

Sodium colistin methanesulfonate のウサギにおける生殖試験

— 器官形成期投与試験 —

辻 谷 典 彦

神奈川県立大学薬理学教室

(主任：伊藤春生教授)

大 内 勝・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、ウサギにおける器官形成期投与試験を行なった。New Zealand white-Sat. ウサギに、CLM の 50 mg, 63 mg, 80 mg/kg をそれぞれ静脈内投与し、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、CLM は影響をおよぼさなかった。
2. 末期胎仔の観察において、着床数、生存胎仔数、生存胎仔体重、性比、死亡胎仔数、吸収胚数および胎盤重量に影響は認められなかった。
3. CLM 投与による胎仔の外形異常、内臓異常および異常化骨の発現は認められなかった。また、化骨遅延も認められなかった。

以上のことから、ウサギにおける CLM の器官形成期投与において、母体および胎仔に対して影響をおよぼすものでないことが示唆された。また、本試験における CLM の最大無作用量は 80 mg/kg であると推定される。

序 言

Colistin (以下、CL と略) は、1950 年小山ら¹⁾によって *Bacillus polymyxa* var. *colistinus* の培養濾液中から発見された polypeptide 系抗生物質で、Gram 陰性菌に対して強い抗菌作用を有している²⁾。Sodium colistin methanesulfonate (以下、CLM と略) は、CL の遊離の 7-amino 基を methanesulfonate 化 (-NH-CH₂-SO₃-) した colistin derivative で、CL に比較して毒性は軽減され、胆汁および血清などによって不活化され難く^{3,4)}、また体内 histamine 様物質の遊離による血圧下降作用がない⁵⁾、などの利点を有していることから、臨床分野での使用頻度は CL よりも高い⁶⁻⁸⁾。

今回著者らは、CLM の安全性研究の一環として、ウサギを用いて生殖におよぼす影響に関する試験を行なった。本報では、ウサギの器官形成期に CLM を投与して、胎仔に対する影響を検討した成績について報告する。

実験材料および方法

1. 被検薬物

実験に使用した CLM は、*Bacillus polymyxa* var.

colistinus の培養濾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。使用に際しては、滅菌生理食塩水に溶解し、投与容量を体重 1 kg 当り 1 ml として、それぞれの所要濃度になるように調整した。

2. 使用動物

実験動物として、生後 4~5 カ月令の雌雄の New Zealand white-Sat. ウサギ (東京実験動物) を購入後予備飼育し、6 カ月令に達したものの中から一般状態の良好なものを選び使用した。妊娠動物を得るために、外陰部観察により交配適期と判定した未経産の雌を、同種の成熟雄のケージに入れ交配させ、肉眼的に交尾を確認したものを妊娠 0 日の動物として、個別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°C、湿度 55±5% の恒温恒湿室内で固型飼料 (ラボ R ストック: 日本農産工業) と水を自由に摂取できるようにして行なった。

3. 投与量

投与量設定のために、本実験と同種の非妊娠雌ウサギを用いて、予備実験を行なった。すなわち、生後 6 カ月

の雌ウサギを1群5匹として、CLM 80 mg, 100 mg および 125 mg/kg を1日1回13日間連続静脈内投与した結果、125 mg/kg 投与群では投与開始後4日目までに全例死亡した。100 mg/kg 投与群では、5例中2例に投与開始後体重減少および摂餌量の低下が見られ、4～9日目に死亡した。80 mg/kg 投与群では、中毒症状の発現および死亡例はなく、体重増加の抑制も認められなかった。したがって、この結果を参考にして80 mg/kg を最高用量とし、中間量を63 mg/kg、最低用量を50 mg/kg と設定した。その他対照として、生理食塩水投与群を設けた。なお、最低用量は推定臨床用量の約7.5倍に相当する。

4. 投与方法および投与期間

薬物は、妊娠6日から18日までの13日間、1日1回毎日一定時刻に耳介静脈内に投与した。

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約10匹とし、妊娠期間中毎日一般症状を観察するとともに、体重および摂餌量を測定した。

2) 胎子の観察

妊娠母体を妊娠29日目に ether 麻酔下に放血致死させ、ただちに開腹して子宮を切開し、子宮内の胎子分布、着床数、生存胎子数、死亡胎子数および吸収胚数を調べ、生存胚子については、体重および胎盤重量の測定および口腔内を含む外形異常の有無を調べた後、開腹して実体顕微鏡下で内性器による性別の判定および胸腹部臓器の異常を検索した。ついで、全胎子を99% alcohol で固定した後、Dawson⁹⁾の変法により alizarin red S 染色による骨格透明標本を作製し、化骨の異常および化骨の進行状態を観察した。

6. 統計処理

実験結果の統計学的処理は、 t 検定および χ^2 検定を用いて行なった。

実験成績

1. 母体におよぼす影響

1) 一般症状

妊娠期間中、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、死亡例も認められなかった。

2)

妊娠期間中の各投与群における平均体重は、各 CLM 投与群および対照群ともほぼ同様の体重推移を示した (Fig. 1)。また、妊娠期間中の体重増加量は、対照群 429.0 g, 50 mg/kg 投与群 550.0 g, 63 mg/kg 投与群 679.0 g および 80 mg/kg 投与群 502.0 g であり、63 mg/

Fig. 1 Mean body weight of pregnant rabbits administered intravenously with CLM on days 6 to 18 of pregnancy

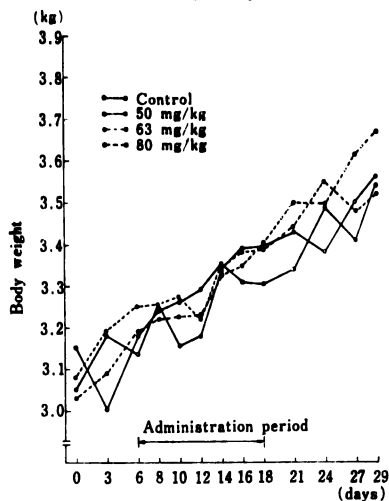
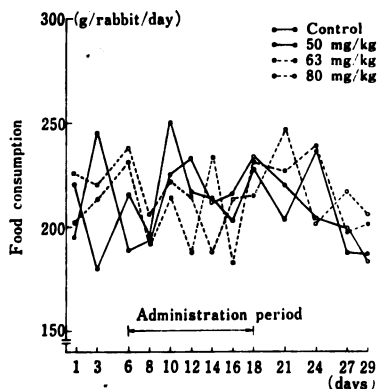


Fig. 2 Mean food consumption of pregnant rabbits administered intravenously with CLM on days 6 to 18 of pregnancy



kg 投与群が対照群に比較して有意に多かった。

3) 摂餌量

妊娠期間中の各投与群における平均摂餌量は、対照群および各 CLM 投与群ともほぼ同様の摂餌傾向を示した (Fig. 2)。

2. 胎子におよぼす影響

1) 開腹時所見

各投与群の開腹時の所見において、63 mg および 80 mg/kg 投与群では、着床数、生存胎子数、生存胎子体重、性比、死亡胎子数、吸収胚数および胎盤重量のいずれにも、対照群との間に有意差は認められなかった。しかしながら、50 mg/kg 投与群においては、性比および吸収胚数については対照群との間に有意差は認められな

Table 1 Effect of CLM on fetuses from pregnant females administered intravenously on days 6 to 18 of pregnancy

Dose (mg/kg)		Control	50	63	80
No. of pregnant animals		12	11	10	12
Body wt. gain during pregnancy : Mean \pm S. E. (g)		429.1 \pm 60.7	550.0 \pm 71.1	679.0 \pm 48.1**	502.0 \pm 72.6
No. of implantation sites (Mean \pm S. E.)		90 (7.5 \pm 0.4)	58 (5.3 \pm 0.5**)	75 (7.5 \pm 0.7)	101 (8.4 \pm 0.6)
No. of live fetuses (Mean \pm S. E.)		87 (7.3 \pm 0.4)	55 (5.0 \pm 0.6**)	66 (6.6 \pm 0.7)	92 (7.7 \pm 0.7)
Wt. of live fetuses Mean \pm S. E. (g)	M	43.6 \pm 1.1	46.3 \pm 1.9	42.2 \pm 4.5	44.8 \pm 2.5
	F	43.1 \pm 1.8	48.8 \pm 0.9*	46.5 \pm 2.2	44.6 \pm 2.6
Sex ratio : M/F		49/38	30/25	36/30	49/43
No. of dead fetuses (%)		1 (1.1)	0	0	0
No. of resorptions (%)	Implanted traces	0	0	0	0
	Early resorption	0	1 (1.7)	0	0
	Late resorption	0	0	0	0
	Placental remnants	2 (2.2)	1 (1.7)	6 (6.0)	6 (5.9)
	Macerated fetuses	0	0	1 (1.3)	3 (3.0)
Total		3 (3.3)	3 (5.2)	7 (9.3)	9 (8.9)
No. of external malformation (%)		0/87*(0)	0/55(0)	0/66(0)	0/92(0)
No. of internal malformation (%)		0/87*(0)	0/55(0)	0/66(0)	0/92(0)
Wt. of placentas : Mean \pm S. E. (g)		5.90 \pm 0.22	7.53 \pm 0.32**	6.12 \pm 0.31	6.29 \pm 0.29

a) $\frac{\text{No. of fetuses with malformation}}{\text{No. of fetuses examined}}$

M : male, F : female

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

かったが、着床数および生存胎仔数は対照群に比較して有意に少なく、また胎盤重量は有意に重かった。さらに、生存胎仔体重は雌雄ともに対照群に較比して重い傾向にあり、とくに雌では有意差が認められた (Table 1)。

外形異常および内臓異常は、対照群および各 CLM 投与群のいずれにも認められなかった。

2) 骨格所見

各投与群の骨格系の観察結果は、各投与群における各骨の総化骨数に対する生存胎仔数の割合で示した。

各投与群において、異常化骨として認められたものは腰肋だけであった。そして、その出現率は対照群 56.2%、50 mg/kg 投与群 61.7%、63 mg/kg 投与群 84.8% および 80 mg/kg 投与群 65.3% であり、63 mg/kg 投与群の出現率が対照群に比較して有意に多かった。その他には、頸肋、胸骨および胸椎の非対称ならびに過剰胸骨分節などの異常化骨はいずれの投与群にも認められなかった。

化骨の進行状態については、後頭骨、胸骨、脊椎 (頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎)、中手骨、中足骨および前後肢の指骨について観察した。後頭骨、脊椎の頸椎、

胸椎および仙椎、中手骨、中足骨ならびに前後肢の各指骨については、対照群および各 CLM 投与群いずれの群においても 100% の完全化骨が認められた。胸骨については、各投与群に完全化骨していない部位が見られたが、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。尾椎において、各投与群の化骨率に差異が見られ、63 mg/kg 投与群の第 16 尾椎の化骨率が対照群に比較して有意に高かったが、その他の部位においては、対照群との間に有意差は認められなかった (Table 2, 3)。

考 察

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の 50 mg, 63 mg および 80 mg/kg ならびに対照として生理食塩水を、1 群約 10 匹からなる New Zealand white-Sat. ウサギの妊娠 6 日から 18 日までの 13 日間、1 日 1 回毎日一定時刻に静脈内投与して、妊娠母体および末期胎仔への影響について検討した。

妊娠母体に対しては、妊娠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餌量も、対照

Table 2 Effect of CLM on fetal ossification in rabbits administered intravenously on days 6 to 18 of pregnancy (1)

Dose (mg/kg)	Control	50	63	80
State of ossification (%)				
Occipital				
Basioccipital	100	100	100	100
Exoccipital	100	100	100	100
Interparietal	100	100	100	100
Supraoccipital	100	100	100	100
Vertebrae				
Cervical				
Centrum of odontoid process	100	100	100	100
Centra & Arches 1-7	100	100	100	100
Thoracic				
Centra & Arches 1-12	100	100	100	100
Lumbar				
Centra & Arches 1-7	100	100	100	100
Sacral				
Centra & Arches 1-4	100	100	100	100
Caudal				
Centra				
1-12	100	100	100	100
13	98.6	100	100	100
14	94.5	100	100	100
15	82.2	85.0	100	84.0
16	49.3	38.3	87.9**	34.7
17	24.7	11.7	37.9	25.3
18	8.2	1.7	4.5	1.3

群と各 CLM 投与群はほぼ同様の傾向を示したが、体重増加量は 63mg/kg 投与群が対照群に比較して有意に多かった。しかし、投与量との相関関係は認められず、CLM 投与による影響とは考えられず、CLM が母体重の増加を促進する作用はないと思われる。

末期胎仔における開腹時の観察において、50mg/kg 投与群の着床数および生存胎仔数が対照群に比較して有意に少なかったが、このことは吸収胚数や死亡胎仔数が増加したためではなく、しかも 63mg および 80mg/kg 投与群において有意差が認められず投与量との相関がないところから、CLM 投与による影響とは考えられず、むしろ偶発的なもので CLM が着床数や生存胎仔数を減少させる作用はないと思われる。また、50mg/kg の生存胎仔体重が対照群に比して重い傾向が見られ、雌においては有意差が認められ、胎盤重量も有意に重かった。このことは、CLM の影響というよりは、むしろ 50mg/kg 投与群の生存胎仔数に関係しているものと思われる。すなわち、一般に生存胎仔数が少ない場合、その胎仔の体重が増量することが多い。したがって、この増

加は代償性のものと考えられる。その他、性比および吸収胚数については、対照群と各 CLM 投与群との間に有意差はなく、外形および内臓異常もいずれの投与群にも認められなかった。

骨格系の観察において、異常化骨として認められたものは腰肋だけであり、これは対照群および各 CLM 投与群の全てに認められたが、63mg/kg 投与群では対照群に比較して有意に多かった。しかしながら、投与量と異常化骨発現との間に相関関係が見られないことから、CLM 投与の影響によるものとは認め難い。したがって、CLM は異常化骨を誘発するものではないと考えられる。また、化骨の進行状態についても、観察した骨格の中で後頭骨、脊椎の頸椎、胸椎、腰椎および仙椎、肋骨、中手骨、中足骨ならびに前後肢の各指節については、いずれの投与群も完全化骨していた。しかしながら、胸骨および尾椎については、完全化骨していない部位が認められた。しかし、その化骨率には投与量との相関は見られず、かつ自然発生的範囲内に含まれるもので、CLM 投与による化骨遅延とは考え難い。

Table 3 Effect of CLM on fetal ossification in rabbits administered intravenously on days 6 to 18 of pregnancy (2)

Dose (mg/kg)		Control	50	63	80
Ribs		100	100	100	100
Sternum					
Sternebrae	1-4	100	100	100	100
	5	87.7	85.0	81.8	81.3
	6	100	100	98.5	100
Metacarpals					
Diaphysis	1-5	100	100	100	100
Phalanges of forepaw					
Distal diaphysis	1-5	100	100	100	100
Middle diaphysis	2-5	100	100	100	100
Proximal diaphysis	1-5	100	100	100	100
Metatarsals					
Diaphysis	2-5	100	100	100	100
Phalanges of hindpaw					
Distal diaphysis	2-5	100	100	100	100
Middle diaphysis	2-5	100	100	100	100
Proximal diaphysis	2-5	100	100	100	100
Abnormal ossification (%)					
Lumbar rib		56.2	61.7	84.8**	65.3

Significant difference from control: ** P<0.01

以上の結果から、CLM 50mg, 63mg および 80mg/kg を妊娠ウサギの器官形成期に投与しても妊娠母体および胎仔に対しては、なんら影響をお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、器官形成期投与試験を New Zealand white Sat. ウサギを用いて、CLM 50mg, 63mg および 80mg/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、摂餌量に対して、影響は認められなかった。
2. 末期胎仔の観察において、着床数、生存胎仔数、生存胎仔体重、性比、死亡胎仔数、吸収胚数および胎盤重量に影響は認められなかった。また、胎仔の外形異常、内臓異常および異常化骨の発現はなく、化骨に対しても影響は認められなかった。
3. CLM のウサギにおける器官形成期投与試験の最大無作用量は、80mg/kg であると考えられる。

文 献

- 1) 小山康夫, 黒沢秋雄, 土屋 厚, 高久田金助: 土壌有芽胞細菌の生産する一新抗菌性物質 Colistin に就て。J. Antibiotics, Ser. B 3: 457~458, 1950

- 2) SCHWARTZ, B. S.; M. R. WARREN F. A. BARKLEY & L. LANDIS: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistin methanesulfonate. Antibiotics Annual 1959/1960: 41~60, 1960
- 3) 東海林純一, 浜田 雅, 渡辺純江, 千葉勝一, 黒沢秋雄, 小山康夫: Colistin sodium methanesulfonate の諸性状について。J. Antibiotics, Ser. B 12: 365~367, 1959
- 4) 小山康夫, 黒沢秋雄: Colistin メタンスルホン酸誘導体の生体内に於る抗菌作用について。東京医事新誌 77: 355~356, 1960
- 5) 松本朋徳: Colistin およびその誘導体による Histamine 様物質の遊離。日本薬理学雑誌 66: 284~291, 1970
- 6) 寺尾宏一郎, 鈴木喜久夫, 星野千賀子, 牛久英雄: 静注用コリマイシン (静注用コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム) の使用経験。基礎と臨床 9: 256~261, 1975
- 7) 平野章治, 勝見哲郎, 黒田恭一: 複雑性尿路感染症における静注用メタコリマイシンの使用経験。Chemotherapy 22: 1413~1417, 1974
- 8) 南条昭一: 緑膿菌を検出した耳漏に対するコリスチンメタンスルホン酸ナトリウムの局所使用経験。診療と新薬 13: 617~620, 1976
- 9) DAWSON, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarine red S. Stain. Technol. 1: 123~124, 1926

REPRODUCTION STUDIES OF SODIUM COLISTIN
METHANESULFONATE. TERATOGENICITY
STUDY IN RABBITS

MICHIHIKO TSUJITANI

Department of Pharmacology, Kanagawa Dental College

(Director : Prof. HARUO ITOH)

MASARU OHUCHI, TARO SAITOH and TOMONORI MATSUMOTO

Pharmacological Research Center,

Kayaku Antibiotic Research Co., Ltd.

Teratogenicity study on sodium colistin methanesulfonate (CLM) were carried out in New Zealand white Sat. rabbits. Pregnant rabbits were given CLM intravenously, once daily, at doses of 50 mg, 63 mg and 80 mg/kg for 13 days from day 6 to day 18 of gestation.

Results were given as follows ;

1. CLM did not affect general condition, body weight and food consumption in pregnant rabbits.
2. There was no significant difference between the CLM treated groups and the control group in number of implantation, number of live fetuses, weight of live fetuses, sex ratio, number of resorptions, number of dead fetuses and weight of placentas.
3. No internal and external malformation as well as anomalous ossification of fetuses were observed in CLM treated groups.
4. The ossifications were not delayed by treatment with CLM.

It can be concluded that CLM does not influence the health of pregnant rabbits or the development of their fetuses. In this study the maximum non-effect dose of CLM was 80 mg/kg in rabbits.