

## カナマイシン耳毒性軽減に関する研究

黒澤菜穂子・大和田栄治・伊藤 圭二

北海道薬科大学

(昭和 56 年 8 月 3 日受付)

アミノ配糖体抗生物質による耳毒性の軽減物質開発を目的とし、カナマイシン (KM) 誘発難聴に対する数種併用薬物の影響をプライエル耳介反射試験を用いて観察した。

モルモットに KM (200 mg/kg s. c.) を連日投与し、投与開始後約 2 週間で難聴を誘発させた。抗結核薬としてよく併用されるイソニアジドおよびパラアミノサリチル酸は KM 耳毒性を増加させた。

臨床に、KM 耳毒性を軽減するために用いられているパンテチンおよびコンドロイチン硫酸は、著者らの実験において、耳毒性軽減効果を示さなかった。

また、アミノ糖である 2-グルコサミンおよび N-アセチル-2-グルコサミンの併用は、KM の耳毒性を増強した。

さらに数種の糖類について検討したところ、グルコースおよびマルトースに KM 難聴発現を遅延する傾向が認められ、特にマルトースにおいて著しかった。

以上の結果から、マルトースの併用により KM 耳毒性を軽減しうる可能性が示唆された。

アミノ配糖体抗生物質は、現在、結核その他数多くの感染症に幅広く用いられている薬物であるが、耳毒性、腎毒性が著しく臨床治療上大きな障害となっている。特に、耳毒性については治療が終了してから進行することもあり、またその症状は不可逆の様相を呈することが多いなど、使用法のむずかしい薬物とされている。

このようなアミノ配糖体抗生物質の耳毒性発現のメカニズムとして、アミノ配糖体抗生物質の有毛細胞膜成分である phosphoinositide<sup>1)</sup> や酸性ムコ多糖類<sup>2)</sup> に対する結合、あるいは有毛細胞における糖代謝<sup>3,4)</sup> やエネルギー利用<sup>5)</sup> の阻害、さらには有毛細胞中へのグルコース取り込みにおける競合<sup>6)</sup> などが関連するという諸説がある。また、これらの観点から耳毒性軽減の試みが種々なされてきたが、未だに著明な軽減効果を示すものは見当たらない。

今回、著者らはアミノ配糖体抗生物質の耳毒性軽減物質の開発を目的とし、耳毒性発現のメカニズムと関連すると思われる種々の薬物を取りあげ、これら薬物のカナマイシン (KM) 難聴発現に及ぼす影響を耳介反射試験を用いて検討した。

## I. 実験材料と方法

### 1. 実験動物

プライエル耳介反射正常の雄性ハートレイ系モルモット (投与開始前体重約 300 g) を用いた。動物は 12 時間ごとの明暗サイクル (午前 6 時～午後 6 時点燈) 調節下

の恒温恒湿動物飼育室にて、市販固型飼料 (オリエンタル酵母, RC-4) ならびに水を自由摂取させ飼育した。

### 2. 試料

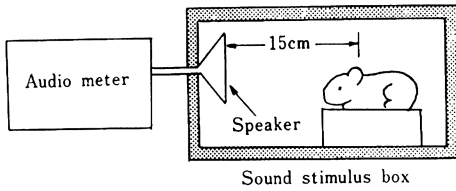
実験に用いた KM は硫酸カナマイシン明治<sup>®</sup> (明治製菓 1g 力価/1 バイアル)、イソニアジド (INH) はイスコチン<sup>®</sup> (第一製薬)、パンテチンは「ハマリ」ピーエス<sup>®</sup> (浜理薬品工業) を使用し、その他の試料はすべて試薬特級品を用いた。

### 3. 投与薬物溶液の調製および投与方法

KM は精製水を用い 13.3% 溶液を調製し、1 日 1 回連日皮下投与した。投与量は 200 mg 力価/1.5 ml/kg とし、投与時の体重にもとづき全投与量を増加させた (併用薬物についても同じく全投与量を増加させた)。

併用薬物については以下に示す濃度の水溶液を調製し、2.5 ml/kg の割合で KM 投与 5 分前に腹腔内に投与した。INH 0.4%、パンテチン 13.7%、コンドロイチン硫酸 2.4%、2-グルコサミン 10.7%、N-アセチル-2-グルコサミン (以下 N-アセチルグルコサミンと略す) 11.0%、マルトース 35.6%、グルコース、ガラクトースおよびフルクトースはいずれも 17.8%。また、パラアミノサリチル酸 (PAS) は、PAS に等モルの NaOH 液を加え溶解した後、精製水を加えて 12% 溶液を調製した。なお、各実験でコントロールとして用いた KM のみの群には、併用薬物のかわりに同量の生理食塩水を腹腔内投与した。

Fig.1 Schematic diagram of audiometric equipment to test the auditory function by preyer reflex in guinea pigs



4. 聴力測定法

Fig.1 に示すような周波数別聴力測定装置を自作した。無音箱中、スピーカーより約 15cm 離れたところに動物を固定し、2, 8, 14 および 18kHz の各周波数音約 120dB の刺激音に対するプライエル耳介反射の有無を観察した。

II. 実験成績

1. カナマイシン投与による難聴誘発

モルモットを各 6 匹ずつの対照群（生理食塩水 s.c.）および KM 投与群（200 mg/kg/day s.c.）に分け、2, 8, 14 および 18kHz におけるプライエル耳介反射の有無を観察した。それらの結果は、縦軸に耳介反射プラスの動物の割合（%）、横軸に投与後の日数を取り Fig.2 に示した。

Fig.2 Hearing loss due to administration of KM (200 mg/kg s.c. daily) to guinea pigs

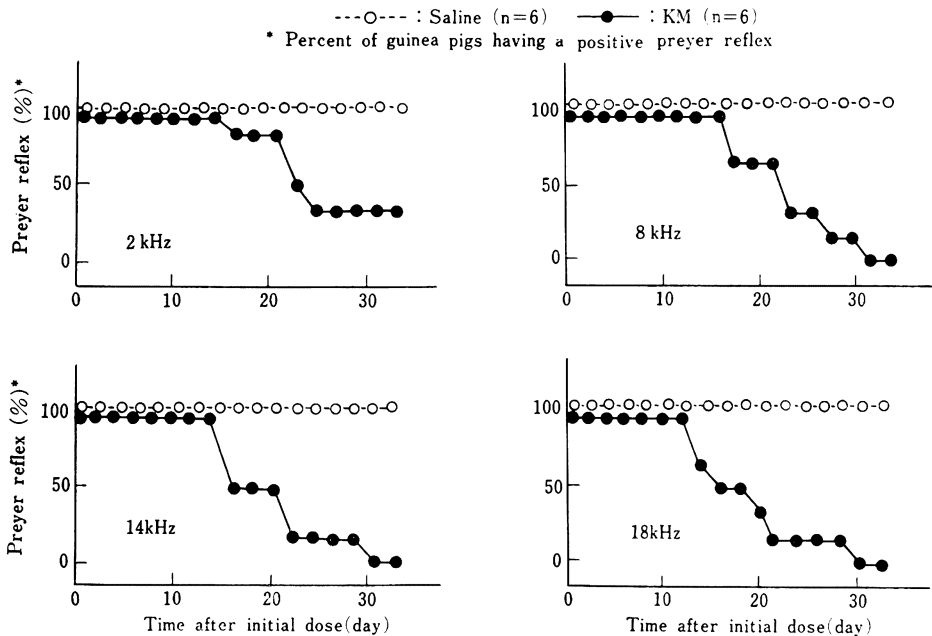
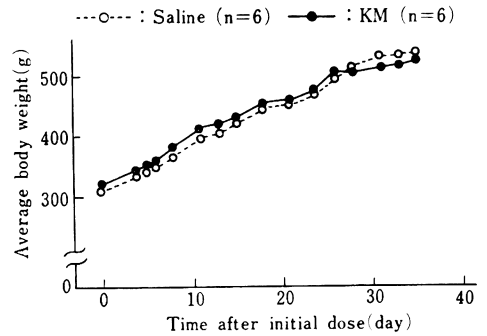


Fig.3 Growth curve of guinea pigs administered KM (200 mg/kg s.c. daily)



対照群においては耳介反射の消失はまったく認められなかったが、一方、KM投与群ではいずれの周波数においても耳介反射の消失が認められた。この反射消失動物は、一般に低周波数よりも高周波数の方が早く現われ、かつ、反射消失動物の割合が増加する速度も大きかった。

Fig.3 はこの実験で用いた KM 投与群と対照群の体重変化を示したものであるが、両群にはほとんど差が認められない。したがって、本実験において KM の投与はモ

Fig. 4 Effect of antitubercular drugs on KM-induced hearing loss. (a) Effect of INH (10 mg/kg/day i. p.), (b) Effect of PAS (300 mg/kg/day i. p.)

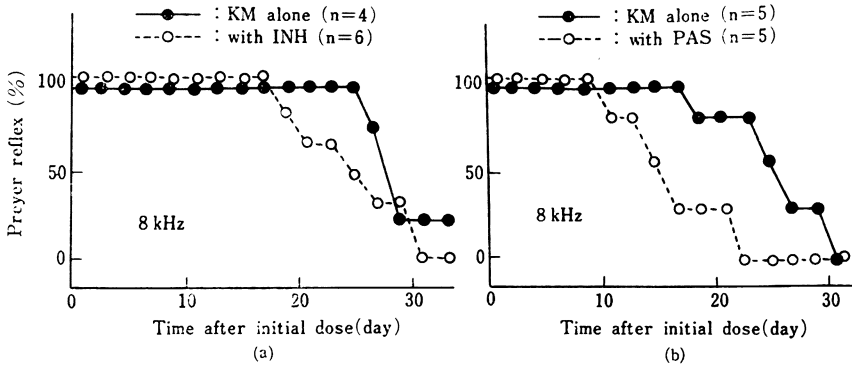
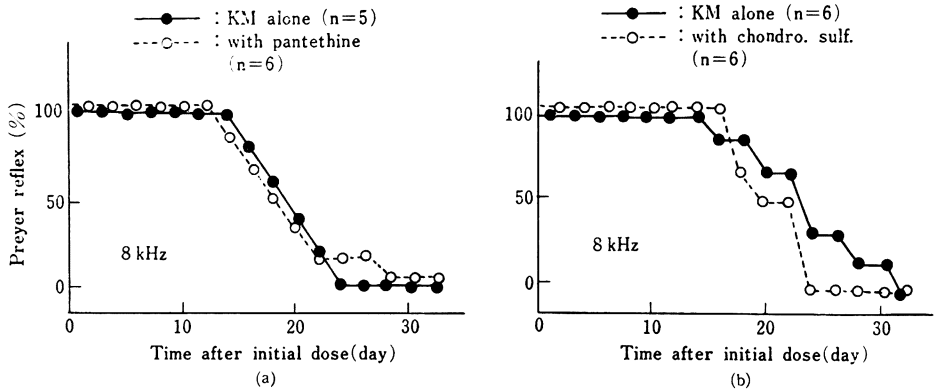


Fig. 5 Effect of possible ototoxicity reducing agents on KM-inducing hearing loss. (a) Effect of pantethine (343 mg/kg/day i. p.), (b) Effect of chondroitin sulfate (60 mg/kg/day i. p.)



ルモットに対し、聴覚をのぞき大きな影響を与えないと思われる。

## 2. 他の抗結核薬の併用

INH および PAS は、臨床治療上 KM とよく併用される。そこで、これら併用薬物の KM 難聴発現に対する影響を観察した。

結果は INH, PAS とも、いずれの周波数においても KM 難聴の発現を促進した。Fig. 4 は 8 kHz における結果を示したものであるが、この周波数では INH, PAS のどちらも KM 単独投与群に比して、約 1 週間、耳介反射の消失時期を早めた。

## 3. パンテチンおよびコンドロイチン硫酸の併用

パンテチンおよびコンドロイチン硫酸は、アミノ配糖体抗生物質による耳毒性の軽減作用があるとして臨床的にも使用されている。

本実験法によりこれらの軽減薬物について検討を加えたところ、いずれの周波数においてもパンテチンおよびコンドロイチン硫酸は KM 難聴に対する軽減効果を示さなかった。Fig. 5 に 8 kHz における結果を示した。

## 4. アミノ糖の併用

アミノ配糖体抗生物質の構成分子であるアミノ糖は聴覚に影響を与える可能性がある。そこで、N-アセチルグルコサミンおよび 2-グルコサミンの KM 難聴に対する効果を観察した。

Fig. 6 は、2, 8, 14 および 18 kHz における N-アセチルグルコサミンの結果を示したものであるが、いずれの周波数においても KM 難聴の増強が認められた。

2-グルコサミンについても、ほぼ同様な傾向が得られ、8 kHz の結果を Fig. 7 に示した。

## 5. グルコースを含む糖類の併用

Fig. 6 Effect of N-acetyl-2-glucosamine (274 mg/kg/day i. p.) on KM-induced hearing loss

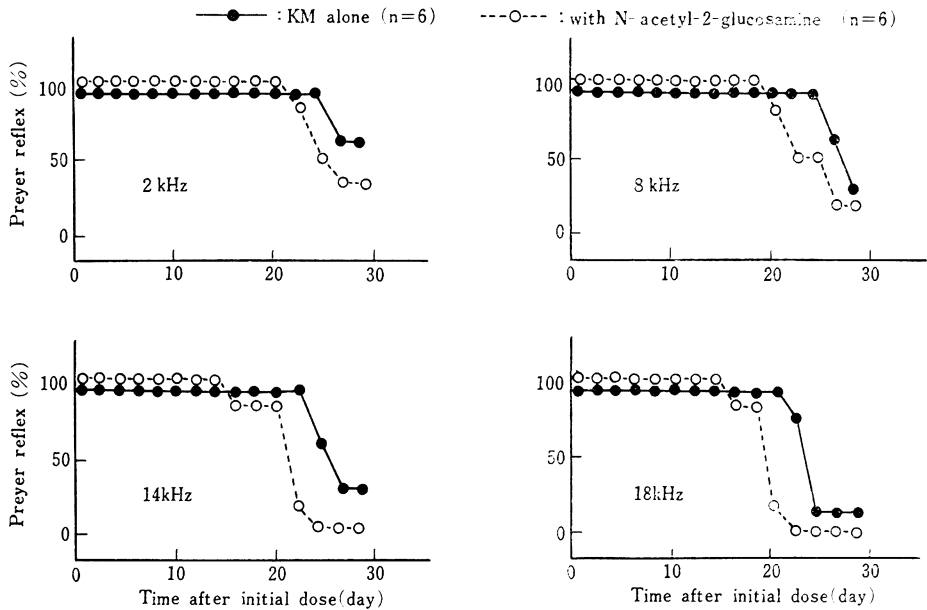
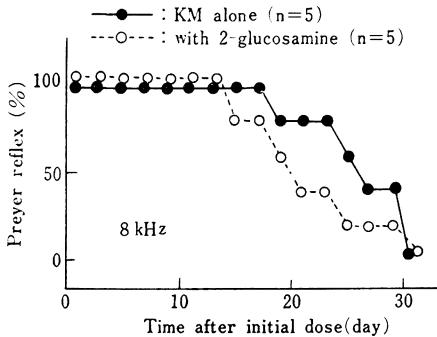


Fig. 7 Effect of 2-glucosamine (267 mg/kg/day i. p.) on KM-induced hearing loss



高血糖下においてKM難聴が軽減された<sup>6)</sup>ことより、著者らはグルコースおよび数種の糖類に着目し、それらとKMの併用実験を行なった。

用いた単糖類のうち、グルコースはKM難聴発現の初期に若干の遅延効果を示したが、ガラクトースおよびフルクトースではほとんど遅延効果は認められなかった。これらの8kHzにおける結果をまとめ、Fig. 8に示した。

一方、二糖類であるマルトースの場合にはFig. 9に示すように、いずれの周波数においてもKM難聴発現に明

らかな遅延効果が認められた。特に、KM難聴の軽度な低周波数領域において、その傾向が著しかった。

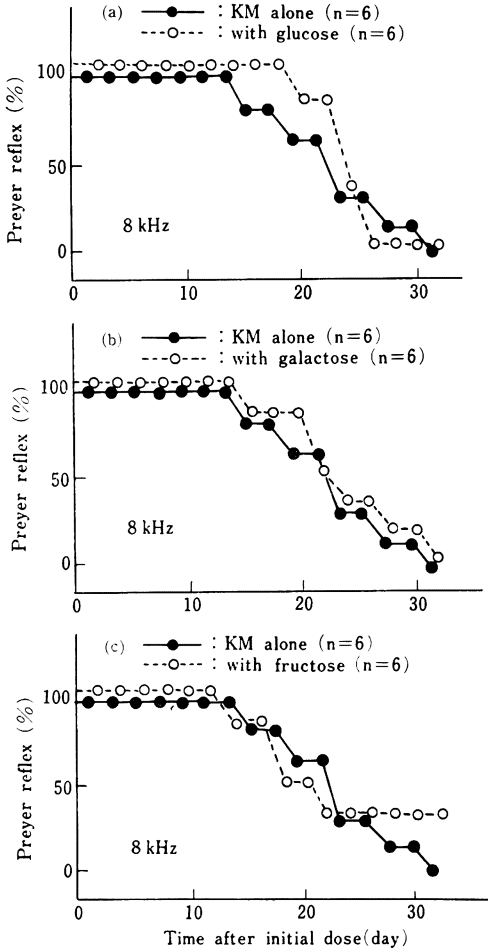
### III. 考 察

今回、著者らは難聴発現の判定にプライエル耳介反射試験を用いたが、この方法は機能的側面を判定するにすぎず、さらに内耳障害に関する詳細な知見をうるには、形態学的あるいは生化学的側面からも検討することが必要である<sup>8)</sup>。しかしながら、耳介反射試験は聴覚障害のおおよその程度を判定し、実験法としても簡便であるため、本実験法のように軽減物質開発のスクリーニングテストとしては有用であると思われる。

本実験では難聴を誘発させる薬物として、各種アミノ配糖体抗生物質の中でも特に難聴をひきおこしやすいとされているKMを用いた。秋吉<sup>9)</sup>は、モルモットにKM 200 mg/kgを連日投与すると聴覚障害はヒトと同様に高周波数にはじまり低周波数領域へ向かって拡大していくと報告している。また、この機能障害は高周波数音の感受性部位である蝸牛基底部から上方に向かっての組織障害の広がりとも一致しているといわれている。著者らの実験においても、KM難聴は低周波数よりも高周波数領域において早く発現し (Fig. 2)、秋吉の報告と同様の傾向を示した。

さらに、そのKM耳毒性は抗結核薬としてKMと併用されるINHおよびPASにより促進された (Fig. 4)。

Fig. 8 Effect of some monosaccharides on KM-induced hearing loss. (a) Effect of glucose (445 mg/kg/day i. p.), (b) Effect of galactose (445 mg/kg/day i. p.), (c) Effect of fructose (445 mg/kg/day i. p.)



INH や PAS のこのような作用がそれら自身の耳毒性によるものか、あるいは腎など他の臓器を障害して二次的に KM の耳毒性を増加させたのかは現在のところ不明である。しかし、この結果は臨床上これらの薬物の併用にあたり、難聴発現にいつそうの注意を払う必要があることを示唆している。

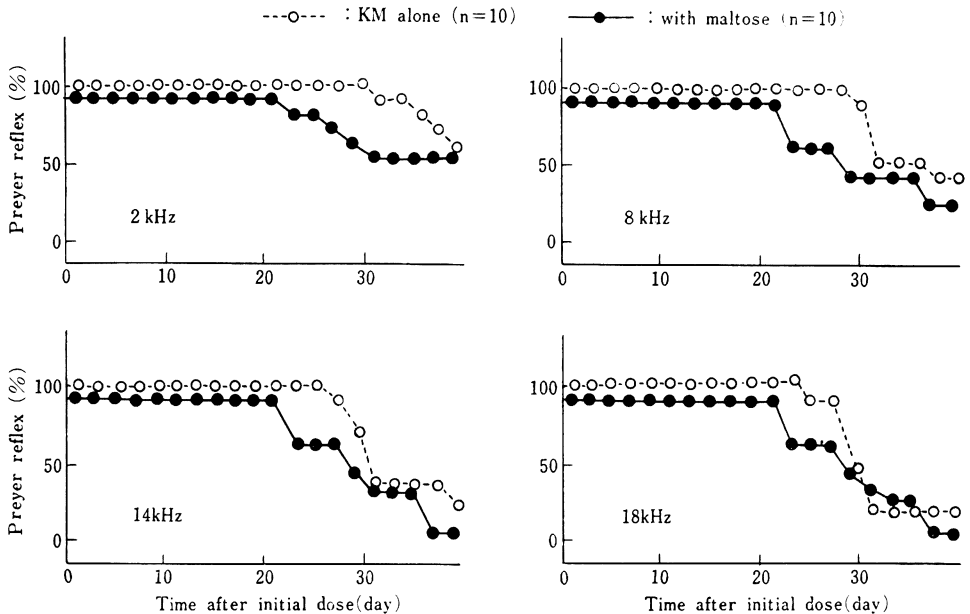
一方、アミノ配糖体抗生物質は内耳有毛細胞中の糖質代謝障害に関係するとの観点から、パントテン酸の添加はこの障害を抑制し、KM の耳毒性を軽減するとの報告<sup>10)</sup>がある。このような理由で、パントテン酸やパンテチンが耳毒性軽減物質として用いられることもある。また、アミノ配糖体抗生物質は内耳結合組織中のコンドロ

イチン硫酸を減少させ、その結果、耳毒性を発現させるとの観点から<sup>11)</sup>、コンドロイチン硫酸の併用を試みた報告<sup>12)</sup>もある。しかしながら、実際にはこれらの軽減物質は臨床上期待されるほどの効果を示しておらず、著者らの実験条件においても軽減効果が認められなかった (Fig. 5)。

アミノ配糖体抗生物質は聴器や腎に特異的に蓄積する結果、副作用をひきおこすことが知られており<sup>13)</sup>、蓄積の原因として膜構成成分との結合<sup>1,2)</sup>などが報告されている。また、KM の腎尿管再吸収はグルコラクトンによって阻害され、その結果腎毒性が著しく減少するとの報告<sup>14)</sup>もある。著者らは、聴器と腎の組織学的類似性<sup>15)</sup>から内耳有毛細胞にもこのような KM トランスポート系が存在し、これにより細胞内に蓄積した KM が毒性を発揮すると仮定した。さらに、KM の構成成分である 3-グルコサミンが耳毒性を有する<sup>7)</sup>ことから、KM トランスポートにはアミノ糖部分が寄与していると考えた。そこで、耳毒性を持たないアミノ糖を KM と併用することにより、内耳有毛細胞への KM 取り込みを競合的に阻害し、これにより KM 耳毒性を軽減すべく実験を行なった。アミノ糖として、本実験条件下で耳毒性がまったく認められなかった 2-グルコサミンおよび N-アセチルグルコサミンを用いた。しかしながら、それらを併用した場合、両者ともむしろ KM 難聴発現を促進する結果を与え (Fig. 6)、このようなアプローチによる KM 耳毒性軽減の試みは成功しなかった。

一方、GARCIA-QUIROGA ら<sup>8)</sup>はアロキサンで誘導した高血糖モルモットが KM 難聴に抵抗性を示すことを見出した。彼らは、アミノ糖がグルコーストランスポートに親和性を有する<sup>16)</sup>ことから、アミノ配糖体である KM が内耳有毛細胞への取り込みを競合的に阻害し、その結果としてエネルギー源の不足をきたし、難聴を導くと推察している。著者らのアミノ糖併用による KM 耳毒性の促進 (Fig. 6) も、この説を支持しているように思われる。そこで、KM によりグルコース不足の状態にある内耳有毛細胞に対し、エネルギー源を補給するという観点から、グルコースを含め数種の糖の併用効果について検討した。グルコースの併用は KM 難聴の発現をわずかではあるが遅延したが、グルコースと同じトランスポート系により取り込まれるガラクトースについては、この効果は認められなかった (Fig. 7)。GARCIA-QUIROGA ら<sup>8)</sup>の報告では血中グルコース濃度が 300 mg % 以上でないとは著明な軽減効果が示されないとされている。著者らの実験条件では、グルコースやガラクトースの血中濃度はこの値をはるかに下まわると思われるので、優れた軽減効果が得られなかったと推察される。一方、トランスガ

Fig. 9 Effect of maltose (890 mg/kg/day i. p.) on KM-induced hearing loss



ート系がグルコースとは異なることとされているフルクトースおよびマルトースについても検討した。フルクトースはKM難聴発現に対する軽減効果を示さなかったが、マルトースは明らかに軽減効果を示した(8kHzで約1週間の難聴発現の遅延, Fig. 9)。また、この効果は高周波数よりも低周波数において強く認められた。マルトースはグルコース2分子よりなる二糖類であるが、そのままの構造で細胞内に取り込まれ、細胞内で代謝されてグルコース2分子として働くと考えられている<sup>17)</sup>。したがって、マルトースを用いることにより、KMとトランスポートを競合することなく細胞内にグルコースを補給することが可能となり、軽減効果を示すと推察される。

耳毒性軽減物質として使われている薬物が本実験条件下で軽減効果を示さなかったのに対し、グルコースやマルトースが若干ではあるが軽減効果を示したという事実は、グルコーストランスポートと関連した方向からの耳毒性軽減薬物開発の有望性を示唆している。特に、マルトースにおいてはグルコースよりも可能性が高く、今後、投与方法についても検討を進め、さらに組織学的あるいは生化学的関連性についても明らかにする予定である。

<謝辞>本研究遂行にあたり、実験に協力された斎藤嘉津彦氏に感謝する。

#### 文 献

1) LODHI, S.; N. D. WEINER, I. MECHIGIAN & J.

SCHACHT: Ototoxicity of aminoglycosides correlated with their action on monomolecular films of polyphosphoinositides. *Biochem. Pharmacol.* 29: 597~601, 1980

- 2) DEUCHI, T.; A. ISHII & M. TANAKA: Binding of aminoglycoside antibiotics to acidic mucopolysaccharides. *J. Antibiotics* 31: 150~155, 1978
- 3) 橋 正芳: 糖代謝よりみたカナマイシン難聴の発現機序。日耳鼻 80: 55~80, 1977
- 4) TACHIBANA, M.; O. MIZUKOSHI & K. KURIYAMA: Inhibitory effects of kanamycin on glycolysis in cochlea and kidney. Possible involvement in the formation of oto- and nephrotoxicities. *Biochem. Pharmacol.* 25: 2297~2301, 1976
- 5) 秋吉正豊: アミノ配糖体抗生物質の聴器毒性。最新医学 32: 1540~1546, 1977
- 6) GARCIA-QUIROGA, J.; C. H. NORRIS, L. GLADE, G. M. BRYANT, M. TACHIBANA & P. S. GUTH: The relationship between kanamycin ototoxicity and glucose transport. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 22: 535~547, 1978
- 7) OWADA, K.: Experimental studies on the toxicity of kanamycin, its hydrolyzed products and neomycin. *Chemotherapia* 5: 277~293, 1962
- 8) 秋吉正豊, 水越 治編: 聴覚障害(基礎と臨床), 内耳研究の展開, 221~328頁, 朝倉書店, 1978

- 9) 豊田弥八郎, 仲間一雄, 松岡秀樹, 中江 進, 飯田武雄, 斎藤 等: カナマイシン内耳障害の計量的観察—第二報—. 耳鼻臨床 70: 669~675, 1977
- 10) PLATTIG, K. H.; U. O. KEIDEL & E. DAVID: Minderung der Ototoxizität des Kanamycins durch Pantothensäure. Deut. Med Wochenschr. 92: 1391~1397, 1967
- 11) 吉沢善作, 長谷川栄一編: ムコ多糖実験法, II, 耳鼻咽喉科領域のムコ多糖 (水越治, 斎藤等), 135~153 頁, 南江堂, 1973
- 12) 志多 享: Dihydrostreptomycinの蝸牛障害並びに Chondroitin sulfate の該障害に対する予防効果に関する実験的研究。日耳鼻 60: 164~188, 1957
- 13) DAVIES, D. M.: Drug-induced deafness. Adverse Drug Reaction Bulletin 69: 244~247, 1978
- 14) FURUNO, K.; S. MATSUBARA, K. ANDO & S. SUZUKI: Preventive effect of D-glucarate against renal damage induced by kanamycin. J. Antibiotics 29: 950~953, 1976
- 15) 鳥山 稔, 他 (5施設): 聴器と腎障害—病理学的研究—. 耳喉 51: 603~613, 1979
- 16) TAN, C. H.; N. A. PETERSON & E. RAGHUPATHY: D-glucosamine uptake by rat brain synaptosomes. Biochem. Biophys. Acta 464: 459~462, 1977
- 17) YOUNG, E. A.; E. WESER: The metabolism of maltose after intravenous injection in normal and diabetic subject. J. Clin. Endocrinol. metab. 38: 181~188, 1974

## STUDIES ON THE REDUCTION OF KANAMYCIN OTOTOXICITY

NAHOKO KUROSAWA, EIJI OWADA and KEIJI ITO  
Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences

In order to reduced the ototoxicity of aminoglycosides, the effects of several compounds on kanamycin (KM)-induced hearing loss were studied. Daily dose of KM (200 mg/kg s.c.) to guinea pigs induced the hearing loss 2 weeks after the initial administration, and isoniazid (INH) and *p*-aminosalicylate (PAS) were increased the KM ototoxicity. In our experimental condition, pantethine and chondroitin sulfate, which are clinically used to reduced the KM ototoxicity, failed to show any modification for the hearing loss by KM. Aminosugars, such as 2-glucosamine and N-acetyl-2-glucosamine, rather enhanced the ototoxicity of KM. However, in several sugars examined, glucose and maltose tended to delay the development of hearing loss by KM. From this result, it is suggested that maltose may be one of the possible agent for reduction of KM ototoxicity.