

## Cephem 系経口抗生物質 7432-S の生殖に及ぼす影響

## (3)ウサギにおける胎仔器官形成期投与試験

長谷川靖彦・葦石米孝

塩野義製薬株式会社研究所\*

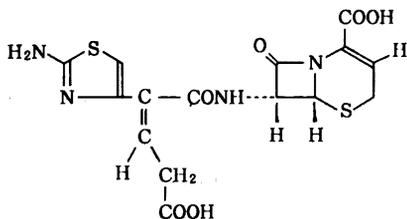
新規経口セフェム剤 7432-S のウサギ胎仔器官形成期経口投与試験を cefaclor (CCL) を対照物質として実施した。7432-S の投与量は 2.5, 10 および 40 mg/kg/日, CCL は 40 mg/kg/日を設定した。対照群には媒体である 5%アラビアゴム水溶液 (1 ml/kg/日) を投与した。投与期間は妊娠 6 日から妊娠 18 日の 13 日間で、いずれもカテーテルで一日一回経口投与した。母動物は妊娠 28 日に屠殺・剖検した。

母動物の体重増加抑制と摂餌量低下は、7432-S の 40 mg/kg/投与群で顕著であったが、2.5 および 10 mg/kg 投与群では体重および摂餌量に対する影響はほとんど認められなかった。剖検所見として、各検体投与群で盲腸内容物が水様に変化した例が散見され、器官重量変化として、7432-S の 10 および 40 mg/kg 投与群で盲腸重量が用量反応的に増加した。

胎仔の子宮内生存性に対して検体投与の影響は認められなかったが、胎仔体重は 7432-S 40 mg/kg 投与群で低下した。しかし、生存胎仔の外形、骨格および内部器官観察で、7432-S 投与によって惹起されたと考えられる異常は全く認められなかった。

**Key words:** 7432-S, 抗生物質, 胎仔器官形成期投与, ウサギ

7432-S は塩野義製薬株式会社研究所で開発された cephem 系経口抗生物質で Fig. 1 の構造を有する。今回、本化合物の安全性評価の一環として、ウサギにおける胎仔器官形成期投与試験を行ったので、その成績を報告する。



(6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-4-carboxy-2-butenoylamino]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4,2,0]oct-2-ene-2-carboxylic acid

$C_{15}H_{14}O_6N_4S_2$   
Mol. wt. : 410.43

Fig. 1. Chemical structure of 7432-S.

## I. 実験材料および実験方法

## 1. 実験動物および飼育条件

北山ラベス(株)伊那研究所より日本白色種ウサギ KBL: JW を、雌は 45 匹 (14 週齢, 体重 2.94-3.34 kg, 第 1 クール) と 40 匹 (14 週齢, 体重 2.92-3.34 kg, 第 2 クール) に分けて購入し、17-18 週齢で交配に用いた。雄は 45 匹 (17 週齢, 体重 3.44-4.02 kg) を購入し、29-34 週齢で交配に用いた。

ウサギはアルミ製ケージ(340(W)×490(D)×350(H) mm) に個別に収容し、温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相対湿度  $55 \pm 10\%$ , 換気 15 回/h の条件で 100% 新鮮空気によって空調したバリアシステム飼育室で飼育した。飼育室の明暗サイクルは 12h/12h (明時 08:00-20:00) とした。ウサギには、オートクレーブ ( $121^\circ\text{C}$ , 7 分) した固型飼料 (CR-1, 日本クレア(株)) を、毎日、雌には 200 g, 雄には 150 g と与え、飲水は、水道水を孔径  $30 \mu$  と  $3 \mu$  フィルターでろ過し、流水殺菌灯を照射したものを自動給水によって与えた。これらの飼料と飲水の摂取は随意に行わせた。個体識別は耳標を付けて行った。

交配は、外陰部検査により交配適期と判定した雌を雄と同居させて行った。交尾が成立した日を妊娠 0 日とした。交尾成立雌 74 匹を、対照群に 15 匹, 7432-S の最低用量投与群に 16 匹, 中間用量投与群に 14 匹, 最高用量投与群に 15 匹, そして対照物質である cefaclor

(CCL) 投与群に 14 匹となるよう配分した。

## 2. 検体・投与方法および投与量

被験物質 7432-S (lot No. 4Y805, 力価: 897.2  $\mu$ g/mg) と比較対照物質として用いた cefaclor (CCL: lot No. 256GK5A, 力価: 956  $\mu$ g/mg) は、それぞれ原末を使用した。媒体として 5% アラビアゴム水溶液 (アラビアゴム末: 関東化学(株) Test No. 804G5004 を注射用蒸留水: 大塚製薬(株)製造番号 5C750 に溶解) を使用した。

投与検体の調製は、毎回、投与直前に次のように行った。すなわち、7432-S, CCL とも、原末に少量の 5% アラビアゴム水溶液を加え、超音波装置 (PET CLEANER 52, 超音波工業(株)) を用いて懸濁液とし、これに 5% アラビアゴム水溶液を加えて 4% (W(力価)/V) 懸濁液となるようにメスアップした。この調製懸濁液を 40 mg/kg 投与用として用いた。7432-S については、4% 懸濁液を 5% アラビアゴム水溶液で希釈して、1% 懸濁液および 0.25% 懸濁液を調製し、これらをそれぞれ、10 mg/kg 投与用および 2.5 mg/kg 投与用として用いた。対照群には媒体の 5% アラビアゴム水溶液のみを投与した。投与容量は対照群および検体投与群共に 1 ml/kg とした。投与容量は投与開始日 (妊娠 6 日) の体重を基準に算出し、以後体重変化に伴う変更は行わなかった。投与は妊娠 6 日から 18 日までの 13 日間、1 日 1 回、午前中に行った。

投与はネラトシカテーテル (9 号, 5 mm ( $\phi$ ), 325 (L) mm, 出雲ゴム工業(株)) を用いて強制経口投与方法で行った。少数例妊娠ウサギでの予備試験では、7432-S の 160 mg/kg/日投与で、母動物の 1/3 例が流産した。7432-S の 40 mg/kg/日投与では摂餌量が減少し、体重増加も抑制的であった。これらの成績から、7432-S の 160 mg/kg/日投与では、催奇形性の評価に十分な胎仔数を得ることが困難と考えられたので、本試験での 7432-S の投与用量として、高用量を 40 mg/kg/日とし、以下公比 4 で減じ、10 および 2.5 mg/kg/日の 3 用量を設定した。CCL は、40 mg/kg/日投与でウサギ母動物の 2/10 例が死亡したと報告されている<sup>1)</sup>。しかし、今回の予備試験では、40 mg/kg/日投与で、母動物の体重抑制傾向がみられるのみで、胎仔には悪影響がみられなかった。従って、本試験での CCL の投与用量として、7432-S の高用量と同じ 40 mg/kg/日を設定した (投与用量はいずれも力価標示)。

## 3. 観察項目

体重測定は、妊娠 0 日、妊娠 6 日から妊娠 19 日までの毎日、妊娠 21 日、妊娠 23 日、妊娠 25 日、妊娠 27 日および妊娠 28 日に行った。給餌量は妊娠 0 日から妊娠

27 日まで、残餌量は妊娠 1 日から妊娠 28 日まで、それぞれ測定し、これらより各妊娠日における摂餌量を算出した。

妊娠 28 日に母動物をエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈よりヘパリン添加注射筒で約 6 ml 採血した。この血液の少量を使用し、白血球 (WBC), 赤血球 (RBC), ヘモグロビン濃度 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を Coulter counter model S により測定した。残りの血液を遠沈 (3,000 rpm, 15 分) し、得られた血漿について、グルコース (ヘキサキナーゼ法) 総タンパク質 (ビュウレット法), アルブミン (BCG 法), クレアチニン (Jaffé 法), 尿素窒素 (ジアセチルモノオキシム法), GOT (UV 法), GPT (UV 法), アルカリホスファターゼ (ALP) (Bessey-Lowry 法), 乳酸脱水素酵素 (LDH) (UV 法), 総コレステロール (酵素法) および総ビリルビン (アルカリアゾビリルビン法) を Technicon SMAC III (C9100) システムにより測定した。A/G 比は総タンパク質とアルブミン値から計算により求めた。

採血後、直ちに胎仔の入った子宮を摘出し、母動物は後大静脈および腹大動脈切断により放血・致死させ、剖検した。母動物の心臓, 肺, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 副腎, 胸腺, 甲状腺, 下垂体, 顎下腺, 脳および盲腸 (内容物共) を摘出し、両側性臓器は左右合わせて重量を測定した。卵巣は妊娠黄体を数えた後重量を測定した。

子宮は摘出後直ちに切開し、胎仔の生存・吸収・浸軟および死亡を調べ、生存胎仔については外形を観察し、体重および胎盤重量を計量した。各リッターの生存胎仔の約半数は内性器によって性を判定し、内臓除去・剥皮後 70% エタノールで固定し、アリザリンレッド-S 染色骨格標本作製して、肉眼で骨格観察を行った。残りの約半数の生存胎仔はブアン液で固定し、脳は粗大切片法<sup>2)</sup>、胸部及び腹部の器官は顕微解剖法<sup>3)</sup>によって、実体顕微鏡下で観察した。

## 4. 統計学的解析方法

平均値の差の検定は、対照群と各検体投与群の間の 2 群間で等分散検定を行った後、等分散の場合は Student の t 検定、分散が等しくない場合は Cochran-Cox の t 検定によって行った。率の検定は同じく 2 群間で X 検定 (Yates の修正付き) で行った。危険率は 5% および 1% とした。

## II. 実験成績

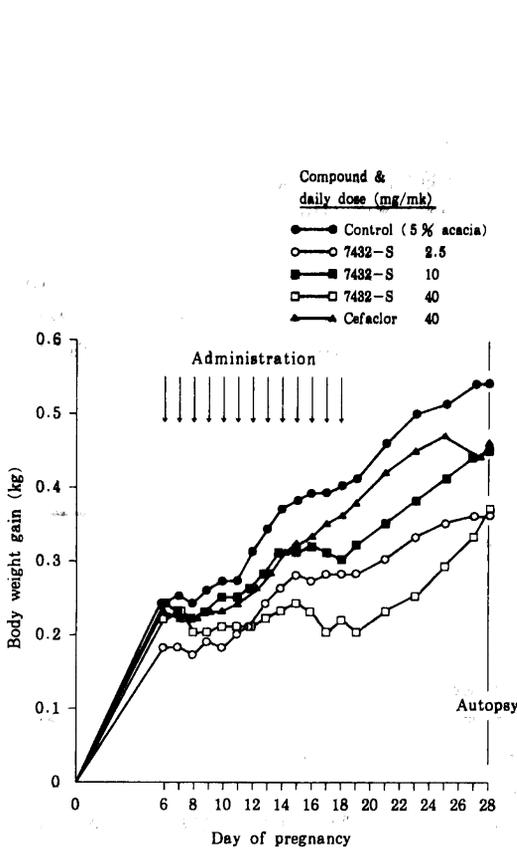


Fig. 2. Body weight gain in pregnant rabbits given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy.

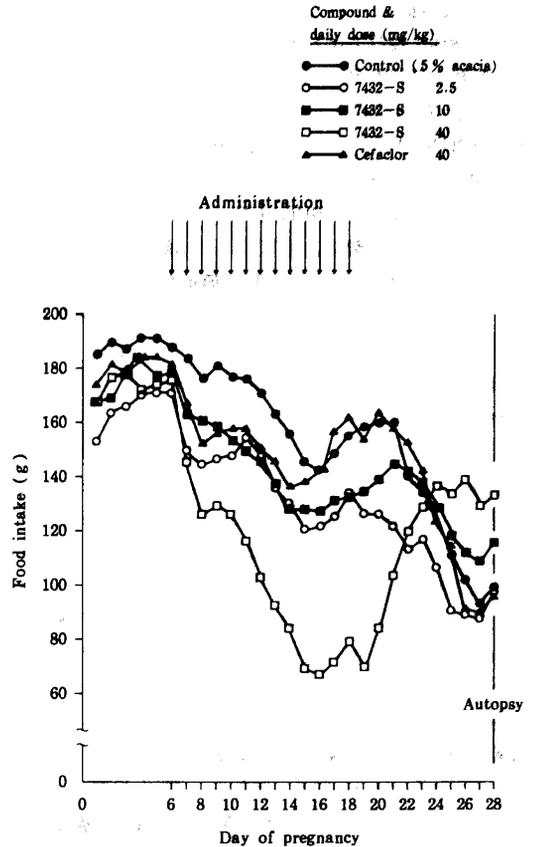


Fig. 3. Food intake in pregnant rabbits given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy.

## 1. 母動物に対する影響

### 1) 一般状態

投与後 30 分の観察で、投与検体に原因すると考えられる一般状態の変化は認められなかった。投与時の暴れ・空蹴りのため、後肢が脱力し、その後、歩行困難になった例が 7432-S 2.5 mg/kg 投与群に 3 例、40 mg/kg 投与群に 1 例、CCL 投与群に 1 例みられた。これら母動物は著しく摂餌量が低下し、試験継続不可能と考えられたので、屠殺・剖検した。いずれにおいても後肢、殿部、腰部、股間部の筋肉に出血を認めた以外、他に異常は認められなかった。7432-S の 2.5 と 40 mg/kg 投与群および CCL 投与群で、各 1 例ずつ軟便がみられた。対照群の 1 例と 7432-S 40 mg/kg 投与群の 1 例が、それぞれ妊娠 28 日と妊娠 25 日に流産した。妊娠 28 日の

剖検では、前者は子宮内に生存胎仔 1 匹、吸収胎仔 2 匹および死亡胎仔 1 匹が残存していた。後者は全仔流産であった。

### 2) 体重

母動物の体重を妊娠 6 日からの増加量で Fig. 2 に示した。これら増加量は、7432-S 40 mg/kg 投与群で投与中期以降対照群に比し有意に低下したが、7432-S の 2.5 と 10 mg/kg 投与群ではいずれの妊娠日齢においても対照群と有意差はなかった。CCL 投与群の体重増加は、いずれの妊娠日齢においても対照群と有意差はなかった。

### 3) 摂餌量

母動物の摂餌量を Fig. 3 に示した。7432-S 2.5 mg/kg 投与群の摂餌量は、投与開始前から妊娠 7 日-

Table 1. Organ weights in pregnant rabbits on day 28 of pregnancy given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose (mg/kg) rabbits	No. of rabbits	Final body weight (kg)	Heart (g)	Lung (g)	Kidney (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Adrenal (mg)	Thymus (g)	Thyroid (mg)	Pituitary (mg)	Submaxillary gl. (g)	Brain (g)	Ovary (g)	Cecum gross (g)
Control (5% acacia)	14	4.23 ± 0.10	8.4 ± 0.2	10.80 ± 0.26	18.61 ± 0.59	96.2 ± 4.0	1.54 ± 0.06	259 ± 15	2.26 ± 0.24	252 ± 17	36 ± 1	1.40 ± 0.05	10.53 ± 0.12	0.86 ± 0.04	111 ± 8
7432-S															
2.5	12	3.92* ± 0.11	7.6* ± 0.3	10.59 ± 0.24	17.10 ± 0.66	95.3 ± 7.3	1.74 ± 0.20	277 ± 13	2.27 ± 0.24	261 ± 22	35 ± 2	1.33 ± 0.04	10.55 ± 0.19	0.82 ± 0.03	116 ± 8
10	14	4.01 ± 0.07	8.2 ± 0.4	10.34 ± 0.24	16.77* ± 0.59	100.4 ± 5.5	1.59 ± 0.09	242 ± 15	2.20 ± 0.23	270 ± 12	33 ± 2	1.38 ± 0.05	10.31 ± 0.12	0.87 ± 0.07	138* ± 5
40	14	3.98 ± 0.09	8.0 ± 0.3	10.40 ± 0.18	17.91 ± 0.36	94.4 ± 3.0	1.52 ± 0.10	268 ± 16	2.48 ± 0.25	256 ± 13	37 ± 2	1.39 ± 0.04	10.51 ± 0.13	0.78 ± 0.04	167** ± 4
Cefaclor															
40	13	4.08 ± 0.08	8.3 ± 0.2	10.93 ± 0.39	18.83 ± 0.69	94.8 ± 7.6	1.77 ± 0.21	223 ± 17	2.33 ± 0.25	277 ± 11	36 ± 2	1.47 ± 0.04	10.43 ± 0.10	0.77 ± 0.04	132 ± 10

Each value shows mean ± S.E.

\*,\*\* : Statistically significant against control at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

Table 2. Relative organ weights in pregnant rabbits on day 28 of pregnancy given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose (mg/kg)	No. of rabbits	Final body weight (kg)	Heart (g/kg)	Lung (g/kg)	Kidney (g/kg)	Liver (g/kg)	Spleen (g/kg)	Adrenal (mg/kg)	Thymus (g/kg)	Thyroid (mg/kg)	Pituitary (mg/kg)	Submaxillary (g/kg)	Brain (g/kg)	Ovary (g/kg)	Cecum gross (g/kg)
Control (5% acacia)	14	4.23 ± 0.10	2.00 ± 0.05	2.56 ± 0.06	4.40 ± 0.11	22.87 ± 1.11	0.37 ± 0.02	61 ± 3	0.54 ± 0.06	59 ± 4	9 ± 0	0.33 ± 0.01	2.50 ± 0.05	0.20 ± 0.01	26 ± 2
	12	3.92* ± 0.11	1.95 ± 0.05	2.71 ± 0.06	4.37 ± 0.14	24.09 ± 1.32	0.45 ± 0.05	71* ± 4	0.59 ± 0.07	67 ± 5	9 ± 1	0.34 ± 0.01	2.72 ± 0.10	0.21 ± 0.01	29 ± 2
7432-S	14	4.01 ± 0.07	2.05 ± 0.07	2.59 ± 0.05	4.19 ± 0.13	25.00 ± 1.20	0.40 ± 0.02	61 ± 4	0.55 ± 0.06	68 ± 3	8 ± 1	0.35 ± 0.01	2.59 ± 0.05	0.22 ± 0.02	34** ± 1
	14	3.98 ± 0.09	2.00 ± 0.05	2.63 ± 0.06	4.53 ± 0.11	23.83 ± 0.76	0.38 ± 0.03	68 ± 4	0.63 ± 0.07	64 ± 3	9 ± 0	0.35 ± 0.01	2.66 ± 0.07	0.20 ± 0.01	42** ± 1
Cefaclor	13	4.08 ± 0.08	2.04 ± 0.04	2.68 ± 0.08	4.61 ± 0.13	23.05 ± 1.58	0.44 ± 0.05	55 ± 4	0.58 ± 0.07	68 ± 2	9 ± 1	0.36 ± 0.01	2.57 ± 0.05	0.19 ± 0.01	32* ± 2

Each value shows mean ± S.E.

\*, \*\* : Statistically significant against control at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

Table 3. Hematological findings in pregnant rabbits on day 28 of pregnancy given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose(mg/kg)	No. of rabbits	WBC ( $10^3/mm^3$ )	RBC ( $10^6/mm^3$ )	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)
Control (5% acacia)	14	5.0 $\pm 0.3$	5.48 $\pm 0.11$	12.2 $\pm 0.2$	36.0 $\pm 0.7$	66 $\pm 1$	22.1 $\pm 0.3$	33.7 $\pm 0.5$
7432-S								
2.5	12	5.6 $\pm 0.8$	5.51 $\pm 0.10$	12.4 $\pm 0.3$	36.2 $\pm 0.7$	66 $\pm 1$	22.4 $\pm 0.3$	34.2 $\pm 0.5$
10	14	6.2 $\pm 0.5$	5.75* $\pm 0.07$	12.9* $\pm 0.2$	37.6 $\pm 0.6$	65 $\pm 0$	22.3 $\pm 0.3$	34.3 $\pm 0.5$
40	14	5.7 $\pm 0.5$	5.70 $\pm 0.11$	12.5 $\pm 0.3$	36.8 $\pm 0.7$	65 $\pm 1$	21.8 $\pm 0.3$	33.8 $\pm 0.4$
Cefaclor								
40	13	6.0 $\pm 0.5$	5.69 $\pm 0.15$	12.7 $\pm 0.4$	37.3 $\pm 0.9$	66 $\pm 0$	22.1 $\pm 0.3$	33.8 $\pm 0.5$

Each value shows mean  $\pm$  S.E.

\*,\*\* : Statistically significant against control at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

Table 4. Blood biochemistry in pregnant rabbits on day 28 of pregnancy given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose(mg/kg)	No. of rabbits	Glucose (mg/dl)	T. protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	Creatinine (mg/dl)	Urea-N (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	Cholesterol (mg/dl)	T. bilirubin (mg/dl)
Control (5% acacia)	14	179 $\pm 8$	4.6 $\pm 0.1$	3.5 $\pm 0.1$	3.4 $\pm 0.1$	1.58 $\pm 0.06$	16 $\pm 1$	42 $\pm 7$	31 $\pm 4$	54 $\pm 4$	64 $\pm 4$	17 $\pm 1$	0.08 $\pm 0.00$
7432-S													
2.5	12	168 $\pm 6$	4.7 $\pm 0.2$	3.7 $\pm 0.1$	3.7* $\pm 0.1$	1.55 $\pm 0.04$	16 $\pm 1$	22* $\pm 2$	22 $\pm 3$	56 $\pm 5$	59 $\pm 3$	20 $\pm 3$	0.08 $\pm 0.00$
10	14	170 $\pm 6$	4.9 $\pm 0.1$	3.8* $\pm 0.1$	3.7 $\pm 0.1$	1.53 $\pm 0.05$	16 $\pm 1$	37 $\pm 7$	39 $\pm 8$	54 $\pm 4$	64 $\pm 6$	16 $\pm 1$	0.08 $\pm 0.01$
40	14	168 $\pm 6$	4.9* $\pm 0.1$	3.9* $\pm 0.1$	3.6 $\pm 0.1$	1.57 $\pm 0.03$	19 $\pm 1$	41 $\pm 6$	34 $\pm 4$	62 $\pm 4$	72 $\pm 4$	35 $\pm 9$	0.09 $\pm 0.01$
Cefaclor													
40	13	171 $\pm 10$	4.9 $\pm 0.1$	3.8 $\pm 0.1$	3.5 $\pm 0.1$	1.53 $\pm 0.06$	18 $\pm 1$	171 $\pm 117$	66 $\pm 28$	56 $\pm 6$	90 $\pm 22$	17 $\pm 2$	0.19 $\pm 0.09$

Each value shows mean  $\pm$  S.E.

\*,\*\* : Statistically significant against control at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

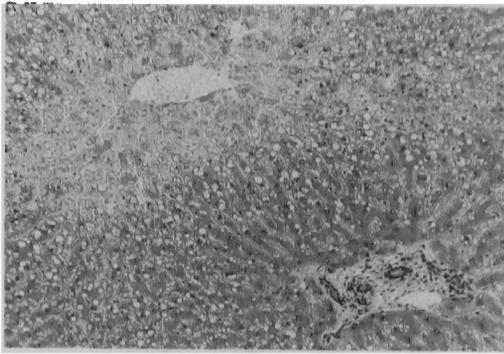


Fig. 4. Necrosis of liver, H.E. stain,  $\times 71$ . cefaclor group.



Fig. 5. Bent tail. 7432-S 2.5 mg/kg group.

妊娠 13 日の間、対照群に比し有意に低下した。7432-S 10 mg/kg 投与群の摂餌量は、主として妊娠 7 日-妊娠 14 日の間、対照群に比し有意に低下した。また、7432-S 40 mg/kg 投与群の摂餌量は、妊娠 7 日から妊娠 21 日まで、対照群に比べ著しく低下したが、妊娠 26 日から妊娠 28 日にかけては、逆に、対照群に比し増加した。CCL 投与群の摂餌量は妊娠 9 日でのみ対照群に比し有意に低下した。

#### 4) 剖検所見

検体投与群では、盲腸内容物の水様性変化が散見された。CCL 投与群の 1 例で肝臓が褪色し、表面が粗となり、さらに辺縁部が鋭利となって弾力性に乏しい変化がみられた。病理組織学的検査の結果、限局性の小葉中心帯壊死 (Fig. 4) を認め、中毒性肝障害が示唆された。対照群の 1 例と 7432-S 10 mg/kg 投与群の 1 例に、十二指腸または胃で、小範囲の潰瘍が 3 - 4 個観察された。

#### 5) 器官重量

器官重量は、絶対重量を Table 1 に、体重 1 kg に対する相対重量を Table 2 に示した。絶対重量では、7432-S 2.5 mg/kg 投与群の心臓重量が対照群に比し有意に低下した。7432-S の 10 および 40 mg/kg 投与群の盲腸重量は、対照群に比し有意に増加し、7432-S 10 mg/kg 投与群の腎臓重量は対照群に比し有意に低下した。CCL 投与群では、対照群に比し有意な重量変化を示す器官はなかった。相対重量では、7432-S 2.5 mg/kg 投与群の副腎重量、7432-S の 10 と 40 mg/kg/投与群および CCL 投与群の盲腸重量が、それぞれ対照群に比し有意に増加した。従って、絶対重量と相対重量の両方で同一方向の変化がみられたのは、7432-S の 10 および 40 mg/kg 投与群における盲腸重量の増加の

みであった。

#### 6) 血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 3 に示した。7432-S 10 mg/kg 投与群の RBC と Hb は対照群に比べて有意に上昇したが、いずれも正常変動範囲内の変化であった。その他特異な変化を示す項目や用量反応的な変化を示す項目はなかった。

#### 7) 血液生化学分析

Table 4 に示したように、検体投与の毒性を示唆するような特異な変化を示す項目や用量反応的な変化を示す項目はなかった。上述の肝臓に変化のみられた CCL 投与群の 1 例では、GOT, GPT, ALP, LDH および総ビリルビン値の異常な上昇とグルコースの低下がみられ、血液生化学分析からも急性肝障害が示唆された。

#### 2. 胎子に対する影響

##### 1) 生存率・体重および外形異常

Table 5 に示したように、7432-S 2.5 mg/kg 投与群の黄体数と 7432-S 10 mg/kg 投与群の着床率が対照群に比し有意に低下した。しかし、着床数、平均生存胎仔数および胎仔生存率は、いずれの検体投与群も、対照群に比し有意差がなかった。7432-S 10 mg/kg 投与群の雌胎仔体重は、対照群に比し有意に増加したが、7432-S 40 mg/kg 投与群の胎仔体重は、雌雄いずれの胎仔も、対照群に比し有意に低下した。胎盤重量は、7432-S の全投与群で、いずれも対照群に比べて有意差はなかった。CCL 投与群の場合、胎仔体重は低下傾向を示したが、対照群との間に有意差はなかった。一方、胎盤重量は有意に低下した。生存胎仔にみられた外形異常は、7432-S 2.5 mg/kg 投与群での曲尾 1 例 (Fig. 5) のみであった。

##### 2) 骨格観察成績

Table 5. Viability, body weights, placental weights and incidence of external anomalies in fetuses from pregnant rabbits given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose (mg/kg)	No. of rabbits	No. of corpora lutea <sup>(e)</sup>	No. of implant sites <sup>(e)</sup> (Ratio) <sup>(c)</sup>	No. of fetuses				Litter size <sup>(e)</sup>	No. & body weight (g) of live fetuses <sup>(e)</sup>		Placental weight (g) <sup>(e)</sup>	Type and No. of external anomalies <sup>(e)</sup>
				Live (%) <sup>(e)</sup>	Resorbed	Macerated	Dead (Abort.)		Male	Female		
Control (5% acacia)	14	11.8 ± 0.7	9.5 ± 1.0 (81)	121 (91)	3	2	1(6)	8.6 ± 1.1	62	59	4.97 ± 0.10	0
7432-S												
2.5	12	10.2* ± 0.3	8.3 ± 0.6 (82)	94 (94)	2	4	0(0)	7.8 ± 0.6	41	53	4.86 ± 0.12	1 BT
10	14	10.7 ± 0.5	7.1 ± 0.8 (67)**	91 (91)	5	4	0(0)	6.5 ± 0.7	37.59 ± 1.10	46	38.66 ± 0.78*	0
40	14	11.4 ± 0.5	9.0 ± 0.5 (79)	108 (86)	4	7	0(7)	8.3 ± 0.6	48	60	4.71 ± 0.10	0
Cefaclor												
40	13	11.2 ± 0.7	8.8 ± 1.0 (79)	98 (85)	12	3	2(0)	7.5 ± 1.0	47	51	4.49 ± 0.12**	0

(a): Mean ± S.E.

(b): Percentage to No. of implantation sites

(c): (No. of implantation sites/No. of corpora lutea) × 100

BT: Bent tail

\*, \*\*: Statistically significant against control at p &lt; 0.05 or p &lt; 0.01

Table 6. Incidence of retarded ossification and minor change in the skeletal system of fetuses from pregnant rabbits given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose (mg/kg) rabbits	No. of rabbits	No. of specimens	No. of sacro <sup>(c)</sup> coccy. vert.	Retarded ossification <sup>(a)</sup>					Minor change <sup>(b)</sup>		
				Incomplete thoracic centrum			Incomplete sternebrae	Metacarpalia <(5/5)	Cervical rib	Lumbar rib	13th rib
				I - IV	V - VIII	IX - XII					
Control (5% acacia)	14	64	19.1±0.1	0	1(1.6)	0	19(29.7)	6(9.4)	0	12(18.8)	8(12.5)
7432-S	12	49	19.3±0.1	0	1(2.0)	0	23(47.9)	1(2.0)	2(4.1)	8(16.3)	12(24.5)
2.5	14	50	19.2±0.1	0	0	0	24(48.0)	0	0	13(26.0)	9(18.0)
10	13	57	19.0±0.1	1(1.8)	0	0	15(26.3)	2(3.5)	2(3.5)	19(33.3)	16(28.1)
40											
Cefaclor	13	52	19.0±0.1	0	1(1.9)	0	9(17.3)	2(3.8)	0	13(25.0)	14(26.9)
40											

(a): Mean ± S.E.

(b): Each value shows cases with percentage (parenthesised figures).

\*\*\*: Statistically significant against control at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

Table 7. Incidence of skeletal anomalies in fetuses from pregnant rabbits given 7432-S of cefaclor by garave from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose(mg/kg)	No. of rabbits	No. of specimens	No. of specimens with anomalies(%)	No. and type of anomaly
Control (5% acacia)	14	64	1(1.6)	1 Biased coccygeal vertebrae
7432-S 2.5	12	49	3(6.1)	1 Vertebral disarrangement 1 Fusion of sternebrae and biased coccygeal vertebrae 1 Fusion of parietal bones
10	14	50	1(2.0)	1 Fusion of coccygeal vertebrae
40	13	57	2(3.5)	1 Fusion of sternebrae 1 Fusion of parietal bones
Cefaclor 40	13	52	1(1.9)	1 Fusion of sternebrae

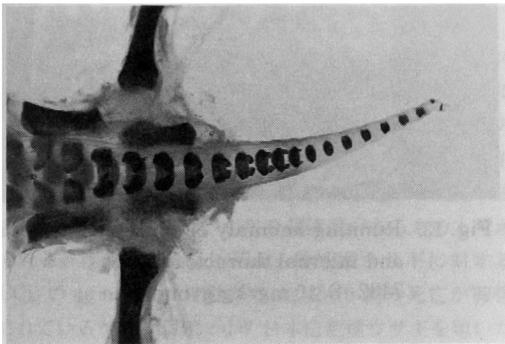


Fig. 6. Biased coccygeal vertebrae. Control group.

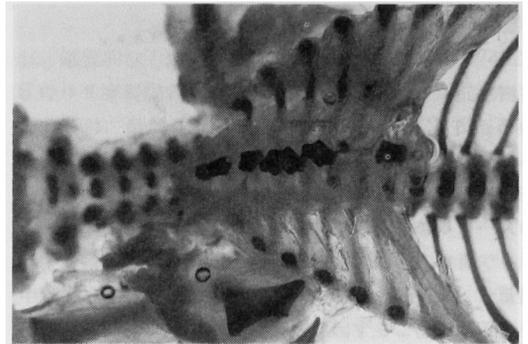


Fig. 8. Fusion of sternebrae. 7432-S 2.5 mg/kg group.

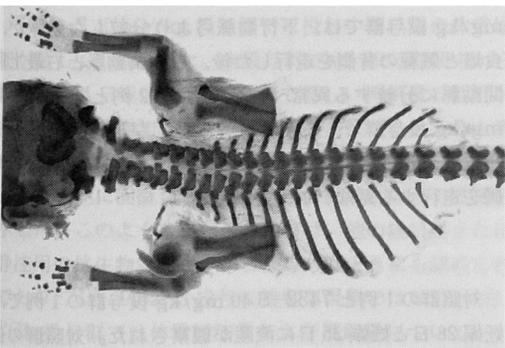


Fig. 7. Disarrangement of cervical vertebrae. 7432-S 2.5 mg/kg group.

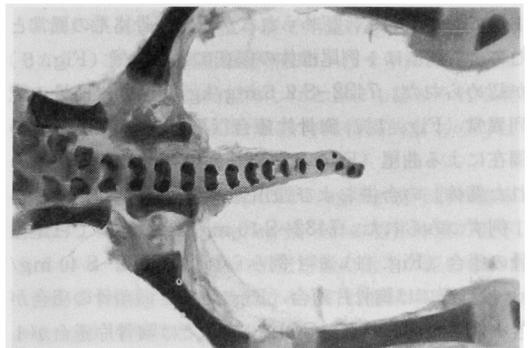


Fig. 9. Biased coccygeal vertebrae (The skeletal specimen of the fetus shown in Fig. 5.). 7432-S 2.5 mg/kg group.

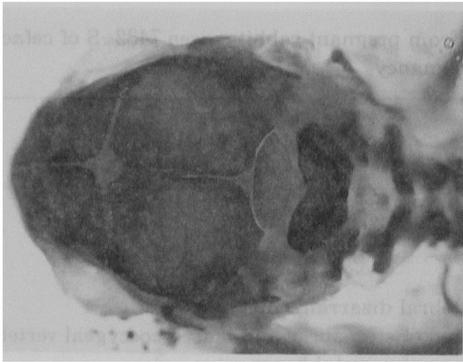


Fig. 10. Fusion of parietal bones.  
7432-S 2.5 mg/kg group.

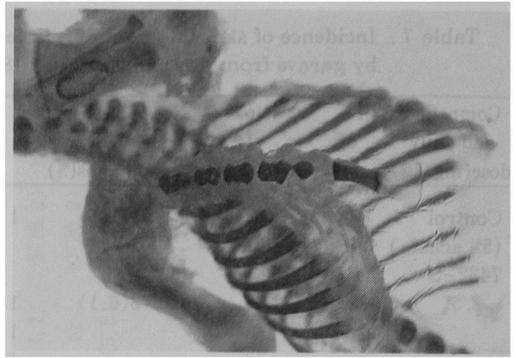


Fig. 12. Fusion of sternbrae.  
7432-S 40 mg/kg group.

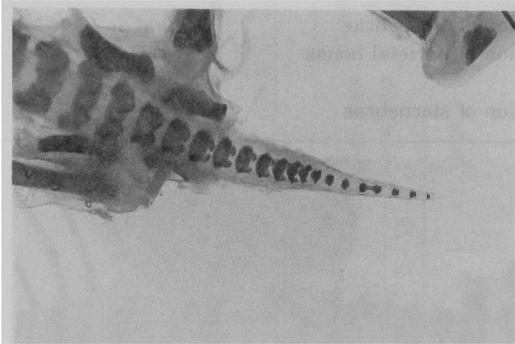


Fig. 11. Fusion of coccygeal vertebrae.  
7432-S 10 mg/kg group.

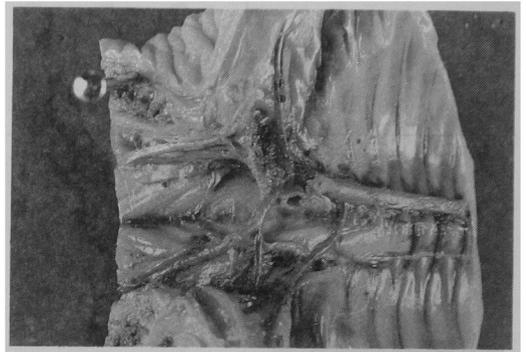


Fig. 13. Running anomaly of supreme intercostal  
and internal thoracic arteries.  
7432-S 10 mg/kg group.

生存胎仔の骨格観察の成績は、化骨遅延と骨格変異を合せて Table 6 に示し、異常を Table 7 に示した。化骨遅延と変異の各指標について、いずれの検体投与群においても特に変化は認められなかった。骨格系の異常として、対照群に 1 例尾椎体の偏在による曲尾 (Fig. 6) が認められた。7432-S 2.5 mg/kg 投与群に椎骨の配列異常 (Fig. 7)、胸骨片癒合 (Fig. 8) と尾椎体の偏在による曲尾 (Fig. 9 : 外形異常として曲尾がみられた個体) の合併および頭頂骨の癒合 (Fig. 10) が各 1 例ずつみられた。7432-S 10 mg/kg 投与群では尾椎骨の癒合 (Fig. 11) が 1 例みられた。7432-S 40 mg/kg 投与群では胸骨片癒合 (Fig. 12) と頭頂骨の癒合が各 1 例ずつみられた。CCL 投与群では胸骨片癒合が 1 例発現した。これらの各異常に関して、いずれの検体投与群においても対照群に比し有意に高い発現率を示すものではなく、またその発現率に用量反応性は認められなかった。

### 3) 内部器官観察成績

Table 8 に示したように、内部器官の異常は 3 例の胎仔で認められたのみであった。すなわち、7432-S 10 mg/kg 投与群では、下行動脈弓より分岐した動脈が、食道と気管の背側を走行した後、右内胸動脈と右最上肋間動脈に分岐する異常 (Fig. 13) が 2 例と 7432-S 40 mg/kg 投与群で、右鎖骨下動脈が、左鎖骨下動脈の分岐位置より下側で、動脈弓から分岐し、食道と気管の背側を走行する異常が 1 例観察された。

### Ⅲ. 考 察

対照群の 1 例と 7432-S 40 mg/kg 投与群の 1 例で、妊娠 28 日と妊娠 25 日に流産が観察された。対照群の例では、妊娠 22 日より妊娠 28 日まで、また、7432-S 40 mg/kg 投与群の例では、妊娠 7 日より妊娠 26 日まで、いずれも摂餌量の著しい低下が継続した。ウサギでは、摂餌量の低下が原因となって流産が引き起こされること

Table 8. Incidence of visceral anomalies in fetuses from pregnant rabbits given 7432-S or cefaclor by gavage from day 6 through day 18 of pregnancy

Compound and daily dose (mg/kg)	No. of rabbits	No. of specimens	No. of specimens with anomalies (%)	No. and type of anomaly
Control (5% acacia)	12	57	0	
7432-S				
2.5	12	45	0	
10	13	41	2(4.9)	2 Running anomaly of interthoracic and supreme intercostal aa.
40	13	51	1(2.0)	1 Running anomaly of subclavian a.
Cefaclor				
40	13	46	0	

が報告されており<sup>4)</sup>、これら2母動物の流産も、極度の摂餌量低下によるものと考えられる。しかし、7432-Sの10 mg/kg 投与群の1例および40 mg/kg 投与群の他の数例でも、同様な著しい摂餌量低下がみられたにもかかわらず流産は生じなかった。摂餌量低下で流産が生ずるか否かについては、かなり個体差があるものと考えられる。New Zealand White 種妊娠ウサギに対するCCLの40 mg/kg/日投与では、2/10例の死亡が報告されているが<sup>1)</sup>、KBL:JW 日本白色種ウサギを用いた今回の試験では、CCLの40 mg/kg 投与でも死亡例はなかった。このことは、ウサギのCCLに対する感受性に、品種による差のあることを示唆している。

7432-S 40 mg/kg 投与群では投与中期以降の体重増加が著しく抑制された。本投与群では、投与期間中から投与終了4日後の妊娠21日まで著しい摂餌量の低下がみられ、体重増加抑制は摂餌量低下を反映したものと考えられる。本投与群における摂餌量低下は妊娠22日ごろから徐々に回復し、妊娠末期では対照群以上の高値を示した。このような摂餌量の推移は、他の経口用または静注用の抗生物質をウサギに投与したときにも認められており<sup>5-8)</sup>、7432-S 投与に特有な現象ではない。一方、CCL 投与群では体重増加量および摂餌量について、いずれの妊娠日齢においても対照群と差がなく、野村ら<sup>1)</sup>の成績と一致した。

Cephem系抗生物質をウサギに投与した場合に、下痢や軟便がしばしば観察されるが<sup>6-13)</sup>、今回の実験で

は、継続的な下痢・軟便はみられなかった。7432-Sのウサギ胃腸管に対する影響は、cephem系抗生物質としては、かなり弱いものと思われる。CCL投与群の1例の肝臓では、褪色に加えて、弾力性の低下などがみられ、本例の血液化学分析では、GOT、GPT、ALP、LDHおよび総ビリルビンの異常な高値とグルコースの低下が認められた。この肝臓の病理組織学的検査でも、中毒性の変化が認められ、ウサギに対するCCL大量投与は、個体によって、肝障害を惹起することがあるように考えられる。

器官の絶対重量や相対重量の両者に共通した変化のみられたのは盲腸のみであった。盲腸重量は7432-Sの10および40 mg/kg 投与群で用量反応的に増加した。しかし、このような盲腸重量増加は、ウサギにflomoxef<sup>5)</sup>やcefamandole<sup>12)</sup>を投与したときにも認められる現象であり、必ずしも7432-S投与に特異的なものではない。

胎仔所見として、7432-S 10 mg/kg 投与群の着床率の低下、7432-S 40 mg/kg 投与群の胎仔体重の低下、あるいは、CCL投与群の胎盤重量の低下が認められた。7432-S 10 mg/kg 投与群でみられた着床率低下は、40 mg/kg 投与群では認められず、用量依存性がないので、検体投与によるものとは考えられない。母動物の摂餌量低下は、生存胎仔体重の低下を引き起こすので、7432-S 40 mg/kg 投与群の胎仔体重低下は、母動物の摂餌量低下を反映した二次的な影響と考えられ、7432-Sの

胎子に対する直接的な影響によるものとは考えられない。7432-S 40 mg/kg 投与群の生存胎子の骨格観察で化骨遅延は認められなかった。従って、本群の生存胎子は低体重ではあるが、未熟な発育不全の状態ではないと考えられる。腰肋痕発現率の増加は、ラットやマウスで催奇形性を示唆する指標になると言われている<sup>14,16)</sup>。7432-S の 10 及び 40 mg/kg 投与群の腰肋痕の発現率は、やや増加していたが、いずれも対照群に比し有意差のある増加ではなく、また、背景データ<sup>17)</sup>の変動範囲内の値であり、問題とすべきものとは考えられない。生存胎子の外形、骨格および内部器官観察で発現した各異常について、7432-S 投与に起因すると考えられる特異なものはなく、また、用量反動的に増加するものもなかった。この成績は、7432-S がウサギ胎子に対して催奇形性を有さないことを示唆している。

以上の成績より、7432-S のウサギ母動物に対する最大無影響量は、盲腸重量の変化を考慮して、2.5 mg/kg/日と推察される。また、胎子について、生存性と催奇形性に関する最大無影響量は 40 mg/kg/日と推察され、発育に関する最大無影響量は、40 mg/kg 投与群で低体重が見られたことから、10 mg/kg/日であると推察される。

(実験期間：1985年4月～1986年3月)

#### 謝 辞

実験に御協力頂いた原 勝巳、安東正則、吉田豊彦、伊藤道雄、岸倉次郎、村中理一、竹川祐司、宮後正志、金森 進、平柴正広、内田浩則、松尾恵美、吉崎敏夫、池内滋郎、高野享治、宮後直子、村岡義博、奈良 博の諸氏に深謝する。

#### 文 献

- 野村 章, 古橋忠和, 池谷恵里, 沢木あけみ, 仲吉 洋: Cefaclor の催奇形および生殖におよぼす影響 (第1報) マウス, ラットおよびウサギにおける器官形成期経口投与による検討。Chemotherapy 27 (S-7): 846~864, 1979
- WILSON J. G.: Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. "Teratology-Principles and Techniques" (Wilson J. G. and Warkany J. eds.), pp. 262~277, Chicago Univ. Press, Chicago and London, 1965
- 西村耕一: マウスおよびラット胎子の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法。先天異常 14: 23~40, 1974
- MATSUZAWA T., NAKATA M., GOTO I. and TSUSHIMA M.: Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. Toxicology 22: 255~259, 1981
- 長谷川靖彦, 蒼石米孝, 原 勝巳, 安東正則, 吉田豊彦, 伊藤道雄, 岸倉次郎, 村中理一, 竹川祐司, 金森 進, 宮後正志, 平柴正広, 内田浩則, 松尾恵美: Oxacephem 抗生物質 Flomoxef (6315-S) の静脈内投与によるウサギ胎子器官形成期投与試験。応用薬理印刷中
- 田内清憲, 川西広明, 五十嵐章之, 前田康行, 前山由紀, 海老野耕一, 鈴木勝士, 今道友則: Cefadroxil (S-578) の毒性に関する研究 (第4報) の生殖試験: ウサギにおける胎子の器官形成投与試験。Jap J Antibiotics 33: 497~502, 1980
- 広岡哲夫, 高橋昌三, 田所 規, 北川純男: 経口抗生物質 Cefroxadin (CGP-9000) の生殖試験 (第4報) ウサギによる器官形成期投与試験。応用薬理 19: 669~679, 1980
- 松崎明紀, 阿久津貞夫, 向川秀生, 小林こずえ: Cefatrizine (S-640P) の催奇形性に関する研究; 第2報: 妊娠ウサギに対する経口投与時の胎子に及ぼす影響。Jap J Antibiotics 29: 144~152, 1976
- 古橋忠和, 加藤育雄, 仲吉 洋: Ceftazidime の安全性に関する研究 (VIII) ウサギにおける器官形成期投与試験。Chemotherapy 31 (S-3): 961~967, 1983
- 古橋忠和, 三好幸二, 仲吉 洋: Cefuroxime axetil (CXM-AX) の生殖試験 (IV) ウサギにおける胎子器官形成期投与試験。Chemotherapy 34 (S-5): 271~279, 1986
- HARADA Y., KOBAYASHI F., MURAOKA Y., HASEGAWA Y., WOLD J. S. and MORTON D.M.: An evaluation of the toxicity of moxalactam in laboratory animals Rev. Infect. Dis. 4 (Suppl.) S536~S545, 1982
- 長谷川靖彦, 吉田豊彦, 光前嗣郎: Cefamandole のラットおよびウサギにおける催奇形性試験。Chemotherapy 27 (S-5): 658~681, 1979
- 暮部 勝, 浅岡宏康, 森口政英, 畑 俊明, 井沢正典, 永井修子: 新しい Cephamycin MT-141 に関する毒性学的研究 (IX) ラット及

- びウサギにおける胎仔器官形成期投与試験。Jap J Antibiotics 37 : 1186~1210, 1984
- 14) 安田峯生, 前田広由 : 催奇形性試験での指標としての腰肋の意義。先天異常 13 : 25~29, 1973
- 15) KIMMEL C. A. and WILSON J. G. : Skeletal deviations in rats : Malformations or variations? Teratology 8 : 309~316, 1973
- 16) 永岡隆晴, 望月泰男, 高塚和彦, 大須賀ふくよ, 奈良間功 : 母体への薬物の投与によるラット胎仔の頸椎・胸椎境界領域の異常とその出現について。先天異常 20 : 143~150, 1980
- 17) MORITA H., ARIYUKI F., INOMATA N., NISHIMURA K., HASEGAWA Y., MIYAMOTO M. and WATANABE T. : Spontaneous malformations in laboratory animals : Frequency of external, internal and skeletal malformations in mice, rats and rabbits Cong. Anom. 27 : 147~206, 1987

## REPRODUCTION STUDIES ON 7432-S

### 3. TERATOLOGY STUDY IN RABBITS

YASUHIKO HASEGAWA and YONETAKA FUKIISHI  
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.  
3-1-1, Futabacho, Toyonaka, Osaka 561, Japan

A new oral cephem antibiotic, 7432-S, was studied for teratological effects using KBL : JW rabbits. Daily doses of 2.5, 10 or 40 mg/kg of 7432-S or 40 mg/kg of cefaclor (the reference drug) were given to dams by gavage from day 6 to 18 of pregnancy. The control group was given 1 ml/kg/day of the vehicle (5% aqueous acacia) alone in the same manner. The dams were killed on day 28 of pregnancy in order to examine their fetuses.

Body weight and food consumption were markedly suppressed in dams of the 7432-S 40 mg/kg group, but almost no such effects were found in the 7432-S 2.5 mg/kg and 10 mg/kg groups. Liquid material was sporadically found in the cecum in all dosed groups, and the cecal weight increased dose-dependently in the 7432-S 10 mg/kg and 40 mg/kg groups. Fetal viability was not affected in any dosed groups, but fetal body weight decreased in the 7432-S 40 mg/kg group. External, skeletal and visceral examinations of the live fetuses revealed no anomalies attributable to the antibiotic treatments.