

KW-1070 (Fortimicin) の内耳に対する影響について

秋吉正豊・矢野三郎・中田穂出美・奈良哲次

鶴見大学歯学部病理学教室

西川 智・原 卓司・大黒友路

協和発酵工業株式会社安全性研究室

幼若なモルモットと妊娠モルモットを用いて4組の耳毒性試験を行ない次のような成績をえた。

- 1) KW-1070 を 200mg/kg と 400mg/kg の投与量で、それぞれ4週間筋注した場合のラセン器と前庭器に対する毒性は軽く、投与量の増加による影響は軽度であった。
- 2) KW-1070 の 10mg/kg と 100mg/kg の投与量で、それぞれ90日間筋注した場合のラセン器と前庭器に対する毒性は弱かった。
- 3) 妊娠直後より4週間、妊娠6週目より分娩までの約4週間、KW-1070 の 100mg/kg と 200mg/kg とをそれぞれ筋注した場合の母モルモットと新生モルモットの内耳の障害は軽度であった。
- 4) 400mg/kg の4週間筋注の場合の比較ではKW-1070 の耳毒性はRSMに近く、現在開発されているアミノ配糖体系抗生剤のうちでは最も耳毒性の弱い群に位置づけられる。
- 5) KW-1070 (200mg/kg) の1回筋注後にフロセミド(100mg/kg)の追加静注を行なうことによって、KW-1070 に有毛細胞のエネルギー代謝を障害する性質のあることが明らかになった。
- 6) KW-1070 を単独筋注した場合の弱い耳毒性は内耳の有毛細胞の膜を障害する作用が弱いためであると推論された。

KW-1070 (fortimicin) は新しいアミノ配糖体系抗生剤であって、*Micromonospora olivoasterospora* によって産生されたものである。本剤は、緑膿菌に対する抗菌力はさほど強くはないが、その他のグラム陰性桿菌に対して強い抗菌力をもっていて、広範囲の抗菌スペクトルを示す。そのうえに、アミノ配糖体系抗生剤について現在知られている不活化酵素のうちで、ただ一つの不活化酵素(AAC(3)-I)によってアセチル化をうけるだけで、他の不活化酵素の影響をうけないという特徴をもっている。

われわれは本剤の内耳に対する影響を検討するために、モルモットについて、急性毒性実験、慢性毒性実験、経胎盤性急性毒性実験、ループ利尿剤との併用実験を行ない、単独投与の場合には本剤による内耳障害が著しく軽度であることを明らかにしたので、これらの結果について報告したい。

I. 実験材料および方法

動物はモルモットを使い、単独投与とループ利尿剤との併用の場合には幼若なモルモット84匹を用い、経胎盤性急性毒性実験には57匹の妊娠モルモットと、それから生れた159匹の新生モルモットについて検索を行なった。

- 1) 急性毒性実験 KW-1070 200mg/kg, 400mg/kg,

kg, 600mg/kg ずつ連日4週間筋肉内注射した。他方、ribostamycin (RSM) を400mg/kg ずつ連日4週間筋肉内注射した。各群の動物数は10匹ずつであった。

- 2) 慢性毒性実験 KW-1070 を10mg/kg と100mg/kg とをそれぞれ連日90日間筋肉内注射した。
- 3) 経胎盤性急性毒性実験 塗抹標本の検索でモルモットの腔内に精子の存在を確認しえた日を妊娠1日とし、妊娠直後から4週間投与し、妊娠前期投与群とし、さらに妊娠6週目より分娩までの約4週間投与したものを妊娠後期投与群とした。

(a) 妊娠前期急性毒性実験

KW-1070 100mg/kg 4週間筋肉内投与 10匹
 " 200mg/kg 4週間筋肉内投与 8匹
 対照 生理的食塩水 0.1ml/100g 筋肉内注射 8匹

(b) 妊娠後期急性毒性実験

KW-1070 100mg/kg 4週間筋肉内投与 10匹
 " 200mg/kg 4週間筋肉内投与 10匹
 対照 生理的食塩水 0.1ml/100g 筋肉内注射 11匹

- 4) KW-1070 とループ利尿剤との併用実験

KW-1070 200mg/kg を3匹のモルモットに1回筋肉内注射し、投与後にフロセミド(furosemide) 50mg/kg と100mg/kg をそれぞれ1回静脈内注射した。

広周波数域の耳介反射試験、聴覚に対する影響をみるために、20K, 15K, 12K, 10K, 8K, 6K, 4K, 3K, 2K, 1K および 500Hz の各周波数における耳介反射を投与開始前、投与中および投与終了後の各時間に測定した。妊娠モルモットにおける急性毒性実験では、妊娠中と、分娩後2週まで測定を行なった。また、新生モルモットは出生後1週と2週とにそれぞれ耳介反射試験を行なった。KW-1070 とループ利尿剤との併用実験では、KW-1070 投与前と筋注後2時間と、フロセミド静注直後、30分、1時間、2時間、4時間、1日、2日、3日、7日の各時期にそれぞれ耳介反射を行なった。

上記の実験終了後に、各動物は nembutal 麻酔下で正中線上で開胸し、KW-1062 (秋吉 1977¹⁾) におけると同様な方法で生体灌流固定した後、PLANK-RYCHLO の迅速脱灰液で切除した両側側頭骨を脱灰、通法にしたがって、セロイジン包埋とし、両側側頭骨の水平断面連続セロイジン切片を作成し、5枚ごとの切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し、蝸牛および前庭の各部位にわたって病理組織学的検索を行なった。

ただし、KW-1070 とループ利尿剤の併用実験の一部の動物には、実験終了時に nembutal 麻酔下で、断頭直ちに側頭骨を切除し、中耳腔を露出し、nitro-blue tetrazolium (Nitro-BT) による超生体還元反応 (秋吉ら 1976²⁾, SAITO et al. 1980³⁾) を行ない内耳有毛細胞のエネルギー代謝に対する影響を組織化学的に観察した。

II. 実験結果

1. 体重および全身に対する影響

1) 急性毒性実験

(1) 生理的食塩水 0.1 ml/100g 体重を4週間連日筋注した10匹のモルモットのうち2匹は注射開始後1週頃に4g前後の減少を示したが、その後は4週まで順調な増加(99~148g)を示した。

(2) KW-1070 200mg/kg を4週間連日筋注した10匹のモルモットのうち2匹は注射開始後1週頃 2~16gの体重減少を示し、2週では1匹が61gの減少を示した。しかしそれ以後は4週まで体重の減少をきたしたものはなかった。4週における体重増加は36~162gであって、対照群(1)に比較すると、増加の少ないものが4匹みられた。

(3) KW-1070 400mg/kg を4週間連日筋注した10匹のモルモットのうち、注射開始後1週では4匹が5~53gの減少をきたし、2週では9匹中2匹が9~60gの減少を、3週では9匹中1匹が56gの減少を、4週では7匹中1匹が18gの減少を示した。途中2週で1匹、4週で2匹が死亡した。4週の体重増加は17~68gであった。

(4) KW-1070 600mg/kg を4週間連日筋注した場合には、死亡が多く、注射開始後1週で4匹が死亡した。生存した6匹のうち5匹は1~64gの体重減少をきたした。生存動物は2週と3週では2匹ずつ、4週では1匹に減少したが、これらの生存動物には体重の減少はみられなかった。しかしながら、4週における体重増加は23gであった。

(5) RSM 400mg/kg を4週間連日筋注した場合には、体重減少は注射開始後1週で10匹中6匹が10~37gの減少を、2週では10匹中5匹が1~48g、3週では10匹中5匹が5~26g、4週では10匹中3匹が8~24gの体重減少をそれぞれ示した。途中で死亡したものはなかったが、4週における体重増加は15~78gで、これらのほとんどは42g以下の軽度の増加を示していた。

(6) 小括 以上の急性毒性実験におけるKW-1070とRSMの体重に対する影響をみると、KW-1070投与群では200mg/kg投与群が、体重に対する障害が最も軽く、対照の生理的食塩水投与群に最も近い体重増加の推移を示していた。しかし、体重増加と全身に対する障害と投与群の間にはdose-responseの関係がみられ、400mg/kg投与群では体重減少動物は軽度ながら増加し、同時に少数の死亡動物があらわれた。600mg/kg投与群では4週間投与群ではわずかに1匹が生存しただけで、全体に対する障害はさらに強くあらわれていた。400mg/kg投与量におけるKW-1070投与群とRSM投与群との体重減少動物数は、KW-1070投与群では1週10匹中4匹、2週9匹中2匹、3週9匹中1匹、4週7匹中1匹であって、3匹が途中で死亡しているのに対してRSM投与群では1週10匹中6匹、2週10匹中5匹、3週10匹中5匹、4週10匹中3匹である。この結果は400mg/kg投与量の4週間投与では、全身に対する障害はKW-1070の方がRSMよりも軽度ながら弱いことを示すものであろう。

2) 慢性毒性実験

(1) 生理的食塩水 0.1 ml/100g 体重を90日間連日筋注した10匹のモルモットでは、注射開始時の体重は362~400gであったが、その後体重増加は順調の推移をとり、30日後に504~615g、60日後に625~810g、90日後に730~920gの体重を示していた。

(2) KW-1070 投与

(a) KW-1070 10mg/kg を90日間連日筋注した10匹のモルモットも、注射開始時の体重は366~402gで、その後も順調な体重増加をきたしていた。すなわち、30日後では510~642g、60日後では650~826g、90日後では737~937gであって、途中で死亡したものはなかった。

Table 1 Hearing impairment, Cochlear damage and Vestibular damage in Guinea pigs treated with physiological saline solution 0.1 ml/100 g B.W i.m. for 4 weeks

Guinea pig No.	Pinna reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Others
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	
1	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	+	(US)	
4	-	-	-	-	-	+	(US)	
5	-	-	-	-	-	+	(US)	
6	-	-	-	-	-	+	(U)	
7	-	-	-	-	-	+	(S)	
8	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	

Table 2 Hearing impairment, Cochlear damage, Vestibular damage and Renal damage in Guinea pigs treated with KW-1070 (200 mg/kg) i.m. for 4 weeks

Guinea pig No.	Hearing impairment Pinna Reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Renal tubular damage			
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	Cloud swell	Regen.	Inter. stit.	
1 (11)	-	-	-	-	-	+	(USP)	-	-	-	-
2 (12)	-	-	-	-	-	+	(US)	-	+	+	-
3 (13)	-	-	-	-	-	+	(US)	-	-	-	-
4 (14)	-	-	-	-	-	+	(US)	-	+	-	-
5 (15)	-	+	(BEU)	-	-	+	(LPUS)	-	+	-	-
6 (16)	-	-	-	-	-	+	(LUS)	-	+	+	-
7 (17)	-	-	-	-	-	+	(ALUS)	-	-	-	-
8 (18)	-	-	-	-	-	+	(US)	-	+	-	-
9 (19)	-	-	-	-	-	+	(LPUS)	-	+	+	-
10 (20)	-	-	-	-	-	+	(LPUS)	-	+	-	-
	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	7/10	3/10	0/10	

(b) KW-1070 100mg/kg を90日間連日筋注した10匹のモルモットは、注射開始時の体重は372~416gで、その後も順調な体重増加をきたし、体重の減少や途中で死亡した動物はいなかった。体重の推移は、30日後で510~594g、60日後で628~756g、90日後に720~893gであった。

(3) 小括 以上の慢性毒性実験における体重に対する影響は、KW-1070の10mg/kg 90日間筋注ではほとんど対照群と差異がなく、体重に対してほとんど障害を与えないことを示している。またKW-1070 100mg/kg 90日間筋注の場合でも、体重および全身に対する影響はほとんどないことを示しているように考えられる。

3) 経胎盤性急性毒性実験

妊娠直後から4週間、生理的食塩水0.1ml/100g体重、KW-1070 100mg/kg、200mg/kgをそれぞれ筋注した妊娠モルモットは比較的順調な体重増加を示した。また、妊娠6週目から分娩まで、生理的食塩水0.1ml/100g体重、KW-1070 100mg/kg、200mg/kgをそれぞれ筋注した妊娠モルモットも同様に比較的順調な体重増加を示した。

2. 耳介反射に及ぼす影響

1) 急性毒性実験

(1) 生理的食塩水0.1ml/100g体重を4週間連日筋注した10匹のモルモットでは、著しい域値の上昇ま

Table 3 Hearing impairment, Cochlear damage, Vestibular damage and Renal damage in Guinea pigs treated with KW-1070 (400 mg/kg) i.m. for 4 weeks

Guinea pig No.	Hearing impairment Pinna Reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Renal tubular damage		
		OHC-loss (BEU)*	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	Cloud swell	Regen.	Inter. stit.
1 (21)*	-	+	-	-	-	+ (PUS)	-	-	-	-
2 (22)	-	-	-	-	-	+ (US)	-	+	-	-
3 (23)	-	-	-	-	-	+ (PUS)	-	+	-	-
4 (24)	-	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	-	-	-
5 (25)*	-	-	-	-	-	+ (LPUS)	-	-	-	-
6 (26)	-	-	-	-	-	+ (LPUS)	-	+	-	-
7 (27)	-	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	+	-	-
8 (28)	-	-	-	-	-	+ (PS)	-	-	+	-
9 (29)	-	-	-	-	-	+ (US)	-	+	-	-
10 (30)*	-	-	-	-	-	+ (PUS)	-	-	+	-
	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	5/10	2/10	0/10

+ : Animal which died in the course of the treatment

* : Otitis media

Table 4 Hearing impairment, Cochlear damage, Vestibular damage and Renal damage in Guinea pigs treated with KW-1070 (600 mg/kg) i.m. for 4 weeks

Guinea pig No.	Hearing impairment Pinna Reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Renal tubular damage		
		OHC-loss (BEU)	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	Cloud swell	Regen.	Inter. stit.
1 (31)*	- (6 d)	-	-	-	-	+ (LUS)	-	-	-	-
2 (32)*	- (11 d)	-	-	-	-	+ (US)	-	N +	-	-
3 (33)*	-									
4 (34)*	-									
5 (35)*	- (4 d)	-	-	-	-	+ (US)	-	-	-	-
6 (36)*	- (10 d)	+ (BEU)	-	-	-	+ (LUS)	-	-	-	-
7 (37)	- (28 d)	-	-	-	-	+ (US)	-	+ Des.	-	-
8 (38)*	- (27 d)	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	-	+	-
9 (39)*	- (13 d)	-	-	-	+ (4)	+ (ALPUS)	-	+	-	-
10 (40)*	- (8 d)	-	-	-	-	+ (US)	-	+	-	-
	0/10	1/8	0/8	0/8	1/8	8/8	0/8	4/8	1/8	0/8

+ : Animal which died in the course of the treatment

たは低下をきたしたものはなかった。すなわち4週目の測定では、20kHzでは4dBまでの域値上昇あるいは6dBまでの域値低下、12kHzでは2dBまでの域値上昇あるいは8dBまでの域値低下、8kHzでは4dBまでの域値上昇、2kHzでは4dBまでの域値上昇あるいは低下を示していた (Table 1)。

(2) KW-1070 200mg/kgを4週間連日筋注した10匹のモルモットでも、著しい域値の上昇または低下ある

いは耳介反射消失はみられなかった (Table 2)。すなわち、4週目の測定では、20kHzでは4dBまでの域値上昇あるいは10dBまでの域値低下、12kHzでは4dBまでの域値上昇あるいは2dBまでの域値低下、8kHzでは4dBまでの域値上昇あるいは2dBまでの域値低下を示していた。

(3) KW-1070 400mg/kgを4週間連日筋注した10匹の動物では、途中で3匹が死亡したが、生存した7匹

Table 5 Hearing impairment, Cochlear damage, Vestibular damage and Renal damage in Guinea pigs treated with RSM (400 mg/kg) i.m. for 4 weeks

Guinea pig No.	Hearing impairment Pinna Reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Renal tubular damage		
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	Cloud swell	Regen.	Interstit.
1 (41)	-	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	+	+	+
2 (42)	-	-	-	-	-	+ (US)	-	+	+	-
3 (43)	+ *	+ (2PU)	-	-	-	+ (ALPUS)	-	N +	+	+
4 (44)	-	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	-	+	-
5 (45)	+ *	-	-	-	-	+ (PUS)	-	-	+	-
6 (46)	-	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	+	+	-
7 (47)	-	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	N +	+	+
8 (48)	-	-	-	-	-	+ (LPUS)	-	N +	#	+
9 (49)	-	-	-	-	-	+ (LPUS)	-	+	#	-
10 (50)	+ *	-	-	-	-	+ (ALPUS)	-	+	+	+
	3/10	1/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	8/10	10/10	5/10

* Otitis media

Table 6 Hearing impairment, Cochlear damage and Vestibular damage in Guinea pigs treated with physiological saline solution 0.1 ml/100 mg B.W. i.m. for 90 days

Guinea pig No.	Pinna reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Others
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	
1	-	-	-	-	-	+ (US)	-	
2	-	-	-	-	-	+ (AS)	-	
3	-	-	-	-	-	+ (S)	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	+ (S)	-	
6	-	-	-	-	-	+ (S)	-	
7	-	-	-	-	-	+ (U)	-	
8	-	-	-	-	-	+ (S)	-	
9	-	-	-	-	-	+ (US)	-	
10	-	-	-	-	-	+ (U)	-	

の動物の4週目の測定では、10dB以上の域値上昇を広範な周波数あるいは高周波数域に示したものが2匹いたが、耳介反射の消失はなかった (Table 3)。

(4) KW-1040 600mg/kg を4週間投与した動物では10匹中1匹だけが、4週間生存した。この動物には耳介反射の著しい域値上昇も、消失もみられなかった (Table 4)。

(5) RSM 400mg/kg を4週間投与した動物では途中で死亡したものはなく、10匹が全部4週間生存した。これらの動物のうち3匹は、投与開始後2週あるいは3週または4週において、低音 (500Hz, 1kHz, 2kHz) または同時に高音 (20kHz) に耳介反射の消失を起こした

(Table 5)。これらの動物は、実験終了時に行なった、側頭骨の病理組織学的検索によって、両耳に中耳炎による線維化が認められ、蝸牛には1匹を除いてラセン器の有毛細胞および、ラセン神経節に異常がみられなかった。

(6) 小括 以上の結果は、KW-1070 は200mg/kg でも400mg/kg でも4週間の筋注では20kHzから500Hzまでの広周波数域の耳介反射に対してほとんど障害を与えないことを示し、聴覚に対する障害が非常に軽いことを示唆しているように考えられる。一方、RSMの400mg/kg投与では、4週間の筋注では内耳障害による耳介反射消失はほとんどみられなかったと考えることができる。したがって、400mg/kgの4週間投与では、耳

Table 7 Hearing impairment, Cochlear damage and Vestibular damage in Guinea pigs with KW-1070 (10 mg/kg) i.m. for 90 days

Guinea pig No.	Pinna Reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Others
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	
201	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	± (S)	-	
7	-	-	-	-	-	± (U)	-	
8	-	-	-	-	-	± (S)	-	
9	-	± (HU)*	-	-	-	± (US)	-	
10	-	-	-	-	-	± (S)	-	

* : Incomplete loss

Table 8 Hearing Impairment, Cochlear damage and Vestibular damage in Guinea pigs treated with KW-1070 (100 mg/kg) i.m. for 90 days

Guinea pig No.	Pinna Reflex-loss (20~0.5 kHz)	Cochlear damage				Vestibular damage		Others
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	
301	-	BE (±)	-	-	4.3 ±	± (USL)	-	+
2	-	-	-	-	-	± (U)	-	+
3	-	-	-	-	4.3 ±	± (US)	-	+
4	-	-	-	-	4 ±	± (US)	-	+
5	-	-	-	-	-	± (USP)	-	+
6	-	BE (+)	-	-	-	± (US)	-	+
7	-	-	-	-	4 ±	± (US)	-	+
8	-	-	-	-	4.3 ±	± (U)	-	+
9	-	-	-	-	4.3 ±	± (US)	-	+
10	-	-	-	-	4 ±	± (S)	-	+

介反射試験では、KW-1070 と RSM との聴覚毒性にはほとんど差異がなく、ともに非常に弱いと考えられる。

2) 慢性毒性実験

(1) 生理的食塩水 0.1 ml/100 g 体重を連日 90 日間筋注した 10 匹のモルモットには、20 kHz から 500 Hz までの広範な周波数域で行なった耳介反射試験では、6 dB 以上の耳介反射の域値の上昇も低下もみられなかった (Table 6)。

(2) KW-1070 投与群

(a) KW-1070 10 mg/kg を 90 日間連日筋注した 10 匹のモルモットのうち途中で死亡したものは 1 匹もなかった。20 kHz から 500 Hz までの周波数域における耳介反射の域値上昇と低下は 6 dB までであって、著しい域値の上昇も、耳介反射消失もみられなかった (Table 7)。

(b) KW-1070 100 mg/kg を 90 日間投与した 10 匹のモルモットでも途中で死亡したものは 1 匹もなかった。耳介反射の域値の上昇は 6 dB まで、低下は 4 dB までで、著しい域値の上昇も、耳介反射消失もみられなかった (Table 8)。

(3) 小括 すなわち、以上の結果は、KW-1070 の 10 mg/kg、および 100 mg/kg をそれぞれモルモットに 90 日間筋注した場合に聴覚に対してほとんど障害を与えないことを示していると考えられる。

3) 経胎盤性急性毒性実験

(1) 妊娠前期急性毒性実験

(a) 生理的食塩水 0.1 ml/100 g 体重を妊娠直後より 4 週間筋注した 8 匹の妊娠モルモットでは、投与終了時においても、投与終了後 3 週、分娩直後、分娩後 1 週およ

び2週においても、20kHz、15kHz、12kHz、10kHz、8kHz、6kHz、4kHz、3kHz、2kHz、1kHz、500Hzの各周波数における耳介反射には著しい域値の上昇も低下もみられなかった。域値の変動範囲は6dBまでの上昇と低下を示していた、耳介反射消失はみられなかった。

これらの妊娠モルモットからは2匹または3匹の新生モルモットが生れた。これら21匹の新生モルモットについて行なった。生後1週と2週における20kHzから500Hzまでの上記周波数における耳介反射試験では、1例を除き、残りの全例が耳介反射陽性を示した。上記1例は低音と高音で耳介反射消失をきたしたが、組織学的

検索で中耳炎の存在が確認され、ラセン器には損傷は認められなかった (Table 9)。

(b) KW-1070 100mg/kg を妊娠直後より4週間筋注した10匹の妊娠モルモットでは、投与終了時においても、さらに投与終了後3週、分娩直後、分娩後1週および2週においても、20kHz、15kHz、12kHz、10kHz、8kHz、6kHz、4kHz、3kHz、2kHz、1kHz、500Hzの各周波数における耳介反射には著しい域値の上昇も低下も、耳介反射の消失もみられなかった。域値の変動範囲は上昇6dBまで、低下8dBまでであった (Table 9)。

これらの妊娠モルモットから2匹から4匹までの新生

Table 9 Hearing impairment, Cochlear damage and Vestibular damage in Newborn guinea pigs from pregnant guinea pigs treated with physiological saline solution (0.1 ml/100 g) and KW-1070 (100 mg/kg, 200 mg/kg) respectively i.m. for 4 weeks in early pregnancy period

Guinea pig No.	Pinna Reflex-loss Incidence	Cochlear damage				Vestibular damage		Others
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	
Control								
MG	0/8	0/8	0/8	0/8	2/8	1/8	0/8	
NG	0/21	0/21	0/21	1/21	4/21	9/21	0/21	
KW-1070 100 mg/kg								
MG	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	7/10	0/10	
NG	0/29	0/29	0/29	0/29	6/29	22/29	0/29	
KW-1070 200 mg/kg								
MG	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	7/8	0/8	
NG	0/29	0/29	0/29	0/29	1/29	24/29	0/29	

MG : Mother guinea pigs NG : Newborn guinea pigs

Table 10 Hearing impairment, Cochlear damage and Vestibular damage in Newborn guinea pigs from pregnant guinea pigs treated with physiological saline solution (0.1 ml/100 g) and KW-1070 (100 mg/kg, 200 mg/kg) respectively i.m. for 4 weeks in later pregnancy period

Guinea pig No.	Pinna Reflex-loss Incidence	Cochlear damage				Vestibular damage		Others
		OHC-loss	IHC-loss	SpG-loss	Str. v-loss	HC-loss	VG-loss	
Control								
MG	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	3/11	0/11	
NG	0/29	0/29	0/29	0/29	0/29	9/29	0/29	
KW-1070 100 mg/kg								
MG	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	5/10	0/10	
NG	0/25	1/25 U*	0/25	4/25	2/25	12/25	0/25	
KW-1070 200 mg/kg								
MG	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	4/10	0/10	
NG	0/26	1/26 U*	0/26	0/26	2/26	16/26	0/26	

MG : Mother guinea pigs NG : Newborn guinea pigs U* : Unilateral incomplete loss

モルモットが生れたが、1例だけ1匹のものがあつた。これらの29匹の新生モルモットについて行なつた生後1週と2週における20kHzから500Hzまでの上記周波数における耳介反射試験では、全例が耳介反射陽性を示し、耳介反射消失をきたしたものはなかつた。また、著しい域値の上昇も低下もみられなかつた。

(c) KW-1070 200mg/kgを妊娠直後より4週間筋注した8匹の妊娠モルモットでは、投与終了時においても、さらに投与終了後3週、分娩直後、分娩後1週および2週においても、20kHz, 15kHz, 12kHz, 10kHz, 8kHz, 6kHz, 4kHz, 3kHz, 2kHz, 1kHz, 500Hzの各周波数における耳介反射には著しい域値の上昇も低下も、耳介反射の消失もみられなかつた (Table 9)。域値の変動範囲は上昇6dBまで、低下8dBまでであつた。

これらの妊娠モルモットからはそれぞれ3匹あるいは4匹ずつの新生モルモットが生れた。これら29匹の新生モルモットについて行なわれた生後1週と2週における20kHzから500Hzまでの上記周波数における耳介反射試験では、全例が耳介反射陽性を示して、耳介反射消失をきたしたものはなかつた。また、著しい域値の上昇も低下もみられなかつた。

(2) 妊娠後期急性毒性実験

(a) 生理的食塩水 0.1ml/100g 体重を妊娠6週目から分娩まで約4週間筋注した11匹の妊娠モルモットでは、分娩直後においても、分娩後1週および2週においても、20kHz, 15kHz, 12kHz, 10kHz, 8kHz, 6kHz, 4kHz, 3kHz, 2kHz, 1kHz, 500Hzの各周波数にお

ける耳介反射には1例を除き、域値の著しい上昇も低下も、耳介反射の消失もみられなかつた (Table 10)。上記の1例は妊娠投与3週より、分娩後2週にかけて、4kHzから1kHzの周波数域で12~16dBまでの域値上昇を示した。この1例以外の母モルモットにおける域値の変動範囲は8dBまでの上昇と4dBまでの低下であつた。これらの妊娠モルモットから2匹あるいは3匹ずつの新生モルモットが生れたが、1例だけは1匹の新生モルモットであつた。これらの29匹の新生モルモットについて行なつた、生後1週と2週における20kHzから500Hzまでの上記周波数における耳介反射試験では、著しい域値の上昇あるいは低下、また耳介反射の消失をきたしたものはなかつた。

(b) KW-1070 100mg/kgを妊娠6週目から分娩までの約4週間筋注した10匹の妊娠モルモットでは、分娩直後においても、分娩後1週および2週においても、20kHz, 15kHz, 12kHz, 10kHz, 8kHz, 6kHz, 4kHz, 3kHz, 2kHz, 1kHz, 500Hzの各周波数における耳介反射には1例も著しい域値の上昇あるいは低下、または耳介反射の消失をきたしたものはなかつた (Table 10)。域値の変動範囲は6dBまでの上昇と4dBまでの低下であつた。これらの妊娠モルモットからは2匹または3匹ずつの新生モルモットが生れた、これら25匹の新生モルモットについて行なつた、生後1週と2週における20kHzから500Hzまでの上記周波数における耳介反射試験では著しい域値の上昇あるいは低下、または耳介反射の消失をきたしたものはなかつた。

(c) KW-1070 200mg/kgを妊娠6週目から分娩ま

Fig. 1 Time course of Pinna reflex in Guinea pig treated with KW-1070 (200mg/kg i. m.) alone

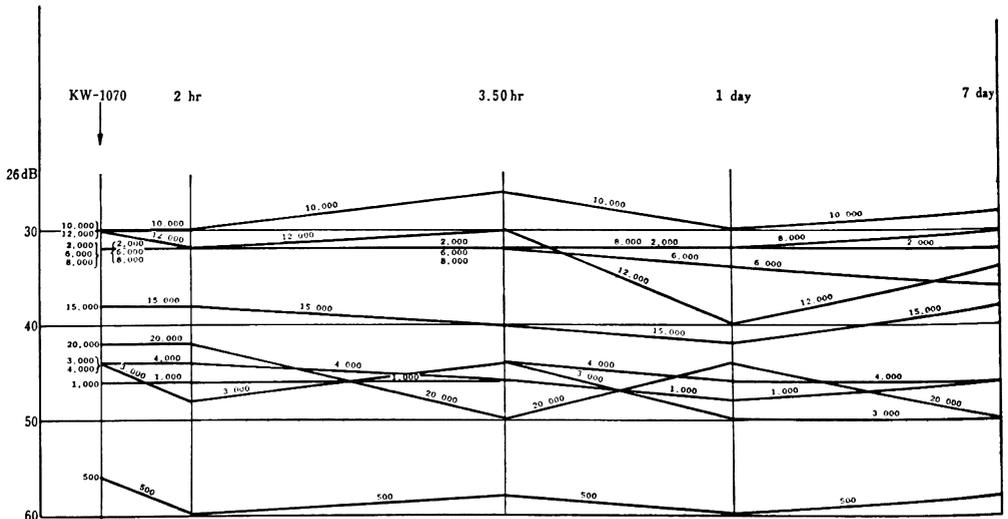


Fig.2 Time course of Pinna reflex-loss in Guinea pig treated previously with KW-1070 (200mg/kg i. m.) and 2 hours later with Furosemide (100mg/kg i. v.)

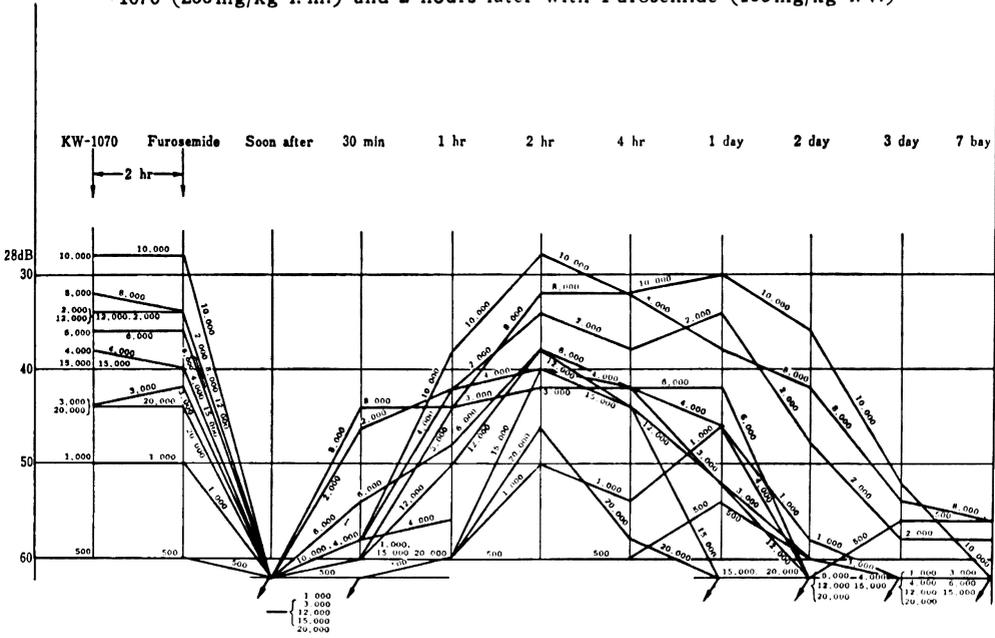
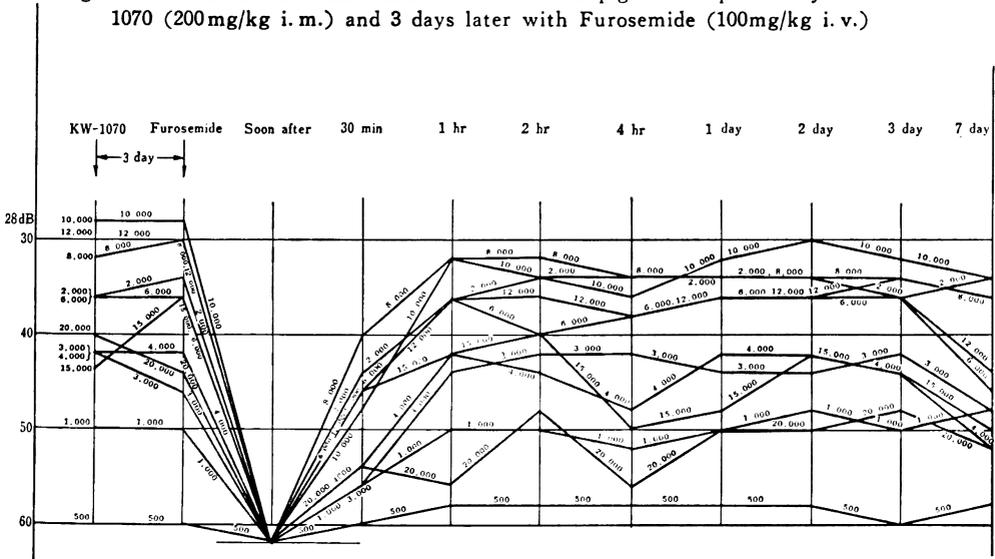


Fig.3 Time course of Pinna reflex-loss in Guinea pig treated previously with KW-1070 (200mg/kg i. m.) and 3 days later with Furosemide (100mg/kg i. v.)

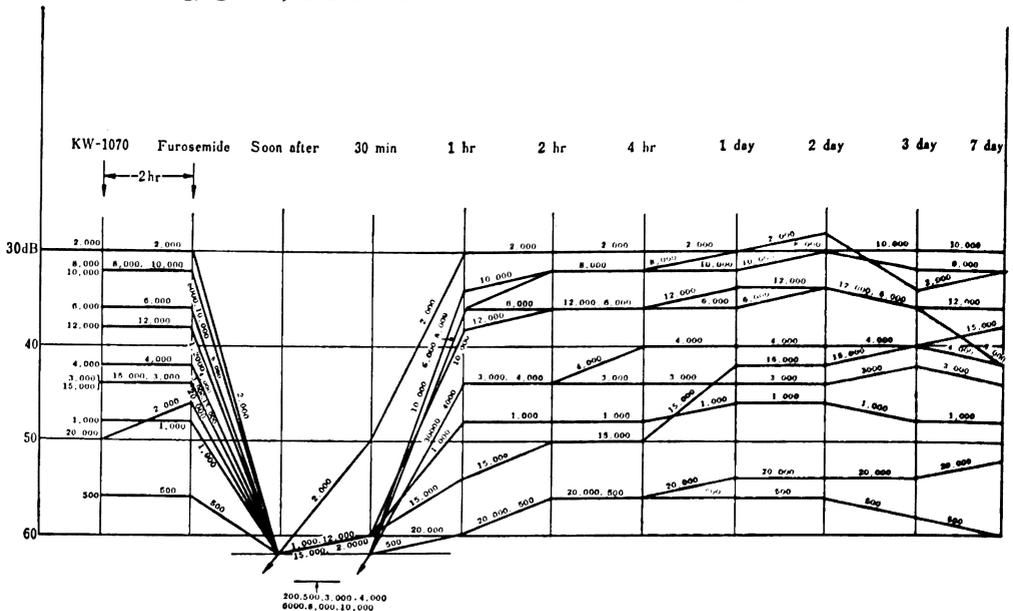


での約4週間筋注した10匹の妊娠モルモットでは、分娩直後においても、分娩後1週および2週においても、20kHzから500Hzまでの各周波数における耳介反射には、著しい域値の上昇も低下も、また耳介反射の消失もみられなかった。域値の変動範囲は10dBまでの上昇と、6dBまでの低下であった (Table 10)。これらの妊娠モルモットからは2匹または3匹ずつ、まれに4匹の新生モルモットが生れた。これら26匹の新生モルモットに

ついて行なった、生後1週と2週における20kHzから500Hzまでの上記周波数における耳介反射試験では、著しい域値の上昇あるいは低下、または耳介反射の消失をきたしたものはなかった。

(3) 小括 以上の妊娠モルモットについて行なった妊娠前期と妊娠後期における急性毒性実験の結果は、KW-1070を100mg/kgと200mg/kgを、妊娠の前期と後期にそれぞれ筋注しても、妊娠モルモットの聴覚に

Fig. 4 Time course of Pinna reflex-loss in Guinea pig treated previously with KW-1070 (200mg/kg i. m.) and 2 hours later with Furosemide (50mg/kg i. v.)



対しても、またそれらの妊娠モルモットから生れた新生モルモットの聴覚に対しても明らかな障害を与えなかったことを示している。

4) KW-1070 とループ利尿剤との併用実験

(1) KW-1070 200mg/kg を1回筋注したモルモットで、注射後2時間、3時間半、1日、7日の各時期に行なった耳介反射試験では、20kHz、15kHz、12kHz、10kHz、8kHz、6kHz、4kHz、3kHz、2kHz、1kHz、500Hzの各周波数における耳介反射に著しい域値の上昇も、耳介反射の消失もみられなかった (Fig. 1)。

(2) KW-1070 200mg/kg を1回筋注したモルモットに、2時間後にフロセミド 100mg/kg を1回静注すると、静注前にはほとんど障害を示していなかった20kHzから500Hzまでの周波数域の耳介反射が、静注直後に20kHzから500Hzまでの広範な周波数域で一過性の耳介反射消失をきたした。その後、耳介反射は2時間から4時間にかけて20kHzから500Hzにかけ、あるいは10kHzから500Hzにかけて回復を示したが、さらに1日後から2日後にかけて、再び20kHzから6kHzまたは4kHzまでの連続性あるいは不連続的な耳介反射消失を起こした。このような再度の耳介反射消失は7日後には動物によってさらに拡大をきたすこと、多少回復を示すことがあった (Fig. 2)。

(3) KW-1070 200mg/kg を1回筋注したモルモットに、3日後にフロセミド 100mg/kg を1回静注すると、静注直後の20kHzから500Hzまでの広範な周波

数域での急激な一過性の耳介反射消失は同じように起るが、30分から1時間後に起こる耳介反射の回復は再度の消失をほとんど起こさないで経過するか、あるいは高音域のみに再度の耳介反射消失をきたし、その後次第に回復を示していた (Fig. 3)。また動物によっては耳介反射の回復が遅れたが、7日までには20kHzと15kHzを除きほとんど耳介反射は回復した。

(4) KW-1070 200mg/kg を1回筋注したモルモットに、2時間後にフロセミド 50mg/kg を1回静注すると、静注直後に20kHzから500Hzにかけて急激な一過性の耳介反射消失をきたした (Fig. 4)。このような一過性の耳介反射消失は30分から1時間には回復はしたが、その後は再度の耳介反射消失を示すことはなかった。

(5) 小括 以上のKW-1070とフロセミドとの併用実験から、次のような点が明らかにされる。すなわち、KW-1070 200mg/kgの1回筋注の場合には、筋注後には20kHzから500Hzまでの測定周波数域では耳介反射の著しい域値の上昇も消失も起らなかったが、KW-1070 200mg/kgを1回筋注してから2時間後にループ利尿剤のフロセミドを100mg/kg 1回静注すると、静注直後に検査した上記の全周波数にわたる広範な耳介反射消失が急激に一過性に起こった。この一過性の広範な周波数域での耳介反射が一旦回復しかけた後に、再度耳介反射消失が種々の拡がりで見られた。この再度の耳介反射消失は、最初に筋注したKW-1070 (200mg/kg)と

次に静注したフロセミド (100mg/kg) との間隔を2時間から3日間に延長することによって、また、KW-1070 (200mg/kg) 筋注2時間後に静注するフロセミド静注の投与量を100mg/kgから50mg/kgに減量することによって、発現がさけられるか、あるいは耳介反射消失の周波数域が著しく縮小することが明らかにされた。

3. 内耳の病理組織学的変化

1) 急性毒性実験

(1) 生理的食塩水 0.1ml/100g 体重を4週間筋注した対照モルモット(10匹)では、内耳の蝸牛ではラセン器の外有毛細胞と内有毛細胞、これらの有毛細胞との関係をもつ第一次ニューロンのラセン神経節、ならびに蝸牛管内の内リンパの分泌部位である血管条には著しい障害像もその部の細胞の消失もみられなかった。しかしながら、前庭器では50%に卵形囊斑と球形囊斑、あるいはいずれか一方に、軽度ではあるが散発性の有毛細胞の消失がみられた。その他の半規管膨大部稜では有毛細胞の消失は明らかでなかった。前庭系の第一次ニューロンである前庭神経節には明らかな障害はみられなかった。

Fig.5 Complete loss of outer hair cells (arrow) of organ of Corti at basal end of right cochlea. Inner hair cells are present. No.15, treated with KW-1070 200mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100

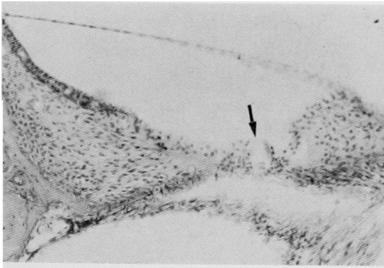


Fig.6 Organ of Corti with outer and inner hair cells at basal end of left cochlea. No.15, treated with KW-1070 200mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100



(2) KW-1070 200mg/kg を4週間筋注したモルモット (10匹)の内耳は、1匹を除いて、ラセン器の外有毛細胞と内有毛細胞の消失も著しい障害像も示してなかった。上記の1匹の内耳では片耳性に1回転下端に局限した外有毛細胞のみの消失がみられた (Fig.5,6)。しかしながら、この群の動物の蝸牛にはラセン神経節にも血管条にも細胞の消失および著しい障害像は認められなかった。前庭器では、軽度ではあるが有毛細胞の散発性消失が100%みられた。有毛細胞の散発性消失は卵形囊斑と卵形囊斑に100%みられ (Fig.7)、さらに、一部の半規管 (外側、後、前)の膨大部稜にもみられた (Fig.8,9)。前庭神経節には細胞の消失はなかった。

これらの動物の腎では、近位尿管上皮の軽度の混濁腫脹 (Fig.10)と散発性の再生が70%と30%にみられたが、間質の細胞浸潤あるいは線維の増生はなかった。

(3) KW-1070 400mg/kg を4週間筋注したモルモット (7匹)の内耳には、蝸牛のラセン器の外有毛細胞と内有毛細胞にも、ラセン神経節細胞にも、血管条にも細胞の消失や著しい障害はみられなかった。途中で死亡した3匹のうち注射後1週で死亡した1匹の内耳には、

Fig.7 Scattered loss of hair cells (arrows) in macula utriculi. No.15 treated with KW-1070 200mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

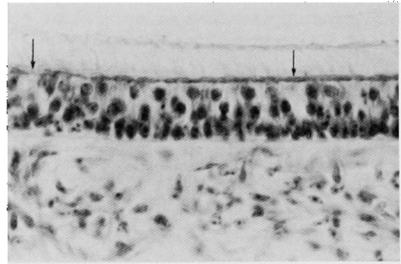


Fig.8 Scattered loss of hair cells (arrows) in crista ampullaris of lateral semicircular canal. No.15, treated with KW-1070 200mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

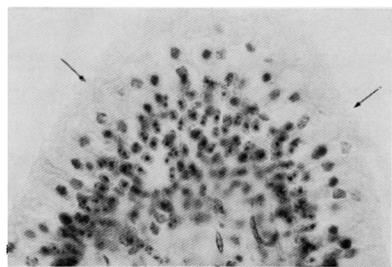


Fig.9 Scattered loss of hair cells in crista ampullaris of posterior semicircular canal. No.15, treated with KW-1070 200mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

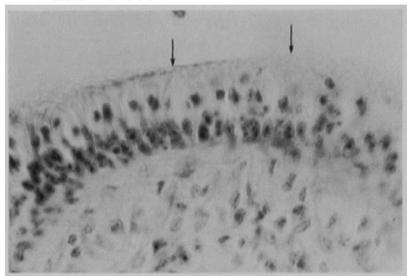


Fig.10 Cloudy swelling of proximal convoluted tubules of kidney. No.15, treated with KW-1070 200mg/kg i. m. for 4 weeks. X 200

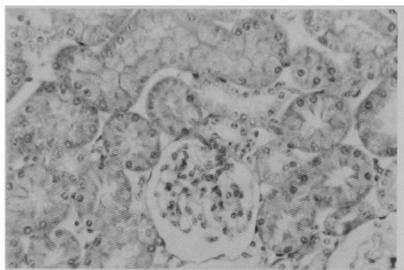
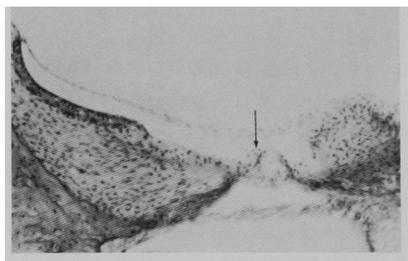


Fig.11 Incomplete loss of outer hair cells of organ of Corti at basal end of right cochlea. Inner hair cells are present. No.21, treated with KW-1070 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100



片側の蝸牛の1回転下端に局限した外有毛細胞のみの不完全消失がみられた (Fig. 11, 12)。その他の死亡動物の内耳には有毛細胞の消失も、その他の細胞の消失もなかった。この群の動物の前庭器には、軽度であるが、有毛細胞の散発性消失が100%にみられていた。これら有毛細胞の消失部位は球形囊斑と卵形囊斑が最多 (Fig. 13, 14)、次いで半規管膨大部稜であった (Fig. 15)。前庭神

Fig.12 Organ of Corti with outer and inner hair cells at basal end of left cochlea. No.21, treated with KW-1070 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100

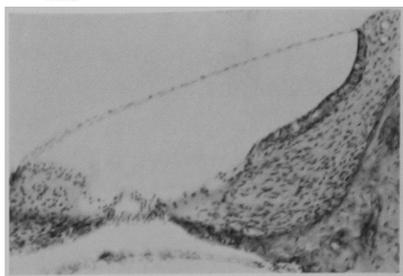


Fig.13 Scattered loss of hair cells (arrows) in macula utriculi. No.21, treated with KW-1070 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

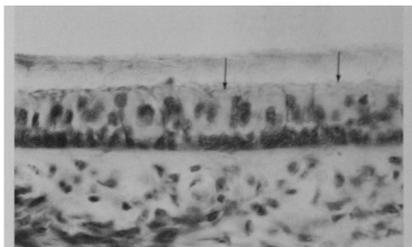


Fig.14 Scattered loss of hair cells (arrows) in macula succuli. No.21, treated with KW-1070 400mg/kg i. m. for weeks. X 400



経節には消失はみられなかった。

この群の動物のうち4週間投与された7匹のうち5匹の腎の近位尿細管上皮には軽度の混濁腫脹があり (Fig. 16)、4週間と3週間投与のそれぞれ1匹には近位尿細管上皮に軽度の再生がみられた。間質には細胞浸潤も線維の増生もなかった。

(4) KW-1070 600mg/kg を投与した群では4週間の筋注をうけたのは1匹だけで、残りの9匹は途中で死亡した。この1匹の内耳には、蝸牛には外有細胞の消

Fig.15 Scattered loss of hair cells (arrows) in crista ampullaris of posterior semicircular canal. No.21, treated with KW-1070 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

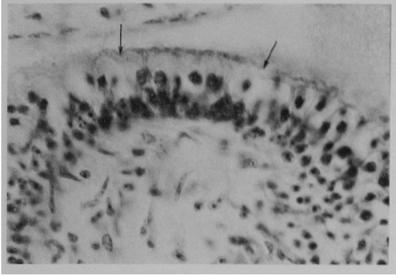


Fig.16 Cloudy swelling of proximal convoluted tubules in kidney. No.21, treated with KW-1070 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100

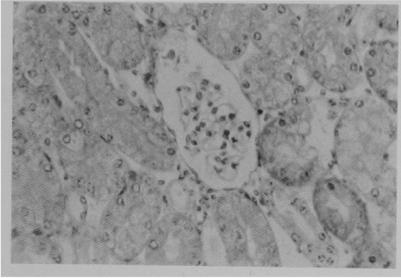
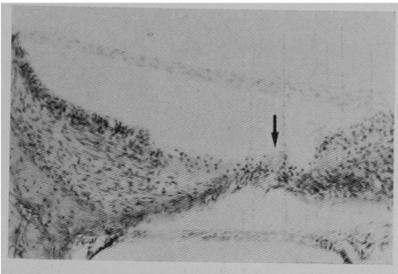


Fig.17 Complete loss of outer hair cells (arrow) in organ of Corti at basal end of right cochlea. Inner hair cells are present. No.36, treated with KW-1070 600mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100



失も、ラセン神経節や血管条における消失もみられなかった。途中で死亡した9匹のうち、1週間の投与後に死亡した1匹の内耳には、片耳性に外有毛細胞だけの1回転下端に限局した消失がみられた (Fig. 17, 18)。前庭器では4週間の投与をうけた動物でも、途中で死亡した動物でも、有毛細胞の軽い散発性消失が卵形囊斑と球形囊斑にほとんど100%に (Fig. 19, 20), その他半規管膨大

Fig.18 Almost complete loss of outer hair cells (arrow) in organ of Corti at lower part of hook of right cochlea. Inner hair cells are present. No.36, treated with KW-1070 600mg/kg i. m. for weeks. X 100

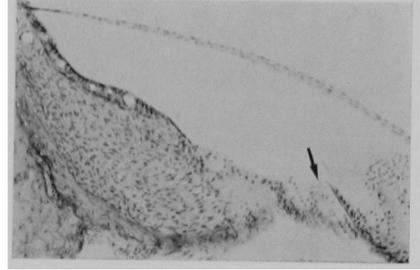


Fig.19 Scattered loss of hair cells (arrows) in macula utriculi. No.36, treated with KW-1070 600mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

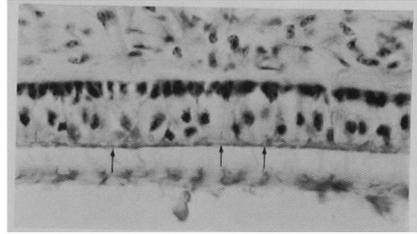
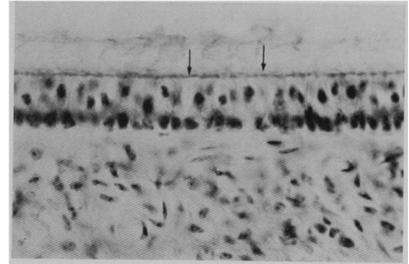


Fig.20 Scattered loss of hair cells (arrows) in macula sacculi. No.36, treated with KW-1070 600mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400



部稜に同様な変化を伴っていた。

この群の動物のうち4週間の投与をうけた1匹の腎では近位尿管上皮の軽度の剝離と再生がみられた。途中で死亡した9匹のうち1匹には近位尿管上皮の限局状の壊死がみられた。また1週間の投与後に死亡した1匹では軽い混濁腫脹が近位尿管上皮に認められた。間質には変化はなかった。

(5) RSM 400mg/kg を4週間筋注した群では、途中で死亡した動物はなかった。10匹の動物のうち、1匹を除き、残りの9匹の内耳には、蝸牛の有毛細胞の消失

Fig. 21 Incomplete loss of outer hair cells (arrow) of organ of Corti in posterior area of second turn of right cochlea. Inner hair cells are present. No. 43, treated with RSM 400 mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100

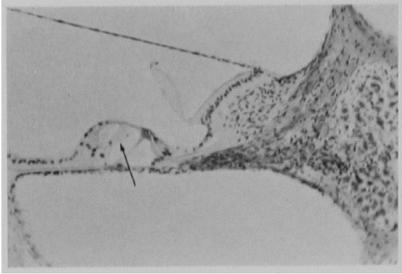


Fig. 22 Organ of Corti with outer and inner hair cells at basal end of right cochlea. Inner hair cells are present. No. 43, treated with RSM 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 100

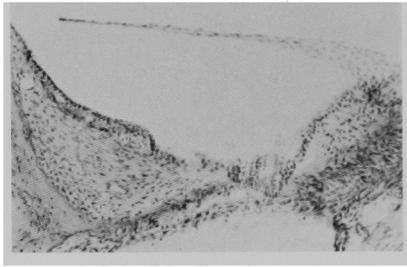
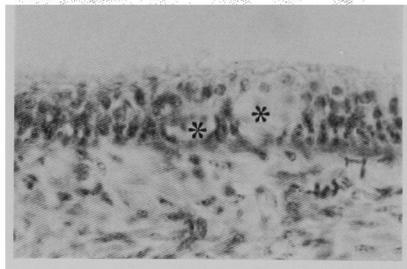


Fig. 23 Scattered loss of hair cells (asterisks) in macula utriculi. No. 43, treated with RSM 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400



も、ラセン神経節や血管条の著しい障害像も認められなかった。上記の1匹の内耳の側の蝸牛は2回転後半部のラセン器に外有毛細胞の不完全消失をきたしていた (Fig. 21, 22)。しかしながら、内毛細胞やラセン神経節や血管条には著変はなかった。これら10匹の前庭器には軽度ではあるが、有毛細胞の散発性消失が、卵形囊斑と球形囊斑では100%に認められていて (Fig. 23),

Fig. 24 Scattered loss of hair cells (arrows) in crista ampullaris of anterior semicircular canal. No. 43, treated with RSM 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

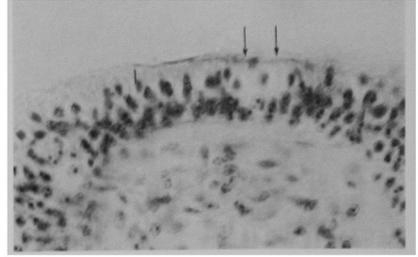


Fig. 25 Scattered loss of hair cells (arrows) in crista ampullaris of posterior semicircular canal. No. 43, treated with RSM 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 400

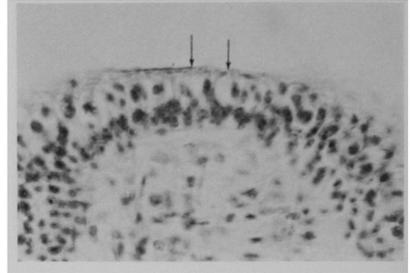
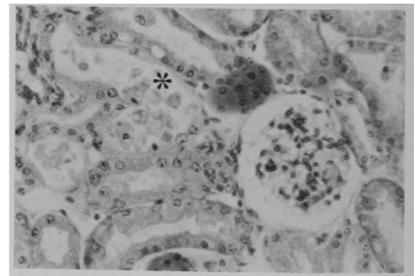


Fig. 26 Occasional necrosis and desquamation of epithelial cells of proximal convoluted tubule (asterisk). Scattered vacuolar degeneration in tubular epithelium. No. 43, treated with RSM 400mg/kg i. m. for 4 weeks. X 200



しばしば前半規管、外側半規管、後半規管の膨大部破にも同様の変化を伴っていた (Fig. 24, 25)。前庭神経節には細胞の消失はなかった。

なお、この群の10匹の動物の腎には、近位尿管上皮には散発性の壊死 (30%) と混濁腫脹 (50%) がみられ、 (Fig. 26), さらに近位尿管上皮の再生像が100%

に、また一部に皮質の間質に軽度の細胞の増生(50%)が認められた。

(6) 小括 生理的食塩水を4週間筋注した場合には、蝸牛のラセン器には外有毛細胞にも内毛細胞にも消失も著しい障害像はみられなかったし、ラセン神経節や血管条にも障害はみられなかった。しかしながら前庭器には卵形囊斑と球形囊斑に有毛細胞の軽い散発性の消失が50%みられていた。KW-1070を4週間筋注した場合には、200mg/kgの投与量では10匹中の1匹の片側の蝸牛に1回転下端に局限した外有毛細胞のみの消失がみられた以外には蝸牛には障害はなかった。一方、前庭器では卵形囊斑と球形囊斑と、半規管膨大部稜の一部に有毛細胞の軽度の散発性消失が100%に認められていた。KW-1070を400mg/kg 4週間投与した場合には、10匹中3匹が途中で死亡したが、生存した7匹の内耳にはラセン器の外有毛細胞の消失はみられなかった。途中で死亡した3匹のうち1匹だけが1回転下端に局限した外有毛細胞のみの不完全消失を示していた。前庭器には有毛細胞の散在性消失が100%にみられたが、その程度は200mg/kgより著しく増強されたということはない。KW-1070を600mg/kgに増量して4週間投与すると、10匹中9匹が途中で死亡し、1匹だけが4週間生存した。この1匹には外有毛細胞の消失はなかった。途中で死亡したうちの1匹だけが蝸牛の1回転下端に局限した外有毛細胞だけの消失がみられた。前庭器の有毛細胞の散発性消失は400mg/kgの場合と比較して特に著しい拡大はみられなかった。これらの結果はKW-1070のラセン器および前庭器に対する障害は非常に軽く、出現頻度も低いことを示すとともに、200mg/kgから400mg/kgへ増量しても内耳の障害はほとんど増強しなかったことを示している。他方RSM 400mg/kg 4週間筋注した10匹の動物のうちの1匹だけが片側の蝸牛の2回転後半のラセン器の一部に外有毛細胞の不完全消失を示していた。前庭器には有毛細胞の散発性の消失が100%にみられたが、半規管膨大部稜への拡大はKW-1070 400mg/kg 4週間筋注動物と著しい差異を示していなかった。なお、これらの動物で行なった腎の病理組織学的検索では近位尿管上皮の変性および再生、ならびに間質の細胞増生の程度は400mg/kgの投与量では、KW-1070の方が、RSMよりも軽い所見を示していた。

2) 慢性毒性試験

(1) 生理的食塩水 0.1ml/100g 体重を90日間筋注した10匹の動物の蝸牛にはラセン器にも、ラセン神経節にも、血管条にも著しい変化はなかった。しかし前庭器には卵形囊斑あるいは球形囊斑に有毛細胞の軽い散

性消失が90%にみられていた。前庭神経節には細胞の消失はなかった。

(2) KW-1070 10mg/kgを90日間筋注した10匹の動物の蝸牛には、1匹を除いては、ラセン器の外有毛細胞および内毛細胞にも、ラセン神経節細胞にも、血管条の細胞にも、消失も著しい障害像もみられなかった。上記の1匹の蝸牛には片耳性に1回転のhookの下部ラセン器に外有毛細胞の不完全消失がみられたが、内毛細胞、ラセン神経節細胞、血管条の細胞には消失も著しい障害も起こっていなかった。この群の10匹の動物の前庭器には50%に卵形囊斑あるいは球形囊斑、それに両方に有毛細胞の軽度の散在性消失がみられた。しかしながら、前庭神経節細胞には消失は認められなかった。

(3) KW-1070 100mg/kgを90日間筋注した10匹の動物のうちの2匹の蝸牛に、片耳性に1回転下端に局限したラセン器の外有毛細胞の不完全消失がみられたのを除いては、その他の動物の蝸牛には、ラセン器にも、ラセン神経節にも細胞の消失や著しい障害は起こっていなかった。しかしながら、血管条には、4回転あるいは4回転から3回転にかけて、毛細血管表層の辺縁細胞の散発性消失や、時には血管条の全層にわたる消失がみられることがあった。この群の10匹の動物の前庭器には100%に卵形囊斑と球形囊斑とのいずれか一方あるいは両者、時にはさらに外側半規管または後半規管の膨大部稜に有毛細胞の軽度の散発性消失がみられていた。前庭神経節には細胞の消失は明らかでなかった。

(4) 小括 以上の結果は、KW-1070 10mg/kgを90日間筋注した場合に蝸牛のラセン器の有毛細胞と前庭器の有毛細胞に対する障害が非常に軽く、内耳に対する安全性の高いことを示している。またKW-1070 100mg/kgの90日間筋注の場合でも、ラセン器の外有毛細胞の消失の頻度は低く、消失部位も1回転下端に局限しており、ラセン器の有毛細胞に対する障害の軽いことを示している。さらに前庭器の有毛細胞に対しても障害の著しい増強はみられていなかった。ただ、血管条の細胞の消失の頻度と広がりとは10mg/kgの場合におけるよりは明らかに増大を示していた。

3) 胚胎盤急性毒性実験

(1) 妊娠前期急性毒性実験

(a) 生理的食塩水 0.1ml/100g 体重を妊娠直後から4週間筋注した8匹の妊娠モルモットの分娩後の2週の内耳には、蝸牛のラセン器とラセン神経節には細胞の消失も、著しい障害像もみられなかった。8匹中の2匹の血管条には4回転と3回転に細胞の消失がみられていた。この群の妊娠モルモットの前庭器には、1匹の球形

囊斑に有毛細胞の軽度の散在性消失があったほかには著変はなかった。前庭神経節にも細胞の消失はみられなかった。

これらの妊娠モルモットから生れた 21 匹の新生モルモットの内耳では、蝸牛のラセン器の有毛細胞には消失はみられなかったが、ラセン神経節には 1 匹の 3 回転に神経細胞の軽度の減少があり、4 匹の 4 回転と 3 回転の血管条には軽度の細胞が減少があった。これら新生モルモットの 9 匹の前庭器には、球形囊斑あるいは卵形囊斑に有毛細胞の軽度の散発性消失がみられた。前庭神経節には細胞の減少はなかった。

(b) KW-1070 100mg/kg を妊娠直後から 4 週間筋注した 10 匹の妊娠モルモットの分娩後 2 週の内耳にはラセン器の外有毛細胞および内毛細胞、ならびにラセン神経節細胞には消失も著しい障害も認められなかった。ただ 1 匹の 4 回転の血管条に軽度の細胞の減少がみられていた。前庭器では、卵形囊斑と球形囊斑あるいはいずれか一方に有毛細胞の軽度の散在性消失が 70% に起こっていた。前庭神経節に著変はみられなかった。

これらの妊娠モルモットから生れた 29 匹の新生モルモットの内耳には、蝸牛のラセン器の有毛細胞、ラセン神経節細胞には消失はみられなかった。しかしながら 6 匹の内耳の血管条では 4 回転の辺縁細胞に散発性消失が起きていた。前庭器では卵形囊斑と球形囊斑のいずれか一方あるいは両方に有毛細胞の軽度の散発性消失がみられたが、前庭神経節には著変はなかった。

(c) KW-1070 200mg/kg を妊娠直後から 4 週間筋注した 8 匹の妊娠モルモットの分娩後 2 週の内耳には、蝸牛のラセン器の有毛細胞、ラセン神経節細胞には消失も著しい障害もみられなかった。1 匹の 4 回転の血管条に萎縮がみられた。前庭器では、7 匹の卵形囊斑と球形囊斑、まれに前半規管あるいは外側半規管の膨大部後に有毛細胞の軽い散発性消失がみられたが、前庭神経節には著変はなかった。

これらの妊娠モルモットから生れた 29 匹の新生モルモットの内耳には、蝸牛のラセン器の有毛細胞にも、ラセン神経節細胞にも消失はみられなかった。1 匹の 4 回転の血管条に辺縁細胞の散発性消失がみられた。これらの 29 匹の新生モルモットの 24 匹の前庭器には、卵形囊斑と球形囊斑のいずれか一方あるいは両方と、まれに後半規管膨大部後における有毛細胞の散発性消失が起きていたが、前庭神経節には著変はなかった。

(2) 妊娠後期急性毒性実験

(a) 生理的食塩水 0.1ml/100g 体重を妊娠 6 週目から分娩までの約 4 週間に筋注した 11 匹の妊娠モルモットの分娩後 2 週を経た時期の内耳には、蝸牛のラセン

器の有毛細胞にも、ラセン神経節細胞にも、血管条の細胞にも消失も著しい障害もみられなかった。前庭器では、3 匹の球形囊斑に有毛細胞の軽度の散発性消失を起こしていたが、前庭神経節には著変はなかった。これらの妊娠モルモットから生れた 29 匹の新生モルモットの内耳には、蝸牛のラセン器にも、ラセン神経節にも、血管条にも細胞の消失および著変はみられなかった。前庭器には 9 匹の球形囊斑に有毛細胞の軽い散発性消失がみられていたが、前庭神経節には著変はなかった。

(b) KW-1070 100mg/kg を妊娠 6 週目から分娩までの約 4 週間筋注した 10 匹の妊娠モルモットの分娩後 2 週を経た時期の内耳には、2 匹の頂回転あるいは 4 回転と 3 回転のラセン神経節に神経細胞の軽い減少がみられたのを除いては、ラセン器にも、ラセン神経節にも、

血管条にも、細胞の消失および著しい障害は認められなかった。前庭器では 5 匹の卵形囊斑あるいは球形囊斑に有毛細胞の軽い散発性消失がみられた以外には著変はなかった。前庭神経節にも細胞の減少はみられなかった。これらの妊娠モルモットから生れた 25 匹の新生モルモットの内耳には、1 匹の蝸牛に片耳性に 1 回転下端に局限した外有毛細胞の不完全消失と、4 匹の 4 回転と 3 回転におけるラセン神経節細胞の軽度の減少と、2 匹の 4 回転における血管条の萎縮がみられたのを除いては著変はなかった。一方、前庭器では 12 匹の卵形囊斑と球形囊斑のいずれか一方、または両方、まれに後半規管に有毛細胞の散発性消失が起きていたが、前庭神経節には著変はなかった。

(c) KW-1070 200mg/kg を妊娠 6 週目から分娩までの約 4 週間筋注した 10 匹の妊娠モルモットの分娩後 2 週を経た時期の内耳には、1 匹の蝸牛に片耳性に 4 回転の血管条に萎縮がみられたのを除いては、ラセン器の有毛細胞にも、ラセン器にも、その他の血管条にも著変は起こっていなかった。前庭器では、4 匹の卵形囊斑と球形囊斑の一方あるいは両方、まれに外側半規管などに有毛細胞の散発性消失がみられたが、前庭神経節には異常はなかった。

これらの妊娠モルモットから生れた 26 匹の新生モルモットの内耳には、1 匹の蝸牛に片耳性に 1 回転下端に局限した外有毛細胞の不完全消失がみられ、他の 2 匹の頂回転から 3 回転へわたる血管条(片耳性)と、4 回転の血管条に萎縮があった以外には、その他の障害は認められなかった。前庭器では、16 匹の卵形囊斑と球形囊斑のいずれか一方、あるいは両方に有毛細胞の散発性消失がみられたのを除いては著変はなかった。また、前庭神経節にも異常はみられなかった。

(3) 小括 以上の結果は KW-1070 100mg/kg と

Fig. 27 Almost normal supravital reduction reaction with nitro blue tetrazolium (Nitro-BT) of hair cells in organ of Corti. One row of inner hair cells have a large amount of formazan granules in supranuclear cytoplasm. Three rows of outer hair cells possess a lot of amount of formazan granules in cytoplasm excepting nucleus. Guinea pig treated with KW-1070 200mg/kg i.m. Second turn, 7 days after the single treatment, 2 turn, X 400

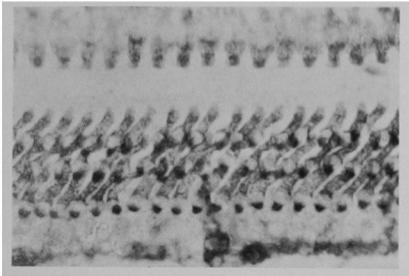
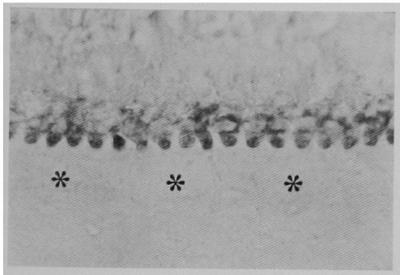


Fig. 28 Extensive severe damage (missing of cell) of outer hair cells (asterisks) caused by combined treatment with KW-1070 (200mg/kg i.m.) and then 2 hours later with furosemide (100 mg/kg i.v.). Remaining inner hair cells have a lot of formazan granules in cytoplasm excepting nuclei. 7 days after the combined treatment, 2. turn, X 400



200mg/kgの投与量では、モルモットの妊娠直後からの4週間の筋注でも、また妊娠6週目から分娩までの約4週間の筋注の場合でも、妊娠モルモットの内耳に対する障害は非常に軽く、投与量の100mg/kgから200mg/kgへの増量によっても、また体液の貯溜をきたしやすい妊娠後期においても、内耳に対する障害にほとんど増強が起こらないことを示すものと考えられる。一方、これらの妊娠モルモットから生れた新生モルモットの内耳にも、ラセン器の有毛細胞に対する障害は非常に軽く、

Fig. 29 Scattered damage (cell missing) of outer hair cells (asterisks) induced by combined treatment with KW-1070 (200mg/kg i.m.) and then 3 days later with furosemide (100mg/kg i.v.). Remaining outer and inner hair cells have a lot of formazan granules (repair of damage). 7 days after the combined treatment, 2. turn, X 400

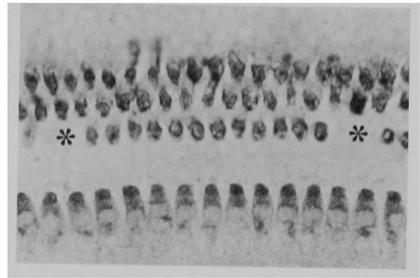
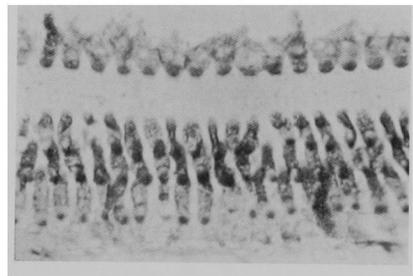


Fig. 30 No remarkable damage of hair cells of organ of Corti. Outer and inner hair cells have a lot of formazan granules. Combined treatment with KW-1070 (200mg/kg i.m.) and then 2 hours later with furosemide (50mg/kg i.v.). 7 days after the combined treatment, 2. turn, X 400



前庭器の有毛細胞の障害も弱かった。新生モルモットの内耳においても、投与量の増量、妊娠後期投与の影響はほとんどみられなかった。

4) KW-1070 とループ利尿剤との併用実験

(1) KW-1070 200mg/kg を1回筋注したモルモットについて7日以後に、断頭直後に取り出した蝸牛について行なったNitro-BTの超生体還元反応では、ラセン器の有毛細胞は1回転から頂回転まで多量のホルマザン顆粒をもっていて、ホルマザンの形成障害や細胞体の消失をきたした有毛細胞はみられなかった (Fig. 27)。外有毛細胞では、ホルマザン顆粒はクチクラ下部と細胞体の底部に密に集合しており、また側壁内側に配列しているのが明らかにみられることもあった。内毛細胞では

一般に核上部の細胞質内に比較的密に形成されていて、特にクチクラ下部に著しい傾向を示していた。

(2) KW-1070 200mg/kg を1回筋注した2時間後にフロセミド 100mg/kg を1回静注したモルモットについて7日以後に、断頭直後に取り出した蝸牛について行なった Nitro-BT の超生体還元反応では、ラセン器の内毛細胞には比較的多量のホルマザン顆粒の形成がみられるものが多かったが、外毛細胞には、2回転から3回転にかけて、細胞体の消失がみられた (Fig. 28)。細胞体の消失は外毛細胞の3列全部に起こることもあった。残存外毛細胞は多量のホルマザン顆粒をもっていることもあったが、ホルマザンの形成障害を示すものもみられた。

(3) KW-1070 200mg/kg を1回筋注した後、3日間たってからフロセミド 100mg/kg を1回静注したモルモットについて7日以後に、断頭直後に取り出した蝸牛について行なった Nitro-BT の超生体還元反応では、ラセン器の内毛細胞には多量のホルマザン顆粒が形成されており、外毛細胞も多量のホルマザン顆粒を有するものが多かった。しかしながら外毛細胞列では1回転から4回転にかけて1コあるいは数コの細胞体の消失が散発性にみられることもあった (Fig. 29)。

(4) KW-1070 200mg/kg を1回筋注して2時間後に静注するフロセミドの投与量を 50mg/kg に減量したモルモットについて7日以後に、断頭直後に取り出した蝸牛について行なった Nitro-BT の超生体還元反応では、ラセン器の内毛細胞も外毛細胞も多量のホルマザン顆粒をもっていて、外毛細胞にも消失はみられなかった (Fig. 30)。ただ、1回転下部の外毛細胞と内毛細胞はホルマザンの軽い形成障害を示していることがあった。

(5) 小括 以上の実験結果は次のような点を明らかにしている。すなわち、KW-1070 200mg/kg を単独に1回筋注した場合には、内耳のラセン器の外毛細胞にも、内毛細胞にも、細胞の消失や生存有毛細胞内のホルマザンの形成障害も起こらない。ところが、同前処置を施したモルモットに2時間後にフロセミドを 100mg/kg 1回静注すると、ラセン器の外毛細胞にはホルマザンの形成障害と細胞の消失がかなり広範に起こる。このような、KW-1070 (200mg/kg) の筋注2時間後に追加静注されたフロセミド (100mg/kg) によって引き起こされるラセン器の有毛細胞、特に外毛細胞の著しい障害は、フロセミド (100mg/kg) の追加静注の時間を2時間から3日後に延長すると著明に軽減されてくる。また、KW-1070 (200mg/kg) の筋注2時間後に追加静注するフロセミドの投与量を 50mg/kg に半減すると、ラ

セン器の有毛細胞、特に外毛細胞のホルマザンの著しい形成障害や細胞の広範な消失はほとんど起こらなくなる。これらの結果は、KW-1070 (200mg/kg) 筋注2時間後にフロセミド (100mg/kg) の追加静注によってラセン器の有毛細胞、特に外毛細胞の著しい広範な障害がひき起こされること、このようなラセン器の外毛細胞の著しい障害はフロセミド (100mg) の追加静注の時間を3日延長したり、フロセミドの投与量を 50mg/kg に半減することによって著しく軽減したり、発現を阻止したりすることができることを示している。これらの機序については考察で述べることにしたい。

考 察

今回行われた実験の結果にもとずいて KW-1070 の耳毒性に関係ある若干の問題について考察を試みたい。

1) KW-1070 を単独筋注した場合の耳毒性

KW-1070 の単独筋注の場合には、200mg/kg あるいは 400mg/kg の多量を4週間投与した場合でも、内耳に対する障害は非常に軽く、200mg/kg で10匹中の1匹の蝸牛に片耳性にラセン器の外毛細胞の消失が1回転下端に局限して起こっているのにすぎなかった。400mg/kg の投与量を4週間筋注した場合でも、途中で死亡した1匹の動物の内耳に、片耳性に同じ部位に外毛細胞の不完全消失のみみられただけで、増量によってラセン器の外毛細胞の消失や前庭器の有毛細胞の消失が特に拡大するような所見はみられなかった。したがって、KW-1070 は単独筋注の場合にはかなりの多量投与によっても、4週間まででは強い内耳障害や、それによる広範な聴覚障害を起こす危険が少ないと考えることができる。

現在まで開発されているアミノ配糖体系抗生剤のうちで、400mg/kg の投与量を4週間筋注して、内耳に軽い障害しか起こしえないものは RSM 以外にはないが (秋吉 1980)⁹⁾、KW-1070 400mg/kg を4週間筋注した場合の内耳障害は RSM に近いので、本剤の耳毒性は RSM に近く、現在のアミノ配糖体系抗生剤のうちでは耳毒性の最も弱いグループに位置づけられると考えられる。

急性毒性実験によって明らかにされた、このような KW-1070 の弱い耳毒性は 100mg/kg の投与量を90日間筋注した場合でも、一般的に内耳障害や耳介反射の障害の増強をきたしやうい妊娠後期4週間の投与の場合でも、ほとんど増強を示していなかった。

2) KW-1070 の経胎盤性耳毒性

これまで行われてきた tobramycin⁵⁾、dibekacin⁶⁾、amikacin⁷⁾、KW-1062¹⁾、kanamycin^{8,7)}、gentamicin⁹⁾ などによる妊娠モルモットの4週間あるいはほとんど全妊娠期間の投与実験では、一般に新生モルモットのラセ

ン器の有毛細胞の障害は1回転下端に限局して、発現頻度も低いことが多かった。KW-1070の経胎盤性耳毒性も弱く、ラセン器の外有毛細胞の消失も1回転下端に限局して、片耳性であり、前庭器の有毛細胞の消失も散在性で軽度であった。内耳の発育障害を示す所見はみられなかった。

3) KW-1070の1回筋注後にフロセミドを1回追加静注した場合の内耳障害の発生機序

すでに述べたように、KW-1070の単独筋注の場合には、かなり高い投与量の400mg/kgを4週間投与してもラセン器の外有毛細胞には強い障害を起こしにくい。しかしながら、フロセミドを大量(100mg/kg)1回静注すると、外有毛細胞は広範に障害をうける。フロセミドの利尿剤としての薬理作用である Na^+ 、 K^+ 、ATPaseの阻害が内耳では血管条の水腫を起こすと同時にラセン器の有毛細胞の膜透過性を高めて有毛細胞周囲の組織液の細胞内への浸入をもたらす、外有毛細胞では著しい細胞の膨化をきたすことはすでに田村(1978)⁹⁾によって明らかにされている。kanamycin (KM)を皮下注射した場合に2時間以後に内耳の外リンパ中のKM濃度が上昇することはSTUPP(1970)⁹⁾の生化学的研究によって明らかにされている。したがって、KW-1070 200mg/kgを筋注してから2時間後には外リンパ内へKW-1070が移行していると考えられる(秋吉1979)¹⁰⁾。この時期にフロセミド(100mg/kg)が静注されると、外有毛細胞の周囲のコルチリンパへ移行しているKW-1070がNaの濃度の高いコルチリンパとともに外有毛細胞内に浸入し、エネルギー代謝を障害して、外有毛細胞の消失をきたすにいたる過程が理解されてくる。KW-1070とフロセミドの追加静注の間隔を3日に延長すると外有毛細胞の障害が軽くなるのは、KW-1070が外リンパから次第に排泄され、濃度が低下し、外有毛細胞に強い障害を起こすにいたらなかったことを示すものであろう。また、追加静注のフロセミドの投与量を100mg/kgから50mg/kgに半減した場合に、外有毛細胞の強い障害が起らなかったのは、フロセミドによる外有毛細胞の膜の障害が軽いために、外有毛細胞内に浸入するコルチリンパの量が少なく、同時にとりこまれたKW-1070の細胞内濃度が、強い代謝障害を起こしうるほど高くなかったことを示すものであろう。

これらの結果は、KMをはじめ他のアミノ配糖体系抗生剤の筋注とループ利尿剤との組合せの場合に起こると同じような、ラセン器の外有毛細胞の強い障害が、KW-1070とフロセミドとの組合せの場合に起こることを示すので、本剤の投与時にはフロセミドあるいは、同じような薬理作用をもつループ利尿剤の投与を避けなければ

ならないことを教示することであろう。

4) KW-1070を単独筋注した場合の耳毒性が弱い理由

すでに述べたように、KW-1070 200mg/kgを1回筋注してから2時間後にフロセミド100mg/kgを1回静注した場合のラセン器の外有毛細胞の強い障害と、関連した耳介反射の再度の消失は、フロセミドによる外有毛細胞の膜の透過性の亢進によって細胞内に浸入したKW-1070の代謝障害による可能性が大きい。しかるに単独筋注する場合には200mg/kgまたは400mg/kgを4週間投与しても、このような強い障害は起こしえない。これはKW-1070は細胞内のエネルギー代謝障害を起こしうるのであるが、筋注の場合に内耳の外リンパへ移行する濃度では、4週間の投与によっても外有毛細胞の膜に強い障害を起こしにくいことを示すものであろう。すなわち、単独筋注の場合にKW-1070が弱い耳毒性を示すのは、外有毛細胞の膜に対する障害作用が弱いためであると考えられることができる。

文 献

- 1) 秋吉正豊, 矢野三郎, 庄司 侃, 田島たよ子, 今沢孝喜, 原 卓司, 清水源昭: KW-1062の聴器毒性および安全性の評価に関する動物試験。Chemotherapy, 25(7): 1892~1914, 1977.
- 2) 秋吉正豊, 矢野三郎, 中田穂出美, 佐藤喜一, 庄司侃: Nitro blue tetrazoliumの超生体還元反応を利用した前庭器病変の研究。内耳生化学, 7: 98~100, 1976
- 3) SAITO, U.; Y. UEDA, & M. AKIYOSHI.: Experimental studies on the ototoxicity and nephrotoxicity of fortimicin A. Current Chemotherapy and Infectious Disease. 1: 401-405, Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C. 1980.
- 4) 秋吉正豊: 聴覚障害と平衡機能障害。毒性と安全性の評価。中島 章, 秋吉正豊編薬物と感覚障害: 169~170, ソフトサイエンス社, 東京, 1980.
- 5) 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2報)。Chemotherapy 23(12): 3707~3720, 1975
- 6) 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ばあいの新生仔モルモットの聴器の変化について。Jap. J. Antibiot. 27(6): 735~745, 1974
- 7) 秋吉正豊, 矢野三郎, 田島たよ子, 松崎明紀, 阿久津貞夫, 岸本勝次, 前田昌彦: 妊娠中に投与したAmikacin (BB-K 8)の在胎モルモットの聴器におよぼす影響。Jap. J. Antibiot. 30(2): 185~196, 1977
- 8) 田村秀明: エタクリン酸およびフロセמידによる

- る内耳障害の発生機序に関する組織化学的研究。
Audiology Jap. 21(6) : 668~687 1978
- 9) STUPP, H. F ; Untersuchung der Antibiotika-
spiegel in den Innenohrflüssigkeiten und
ihre Bedeutung für die spezifische Ototoxi-
zität der Aminoglykosidantibiotika. Acta
Oto-Laryngol. Suppl. 262 : 1-85, 1970.
- 10) 秋吉正豊 : アミノ配糖体系抗生物質による聴器障
害とその発生機構および安全性。臨床と細菌。
6(4) : 353~361, 1979

OTOTOXIC EFFECT OF KW-1070 (FORTIMICIN) ON THE INNER EAR IN GUINEA PIGS

MASATOYO AKIYOSHI, SABURO YANO

HOZUMI NAKADA and TETSUJI NARA

Department of Pathology, School of Dental
Medicine Tsurumi University

SATOSHI NISHIKAWA, TAKUJI HARA, YUJI OHGURO

Toxicological laboratoty, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

The present experimental study was made in 84 young adult guinea pigs, 57 pregnant ones and 159 new born ones to evaluate the ototoxic effect of KW-1070 on auditory function and inner ear. Four series of experiments were performed and following results were obtained.

1) In the short-term intramuscular administration for 4 weeks with KW-1070, the ototoxic damage was confined to the outer hair cells of the organ of Corti at the basal end of the unilateral cochlea and there was no severe auditory impairment (scale out) in pinna reflex test in extensive frequency range from 20 KHz to 500 Hz at dose of 200mg/kg. In the vestibular organs scattered missing of the hair cells was found. There was no remarkable dose-dependant enhancement in the damage of the hair cells in the administration at 400mg/kg.

2) In the long-term intramuscular administration for 90 days with KW-1070 at 10mg/kg, and 100mg/kg, respectively, the ototoxic damage of the hair cells in the cochlea and vestibulum was slight or not found. There was no distinct dose-dependent enhancement in the ototoxic damage of the inner ear.

3) In the short-term intramuscular administration with KW-1070 in the early and later period of pregnancy, the ototoxic effect on the organ of Corti and vestibular organs in the maternal and newborn guinea pigs was mild or not found at dose of 100mg/kg and 200mg/kg.

4) In the short-term intramuscular administration at 400mg/kg, there was no distinct difference between the ototoxicities of KW-1070 and RSM with the least ototoxicity among the available aminoglycoside antibiotics.

5) Combined treatment with KW-1070 (200mg/kg i. m.) and 2 hours later with furosemide (100 mg/kg i. v.) caused an enhanced extensive ototoxic damage in the outer hair cells by KW-1070. The enhanced ototoxic damage became decreased by prolongation of the period between administration of the antibiotic and the diuretic, and by decrease in the dose of the latter. The mechanism of these events was discussed.

6) The present experimental study indicates that in intramuscular administration KW-1070 belongs to the least ototoxic aminoglycoside antibiotic group.