アミノ配糖体系薬物および利尿剤 との併用による内耳病態

大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：山本 馨教授）

中 井 義 明, 藤 本 明 子, 山 本 馨

緒 言

内耳に障害をおよぼす薬剤としてアミノ配糖体抗生剤¹⁾²⁾, ある種の抗癌剤³⁾⁴⁾, 利尿剤⁵⁾⁶⁾, 神経毒性薬剤⁷⁾などが挙げられ, その内耳障害様式も臨床的, 実験的に数多くの検索がなされている。これら薬剤の中で前二者は内耳感覚細胞を障害することが知られている。しかし利尿剤であるフロセマイド, エタクリン酸は蝸牛血管条に可逆的な変化を惹起することが知られている⁸⁾。

聴器毒性薬物が投与された場合, その大部分は内耳障害程度に個体差がみられることが多い。この個体差の原因となる因子には不明のことが多く, 臨床的にも実験的にもその毒性あるいは治療を論ずる場合, 厄介な事項の一つである。この中のごく一部であろうが, 上記薬物の中で作用機序の異なった二種類が同時投薬を受けるのも一つの因子といえよう。

今回, アミノ配糖体薬物のなかで比較的新しく合成された薬物である DKB(3',4'-Dideoxykanamycin B)の内耳に対する作用をマウス, モルモットを使用し, 実験形態学的に検索するとともに, これと作用機序の異なる薬物である利尿剤, エタクリン酸, フロセマイドが同時に投与された場合の蝸牛病態を知ろうとし, 本実験を計画した。

実験動物および方法

実験動物には, 鼓膜所見, プライエル反射正常の体重約 20 g のマウス, および体重約 300 g のハートレイ系モルモットを使用した。

マウス 75 匹に, DKB を 50, 100, 200, 300, 400 mg/kg を 10 日間, 20 日間, 30 日間連日腹腔内に投与した。各条件ともおのおの 5 匹のマウスを使用した。

モルモット 30 匹には各条件 5 匹を使用し, DKB 300, 400 mg/kg を同じく 10, 20, 30 日間大腿部に筋注を行なった。各条件とも最終投薬 2~48 時間後に内耳を

採取した。

マウス, モルモット各 5 匹にフロセマイド, エタクリン酸 40 mg/kg を前者は尾静脈, 後者は頸静脈より静注を行ない, 5 分後, 数十分後, 2 日後に内耳を観察した。

マウス, モルモット各 5 匹に DKB 400 mg/kg 1 回投与して 2 時間後, フロセマイド, あるいはエタクリン酸 40 mg/kg 静注を行なった。各条件とも投薬 2 日後に内耳を採取した。

採取された内耳はただちに 2% オスミック酸 (pH 7.0 磷酸緩衝) にて固定を行い, 一側耳は常法によりエポキシ樹脂包埋し, 切片作成, 光顕および JEM 7, HS-9 透過電顕で観察した。同一動物の他側耳はエタノール脱水, 臨界点乾燥法により乾燥させ, カーボン, 金の二重蒸着後, JSM-50A 走査電顕で観察した。

成 績

マウス, モルモットとも DKB 50, 100 mg/kg では 30 日間投与においても内耳に変化はみられなかった。200, 300, 400 mg/kg 群では 10 日間投与では, 内耳に変化は, 電顕レベルにおいてもみられなかった。しかし, 20 日間以上の投薬においては, 200 mg/kg 投与例では各条件の約 1/3 に, 300, 400 mg/kg 投与例では約 2/3 の動物において蝸牛ラセン器の変化がみられた。すなわち感覚毛の rigidity の減少による彎曲; 一部膨化; 蓋板下部の糸粒体の変性, ライソゾームの増大などが初期の変性像であった。ついで外有毛細胞全体の崩壊が起り, 消失する (図 1)。その際, 神経線維および終末は遺残していることが多いが, 変性の高度の部位ではこれら神経成分も消失していた。内毛細胞はその胞体内の糸粒体の変性はみられたが; 消失像は本実験条件では殆んど認められなかった。血管条においては, 時にその辺縁細胞に小胞の増大がみられることがあったが, その他の構成細胞や, ラセン隆起, ラセン靱帯などには特記すべき変化はみられなかった。以上の形態的変化の程度は, 薬剤の投

与量にほぼ比例してみられた。

フロセマイド単独静注例では、5分後においてすでに血管条各細胞間隙の増大がみられた(図2)。しかし数10分後ではこれらの変化は消失し、正常像を呈していた。エタクリン酸静注後では、血管条の変化はフロセマイドよりも高度で、持続時間も長期であったが、やはり可逆性であった。ラセン器は、一回の投薬ではまれに基底回転下方の有毛細胞の軽度の変化がみられる以外は正常像を呈していた。この詳細な観察は著者の一人が既に報告し⁶⁾、あるいは他に2~3の報告⁸⁾⁹⁾がみられるので省略する。

DKBとフロセマイド各1回併用した場合、マウス、モルモット両者とも内耳諸細胞に変化はみられなかった。マウスにおいてDKBとエタクリン酸併用例でも内耳は正常像を呈していた。

モルモットにおいて、DKBとエタクリン酸各1回併用例においては、蝸牛下部回転より上部回転に至るまで高度のラセン器の変性が認められた。すなわち図3~8に示すごとく、内・外有毛細胞の高度の変性、消失ならびに、ヌエル腔、コルチトンネルの支持細胞の膨化による消失、求心・遠心両神経線維の変性、消失が種々の程度にみられた。これらの所見は、DKB単独大量長期間投与によるラセン器変性像に類似した形態を示したが、変性が急速に惹起されているので、感覚細胞の変性細胞破片が支持細胞間あるいは蓋膜下腔に散在しているのが多くみられた(図5, 6)。このように急速な変性像は、蝸牛内に一時に大量抗生物質が作用した場合である鼓室内注入の所見¹⁰⁾にも類似していた。本実験で観察した両薬剤投与2日目では、血管条はほぼ正常像を呈していた。なお本条件における変化は、個体差は余りみられなかった。

考 察

今回、アミノ配糖体系薬物として使用したDKBは、梅沢博士のkanamycin Bの化学的処理によって得られた抗生物質で、3',4'-Dideoxykanamycin Bと称せられ、kanamycin Bの3'および4'の水酸基が水素で置換された化学構式をもっている。これは広い抗菌スペクトルを持つと同時に、kanamycinに耐性である菌、E. coli K-12, R-6に対しても感受性を持ち、また緑膿菌に対して強い阻害を示すのが特徴とされている¹¹⁾。この薬物の聴器毒性に関する検討は既に一部報告されており¹²⁾¹³⁾、DKBはkanamycin, kanendomyacinとほぼ同様あるいはやや強度の聴器毒性を示

し、gentamicinよりも毒性は僅少であり、vistamycinよりも強度であると動物実験で推定されている¹³⁾。DKBのラセン器障害様式は、下部回転ラセン器の障害が上部回転よりも大であり、外有毛細胞が内有毛細胞よりも易受傷性である。ラセン器の神経成分は有毛細胞よりも薬剤抵抗性が大であるなどすでに報告されている他種アミノ配糖体系薬物のそれとほぼ同様であった。

利尿剤であるエタクリン酸については、1965年、Maher, Schreiner¹⁴⁾が治療量の投薬により、一過性の聴力障害が発生することが臨床でみられたことが報告されて以来、この薬剤が何らかの聴器毒性をもつという臨床的報告が多くみられる¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。中でも1969年、Matzら¹⁸⁾は、エタクリン酸静注後の難聴例のヒト側頭骨症例で、蝸牛ラセン器の障害を報告している。これら臨床例が報告されはじめた時期に、実験的にその蝸牛障害様式を証明しようとし、著者は動物にエタクリン酸を投薬したところ、従来知られていた聴器毒性薬物が主としてラセン器を障害するのに対し、これは血管条に主として変化を発生させる作用があり、これが聴力障害と関係のあることを知った⁵⁾。時を前後してQuick & Duvall¹⁹⁾も同様の知見を、Laryngoscopeに報告している。以来、形態的、あるいは電気生理的にこの薬物の毒性を知ることとともに、この薬剤が血管条を選択的に侵襲することを利用した蝸牛の生理機能の解明など、実験的研究が数多く行なわれている²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾。一方、エタクリン酸に薬理作用の類似したフロセマイドも血管条に類似的作用をおよぼすことが知られ、特に本邦においては静注用のエタクリン酸が入手困難であるのに反し、フロセマイドはごく簡単に入手可能であるので、本薬剤が盛んに動物実験に利用されるようになった。エタクリン酸とフロセマイドの血管条におよぼす形態的变化はほぼ同様であるが、量的には前者が毒性が大であり、かつまた前者はその変化の持続性が長く、回復時間が後者に比し遅い。電気生理の実験においても²¹⁾前者が後者よりも毒性の強いことが証明されている。これらの利尿剤は腎尿細管上皮の膜ATP-aseを阻害するためNaイオンの吸収が抑制されるといわれ²⁴⁾、腎に形態の類似している血管条にも同様の作用が生じていると考えられている。恐らくこの作用のみならず、他の薬理作用とともに内リンパの高Kイオン濃度を維持する部位である血管条の機能の特殊性が加わり上記の諸変化が生ずるのであろうが、その詳細な薬理作用の解明は今後

に残された課題であろう。

内耳性難聴の大部分は、程度の差はあるが蝸牛感覚細胞の変性がみられる。しかるに、蝸牛ラセン器ならびにそれに付随する諸神経が正常であっても、血管条の機能が障害されると高度の難聴を来すことが蝸牛電氣的諸現象の測定²⁵⁾や脳波聴性誘発反応²⁶⁾により証明されている。この血管条の障害がラセン器障害と大きく異なる所は、前者は可逆的であることが多いのに反し、後者は不可逆的障害が大であるという点である。最近、特に多くの興味を持って研究対象となっているいわゆる突発性難聴は、臨床治療可能なことが多い難聴の一つであり、この病因の一つとして血管条の病変が大であるものが存在すると考えられる。この理論に準じた治療法の一つとして森満ら²⁷⁾のアミドリゾアート使用も最近話題の一つである。

上記利尿剤による内耳性難聴は、可逆性が大であることを述べたが、臨床報告されている例には必ずしも一過性の難聴でないものもある。この原因として動物差、個体差が挙げられるが、個体差として考えられている中にも、体質あるいは素因以外に他の因子が加わっている例も多いと考えられる。例えば、騒音性難聴に個体差の多い中で、その易受傷性の条件として聴器毒性薬物が投与されている例が挙げられ、臨床的あるいは実験的^{26), 28), 29), 30)}に証明されている。同様なことが薬理作用の異なる2種以上の聴器毒性薬物の併用投与についても考えられる。この場合、個々の薬物の障害度の相加あるいは相乗作用があると推定され、それを裏づける実験的報告がみられる³¹⁾。今回おこなった実験においても、アミノ配糖体系薬物あるいはエタクリン酸ともそれ単独では恒久的な蝸牛ラセン器の変性あるいは消失が全くみられない量の投与であるに拘わらず、この両者を併用投与された場合非常に高度のラセン器内、外有毛細胞ならびに神経成分の変性、あるいは消失がモルモットにおいてみられた。これはアミノ配糖体系薬物のラセン器諸細胞の物質代謝阻害作用にエタクリン酸の膜 ATP-ase 阻止作用を主とする薬理作用の相加、蝸牛管側壁構成細胞のポンプ作用の障害によるアミノ配糖体系薬物の高濃度の内耳液への移行ならびに長期間の停滞、あるいは未だ不明の諸因子によりこのようなラセン器障害がみられる。この不明の因子については今後検索をすすめられなければならないが、いずれにしても临床上この2種の薬剤を併用投与する場合、ろうに近くなる可能性があるということは耳科医が充分認識してかねばならぬ現実であろう。

この実験的結果よりふり返ってみると、現在までの聴器毒性薬剤による難聴臨床例の報告の中に案外2種の薬剤併用によるものも含まれていると考えられる。Matz ら¹⁸⁾の臨床報告もエタクリン酸による内耳障害と題して蝸牛ラセン器感覚細胞の変性消失を示しているが、同時に neomycin の 18 gm 投与がなされているので、この両者が併用された結果の高度の難聴例といえよう。

む す び

アミノ配糖体系薬物である DKB の内耳への作用をマウス、モルモットを使用して光顕、透過、走査電顕にて検索した場合、kanamycin とほぼ同様の内耳障害性をもつことがわかった。

同様の検索を利尿剤であるフロセマ이드、エタクリン酸についておこなうと、両者とも可逆的な変化を蝸牛血管条に惹起せしめ得るが、その変化の程度は前者が後者に比し軽度であった。

薬理作用の異なった2種の薬剤である上記 DKB とエタクリン酸を、それ単独では内耳に恒久的な変性を発生せしめ得ない量を併用投与した場合、モルモットにおいてその蝸牛ラセン器に非常に高度の変性が認められた。

以上の結果より、聴器毒性薬剤2種類以上の併用投与により、その聴器障害性に相乗作用のあることともに、临床上注意すべき点について論じた。

本論文の要旨は第19回日本オージオロジー学会(1974年)において報告した。本研究の一部は厚生省特別研究費補助金によった。

Combined Effect of Aminoglycoside Antibiotic and Potent Diuretics on the Cochlea

Yoshiaki Nakai, M.D., Akiko Fujimoto, M.D.,
and Kaoru Yamamoto, M.D.

(Department of Otolaryngology, Osaka City
University Medical School)

The study was designed to examine the combined toxic effect of DKB, a new semi-synthetic aminoglycoside antibiotic, and diuretics, ethacrynic acid or furosemide, on the cochlea in three groups of guinea pigs and mice. One group received DKB alone, one received ethacrynic acid or furosemide alone, and one received DKB with

- 図 1 DKB 300 mg/kg 30 日間投与，マウスラセン器基底回転。外有毛細胞が消失し，ダイテルス細胞 (D) が膨化置換している蓋膜 (T) 下腔に変性細胞破片 (矢印) がみられる ($\times 8,000$)。
- 図 2 フロセマド 40 mg/kg 静注 5 分後のモルモット血管条。細胞間隙の異常な大增 (矢印) がみられる。ラセン靱帯 (L) には変化がみられない。M: 辺縁細胞, I: 中間細胞, C: 毛細血管 ($\times 5,500$)。

図 3 DKB およびエタクリン酸各 1 回併用投与 2 日後のモルモットラセン器第 2 回転表面像。内有毛細胞 (I), 外有毛細胞 (O) とも著明な変性がみられる ($\times 330$)。

図 4 図 3 と同条件ラセン器高倍像。外有毛細胞の毛の変形, 一部消失を示す ($\times 5,000$)。

図 5 DKB およびエタクリン酸各 1 回併用投与 2 日後のモルモットラセン器第 2 回転。内有毛細胞 (I)、外有毛細胞 (O) の変性、ダイテルス細胞 (D) の膨化によるヌエル腔、コルチトンネルの消失を示す ($\times 2,500$)。

図 6 DKB およびエタクリン酸併用投与、モルモットラセン器基底回転。外有毛細胞 (O) は変性し、その形態を殆んどとどめていない。蓋膜下腔に変性細胞破片 (矢印) をみる ($\times 6,000$)。

図 7 DKB およびエタクリン酸併用投与モルモットラセン器基底回転。感覚細胞の高度の変性消失に拘わらず神経線維(N)の遺残がみられる(×17,000)。

図 8 DKB およびエタクリン酸併用投与モルモット第2回転。内毛細胞(IH)の高度の変性を示す(×17,000)。

either of ethacrynic acid or furosemide. DKB was found as much toxic as kanamycin A, but less toxic than gentamicin with regard to toxicity /g/body weight. Degeneration appeared first in the outer hair cells in the basal turn of the cochlea starting with the increasing of lysosomes, degeneration of mitochondria and resulting in the complete loss of hair cells, but stria vascularis showed little change.

No change in the cochlea were observed in 2 days after single administration of DKB, ethacrynic acid or furosemide in both guinea pigs and mice. Mice receiving both DKB and diuretics did not show any change in the cochlea.

The harmful effects were shown in guinea pigs, when DKB and ethacrynic acid were combined, more significantly than predicted by simple addition of the effect of each drug. The sever disintegration and loss of outer and inner hair cells and nerve fibers in all turns were observed in this condition. Therefore, it was suggested that a care must be taken when amino glycoside antibiotics and ethacrynic acid are given together in a patient. The toxic mechanism of the interaction of these drugs to the cochlea were discussed from the morphological point of view.

文 献

- 1) Hawkins, J.E.: Biochemical aspects of ototoxicity. Biochemical mechanisms in hearing and deafness. (Ed. Paparella, M. M.) C. C. Thomas 323-339, 1970.
- 2) 中井義明, 山本 馨, 岩本 勉: Kanendomycin, Vistamycin の聴器におよぼす影響に関する電子顕微鏡的研究. *Audiology Japan*, 15; 202-210, 1972.
- 3) 角田由美子: Nitrogen mustard-N-oxide の聴器毒性について. *日耳鼻*, 73; 581-598, 1970.
- 4) Nakai, Y. & Nakai, S.: Ototoxic effects of nitromin and some congenital deaf animal cochlea. *Arch. klin. exp. Ohr., Nas.,-u Kehl.* Heilk., 198; 325-338, 1971.
- 5) 中井義明, 山本 馨, 岩本 勉: 薬物中毒及び先天ろう動物蝸牛の成立機転に関する電子顕微鏡的研究. *Audiology Japan*, 14; 504-512, 1971.
- 6) Nakai, Y.: Electron microscopic study of the inner ear after ethacrynic acid intoxication. *Pract. oto-rhinolaryng.*, 33; 366-376, 1971.
- 7) 村上嘉彦: 聴器毒と臨床. *臨床耳科*, 2; 148-149, 1975.
- 8) 笠島和子: Ethacrynic acid 投与による血管条の変化. *日耳鼻*, 76; 24-32, 1973.
- 9) Quick, C. A. & Duvall, A. J.: Early changes in the cochlear duct from ethacrynic acid. An electron microscopic evaluation. *Laryngoscope*, 80; 954-965, 1970.
- 10) 中井義明, 山本 馨, 五十嵐 真: 鼓室内薬剤による内耳障害. *Audiology Japan*, 17; 190-197, 1974.
- 11) Umezawa, H., Umezawa, S., Tsuchiya, T. & Okazaki, Y.: 3',4'-Dideoxy Kanamycin B active agent Kanamycin-resistant *E. coli* and *Ps. aeruginosa*. *J. Antibiotics*, 24; 485-487, 1971.
- 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. Antibiotics*, 27; 15-26, 1974.
- 13) 中井義明, 他: DKB (3',4'-Dideoxykanamycin B) の内耳毒性に関する実験的研究. *Chemotherapy*, 22; 1000-1006, 1974.
- 14) Maher, J. F. & Schreiner, G. E.: Studies on ethacrynic acid in patients with refractory edema. *Ann. intern. Med.*, 62; 15-21, 1965.
- 15) Meriwether, W. D., Mangi, R. J. & Serpick, A. A.: Deafness following standard intravenous dose of ethacrynic acid. *J. Amer. med. Ass.*, 216; 795-798, 1971.
- 16) Schneider, W. J.: Acute transient hearing loss after ethacrynic acid therapy. *Arch. Intern. Med.*, 117; 715-717, 1966.
- 17) Conley, C. F.: Deafness after ethacrynic acid. *Lancet*, 7596; 673-674, 1969.
- 18) Matz, G. J., Beal, D. D. & Krames, L.: Ototoxicity of ethacrynic acid demonstrated in an human temporal bone. *Arch. Otolaryng.*, 90; 60-63, 1969.
- 19) 中井義明, 岩本 勉: Ethacrynic acid の内耳に及ぼす影響に関する実験的研究. *内耳生化*, 2; 38-39, 1971.
- 20) Dilling, J. M., Nakashima, T. & Snow, J. B.:

- Effect of ethacrynic acid² on endolymphatic DC potential. Arch. Otolaryng., 98; 183-186, 1973.
- 21) Mathog, R. H., Thomas, W. G. & Hudson, W. R.: Ototoxicity of new and potent diuretics. Arch. Otolaryng., 92; 7-13, 1970.
- 22) Bosher, S. K., Smith, C. & Warren, R. L.: The effects of ethacrynic acid upon the cochlear endolymph and stria vascularis. Acta Otolaryng., 75; 184-191, 1973.
- 23) Crifo, S.: Ototoxicity of sodium ethacrylate in the guinea pig. Arch. Oto-Rhino-Laryng., 206; 27-38, 1973.
- 24) Flanagan, W. J.: Site of action of ethacrynic acid. Arch. Intern. Med., 118; 117-122, 1966.
- 25) 志多 享：蝸牛内直流電位の消長とマイクロフォン電位との相関性. 日耳鼻, 78; 増, 79, 1975.
- 26) 中井義明：内耳の形態と機能. 内耳の電子顕微鏡的研究, 日耳鼻, 78; 増, 78, 1975.
- 27) 森満 保, 平島直子, 安田宏一：アミドリゾアートによる突発難聴の治療成績. 臨床耳科, 2; 124-125, 1975.
- 28) 志多 享：音響性聴器障害の発生について. 耳鼻, 19; 431-436, 1973.
- 29) Jauhiainen, T., Kohonen, A., & Jauhiainen, M.: Combined effect of noise and neomycin on the cochlea. Acta Otolaryng., 73; 387-390, 1972.
- 30) 中井義明：強大音による内耳の病態. 第19回日本医学会総会シンポジウム. 1975.
- 31) West, B. A., Brummett, R. E. & Himes, D. L.: Interaction of Kanamycin and ethacrynic acid. Arch. Otolaryng., 98; 32-37, 1973.

(受付 50.6.16)