

新キノロン系抗菌剤Fleroxacinのウサギにおける器官形成期投与試験

鈴木 博・石川 聡・小川由美子・高橋多喜夫・阿部泰夫

杏林製薬株式会社 中央研究所*

新キノロン系抗菌剤fleroxacinの25, 50および100mg/kgを妊娠ウサギの器官形成期に経口投与し母動物ならびに胎仔の発育に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

1. 母動物において流産が25mg/kg投与群で1例, 100mg/kg投与群で4例みられた。また, 100mg/kg投与群では体重の増加抑制がみられた。摂餌量はfleroxacin各投与群の投与初期に一過性の有意な減少がみられた。また, 妊娠末期の剖検で100mg/kg投与群に胃と盲腸の拡張が3例みられたが, 25および50mg/kg投与群には認められなかった。

2. 胎仔観察では25mg/kg群で平均生存胎仔数が有意に減少していたが, 吸収胚および死亡胎仔数に有意な差はみられなかった。さらに, 胎仔発育ならびに催奇形性作用についてもfleroxacin投与による影響は認められなかった。

以上の結果から, 母動物への無影響量は50mg/kg, 胎仔の催奇形性作用における無影響量は100mg/kg以上と推定された。

Key words: 合成抗菌剤, Fleroxacin, ウサギ, 生殖試験

Fleroxacinは杏林製薬株式会社において開発された新キノロン系抗菌剤で, グラム陽性菌およびグラム陰性菌の広範囲に優れた抗菌活性を示す¹⁾。今回, 本化合物をウサギの器官形成期に経口投与し, 母動物および胎仔の発育に及ぼす影響について検討したので, その結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 被験物質

本試験には杏林製薬で合成されたfleroxacin原末(Lot No. G524031)を用いた。

2. 実験動物および飼育条件

有限会社市川屋より生後5箇月齢のニュージーランド・ホワイト・ウサギを雄27匹, 雌124匹購入し, 約1箇月の検疫, 予備飼育後に実験に供した。

動物は温度21~24℃, 湿度35~75%, 換気回数10~20/h, 10時間照明(8:00am~6:00pm)の動物室内で金属製底金網ケージに個別に収容し, 日本クレア株式会社製のウサギ用固形飼料CR-1および水道水(25μm径フィルターでろ過)を自由に摂取させた。なお, 実験開始時の体重は雄で 3.4 ± 0.2 kg, 雌で 3.5 ± 0.2 kgであった。

3. 妊娠動物の作製および群分け

外陰部検査により適期と判定した雌を雄と1対1で同居させ, 交尾行動の確認された動物を妊娠動物とし, その日を妊娠0日目とした。得られた妊娠動物の群分けは無作為に行い, 1群当たり21匹とした。

4. 投与量および投与方法

本試験に先立ち, 同系のウサギを用いてfleroxacin 150, 300, 600および900mg/kgの投与量で予備試験を実施したところ, 150および300mg/kg投与群で流産がそれぞれ1/3および2/3例認められ, 600および900mg/kg投与群では死亡がそれぞれ1/2および2/2例認められたことから, 本試験の投与量を25, 50および100mg/kgとした。

Fleroxacinは0.3% CMC溶液に懸濁し, 投与液量が3ml/kgとなるよう, それぞれ用時調製した。投与は臨床投与経路に準じ, ネラトン・カテーテル(No.9)を用いて経口投与した。

投与期間は妊娠6日から18日目までの13日間とし, 1日1回投与した。投与液量は各個体の妊娠0日目の体重に基づいて算出し, 投与期間中一定にした。なお, 対照群には0.3% CMC溶液のみを投与した。

5. 観察方法

(1) 母動物の観察

母動物の一般状態観察および体重測定は毎日行い, 摂餌量の測定は妊娠5日目より19日目まで毎日行った。母動物は妊娠29日目に空気栓塞法により屠殺し, 直ちに開腹, 剖検後, 黄体数および着床数を調べた。なお, fleroxacinの血中濃度を調べるため, 各投与群それぞれ3匹について妊娠6日目の初回投与後, 1, 3時間目の血液ならびに妊娠18日目の最終投与後, 0, 1, 3時間目の血液を耳静脈より採取し, 血清を用いて血中濃度を測定した。

* 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町御手洗2399-1

(2) Fleroxacinの血中濃度測定

Fleroxacinの血中濃度は試験菌として*Bacillus subtilis* ATCC 6633を用いたBioassay法により測定した。試験菌に孢子を形成させ10⁶CFU/mlの孢子液を調製し、これを実験に供した。オートクレーブにて滅菌溶解した培地(感性ディスク用培地-N「ニッスイ」)を55℃に保ち、上記孢子液を0.1%(v/v)加え混合した。この培地5mlを直径100mmのシャーレに広げ、水平面上で固化させ、ステンレスカップ(直径8mm、高さ10mm)を4箇所等に間隔にのせた。それに1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)で適度に希釈した血清をピペットを用いて0.3mlずつ注入し、ふ卵器(37℃)内で1晩培養した後、カップの周囲に形成された阻止円の直径を測定した。1つのサンプルについて5つのカップを用いてそれらの値を平均し、標準液の検量線からfleroxacinの濃度を求めた。なお、阻止円の直径が平均値で10mm以下のものは無反応として扱った。

(3) 胎仔観察

妊娠動物を屠殺後開腹し、生存胎仔数、吸収胚数および死亡胎仔数を調べた。生存胎仔は体重および胎盤重量を測定し、外表、口腔内異常の有無を肉眼的に観察した後、開腹して性別を判定し、さらに、腹部の異常の有無を観察した。その後、それらの約半数をアルコール液中に、また、残りの約半数をブアン液中にそれぞれ固定した。前者の胎仔については、DAWSON法の変法²⁾によりアリザリン・レッド染色骨格透明標本を作製し、骨格観察

を行った。また、後者の胎仔はfree handによる粗大切片法(頭部、腹部：WILSON法³⁾、胸部：BARROW法⁴⁾)により内臓観察を行った。

6. 統計処理

計数値については χ^2 検定又はWILCOXONの順位和検定⁵⁾により、計量値については平均値±標準偏差で表し、F検定およびt検定によって処理し、有意水準は危険率5%未満とした。なお、胎仔に関する項目については一腹の平均値または百分率を求め、これを一標本単位として処理した。

Ⅱ. 実験結果

1. 母動物

(1) 一般状態観察

途中死亡はTable 1に示したように、対照群1例、25mg/kg投与群2例、50mg/kg投与群2例および100mg/kg投与群2例であった。そのうち、対照群の1例、25mg/kg投与群の2例、50mg/kg投与群の1例および100mg/kg投与群の1例は、いずれも投与中あるいは投与終了直後に死亡した。剖検の結果、口腔内出血、気管内出血、肺の出血あるいは肺の穿孔等を認めたため、誤投与による死亡とみなした。残りの50mg/kg投与群の1例は著変もみられず死亡し、剖検の結果では肺にうっ血が認められたがその他の臓器には特に異常は認められなかった。また、100mg/kg投与群の1例は妊娠1日目に死亡し、肋骨肋軟骨接合部の骨折および胃壁破裂等が認め

Table 1. Effects of fleroxacin on pregnant rabbits

Dose (mg/kg)	Control	25	50	100
No. of copulations	21	21	21	21
No. of dead rabbits	1	2	2	2
No. of infertilities	1	0	0	0
No. of pregnant rabbits	19	19	19	19
No. of aborted dams	0	1	0	4
No. of corpora lutea (per litter)	180 (9.5±1.5)	176 (9.3±1.7)	194 (10.2±1.7)	179 (9.4±2.2)
No. of implantations (per litter)	163 (8.6±1.3)	146 (7.7±1.7)	172 (9.1±1.2)	139 (7.3±3.0)
Implantation rate (%)	91.1	83.5	89.7	76.3
No. of resorptions (%)	1 (0.6)	2 (1.4)	6 (3.5)	7 ^{a)} (5.0)
No. of dead fetuses (%)	4 (2.5)	4 (2.7)	4 (2.3)	0 (0.0)
No. of aborted embryos	0	10*	0	35*

* significant difference from the control (P<0.05)
a) including the number of resorptions from aborted dams.

られたため事故死とみなした。流産は妊娠後期に25mg/kg投与群で1例および100mg/kg投与群で4例認められ、100mg/kg投与群の1例は妊娠後期に著しい削瘦が認められた。

(2) 体重

体重推移をFig. 1に示した。対照群と比較し、100mg/kg投与群では妊娠9日目より25日目まで連日体重増加抑制が認められた。ただし、妊娠18および19日目には有意差はみられなかった。一方、25および50mg/kg投与群においては有意な増加抑制は認められなかった。

(3) 摂餌量

投与期間中の摂餌量の推移をFig. 2に示した。対照群と比較し、25mg/kg投与群は妊娠6, 8, 9日目、また、50および100mg/kg投与群は妊娠7, 8, 9日目に摂餌量の有意な減少が認められた。その他、投与終了後に摂餌量の減少傾向を示した個体が各群に1~4例みられた。

(4) 剖検所見

妊娠末期における剖検では、25mg/kg投与群に胃噴門部の出血斑を認めるものが1例、100mg/kg投与群では肝臓に白斑を認めるものが1例、胃と盲腸の拡張しているものが3例認められたが、そのほかには特に異常は認められなかった。

2. Fleroxacinの血中濃度

妊娠6日目(投与初日)および18日目(投与最終日)の測定結果をTable 2に示した。投与初日と投与最終日の血清中濃度はほぼ同じ値を示し、投与後24後間では血清中のfleroxacinは測定されなかった。

3. 胎仔観察

妊娠末期の胎仔所見をTable 1に示した。平均黄体数、平均着床数、着床率、吸収胚および死亡胎仔数において、対照群とfleroxacin各投与群との間に有意差はみられなかった。流産胚(胎仔)数は25および100mg/kg投与群で有意に増加していた。

生存胎仔の観察結果をTable 3に示した。25mg/kg投与群では平均生存胎仔数が対照群に比べて有意に減少した。その他、生存胎仔数、性比、胎仔体重および胎盤重量については、対照群とfleroxacin各投与群との間に有意な差はみられなかった。外表異常は対照群およびfleroxacin各投与群に認められなかった。

内臓観察の結果をTable 4に示した。対照群の1例に大動脈弁および肺動脈弁の形成不全(Fig. 3)が観察されたのみで、fleroxacin各投与群に異常は全く認められなかった。

骨格観察の結果をTable 5に示した。骨格異常発生は25mg/kg投与群に仙椎椎体癒合(Fig. 4)1例、50mg/kg投与群に肋骨癒合(Fig. 5)1例および胸骨核癒合(Fig. 6)1

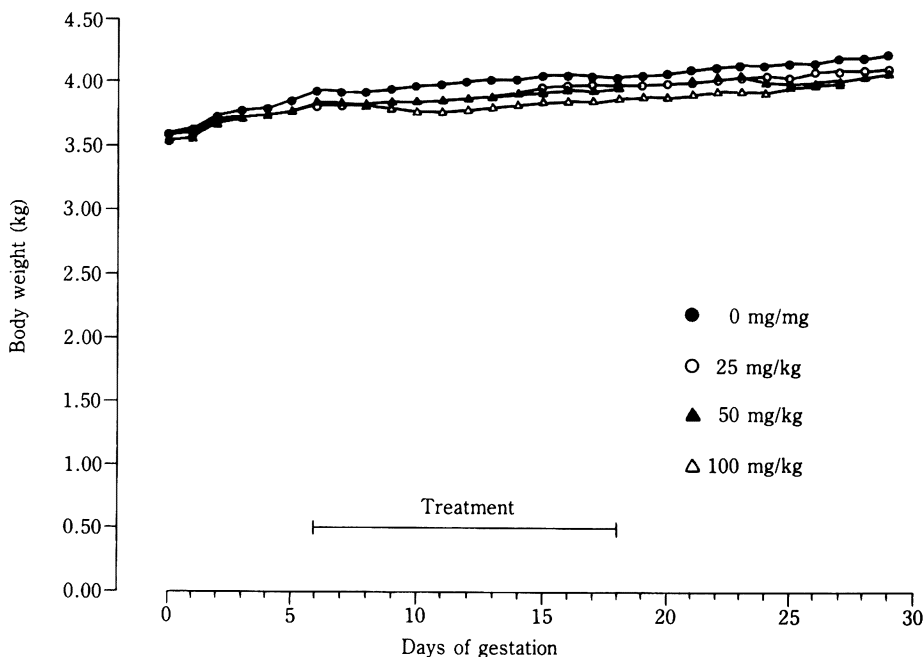


Fig. 1. Body weight changes of pregnant rabbits treated orally with fleroxacin for 13 days.

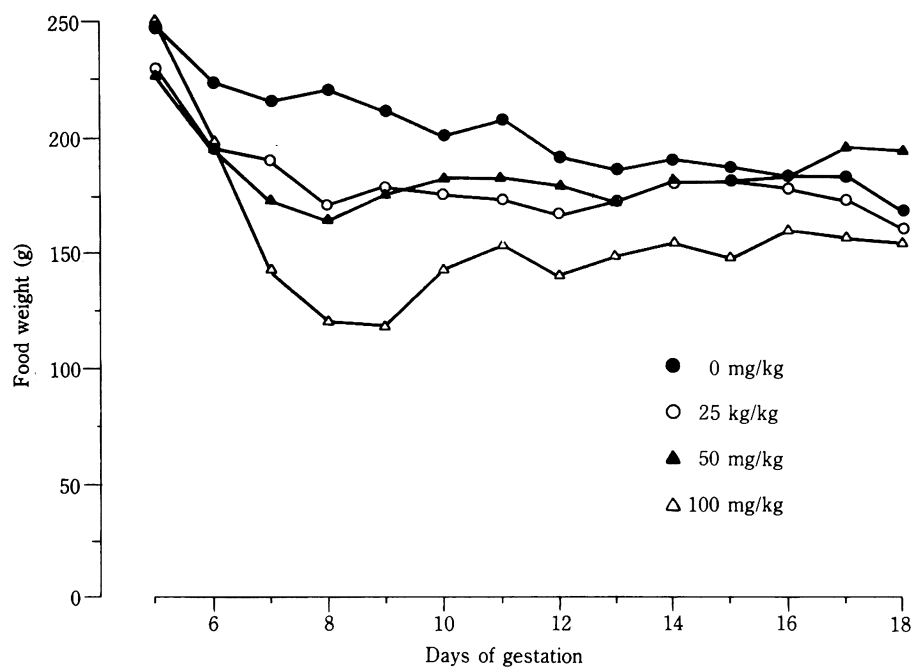


Fig. 2. Food consumption changes of pregnant rabbits treated orally with fleroxacin for 13 days.

Table 2. Serum concentrations of fleroxacin in pregnant rabbits after oral administration of fleroxacin

Dose (mg/kg)	No.	Time after administration (h)					
		6th day of gestation (first administration)		18th day of gestation (last administration)			
		1	3	0	1	3	
Control	1	ND ^{a)}	ND	ND	ND	ND	
	2	ND	ND	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	ND	ND	
	(mean)	—	—	—	—	—	
25	1	12.48 ^{b)}	4.29	ND	9.84	2.69	
	2	7.29	2.25	ND	6.17	2.26	
	3	7.26	2.44	ND	5.19	2.02	
	(mean)	(9.01)	(2.99)	—	(7.07)	(2.32)	
50	1	13.35	8.77	ND	19.72	3.82	
	2	3.29	1.24	ND	10.92	2.95	
	3	13.66	8.32	ND	17.17	9.04	
	(mean)	(10.10)	(6.11)	—	(15.94)	(5.27)	
100	1	47.96	23.59	ND	28.14	16.51	
	2	24.22	24.05	ND	34.86	18.86	
	3	37.89	14.69	ND	39.08	10.38	
	(mean)	(36.69)	(20.78)	—	(34.03)	(15.25)	

a) not detected
b) $\mu\text{g/ml}$

例が観察された。一方、骨格変異では50mg/kg投与群の第6胸骨核の化骨遅延が対照群に比べて有意に増加した。また、100mg/kg投与群の13-13肋骨が有意に減少した。化骨進行度の指標としての仙尾椎の化骨数においては、対照群とfloxacin各投与群との間に有意な差は認められなかった。

Ⅲ. 考 察

Floxacinを妊娠ウサギの器官形成期に投与し、母動物および胎仔への影響を検討した。

Floxacinの血清中濃度は、25、50および100mg/kgの投与で、用量依存的に上昇しており1時間値の血中濃度は25、50および100mg/kg投与群で、推定臨床用量での血中濃度⁶⁾のそれぞれ約2～3倍、4～5倍および10倍であった。

母動物に対する影響として、誤投与あるいは事故死を除き50mg/kg投与群に死亡1例がみられた。これは、投与終了後の妊娠24日目に突然死亡したもので、死亡時までの体重推移では、対照群および50mg/kg投与群の平均値と比較しても差は認められず、極端な摂餌量の減少もみられなかった。また、剖検によっても肺にうっ血が認められただけでその他の臓器には特に異常が認められ

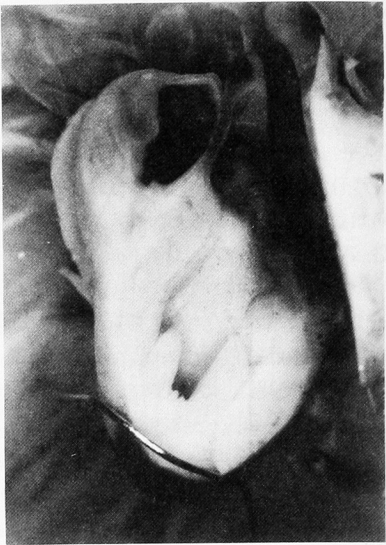


Fig. 3. Hypoplasia of the aortic and pulmonary truncal valves (control).

Table 3. Effects of floxacin on rabbit fetuses

Dose (mg/kg)	Control	25	50	100
No. of examined dams	19	18	19	15
No. of live fetuses (per litter)	158 (8.3±1.3)	130 (7.2±1.8)*	162 (8.5±1.0)	99 (6.6±3.2)
No. of males	72	70	81	55
No. of females	86	60	81	44
Sex ratio [M/F]	0.84	1.17	1.00	1.25
Fetal body weight [g]				
Males	45.57±6.68	46.25±7.40	45.30±4.64	46.99±5.50
Females	44.55±7.06	45.77±6.05	43.82±4.09	47.91±8.54
Placental weight [g]				
Males	4.76±1.04	5.09±0.91	4.56±0.75	4.89±1.18
Females	4.57±1.01	4.94±0.74	4.31±0.76	5.21±2.41
No. of malformed fetuses	0	0	0	0

* significant difference from the control (P<0.05)

Table 4. Effects of floxacin on visceral malformations in rabbit fetuses

Dose (mg/kg)	Control	25	50	100
No. of examined fetuses	79	65	80	49
Hypoplasia of the aortic and pulmonary truncal valves (%)	1 (1.3)	0	0	0

Table 5. Effects of fleroxacin on the skeleton of rabbit fetuses

Dose (mg/kg)	Control	25	50	100
No. of examined fetuses	79	65	82	50
Cervical rib	2 (2.5) ^{a)}	0	1 (1.2)	0
Sternebrae				
Asymmetry	0	0	1 (1.2)	0
Accessory				
Position I	0	5 (7.7)	1 (1.2)	0
Fusion				
Position IV-V	0	0	1 (1.2)	0
Retarded ossification				
Position V	19 (24.1)	20 (30.8)	26 (31.7)	16 (32.0)
Position VI	0	3 (4.6)	8 (9.8)*	3 (6.0)
Rib				
12-13 ribs (Extra)	10 (12.7)	2 (3.1)	13 (15.9)	4 (8.0)
13-13 ribs (Extra)	25 (31.6)	15 (23.1)	27 (32.9)	8 (16.0)*
Rudimentary ribs	22 (27.8)	14 (21.5)	15 (18.3)	12 (24.0)
Fusion				
Position V-VI	0	0	1 (1.2)	0
Sacral vertebrae				
Fusion of vertebral bodies	0	1 (1.5)	0	0
Sacral and caudal vertebrae				
No. examined ^{b)}	71	56	75	45
No. of ossifications	20.3±0.5 ^{c)}	20.2±0.4	20.1±0.4	20.3±0.4

* significant difference from the control (P<0.05)
a) %
b) specimens with missing caudal vertebrae were excluded.
c) mean ± SD

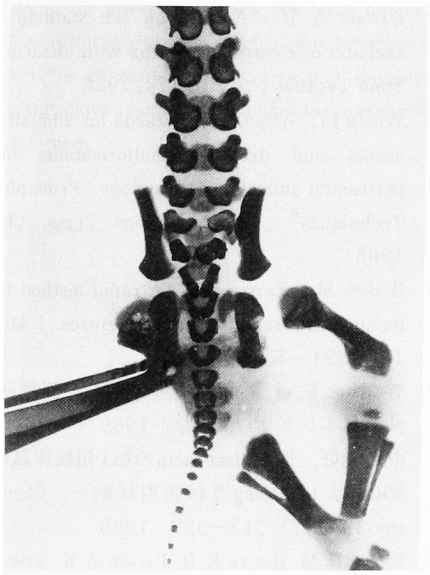


Fig. 4. Fusion of sacral vertebral bodies (25 mg/kg).

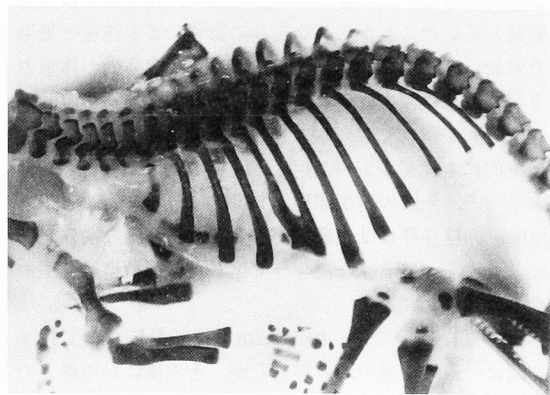


Fig. 5. Fused ribs (50 mg/kg).

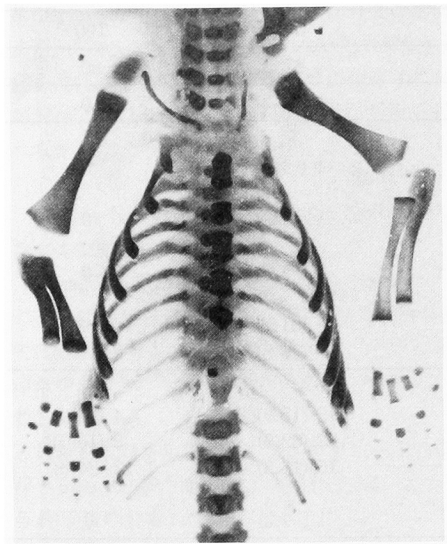


Fig. 6. Fused sternbrae and retarded ossification of sternbrae (50 mg/kg).

なかったことから、薬物との因果関係は薄いものと思われた。

流産は25mg/kg投与群で1例および100mg/kg投与群で4例認められた。ウサギを用いた抗生物質の催奇形性試験では、腸内細菌叢の菌交代現象に伴うと思われる一般状態の悪化により、流産が生じることが報告されている⁷⁻⁹⁾。さらに、MATSUZAWAらは妊娠中期の継続的な制限摂餌により流産を起こすことを報告している¹⁰⁾。100 mg/kg投与群の4例は、いずれも投与初期から体重減少ならびに著しい摂餌量の抑制がみられ、投与終了後も継続していたことから薬物投与の影響による流産と推測された。一方、25mg/kg投与群の1例は投与中の体重および摂餌量の減少はほとんどなく、妊娠後期に摂餌量の減少傾向が現れて流産したものである。ウサギでは自然発生的にも流産が2~5%起っていることが報告されており¹¹⁻¹²⁾、今回の発生頻度も19例中1例であることや、50mg/kg投与群には流産例がなく用量依存的な関係がないことから、25mg/kg投与群で生じた流産は自然発生的なものと思われた。

摂餌量については、floxacin各投与群において投与初期に一過性の減少がみられたが、その後は対照群との間に差はみられなかった。一方、体重推移では、100 mg/kg投与群で妊娠中期より後期にかけて増加抑制が認められ、floxacin投与の影響が示唆された。

妊娠末期の剖検において、胃と盲腸の拡張が100mg/

kg投与群に3例観察されたが、ラットの妊娠前および妊娠初期投与試験¹³⁾においても同様の所見がみられていることから、floxacinによる作用と推測された。

胎仔毒性についてみると、25mg/kg投与群の平均生存胎仔数は、対照群に比べ有意な減少を示したが、吸収胚および死亡胎仔数は対照群との間に有意差はなく、亀山ら¹⁴⁾の報告と比較しても正常範囲内の変動と思われる。骨格異常は25mg/kg投与群に仙椎椎体癒合1例(1.5%)、50mg/kg投与群に肋骨癒合1例(1.2%)および胸骨核癒合1例(1.2%)が観察されたのみであり、骨格変異は50 mg/kg投与群で第6胸骨核の化骨遅延ならびに100mg/kg投与群の13-13肋骨で有意な減少がみられたが、奇形発生の指標とされる13肋骨の発生には増加傾向が認められなかったことから、今回みられた骨格異常ならびに骨格変異は、自然発生的なものと思われた。なお、floxacin各投与群の胎仔体重、胎盤重量、外表異常発生および内臓異常発生の頻度については、対照群との間に差は認められなかった。以上の結果より、母動物への無影響量は流産および体重に影響がみられなかった50mg/kgと推定され、また、胎仔への無影響量は催奇形性が認められなかった100mg/kgあるいはそれ以上と推定された。

文 献

- 1) HIRAI K, AOYAMA H, HOSAKA M, OOMORI Y, NIWATA Y, SUZUE S, IRIKURA T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 1059~1066, 1986
- 2) DAWSON A B: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Technol* 1: 123~124, 1926
- 3) WILSON J G, WORKANY J: Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. "Teratology: Principles and Techniques", Univ Chicago Press, Chicago, 1965
- 4) BARROW M J, TAYLOR W J: A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol* 127: 291~306, 1969
- 5) WILCOXON F, et al. (佐久間 昭訳): 簡便統計手法, 日本レダリー, 東京, 1969
- 6) 中島光好, 他: Floxacinの第1相臨床試験Ⅱ-200および300mg連続服用試験一. *Chemotherapy* 38 (S-2): 312~327, 1990
- 7) BROWN D M, HARPER K H, PALMER A K, TESH S A: Effect of antibiotics upon pregnancy in the rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 12: 295, 1968

- 8) 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7報,
生殖試験:ウサギにおける胎仔の器官形成期投与
試験。Japan J Antibiot 33: 497~502, 1980
- 9) 杉崎孝之, 赤池雅司, 林 昌亮: Cefotaximeのウ
サギの生殖に及ぼす影響—胎仔の器官形成期静
脈内投与試験—。応用薬理 21, 375~384,
1981
- 10) MATSUZAWA T, NAKATA M, GOTO I, TSUSHIMA M: Diet-
ary deprivation induces fetal loss and abortion in
rabbits. Toxicology 22: 255~259, 1981
- 11) 杉崎孝之, 飯島美恵子, 高山和男, 林 昌亮,
宮本政樹: 日本白色種ウサギにおける胎仔奇形
の自然発生頻度。実験動物 28: 273~278,
1979
- 12) 松原孝雄, 山中宏志, 鈴木芳和: JW-NIBISウサ
ギにおける自然発生奇形。実験動物 33: 227~
232, 1984
- 13) 鈴木 博, 高橋多喜夫, 佐藤祐子, 阿部泰夫:
新キノロン系抗菌剤Fleroxacinのラットにおける
妊娠前および妊娠初期投与試験。
Chemotherapy38(S-2): 261~271, 1990
- 14) 亀山義郎, 谷村 孝, 安田峯生 実験動物にお
ける自然発生奇形—写真図譜および参考資料—。
先天異常 20: 25~104, 1980

TERATOLOGICAL STUDY OF FLEROXACIN IN RABBITS

HIROSHI SUZUKI, SATOSHI ISHIKAWA, YUMIKO OGAWA, TAKIO TAKAHASHI and YASUO ABE
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.
2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-01, Japan

Fleroxacin was administered orally to pregnant rabbits during fetal organogenesis at daily doses of 25, 50 and 100 mg/kg, and the following results were obtained.

1. In pregnant rabbits, abortions were observed in one and four cases of the 25 mg and 100 mg/kg groups, respectively. Body weight gain was suppressed in the 100 mg/kg group. Transient reduction in food intake was noted in the early days of treatment. Dilatation of stomach and caecum was observed in three cases of the 100 mg/kg group at autopsy on day 29 of gestation, but the other drug-treated groups were unaffected.

2. As to the effect on fetuses, the mean number of live fetuses was less in the 25 mg/kg group, but there were no significant differences in the number of resorptions or dead fetuses between the control and drug-treated groups. Moreover, there were no effects of fleroxacin on fetal development or any occurrence of teratogenicity.

From the above results, we consider the maximum no-effect dose of fleroxacin to be 50 mg/kg in dams, and 100 mg/kg or more in fetuses.