耳毒性薬物によるカエル半規管障害について

——生理学的ならびに形態学的研究——

小 村 良

Effects of an Ototoxic Drug on the Frog Semicircular Canal Crista

—Physiological and Morphological Study—

Ryo Omura

(Hiroshima University)

The effect of Gentamicin on the vestibular system was studied using bullfrogs. The ototoxicity was compared using 3 different routes of administration, i.e., intraperitoneally (IP), intramuscularly (IM) and intralabyrinthine (IL). Morphological change of the posterior canal crista was observed by SEM. The posterior canal ampullary nerve action potentials (AP) in response to 3 classes of mechanical endolymphatic flow were recorded. The change in AP maximum spike count was compared with SEM findings of the sensory epithelia.

SEM revealed no damage in the crista of IP-injected animals. In IM-injected animals, mild changes were found. IL injection, however, resulted in severe damage. The damage started at the portion between the center and the periphery of the crista and developed toward the center and finally toward the periphery. The damage also progressed with the lapse of time after injection, indicating "delayed ototoxicity". Changes in the AP were already noticed even in the animals without damage in the surface structure. Decrease in the AP maximum spike count was minimum in IP-injected animals and was maximum with IL injection. With any type of injection, the decrease in the AP tended to correlate with the degree of the damage in the sensory epithelia. The bullfrog may serve as a good model for evaluating both physiological and morphological effects of ototoxicity

Key words: intraperitoneal injection, intramuscular injection, intralabyrinthine injection, frog semicircular canal, Gentamicin

緒 言

耳毒性薬物による内耳感覚器の障害は臨床的によく知られており、この障害様式を形態学的変化のみならず、生理学的変化の面からも把握しようとする実験的基礎的研究は数多くなされ

ている。とくに蝸牛有毛細胞の障害様式は、生理学、形態学両面から詳しく研究されている。しかし、耳毒性薬物の前庭器障害に関する研究は少なく、障害様式を生理学、形態学両面より検討した報告はほとんどみられていない。

そこで耳毒性薬物による半規管の障害様式を生理学、形態学両面より観察し、さらに両者の相関性について検討する目的で、比較的容易に活動電位の得られるカエル半規管を用い、耳毒性薬物による膨大部神経活動電位の変化と、膨大部感覚上皮の形態学的変化とを定量的に観察し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 実験材料および薬物投与方法

実験動物としては体重 100 g 前後のウシガエル (*Rana catesbeiana*) 38匹を用いた。耳毒性薬物としては硫酸ゲンタマイシン (GM と略す) をえらび、表 1 に示した方法で投与した。動物は 5 群に分け、3 種の障害群と 2 種のコン

トロール群を設定した。

第 1 群は腹腔内投与群とし、GM 100 mg/kg を 7 日間 連日 腹腔内に投与し、投与終了 1 週後、2 週後に断頭した。第 2 群は筋注群とし、GM 100 mg/kg を 7 日間 連日 大腿内側部に筋注し、投与終了 1 週後、2 週後、3 週後、4 週後に断頭した。第 3 群は内耳内投与群とし、両側内耳内に GM 80 μ g (2 μ l) を 3 日間連日投与し、投与終了翌日、4 日後、1 週後に断頭した。第 4 群は無処置のまま断頭し、腹腔内投与群および筋注群のコントロール (コントロール①群) とした。第 5 群は両側内耳内に生理的食塩水 2 μ l を 3 日間連日投与し、投与終了 1 週間後に断頭し、内耳内投与群のコントロール (コントロール②群) とした。

図 1 はウシガエル内耳の模式図で¹⁾、内耳内投与法を示したものである。口蓋粘膜を切開し、otic capsule を露出すると、白色を呈した sacculus の耳石が透視できる。これを指標とし注意深く microsyringe を刺入し、perilymphatic cistern に薬液を注入した。

2. 刺激および活動電位記録法

各群のカエルは断頭後、頭部を Frog Ringer 液 (NaCl 6.4587 g/l, KCl 0.1863 g/l, CaCl₂ 0.1997 g/l, NaHCO₃ 0.2 g/l) 内に浸し、実体

表 1 薬物投与方法と使用内耳数

投与経路	薬物投与条件	n
1. 腹腔内投与群	GM 100mg/kg 7日間投与 (1週後 2週後)	5 4
2. 筋注群	GM 100mg/kg 7日間投与 (1週後 2週後 3週後 4週後)	6 5 4 4
3. 内耳内投与群	GM 80 μ g (2 μ l) 3日間投与 (翌日 4日後 1週後)	7 8 6
4. コントロール 1 群	無 処 置	19
5. コントロール 2 群	生食 2 μ l 内耳内 3日間投与 1 週後	7

図 1 内耳内投与法の模式図 (前額断) (Frishkopf LS and Goldstein : 1963¹⁾ より改変)

図2 実験装置のブロックダイアグラム

顕微鏡下に後半規管および後半規管膨大部神経を摘出した。まず後半規管膨大部神経をできるだけ中枢側で切断し、ついで後半規管の utricular side, canal side を切断した。この過程は原田の方法²⁾に準じて行なった。図2のごとく摘出した後半規管の canal side に微細ポリエチレン管を挿入し、一方、後半規管膨大部神経をガラス吸引電極で吸引した。ポリエチレン管は容量 $5\mu\text{l}$ の microsyringe に接続され、syringe を micromanipulator で駆動することにより、反膨大部向の内リンパ流動を生ぜしめた。刺激量は3段階とし、 $0.012\mu\text{l}$ 、 $0.036\mu\text{l}$ 、 $0.06\mu\text{l}$ の内リンパ流動を生じる量、すなわちクプラの偏位角でそれぞれ約 6° 、 18° 、 30° の偏位をおこす量とし、それぞれ刺激1、刺激2、刺激3とした。なお、刺激持続時間は10秒とした。吸引電極で誘導された活動電位は、増幅器（日本光電 VC-10）で観察し、データレコーダで記録した（AC 記録）。得られた AC 電位は、コンピューター（ATAC 450）を通して振幅 $40\mu\text{V}$ 以上のスパイク数を計算し、スパイク密度ヒストグラムに変換した。そして刺激1、刺激2、刺激3における最大スパイク数/sec を記録し、生理学的障害程度の指標とした。さらに刺激3における反応の減衰時定数をヒストグラム上で計測した。なお活動電位記録時には、内リンパ流動下のクプラの動きを詳細に観察し、クプ

ラの運動自体には薬液注入による機械的障害がないことを確認した。断頭後、活動電位記録までの操作は約35分で終了した。

3. 形態学的観察法

活動電位記録終了後、ただちに両側後半規管を同時に 2.5% グルタルアルデヒド液にて固定し、2% タニン酸、2% オスミウム酸による重固定後、上昇エタノール系列にて脱水、酢酸イソアミルで置換後、臨界点乾燥、金スパッタコーティングを行ない、後半規管膨大部稜（crista と略す）感覚上皮を走査型電子顕微鏡（HITACHI S-800, SEM と略す）で観察した。

crista 感覚上皮における生存有毛細胞数を正確に算定することは困難と思われたので、GM による cristae 感覚上皮の障害度は半定量的表現を用いて記録した。すなわち図3のように感覚上皮障害程度を0度～4度の5段階に分類した。感覚上皮に全く障害を認めないものを0度、crista の中央部（eminencia cruciata）をはさむ両側の狭小部（狭小部と略す）に感覚毛の膨化や融合を認めるものを1度、狭小部の感覚毛は脱落し、中央部の感覚毛に膨化や融合を認めるものを2度、狭小部、中央部ともに感覚毛の脱落を認めるものを3度、crista 長軸方向での辺縁部（辺縁部と略す）にまで感覚毛の脱落が進展したものを4度とした。この障害度数を

用いて形態学的障害の程度を記録した。

以上のようにして各群の生理学的、形態学的障害程度を数量化して表現、記録することにより、GM 投与終了後断頭までの経過日数（経過日数と略す）からみた活動電位の変化、経過日数からみた感覚上皮障害度、感覚上皮障害度と活動電位の関係、反応の減衰時定数からみた生理学的障害様式の4点について検討を行なった。

結 果

まずコントロール②群については、その最大スパイク数は表2からわかるようにコントロール①群（無処置群）とほぼ等しい値を示し、形態学的にも感覚上皮の障害は認められなかつ

図3 感覚上皮障害度の模式図

た。すなわち内耳内への生理的食塩水投与では、生理学的にも形態学的にも半規管障害は認められなかった。したがって内耳内投与群における半規管障害は、GMの薬物そのものによる影響と考えられた。

全身状態については腹腔内投与群では腹水貯留による著明な腹部膨満をきたし、GM投与終了後2週以上経過すると死亡例が多くなったため、観察期間は投与終了2週後までとした。筋注群でも軽度の腹部膨満がみられたが死亡例は少なく、観察期間は投与終了4週後までとした。内耳内投与群では姿勢に変化はみられず、またGM投与終了1週後で高度の生理学的、形態学的障害が出現したため、観察期間は投与終了1週後までとした。

1. 経過日数からみた活動電位の変化

各群の経過日数別にみた刺激1, 2, 3における活動電位最大スパイク数、およびコントロール群に対するスパイク数百分率を表2に示した。以下、各群ごとに結果を述べる。

(i) 腹腔内投与群

図4にコントロール①群および腹腔内投与群の刺激1, 2, 3における活動電位最大スパイ

表2 経過日数と活動電位

投与経路	投与後経過日数	最大 spike 数/sec (コントロール群の平均値に対する百分率 %)		
		刺激 1	刺激 2	刺激 3
腹腔内投与群	1 週 (n=5)	227±46 (67.3±13.7)	407±57 (94.0±13.3)	432±61 (98.5±14.0)
	2 週 (n=4)	203±16 ^{##} (60.0±4.9)	365±64 (84.4±14.8)	378±69 (86.1±15.8)
筋注群	1 週 (n=6)	166±54 ^{##} (49.2±16.1)	317±80 ^{##} (73.1±18.4)	350±80 ^{##} (80.1±18.4)
	2 週 (n=5)	57±10 ^{##} (17.0±2.9)	255±58 (58.8±13.5)	325±77 (74.0±17.5)
	3 週 (n=4)	22±6 ^{##} (6.5±1.6)	162±64 (37.5±14.9)	235±97 (53.7±22.2)
	4 週 (n=4)	23±13 (6.4±4.0)	144±23 (33.1±5.2)	234±81 (53.3±18.5)
内耳内投与群	翌日 (n=7)	41±17 ^{##} (12.1±5.1)	66±36 ^{##} (15.2±8.4)	91±45 ^{##} (20.7±10.3)
	4 日 (n=8)	34±10 (10.1±3.1)	54±19 (11.9±4.4)	87±47 (19.9±10.9)
	1 週 (n=6)	21±12 (6.1±3.5)	37±24 (8.6±5.5)	54±20 (12.3±4.6)
コントロール ① 群 (n=19)		338±124	433±81	439±84
コントロール ② 群 (n=7)		322±72	433±20	437±39

各値は平均値±標準偏差。

コントロール群との間に^{##}P<0.05, ^{##}P<0.01で最初に有意差を認めた。

1 週前の経過日数の群に比し^{##}P<0.01で有意に低い。

ク数を経過日数別に示した。コントロール①群，すなわち無処置群ではスパイク数約 350～450 spike/sec の良好な反応が得られ，刺激量が大きい程スパイク数も増加したが，刺激 3 で反応量はほぼ飽和に達した。

投与終了 1 週後のものでは，刺激 1，2，3 ともコントロール群に比しスパイク数は，それぞれ 67.3%，94.0%，98.5% と低下し，特に刺激 1（弱刺激）でのスパイク数低下が著明であった。刺激 2（中等度刺激）ではスパイク数低下は軽度で，刺激 3（強刺激）ではスパイク数低下はほとんどみられなかった。投与終了 2 週後のものでは刺激 1，2，3 ともスパイク数はさらに低下し，コントロール群に比し，それぞれ 60.0%，84.4%，86.1% と，投与終了 1 週後のものと同様，刺激量が小さい程スパイク数低下は著明であった。

(ii) 筋注群

図 5 のように筋注群ではスパイク数低下は高度であり，投与終了 1 週後のものでは，コント

ロール群に比しスパイク数は，それぞれの刺激で 49.2%，73.1%，80.1% と腹腔内投与群の投与終了 2 週後のものよりも低値であった。

投与終了 2 週後，3 週後，4 週後と経過日数が増すにつれ，スパイク数低下は高度となり，投与終了 4 週後のものでは，コントロール群に比しスパイク数は，それぞれの刺激で 6.4%，33.1%，53.3% と，弱刺激のみならず中等度刺激でもかなりの低下がみられた。

(iii) 内耳内投与群

図 6 のように内耳内投与群では，投与終了翌日ですでにスパイク数はコントロール群に比し，それぞれの刺激で 12.1%，15.2%，20.7% と高度の低下を示した。

投与終了 4 日後，1 週後と経過日数が増すにつれて，スパイク数低下はさらに高度となる傾向が認められた。また腹腔内投与群，筋注群と同様，刺激量が小さい程スパイク数は低下する傾向が認められたが，内耳内投与群では弱刺激，中等度刺激のみならず強刺激においても高

図 4 腹腔内投与群の経過日数と活動電位

図 5 筋注群の経過日数と活動電位

度のスパイク数低下がみられた。

以上経過日数からみた活動電位の変化をまとめると、

(1) 各障害群とも経過日数が増すにつれてスパイク数が減少する、いわゆる delayed ototoxicity が認められた。

(2) 各障害群とも経過日数にかかわらず、刺激量が小さい程スパイク数低下は著明であった。

(3) 生理学的障害が軽度の場合は弱刺激でのスパイク数低下が著明であるが、障害が高度になるにつれ、強刺激でのスパイク数も低下し、刺激量間のスパイク数の差がみられなくなった。

(4) 投与経路別にみた生理学的障害程度は、薬物投与条件が異なるので単純に比較できないが、今回用いた条件下では内耳内投与群>筋注群>腹腔内投与群の順に障害は高度であった。

2. 経過日数からみた感覚上皮障害度

crista 感覚上皮の障害様式を経時的に観察す

図6 内耳内投与群の経過日数と活動電位

ると、投与経路にかかわらず障害はまず crista 狭小部の感覚毛の膨化や融合に始まり、障害が進むと狭小部の感覚毛は脱落し、中央部の感覚毛に膨化や融合がみられるようになる。さらに障害が進むと中央部の感覚毛も脱落し、最終的には辺縁部にまで感覚毛の脱落が進展する。すなわち、障害度数で表現すると0度から4度へと順次進展する障害様式が認められた。

図7に各障害群別に、経過日数と感覚上皮障害度との関係を示した。

(i) 腹腔内投与群

投与終了1週間後のもの、2週間後のものとも全例、感覚上皮の障害は外観上みられなかった。

(ii) 筋注群

投与終了1週後のものおよび2週後のものでは、全例感覚上皮の障害は外観上みられなかった。投与終了3週後のものおよび4週のものでは、それぞれ4例中2例に1度の障害がみられた。すなわち経過日数が増すと軽度の障害が出

図7 経過日数と感覚上皮障害度

現した。

(iii) 内耳内投与群

図7から明らかなように全例1度以上の障害がみられ、経過日数が増すにつれて障害も高度となる傾向が認められた。

以上経過日数からみた感覚上皮障害度をまとめると、

(1) 腹腔内投与群では外観上障害はみられなかったが、筋注群および内耳内投与群では経過日数が増すにつれて障害が高度となるいわゆる delayed ototoxicity が認められた。

(2) 感覚上皮の障害は crista 狭小部に始まり、中央部、辺縁部へと進展した。

(3) 投与経路別にみた感覚上皮障害度は、内耳内投与群が最も高度で、筋注群ではごく軽度であった。なお腹腔内投与群では外観上障害はみられなかった。

3. 感覚上皮障害度と活動電位の関係

各群の障害度別にみた刺激1, 2, 3における活動電位最大スパイク数、およびコントロール群に対するスパイク数百分率を表3に示した。

図8～図15に各群における代表的な crista

感覚上皮の SEM 像とそれに対応する活動電位記録とを示す。活動電位記録の上段は、 $0.06 \mu\text{l}$ の反膨大部流刺激を10秒間持続負荷した際（刺激3）に誘導された活動電位の AC 記録である。下段はこの AC 電位のうち振幅 $40 \mu\text{V}$ 以上のスパイク数をヒストグラムで表示したスパイク密度ヒストグラムである。

図8はコントロール①群の代表例である。SEM 像では感覚上皮の変化はみられない。AC 記録では自発放電、活動放電とも良好な反応が得られた。スパイク密度ヒストグラムでは刺激直後よりスパイク数は増加し、時間の経過とともに減少し、最大スパイク数は約 400 spike/sec であった。以下、各障害群ごとに結果を述べる。

(i) 腹腔内投与群

図9は腹腔内投与群の代表例である。感覚上皮の変化はみられず、活動電位も良好な反応が得られ、最大スパイク数は約 400 spike/sec であった。

(ii) 筋注群

図10は障害度0度のものの代表例である。コントロール①群、腹腔内投与群と同様に感覚

表3 感覚上皮障害度と活動電位

投与経路	感覚上皮障害度	最大 spike 数/sec (コントロール群の平均値に対する百分率 %)		
		刺激 1	刺激 2	刺激 3
腹腔内投与群	0 度 (n = 9)	216 ± 38 (64.0 ± 11.3)	389 ± 64 (89.7 ± 14.8)	408 ± 70 (92.9 ± 16.1)
筋注群	0 度 (n = 15)	90 ± 74 ^{##} (26.6 ± 21.8)	243 ± 101 ^{##} (56.2 ± 23.4)	290 ± 109 ^{##} (65.9 ± 24.9)
	1 度 (n = 4)	28 ± 5 ^{**} (8.3 ± 1.5)	187 ± 41 ^{**} (43.2 ± 9.4)	315 ± 32 (72.4 ± 7.2)
内耳内投与群	1 度 (n = 5)	50 ± 16 ^{##} (14.8 ± 4.7)	75 ± 41 ^{##} (17.3 ± 9.5)	107 ± 57 ^{##} (24.4 ± 13.0)
	2 度 (n = 7)	30 ± 6 (8.9 ± 1.7)	55 ± 15 (12.7 ± 3.4)	87 ± 34 (19.9 ± 7.8)
	3 度 (n = 6)	31 ± 9 (9.2 ± 2.8)	48 ± 71 (11.0 ± 3.9)	64 ± 30 (14.7 ± 6.9)
	4 度 (n = 3)	12 ± 10 [*] (3.7 ± 3.0)	16 ± 6 [*] (3.8 ± 1.4)	41 ± 6 (9.4 ± 1.4)
コントロール①群	0 度 (n = 19)	338 ± 124	433 ± 81	439 ± 84
コントロール②群	0 度 (n = 7)	322 ± 72	433 ± 20	437 ± 39

各値は平均値 ± 標準偏差。

コントロール群との間に^{##}P<0.01で最初に有意差を認めた。

障害度が1段階前の群に比し^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01で有意に低い。

上皮の変化はみられないが、スパイク数は低下し、最大スパイク数は約 300 spike/sec であった。

図11は障害度1度のものの代表例である。SEM像では crista 狭小部に感覚毛の膨化、融合がみられる。活動電位は障害度0度のものと

図8 コントロール①群の SEM 像と活動電位

図9 腹腔内投与群の SEM 像と活動電位

比較して大差はなく、最大スパイク数は約 300 spike/sec であった。

図12にコントロール①群、腹腔内投与群およ

び筋注群の刺激 1, 2, 3 における最大スパイク数を感覚上皮の障害度別に示した。腹腔内投与群では感覚上皮の変化はみられなかったにも

図10 筋注群（障害度0度）の SEM 像と活動電位

図11 筋注群（障害度1度）の SEM 像と活動電位

図12 腹腔内投与群および筋注群の感覚上皮障害度と活動電位

図13 内耳内投与群（障害度1度）の SEM 像と活動電位

かわらず、スパイク数は刺激1でコントロール群に比し64.0%と著明に低下し、刺激2, 3でもそれぞれ89.7%, 92.9%と低下する傾向が認められた。筋注群では、障害度0度のものでは、刺激1, 2, 3ともスパイク数低下はより高度で、コントロール群に比し、それぞれ26.6%, 56.2%, 65.9%であった。筋注群の障害度1度のものでは、障害度0度のものに比し、刺激1, 2においてはスパイク数はさらに低下する傾向が認められたが、刺激3ではほとんど差はなかった。また腹腔内投与群、筋注群ともに刺激量が小さい程スパイク数低下は著明であった。

(iii) 内耳内投与群

図13は障害度1度のもので代表例である。SEM像では crista 狭小部に感覚毛の膨化、融合がみられる。活動電位は筋注群に比して著明に低下し、最大スパイク数は約 150 spike/sec であった。

図14は障害度2度のもので代表例である。SEM像では crista 狭小部の感覚毛は脱落し、

中央部の感覚毛に膨化, 融合がみられる. 活動電位は障害度1度のものよりさらに低下し, 最大スパイク数は約 100 spike/sec であった.

図15は障害度3度のものの代表例である.

SEM 像では crista 狭小部から中央部にかけて感覚毛の脱落, 消失がみられる. 活動電位は障害度2度のものよりさらに低下し, 最大スパイク数は約 80 spike/sec であった.

図14 内耳内投与群 (障害度2度) の SEM 像と活動電位

図15 内耳内投与群 (障害度3度) の SEM 像と活動電位

図 16 は 障害度 4 度のものの代表例である。SEM 像では crista 狭小部から中央部にかけて感覚毛は全く消失し、辺縁部にも感覚毛の脱落がみられる。活動電位は障害度 3 度のものよりさらに低下し、最大スパイク数は約 40 spike/sec であった。

図 17 に内耳内投与群の刺激 1, 2, 3 における最大スパイク数を、感覚上皮障害度別に示した。障害度 1 度のものですでにスパイク数はコントロール群に比し、それぞれの刺激で 14.8%, 17.3%, 24.4% と著明に低下した。さらに障害度が 2 度, 3 度, 4 度と進むにつれて、スパイク数も次第に低下する傾向が認められた。また感覚上皮障害度にかかわらず、刺激量が小さい程スパイク数低下は著明であった。また感覚上皮障害度が 4 度、すなわち辺縁部に少数の感覚毛の残存しかみられない高度の障害でも、各刺激における最大スパイク数は 12 spike/sec, 16 spike/sec, 41 spike/sec とわずかではあるが反応は認められた。なお感覚上皮障害度 1 度のものどうしを比較すると、筋注群よりも内耳内投与群の方がスパイク数低下は高度であ

図 17 内耳内投与群の感覚上皮障害度と活動電位

図 16 内耳内投与群 (障害度 4 度) の SEM 像と活動電位

った。

以上、感覚上皮障害度と活動電位の関係をまとめると、

(1) 感覚上皮障害が高度になるにしたがい、スパイク数は低下する傾向が認められた。

(2) 各障害群とも感覚上皮障害度にかかわらず、刺激量が小さい程スパイク数低下は著明であった。

(3) 生理学的障害が軽度の場合は、弱刺激でのスパイク数低下が著明であるが、障害が高度になるにつれ、強刺激でのスパイク数も低下し、刺激量間のスパイク数の差がみられなくなった。

(4) 投与経路別にみた生理学的障害程度は、感覚上皮障害度が同じものどうしを比較すると、内耳内投与群>筋注群>腹腔内投与群の順に障害は高度であった。

(5) 腹腔内投与群および筋注群においては、感覚上皮障害が出現する以前にすでにスパイク数低下がみられた。

4. 反応の減衰時時定数からみた生理学的障害様式

コントロール①群および各障害群の、刺激3における反応の減衰時時定数を表4に示した。なお、筋注および内耳内投与群において、スパイク数低下が著しく、ヒストグラム上で時定数計測が困難なものは除外した。腹腔内投与群の時定数は5.0 secでコントロール群と差はなかった。筋注群では2.7 sec、内耳内投与群では1.4 secと障害が進むにつれて時定数は小となる傾向が認められた。

表4 反応の減衰時時定数

投 与 経 路	時定数 (sec)
腹腔内投与群 (n=9 / 9)	5.0 ± 1.5
筋 注 群 (n=16/19)	2.7 ± 1.1
内耳内投与群 (n=6 / 21)	1.4 ± 0.7
コントロール①群 (n=19/19)	5.0 ± 2.0

数値は刺激3における時定数の平均値±標準偏差

考 按

耳毒性薬物による内耳障害様式に関しては多くの形態学的、生理学的研究があり、とくに蝸牛については、蝸電図, shiver audiometry, 条件反射を利用した聴力検査などを用い、基底板に沿った有毛細胞の障害範囲と周波数毎の聴力閾値上昇とを対比させた研究が行なわれている^{3)~5)}。しかし、耳毒性薬物の前庭器障害に関する研究は少なく、感覚上皮の形態学的変化と、回転後眼振検査、温度眼振検査などの機能検査とを対比させた研究はいくらかみられるが^{5)~8)}、電気生理学的に実際に前庭一次ニューロンより活動電位を誘導し、感覚上皮の形態学的変化とを比較検討した報告はほとんどみられていない。この方面からの研究では、鈴木⁹⁾がウシガエルを用いてゲンタマイシンの鼓室内注入ならびに内耳内注入を行なった際の半規管障害について検討し、活動電位の減少と感覚上皮の形態学的障害との間に関連性が認められたと報告している。

原田^{2)10)~12)}はカエル摘出後半規管を用い、人工的内リンパ流で刺激することにより、半規管受容器電位を詳細に検討し、Ewaldの法則を電気生理学的に証明すると同時に、各種耳毒性薬物の半規管への直接作用について報告を行なっている。この原田らの実験をもとに、生体より摘出後も比較的長時間にわたり安定した活動電位の得られるウシガエル後半規管を用い、耳毒性薬物による半規管障害を生理学、形態学両面より定量的に評価し、さらに両者の関連性について検討することを目的に実験を行なった。

形態学的障害については crista の狭小部から感覚毛の融合、膨化、脱落などの変化が始まり、中央部、辺縁部へとしだいに進展する障害様式が観察された。モルモット、猫などにおいてはアミノ配糖体による半規管障害は crista 中央部から始まり、周辺部へと進展するとされている^{6)13)~16)}。またこれらの動物の感覚細胞にはI型細胞とII型細胞とがあり、I型細胞は crista 中央部に多く存在し、II型細胞は crista

周辺部に多く存在し¹⁷⁾¹⁸⁾、耳毒性薬物に対する受傷性は細胞表面のより大きいI型細胞の方が高いといわれている¹⁹⁾。

一方カエルの前庭感覚細胞はII型細胞のみであることが知られている²⁰⁾。原田²¹⁾²²⁾はカエル半規管膨大部稜のSEMによる観察をおこない、前後半規管にはcrista中央部に*eminentia cruciata*と称する小突起を認め、感覚毛の配列は*eminentia cruciata*に近い部では規則的かつ密度は小であるのに対し、半月状面に近い部では不規則かつ無数にみられると報告している。したがって、今回の結果で*eminentia cruciata*の両側部で感覚毛が規則的配列を示す部位は、他の部位に比し薬剤感受性が高かったことより、この部の感覚細胞は同じII型細胞の中でもI型細胞に近い性格を有する可能性が示唆された。

生理学的障害様式については、障害が軽度の場合は弱刺激での電位減少が著しく、障害が高度になるにつれ強刺激での電位も減少し、刺激量間の電位の差がみられなくなった。このことより、cristaの個々の有毛細胞についてみると、閾値の低い受容器がまず障害され、順次閾値の高い受容器へ障害がおよぶものと考えられる。八木²³⁾はネコ外側半規管一次ニューロンにおいては、閾値の低い受容器は自発放電が不規則で、回転加速度に対して順応型反応を示すとした。さらに鈴木²⁴⁾によれば、カエル後半規管についても、不規則で*rapid adaptation*を示す活動放電は、crista中央部付近の感覚細胞に由来することがわかっている。したがって今回得られた弱刺激に対する電位がまず低下するという事実は、crista中央部付近から障害が始まるという形態学的所見と一致するところとなった。

反応の減衰時定数は障害が高度になるにつれ減少する傾向が認められた。Haradaら²⁵⁾は、カエル後半規管神経の活動電位を*phasic component*と*tonic component*に分け、*phasic component*は*rapid adaptation*を示し、角速

度の変化をモニターするものとした。一方鈴木²⁴⁾によれば、カエル後半規管感覚細胞のciliaを直接圧迫偏位させた際の反応の減衰時定数は、cristaの外側部ほど大で、中央部付近では小であるという。したがってこれらより、カエル後半規管神経の活動電位にはcrista中央部付近では*phasic component*が多く、外側部では*tonic component*が多く含まれるものと考えられる。今回の結果では、障害が進むにつれ時定数が減少したことより、形態学的障害はcrista中央部付近より始まるが、生理学的には*phasic component*と同時に*tonic component*もかなり早期に障害されてくるものと推測された。そして障害がさらに進むと、最終的には*phasic component*は消失し、小振幅の*tonic component*のみが残るという所見が得られた。

感覚上皮に障害がまだみられない時点ですでに活動電位が低下したことに関しては、同様の所見を志多²⁶⁾が、モルモット正門窓窩にクロラムフェニコールを滴下した実験で示している。すなわち、形態学的には有毛細胞に変化がみられない時期にすでに蝸牛内電位が減少したという。また、豊田²⁷⁾もモルモットの鼓室にカナマイシンおよび硫酸ストレプトマイシンを注入した実験で、注入後3～4時間ですでに注入側の前庭機能脱落状態をきたしているにもかかわらず、前庭感覚器には形態学的には何ら変化を示さなかったと報告している。ここで有毛細胞における活動電位の発現機構を、感覚毛束の偏位と、細胞内部での興奮伝達とに大きく分けて考えると、耳毒性薬物投与ではまず最初に細胞内部での興奮伝達機構が障害され、ついで感覚毛の膨化、融合、消失による機械的な刺激受容機構が障害されるものと推測される。さらに、たとえ軽度の障害であっても、いったん感覚上皮障害が出現すると、活動電位は高度の低下を示すことより、細胞内部での興奮伝達機構の障害がかなり進行してはじめて、細胞表面の形態学的障害が出現するものと考えられる。

GMの投与経路別にみた生理学的および形

態学的障害程度は、内耳内投与群>筋注群>腹腔内投与群の順に高度であった。Brumett²⁸⁾は、耳毒性薬物による内耳障害は外リンパ中の薬物濃度が高いものほど高度であったと報告している。図1のようにウngaエルの内外リンパ腔は一層の扁平な細胞層で分離されており、内耳内投与では高濃度のGMを直接外リンパ腔に注入したため、全身投与に比し、より短時間に高度の障害が出現したものと考えられる。また筋注群の方が腹腔内投与群よりも障害が高度であった理由は、腹腔内投与群は注射期間中より著明な腹水貯留がみられ、このために注入したGMが希釈され、吸収効率が悪かったものと考えられた。

さらに内耳内投与群と筋注群とで感覚上皮障害が同じものどうしを比較すると、スパイク数低下は内耳内投与群の方が高度であった。Harada¹¹⁾はカエル摘出半規管に直接アミノ配糖体系薬剤を作用させた実験で、薬剤添加後より活動電位は低下するが、薬剤をwash outすると電位が回復したことより、この場合のアミノ配糖体系薬剤の作用部位は感覚細胞表面で、薬剤中の正に荷電したイオンが細胞表面に付着し、反応性を低下させるものとした。したがって、感覚上皮障害が同じであるにもかかわらず、筋注群よりも内耳内投与群の方がスパイク数低下が高度であった原因は、内耳内投与群の場合は、感覚毛の障害および細胞内部の障害以外に、感覚細胞膜の障害も関与するためと推測された。

今後は、細胞内部の形態学的観察もあわせて行ない、とくに早期の障害様式について詳細に検討する予定である。

結 語

ウngaエルを用いて、ゲンタマイシンの腹腔内投与、筋注、内耳内投与を行ない、後半規管の障害様式を形態学的、生理学的に観察した。すなわち膨大部稜感覚上皮の形態学的変化をSEMにて観察し、3段階の機械的内リンパ流動刺激を加えた際の膨大部神経の活動電位最大

スパイク数を記録し、両者を比較検討した。その結果、次のような結論を得た。

- 1) 形態学的には、内耳内投与>筋注>腹腔内投与の順に障害が高度で、cristaにおける受傷性は狭小部>中央部>辺縁部の順に高かった。また、経過日数が増すにつれて障害が高度となるいわゆるdelayed ototoxicityが認められた。
- 2) 生理学的にも、内耳内投与>筋注>腹腔内投与の順に障害が高度であった。また、弱刺激での活動電位低下が著明であり、閾値の低い受容器から障害が始まるものと考えられた。
- 3) 形態学的障害の出現以前にすでに活動電位の低下がみられた。形態学的障害が高度になるにしたがい、活動電位は低下した。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師原田康夫教授に深甚なる謝意を表します。さらに、本研究に際し、絶えず御指導と御助言を戴いた鈴木 衛講師、技官村尾 学氏をはじめ本教室員の皆様に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第46回日本平衡神経科学会総会において発表した。

参考文献

- 1) Frishkopf LS and Goldstein MH: Responses to acoustic stimuli from single units in the eighth nerve of the bullfrog. *J Acoust Soc Am* 35: 1219~1228, 1963.
- 2) Harada Y and Musso E: Study of the action potential in the isolated posterior ampullar receptor. *Acta Otolaryngol* 72: 274~280, 1971.
- 3) Anniko M and Moller AR: A physiological and morphological study of the cochlea of the rat following treatment with atoxyl and neomycin. *Acta Otolaryngol* 86: 201~211, 1978.
- 4) Ylikoski J: Correlation studies on the cochlear pathology and hearing loss in guinea pigs after intoxication with ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 326: 1~62, 1974.
- 5) McGee TM and Olszewski J: Streptomycin sulfate and dihydrostreptomycin toxicity. *Arch Otolaryng* 75: 295~311, 1962.
- 6) Wersäll J and Hawkins JE Jr: The vestibular sensory epithelia in the cat labyrinth and their

- reactions in chronic streptomycin intoxication. *Acta Otolaryngol* 54 : 1~23, 1962.
- 7) Nagaba M : Electron microscopic study of semicircular canal organs and otolith organs of squirrel monkeys after administration of streptomycin sulfate. *Acta Otolaryngol* 66 : 541~552, 1968.
 - 8) 小川 明 : 耳毒性抗生物質による内耳障害に関する機能的および組織学的研究. *Audiology Japan* 18 補1 : 1~19, 1975.
 - 9) 鈴木 衛, 原田康夫 : 耳毒性薬剤のカエル鼓室内注入による前庭器障害について. *耳鼻臨床 補* 8 : 53~58, 1986.
 - 10) 原田康夫 : 蛙摘出半規管受容器の活動電位とEwaldの法則. *日耳鼻* 74 : 1335~1339, 1971.
 - 11) Harada Y : Action of streptomycin, dihydrostreptomycin, neomycin and kanamycin on the ampullar receptors of the frog. *Acta Otolaryngol* 64 : 327~337, 1967.
 - 12) Harada Y : The influence of quinine on the ampullar receptors of the isolated posterior semicircular canal of the frog. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 69 : 200~205, 1970.
 - 13) 原田康夫 : 耳中毒性薬物の前庭器に及ぼす影響. *耳鼻* 23 : 604~608, 1977.
 - 14) Wersäll J, et al : Sensory hair fusion in vestibular sensory cells after gentamicin exposure. *Arch Ohr-Nas- u Kehlk Heilk* 200 : 1~14, 1971.
 - 15) Lindeman HH : Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 67 : 177~189, 1969.
 - 16) Watanuki K et al : Toxic effects of gentamycin upon the peripheral vestibular sensory organs. *Laryngoscope* 82 : 363~371, 1972.
 - 17) Wersäll J : Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 126 : 1~85, 1956.
 - 18) Flock Å and Wersäll J : A study of the orientation in the sensory hairs of the receptor cells in the lateral line organs of fish, with special reference to the function of the receptors. *J Cell Biol* 15 : 19, 1962.
 - 19) 綿貫幸三 : 前庭感覚器のSMおよびKM中毒の病理学的研究. *日耳鼻* 74 : 1028~1035, 1971.
 - 20) Wersäll J, Flock Å and Lundquist PG : Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Biol* : 115~132, 1965.
 - 21) 原田康夫 : 半規管膨大部の生体観察並びに走査電顕による観察. *日耳鼻* 74 : 1036~1039, 1971.
 - 22) 原田康夫 : 走査電顕による半規管膨大部稜の観察. *日耳鼻* 75 : 546~549, 1972.
 - 23) 八木聡明, Simpson NE, Markham CH : ネコ前庭一次ニューロンの電気生理学的特性. *Equilibrium Res* 37 : 13~18, 1978.
 - 24) 鈴木 衛, 原田康夫 : カエル半規管活動電位のcrista内 localization について—とくに時間経過からの検討—. *Equilibrium Res* 44 : 146~149, 1985.
 - 25) Harada Y and Hirata K : Phasic components of frog semicircular canal. *Annals of the New York academy of sciences* 374 : 31~39, 1981.
 - 26) 志多 亨 : 薬液の鼓室腔内滴下と蝸牛障害—聴覚電気生理学的研究から—. *耳喉* 51 : 867~873, 1979.
 - 27) 豊田弥八郎 : アミノ配糖体系抗生物質による内耳障害様式に関する実験的研究. *耳鼻臨床* 67 : 481~494, 1974.
 - 28) Brummett RE, Fox KE, Brown RT, et al : Comparative ototoxic liability of netilmicin and gentamicin. *Arch Otolaryngol* 104 : 579~584, 1978.

(別刷請求先 : 小村 良
〒734 広島市南区霞 1-2-3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)