

BRL14151K および BRL25000 の生殖試験 (第3報)

ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験

平川 哲孝・鈴木 孝男・佐野 嘉正・田村 一利

株式会社ボゾリサーチセンター

幸嶋 祥亘・日浦謙一郎・藤田 和司

ビーチャム薬品株式会社

T. L. HARDY

Beecham Pharmaceuticals Research Division

BRL14151K および BRL25000 の妊娠前および妊娠初期投与試験を CRJ:SD ラットを用いて行なった。BRL14151K は 10, 50 および 400 mg/kg を, BRL25000 は 30, 150 および 1,200 mg/kg を雄ラットに 63 日間, 雌ラットに 14 日間経口投与した後, 同じ投与水準の雌雄を同居・交配させて交尾および受胎の能力を検索するとともに, 雌ラットには妊娠 7 日まで投与を継続し, 着床および胎仔の死亡ならびに発育分化への影響を検討した。両薬物投与群の高用量群に投与後一過性の流産と, 体重増加抑制, 摂水量の増加, 肝重量の増加がみられた。交尾率, 妊娠率への影響は認められなかった。また, 雄の精子形成過程, 雌の卵子形成過程, 排卵, 受精, 着床および胎仔の発育分化に異常は認められなかった。

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 β -lactamase を阻害するため, β -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¹⁻⁴⁾。

今回, BRL14151K および BRL25000 のラットを用いた妊娠前および妊娠初期投与試験を行なったのでその成績を報告する。なお, 両薬物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. 試験材料および方法

1. 被験物質および調製法

両薬物はともに白色の粉末で, BRL14151K は Lot No. CT 10320 および CT 10321 を, BRL25000 は Lot No. CT 10312 および CT 10313 を試験に用いた。被験液の調製は用時に蒸留水に溶解して行なった。

2. 試験動物および飼育条件

CRJ:SD ラットを日本チャールス・リバー株式会社より雄は 5 週齢で, 雌は 12 週齢でそれぞれ購入し, 1 週間の馴化飼育後試験に供した。動物は馴化期間および試験期間を通して, 温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の条件下でラット用金属製ケージ (250×350×200 mm: 日本ケ

ージ株式会社) に雄および交配前の雌は 2 匹ずつ, 妊娠動物は 1 匹ずつ収容して飼育した。飼料は妊娠動物には繁殖用固型飼料: NMF を, 他には育成用固型飼料: MF (いずれもオリエンタル酵母工業株式会社製) を, 水は水道水を自由に摂取させた。動物は 1 群当り雌雄各 20 匹使用した。

3. 投与量の設定, 投与方法および投与期間

投与量は, 両薬物の器官形成期投与試験⁵⁾ の投与量に準じて BRL14151K は遊離酸として 10, 50 および 400 mg/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。投与液量は各投与水準とも 5 ml/kg とし, 測定した体重をもとに雄ラットに対しては 6 週齢より交配開始までの 63 日間と交配期間中, 雌ラットに対しては 13 週齢より交配開始までの 14 日間とそれに引き続く妊娠 7 日までの期間 1 日 1 回ラット用金属製胃ゾンデを用い連続経口投与した。以下, 投与量は遊離酸の重量として表示する。

4. 交配方法および交尾妊娠成立の確認

前述したように, 63 日間投与した雄と 14 日間投与した雌とを交配したが, 交配は同投与群の雌雄を 1:1 で 14 日間同居させて行なった。交尾確認のために毎朝腔内観察を行ない, 腔栓あるいは腔脂膏中に精子を認めた雌を妊娠したものとみなして, 雄と分けて飼育し, この

日を妊娠0日として起算した。同居期間中、交配しなかった雌雄ラットのうち雌については同一投与量群の既に交配した雄ラットと新たに組み合わせて同居交配を行ない、その後雄ラットについては精巣のヘマトキシリン・エオジン染色標本による病理組織学的検索を行なった。また、交尾成立に要する日数、交尾率（交尾成立雌数／同居雌数×100、交尾成立雄数／同居雄数×100）および妊娠率（着床成立雌数／交尾成立雌数×100）をそれぞれ検索し、交尾および受胎の能力を調べた。

5. 観察および検査項目

試験期間中は毎日動物死亡の有無および一般状態を観察した。体重では雄では交配開始までは週2回、雌では交配開始までは週2回、妊娠期間中は毎日測定した。摂餌量および摂水量は雌で妊娠期間中に限って妊娠1, 4, 7, 11, 14, 17 および 20 日にそれぞれ前日からの 24 時間量を測定した。交尾・受胎能力試験終了後、雄は二酸化炭素により窒息させ、直ちに開胸、開腹して腹大動脈より放血した後諸臓器の肉眼的観察ならびに心、肺、肝、腎、副腎、脾および精巣の重量を測定した。また、精巣についてはヘマトキシリン・エオジン染色標本による病理組織学的検索を実施した。

妊娠母体は全例を妊娠 20 日の午後 1 時より午後 3 時の間に二酸化炭素により窒息死させ、直ちに開胸・開腹して諸臓器の肉眼的観察を行なった。黄体数、着床数、死亡吸収胚数（早期死亡：着床痕と胎盤遺残、後期死亡：浸軟胎仔と死亡胎仔）および生存胎仔数を数えた後、胎盤重量および母体の下垂体、心、肺、肝、腎、脾、卵巣および子宮の重量を測定した。

生存胎仔については、肛門生殖結節間距離の差による雌雄の判別を行ない、体重を測定した後、肉眼または実体顕微鏡下で外形異常の有無を観察した。各群とも各 1

腹仔数の 2/3 の胎仔は 95% アルコールで固定し、Dawson 法⁶⁾に従い、アリザリンレッド S 染色による透明骨格標本作製し、骨格の異常ならびに化骨の進行状態を観察した。残りの胎仔は Bouin 液で固定後、Wilson 法⁷⁾により頭部、胸部および腹部の内部異常を検索した。また、母体の卵巣についてはヘマトキシリン・エオジン染色標本による病理組織学的検査を実施した。

6. 統計処理法

諸種の数値の統計処理は母体単位で処理した後、交尾率、妊娠率および性比については χ^2 検定により、死亡胎仔、外形異常、内部異常、骨格異常、骨格変異および化骨進行状態については Wilcoxon の順位検定⁸⁾により、その他の数値については分散分析により検定を行なった。

II. 実験成績

1. 雄動物に及ぼす影響

BRL14151K 投与試験

試験期間を通して、各群とも死亡例はなかった。一般状態の観察では、400 mg/kg 投与群で、投与 1 か月頃よりおよそ半数例の動物に投与後一過性の流涎が認められた。他には各群ともに一般状態に異常は認められなかった。

交配前投与期間中の体重推移を Fig. 1 に示した。

10 mg/kg 投与群では、投与中期に限り体重増加抑制がみられ、投与 17 日より投与期間を通して体重値に有意の差が認められたが、投与後期の体重増加量は対照群とほぼ同様であった。50 mg/kg 投与群では、投与期間中対照群とほぼ同様な体重推移がみられ、有意の差も認められなかった。400 mg/kg 投与群では、投与初期より体重増加抑制がみられ、投与 7 日以降の体重値に有意な

Fig. 1 Mean body weight changes of male rats given BRL14151K

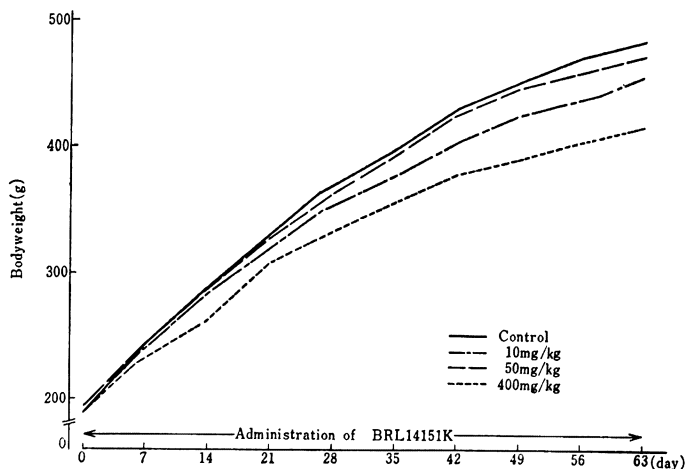


Table 1 Absolute organ weight of male rats in fertility study on BRL14151K

Dose (mg/kg)	No. of rats	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Mean ± S.D.					
						Kidney (g)		Adrenal (mg)		Testis (g)	
						Left	Right	Left	Right	Left	Right
Control	20	1.53	1.58	15.07	0.74	1.66	1.65	30.1	31.3	1.68	1.66
		0.17	0.13	2.78	0.10	0.17	0.18	5.3	4.4	0.15	0.14
10	20	1.47	1.51	15.32	0.71	1.60	1.61	30.0	28.5*	1.64	1.66
		0.13	0.10	2.55	0.09	0.17	0.17	4.2	3.6	0.12	0.13
50	20	1.46	1.53	16.47	0.76	1.70	1.72	33.0	31.5	1.64	1.69
		0.13	0.13	1.78	0.13	0.15	0.16	5.1	5.6	0.17	0.14
400	20	1.36**	1.43**	17.17*	0.70	1.55	1.57	30.9	30.4	1.60	1.60
		0.20	0.14	2.99	0.10	0.19	0.20	2.8	3.8	0.13	0.13

* : P<0.05, ** : P<0.01 (Significant difference from control)

Table 2 Absolute organ weight of male rats in fertility study on BRL25000

Dose (mg/kg)	No. of rats	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Mean ± S.D.					
						Kidney (g)		Adrenal (mg)		Testis (g)	
						Left	Right	Left	Right	Left	Right
Control	20	1.64	1.66	19.01	0.82	1.78	1.78	31.8	30.9	1.78	1.81
		0.17	0.17	2.09	0.12	0.15	0.16	5.6	5.4	0.10	0.13
30	20	1.56	1.55*	16.34**	0.73*	1.78	1.80	31.4	31.9	1.72	1.72*
		0.16	0.14	3.35	0.14	0.25	0.24	5.9	7.0	0.12	0.12
150	20	1.60	1.56*	18.58	0.72*	1.80	1.85	32.7	32.2	1.78	1.81
		0.12	0.12	3.02	0.15	0.24	0.22	5.3	5.7	0.10	0.12
1,200	20	1.48**	1.56	22.05**	0.77	1.80	1.81	31.5	29.9	1.74	1.75
		0.13	0.16	2.98	0.17	0.21	0.22	6.6	6.0	0.13	0.10

* : P<0.05, ** : P<0.01 (Significant difference from control)

差が認められた。

受胎能力試験終了後の臓器重量を Table 1 に示した。剖検では、各群に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。臓器重量では 400 mg/kg 投与群に心重量および肺重量に有意な減少が、肝重量に有意な増加が認められた。10 mg/kg 投与群に右側副腎重量の有意な減少が認められたが、用量相関性はなかった。他には対照群との間に有意な差は認められなかった。

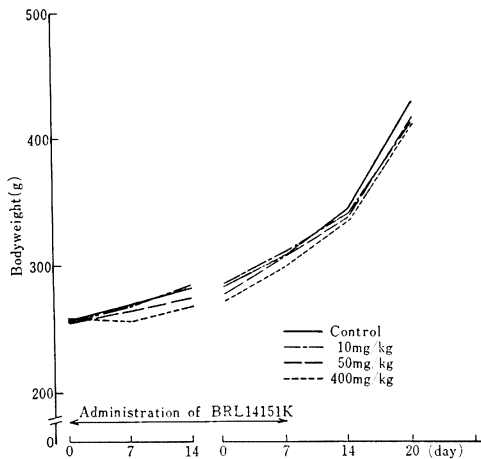
精巢の病理組織所見では、50 mg/kg 投与群に 1 例軽度な精細管の萎縮と精子形成減退が認められた。他には各例ともに異常所見は認められなかった。

BRL25000 投与試験

試験期間を通して、各群とも死亡例はなかった。一般状態の観察では、1,200 mg/kg 投与群で、投与 2 週間頃より投与期間を通しておよそ 1/3 例の動物に投与後一過性の流涎が認められた。他には各群ともに一般状態に異常は認められなかった。

交配前投与期間中の体重推移を Fig. 3 に示した。

Fig. 2 Mean body weight changes of female rats given BRL14151K



30 mg/kg 投与群では、投与初期に軽度な体重増加抑制がみられ、投与 10 日に有意の差が認められた。しかし、以降の数値には対照群との間に有意の差はなかった。

Fig. 3 Mean body weight changes of male rats given BRL25000

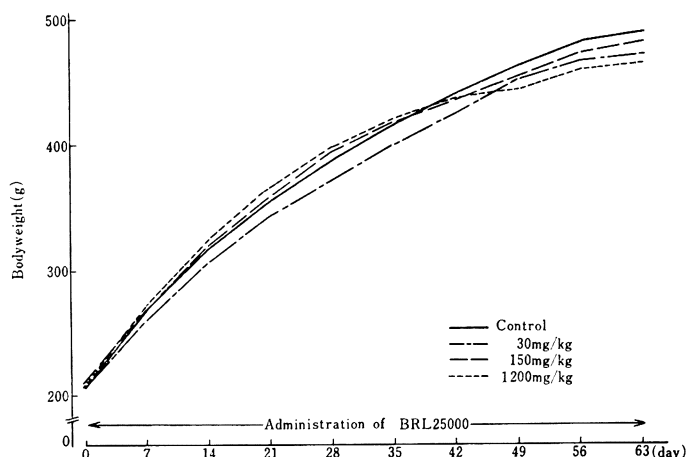


Table 3 Absolute organ weight of female rats at term in fertility study on BRL14151K

Mean $\pm$ S.D.

Dose (mg/kg)	No. of rats	Hypophysis (mg)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)		Ovary (mg)		Uterus (g)
							Left	Right	Left	Right	
Control	20	15.7	1.08	1.28	15.90	0.70	1.06	1.08	67.9	67.8	5.87
		2.9	0.08	0.08	1.53	0.14	0.13	0.13	10.8	15.1	0.89
10	20	15.2	1.11	1.27	15.88	0.69	1.08	1.09	61.9	71.2	5.24
		2.1	0.12	0.13	2.06	0.11	0.10	0.11	17.7	14.7	1.50
50	20	14.6	1.09	1.26	15.28	0.68	1.05	1.08	63.7	68.5	5.50
		2.0	0.11	0.09	1.70	0.09	0.11	0.12	13.5	12.2	1.07
400	20	14.9	1.08	1.25	16.17	0.69	1.05	1.07	61.6	62.1	5.63
		2.8	0.12	0.12	1.41	0.08	0.10	0.11	9.8	10.9	0.85

150 mg/kg 投与群では、投与期間中対照群とほぼ同様な体重推移がみられ、有意の差も認められなかった。1, 200 mg/kg 投与群では、投与後期に体重増加抑制がみられ、投与 63 日に有意の差が認められた。

受胎能力試験終了後の臓器重量を Table 2 に示した。剖検では、各群に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。臓器重量では 1, 200 mg/kg 投与群に心重量の有意な減少が、肝重量の有意な増加が認められた。30 mg/kg 投与群で肺、肝、脾および精巣重量に、150 mg/kg 投与群で肺および脾重量に有意な減少が認められたが、用量相関性はなかった。他には対照群との間に有意な差は認められなかった。

精巣の病理組織所見には各例ともに異常所見は認められなかった。

2. 雌動物に及ぼす影響

BRL14151K 投与試験

試験期間を通して、各群とも死亡例はなかった。一般

状態の観察では、400 mg/kg 投与群で、投与 10 日頃より少数例に投与後一過性の流産が認められた。他には各群ともに一般状態に異常は認められなかった。

交配前投与期間中および妊娠期間中の体重推移を Fig. 2 に示した。

10 および 50 mg/kg 投与群では、交配前および妊娠期間中ともに対照群と同様な体重推移がみられ、有意の差は認められなかった。400 mg/kg 投与群で体重増加抑制がみられ、投与 7 日より妊娠期間を通してほぼ全測定値に有意な差が認められた。

妊娠期間中の摂餌量には被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

妊娠期間中の摂水量は 400 mg/kg 投与群では妊娠期間中対照群を上回る傾向がみられ、妊娠 1 日から妊娠 14 日の測定値に有意差が認められた。しかし、10 および 50 mg/kg 投与群には対照群との間に差は認められなかった。

妊娠 20 日の臓器重量を Table 3 に示した。剖検では、

Table 4 Absolute organ weight of female rats at term in fertility study on BRL25000
Mean $\pm$ S.D.

Dose (mg/kg)	No. of rats	Hypophysis (mg)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)		Ovary (mg)		Uterus (g)
							Left	Right	Left	Right	
Control	20	16.7	1.13	1.33	16.33	0.71	1.08	1.08	71.4	79.6	4.97
		3.8	0.11	0.16	1.50	0.12	0.10	0.09	16.8	21.9	0.83
30	20	17.9	1.07*	1.24	15.39*	0.68	1.11	1.11	67.9	69.7	5.33
		3.4	0.09	0.11	1.37	0.10	0.15	0.13	14.5	14.9	0.78
150	17	17.8	1.09	1.19**	15.52	0.62*	1.09	1.09	67.5	64.8*	4.86
		3.6	0.23	0.13	2.09	0.08	0.11	0.13	12.9	16.1	0.79
1,200	20	16.8	1.10	1.24	17.00	0.73	1.14	1.15	68.9	63.8**	5.19
		3.8	0.11	0.12	1.81	0.11	0.13	0.14	14.9	10.9	0.69

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ (Significant difference from control)

各例に被験物質投与と関連した変化は認められなかった。偶発所見として 50mg/kg 投与群に 1 例子宮内出血が認められたが、胎仔に異常は認められなかった。また、この例に死亡胎仔は認められなかった。各臓器重量には対照群と投与群との間に有意の差は認められなかった。

卵巣の病理組織学的検索には各例とも異常所見は認められなかった。

BRL25000 投与試験

試験期間を通して、各群とも死亡例はなかった。一般状態の観察では、1,200mg/kg 投与群で、投与 2 週頃より投与期間を通して少数例に投与後一過性の流涎が認められた。他には各群ともに一般状態に異常は認められなかった。

交配前投与期間中および妊娠期間中の体重推移を Fig. 4 に示した。

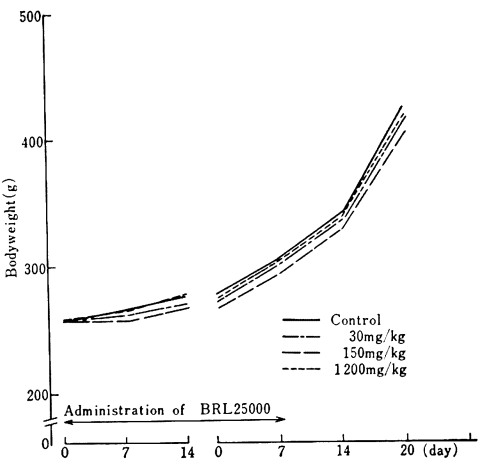
各投与群とも、交配前および妊娠期間中ともに対照群と同様な体重推移がみられた。

妊娠期間中の摂餌量には著変は認められなかった。

妊娠期間中の摂水量は、1,200mg/kg 投与群では妊娠初期および中期に対照群を上回る傾向がみられ、妊娠 4 日から妊娠 14 日の測定値に有意差が認められた。30 および 150mg/kg 投与群には対照群との間に著変は認められなかった。

妊娠 20 日の臓器重量を Table 4 に示した。剖検では、各例に被験物質投与と関連した変化は認められなかった。臓器重量では 30mg/kg 投与群の心および肝、150 mg/kg 投与群の肺および脾重量に有意の変動が認められたが、用量相関性は認められなかった。右側卵巣重量の有意の低下が 150 および 1,200mg/kg 投与群に認められた。他には対照群との間に有意の差は認められなかった。

Fig. 4 Mean body weight changes of female rats given BRL25000



卵巣の病理組織所見では各投与群に被験物質投与と関連した変化は認められなかった。偶発所見として 30mg/kg 投与群に 1 例黄体嚢胞がみられた。

3. 交尾能力および受胎能力

BRL14151K 投与試験

交尾および受胎能力試験の成績を Table 5 に示した。交尾能力については、2 週間の同居期間中、400 mg/kg 投与群に 1 組の交尾不成立が認められたのみで、他の例については全例交尾が確認された。また、交尾成立までの交配期間も各群同程度で有意の差は認められなかった。400mg/kg 投与群の交尾不成立の雌については、同投与群の交尾の確認された雄と同居・交配させた結果交尾が確認され、雄については精巣の病理組織学的検索の結果、異常は認められなかった。妊娠率については、交尾成立例の全例に妊娠成立が認められ、各群とも 100% であった。

Table 5 General reproductive performance of rats in fertility study on BRL14151K

Dose (mg/kg)	No. of rats		No. of rats mating (female)														Precoital time ^{b)}		Mating rate(%)		Pregnancy rate ^{e)} (%)
	Female	Male	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 ^{a)}	Mean	Median	Female ^{c)}	Male ^{d)}	
Control	20	20	5	5	4	6											2.6	2	100	100	100
10	20	20	7	4	3	5				1							2.7	2	100	100	100
50	20	20	3	4	7	5								1			3.3	3	100	100	100
400	20	20	7	2	3	5	1			1				1 ^{f)}			4.0	3	100	95	100

a) : Day after pairing, b) : Day, c) : (No. of copulated females / No. of pairing females) × 100
d) : (No. of copulated males / No. of pairing males) × 100, e) : (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100
f) : 2nd mating cycle

Table 6 General reproductive performance of rats in fertility study on BRL25000

Dose (mg/kg)	No. of rats		No. of rats mating (female)														Precoital time ^{b)}		Mating rate(%)		Pregnancy rate ^{e)} (%)
	Female	Male	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 ^{a)}	Mean	Median	Female ^{c)}	Male ^{d)}	
Control	20	20	7	5	3	5											2.3	2	100	100	100
30	20	20	9	2	3	4	2										2.4	2	100	100	100
150	20	20	2	5	3	7									3 ^{f)}		2.9	3	100	100	100
1,200	20	20	7	4	6	3											2.3	2	100	100	100

a) : Day after pairing, b) : Day, c) : (No. of copulated females / No. of pairing females) × 100
d) : (No. of copulated males / No. of pairing males) × 100, e) : (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100
f) : Undetermined copulatory plug or sperm

BRL25000 投与試験

交尾および受胎能力試験の成績を Table 6 に示した。

交尾能力については、2 週間の同居期間中に 150mg/kg 投与群の 3 例を除いて全例交尾が確認され交尾率は各群とも 100% であった。また、交尾成立までの交配期間も各群同程度で有意の差は認められなかった。妊娠率については、交尾成立例の全例に妊娠成立が認められ、妊娠率は各群とも 100% であった。ただし、上記の 150 mg/kg 投与群の 3 例については腔栓または腔脂膏中における精子が確認できないまま、2 週間の交配期間の末期の腔脂膏検査中に胎盤徴候が観察され、妊娠していることが確認された。しかし、妊娠 0 日を特定することができないため、この 3 例については交配以降の諸数値を群の成績から除外した。

4. 胎仔に及ぼす影響

BRL14151K 投与試験

1) 妊娠末期開腹所見

妊娠 20 日の帝王切開所見を Table 7 に示した。

黄体数は各群ほぼ同程度であり有意の差はなかった。着床数および生存胎仔数は 10mg/kg 投与群でわずかに低い傾向が認められたが、有意の差はなかった。また、50mg/kg 投与群および 400mg/kg 投与群には有意差は認められなかった。死亡吸収胚の出現率は、対照群で 4.1%、10mg/kg 投与群で 3.5%、50mg/kg 投与群で 5.0%、400mg/kg 投与群で 4.5% であり各群ほぼ同程度で有意の差もなかった。生存胎仔重量は、10mg/kg 投与群の雌雄および 400mg/kg 投与群の雄に有意の減少が認められた。その他、性比、胎盤重量には対照群と投与各群の間に有意の差は認められなかった。

胎仔の外形異常は、10mg/kg 投与群に尾部の皮下出血が 1 例 (0.4%)、50mg/kg 投与群に頸部皮下出血が 1 例 (0.3%) 認められたが、これらの出現率には対照群との間に有意の差はなかった。

2) 内臓観察所見および骨格観察所見

内臓および骨格の検査成績を Table 8 に示した。

内臓観察では、対照群に片側性の無眼球と左右腎欠損の複合奇形が 1 例 (1.0%)、50mg/kg 投与群に水頭が 1 例 (1.0%)、各群に腎盂拡張が 1.0%~4.5% の頻度

Table 7 Cesarean section data of rats in fertility study on BRL14151K

Dose (mg/kg)	No. of dams		Corpora lutea	Implan- tations	No. of dead fetuses			Live fetuses						Placental weight(g)	Ext. ^{a)} mal.
								No. of fetuses			Sex ratio	Body weight (g)			
					Total	Early	Late	Total	Male	Female		Male	Female		
Control	20	Total	362	319	13	13	0	306	158	148	1.07				0
		Mean	18.1	16.0	(4.1) ^{d)}	(4.1) ^{d)}	(0) ^{d)}	15.3	7.9	7.4		4.38	4.11	0.49	(0)
		S.D.	2.3	2.1				2.2	2.4	2.1		0.85	0.83	0.06	
10	20	Total	368	289	10	10	0	279	136	143	0.95				1 ^{b)}
		Mean	18.4	14.5	(3.5)	(3.5)	(0)	14.0	6.8	7.2		3.97*	3.67*	0.55	(0.4)
		S.D.	2.5	4.6				4.7	2.6	2.9		0.35	0.29	0.16	
50	20	Total	353	320	16	16	0	304	148	156	0.95				1 ^{c)}
		Mean	17.7	16.0	(5.0)	(5.0)	(0)	15.2	7.4	7.8		4.05	3.87	0.49	(0.3)
		S.D.	2.0	2.4				2.2	1.9	2.1		0.48	0.47	0.06	
400	20	Total	342	313	14	14	0	299	160	139	1.15				0
		Mean	17.1	15.7	(4.5)	(4.5)	(0)	15.0	8.0	7.0		3.94*	3.74	0.51	(0)
		S.D.	2.4	1.4				1.6	2.2	2.6		0.32	0.29	0.06	

Significant difference from control *: P<0.05

^{a)}: No. of fetuses with external malformations,^{b)}: Tail with hemorrhage, ^{c)}: Subcutaneous hemorrhage^{d)}: Dead fetuses/implantations × 100

Table 8 Visceral and skeletal observations of rat fetuses in fertility study on BRL14151K

Dose (mg/kg)	Control	10	50	400
Visceral examination				
No. of fetuses examined	97	88	101	97
No. of abnormalities (%)	2 DR (2.1) 1 An (1.0)	4 DR (4.5)	1 DR (1.0) 1 Hy (1.0)	4 DR (4.1)
Skeletal examination				
No. of fetuses examined	209	191	203	202
No. of abnormalities (%)	0	0	0	0
Variation (%)				
14th rib Extra 14th rib	0	1 (0.5)	2 (1.0)	1 (0.5)
Rudimentary 14th rib	24(11.5)	14 (7.3)	14 (6.9)	17 (8.4)
Total	24(11.5)	15 (7.9)	16 (7.9)	18 (8.9)
Progress of ossification				
No. of ossified sternebrae (%)				
1 st- 4 th	209(100.0)	191(100.0)	203(100.0)	202(100.0)
5 th	173 (82.8)	159 (83.2)	179 (88.2)	169 (83.7)
6 th	191 (91.4)	159 (83.2)	175 (86.2)	166 (82.2)
No. of ossified metacarpal				
Right	3.69±0.34	3.65±0.29	3.63±0.35	3.57±0.28
Left	3.68±0.36	3.63±0.28	3.62±0.36	3.58±0.28
No. of ossified metatarsal				
Right	4.22±0.40	4.01±0.02	4.07±0.24	4.00±0.02
Left	4.22±0.40	4.01±0.02	4.08±0.26	4.00±0.02
No. of ossified sacral and caudal vertebrae	8.55±0.82	8.01±0.29	8.22±0.67	8.08±0.39

Mean±S.D. An: Anophthalmia and absence of kidney, Hy: Hydrocephaly

DR: Dilation of renal pelvis

で認められた。しかし、発生頻度に有意の差は認められなかった。

骨格観察では、骨格異常は各群に1例も認められなかった。骨格変異として、14肋骨が対照群に11.5%、

10mg/kg 投与群に7.9%、50mg/kg 投与群に7.9%、400mg/kg 投与群に8.9%の頻度で認められたが、発生頻度に有意の差はなかった。化骨進行状態については、胸骨核、中手骨、中足骨および仙尾椎の化骨数につ

Table 9 Cesarean section data of rats in fertility study on BRL25000

Dose (mg/kg)	No. of dams		Corpora lutea	Implan- tations	No. of dead fetuses			Live fetuses						Placental weight(g)	Ext. ^{a)} mal.
								No. of fetuses			Sex ratio	Body weight (g)			
					Total	Early	Late					Total	Male		
Control	20	Total	373	321	18	18	0	303	143	160	0.89				0 (0)
		Mean	18.7	16.1	(5.6) ^{b)}	(5.6) ^{b)}	(0) ^{b)}	15.2	7.2	8.0		3.90	3.66	0.47	
		S.D.	3.4	1.9				2.4	1.9	2.3		0.24	0.38	0.04	
30	20	Total	362	309	5	5	0	304	153	151	1.01				0 (0)
		Mean	18.1	15.5	(1.6)	(1.6)	(0)	15.2	7.7	7.6		3.92	3.73	0.48	
		S.D.	3.7	1.9				2.0	2.5	2.5		0.21	0.24	0.04	
150	17	Total	299	250	7	7	0	243	126	117	1.08				0 (0)
		Mean	17.6	14.7*	(2.8)	(2.8)	(0)	14.3	7.4	6.9		4.06	3.72	0.47	
		S.D.	3.1	1.3				1.5	1.9	2.2		0.53	0.47	0.05	
1,200	20	Total	339	303	11	10	1	292	151	141	1.07				0 (0)
		Mean	17.0	15.2	(3.6)	(3.3)	(0.3)	14.6	7.6	7.1		4.04*	3.79	0.52**	
		S.D.	2.9	1.5				1.8	1.9	1.6		0.22	0.24	0.05	

Significant difference from control *: P<0.05, **: P<0.01

^{a)}: No. of external malformation

^{b)}: Dead fetuses/implantations × 100

Table 10 Visceral and skeletal observations of rat fetuses in fertility study on BRL25000

Dose (mg/kg)	Control	30	150	1200
Visceral examination				
No. of fetuses examined	101	101	82	97
No. of abnormalities (%)	1 An(1.0)	0	0	2 DR(2.1)
Skeletal examination				
No. of fetuses examined	202	203	161	195
No. of abnormalities	0	0	0	0
Variation (%)				
14th rib Extra 14th rib	1(0.5)	4(2.0)	1(0.6)	4(2.1)
Rudimentary 14th rib	21(10.4)	28(13.8)	28(17.4)	31(15.9)
Total	22(10.9)	32(15.8)	29(18.0)	35(17.9)
Separation of thoracic vertebral centra	3(1.5)	1(0.5)	2(1.2)	2(1.0)
Asymmetric sternebrae	0	1(0.5)	0	0
Progress of ossification				
No. of ossified sternebrae (%)				
1st-4th	202(100.0)	203(100.0)	161(100.0)	195(100.0)
5th	154(76.2)	137(67.5)	111(68.9)	175(89.7)
6th	151(74.8)	141(69.5)	128(79.5)	165(84.6)
No. of ossified metacarpal				
Right	3.56±0.37	3.66±0.35	3.61±0.36	3.61±0.29
Left	3.56±0.37	3.66±0.35	3.61±0.36	3.61±0.29
No. of ossified metatarsal				
Right	4.00±0.02	4.00±0.00	4.06±0.24	4.00±0.00
Left	4.00±0.02	4.00±0.00	4.06±0.24	4.00±0.00
No. of ossified sacral and caudal vertebrae	7.97±0.44	7.98±0.57	8.12±0.81	7.95±0.33

An : Anophthalmia, DR : Dilation of renal pelvis

いて検索したが、いずれにも対照群と投与各群の間に有意の差は認められなかった。

BRL25000 投与試験

1) 妊娠末期開腹所見

妊娠 20 日の帝王切開所見を Table 9 に示した。

黄体数は各群ほぼ同程度であり有意の差はなかった。

着床数は 150mg/kg 投与群で有意の低下が認められた

が、30mg/kg および 1,200mg/kg 投与群では有意の差は認められなかった。死亡吸収胚の出現率は、対照群で 5.6%, 30mg/kg 投与群で 1.6%, 150mg/kg 投与群で 2.8%, 1,200mg/kg 投与群で 3.6% であり各群はほぼ同程度で有意の差もなかった。生存胎仔重量は、1,200mg/kg 投与群の雄に有意の増加が、胎盤重量は 1,200mg/kg 投与群に有意の増加が認められた。その他、雌の生存胎仔重量、性比、胎盤重量には対照群と投与各群の間に有意の差は認められなかった。

胎仔の外形異常は、各群を通し 1 例も認められなかった。

2) 内臓観察所見および骨格観察所見

内臓および骨格の検査成績を Table 10 に示した。

内臓観察では、対照群に片側性無眼球が 1 例 (1.0%), 1,200mg/kg 投与群に腎盂拡張が 2 例 (2.1%) 認められた。しかし、これらの発生頻度に有意の差は認められなかった。

骨格観察では、骨格異常は各群に 1 例も認められなかった。骨格変異として、14 肋骨が対照群の 10.9% に対し 30mg/kg 投与群で 15.8%, 150mg/kg 投与群に 18.0%, 1,200mg/kg 投与群で 17.9% の頻度で認められ投与群でわずかに高かったが、発生頻度に有意の差はなかった。胸椎椎体分離が各群に 1~3 例、胸骨核非対称が 30mg/kg 投与群に 1 例認められたが、これらの発生頻度についても対照群との間に有意の差はなかった。化骨進行状態については、胸骨核、中手骨、中足骨および仙尾椎の化骨数について検査したが、いずれにも対照群と投与群の間に有意の差は認められなかった。

III. 考 察

BRL14151K および BRL25000 についてラットを用いた妊娠前および妊娠初期投与試験を行なった。

雌雄投与ラットについては、発現した一般症状は両薬物間に差はなかった。両薬物の高用量群に流産がみられ、その発現例数は投与期間の長い雄で雌より多かったが、薬物間には特に差を認めなかった。体重増加抑制が BRL14151K では 400mg/kg 投与群の雌雄に投与初期より認められたが、BRL25000 投与群では雄の 1,200mg/kg 投与群で投与後期にわずかな増加抑制が認められたのみで、その影響は BRL14151K 投与群でやや強く、BRL14151K 単独投与に比し BRL25000 ではやや軽減する傾向がみられた。妊娠動物の摂水量の増加が両薬物の高用量群にみられたが、その影響はほぼ同程度で薬物間に特に差はなかった。摂餌量には薬物投与の影響は認められなかった。肝重量の増加、心重量あるいは肺重量の低下が両薬物の高用量群の雄のみに認められたが、心および肺の変化は主に体重増加抑制に起因したものと考

えられる。しかし、両薬物間に特に差は認められなかった。雌についてはこれらの臓器に異常は認められなかったが、投与期間が短く、また、投与中止後はほぼ 2 週間目の測定値であるためと思われる。

交尾および受胎能力については、両薬物とも高い交尾率および妊娠率を示しており、投与の影響はなら認められなかった。また、交尾は大多数例は最初の性周期期間内にみられ、残る少数例も 2 回目の性周期で交尾が成立し、交配期間についても各群同程度であり、なら異常は認められなかった。また、精巣および卵巣の病理組織所見についても薬物投与の影響は認められなかった。

帝王切開による観察では、妊娠黄体数および着床数には著変はなく、排卵、着床への影響は認められなかった。死胎仔数、生存胎仔数および性比にはなら異常は認められなかった。胎仔重量において、BRL14151K の 10mg/kg 投与群の雌雄胎仔および 400mg/kg 投与群の雄胎仔が対照群よりも有意に低く、BRL25000 投与群の 1,200mg/kg 投与群の雄胎仔が有意に高い値を示したが、両薬物投与群の胎仔重量はほぼ同等であり、当研究所の背景データ (Table 11) の値ともよく一致していた。一方、BRL14151K の対照群の個別データを検討した結果、雄胎仔で 5.8g 以上および雌胎仔で 5.4g 以上の母体が、20 腹中 3 腹にみられた。背景データにおいても、この 3 腹の胎仔重量と同等かそれ以上の値を示す例が出現率は低いが数例認められたことから、BRL14151K の試験ではこの 3 例の偏りの結果対照群の値が偶発的に高い水準を示したものであると思われる。故に、投薬 (BRL14151K) 群の雌雄胎仔の低体重は薬物投与による影響とは考え難い。BRL25000 の試験では、1,200mg/kg 投与群 (雄 4.04g) が対照群 (雄 3.90g) よりも有意に高い値を示したが、その差は小さく、両群共に前記の背景データの範囲内にあり偶発的なものと思われ、薬物 (BRL25000) の投与による悪影響を示したものと考えられない。胎盤重量が BRL25000 の 1,200mg/kg 投与群でわずかに高い傾向が認められたが当社の背景データと比較すると特に大きな差はなかった。外表、内臓および骨格の観察では、皮下出血、水頭、片側性無眼球、腎盂拡張および腎盂欠損が認められたが、いずれも自然発生的に認められる異常であり、また、その発生頻度も低頻度であり有意差も認められないことから薬物投与とは無関係と思われる。その他骨格変異および化骨状態には両薬物投与群ともに著変は認められなかった。

IV. 結 論

β -ラクタマーゼ阻害剤である BRL14151K および BRL14151K と Amoxicillin との 1:2 の配合剤である BRL25000 についてラットを用いた妊娠前および妊娠初

Table 11 Control data in fertility study

Animal : Rat, Strain : CRJ : CD

Route	I.V.	P.O. D. water	P.O. MC	S.C. Saline	S.C. PEG400	P.O. D. water	P.O. D. water	P.O. D. water	P.O. D. water	P.O.
Solvent	Saline									
No. of dams	18	20	19	17	19	19	17	18	18	19
No. of corpora lutea	15.5 2.0 13-21	15.4 2.1 11-19	16.3 2.0 14-21	17.0 2.2 14-23	15.6 3.6 3-20	15.8 1.9 12-19	15.7 2.8 6-18	16.3 1.7 14-21	15.7 2.4 12-23	17.7 0.6 14-23
No. of implants	14.8 2.0 11-19	14.1 3.2 5-18	15.1 2.2 10-19	15.8 1.4 14-18	13.4 4.2 3-19	14.6 2.6 7-18	13.8 4.1 4-18	15.0 1.4 12-17	14.6 1.2 12-16	15.5 0.7 5-20
No. of death (%)	3.4 0 3.4	5.3 0 5.3	3.5 0 3.5	5.2 0 5.2	5.1 0 5.1	2.5 0 2.5	5.5 0 5.5	7.0 0 7.0	4.9 0 5.7	3.1 0.3 3.4
No. of live fetuses	14.3 1.9 11-18	13.4 3.4 3-18	14.5 2.4 10-19	15.0 1.4 13-17	12.7 4.4 2-19	14.3 2.6 7-17	13.1 3.8 4-18	13.9 1.6 10-16	13.6 1.9 9-16	14.9 1.4 5-20
Male	7.1 2.0 4-12	6.4 2.6 1-14	7.1 2.0 2-12	7.8 1.4 6-10	6.1 2.4 1-11	7.4 1.9 3-11	5.9 2.5 2-9	6.4 2.2 4-10	6.4 1.4 5-10	7.7 1.7 1-13
Female	7.1 2.0 3-11	6.9 2.6 2-12	7.4 2.5 3-13	7.1 1.8 4-11	6.6 2.8 1-11	6.9 2.2 2-10	7.2 3.3 1-12	7.0 2.1 3-10	7.2 1.5 4-9	7.3 0.6 3-13
Sex ratio M/F	1.00	0.93	0.96	1.10	0.91	1.07	0.82	0.99	0.90	1.06
Fetal weight (g)										
Male	3.96 0.49 3.51-5.72	3.79 0.70 3.03-6.60	3.96 0.21 3.57-4.37	3.88 0.21 3.53-4.41	3.96 0.25 3.53-4.52	4.09 0.24 3.64-4.46	4.40 1.02 2.66-6.82	4.02 0.33 3.47-4.68	4.03 0.59 3.27-6.16	3.89 0.17 3.43 4.43
Female	3.70 0.57 2.90-5.71	3.57 0.68 2.51-6.11	3.76 0.23 3.38-4.32	3.65 0.21 3.21-4.03	3.68 0.23 3.26-4.25	3.89 0.22 3.53-4.35	4.10 0.92 2.53-6.46	3.79 0.31 3.32-4.61	3.84 0.52 3.41-5.72	3.71 0.06 3.17-4.38
Placental weight	0.46 0.04 0.37-0.54	0.51 0.09 0.39-0.79	0.48 0.05 0.37-0.60	0.48 0.04 0.40-0.57	0.53 0.16 0.42-1.18	0.50 0.05 0.41-0.62	0.55 0.14 0.44-1.02	0.45 0.05 0.37-0.56	0.49 0.06 0.41-0.57	0.50 0.01 0.43-0.62
External malformation No., % and type		1 (0.4) ^a							1 (0.4) ^b	

a) : Edema b) : Exencephaly, myeloschisis and open eyelid

期投与試験を行ない以下の結果を得た。

1. 雄投与ラットについて、両薬物の高用量群に投与後、一過性の流産、体重増加抑制、肝重量の増加がみられた。
2. 雌投与ラットについて、両薬物の高用量群に投与後、一過性の流産、摂水量の増加がみられた。また、BRL14151Kの高用量群で体重増加抑制がみられた。
3. 交尾率、妊娠率および交配期間には異常は認められなかった。
4. 黄体数、着床数には著変はなく排卵および着床への影響はみられなかった。妊娠末期胎子については、死亡胎子数、生存胎子数、性比および胎盤重量等に投与量に関連した異常はなく、胎子の外表、内臓、骨格にも投与の影響は認められなかった。

以上に示したように両薬物とも、雄の精子形成過程、雌の卵子形成過程、排卵、受精、着床および胎子の発育分化への影響はなく、最大無作用量は BRL14151K で 400 mg/kg、BRL25000 では 1,200 mg/kg と結論づけられた。

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) 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: BRL14151K 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) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Tech., 1, 123 (1926)
- 7) WILSON, J. G.: Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals, "Teratology-principles and techniques", 262~277, University of Chicago Press, Chicago, 1965
- 8) WILCOXON & WILCOX (佐久間 昭訳): 簡便統計手法, 日本レダリー (東京), 1969

REPRODUCTION STUDIES OF BRL14151K AND BRL25000

III. FERTILITY STUDIES IN RATS

TETSUTAKA HIRAKAWA, TAKAO SUZUKI, YOSHIMASA SANO

and KAZUTOSHI TAMURA

Bozo Research Center, Co., Ltd.

YOSHINOBU KOSHIMA, KEN-ICHIRO HIURA and KAZUSHI FUJITA

Beecham Yakuhin K. K.

TERRY L. HARDY

Beecham Pharmaceuticals Research Division

Fertility tests on BRL14151K and BRL25000 were carried out in CRJ:SD rats. BRL14151K (10, 50 and 400 mg/kg) and BRL25000 (30, 150 and 1,200 mg/kg) were given orally to male rats for 63 days and to female rats for 14 days. Males and females treated at the same dose levels were paired and housed together to observe mating and fertility. In females dosing was continued up to Day 7 of pregnancy to study drug effects on implantation, fetal death and development. For both compounds, temporary salivation, inhibition of weight gain, increase in water intake and increase in liver weight were noted in high-dose groups. There were no treatment related effects on mating and pregnancy indices or spermatogenesis, oogenesis, insemination ovulation, implantation, and fetal survival, anomalies (viscera and skeleton), growth and sex ratio.