薬物移行性よりみた末梢前庭器障害

——内リンパ嚢との関連において——

山 根 英 雄・中 井 義 明・杉 山 正 夫
小 西 一 夫・桜 井 敏 恵・三 木 祐一郎
宮 本 一 良・趙 重 生・高 橋 研 一*

Drug Permeability of the Endolymphatic Sac
and Peripheral Vestibular Disorders

Hideo Yamane, Yoshiaki Nakai, Masao Sugiyama,
Kazuo Konishi, Toshie Sakurai, Yuuichiro Miki,
Kazuyoshi Miyamoto, Joong Saeng Cho
and Kenichi Takahashi

(Osaka City University)

The location of intravenously injected kanamycin sulfate (KM) in the endolymphatic sac (ES) of guinea pigs was investigated immunohistologically. Animals were sacrificed 1, 2, 5, 10 and 30 minutes after KM injection. One minute after KM injection, KM had already passed through the capillaries in the subepithelial layer of the ES and reached the epithelial layer. As time elapsed, the amount of KM in the epithelial layer of the ES increased. KM also accumulated in the floating cells in the ES.

These results indicate that the ES is relatively permable to systemically injected drugs. Their passage into the regional endolymph should be investigated from the viewpoints of drug ototoxicity and treatment of inner ear disturbances.

緒 言

アミノ配糖体系薬物(以下ア配糖体)により、内耳障害が惹起しうることは、臨床的¹⁾²⁾にも、基礎的にも³⁾⁴⁾よく知られた事実である。この機序として、ア配糖体が、直接、蝸牛および末梢前庭器の感覚細胞に働くためであろうことが考えられている。しかしながら、ア配糖体が、内耳毒性になりうるためには、まず、これら薬物が内耳に到達しうるが必要条件であるが、果して、どの程度、これらが薬物が内耳に移行し得るのであろうか。内耳には脳における blood-brain-barrier⁵⁾

の如くの blood-labyrinth-barrier⁶⁾⁷⁾⁸⁾ なるものが存在し、薬物は容易には内耳には移行しないとされている。この事は、形態学的にも、機能的にも確かめられている。一方、内リンパ嚢は、非常に血行に富んだ器官であり、上皮下組織の毛細血管には有窓構造も存在し⁹⁾¹⁰⁾、同部には、他の内耳の部位に比べて、より容易に薬物が移行しうる可能性が考えられる。

そこで今回、我々は、モルモットに硫酸カナマイシン (KM) を全身的に投与し、KMが、内リンパ嚢にどの程度移行するのか、また内リンパ嚢内腔 (内リンパ) には移行がありうるのかを検討してみた。

実験方法

実験動物として体重 (250~350 g) の有色モルモット 20匹を用い、ネブタール麻酔下にて硫酸カナマイシン (KM) (400 mg/kg 体重) を股静脈より緩徐に投与した。投与終了後 1, 2, 5, 10, 30 分後に (各群 4 匹)、側頭骨を採取し、内リンパ嚢を取り出し、4%パラフォルムアルデヒド (0.1M 磷酸緩衝液) で 6 時間固定を行った。シヨ糖加 -0.1M 磷酸緩衝液で洗浄後、凍結切片を作成し、スライドガラス上で間接法による蛍光抗体法を施行した。一次抗体と

しては抗カナマイシン抗体 (ヤギ) (Miles) を 20 倍あるいは 100 倍希釈にて、二次抗体としては FITC 抗ヤギ抗体 (ウサギ) を 20 倍あるいは 40 倍希釈にて使用した。対照としては、一次抗体として正常ヤギ血清を使用したものと、一次抗体を使用しないものを用いた。また、内リンパ嚢における KM の分布と比較のために、内リンパ嚢の IgG の分布をも検討した。観察は Olympus Vanox 蛍光顕微鏡で行った。

実験結果

全ての時間帯で KM の内リンパ嚢 (特に中間部) への移行が認められた。1 分後、すでに KM は内リンパ嚢上皮下組織の毛細血管を通過し、上皮下組織にびまん性に移行し、少量ながらも内リンパ嚢上皮に達し、細胞間隙へと進入していた (図 1)。また内リンパ嚢内腔の浮遊細胞内にも KM の存在が認められた。しかしながら、KM の濃度は上皮下組織に比較して、上皮層では、まだ低い様に思われた。

時間経過と共に、KM の上皮層への移行は増加しており、投与後 30 分後では KM は上皮下組織より、上皮層の方が高濃度に観察され、上皮の内リンパ嚢内腔に面した側には、高濃度の KM の存在が認められた (図 2, 3)。しかし、

図 1 KM 静注 1 分後の内リンパ嚢中間部。KM は上皮下組織にびまん性に存在すると共に、上皮層にも進入が認められる。上皮層の KM は上皮下組織に比較して未だ、低濃度の様である。嚢内浮遊細胞にも KM の集積が認められる。

図 1

図 2

図 4

図 3

図 2 KM 静注 30 分後の内リンパ囊 (近位部～中間部) では, 上皮下組織 (*印) に比較して, 上皮層の方に高濃度の KM が存在する。

挿入図: 同条件の上皮層の拡大. KM は上皮の内リンパ腔に面した側に高濃度に存在すると共に, 上皮の細胞間隙にも少量存在する。

図 3 図 2 と同条件の内リンパ囊上皮下組織の細動脈. KM は, すでに細動脈腔には, ほとんど存在せず. 内弾性板 (矢印) に沿って沈着している。

図 4 図 2 と同条件の内リンパ囊中間部, 上皮下組織 (*印) に比較して, 上皮層および囊内浮遊細胞 (矢印) に多量の KM の集積が認められる。

上皮内においては, その基底部より上部の細胞縁近くまでには KM の存在はほとんど認められない様であった。内リンパ囊内腔の浮遊細胞内にも多量の KM の集積が認められた (図 4)。これに反し, 前庭半規管の感覚細胞, 蝸牛管のコルチ器には KM の移行は, ほとんど認められなかった。また, 対照標本にも KM の蛍光は認められなかった (図 5)。

図5 対照標本. KM の蛍光は認められない.

考 按

ア配糖体に限らず、その薬物が内耳障害を惹起しうるには、次の3因子が必要と思われる。

- ① 薬物の内耳への到達度
- ② 薬物の内耳への停滞度
- ③ 薬物の内耳に対する選択毒性

一方、ア配糖体のこれら3因子を検討する上で、次の3点は興味ある事実である。

① 実験動物（モルモット）に KM を筋注した場合、内耳障害に起因した聴覚障害を惹起しうるが Auditory Brainstem Response (ABR) を指標にして聴覚障害の程度を想定すると、400 mg/kg の投与で少なくとも2週間程の連続投与が必要である¹¹⁾。

② ループ利尿剤とア配糖体のある時間間隔で投与すると、たった1度のア配糖体の投与で、①に匹敵する内耳障害を惹起しうる¹²⁾。

③ 蝸牛管や側線器において、内リンパや内リンパ相等部位をア配糖体で還流すると cochlear microphonics (CM) や saccular microphonics (SM) を著明に減弱させ、その程度は、これら薬物を外リンパに還流した場合に比較して非常に大である^{4) 13)}。

これらの報告は、KM などのア配糖体がいかに内耳液（特に内リンパ）に移行しにくい、

また一度、ア配糖体が内リンパに移行した場合の内耳障害の起こり易さを示唆したものである。

しかし、内リンパ囊の場合、KM の1回投与で、投与1分後には、すでに KM は内リンパ囊の上皮層に移行し、一部は、内リンパ囊の浮遊細胞に取り込まれていた。これら KM は時間経過と共に内リンパ囊に移行し続け、投与30分後には多量の KM が内リンパ囊の上皮層および、囊内の浮遊細胞に集積していた。これに比し、上皮組織の KM は、投与30分後では徐々に消退しつつある傾向がうかがわれた。すなわち、このことは、内リンパ囊においては、KM などの薬物が、内耳の他部位に比較してより容易に内リンパに移行しうることを示唆している。これは、モルモットにトリパンプルーの静注を行った Engström ら¹⁴⁾ の data と一致するものであり、内リンパ囊においては、blood-labyrinth-barrier が、それ程 tight でないことを示している。

このことは、内リンパ囊の微細構造上の検討からも裏付けられるものである。その1つとして、内リンパ囊上皮組織の毛細血管は、有窓構造をもち、また非常に活発な飲食作用を行っている事実がある。

図6 内リンパ嚢中間部の IgG.

IgG は主として、上皮組織にびまん性に存在し、上皮層 (E) には、ほとんど存在しない様である。嚢内浮遊細胞 (矢印) にも IgG が存在している。(モルモット)

一方、内リンパ嚢上皮間の tight junction は、freeze fracture による観察では¹⁵⁾、strand はそれ程多くなく、特に近位部の内リンパ嚢において、その傾向が強いという。これらの組織学的特徴より、内リンパ嚢は、全身投与された薬物がより容易に、内リンパに移行し易い部位だということが出来よう。

蝸牛管などに異物を注入した際、ゆるやかな longitudinal flow¹⁶⁾ にのり、異物が内リンパ嚢の中間部～遠位部の上皮 (主として暗細胞) や嚢内の浮遊細胞に取り込まれるが、今回の検討からは、逆向きの薬物移行 (すなわち、内リンパ嚢上皮下組織より、局所の内リンパへの薬物の排出) も認められたことになる。これら内

リンパに入った薬物が、局所にとどまらず、どの程度、蝸牛管、耳石器や半規管に内リンパ流に逆って移行するかは不詳である (短期間投与では、恐らくあまり移行はありえないかも知れないが)。

ただ、モルモットの内リンパ嚢にトロトラストを注入した Morgenstern ら¹⁷⁾ は、蝸牛管にトロトラストの移行を認めており、我々の薬物投与の検討からもその可能性は示唆される。内リンパ嚢よりの蝸牛管や前庭半規管への薬物移行量については、今後の検討が必要であろう。

さて、嚢内の浮遊細胞に多量の KM が集積した事実は、これら嚢内浮遊細胞が、蝸牛管や前庭半規管で生じた異物処理のみならず、内リンパ嚢経由で内リンパに移行した異物の局所処理を行っているとも考えられ、興味深い。

今回の光顕上の観察からは KM が内リンパ嚢の上皮層をどの様にして通過したかについては不詳である。しかし、上皮間隙および上皮の上層に多量の KM が存在し、上皮内にはあまり存在しなかった事実より、一部の KM は上皮間隙を通過することにより、一部は上皮間隙より上皮内に取り込まれて内リンパに移行したのではと推察される。

メニエール病患者¹⁸⁾に限らず、一般に内リンパ嚢上皮下組織および嚢内の浮遊細胞には IgG が存在する様であるが¹⁹⁾ (図6), IgG は KM より分子量が大いいためか、上皮直下の基底膜で、上皮への進入を阻止されており、上皮内には存在せず、KM の場合と比較すると興味深い。嚢内の浮遊細胞内の IgG については、本来、この種の細胞が含有していたものと思われるが、これについては別報で述べる予定である。

いずれにせよ、今回の検討により、全身投与された薬物が内リンパ嚢を経由して、より容易に局所の内リンパへ移行しうる事実は、今後、薬物による内耳障害のみならず、内耳障害治療の目的での薬物投与についても興味深い結果であると考ええる。

ま と め

モルモットに KM を静注し、内リンパ嚢への KM の移行を免疫組織学的に経時的に（投与 1, 2, 5, 10, 30分後に側頭骨を採取）検討した。

投与 1 分後には KM はすでに内リンパ嚢上皮層へと移行し、時間経過と共に、その量は増加していた。嚢内の浮遊細胞内にも多量の KM の集積をみた。以上の結果は、内リンパ嚢においては全身投与された薬物は内リンパへかなり permeable で、内耳の他部位に比較して、より容易に局所の内リンパへ移行しうることを示唆するものであり、薬物の内耳障害を考える上でも、内リンパ嚢は、今後さらに検討されるべき部位だと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Leach W: Ototoxicity of neomycin and other antibiotics. *J Laryngol Otol* **76**: 774~789, 1962.
- 2) Dayal VS, Smith EL and McCain WG: Cochlear and vestibular gentamycin toxicity. *Arch Otolaryngol* **100**: 338~340, 1974.
- 3) Hawkins JE and Engström H: Effect of kanamycin on cochlear cytoarchitecture. *Acta Otolaryngol [Suppl] (Stockh)* **188**: 100~107, 1964.
- 4) Konishi T: Effects of local application of Ototoxic antibiotics on cochlear potentials in guinea pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **88**: 41~46, 1979.
- 5) Pollay M and Roberts PA: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. *Neurosurg* **6**: 6; 675~685, 1980.
- 6) Duval AJ III, Quick CA and Sutherland CR: Horseradish peroxidase in the lateral cochlear wall. An electron microscopic study of transport. *Arch Otolaryngol* **93**: 304~316, 1971.
- 7) Hirokawa N: Freeze-fracture study of intercellular junctions between various kinds of epithelial cells surrounding common endolymphatic space in the hearing organ of the chick. *Anat Rec* **196**: 129~143, 1980.
- 8) Jahnke K: The blood-perilymph barrier. *Arch Otorhinolaryngol* **228**: 29~34, 1980.
- 9) Lundquist PG: The endolymphatic duct and sac in the guinea pig. *Acta Otolaryngol [Suppl] (Stockh)* **201**: 1~108, 1965.
- 10) 山根英雄, 井元俊夫, 中井義明: 内リンパ管及び内リンパ嚢の微細構造. *Equilibrium Res* **42**: 9~15, 1983.
- 11) Nakai Y, Zushi K, Chang KC, Yagi H and Tokimoto T: An experimental study on the progressiveness of cochlear damage by aminoglycoside drug. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **91**: 199~206, 1981.
- 12) Brummet RE, Traynor J, Brown R and Himes D: Cochlear damage resulting from kanamycin and furosemide. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **80**: 86~92, 1975.
- 13) Matsuura S, Ikeda K and Furukawa T: Effects of streptomycin, kanamycin, quinine and other drugs on microphonic potentials of goldfish sacculus. *Jap J Physiol* **21**: 579~590, 1971.
- 14) Engström H and Hjorth S: On the distribution and localization of injected dyes in the labyrinth of the guinea pig. *Acta Otolaryngol [Suppl] (Stockh)* **95**: 149~158, 1950.
- 15) Bagger-Sjöbäck D, Rask-Andersen H and Lundquist PG: Intercellular junctions in the epithelium of the endolymphatic sac: a freeze-fracture and TEM study on the guinea pigs labyrinth. In: Vosteen KH, Schuknecht H, Pfaltz CR, Wersäll J, Kimura RS, Morgenstern C and Juhn SK (eds) *Ménière's disease. pathogenesis, diagnosis and treatment*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 127~140, 1980.
- 16) Guild SR: The circulation of the endolymph. *Am J Anat* **39**: 57~81, 1927.
- 17) Morgenstern C, Miyamoto H, Arnold H and Vosteen KH: Functional and morphological findings of the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **93**: 187~194, 1982.

- 18) 二木 隆, 石井甲介, 山根雅昭, 太田 健, 平井
浩一: メニエール病患者の内リンパ嚢を用いた内
リンパ嚢内リンパ液中の免疫グロブリン IgG の
検出について. 耳鼻臨床 77: 2143~2147, 1984.

- 19) Yamane H: Unpublished data.

(別刷請求先: 山根 英雄
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室)