

AM-715 のマウスにおける生殖試験 (第2報)

胎仔の器官形成期投与試験

入倉 勉・鈴木 博・杉本 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

新規合成抗菌剤である 1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid (AM-715) のマウスにおける器官形成期投与試験を行なった。

AM-715 の 125, 250 および 500 mg/kg を蒸留水に懸濁し、妊娠 6 日から 15 日目までの 10 日間、連日経口投与した。

投与期間を通じて全投与群の母獣への副作用はみられなかった。

全投与群において胎仔に対する AM-715 の致死的影响は何らみられなかった。

対照群および AM-715 投与群において、外表および骨格異常が散見されたが、これらの出現頻度は対照群と比較し統計学的有意差はなく、かつ用量依存性の関係もみられなかった。

F₁ および F₂ 世代の新生仔における機能検査ならびに行動観察では異常はみられず、かつそれらの生殖能力にも AM-715 の影響はみられなかった。

以上の結果から、AM-715 はマウスにおいて何ら催奇形作用はないものと推測される。

本報ではマウスの器官形成期に AM-715 を投与し、胎仔への催奇形性、新生仔 (F₁, F₂) の発育、機能、骨格、行動および生殖能力への影響の有無について調べた結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 実験動物および飼育環境

生後 8 週令の SLC: ICR 系雌雄マウスを静岡実験動物(協)から購入し、性成熟の動物を得るために 2~3 週間予備飼育を行ない、健康と思われる動物を実験に供した。実験開始時の体重は雄 37.6±2.4 g、雌 33.6±2.3 g であった。

予備飼育および実験期間中、動物は室温 24±2°C、湿度 65±10%、照明時間午前 9 時~午後 5 時の環境条件のもとで、アルミ製ケージに 10 匹ずつ収容し飼育した。飼料 (CA-1, 日本クレア製) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

2. 投与量

投与量の設定は、予備的に妊娠動物 (1 群 5~7 匹) を用い、妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間、AM-715 を 500 mg/kg (2.5% 懸濁液) および 1,000 mg/kg (5.0% 懸濁液) 連続経口投与した結果を参考にした。この予備実験から、一般症状観察、体重推移 (Fig. 1) および胎仔の観察 (Table 1) においてとくに AM-715 による影響がみられなかったため、懸濁可能な 5.0% を用い、投与量を無理をしないで与えられる体重 10 g 当り 0.1 ml とし、高用量群を 500 mg/kg、そして、低用量群を臨床

推定使用量 (12 mg/kg/day) の 10 倍に相当する 125 mg/kg に設定した。中用量は等比的に 250 mg/kg とした。

3. 交配方法および妊娠動物の確認

肉眼的に発情徴候が認められた雌マウスを同系の雄マウスと 1 対 1 の割合で同居させ、翌朝、膣栓が確認された動物を妊娠動物とし、当日を妊娠 0 日目とした。

4. 投与方法および投与期間

AM-715 は滅菌蒸留水に懸濁し、投与液量が体重 10 g 当り 0.1 ml になるように用時調製し、強制経口投与した。対照群には、滅菌蒸留水のみを同液量経口投与した。

投与は 1 日 1 回、マウス用金属製経口ゾンデを用い、妊娠 6 日目から 15 日目の 10 日間、連続投与した。

5. 観察項目

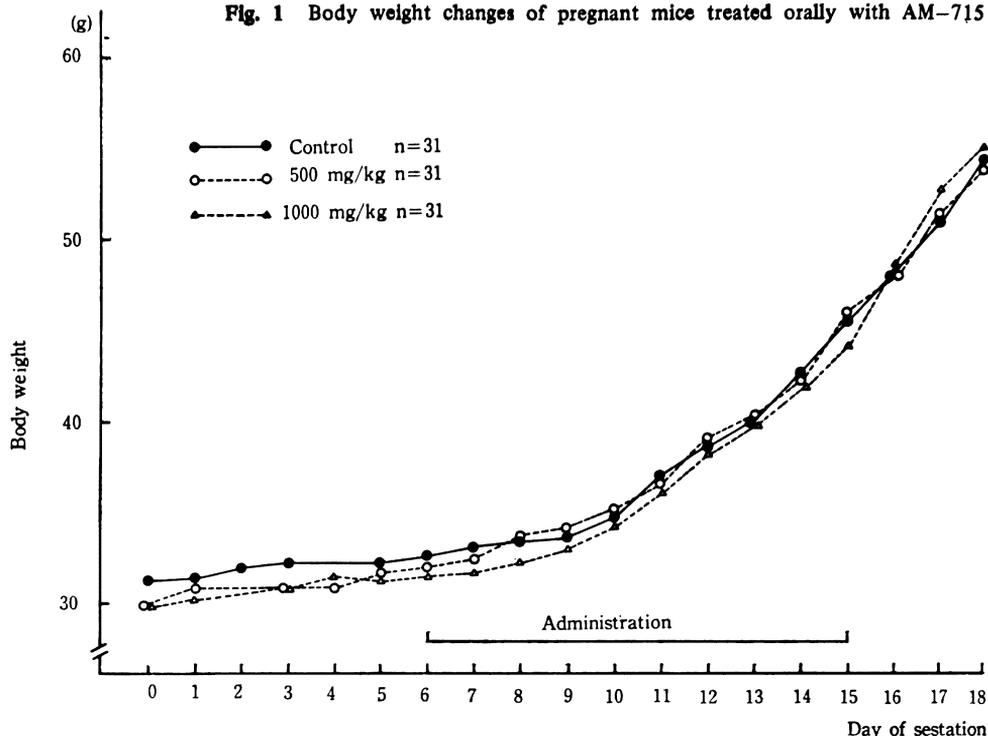
1) 母獣の観察

妊娠期間中の一般症状の観察および体重測定を行なった。また、投与期間中は 5 匹をえらび摂餌量、摂水量の測定を行なった。自然分娩させた母獣については、分娩後 4 週目に解剖し、着床痕数を調べた。

2) 胎仔の観察

妊娠 18 日目に各群 21 匹の母獣を解剖し、着床数、死亡胎仔数、吸収胚数、生存胎仔数および性別を調べ、生存胎仔については、体重および胎盤重量を測定した。また対照群を含め全例の胎仔につき外表奇形の有無を検査した。その後、各群の 1/3 の胎仔を Bouin 液で固定し、安全カミソリで切断して頭部および腹部は WILSON の方法¹⁾、胸部は BARROW の方法²⁾ に従って内臓異常の有無について検索した。残りの胎仔はアルコール固定後、

Fig. 1 Body weight changes of pregnant mice treated orally with AM-715



DAWSON の方法³⁾に従ってアリザリンレッドS染色透明骨格標本を作製し、骨格奇形および変異につき検索を行なった。

3) 新生仔の観察

各群10匹の妊娠母獣を自然分娩させ、妊娠期間、出生仔数、性別および外表異常の有無を調べ、各群の新生仔は4週令時まで全例生存させ、その間体重を測定し、耳介開展、切歯萌出および眼瞼開裂などにつき調べた。

各群の新生仔(F₁)は、4週令で離乳し、カゴ登り、平衡感覚、PREYER反射、トンボ返り、角膜反射、耳介反射およびHAFFNER疼痛反射の各機能検査を行なった。また精巣下降および腔開口について調べた。

各群の同腹仔は、無作為に約3等分し、主要器官の重量測定、骨格観察、行動観察ならびに生殖能力の検索を行なった。

器官重量の測定は4週令仔の脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓および生殖器について行なった。骨格検査(4週令仔)は常法に従ってアリザリンレッドS染色透明標本を作製し行なった。

行動観察は8週令仔につき、Open field test, LASHLEY III type mazeの方法を用いて行なった。生殖能力の検索は生後10~11週目に兄妹交配を避けて同一群内の雌

雄で行なった。交尾の確認された母獣(F₁)は妊娠14日目に約2/3を解剖し、黄体数、着床数、初期および後期死胚数を調べ、残りの約1/3は自然分娩させ、妊娠期間、出生仔数、性別および外表異常につき調べた。新生仔(F₂)は10週令時まで体重を測定し、耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂を調べ、機能検査を行ない、精巣下降および腔開口についても調べた。

F₂新生仔についても、F₁新生仔と同様な方法により、主要器官の重量測定、骨格検査、行動観察ならびに生殖能力の検索を行なった。

6. データ処理法

外表および骨格異常の出現については、WILCOXONの順位和検定⁴⁾($p < 0.05$)で、その他の反応値は χ^2 検定($p < 0.05$)で処理し、実数値は平均値±標準偏差で表わし、F検定、STUDENTのt検定を用い対照群と比較した。

II. 実験結果

1. 母獣の観察

妊娠期間中の体重推移を示したのがFig. 2で、対照群に比べ増加抑制の傾向がみられたが、用量依存性の関係は認められなかった。

摂餌量および摂水量はFig. 3に示すとおりで、対照

Table 1 Preliminary test of AM-715

Dose (mg/kg)	Control	500	1000
No. of pregnant mouse	6	7	5
No. of implantation	76 12.6±0.8 ¹⁾	96 13.7±1.1	72 14.4±1.5
No. of resorption (%)	1 (1.3)	7 (7.2)	2 (2.7)
No. of dead fetus (%)	0	2 (2.0)	1 (1.3)
No. of surviving fetus	75 12.5±0.8	87 12.4±2.0	69 13.8±2.2
No. of male	33	50	36
No. of female	42	37	33
Sex ratio (M/F)	0.78	1.35	1.09
Fetal body weight (g)			
Male	1.32±0.10	1.25±0.09*	1.28±0.05
Female	1.28±0.11	1.20±0.09*	1.23±0.05
Placental weight (mg)			
Male	86.9±16.1	81.2±13.4	78.0±13.4*
Female	85.7±17.5	76.2±9.2*	75.7±15.2*
No. of gross malformation (%)	0	0	1 (1.4)
Type			
Club foot	0	0	1
No. of skeletal malformation	0	0	0

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control (p<0.05)

群に比べ500 mg/kg 群の摂取量に低下傾向が認められた。

一般症状には AM-715 の中毒様効果はみられず、また各投与群に死亡個体は1例も認められなかった。

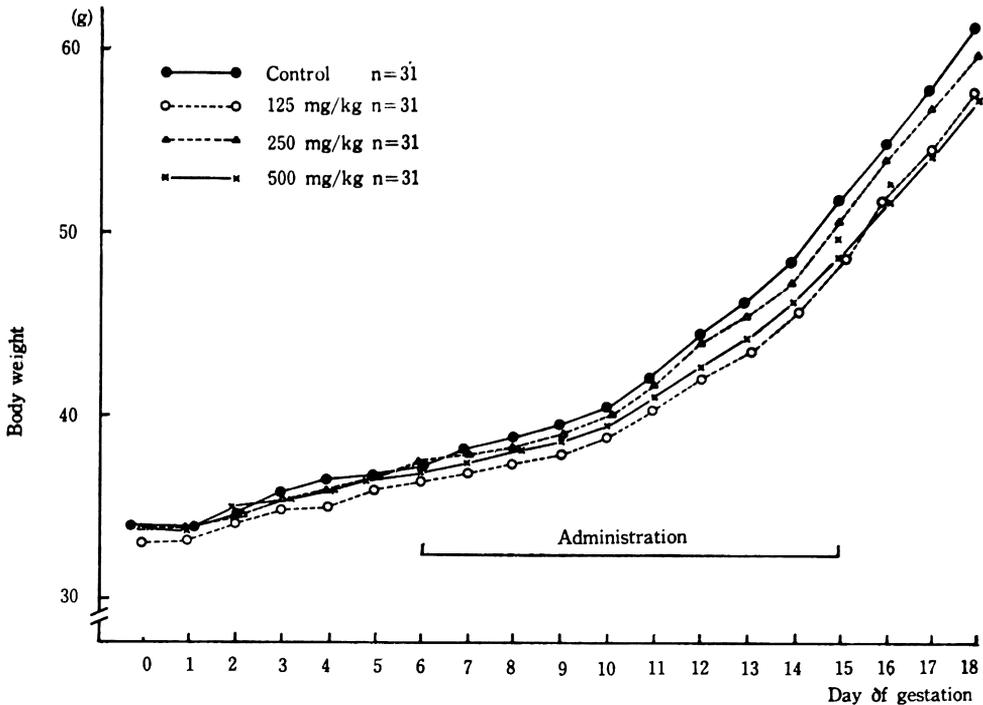
2. 胎仔の観察

胎仔の観察に関する結果をまとめたのが Table 2 である。着床数、死亡胎仔数、吸収胚数、生存胎仔数および性比には、対照群との間に有意な差は認められなかった。AM-715 投与群の雄の胎仔重量、125 mg/kg および 250 mg/kg 群の雄胎仔の胎盤重量が対照群と比較し有意な差を示したが、いずれの重量変動にも、用量依存性の関係は認められなかった。

外表奇形として、対照群に口蓋裂1例、125 mg/kg 群に外脳症と臍ヘルニアの合併仔1例、250 mg/kg 群に曲尾1例、500 mg/kg 群に口蓋裂1例が認められたが、出現頻度には、有意な差は認められなかった。

内臓異常をもった胎仔は、対照群を含め各群に1例も認められなかった。骨格検査の結果は Table 3 に示すとおりで骨格奇形として、対照群に胸椎弓の癒合と肋骨の癒合の合併仔1例、500 mg/kg 群に波状肋骨1例が認められた。また骨格変異として、頸椎弓の分離および分枝、胸骨核の化骨遅延、分離および不相称、副胸骨核、腰肋など散見されたが、対照群との間に有意な差は認められ

Fig. 2 Body weight changes of pregnant mice treated orally with AM-715



なかった。しかし、250 mg/kg 群の14肋骨ならびに500 mg/kg 群の仙尾椎の化骨数については有意な差を認めた。

3. 新生仔の観察

1) F₁ 新生仔

母獣および F₁ 新生仔に関する検査結果を示したのが Table 4 で、妊娠期間、着床痕数、出生率、離乳率などには、対照群との間に有意な差は認められなかった。

外表奇形は対照群に短尾と曲尾の合併仔1例、250 mg/kg 群に曲尾1例が認められた。

生後4週目までの体重推移をみると、対照群に比べ体重増加が劣ることはなく、125および500 mg/kg 群では、逆に対照群より体重増加傾向が認められた。

発育分化および機能検査の結果を Table 5 に示した。耳介開展、切歯萌出および眼瞼開裂の日令には、対照群との間に有意な差はなく、また精巣下降および陰開口においても、対照群との間に有意な差は認められなかった。機能検査では対照群を含め各群に異常が認められた個体は1例もなかった。

4週令仔の主要器官重量を Table 6 に示した。雄では125 mg/kg 群の生殖器官、250および500 mg/kg 群の脾臓に有意な重量増加が、雌では125 mg/kg 群の腎臓に有

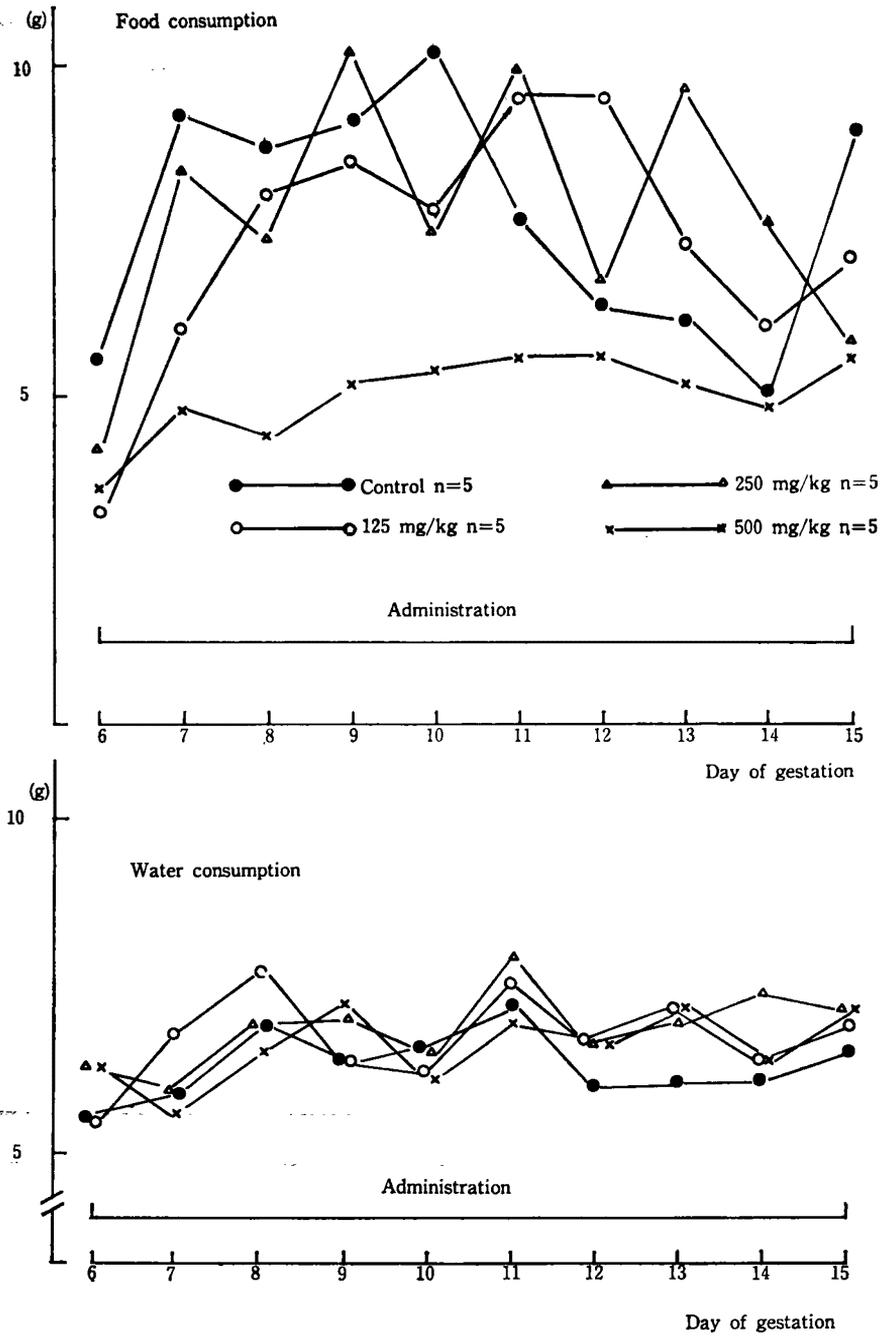
意な重量増加が認められたが、いずれの重量増加にも用量依存性の関係はなかった。

4週令仔の骨格を検索した結果を Table 7 に示した。対照群を含め各群に14肋骨、副胸骨、肋軟骨の癒合がみられたが、対照群との間に有意な差は認められなかった。尾骨数は500 mg/kg 群でのみ対照群との間に有意な差を認めた。

生後5週目から10週目までの体重推移は、Table 8 に示すとおりで、雌の500 mg/kg 群の5週令仔で有意な減少がみられたが、その後の体重増加は、対照群との間に有意な差は認められなかった。雄では500 mg/kg 群で8週令仔を除き有意な体重増加がみられた。しかし、10週令までの体重増加は対照群の11.8 g に対し、500 mg/kg 群では12.6 g と大きな差ではなかった。

行動観察を行なった結果は、Table 9 (Open field) および Table 10 (LASHLEY III type maze) に示すとおりで、Open field および LASHLEY III type maze のいずれの検査においても、対照群との間に著変はみられなかった。Open field で雄の125 mg/kg 群の Rearing, Defecation, Grooming, 雌の250 mg/kg 群の Defecation に有意な差がみられたが、いずれの値にも、用量依存性の関係は認められなかった。

Fig. 3 Food and water consumption changes of pregnant mice treated orally with AM-715



生殖能力に関する検査結果は Table 11 に示した。交配期間、交尾率、妊娠率、黄体数、初期および後期死胚数には、対照群との間に著差は認められなかった。

2) F₂ 新生仔

対照群を含め各群 5 匹ずつの F₁ 母獣を自然に分娩させた結果は Table 12 に示すように、妊娠期間、新生仔

Table 2 Effects of AM-715 on the mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of pregnant mouse	21	21	21	21
No. of implantation	296 14.0±2.4 ¹⁾	277 13.1±1.9	295 14.0±2.2	277 13.1±2.1
No. of resorption (%)	18 (6.0)	13 (4.6)	17 (5.7)	26 (9.3)
No. of dead fetus (%)	10 (3.3)	10 (3.6)	5 (1.6)	8 (2.8)
No. of surviving fetus	268 12.7±2.3	254 12.0±1.6	273 13.0±2.2	243 11.5±1.8
No. of male	134	127	135	124
No. of female	134	127	138	119
Sex ratio (M/F)	1.00	*1.00	0.97	1.04
Fetal body weight (g)				
Male	1.30±0.13	1.26±0.11*	1.26±0.10*	1.26±0.13*
Female	1.24±0.12	1.22±0.11	1.22±0.10	1.22±0.09
Placental weight (mg)				
Male	88.7±14.7	82.4±11.5*	83.1±13.3*	85.5±12.4
Female	81.3±11.4	78.5±12.4	79.1±11.9	79.9±11.8
No. of gross malformation (%)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.4)
Type				
Cleft palate	1	0	0	1
Kinky tail	0	0	1	0
Exencephalia and umbilical hernia	0	1	0	0
No. of visceral malformation	0/81 ²⁾	0/76	0/85	0/58

1): Mean ± SD

2): No. of malformation/No. of examined fetus

* : Significant difference from control (p<0.05)

Table 3 Effects of AM-715 on the skeleton of mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of fetus	187	177	188	185
Cervical vertebra				
Atlas				
Forking	0	1(0.5)	0	0
Axis				
Bifurcation	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)
Forking	5(2.6)	2(1.1)	2(1.0)	6(3.2)
Bifurcation	1(0.5)	1(0.5)	0	0
Cervical rib	19(10.1)	22(12.4)	15(7.9)	15(8.1)
Sternebra				
Asymmetry	4(2.1)	3(1.6)	3(1.5)	6(3.2)
Retarded ossification				
Position I-VI	3(1.6)	1(0.5)	0	2(1.0)
Position V	5(2.6)	2(1.1)	0	7(3.7)
Position VI	1(0.5)	0	0	0
Bifurcation				
Position V	0	2(1.1)	5(2.6)	1(0.5)
Super-sternebra	1(0.5)	5(2.8)	3(1.5)	1(0.5)
Thoracic vertebra				
Adhesion of arch	1(0.5)	0	0	0
Rib				
14 rib	8(4.2)	10(5.6)	19(10.1)*	15(8.1)
Adhesion	1(0.5)	0	0	0
Wavy	0	0	0	1(0.5)
Lumbar vertebra				
Lumbar rib	18(9.6)	20(11.2)	18(9.5)	19(10.2)
Five lumbar vertebra	0	2(1.1)	4(2.1)	0
Sacral and caudal vertebra				
No. of ossification	10.6±1.7 ¹⁾	10.8±1.9	10.5±1.5	10.1±1.6*

1): Mean ± SD

Each value of parentheses was expressed as percentage.

* : Significant difference from control (p<0.05)

Table 4 Effects of AM-715 on delivery and postnatal development of F₁ mice

Dose (mg/kg)		Control	125	250	500	
No. of pregnant mouse		10	10	10	10	
No. of delivery		10	10	10	10	
Gestation period		18.9±0.3 ¹⁾	19.0±0.0	19.1±0.3	19.0±0.0	
No. of implantation site		138 13.8±1.9	128 12.8±1.8	147 14.7±1.2	135 13.5±1.5	
No. of newborn mouse		129 12.9±2.0	118 11.8±1.6	134 13.4±1.8	122 12.2±1.4	
No. of male		63	63	73	75	
No. of female		66	55	61	47	
Sex ratio (M/F)		0.95	1.14	1.19	1.59*	
Body weight changes of newborn mouse (F ₁) (g)	At birth	1.60±0.11	1.65±0.13*	1.60±0.16	1.59±0.12	
	4-day old	2.82±0.43	2.95±0.53	2.69±0.43	2.92±0.28	
	Male	1-week old	3.99±0.48	4.14±0.84	3.99±0.80	4.17±0.50*
		2-week old	6.12±0.82	6.40±1.03	6.21±0.94	6.48±0.83*
		3-week old	10.67±1.82	11.10±1.98	10.58±2.00	11.20±1.63
		4-week old	18.45±2.54	19.41±2.67*	18.49±2.86	19.48±2.25*
	Female	At birth	1.57±0.17	1.62±0.17	1.53±0.14	1.50±0.13*
		4-day old	2.76±0.50	3.01±0.54*	2.60±0.44	2.83±0.37
		1-week old	3.93±0.69	4.23±0.87*	3.92±0.74	4.00±0.53
		2-week old	6.16±1.00	6.53±1.24	6.20±1.07	6.26±0.88
		3-week old	10.64±2.07	11.12±2.43	10.63±2.21	10.53±1.84
		4-week old	17.11±2.69	17.90±2.92	17.08±2.76	16.89±2.23
	No. of gross malformation (%)		1 (0.7)	0	1 (0.7)	0
	Type					
Short tail		1	0	0	0	
Kinky tail		1	0	1	0	
Birth rate (%)		93.4	92.1	91.1	90.3	
Weaning rate (%)	Male	100.0	96.8	98.6	98.6	
	Female	96.9	98.1	98.3	97.8	

1): Mean ± SD

* : Significant difference from control (p<0.05)

Table 5 Effects of AM-715 on growth, sexual function and functional tests of F₁ mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
Opening days of auricles (mean days)	3.7	3.6	3.8	3.7
Odontiasis (mean days)	10.9	10.8	11.1	11.0
Opening days of eyelids (mean days)	14.4	14.0	14.4	14.3
Descent of testes at 4-week old (%)	87.3	90.1	81.9	89.1
Opening of vagina (mean days)	30.6	29.8	29.6	29.8
Functional tests (At 4-week old)				
Abnormality of the behavior	0	0	0	0
Abnormality of the sense equilibrium	0	0	0	0
Abnormality of the HAFNER'S reflex	0	0	0	0
Abnormality of the corneal reflex	0	0	0	0
Abnormality of the pinna reflex	0	0	0	0
Abnormality of the righting reflex	0	0	0	0
Abnormality of the PREYER'S reflex	0	0	0	0

Table 6 Effects of AM-715 on organ weights of F₁ mice at 4-week old

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	21	20	22	20
Body weight (g)	18.4± 2.7 ¹⁾	19.6± 3.0	18.7± 3.4	19.4± 2.2
Brain	46.9± 3.5	46.9± 2.4	47.6± 2.6	46.0± 2.7
Thymus	9.5± 1.9	9.3± 1.1	9.6± 1.6	9.2± 1.4
Heart	8.8± 1.5	9.7± 1.3	9.3± 1.2	9.4± 1.0
Lung	17.1± 4.7	16.6± 2.7	16.7± 2.4	15.1± 2.1
Liver	128.8±22.3	137.3±25.1	133.4±29.2	131.9±21.7
Pancreas	13.0± 4.1	12.3± 2.7	11.5± 3.2	12.7± 3.0
Spleen	12.5± 2.2	13.0± 1.2	14.0± 2.5*	14.1± 1.7*
Kidney	31.1± 5.7	31.9± 5.9	31.0± 6.2	30.9± 5.6
Testis and epididymis	12.6± 3.8	15.2± 3.2*	14.0± 2.1	14.3± 1.5
No. of female	22	19	22	21
Body weight (g)	16.9± 2.7	18.0± 2.9	17.3± 2.3	17.3± 2.1
Brain	45.9± 3.7	45.2± 3.1	46.5± 2.3	45.8± 3.0
Thymus	9.4± 1.9	9.4± 1.9	9.7± 1.6	10.1± 1.5
Heart	8.7± 1.5	8.9± 0.9	9.0± 1.2	8.5± 1.3
Lung	15.0± 2.1	14.8± 2.0	14.0± 2.1	14.1± 1.5
Liver	111.3±19.0	109.4±19.6	108.3±20.3	106.3±13.4
Pancreas	12.8± 3.5	14.3± 4.1	13.5± 4.0	11.6± 3.2
Spleen	13.7± 5.6	12.4± 1.6	11.7± 1.8	12.6± 2.6
Kidney	23.8± 5.0	27.2± 3.5*	25.3± 3.9	25.1± 3.5
Uterus and ovary	8.1± 4.8	8.3± 4.1	7.6± 2.9	9.2± 5.1

1): Mean ± SD

Organ weights were expressed as × 10 mg unit

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 7 Effects of AM-715 on skeleton of F₁ mice at 4-week old

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of mouse	44	39	46	41
Thoracic vertebra				
Retarded ossification	1(2.2)	0	0	0
Sternum				
Bifurcation	0	0	1(2.1)	0
Super-sternum	0	0	4(8.6)	1(2.4)
Rib				
14 rib	6(13.6)	4(10.2)	5(10.8)	4(9.7)
Adhesion of costal cartilage	1(2.2)	1(2.5)	0	0
No. of caudal vertebra	29.6±0.8 ¹⁾	29.8±0.9	29.7±0.8	30.0±0.7*

1): Mean ± SD

Each value of parentheses was expressed as percentage

* : Significant difference from control (p<0.05)

数、性比、着床痕数、出生率、離乳率などには、対照群との間に有意な差はなく、また生後4週目までの体重増加が対照群より劣ることもなかった。125および250 mg/kg 群ではむしろ対照群より体重は増加した。外表奇形は対照群を含め各群に1例も認められなかった。

発育分化および機能検査の結果を Table 13 に示したが、耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂の日令には対照群との間に有意な差は認められず、各機能検査でも、対照群を含め各群に異常が認められた個体は1例もなかった。また精巣下降率および膈開口日数においても、対照群との間に著差は認められなかった。

主要器官重量は Table 14 に示したように雄の125 mg/kg 群で体重、肺および脾臓を除いた他の器官が、250 mg/kg 群の脳、肝臓、脾臓が対照群との間に有意な重量増加を見た。

雌では、125 mg/kg 群が体重、脳、心臓、肝臓および腎臓に有意な増加が認められた。これら臓器の有意な重量の増加は、体重に依存していた。

骨格検査の結果は Table 15 に示した。対照群を含め各群に14肋骨、副胸骨、肋軟骨の癒合などが認められたが、対照群との間に有意な差はみられなかった。尾椎数は500 mg/kg 群でのみ対照群との間に有意な差を認めた。生後5週目から10週目の体重増加は Table 16 に示した

ように、125 および 250 mg/kg 投与群に有意な体重増加を認めた。

行動観察を行なった結果は、Table 17 (Open field) および Table 18 (LASHLEY III type maze) に示した。Open field で雄の250 mg/kg 群で ambulation に、雌の125 mg/kg 群で defecation に有意な差がみられたが、いずれの場合にも用量依存性の関係は認められなかった。LASHLEY III type maze では250 mg/kg 群の4日目の測定値に有意な時間短縮がみられたが、用量依存性の関係は認められなかった。

生殖能力に関する検査結果は Table 19 に示した。交配期間、交尾率、妊娠率、黄体数、着床数、初期および後期死胚数には、対照群との間に有意な差は認められなかった。

III. 考察および結語

AM-715 の125, 250 および 500 mg/kg を ICR 系マウスの器官形成期6~15日に経口投与し、胎仔に対する催奇形性の有無を調べるとともに、新生仔(F₁, F₂)の機能、行動および生殖能力への影響について検索を行なった。

125 および 500 mg/kg 群においては母獣の体重上昇が対照群より劣り、500 mg/kg 群には摂餌量が減少する傾

Table 8 Effects of AM-715 on body weight changes of F₁ mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	20	19	22	19
5-week old	27.1±1.6 ¹⁾	27.5±1.9	27.8±2.0	28.5±1.9*
6-week old	30.9±1.9	31.6±1.5	31.5±2.2	32.4±2.3*
7-week old	33.8±1.8	35.3±2.0*	34.7±1.9	35.5±2.5*
8-week old	36.1±2.5	37.1±2.1	36.6±1.9	37.3±2.3
9-week old	37.7±2.6	38.5±2.1	38.1±1.9	39.5±2.4*
10-week old	38.9±2.8	40.4±2.5	39.3±1.9	41.1±3.0*
No. of female	20	18	20	19
5-week old	23.4±1.9	23.2±2.0	22.2±2.2	21.8±2.2*
6-week old	25.2±2.2	25.5±2.0	24.6±1.9	23.9±2.0
7-week old	27.2±2.2	27.9±2.4	26.9±1.8	26.3±2.1
8-week old	29.3±2.8	30.5±2.6	28.8±2.3	28.0±2.5
9-week old	30.7±2.6	32.0±2.7	29.8±2.3	29.6±2.8
10-week old	32.4±2.9	33.9±3.9	31.4±2.1	32.0±3.5

1): Mean ± SD

Body weights were expressed as gram unit

*: Significant difference from control (p<0.05)

向にあったが、これらの結果が胎仔および新生仔に影響をおよぼすようなことはなかった。

雄の生存胎仔重量および胎盤重量に有意な減少が時に見られたが、それらの減少には用量依存性はなく、また、いずれの値も当研究所で行なった正常な妊娠マウス(188母鼠, 胎仔数2,108)で認められる変動値(雄胎仔重量: 1.28±0.13 g, 雄胎仔の胎盤重量: 90.6±18.2 mg)の範囲内にあることから、AM-715の影響とは考えられなかった。着床数, 吸収胚数, 死亡胎仔数, 生存胎仔数, 性比の検索では異常と考えられる変動は認められなかった。

外表奇形としては、対照群に口蓋裂(1例), 125 mg/kg群に外脳症と膈ヘルニアの合併(1例), 250 mg/kg群に曲尾(1例), 500 mg/kg群に口蓋裂(1例)が認められたが、通常健康な妊娠マウスでも自然発生的に出現する奇形の種類であること、およびそれらの出現頻度1.94%

からみて、いずれの奇形も自然発生によるものと判断し得た。

内臓奇形をもった胎仔は、対照群を含め1例の出現もなく、骨格検索の結果も合せ、AM-715は、胎仔の内臓、骨格の形成過程で好ましくからぬ作用をもたないことが示唆された。

F₁新生仔で、対照群に短尾と曲尾の合併(1例), 250 mg/kg群に曲尾(1例)の奇形仔が認められたが、F₂新生仔には、対照群を含め1例の奇形仔も出現しなかった。

新生仔の器官重量, 骨格, 発育分化および機能につき調べたが、F₁, F₂新生仔のいずれの場合にも、AM-715の影響と考えられる好ましくからぬ結果は得られなかった。行動観察については、Open fieldとLASHLEY III type mazeの試験法を採用し、F₁, F₂新生仔につき検索を行なったが、行動および学習能力に異常が認められた個体

Table 9 Effects of AM-715 on open field behavior in F₁ mice

Sex	Dose (mg/kg)	No. of mouse	Ambulation	Rearing	Defecation	Urination	Grooming
Male	Control	20	101.2±35.5 ¹⁾	34.9±16.5	1.2±1.8	0.15±0.36	1.0±0.9
	125	19	87.0±33.3	24.0±14.0*	2.7±2.0*	0.15±0.37	1.7±1.0*
	250	22	99.2±50.1	28.1±16.0	1.6±1.9	0	1.0±1.1
	500	19	100.5±34.0	29.1±16.2	2.1±2.2	0.05±0.22	1.6±1.3
Female	Control	20	101.3±41.7	28.6±14.8	3.4±2.5	0.05±0.22	1.2±1.3
	125	18	89.8±45.5	19.8±13.8	3.2±2.0	0.05±0.23	1.5±1.5
	250	20	119.8±54.2	27.1±14.1	1.8±1.3*	0	1.2±1.2
	500	19	85.9±26.7	22.0±10.3	2.9±2.3	0.10±0.31	1.1±0.6

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 10 Effects of AM-715 on learning behavior by LASHLEY III type maze in F₁ mice

Dose (mg/kg)	No. of mouse	1st day (sec)	2nd day (sec)	3rd day (sec)	4th day (sec)	5th day (sec)
Control	10	49.3±26.8 ¹⁾	34.2±18.5	22.8± 6.7	19.1±10.9	12.0±5.3
125	10	54.6±39.7	46.3±34.8	25.5±18.8	16.4± 5.4	13.0±4.8
250	10	53.4± 9.2	53.6±32.1	23.0±11.7	21.8±10.5	11.7±3.8
500	10	85.0±54.4	48.1±33.2	28.9±14.6	18.2±11.4	10.8±2.7

1): Mean ± SD

Table 11 Effects of AM-715 on reproductive performance of F₁ mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	20	18	20	19
No. of female	20	18	20	19
Mating period (days)	2.7±1.2 ¹⁾	3.1±1.6	2.5±1.1	2.6±1.1
No. of copulation (%)	20 (100.0)	18 (100.0)	20 (100.0)	19 (100.0)
No. of pregnancy (%)	20 (100.0)	17 (94.4)	19 (95.0)	19 (100.0)
No. of pregnancy	15	12	14	14
No. of corpus luteum	221 14.7±2.5	174 14.5±1.5	196 14.0±1.8	190 13.5±2.2
No. of implantation	184 12.2±2.7	147 12.2±3.4	177 12.6±3.2	174 12.4±2.5
No. of early death (%)	10 (5.4)	9 (6.1)	17 (9.6)	8 (4.5)
No. of late death (%)	0	0	1 (0.5)	0

1): Mean ± SD

は、対照群を含め1例も認められなかった。また、生殖能力への影響について検索したが、F₁, F₂ 新生仔ともに、交配期間、交尾率、妊娠率、黄体数、死胚数、着床数への AM-715 の好ましくからぬ作用は認められなかった。

以上のことから、AM-715 は胎仔に奇形を誘発するような作用を有さず、また、次世代の発育分化、機能、行動および生殖能力に悪影響をおよぼすような作用をもたない化合物であることが示唆された。

文 献

- 1) WILSON, J. G.: Method for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *In* Teratology, Principles and Techniques. J. G. WILSON & J. WARKANY, Eds., The University of Chicago Press, pp. 262~277, 1965
- 2) BARROW, M. V. & W. J. TAYLOR: A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morphol.* 127: 291~306, 1969
- 3) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarine red S. *Stain. Technol.* 1: 123~124, 1926
- 4) WILCOXON, F. & R. WILCOX (佐久間 昭訳): 簡便統計法, 2種類の処理間の差の有意性, 5~7頁, 日本レダリー, 1975

Table 12 Effects of AM-715 on delivery and postnatal development of F₂ mice

Dose (mg/kg)		Control	125	250	500
No. of pregnant mouse		5	5	5	5
No. of delivery		5	5	5	5
Gestation period		19.0±0.0 ¹⁾	19.0±0.0	19.0±0.0	19.0±0.0
No. of implantation site		72	65	67	74
		14.4±1.5	13.0±2.1	13.4±2.6	14.8±2.3
No. of newborn mouse		69	62	57	65
		13.8±1.3	12.4±1.5	11.4±2.3	1.30±2.3
No. of male		30	34	29	28
No. of female		39	28	28	37
Sex ratio (M/F)		0.76	1.21	1.03	0.75
	At birth	1.63±0.14	1.69±0.11	1.66±0.12	1.60±0.15
	4-day old	2.80±0.24	3.15±0.30*	3.06±0.23*	2.89±0.31
	1-week old	3.94±0.46	4.65±0.48*	4.54±0.42*	4.09±0.43
	2-week old	6.11±0.62	7.22±0.69*	7.21±0.82*	6.39±0.63
	3-week old	10.21±1.28	12.36±1.58*	12.05±1.64*	10.82±1.44
	4-week old	18.79±2.07	22.31±1.88*	20.67±2.32*	20.14±3.67
Body weight changes of newborn mouse (F ₂) (g)	At birth	1.54±0.17	1.56±0.14	1.57±0.14	1.50±0.16
	4-day old	2.75±0.31	2.98±0.31*	2.97±0.30*	2.73±0.39
	1-week old	3.80±0.47	4.25±0.69*	4.35±0.50*	3.83±0.66
	2-week old	5.88±0.98	6.81±1.06*	7.24±0.91*	5.94±1.07
	3-week old	10.14±1.59	11.63±2.17*	12.09±1.45*	9.72±2.55
	4-week old	17.37±1.73	18.97±2.89*	19.10±2.17*	16.78±4.24
No. of gross malformation (%)		0	0	0	0
Birth rate (%)		95.8	95.3	85.0	87.8
Weaning rate (%)	Male	100.0	100.0	93.1	100.0
	Female	97.4	96.4	96.4	100.0

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 13 Effects of AM-715 on growth, sexual function and functional tests of F₂ mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	.500
Opening days of auricles (mean days)	3.6	3.4	3.6	3.8
Odontiasis (mean days)	10.7	10.7	10.8	10.9
Opening days of eyelids (mean days)	14.3	13.8	13.9	14.0
Descent of testes at 4-week old (%)	100.0	100.0	100.0	96.4
Opening of vagina (mean days)	31.3	31.6	30.3	32.5
Functional tests (At 4-week old)				
Abnormality of the behavior	0	0	0	0
Abnormality of the sense equilibrium	0	0	0	0
Abnormality of the HAFFNER'S reflex	0	0	0	0
Abnormality of the corneal reflex	0	0	0	0
Abnormality of the pinna reflex	0	0	0	0
Abnormality of the righting reflex	0	0	0	0
Abnormality of the PREYER'S reflex	0	0	0	0

Table 14 Effects of AM-715 on organ weights of F₂ mice at 4-week old

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	11	11	10	12
Body weight (g)	18.3± 1.6 ¹⁾	21.8± 2.5*	20.1± 2.3	20.2± 3.3
Brain	45.1± 1.7	48.7± 3.8*	48.2± 2.6*	47.5± 3.7
Thymus	9.0± 1.2	10.0± 0.8*	8.7± 1.1	9.3± 2.4
Heart	9.5± 1.4	11.1± 1.2*	10.2± 1.3	9.9± 2.0
Lung	15.8± 3.0	18.7± 4.9	16.9± 3.6	15.7± 4.1
Liver	121.9±12.1	154.9±17.9*	136.0±17.7*	135.0±36.9
Pancreas	15.8± 2.5	17.3± 4.5	16.7± 2.9	14.0± 4.3
Spleen	12.2± 1.2	14.6± 1.5*	14.8± 2.0*	12.9± 2.8
Kidney	28.8± 3.8	36.9± 4.9*	31.6± 5.3	30.8± 8.3
Testis and epididymis	13.1± 1.6	16.8± 2.4*	14.6± 2.3	14.5± 3.2
No. of female	11	10	9	11
Body weight (g)	18.2± 1.4	20.0± 2.3*	18.2± 2.6	17.8± 3.3
Brain	45.6± 2.8	48.0± 2.2*	47.5± 2.6	46.8± 4.6
Thymus	9.8± 1.3	10.8± 0.9	9.6± 1.0	9.8± 1.4
Heart	9.3± 0.8	10.6± 1.1*	9.8± 1.1	9.2± 1.8
Lung	14.6± 2.3	15.7± 1.4	14.3± 1.3	13.9± 2.4
Liver	115.2±13.1	128.2± 7.7*	113.6±20.6	108.2±27.6
Pancreas	16.0± 1.6	18.4± 5.5	18.4± 4.2	14.4± 3.7
Spleen	12.2± 1.6	13.5± 1.5	13.3± 2.8	11.8± 2.6
Kidney	26.0± 2.8	30.4± 3.7*	26.4± 4.3	26.4± 6.3
Uterus and ovary	8.4± 4.8	11.1± 5.1	7.7± 3.7	9.9± 5.8

1): Mean ± SD

Organ weights were expressed as × 10 mg unit

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 15 Effects of AM-715 on skeleton of F₂ mice at 4-week old

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of mouse	25	21	17	19
Thoracic vertebra				
Retarded ossification	0	0	2(11.7)	0
Sternum				
Bifurcation	0	1(4.7)	0	0
Super-sternum	1(4.0)	1(4.7)	0	0
Rib				
14 rib	1(4.0)	2(9.5)	3(17.6)	0
Costal cartilage				
Adhesion	0	1(4.7)	0	0
Asymmetry	0	0	0	1(5.2)
No. of caudal vertebra	29.8±0.9 ¹⁾	29.9±0.7	30.0±0.7	29.2±0.7*

1): Mean ± SD

Each value of parentheses was expressed as percentage

* : Significant difference from control (p<0.05)

Table 16 Effects of AM-715 on body weight changes of F₂ mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	10	10	9	11
5-week old	27.1±1.1 ¹⁾	28.8±2.2	28.8±1.2*	27.5±1.3
6-week old	31.0±1.3	33.7±3.3*	32.8±1.4*	31.4±2.2
7-week old	34.1±1.1	37.3±3.5*	35.4±1.3*	34.3±2.4
8-week old	34.8±1.3	38.8±3.4*	36.7±1.0*	35.1±2.3
9-week old	36.1±1.5	40.6±5.1*	37.6±2.0	36.0±2.5
10-week old	37.7±1.4	43.4±5.2*	40.1±1.9*	38.3±2.0
No. of female	11	9	9	12
5-week old	22.0±1.4	22.6±1.8	24.7±1.3*	21.9±2.1
6-week old	24.9±1.5	26.0±2.1	26.7±1.6*	25.0±2.1
7-week old	27.1±1.3	28.4±2.0	29.1±1.8*	27.5±2.5
8-week old	28.2±2.0	28.8±1.9	30.6±1.7*	27.8±3.3
9-week old	28.3±2.3	30.6±1.5*	30.3±2.3	28.4±3.8
10-week old	29.9±2.3	32.0±1.8*	32.8±2.0*	29.5±3.6

1): Mean ± SD

Body weights were expressed as gram unit

* : Significant difference from control (p<0.05)

Table 17 Effects of AM-715 on Open field behavior in F₂ mice

Sex	Dose (mg/kg)	No. of mouse	Ambulation	Rearing	Defecation	Urination	Grooming
Male	Control	10	95.5±25.9 ¹⁾	26.5±12.3	2.5±1.8	0.10±0.31	1.8±1.3
	125	10	99.0±58.3	23.2±16.9	1.9±1.9	0	1.5±1.7
	250	9	141.6±49.3*	36.5±18.4	2.8±2.0	0.11±0.33	0.8±1.0
	500	11	123.4±44.0	31.2±23.7	1.5±1.9	0	1.1±1.0
Female	Control	11	102.5±51.3	25.1±18.3	2.7±1.7	0	0.9±0.8
	125	9	75.8±43.3	22.2±18.8	4.4±1.6*	0.22±0.44	1.3±1.0
	250	9	132.8±27.2	29.7±11.2	2.3±1.5	0	0.6±0.7
	500	12	123.0±35.5	26.2± 9.5	2.8±1.7	0.08±0.28	1.6±1.3

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 18 Effects of AM-715 on learning behavior by LASHLEY III type maze in F₂ mice

Dose (mg/kg)	No. of mouse	1st day (sec)	2nd day (sec)	3rd day (sec)	4th day (sec)	5th day (sec)
Control	10	88.6±58.9 ¹⁾	70.1±73.6	28.8±16.1	26.5±14.4	17.1±10.8
125	10	95.0±49.6	68.5±69.4	45.7±45.7	31.6±16.5	17.6±12.1
250	9	69.1±34.7	65.6±53.8	34.3±23.4	15.3± 4.4*	15.6± 3.7
500	10	83.7±50.8	33.6±12.2	46.0±36.1	22.4± 7.8	14.5± 5.5

1): Mean ± SD

*: Significant difference from control (p<0.05)

Table 19 Effects of AM-715 on reproductive performance of F₁ mice

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of male	10	9	9	12
No. of female	11	9	9	12
Mating period (days)	3.1±0.3 ¹⁾	2.8±0.7	2.8±0.9	3.0±0.7
No. of copulation (%)	11 (100.0)	9 (100.0)	9 (100.0)	12 (100.0)
No. of pregnancy (%)	10 (90.9)	9 (100.0)	9 (100.0)	11 (91.6)
No. of corpus luteum	134 13.4±2.2	128 14.2±1.3	129 14.3±1.9	167 15.1±2.6
No. of implantation	129 12.9±1.7	117 13.0±2.4	120 13.3±2.3	155 14.0±2.6
No. of early death (%)	6 (4.6)	6 (5.1)	3 (2.5)	11 (7.0)
No. of late death (%)	0	2 (1.7)	2 (1.6)	5 (3.2)

1): Mean ± SD

REPRODUCTION STUDIES OF AM-715 IN MICE II. TERATOLOGICAL STUDY

TSUTOMU IRIKURA, HIROSHI SUZUKI and TSUTOMU SUGIMOTO
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Teratological study of AM-715, a new synthetic antibacterial agent, was carried out in mice.

AM-715 was orally administered at daily doses of 125, 250 and 500 mg/kg for 10 days from the day 6 to day 15 of pregnancy. The effects of AM-715 on dams, fetal teratogenicity and development, and also on the postnatal development of newborn mice (F₁ and F₂) were studied.

No untoward effects on dams were found in all the dose groups during the period of administration. No lethal effects of AM-715 on fetuses were observed in all the dose groups. Some of external and skeletal abnormalities were observed in the control group and the dose groups, but neither statistical difference as compared with the control group nor dose-dependent relationship was found in these findings.

In the newborn mice of F₁ and F₂ generations, no abnormalities were observed in functional tests and behavior observation, and no untoward effects on reproductive performance were found.

It is concluded from the present study that AM-715 has no teratogenic effects in mice.