

AM-715 のラット聴器に及ぼす影響

入倉 勉・庄子 進・細川 常通・大久保秀夫
杏林製薬株式会社中央研究所

AM-715 の 500 mg/kg をラットに 6 カ月間連続経口投与し、聴器に対する影響を検討したところ、これらの動物は、12 kHz および 6 kHz の音刺激に対する耳介反射試験、平板上および棒上における平衡覚試験、走査型電子顕微鏡による蝸牛管内コルチ器細胞の病理組織学的検査で、異常を示さなかった。

結 言

1-Ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid (以下、AM-175 と略す) は杏林製薬株式会社において開発中の合成抗菌剤である¹⁾。今回、安全性確認の観点から、本剤のラット聴器に及ぼす影響を検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

実験動物は Wistar 系ラットを使用した。AM-715 投与群は、慢性毒性試験²⁾において回復試験用として別に設定した最高投与量群、すなわち毎日 500 mg/kg の AM-715 を 6 カ月間経口投与したラットである。陽性対照薬としては kanamycin (KM) および streptomycin (SM) を用いた。各群の匹数、検査時の体重、投与量と投与経路および投与期間は Table 1 に示すとおりである。

聴覚系の機能検査および平衡覚の検査は、VERNIER ら³⁾の方法に準じて行なった。すなわち聴覚機能は 12 kHz.

6 kHz の純音を 2 秒間、10 秒間隔で 3 回聴かせ、これに対する耳介反射の有無で検査した。平衡覚への影響は、14×14 cm の平板上および 5×50 cm の棒上にラットを置き、歩行状態などを観察し、次の各段階に区分して判定した。0 点：正常、1 点：頭部の振せん、2 点：正方形の平板上から落下、3 点：5 cm 幅の棒上から 3 秒以内に落下、4 点：歩行異常、5 点：正向反射の 5 秒以上の消失。

上記実験終了後、放血致死せしめ、内耳蝸牛部を摘出し、2.5% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液で調整、pH 7.3) による固定を 4°C で行なった。次に EDTA 液で 4~5 日間脱灰し、0.2M 蔗糖を含む 0.1M リン酸緩衝液で十分に洗浄した後、順次 30%~99% エタノール濃度系列を用いて脱水した。エタノールを酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥法を施した。乾燥した蝸牛管周囲の骨成分を除去し、さらに実体顕微鏡下で前庭膜および蓋膜を除去し、内・外有毛細胞を露出させ、金イオン・スパッター・コーティング (約 200~250 Å)

Table 1 Mode of administration of drugs to rats

Groups	Sex	Body weight (g)	No. of rats	Daily dose	Route	Duration
Control (Distilled water)	male	555.6±15.4	9*	-	p.o.	6 months
	female	320.0± 5.9	10			
AM-715	male	538.8±17.3	10	500mg/kg×1	p.o.	6 months
	female	305.1± 5.8	9*			
KM	male	330.3±12.8	3	200mg/kg×2	s.c.	27 days
SM	male	313.3± 7.7	3	400mg/kg×2	s.c.	27 days

* One of 10 rats in each group died owing to technical failure of oral administration.

Table 2 Influence of AM-715 and aminoglycosides on the auditory and vestibular functions in rats

Groups	No. of rats tested	Auditory test*		Vestibular test**					
		6KHz	12KHz	0	1	2	3	4	5***
Control (Distilled water)	19	19	19	19	0	0	0	0	0
AM-715 500mg/kg 6 months	19	19	19	19	0	0	0	0	0
KM 200mg/kg 27 days	3	0	0	3	0	0	0	0	0
SM 400mg/kg 27 days	3	3	3	0	3	0	0	3	0

* Number of rats showing pinna twitch reflex

** Number of rat showing vestibular impairment

*** 0-5 represents from normal to severe vestibular trouble

を行ない、走査型電子顕微鏡 (S-450 型, 日立) で観察した。

II. 実験結果

1. AM-715 のラット聴器に及ぼす影響

AM-715 の 500 mg/kg を 6 カ月間経口投与したラット (雄 10 匹, 雌 9 匹) において、聴覚機能検査、平衡覚検査、病理組織学的検査を行なったところ、いずれの検査においても異常は 19 匹中 1 例も認められなかった

(Table 2, Photo 1 & 2)。

2. 陽性対照薬 KM および SM のラット聴器に及ぼす影響

SM を投与したラットの聴覚機能検査では 3 匹全例に異常は認められなかったが、平衡覚検査においては 3/3 匹に頭部の傾斜と振せん、および棒上における平衡覚の減弱が観察された (Table 2)。病理組織学的には蝸牛管正円窓より $2\frac{1}{2}$, 2, 1, $\frac{1}{2}$ 回転のいずれの部位においても内・外有毛細胞の異常は認められなかった (Photo 3)。

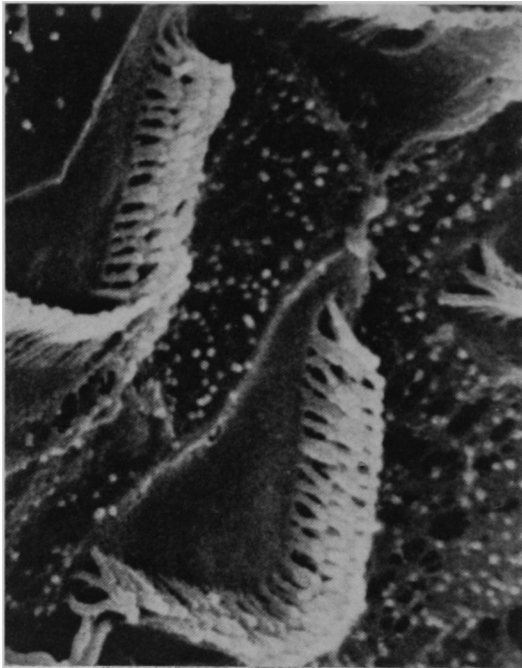


Photo 1



Photo 2

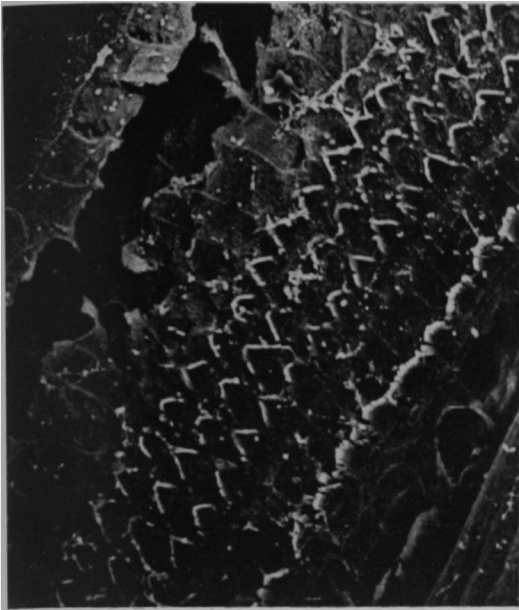


Photo 3

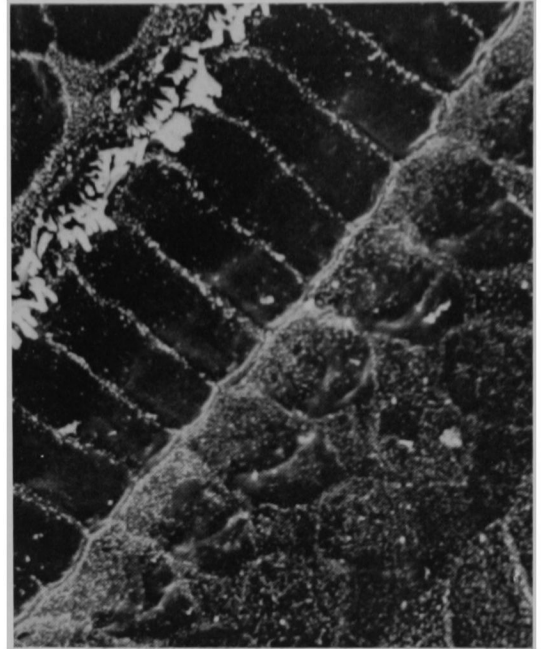


Photo 4

KM を投与したラットでは、投与9～14日目に hand claps に対する反応消失が観察され、27日間の投与により、3/3匹とも12 kHz および6 kHz の純音刺激に対する pinna twitch reflex を全く示さなくなった。一方、平衡覚の減弱は27日間の投与終了時においても認められなかった (Table 2)。病理組織学的には基底回転部 (1～11/2 回転) において内毛細胞の不動毛 (stereocilia) の減少、細小化、および外毛細胞の不動毛の完全な消失が3/3匹に観察された (Photo 4)。

III. 考 察

合成抗菌剤 AM-715 の安全性確認試験の一環として、聴器に対する影響を薬理学的方法と形態学的方法の両面から調べた。

AM-715 は化学構造的に nalidixic acid (NA) の類縁化合物として位置づけられる。NA の視聴覚器に対する作用に関しては、ネコの網膜電位波形に悪影響を与えることが知られている⁴⁾ が、聴器毒性を有するとの報告はみられない。AM-715 も聴覚毒性を示すとは考えにくかったが、抗菌活性がグラム陰性菌に強く、アミノ配糖体に近い抗菌スペクトラムを示すため、念のために聴器に対する影響を調べることも意義のあることと考えた。そ

こで、聴器毒性を有することが良く知られている⁵⁾ アミノ配糖体 KM および SM を陽性対照薬に選び、少数例で実験手技の妥当性を確かめた。その結果、KM200 mg/kg を1日2回、27日間皮下投与したラットでは聴覚異常が観察されたが、平衡覚の減弱は認められなかった。一方、SM 400 mg/kg を1日2回、27日間皮下投与したラットでは、平衡覚の減弱が明らかであるにもかかわらず、6 kHz および12 kHz の純音刺激に対する聴覚異常は観察されなかった。KM と SM の聴器に対する毒性発現におけるこのような差は、VERNIER^ら³⁾ の結果と一致した。

次に、KM 投与による聴覚障害を認めたラットでコルチ器の走査型電子顕微鏡による観察を行なったところ、頂回転の一部までは内・外毛細胞の不動毛の存在が認められたが、中間部および基底回転部においては外毛細胞の不動毛は全く消失し、内毛細胞の不動毛も部分的に消失していた。このようなコルチ器の病理組織学的変化は豊田⁶⁾ や秋吉⁷⁾、秋吉および岩崎⁸⁾ の報告にみられるものと同様の所見である。

これらのアミノ配糖体は比較的短期間の投与で聴器毒性を示すが、毒性未知の薬物の安全性を確かめるという観点からは、できる限り長期間、大量投与した動物にお

いて観察することが望ましいと考えた。そこで実験材料として慢性毒性試験での回復試験用に準備されたラットを用い、聴器に及ぼす影響を検討したところ、AM-715の500 mg/kg/day、6カ月連続投与という大量においても、聴覚機能検査、平衡覚検査および蝸牛管内コルチ器細胞の病理組織学的検査において19匹中1匹の異常も認められなかった。

以上のことから、AM-715は聴器に対する安全性が高いと推測された。

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) 入倉 勉, 杉本 勉, 相島 博, 土屋 剛: AM-715の毒性学的研究。第4報。ラットにおける慢性

- 毒性試験。 *Chemotherapy* 29(S-4): 829~848, 1981
- 3) VERNIER, V. G. & F. R. ALLEVA: The bioassay of kanamycin auditory toxicity. *Arch. int. Pharmacodyn.* 176: 59~72, 1968
 - 4) 入倉 勉, 平山隆士, 大久保秀夫, 伊藤由規男, 西納啓吾: AM-715のネコ網膜に対する影響。 *Chemotherapy* 29(S-4): 946~952, 1981
 - 5) 古河太郎: 耳毒性物質の作用機序。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, 地人書館, 391~400頁, 1978
 - 6) 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研究。 *耳鼻臨床* 67: 481~494, 1974
 - 7) 秋吉正豊: 抗生物質による聴器障害の病理。動物の内耳の病理組織像を中心に。 *Medicina* 10: 881~888, 1973
 - 8) 秋吉正豊, 岩崎信一: ラットにおける T-1220 (Piperacillin) の聴器毒性とその安全性の評価について——病理組織学的検索——。 *Chemotherapy* 26: 615~629, 1978

AUDITORY TOXICITY TESTS OF AM-715 IN RATS

TSUTOMU IRIKURA, SUSUMU SHOJI, TSUNEYUKI HOSOKAWA and HIDEO OHKUBO

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Auditory toxicity of AM-715 was studied in the rats which had been administered orally at a dose of 500mg/kg/day for 6 months.

All of the rats responded to acoustic stimuli of 12 kHz and 6 kHz, respectively. No influence of AM-715 on vestibular function was observed. In addition, no pathological change in the Corti's organ was observed by the scanning electron microscopy.