

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

寺田芳規・西村耕一・小紫正一・鶴田耕右

井村義明・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 の胎仔の器官形成期投与試験を Jcl:SD 系雌ラットを用いて行った。AT-2266 の 100, 300, 1,000 mg/kg を妊娠 7 日から 17 日まで強制経口投与した。各群 25 匹の交尾成立雌ラットは、妊娠 21 日に帝王切開して胎仔を取り出し、外表、内臓、骨格異常について検査した。また、1 群あたり 15 匹の母体は自然分娩させ、次世代動物の成長および機能発達について調べた。

母体においては、1,000 mg/kg 群で継続的な軟便と妊娠中の体重増加抑制が認められた。帝王切開した母体では、全投薬群で盲腸重量 (内容物を含む) の増加が認められ、自然分娩させた母体においても 300, 1,000 mg/kg 群でわずかに盲腸重量が増加した。母体の分娩、哺育状態には何ら異常な所見はなかった。

胎仔の検査では、1,000 mg/kg 群で胎仔体重の減少、14 肋骨の発生数減少、および化骨の遅延が認められた。しかし、自然分娩によって生まれた次世代動物では、生存率、成長、分化状態、行動発達、自発運動量、学習能力、生殖能力、剖検所見のいずれにおいても投薬の影響は認められなかった。

以上、AT-2266 の本試験における最大無作用量は 300 mg/kg と考える。

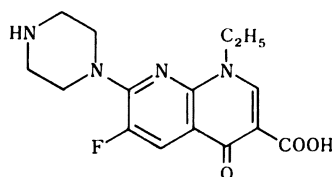
AT-2266 のラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験はすでに報告した。今回、AT-2266 をラットの胎仔の器官形成期に投与して、母体、胎仔および新生仔に及ぼす影響について検討したので、その結果を報告する。なお、本試験は帝王切開試験と自然分娩試験の実施時期を分けた。

I. 実験材料および方法

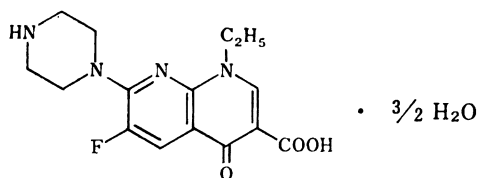
1. 被験物質

本試験では、帝王切開試験に 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、自然分娩試験に AT-2266 の 3/2 水和物 [1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid sesquihydrate] を使用した。(注)

AT-2266 の無水物は微黄色の粉末で水酢酸に溶けやすく、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ない。3/2 水和物は白色～微黄色の結晶または結晶性粉末で水酢酸に溶けやす



AT-2266 (anhydrous)



AT-2266 (sesquihydrate)

く、エタノールにやや溶けにくく、クロロホルムに極めて溶けにくく、水、アセトン、エーテル、ヘキサンにほとんど溶けない。いずれも熱、酸に安定であるが、光にはやや不安定である。

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 4～8 週齢で購入し、予備飼育の後、10～14 週齢で試験に使用した。動物の飼育は、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、

(注)当初、AT-2266 は無水物で検討されたが、3/2 水和物が安定な結晶型であることが判明したので、以後 3/2 水和物で開発が進められた。なお、両物質は投与薬液 (sodium carboxymethylcellulose 水溶液に懸濁) において理化学的に同等であることが確認されている。

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。金属性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. 交配方法

10週齢以降で、雄と雌を1対1で同居させ、産卵中に精子が認められたものを交尾成立とみなし、その日を妊娠0日とした。妊娠0日の雌ラットの体重は182～268gであった。

4. 投与量および投与方法

投与量の設定は、雌ラットにおける1ヶ月の予備的亜急性毒性試験（未公表）の結果を参考にした。亜急性毒性試験において、1,000 mg/kgの投与で動物に影響を認めなかったが、3,000 mg/kgの投与で6例中1例が死亡した。このことから、本試験では母体が死亡しない最大の投与量と考えられる1,000 mg/kgを高用量とし以下、公比を約1/3にとり、中用量に300 mg/kg、低用量に100 mg/kgを用いた。投与量は無水物換算で表示した。

AT-2266の臨床適用経路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は、1回の投与液量が体重100gあたり1mlとなるよう、0.2% sodium carboxymethylcellulose (CMC) 水溶液に懸濁し、妊娠7日から17日まで1日1回投与した。対照群の動物には0.2% CMCを体重100gあたり1mlの割合で投与した。

5. 検査方法

1) 帝王切開試験

1群あたり25匹の交尾成立雌を用い、一般症状と生死を毎日観察した。体重および飼料摂取量は、妊娠0日と7日から21日までの毎日測定した。妊娠21日の午前中にすべての雌ラットを殺し、病理肉眼観察および臓器重量の測定を行うとともに、子宮を切開して着床数、遺残胎盤数、吸収胚数、死亡胎仔数、生存胎仔数を調べた。生存胎仔は、体重、性別、外表異常の有無を記録した後、各腹の半数の胎仔は内臓検査¹⁾を、残りの半数は骨格検査²⁾を行った。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。

2) 自然分娩試験

1群あたり15匹の交尾成立雌を用いた。一般症状、生死を毎日観察した。体重、飼料摂取量は妊娠0日と7日から21日まで毎日、分娩後は週に一度測定した。次世代動物の生後観察のため、雌ラットはすべて自然分娩させた。分娩終了時に妊娠日数および出産仔の数、生死、性別、体重および外表異常の有無を記録した。この時すでに死亡していた仔は周産期死亡仔とした。哺育期間中、

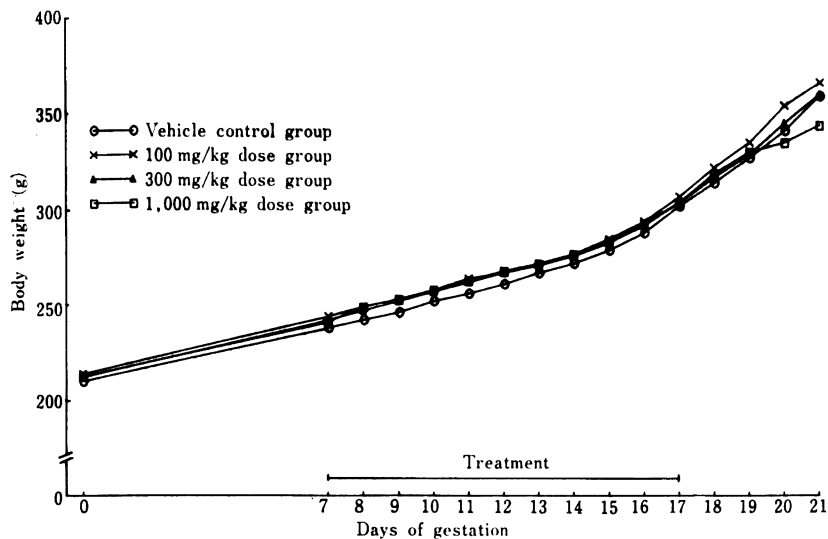
母体は巣作り、授乳、仔の連れ戻しを指標として哺育行動を毎日観察した。分娩後21日に離乳し、この日に母体を剖検して臓器重量を測定するとともに、着床床数を記録した。

次世代動物は、生まれた日を生後0日とし、この日に各腹8匹（可能な限り雄4匹、雌4匹）に調整し、これ以外の出産仔は殺した。次世代動物の一般症状および生死を、哺育期間中は1日2回、離乳後は1日1回観察した。体重は週に一度、哺育期間中は各性ごとに一腹をまとめて、離乳後は各腹の雄2匹、雌2匹について測定した。飼料摂取量は体重を測定した動物についてのみ離乳後に測定した。

分化状態として耳介開展、切歯萌出、外耳口開口、眼瞼開裂、精巣下降、腔開口を全生存仔について検査した。初期行動³⁾および感覚機能として平面立ち直り反射、把握反射、回転運動、四肢歩行、空中立ち直り反射、視覚性踏み直し反射、聴覚性驚愕反応、疼痛反応、角膜反射の発達を各腹の雌雄2匹ずつについて検査した。また、これらの動物を用いてロータロッド試験およびロープ降り試験を実施した。ロータロッド試験は生後21日に実施し、1分間に9回転する直径6.5cmの回転棒に動物を乗せ、3分間に落下した回数を記録した。ロープ降り試験は生後14日から26日にかけて実施した。直径17mmの麻ロープを垂直にたらし、床から50～60cmの高さに頭を上向けにして動物をつかまらせ、その位置からロープを降りる動物の姿勢を観察した。落下またはロープにつかまらなかった姿勢でずり落ちた場合をスコア0、頭および体を横あるいは下に向けて滑り降りた場合をスコア3、頭および体を下に向けて前後肢でロープをはさむようにして下降した場合をスコア6とした。

5週齢において、各群より雌雄10匹ずつを選び、7メックス（ファラッド社製O型）による3分間の自発運動量の測定および水迷路⁴⁾による学習試験を行った。水迷路試験では、1日目に直線コースを3回泳がせて遊泳姿勢を観察し、2日目から6日目までは迷路コースを1日3回泳がせて、各試行におけるエラー数（全身が袋小路に入った回数）を記録した。

10週齢で、各群雌雄10匹ずつ（水迷路には使用していない）を用いてシャトルボックス（テックサーボ社製）による条件回避学習試験を行った。シャトルボックスは、80 dBのホワイトノイズを流した防音箱に入れ、高さ7 cmのハードルで2室に区切り、条件刺激(CS)には1.5ルクスの白色ランプと1,000 Hz (80 dB)の純音を、無条件刺激(UCS)には3～4 mAのスクランブル直流定電流を用いた。CS発生からUCS発生までを5秒、UCS

Fig. 1 Body weights of F₀ dams cesarean-sectioned on day 21 of gestation

の最大継続時間を5秒、試行間隔を平均40秒の変時間隔とし、CSまたはUCS呈示中に動物が他室に移動すれば両刺激を終結した。各動物に連続200試行を課し、回避反応数(CSのみによる反応)、逃避反応数(UCSによる反応)を記録した。

生殖能力の検査を各腹より雌雄1匹ずつを選んで実施した。雌は8週齢から性周期を2週間検査した。10週齢以降で兄妹交配を避けて、雌雄1対1で10日間を限度として交配を行った。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。初回の交配で妊娠の成立がなかった場合、雄は無処置雌と、雌は生殖能力の確認された同群内の雄とそれぞれ再交配した。この交配でもなお妊娠の成立がなければ、もう一度同様な交配を行った。妊娠した雌は妊娠0, 7, 14, 21日に体重を測定し、妊娠21日に帝王切開して黄体数、着床数、遺残胎盤数、吸収胚数、死亡胎仔数、生存胎仔数を記録した。生存胎仔については、体重、性別、外表異常の有無を調べた。

次世代動物の剖検は以下のように行った。周産期死亡仔および哺育中の死亡仔は、発見後直ちに剖検し、死因の解明に努めた。各腹1/4の動物(水迷路試験に用いた動物を含む)は6週齢で殺して剖検し、このうち水迷路試験に用いた動物については脳重量の測定を行った。各腹半数の動物は10週齢で殺して剖検し、臓器重量の測定を行うとともに、これらの動物のうち、各腹雌雄1匹ずつについてはソフトックス(ソフトックス社製CBM型)を用いて軟X線写真を撮影して骨格検査を行った。生殖

試験に用いた雌は17週齢で殺して剖検し、妊娠した雌は帝王切開後に剖検した。

6. 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 χ^2 検定またはFisherの直接確率計算法を用いた。ただし胎仔と哺育仔に関する項目については腹単位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. 実験結果および考察

1. 帝王切開試験

各群に25匹の交尾成立雌を割り当てたが、投薬との関連が考えられない非妊娠動物(300 mg/kg群で3例)、着床数の少ない動物(対照群で2例、300 mg/kg群で2例、いずれも棄却検定により棄却)が認められた。したがって、以下の結果は、これらの動物を除外してまとめた。

1) 母体に及ぼす影響

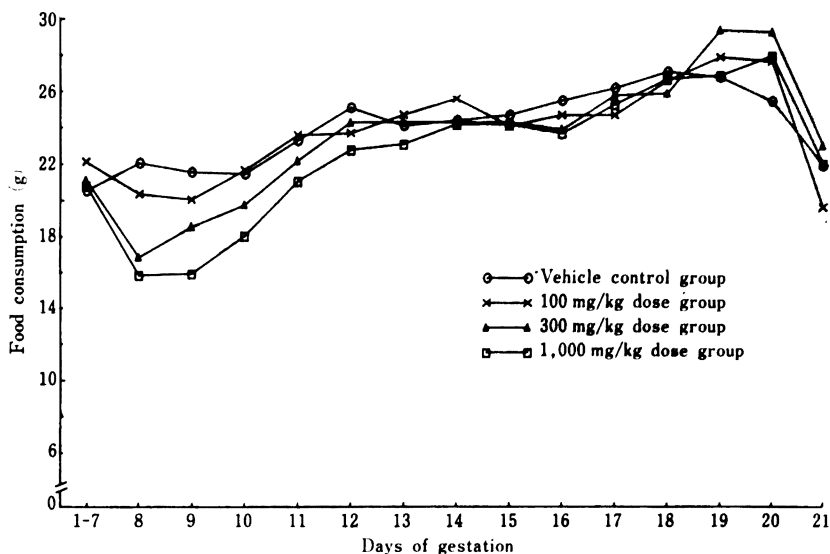
a) 症状および生死

軟便が1,000 mg/kg群で全例の母体に投与4日より妊娠末期までほぼ継続して認められた。なお、軟便は抗菌性物質に共通して見られる所見で、AT-2266に特異的なものではない。

死亡動物は、いずれの群にも認められなかった。

b) 体重 (Fig. 1)

1,000 mg/kg群の母体の体重が妊娠21日に有意に軽くなり、妊娠18~21日の体重増加量が有意に減少した。同群の投薬中止後の体重増加抑制については、胎仔体重が対照群に比べて減少したことが一因と考えられる。また、

Fig. 2 Food consumption in F₀ dams cesarean-sectioned on day 21 of gestation

ラットの盲腸重量（内容物を含む）は本薬の投与により増加するが、投薬中止後減少して回復に向かうことが知られており³⁾、この重量減少が投薬中止後の体重抑制として現われた可能性も考えられる。

c) 飼料摂取量 (Fig. 2)

飼料摂取量は 300, 1,000 mg/kg 群で減少したが、一過性的な変化で、300 mg/kg 群では妊娠10日（投与4日）に、1,000 mg/kg 群では妊娠13日（投与7日）に回復した。

d) 剖検所見および臓器重量 (Table 1)

Table 1 Organ weights of F₀ dams autopsied on day 21 of gestation

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of dams examined	23	25	20	25
Body weight (g) (Av. ± SE)	359±5.0	366±4.8	360±4.7	344±4.6*
Organ weight (Av. ± SE)				
Heart (g)	0.79±0.013	0.82±0.013	0.75±0.015	0.76±0.011
Lungs (g)	1.04±0.015	1.09±0.021	1.06±0.021	1.08±0.013
Liver (g)	13.6 ±0.31	13.5 ±0.25	14.2 ±0.39	13.3 ±0.30
Kidneys (g)	1.88±0.042	1.95±0.031	1.95±0.029	1.95±0.036
Spleen (g)	0.60±0.015	0.63±0.011	0.64±0.021	0.64±0.012
Submaxillary glands (g)	0.47±0.009	0.46±0.009	0.46±0.010	0.45±0.007
Brain (g)	1.84±0.013	1.86±0.011	1.85±0.016	1.82±0.013
Pituitary (mg)	13.9 ±0.40	14.4 ±0.40	14.1 ±0.52	13.6 ±0.47
Thyroids (mg)	15.7 ±0.74	15.1 ±0.56	15.6 ±0.64	15.7 ±0.59
Thymus (g)	0.20±0.009	0.20±0.009	0.22±0.013	0.20±0.011
Adrenals (mg)	68.7 ±2.29	66.0 ±2.12	71.1 ±2.26	70.3 ±1.61
Ovaries (mg)	113 ±2.6	116 ±3.2	119 ±3.6	115 ±3.2
Cecum (g)	4.61±0.242	5.38±0.260*	7.66±0.313**	7.77±0.466 [†]

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

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

Table 2 Cesarean section data of F₀ dams

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of dams examined	23	25	20	25
No. of implantations	317	379	292	347
(Av. ± SE)	13.8±0.41	15.2±0.37*	14.6±0.30	13.9±0.37
No. of fetal deaths				
Placental remnants and resorptions	14	21	16	44
Dead fetuses	1	0	1	1
Total	15	21	17	45
Fetal deaths/implantations (%)	4.7	5.5	5.8	13.0
No. of live fetuses	302	358	275	302
(Av. ± SE)	13.1±0.46	14.3±0.53	13.8±0.33	12.1±0.64
Sex ratio (Male/Female)	1.05(155/147)	1.00(179/179)	0.99(137/138)	0.83(137/165)
Fetal weight (g) (Av. ± SE)	5.14±0.070	5.12±0.067	5.05±0.066	4.87±0.059**
No. of retarded fetuses (%)	0	2(0.6)	1(0.4)	1(0.3)

*: Significantly different from control at p < 0.05

**: Significantly different from control at p < 0.01

投薬に関連すると思われる変化としては、盲腸の拡張が認められただけであった。盲腸の拡張は、100 mg/kg 群で1例、300 mg/kg 群で6例、1,000 mg/kg 群で10例認められた。その他の異常では、腎の白色の腫瘍と胸部皮下の腫瘍が対照群で1例ずつ、水腎症と嚢胞腎が300 mg/kg 群で1例ずつ、腎の限局性変色（黄色）が1,000 mg/kg 群で1例、肝の線状白変化が100、1,000 mg/kg 群で2例ずつ、卵巣嚢水腫が対照群で1例、300、1,000 mg/kg 群で2例ずつ認められたが、いずれも発生率が低く、用量依存性もないことから、自然発生によるものと考える。

臓器重量では、盲腸重量（内容物を含む）がすべての投薬群で有意に増加した。他の臓器では薬物投与によると考えられる重量変化は認められなかった。盲腸の拡張および重量増加は薬効に関連する変化で、抗菌性物質の投与で一般的に認められる所見である。

2) 胎仔に及ぼす影響

a) 帝王切開所見 (Table 2)

胎仔体重が1,000 mg/kg 群で有意に減少した。胎仔死亡率は1,000 mg/kg 群でわずかに増加したが、有意差は認められなかった。性比および未熟仔発生率に投薬の影響は認められなかった。着床数が100 mg/kg 群で有意に増加した。しかし、着床は妊娠5日に成立し、妊娠7日に投薬を開始していることから、着床数の増加は投薬と関連するものではないと考える。

b) 外表検査所見 (Table 3)

無尾、鎖肛、腰椎欠損を合併した胎仔が、1,000 mg/

kg 群で1例認められたのみで、投薬による異常発生の上増加はなかった。

c) 内臓検査所見 (Table 3)

胸腺の頸部残留、心室中隔欠損、冠状動脈口過剰、尿管拡張、腎盂拡張が認められたがいずれの発生率も低く、投薬群と対照群の間で有意差はないことから、投薬の影響はないと考える。

d) 骨格検査所見 (Table 3)

骨格異常の発生は認められなかった。骨格変異では、14肋骨の発生率が対照群の42例 (28.6%) に対し、1,000 mg/kg 群では13例 (9.0%) と有意に減少した。他の骨格変異の発生率に有意な増減はなかった。1,000 mg/kg 群では、化骨の遅延が上後頭骨、胸骨、頸椎、尾椎、中足骨に認められた。しかし、これらの化骨遅延は胎仔体重の低下に関連した変化と思われた。

2. 自然分娩試験

各群に15匹の交尾成立雌を割り当てたが、300 mg/kg 群で非妊娠動物が1例認められたため、この雌の成績は除外した。

1) 母体に及ぼす影響

a) 症状および生死

軟便が300 mg/kg 群で7例に、1,000 mg/kg 群で15例全例に認められた。300 mg/kg 群では投与3日（妊娠9日）から散発的に見られた程度であったが、1,000 mg/kg 群では投与2～3日（妊娠8～9日）から妊娠末期まではほぼ連続して認められた。帝王切開試験の母体と比較すると、自然分娩試験で用いた母体で、やや軟便の発

Table 3 External, visceral and skeletal examinations of F₁ fetuses

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
External				
No. of fetuses examined	302	358	275	302
No. of fetuses with abnormalities(%)	0	0	0	1(0.3)
Short trunk, atretic anus and absent tail	0	0	0	1
Visceral				
No. of fetuses examined	155	185	142	156
Head				
No. of fetuses with abnormalities(%)	0	0	0	0
Thorax				
No. of fetuses with abnormalities(%)	7(4.5)	15(8.1)	10(7.0)	12(7.7)
Persistence of cords of thymic tissue	4	8	4	3
Ventricular septal defect	2	3	3	2
Supernumerary coronary orifice	1	6	3	8
Abdomen				
No. of fetuses with abnormalities(%)	6(3.9)	5(2.7)	6(4.2)	11(7.1)
Dilatation of the ureter	3	5	5	10
Dilatation of the renal pelvis	4	0	2	7
Skeletal				
No. of fetuses examined	147	173	133	145*
No. of fetuses with abnormalities(%)	0	0	0	0
No. of fetuses with variations (%)	45(30.6)	52(30.1)	30(22.6)	19(13.1)*
Cervical ribs	0	1	0	0
Extra 14th ribs	1	1	0	1
Rudimentary 14th ribs	41	49	28	12**
Short 13th ribs	2	0	2	5
Dislocated sternbrae	1	1	0	1
Additional sternbrae	1	0	0	0
7 lumbar vertebrae	3	3	2	2
Maturation of ossification				
Delayed ossification				
Supraoccipital bone (%)	0	0	3(2.3)	11(7.6)*
Sternbrae (%)	61(41.5)	60(34.7)	58(43.6)	85(58.6)*
Cervical odontoid process	21(14.3)	37(21.4)	11(8.3)	4(2.8)**
No. of ossification centers(Av. $\pm$ SE)				
Cervical vertebra	3.1 $\pm$ 0.33	3.4 $\pm$ 0.28	3.3 $\pm$ 0.34	2.5 $\pm$ 0.26
Caudal vertebra	6.5 $\pm$ 0.14	6.4 $\pm$ 0.12	6.2 $\pm$ 0.16	5.5 $\pm$ 0.11**
Fore limb				
Metacarpal bones	4.0 $\pm$ 0.01	4.0 $\pm$ 0.00	4.0 $\pm$ 0.00	4.0 $\pm$ 0.01
Proximal phalanges	3.6 $\pm$ 0.08	3.8 $\pm$ 0.07	3.8 $\pm$ 0.06	3.6 $\pm$ 0.10
Hind limb				
Metatarsal bones	4.6 $\pm$ 0.08	4.8 $\pm$ 0.06	4.7 $\pm$ 0.06	4.3 $\pm$ 0.06**
Proximal phalanges	1.3 $\pm$ 0.21	1.6 $\pm$ 0.20	1.5 $\pm$ 0.27	0.8 $\pm$ 0.18

* : One fetus malformed externally is excluded.

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

Fig. 3 Body weights of F₀ dams assigned to the spontaneous delivery

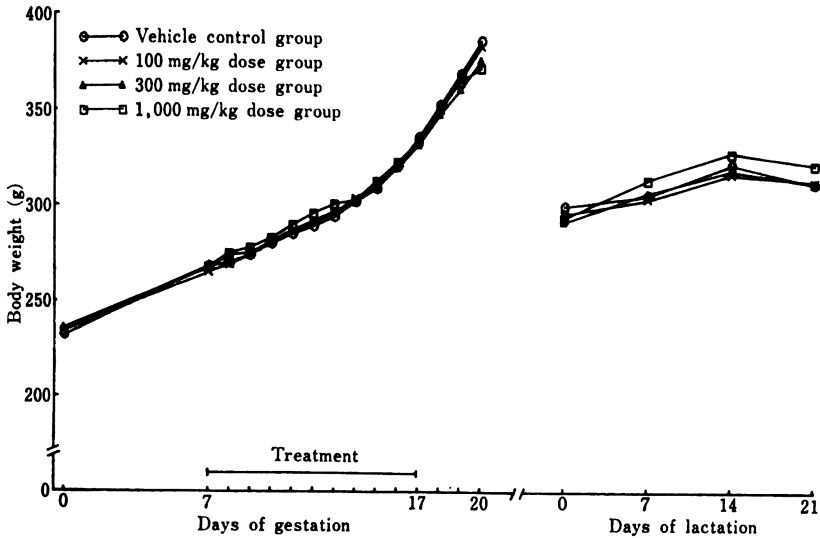
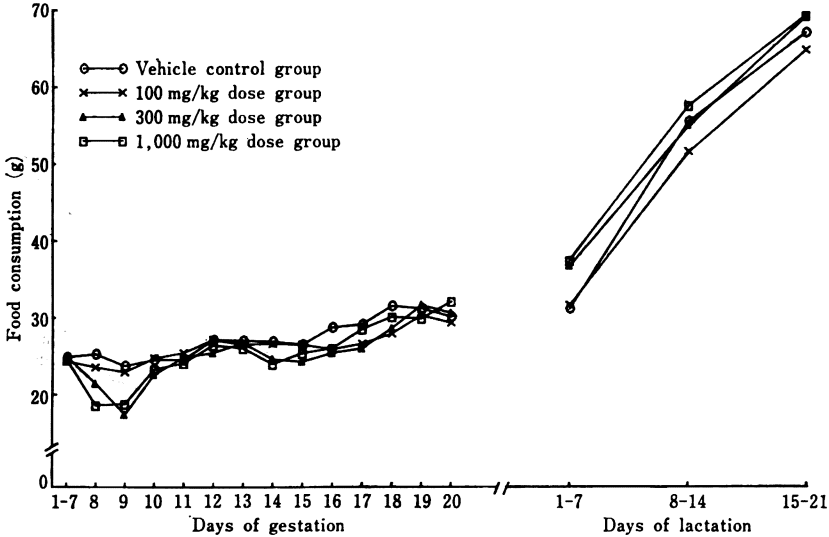


Fig. 4 Food consumption in F₀ dams assigned to the spontaneous delivery

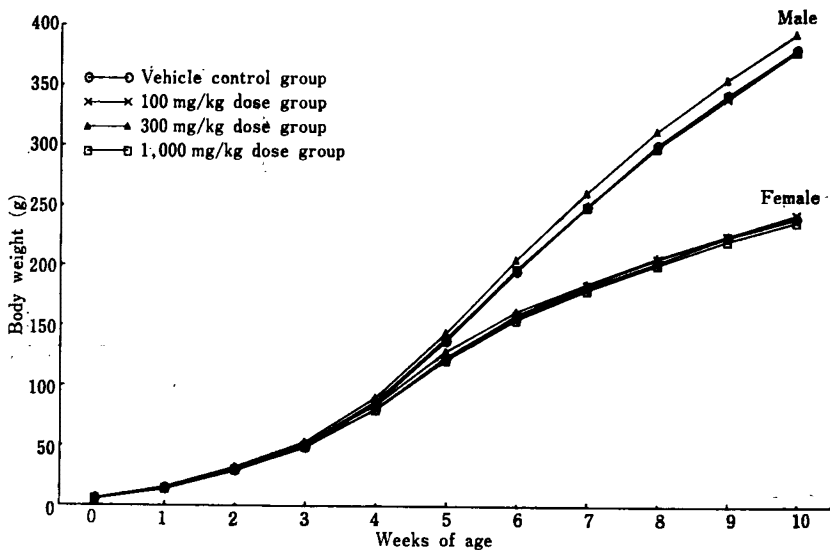


現が強かったが、本質的に差はないと考える。哺育期間中は投薬に関連した症状は見られなかった。
死亡動物は、いずれの群にも認められなかった。
b) 体重 (Fig. 3)
300, 1,000mg/kg 群で妊娠末期の体重増加がわずかに抑制され、妊娠18~20日の体重増加量が対照群に比較して有意に減少した。自然分娩した母体の妊娠中の体重変化は、帝王切開した母体のそれとほぼ同様の傾向であった。

哺育期間中の体重には、いずれの投与群も薬物による影響は認められなかった。
c) 飼料摂取量 (Fig. 4)
300, 1,000 mg/kg 群で妊娠 8, 9 日に一過性の減少が認められた。その後、妊娠期間中、哺育期間中に投薬群で有意な増加または減少が認められたが、用量依存性がなく投薬とは関連しないと考える。
d) 分娩所見
いずれの動物も正常に分娩し、難産は認められなかつ

Table 4 Organ weights of F_0 dams autopsied on day 21 of lactation

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of dams examined	15	14	14	15
Body weight (g) (Av. $\pm$ SE)	312 $\pm$ 4.6	313 $\pm$ 4.3	312 $\pm$ 5.5	322 $\pm$ 5.6
Organ weight (Av. $\pm$ SE)				
Heart (g)	1.03 $\pm$ 0.022	1.01 $\pm$ 0.009	1.03 $\pm$ 0.020	1.04 $\pm$ 0.017
Lungs (g)	1.19 $\pm$ 0.020	1.18 $\pm$ 0.018	1.20 $\pm$ 0.028	1.21 $\pm$ 0.037
Liver (g)	16.2 $\pm$ 0.32	16.6 $\pm$ 0.36	17.2 $\pm$ 0.46	17.7 $\pm$ 0.36**
Kidneys (g)	2.66 $\pm$ 0.050	2.64 $\pm$ 0.057	2.62 $\pm$ 0.055	2.52 $\pm$ 0.058
Spleen (g)	0.60 $\pm$ 0.023	0.62 $\pm$ 0.021	0.62 $\pm$ 0.021	0.59 $\pm$ 0.027
Submaxillary glands (g)	0.55 $\pm$ 0.014	0.53 $\pm$ 0.012	0.52 $\pm$ 0.014	0.54 $\pm$ 0.011
Brain (g)	1.82 $\pm$ 0.013	1.82 $\pm$ 0.018	1.84 $\pm$ 0.018	1.85 $\pm$ 0.026
Pituitary (mg)	16.3 $\pm$ 0.84	15.7 $\pm$ 0.72	16.2 $\pm$ 0.56	16.7 $\pm$ 0.51
Thyroids (mg)	18.5 $\pm$ 0.78	18.9 $\pm$ 1.24	17.1 $\pm$ 1.25	15.6 $\pm$ 0.93*
Thymus (g)	0.15 $\pm$ 0.010	0.17 $\pm$ 0.020	0.16 $\pm$ 0.014	0.14 $\pm$ 0.009
Adrenals (mg)	74.6 $\pm$ 2.71	73.4 $\pm$ 2.66	74.3 $\pm$ 4.08	78.9 $\pm$ 3.25
Ovaries (mg)	88.2 $\pm$ 4.27	100.0 $\pm$ 3.73*	98.5 $\pm$ 3.29	93.7 $\pm$ 2.88
Uterus (g)	0.31 $\pm$ 0.021	0.39 $\pm$ 0.044	0.37 $\pm$ 0.020*	0.38 $\pm$ 0.032
Cecum (g)	13.1 $\pm$ 0.67	11.8 $\pm$ 0.56	15.9 $\pm$ 0.85*	19.3 $\pm$ 1.00**

*: Significantly different from control at $p < 0.05$ **: Significantly different from control at $p < 0.01$ Fig. 5 Body weights of F_1 rats

た。妊娠期間は対照群, 100, 300, 1,000 mg/kg 群でそれぞれ, 21.5, 21.7, 21.6, 21.7日で, 各投薬群と対照群との間に有意差は認められなかった。

e) 哺育行動

巣作り, 授乳, 哺育仔の回収を指標として哺育行動を観察したが, 薬物投与の影響は認められなかった。

全仔死亡の母体が100 mg/kg 群で1例認められた。この母体は授乳行動がみられず, 分娩後5日までに全仔が

Table 5 F₁ pup data during lactation period

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of litters examined	15	15	14	15
No. of implantations	234	236	223	235
(Av. $\pm$ SE)	15.6 $\pm$ 0.35	15.7 $\pm$ 0.57	15.9 $\pm$ 0.55	15.7 $\pm$ 0.59
No. of pups delivered	220	225	209	214
(Av. $\pm$ SE)	14.7 $\pm$ 0.35	15.0 $\pm$ 0.76	14.9 $\pm$ 0.58	14.3 $\pm$ 0.54
No. of perinatal deaths	2	2	1	1
Perinatal deaths/pups delivered (%)	0.9	0.9	0.5	0.5
No. of liveborn pups	218	223	208	213
(Av. $\pm$ SE)	14.5 $\pm$ 0.38	14.9 $\pm$ 0.74	14.9 $\pm$ 0.55	14.2 $\pm$ 0.54
Live birth index (%) ^a	93.2	94.5	93.3	90.6
Sex ratio (Male/Female)	0.91(104/114)	1.08(116/107)	1.14(111/97)	0.92(102/111)
No. of pups with external abnormalities (%)	1(0.5) ^b	0	0	0
Pup body weight on day 0(g) (Av. $\pm$ SE)				
Male				
Pre-culling	5.8 $\pm$ 0.07	5.8 $\pm$ 0.15	5.9 $\pm$ 0.13	5.7 $\pm$ 0.21
Post-culling	5.9 $\pm$ 0.08	5.9 $\pm$ 0.15	5.9 $\pm$ 0.12	5.8 $\pm$ 0.23
Female				
Pre-culling	5.5 $\pm$ 0.05	5.4 $\pm$ 0.12	5.5 $\pm$ 0.11	5.6 $\pm$ 0.13
Post-culling	5.5 $\pm$ 0.07	5.5 $\pm$ 0.11	5.5 $\pm$ 0.10	5.7 $\pm$ 0.13
No. of live pups (Av. $\pm$ SE)				
Pre-culling	218(14.5 $\pm$ 0.38)	223(14.9 $\pm$ 0.74)	208(14.9 $\pm$ 0.55)	213(14.2 $\pm$ 0.54)
Post-culling				
Day 0	120(8.0 $\pm$ 0.00)	119(7.9 $\pm$ 0.07)	112(8.0 $\pm$ 0.00)	119(7.9 $\pm$ 0.07)
7	117(7.8 $\pm$ 0.11)	101(7.2 $\pm$ 0.30) ^c	112(8.0 $\pm$ 0.00)	118(7.9 $\pm$ 0.09)
14	117(7.8 $\pm$ 0.11)	100(7.1 $\pm$ 0.31) ^c	106(7.6 $\pm$ 0.29)	117(7.8 $\pm$ 0.11)
21	117(7.8 $\pm$ 0.11)	100(7.1 $\pm$ 0.31) ^c	106(7.6 $\pm$ 0.29)	117(7.8 $\pm$ 0.11)
Lactation index (%) ^d	97.5	84.0	94.6	98.3

^a: No. of liveborn pups/No. of implantations^b: Absent tail and atretic anus^c: One litter of which all pups died is excluded from calculation.^d: No. of live pups on day 21/No. of live pups on day 0 (Post-culling)Table 6 Physical development of F₁ rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of animals positive/examined (%)				
Pinna unfolding on day 5	114/117(97.4)	93/101(92.1)	104/112(92.9)	116/118(98.3)
Tooth eruption on day 15	112/117(95.7)	99/100(99.0)	106/106(100)	114/117(97.4)
Ear opening on day 14	116/117(99.1)	99/100(99.0)	105/106(99.1)	117/117(100)
Eye opening on day 15	113/117(96.6)	86/100(86.0)	94/106(88.7)	110/117(94.0)
Testis descent on day 22	54/59 (91.5)	43/48 (89.6)	48/52 (92.3)	56/56 (100)
Vaginal opening on day 36	57/58 (98.3)	49/50 (98.0)	52/54 (96.3)	57/61 (93.4)

死亡した。

f) 母体の剖検所見および臓器重量 (Table 4)

盲腸の拡張が対照群, 100, 300, 1,000 mg/kg 群にそれぞれ, 2, 5, 9, 14例認められ, その発生数が300, 1,000 mg/kg 群で有意に増加した。その他では, 生理的な変化と考えられる子宮腔水腫が100, 1,000 mg/kg 群でそれぞれ, 1, 2例認められただけであった。

臓器重量では, 盲腸重量(内容物を含む)が300, 1,000 mg/kg 群で有意に増加した。肝臓, 甲状腺, 子宮, 卵巣の重量にも有意な増加あるいは減少が認められたが, これら臓器にあらわれた重量変化は軽微で, 重量変化と

関連する剖検所見もなく, また, 帝王切開試験の母体でこれらの臓器に重量変化は認められていないことから, 薬物投与とは関連しないものと考ええる。

2) 次世代動物に及ぼす影響

a) 出産時観察所見 (Table 5)

着床痕数, 出産仔数, 生産仔数, 出生率, 性比については, いずれも各投薬群と対照群との間に有意差は認められなかった。また, 出産仔の外表面異常では対照群に痕跡尾と鎖肛の合併症が1例認められただけであった。

b) 症状および生死 (Table 5)

いずれの動物にも異常症状は観察されなかった。

Table 7 Behavioral and functional development of F₁ rats

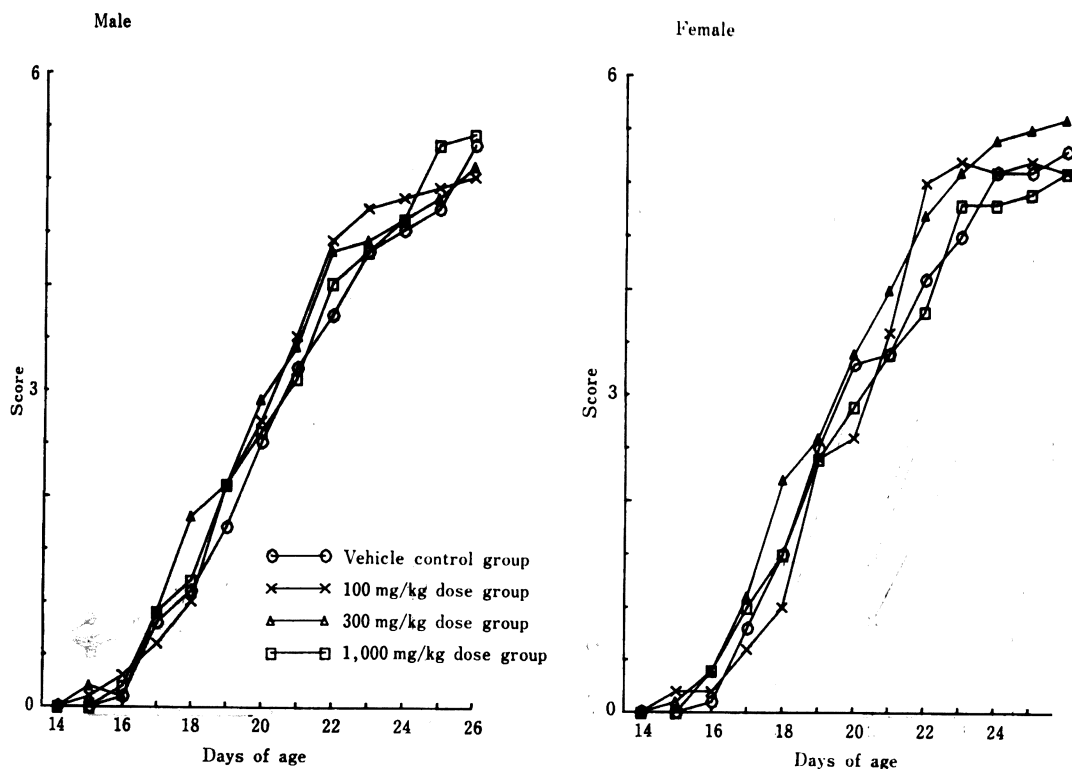
Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
No. of animals positive/examined (%)				
Righting on surface on day 2	60/69(100)	55/56(98.2)	55/56(98.2)	57/58(98.3)
Wire grasping on day 3	59/60(98.3)	55/56(98.2)	56/56(100)	58/58(100)
Pivoting on day 7	56/60(93.3)	53/56(94.6)	56/56(100)	57/58(98.3)
Walking on day 15	59/60(98.3)	50/56(89.3)	55/55(100)	55/58(94.8)
Righting in air on day 16	55/60(91.7)	51/56(91.1)	49/55(89.1)	50/58(86.2)
Visual placing on day 21	60/60(100)	56/56(100)	55/55(100)	58/58(100)
Auditory startle on day 21	60/60(100)	56/56(100)	55/55(100)	58/58(100)
Pain response on day 21	60/60(100)	56/56(100)	55/55(100)	58/58(100)
Corneal reflex on day 21	60/60(100)	56/56(100)	55/55(100)	58/58(100)

Table 8 Rotorod coordination of F₁ rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
Male				
No. of animals examined	30	28	28	28
No. of falls for 3 min. (Av. $\pm$ SE)	2.8 $\pm$ 0.49	2.9 $\pm$ 0.47	2.6 $\pm$ 0.55	3.0 $\pm$ 0.69
Female				
No. of animals examined	30	28	28	30
No. of falls for 3 min. (Av. $\pm$ SE)	2.6 $\pm$ 0.60	4.2 $\pm$ 1.14	2.3 $\pm$ 0.57	2.9 $\pm$ 0.92

Table 9 Spontaneous activity of F₁ rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
Male				
No. of animals examined	10	10	10	10
No. of counts for 3 min. (Av. $\pm$ SE)	190.9 $\pm$ 13.00	207.6 $\pm$ 4.08	206.6 $\pm$ 9.52	214.6 $\pm$ 11.00
Female				
No. of animals examined	10	10	10	10
No. of counts for 3 min. (Av. $\pm$ SE)	212.6 $\pm$ 7.69	201.7 $\pm$ 10.24	199.4 $\pm$ 6.31	210.6 $\pm$ 9.52

Fig. 6 Climbing down a rope in F₁ rats

Score 0: Falling or sliding down while grasping the rope.

Score 3: Turning the head to the side or downwards and sliding down the rope.

Score 6: Turning the head downwards and climbing down the rope.

哺育期間中に発生した死亡動物は、対照群、100, 300, 1,000 mg/kg 群でそれぞれ、3, 19, 6, 2例で、各投薬群と対照群の間に有意差は認められなかった。離乳後の死亡動物は対照群で1例認められただけであった。この動物は歯のかみ合わせが悪く、門歯が著しく伸びていた。このため、飼料を摂取することができずに死亡したものと思われた。

c) 体重 (Fig. 5)

体重の推移に薬物投与の影響は認められなかった。300 mg/kg 群の雄で生後3～8週、雌で3～5週に有意な増加が認められたが、用量依存性がないことから、薬物投与と関連しないと考える。

d) 飼料摂取量

飼料摂取量に薬物投与の影響は認められなかった。300 mg/kg 群の雌雄で有意な増加がみられたが、これは同群で体重が重かったことと関連する変化と考える。

e) 分化状態 (Table 6)

耳介開展、切歯萌出、外耳口開口、眼瞼開裂、精巣下降、陰開口の時期は各投薬群と対照群との間に有意差は認められなかった。

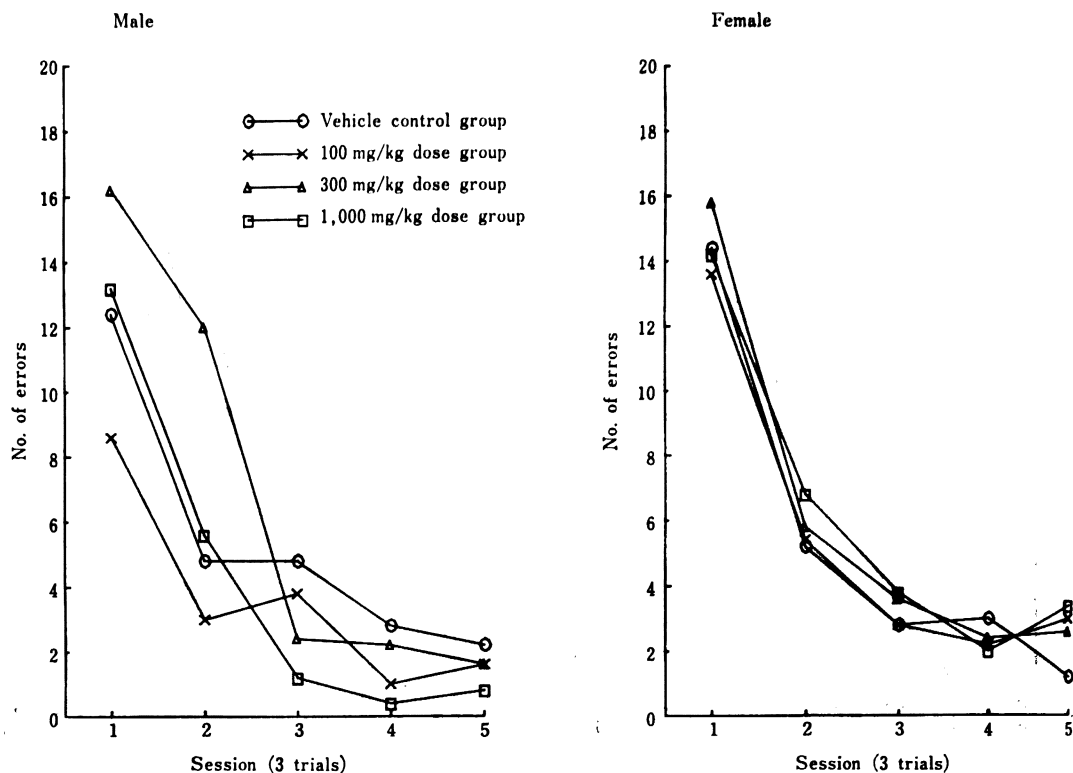
f) 行動および感覚機能発達 (Table 7, 8, Fig. 6)
 立ち直り反射、把握反射、回転運動、四肢歩行、視覚性踏直し反射、聴覚性驚愕反応、疼痛反応、角膜反射 (Table 7)、またロータロッド試験における落下回数 (Table 8)、ロープ降り試験における平均スコアの推移 (Fig. 6) のいずれも各群同等で、薬物投与による影響は認められなかった。

g) 自発運動量 (Table 9)

3分間の自発運動量は各群でほぼ等しかった。

h) 水迷路学習試験 (Fig. 7)

第1日目の直線コースでの遊泳姿勢および第2～6日の迷路試験におけるエラー回数の推移に投薬による影響は認められなかった。300 mg/kg 群の雄に見られた第2セッションのエラー回数の有意な増加、1,000 mg/kg 群

Fig. 7 Water-filled multiple T-maze performance of F₁ ratsTable 10 Conditioned avoidance responses of F₁ rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
Male				
No. of animals examined	10	10	10	10
No. of avoidance responses(Av. $\pm$ SE)				
Session 1	6.9 $\pm$ 2.50	6.7 $\pm$ 2.97	4.4 $\pm$ 1.56	1.6 $\pm$ 0.50
2	17.9 $\pm$ 4.30	11.5 $\pm$ 5.01	11.1 $\pm$ 3.66	9.0 $\pm$ 3.26
3	21.0 $\pm$ 5.25	12.2 $\pm$ 4.85	12.5 $\pm$ 3.95	14.9 $\pm$ 4.38
4	21.6 $\pm$ 5.55	16.3 $\pm$ 4.28	16.2 $\pm$ 4.26	17.2 $\pm$ 4.66
5	19.9 $\pm$ 5.29	18.9 $\pm$ 4.22	18.0 $\pm$ 4.33	19.0 $\pm$ 4.69
Total	87.3 $\pm$ 21.8	65.6 $\pm$ 20.0	62.2 $\pm$ 16.2	61.7 $\pm$ 16.7
Female				
No. of animals examined	10	10	10	10
No. of avoidance responses(Av. $\pm$ SE)				
Session 1	5.4 $\pm$ 2.33	3.5 $\pm$ 1.40	4.0 $\pm$ 1.22	4.7 $\pm$ 1.70
2	15.3 $\pm$ 3.98	10.8 $\pm$ 3.46	10.2 $\pm$ 3.62	12.1 $\pm$ 3.74
3	21.4 $\pm$ 4.49	11.8 $\pm$ 3.53	14.4 $\pm$ 4.23	14.0 $\pm$ 3.19
4	24.0 $\pm$ 4.49	17.6 $\pm$ 4.18	12.7 $\pm$ 3.65	15.5 $\pm$ 3.52
5	24.9 $\pm$ 4.12	19.4 $\pm$ 3.82	12.1 $\pm$ 3.68*	18.3 $\pm$ 3.56
Total	91.0 $\pm$ 16.6	63.1 $\pm$ 15.6	53.4 $\pm$ 15.4	64.6 $\pm$ 14.5

One session consists of 40 trials.

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

Table 11 Mating and fertility data and cesarean section data of F₁ rats

Dose (mg/kg)	Vehicle control	100	300	1,000
Mating and fertility data				
Male				
No. mated/No. paired	15/15	14/14	14/14	14/14
No. impregnating/No. paired	15/15	14/14	14/14	14/14
Female				
No. mated/No. paired	15/15	14/14	14/14	15/15
No. pregnant/No. paired	15/15	14/14	14/14	15/15
Cesarean section data				
No. of dams examined	15	14	14	15
No. of corpora lutea	226	227	237	240
(Av. $\pm$ SE)	15.1 $\pm$ 0.71	16.2 $\pm$ 0.48	16.9 $\pm$ 0.51*	16.0 $\pm$ 0.51
No. of implantations	211	219	210	228
(Av. $\pm$ SE)	14.1 $\pm$ 0.73	15.6 $\pm$ 0.46	15.0 $\pm$ 1.03	15.2 $\pm$ 0.36
Implantations/corpora lutea (%)	93.4	96.5	88.6	95.0
No. of fetal deaths				
Placental remnants and resorptions	13	9	8	8
Dead fetuses	0	1	0	0
Total	13	10	8	8
Fetal deaths/implantations (%)	6.2	4.6	3.8	3.5
No. of live fetuses	198	209	202	220
(Av. $\pm$ SE)	13.2 $\pm$ 0.73	14.9 $\pm$ 0.56	14.4 $\pm$ 1.06	14.7 $\pm$ 0.45
Sex ratio (Male/Female)	0.65(78/120)	1.05(107/102)	0.82(91/111)	1.10(115/105)
Fetal weight (g) (Av. $\pm$ SE)	5.05 $\pm$ 0.07	5.04 $\pm$ 0.08	5.06 $\pm$ 0.09	5.20 $\pm$ 0.06
No. of retarded fetuses (%)	1(0.5)	1(0.5)	0	2(0.9)
No. of fetuses with external abnormalities (%)	0	0	0	1(0.5) ^a

^a: Shortening of upper and lower jaws and cleft palate

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

の雄にみられた第4セッションのエラー回数の有意な減少は、用量依存性がないことから、薬物投与とは関連しないと考ええる。

i) 条件回避学習試験 (Table 10)

シャトルボックスを用いた条件回避における回避反応数は各群はほぼ同等で、薬物投与による影響は認められなかった。300 mg/kg 群の雌で、第5セッションの回避反応数が有意に減少したが、総合の回避反応数では有意差はなく、また用量依存性もないことから、薬物投与と関連しないものと考ええる。

j) 生殖能力試験 (Table 11)

いずれの群の動物も、すべて交尾能力および生殖能力が認められ、生殖能力試験に用いた雌の性周期にも異常はみられなかった。妊娠した F₁ 母体の体重は各投薬群と対照群との間に有意差はなく、これらの母体の帝王切

開所見にも薬物投与による影響は認められなかった。1,000 mg/kg 群の F₂ 胎仔1例に上下顎の短小と口蓋裂の合併した外表奇形が認められたが、1例だけの発生であること、この種の奇形はラットの自然発生奇形としてみられる⁶⁾ことから、薬物投与と関連するものではないと考える。

k) 剖検所見および臓器重量

対照群、100、300、1,000 mg/kg 群でそれぞれ、2、2、1、1例認められた周産期死亡仔および各群でそれぞれ4、19、6、2例認められた死亡動物の剖検において異常所見は認められなかった。

6週齢で各群それぞれ、雄15、12、13、14匹、雌14、13、14、15匹の動物を剖検し、腎盂拡張が1,000 mg/kg 群の雌雄に1例ずつ、子宮腔水腫が100、300、1,000 mg/kg 群で1例ずつ認められたが、それぞれの発生率に有

意差はなかった。水迷路試験に用いた動物の脳重量は雌雄とも各投薬群と対照群との間に有意差は認められなかった。

10週齢で各群それぞれ、雄29, 24, 25, 28匹、雌28, 23, 26, 31匹の動物を剖検した。胸腺残留が対照群の雄に1例、肝臓、脾臓の腫大が300 mg/kg 群の雄に1例ずつ、腎盂拡張が対照群の雄に1例、100 mg/kg 群の雄に1例、雌に1例、1,000 mg/kg 群の雌に1例、腎表面の嚢胞が1,000 mg/kg 群の雌に1例、精巣の小さいものが対照群に2例、300, 1,000 mg/kg 群に1例ずつ、精巣が水腫状で軟らかいものが対照群、300, 1,000 mg/kg 群に1例ずつ、精巣上体の小さいものが対照群、1,000 mg/kg 群に1例ずつ、精囊の小さいものが対照群に1例、肝臓の一部の横隔膜ヘルニアが100 mg/kg 群の雄に1例、子宮腔水腫が対照群、100 mg/kg 群に2例ずつ、300 mg/kg 群に3例、1,000 mg/kg 群に5例みられたが、いずれの発生率も各投薬群と対照群との間に有意差はなかった。これらの動物の臓器重量においては、投薬群雄の肺、肝臓、脳、胸腺、精囊の実重量あるいは体重比重量に、投薬群雌の肝臓、腎臓、下垂体、胸腺、卵巣の実重量あるいは体重比重量に有意な増加または減少が認められたが、いずれも用量依存性はなく、また重量変化と関連する剖検所見も認められなかったことから、薬物投与による影響はないものと考ええる。

10週齢で剖検した動物のうち、対照群、100, 300, 1,000 mg/kg 群でそれぞれ、雄15, 14, 13, 14例、雌15, 14, 14, 15例について骨格検査を実施したが、骨格異常は認められなかった。骨格変異として胸骨核過剰が対照群、100, 300, 1,000 mg/kg 群でそれぞれ、雄に11, 13, 4, 6例、雌に8, 6, 2, 5例認められ、300 mg/kg 群で雌雄とも有意に少なかったが、用量依存性は無かった。他に骨格変異として7腰椎がみられたが、これは対照群の雌1例のみの発生であった。帝王切開試験の胎仔の骨格検査所見と比較すると、いずれの群も10週齢の検査では胸骨核過剰の発生率が高くなり、逆に14肋骨の発生は皆無となった。この現象は、胸骨核過剰の場合、生後に化骨が起こり、14肋骨の場合は一度化骨したものが

成長の過程で消失するものと考えられる。

生殖能力試験に用いた雄は17週齢で剖検し、肝臓、脾臓の腫大が1,000 mg/kg 群に1例ずつ、腎盂拡張が対照群、300 mg/kg 群に1例ずつ、精巣が水腫状で軟らかいものの、精巣上体の小さいものが対照群に1例ずつ認められたが、いずれの発生率も低く、用量依存性もなかった。妊娠したF₁母体の剖検でも、腎盂拡張が1,000 mg/kg 群に2例認められただけで、薬物投与と関連すると思われる異常所見はみられなかった。

以上の結果より、AT-2266はラットにおいて催奇形性作用はなく、母体の分娩、哺育、次世代動物の成長、行動、機能発達に及ぼす影響はないと結論される。なお、1,000 mg/kg では母体の妊娠中の体重増加抑制、軟便の継続的発現が認められ、また胎仔において、体重の減少、14肋骨の発生数減少、化骨遅延が認められた。300 mg/kg でも母体の妊娠期間中のわずかな体重増加抑制、散発的な軟便の発現が認められたが、その程度は1,000 mg/kg に比べて軽微で、特に問題とされるものではないと考える。したがって、本試験における最大無作用量は300 mg/kg と考える。

(帝王切開の実験は昭和54年9月から11月の間に、自然分娩の実験は昭和57年1月から7月の間に実施した。)

文 献

- 1) 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
- 2) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton on cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 3) 関口茂久：ラットとマウスを用いた行動発達研究法。談信書房, 1978
- 4) BIEL, W. C.: Early age differences in maze performance in the albino rats. J. Genet. Psychol. 56: 439~453, 1940
- 5) 竹本勇一, 仙田博美, 中野幸徳, 山添浩史, 山吉進子, 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試験。Chemotherapy 32(S-3): 199~220, 1984
- 6) 亀山義郎, 谷村 孝, 安田峯生編：実験動物における自然発生奇形。先天異常 20: 25~106, 1980

REPRODUCTION STUDIES OF AT-2266 (3) TERATOGENICITY STUDY IN RATS

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

AT-2266, a new antibacterial agent, was evaluated for teratogenic potential in the Jcl: SD rats. The compound was administered daily by gavage to the mated females at doses of 100, 300 and 1,000 mg/kg/day from days 7 through 17 of gestation. Twenty-five mated females in each group were cesarean-sectioned on day 21 of gestation and their fetuses were examined for external, visceral and skeletal abnormalities. Fifteen mated females in each group were allowed to deliver and their offspring were examined for growth and functional development.

In 1,000 mg/kg dose group dams, soft feces were consecutively observed and body weight gain was decreased during gestation. An increased cecum weight was noted in cesarean-sectioned females in all drug-treated groups and also in females allowed to deliver in the 300 and 1,000 mg/kg dose groups. No drug-related variations were found in delivery or maternal behavior.

In the fetal examination, decreased body weight, decreased incidence of 14th ribs and retarded ossification were observed in the 1,000 mg/kg dose group. But drug-treated and control group offspring were comparable in survival rate, growth, physical and behavioral development, spontaneous activity, learning ability and reproductive performance.

It is concluded that AT-2266 has no teratogenic potential in the rat at a dose of 1,000 mg/kg/day and that the non-toxic maximum dose of the compound is 300 mg/kg/day in this study.