

## Biapenem のラットにおける生殖発生毒性試験

原田 寧・田中憲夫

日本レダリー株式会社生物研究所\*

Biapenem(BIPM)の30, 100および300 mg/kgをラットの妊娠前および妊娠初期(Seg. I), 胎児の器官形成期(Seg. II)ならびに周産期および授乳期(Seg. III)に静脈内投与し, 生殖に及ぼす影響を検討した。

すべての親動物において, 投与による死亡は見られなかった。雌雄とも軟便, 剖検時の盲腸の肥大がBIPM投与群に認められた。摂餌量の低値をとまう体重増加抑制が, 雌雄ともに100 mg/kg以上の群に見られた。親動物の生殖能, 妊娠の維持, 分娩・哺育行動にBIPMの投与に関連した影響は認められなかった。

胎児に対する影響については, Seg. IIの300 mg/kg群において胎児平均体重が有意な低値を示した。しかし, いずれの試験においても致死作用, 催奇形作用はともに認められなかった。

出生児に対しては, 出生率, 生存率, 発育分化および行動機能に関して投与に起因した影響は認められなかった。出生児体重についてはSeg. IIの300 mg/kg群で生下時に, Seg. IIIの100 mg/kg以上の群で生後に低値が見られた。

F<sub>2</sub>胎児およびF<sub>2</sub>出生児については影響は認められなかった。

**Key words:** Biapenem, 生殖発生毒性, ラット

Biapenem(BIPM)は日本レダリー株式会社で開発されたカルバペネム系抗生物質である。今回, BIPMの生殖発生毒性を検索するため, ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験, 胎児の器官形成期投与試験ならびに周産期および授乳期投与試験を行ったので, その結果を報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 被験物質

BIPMはLot No. 034 (Seg. I), 035 (Seg. IおよびSeg. II), ならびに036 (Seg. III)を使用した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

F344/DuCrj (Fischer)ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し, 1週間以上の検疫馴化後, 試験に供した。

動物は, 温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度 $50 \pm 5\%$ , 換気回数1時間10回以上の空調を施したバリアシステムの無窓動物室で飼育した。照明は午前7時から午後7時まで連続12時間点灯した。飼育に際しては, つり式ステンレス二連ケージまたは床敷(オリエンタル酵母株式会社, ホワイトフレーク<sup>®</sup>)を敷いたプラスチック平底ケージを使用した。餌は, 放射線滅菌固型飼料(日本クレア株式会社, CE-2)を, 水は孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターに

よって除菌した水道水をいずれも自由摂取させた。

#### 3. 投与薬液の調製および投与方法

BIPMは生理食塩液で25 mg/mlの濃度になるよう用時に溶解し, 投与薬液として使用した。投与経路は臨床適用経路である静脈内投与とした。

#### 4. 投与量および投与期間

3カ月反復静脈内投与毒性試験<sup>1)</sup>の結果, 一過性ながら, 雄の100 mg/kg以上, 雌の300 mg/kg以上の投与群で体重の増加抑制傾向が認められた。したがって, Seg. Iの最高用量は親動物に何らかの毒性を示すと考えられる300 mg/kgとし, 以下公比3で減じ, 100および30 mg/kg投与群を設定した。また, 胎児の器官形成期静脈内投与予備試験において300 mg/kg群以上で胎児の低体重が認められたため(未発表), Seg. IIの最高用量は母動物および胎児のいずれにも影響がみられると予想される300 mg/kgとし, 以下公比3で減じ, 100および30 mg/kgとした。Seg. IIIについてはSeg. IIの投与量に準換して300, 100および30 mg/kgの3用量とした。

投与期間はSeg. Iでは雄は交配開始前63日から交配終了まで, 雌については交配開始前14日から妊娠7日まで, Seg. IIでは妊娠6日から妊娠17日まで, Seg. IIIでは妊娠17日から分娩後21日までとした。なお, 交尾

\* 〒353 埼玉県志木市柏町1丁目6番34号

確認日を妊娠0日、分娩を確認した日を分娩後0日とした。

## 5. 観察方法

### 1) 妊娠前および妊娠初期投与試験 (Seg. I)

雌雄とも1群あたりの動物数を30匹とした。試験開始日の動物の週齢は、雄が6週齢、雌が11週齢、体重範囲は雄が131.6g～173.8g、雌が151.8g～192.6gであった。試験期間を通して毎日、一般状態および死亡の有無を観察した。体重および摂餌量の測定は雄では投与開始から交配開始まで毎週1回、雌では投与開始2週間前から交配開始まで毎週1回行った。さらに交尾が確認された雌の体重について、妊娠0日から20日まで毎日、摂餌量については2日ないし3日間隔で測定した。

雌の全例について投与開始14日前から交尾が成立するまでの期間、毎日陰脂垢塗抹標本を作製し、性周期の観察を行った。交配は同一群内の雌雄1対1で行い2週間を限度とした(一次交配)。交尾の確認は毎朝陰栓および陰脂垢中の精子の有無を調べることにより行い、交尾の確認された雌は雄から分離して個別に飼育した。2週間以内に交尾が成立しなかった動物については、相手を変えてさらに2週間同居させた(二次交配)。この時、雌については同一群内のすでに交尾の確認された雄と、雄については無処置の雌を交配相手に使用した。雄、雌とも群ごとの交尾率および受胎率を求めた。二次交配終了時点においても交尾しなかった動物は、剖検して生殖器官を摘出し、病理組織学的検査を実施した。交尾の確認された雌は交配終了後に頸椎脱臼により安楽死させ、剖検して胸腹腔内臓器を観察した。この時相手の雌が妊娠しなかった雄については、精巣剖面塗抹標本を作製し、精子の有無を確認した。

交尾の成立した雌は妊娠20日に剖検し、妊娠の有無を確認後、剖検し、胸腹腔内臓器を観察した。妊娠雌は卵巣および子宮を摘出して妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数とその状態を調べた。またこれらの結果から、着床率、胎児生存率・死亡率を算出した。生存胎児については雌雄の判別、体重測定および口腔を含む外表異常の検査を実施した。さらに各腹ごとに約1/3の胎児をホルマリン固定後、内臓検査に供し、残りの約2/3の胎児をDawson法<sup>2)</sup>に準じて骨標本を作製後、骨格検査に供した。なお、内臓検査は頭部をWilson法<sup>3)</sup>、胸部を西村の顕微解剖法<sup>4)</sup>に準じ、腹部を一般的な顕微解剖法にしたがって実施した。骨格検査では異常および変異の有無を観察するとともに、骨化進行度の指標として仙尾椎および胸骨分節の骨化核数を計測した。

### 2) 胎児の器官形成期投与試験 (Seg. II)

1群あたりの妊娠動物数は、47～50匹とし、このうち27～30匹を妊娠末期に剖検する群(妊娠末期検査群)とし、残りの20匹を自然分娩させる群(自然分娩検査群)とした。交配開始日の週齢は10週齢、妊娠0日における体重範囲は154.9g～193.6gであった。母動物は試験期間中毎日、一般状態および死亡の有無を観察した。体重は、妊娠期間中は毎日、分娩後は毎週1回剖検時まで測定した。摂餌量は妊娠期間中は2日ないし3日間隔、分娩後は毎週1回剖検時まで測定した。

妊娠末期検査群は妊娠20日に剖検し、Seg. Iと同様に母動物および胎児を処置した。自然分娩検査群は自然分娩させ、妊娠期間ならびに分娩状態を観察した。分娩母動物には分娩後21日まで児を哺育させ、その間哺育状態を毎日観察し、分娩後21日に剖検した。剖検時には着床痕数を調べ出生率を算出した。

F<sub>1</sub>出生児は、出産の終了を確認後、生死、性別を判定し、外表異常の有無を検査し、個々に体重を測定した。出生確認日を生後0日とし、生後4日に原則として1母体当たり雌雄各4匹を残して淘汰した。雌雄いずれかの個体数が4匹に満たない場合は合計が8匹となるように調整した。生後21日の離乳時には雌雄を分けて1腹ごとに群飼いたした。なお、生後4日に出生児に対する生存率(生後4日生存率)および生後21日に生後4日の同腹児数調整後からの生存率(離乳率)を、それぞれ求めた。F<sub>1</sub>児は生後毎日一般状態を観察し、毎週1回生後10週まで個別に体重を測定した。

生後3週までに形態分化の指標として、耳介伸展、被毛状態、切歯萌出および眼瞼開裂についての検査を、行動機能検査として、正向反射、グリッパ反射、耳介反射、ピポッティング、背地走性、断崖落下回避、歩行、聴覚性驚愕反応、痛覚反応、視覚反応、角膜反射および自由落下を実施した。性成熟の指標として、6週齢以降に雄では精巣下降の有無、雌では腔口開口の有無の検査を実施した。また生後42日および70日に原則として各腹雌雄1匹ずつ選んで剖検し、肉眼的観察を行った。行動検査として、生後5週齢に達した雄についてAnimex<sup>®</sup>を用いた自発運動量の測定を、生後6週齢に達した雌雄について多単位T型水路迷路を用いた学習行動試験を、生後8週齢に達した雄についてオープンフィールドを用いた情動性試験を実施した。また、生後8週齢に達した時点から生殖能力検査に用いる予定の雌は、交尾が確認されるまで毎日陰脂垢を採取し性周期検査を実施した。生殖能力検査として10週齢に達した雌雄を兄妹交配を避けて同一群内で交配させた。生殖能力検査はSeg. Iと同様の方法で行った。交尾成立雌のうち、約半数は妊娠末期検査群、残りの半数は自然分娩

検査群とし、妊娠末期検査群は親動物と同様の処置を施した。自然分娩検査群は自然分娩させ、親動物と同様に出生観察、体重測定およびF<sub>2</sub>出生児の観察等を行った。分娩後21日にすべてのF<sub>1</sub>母動物およびF<sub>2</sub>出生児を剖検した。

### 3) 周産期および授乳期投与試験 (Seg. III)

各群28もしくは29匹の妊娠動物をすべて自然分娩させ、Seg. IIにおける自然分娩検査群と同様に、分娩および哺育状態の観察を実施した。交配開始日の雌の週齢は10週齢、妊娠0日における体重範囲は154.5g~186.1gであった。出生児の観察および各種検査については、生後21日にも剖検を実施した以外は、Seg. IIと同様の方法で実施した。

### 6. 統計処理法

体重、摂餌量、骨格検査における仙尾椎・胸骨分節の骨化核数、着床数および一次交配において交尾までに要した日数についてはt検定を実施した。着床率、胎児生存率・死亡率、出生率、生後4日生存率、離乳率ならびに各種行動検査については、t検定もしくはWilcoxonの順位和検定を実施した。なお、胎児体重および出生児体重については腹ごとに雌雄別の平均値を、仙尾椎・胸骨分節の骨化核数については腹ごとに平均値を算出し、その値から各群ごとの平均値および標準偏差を求めた。出産率、交尾率、受胎率、性周期、出生児の行動発達・発育分化検査および胎児の外表・骨格・内臓検

査における異常および変異の出現頻度、さらに一般状態および剖検における異常所見の出現頻度については $\chi^2$ 検定を行った。

t検定において有意差の認められたデータについてはBartlett法により各群の分散の一様性を検定した。分散が一樣な場合には一元配置法による分散分析を行い、分散が一樣でない場合には、データを順位変換した後一元配置の分散分析を行い、有意性が認められた場合には対照群と投与各群との差についてDunnett型あるいはScheffé型の検定を行った。t検定、ならびにDunnett法あるいはScheffé法のどちらかの方法において有意差を認めたものを最終的に対照群と各投与群との間に有意な差があるものとした。

なお、いずれの検定方法においても有意水準は5%とした。

## II. 結 果

### 1. 妊娠前および妊娠初期投与試験

すべての群の雌雄ともに、試験期間を通して死亡例はみられなかった。雄では試験1日(投与開始日を試験0日とする)以降からほぼ3週間にわたり、雌では試験1日からほぼ2週間にわたり、BIPM投与全群で軟便が観察された。軟便の出現頻度は雄では100 mg/kgおよび300 mg/kg群、雌ではBIPM投与全群で対照群と比較して有意な高値を示した。

雄の体重については100 mg/kg群の試験7日ならびに

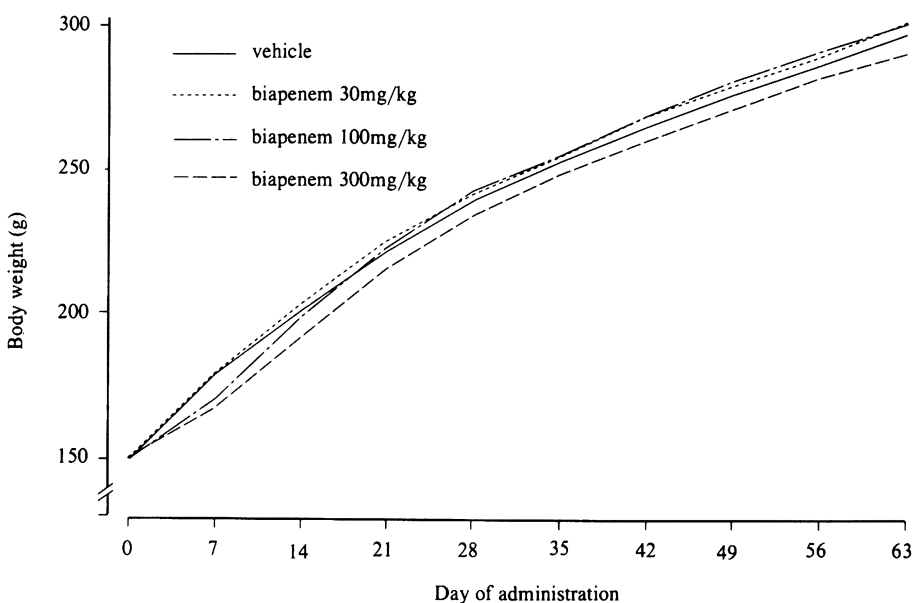


Fig. 1. Body weight changes of male rats (Segment I)

300 mg/kg群の試験 7日および 14日に有意な低値が認められたが、試験 21日以降はいずれの投与群でも対照群との間に統計学的に有意な差はみられなかった (Fig. 1)。摂餌量は 100 mg/kg群および 300 mg/kg群の試験 0~7日において有意な低値が認められた。雌の体重については 100 mg/kg群および 300 mg/kg群の試験 7日および 14日に有意な低値が認められた。さらに 300 mg/kg群では妊娠 0日、1日および 4日に有意な低値が認められたが、妊娠 5日以降いずれの群においても対照群との差はみら

れなかった (Fig. 2)。摂餌量については 30 mg/kgおよび 100 mg/kg群では試験 0~7日、300 mg/kg群では試験 0~13日において有意な低値が認められた。生殖能力検査では BIPM 投与群の交尾率および受胎率に影響はみられなかった。平均発情周期は投与前、投与後ともに対照群と各投与群との間に有意な差は認められなかった。一次交配における交尾までに要した日数についても対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった (Table 1)。二次交配終了時点においても交尾の成立しなかつ

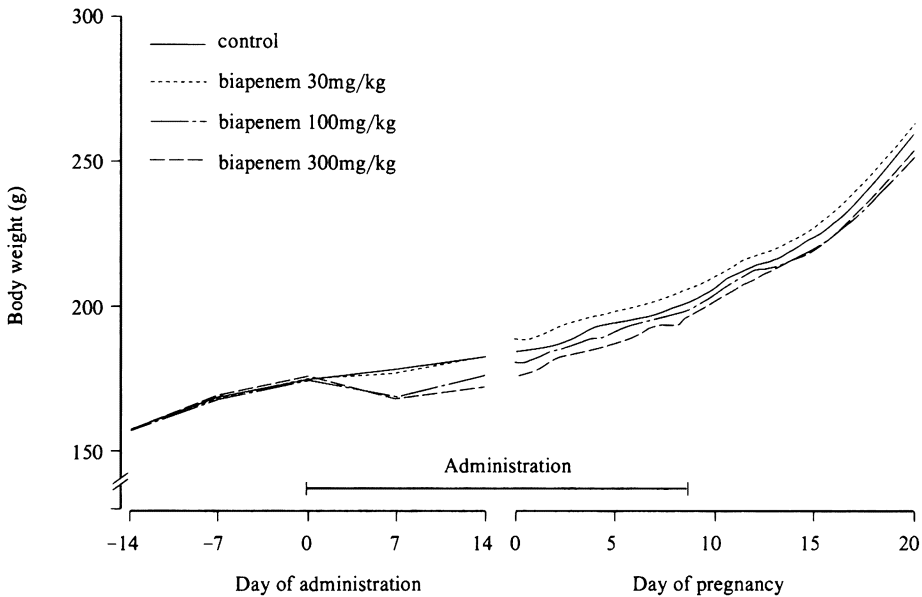


Fig. 2. Body weight changes of female rats (Segment I)

Table 1. Summary of estrous cycle, mating and fertility (Segment I)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
Mean length of estrous cycle (days)					
Pre-dosing period		4.3	4.2	4.4	4.4
Dosing period		4.9	4.8	5.0	5.2
Mean interval from mating to copulation during the first mating period (days)		4.0	4.7	4.2	3.4
No. of mated animals	Male/Female	30/30	30/30	30/30	30/30
No. of animals with successful copulation	Male/Female	30/30	26/29	30/30	30/29
Total copulation index <sup>a)</sup>	Male/Female	100/100	86.7/96.7	100/100	100/96.7
No. of animals confirmed fertile	Male/Female	23/23	22/24	25/25	26/24
Total fertility index <sup>b)</sup>	Male/Female	76.7/76.7	84.6/82.8	83.3/83.3	86.7/82.8

a) : (No. of animals with successful copulation/No. of mated animals) × 100

b) : (No. of animals confirmed fertile/No. of animals with successful copulation) × 100

た動物について生殖器官の病理組織学的検索を実施したが、いずれの動物にも特記すべき所見は認められなかった。妊娠が成立しなかった雌の相手の雄全例に正常な精子の存在が確認された。

雄を剖検した結果、盲腸の肥大が 30 mg/kg で 7 例、100 mg/kg で 21 例および 300 mg/kg で 24 例に観察され、全群で有意に高値であった。この他、30 mg/kg 群の 1 例に精巣の赤色化が認められたが、この雄の交配相手の雌は正常に妊娠した。妊娠雌の剖検の結果、盲腸の肥大が 30 mg/kg 群で 3 例、100 mg/kg 群で 8 例および 300 mg/kg 群で 16 例に観察された。盲腸の肥大の出現頻度は 100 mg/kg 群および 300 mg/kg 群において有意な高値を示した。この他横隔膜ヘルニアが 100 mg/kg 群および 300 mg/kg 群に各 1 例観察された。

妊娠黄体数、着床数、生存胎児数・死亡児数、胎児生存率・死亡率について、BIPM 投与に起因すると考えられる影響は認められなかった。着床率については 100 mg/kg 群で対照群と比較して有意な低値が認められたが、用量相関性はみられず、偶発的なもので、BIPM の影響とは考えられなかった。胎児平均体重についても対照群と各投与群との間に有意な差は認められなかった (Table 2)。

胎児の外表異常、内臓異常はいずれの群においても観察されなかった。骨格異常については、300 mg/kg 群の 1 例に腰椎椎体癒合が観察された。骨格変異について

は一般的にラットに多くみられる変異のみが各群 4~8 例に観察された。これらの異常および変異の出現頻度には対照群と比較して有意な差はみられなかった。内臓検査の変異としてみられたものは胸腺頸部遺残および臍帯動脈の左側走行のみであり、BIPM 投与群におけるそれらの出現頻度には対照群と比較して有意差が認められなかった (Table 3)。

## 2. 胎児の器官形成期投与試験

試験期間を通して親動物の死亡は見られなかった。投与開始から妊娠末期まで BIPM 投与全群において軟便が対照群と比較して高頻度に観察されたが、投与終了後には観察されなかった。

母動物の体重については 100 mg/kg 群の妊娠 10 日から 16 日、300 mg/kg 群の妊娠 8 日から分娩後 0 日において有意な低値が認められた。分娩後 7 日以降はいずれの投与群にも対照群と比較して有意差は認められなかった (Fig. 3)。摂餌量については 100 mg/kg 群の妊娠 6 日から 12 日、300 mg/kg 群の妊娠 6 日から 18 日にかけて有意な低値が認められたが、投与終了後の 100 mg/kg 群の妊娠 18 日から 20 日および 300 mg/kg 群の分娩後 0 日から 7 日では有意な高値が認められた。

妊娠末期検査群の剖検において、盲腸の肥大が BIPM 投与全群に 8~11 例認められ、この出現頻度はいずれの投与群でも対照群と比較して高値を示した。また自然分娩検査群の剖検においても同様の所見が 30 mg/kg 群、

Table 2. Reproductive data of dams (Segment I)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		23	24	25	24
No. of corpora lutea (Mean ± S. D.)		239(10.4±1.3)	266(11.1±1.5)	243( 9.7±1.3)	228( 9.5±1.1)
No. of implants (Mean ± S.D.)		226( 9.8±1.8)	246(10.3±2.4)	209( 8.4±2.2)	218( 9.1±1.4)
Rate of implantation (%)		94.3	92.4	85.2*	95.7
Intrauterine deaths	No. of deaths (Mean ± S.D.)	10( 0.4±0.7)	11( 0.5±0.7)	8( 0.3±0.9)	6( 0.3±0.7)
	Implantation sites	0	0	0	0
	Resorptions	10	11	8	6
	Macerated fetuses	0	0	0	0
	Intrauterine mortality (%)	4.9	4.3	3.3	2.6
Live fetuses	No. of fetuses (Mean ± S.D.)	216( 9.4±2.0)	235( 9.8±2.4)	201( 8.0±2.2)	212( 8.8± 1.5)
	Viability (%)	95.1	95.7	96.7	97.4
	No. of males/No. of females	111/105	105/130	101/100	119/93
Mean body weight of fetuses (g, Mean ± S.D.)	Male	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1
	Female	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2

Rate of implantation, viability and intrauterine mortality were calculated by litter-basis analysis.

\* : Significantly different from the vehicle control group at  $p < 0.05$

Table 3. Summary of external, skeletal and visceral findings of F<sub>1</sub> Fetuses (Segment I)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
External examination	No. of fetuses examined	216	235	201	212
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
Skeletal examination	No. of fetuses examined	152	165	140	148
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	1
	Types of malformation				
	Fusion of lumbar vertebral bodies	0	0	0	1
	No. of fetuses with variations	8	4	6	6
	Types of variation				
	Splitting of ossification center of thoracic vertebral body	3	0	3	0
	Splitting of ossification center of lumbar vertebral body	0	0	0	1
	Splitting of sternebra	3	2	0	1
	Asymmetry of sternebrae	1	2	0	3
	Cervical rib	0	0	3	1
	14th rib	1	0	1	0
Visceral examination	No. of fetuses examined	64	70	61	64
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
	No. of fetuses with variations	13	22	13	17
	Types of variation				
	Persistence of thymus on the side of thyroid	13	21	13	16
Existence of umbilical artery on the left side of bladder	0	2	0	1	

100 mg/kg群および300 mg/kg群のそれぞれ2例、1例および8例に認められ、この出現頻度は300 mg/kg群で対照群と比較して高値を示した。この他横隔膜ヘルニア等が少数例認められたが、BIPMの影響と考えられる所見は認められなかった。妊娠末期検査群における不妊動物の剖検では異常所見は観察されなかった。自然分娩検査群において、出産しなかった動物(100 mg/kg群および300 mg/kg群の各1例)は、いずれも着床痕跡が観察されたことから妊娠の成立が確認されたが、これらの動物の剖検では異常所見は認められなかった。出生児が全部生後4日までに死亡した母動物は対照群に1例、100 mg/kg群に3例および300 mg/kg群に5例認められたが、剖検において異常所見は観察されなかった。

妊娠黄体数、着床数、着床率、生存胎児数・死亡児数に影響は認められなかった。しかし300 mg/kg群の胎児生存率および死亡率はそれぞれ有意な低値および有意

な高値を示した。また、胎児の平均体重については300 mg/kg群において雌雄ともに有意な低値が認められた(Table 4)。

F<sub>1</sub>胎児の外表異常としては100 mg/kg群で鎖肛が1例観察された。骨格異常は頸椎椎弓癒合が対照群と100 mg/kg群で各1例認められた。内臓異常はいずれの群においても観察されなかった。骨格検査および内臓検査における変異としては一般的に多く見られる変異が各群に数例観察されたがいずれもその出現頻度に差は見られなかった(Table 5)。

自然分娩させた母動物の出産率および出生率はいずれの群においても90%以上の高値を示し、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。妊娠期間についても全投与群に異常は見られなかった。F<sub>1</sub>出生児の総数および性比にはBIPMの影響は見られなかった。同腹児数調整後の哺育期間中離乳までに死亡した児は、

対照群の雄1例、30 mg/kg群の雄2例、雌1例の外には、認められなかった。生後4日生存率および離乳率については対照群と各投与群との間に差は見られなかった (Table 6)。

離乳後の死亡例はいずれも事故等によるものでBIPM投与に関連したものではなかった。

哺育期間中に死体を発見した児および生後4日に淘汰した児の骨格検査では、骨格異常は認められなかった。変異については頸肋が少数例観察されたがその出現頻度には差は見られなかった。なお、生後4日に淘汰した児の仙尾椎・胸骨分節の骨化核数についても対照群と各投与群との間に有意差は見られなかった。

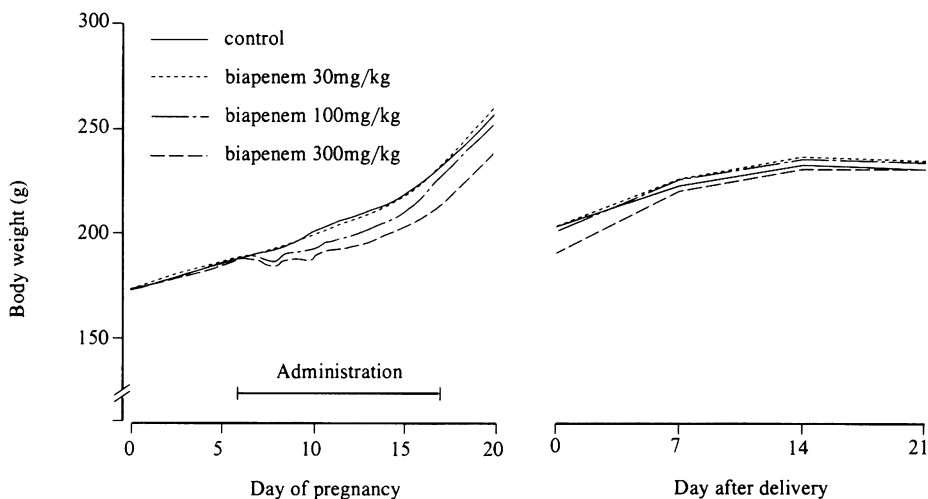


Fig. 3. Body weight changes of dams during pregnancy and after delivery (Segment II)

Table 4. Reproductive data of dams (Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		28	27	30	28
No. of corpora lutea (Mean $\pm$ S. D.)		315(11.3 $\pm$ 1.6)	310(11.5 $\pm$ 1.7)	334(11.1 $\pm$ 2.0)	309(11.0 $\pm$ 1.7)
No. of implants (Mean $\pm$ S.D.)		298(10.6 $\pm$ 1.9)	290(10.7 $\pm$ 2.7)	320(10.7 $\pm$ 2.9)	302(10.8 $\pm$ 1.9)
Rate of implantation (%)		94.4	92.4	93.7	97.6
Intrauterine deaths	No. of deaths (Mean $\pm$ S.D.)	9( 0.3 $\pm$ 0.7)	10( 0.4 $\pm$ 0.6)	11( 0.4 $\pm$ 0.7)	39( 1.4 $\pm$ 2.7)
	Implantation sites	0	0	0	22
	Resorptions	9	10	11	17
	Macerated fetuses	0	0	0	0
	Intrauterine mortality (%)	3.1	3.1	3.2	13.3*
Live fetuses	No. of fetuses (Mean $\pm$ S.D.)	289(10.3 $\pm$ 2.0)	280(10.4 $\pm$ 2.6)	309(10.3 $\pm$ 2.9)	263( 9.4 $\pm$ 3.3)
	Viability (%)	96.9	96.9	96.8	86.7*
	No. of males/No. of females	143/146	141/139	163/146	127/136
Mean body weight of fetuses (g, Mean $\pm$ S.D.)	Male	3.2 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2*
	Female	3.0 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.2*

Rate of implantation, viability and intrauterine mortality were calculated by litter-basis analysis.

\* : Significantly different from the vehicle control group at  $p < 0.05$

Table 5. Summary of external, skeletal and visceral findings of F<sub>1</sub> Fetuses (Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
External examination	No. of fetuses examined	289	280	309	263
	No. of fetuses with malformations	0	0	1	0
	Types of malformation Anal atresia	0	0	1	0
Skeletal examination	No. of fetuses examined	202	195	216	182
	No. of fetuses with malformations	1	0	1	0
	Types of malformation Fusion of cervical vertebral arches	1	0	1	0
	No. of fetuses with variations	3	4	7	9
	Types of variation Small thoracic vertebral body	0	1	0	0
	Asymmetry of sternbrae	0	0	1	0
	Cervical rib	2	2	6	8
	14th rib	1	1	0	1
Visceral examination	No. of fetuses examined	87	85	93	81
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
	No. of fetuses with variations	17	25	13	13
	Types of variation Persistence of thymus on the side of thyroid	16	23	12	10
	Diaphragmatic hernia	1	1	0	0
	Existence of umbilical artery on the left side of bladder	1	1	1	4

生後42日および70日における剖検では、雄に精巣未発達および横隔膜ヘルニアが少数例認められたがこれらの出現頻度に有意差は見られなかった。

F<sub>1</sub>出生児の体重推移では、雌雄とも300 mg/kg群において生下時の体重が対照群と比較して有意な低値を示した。しかし1週以降の体重には差は見られなかった。

生後3週齢までに実施したF<sub>1</sub>児の発育分化検査および各種行動機能検査ならびに6週齢以降実施した性成熟検査ではいずれの項目においても対照群と各投与群との間に有意な差はなかった。生後5週齢における自発運動量の測定、生後6週齢における多単位T型水路迷路を用いた学習試験においても対照群と比較して各投与群にBIPMの影響と考えられる明らかな差を認めなかった。生後8週齢におけるオープンフィールドを用いた情動性の検査を実施したところ、300 mg/kg群で、探索行動の

減少が認められた (Table 7)。

平均発情周期はすべての群で4.6~4.9日であり、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。二次交配を含めた交尾率、交尾に要した日数については対照群と各投与群との間に有意な差は見られなかった。受胎率は雌雄とも全群において83.3~100%であった (Table 8)。

交配に用いたF<sub>1</sub>雄の剖検では、横隔膜ヘルニアが対照群、100 mg/kg群および300 mg/kg群に1~2例観察された。また、精巣未発達および赤色化が300 mg/kg群の1例に観察されたが、この動物の交配相手の雌は正常に妊娠した。なお、妊娠が成立しなかった雌の相手の雄には、全例に正常な精子の存在が確認された。交尾が確認されなかった雄の生殖器官の病理組織学的検査では異常所見は見られなかった。これらの雄の交配相手



Table 6. Findings at delivery and during the nursing period of dams (Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		20	20	20	20
No. of dams with live newborns		20	20	19	19
Delivery index (%) <sup>a)</sup>		100	100	95.0	95.0
Delivery day (No. of dams)	Day 20 of pregnancy	0	1	0	0
	Day 21 of pregnancy	16	16	18	17
	Day 22 of pregnancy	3	3	1	2
	Day 23 of pregnancy	1	0	0	0
No. of implantation sites (Mean ± S.D.)		217(10.9±2.6)	231(11.6±1.4)	212(10.6±2.8)	231(11.6±1.4)
No. of newborns (Male/Female)		206(109/97)	222(105/117)	202(111/91)	217(103/114)
Birth index (%) <sup>b)</sup>		95.6	96.0	90.7	93.4
No. of pups on day 4 after birth (Male/Female)		195(103/92)	219(103/116)	165(97/68)	154(71/83)
Viability on day 4 after birth (% , Male/Female) <sup>c)</sup>		95.0(95.0/95.0)	98.7(98.0/99.3)	83.3(84.2/82.3)	73.2(73.7/72.6)
No. of pups after culling (Male/Female)		146(76/70)	159(77/82)	126(69/57)	112(54/58)
No. of pups at weaning (Male/Female)		145(75/70)	156(75/81)	126(69/57)	112(54/58)
Weaning rate (% , Male/Female) <sup>d)</sup>		99.4(98.7/100)	98.2(97.5/98.8)	100(100/100)	100(100/100)

a) : (No. of dams with live pups/No. of pregnant females) × 100

b) : (No. of newborns/No. of implantation sites) × 100

c) : (No. of live pups on day 4 after birth/No. of newborns) × 100

d) : (No. of live pups at 3weeks of age/No. of pups after culling) × 100

Birth index, viability on day 4 after birth and weaning rate were calculated by litter- basis analysis.

の無処置雌の剖検においても異常所見は見られなかった。

F<sub>1</sub>雌の体重において100 mg/kg群の妊娠7および14日さらに分娩後0日および21日に有意な低値が認められたが、明らかな用量相関性は認められず、BIPM投与に起因した影響とは考えられなかった。

F<sub>1</sub>雌の妊娠末期検査群の剖検では横隔膜ヘルニアが対照群および100 mg/kg群にそれぞれ2例および1例認められた他は特記すべき所見は見られなかった。また不妊動物の剖検では異常所見は認められなかった。F<sub>1</sub>雌の自然分娩検査群の剖検についても横隔膜ヘルニアが対照群に1例見られた他は異常は見られなかった。出産しなかった雌はすべて不妊動物であったが、剖検では異常所見は認められなかった。

F<sub>1</sub>雌の妊娠末期検査における生殖データについてはいずれの項目についても対照群と各投与群との間に有意な差は見られなかった (Table 9)。

F<sub>2</sub>胎児の外表、骨格および内臓異常はいずれも観察されなかった。骨格および内臓変異についてはいずれも自然発生的に多く見られるものがすべての群にわたり散見された。これらの変異の出現頻度および骨格検査における仙尾椎・胸骨分節の骨化核数については対照

群と各投与群との間で有意差は認められなかった (Table 10)。

自然分娩させたF<sub>1</sub>雌の出産率は100%であった。妊娠期間の長さ、着床痕跡数、出生児数および出生率にはBIPMに起因すると考えられる影響は認められなかった。出生時の一般状態および哺育状態はすべての動物が良好であった。F<sub>2</sub>出生児の総数および性比は対照群と各投与群間で明らかな差はなく、生後4日生存率についても有意差は認められなかった。離乳率は全群100%であった (Table 11)。F<sub>2</sub>出生児の一般状態、体重および剖検時の所見等に投与に関連した影響は見られなかった。

### 3. 周産期および授乳期投与試験

親動物の死亡は認められなかった。妊娠18日から剖検日までBIPM投与全群に軟便が対照群と比較して高頻度に認められた。

母動物の100 mg/kg群の分娩後7日および300 mg/kg群の妊娠19日から分娩後14日まで体重の有意な低値が認められた (Fig. 4)。母動物における摂餌量については30 mg/kg群および100 mg/kg群の妊娠18~20日、ならびに300 mg/kg群の妊娠15~20日に有意な低値が認められた。

母動物の出産率はすべての群で100%であり、妊娠期間の長さ、着床痕跡数、出生児数および出生率につい

Table 7. Physical and behavioral development in F<sub>1</sub> pups (Segment II)

Items			Vehicle control		biapenem(mg/kg)					
					30		100		300	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Physical development (No. of pups undeveloped/ No. of pups examined)	Ear unfurling	on day 4 after birth	0/76	0/70	0/77	0/82	0/69	0/57	0/54	0/58
	Hair growth	At 1 week of age	0/76	0/70	0/77	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58
		At 2 weeks of age	0/75	0/70	0/76	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58
		At 3 weeks of age	0/75	0/70	0/75	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58
	Tooth eruption	At 2 weeks of age	0/75	0/70	0/76	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58
	Eyelid opening	At day 18 after birth	2/75	0/70	1/75	2/81	5/69	2/57	2/54	0/58
		At 3 weeks of age	0/2	0/0	0/1	0/2	0/5	0/2	0/2	0/0
Testicular descensus	At 6 weeks of age	0/74	—	0/73	—	0/69	—	0/54	—	
Vaginal opening	At 6 weeks of age	—	18/68	—	13/76	—	9/57	—	10/58	
	At 7 weeks of age	—	4/14	—	2/12	—	1/7	—	2/7	
	At 8 weeks of age	—	0/4	—	0/2	—	0/1	—	0/2	
Reflexes and responses (No. of pups defected/ No. of pups examined)	Righting reflex Palmar grasp Pinna response Pivoting	At 1 week of age	0/76	0/70	0/77	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58
		0/76	0/70	0/77	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58	
		0/76	0/70	0/77	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58	
		0/76	0/70	0/77	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58	
	Walking Negative geotaxis Cliff drop aversion Auricular startle response Pain response	At 2 weeks of age	0/75	0/70	0/76	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58
		0/75	0/70	1/76	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58	
		0/75	0/70	0/76	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58	
		0/75	0/70	1/76	0/81	0/69	0/57	0/54	0/58	
	Visual function Corneal reflex Air righting	At 3 weeks of age	0/75	0/70	0/70	0/78	0/69	0/57	0/54	0/58
		0/75	0/70	0/70	0/78	0/69	0/57	0/54	0/58	
1/75		3/70	1/70	2/78	0/69	1/57	0/54	0/58		
Spontaneous locomotor activity (Mean ± S.D.)	No. of pups examined	16	—	15	—	15	—	13	—	
	Total counts for 22 hours (Mean ± S.D.)	25546 ± 4119	—	23366 ± 2664	—	27217 ± 6538	—	24748 ± 6496	—	
Water T- maze test	No. of pups examined		20	18	20	19	20	20	20	20
	Mean no. of errors	1st day	7.8	9.1	8.3	10.2	8.6	8.4	8.6	9.0
		2nd day	1.6	3.1	2.6	2.5	2.0	2.4	2.4	4.1
		3rd day	0.5	0.9	0.3	1.1	0.3	0.6	0.9	1.4
Mean swimming time (sec.)	1st day	53	59	55	64	59	60	61	61	
	2nd day	21	30	25	27	26	26	25	20	
	3rd day	16	18	15	18	17	17	18	21	
Open field test	No. of pups examined		18	—	18	—	16	—	14	—
	Mean time on the field (sec.)	Corner	93.3	—	105.3	—	102.2	—	111.2*	—
		Periphery	72.0	—	63.9	—	61.5	—	62.2	—
		Center	15.0	—	10.8	—	10.1	—	6.6*	—
	Mean no. of feces	1.1	—	0.9	—	0.9	—	1.1	—	
	Mean no. of urinations	0.8	—	0.9	—	0.7	—	0.9	—	
	Mean no. of passing blocks	52.8	—	51.4	—	48.9	—	41.8*	—	
Mean no. of entered blocks	14.9	—	14.6	—	14.2	—	13.5	—		

— : Not examined

\* : Significantly different from the vehicle control group at p &lt; 0.05

では対照群と各投与群との間に差は見られなかった。母動物の分娩状態はいずれの動物も良好であった。

全出生児が死亡した母動物が BIPM 各投与群に 1~3 例認められたが、これらの動物の出現頻度は対照群と差がなかった。F<sub>1</sub> 出生児の総数および性別についてはいずれの群においても明かな差は見られなかった。生後 4 日生存率および離乳率には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった (Table 12)。生後 4 日から離乳までに対照群で雄が 3 匹死亡した以外は、離乳までに

死亡した児はなかった。離乳後の死亡は 30 mg/kg 群の雌雄各 1 例と 300 mg/kg 群の雌 1 例が事故死した以外に認められなかった。

母動物の剖検では、盲腸の肥大が 30 mg/kg 群、100 mg/kg 群および 300 mg/kg 群にそれぞれ 8 例、14 例および 19 例認められ、全群において有意な高値であった。この他横隔膜ヘルニアが全群に 1~2 例認められたが、この出現頻度には対照群と各群間で有意差は認められなかった。

Table 8. Summary of estrous cycle, mating and fertility in F<sub>1</sub> pups (Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
Mean length of estrous cycle (days)		4.9	4.6	4.8	4.8
Mean interval from mating to copulation during the first mating period (days)		5.1	3.7	4.8	4.9
No. of mated animals	Male/Female	34/34	36/36	31/31	28/28
No. of animals with successful copulation	Male/Female	33/34	36/36	29/31	27/28
Total copulation index <sup>a)</sup>	Male/Female	97.1/100	100/100	93.5/100	96.4/100
No. of animals confirmed fertile	Male/Female	30/31	30/30	27/29	27/28
Total fertility index <sup>b)</sup>	Male/Female	90.9/91.2	83.3/83.3	93.1/93.5	100/100

a): (No. of animals with successful copulation/No. of mated animals) × 100

b): (No. of animals confirmed fertile/No. of animals with successful copulation) × 100

Table 9. Reproductive data of F<sub>1</sub> dams (Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		17	14	13	14
No. of corpora lutea (Mean ± S. D.)		181(10.6 ± 1.1)	150(10.7 ± 1.5)	136(10.5 ± 1.3)	141(10.1 ± 1.1)
No. of implants (Mean ± S.D.)		173(10.2 ± 1.0)	147(10.5 ± 1.5)	134(10.3 ± 1.3)	135( 9.6 ± 1.6)
Rate of implantation (%)		95.8	98.0	98.6	95.4
Intra-uterine deaths	No. of deaths (Mean ± S.D.)	6( 0.4 ± 0.5)	3( 0.2 ± 0.4)	5( 0.4 ± 0.5)	5( 0.4 ± 0.6)
	Implantation sites	0	0	0	0
	Resorptions	6	3	5	5
	Macerated fetuses	0	0	0	0
	Intrauterine mortality (%)	3.6	2.2	4.1	4.0
Live fetuses	No. of fetuses (Mean ± S.D.)	167( 9.8 ± 1.2)	144(10.3 ± 1.6)	129( 9.9 ± 1.6)	130( 9.3 ± 1.8)
	Viability (%)	96.4	97.8	95.9	96.0
	No. of males/No. of females	71/96	70/74	64/65	74/56
Mean body weight of fetuses (g, Mean ± S.D.)	Male	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.1
	Female	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1

Rate of implantation, viability and intrauterine mortality were calculated by litter-basis analysis.

F<sub>1</sub> 出生児の体重推移において、雄では 100 mg/kg 群の生後 0 週および生後 6 週から 8 週ならびに 300 mg/kg 群の生後 1 週において、雌では 100 mg/kg 群の生後 5 週から 9 週および 300 mg/kg 群の生後 0 週から 2 週および 4 週から 9 週まで有意な低値が認められた (Fig. 5, Fig. 6)。

哺育期間中の死亡児の骨格検査において異常は認められなかった。変異としては頸肋、腰肋、胸骨分節の非対称およびそれらの合併症が、対照群、100 mg/kg 群および 300 mg/kg 群に 1~3 例ずつ認められた。生後 4 日に淘汰した児の骨格検査では、異常としては頸椎椎弓

の癒合および変形、胸骨分節の癒合が BIPM 投与各群に 1~3 例認められた。また頸肋、腰肋、胸骨分節の非対称および胸椎椎体分離などの変異が全群に 3~9 例認められた。これらの異常ならびに変異の出現頻度にはいずれも対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。仙尾椎・胸骨分節の骨化核数についても対照群と各投与群との間で有意差は認められなかった。

生後 21 日、42 日および 70 日の解剖では、胸腺頸部遺残、精巢未発達、横隔膜ヘルニアおよび水腎症と尿管の拡張などの所見がいずれも少数例ずつ散見された。こ

Table 10. Summary of external, skeletal and visceral findings of F<sub>2</sub> Fetuses(Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
External examination	No. of fetuses examined	167	144	129	130
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
Skeletal examination	No. of fetuses examined	117	100	91	92
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
	No. of fetuses with variations	11	4	6	8
	Types of variation				
	Asymmetry of sternebrae	1	0	0	0
	Cervical rib	9	4	6	6
14th rib	1	0	0	2	
Visceral examination	No. of fetuses examined	50	44	38	38
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
	No. of fetuses with variations	17	16	12	11
	Types of variation				
	Persistence of thymus on the side of thyroid	14	13	11	10
	Diaphragmatic hernia	2	3	0	1
	Existence of umbilical artery on the left side of bladder	1	0	2	0

Table 11. Findings at delivery and during the nursing period of F<sub>1</sub> dams (Segment II)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		14	16	16	14
No. of dams with live newborns		14	16	16	14
Delivery index (%) <sup>a)</sup>		100	100	100	100
Delivery day (No. of dams)	Day 21 of pregnancy	9	16	14	13
	Day 22 of pregnancy	5	0	2	1
No. of implantation sites (Mean ± S.D.)		138(9.9 ± 1.2)	156(9.8 ± 1.6)	153(9.6 ± 1.7)	145(10.4 ± 1.3)
No. of newborns (Male/Female)		133(65/68)	149(72/77)	150(84/66)	141(66/75)
Birth index (%) <sup>b)</sup>		96.3	95.2	98.0	97.0
No. of pups on day 4 after birth (Male/Female)		128(63/65)	149(72/77)	150(84/66)	139(65/74)
Viability on day 4 after birth (% , Male/Female) <sup>c)</sup>		97.2(98.0/96.4)	100(100/100)	100(100/100)	98.7(99.1/98.2)
No. of pups after culling (Male/Female)		111(56/55)	124(63/61)	126(71/55)	110(56/54)
No. of pups at weaning (Male/Female)		111(56/55)	124(63/61)	126(71/55)	110(56/54)
Weaning rate (% , Male/Female) <sup>d)</sup>		100(100/100)	100(100/100)	100(100/100)	100(100/100)

a) : (No. of dams with live pups/No. of pregnant females) × 100

b) : (No. of newborns/No. of implantation sites) × 100

c) : (No. of live pups on day 4 after birth/No. of newborns) × 100

d) : (No. of live pups at 3weeks of age/No. of pups after culling) × 100

Birth index, viability on day 4 after birth and weaning rate were calculated by litter- basis analysis.

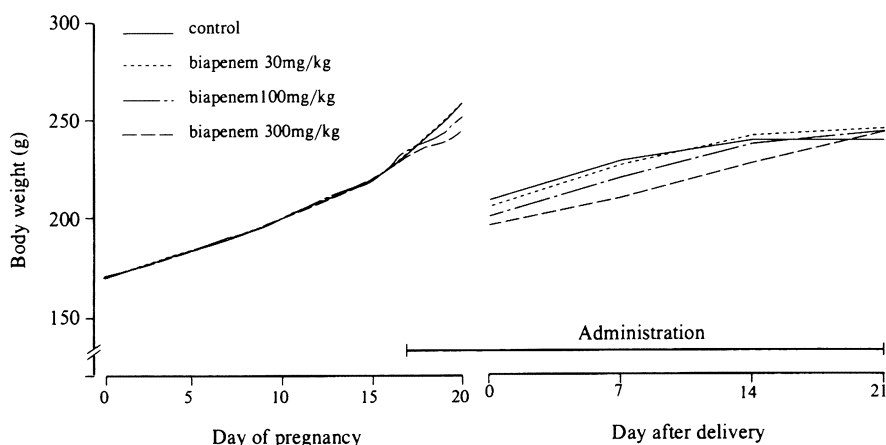


Fig. 4. Body weight changes of dams during pregnancy and after delivery (Segment III)

Table 12. Findings at delivery and during the nursing period of dams (Segment III)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		28	29	28	29
No. of dams with live newborns		28	29	28	29
Delivery index (%) <sup>a)</sup>		100	100	100	100
Delivery day (No. of dams)	Day 20 of pregnancy	1	0	0	0
	Day 21 of pregnancy	19	19	23	23
	Day 22 of pregnancy	8	10	5	6
No. of implantation sites (Mean $\pm$ S.D.)		301(10.8 $\pm$ 2.2)	327(11.3 $\pm$ 1.7)	312(11.1 $\pm$ 2.2)	322(11.1 $\pm$ 1.7)
No. of newborns (Male/Female)		289(120/169)	314(165/149)	300(148/152)	293(151/142)
Birth index (%) <sup>b)</sup>		96.0	96.1	96.0	91.5
No. of pups on day 4 after birth (Male/Female)		284(118/166)	294(150/144)	268(133/135)	276(142/134)
Viability on day 4 after birth (% , Male/Female) <sup>c)</sup>		98.0(98.4/97.5)	94.3(92.0/96.6)	89.1(88.9/89.3)	95.1(94.8/95.4)
No. of pups after culling (Male/Female)		214(95/119)	213(107/106)	191(100/91)	215(106/109)
No. of pups at weaning (Male/Female)		211(93/118)	213(107/106)	191(100/91)	215(106/109)
Weaning rate (% , Male/Female) <sup>d)</sup>		98.8(98.2/99.3)	100(100/100)	100(100/100)	100(100/100)

a): (No. of dams with live pups/No. of pregnant females)  $\times$  100

b): (No. of newborns/No. of implantation sites)  $\times$  100

c): (No. of live pups on day 4 after birth/No. of newborns)  $\times$  100

d): (No. of live pups at 3 weeks of age/No. of pups after culling)  $\times$  100

Birth index, viability on day 4 after birth and weaning rate were calculated by litter- basis analysis.

これらの所見はすべて出現頻度に対照群と差がなく、BIPM投与に関連するものとは考えられなかった。

生後3週齢までに実施したF<sub>1</sub>児の発育分化検査および各種行動機能検査ではいずれの項目においても対照群と各投与群との間に差は認められなかった。生後6週

齢以降に実施した性成熟検査において雄の精巣下降に影響は認められなかったが、雌の膣口開口については生後6週齢時点で未開口であった動物の出現頻度が100 mg/kg群および300 mg/kg群において有意な高値を示した。しかし7週齢時の再検査ではいずれの群にも差は認

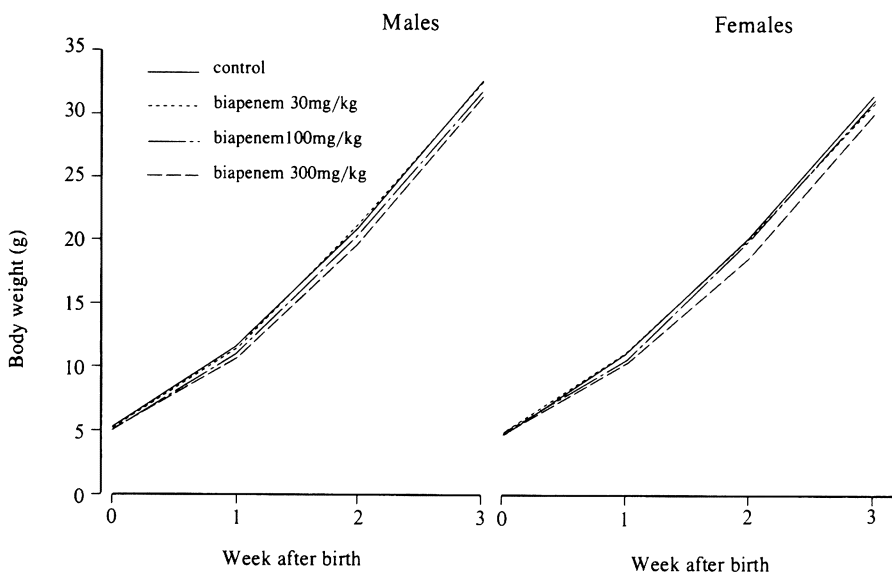


Fig. 5. Body weight changes of F<sub>1</sub> pups during the nursing period (Segment III)

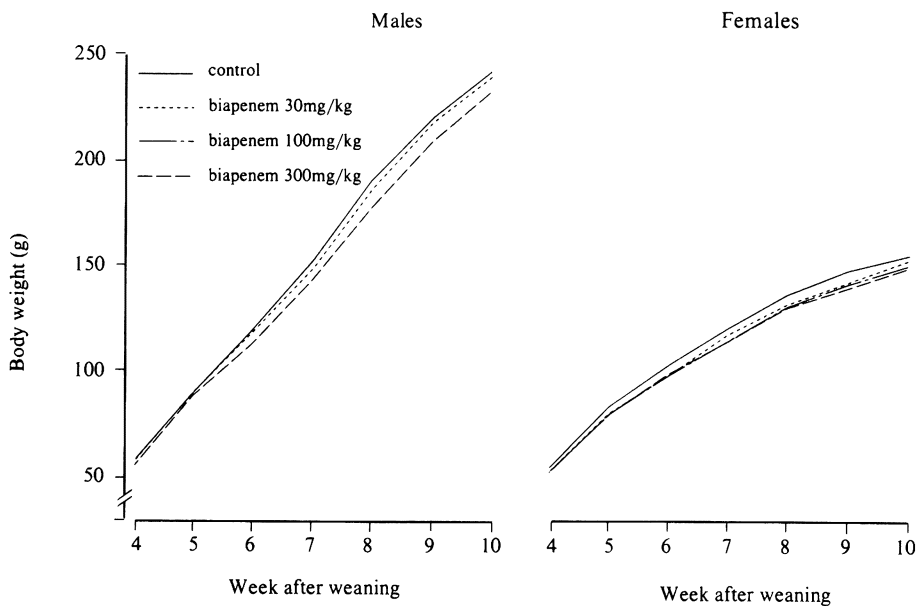


Fig. 6. Body weight changes of F<sub>1</sub> pups after weaning (Segment III)

められず、8週齢ではすべての動物に腔口開口が認められた。生後5週齢における自発運動量の測定、生後6週齢における多単位T型水路迷路を用いた学習試験ならびに生後8週齢におけるオープンフィールドを用いた情動性の検査においても対照群と比較して各投与群にBIPMの影響と考えられる明らかな差を認めなかった (Table 13)。

平均発情周期はすべての群で4.8~5.1日であり、対照

群と各投与群との間に有意差は認められなかった。一次交配における交尾に要した日数については対照群と各投与群との間に有意な差は見られなかった。二次交配を含めた交尾率、受胎率ともに対照群と各投与群との間に有意な差は認められなかった (Table 14)。

交配に用いたF<sub>1</sub>雄の剖検所見では、横隔膜ヘルニアが100 mg/kg群に1例観察された以外に異常は見られなかった。なお、妊娠が成立しなかった雌の相手の雄に

Table 13. Physical and behavioral development in F<sub>1</sub> pups (Segment III)

Items			Vehicle control		biapenem (mg/kg)					
					30		100		300	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Physical development (No. of pups undeveloped/ No. of pups examined)	Ear unfurling	on day 4 after birth	0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
	Hair growth	At 1 week of age	0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
		At 2 weeks of age	0/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
		At 3 weeks of age	0/93	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
	Tooth eruption	At 2 weeks of age	0/95	0/118	0/106	1/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0
	Eyelid opening	At day 18 after birth	0/93	0/118	0/106	2/106	0/100	0/91	0/106	0/109
At 3 weeks of age		0/0	0/0	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	
Testicular descensus	At 6 weeks of age	1/78	—	0/78	—	1/72	—	0/77	—	
	At 7 weeks of age	1/1	—	0/0	—	0/1	—	0/0	—	
	At 8 weeks of age	0/1	—	0/0	—	0/0	—	0/0	—	
Vaginal opening	At 6 weeks of age	—	15/81	—	16/80	—	31/73*	—	29/80*	
	At 7 weeks of age	—	4/8	—	4/13	—	8/21	—	3/19	
	At 8 weeks of age	—	0/4	—	0/4	—	0/8	—	0/3	
Reflexes and responses (No. of pups defected/ No. of pups examined)	Righting reflex	At 1 week of age	0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
	Palmar grasp Pinna response Pivoting	At 1 week of age	0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			0/95	0/119	0/107	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
	Walking Negative geotaxis Cliff drop aversion Auricular startle response Pain response	At 2 weeks of age	1/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			0/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	1/109
			0/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			1/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
			0/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109
Visual function Corneal reflex Air righting	At 3 weeks of age	0/95	0/118	0/106	2/106	0/100	0/91	0/106	0/109	
		0/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	0/109	
		0/95	0/118	0/106	0/106	0/100	0/91	0/106	1/109	
Spontaneous locomotor activity (Mean ± S.D.)	No. of pups examined	16	—	16	—	16	—	16	—	
	Total counts for 22 hours (Mean ± S.D.)	26400 ± 3375	—	25697 ± 4256	—	24064 ± 4596	—	24319 ± 3464	—	
Water T-maze test	No. of pups examined		20	20	20	20	20	20	20	20
	Mean no. of errors	1st day	11.4	7.4	8.4	8.6	9.9	8.0	9.6	8.7
		2nd day	3.5	2.2	2.3	3.7	2.5	2.3	2.3	3.1
		3rd day	1.0	0.6	0.7	1.1	0.7	1.0	1.1	0.9
	Mean swimming time (sec.)	1st day	76	53	59	57	64	51	62	55
2nd day		33	22	24	29	27	23	24	28	
3rd day		19	17	17	19	17	17	18	20	
Open field test	No. of pups examined		20	—	20	—	20	—	20	—
	Mean time on the field (sec.)	Corner	78.7	—	75.8	—	82.2	—	76.2	—
		Periphery	77.0	—	79.6	—	81.1	—	83.0	—
		Center	24.3	—	24.6	—	16.8*	—	20.8	—
	Mean no. of feces	1.5	—	1.9	—	1.0	—	0.8*	—	
	Mean no. of urinations	1.6	—	1.5	—	0.9*	—	1.0*	—	
Mean no. of passing blocks	49.7	—	55.5*	—	54.5	—	55.2	—		
Mean no. of entered blocks	15.6	—	15.3	—	15.4	—	15.5	—		

— : Not examined

\* : Significantly different from the vehicle control group at  $p < 0.05$

Table 14. Summary of estrous cycle, mating and fertility in F<sub>1</sub> pups (Segment III)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
Mean length of estrous cycle (days)		5.1	4.9	5.1	4.8
Mean interval from mating to copulation during the first mating period (days)		4.5	4.2	5.3	4.5
No. of mated animals	Male/Female	27/27	27/27	25/25	26/26
No. of animals with successful copulation	Male/Female	27/27	27/27	24/25	25/26
Total copulation index <sup>a)</sup>	Male/Female	100/100	100/100	96.0/100	96.2/100
No. of animals confirmed fertile	Male/Female	23/24	25/25	23/24	25/25
Total fertility index <sup>b)</sup>	Male/Female	85.2/88.9	92.6/92.6	95.8/96.0	100/96.2

a) : (No. of animals with successful copulation/No. of mated animals) × 100

b) : (No. of animals confirmed fertile/No. of animals with successful copulation) × 100

Table 15. Reproductive data of F<sub>1</sub> dams (Segment III)

Items		Vehicle control	biapenem(mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		14	13	13	14
No. of corpora lutea (Mean ± S. D.)		136( 9.7±1.2)	136(10.5±1.1)	129( 9.9±1.7)	149(10.6±1.7)
No. of implants (Mean ± S.D.)		129( 9.2±1.4)	126( 9.7±1.1)	118( 9.1±2.1)	144(10.3±1.7)
Rate of implantation (%)		94.8	93.0	91.3	96.8
Intrauterine deaths	No. of deaths (Mean ± S.D.)	1( 0.1±0.3)	3( 0.2±0.4)	14( 1.1±3.3)	8( 0.6±0.6)
	Implantation sites	0	1	0	1
	Resorptions	1	2	14	7
	Macerated fetuses	0	0	0	0
	Intrauterine mortality (%)	0.9	2.6	10.5	5.6*
Live fetuses	No. of fetuses (Mean ± S.D.)	128( 9.1±1.5)	123( 9.5±1.3)	104( 8.0±3.2)	136( 9.7±1.7)
	Viability (%)	99.1	97.4	89.5 <sup>†</sup>	94.4*
	No. of males/No. of females	70/58	70/53	54/50	64/72
Mean body weight of fetuses	Male	3.3±0.2	3.3±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1
	Female	3.1±0.2	3.1±0.1	3.0±0.2	3.1±0.1

Rate of implantation, viability and intrauterine mortality were calculated by litter- basis analysis.

\* : Significantly different from the vehicle control group at p &lt; 0.05

† : One female showed whole litter resorption.

は全例に正常な精子の存在が確認された。交尾が確認されなかった雄の生殖器官の病理組織学的検査では異常所見は見られなかった。これらの雄の交配相手の無処置雌の剖検においても異常所見は見られなかった。

妊娠したF<sub>1</sub>雌の体重については妊娠期間および哺育期間を通して対照群と各投与群との間に有意な差は見られなかった。

交配に用いたF<sub>1</sub>雌の剖検では、横隔膜ヘルニアが対照群、100 mg/kg群および300 mg/kg群に1~2例認められた以外に異常は見られなかった。

妊娠末期検査におけるF<sub>1</sub>雌の子宮内の観察において、胎児生存率および胎児死亡率については300 mg/kg群でそれぞれ有意な低値および有意な高値が認められた。この他の項目については対照群と各投与群との間に有意な差は見られなかった (Table 15)。

F<sub>2</sub>胎児における外表、骨格および内臓異常はいずれも観察されなかった。骨格および内臓変異についてはいずれも自然発生的に多く見られるものがすべての群にわたり散見された。これらの変異の出現頻度および骨格検査における仙尾椎・胸骨分節の骨化核数は対照群



Table 16. Summary of external, skeletal and visceral findings of F<sub>2</sub> Fetuses (Segment III)

Items		Vehicle control	biapenem(mg/kg)		
			30	100	300
External examination	No. of fetuses examined	128	123	104	136
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
Skeletal examination	No. of fetuses examined	90	87	74	95
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
	No. of fetuses with variations	9	7	8	4
	Types of variation				
	Asymmetry of sternebrae	1	0	2	0
	Cervical rib	7	7	6	3
14th rib	1	0	0	1	
Visceral examination	No. of fetuses examined	38	36	30	41
	No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
	No. of fetuses with variations	10	7	5	11
	Types of variation				
	Persistence of thymus on the side of thyroid	10	7	5	10
	Existence of umbilical artery on the left side of bladder	0	0	0	1

Table 17. Findings at delivery and during the nursing period of F<sub>1</sub> dams (Segment III)

Items		Vehicle control	biapenem (mg/kg)		
			30	100	300
No. of pregnant females		10	12	11	11
No. of dams with live newborns		10	12	11	11
Delivery index (%) <sup>a)</sup>		100	100	100	100
Delivery day (No. of dams)	Day 21 of pregnancy	0	0	1	0
	Day 22 of pregnancy	10	12	10	11
No. of implantation sites (Mean ± S.D.)		101(10.1±1.3)	128(10.7±1.6)	101(9.2±1.6)	112(10.2±1.2)
No. of newborns (Male/Female)		95(45/50)	125(59/66)	95(49/46)	109(51/58)
Birth index (%) <sup>b)</sup>		94.3	97.9	94.6	97.5
No. of pups on day 4 after birth (Male/Female)		95(45/50)	125(59/66)	95(49/46)	109(51/58)
Viability on day 4 after birth (% , Male/Female) <sup>c)</sup>		100(100/100)	100(100/100)	100(100/100)	100(100/100)
No. of pups after culling (Male/Female)		80(40/40)	96(46/50)	86(43/43)	88(39/49)
No. of pups at weaning (Male/Female)		80(40/40)	96(46/50)	85(42/43)	88(39/49)
Weaning rate (% , Male/Female) <sup>d)</sup>		100(100/100)	100(100/100)	98.5(97.0/100)	100(100/100)

a) : (No. of dams with live pups/No. of pregnant females) × 100

b) : (No. of newborns/No. of implantation sites) × 100

c) : (No. of live pups on day 4 after birth/No. of newborns) × 100

d) : (No. of live pups at 3 weeks of age/No. of pups after culling) × 100

Birth index, viability on day 4 after birth and weaning rate were calculated by litter-basis analysis.

と各投与群との間で有意差は認められなかった (Table 16)。

自然分娩させた F<sub>1</sub> 雌の出産率は全群が 100% であった。妊娠期間の長さ、着床痕跡数、出生児数および出生率には BIPM に起因すると考えられる影響は認められなかった。出生時の異常および哺育状態はすべての動物で良好であった。F<sub>2</sub> 出生児の総数および性比には各群間で明らかな差はなく、生後 4 日生存率および離乳率についても有意差は認められなかった (Table 17)。F<sub>2</sub> 出生児の一般状態、体重および剖検時の所見等には、BIPM 投与に関連した影響は見られなかった。

### III. 考 察

妊娠前および妊娠初期 (Seg. I), 胎児の器官形成期 (Seg. II) ならびに周産期および授乳期 (Seg. III) に BIPM を静脈内投与し、親動物の一般毒性学および生殖に及ぼす影響、F<sub>1</sub> 児の発生、成長、発育ならびに生殖能力に及ぼす影響、さらに F<sub>2</sub> 児の発生、成長に及ぼす影響について検討した。投与量はいずれの試験においても 30 mg/kg, 100 mg/kg および 300 mg/kg とした。

#### 1. 親動物に及ぼす影響

いずれの試験においても観察された投与動物の軟便および盲腸の肥大は、抗生物質では菌交代症による腸内細菌叢の変動により生じる一般的な現象である<sup>5-8)</sup>。したがってこれらの所見については一般毒性学的に意味のある所見とは考えられなかった。摂餌量の低値をとまう体重増加抑制が、Seg. I および Seg. II において 100 mg/kg 以上の群に、Seg. III において 300 mg/kg 群に認められた。以上のことから親動物に対する一般毒性学的な無影響量は 30 mg/kg と考えられた。

雄における交尾行動、交尾率および授乳率に異常は認められなかった。また雌における性周期、交尾行動、交尾率、受胎率、着床数ならびに自然分娩母動物における妊娠の維持、分娩・哺育行動についても BIPM に起因すると考えられる影響は認められなかった。したがって、生殖に及ぼす影響に関する無影響量は雌雄とも 300 mg/kg 以上と考えられた。

#### 2. F<sub>1</sub> 胎児に及ぼす影響

Seg. II において妊娠黄体数、着床数に影響は見られなかったが、300 mg/kg 群の F<sub>1</sub> 胎児の生存率・死亡率にそれぞれ有意な低値および有意な高値が見られた。これは全胚着床痕であった 2 例の動物の影響と考えられ、F<sub>1</sub> 出生率をみても BIPM 投与の影響はないことから、偶発的なものと考えられた。F<sub>1</sub> 胎児の平均体重については雌雄ともに 300 mg/kg 群において低値が認められたが、妊娠中期から末期にかけて母動物の体重増加抑制に起因する胎児の発育遅延が考えられた。F<sub>1</sub> 胎児の外表、

骨格および内臓検査において観察された異常および変異は、少数例でかつ明らかな用量相関性もなく、その出現頻度においても対照群と各投与群との間に差が見られなかった。したがって、これらの異常および変異はすべて自然発生の範囲内であると判断された。以上のことから、BIPM には胎児致死作用および催奇形作用はなく、F<sub>1</sub> 胎児に対する無影響量は、100 mg/kg と考えられた。

#### 3. F<sub>1</sub> 出生児に及ぼす影響

F<sub>1</sub> 出生児の出生率、生後 4 日生存率、離乳率、発育分化および行動機能の発達に影響は認められなかった。Seg. II では雌雄ともに 300 mg/kg 群の生下時に体重の低値が認められた。Seg. III の雄では 100 mg/kg 群の生下時および生後 6 週から 8 週、300 mg/kg 群の生後 1 週に体重の低値が認められた。雌では 100 mg/kg 群の生後 5 週から 9 週および 300 mg/kg 群の出生時から 9 週まで体重の低値が見られた。出生児体重の低値は他のカルバペム系抗生物質でも見られている<sup>9)</sup>。Seg. III では雌の体重低値にともない生後 6 週齢の性成熟検査で、100 mg/kg 以上の群の膈口未開口動物の出現頻度が有意な高値を示した。しかしながら 7 週齢における再検査では差はなく、8 週齢に至っては全例が開口し、生後 8 週以降実施した性周期検査、生殖機能および分娩・哺育状態に異常は見られなかった。これらのことから、雌の性成熟の遅延は成熟期間中の体重の低値をとまなった発育の遅延と考えられるが、その程度は軽度でかつ生殖機能に影響を及ぼすものではなかった。F<sub>2</sub> 胎児ならびに F<sub>2</sub> 出生児については BIPM の影響を示唆するような結果は認められなかった。以上のことから、F<sub>1</sub> 出生児に対する無影響量は 30 mg/kg と考えられた。

### 文 献

- 1) 増田達樹, 茂田哲哉, 坂内なるみ, 村上善紀, 高木英利, 原田 寧: BIPM (Biapenem) のラットにおける静脈内投与による亜急性毒性試験。Chemotherapy 42(S-4):130~155, 1994
- 2) Dawson A B: Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red - S. Stain Technol., 1: 123~125, 1926
- 3) Wilson J G: Method for administering agents and detecting malformation in experimental animals. Chicago Univ. Press, in Teratology, 262~272, 1965
- 4) 西村耕一: マウス及びラット胎児の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法。先天異常 14(1), 23~40, 1974
- 5) 小林文彦, 伊藤道雄: Cefamandole のラット周産期および授乳期投与試験。Chemotherapy 27(S-5):

- 682~699, 1979
- 6) 小林文彦, 原 勝巳: 6059-Sの妊娠前および妊娠初期投与試験。Chemotherapy 28(S-7): 1108~1118, 1980
- 7) 臼井敏仁, 久野博司, 松井恭子, 花見正幸, 田中浩二: Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791)の安全性に関する研究(第2報)ラットにおける静脈内または皮下投与による亜急性ならびに慢性毒性試験。Chemotherapy 33(S-4): 129~180, 1985
- 8) 木村重紀, Russell A W, Topha J C: Meropenemのラットにおける3ヵ月間静脈内亜急性毒性試験。Chemotherapy 40(S-1): 192~206, 1992
- 9) 川村 聡, Russell A. W., Freeman S. J., Siddall R. A.: Meropenemのラットにおける生殖発生毒性試験。Chemotherapy 40(S-1): 238~250, 1992

## Reproductive and developmental toxicity studies of biapenem in rats

Yasushi Harada and Norio Tanaka

Biological Research Laboratories, Lederle (Japan), Ltd.

1-6-34, Kashiwa-cho, Shiki, Saitama 353, Japan

Biapenem(BIPM) was administered intravenously to rats at a daily dose of 30, 100 or 300 mg/kg prior to and in the early stages of pregnancy (Seg. I), during the period of organogenesis (Seg. II) and during the perinatal and lactation periods (Seg. III) to evaluate the effects of this compound on reproduction and development.

No dead parent animal was observed in any of the studies. Soft feces by daily observation and large cecum at autopsy were noticed in all of the treated groups. A decrease in body weight with a decrease in food consumption was observed in the groups treated with BIPM at 100 mg/kg and above. The reproductive function, maintenance of pregnancy, delivery and nursing behavior of the parents were not affected. In the F<sub>1</sub> fetuses, low body weight was found in the 300 mg/kg group in Seg. II, but there were no effects on fetal lethality or teratogenicity in any of the studies.

There were no effects caused by BIPM on birth index, viability, physical and behavioral development of the F<sub>1</sub> pups. Low body weights of the F<sub>1</sub> pups were found at birth in the 300 mg/kg group in Seg. II and during the developmental period in the 100 mg/kg group and above in Seg. III. In the 100 mg/kg group and above in Seg. III, female pups with delayed vaginal opening were observed frequently at 6 weeks of age, but the reproductive function was not affected later at 10 weeks of age. There were no effects caused by BIPM on the F<sub>2</sub> fetuses or pups.