タルチレリン水和物の生殖毒性試験 (第1報)
—ラットを用いた経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験—

新比恵啓志, 子林孝司, 今戸奈保子,
乾 俊秀, 有行史男, 浅野裕三

田辺製薬株式会社 安全性研究所
〒532 大阪市淀川区加島3丁目16-89

REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY
STUDIES OF TALTIRELIN HYDRATE (1)
FERTILITY STUDY IN RATS BY ORAL ADMINISTRATION

Hiroshi IMAHIE, Takashi KOBAYASHI, Nahoko IMADO,
Toshihide INUI, Fumio ARIYUKI and Yuzo ASANO

*Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
3-16-89 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan*

(Received December 17, 1996; Accepted September 8, 1997)

ABSTRACT— Fertility study of taltirelin hydrate, a thyrotropin releasing hormone analogue, was carried out in Wistar rats. Taltirelin hydrate was orally administrated at a dose of 0 (control), 0.15, 1.5, or 15 mg/kg. Male rats were given the drug from 63 days before mating to the day before autopsy (total of 121 days), and female rats were treated from 14 days before mating to day 7 of gestation. The females were sacrificed on day 21 of gestation and pregnancy outcome was determined.

In the 15 mg/kg group, wet dog shaking behavior and hyperlocomotion were observed in males and females, and the food consumption was slightly decreased in male rats. These changes induced by taltirelin hydrate were not found in the 0.15 and 1.5 mg/kg groups. No adverse effects of taltirelin hydrate on reproductive function were detected in any groups. In the fetal examination, taltirelin hydrate had no teratogenic, lethal, or growth retardation effects in any groups.

These results show that the no-toxic dose levels of taltirelin hydrate are 1.5 mg/kg for general toxicity in parent animals, and 15 mg/kg for reproductive function of parent animals and for development of their fetuses.

KEY WORDS : Taltirelin hydrate, TRH analogue, Rat, Fertility study, Oral administration

要 約

脊髄小脳変性症の治療薬として開発されたタルチレリン水和物の 0.15, 1.5 および 15 mg/kg を, Slc:Wistar 系の雌雄ラットの妊娠前および妊娠初期の各期間を通じて連日経口投与して, 親動物ならびに次世代の発生に及ぼす影響を検討した。

親動物(P)に及ぼす影響

15 mg/kg 群で wet dog shaking および運動量の著明な増加が認められ, さらに雄の摂餌量に軽微な減少がみられた。1.5 mg/kg 以下の投薬群には毒性学的な影響を認めなかった。親動物の生殖機能には投薬による影響を認めなかった。

次世代(F1)に及ぼす影響

各投薬群とも胚致死, 発育抑制および催奇形性は認められなかった。

以上の結果から, 本試験条件下における無毒性量は, 親動物に対する一般毒性学的影響に関しては 1.5mg/kg, 親動物の生殖機能および次世代に関してはそれぞれ 15mg/kg であると考えられた。

緒 言

タルチレリン水和物 (化学名: (-)-N-[(S)-hexahydro-1-methyl-2,6-dioxo-4-pyrimidinylcarbonyl]-L-histidyl-L-prolinamide tetrahydrate) は田辺製薬株式会社が脊

髄小脳変性症の治療薬として開発した化合物で, TRH (thyrotropin-releasing hormone) に類似の構造および薬理活性を有している (Yamamura *et al.*, 1990)。

今回, 本剤の安全性試験の一環として, ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験を実施し, 親動物ならびに次世代の発生に及ぼす影響を検討したので報告する。

実験材料および方法

被験物質および対照物質

被験物質であるタルチレリン水和物は, 田辺製薬株式会社で合成された Fig. 1 の化学構造を有する, 水に溶けやすい白色の結晶性粉末である。試験には室温保存可能な注射用製剤 (組成を Table 1 に示す) を用いた。また, 陰性対照物質には被験物質の媒体であるリン酸二ナトリウム, クエン酸および塩化ナトリウムを含有する水溶液を用いた。

(-)-N-[(S)-hexahydro-1-methyl-2, 6-dioxo-4-pyrimidinylcarbonyl]-L-histidyl-L-prolinamide tetrahydrate

Fig. 1. Chemical structure of taltirelin hydrate.

Table 1. Composition of preparations.

	Lot No.	600020	600030	600040	600050
Taltirelin hydrate concentration (%)		0.3	0.03	0.003	0 (control)
Taltirelin hydrate	(g)	3.0	0.3	0.03	0
Di-sodium hydrogen phosphate	(g)	7.1	7.1	7.1	7.1
Citric acid	(g)	9.9	8.9	8.7	8.6
Sodium chloride	(g)	3.5	3.5	3.5	3.5
Distilled water	(	proper quantity			)
Total amount	(ml)	1,000	1,000	1,000	1,000

使用動物、飼育環境条件および群分け

日本エスエルシー株式会社からSlc:Wistar系の雄ラットおよび雌ラットを購入して、2週間の檢疫馴化、予備飼育後に使用した。入手時に耳パンチ法によって動物を個体識別した。

すべてのラットは室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、毎時12回以上の換気および12時間照明（6:30～18:30）に設定された飼育室で、放射線（15 KGY）滅菌処理した固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）と飲料水を自由に与えて飼育した。

親動物（P）は金網製4連ケージまたは5連ケージに個別に収容した。交配時には雄のケージ内で雄1匹と雌1匹を同居させた。

雄ラットは投与開始前日に96匹（投与開始日の体重範囲：139～194 g）を1群当り24匹に群分けした。雌ラットは投与開始3日前に1群当り24匹に群分けした。なお、雌ラットについては、妊娠率が対照群を含めて全群で低率であったため、後日、追加動物として各群に8匹ずつを割り当て、最終的には1群当り合計32匹となった。群分けされた雌の投与開始日の体重範囲は169～215 gであった。

投与の時期および方法

雄ラットは、7週齢で投与を開始し、交配前の63日間と交配期間を通じて剖検前日までの毎日（121日間）投与した。雌ラットは、14週齢で投与を開始し、交配前14日間、交配期間中および交尾成立後（妊娠）の7日までの毎日、ほぼ一定時刻に投与した。なお、未交尾雌ラットについては交配期間終了後の剖検前日まで投与を継続した。

投与にはラット用金属製胃ゾンデを装着した2.5 mlのデイスポーザブル注射筒を用い、5 ml/kg体重の割合で算出された液量を経口投与した。

投与液量は、雄ラットについては交配開始日までは投与日に最も近い体重測定日の、交配開始後は交配開始日のそれぞれの体重を基準として個体別に算出した。雌ラットについては、交配開始日までは投与開始日、交配期間中は交配開始日、交尾成立後は交尾確認日のそれぞれの体重を基準として個体別に算出した。

なお、対照群のラットには媒体のみを同様の方法で投与した。

投与量

投与量はラット胎児の器官形成期投与試験の予備試験（社内資料）の成績を参考にして設定した。すなわち、予備試験では本試験で用いたラットとブリーダー・系統が同じ妊娠ラット（各群10～12匹）に、本剤の0.15, 1.5, 15および150 mg/kgを妊娠7日から17日までの連日経口投与し、母動物と胎児を観察した。その結果、母動物において15 mg/kg以上の投薬群では中枢賦活症状（wet dog shakingおよび運動量増加）が顕著に認められ、150 mg/kg群では体重増加抑制、摂餌量の減少および摂水量の増加が認められた。胎児においてはいずれの投薬群でも影響を認めなかった。

したがって、本試験の最高用量は親動物において中枢賦活症状が顕著に認められると予想された15 mg/kgとし、以下、1.5および0.15mg/kgをそれぞれ中間用量および最低用量とした。

投与液

投与液は、所定濃度（0.3, 0.03および0.003%）毎にアンプル（20 ml）に充填されたものを使用時に開封して用いた。

観察方法

親動物（P）の観察

すべての雄の一般状態を投与開始後の毎日、複数回（投与前ならびに投与後1時間および3～4時間後）観察した。体重は投与期間中の毎週1回測定した。摂餌量は投与開始日から交配開始日までの毎週1回測定し、各7日間の摂餌量を算出した。すべての雄は交配期間終了日（投与121日）の翌日に、エーテル麻酔下で腋窩動脈切断によって放血致死させて剖検し、精巣、精巣上体、精囊および前立腺を摘出して、これらの重量を測定した。

すべての雌の一般状態を投与開始後の毎日、複数回（投与前ならびに投与後1時間および3～4時間後）観察した。体重および摂餌量は投与開始日から交配開始日まで毎日測定した。未交尾雌については体重のみを交配期間中の毎週1回測定した。また、投与開始日から交配開始までの15日間および交配期間中の交尾確認日まで、毎日膈垢を

採取して性周期を観察した。

雌は15回の投与終了日から、64回投与された雄と、同一群内の雌雄各1匹の組合せで夜間のみ同居させた。翌朝、膣栓または膣垢中の精子の確認により交尾判定した。交尾確認された雌はその日を妊娠0日とした。交配期間は最長14日間とし、14日間同居させても交尾しなかった組合せについては、同一群内の未交尾の雌雄で組合せを変更し、さらに最長14日間交配した。

追加の雌については15回の投与終了日から、107回投与された授胎能の確認された雄と上記の方法で最長14日間交配した。初回交配検査で見られた低妊娠率は、雌側の要因ではないかと考え、また、十分な数の胎児観察用母動物を得る為、雄の投与は継続したまま、新規に追加分の雌を試験に加えた。

すべての未交尾雌について、交配期間終了後に剖検し、卵巣、子宮を摘出して重量を測定した。

すべての交尾確認雌の一般状態を妊娠0日から21日まで毎日1回、投与後の症状については複数回（投与前ならびに投与後1時間および3～4時間後）観察した。体重および摂餌量は妊娠0日から21日まで毎日測定した。母動物は妊娠21日に剖検して妊娠の成否を確認した。妊娠雌は卵巣お

よび子宮を摘出して、妊娠黄体数を数え、子宮内を後述の方法で観察した。

胎児 (F1) の観察

胎児は死亡・吸収胎児（胚）と生存胎児に区別し、それらの着床位置と数を観察した。死亡・吸収胎児（胚）は浸軟の程度により次の4型に分類した。すなわち、1) 着床痕のみ、2) 早期吸収胚：胎児としての形をとどめない胚、3) 後期吸収胚：胎児としての形はとどめているが肢端が不明瞭な胚、および4) 浸軟胎児：胎児としての形と肢端が明瞭な胎児、である。生存胎児については口腔内を含む外表の観察を行い、体重を測定した。性別は内部生殖器によって判定した。

生存胎児のうち、一腹の約3分の1の胎児をブアン固定して、Wilson (1965) の変法による内臓観察に供した。残りの胎児については、剖検して胸腹部の内臓を肉眼的に検査した後、アルコール液で固定しDawson法 (1926) による骨格染色標本作製して骨格観察に供した。骨格観察における骨化状態は、境界明瞭な濃染部が認められるものを骨化とし、以下の骨について部位別に観察した。すなわち、前肢基節骨、中足骨、後肢基節骨、踵骨、胸骨核および仙尾椎体数である。

Fig. 2. Body weight change of male rats during pre-mating period.

統計学的解析方法

得られたデータは分散分析、順位和検定あるいはカイ自乗検定を用いて解析し、有意水準は5%未満とした。なお、胎児のデータについては、一腹児を標本単位として解析したが、数値の表示にはすべて各群あたりの百分率または総平均値を用いた。

実験結果

雄ラット (P) に対する影響

一般状態

試験期間を通じていずれの群にも死亡はみられなかった。探索行動と情動行動を指標とした運動量の増加が、1.5 mg/kg群で投薬期間を通じて投薬後1時間に少数例にみられた。15 mg/kg群では投薬期間中の毎日、投薬後1時間に必ずみられたが、頻度には一定の傾向はなかった。15 mg/kg投与群においては、投薬3～4時間後でも症状の持続する雄もみられたが、いずれも翌日の投薬前に症状は消失した。Wet dog shaking (Martin *et al.*, 1963) は1.5mg/kg群では投薬後1時間のみに数日、各発現日に1匹ずつみられた。15 mg/kg群では交配開始前の投薬期間中では、投薬後1時間に2～

4割の動物にみられ、投薬3～4時間後でも少数例にみられた。交配開始日以降は、これらの症状は投薬後1時間に散見されたのみであった。

体重および摂餌量

体重はいずれの測定日においても投薬各群と対照群との間に有意差は認められなかった (Fig. 2)。摂餌量は15 mg/kg群では投薬後28日以降に低下傾向がみられ、投薬49～56日の1週間の値は対照群に比して統計学的に有意に低かった (144 g vs. 136 g)。その他の測定日の値には群間に統計学的に有意な差を認めなかった。

剖検

剖検では対照群の1匹に精巣および精巣上体の萎縮が、15 mg/kg群の1匹に前立腺の肉様変化が1匹みられたのみで、その他の雄には異常はみられなかった。なお、上記の雄2匹は授胎能を有することが確認された。15 mg/kg群の精巣の相対重量が対照群に比べ統計学的に有意に重かった (0.86 g vs. 0.90 g)。その他の生殖器系臓器においては絶対・相対重量ともに、投薬各群と対照群との間に統計学的な有意差を認めなかった。

雌ラット (P) に対する影響

一般状態

Fig. 3. Body weight change of female rats during pre-mating period.

試験期間中を通じていずれの群にも死亡はみられなかった。運動量の増加は1.5 mg/kg群で投薬期間中のほぼ毎日、投薬後1時間に少数例みられたが、投薬3～4時間後には消失した。15 mg/kg群では投薬期間の毎日、投薬後1時間に約半数の雌にみられ、投薬3～4時間後でもまれにみられたが、翌日の投薬前には消失した。Wet dog shakingは、1.5 mg/kg群では投薬後1時間に1例1日だけみられたのみであった。15mg/kg群では投薬後1時間において、交配前から妊娠初期にかけてはほぼ毎日少数例にみられた。なお、交尾後の不妊雌でも同様の発現状況であった。

体重および摂餌量

いずれの測定日においても体重 (Figs. 3, 4), 摂餌量とも対照群に比して投薬各群の値には統計学的に有意な低下を認めなかった。

剖検

母動物、未交尾雌および不妊雌の剖検において、異常はみられなかった。未交尾雌については子宮および卵巣重量を測定したが、いずれにも毒性学的な影響を示唆する変化はなかった。

雌雄ラット (P) の交配に対する影響

性周期

交配前の性周期は2週間の観察期間にみられた発情回数毎に分類した時の各動物数で評価したが、投薬による影響はみられなかった (Table 2)。

交尾率および妊娠率

雄の64回投与後に開始した交配では、各群とも8割以上の組合せが交尾し、交尾率に統計学的な有意差を認めなかった。妊娠率は対照群を含む各群とも低く、群間に統計学的な有意差を認めなかった。追加交配 (雄の107回投与後に開始) では、交尾率は各群とも100%であった。妊娠率は投薬各群で低かったが、群間に統計学的な有意差を認めず、用量依存的な傾向も認めなかった (Table 2)。

胎児 (F1) に対する影響

妊娠末期剖検時の母動物および胎児の外表観察結果では、いずれの観察項目においても投薬各群と対照群との間に統計学的な有意差を認めなかった。無眼が1.5 mg/kg群の1匹にのみ発現した (Table 2)。また、矮小児 (対照群の平均胎児体

Fig. 4. Body weight change of dams during gestation period.

重 - 2.58 × 標準偏差より体重の軽い児) が各群に散見されたが、その発現頻度には有意差を認めなかった。

内臓の観察結果では奇形は 1 例もみられなかった。内臓変異としては腎盂拡張および輸尿管拡張を有する胎児が各群に散見されたが、それらの発

現頻度には群間に統計学的な有意差を認めなかった (Table 3)。

骨格の観察結果では奇形は 1 例もみられなかった。骨格変異としては頸肋骨、腰肋骨、胸椎体分離、亜鈴状胸椎体、胸骨核非対称、仙椎の腰椎化および仙椎前椎骨数 27 を有する胎児が各群に散見

Table 2. Effect of taltirelin hydrate on reproductive ability of parent animals and development of fetuses.

Dose (mg/kg)	0 (control)	0.15	1.5	15
No. of females examined	32	32	32	32
No. of females having shown estrus				
2 times	0	0	1	2
3 times	29	20	19	25
4 times	3	12	12	5
Scheduled pairing				
No. of pairs	24	24	24	24
No. of mated pairs (%) ^{a)}	21 (87.5)	20 (83.3)	20 (83.3)	22 (91.7)
No. of pregnant females (%) ^{b)}	8 (38.1)	10 (50.0)	11 (55.0)	10 (45.5)
Addendum pairing ^{c)}				
No. of pairs	8	8	8	8
No. of mated pairs (%) ^{a)}	8 (100.0)	8 (100.0)	8 (100.0)	8 (100.0)
No. of pregnant females (%) ^{b)}	8 (100.0)	5 (62.5)	5 (62.5)	5 (62.5)
No. of dams	16	15	16	15
No. of corpora lutea				
Total	196	188	203	171
Litter mean ± SD	12.3 ± 1.6	12.5 ± 1.4	12.7 ± 1.8	11.4 ± 1.5
No. of implantations				
Total	122	126	115	116
Litter mean ± SD	7.6 ± 3.6	8.4 ± 3.7	7.2 ± 4.2	7.7 ± 4.0
Implantation rate (%) ^{d)}	62.2	67.0	56.7	67.8
No. of post-implantation loss (%) ^{e)}				
Early resorptions	14 (11.5)	15 (11.9)	8 (7.0)	6 (5.2)
Late resorptions	13	14	8	6
Macerative fetuses	0	0	0	0
Total	1	1	0	0
Number of live fetuses				
Total	108	111	107	110
Litter mean ± SD	6.8 ± 3.4	7.4 ± 4.3	6.7 ± 3.8	7.3 ± 3.9
Sex ratio (males / live fetuses)	0.52	0.57	0.49	0.46
Fetal weight (g) Mean ± SD	4.42 ± 0.29	4.43 ± 0.28	4.45 ± 0.38	4.41 ± 0.29
No. of fetuses with external malformations (%) ^{f)}	0	0	1 ¹⁾ (0.9)	0
No. of runt ^{g)} (%) ^{f)}	1 (0.9)	1 (0.9)	4 (3.7)	1 (0.9)

^{a)} Percent copulations of pairs.

^{b)} Percent pregnancy of copulated pairs.

^{c)} Females used in addendum pairing were paired with male rats which had mated during the scheduled pairing period.

^{d)} Percent implantations of corpora lutea.

^{e)} Percent post-implantation losses of implantations.

^{f)} Percent fetuses of live fetuses.

^{g)} A runt was defined as fetus whose body weight was lower by 2.58 SD than the mean weight in the control group.

¹⁾ Anophthalmia.

みられた。しかし、1.5 mg/kg群ではこれらの症状は投薬後1時間に少数例に認められたのみであり、特にwet dog shakingは投薬期間中に散見されたのみであった。本薬物のラットを用いた経口投与による胎児の器官形成期投与試験（新比恵ら、1997）およびラットを用いた反復経口投与毒性試験（乾ら、1997）においても、それぞれ1.5および3 mg/kg以上の投薬群で運動量の増加およびwet dog shakingがみられており、これらは本薬の中樞賦活作用による症状の発現と考えられる。しかし、本試験において1.5 mg/kg群の中樞賦活症状は発現頻度が低かったことから、毒性学的な影響とはみなし難かった。体重および摂餌量の推移では、15 mg/kg群の雄の摂餌量が一過性に低下したのみで、その他に影響はみられなかった。

親動物（P）の生殖においては、性周期、交配（交尾率）および妊娠維持（妊娠率）に投薬による影響はみられなかった。なお、妊娠率および着床率の低下が対照群を含むすべての群で認められたが、これはラットの系統による遺伝学的な特性あるいは飼育環境などの施設的な要因によるものと考えており、被験物質によるものではないと判断した。

次世代（F1）においては、胎児の外表、内臓および骨格の観察において、投薬群の異常児は極めて少数例であり、変異の増加も認められないことから、本薬に催奇形性はないものと考えられた。死亡・吸収胎児（胚）率および生存胎児数などにおいて、投薬各群と対照群との間に差がみられなかったことから、本薬に致死作用はないものと考えられた。さらに、胎児体重および胎児の骨化状態などに抑制傾向がみられなかったことから、本薬に発育抑制作用はないものと考えられた。

なお、本薬物の類薬である montirelin のラットの妊娠前および妊娠初期投与試験（守永ら、1995）においても同様に、親動物の生殖機能および次世代には異常は認められていない。

以上の結果から、本試験の条件下でタルチレリン水和物の親動物（P）に対する無毒性量は、15

mg/kg群で投薬後に毒性学的影響と判断される著明な症状発現がみられたことおよび雄の摂餌量に軽微な減少がみられたのに対し、1.5 mg/kg以下の投薬群では毒性学的影響がみられなかったことから、1.5 mg/kgであると判断された。親動物の生殖機能ならびに胎児（F1）の発生に対する無毒性量は、いずれの投与群において投薬の影響を認めなかったことから、15 mg/kgであると判断された。

文 献

- Dawson, A.B. (1926) : A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Technol.*, **1**, 123-124.
- 新比恵啓志, 子林孝司, 西田敦之, 今戸奈保子, 浅野裕三 (1997): タルチレリン水和物の生殖毒性試験(第2報)ーラットを用いた経口投与による胎児の器官形成期投与試験ー. *J. Toxicol. Sci.*, **22**, Suppl. II, 381-394.
- 乾俊秀, 藤原利久, 周参見正行, 菱田尚樹, 桑村有規, 久世博, 川合是彰, 工藤悟 (1997): タルチレリン水和物 (TA-0910) のラットを用いた反復経口投与毒性試験. *J. Toxicol. Sci.*, **22**, Suppl. II, 335-356.
- Martin, W.R., Wikler, A., Eades, G.G., Pescor, F.T. (1963): Tolerance to and physical dependence on morphine in rats. *Psychopharmacologia*, **4**, 247.,
- 守永太賀彦, 古川茂典, 藤井重信, 菊森幹人, 安平公夫, 渡辺正孝, 鷺見信好 (1995): MONTIRELIN HYDRATE (NS-3)の生殖・発生毒性試験 (第1報)ーラット静脈内投与による妊娠前および妊娠初期投与試験ー. *J. Toxicol. Sci.*, **20**, Suppl. II, 259-275.
- Wilson, J.G. (1965) : Methods for administering agents and detecting malformations. *In experimental animals* (J.G. Wilson and J. Warkany., eds.), pp. 262-277, University of Chicago Press, Chicago, U.S.A.
- Yamamura, M., Kinoshita, K., Nakagawa, H., Tanaka, T., Maeda, K., Ishida, R. (1990): Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog, (I): effects on the central nervous system by oral administration. *Japan. J. Pharmacol.*, **53**, 451-461.