

## Potassium clavulanate および BRL 28500 の生殖試験 (第3報)

ラットにおける周産期および授乳期投与試験

藤田 和司・西岡佳隆・倉片康雄・幸嶋祥亘

ビーチャム薬品株式会社

島津 宏・中村 厚・石田 茂

株式会社ボゾリサーチセンター

JOHN A. BALDWIN

Beecham Pharmaceuticals Research Division

Crj: CD (SD) ラットを用いて, CVA-K の 25, 50, 75 および 150 mg/kg, BRL 28500 の 200, 400, 800 および 1,200 mg/kg を周産期および授乳期に静脈内投与し, 母体ならびに出生仔におよぼす影響を検討した。

母体への影響として, CVA-K の 75 mg/kg 以上で肝重量の増加が認められた。また, BRL 28500 の 800 mg/kg 以上の投与群で妊娠末期の体重増加抑制, 1,200 mg/kg 投与群で盲腸の拡張および肝重量の増加が認められた。

妊娠維持, 妊娠期間, 分娩および哺育状態には両検体の各投与群で異常は認められなかった。

出生仔の生後発育には両検体の各投与群で異常は認められず, 機能検査, Open field 試験, 複式水T迷路試験, 条件回避反応試験および生殖能力試験のいずれにおいても検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より, 本実験条件下における母体の一般毒性学的な無影響量は CVA-K では 50 mg/kg, BRL 28500 では 400 mg/kg, 母体の分娩・哺育に関する無影響量は CVA-K では 150 mg/kg, BRL 28500 では 1,200 mg/kg, 出生仔に対する無影響量は CVA-K で 150 mg/kg, BRL 28500 で 1,200 mg/kg と考えられる。

BRL 28500 は,  $\beta$ -lactamase 阻害作用を有する clavulanic acid (CVA) のカリウム塩 (CVA-K) と ticarcillin (TIPC) を遊離酸重量として 1:15 に配合した抗生物質である。

配合成分の一つである TIPC については, 生殖試験の成績がすでに報告されている<sup>1)</sup>。今回, 著者らは CVA-K および BRL 28500 を, 周産期および授乳期のラットに静脈内投与し, 母体ならびに出生仔におよぼす影響を検討したので報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 検体

CVA-K は生理食塩液, BRL 28500 は注射用蒸留水に溶解させ, 投与液量が各群とも 5 ml/kg となるように用時調製した。なお, BRL 28500 については, 投与液の浸透圧を生理的浸透圧により近づけるために注射用蒸留水を溶媒として用いた。

## 2. 使用動物および飼育条件

雌雄の Crj: CD(SD) ラット (日本チャールス・リバ

ー) を 11 週齢で購入後, 1 週間予備飼育したのち使用した。固型飼料 (NMF, オリエンタル酵母) および水道水を自由に摂取させ, 飼育室は温度  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 10\%$  に保った。

妊娠動物を得るため, 雌雄を 1:1 で終夜同居させた。翌朝, 腔栓形成または腔垢中に精子が確認された雌を交尾確認動物とみなし, この日を妊娠 0 日とした。なお, 1 群の妊娠動物数は 20~22 匹とした。

## 3. 投与方法

投与期間は妊娠 17 日より分娩 21 日までとし, 1 日 1 回, 投与速度 0.05 ml/sec で静脈内投与した。対照群には浸透圧を考慮して両検体とも生理食塩液を検体と同様に投与した。

## 4. 投与量の設定

投与量は, 両検体とも, それぞれの器官形成期投与試験<sup>2)</sup>と同用量とした。すなわち, CVA-K では 150 mg/kg, BRL 28500 では 1,200 mg/kg をそれぞれ最高用量に設定し, 以下の投与量は, CVA-K では 75, 50 およ

び 25 mg/kg, BRL 28500 では 800, 400 および 200 mg/kg とした。なお、投与量はすべて遊離酸として示した。

## 5. 検査方法

### 1) 母体 (F<sub>0</sub>) の観察

分娩後 21 日まで一般状態を毎日観察し、体重および摂餌量は妊娠 17 日から分娩後 4 日までは毎日、その他の期間は 3 ないし 4 日毎に測定した。妊娠母体は全例自然分娩させて、分娩状態の観察および妊娠期間の算出を行った。さらに出生仔を離乳時 (分娩 21 日) まで哺育させて、この間の哺育行動を観察した。母体は哺育期間終了時に屠殺して主要臓器の肉眼的観察、脳、心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓および卵巣の重量測定を行い、さらに、着床痕数を調べた。

### 2) 出生仔 (F<sub>1</sub>) の観察

分娩後、出産仔数、死産仔数、性別、外表異常の有無を観察し、体重を測定した。生後 4 日に 1 腹仔が 10 匹を越える母体については哺育仔数を 10 匹に調整し、残余の仔は屠殺し剖検した。

出生仔について、体重を生後 21 日 (離乳時) まで週 2 回、生後 21 日以降 70 日まで週 1 回測定するとともに、一般状態および発育分化を観察した。発育分化の指標として、耳介開展、腹部毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降および腔開口を観察した。

生後 21 日の離乳時に、1 腹当たり雌雄各 3 匹の仔を無作為に残した。それ以外は屠殺剖検後、70% ethanol で固定して Dawson 法<sup>3)</sup> に準じて alizarin red S 染色による骨格透明標本を作成し、骨格異常、骨格変異、骨化進行度 (胸骨核、中手骨、中足骨および仙尾椎) を調べた。生後 21 日の出生仔数の調整後、機能検査として各腹当たり雌雄各 1 匹について、IRWIN の多元観察法、回

転籠法、傾斜板法、回転棒法、瞳孔反射および耳介反射により一般状態、自発運動量、筋力および視覚・聴覚反射を検査した。

生後 21 日に機能検査を行った動物について、行動試験として 8 週齢で Open field 試験、9 週齢で複式水 T 迷路試験、10 週齢でシャトルボックスによる条件回避反応試験を行い、情動性および学習能力を検査した。行動試験に用いた動物は、試験終了後に屠殺剖検した。

生殖能力試験は、行動試験に用いなかった雌雄各 2 匹について 10 週齢で行った。交尾の確認された雌は自然分娩させ、妊娠期間の算出を行い、生産仔数、死産仔数、性別および外表異常の有無を観察し、体重を測定した。さらに、分娩後 4 日まで哺育させ、母仔ともに屠殺剖検し、母体の着床痕数より出生率を算出した。

## 6. 統計処理

性比、交尾率、妊娠率、分化状態については  $\chi^2$  検定、その他の数値については KRUSKAL-WALLIS の H 検定を行い、群間に差を認めた場合のみ対照群との多重比較<sup>4)</sup> を行った。

## II. 実験結果

### 1. 母体および仔の影響

#### 1) 一般状態

CVA-K の 75 mg/kg 投与群の 1 例が妊娠 22 日の分娩中に死亡したが、BRL 28500 では死亡例は観察されなかった。また、一般状態には両検体の投与に起因すると考えられる異常はみられなかった。

#### 2) 体重および摂餌量 (Fig. 1~4)

CVA-K では、哺育期間中の体重において、150 mg/kg 投与群は対照群に比べて低く推移したが有意差は認められなかった。この他には、体重および摂餌量に特記すべき変化はみられなかった。

Fig. 1 Changes of body weight in rat dams treated intravenously with CVA-K

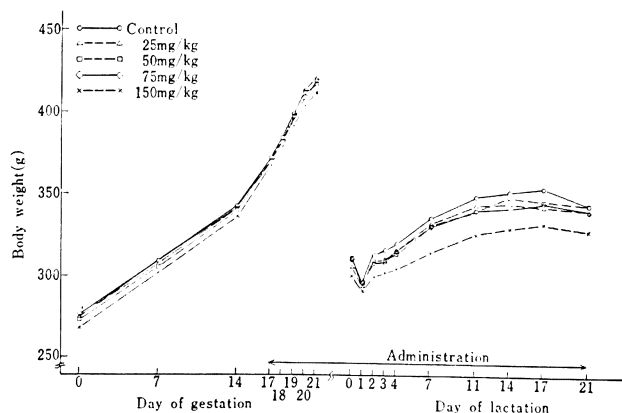


Fig. 2 Changes of food consumption in rat dams treated intravenously with CVA-K

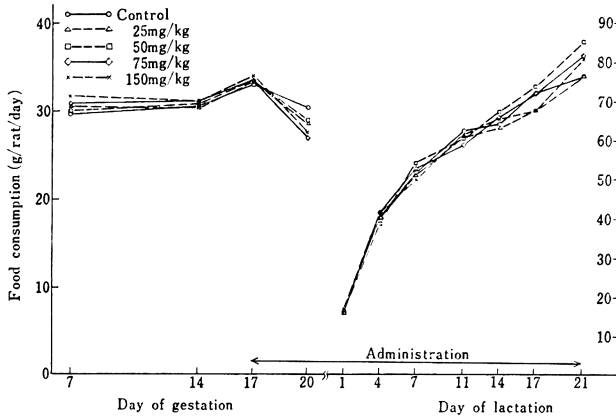


Fig. 3 Changes of body weight in rat dams treated intravenously with BRL 28500

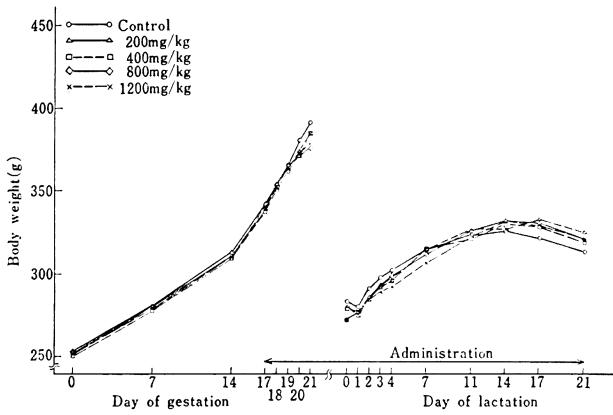


Fig. 4 Changes of food consumption in rat dams treated intravenously with BRL 28500

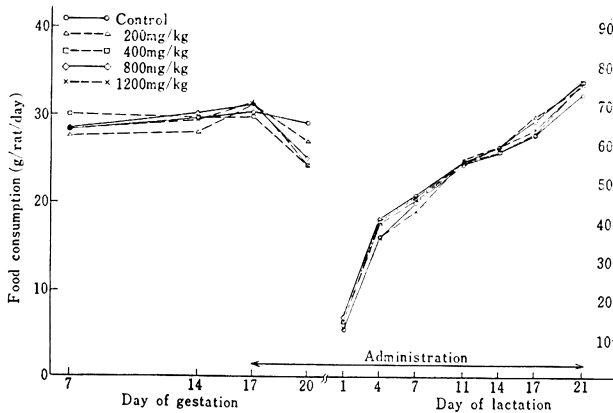


Table 1 Effects of CVA-K on F<sub>1</sub> rat offspring from dams treated intravenously with CVA-K

Dose (mg/kg)	Control	25	50	75	150
No. of pregnant females	22	22	22	22 <sup>c1</sup>	22
No. of females delivered of live offspring	22	22	22	21	22
Gestation length (Day)	21.8±0.5	21.9±0.4	21.8±0.4	21.9±0.4	21.9±0.4
No. of implants	14.9±3.3	15.7±1.9	15.4±1.7	14.3±3.3	16.3±1.5
No. of still born (Total)	10	5	4	4	5
No. of live born	13.6±3.4	14.7±2.1	14.5±1.9	13.9±3.1	14.3±1.6
Sex ratio (Male/Female)	1.03	1.02	0.99	1.03	0.91
Body weight of offspring at birth (g)					
Male	6.3±0.6	6.3±0.4	6.2±0.5	6.3±0.6	6.2±0.4
Female	5.9±0.5	5.8±0.4	5.9±0.5	6.0±0.6	5.8±0.3
No. of offspring with external abnormality (%) <sup>a1</sup>	1 (0.3) <sup>a1</sup>	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3) <sup>c1</sup>	0 (0.0)
Live birth index (%) <sup>b1</sup>	91.4	93.4	93.8	96.7	93.5

<sup>a1</sup>: (No. of offspring with external abnormality/No. of live born offspring) × 100

Mean ± S.D.

<sup>b1</sup>: (No. of live born/No. of implants) × 100<sup>c1</sup>: One animal died on Day 22 of gestation due to dystocia<sup>a2</sup>: Absence of tail<sup>c2</sup>: Kinked tailTable 2 Effects of BRL28500 on F<sub>1</sub> rat offspring from dams treated intravenously with BRL28500

Dose (mg/kg)	Control	200	400	800	1200
No. of pregnant females	22	20	20	20	20
No. of females delivered of live offspring	22	20	20	20	20
Gestation length (Day)	22.0±0.2	21.9±0.4	21.9±0.4	22.0±0.3	22.0±0.2
No. of implants	14.7±2.5	15.3±2.7	14.7±3.1	15.1±1.5	15.9±2.6
No. of still born (Total)	20	2	1	1	5
No. of live born	13.1±3.5	13.5±3.1	13.4±3.3	13.9±1.5	14.1±2.4
Sex ratio (Male/Female)	0.96	0.92	1.00	0.92	0.87
Body weight of offspring at birth (g)					
Male	6.1±0.4	6.0±0.7	6.0±0.6	5.9±0.4	5.7±0.6
Female	5.8±0.4	5.7±0.6	5.7±0.5	5.5±0.4	5.4±0.6
No. of offspring with external abnormality (%) <sup>a1</sup>	1 (0.3) <sup>c1</sup>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.4) <sup>d1</sup>
Live birth index (%) <sup>b1</sup>	88.9	87.9	91.2	92.1	89.0

<sup>a1</sup>: (No. of offspring with external abnormality/No. of live born offspring) × 100

Mean ± S.D.

<sup>b1</sup>: (No. of live born/No. of implants) × 100<sup>c1</sup>: Subcutaneous hematoma<sup>d1</sup>: Omphalocele

BRL 28500 では、妊娠期間中の体重において、800 mg/kg 以上の投与群では妊娠末期に有意な増加抑制がみられた。妊娠期間中の摂餌量において、妊娠末期にすべての投与群で減少傾向がみられたが、有意差は認められなかった。哺育期間中の体重および摂餌量は、各投与群とも対照群と同程度であった。

### 3) 離乳時の剖検および臓器重量

剖検所見では、CVA-K の各投与群に異常は認められず、BRL 28500 の 1,200 mg/kg 投与群で盲腸の拡張が 20 例中 5 例に認められただけであった。

臓器重量では、CVA-K の 75 mg/kg 以上および BRL 28500 の 1,200 mg/kg の投与群で有意な肝重量の増加が認められた。

### 2. 分娩および哺育におよぼす影響 (Table 1, 2)

分娩状態の観察では、CVA-K の 75 mg/kg 投与群で妊娠 22 日に分娩中の死亡が 1 例みられた。BRL 28500

投与群では分娩状態に異常は観察されなかった。BRL 28500 の対照群で死産仔数が多くみられたが、これは同群に死産仔率 94.1% という母体が 1 例含まれていたためであり、両検体の投与群には異常は認められなかった。

この他、妊娠期間、着床痕数、生産仔数、性比、出生率、外表異常の出現頻度および体重に両検体とも対照群と各投与群との間で有意差は認められなかった。

哺育行動には、両検体の投与群とも異常は認められなかった。

### 3. 出生仔 ( $F_1$ ) の生後発育におよぼす影響 (Fig. 5~8)

CVA-K では、25 mg/kg 投与群の雌および 150 mg/kg 投与群の雌雄の体重は、生後 56 あるいは 63 日以降、対照群に比べ有意に低値を示した。一方、BRL 28500 では、各投与群とも異常は認められなかった。

Fig. 5 Changes of body weight in male offspring ( $F_1$ ) from dams treated intravenously with CVA-K

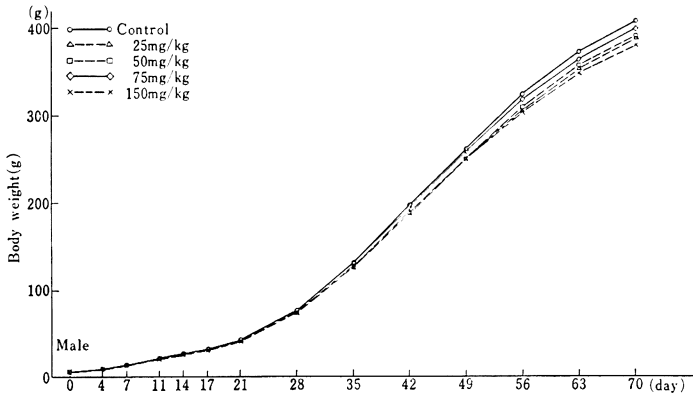


Fig. 6 Changes of body weight in female offspring ( $F_1$ ) from dams treated intravenously with CVA-K

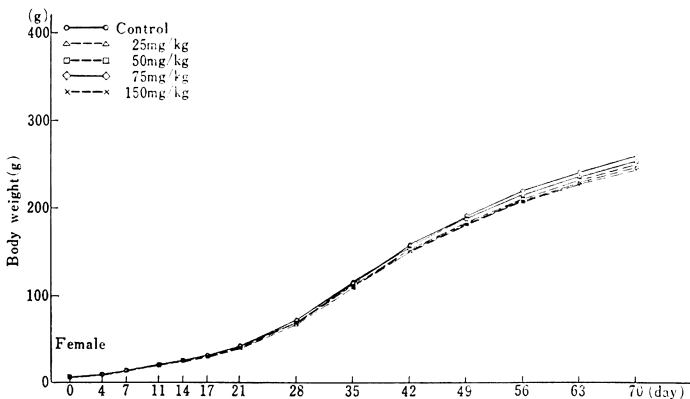


Fig. 7 Changes of body weight in male offspring ( $F_1$ ) from dams treated intravenously with BRL 28500

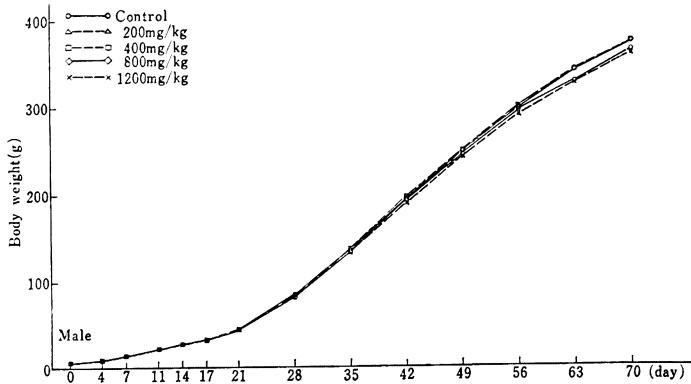
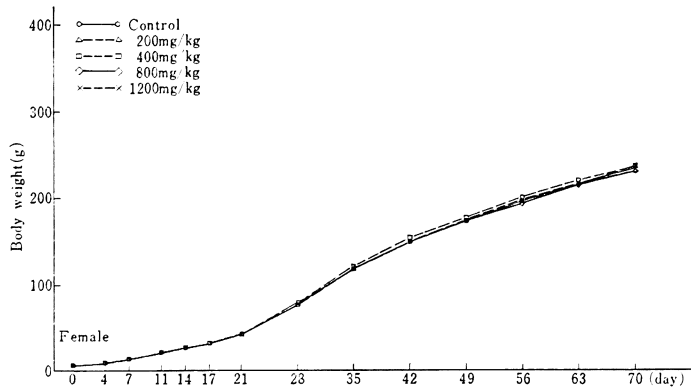


Fig. 8 Changes of body weight in female offspring ( $F_1$ ) from dams treated intravenously with BRL 28500



出生仔の生後4日生存率および離乳率には、両検体の対照群と各投与群の間に有意差は認められず、発育分化にも異常は認められなかった。

生後4日ならびに21日の剖検所見および離乳時の骨格観察では、両検体ともに投与によると思われる異常は認められなかった。

#### 4. 出生仔 ( $F_1$ ) の機能および行動におよぼす影響

##### 1) 機能検査

一般状態、自発運動、筋力、視覚および聴覚の検査には両検体の投与群とも異常は認められなかった。

##### 2) 行動試験

Open field 試験、複式水T迷路試験および条件回避反応試験において、両検体の各投与群とも検体投与によると思われる異常は認められなかった。

#### 5. 出生仔 ( $F_1$ ) の生殖能力におよぼす影響

出生仔 ( $F_1$ ) の生殖能力は、両検体のいずれの投与群

も90%以上の交尾率および92.1~100%の受胎率を示し良好であった。

また、出産率、妊娠期間、着床痕数、生産仔数、死産仔数、性別、出生率、外表異常の出現頻度、体重および生後4日生存率にも両検体とも対照群と各投与群の間に有意差は認められなかった。

### III. 総括および考察

Crj: CD(SD) ラットを用いて、CVA-Kの25, 50, 75および150 mg/kg, BRL 28500の200, 400, 800および1,200 mg/kgを周産期および授乳期に静脈内投与し、母体ならびに出生仔におよぼす影響を検討した。

母体の一般状態には両検体投与に起因すると思われる異常はみられなかった。体重の推移では、CVA-Kには異常は認められなかったが、BRL 28500の800 mg/kg以上の投与群では妊娠末期に体重増加抑制が認められた。摂餌量には、両検体とも顕著な異常は認められな

った。離乳時の剖検所見では、CVA-K には異常はみられず、BRL 28500 の 1,200 mg/kg 投与群で盲腸の拡張がみられた。抗生物質投与による盲腸の拡張はしばしば観察され、BRL 28500 の配合成分である TIPC でも報告されている<sup>4)</sup>。また、離乳時の臓器重量では、CVA-K の 75 mg/kg 以上および BRL 28500 の 1,200 mg/kg 投与群で肝重量の増加がみられ、これは亜急性毒性試験<sup>5)</sup>においても認められた変化であった。

分娩状態については、CVA-K の 75 mg/kg 投与群で分娩中の死亡が 1 例みられたが、この他に流産あるいは難産は認められず、さらに高用量の 150 mg/kg 投与群にも何ら異常が認められないことから検体投与の影響とは考えられなかった。BRL 28500 では分娩状態に何ら異常は認められなかった。また、分娩時の各観察項目にも両検体の投与による影響は認められなかった。さらに、母体の哺育行動にも異常は認められなかった。

出生仔 (F<sub>1</sub>) では、生後 4 日生存率および離乳率は良好で両検体の投与による影響は認められなかった。また、離乳時の剖検および骨格観察でも両検体の投与によると考えられる異常は認められなかった。体重について、CVA-K の 25 mg/kg 投与群の雌および 150 mg/kg 投与群の雌雄では低値が生後 56 あるいは 63 日以降に認められたが、検体投与終了より 5 ないし 6 週後に見られたことおよびその間の発育分化、機能検査には異常が認められないことより検体投与との関連性は低いと考えられた。

発育分化、離乳時の機能検査において両検体の投与の影響は認められず、さらに情動性ならびに学習能力を指標とした行動試験においても異常は認められなかった。

また、生殖能力試験においても交尾率、受胎率は良好で両検体の投与による影響は認められなかった。

以上、ラットの周産期および授乳期に、CVA-K あるいは BRL 28500 を静脈内投与したところ、CVA-K では母体の肝重量の増加が 75 mg/kg 以上で認められ、BRL 28500 では母体の体重増加抑制が 800 mg/kg 以上で、盲腸の拡張および肝重量の増加が 1,200 mg/kg 投与群で認められた。しかし、母体の分娩および哺育、出生仔の発育、行動、機能および生殖能力には検体投与の影響は認められなかった。

従って、本実験条件下における母体の一般毒性学的な無影響量は CVA-K では 50 mg/kg、BRL 28500 では 400 mg/kg、母体の分娩・哺育に関する無影響量は CVA-K では 150 mg/kg、BRL 28500 では 1,200 mg/kg、出生仔に対する無影響量は CVA-K で 150 mg/kg、BRL 28500 で 1,200 mg/kg と考えられる。

#### 文 献

- 1) 福原幸輝, 江見義明, 岩波黄葵, 藤井登志之, 古川 剛, 渡辺信夫: Ticarcillin sodium の毒性試験。基礎と臨床 12: 556~576, 1978
- 2) 藤田和司, 西岡佳隆, 倉片康雄, 幸嶋祥亘, 中村厚, 石田 茂, JOHN A. BALDWIN: Potassium clavulanate および BRL 28500 の生殖試験 (第 2 報) ラットにおける器官形成期投与試験。Chemotherapy, 34(S-4): 142~152, 1986
- 3) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 4) HOLLANDER, M. & D. A. WOLF: KRUSKAL-WALLIS and JONCKHEERE test. Nonparametric statistical method (WILEY, J.) New York, pp. 114~132, 1973
- 5) 倉片康雄, 他: Potassium clavulanate および BRL 28500 の急性毒性および亜急性毒性試験。Chemotherapy, 34(S-4): 69~95, 1986

## REPRODUCTION STUDIES OF POTASSIUM CLAVULANATE AND BRL 28500

### III. PERINATAL AND POSTNATAL STUDIES IN RATS

KAZUSHI FUJITA, YOSHITAKA NISHIOKA, YASUO KURAKATA and YOSHINOBU KOSHIMA  
Beecham Yakuhin K. K.

HIROSHI SHIMAZU, ATSUSHI NAKAMURA and SHIGERU ISHIDA  
Bozo Research Center, Co., Ltd.

JOHN A. BALDWIN  
Beecham Pharmaceuticals Research Division

Potassium clavulanate (CVA-K) at 25, 50, 75 and 150 mg/kg or BRL 28500 at 200, 400, 800 and 1,200 mg/kg were administered intravenously to Crj: CD (SD) rats during the perinatal and postnatal periods to assess effects of treatment on dams and their offspring.

For dams, increased liver weight occurred with CVA-K at 75 mg/kg and above, a suppression of bodyweight gain was noted during late gestation with BRL 28500 at 800 mg/kg and above, and enlargement of the cecum and increased liver weight were noted in the 1,200 mg/kg BRL 28500 group.

However, no changes attributable to treatment with either drug were noted with regard to the maintenance or length of gestation, delivery or lactation.

For both drugs, the development of the offspring after birth was normal and no treatment related effects were observed in the functional tests nor in the open field, multiple T-maze, conditioned avoidance response and reproductive performance tests.

In view of the above findings and under the experimental conditions employed, the maximum no-effect doses for general toxicological responses in the dams are considered to be 50 mg/kg for CVA-K and 400 mg/kg for BRL 28500, for delivery and lactation are 150 mg/kg for CVA-K and 1,200 mg/kg for BRL 28500 and for the offspring are 150 mg/kg for CVA-K and 1,200 mg/kg for BRL 28500.