

Azthreonam (SQ 26,776) の安全性研究 (第6報)

ラットにおける周産期および授乳期投与試験

古橋 忠和・牛田 和夫・武井あき子・仲吉 洋

株式会社野村生物科学研究所

モノバクタム系抗生物質である Azthreonam (以下 AZT) の 100 mg/kg, 270 mg/kg および 750 mg/kg をラットの周産期および授乳期に静脈内投与し, 自然分娩後の新生仔 (F1) および胎仔 (F2) ならびに新生仔 (F2) に対する影響を検討した。

母動物において, 平均体重の増加が 270 mg/kg 投与群および 750 mg/kg 投与群で分娩 14 日後から離乳時までみられた。また, 摂餌量に関しては 100 mg/kg 以上の検体投与各群で投与開始後に一過性の減少, 750 mg/kg 投与群で出産後に増加がみられ, 摂水量では 270 mg/kg 投与群および 750 mg/kg 投与群で投与開始後に増加がみられた。750 mg/kg 投与群の 1 例で分娩遅延がみられ, 妊娠 23 日に死亡した。この動物で肝細胞と腎尿管上皮細胞の空胞化が認められた。分娩 21 日後の剖検では, 検体投与各群で盲腸の重量増加が認められた。

新生仔に関しては, 出生率, 生存率, 離乳率, 性比, 体重, 生後分化状態, 外形, 内部臓器, 骨格, 出生 21 日後および出生 84 日後の臓器重量, 機能, 行動, 情動性, 学習, 生殖能力などに検体投与によると考えられる変動は認められなかった。

以上の結果より, 本実験条件下におけるラット周産期および授乳期投与試験では, AZT の無影響量は, 母動物では一過性の摂餌量の減少および盲腸重量の増加がみられたが 100 mg/kg, 次世代では 750 mg/kg と結論された。

Azthreonam (SQ 26,776, 以下 AZT) は Squibb Institute for Medical Research で開発されたモノバクタム系 (単環 β -ラクタム) 抗生物質であり, ラットおよびマウスにおける急性毒性試験¹⁾, ラットにおける亜急性毒性試験^{2,3)}, ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験⁴⁾, ラットにおける器官形成期投与試験⁵⁾ はすでに報告されている。今回, 著者らは, ラットにおける周産期および授乳期投与試験を実施したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用検体

試験に用いた AZT (Lot AZ 040, 力価 947 μ g/mg) および溶解補助剤のアルギニン (Lot 54811-009) は, 日本スクイブ株式会社より提供を受け使用した。AZT は用時にアルギニンとともに (AZT:アルギニン=10:8) 局方注射用蒸留水に溶解し, 濾過滅菌 (0.45 μ) の後, 使用した。対照群には局方生理食塩液を用いた。

2. 使用動物および飼育環境

Crj:CD (Sprague-Dawley; SD) ラット (日本チャールス・リバー) を雄は 12 週齢, 雌は 11 週齢で購入した。入荷時に雄 4 匹, 雌 6 匹を選び血清微生物反応および内部臓器の肉眼的検査で異常のないことを確認した。

10 日間の予備飼育期間中に一般症状および体重変動に異常がみられない動物を試験に用いた。

動物は, 室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm 10\%$, 12 時間照明 (6:00 a.m.~6:00 p.m.) に設定された飼育室で木屑入りのプラスチック製ケージを用いて飼育した。また, 固型飼料 (オリエンタル酵母工業製 CRF-1) および水 (水道水) を自由に摂取させた。予備飼育終了後, ラットを雌雄 2:1 で一夜 (4:00 p.m.~9:00 a.m.) 同居させ, 腔脂垢法により交尾の有無を確認し, 交尾した雌ラットを妊娠 0 日として試験に用いた。

3. 投与方法, 投与量および投与期間

投与経路は推定臨床適用経路に準じて静脈内 (尾静脈内) 投与とした。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⁴⁾と同様に, 100 mg/kg, 270 mg/kg, 750 mg/kg とした。なお, 低用量の 100 mg/kg は臨床予定量の約 3 倍に相当する。投与液量は 5 ml/kg とし, 妊娠中は妊娠 7 日の体重を基準にして, 分娩後は体重測定値を基準にして投与した。投与期間は妊娠 17 日~分娩 20 日後までとし, 毎日 1 回午前中に投与した。対照群には局方生理食塩液を検体投与各群と同量投与した。なお, 各群 20 匹の妊娠雌で構成した。

4. 観察項目

1) 母動物に対する影響

一般症状を毎日観察し、体重、摂餌量および摂水量を測定した。

妊娠 21 日から毎日 2 回 (9:00 a. m. および 5:00 p. m.) 分娩の有無および分娩状態を観察し、妊娠期間を算出した。その後分娩 21 日後までの哺育期間中、毎日 1 回午前中に哺育状態を観察した。分娩 4 日後に同腹仔数が 10 匹以上の場合は、雌雄各 5 匹として 1 腹 10 匹に淘汰した。ただし、雌雄いずれかが 5 匹未満の場合は少ない方の性を全例残して合計で 10 匹となるよう調整し、雌雄の合計が 10 匹以下の場合は全例を哺育させた。

分娩 21 日後に母動物をペントバルビタールナトリウム麻酔下に腹大動脈より放血致死させ、剖検し、着床痕数を調べ、主要諸臓器の重量を測定した。

2) 仔動物に対する影響

毎日 1 回、仔動物 (以下 F1) の生死、一般症状を肉眼的に観察し、出生率、生存率、離乳率を算出し、体重を定期的に測定した。生後分化状態としては、耳介開展、臍部の発毛、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降および腔開口について観察した。

出生 21 日後に各腹雌雄各 3 匹を残してそれ以外の F1 については剖検後主要諸臓器の重量を測定した。また、出生 84 日後に各腹雌雄各 1 匹の F1 (行動検査に用いた F1) を剖検し、主要諸臓器の重量を測定した。出生 4 日後に淘汰した F1 を 70% アルコール液で固定後、DAWSON の方法⁹⁾に準じて alizarin red S 染色を施し、骨格の異常、変異、骨化の状況を検査した。出生 21 日後に剖検した F1 の骨格を Softex 撮影し、骨格の異

常を検査した。

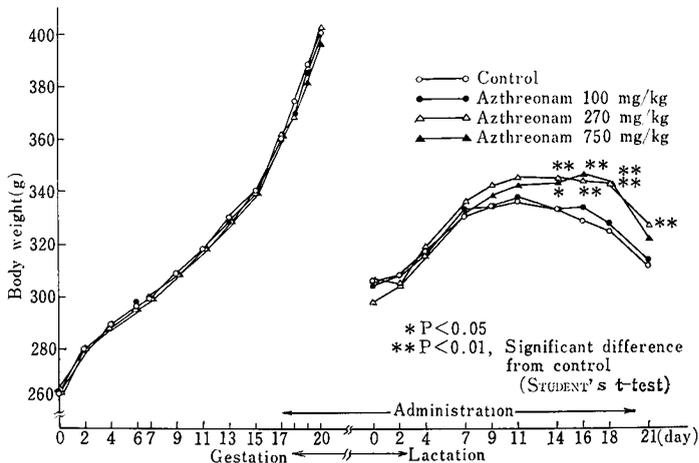
出生 21 日後の剖検前に全 F1 について、角膜反射⁹⁾、正向反射⁹⁾ および痛覚反応⁹⁾ による機能検査を行った。また、4~5 週齢時に各腹雌雄各 1 匹の F1 について瞳孔反射による機能検査ならびに回転棒⁹⁾、傾斜板⁹⁾、筋弛緩⁹⁾ による行動検査を行った。5~6 週齢時に各腹雌雄各 1 匹の行動検査に使用した動物とは異なる F1 を用いて open field¹⁰⁾ による情動性の検査を行った。行動検査に用いた F1 については、7~8 週齢時に電撃回避試験¹¹⁾ による学習能力の検査を行った。

生殖能力の検査は 12 週齢時に同一群内で兄妹交配を避けて雌雄 1:1 で同居させることにより行い、交尾率、受胎率を求めた。各群の妊娠動物の約 2/3 について妊娠 20 日に剖検し、黄体数、着床数、生存胎仔数、死胚数とそれらの状況 (吸収胚、胎盤遺残、浸軟胎仔および死亡胎仔に分類) を観察した。生存胎仔は体重、体長、尾長、胎盤重量を個別別に測定し、口腔内を含む外形異常、性別を検査した。各群の妊娠動物の約 1/3 は自然分娩させ妊娠期間を算出した。出生 4 日後に 1 腹 10 匹以下に淘汰を行い、3 週間哺育させた。その間、出生率、生存率、離乳率を算出し、体重を定期的に測定した。

5. 統計学的処理

測定値は、1 母体ごとの平均値を算出し、対照群と検体投与各群の間で等分散の検定を行った。分散の等しい場合は STUDENT の方法により、分散が等しくない場合は ASPIN-WELCH の方法によりそれぞれ t 検定を行った。ただし、出生率、生存率、離乳率、死胚率、性比、外形、内臓および骨格異常の発現率の検定には WILCOXON の順位和検定法¹²⁾ を用い、交尾率、受胎率

Fig. 1 Mean body weight changes of dams during gestation and lactation periods in perinatal and postnatal study on Azthreonom



には χ^2 検定を用いた。

II. 結 果

1. 母動物に対する影響

妊娠中に対照群を含む全群で死亡例および一般症状の異常はみられなかった。体重変動は Fig. 1 に示したように、妊娠期間を通じて対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差は認められなかった。

各群の摂餌量、摂水量の変動を Table 1 に示した。

100 mg/kg 以上の検体投与各群において妊娠 17~20 日に対照群と比べて統計学的に有意な摂餌量の減少がみられ、270 mg/kg 以上の検体投与各群で妊娠 18~19 日

に対照群と比べて統計学的に有意な摂水量の増加が認められた。

750 mg/kg 投与群の 1 例で分娩の遅延がみられ、妊娠 23 日に死亡した。この死亡例の病理組織学的検査では肝細胞の空胞化および腎尿細管上皮細胞の硝子滴変性を伴う空胞化が認められた。また、ストレス性の変化と判断された副腎皮質の肥大、胸腺および脾臓の白脾髄の退縮がみられた。生存例においては、分娩中、分娩直後および哺育期間中に異常は認められなかった。

体重変動は Fig. 1 に示したように、平均体重の増加が 270 mg/kg 投与群で分娩 14, 16, 18, 21 日後に、

Table 1 Mean food and water consumptions by dams during gestation period

Compound	Control	Azthreonom		
		100	270	750
Dose (mg/kg)		100	270	750
No. of dams	20	20	20	20
Food (g/day)				
Day 1~4	22.7±2.1	22.4±2.2	22.0±1.7	22.5±1.7
4~7	22.4±2.1	22.7±2.4	22.3±1.8	23.0±1.9
7~10	24.1±2.0	23.7±2.5	23.5±2.4	23.9±1.9
10~13	24.2±1.9	24.4±2.0	24.2±1.9	24.2±1.5
13~17	24.2±1.8	24.0±1.6	24.5±1.8	25.0±1.5
17~20	24.6±2.3	22.2±2.7**	22.1±2.4**	18.5±3.6**
Water (ml/day)				
Day 2~3	42.8±8.2	40.2±7.9	41.8±7.5	45.3±8.4
5~6	39.5±6.1	39.4±7.8	41.2±7.5	41.0±11.1
8~9	40.4±4.3	41.1±7.6	42.9±7.6	42.1±6.7
11~12	45.8±6.4	45.0±7.8	45.0±6.4	50.8±9.8
14~15	43.7±5.3	43.0±6.3	44.2±6.0	44.8±7.2
18~19	43.8±11.0	46.5±8.1	52.8±6.6**	54.0±15.3*

Mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Table 2 Mean food and water consumptions by dams during lactation period

Compound	Control	Azthreonom		
		100	270	750
Dose (mg/kg)		100	270	750
No. of dams	20	20	20	19
Food (g/day)				
Day 1~4	34.1±4.6	37.2±12.2	36.9±4.4	38.1±6.2*
8~11	57.0±6.2	55.6±9.4	60.8±5.9	64.1±7.2**
Water (ml/day)				
Day 1~2	50.8±7.3	58.8±31.2	59.8±11.4**	70.0±12.9**
8~9	78.8±9.9	80.9±19.9	91.4±15.9**	104.2±17.8**

Mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

750 mg/kg 投与群で分娩 14, 16, 18 日後にそれぞれ対照群と比べて統計学的に有意にみられた。

各群の摂餌量, 摂水量の変動を Table 2 に示した。

750 mg/kg 投与群において分娩 1~4 日後および分娩 8~11 日後に対照群と比べて統計学的に有意な摂餌量の増加がみられ, 270 mg/kg 以上の検体投与各群において分娩 1~2 日後および分娩 8~9 日後に対照群と比べて統計学的に有意な摂水量の増加が認められた。

分娩 21 日後の母動物の剖検では 100 mg/kg 以上の検体投与各群で盲腸の重量増加がみられた。

2. 仔動物 (F1) に対する影響

Table 3 に示したように, 平均着床数, 平均妊娠期間, 平均出生数, 死亡率, 性比, 出生率, 生存率および離乳率に関しては, 対照群と検体投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。外形異常は対照群, 検体投与各群ともに 1 例もみられなかった。また, 出生時から剖検時までの一般症状についても対照群を含む全群で異常はみられなかった。F1 の内部臓器検査の結果, 腎盂拡張, 胸腺の鬱血, 精巣および精巣上体の萎縮と腎芽細胞腫がみられたが, 発現頻度が少なく, 明ら

Table 3 Observations of F0 with respect to the birth of F1

Compound	Control	Azthreonom		
		100	270	750
Dose (mg/kg)		100	270	750
No. of litters (F0)	20	20	20	19
No. of implantations				
Total	(295)	(289)	(298)	(287)
Mean \pm S.D.	14.8 \pm 2.5	14.4 \pm 2.6	14.9 \pm 1.6	15.1 \pm 2.9
Mean length of gestation period (Day)				
Mean \pm S.D.	21.8 \pm 0.4	21.8 \pm 0.4	21.8 \pm 0.4	21.8 \pm 0.5
No. of alive F1				
Postpartum day 0	(275)	(266)	(281)	(270)
Mean \pm S.D.	13.8 \pm 2.4	13.3 \pm 2.8	14.0 \pm 1.9	14.2 \pm 2.7
Postpartum day 1	(274)	(266)	(280)	(269)
Mean \pm S.D.	13.7 \pm 2.5	13.3 \pm 2.8	14.0 \pm 1.9	14.2 \pm 2.7
Postpartum day 4	(268)	(253)	(275)	(267)
Mean \pm S.D.	13.4 \pm 3.0	12.6 \pm 4.1	13.8 \pm 1.6	14.1 \pm 2.7
after selection	(192)	(183)	(200)	(186)
Mean \pm S.D.	9.6 \pm 1.2	9.1 \pm 2.3	10.0 \pm 0.0	9.8 \pm 0.7
Postpartum day 21	(192)	(183)	(194)	(181)
Mean \pm S.D.	9.6 \pm 1.2	9.1 \pm 2.3	9.7 \pm 1.1	9.5 \pm 1.1
Sex ratio of newborns (Male / Female)	146/129 (1.13)	131/135 (0.97)	141/140 (1.01)	130/140 (0.93)
Live birth index (A) (%)	93.2	92.0	94.3	94.1
Viability index (B) (%)	97.5	95.1	97.9	98.9
Weaning index (C) (%)	100.0	100.0	97.0	97.3
No. of F1 with malformation	0	0	0	0
Visceral examination				
No. of F1 examined	192	183	194	181
Dilatation of the renal pelvis (%)	0.5	1.6	4.6	2.2
Congestion of the thymus (%)	0.5	0.0	0.0	1.7
Atrophy of testis and epididymis (%)	0.0	1.1	0.0	0.0
Nephroblastoma (%)	0.0	0.5	0.0	0.0

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Significant difference from control (WILCOXON'S rank sum test)

(A) Live birth index (%) = No. of alive F1 at day 0 / No. of implantations \times 100

(B) Viability index (%) = No. of alive F1 at day 4 / No. of alive F1 at day 0 \times 100

(C) Weaning index (%) = No. of alive F1 at day 21 / No. of F1 at day 4 after selection \times 100

Table 4 Postnatal developments of F1

Compound		Control	Azthreonom		
Dose (mg/kg)			100	270	750
No. of litters (F0)		20	19	20	19
Separation of auricle (%)	Day 2	36.3	36.8	42.9	36.2
	3	91.4	87.7	81.8	78.7
	4	100.0	100.0	100.0	100.0
Appearance of abdominal hair (%)	Day 9	0.0	0.0	0.0	0.0
	10	13.0	24.6	12.4	11.0
	11	88.0	86.9	77.3	86.3
	12	100.0	100.0	98.5	98.9
	13	100.0	100.0	99.0	100.0
	14	100.0	100.0	99.0	100.0
Odontiasis (%)	Day 10	1.6	1.6	1.5	4.9
	11	30.2	38.3	40.7	26.9
	12	66.7	67.8	72.2	60.8
	13	95.8	93.4	95.4	90.6
	14	98.4	100.0	100.0	100.0
	15	100.0	100.0	100.0	100.0
Eyelids opening (%)	Day 13	0.0	1.6	0.0	0.6
	14	35.9	37.7	29.4	39.2
	15	86.5	92.9	85.1	94.5
	16	100.0	100.0	99.5	100.0
	17	100.0	100.0	100.0	100.0
Descent of testes (%)	Day 21	100.0	100.0	100.0	100.0
Vaginal opening (%)	Day 35	81.0	76.8	76.7	80.7
	42	100.0	98.2	100.0	100.0
	49	100.0	98.2	100.0	100.0
	56	100.0	98.2	100.0	100.0
	63	100.0	100.0	100.0	100.0

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Significant difference from control (WILCOXON's rank sum test)

かな用量相関性もないことから検体投与との関連はないと考えられた。

生後分化状態は Table 4 に示したように、対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差は認められなかった。

体重変動は Table 5, 6 に示したように、出生時から出生 84 日後まで対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差はみられなかった。

出生 21 日後の臓器の絶対重量は Table 7 に示したように検体投与の影響はみられなかった。出生 84 日後の臓器の絶対重量は Table 8 に示したように、100 mg/kg 以上の検体投与各群において雌雄ともに内容物を含まない盲腸（以下、盲腸（-））の重量増加が、270mg/kg 以上の検体投与各群の雌で内容物を含む盲腸（以下、

盲腸（+））の重量増加が対照群と比べて統計学的に有意にみられた。

出生 4 日後および 21 日後の骨格検査において検体投与の影響はみられなかった。

機能検査および行動検査の結果は Table 9 に示したように、対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差は認められなかった。

情動性検査の結果は Table 10 に示したように、対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差はみられなかった。

学習能力検査の結果は Table 11 に示したように、雄の回避率が雌に比べて低値を示した。また、270 mg/kg 投与群の雌において 1 日目に回避+逃避の減少が、750 mg/kg 投与群の雌において 5 日目に回避の減少がみら

Table 5 Mean body weight changes of F1 (male)

Compound		Control	Azthreonom		
Dose (mg/kg)			100	270	750
No. of litters (F0)		20	20	20	19
Body weight (g)	Day 0	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.5	6.1 ± 0.5	6.1 ± 0.6
	4	10.0 ± 1.1	10.2 ± 1.3	9.6 ± 1.4	9.6 ± 1.5
	7	16.3 ± 1.5	16.6 ± 1.3	15.9 ± 1.5	15.7 ± 2.1
	14	32.2 ± 3.1	32.3 ± 3.2	31.5 ± 1.8	32.1 ± 2.7
	21	51.6 ± 4.2	52.8 ± 4.9	51.7 ± 3.4	51.3 ± 4.7
	28	94 ± 8	94 ± 8	92 ± 7	92 ± 8
	35	154 ± 10	155 ± 12	151 ± 10	150 ± 13
	42	220 ± 13	220 ± 14	217 ± 13	215 ± 16
	49	280 ± 15	281 ± 15	278 ± 16	275 ± 19
	56	332 ± 17	331 ± 18	328 ± 16	324 ± 24
	63	369 ± 19	369 ± 17	366 ± 20	365 ± 19
	70	401 ± 23	403 ± 20	395 ± 24	399 ± 20
	77	430 ± 24	434 ± 22	427 ± 26	431 ± 22
	84	452 ± 28	456 ± 33	452 ± 28	452 ± 24

Mean ± S.D.

* P < 0.05, ** P < 0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P < 0.05, ++ P < 0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Table 6 Mean body weight changes of F1 (female)

Compound		Control	Azthreonom		
Dose (mg/kg)			100	270	750
No. of litters (F0)		20	20	20	19
Body weight (g)	Day 0	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.5
	4	9.5 ± 1.0	9.7 ± 1.3	9.3 ± 1.3	9.2 ± 1.4
	7	15.4 ± 1.3	15.9 ± 1.4	15.0 ± 2.0	14.9 ± 1.9
	14	30.8 ± 2.8	31.7 ± 3.1	30.1 ± 2.3	30.9 ± 2.5
	21	49.4 ± 3.6	50.9 ± 4.7	48.7 ± 4.1	49.3 ± 4.4
	28	83 ± 6	85 ± 7	82 ± 7	84 ± 6
	35	128 ± 9	130 ± 10	126 ± 10	129 ± 9
	42	166 ± 10	167 ± 10	165 ± 11	167 ± 10
	49	192 ± 11	194 ± 12	193 ± 12	194 ± 9
	56	217 ± 13	214 ± 17	217 ± 13	218 ± 10
	63	235 ± 15	234 ± 14	236 ± 14	237 ± 12
	70	249 ± 16	250 ± 14	249 ± 14	253 ± 15
	77	263 ± 16	260 ± 16	264 ± 15	266 ± 14
	84	275 ± 17	274 ± 14	276 ± 17	276 ± 16

Mean ± S.D.

* P < 0.05, ** P < 0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P < 0.05, ++ P < 0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Table 7 Mean absolute organ weights of 21 days old F1

Compound	Control	Azthreonam		
		100	270	750
Dose (mg/kg)				
Male No. of litters (F0)	20	16	19	18
Final body weight (g)	50.9 ± 4.3	51.5 ± 3.7	51.6 ± 4.2	51.3 ± 5.3
Carcass (g)	37.6 ± 3.1	37.6 ± 2.7	37.9 ± 2.6	38.0 ± 3.9
Heart (mg)	246 ± 25	255 ± 23	244 ± 23	260 ± 37
Lung (mg)	450 ± 28	455 ± 32	463 ± 44	462 ± 38
Liver (g)	1.92 ± 0.20	2.00 ± 0.17	1.99 ± 0.24	1.93 ± 0.28
Kidneys (mg)	558 ± 46	566 ± 45	559 ± 58	583 ± 79
Spleen (mg)	236 ± 40	252 ± 43	243 ± 39	241 ± 48
Testes (mg)	227 ± 27	218 ± 21	221 ± 29	225 ± 34
Caecum (+) (mg)	592 ± 131	604 ± 79	628 ± 87	621 ± 148
Caecum (-) (mg)	216 ± 40	228 ± 33	235 ± 31	229 ± 45
Female No. of litters (F0)	16	18	20	17
Final body weight (g)	49.6 ± 3.4	50.9 ± 4.7	48.4 ± 6.0	48.2 ± 3.6
Carcass (g)	36.7 ± 2.6	37.4 ± 3.5	35.8 ± 4.2	35.9 ± 2.8
Heart (mg)	240 ± 27	254 ± 22	235 ± 30	238 ± 31
Lung (mg)	436 ± 37	440 ± 27	434 ± 44	427 ± 39
Liver (g)	1.95 ± 0.17	2.00 ± 0.25	1.89 ± 0.30	1.84 ± 0.23
Kidneys (mg)	568 ± 46	574 ± 98	540 ± 76	559 ± 51
Spleen (mg)	249 ± 37	275 ± 87	231 ± 42	235 ± 37
Ovaries (mg)	13 ± 3	16 ± 5*	13 ± 4	15 ± 4
Caecum (+) (mg)	557 ± 64	594 ± 89	572 ± 156	569 ± 142
Caecum (-) (mg)	203 ± 19	228 ± 40*	210 ± 45	213 ± 44

Mean ± S.D.

* P < 0.05, ** P < 0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

* P < 0.05, ** P < 0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Caecum (+) : Caecum with contents

Caecum (-) : Caecum without contents

れたが、明確な用量相関性がないことから、雌雄ともに検体投与の影響はないと考えられた。

生殖能力の検査結果は Table 12 に示したように、交尾率、受精率、受胎率および出産率に関しては、対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差はみられなかった。

各群の F1 の胎仔の観察結果を Table 13 に示した。平均黄体数、非着床率、平均着床数、胎仔の死胚率および死亡時期、平均生存胎仔数、胎仔の性比、生存胎仔の体長、尾長、体重および胎盤重量については、対照群と検体投与各群との間に統計学的有意差は認められなかった。胎盤癒着が 100 mg/kg 投与群で 1 例にみられた。外形異常は全群で 1 例もみられなかった。

F2 の観察結果を Table 14 に示した。

平均着床数、平均妊娠期間、性比、出生率、生存率に

関しては、対照群と検体投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。出生 21 日後の平均生存仔数の減少が 750 mg/kg 投与群で対照群と比べて統計学的に有意にみられたが、離乳率に統計学的有意差は認められなかった。F2 の外形異常としては、100 mg/kg 投与群で無眼球 (Photo. 1) が 1 例にみられた。F2 の一般症状に関しては、対照群を含む全群で特記すべき異常はみられなかった。出生時から出生 21 日後までの体重変動では、対照群と検体投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

III. 考 察

モノバクタム系抗生物質である AZT をラットの周産期および授乳期に静脈内投与し、母動物ならびに新生仔に対する影響を検討した。

母動物に関しては、平均体重の増加が 270 mg/kg 投

Table 8 Mean absolute organ weights of 84 days old F1

Compound	Control	Azthreonom		
		100	270	750
Dose (mg/kg)				
No. of males	20	19	19	19
Final body weight (g)	440 ± 32	447 ± 39	438 ± 38	447 ± 35
Carcass (g)	345 ± 23	352 ± 30	341 ± 27	348 ± 24
Heart (mg)	1,395 ± 143	1,388 ± 135	1,362 ± 137	1,370 ± 109
Lung (mg)	1,437 ± 90	1,456 ± 124	1,451 ± 147	1,454 ± 163
Liver (g)	15.0 ± 1.6	14.8 ± 2.4	15.1 ± 1.8	15.4 ± 1.7
Kidneys (g)	2.99 ± 0.33	2.95 ± 0.25	2.93 ± 0.30	3.02 ± 0.29
Spleen (mg)	804 ± 138	851 ± 120	814 ± 118	806 ± 126
Adrenals (mg)	63 ± 10	64 ± 9	60 ± 7	61 ± 8
Thymus (mg)	431 ± 104	454 ± 88	441 ± 109	428 ± 74
Testes (g)	3.38 ± 0.23	3.23 ± 0.30	3.30 ± 0.26	3.36 ± 0.32
Epididymides (mg)	1,126 ± 91	1,112 ± 80	1,110 ± 72	1,110 ± 102
Prostate (mg)	591 ± 103	491 ± 98**	549 ± 93	569 ± 116
Caecum (+) (g)	5.9 ± 1.2	5.9 ± 1.3	6.2 ± 1.2	5.9 ± 0.8
Caecum (-) (g)	1.33 ± 0.21	1.50 ± 0.22*	1.59 ± 0.23**	1.51 ± 0.20*
No. of females	20	19	20	19
Final body weight (g)	268 ± 22	278 ± 23	271 ± 22	272 ± 16
Carcass (g)	213 ± 18	221 ± 18	214 ± 16	218 ± 13
Heart (mg)	913 ± 77	914 ± 120	858 ± 85*	889 ± 67
Lung (mg)	1,118 ± 99	1,164 ± 114	1,142 ± 129	1,111 ± 74
Liver (g)	9.0 ± 1.1	9.4 ± 1.4	9.2 ± 1.2	9.0 ± 0.8
Kidneys (g)	1.81 ± 0.19	1.90 ± 0.15	1.77 ± 0.15	1.82 ± 0.12
Spleen (mg)	626 ± 78	629 ± 126	617 ± 88	624 ± 92
Adrenals (mg)	69 ± 8	68 ± 10	66 ± 10	68 ± 9
Thymus (mg)	404 ± 90	440 ± 118	401 ± 60	435 ± 72
Ovaries (mg)	98 ± 16	99 ± 15	94 ± 21	93 ± 22
Uterus (mg)	447 ± 87	410 ± 87	415 ± 85	457 ± 82
Caecum (+) (g)	3.8 ± 0.7	4.1 ± 0.9	4.5 ± 1.0*	4.3 ± 0.8*
Caecum (-) (g)	0.92 ± 0.15	1.11 ± 0.19**	1.11 ± 0.23**	1.14 ± 0.21**

Mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Caecum (+): Caecum with contents

Caecum (-): Caecum without contents

与群および 750 mg/kg 投与群において分娩 14 日後から離乳時まで対照群に比べてみられた。摂餌量は、100 mg/kg 以上の検体投与各群において投与開始後に一過性に減少し、750 mg/kg 投与群において出産後に増加した。摂水量は、270 mg/kg 投与群および 750 mg/kg 投与群において投与開始時より増加がみられ、分娩後も高値を示した。分娩 21 日後の剖検においては、盲腸の重量増加が 100 mg/kg 以上の検体投与各群でみられた。ラットにおける亜急性毒性試験²⁾においても、本試験と同様に盲腸の重量増加が認められた。この盲腸の重量増加は抗生物質に共通な腸内細菌叢の変化に起因するもの^{13,14)}と考えられた。

750 mg/kg 投与群の 1 例で分娩遅延がみられ、妊娠 23 日に死亡した。この死亡例では、肝細胞の空胞化および腎尿管上皮細胞の空胞化が認められたほか、ストレス性の変化と判断される副腎皮質の肥大、胸腺および脾臓の白脾髄の退縮が認められた。肝細胞と腎尿管上皮細胞の空胞化は、ラットにおける亜急性毒性試験²⁾においても同様にみられ、その変化は検体の取り込みと貯留による変化と考えられた。

分娩時の観察においては、妊娠 23 日に死亡した 1 例を除き、妊娠期間に差はなく、分娩異常は認められなかった。また、出生率、生存率、離乳率に関しても検体投与の影響はみられなかった。

Table 9 Sense and behavior tests of F1

Compound	Control	Azthreonam		
		100	270	750
Dose (mg/kg)		100	270	750
No. of litters (F0)	20	19	20	19
Sense test				
No. of males examined	102	89	96	93
Corneal reflex (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Pain response (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Righting reflex (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of males examined	20	19	19	19
Light reflex (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of females examined	90	94	98	88
Corneal reflex (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Pain response (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Righting reflex (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of females examined	20	19	20	19
Light reflex (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Behavior test				
No. of males examined	20	19	19	19
Traction (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Rotating road (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Sliding angle (°)	46.7±3.8 ^a	45.4±4.6	45.7±4.5	44.3±3.8
No. of females examined	20	19	20	19
Traction (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Rotating road (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Sliding angle (°)	46.0±3.9 ^a	46.6±4.1	45.4±4.9	44.6±3.2

^a: Mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P<0.05, ++ P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

× P<0.05, ×× P<0.01 Significant difference from control (WILCOXON'S rank sum test)

Table 10 Open field tests of F1

Compound	Control	Azthreonam		
		100	270	750
Dose (mg/kg)		100	270	750
No. of males examined	20	17	19	18
Ambulation	44.3±26.7	41.4±23.5	38.2±27.7	35.0±17.9
Latency (sec)	39.3±20.5	42.1±23.7	38.1±19.5	45.4±24.5
Defecation	0.5± 1.2	0.9± 2.0	0.3± 0.9	0.1± 0.5
Urination	0.0± 0.2	0.1± 0.2	0.1± 0.2	0.1± 0.3
Rearing	5.6± 3.9	5.6± 4.9	4.7± 3.6	4.9± 4.5
Grooming	0.3± 0.6	0.4± 0.6	0.6± 0.8	0.3± 0.7
No. of females examined	18	18	20	19
Ambulation	53.9±27.5	46.7±27.8	55.3±23.7	46.4±19.1
Latency (sec)	38.8±23.1	46.7±20.1	33.9±15.2	34.1±18.1
Defecation	0.4± 1.0	0.2± 0.7	0.2± 0.9	0.3± 0.7
Urination	0.0± 0.0	0.1± 0.2	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Rearing	7.8± 5.6	5.8± 4.3	8.3± 5.0	6.5± 3.5
Grooming	0.4± 0.5	0.2± 0.4	0.6± 0.9	0.3± 0.7

Mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P<0.05, ++ P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Table 11 Avoidance response test of F1

Compound		Control	Azthreonam		
Dose (mg/kg)			100	270	750
No. of males examined		20	19	19	19
Avoidance + Escape (%)	Day 1	54.5±38.8	34.0±39.9	44.2±38.8	44.4±42.5
	2	97.5± 4.8	96.5± 6.5	98.6± 2.3	97.2± 4.5
	3	99.7± 1.0	97.7± 6.3	99.6± 1.5	99.8± 0.8
	4	99.2± 3.0	97.4± 3.1	99.3± 1.8	99.6± 1.5
	5	97.0± 8.1	99.3± 2.1	99.5± 1.2	98.8± 3.4
Avoidance (%)	Day 1	0.0± 0.0	0.5± 1.2	0.2± 0.8	0.5± 1.7
	2	1.7± 2.8	1.2± 2.3	3.0± 9.3	0.3± 1.0
	3	3.7± 6.9	2.1± 4.2	7.4±17.1	1.8± 3.0
	4	5.3± 8.8	1.9± 3.7	6.8±17.8	3.9± 8.0
	5	4.8± 8.6	3.9± 7.1	9.3±20.0	2.1± 5.1
No. of females examined		20	19	20	19
Avoidance + Escape (%)	Day 1	67.8±22.9	54.9±34.6	47.8±29.9*	62.1±28.5
	2	97.3± 7.6	86.5±26.1	96.2± 9.4	95.6± 8.7
	3	99.2± 2.1	99.1±11.7	99.2± 2.1	99.7± 1.0
	4	99.5± 1.2	99.5± 1.7	99.7± 1.0	100.0± 0.0
	5	99.8± 0.7	99.7± 1.0	99.0± 3.1	99.7± 1.0
Avoidance (%)	Day 1	1.2± 2.7	1.4± 3.9	1.8± 3.2	0.9± 1.9
	2	8.2±16.4	2.5± 4.4	6.3± 8.0	4.4± 5.9
	3	12.5±26.9	6.8±13.1	9.2±10.5	6.3± 9.3
	4	18.2±25.8	11.1±19.3	15.8±18.7	15.8±21.9
	5	23.2±26.3	12.1±23.7	19.0±21.0	9.1±12.9*

Mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P<0.05, ++ P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

Table 12 Copulation, insemination and fertility indices of F1

Compound	Control	Azthreonam		
Dose (mg/kg)		100	270	750
Copulation index Male (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Insemination index Male (%)	95.0	84.2	85.0	94.7
Copulation index Female (%)	95.0	100.0	95.0	100.0
Fertility index Female (%)	94.7	84.2	84.2	94.7
Delivery rate (%)	100.0	100.0	100.0	100.0

^ P<0.05, ^^ P<0.01 Significant difference from control (CHI-SQUARE test)

Copulation index (%) = No. of animals copulated/No. of animals paired × 100

Insemination index (%) = No. of males inseminated/No. of males copulated × 100

Fertility index (%) = No. of females fertilized/No. of females copulated × 100

Delivery rate (%) = No. of females delivered alive F1/No. of females fertilized × 100

Photo. 1 Anophthalmia (21 days old F2, 100 mg/kg, ×40, H. E. stain)

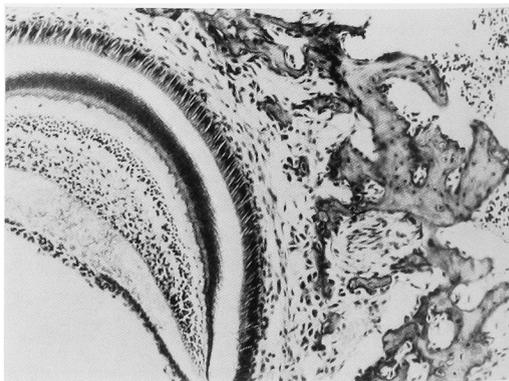


Table 13 Observations of fetuses from F1 dams

Compound	Control	Azthreanam		
Dose (mg/kg)		100	270	750
No. of dams (F1)	11	9	10	11
No. of corpora lutea				
Total	(179)	(140)	(158)	(171)
Mean \pm S.D.	16.3 \pm 2.2	15.6 \pm 2.1	15.8 \pm 2.3	15.5 \pm 3.0
Preimplantation loss (%)	18/179 (10.1)	9/140 (6.4)	14/158 (8.9)	27/171 (15.8)
No. of implantations				
Total	(161)	(131)	(144)	(144)
Mean \pm S.D.	14.6 \pm 1.6	14.6 \pm 2.7	14.4 \pm 2.1	13.1 \pm 2.6
No. of dead implantations				
Resorptions (%)	8/161 (5.0)	2/131 (1.5)	2/144 (1.4)	2/144 (1.4)
Placental remnants (%)	0/161 (0.0)	0/131 (0.0)	0/144 (0.0)	2/144 (1.4)
Macerated fetuses (%)	0/161 (0.0)	0/131 (0.0)	0/144 (0.0)	0/144 (0.0)
Dead fetuses (%)	0/161 (0.0)	0/131 (0.0)	0/144 (0.0)	0/144 (0.0)
Total dead implantations (%)	8/161 (5.0)	2/131 (1.5)	2/144 (1.4)	4/144 (2.8)
No. of live fetuses (F2)				
Total	(153)	(129)	(142)	(140)
Mean \pm S.D.	13.9 \pm 1.9	14.3 \pm 2.4	14.2 \pm 2.0	12.7 \pm 2.8
Sex ratio (Male / Female)	71/82 (0.87)	59/70 (0.84)	65/77 (0.84)	76/64 (1.19)
Body length (mm)				
Male Mean \pm S.D.	38.3 \pm 0.9	38.2 \pm 0.7	38.9 \pm 0.7	38.9 \pm 0.9
Female Mean \pm S.D.	37.6 \pm 1.0	37.5 \pm 0.6	38.1 \pm 0.6	38.2 \pm 1.2
Tail length (mm)				
Male Mean \pm S.D.	13.7 \pm 0.5	13.2 \pm 0.6	14.0 \pm 0.6	13.6 \pm 0.7
Female Mean \pm S.D.	13.6 \pm 0.5	13.1 \pm 0.6	13.8 \pm 0.5	13.5 \pm 0.8
Body weight (g)				
Male Mean \pm S.D.	3.69 \pm 0.25	3.67 \pm 0.14	3.77 \pm 0.19	3.85 \pm 0.31
Female Mean \pm S.D.	3.49 \pm 0.28	3.52 \pm 0.11	3.51 \pm 0.17	3.60 \pm 0.34
Placental weight (mg)				
Male Mean \pm S.D.	498 \pm 41	478 \pm 74	475 \pm 64	511 \pm 58
Female Mean \pm S.D.	472 \pm 36	461 \pm 75	453 \pm 54	499 \pm 70
Adhesion of placenta	0	1	0	0
No. of fetuses with malformations (F2)	0	0	0	0

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

+ P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (WILCOXON'S rank sum test)

Table 14 Observations of F2

Compound	Control	Azthreonom		
		100	270	750
Dose (mg/kg)				
No. of litters (F1)	7	7	6	7
No. of implantations				
Total	(105)	(110)	(90)	(98)
Mean \pm S.D.	15.0 \pm 0.8	15.7 \pm 1.1	15.0 \pm 2.6	14.0 \pm 2.2
Mean length of gestation period (Day)	21.7 \pm 0.5	21.9 \pm 0.4	22.0 \pm 0.0	21.9 \pm 0.4
No. of alive F2				
Postpartum day 0	(93)	(99)	(79)	(93)
Mean \pm S.D.	13.3 \pm 2.4	14.1 \pm 1.6	13.2 \pm 2.6	13.3 \pm 2.1
Postpartum day 1	(93)	(99)	(70)	(93)
Mean \pm S.D.	13.3 \pm 2.4	14.1 \pm 1.6	11.7 \pm 4.2	13.3 \pm 2.1
Postpartum day 4	(92)	(99)	(69)	(92)
Mean \pm S.D.	13.1 \pm 2.2	14.1 \pm 1.6	11.5 \pm 4.1	13.1 \pm 2.1
after selection	(70)	(70)	(53)	(70)
Mean \pm S.D.	10.0 \pm 0.0	10.0 \pm 0.0	8.8 \pm 2.0	10.0 \pm 0.0
Postpartum day 21	(70)	(69)	(49)	(65)
Mean \pm S.D.	10.0 \pm 0.0	9.9 \pm 0.4	8.2 \pm 1.8	9.3 \pm 0.8*
Sex ratio of newborns (Male / Female)	50/43 (1.16)	49/50 (0.98)	34/45 (0.76)	51/42 (1.21)
Live birth index (A) (%)	88.6	90.0	87.8	94.9
Viability index (B) (%)	98.9	100.0	87.3	98.9
Weaning index (C) (%)	100.0	98.6	92.5	92.9
No. of F2 with malformation Type and No.				
Anophthalmia	0	1	0	0
Body weight (g)				
Male Day 0	6.1 \pm 0.6 ^a	6.2 \pm 0.5	6.0 \pm 0.7	6.4 \pm 0.5
21	47.8 \pm 4.2 ^a	49.6 \pm 3.7	50.4 \pm 5.4	51.4 \pm 4.8
Female Day 0	5.7 \pm 0.4 ^a	5.8 \pm 0.3	5.4 \pm 0.7	6.0 \pm 0.5
21	45.8 \pm 2.6 ^a	47.3 \pm 2.9	48.4 \pm 6.4	49.9 \pm 4.9

^a Mean \pm S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (STUDENT'S t-test)

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (ASPIN-WELCH'S t-test)

* P<0.05, ** P<0.01 Significant difference from control (WILCOXON'S rank sum test)

(A) Live birth index (%) = No. of alive F2 at day 0 / No. of implantations \times 100

(B) Viability index (%) = No. of alive F2 at day 4 / No. of alive F2 at day 0 \times 100

(C) Weaning index (%) = No. of alive F2 at day 21 / No. of F2 at day 4 after selection \times 100

F1の体重、生後分化状態、出生21日後の臓器重量に検体投与によると思われる変動は認められなかった。出生84日後の臓器重量に関しては、100 mg/kg以上の検体投与各群において雌雄ともに盲腸の重量増加がみられた。盲腸の重量増加は、乳汁を介してF1に摂取されたAZTによる腸内細菌叢の変化に伴う所見の可能性も考えられるが、盲腸の重量増加は出生21日後には認められないこと、明確な用量相関性がないことから検体投与の影響とは考えにくい。

F1の機能、行動、情動性および学習能力の検査においては、検体投与によると考えられる変動は認められなかった。また、F1の交尾率、受胎率、F1の胎仔およびF2の観察においても検体投与の影響はみられなかった。

以上のように、本実験条件下においては、AZTの無影響量は、母動物では一過性の摂餌量の減少および盲腸重量の増加がみられたが100 mg/kg、次世代では750 mg/kgと推察された。

(試験期間：昭和57年10月～昭和59年3月)

文 献

- 1) 根田公一, 奥田香織, 仲吉 洋: Azthreonam の安全性研究 (第1報) マウスおよびラットにおける急性毒性試験。Chemotherapy 33 (S-1): 143~148, 1985
- 2) 川崎 一, 三好幸二, 野村 章, 宇田文昭, 平尾地恵見, 仲吉 洋: Azthreonam の安全性研究 (第2報) ラットにおける静脈内投与による亜急性毒性試験。Chemotherapy 33 (S-1): 149~168, 1985
- 3) 川崎 一, 三好幸二, 野村 章, 宇田文昭, 丹羽卓朗, 平尾地恵見, 仲吉 洋: Azthreonam の安全性研究 (第3報) ラットにおける皮下投与による亜急性毒性試験。Chemotherapy 33 (S-1): 169~189, 1985
- 4) 古橋忠和, 加藤育雄, 五十嵐裕子, 仲吉 洋: Azthreonam の安全性研究 (第4報) ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験。Chemotherapy 33 (S-1): 190~202, 1985
- 5) 古橋忠和, 牛田和夫, 佐藤久美子, 仲吉 洋: Azthreonam の安全性研究 (第5報) ラットにおける器官形成期投与試験。Chemotherapy 33 (S-1): 203~218, 1985
- 6) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1: 123~124, 1926
- 7) 真島英信 編: 生理学, VII. 中枢神経系, 150頁, 文光堂, 1956
- 8) 高木敬次郎, 小沢 充 編: 薬物学実験, I. 中枢神経系の薬理, 49~76頁, 南山堂, 1960
- 9) 浅見幸男, 犬飼利也, 大塚 勝, 本間健次, 柳義和, 北川純男: 新規 Benzodiazepine 系化合物 Nimetazepam (S-1530) の中枢作用。応用薬理 7 (5): 705~722, 1973
- 10) HALL, C. S.: Emotional behavior in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol. 18: 385~403, 1975
- 11) 野村 章, 古橋忠和, 小室恵美子, 上原正己, 三好幸二, 仲吉 洋: Netilmicin の催奇形性ならびに生殖におよぼす影響に関する研究 (1) ラット器官形成期筋肉内投与試験。Jap. J. Antibiotics 35: 614~629, 1982
- 12) ウィルコクソン, ウィルコックス, 佐久間昭 訳: 簡易統計手法, 日本レダリー (東京), 1969
- 13) 今井章浩: マウスの盲腸内細菌叢と盲腸内容の揮発性脂肪酸組成におよぼす各種抗生物質投与の影響。Chemotherapy 26: 345~350, 1978
- 14) 村上 宏: ペニシリン投与ラットの盲腸拡張機構。無菌生物 2: 62, 1972

TOXICITY STUDY ON AZTHREONAM (6)

PERINATAL AND POSTNATAL STUDY IN RATS

TADAKAZU FURUHASHI, KAZUO USHIDA, AKIKO TAKEI and HIROSHI NAKAYOSHI
NRI Life Science

Perinatal and postnatal study on Azthreonam (AZT), a newly developed monobactam antibiotic, was conducted by intravenous injection in Sprague-Dawley rats. AZT was administered to female rats from day 17 of gestation throughout day 20 after delivery.

Body weight gain was decreased from day 14 of lactation until weaning in dams (270 mg/kg or more). Food intake showed a transient decrease after administration (100 mg/kg or more) and an increase after delivery (750 mg/kg). Water intake increased after administration (270 mg/kg or more). An animal in the 750mg/kg group showed a delayed delivery and died on day 23 of gestation. This animal presented vacuolation of hepatocytes and tubular epithelium. At necropsy on day 21 of lactation, the increase in weight of caecum (all administration groups) was observed.

No changes were observed as to live birth index, viability index, weaning index, sex ratio, body weight, postnatal physical developments, external, visceral and skeletal malformations, organ weights at the age of 21 and 84 days, functional developments, behavioral developments, emotional activity, learning ability and reproductive performance.

Thus, the maximum no-effect dose level of AZT in the next generation in the present study, was estimated to be 750 mg/kg.