

【原著・基礎】

Garenoxacin の生殖発生毒性試験

小崎 司¹⁾・古坊 英子¹⁾・三善 隆広¹⁾・古川 正敏²⁾・藤堂 洋三¹⁾¹⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所*²⁾ 株式会社化合物安全性研究所

(平成 19 年 5 月 15 日受付・平成 19 年 8 月 22 日受理)

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) の生殖発生毒性試験を Sprague-Dawley 系ラットおよび New Zealand White 種ウサギを用いて行った。

ラットを用いた経口投与による受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験では、100 および 400 mg/kg 群の雄に体重増加の抑制ならびに摂餌量の低値が、1,000 mg/kg 群の雌に体重増加の抑制がみられた。生殖能検査、精子検査、性周期および妊娠 15 日の子宮内観察結果に GRNX の影響はみられなかった。

ラットを用いた経口投与による出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験では、250 および 1,000 mg/kg 群の母動物において、妊娠期間中に体重増加の抑制および摂餌量の低値がみられた。母動物の妊娠の維持、分娩および哺育からみた生殖能力に GRNX の影響はみられなかった。出生児については、生存率、体重推移、一般状態、発育分化、反射反応性試験、オープンフィールド試験、学習試験、生殖能検査および妊娠 20 日の子宮内観察結果に GRNX の影響はみられなかった。

ラットを用いた経口投与による胚・胎児発生に関する試験では、1,000 mg/kg 群の母動物に体重増加の抑制および摂餌量の低値がみられた。母動物の妊娠の維持および妊娠末期帝王切開所見からみた生殖能力に GRNX の影響はみられなかった。胎児については、生存胎児数、死亡胚・胎児数、生存胎児体重、性比、外表観察、内臓観察および骨格観察結果のいずれにも GRNX の影響はみられず、GRNX に催奇形性はなかった。

ウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験では、流産が GRNX の各投与群に 1~3 例みられ、12.5 mg/kg 群の 1 例は流産後に死亡した。また、6.25, 12.5 および 25 mg/kg 群の母動物に体重増加の抑制および摂餌量の低値がみられた。胎児については、25 mg/kg 群で生存胎児体重の低値および内臓観察において胸腺頸部残留を有する胎児数の増加がみられたが、胸腺頸部残留は母動物の低体重に起因する胎児の発育遅延を示唆する所見と考えられ、GRNX に催奇形性はなかった。

Key words: garenoxacin, des-fluoro(6)-quinolone, reproductive and developmental toxicity study, rats and rabbits

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) は富山化学工業株式会社で創製された新規な des-F(6)-quinolone 系抗菌薬である。GRNX にはこれまで上市されたフルオロキノロン系抗菌薬に共通の置換基である 6 位フッ素がなく、同系抗菌薬とは異なった新規な化学構造を有している。GRNX は広範な抗菌スペクトルを有しており、非定型菌を含む呼吸器感染症の多くの起因菌に優れた抗菌活性を示すとともに、グラム陽性菌に対して従来のフルオロキノロン系抗菌薬よりも強い活性を保有することが報告されている^{1,2)}。今回、GRNX の生殖発生に及ぼす影響を評価する目的で、ラットを用いた試験として受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験、出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験および

胚・胎児発生に関する試験を、ウサギを用いた試験として胚・胎児発生に関する試験を実施したので、結果を報告する。

I. 材料および方法

1. 被験物質

GRNX は、富山化学工業株式会社合成品を用いた。なお、投与量はすべて活性本体で換算し、表記した。

2. 使用動物および飼育条件

ラットは日本チャールス・リバー株式会社より購入した Sprague-Dawley 系ラットを用いた。受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験では 7 週齢の雌雄を購入し、1~3 週間の検疫・馴化飼育の後、試験に使用した。投与開始時の週齢は雄が 8 週齢、雌が 10 週齢であり、体

*富山県富山市下奥井 2-4-1

重範囲は雄が 290~331 g、雌が 233~301 g であった。出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験では 8 週齢の雌雄を購入し、1~2 週間の検疫・馴化の後、試験に使用した。交配開始時週齢は 10 週齢であり、妊娠 0 日の雌の体重範囲は 233~306 g であった。ラット胚・胎児発生に関する試験では 8 週齢の雌雄を購入し、1~2 週間の検疫・馴化の後、試験に使用した。交配開始時週齢は 10 週齢であり、妊娠 0 日の雌の体重範囲は 234~287 g であった。なお、雌ラットについてはいずれの試験でも馴化期間中に性周期検査を行い、異常のみられなかった動物を試験に用いた。

ラットの飼育は温度 20~26℃、湿度 45~65%、換気回数 10~15 回/時、照明時間 12 時間（午前 8 時から午後 8 時まで点灯）に維持されたバリアシステム飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージ（幅 260×奥行 380×高さ 180 mm）を用いて行った。ただし、妊娠 17 日から出産および授乳期間中は、金網床の代わりに実験動物用床敷ホワイトフレック（日本チャールス・リバー（株））を敷いた受皿を使用した。1 ケージあたりの収容匹数は、交配前および妊娠期間中は 1 匹、交配中は雌雄各 1 匹、哺育期間中は 1 母動物とその児、離乳後の出生児については 1 母動物ごとの雌雄別に 4 匹以内とした。飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製造のラット用固型飼料 CRF-1（ γ 線照射滅菌）を使用し、金属製給餌器から自由に摂取させた。飲料水は水道水を自動給水装置から自由に摂取させた。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、北山ラベス株式会社より 20 週齢の New Zealand White 種（Kbl: NZW）ウサギを購入し、1 週間の検疫・馴化飼育の後、試験に使用した。交配開始時週齢は 21 週齢であり、妊娠 0 日の体重範囲は 3.09~4.74 kg であった。ウサギは温度 21~25℃、湿度 40~60%、換気回数 10 回/時以上、照明時間 12 時間（午前 6 時から午後 6 時まで点灯）に維持された飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージ（幅 400×奥行 500×高さ 330 mm）に個別飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製造のウサギ用固型飼料 LRC-4 を使用し、金属製給餌器から自由に摂取させた。飲料水はフィルター濾過、塩素添加および紫外線殺菌した水を自動給水装置から自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

ラットを用いた試験の投与量は、ラット 1 カ月間反復経口投与毒性試験および生殖発生毒性試験の予備試験の結果を参考に、いずれの試験も 60、250 および 1,000 mg/kg とした。ただし、受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験の雄の投与量は、トキシコキネティクスにおいて雄の AUC が雌の約 3 倍であったことから投与量を減じ 25、100 および 400 mg/kg とした。投与容量は体重 1 kg あたり 10 mL とし、雄ならびに交配前の雌は投与日に最も近い日の体重に基づき算出し、妊娠期間

中の母動物は妊娠 0 日の体重に基づき、哺育期間中の母動物は毎日の体重に基づき算出した。いずれも GRNX を 0.5% メチルセルロース液に懸濁し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には 0.5% メチルセルロース液を同様に投与した。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験の投与量は、予備試験の結果を参考に 6.25、12.5 および 25 mg/kg とした。投与経路は経口と比較して高い曝露が可能である静脈内投与とし、GRNX を 5% ブドウ糖液に溶解し、27 G 翼状針を用いて 5 mL/分 の速度で耳介静脈内に投与した。投与容量は体重 1 kg あたり 2.5 mL とし、妊娠 0 日の体重に基づき算出した。対照群には 5% ブドウ糖液を同様に投与した。

4. 投与期間、観察および検査項目

母動物は交尾成立確認日を妊娠 0 日とし、分娩終了確認日を哺育 0 日（出生児にあたっては生後 0 日）として起算した。

1) ラット受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験

1 群あたりの動物数は雌雄各 22 匹とし、雄には交配前 28 日間と交配期間を含め剖検までの 66~69 日間投与し、雌には交配前 14 日間と交配期間を含め妊娠 7 日まで投与した。雌雄親動物の一般状態を観察し、体重および摂餌量を測定した。雌については陰垢塗抹標本の観察による性周期検査を行った。交配は雄の投与 28 日および雌の投与 14 日に、雄の 400 mg/kg 群と雌の 1,000 mg/kg 群、雄の 100 mg/kg 群と雌の 250 mg/kg 群、雄の 25 mg/kg 群と雌の 60 mg/kg 群、雄の対照群と雌の対照群の組み合わせで、雌雄 1 匹対 1 匹で同居させて行った。交配期間は 2 週間とし、雌雄の交尾率および受胎率を算出した。

交配終了後の雄はエーテル麻酔下で放血致死後に剖検し、器官重量の測定および病理組織学的検査を行った。剖検時に摘出した右側精巣上体尾部から精子を採取し、用手法による精子数の計数を行い、精子運動能解析装置（HTM-IVOS, (株) アースト・ハンセン商会）を用いて運動精子率および精子の平均速度を測定し、エオジン染色による精子塗抹標本を用いて精子形態を観察した。交配終了後の雌は妊娠 15 日にエーテル麻酔下で放血致死後に剖検し、器官重量の測定および病理組織学的検査を行った。さらに、卵巣および子宮を摘出し、妊娠黄体数、着床数、生存胚数および死亡胚数の計数を行い、着床率、胚生存率および胚死亡率を算出した。

2) 出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験

1 群あたりの母動物数は 17~20 匹とし、妊娠 7 日から分娩後 21 日まで投与した。母動物は一般状態観察、体重測定および摂餌量測定を行い、全例自然分娩させた。妊娠期間を算定し、出産児数および児の生死を調べ、出生

児については性別判定, 外表観察および体重測定を行った。出生児は哺育22日に離乳させ, 離乳後の母動物はエーテル麻酔下で放血致死後に剖検し, 子宮内の着床痕数の計数, 器官重量測定および病理組織学的検査を行った。また, 母動物については出産率を, 出生児については出生率および性比を算出した。

出生児は生後4日に1母動物あたり8匹(雌雄各4匹)に児数調整して哺育を継続させ, 8匹を超えた出生児はKawamuraらの方法³⁾に準じてアリザリンレッドSの単染色骨格標本を作製し, 骨格観察を行った。生後22日に離乳させ, 1母動物あたり雄2匹および雌2匹に児数調整して飼育を継続させた。残りの出生児はエーテル麻酔下で放血致死後に剖検し, 器官重量を測定した。児は離乳前は週2回, 離乳後は週1回の頻度で体重を測定した。生後の発育分化として, 全例について耳介開展(生後4日), 背部毛生(生後7日), 切歯萌出(生後14日), 眼瞼開裂(生後16日), 精巣下降(生後25日), 膈開口(生後35日), 陰茎亀頭と包皮との分離(生後42日)を観察した。反射反応性試験として, 全例について生後21日にIrwinの多面的観察法⁴⁾に準じて視覚性断崖回避反応, 聴覚性驚愕反応, 耳介反射, 角膜反射, 疼痛反応, 把握反射, 空中正向反射, 牽引力, 背地走性および対光反射の検査を行った。また, 1母動物あたり雌雄各1例について, 行動観察として生後42~44日にオープン・フィールド試験を, 学習試験として生後7~9週齢時にシャトルボックス試験を行った。行動観察に用いた雌雄について, 生後10週齢時より兄妹を避けて同一試験群内の雌雄を1匹対1匹で交配させ, 交尾所要日数, 交尾率および受胎率を算出した。交尾成立雌は妊娠20日に剖検して妊娠成立の有無を調べ, 黄体数, 着床痕数, 生存胎児数および死亡胚・胎児数の計数を行い, 器官重量を測定した。生存胎児(F2)については外表観察, 性別判定および体重測定を行った。生殖能検査実施例以外の出生児については, 生後10週齢に剖検し器官重量を測定した。

3) ラット胚・胎児発生に関する試験

1群あたりの母動物数は16~19匹とし, 妊娠7日から妊娠17日まで投与した。母動物の一般状態を観察し, 体重および摂餌量を測定した。妊娠20日にエーテル麻酔下で放血致死後に剖検し, 器官重量の測定および病理組織学的検査を行った。剖検時に卵巣および子宮を摘出し, 黄体数, 着床数, 生存胎児数および死亡胚・胎児数の計数を行い胚・胎児死亡率を算出した。死亡胚・胎児については, 早期死亡(着床痕, 早期吸収胚)と後期死亡(浸軟胎児, 死亡胎児)に分類した。また, 胎盤形態を観察した。

生存胎児については性別判定, 体重測定および外表観察を行った後, 生存胎児の約半数例をブアン液で固定し, Wilsonの粗大切片法⁵⁾および西村の方法⁶⁾に準じて実体顕微鏡下で内臓を観察した。残りの半数をエタノール原

液で固定し, Kawamuraらの方法³⁾に準じてアリザリンレッドSの単染色骨格標本を作製し, 実体顕微鏡下で骨格を観察した。骨格奇形についてはMoritaら⁷⁾およびNakatsukaら⁸⁾の報告を参考に, 骨格異常および骨格変異に分類した。

4) ウサギ胚・胎児発生に関する試験

1群あたりの母動物数は19~24匹とし, 妊娠6日から妊娠18日まで投与した。母動物の一般状態を観察し, 体重および摂餌量を測定した。妊娠28日にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死後に剖検し, 器官重量を測定した。剖検時に卵巣および子宮を摘出し, 黄体数, 着床数, 生存胎児数および死亡胚・胎児数の計数を行い胚・胎児死亡率を算出した。死亡胚・胎児については, 早期死亡と後期死亡に分類した。また, 胎盤形態を観察した。

生存胎児については性別判定, 体重測定および外表観察を行った後, 胸腹部器官を肉眼ならびに実体顕微鏡下で観察した。さらに, 胎児の胸腔内器官を一括して摘出し, 10%ホルマリンで固定後, 心臓, 肺および胸部大血管について西村の方法⁶⁾により実体顕微鏡下で観察した。器官を摘出したすべての胎児は組織脱水溶液(和光純薬工業(株))で固定し, 固定中にカミソリを用いて頭頂部の冠状縫合の位置に横断割を入れ, 脳室の拡張の有無を調べた。その後, Kawamuraらの方法³⁾に準じて骨格標本を作成し, 骨格観察を行った。なお, 奇形の分類についてはMoritaら⁷⁾, Nakatsukaら⁸⁾および黒木⁹⁾の報告を参考に, 内臓奇形を内臓大異常および内臓小異常に, 骨格奇形を骨格異常および骨格変異に分類した。

5. 統計処理

平均値の差についてはF-検定により対照群とGRNXの各投与群との間で分散の検定を行い, 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。また, 着床率, 胚・胎児死亡率, 胎児の性比, 胎児の外表異常, 内臓異常, 骨格異常および骨格変異の各出現率についてはMann-WhitneyのU-検定を, 交尾率, 受胎率, 出産率および出生児生存率についてはFisherの正確確率検定を行った。有意水準は5%および1%とし, 片側検定で実施した。なお, 妊娠15日および20日の子宮内観察結果, 胎児検査結果, 出生児の離乳前の体重および出生児生存率の各項目については, 1腹を単位として検定を行った。

II. 結 果

1. ラット受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験

雌雄の一般状態には, いずれの群においても異常はなかった。100および400 mg/kg群の雄ならびに1,000 mg/kg群の雌の妊娠期間中に体重増加が抑制された。摂餌量については, 雄の100および400 mg/kg群が低値であった。

Table 1. Fertility data on male rats treated orally with GRNX in the study of fertility and early embryonic development to implantation

| Dose (mg/kg) | Control | 25 | 100 | 400 |
|--|---------------|-----------------|--------------|---------------|
| No. of male rats examined | 22 | 22 | 22 | 22 |
| Copulation rate (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Impregnation rate (%) | 95.5 | 100 | 100 | 95.5 |
| No. of sperms (10 ⁶ /g cauda) | 603.5 ± 142.5 | 679.4 ± 111.9 * | 643.9 ± 81.3 | 628.9 ± 129.6 |
| Motility of sperms (%) | 88.4 ± 21.2 | 93.6 ± 5.8 | 92.8 ± 7.3 | 83.6 ± 24.8 |
| Swimming speed of sperms (μ m/sec.) | 141.8 ± 23.5 | 144.5 ± 15.4 | 143.3 ± 18.2 | 143.0 ± 25.2 |
| Abnormal sperm ratio (%) | 2.0 ± 2.3 | 1.6 ± 1.0 | 2.1 ± 1.2 | 5.7 ± 18.0 |

Mean ± S.D.

Significant difference from control: *, p < 0.05 (Student's t-test or Aspin-Welch test)

Table 2. Fertility and caesarean section data on female rats treated orally with GRNX in the study of fertility and early embryonic development to implantation

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| No. of female rats examined | 22 | 22 | 22 | 22 |
| Estrous cycle (days) | 4.2 ± 1.0 | 4.2 ± 0.7 | 4.1 ± 0.2 | 4.0 ± 0.3 |
| Days from mating to copulation | 1.8 ± 0.9 | 2.0 ± 1.1 | 2.0 ± 1.0 | 1.8 ± 0.8 |
| Copulation rate (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Pregnancy rate (%) | 95.5 | 90.9 | 100 | 90.9 |
| No. of corpora lutea | 21.2 ± 4.6 | 19.6 ± 3.1 | 19.9 ± 3.7 | 20.0 ± 3.1 |
| No. of implantations | 16.7 ± 2.6 | 16.1 ± 3.0 | 16.9 ± 2.2 | 16.5 ± 3.2 |
| Implantation rate (%) | 81.6 ± 18.5 | 82.8 ± 13.4 | 86.4 ± 11.3 | 83.7 ± 18.2 |
| No. of live embryos | 15.2 ± 2.9 | 14.8 ± 2.6 | 15.7 ± 2.2 | 15.6 ± 2.9 |
| Dead or resorbed embryos (%) | 9.1 ± 8.3 | 7.5 ± 7.4 | 7.0 ± 6.7 | 5.1 ± 6.8 |

Mean ± S.D.

雄の生殖能検査結果を Table 1 に示す。対照群および 400 mg/kg 群の各 1 例の交配相手雌が不妊であったが、交尾率および受胎率には、いずれの投与群にも統計学的有意差はみられなかった。精子検査として、精子数、運動精子率、精子運動速度および形態異常精子率に GRNX 投与に起因すると考えられる異常はなかった。

雄の剖検では 100 mg/kg 群の 1 例に左精巣の低形成が、400 mg/kg 群の 1 例に空腸の憩室がみられた。なお、生殖能検査で交配相手雌が不妊であった 400 mg/kg 群の 1 例について、精巣および精巣上体の病理組織学的検査を行ったが異常はなかった。器官重量では、GRNX 全投与群で盲腸重量が高値であった。また、100 および 400 mg/kg 群では唾液腺重量が低値であり、400 mg/kg 群では肝臓および心臓重量が低値であったが、これら器官の病理組織学的検査で異常はなかった。

雌の生殖能検査を Table 2 に示す。交配前の性周期検査では、いずれの投与群にも統計学的有意差はみられなかった。対照群の 1 例、60 mg/kg 群の 2 例および 1,000 mg/kg 群の 2 例が不妊であったが、交尾に要した日数、交尾率および受胎率には、いずれの投与群にも統計学的有意差はみられなかった。妊娠 15 日の子宮内観察では、いずれの群にも黄体数、着床数、着床率、生存胚数および胚死亡率に統計学的有意差はみられなかった。

雌の剖検では、妊娠例のうち 1,000 mg/kg 群の 1 例に左卵巣の嚢胞がみられた。器官重量では、GRNX 全投与群で盲腸重量が高値であった。また、1,000 mg/kg 群で心臓重量が低値であったが、病理組織学的検査で異常はなかった。

2. ラット出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験

1) 母動物について

妊娠および授乳期間中の一般状態および哺育状態に異常はなかった。250 および 1,000 mg/kg 群では妊娠期間中の体重は対照群を下回って推移し、哺育期間中は対照群の体重を上回って推移した。摂餌量については、体重推移と同様に 250 および 1,000 mg/kg 群において妊娠期間中は低値であり、哺育期間中は高値であった。

生殖能検査結果を Table 3 に示す。母動物の妊娠期間、出産率および着床痕数に統計学的有意差はみられず、分娩状態に異常はなかった。その他、離乳時の剖検では異常はみられず、器官重量では GRNX の全投与群で盲腸重量が高値であった。また、1,000 mg/kg 群で肝臓、心臓および唾液腺重量が低値であったが、これら器官の病理組織学的検査で異常はなかった。

2) 出生児について

出生児の検査結果を Table 4 に示す。出生率、出生児

Table 3. Reproductive findings on rat dams treated orally with GRNX in the study for effects on pre- and postnatal development, including maternal function

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
| No. of dams | 20 | 17 | 19 | 18 |
| Gestation period (days) | 22.3 ± 0.6 | 22.1 ± 0.2 | 22.3 ± 0.9 | 22.1 ± 0.3 |
| Delivery rate (%) | 95.0 | 100 | 89.5 | 100 |
| No. of implantations | 14.8 ± 3.9 | 15.0 ± 2.4 | 14.3 ± 5.0 | 15.1 ± 3.3 |

Mean ± S.D.

Table 4. F1 offspring data at birth and during lactation period obtained from rat dams treated orally with GRNX in the study for effects on pre- and postnatal development, including maternal function

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|---|-------------|-------------|---------------|--------------|
| Birth rate (%) | 82.2 ± 28.3 | 93.2 ± 9.3 | 83.3 ± 29.9 | 89.6 ± 7.8 |
| No. of live offspring at birth | 12.7 ± 5.1 | 13.9 ± 2.5 | 13.2 ± 5.0 | 13.4 ± 3.0 |
| Sex ratio [Male/ (Male + Female)] | 0.51 ± 0.17 | 0.50 ± 0.16 | 0.53 ± 0.14 | 0.48 ± 0.08 |
| Viability on Day 4 (%) | 99.2 ± 2.5 | 98.2 ± 3.5 | 98.8 ± 2.7 | 97.4 ± 7.3 |
| Viability on Day 22 (%) | 99.3 ± 2.9 | 100 ± 0.0 | 95.6 ± 7.6 | 98.8 ± 4.9 |
| Body weight (g) | | | | |
| Day 0 | 7.07/6.70 | 6.97/6.53 | 6.74*/6.34* | 6.96/6.49 |
| (Male/Female) | | | | |
| Day 4 | 11.21/10.43 | 11.01/10.50 | 10.22*/9.58* | 10.79/10.06 |
| Day 7 | 18.69/17.27 | 18.26/17.41 | 17.27*/16.27* | 17.82/16.59 |
| Day 14 | 37.98/35.06 | 36.41/34.91 | 35.30**/33.47 | 35.79*/33.88 |
| Day 21 | 63.63/59.22 | 61.91/59.11 | 60.11*/56.72 | 61.98/58.51 |
| (Skeletal observation on Day 4) | | | | |
| No. of fetuses with skeletal anomalies | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (1.7%) |
| Fusion of cervical vertebral arches | 0 | 0 | 0 | 1 |
| No. of fetuses with skeletal variations | 22 (17.9%) | 12 (11.5%) | 21 (21.6%) | 19 (20.8%) |
| Cervical vertebral body | | | | |
| Dumbbell shape | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Splitting | 0 | 0 | 2 | 3* |
| Unilateral formation | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Thoracic vertebral body | | | | |
| Dumbbell shape | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 lumbar vertebrae | 4 | 0* | 0* | 6 |
| Sacralization | 1 | 1 | 3 | 5 |
| Cervical rib | 1 | 1 | 2 | 6* |
| Lumbar rib | 9 | 7 | 7 | 3 |
| Shortening of 13th rib | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Extra sternbrae | 6 | 2 | 6 | 0 |
| Degree of ossification | — | — | — | — |

Mean ± S.D. —: Normal.

Significant difference from control: *, p < 0.05; **, p < 0.01 (Student's t-test or Aspin-Welch test)

数, 性比ならびに生後4日および22日生存率に統計学的有意差はみられなかった。また, 出生児の体重推移にGRNX投与の影響はみられなかった。生後4日で児数調整のため淘汰した児の骨格観察では, 骨格異常の出現率に統計学的有意差はみられず, 骨化進行度にも異常はなかった。骨格変異として, 1,000 mg/kg群では頸椎椎体の分離および頸肋を有する児数に統計学的に有意な高値がみられた。出生児の発育分化として, 耳介開展, 背部毛生, 切歯萌出, 眼瞼開裂, 精巣下降, 陰莖開口および陰莖龟头と包皮との分離を規定の期日に観察した結果, 各群の発育分化率は97~100%であった。反射反応性試験では全例正常反応がみられ, 行動観察, 学習試験ならびに生後22日および10週齢時の剖検では, いずれの群にも

GRNX投与に起因すると考えられる異常はなかった。

出生児の器官重量をTable 5に示す。生後22日剖検例では1,000 mg/kg群の雄で精巣重量が低値であり, 1,000 mg/kg群の雌雄で盲腸重量が高値であった。生後70日剖検例では, 60 mg/kg以上の投与群の雄で精巣上体重量が低値であり, 250および1,000 mg/kg群で精巣重量が低値であったが, 対照群と1,000 mg/kg群の精巣および精巣上体の病理組織学的検査で異常はなかった。生殖能検査後の剖検例では, 1,000 mg/kg群において精巣上体重量が低値であった。

出生児F1の生殖能検査結果および帝王切開所見をTable 6に示す。交尾率, 受胎率および交尾成立までの日数に統計学的有意差はみられなかった。F1雌の妊娠期間

Table 5. Organ weights of F1 offspring obtained from rat dams treated orally with GRNX in the study for effects on pre- and postnatal development, including maternal function in rats

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|--|---------------|------------------|-----------------|------------------|
| (Autopsy on Day 22) | | | | |
| Main genital organ weights (g) | | | | |
| Male Testis | 0.31 ± 0.05 | 0.30 ± 0.04 | 0.30 ± 0.03 | 0.29 ± 0.04 * |
| Epididymis | 0.045 ± 0.008 | 0.043 ± 0.007 | 0.044 ± 0.006 | 0.046 ± 0.007 |
| Prostate | 0.032 ± 0.008 | 0.031 ± 0.005 | 0.031 ± 0.005 | 0.031 ± 0.007 |
| Seminal vesicle | 0.015 ± 0.006 | 0.014 ± 0.005 | 0.014 ± 0.005 | 0.015 ± 0.006 |
| Female Ovary | 0.018 ± 0.002 | 0.020 ± 0.004 ** | 0.018 ± 0.004 | 0.018 ± 0.004 |
| Cecum weights (g) | | | | |
| Male | 1.05 ± 0.27 | 1.01 ± 0.20 | 1.05 ± 0.23 | 1.36 ± 0.26 ** |
| Female | 0.91 ± 0.15 | 0.92 ± 0.19 | 0.85 ± 0.19 | 1.26 ± 0.34 ** |
| (Autopsy on Day 70) | | | | |
| Main genital organ weights (g) | | | | |
| Male Testis | 3.39 ± 0.25 | 3.29 ± 0.21 | 3.22 ± 0.25 * | 3.18 ± 0.22 ** |
| Epididymis | 0.933 ± 0.066 | 0.888 ± 0.080 * | 0.875 ± 0.074 * | 0.871 ± 0.057 ** |
| Female Ovary | 0.109 ± 0.019 | 0.109 ± 0.013 | 0.107 ± 0.010 | 0.114 ± 0.016 |
| (Autopsy after reproductive ability examination) | | | | |
| Main genital organ weights (g) | | | | |
| Male Testis | 3.71 ± 0.25 | 3.71 ± 0.56 | 3.62 ± 0.28 | 3.58 ± 0.27 |
| Epididymis | 1.364 ± 0.072 | 1.315 ± 0.104 | 1.335 ± 0.106 | 1.282 ± 0.099 ** |
| Female Ovary | 0.143 ± 0.025 | 0.140 ± 0.018 | 0.136 ± 0.015 | 0.145 ± 0.015 |

— : Normal.

Significant difference from control: *, p < 0.05; **, p < 0.01 (Student's t-test or Aspin-Welch test)

Table 6. Fertility and caesarean section data on F1 offspring and F2 fetal data obtained from rat dams treated orally with GRNX in the study for effects on pre- and postnatal development, including maternal function in rats

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|---|-------------|----------------|-------------|---------------|
| Copulation rate | | | | |
| Male | 100 | 100 | 94.1 | 100 |
| Female | 94.7 | 100 | 100 | 100 |
| Impregnation or pregnancy rate (%) | | | | |
| Male | 94.4 | 100 | 88.2 | 94.1 |
| Female | 94.4 | 100 | 76.5 | 94.1 |
| Days from mating to copulation (Female) | 3.7 ± 2.4 | 2.8 ± 1.3 | 3.2 ± 2.1 | 2.6 ± 1.9 |
| No. of corpora lutea | 19.5 ± 3.3 | 19.9 ± 4.3 | 20.2 ± 3.6 | 21.4 ± 5.1 |
| No. of implantations | 16.9 ± 2.9 | 16.3 ± 3.8 | 17.2 ± 2.5 | 16.2 ± 3.4 |
| Implantation rate (%) | 87.4 ± 13.1 | 82.7 ± 17.1 | 86.7 ± 14.7 | 77.4 ± 17.0 # |
| No. of live fetuses | 15.9 ± 3.0 | 14.7 ± 3.6 | 16.7 ± 2.5 | 15.3 ± 3.5 |
| No. of dead fetuses | 1.0 ± 1.0 | 1.6 ± 1.5 | 0.5 ± 0.7 | 0.9 ± 1.0 |
| Early stage | 1.0 ± 1.0 | 1.6 ± 1.5 | 0.5 ± 0.7 | 0.8 ± 1.0 |
| Late stage | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.3 |
| Dead fetuses (%) | 6.4 ± 7.0 | 9.2 ± 8.4 | 3.1 ± 3.7 | 5.4 ± 6.2 |
| Sex ratio [Male/ (Male + Female)] | 0.50 ± 0.15 | 0.49 ± 0.13 | 0.53 ± 0.10 | 0.54 ± 0.11 |
| Body weight (g) | | | | |
| Male | 3.17 ± 0.20 | 3.34 ± 0.20 * | 3.23 ± 0.21 | 3.45 ± 0.61 |
| Female | 3.02 ± 0.18 | 3.24 ± 0.22 ** | 3.08 ± 0.20 | 3.26 ± 0.54 |
| No. of F2 fetuses with external anomalies | | | | |
| Dwarf | 1 (0.4%) | 1 (0.7%) | 1 (0.4%) | 3 (1.1%) |
| Edema | 1 | 1 | 1 | 2 |
| Micrognathia | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Imperforate anus | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Brachyury | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Filamentous tail | 0 | 0 | 0 | 1 |

Mean ± S.D.

Significant difference from control: #, p < 0.05 (Mann-Whitney U-test)

Significant difference from control: *, p < 0.05; **, p < 0.01 (Student's t-test or Aspin-Welch test)

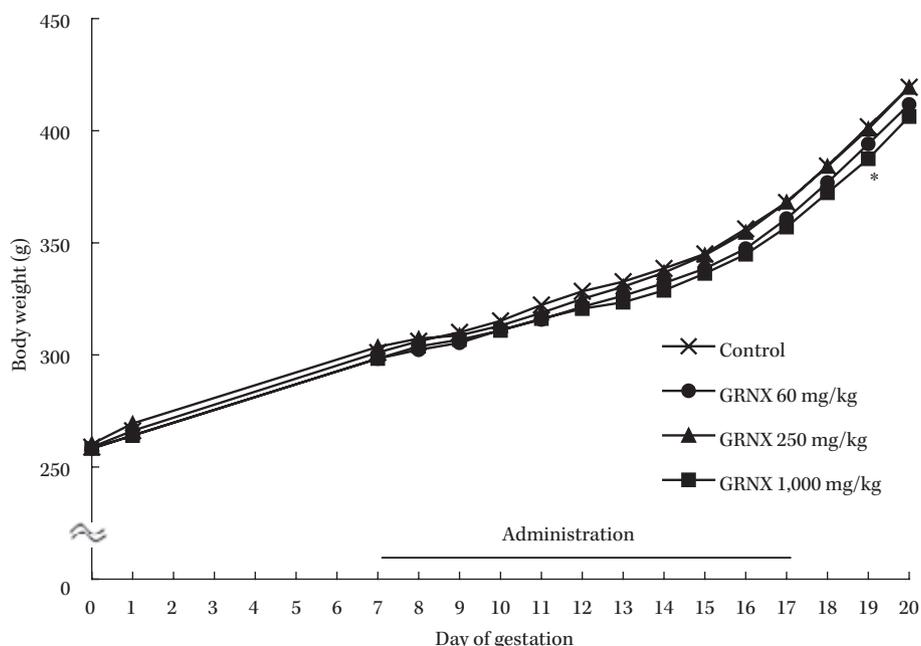


Fig. 1. Body weight changes during the gestation period of dams treated orally with GRNX in the study for effects on embryo-fetal development in rats.

Significant difference from control: *, $p < 0.05$ (Student's t-test or Aspin-Welch test).

Table 7. Caesarean section data on rat dams treated orally with GRNX in the study for effects on embryo-fetal development

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| No. of dams | 18 | 16 | 18 | 19 |
| No. of corpora lutea | 18.4 ± 3.6 | 19.3 ± 2.9 | 19.3 ± 3.9 | 17.7 ± 3.6 |
| No. of implantations | 14.9 ± 4.1 | 15.5 ± 3.2 | 15.4 ± 3.3 | 14.7 ± 3.8 |
| Implantation rate (%) | 80.8 ± 21.4 | 81.9 ± 19.6 | 82.8 ± 20.6 | 82.0 ± 20.5 |
| No. of live fetuses | 13.8 ± 3.9 | 14.8 ± 3.2 | 14.7 ± 3.4 | 13.9 ± 3.6 |
| No. of dead fetuses | 1.1 ± 1.1 | 0.7 ± 0.8 | 0.8 ± 1.1 | 0.7 ± 0.9 |
| Early stage | 1.1 ± 1.1 | 0.7 ± 0.8 | 0.8 ± 1.1 | 0.7 ± 0.9 |
| Late stage | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.2 |
| Dead fetuses (%) | 6.8 ± 7.0 | 4.4 ± 5.4 | 5.0 ± 6.9 | 4.6 ± 5.5 |
| Sex ratio | | | | |
| [Male/ (Male + Female)] | 0.48 ± 0.17 | 0.47 ± 0.15 | 0.53 ± 0.13 | 0.45 ± 0.18 |
| Body weight (g) | | | | |
| Male | 3.26 ± 0.20 | 3.26 ± 0.26 | 3.19 ± 0.16 | 3.22 ± 0.20 |
| Female | 3.11 ± 0.28 | 3.14 ± 0.25 | 3.04 ± 0.24 | 3.07 ± 0.18 |

Mean ± S.D.

中の一般状態および体重に異常はなかった。F1 雌の妊娠 20 日帝王切開所見として、1,000 mg/kg 群で着床率が低値であったが、F2 生存胎児数および胚・胎児死亡率に統計学的有意差はみられなかった。その他、黄体数、着床数、性比、胎児体重および胎児の外表観察に GRNX 投与の影響はみられなかった。

3. ラット胚・胎児発生に関する試験

母動物の一般状態には、いずれの群にも異常はなかった。1,000 mg/kg 群では体重増加が抑制され (Fig. 1)、摂餌量も低値であった。

母動物の妊娠 20 日の帝王切開所見を Table 7 に示す。

黄体数、着床数、着床率、生存胎児数、胚・胎児死亡率、性比および生存胎児体重には、いずれの群にも統計学的有意差はみられず、胎盤形態に異常はなかった。

母動物の剖検では GRNX 投与に起因すると考えられる異常はなかった。器官重量では GRNX の全投与群で盲腸重量が高値であった。また、肝臓および唾液腺重量が 60 および 250 mg/kg 群で低値であり、心臓、肝臓および唾液腺重量が 1,000 mg/kg 群で低値であったが、これら器官の病理組織学的検査で異常はなかった。

胎児の外表、骨格および内臓観察結果を Table 8 に示す。外表観察では対照群に矮小体、無眼球および曲尾が、

Table 8. External, skeletal and visceral observation of fetuses obtained from rat dams treated orally with GRNX in the study for effects on embryo-fetal development

| Dose (mg/kg) | Control | 60 | 250 | 1,000 |
|---|-----------|------------|------------|------------|
| No. of fetuses with external anomalies | 3 (1.1%) | 0 (0%) | 3 (1.1%) | 0 (0%) |
| Dwarf | 1 | 0 | 3 | 0 |
| Anophthalmia | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Kinked tail | 1 | 0 | 0 | 0 |
| No. of fetuses with skeletal anomalies | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (1.6%) |
| Fusion of exoccipital bone and cervical vertebral arch | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Fusion of sternbrae | 0 | 0 | 0 | 1 |
| No. of fetuses with skeletal variations | 11 (8.7%) | 16 (12.8%) | 22 (16.6%) | 20 (13.3%) |
| Thoracic vertebral body | | | | |
| Splitting | 0 | 5* | 2 | 2 |
| Dumbbell shape | 2 | 2 | 4 | 2 |
| Unilateral formation | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Unossification | 2 | 2 | 4 | 0 |
| 5 lumbar vertebrae | 0 | 4 | 3* | 7 |
| Sacralization | 1 | 2 | 2 | 4 |
| Cervical rib | 2 | 3 | 2 | 0 |
| Lumbar rib | 3 | 1 | 2 | 2 |
| Shortening of 13th rib | 1 | 1 | 4 | 5 |
| Sternebra | | | | |
| Asymmetry | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Splitting | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Degree of ossification | — | — | — | — |
| No. of fetuses with visceral anomalies | 8 (6.9%) | 13 (10.9%) | 13 (9.8%) | 11 (8.1%) |
| Situs inversus viscerum totalizes | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Dilatation of lateral ventricle | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Malposition of pituitary gland and deformity of third ventricle | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Anophthalmia | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Thymic remnant in neck | 7 | 11 | 8 | 5 |
| Dilatation of renal pelvis | 0 | 1 | 4 | 3 |
| Dilatation of renal ureter | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Aplasia of testis and epididymis | 0 | 0 | 0 | 1 |

—: Normal

Significant difference from control: *, $p < 0.05$ (Student's t-test or Aspin-Welch test)

250 mg/kg 群に矮小体がみられたが、外表異常を有する胎児の出現率に統計学的有意差はみられなかった。骨格観察では、骨格異常として1,000 mg/kg 群に外後頭骨と頸椎弓の癒合および胸骨分節癒合がみられたが、骨格異常を有する胎児の出現率に統計学的有意差はみられなかった。骨格変異として胸椎椎体の分離、亜鈴型、一側性形成および未化骨、5腰椎骨、腰椎の仙椎化、頸肋、腰肋、第13肋骨の短小ならびに胸骨分節の非対称および分離が対照群およびGRNX投与群に散見された。これら骨格変異のうち、60 mg/kg 群の胸椎体分離および250 mg/kg 群の5腰椎骨を有する胎児数に統計学的に有意な高値がみられた。骨化進行度については、いずれの群にもGRNX投与の影響はみられなかった。胎児の内臓観察では、胸腺頸部残留、下垂体の位置異常、第3脳室の変形、腎盂拡張、尿管拡張、全内臓逆位、側脳室拡張、無眼球ならびに精巣および精巣上体の無形成が対照群およびGRNX投与群に散見された。これら内臓異常を有す

る胎児の出現率には、いずれの投与群にも統計学的有意差はみられなかった。

4. ウサギ胚・胎児発生に関する試験

母動物の一般状態では、12.5 mg/kg 群の1例が妊娠21日に流産し、翌日死亡した。その他、流産が6.25および12.5 mg/kg 群に各1例(いずれも妊娠25日)、25 mg/kg 群に3例(妊娠26日に1例、妊娠28日に2例)みられた(Table 9)。これら死亡および流産例は、摂餌量の低値もしくは無摂餌と体重減少が継続していた。母動物の体重推移をFig. 2に示す。6.25、12.5および25 mg/kg のいずれの投与群においても体重増加が抑制され、摂餌量も低値であった。

母動物の妊娠28日の帝王切開所見をTable 9に示す。黄体数、着床数、着床率、胚・胎児死亡率、胎児生存率および性比には、いずれの群にも統計学的有意差はみられず、胎盤形態に異常はなかった。胎児については、12.5 mg/kg 群の生存胎児数が低値であった。また、25 mg/kg

Table 9. Caesarean section data on rabbit dams treated intravenously with GRNX in the study for effects on embryo-fetal development

| Dose (mg/kg) | Control | 6.25 | 12.5 | 25 |
|-------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| No. of dams | 19 | 20 | 24 | 22 |
| No. of died | 0 | 0 | 1 | 0 |
| No. of abortion | 0 | 1 | 2 ^{a)} | 3 |
| No. of corpora lutea | 10.6 ± 2.4 | 9.9 ± 2.0 | 10.6 ± 2.3 | 10.7 ± 1.7 |
| No. of implantations | 9.3 ± 2.7 | 8.4 ± 2.0 | 8.2 ± 2.8 | 9.5 ± 1.9 |
| Implantation rate (%) | 86.7 ± 15.5 | 84.9 ± 15.6 | 78.3 ± 23.0 | 89.0 ± 13.2 |
| No. of live fetuses | 8.6 ± 2.7 | 7.8 ± 1.7 | 7.1 ± 2.9 * | 8.2 ± 1.9 |
| No. of dead fetuses | 0.6 ± 1.1 | 0.6 ± 0.9 | 1.0 ± 2.1 | 1.3 ± 1.6 |
| Early stage | 0.3 ± 0.5 | 0.2 ± 0.5 | 0.3 ± 0.6 | 0.4 ± 0.5 |
| Late stage | 0.4 ± 0.8 | 0.3 ± 0.6 | 0.8 ± 2.0 | 0.9 ± 1.4 |
| Dead fetuses (%) | 6.3 ± 10.0 | 5.6 ± 8.4 | 12.5 ± 22.8 | 13.0 ± 15.7 |
| Sex ratio | | | | |
| [Male/ (Male + Female)] | 0.51 ± 0.25 | 0.51 ± 0.18 | 0.53 ± 0.27 | 0.51 ± 0.20 |
| Body weight (g) | | | | |
| Male | 36.41 ± 6.60 | 35.20 ± 5.96 | 36.28 ± 5.99 | 34.52 ± 5.72 |
| Female | 34.67 ± 5.76 | 34.95 ± 6.58 | 33.86 ± 6.66 | 33.16 ± 6.04 |

Mean ± S.D.

^{a)}: The number contains a dead animal.

Significant difference from control: *, $p < 0.05$ (Student's t-test or Aspin-Welch test)

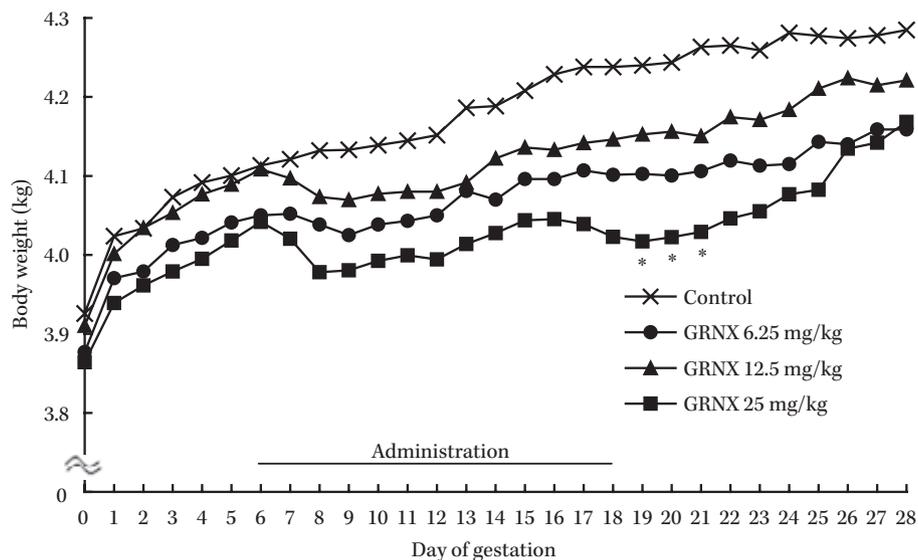


Fig. 2. Body weight changes during the gestation period of dams treated intravenously with GRNX in the study for effects on embryo-fetal development in rabbits.

Significant difference from control: *, $p < 0.05$ (Student's t-test or Aspin-Welch test).

群の雌雄の胎児体重は対照群と比較して統計学的有意差はみられないものの低値傾向を示した。

母動物の剖検ではGRNX投与に起因すると考えられる異常はなかった。器官重量では25 mg/kg群の盲腸重量が高値であった。

胎児の外表、骨格および内臓観察結果をTable 10に示す。外表観察では、対照群に左前肢手関節屈曲拘縮が、12.5 mg/kg群に臍帯ヘルニアがみられた。25 mg/kg群では同一母動物からの胎児4例が短尾であり、そのうち3例は臍帯ヘルニアを伴っていた。骨格観察では、骨格異

常として対照群に肋骨分岐が、6.25 mg/kg群に肋骨結節、胸椎体癒合および胸椎弓欠損が、12.5 mg/kg群に胸椎核分裂が、25 mg/kg群に胸椎体癒合、胸椎弓欠損、肋骨結節、肋骨欠損および肋骨癒合がみられた。また、25 mg/kg群では外表観察で短尾がみられた同一母動物からの胎児4例に尾椎癒合、胸椎核癒合および肋骨分岐がみられたことから、骨格異常を有する胎児の出現率は統計学的に有意な高値を示した。骨格変異の出現率および骨化数には、いずれの群にも統計学的有意差はみられなかった。胎児の内臓観察では、内臓大異常として6.25

Table 10. External, skeletal and visceral observation of fetuses obtained from rabbit dams treated intravenously with GRNX in the study for effects on embryo-fetal development

| Dose (mg/kg) | Control | 6.25 | 12.5 | 25 |
|--|-----------|------------|-----------------------|--------------------------|
| No. of fetuses with external anomalies | 1 (0.8%) | 0 (0%) | 1 (0.5%) | 4 (3.7%) ^{a)} |
| Forelimb arthrogryposis | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Omphalocele | 0 | 0 | 1 | 3 ^{a)} |
| Brachyury | 0 | 0 | 0 | 4 ^{a)} |
| No. of fetuses with skeletal anomalies | 1 (0.5%) | 2 (1.4%) | 1 (0.5%) | 8 (6.3%) [#] |
| Fused sternebrae | 0 | 0 | 0 | 2 ^{a)} |
| Sternoschisis | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Fused rib | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Branched rib | 1 | 0 | 0 | 1 ^{a)} |
| Absent rib | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Nodulated rib | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Fused thoracic centrum | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Absent thoracic arch | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Fused caudal vertebrae | 0 | 0 | 0 | 4 ^{a)} |
| No. of fetuses with skeletal variations | 1 (0.4%) | 1 (0.8%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Accessory of sternebrae | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Incomplete ossification of rib | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Degree of ossification | — | — | — | — |
| No. of fetuses with visceral major anomalies | 0 (0%) | 1 (0.6%) | 3 (1.8%) [#] | 2 (1.5%) |
| Right subclavian artery arising from aortic arch | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Ventricular septum defect | 0 | 0 | 1 | 1 ^{a)} |
| Persistent truncus arteriosus | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Diaphragmatic hernia | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ectopic kidney | 0 | 0 | 0 | 1 |
| No. of fetuses with visceral minor anomalies | 12 (8.3%) | 20 (13.5%) | 13 (8.5%) | 31 (23.0%) ^{##} |
| Thymic remnant in neck | 6 | 14 | 8 | 26 ^{##} |
| Supernumerary coronary artery orifice | 5 | 6 | 5 | 4 |
| Absent accessory lobe in lung | 1 | 0 | 0 | 1 |

— : Normal

^{a)}: They were littermates.Significant difference from control: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

mg/kg 群に右鎖骨下動脈の大動脈起始が、12.5 mg/kg 群に心室中隔欠損、大動脈幹遺残および横隔膜ヘルニアが、25 mg/kg 群に心室中隔欠損および腎臓逸所がみられた。これら内臓大異常を有する胎児の出現率に GRNX 投与の影響はみられなかった。内臓小異常として、胸腺頸部残留、冠状動脈口過剰および肺副葉欠損が対照群を含む GRNX 投与群にみられ、25 mg/kg 群では胸腺頸部残留を有する胎児の出現率に統計学的に有意な高値がみられた。

III. 考 察

ラット受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験では、100 および 400 mg/kg 群の雄ならびに 1,000 mg/kg 群の雌で体重増加が抑制され、GRNX 投与の影響と考えられた。GRNX 投与群の雌雄の剖検でみられた所見は自然発生することが知られており^{10,11)}、いずれも 1 例の発現であることから自然発生異常と考えられた。また、盲腸重量の高値はフルオロキノロン系抗菌薬やセフェム系抗生物質でも知られており¹²⁻¹⁸⁾、被験物質の抗菌作用による腸内細菌叢の変動に起因する変化と考えら

れた。

生殖能検査、精子検査および妊娠 15 日の子宮内観察結果に GRNX 投与の影響はみられず、GRNX は親動物に体重増加の抑制を示す投与量においても、受胎能および初期胚発生に影響を及ぼさなかった。

本試験での親動物に対する一般毒性的無毒性量は、体重増加が抑制されなかった量として、雄が 25 mg/kg であり雌が 250 mg/kg であった。生殖能力に関する無毒性量および初期胚に関する無毒性量は、いずれも雄が 400 mg/kg、雌が 1,000 mg/kg であった。

ラット出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験では、250 および 1,000 mg/kg 群の母動物において妊娠期間中に体重増加が抑制され、GRNX 投与の影響と考えられた。また、離乳後の剖検において盲腸重量が高値を示し、GRNX の抗菌作用に起因する変化と考えられた。母動物の分娩および哺育状態に GRNX 投与の影響はみられなかった。

出生児については、生後 4 日齢で観察された骨格変異は自然発生することが知られており^{7,8)}、ラット胚・胎児

発生に関する試験では確認されない変化であることから自然発生変異であると考えられた。器官重量として、1,000 mg/kg 群の雌雄で生後 22 日の盲腸重量が高値を示し、母乳を介した GRNX の移行に伴う変化と考えられた。精巣あるいは精巣上体重量の低値については、精巣下降および陰茎亀頭と包皮との分離を指標とする性成熟、生殖能検査ならびに精巣および精巣上体の病理組織学的検査で異常がなかったことから、毒性とは判断しなかった。

本試験での親動物に対する一般毒性学的無毒性量は体重増加が抑制されなかった量として 60 mg/kg、生殖能力に関する無毒性量および次世代の発生に関する無毒性量はいずれも 1,000 mg/kg であった。

ラット胚・胎児発生に関する試験では、1,000 mg/kg 群の母動物に体重増加の抑制および摂餌量の低値がみられ、GRNX 投与の影響と考えられた。器官重量では盲腸重量が高値を示し、GRNX の抗菌作用に起因する変化と考えられた。

胎児の外表および内臓観察では、GRNX 投与群に観察された異常はいずれも自然発生することが知られており^{7,8)}、発生頻度に統計学的有意差はみられなかった。骨格観察では、60 mg/kg 群の胸椎体分離および 250 mg/kg 群の 5 腰椎骨を有する胎児数が高値であったが、高用量群に統計学的有意差がみられなかったことから自然発生変異^{7,8)}と考えられ、ラット母動物の体重増加が抑制される投与量においても、GRNX に催奇形性はなかった。

本試験での親動物に対する一般毒性学的無毒性量は体重増加が抑制されなかった量として 250 mg/kg、生殖能力に関する無毒性量および次世代の発生に関する無毒性量はいずれも 1,000 mg/kg であった。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、母動物の流産および流産翌日の死亡が GRNX 投与群にみられた。Matsuzawa ら¹⁹⁾は妊娠ウサギを用いた実験で、妊娠中期に継続的な制限給餌をすることにより流産が起こることを報告している。本試験で観察された流産例には摂餌量の低値および体重減少が継続していたこと、妊娠 28 日の帝王切開所見では GRNX に胎児致死作用がみられず、胎児死亡による流産とは考えられないことから、流産は摂餌量の継続的低値に伴う栄養不良が原因であると考えられた。

妊娠 28 日の帝王切開所見として、25 mg/kg 群では胎児体重が低値であり、母動物の低体重に起因した変化と考えられた。12.5 mg/kg 群では生存胎児数が低値であったが、報告されている Kbl: NZW ウサギの背景データ⁸⁾の範囲内にあり、高用量群にはみられない変化であることから偶発的変動と考えられた。

胎児の外表面観察では、25 mg/kg 群の外表面異常は同一母動物に集中しており、自然発生異常と考えられた。胎児の骨格観察結果に GRNX 投与の影響はみられな

かった。胸腺頸部残留を有する胎児の出現率の高値については、本試験で用いた Kbl: NZW ウサギの胎児には胸腺頸部残留が比較的高率に発現することが報告されており(背景値⁸⁾: 0~16.67%)、25 mg/kg 群では胎児体重が低値であったことから、胸腺頸部残留は母動物の低体重に起因する胎児の発育遅延を示唆する所見^{20,21)}であると考えられた。したがって、GRNX 投与によりウサギ母動物の体重増加が抑制され胎児の発育が遅延したものの、催奇形性はみられなかった。

本試験での親動物に対する一般毒性学的無毒性量は、体重増加の抑制および摂餌量の低値が 6.25 mg/kg 以上の投与群にみられたことから 6.25 mg/kg 未満であった。生殖能力に関する無毒性量は、流産が 6.25 mg/kg 以上の投与群にみられたことから 6.25 mg/kg 未満、次世代の発生に関する無毒性量は 25 mg/kg 群で胎児発育が遅延したことから 12.5 mg/kg であった。

以上のように、ラットを用いた一連の生殖発生毒性試験では雌雄の受胎能、母動物の生殖能力、胎児および出生児の発育分化に GRNX 投与の影響はみられなかった。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の摂餌量の低値および栄養不良に起因すると考えられる流産、胎児体重の低値および胸腺頸部残留を有する胎児の出現率の高値がみられたが、胚・胎児死亡率、胎児生存率および性比に GRNX 投与の影響はみられなかった。

文 献

- 1) Takahata M, Mitsuyama J, Yamashiro Y, Yonezawa M, Araki H, Todo Y, et al: *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of T-3811 ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1077-84
- 2) Fung-Tomc J C, Minassian B, Kolek B, Huczko E, Aleksunes L, Stickle T, et al: Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro (6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3351-6
- 3) Kawamura S, Hirohashi A, Kato T, Yasuda M: Bone-staining technique for fetal rat specimens without skinning and removing adipose tissue. *Congenit Anom* 1990; 30: 93-5
- 4) Irwin S: Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13: 222-57
- 5) Wilson J G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *In* Wilson J G, Warkany J (eds.), *Teratology: Principles and Techniques*. The University of Chicago Press, 1965; p.262-77
- 6) 西村耕一: マウスおよびラット胎仔の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法。先天異常 1974; 14: 23-40
- 7) Morita H, Ariyuki F, Inomata N, Nishimura K, Hasegawa Y, Miyamoto M, et al: Spontaneous malformations in laboratory animals: Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Congenit Anom* 1987; 27: 147-206

- 8) Nakatsuka T, Horimoto M, Ito M, Matsubara Y, Akaike M, Ariyuki F: Japan pharmaceutical manufacturers association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice. *Congenit Anom* 1997; 37: 47-138
- 9) 黒木良和：小奇形の意義と判定上の問題点。先天異常 1979; 19: 163
- 10) Boorman G A, Eustis S L, Elwell M R, Montgomery C A, MacKenzie W F: Pathology of the Fisher Rat, Reference and Atlas. Academic Press 1990; 46-7
- 11) Maeda H, Omori M, Miyajima H: Comparison of historical control data between Crj: CD(SD)IGS and Crj: CD(SD) rats. Biological reference data on CD(SD)IGS Rats-1999. Best Printing, Tokyo, 1999; p. 105-18
- 12) 小野寺威, 稲毛富士郎, 吉田貢由, 加藤道幸, 山田明甫：合成抗菌剤 DL-8280 のラットにおける4週経口亜急性毒性。Chemotherapy 1984; 32(Suppl 1): 1091-104
- 13) 竹本勇一, 仙田博美, 中野幸穂, 山添浩史, 山吉迪子, 松岡信男, 他：AT-2266 の毒性学的研究第2報 ラットにおける亜急性ならびに慢性毒性試験。Chemotherapy 1984; 32(Suppl 3): 199-220
- 14) 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 週間経口投与亜急性毒性試験。Chemotherapy 1988; 36 (Suppl 2): 343-70
- 15) 小林文彦, 矢原 功, 吉崎敏夫, 村岡義博：Cephem系経口抗生物質 7432-S (Ceftibuten) のラットにおける1ヵ月亜急性毒性試験。Chemotherapy 1989; 37 (Suppl 1): 816-32
- 16) 河村泰仁, 永井章夫, 吉田一晴, 長沢峰子, 鬼頭暢子, 児玉卓也：T-3761 のラット 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験。Jpn J Antibiotics 1995; 48: 769-89
- 17) 小野寺威：3 化学療法剤。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; 29-42
- 18) Takayama S, Hirohashi M, Kato M, Shimada H: Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *J Toxicol Environ Health* 1995; 45: 1-45
- 19) Matsuzawa T, Nakata M, Goto I, Tsushima M: Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. *Toxicology* 1981; 22: 255-9
- 20) 西村耕一, 寺田芳規, 椋本健次, 庄司起代子, 辰巳熙：Phenobarbital のラット胎仔に及ぼす影響。先天異常 1979; 19: 179-80
- 21) 稲葉智之, 佐々 齊, 田中千晶, 徳永佐和子, 脇坂美国：ラットの胸腺頸部残留に関する研究 1. 胎児における自然発生状況。第30回日本先天異常学会学術集会抄録集, 1990; 100

Reproductive and developmental toxicity studies of garenoxacin

Tsukasa Kozaki¹⁾, Eiko Furubo¹⁾, Takahiro Sanzen¹⁾,
Masatoshi Furukawa²⁾ and Yozo Todo¹⁾

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

²⁾ Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.

Reproductive and developmental toxicity studies of garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) were conducted in Sprague-Dawley rats and New Zealand White rabbits.

In the oral study of fertility and early embryonic development to implantation in rats, suppressed body weight gain and decreased food consumption in males in the 100 and 400 mg/kg groups, and suppressed body weight gain in females in the 1,000 mg/kg group were noted. No effects of GRNX were noted in reproductive ability, sperm examination, estrous cycle, or intrauterine condition on Day 15 of gestation.

In the oral study of pre- and postnatal development, including maternal function in rats, suppressed body weight gain and decreased food consumption were noted during gestation period in dams in the 250 and 1,000 mg/kg groups. No effects of GRNX were noted in reproductive ability of dams, which were indicated by maintenance of pregnancy, delivery or nursing. In offspring, no effects of GRNX were noted in viability, body weight changes, general sign, postnatal development, reflex response, open field performance, learning ability, reproductive ability, or intrauterine condition on Day 20 of gestation.

In the oral study of embryo-fetal development in rats, suppressed body weight gain and decreased food consumption were noted in dams in the 1,000 mg/kg group. No effects of GRNX were noted in reproductive ability of dams, which were indicated by maintenance of pregnancy or findings of caesarean section at term. In fetuses, no effects of GRNX were noted in the number of live, dead and resorbed fetuses, body weights, sex ratio, or external, visceral and skeletal examination. GRNX was concluded to be not teratogenic in rats.

In the intravenous study of embryo-fetal development in rabbits, suppressed body weight gain and decreased food consumption were noted in dams in the 6.25, 12.5 and 25 mg/kg groups, with abortion occurring for 1 to 3 dams. In the 12.5 mg/kg group, death after abortion was observed for 1 dam. In fetuses, decreased body weight of live fetuses and increased incidence with thymic remnant in the neck were observed. These changes were considered to be an effect of delayed growth of fetuses due to the lower body weight of dams, and it could therefore be concluded that GRNX was not teratogenic in rabbits.