

アミノ配糖体系抗生物質の聴覚器に及ぼす影響

三島 正子・堀坂 和敬・小枝 武美

神戸女子薬科大学薬理学研究室

(昭和 61 年 8 月 25 日受付)

アミノ配糖体系抗生物質として RSM 200 mg/kg, 400 mg/kg, AMK 100 mg/kg, 200 mg/kg, AKM 100 mg/kg, 200 mg/kg をモルモットに 28 日間 i.m. 投与し, Preyer 反射, CM 電位および NBT 還元能の三方法より聴覚器への影響を検討した。

Preyer 反射測定では, 用いた最高周波数である 20 kHz より 10 kHz へと鈍化または消失が認められた。これに対応して, OHC および IHC でホルマゼン形成の低下または消失が認められ NBT 還元能の低下が推定された。CM 電位測定では電位の低下は NBT 還元能の消失が IHC に及んでいた AKM 投与群でのみ認められた。また, この IHC の障害は OHC と同様に蝸牛第 1 回転も起きていることが推定された。

これらの結果から, 用いたアミノ配糖体の聴力毒性の強弱を臨床投与量との比および急性毒性試験における LD₅₀ 値との比から比較すると, AKM > AMK > RSM となった。聴力毒性試験の投与量の設定に際しては抗菌作用による想定臨床適用量だけでなく毒性試験結果を参考とするとともに, 幅広い投与量範囲を考慮する必要があることが推定された。

アミノ配糖体系抗生物質は化学療法においてその有用性から広く使用されているが, 動物実験において大量投与または連用により腎臓, 聴覚器, さらに神経-筋接合部などに影響を及ぼすという報告がある¹⁻³⁾。

今回, アミノ配糖体系抗生物質であるリボスタマイシン, アミカシンおよびベカナマイシンを用いて, モルモットの聴覚器に及ぼす影響を Preyer 反射, CM 電位および NBT 還元能について試験し, 聴覚器毒性の指標としての有用性について検討し, 2, 3 の知見を得たので報告する。

I. 実験材料および方法

供試動物として 10 kHz, 15 kHz および 20 kHz で正常な Preyer 反射を示す Hartley 系雄性モルモット (静岡県実験動物) を用い, 体重 300 g 前後のものを 1 群 5 匹として 7 群を設け, 室温 24 ± 1°C, 湿度 55 ± 5%, 照明時間 7~19 時に設定した環境下で飼育, 実験を行なった。飼料 (GM-3: 船橋農場) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

被験薬として硫酸リボスタマイシン (力価 691 μg/mg: 以下, RSM と略す), 硫酸アミカシン (力価 759 μg/mg, 以下, AMK と略す) および硫酸ベカナマイシン (力価 703 μg/mg: 以下, AKM と略す) を用いた。

実験群の投与量は, 投与により聴覚器に影響が出るであろうと推定される量として臨床用量の約 20 倍量で

ある RSM 400 mg/kg, AMK 200 mg/kg, AKM 200 mg/kg とし, 影響の少ない量としてこれら投与量の 1/2 量, すなわち臨床用量の約 10 倍量である RSM 200 mg/kg, AMK 100 mg/kg, AKM 100 mg/kg とした。投与量は抗菌力価に換算し, 表示した。

薬物はすべて局方生理食塩液 (大塚製薬) に溶解し, 20 w/v% 溶液とし, 濾過滅菌後モルモットの大腿部筋肉内に 1 日 1 回 28 日間投与した。

対照群には局方生理食塩液 1 ml/kg を投与した。

投与期間中の観察は常法によりオージオメーター (永島医化器械) より 10 kHz, 15 kHz および 20 kHz の純音を負荷し Preyer 反射閾値を 3 日に 1 回測定することにより行ない, 10 dB 以上の閾値の上昇を鈍化 (dull) と判断した⁶⁻⁹⁾。

薬物投与終了後にネプタール (35 mg/kg, i.p.) 麻酔下で, 正門窓誘導法により CM 電位を導出し, オージオメーターより 10 kHz, 15 kHz および 20 kHz の純音を負荷し, 最大電位および発生閾値を測定した⁹⁾。

その後放血致死させ, 内耳を摘出し, NBT 還元反応を秋吉らの方法に準じて行なった。すなわち, 摘出した内耳に 38°C に加温した Nachlas 液 [NBT 1 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 1 ml に溶解] を 30 分間灌流反応させた後, 10% リン酸緩衝ホルマリン液で固定し, 実体顕微鏡下で蝸牛の Surface preparation を作製し, 内・外有毛細胞の NBT 還元能をホルマゼン形

成による着色を指標に、第1回転を主にして観察した¹⁰⁻¹¹⁾。

II. 実験成績

1. 体重の変化

各群とも死亡例は認められなかった。

各群の平均体重の変化を Fig. 1 に示した。

対照群に比べ RSM 200 mg/kg 投与群および AMK 100 mg/kg 投与群に統計的な有意差はなかった。しかし、他の群では投与5日目まで差はなかったが、その後、対照群に比べ統計的に有意に体重増加の抑制が認められ、14日目以降では AKM 200 mg/kg 投与群で対照群と比べ有意な増加抑制が認められた ($P < 0.01$)。17日目以降では AMK 200 mg/kg 投与群で、20日目以降には RSM 400 mg/kg 投与群で、23日目以降には AKM 100 mg/kg 投与群で対照群と比べ有意な増加抑制が認められた ($P < 0.05$)。

投与終了翌日(29日目)に最も体重の低かった AKM 200 mg/kg 投与群は対照群よりも約 120 g 少なかった。

2. Preyer 反射閾値の変化

10 kHz, 15 kHz および 20 kHz における Preyer 反射閾値を薬物投与1日目(投与前)の閾値からの増減で表わし、Fig. 2 に示した。

投与前の Preyer 反射陽性最小閾値は全群とも 10 kHz および 15 kHz では約 90 dB, 20 kHz では約 94 dB であった。

実験に用いた最も高周波数である 20 kHz において AKM 200 mg/kg 投与群では 11日目から、AKM 100 mg/kg 投与群および AMK 200 mg/kg 投与群では 20日目から Preyer 反射閾値の上昇がみられ、投与を続け

るに従い Preyer 反射は消失した。15 kHz および 10 kHz では、20 kHz よりも 3~6日遅れて閾値は上昇した。

対照群, RSM 200 mg/kg 投与群, RSM 400 mg/kg 投与群および AMK 100 mg/kg 投与群では経日的な閾値の上昇はみられなかった。

3. CM 電位

結果を Fig. 3 および Fig. 4 に示した。

CM 最大電位は対照群において 10 kHz では 222 μ V, 15 kHz では 194 μ V, 20 kHz では 174 μ V であった。また、最大電位は 10 kHz で最も高く、20 kHz で最も低かった。

RSM 200 mg/kg 投与群, RSM 400 mg/kg 投与群, AMK 100 mg/kg 投与群, AMK 200 mg/kg 投与群および AKM 100 mg/kg 投与群において、最大電位は対照群と有意な差はなく 260~140 μ V で、10 kHz で最も最大電位が高く、周波数の増加に伴い最大電位は低くなった。

AKM 200 mg/kg 投与群では 10 kHz で最も最大電位が高く、周波数の増加に従い最大電位は低下したが、15 kHz および 20 kHz において対照群に比べ有意な低下が認められた ($P < 0.05$)。

また、10 kHz, 15 kHz および 20 kHz における CM 発生閾値は対照群では 84~86 dB であったが AKM 投与群では 93~100 dB で対照群と比べ有意な閾値上昇が認められた ($P < 0.05$ または $P < 0.01$)。

4. NBT 還元能

NBT 還元反応の産生物であるホルマザン形成は RSM 200 mg/kg 投与群, RSM 400 mg/kg 投与群および AMK 100 mg/kg 投与群と対照群では大差なかった (Photo. 1)。

AMK 200 mg/kg 投与群では外有毛細胞 (Outer Hair Cell: 以下, OHC と略す) にはホルマザン形成が全くなく、内毛細胞 (Inner Hair Cell: 以下, IHC と略す) ではホルマザン形成の低下がみられた。

AMK 100 mg/kg 投与群も同様に OHC では全くホルマザン形成がなく (5匹), IHC にはホルマザン形成低下がみられた (4匹)。

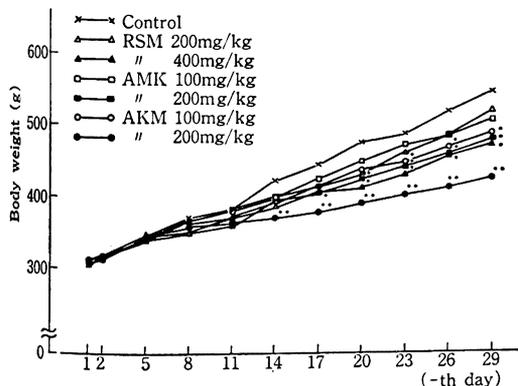
なお、AMK 200 mg/kg 投与群および AKM 100 mg/kg 投与群では OHC の高回転部でホルマザン形成が見られ、ホルマザン形成の低下は1列目に最も強く現われていた。

AKM 200 mg/kg 投与群では OHC, IHC ともにホルマザン形成は全くみられなかった (Photo. 2)。

III. 総括

アミノ配糖体抗生物質を臨床的もしくは動物実験にお

Fig. 1 Body weight changes of guinea pigs administered intramuscularly with RSM, AMK or AKM



*; $P < 0.05$ significant differences from control group.

**; $P < 0.01$ " "

いて用いた場合の聴力障害は、聴力検査で高周波数域から始まり、障害の程度に応じ、低周波数域へと拡大することが認められている。モルモットにアミノ配糖体系抗生物質を投与し、オージオメーターより一定音圧の音を負荷すると聴力障害の発現により高周波数域から耳介反射 (Preyer 反射) が消失すると報告されている^{5-8,10}。

また、耳介反射の消失音域の変化に対応して蝸牛有毛細胞、特に OHC が基底回転から上方回転へと規則性をもって消失することも報告されている^{5-8,10}。聴力障害の検索方法の一つに CM 測定法があるが、CM 電位は負荷周波数音域に応じた部位の有毛細胞から発する電位で^{9,12}、モルモットにおいて CM の再生周波数の上限は 100 kHz あるいはそれ以上であるが、最高感度はモルモ

ットでは 5 kHz 付近にあるといわれている⁹。また、酵素反応を利用した方法としては NBT 還元能を利用した方法があるが、通常、生体細胞において電子伝達系に関連した水素原子により NBT が還元されてホルマザンが形成され、青紫色顆粒が実体顕微鏡下で観察される。しかも蝸牛では有毛細胞のみ容易に NBT が浸透し、聴力障害が発現するとその程度に応じホルマザンの青紫色顆粒の染色度合が低下し、しかも聴力障害の初期の段階でも容易に検索することができることが特徴とされ^{10,11,13}、さらに、Preyer 反射の閾値変動とも対応し、聴力障害が発現すると低回転から上方回転へとその染色度合も低下すると報告されている^{10,11,13}。この特徴を利用して、聴力障害検索の一手技として NBT 還元能測定

Fig. 3 The maximum voltage of cochlear microphonics of guinea pigs

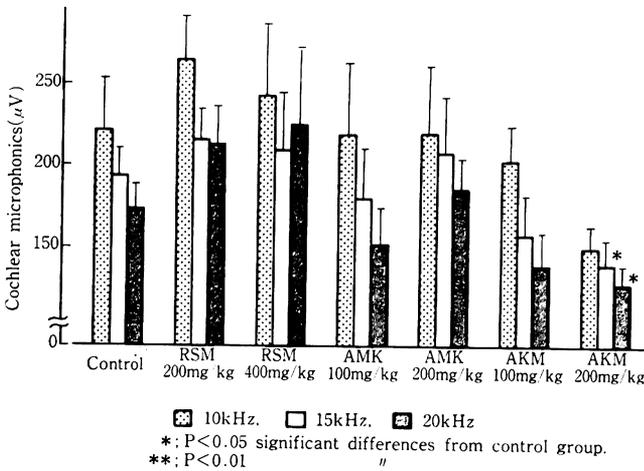


Fig. 4 The threshold of cochlear microphonics of guinea pigs

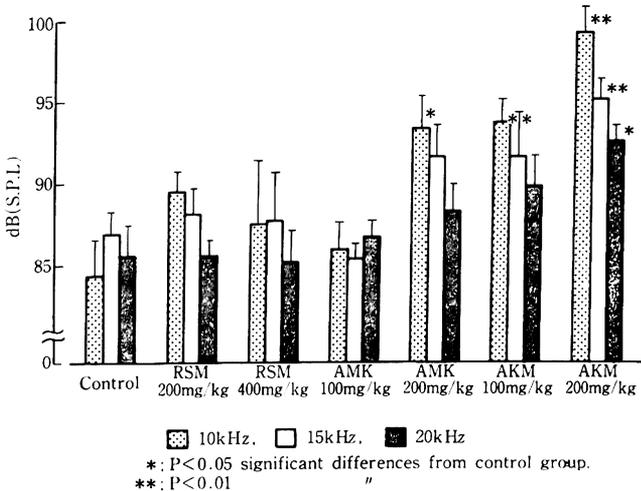
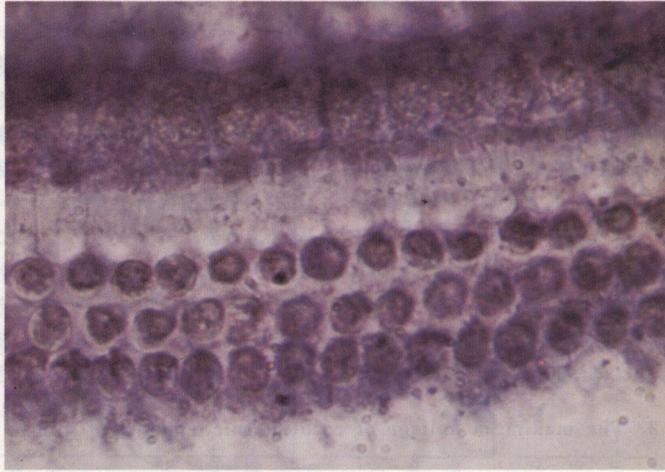
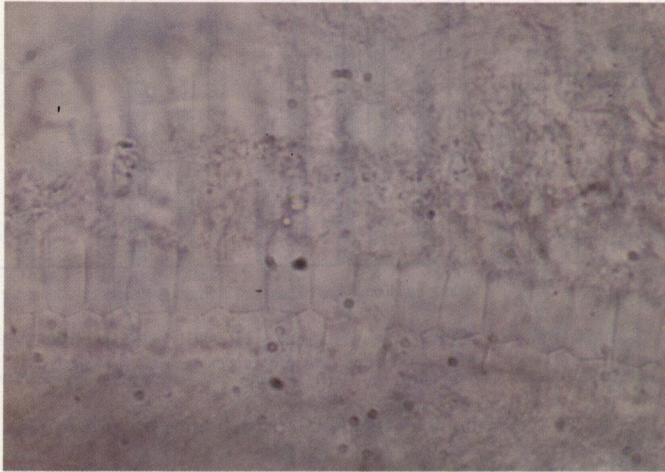


Photo. 1 Effect of RSM 400 mg/kg on NBT reducibility in guinea pigs. ($\times 200$) $\times 70$ Photo. 2 Effect of AKM 200 mg/kg on NBT reducibility in guinea pigs. ($\times 200$) $\times 75$ 

法が利用されている。

これらのことより今回の試験では耳介反射 (Preyer 反射) 測定法, CM 電位測定法および NBT 還元能の三方法を利用して, RSM, AMK および AKM の聴力毒性について検討した。投与量は臨床用量の約 10 倍および 20 倍とし, 投与経路は臨床適用経路の一つに準じ, i. m. 投与とした。

今回の実験成績をまとめて Table 1 に示した。

すなわち, Preyer 反射において AMK 200 mg/kg, AKM 100 mg/kg および 200 mg/kg 投与群では, 投与期間の早期から最高周波数である 20 kHz に鈍化または消失が認められ, 投与期間が長くなるにつれ 15 kHz および 10 kHz でも障害が認められるようになった。

しかし, RSM 200 mg/kg, 400 mg/kg 投与群および AMK 100 mg/kg 投与群では Preyer 反射の鈍化または消失の変化はなかった。

他方, 蝸牛 1 回転の NBT 還元能に関しては, AMK 200 mg/kg 投与群では OHC にはホルマゼン形成はなく, IHC ではホルマゼン形成の低下が認められ, AKM 100 mg/kg 投与群でも同様な傾向が認められた。AKM 100 mg/kg 投与群では OHC, IHC 共にホルマゼン形成はなかった。RSM 200 mg/kg, 400 mg/kg および AMK 100 mg/kg 投与群ではホルマゼン形成は対照群と著差はなかった。

秋吉らは Preyer 反射の変動と蝸牛病理検索結果とを総合した場合, Preyer 反射が 20 kHz から 8 kHz まで

Table 1 Ototoxic effect of RSM, AMK and AKM.

Drug (mg/kg)	n	Preyer reflex (dB)			Cochlear microphonics						NBT reducibility at 1st turn of cochlear		
					Threshold (dB)			Max. voltage (μ V)					
		10	15	20(kHz)	10	15	20(kHz)	10	15	20(kHz)	IHC	OHC	
Control	5	90.4	93.0	97.6	84	87	86	222	194	174	— ^{b)}	—	
RSM	200	5	88.0	91.4	96.8	90	88	86	266	216	214	—	—
	400	5	92.0	92.6	98.0	88	88	85	244	210	226	—	—
	100	5	89.2	89.8	96.4	86	85	87	220	180	152	—	—
AMK	200	5	102.0 dull(4)	106.2 dull(4)	loss(5)	94*	92	88	221	209	187	↓(3)	loss(5)
	100	5	100.8 dull(3)	107.4 dull(4)	loss(5)	94**	92	90	204	158	140	↓(2)	loss(5)
AKM	200	5	102.0 dull(5)	105.8 dull(5)	loss(5)	100**	95**	93*	151	141*	129* ^{a)}	loss(5)	loss(5)

*; Significant difference from control ($P < 0.05$)

**; " ($P < 0.01$)

^{b)} —; Normal

消失したモルモット (63 匹) では OHC の消失がない (6%) か, 1 回転下端から 1 回転 1/4 までの範囲の OHC の消失 (83%) が多く, 最も範囲の広いもので 2 回転 3/4 までの OHC の消失 (3%) であり, 8 kHz 以下の低周波数域へ反射の消失が拡大するにつれ OHC の消失範囲が高回転に及ぶ例が増すと結論を得, 報告している²⁾。

今回の著者らの試験において Preyer 反射が消失したのはいずれも 20 kHz のみで, NBT 還元能の消失も Preyer 反射消失と対応し第 1 回転の OHC において認められたが, 上方回転に行くにしたがってホルマザン形成が認められた。

また, 光学顕微鏡下で蝸牛有毛細胞の形態変化について検索すると, OHC では第 1 列目に最も強い障害が発現するが IHC の消失と聴力障害とは必ずしも一定の規則性は認められないと報告されているが²⁾, 今回の試験では AMK 200 mg/kg および AKM 100 mg/kg 投与群の高回転の OHC ではホルマザン顆粒の消失は第 1 列目に最も強く現われていた。これらのことより, ホルマザン顆粒の染色度測定による NBT 還元能測定方法は Preyer 反射消失との相関性が認められ, しかも秋吉らの光学顕微鏡観察法による OHC 形態変化測定結果ともほぼ合致することがわかり, NBT 還元能測定法の聴力毒性試験の有用性が確認できた。また, IHC の NBT 還元能の消失または低下が AMK 200 mg/kg, AKM 100 mg/kg および 200 mg/kg 投与群で認められたことより IHC にも OHC と同様に器質的变化が起こっているこ

とも確認できた。

佐藤らはアミノ配糖体系抗生物質をモルモットに i. m. 投与し, その聴力試験を検査する場合, マウス i. m. 投与による LD₅₀ 値の 0.15~0.2 倍を換算した投与量を設定することが適切であると報告しているが¹⁴⁾, 今回の我々の試験では LD₅₀ 値の約 0.18 倍である RSM 400 mg/kg 投与群では Preyer 反射および NBT 還元能に異常は認められなかったにもかかわらず, LD₅₀ 値の 0.06 倍である AMK 200 mg/kg および LD₅₀ 値の 0.14 倍である AKM 100 mg/kg 投与群では Preyer 反射の消失, OHC および IHC の NBT 還元能の低下または消失が認められたことより RSM の聴力障害は AKM や AMK よりも弱いことが推定された。

CM 電位に関しては相当広範囲な再生周波数の上限値を示すものの, モルモットでは最高感度が 5 kHz 付近にある⁹⁾ ということについては前述のごとくであるが, 今回の著者らの試験でいずれの投与群でも 10 kHz で最大電位が最も高く, 周波数が高くなるにつれてその電位の低下が認められたが, これは CM の最高感度に対応する変化と考えられる。薬物投与群では AKM 200 mg/kg 投与群で 15 kHz および 20 kHz で最大電位が対照群に比べ有意に低下したのみで, 他の投与群ではいずれの周波数においても最大電位は対照群と著差はなかった。聴覚器障害が発現した場合, 初期においては耳介反射閾値の上昇が認められるが, 今回の CM 発生閾値では 10~20 kHz で AKM 200 mg/kg 投与群に, 対照群に比べ有意な上昇があり, これに対応して耳介反射の消失または鈍

化, OHC および IHC における NBT 還元能の消失も認められた。これらのことより, CM 発生閾値の上昇と耳介反射および NBT 還元能とに相関性のあることが推定できた。また, CM の電位発生に IHC の形態変化と相関性があるとの報告もあるが⁹⁾, 今回の試験で AKM 200 mg/kg 投与群の様に IHC の NBT 還元能が消失していた場合, CM の最大電位が対照群と比べ有意に低下することが確認できた。しかし, CM 電位測定法は Preyer 反射および NBT 還元能と対比すると明らかに聴力毒性試験の評価手段としてその感度の問題があるように思えた。

マウス急性毒性試験における LD₅₀ 値と聴力毒性との対比については前述のごとくであるが, 今回用いた RSM, AMK および AKM の聴力への作用を臨床投与量との比から比較すると, 臨床 10 倍量相当量では AKM にのみ聴力障害がみられ, RSM および AMK には障害はみられなかった。臨床 20 倍量相当量では AKM に障害が強く, AMK にも障害がみられたが, RSM には障害は認められなかった。これらのことはアミノ配糖体系抗生物質の聴力毒性は薬物間差が大きく聴力毒性試験を行なう場合には急性毒性試験をはじめとする毒性試験の結果はもちろん, 抗菌性を主体として判断された想定臨床投与量を考慮して投与量を設定することが必要であることが推定された。

まとめ

アミノ配糖体系抗生物質として RSM 200 mg/kg, 400 mg/kg, AMK 100 mg/kg, 200 mg/kg, AKM 100 mg/kg, 200 mg/kg をモルモットに 28 日間 i.m. 投与し, Preyer 反射, CM 電位および NBT 還元能の三方法より聴覚器への影響を検討し, 次の結論を得た。

1) Preyer 反射への影響については, AMK 200 mg/kg, AKM 100 mg/kg および 200 mg/kg 投与群で 20 kHz より 10 kHz へと鈍化または消失が認められた。これに対応して, OHC および IHC でホルマゼン形成の低下または消失が認められ NBT 還元能の低下が推定された。これらのことより Preyer 反射の変化と NBT 還元能の変化は対応性があると判断した。

2) CM 電位では最大電位は 10 kHz が最も高く, 20 kHz が最も低かった。また, 電位の低下は NBT 還元能の低下が IHC および OHC の両方に認められた AKM 200 mg/kg 投与群でのみ認められた。

3) アミノ配糖体系抗生物質投与による聴力毒性が発現した場合, 光学顕微鏡下で OHC の消失は基底回転から上方回転へと進行していくのに対し IHC ではこのような規則性はないと報告されているが, NBT 還元能からみた場合, 程度の差はあるものの OHC, IHC ともに

NBT 還元能の低下もしくは消失が認められた。このことからアミノ配糖体系抗生物質を投与し初期の聴力障害が発現した場合, IHC でも OHC と同様な程度で器質的な変化が起きていることが推定できた。

4) 臨床適用量の約 10 倍および 20 倍量のアミノ配糖体系抗生物質をモルモットに 28 日間にわたり i.m. 投与した時の聴器への作用は AKM で強く, AMK も高用量で障害がみられたが, RSM では認められなかった。これらのことは聴力毒性試験の投与量の設定に際しては抗菌作用による想定臨床適用量だけでなく, 毒性試験結果を参考とするとともに幅広い投与量範囲を考慮する必要があることが推定された。

文 献

- 1) KOEDA, T.; K. UMEMURA & M. YOKOTA: Toxicology and pharmacology of aminoglycoside antibiotics. Handbook of experimental pharmacology. (Springer-Verlag) (edited by H. UMEZAWA and I. R. HOOPER), 62: 293~356, 1982
- 2) 上田 泰編集: アミノ配糖体薬(南江堂), 1985
- 3) WHELTON, A.; H. C. NEU: The aminoglycosides, microbiology, Clinical use, and toxicology. (Marcel Dekker, INC.) (1982)
- 4) GOODMAN, L. S. & A. GILMAN: The pharmacological basis of therapeutics, (Fifth edition), (Macmillan Publishing CO., INC.), 1975
- 5) 秋吉正豊: 新しいアミノグリコシド系抗生剤—基礎と臨床—新しいアミノグリコシド系抗生剤, 副作用—耳毒性. Progress in Medicine, 309~316, 1986
- 6) 中島 章, 秋吉正豊編集: 薬物と感覚障害(ソフトサイエンス社), 1980
- 7) 横田正幸: アミノ配糖体系抗生物質のモルモット聴覚器におよぼす影響. 昭和医学会雑誌 37: 535~544, 1977
- 8) 神崎 仁: 聴力の指標としてのモルモットの耳介反射について. Audiology Japan 60: 940~948, 1966
- 9) 森 満保編集: 内耳の聴覚電気生理(金原出版), 1985
- 10) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 早野和夫, 吉沢家敏: Tuberactinomycin のモルモット聴器に及ぼす影響, 特に耳介反射の域値変動と病理組織学的所見ならびに酵素組織化学的所見について. Chemotherapy 18: 167~183, 1970
- 11) 秋吉正豊, 佐藤喜一: 蝸牛生体灌流法による有毛細胞のコハク酸脱水素酵素活性の組織化学的証明. Audiology 10: 48~56, 1967
- 12) 古河太郎: 聴器における刺激の受容と伝達. 蛋白質核酸酵素(臨時増刊), 神経生化学(上) 29: 1188~1204, 1984
- 13) 秋吉正豊: アミノ配糖体系抗生物質の聴器毒性. 最新医学 32: 1540~1546, 1977
- 14) 佐藤喜一, 畑中美枝子, 横田正幸, 小枝武美: 耳

OTOTOXIC EFFECT OF AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS IN GUINEA PIGS

MASAKO MISHIMA, KAZUYOSHI HORISAKA and TAKEMI KOEDA

Department of Pharmacology and Toxicology,

Kobe Women's College of Pharmacy,

Motoyamakita-machi 4-19-1, Higashinada-ku, Kobe, 658, Japan

Guinea pigs were given daily intramuscular injection of RSM 200 mg/kg, 400 mg/kg, AMK 100 mg/kg, 200 mg/kg, AKM 100 mg/kg, 200 mg/kg for 28 days.

They were experimented with Preyer reflex, cochlear microphonics and NBT reducibility, and the results are as follows ;

1) Animals receiving AMK 200 mg/kg, AKM 100 & 200 mg/kg caused decrease in formazan production in OHC & IHC in answer to the loss or dull of Preyer reflex in frequency range of 20 kHz to 10 kHz. From these results it was concluded that the changes in Preyer reflex is corresponded to the changes in NBT reducibility.

2) Animals receiving AKM 200 mg/kg caused decrease in NBT reducibility both in OHC & IHC, and the decline of CM was only observed at this dose.

3) The ototoxic effect of aminoglycoside antibiotics has been reported that the loss of OHC progresses from basal turn to the upper, but not in IHC. From this results of NBT reducibility, the disappearance or decline of NBT reducibility was observed in OHC and a matter of degree in IHC. It was presumed that when the first ototoxicity after aminoglycoside antibiotics injection appeared, some organic changes occur not only in OHC but in IHC.

4) Ototoxic effect on cochlea in guinea pigs receiving 10 or 20 times of clinical dose of aminoglycoside antibiotics daily i. m. injection for 28 days was AKM > AMK > RSM in order, and RSM was not toxic. From these results it was presumed that for setting up the doses of ototoxic experiment it is necessary to refer to acute toxicity as well as to maximum recommended clinical dose based on antibiotic activity and to consider wide extent of doses.