

AT-2266 の生殖試験 (第 2 報) 雄ラットの生殖能力に及ぼす影響 (連続交配試験)

寺田芳規・西村耕一・竹中秀子・吉田耕一

大日本製薬株式会社総合研究所

AT-2266 のラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験において、1,000 mg/kg の用量で雌ラットに生殖障害 (交尾雌における不妊および着床率の低下) が認められた。この生殖障害は精子形成障害によるものと考えられたので、本試験ではそのメカニズムについて検討した。

AT-2266 の 0 および 1,000 mg/kg を Jcl:SD 系雄ラットに、10週齢から13週間連続して経口投与した。投薬開始の1週間前より投薬中止後10週まで、雄1匹に対し、週に2匹の割合で無処置雌を交配し、雄ラットの生殖能力の変化を調べた。この間に、一部の雄にはさらに別の無処置雌を交配し、交尾確認雌から卵子を採取して受精の成否を検査した。

交配試験の結果、1,000 mg/kg 群で交尾雌における着床率の低下が、投与6週から休薬4週にかけて、ほぼ連続して認められた。この成績より、AT-2266 の 1,000 mg/kg を精母細胞期から精子細胞期まで連続的に暴露すると精子形成に障害を及ぼすことが推察された。また卵子の検査から、着床率の低下は非受精卵の増加によるものとわかった。さらにこの結果から、着床率の低下に優性致死作用が関与しないことも明らかとなった。

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¹⁾で報告したように、AT-2266 の 100, 300 mg/kg の用量は動物に影響を及ぼさなかったが、1,000 mg/kg では、投与した雄ラットと交尾した雌ラットにおいて不妊および着床率の低下が認められ、また精巣上体の組織学的検査から精子形成障害を示唆する結果が得られた。今回の試験では、AT-2266 の 1,000 mg/kg を反復投与した雄ラットに無処置雌を連続的に交配して、精子形成障害のメカニズムについて検討した。また一部の雄には、さらに別の無処置雌を交配し、交尾確認雌から卵子を採取して受精の成否を検査し、不妊および低着床率の原因を調べた。

I. 実験材料および方法

1. 被検物質

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。

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週齢で購入した。予備飼育の後、雄は精巣の大きさが正常で、かつ左右均等な動物を9週齢 (体重 300~347 g) で試験に使用した。雌は発情前期を呈する健康な動物を8週齢以降で交配に用いた。動物の飼育は、温度 24 ± 2 °C、湿度 55 ± 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 (日本クレア製固形飼料 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

投与量はラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験¹⁾で雄ラットに生殖障害を惹起した1,000 mg/kg を用いた。薬液調製、投与経路、投与液量は妊娠前および妊娠初期投与試験¹⁾に準じた。雄ラットが10週齢に達した時、投薬を開始し、13週間連続投与した。雌ラットには投薬しなかった。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% sodium carboxymethylcellulose (CMC) を投与した。

4. 検査方法

1群あたり15匹の雄ラットを用い、雄ラットが9週齢 (投与開始の1週間前) に達した時交配を開始し、投薬終了まで14週間連続して無処置雌ラットと交配した。さらに、雄ラットの生殖能力の回復性を検討するため、投薬中止後も10週間連続して交配を行った。雄1匹に対し、週に2匹の無処置雌を交配した。発情前期の雌を雄ラットと1対1で同居させ、陰栓形成あるいは陰垢中に精子が認められた雌は交尾成立とみなし、その日を妊娠0日とした。交尾が認められた場合、次の交配は翌日の夕方より再開した。2昼夜同居させても陰栓形成あるいは陰垢中に精子が認められなかった雌は、雄から離し、その後も引き続いて陰垢検査および腹部の触診を行った。今

回の試験では、交尾が確認されずに妊娠した動物はいなかった。

交尾が成立した無処置雌ラットは、妊娠14日に殺し、帝王切開して生存胎仔数、総着床数、黄体数を記録した。着床の認められなかった場合は、黄体数を数えなかった。これらの成績をもとに、着床率（着床数×100/黄体数）および着床卵生存率（生存胎仔数×100/着床数）を求めた。着床卵生存率は慢性致死作用の一指標として求めたものである。

交尾成立雌における着床率を雄ラットの生殖能力の指標とした。各雄について、その週に交尾した2匹の雌から平均着床率を求め、この値をもとに週単位で群の平均値を算出した。

対照群から雄3匹、投薬群から生殖能力に異常がないと判定された雄3匹および生殖能力に異常が認められた雄3匹を選出し、これらの雄ラットに無処置雌ラットを交配して、妊娠0日あるいは妊娠1日に卵管より卵子を採取し、受精の成否を検査した。検査は投与10週から休業3週までの期間（生殖障害は投与6週から休業3～5週まで認められた）で実施した。連続交配試験と平行して検査を行ったため、この期間中いずれかの週で、上記の雄ラットは週に3匹の雌と交配した。検査に用いた雌の数は、1匹の雄に対して、妊娠0日では1例ずつ、妊娠1日では2例ずつとした。妊娠0日の卵子検査は、その日の午後2～3時に実施した。卵管を子宮の一部とともに摘出して生理食塩水に浸し、子宮角側より卵子を流出させた。マイクロピペットを用いて卵子を採集し、0.1%ヒアルロニダーゼ処理（1分間）をして放射冠細胞を除去した後、すべての卵子を光学顕微鏡下で観察した。精子尾部の付着（精子の侵入）が認められた卵子を受精卵とし、採取卵子数と受精卵子数を記録した。妊娠1日の卵子の採取は妊娠0日の方法に準じた。卵子検査では、ヒアルロニダーゼ処理は行わず、受精の成立は、卵子が2分割の状態にあることをもって判定した。

5. 推計学的処理

各週の着床率、着床卵生存率の群平均値を求め、投薬群と対照群の間で、Mann-WhitneyのU検定を用いて解析した。

II. 実験結果

1. 雄ラットの生殖能力の変化 (Table 1, Fig. 1～2)

雄ラットの交尾能力に異常は認められなかった。したがって、雄ラットの生殖能力は、交尾した雌ラットにおける着床率を指標として評価した。

投薬群の雄ラットの生殖能力は、投与6週から低下し、休業5～6週で回復した。投薬群の着床率は、投与0週

から5週までは、平均85.5～96.0%と良好な成績であった。しかし、投与6週から着床率は急速に低下し、以後休業3週まで平均63.2～79.0%の低値が続いた。休業4週には82.9%と回復に向かい、休業5週から10週では平均84.8～95.7%と再び良好な成績に戻った。対照群の成績はいずれの期間も大きな変動はなく、平均85.3～97.7%の成績を示した。

着床率の経時的な変化を個々の動物で見ると (Fig. 1, 2 参照)、投薬群では、強い影響が4例の雄ラット (No. 208, 209, 210, 212) で認められた。これらの動物では投与6～7週から休業3～5週まで、ほぼ全期間にわたって着床率の低下が認められた。投薬群では、さらに1例 (No. 213) で投与13週から休業3週まで連続した着床率の低下が認められた。他の投薬群ラットおよび対照群ラットでは、散発的に着床率の低下が認められたのみで、意味ある変動はなかった。

投薬群の平均着床率が対照群より推計学的に有意に低下したのは、投与8週および休業2～4週のみであった。他の期間でも投薬群の平均着床率にかなりの低下が認められたにもかかわらず、有意差が生じなかったのは、着床率低下の発現に個体差が大きかったためであろう。

2. 着床卵生存率 (Table 1)

着床卵生存率は、投薬群と対照群、いずれの期間においてもほぼ等しかった。

3. 卵管卵子の受精率 (Table 2, Fig. 3～4)

卵子の検査は、対照群の雄3匹 (No. 101, 102, 103)、投薬群で生殖能力に異常がないと判定された雄3匹 (No. 201, 202, 203)、および生殖障害が認められた雄3匹 (No. 208, 210, 212) を対象に行った。検査に用いた雌の数は、1匹の雄に対して、妊娠0日では1匹ずつ、妊娠1日では2匹ずつとした。

妊娠0日の卵子の受精率は、投薬群の生殖障害雄ラットと交尾した雌で著しく低く、8.8%であった（例数が少ないため推計学的に有意差はない）。対照群の雄ラットあるいは投薬群の生殖能正常雄ラットと交尾した雌では、受精率はそれぞれ、97.8%、97.6%であった。妊娠1日の検査でも、受精率は投薬群の生殖障害雄ラットと交尾した雌で有意に低く、18.9%の成績であった。対照群の雄ラットあるいは投薬群の生殖能正常雄ラットと交尾した雌の受精率は、それぞれ、97.3%、95.5%であった。

III. 考察

性成熟した雄ラットの精巣においては、精原細胞から精子まで、あらゆる分化段階の精細胞が存在する。各分化段階の精細胞は、精細管内に規則正しく配列し、それ

Table 1 Implantation rates and post-implantation survival rates in females mated with treatment or control group males

Dose (mg/kg)	No. of males		No. of females		Implan- tation rate (%) ^a	Post-implan- tation survi- val rate(%) ^b
	Examined	Copulating	Used	Mated		
Vehicle control						
During treatment						
Week 0	15	15	30	30	88.8	94.7
1	15	15	30	29	91.6	92.9
2	15	15	30	29	92.0	95.6
3	15	15	30	30	91.8	93.2
4	15	15	30	30	90.2	94.0
5	15	15	30	29	96.8	94.9
6	15	15	30	30	90.6	91.5
7	15	15	30	30	91.8	95.0
8	15	15	30	30	97.7	95.5
9	15	15	30	30	95.8	92.1
10	15	15	30	29	95.8	93.8
11	15	15	30	29	89.6	93.2
12	14 ^c	14	28	28	92.9	90.6
13	14	14	28	28	94.9	95.9
After cessation						
Week 1	14	14	28	28	90.9	91.6
2	14	14	28	27	88.1	97.0
3	14	14	28	28	88.6	97.4
4	14	14	28	27	95.2	92.8
5	14	14	28	28	85.3	93.6
6	14	14	28	28	93.2	92.0
7	14	14	28	28	89.6	95.8
8	14	14	28	28	90.2	96.1
9	14	14	28	27	88.3	93.8
10	14	14	28	27	94.0	93.5
1,000						
During treatment						
Week 0	15	15	30	30	85.5	91.2
1	15	15	30	30	96.0	94.2
2	15	15	30	30	93.3	95.3
3	15	15	30	29	88.2	89.8
4	15	15	30	30	95.9*	94.0
5	15	15	30	30	95.1	95.2
6	15	15	30	30	79.0	94.9
7	15	15	30	30	66.9	95.5
8	15	15	30	29	70.1**	96.8
9	15	15	30	30	78.0	96.9*
10	15	15	30	30	77.7	95.9
11	15	15	30	30	71.6	95.2
12	15	15	30	30	72.5	93.9
13	15	15	30	30	65.7	93.7
After cessation						
Week 1	15	15	30	29	66.2	97.3
2	15	15	30	30	65.4*	95.1
3	15	15	30	29	63.2*	91.9
4	15	15	30	30	82.9*	96.2
5	15	15	30	30	84.8	93.5
6	15	15	30	30	88.8	91.4
7	15	15	30	30	94.6	93.9
8	15	15	30	30	95.7	92.4*
9	15	15	30	30	92.5	94.2
10	15	15	30	29	89.9	95.3

a : Implantations × 100/corpora lutea

b : Live fetuses × 100/implantations

c : One male died.

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

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

Fig. 1 Implantation rates as an index of the male fertility in the control group (individual data)

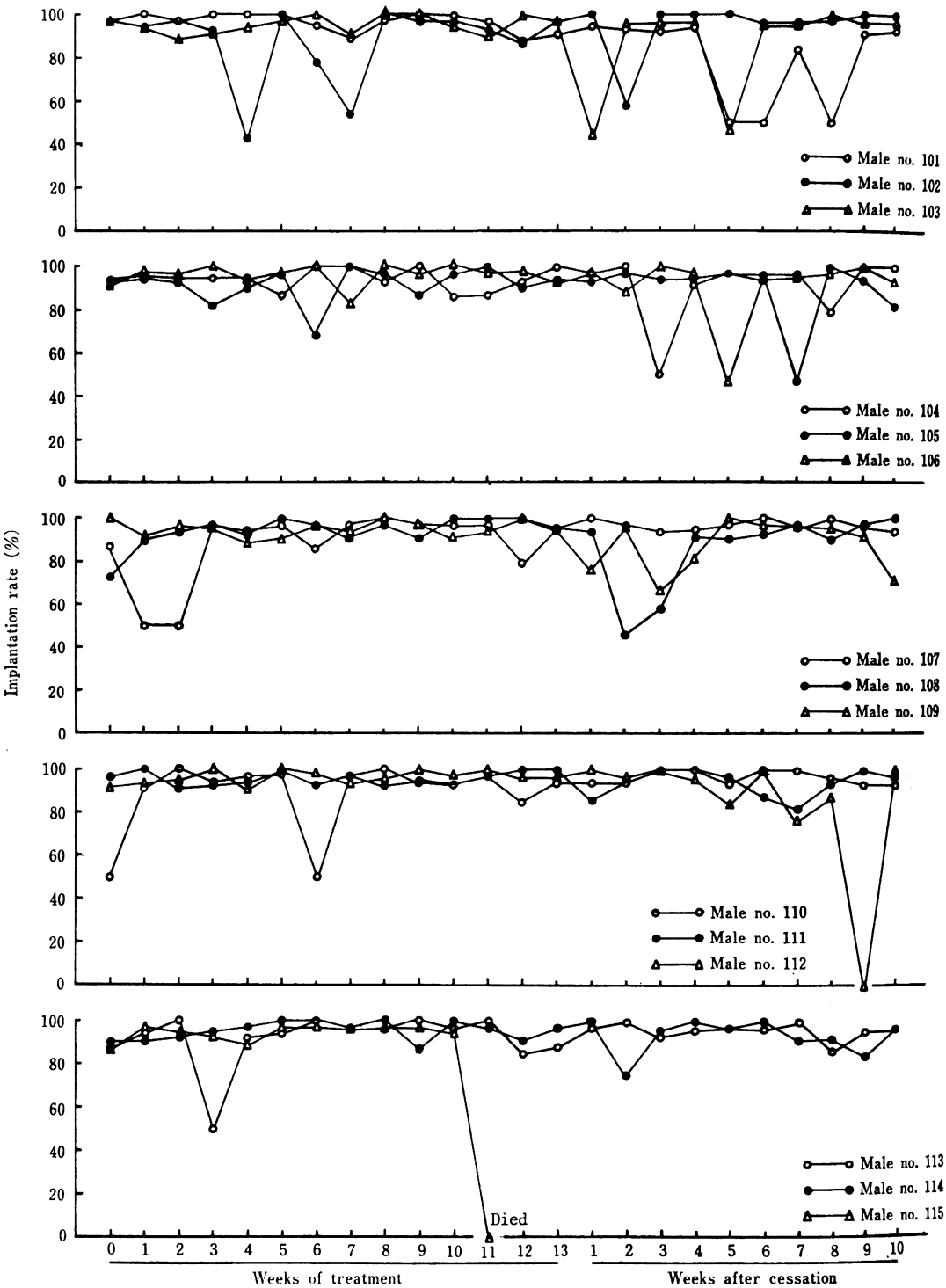


Fig. 2 Implantation rates as an index of the male fertility in the 1,000 mg/kg dose group (individual data)

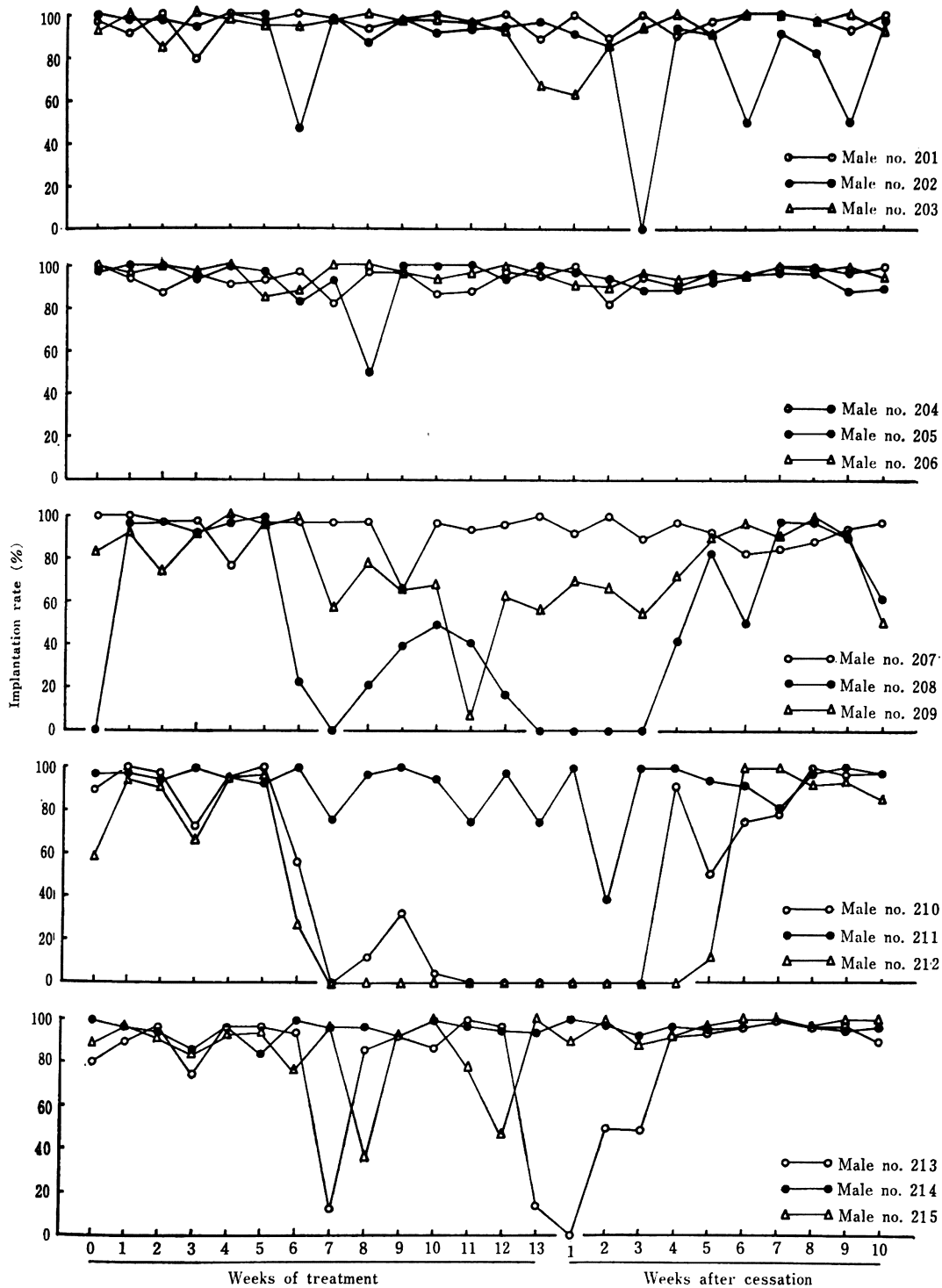


Table 2 Examinations of eggs from females mated with treatment or control group males

Dose (mg/kg)	No. of males examined	No. of females examined	No. of eggs			Percentage of eggs fertilized ^c
			Collected	Unfertilized ^a	Fertilized ^b	
Day 0 of gestation						
Vehicle control	3	3	40(13.3)	1(0.3)	39(13.0)	97.8
1,000						
Not affected ^d	3	3	41(13.7)	1(0.3)	40(13.3)	97.6
Affected ^e	3	3	43(14.3)	38(12.7)	5(1.7)	8.8
Day 1 of gestation						
Vehicle control	3	6	74(12.3)	2(0.3)	72(12.0)	97.3
1,000						
Not affected ^d	3	6	84(14.0)	4(0.7)	80(13.3)	95.5
Affected ^e	3	6	70(11.7)	56(9.3)	14(2.3)	18.9**

a : Eggs without spermatozoa on day 0 of gestation and 1-cell or degenerate ones on day 1 of gestation

b : Eggs with spermatozoa on day 0 of gestation and 2-cell ones on day 1 of gestation

c : Mean in females

d : Animals whose fertility is not affected ; No. 201, No. 202, No. 203

e : Animals whose fertility is affected ; No. 208, No. 210, No. 212

() : No. of eggs per female

** : Significantly different from control at $P < 0.01$

それ一定した時間で次の分化段階へと移行している。精子は精巣から精巣上体へ送られ、ここで成熟精子となる。精原細胞から成熟精子となるまでの期間は、どの精子もほぼ一定で、ラットの場合約9～10週とされている^{2,3)}。精子形成過程の規則性を利用すると、薬物投与開始から交配までの期間あるいは投薬中止から交配までの期間を変えることにより、交尾で射出された精子がいずれの分化段階で薬物に暴露されたかを推測することができる。連続投与の場合、投薬1～2週の交尾では精巣上体精子期から射精前まで薬物に暴露された精子が射出されるものと考えられる。また、投薬6～7週では精母細胞期から射精前まで、投薬9～10週では精原細胞期から射精前まで暴露された精子が射出されると推定される。一方、10週間以上投薬し、その後休薬した場合、休薬1～2週の交尾では精原細胞期から精巣上体精子期まで、休薬6～7週では精原細胞期から精母細胞期まで、休薬9～10週では精原細胞期に、それぞれ薬物に暴露された精子が射出されるものと考えられる(表参照)。

上記の考えに基づけば、本試験の投薬群で認められた雄ラットの生殖能力の変化は次のように考察される。

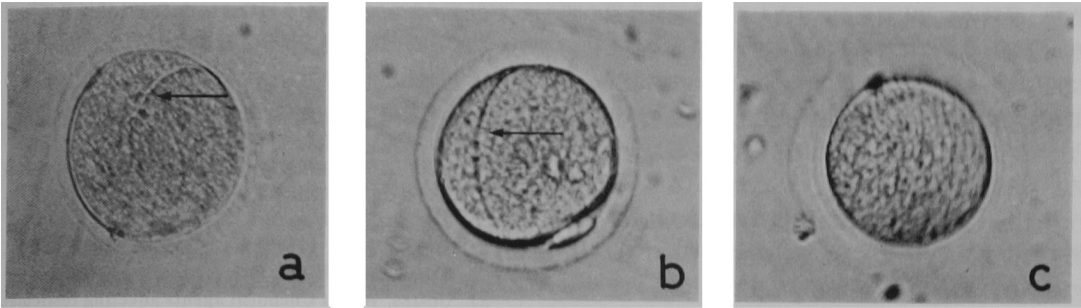
投薬期間中の交配では、投薬6週から着床率の低下が始まった。このことから、精細胞は精子細胞初期から射出まで薬物に暴露されても着床率に影響は出ないが、それより一段階前の精母細胞期から暴露されると影響を受けるものと推定できる。

	射出精子が薬物に暴露された分化段階
投薬1～2週	精巣上体精子～射出まで
投薬3週	精子細胞後期～射出まで
投薬4週	精子細胞中期～射出まで
投薬5週	精子細胞初期～射出まで
投薬6～7週	精母細胞～射出まで
投薬8週	第1次精母細胞, B型精原細胞～射出まで
投薬9～10週	精原細胞(幹, 中間型, A型)～射出まで
休薬1～2週	精原細胞～精巣上体精子
休薬3週	精原細胞～精子細胞後期
休薬4週	精原細胞～精子細胞中期
休薬5週	精原細胞～精子細胞初期
休薬6～7週	精原細胞～精母細胞
休薬8週	精原細胞(幹)～
休薬9～10週	B型精原細胞, 第1次精母細胞 精原細胞(幹, 中間型, A型)

休薬期間中の交配では、着床率は休薬5～6週で回復し正常となった。このことから、精子は精原細胞期から精母細胞期までの暴露では薬物の影響を受けず、着床率の低下が発現するには、少なくとも精子細胞初期～中期まで連続して暴露される必要があるものと思われる。

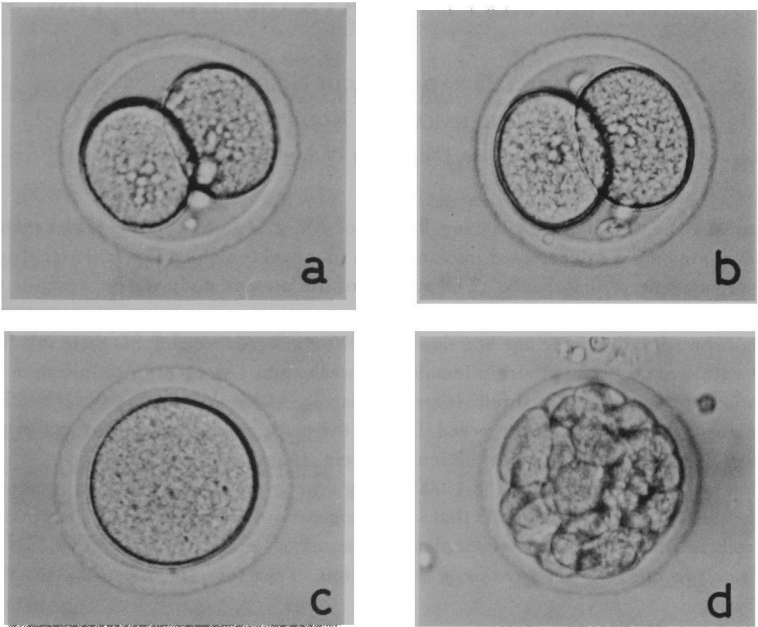
投薬期間中および休薬期間中の交配結果を総合すると、本薬の1,000 mg/kgがラットの精子形成に及ぼす障害は、精細胞が精母細胞期から精子細胞期にかけて約4週間連続的に影響を受けた結果として生じるものと考えられる。

Fig. 3 Eggs recovered on day 0 of gestation



- a. A fertilized egg from a female mated with a control group male (No. 101). The egg shows a sperm tail(←).
- b. A fertilized egg from a female mated with a treatment group male (No. 201) whose fertility was not affected. The egg shows a sperm tail(←).
- c. An unfertilized egg from a female mated with a treatment group male (No. 210) whose fertility was affected. The egg shows no sperm tail.

Fig. 4 Eggs recovered on day 1 of gestation



- a. A fertilized egg from a female mated with a control group male (No. 102). The egg is in two-cell stage.
- b. A fertilized egg from a female mated with a treatment group male (No. 203) whose fertility was not affected. The egg is in two-cell stage.
- c. An unfertilized egg from a female mated with a treatment group male (No. 212) whose fertility was affected. The egg is in one-cell stage.
- d. An unfertilized egg from a female mated with a treatment group male (No. 208) whose fertility was affected. The egg is degenerate.

次に、投薬群で認められた着床率の低下に関しては、当初、受精卵の着床前死亡、すなわち優性致死作用の関与が疑われた。優性致死とは、ヘテロ接合体を発生初期に死に至らせることで、配偶子の遺伝子に突然変異が生じたために受精卵が発生途中で死亡してしまう障害をいう。したがって、優性致死の検出は受精を確認するところから出発しなければならないとされている。このような理由から、本試験では、妊娠0日および妊娠1日に卵子の検査を行ったところ、着床率の低下あるいは不妊の認められた雄ラットと交尾した雌では、卵子の受精率が著しく低下するか、あるいは受精がまったく成立していなかった。

この事実から、AT-2266の1,000 mg/kg投与による着床率の低下あるいは不妊は、非受精卵の増加、すなわち雄ラットの妊性の低下によるもので、優性致死作用の

関与はないことが明らかとなった。着床後の胚の生存性が投薬によって影響をうけなかったことも優性致死作用の関与がないことを支持する成績である。

(本実験は昭和56年12月から57年11月の間に実施した。)

文 献

- 1) 寺田芳規, 西村耕一, 小紫正一, 吉岡真智子, 吉田耕一: 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. *Chemotherapy* 32 (S-3): 279~292, 1984
- 2) 高橋日出彦: くすりの毒性, 雄の生殖機能に対する毒性, 300~302頁, 南江堂, 1973
- 3) GOMES, W.R.: Chemical agents affecting testicular function and male fertility. The testis III, Influencing factors. (JOHNSON, A. D.; W.R. GOMES & N.L. VANDERMARK) Academic press, pp. 485, 1970
- 4) 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), 変異原性(田島弥太郎), 1336~1348頁, 地人書館, 1978

REPRODUCTION STUDIES OF AT-2266 (2) EFFECT ON MALE FERTILITY IN RATS (SERIAL MATING STUDY)

YOSHIKI TERADA, KOICHI NISHIMURA,
HIDEKO TAKENAKA, and KOUICHI YOSHIDA
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

It has been reported that treatment with 1,000 mg/kg/day of AT-2266, a new antibacterial agent, to male rats for 63 days resulted in non-pregnancy or decreased implantations in mated females. The male fertility impairment was considered due to spermatogenesis disturbance. The purpose of the present study was to examine the mechanism of the effect on male fertility.

AT-2266 was administered daily by gavage at a dose of 1,000 mg/kg/day to Jcl:SD male rats for 13 weeks. Each male rat was paired with two non-treated virgin females per week from 1 week prior to initiation of treatment until 10 weeks after cessation of treatment. Mated females were cesarean-sectioned on day 14 of gestation and implantation rates as an index of male fertility were recorded. During the mating period, a part of males were additionally mated with non-treated females and eggs from the females were examined for fertilization.

Lower implantation rates were observed in the 1,000 mg/kg dose group from week 6 of treatment until week 4 after cessation of treatment. The result suggests that spermatogenesis is disturbed when germinal cells are continuously exposed to the compound from spermatocyte phase to spermatid phase. Egg examinations revealed that the lower implantation rate was due to lower rate of egg fertilization. Therefore, the lower implantation rate is not due to dominant lethality.