

【原著・基礎】

Tosufloxacin tosilate hydrate の幼若動物における毒性試験および
クラスエフェクトに関する検討古坊 真一¹⁾・福田 均¹⁾・小崎 司¹⁾・阿久根 淳²⁾・三善 隆広¹⁾¹⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所*²⁾ 株式会社新日本科学

(平成 22 年 4 月 20 日受付・平成 22 年 6 月 9 日受理)

Tosufloxacin tosilate hydrate (TFLX) の幼若動物における毒性を検討するため、ラットの単回ならびにラットおよびイヌの反復経口投与毒性試験を実施した。また、キノロン系薬のクラスエフェクトとして知られる関節毒性、QT 延長作用および血糖への影響を検討した。

7 日齢ラットの単回経口投与試験の結果、致死量は 6,000 mg/kg を上回る量であった。7 日齢ラットの 1 カ月間反復経口投与試験では、3,000 mg/kg で雄 1 例が死亡し、生存例には一過性の体重増加抑制がみられた。1,000 mg/kg 以上で腎尿管に結晶がみられたが、成熟ラットでも認められる軽度の変化であった。300 mg/kg では上記の変化はみられなかった。3 週齢イヌの 1 カ月間反復経口投与試験では、300 mg/kg 以上で摂餌量低下および体重増加抑制がみられたが、同様の変化は norfloxacin (NFLX) や ciprofloxacin hydrochloride hydrate (CPFH) でもみられた。150 mg/kg では異常はなかった。

3 カ月齢イヌの 2 週間経口投与関節毒性試験では、50 mg/kg 以上で肩関節に微小な水疱やびらんがみられたが、NFLX や CPFH に比べ弱い変化であった。

QT 延長作用の検討では、hERG 電流の軽度抑制 (約 5%, hERG 導入 HEK 293 細胞) が 10 μ mol/L 以上でみられたが、イヌのテレメトリー試験では 100 mg/kg までの経口投与で血圧、心拍数および心電図に影響はなかった。

血糖およびインスリン分泌への影響をイヌで検討したが、600 mg/kg までの経口投与で影響はなかった。

以上のように、本薬の関節毒性は NFLX および CPFH より弱く、他に幼若動物で特有の毒性および増強される毒性はなかった。また、QT 間隔、血糖およびインスリン分泌にも明らかな影響はなかった。

Key words: tosufloxacin, juvenile animal, adverse effect

Tosufloxacin tosilate hydrate (TFLX, Fig. 1) は、グラム陽性菌、グラム陰性菌ならびにクラミジアにまで及ぶ幅広い抗菌スペクトルとともに、強い抗菌活性を有するキノロン系薬である^{1,2)}。これまで、キノロン系薬は小児における有効性および安全性が十分確認されておらず、特に関節毒性が懸念されることから、国内では NFLX を除き小児への使用が禁忌となっていた³⁾。一方、小児の肺炎および中耳炎において、近年、penicillin-intermediate および penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PISP および PRSP)^{4,5)}、 β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR)^{6,7)}、 β -lactamase 産生 *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*⁸⁾ などの薬剤耐性菌が問題となっており、医療現場からはこれら耐性菌に効果のあるキノロン系薬の小児用薬が要望されている。

今回、本薬を小児用薬として開発するにあたり、幼若動物に対する毒性を評価する目的で、幼若ラット (7 日齢) における

単回経口投与毒性試験ならびに幼若ラット (7 日齢) および幼若イヌ (3 週齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験を実施した。また、キノロン系薬のクラスエフェクトとして知られている作用のうち、幼若動物における関節毒性^{9,10)} (3 カ月齢の幼若イヌにおける 2 週間反復経口投与関節毒性試験)、QT 延長作用^{11,12)} (覚醒イヌの心血管系および hERG 電流への影響) および膀胱への作用¹³⁾ (イヌの血糖およびインスリン分泌への影響) についても検討した。

なお、投与量はすべて tosufloxacin tosilate hydrate 量で記載した。

I. 材料と方法

1. 被験物質

いずれの試験においても富山化学工業株式会社に製造した TFLX (ロット: TCP3 および HI287) を用いた。

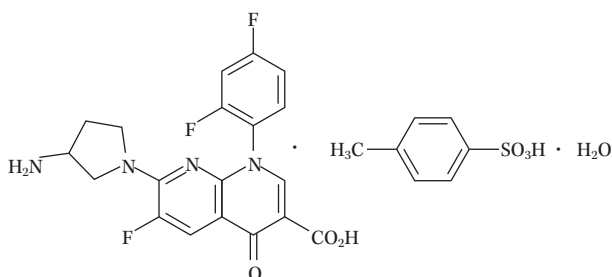


Fig. 1. Chemical structure of tosoflaxacin tosylate hydrate.

2. 試験方法

1) 幼若ラット (7日齢) における単回経口投与毒性試験

7日齢の幼若ラット (SD系, 日本チャールス・リバー) に TFLX を 0 (対照群), 3,000 および 6,000 mg/kg の用量で単回経口投与した (各群雌雄各 5 例)。また, 週齢による急性毒性の違いを検討するため, 6 週齢ラットにも同様に投与した。毎日一般状態の観察および体重測定を行い, 投与後 14 日にジエチルエーテル麻酔下で放血安楽死させた後, 各器官, 組織および関節軟骨 (肩, 肘, 股および膝関節) を肉眼的に観察した。

2) 幼若ラット (7日齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験

7日齢の幼若ラット (SD系, 日本チャールス・リバー) に TFLX を 0 (対照群), 300, 1,000 および 3,000 mg/kg の用量で 1 カ月間反復経口投与した (各群雌雄各 10 例)。また, 対照群および 3,000 mg/kg 群には 1 カ月間の回復性試験群 (各群雌雄各 5 例) を設け, 以下の観察および検査を行った。

(1) 一般状態および体重測定

一般状態観察を毎日, 体重測定を投与期間中は週 2 回, 回復期間中は週 1 回行った。

(2) 尿検査

投与 4 週目および回復 4 週目に, 尿量, pH, ブドウ糖, ケトン体, 潜血, ビリルビン, ウロビリノーゲン, 蛋白, 比重, 尿沈渣, ナトリウム (Na), カリウム (K), 塩素 (Cl) を測定した。

(3) 血液学的検査

剖検時に, 総合血液学検査装置 (ADVIA 120, シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス) により, 赤血球数 (RBC), 白血球数 (WBC), ヘマトクリット (Ht), ヘモグロビン濃度 (Hb), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC), 血小板数 (Plt), 白血球百分率, 網赤血球数 (Ret) を測定した。

(4) 血液生化学的検査

剖検時に, 自動分析装置 (日立 7070 形, 日立製作所) により, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), ア

ルカリホスファターゼ (ALP), クレアチンキナーゼ (CK), 乳酸脱水素酵素 (LDH), トリグリセリド (TG), リン脂質 (PL), 総コレステロール (Cho), 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), アルブミン/グロブリン比 (A/G), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cr), 血糖, 総ビリルビン (T-Bil), 無機リン (IP), カルシウム (Ca), Na, K, Cl を測定した。また, 血清をセルロースアセテート膜で電気泳動し, 蛋白分画比を測定した。

(5) 眼科学的検査

投与 4 週目および回復 4 週目に, 眼部の外観と眼底の観察を行った。

(6) 剖検, 器官重量測定および病理組織学的検査

投与期間終了時および回復期間終了時に, ジエチルエーテル麻酔下で動物を放血安楽死させ, 各器官, 組織および四肢関節 (肩, 肘, 股および膝関節) を肉眼的に観察した。脳, 下垂体, 唾液腺, 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 盲腸, 甲状腺, 精巣, 精囊, 前立腺, 精巣上体, 卵巣および子宮を採取し, 重量測定および重量体重比の算出を行った。さらに, 気管, 脾臓, 舌, 食道, 胃, 小腸, 大腸, 下顎部および腸間膜リンパ節, 眼球, ハーダー腺, 骨格筋, 脊髄, 胸骨, 大腿骨, 脛, 乳腺, 膀胱, 皮膚, 大動脈, 四肢関節を採取した。対照群および 3,000 mg/kg 群の各器官, 組織 (関節を除く) ならびに 300 および 1,000 mg/kg の腎臓について, 病理組織学的検査を行った。

3) 幼若イヌ (3 週齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験

3 週齢の幼若ビーグル犬 (北山ラベス) に TFLX を 0 (対照群), 150, 300 および 600 mg/kg の用量で 1 カ月間反復経口投与した (各群雌雄各 3 例)。対照群および 600 mg/kg 群には 1 カ月間の回復性試験群 (各群雌雄各 1 例) を設けた。また, 比較対照として, norfloxacin (NFLX, 和光純薬工業) の 51 および 102 mg/kg 群ならびに ciprofloxacin hydrochloride hydrate (CPFH, 和光純薬工業) の 59 および 119 mg/kg 群 (各群雌雄 3 例) を設定し, 以下の観察および検査を行った。

(1) 一般状態観察

投与期間中および回復期間中, 一般状態観察を毎日行った。

(2) 体重および摂餌量測定

投与期間中および回復期間中, 体重測定を週 2 回, 摂餌量測定を毎日行った。

(3) 眼科学的検査

投与 3 週目および回復 3 週目に, 眼部の外観, 中間透光体および眼底の観察ならびに網膜電位図測定 (ERG-50, 興和) を行った。

(4) 心電図検査

投与開始前, 投与 4 週目および回復 4 週目に, 心電図解析装置 (カーディサニー α 6000AX-D, フクダ M・E

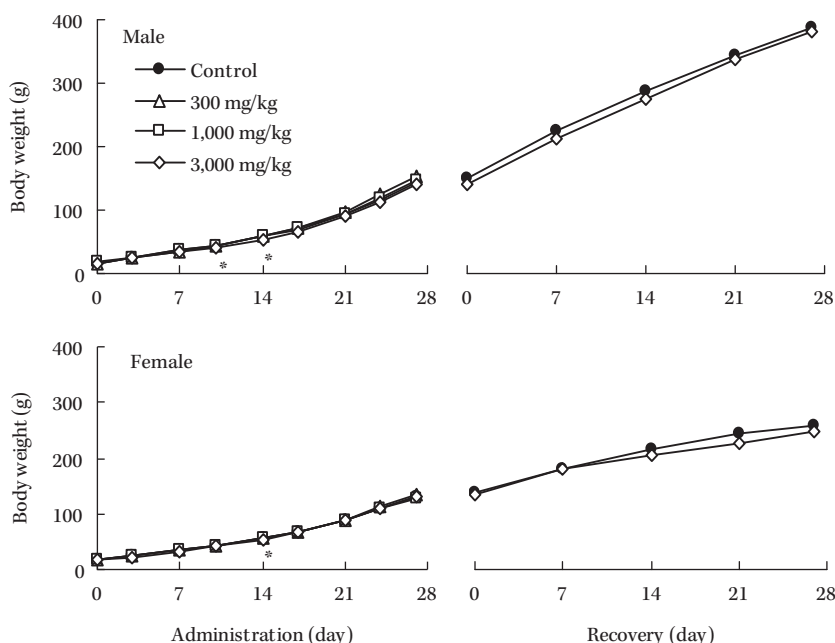


Fig. 2. Changes in mean body weight in juvenile rats administered TFLX orally for 1 month.

*: The difference from controls is significant at $p < 0.05$ in the 3,000 mg/kg group.

Table 1. Histopathology in juvenile rats administered TFLX orally for 1 month

Organ/Tissue and Findings	Dose (mg/kg)	Control		300		1,000		3,000	
		8M	8F	7M	5F	10M	10F	10M	10F
Kidney									
Crystal, renal tubular lumen		0	0	0	0	3[+]	2[±], 1[+]	5[±], 1[+]	4[±], 4[+]
Dilatation, renal tubule		0	0	0	0	2[±]	2[+]	5[±], 1[+]	4[±], 2[+]
Foreign body reaction		0	0	0	0	0	0	2[±]	4[±]

Number of animals with findings and degree in [] (±, very slight; +, slight).

M: male.

F: female.

There were no histopathological findings related to test article administration in other organs/tissues, including the brain, pituitary, salivary gland, thymus, heart, lung, liver, spleen, adrenal, cecum, thyroid, testis, seminal vesicle, prostate, epididymis, ovary, uterus, trachea, pancreas, tongue, esophagus, stomach, small intestine, large intestine, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, eye, Harderian gland, skeletal muscle, spinal cord, bone, bone marrow, vagina, mammary gland, urinary bladder, skin, and aorta.

There were no histopathological findings related to test article administration at the end of recovery in the 3,000 mg/kg group.

工業)を用いて心電図を測定した。

(5) 尿検査

投与4週目および回復4週目に、色調、pH、ブドウ糖、ケトン体、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲン、蛋白を検査した。

(6) 血液学的検査

投与開始前、投与4週目および回復4週目に、総合血液学検査装置(ADVIA 120)により、RBC、WBC、Ht、Hb、MCV、MCH、MCHC、Plt、白血球百分率およびRetを、全自動血液凝固測定装置(CA-5000、シスメックス)により、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

(7) 血液生化学的検査

投与開始前、投与4週目および回復4週目に、自動分

析装置(JCA-BM8、日本電子)により、AST、ALT、ALP、CK、LDH、TG、Cho、TP、Alb、BUN、Cr、血糖、T-Bil、IP、Ca、Na、K、Clを測定した。

(8) 剖検、器官重量測定および病理組織学的検査

投与期間終了時および回復期間終了時剖検日に全例について、ベントバルビタール麻酔下で放血安楽死させ、各器官、組織および四肢関節(肩、肘、手根、股、膝および足根関節)を肉眼的に観察した。脳、下垂体、顎下腺、胸腺、心臓、肺、肝臓(胆嚢を含む)、脾臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺、精巣、前立腺、精巣上体、卵巣および子宮を採取し、重量測定および重量体重比の算出を行った。さらに気管、舌、食道、胃、小腸、大腸、下顎部および腸間膜リンパ節、眼球、涙腺、骨格筋、脊髄、坐骨神経、胸骨、大腿骨、膈、乳腺、膀胱、皮膚、大動

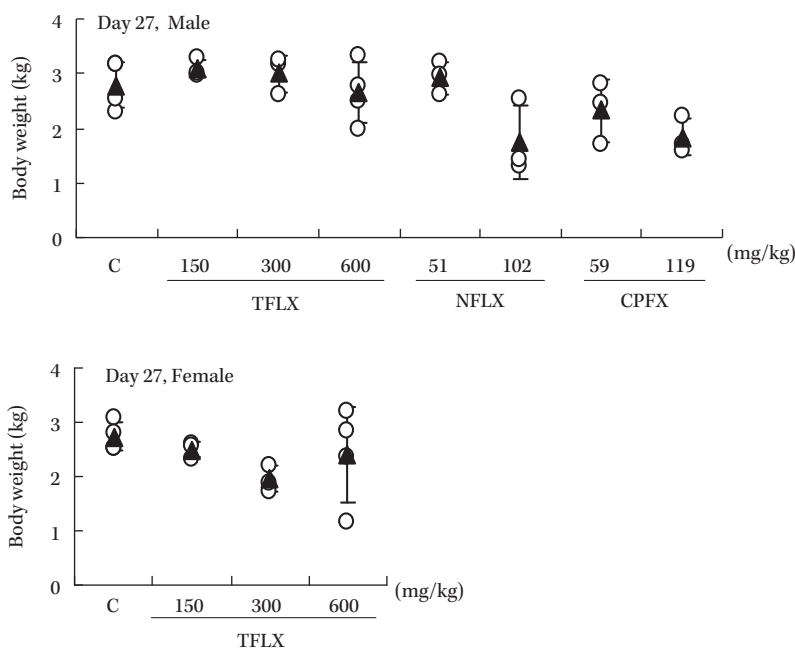


Fig. 3. Body weight in juvenile dogs administered TFLX, NFLX, and CPFX for 1 month.

Individual (○) and group mean (▲) body weights on the end of administration (Day 27) are indicated.

Error bars are standard deviation.

脈、四肢関節を採取した。全例の各器官および組織について、病理組織学的検査を行った。

(9) 血漿中薬物濃度測定

最終投与日に血漿中 tosylfloxacin 濃度を経時的に測定し、 C_{max} および AUC_{0-t} を算出した。

4) 幼若イヌ (3カ月齢) における2週間反復経口投与関節毒性試験

3カ月齢の幼若ビーグル犬 (自家繁殖) に TFLX を 0 (対照群)、50 および 500 mg/kg の用量で2週間反復経口投与した (各群4例、雄2または3例、雌1または2例)。投与期間終了時にペントバルビタール麻酔下で放血安楽死させ、四肢関節 (肩、肘、手根、股、膝および足根関節) を肉眼的に観察するとともに、各群の上腕骨近位端、対照群および 500 mg/kg の大腿骨近位端および遠位端について病理組織学的検査を行った。また、初回および最終投与日に血清中 tosylfloxacin 濃度を経時的に測定し、 C_{max} および AUC_{0-t} を算出した。

5) 覚醒イヌにおける血圧、心拍数および心電図への影響

10カ月齢の雄性ビーグル犬4例 (日本農産工業) にテレメトリー用送信器 (Data Sciences International) を埋設し、7または8日間の投与間隔で、空カプセルならびに TFLX の 30 および 100 mg/kg を順に単回経口投与した。覚醒下、データ取得解析システム (Dataquest A.R.T. Analog, Data Sciences International および NOTOCORD-hem, Notocode systems) により血圧、心拍数および心

電図 (RR, PR, QRS および QT 間隔) を記録した。また、Fridericia¹⁴⁾ による補正式により QTc を算出した。

6) hERG 電流への影響

hERG 導入 HEK 293 細胞 (Cytomyx) に、媒体 (0.25 vol% DMSO)、TFLX は溶解限界である 20 μ mol/L を最高濃度に、以下、3 および 1 μ mol/L、moxifloxacin (MFLX, アベロックス錠より富山化学工業にて抽出) は 100, 30 および 10 μ mol/L の濃度で10分間適用し、ホールセルクランプ法 (保持電位 -80 mV, 脱分極パルス +20 mV で1.5秒間, 再分極パルス -50 mV で1.5秒間, 15秒間に1回の試験パルス) により hERG 電流を測定した (各群5細胞)。なお、細胞には外液 [組成 (mmol/L): NaCl, 137; KCl, 4; HEPES, 10; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; glucose, 10; pH 7.33~7.37] を灌流し、槽内の温度は 22.2~24.9°C に維持した。また、ガラス電極は抵抗値 2.3~6.1 M Ω で、電極内液 [組成 (mmol/L): KCl, 130; MgCl₂, 1; EGTA, 5; HEPES, 10; MgATP, 5; pH 7.20] を充填したものを用いた。

7) イヌの血糖およびインスリン分泌への影響

8~9カ月齢の雄性ビーグル犬8例 (日本農産工業) に、7日間の投与間隔で、空カプセル、TFLX の 100 および 600 mg/kg ならびに tolbutamide (ブタマイド錠, 富山化学工業) の 1,000 mg/body を順に単回経口投与した。それぞれの投与後12時間まで、血糖 (ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法, 自動分析装置 日立 7070 形) およびインスリン濃度 (EIA サンドイッチ法, 超高感度ラットインスリ

Table 2. Histopathology in juvenile dogs administered TFLX orally for 1 month

Organ/Tissue and Findings	Test substance Dose (mg/kg)	Control		TFLX						NFLX		CPFX	
		Number of animals		150		300		600		51	102	59	119
		3M	3F	3M	3F	3M	3F	3M	3F	3M	3M	3M	3M
Bone marrow, sternal													
Decrease, hematopoietic cell		0	0	0	0	0	1[±]	1[±]	1[±]	0	2[±, ++]	1[±]	1[+]
Bone marrow, femoral													
Decrease, hematopoietic cell		0	0	0	0	0	1[±]	1[±]	1[±]	0	2[±, ++]	1[±]	1[±]
Spleen													
Decrease, lymphocyte, white pulp		0	0	0	0	0	0	0	1[±]	0	2[±, +]	0	1[±]
Thymus													
Decrease, lymphocyte		0	0	0	0	0	0	0	1[±]	0	1[±]	1[+]	1[±]
Liver													
Atrophy/decreased glycogen area, hepatocyte		0	0	0	0	0	2[±]	1[±]	1[±]	0	2[±]	0	1[±]
Bone, sternum													
Retarded ossification, trabecula, spongy bone		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1[±]
Bone, femur													
Retarded ossification, trabecula, spongy bone		0	0	0	0	0	1[±]	1[±]	1[±]	0	2[±]	1[±]	1[±]

Number of animals with findings and degree in [] (±, very slight; +, slight; ++, moderate).

M: male.

F: female.

There were no changes related to test article administration in any groups in other organs/tissues, including the brain, pituitary, submandibular gland, heart, lung, gall bladder, pancreas, kidney, adrenal, thyroid, testis, prostate, epididymis, ovary, uterus, trachea, tongue, stomach, small intestine, large intestine, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, eye, lacrimal gland, skeletal muscle, spinal cord, sciatic nerve, vagina, mammary gland, urinary bladder, skin, aorta, and articular cartilage of shoulder, elbow, carpal, hip, knee, and tarsal joint.

There were no histopathological findings related to test article administration at the end of recovery in the 600 mg/kg group.

ン測定キット, 森永生科学研究所)を経時的に測定した。

3. 統計処理

各試験より得られた定量値データについて, 多群間比較には Bartlett 検定の後, 等分散の場合は Dunnett 検定を, 不等分散の場合は Steel 検定を行った。なお, hERG 電流値の多群間比較には Bartlett 検定の後, 等分散の場合は Williams の検定を, 不等分散の場合は Shirley-Williams の検定を行った。二群間の比較には, いずれの試験でも F 検定の後, 等分散の場合は Student の t 検定を, 不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行った。いずれの検定においても有意水準は 5% とした。

II. 結 果

1. 幼若ラット (7 日齢) における単回経口投与毒性試験

7 日齢ラットには, 高用量の 6,000 mg/kg でも死亡例はなく, 一般状態, 体重, 剖検時肉眼観察に異常はみられなかった。また, 6,000 mg/kg 群でも, 四肢の関節に肉眼的異常はみられなかった。6 週齢ラットでも同様の結果であり, 概略の致死量は, 7 日齢ラットおよび 6 週齢ラットともに 6,000 mg/kg を上回る量であった。

2. 幼若ラット (7 日齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験

3,000 mg/kg 群の雄 1 例に投与 14 日から自発運動の低下がみられ, 投与 16 日に同例を死後発見した。死亡例

の剖検では, 胃および盲腸に黄白色物質, 消化管内にガスの貯留が, 病理組織学的検査では肺に軽度のヘマトイジン結晶がみられたが, その他に異常はみられなかった。

生存例では, 3,000 mg/kg 群に軽度体重増加抑制が投与 10 日~14 日にみられたが, 一過性の変化であり, 投与 17 日以降の体重推移に異常はみられなかった (Fig. 2)。1,000 mg/kg 以上の群で腎尿管細管腔に結晶, 尿管の拡張および異物反応がみられた (Table 1)。なお, 300 mg/kg 以上の群で, 盲腸重量および重量体重比の増加ならびに血清中 Na の減少が, 1,000 mg/kg 以上の群で血清中 Cl の減少が, 3,000 mg/kg では PL および Cho の増加がみられたが, これらはいずれも本薬の抗菌活性に起因する腸内細菌叢の変化によるものと考えられた。四肢関節 (肩, 肘, 股および膝) の肉眼観察およびその他の検査項目には本薬投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。また, 1 カ月間の回復性試験では, いずれの検査項目にも異常はみられなかった。

以上の結果より, 1,000 mg/kg 以上の群で腎尿管細管腔に結晶がみられたことから, 本試験の無毒性量は 300 mg/kg/日であった。

3. 幼若イヌ (3 週齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験

TFLX では, 150 mg/kg 群の各検査項目に異常はみられなかった。体重増加抑制 (Fig. 3) および摂餌量の低下

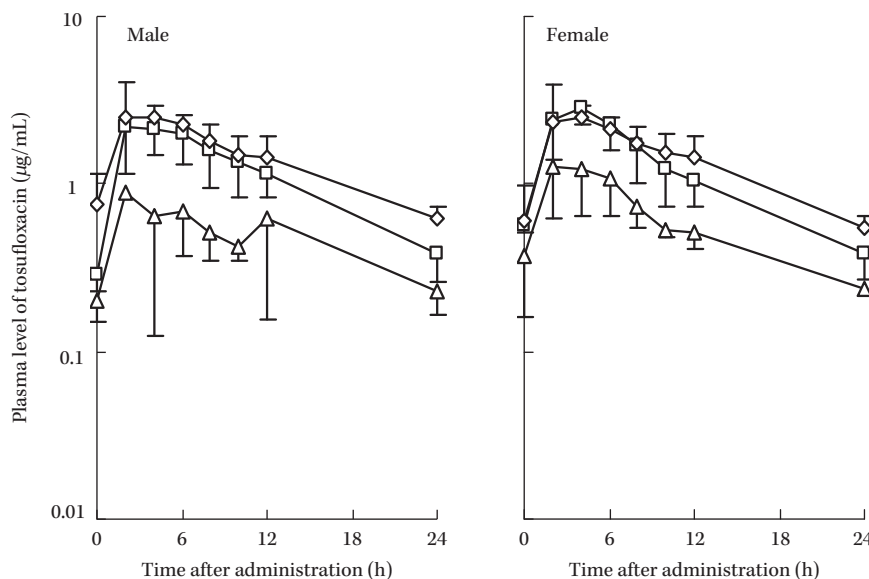


Fig. 4. Plasma level of TFLX after oral administration in juvenile dogs. On the final day (Day 28) of dosing at 150 (\triangle), 300 (\square), and 600 mg/kg (\diamond). Error bars are standard deviation.

が 300 mg/kg 群の雌 2/3 例および 600 mg/kg 群の雌雄各 1/4 例にみられ、また、600 mg/kg 群では雌 1/4 例に嘔吐が高頻度に見られた。体重増加抑制および摂餌量の低下が見られた動物には、血糖の減少、Cho および BUN の増加ならびに肝臓重量の減少が見られ、病理組織学的検査では、胸骨および大腿骨骨髄に骨髄細胞の減少、大腿骨に海綿骨の化骨遅延、肝細胞の萎縮/グリコーゲン野の減少あるいは白脾髄および胸腺にリンパ球の減少が観察された (Table 2)。四肢関節 (肩、肘、手根、股、膝および足根) には、いずれの投与量でも肉眼的および組織学的異常は見られなかった。その他の検査項目には被験物質投与に起因すると考えられる変化は見られなかった。1 カ月間の回復性試験では、いずれの検査項目にも異常は見られなかった。以上の結果より、300 mg/kg 以上の群で体重増加抑制、摂餌量の低下および嘔吐が見られたことから、本試験の無毒性量は 150 mg/kg/日であった。血漿中薬物濃度測定の結果 (Fig. 4)、最終投与日における TFLX 150, 300 および 600 mg/kg 群の未変化体の C_{max} は、それぞれ 1.0~1.3, 2.4~3.2 および 2.7~2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 AUC_{0-t} はそれぞれ 12.3~15.0, 29.0~31.1 および 34.4~35.5 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ であった。

NFLX では 102 mg/kg 群の 2/3 例に、CPFLEX では 59 mg/kg および 119 mg/kg 群のそれぞれ 1/3 例に体重増加抑制 (Fig. 3) および摂餌量の低下が見られた。これらの動物には AST, ALT, Cho の増加、血糖の減少または IP の減少あるいは肝臓重量および胸腺重量の低値が見られ、病理組織学的検査では、胸骨および大腿骨骨髄に骨髄細胞の減少、大腿骨に海綿骨の化骨遅延、肝臓に肝細胞の萎縮/グリコーゲン野の減少および白脾髄、胸腺に

リンパ球の減少が見られた (Table 2)。四肢関節には、NFLX および CPFLEX とも、いずれの投与量でも異常は見られなかった。

4. 幼若イヌ (3 カ月齢) における 2 週間反復経口投与関節毒性試験

四肢関節軟骨の肉眼的観察で、50 mg/kg 群 1/4 例の上腕骨近位端に微小な水疱が、500 mg/kg 群 3/4 例の上腕骨近位端に微小な水疱またはびらんが見られ (Table 3)、病理組織学的には、関節軟骨の空洞形成、軟骨表層の剥離、軟骨細胞の壊死、巨細胞様軟骨細胞塊および線維化が観察された (Table 4)。

血漿中薬物濃度測定の結果、初回投与日における TFLX 50 および 500 mg/kg 群の未変化体の C_{max} は、それぞれ 2.62~6.10 および 2.83~4.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 AUC_{0-t} はそれぞれ 25.8~54.4 および 39.2~66.4 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ であった (Table 3)。

5. 覚醒イヌの血圧、心拍数および心電図に及ぼす影響

TFLX は 100 mg/kg まで血圧、心拍数および心電図 QTc に影響を及ぼさなかった (Fig. 5)。また、他の心電図パラメータ (PR, QRS および QT 間隔) にも影響は見られなかった。

6. hERG 電流に及ぼす影響

TFLX の 10 および溶解限界濃度の 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ で hERG 電流の軽度抑制 (約 5%) がみられたが、濃度との関連は見られなかった。MFLX では、10, 30 および 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ で、それぞれ 7.8, 17.9 および 36.5% の濃度に依存した抑制が見られた (Table 6)。

7. イヌの血糖およびインスリン分泌への影響

TFLX では、100 および 600 mg/kg のいずれの群に

Table 3. Gross pathology of articular cartilage and toxicokinetic parameters in juvenile dogs (3-month-old) administered TFLX for 2 weeks

Dose (mg/kg)	Control	50	500
Number of animals	4	4	4
Gross pathology (number of animals with findings)			
Shoulder joint			
Humerus, proximal			
Blister	0	1[+]	1[+]
Erosion	0	0	2[+]
Elbow joint			
Humerus, distal	0	0	0
Ulna/Radius, proximal	0	0	0
Carpal joint			
Ulna/Radius, distal	0	0	0
Hip joint			
Femur, proximal	0	0	0
Knee joint			
Femur, distal	0	0	0
Tibia, proximal	0	0	0
Tarsal joint			
Tibia/Fibula, distal	0	0	0
Toxicokinetic parameters			
1st administration			
C _{max} (μg/mL)	—	2.62–6.10	2.83–4.08
AUC _{0-t} (μg·h/mL)	—	25.8–54.4	39.2–66.4
14th administration			
C _{max} (μg/mL)	—	3.92–4.90	3.65–3.88
AUC _{0-t} (μg·h/mL)	—	27.0–43.0	37.4–53.1

[]: Degree of findings (+, slight).

Table 4. Histopathology of articular cartilage in juvenile dogs (3-month-old) administered TFLX for 2 weeks

Site and findings	Dose (mg/kg)	Control	50	500
Number of animals		4	4	4
Shoulder joint				
Humerus, proximal				
Cavitation		0	1[++]	1[+]
Detachment, cartilage surface layer		0	0	1[+], 1[++]
Necrosis, chondrocyte		0	1[++]	2[+], 1[++]
Cluster formation, chondrocyte		0	1[++]	2[+], 1[++]
Fibrosis		0	1[+]	
Hip joint				
Femur, proximal		0	NE	0
Knee joint				
Femur, distal		0	NE	0

Number of animals with findings and degree in [] (+, slight; ++, moderate).

NE: not examined.

も、血糖およびインスリン濃度推移に異常はみられなかった。陽性対照薬である tolbutamide 群では、投与後1時間にインスリン濃度の増加が、また、投与後1時間から12時間にかけて血糖の減少がみられた (Fig. 6)。

III. 考 察

キノロン系薬は、小児における安全性および有効性が十分確認されておらず、特に関節毒性が懸念されるため、国内ではNFLXを除き小児への投与は禁忌とされてき

た³⁾。しかし、小児の肺炎および中耳炎において、近年、PISP, PRSP および BLNAR などの薬剤耐性菌が問題となっており⁴⁻⁸⁾、医療現場からは耐性菌に効果のあるキノロン系抗菌薬の小児用薬が要望されている。今回、TFLXを小児にも服用可能な製剤として開発するにあたり、幼若動物に対する安全性を評価するため、7日齢ラットにおける単回経口投与毒性試験ならびに7日齢ラットおよび3週齢イヌにおける1カ月間反復経口投与毒性試験を

Table 5. Incidence of arthropathy and toxicokinetic parameters in juvenile dogs administered NFLX and CPFEX for 1 week

Drug	NFLX			NFLX	CPFEX
	Beagle, 3-4-month-old			Beagle, 2-3-month-old	
Animal					
Dose (mg/kg)	20	50	200	50	50
Number of animals	3M	3M	3M	3M 3F	3M 3F
Number of animals with arthropathy					
Total	0	2	3	4	6
Shoulder joint	0	0	3	3	6
Elbow joint	0	2	3	2	5
Carpal joint	0	0	2	0	3
Hip joint	0	1	2	3	6
Knee joint	0	2	3	2	6
Tarsal joint	0	0	2	0	0
Toxicokinetics parameters					
1st administration					
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	M 3.52 \pm 2.05 F 4.19 \pm 2.59	M 5.64 \pm 2.06 F 3.93 \pm 1.12
$AUC_{0-\text{inf}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	—	—	—	M 24.2 \pm 14.8 F 25.0 \pm 16.1	M 40.8 \pm 11.8 F 24.9 \pm 9.9
6th administration					
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	3.5 \pm 0.78	5.11 \pm 1.66	13.5 \pm 7.1	M 2.04 \pm 1.04 F 1.72 \pm 1.10	M 4.25 \pm 2.79 F 6.24 \pm 1.55
$AUC_{0-\text{inf}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	21.4 \pm 1.1	26.2 \pm 3.4	93.6 \pm 49.7	M 11.9 \pm 3.7 F 13.1 \pm 8.8	M 25.9 \pm 9.2 F 45.4 \pm 13.9
Reference	Machida, et al (1990) ¹⁶⁾			Nagai, et al (2002) ¹⁷⁾	

M: male.

F: female.

実施した。

幼若ラット (7 日齢) における単回経口投与毒性試験では、各投与量で一般状態、体重および剖検時肉眼観察で異常はみられず、概略の致死量は 6,000 mg/kg を上回る量であった。6 週齢ラットでも同様の結果であり、急性毒性に週齢による差はみられなかった。

幼若ラット (7 日齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験では、3,000 mg/kg 群で雄 1 例が死亡した。死亡例には肺に陳旧性の出血を示すヘマトイジン結晶がみられたが、軽度であることから毒性学的意義に乏しい変化と考えられ、本例の死因は明らかでなかった。300 および 1,000 mg/kg で死亡例はなかった。生存例には雌雄で投与 10 日から 14 日にかけて軽度の体重増加抑制がみられたが、一過性の変化であり、投与 17 日以降の体重推移に異常はみられなかった。1,000 mg/kg 以上の群で腎臓の尿管腔に薬剤由来と考えられる結晶がみられたが、いずれもごく軽度または軽度の変化であり、休薬により消失することが確認された。また、同様の変化は 6 週齢ラットを用いた 1 カ月間 (未発表データ) および 6 カ月間反復投与毒性試験¹⁵⁾で、それぞれ 1,000 mg/kg 以上および 400 mg/kg 以上の用量で観察されており、幼若動物に特有の変化ではなかった。

幼若イヌ (3 週齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験では、300 mg/kg 以上の群で体重増加抑制および摂

餌量の低下を示す例がみられた。なお、これらの動物にみられた血糖の減少、Cho および BUN の増加、肝臓重量の低値、骨髓細胞の減少、大腿骨海綿骨の化骨遅延、肝細胞の萎縮/グリコーゲン野の減少あるいは白脾髄および胸腺のリンパ球の減少は、いずれも体重増加抑制および摂餌量の低下に起因した二次的変化と考えられた。また、600 mg/kg 群で嘔吐の発現頻度増加がみられたが、同様の変化は、先に実施したイヌ (12 カ月齢前後) における 1 カ月間反復投与毒性試験でも 70 mg/kg 以上の群で観察されており (未発表データ)、幼若動物に特有の変化ではなかった。また、体重増加抑制および摂餌量の低下とこれに関連した二次的な変化は、NFLX 群および CPFEX 群でもみられる変化であった。以上のことから、TFLX は幼若動物に対して毒性の増強あるいは特異的な毒性を示さないものと考えられた。

一方、ヒトの小児に 4 mg/kg (以下、ヒト小児の投与量は tosofloxacin 量で示す。) を 1 日 2 回投与した時の曝露 (C_{max} 0.96 $\mu\text{g/mL}$, $AUC_{0-24\text{h}}$ 15.16 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) と比較した場合、幼若イヌ (3 週齢) における 1 カ月間反復経口投与毒性試験の無毒性量 (150 mg/kg) 投与時の C_{max} および AUC はそれぞれ 1.0~1.4 倍および 0.8~1.0 倍であり、同程度の曝露であった。毒性発現量の 300 および 600 mg/kg (C_{max} および AUC はそれぞれ 2.5~3.3 倍および 1.9~2.3 倍) では、嘔吐、体重増加抑制および摂餌量の低

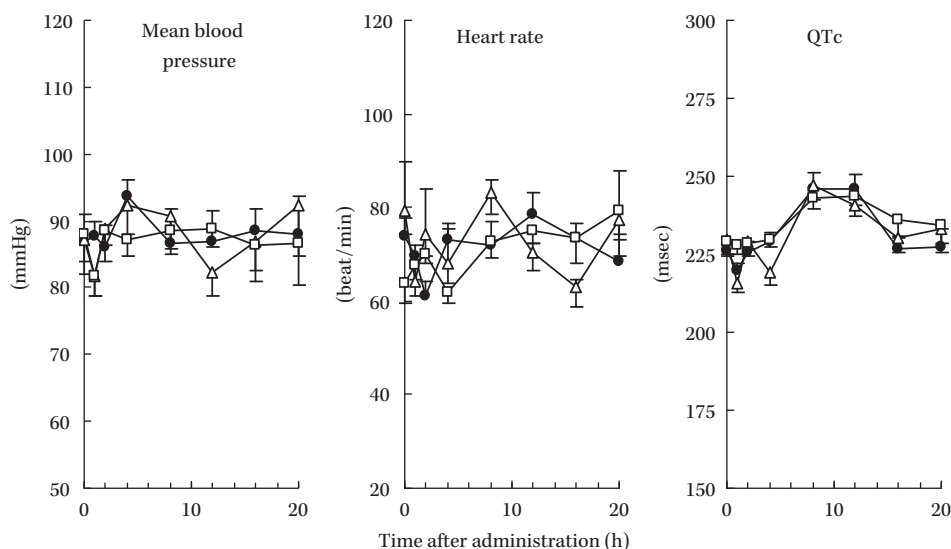


Fig. 5. Effect of TFLX on the cardiovascular parameter in dogs. Blood pressure, heart rate, and ECG were monitored by telemetry after a single oral dose of TFLX at 0 (●), 30 (△), and 100 (□) mg/kg.

Table 6. TFLX and MFLX effects on hERG current stably expressed HEK293 cells

Test substance	Concentration (μmol/L)	Number of preparations	% before ^a	% inhibition
Vehicle ^b	—	5	94.9 ± 1.9	—
TFLX	1	5	92.2 ± 1.2	2.8
	3	5	92.9 ± 1.1	2.1
	10	5	90.1 ± 0.6 *	5.1
	20	5	90.6 ± 1.5 *	4.5
MFLX	10	5	87.5 ± 1.5 *	7.8
	30	5	77.9 ± 2.0 *	17.9
	100	5	60.3 ± 3.6 *	36.5

^a: percentage of value just before application.

^b: 0.25 vol% dimethyl sulfoxide.

Each value represents mean ± S.E.

*: Significant difference from control at $p < 0.05$.

下がみられ、小児臨床試験では、これらに関連する可能性がある副作用として、嘔吐 (4.3%)、悪心 (0.9%) あるいは食欲不振 (2.1%) が認められている。しかし、食欲不振および悪心を併発し中等度と判定された1例を除きすべて軽度であり、いずれも処置なしで回復する変化であった。

キノロン系薬は各種幼若動物に関節毒性を惹起し、特に3カ月齢前後のイヌが最も感受性が高いといわれている^{9,10)}。TFLXについて、3カ月齢の幼若イヌを用いて2週間反復経口投与関節毒性を実施した結果、50 mg/kg 群の1/4例 (25%) および500 mg/kg 群の3/4例 (75%) で関節軟骨の水疱あるいはびらんが認められた。50 mg/kg 投与時の C_{max} および AUC_{0-t} (それぞれ2.62~6.10 μg/mL および25.8~54.4 μg·h/mL, Table 3) は、ヒトの小

児に4 mg/kg を1日2回投与した時のそれぞれ2.7~6.4倍および1.7~3.6倍であったが、観察された関節軟骨の変化はいずれも微小なものであり、発現した部位も肩関節 (上腕骨近位端) のみであった。一方、日本または海外で小児への適用が承認されているNFLX およびCPFXについては、2~4カ月齢のイヌに50 mg/kg の用量で1週間反復経口投与することにより、それぞれ67% および100% の出現頻度で関節軟骨障害がみられ、その発現部位は肩、肘、手根、股、膝関節と広範囲に及んでいたとの報告がある (Table 5)^{16,17)}。また、NFLX およびCPFX を50 mg/kg の用量で経口投与した時の C_{max} はそれぞれ3.52~4.19 および3.93~5.64 μg/mL、 AUC_{0-inf} はそれぞれ24.2~25.0 および24.9~40.8 μg·h/mL であり (Table 5)、TFLX の50 mg/kg 投与時と同程度の曝露で

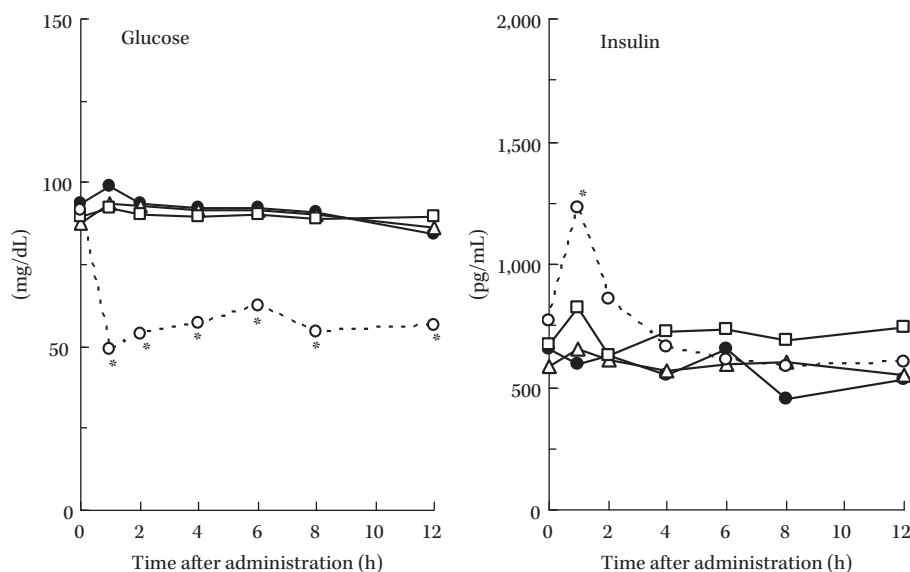


Fig. 6. Effect of TFLX on glucose and insulin levels in serum in dogs after a single oral dose of TFLX at 0 (●), 100 (△), 600 (□) mg/kg, and tolbutamide 1,000 mg/body (○).

*: Significant difference from control at $p < 0.05$.

あった。以上のことから、本薬の関節毒性はNFLX および CFX と比較して弱いものであり、本薬の臨床使用にあたり関節障害には注意を払う必要はあるものの、重篤な関節毒性が発現する可能性は低いものと考えられた。

キノロン系薬のなかには、臨床使用において心電図 QT 延長に伴う torsade de pointes^{11,12)}、あるいは血糖値の異常¹³⁾を誘発するものが知られている。hERG 電流への影響を検討した結果、TFLX はヒトの小児に 4 mg/kg を投与した時の C_{max} に比べ 8.4 倍高い濃度である 20 $\mu\text{mol/L}$ (8.1 $\mu\text{g/mL}$) でも、軽度の hERG 電流抑制 (約 5%) がみられるのみであった。一方、MFLX は臨床用量 (400 mg) 投与時の C_{max} (4.13 $\mu\text{g/mL}$, 10.29 $\mu\text{mol/L}$ に相当¹⁸⁾ の 1.0, 2.9 および 9.7 倍となる濃度 (それぞれ 10, 30 および 100 $\mu\text{mol/L}$) で、それぞれ 7.8, 17.9 および 36.5% の抑制を示した。また、TFLX を覚醒イヌへ 100 mg/kg まで経口投与しても心電図 QTc に影響はみられず、幼若イヌ (3 週齢) における 1 カ月間反復経口投与試験でも、心電図の異常および心血管系の病理学的な異常はみられなかった。したがって、本薬の心電図 QT 間隔への影響は弱く、臨床使用で QT 間隔延長に基づく心血管系への重篤な影響が発現する可能性は低いものと考えられた。

膵臓への影響として、gatifloxacin および lomefloxacin はラットおよびイヌの反復経口投与毒性試験で、膵 β 細胞の空胞変性を誘発したことが報告されている^{19,20)}。また、ラット膵 β 細胞を用いた *in vitro* の検討では、キノロン系薬 (enoxacin, lomefloxacin および sparfloxacin) はインスリン分泌を刺激し、TFLX も 10 $\mu\text{mol/L}$ で同様の作用を示したことが報告されている²¹⁾。しかし、TFLX

をイヌに 600 mg/kg まで経口投与しても血糖および血清中インスリン濃度に影響はみられず、この時の C_{max} および AUC (それぞれ 5.43 $\mu\text{g/mL}$ および 68.54 $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$) は、ヒト小児に 4 mg/kg を 1 日 2 回投与した場合のそれぞれ 5.7 倍および 4.5 倍であった。また、幼若ラットおよび幼若イヌにおける 1 カ月間反復経口投与毒性試験ならびに先に実施したラット (6 週齢) およびイヌ (12~14 カ月齢) の 6 カ月間反復経口投与毒性試験^{15,22)} では、いずれも血糖の変化および膵臓の病理組織学的異常はみられなかった。これらのことから、TFLX は膵 β 細胞に対してインスリン分泌刺激作用を有することが示唆されるものの、臨床使用において重篤な血糖異常が発現する可能性は低いものと考えられた。

以上、TFLX の幼若動物における関節毒性は、NFLX, CFX に比較して弱いものであり、その他に幼若動物で特有の毒性あるいは増強される毒性はなかった。また、キノロン系薬のクラスエフェクトとして知られている心血管系および膵臓 (血糖およびインスリン) に対する影響は認められず、本薬の小児患者への使用で重篤な副作用が発現する可能性は低いと考えられた。

謝 辞

hERG 試験の実施にあたりご協力をいただきました、三菱化学メディエンス株式会社 大保真由美先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 高畑正裕, 福田淑子, 二口直子, 杉浦陽子, 久田晴美, 水永真吾, 他: Garenoxacin の *in vitro* 抗菌活性. 日化療会誌 2007; 55: 1-20
- 2) Miyashita N, Niki Y, Kishimoto T, Nakajima M, Mat-

- sushima T: *In vitro* and *in vivo* activities of AM-1155, a new fluoroquinolone, against *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1331-4
- 3) 高橋 寿, 早川勇夫, 秋元 健: キノロン系合成抗菌薬の開発と変遷。薬史学雑誌 2003; 38: 161-79
 - 4) 賀来満夫, 金光敬二, 國島広之, 井上松久, 小松真由美, 北川美穂: 肺炎球菌およびインフルエンザ菌における薬剤耐性の検討—開業医および大学病院臨床分離株での比較—。化学療法の領域 2007; 23: 1318-25
 - 5) Felmingham D, Reinert R R, Hirakata Y, Rodloff A: Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from PROTEKT surveillance study, and comparative *in vitro* activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 25-37
 - 6) Nariai A: Prevalence of β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus influenzae* type b strains obtained from children with lower respiratory tract infections. *J Infect Chemother* 2007; 13: 396-9
 - 7) 山中 昇, 保富宗城: 難治化する急性中耳炎—難治化の要因とその対策—。感染症誌 2003; 77: 595-605
 - 8) 岸本寿男: 肺炎の治療—市中肺炎。臨床と研究 2001; 78: 1025-30
 - 9) Stahlmann R, Lode H: Safety overview. In Andriole V T (ed.), *The quinolones*, 3rd ed. Academic Press, San Diego. 2000; p. 397-453
 - 10) 小野寺威: キノロン剤。福田英臣, 秋元 健, 坂口孝 編, 毒性試験講座 15 医薬品, 地人書館, 東京, 1990; 35-40
 - 11) Ball P: Quinolone-induced QT interval prolongation: a not-so-unexpected class effect. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 557-9
 - 12) Kang J, Wang L, Chen X L, Triggler D J, Rampe D: Interactions of a series of fluoroquinolone antibacterial drugs with the human cardiac K⁺ channel HERG. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 122-6
 - 13) 坂本光男, 柴 孝也: 3. 安全性と副作用。小林宏行編, ニューキノロン剤の臨床応用, 医薬ジャーナル, 東京, 2001; 156-76
 - 14) Fridericia L S: Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. *Acta Med Scand* 1920; 53: 469-86
 - 15) 米田豊昭, 河村泰仁, 柴田哲夫, 長沢峰子, 吉田一晴, 鬼頭暢子: 合成抗菌剤 T-3262 のラット 6 ヶ月間経口投与慢性毒性試験。Chemotherapy 1988; 36: 233-49
 - 16) Machida M, Kusajima H, Aijima H, Maeda A, Ishida R, Uchida H: Toxicokinetic study of norfloxacin-induced arthropathy in juvenile animals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 105: 403-12
 - 17) Nagai A, Miyazaki M, Morita T, Furubo S, Kizawa K, Fukumoto H, et al: Comparative articular toxicity of garenoxacin, a novel quinolone antimicrobial agent, in juvenile beagle dogs. *J Toxicol Sci* 2002; 27: 219-28
 - 18) 大西明弘, 豊城隆明, 吉川健一, 橋爪憲聖, 谷川賞彦, 小森哲志, 他: 塩酸モキシフロキサシン (BAY 12-8039) の第 1 相臨床試験における安全性, 薬物動態および腸内細菌叢への影響の検討。薬理と治療 2005; 33: 1029-45
 - 19) 笠井正博, 鳥屋部保, 益本吉廣, 佐藤裕和, 棚瀬裕文, 今井 繁: Gatifloxacin のイヌにおける 26 週間反復経口投与毒性試験。薬理と治療 1998; 26: 39-58
 - 20) 野村岳之, 渡辺満利, 河上喜之, 平田真理子, 鈴木修三, 柳田知司: NY-198 のラット 13 週間経口投与急性毒性試験。Chemotherapy 1988; 36: 343-69
 - 21) Maeda N, Tamagawa T, Niki I, Miura H, Ozawa K, Watanabe G, et al: Increase in insulin release from rat pancreatic islets by quinolone antibiotics. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 372-6
 - 22) 中川重仁, 上原 京, 永井章夫, 長沢峰子, 吉田一晴, 米田豊昭: 合成抗菌剤 T-3262 のイヌ 6 ヶ月間経口投与慢性毒性試験。Chemotherapy 1988; 36: 250-93

Toxicity studies of tosufloxacin tosilate hydrate in juvenile animals and class effects studies

Shinichi Furubo¹⁾, Hitoshi Fukuda¹⁾, Tsukasa Kozaki¹⁾,
Atsushi Akune²⁾ and Takahiro Sanzen¹⁾

¹⁾ Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama, Japan

²⁾ Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

To examine the toxicity of tosufloxacin tosilate hydrate(TFLX) in juvenile animals, a single oral dose study in rats and repeated oral dose studies in rats and dogs were conducted. Effects of TFLX on articular cartilage, QT interval, and blood glucose, known class effects of quinolone antibiotics, were examined.

In the single oral dose toxicity study in 7-day-old rats, the lethal dose was >6,000 mg/kg. In the 1 month repeated oral dose study in 7-day-old rats, 1 male died and transient body weight gain suppression was observed in survival at 3,000 mg/kg. Crystals were observed in the lumen of renal tubules at 1,000 mg/kg and higher and also observed in mature rats. The above changes were not observed at 300 mg/kg. In the 1 month repeated oral dose study in 3-week-old dogs, decrease in food consumption and body weight gain suppression were observed at 300 mg/kg and higher but also in norfloxacin(NFLX) and ciprofloxacin hydrochloride hydrate(CPFX) groups. No abnormality was observed at 150 mg/kg.

Articular toxicity was examined in juvenile (3-month-old) dogs administered TFLX orally for 2 weeks. Small blisters or erosion were observed on the shoulder articular cartilage at >50 mg/kg but was milder than NFLX or CPFX.

In QT interval studies, slight hERG current suppression (5%, using hERG-expressing HEK293 cells) was observed at >10 μ mol/L, but no effect was seen on blood pressure, heart rate, or electrocardiogram in dogs up to 100 mg/kg.

In study on blood glucose and insulin levels in dogs, no effect was observed after a single oral administration of TFLX up to 600 mg/kg.

In conclusion, the effect of TFLX on articular cartilage was milder than NFLX and CPFX, no other specific toxicity or enhanced toxicity was seen in juvenile animals. No obvious effects were observed on QT interval or blood glucose or insulin levels.