

AM-715 のマウスにおける生殖試験 (第1報)

妊娠前および妊娠初期投与試験

入倉 勉・鈴木 博・杉本 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

新規合成抗菌剤である 1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid (AM-715) の妊娠前および妊娠初期投与試験をマウスにおいて行なった。

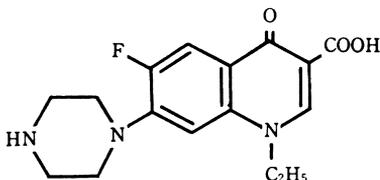
AM-715 は蒸留水で懸濁して経口投与した。投与量は 125, 250 および 500 mg/kg とし、対照群 (蒸留水投与) を含む 4 投与群とした。投与期間は雄マウスでは交配前 61 日間および交配期間中とし、雌マウスでは交配前 15 日から交配期間および交尾成立後妊娠 6 日目までとし、連続投与した。交配は同一投与群内で行ない、交尾の認められた雌動物は妊娠 18 日目に屠殺、剖検した。

雌雄ともに、一般症状、体重、摂餌量ならびに摂水量への AM-715 の影響はみられなかった。全投与群において、黄体数、着床数および胎仔への AM-715 の影響はみられなかった。対照群および投与群において、外表、内臓ならびに骨格異常が散見されたが、これらは対照群との間に統計学的有意差がなく、かつ用量依存関係もみられなかった。

以上の結果から、AM-715 はマウスにおいて生殖能力および胎仔発育に対し何ら影響を及ぼさないものと推測される。

AM-715 は杏林製薬株式会社で開発した新しい抗菌剤で、その抗菌スペクトラムは広く、グラム陽性菌および陰性菌の両群にわたりすぐれた抗菌力を示すことが認められている¹⁾。AM-715 は Fig. 1 に示した化学構造を有し、融点 220~224°C の白色ないし淡黄色の結晶性の粉末で、臭いはなく苦味を呈し、氷酢酸に溶けやすく、アセトンまたはクロロホルムに溶けにくく、メタノールまたはエタノールに極めて溶けにくく、水にはほとんど溶けない化合物である。

Fig. 1 Chemical structure of AM-715



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

今回、AM-715 の安全性を確認するために、マウスの妊娠前および妊娠初期に AM-715 を投与して親マウス

の生殖能力および胎仔への影響について調べたので報告する。

1. 実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物は、生後 5 週令の SLC: ICR 系雌雄マウスを静岡実験動物 (協) から購入し、雄は 1 週間、雌は 7 週間の予備飼育後、健康と思われる動物を実験に供した。投与開始時の体重は雄 31.5 ± 1.5 g、雌 38.5 ± 2.8 g であった。

予備飼育および実験期間中、動物は室温 24 ± 2°C、湿度 65 ± 10%、照明時間午前 9 時~午後 5 時の環境条件のもとで、アルミ製ケージに 10 匹ずつ収容し飼育した。飼料 (CA-1、日本クレア製) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

2. 投与量

投与量は、125, 250 および 500 mg/kg とした。500 mg/kg は懸濁可能 (5%) でマウスに無理なく投与できる量の最大用量で、125 mg/kg は臨床推定使用量 (12 mg/kg/day) の 10 倍量に相当する用量であり、250 mg/kg はその等比的中間量である。

3. 交配方法および妊娠動物の確認

雄 61 日間、雌 15 日間の投与終了後、同一投与群の雌雄を任意に 1 対 1 の割合で同居させた。交配期間は 8 日間とし、膣栓の確認をもって妊娠動物とし、その日を妊

娠0日目として起算した。

4. 投与方法および投与期間

投与液量が体重10g当り0.1mlになるように滅菌蒸留水に懸濁し投与した。懸濁液は用時調製し、マウス用金属経口ゾンデを用い、雄は交配前61日間および交配期間中、雌は交配前15日間および交配期間を通し妊娠6日目までそれぞれ連続経口投与した。

5. 観察項目

1) 親マウスの観察

投与期間中、雄については、体重測定および一般症状の観察を毎日行ない、摂餌量および摂水量を週1回測定し、雌については、妊娠期間を含め体重測定および一般症状の観察を毎日行ない、摂餌量および摂水量を週2回測定した。各群の雄は交配終了後に解剖し、諸器官を剖検した後、生殖器官の重量を測定した。なお、交尾確認後不妊と認めた雌と交配を行なった雄については、精子検査を行なった。交尾確認後の各群の雌はすべて妊娠18日目に解剖し、諸器官を剖検、胎仔を摘出した後、黄体数を調べた。

2) 胎仔の観察

着床数、生存胎仔数、吸収胚数および死亡胎仔数を調べ、生存胎仔については、体重および胎盤重量を測定し、性別および外表異常を調べた。また各群の生存胎仔の約2/3をアルコール固定し、DAWSONの変法によりアリザリンレッドS染色透明標本を作製し、骨格検査を行なつ

た。残りの生存胎仔は、Bouin液で固定し、頭部および腹部はWILSON²⁾の方法、胸部はBARROW³⁾の方法に従って内臓異常の有無について検索した。

6. データ処理

外表、内臓および骨格の異常の出現については、WILCOXON⁴⁾の順位和検定 ($p < 0.05$) を、その他の異常出現率は χ^2 検定 ($p < 0.05$) で検定し、実数値は平均値±標準偏差で示し、F検定、STUDENTのt検定によつて対照との有意差を検定した。

II. 実験結果

1. 親マウスの観察

1) 一般症状

実験期間中の雌雄マウスの一般症状は正常であつてAM-715の中毒を示す行動は全くみられず、また対照群を含め各群共死亡個体は1例も認められなかった。

2) 体重推移

各群の体重推移を示したのが Fig. 2 (雄) および Fig. 3 (雌) で雌雄の500 mg/kg 投与群の体重増加が幾分劣る傾向がみられたが有意でなかった。他には対照群との間に差は認められなかった。

3) 摂餌量および摂水量

摂餌量および摂水量の動向を示したのが、Fig. 4 (雄) および Fig. 5 (雌) で、投与期間中各群の摂取量は対照群との間に有意な差を認めなかった。

Fig. 2 Body weight changes of male mice treated orally with AM-715 before mating

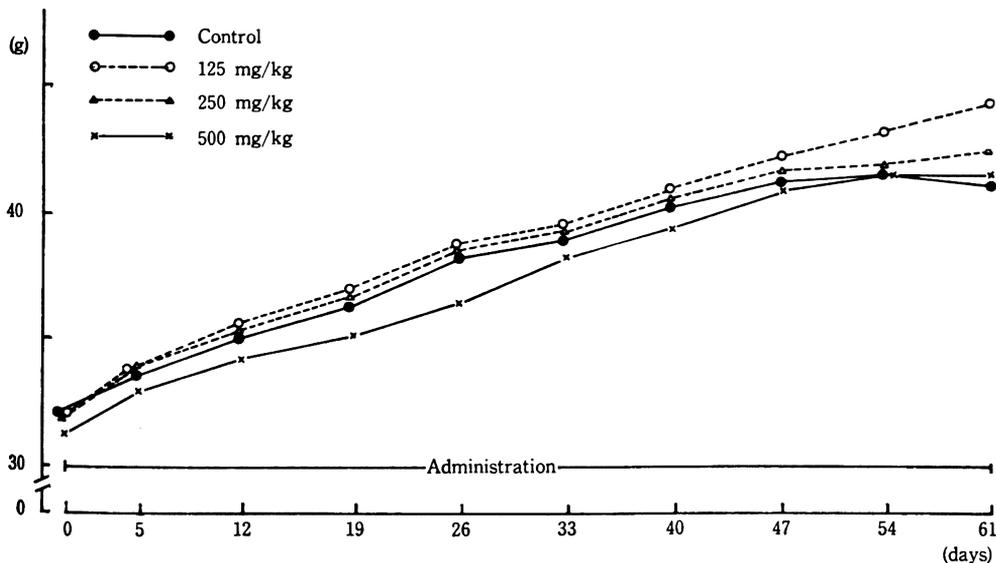
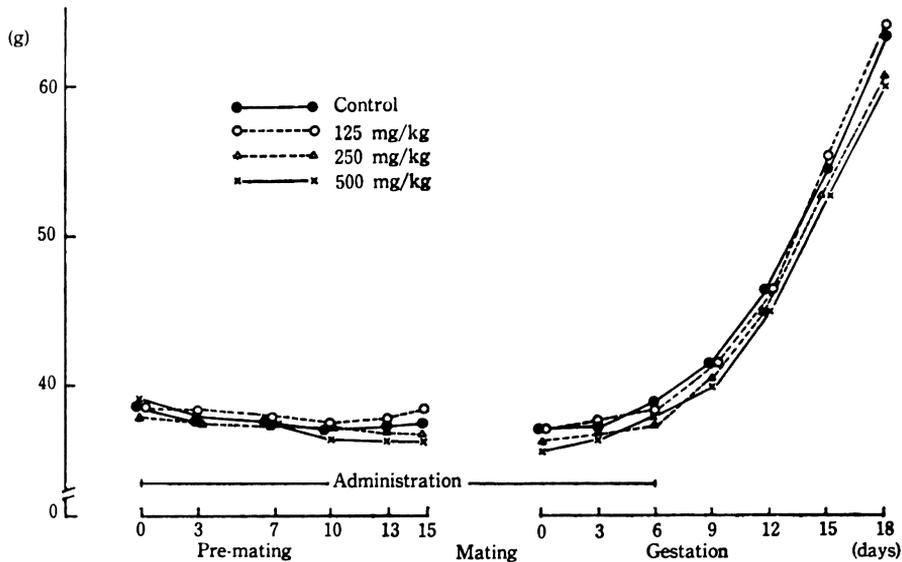


Fig. 3 Body weight changes of female mice treated orally with AM-715 before mating and after copulation



4) 交尾率および妊娠率

Table 1 に示すように、対照群との間に交配期間の延長もなく、交尾率は対照群を含め各群 100%であった。妊娠率においては、250 mg/kg 群で 1/20 例に不妊がみられたが、他の AM-715 投与群では、いずれも 100% の妊娠率が認められた。不妊を認めた雌と交配した雄の精子数およびその活性は正常で、生殖器官および重量にも異常は認められなかった。

2. 胎子の観察

1) 黄体数および着床数

Table 2 に示すように、黄体数および着床数ともに、対照群との間に有意な差は認められなかった。

2) 吸収胚数、死亡胎仔数および生存胎仔数

Table 2 に示すように、吸収胚数、死亡胎仔数および生存胎仔数いずれの検査結果においても、対照群との間に有意な差は認められなかった。

3) 生存胎仔重量

Table 2 に示すように、250 mg/kg 群の雌雄の胎仔重量に対照との間に有意な差が認められたが、その他の AM-715 投与群には有意な差は認められなかった。

4) 胎盤重量

Table 2 に示すように、500 mg/kg 群の雌胎仔の胎盤重量を除き、対照群との間に有意な差がみられたが、用量依存性の関係は認められなかった。

5) 外表観察

対照群および 500 mg/kg 群に口蓋裂が 2 例ずつ認められた。その他の群には外表異常は認められなかった。

6) 内臓観察

Table 3 に示すように、250 mg/kg 群に水腎症を持った胎仔が 1 例、500 mg/kg 群に水腎症と水頭症の合併症を持った胎仔が 1 例と水腎症を持った胎仔が 1 例認められた。

7) 骨格規察

骨格検査の結果は Table 4 に示した。骨格異常として、波状肋骨を持った胎仔が対照群および 125 mg/kg 群に各 1 例、500 mg/kg 群に 2 例認められた。また、肩甲骨の屈曲を持った胎仔が 500 mg/kg 群に 1 例認められた。骨格変異としては、胸骨核不相称を持った胎仔が 500 mg/kg 群に、第 5 胸骨核の化骨遅延を持った胎仔が 250 mg/kg 群に、対照群と比較し有意に多く認められ、また、仙・尾椎の化骨数が 500 mg/kg 群で有意に多かったが、いずれの場合にも、用量依存性の関係は認められなかった。

III. 考察および結語

AM-715 の 125, 250 および 500 mg/kg を ICR 系マウスの妊娠前および妊娠初期に経口投与し、生殖能力および胎仔への影響について検索を行なった。

AM-715 の 125, 250 および 500 mg/kg をそれぞれ雄に 61 日間、雌に 15 日間連続投与したが、500 mg/kg 群に

Fig. 4 Food and water consumption changes of male mice treated orally with AM-715 before mating

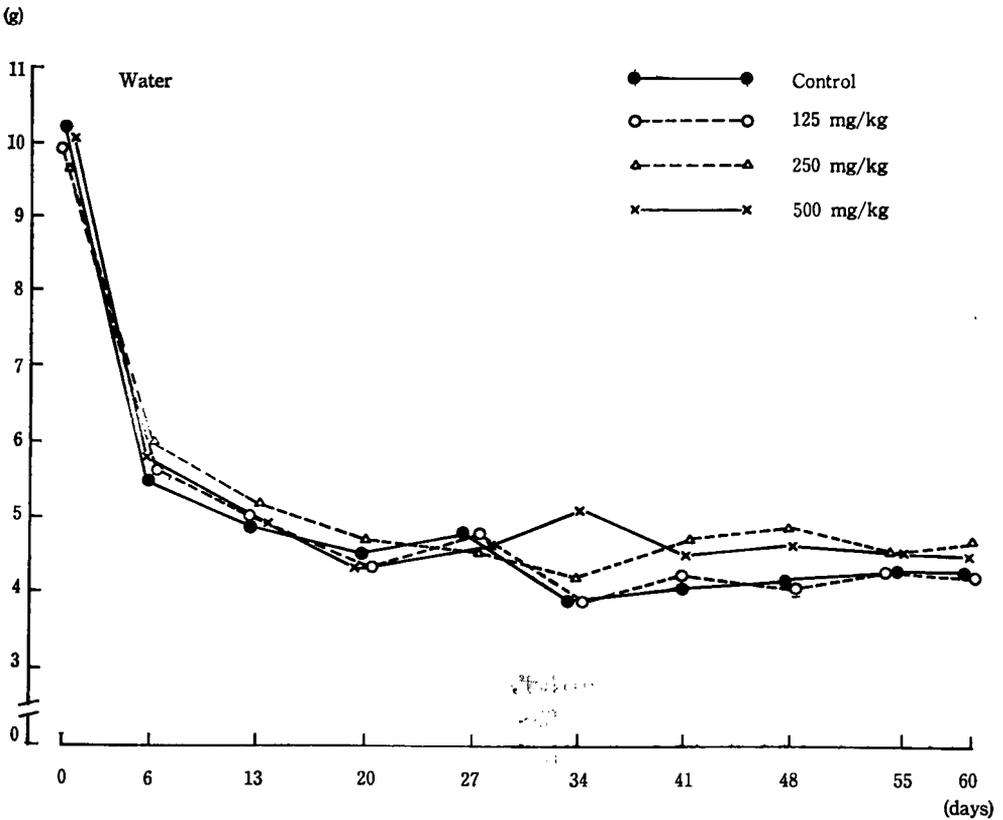
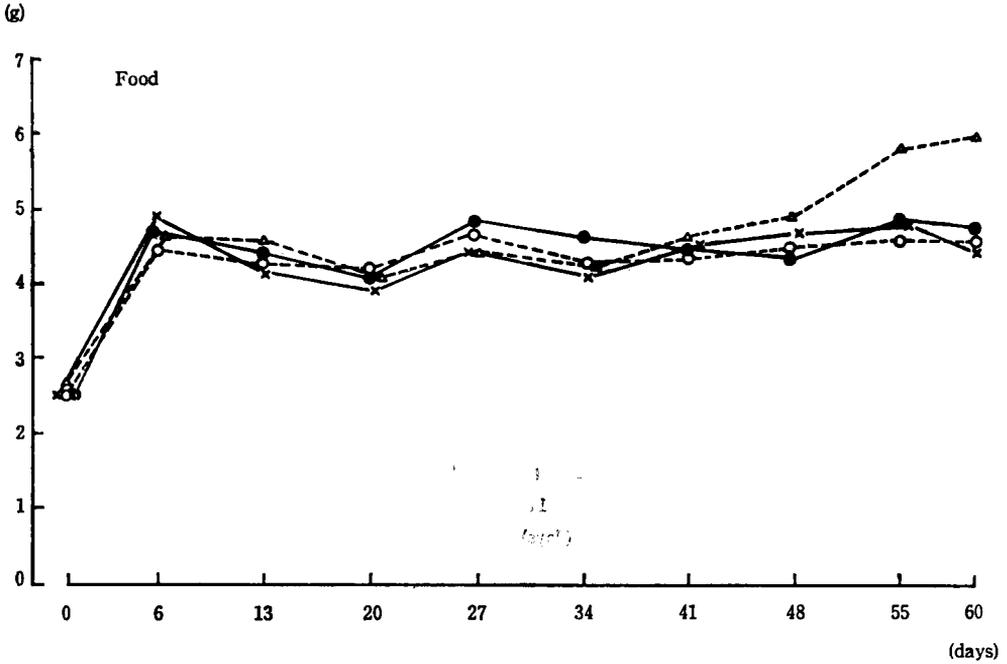
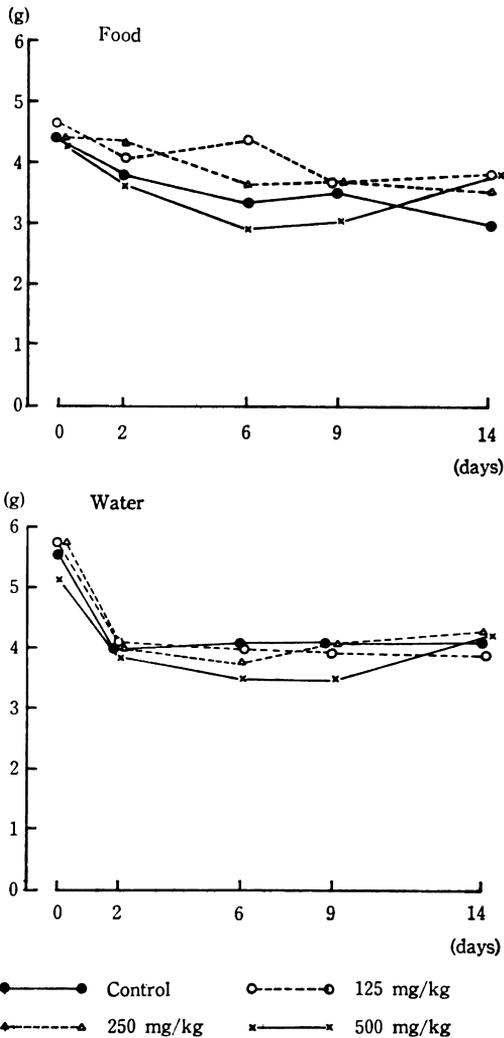


Fig. 5 Food and water consumption changes of female mice treated orally with AM-715 before mating



外表異常として、口蓋裂が対照群と同数(2例)500 mg/kg 群に認められ、内臓異常として、250および500 mg/kg に水腎症(各1例)、500 mg/kg 群に水頭症と水腎症の合併症(1例)が認められ、また骨格異常として対照群、125および500 mg/kg に波状肋骨(対照群、125 mg/kg、各1例、500 mg/kg; 2例)、500 mg/kg 群に肩甲骨の屈曲(1例)が認められたがいずれの発生頻度にも対照群との間に統計学的有意な差はなく、用量依存性の関係も認められず、亀山ら(1980)⁵⁾の報告による自然発生奇形の種類と頻度などより判断すると、今回認められた外表、内臓および骨格の各異常については、自然発生的に出現したものと考えられた。

以上のことから、マウスの妊娠前および妊娠初期にAM-715を投与した場合、AM-715には、生殖能力および胎子の発育、分化に対し、悪い影響をもたらすような作用のないことが推察された。

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) WILSON, J. G.: Method for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *In Teratology, Principles and Techniques.* J. G. WILSON & J. WARKANY, Eds., The University of Chicago Press, pp. 262~277, 1965
- 3) BARROW, M. V. & W. J. TAYLOR: A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morphol.* 127: 291~306, 1969
- 4) WILCOXON, F. & R. WILCOX (佐久間昭詔), 簡便統計法, 2種類の処理間の差の有意性, 5~7頁, 日本レダリー, 1969
- 5) 亀山義郎, 谷村 孝, 安田峯生: 実験動物における自然発生奇形. *先天異常* 20: 25~106, 1980

軽度な体重増加抑制の傾向が認められた他には、一般症状、摂餌量および摂水量への影響、致死作用も認められなかった。

交配期間、交尾率および妊娠率への影響は認められず、黄体数および着床数からみて、排卵、受精、着床過程への好ましからぬ影響は考えられず、また着床後の胎仔形成の結果から推定すると、胚の発育・分化に対し重大な障害をもたらすような作用を生じていないと考えられた。

Table 1 Effects of AM-715 on copulation and pregnancy in mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	20	20	20	20
No. of female	20	20	20	20
Mating period	3.1±1.7 ¹⁾	2.9±1.4	2.7±0.8	2.4±0.9
1	5	2	2	5
2	0	4	4	3
3	10	11	12	10
Days of copulation after mating	4	2	2	2
5	1	0	0	0
6	1	0	0	0
7	0	0	0	0
8	1	1	0	0
No. of copulation (%)	20 (100.0) ²⁾	20 (100.0)	20 (100.0)	20 (100.0)
No. of pregnancy (%)	20 (100.0) ³⁾	20 (100.0)	19 (95.0)	20 (100.0)

1): Mean ± SD

2): (No. of copulated mice/No. of mated mice) × 100

3): (No. of pregnant mice/No. of mated mice) × 100

Table 2 Effects of AM-715 on the mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of pregnant mouse	20	20	19	20
No. of corpus luteum	308 15.4±2.0 ¹⁾	304 15.2±1.8	285 15.0±2.5	285 14.2±2.0
No. of implantation	262 13.1±3.1	267 13.3±1.5	251 13.2±1.4	229 11.4±2.3
Implantation rate	85.0	87.8	88.0	80.3
No. of resorption (%)	22 (8.3)	20 (7.4)	20 (7.9)	25 (10.9)
No. of dead fetus (%)	17 (6.4)	5 (1.8)	17 (6.7)	7 (3.0)
No. of surviving fetus	223 11.1±2.9	242 12.1±2.0	214 11.2±1.4	197 9.8±2.7
No. of male	121	129	115	83
No. of female	102	113	99	114
Sex ratio (M/F)	1.18	1.14	1.16	0.72
Fetal body weight (g)				
Male	1.33±0.11	1.32±0.12	1.30±0.10*	1.34±0.18
Female	1.28±0.08	1.28±0.10	1.25±0.12*	1.29±0.13
Placental weight (mg)				
Male	103.3±20.2	94.3±18.1*	90.2±15.6*	90.1±20.9*
Female	92.3±14.9	87.0±12.8*	81.8±16.9*	88.0±18.4
No. of gross malformation (%)	2 (0.8)	0	0	2 (1.0)
Type				
Cleft palate	2	0	0	2

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 4 Effects of AM-715 on the skeleton of mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of fetus	165	174	155	141
Cervical vertebra				
Atlas				
Bifurcation	0	1(0.5)	1(0.6)	0
Forking	0	0	0	2(1.4)
Axis				
Bifurcation	2(1.2)	10(5.7)	6(3.8)	7(4.9)
Forking	7(4.2)	5(2.8)	15(9.6)	8(5.6)
Cervical rib	23(13.9)	21(12.0)	8(5.1)	11(7.8)
Sternebra				
Asymmetry	3(1.8)	4(2.2)	2(1.2)	10(7.0)*
Bifurcation				
Position V	2(1.2)	0	2(1.2)	2(1.4)
Position VI	0	2(1.1)	0	0
Retarded ossification				
Position I-VI	0	0	1(0.6)	0
Position V	0	0	10(6.4)*	3(2.1)
Position VI	4(2.4)	3(1.7)	2(1.2)	3(2.1)
Super-sternebra	2(1.2)	7(4.0)	2(1.2)	1(0.7)
Rib				
Wavy	1(0.6)	1(0.5)	0	2(1.4)
14 rib	30(18.1)	17(9.7)	14(9.0)	16(11.3)
Lumbar vertebra				
Lumbar rib	27(16.3)	20(11.4)	16(10.3)	20(14.1)
Scapula				
Flexure	0	0	0	1(0.7)
Sacral and caudal vertebra				
No. of ossification	11.3±1.6 ¹⁾	11.0±1.6	11.4±1.9	11.7±2.0*

Each value of parenthesis was expressed as percentage.

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control ($p < 0.05$)

Table 3 Effects of AM-715 on the viscera of mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of fetus	58	68	59	56
No. of fetus with abnormality	0	0	1(1.6) ^{a)}	2(3.5) ^{a),b)}

Each value of parenthesis was expressed as percentage

a): Hydronephrosis

b): Complication with hydronephrosis and hydrocephalia

REPRODUCTION STUDIES OF AM-715 IN MICE

I. FERTILITY STUDY

TSUTOMU IRIKURA, HIROSHI SUZUKI and TSUTOMU SUGIMOTO

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Fertility study of AM-715, a new synthetic antibacterial agent, was carried out in mice.

AM-715, suspended in distilled water, was orally administered at daily doses of 125, 250 and 500 mg/kg before mating (61 days) and through the mating period (8 days) in male mice; before mating (15 days), through the mating period and till the day 6 of pregnancy in female mice. Each female mouse was mated with male one of the same dose group, and all the female mice were sacrificed on the day 18 of pregnancy.

No effects of AM-715 on general symptoms, body weight and food consumption were found in both sexes of all the dose levels. No effects of AM-715 on corpus luteum, implantation and fetus were observed in all the dose groups. Some of external, visceral and skeletal abnormalities were observed in the control group and the dose groups, but neither statistical difference as compared with the control group nor dose-dependent relationship was found in these findings.

It is concluded from the present study that AM-715 has no untoward effects on the reproductive performance and fetuses in mice.