消失を示したが、これらのモルモットは、すでに注射開始前に20 kHz の耳介反射消失をきたしていたので、KM 投与による障害とはみなしにくい。したがって、この群では、KM 投与と関係ある耳介反射消失は1匹もなか

Table 3 Frequency range of pinna reflex loss in 9 guinea pigs received GM 40 mg/kg for 28 days

Animal No.	Frequency (kHz) of pure tone used in pinna reflex test										
	20 kHz	15	12	10	8	6	4	3	2	1	0.5
1	→										
2											
3											
4	→										
(†) 5											
6											
7											
8	→										
9	→										
10	→										

Table 4 Frequency range of pinna reflex loss in 9 guinea pigs received GM 100 mg/kg for 28 days

Animal No.	Frequency (kHz) of pure tone used in pinna reflex test											
	20 kHz	15	12	10	8	6	4	3	2	1	0.5	
1												
2												→
3	→											
4												→
(†)5												→
6												→
7												→
8												→
9	→											
10												→

Table 5 Frequency range of pinna reflex loss in 10 guinea pigs received KM 100 mg/kg for 28 days

Animal No.	Frequency (kHz) of pure tone used in pinna reflex test											
	20 kHz	15	12	10	8	6	4	3	2	1	0.5	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

ったことになる (Table 5)。

KM 200 mg/kg/日を28日間投与した5匹のモルモットのうち、耳介反射消失は1匹に20 kHzに限局してみられ、残りの4匹では耳介反射の消失は認められなかった。しかしながら、これらの4匹では、14 dB から26 dBまでの耳介反射の中等度以上の域値上昇がみられ、聴覚障害のあることが示唆された。

KM 400 mg/kg/日を14日間投与した5匹のモルモットのうち、1匹は途中で死亡したが、14日間生存した4匹は全例が耳介反射消失を示した。耳介反射消失の拡がり、20 kHzから15 kHzまでのもの2匹、20 kHzから12 kHzまでのもの1匹、20 kHzから8 kHzまでのもの1匹であった。

b. 内耳の病理組織学的所見

TOB 50 mg/kg/日を28日間投与した10匹のモルモットのうちで、抗生物質の聴器毒性の障害を最も受け易い、蝸牛1回転下端部のラセン器の外有毛細胞の消失を示したものは6匹であって、うち2匹では両耳性に (Fig. 1)、残りの4匹では片耳性に外有毛細胞の消失をきたしていた (Fig. 2)。片耳性に外有毛細胞の消失をきたした動物の一部では、部分的な外有毛細胞の消失を示していた (Fig. 3)。両耳性に1回転下端に限局した外有毛細胞の消失をきたした1匹と、下端から Hook の下部までの外有毛細胞の消失を示した1匹とは、それぞれ、20 kHzと20 kHzから15 kHzまで耳介反射の消失を起こしていた。片耳性に1回転下端に限局した外有毛細胞の完全消失 (Fig. 2) または不完全消失 (Fig. 3) をきたしたモルモットでは、耳介反射の消失はみられなかつ

Fig. 1 : 1 L

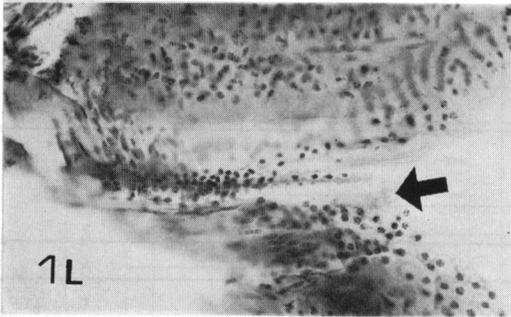


Fig. 1 : 1 R

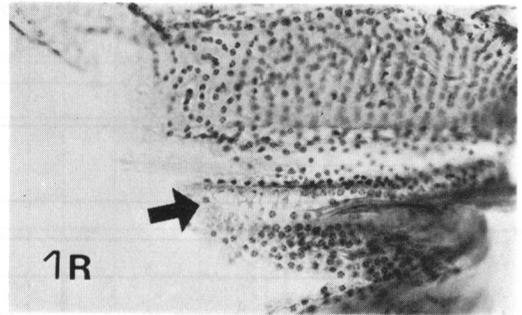


Fig. 2 : 2 A

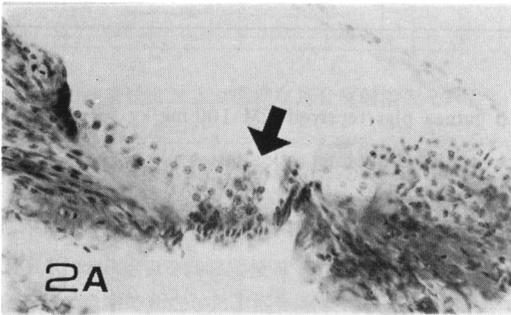


Fig. 2 : 2 B

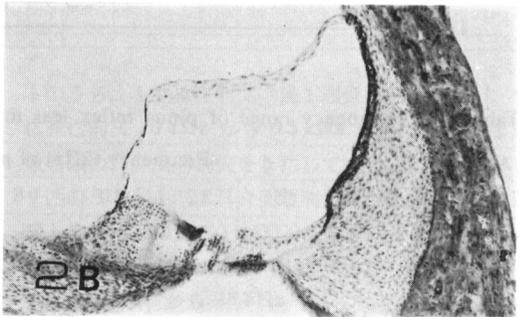


Fig. 2 : 2 C

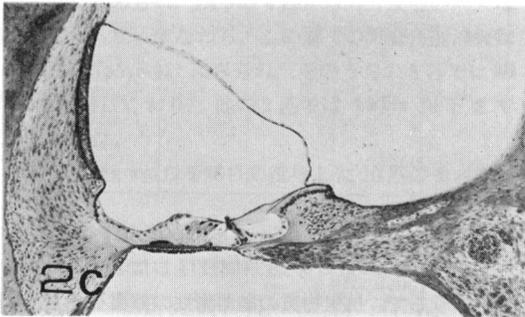


Fig. 3 : 3 A

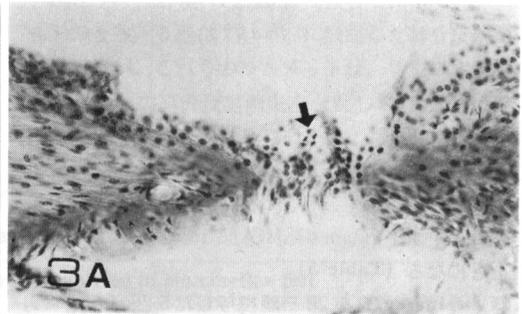


Fig. 3 : 3 B

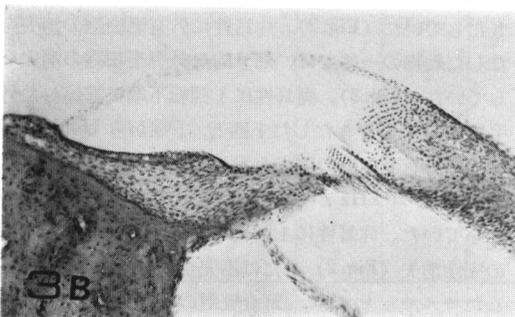


Fig. 4 : 4 A

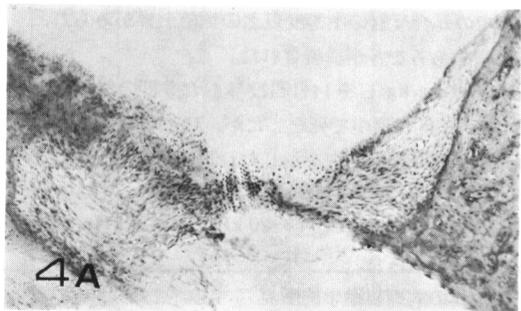


Fig. 4 : 4 B

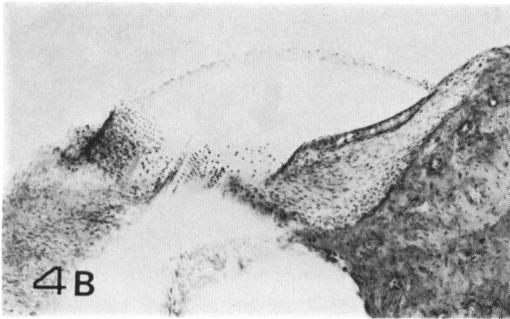


Fig. 5

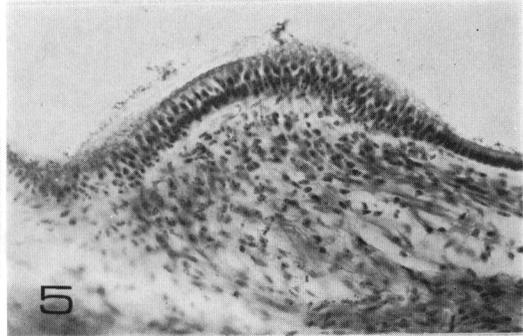


Fig. 6

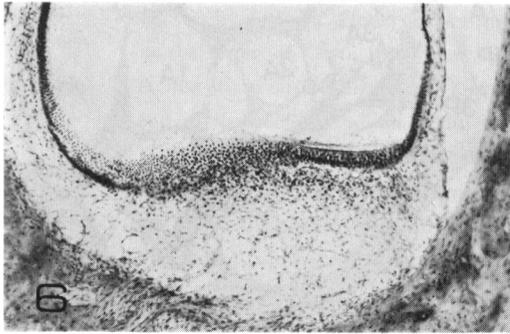


Fig. 7

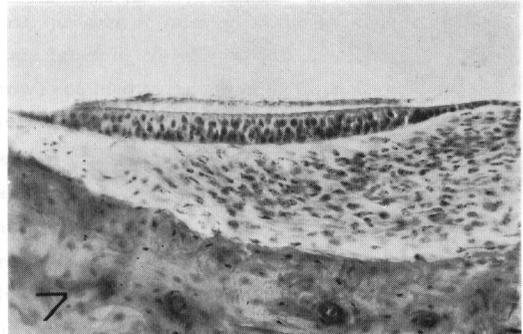


Fig. 8 : 8 LA

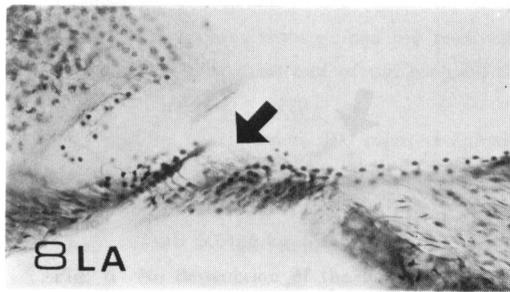


Fig. 8 : 8 LB

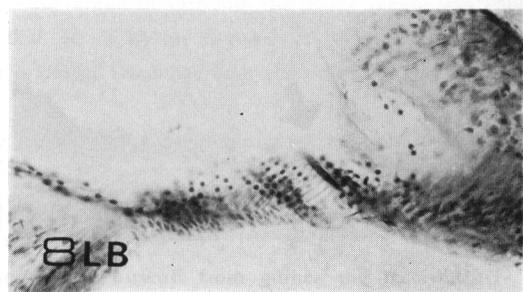


Fig. 8 : 8 RA

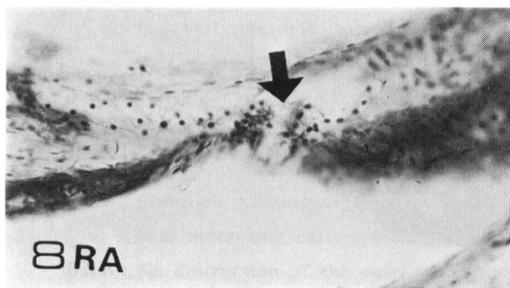


Fig. 8 : 8 RB

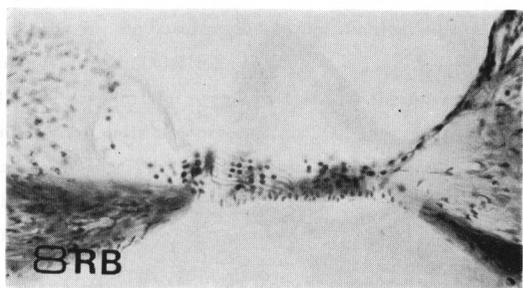


Fig. 9 : 9 A

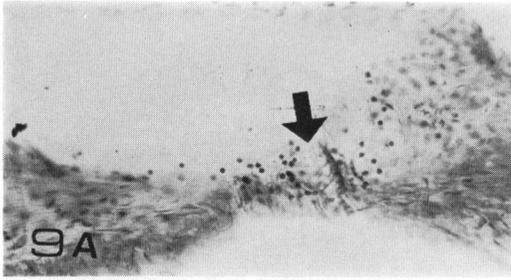


Fig. 9 : 9 B

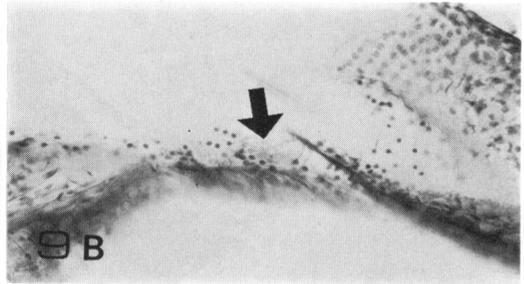


Fig. 9 : 9 C

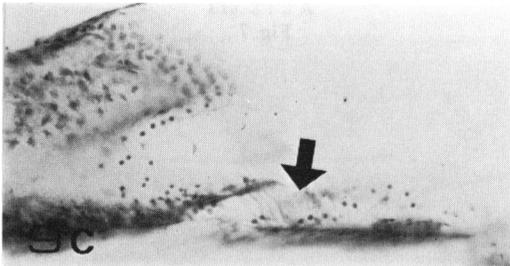


Fig. 10 : 10-1

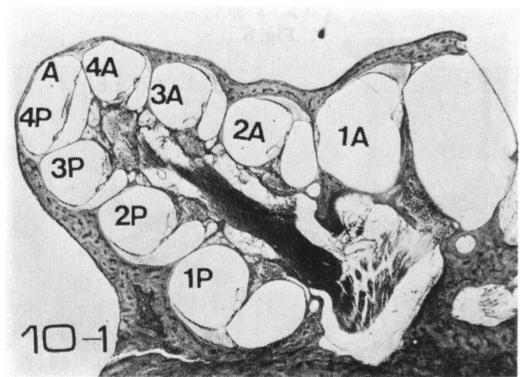


Fig. 10 : 10-1 A

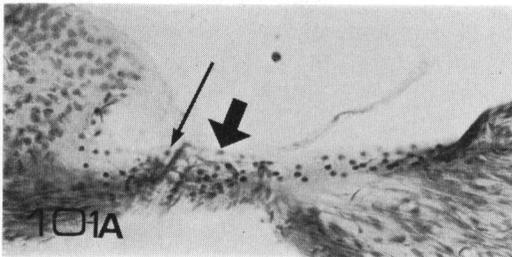


Fig. 10 : 10-1 B

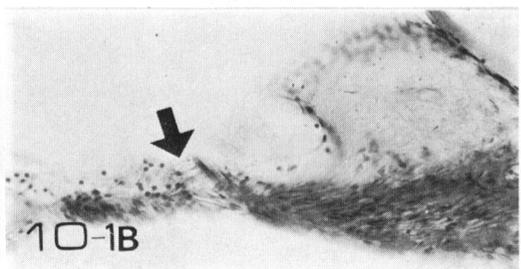


Fig. 10 : 10-2

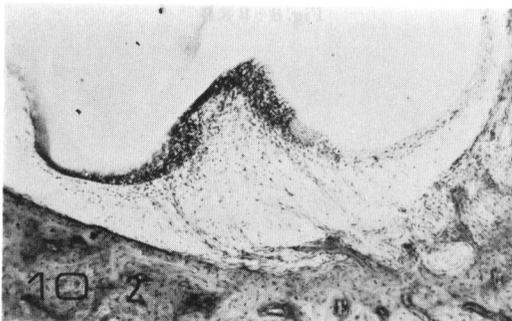


Fig. 11 : 11 A

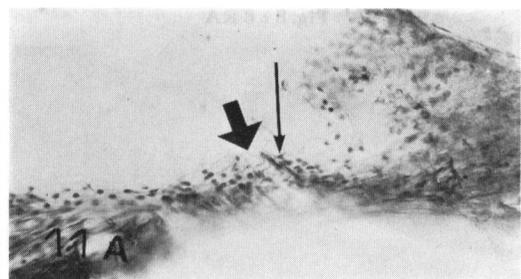


Fig. 11 : 11 B

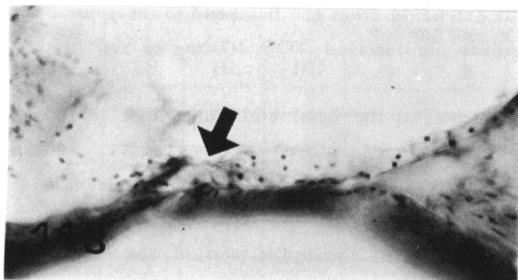
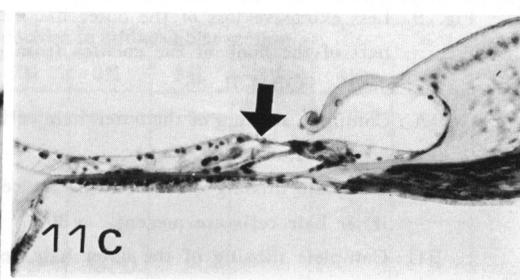


Fig. 11 : 11 C



Explanation of figures

- Fig. 1 Bilateral complete loss of the outer hair cells in the organ of Corti at the basal end of the cochleas from guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. 1L : left cochlea, 1R : right cochlea. Thick arrows indicate the sites of missing of the outer hair cells in the organ of Corti, inner hair cells are present. T-1-20. $\times 300$.
- Fig. 2 A loss of the outer hair cells (thick arrow) confined to the organ of Corti at the basal end of the cochlea in guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. T-8-47
- 2A : Basal end of the cochlea, inner hair cells are present. $\times 300$.
- 2B : 1/4 of the 1st turn, outer and inner hair cells are present. $\times 120$.
- 2C : 3/4 of the 1st turn, outer and inner hair cells are present. $\times 120$.
- Fig. 3 Partial loss of the outer hair cells (arrow) confined to the organ of Corti at the basal end of the cochlea in guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. T-5-33, 37.
- 3A : Basal end, partial loss of the outer hair cells, inner hair cells are present. $\times 300$.
- 3B : Lower part of the hook of the cochlea, about 130 microns apically from 3A. $\times 120$, No missing of the hair cells.
- Fig. 4 No destruction of the outer hair cells in the organ of Corti in the basal region of the cochlea from guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. T-10-30, 33.
- 4A : The most basal end of the cochlea, the organ of Corti has both the outer and inner hair cells. $\times 120$
- 4B : The basal region, 100 microns apically from 4A, the outer and inner hair cells are present. $\times 120$
- Fig. 5 No destruction of the hair cells in the crista ampullaris from guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. T-2-30, $\times 300$.
- Fig. 6 No destruction of the hair cells in the macula utriculi from guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. T-3-18, $\times 120$.
- Fig. 7 No destruction of the hair cells in the macula sacculi from guinea pig received TOB 50 mg/kg for 28 days. T-6-33, $\times 300$.
- Fig. 8 Bilateral complete loss of the outer hair cells in the basal region of the cochlea from guinea pig received TOB 100 mg/kg for 28 days. TOB 6-5, 15, 20.
- 8LA : Complete missing of the outer hair cells (arrow) in the organ of Corti at the lower part of the hook of the left cochlea, inner hair cells are present. $\times 300$.
- 8LB : No destruction of the outer hair cells at the upper part of the hook. $\times 300$, left.
- 8RA : Complete missing of the outer hair cells (arrow) in the organ of Corti at the basal end, inner hair cells are present. $\times 300$, right.
- 8RB : No destruction of the outer and inner hair cells in the organ of Corti at the 1/4 of

the 1st turn of the cochlea. $\times 300$, right.

Fig. 9 Less extensive loss of the outer hair cells extending from the basal end to the upper part of the hook of the cochlea from guinea pig received TOB 100 mg/kg for 28 days. TOB 4-31, 36.

9A : Complete missing of the outer hair cells (arrow) at the basal end, inner hair cells are present. $\times 300$.

9B : Complete missing of the outer hair cells (arrow) at the lower part of the hook, inner hair cells are present. $\times 300$

9C : Complete missing of the outer hair cells (arrow) at the upper part of the hook, inner cells are present. $\times 300$

Fig. 10 Extensive loss of the outer hair cells extending from the basal end to the 2/4 of the 2nd turn in guinea pig received TOB 100 mg/kg for 28 days. TOB 5-26, 30.

10-1 : Midmodiolar section of the cochlea, 1A : 1/4 of the 1st turn, 1P : 3/4 of the 2nd turn. 2A : 1/4 of the 2nd turn, 2P : 3/4 of the 2nd turn. 3A : 1/4 of the 3rd turn, 3P : 3/4 of the 3rd turn. 4A : 1/4 of the 4th turn, 4P : 1/4 of the 4th turn, 4P : 3/4 of the 4th turn. A : Apical turn. $\times 25$.

10 1A : Complete loss of the outer hair cells (thick arrow) at the lower part of the hook of the cochlea, inner hair cells (thin arrow) are present. In the spiral limbus, there are many connective tissue cells. $\times 300$.

10 1B : Complete loss of the outer hair cells (arrow) at the upper part of the hook. The connective tissue cells in the spiral limbus are missing due to ototoxic effect of the antibiotic. $\times 100$.

10-2 : No destruction of the hair cells in the crista ampullaris which is most sensitive vestibular organ to the ototoxic effect. $\times 120$.

Fig. 11 Extensive loss of the outer hair cells extending from the basal end to the 1/4 of the 3rd turn from guinea pig received TOB 100 mg/kg for 28 days. TOB 1-31, 51.

11A : Complete loss of the outer hair cells (thick arrow) at the lower part of the hook of the cochlea, inner hair cells (thin arrow) are present. $\times 300$

11B : Complete loss of the outer hair cells (arrow) at the outer hair cells (arrow) at the upper part of the hook, inner hair cells are present. $\times 300$.

11C : Complete loss of the outer hair cells (arrow) at the 3/4 of the 1st turn, inner hair cells are present. $\times 300$.

た。また、残りの4匹は、1回転下端の外有毛細胞の消失を示していなかった (Fig. 4)。注射開始前から 20 kHz の耳介反射消失を示していた2匹は、1回転下端の外有毛細胞の消失をきたしていなかった。これらの群のモルモットでは、前庭の半規管膨大部稜 (Fig. 5)、卵形囊斑 (Fig. 6)、球形囊斑 (Fig. 7) の有毛細胞には明らかな消失はみられなかった。

TOB 100 mg/kg/日を28日間投与した9匹のモルモットは、全例が、1回転下端部から始まり、種々の範囲の拡がりを示したラセン器の外有毛細胞の消失をきたしていた (Table 6)。外有毛細胞の消失は、2匹では1回転下端部に比較的近い部位にみられたが (Fig. 8)、2匹では1回転下端から Hook の下部あるいは上部まで拡

大し、2匹では1回転下端から1回転の1/4付近まで拡大しており (Fig. 9)、他の3匹では1回転下端から3/4まで、あるいは2回転2/4 (Fig. 10) または3回転1/4 (Fig. 11) まで拡大していた。外有毛細胞の消失が1回転下端から2回転2/4まで拡大していたモルモットの蝸牛では (Fig. 10)、ラセン縁の結合組織細胞が1回転1/4から3回転1/4まで消失していた。前庭では、抗生物質の聴器毒性の障害を最も受けやすい半規管膨大部稜の有毛細胞にも消失はみられなかった。

GM 40 mg/kg/日を28日間投与した9匹のモルモットのうち、病理組織学的観察を行なうことができた7匹についてみると、ラセン器の外有毛細胞の消失が蝸牛の1回転の下端部に局限してみられたものは2匹、うち1

Table 6 Range of outer hair cell loss of organ of Corti in 9 guinea pigs received TOB 100 mg/kg for 28 days

Animal No.	Site and turn of cochlea in midmodiolar section											
	BE	HL	HU	¼	¾	2¼	2¾	3¼	3¾	4¼	4¾	Ap
1												
2												
3												
4												
5												
6												
(†) 7												
8												
9												
10												

BE: basal end, HL: lower part of hook, HU: upper part of hook, Ap: apical end, †: died

Table 7 Range of outer hair cell loss of organ of Corti in 10 guinea pigs received GM 100 mg/kg for 28 days

Animal No.	Site and turn of cochlea in midmodiolar section											
	BE	HL	HU	¼	¾	2¼	2¾	3¼	3¾	4¼	4¾	Ap
1												
2												
3												
4												
(†) 5												
6												
7												
8												
9												
10												

BE: basal end, HL: lower part of hook, HU: upper part of hook, Ap: apical end,
Discontinuous line: scattered partial loss of outer hair cells

匹では、ラセン器の外有毛細胞の消失は片耳性であった。他の2匹では、外有毛細胞の消失は1回転の下端から1/4まで拡がっていた。残りの3匹には外有毛細胞の消失はみられなかった。

GM 100 mg/kg/日を28日間投与した10匹のモルモットのうち、1匹は注射開始後1週間で死亡したが、この1匹を含めた10匹のうち、全例がラセン器の外有毛細胞の消失をきたしていた (Table 7)。外有毛細胞の消失範囲は、蝸牛の1回転下端部に限局したもの1匹、1回転下端から Hook 上部までのもの2匹、1回転1/4まで

のもの1匹、1回転3/4まで拡がったもの1匹、2回転1/4まで拡がったもの3匹、2回転3/4まで拡大したもの1匹、3回転1/4まで拡大したもの1匹であった。これらのモルモットのうち、ラセン器の外有毛細胞の消失が1回転の下端から1/4以上まで拡大していた場合には、上記部位よりさらに上方の回転まで外有毛細胞の部分的な消失をともなっていた。

KM 100 mg/kg/日を28日間投与した10匹のモルモットのうち、8匹は1回転下端部のラセン器に片耳性または部分的な外有毛細胞の消失をきたしていた (Table

Table 8 Range of outer hair cell loss of organ of Corti in 10 guinea pigs received KM 100 mg/kg for 28 days

Animal No.	Site and turn of cochlea in midmodiolar section												
	BE	HL	HU	¼	⅓	2/3	¾	¾	¾	¾	¾	¾	Ap
1	----->												
2													
3													
4	----->												
5	----->												
6	----->												
7	----->												
8	----->												
9	----->												
10	----->												

BE: basal end, HL: lower part of hook, HU: upper part of hook, Ap: apical end,
Discontinuous line: partial or unilateral loss of outer hair cells

8)。残りの2匹には、1回転下端部のラセン器にも外有毛細胞の消失は認められなかった。

KM 200 mg/kg/日を28日間投与した5匹のモルモットは、全例ラセン器の外有毛細胞の消失を示していた。外有毛細胞の消失範囲は、1回転の下端から1/4までの拡がりをきたしたのも4匹、残りの1匹では1回転の下端からHook上部までの外有毛細胞の消失が認められた。

KM 400 mg/kg/日を14日間投与した4匹では、全例が、ラセン器の外有毛細胞の消失を示していた。外有毛細胞の消失の範囲は、1回転の下端から1/4までのもの3匹で、残りの1匹では、外有毛細胞の消失は1回転下端から2/4までみられた。

c. 耳介反射の消失範囲とラセン器の外有毛細胞の消失範囲からみた聴器毒性の比較

以上の耳介反射試験成績と内耳の病理組織学的所見をまとめると Table 9, Table 10 となる。これらの結果から、TOBの聴器毒性をGMおよびKMの聴器毒性と比較すると、投与量100 mg/kg/日の28日間投与では、聴器毒性はKMが最も軽く、ついでTOBであって、GMが一番強いように判定された。TOB 50 mg/kg/日とGM 40 mg/kg/日の28日間投与の結果を比較してみても、TOBのほうがGMよりも弱い聴器毒性を示していた。

2. 長期間の少量投与実験

TOB 3 mg/kg/日を90日間筋肉内注射した3匹のモ

Table 9 Incidence and range of the pinna reflex loss in guinea pigs received TOB, GM and KM respectively

Drug	Dosage & Duration		Frequency (kHz) of pure tone used in pinna reflex test										
			20 kHz	15	12	10	8	6	4	3	2	1	0.5
TOB	50 mg/kg	28 d.	3/10	1/10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GM	40 mg/kg	28 d.	5/9	2/9	2/9	2/9	2/9	2/9	2/9	1/9	1/9	1/9	1/9
TOB	100 mg/kg	28 d.	9/9	8/9	7/9	5/9	4/9	4/9	2/9	2/9	2/9	2/9	1/9
GM	100 mg/kg	28 d.	9/10	8/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	5/10
KM	100 mg/kg	28 d.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
KM	200 mg/kg	28 d.	1/5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
KM	400 mg/kg	14 d.	4/4	4/4	2/4	1/4	1/4	*	*	*	*	*	*

Number of guinea pigs with pinna reflex loss/Number of guinea pigs in the dose level

* : no guinea pig with pinna reflex loss

Table 10 Incidence and range of the outer hair cell loss in guinea pigs received TOB, GM and KM respectively

Drug	Dosage & Duration		Site and turn of cochlea in midmodiolar section											
			BE	HL	HU	¼	¾	2¼	2¾	3¼	3¾	4¼	4¾	Ap
TOB	50 mg/kg	28 d.	6/10	1/10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GM	40 mg/kg	28 d.	4/7	2/7	2/7	2/7	*	*	*	*	*	*	*	
TOB	100 mg/kg	28 d.	9/9	7/9	6/9	5/9	3/9	2/9	1/9	1/9	*	*	*	
GM	100 mg/kg	28 d.	10/10	9/10	9/10	7/10	7/10	7/10	7/10	4/10	3/10	1/10	1/10	
KM	100 mg/kg	28 d.	8/10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
KM	200 mg/kg	28 d.	5/5	5/5	5/5	4/5	*	*	*	*	*	*	*	
KM	400 mg/kg	14 d.	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	*	*	*	*	*	*	

Number of guinea pigs with outer hair cell loss/Number of guinea pigs in the dose level

* : no guinea pig with outer hair cell loss

ルモットの耳介反射を、TOB 投与期間中1週毎に観察したが、耳介反射の消失をきたしたものはなかった。TOB 90日間投与終了後のオージオグラムは、Table 11のように、注射開始前から20 kHzで陰性の耳介反射を示していた1匹を除き、20 kHz, 15 kHz, 12 kHz, 10 kHzの高音域においても耳介反射の消失をきたしたものはなかった。

TOB 6 mg/kg/日を90日間筋肉内注射した3匹のモルモットにおいても1週毎に耳介反射を観察したが、消失をきたしたものはなく、90日間投与終了後のオー

ジオグラムではTable 12のように、20 kHz, 15 kHz, 12 kHz, 10 kHzにおいても耳介反射の消失をきたしたものは1匹もなかった。

これらのモルモットの聴器の病理組織学的検索は進行中であるので、内耳所見については、のちに報告する予定である。しかしながら、オージオグラムの所見では、いずれの動物の耳介反射域値も正常範囲内にあったので、蝸牛のラセン器にも著しい障害はないと考えられる。

3. 妊娠期間中の投与と実験成績

a. 妊娠前半期におけるTOB投与の妊娠モルモット

Table 11 Pinna reflex audiogram ranging in frequency from 500 Hz to 20000 Hz in 3 guinea pigs received TOB 3 mg/kg for 90 days

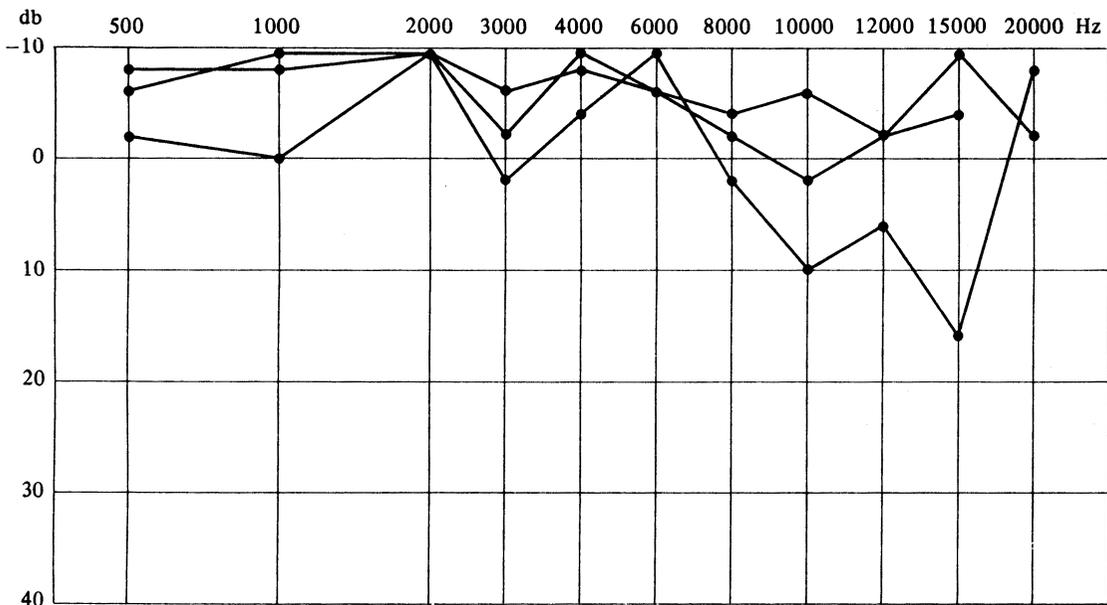


Table 12 Pinna reflex audiogram ranging in frequency from 500 Hz to 20000 Hz in 3 guinea pigs received TOB 6 mg/kg for 90 days

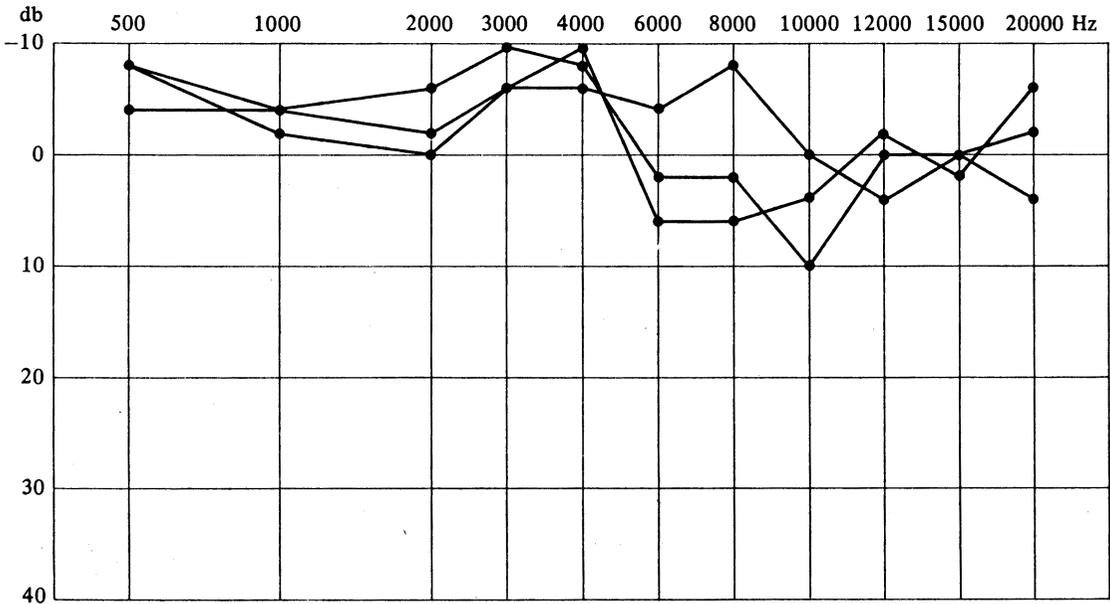


Table 13 Frequency range of pinna reflex loss in 4 pregnant guinea pigs received TOB 50 mg/kg for 4 weeks during early half of gestation period and pinna reflex loss of maternal and newborn guinea pigs in post partum period.

Dose Duration	Gestation period										Post partum		
	1 ^w	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1 ^w	2	
50 mg/kg x 28 d. (No. 49)	-	←-----→				-	-	-	-	-	-	3* (-)	3(-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 35)	-	←-----→				-	-	-	-	-	-	2* (-)	2(-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 3)	-	←-----→				-	-	-	-	-	-	5* (-)	5(-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 34)	-	←-----→				-	-	-	-	-	-	3* (-)	3(-)

- : positive pinna reflex
 () : pinna reflex of newborn guinea pig
 * : number of newborn sibling guinea pigs

と在胎モルモットの聴覚におよぼす影響

TOB の投与期間は、 膈内に精子の存在を確認して 1 週後から、 5 週後までの 4 週間であって、 その後は出産まで飼育し、 出産後 2 週目で母モルモットと新生モルモットを屠殺し、 病理組織学的検索に供することにした。

TOB 50 mg/kg/日 を 28 日間投与した 6 匹の妊娠モルモットのうち、 注射開始時に 0.5 kHz から 20 kHz までの検査純音周波数帯域で陽性の耳介反射を示した 4 匹

の妊娠モルモットと、 それから生まれた 13 匹の新生モルモットについて行なった耳介反射の測定成績は、 Table 13 に示したとおりである。

まず、 4 匹の妊娠モルモットについてみると、 注射終了後の妊娠後半期においても、 分娩後においても、 20 kHz から 0.5 kHz までの音域での耳介反射の消失は 1 例もみられなかった。

これらの 4 匹の母モルモットから、 2 匹または 3 匹あ

るいは5匹ずつの新生モルモットが総計13匹生まれました。これらの13匹の新生モルモットについて、生後1週目と2週目とに行なった20kHzから0.5kHzまでの音域での耳介反射試験では、1例も耳介反射の消失をきたしたものは認められなかった。

TOB 100 mg/kg/日を妊娠前半期に28日間投与した8匹の妊娠モルモットのうち、注射開始前に、20kHzから0.5kHzまでの検査純音周波数帯域で、すべて陽性の耳介反射を示した6匹の妊娠モルモットのうち、注射開始後4週で耳介反射消失をきたしたものは5匹であった (Table 14)。5匹のうちで、耳介反射の消失が20kHzに限局して起こったものは2匹、20kHzから10kHzまで拡大したもの1匹、20kHzから1kHzまで拡がったもの1匹であった。残りの1匹は、20kHzと1kHzから0.5kHzまでとで耳介反射消失を示した。

耳介反射消失をきたした5匹の妊娠モルモットのうちで、妊娠後半期にさらに耳介反射消失の拡大を示したものは、20kHzから15kHzまでのもの2匹で、残りの3匹では、耳介反射消失の拡大はみられなかった。3匹の妊娠モルモットは分娩前に流産したので、自然分娩をしたのは3匹の妊娠モルモットであった。自然分娩をした3匹のモルモットのうち、1匹は分娩後1週目にまた他の1匹は2週目に耳介反射消失の拡大を示した。

上記の自然分娩した3匹の母モルモットから、それぞれ2匹、3匹、5匹の新生モルモットが生まれた。これらの10匹の新生モルモットについて、生後1週目と2週目に行なった20kHzから0.5kHzまでの周波数音域の耳介反射試験では、高音域にも低音域にも耳介反射の消失は起こらなかった。

b. 妊娠後半期における TOB 投与の妊娠モルモットと在胎モルモットの聴覚におよぼす影響

TOB 50 mg/kg/日を妊娠7週から28日間あるいは26日間にわたって投与した7匹の妊娠モルモットと、妊娠8週から24日間あるいは21日間投与した2匹の妊娠モルモットのうち、2匹は注射開始前から、20kHzまたは20kHzと15kHzとで耳介反射消失を示していたが、注射終了後も耳介反射消失の拡大を示さなかったため、TOB投与による障害はないといちおう考えた。他の1匹は、注射開始1週から20kHzで耳介反射の消失をきたした (Table 15)。これら9匹の妊娠モルモットでは、流産は1例もみられなかった。分娩後1週で、1匹は20kHzと15kHzとで耳介反射消失をきたし、他の1匹は20kHzから1kHzまでの耳介反射消失を起こした。分娩後2週では、3匹が20kHzに始まる耳介反射消失をきたしていた。耳介反射消失の拡がりは、20kHz 1匹、20kHzと15kHz 1匹、20kHzから2

kHzまでと0.5kHzとの耳介反射消失が1匹であった。

上述の9匹の妊娠モルモットから、1匹、2匹または3匹ずつの新生モルモット20匹が生まれたが、生後1週と2週とで行なった耳介反射試験では、耳介反射の消失は1例もみられなかった。

TOB 100 mg/kg/日を妊娠7週から28日間または24日間投与した5匹と、妊娠8週あるいは9週から23日間または14日間投与した3匹の妊娠モルモットのうち、1匹だけが注射開始前から20kHzの耳介反射消失を起こしていた (Table 16)。TOB使用中に、8匹中6匹が耳介反射消失またはその拡大をきたし、耳介反射消失の範囲は20kHzに1匹、20kHzと15kHzに1匹、20kHzから10kHzまで1匹、20kHzから8kHzまで1匹、20kHzから1kHzまで1匹、20kHzから0.5kHzまで1匹ずつであった。妊娠後半期に投与した8匹の妊娠モルモットには流産はみられなかったが、分娩後は7例に耳介反射の消失あるいは消失範囲の拡大がみられた。

これら8匹の母モルモットから、2匹または3匹ずつの新生モルモットが合計20匹生まれましたが、うち2匹は、生後1週以内に死亡した。生後1週目で行なった耳介反射試験では、20匹の新生モルモットのうち、高音域での耳介反射消失を示したものは1例もなかった。しかしながら、生後2週目で行なった耳介反射試験では、生存した18匹の新生モルモットのうち、20kHzから0.5kHzまでの広範な音域の耳介反射消失を示した母モルモットから生まれた2匹の新生モルモットの1匹が、20kHzに限局した耳介反射の消失を起こした。残りの17匹の新生モルモットには、検査したいずれの周波数域においても耳介反射の消失をきたしたものはなかった。

c. 小 括

TOB 50 mg/kg/日を妊娠前半期に28日間投与した場合には、母モルモットにも、それから生まれた13匹の新生モルモットにも耳介反射の消失はみられなかった。しかしながら、TOB 50 mg/kg/日を妊娠後半期に28日間または21日間投与した場合には、母モルモットの22% (9匹中2匹) に20kHzに限局した耳介反射消失がみられ、さらに分娩後には、4匹 (44%) に耳介反射の消失または消失範囲の拡大が起こった。しかし、生まれた20匹の新生モルモットでは、耳介反射消失は1例もみられなかった。これらの結果は、TOB 50 mg/kg/日投与では、妊娠前半期でも妊娠後半期でも、在胎モルモットの聴器の発育および胎生後半にできあがった聴器に対する障害はほとんどないと考えられる。

TOB 100 mg/kg/日を妊娠前半期に28日間投与した場合には、83% (6匹中5匹) に投与後の耳介反射消失

Table 14 Frequency range of pinna reflex loss in 6 pregnant guinea pigs received TOB 100 mg/kg for 4 weeks during early half of gestation period and pinna reflex loss of maternal and newborn guinea pigs in post partum period.

Dose Duration	Gestation period										Post partum	
	1 ^W	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1 ^W	2
100 mg/kg x 28 d. (No. 22)	-	-	-	1←20 kHz	1←20 kHz	1←20 kHz	1←20 kHz		1←20 kHz			abortion
100 mg/kg x 28 d. (No. 52)	-	-	-	-	20 kHz	20 kHz	20 kHz	15←20 kHz				abortion
100 mg/kg x 28 d. (No. 57)	-	-	-	-	-	-	-	-				abortion
100 mg/kg x 28 d. (No. 2)	-	-	-	-	20 kHz	10←20 kHz	15←20 kHz	15←20 kHz				15←20 kHz
100 mg/kg x 28 d. (No. 44)	-	-	15←20 kHz	15←20 kHz	10←20 kHz		15←20 kHz	15←20 kHz	10←20 kHz			2* (-) 1←20 kHz
100 mg/kg x 28 d. (No. 51)	-	-	-	20 kHz	0.5←1 20 kHz	0.5←1 20 kHz	0.5←2 15←20 kHz		15←20 kHz			3* (-) 0.5←2 20 kHz 5* (-)

- : positive pinna reflex
 () : pinna reflex of newborn guinea pigs
 * : number of newborn sibling guinea pigs

Table 15 Frequency range of pinna reflex loss in 9 pregnant guinea pigs received TOB 50 mg/kg for 3 to 4 weeks during later half of gestation period and pinna reflex loss of maternal and newborn guinea pigs in post partum period

Dose Duration	Gestation period					Post partum	
	6 ^W	7	8	9	10	1 ^W	2
50 mg/kg x 21 d. (No. 47)		—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	15←20 kHz 3*(-)	15←20 kHz 3 (-)
50 mg/kg x 24 d. (No. 31)		—	← 20 kHz — — — — — →	← 20 kHz — — — — — →	← — — — — — →	— 3*(-)	20 kHz 3 (-)
50 mg/kg x 26 d. (No. 46)	20 kHz	← 20 kHz — — — — — →	← 20 kHz — — — — — →	← 20 kHz — — — — — →	← — — — — — →	20 kHz 3*(-)	15←20 kHz 3 (-)
50 mg/kg x 27 d. (No. 43)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	— 2*(-)	20 kHz 2 (-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 5)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	1←20 kHz 2*(-)	0.5, 2←20 kHz 2 (-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 10)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	— 2*(-)	— 2 (-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 25)	15←20 kHz	← 20 kHz — — — — — →	← 15←20 kHz — — — — — →	← 15←20 kHz — — — — — →	← — — — — — →	15←20 kHz 2*(-)	20 kHz 2 (-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 27)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	— 1*(-)	— 1 (-)
50 mg/kg x 28 d. (No. 30)	—	← — — — — — →	← — 20 kHz — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	— 2*(-)	— 2 (-)

— : positive pinna reflex

(-) : pinna reflex of newborn guinea pigs

* : number of newborn sibling guinea pigs

Table 16 Frequency range of pinna reflex loss in 8 pregnant guinea pigs received TOB 100 mg/kg for 2 to 4 weeks during later half of gestation period and pinna reflex loss of maternal and newborn guinea pigs in post partum period

Dose Duration	Gestation period					Post partum	
	6 ^W	7	8	9	10	1 ^W	2
100 mg/kg x 14 d. (No. 9)			← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	15←20 kHz 2*(-)	15←20 kHz 2 (-)
100 mg/kg x 22 d. (No. 36)		—	← — — — — — →	← — — — — — →	← 15←20 kHz — — — — — →	0.5←20 kHz 2*(died)	0.5←3 kHz 12←20 kHz
100 mg/kg x 23 d. (No. 12)		← 20 kHz — — — — — →	← 20 kHz — — — — — →	← 20 kHz — — — — — →	← 0.5←20 kHz — — — — — →	2←20 kHz 2*(-)	1←20 kHz 1 (20 kHz) 1 (-)
100 mg/kg x 24 d. (No. 21)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← 10←20 kHz — — — — — →	← — — — — — →	0.5←20 kHz 2*(-)	0.5←20 kHz 2 (-)
100 mg/kg x 28d. (No. 26)		← — — — — — →	← 3←20 kHz — — — — — →	← 1←20 kHz — — — — — →	← 1←20 kHz — — — — — →	0.5←20 kHz 3*(-)	2←20 kHz 3 (-)
100 mg/kg x 28 d. (No. 40)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	0.5←20 kHz 3*(-)	0.5, 1, 6←20 kHz 3 (-)
100 mg/kg x 28 d. (No. 48)	—	← — — — — — →	← — 20 kHz — — — — — →	← 8←20 kHz — — — — — →	← — — — — — →	0.5←20 kHz 3*(-)	0.5←20 kHz 3 (-)
100 mg/kg x 28 d. (No. 53)	—	← — — — — — →	← — — — — — →	← — — — — — →	← 20 kHz — — — — — →	— 3*(-)	— 3 (-)

— : positive pinna reflex

(-) : pinna reflex of newborn guinea pigs

* : number of newborn sibling guinea pigs

が 20 kHz だけに、あるいは 20 kHz から 10 kHz まで、または 20 kHz から 1 kHz までに起こった。これら 6 匹のうち 3 匹 (50%) に流産がみられたが、残りの 3 匹から生まれた 10 匹の新生モルモットには耳介反射消失は起こらなかった。TOB 100 mg/kg/日を妊娠後半期に 28 日間あるいは 14 日間投与した場合には、投与後の耳介反射消失は 8 例中 6 例 (75%) にみられた。しかし、流産は 1 例も起こらなかった。母モルモットには、87.5% (8 匹中 7 例) に分娩後の耳介反射消失あるいは消失範囲の拡大がみられた。生まれた 20 匹の新生モルモットのうち 2 匹は、出生後死亡し、生き残った 18 匹のうち 1 匹が、20 kHz に限局した耳介反射消失を起こした。すなわち、100 mg/kg/日投与では、妊娠後半期のほうが、母モルモットの聴覚に及ぼす障害は著しいように考えられたが、新生モルモットの聴覚に対する障害は、20 kHz に限局した耳介反射消失が 28 例中 1 例に認められただけで、聴器障害はきわめて少ないと考えられる。なお、新生モルモットの聴器障害については、これら動物の内耳の病理組織学的検索が終了した後に、さらに検討を加えることにしたい。

考 案

アミノ配糖体抗生物質を投与した場合に、臨床的には、難聴やめまいまたは眼振などの聴覚障害や平衡機能障害が現れることがあるが、このような抗生物質投与の場合に起こる機能障害は、聴覚系でも、平衡感覚系でも、末梢部の感覚上皮、すなわち、ラセン器あるいは前庭器の有毛細胞に起こる一次的な強い障害によって起こされることが、最近の研究によってしだいに明らかにされてきている⁸⁻¹¹⁾。抗生物質による難聴の発現と進展様式には、臨床的に特徴があって、難聴はほとんど常にヒトで行なえる聴力検査の最高周波数の 8000 Hz に始まり、難聴が進展する場合には、高音からより低音へと拡大してゆき、2000 Hz 以下まで障害が広がると会話に支障をきたすようになる。動物に抗生物質を投与した場合にも、聴覚障害は高音から始まり、より低音へと拡大してゆくことが明らかにされているし、また、ラセン器の有毛細胞は、蝸牛 1 回転下端部から障害をうけ、その障害は、下端部から上方回転の方向へ次第に拡大してゆくことが明らかにされている。秋吉ら (1971)¹¹⁾ は、Aminodeoxykanamycin (40, 80, 200 mg/kg), Aminostidine (200 mg/kg), Dihydrostreptomycin (200, 400 mg/kg), Gentamicin (25 mg/kg), Lividomycin (200, 400 mg/kg), Kanamycin (200, 400 mg/kg), Vistamycin (400 mg/kg), Capreomycin (400 mg/kg), Tubercinomyacin (100, 400 mg/kg), Viomycin (100, 200, 400

mg/kg) などのアミノ配糖体抗生物質とペプチド抗生物質を投与した 124 匹のモルモットの蝸牛の連続切片の組織学的検索によって、ラセン器の外有毛細胞の消失は、ほとんど常に蝸牛 1 回転の下端部に始まり、さらに下端部から上方回転へと拡大する傾向を示すことを明らかにしている。その後 AKIYOSHI & SATO (1974)¹²⁾ は、Kanamycin, 3', 4'-Dideoxykanamycin B, BB-K8, Vistamycin, Gentamicin, Tobramycin, Butirosin などのアミノ配糖体抗生物質を投与した 201 匹のモルモットについて、20 kHz から 0.5 kHz までの検査純音周波数帯域をもつオーディオメーターで、耳介反射の消失範囲を測定し、また、注射終了後に、内耳のセロイジン連続切片でラセン器の外有毛細胞の消失範囲を検索した。そして上記抗生物質を投与したモルモットでは、耳介反射消失は、ほとんど常にモルモットでの最高周波数の 20 kHz から始まり、障害が拡大する場合には、20 kHz からより低い周波数域へと耳介反射消失範囲が広がってゆくこと、さらにラセン器の外有毛細胞の消失は、ほとんど常に蝸牛 1 回転下端部より始まり、耳介反射消失例では、耳介反射の 20 kHz からの消失範囲と、外有毛細胞の 1 回転下端部からの消失範囲とが比較的良好に対応することを認めている。

Streptomycin sulfale (SM) のように、とくに前庭器の有毛細胞に対して障害を起こし易い抗生物質を除けば、その他のアミノ配糖体抗生物質あるいはペプチド抗生物質は、モルモットのラセン器の外有毛細胞に強い障害を起こし易い (秋吉, 1973)¹³⁾。

したがって、アミノ配糖体抗生物質あるいはペプチド抗生物質の聴器毒性を、モルモットで判定する目的には、蝸牛ラセン器の外有毛細胞の障害を機能的ならびに形態学的に検索することによって、聴器毒性を判定しうると考えられる。このさい、モルモットにおける抗生物質による聴器障害の場合に認められる、20 kHz に始まり漸次低い周波数域へ拡大する耳介反射消失の拡大様式と、ラセン器の 1 回転下端に始まり、漸次上方の回転へと拡大する外有毛細胞消失の拡大様式とに注意を払うことによって、聴器毒性を判定するためのラセン器の機能的ならびに形態学的障害の拡がりや、かなり正確にとらえることができると考えられる。

1) 短期間、大量投与時の聴器におよぼす影響

TOB と GM ならびに KM の聴器毒性を、TOB : 50, 100 mg/kg/日, GM : 40, 100 mg/kg/日, KM : 100, 200, 400 mg/kg/日を 28 日間 (KM 400 mg/kg/日だけは 14 日間) 投与したモルモットにおいて、20 kHz から 0.5 kHz までのオーディオメーターを用いて耳介反射の消失を測定し、さらに、ラセン器の 1 回転下端から頂

回転までにわたって外有毛細胞の消失範囲を観察して、両者の結果を比較した。それぞれの測定結果、観察結果は前述の Table 9, Table 10 にまとめたとおりである。

まず、TOB と GM の聴器毒性を TOB 50 mg/kg/日と GM 40 mg/kg/日を投与した場合で比較すると、耳介反射消失では、TOB のほうが耳介反射消失をきたした動物数も少なく、その拡がりも、TOB は 15 kHz までであるのに対し、GM では、4 kHz、あるいは 0.5 kHz にまで拡がっている。これを組織学的に外有毛細胞の消失範囲でみると、TOB 50 mg/kg/日では、消失の拡がりか1回転下端から Hook 下部までであるのに対し、GM 40 mg/kg/日では、1/4 回転にまで拡がっており、耳介反射消失からみても、また組織学的にみても、TOB は GM より聴器毒性が少ないことがわかる。

TOB 100 mg/kg/日、GM 100 mg/kg/日投与した場合においても同様で、20 kHz から 0.5 kHz までの広範な周波数帯の耳介反射消失を起した動物数は、GM で明らかに多く、外有毛細胞の消失範囲も広範にわたっている。

いっぽう、TOB と KM の比較をしてみると、KM 100 mg/kg/日では、耳介反射の消失は1匹もみられず、外有毛細胞の消失は1回転下端部にだけに限局されており、明らかに KM は TOB より聴器毒性が弱いことを示している。以上をまとめてみると、100 mg/kg/日の等量比較においては、KM の聴器毒性が最も弱く、ついで TOB で、GM が最も強いという結果であった。

しかし、ここで考慮に入れなければならないのは、KM の臨床投与量である。KM の常用投与量を 1g/日とすると、体重 50 kg の人で 20 mg/kg/日となる。そこで、TOB の臨床試験推奨用量の最高量 (5mg/kg/日) の10倍である 50 mg/kg/日と、KM の常用量の10倍である 200 mg/kg/日を投与したモルモットの場合で比較してみると、耳介反射消失では、KM のほうが少ない傾向がうかがえるが、外有毛細胞の消失は、KM のほうが明らかに広範囲に、かつ高頻度で発生している。したがって、臨床投与量を考慮にいれば、TOB の聴器毒性は KM よりも弱く、TOB の 5 mg/kg/日を用いた場合での聴器障害は、腎機能に障害がなく、かつラセン器の有毛細胞の感受性が、とくに大きくないかぎり、KM 20 mg/kg/日を用いた場合よりはむしろ軽いと考えられる。しかし、この点については、臨床の投与例についてさらに吟味する必要がある。

2) 長期間、少量投与時の聴器におよぼす影響

抗生物質の臨床投与量の聴器に対する安全性を評価することは、臨床応用にあたって緊要なことにはちがいないが、これ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。とくに重要な点は、種の差異にもとづくラセン器の有毛細胞の感受性の差異や、有毛細胞の障害の発生機序の差異にあると考えられるが、この他に、飼育条件や実験条件などについても問題がある。したがって、種の差異を少なくするために、すでにサルでの実験が行なわれている。今回の動物試験では、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/日との投与量を、90 日間モルモットに注射し、注射前、注射期間中、最終注射後の各時期に、20 kHz から 0.5 kHz までの周波数帯域で耳介反射測定を行ないながら、耳介反射の消失の発現を観察した。しかしながら、耳介反射の域値は、大体正常範囲中であって、耳介反射の消失は、高音域においても、また低音域においても1例も認められなかった。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が、モルモットでの耳介反射消失のみでみる限りでは、このような投与量では、聴力障害はみられない。今後は、抗生物質の聴器に対する安全性を、動物試験レベルで評価するための判定基準の確立が強く望まれることになろう。

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

ヒトでは、内耳の膜迷路の原基になる耳小囊は、胎生 29 日頃にでき、これから半規管、卵形囊、球形囊、内リンパ管および内リンパ囊、蝸牛管が分化していく。半規管の大きさは、胎生 22 週頃に最終的の大きさになり、蝸牛管は、胎生 10 週頃に2回転半になる。有毛細胞の出現は、斑では胎生 10 週頃であるが、蝸牛内のラセン器の分化は、胎生 5~7 カ月頃までに1回転起始部(下端)から2回転半の頂回転の方向へ向かって進んでいくといわれている(秋吉, 1972)¹⁴⁾。したがってヒトでは、内耳の発生は胎生 1 カ月までに始まり、胎生 5~7 カ月頃までの間に前庭器やラセン器の分化は終わり、胎生末期には、内耳膜迷路の構造はすでにできあがっていることになる。モルモットの在胎期間は平均 70 日(10 週)であって、新生モルモットは出生後 1 週目で、20 kHz から 0.5 kHz までの周波数の純音刺激に対して、かなり高い頻度で、陽性の耳介反射を示す。したがって、モルモットでも、胎生末期には、内耳の膜迷路の構造はできあがっていると考えられる。そこで、今回は、胎生前半期に起こる内耳膜迷路の発生過程におよぼす抗生物質の影響と、内耳膜迷路の発生がいちおう完了して膜迷路の

構造ができあがった胎生後半期のラセン器におよぼす抗生物質の影響とをみるために、TOBを50 mg/kg/日と100 mg/kg/日との投与量で、妊娠前半期と妊娠後半期にそれぞれ4週間注射し、自然分娩後1週目と2週目に新生モルモットの耳介反射を、20 kHz から 0.5 kHz の周波数帯域で測定した。

TOB 50 mg/kg/日を4週間またはそれに近い期間投与した場合には、妊娠前半期の投与でも、妊娠後半期の投与でも、33匹の新生モルモットには耳介反射消失は1例もみられなかった。TOB 100 mg/kg/日を4週間またはそれに近い期間投与した場合には、妊娠の前半期の投与でも、後半期の投与であっても、母モルモットには、75～83%に高音域あるいは高音域から低音域へわたる耳介反射消失がみられた。そして、妊娠前半期にTOB 100 mg/kg/日を4週間投与した母モルモットの50%は、流産を起こした。また、妊娠後半期にTOB 100 mg/kg/日を4週間またはそれに近い期間投与した母モルモットから生まれた20匹の新生モルモットのうち2匹は、出生後間もなく死亡した。しかしながら、TOB 100 mg/kg投与の妊娠モルモットから生まれた28匹の新生モルモットの耳介反射試験では、耳介反射消失は、妊娠後半期に投与された母モルモットから生まれた新生モルモットの1匹に20 kHzに局限して認められただけで、その他の新生モルモットには認められなかった。最近行なった秋吉ら¹⁵⁾の実験では、妊娠モルモットにアミノ配糖体抗生物質を長期間投与した場合に、新生モルモットの内耳では蝸牛1回転下端に局限したラセン器の外有毛細胞の消失がみられる場合と、蝸牛4回転後半部のラセン神経節細胞の減形成と、それに対応するラセン器に外有毛細胞の短小ならびにダイテル細胞の欠如をとまなう比較的軽い発生障害を起こす場合とが認められている。これらの胎生期に起こった内耳の変化のうち、蝸牛1回転下部のラセン器の外有毛細胞の消失は、20 kHzでの耳介反射消失として新生モルモットの耳介反射試験で測定しうる可能性があるが、4回転後半部のラセン神経節とラセン器との形成障害は、0.5 kHzまでの低音域の耳介反射試験では、新生モルモットでも測定不能である。したがって、進行中の蝸牛の病理組織学的検索がすむまでは、はっきりした内耳の障害像は明らかにできないが、耳介反射試験の結果と病理組織学的所見とはよく一致する点からみて、母モルモットに聴力障害を現すような大量のTOBを投与した場合でも、在胎モルモットの内耳に対するTOBの影響はほとんどないか、あってもきわめて軽度なものと考えられる。

総 括

TOBの聴器毒性を動物試験で判定するために、Hartley系モルモットに、TOB(50, 100 mg/kg/日)とGM(40, 100 mg/kg/日)とKM(100, 200 mg/kg/日)とをそれぞれ4週間筋肉内注射した場合、およびTOB(3, 6 mg/kg/日)を3カ月間筋肉内注射した場合、さらにTOB(50, 100 mg/kg/日)を妊娠の前半期または後半期に4週間前後筋肉内注射した場合について、20 kHzから0.5 kHzまでの検査純音周波数帯をもつオーディオメーターで、耳介反射消失を測定するとともに、注射終了後に、内耳組織の連続切片による病理組織学的検索を併せ行ない、つぎのような結果をえた。

1. 100 mg/kg/日を4週間筋肉内注射した場合での聴器障害は、KMが最も軽く、TOBがこれにつき、GMは最も重かった。TOB(50 mg/kg/日と100 mg/kg/日)とGM(40 mg/kg/日と100 mg/kg/日)との4週間の投与では、聴器障害は、TOBのほうがGMより軽かった。TOBの臨床試験推奨用量の上限の5 mg/kg/日の10倍量と、KMの臨床投与量の20 mg/kg/日の10倍量とをそれぞれ4週間投与した場合の聴器障害は、TOBのほうがKMよりも軽かった。

2. TOBの臨床試験推奨用量の3 mg/kg/日と、その倍量の6 mg/kg/日とをそれぞれ3カ月間投与した場合には、耳介反射の消失は、20 kHzまでの高周波数音域においても、また低周波数音域においても1例もみられなかった。

3. 妊娠の前半期または後半期にTOBを4週間投与した場合、50 mg/kg/日の投与量では、母モルモットの聴覚に対する障害は軽く、それから生まれた33匹の新生モルモットには、耳介反射消失は1例もなかった。100 mg/kg/日の投与量では、母モルモットの75～83%に、20 kHzから始まる耳介反射消失がみられ、妊娠前半期投与では、50%に流産が起こった。しかしながら、28匹の新生モルモットには、20 kHzに局限した耳介反射消失が1匹に認められただけであった。

4. 以上のモルモットで行なった動物試験の結果からみて、TOBの聴器毒性による内耳障害は、TOB 5 mg/kg/日までの臨床投与量の場合では、KM 20 mg/kg/日の臨床投与量の場合よりも軽く、GM 4 mg/kg/日の臨床投与量の場合よりも軽いと考えられる。また、TOB 5 mg/kg/日までの臨床投与量は、妊娠中に投与された場合でも、投与期間が4週以内では胎児の聴器に対する障害を起こす危険はほとんどないと考えられる。

5. TOB投与モルモットの前庭器には障害はみられなかった。

文 献

- 1) STARK, W.M.; M.M. HOEHN & N.G. KNOX: Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex I. Detection and biosynthesis. *Antimicrob. Agents & Chemoth.*: 314~323, 1967
- 2) WICK, W.E. & J.S. WELLES: Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex IV. *In vitro* and *in vivo* laboratory evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.*: 341~348, 1967
- 3) BRUMMETT, R.E.; M.M. MEIKLE & J.A. VERNON: Ototoxicity of tobramycin in guinea pigs. *Arch. Otolaryng.* 94: 59~63, 1971
- 4) BRUMMETT, R.E.; D. HIMES, B. SAINES & J. VERNON: A comparative study of the ototoxicity of tobramycin and gentamicin. *Arch. Otolaryng.* 96: 505~512, 1972
- 5) HAWKINS, JR. J.E. & H. ENGSTRÖM: Effect of kanamycin on cochlear cytoarchitecture. *Acta otolaryng. Suppl.* 188: 100~107, 1964
- 6) ENGSTRÖM, H. & A. KOHONEN: Cochlear damage from ototoxic antibiotics. *Acta otolaryng.* 59: 171~178, 1965
- 7) KOHONEN, A.: Effect of some ototoxic drugs upon the pattern and innervation of cochlear sensory cells in the guinea pig. *Acta otolaryng. Suppl.* : 208, 1965
- 8) NAGABA, M.L.: Electron microscopic study of semicircular canal organs and otolith organs of squirrel monkeys after administration of streptomycin sulfate. *Acta otolaryng.* 66: 541~552, 1968
- 9) LINDEMAN, H.H.: Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta otolaryng.* 67: 177~189, 1969
- 10) WATANUKI, K. & A. MEYER ZUM GOTTESBERGE: Toxic effects of streptomycin and kanamycin upon the sensory epithelium of the crista ampullaris. *Acta otolaryng.* 72: 59~67, 1971
- 11) 秋吉正豊, 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
- 12) AKIYOSHI, M. & K. SATO: Simple valuable audiometry in high frequency range in guinea pigs for screening of ototoxicity of antibiotics. Program and abstracts of the 14th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16, 1974
- 13) 秋吉正豊: 中毒による難聴。 *薬物療法* 6: 1061~1065, 1973
- 14) 秋吉正豊: 遺伝性難聴について。 *Audiology Japan* 15: 83-84, 1972
- 15) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 庄司 侃, 菅広 敬, 田島たよ子, 小枝武美, 小滝益三, 横田正幸: 3', 4'-Dideoxykanamycin B を妊娠モルモットに投与した場合の新生仔モルモットの聴器の変化について。 *Jap. J. Antibiotics* 27 (6): 735~745, 1974

OTOTOXICITY OF TOBRAMYCIN IN GUINEA PIGS

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.

Ototoxicity of tobramycin (TOB) has been evaluated in guinea pigs by BRUMMETT, *et al.* (1971) and then compared with ototoxicity of gentamicin (GM) by BRUMMETT, *et al.* (1972). Their electrophysiological study of the cochlear alternating current potential and histopathological examination of the outer and inner hair cells of the organ of Corti on the surface specimens indicated that TOB must be considered to be toxic to the auditory system, and GM is more damaging to the guinea pig cochlea than is TOB.

The present authors performed the following series of animal tests for evaluation of ototoxic effect of TOB on young adult guinea pigs and intrauterine guinea pig embryos.

Materials and methods:

Series 1: A total of 60 albino guinea pigs of the Hartley strain initially weighing between 300 and 350 gm were employed in the series 1 of the present animal experiments. These animals were allotted to the following groups and injected intramuscularly with TOB, GM and kanamycin (KM) in various doses for 14 to 28 days, respectively.

TOB : 50 mg/kg/day, 28 days, 10 guinea pigs

TOB : 100 mg/kg/day, 28 days, 10 (1 died)

GM : 40 mg/kg/day, 28 days, 10 (1 died)

GM : 100 mg/kg/day, 28 days, 10 (1 died)

KM : 100 mg/kg/day, 28 days, 10

KM : 200 mg/kg/day, 28 days, 5

KM : 400 mg/kg/day, 14 days, 5 (1 died)

The pinna reflex was measured with audiometer with the frequency range from 500 hertz to 20 kilohertz (kHz) before, during and after injection of the antibiotics within a double walled acoustically shielded room, to detect the occurrence of pinna reflex loss at the individual frequencies, especially in high frequency range from 10 kHz to 20 kHz. At the end of the experiment, each animal was anesthetized with nembutal and the thoracic cavity was opened in median line to carry out the intravital perfusion of the vascular system through the aorta with physiological saline solution and then subsequent intravital fixation of the animal with WRTMAACK's fixative. After the intravital fixation the skull was removed and fixed in the same fixative for 7 to 10 days. The skulls were decalcified in PLANK-RYCHLO's solution and the blocks including bilateral temporal bones were trimmed. These blocks were rinsed under running water for 24 to 48 hours, then dehydrated and embedded in celloidin. Serial celloidin sections of the inner ear were sectioned in horizontal direction. Each 5 section was stained with hematoxylin-eosin.

Series 2: Six Hartley strain albino guinea pigs (300 to 350 gm at the start of the injection) were divided into following 2 groups to evaluate a security of the recommended doses of TOB for clinical study in long-term administration.

TOB : 3 mg/kg/day, 90 days, 2 guinea pigs

TOB : 6 mg/kg/day, 90 days, 3 guinea pigs

The pinna reflex audiometry mentioned above was performed on each animal before, during and after

the injection of TOB to detect the occurrence of the pinna reflex loss at individual frequencies ranging from 500 Hz to 20 kHz. After the last injection individual animals underwent intravital perfusion fixation with WITTMACK's fixative under nembutal narcosis. The skulls of the guinea pigs are in process of celloidin embedding for histologic examination of the inner ear.

Series 3: After confirmation of the presence of sperms in the vaginal smear administration of TOB (50 mg/kg/day, 100 mg/kg/day) to pregnant guinea pigs started in 2 week or in 7 week of gestation and lasted for 4 weeks or 2 weeks. Pinna reflex of the pregnant and new born guinea pigs was measured with audiometer with the frequency range from 500 Hz to 20 kHz during pregnancy and after delivery. The temporal bones were in process of celloidin embedding.

Summary of the results:

1. Series 1: Audiometrical and histopathological examination suggest that TOB is less ototoxic than GM in administration of 100 mg/kg/day for 4 weeks, but more ototoxic than KM. However, ototoxic effect was milder in guinea pigs received 50 mg/kg/day of TOB for 4 weeks than in guinea pigs treated with 200 mg/kg/day of KM and 40 mg/kg/day of GM for 4 weeks, respectively.

2. Series 2: All of guinea pigs received 3 mg/kg/day and 6 mg/kg/day of TOB for 90 days indicated positive pinna reflex in the extensive frequency range from 500 Hz to 20 kHz. Audiometrically, pinna reflex loss did not occur in any animal of these received the dose of TOB similar to the recommended dose for clinical study.

3. Series 3: Intramuscular administration of TOB (50 mg/kg/day for 4 weeks) to the pregnant guinea pigs during early half of the gestation period or later half caused less frequently disappearance of the pinna reflex in 20 kHz, and all of the new born guinea pigs indicated positive pinna reflex in the all frequency range from 500 Hz to 20 kHz. On the other hand, intramuscular administration of TOB (100 mg/kg/day for 4 to 2 weeks) to the pregnant guinea pigs resulted in disappearance of the pinna reflex in 75 % and 83 %. Administration of TOB (100 mg/kg/day for 4 weeks) in early half of gestation period induced abortion in 50 %. However, even at such toxic dose to the pregnant guinea pigs, new born guinea pigs from the remaining pregnant guinea pigs received TOB (100 mg/kg/day for 4 to 2 weeks) showed positive pinna reflex in the all frequency range from 500 Hz to 20 kHz, except one guinea pig which indicated pinna reflex loss confined to 20 kHz.

4. There was no remarkable damage in the vestibular organ in guinea pigs received TOB (50 mg/kg/day, 100 mg/kg/day for 4 weeks and 3 mg/kg/day, 6 mg/kg/day for 3 months).