

T-1220 の毒性試験 (第7報)

——ラットにおける生殖試験——
(器官形成期投与試験)

高井 明・米田豊昭・中田弘子
中村昌三・稲場淳子
富山化学工業株式会社総合研究所

T-1220 のマウスにおける生殖試験について前報¹⁾ で報告したが、今回、ラットにおける生殖試験 (器官形成期投与試験) を行なったので報告する。

I. 実験方法

1. 動物および投与期間

12~14週齢の日本クレア産 SPF-Wistar 系ラットを交配させ雌の膈内に精子を認めた日を妊娠 0 日として起算し、妊娠 7 日目から 17 日目までの 11 日間連日薬物の投与を行なった。動物はすべて室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ の空調下に飼育し、繁殖用固型飼料オリエンタル NMF および水は自由に摂取させた。

2. 投与方法および投与量

T-1220 は静脈内または筋肉内適用の薬物であるが、ラットでは筋肉内連続投与が困難であり、マウスの器官形成期投与試験において静脈内投与を採用したことから本実験では皮下投与を採用することにした。

投与量決定のための予備試験の結果 2,000 mg/kg では投与部位に潰瘍を生じ連続投与が不可能であったが、1,000 mg/kg は可能であり、妊娠動物を用いての予備試験でも妊娠を持続し得たことより最大量を 1,000 mg/kg とし、最小量として臨床量の約 5 倍である 250 mg/kg を、中間量として 500 mg/kg を採用した。なお、薬物はすべて蒸留水に溶解し、投与液量はすべて 10 ml/kg とし

た。対照群には生理食塩水を投与した。

II. 観察方法

1. 妊娠末期胎仔観察

各群 30 匹の妊娠雌を使用し、20 匹を妊娠 21 日目にエーテル麻酔死させて開腹し、着床数、死亡仔数および生存仔数を調べた。生存仔については性別の判定を行ない、体重測定後外形異常の有無を調べ、半数を骨格異常の検索に²⁾、半数を内臓異常の検索³⁾ に供した。母体は内臓を肉眼的に観察したのち主要臓器の重量を測定した。

2. 新生仔観察

残りの各群 10 匹の妊娠動物を自然分娩させ、生後 12 時間以内に出産仔数とその生死、性別および外形異常の有無を調べ、生仔の体重を測定した後そのまま母体に哺育させ生後 6 週まで週 1 回体重を測定した。いっぽう、行動異常の有無および耳介開展、歯牙萌出、毛生、眼瞼の開裂などの分化状態の観察を行なった。母体は離乳時に屠殺して内臓を肉眼的に観察したのち、着床痕数より胎仔の出生率を算定した。なお、生後 6 週で各母体より雌雄各 2 例ずつ任意に選抜して 12 週まで飼育し、そのなか

Fig. 1 Food consumption of pregnant rats administered T-1220 subcutaneously on teratological study

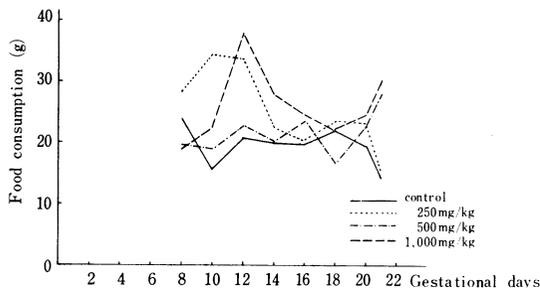


Fig. 2 Body weight gain of pregnant rats administered T-1220 subcutaneously on teratological study

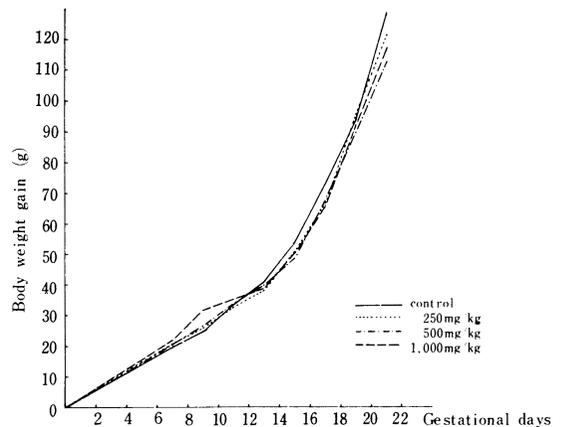


Table 1 Effect of T-1220 in rat fetuses and pregnant rats

Dose (mg/kg)	control	250	500	1,000
No. of litters	20	20	20	20
Mean body weight gain of pregnant rat (g±S.E.)				
Day 0-7 of pregnancy	19.6±0.88	20.5±1.15	20.1±1.29	21.9±1.28
Day 0-17 of pregnancy	72.8±1.56	70.2±1.59	67.6±1.82	66.0±2.60
Day 0-21 of pregnancy	128.6±5.53	126.3±2.36	112.6±3.57	117.1±4.70
No. of implants (mean±S.E.)	260(13.0±0.75)	307(15.4±0.39)	262(13.1±0.90)	268(13.4±0.89)
Alive fetuses (mean±S.E.)	252(12.6±0.85)	293(14.7±0.40)	256(12.8±0.91)	262(13.1±0.86)
Dead fetuses (%)	8 (3.1)	14 (4.6)	6 (2.3)	6 (2.2)
Mean body weight of fetuses (g±S.E.)	5.04±0.081	4.90±0.058	5.01±0.061	5.00±0.081
Sex				
Male	119	158	138	129
Female	133	135	118	133
Malformed fetuses (%)	1 (0.4)	—	1 (0.4)	1 (0.4)
Agnathia	1	—	—	—
Micrognathia	—	—	—	1
Umbilical hernia	—	—	1	—
Mean organ weight of pregnant rats (g±S.E.)				
Heart	0.97±0.021	0.95±0.020	0.97±0.029	0.97±0.031
Lung	1.34±0.022	1.35±0.031	1.33±0.048	1.30±0.051
Liver	14.97±0.372	14.31±0.243	13.06±0.400	13.60±0.305
Kidney				
left	1.04±0.026	1.06±0.019	1.06±0.031	1.03±0.027
right	1.10±0.025	1.09±0.025	1.10±0.049	1.04±0.028
Spleen	0.63±0.018	0.58±0.045	0.56±0.017	0.59±0.016

から各群雌雄15匹ずつを用いて1週間交配させ生殖機能を検索した。残りの仔は6週で剖検し肉眼的に内臓を観察したのち主要臓器の重量を測定した。

III. 実験成績

1. 母体に対する影響

摂餌量および母体体重の推移を Fig. 1, Fig. 2 に示す。摂餌量および母体体重には、薬物投与に起因すると思われる減少は認められなかった。母体臓器の肉眼的観察および臓器重量にも異常は認められなかった。

2. 胎仔に対する影響

出産前検査の結果を Table 1 に示す。着床数、生存仔数、死亡仔数、性別および生存仔平均体重のいずれにも対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。外形異常としては対照群に無顎症が1例、500 mg/kg 群に臍帯ヘルニアが1例、1,000 mg/kg 群に小顎症が1例認められた。

骨格および内臓観察の結果を Table 2 に示す。骨格の奇形は対照群および薬物投与群のいずれにも認められず、変異として14肋骨の形成が対照群に1例、250 mg/kg 群に2例、1,000 mg/kg 群に3例、第2頸椎弓の分

離が500 mg/kg 群に1例、第13肋骨の短小が1,000 mg/kg 群に1例認められたが、これらの発生頻度には対照群と薬物投与群との間に差が認められない。また、化骨進行度として右上肢基節骨化骨数、尾椎骨化骨数および胸骨核の化骨度を調べたが、いずれも対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。内臓の異常は対照群、薬物投与群とも全く認められなかった。

3. 新生仔に対する影響

各群10匹ずつの母体から自然分娩した新生仔の哺育成績および発育状態を Table 3 に示す。出産仔数、出生率、哺育率、生存率および平均体重にはいずれも対照群と薬物投与群との間に差を認めなかった。出生仔の外形異常、行動状態、耳介開展、歯牙萌出、毛生、眼瞼の開裂などの生後分化の時期についても全く差は認められなかった。

生後6週で剖検した F₁ の臓器重量体重比および内臓の肉眼的観察の結果を Table 4 に示す。臓器重量には対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。内臓の異常としては、腎盂の拡大が対照群に4例、250 mg/kg 群に2例、500 mg/kg 群に4例、1,000 mg/kg 群に

Table 2 Effect of T-1220 on skeletal development and visceral malformation in rat fetuses

Dose (mg/kg)	control	250	500	1,000
No. of fetuses examined in skeletal development	130	153	134	138
No. of ossified proximal phalanges of right forelimb, mean \pm S. E.	3.7 \pm 0.10	3.4 \pm 0.14	3.7 \pm 0.09	3.7 \pm 0.08
No. of ossified caudal vertebrae, mean \pm S. E.	5.6 \pm 0.11	5.4 \pm 0.12	5.7 \pm 0.12	5.5 \pm 0.10
Retarded ossification of sternbrae (%)	3 (2.3)	12 (7.8)	8 (6.0)	7 (5.1)
14 th rib (%)	1 (0.8)	2 (1.3)	—	3 (2.1)
Split of the body of thoracic vertebrae (%)	—	—	1 (0.7)	—
Shortness of 13 th rib (%)	—	—	—	1 (0.7)
No. of fetuses examined in visceral malformations	121	140	121	123
Malformed fetuses	0	0	0	0

Table 3 Effect of T-1220 on delivery and postnatal development of rat offsprings

Dose (mg/kg)	control	250	500	1,000
No. of litters	10	10	10	10
No. of implants	140	133	150	145
No. of new born young	124	124	143	135
Delivering rate (%)	88.6	93.2	95.3	93.1
Weaning rate (%) ^{a)}	95.2	96.0	98.6	88.2
Survival rate (%) ^{b)}	95.2	96.0	98.6	88.2
No. and mean body weight of offsprings at birth				
Male (g \pm S.E.)	60 5.69 \pm 0.149	60 5.83 \pm 0.132	67 6.01 \pm 0.132	68 5.68 \pm 0.161
Female	64 5.34 \pm 0.123	64 5.49 \pm 0.126	76 5.58 \pm 0.108	67 5.24 \pm 0.165
1 st week				
Male	57 14.42 \pm 0.446	58 14.62 \pm 0.506	66 14.05 \pm 0.432	65 13.35 \pm 0.632
Female	63 13.73 \pm 0.365	62 14.05 \pm 0.492	75 13.21 \pm 0.413	59 12.65 \pm 0.563
2 nd week				
Male	57 26.32 \pm 1.017	58 26.66 \pm 1.078	66 25.42 \pm 0.701	63 25.39 \pm 1.240
Female	62 25.34 \pm 0.882	61 25.56 \pm 1.145	75 24.30 \pm 0.802	58 23.71 \pm 1.089
3 rd week				
Male	57 41.16 \pm 1.867	58 42.09 \pm 1.544	66 38.97 \pm 1.831	63 40.51 \pm 2.087
Female	62 39.36 \pm 1.719	61 39.80 \pm 1.631	75 37.17 \pm 1.722	57 38.51 \pm 1.890
4 th week				
Male	57 76.40 \pm 3.028	58 75.87 \pm 2.301	66 71.74 \pm 2.434	62 73.82 \pm 3.150
Female	61 71.19 \pm 2.721	61 70.73 \pm 2.322	75 67.43 \pm 1.987	57 68.14 \pm 2.906
5 th week				
Male	57 125.70 \pm 3.851	58 124.43 \pm 3.501	66 118.69 \pm 3.344	62 122.62 \pm 4.857
Female	61 110.94 \pm 2.623	61 109.38 \pm 2.915	75 105.54 \pm 2.290	57 105.46 \pm 3.344
6 th week				
Male	57 174.53 \pm 4.496	58 172.99 \pm 4.032	66 166.49 \pm 4.036	62 169.76 \pm 5.859
Female	61 140.79 \pm 2.797	61 138.33 \pm 3.176	75 135.95 \pm 2.431	57 134.97 \pm 3.691

a) No. of young at 4 th week/No. of young at birth

b) No. of young at 6 th week/No. of young at birth

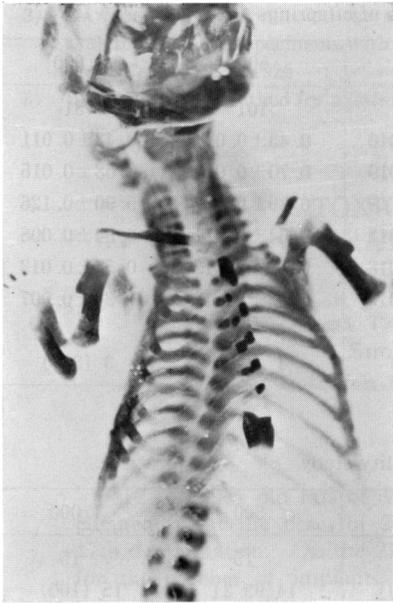


Photo. 1 Asymmetry of sternbrae control

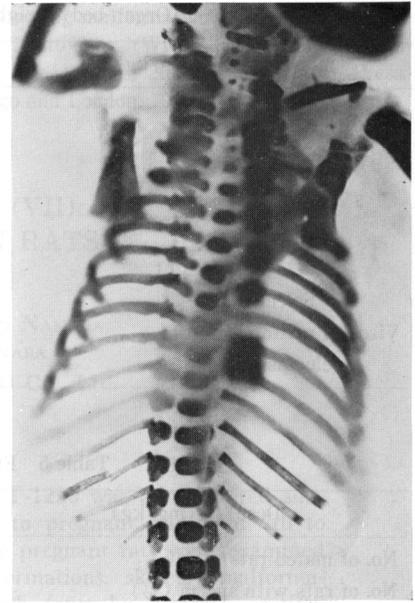


Photo. 2 14th rib 1,000 mg/kg

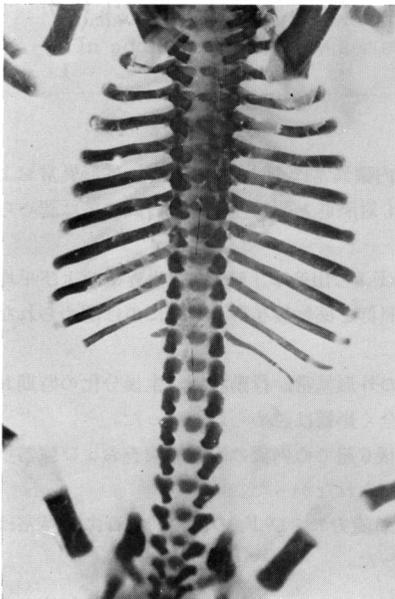


Photo. 3 Shortness of 13th rib 1,000 mg/kg

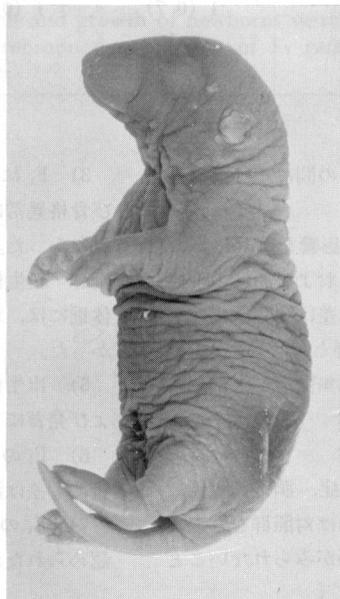


Photo. 4 Agnathia control

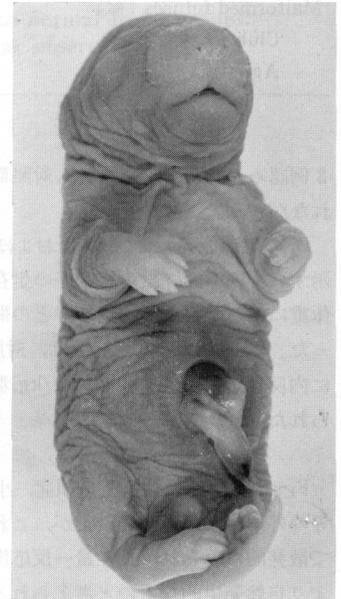


Photo. 5 Umbilical hernia 500 mg/kg

Table 4 Organ-body weight ratio and visceral malformation of offsprings at 6 weeks

Dose (mg/kg)	control	250	500	1,000
No. of fetuses examined	80	75	101	81
Heart	0.42±0.009	0.43±0.010	0.43±0.014	0.42±0.011
Lung	0.67±0.009	0.67±0.019	0.70±0.011	0.68±0.016
Liver	6.22±0.122	6.15±0.119	6.39±0.172	5.90±0.126
Kidney left	0.53±0.006	0.55±0.017	0.54±0.011	0.54±0.008
Kidney right	0.55±0.009	0.57±0.018	0.56±0.012	0.57±0.013
Spleen	0.34±0.004	0.34±0.010	0.33±0.012	0.34±0.007
Visceral malformation				
Pyelectasia (%)	4 (5.0)	2 (2.7)	4 (4.0)	3 (3.7)

Table 5 Effect of T-1220 in F₁ rats on fertility study

Dose (mg/kg)	control	250	500	1,000
No. of mated rats	15	15	15	15
No. of rats with sperm (%)	15 (100)	13 (86.7)	14 (93.3)	15 (100)
No. of pregnant rats (%)	11 (73.3)	11 (84.6)	11 (78.6)	13 (86.7)
Survival rate of fetuses (%)	98.6	97.1	92.0	97.0
Mean body weight of fetuses (g±S.E.)	4.95±0.054	4.95±0.097	5.02±0.069	4.89±0.068
Sex Male	79	62	56	87
Female	60	74	70	74
Malformed fetuses (%)	1 (0.7)	1 (0.7)	—	1 (0.6)
Club foot	1	1	—	—
Agnathia	—	—	—	1

3例認められたが、いずれも対照群との間に差は認められなかった。

F₁の生殖能力およびF₂におよぼす影響をTable 5に示す。交尾率、妊娠率、胎子の生存率および胎子の平均体重には対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。F₂の外見異常としては、対照群と250 mg/kg群に内反足が各1例、1,000 mg/kg群に無顎症が1例認められた。

IV. 考 察

F₁およびF₂において無顎症、小顎症、臍帯ヘルニア等の外見異常が観察されたが、これらは対照群をも含めて散発的にみられ、投与量-反応関係がみられないことより自然発生的なものと考えられる。

結 論

1) 妊娠母獣の摂餌量および体重増加に差は認められなかった。

2) 着床数、生存仔数、死亡仔数、生存仔平均体重のいずれにも各群に差は認められなかった。

3) F₁には内臓異常は全く認められず、外見異常および骨格異常にも対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。

4) 新生仔(F₁)の出産率、哺育率、生存率および平均体重には、対照群と薬物投与群との間に差は認められなかった。

5) 出生仔の外見異常、行動状態、生後分化の時期および発育にも全く影響は認められなかった。

6) F₁の生後6週での内臓の肉眼的検査および臓器重量にも差は認められなかった。

7) F₁の生殖能力およびF₂の出産前検査にも異常は認められなかった。

本実験の遂行にあたり、実験に協力された当研究所の守田加津江および折川真佐子の両嬢に感謝致します。

文 献

- 高井 明, 米田豊昭, 中田弘子, 中村昌三, 稲場淳子: T-1220の毒性試験(第6報)マウスにおける生殖試験. Chemotherapy 25(5): 915~927, 1977

- 2) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Tech. 1: 123, 1926
- 3) WILSON, J. G.: Method for administering agents and detecting malformation in experimental animals. Teratology (WILSON, J. G. and J. WARKANY, the Editors) 262 Chicago, Univ., Press, Chicago and London, 1965

TOXICITY TESTS OF T-1220 (VII): TERATOLOGICAL STUDY IN RATS

AKIRA TAKAI, TOYOAKI YONEDA, HIROKO NAKADA,
SHOZO NAKAMURA and JUNKO INABA
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

12-14 weeks old rats of Wistar strain were employed. T-1220 was administered subcutaneously at the doses of 250, 500 and 1,000 mg/kg/day to pregnant rats from 7th to 17th day gestation. On the 21st day of gestation, 2/3 of the pregnant rats were examined for the number of implants, fetal mortality external malformations, skeletal malformations, visceral malformations, body weight and sex of each fetus by cesarean section. Growth and behavior of newborns delivered spontaneously from the remaining 1/3 of the pregnant rats were observed.

As the result, in the observation of external malformations, skeletal and visceral malformations, there were no significant difference between administered animals and the control. The delivering rates, the weaning rates and the survival rates of all treated groups had no significant difference from those of the control, respectively. External malformation, behavior, differentiation after birth and growth of newborns were also normal in all groups. In addition, no abnormality of reproductive function of F₁ rats was observed.