

AM-715 のネコ網膜に対する影響

入倉 勉・平山 隆士・大久保秀夫・伊藤由規男・西納 啓吾
杏林製薬株式会社中央研究所

AM-715 の静脈内定速持続注入、または14日間連続経口投与によるネコの網膜に及ぼす影響を、網膜電図 (ERG) および病理組織学的所見を指標として、nalidixic acid (NA) と比較検討した。

1) 40 mg/kg (0.8 ml/min) の静脈内定速持続注入により、AM-715 では有意な ERG 波形の変化が認められず、NA では各波成分の潜時が延長し、更に op 波および b 波成分が消失した。

2) 14日間の連続経口投与により、AM-715 の 50, 100 および 200 mg/kg/day ではいずれも ERG 波形の変化はなく、組織学的にも明らかな異常は認められなかった。NA の 100~200 mg/kg/day により、ERG の変化および組織学的な異常が多数例に認められた。

以上の実験結果から、AM-715 は網膜毒性作用のない安全な合成抗菌剤であると考えられる。

AM-715 は杏林製薬株式会社において新規に開発された quinolinecarboxylic acid 誘導体の合成抗菌剤であり強い抗菌活性と広範囲の抗菌スペクトラムを有している¹⁾。現在、類縁構造を有する抗菌剤、その他の抗生物質による視覚器、聴器または腎毒性などの副作用は問題となるところである。

今回、安全性評価の一環として、AM-715 をネコに静脈内定速持続注入、または14日間連続経口投与した時の網膜に及ぼす影響について、類縁化合物の nalidixic acid (NA) を対照に比較検討したので報告する。

1. 実験材料および方法

1. 使用動物および飼育条件

日本医科より購入した成熟ネコ雄雌の 2.25~4.95 kg を使用した。ネコは個別ケージに一匹ずつ収容し、室温 24±2°C、湿度 60±5%、明12時間、暗12時間の環境で約1週間飼育した後、実験に供した。飼料は日本クレア製の CG-3 を、飲料水は水道水を与えた。

2. 網膜電図 (ERG) 記録

ERG は筋弛緩剤 (gallamine-triethiodide 帝国化学) 5 mg/kg 筋肉内投与で非動化、人工呼吸下、またはケタラル (三共) 20 mg/kg 筋肉内投与で麻酔下に測定した。前者の条件では無投与群と薬物投与群との間で ERG を比較し、後者の条件では同一個体で薬物投与前後の変化を比較した。

硫酸アトロピン (半井化学) 2 mg/kg 筋肉内投与により散瞳させ、暗室内に15分以上放置し暗順応状態にした後、眼前 30 cm の距離からレチノグラム用刺激装置 (3G 21-P 三栄測器) を用いて、光量 1, 10 および 20 ジュー

ルを30秒に1回の頻度で閃光刺激した。

閃電極として白金線で作製したリング電極を角膜表面に軽く接触させ、不閃電極は頭部皮下に刺入し角膜誘導法により ERG を導出した。

誘導された ERG はオシロスコープ (VC-9 日本光電) 上に時定数 0.01 または 0.03 秒で掃引し、加算平均装置 (ATAC-201 日本光電) により 5 回加算平均した後、XY レコーダー (WX-4401 渡辺測器) 上に描記させた。

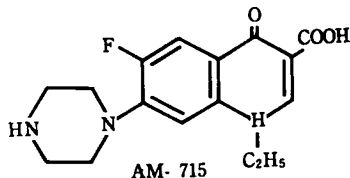
3. 病理組織学的検索

薬物投与終了時に ERG を測定し、その後総頸動脈より放血、致死せしめ直ちに両眼球を摘出した。沖坂²⁾の方法に従い、4% グルタルアルデヒドおよび5% ホルマリンで固定し、エタノール上昇系列で脱水した後、2% セロイジン、アバティー氏油混合液、ベンゼンにて浸透した。パラフィン包埋後薄切し、HE 染色を施して鏡検した。

4. 被検薬物および投与条件

AM-715 は下記の化学構造式 (Fig. 1) を有する白色結晶性粉末で分子量 319.33、融点 220~224°C を示す。

Fig. 1 Chemical structure of AM-715



1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid

対照薬物には NA を用いた。

1) 静脈内定速持続注入試験

AM-715 (塩酸塩) は生理食塩液に溶解し 0.6% 溶液 (pH 5.5) を作成した。NA は 1N NaOH 溶液に溶解後、1N HCl 溶液で逆滴し、更に生理食塩液を加え 0.6% 溶液 (pH 8.2) を作成した。

各薬物は定速注入装置を用いて 0.8 ml/min の一定速度で、40 mg/kg を前肢静脈より投与した (AM-715, 3 例, NA, 2 例)。同時に大腿動脈より血圧をモニターした。

2) 連続経口投与試験

AM-715 および NA は 0.3% CMC 溶液に懸濁し、各々 5 ml/kg および 2.5 ml/kg の容量を胃カテーテルを用いて強制経口投与した。AM-715 は 50 mg/kg (3 例), 100 mg/kg (4 例), 200 mg/kg (5 例) を毎日 1 回 14 日間投与した。NA は、NA 投与後一般症状観察を行い、強い中枢興奮症状の有無に従って適宜投与量を増減しながら、100~200 mg/kg (9 例) を毎日 1 回 14 日間経口投与した。いずれの薬物も嘔吐を生じた場合は 3 時間後に 50 mg/kg を追加投与した。

II. 実験結果

1. 静脈内定速持続注入試験

薬物投与前後の血圧の変化を Fig. 2, ERG 波形の変化を Fig. 3~4 に示した。

AM-715 の 40 mg/kg (3 例) により血圧は投与終了時に約 13% 低下し、投与終了後 30 分には回復した。

Fig. 3 にみられるように、ERG 波形の潜時および振幅共に投与中および投与後 60 分まで、薬物投与前との間に有意な変動は認められなかった。

NA の 40 mg/kg (2 例) により血圧は投与開始 15 分後に約 7% 低下し、その後は徐々に上昇し投与後 60 分に回復した。

Fig. 4 に示したように、ERG 波形は、投与開始 15 分後 (約 20 mg/kg 投与) には a 波、op 波および b 波の潜時がいずれも延長し、振幅は a 波が増大、op 波および b 波は著明に減少し、投与終了時には完全に消失した。投与後 60 分においても b 波の消失は持続していた。

2. 連続経口投与試験

1) 一般症状

AM-715 の 50, 100, 200 mg/kg/day の 14 日間の経口投与により、それぞれ 1/3, 2/4, 5/5 例に不定期な嘔吐の発現が観察される以外に特に症状変化は認められなかった。嘔吐はいずれも投与後 30 分から 1 時間後に発現し、その後は生じなかった。

NA は 9 例について検討し、1 例は初回から 100 mg/kg を 14 日間投与したが、症状変化はなく死亡もしなかつた。

Fig. 2 Effect of intravenous infusion of AM-715 and nalidixic acid on the femoral blood pressure in cats.

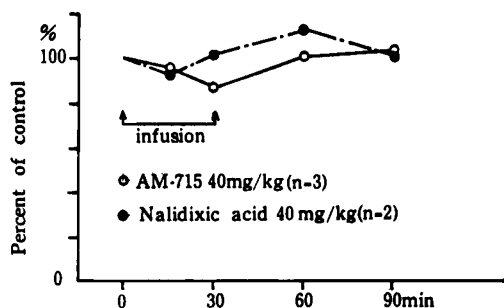
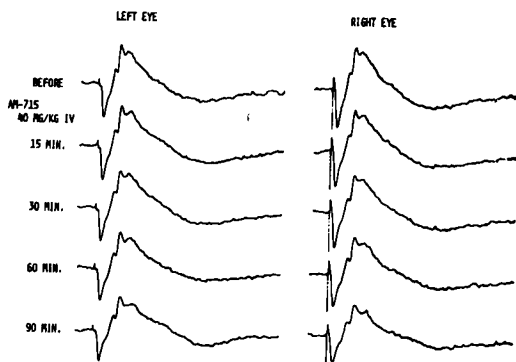


Fig. 3 Effect of intravenous infusion of AM-715 (40mg/kg) on ERG of cat

ERG was measured under the following condition. (Gallamine-immobilized, artificial respiration, Time constant: 0.01 sec, Stimulus intensity: 20 joules-30cm) Vertical calibration: 400μV, Horizontal calibration: 50 msec.



った。

8 例は 200 mg/kg から投与を始め、そのうち 2 例は初回投与後 2~4 時間を経過する頃から流涎および中枢興奮を示すようになり、痙攣に移行し、更に強度の歩行失調から横臥位状態を示すようになった。これらは 12~48 時間後に回復した。その後 100 mg/kg/day に減量すると症状は発現しなくなった。その他の 3 例では流涎または嘔吐が観察され、3 例は目立った症状を示さなかった。これらの例でも 200 mg/kg/day の投与を続けると、前記の重篤な症状が発現するようになり 10 日目までに 5/8 例は死亡した。

生存した 3/8 例中 200 mg/kg を 14 日間投与した 1 例、途中より 100 mg/kg/day に減量した 2 例はいずれも症

Fig. 4 Effect of intravenous infusion of nalidixic acid (40mg/kg) on ERG of cat

ERG was measured under the following condition. (Gallamine-immobilized, artificial respiration, Time constant: 0.01 sec, Stimulus intensity: 20 joules-30cm) Vertical calibration: 400 μ V, Horizontal calibration: 50 msec.

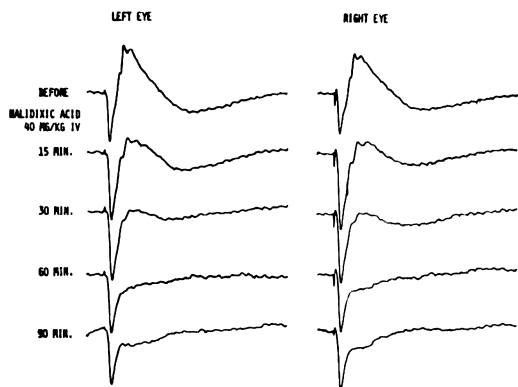


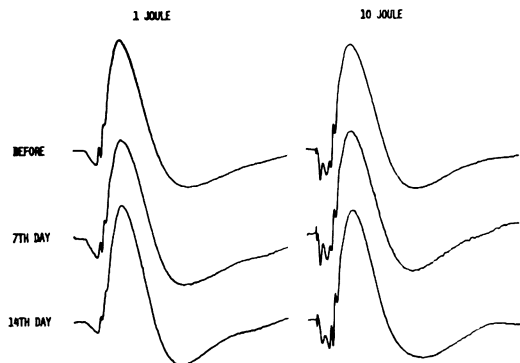
Fig. 5 Effect of AM-715 on the ERG of cat.

AM-715 was administered orally at a dose of 200mg/kg/day for 2 weeks. ERG was measured under the following condition.

(Ketamine-anesthetized, Time constant: 0.03 sec, Stimulus intensity: 10 joules-30cm)

Vertical calibration: 200 μ V, Horizontal calibration: 50 msec.

AM-715 200 MG/KG/DAY P.O.



状を示さなかった。

2) ERG 所見

AM-715 の 50 mg/kg (3 例), 100 mg/kg (4 例) および 200 mg/kg/day (5 例) の 14 日間連続経口投与により, Table 1, 2, Fig. 5 に示すように ERG 波形の潜時および振幅に有意な変化は観察されなかった。

NA の 100~200 mg/kg 投与による ERG 波形の潜時および振幅の変化を Table 3, Fig. 6 に示した。重篤な症状が発現しその後 10 日目までに死亡した 5/9 例では, いずれも投与 7 日目 (死亡の 1~3 日前) の ERG 測定

により, a 波 (主に a₂ 波), op 波および b 波の頂点潜時が著明に延長し, a, a+b 波の振幅の減少または b 波の消失が観察された。典型例を Fig. 6 に示した。14 日間投与後も生存し, 特に症状がなかった 4/9 例では 14 日目の ERG 測定において, 1 例のみ a 波の振幅の減少がみられたが, 他の 3 例には投薬の影響は認められなかった。

3) 病理組織学的所見

AM-715 の 200 mg/kg/day の 14 日間投与 (5 例) および NA の 100~200 mg/kg/day の 7~14 日間投与 (6 例) について病理組織学的に検索した。

ERG に異常の認められなかった AM-715 投与例 (photo 1) および NA 投与例では組織学的にはっきりした異常所見は観察されなかった。

ERG に異常の認められた NA 投与の 2 例の網膜において, 外顆粒層の波状配列 (photo 2) および神経線維層の浮腫とそれに伴う外網状層の幅の減少 (photo 3) が認められた。

III. 考 察

薬物安全性の評価を行う上で感覚機能への影響を検討することは重要である。医薬品の副作用の中で視覚器毒性を有する薬物は多数報告され, 水晶体異常 (白内障), 網膜変性, 視神経萎縮などの症状は不可逆かつ重篤な場合が多く, 臨床においても問題とされている³⁻⁷⁾。視覚器障害の観察方法として ERG 測定法や眼底検査法等が採用されているが, 動物では一定した試験方法がないのが現状である⁸⁻¹⁰⁾。

また, 薬物による網膜毒性作用に関し, 実験動物による種差が報告されており, その例として cinoxacin はサル, ラット, ウサギでは網膜障害がなく, イヌとネコで障害が認められ, NA はネコで同様の網膜変性を生じることが報告されている¹¹⁾。そこで我々は AM-715 の網膜に与える影響を調べるためにネコを使用し, 臨床において通常使用される ERG 測定法¹²⁻¹³⁾を参考にした。

AM-715 の ERG に及ぼす影響を, 類縁化合物で網膜障害が知られている NA^{3,11)}を対照として, 静脈内定速持続注入による急性試験および連続経口投与試験によって比較検討した。

NA の静脈内定速持続注入では, op 波, b 波の潜時の延長および振幅の減少ないし完全な消失が見られた。ERG 波形についてはある程度詳細に分析されており, 特に網膜を主とした視覚機能検査として a 波, b 波, op 波成分の潜時および振幅の変化が視細胞の活動や, 網膜中心動脈の血行に依存する網膜内層領域における活動状態の変化を反映し, 網膜変性を捉える指標となること¹²⁻¹⁵⁾, また網膜毒性を有するヨード酢酸¹⁶⁾や diaminodiphenoxy-

Table 1 Changes in ERG components of cats treated orally with AM-715 for 2 weeks

	No-treated	AM-715-treated	
		50mg/kg	100mg/kg
Latency (msec)			
a	7.8±0.2	7.5±0.0	7.6±0.1
op ₁	14.5±0.4	14.3±0.2	14.1±0.6
op ₂	22.0±0.5	20.1±0.6	20.3±1.1
b	36.3±1.0	33.9±2.8	35.5±3.0
Amplitude (μV)			
a	338±27	309±52	304± 58
a+b	704±57	674±89	718±136

The values represent the mean±S.E. for no-treated group (n=8), 50mg/kg/day-treated group (n=3) and 100mg/kg/day-treated group (n=4).

ERG was measured under the following condition.

(Gallamine-immobilized, artificial respiration, Time constant: 0.01 sec, Stimulus intensity: 20 joules-30cm)

Table 2 Changes in ERG components of cats treated orally with AM-715 for 2 weeks

	Before	After administration	
		7th day	14th day
Latency (msec)			
a ₁	6.0±0.2	6.0±0.2	6.3±0.2
a ₂	14.0±0.3	14.0±0.3	14.4±0.3
op ₁	17.3±0.2	17.3±0.3	17.6±0.1
op ₂	22.3±0.4	22.1±0.4	22.5±0.3
b	43.8±0.6	43.9±0.5	44.5±0.3
Amplitude (μV)			
a	161±10	177± 9	171± 7
a+b	716±38	735±30	721±40

AM-715 was administered orally at a dose of 200mg/kg/day for 2 weeks. The values represent the mean±S.E. of 5 cats.

ERG was measured under the following condition.

(Ketamine-anesthetized, Time constant: 0.03 sec, Stimulus intensity: 10 joules-30cm)

alkanes¹⁷⁾などが、ERG波形を変化させることが報告されている¹⁸⁾。それ故、NAは少なくともこれらの網膜領域のいずれかに作用し、急性的に網膜機能の異常を惹起することが示唆される。しかるに、同様の実験により、AM-715はERGに有意な変化を与えることはなく、前記の薬物の如き網膜への影響を及ぼさないものとする。

また、薬物による臓器障害は急性投与よりも高用量を長期投与して初めて発現する場合もある。これらにはクロキニンによる網膜変性³⁾やエタンブトールによる視神経障害³⁻⁴⁾などが知られている。またNAの連続経口

投与においてERGおよび病理組織学的検索により網膜変性を生じることが報告されている¹¹⁾。本実験ではNAの100~200mg/kg/dayの14日間連続経口投与において、目立った症状が観察されなかった例ではERGおよび組織学的にも著しい変化は認められなかったが、重篤な症状が発現した例ではいずれもERGの著明な変化が生じることを確認した。病理組織学的には必ずしも一致した所見は得られなかったが、神経線維層の浮腫、外網状層の幅の減少および外顆粒層の波状配列などが認められ、これらが網膜の機能的変化に何らかの影響を及ぼす可能

Table 3 Changes in ERG components of cats treated orally with nalidixic acid for 2 weeks

	Before	After administration	
		7th day	14th day
Latency (msec)			
a ₁	5.7±0.2	6.9±0.8	6.4±0.4
a ₂	13.5±0.3	18.2±1.7	14.7±0.8
op ₁	16.9±0.3	22.2±2.4	19.5±0.4
op ₂	22.0±0.3	26.5±2.8	24.8±0.4
b	43.5±0.6	50.2±3.4	45.5±0.5
Amplitude (μV)			
a	155± 8	118± 9	151± 8
a+b	631±41	378±53	575±30

Nalidixic acid was administered orally at doses of 100–200mg/kg/day for 2 weeks. The values represent the mean±S.E..

Before: The values were calculated for 9 cats.

7th day: The ERG measurements were performed for 6–8 cats, but the cases in which any component had been abolished were omitted from the calculation of the mean±S.E..

14th day: The values were calculated from the ERG components of 4 cats survived at the time of measurement.

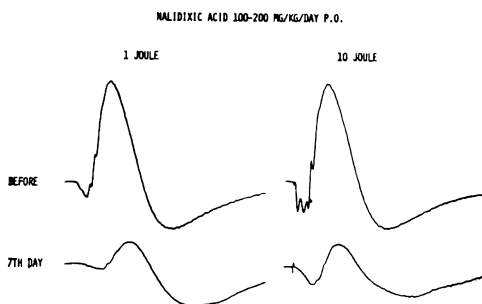
ERG was measured under the following condition.

(Ketamine-anesthetized, Time constant: 0.03 sec, Stimulus intensity: 10 joules-30cm)

Fig. 6 Effect of nalidixic acid on the ERG of cat
Nalidixic acid was administered orally at doses of 100–200mg/kg/day for 2 weeks. ERG was measured under the following condition.

(Ketamine-anesthetized, Time constant: 0.03 sec, Stimulus intensity: 10 joules-30cm)

Vertical calibration: 200μV, Horizontal calibration: 50 msec.



性が考えられる。それ故、NA の連続経口投与による網膜変性は少なくとも中毒量領域の投与量を維持することにより発現する可能性が示唆された。

一方、AM-715 では 200 mg/kg/day の 14 日間連続経口投与において、不定期な嘔吐の発現以外はみるべき症状は惹起されず、ERG 波形の変化もなく、また組織学

的にも NA のような明らかな異常所見は観察されなかったことから網膜障害はないものと考えられる。なおネコに 200 mg/kg を経口投与すると AM-715 の最大血中濃度は 10 μg/ml 以上に達し、本試験が十分な投与量で行われたことを確認した。

以上の急性の静脈内定速持続注入および連続経口投与試験の結果は、AM-715 が網膜に影響を及ぼすことなく、視覚器に対し安全な薬物であることを示唆する。

文 献

- 1) ITO, A.; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI: In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 17: 103~108, 1980
- 2) 沖坂重邦: 眼球の顕微鏡試料作製法についての一考察. *日眼* 80: 396~400, 1976
- 3) 浦口健二, 上野芳夫, 粕谷 豊, 北川晴雄, 酒井文徳編: トキシコロジー, 1. 2. 視覚器 (眼組織に及ぼす薬物の中毒学的考察) (中島章), 377~390 頁, 地人書館, 1978
- 4) 原田敬志, 佐竹成子, 市川 宏: エタンブトールによる視神経症の観察. *臨眼* 33: 1345~1355, 1979
- 5) GOODMAN, L. S. & A. GILMAN: *The pharmacological basis of therapeutics*. 5th Ed., Macmillan Publishing Co., Inc. XIII. Chemotherapy of parasitic disease (ROLLO, I. M.) pp. 1049~1053, 1975

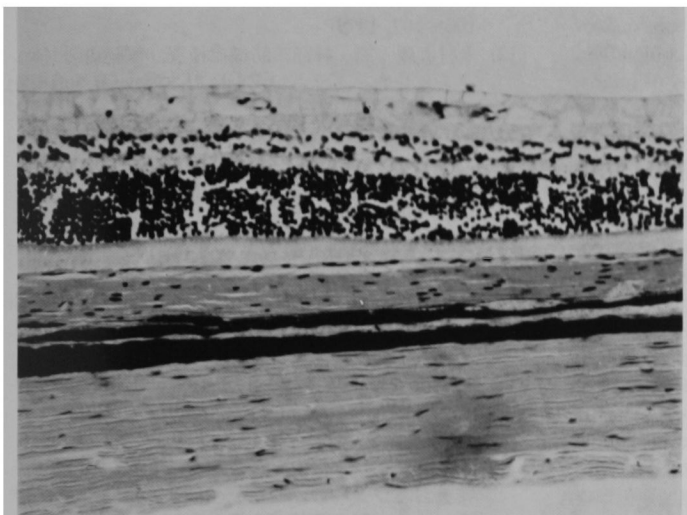


Photo 1 The retina of a cat in AM-715 group (X 66)



Photo 2 The retina of a cat in NA group Wave-like arrangement of outer nuclear layer (X 66)



Photo 3 The retina of a cat in NA group Edema of nerve fiber layer (X 66)

- 6) GOODMAN, L. S. & A. GILMAN: The pharmacological basis of therapeutics. 5th Ed., Macmillan Publishing Co., Inc. XIV. Chemotherapy of microbial diseases (WEINSTEIN, L.) pp. 1207~1208, 1975
- 7) PLACE, V. A. & J. P. THOMAS: Clinical pharmacology of ethambutol. *Am. Rev. Resp. Dis.* 87: 901~904, 1963
- 8) AGUIRRE, G. D. & L. F. RUBIN: Progressive retinal atrophy in the miniature poodle: An electrophysiologic study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160: 191~202, 1972
- 9) AGUIRRE, G. D. & L. F. RUBIN: The early diagnosis of rod dysplasia in the norwegian elkhound. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159: 429~433, 1971
- 10) BROWN K. T. & M. MURAKAMI: A new receptor potential of the monkey retina with no detectable latency. *Nature* 201: 626~628, 1964
- 11) 原田喜男, 花房友行: Cinoxacin および関連化学療法剤による網膜毒性の動物種差について。第2回国際眼研究会日本部会, プロシーディング(名古屋): 106~107, 1979
- 12) 米村大蔵: 脳・神経・筋機能検査, 網膜電図(エレクトロレチノグラム: ERG)。日本臨床(夏季増刊号) 37: 557~560, 1979
- 13) 永田 誠: ERG の臨床的意義。臨眼 19: 353~358, 1965
- 14) 倉知与志, 米村大蔵: 臨床 ERG の進歩。臨眼 21: 937~944, 1967
- 15) 米村大蔵, 河崎一夫: 正常人眼 ERG。眼科 14: 391~406, 1972
- 16) NOEL, W. K.: The impairment of visual cell structure by iodoacetate. *J. Cell. Comp. Physiol.* 40: 25, 1952
- 17) READING, H. W.: Effect of a retinotoxic phenoxyalkane on the visual cycle in rabbit retina. *Biochem. Pharmacol.* 19: 1307~1313, 1970
- 18) 佐藤秀蔵, 杉本信次, 野口雄次, 千葉祐広: ラット, 家兎および犬における電気生理学的な視覚毒性試験法。第2回国際眼研究会日本部会, プロシーディング(名古屋): 98~99, 1979

INFLUENCE OF AM-715 ON THE RETINA OF CATS

TSUTOMU IRIKURA, TAKASHI HIRAYAMA, HIDEO OHKUBO, YUKIO ITOH AND KEIGO NISHINO

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

The influence of AM-715 on the retina was studied by electroretinogram (ERG) and histopathological observation in cats and compared with that of nalidixic acid.

1. AM-715 and nalidixic acid were infused intravenously (0.8 ml/min) at a dose of 40 mg/kg.

AM-715 caused no remarkable change in ERG. In contrast, nalidixic acid caused a prolongation of latency followed by an abolition of op and b waves in ERG components.

2. AM-715 was administered orally at doses of 50, 100 and 200 mg/kg/day for 2 weeks. There was no remarkable changes in ERG and histopathological observation of the retina. Nalidixic acid was administered orally at doses of 100~200 mg/kg/day for 2 weeks. In ERG components and histopathological observation of the retina, abnormalities were observed in a majority of cats used.

From these results, it was concluded that AM-715 had no retinal toxicity in cat.