

Cinoxacin のウサギによる催奇形性試験

佐藤利和

株式会社 生物科学技術研究所

小林文彦

塩野義製薬株式会社研究所

キノロンカルボン酸系抗菌薬である Cinoxacin の 100, 450 および 800 mg/kg/day, ならびに対照薬 Nalidixic acid の 800 mg/kg/day を胎仔器官形成期の妊娠ウサギに強制経口投与し, 妊娠母体および胎仔におよぼす影響について検討した。

母体におよぼす影響としては, Cinoxacin の 800 mg/kg/day 投与群で, 投与末期に軽度な体重減少と摂餌量の低下がみられた以外, 明らかな変化は認められなかった。

胎仔に及ぼす影響については, Cinoxacin の各投与群とも, 胚致死作用, 胎仔発育抑制作用および催奇形作用は認められなかった。一方 Nalidixic acid 投与群では, 胚致死率の軽度な増加がみられた。しかし胎仔発育抑制作用および催奇形作用は認められなかった。

以上の結果から, Cinoxacin のウサギ催奇形性試験における経口投与時の最大無作用量は 800 mg/kg/day と推定された。

緒言

Cinoxacin (以下 CINX と略す) は, Eli Lilly 社で開発されたキノロンカルボン酸系の化合物でグラム陰性菌に対して強い抗菌作用をもっている抗菌薬である。

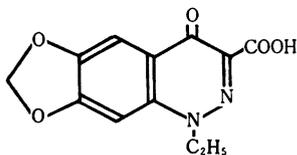
我々は, すでにラットによる一連の生殖試験について検討し, その成績を報告した¹⁾。今回さらに胎仔器官形成期の妊娠ウサギに CINX を経口投与し, その母体および胎仔に及ぼす影響を, 対照薬 Nalidixic acid (以下 NA と略す) と比較検討したので, その成績を報告する。

実験材料および方法

1. 検体

CINX は Fig.1 に示した化学構造をもっている 1-

Fig. 1 Chemical structure of CINX



Molecular formula	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₅
Molecular weight	262.22
Melting point	265°C

ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo [1, 3] dioxolo-(4, 5-g) cinnoline-3-carboxylic acid で, 水に難溶性の淡黄色結晶性粉末である。

本試験に用いた検体は CINX (Eli Lilly 社製: Lot No. B14-Y55-091) および NA (日局 9) である。

2. 実験動物および飼育条件

船実験生物センターから入手した生後 7 カ月齢の雌雄日本白色種ウサギを 20 日間予備飼育したのち, 本試験に供した。交配適期の雌を雄ケージ内に入れ, 交尾行動を観察したのち, 膣垢中の精子を確認し, 交尾成立の日を妊娠 0 日として起算した。

ウサギは, 予備飼育および本試験期間を通じて, 室温 24 ± 2°C, 湿度 55 ± 5% の飼育室で飼育し, アルミ製ケージ (32×40×50 cm) に個別に収容した。飼料 (船橋農場製 MG-1) は, 1 日当り 200 g の制限給餌とし, 水は新鮮な市水道水を 500 ml の給水瓶で自由に摂取させた。

3. 投与量の設定

本試験の投与量は, 成熟雌ウサギによる 2 週間連続投与試験および妊娠ウサギによる予試験の成績を参考に決定した。すなわち CINX の 200, 400, 600, 800 および 1,200 mg/kg/day を非妊娠雌ウサギに 2 週間連続経口投与したところ, 1,200 mg/kg/day 投与群で

は5日目に3例中1例死亡したが、他の投与群では明らかな中毒症状はみられず、死亡例もみられなかった。しかし、600および800 mg/kg/day 投与群で投与期間中軽度な体重減少が認められた。

妊娠ウサギによる予備試験では、CINXの200, 400および600 mg/kg/dayを妊娠6日より18日まで経口投与し、妊娠29日に帝王切開を行なった。母体では、600 mg/kg/day 投与群で体重増加の抑制が軽度のみ見られた以外は著変はなく、胎仔検査においても特別な異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験の投与量は、最大量を800 mg/kg/dayとし、最小量を100 mg/kg/day (臨床推定常用量の6~12倍)、中間量を450 mg/kg/dayとした。なお対照薬NAの投与量は、CINXの最大量と同一量の800 mg/kg/dayとした。

4. 投与方法

CINXおよびNAは、5%アラビアゴム溶液(半非化学薬品製)に用時懸濁し、妊娠6日より18日までの13日間、毎日1回前記用量を10 ml/kgの割合(妊娠6日の体重を基準)で、胃カテーテルを用い強制経口投与した。なお対照群には5%アラビアゴム溶液を10 ml/kgの割合で、検体と同様の手法により投与した。

5. 観察方法

妊娠0日より帝王切開を行なった妊娠29日まで、母体の体重および摂餌・摂水量を毎日測定するとともに、一般状態の観察を行なった。

妊娠29日に耳静脈から空気注入を行なって致死させたのち、内部臓器の肉眼的検査および重量測定を行なった。ついで、黄体、吸収胚、死亡および生存胎仔の位置および数を算定した。生存胎仔については、外形異常の有無を調べたのち、各母体につき1/3の胎仔をブアン液に固定し、WILSON法²⁾に準じて粗大切片標本を作

Fig. 2 Effect of CINX on body weight in pregnant rabbits on teratological study

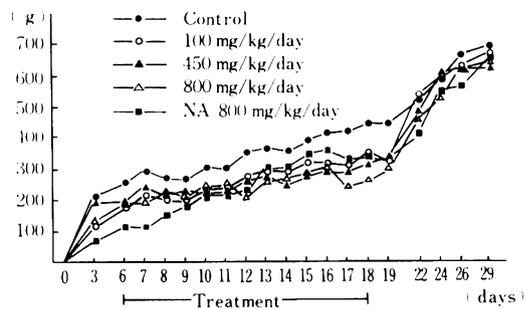


Table 1 Effect of CINX on organ weight in rabbits at 29 days of pregnancy on teratological study

Drug & dose (mg/kg)	CINX					NA
	Control	CINX			NA	
	No. of rabbits sacrificed	100	450	800	800	
Item	10	10	10	10	10	
Final body weight (g)	4,054 ± 415	3,950 ± 325	3,872 ± 313	3,794 ± 367	3,818 ± 433	
Absolute organ weight ^{a)}						
Heart	8.62 ± 1.28	9.30 ± 1.83	9.55 ± 1.65	9.31 ± 1.38	9.75 ± 1.77	
Lung	14.90 ± 5.31	14.46 ± 2.16	14.20 ± 2.82	14.64 ± 3.24	14.64 ± 2.35	
Spleen	1.80 ± 0.71	1.64 ± 0.55	1.87 ± 0.47	1.70 ± 0.57	1.70 ± 0.61	
Liver	132.42 ± 46.81	135.04 ± 31.48	121.81 ± 18.54	124.73 ± 31.19	148.99 ± 34.46	
Kidney	17.63 ± 2.90	18.12 ± 2.00	19.45 ± 3.20	18.68 ± 3.00	19.01 ± 3.31	
Ovary	0.91 ± 0.23	0.94 ± 0.20	1.06 ± 0.34	0.93 ± 0.19	0.92 ± 0.31	
Relative organ weight ^{b)}						
Heart	213 ± 28	235 ± 36	242 ± 34*	246 ± 29*	254 ± 29**	
Lung	374 ± 155	366 ± 46	360 ± 58	385 ± 70	387 ± 72	
Spleen	44 ± 15	41 ± 13	48 ± 13	45 ± 15	44 ± 14	
Liver	3,242 ± 959	3,410 ± 722	3,107 ± 469	3,267 ± 649	3,885 ± 692	
Kidney	437 ± 70	459 ± 42	495 ± 77	492 ± 64	499 ± 82	
Ovary	22 ± 5	24 ± 4	27 ± 10	25 ± 7	24 ± 8	

a) g ± S.D.

b) mg/100 g body weight ± S.D.

* Significantly different from control data (p less than 0.05)

** Significantly different from control data (p less than 0.01)

製し、脳室、眼球および胸・腹部の検査を行なった。残りの2/3の胎仔は $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ の孵卵器内に收容し、6および24時間後の生存率を求めた。生存能の検査を終えた胎仔については、内臓観察および性別の検索を行なったのち、DAWSON法³⁾により骨格標本作製し、骨格検査を行なった。

得られた測定値は、1腹を単位として集計し、推計学的処理にはt-検定および χ^2 -検定を用いた。

実験成績

1. 母体に及ぼす影響

CINX および NA の各投与群ともに明らかな中毒症状はみられなかった。

妊娠期間中の体重推移は Fig. 2 に示すように CINX の800 mg/kg/day 投与群の体重増加量が投与11日(妊娠17日)に減少し、対照群と比較して有意差($p < 0.05$)がみられた。また当該群では摂餌量が投与末期に減少した。一方 NA 投与群では、投与開始前より投与開始3日まで体重増加量が低値を示したが、投与4日以降には回復した。

帝王切開時の剖検では、CINX および NA 投与に起

因する変化はみられなかったが、臓器の重量測定において、CINX の450 および 800 mg/kg/day ならびに NA 投与群の心臓の相対重量が対照群に比して、それぞれ有意な高値を示した。 $(p < 0.05, p < 0.01)$ (Table 1)。

2. 胎仔に及ぼす影響

妊娠29日に帝王切開した母体について、黄体数、着床数および胎仔に関する成績を Table 2 に示した。

CINX の各投与群では、諸指標とも対照群との間に有意の差は認められなかったが、NA 投与群の胚致死率が対照群の8.5%に対して16.8%と増加傾向を示し、生存胎仔数の減少傾向がみられた。各母体の2/3の胎仔について調べた6時間および24時間の生存率は、対照群と CINX 投与群および NA 投与群間に差がなかった。この際、24時間までに死亡した各群の胎仔につき肉眼的に外形および内臓臓器の観察を行なったが特に異常はなく死亡の原因を明確にはできなかった。

外形、内臓および骨格検査の結果を Table 3 に示した。外形異常として、対照群 (Photo. 1), CINX 100 mg/kg/day および NA 投与群の各1例に臍ヘルニアがみられたほか、CINX の100 mg/kg/day 投与群の

Table 2 Effect of CINX on rabbit fetuses on teratological study

Drug & dose (mg/kg)	Control	CINX			NA
		100	450	800	800
No. of dams sacrificed	10	10	10	10	10
Item					
No. of copora lutea	103 (10.3±1.57) a)	98 (9.8±1.69)	100 (10.0±1.70)	99 (9.9±2.23)	98 (9.8±2.78)
No. of implantations	87 (8.7±2.16)	87 (8.7±1.42)	88 (8.8±2.39)	83 (8.3±2.71)	81 (8.1±3.18)
No. of fetal deaths					
Early deaths	3	3	2	1	9
Placental remnants	0	0	0	0	3
Late deaths	3	4	2	2	2
Total	6	7	4	3	14
Fetal death/implantations (%)	8.5	8.1	5.6	3.1	16.8
No. of live fetuses	81 (8.1±2.60)	80 (8.0±1.89)	84 (8.4±2.59)	80 (8.0±2.62)	67 (6.7±2.45)
Sex ratio (male/female)	0.80 36/45	1.05 41/39	1.27 47/37	0.86 37/43	0.97 33/34
Mean body weight of fetuses (g±S.D.)	40.3±5.34	41.9±5.55	39.5±4.56	38.7±4.27	39.8±5.08
Mean placental weight (g±S.D.)	4.26±1.03	4.37±0.52	4.31±0.81	4.12±0.87	4.25±0.81
Viability of live fetuses (%) ^{b)}					
After 6 hours	96.0	97.1	98.6	94.7	95.4
After 24 hours	87.3	90.0	88.0	89.3	83.8

a) Mean±S.D. b) No. of live fetuses after 6 or 24 hours/No. of live fetuses at maternal sacrifice

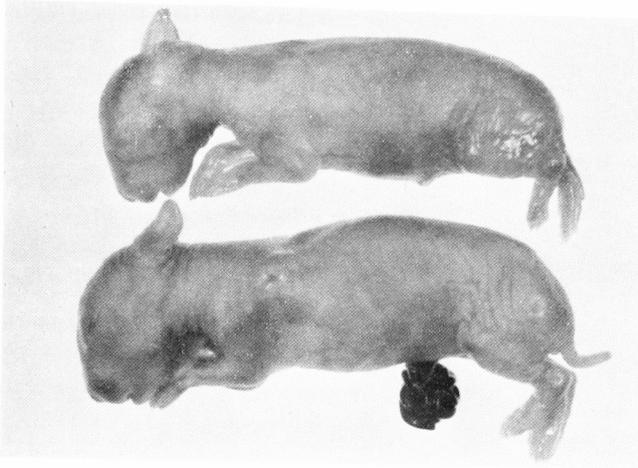


Photo. 1 Control group

Normal

Umbilical hernia



Photo. 2 CINX 100mg/kg/day

Normal

Acephaly with umbilical
hernia and club foot

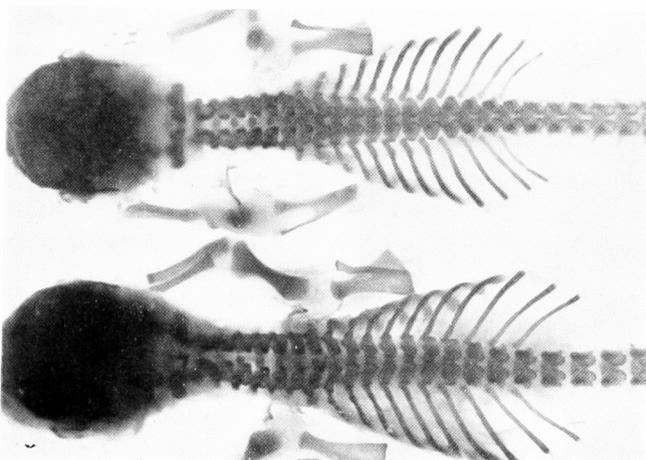


Photo. 3 Control group

Normal

11 ribs

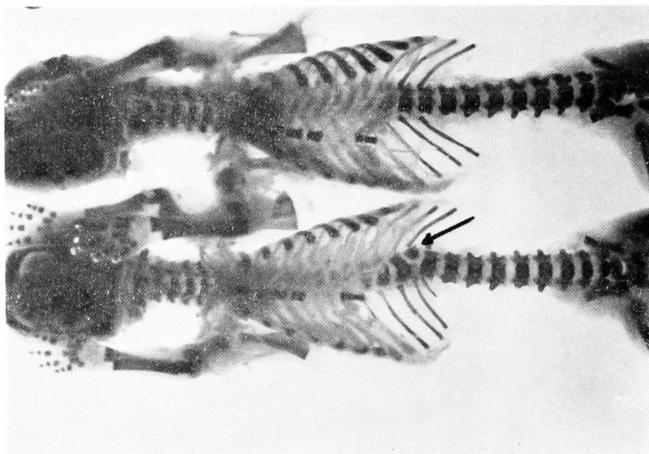


Photo. 4 CINX 800 mg/kg/day

Normal

Defect of the 12th thoracic vertebral body. Deformation of 12th thoracic vertebral arch and the 1st lumbar vertebral body.

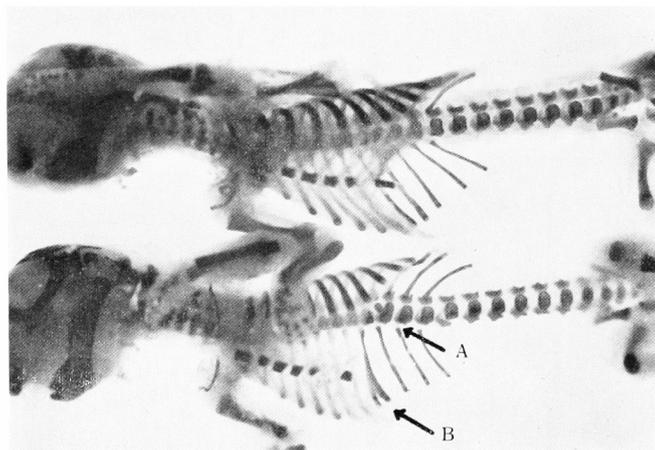


Photo. 5 NA 800 mg/kg/day

Normal

A : Deformation of the 11th thoracic vertebral body by fusing with the 10th thoracic vertebral body. The 10th thoracic vertebral arch is defected.

B : Fusion of the 9th and 10th rib.

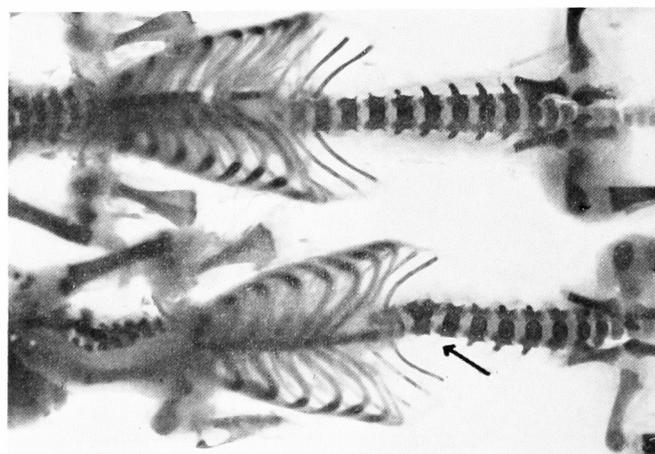


Photo. 6 NA 800 mg/kg/day

Normal

Fusion of the 1st and 2nd lumbar vertebral body. Defect of the 2nd lumbar vertebral arch.

同腹胎仔 3 例に水頭, 他の母体の 1 例に無頭 (Photo. 2) がそれぞれ観察された。

内臓検査では, CINX の 100 mg/kg/day 投与群の 2 例に水頭にもとづく側脳室の拡張がみられたのみであった。

骨格検査では, 対照群の 1 例に 11 対肋骨 (Photo. 3), CINX の 100 mg/kg/day 投与群に無頭を伴う複合異常および水頭を伴う頭骨の異常がそれぞれ 1 例, 800 mg/kg/day 群に椎骨異常が 1 例 (Photo. 4) 観察された。また NA 投与群では, 椎骨および肋骨の複合異常, 椎骨異常, 椎骨と胸骨核の複合異常, 肋骨と胸骨核の複合異常がそれぞれ異なった 1 例にみられた (Photo. 5, 6)。しかし, 骨格変異および化骨進行度の検索では, 各投与群とも対照群との間に差は認められな

かった。なお, 骨格標本作製時に各胎仔の内臓臓器の肉眼的観察を行なったが, 各群とも異常はみられなかった。

考 察

キノロンカルボン酸系抗菌薬である CINX の 100, 450 および 800 mg/kg/day と対照薬 NA の 800 mg/kg/day を, 胎仔器官形成期の妊娠ウサギに強制経口投与し, 妊娠母体および胎仔に及ぼす影響について検討した。

CINX の 800 mg/kg/day 投与群で投与末期の一時に母体体重の軽度な減少と摂餌量の低値がみられ, CINX の 450 および 800 mg/kg/day ならびに NA の 800 mg/kg/day 投与群において心臓相対重量の増

Table 3 Effect of CINX on external, visceral and skeletal malformation in rabbit fetuses on teratological study

Item	Drug & dose (mg/kg)	Control	CINX			NA
			100	450	800	800
External						
No. of examined		81	80	84	80	67
Malformed fetuses (%)		1 (1.2)	5 (6.3)	0	0	1 (1.5)
Umbilical hernia		1 (1.2)	1 (1.3)	0	0	1 (1.5)
Acephaly		0	1 (1.3)	0	0	0
Hydrocephaly		0	3 (3.8)	0	0	0
Visceral						
No. of examined		26	25	28	25	20
Malformed fetuses (%)		0	2 (8.0)	0	0	0
Enlarged lateral ventricle		0	2 (8.0)	0	0	0
Skeletal						
No. of examined		55	55	56	55	47
Malformed fetuses (%)		1 (1.8)	2 (3.6)	0	1 (1.8)	4 (8.5)
11 ribs		1 (1.8)	0	0	0	0
Various abnormalities		0	2 (3.6) a)	0	1 (1.8) b)	4 (8.5) c)
Fetuses with variation (%)		18(32.7)	19(34.5)	20(35.7)	20(36.4)	17(36.2)
Cervical rib		0	0	0	0	0
Lumbar rib		18(32.7)	19(34.5)	20(35.7)	20(36.4)	17(36.2)
Degree of ossification (mean±S.D.)						
Sternebrae		6.0±0.08	6.0±0.0	5.9±0.16	6.0±0.13	6.0±0.06
Coccygeal vertebrae		14.8±0.61	14.8±0.59	14.7±0.53	14.8±0.34	14.6±0.20

a) One case in acephaly and other case in hydrocephaly

b) Defect and deformation of vertebrae

c) Case 1 : Fusion of ribs, fusion, defect and deformation of vertebrae

Case 2 : Fusion and defect of vertebrae

Case 3 : Separation of vertebrae and fusion of sternebrae

Case 4 : Asymmetrical location of sternebrae and fusion of ribs

加が認められた。これら投与群における心臓相対重量の増加は、絶対重量や肉眼的観察では異常はみられず、またラット亜急性毒性試験⁴⁾またはサル慢性毒性試験⁵⁾の組織学的検索およびラットの一連の生殖試験¹⁾においても心臓に変化はみられていないことから、体重の低値に起因する変動と考えられる。なお、ラットにおいて観察された^{1,4)}尿路系の障害は、本試験のウサギでは全く認められなかった。

着床数、胚致死率、生存胎仔数、胎盤重量等について、CINX 投与の影響はみられなかったが、NA 投与群では凶致死率が軽度増加していた。この増加は、今迄の背景データと比較しても高値であった。しかし、本試験の対照群との間に推計学的有意差はなく、1 用量しか検査しなかったため、NA の胚致死作用の有無を完全に証明することはできなかった。

胎仔の外形異常は、対照群の 1 例に対して、CINX の 100 mg/kg/day 投与群で 5 例、800 mg/kg/day 投与群で 1 例および NA 投与群で 1 例みられた。100 mg/kg/day 投与群の 5 例のうち 3 例は水頭であったが、この 3 例はいずれも同腹胎仔であり、他の投与群にはみられず用量作用関係もないことから、CINX 投与に起因するものとは考え難く、遺伝的因子によるものと思われる。内臓異常は、CINX の 100 mg/kg/day 投与群で 2 例（水頭例）みられたのみであった。骨格異常は、対照群に 11 対肋骨が 1 例みられたのに対し、CINX 群では 100 mg/kg/day 投与群に無頭を伴う複合異常と水頭を伴う頭骨異常および 800 mg/kg/day 投与群に椎骨異常が各 1 例みられた。これら骨格異常は今回の対照群にはみられなかったが、今迄の背景データにみられること、またいずれも発現頻度が低く、用量

作用関係もないことから薬剤の影響と断定することは困難であると考えられる。また NA 投与群に 4 例の骨格異常が認められたが、対照群と有意な差は認められなかった。

以上の結果から、CINX および NA はともにウサギに対して催奇形作用を有さないものと推察され、本試験における胎仔に対する最大無作用量は 800 mg/kg/day と考えられた。

なお、Lilly 社のウサギによる催奇形性試験においても、CINX の催奇形作用を認めておらず、本試験の結果と一致した⁶⁾。

(試験期間 昭和 52 年 8 月～昭和 52 年 12 月)

参 考 文 献

- 1) 佐藤利和, 金子洋二, 三枝 雅, 小林文彦: Cinoxacin のラット生殖におよぼす影響。Chemotherapy 28(S-4): 484~507, 1980
- 2) WILSON, J.G.: Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animals. "Teratology; Principles and Techniques" ed. by WILSON, J.G. and WORKANY, J. Univ. Chicago press, Chicago, 262~277, 1965
- 3) DAWSON, A.B.: A note on staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 4) 奈良間 功, 土谷 稔, 佐野正樹, 斎藤 実, 原田喜男: Cinoxacin の急性および亜急性毒性試験。Chemotherapy 28(S-4): 406~439, 1980
- 5) 斎藤 実, 土谷 稔, 佐野正樹, 奈良間 功, 原田喜男: Cinoxacin のカニクイザルによる 亜急性並びに慢性毒性試験。Chemotherapy 28(S-4): 440~483, 1980
- 6) WELLS, J.S. et al: Teratology studies of cinoxacin in rats and rabbits, Lilly Research Laboratories, IND 9075 Toxicology Report No. 5

TERATOLOGICAL STUDY ON CINOXACIN IN RABBITS

TOSHIKAZU SATO

Technical Research Laboratory of Biological Science Co., Ltd.

FUMIHIKO KOBAYASHI

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

Teratological study on cinoxacin (CINX), a new synthetic chemotherapeutic, was performed in primigravid Japanese white rabbits. CINX was orally administered at doses of 100, 450 and 800 mg/kg/day from day 6 to day 18 of pregnancy. For a comparative study, nalidixic acid (NA) was administered at a dose of 800 mg/kg/day in a similar way. Control rabbits were administered orally 5% acacia solution alone. On day 29 of pregnancy, pregnant rabbits were sacrificed to evaluate the effect of CINX or NA on fetuses.

In 800 mg/kg group of CINX, decrease in the maternal weight gain and food consumption was observed during the terminal period of administration. No significant differences between the control and the treated groups were found in fetal mortality, body weight of fetuses and the incidence of external, visceral and skeletal abnormalities of fetuses. Effects of 800 mg/kg group of NA on pregnant rabbits and fetuses were the same as those of CINX except slight increase of fetal death.