

## Cephem 系経口抗生物質 7432-S の生殖におよぼす影響

## (5) ラットにおける周産期および授乳期投与試験に関する補遺

長谷川 靖彦・伊藤 道雄

塩野義製薬株式会社研究所\*

(平成2年12月1日受付・平成2年12月22日受理)

新規経口 cephem 剤 7432-S のラット周産期および授乳期投与試験 (投与量: 125, 500 および 2,000 mg/kg/日) で, F<sub>0</sub>母動物・F<sub>1</sub>出生児の重量データは, 個体データを標本単位として, Student の t-検定 (等分散の場合) または Cochran-Cox の t-検定 (等分散でない場合) で解析したが, 出生時から離乳時までの F<sub>1</sub>出生児の体重および F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量に関する最大無影響量は明確でなかった。今回は, 同腹児の平均値を標本単位として, Kruskal-Wallis 検定・Dunn 法多重比較によって, これらの体重および盲腸重量に関する統計学的再検討を行った。その結果, 1) 出生時から離乳時までの F<sub>1</sub>出生児の体重は, 7432-S の 125 mg/kg/日投与で, 雌雄とも, これら哺育期間中のいずれの週齢においても, 対照群と比較して有意差は認められなかった。2) F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量は, 7432-S の 125 mg/kg/日投与で, 雌雄そして絶対重量・相対重量ともに, 対照群と比較して有意差は認められなかった。3) したがって, 出生時から離乳時までの F<sub>1</sub>出生児の体重および F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量に関する 7432-S の最大無影響量は, いずれも, 125 mg/kg/日と結論することができた。なお, 7432-S の 500 mg/kg および 2,000 mg/kg 投与群については, 今回の統計学的再検討を行っても, これらの F<sub>1</sub>出生児の体重および F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量に関して, 対照群と比較して有意差が認められた。

**Key words :** 7432-S, 抗生物質, 周産期・授乳期投与, ラット, F<sub>1</sub>児体重, F<sub>1</sub>児盲腸重量, 最大無影響量

7432-S は塩野義製薬株式会社研究所で開発された経口 cephem 系抗生物質で, Fig. 1 の構造を有する。本剤の生殖・発生毒性は, ラットを供試した妊娠前および妊娠初期投与試験<sup>1)</sup>, 胎児器官形成期投与試験<sup>2)</sup>, 周産期および授乳期投与試験<sup>3)</sup>ならびにウサギを供試した胎児器官形成期投与試験<sup>4)</sup>で検討し, その成績は本誌に発表した。これら各試験のうち, 周産期および授乳期投与試験<sup>3)</sup>では, 出生時から離乳時までの F<sub>1</sub>出生児の体重および F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量に関する最大無影響量の評価が曖昧で不明確であった。今回, これら両項目 (出生時から離乳時までの F<sub>1</sub>出生児の体重および F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量) について, 統計学的な再検討を行い, 両項目に関する最大無影響量を明らかにしたので, 補遺として報告する。

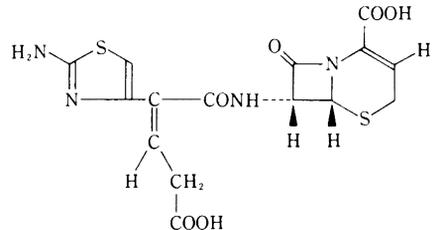
## I. 実験材料および実験方法

実験材料および実験方法の詳細は既報<sup>3)</sup>に示したので, 本報には概略を示す。

## 1. 実験動物および飼育条件

日本クレア (株) より購入した Sprague-Dawley 系

ラット (Jcl: SD) を使用した。ラットは個別ケージに收容し, 室温 (23±1°C), 相対湿度 (55±10%) を調節したバリエーションシステム空調室で飼育した。ラットにはオートクレーブした固型飼料 (日本クレア; CA-1) および飲水 (水道水を濾過後, 殺菌燈照射) を与え, 自由に摂取させた。



(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<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>  
Mol. wt.: 410.43

Fig. 1. Chemical structure of 7432-S

予備飼育および馴化飼育の後、10～11週齢の雌ラットを雄ラットと1対1で同居させ、翌朝、膈内に精子または膈栓を認めたものを妊娠0日の動物とした。1群には22～24匹の交尾成立雌ラットを配分した。

## 2. 検体および投与方法

被験物質として、7432-S原末 (Lot No. 56808, 力価: 861  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )、比較対照物質として、cefaclor原末 (Lot No. 256 GK 5 A, 力価: 956  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) および媒体として5%アラビアゴム水溶液を使用した。投与検体は用時調製した。すなわち、7432-Sあるいはcefaclorの原末に、5%アラビアゴム水溶液を加え、超音波装置を用いて25% (W/V, 力価換算) 懸濁液を調製した。7432-Sの6.25%および1.56%懸濁液は、25%懸濁液を5%アラビアゴム水溶液で稀釈して調製した。投与検体は、妊娠17日から哺育20日までの約26日間、1日1回、午前中に強制経口投与した。投与容量は、いずれの群も8 ml/kgとし、妊娠中は妊娠17日の体重、分娩後は分娩日(哺育0日)、哺育7日および14日の体重を基準に算出し、この間、同じ容量を投与した。

## 3. 投与量

本試験における投与量は、7432-Sのラット胎児器官形成期投与試験 (用量: 62.5, 250, 1,000, 4,000 mg/kg/日)<sup>2)</sup>の成績を参考に設定した。本試験では、器官形成期に比し約2.4倍の投与期間であること、さらに周産期および授乳期の母動物に投与することを考慮して、2,000 mg/kg/日 (25%懸濁液を投与) を最高用量とし、中間用量として500 mg/kg/日 (6.25%懸濁液を投与)、最低用量として125 mg/kg/日 (1.56%懸濁液を投与) を設定した。また、比較対照物質 cefaclor は、7432-Sの最高用量と同じ2,000 mg/kg/日 (25%懸濁液を投与) を設定した。対照群には媒体として用いた5%アラビアゴム水溶液のみを投与した。

## 4. 観察項目

### 1) 母動物 (F<sub>0</sub>)

妊娠母動物は、いずれも自然分娩させ、分娩日を哺育0日とした。分娩母動物の分娩状態を調べ、出生児を生後21日まで哺育させた。哺育21日に、母動物を屠殺、剖検し、主要器官重量を測定した。これらの屠殺母動物について血液学的検査と血液生化学検査を行った。子宮については着床痕数を数えた。

### 2) F<sub>1</sub>児

#### (1) 出生時から離乳までの観察

出生時 (生後0日) に生存児と死亡児を数え、生存児の外形観察と性別を行った。F<sub>1</sub>出生児の体重は生後0, 4, 7, 14 および21日に測定した。生後4日に、同

腹児数を8匹 (可能な限り雌雄同数) に調整した。これらのF<sub>1</sub>児は生後21日に離乳させた。離乳時に各腹のF<sub>1</sub>児について、生殖能検査用に雌雄各1匹、行動試験用に雌雄各1匹を残し、これらF<sub>1</sub>児は離乳後も継続飼育した。他のF<sub>1</sub>児は、この時点 (生後21日) で屠殺、剖検し、主要器官重量を測定した。この間、発育分化および反射機能も調べた。生後21日で屠殺したF<sub>1</sub>離乳児について血液学的検査を行った。

#### (2) 離乳後の観察

既報<sup>3)</sup>に示した項目 (体重、性成熟、行動、性周期、生殖能、器官重量、血液学的検査、血液生化学検査) を検討した。

### 3) F<sub>2</sub>胎児およびF<sub>2</sub>出生児

既報<sup>3)</sup>に示した項目 (胎児について生存性、体重、外形、内部器官、骨格; 出生児について、出生時から離乳時まで、血液学的検査を除いて、F<sub>1</sub>児と同様な項目) を検討した。

## 5. 統計学的解析方法

今回再検討を行った対象は、出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児の体重およびF<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量である。これら体重および盲腸重量に関して、各腹毎の同腹児の平均値を1標本単位として、Kruskal-Wallis検定<sup>5)</sup>を行い、危険率0.05で群間に有意差が検出された場合は、危険率0.05あるいは0.01として、群平均値に関するDunn法による多重比較<sup>5)</sup>を行った。体重に関しては、雌雄および測定日毎に分けて検定した。盲腸重量に関しては、雌雄および絶対重量・相対重量毎に分けて検定した。

## II. 実験成績

### 1. 出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児の体重

出生時 (生後0日) から離乳時 (生後21日) までの哺育期間中のF<sub>1</sub>出生児の体重はTable 1に示した。7432-Sの125 mg/kg投与群では、雌雄とも、これら哺育期間中のいずれの週齢においても、対照群に比較して有意差は認められなかったが (p>0.05)、7432-Sの500 mg/kg投与群では、雌の2週齢で有意差が認められた (p<0.05)。また、7432-Sの2,000 mg/kgおよびcefaclor投与群は、雌雄とも、これら哺育期間中のいずれの週齢においても、対照群と比較して有意な低体重であった (p<0.01)。これらの成績を総合すると、7432-Sの125 mg/kg/日投与は、出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児に低体重をもたらさないものと結論される。

### 2. F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量

生後21日で屠殺したF<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量はTable 2に示した。7432-Sの500 mg/kgおよび2,000 mg/kg

Table 1. Body weights of F<sub>1</sub> pups from mother rats given 7432 S or cefaclor by gavage from day 17 of pregnancy through day 20 of lactation

Age of pups (Day-old)	Compound and daily dose (mg/kg)				
	Control (5% acacia)	7432 S			Cefaclor
		125	500	2,000	2,000
0	23 <sup>a)</sup>	22	22	23	21
	6.1±0.1 (172) <sup>b)</sup>	5.9±0.1 (156)	6.1±0.1 (160)	5.5±0.1 (179)**	5.5±0.1 (152)**
	5.8±0.1 (169) <sup>c)</sup>	5.5±0.1 (171)	5.7±0.1 (150)	5.2±0.1 (165)**	5.1±0.1 (151)**
4	23	21	22	23	21
	9.7±0.2 (90)	9.2±0.2 (81)	9.3±0.2 (88)	8.4±0.2 (93)**	8.3±0.3 (81)**
	9.3±0.2 (94)	8.7±0.2 (87)	8.9±0.2 (88)	8.0±0.2 (91)**	7.7±0.3 (87)**
7	23	20	22	23	21
	16.0±0.3 (90)	15.4±0.4 (77)	15.2±0.3 (88)	13.9±0.3 (93)**	13.9±0.4 (81)**
	15.3±0.3 (94)	14.5±0.5 (83)	14.4±0.4 (88)	13.3±0.2 (91)**	13.1±0.4 (87)**
14	23	20	22	23	21
	32.5±0.4 (90)	31.5±0.6 (77)	30.1±0.5 (88)	28.1±0.4 (93)**	28.3±0.7 (81)**
	31.2±0.3 (94)	30.0±0.7 (83)	28.7±0.6 (88)*	27.3±0.5 (90)**	26.9±0.6 (87)**
21	23	20	22	23	21
	51.9±0.7 (90)	50.5±0.9 (77)	48.6±1.0 (87)	44.3±0.9 (93)**	45.4±1.2 (81)**
	50.0±0.6 (94)	48.8±1.1 (83)	46.7±1.1 (88)	43.2±0.9 (90)**	44.2±1.1 (87)**

Body weights of pups were statistically analyzed for each age by Kruskal-Wallis' test followed by Dunn's multiple comparison using means of the individual data of male or female litter-mates as the sample unit.

<sup>a)</sup> No. of litters

<sup>b)</sup> Mean body weight (g) with its SE and number (parentheses) of male pups

<sup>c)</sup> Mean body weight (g) with its SE and number (parentheses) of female pups

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

投与群では、雄の絶対重量・相対重量について、対照群と比較して有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。雌雄ともに、そして絶対重量・相対重量ともに、対照群と比較して有意差が認められないのは、7432-S の 125 mg/kg および cefaclor 投与群のみであった ( $p > 0.05$ )。

以上の成績以外の母動物 (F<sub>0</sub>)、F<sub>1</sub> 児および F<sub>2</sub> 児に関する成績は既報<sup>3)</sup>に詳述した。

### III. 考 察

新規合成 cephem 系抗生物質である 7432-S のラット周産期および授乳期投与試験を実施した際、得られた成績の統計学的解析として、連続量については、Student の t-検定 (等分散の場合) または Cochran-Cox の t-検定 (等分散ではない場合) を行い、頻度は  $\chi^2$  検

定 (Yates の補正つき) または Fisher の直接確率計算法で解析した。また、F<sub>2</sub> 胎児の体重、胎盤重量、尾椎骨数などは、Kruskal-Wallis 検定で解析した<sup>3)</sup>。これらの解析では、F<sub>2</sub> 胎児における Kruskal-Wallis 検定を除き、他はいずれも個体毎の成績を標本単位として検定した。その結果、F<sub>0</sub> 母動物の妊娠期間、分娩、哺育、F<sub>1</sub> 児の生存性、外形、発育分化、骨格、反射機能、離乳後の体重、行動、性成熟、生殖能、F<sub>1</sub> 児の生殖能検査後の器官重量、血液学的検査、血液生化学検査、さらに F<sub>2</sub> 胎児・出生児に対する影響などの生殖・発生毒性検査項目については、いずれも 7432-S の最大無影響量を推定することができた。しかしながら、出生時から哺乳時までの F<sub>1</sub> 出生児の体重および F<sub>1</sub> 離

Table 2. Cecal weights of 21 day old F<sub>1</sub> pups from mother rats given 7432-S or cefaclor by gavage from day 17 of pregnancy through day 20 of lactation

	Compound and daily dose (mg/kg)				
	Control (5% acacia)	7432-S			Cefaclor
		125	500	2,000	2,000
<b>Males</b>					
No. of litters	22	20	22	23	19
No. of pups	44	37	43	47	39
Cecal weight (g)	0.50±0.03 <sup>a)</sup>	0.40±0.03	0.35±0.02 <sup>**</sup>	0.32±0.01 <sup>**</sup>	0.43±0.04
(Mean±SE)	0.96±0.05 <sup>b)</sup>	0.79±0.04	0.72±0.04 <sup>**</sup>	0.74±0.03 <sup>**</sup>	0.93±0.05
<b>Females</b>					
No. of litters	23	20	22	23	21
No. of pups	48	43	44	44	45
Cecal weight (g)	0.45±0.02	0.38±0.02	0.36±0.02	0.32±0.02 <sup>**</sup>	0.39±0.02
(Mean±SE)	0.89±0.04	0.78±0.04	0.77±0.03	0.74±0.03	0.87±0.04

Absolute or relative cecal weights of pups were analyzed by Kruskal Wallis' test followed by Dunn's multiple comparison using means of the individual data of male or female litter-mates as the sample unit.

<sup>a)</sup> Absolute weight

<sup>b)</sup> Relative weight to 100 g of body weight

<sup>\*\*</sup> Statistically significant against control at  $p < 0.01$

乳児の器官重量(盲腸重量)に関する最大無影響量は、設定した最低用量(125 mg/kg/日)以下と推定され、これらの2項目に関する最大無影響量は曖昧であった。

1990年6月に公表された毒性試験の新ガイドラインの解説は、胎児あるいは授乳期の児に対する統計学的解析には、母体効果を考慮して、個体を標本単位とするよりも、同腹児を標本単位とするのが、一般的になってきたことを示している<sup>6)</sup>。そこで、今回、最大無影響量の評価が曖昧であった上記の2項目、すなわち、出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児の体重およびF<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量について、同腹児の成績の平均値を標本単位として統計学的な再検討を行った。

統計学的解析方法としては、Gad<sup>7)</sup>、レーマン<sup>8)</sup>、高垣<sup>9)</sup>などを参照し、最初に全群に関する吟味(global comparison<sup>7)</sup>)を行い、群間の有意差が検出された場合は、多重比較によって2群間の平均値の比較を行った。その結果、出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児の体重について、7432-Sの125 mg/kg投与群では、雌雄とも、これら哺育期間中のいずれの週齢においても、対照群に比較して有意差は認められず、また、F<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量についても、7432-Sの125 mg/kg投与群では、

雌雄それぞれの絶対重量・相対重量ともに、対照群に比較して有意差は認められなかった。

したがって、さきの報告<sup>3)</sup>では曖昧であった2項目、すなわち、出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児の体重およびF<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量に関する7432-Sの最大無影響量は、いずれも125 mg/kg/日と結論することができた。

なお、7432-Sの500 mg/kgおよび2,000 mg/kg投与群については、今回のような再検討を行っても、対照群に比較して有意差が認められるので、これら両投与群では、出生時から離乳時までのF<sub>1</sub>出生児の体重およびF<sub>1</sub>離乳児の盲腸重量に、7432-S投与の影響が発現しているものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 長谷川靖彦, 原 勝己: Cephem系経口抗生物質7432-Sの生殖に及ぼす影響(1)ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験. *Chemotherapy* 37 (S-1): 972~989, 1989
- 2) 長谷川靖彦, 竹川祐司: Cephem系経口抗生物質7432-Sの生殖に及ぼす影響(2)ラットにおける胎仔器官形成期投与試験. *Chemotherapy* 37 (S-1): 990~1025, 1989

- 3) 長谷川靖彦, 伊藤道雄: Cephem 系経口抗生物質 7432-S の生殖に及ぼす影響(4)ラットにおける周産期および授乳期投与試験。Chemotherapy 37 (S-1): 1040~1072, 1989
- 4) 長谷川靖彦, 轟石米孝: 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。Chemotherapy 37 (S-1): 1026~1039, 1989
- 5) Hollander M, Wolfe D A: Non-parametric Statistical Methods. pp. 114~137, John Wiley & Sons, New York, 1972
- 6) 厚生省薬務局審査第一課監修: 医薬品毒性試験法ガイドライン解説1990. p.28 薬事日報社 東京 1990
- 7) Gad S C: Statistical analysis of behavioral toxicology data and studies. Arch Toxicol Suppl 5: 256~266, 1982
- 8) レーマン, I.E.(鍋谷清治ほか訳): ノンパラメトリックス—順位にもとづく統計的方法... pp. 244~246 森北出版 東京 1978
- 9) 高垣善男: GLP に適合する安全性試験のやり方。pp. 113~116 アイシス 東京 1980

## REPRODUCTION STUDIES ON 7432-S

### 5. SUPPLEMENT TO PERINATAL AND POSTNATAL STUDY IN RATS

Yasuhiko Hasegawa and Michio Itoh

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.,

3-1-1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561, Japan

In a perinatal and postnatal study in rats on a new oral antibiotic, 7432-S, at daily doses of 125, 500 and 2,000 mg/kg, the data for weight in  $F_0$  dams and  $F_1$  postnatal offspring were statistically analyzed by Student's t-test (for homogeneous variances) and Cochran-Cox's t-test (for heterogeneous variances) using the individual data as the sample units. However, the data for the maximum no-effect doses of 7432-S were unclear for two items: the body weights of  $F_1$  postnatal offspring at the preweaning period from the day of birth through the day of weaning, and the cecal weights of  $F_1$  weanlings. In the present supplement, these two items were statistically re-analyzed by Kruskal-Wallis' test followed by Dunn's multiple comparison using the mean litter values as the sample units. No significant difference was detected for the body weights of males or females of  $F_1$  postnatal offspring at any age during the preweaning period and for the absolute or relative cecal weights of males or females of  $F_1$  weanlings between the 7432-S 125 mg/kg group and the control group. In the 7432-S 500 and 2,000 mg/kg groups, body weights and cecal weights were significantly different from those of the control group, even after statistical re-analysis. Thus, the maximum no-effect dose of 7432-S for both body weights of  $F_1$  postnatal offspring during the preweaning period and cecal weights of  $F_1$  weanlings was assessed as 125 mg/kg/day.