母体へ投与した薬物による次世代の 聴覚機能障害の検出法

亀山 勉, 鍋島 俊隆, 伊藤 治朗

名城大学薬学部薬品作用学教室*

(昭和57年9月14日〔特〕)

要約: 薬物を胎生期に投与することによって生じる胎児の聴器毒性を検定する方法として, 訓練および実験操作が簡単な, shuttle box による条件回避反応を利用したラットの聴覚閾値測定法を利用し検討した。妊娠10日目から19日目までの10日間生理食塩液 (S 群), kanamycin sulfate 200 mg/kg (KM 群), dihydrostreptomycin sulfate 200 mg/kg (DHSM 群) および neomycin sulfate 100 mg/kg (NM 群) を連日筋肉内投与したラットより出産し, 生存した90%以上の仔について聴覚閾値を測定することが可能であった。各群の聴覚閾値は, S 群 53.8 ± 0.6 dB (N=36), KM 群 63.8 ± 1.1 dB (N=34), DHSM 群 60.0 ± 1.2 dB (N=29), NM 群 62.4 ± 1.2 dB (N=24) であった。KM 群, DHSM 群および NM 群では, S 群に比較して聴覚閾値が有意に上昇した。訓練の過程および聴覚閾値測定時の動物の行動から, 視覚機能, 運動機能, 条件反応の学習機能には障害が認められなかった。以上の結果から, 条件回避反応を利用した本実験スケジュールは, 短期間に多数の動物の行動測定が可能であるので薬物を母体に投与した場合の次世代の知覚, 運動, 学習機能への影響についてのスクリーニング法として有用であると思われる。

緒 言

アミノ配糖体系抗生物質は, 血液胎盤関門を通過するため^{1,2)}, また, 胎児では排泄能が低い^{3,4)}ため, 妊娠中の母体への投与により出産した子供に聴覚障害が発現する危険がある^{3,4)}。またラットにおいても, 妊娠中の母体への投与により出産した仔に聴覚障害が起こることが知られている⁵⁻⁷⁾。しかし, ラットなどの実験動物の胎生期に生じた聴覚障害を検定する方法としては, 耳介反射法以外に適当な方法がない。

そこで先に報告した条件回避反応を利用した薬物による聴器毒性の試験法⁸⁻¹⁰⁾が使用できないか検討した。この試験法は, 他の陽性強化によるレバー押しなどのオペラント条件行動を利用した方法¹¹⁻¹⁷⁾に比べて, 実験に使用した動物総数のほとんどについて聴覚閾値を測定することが可能であり, また耳介反射法に比べて, 反応が明瞭なことから正確で客観的な実験結果が得られるという利点を持っている。

以下に, 母体にアミノ配糖体系抗生物質を投与した場合に胎仔の聴覚機能にどのような影響がみられるか, この条件回避反応を利用した聴器毒性の試験法で検討したので報告する。

実験材料および実験装置

実験動物は, Wistar 系雄性および雌性ラットを使用した。ラットの飼育には, 繁殖用飼料 NMF (オリエンタル酵母工業) を使用した。

薬物はそれぞれ生理食塩水に溶解し, kanamycin sulfate (明治製菓) と dihydrostreptomycin sulfate (Sigma) は 200 mg/kg/day の用量を, neomycin sulfate (Sigma) は, 毒性が強く, 出産後母ラットが仔を育てなかった¹⁸⁾ので, 100 mg/kg/day に減量して筋肉内注射した。

実験装置として, 2-way shuttle box (Lehigh Valley Electronics 社) を一部改良した亀山ら⁹⁾の装置を使用した。すなわち, shuttle box の大きさは, $20 \times 45 \times 20$ cm であり, 箱の中央で高さ 4.5 cm のハードルにより

* 〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山15

2つの部屋に仕切られている。床面から 35 cm の高さに直径 6.5 cm のスピーカーを、その中心が床のグリッドの中央と一致する位置に水平に設置した。スピーカーを shuttle box の上部に取り付けたので、shuttle box のふたを金網製のものに取り換えた。shuttle box の前面側の床面からの高さが 32 cm の位置に、ルームランプ (15 W, 28 V) を取り付け、実験中は点灯した。また今回の実験では、実験中にラットがハードルに登るのを防ぎ、回避反応を明瞭にする目的で、ラットがハードルに触れると電気ショックが与えられるようにハードルを改造し、60 V (A.C.) の電圧をかけた。条件刺激としての音刺激は上部のスピーカーから提示し、音圧および周波数は音刺激装置 (室町機械) で制御した。光刺激は左右の壁面に1個ずつ取りつけたキューランプ (15 W, 28 V) を点灯することにより提示した。無条件刺激には電気ショックを用い、無条件刺激提示期間中ショッカージェネレーター/スクランブル (Lehigh Valley Electronics 社) によりグリッドへ 0.3 mA (D.C.) の電流を流した。

この shuttle box は、音の反射および周囲の騒音により測定誤差が生じるのを防ぐため、床を除くすべての内壁を吸音材で覆った防音の恒温室 (温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 2.5\%$) 内に設置した。恒温室内には、聴覚閾値測定時のラットの音源に対する位置、方向および薬物によるラットの行動面への影響を観察するために、赤外線テレビカメラと赤外線投光機 (松下電器) を設置し、室外からモニター用テレビ (池上通信機) により観察しながら測定を行なった。

実験スケジュールのプログラミングは、ソリッドステートコントロール (Lehigh Valley Electronics 社) を使用した。

実験方法

1. 訓練手続

実験に使用するラットをハンドリングにより慣らした後、1匹ずつ shuttle box 内に入れ、1日約 20 分間で2日間実験装置内を自由に探索させた。このラットを Kameyama and Nabeshima の方法¹⁸⁾に基づいて、以下のスケジュールにより訓練した。

条件刺激 (CS) としては、音 (10 kHz, 90 dB) と光 (15 W, 28 V, 2 個) を同時に提示し、無条件刺激 (US) としては、電気ショック (0.3 mA, D.C.) を用い、試行間隔 (interval) を 30 秒, CS を最大 5 秒, US を最大 5 秒与えるスケジュールで行なった。

ラットが CS 提示中に隣室へ移動した場合を回避 (avoidance), US 提示中に隣室へ移動した場合を逃避 (escape), US の提示が終了するまでに隣室へ移動しなかった場合を逃避失敗 (escape failure), 試行間隔中に隣室へ移動した場合を試行間反応 (intertrial response) と呼び、逃避、逃避失敗および試行間反応の3つの数値を記録した。ここで回避の数値は、試行数から逃避および逃避失敗の数を引いたものであり、回避率は、回避の数値を試行数で除したものに 100 を乗じて求めた。

訓練は、1セッションを 40 試行とし、1日1セッションで3~4日間行なった。

つぎに、CS として同時に提示していた音と光を別々に分け (分化), これらをランダムにそれぞれ約 50 % の比率で提示するスケジュールを用いて、1日1セッション (40 試行) で 10~15 日間訓練を行なった。

CS を分化したスケジュールによって、3セッション以上連続して、音刺激単独の CS 提示による回避率が 80 % 以上、光刺激単独の CS 提示による回避率が 70 % 以上の学習基準に達したラットを用いて、聴覚閾値の測定を行なった。

2. 聴覚閾値の測定

ラットの聴覚閾値は、精神物理学の極限法^{15,19)}に基づいた著者らの方法⁹⁾によってつぎのようにして求めた。

音刺激は周波数を一定 (10 kHz) とし、音圧のみを変化させた。音圧は 90 dB から 10 dB ずつ下げ、回避反応がなくなった音圧よりさらに 10 dB 下げた音圧から 5 dB の間隔で音圧を上げ、回避反応が5試行中4回以上みられる音圧を求め、それを上限値とした。なお、回避反応の基準を 4/5 としたのは、訓練時に音刺激に対する回避率が 80 % 以上の動物を選択して測定に用いたからである。つぎに、上限値から 2 dB ずつ下げ、回避

反応が5試行中1回以下の場合には聞こえていないと判定し、正常な回避反応が完全にみられなくなるまで音圧を下げ、ラットに聞こえた最も低い音圧を求め、下限値とした。

以上のようにして、1匹のラットについて上限値と下限値を日を替えてそれぞれ3回ずつ求め、それらの平均値をラットの聴覚閾値とした。

聴覚閾値測定中のラットの shuttle box 内での行動は、赤外線テレビカメラを用いて室外より観察し、反応潜時は手製のデジタルタイマーによって測定した。また、各試行ごとに CS を提示した時のラットの位置と方向、反応潜時および試行間反応の回数を記録しながら測定を行なった。

聴覚閾値の測定にあたり、つぎに述べる場合は正常な回避反応とは思われないので、回避反応陽性としなかった。

i) CS が提示された時にラットが動いていた時（ラットが CS とは無関係に反応する場合が多く、CS に対する注意を欠いていると考えられる）。

ii) 反応潜時が1.0秒以下の場合（10 kHz, 90 dB での正常なラットの反応潜時の平均値は 2.5 ± 0.2 秒（ $N=10$ ）であり、1.0秒以下の反応は試行間反応であり、これが偶然 CS と重なり回避反応が陽性であるようにみられたものと思われる）。

iii) 1試行中に試行間反応が3回以上あった場合（試行間反応の数が増せば、CS 提示中に偶然に移動する可能性が高くなると考えられる）。

また、聴覚閾値の測定中において低い音圧を音刺激として提示する場合、ラットが回避に失敗して電気ショックを受けることにより、試行間反応が急激に増加することがある。そこで、これを防ぐため聴覚閾値の測定中に音刺激を提示する場合は、原則として US としての電気ショックを停止した。そして、音圧を変えたとき最初の1試行目に、CS として音刺激の変わりに一定照度の光刺激を提示して、回避反応がみられるかどうかを確認した。続いて CS として低い音圧または高い音圧を使用して、ラットが回避反応を示すかどうかを検討した。しかし、電気ショックを停止したことによって、CS としての音刺激が聞こえていても、回避反応を起こさなくなる可能性があるために、3試行続けて回避反応がみられない場合には、つぎの1試行のみ電気ショックを加えた。

3. 実験手順

ラットの交配および薬物の投与は、つぎのような手順で行なった。

あらかじめ聴覚閾値を測定しておいた、生後120～150日齢の雌性ラットと雄性ラットを同じケージ内に入れ交配を行なわせた。膣栓を認めた日を妊娠0日目とし、妊娠10日目から19日目までの10日間にわたって薬物を連日投与した。

出産した仔については、生後約60日後から聴覚閾値の測定のため、条件回避反応の訓練を開始した。聴覚閾値の測定は、生後90日目から110日目の間に行なった。

母親の聴覚閾値は、妊娠中の薬物投与による母体への直接的な影響を調べる目的で、交配する前に1度求めておき、出産後、仔の測定と同じ期間に再び聴覚閾値を測定した。

実験結果の統計処置には、 t 検定を用いた。

実験結果

1. 母ラットへのアミノ配糖体系抗生物質投与による仔ラットの聴覚機能への影響

薬物未処置の妊娠ラット5腹（ N 群）より出産し、生存した32例の仔について聴覚閾値の測定を試みた。その結果、32例のうち30例の仔について聴覚閾値を測定することが可能であり、その平均値は 56.2 ± 0.7 dB であった（Fig. 1）。本実験スケジュールにより、出産した90%以上の仔について聴覚閾値を測定することが可能であったので、薬物投与による実験を行なった。

S群は、妊娠10日目から19日目までの10日間、生理食塩液を連日筋肉内投与したラット5腹より出産し、生存した仔39例より成り、KM群は、薬物として kanamycin sulfate 200 mg/kg を投与したラット5腹より出産し、生存した仔36例より成る。また DHSM群は、dihydrostreptomycin sulfate 200 mg/kg を投与したラッ

Fig. 1 Auditory threshold in each of the offspring from naive pregnant rats. α : number of mother rat, β : number of offspring measured, γ : total number of litter (live born).

Fig. 2 Auditory threshold in each of the offspring from pregnant rats treated with saline i.m. from the 10th to the 19th day of pregnancy. α , β , γ : see the legend of Fig. 1.

ト4腹より出産し、生存した仔31例より成り、NM群は、neomycin sulfate 100 mg/kgを投与したラット4腹より出産し、生存した仔27例より成る。なお、NM群では、受胎、出産には影響が認められないが、100 mg/kgの投与量でも出産後仔を育てない母ラットが、15例中11例もあった。KMおよびDHSM群では、その様な母ラットの異常行動は認められなかった。

S群では、39例のうち36例について聴覚閾値を測定することが可能であり、得られた聴覚閾値は47~60 dBの範囲内にあり、N群とほぼ同様の結果であった (Fig. 2)。

Fig. 3 Auditory threshold in each of the offspring from pregnant rats treated with 200 mg/kg kanamycin sulfate i.m., from the 10th to the 19th day of pregnancy. α , β , γ : see the legend of Fig. 1.

KM群では、36例中34例の聴覚閾値の測定が可能であった。その結果、ラットKM-1の仔で2例 (d, g), KM-2の仔で2例 (d, e), KM-4の仔で4例 (d, f, g, h) に70 dB以上の高い聴覚閾値が認められた。KM-5の仔については53~63 dBの聴覚閾値を示し、S群と比較してほとんど変化はみられなかった (Fig. 3)。また、DHSM群では、31例中29例の聴覚閾値の測定が可能であり、1腹の仔の間でも聴覚閾値にかなりの個体差が見られた。聴覚障害の発現については、70 dB以上の聴覚閾値を示したものが、DHSM-1の仔で2例 (e, i), DHSM-2の仔で1例 (c) と3例しか認められず、聴覚障害の程度はKM群に比べて小さかった (Fig. 4)。一方、NM群では、27例中24例の聴覚閾値が測定可能であり、NM-1の仔で3例 (e, h, i), NM-2の仔で1例 (c), 計4例が70 dB以上の聴覚閾値を示した (Fig. 5)。

なお、聴覚閾値測定不能なラットは、光に対する条件回避反応も基準値70%を越えないラットで全群ではなかった。

以上のようにして得られたラットの仔1例ずつの聴覚閾値を各群に分けてプロットし、Fig. 6に要約した。聴覚閾値の分布は、S群では50 dBから60 dBの範囲内に集中しているのに対し、KM群、DHSM群およびNM群では、その分布が高い聴覚閾値の側へ広がりを示した。各群ごとの聴覚閾値の平均値をTable 1に示した。S群では 53.8 ± 0.6 dB, KM群では 63.8 ± 1.1 dB ($t=8.50$, $P<0.001$), DHSM群では 60.0 ± 1.2 dB ($t=$

Fig. 4 Auditory threshold in each of the offspring from pregnant rats treated with 200 mg/kg dihydrostreptomycin sulfate i.m., from the 10th to the 19th day of pregnancy.

α , β , γ : see the legend of Fig. 1.

4.95, $P < 0.001$), また, NM 群では 62.4 ± 1.2 dB ($t = 7.19$, $P < 0.001$) を示し, 薬物群の聴覚閾値は S 群と比較して, いずれも有意に上昇した。

2. 母ラットへのアミノ配糖体系抗生物質投与による仔ラットの体重, 学習機能に対する影響

Table 2 に示した様に, 生後 60 日目における各群の体重の平均値は, S 群では 103.2 ± 7.3 g, KM 群では 109.4 ± 6.2 g, DHSM 群では 109.7 ± 6.4 g また, NM 群では 98.9 ± 3.2 g でありまったく差は認められなかった。

また, 薬物による学習過程への影響を調べるため, 各群ごとに訓練開始から, 本実験スケジュールで定めた回避学習基準, 音刺激に対して 80 % 以上, 光刺激に対して 70 % 以上の回避率に達するまでのセッション数 (1 セッション = 40 試行) の平均値を求めた。S 群では 6.1 ± 0.3 セッション, KM 群では 5.7 ± 0.2 セッション, DHSM 群では 6.9 ± 0.3 セッション, また, NM 群では 6.0 ± 0.2 セッションであり, 回避学習の習得には有意な影響は認められなかった。

さらに, 実験方法の項で述べた様に, このスケジュールでは, 音刺激の他に視覚刺激を利用して条件行動を観察しているが, 視覚刺激に対する反応には変化が認められなかった。

3. 母ラットの聴覚閾値測定

薬物の母体に対する聴器毒性を検討するため, 母ラット 1 匹ずつについて妊娠前と妊娠後の聴覚閾値を測定し, 比較した (Fig. 7)。

妊娠前と妊娠後の聴覚閾値については, ラット KM-2 および DHSM-1 で妊娠後 4 dB 程度の聴覚閾値の上昇がみられたが, 著明な変化は認められなかった。

Fig. 5 Auditory threshold in each of the offspring from pregnant rats treated with 100 mg/kg neomycin sulfate i.m., from the 10th to the 19th day of pregnancy.
 α , β , γ : see the legend of Fig. 1.

Fig. 6 Distribution of auditory thresholds in offspring from pregnant rats treated with aminoglycosides from the 10th to the 19th day of pregnancy. KM: 200 mg/kg kanamycin sulfate i.m. DHSM: 200 mg/kg dihydrostreptomycin sulfate i.m. NM: 100 mg/kg neomycin sulfate i.m.

Table 1 Changes of auditory thresholds in offspring from pregnant rats treated with aminoglycosides from the 10th to the 19th day of pregnancy

Treatment	Dose (mg/kg/day, 10 days)	Auditory threshold (dB±S.E.)	N
Saline	—	53.8±0.6	36
Kanamycin sulfate	200	63.8±1.1*	34
Dihydrostreptomycin sulfate	200	60.0±1.2*	29
Neomycin sulfate	100	62.4±1.2*	24

* $P<0.001$ vs the saline-treated group.**Table 2** Effects of prenatal administration of aminoglycosides on body weight and the acquisition rate of conditioned avoidance in the shuttle box method in the offspring

Treatment	Dose (mg/kg/day, 10 days)	Body weight (g)*	Number of session #	N
Saline	—	103.2±7.3	6.1±0.3	36
Kanamycin sulfate	200	109.4±6.2	5.7±0.2	34
Dihydrostreptomycin sulfate	200	109.7±6.4	6.9±0.3	29
Neomycin sulfate	100	98.9±3.2	6.0±0.2	24

* at the age of 60 days, # Rats can avoid an electric shock more than 80 or 70% of the time when a conditioned stimulus, tone or light is presented, if the rats are trained to avoid a shock during these number of sessions.

Fig. 7 Changes of auditory thresholds in mother rats treated with aminoglycosides from the 10th to the 19th day of pregnancy. □: before treatment, ■: after treatment.

考 察

聴器毒性を有する薬物として、アミノ配糖体系抗生物質がよく知られており、kanamycin, dihydrostreptomycin や neomycin などの投与により、聴覚障害が生じたという臨床例は多い²⁰⁾。また、アミノ配糖体系抗生物質は血液胎盤関門を容易に通過することが知られており^{1,2)}、たとえば kanamycin では、ヒトの場合において 30~50% が胎児へ移行するといわれており^{2,21,22)}、ラットにおいても 9~20% が胎仔へ移行するという報

告^{23,24)}がある。そのため、妊娠中にこれらの薬物を投与したことにより、出産した子供に聴覚障害が認められたという報告^{3,4)}もある。

したがって、薬物による聴覚障害を検査するために、いろいろな方法によって動物実験が試みられているが、特に妊娠中の薬物投与によって胎児に生じる聴覚障害を検査する方法では、出産後、短期間に多数の動物について実験を行なう必要があるために、組織学的検査法と耳介反射法以外に適当な方法がなかった。組織学的検査では、動物を殺さねばならず、その上、薬物による聴覚障害では、聴覚器の組織障害の程度と機能障害の程度は必ずしも一致しておらず、機能検査を重視する必要があると思われる。機能検査法としては耳介反射法があげられるが、この方法は非常に簡便である反面、動物が刺激音に対し慣れを生じ易くまた、一定音圧以下の音では、聞こえていても耳介反射が起らず、正確な聴覚閾値を求めることが困難であり、反応が不明瞭なため実験結果に客観性を欠く危険がある。

そこで著者は、以前行なった shuttle box による条件回避反応を利用したラットの聴覚閾値測定法⁸⁻¹⁰⁾が、妊娠中の薬物投与によって胎児に生じる聴覚障害を検出するのに利用できるのではないかと考え実験を試みた。

この shuttle box を用いた聴覚閾値測定法では、陽性強化などのレバー押しを利用したオペラント条件づけによる方法¹¹⁻¹⁷⁾に比べて、測定時間が比較的短かく、訓練および実験操作が簡単なため、実験に多数の動物を供給できる特徴を持っている。

今回の実験においては、さらに多数の動物について聴覚閾値の測定が可能となるように、実験方法を一部変更した。前回の実験で聴覚閾値の測定に使用できなかったラットの大半は、実験中にハードルに登ることが原因であった。それゆえ、今回の実験では、訓練中および聴覚閾値測定中にラットがハードルに触れると、60 V A.C. の電気ショックが与えられるように、ハードルを改造した。つぎに、訓練中の光刺激に対する回避率の基準を 80 % から 70 % に引き下げた。今回の実験においても前回と同様、すべてのラットについて音刺激の回避率に比べ、光刺激の回避率の方が低い結果が得られた。この現象は、ラットが光刺激よりも音刺激に注意²⁵⁾する性質により生じるためであると考えられ、光刺激の回避率が多少悪くても、音刺激の回避率が 80 % 以上に達していれば、聴覚閾値の測定にはほとんど影響しないと思われるので、光刺激の回避率の学習基準を 80 % から 70 % に引き下げ、光刺激に対する回避率の低いラットについても聴覚閾値の測定を行なった。また、音刺激の周波数については、アミノ配糖体系抗生物質によって生じる聴覚障害が、主に高周波数音域から始まるという報告^{26,27)}があるので、音刺激は前回使用した 3 kHz よりも高周波である 10 kHz の音を用いて実験を行なった。

仔ラットの聴覚閾値の測定は、出産後できる限り早い時期に行ないたかったが、本実験に使用した shuttle box はその構造上から、体重 100 g 以下の動物では、回避してもグリッドの傾きに連動しているマイクロスイッチが正常に働かない場合がある。そのため、アミノ配糖体系抗生物質によって生じる聴覚障害は非可逆であること²⁷⁾を考慮して、仔の訓練は、体重が 100 g を超える生後約 60 日目から開始し、聴覚閾値の測定は、生後約 90 日目から 110 日目の間に行なった。なお、近年マウス用の shuttle box が開発されているので、これを利用すれば若い仔ラットの聴覚閾値の測定が可能となろう。

本実験スケジュールにより出産したラットの仔の何%について聴覚閾値の測定が可能であるかを調べたところ、妊娠期間中未処置のラット 5 腹より出産した N 群の仔 32 例中 30 例について聴覚閾値を得ることが可能であった。実験方法を一部変更したことによる聴覚閾値測定への弊害は特に認められず、逆にハードルを改造したことにより、ラットは必ずハードルを飛び越えるため、回避反応が明瞭となった。また、すべてのラットにおいてハードルから離れた位置で条件刺激を受けるとる傾向がみられ、これにより音源からのラットの耳の位置が各個体間ではば一定となり、位置の違いによって生じる測定誤差は減少したと思われる。

出産し、生存した N 群の仔の 90 % 以上について聴覚閾値の測定が可能であったので、つぎに薬物投与による実験を試みた。薬物は kanamycin sulfate, dihydrostreptomycin sulfate および neomycin sulfate を用い、臨床常用量の約 5 倍に相当する用量を使用した。投与日数については、耳介反射法を用いた実験では妊娠後半期の dihydrostreptomycin 投与による仔ラットの聴覚障害の発生率は、前半期投与に比べて高いという報告⁶⁾があり、薬物の妊卵着床に及ぼす影響、およびラットでは妊娠の後期に聴覚器が形成されることを考慮して、妊娠 10 日目から 19 日目までの 10 日間とした。

生理食塩液を投与したS群, kanamycin を投与したKM 群, dihydrostreptomycin を投与した DHSM 群および neomycin を投与した NM 群において, それぞれ出産し, 生存した約 90 %の仔の聴覚閾値を得ることが可能であった。なお, 約 10 %の動物について聴覚閾値を得ることができなかったが, これは, これらの動物は条件回避反応を習得できず, 光刺激に対しても回避率が 70 %以下の個体で, 全聾のためではない。KM 群, DHSM 群および NM 群ではS群よりも有意な聴覚閾値の上昇が認められ, 本実験スケジュールにより胎仔期に受けた聴覚障害を検出することが可能であった。KM 群, DHSM 群および NM 群については 70 dB 以上の高い聴覚閾値を示した仔ラットの出現率を求めたところ, KM 群では 24 % (34 例中 8 例), DHSM 群では 10 % (29 例中 3 例), NM 群では 17 % (24 例中 4 例) であり, KM 群の方が障害を受けた比率は高く, 藤森⁷⁾らの耳介反射による報告と類似していた。なお, 篠崎は, DHSM 50~500 mg/kg を胎生期のラットに連続投与し, 30 日令の仔ラットについて病理組織学的検索を行なっている⁶⁾。DHSM はコルチ氏器には影響を与えなかったが, 用量依存的に前庭階および鼓室階に雲架状物質を出現すること, ならびに前庭膜を外方へ挙上していること, さらに中耳のあぶみ骨周辺に雲架状物質を認め, 聴覚障害との関係を論じている。また, 堤はモルモットを使用し, 妊娠後, 1 週目より 200 mg/kg の SM を連日 30 日間筋注して得た新生仔の病理組織学的検索を行ない, コルチ氏器, 螺旋神経節に親と同じ変化を認め, しかも仔の方が病変部位が広範囲に及ぶことを報告している²⁸⁾。しかし, われわれの実験では, 用量が少なく期間も短かったためか, 組織学的には, コルチ氏器も螺旋神経節にも異常を認めなかった。このことから, この方法を用いれば, 組織学的に顕著な影響が出ていない段階での聴覚機能障害の検出も可能と思われる。

一方, SM は, 蝸牛系に対する障害より前庭系または平衡感覚器に対する障害の方が強いといわれているが, 今回の実験から, よろめき歩行やハードルを躍り越す行動の異常などは観察されなかった。

妊娠中の薬物処置により, 出産したラットの仔の学習行動に影響があるという報告²⁹⁾がある。そこで本実験でも出産し, 生存したラットの仔のすべてについて, 各群ごとに実験方法で定めた回避学習基準, 音刺激に対して 80 %以上, 光刺激に対して 70 %以上の回避率に達するまでのセッション数を求め比較検討した。しかし, アミノ配糖体系抗生物質が, 学習行動に影響を及ぼすという報告はなく, 今回の結果においても, S群と薬物群との間に著明な変化は認められなかった。

臨床例においては, 妊娠中にアミノ配糖体系抗生物質を投与した場合, 出産した子供より母親自身に聴覚障害が認められる例が多いという報告³⁰⁾があるため, 母ラットについて妊娠前と妊娠後の聴覚閾値を測定した。その結果, 各群のどのラットにおいても, 両者の間にはほとんど変化はみられなかった。今回の実験では, 投与量および投与日数が少なかったため, 母体への影響を調べるには, さらに投与量および投与日数を多くして実験を行なう必要があると思われる。

本実験スケジュールを用いて, 妊娠中に kanamycin, dihydrostreptomycin および neomycin を投与したラットから出産し, 生存した仔の 90 %以上について聴覚閾値を測定することができ, 薬物による胎仔聴器毒性を検出することが可能であった。本実験スケジュールでは, 訓練が必要なため, 耳介反射法のように, 離乳後ただちに実験を行なうことが不可能である。しかし, 訓練から聴覚閾測定までの過程において聴器毒性以外の胎仔毒性, 例えば学習障害, 運動機能障害, 視覚障害などについても同時に検査できる可能性があり, 実験スケジュールを改良することにより, 今後, 母体に薬物を投与した場合に次世代の機能にどのような影響がみられるかを検討するための多面的な胎仔毒性のスクリーニング法として, 非常に有用な方法になると思われる。

謝辞: 仔および母ラットの聴覚器に対するアミノ配糖体系抗生物質の影響について病理組織学的検索をして下さいました日本バイオリサーチセンター山口和政氏に深謝致します。

文 献

- 1) SERENI, F. AND PRINCIPI, N.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **8**, 453 (1968)
- 2) GOOD, R. G. AND JOHNSON, G. H.: *Obstet. Gynecol.* **38**, 60 (1971)
- 3) CONWAY, N. AND BIRT, B. D.: *Br. Med. J.* **2**, 260 (1965)
- 4) RASMUSSEN, F.: *Scand. J. Resp. Dis.* **50**, 61 (1969)
- 5) 渋川 登, 篠崎 輝男: 最新医学 **20**, 615 (1967)
- 6) 篠崎 輝男: 産婦進歩 **19**, 133 (1967)
- 7) 藤森 速水: 日本医師会雑誌 **58**, 1448 (1967)
- 8) 亀山 勉: 月刊薬事 **21**, 176 (1979)
- 9) 亀山 勉, 鍋島 俊隆, 伊藤 治朗: 日薬理誌 **77**, 15 (1981)
- 10) 亀山 勉: 薬物と感覚障害, 中島 章, 秋吉正豊編, p. 117, ソフトサイエンス社, 東京 (1980)
- 11) GOUREVITCH, G., HACK, M. H. AND HAWKING, J. E. JR.: *Science* **131**, 1046 (1960)
- 12) HEFFNER, R., HEFFNER, H. AND MASTERTON, B.: *J. Acoust. Soc. Am.* **49**, 1888 (1971)
- 13) HARPER, E. S. AND D'ARCY, P. E.: *Japan. J. Pharmacol.* **27**, 907 (1975)
- 14) KAMEYAMA, T., SHIGEHISA, T. AND NABESHIMA, T.: *Japan. J. Pharmacol.* **25**, 784 (1975)
- 15) KAMEYAMA, T., SHIGEHISA, T. AND NABESHIMA, T.: *Psychopharmacology* **48**, 199 (1976)
- 16) CHIBA, S. AND ANDO, K.: *Japan. J. Pharmacol.* **26**, 419 (1976)
- 17) 亀山 勉, 鍋島 俊隆, 高橋 和幸: 日薬理誌 **74**, 426 (1978)
- 18) KAMEYAMA, T. AND NABESHIMA, T.: *Neuropharmacology* **17**, 249 (1978)
- 19) 大山 正: 感覚+知覚心理学ハンドブック, 和田陽平, 大山 正, 今井省吾編, p. 39, 誠信書房, 東京 (1969)
- 20) 秋吉 正豊: 最新医学 **32**, 1540 (1977)
- 21) 黒川 徹男: 日産婦誌 **19**, 203 (1967)
- 22) McCracken, G. H. JR.: *Am. J. Dis. Child.* **128**, 407 (1974)
- 23) 森 操七郎: 日本産婦人科学会雑誌 **23**, 547 (1971)
- 24) 谷村 孝: 小児科診療 **38**, 45 (1975)
- 25) REYNOLDS, G. S.: オペラント心理学入門, 浅野俊夫訳, p. 49, サイエンス社, 東京 (1978)
- 26) STEBBINS, W. C. AND RUDY, M. C.: *Environmental Health Perspectives* **26**, 43 (1978)
- 27) 秋吉 正豊: 聴覚障害—基礎と臨床—, 秋吉正豊, 水越治編, p. 390, 朝倉書店, 東京 (1978)
- 28) 堤 昌己: 耳鼻展望, 補2, **159**, 175 (1960)
- 29) HUTCHINGS, D. E., TOWEY, J. P., GORINSON, H. S. AND HUNT, H. F.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 106 (1979)

Abstract—Tsutomu KAMEYAMA, Toshitaka NABESHIMA and Jiroh ITOH (Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University, Nagoya 468, Japan). Measurement of an auditory impairment induced by prenatal administration of aminoglycosides using a shuttle box method. *Folia pharmacol. japon.* **80**, 525~535 (1982)

To study the auditory impairment induced by prenatal administration of aminoglycosides in the offspring, the shuttle box method to measure the auditory threshold of rats (Kameyama et al., *Folia pharmacol. japon.* **77**, 15, 1981) was employed. Four groups of pregnant rats were administered 200 mg/kg kanamycin sulfate (KM), 200 mg/kg dihydrostreptomycin sulfate (DHSM), 100 mg/kg neomycin sulfate (NM), or 1 ml/kg saline intramuscularly from the 10th to the 19th day of pregnancy. The auditory threshold of the offspring could be measured by the shuttle box method in about 90% of the live born rats at the age of 100 days. The auditory thresholds of the groups were as follows (mean $\pm$ S.E.): saline group, 53.8 ± 0.6 dB ($N=36$); KM group, 63.8 ± 1.1 dB ($N=34$); DHSM group, 60.0 ± 1.2 dB ($N=29$); NM group, 62.4 ± 1.2 dB ($N=24$). Auditory thresholds of drug-treated groups were significantly higher than that of the saline group. However, no increase in the auditory threshold of the mother rat was detected after treatment with aminoglycosides. In addition, the experimental procedure of the shuttle box method is very easy, and the auditory threshold of a large number of rats could be measured in a short period. These findings suggest that this method is a very useful one for screening for auditory impairment induced by prenatal drug treatment in rat offspring.