

新らしい合成抗菌薬 1-Ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperaziny)-3-quinolinecarboxylic acid の一般薬理作用

(I) 中枢神経系, 末梢神経系に対する作用

大久保秀夫・瀬川 満・平山 隆士・西納 啓吾
杏林製薬株式会社中央研究所

AM-715 の安全性研究の一環として中枢神経系, 末梢神経系, 臓器運動に対する作用を検討した。

AM-715 の 30~1,000 mg/kg の経口投与はマウスおよびラットにおける一般症状観察, 自発運動量, 協調運動, チオペンタール睡眠, 酢酸ライシング, 正常体温, 発熱ウサギ体温, 条件回避反応に影響せず, 鎮痛作用, 筋弛緩作用も示さなかった。

AM-715 の 10, 20 mg/kg 静脈内投与は急性および慢性植込電極ウサギの自発脳波パターン, 脳波覚醒反応に影響を与えなかった。また, 10 mg/kg 静脈内投与は脊髄ウサギにおける単および多シナプス反射電位に対してほとんど影響を与えなかった。

AM-715 の 10^{-4} g/ml は摘出したモルモット回腸, 気管平滑筋, ラット輸精管の緊張および各種アゴニストによる収縮・弛緩反応に影響を与えなかったが, 妊娠, 非妊娠ラットの子宮自動運動の振幅をそれぞれ 37%, 25% 抑制した。 3×10^{-4} g/ml はウサギ摘出回腸自動運動の振幅および緊張を増大させた。

AM-715 の 10 mg/kg 静脈内投与はウサギの生体位胃小腸運動, 膀胱運動, 子宮運動に対して影響をおよぼさなかった。また, 1,000 mg/kg 経口投与はマウスの腸管輸送能に影響を与えなかった。

以上, AM-715 はいづれの項目においても著しい作用を示さず, 一部で観察された作用も抗菌作用が認められる用量をはるかに超える用量であった。

近年, 合成ペニシリンやセファロスポリン系などの抗生物質に耐性を有する菌種が臨床材料から高率に検出されるようになり, そのうちでも, *Pseudomonas*, *Serratia* などが増加し治療面から問題となっている。杏林製薬株式会社において新しく開発中の 1-Ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperaziny)-3-quinolinecarboxylic acid (AM-715) は Fig. 1 に示す化学構造を有する合成抗菌薬であるが上述 *Pseudomonas*, *Serratia* を含むグラム陰性桿菌のみならずグラム陽性菌の臨床分離株に対してもすぐれた抗菌活性を示し, 類縁化合物である nalidixic acid (NA), piromidic acid (PA), pipemidic acid (PPA), miloxacin (MLX) よりも強い抗菌活性と広範囲スペクトラムを有するのみならず NA 耐性菌に対しても有効であることが明らかとなっている¹⁾。

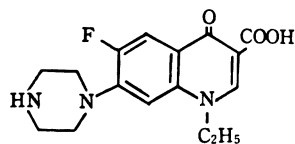
今回, 著者らは AM-715 の安全性研究の一環として一般薬理試験のうち中枢神経系, 末梢神経系に対する作用を検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用動物

実験動物は購入後一定条件下 (温度: $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度:

Fig. 1 Chemical structure of AM-715



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

$55 \pm 5\%$, 照明時間: 午前 8:30~午後 5:45) で一週間以上予備飼育したのち実験に用いた。動物の種および系統は次の通りである。マウス (JCL-ICR, 日本クレア), ラット (Wistar, 日本医科), モルモット (Hartley, 日本医科), ウサギ (日本在来白色種, 日本医科)。

2. 被検薬の調製

AM-715 の経口投与は原則としてつぎの方法で行なった。AM-715 を蒸留水に懸濁させ, 体重 100 g あたり 2 ml となる濃度に調製した。また, 静脈内投与の場合には AM-715 の塩酸塩を生理的食塩水に溶解して用いた。摘出標本の実験においては AM-715 に 1N NaOH を加

えて溶解し過剰のアルカリを 1N HCl で中和したものを
用いた。

3. 一般症状観察

1) マウス

雄性マウス (25~30 g) を 1 群 5 匹とし、被検薬の経
口投与後、Irwin の変法²⁾ により一般症状を観察した。

2) ラット

雄性ラット (180~230 g) を 1 群 3 匹使用した。観察
はマウスの場合と同様に行なった。

4. 中枢神経系に対する作用

1) 鎮痛作用

(1) 圧刺激法

雄性マウス (25~32 g) を 1 群 10 匹使用した。被検薬
を経口投与し、高木らの圧刺激法³⁾ によって鎮痛作用の
有無を測定した。

(2) 酢酸ライシグ法

雄性マウス (26~32 g) を 1 群 10 匹使用した。AM-715
および acetylsalicylic acid の蒸留水懸濁液を体重 10 g
あたり 0.2 ml 経口投与した。薬物投与 30 分後に 0.7%
酢酸を体重 10 g あたり 0.1 ml 腹腔内注射し、その 5 分
後より 10 分間の stretching 数を測定し、酢酸ライシグ
に対する抑制作用を調べた。

2) 抗けいれん作用

(1) ペンテトラゾールけいれん

雄性マウス (28~32 g) を 1 群 10 匹用いた。AM-715 の
経口投与 30 分後に pentetrazol 60 mg/kg (体重 10 g 当り
0.1 ml) を 3 秒間で静脈内投与し、間代性けいれん、強
直性けいれんおよび死亡発現の有無を観察し、all or
none の反応として抑制%で表現した。また、それらが
発現するまでの時間 (latency) を測定し被検薬の影響を
検討した。対照薬には diazepam を用いた。

(2) ストリキニーネけいれん

動物および方法はペンテトラゾールけいれん試験と同
様である。Strychnine は 0.75 mg/kg を静脈内に投与し
た。

(3) 電撃けいれん

雄性マウス (27~32 g) を 1 群 9 匹使用した。AM-715
を経口投与し、30 分後に生理的食塩水でぬらしたマウス
の両眼に矩形波電気刺激 (100 Hz, 140 V, 1 msec) を
0.3 秒間与え、強直性けいれんおよび死亡発現の有無を
調べた。

3) 体温におよぼす影響

(1) ラット正常体温

雄性ラット (205~245 g) を 1 群 6 匹使用した。実験
当日は絶食させ、体温変動の少ないラットを選択した。
AM-715 を経口投与し、サーミスタ温度計により経時的

に直腸温変化を測定した。対照薬には chlorpromazine・
HCl を用いた。

(2) 発熱ウサギ体温

雄性ウサギ (2.78~3.42 kg) を 1 群 5 匹使用した。実
験当日は絶食させた。TTG-2 号 (藤沢) 15 µg/kg を静脈
内投与し発熱させた。TTG 投与 1.5 時間後に AM-715
を経口投与し直腸温変化を測定した。対照薬には acety-
lsalicylic acid を用いた。

(4) 自発運動におよぼす影響

雄性マウス (28~32 g) を 1 群 3 匹とし、1 投与量当り
6 群を使用した。被検薬経口投与 30 分後に home cage
から測定用プラスチックケージ (17×27×13 cm) に 3
匹のマウスを移し、10 分間の自発運動量を ANIMEX
activity meter (Farad Electronics) により sensitivity 30
µA で測定した。実験は室温 25±1°C、一定照明下で行
なった。結果は 6 群の平均値で示し、薬物無処理群との
間で t-検定を行なった。

(5) 協調運動に対する作用

雄性マウス (26~32 g) を 1 群 10 匹使用した。Rota
rod は直径 2.3 cm の木製で、これを 8 回転/分させた。
回転方向と逆向きにマウスを乗せ 5 分間訓練し、落下の
多い動物は除外し、さらに被検薬投与前に 2 分間試行さ
せ一度も落下しなかったものを本実験に供した。投与後、
各測定時間ごとに 2 分間 rota rod 上に乗せ、この間に
落下した場合を協調運動失調と判定した。対照薬には
chlorpromazine・HCl を用いた。

(6) 筋弛緩作用

雄性マウス (28~35 g) を 1 群 10 匹使用した。AM-715
および対照薬 chlorpromazine・HCl は試験 30 分前に経
口投与した。

(1) 傾斜板法

38 度角に傾けたすりガラス (34.4×50.7 cm) 上の中央
に静かにマウスを置き、10 秒以内に滑り落ちた場合を筋
弛緩作用陽性とした。

(2) 懸垂法

直径 1 mm の針金を床上 50 cm の高さに水平に張り、
マウスの両前肢を懸けさせる。5 秒以内に後肢を針金に
懸けることができるか否かを測定時間ごとに 3 回観察し、
3 回とも 5 秒以内の反応がみられなかった場合を筋弛緩
作用陽性とした。

(7) チオペンタール麻酔におよぼす影響

雄性マウス (27~32 g) を 1 群 10 匹用いた。被検薬の
経口投与 30 分後に thiopental sodium 40 mg/kg を 2 mg/
kg/sec の速さで静脈内投与して AM-715 の影響を検討
した。Thiopental sodium 投与終了時から正向反射が回
復するまでを睡眠時間とした。対照として chlorpro-

mazine・HClを用いた。

8) レセルピン作用におよぼす影響

雄性マウス (29~35 g) を1群10~15匹使用した。AM-715の経口投与30分後に reserpine 2.5 mg/kg を尾静脈内に投与した。1時間間隔で直腸温をサーミスタ温度計により測定し、被検薬を処理する前の体温からの変動値を求め薬物無処理群のそれと比較した (t-検定)。また、各測定時間ごとにマウスをケージ外へ出し、眼瞼裂を全開=4点、半開=2点、閉眼=0点とし、眼瞼下垂に対する影響も検討した。対照薬には imipramine・HCl を使用した。実験は室温 23±1°C で行なった。

9) 脳波

(1) 急性ウサギ脳波

雄性ウサギ (2.9~3.4 kg) 3羽を使用した。Gallamine triethiodide 5 mg/kg の筋肉内注射により非動化後、ただちに気管内挿管を施し人工呼吸を行なった。ついで、ether 麻酔下で東大脳研型脳定位固定装置に固定し、SAWYER⁴⁾の脳図譜にしたがって海馬 (HPC, P: 3.0, L: 4.0, H: 5.0) および扁桃核 (AMY, A: 2.0, L: 7.0, H: -5.0) にステンレス製双極同芯電極を刺入して脳波を誘導した。皮質脳波は運動野 (MC, motor area of the cortex) の硬膜上にネジ電極が密着するように頭蓋骨に植え込み、誘導した。実験は ether 麻酔停止後約4時間を経過したのち筋弛緩剤非動化のもとで行なった。

(2) 慢性電極植込ウサギ脳波

雄性ウサギ (2.9~3.3 kg) 3羽を使用した。Pentobarbital sodium 麻酔下に慢性電極の植込みを行なった。前項急性実験と同様に、皮質脳波は運動野 (MC) 上部頭骨上に双極型コルチコ電極 (DWS) を固定、導出し、深部脳波は海馬 (HPC) および扁桃核 (AMY) に中継同芯円電極 (D: 東海医理科) を刺入して固定、導出した。これらのリード線をミニチュアソケットに接続し歯科用セメント (ユニファスト) を用いて頭骨上に固定した。実験は術後約1ヶ月を経過したのち、安定した脳波が記録できるようになってから開始した。AM-715は耳介静脈より投与した。脳波は9素子脳波記録計 (EU/5D) に描記させ、音刺激による脳波覚醒反応には音刺激装置 (SSS-1101, 以上日本光電) を使用し2 KHzの純音を8秒間与えた。

10) 脊髄反射におよぼす影響

雄性ウサギ (2.9~3.3 kg) 6羽を使用した。Ether 麻酔下に気管カニューレを挿入し、gallamine triethiodide による非動化を行ない人工呼吸を施し、脳定位固定装置に固定した。椎弓切除により脊髄露出後、胸椎一腰椎間で脊髄を切断し、低位脊髄標本を作製した。ついで脊髄反射記録のために脛骨神経、総腓骨神経および腓腹神経

を分離露出した。露出した神経は流動パラフィンによりブールを作製し保温に留意した。

単シナプス反射 (MSR) は脛骨神経の中樞側を刺激し、その末梢端より記録し、多シナプス反射 (PSR) は腓腹神経および脛骨神経を刺激し、総腓骨神経より記録した。電気刺激は電子管刺激装置 (MSE-3, MSE-40) を使用し、0.2 Hz の頻度で、0.1 msec, supramaximal 電圧 (1~4 V) の矩形波刺激を用いた。記録はオシロスコープ (VC-7) 上に描引し、加算平均装置 (ATAC-201, 以上日本光電) により20回加算平均した後、XY レコーダ (WX-4401, 渡辺測器) 上に描記させた。

実験は ether 麻酔停止3~4時間後より、gallamine triethiodide 非動、人工呼吸下に行なった。AM-715は耳介静脈より投与した。

11) 条件回避反応におよぼす影響

体重150~180 g で購入した Wistar 系雄性ラットを4日後から訓練した。装置は自製の pole climbing box (30×30×50 cm) を用い条件刺激 (CS) にはブザー音 (EB-23, 松下電工) を、無条件刺激 (UCS) には電子管刺激装置 (MSE-3, 日本光電) による床面ステンレス製グリッドへの通電 (50 Hz, 0.5 msec, 40~60 V) を用いた。訓練期間中は最長5秒間の CS を与え、最長10秒間の CS+UCS を与えた。これを1日5試行、2~3日間隔で合計7日行ない、CS のみで確実に反応するラットを選び1群10匹を実験に供した。

実験日にはラットを box 内に入れ30秒間放置後 CS のみを最長10秒間提示し、この間に反応しなかった場合にはひき続いて最長5秒間の CS+UCS を与えた。各測定時間ごとにこれを1試行ずつ行ない、10秒間の CS のみの提示で反応のなかった場合を回避反応抑制、つづく5秒間の CS+UCS 提示期間内にも反応しない場合を逃避反応抑制とした。また、刺激提示開始から反応終了までの時間を反応潜時とし、反応潜時が15秒以上の場合は15秒として計算し、薬物無処理群との間で t-検定を行なった。対照薬には chlorpromazine・HCl を用いた。

5. 末梢神経系に対する作用

1) 摘出臓器

(1) モルモット腸管、気管平滑筋およびラット輪精管標本

雄性モルモット (350~440 g)、または雄性ラット (370~440 g) の頭部を殴打後、滴血致死せしめ、ただちに目的臓器を摘出し、温 Tyrode 液中で標本を作製し Magnus 槽に懸垂した。気管筋標本は TAKAGI らの方法⁵⁾にしたがって作製した。栄養液は Tyrode 液を用い、95% O₂, 5% CO₂ を通気した。槽内温度は 31±1°C (輪精管は 34±1°C) とし、反応はヘーベルを介し等張性に

煤煙紙上に描記させた。

(2) 妊娠, 非妊娠ラット子宮自動運動に対する影響
非妊娠子宮自動運動の実験には処女ラットを用いた。また, 妊娠子宮標本は次のようにして作製した。12~13週令の処女ラットを交配して, 妊娠14~16日目に使用した。子宮角先端(卵巣も一部ついた状態)から約2 cm 位の子宮を摘出し, 子宮内の胎児および胎盤その他表面に付着する組織を除去し, Magnus 槽に懸垂した。栄養液は Locke-Ringer 液を用い, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で空気を通気した。収縮運動はヘーベルを介して等張性に煤煙紙上に描記した。安定した律動性の自発運動が得られるようになってから実験を開始した。なお, 被検薬は約10分の間隔で cumulative に槽内に加えた。

(3) ウサギ腸管の自動運動に与える影響

雄性ウサギ (2.1~3.6 kg) を6匹使用した。撲殺後, 回盲部より吻側 20 cm 付近の腸管を摘出し, 腸間膜や脂肪組織などを除去したのち, 約2 cm の標本を空気を通気し, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った Tyrode 液を満した槽内に懸垂した。腸管の自動運動はヘーベルを介して等張性に煤煙紙上に描記した。

2) ネコ瞬膜におよぼす影響

体重2.4~3.7 kg のネコ6匹を雌雄の別なく使用した。Urethane 1 g/kg の腹腔内投与により麻酔を行ない, 気管挿管後, gallamine triethiodide 5 mg/kg 静脈内投与により非動化し, 人工呼吸を施した。ついで, 頸部交感神経の節前, 節後神経を周囲組織から分離, 露出し, 両神経をそれぞれ白金双極電極上に固定した。節前線維刺激には 20 Hz, 1 msec, 2~5 V, 15 sec, 節後線維刺激には 20 Hz, 1 msec, 7~10 V, 15 sec を5分間隔で使用した。瞬膜の収縮は筋張力計 (SB-1T) を介しポリグラフ (RM-85) 上に記録した。被検薬は浅橈骨静脈より注入した。

3) 神経骨格筋標本におよぼす影響

雄性ウサギ (2.8~3.1 kg) 3匹を使用した。Urethane 1.5 g/kg 皮下投与により麻酔し背位に固定したのち, 前脛骨筋を剝離し, 腱を糸で結紮し, 筋張力計 (SB-1T) に接続した。つぎに, 総腓骨神経を露出切断し白金双極電極上に固定した。刺激は電子管刺激装置 (MSE-3, 以上日本光電) を用い, 0.1 Hz, 4~5 V, 0.5 msec の sub-maximal 刺激を行なった。なお露出した神経および筋を覆うように流動パラフィンによるプールを作製した。被検薬は耳介静脈より投与した。

6. 臓器運動に対する作用

1) 胃小腸運動におよぼす影響

雄性ウサギ (2.4~4.0 kg) を各用量について5~6羽を使用した。Urethane 1.5 g/kg 皮下投与により麻酔し背位に固定した。開腹後, 胃幽門部および空腸にパルーンを

挿入し, それらの運動を圧変化としてとらえた。これらの圧変化は圧トランスデューサ (MPU-0.5) を介し, また, 一部の標本では胃・腸管筋電図をステンレス製双極針電極 (直径 0.25 mm, 極間距離 1 mm) を漿膜下に刺入, 縫合固定し, input box を介してポリグラフ (RM-85) 上に導出記録した。

2) 膀胱運動におよぼす影響

雄性ウサギ (2.7~3.3 kg) 6羽を使用した。胃・小腸運動の実験と同様に麻酔, 固定し, 膀胱を露出させた。尿道を結紮して閉鎖したのち膀胱体部に小切開を加えカテーテルを挿入, 50~60 ml の Locke-Ringer 液 (37°C) を膀胱内に注入し, これを圧トランスデューサ (MPU-0.5) に接続して内圧変化を測定した。薬物は耳介静脈より投与した。

3) 子宮運動におよぼす影響

体重2.5~3.5 kg の雌性ウサギに1匹当たり 0.06 mg の estradiol benzoate を1日1回, 2日間皮下投与した。そのうちで子宮に肥厚の認められたもの4羽を実験に用いた。Urethane 1 g/kg 腹腔内投与により麻酔し, 背位に固定したのち下腹部に約5 cm の正中切開を加え腹窓を作った。子宮体部 (卵巣から約2 cm の部位) をセルフインでつまみ糸で吊り上げて筋張力計 (SB-1T, 以上日本光電) に接続した。AM-715 および対照薬 oxytocin は耳介静脈から投与した。

4) マウス腸管輸送能におよぼす影響

雄性マウス (28~34 g) を1群10匹使用した。18時間絶食させたマウスに AM-715 または対照薬 atropine sulfate を経口投与し, その30分後に10%アラビアゴム溶液に懸濁した5%活性炭末を0.2 ml 経口投与した。30分後に動物を殺し開腹して幽門部から盲腸開口部までの小腸を取り出し, 小腸全長および移動炭末の先端までの長さを測定し移動率を求めた。

II. 実験結果

1. 一般症状観察

1) マウスにおける一般症状変化

AM-715 の 30, 100, 300, 1,000 および 2,000 mg/kg を1回経口投与したのち一般症状を観察したところ, 300 mg/kg 以下では変化はみられなかった。1,000 または 2,000 mg/kg を投与した場合に自発運動の低下と探索運動のわずかな低下が認められた (Table 1)。

2) ラットにおける一般症状変化

AM-715 の 30, 100, 300, 1,000 mg/kg を1回経口投与したのち一般症状変化を観察したところ, 変化は認められなかった。

Table 1 Behavior check of AM-715 in mice

Test description		Dose: 1000 mg/kg, p.o.						Dose: 2000 mg/kg, p.o.				
		Time after administration										
		15	30	60min	2	3	4hr	15	30	60min	2	3hr
Consciousness	Alertness											
	Passivity											
	Stereotypy											
Emotionality	Grooming		↓3/5 ^{a)}						↓4/5			
	Desgrouping											
	Restlessness											
	Vocalization											
	Irritability											
Motor activity	Spontaneous locomotion	↓3/5	↓3/5					↓4/5	↓4/5			
	Exploratory locomotion		↓1/5					↓1/5	↓2/5			
Lower CNS excitation	Startle response											
	Straub tail											
	Twitches											
	Tremor											
	Convulsion											
Motor inco-ordination	Staggering gait											
	Loss of righting reflex											
Muscle tone	Body tone											
	Grip strength											
Posture	Body posture											
	Limb position											
Reflexes	Pinna											
	Cornea											
	Pain											
	Withdrawal											
Autonomic profile	Pupil size											
	Palpebral opening											
	Exophthalmos											
	Lacrimation											
	Salivation											
	Piloerection											
	Body temperature											
	Skin color											
	Respiration											
	Urination											
	Diarrhea											
Mortality												0/5
Miscellaneous												0/5

Notes ↓ : Slightly inhibited

a): No. of mice inhibited/No. of mice used

2. 中枢神経系に対する作用

1) 鎮痛作用

(1) 圧刺激法

AM-715 の 100, 1,000 mg/kg 経口投与では 30, 60, 120 分いずれの測定時点においても閾値圧の有意な変化は認められなかった (Table 2)。

(2) 酢酸ライシング法

AM-715 の 100 および 1,000 mg/kg を経口投与して

も酢酸による writhing に対して影響を与えなかった (Table 3)。

2) 抗けいれん作用

(1) ペンテトラゾールけいれん

AM-715 の 100, 1,000 mg/kg を経口投与しても pentetrazol が惹起するけいれんに影響を与えなかった (Table 4)。

(2) ストリキニーネけいれん

Table 2 Influence of AM-715 on the pain threshold by pressure method in mice

Treatment	Dose mg/kg	Route	Body weight (g)	Threshold (mmHg)			
				before	0.5 hr	1 hr	2 hr
AM-715	100	p.o	30.7±0.3	40.1±1.7	39.0± 2.7	39.5±3.0	42.0±2.7
AM-715	1,000	p.o	30.3±0.5	41.5±1.7	40.9± 2.2	41.8±2.8	43.1±2.0
Morphine HCl	8	s.c	29.6±0.4	44.1±1.5	168.5±13.5*		

*: Significantly different from the before threshold, $p<0.05$

Table 3 Influence of AM-715 on acetic acid-induced writhing in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of writhing Mean ± S.E.
Saline		19.4±2.3
AM-715	100	17.2±1.6
	1,000	20.0±3.2
ASA	600	6.3±1.4**

ASA: Acetylsalicylic acid

* : Significantly different from the saline group, $p<0.01$

Table 4 Influence of AM-715 on pentetrazol-induced convulsions and death in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Clonic convulsion		T.E. of hind limb		Death	
		Incidence (%)	Latency (sec)	Incidence (%)	Latency (sec)	Incidence (%)	Latency (sec)
Saline		100	2.7±0.2	100	4.8±0.3	100	19.5±1.2
AM-715	100	100	2.5±0.1	100	5.6±0.4	100	22.2±1.4
	1,000	100	2.5±0.3	100	5.2±0.4	100	21.5±1.5
Diazepam	4	80	6.5±0.6***	50	9.2±0.7***	40	29.8±1.5***

T.E. : tonic extensive convulsion

Latency: latent time from pentetrazol injection (Mean ±S.E.)

Each group consisted of 10 mice.

*** : Significantly different from the saline group, $p<0.001$

Table 5 Influence of AM-715 on strychnine-induced convulsion and death in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	T.E. of hind limb		Death	
		Incidence (%)	Latency (sec)	Incidence (%)	Latency (sec)
Saline		100	5.0±0.4	100	17.3±1.3
AM-715	100	100	5.4±0.3	100	18.1±1.5
	1,000	100	6.3±0.6	100	23.2±1.3**
Diazepam	20	20	21.0±9.0	0	—

T.E.: Tonic extensive convulsion

Latency: Latent time from strychnine injection (Mean ± S.E.)

Each group consisted of 10 mice.

: Significantly different from the saline group, $p < 0.01$ **Table 6 Influence of AM-715 on electro-schock convulsion and death in mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	T.E.C./Animals	Death/Animals
Dist. Water		9/9	4/9
AM-715	100	9/9	6/9
AM-715	1,000	9/9	6/9
Phenobarbital	40	0/9	0/9

T.E.C.: Tonic extensive convulsion

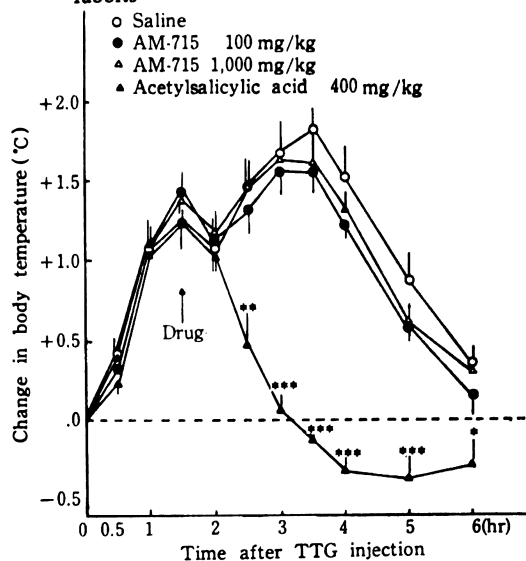
Table 7 Influence of AM-715 on normal body temperature in rats

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Initial value	Body temperature Mean ± S.E. (°C)					
			Change from the initial value					
			0.5	1	2	3	4	5 hr ^a)
Control		37.7±0.1	-0.3±0.1	-0.4±0.1	-0.6±0.1	-0.6±0.1	-0.5±0.2	-0.5±0.2
AM-715	100	37.8±0.1	-0.4±0.1	-0.3±0.2	-0.6±0.1	-0.7±0.1	-0.6±0.1	-0.6±0.1
	1,000	37.8±0.1	-0.4±0.1	-0.5±0.1	-0.6±0.2	-0.6±0.2	-0.7±0.1	-0.5±0.2
Chlorpromazine-HCl	10	37.7±0.1	-0.4±0.1	-0.8±0.2	-1.0±0.2	-1.1±0.0*	-1.1±0.2*	-1.2±0.2*

a): Time after drug administration.

*: Significantly different from control, $p < 0.05$

Fig. 2 Antipyretic action of AM-715 in febrile rabbits



Drugs were administered orally.

Vertical bar indicates standard error of the mean of 5 rabbits.

*, **, ***: Significantly different from control, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively

AM-715 を 100 および 1,000 mg/kg 経口投与したところ、1,000 mg/kg において strychnine けいれんの死亡発現までの時間の延長が認められた (Table 5)。

(3) 電撃けいれん

AM-715 の 100 および 1,000 mg/kg 経口投与は電撃によるけいれんを抑制しなかった (Table 6)。

3) 体温におよぼす影響

(1) ラット正常体温

AM-715 の 100 および 1,000 mg/kg 経口投与はラットの正常体温に影響を与えなかった (Table 7)。

(2) 発熱ウサギ体温

AM-715 の 100 および 1,000 mg/kg 経口投与は TTG-2 号による発熱ウサギ体温に有意な影響を与えなかった (Fig. 2)。

4) 自発運動におよぼす影響

Chlorpromazine・HCl 10 mg/kg 経口投与により明らかな抑制を示す方法で、AM-715 は自発運動をわずかに抑制する傾向を示したが、それは統計的に有意な変化ではなかった (Table 8)。

Table 8 Influence of AM-715 on spontaneous motor activity in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	S.M.A. (Mean±S.E.) counts/10 min %	
Saline		1,257±38	100±3
AM-715	100	1,183±47	94±4
	1,000	1,153±42	92±3
Chlorpromazine・HCl	10	261±50**	21±4

** : Significantly different from the saline group, $p < 0.01$

Table 9 Influence of AM-715 on rota rod test in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Inhibition of rota rod performance (%)						
		0.5	1	1.5	2	3	4	5 hr ^a)
Saline		0	0	0	0	0	0	0
AM-715	100	0	0	0	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0	0	0	0
Chlorpromazine・HCl	10	20	50	50	40	0	0	0

a): Time after drug administration

Each group consisted of 10 mice.

Table 10 Influence of AM-715 on inclined plane test and traction test in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)		Inhibition of performance (%)						
			0.5	1	1.5	2	3	4	5 hr ^{a)}
Saline		I	0	0	0	0	0	0	0
		T	0	0	0	0	0	0	0
AM-715	100	I	0	0	0	0	0	0	0
		T	0	0	0	0	0	0	0
	1,000	I	0	0	0	0	0	0	0
		T	0	0	0	0	0	0	0
Chlorpromazine·HCl	10	I	30	80	80	80	80	60	10
		T	10	50	30	40	10	10	10

I: Inclined plane test T: Traction test

a): Time after drug administration

Each group consisted of 10 mice.

Table 11 Influence of AM-715 on thiopental-induced sleeping time in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Sleeping time Mean±S.E. (sec)
Saline		582± 92
AM-715	100	546± 92
	1,000	558± 87
Chlorpromazine·HCl	10	3,493±267***

***: Significantly different from the saline group, $p<0.001$

5) 協調運動におよぼす影響

Table 9 に示すように、対照薬 chlorpromazine·HCl 10 mg/kg 経口投与により最大 50% のマウスに協調運動の失調が認められたが、AM-715 の 100 あるいは 1,000 mg/kg 経口投与では全測定時間を通して協調運動は抑制されなかった。

6) 筋弛緩作用

傾斜板法、懸垂法で検討したところ、AM-715 の 100 および 1,000 mg/kg を経口投与されたマウスにおいて全測定時間を通して 1 例の筋弛緩も認められなかった (Table 10)。

7) チオペンタール麻酔におよぼす影響

AM-715 の 100 および 1,000 mg/kg 経口投与は thio-

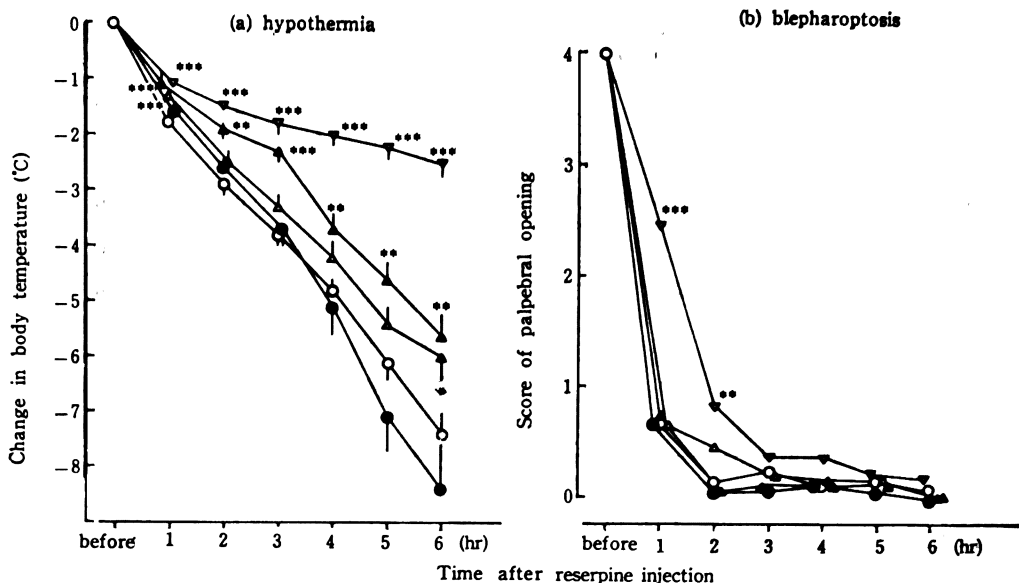
pental の睡眠時間に対して影響を与えなかった (Table 11)。

8) レセルピン作用におよぼす影響

AM-715 の 100 mg/kg 経口投与では reserpine による体温下降、眼瞼下垂に対し影響を与えなかった。300 mg/kg では体温下降は減弱される傾向にあったが、眼瞼下垂に対しては影響はみられなかった。1,000 mg/kg では全測定時間において、体温下降は薬物無処理群より有意に減弱されたがその差は 1~2°C であった。眼瞼下垂に対しては影響を与えなかった。対照薬 imipramine·HCl 100 mg/kg は明らかに reserpine の体温下降、眼瞼下垂作用に拮抗した (Fig. 3)。

9) 脳波

Fig. 3 Action of AM-715 on reserpine-induced hypothermia(a) and blepharoptosis(b) in mice



○: Saline, ●: AM-715 100 mg/kg, △: AM-715 300 mg/kg, ▲: AM-715 1,000 mg/kg, ▼: Imipramine, HCl 100 mg/kg. Drugs were administered orally.

Vertical bar represents standard error of the mean of 10 or 15 mice.

*, **, ***: Significantly different from the saline group, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively

(1) 急性ウサギ脳波

Ether 麻酔停止後約4時間を経過したウサギの皮質および扁桃核脳波は低振幅速波が優位になり、ときに高振幅徐波成分が出現し、海馬では4~7 Hzの律動的θ波、いわゆる海馬覚醒波に乱れを生ずる安静覚醒波が記録されるようになる。

AM-715の10および20 mg/kg 静脈内投与はこのような自発脳波のパターンに影響を与えず、また、音刺激による脳波覚醒反応にも影響を与えなかった (Fig. 4)。

(2) 慢性電極植込ウサギ脳波

ウサギを実験室内のケージに入れて約3時間放置したのち実験を開始した。ウサギはうずくまり姿勢を示し、皮質脳波はときどき紡錘波および高振幅徐波を示し、このとき海馬では覚醒波である律動的な4~7 Hzのθ波が不規則となり、いわゆる drowsy pattern が得られるようになる。

AM-715の10および30 mg/kg 静脈内投与では投与前と同じく、うずくまり姿勢を維持しており投与時の刺激(人為的)による脳波覚醒以外は、行動および脳波パターン、音刺激による脳波覚醒反応に対して認むべき影響を与えなかった (Fig. 5)。

10) 脊髓反射におよぼす影響

AM-715の3, 10 mg/kg 静脈内投与は単シナプスおよび多シナプス反射に対しほとんど影響をおよぼさなかった (Fig. 6)。

11) 条件回避反応におよぼす影響

Table 12に示すように、対照薬 chlorpromazine・HCl 20 mg/kg 経口投与は最大80%のラットに条件回避反応の抑制を起させたが、AM-715の100および1,000 mg/kg 経口投与は条件回避反応を抑制せず、反応潜時に対しても影響を与えなかった。

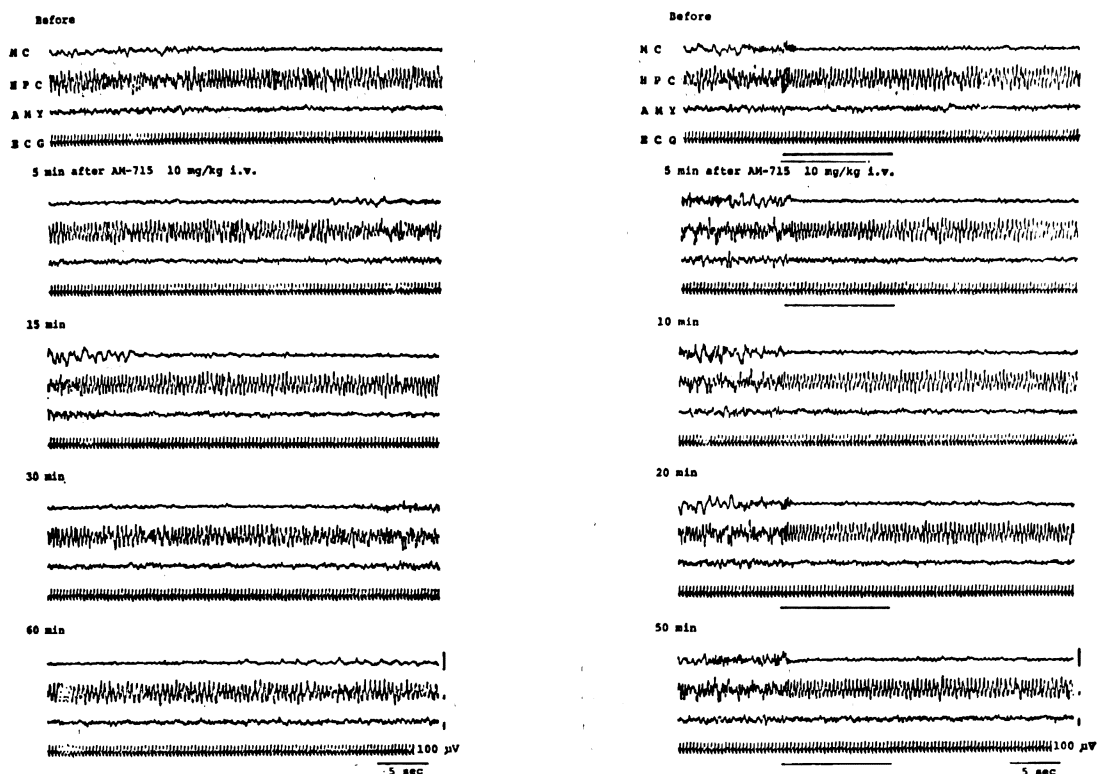
3. 末梢神経系に対する作用

1) 摘出臓器

(1) モルモット腸管、気管平滑筋およびラット輪精管標本

モルモット摘出腸管において収縮薬 acetylcholine (ACh), histamine (His), serotonin (5-HT) に対するAM-715の作用を検討したところ、AM-715の 10^{-5} g/ml はこれらの収縮に対して影響を与えなかった。 3×10^{-4} g/ml はAChの低濃度による収縮をわずかに抑制し、Hisおよび5-HTによる収縮をわずかに増大させる傾向を示したが、AM-715を含有しない同じpHの溶液

Fig. 4 Influence of AM-715 on the spontaneous EEG activity and the arousal response to auditory stimulation in the rabbit under the gallamine-immobilization



Left side : Spontaneous EEG, Right side : Arousal response to auditory stimulation (Underline; 2000 Hz, 8 sec)

M C : motor cortex, H P C : hippocampus, A M Y : amygdala, E C G : electrocardiogram.

(pH 10) も程度は弱いが同様の傾向を示した (Fig. 7-A, B, C)。

摘出気管平滑筋の緊張は AM-715 の 10^{-5} , 3×10^{-4} g/ml の適用によっても影響を受けなかった。また, adrenaline (Adr) による弛緩反応も AM-715 の 3×10^{-4} g/ml 適用により影響を受けなかった (Fig. 7-D)。

ラット摘出輸精管の緊張は AM-715 の 10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} g/ml の適用によっても影響を受けなかった。Noradrenaline (NAdr) が惹起する収縮反応に対し, AM-715 は低濃度による収縮を抑制し, NAdr 高濃度による収縮を増強した (Fig. 7-E)。

(2) 妊娠, 非妊娠ラット子宮の自動運動におよぼす

影響

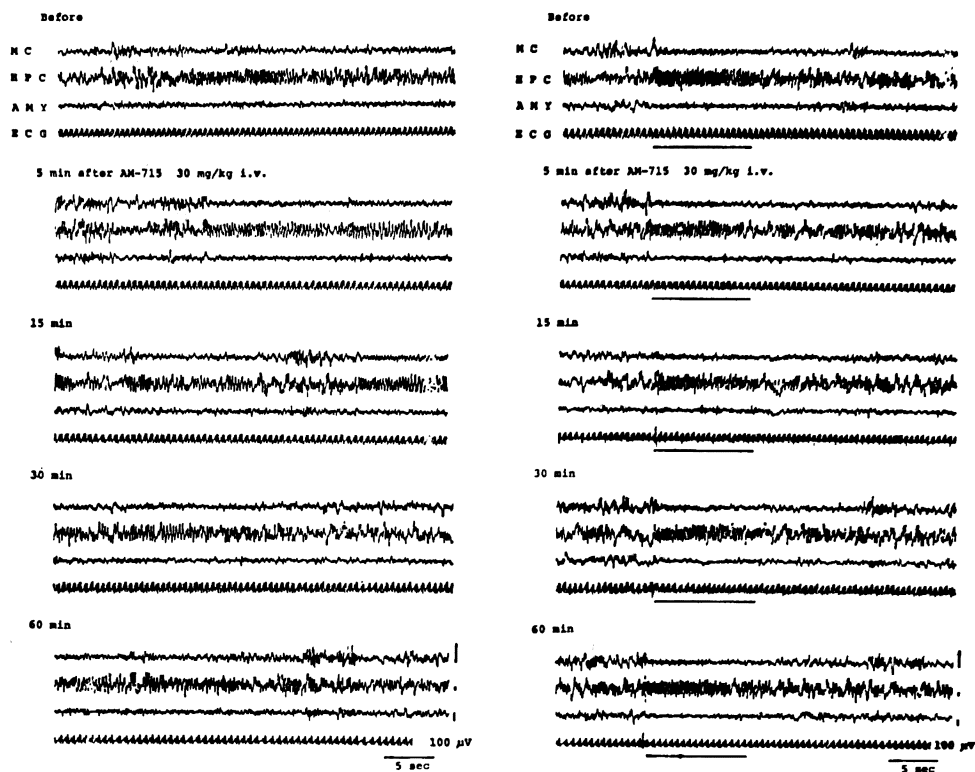
処女ラット発情期の摘出子宮において AM-715 の 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} g/ml の適用は子宮自動運動の収縮頻度および静止準位に対して影響を与えなかったが, 10^{-4} g/ml の適用は収縮の振幅を約 25% 抑制した (Fig. 8-A)。

妊娠ラット摘出子宮の自動運動の収縮頻度および静止準位は AM-715 の 10^{-4} g/ml 以下では影響されなかったが収縮高 (振幅) は 10^{-4} g/ml により約 37% 抑制された (Fig. 8-B)。

(3) ウサギ摘出腸管の自動運動におよぼす影響

AM-715 の 10^{-4} g/ml 以下の濃度は自動運動に影響を

Fig. 5 Influence of AM-715 on the spontaneous EEG pattern and the arousal response to auditory stimulation in the conscious rabbit with chronically implanted electrodes



Left side : Spontaneous EEG, Right side : Arousal response to auditory stimulation (Underline; 2000 Hz, 8 sec),

M C : motor cortex, H P C : hippocampus, A M Y : amygdala,

E C G : electrocardiogram.

与えなかった。 3×10^{-4} g/ml は 3/6 例に 9~36% の振幅の増大, そして 3/6 例に 10~43.5% の静止準位の上昇を起した。pH を同じに調整した AM-715 を含まない溶液の適用はこれらに影響をおよぼさなかった (Fig. 9)。

2) ネコ瞬膜におよぼす影響

AM-715 の 1, 3 mg/kg 静脈内投与により上頸神経節前線維刺激による瞬膜収縮は投与直後のみ約 2~5% の抑制を受けた。10 mg/kg 静脈内投与では節前および節後線維刺激による瞬膜収縮はそれぞれ約 25%, 10% の抑制を受け, 約 60 分間でほぼ元のレベルに戻った (Fig. 10)。

対照薬 hexamethonium bromide 0.3 mg/kg 静脈内投与は節後線維刺激による収縮に対してはほとんど影響しなかったが節前線維刺激による瞬膜収縮を顕著に抑制した。

3) 神経-骨格筋標本におよぼす影響

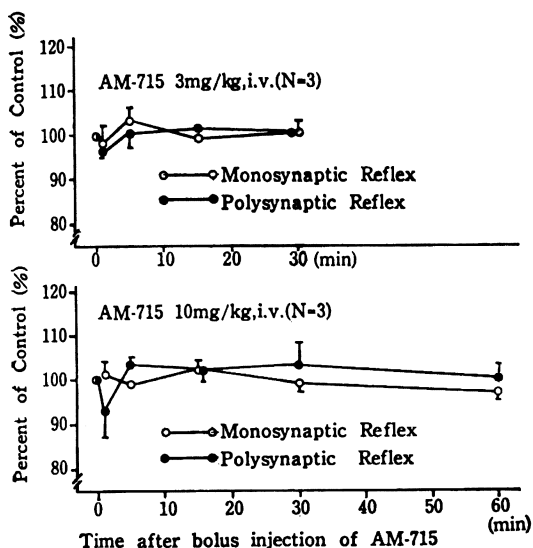
AM-715 の 1, 3, 10 mg/kg 静脈内投与はウサギの総腓骨神経刺激による前脛骨筋のれん縮反応に対し影響をおよぼさなかった。一方, gallamine triethiodide 0.5 mg/kg 静脈内投与は約 80% の抑制を示した (Fig. 11)。

4. 臓器運動に対する作用

1) 胃・小腸運動におよぼす影響

AM-715 の 1, 10 mg/kg 静脈内投与では Fig. 12 に示

Fig. 6 Influence of AM-715 to the amplitudes of spinal reflex in spinal rabbit



のように、ウサギの胃幽门部および空腸の自発運動の振幅および緊張レベルに認むべき影響を与えなかった。

2) 膀胱運動におよぼす影響

尿道および輸尿管結紮により膀胱を閉鎖系にして、50~60 ml の液を負荷すると、動物により若干異なるが、5 cm H₂O 前後の膀胱内圧を示し、ときどき3~7 cm

H₂O の不規則な内圧上昇が観察される。これらは atropine sulfate の1~2 mg/kg 静脈内投与により抑制されるが完全に消失することはない。

AM-715 の1, 3, 10 mg/kg 静脈内投与は全例に影響を与えなかった。ACh 10 μg/kg 静脈内投与は膀胱内圧を一過性に上昇させた (Fig. 13)。

3) 子宮運動におよぼす影響

AM-715 の1, 3, 10 mg/kg 静脈内投与はウサギの生体位子宮運動に対し影響をおよぼさなかった。同一標本に対し oxytocin 0.05 U/kg 静脈内投与は一過性の子宮収縮を惹起した (Fig. 14)。

4) マウス腸管輸送能におよぼす影響

AM-715 の100および1,000 mg/kg 経口投与はマウスの腸管輸送能に有意な影響を与えなかった (Table 13)。

III. 考 察

AM-715 はマウスおよびラットにおいて30~1,000 mg/kg 経口投与では一般症状に影響を与えず、自発運動、協調運動、チオペンタール睡眠、酢酸ライシグ、正常体温、発熱ウサギ体温、条件回避反応にも影響せず、鎮痛作用や筋弛緩作用も認められなかった。1,000 mg/kg 経口投与は strychnine けいれんの死亡潜時をわずかに抑制したが死亡率を減少させず、また、pentetrazol けいれんや電撃けいれんを抑制しなかったことから、AM-715 は抗けいれん作用も有さないものとする。急性および慢性電極植込ウサギ脳波の実験においても、10, 30 mg/kg という大量の静脈内投与により、自発脳波、

Table 12 Influence of AM-715 on conditioned avoidance response in rats (pole climbing method)

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Block of conditioned response (%)							
		0.5	1	1.5	2	3	4	5	6 hr ^{a)}
Saline		0	0	0	0	0	0	0	0
AM-715	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorpromazine-HCl	20	0	20	40	50	60	50 (30)	80 (10)	60 (10)

a): Time after drug administration

Number in parenthesis represents the block percent of escape response.

Each group consisted of 10 rats.

Fig. 7 Influence of AM-715 on the contraction induced by spasmogens in several isolated organs

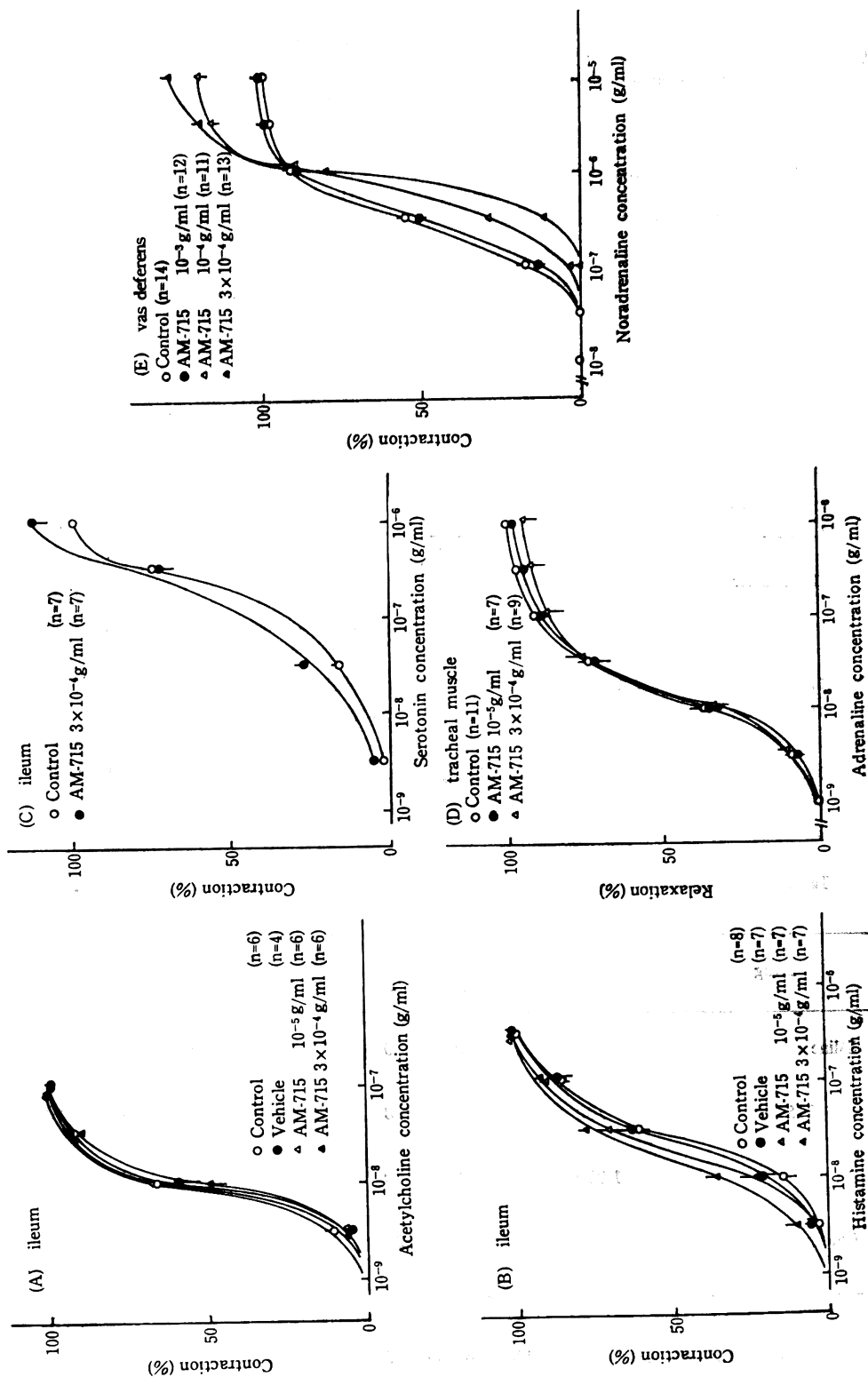
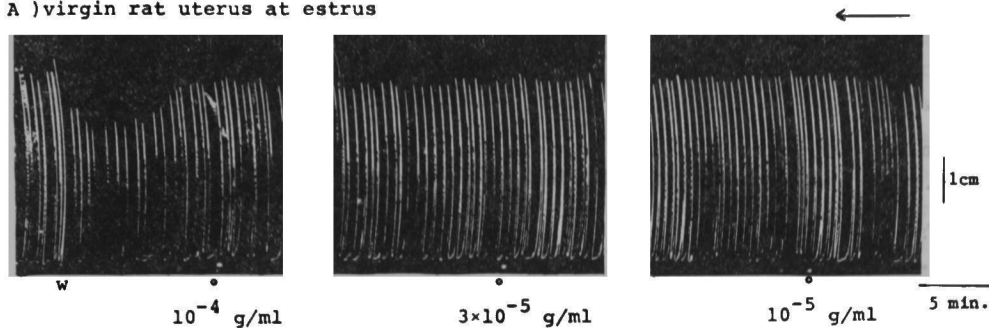


Fig. 8 Action of AM-715 on spontaneous movement of the isolated uterus from virgin and pregnant rat
(A) virgin rat uterus at estrus



(B) pregnant rat uterus

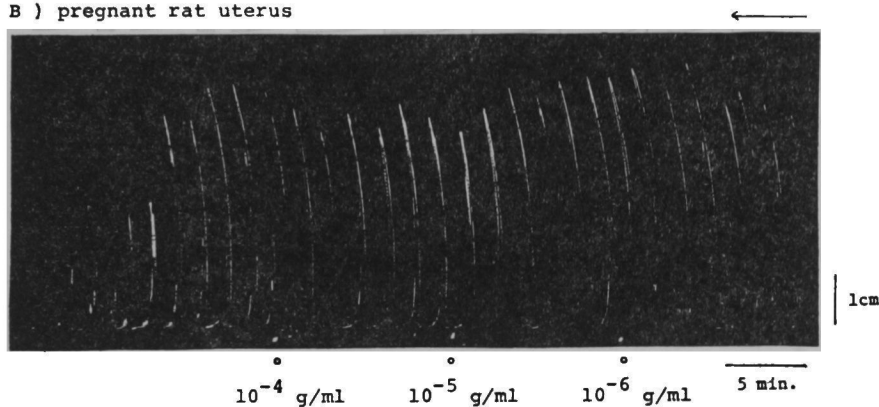
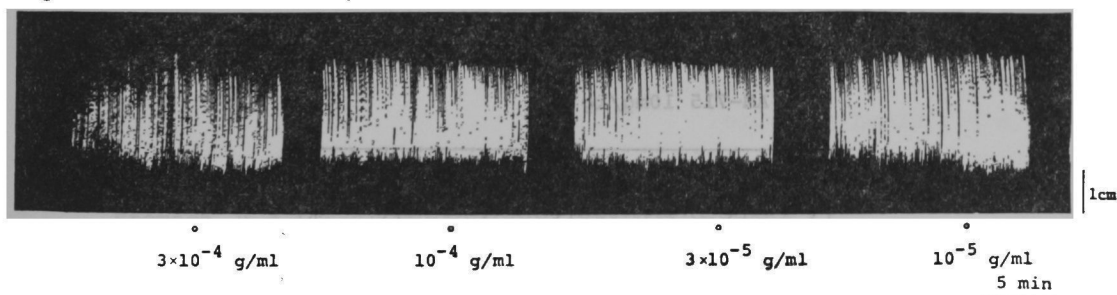


Fig. 9 Action of AM-715 on spontaneous movement of the isolated ileum from rabbit



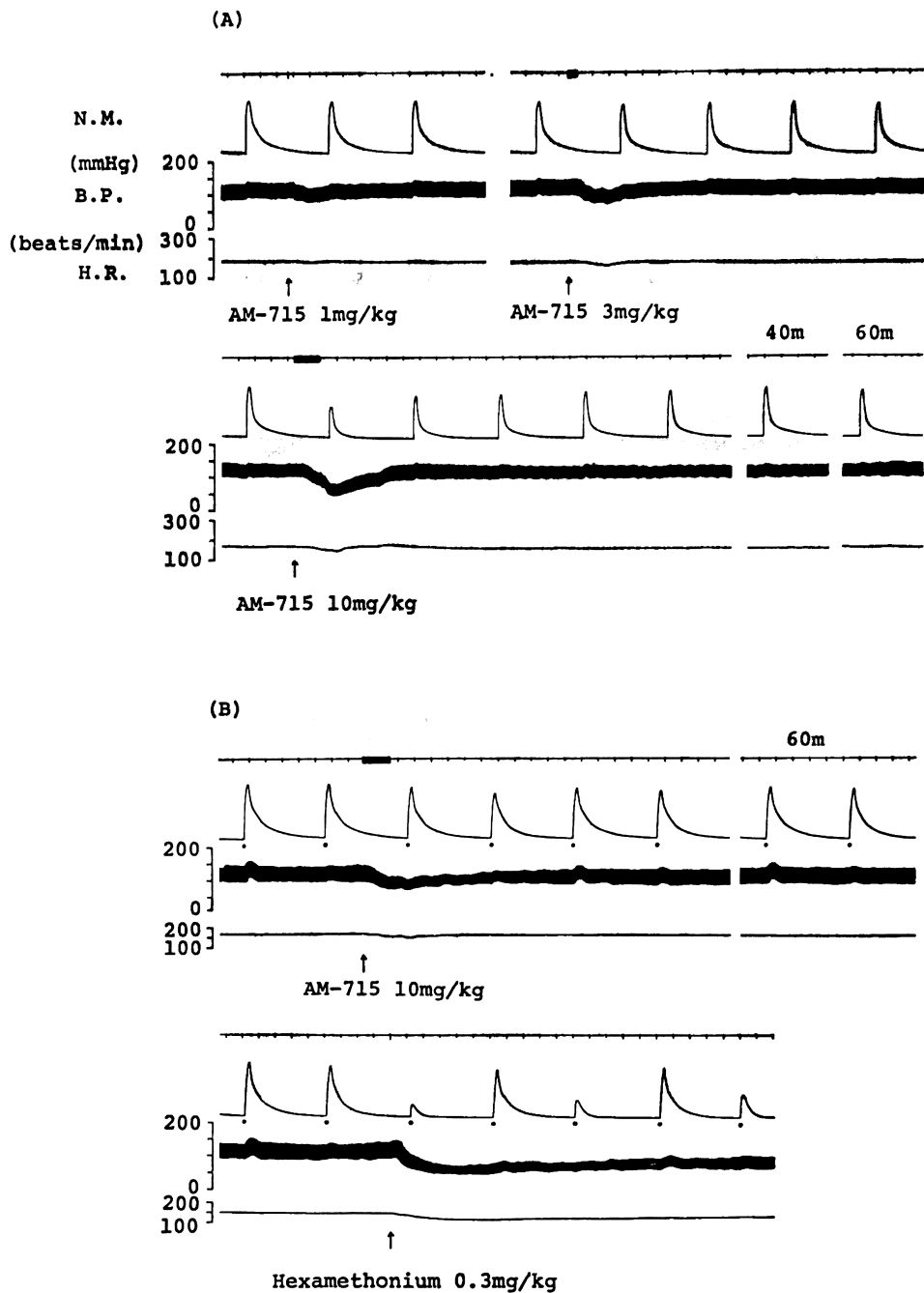
脳波覚醒反応に影響をおよぼさなかった。

以上のように、AM-715 は中枢神経系に対しほとんど影響を与えないことから、すくなくとも臨床経口用量 (10~15 mg/kg/day) においては中枢神経系の反応は惹起しないものと考ええる。

AM-715 は 3×10^{-4} g/ml という高濃度でウサギ摘出

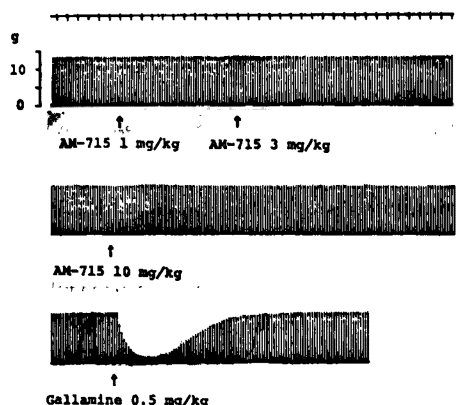
回腸の自動運動を一過性に興奮させ、 10^{-4} g/ml で妊娠あるいは非妊娠ラットの摘出子宮の自動運動を抑制したがいずれの場合も洗浄することによりすみやかに回復した。AM-715 は 3×10^{-4} g/ml でもモルモットの摘出回腸、摘出気管平滑筋、ラットの摘出輸精管標本の緊張を変化させず、ACh や Adr による収縮や弛緩反応にも影

Fig. 10 Influence of AM-715 on the response of nictitating membrane to cervical sympathetic nerve stimulation in pentobarbital anesthetized cat



(A):Preganglionic stimulation, (B):○ Preganglionic stimulation, and ● Postganglionic stimulation, Time marker:1 min

Fig. 11 Influence of AM-715 on the twitch tension of the tibialis anterior muscle in rabbit



Drugs were administered intravenously. Time marker : 1 min.

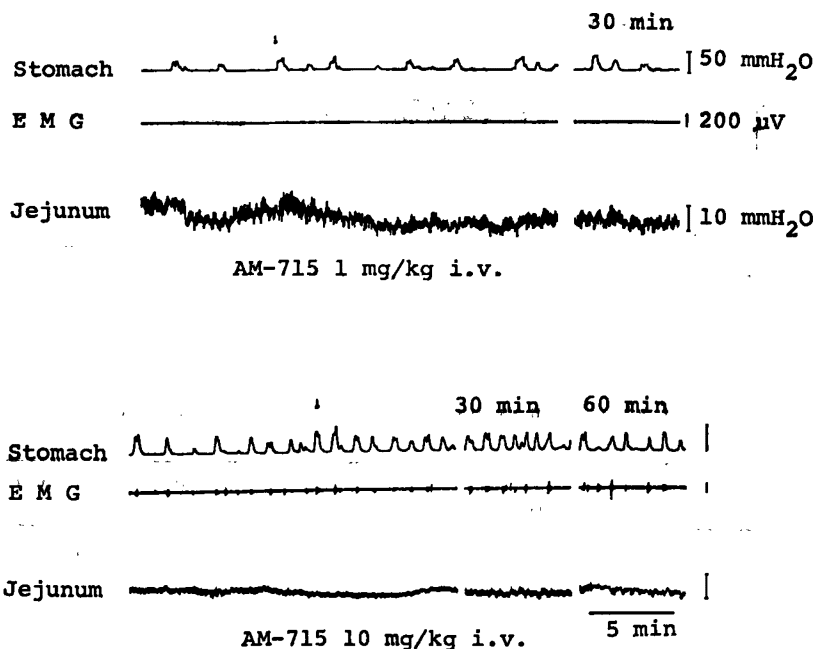
響を与えなかったが、His および 5-HT による回腸の収縮反応を軽微に増強した。また、ラット摘出輸精管において NAdr の低濃度による収縮を抑制、高濃度による収縮を増強するというように二相性の影響を与えた。このことと AM-715 1,000 mg/kg 経口投与による reserpine 低体温に対する弱い抑制、そして、10 mg/kg 静脈内投与による弱い平滑筋収縮の抑制を考えあわせると、AM-715 は大量投与の際には弱いながらも monoaminergic 機構になんらかの作用を有するに思われる。

以上のように、AM-715 は摘出平滑筋臓器に対して 100 μ g/ml 以上の高濃度で軽微な影響を与えるが、それ以下の濃度では作用を示さないものと判断された。

AM-715 は腓骨神経刺激による前脛骨筋のれん縮反応に対して 30 mg/kg 以下の静脈内投与では影響を与えず、脊髄ウサギにおける MSR, PSR に対しても 10 mg/kg 静脈内投与ではほとんど作用を示さないことから運動系に対しても影響を与えないものと判断される。

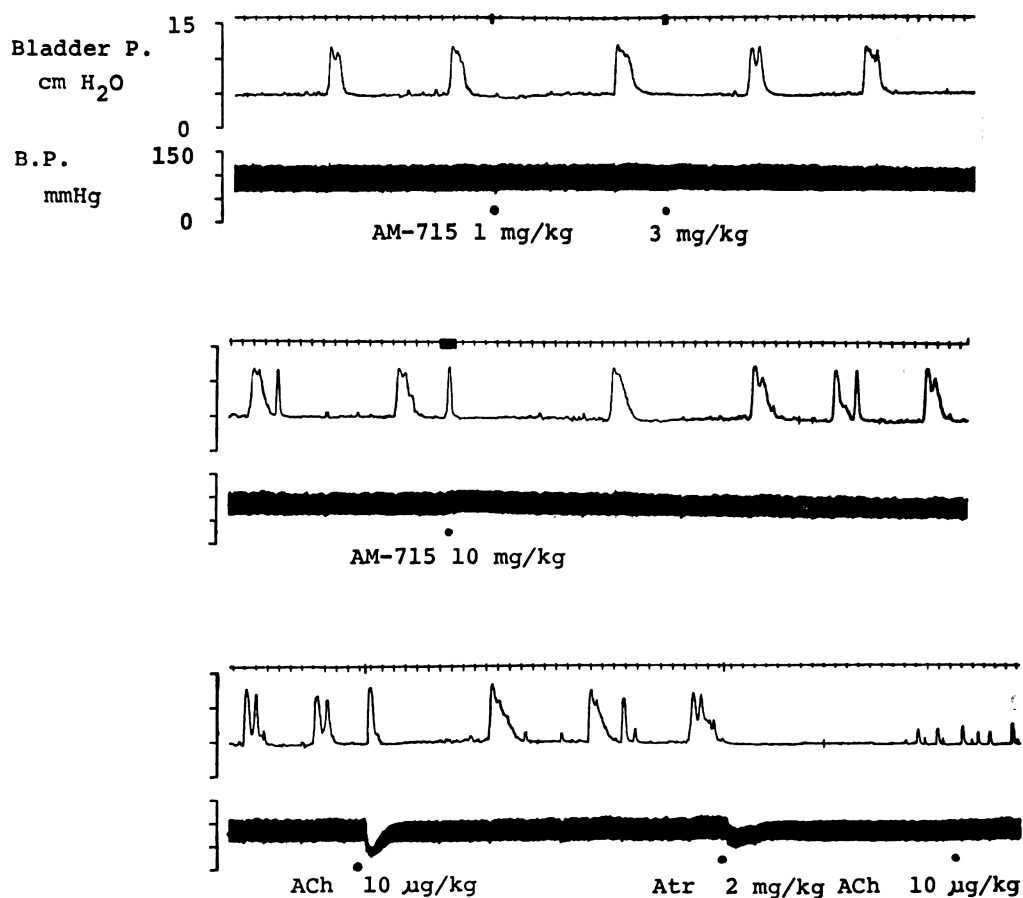
ウサギの胃・小腸運動、膀胱運動、子宮運動などの生体位臓器運動に対して、AM-715 は 10 mg/kg 静脈内投

Fig. 12 Influence of AM-715 on spontaneous movement of stomach and jejunum of rabbit *in situ*



E M G : EMG was recorded from the pyrolic portion of stomach.

Fig. 13 Influence of AM-715 on urinary bladder in rabbit



Drugs were administered intravenously. Time marker : 1 min.

ACh : Acetylcholine, Atr : Atropine sulfate,

Bladder P. : Intravesical pressure of bladder,

B.P.: Blood pressure.

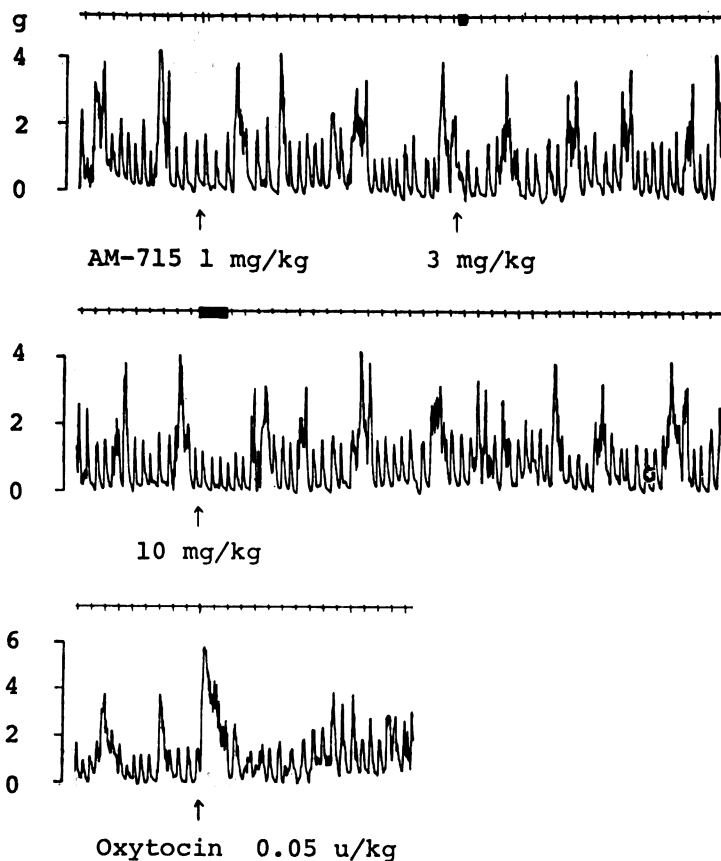
Table 13 Influence of AM-715 on gastrointestinal propulsion of charcoal meal in mice

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Propulsive rate (%) Mean $\pm$ S.E.
Saline		64.3 $\pm$ 7.1
AM-715	100	64.5 $\pm$ 3.6
	1,000	53.3 $\pm$ 2.9
Atropine sulfate	10	42.2 $\pm$ 6.7*

*: Significantly different from the saline group, $p < 0.05$

Each group consisted of 10 mice.

Fig. 14 Influence of AM-715 on spontaneous movement of uterus in rabbit



Drugs were administered intravenously. Time marker : 1 min.

与以下では影響をおよぼさず、マウス腸管輸送に対しては1,000 mg/kg 経口投与という大量で影響をおよぼさなかった。抗生物質の薬理作用について簡潔にまとめた中塚の報告⁶⁾によると、抗生物質は比較的低濃度で臓器に対する抑制作用を示しこれがヒトにおける胃腸管系の副作用と不可分の関係があるとしている。合成抗菌薬AM-715は高濃度においても摘出腸管を弱く、しかも一過性に興奮させるにすぎず、生体位胃腸管運動、腸管輸送能に対しては大量でも影響を与えないことから、臨床経口用量では胃腸管系の副作用は生じにくいと考えられる。

以上、AM-715について中枢神経系、末梢神経系、臓器運動におよぼす影響を検討したところ、いずれの項目においても著しい作用は観察されず、一部でみられた作用も抗菌作用が認められる用量をはるかに超える用量であった。

謝 辞

本実験に御協力いただいた当研究所の多賀福太郎博士ならびに当社開発技術センターの今井繁氏に謝意を表します。

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 & Chemoth.* 17: 103~108, 1980
- 2) IRWIN, S.; Animal and clinical pharmacological techniques in drug evaluation (NODIN, J. H. & SIEGLER, P. E.) pp. 36~54, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1964
- 3) 高木敬次郎, 亀山 勉, 矢野剋二: 鎮痛剤の研究 (第3報), 加圧刺激装置による試験法。薬学雑誌 78: 553~557, 1958
- 4) SAWYER, C. H.; J. W. EVERETT & J. D. GREEN: The rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates. *J. Comp. Neurol.* 101: 801~824, 1954
- 5) TAKAGI, K.; I. TAKAYANAGI & K. FUJIE: Chemico-pharmacological studies on antispasmodic action. XV. Non-specific antispasmodic action on tracheal muscle. *Chem. Pharm. Bull.* 6: 716~720, 1958
- 6) 中塚正行: 抗生物質の薬理作用。医学のあゆみ 56: 285~293, 1966

PHARMACOLOGICAL STUDIES ON AM-715; (I) INFLUENCES OF AM-715 ON CENTRAL NERVOUS SYSTEM, PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM AND SMOOTH MUSCLE ORGANS

HIDEO OHKUBO, MITSURU SEGAWA, TAKASHI HIRAYAMA AND KEIGO NISHINO
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Pharmacological studies on AM-715, a new antibacterial drug, were performed from a view point of side effects in its considerable large doses. The following results were obtained.

1. Central Nervous System; Oral administration of large doses (100, 1,000 mg/kg) of AM-715 did not show any significant influences on behaviors and on various pharmacological tests in mice and rats. Intravenous administration of AM-715 at a dose of 10 mg/kg did not cause any changes in spontaneous EEG, arousal response and spinal reflexes in the rabbit.

2. Peripheral Nervous System; AM-715 had no antagonistic or inhibitory properties to acetylcholine, histamine, serotonin and adrenaline in the experiments of isolated ileum and tracheal muscle from guinea-pigs. Spontaneous movements of the rat uterus during pregnancy or virginity were depressed and that of the rabbit ileum was augmented with such a high concentration as 10^{-4} g/ml *in vitro*. Contraction of nictitating membrane of the cat caused by stimulating the pre- or post-ganglionic fibre was slightly inhibited by intravenous administration of 10 mg/kg. Nerve-muscle preparation (M. tibialis) in rabbit *in situ* was not affected.

3. Smooth Muscle Organs; Intravenous administration of 10 mg/kg did not show any significant influences on movements of the smooth muscle organs such as stomach, intestine, bladder and uterus at estrus of rabbit. Motility of alimentary tract of mouse (gastro-intestinal propulsion test) was not influenced by oral administration of 1,000 mg/kg of AM-715.