THE POSSIBLE EFFECTS OF VARIOUS OTOTOXIC DRUGS UPON THE ATP-HYDROLYZING SYSTEM IN THE STRIA VASCULARIS AND SPIRAL LIGAMENT OF THE GUINEA PIGS

By

TOSHITAKA IINUMA, M.D.

*From the Department of Otorhinolaryngology, Tokyo University, School of Medicine,
Bunkyo-ku, Tokyo, Japan. (Director. Prof. Ichiro Kirikae)*

The present report is concerned with the possible effects of various ototoxic drugs upon the enzymatic ATP-hydrolyzing system in the stria vascularis and spiral ligament of the guinea pigs which were intoxicated with these drugs by parenteral administration. The membrane ATPase, which is said to be closely related with the active transport of both sodium and potassium across the

biological membranes, showed a decrease in comparison to the normal cases, whereas the ouabain-insensitive component showed an increase. The ATP-hydrolyzing system as a whole did not yield any common results.

The vestibular portion of the membranous labyrinth showed rather bizzare picture, so that no generalization of the changes was possible.

耳中毒性薬物のモルモット血管条および螺旋靱帯の ATP 水解系に対する影響について

東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室，大学院学生（主任 切替一郎教授）

飯 沼 寿 孝
い い ぬ ま と し た か

目 次

1. 緒 論

2. 方 法

1) 動物準備法

2) 組織準備法

3) 試 薬

4) 酵素活性度測定法

5) 乾燥重量測定法

3. 結 果

1) 正常動物における酵素活性分布

2) カナマイシン中毒例の酵素活性分布

3) ストレプトマイシン中毒例の酵素活性分布

4) デハイドロストレプトマイシン中毒例の酵素活性分布

5) 結果のまとめ

4. 検 討

1) 耳中毒性薬物の体内分布について

2) 耳中毒性薬物の作用機序について

3) ATP 水解系への影響について

5) ま と め

1. 緒 論

1944年 Wachsman がストレプトマイシンを発見して以来，化学治療法分野において大きな進歩もたらされ，感染症，特に結核の治療法は躍進的变化をとげた。

以来，様々の *Streptomyces* 属のものが，臨床的に有効な抗生物質を産することがわかり，デハイドロストレプトマイシン，カナマイシンなどがその群に加わった。間もなく，これらの薬物は副作用もあることが判明した。

我々の分野で注目されたのは耳中毒性である。この問題に関しては多くの出版がなされ，基礎部門，臨床部門において充分の検討が進んだ。Berg (1), Lindsay 他

2), Tyberghein³⁾, Wersäll 他⁴⁾などの文献に優れた概論が見出される。

耳中毒性薬物に関する研究の大部分は主に感覚上皮系、即ち、コルチ氏器管および前庭上皮系に関するものであるが、膜迷路のその他の部分に関するものも存在する。

血管条における種々な退行変化も数多くの文献に報告された (Rüedi⁵⁾, Riskaer 他⁶⁾, 中村⁷⁾, Lindsay 他⁸⁾。

これより先 (飯沼⁸⁾) 正常モルモットの血管条と螺旋帯の Adenosine Triphosphatase (ATPase) につき詳細な報告がなされた。

今回の報告は耳中毒性薬物が ATP 水解系に及ぼし得る変化についてなされる。

2. 方 法

1) 動物準備法

正常耳介反射を有する大人モルモットを使用した。耳中毒性薬物は、ストレプトマイシン、デハイドロストレプトマイシン、カナマイシンであつて、腹腔内注射法がとられた。以上の薬物の Sulfates が 400mg/kg で毎日注射された (但し土曜、日曜を除く)。20日間をもつて注射期間とした。各薬物につき20匹が使用された。

注射期間中、約15%の動物が死亡した。注射終了後3日以内に動物は使用された。

2) 組織準備法

前出。(飯沼⁸⁾) 参照。

3) 試 薬

カナマイシン (有効量 770micrograms/mg) は Bristol Laboratories より供給された。ストレプトマイシン (有効量 700micrograms/mg 以上)、デハイドロストレプトマイシン (有効量 740micrograms/mg 以上) は Nutritional Biochemicals Corp. より購入された。ATP は Sigma Chemical Co. より購入された。Ouabain は Mann Research Laboratories より購入された。他の共通試薬は Reagent Grade で、すべてガラス再蒸留水をもつて準備された。

4) 酵素活性度測定法

詳しくは文献 (飯沼⁸⁾) 参照。ATP より酵素的遊離を受けた無機リン酸は Fiske-Subba Row 法 (Fiske 他⁹⁾) の変法により測定された。

5) 乾燥重量測定法

詳しくは文献⁸⁾参照。Helix, Quartz Balance (Microchemical Specialities Co.) が用いられた。

3. 結 果

1) 正常動物における酵素活性分布

図—1には酵素的 ATP 水解系の種々な成分の膜迷路における分布が示してある。

図 1 正常モルモット膜迷路における
活 性 度 分 布

Temp. 37°C. pH7.5, Na 25mM. K 140mM.
Mg 2.5mM. Tris 20mM. ATP 2.5mM.

縦線は標準偏差を示す。各点は側頭骨12箇の測定値の平均を示す

Ap. は Apex, 4th T. は第4廻転, 3rd T. は第3廻転, 2nd T. は第2廻転, 1st T. は第1廻転, Av. は 1st T. を除く。以上の平均値である。

Mac. utr. は Macula utriculi, Amp. は Ampulla semicanalis, Wall utr. は Utriculus の壁を各々指す。

ATP 水解系全体としての活性度は第1廻転から Apex に行くに従つて高くなる。このことは Ouabain で影響を受けぬ成分についてもいえる。膜 ATPase に関しては、第3廻転の活性度が低いため、廻転に従つての活性度分布は明らかではない。この第3廻転の活性度に関して今の所、何の説明もつかない。前庭系膜迷路の活性も参照まで図示されてある。蝸牛系と異なつて、種々雑多な組織を含むものであるため、両者の比較は制限を受ける。

2) カナマイシン中毒例の活性分布

図—2はカナマイシン慢性中毒例である。ATP 水解系全体としてはやはり第1廻転から Apex に活性度がたかまる傾向をみるが、正常の値に対して一般に活性度は増加傾向を示す。このことは Ouabain に影響されない成分についても、第3廻転を除き、いえることであ

図 2 カナマイシン慢性中毒モルモットの
膜迷路における活性度分布

測定条件その他は図 1 参照。

る。

膜 ATPase は第 3 廻転を除き、正常に比較して減少の傾向がみられる。

前庭系膜迷路では、ATP 水解系全体としての活性度および膜 ATPase は増加傾向を示すに反し、Ouabain で影響されない部分は正常に比較して減少傾向を示す。

3) ストレプトマイシン中毒例の活性分布

図—3 はストレプトマイシン慢性中毒例の活性度分布を示す。ATP 水解系全体としての活性度及び Ouabain に影響されない成分の活性度は、第 1 廻転から Apex の順に増加を示すのは正常のものと同じである。また、活性度は正常よりは増加の傾向を示す。膜 ATPase は第 3 廻転を除き、正常値に比較して減少傾向を示す。

図 3 ストレプトマイシン慢性中毒モルモットの
膜迷路における活性度分布

測定条件、その他は図 1 参照。

前庭系膜迷路は変化が雑多であつて、一般的傾向は示し難い。

4) デハイドロストレプトマイシン中毒例の活性分布

図—4 はデハイドロストレプトマイシン慢性中毒例の活性度分布を示す。ATP 水解系全体および Ouabain で影響を受けぬ成分の活性度が第 1 廻転から Apex の順に増加をするのは正常例と同じである。但し、ATP 水解系全体と膜 ATPase の活性度は正常例に比較して、減少傾向を示す。

図 4 デハイドロストレプトマイシン慢性中毒
モルモットの膜迷路における活性度分布

測定条件、その他は図 1 参照。

Ouabain で影響を受けぬ成分は増加傾向を示す。前庭系膜迷路では、すべての成分が減少傾向を示す。但し Utriculus の壁は除く。

5) 結果のまとめ

表—1 は今回の報告の一覧表である。

血管条と螺旋帯においては、ATP 水解系全体としての活性度は、カナマイシンとストレプトマイシンの場合に正常に比して増加の傾向を示すが、デハイドロストレプトマイシンでは減少の傾向がある。Ouabain に影響されない成分の活性度は共通して増加傾向を示す。膜 ATPase は共通して減少傾向を示す。前庭系膜迷路では Ouabain に影響を受けぬ成分のみが共通して減少傾向を示すが、他の成分は結果が雑多で一般論が不可能である。

4. 検 討

1) 耳中毒性薬物の体内分布について

ストレプトマイシン、デハイドロストレプトマイシン、カナマイシンの体内分布、吸収および排泄は大体に

表 1 耳中毒性薬物の影響のまとめ

	ap. 4th T.	3rd T.	2nd T.	1st T.	Av.	Mac. utr.	Amp.	Wall- utr
KM	1 0	++	+	+	++	++	++	+
	2 ++	—	++	++	++	—	0	—
	3 —	++	—	—	—	++	++	++
SM	1 —	++	0	0	++	—	+	—
	2 ++	+	++	0	++	—	0	++
	3 —	+	—	0	—	0	+	—
D H S M	1 —	—	—	—	—	—	—	++
	2 +	0	++	+	0	—	—	—
	3 —	—	—	—	—	—	—	++

1. Total ATP-hydrolysis
2. OUABAIN insensitive comp.
3. OUABAIN sensitive comp. =
Membrane ATPase

++：正常値に対して 0.5 以上の活性度の増加。

＋：0.2—0.5 の間の活性度増加。

0：正常値との差の絶対値が 0.2 より少い。

—：0.2—0.5 の間の活性度減少。

—：0.5 以上の活性度減少。

測定条件，その他は図 1 参照。

おいて同じであるという (Buggs 他¹⁰⁾, Marshall¹¹⁾, Levin, 他¹²⁾, Rake 他¹³⁾, Cronk, 他¹⁴⁾). ストレプトマイシンの場合には，体積分布がほぼ全体の 30% であつて，これは細胞外液に分布することを思わせる (Marshall¹¹⁾).

ストレプトマイシンは，また，細胞壁内には入らない Robson, 他¹⁵⁾). ストレプトマイシン，デハイドロストレプトマイシンはともに脳脊髄液には移行がわるい (Levin 他¹²⁾). カナマイシンの移行は相当量みられる (Tisch 他¹⁶⁾).

選択的耳中毒性の説明の試みとして，内リンパ液には濃縮された状態でこれらの薬物が分布されるのではないかという想像がある (Wersäll 他⁴⁾, Duvall, 他¹⁷⁾). 但し，内耳液内におけるこれら薬物の濃度を直接に測定した研究によれば (Voldrich¹⁸⁾)，薬物の移行は極めて緩徐で，しかも最高の濃度は血漿のそれに比較して 1% 見当であるという。これらの事実から，濃度ではなくで，薬物の排出速度がむしろ耳中毒性に関連するのではないかという。一方，Stupp 他²⁰⁾によれば，カナマイシンは内耳液において血中濃度より相当に高濃度に存在するという。いずれにしても内耳液においては，他の細

胞外液とは異なる分布を考えるのが，濃度説，接触時間説に共通する見方であるようである。それならば何故に膜迷路のむしろ特定した箇所が侵されるかに関しては説明がない。

2) 耳中毒性薬物の作用機序について

抗生物質の作用機序を比較検討することにより，若し耳中毒性の問題が解明され得るとしたら，非常に有益であろう。この場合，比較検討とは，微生物に対する作用機序のことを指し，高等動物間の比較ではない。

Duvall 他¹⁷⁾は，慎重な検討と共に，内耳の細胞と細菌との間には，薬物の作用機序に共通点があることを想定し，耳中毒性を説明しようと試みている。

同時に，このような比較検討にまつわる困難さには次の事実がある。即ち，第 1 に，異なる種属のデーター分析は解釈が困難な場合が多く，第 2 に異なる種属のデーターが他のものに適応できるとは限らないからである。このような事情に留意した上で，主に生化学の見地から微生物の場合に見られる抗生物質の作用機序につき概略をのべる。

ストレプトマイシンは他のものに比べて広範囲に研究されて，データーも豊富であるので，主にストレプトマイシンにつきのべる事になる。他のデハイドロストレプトマイシンやカナマイシンの作用機序も，完全な証明やデーターは欠くが，多分同じであろうといわれる (Feingold¹⁹⁾).

他の多くの抗生物質の場合にみられるごとく，ストレプトマイシンもまた，活動的に分割を続けている微生物に最も効果が強く，休止期のものには比較的作用が弱い (Robson 他¹⁵⁾). ストレプトマイシンは，多くの研究がなされたのにもかかわらず，種々の型式の作用機序が仮定され，現在にいたるまで，主な作用，殊に感受性のある微生物への抑制が何であるか解つていないという (Gale²⁰⁾). 一般的に，ストレプトマイシンの作用機序は細胞膜（但し，これは硬い細胞壁の内側の柔い細胞膜 (Plasma Membrane) を指す) に対するものと，蛋白合成に対するものとに分けられるようである。大腸菌などの場合，カリウムの流出増加が最も初期の生化学的変化であるという (Dubin, 他²¹⁾).

微生物と内耳細胞間の形態学的および生化学的比較研究については，殆んど知られていないため，少なくとも現在の時点では，微生物の研究から得た結果を類似的に内耳にもたらすのは，余りにも仮定の段階が多すぎるものと思われる。

3) ATP 水解系への影響について

ATPase の局在 に関する 組織化学染色法によれば、形質膜がその部位であつて、しかも能動輸送の活潑な部位、例えば腸粘膜上皮の Microvilli、腎糸球体の上皮細胞などに発見されるという (Ashworth, 他²²⁾, Spater 他²³⁾, McClurkin²⁴⁾). モルモットの血管条の電子顕微鏡の所見によれば、中井²⁵⁾は Endoplasmic reticulum に ATPase を認めた。但し ATPase は Cristae mitochondrialis にも認められる (Ashworth 他²²⁾).

今回の報告では、血管条および螺旋帯の単一廻転が ATPase の活性度測定に まるごと用いてある。この組織片は均一ではなく、これをもつて ATPase の局在は云々できない。但し前回の報告 (飯沼⁸⁾) によれば、ミトコンドリアより由来する ATPase 活性を抑制する濃度の Oligomycin は、現在の測定条件下では ATPase に影響がみられなかつた。このことから、現在用いてある組織片から測定された ATPase の活性度は、恐らくミトコンドリア以外の細胞成分に由来すると思われ、先の電子顕微鏡所見を考慮に入れるとき、恐らく主に細胞の膜成分に由来するものと思われる。

今回の耳中毒性薬物を用いての慢性中毒実験では、正常のモルモットに比較して、ATP 水解系に変化が認められた。

Ouabain を用いての実験で ATP 水解系は種々な成分に分割できるが、そのなかには機能のわかつたものも解らないものもある。

膜 ATPase は生物学的膜を通してのカリウムとナトリウムの能動輸送に密接な関連があるといわれてきた (Judah, 他²⁶⁾, Whittam²⁷⁾, Skou²⁸⁾). 耳中毒性薬物の慢性実験の結果によれば、膜 ATPase の活性は、血管条と螺旋帯において、正常の例に比較して減少している。しかし今回の研究からは、これが内耳に限定した変化か全身的なものかは結論できない。

3. ま と め

今回の報告は、種々な耳中毒性薬物の慢性中毒に際し、モルモットの血管条と螺旋帯における酵素的 ATP 水解系の変化を観察した。

生物学的膜を通してカリウムおよびナトリウムの能動輸送に密接な関係を有するといわれる膜 ATPase は正常に比し減少傾向を示した。その機能が明らかでない Ouabain に影響されない成分は増加傾向を示した。

ATP 水解系全体としては、一般的傾向は顕著ではなかつた。

前庭系膜迷路は、薬物により変化が様々で観察結果に共通な傾向は見出せなかつた。

文 献

- 1) Berg.: The ototoxic effect of streptomycin on the vestibular and cochlear apparatus. *Acta otolaryng.*, Supp., 172, 1951.
- 2) Lindsay, et al.: Histopathologic inner ear changes in deafness due to neomycin. *Laryngoscope*, 70; 382, 1960.
- 3) Tyberghein: Influence of streptomycin antibiotics on the cochlear microphonics in the guinea pig. *Acta otolaryng.*, Supp., 171, 1962.
- 4) Wersäll et al.: The vestibular sensory epithelia in the cat labyrinth and their reactions in chronic streptomycin intoxication. *Acta otolaryng.*, 54; 1962.
- 5) Rüedi: Some animal experimental findings on the function of the inner ear. *Ann. Otol.*, 60; 993, 1951.
- 6) Riskaer et al.: The ototoxicity of neomycin. *Acta otolaryng.*, 46; 137, 1956.
- 7) Nakamura: Electrophysiological and cytochemical study of the ototoxicity of dihydrostreptomycin. *Ann. Otol.*, 66; 1080, 1957.
- 8) Inuma: Evaluation of adenosine triphosphatase activity in the stria vascularis and spiral ligament of the normal guinea pig. *日耳鼻*, 69; 9867~9875, 1966.
- 9) Fiske et al.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66; 375, 1925.
- 10) Buggs et al.: The absorption, distribution and excretion of streptomycin in man. *J. Clin. Inv.*, 25; 94, 1946.
- 11) Marshall: The absorption, distribution and excretion of streptomycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 92; 43, 1948.
- 12) Levin et al.: The distribution of dihydrostreptomycin in various body fluids. *Amer. Rev. Tuberc.*, 58; 531, 1948.
- 13) Rake et al.: Further studies on the dihydrostreptomycin. *Amer. Rev. Tuberc.*, 58; 479, 1948.
- 14) Cronk et al.: The absorption and excretion of kanamycin in human beings. *J. Lab. Clin. Med.*, 53; 888, 1959.
- 15) Robson et al.: Antituberculous drugs. *Pharmacol. Rev.*, 15; 169, 1963.
- 16) Tisch et al.: Pharmacological studies with kanamycin. *Ann. New York Acad. Sc.*, 76; 44, 1959.
- 17) Duvall et al.: Site of action of streptomycin upon inner ear sensory cells. *Acta otolaryng.*, 57; 581, 1964.

- 18) *Voldrich*: The kinetics of streptomycin, kanamycin and neomycin in the inner ear, *Acta otolaryng.*, 60; 243, 1965. 19) *Feingold*: Antimicrobial chemotherapeutic agents: the nature of their action and selective toxicity. *New England J.*, 269; 900, 1963. 20) *Gale*: Mechanisms of antibiotic actions. *Pharmacol. Rev.*, 15; 481, 1963. 21) *Dubin et al.*: The sequence of some effects of streptomycin in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 74; 476, 1963. 22) *Ashworth et al.*: The fine structural localization of adenosine triphosphatase in the small intestine, kidney and liver of the rat. *J. Cell. Biol.*, 17; 1, 1963. 23) *Spator et al.*: Adenosine triphosphatase activity in the cell membranes of kidney tubulus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4; 765, 1958. 24) *McClurkin*: A method for the cytochemical demonstration of sodium-activated adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, 12; 654, 1964. 25) *Nakai*: Histochemistry of the stria vascularis in the inner ear by electron microscopy. *Ann. Otol.*, 74; 326, 1965. 26) *Judah et al.*: The biochemistry of sodium transport. *Biol. Rev.*, 39; 160, 1964. 27) *Whittam*: The interdependence of metabolism and active transport. "The cellular functions of membrane transport", Ed. Hoffman, J. F. Prentice-Hall Inc., New Jersey, 1964. 28) *Skou*: Enzymatic basis for active transport of Na and K across cell membrane. *Physiol. Rev.*, 45; 596, 1965. 29) *Stupp and Rauch*: Read at Deutscher HNO-Kongress, May, 1965.
-
- この実験は著者がニューヨーク大学医学部耳鼻咽喉科学教室にレジデントとして留学中になされた。J. F. Daly 教授および水越治客員教授の御鞭撻、御指導に感謝する。R. Gore 氏および A.M. Morrison 学士の協力に感謝する。
- 又、本論文を作成するにあたり、御支援を戴いた、切替一郎教授、野村恭也博士、星野知之医学士、石井大二医学士にも深く感謝する。
-
- (原稿到着＝昭和 41.4.20 日)