

ラットおよびモルモットにおける Netilmicin の 耳毒性について

秋吉正豊・矢野三郎*・中田穂出美・及川浩志

奈良哲次・今沢孝喜

鶴見大学歯学部病理学教室

* 東京都立大久保病院耳鼻科

Netilmicin の耳毒性を検討する目的で、ラットあるいはモルモットを用いた3種類の動物実験を行ない、広音域の周波数別耳介反射試験および内耳の病理組織学的検索、さらに一部には Nitro-BT 超生体還元反応を実施して、これらの実験成績より次のような評価を得た。

ラットにおける耳毒性を Gentamicin と比較し、両剤とも 30, 90, 120 mg/kg 3週間投与では、耳介反射の消失はみられず、内耳の蝸牛ラセン器の内有毛細胞にも消失はみられなかった。外有毛細胞には1回転下端部にはじまる消失像がみとめられ、その発現頻度は Netilmicin では 90, 120 mg/kg 投与群ともに11%であったが、Gentamicin では同じ投与量でそれぞれ30, 100%と高頻度に見られ、また消失範囲も Gentamicin の方が広範におよんでいた。

同じラットにおける耳毒性と腎毒性の関係については、Netilmicin は耳毒性、腎毒性ともに Gentamicin よりも弱く、特に投与量増加による障害の増強がきわめて少なかった。

モルモットにおいては、Netilmicin 50, 100 mg/kg 4週間投与でも耳介反射の消失はみられず、内耳の蝸牛ラセン器にも、1回転下端部に限局した外有毛細胞の消失が1例にみとめられたにすぎなかった。モルモットにおける本剤の耳毒性は、ラットでの成績とほぼ同様であり、また従来われわれが実施してきた各種アミノ配糖体系抗生物質の成績と比較すると、聴覚器系に対する障害が非常に弱い薬剤であるといえる。

前庭器系に対しては、ラット、モルモットともに有毛細胞の軽度の散発性消失がみとめられたが、用量相関性の増強はきわめて少なく、また明らかな平衡機能障害もみられなかった。

Netilmicin と Furosemide の併用時には、Netilmicin 単独では発現しない、広範な周波数域における耳介反射消失とラセン器外有毛細胞の消失および細胞内のエネルギー代謝障害を示す所見がみとめられた。これは Furosemide によって細胞膜の透過性が亢進され、Netilmicin が細胞内に移行することにより、その障害が発現するにいたったものと考えられる。

以上、Netilmicin は有毛細胞内においてはエネルギー代謝を障害する作用を有するものの、細胞膜に対する障害作用が少なく、細胞内に移行していくために、筋注の場合には投与量を多くしても蝸牛ラセン器には強い障害が発現しにくいものと推察される。

はじめに

Netilmicin は米国シュering社の開発による新しい半合成アミノ配糖体系抗生物質であって、Gentamicin (以下、GM) 系の Sisomicin (以下、SISO) の 1-N-エチル誘導体である。SISO は化学構造上 GM C_{1a} に近似し、その抗菌力、毒性ともに GM とほぼ同程度とされているが、この SISO の1位のアミノ基をエチル化しただけの Netilmicin には次のような特徴があるといわれている。抗菌力では GM とほぼ同程度の広い抗菌スペクトルと強い殺菌作用を有し、しかも GM 耐性株のうち、アセチル化、アデニリル化などの不活化酵素による

耐性株の一部に対して感受性を示すことであり、また毒性においても、従来のアミノ配糖体系抗生物質で問題にされている耳毒性や腎毒性が弱いとされていることである^{1,2)}。

耳毒性については、1976年以来ラット、モルモット、ネコ、イヌ、サルなどを用いた各種の実験成績が報告されており、本剤の聴覚器系および前庭器系に対する障害の程度について、耳介反射などの各種機能検査、電気生理学的検査、病理組織学的検索などにより検討されている。Luft³⁾ は1978年までのこれらの報告をまとめて、本剤の毒性について総合的な評価を試みているが、そのなかで Netilmicin はいずれの動物種において

も耳毒性が弱く、特に投与量の増加による障害の増強がきめて少ない点を特記している。聴覚器系に対する障害に関する、従来のアミノ配糖体系抗生物質との比較試験は、主にモルモットで詳細に検討されており、BRUMMETT⁴⁾、FEDERSPIL⁵⁾、WERSÄLL⁶⁾の一連の実験成績から、NetilmicinはGM、SISO、Tobramycin(以下、TOB) Amikacin(以下、AMK)よりも聴覚器系に対する障害が少ないことが明らかにされており、等量比較ではGMの1/4以下、AMKの1/2以下とも述べられている。これらの報告以降もARPINI⁷⁾によって同様の成績が再現されている。またNetilmicinは前庭器系に対する障害も非常に少なく、MILLER¹⁾のネコやIGARASHI⁸⁾のサルにおける平衡機能検査ではGMよりも軽度であるとされている。さらに臨床的にも本剤の耳毒性が少ないことが確認されており、国内では各種感染症に主に1日150~200mg、5~10日間使用した約750例の臨床成績があり²⁾、外国でもSOLBERG⁹⁾の報告をはじめ数多くの臨床評価がなされている。

今回われわれは、東京慈恵会医科大学第二内科との共同研究により、Netilmicinの耳毒性と腎毒性との関係を検討する目的で、ラットを用いた実験を行なうとともに、これまで報告してきた一連のアミノ配糖体系抗生物質についての耳毒性試験成績との比較のために、モルモットでの実験をもあわせて行ない(1977~1978)、さらに膜透過性をたかめる作用のあるループ利尿剤と本剤との併用実験を実施した(1980)。これらの実験成績より、Netilmicinの耳毒性、特に聴覚器系に対する障害が従来のアミノ配糖体系抗生物質と比較してかなり弱いことが明らかにされたので、これらについて報告する。なおラットでの実験成績のうち、腎毒性に関しては共同研究者の報告に委ね、ここでは耳毒性としての聴覚障害と内耳障害を主体に報告し、あわせて本剤の耳毒性と腎毒性の関係について若干の考察を加えた。

実験材料. 実験方法

1. ラットにおける耳毒性、腎毒性試験

Sprague-Dawley系雄ラット(体重約200g)60匹を6群に分け、NetilmicinあるいはGMを次の要領で1日1回筋肉内注射した。

1日投与量	投与期間	1群動物数
30 mg/kg	3週間	10匹
90 mg/kg	3週間	10匹
120 mg/kg	3週間	10匹

投与量はNetilmicinの主要臨床用量である3~4 mg/kg/day(成人体重50kgとして150~200 mg/day)より3 mg/kgを基準として、その10, 30, 50倍量を設定して実験を開始したが、50倍量の150 mg/kg投与ではNetilmicin, GM両群ともに3週間投与に耐えうる動物数が少なかったため、今回の実験における耳毒性の評価からは除外し、最高投与量を120 mg/kg(40倍量)

に減量した。投与期間は従来のラットおよびモルモットにおける耳毒性試験では通常4週間としているが、今回の実験は腎毒性試験投与期間にあわせて3週間とした。実験に用いた薬剤はNetilmicin(Batch No. 7733-42, 力価611 µg/mg, エッセクス日本K.K.)とGM(Batch No. GMC-6-M-7046, 力価538 µg/mg, 塩野義製薬K.K.)である。

聴覚機能検査は従来より実施している広周波数域(20,000~500または200 Hz)での純音刺激に対する周波数別耳介反射試験を、投与前と投与後は1週毎に実施し、各周波数における耳介反射について域値の変動および消失の際の周波数の拡がり測定した。平衡機能検査は従来の経験より特に実施はしなかった。

内耳の病理組織学的検索は、投与終了後の動物をNembutal(30~50 mg/kg)麻酔下で開胸し、腎動脈を結紮切断した後に37°Cの生理食塩水で生体灌流し、ピクリン酸(適量、着色の目的)と氷醋酸(1/10容量)を混じた10%ホルマリン液で灌流固定した。生体灌流固定後切除した側頭骨はさらに同じホルマリン液で7~10日間固定し、水洗後Plank and Rychlo脱灰液(塩化アルミニウム・結晶70g, ギ酸50ml, 塩酸85mlに蒸留水を加えて1,000mlとしたもの)で7~10日間脱灰し、この間に脱灰液は1~2回新しいものと取替えた。脱灰後の側頭骨は余分な部分を切除し、流水中で2昼夜ほど水洗し、アルコール系列で3~4日間ずつ脱水洗し、さらに無水アルコール・エーテル系列の等量混合液で3~4日間ずつ処理した。次にセロイジン系列の2, 4, 8%液に3~4週間ずつ入れ、8%セロイジン液に入れて硬化させた。各側頭骨部分を含むセロイジン・ブロックを側頭骨の水平断面方向で、内耳を含む連続切片とし、5枚おきにヘマトキシリン・エオジン染色をほどこした。内耳の蝸牛および前庭器の各部位について病理組織学的検索を行ない、投与薬剤に関係があると思われる障害像の程度と拡がりについて観察した。

なお腎毒性についての機能検査および病理組織学的・組織化学的検索は、東京慈恵会医科大学で実施した。

2. モルモットにおける耳毒性試験

Hartley系モルモット(体重約350g)30匹を3群に分け、Netilmicinを次の要領で1日1回筋肉内注射した。

1日投与量	投与期間	1群動物数
50 mg/kg	4週間	10匹
100 mg/kg	4週間	10匹
150 mg/kg	2週間	10匹

投与量、投与期間は、他のアミノ配糖体系抗生物質の耳毒性試験成績と比較する目的で従来の方法で準じた

が、最高投与量の 150 mg/kg ではラットの場合と同様に死亡例が多く、2週間投与時の生存例が4例となったため、それ以上投与を続けては耳毒性の検討が困難になると判断し、2週間で投与を中止した。また対照薬として GM を用いなかった理由は、すでにわれわれの一連の実験において、GM の耳毒性の成績がほぼ一定しており、バックグラウンド・データとして充分使用に耐え得ると判断したためである。

耳介反射試験と内耳の病理組織学的検索の方法は、ラットの場合と同様である。

3. モルモットにおける Furosemide 併用時の耳毒性試験

Hartley 系モルモット (体重約 350 g) 3匹に, Netilmicin 100 mg/kg を1回筋肉内注射後2時間目に, Furosemide 100 mg/kg を1回静脈内注射し, その後3週間飼育観察した。

耳介反射試験は Netilmicin 投与前, 投与後2時間目 (Furosemide 投与直前), Furosemide 投与直後より3週目まで実施した。

内耳については, 通常の病理組織学的検索に加えて, 生存有毛細胞のエネルギー代謝を検討する目的で組織化学的検索をあわせて実施した。投与終了後の動物は断頭後直ちに両側中耳腔を開き, 内耳を Nitro blue tetrazolium (Nitro-BT) の反応液 (Nitro-BT 1 mg/ml 水溶液 5 ml に同量の 0.2 M リン酸緩衝液を混和したもの) で灌流反応させ, 37°C 40分間放置後10%ホルマリ

ン液で固定した。固定後24時間以降に実体顕微鏡下で蝸牛の全回転よりラセン器の剝離標本を作成し, ラセン器の有毛細胞における Nitro-BT 超生体還元反応産物であるホルマザンの形成障害を観察し, あわせて病理組織学的検索を実施した。

結 果

1. 耳介反射

1) ラット毒性試験での耳介反射

30 mg/kg 投与では, Netilmicin, GM 両群ともに死亡例はなく, また3週間の投与期間を通してどの周波数域にも耳介反射の消失はみられなかった。Fig. 1 は各周波数における投与前の耳介反射域値を 0 (dB) とした場合の, 投与3週目の耳介反射域値の上昇(+)と低下(-)の変動範囲を示したものである。両群ともに Fig. 4 のモルモットの場合と比較すると変動範囲が大きい。

90 mg/kg 投与では, 両群ともに1例ずつが死亡したが, 生存例で耳介反射の消失をきたしたものはなかった。Fig. 2 の耳介反射域値の変動範囲は, モルモットの場合と比較して, 域値低下の傾向がみとめられた。

120 mg/kg 投与では, Netilmicin 群で1例が1週目に死亡したが, 両群とも生存例で耳介反射の消失をきたしたものはなかった。Fig. 3 の耳介反射域値の変動範囲は, GM 群の方に 2,000 Hz 以上の高周波数域における域値低下が著明であった。

なお3週間の投与期間中には, いずれの群においても

Fig. 1 Threshold shift of pinna reflex in rats receiving Netilmicin or Gentamicin (30 mg/kg, 3weeks)

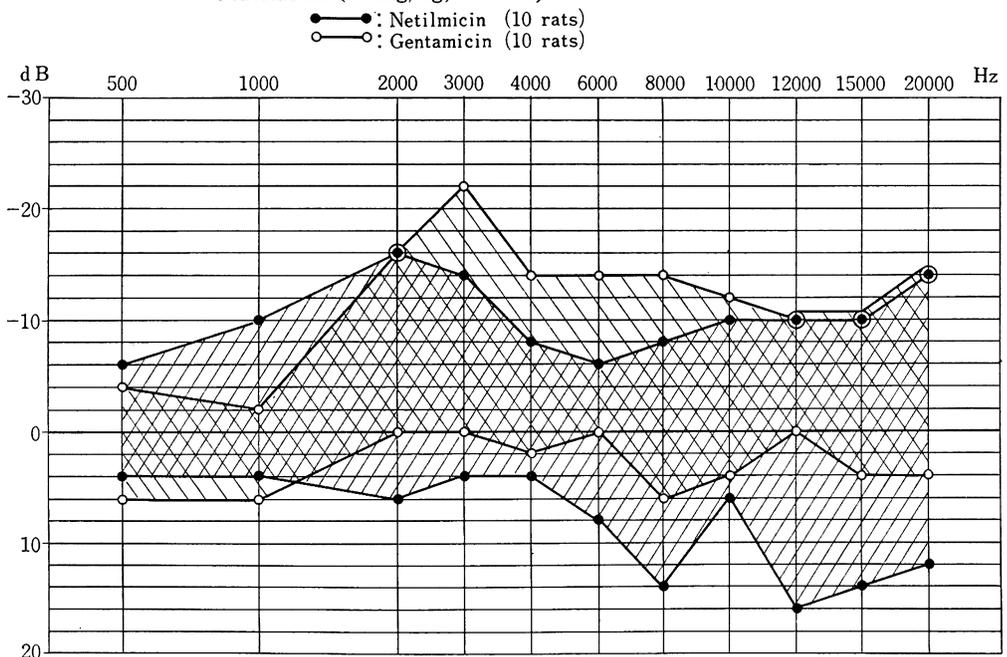


Fig.2 Threshold shift of pinna reflex in rats receiving Netilmicin or Gentamicin (90 mg/kg, 3weeks)

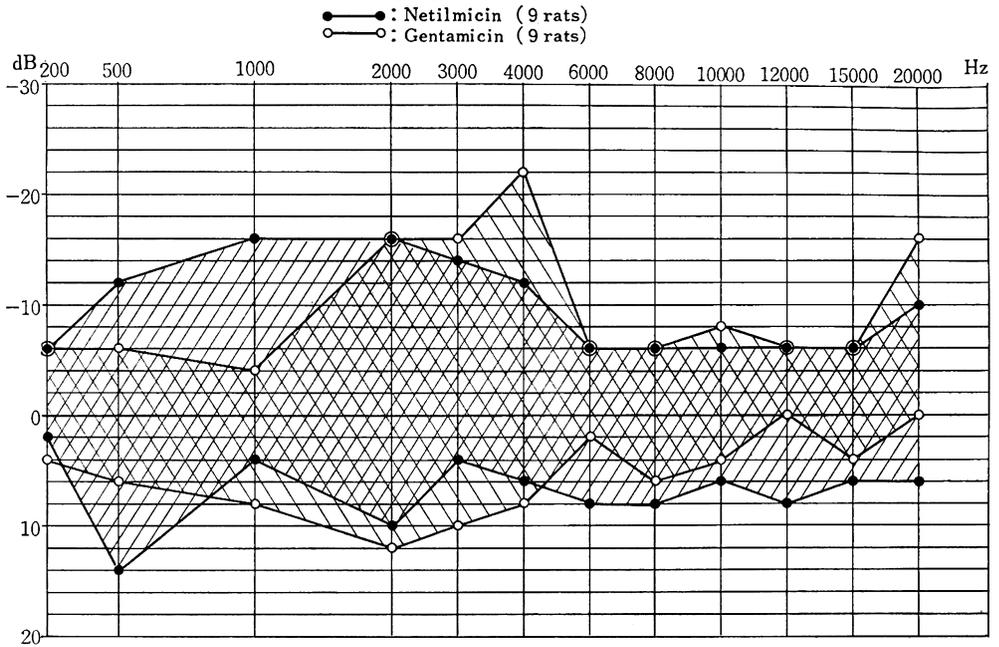
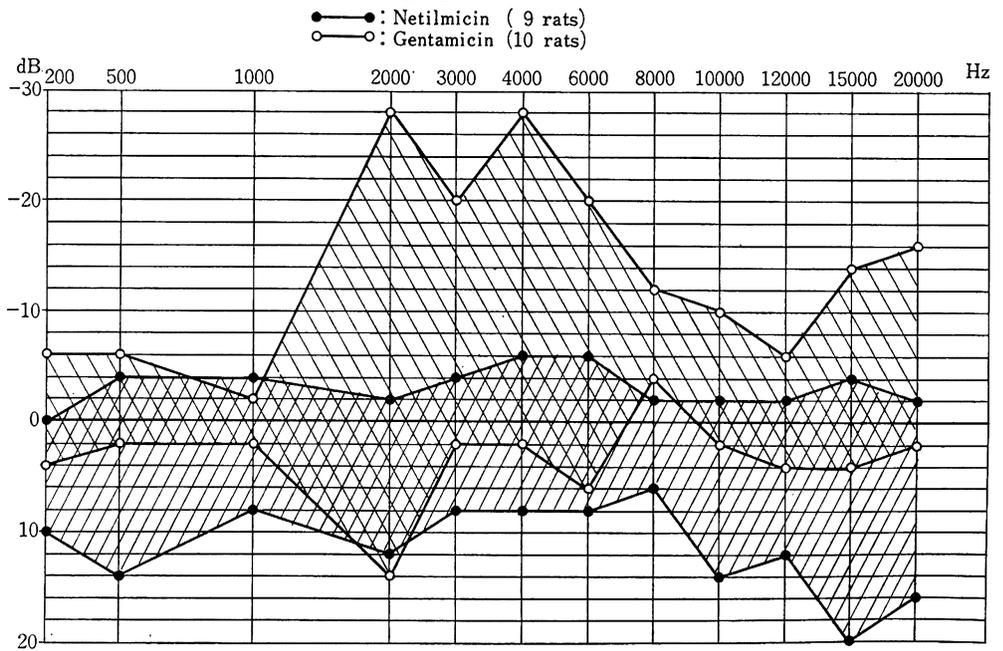


Fig.3 Threshold shift of pinna reflex in rats receiving Netilmicin or Gentamicin (120 mg/kg, 3weeks)



明らかな平衡障害と思われる症状は観察されなかった。

2) モルモット耳毒性試験での耳介反射

Netilmicin 50, 100 mg/kg 4週間投与群では死亡例はなく、また投与期間中に耳介反射の消失をきたしたもののなかった。

Netilmicin 150 mg/kg 2週間投与群では6例が死亡したが、生存例4例で耳介反射の消失をきたしたものはなかった。

各周波数における耳介反射域値の変動範囲は Fig.4 に示す通りで、50 mg/kg 投与群では8,000 Hz 以上

Fig. 4 Threshold shift of pinna reflex in guinea pigs receiving Netilmicin

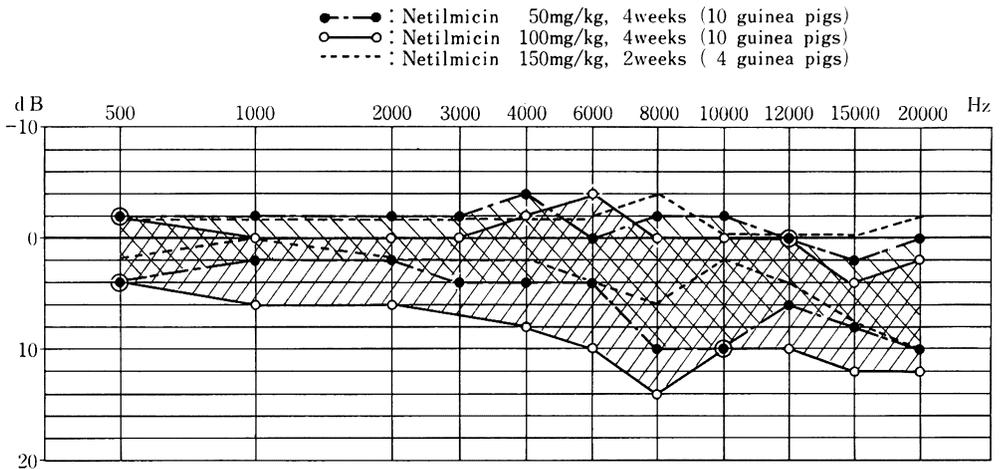
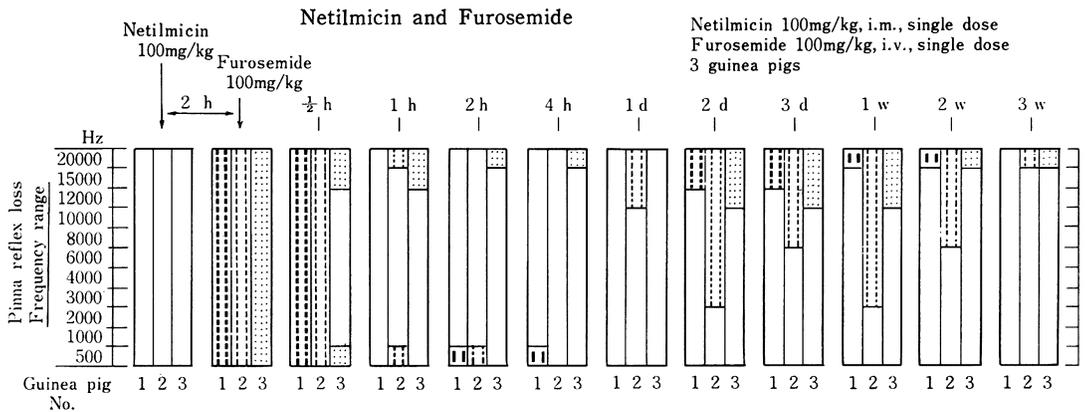


Fig. 5 Occurrence of pinna reflex loss in guinea pigs receiving



Netilmicin 100mg/kg, i. m., 4weeks (10 guinea pigs)				
	1 w	2 w	3 w	4 w
Incidence of pinna reflex loss (20,000-200Hz)	0/10	0/10	0/10	0/10

の高周波数域で域値の上昇がみられ、この傾向は 100 mg/kg 投与群では 6,000 Hz 以上にみられ、その変動範囲もやや大きくなっていった。150 mg/kg 投与群では投与期間が短いためか、変動範囲は小さく、15,000 Hz 以上で軽度の上昇がみられたにすぎなかった。

なお4週間または2週間の投与期間中には、いずれの群においても明らかな平衡障害と思われる症状は観察されなかった。

3) モルモットにおける Furosemide 併用 耳毒性試験での耳介反射

Netilmicin 100 mg/kg 1回投与後2時間目では、20,000~500 Hz の周波数域における 耳介反射には域値の上昇も消失もみられないが、この時点で Furosemide

100 mg/kg を1回静注すると、急速な耳介反射の消失が発現し、さらにその回復と再発現の推移を観察することができた。その経過は Fig.5 に示す通り、Furosemide 投与直後に 20,000~500 Hz にわたる広範な周波数域での耳介反射の消失が3例ともに発現し、この内の2例はこのような広範な周波数域での消失が投与後30分目まで持続していた。1~4時間目には一部の 20,000~15,000 Hz および 500 Hz の周波数域を除き、全例とも回復を示したものの、投与後1日目に1例に 20,000~12,000 Hz での耳介反射の消失が、2日目には他の2例にも高周波数域での消失が再度発現した。1日目に再発現をみた1例での消失は 20,000~3,000 Hz の広範な周波数域に拡大していた。このような耳介反射消

失の再発現は、Furosemide 投与後3週目には一部の20,000 Hzを除く周波数域において再び回復していた。

2. 内耳の病理組織学的所見

1) ラット毒性試験での内耳所見

30 mg/kg 投与では、Netilmicin 群 (Table 1, Fig. 6~9)。GM 群 (Table 2) とともに、アミノ配糖体系抗生物質による障害を起こしやすいラセン器の外有毛細胞には、蝸牛1回転下端部から頂回転にいたるいずれの部位においても消失像はみられなかった (Fig. 6, 7)。またラセン器の内有毛細胞、さらにラセン器と関連した求心性一次ニューロンのラセン神経細胞にも消失像はみら

ずれ (Fig. 7)、血管条の辺縁細胞にも明らかな病変像はみられなかった。前庭器については、両群とも全例に卵形囊斑や球形囊斑での、また Netilmicin 群の半数に半規管膨大部後での有毛細胞の散発性消失像がみられた (Fig. 8, 9)。消失の程度はいずれも軽度であったが、卵形囊斑や球形囊斑では耳石 (基質) の消失をとまっていた。前庭神経節には明らかな病変像はみられなかった。

90 mg/kg 投与では、Netilmicin 群 (Table 3, Fig. 10, 11) の9例中1例と GM 群 (Table 4, Fig. 12, 13) の9例中3例に、耳介反射は正常でありながら、組

Table 1 Effect of Netilmicin (30 mg/kg, 3weeks) on pinna reflex and inner ear

Rat No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 2	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 3	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 4	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 5	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 6	0	0	0	0	0	+ (U, S, A)
Ex. 7	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 8	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 9	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 10	0	0	0	0	0	+ (U, S)

Frequency range; 20,000-500 or 200 Hz

HC: hair cell, OHC: outer hair cell, IHC: inner hair cell,

SG: spiral ganglion cell, MC: marginal cell of stria vascularis,

U: utricle, S: saccule, A: anterior semicircular canal,

L: lateral semicircular canal, P: posterior semicircular canal

O: normal, +: hair cell missing slightly

Table 2 Effect of Gentamicin (30 mg/kg, 3weeks) on pinna reflex and inner ear

Rat No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 2	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 3	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 4	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 5	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 6	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 7	0	0	0	0	0	+ (S)
Ex. 8	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 9	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 10	0	0	0	0	0	+ (U, S)

Fig. 6 Normal spiral organ with inner hair cell (IHC), outer hair cells (arrow), Deiter cells (DC), and Hensen cells (HC) near the basal end of first turn of cochlea. IST: internal spiral tunnel, AT: auditory teeth, VL: vestibular lip. Rat treated with netilmicin at 30 mg/kg for 3 weeks. $\times 300$

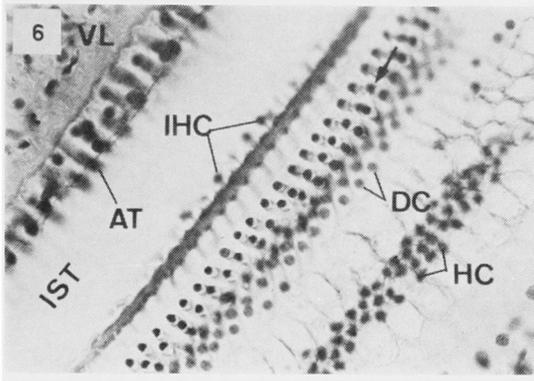
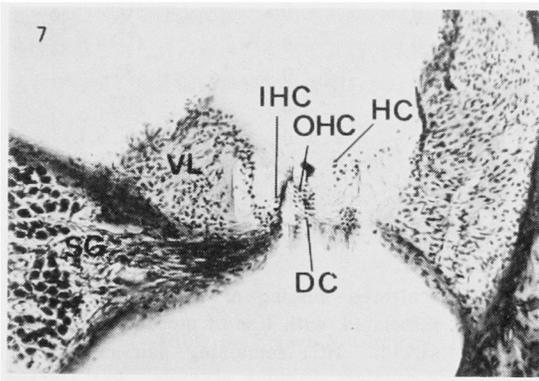


Fig. 7 Normal spiral organ with inner hair cell (IHC), outer hair cells (OHC), Deiter cells (DC) and Hensen cells (HC) at anterior 1/4 of first turn. VL: vestibular lip, No atrophy in spiral ganglion. Rat treated with netilmicin at 30 mg/kg for 3 weeks. $\times 120$



組織学的検索ではラセン器外有毛細胞の消失像がみとめられた。その消失の拡がり、Netilmicin 群の 1 例では、片側の蝸牛 1 回転の下端部から 1/4 まで (Fig. 10) であり、GM 群の 3 例では、1 回転 下端部に限局したものが 2 例、さらに片側の蝸牛 1 回転の下端部から 1/4 まで (Fig. 12) のものが 1 例であった。これら以外にはラセン器における病変像は両群ともにみられなかった。前庭器については、Netilmicin 群では、全例の卵形囊斑、球形囊斑と一部の半規管膨大部に散発性の有毛細胞の消失が軽度ながらみとめられた (Fig. 11)。GM 群では、1/3 は全例の卵形囊斑と一部の球形囊斑や半規管膨大部に散発性の有毛細胞の消失が軽度ながらみとめられ

Fig. 8 Scattered missing of hair cells (arrows) associated with loss of otoconia in macula utriculi. HC: remaining hair cells, OC: remaining grotesque otoconia, UM: membrane of utricle. Rat treated with netilmicin at 30 mg/kg for 3 weeks. $\times 300$

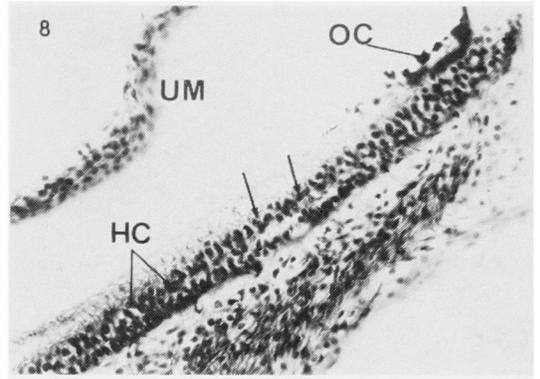
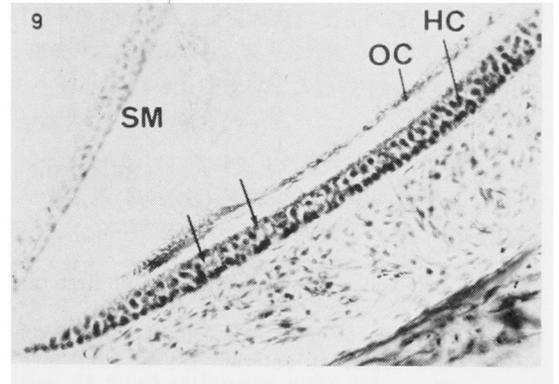


Fig. 9 Scattered missing of hair cells (arrow) associated with loss of otoconia in macula sacculi. HC: remaining hair cells, OC: remaining granular otoconia, SM: membrane of saccule. $\times 300$



た (Fig. 13)。これらの有毛細胞の消失には程度差はあるが耳石 (基質) の消失をともなっていた。両群とも前庭神経節には明らかな病変像はみられなかった。

120 mg/kg 投与では、Netilmicin 群 (Table 5) においては 9 例中 1 例のみに、片側の蝸牛 1 回転 下端部に限局した外有毛細胞の消失がみとめられたにすぎなかったが、GM 群 (Table 6, Fig. 14~17) では病理組織学的検索が不能であった 1 例を除き、全例に外有毛細胞の消失がみとめられ、その消失の拡がり、蝸牛 1 回転 下端部に限局したもの (Fig. 14) が 3 例で、2 回転 1/4 まで (Fig. 15)、1 回転 3/4 まで (Fig. 16)、1 回転 1/4 まで (Fig. 17) 拡大したものがそれぞれ 1 例、2 例、3 例であった。1 回転 下端部に限局した消失のみられた 3 例中

Table 3 Effect of Netilmicin (90 mg/kg, 3weeks) on pinna reflex and inner ear

Rat No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 2	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 3	0	0	0	0	0	+ (U, S, L, P)
Ex. 4	0	0	0	0	0	+ (U, S, L, P)
Ex. 5	*	*	*	*	*	*
Ex. 6	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 7	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 8	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L)
Ex. 9	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 10	0	BE-1A (Un)	0	0	0	+ (U, S)

*: died

BE-1A(Un): hair cell missing from basal end to anterior 1/4 of first turn (unilaterally)

Table 4 Effect of Gentamicin (90 mg/kg, 3weeks) on pinna reflex and inner ear

Rat No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	+ (U)
Ex. 2	*	*	*	*	*	*
Ex. 3	0	0	0	0	0	+ (U)
Ex. 4	0	0	0	0	0	+ (U)
Ex. 5	0	BE	0	0	0	+ (U)
Ex. 6	0	BE	0	0	0	+ (S)
Ex. 7	0	0	0	0	0	+ (U)
Ex. 8	0	BE-1A (Un)	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 9	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 10	0	0	0	0	0	+ (U)

BE: hair cell missing at basal end of first turn

Fig.10 Missing of outer hair cells (arrow) of spiral organ at anterior 1/4 of first turn. Inner hair cell (IHC) was present. No remarkable change in stria vascularis (SV) and spiral ganglion (SG). Rat treated with netilmicin at 90 mg/kg for 3 weeks. $\times 120$

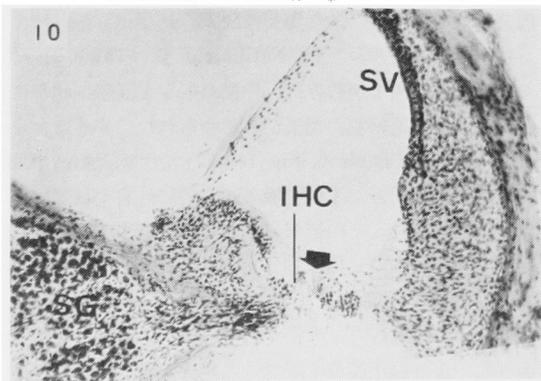


Fig.11 Scattered missing of hair cells (arrows) associated with loss of otoconia in macula sacculi. HC: remaining hair cells, OC: remaining granular otoconia. Rat treated with netilmicin at 90 mg/kg for 3 weeks. $\times 300$

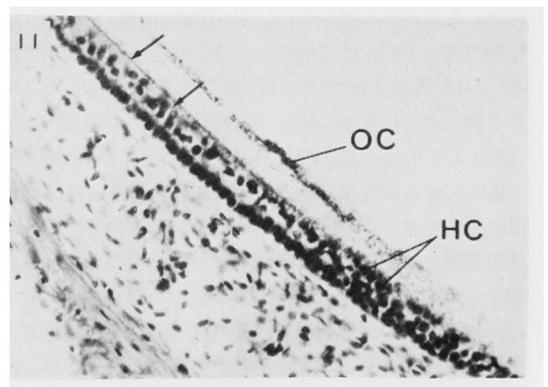


Fig. 12 Missing of outer hair cells (arrow) of spiral organ at anterior 1.4 of first turn. Inner hair cells (IHC) were present. Both stria vascularis and spiral ganglion did not show remarkable change. Rat treated with GM at 90 mg/kg for 3 weeks. $\times 120$

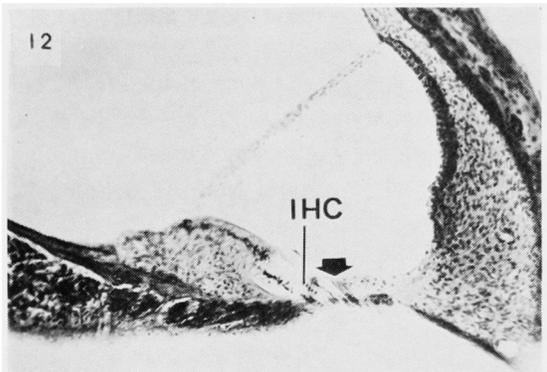
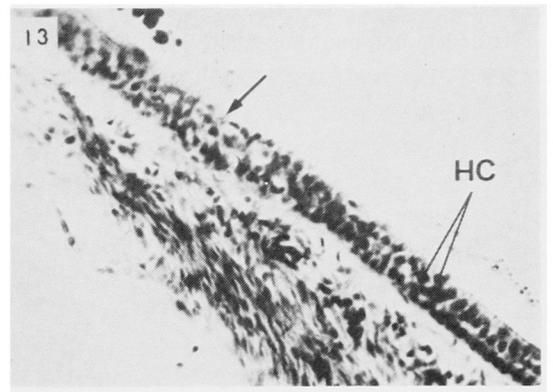


Fig. 13 Scattered missing of hair cells (arrow) associated with loss of otoconia in macula utriculi. HC: remaining hair cells. A few number of bizarre otoconia. Rat treated with GM at 90 mg/kg for 3 weeks. $\times 300$



2例は片側性の消失であった。これら以外にはラセン器における病変像は両群ともにみられなかった。また外有毛細胞の消失の有無およびその拡がりとは関係なく、耳介反射は全例が正常であった。前庭器については、Netilmicin 群ではほぼ全例の卵形囊斑、球形囊斑、半規管膨大部後に、GM 群ではほぼ全例の卵形囊斑、球形囊斑と一部の半規管膨大部後に、有毛細胞の軽度の消失が散発性にみとめられ、種々の程度の耳石(基質)の消失をともなっていた。前庭神経節には明らかな病変像は両群ともにみられなかった。

2) モルモット耳毒性試験での内耳所見

Netilmicin 50 mg/kg 4週間投与群 (Table 7, Fig. 18~23) では、ラセン器の外有毛細胞や内毛細胞の消失は全くみられなかったが (Fig. 18, 19)、10例中1例

のみに蝸牛軸の頂回転に比較的限局性のラセン神経節細胞の一次的消失を示唆する変化がみとめられ (Fig. 20, 21)、さらにこの動物では生理的に発達している4回転前半部の血管系も消失していた。この1例以外にはラセン器の病変像はみられなかった。前庭器については、ほぼ全例の卵形囊斑と球形囊斑に有毛細胞の軽度の消失が散発性にみとめられ、種々の程度の耳石(基質)消失をともなっていた (Fig. 22, 23)。前庭神経節には明らかな病変像はみられなかった。

Netilmicin 100 mg/kg 4週間投与群 (Table 8, Fig. 24~27) では10例中1例に、片側の蝸牛1回転下端部に限局した外有毛細胞の不完全消失がみとめられ (Fig. 24)、他の1例に片側の蝸牛軸4回転のラセン神経節細胞に一次的消失像がみとめられた。この2例以外にはラ

Table 5 Effect Netilmicin (120 mg/kg, 3weeks) on pinna reflex and inner ear

Rat No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 2	0	BE(Un)	0	0	0	(U, S, A, L, P)
Ex. 3	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 4	*	*	*	*	*	*
Ex. 5	0	0	0	0	0	(U, S, A, L, P)
Ex. 6	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 7	0	0	0	0	0	+ (S, P)
Ex. 8	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 9	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 10	0	0	0	0	0	+ (U, S, A, L, P)

BE(Un): hair cell missing at basal end of first turn (unilaterally)

セン器の病変像はみられなかった (Fig. 25)。前庭器については、全例の卵形囊斑、球形囊斑と一部の半規管膨大部様に軽度の有毛細胞の散発性消失がみとめられ、耳石 (基質) の消失をともなっていた (Fig. 26, 27)。前庭神経節には明らかな病変像はみられなかった。

Netilmicin 150 mg/kg 2 週間投与群 (Table 9) では、ラセン器の外有毛細胞、内有毛細胞、ラセン神経節ともに細胞の消失像がみられたものはなかったが、血管束の 3 ~ 4 回転での辺縁細胞の消失が全例にみとめられた。前庭器については、全例の卵形囊斑、球形囊斑、半規管膨大部様に軽度の有毛細胞の散発性消失と耳石 (基

質) の消失がみとめられた。前庭神経節には明らかな病変像はみられなかった。

3) モルモットにおける Furosemide 併用 耳毒性試験での内耳所見

通常の病理組織学的検索に加えて、内耳の生存有毛細胞におけるエネルギー代謝についての組織化学的検索を実施した。

耳介反射の項で述べたように、Netilmicin と Furosemide の併用時には広範な周波数域での耳介反射の消失と回復を反復する経過が観察されたが、この時期におけるラセン器有毛細胞内の Nitro-BT 超生体還元反

Table 6 Effect of Gentamicin (20 mg/kg, 3weeks) on pinna reflex and inner ear

Rat No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	BE(Un)	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 2	0	**	**	**	**	**
Ex. 3	0	BE(Un)	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 4	0	BE-1A	0	0	0	(U, S)
Ex. 5	0	BE-1A	0	0	0	(U, P)
Ex. 6	0	BE	0	0	0	(S)
Ex. 7	0	BE-1P	0	0	0	(U, S)
Ex. 8	0	BE-1A	0	0	0	(U, S, L)
Ex. 9	0	BE-1P	0	0	0	(U, S)
Ex. 10	0	BE-2A(Un)	0	0	0	(U, S)

BE-1P: hair cell missing from basal end to posterior 3/4 of first turn

BE-2A: hair cell missing from basal end to anterior 1/4 of second turn

** : postmortum

Fig. 14 Complete missing of outer hair cells (asteroids) of spiral organ near the basal end (BE) of first turn. Deiter cells and inner hair cells (IHC) were present. IST: internal spiral tunnel, VL: vestibular limbus. Rat treated with GM at 120 mg/kg for 3 weeks. ×120

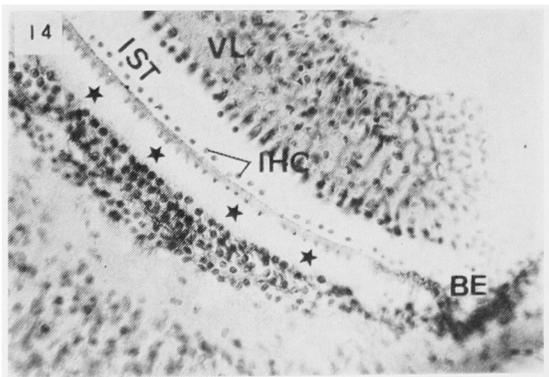


Fig. 15 Incomplete missing of outer hair cells in spiral organ at anterior 1/4 of second turn. OHC: pyknotic nucleus of remaining outer hair cell in outermost row. Inner hair cell (IHC) was present. Rat treated with GM at 120 mg/kg for 3 weeks. ×300

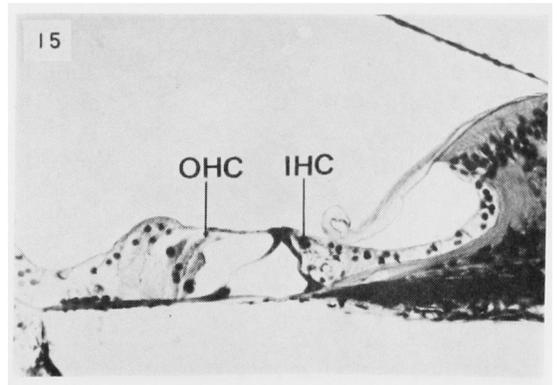


Fig.16 Complete missing of outer hair cells (arrow) of spiral organ at posterior 3/4 of first turn. Inner hair cells (IHC) were present. Neither stria vascularis (SV) nor spiral ganglion (SG) were affected. Rat treated with GM at 120 mg/kg for 3 weeks. ×120

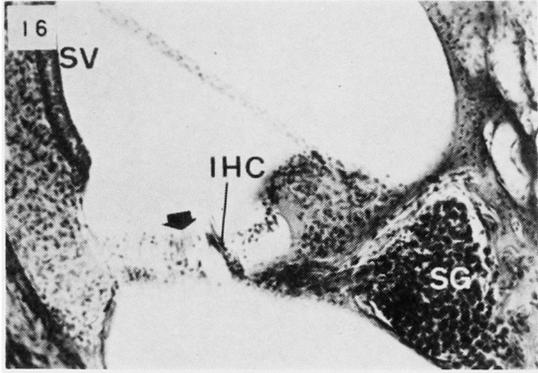


Fig.17 Complete missing of outer hair cells (arrow) of spiral organ at anterior 1/4 of first turn. Inner hair cell (IHC) was present. Both stria vascularis and spiral ganglion did not show remarkable change. Rat treated with G.M at 120 mg/kg for 3 weeks. ×120

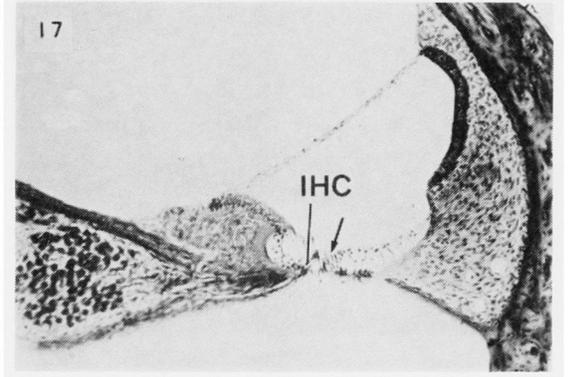


Table 7 Effect of Netilmicin (50 mg/kg, 4weeks) on pinna reflex and inner ear

Guinea pig No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochles				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	- U,S
Ex. 2	0	0	0	0	0	+ U,S
Ex. 3	0	0	0	0	0	+ U,S
Ex. 4	0	0	0	0	0	+ U,S
Ex. 5	0	0	0	0	0	+ S,L
Ex. 6	0	0	0	0	0	+ U,S
Ex. 7	0	0	0	Ap	4T	U,S
Ex. 8	0	0	0	0	0	+ U,S
Ex. 9	0	0	0	0	0	S
Ex. 10	0	0	0	0	0	U,S

Ap: apical turn, 4T: fourth turn

応産物であるホルマザンの形成障害は、全体的に内毛細胞よりも外毛細胞の方がやや強く、蝸牛1回転 1/4 付近に著明にみとめられた。また同時に外毛細胞には不規則な散発性の消失像がみとめられ、耳介反射消失の再発現が広範な周皮数域にまでおよんでいた例では、その消失範囲は蝸牛1回転のみでなく3回転にまでおよんでいた (Fig. 28, 29, 30, 31)。

考 察

1. ラットにおける Netilmicin と GM の耳毒性の比較

聴覚器系に対する障害について、耳介反射と蝸牛ラセ

ン器の病理組織学的所見より比較検討すると、耳介反射は Netilmicin, GM 両群ともにいずれの投与量においても消失例はなく、また両群ともに 30 mg/kg 投与ではラセン器にも障害像はみられなかった。90 mg/kg 以上の投与ではラセン器の外毛細胞の消失のみがみとめられたが、その発現頻度と消失範囲の拡がりと比較すると、Netilmicin 群では 90, 120 mg/kg 投与とともに 11%の発現頻度で、消失範囲も 90 mg/kg 投与で片側の蝸牛1回転の下端部から 1/4 まで、120 mg/kg 投与でも片側の1回転下端部に局限しており、用量相関性の増強がみられなかったのに対して、GM 群では 90, 120 mg/kg 投与でそれぞれ30, 100%に発現し、120 mg/kg

Fig.18 Normal spiral organ with inner hair cell (IHC) and outer hair cell (OHC) at near the basal end of first turn. Guinea pig treated with netilmicin at 50 mg/kg for 4 weeks. $\times 130$

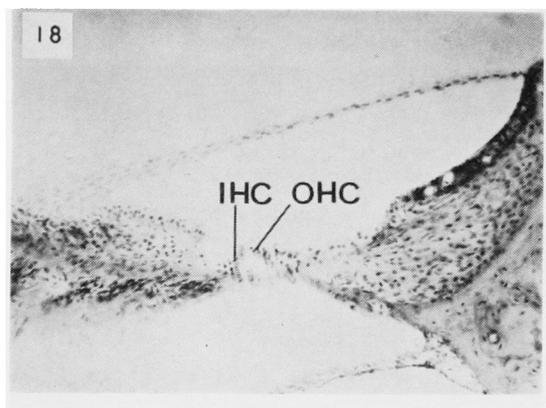
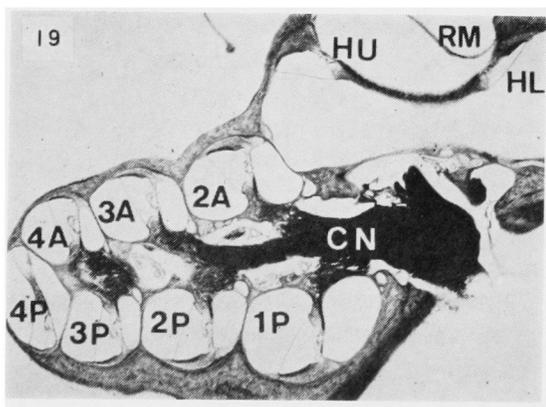


Fig.19 Midmodiolar section of normal cochlea. CN: cochlear nerve, RM: round window membrane, HL: lower part of hook, HU: upper part of hook, 1P: posterior 3/4 of first turn, 2A and 2P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of second turn, 3A and 3P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of third turn, 4A and 4P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of fourth turn. Guinea pig treated with netilmicin at 50 mg/kg for 4 weeks. $\times 21$



投与では消失範囲も2回転1/4までにおよぶものがあり、明らかに用量相関性の増強がみとめられた。聴覚器系に対する障害の程度は、GMよりもNetilmicinの方が明らかに軽度であるといえる。

なおラットにおける耳介反射の消失とラセン器外有毛細胞および内毛細胞の消失との相関性についてはすでに報告^{10,11)}の通りであるが、今回の実験で全例に外

Fig.20 Atrophy of spiral ganglion (asteroid) in apical region of modiolus of right cochlea with normal spiral organ. AP: apical turn, 4A and 4P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of fourth turn, SG: remaining spiral ganglion cells Guinea pig treated with netilmicin at 50 mg/kg for 4 weeks. $\times 100$

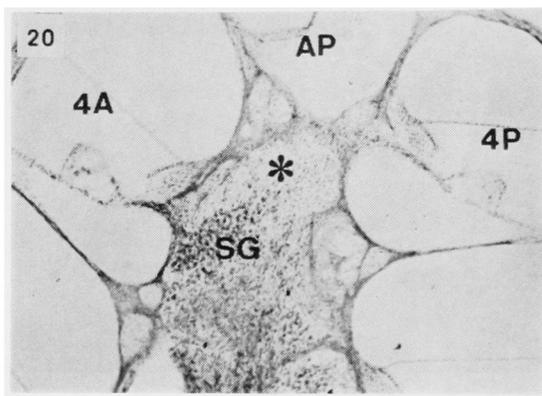
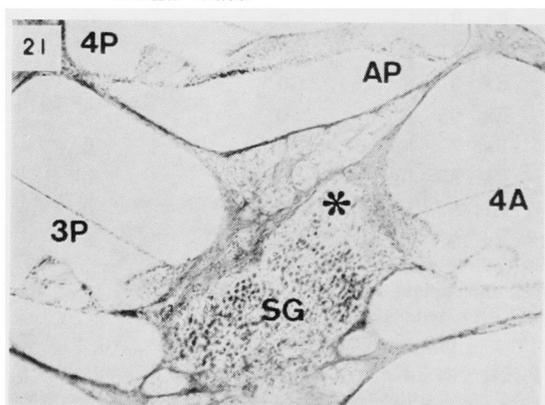


Fig.21 Atrophy of spiral ganglion (asteroid) in apical region of modiolus of left cochlea. AP: apical turn, 4A and 4P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of fourth turn. 3P: posterior 3/4 of third turn. Guinea pig treated with netilmicin at 50 mg/kg for 4 weeks. $\times 100$



有毛細胞の消失をきたした GM 120 mg/kg 投与群において、耳介反射値の著明な低下がみられており、両者の関係について今後の検討が必要であると考えられる。

前庭器系については、投与期間中明らかな平衡機能障害と思われる症状は観察されなかったが、両群とも全例に前庭器有毛細胞の軽度の散発性消失と耳石の部分的消失がみとめられた。これらの障害像は卵形囊斑、球形囊斑では全例に、また半規管膨大部様では Netilmicin 群の約半数と GM 群の一部にみとめられたが、その程度

Fig. 22 Scattered missing of hair cells (arrow) in macula utriculi (U) and crista ampullaris of lateral semicircular canal (L). Guinea pig treated with netilmicin at 50 mg/kg for 4 weeks. $\times 52$

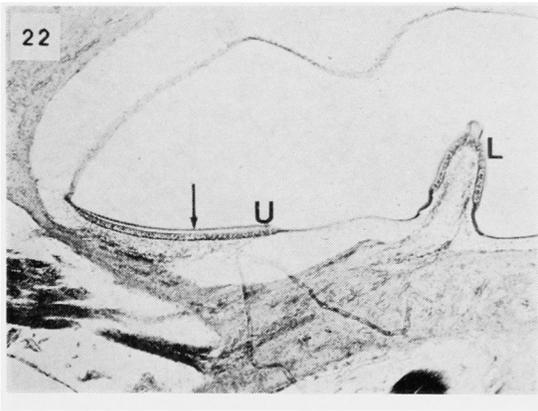


Fig. 23 Scattered missing of hair cells (arrows) associated with occasional loss of supporting cells in macula sacculi. Guinea pig treated with netilmicin at 50 mg/kg for 4 weeks. $\times 130$

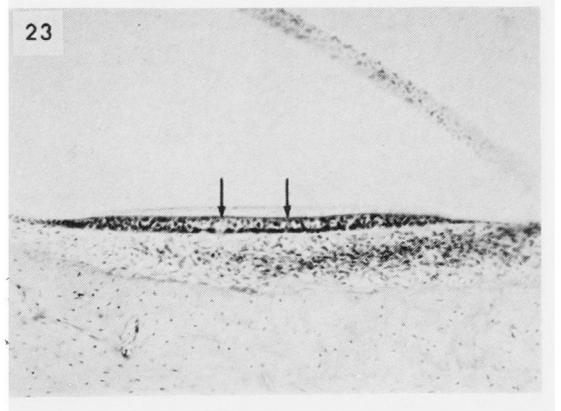


Table 8 Effect of Netilmicin (100 mg/kg, 4weeks) on pinna reflex and inner ear

Guinea pig No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 2	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 3	0	0	0	4T	0	+ (S)
Ex. 4	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 5	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 6	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 7	0	BE	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 8	0	0	0	0	0	+ (U, S)
Ex. 9	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)
Ex. 10	0	0	0	0	0	+ (U, S, L)

はいずれも軽度で、用量相関性の増強はみられず、両群間に明らかな差はみられなかった。

以上、ラットにおける耳毒性は、耳介反射と外有毛細胞消失との対応性および耳介反射域値の変動範囲を除くと、後に述べるモルモットにおける成績と比較的よく一致していた。

2. ラットにおける耳毒性と腎毒性の関係

共同研究者による腎の病理組織学的検索結果より、Netilmicin と GM の耳毒性と腎毒性の関係をかなり明確にすることができる。

30 mg/kg 投与の場合、内耳所見では両群ともにラセン器には外有毛細胞の消失などの障害像はみられなかったが、腎所見においても両群ともに、近位尿管上皮の壊死や剝離消失などの障害像はみられなかった。さらに

120 mg/kg まで増量した場合、内耳では両群間に外有毛細胞消失の発現頻度と拡がりには明らかな差がみとめられ、また腎においても近位尿管上皮の障害は、Netilmicin 群では用量相関性の増強がきわめて軽度であったのに対して、GM 群では障害が高度でかつ広範囲に増強していた。これらの成績より、Netilmicin は耳毒性、腎毒性ともに GM よりもかなり弱いことが明らかであり、特に投与量の増加による耳毒性、腎毒性の発現の危険性が、従来のアミノ配糖体系抗生物質に比べて少ないことが本剤の特徴と考えられる。

なおこの共同研究では、同一個体における耳毒性と腎毒性の発現時期についても検討する予定であったが、ラットでは投与可能な最高投与量においても、機能検査としての耳介反射試験に異常を示さなかったため、今回の

Fig. 24 Incomplete missing of outer hair cells (arrow) of spiral organ at the basal end of first turn. Inner hair cells (IHC) were present. Guinea pig treated with netilmicin at 100 mg/kg for 4 weeks. $\times 130$

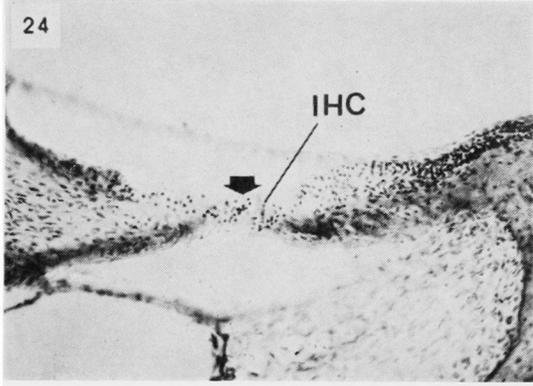


Fig. 26 Scattered missing of hair cells (arrow) and supporting cells (asteroids) of crista ampullaris of lateral semicircular canal. Guinea pig treated with netilmicin at 100 mg/kg for 4 weeks. $\times 300$

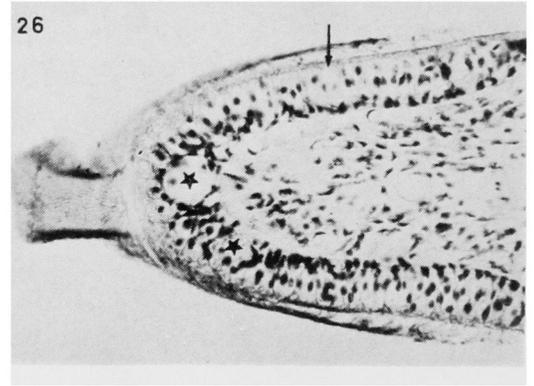


Fig. 25 Normal spiral organ of the cochlea, excepting the basal end of the first turn. 1A and 1P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of first turn, 2A and 2P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of second turn, 3A and 3P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of third turn, 4A and 4P: anterior 1/4 and posterior 3/4 of fourth turn, AP: apical turn. Guinea pig treated with netilmicin at 100 mg/kg for 4 weeks. $\times 21$

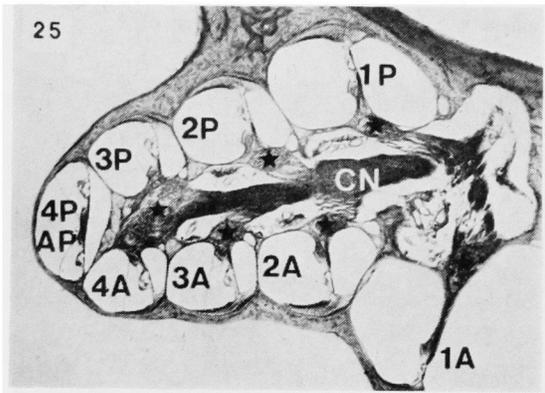


Fig. 27 Scattered missing of hair cells (arrows) associated with loss of otoconia in macula utriculi. Guinea pig treated with netilmicin at 100 mg/kg for 4 weeks. OC: remaining granular otoconia. $\times 52$

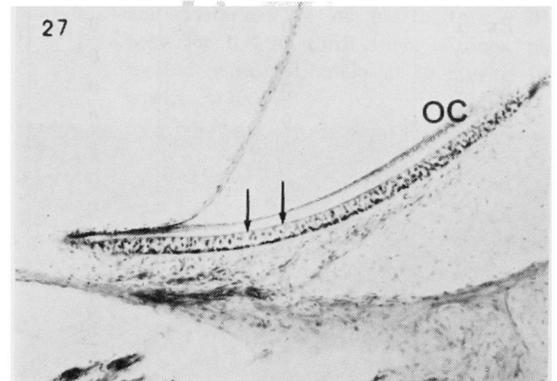


Table 9 Effect of Netilmicin (150 mg/kg, 2weeks) on pinna reflex and inner ear

Guinea pig No.	Pinna reflex loss Frequency range	Cochlea				Vestibulum
		OHC loss	IHC loss	SG loss	MC loss	HC loss
Ex. 1	0	0	0	0	4T	+ (U, S, L, P)
Ex. 2	0	0	0	0	3, 4T	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 3	0	0	0	0	3, 4T	+ (U, S, A, L, P)
Ex. 4	0	0	0	0	3, 4T	+ (U, S, A, L, P)

Other 6 guinea pigs died

3, 4T: third and fourth turn

Fig. 28 Moderate decrease in formazan deposition of outer hair cells (OHC) and slight decrease of inner hair cells (IHC) in spiral organ at anterior 1/4 of first turn of cochlea. Surface specimen. Guinea pig treated with previously with netilmicin (100 mg/kg) and 2 hours later followed by intravenous injection of furosemide (100 mg/kg) Three weeks later. $\times 200$

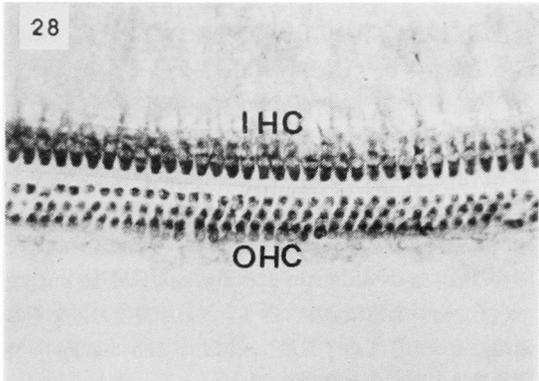
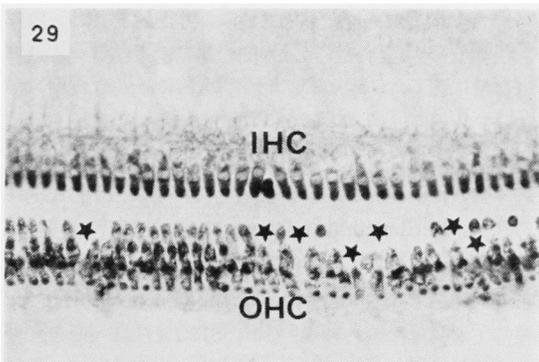


Fig. 29 Moderate decrease in formazan deposition and scattered missing (asteroids) of outer hair cells (OHC) and slight decrease in formazan of inner hair cells (IHC) in spiral organ at 2/4 of first turn in the same cochlea as in Fig. 28. $\times 200$



実験系から考察を加えることができなかった。

3. モルモットにおける耳毒性

聴覚系に対する障害について、耳介反射と蝸牛ラセン器の病理組織学的所見より検討すると、耳介反射は Netilmicin 50, 100 mg/kg 4週間投与、150 mg/kg 2週間投与のいずれの群においても正常であり、域値の変動もきわめて少なかった。ラセン器有毛細胞では、内毛細胞については障害像はみられず、外毛細胞につ

Fig. 30 Slight decrease in formazan and scattered missing of outer hair cells, and scattered decrease in formazan of inner hair cells in spiral organ at anterior 1/4 of second turn in the same cochlea as in Fig. 28. $\times 200$

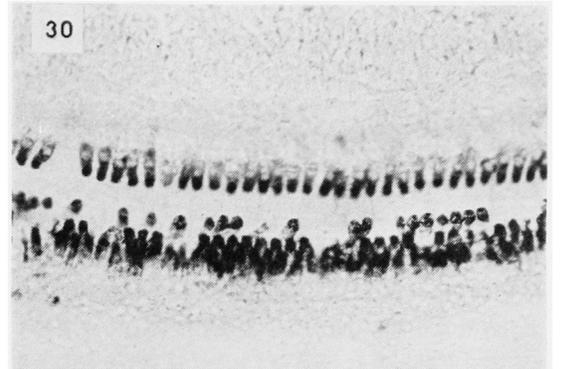
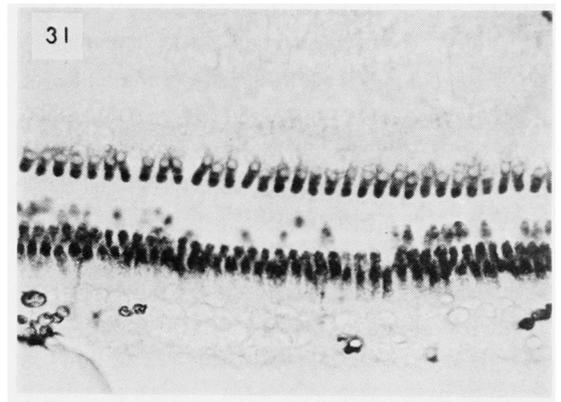


Fig. 31 Rather extensive missing of outer hair cells (especially in innermost row) and scattered loss of inner hair cells of the same cochlea as in Fig. 28. $\times 200$



いても 100 mg/kg 投与群の 1例 (10%) に 1回転下端部に限局した消失がみとめられたにすぎなかった。150 mg/kg 投与群で障害像がみられなかったのは投与期間が短かったためとも考えられるが、Netilmicin の聴覚系に対する障害の程度は非常に弱く、用量相関性の増強もきわめて少なかった。

ラセン器の他の部位では、ラセン神経節細胞や血管条に障害像がみとめられるものがあったが、いずれも軽度で用量相関性は明確ではなかった。ラセン神経節細胞の障害例では、そのラセン器の有毛細胞やそれに関係のある骨ラセン板内の末梢神経線維には障害がみられなかったことにより、ラセン神経節細胞の一次的障害と考えら

れる。このような障害の機能的意義については今後の検討が必要と思われる。

モルモットの聴覚器系に対する障害の程度を、従来われわれが実施してきた各種アミノ配糖体系抗生物質の成績と、耳介反射試験およびラセン器外有毛細胞の病理組織学的所見について比較すると以下の通りであり、Netilmicin の聴覚器系に対する障害が非常に弱いことが理解できる。

GM¹²⁻¹⁶⁾ では、対照薬として用いられた各種の実験成績がほぼ一定した傾向を示しており、100 mg/kg 4週間投与での耳介反射消失の発現頻度は90~100%、このうち広範囲な周波数域における耳介反射消失の発現率は75~80%で、ラセン器外有毛細胞消失の発現頻度は90~100%、このうち1回転下端部から2回転以上におよぶ広範な外有毛細胞消失の発現率は70~75%であった。耳介反射とラセン器外有毛細胞の所見が比較的良好一致していることがわかる。

次に Dibekacin (DKB)¹²⁾、TOB¹³⁾、AMK¹⁴⁾、KW-1062¹⁵⁾、SISO¹⁶⁾、を加えて同様な方法で比較してみると、100 mg/kg 4週間投与では、GM、SISO、TOB、は耳介反射消失、外有毛細胞消失の発現頻度がともにほぼ100%、DKB (DKBのみ3週間投与)は耳介反射同50%、外有毛細胞同75%、AMK、KW-1062は耳介反射同0%、外有毛細胞同約50%、Netilmicinは耳介反射同0%、外有毛細胞同10%である。GM、SISO、TOBのグループでは、耳介反射の消失は20,000 Hz付近に局限するものは少なく、さらに広範囲の500 Hzまでにいたり、外有毛細胞の消失でも1回転下端部付近に局限するものは少なく、それ以上の3~4回転までおよんでいた。広範囲な周波数域における耳介反射消失の発現率はGM 75~80%、SISO 50%、TOB 20%で、2回転以上におよぶ外有毛細胞消失の発現率はGM 70~75%、SISO 50%、TOB 22%であり、等量比較での障害の強さはGM>SISO>TOBと考えられるが、三剤間の差は小さく臨床最高使用量 (GM 120 mg/day、SISO 150 mg/day、TOB 180 mg/day) を考慮すると、これらの薬剤の聴覚器系に対する障害はほぼ同程度と考えられる。次に障害の強いDKBでは、耳介反射消失は20,000~15,000 Hzの高音域であり、外有毛細胞の消失は1回転の下端部から1/4の範囲であった。AMK、KW-1062については、100 mg/kg投与では1回転下端部に局限した外有毛細胞の消失のみがみられたが、40~50 mg/kg投与でみると、AMKは40 mg/kg 4週間投与で耳介反射は正常であったが、外有毛細胞の消失が63%にみられ、KW-1062は50 mg/kg 4週間投与で耳介反射は正常、外有毛細胞の消失は10%であった。最も

障害の弱い Netilmicin の50 mg/kg 4週間投与では、耳介反射、外有毛細胞ともに障害はみられず、さらに150 mg/kg 2週間投与でも耳介反射、外有毛細胞に障害はみられていない。以上を要約すると、聴覚器系に対する障害の強さは、等量比較ではGM>SISO>TOB>DKB>AMK>KW 1062> Netilmicin の順になる。

冒頭に紹介した Netilmicin の耳毒性についての各種の報告のうち、モルモットの聴覚器系に対する障害を検討した成績と対比してみると、今回のわれわれの実験成績と比較的良好一致していることがわかる。BRUMMETT⁴⁾は50、100、150 mg/kg 4週間皮下注射し、耳介反射、蝸牛マイクロホン電位 (CM) の測定、病理組織学的検索さらに血中、外リンパ液中濃度の測定の結果をGM群と比較しているが、Netilmicin群では明らかに本剤に起因すると思われる障害はみられておらず、その障害の強さは Netilmicin 150 mg/kg<GM 50 mg/kgとしている。さらに血中、外リンパ液中濃度の差をその理由の1つとしてあげており、例えば150 mg/kg 4週間投与後の平均血中濃度は Netilmicin で98 µg/ml、GMで402 µg/ml、平均外リンパ液中濃度は Netilmicin で12.5 µg/ml、GMで32.7 µg/mlであり、Netilmicin 150 mg/kg投与での平均外リンパ液中濃度は、GM 50 mg/kg投与での5.5 µg/mlとGM 100 mg/kg投与での17.1 µg/mlとの間であったとしている。

FEDERSPIEL⁵⁾は Netilmicin 100~300 mg/kg 28~40日間 (1日2分割) 皮下注射し、耳介反射とラセン器外有毛細胞の病理所見から、本剤の聴覚器系に対する障害は非常に弱く、GMの1/4以下、AMKの1/2以下と報告し、WERSÄLL⁶⁾も50~100 mg/kg 18~30日間 (1日2分割) 投与し、GM、AMKと比較して Netilmicinの障害の程度が弱いことを報告している。またARPINI⁷⁾も Netilmicin 67~150 mg/kg 21日間皮下注射し、耳介反射、電気生理学的検査によりGM、SISOと比較しているが、耳介反射では Netilmicinは150 mg/kg投与でも異常はみられず、GM、SISOは44 mg/kg投与では異常はみられなかったが、67 mg/kgでそれぞれ14%、54%、100 mg/kg投与ではともに82%に障害が発現し、電気生理学的検査でも Netilmicinの聴覚器系に対する障害がGM、SISOよりもはるかに弱いことを報告している。

これらの報告内容にしたがって、従来のわれわれの実験成績をより詳細に検討してみると、Netilmicin 100 mg/kg 4週間投与での耳介反射消失の発現頻度が0%で、ラセン器外有毛細胞消失の発現頻度が10%であるのに対して、GM¹⁶⁾との比較では、GM 25 mg/kg 4週間投与での耳介反射同20%、外有毛細胞同88%であるこ

と、また AMK¹⁴⁾ との比較では、AMK 40 mg/kg 4 週間投与での耳介反射同 0%，外有毛細胞同 63% であることより、Netilmicin の聴覚器系に対する障害の強さは GM の 1/4 以下、AMK の 1/2 以下ということが出来る。

前庭器系に対する障害については、明らかな平衡機能障害と思われる症状は観察されなかったが、病理組織学的所見では全例に前庭器有毛細胞の軽度の散発性消失がみとめられた。有毛細胞の消失は 50, 100 mg/kg 4 週間投与では卵形囊斑、球形囊斑および一部の半規管膨大部後に、150 mg/kg 2 週間投与では卵形囊斑、球形囊斑、半規管膨大部後のいずれにもみとめられたが、その程度は軽度であり用量相関性の増強はきわめて少なかった。

平衡機能検査についてはモルモットよりも大きい動物を用いた実験成績が報告されており、MILLER ら¹⁵⁾ はネコに Netilmicin, GM の 40 mg/kg を投与し、Netilmicin 群では平衡機能障害が発現するまでに 92 日以上も要したのに対して、GM 群では投与開始後約 2 週目で障害が発現したと報告している。また IGARASHI ら⁸⁾ はリスザルに Netilmicin 50~100 mg/kg, GM 25~75 mg/kg を 21 日間投与し、Netilmicin 群では 100 mg/kg 投与で障害がみとめられたのに対して、GM 群では 25 mg/kg 投与ですでに障害が発現したと報告している。

モルモットやラットを用いた今回の実験成績からは、前庭器系に対する障害について機能検査と病理組織学的検索の両面から十分な評価をするにはいたらなかったが、上記のネコやサルでの実験成績より考察すると、Netilmicin も他のアミノ配糖体系抗生物質と同質の前庭器系に対する障害作用を有するものの、その程度は弱いものと考えられる。

4. Netilmicin とループ利尿剤併用時の耳毒性

Netilmicin と Furosemide 併用時の聴覚器系に対する障害は、それぞれの単独 1 回投与では発現しないことより、両剤の併用による相互作用が重要な役割を果しているものと考えられる。

Furosemide の薬理作用としては、膜の能動輸送に関する Na⁺, K⁺, ATPase の阻害作用¹⁷⁻¹⁹⁾、嫌気性解糖過程の glycerolaldehyde-3-phosphate 脱水素酵素の阻害作用²⁰⁾、電子伝達系における ATP の第 2 産生部位であるチトクローム b から c に移行する過程でのリン酸化の阻害作用^{21,22)}、などが明らかにされている。

また内耳に対する障害を Nitro-BT 超生体還元反応により、細胞内のエネルギー代謝障害として捉える方法がある。内耳の有毛細胞は生体内や断頭直後では、

Nitro-BT を比較的容易に細胞内にとり入れ、有毛細胞内での Nitro-BT 還元反応によりホルマザンが形成される。このホルマザンの形成障害は、既述の如く²³⁻²⁵⁾、有毛細胞内のエネルギー代謝障害を示すものと考えられ、エネルギー代謝障害が進行すると最終的には、有毛細胞の壊死から消失への障害像として捉えられるものと考えられる。

Furosemide 単独投与時の聴覚器系に対する障害に関する報告²⁶⁾ では、広範な周波数域における耳介反射の消失にともなって、ラセン器外有毛細胞に Nitro-BT 還元能の著明な低下がみられ、また Nitro-BT 還元能の低下がみられた細胞に限って、細胞体の著明な膨化がみられている。このような細胞体の膨化は、Furosemide による膜の能動輸送の ATPase の阻害が、腎のヘンレ・ループとともに、内耳の外有毛細胞にもおこり、その結果 Na⁺ ポンプの障害された外有毛細胞内に、細胞外に多量に存在するコルチリンパが浸入した可能性を示唆している。

一方 SCHACHT²⁷⁾ は、細胞膜を構成しているリン脂質のうちの phosphatidyl-inositol が Neomycin との親和性が強いことを見出し、両者の複合体が膜の構造を破壊することにより細胞内への透過性が高められるものと考えているが、これはアミノ配糖体系抗生物質によるラセン器有毛細胞の膜障害の機作を理解する上で参考となる内容と考えられる。

以上の基礎的見地より、Netilmicin と Furosemide 併用時の聴覚器系に対する障害の発現を考察すると次のように考えられる。Netilmicin 単独投与時の成績より判断すると、Netilmicin は膜障害作用が弱く、ラセン器有毛細胞内に移行しにくいために聴覚器系に対する障害が他のアミノ配糖体系抗生物質よりも弱く、投与量を増加しても用量相関性の増強がみられない。しかしながら、Furosemide 投与により膜の能動輸送が障害されると、すでに内耳に移行していた Netilmicin がコルチリンパから外有毛細胞内に移行して、細胞内ではじめてエネルギー代謝障害による聴覚器系に対する障害が発現する。またこの時の障害の程度は耳介反射試験の推移より判断して、一過性の比較的軽度のものと考えられる。

5. Netilmicin の聴覚器系に対する障害についての総合的評価

今回の実験成績より、Netilmicin の聴覚器系に対する障害について総合的に評価すると、次の通りである。

1) Netilmicin も他のアミノ配糖体系抗生物質と同質の膜障害作用とエネルギー代謝障害を有する。

2) Netilmicin の膜障害作用は、GM や他のアミノ配糖体系抗生物質よりも弱く、ラセン器有毛細胞の膜障

害をおこしにくいために、筋注の場合には投与量を増加しても用量相関性の障害像の増強はきわめて軽度であった。

3) Furosemide との併用により膜の透過性が亢進され、Netilmicin が細胞内に移行すると、エネルギー代謝障害により聴覚器系に対する障害が発現するが、その障害の程度は一過性の比較的軽度のものであった。

4) 以上より、Netilmicin の聴覚器系に対する安全性は従来のアミノ配糖体系抗生物質よりも高いものと考えられるが、臨床使用における安全性を十分に保つためには、ループ利尿剤などの膜透過性亢進作用のある薬剤との併用は、慎重に行なう必要がある。

謝 辞

共同研究者の東京慈恵会医科大学上田泰名誉教授ならびに同第二内科斎藤篤博士の御協力に深謝する。

文 献

- 1) MILLER, G. H.; G. ARCIERI, M. J. WEINSTEIN & J. A. WAITZ: Biological activity of netilmicin, a broad-spectrum semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10(5): 827~836, Nov. 1976
- 2) 第26回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム "Netilmicin", 1979
- 3) LUFT, F. C.: Netilmicin: A review of toxicity in laboratory animals. *The Journal of International Medical Research* 6: 286~299, 1978
- 4) BRUMMETT, R. E.; K. E. FOX, R. T. BROWN & D. L. HIMES: Comparative ototoxic liability of netilmicin and gentamicin. *Arch. Otolaryngol.* 104: 579~584, Oct. 1978
- 5) FEDERSPIEL, P. J.: Evaluation of the ototoxicity of netilmicin. *Current Chemotherapy. Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy*, Vol. 2: 975~976, Am. Soc. for Microb. Washington, D. C. 1978
- 6) WERSÄLL, J. & B. BJÖRCKROTH: Netilmicin, an aminoglycoside antibiotic with low ototoxicity in animal experiments. *Current Chemotherapy. Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy*. Vol. 2: 976~977, Am. Soc. for Microb. Washington, D. C. 1978
- 7) ARPINI, A.; L. CORNACCHIA, L. ALBIERO, F. BAMONTE & L. PARRAVICINI: Auditory function in guinea pigs treated with netilmicin and other aminoglycoside antibiotics. *Arch. Otorhinolaryngol.* 224(1-2): 137~142, 1979
- 8) IGARASHI, M.; J. K. LEVY & J. JERGER: Comparative toxicity of netilmicin and gentamicin in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *The Journal of Infectious Diseases* 137(4): 476~480, April 1978
- 9) SOLBERG, C. O.; S. T. MADSEN, A. DIRTANES, S. STOKSTAD, K. B. HELLUM, F. J. HALVORSEN & K. BAKKE: High-dose netilmicin therapy of patients with septicemia and pyelonephritis. *Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 1: 378~380, Am. Soc. for Microb. Washington, D. C. 1980
- 10) 秋吉正豊, 梶村哲世: ラットにおけるセフォキシチンの聴器に対する影響。 *Chemotherapy* 26(5): 643~655, Sept. 1978
- 11) 秋吉正豊, 岩崎信一: ラットにおける T-1220 (Pipera-cillin) の聴器毒性とその安全性の評価について。 *Chemotherapy* 26(5): 615~629, Sept. 1978
- 12) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 中田穂出美, 田島たよ子: 3', 4'-Dideoxykanamycin B (DKB) の聴器毒性について。 *Jap. J. Antibiot.* 27(1): 15~26, Feb. 1974
- 13) 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, Mar. 1975
- 14) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 中田穂出美, 田島たよ子, 鈴木健, 岸本勝次: Amikacin (BB-K8) の聴器毒性について。 *Jap. J. Antibiot.* 28(3): 288-304, June 1975.
- 15) 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, Sept. 1977
- 16) 秋吉正豊, 矢野三郎, 中田穂出美: Sisomicin の聴器毒性とその安全性について。 *Chemotherapy* 26(3): 70~84, July 1978
- 17) DUGGAN, D. E. & R. M. NOLL: Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosine-triphosphatase of renal cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* 109: 388~396, 1965
- 18) HOOK, J. B. & H. W. WILLIAMSON: Lack of correlation between natriuretic activity and inhibition of Na-K activated ATPase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 358~360, 1965
- 19) DAVIS, P. W.: Inhibition of renal Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase activity by ethacrynic acid. *Biochem. Pharmacol.* 19: 1983~1989, 1970
- 20) KLAHR, S.; J. YATES & J. BOURGOIGNIE: Inhibition of glycolysis by ethacrynic acid and furosemide.

- Am. J. Physiol. 221: 1038~1043, 1971
- 21) GORDON, E. E.: Site of ethacrynic acid action on Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 17: 1237~1242, 1968
- 22) MANUEL, M. A. & M. W. WEINER: Effect of ethacrynic acid and furosemide on isolated rat kidney mitochondria: Inhibition of electron transport in the region of phosphorylation site II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198: 209~221, 1976
- 23) AKIYOSHI, M.; K. SATO & H. NAKADA: Histochemical study on the intravital reduction potency of coenzyme Q in the respiratory chain of the hair cells of the spiral organ in normal guinea pigs and its alteration in acute starvation and vitamin B1 deficiency. *Acta Histochem. Cytochem.* 6(4): 233~247, 1973
- 24) AKIYOSHI, M.; S. YANO & H. NAKADA: Histochemical study on effect of freezing and thawing on tetrazolium reducibility of the hair cells of the inner ear in guinea pigs. *Acta Histochem. Cytochem.* 9(1): 12~29, 1976
- 25) 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
- 26) 田村秀明: エタクリン酸およびフロセマイドによる内耳障害の発生機序に関する組織化学的研究。Audiology Jap. 21: 668~687, 1978
- 27) SCHACHT, J.: Isolation of an aminoglycoside receptor from guinea pig inner ear tissues and kidney. *Arch. Otorhinolaryngol.* 224(1-2): 129~134, 1979

EXPERIMENTAL STUDY ON OTOTOXICITY OF NETILMICIN IN RATS AND GUINEA PIGS

MASATOYO AKIYOSHI, SABURO YANO,*

HOZUMI NAKADA, HIROSHI OIKAWA,

TETSUJI NARA and TAKAYOSHI IMAZAWA

Department of Pathology, School of Dental Medicine,

Tsurumi University

*Otorhinolaryngological Clinic,

Tokyo Municipal Okubo Hospital

Three series of experiments were performed to evaluate the ototoxicity of netilmicin in 80 rats (Sprague-Dawley) and 33 guinea pigs (Hartley). In order to evaluate the auditory impairment in the animals the pinna reflex test was carried out in a wide frequency range from 20 KHz to 500 Hz before, during and after the administration of netilmicin and gentamicin. Upon completion of the drug administrations histopathological investigations were made on the serial celloidin sections in horizontal direction of the inner ears in the rats and guinea pigs. In addition, supravital reduction reaction with nitro blue tetrazolium (Nitro-BT) was conducted on the inner ears which were removed immediately after guinea pig decapitation. This was done to evaluate the reduction potency in the electron transport system in the surviving hair cells of the cochlea.

Series 1. a) Comparative evaluation of ototoxicity of netilmicin and gentamicin in rats

Netilmicin and gentamicin were given intramuscularly at various doses of 30, 90 and 120 mg/kg, respectively for 3 weeks. Pinna reflex loss was not detected in animals of either group. Histopathologically, at 30 mg/kg there were no animals missing the aminoglycoside sensitive outer hair cells of the spiral organ. However, at 90 mg/kg the loss of the outer hair cells occurred in 11% of netilmicin treated animals

and in 30% of gentamicin treated ones. At 120 mg/kg the loss of the outer hair cells was seen in 11% of the netilmicin animals and in 100% of the gentamicin ones. The loss of these outer hair cells was relatively localized in the lower part of the basal turn of the cochlea in the netilmicin animals, but more extensive in the gentamicin treated animals. On the other hand, scattered loss of the hair cells in the vestibular organs including the cristae ampullares of the semicircular canals and the utricular as well as saccular maculae was found in the animals of both groups. There was no remarkable difference in vestibular toxicity between the netilmicin and gentamicin rats.

b) Ototoxicity and nephrotoxicity

According to the comparative nephrotoxicity study of netilmicin and gentamicin in the rats performed by the coworkers, Prof. Yasushi Ueda and Dr. Atsushi Saito (Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo), the gentamicin treated rats showed a dose dependent alteration in nephrotoxicity, while the netilmicin treated rats showed little alteration. Our results indicated that the nephrotoxicity tendencies seen with netilmicin and gentamicin were also similar for ototoxicity.

Series 2. Evaluation of ototoxicity of netilmicin in guinea pigs.

Netilmicin was administered intramuscularly at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg, respectively for 4 weeks. Loss of the pinna reflex did not occur in any animals of both groups. Loss of the outer hair cells in the basal end of the cochlea was found in only one animal treated with netilmicin at 100 mg/kg. Decrease in the number of spiral ganglion cells occurred in only the upper part over the fourth turn of the modiolus in one animal from each group without the loss of the outer hair cells in the corresponding spiral organ. In the vestibular organs a scattered loss of hair cells was found in all animals of both groups. The results of the present and previous guinea pig experiments suggest that netilmicin is less ototoxic than amikacin, dibekacin and kanamycin.

Series 3. Combined administration with netilmicin and furosemide

A single injection of netilmicin (100 mg/kg, i.m.) was given to 3 guinea pigs and 2 hours later furosemide (100 mg/kg, i.v.) was administered. The pinna reflex test revealed that a transient auditory impairment was induced in a wide frequency range (20 to 0.5 KHz) immediately after the furosemide administration. The loss of the pinna reflex lasted for about 30 minutes, then decreased in frequency range and localized at 20 KHz. However, from the 2nd day after the furosemide administration the loss of the pinna reflex again increased in the frequency range. On the 21st day, the pinna reflex again showed remarkable repair except for the loss at 20 KHz. By supravital reduction reaction using Nitro-BT, formazan, the reaction product, was less noted in the lower one fourth segment of the basal turn of the cochlea and at the same time a loss of the outer hair cells was noted scatteringly.

The results suggest that netilmicin possesses a property to affect energy metabolism of the hair cells similar to other aminoglycoside antibiotics. It also may be able to cause some damage to the outer hair cells in combination with furosemide at high dose.

In conclusion, netilmicin inhibited energy metabolism of the hair cells same as other aminoglycosides do, but its hair cell membrane toxicity is milder than the other aminoglycosides, and netilmicin is one of the less ototoxic aminoglycosides.