

TE-031の生殖試験(第2報) ラットにおける器官形成期投与試験

山田 隆・大沢浩一・中根貞雄
大正製薬株式会社総合研究所

Slc: Wistar 系ラットの器官形成期に TE-031 の 10, 40 および 160 mg/kg を経口投与し, 母獣ならびに胎仔・産仔に及ぼす影響を検討した。

1. TE-031 は 160 mg/kg の投与量で母獣に体重増加抑制と胎仔に軽度な死亡数増加, 体重低下および骨化遅延を起こした。

2. TE-031 は 160 mg/kg の投与で出産仔(F₁)の体重を一時的に抑制したが, 出産仔(F₁)および次々世代仔(F₂)の行動・発達に影響を与えなかった。

3. TE-031 はラットの器官形成期投与において, 催奇形作用を示さず, 無影響量は 40 mg/kg であると考えられた。

TE-031 は大正製薬株式会社で開発された新規マクロライド系抗生物質である。

本薬物の生殖試験については, すでにラットにおける妊娠前・妊娠初期投与試験¹⁾を実施し, 報告した。

今回は, TE-031 をラットの器官形成期に経口投与し, 母獣ならびに胎仔・産仔に及ぼす影響について検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 被験薬物

TE-031, (-)-(3R, 4S, 5S, 6R, 7R, 9R, 11R, 12R, 13S, 14R)-4-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-14-ethyl-12,13-dihydroxy-7-methoxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-[[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]oxacyclotetradecane-2,10-dione は, Fig. 1 に示す化学構造を有する白色無臭結晶性粉末で, chloroform に溶けやすく, acetone にやや溶けやすく, methanol, ethanol, ethyl ether および acetonitrile に溶けにくく, 水にはほとんど溶けない。

2. 使用動物および飼育条件

動物は Wistar 系ラット(静岡県実験動物農業協同組合)で未経産雌10週齢(体重: 130~160 g)および雄11週齢(体重: 235~270 g)を購入し, 2週間の予備飼育後実験に使用した。飼育は, 木屑敷プラスチックケージに動物を収容し, 温度21~25℃, 湿度26~81%, 照明時間12時間, 換気回数15~20回/時間の空調動物舎で固型飼料(オリエンタル酵母社製: MF)および殺菌水を自由に摂取させる方法で行った。

妊娠動物を得るために, 雌雄を2対1の割合で昼夜同

居させ, 翌朝, 膈内に精子の認められた雌を妊娠動物として選び, その日を妊娠0日と定め, 用いた。

妊娠動物は平均体重が等しくなるように群分けし, 1群38~44匹を試験に供した。

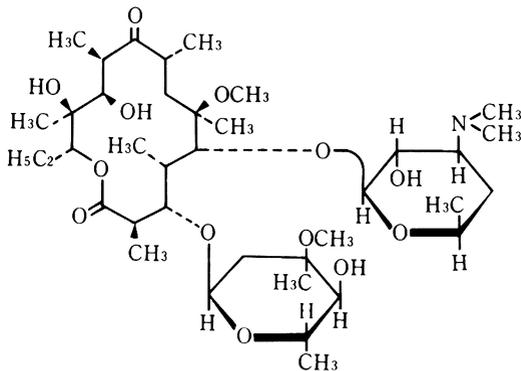
3. 投与量および投与方法

先に行われた妊娠前・妊娠初期投与試験¹⁾の成績を参考に30, 100および300 mg/kg 投与量による予試験を行った。その結果, 300 mg/kg 投与量において, 母獣に体重増加の抑制ならびにその胎仔に死亡率の増加, 体重の減少および2例の外表面異常(3.2%)が認められた(Fig. 2, Table 1)。しかし, 100 mg/kg では影響は認められなかった。

以上より, 本試験における最高投与量を100 mg/kg と300 mg/kg の中間量の160 mg/kg に選び, 以下40および10 mg/kg(推定臨床用量)を設定した(公比4)。

TE-031は5%アラビアゴム懸濁液として, 体重1 kg

Fig. 1 Chemical structure of TE-031



当たり 5 ml の割合で 1 日 1 回 (1:00~3:00p.m.) 胃ゾンデを用い、強制経口投与した。なお、5%アラビアゴム溶液 (5 ml/kg) のみを投与した群を設け、対照群とした。

4. 投与期間

妊娠 7 日より妊娠 17 日までの 11 日間連日投与した。

5. 検査方法

1) 母獣 (F₀)

母獣は症状を毎日観察し、体重を妊娠 0, 3, 7~18, 20 日、分娩後 0, 7, 14, 21 日、摂餌量を妊娠 3, 8, 12, 17, 20 日に測定した。妊娠 20 日に約 2/3 例は頸椎脱臼により屠殺し、胸腹部内器官の肉眼的観察および子宮内状態を調べた。残りの約 1/3 例は自然分娩させ、妊娠日数、分娩状態、出産率 (生仔出産雌数/妊娠雌数×100)、哺育状態を調べ、分娩後 21 日には屠殺し、器官の肉眼的観察、着床痕数の測定を行った²⁾。

2) 胎仔 (F₁)

妊娠 20 日の子宮内の胎仔 (F₁) について生存および死亡数を調べ、死亡仔はその形状により吸収、初期 (吸収胚よりやや大きい褐色塊)、中期 (初期と後期の中間的形状、頭部・四肢をかりうじて判別できるもの) および後期 (頭部・四肢が完全に判別できるもの) 死亡に分類した。生

存胎仔は外表検査、パイアビリティー (摘出 10 分後の常温下における四肢の動きおよび鳴き声の有無) 観察、性別判定および体重測定を行った後、1 母獣当たり雌雄各 1~2 匹ずつを選び bouin 液に固定し、残りは 70% ethanol に固定した。

Bouin 液に固定した胎仔は WILSON³⁾ (粗大切片法)、BARROW⁴⁾ および西村ら⁵⁾ (顕微解剖法) の方法に従い頭・胸・腹部の諸器官について異常の有無を調べた。

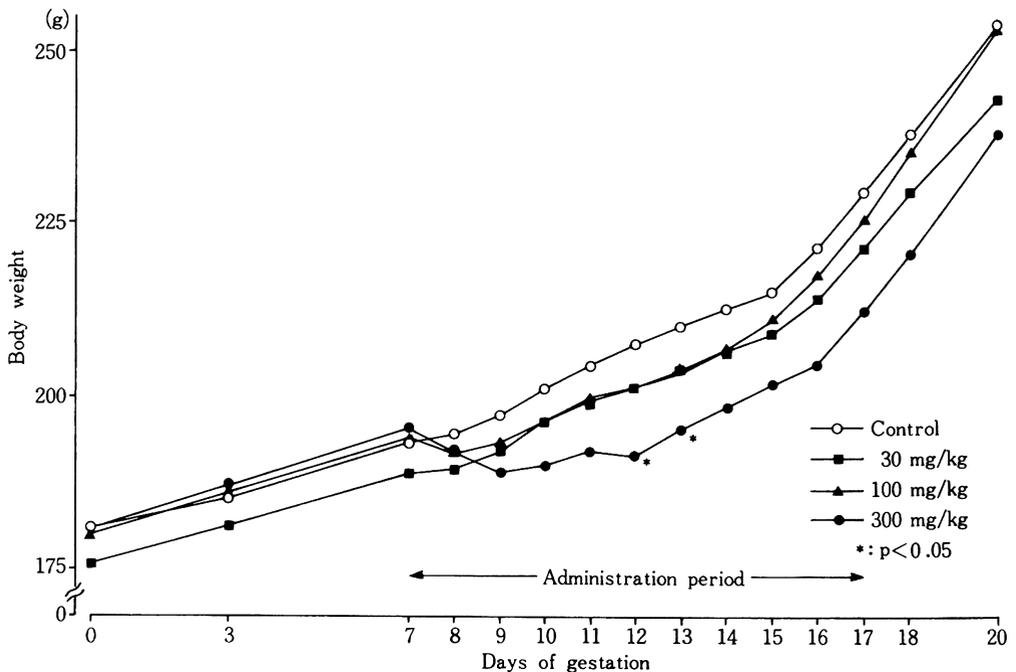
Ethanol 固定した胎仔は、DAWSON⁶⁾ の方法に準じ alizarin red S 染色により骨格標本を作製し、骨格異常、骨格変異の有無および骨化状態を調べた。外表、内部器官および骨格の観察には、いずれも実体顕微鏡を用いた。

3) 産仔 (F₁)

出産仔 (F₁) は生死数、性別、外表を調べた後、一般状態および外表分化状態 (耳介開展日、発毛日、歯芽萌出日、眼瞼開裂日、精巢下降日、陰開口日) について毎日観察し、体重を全生存仔について、生後 0, 4, 7, 14 および 21 日に、また、21 日以降は生殖能検査に供した産仔についてのみ 1 週毎に 8 週齢まで測定した。

生後 4 日齢時には、1 母獣当たり産仔が 8 匹を越える場合についてのみ 8 匹になるように調整し、その後は難

Fig. 2 Body weight changes in dams (Preliminary examination)



乳(生後21日)まで母獣に哺育させた。生存率については生後4日(生後4日の生仔数/出産生仔数×100)および生後21日(生後21日の生仔数/生後4日の調整直後の生仔数×100)にそれぞれ算出した。

生後21日には、原則として1母獣当たり雌雄各2匹を残し剖検した。剖検仔(44~45匹/群)については胸腹部内器官の肉眼的観察および軟X線撮影(ソフテックス社:CMB-2型)による骨格検査を行った。

生後21日に剖検しなかった残りの出産仔のうち、1母獣当たり雌雄各1匹(雄:11~12匹/群, 雌:11~12匹/群)を選び、行動・感覚機能検査および学習能・情動性検査を行った。検査は4週齢時にはFox⁷⁾, IRWIN⁸⁾お

びALTMAN⁹⁾の方法に準じ、正向・耳介・音・角膜・光・痛覚反射および平衡感覚を、5週齢時には傾斜板(シナノ製作所:SN-463型)で筋力を調べた。また、7週齢時にはSCHAPIRO¹⁰⁾の方法により遊泳試験による運動協調性を調べた後、水迷路装置 Water-filled-multiple T-maze(室町機械:WM-01型, 縦・横各120 cm, 深さ20 cm, 水温23~25℃)により学習能を検索した¹¹⁾。更に、8週齢時にはPassive avoidance response(P.A.R. 自社製)装置により、学習能ならびに情動性の検索を行った¹²⁾。

上記の各検査に用いなかった残りの出産仔について、10週齢以降に1母獣当たり雌雄各1匹(雄:11~12匹/群,

Table 1 Findings in dams <F₀> and fetuses <F₁> at term
(Preliminary examination)

Group	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of dams (F ₀)	7	7	10	8
No. of implantation sites	65	61	108	80
Implantation sites per litter	9.3 ± 2.4	8.7 ± 2.7	10.8 ± 2.3	10.0 ± 2.1
No. of dead fetuses (%) ^①	3 [3] 4.6	5 [4] 8.2	4 [4] 3.7	17 [6] 21.3
Resorption	3 [3]	3 [3]	1 [1]	4 [4]
Early death	0 [0]	2 [2]	3 [3]	12*[6]
Middle death	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Late death	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
No. of live fetuses	62	56	104	63
Fetuses per litter	8.9 ± 2.6	8.0 ± 2.7	10.4 ± 2.5	7.9 ± 1.8
Sex ratio (Male/Female)	1.00 (31/31)	0.93 (27/29)	1.42 (61/43)	1.03 (32/31)
Body weight (g)				
Male	3.25 ± 0.18	3.27 ± 0.12	3.12 ± 0.11	2.85 ± 0.17**
Female	3.00 ± 0.20	3.03 ± 0.14	2.98 ± 0.11	2.63 ± 0.21**
Male+Female	3.11 ± 0.18	3.12 ± 0.10	3.05 ± 0.10	2.75 ± 0.14**
External anomalies (%) ^②	0 [0] 0.0	0 [0] 0.0	0 [0] 0.0	2 ^μ [2] 3.2

Mean ± S.D.

[] : No. of dams involved with case

① : (No. of resorbed and dead fetuses/No. of implantation sites)×100

② : (No. of fetuses with external anomalies/No. of live fetuses)×100

^μ : Micromelia and oligosyndactylia

* : p<0.05

** : p<0.01

雌:11~12匹/群)を用いて生殖能検査を行った。検査は兄妹を避け、3週間の交配を行い、交尾率(交尾動物数/同居動物数×100)、受胎率(妊娠動物数/交尾動物数×100)、妊娠の成立した雌については自然分娩させ、出産率の算出、分娩および哺育状態を観察した後屠殺し、着床痕数の測定を行った。産仔(F₂)は、生死数、性別および外表を調べ、生後21日まで毎日一般状態を観察し、生後0, 4, 21日に体重を測定した後屠殺した。なお、F₁産仔同様、生後4日齢時には1母獣当たり8匹のように調整した。

6. 統計処理

得られたデータについて多重比較検定を実施した。平均値については、Bartlett法による等分散検定を行い、等分散の場合には、一元配置分散分析を経てDunnettあるいはScheffe検定、不等分散の場合にはKruskal-Wallis(H)検定を経て、Mann-Whitney(U)検定を行った。出現率および百分率については、順位尺度変数の場合には、H検定を経てU検定、類別尺度変数の場合には累 χ^2 検定を経て2×2 χ^2 検定あるいはFisherの直接確率法で行った。統計学的有意性はいずれも危険率5%および1%で検討した。なお、胎仔・産仔に関しては、性比を

除きすべて腹単位とした。

II. 実験結果

1. 母獣(F₀)に及ぼす影響

1) 一般状態

対照群およびいずれの投与群にも異常は観察されず、死亡例も認められなかった。

2) 体重

妊娠中および分娩後の体重変動をFig. 3に示した。160 mg/kg群において妊娠11, 12, 13, 15, 16, 17, 18および20日に対照群と比べ有意な増加抑制が認められた。

3) 摂餌量

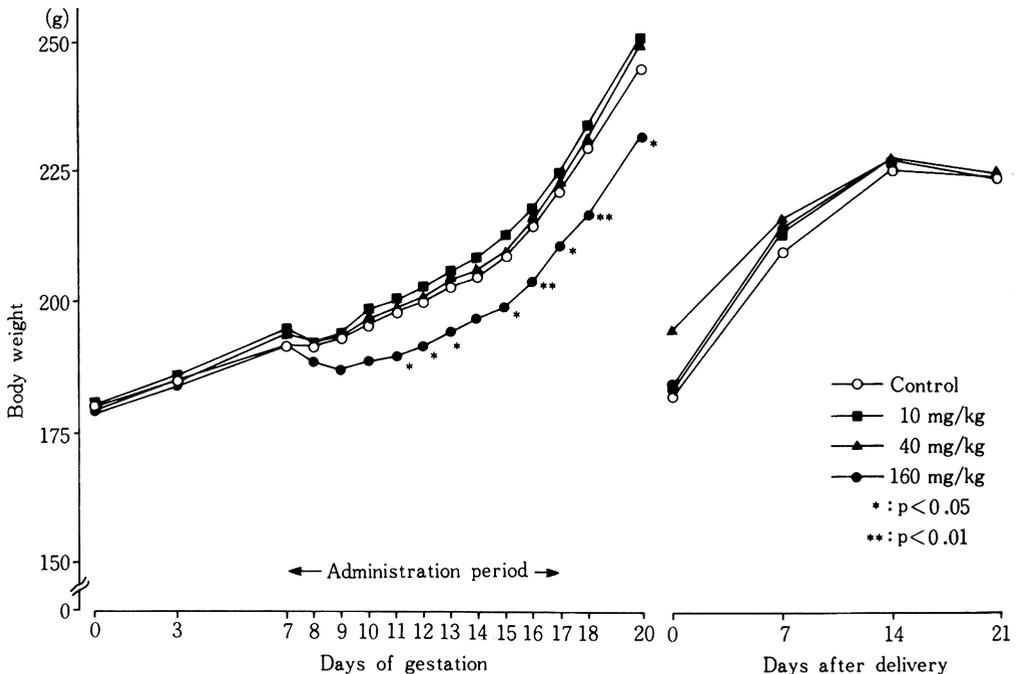
摂餌量をFig. 4に示した。160 mg/kg群において、対照群と比較し妊娠8および12日に有意な減少が、また、10, 40 mg/kg群の妊娠17および20, ならびに160 mg/kg群の妊娠20日に有意な増加が認められた。

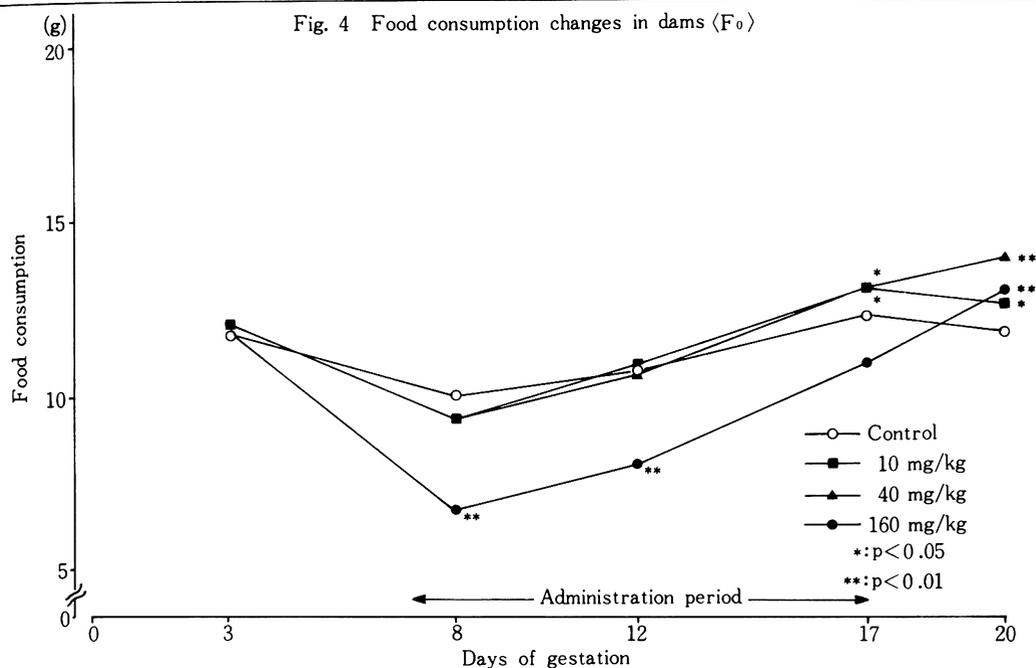
4) 妊娠末期および哺育終了時剖検所見

両剖検において、対照群およびいずれの投与群においても子宮内状態ならびに器官に肉眼的な異常は観察されなかった。

5) 分娩および哺育所見

Fig. 3 Body weight changes in dams (F₀)



Table 2 Findings in dams (F₀) and offspring (F₁) after delivery

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	12	12	12	12
Gestation period (day)	21.9 ± 0.3	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0
No. of implantation traces	131	136	126	128
Implantation traces per litter	10.9 ± 2.2	11.3 ± 1.0	10.5 ± 2.1	10.7 ± 2.1
Delivery rate (%) ^①	100.0 (12/ 12)	100.0 (12/ 12)	100.0 (12/ 12)	100.0 (12/ 12)
No. of newborns	127	129	118	123
Newborns per litter	10.6 ± 2.5	10.8 ± 1.2	9.8 ± 2.1	10.3 ± 2.2
No. of live newborns	127	129	118	121
Live newborns per litter	10.6 ± 2.5	10.8 ± 1.2	9.8 ± 2.1	10.1 ± 2.1
Birth rate (%) ^②	96.9 (127/131)	94.9 (129/136)	93.7 (118/126)	94.5 (121/128)
Sex ratio (Male/Female)	0.90(60/ 67)	0.84(59/ 70)	0.87(55/ 63)	0.81(54/ 67)
No. of stillborn	0 [0]	0 [0]	0 [0]	2 [2]
No. of external anomalies	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Survival rate (%) ^③				
On day 4	92.1 (117/127)	90.7 (117/129)	99.2 (117/118)	94.3 (116/121)
On day 21	97.8 (90/ 92)	100.0 (88/ 88)	100.0 (92/ 92)	100.0 (92/ 92)

Mean ± S.D.

[] : No. of dams involved with case

① : (No. of animals delivered with live newborns/No. of pregnant animals)×100

② : (No. of live newborns/No. of implantation traces)×100

③ : On day 4; (No. of live offspring on day 4/No. of live newborns)×100

On day 21; (No. of live offspring on day 21/No. of live offspring after selection on day 4)×100

分娩母獣の所見を Tabel 2の一部に示した。母獣の全てに分娩時の異常および出産率の低下は認められなかった。哺育観察では、10 mg/kg 群に1/12例の哺育放棄の母獣がみられたが、40および160 mg/kg 群ではいずれの母獣も対照群と同様、全例出産仔を哺育した。

2. 胎仔(F₁)に及ぼす影響

1) 胎仔所見

胎仔所見を Table 3に示した。対照群に比べ、いずれの投与群においても着床数、生存胎仔数、性比、パイアピリティーに著変は認められなかったが、160 mg/kg 群で死亡胎仔数(吸収)に増加傾向と胎仔体重に低下傾向が

みられた。外表異常仔は観察されなかった。

2) 内部器官検査

Bouin 固定胎仔の内部器官の検査結果を Table 3に示した。10 mg/kg 群において片側無眼球が¹1/86例、右鎖骨下動脈起始異常1/86例、160 mg/kg 群において奇静脈遺残が¹1/74例、精巢転位が²2/74例観察された。しかし、これらの出現率は、いずれも対照群に比べ有意なものではなかった。

3) 骨格検査

胎仔の骨格検査のうち異常および変異に関する観察結果を Table 4-1に示した。対照群を含む各群に骨格異常

Table 3 Findings in dams <F₀> and fetuses <F₁> at term

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	32	26	30	28
No. of implantation sites	309	277	310	277
Implantation sites per litter	9.7 ± 2.4	10.7 ± 3.1	10.3 ± 2.2	9.9 ± 2.8
No. of dead fetuses (%) ^①	24 [12] 7.8	14 [9] 5.1	14 [11] 4.5	47 [11] 17.0
Resorption	18 [8]	12 [8]	8 [7]	29 [9]
Early death	5 [4]	2 [1]	6 [4]	17 [3]
Middle death	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Late death	1 [1]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
No. of live fetuses ^②	285	263	296	230
Fetuses per litter	8.9 ± 2.7	10.1 ± 2.9	9.9 ± 2.3	8.2 ± 4.3
Sex ratio (Male/Female)	0.88(133/152)	1.05(135/128)	0.93(143/153)	1.19(125/105)
Body weight (g)				
Male	3.26 ± 0.15	3.24 ± 0.10	3.20 ± 0.17	3.10 ± 0.29
Female	3.04 ± 0.16	2.99 ± 0.14	3.00 ± 0.20	2.89 ± 0.31
Male+Female	3.14 ± 0.13	3.12 ± 0.10	3.10 ± 0.17	3.01 ± 0.29
External anomalies	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Visceral anomalies (%) ^③	0 [0] 0	2 ^a [2] 2.3	0 [0] 0	3 ^b [2] 4.1

Mean ± S.D.

[] : No. of dams involved with case

① : (No. of resorbed and dead fetuses/No. of implantation sites)×100

② : Viability; live fetuses were normal in all the groups

③ : (Total fetuses with abnormalities/No. of fetuses observed)×100

^a : Unilateral anophthalmia (1) ; Abnormality of origin of the right subclavian artery (1)

^b : Persistent right azygos vein (1) ; Undescended testis (2)

Table 4-1 Skeletal observations of fetuses <F₁>

【Abnormalities and variations】

Groups	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	32	26	30	24
No. of fetuses examined (F ₁)	193	177	198	156
Abnormalities				
Fused vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Deformed vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Fused vertebral arches	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Deformed vertebral arches	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Fused sternbrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Fused ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Wavy ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Absent ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Knobbed ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Others	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Total	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
(%) ^①	0	0	0	0
Variations				
Bilobed vertebral centers	6 [5]	9 [8]	10 [7]	14 [10]
Split vertebral centers	6 [6]	2 [2]	6 [6]	11 [7]
Bifurcate vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Split cervical vertebral arches	2 [2]	0 [0]	2 [1]	5 [4]
Bifurcate cervical vertebral arches	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Split lumbar vertebral arches	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Extra lumbar vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Rudimentary lumbar vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Split sternbrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Asymmetric sternbrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Accessory sternbrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Dislocated sternbrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Cervical ribs	0 [0]	3 [3]	0 [0]	0 [0]
Lumbar ribs	18 [16]	12 [9]	12 [9]	7 [5]
Short ribs	1 [1]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Others	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Total	28 [19]	24 [17]	30 [17]	30 [14]
(%) ^②	14.5	13.6	15.2	19.2

[] : No. of dams involved with case

① : (Total fetuses with abnormalities/No. of fetuses observed)×100

② : (Total fetuses with variations/No. of fetuses observed)×100

Table 4-2 Skeletal observations of fetuses <math>\langle F_1 \rangle</math>

【Ossification】

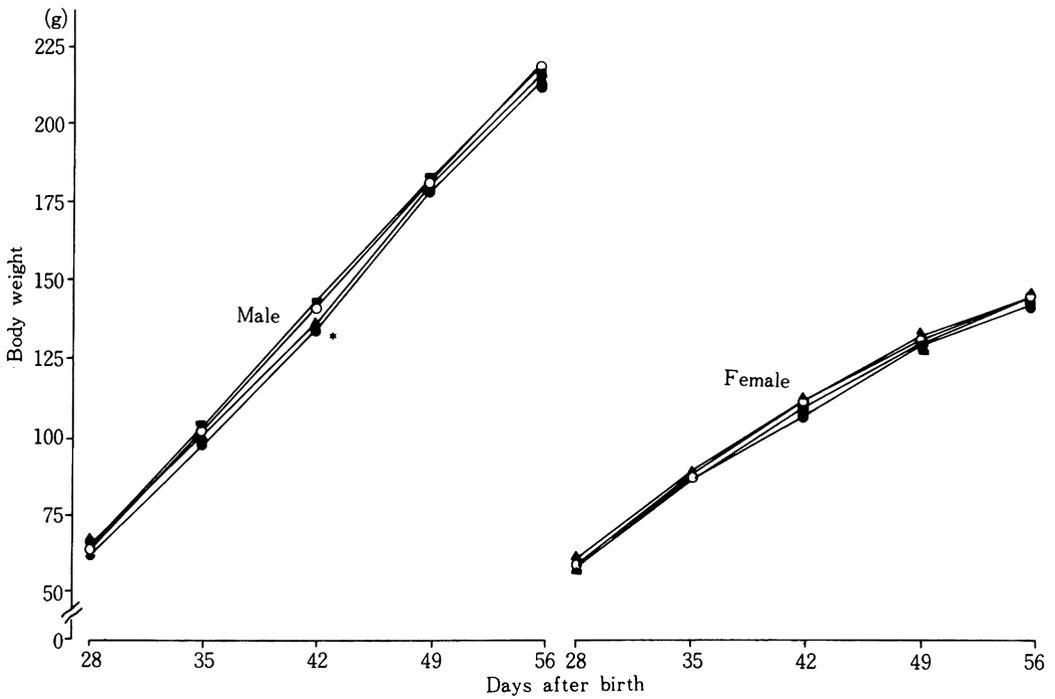
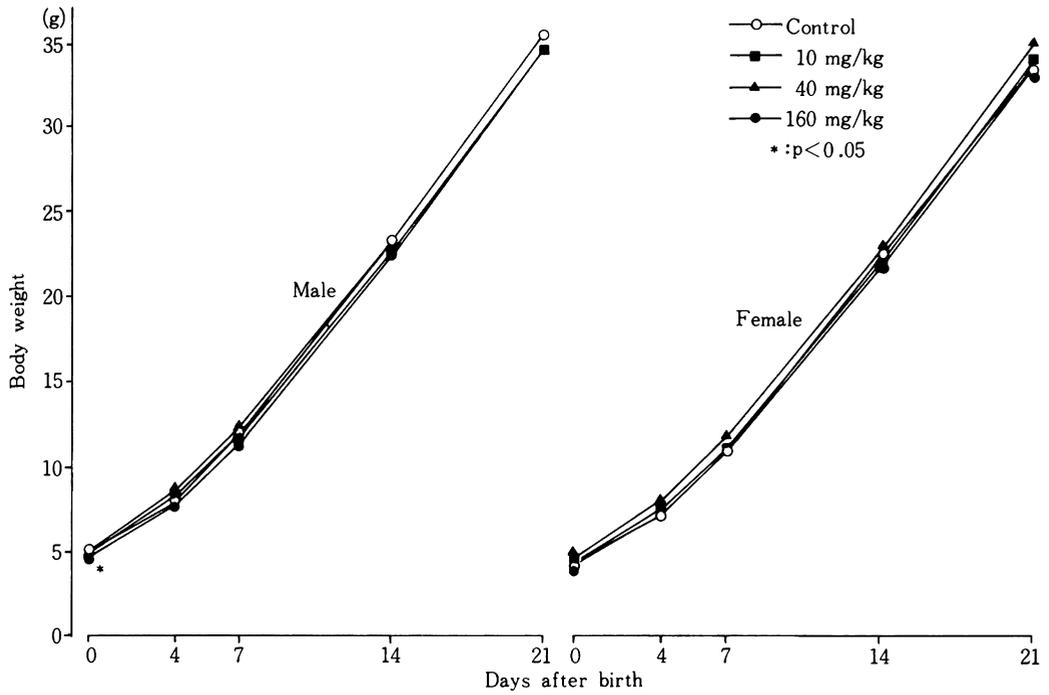
Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F_0)	32	26	30	24
No. of fetuses examined (F_1)	193	177	198	156
Skull				
Supraoccipital bone	192 [32]	177 [26]	194 [30]	146 [24]
Cervical vertebrae				
1st cervical center	35 [22]	26 [15]	30 [20]	18 [14]
2nd cervical center	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
3rd cervical center	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
4th cervical center	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
5th cervical center	10 [7]	1 [1]	5 [5]	0 [0]
6th cervical center	35 [20]	12**[10]	21 [16]	8**[7]
7th cervical center	165 [32]	145 [25]	156 [30]	86**[22]
Sternebrae				
1st sternebra	191 [32]	175 [26]	198 [30]	155 [24]
2nd sternebra	189 [32]	173 [26]	188 [30]	142 [24]
3rd sternebra	191 [32]	176 [26]	194 [30]	145**[24]
4th sternebra	189 [32]	166* [26]	189 [30]	130**[24]
5th sternebra	45 [25]	41 [22]	42 [23]	19 [11]
6th sternebra	56 [24]	50 [22]	55 [26]	27 [14]
Fore limb				
No. of metacarpus (Right)	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.1	3.9 \pm 0.3
No. of metacarpus (Left)	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.1	3.9 \pm 0.3
No. of proximal phalanges (Right)	0.9 \pm 0.3	0.9 \pm 0.3	0.9 \pm 0.4	0.7 \pm 0.5
No. of proximal phalanges (Left)	0.8 \pm 0.4	0.7 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4
Hind limb				
No. of metatarsus (Right)	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0
No. of metatarsus (Left)	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0
No. of proximal phalanges (Right)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
No. of proximal phalanges (Left)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
No. of caudal vertebrae	4.8 \pm 0.2	4.7 \pm 0.2	4.7 \pm 0.4	4.3 \pm 0.9

Mean \pm S.D.

[] : No. of dams involved with case

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

Fig. 5 Body weight changes in offspring (F₁)



は認められなかった。骨格変異については、対照群を含む各群に椎体の分離、椎体くびれおよび腰肋骨が、対照、40および160 mg/kg 群に頸椎弓の分離が、対照群に短小肋骨、10 mg/kg 群に頸肋骨がそれぞれ散見された。しかし、これらの頻度はいずれも対照群に比べて有意なも

のではなかった。

胎仔の骨化状態の観察結果を Table 4-2に示した。骨化の進行は10 mg/kg 群の第6頸椎体と第4胸骨に、また160 mg/kg 群の第6、7頸椎体と第3、4胸骨にそれぞれ対照群と比較し有意な遅延が認められた。

Table 5 Skeletal observations of offspring <F₁>
【Soft X-ray film】

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	12	11	12	12
No. of offspring examined (F ₁)	45	44	45	44
Abnormalities				
Skull	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Thoracic vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
Lumbar vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Sacral vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Caudal vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Sternum	2 [2]	0 [0]	1 [1]	0 [0]
Ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Fore limb	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Hind limb	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Others	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Total	2 [2]	0 [0]	1 [1]	1 [1]
(%) ^①	4.4	0	2.2	2.3
Variations				
Extra thoracic vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Extra lumbar vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Rudimentary lumbar vertebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Cervical ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Lumbar ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Short ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Accessory sternebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
Others	1 ^a [1]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Total	1 [1]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
(%) ^②	2.2	0	0	2.3
No. of caudal vertebrae	28.7 ± 0.6	28.7 ± 0.3	28.7 ± 0.3	28.5 ± 0.9

Mean ± S.D.

[] : No. of dams involved with case

① : (Total offspring with abnormalities/No. of offspring observed) × 100

② : (Total offspring with variations/No. of offspring observed) × 100

^a : Lumbarization of sacral vertebra

3. 産仔(F₁)に及ぼす影響

1) 出生後観察

産仔の出生後状況を Table 2の一部に示した。いずれの投与群においても対照群との間に出生率、性比、外表および生存率に差異は認められず、対照群を含む各群の一般状態に異常は認められなかった。

2) 体重

育成中の体重変動を Fig. 5 に示した。雄では160 mg/kg 群の生後0, 42日に一時的な増加抑制がみられたが、雌ではいずれの投与群も対照群と変わらぬ推移であった。

3) 離乳時剖検所見

対照群およびいずれの投与群においても剖検した出産仔の器官に肉眼的な異常は認められなかった。

4) 骨格検査

軟X線撮影による骨格検査の結果を Table 5に示した。骨格異常としては、160 mg/kg 群に第4胸椎体の欠損が1/44例、対照群に胸骨欠損1/45例、対照群と40 mg/kg 群に胸骨癒合がそれぞれ1/45例ずつ観察された。骨格変異としては、160 mg/kg 群に副胸骨が1/44例、対照群に仙椎弓の腰椎弓化が1/45例認められた。しかし、これら骨格異常ならびに骨格変異の出現率はいずれも対照群に比べて有意なものではなかった。

5) 外表分化観察

各分化状況を Table 6に示した。いずれの投与群においても対照群に比べて外表分化状態に遅れは認められなかった。

6) 行動・感覚機能検査

行動・感覚機能検査の結果を Table 7に示した。対照群およびいずれの投与群においても行動・感覚機能に異常は認められなかった。

7) 学習能および情動性検査

水迷路学習検査の結果を Fig. 6-1, 6-2に示した。各群ともトレーニング後の学習に効果がみられ、異常は認められなかったが、雌の10 mg/kg 群の3回目の遊泳時間において対照群に比べ一時的な延長が示された。

P.A.R.による学習能および情動性の検査結果を Table 8-1, 8-2に示した。対照群を含む各群の電気刺激後の脱糞回数および排尿回数は増加し、入室回数、滞在時間、区画移動および立ち上がり回数は減少し、明らかに学習効果が認められた。各投与群の電気刺激前(学習前)と電気刺激後(学習後)の情動性(フィールド内の行動)および学習獲得(入室回数)は雌雄とも対照群と差異のない成績であった。

8) 生殖能検査

生殖能検査の結果を Table 9, 10に示した。いずれの投与群においても対照群との間に交尾率および受胎率に

Table 6 External differentiation of offspring (F₁)

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	12	11	12	12
No. of offspring examined (F ₁)	92	88	92	92
Detachment of ears				
Day 5 (%)	100.0(92/92)	100.0(88/88)	100.0(92/92)	100.0(92/92)
Appearance of hair				
Day 12 (%)	100.0(92/92)	100.0(88/88)	100.0(92/92)	100.0(92/92)
Eruption of teeth				
Day 13 (%)	100.0(92/92)	100.0(88/88)	100.0(92/92)	100.0(92/92)
Opening of eyelids				
Day 19 (%)	100.0(90/90)	100.0(88/88)	100.0(92/92)	100.0(92/92)
Descent of testes				
Day 32 (%)	100.0(23/23)	100.0(22/22)	95.8(23/24)	95.8(23/24)
Opening of vagina				
Day 42 (%)	100.0(22/22)	100.0(22/22)	100.0(23/23)	95.8(23/24)

(No. of offspring developed/No. of offspring observed)×100

差異は認められなかった。

分娩した母獣(F₁)およびその出産仔(F₂)の所見を Table 10に示した。対照群およびいずれの投与群においても母獣の分娩時に異常はみられなかったが、40 mg/kg 群で1/11例の哺育放棄の母獣が認められた。

出産仔(F₂)はいずれの投与群においても、生死数、性比、外表、一般状態および発育に異常は認められず、順調な発育を示した。

Ⅲ. 考 察

ラットの器官形成期に TE-031を経口投与し、母獣ならびにその胎仔・出産仔に及ぼす影響を検討した。

TE-031を投与した160 mg/kg 群の母獣に対照群に比べて体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められ、その胎仔に死亡数の増加および体重低下の傾向が認められた。しかし、10および40 mg/kg 群では、母獣ならびに胎仔にこれらの影響はみられなかった。胎仔の外表検査からは対照群およびいずれの投与群においても異常は観察されなかったが、内部器官検査では10 mg/kg 群に2例(片側無眼球1例、右鎖骨下動脈起始異常1例)、160 mg/kg 群に3例(奇静脈遺残1例、精巣転位2例)の異常が観察された。これらの異常はいずれもラットにおいて自然発生することが知られており¹³⁾、しかも投与群によりそれぞれタイプが異なり、出現率にも統計的な有意

Table 7 Findings in behaviour and sensory function tests of offspring (F₁)

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
Male				
No. of offspring examined (F ₁)	12	11	12	12
Righting reflex	12/12	11/11	12/12	12/12
Pinna reflex	12/12	11/11	12/12	12/12
Tone reflex	12/12	11/11	12/12	12/12
Corneal reflex	12/12	11/11	12/12	12/12
Light reflex	12/12	11/11	12/12	12/12
Pain reflex	12/12	11/11	12/12	12/12
Equilibrium response	12/12	11/11	12/12	12/12
Muscular tone (deg.)	30.3 ± 1.6	29.1 ± 5.6	28.1 ± 5.6	29.0 ± 3.0
Motor coordination	12/12	11/11	12/12	12/12
Spontaneous activity	12/12	11/11	12/12	12/12
Female				
No. of offspring examined (F ₁)	11	11	11	12
Righting reflex	11/11	11/11	11/11	12/12
Pinna reflex	11/11	11/11	11/11	12/12
Tone reflex	11/11	11/11	11/11	12/12
Corneal reflex	11/11	11/11	11/11	12/12
Light reflex	11/11	11/11	11/11	12/12
Pain reflex	11/11	11/11	11/11	12/12
Equilibrium response	11/11	11/11	11/11	12/12
Muscular tone (deg.)	30.9 ± 4.2	30.9 ± 3.3	29.2 ± 6.8	29.5 ± 7.0
Motor coordination	11/11	11/11	11/11	12/12
Spontaneous activity	11/11	11/11	11/11	12/12

Mean ± S.D.

No. of normal animals/No. of examined animals

Fig. 6-2 Learning ability test of female offspring (F₁)
【Water multiple T-maze】

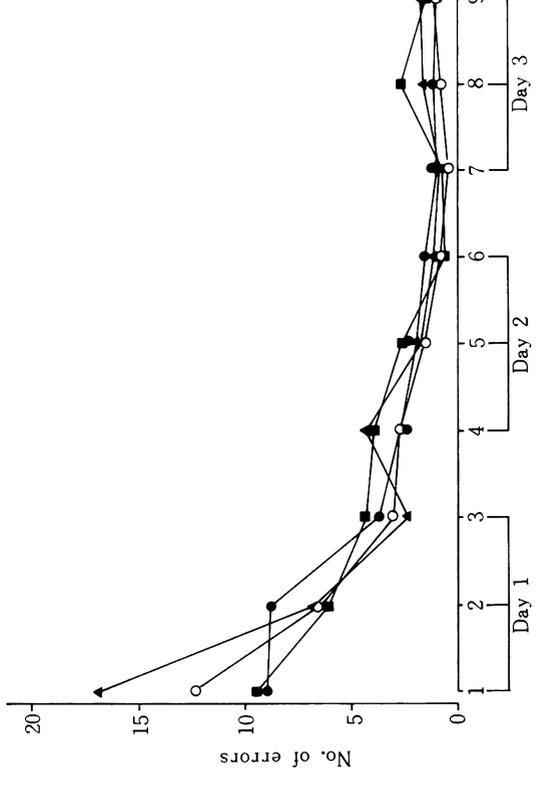
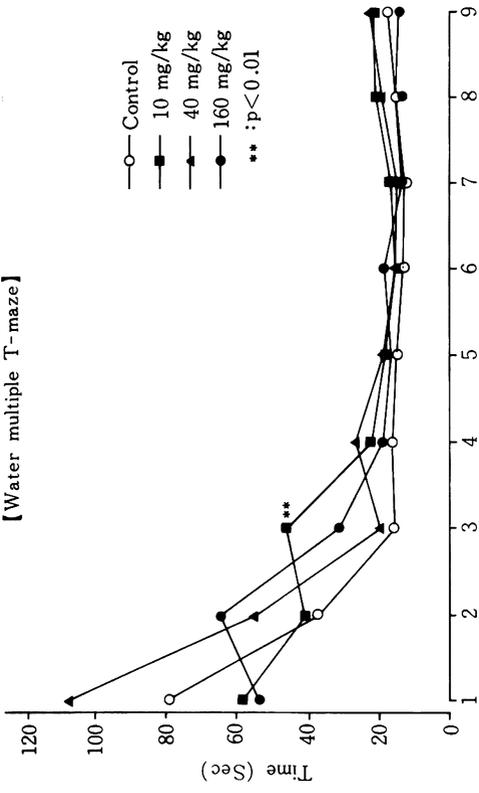
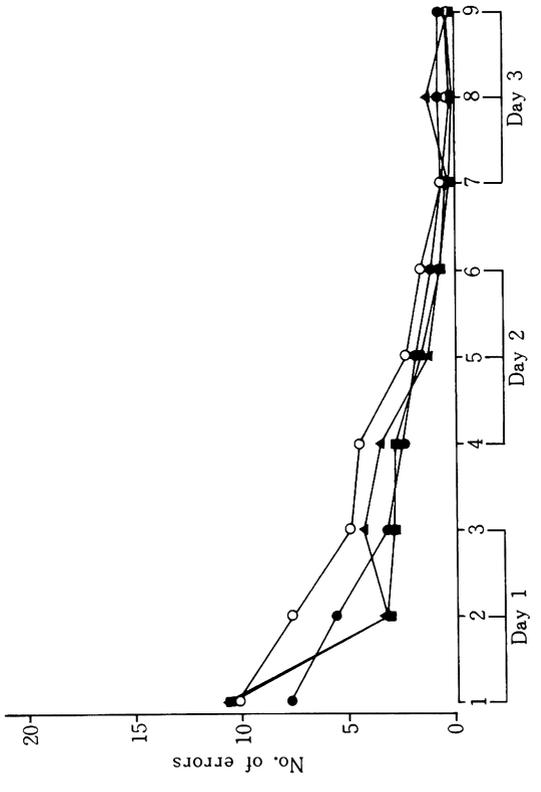
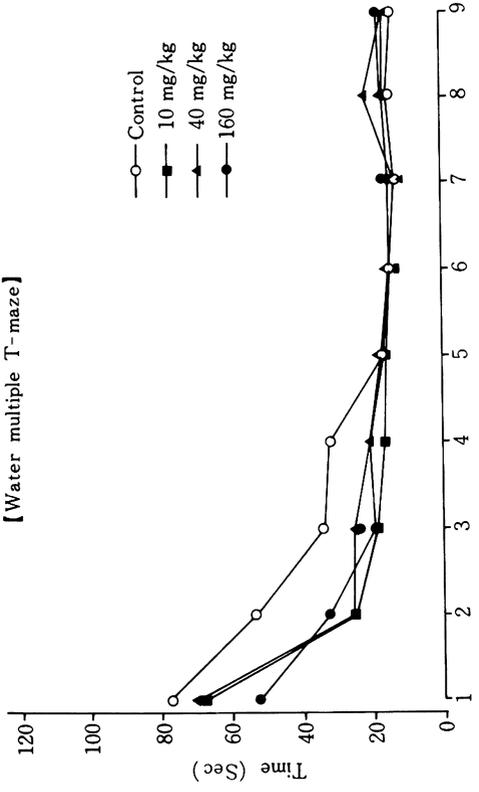


Fig. 6-1 Learning ability test of male offspring (F₁)
【Water multiple T-maze】



性および用量依存性も認められなかったことから、TE-031投与に起因した異常と考えられなかった。

骨格検査では、骨格異常は観察されず、頸肋骨や腰肋骨等の骨格変異にも、催奇形性を示唆する¹⁴⁾出現率は認められなかった。骨化状態では、10および160 mg/kg群の一部の骨格系において対照群に比べ有意な遅延が認められた。10 mg/kg群の遅延は胎仔体重や母獣体重が対照群と変わらず、しかも40 mg/kg群に同様な変化がみられない点より、TE-031の投与によるものではないと考えられた。しかし、160 mg/kg群の遅延は、他の骨格でも有意ではないが骨化状態が悪いものもあり、また、胎仔体重も対照群に比べ若干低値を示していることから、発育抑制と関連した変化と推察された。

産仔(F₁)の観察からは、対照群に比べ160 mg/kg群の雄の体重に一時的な低下がみられたが、外表異常は1例も認められず、外表分化、骨格、一般状態にも影響は認められなかった。また、行動・機能、学習能および生殖

能検査にも影響は認められず、F₂産仔の発育も順調であり、一般状態に異常はみられなかった。

マクロライド系抗生物質には、胎仔致死および発育抑制作用^{15,16)}あるいは若干の奇形例¹⁷⁾が報告されているが、明白に催奇形作用を認めた報告はない。

以上より、TE-031は160 mg/kgで母獣に体重増加抑制と摂餌量減少、胎仔に死亡数増加と発育抑制、産仔に体重増加抑制を示すが、催奇形作用はないものと推測され、母獣、胎仔および産仔に対する無影響量は、いずれも40 mg/kgであると考えられた。

(試験期間：昭和59年10月～昭和61年5月)

文 献

- 1) 山田 隆, 内田英男, 松沢伸子: TE-031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 36(S-3):1988掲載予定

Table 8-1 Emotion and learning ability test of male offspring
【Passive avoidance response】

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of offspring examined (F ₁)	12	11	12	12
Exploration				
Gate in	2.5 ± 1.6	3.1 ± 1.4	2.8 ± 0.8	1.7 ± 1.1
Latency (sec)	64.0 ± 43.9	39.4 ± 30.2	54.0 ± 19.6	74.2 ± 43.8
Stay time (sec)	37.6 ± 52.2	36.6 ± 43.8	25.9 ± 15.1	57.0 ± 46.3
Ambulation	20.0 ± 12.0	17.0 ± 12.1	19.9 ± 9.8	11.8 ± 6.9
Rearing	5.5 ± 4.1	2.9 ± 3.5	4.6 ± 3.9	3.2 ± 2.2
Grooming	0.7 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.7	0.4 ± 0.9
Defecation	0.8 ± 1.1	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.9	0.3 ± 1.2
Urination	0.6 ± 1.0	0.3 ± 0.9	1.8 ± 3.0	0.8 ± 2.0
Acquisition				
Gate in	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Latency (sec)	175.5 ± 15.5	158.2 ± 53.2	180.0 ± 0.0	180.0 ± 0.0
Stay time (sec)	0.4 ± 1.4	16.9 ± 50.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Ambulation	7.9 ± 12.3	6.2 ± 6.1	12.6 ± 15.7	5.1 ± 5.3
Rearing	2.2 ± 3.2	1.2 ± 1.5	3.2 ± 4.3	1.1 ± 1.2
Grooming	0.5 ± 0.7	0.3 ± 0.6	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.5
Defecation	1.4 ± 1.7	1.5 ± 1.6	1.1 ± 1.7	2.3 ± 1.7
Urination	1.6 ± 1.4	1.0 ± 1.2	0.7 ± 1.5	1.1 ± 1.2

Mean ± S.D.

Table 8-2 Emotion and learning ability test of female offspring
 【Passive avoidance response】

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of offspring examined (F ₁)	11	11	11	12
Exploration				
Gate in	3.0 ± 1.5	3.5 ± 1.3	2.6 ± 1.0	2.4 ± 1.1
Latency (sec)	60.0 ± 44.1	41.3 ± 19.9	42.4 ± 20.2	44.2 ± 24.3
Stay time (sec)	27.4 ± 34.3	24.3 ± 30.7	40.6 ± 47.3	48.5 ± 50.1
Ambulation	26.9 ± 12.3	24.5 ± 10.7	18.9 ± 10.2	18.6 ± 9.2
Rearing	6.3 ± 4.1	5.5 ± 3.8	3.4 ± 2.2	3.3 ± 3.1
Grooming	0.5 ± 0.9	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.7
Defecation	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Urination	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3
Acquisition				
Gate in	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.6
Latency (sec)	180.0 ± 0.0	180.0 ± 0.0	180.0 ± 0.0	170.3 ± 33.6
Stay time (sec)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 2.0
Ambulation	20.5 ± 14.5	26.5 ± 15.6	13.6 ± 15.0	13.0 ± 12.7
Rearing	4.6 ± 3.7	5.2 ± 3.7	2.3 ± 3.2	2.4 ± 2.8
Grooming	0.5 ± 0.8	1.4 ± 1.5	1.1 ± 1.6	0.9 ± 0.9
Defecation	0.1 ± 0.3	0.5 ± 0.8	0.1 ± 0.3	0.8 ± 2.0
Urination	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.3	0.6 ± 1.7

Mean ± S.D.

Table 9 Reproductive ability of offspring <F₁>
 【Mating and fertility】

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	11	11	12	12
No. of males mated (F ₁)	11	11	12	12
No. of females mated (F ₁)	11	11	12	12
Copulation (days)				
1 ~ 7	8	8	9	5
8 ~ 14	0	0	1	2
Over 15	2	2	1	3
Copulative rate (%) ^①	90.9 (10/ 11)	90.9 (10/ 11)	91.7 (11/ 12)	83.3 (10/ 12)
Pregnancy (days)				
1 ~ 7	7	7	9	5
8 ~ 14	0	0	1	2
Over 15	1	1	1	0
Pregnancy rate (%) ^②	80.0 (8/ 10)	80.0 (8/ 10)	100.0 (11/ 11)	70.0 (7/ 10)

① : (No. of animals copulated/No. of animals mated) × 100

② : (No. of animals pregnant/No. of animals copulated) × 100

Table 10 Reproductive ability of offspring <F₁>
【Development of offspring <F₂>】

Group	Control	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg
No. of dams (F ₀)	8	8	11	7
No. of offspring pregnant (F ₁)	8	8	11	7
Gestation period (day)	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0
No. of implantation traces	79	84	123	60
Implantation traces per litter	9.9 ± 2.9	10.5 ± 1.3	11.2 ± 2.6	8.6 ± 4.0
Delivery rate (%) ^①	100.0 (8/ 8)	100.0 (8/ 8)	100.0 (11/ 11)	100.0 (7/ 7)
No. of newborns	78	82	118	56
Newborns per litter	9.8 ± 2.7	10.3 ± 1.5	10.7 ± 3.0	8.0 ± 3.6
No. of live newborns	78	82	116	56
Live newborns per litter	9.8 ± 2.7	10.3 ± 1.5	10.5 ± 3.0	8.0 ± 3.6
Birth rate (%) ^②	98.7 (78/ 79)	97.6 (82/ 84)	94.3 (116/123)	93.3 (56/ 60)
Sex ratio (Male/Female)	1.11(41/ 37)	1.00(41/ 41)	0.81(52/ 64)	0.93(27/ 29)
No. of stillborn	0 [0]	0 [0]	2 [2]	0 [0]
No. of external anomalies	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Survival rate (%) ^③				
On day 4	100.0 (78/ 78)	100.0 (82/ 82)	85.6 (101/116)	100.0(56/56)
On day 21	100.0 (60/ 60)	100.0 (64/ 64)	100.0 (73/ 73)	100.0(46/46)

Mean ± S.D.

[] : No. of dams involved with case

① : (No. of animals delivered with live newborns/No. of pregnant animals) × 100

② : (No. of live newborns/No. of implantation traces) × 100

③ : On day 4 : (No. of live offspring on day 4/No. of live newborns) × 100

On day 21 : (No. of live offspring on day 21/No. of live offspring after selection on day 4) × 100

- 2) 山田 隆, 原真理子, 大場由香, 井上忠広, 大野博: ラットの着床痕に関する研究 II. 子宮透明化着床痕染色, 着床痕の成立及び分布について. *Exp. Anim.* 34 : 249~260, 1985
- 3) WILSON, J. G. : Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *Teratology : Principles and Techniques* (WILSON, J. G. & J. WARKANY) Univ. Chicago Press, Chicago, pp. 262~277, 1965
- 4) BARROW, M. V. & W. J. TAYLOR : A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morph.* 127 : 291~306, 1969
- 5) 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. *Cong. Anom.* 14 : 23~40, 1974
- 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) FOX, W. M. : Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13 : 234~241, 1965
- 8) IRWIN, S. : Animal and clinical pharmacological techniques in drug evaluation. (Nodine J. H. & P. E. Siegler). Year book medical publishers, pp. 36~54, 1964
- 9) ALTMAN, J. & K. SUDARSHAN : Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 23 : 896~920, 1975
- 10) SCHAPIRO, S. ; M. SALAS & K. VUKOVICH : Hormonal effect on ontogeny of swimming ability in the rats

- ; Assessment of central neurons system development. *Science* 168 : 47~151, 1970
- 11) BIEL, W. C. : Early age differences in maze performance in the albino rat. *J. Gen. Psychol.* 56 : 439~453, 1940
- 12) 山田 隆, 内田英男, 市川明美: 生殖試験における次世代動物の学習障害検索について。 *Exp. Anim.* 32 : 107~113, 1983
- 13) 亀山義郎, 谷村 孝, 安田峯生: 実験動物における自然発生奇形 写真図譜および参考資料。 *Cong. Anom.* 20 : 25~106, 1980
- 14) 安田峯生, 前田広由: 催奇形性試験での指標としての腰肋の意義。 *Cong. Anom.* 13 : 25~29, 1973
- 15) 森口政英, 藤田正敬, 小枝武美: SF-837の催奇形学的研究 第1報 ラット胎仔および新生仔に及ぼす影響。 *Jpn. J. Antibiot.* 25 : 187~192, 1972
- 16) 栗秋 要, 三木寿雄, 瀬島行雄, 柴田正勝, 井田 昶, 岡崎雅彦, 橋本敬祐: Josamycinの研究 V。 *Jpn. J. Antibiot.* 22 : 219~225, 1969
- 17) 高谷雅巳: 抗生物質による奇形の実験的発生。 *阪市大医誌* 14 : 107~115, 1965

REPRODUCTION STUDIES OF TE-031(A-56268)(II)
— ADMINISTRATION STUDY DURING THE PERIOD
OF FETAL ORGANOGENESIS IN RATS —

TAKASHI YAMADA, KOHICHI OHSAWA and SADA O NAKANE
Research Center, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama

TE-031(A-56268) was given orally to Slc : Wistar rats during fetal organogenesis at a dose of 10, 40, or 160 mg/kg in order to examine the effects on rat dams, fetuses and offspring.

1. TE-031 given at a dose of 160 mg/kg suppressed the body weight of dams, slightly caused deaths of fetuses, and affected development of living fetuses to a small extent.
2. TE-031 given at a dose of 160 mg/kg temporarily suppressed the body weight of offspring(F_1) but did not affect behaviour and development of offspring(F_1) and the next generation(F_2).
3. TE-031 did not show teratogenic effect when given during fetal organogenesis in rats. The no-effect dose level was considered to be 40 mg/kg.