

RU 28965の聴器毒性試験

渡辺満利・小泉治子・柳田知司

(財)実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所

マクロライド系の抗生物質 RU 28965(以下, RU)の10および50 mg/kg をモルモットに4週間経口投与し, 聴器に対する影響を, 音刺激に対する耳介反射検査と内耳の組織病理学的検査を行い検索した。比較対照群として, 溶媒投与群の他に, 化学構造の類似した erythromycin(以下, EM)の130 mg/kg 経口投与群および聴器障害性が知られている kanamycin(以下, KM)の160 mg/kg 筋注群を設けた。検査の結果, 以下の成績が得られた。

1. 各投与群で摂餌量が減少し, 体重増加が抑制された。その程度は KM 群で最も強く, RU 50 mg/kg 群と EM 群で同程度であり, RU 10 mg/kg 群では軽度であった。
2. 耳介反射検査において, RU 10および50 mg/kg 群ならびに EM 群では, 0.5~20 KHz の周波数の音刺激に対する反応には, 投与前と投与後の差はみられなかった。KM 群では投与後2週に8および10 KHz, 3週に8~20 KHz および4週に2~20 KHz の音刺激に対する反応閾値の上昇がみられた。
3. 内耳の組織病理学的検査において, RU 10および50 mg/kg 群ならびに EM 群では薬物投与に基づく異常はみられなかった。KM群ではラセン器の外有毛細胞および内毛細胞の脱落ならびにラセン器神経節細胞の壊死脱落が観察された。

RU 28965は Fig. 1 に示す化学名および構造式の白色粉末の抗生物質である。

今回, 本薬の毒性試験の一つとして, 聴器に対する影響をモルモットを用い検索した。検索の比較対照薬として, 化学構造の類似した erythromycin および聴器毒性の知られている kanamycin を用いた。

I. 材料と方法

1. 使用動物および飼育条件

5週齢で入手した Fub: Hartley 系モルモット(入手先: 船橋農場 K.K., 入手年月日: 1985年7月3日)のオス40匹を環境馴化のため20日間, 動物室温度: 22~24℃, 動物室湿度: 66~83%, 照明時間: 午前8時から午後8時までの12時間の飼育条件下に1ケージに1匹を入れ, 固型飼料[CG-3, 日本クレア K.K.]および水道水を自由に与えて飼育した。

環境馴化飼育の後, これらの動物の中から馴化期間中の体重増加, 一般状態の観察結果および投与前の聴覚試験の結果から正常と思われる30匹を選び, 1群6匹より成る5群を設けた。

動物の群分けは体重の小さい順から1匹ずつを各群に無作為に割り当てることを繰り返して行った。その後, 各群の平均体重の差が大きい場合は, 平均値がほぼ同程度となるように群間で1~2匹を交換した。

2. 投与量, 使用薬物, 投与方法および投与期間

1) 投与量: RUの臨床使用予定量が5~6 mg/kg であ

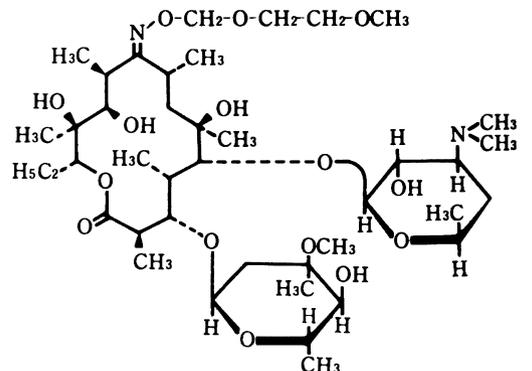
ることから, 下限の2倍量の10 mg/kg を RU の低用量に, 10倍量の50 mg/kg を高用量に用いた。

EM の経口投与での常用量が800 mg/ヒト/日であることから, ヒトの体重を60 kg として計算した体重1 kg あたりの常用量13.3 mg の約10倍量の130 mg/kg を EM 群の投与量とした。

KM の筋注による常用量が1 g/ヒト/日であることから, 体重1 kg あたりの常用量16.7 mg の約10倍量である160 mg/kg を KM 群の投与量とした。

なお, 本試験に先立ち RU 50 mg/kg, EM 130 mg/kg および KM 160 mg/kg の2週間投与による予備試験を行

Fig. 1 Chemical structure of RU 28965



9-[O-[(2-Methoxyethoxy)methyl]oxime] erythromycin

い、薬物による死亡のないことを確認した。

2) 使用薬物: RU 28965 (Lot No. 4S-0445, 原末), erythromycin (Lot No. S/STEL/714, 原末) および kanamycin (Lot No. KMA 168, 硫酸カナマイシン「萬有」注射用) は、いずれも日本ルセル株式会社より提供されたものを使用した。RU の投与量は10および50 mg/kg とし, sodium carboxymethyl cellulose (CMC) を0.5% 添加した0.1および0.5% 懸濁液を使用した。EM の投与量は130 mg/kg とし, CMC を0.5% 添加した1.3% 懸濁液を調製し使用した。KM の投与量は160 mg/kg とし, 滅菌蒸留水を用いた8% 溶液を使用した。対照群には0.5% CMC 懸濁液を10 ml/kg 投与した。

3) 投与方法および投与期間: RU と EM は胃カテテルを用い経口投与した。KM は腎筋内に投与した。いずれの薬物も1日1回, 28日間連続して投与した。

3. 観察および検査項目

1) 一般状態: 毎日投与前, 投与直後および2時間後に観察した。

2) 体重: 投与前および投与後1週毎に測定した。

3) 摂餌量: 週に2回, 与えた餌の残りを計量し, 1週毎の1日平均摂餌量を算出した。

4) 聴覚試験: 投与前および投与後1週毎に小動物用オージオメーター (PA-1型, 音圧間隔: 5 dB, 永島医科器械 K.K.) を用い, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 および20 KHz の純音刺激に対する耳介反射を観察し, 聴覚機能を検査した。

5) 剖検肉眼観察: 投与期間終了の翌日の内耳灌流固

定時に腹腔内の諸臓器を観察した。

6) 組織病理学的検査: 投与期間終了の翌日にエーテル吸入麻酔およびペントバルビタール腹腔内投与麻酔下に秋吉らりの方法に従い, 左室壁から大動脈弓にカテテルを挿入して内耳を3%のグルタルアルデヒド固定液で灌流固定し, 両側の蝸牛および前庭が含まれる側頭骨の錐体部を切り出し, さらに10%緩衝ホルマリン液に固定した。脱灰および脱水後に一侧をセロイジンに包埋し, 他側をメタクリレート系樹脂 (テクノバイト7100, クルーザー社製) に包埋した。各個体の一侧の内耳について連続切片を作製し, 切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。

II. 結 果

1. 一般状態

RU の10および50 mg/kg 群, EM 群および KM 群において, 投与3週目以降の投与後30分ないし1時間に自発運動が減少し, 軽度な立毛がみられた。

EM 130 mg/kg 群では, 1匹で投与16日目から投与期間終了まで軟便がみられる日があった。

KM 160 mg/kg 群では投与部腎筋の硬結が20日目頃からみられはじめ, その後徐々にその程度が強くなった。

2. 体重 (Table 1)

いずれの薬物投与群の体重も投与1週後には対照群に比べ小さく, 体重増加が抑制された。その程度は EM 群で最も強く, 次いで RU 50 mg/kg 群, KM 群の順であり, RU 10 mg/kg 群での体重増加抑制は軽度であった。2週

Table 1 Mean body weight and food intake of guinea pigs treated with RU 28965, erythromycin or kanamycin for 4 weeks

Group & Dose (Route)	Body weight (g)					Food intake (g)			
	Pretreatment	Weeks				Weeks			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Control	347.8	388.7	422.3	459.3	490.2	32.5	32.8	34.8	34.5
0.5%CMC ^{a)} (p.o.)	± 27.7	±30.1	±34.2	±36.7	±29.8	± 3.5	± 2.4	± 2.1	± 3.1
RU 28965	345.3	371.5	411.0	442.2	466.8	28.4	31.7	32.4	29.3**
10 mg/kg (p.o.)	± 12.0	±20.9	±30.5	±28.5	±34.3	± 8.3	± 3.6	± 3.6	± 1.7
RU 28965	343.8	347.2*	378.2	403.7*	435.2*	24.6	30.0	30.1	34.2
50 mg/kg (p.o.)	± 12.2	±24.3	±34.9	±31.9	±32.9	±11.2	± 6.1	± 6.1	± 6.2
Erythromycin	344.5	340.7**	372.7*	397.3**	427.5**	22.8*	26.3	31.1	29.8*
130 mg/kg (p.o.)	± 18.7	±21.3	±18.0	±30.0	±34.7	± 6.9	± 7.4	± 6.9	± 4.1
Kanamycin	346.0	366.5	385.8	401.7*	408.0**	22.3	27.6	22.1**	25.6*
160 mg/kg (i.m.)	± 15.6	±24.3	±30.5	±31.4	±38.6	±11.0	± 7.3	± 6.9	± 6.5

Mean ± S.D.

^{a)} : Sodium carboxymethylcellulose

* : P<0.05

** : P<0.01

後も同様に体重増加が抑制されていた。投与3週後にはRU 50 mg/kg 群, EM 群およびKM 群で同程度の体重であった。3週から4週にかけてKM 群の2匹の体重が減少した。投与期間終了時の体重はKM 群で最も低く, 次いでEM 群, RU 50 mg/kg 群の順であった。RU 10 mg/kg 群の体重も対照群に比べ小さかった。

3. 摂餌量 (Table 1)

RU 10 mg/kg 群では投与1週に1匹で摂餌量が対照群に比べ減少していたが, 他の例では減少はなかった。この例はその後摂餌量は回復したが, 対照群に比べ1日平均摂餌量は数グラム程度少なかった。

RU 50 mg/kg 群では投与1週に半数例で摂餌量が対照群の半分程度に減少していた。しかし, 2週以後の摂餌量は対照群との間に明らかな差はなかった。

EM 群では投与期間をととし約半数例で摂餌量が減少していた。しかし, その他の例の摂餌量は対照群の摂餌量と同程度であった。

KM 群では投与期間を通し約半数例で摂餌量が減少し, 平均値は対照群より低かった。

4. 聴覚試験 (Fig. 2)

対照群では投与前に2匹が1 KHzの周波数だけで最大音圧の110 dBでも反応しなかった。他の1匹は20 KHz だけにおいて限界の120 dBの音に反応しなかった。

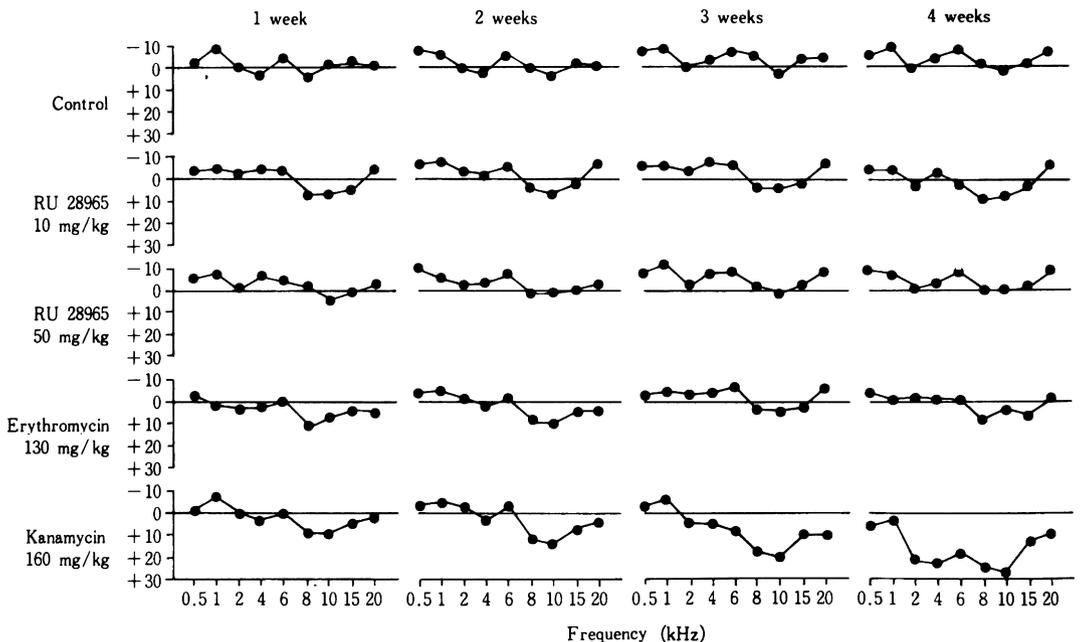
投与期間の1, 2, 3および4週における検査での反応閾値の変動は $-20 \sim +15$ dBであった。

RU 10 mg/kg 群では, 投与前に2匹が1 KHzの最大音圧110 dBにも反応しなかった。投与後の反応閾値の変動はいずれの週でもほとんどの例が ± 15 dBであったが, 4週に1匹が8 KHzで, 他の1匹が10 KHzでそれぞれ $+25$ dB および $+20$ dBと, 対照群の変動範囲をわずかに越えていた。しかし, それらの前後の周波数では反応閾値の上昇はみられなかった。

RU 50 mg/kg 群では投与前に1匹が1 KHzの最大音圧110 dBに対し反応しなかった。投与後の反応閾値の変動は, 1匹において2週に10および20 KHzでそれぞれ $+25$ dB および $+15$ dB以上, 他の1匹で8 KHzで $+20$ dBであったが, これらの例を含め投与3および4週には, いずれの周波数においても対照群の閾値上昇の変動範囲 $+15$ dBを越えている例はなかった。

EM 群では投与前に1匹が1 KHzの最大音圧110 dBに対し反応しなかった。投与後1および2週に1匹が8 KHzで $+25$ dBの閾値上昇を示したが, その前後の周波数では対照群の変動範囲を越えた上昇はなかった。3週にはこの例も含め反応閾値の上昇はなかった。投与4週目に1匹が8 KHzで $+25$ dB, 他の1匹が10 KHzで $+20$ dBと対照群の変動範囲をわずかに越えて反応閾値の上

Fig. 2 Mean values of threshold shift (dB) of pinna reflex in guinea pigs treated with RU 28965, erythromycin or kanamycin for 4 weeks



昇がみられたが、その前後の周波数では上昇はみられなかった。

KM群では、投与1週目に1匹で8、10および20 KHzで+20~25 dBとわずかな反応閾値の上昇があり、2週目にはこの例は同様の上昇を示し、他の1匹でも8~20 KHzで最大音圧120 dBに対し反応しなかった。3週には別の1匹で1 KHz~20 KHzの最大音圧110~120 dBに対し反応がなく、その他の4匹でも6~20 KHzの間で反応が消失していた。1匹では閾値の上昇はみられなかった。しかし、4週にはこの1匹も含め0.5あるいは1

KHzから20 KHzの音に対しほとんど反応しなかった。

5. 剖検肉眼所見

いずれの投与群においても薬物投与による変化はみられなかった。

6. 内耳の組織病理学的検査 (Table 2, Fig. 3~9)

対照群、RU 10および50 mg/kg群とEM群では、いずれの例においても内耳蝸牛ラセン器の内、外有毛細胞(感覚細胞)に異常はみられなかった。対照群の1匹およびRU 50 mg/kg群の2匹でラセン器神経節の神経節細胞の萎縮が少数散見されたが、その程度には両群間に差

Table 2 Microscopic findings in cochlea and vestibulum of guinea pigs treated with RU 28965, erythromycin or kanamycin for 4 weeks

Group & Animal No.	Changes						
	Outer hair cells	Inner hair cells	Loss of organ of Corti	Spiral ganglion cells			Necrosis of epithelial hair cells of crista ampullaris
				Atrophy	Necrosis	Disappearance	
Control 0.5%CMC (p.o.)	10	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	±	-	-
RU 28965 10 mg/kg (p.o.)	16	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-
RU 28965 50 mg/kg (p.o.)	22	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	±	-	-
	25	-	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	±	-	-
	27	-	-	-	-	-	-
Erythromycin 130 mg/kg (p.o.)	28	-	-	-	±	-	±
	29	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	±	-	-
	31	-	-	-	±	-	-
	32	-	-	-	±	-	-
	33	-	-	-	±	±	-
Kanamycin 160 mg/kg (i.m.)	34	+ ^{a)} + ^{b)} + ^{c)}	-	-	+	±	-
	35	+ ^{a)} + ^{b)} + ^{c)}	-	-	+	+	±
	36	+ ^{a)} + ^{b)} + ^{c)}	+ ^{a)} + ^{c)}	+	+	±	±
	37	+ ^{a)} + ^{b)} + ^{c)}	-	-	+	±	±
	38	+ ^{a)} + ^{b)} + ^{c)}	+ ^{a)}	-	+	-	-
	39	+ ^{a)} + ^{b)} + ^{c)}	+ ^{a)} + ^{c)}	+	+	+	±

^{a)}: Atrophy ^{b)}: Necrosis ^{c)}: Loss

Grade of changes: -; Negative

+; Slight

±; Moderate

がなかった。EM 群では同神経節細胞の萎縮がやや多く、1 匹では壊死が散見され、他の 1 匹では少数の神経節細胞が消失していた。

KM 群ではいずれの例でも蝸牛の 1 および 2 回転のラセン器外有毛細胞の萎縮、脱落が広範にみられ、内有毛細胞の萎縮および消失もみられた。3~4 回転のラセン器においても外有毛細胞の萎縮、壊死、消失が散見された。また、前庭器膨大部後の少数の有毛細胞の壊死が観察された。KM 群の 2 匹では 1~2 回転のラセン器が消失していた。

Fig. 3 RU 28965 50 mg/kg for 28 days : No cell loss or abnormalities are seen in either the outer or inner hair cells of the cochlea

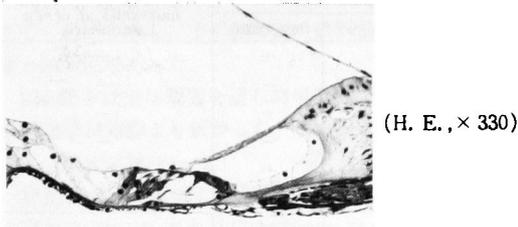


Fig. 4 RU 28965 50 mg/kg for 28 days : No changes are observable in the spiral ganglion

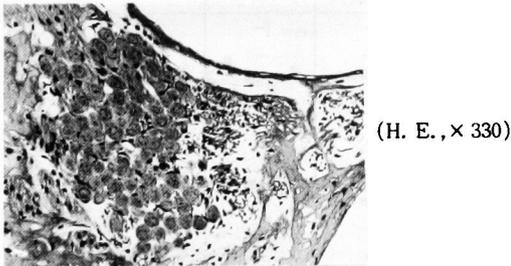


Fig. 5 RU 28965 50 mg/kg for 28 days : No abnormalities are seen in the stria vascularis

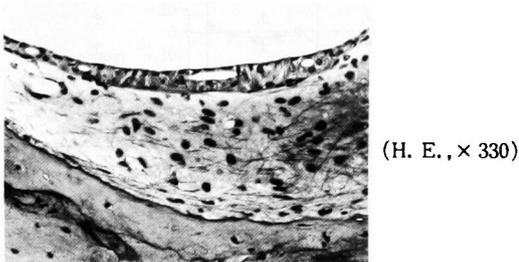


Fig. 6 RU 28965 50 mg/kg for 28 days : No changes are observable in the crista ampullaris

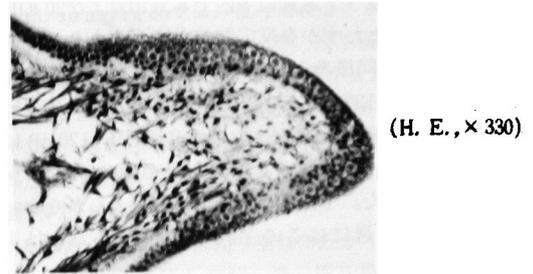


Fig. 7 Kanamycin 160 mg/kg for 28 days : Outer hair cell loss is noticeable

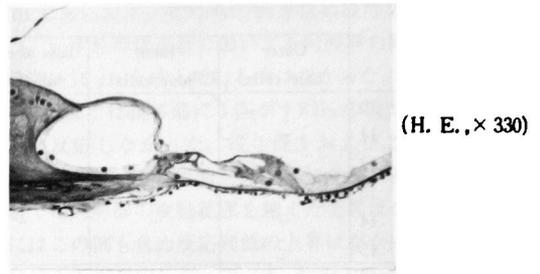


Fig. 8 Kanamycin 160 mg/kg for 28 days : Cell loss of the outer and inner hair cells is seen in the first turn of the cochlea

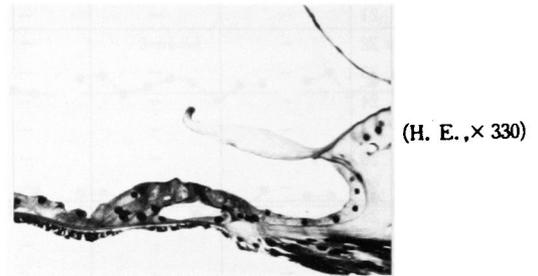
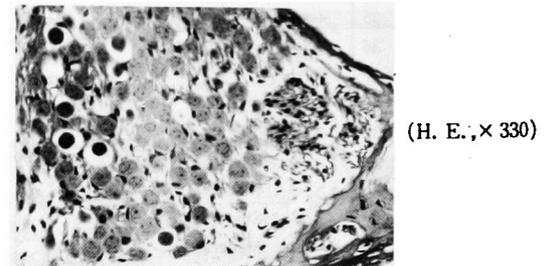


Fig. 9 Kanamycin 160 mg/kg for 28 days : Atrophy, necrosis, and disappearance of the ganglion cells are seen in the spiral ganglion



Ⅲ. 考 察

RUの10および50 mg/kg群では、0.5~20 KHzの純音刺激に対する耳介反射による聴覚試験において投与前と投与後の反応に差はほとんどなかった。また、内耳聴覚器の組織病理学的検査においても対照群とRU投与群との間に明らかな差はみられなかった。したがって、モルモットにおいてRUの10および50 mg/kgの4週間投与では聴覚機能への影響はないものと思われる。EM投与群においてはラセン神経節の神経節細胞の萎縮が対照群に比べ多くの例にみられ、同細胞の壊死と消失がそれぞれ1例でみられた。しかし、内耳聴覚器の感覚細胞には異常はみられなかった。ラセン神経節細胞の萎縮は対照群においても散見された変化であり、またEM群でみられた神経節細胞の萎縮はきわめて限局性であったことから、EM投与に起因したものか、偶発的な対照群との差が明らかではなかった。EM群の聴覚試験ではいずれの例にも異常はみられなかった。

KM群では聴覚試験で2~20 KHzの音刺激に対する反応閾値が上昇しており、内耳の組織病理学的検査においても感覚細胞の萎縮、壊死、脱落などの障害がみられた。KMを投与したモルモットにおける聴覚および聴覚器の障害はすでに報告されており^{2,3)}、今回の実験においても、これらの報告とほぼ同様の結果が得られた。

文 献

- 1) 榎本 真, 他編: 実験動物の病理組織, 10. 聴器 (秋吉正豊), 456~479頁, ソフトサイエンス社, 1980
- 2) 秋吉正豊: 抗生物質による聴器障害の病理—動物の内耳の病理組織像を中心に—. *Medicina*, 10: 881~888, 1973
- 3) 秋吉正豊, 佐藤喜一, 庄司 侃, 菅原 敬: 耳毒性抗生物質によるコルチ器有毛細胞の拡がりがた。 *Audiology Japan*, 14: 530~541, 1971

TOXICITY OF RU 28965 ON THE AUDITORY ORGANS

MITSUTOSHI WATANABE, HARUKO KOIZUMI and TOMOJI YANAGITA

Preclinical Research Laboratories, Central Institute for Experimental Animals

We evaluated the ototoxicity of RU 28965(RU), a macrolide antibiotic under development, by the pinna reflex test and histopathological examination of the inner ear in guinea pigs given orally 10 or 50 mg/kg/day of the drug for 4 weeks. RU possesses a chemical structure similar to erythromycin(EM, 130 mg/kg)and kanamycin(KM, 160 mg/kg). Since these are known to be ototoxic, they were similarly administered for comparison.

No death attributable to the drugs occurred. Food intake and body weight gain were suppressed in all treated groups, but were very slight in the RU 10 mg/kg group. Suppression was similar in the RU 50 mg/kg and the EM groups, and was severest in the KM group.

In the pinna reflex test, conducted before and at weekly intervals after the administration period, no differences were seen in the threshold of positive responses to sound stimuli in the frequency range from 0.5~20 kHz in the RU 10 mg/kg, RU 50 mg/kg, and EM groups. In the KM group, a threshold shift was seen at 8 and 10 kHz at 2 weeks, 8~20 kHz at 3 weeks, and 2~20 kHz at 4 weeks after administration. Histopathological examination of the inner ear showed no abnormalities in the RU 10 mg/kg, RU 50 mg/kg, and EM groups, whereas in the KM group loss of inner and outer hair cells and necrosis and loss of ganglion cells in the spiral ganglion were observed.

These results suggest that RU has no toxic effect on the inner ear up to a dosage of 50 mg/kg/day.