

TE-031の生殖試験(第3報) ウサギにおける器官形成期投与試験

山田 隆・西山 勤・大野 博・中根貞雄
大正製薬株式会社総合研究所

New Zealand White 種ウサギの妊娠6日より18日までTE-031の10, 35および125 mg/kg を経口投与し、母獣ならびにその胎仔に及ぼす影響について検討した。

1. 母獣では最高投与量の125 mg/kg 群において摂餌量の減少ならびに体重の増加抑制の傾向が認められた。

2. 妊娠28日の子宮内観察からは、いずれの投与群においても異常は認められなかった。

3. 胎仔の観察からは、いずれの投与群にも外表ならびに内部器官異常仔はみられず、また、薬物投与に起因したと思われる骨格異常ならびに骨格変異の増加も認められなかった。

以上の成績より、TE-031はウサギの器官形成期投与において、催奇形性を示さず無影響量は母獣では35 mg/kg、胎仔では125 mg/kg と考えられた。

TE-031は大正製薬株式会社に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既にラットにおける妊娠前・妊娠初期投与試験¹⁾ および器官形成期投与試験²⁾ を実施し報告した。

今回は、TE-031をウサギの器官形成期に経口投与し、母獣ならびに胎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, (-)-(3*R*, 4*S*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 9*R*, 11*R*, 12*R*, 13*S*, 14*R*)-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、水にほとんど溶けない。

2. 使用動物および飼育条件

動物は4~5.5ヶ月齢(体重範囲:雄2.9~3.9 kg, 雌3.1~4.3 kg)のNew Zealand White 種ウサギ(日本農産工業株式会社)を購入し、11日間の検疫・馴化により順調な体重増加を示したものをを用いた。

ウサギは金網製の単飼育・自動水洗飼育機[日本ケージ(株):BAW3型]を用い、空調動物舎(範囲:温度22~26℃, 湿度43~77%, 照明時間12時間および換気回数15

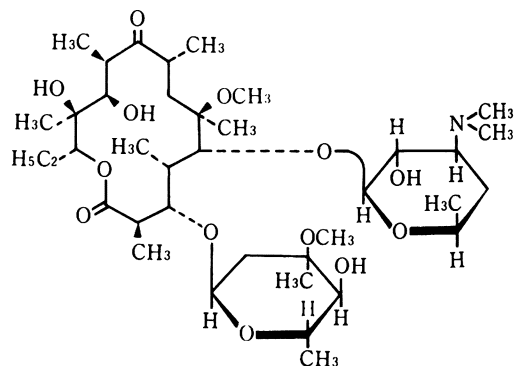
~20回/時間)で固型飼料(オリエンタル酵母工業社製:RC-4)および殺菌水を自由に摂取させる方法で飼育した。交配は外陰部検査により、発情徴候のみられた雌と交尾経験のある雄とを同居させる方法で行い(8:30~10:30a.m.), 2回以上交尾した雌を妊娠したものとみなし、その日を妊娠0日と定め実験に用いた。

妊娠動物は平均体重が等しくなるように1群14~15匹に群分けをした。

3. 投与量および投与方法

投与量決定のための予試験として妊娠ウサギにTE-031の0(対照), 40および150 mg/kg を妊娠6日から妊娠18日まで経口投与した。その結果、胎仔の生存・発育に著変は認められなかったが、150 mg/kg 群の母獣で、投与初期に体重減少がみられた(Table 1, Fig. 2)。これより本試験では150 mg/kg 以下の投与量で毒性が発現

Fig. 1 Chemical structure of TE-031



すると推測し、推定臨床用量の10 mg/kgを基準に公比約3.5で中間用量35 mg/kg, 最高用量125 mg/kgを設定した。TE-031は5%アラビアゴム懸濁液とし、体重1 kg当たり5 mlの割合で、1日1回(1:00~3:00p.m.)ゴム製カテーテル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6日より18日までの13日間連日投与した。

5. 検査方法

母獣は一般状態を毎日観察し、体重を妊娠0, 3, 6~19, 23および28日に、摂餌量を妊娠3, 7, 12, 19, 23および28日に測定した。妊娠28日に空気栓塞法により屠殺し、胸腹部内諸器官および子宮の肉眼的観察を行った。さらに、子宮壁を切開し、着床数、死胚胎仔数および生存胎仔数を調べた。死胚胎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(初期と後期の中間の形状、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。生存胎仔はバイアピリティー(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、外表検査および体重測定を行った後、腹壁を切開して性別を判定した³⁾。次いで、これらの胎仔の約1/3例は bouin 液に固定し、残りの2/3例は内部器官を除去した後、70% ethanol で固定した。Bouin 固定胎仔は WILSON⁴⁾ および西村⁵⁾ の方法に従い内部器官の異常の有無を観察した。Ethanol 固定胎仔は、DAWSON の方法⁶⁾ に準じて alizarin red S 染色による骨格標本を作製し、全骨格系の異常、変異ならびに骨化状態について観察した。観察はいずれも実体顕微鏡下で行った。

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

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

Group	Control	40mg/kg	150mg/kg
No. of dams (F ₀)	4	5	4
No. of implantation sites	31	37	31
Implantation sites per litter	7.8 ± 1.9	7.4 ± 2.7	7.8 ± 2.2
No. of dead fetuses (%) ^①	1 [1] 3.2	1 [1] 2.7	0 [0] 0.0
Resorption	1 [1]	1 [1]	0 [0]
Early death	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Middle death	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Late death	0 [0]	0 [0]	0 [0]
No. of live fetuses	30	36	31
Fetuses per litter	7.5 ± 1.7	7.2 ± 2.6	7.8 ± 2.2
Sex ratio (Male/Female)	0.88 (14/16)	1.12 (19/17)	0.94 (15/16)
Body weight (g)			
Male	35.48 ± 2.57	35.31 ± 2.52	34.23 ± 2.99
Female	36.42 ± 2.07	37.54 ± 2.52	33.80 ± 1.51
Male+Female	35.95 ± 2.11	37.15 ± 2.70	33.89 ± 1.01
External anomalies	0 [0]	0 [0]	0 [0]

Mean ± S.D.

[]: No. of dams involved with case

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

積 χ^2 検定を経て、 $2 \times 2 \chi^2$ 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 1 および 5 % で検討した。なお、胎仔のデータは、性比を除き、すべて腹単位とした。

II. 結 果

1. 母獣に及ぼす影響

1) 一般状態

対照群およびいずれの投与群においても、異常はみられず死亡例も認められなかった。

2) 体重および摂餌量

体重を Fig. 3 に摂餌量を Fig. 4 に示した。対照群に比べて、125 mg/kg 群に投与期間中体重増加抑制の傾向が認められた。摂餌量については、125 mg/kg 群の妊娠 7 日に有意な減少が認められた以外著変は認められなかった。

3) 剖検所見

妊娠末期の剖検からは胸腹部内諸器官に異常は認められなかった。

2. 胎仔に及ぼす影響

1) 子宮内および胎仔観察

妊娠 28 日における子宮内および胎仔の観察所見を Table 2 に示した。いずれの投与群においても着床数、死胚胎仔数、生存胎仔数、生存仔性比および胎仔体重は対照群と変わらずバイアピリティーにも異常はみられなかった。生存胎仔の外表面および内部器官の観察から異常仔は認められなかった。

2) 骨格検査

胎仔の骨格異常および変異の所見を Table 3-1, 骨化状態の所見を Table 3-2 に示した。骨格異常としては、胸骨核癒合仔が対照, 10, 35 および 125 mg/kg 群にそれぞれ 2 例 (2.4%), 2 例 (2.5%), 1 例 (1.1%), および 4 例 (4.3%) 観察され、このうち 125 mg/kg 群の 1 例 (1.1%) については椎体ならびに肋骨癒合を合併したものであった。

骨格変異としては対照群に胸骨核分離仔が 2 例 (2.4%), 腰肋骨仔が 30 例 (35.3%), 10 mg/kg 群に腰肋骨仔が 20 例 (24.7%), 35 mg/kg 群に頸肋骨仔が 1 例

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

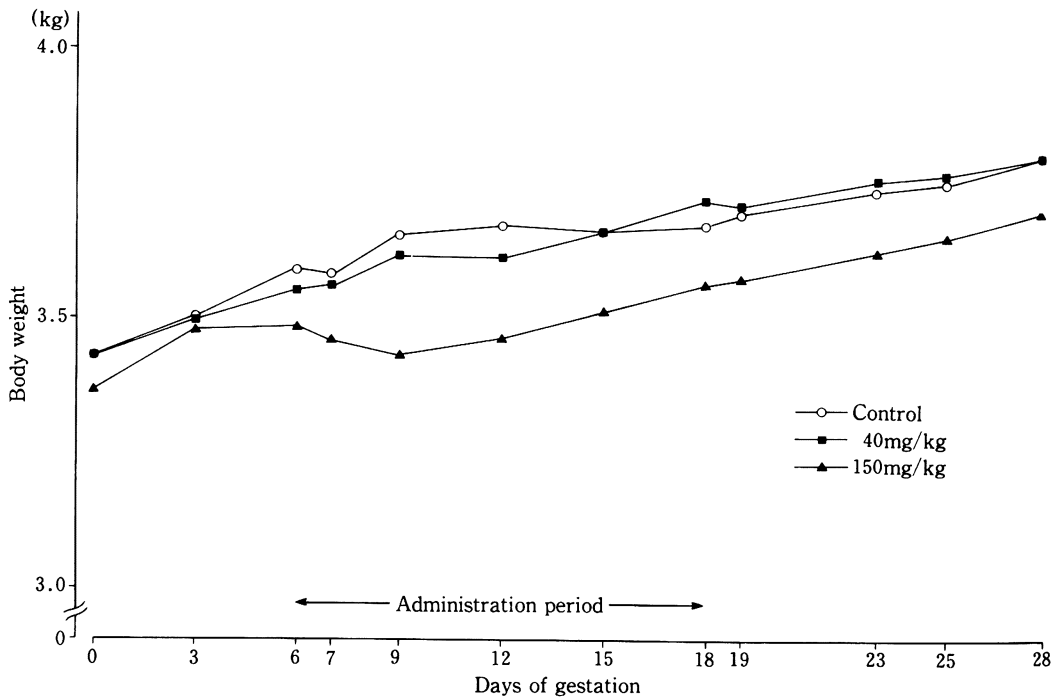


Fig. 3 Body weight changes in dams

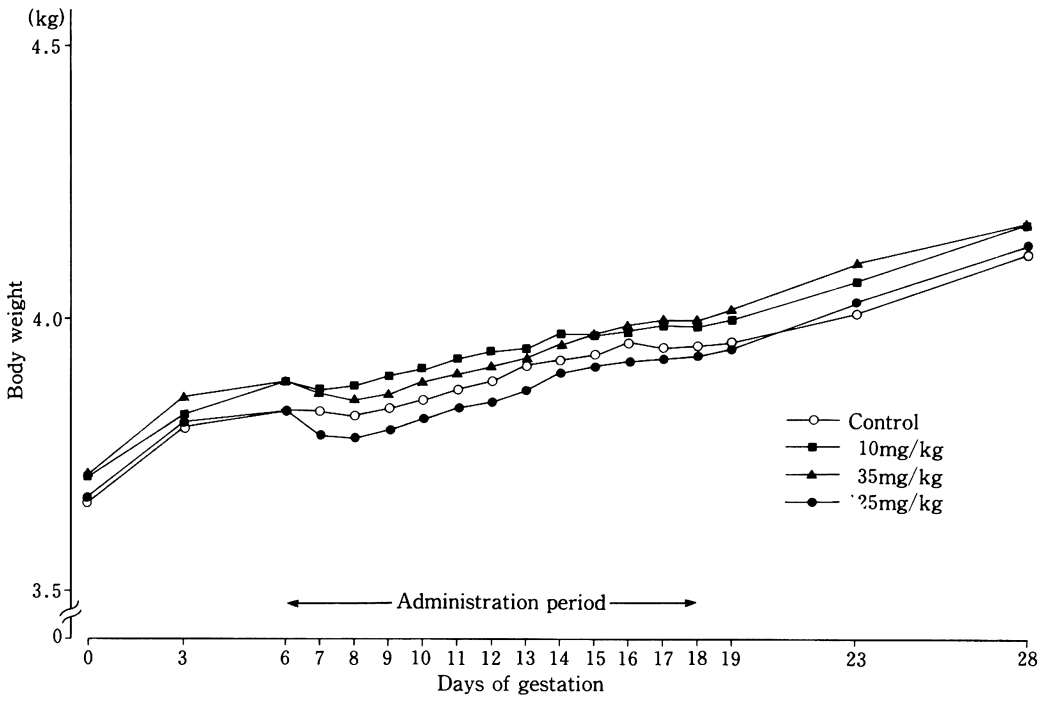
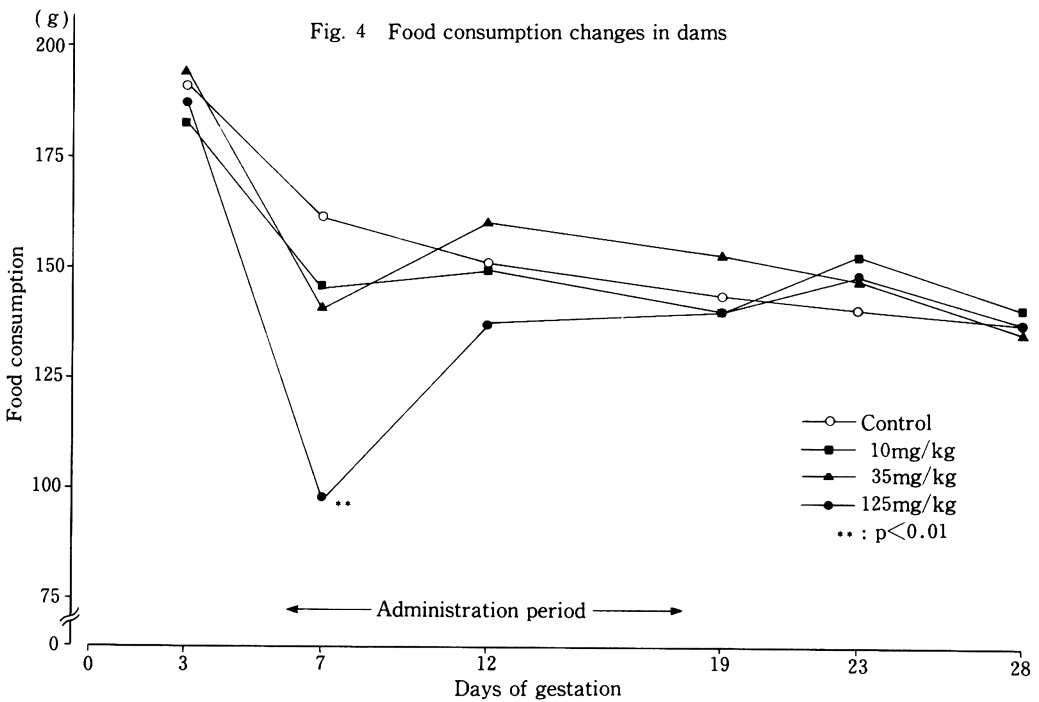


Fig. 4 Food consumption changes in dams



(1.1%), 腰肋骨仔が35例(38.5%)ならびに125mg/kg群に胸骨核不相称仔, 頸肋骨仔がそれぞれ1例(1.1%)および腰肋骨仔が46例(48.9%)観察された。しかしこれらの出現率に有意な差はみられず, 用量依存性も認められなかった。

骨化状態については, 各群とも同等の骨化進行を示し, 対照群と投与群の間に差はみられなかった。

Ⅲ. 考 察

妊娠ウサギの器官形成期に TE-031 の 10, 35 および 125 mg/kg を経口投与し, 母獣ならびに胎仔に及ぼす影響について検討した。

母獣の観察において最高投与量の 125 mg/kg 群に摂餌量の減少がみられ, 体重に増加抑制の傾向が認められた。摂餌量減少についてはいくつかの要因が知られているが^{7,8)}, Lincomycin, Penicillin および Erythromycin などの抗生物質をウサギに投与すると, 腸内の細菌叢が変化

し, 食欲を減退させるという報告⁹⁾もある。本試験においてみられた摂餌量減少もこれらの抗生物質と同様な作用に基づいたものと推測され, 体重増加抑制傾向は摂餌量減少に伴う二次的な影響と考えられた。

妊娠末期の子宮内ならびに胎仔の観察からはいずれの投与群においても着床数, 生存胎仔数, 死胚胎仔数, 性比, 胎仔体重に影響は認められず, 外表, 内部器官, 骨格検査からも TE-031 投与に起因したと思われる異常は認められなかった。従って, TE-031 は母獣に若干毒性の現われる投与量でも胚・胎仔の生存・発育に対し悪影響を与えないと考えられた。

マクロライド系抗生物質は細菌細胞の増殖を強く抑制するが, 動物細胞に対してはその作用が弱いという選択毒性を持っている¹⁰⁾。実験動物におけるマクロライド系抗生物質の催奇形性に関しては栗秋ら¹¹⁾が Josamycin のマウスとラットの試験において, また, 森口ら¹²⁾ Mio-camycin のラット, ウサギの試験においていずれも陰性

Table 2 Findings in dams (F₀) and fetuses (F₁) at term

Group	Control	10mg/kg	35mg/kg	125mg/kg
No. of dams (F ₀)	14	14	14	15
No. of implantation sites	133	123	135	141
Implantation sites per litter	9.5 ± 2.3	8.8 ± 1.4	9.6 ± 1.4	9.4 ± 1.1
No. of dead fetuses (%) ^①	8 [4] 6.0	4 [3] 3.3	0 [0] 0.0	9 [6] 6.4
Resorption	3 [2]	2 [2]	0 [0]	4 [3]
Early death	0 [0]	0 [0]	0 [0]	2 [1]
Middle death	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Late death	5 [2]	2 [2]	0 [0]	3 [3]
No. of live fetuses ^②	125	119	135	132
Fetuses per litter	8.9 ± 2.5	8.5 ± 1.6	9.6 ± 1.4	8.8 ± 1.5
Sex ratio (Male/Female)	1.02 (63/62)	1.02 (60/59)	0.90 (64/71)	0.97 (65/67)
Body weight (g)				
Male	32.98 ± 5.05	34.54 ± 3.29	33.34 ± 4.49	33.77 ± 3.62
Female	32.47 ± 4.03	34.07 ± 4.42	32.46 ± 3.98	32.98 ± 3.94
Male+Female	32.74 ± 4.35	34.47 ± 3.58	32.75 ± 4.04	33.36 ± 3.42
External anomalies	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Visceral anomalies	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]

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

Table 3-1 Skeletal observations of fetuses (F₁)

【Abnormalities and variations】

Group	Control	10mg/kg	35mg/kg	125mg/kg
No. of dams (F ₀)	14	14	14	15
No. of fetuses examined (F ₁)	85	81	91	94
Abnormalities				
Fused vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
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 sternebrae	2 [2]	2 [2]	1 [1]	4 [3]
Fused ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
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	2 [2]	2 [2]	1 [1]	4 [3]
(%) ^①	2.4	2.5	1.1	4.3
Variations				
Bilobed vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Split vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Bifurcate vertebral centers	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Split cervical vertebral arches	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
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 sternebrae	2 [2]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Asymmetric sternebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]
Accessory sternebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Dislocated sternebrae	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Cervical ribs	0 [0]	0 [0]	1 [1]	1 [1]
Lumbar ribs	30 [11]	20 [11]	35 [12]	46 [12]
Short ribs	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Others	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Total	32 [12]	20 [11]	36 [12]	46 [12]
(%) ^②	37.6	24.7	39.6	48.9

[] : 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 3-2 Skeletal observations of fetuses <F₁>
 【Ossification】

Group	Control	10mg/kg	35mg/kg	125mg/kg
No. of dams (F ₀)	14	14	14	15
No. of fetuses examined (F ₁)	85	81	91	94
Skull				
Supraoccipital bone	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
Cervical vertebrae				
1st cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
2nd cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
3rd cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
4th cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
5th cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
6th cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
7th cervical center	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
Sternebrae				
1st sternebra	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
2nd sternebra	85 [14]	80 [14]	91 [14]	94 [15]
3rd sternebra	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
4th sternebra	85 [14]	81 [14]	91 [14]	94 [15]
5th sternebra	60 [14]	67 [14]	74 [14]	76 [15]
6th sternebra	80 [14]	81 [14]	86 [14]	90 [15]
Fore limb				
No. of metacarpus (Right)	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1
No. of metacarpus (Left)	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1
No. of proximal phalanges (Right)	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
No. of proximal phalanges (Left)	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
Hind limb				
No. of metatarsus (Right)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
No. of metatarsus (Left)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
No. of proximal phalanges (Right)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
No. of proximal phalanges (Left)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
No. of caudal vertebrae	16.1 ± 0.3	16.1 ± 0.3	16.1 ± 0.3	16.3 ± 0.4

Mean ± S.D.

[] : No. of dams involved with case

結果を報告している。

TE-031はこれら他のマクロライド系抗生物質と同様に、ウサギの器官形成期投与において催奇形性を示さなかった。無影響量は母獣では35 mg/kg、胎仔では125 mg/kgと考えられた。

(試験期間:昭和60年8月～昭和61年6月)

文 献

- 1) 山田 隆, 内田英男, 松沢伸子, 中根貞雄: TE-031の生殖試験(第1報)ラットにおける妊娠前・妊娠初期投与試験。Chemotherapy 36(S-3): 1988 掲載予定
- 2) 山田 隆, 大沢浩一, 中根貞雄: 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。Chemotherapy 36(S-3): 1988掲載予定
- 3) RICHARD, R. F & D. G. DARCAS : A simple technic for the sexing of newborn rabbits. Lab. Anim. Sci. 22(4) : 556~558, 1972
 - 4) 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 and London, pp. 262~277, 1965
 - 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) 高橋日出彦: くすりの毒性。一般毒性検出法, 83頁, 南江堂。1973
 - 8) 今道友則: ウサギと嚙菌類の生物学と臨床医学。9~159頁, 養賢堂。1985
 - 9) GRAY, J. E & C. LEWIS : Enigma of Antibiotic-induced Diarrhea in the Laboratory Rabbit. Toxicol. Appl. Pharmacol. 8, 342, 1966
 - 10) 東出栄治: マクロライド抗生物質の発酵生産。武田研究報, 42 : 110~149, 1983.
 - 11) 栗秋 要, 三木寿雄, 瀬島行雄, 柴田正勝, 井田 昶, 岡崎雅彦: Josamycin の研究 V。Josamycin の毒性に関する研究。Jpn. J. Antibiot. 22(3) : 219~225, 1969
 - 12) MORIGUCHI, M. ; U. TAKEDA, T. HATA, A. YAMAMOTO & T. KOEDA : Effects of midecamycin acetate (Miocamycin), a new drug macrolide antibiotic on reproductive performances in rats and rabbits. Jpn. J. Antibiot. 37 : 1572~1595, 1984

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

TAKASHI YAMADA, TSUTOMU NISHIYAMA, HIROSHI OHNO and SADA O NAKANE
Research Center, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama

TE-031(A-56268) was given orally to New Zealand White rabbits at a dose of 10, 35, or 125 mg/kg from days 6~18 of gestation to examine the effects on dams and their fetuses.

1. In dams of the group given the maximum dose, 125 mg/kg, food consumption decreased and body weight tended to be suppressed.
2. Intrauterine observation on day 28 of gestation revealed normal findings in all treated groups.
3. Observation of fetuses revealed normal findings of external and viscera, and no increase in skeletal variations or anomalies attributable to the drug administration.

From the above results, we considered TE-031 not to exert teratogenic effect on rabbits treated during fetal organogenesis, and the no-effect dose level to be 35 mg/kg for dams and 125 mg/kg for fetuses.