Sodium colistin methanesulfonate のラットにおける生殖試験(第3報)

----周産期および授乳期投与試験----

辻 谷 典 **彦・大** 山 正 和·角 谷 清 剛

神奈川歯科大学楽理学教室

(主任:伊藤春生教授)

大 内 膀・斎 藤 太 郎・松 本 朋 徳

科薬抗生物質研究所開発部

薬理研究センター

(昭和 55 年 7 月 17 日受付)

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の安全性研究の一環として、生殖に対する影響を検討する目的で、周産期および授乳期投与試験を Wistar 系ラットを用いて、CLM 6.25 mg, 12.5 mg および 25 mg/kg をそれぞれ静脈内に投与して行ない、以下の成績を得た。

- 1. 妊娠母体の一般症状、体重および摂餌量に対して影響は認められなかった。
- 2. 分娩時および授乳期の観察において、妊娠期間、出産仔数、生存仔数、生存仔体重、性比、 死産仔数、着床痕数、分娩率および哺育率に対して影響は認められず、生存仔の外形異常も見られ なかった。
 - 3. 新生仔の成長および発育・分化に対して影響は認められなかった。
- 4. 新生仔の生後の行動および機能観察では、行動および感覚反射機能、自発運動量、神経・筋能力、学習能力、情緒性および生殖能力に対して、影響は認められなかった。

以上のことから、CLMを雌ラットの周産期および授乳期に投与した場合、母動物ならびにその新生仔の生後の発育・分化および行動などに、ほとんど影響をおよぼさないことが確認された。なお、本試験における CLM の最大無作用量は、25 mg/kg であると考えられる。

序言

Colistin (以下, CLと略) は、Gram 陰性桿菌に対して強い抗菌作用を有する、polypeptide 系抗生物質である¹⁾。著者らは、CL の誘導体である sodium colistin methanesulfonate (以下, CLM と略) の、安全性を確認する目的で、CLM の生殖におよぼす影響をラットを用いて検討した。すでに、第1報²⁾ においては妊娠前および妊娠初期投与試験、また第2報³⁾ においては器官形成期投与試験の成績について、それぞれ報告した。そこで、本報では CLM のラットにおける周産期および授乳期投与試験の成績について報告する。

実験材料および方法

1. 被検薬物

本実験に使用した CLM は、第 1 報²⁾および第 2 報²⁾に 記したものと同一のもので、 Bacillus polymyza var. colistinus の培養沪液から分離精製 された 白色 粉末 (12,000 単位/mg: 科薬抗生物質研究所)である。CLM の使用に験しては、減菌生理食水塩に溶解し、投与容量 を体重 100g 当り 0.5 ml として, それぞれ所要濃度になるように調製した。

2. 使用動物

実験動物として、生後 5 週令の雌雄の Wistar 系ラット(東京実験動物)を購入後予備飼育し、10 週令 に達したものの中から、一般症状の良好なものを選び使用した。妊娠動物を得るために、腟垢塗抹標本で発情前から発情期と確認した未経産の雌を、同系の雌と 1 対 1 の割合で 1 夜同居させ、翌朝腟栓あるいは腟垢中に精子の存在が確認されたものを、妊娠 0 日の動物として、小型ケージに独居させ飼育した。動物の飼育は、予備飼育および実験期間を通して、全て室温 23±1℃、湿度 55±5%の恒温恒湿の環境下で行なった。飼料は、妊娠および授乳期間のものには、繁殖用固型飼料(CA-1:日本クレア)、その他のラットには飼育用固型飼料(CE-2:日本クレア)を与え、水と共に自由に摂取させた。

3. 投与量

CLM の投与量は、「妊娠前および妊娠初期投与試験²⁾」

および「器官形成期投与試験⁹」と同様,最高用量を 25 mg/kg とし、以下中用量を12.5 mg/kg,最低用量を 6.25 mg/kg とした。また、対照として生理食塩水投与 群を設けた。

4. 投与方法および投与期間

薬物は, 妊娠 17 日から分娩後 21 日まで, 1 日 1 回毎 日一定時刻に尾静脈内に投与した。

5. 観察項目および方法

1) 母体の観察

各投与群の妊娠母体数をそれぞれ 20 匹とし、妊娠期間中母日一般症状を観察すると共に、体重および摂餌量を測定した。母体はいずれも自然分娩させ、分娩時の状態を観察し、妊娠期間を算定した。分娩後は 21 日まで出生仔を全例哺育させ、この間一般症状の観察を毎日、体重および摂餌量の測定を毎週1回行なった。分娩後21日目で仔を離乳させ、母体は屠殺して内臓の変化を肉眼的に剖検し、さらに子宮について着床痕数を調べ分娩時に見られた出産仔数と対比して分娩率を算出した。

2) 新生仔 (F₁) の発育・分化観察

分娩後ただちに出産仔数および生死を確認し、生存仔については性別、外形異常および行動異常の有無を調べ、体重を測定した後、全例母体に哺育させた。

新生仔は、生後 21 日まで哺育し、この間毎日一般症状を観察すると共に、毎週1回体重を測定した。発育分化の状態については、耳介開展を生後 7 日目、腹部毛生および切歯萠出を生後 14 日目、眼瞼開裂を生後 21 日目に観察した。生後 21 日目に新生仔は離乳し、離乳後は雌雄を分離して飼育し、生後 8 週まで一般症状を毎日観察すると共に、毎週1回体重を測定し、生後 28 日目に雄の特巣下降を、生後 42 日目に雌の腔閉口を観察した。生後 8 週令時には、1 母体から雌雄各 1 匹ずつ無作為に抽出し、屠殺して主要職器の肉眼的観察を行なった。

3) 新生仔(F₁)の行動および機能観察

新生仔は生後 21 日目の離乳時に、全例について行動 および感覚反射機能を、8週令時には各投与群から1母 体につき雌雄1匹ずつ無作為に抽出し、自発運動量、神 経・筋能力、学習能力および情緒性について検査し、10 週令時には同じく1母体当り雌雄2匹ずつについて、生 殖能力に関する検索を行なった。

(1) 行動および感覚反射機能

IRWIN 法⁶による行動および感覚反射機能の観察と、 PREYER 反射による聴覚機能試験を行なった。

(2) 自発運動量

回転カゴ法により、予めラットを回転カゴ装置(シナノ製作所)に30分間入れ順応させた後、30分間の回転数を測定した。

(3) 神経・筋能力

回転棒法により検査した。直径のcm で1分間に10回転する回転棒(シナノ製作所)を用い、動物を予め静止させた回転棒上に60秒間置き、つぎに回転された上で30秒間練習させた後実験を開始し、回転棒上に帯留する時間を測定した。なお、動物は頭部を回転方向に向けてのせ、帯容時間の測定は2分以上行なわなかった。

(4) 学習能力

条件回避反応試験および Water T-maze 試験を行なった。

条件回避反応試験は、Schuttle box(ANAC 300 型: 岡崎産業)を用いて行なった。条件刺激として、光およびブザーを5秒間与え、この間にラットが他室に移動しない場合には、無条件刺激として床のグリットから電気刺激(130 V, 1 mA)を5秒間与えた。反応後の休息時間は20秒とした。これを1試行として、1日20試行を連続して行ない、連日4日間に亘り回避率を測定した。

Water T-maze 試験は、water filled multiple T-maze (シナイ製作所)を用いて、石崎の方法が比単じて行なった。装置は、縦 120cm×横 120cm×標さ 40cmの塩化ビニール製の水槽中に、高さ 35cm、幅 12cmの直線水路およびT-迷路を配置したものである。試験は、水深 23cm、水温 23~24℃ の条件下で、第1日目は直線水路を用いて、出発点から目標点に達するまでの所要時間を測定し、これを1匹当り5試行行なわせた。第2日から4日目には水迷路を用いて、出発点から目標点に達するまでの所要時間と、盲路に体全体が入り込んだ鎖設を測定し、これを1日1匹当り5試行行なわせた。なお、動物を直線水路および水迷路に入れる時は、進行方向に対して逆向きに入れ、また1試行は3分以上行なわなかった。

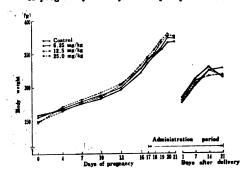
(5) 情緒性

Open field 法により検索した。装置は、HALLの open field 装置(シナノ製作所)を用いた。この装置は、底面の直径 80 cm, 壁の高さ 50 cm, 壁の上端の直径 100 cm のステンレス製のパケツ状のもので、底面は金割製でほぼ等面積の 19 区画に分けられている。Open field の中央真上1 m の高さから、100 W の電球を用いて唯一の照明とした。試験は、Open field の中心にラットを置き、3分間の区画移動数、立ち上り回数、洗面回数、排尿回数および脱糞回数を2日間に亘り測定した。

(6) 生殖能力

同一投与群内で兄妹交配を避けて、雌雄1対1で7日間同居させた。腟栓あるいは腟垢中に精子の存在を確認 したものを、交尾の成立したものとして交尾率を算出した。交尾の成立したラットは、妊娠期間中毎日体重を削 定し、転級 21 日日に屠殺して開腹し、子宮を切開し妊娠の有無を調べ妊娠率を算出し、着床数、生存胎仔数、死亡胎仔数はび吸収胚数を調べ、生存胎仔(Fg)については、雌雄の判別、体重および胎盤重量測定、口腔内を含む外形異常の有無を調べた。交尾あるいは妊娠が成立しなかったものは、雄は同一群内の未経産の雌と、雌は同一群内の生殖能力の確認された雄と、同様に7日間同居させた。

Fig. 1 Mean body weight of female rats administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition



6. 統計学的処理

実験の結果は、 / 検定および X¹ 検定を用いて統計処理を行なった。

実 験 成 綾

1. 母体におよぼす影響

1) 一般症状

振妊および哺育期間中、対照群および各 CLM 投与群のいずれにも、特異な中毒症状は観察されず、死亡例も

Fig. 2 Mean food consumption of female rats administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

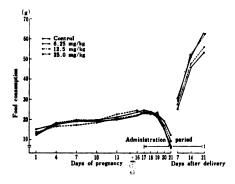


Table 1 Observation of newborn rats from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg)		Control	6. 25	12. 5	25. 0
No of mothers (Death)*)		20 (0)	20 (0)	18 (0) ^[5]	ant 20 (0) T
Duration of pregnancy: Mean ± (days)	S. E.	22. 1±0. 1	21.7±0.1	22. 0±0. 0	22. 0±0. 0
Body wt. gain during megnancy: Mean ± S. E.		128. 5±4. 2	119. 4±5. 0	120.7±5.8	129.7±3.0
No. of implantation sites (Mean ±	S.E.)	274 (13.7±0.5)	254 (12.9±0.6)	219 (12. 4±0. 5)	285 (14. 3±0. 5)
No. of newborns (Mean ± S. E.)		250 (12.5±0.5)	216* (10.8±0.6)	216 (11.7±0.5)	246 (12. 3±0. 5)
No. of stillborns		7 (2.8)	12 (5.5)	6 (2.8)	7 (2.5)
No. of live borns (Mean ± S. E.)		243 (12. 2±0. 4)	204* (10. 2±0. 6)	205 (11. 4±0. 4)	239 (12. 0±0. 4)
We of limbers of	M	5.7±0.1	5.7±0.1	5.9±0.1	5. 6±0. 1
Wt. of liveborns (Mean ± S. E.)	F	5. 4±0. 1	5. 4±0. 1	5. 5±0. 1	5.3±0.3
Sex ratio : M/F		130/113	98/106	101/104	113/126
Delivery rate: %b)	91. 2	85. 0**	98. 6	86. 3	
No. of liveborns with external malformation		0	0	0	0

a) Death before delivery

M: male, F: female

No. of newborns at birth
No. of implantations

Significant difference from control: * P<0.05, ** P<0.01

認められなかった。

2) 体重変化

妊娠および哺育期間中の各 CLM 投与群の平均体重の推移は、対照群とほぼ同様の増加傾向を示した(Fig. 1)。 妊娠期間中の体重増加量は、対照群 128.5g, 6.25 mg/kg 投与群 119.4g, 12.5 mg/kg 投与群 120.7g および 25 mg/kg 投与群 129.7g で、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量

妊娠および哺育期間中の各 CLM 投与群の平均摂餌量 は、いずれも対照群とほぼ同様の摂取傾向を示した(Fig. 2)。

4) 分娩所見

各投与群の平均妊娠期間には、対照群と各 CLM 投与群との間には有意差は見られなかった (Table 1)。生存仔体重および性比には、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差はなく、生存仔の外形異常も全ての投与群に認められなかった。死産仔数は、対照群で7例 (2.8%)、6.25 mg/kg 投与群で12 例 (5.5%)、12.5 mg/kg 投与群で6例 (2.8%)、25 mg/kg 投与群で7例 (2.5%)認められたが、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。出産仔数および生存仔数については、6.25 mg/kg 投与群が対照群に比して有意に低かったが、12.5 mg および 25 mg/kg 投与群では、有意差は見られなかった (Table 1)。

分娩後 21 日目の母体の剖検所見では、各投与群とも主要臓器に異常は認められなかった。また、着床痕数にも対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかったが、分娩率は 6.25 mg/kg 投与群が対照群と比較して有意に低かった (Table 1)。

5) 哺育状態

哺育期間中の死亡仔數は、対照 群で30例, 6.25mg/kg 投与群で27例, 12.5 mg/kg 投与群で19例, 25mg/kg 投与群で26例認められ、哺育率は対照群で87.7%, 6.25 mg/kg 投与群で86.8%, 12.5 mg/kg 投与群で90.7% そして25 mg/kg 投与群で89.1%となり、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった(Table 2)。

2. 新生仔 (F₁) におよぼす影響

1) 一般症状

分娩後から 8 週齢時に至るまでの観察期間中,いずれの投与群にも特異な中毒症状は観察されなかった。また,離乳時から 8 週令までの死亡仔數は対照群で2 例, 12.5 mg/kg 投与群で3 例, 25 mg/kg 投与群で10 例見られたが,生育率には対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は見られなかった (Table 2)。

2) 体重変化

分娩時から8週令時に至るまでの平均体重は、各CLM 投与群と対照群の雌雄ラットとも同様の推移を示した (Fig. 3 および4)。

Table 2 Postnatal observation of F₁ rat offspring from mothers adminstered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg	g)	Control	6. 25	12 . 5	25. 0
No. of mothers		20	20	18	20
No. of dead mothers du	iring lactation	0	0	0	0
	at birth	243(130/113)	204 (98/106)	205(101/104)	239(113/126)
	7 th day	213(117/96)	193 (93/100)	189 (90/99)	223(106/117)
	14 th day	213(117/96)	188 (91/97)	187 (89/98)	222(105/117)
No. of live	21 st day	213(117/96)	177 (84/93)	186 (89/97)	213(102/111)
offspring	28 th day	213(117/96)	177 (84/93)	184 (87/97)	208(100/108)
(M/F)	35 th day	213(117/96)	177 (84/93)	184 (87/97)	208(100/108)
	42 nd day	211(115/96)	177 (84/93)	184 (87/97)	205 (99/106)
	48 th day	211(115/96)	177 (84/93)	184 (87/97)	203 (98/105)
	56 th day	211(115/96)	177 (84/93)	183 (87/96)	203 (98/105)
Nursing rates): %		87. 7	86. 8	90. 7	89. 1
Survival rateb): %		99. 1	100	98. 4	95.3

No. of offspring at 21st day

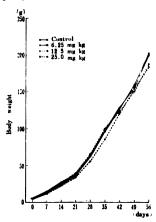
No. of offspring at birth $\times 100$

M: male, F: female

No. of offspring at 56th day

No. of offspring at 21st day

Fig. 3 Mean body weight of male F₁ rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition



3) 発育·分化状態

各投与群の発育・分化の状態において、耳介開展、腹部毛生、切歯萠出、眼瞼開裂、精巣下降および腟開口時期には、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった (Table 3)。

4) 行動および機能観察

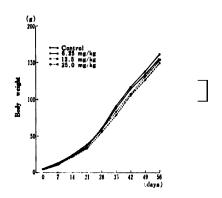
(1) 行動および感覚反射機能

生後 21 日目の行動および感覚反射機能検査の結果、 膏液性、視覚による位置認識、落着きのなさ、自発性運動、疼痛反応、握力、耳介反射、角膜反射、同側屈筋反射ならびに PREYER 反射のいずれにおいても、対照群および各 CLM 投与群には異常は認められなかった(Table 4)。

(2) 自発運動量

回転カゴ法による自発運動量測定の結果, 6.25 mg/kg 投与群の雌で,対照群に比較して有意な減少が見られた が,その他の投与群では対照群との間に有意差は認めら

Fig. 4 Mean body weight of female F₁ rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition



れなかった (Table 5)。

(3) 神経・筋能力

回転棒法により測定した結果、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった (Table 6)。

(4) 学習能力

条件回避反応試験の結果、回避率および逃避率には対 照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかっ た (Table 7)。

Water T-maze 試験の結果は、各測定日の第5試行目の所要時間と錯誤数で示した。所要時間は、第1日目に 6.25 mg/kg 投与群の雄で減少、12.5 mg/kg 投与群の雄および 25 mg/kg 投与群の雌で増加、錯誤数は12.5 mg/kg 投与群の雌の第1日目および 25 mg/kg 投与群の雌の第2日目で増加が、それぞれ対照群との間に有意差が認められた。しかし第3日目には、いずれの投与群においても所要時間と錯誤数は減少し、また対照群と各CLM 投与群との間に有意差は認められなかった(Table 8)。

Table 3 Postnatal differentiation of F_1 rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg)	Control	6. 25	12. 5	25. 0
Separation of auricles: at 7 th day	213/213(100)*)	193/193(100)	189/189(100)	223/223(100)
Appearance of abdominal: at 14 th day hair	213/213(100)	188/188(100)	189/189(100)	222/222(100)
Eruption of incisors: at 14 th day	205/213(96. 2)	178/188(94.7)	183/187(97.9)	216/222(97. 3)
Separation of eyelids: at 21 st day	213/213(100)	177/177(100)	186/186(100)	213/213(100)
Decent of testis: at 28 th day	117/117(100)	84/84 (100)	87/87 (100)	100/100(100)
Opening of vagina: at 42 nd day	92/96 (95.9)	93/93 (100)	94/96 (97.9)	105/105(100)

No. of offspring completed No. of offspring examined (): %

Table 4 IRWIN'S test and PREYER'S reflex of F₁ rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg)	Sex	Control	6. 25	12. 5	25. 0
No. of offspring examined	M	117	84	89	102
	F	96	93	97	111
IRWIN'S test: Alertness	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0
Visual placing	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4.0±0.0
Restlessness	M	0.0±0.0	0. 0±0. 0	0.0±0.0	0.0±0.0
	F	0.0±0.0	0. 0±0. 0	0.0±0.0	0.0±0.0
Spontaneous activity	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
Pain response	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
Grip strength	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
Pinna reflex	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4.0±0.0
Corneal reflex	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4. 0±0. 0	4.0±0.0
Ipsilateral flexor reflex	M	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
	F	4.0±0.0	4. 0±0. 0	4.0±0.0	4.0±0.0
PREYER'S reflex	M	Normal	Normal	Normal	Normal
	F	Normal	Normal	Normal	Normal

Mean ± S. E. M: male, F: female

Table 5 Spontaneous motor activity of F₁ rat ofspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg)	Sex	No. of offspring tested	counts/30min
Control	M	20	51.0± 5.8
Control	F	20	119.8±11.3
6. 25	M	20	53.3± 7.2
0. 23	F	20	89.3± 7.0*
12. 5	M	20	51.8± 5.6
12. 5	F	20	95.1± 6.8
05.0	M	20	48.4± 5.1
25. 0	F	20	99.4± 9.2

Mean ± S. E. M: male, F: female Significant difference from control: * P<0.05

Table 6 Rotarod test of F₁ rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg)	Sex	No. of offspring tested	Rotarod performances)
	M	20	16/20
Control	F	20	19/20
	M	20	15/20
6. 25	F	20	16/20
44.	M	20 ·	14/20
12. 5	F	20	17/20
	M	20	14/20
25. 0	F	20	18/20

a) No. of offspring who can ride on the rod over 2 min. /No. of offspring tested

M: male, F: female

Table 7 Conditioned avoidance response of F₁ rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

		No. of	Avoidance rate (%)					
Dose (mg/kg)	Sex	offspring tested	1st day	2nd day	3 rd day	4 th day		
1	М	20	24.5±11.9	28. 0±13. 2	29. 0±13. 0	29.5±10.6		
Control	F	20	29.3± 8.2	30.3± 9.1	32.1± 8.3	41.6± 8.4		
4.05	М	20	26. 0± 7. 2	32. 5 ± 10. 1	31.5±10.0	35.0± 9.8		
6. 25	F	20	23. 2± 9. 1	23. 4± 9. 1	28.1± 9.0	34.4± 9.4		
40.5	M	20	22.5± 1.3	23.5± 1.1	25.0± 1.5	26.5± 3.5		
12.5	F	20	17.5± 4.8	26.6± 7.1	28.1± 5.6	29.7± 6.9		
	M	20	18.8± 5.3	27. 2± 8. 7	27.8± 9.3	27.2± 9.6		
25. 0	F	20	17.2± 2.1	15.3± 3.4	21.0± 3.4	28.3± 5.2		
D ((h)	Sex	No. of offspring		Escape	rate (%)			
Dose (mg/kg)	Sex	tested	1st day	2nd day	3 rd day	4 th day		
Control	M	20	29. 1±10. 5	40.8±10.8	60. 8±12. 4	49.6±11.0		
Control	F	20	38.3± 7.9	46.2± 8.7	60.6± 7.7	52.8± 7.4		
c or	M	20	20.8± 6.3	30.0± 9.6	33.8±11.4	35.8±10.3		
6. 25	F	20	27.4± 7.1	44.7+1 8.6	61.4± 7.8	43.3± 8.6		
10 F	М	20	29. 1± 8. 1	43. 2 ± 10. 6	61.8± 9.3	64.5± 8.8		
12. 5	1 _ 1	20	50.9± 6.9	64.7± 5.9	70.3± 7.7	64.4± 6.9		
	F	20	1					
25. 0	M	20	24.5± 8.2	36.4± 8.8	43. 2±11. 0	46. 4 ± 10. 3		

Mean \pm S. E. M: male, F: female

Table 8 Water T-maze test of F₁ rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose		No. of		Time (sec)a)		Errors*)		
(mg/kg)	Sex	offspring tested	1st day	2nd day	3 rd day	1st day	2nd day	3 rd day
Control	М	20	35.1± 5.2	29. 3 ± 6. 0	22.9±3.2	2.0±0.3	1.9±0.6	0.6±0.3
Control	F	20	34.3± 4.8	29.3±7.7	25.7±4.5	3.1±1.0	1.5±0.6	0.7±0.2
6. 25	М	20	20.2± 4.5*	22. 2 ± 4. 1	15.0±2.5	1.2±0.3	0.7±0.3	0.4±0.2
0. 25	F	20	33. 2± 5. 5	22.6±2.6	22.2±3.4	2.4±0.5	0.9 ± 0.3	0.6±0.2
12. 5	М	20	57.1± 8.1*	28.0±5.6	27.6±5.2	5.2±1.0**	2.1±0.9	1.9±0.5
12. 5	F	20	42.0± 8.2	26.0±7.3	24. 1±4. 6	2.8±0.5	1.0±0.3	0.1±0.3
25. Q	М	20	32.2± 4.8	16.4±3.0	15.6±3.3	3.8±1.0	0.6±0.3	0.4±0.2
40. U	F	20	72. 4±10. 3**	36.0±8.6	28.5±5.0	5.9±1.2	2.1±0.8*	0.4±0.2

Mean ± S. E. M: male, F: female

Significant difference from control: * P<0.05, **<0.01

a) time or errors per animal per trial

Table 9 Og	nec fi	ield test of	F ₁ rat offsp	Table 9 Open field test of F1 rat offspring from mothers administeed intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition	others admin	isteed intrav	enously witl	h CLM from	day 17 of pr	egnancy to d	ay 21 of pos	tparturition
Dose	0	No. of	Rear	Rearing	Ambu	Ambulation	Prec	Preening	Defe	Defecation	Uris	Urination
(mg/kg)	4 2 2	dex ouspring tested	1st day	2nd day	1st day	2nd day	1st day	2nd day	1st day	2nd day	1st day	2nd day
Control	ጃ ፡፡	20	13. 4±1. 6 14. 6±1. 2	3.6±1.0 4.3±0.9	59. 1±0. 4 78. 7±7. 6	59.1±0.4 24.1± 5.9 78.7±7.6 43.0±11.5	2.3±0.7 1.9±0.4	1.9±0.3 1.5±0.4	1.1±0.5 1.8±1.0	3.2±0.7	0.6±0.2	0.6±0.2 0.3±0.1
6. 25	Жя	20	13.6±2.6 16.8±1.3	6.9±1.9 8.7±1.6*	72.7±6.3 87.6±6.0	72.7±6.3 30.1± 6.4 87.6±6.0 42.4± 5.8	2.1±0.4 1.3±0.3	1.6±0.6 0.9±0.2	1.4±0.6 0.8±0.3	2.1±0.6	0.7±0.2	0.8±0.2
12.5	Z F	20	12. 1±1. 8 16. 8±2. 0	7.5±1.2* 9.5±1.4**	55. 2±0. 4 77. 8±4. 8	55. 2±0. 4 39. 6± 5. 5 77. 8±4. 8 61. 9± 7. 2	2.3±0.4 1.3±0.3	1.4±0.3 1.9±0.5	2.5±0.7 0.5±0.3	2.5±0.5 1.4±0.5	1.3±0.5 0.3±0.1	0.6±0.1 0.2±0.1
25.0	¥ ₩	20	9.5±1.5 12.3±1.4	5.9±1.2 4.8±1.2	49.5±6.7 74.2±6.2	49.5±6.7 27.5± 5.4 74.2±6.2 34.1± 4.9	2.4±0.4 1.9±0.3	1.4±0.4 1.1±0.3	2.2±0.6 0.5±0.3	2.7±0.7	1.1±0.3 0.2±0.1	07±02 05±02 =
Mean±	S.E.	Mean ± S. E. M. male, F: female	: female									1

Significant difference from control: * P<0.05, ** P<0.01

(5) 情緒性

Open field 法により観察した 結果、第2日目の立ち上がり回数が 6.25 mg/kg 投与群の雌および 12.5 mg/kg 投与群の雌雄で対照群と比較して有意に増加したが、区画移動数、洗顔回数、排尿回数および脱糞回数には、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められたかった (Table 9)。

(6) 生殖能力

雌雄の交尾率および妊娠率において、雄の交尾率は各投与群との 100% であった。雌では、対照群、12.5 mg および 25 mg/kg 投与群では 100% を示したが、6.25 mg/kg 投与群では、不交尾のラットが 2 例認められた。妊娠率は、いずれの投与群も 95% 以上で、対照群および各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。不妊ラットを剖検した結果では、肉眼的になんら異常は認められなかった(Table 10)。

各投与群の胎仔(F_s)観察の結果, 母体重の増加量, 着床数, 雌の生存胎仔体重, 性比および吸収胚数には, 対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。また, 外形異常はいずれの投与群にも認められな かった。生存胎仔数は, 12.5 mg/kg 投与群が対照群に 比較して有意に多かった。その他, 雄の生存胎仔体重が 25 mg/kg 投与群において, 対照に比して有意に低かった (Table 11)。

考算

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の 6.25 mg, 12.5 mg および 25 mg/kg ならびに対照として生理食塩水を、1群 20 匹からなる Wistar 系維ラットの妊娠 17 日から分娩後 21 日まで、1日1回毎日一定時期に静脈内投与して、妊娠母体および出生仔への影響について検討した。

母体に対しては、妊娠および哺育期間中、いずれの投与群においても特異な中毒症状は観察されず、死亡例も認められなかった。また、平均体重の推移および摂倒量にも、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。分娩時の観察では、妊娠期間、死亡仔數、生存仔体重および性比には、対照群と各 CLM 投与量との間に有意差はなく、生存仔の外形異常もいずれの投与群にも認められなかった。生産仔数および生存仔数は、6.25 mg/kg 投与群において対照群に比較して有意に低かった。分娩後 21 日目の母体の剖検所見では、各投与群とも主要臓器に異常はなく、着床痕数にも対照群と名CLM 投与群との間に有意差は見られなかった。しかしながら、6.25 mg/kg 投与群の分娩率は対照群に比して有意に低かった。しかし、この6.25 mg/kg 投与群に見られた生産仔数および生存仔数そして分娩率の低下は、

Table 10 Reproductive ability of F_1 rat offspring from mothers administered intravenously with CLM from day 17 of pregnancy to day 21 of postparturition

Dose (mg/kg)	Sex	No. of animals mated	No. of animals copulated	No. of pregnant animals	Mating ^{a)} (%)	Fertility ^b (%)
	M	45	45		100	
Control	F	45	45	.44	100	97. 8
	M	40	40		100	
6. 25	F	40	38	37	95. 0	97. 4
	М	40	40		100	
12. 5	F	40	40	40	100	100
	М	40	40		100	
25. 0	F	40 '	40	38	100	95. 0

a) copulated/mated×100 M: male, F: female

Table 11 Effect of CLM on F₂ fetuses from F₁ offspring used for reproductive ability test

Dose	(mg/kg)		Control	6 . 25	12. 5	25. 0
No. of pregnant	animals		44	37	40	38
Body wt. gain Mean ± S. E. (during pregnancy	y :	119. 7±3. 9	114. 6±3. 7	115.7±2.1	114.7±2.9
No. of implantation (Mean ± S. E.)		:	527 (12.0±0.4)	473 (12.5±0.4)	507 (12. 7±0. 3)	475 (12.8±0.5)
No. of live fetus (Mean ± S. E.)			502 (11. 2±0. 5)	443 (11. 7±0. 5)	495 (12.4±0.3)*	443 (11.9±0.7)
Wt. of live fetuses: Mean ± S. E. (g) F		5. 32±0. 06 4. 98±0. 07	5. 15±0. 07 4. 91±0. 07	5. 18±0. 07 4. 90±0. 07	5. 06±0. 07* 4. 84±0. 08	
Sex ratio: M/F No. of dead fetu			276/226 9 (1. 7)	224/219 0	251/246 2 (0. 4)	239/204 0
No. of resorptions (%)	Implanted trace Early resorption Late resorption Placental remna	n ants	1 (0.2) 2 (0.4) 0 20 (3.8) 1 (0.2)	0 1 (0.2) 0 16 (3.4) 2 (0.4)	0 1 (0.2) 0 7 (1.4) 0	0 3 (0.6) 0 1 (0.2) 27 (5.7)
	Total		24 (4.6)	30 (6.3)	8 (1.6)	32 (6.7)
	malformation (%) s: Mean±S. E. (0/502*)(0) 0.60±0.01	0/443(0) 0. 63±0. 03	0/495(0) 0. 62±0. 01	0/443(0) 0. 63±0. 01

No. of fetuses with malformation

No. of fetuses examined

M: male, F: female

Significant difference from control: * P<0.05

CLM による影響とは考えにくい。すなわち、いずれの変化も投与量との間に相関が認められず、死亡仔数の増加も著しくない点などから考えて、むしろ偶発的に出現したものと考えたほうがよいであろう。哺育期間中の死亡例は、対照群を含む全ての投与群に見られたが、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかっ

た。これらのことから、CLM の周産期投与は母動物および胎仔の発育にほとんど影響をおよぼさないことが判明した。

新生仔に対しては、分娩後8週令時に至るまでの観察期間中、いずれの投与群にも特異な中毒症状は観察されなかった。また、生育率にも対照群と各 CLM 投与群と

b) pregnant/copulated×100

の間に有意差はなく、平均体重も対照群と各 CLM 投与群はほぼ同様の推移を示し、いずれも CLM 投与の影響は認められなかった。発育分化の観察では、耳介開展、切歯前出、腹部毛生、眼瞼開裂、精巣下降および腫閉口時期には、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は認められなかったことから、授乳期間中の CLM の投与は新生仔の生後発育に悪影響をおよばさないことが判明した。

新生仔の行動および機能観察では、行動および感覚反射機能についてはいずれも正常で、CLM 投与による異常は見られなかった。その他、自発運動量および神経・筋能力に対しても影響は認められず、また学習能力に関しても、条件回避反応試験および water T-maze 試験において、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差は見られず、open field 法による情緒性の試験においても、CLM 投与の影響は認められなかった。生殖能力の試験では、雄の交尾率はいずれの投与群も 100%で、雌においても 95.0~100% を示した。また、妊娠率も 95.0~100% を示し、CLM の生殖能力に対する影響は認められなかった。

生殖能力試験において妊娠した母体の観察では、妊娠期間中いずれの投与群にも中毒症状および死亡例は見られなかった。また、末期胎仔(F₁)の観察では、着床数、雌の生存胎仔体重、性比および吸収胚数には、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差はなく、外形異常もいずれの投与群にも認められなかった。しかし、12.5 mg/kg 投与群の生存胎仔数は対照群に比較して有意に多く、また 25 mg/kg 投与群の雄の生存胎仔体重は有意に低かった。しかしながら、そのいずれも投与量との相関はなく、正常範囲内の変動であると思われる。

以上の結果から、CLM の 6.25 mg, 12.5 mg および 25 mg/kg を妊娠ラットの周産期および授乳期に投与 しても、妊娠母体および出生仔に対してなんら影響をおよぼさないものと思われる。

結 論

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の生殖に

およぼす影響を検討する目的で、周慶期および授乳期後 与試験を Wistar 系ラットを用いて、CLM 6.25 mg, 12.5 mg および 25 mg/kg の静脈内投与により行ない。 つぎの結論を得た。

- 1. 妊娠母体の一般症状、体重および摂倒量に対して 影響を与えなかった。
- 2. 分娩時および授乳期の観察において、妊娠期間、 出産仔数、生存仔数、生存仔体重、性比、死産仔数、着 床痕数、分娩率および哺育率に対して影響を与えず、ま た生存仔の外形異常の発現を促進させなかった。
- 3. 新生仔の成長および発育・分化に対して影響をお よぼさなかった。
- 4. 新生仔の生後の行動および感覚反射機能、自発運動量、神経・筋能力、学習能力、情緒性および生殖能力に対して、影響をおよぼさなかった。
- 5. CLM の周産期および授乳期投与試験における最大無作用量は、25mg/kg であると考えられる。

文 献

- SCHWARTZ, B. S.; M. R. WARREN, F. A. BARRLEY& L. LANDIS: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistin methanesulfonate. Antibiotics Annual 1959/ 1960: 41~60, 1960
- 2) 辻谷典彦,大山正和,大内 勝,斎藤太郎,根本 朋徳: Sodium colistin methanesulfonete のラットにおける生殖試験。第1報。妊娠前および妊娠初期投与試験。(未発表)
- 3) 辻谷典彦,川口洋二,高田晴彦,大内 勝,斎藤 太郎,松本朋徳: Sodium colistin methanesulfonate のラットにおける生産試験。第2報。器 官形成期投与試験。(未発表)
- 4) IRWIN, S.; Drug screening and evaluation of new compounds in animals. Animal and clinical pharmacological techniques in drug evaluation, ed. by NODIME, J. H. & P. E. SIEGELER: 36~54, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1964
- 石崎 綸:水迷路におけるラットの学習行動について。Exp. Anim. 27:9~12, 1978

REPRODUCTION STUDIES OF SODIUM COLISTIN METHANESULFONATE. III

Perinatal and Postnatal Study in Rats

Michihiko Tsujitani, Masakazu Oyama and Kiyotake Kadoya Department of Pharmacology, Kanagawa Dental College (Director: Prof. Haruo Itôh)

MASARU OHUCHI, TARO SAITOH and TOMONORI MATSUMOTO
Pharmacological Research Center,
Kayaku Antibiotic Research Co., Ltd.

Perinatal and postnatal study of sodium colistin methanesulfonate (CLM) was performed with Wistar strain rats. The dams were given CLM intravenously at doses of 6.25 mg, 12.5 mg and 25 mg/kg from day 17 of gestation to the 21 st day post partum.

Results were given as follows;

- 1. CLM did not affect general condition, maternal body weight and food consumption in the dams.
- 2. There was no significant difference between the CLM treated groups and the control group in duration of pregnancy, number of newborns, number of liveborns, number of stillborns, sex ratio and weight of liveborns at delivery. Moreover, no external malformations of liveborns were observed in any treated group.
 - 3. CLM did not affect delivery rate or nursing rate.
 - 4. CLM did not affect postnatal growth, development and differentiation in newborn rats.
- 5. CLM did not affect postnatal behavior, sensational reflex, spontaneous activity, nerve-muscle ability, learning ability, emotional pattern and reproductive ability in newborn rats.

It can be concluded that CLM does not influence the health of dams and postnatal development of their offspring. In this study, the maximum non-effect dose of CLM was 25 mg/kg in rats.