

## AT-2266 の生殖試験 (第 1 報)

## ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験

寺田芳規・西村耕一・小紫正一・吉岡真智子・吉田耕一  
大日本製薬株式会社総合研究所

新規合成抗菌薬 AT-2266 の妊娠前および妊娠初期投与試験を Jcl : SD 系ラットを用いて行い、親動物の生殖能力および胎仔に及ぼす影響について検討した。AT-2266 の 100, 300, 1,000 mg/kg を、雄には 6 週齢から交配までの 63 日間を含め 112~113 日間、雌には 11 週齢から交配までの 14 日間を含め妊娠 7 日まで強制経口投与した。

投薬期間中に実施した交配試験において、1,000 mg/kg 群雄動物の生殖能力に異常が認められ、これらの動物と交尾した雌に不妊または着床率の低下が生じた。半数の雄を直ちに剖検し、生殖器の組織学的検査を行ったところ、精巣上体に変性した精細胞の混入が認められ、精子形成障害が推測された。残りの半数の雄には 63 日以上休薬期間を与えて再交配を行ったところ、1,000 mg/kg 群の雄動物の生殖能力は回復し、精巣上体の組織像も正常となった。すなわち、AT-2266 の 1,000 mg/kg は雄ラットの生殖能力に異常をきたしたが、これは可逆性の変化であった。一方、雌ラットおよび胎仔に対しては、1,000 mg/kg でも特に問題となる変化はなかった。以上の結果から、本試験における最大無作用量は 300 mg/kg と考える。

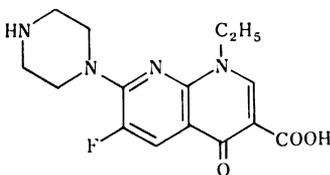
AT-2266 は大日本製薬株式会社で開発された新しい抗菌薬で、グラム陽性菌、緑膿菌、セラチアを含むグラム陰性菌、ブドウ糖非発酵菌、マイコプラズマ等に抗菌作用を示す。今回、AT-2266 をラットの妊娠前および妊娠初期に経口投与して、親動物の生殖能力および胎仔に及ぼす影響を検討したのでその結果を報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 被験物質

本試験には、AT-2266 の無水物 [1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid] を用いた。AT-2266 の無水物は微黄色の粉末で、氷酢酸に溶けやすく、クロロホルムに溶けにくく、水、エタノール、アセトン、エーテルにほとんど溶けず、熱、酸に安定であるが、光にはやや不安定である。

AT-2266 (anhydrous)



## 2. 使用動物および飼育条件

Jcl : SD 系の雌雄ラットを日本クレア株式会社より 4 週齢で購入し、予備飼育の後、雄は 6 週齢 (体重 145~

173 g) で、雌は 11 週齢 (体重 193~274 g) で試験に使用した。雄は精巣の大きさが正常なものを、雌は性周期の正常なものを用いた。動物の飼育は温度  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、1 日 12 時間照明 (午前 6 時~午後 6 時) の空調動物室で行った。金属製ケージで個別に飼育し、滅菌した飼料 (日本クレア製固型飼料 CA-1) および水を自由に摂取させた。

## 3. 投与量および投与方法

投与量の設定は、ラットにおける垂急性ならびに慢性毒性試験<sup>1)</sup>、および先行した器官形成期投与試験<sup>2)</sup>の結果を参考にした。高用量には、動物に体重増加抑制、軟便が発現すると思われる 1,000 mg/kg を用い、以下、公比を約 1/3 とし、中用量に 300 mg/kg、低用量に 100 mg/kg を用いた。

AT-2266 の臨床適用経路としては経口投与が予定されていることから、本試験では胃ゾンデを用いて強制経口投与を行った。AT-2266 を 0.2% sodium carboxymethylcellulose (CMC) 水溶液に懸濁し、いずれの用量も 1 回の投与液量が体重 100 g あたり 1 ml となるようにした。雄は 6 週齢において投薬を開始し、交配までの 63 日間を含めて 112~113 日間連続投与した。雌は 11 週齢で投薬を開始し、交配までの 14 日間を含めて、妊娠 7 日まで投与を続けた。投薬は 1 日 1 回とし、各投与日の動物の体重を基準とした。対照群の動物には、0.2% CMC を体重 100 g あたり 1 ml の割合で投与した。

#### 4. 検査方法

1群あたり雄25匹、雌25匹とし、一般状態および生死を毎日観察した。死亡動物は、発見後、直ちに剖検して死因の解明に努めた。体重、飼料摂取量は、雌雄とも投与14日までは毎日、それ以後は、雄では週に1回、雌では妊娠0日から8日までの毎日と妊娠14日、21日に測定した。また、雌ラットの性周期に対する影響を調べるため投与開始から交尾成立まで毎日、陰垢像を検査した。

雄が投与63日、雌が投与14日に達した時、各群の雌雄を1対1で10日間を限度に交配させた。交尾は陰栓の形成あるいは陰垢中の精子の存在により確認し、その日を妊娠0日とした。初回の交配において、交尾した1,000 mg/kg 群の雌で着床率の低下が認められた。そこで、投薬群の雄全例を無処置雌と1対1で再び交配させた。対照群については、初回の交配で妊娠の成立がなかった動物のみ再交配を行った。この2回の交配でなお妊娠の成立がなかった場合、もう一度同様な交配を実施した。雌動物については、初回の交配で妊娠の成立がなかった場合、同一群内の妊孕能の確認された雄と再交配させた。この追加交配は2回を限度とした。

前述した通り、交配試験の結果から、1,000 mg/kg 群で雌動物の生殖能力に異常があることが明らかとなった。そこで、各群半数の雄動物は生殖器の観察を行うため直ちに剖検した。残りの半数は63日間の休薬期間を与えた後、再び交配試験を行い生殖能力の回復性を調べた。直後剖検動物は22週齢（投与112～113日）で、回復性試験に用いた動物は37週齢（休薬108日）でそれぞれ剖検した。剖検に際しては、病理肉眼所見を記録するとともに臓器重量を測定した。精巣および精巣上体はホルマリン固定の後、HE染色による組織標本を作製し、光学顕微鏡下で観察した。

妊娠した雌動物は妊娠21日に殺して帝王切開を行った。遺残胎盤、吸収胎、死亡胎仔、生存胎仔の数、およびそれらの子宮内分布と黄体数を記録した。生存胎仔は、体重、性別、外表異常の有無を調べた後、各腹半数の胎仔を10%ホルマリンに、残りの半数は95%アルコールに固定した。対照群の平均胎仔体重の70%に満たない胎仔を未熟仔とした。投薬した雌動物は、引き続き病理肉眼解剖を行い、臓器重量を測定した。

ホルマリンに固定した胎仔はブアン液で再固定し、顕微解剖法<sup>3)</sup>により頭、胸、腹部の内臓を検査した。アルコール固定の胎仔はDawson法<sup>4)</sup>により骨格標本作製し、骨格検査を行った。なお、胎仔の内臓検査、骨格検査は投薬した雌（対照群を含む）から取り出した胎仔についてのみ実施した。

#### 5. 推計学的処理

平均値の差の検定にはStudentのt検定、百分率の差の検定には $\chi^2$ 検定またはFisherの直接確率計算法を用いた。ただし胎仔に関する項目については、各腹で平均値または百分率を求め、それぞれStudentのt検定、Mann-WhitneyのU検定を行った。

### II. 実験結果

#### 1. 雄ラットに及ぼす影響

##### 1) 死亡動物

誤嚥により100, 1,000 mg/kg 群で各1例が死亡（投与83日と投与29日）したのみで、薬物の中毒による死亡例はなかった。

##### 2) 一般症状

軟便が1,000 mg/kg 群で全例に、投与4日より投薬を中止するまで毎日認められた。軟便は本薬に限らず、他の抗菌製剤でも一般的に認められる症状である。なお、1,000 mg/kg 群では流涎を呈する動物が、投与25日より投薬終了まで認められた。しかし、流涎は胃ソングで口腔を刺激しただけでも生じたことから、本薬の薬理作用によるものではないと考える。1,000 mg/kg の薬液は粘性が高く、他群より投薬に時間を要した。その分、投薬による刺激が強くなり、流涎という条件反射が形成されたものとする。

##### 3) 体重 (Fig. 1)

1,000 mg/kg 群で投与35日頃より体重増加抑制が認められた。投薬中止後の同群の体重増加量は対照群とはほぼ等しかったため、投薬期間中に生じた体重差は回復しなかった。

##### 4) 飼料摂取量 (Fig. 2)

いずれの投薬群も、投与1～2日に一過性の飼料摂取量の減少が認められたのみで、特に問題はなかった。

##### 5) 生殖能力 (Table 1)

#### 投与期間中の成績

1,000 mg/kg 群では、交尾能に異常がなかったにもかかわらず、交尾した雌に着床率の低下が認められた。同群の着床率は、第1回目の投与雌との交配で51.2%と、対照群の96.6%に比べて著しく低値であった。そこで、着床率低下の原因が雄側にあるのかどうかについて調べるため、第2回目の交配では、投与群の雄に無処置雌を交配した。その結果、1,000 mg/kg 群の雄と交尾した雌では40.0%の低い着床率であった。この2回の交配でも妊孕能が見られなかった同群の5例の雄に、無処置雌を用いて第3回目の交配を行ったところ、すべて不妊であった。以上、1,000 mg/kg 群の着床率の低下は、無処置雌との交配の結果が示すように、雄の生殖能力の異常に

Fig. 1 Body weights of male rats

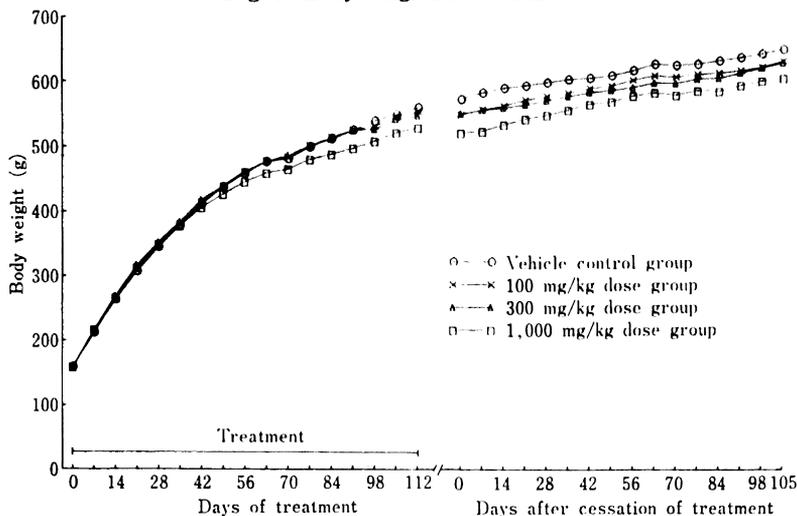
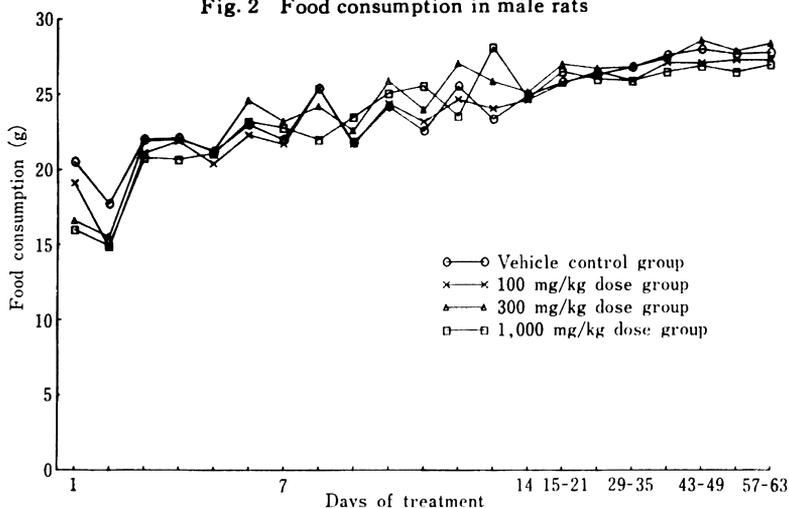


Fig. 2 Food consumption in male rats



よるものであることが明らかとなった。

100, 300 mg/kg 群の着床率は、第1回目の交配ではそれぞれ85.7%, 88.6%, 第2回目ではそれぞれ86.2%, 86.0%で、対照群よりやや低値を示した。しかし、最高3回までの交配ですべての動物に妊孕能が認められ、100, 300 mg/kg 群の雄ラットの生殖能力に投薬の影響はないと考える。100, 300 mg/kg 群でも着床率の低下した動物(着床率70%未満)が2~4例認められたが、この程度の低下は、雄ラットの生殖能力を検討した試験<sup>5)</sup>の対照群においてもしばしば認められており、自然発生

的なものと考ええる。

#### 休薬後の成績

63日以上休薬により、1,000 mg/kg 群の雄動物の生殖能力は回復した。休薬後の第1回目の交配において、交尾確認雌の着床率は、対照群94.5%, 100 mg/kg 群95.7%, 300 mg/kg 群96.7%, 1,000 mg/kg 群93.5%で、各群ともほぼ等しい値であった。なお1,000 mg/kg 群で1例が不妊雄動物と判定された。しかしながら、後述のように、本例は自然発生的な精巣の萎縮によるもので、投薬との関連はないと考える。

Table 1 Mating and fertility data of male rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
<b>During treatment</b>				
No. of males examined	25	25	25	24
<b>1st mating with treated females</b>				
No. of males				
Paired	23 <sup>a</sup>	25	25	24
Copulating (%)	22(95.7)	25(100)	24(96.0)	23(95.8)
Impregnating (%)	22(100)	24(96.0)	24(100)	16(69.6)**
Average implantation rate <sup>b</sup> (%)	96.6	85.7*	88.6*	51.2**
<b>2nd mating with untreated females</b>				
No. of males				
Paired	3	24	25	24
Copulating (%)	2(66.7)	24(100) <sup>c</sup>	24(96.0) <sup>c</sup>	24(100) <sup>c</sup>
Impregnating (%)	2(100)	22(91.7) <sup>c</sup>	22(91.7) <sup>c</sup>	14(58.3)** <sup>c</sup>
Average implantation rate <sup>b</sup> (%)	93.3	86.2 <sup>c</sup>	86.0 <sup>c</sup>	40.0** <sup>c</sup>
<b>3rd mating with untreated females</b>				
No. of males				
Paired	1	1	0	5
Copulating (%)	1(100)	1(100) <sup>d</sup>	—	5(100) <sup>d</sup>
Impregnating (%)	1(100)	1(100) <sup>d</sup>	—	0 <sup>d</sup>
Average implantation rate <sup>b</sup> (%)	93.3	100 <sup>d</sup>	—	0 <sup>d</sup>
<b>After 63-day cessation of treatment</b>				
No. of males examined	13	12	13	12
<b>1st mating with untreated females</b>				
No. of males				
Paired	13	12	13	12
Copulating (%)	13(100)	11(91.7)	13(100)	11(91.7)
Impregnating (%)	13(100)	11(100)	13(100)	11(100)
Average implantation rate <sup>b</sup> (%)	94.5	95.7	96.7	93.5
<b>2nd mating with untreated females</b>				
No. of males				
Paired	0	1	0	1
Copulating (%)	—	0 <sup>d</sup>	—	1(100) <sup>d</sup>
Impregnating (%)	—	—	—	0 <sup>d</sup>
Average implantation rate <sup>b</sup> (%)	—	—	—	0 <sup>d</sup>
<b>3rd mating with untreated females</b>				
No. of males				
Paired	0	1	0	1
Copulating (%)	—	1(100) <sup>d</sup>	—	1(100) <sup>d</sup>
Impregnating (%)	—	1(100) <sup>d</sup>	—	0 <sup>d</sup>
Average implantation rate <sup>b</sup> (%)	—	18.8 <sup>d</sup>	—	0 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> : Excludes 2 males whose partner females were killed by missed administration.

<sup>b</sup> : The values are from partner females which were mated.

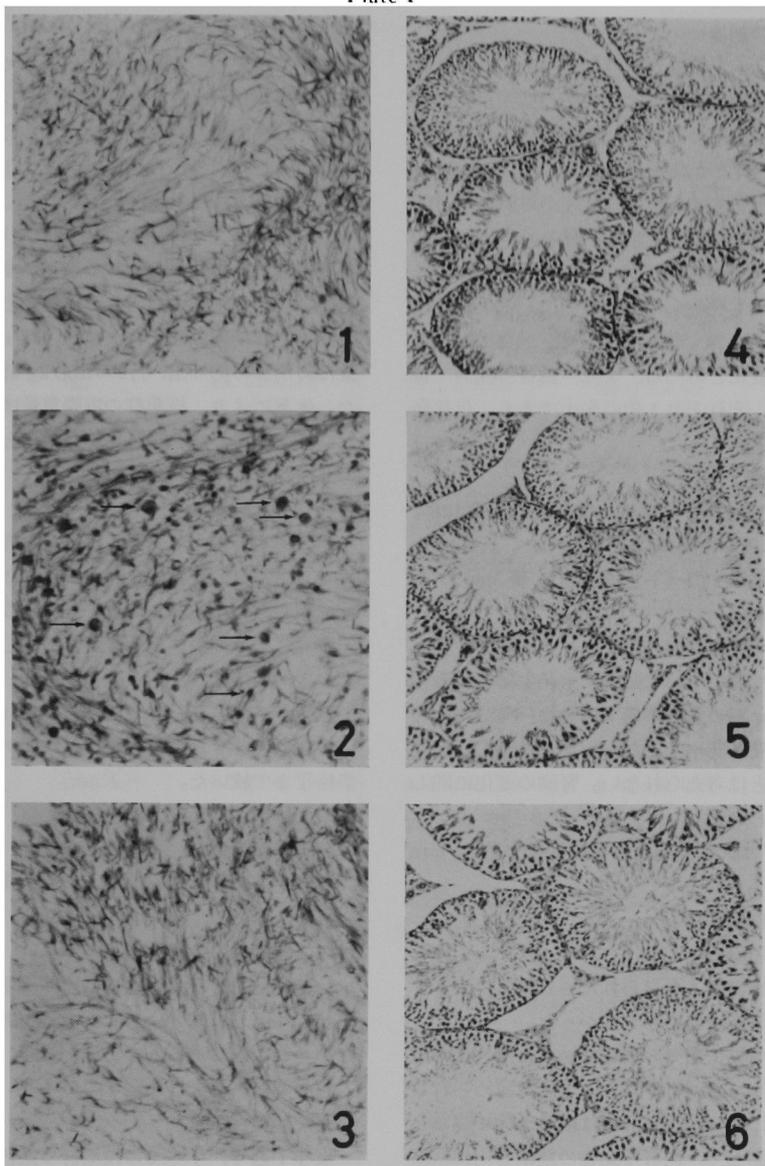
<sup>c</sup> : The values are compared with control value in the 1st mating.

<sup>d</sup> : The values are not analyzed statistically.

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$

\*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$

Plate 1



Explanation of figures

Epididymis, Contents in the lumen (H. E.  $\times 500$ )

1. Control group animal (No. 1118) autopsied on day 113 of treatment. Normal.
2. 1,000 mg/kg dose group animal (No. 1402) autopsied on day 112 of treatment. Presence of degenerate germinal cells (arrows).
3. 1,000 mg/kg dose group animal (No. 1425) autopsied on day 108 after cessation of treatment. Normal.

Testis (H. E.  $\times 125$ )

4. Control group animal (No. 1118) autopsied on day 113 of treatment. Normal.
5. 1,000 mg/kg dose group animal (No. 1402) autopsied on day 112 of treatment. Normal.
6. 1,000 mg/kg dose group animal (No. 1425) autopsied on day 108 after cessation of treatment. Normal.

## 6) 病理肉眼解剖所見 投与112~113日の剖検

各群12例の雌ラットを投与112~113日に剖検した。薬物の影響と思われる変化としては、盲腸の拡張が認められたのみであった。盲腸の拡張は、100 mg/kg 群で11例、300, 1,000 mg/kg 群でそれぞれ全12例に認められた。

その他の異常としては、精巣の萎縮が対照群と100 mg/kg 群に1例ずつ、副腎の腫大、腎の退色が1,000 mg/kg 群に1例ずつ認められた。しかし精巣の萎縮については、対照群でも発生していること、1,000 mg/kg 群の動物で精巣の大きさ、形、色調に異常がなかったことから自然発生的変化と考える。また、副腎の腫大、腎の退色についても、それぞれ1例の発生であり、自然発生的な変化と考える。

## 休薬108日の剖検

対照群13例、100 mg/kg 群12例、300 mg/kg 群13例、1,000 mg/kg 群12例を休薬108日に剖検した。1,000 mg/kg 群で精巣の萎縮が1例（不妊雄動物）、腎表面の凹凸が1例認められた。

精巣の萎縮については、前項でも述べた通り、投与112~113日の剖検において、対照群でも発生していることや、1,000 mg/kg 群の着床率低下雄動物（不妊を含む）でさえ精巣には著変が認められなかったことから、投薬の影響によるものとは考えられない。腎臓の変化に関しても自然発生と思われる。

## 7) 精巣上体および精巣の病理組織検査所見 (Plate 1)

### 投与112~113日剖検動物

精巣上体：1,000 mg/kg 群の9/12例において、上体管内に変性した精細胞の混入が見られた。しかし、上体管上皮および間質に異常は認められなかった。

精巣：病理肉眼所見で精巣の萎縮を呈した動物（対照群、100 mg/kg 群に1例ずつ）以外、著変は認められなかった。しかし、1,000 mg/kg 群では精巣上体で認められた異常像から推測して、同群の動物の精細管内に精細胞の変性あるいは脱落があるものとする。なお、精巣萎縮の動物では、いずれも精細管の萎縮、精子形成の欠如、間質水腫が認められた。

### 休薬108日剖検動物

精巣上体：対照群で1/13例、1,000 mg/kg 群で1/12例に変性した精細胞の上体管内混入が見られたが、他の動物では異常はなかった。なお、対照群、1,000 mg/kg 群の異常例は明らかな精細管の萎縮があり、1,000 mg/kg 群の投与112~113日剖検動物に見られた変化とは異なるものであった。以上の結果から、投薬期間中に1,000

mg/kg 群で認められた変性精細胞の混入は休薬により消失するものとする。

精巣：精細管の萎縮、精子形成の欠如、間質の水腫が対照群に1/13例、100 mg/kg 群に1/12例、1,000 mg/kg 群に1/12例認められたが、いずれも自然発生的変化と考える。これら以外、特記すべき変化は認められなかった。

## 8) 臓器重量 (Table 2, 3)

絶対重量および体重比重量を総合して評価すると、盲腸重量（内容物を含む）の増加が投薬群で認められた以外、投薬の影響と思われる重量変化はなかった。投与112~113日剖検動物では、100, 300 mg/kg 群の盲腸重量は対照群の約2倍、1,000 mg/kg 群では約3倍に達した。休薬により、投薬群の盲腸重量はかなり減少したが、なお投薬群で軽度の重量増加が認められた。

## 2. 雌ラットに及ぼす影響

### 1) 死亡動物

誤嚥あるいは食道貫通により対照群で2例が死亡（妊娠4日と15日）した。なお、これら2例については、交配成績、妊娠中の体重および飼料摂取量の成績、帝王切開所見、病理肉眼解剖所見から除外した。

### 2) 一般症状

軟便が1,000 mg/kg 群で認められた。この群では、雄と同様、投与4日頃より全例に軟便が見られ、症状は投薬終了まで続いた。

### 3) 体重 (Fig. 3)

#### 交配前の体重

各投与群の体重はほぼ等しく、投薬による影響は認められなかった。

#### 妊娠期間中の体重

1,000 mg/kg 群で妊娠末期の体重増加抑制が認められた。これは、1,000 mg/kg 群で一腹あたりの胎仔数が少なかったことによるものと思われる。

### 4) 飼料摂取量 (Fig. 4)

#### 交配前の摂取量

投与1週で、すべての投薬群の飼料摂取量が有意に減少した。しかし、投与2週では対照群と各投与群の摂取量はほぼ等しかった。

#### 妊娠期間中の摂取量

妊娠期間中の飼料摂取量は各群ほぼ等しく、投薬の影響は認められなかった。

### 5) 性周期

いずれの動物も4~5日型の正常な性周期を示し、投薬による影響はなかった。

### 6) 生殖能力 (Table 4)

いずれの群も、すべての動物で妊娠が認められ、雌動

Table 2 Organ weights of male rats autopsied on day 112 or 113 of treatment

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight (g) (Av. $\pm$ SE)	547 $\pm$ 12.8	562 $\pm$ 13.6	545 $\pm$ 20.8	537 $\pm$ 13.4
Organ weight (Av. $\pm$ SE)				
Heart (g)	1.49 $\pm$ 0.049	1.47 $\pm$ 0.043	1.45 $\pm$ 0.056	1.38 $\pm$ 0.039
(g%) <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.005	0.26 $\pm$ 0.006	0.27 $\pm$ 0.004	0.26 $\pm$ 0.006
Lungs (g)	1.71 $\pm$ 0.047	1.79 $\pm$ 0.060	1.68 $\pm$ 0.062	1.67 $\pm$ 0.056
(g%)	0.31 $\pm$ 0.006	0.32 $\pm$ 0.011	0.31 $\pm$ 0.007	0.31 $\pm$ 0.011
Liver (g)	24.3 $\pm$ 0.74	24.3 $\pm$ 1.10	22.4 $\pm$ 1.29	22.2 $\pm$ 0.90
(g%)	4.44 $\pm$ 0.065	4.31 $\pm$ 0.120	4.08 $\pm$ 0.113*	4.12 $\pm$ 0.084**
Kidneys (g)	4.07 $\pm$ 0.126	4.19 $\pm$ 0.133	4.07 $\pm$ 0.170	4.36 $\pm$ 0.146
(g%)	0.74 $\pm$ 0.016	0.75 $\pm$ 0.021	0.75 $\pm$ 0.019	0.81 $\pm$ 0.016**
Spleen (g)	0.98 $\pm$ 0.045	0.96 $\pm$ 0.038	0.94 $\pm$ 0.047	0.89 $\pm$ 0.040
(g%)	0.18 $\pm$ 0.007	0.17 $\pm$ 0.005	0.17 $\pm$ 0.007	0.17 $\pm$ 0.008
Submaxillary glands (g)	0.71 $\pm$ 0.027	0.73 $\pm$ 0.018	0.71 $\pm$ 0.022	0.70 $\pm$ 0.022
(g%)	0.13 $\pm$ 0.004	0.13 $\pm$ 0.002	0.13 $\pm$ 0.004	0.13 $\pm$ 0.003
Brain (g)	2.09 $\pm$ 0.024	2.06 $\pm$ 0.022	2.09 $\pm$ 0.026	2.04 $\pm$ 0.020
(g%)	0.39 $\pm$ 0.009	0.37 $\pm$ 0.008	0.39 $\pm$ 0.013	0.38 $\pm$ 0.009
Pituitary (mg)	13.2 $\pm$ 0.65	13.6 $\pm$ 0.51	13.0 $\pm$ 0.51	14.2 $\pm$ 0.79
(mg%) <sup>b</sup>	2.42 $\pm$ 0.128	2.43 $\pm$ 0.099	2.41 $\pm$ 0.098	2.66 $\pm$ 0.171
Thyroids (mg)	23.9 $\pm$ 1.17	27.2 $\pm$ 1.71	23.8 $\pm$ 0.90	26.8 $\pm$ 1.94
(mg%)	4.38 $\pm$ 0.194	4.83 $\pm$ 0.247	4.43 $\pm$ 0.257	4.93 $\pm$ 0.271
Thymus (g)	0.31 $\pm$ 0.026	0.26 $\pm$ 0.025	0.27 $\pm$ 0.039	0.25 $\pm$ 0.024
(g%)	0.058 $\pm$ 0.005	0.045 $\pm$ 0.004	0.052 $\pm$ 0.009	0.047 $\pm$ 0.004
Adrenals (mg)	56.8 $\pm$ 3.18	56.0 $\pm$ 2.51	56.8 $\pm$ 2.60	56.0 $\pm$ 3.37
(mg%)	10.4 $\pm$ 0.48	10.0 $\pm$ 0.44	10.5 $\pm$ 0.47	10.5 $\pm$ 0.68
Testes (g)	3.63 $\pm$ 0.125	3.75 $\pm$ 0.084	3.64 $\pm$ 0.079	3.75 $\pm$ 0.060
(g%)	0.67 $\pm$ 0.022	0.67 $\pm$ 0.022	0.67 $\pm$ 0.020	0.70 $\pm$ 0.020
Epididymides (g)	1.18 $\pm$ 0.052	1.28 $\pm$ 0.036	1.20 $\pm$ 0.031	1.04 $\pm$ 0.025*
(g%)	0.22 $\pm$ 0.010	0.23 $\pm$ 0.007	0.22 $\pm$ 0.009	0.20 $\pm$ 0.007
Seminal vesicle (g)	1.96 $\pm$ 0.089	2.03 $\pm$ 0.095	1.99 $\pm$ 0.077	2.08 $\pm$ 0.095
(g%)	0.36 $\pm$ 0.015	0.36 $\pm$ 0.016	0.37 $\pm$ 0.015	0.39 $\pm$ 0.016
Cecum (g)	7.3 $\pm$ 0.31	14.1 $\pm$ 0.85**	16.5 $\pm$ 1.08**	22.9 $\pm$ 1.24**
(g%)	1.34 $\pm$ 0.068	2.50 $\pm$ 0.134**	3.05 $\pm$ 0.213**	4.31 $\pm$ 0.275**

a : g/100g body weight

b : mg/100g body weight

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$ \*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$

Table 3 Organ weights of male rats autopsied on day 108 after cessation of treatment

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of animals examined	13	12	13	12
Body weight (g) (Av. $\pm$ SE)	647 $\pm$ 12.9	637 $\pm$ 24.4	632 $\pm$ 14.3	608 $\pm$ 11.8*
Organ weight (Av. $\pm$ SE)				
Heart (g)	1.57 $\pm$ 0.040	1.58 $\pm$ 0.052	1.53 $\pm$ 0.037	1.59 $\pm$ 0.051
(g%) <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.004	0.25 $\pm$ 0.004	0.24 $\pm$ 0.003	0.26 $\pm$ 0.006*
Lungs (g)	1.85 $\pm$ 0.042	1.84 $\pm$ 0.052	1.86 $\pm$ 0.040	1.86 $\pm$ 0.036
(g%)	0.29 $\pm$ 0.006	0.29 $\pm$ 0.005	0.30 $\pm$ 0.006	0.31 $\pm$ 0.007*
Liver (g)	26.1 $\pm$ 0.64	26.0 $\pm$ 1.32	25.4 $\pm$ 0.97	25.0 $\pm$ 0.62
(g%)	4.04 $\pm$ 0.088	4.07 $\pm$ 0.086	4.00 $\pm$ 0.090	4.12 $\pm$ 0.101
Kidneys (g)	4.37 $\pm$ 0.107	4.31 $\pm$ 0.173	4.34 $\pm$ 0.101	4.43 $\pm$ 0.148
(g%)	0.68 $\pm$ 0.017	0.68 $\pm$ 0.014	0.69 $\pm$ 0.006	0.73 $\pm$ 0.016*
Spleen (g)	1.00 $\pm$ 0.032	1.01 $\pm$ 0.067	0.96 $\pm$ 0.034	0.94 $\pm$ 0.038
(g%)	0.16 $\pm$ 0.004	0.16 $\pm$ 0.007	0.15 $\pm$ 0.005	0.16 $\pm$ 0.006
Submaxillary glands (g)	0.73 $\pm$ 0.024	0.74 $\pm$ 0.023	0.75 $\pm$ 0.019	0.75 $\pm$ 0.018
(g%)	0.11 $\pm$ 0.004	0.12 $\pm$ 0.003	0.12 $\pm$ 0.003	0.12 $\pm$ 0.004
Brain (g)	2.13 $\pm$ 0.025	2.12 $\pm$ 0.029	2.12 $\pm$ 0.028	2.14 $\pm$ 0.016
(g%)	0.33 $\pm$ 0.007	0.34 $\pm$ 0.011	0.34 $\pm$ 0.008	0.35 $\pm$ 0.007*
Pituitary (mg)	14.4 $\pm$ 0.76	14.1 $\pm$ 0.62	12.7 $\pm$ 0.69	13.5 $\pm$ 0.52
(mg%) <sup>b</sup>	2.23 $\pm$ 0.121	2.23 $\pm$ 0.109	2.02 $\pm$ 0.109	2.23 $\pm$ 0.095
Thyroids (mg)	27.3 $\pm$ 1.25	29.0 $\pm$ 1.88	26.0 $\pm$ 0.94	29.3 $\pm$ 1.75
(mg%)	4.25 $\pm$ 0.223	4.53 $\pm$ 0.226	4.13 $\pm$ 0.159	4.81 $\pm$ 0.275
Thymus (g)	0.10 $\pm$ 0.011	0.08 $\pm$ 0.011	0.09 $\pm$ 0.008	0.08 $\pm$ 0.008
(g%)	0.015 $\pm$ 0.002	0.013 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.001
Adrenals (mg)	54.4 $\pm$ 2.78	53.8 $\pm$ 2.42	51.8 $\pm$ 1.71	54.8 $\pm$ 1.73
(mg%)	8.47 $\pm$ 0.487	8.44 $\pm$ 0.242	8.23 $\pm$ 0.303	9.05 $\pm$ 0.363
Testes (g)	3.86 $\pm$ 0.109	4.03 $\pm$ 0.095	3.81 $\pm$ 0.065	3.49 $\pm$ 0.192
(g%)	0.60 $\pm$ 0.020	0.64 $\pm$ 0.023	0.61 $\pm$ 0.016	0.57 $\pm$ 0.031
Epididymides (g)	1.31 $\pm$ 0.040	1.32 $\pm$ 0.027	1.29 $\pm$ 0.029	1.18 $\pm$ 0.063
(g%)	0.20 $\pm$ 0.008	0.21 $\pm$ 0.009	0.21 $\pm$ 0.006	0.19 $\pm$ 0.010
Seminal vesicle (g)	2.03 $\pm$ 0.109	1.97 $\pm$ 0.076	1.88 $\pm$ 0.090	2.16 $\pm$ 0.097
(g%)	0.32 $\pm$ 0.020	0.31 $\pm$ 0.015	0.30 $\pm$ 0.015	0.36 $\pm$ 0.017
Cecum (g)	8.0 $\pm$ 0.19	10.1 $\pm$ 0.42**	8.5 $\pm$ 0.47	8.9 $\pm$ 0.36*
(g%)	1.24 $\pm$ 0.037	1.59 $\pm$ 0.056**	1.34 $\pm$ 0.072	1.46 $\pm$ 0.047**

a : g/100g body weight

b : mg/100g body weight

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$ \*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$

Fig. 3 Body weights of female rats

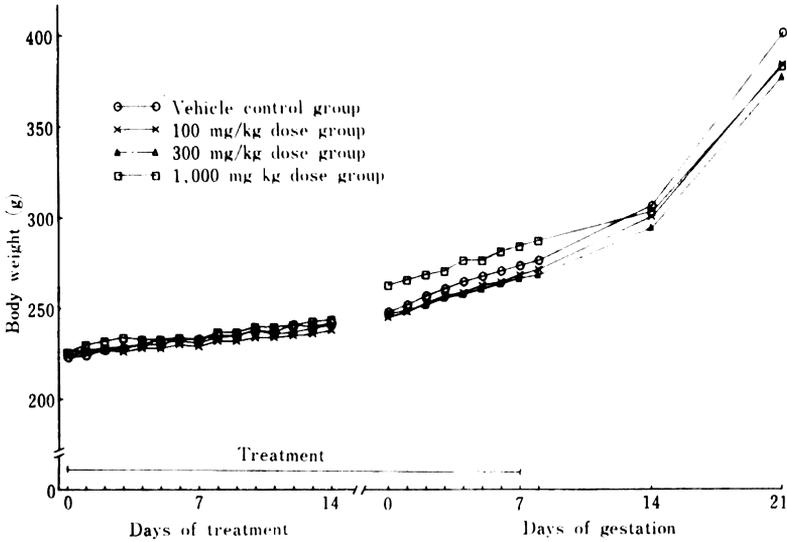
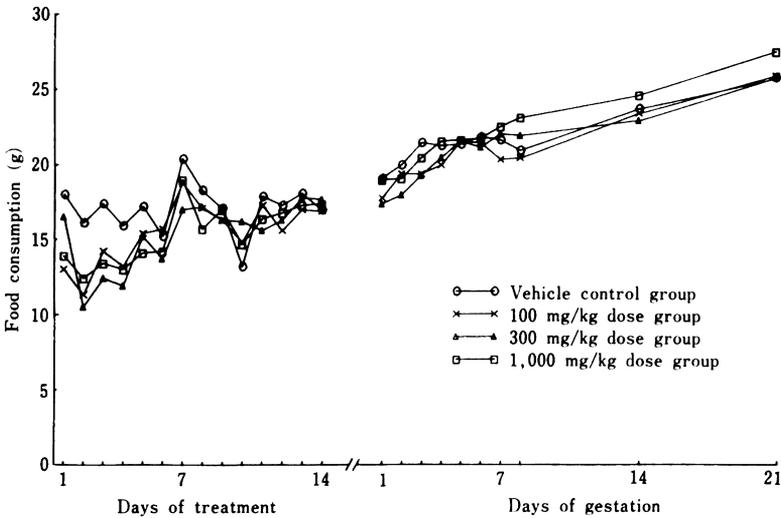


Fig. 4 Food consumption in female rats



物の生殖能力に投薬の影響はなかった。

#### 7) 母体の病理肉眼解剖所見

投薬の影響と思われる変化としては、盲腸の拡張が認められたのみであった。盲腸の拡張は100 mg/kg 群で4例、300 mg/kg 群で15例、1,000 mg/kg 群で22例認められた。他の異常としては、肝臓に点状の白変化が対照群、1,000 mg/kg 群に1例ずつ、卵巣嚢水腫が300 mg/kg 群に1例認められたが、いずれも自然発生的変化と思われる。

#### 8) 母体の臓器重量 (Table 5)

盲腸重量 (内容物を含む) の有意な増加がすべての投薬群で認められたのみで、他の臓器では投薬によると思われる重量変化はなかった。

#### 3. 胎仔に及ぼす影響

##### 1) 帝王切開所見 (Table 6)

黄体数が100、300 mg/kg 群で減少し、300 mg/kg 群で有意差が認められたが、用量依存性はなく、自然発生的変化と考える。着床数、生存胎仔数がすべての投薬群

で、着床率が 300, 1,000 mg/kg 群で有意に減少した。着床数、生存胎仔数の減少は、1,000 mg/kg 群では雄の生殖能力の異常による着床率の低下が原因であることは明らかである。しかし、100, 300 mg/kg 群の着床数、生存胎仔数の減少はむしろ、自然発生的な黄体数（排卵数）の減少によるものと考えられる。なお、100, 300 mg/kg 群で認められた着床率のわずかな低下は、雄の項で述べたように、2~3 例の動物で着床率が低下したことが原因で、投薬との関連はないと考える。胎仔死亡率、性比、未熟仔発生率はいずれの投薬群も有意差はなかった。胎仔体重は投薬群で増加し、100, 300 mg/kg 群で有意差が認められたが、これは一腹あたりの着床数が少なかったことを反映したもので、薬物が直接胎仔に作用したのではないと考える。

#### 2) 胎仔外表検査所見 (Table 7)

薬物によると思われる外表異常の発生はなかった。痕跡尾が対照群、100 mg/kg 群に 1 例ずつ、痕跡尾と鎖肛の合併症が 100, 1,000 mg/kg 群に 1 例ずつ認められ

たが、いずれもその発生率に有意差はなく、用量依存性もないことから、自然発生と考える。

#### 3) 胎仔内臓検査所見 (Table 7)

薬物による内臓異常発生率の増加はなかった。胸腺の頸部残留、心室中隔欠損、冠状動脈口過剰、総房室口遺尿管拡張、腎盂拡張、卵巣の位置異常が認められたが、残、これらの異常の発生率はいずれも低頻度で有意差はなく、用量依存性も認められなかった。

#### 4) 胎仔骨格検査所見 (Table 7)

骨格異常の発生はなかった。骨格変異を持つ胎仔数は、対照群と各投薬群の間でほぼ等しかった。骨格変異としては、14肋骨、13肋骨短小、胸骨核非対称、7腰椎が認められたが、これら変異の発生率は、対照群と各投薬群の間で有意差はなかった。化骨進行状態においても、100, 300 mg/kg 群でわずかな化骨促進が、頸椎、腰椎、足趾基節骨に認められたのみで投薬の影響はなかった。

### III. 考 察

AT-2266 の 1,000 mg/kg 投与により雄動物に生殖障

Table 4 Mating and fertility data of female rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of females examined	23 <sup>a</sup>	25	25	25
1st mating				
No. of females				
Paired	23	25	25	25
Copulating (%)	22(95.7)	25(100)	24(96.0)	24(96.0)
Pregnant (%)	22(100)	24(96.0)	24(100)	17(70.8)**
Average implantation rate (%)	96.6	85.7*	88.6*	53.3**
2nd mating				
No. of females				
Paired	1	1	1	8
Copulating (%)	1(100)	1(100) <sup>b</sup>	1(100) <sup>b</sup>	7(87.5) <sup>b</sup>
Pregnant (%)	1(100)	1(100) <sup>b</sup>	1(100) <sup>b</sup>	5(71.4) <sup>b</sup>
Average implantation rate (%)	94.7	94.4 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	52.4 <sup>b</sup>
3rd mating				
No. of females				
Paired	0	0	0	3
Copulating (%)	—	—	—	3(100) <sup>b</sup>
Pregnant (%)	—	—	—	3(100) <sup>b</sup>
Average implantation rate (%)	—	—	—	82.2 <sup>b</sup>

a : Excludes 2 females killed by missed administration during gestation.

b : The values are not analyzed statistically.

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$

\*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$

Table 5 Organ weights of female rats autopsied on day 21 of gestation

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of females examined	23	25	25	25
Body weight (g) (Av. $\pm$ SE)	402 $\pm$ 5.8	385 $\pm$ 6.8	378 $\pm$ 5.5**	384 $\pm$ 7.2
Organ weight (Av. $\pm$ SE)				
Heart (g)	0.87 $\pm$ 0.019	0.90 $\pm$ 0.018	0.87 $\pm$ 0.015	0.93 $\pm$ 0.019*
Lungs (g)	1.21 $\pm$ 0.022	1.21 $\pm$ 0.026	1.17 $\pm$ 0.022	1.21 $\pm$ 0.014
Liver (g)	14.6 $\pm$ 0.30	14.5 $\pm$ 0.29	14.0 $\pm$ 0.27	15.0 $\pm$ 0.29
Kidneys (g)	2.11 $\pm$ 0.044	2.05 $\pm$ 0.040	2.08 $\pm$ 0.039	2.12 $\pm$ 0.033
Spleen (g)	0.66 $\pm$ 0.019	0.69 $\pm$ 0.024	0.68 $\pm$ 0.020	0.69 $\pm$ 0.019
Submaxillary glands (g)	0.49 $\pm$ 0.012	0.48 $\pm$ 0.009	0.47 $\pm$ 0.010	0.50 $\pm$ 0.008
Brain (g)	1.86 $\pm$ 0.017	1.84 $\pm$ 0.016	1.86 $\pm$ 0.014	1.90 $\pm$ 0.012
Pituitary (mg)	15.5 $\pm$ 0.45	14.4 $\pm$ 0.44	15.1 $\pm$ 0.52	16.1 $\pm$ 0.60
Thyroids (mg)	18.4 $\pm$ 0.96	16.3 $\pm$ 0.58	18.6 $\pm$ 0.81	19.0 $\pm$ 0.89
Thymus (g)	0.19 $\pm$ 0.008	0.20 $\pm$ 0.012	0.20 $\pm$ 0.011	0.19 $\pm$ 0.010
Adrenals (mg)	66.3 $\pm$ 1.80	64.5 $\pm$ 2.36	61.8 $\pm$ 1.29*	66.1 $\pm$ 1.89
Ovaries (mg)	122 $\pm$ 3.7	113 $\pm$ 3.1	114 $\pm$ 3.2	127 $\pm$ 4.0
Cecum (g)	4.84 $\pm$ 0.194	6.10 $\pm$ 0.278**	7.53 $\pm$ 0.321**	8.64 $\pm$ 0.316**

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$ \*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$ 

Table 6 Cesarean section data of female rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of females examined	23	25	25	25
No. of corpora lutea (Av. $\pm$ SE)	358 15.6 $\pm$ 0.44	363 14.5 $\pm$ 0.41	351 14.0 $\pm$ 0.37*	383 15.3 $\pm$ 0.40
No. of implantations (Av. $\pm$ SE)	346 15.0 $\pm$ 0.48	326 13.0 $\pm$ 0.60*	315 12.6 $\pm$ 0.69**	291 11.6 $\pm$ 0.87**
Implantations/corpora lutea (%)	96.6	89.8	89.7*	76.0**
No. of fetal deaths				
Placental remnants and resorptions	19	28	17	25
Dead fetuses	0	1	0	0
Total	19	29	17	25
Fetal deaths/implantations (%)	5.5	8.9	5.4	8.6
No. of live fetuses (Av. $\pm$ SE)	327 14.2 $\pm$ 0.47	297 11.9 $\pm$ 0.65**	298 11.9 $\pm$ 0.65**	266 10.6 $\pm$ 0.77**
Sex ratio (Male/Female)	1.11(155/172)	0.86(160/137)	1.06(145/153)	1.05(130/136)
Fetal weight (g) (Av. $\pm$ SE)	5.07 $\pm$ 0.062	5.30 $\pm$ 0.067*	5.41 $\pm$ 0.081**	5.21 $\pm$ 0.075
No. of retarded fetuses (%)	2(0.6)	2(0.7)	1(0.3)	1(0.4)

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$ \*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$

Table 7 External, visceral and skeletal examinations of fetuses

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
<b>External</b>				
No. of fetuses examined	327	297	298	266
No. of fetuses with abnormalities (%)	1(0.3)	2(0.7)	0	1(0.4)
Rudimentary tail	1	2	0	1
Atretic anus	0	1	0	1
<b>Visceral</b>				
No. of fetuses examined	171	152	155	140
<b>Head</b>				
No. of fetuses with abnormalities (%)	0	0	0	0
<b>Thorax</b>				
No. of fetuses with abnormalities (%)	12(7.0)	5(3.3)*	5(3.2)	7(5.0)
Persistence of cords of thymic tissue	8	2	4	6
Ventricular septal defect	4	3	0*	1
Supernumerary coronary orifice	0	0	1	0
Common atrioventricular orifice	1	1	0	0
<b>Abdomen</b>				
No. of fetuses with abnormalities (%)	2(1.2)	1(0.7)	10(6.5)	7(5.0)
Dilatation of the ureter	2	0	9	5
Dilatation of the renal pelvis	1	1	4	1
Ectopic ovary	0	0	0	1
<b>Skeletal</b>				
No. of fetuses examined	156	144 <sup>a</sup>	143	126
No. of fetuses with abnormalities (%)	0	0	0	0
No. of fetuses with variations (%)	49(31.4)	41(28.5)	33(23.1)	26(20.6)
Extra 14th ribs	3	5	1	2
Rudimentary 14th ribs	45	35	31	23
Short 13th ribs	0	0	1	0
Dislocated sternbrae	0	0	1	1
7 lumbar vertebrae	5	2	3	1
<b>Maturation of ossification</b>				
<b>Delayed ossification</b>				
Supraoccipital bone (%)	0	0	0	0
Sternebrae (%)	46(29.5)	39(27.1)	43(30.1)	58(46.0)
Cervical vertebrae	153(98.1)	132(91.7)	130(90.9)*	122(96.8)
Ossified 4th lumbar transverse process	103(66.0)	120(83.3)**	112(78.3)*	93(73.8)
<b>No. of ossification centers (Av. ±SE)</b>				
Cervical vertebra	3.0±0.22	3.1±0.33	3.3±0.29	2.4±0.24
Caudal vertebra	6.6±0.16	6.6±0.17	6.8±0.18	6.4±0.13
<b>Fore limb</b>				
Metacarpal bones	4.0±0.00	4.0±0.00	4.0±0.00	4.0±0.00
Proximal phalanges	3.8±0.05	3.8±0.06	3.8±0.06	3.7±0.08
<b>Hind limb</b>				
Metatarsal bones	4.7±0.06	4.8±0.05	4.8±0.06	4.7±0.07
Proximal phalanges	1.2±0.18	2.1±0.25**	1.9±0.24*	1.3±0.20

<sup>a</sup> : One fetus is excluded because its skeleton was taken to pieces in the process of staining.

\* : Significantly different from control at  $p < 0.05$

\*\* : Significantly different from control at  $p < 0.01$

害が生じ、交尾雌ラットにおいて着床数、着床率の著しい低下が認められた。これらの雄の精巣には、重量的、組織学的に異常を検出することはできなかった。しかしながら、精巣上体に変性した精細胞の混入が認められ、このことから、精巣において一部の精細胞が脱落あるいは変性していることが推測された。以上の結果より、1,000 mg/kg 群の雄ラットに見られた生殖障害は精子形成障害によるものと思われた。一方、同群の雄ラットに63日間(精原細胞が成熟精子となるまでに要する日数)の休薬をしたところ、生殖能力は回復し、精巣上体の異常所見も見られなくなったことから、生殖障害は可逆性の変化であった。

一般に精子形成障害のメカニズムとしては、精細胞に対する直接作用として、①核酸合成阻害、②細胞分裂阻害、③代謝阻害が知られている<sup>6,7)</sup>。また間接作用の面から、精子形成に必須な環境因子に対する作用として、④ホルモン平衡の乱れ、⑤精巣温度の上昇、⑥金属元素(主に亜鉛)の欠乏、⑦精巣の血行障害が知られている<sup>8)</sup>。ところで、もしホルモン平衡の乱れが生じると精巣のみならず精巣上体、精囊等の副生殖器の形態的、機能的変化を伴う<sup>9)</sup>。また、交尾能にも異常が認められるであろう。精巣温度の上昇(例えば実験的陰瘡)あるいは血行障害が生じると、短期間のうちに精巣の萎縮、精細胞の変性が現れる<sup>9,10)</sup>。亜鉛の欠乏においても、精巣および副生殖器の著明な萎縮、体重減少が生じることが知られている<sup>9)</sup>。しかしながら、本試験においては精巣、副生殖器の形態および重量、動物の交尾能に異常が認められないことから、少なくとも④~⑦のメカニズムの関与はないものと考え。したがって、今回の精子形成障害は、精細胞に対するAT-2266の直接作用によるものであろうと推察する。

なお、AT-2266の1,000 mg/kgがラットの精子形成過程のいかなるステージに作用を及ぼすのかについては、後に実施した試験の結果より、精細胞が精母細胞期から精子細胞期にかけて薬物に暴露された時、障害されることが明らかとなった<sup>5)</sup>。また雌ラットにおける着床率の低下あるいは不妊に関しては、非受精卵の増加によるものであることが分かった<sup>5)</sup>。

以上述べたように、本試験において、AT-2266の1,000 mg/kgは雌ラットの生殖能力に影響を及ぼす用量であった。しかし、生殖障害は休薬により回復し正常となった。一方、100, 300 mg/kgの用量では、雌雄ともに胃腸の拡張および投薬開始後の一過性の飼料摂取量減少が認められたのみで、特に問題となる変化はなかった。また、胎仔に対しては、1,000 mg/kgの用量でも何ら異常はなかった。これらの結果を総合すると、本試験における最大無作用量は300 mg/kgと考えられる。

(本実験は昭和56年1月から9月の間に実施した。)

#### 文 献

- 1) 竹本勇一, 仙田博美, 中野幸穂, 山添浩史, 山吉迪子, 松岡信男, 大西久美雄, 吉田耕一: 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 32(S-3): 199~220, 1984
- 2) 寺田芳規, 西村耕一, 小紫正一, 鶴田榎右, 井村義明, 吉岡真智子, 吉田耕一: AT-2266の生殖試験(第3報), ラットにおける胎仔の器官形成期投与試験。Chemotherapy 32(S-3): 301~315, 1984
- 3) 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 14: 23~40, 1974
- 4) DAWSON, A.B.: A note on the staining of the skeleton on cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 5) 寺田芳規, 西村耕一, 竹中秀子, 吉田耕一: AT-2266の生殖試験(第2報), 雌ラットの生殖能力に及ぼす影響(連続交配試験)。Chemotherapy 32(S-3): 293~300, 1984
- 6) 浦口健二, 上野芳夫, 粕谷 豊, 北川晴雄, 酒井文徳編: トキシコロジー(毒性学の基本的問題点とその実際), 性腺に及ぼす薬物の障害的副作用一筆丸一(伊藤善一, 志田圭三)。662~678頁, 地人書館, 1978
- 7) 高橋日出彦: くすりの毒性, 雄の生殖機能に対する毒性, 300~312頁, 南江堂, 1973
- 8) GUNN, S.A. & T.C. GOULD: Cadmium and other mineral elements. The testis III, Influencing factors. (JOHNSON, A.D.; W.R. GOMES & N.L. VANDERMARK) Academic press, pp. 379~392, 1970
- 9) 稲葉善雄: ラットの実験的停留率丸における下垂体性腺系の機能について。日本不妊学会雑誌25: 519~530, 1980
- 10) STEINBERGER, E.: Effect of altered blood flow on the testis. The testis III, Influencing factors. (JOHNSON, A. D.; W. R. GOMES & N.L. VANDELMARK) Academic press, pp. 313~376, 1970

## REPRODUCTION STUDIES OF AT-2266 (1) FERTILITY STUDY IN RATS

YOSHIKI TERADA, KOICHI NISHIMURA, MASAKAZU KOMURASAKI,  
MACHIKO YOSHIOKA, and KOUICHI YOSHIDA  
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

The purpose of this study was to evaluate the effects of AT-2266, a new antibacterial agent, on the fertility and early fetal development in the Jcl : SD rats. The compound was administered daily by gavage at doses of 100, 300 and 1,000 mg/kg/day to the males from 63 days before mating until completion of reproductive performance and to the females from 14 days before mating until day 7 of gestation.

Male fertility impairment resulting in non-pregnancy or decreased implantations in partner females occurred in the 1,000 mg/kg dose group after 63-day treatment. One half of males in each group were autopsied on day 112 or 113 of treatment and examined for their testes and epididymides microscopically. Although no apparent changes were detected in the testes for any group, degenerate germinal cells were observed in the lumen of the epididymal ducts in the males treated with 1,000 mg/kg of the compound. The observations suggest that the dose of 1,000 mg/kg impairs spermatogenesis. The remaining half males in each group were examined for their fertility again after 63-day cessation of treatment. The fertility of the males in the 1,000 mg/kg dose group recovered to normal and no microscopical changes in the epididymis were observed. Therefore, the male fertility impairment was reversible.

No markedly abnormal changes were observed in the adult females or their fetuses.

It is concluded that the maximum non-toxic dose is 300 mg/kg/day in this study.