

TMS-19-Q の 生 殖 試 験 (第 2 報)

ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験

小林洋四郎・須田真理子・久保田宏史・佐々木眞敬・早野和夫

東洋醸造株式会社リサーチセンター 安全性研究所

マクロライド系抗生物質である TMS-19-Q (3'-O-propionylleucomycin A₅ 以下, TMS と略す) の安全性試験の一環として, ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験を行なった。

TMS の 125, 500 および 1,000mg/kg を雄ラットには交配前 64 日間と交配期間中, 雌ラットには交配前 14 日間と交配期間中および妊娠 7 日目まで経口投与し, 以下に述べる結果を得た。

- 1) 親動物の体重増加, 摂餌量および摂水量には影響は認められなかった。
- 2) 親動物の交配, 授精, 妊娠および着床の生殖能力は正常と認められた。
- 3) 妊娠末期および胎仔観察において, 薬物投与の影響は認められなかった。
- 4) 以上の結果より, TMS のラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験の最大無作用量は 1,000mg/kg であった。

TMS は新しく合成されたマクロライド系抗生物質であり, グラム陽性菌およびマイコプラズマに優れた抗菌力を示している^{1,2)}。

今回著者は, TMS の安全性試験の一環として, ラットを用いて妊娠前および妊娠初期投与試験を行なったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

TMS は東洋醸造(株)で合成された Lot No. TMS-8 を用いた。

2. 使用動物と飼育条件

日本クレア(株)で生産された Jcl:Wistar 系ラットを, 雌 8 週齢, 雄 5 週齢で購入し, 約 1 週間の予備飼育後試験に用いた。飼育室は温度 23±2°C, 湿度 55±5% に環境調節し, 飼料は日生研(株)製固型飼料(NR-2)を, 水は水道水を自由に与えた。

なお, 1 群の動物数は 22 匹とした。

3. 投与量の設定

投与量は 1 か月の亜急性毒性試験³⁾および胎仔の器官形成期投与試験⁴⁾の結果より, 1,000, 500 および 125 mg/kg とした。投与は 1 日 1 回, 一定時刻に, 前回測定した体重 100g 当り 1.0ml に 0.5% CMC で所定の濃度に調節した TMS を, 金属製経口ゾンデを用い, 強制的に経口投与した。投与期間は, 雄では生後約 6 週齢より 64 日間および交配期間中, 雌では生後約 9 週齢から 14 日間, 交配期間中および交配成立後 7 日までとした。

4. 交配方法

雄 64 日間, 雌 14 日間の前投与終了後, 同一投与量群内で無作為に, 雌雄 1 対 1 の交配組を作成し, 10 日間の交配を行なった。交配期間中毎日陰脂垢塗末標本を作成し, 陰脂垢中における精子の有無を観察した。陰脂垢中に精子の認められた雌を交配成立とみなし, 雄と分離した。第 1 回交配で交配不成立の交配組では, 雄に対しては無処置の雌と, 雌に対しては無処置の雄と, 10 日間の第 2 回交配を行なった。第 2 回交配においても交配不成立のラットは, 交配期間終了後に剖検を行ない, 生殖関連臓器の病理組織学的検査を行なった。

5. 観察法

1) 親動物の観察

試験期間中, 一般症状は毎日観察し, 体重, 摂餌量および摂水量は週 2 回測定した。

妊娠 21 日目に頸椎脱臼法で屠殺し, 直ちに開腹して子宮, 卵巣を取り出した後, 胸腹部主要臓器の肉眼的観察を行なった。子宮については着床数, 生存胎仔数および死亡吸収胚数を卵巣については黄体数を調査した。交配能力の認められた雄動物については, 交配期間終了後, 全例とも屠殺し, 胸腹部主要臓器の肉眼的観察を行なった。

2) 末期胎仔の観察

胎盤重量の測定後, 生仔については体重, 体長, 尾長の測定, 性の確認, および外形異常の有無を調べた。約半数は胸腹部臓器を観察した後, 除去し, 95% アルコールに固定した後, Dawson の変法⁵⁾に従い, アリザリン赤色骨透明標本を作製して骨格観察を行なった。残りの胎仔はブアン液に固定し, Wilson 法⁶⁾により薄切標本

を作成して、内臓観察を行なった。

3) 統計処理

得られたデータの処理にあたっては、西村⁷⁾の方法に従い、各項目とも母体単位での数値を平均して群の値とし、差の検定には t -検定、 χ^2 -検定および順位和検定のうちより適宜選択して行なった。有意水準は5%以下をもって有意とした。

II. 試験成績

1. 親動物の観察

対照群の1例で、交配成立後2日目に誤投与による死亡が認められた以外、雌雄とも対照群を含む全群で試験期間中の一般症状に異常は認められなかった。

親動物の体重、摂餌量および摂水量を Fig. 1~6 に示した。雌雄いずれも、これらの観察項目で対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

親動物の交配結果を Table 1 に示した。2回の交配による交配率、授精率および妊娠率とも、各薬物投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。交配期間終了後、交配不成立の雄および雌について行なった生殖関連臓器の病理組織学的な検査では、器質的な変化は認められなかった。

妊娠成立雌の体重を Fig. 7 に示した。各投与群とも

Fig. 1 Body weight of male rats in fertility study of TMS-19-Q

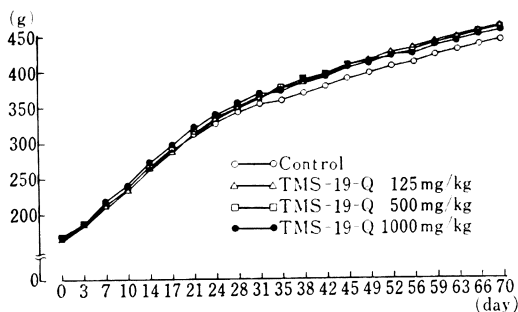


Fig. 2 Food intake of male rats in fertility study of TMS-19-Q

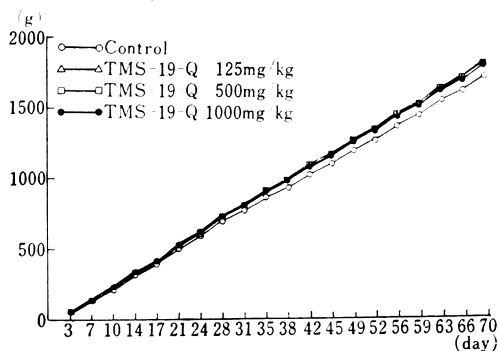


Fig. 3 Water intake of male rats in fertility study of TMS-19-Q

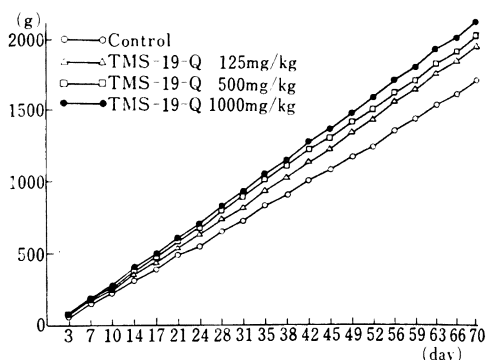


Fig. 4 Body weight of female rats in fertility study of TMS-19-Q

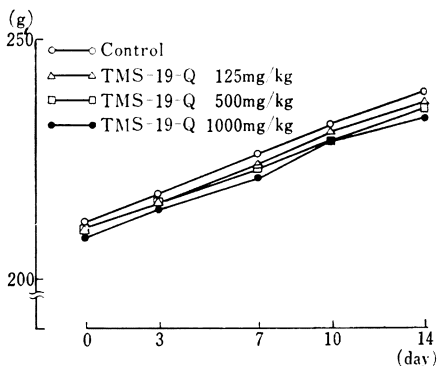
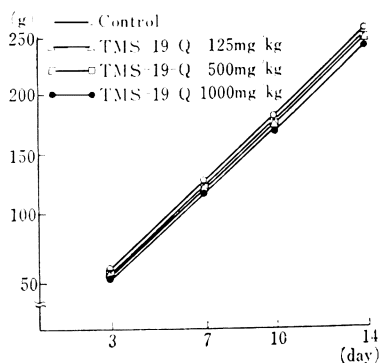


Fig. 5 Food intake of female rats in fertility study of TMS-19-Q

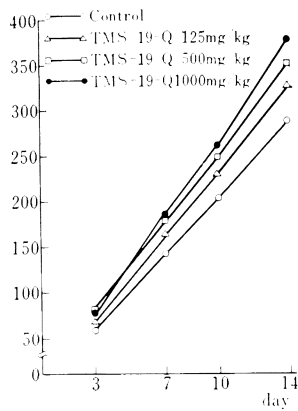


妊娠に伴う体重増加に関し、対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 胎仔の観察

第1回交配により妊娠の成立した雌の妊娠末期観察における黄体数、着床率、生仔数、死亡吸収胚率、雄比、

Fig. 6 Water intake of female rats in fertility study of TMS-19-Q



胎仔体重、体長、尾長および胎盤重量を Table 2 に示し、胎仔の骨格観察の結果を Table 3 に示した。なお、妊娠 21 日目の解剖前に、対照群および 1,000mg/kg 投与群でそれぞれ 1 例ずつ自然分娩したので、末期胎仔の観察からは除外した。

胎仔の観察では、500mg/kg 投与群の雌雄および 1,000mg/kg 投与群の雄の胎仔体長で、対照群との間に有意な差が認められた。他の観察項目においては各投与

Table 1 Effect of TMS-19-Q on mating and fertility of rat in fertility study

Dose (mg/kg)		Control	125	500	1,000
No. of pairs		21	22	22	22
	Copulated	20	18	22	22
1st mating					
	Pregnated	16	18	19	21
2nd mating	male Copulated	1	0	0	0
	Impregnated	1	0	0	0
	female Copulated	1	4	0	0
	Pregnated	1	3	0	0

Fig. 7 Body weight of pregnant rats in fertility study of TMS-19-Q

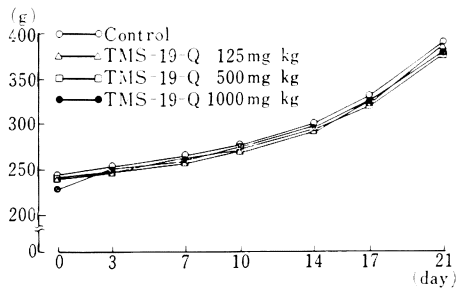


Table 2 Effect of TMS-19-Q on rat fetuses in fertility study

Dose (mg/kg)		Control	125	500	1,000
No. of mothers		15	18	19	20
No. of corpora lutea (/dam)		15.2±1.8	14.7±1.4	15.1±1.6	14.8±1.6
No. of implants (/dam)		14.5±1.7	14.0±1.1	14.3±1.8	13.8±2.0
Implantation rate (%)		95.7	95.7	94.4	93.4
No. of survivors (/dam)		13.7±2.1	13.5±1.4	13.6±2.0	13.1±2.0
Dead or resorbed		5.6	3.6	4.3	5.2
Male ratio		0.48	0.49	0.48	0.51
External anomalies		0	0	1 ¹	0
Visceral anomalies		4 ²	3 ³	4 ⁴	5 ⁵
Body weight (g)	male	5.19±0.27	5.20±0.27	5.10±0.34	5.02±0.31
	female	4.90±0.24	4.85±0.36	4.85±0.33	4.81±0.29
Body length (cm)	male	4.13±0.22	4.07±0.14	4.02±0.11*	4.01±0.12*
	female	3.98±0.09	3.97±0.15	3.94±0.11*	3.97±0.11
Tail length (cm)	male	1.46±0.05	1.49±0.06	1.45±0.05	1.44±0.07
	female	1.48±0.06	1.50±0.08	1.46±0.05	1.47±0.07
Placental weight (g)	male	0.39±0.03	0.41±0.04	0.39±0.05	0.39±0.03
	female	0.37±0.03	0.39±0.05	0.38±0.04	0.39±0.04

1) exencephaly:1, 2) hydronephrosis:2, V.S.D.:2, 3) hydrocephaly:1, V.S.D.:2, 4) V.S.D.:2, exencephaly+anophthalmia:1, V.S.D.+curvature of retina:1, V.S.D.:1, curvature of retina:1, hydrocephaly+V.S.D.:1, hydronephrosis+V.S.D.:1

* P<0.05

Table 3 Skeletal observation of fetuses from rats treated with TMS-19-Q in fertility study

Dose (mg/kg)	Control	125	500	1,000
No. of fetuses examined	102	122	130	132
No. of anomalies	0	0	0	0
No. of variations				
Cervical rib	1	1	1	1
Lumber rib	6	7	18	12
Pre-sacral vertebrae	0	0	0	0
Status of ossification				
No. of ossified sternebrae	5.9±0.1	5.9±0.1	6.0±0.0	5.9±0.1
No. of ossified caudal vertebrae	5.5±0.5	5.4±0.5	5.6±0.6	5.4±0.5
No. of ossified fore-limb phalanges	7.7±0.3	7.6±0.4	7.7±0.3	7.8±0.2
No. of ossified hind-limb phalanges	6.6±1.3	6.8±1.2	6.5±1.4	6.5±1.0

Photo. 1 Control, Hydronephrosis

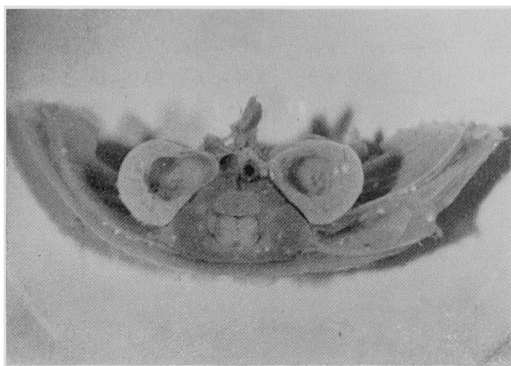
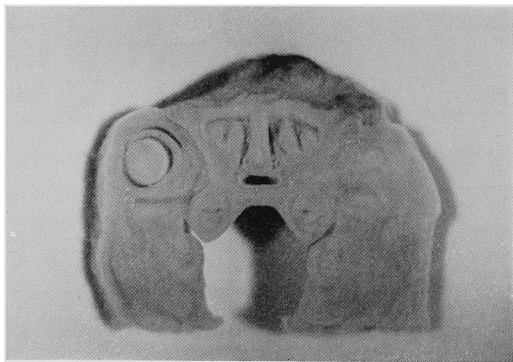


Photo. 2 TMS-19-Q 500mg/kg, Exencephaly + Anophthalmia



群と対照群との間に差は認められなかった。

外表奇形としては、500mg/kg 投与群で外脳症が1例認められ、また、内臓奇形としては、対照群では水腎症2例 (Photo. 1)、心室中隔欠損症2例の計4例、125mg/kg 投与群では水頭症1例、心室中隔欠損症2例計3例、500mg/kg 投与群では心室中隔欠損症2例、外脳症と無

眼症の合併症1例 (Photo. 2)、網膜褶曲と心室中隔欠損症の合併症1例計4例、1,000mg/kg 投与群では、水頭症、心室中隔欠損症、網膜褶曲、水頭症と心室中隔欠損症の合併症、水腎症と心室中隔欠損症の合併症各1例ずつ計5例が、それぞれ観察された。しかし、これらの奇形の出現率に関し、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

骨格観察の結果では、奇形は1例も認められず、変異の出現率、化骨進行度いずれにおいても対照群との間に差は認められなかった。

III. 考 察

TMS の生殖試験の一環として、ラットを用いて妊娠前および妊娠初期投与試験を実施した。

親動物には、125, 500 および 1,000mg/kg のいずれの投与によっても、交配前の投与期間中および妊娠中の体重増加に関し、薬物投与による影響は認められなかった。また、交配率、授精率および妊娠率、交配成立後の雄動物の剖検所見についても、各薬物投与群と対照群との間に差は認められなかった。

妊娠末期の観察では、黄体数、着床数、着床率、死亡吸収率のいずれにおいても、TMS 投与による影響は認められなかった。

胎仔の観察では、500 および 1,000mg/kg 投与群で胎仔体長に関して、対照群との間に有意差が認められたが、これらの値は当社におけるバックグラウンドデータ (雌: 3.99 ± 0.14 , 雄: 4.10 ± 0.07) の 2 S.D. の範囲内にあり、また、体重および尾長においても差は認められず、かつ、骨格においても異常が認められなかったことから、TMS 投与による影響とは考えられなかった。

胎仔の外表、内臓および骨格観察の結果においても、TMS 投与によると思われる所見は認められなかった。

TMS はラット、イヌの亜急性および慢性毒性試験^{8,9)}

において、雌雄とも生殖関連臓器には器質的な変化は認められないことが報告されている。しかし、一般薬理試験¹⁰⁾では、ラットで、摘出輸精管においてノルアドレナリンの収縮作用を 10^{-4} g/ml 以上の濃度で抑制すること、発情期の摘出子宮においても、 10^{-5} g/ml の濃度で自動運動の抑制が報告されており、生殖能力に対する TMS の影響が考えられたが、マウスを用いた優性致死試験¹¹⁾において TMS 投与の影響は認められず、今回我々が得た、ラットの妊娠前および妊娠初期投与試験の結果においても薬物投与の影響は認められなかった。

文 献

- 1) SAKAKIBARA, H.; O. OKEKAWA, T. FUJIWARA, M. OTANI & S. ŌMURA: Acyl derivatives of 16-membered macrolides I. Synthesis and biological properties of 3'-O-propionylleucomycin A₅ (TMS-19-Q). J. Antibiotics 34: 1001~1010, 1981
- 2) SAKAKIBARA, H.; O. OKEKAWA, T. FUJIWARA, M. AIZAWA & S. ŌMURA: Acyl derivatives of 16-membered macrolides II. Antibacterial activities and serum levels of 3'-O-acyl derivatives of leucomycin. J. Antibiotics 34: 1011~1018, 1981
- 3) 松本一彦, 守野豊彦, 佐野光一, 渡辺秀之, 白岩和己, 矢野譲次, 早野和夫: TMS-19-Q の安全性に関する研究(I) 急性毒性試験およびラットにおける亜急性毒性試験。Chemotherapy 32(S-6): 138~149, 1984
- 4) 佐々木眞敬, 須田真理子, 久保田宏史, 小林洋四郎, 早野和夫: TMS-19-Q の生殖試験(第1報) ラットにおける胎仔の器官形成期投与試験。Chemotherapy 32(S-6): 200~208, 1984
- 5) DAWSON, A. B.: A note of the staining of skeleton of cleared specimens with alizarin red. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 6) WILSON, J. G.: Method for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In "Teratology-Principles and Techniques" edited by J. G. WILSON & J. WARKANY, pp. 262~272, Univ. Chicago Press, 1965 (Chicago & London)
- 7) 西村秀雄: 奇形を究める胎仔科学, 115~117 頁, 雄鶏社, 1976
- 8) 守野豊彦, 白岩和己, 佐野光一, 矢野譲次, 遠藤晴子, 松本一彦, 早野和夫: TMS-19-Q の安全性に関する研究(II) ラット慢性毒性試験。Chemotherapy 32(S-6): 150~176, 1984
- 9) 松本一彦, 守野豊彦, 佐野光一, 三浦昌己, 矢野譲次, 渡辺秀之, 早野和夫: TMS-19-Q の安全性に関する研究(III) イヌ亜急性毒性試験。Chemotherapy 32(S-6): 177~199, 1984
- 10) 柴田健介, 中野 潮, 野口 優, 宗宮善典, 篠田芳樹, 大野宏土, 高柳法康: TMS-19-Q の一般薬理作用。Chemotherapy 32(S-6): 117~137, 1984
- 11) 國 明, 小柳出貴巳子, 小林洋四郎, 山本 宏: TMS-19-Q の変異原性試験。Chemotherapy 32(S-6): 222~227, 1984

REPRODUCTION STUDY OF TMS-19-Q (II)

FERTILITY STUDY IN RATS

YOSHIRO KOBAYASHI, MARIKO SUDA, MASANORI SASAKI,

HIROSHI KUBOTA and KAZUO HAYANO

Toxicological Research Laboratories, Toyo Jozo, Co., Ltd.

Fertility study of TMS-19-Q, a new semi-synthetic antimicrobial agent, was carried out in Jcl-Wistar rats.

TMS-19-Q at daily dose of 125, 500 and 1,000mg/kg was orally administered to male rats for 63 days and to female rats for 14 days. Males and females treated at same dose levels were paired to mating for 10 days. Dosing to female was continued up to the day 7 of pregnancy to test drug effects on implantation and fetal development.

TMS-19-Q did not affect on the body weight gain, food consumption and water intake in male and female rats. There were no change on mating and fertility or spermatogenesis, oogenesis, insemination, ovulation, implantation and fetal survival, anomalies (external, visceral and skeletal), growth and sex ratio at any dose of TMS-19-Q.

From these results, the maximum safety dose of TMS-19-Q in rat fertility study was estimated to be 1,000mg/kg.