

## BRL14151K および BRL25000 の生殖試験 (第2報)

ラットにおける周産期および授乳期投与試験

JOHN A. BALDWIN

Beecham Pharmaceuticals Research Division

JAMES L. SHARDEIN

International Research and Development Corporation

幸 嶋 祥 亘

ビーチャム薬品株式会社

新規抗生剤である BRL25000 と、その成分である  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としての BRL14151K の周産期および授乳期投与試験を、COBS:SD 系ラットを用いて行なった。投与量は、BRL14151K では、10, 50 および 400mg/kg, BRL25000 では、30, 150 および 1,200mg/kg とし、妊娠 15 日より親ラット ( $F_0$ ) に経口投与した。投与は  $F_0$  の分娩を経て、次世代 ( $F_1$ ) が離乳 (生後 21 日) するまで継続した。母獣はすべて自然分娩させ、一般症状、体重および分娩状態を観察し、同腹仔数、生産仔数、外表異常、新生仔の発育および離乳時までの生存率を検討した。さらに諸機能、神経薬理学的観察、反射および生殖能を  $F_1$  世代で検討し、 $F_2$  胎仔についての異常の有無を観察した。

BRL14151K の 400mg/kg 投与群および BRL25000 の 1,200mg/kg 投与群で、母獣の体重増加抑制および摂餌量減少が認められたが、妊娠期間、分娩に異常はみられなかった。

BRL14151K の 400mg/kg 投与群で、雌雄の新生仔に体重増加抑制が認められた。BRL25000 の 1,200mg/kg 投与群の雄でも同様の傾向がみられたが、BRL14151K に比べて極く軽度であった。

両検体投与群とも、離乳後の新生仔 ( $F_1$ ) の行動および生殖能に異常はみられず、 $F_2$  世代にも検体によると思われる異常は認められなかった。

したがって本試験における最大無作用量は、BRL14151K については 50mg/kg, BRL25000 については 1,200mg/kg と考えられる。

BRL25000 は、Amoxicillin (AMPC) および Potassium clavulanate (BRL14151K) を 2:1 に配合した経口抗生物質であり、広範囲な抗菌スペクトルを有する。BRL14151K が種々の  $\beta$ -lactamase を阻害するため、 $\beta$ -lactamase 産生により AMPC に対して耐性を獲得した細菌に対しても抗菌力を示し、また合剤にすることにより従来 AMPC 耐性であった細菌に対しても AMPC の抗菌スペクトルを広げている<sup>1-4)</sup>。

今回、BRL14151K および BRL25000 のラットにおける周産期および授乳期投与試験を行なったので、その成績を報告する。なお、両検体の試験は別々に行なったが、ここでは一括して報告する。

## I. 実験方法

## 1. 実験動物

性成熟雌ラット (COBS®:SD) 各 120 匹を Charles River Breeding Laboratories 社 (Portage, Michigan,

USA) より入手し、使用した。これらの動物は馴化後、約 14 週齢で交配に用いた。交配は Charles River 社より入手した雄性ラットと 1:1 で行ない、腔栓または腔脂膏中に精子が確認された日を妊娠 0 日とした。交尾を確認した動物を各群 20 匹となるように対照群および 3 投与群に分けた。

動物は、いずれも交配期間を除き妊娠 18 日までは金網ケージに、妊娠 18 日からはトウモロコシの穂を砕いた床敷を入れたプラスチックケージに個別に収容した。動物は温度 (21.1°C~23.3°C)、湿度 (27%~68%) および照明 (12 時間明/12 時間暗) を調節した動物室で飼育し、飼料 (Purina® Rodent Laboratory Chow®) と飲料用水を自由に摂取させた。

## 2. 投与方法

投与量は、BRL14151K は遊離酸として 10, 50 および 400mg/kg, BRL25000 は遊離酸として 30, 150 お

よび 1,200 mg/kg とし、各対照群には蒸留水を投与した。投与量は各群とも 5 ml/kg とし、妊娠 15, 18 および 20 日、授乳 0, 4, 8, 12 および 21 日に測定した体重をもとに妊娠 15 日から分娩 21 日まで強制経口投与した。

投与量は、両検体の器官形成期投与試験<sup>5)</sup>の投与量に準じて設定した。

### 3. 母獣 (F<sub>0</sub>) の観察

すべての母獣 (F<sub>0</sub>) について、死亡の有無および一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は妊娠 0, 7, 15, 18 および 20 日に測定した。分娩予定時期には、出産を確認するため F<sub>0</sub> 母獣を 1 日 2 回観察し、異常がみられた場合はすべて記録した。同腹仔のすべてが生まれた日を授乳 0 日とした。

授乳 21 日に母獣を屠殺し剖検を行なった。また、試験中に死亡した母獣および交配後 25 日になっても分娩の認められなかった母獣についても剖検した。

### 4. F<sub>1</sub> 新生仔の観察

分娩時に、出産仔の数、生死、性別および外表異常の有無を観察した。

新生仔の体重測定は、授乳 0, 4, 8, 12 および 21 日に行ない、一般症状は毎日観察した。

新生仔の死亡例はすべて記録し、授乳期間中に死亡した新生仔については、内臓および骨格の異常を検査した。

授乳初期に発育分化 (耳介開展, 眼瞼開裂), 初期行動発達 (静的正向反射, 断崖回避, 空中落下正向反射<sup>6)</sup>) を全動物について検査した。

また授乳 21 日に、Irwin の方法<sup>7)</sup>により運動失調, 正向反射, 麻痺, 振戦, 筋線維束攣縮, 痙攣, 耳および口腔粘膜の異常着色, 流涎, 拳尾, 尾の鞭打ち運動, 立毛, 下痢, 後足立, 体姿勢, 旋回運動, 脱水, その他の行動異常を最低 1 分間観察し、その有無を記録した。

離乳時 (授乳 21 日) に、各群より雌雄各 20 匹ずつを選び、性成熟に達するまで飼育した。この際、1 母獣からは雌雄各 1 匹を無作為に選んだ。残りの新生仔は屠殺して剖検を行なった。

### 5. 離乳後の F<sub>1</sub> 新生仔の観察

離乳後の F<sub>1</sub> 新生仔については、一般症状および死亡の有無について毎日観察し、体重について 1 週間ごとに測定した。

生後 33~35 日に以下の項目について検査した。

#### 1) 自発運動量の測定 (光電管法)

各新生仔を photocell-sensitive activity cage (PAC-001: BRS/LVE) に入れ、2 分間の運動量を記録した。

#### 2) 回転棒試験

各新生仔を、5rpm の速度で回転している棒上に、回転と逆向きに乗せた。動物が 60 秒間落ちないで回転棒の上にとどまっていれば成功とみなし、試験を終了した。この試験は各新生仔につき 3 回まで行なった。

#### 3) 聴覚機能試験 (Preyer 反射<sup>8)</sup>)

周波数が約 10~13 キロサイクル/秒となるように Galton 笛をセットし、Preyer 反射の有無を観察した。

#### 4) 視覚機能試験

35 日齢に、各ラットについて、視覚試験を行なった。使用した装置は、円筒状の金属製容器 (直径 28 cm × 高さ 33 cm) の中に小さな容器 (10 cm × 11 cm) を入れたものである。直径約 1 cm の穴を 2 つ、外部容器の底から約 4 cm の箇所に、互いに 90° の角度になるようにあけた。内部容器に接続したひもが外部容器の上部にある 1 つの穴から出ており、動物を中に放すようになっている。仔ラットを内部容器の中に入れて、接続しているひもで内部容器を持ち上げ、中に放した。このときに、ストップウォッチをスタートさせ、動物の鼻が外部容器のどちらかの穴に現われたときに止めた。反応が 60 秒以内に起きた場合に時間を記録し、60 秒以内に反応が起らなかった場合は、視覚性置き直し反応により再検査した。これは、平らな表面の端から約 30 cm の所に、角度が 45° になるようにラットを尾のつけ根で持ち、角度を保ってラットを端に近づけ、両方の前肢を表面に置くかどうかを観察するものである。

### 6. F<sub>1</sub> の生殖能力試験

F<sub>1</sub> ラットが 80 日齢に達した時点で生殖能力の検査を行なった。交配は、雌ラットを同投与群の雄ラットと 1:1 で兄妹交配を避けて同居させた。交尾の認められなかった雌については同投与群の別の雄と、さらに 10 日間同居させた。交配が確認されなかった雌ラットは、交配期間最終日より 20 日後に、すべて屠殺し、子宮および卵巣を検査した。

妊娠 20 日に、雌ラットを二酸化炭素で窒息させた後、帝王切開を行ない、以下の胎仔検査を行なった。

各胎仔は個別に体重を測定し、外部奇形および変異を検査した。外見から性を判別し、個別に番号を付し、耳標識をつけた。約 1/3 の胎仔を Bouin 液に固定し、カミソリによる切片標本<sup>9)</sup>をつくり内臓検査に供した。残りの 2/3 の胎仔については、透明骨格標本<sup>10)</sup>を作製する第一段階として、アルコール固定した。胎仔は固定液中に保存し、それ以上の検査は行なわなかった。

### 7. 統計分析

統計分析は、投与群と対照群とを比較し、 $P < 0.05$  で有意性を検定した。胎仔および新生仔の性比、奇形仔数、妊娠率、発育分化および行動試験 (Activity cage

testを除く)の観察結果については、2×2 分割表を用いて、YATESの補正による $\chi^2$ -test、またはFISHER testを行なった<sup>11)</sup>。早期吸収胚数、着床後の吸収胚数および新生仔の生存率の比較については、MANN-WHITNEYのU-test<sup>11,12)</sup>で検定した。平均生存胎仔数、総着床数、黄体数、生存新生仔数、新生仔体重の比較およびActivity cage testについては、DUNNETTの多因数比較表<sup>13)</sup>を用いて、分散分析および等分散と不等分散の場合に分けて、それぞれ適当なt-testを採用して有意差検定を行なった<sup>14)</sup>。

II. 成績

1. BRL14151K 投与試験

1) 母獣(F<sub>0</sub>)の観察

今回の検体投与に対する母獣(F<sub>0</sub>)の認容性は、比較的良好であったが、死因不明の死亡例が400 mg/kg 投与群で1例(妊娠23日)認められた。

一般症状として、投与群の動物の鼻周囲に赤色付着物が散発的に認められ、400mg/kg 投与群で脱毛(主に四肢)

肢)が認められた。

妊娠および授乳期間中の体重の推移をFig.1、妊娠期間中の摂餌量をTable1に示した。

50mg/kg 投与群で投与開始から3日までに摂餌量減少に伴う軽度の体重増加抑制が、また400 mg/kg 投与群で投与開始から5日までに摂餌量減少に伴う中等度の体重増加抑制が、それぞれ認められた。摂餌量については、50 および 400mg/kg 投与群の妊娠15日から17日までの測定値および400mg/kg 投与群の妊娠18日から19日までの測定値に、それぞれ有意な減少が認められた。

母獣の妊娠期間、分娩に異常は認められなかった。

不妊動物が対照群で2例、10 mg/kg 投与群で4例、50 mg/kg 投与群で1例、400 mg/kg 投与群で2例認められた。これらの動物の剖検を行なった結果、子宮水腫が対照群で1例、10 mg/kg 投与群で2例みられ、またこの2例のうち1例に肺の充血、胸腺の癌腫が認められた。他の6例の動物には異常は認められなかった。

2) 授乳期におけるF<sub>1</sub>新生仔の観察

Fig.1 Group mean maternal body weight during gestation and lactation of rat dams administered BRL14151K orally in the peri-natal period.

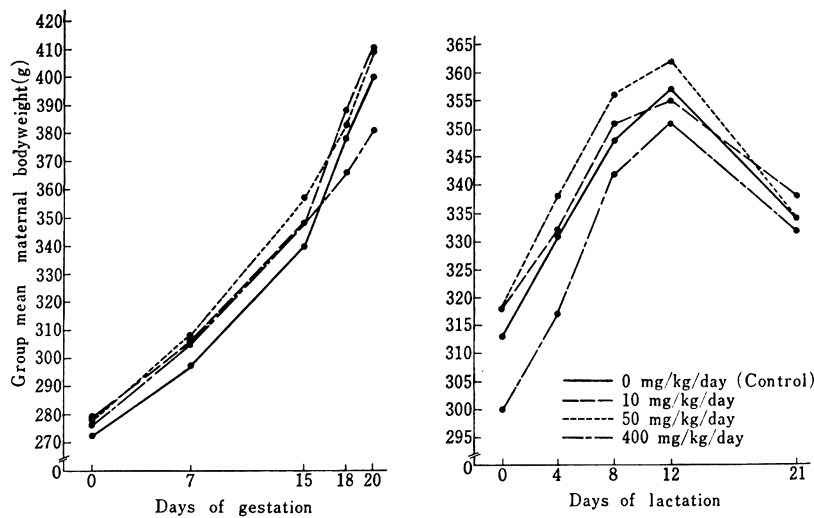


Table 1 Group mean food consumption during gestation in Fo rats given BRL14151K orally in late pregnancy and throughout lactation

| Period of gestation<br>(Days) | Dose (mg/kg/day) |           |             |             |
|-------------------------------|------------------|-----------|-------------|-------------|
|                               | 0                | 10        | 50          | 400         |
| 0 ~ 6                         | 20.7±2.17        | 20.7±2.69 | 22.1* ±2.05 | 21.6 ±3.19  |
| 7 ~ 14                        | 24.9±2.29        | 24.7±2.55 | 27.1**±2.20 | 25.8 ±2.89  |
| 15 ~ 17                       | 28.5±3.01        | 28.7±2.43 | 25.5**±3.59 | 16.8**±4.69 |
| 18 ~ 19                       | 23.3±2.17        | 21.8±4.73 | 23.6 ±4.17  | 15.2**±6.38 |

\* Significant difference from control at P<0.05

\*\* Significant difference from control at P<0.01

(g/rat/day±S.D.)

分娩および哺育に関するデータを Table 2 に示した。  
生存新生仔数および新生仔の生存率に検体によると思  
われる影響は認められなかった。

新生仔体重は、10 mg/kg 投与群で軽度の体重増加抑  
制が認められたが、50 mg/kg 投与群では対照群と同等  
の推移を示した。また 400 mg/kg 投与群で、授乳 0 日  
の雌雄の体重に、対照群と比較して有意差が認められ  
た。

離乳前に死亡した新生仔の剖検および骨格検査を行な  
った。その結果、骨格の変異が数例に認められたが、変  
異の出現率に用量相関性はみられなかった。

分娩後の発育および行動試験の成績を Table 3 に示し  
た。

生後 15 日の眼瞼開裂において、10 および 50mg/kg  
投与群で有意差がみられたが、両群とも生後 17 日まで  
に 100% に達した。耳介開展、静的正向反射、断崖回  
避、空中落下正向反射に異常は認められなかった。また  
神経薬理学的観察でも異常は認められなかった。

離乳時に、すべての母獣 (F<sub>0</sub>) と淘汰した新生仔 (F<sub>1</sub>)  
の剖検を行なった。その結果、偶発的な所見がみられた  
が、検体によると思われる異常は認められなかった。

3) 離乳後の F<sub>1</sub> 新生仔の観察

交配用に選んだ F<sub>1</sub> 新生仔の一般症状に異常はみられ  
ず、対照群および 10mg/kg 投与群の各 1 例を除いて、  
生存率は 100% であった。この 2 例の F<sub>1</sub> 新生仔の死因  
は、剖検では究明できなかった。

離乳後の新生仔の体重において、400mg/kg 投与群で  
増加抑制がみられ、13 週齢の雌雄の測定値に有意な減  
少が認められた。10 および 50mg/kg 投与群では、対  
照群と同等の推移を示した (Table 2)。

運動量、平衡感覚、視・聴覚機能の試験では、全投与  
群に異常は認められなかった (Table 3)。

4) F<sub>1</sub> 世代の生殖能

妊娠率について検討したが、投与群と対照群との間に  
差は認められなかった。また妊娠成立日の誤認により帝  
王切開日前に分娩してしまった動物が数例認められた。

Table 2 Post-natal growth and survival in F<sub>1</sub> rat newborns from dams administered BRL 14151K orally in late pregnancy and throughout lactation

| Dose (mg/kg/day)                              | Mean ± S.D. |             |             |               |
|-----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
|                                               | 0           | 10          | 50          | 400           |
| No. of dams delivering                        | 18          | 16          | 19          | 18            |
| Gestation period (Days)                       | 22.0 ± 0.34 | 21.8 ± 0.54 | 22.1 ± 0.46 | 22.2 ± 0.56   |
| No. of live newborns                          | 241         | 233         | 251         | 236           |
| No. of live newborns per litter               | 13.4 ± 2.70 | 14.6 ± 1.82 | 13.2 ± 4.32 | 13.9 ± 1.65   |
| Sex ratio of newborns (Male:Female %)         | 46 : 54     | 56 : 44     | 51 : 49     | 53 : 47       |
| Birth rate % (1)                              | 98.8        | 98.7        | 97.3        | 97.9          |
| Suckling rate % (2)                           | 97.9        | 97.9        | 98.8        | 98.3          |
| Weanling rate % (3)                           | 99.6        | 99.6        | 99.6        | 100.0         |
| Overall survival rate % (4)                   | 97.1        | 96.1        | 98.4        | 97.0          |
| Mean body weight of F <sub>1</sub> pups (g) : |             |             |             |               |
| Day 0 (Male)                                  | 6.7 ± 0.50  | 6.3* ± 0.52 | 6.7 ± 0.76  | 6.1* ± 0.76   |
| Day 0 (Female)                                | 6.3 ± 0.51  | 6.0 ± 0.50  | 6.3 ± 0.64  | 5.8* ± 0.70   |
| 3 weeks (Male)                                | 48.4 ± 6.42 | 45.6 ± 4.73 | 48.9 ± 8.83 | 44.3 ± 5.69   |
| 3 weeks (Female)                              | 45.7 ± 5.80 | 43.8 ± 5.82 | 46.0 ± 8.05 | 42.2 ± 5.54   |
| 13 weeks (Male)                               | 500 ± 44.1  | 494 ± 39.8  | 497 ± 59.2  | 439*** ± 43.6 |
| 13 weeks (Female)                             | 292 ± 26.4  | 279 ± 23.0  | 290 ± 37.1  | 262*** ± 38.3 |

\* Significant difference from control at P<0.05

\*\* Significant difference from control at P<0.01

\*\*\* Significant difference from control at P<0.001

1) Birth rate :  $\frac{\text{No. of live pups}}{\text{Total No. pups born}} \times 100$

2) Suckling rate :  $\frac{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 4th day}}{\text{No. of live pups at birth}} \times 100$

3) Weanling rate :  $\frac{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 21st day}}{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 12th day}} \times 100$

4) Overall survival rate :  $\frac{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 21st day}}{\text{No. of live pups at birth}} \times 100$

Table 3 Post-natal development and behaviour in  $F_1$  rats derived from dams administered BRL14151K orally in late pregnancy and throughout lactation

| Dose (mg/kg/day)                             | 0     | 10      | 50      | 400   |
|----------------------------------------------|-------|---------|---------|-------|
| Pinna detachment (3 days) <sup>a</sup>       | 94.1  | 90.4    | 99.2**  | 97.0  |
| Static righting reflex (4 days) <sup>a</sup> | 98.3  | 99.6    | 100.0   | 99.6  |
| Cliff aversion (14 days) <sup>a</sup>        | 99.6  | 99.1    | 94.8    | 97.4  |
| Eyelid opening (15 days) <sup>a</sup>        | 91.8  | 79.9*** | 66.7*** | 86.4  |
| Air righting reflex (17 days) <sup>a</sup>   | 100.0 | 97.8    | 100.0   | 98.2  |
| Activity cage test (34 days) <sup>b</sup>    |       |         |         |       |
| Males                                        | 157   | 151     | 158     | 157   |
| Females                                      | 157   | 169     | 172     | 164   |
| Rotorod performance (34 days) <sup>a</sup>   |       |         |         |       |
| Males                                        | 75.0  | 85.0    | 55.0    | 60.0  |
| Females                                      | 95.0  | 75.0    | 75.0    | 65.0  |
| Auditory performance (35 days) <sup>a</sup>  |       |         |         |       |
| Males                                        | 100.0 | 100.0   | 100.0   | 100.0 |
| Females                                      | 95.0  | 95.0    | 100.0   | 100.0 |
| Visual discrimination (35 days) <sup>a</sup> |       |         |         |       |
| Males                                        | 100.0 | 100.0   | 100.0   | 100.0 |
| Females                                      | 100.0 | 100.0   | 100.0   | 100.0 |

\* Significant difference from control at  $P < 0.05$ \*\* Significant difference from control at  $P < 0.01$ \*\*\* Significant difference from control at  $P < 0.001$ <sup>a</sup>=Percentage of pups acquiring a positive response or meeting successful test criteria.<sup>b</sup>=Values expressed as mean number of counts.Table 4 Caesarean section data of  $F_1$  rat dams derived from  $F_0$  dams given BRL 14151K

| Dose received by $F_0$ dams<br>(mg/kg/day) | Mean $\pm$ S.D. |                 |                 |                 |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                            | 0               | 10              | 50              | 400             |
| No. of females mated                       | 20              | 20              | 20              | 20              |
| No. of females pregnant                    | 16              | 16              | 17              | 20              |
| No. of females died                        | 1               | 1 <sup>a</sup>  | 0               | 0               |
| No. of females delivered                   | 1               | 5               | 4               | 2               |
| No. examined at caesarean section          | 14              | 11              | 13              | 18              |
| No. of corpora lutea                       | 15.9 $\pm$ 1.64 | 15.7 $\pm$ 1.58 | 17.1 $\pm$ 2.73 | 15.8 $\pm$ 3.29 |
| No. of implants                            | 14.3 $\pm$ 3.90 | 14.9 $\pm$ 1.92 | 15.1 $\pm$ 3.67 | 13.9 $\pm$ 2.64 |
| No. of resorptions                         | 0.7             | 0.4             | 1.4             | 1.0             |
| No. of dead fetuses                        | 0.0             | 0.0             | 0.0             | 0.0             |
| No. of live fetuses                        | 13.7 $\pm$ 4.15 | 14.5 $\pm$ 2.03 | 13.6 $\pm$ 3.69 | 12.9 $\pm$ 3.48 |
| Sex ratio (Male : Female %)                | 53 : 47         | 50 : 50         | 49 : 51         | 47 : 53         |
| Mean bodyweight (g)                        | 3.5 $\pm$ 0.70  | 3.6 $\pm$ 0.77  | 3.4 $\pm$ 0.20  | 3.6 $\pm$ 0.77  |

<sup>a</sup>=Not pregnant

帝王切開時のデータを Table 4 に示した。どの投与群にも黄体数、着床数、胎仔体重、性比に異常は認められず、死亡胎仔もみられなかった。

50 および 400 mg/kg 投与群で、吸収胚数の軽度増加および生存胎仔数の減少が認められた。しかし、この吸

収胚数の軽度増加には、用量相関性および統計学的有意差は認められず、またバックグラウンドデータ (0.4~1.6) 範囲内の変動であるということから、検体による変化とは考えられない。

外表観察では、50 mg/kg 投与群の 1 例 (短尾) を除

いて異常は認められなかった。

親動物 (F<sub>1</sub>) の剖検所見には、異常は認められなかった。

2. BRL25000 投与試験

1) 母獣 (F<sub>0</sub>) の観察

試験期間を通して各群とも死亡例はなかった。一般症状の観察でも、すべての投与群で異常は認められなかった。

妊娠および授乳期間中の体重の推移を Fig. 2, 妊娠期間中の摂餌量を Table 5 に示した。

1, 200 mg/kg 投与群で、妊娠後期および授乳初期に軽度の体重増加抑制が認められた。また摂餌量減少が授乳期間の初期に用量相関的にみられ、妊娠 15 日から 17 日の測定値に、すべての投与群で有意差が認められた。

母獣の妊娠期間および分娩に異常は認められなかった。

不妊動物が対照群で 1 例、30 mg/kg 投与群で 2 例、1, 200 mg/kg 投与群で 1 例認められた。これらの動物の

剖検を行なった結果、30 mg/kg 投与群で子宮水腫、腎臓の斑点が 1 例ずつ認められた。他の 2 例の動物には異常は認められなかった。

2) 授乳期における F<sub>1</sub> 新生仔の観察

分娩および哺育に関するデータを Table 6 に示した。

1, 200 mg/kg 投与群で、分娩時の 1 母獣当りの生存新生仔数に有意な減少が認められた。150 および 1, 200 mg/kg 投与群で新生仔の授乳 0 日の生存率に軽度の減少がみられ、この傾向は授乳期間を通して認められた。また、離乳時における生存率は、対照群、30 mg/kg 投与群、150 mg/kg 投与群、1, 200 mg/kg 投与群で、それぞれ 96.3%, 97.2%, 76.8%, 88.1% であった。

新生仔の軽度の体重増加抑制が、150 および 1, 200 mg/kg 投与群でみられた。

分娩後の発育および行動観察の成績を Table 7 に示した。

生後 3 日の耳介の開展率において、150 mg/kg 投与群で有意差がみられたが、生後 5 日までに 100% に達し

Fig. 2 Group mean maternal body weight during gestation and lactation of rats administered BRL25000 orally in the peri-natal period.

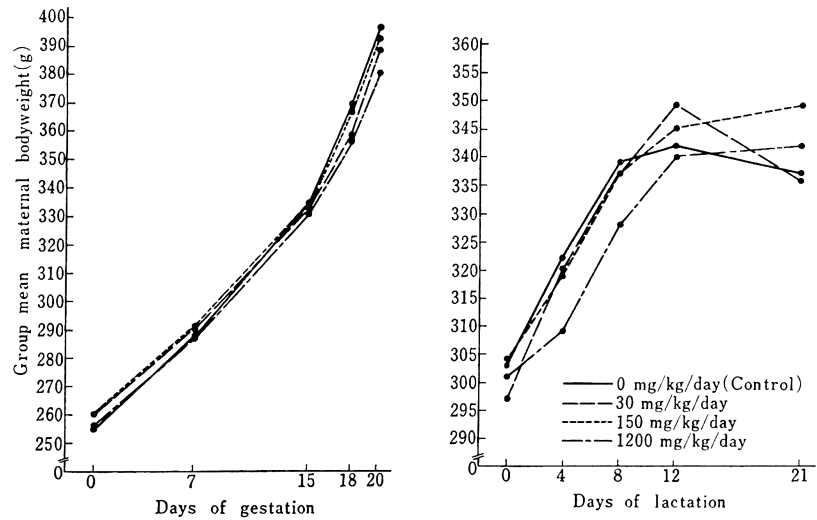


Table 5 Group mean food consumption during gestation in F<sub>0</sub> rats given BRL25000 orally in late pregnancy and throughout lactation

| Period of gestation<br>(Days) | Dose (mg/kg/day) |               |               |               |
|-------------------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
|                               | 0                | 30            | 150           | 1200          |
| 0 ~ 6                         | 21.5 ± 2.77      | 21.5 ± 1.54   | 21.3 ± 1.94   | 21.0 ± 1.45   |
| 7 ~ 14                        | 26.3 ± 2.18      | 24.3** ± 1.68 | 25.4 ± 1.59   | 25.7 ± 2.78   |
| 15 ~ 17                       | 31.9 ± 5.68      | 21.4** ± 2.52 | 21.3** ± 3.44 | 17.3** ± 2.57 |
| 18 ~ 19                       | 21.9 ± 8.13      | 22.9 ± 5.75   | 22.8 ± 4.07   | 19.4 ± 4.78   |

\* Significant difference from control at P<0.05

(g/rat/day ± S.D.)

\*\* Significant difference from control at P<0.01

Table 6 Post-natal growth and survival in F<sub>1</sub> rat newborns from dams administered BRL25000 orally in late pregnancy and throughout lactation

| Dose (mg/kg/day)                             | Mean±S.D. |           |           |            |
|----------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                                              | 0         | 30        | 150       | 1200       |
| No. of dams delivering                       | 19        | 18        | 20        | 19         |
| Gestation period (Days)                      | 22.0±0.58 | 22.0±0.49 | 21.9±0.59 | 22.0±0.58  |
| No. of live newborns                         | 267       | 251       | 285       | 235        |
| No. of live newborns per litter              | 14.1±1.34 | 13.9±2.34 | 14.3±2.38 | 12.4*±2.85 |
| Sex ratio of newborns (Male:Female %)        | 45 : 55   | 51 : 49   | 49 : 51   | 54 : 46    |
| Birth rate % (1)                             | 98.2      | 98.0      | 96.0      | 96.3       |
| Suckling rate % (2)                          | 98.5      | 98.0      | 89.8      | 91.9       |
| Weanling rate % (3)                          | 99.2      | 100.0     | 94.0*     | 100.0      |
| Overall survival rate % (4)                  | 96.3      | 97.2      | 76.8**    | 88.1       |
| Mean bodyweight of F <sub>1</sub> pups (g) : |           |           |           |            |
| Day 0 (Male)                                 | 6.4±0.67  | 6.5±0.56  | 6.2±0.62  | 6.3±0.87   |
| Day 0 (Female)                               | 6.1±0.54  | 6.1±0.45  | 5.9±0.68  | 6.0±0.82   |
| 3 weeks (Male)                               | 45.6±5.49 | 46.5±4.93 | 44.9±5.12 | 43.2±5.35  |
| 3 weeks (Female)                             | 42.3±5.19 | 43.3±4.71 | 43.2±5.19 | 41.4±5.97  |
| 13 weeks (Male)                              | 464±36.1  | 470±39.9  | 463±30.2  | 438*±37.4  |
| 13 weeks (Female)                            | 262±20.7  | 270±35.6  | 263±23.4  | 256±31.6   |

\* Significant difference from control at P&lt;0.05

\*\* Significant difference from control at P&lt;0.01

- 1) Birth rate :  $\frac{\text{No. of live pups}}{\text{Total No. pups born}} \times 100$   
 2) Suckling rate :  $\frac{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 4th day}}{\text{No. of live pups at birth}} \times 100$   
 3) Weanling rate :  $\frac{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 21st day}}{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 12th day}} \times 100$   
 4) Survival rate :  $\frac{\text{No. of F}_1 \text{ pups at 21st day}}{\text{No. of live pups at birth}} \times 100$

た。静的正向反射、断崖回避、眼瞼開裂、空中落下正向反射に異常は認められなかった。また神経薬理学的観察でも異常は認められなかった。

離乳時に母獣 (F<sub>0</sub>) と淘汰した新生仔 (F<sub>1</sub>) について剖検を行なった。その結果、検体によると思われる異常は認められなかった。

### 3) 離乳後の新生仔の観察

交配用に残った新生仔において、150mg/kg 投与群で死亡例が1例 (呼吸不全) みられた。その他の群では生存率は100%であった。一般症状の観察でも、すべての投与群で異常は認められなかった。

新生仔の体重増加は30および150mg/kg 投与群では、対照群と同等の推移を示したが、1,200mg/kg 投与群で、軽度の体重増加抑制が認められた (Table 6)。

運動量の試験では、1,200mg/kg 投与群の雌に有意な減少がみられたが、雄については認められなかった。平衡感覚、視・聴覚機能の試験では、全投与群に異常は認められなかった (Table 7)。

### 4) F<sub>1</sub> 世代の生殖能

妊娠率について検討したが、投与群と対照群との間に検体による影響は認められず、投与群の中では1,200mg/kg 投与群の妊娠率が最も高かった。

帝王切開時のデータを Table 8 に示した。

150 および 1,200mg/kg 投与群で、黄体数および総着床数に有意な減少が認められた。黄体数の減少については、顕著な用量相関性はみられず、それぞれの値がバックグラウンドデータ値 (13.7~17.8) の変動範囲内であることから、検体による影響とは考えられない。また着床数の減少は、着床率 (着床数/黄体数) に用量相関性が認められないことから、黄体数の減少に伴う変化と考えられる (着床率: 対照群 95.5%, 30mg/kg 投与群 89.1%, 150mg/kg 投与群 92.2%, 1,200mg/kg 投与群 95.0%)。

また投与各群の生存胎仔数が、対照群の値よりわずかに低値であったが、有意差は認められなかった。性比、胎仔体重および親動物 (F<sub>1</sub>) の剖検所見には、異常は認

Table 7 Post-natal development and behaviour in  $F_1$  rats derived from dams administered BRL25000 orally in late pregnancy and throughout lactation

| Dose (mg/kg/day)                             | 0     | 30    | 150     | 1200  |
|----------------------------------------------|-------|-------|---------|-------|
| Pinna detachment (3 days) <sup>a</sup>       | 95.1  | 96.0  | 82.3*** | 90.3  |
| Static righting reflex (4 days) <sup>a</sup> | 97.0  | 99.2  | 96.3    | 97.8  |
| Cliff aversion (14 days) <sup>a</sup>        | 99.6  | 100.0 | 98.7    | 100.0 |
| Eyelid opening (15 days) <sup>a</sup>        | 82.9  | 84.0  | 86.6    | 91.3  |
| Air righting reflex (17 days) <sup>a</sup>   | 98.1  | 100.0 | 100.0   | 100.0 |
| Activity cage test (34 days) <sup>b</sup>    |       |       |         |       |
| Males                                        | 152   | 154   | 138     | 135   |
| Females                                      | 153   | 155   | 146     | 134*  |
| Rotorod performance (34 days) <sup>a</sup>   |       |       |         |       |
| Males                                        | 70.0  | 60.0  | 80.0    | 78.9  |
| Females                                      | 73.7  | 86.7  | 80.0    | 78.9  |
| Auditory performance (35 days) <sup>a</sup>  |       |       |         |       |
| Males                                        | 100.0 | 100.0 | 95.0    | 100.0 |
| Females                                      | 100.0 | 100.0 | 95.0    | 100.0 |
| Visual discrimination (35 days) <sup>a</sup> |       |       |         |       |
| Males                                        | 100.0 | 100.0 | 100.0   | 100.0 |
| Females                                      | 100.0 | 100.0 | 100.0   | 100.0 |

\* Significant difference from control at  $P < 0.05$ \*\* Significant difference from control at  $P < 0.01$ \*\*\* Significant difference from control at  $P < 0.001$ <sup>a</sup>=Percentage of pups acquiring a positive response or meeting successful test criteria.<sup>b</sup>=Values expressed as mean number of counts.Table 8 Caesarean section data of  $F_1$  rat dams derived from  $F_0$  dams given BRL25000

| Dose received by $F_0$ dams<br>(mg/kg/day)                   | Mean $\pm$ S.D. |                 |                   |                  |
|--------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|
|                                                              | 0               | 30              | 150               | 1200             |
| No. of females mated                                         | 20              | 20              | 20                | 20               |
| No. of females pregnant                                      | 19              | 14              | 15                | 18               |
| No. of females died                                          | 0               | 0               | 0                 | 0                |
| No. of females delivered                                     | 0               | 1 <sup>a</sup>  | 2 <sup>a</sup>    | 1 <sup>a</sup>   |
| No. of females examined<br>at caesarean section <sup>b</sup> | 19              | 14              | 15                | 18               |
| No. of corpora lutea                                         | 15.7 $\pm$ 1.86 | 15.6 $\pm$ 3.90 | 14.1* $\pm$ 1.79  | 14.1* $\pm$ 1.98 |
| No. of implants                                              | 15.0 $\pm$ 2.00 | 13.9 $\pm$ 4.73 | 13.0** $\pm$ 1.77 | 13.4* $\pm$ 1.79 |
| No. of resorptions                                           | 1.2             | 0.6             | 0.2*              | 1.0              |
| No. of dead foetuses                                         | 0.0             | 0.0             | 0.0               | 0.0              |
| No. of live foetuses                                         | 13.8 $\pm$ 2.20 | 13.3 $\pm$ 4.56 | 12.8 $\pm$ 1.61   | 12.4 $\pm$ 2.59  |
| Sex ratio (Male : Female %)                                  | 55 : 45         | 47 : 53         | 50 : 50           | 49 : 51          |
| Mean bodyweight (g)                                          | 3.5 $\pm$ 0.34  | 3.4 $\pm$ 0.33  | 3.1 $\pm$ 0.81    | 3.5 $\pm$ 0.23   |

\* Significant difference from control at  $P < 0.05$ \*\* Significant difference from control at  $P < 0.01$ <sup>a</sup>=Delivered immediately prior to caesarean section. Data for these animals included, with exception of mean foetal bodyweight.<sup>b</sup>=Includes animals delivering immediately prior to caesarean section.



められなかった。

F<sub>2</sub> 胎仔の観察で、対照群および 150 mg/kg 投与群の各数例に奇形が認められたが、30 および 1,200 mg/kg 投与群には異常はみられなかったことから、検体による影響とは思われない。

### III. 考 察

BRL 14151K および BRL25000 についてラットを用いて周産期および授乳期投与試験を、それぞれ 400 mg/kg および 1,200 mg/kg を最高用量として経口投与により行なった。

母獣の一般症状として、BRL14151K 投与試験群で鼻部の赤色付着物および脱毛がみられたが、これらの変化は、BRL25000 投与試験群にはみられなかった。

母獣の摂餌量減少、体重増加抑制が投与期間の初期に BRL14151K 投与試験群でみられた。BRL25000 投与試験群についても同様の所見がみられたが、BRL14151K 投与試験群と比較して軽度であった。

妊娠期間および分娩に関しては、両検体とも異常は認められなかった。

F<sub>1</sub> 新生仔の所見として、BRL25000 の 1,200 mg/kg 投与群で授乳 0 日の生存新生仔数に有意な減少が認められた。しかし、この減少については、1,200 mg/kg 投与群で死亡新生仔数の増加傾向は認められず、生存新生仔数 (12.4) もバックグラウンドデータ値 12.6 (10.1~15.0) の範囲内であったことから、検体投与による影響とは思われず、対照群の値 14.1 がバックグラウンドデータの平均値と比較してやや高いことが関与しているものと思われる。また、この 1,200 mg/kg 投与群に、新生仔数が 3 匹という母獣が 1 例みられ、この 1 例を除いた値では 12.9 となり、バックグラウンドデータ値 12.6 と同等の値となる。なお、このように、新生仔数が極端に少ない母獣は他の群にはなく、また、この 1 例の母獣は、妊娠期間、授乳期間中の体重の推移、新生仔の体重、発育分化、諸機能に異常はみられないので、偶発的に生じたものと考えられる。以上の点から、BRL25000 の 1,200 mg/kg 投与群における生存新生仔数の減少は、薬物による影響とは考えられず、偶発的所見と思われる。

新生仔生存率の減少が BRL25000 の 150 および 1,200 mg/kg 投与群でみられ、150 mg/kg 投与群では有意差が認められた。しかし、各投与群の個別データを検討した結果、150 および 1,200 mg/kg 投与群に 1 例ずつ哺育能力の低い母獣が認められた。150 mg/kg 投与群については、1 母獣から生まれた新生仔 18 匹が分娩 12 日までに、また 1,200 mg/kg 投与群については、1 母獣から生まれた新生仔 13 匹が分娩 8 日までにすべて死亡した。この他には、哺育能力の特に低い母獣は認められ

ず、150 および 1,200 mg/kg 投与群の減少は、この 2 例によるものと考えられる。

BRL14151K の投与試験群では、生存新生仔数、新生仔生存率に異常は認められなかった。

新生仔体重については、BRL14151K の 400 mg/kg 投与群で、授乳 0 日の雌雄の体重に有意な低下がみられ、離乳以降も体重増加抑制が認められた。BRL25000 の 1,200 mg/kg 投与群の雄で同様の傾向がみられたが、BRL14151K 投与試験群に比べて極く軽度であった。

離乳後の新生仔 (F<sub>1</sub>) の発達、行動および生殖能に異常はみられず、F<sub>2</sub> 世代にも薬物によると思われる異常は認められなかった。

なお、新生仔体重の低下については、Amoxicillin<sup>15)</sup> を含む他のペニシリン系抗生物質<sup>16-18)</sup> およびセファロスポリン系抗生物質<sup>19)</sup> でもいくつか報告されていることから、本配合剤に特異的なものではなく、母獣の摂餌量減少、体重増加抑制に伴う変化と考えられる。

また、BRL14151K の 400 mg/kg 投与群の母獣の摂餌量減少および体重増加抑制の程度が、BRL25000 の 1,200 mg/kg 投与群に比べ顕著であったことと、BRL25000 の 1,200 mg/kg 投与群の新生仔体重の増加抑制の程度が BRL14151K に比べて極く軽度であった結果と一致する。

したがって、本試験における最大無作用量は、BRL14151K については 50 mg/kg、BRL25000 については 1,200 mg/kg と考えられる。

### 文 献

- 1) READING, C. & M. COLE: Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents & Chemother. 11: 852~857, 1977
- 2) WISE, R.; J. M. ANDREWS & K. A. BEDFORD: *In vitro* study of clavulanic acid in combination with penicillin, amoxycillin and carbenicillin. Antimicrob. Agents & Chemother. 13: 389~393, 1978
- 3) NELSON, J. D. & C. GRASSI: Current Chemotherapy & Infectious Disease. American Society for Microbiology., 1. Activity of amoxycillin/clavulanic acid (2:1) (BRL25000 Augmentin) *in vitro* & *in vivo* (COMBER, K. R.; R. HORTON, L. MIZEN, A. R. WHITE & R. SUTHERLAND) pp. 343~344, 1980
- 4) O'GRADY, F. W.: Twenty-one years of beta lactamases. Brit. Med. J. 284: 369~370, 1982
- 5) BALDWIN, J. A. & J. L. SCHARDEIN: BRL14151 K および BRL25000 の生殖試験 (第一報) ラットにおける器官形成期投与試験. Chemotherapy 31 (S-2): 238~251, 1983

- 6) HARD, E. & K. LARSSON: Development of Air Righting in Rats, Brain Behavior. Evol. 11: 53~59, 1975
- 7) IRWIN, S.: Comprehensive Observational Assessment; Ia. A Systematic, Quantitative Procedure for Assessing the Behavioral and Physiologic State of the Mouse, Psychopharmacologia 13: 222~257, 1969
- 8) VERNIER, V. G. & F. R. ALLEVA: The Bioassay of Kanamycin Auditory Toxicity, Arch. int. Pharmacodyn. 176: 59~73, No. 1, 1968
- 9) WILSON, J. G.: Methods of administering agents and detecting malformations in experimental animals. J. G. WILSON and J. WARKANY, eds. Teratology-Principles and Techniques, The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, pp. 262~277, 1965
- 10) DAWSON, A. B.: Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red s. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 11) SIEGEL, S.: Nonparametric Statistics for the Behavioral Science, McGraw-Hill, New York, N. Y. 1956
- 12) WEIL, C. S.: Selections of the valid number of sampling units and a consideration of their combination in toxicological studies involving reproduction, teratogenesis or carcinogenesis, Food Cosmet. Toxicol. 8: 177~182, 1970
- 13) DUNNETT, C. W.: New Tables for Multiple Comparisons With a Control, Biometrics, Sept. 1964
- 14) STEEL, R. G. D. & J. H. TORRIE: Principles and Procedures of Statistics, McGraw-Hill, New York, N. Y. 1960
- 15) ラットの出産前および出産後の発育に及ぼすBRL 2333 の影響 (社内資料)
- 16) SOLOVYEV, V. N. & L. P. KOVALENKO: Effect of bynzympenicillin and ampicillin on embryogenesis of albino rats. Antibiotiki, 18: 815~818, 1973
- 17) 野口晏弘, 大脇康雄: Bacampicillin hydrochloride のラット, ウサギを用いた生殖試験。Chemotherapy 27 (Suppl. 4): 30~35, 1979
- 18) 浜田佑二, 今西雅典: Mezlocillin のラットにおける生殖試験 (第3報) 周産期および授乳期授与試験。医薬品研究 9: 997~1004, 1978
- 19) 古橋忠和, 野村 章, 上原正巳, 小室恵美子, 仲吉 洋: Cefaclorの催奇形性および生殖におよぼす影響 (第2報) ラットにおける妊娠前・妊娠初期ならびに周産期・授乳期経口投与による検討。Chemotherapy 27 (Suppl. 7): 865~879, 1979

## REPRODUCTION STUDIES OF BRL14151K AND BRL25000

## II. PERI- AND POST-NATAL STUDIES IN RATS

JOHN A. BALDWIN

Beecham Pharmaceuticals Research Division

JAMES L. SCHARDEIN

International Research and Development Corporation

YOSHINOBU KOSHIMA

Beecham Yakuhin K. K.

The novel antibiotic formulation BRL25000 and its  $\beta$ -lactamase inhibitor component BRL14151K were given to pregnant rats from Day 15 of gestation until Day 21 of lactation to examine their effects on peri- and post-natal development. BRL14151K was administered orally at doses of 10, 50 and 400 mg/kg/day and, in a separate study, BRL25000 was given orally at doses of 30, 150 and 1,200 mg/kg/day. The dams were allowed to deliver their offspring. Parent animals were assessed for maternal toxicity, viability, growth, duration of gestation, problems at parturition and maternal instinct. Litter size, number of livebirths and stillbirths, gross anomalies, pup growth and survival to weaning were evaluated. In addition, physiological, neuropharmacological and reflex development of the offspring were determined and some were retained to examine their reproductive performance: the foetal  $F_2$  generation were observed for abnormalities. In BRL14151K study, dose related decreases occurred in  $F_0$  maternal body weight gain and food consumption at 50 and 400 mg/kg/day. The duration of gestation and parturition were normal, however. Decrease of pup body weight gain was observed in males and females of 400 mg/kg/day. Treatment with BRL14151K did not adversely affect the number of stillborn or viable pups per litter at birth nor pup survival indices. Neither did treatment adversely affect the physiological or behavioural development or reproductive capabilities of the  $F_1$  generation, nor the foetal development of the  $F_2$  generation. Treatment with BRL25000 induced no marked maternal toxicity when given in the peri-natal period. There were no significant observations in the treated animals, but inhibition of food consumption and body weight gain occurred at 1,200 mg/kg/day. The duration of gestation and the act of parturition were normal. Some intergroup differences in litter parameters from birth to weaning were observed but none were considered to be associated with treatment. The magnitude of these effects at the highest dose level was only slight. There were no biologically meaningful differences or dose related trends in any BRL25000 treated group in regard to litter observations, behavioural and developmental indices, neuropharmacological responses or reproductive capabilities in the  $F_1$  generation. The  $F_2$  generation was also unaffected. These results indicate absence of potential hazard during the perinatal- postnatal period at doses as high as 50 mg/kg/day for BRL14151K and 1,200 mg/kg/day for BRL25000.