蝸牛窓膜の透過性と経蝸牛窓膜聴器毒性の実験的研究

東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：野村恭也教授）

原 田 勇 彦

EXPERIMENTAL STUDY ON THE PERMEABILITY AND OTOTOXICITY
ACROSS THE ROUND WINDOW MEMBRANE

TAKEHIKO HARADA, M.D.

Department of Otolaryngology, University of Tokyo School of Medicine, Tokyo

Permeability and ototoxicity across the round window membrane was studied in guinea pigs by applying neomycin directly to the round window membrane, and the following results were obtained.

- 1) Neomycin passed the round window membrane freely, and caused damage to the cochlea.
- 2) Damage of the cochlea was confined to the organ of Corti. In general, the damage was severest in the basal turn, and was observed more frequently in the outer hair cells.
- 3) In some cases, the severest damage was observed in the second turn.
- 4) When neomycin was applied to the round window membrane on both sides, the damage was often quite severe.
- 5) Damage was observed as early as 4 hours after application of neomycin, and it increased in frequency as the time of application became longer.
- 6) Damage was compared in normal ears and in ears with experimental otitis media with effusion, and no significant difference was observed. The result appeared to indicate that neomycin passed the round window membrane quite freely regardless of condition of the middle ear mucosa.
- 7) Analysis of the concentration of neomycin in the perilymph disclosed that neomycin on the round window membrane penetrated into the perilymph quickly, and that its concentration in the perilymph became extremely high, reaching a peak after 2 hours, and then decreased gradually.
- 8) No consistent relationship was observed between the concentration of neomycin in the perilymph and the presence or absence of the damage at each time interval of neomycin application.
- 9) Results of this study suggested probable existence of individual variations among guinea pigs.

Key words : 蝸牛窓膜, 透過性, 聴器毒性, ネオマイシン, 外リンパ

A 89-0559-23550

I 緒 言

ある種の薬剤が聴器毒として作用し聴覚前庭障害をおこすことは、すでに 19 世紀後半より知られていた。この薬剤の聴器毒性が臨床的に重要視されるようになったのはストレプトマイシンの出現による。以来、アミノ配糖体抗生物質はその強力な聴器毒性で臨床医の注目を浴びるようになった。

こうして現在では聴器毒性抗生物質はその全身投与に関してはかなり注意深く使用されるようになったが、一方でその局所使用に際しての聴器毒性が問題にされるようになった¹⁾。たとえば聴器毒性抗生物質を含有する点耳薬の局所使用により生じた難聴は点耳薬性難聴として知られている²⁾。この場合に薬剤が中耳から内耳に到達する経路としてはいくつかの可能性が

考えられるが、このうち蝸牛窓膜を透過する経路がもっとも重要視されている³⁾。

他方、中耳炎に合併して種々の程度の感音難聴や内耳障害がみられることがある⁴⁾。また、側頭骨標本の検索で中耳炎と内リンパ水腫の合併がみられることも少なくない⁵⁾。そしてこれら中耳炎と内耳病変の合併には蝸牛窓膜の関与が指摘されるようになった⁶⁾。

こうして蝸牛窓膜、とくにその透過性に関する関心が高まり、最近これに関するいくつかの研究報告がみられるようになった。今回、著者はネオマイシンを用いて蝸牛窓膜の透過性と経蝸牛窓膜聴器毒性に関する種々の実験を行い、いくつかの興味ある結果を得たのでここに報告する。実験は目的の異なる3つの部分よりなるので、以下にその各部について順に詳述する。

II ネオマイシンの経蝸牛窓膜聴器毒性に関する実験

1. 目的

ネオマイシンは強力な聴器毒性でよく知られたアミノ配糖体抗生物質で、とくに蝸牛に対する毒性が強いといわれている⁷⁾。ネオマイシン含有の点耳薬を局所使用することにより難聴が生じることもよく知られている²⁾³⁾。

本実験の目的は蝸牛窓膜上に留置したネオマイシンによる蝸牛障害を観察することにより蝸牛窓膜のネオマイシンに対する透過性を検討することにある。

2. 方法

プライエル反射正常のモルモット10匹を用いて実験を行った。ネンブタールで麻酔したモルモットの耳後部に皮膚切開を置き、耳胞を開放した。蝸牛窓膜を直視下に置き、小さく切ったゼルフォームの薄片を蒸留水にひたしてこれにネオマイシンの粉末5mgを吸着させ、蝸牛窓膜上に直接留置した。耳後部創は一時的に縫合閉鎖した。表1に示すように術後種々の日数を経た上でそれぞれのモルモットを断頭し、耳胞を採取した。これをただちに2.5%グルタルアルデヒドで固定、1%オスミック酸で後固定し、脱水後エボン812に包埋した。標本は蝸牛の各回転ごとに分割して、この断面より5 μ mの厚さの切片を作製し、スライドグラスにマウントしてトルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡下に蝸牛を観察した。

対照としては5匹のモルモットを用い、このうち1匹ではそのまま断頭して上記の方法で標本を作製し、残る4匹では蝸牛窓膜上に生食にひたしたゼルフォームの薄片を留置し、術後1-10日目に断頭して標本を

表1 ネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性
(1) 種々の留置期間における聴器毒性発現の有無

モルモット No.	ネオマイシンの 留置期間	蝸牛病変
1	1日	—
2	1	—
3	1	+
4	7	+
5	8	+
6	10	+
7	10	+
8	10	+
9	10	+
10	11	—

表2 ネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性
(2) 滲出性中耳炎耳と正常耳における比較

モルモット No.	蝸牛病変	
	中耳炎側	対照側
11	—	+
12	—	+
13	—	+
14	—	+
15	—	+
16	—	+
17	—	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	—
27	+	—
28	+	—
29	+	—
30	—	—

作製し、蝸牛を観察した。

図1 ネオマイシンによる蝸牛病変 (1)

モルモット No.5, 基底回転. ネオマイシン留置8日間. 外有毛細胞に変性, 消失がみられる. 内有毛細胞は残存している.

図2 ネオマイシンによる蝸牛病変 (2)

モルモット No.6, 基底回転. ネオマイシン留置10日間. らせん器は虚脱して内, 外有毛細胞が変性, 消失している.

3. 結果

標本作製方法の関係上, 蝸牛のみを観察した. 表1に示すように10匹中7匹のモルモットで蝸牛に病変が観察された. この病変はらせん器に局限しており, 内, 外有毛細胞の変性, 消失, あるいはらせん器の虚脱として観察された. 病変は術後1日目のモルモットの一部ですでに観察されたが, 11日目のモルモットではみられなかった. 術後8日目までにみられた病変は外有毛細胞の一部が変性, 消失しただけの軽度なものであったが(図1), 10日目にみられた病変は内, 外有毛細胞の変性, 消失と虚脱をとまう高度なものであった

(図2). 軽度の病変は基底回転, 第2回転のみにみられ, 高度の病変はさらに上方回転にまでみられたが, その程度は下方回転で高度で上方回転では軽度であるかあるいは正常であった. また内有毛細胞が消失している場合は外有毛細胞の消失をとまっていたが, 外有毛細胞が消失している場合は内有毛細胞は残存していることもあった.

対照としたモルモットでは全例において特別な病変を認めなかった.

4. 小括

モルモットの蝸牛窓膜上にネオマイシンを留置することにより蝸牛に病変がみられた. このことよりネオマイシンは蝸牛窓膜を透過して外リンパに移行し, らせん器に到達してその聴器毒性を発現したと考えられた.

蝸牛の病変は一般にネオマイシンの留置期間が長いものが高度であったが例外もあった. 初期の病変は外有毛細胞の変性として始まり, 病変が高度になるにしたがい外有毛細胞の消失, 内有毛細胞の変性, 消失, らせん器全体の虚脱という順に進行すると考えられた. また同一蝸牛では病変の程度は一般に基底回転に高度で, 上方回転になるにしたがい軽度となった⁹⁾.

III 滲出性中耳炎における蝸牛窓膜の透過性に関する実験

1. 目的

蝸牛窓膜の形態的变化はその透過性にかかなりの影響を及ぼすと考えられる. これに関連して最近, 滲出性中耳炎では蝸牛窓膜の透過性が高まる可能性が指摘されている⁹⁾.

本実験の目的はモルモットで実験的に作製した滲出性中耳炎が蝸牛窓膜のネオマイシンに対する透過性にどのような変化をもたすかを検討することにある.

2. 方法

A) 実験的滲出性中耳炎の作製 ネブタール麻酔下にモルモットの軟口蓋に切開を入れて一側の耳管咽頭口を直視下に置き, これにシリコンスポンジの薄片をつめ込んで耳管を閉塞した. 別のグループのモルモットでは一側の耳胞を下方より開放して耳管鼓室口を直視下に置き, これをエポキシ系樹脂にて閉塞した. 術後4日目から7日目に耳後部より耳胞を開放すると多くのモルモットで中耳腔に貯留液を認めた. 一部のモルモットで細菌検査を行ったが無菌であることが確認された.

表3 ネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性
(3) 両側蝸牛病変の程度の比較

蝸牛病変の程度	モルモット数
中耳炎側>対照側	5
中耳炎側<対照側	3

表4 ネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性
(4) 耳管閉塞の方法により分類した結果

耳管閉塞の方法	蝸牛病変		モルモット数
	中耳炎側	対照側	
耳管咽頭口			6
	—	+	4
	+	+	2
耳管鼓室口			14
	—	+	3
	+	+	6
	+	—	4
	—	—	1

B) ネオマイシンの留置 一侧は滲出性中耳炎で他側(対照側)は正常耳のモルモット20匹をネンブタールで麻酔し、耳後部より両側の耳胞を開放して蝸牛窓膜を直視下に置いた。中耳炎側では中耳貯留液を十分に吸引除去した。ゼルフォームの薄片を蒸留水にひたしてこれに5mgのネオマイシン粉末を吸着させ、両側の蝸牛窓膜上に直接留置した。

C) 標本の作製 翌日に断頭し、前項IIの2で述べた方法で標本作製し、光学顕微鏡下に蝸牛を観察した。

3. 結果

20匹のモルモットのうち中耳炎側に蝸牛病変がみられたのは12匹、対照側にみられたのは15匹であった。両側共にみられたのは8匹、両側共にみられなかったのは1匹であった。これらの結果を表2に示すが、両耳のあいだにはっきりした差はみられなかった。両側に蝸牛病変がみられた8匹でその病変の程度を左右で比較すると、表3に示すようにはっきりした差はみられなかった。また病変を耳管閉塞の方法により比較してみると表4のようになる。耳管咽頭口を閉塞した

場合には対照側に病変が多かったが、例数は少ないのではっきりした結論は出せない。

蝸牛病変は前項IIの場合と同様にらせん器に局限しており、一般に下方回転の病変が上方回転より高度で、外有毛細胞の障害が内有毛細胞の障害より高度であった。しかし例外として第2回転の病変がもっとも高度である場合もあった。多くのモルモットでは前項IIの場合よりも高度の病変がみられ、らせん器がほとんど破壊されたに近い状態のこともあった。その例を図3と図4に示す。

4. 小括

一侧には実験的に滲出性中耳炎を作製し他側が正常耳であるモルモットの両側の蝸牛窓膜上にネオマイシンを留置し、ネオマイシンによる蝸牛障害を指標として蝸牛窓膜の透過性を比較、検討してみると、両者のあいだに有意の差はみられなかった。

図3 ネオマイシンによる蝸牛病変(3)

モルモット No. 18, 基底回転。両側共に高度の病変がみられるが、中耳炎側(A)の病変は対照側(B)より著しい。

A

B

図4 ネオマイシンによる蝸牛病変(4)

モルモット No. 23, 基底回転. 両側共に高度の病変がみられるが, 対照側(B)の病変が中耳炎側(A)より著しい。

以上の結果よりネオマイシンは蝸牛窓膜をきわめて容易に透過し, 中耳病変はその透過性にあまり影響は及ぼさないと考えられた。高度の蝸牛病変がみられた例が多かったのは, 両側の蝸牛窓膜上にネオマイシンを留置したためであるのかもしれない。本実験では同一の条件下で実験を行ったにもかかわらず病変なしから高度病変まで種々の程度の病変がみられた。

IV 外リンパ中のネオマイシンの動態と 経蝸牛窓膜聴器毒性に関する実験

1. 目的

聴器毒性薬剤を全身投与した後の血中, 外リンパ中の薬剤濃度の動態に関しては数多くの研究がなされている¹⁰⁾。しかし蝸牛窓膜を透過した薬剤の外リンパ中の動態に関する報告はみあたらない。

本実験の目的は蝸牛窓膜を透過したネオマイシンの

外リンパ中濃度を定量してその時間的推移を検討すること, ネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性の発現時期, ならびに蝸牛病変と外リンパ中のネオマイシン濃度およびネオマイシンの留置時間との関係について検討することにある。

2. 方法

A) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるネオマイシンの微量迅速定量法の確立

実験に先立ち, 外リンパ中のネオマイシンを定量する目的で HPLC によるネオマイシンの検出方法を確立した。ネオマイシンに塩化ベンゾイルを反応させる¹¹⁾と, ネオマイシンのアミノ基, 水酸基にベンゾイル核が結合する。こうしてベンゾイル化されたネオマイシンは波長 230 nm の紫外線に吸収のピークを持つので, これを HPLC に注入して 230 nm の波長で検出した。この反応の操作手順を表 5 に示すが, 詳しい解説は別項にゆずる¹¹⁾。

B) 外リンパ中のネオマイシン濃度の定量

56 匹のモルモットを用いて実験を行った。耳後部より耳胞を開放して蝸牛窓膜を直視下に置き, 5 mg のネオマイシン粉末を蒸留水にひたしたゼルフォームの小片に吸着させて蝸牛窓膜上に留置した。モルモットを各群 8 匹ずつの 7 群に分け, ネオマイシンの留置時間を 30 分, 1, 2, 4, 8, 16, 24 時間の 7 種類として各群に各留置時間を割り当てた。各留置時間の経過後にふたたび耳胞を開放し, ただちにゼルフォームを除去して中耳を生食にてよく洗浄した。続いて電動ドリルにて蝸牛の基底回転鼓室階に小孔をあけ, マイクロピペットで 6 μ l の外リンパを採取した。外リンパは採取後に直接凍結乾燥し, この中に含まれるネオマイシンを上記の方法で定量した。

C) 蝸牛病変の観察

ネオマイシンの留置 4, 8, 16, 14 時間後に外リンパを採取したうちの各群 4 匹, 計 16 匹のモルモットはただちに断頭して蝸牛を取り出し, II の 2 項で述べた方法で標本作製して光学顕微鏡下に観察した。

3. 結果

A) HPLC によるネオマイシンの定量

ネオマイシンと同様にカナマイシン, ストレプトマイシン, ジヒドロストレプトマイシンを反応させて得られた HPLC のクロマトグラムを図 5 に示す。いずれも多峰性のピークを呈し, これら 4 種類の薬剤が HPLC で検出できることがわかる。既知量の薬剤のクロマトグラムのピーク面積を計算することにより検量

表5 HPLCによるネオマイシン微量定量のための操作手順

Analytical Procedure

図5 各種アミノ配糖体抗生物質の HPLC クロマトグラム

A: ネオマイシン

B: カナマイシン

C: ストレプトマイシン

D: ジヒドロストレプトマイシン

線が作製できる。図6にネオマイシンの検量線を示す。外リンパ中のネオマイシン濃度はクロマトグラムのピーク面積よりこの検量線を用いて算出される。この方法によるネオマイシンの検出限界値は実測上180 ngで、採取した6 μ lの外リンパ中のネオマイシン濃度の測定限界は30 ng/ μ lであった。これはバイオアッセイやラジオイムノアッセイなどの鋭敏な方法と比較するとかなり低い感度であるが、比較的簡単な方法で迅速

に行うことができ、常に安定した結果が得られる点は長所であった。

B) 外リンパ中のネオマイシン濃度 表6に56匹のモルモットで定量したネオマイシンの外リンパ中濃度を示す。30分の留置ですでに外リンパ中にはきわめて高濃度のネオマイシンが検出され、最高値は2時間の留置後にみられた。しかしその後の濃度は徐々に低下していき、24時間の留置後では全例が測定限界以下の濃

図6 HPLCによるネオマイシン定量のための検量線(挿入図では注入濃度が5倍である)

表6 各留置時間における外リンパ中のネオマイシン濃度

時間	30分	1時間	2時間	4時間	8時間	16時間	24時間
外リンパ中濃度 ng/μl	30.7	40.3	161	51.0	32.7	<30	<30
	33.7	53.0	188	77.3	37.3	<30	<30
	36.7	62.7	205	223	64.7	<30	<30
	52.3	71.7	209	227	71.0	<30	<30
	56.3	79.3	213	228	167	30.0	<30
	60.7	84.7	234	241	198	33.7	<30
	94.7	185	241	247	217	34.7	<30
	103	206	292	260	261	128	<30

図7 外リンパ中ネオマイシン濃度の各留置時間における平均値と標準偏差

度であった。図7は各時間での平均値と標準偏差をグラフにしたものである。留置2時間まではネオマイシン濃度は急速に上昇してきわめて高濃度となるが、その後は24時間までのあいだに徐々に低下していく。図7から全体的傾向はよくわかるものの、個々の結果にはかなりのばらつきがみられた。

C) 蝸牛病変と外リンパ中のネオマイシン濃度 16匹のモルモットで蝸牛を観察した結果を表7に示す。またそれぞれのネオマイシンの留置時間でそれぞれの外リンパ中のネオマイシン濃度の位置に蝸牛病変の有無をプロットすると図8のようになった。4時間のネオマイシン留置ですでに病変がみられ、留置時間が長くなると病変のおきる割合は増大した。しかし各留置時間でみると病変の有無と外リンパ中のネオマイシン濃度とのあいだに関連はみられなかった。

蝸牛病変は前項II, IIIの場合と同様にらせん器に局限していたが、IIIにおいてみられたような高度の病変はみられなかった。外有毛細胞が完全に消失していた

表7 ネオマイシンの各留置時間における蝸牛病変の有無

時間	4時間	8時間	16時間	24時間
蝸牛病変	+	+	+	+
	—	+	+	+
	—	—	+	+
	—	—	—	—
	—	—	—	—

— 正常 + 部分変性 + 完全変性

図8 各留置時間における蝸牛病変の有無とそのときの外リンパ中ネオマイシン濃度との関係

図9 ネオマイシンによる蝸牛病変(5)
蝸牛病変の分類例

A: 完全変性としたもの。外有毛細胞は消失しているが、しているが、内有毛細胞は残存していることもある(基底回転)。

B: 部分変性としたもの。外有毛細胞が不完全に変性、消失している(第2回転)。

場合は内有毛細胞が残存していても完全変性と分類したが、これは基底部の病変がもっとも高度で上方回転は軽度であった。部分変性としたものは外有毛細胞が不完全に変性、消失していた場合で、この場合は第2回転の病変がもっとも高度であった。図9に蝸牛病変の完全変性と部分変性の例を示す。

4. 小括

モルモットの蝸牛窓膜を透過したネオマイシンの外リンパ中濃度をHPLCにより定量した結果、蝸牛窓膜上のネオマイシンは短時間のうちに外リンパに移行してきわめて高濃度となり、その後は徐々に減少することがわかった。このことよりネオマイシンはきわめて容易に蝸牛窓膜を透過することが推測された。

またネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性は短時間で発現しうることがわかった。これは蝸牛窓膜を透

過したネオマイシンの外リンパ中濃度が非常に高くなることと関係していると考えられる。しかしながらネオマイシンの留置時間、外リンパ中のネオマイシン濃度と蝸牛病変の有無とのあいだに一定の関係はみられなかった。

V 考 察

1. 経蝸牛窓膜聴器毒性について

局所に点耳した聴器毒性薬剤が内耳に到達する経路としては蝸牛窓、前庭窓、microfissure、顔面神経、骨迷路の血管などが考えられるが、このうちもっとも重要なのが蝸牛窓膜を透過して内耳に到達する経路であろう²⁾³⁾。こうして生じる点耳薬性難聴のヒトにおける側頭骨標本検索の報告はみられないが、動物実験では中耳に聴器毒性薬剤を注入した後に内耳を組織学的に検索した報告がいくつかある。Riskaer et al¹²⁾はモルモットの中耳にネオマイシンを注入した実験で聴力に変化がなかったとして組織学的検索は行わなかった。Mittelman¹⁾はネオマイシンを蝸牛窓膜に1回作用させた実験で組織学的に内耳に変化を認めなかった。これに対してKohonen and Tarkkanen¹³⁾、Brummett et al¹⁴⁾、中井ら¹⁵⁾、Ginsberg et al¹⁶⁾、Wright and Meyerhoff¹⁷⁾はネオマイシンなどの聴器毒性薬剤を鼓室内に注入することにより引き起こされた内耳病変を観察している。これらの病変の程度や分布のパターンについては報告によりかなりの差がみられ、著者の実験結果とも多少異なるものである。中井ら¹⁵⁾は動物差が大であることを強調しているが、実験動物の差や実験条件の差が結果に大きく影響していると考えられる。

著者の結果では一般に病変はらせん器に局限しており基底回転に高度で上方回転になるにしたがって軽度となったが、一部では第2回転の病変がもっとも高度である例がみられた。これは蝸牛病変に3つのパターンを認めたKohonen and Tarkkanen¹³⁾の実験結果に比較的近いものと考えられよう。また一般に外有毛細胞の障害が内有毛細胞の障害よりも高度であった。これは他の報告^{13)~17)}とも共通することであるが、他方Lindsay et al¹⁸⁾が報告したネオマイシンの全身投与により聾となったヒト側頭骨組織標本でみられた内有毛細胞の障害を主とする所見とは大きく対比されるものである。ここでも種属差、投与方法の差が大きく関係しているものと思われる。Wright and Meyerhoff¹⁷⁾はらせん器の障害に加えて血管条にも高度な障害がお

ることを報告しているが、本実験では病変は高度であってらせん器に局限していた。

従来の研究報告をみると鼓室内に聴器毒性薬剤を注入する方法が多かったが、本実験ではネオマイシンを蝸牛窓膜のみに作用させるためにゼルフォームの薄片を用いた。これにより微量のネオマイシンが定量化されて蝸牛窓膜上に直接留置されることとなり、鼓室内注入法と比較すると経蝸牛窓膜聴器毒性がより厳密に検討できると考えられる。この留置方法は他の報告ではみられない。

経蝸牛窓膜聴器毒性の発現時期については本研究でもっとも早くみられたのがネオマイシンを4時間留置した後であり、それより早い時期については検索していない。他の報告^{13)~17)}ではネオマイシンの鼓室内注入は数回にわたり繰り返されたり、1回注入の場合は数日後に内耳を観察しているのが、発現時期については不明である。これに対してクロラムフェニコールを用いた実験では、Proud et al¹⁹⁾は薬剤を30分間作用させて3時間後に蝸牛病変を認めている。本研究よりネオマイシンでも同じ程度に早期から内耳障害が発現する可能性が示唆された。そしてその内耳障害はBrummett et al¹⁴⁾も指摘しているように、ネオマイシンの留置時間が長くなるほど高度となっていくと考えられた。

II, IV項の実験でみられた蝸牛病変と比較するとIII項の実験でみられた蝸牛病変には高度なものが多かった。これにはらせん器が破壊されたに近いものも含まれていた。単に実験動物の数が少ないためにこのような結果が出たとも考えられるが、それ以外に何か理由があるようにも思われる。III項とII, IV項の実験の違いは両側の蝸牛窓膜上にネオマイシンを留置したことである。Schreiner²⁰⁾は左右の外リンパ間でイオンの交換がさかんであることを証明しているが、こうしたことが両側のネオマイシン留置では一側留置の場合と比較して両側ともに蝸牛病変を高度なものとしているのかもしれない。

本研究ではすべて同一のテクニックで実験を行ったにもかかわらず、結果は病変のまったくみられなかったものから高度病変のものまでさまざまであった。こうした病変出現の不確定さはKohonen and Tarkkanen¹³⁾の報告でもみられるところであるが、これには本研究で用いた方法論に起因する要素のみならず動物の個体差が関係しているのではないと思われる。これに関しては後でふたたび考察を加える。

2. 蝸牛窓膜の透過性について

前述のように経蝸牛窓膜聴器毒性の発現には蝸牛窓膜の透過性が重要であるが、蝸牛窓膜は種々の物質に対して透過性を有すると考えられる。現在までにナトリウム²¹⁾、ヨード²²⁾などのイオンやアミノ配糖体を含めた抗生物質^{23)~25)}などの比較的分子量の小さい物質のみならず、トロトラスト²⁶⁾、horseradish peroxidase (HRP)²⁷⁾²⁸⁾、アルブミン²⁹⁾³⁰⁾、外毒素³¹⁾³²⁾などの高分子量の物質にいたるまで種々の物質に対する透過性を証明した報告がなされている。これに対してGalle and Siegel³³⁾はナトリウムは蝸牛窓膜を透過しないと報告しており、中井と金子³⁴⁾はフェリチンなどの追跡子を用いた実験で中耳側より内耳側への侵入は困難であるとしている。

このように蝸牛窓膜の透過性に関して一部では相反する結果となつてはいるが、実際にはかなり多種類の物質に対して透過性を有すると考えてよいであろう。ネオマイシンに関してはSmith and Myers²⁴⁾が蝸牛窓膜に作用させたネオマイシンをradioenzyme法を用いて外リンパ中で定量し蝸牛窓膜の透過性を証明している。

本研究では蝸牛窓膜上に直接留置したネオマイシンによる蝸牛障害を観察し、また外リンパ中に移行したネオマイシンをHPLCで定量した。これにより蝸牛窓膜のネオマイシンに対する透過性は直接的に証明されたといえよう。しかしながらネオマイシンがどのようにして蝸牛窓膜を透過するのかに関してはいまだ研究がなされていない。HRPに関してはTanaka and Motomura²⁷⁾が蝸牛窓膜上のHRPは細胞吞食作用によりただちに上皮細胞内にとりこまれて蝸牛窓膜を透過することを観察している。ネオマイシンは分子量908.87という小さな物質であるのもっと容易に蝸牛窓膜を透過するのではないかと考えられるが、その過程は不明である。

蝸牛窓膜の透過性は中耳粘膜が病的状態の場合には増大するものと考えられる。現在のところ滲出性中耳炎^{29)~31)}、イオントフォレーゼ²²⁾、パントカインの使用²⁶⁾などで蝸牛窓膜の透過性が高まるとの実験結果が報告されている。このうち滲出性中耳炎の場合は臨床的意義も大きく重要な問題となるであろう。本研究でも実験的に滲出性中耳炎を作製して蝸牛窓膜の透過性の変化を検討した。実験動物数が少ない時点では中耳炎側に病変が少なく対照側では全例で病変みられたので、これに対して考察を行ったこともある^{35)~37)}。し

かし実験動物数を増やすと両耳のあいだに有意の差はみられなくなった。これはネオマイシンが中耳病変がなくとも正常の状態ですでに非常に容易に蝸牛窓膜を透過することを意味すると考えられよう。中耳病変が蝸牛窓膜の透過性に与える影響をみるには他の報告^{29)~31)}におけるようにもっと高分子量の物質を用いた方がよかったのかもしれない。

3. 外リンパ中のネオマイシン動態について

アミノ配糖体抗生物質の聴器毒性に関連して、これらの抗生物質の外リンパ中における動態に関しては数多くの研究がなされている。現在のところストレプトマイシン^{38)~42)}、ジヒドロストレプトマイシン⁴¹⁾、カナマイシン^{38)41)43)~47)}、ゲンタマイシン¹⁰⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾、ネオマイシン³⁸⁾⁴¹⁾、トブラマイシン⁴⁸⁾、アミカシン⁴⁸⁾、ネチルマイシン⁴⁹⁾、ジベカシン⁵⁰⁾、リボスタマイシン⁵¹⁾に関する報告がみられる。これらの報告ではアミノ配糖体抗生物質を筋注、皮下注あるいは腹腔内投与した後の外リンパ中と血中の動態の比較を行っている。一般に血中の薬剤濃度は外リンパ中の濃度よりも早くピークに達してその濃度もずっと高値であるが、外リンパからの排泄は血中からの排泄に比べるとずっと遅い。しかしながらその詳細なデータを検討すると矛盾するとまではいえないものの報告によりかなりの違いがみられる。

これに対して蝸牛窓膜を透過して外リンパに移行した薬剤の動態に関しての報告は今のところみあたらない。蝸牛窓膜を透過した薬剤の外リンパ中での直接定量については Smith and Myers²⁴⁾ によるネオマイシンとゲンタマイシンの報告、Okuno and Nomura²⁵⁾ によるセフメタゾールの報告があるが、いずれも外リンパ中における薬剤動態についての検討はなされていない。本研究ではこの点についての検討を行った結果、個々の測定値にはかなりのばらつきをみるものの平均値をとるとはっきりした一定の傾向を認めることができた。これによると外リンパ中のネオマイシン濃度は急速に上昇し2時間でピークとなり、以後は徐々に減少した。このパターンは前述の全身投与後の動態と比較するとピークに達する時間がやや早く、さらにこのピーク濃度は非常に高値であった。これは蝸牛窓膜上に留置したネオマイシンが微量であることを考慮すると一層際立ったものとなり、ネオマイシンが蝸牛窓膜をきわめて容易に透過することを意味する所見と考えられよう。

経蝸牛窓膜聴器毒性の発現にはネオマイシンの留置

時間と外リンパ中の濃度が重要な要素になると考えられるが、蝸牛病変の有無と外リンパ中のネオマイシン濃度とのあいだに一定の関係はみられなかった。これは結局本研究ではそれぞれの留置時間における外リンパ中の濃度をみたのみであるからで、聴器毒性の発現には各実験動物において外リンパ中のネオマイシン濃度がどのような経過をたどって推移したかが問題となってくるのであろう。さらには外リンパ中の濃度よりも留置時間のほうが聴器毒性の発現にはより重要であるのかもしれない。

4. 結果のばらつきについて

本研究における蝸牛病変の有無とその程度、外リンパ中ネオマイシン濃度の結果にはかなりのばらつきがみられた。この原因としてまず第1に本研究で用いた方法に固有の要因が考えられる。すなわち5mgのネオマイシン粉末をゼルフォームの薄片に吸着させて蝸牛窓膜上に一定時間留置する場合に、蝸牛窓膜に直接作用したネオマイシンの最終的な量と濃度には厳密には各動物間でいくらかの違いが生じていると思われる。これはもちろん結果にある程度の誤差を生じさせるが、本研究における結果のばらつきの度合いはこの誤差の推定範囲を越えるものと考えられる。ここに第2の要因として動物の個体差が考えられるのである。

本研究において個体差を生じる要素としては1)蝸牛窓膜のネオマイシンに対する透過性の個体差、2)ネオマイシンの外リンパからの排泄の個体差、3)ネオマイシンと有毛細胞との親和性の個体差、4)有毛細胞の易損傷性の個体差などが考えられる。Ohtani et al⁵²⁾ はカナマイシンを用いたウサギでの実際に動物の個体差を内耳への薬剤移行の個体差に求めているが、実際には以上の1)から4)の要素が様々にからみあっているのではないだろうか。

VI 結 語

モルモットの蝸牛窓膜上にネオマイシンを留置して蝸牛窓膜の透過性と経蝸牛窓膜聴器毒性に関する種々の実験を行った結果、以下のような結論を得た。

- 1) ネオマイシンは蝸牛窓膜を容易に透過して内耳に移行し、経蝸牛窓膜聴器毒性をひきおこした。
- 2) 蝸牛病変はらせん器に限局しており、一般に基底回転に高度で上方回転となるにしたがい軽度となった。また外有毛細胞の障害が内有毛細胞の障害より高度であった。
- 3) 例外として第2回転の病変がもっとも高度である

場合があった。

- 4) 両側にネオマイシンを留置した場合には非常に高度の病変がみられることがあった。
- 5) ネオマイシンによる経蝸牛窓膜聴器毒性は比較的短時間で発現した。またネオマイシンの留置時間が長くなると蝸牛病変のおきる割合が増大した。
- 6) 実験的に滲出性中耳炎を作製して中耳病変が蝸牛窓膜の透過性に及ぼす影響をみると、対照とのあいだに有意の差はみられなかった。これは中耳粘膜の状態と関係なくネオマイシンが蝸牛窓膜をきわめて容易に透過するためと考えられた。
- 7) 外リンパ中のネオマイシンの動態を検討すると、蝸牛窓膜上のネオマイシンは短時間で外リンパに移行してきわめて高濃度となり、その後は徐々に減少した。
- 8) 蝸牛病変の有無とネオマイシンの留置時間、外リンパ中のネオマイシン濃度とのあいだには一定の関係はみられなかった。
- 9) 本研究では結果にかなりのばらつきがみられたが、これにはモルモットの個体差が関係していると考えられた。

参考文献

- 1) Mittelman H : Ototoxicity of "ototopical" antibiotics : Past, present, and future. *Tr Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 76 : 1432-1443, 1972.
- 2) 野村恭也 : 点耳薬性難聴について。耳展 18 : 541-546, 1975.
- 3) 野村恭也 : 点耳療法による内耳障害について。耳喉 51 : 857-862, 1979.
- 4) Paparella MM, Oda M, Hiraide F et al : Pathology of sensorineural hearing loss in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81 : 632-647, 1972.
- 5) Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff WL : Endolymphatic hydrops and otitis media. *Laryngoscope* 89 : 43-54, 1979.
- 6) Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff ML : Inner ear pathology and otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89, Suppl 68 : 249-253, 1980.
- 7) 野村恭也, 土田みね子 : 聴力障害。中島, 秋吉(編) : 薬物と感覚障害。ソフトサイエンス社, 東京, 1980, 448-471 頁。
- 8) 野村恭也, 原田勇彦, 川端五十鈴 : 経蝸牛窓膜聴器毒性の実験的研究。厚生省特定疾患特発性の感音難聴調査研究班昭和 55 年度研究報告書, 1981, 45-48 頁。
- 9) Goycoolea MV, Paparella MM, Juhn SK et al : Otitis media with perforation of the tympanic membrane : A longitudinal experimental study. *Laryngoscope* 90 : 2037-2045, 1980.
- 10) Tran Ba Huy P, Manuel C, Meulemans A et al : Pharmacokinetics of gentamicin in perilymph and endolymph of the rat as determined by radioimmunoassay. *J Infect Dis* 143 : 476-486, 1981.
- 11) Harada T, Iwamori M, Nagai Y et al : Analysis of aminoglycoside antibiotics as benzoyl derivatives by high-performance liquid chromatography and its application to the quantitation of neomycin in the perilymph. *J Chromatogr* 337 : 187-193, 1985.
- 12) Riskaer N, Christensen E, Petersen PV et al : The ototoxicity of neomycin. *Experimental investigations. Acta Otolaryngol* 46 : 137-152, 1956.
- 13) Kohonen A, Tarkkanen J : Cochlear damage from ototoxic antibiotics by intratympanic application. *Acta Otolaryngol* 68 : 90-97, 1969.
- 14) Brummett RE, Harris RF, Lindgren JA : Detection of ototoxicity from drugs applied topically to the middle ear space. *Laryngoscope* 86 : 1177-1187, 1976.
- 15) 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.
- 16) Ginsberg IA, Rudnick MD, Huber PS : Aminoglycoside ototoxicity following middle ear injection. III. Comparative quantitative analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89, Suppl 77 : 17-24, 1980.
- 17) Wright CG, Meyerhoff WL : Ototoxicity of otic drops applied to the middle ear in the chinchilla. *Am J Otolaryngol* 5 : 166-176, 1984.
- 18) Lindsay JR, Proctor LR, Work WP : Histopathologic inner ear changes in deafness due to neomycin in a human. *Laryngoscope* 70 : 382-392, 1960.
- 19) Proud GO, Mittelman H, Seiden GD : Ototoxicity of topically applied chloramphenicol. *Arch Otolaryngol* 87 : 580-587, 1968.
- 20) Schreiner L : Experimentelle Untersuchungen über die Bildungsstätten und den Stoffaustausch der Perilymphe. *Acta Otolaryngol*, Suppl 212, 1966.
- 21) Brady DR, Pearce JP, Juhn SK : Permeability of round window membrane to ^{22}Na or RISA . *Arch Otorhinolaryngol* 214 : 183-184, 1976.
- 22) Stecker RH, Cody DTR : Iontophoresis of ^{22}Na and ^{131}I into the inner ear. *Arch Otolaryngol* 83 : 213

- 217, 1966.
- 23) Breuninger H, Giebel W, Haug H-P : Über das Eindringen von tympanal appliziertem Tetracyclin in das Innenohr des Meerschweinchens. Arch Otorhinolaryngol 216 : 523-524, 1977.
 - 24) Smith BM, Myers MG : The penetration of gentamicin and neomycin into perilymph across the round window membrane. Otolaryngol Head Neck Surg 87 : 888-891, 1979.
 - 25) Okuno T, Nomura Y : Permeability of the round window membrane. Arch Otorhinolaryngol 240 : 103-106, 1984.
 - 26) Hoft J : Die Permeabilität und die Beeinflussung der Permeabilität der Membran des runden Fensters durch Pantocain (Tetracain). Arch Klin Exp Ohr-Nas-Kehlk Heilk 193 : 128-137, 1969.
 - 27) Tanaka K, Motomura S : Permeability of the labyrinthine windows in guinea pigs. Arch Otorhinolaryngol 233 : 67-75, 1981.
 - 28) Saijo S, Kimura RS : Distribution of HRP in the inner ear after injection into the middle ear cavity. Acta Otolaryngol 97 : 593-610, 1984.
 - 29) Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B et al : Permeability of the round window membrane in otitis media. Arch Otolaryngol 106 : 430-433, 1980.
 - 30) Goldberg B, Goycoolea MV, Schlievert PM et al : Passage of albumin from the middle ear to the inner ear in otitis media in the chinchilla. Am J Otolaryngol 2 : 210-214, 1981.
 - 31) Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B et al : Permeability of the middle ear to staphylococcal pyrogenic exotoxin in otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1 : 301-308, 1980.
 - 32) Schachern PA, Paparella MM, Goycoolea MV et al : The round window membrane following application of staphylococcal exotoxin : An electron microscopic study. Laryngoscope 91 : 2007-2016, 1981.
 - 33) Golle E, Siegel G : The transport of radioactive labelled sodium ions at the round window. Acta Otolaryngol 79 : 108-110, 1975.
 - 34) 中井義明, 金子 実 : 正円窓膜—微細構造ならびに透過性について—, 耳鼻臨床 68 : 223-232, 1975.
 - 35) 原田勇彦, 川端五十鈴, 野村恭也 : 蝸牛窓膜の透過性に関する実験的研究, 耳鼻 28 : 857-862, 1982.
 - 36) 原田勇彦, 許 権振, 川端五十鈴 : 蝸牛窓膜の透過性に関する実験的研究—第2報—, Ear Res Jpn 14 : 208-210, 1983.
 - 37) 野村恭也, 原田勇彦, 許 権振, 川端五十鈴 : 蝸牛窓膜の透過性に関する実験的研究 (II), 厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班昭和57年度研究業績報告書, 1983, 67-71頁.
 - 38) Voldrich L : The kinetics of streptomycin, kanamycin and neomycin in the inner ear. Acta Otolaryngol 60 : 243-248, 1965.
 - 39) Vrabec DV, Cody DTR, Ulrich JA : A study of the relative concentrations of antibiotics in the blood, spinal fluid, and perilymph in animals. Ann Otol Rhinol Laryngol 74 : 688-705, 1965.
 - 40) Wagner WH, Chou JTY, Ilberg Ch v et al : Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Streptomycin. Arzneimittel Forsch 21 : 2006-2016, 1971.
 - 41) Stupp H, Kupper K, Lagler F et al : Inner ear concentrations and ototoxicity of different antibiotics in local and systemic application. Audiology 12 : 350-363, 1973.
 - 42) Ilberg Ch v, Arnold W, Ritter R : Ursachen und Beeinflussung der Ototoxizität des Streptomycins und verwandter Antibiotika. Laryngol Rhinol 53 : 112-120, 1974.
 - 43) Watanabe Y, Nakajima R, Oda R et al : Experimental study on the transfer of kanamycin to the inner ear fluids. Med J Osaka Univ 21 : 257-263, 1971.
 - 44) Ohtani I, Mizuno S, Mafune N et al : Experimental study of kanamycin concentration in blood, cerebrospinal fluid and perilymph in rabbits. Fukushima J Med Sci 22 : 11-16, 1976.
 - 45) Toyoda Y, Tachibana M : Tissue levels of kanamycin in correlation with oto- and nephrotoxicity. Acta Otolaryngol 86 : 9-14, 1978.
 - 46) Russell NJ, Fox KE, Brummett RE : Ototoxic effects of the interaction between kanamycin and ethacrynic acid. Acta Otolaryngol 88 : 369-381, 1979.
 - 47) Juhn SK, Rybak LP, Prado S : Nature of blood-labyrinth barrier in experimental conditions. Ann Otol Rhinol Laryngol 90 : 135-141, 1981.
 - 48) Federspil P, Schatzle W, Tiesler E : Pharmacokinetics and ototoxicity of gentamicin, tobramycin, and amikacin. J Infect Dis 134, Suppl : S200-S205, 1976.

- 49) Brummett RE, Fox KE, Brown RT et al : Comparative ototoxic liability of netilmicin and gentamicin. Arch Otolaryngol 104 : 579—584, 1978.
 - 50) Ohtani I, Ohtsuki K, Aikawa T et al : Ototoxicity of aminoglycoside antibiotics by rapid intravenous injection. ORL 44 : 156—169, 1982.
 - 51) Harpur ES, Gonda I : Analysis of the pharmacokinetics of ribostamycin in serum and perilymph of guinea pigs after single and multiple doses. Brit J Audiol 16 : 95—99, 1982.
 - 52) Ohtani I, Ohtsuki K, Aikawa T et al : Individual variation and mechanism of kanamycin ototoxicity in rabbits. Acta Otolaryngol 94 : 413—419, 1982.
-

稿を終わるにあたり終始御指導いただいた恩師東京大学医学部耳鼻咽喉科野村恭也教授，絶えず御助言いただいた埼玉医科大学総合医療センター耳鼻咽喉科川端五十鈴教授，HPLC に関して御指導，御助言いただいた東京大学医学部第2化学永井克孝教授，同岩森正男博士に深謝する。

なお本論文の要旨は厚生省特定疾患特発性の感音難聴調査研究班昭和55年度第1回総会，同56年度第2回総会，厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班昭和57年度第2回総会，同58年度第2回総会，ならびに第29回，第30回，第32回日本基礎耳科学会において発表した。

(原稿受付 昭和60. 8. 7日)

別刷請求先 〒113 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室 原田 勇彦