

AT-2266 の生殖試験 (第5報) イヌにおける胎仔の器官形成期投与試験

西村耕一・椋本健次・寺田芳規・竹中秀子・吉田耕一
大日本製薬株式会社総合研究所

新規合成抗菌薬である AT-2266 の 15, 30, 60 mg/kg を妊娠 14 日から 35 日までビーグル犬に経口投与し、母体および胎仔に及ぼす影響について検討した。

母体では死亡動物の発生はなく、一般症状、妊娠経過、飼料摂取量に投薬の影響は認められなかった。母体の体重が 60 mg/kg 群で妊娠 45 日以降わずかに軽かったが、これは 1 母体で胎仔 8 例中 7 例が死亡し、妊娠期間中体重がほとんど増えなかったことによる。

胎仔では 60 mg/kg 群で体重がわずかに減少した。また、60 mg/kg 群では上述のように胎仔のほとんどが死亡した母体が 1 例あり、胎仔死亡率がわずかに上昇した。外表異常については、対照群で 1 例、60 mg/kg 群で 4 例認められたが、その発生率に有意差はなかった。当研究所のビーグル犬における催奇形性試験でも、対照群で外表異常の発生率が同程度のものを認めている。内臓検査では薬物投与によると考えられる異常の発生は認められなかった。

以上、本試験では AT-2266 の 60 mg/kg で胎仔体重のわずかな減少、胎仔死亡の可能性が示唆されたが、催奇形性作用はないと考える。したがって、本試験の最大無作用量は 30 mg/kg である。

AT-2266 のラットにおける胎仔の器官形成期投与試験¹⁾はすでに報告した。今回、ビーグル犬を用いて胎仔の器官形成期投与試験を実施したので、その結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 被験物質

本試験には AT-2266 の無水物 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid] および 3/2 水和物 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid sesquihydrate] を用いた。^{注)}

2. 使用動物および飼育条件

雌雄のビーグル犬を用いた。雌は日本クレア株式会社を通じて入手した Marshall Research Animals Inc. 産のビーグル犬で、5 ヶ月齢で購入し、7 ヶ月齢以上 (体重 8.2~13.0 kg) で試験に使用した。雄は当研究所で自家繁殖させたビーグル犬で、年齢 2~5 歳の種雄である。

動物は金属製ケージに入れるかまたは鎖でつなぎ、温度 23±3 °C、湿度 40~70%、1 日 12 時間照明 (午前 6 時~午後 6 時) とした動物室で飼育した。飼料にはオリエ

ンタル酵母工業社製犬用固型飼料 DS を使い、これに北越飼料研究所製ドッグミールを少量加え、1 日 1 匹あたり 300 g を与えた。飲料水は水道水を自動給水により自由に摂取させた。

3. 交配方法

発情前期に達し陰出血があらわれた雌について毎日陰垢を検査し、排卵の時期を調べた。排卵日にあたると考えられたときに雌を雄と交尾 (1 日 1 回) させ、交尾は確実な妊娠の成立を図るため、原則として同じ雄と 2 回以上行った。陰垢像から判断して排卵日にあたる日を妊娠 0 日とした。

4. 投与量および投与方法

投与量の設定は、ビーグル犬における 6 ヶ月の慢性毒性試験²⁾の結果を参考にした。慢性毒性試験では 60 mg/kg が最大安全量であって、120 mg/kg で飢餓衰弱による瀕死例が認められている。したがって、高用量に 60 mg/kg を使い、以下公比を 1/2 として中用量に 30 mg/kg、低用量に 15 mg/kg を用いた。投与量は無水物換算で表示した。

AT-2266 の臨床適用経路としては経口投与が予定されていることから、本試験ではネラトシカテールを用いて強制経口投与を行った。AT-2266 を 0.5% sodium carboxymethylcellulose (CMC) 溶液に懸濁し、いずれの用量も 1 回の投与量を 4 ml/kg の体重割合として妊娠 14 日から 35 日までの 22 日間投与した。投薬は 1 日 2

注) 当初、AT-2266 は無水物で検討されたが、3/2 水和物が安定な結晶型であることが判明したので、本試験では昭和 56 年 4 月以降 3/2 水和物を使用した。なお、両物質は投与用薬液 (sodium carboxymethylcellulose 水溶液に懸濁) において理化学的に同等であることが確認されている。

Fig. 1 Body weights of dams

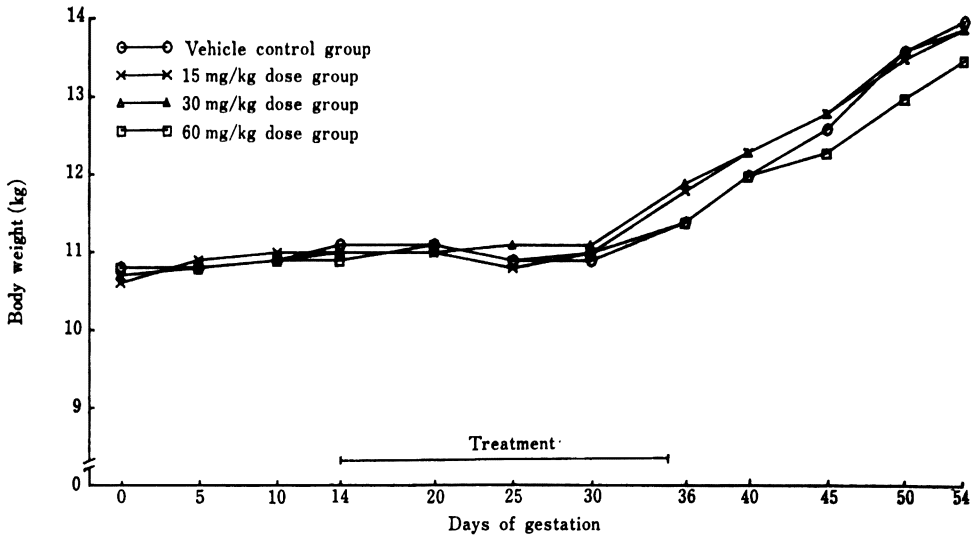
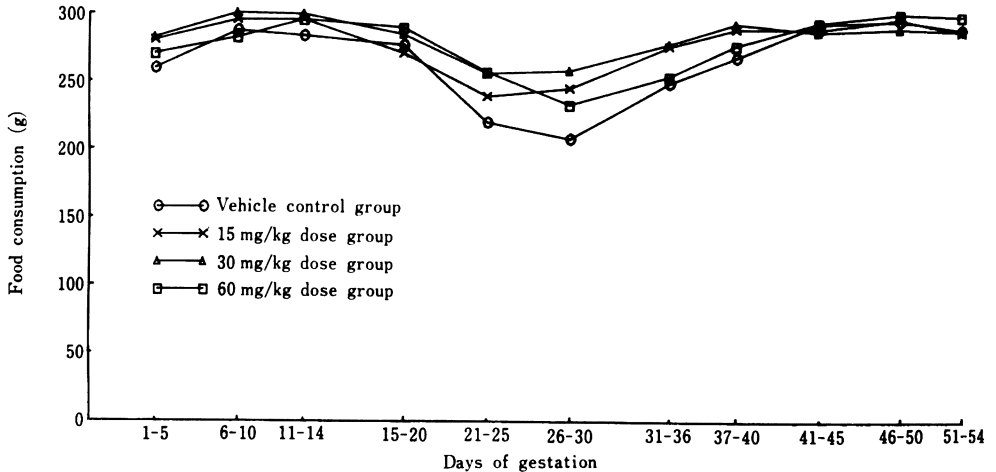


Fig. 2 Food consumption in dams



回の分服とし、妊娠14日の動物の体重を基準とした。対照群の動物には、投薬群と同じ方法で0.5% CMCのみを与えた。

5. 検査方法

各群妊娠母体を7匹とし、一般状態および生死を毎日観察した。流産を見つけるため臍出血の有無を毎日調べ、妊娠期間中、体重測定、飼料摂取量の記録を毎日行った。

妊娠55 ± 1日に Halothane と笑気の混合ガス麻酔下で帝王切開手術を行い、胎仔を取り出した。着床数、吸収胚数、死亡胎仔数、生存胎仔数を調べ、子宮内における吸収胚、死亡胎仔、生存胎仔の分布を記録した。

生存胎仔については個別に体重を測定し、性別、外表異常の有無を調べた。その後、胎仔を剖検して各臓器の存在、位置、形状について観察し、主要臓器の重量を測定した。脳はホルマリン固定後粗大切片として、心臓と腎臓はホルマリン固定後顕微解剖により内部を検査した。

臓器を摘出した胎仔は剥皮後95%アルコールに固定し、Dawson法³⁾で骨格標本を作製して、骨格異常および骨格変異の有無、化骨進行度について検査した。

6. 推計学的処理

平均値の差の検定には Student の t 検定、百分率の差の検定には χ^2 検定または Fisher の直接確率計算法を用

Table 1 Cesarean section data of dams

Dose (mg/kg)	Vehicle control	15	30	60
No. of dams examined	7	7	7	7
No. of implantations (Av. \pm SE)	52 7.4 \pm 0.53	53 7.6 \pm 0.57	45 6.4 \pm 0.48	46 6.6 \pm 0.53
No. of fetal deaths				
Placental remnants and resorptions	3	7	1	6
Dead fetuses	0	0	1	1
Total	3	7	2	7
Fetal deaths/implantations (%)	5.8	13.2	4.4	15.2
No. of live fetuses (Av. \pm SE)	49 7.0 \pm 0.65	46 6.6 \pm 0.57	43 6.1 \pm 0.51	39 5.6 \pm 0.90
Sex ratio (Male/Female)	0.96(24/25)	0.92(22/24)	1.15(23/20)	2.90(29/10)
Fetal body weight (g) (Av. \pm SE)				
Male	278 \pm 16.3	286 \pm 18.7	270 \pm 15.1	250 \pm 18.8
Female	267 \pm 20.6	267 \pm 10.9	253 \pm 12.6	230 \pm 20.0
No. of retarded fetuses (%)	5(10.2)	0	0	8(20.5)

いた。ただし、胎仔に関する項目については、各腹で平均値または百分率を求め、それぞれ Student の t 検定、Mann-Whitney の U 検定を行った。

II. 実験結果

1. 母体に及ぼす影響

1) 死亡動物

試験期間中、母体の死亡例は認められなかった。

2) 一般症状

流産が 60mg/kg 群の 1 例、嘔吐が対照群の 1 例、15 mg/kg 群の 2 例にそれぞれ 1 回観察されただけで、薬物投与による異常症状は認められなかった。また、妊娠期間中に著しい陰道出血はなく、流産の発現はなかった。

3) 体重 (Fig. 1)

60 mg/kg 群で妊娠 45 日以降体重がわずかに軽かったが、いずれの群も母体の体重は順調に増加した。60mg/kg 群の体重が妊娠 45 日以降軽かったのは、この群の 1 母体において胎仔 8 例中 7 例が死亡し、妊娠期間中体重がほとんど増えなかったことによる。

4) 飼料摂取量 (Fig. 2)

飼料摂取量は各投薬群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 胎仔に及ぼす影響

1) 帝王切開所見 (Table 1)

15, 30 mg/kg 群では着床数、胎仔死亡率、生存胎仔

数、胎仔体重、未熟仔数ともに影響は認められなかった。60 mg/kg 群においても着床数および未熟仔数に異常は認められなかった。この群で性が雄に偏った。2 腹で特に偏っていたが、対照群との間に有意は認められなかった。胎仔体重が対照群雄 278 g、雌 267 g に対して、60 mg/kg 群で雄 250g、雌 230g と減少した。また前述のように 1 母体において胎仔 8 例中 7 例が死亡し、胎仔死亡率が 15.2% と上昇した。しかし、60 mg/kg 群の胎仔体重、胎仔死亡率は対照群との間に有意差は認められなかった。また、未熟仔 (対照群の平均胎仔体重の 70% に満たない胎仔) が対照群に 5 例、60 mg/kg 群に 8 例認められたが、その発生率は両群間で有意差はなかった。

2) 胎仔の外表検査所見 (Table 2)

外表異常の胎仔は対照群に 1 例 (2.0%)、60 mg/kg 群に 4 例 (10.3%) 認められた。60mg/kg 群の発生率は高かったが、対照群との間に有意差は認められなかった。15, 30 mg/kg 群では異常胎仔の発生はなかった。

異常の種類としては対照群で尾の異常が 1 例認められ、60 mg/kg で尾の異常が 2 例、外脳症、眼瞼開存、眼球突出、兔唇、口蓋裂が各 1 例認められた。しかし、これら各異常の発生率は 60mg/kg 群と対照群との間に有意差はなく、外脳症、眼瞼開存、眼球突出、口蓋裂については 1 例の胎仔に合併してみられたものであった。

3) 胎仔の内臓検査所見 (Table 2)

内臓異常の胎仔が対照群に4例(8.2%), 15mg/kg群に4例(8.7%), 30mg/kg群に6例(14.0%), 60mg/kg群に5例(12.8%)認められた。しかし、異常胎仔の発生率は各投薬群と対照群との間に有意差は認められなかった。異常の種類では胸腺の頸部残留, 心室中隔欠損, 心肥大, 肺動脈弁の肥厚, 大動脈から発する左総頸動脈, 冠状動脈口過剰, 腎臓欠損, 腎盂拡張が認められたが, これら個々の発生率も各投薬群と対照群との間に有意差はなかった。

4) 胎仔の臓器重量 (Table 3)

体重に対する相対重量を求めた胎仔の臓器重量では, いずれの投薬群も異常は認められなかった。

5) 胎仔の骨格検査所見 (Table 4)

尾の異常, 外脳症, 兔唇, 口蓋裂の外表異常に随伴する骨格異常(尾椎の変形と癒合, 前頭骨, 頭頂骨, 後頭骨の欠損, 切歯骨の欠損, 口蓋骨の癒合不全)が認められた以外, 胸椎体の癒合, 肋骨の癒合が60mg/kg群に各1例認められただけで骨格異常に関して特に問題はなかった。

骨格変異とした14肋骨, 胸骨核の融合不全, 肋軟骨の

癒合, 8腰椎についても, 各投薬群と対照群との間で発生率に有意差は認められなかった。

化骨進行度においても異常は認められなかった。30mg/kg群で尾椎の化骨核数が有意に減少したが, 用量依存性がないことから, 偶発的なものと考えられる。

III. 考 察

AT-2266の15, 30, 60mg/kgをビーグル犬に妊娠14日から35日まで経口投与し, 母体および胎仔に及ぼす影響について検討した。

母体では一般症状, 妊娠経過, 飼料摂取量に薬物投与の影響は認められなかった。また, 死亡動物の発生もなかった。母体の体重が60mg/kg群で妊娠45日以降わずかに軽かったが, これは60mg/kg群の1母体において胎仔8例中7例が死亡し, 妊娠期間中体重がほとんど増えなかったことによるもので, 母体自身の毒性による影響でないと考えられる。

胎仔では60mg/kg群で体重がわずかに減少した。この体重減少は対照群と比較して有意差はなかったが, 用量依存性の傾向がみられることから, 薬物投与による影響が考えられる。60mg/kg群では上述のように1母体

Table 2 External and visceral examinations of fetuses

Dose (mg/kg)	Vehicle control	15	30	60
External				
No. of fetuses examined	49	46	43	39
No. of fetuses with abnormalities (%)	1(2.0)	0	0	4(10.3)
Kinky tail or short and kinky tail	1	0	0	2
Exencephaly	0	0	0	1
Open eyelid	0	0	0	1
Exophthalmia	0	0	0	1
Cleft palate	0	0	0	1
Cleft lip	0	0	0	1
Visceral				
No. of fetuses examined	49	46	43	39
No. of fetuses with abnormalities (%)	4(8.2)	4(8.7)	6(14.0)	5(12.8)
Persistence of cords of thymic tissue	1	0	3	0
Ventricular septal defect	0	1	0	1
Cardiomegaly	1	0	0	0
Thickening of the pulmonary valves	0	0	1	0
Left common carotid artery arising from the aortic arch	1	0	0	0
Supernumerary coronary orifice	2	3	2	3
Absence of the kidney	0	0	0	1
Dilatation of the renal pelvis	0	0	0	1

Table 3 Organ weights of fetuses

Dose (mg/kg)	Vehicle control	15	30	60
Male				
No. of litters examined	7	7	7	7
No. of fetuses examined	24	22	23	28
Body weight (g) (Av. \pm SE)	278 \pm 16.3	286 \pm 18.7	270 \pm 15.1	252 \pm 17.7
Organ weight (Av. \pm SE)				
Heart (g%) ^a	0.63 \pm 0.018	0.67 \pm 0.014	0.68 \pm 0.018	0.65 \pm 0.025
Lungs (g%)	2.71 \pm 0.085	2.81 \pm 0.096	2.60 \pm 0.128	2.86 \pm 0.082
Liver (g%)	6.59 \pm 0.243	6.69 \pm 0.153	6.68 \pm 0.177	6.69 \pm 0.213
Kidneys (g%)	0.96 \pm 0.066	1.06 \pm 0.033	0.93 \pm 0.020	0.98 \pm 0.040
Spleen (g%)	0.27 \pm 0.024	0.32 \pm 0.036	0.33 \pm 0.019	0.29 \pm 0.031
Submaxillary glands (g%)	0.13 \pm 0.008	0.14 \pm 0.005	0.13 \pm 0.005	0.13 \pm 0.005
Brain (g%)	1.94 \pm 0.048	2.03 \pm 0.050	1.94 \pm 0.043	1.98 \pm 0.060
Pancreas (g%)	0.15 \pm 0.013	0.16 \pm 0.013	0.15 \pm 0.011	0.16 \pm 0.011
Stomach (g%)	0.36 \pm 0.017	0.37 \pm 0.017	0.35 \pm 0.008	0.34 \pm 0.010
Intestine (g%)	3.31 \pm 0.221	3.28 \pm 0.145	3.17 \pm 0.112	3.27 \pm 0.079
Thymus (g%)	0.33 \pm 0.013	0.35 \pm 0.012	0.36 \pm 0.024	0.35 \pm 0.021
Thyroids (mg%) ^b	21 \pm 1.5	20 \pm 0.6	22 \pm 1.1	21 \pm 0.8
Adrenals (mg%)	15 \pm 1.0	17 \pm 0.9	16 \pm 0.7	16 \pm 1.1
Testes (mg%)	7 \pm 0.3	8 \pm 0.6	7 \pm 0.3	7 \pm 0.5
Female				
No. of litters examined	7	7	7	5
No. of fetuses examined	25	24	20	10
Body weight (g) (Av. \pm SE)	267 \pm 20.6	267 \pm 10.9	253 \pm 12.6	230 \pm 20.0
Organ weight (Av. \pm SE)				
Heart (g%) ^a	0.66 \pm 0.015	0.69 \pm 0.018	0.68 \pm 0.020	0.71 \pm 0.039
Lungs (g%)	2.64 \pm 0.109	2.80 \pm 0.089	2.52 \pm 0.245	2.71 \pm 0.101
Liver (g%)	6.57 \pm 0.150	6.48 \pm 0.216	6.93 \pm 0.260	6.57 \pm 0.139
Kidneys (g%)	0.99 \pm 0.072	1.05 \pm 0.053	0.93 \pm 0.031	1.05 \pm 0.037
Spleen (g%)	0.27 \pm 0.022	0.29 \pm 0.028	0.31 \pm 0.020	0.28 \pm 0.018
Submaxillary glands (g%)	0.13 \pm 0.008	0.13 \pm 0.005	0.13 \pm 0.005	0.14 \pm 0.005
Brain (g%)	2.01 \pm 0.082	2.10 \pm 0.077	1.97 \pm 0.048	2.16 \pm 0.075
Pancreas (g%)	0.14 \pm 0.019	0.15 \pm 0.012	0.14 \pm 0.010	0.16 \pm 0.007
Stomach (g%)	0.37 \pm 0.015	0.36 \pm 0.011	0.37 \pm 0.012	0.37 \pm 0.005
Intestine (g%)	3.17 \pm 0.161	3.35 \pm 0.129	3.11 \pm 0.116	3.20 \pm 0.070
Thymus (g%)	0.36 \pm 0.023	0.36 \pm 0.012	0.35 \pm 0.029	0.37 \pm 0.027
Thyroids (mg%) ^b	23 \pm 1.2	20 \pm 0.8	23 \pm 1.7	21 \pm 1.4
Adrenals (mg%)	17 \pm 1.2	18 \pm 0.8	17 \pm 1.2	16 \pm 1.4
Ovaries (mg%)	16 \pm 0.8	18 \pm 0.6	17 \pm 0.8	18 \pm 1.2

a: g/100g body weight

b: mg/100g body weight

Table 4 Skeletal examinations of fetuses

Dose (mg/kg)	Vehicle control	15	30	60
No. of fetuses examined	49	46	43	39
No. of fetuses with abnormalities (%)	0	0	0	5(12.8)
Absence of frontal, parietal and supraoccipital bones	0	0	0	1
Arrested fusion of the palatal bone	0	0	0	1
Absence of incisive bone	0	0	0	1
Fusion of thoracic vertebral centra	0	0	0	1
Fusion of the 5th and 6th ribs	0	0	0	1
Fusion and/or deformity of caudal vertebrae	0	0	0	2
No. of fetuses with variations (%)	11(22.4)	4(8.7)	9(20.9)	7(17.9)
14th ribs	0	1	0	0
Incomplete fusion of the 8th sternbrae	10	2	9	6
Fusion of costal cartilage	1	0	0	0
8 lumbar vertebrae	0	2	1	1
Maturation of ossification				
Delayed ossification				
Sternebrae	2	0	0	2
Pubic centers	16	2	3	4
Astragalar centers	16	9	15	12
No. of ossified caudal vertebrae (Av. \pm SE)	19.4 \pm 0.08	19.2 \pm 0.14	18.7 \pm 0.17**	19.2 \pm 0.18

** : Significantly different from control at $P < 0.01$

の胎仔 8 例中 7 例が死亡し、このため胎仔死亡率がわずかに上昇した。この胎仔死亡率は対照群との間に有意差はなかったが、当研究所で過去に行ったビーグル犬での催奇形性試験では、対照群の背景データにおいて母体あたりの胎仔死亡率が 70% を越えることはなかったことから、60 mg/kg 群の上記の胎仔死亡については投薬との関連性が示唆される。

外表異常の胎仔は対照群 1 例 (2.0%) に対して 60 mg/kg 群 4 例 (10.3%) とわずかに多かった。しかし、当研究所のビーグル犬における催奇形性試験では対照群において外表異常の発生率が 9.1% のことがあり、また、今回の試験で 60 mg/kg 群と対照群の間の発生率に有意差は認められなかった。異常の種類としては対照群で尾の異常 1 例、60 mg/kg 群で尾の異常 2 例、外脳症、眼瞼開存、眼球突出、兔唇、口蓋裂各 1 例が認められたが、個々の異常の発生率に有意差は認められなかった。当研究所のビーグル犬における対照群の外表異常としては尾の異常が認められている。江崎ら⁹はビーグル犬の無処置

母体について自然発生の外表異常を検査した結果、曲尾が 1.8%、臍ヘルニアと多指がそれぞれ 0.4% であったと報告している。また、江崎ら⁹は催奇形性試験の対照群に外表異常として尾の異常と認めている。Robertson ら¹⁰は催奇形性試験の対照群に外表異常として尾の異常を 3.5% に認めている。したがって 60 mg/kg 群で発生した尾の異常と兔唇はビーグル犬で自然発生する外表異常の種類に含まれると考える。一方、外脳症、眼瞼開存、眼球突出、口蓋裂については 1 例の胎仔に合併して発生したことから、偶発的にあらわれた可能性が考えられる。内臓異常としては胸腺の頸部残留、心室中隔欠損、心肥大、肺動脈弁の肥厚、大動脈から発する左総頸動脈、冠状動脈口過剰、腎臓欠損、腎盂拡張が認められたが、個々の異常の発生数や内臓異常を持つ胎仔の発生数に有意差は認められず、投薬によると思われる影響はなかった。骨格異常においても上記の外表異常に伴う骨格異常以外特記すべき所見はなく、骨格変異や化骨進行度でも著変は認められなかった。

以上、本試験では AT-2266 の 60 mg/kg で胎仔体重のわずかな減少、胎仔死亡の可能性が示唆されたが、催奇形性作用はないと考える。したがって、本試験の最大無作用量は 30 mg/kg である。

(本試験は昭和55年12月から56年10月の間に実施した。)

文 献

- 1) 寺田芳規, 西村耕一, 小柴正一, 鶴田耕右, 井村義明, 吉岡真智子, 吉田耕一: AT-2266の生殖試験(第3報), ラットにおける胎仔の器官形成期投与試験. *Chemotherapy* 32 (S-3): 301~315, 1984
- 2) 仙田博美, 里村州久, 佐藤義考, 竹本勇一, 大西久美雄, 松岡信男, 吉田耕一: AT-2266の毒性的研究, 第4報, イヌにおける6カ月の慢性毒性試験. *Chemotherapy* 32 (S-3): 242~278, 1984
- 3) DAWSON, A.B.: A note on the staining of the skeleton on cleared specimens with alizarin red S. *Stain Technol.* 1: 123~124, 1926
- 4) 江崎孝三郎, 平山三船, 中山太郎, 岩城隆昌, 谷本義文, 柳田知司: ビーグルを用いる薬物催奇形性試験法に関する研究. 実中研, 前臨床研究報 6: 37~53, 1980
- 5) 江崎孝三郎, 野村岳之, 岩城隆昌: 妊娠ビーグルにおける Cefmetazole (CS-1170) 静脈内投与による催奇形性試験. 実中研, 前臨床研究報 6: 289~292, 1980
- 6) ROBERTSON, R.T.; H.L. ALLEN & D.L. BOKELMAN: Aspirin: Teratogenic evaluation in the dog. *Teratology* 20: 313~320, 1979

REPRODUCTION STUDIES OF AT-2266 (5) TERATOGENICITY STUDY IN DOGS

KOICHI NISHIMURA, KENJI MUKUMOTO, YOSHIKI TERADA,
HIDEKO TAKENAKA and KOUICHI YOSHIDA
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

The purpose of this study was to evaluate the effects of AT-2266, a new antibacterial agent, on the dams and their fetuses in beagle dogs. AT-2266 was administered by gavage to pregnant animals at doses of 15, 30 and 60 mg/kg/day on days 14 through 35 of gestation.

No maternal deaths occurred during the study. Physical sign, pregnancy and food consumption were not affected by treatment. Maternal body weight was slightly decreased in the 60 mg/kg dose group on and after day 45 of gestation because one 60 mg/kg dose group dam had fetal deaths (7 of 8 fetuses died in the uterus) and did not put on weight during gestation.

Fetal body weight was slightly decreased in the 60 mg/kg dose group. At 60 mg/kg, slight increase of fetal mortality was observed because one dam in that group had intrauterine fetal death as mentioned above.

One control and four 60 mg/kg dose group fetuses had external abnormalities. The abnormalities, however, were not considered to be related to treatment since the incidence was not significantly different between the two groups and was similar to that in one of the previous dog teratogenicity studies conducted in our laboratory. No drug-related visceral or skeletal abnormalities were observed in fetuses.

Therefore, it is concluded that AT-2266 is not teratogenic to dogs at 60 mg/kg. A dose of 30 mg/kg is the maximum non-toxic dose in this study.