

## Sodium colistin methanesulfonate (CLM) のマウスにおける生殖試験 (第3報)

## — 周産期および授乳期投与試験 —

斎藤 太郎・辻谷 典彦・大内 勝・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 12 月 27 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 ICR-JCL 系マウスを用いて行った。CLM は 125, 250 および 500 mg/kg を、妊娠 15 日から分娩後 21 日までの母体にそれぞれ静脈内投与を行ない、次に述べる結果を得た。

1. 妊娠母体の一般状態、体重および摂餌量に対して、CLM の影響はみとめられなかった。
2. 分娩時および授乳期の観察において、妊娠期間、生存仔数、性比、着床痕数、分娩率および哺育状態に対して CLM の影響はなく、死産仔や生存仔の外形異常の発現もみとめられなかった。
3. 新生仔の成長および発育・分化に対して、CLM の影響はみとめられなかった。
4. 新生仔の生後の行動および機能観察では、感覚機能、自発運動量、神経・筋能力、情緒性、学習能力および生殖能力に対して、CLM の影響はみとめられなかった。

以上のことから、CLM を雌マウス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、ほとんど影響を及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 500 mg/kg であると推定される。

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<sup>1)</sup>。著者らは、CL の誘導体である sodium colistin methanesulfonate (以下 CLM と略) の生殖に及ぼす影響を検討する目的でマウスを用い、第 1 報<sup>2)</sup>において妊娠前および妊娠初期投与試験、第 2 報<sup>3)</sup>において器官形成期投与試験について報告した。本報では、マウス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。

## I. 実験材料および方法

## 1. 被検薬物

実験に使用した CLM は、第 1 報<sup>2)</sup> および第 2 報<sup>3)</sup> と同一のもので、*Bacillus polymyxa var. colistinus* の培養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、滅菌生理食塩液に溶解し、投与容量を体重 10g 当り 0.1 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 4 週令の雌雄の ICR-JCL 系マウス (日本クレア) を購入後予備飼育し、10~13 週令に達したもののの中から、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、外陰部の肉眼的所見に

より交配適期とした未經産の雌を、同系の雄と 5 対 5 の割合で 1 夜 (約 17 時間) 同居させ、翌朝腔栓をみとめたものを妊娠 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とおして、すべて室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の恒温恒湿室内で行った。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)、その他のものには飼料用固型飼料 (CE-2, 日本クレア) を与え、水とともに自由に摂取させた。

## 3. 投与量

投与量は、「器官形成期投与試験<sup>3)</sup>と同様、最高用量を 500 mg/kg とし、以下中用量を 250 mg/kg、最低用量を 125 mg/kg とした。その他対照として、生理食塩液投与群を設けた。

## 4. 投与方法および投与期間

薬物は、妊娠 15 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、妊娠期間中毎日一般状態を観察するとともに、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、分娩時分娩

の状態を観察し、妊娠期間を算定した。分娩後は21日まで出生仔を哺育させ、この間一般状態の観察を毎日、体重および摂餌量の測定を毎週1回行なった。分娩後21日に仔を離乳させた後、母体を屠殺開腹し、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しらべ、分娩時にみられた生存数と対比して分娩率を算出した。

## 2) 新生仔の発育、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しらべ、体重を測定した後、全例母体に哺育させた。生後4日には、1母体あたり雌雄各々4匹になるように仔数を調整した。

新生仔は、生後21日まで哺育し、この間一般状態を観察するとともに、毎週1回、耳介の開展、切歯の萌出、腹部毛生、眼瞼開裂について観察し、体重を測定した。生後21日目に新生仔を離乳し、離乳後は雌雄を分離して飼育し、生後10週まで毎週1回体重を測定し、一般状態ならびに雄の精巣下降および雌の腔開口について観察した。生後10週令時には、生殖能力試験のために、1腹当たり雌雄約2匹ずつを残して屠殺し、主要臓器の肉眼的観察を行なった。

## 3) 新生仔の行動および機能観察

新生仔は、生後21日の離乳時に HAFFNER 法による痛覚反射、正向反射および ammonia ガスに対する反応を検査した。

その他、生後の行動・機能観察として、自発運動量、神経・筋能力、情緒性、学習能力および生殖能力について検査した。自発運動量は回転カゴ法<sup>9)</sup>により、神経・筋能力は回転棒法<sup>9)</sup>および傾斜板法<sup>9)</sup>により、7~8週令時に全仔数を検査した。情緒性は Open field 法<sup>7)</sup>により、4~5週令時に各投与群各1腹より雌雄それぞれ1匹ずつを無作為に選び、3分間の区画移動数、立ち上がり回数、洗顔回数、脱糞回数、排尿回数および移動を開始するまでの潜時を測定した。学習能力は、Water T-maze 試験<sup>9)</sup>および Shuttle box 法<sup>9)</sup>により、8~10週令時に、各投与群各1腹より雌雄それぞれ1匹について検査した。Water T-maze 試験は、1日1匹当たり5試行を4日間連続して行ない、遊泳時間と錯誤数を測定した。Shuttle box 法は、1日1匹当たり20試行を4日間連続して行ない、回避反応回数および逃避反応回数を測定日ごとに百分率で示した。なお試行間隔は20秒とし条件刺激としてブザーを5秒間与え、この間に動物が他室に移動しない場合は、無条件刺激として電気刺激(130V, 0.2mA)を5秒間与えた。生殖能力は、生後12週令時に、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。毎朝腔栓の有無を検査して交尾を

確認し、交尾の成立した雌動物は、それぞれ小型ケージに独居させて飼育した。妊娠期間中は毎日一般状態の観察、体重および摂餌量測定を行なった。妊娠18日に屠殺して開腹し子宮を切開し、妊娠の有無をしらべ妊娠率を算出し、着床数、生存胎仔数、死亡胎仔数および吸収胎数をしらべ、生存胎仔については、雌雄の判別、体重および胎盤重量測定ならびに外形(腹腔内を含む)異常の有無をしらべた。ついで生存胎仔は99% alcohol で固定した後、alizarin red S 染色による骨格透明標本作成し、骨格の異常および化骨の進行状態を観察した。交配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。

## 6. 統計処理

実験結果の統計処理は、t検定、 $\chi^2$ 検定および Wilcoxon の順位検定により行なった。

## II. 実験成績

### 1. 母体に及ぼす影響

#### 1) 一般症状

妊娠および哺育期間中、対照群および CLM 投与群のいずれにも、特異な中毒症状は観察されず、死亡例もみとめられなかった。

#### 2) 体重変化

妊娠および哺育期間中の各投与群の平均体重の推移は、Fig. 1 に示した。妊娠期間中 125 mg/kg 投与群の体重増加量が、対照群に比較して有意に低かったが、哺育期間中においては特に差はみられなくなった。その他の投与群においては、対照群と CLM 投与群との間に差はみられなかった。

#### 3) 摂餌量

妊娠および哺育期間中の各投与群の平均摂餌量は

Fig. 1 Mean body weight of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational and postnatal period)

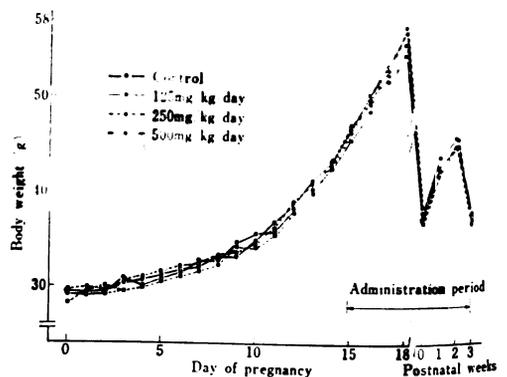


Fig. 2 Mean food consumption of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational and postnatal period)

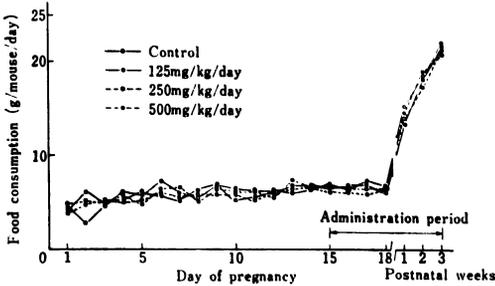


Fig. 2 に示した。CLM 投与群はいずれも対照群とほぼ同様の摂餌傾向を示した。

#### 4) 分娩時所見

各投与群の分娩時所見は、Table 1 に示した。

平均妊娠期間は、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみられなかった。その他、生存仔数、生存仔体重および性比についても、対照群と CLM 投与群との間に有意差はなく、死産仔および生存仔の外形異常も、すべての投与群にみとめられなかった。

#### 5) 哺育状態

各投与群の哺育期間中の所見は、Table 2 に示した。哺育期間中の死亡仔数は、生後 4 日の仔数の調整日までは、いずれの投与群にもみとめられなかった。その後離乳時までには、対照群および 125 mg/kg 投与群で 1 例、250 mg/kg 投与群で 8 例、500 mg/kg 投与群で 4 例みられたが、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。離乳時の母体の剖見所見では、各投与群とも主要臓器に異常はなく、着床痕数および分娩率にも対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。

#### 2. 新生仔に及ぼす影響

##### 1) 一般症状

分娩後から 70 日令にいた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 70 日令にいたるまでの死亡仔は、Table 2 に示すように、500mg/kg 投与群で 2 例みとめられただけで、その他の投与群にはみられなかった。

##### 2) 体重推移

分娩から 70 日令にいたるまでの平均体重の推移は、Fig. 3 に示した。CLM 投与群は雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示した。

Table 1. Perinatal and postnatal observation of mice administered with CLM

Dose(mg/kg)	Control	125	250	500
No. of mothers	20	20	20	20
No. of dead mothers during peri-and postnatal term	0	0	0	0
Body weight gain of mothers during pregnancy, $\bar{x} \pm S. E.$	27.5 ± 0.69	25.2 ± 0.68 <sup>*</sup>	27.9 ± 0.86	27.5 ± 0.83
Duration of gestation(day)	19.2 ± 0.08	19.1 ± 0.07	19.1 ± 0.09	19.1 ± 0.10
No. of implantation sites (litter size)	238 (11.9 ± 0.36)	221 (11.1 ± 0.60)	233 (11.7 ± 0.32)	245 (12.3 ± 0.56)
No. of new borns (per litter)	235 (11.8 ± 0.40)	203 (10.2 ± 0.44)	227 (11.4 ± 0.30)	231 (11.6 ± 0.56)
No. of stillborns	0	0	0	0
No. of live borns (per litter)	235 (11.8 ± 0.40)	203 (10.2 ± 0.44)	227 (11.4 ± 0.30)	231 (11.6 ± 0.56)
Sex ratio at birth (male/female)	0.84 (107/128)	1.07 (105/98)	0.96 (111/116)	0.82 (104/127)
Delivery rate, % <sup>a)</sup>	98.7	91.9	97.4	94.3
No. of newborns with external abnormalities	0	0	0	0

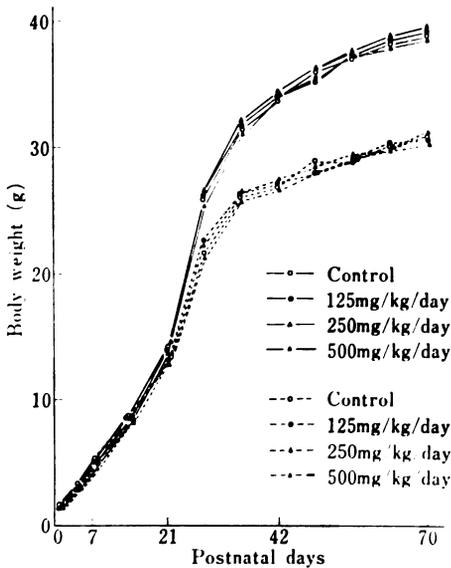
Mean ± standard error

a) : (No. of newborns at birth/No. of implantation sites) × 100

Significant difference from control : \*P < 0.05

Table 2. Observation of postnatal development of mouse F<sub>1</sub> offspring

Dose(mg/kg)	Control	125	250	500
No. of mothers	20	20	20	20
No. of dead mothers during lactation	0	0	0	0
Body weight gain of mothers during lactation, $\bar{x} \pm S. E.$	0.1 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.6	-0.4 $\pm$ 0.6	-0.1 $\pm$ 0.4
No. of live F <sub>1</sub> offspring (male/female), at birth	235 (107/128)	203 (105/98)	227 (111/116)	231 (104/127)
postnatal day 4 before selection (per litter)	235(107/128)	203(105/98)	227(111/116)	231(104/127)
postnatal day 4 Viability(%) after selection (per litter)	100 160(80/80) (8.0 $\pm$ 0.0)	100 157(78/79) (7.9 $\pm$ 0.11)	100 160(80/80) (8.0 $\pm$ 0.0)	100 160(80/80) (8.0 $\pm$ 0.0)
postnatal day 21 No. of live F <sub>1</sub> offspring Viability(%)	159(80/79) 99.4	156(77/79) 99.4	152(75/77) 95.0	156(78/78) 97.5
postnatal day 35 No. of live F <sub>1</sub> offspring Viability(%)	159(80/79) 99.4	156(77/79) 99.4	152(75/77) 95.0	155(78/77) 96.9
postnatal day 56 No. of live F <sub>1</sub> offspring Viability(%)	159(80/79) 99.4	156(77/79) 99.4	152(75/77) 95.0	154(78/76) 96.3
postnatal day 70 No. of live F <sub>1</sub> offspring Viability(%)	159(80/79) 99.4	156(77/79) 99.4	152(75/77) 95.0	154(78/76) 96.3

Fig. 3 Mean body weight of male and female offspring (F<sub>1</sub>) from mouse mothers administered intravenously with CLM

## 3) 発育・分化状態

各投与群の発育・分化の状態は、Table 3 に示した。耳介開展，切歯萌出，腹部毛生，眼瞼開裂および精巢下

降の時期には、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。しかし、腔開口時期は、CLM 投与群は、対照群に比較して有意に早かった。

## 4) 行動および機能観察

## (1) 感覚機能

生後 21 日目の感覚機能検査の結果は、Table 4 に示すように、痛覚反射には対照群および CLM 投与群のいずれにも異常はみとめられなかった。また、正向反射および ammonia ガスに対する臭覚反応も、対照群および CLM 投与群のすべてにおいて正常であった。

## (2) 自発運動量

回転カゴ法による自発運動量測定の結果は、Table 5 に示すように、125 mg/kg 投与群の雌雄で対照群に比較して有意な増加がみられたが、その他の投与群では対照群との間に有意差はみとめられなかった。

## (3) 神経・筋能力

傾斜板法により測定した結果は、Table 6 に示すように、125 mg/kg 投与群の雌雄が対照群に比較して有意に低かったが、その他の投与群では対照群との間に有意差はみとめられなかった。

回転棒法により測定した結果は、Table 7 に示すように、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。

## (4) 情緒性

Table 3. Effect of CLM on postnatal differentiation of mouse F<sub>1</sub> offspring

Dose(mg/kg)	Control	125	250	500
No. of litters	20	20	20	20
Separation of auricles (week)	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00
Eruption of lower incisors (week)	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00
Appearance of abdominal hair (week)	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00
Separation of eyelids (week)	2.0±0.00	2.0±0.00	2.0±0.00	2.0±0.02
Descent of testis (week)	3.0±0.00	3.0±0.00	3.0±0.00	3.0±0.00
Opening of vagina (week)	5.6±0.07	5.1±0.08**	5.1±0.06**	5.1±0.08**

Mean±standard error

Significant difference from control : \*\* P&lt;0.01

Table 4. Effect of CLM on pain response using HAFFNER method

Dose (mg/kg)	Response	
	(+)	(-)
Control	156	0
125	155	0
250	155	0
500	155	0

Values are the number of offspring tested

Table 6. Effect of CLM on the inclined plane test

Dose (mg/kg)	Degree of inclination	
	Male	Female
Control	44.1±0.4	44.8±0.4
125	42.9±0.3*	43.7±0.3*
250	44.2±0.4	43.9±0.4
500	43.4±0.4	43.8±0.4

Mean±standard error

Significant difference from control : \*P&lt;0.05

Open field 法により観察した結果は、Table 8 に示すように、立ち上がり回数および区画移動数は 250mg/kg 投与群の雄で減少、洗顔回数は 125 mg/kg 投与群の雌雄で減少、潜時は 250 mg/kg 投与群の雄で延長がそれぞれ対照群との間に有意にみとめられた。しかし、脱糞

Table 5. Effect of CLM on locomotor activity using rotating drum method

Dose (mg/kg)	Mean score(counts/5minutes)	
	Male	Female
Control	39.7±2.7	44.3±3.5
125	53.1±2.1**	54.6±2.8*
250	41.3±2.5	51.9±3.0
500	47.7±3.0	50.2±2.8

Mean±standard error

Significant difference from control : \*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

Table 7. Effect of CLM on rotarod test

Dose (mg/kg)	Probability(%) <sup>a)</sup>	
	Male	Female
Control	68	76
125	62	77
250	65	62
500	74	73

a) : Probability indicates the percentage when animals tested can ride on the rod over 1 minutes

Rubber rod : 3 cm diameter, Rotation : 6 rpm

回数および排尿回数には、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。

(5) 学習能力

Table 8. Open field performance of mouse offspring( $F_1$ ) at the 5th week after birth from mothers administered intravenously with CLM

Dose (mg/kg)	Sex	No. of offspring examined	Rearing <sup>a)</sup>	Ambulation <sup>b)</sup>	Preening <sup>a)</sup>	Defecation <sup>a)</sup>	Urination <sup>a)</sup>	Latency <sup>a)</sup>
Control	M	20	11.2±1.7	114.4±9.4	1.8±0.2	2.4±0.4	0.4±0.1	3.8±1.1
	F	20	7.1±1.4	96.0±8.6	2.1±0.3	2.2±0.3	0.3±0.1	6.2±1.7
125	M	20	7.5±1.5	90.1±8.3	1.0±0.1**	2.1±0.3	0.2±0.1	6.2±2.8
	F	20	9.6±1.6	122.1±12.6	1.3±0.1*	2.0±0.7	0.1±0.0	4.1±1.3
250	M	20	5.9±1.1*	77.6±7.1**	2.0±0.1	2.2±0.4	0.6±0.1	7.9±1.2*
	F	20	7.9±1.6	101.2±11.4	2.5±0.2	2.3±0.3	0.3±0.1	7.7±2.0
500	M	20	8.9±1.7	97.9±6.9	1.7±0.1	2.9±0.5	0.3±0.1	4.9±1.3
	F	20	9.9±0.5	100.0±10.1	1.9±0.3	1.8±0.4	0.1±0.0	5.4±1.6

Mean±standard error

a) : Mean number of times per offspring( $F_1$ ) M : Male, F : Female

b) : Mean number of sections entered per offspring( $F_1$ )

c) : Mean time(second) per offspring( $F_1$ )

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

Table 9. Water T-maze performance of mouse offspring( $F_1$ ) at 8th to 10th week after birth from mothers administered intravenously with CLM

Dose (mg/kg)	Sex	No. of offspring examined( ) <sup>a)</sup>	Time(second)per animal per trial		No. of errors per animal per trial	
			First	Last	First	Last
Control	M	18(2)	38.6±5.6	16.0±2.0	6.2±0.9	1.3±0.3
	F	18(2)	38.7±8.7	15.1±2.6	7.0±1.5	1.4±0.3
125	M	18(2)	52.4±7.8	19.3±2.5	9.4±1.1	1.7±0.3
	F	17(3)	50.0±11.5	13.3±1.3	8.5±1.1	1.7±0.4
250	M	18(2)	44.3±6.1	13.9±1.7	7.3±1.0	1.3±0.2
	F	20(0)	41.4±5.9	13.2±2.1	6.6±0.9	1.9±0.4
500	M	19(1)	46.0±7.9	20.9±2.9	6.2±1.0	1.8±0.5
	F	17(3)	59.5±19.0	16.8±3.1	8.3±1.2	2.3±0.5

Mean±standard error

a) : Number of animals in( ) is omitted from trials because they can not reach the goal within 5 minutes  
M : Male, F : Female

Water T-maze 試験の結果は、Table 9 に第 1 試行と最終第 20 試行の遊泳時間と錯誤数で示した。第 1 試行では、各投与群間でバラツキがみられたが、第 20 試行では遊泳時間および錯誤数の減少がみられ、これらの値には対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。

Shuttle box 法により測定した結果は、Table 10 に

示すように、250mg/kg 投与群の雌雄の 4 日目の回避率が、他の投与群より高かったが、その他は対照群と CLM 投与群はほぼ同様の傾向を示した。

#### (6) 生殖能力

雌雄の交尾率および妊娠率は、Table 11 に示した。雄の交尾率は、各投与群とも 100% であった。雌では、125 および 250mg/kg 投与群は 100% を示したが、対照

Table 10. Effect of CLM on conditioned avoidance response using the shuttle box method in mice

Dose (mg/kg)	Sex	Avoidance(%)				Escape(%)			
		Day				Day			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Control	M	0.9	5.0	10.9	14.1	35.7	68.5	72.5	75.5
	F	0.9	2.8	7.5	8.9	40.7	69.0	78.0	80.5
125	M	0.4	5.0	15.2	22.1	29.0	59.5	69.5	67.5
	F	0.7	2.3	6.7	8.4	27.1	47.7	72.5	85.0
250	M	0.6	6.0	13.0	28.2	35.8	71.0	75.0	69.0
	F	1.2	3.6	11.2	19.8	34.8	78.5	83.0	80.0
500	M	0.4	5.4	12.9	19.2	29.2	63.0	73.5	72.5
	F	0	3.1	5.9	10.2	33.9	58.5	71.0	74.5

Results are the mean percentage values of avoidance and escape for 20 trials from 10 animals  
M : Male, F : Female

Table 11. Effect of CLM on mating and fertility of mice

Dose (mg/kg)	No. of animals examined	No. of animals copulated	No. of pregnant animals	Mating <sup>a)</sup> (%)	Fertility <sup>b)</sup> (%)
Control	M 44	M 44		M 100	
	F 44	F 43	42	F 98	98
125	M 46	M 46		M 100	
	F 46	F 46	44	F 100	96
250	M 46	M 46		M 100	
	F 46	F 46	45	F 100	98
500	M 46	M 46		M 100	
	F 46	F 45	44	F 98	98

a) : % copulated/mated M : Male, F : Female

b) : % pregnant/copulated

群および 500 mg/kg 投与群では、不交尾の動物が 1 例ずつみとめられた。妊娠率は、対照群、250 および 500 mg/kg 投与群は 98% を示し、125 mg/kg 投与群では 90% であった。

各投与群の胎仔観察の結果は、Table 12 に示した。妊娠期間中の体重増加量は、125 mg/kg 投与群が対照群と比較して有意に低かった。着床数は、125 および 500 mg/kg 投与群が、生存胎仔数は 500 mg/kg 投与群がそれぞれ有意に多かった。吸収胚数、生存胎仔の性比、生存胎仔体重および胎盤重量には、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。

外形異常は、対照群で眼瞼開裂が 1 例 (0.2%)、125 mg/kg 投与群で眼瞼開裂が 2 例 (0.4%)、口蓋裂およ

び尾彎曲が各 1 例 (0.2%)、250 mg/kg 投与群で脳ヘルニアおよび眼瞼開裂が各 1 例 (0.2%)、口蓋裂および尾彎曲が各 2 例 (0.4%)、500 mg/kg 投与群で口蓋裂が 1 例 (0.2%) みとめられた。

内臓異常は、対照群および CLM 投与群のいずれにもみとめられなかった。

各投与群の骨格系の観察結果は、Table 13 に示した。骨格異常および骨格変異は、対照群および CLM 投与群のいずれにもみとめられなかった。化骨の進行状態では、125 mg/kg 投与群において頸椎および尾椎の化骨数が対照群と比較して有意に多く、500 mg/kg 投与群では尾椎の化骨数が有意に少なかった。その他の部位においては、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめら

Table 12. Effect of CLM on mouse F<sub>2</sub> fetuses

Dose(mg/kg)	Control	125	250	500
No. of pregnant animals	42	44 *	45	44
Body weight gain during gestation(g)	28.8±0.64	26.8±0.42	27.6±0.73	28.1±0.61
No. of implantation sites (litter size)	519 (12.4±0.31)	580 (13.2±0.24) *	581 (12.9±0.36)	594 (13.5±0.32) *
No. of embryo resorptions				
Placental remnant	23	34	24	33
Early resorption	4	6	3	2
Late resorption	1	0	1	2
Macerated embryo	1	4	8	6
Total(%)	29(5.6)	44(7.6)	36(6.2)	43(7.2)
No. of live fetuses(%) (per litter)	490(94.4) (11.7±0.31)	536(92.4) (12.2±0.25)	544(93.6) (12.1±0.36)	551(92.8) * (12.6±0.33)
Sex ratio (male/female)	1.11 (258/232)	0.95 (261/275)	1.06 (280/264)	0.93 (265/286)
Mean body weight of live fetuses(g)	1.37±0.008	1.35±0.005	1.33±0.006	1.32±0.008
Mean placental weight(g)	0.10±0.001	0.10±0.001	0.10±0.001	0.10±0.001
No. of fetuses with external abnormalities(%)	1(0.2) <sup>a)</sup>	4(0.7) <sup>b)</sup>	6(1.1) <sup>c)</sup>	1(0.2) <sup>d)</sup>

Mean ± standard error Significant difference from control : \*P<0.05

a) : Open eyes (1)

b) : Open eyes (2), cleft palate (1), curved tail (1)

c) : Encephalocele (1), open eyes (1), cleft palate (2), curved tail (2)

d) : Cleft palate (1)

れなかった。

### III. 総括および考察

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の 125, 250 および 500 mg/kg ならびに对照として生理食塩液を、1群20匹からなる ICR-JCL 系雌マウスの妊娠15日から分娩後21日まで、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、死亡例もみとめられなかった。体重の推移は、妊娠期間中125 mg/kg 投与群の体重増加量が对照群に比較して有意に低かったが、投与量との相関はなく、哺育期間中は对照群とはほぼ同様の体重推移を示し、薬物投与の影響によるものとは思われない。摂餌量には、对照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。分娩時の観察では、妊娠期間、生存仔数、生存仔体重および性比は、对照群と CLM 投与群との間に有意差はなく、死産仔および生存仔の外形異常もすべての投与群にみとめられなかった。哺育期間中の死亡例は、对照群を含むすべての投与群にみられたが、对照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。離乳時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、着床数および分娩率にも对照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。

新生仔に対しては、分娩後から70日令にいたるまで、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。死亡仔数には、对照群と CLM 投与群との間に有意差はなく、平均体重の推移にも、CLM 投与群は雌雄とも对照群とはほぼ同様の推移を示し、CLM 投与の影響はみとめられなかった。発育・分化の観察では、耳介開展、切歯萌出、腹部毛生、眼瞼開裂および精巣下降の時期には、对照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかった。しかし、腔開口時期については CLM 投与群が对照群に比較して有意に早かったがこれは正常範囲内の変動であると思われる。生後の行動および機能観察では、痛覚反射、正向反射および ammonia ガスに対する臭覚反射は正常で、感覚機能に対する影響はみとめられなかった。その他自発運動量および神経・筋力に対しても、CLM 投与の影響はみとめられなかった。Open field 法による情緒性の試験では、立ち上がり回数、区画移動数、洗顔回数および潜時に对照群と比較して有意差を示すものが散見されたが、投与量との関連はなく、学習能力に関しても、对照群と CLM 投与群との

Table 13. Skeletal examinations of mouse fetuses (F<sub>2</sub>) from dams (F<sub>1</sub>) treated with CLM

Dose(mg/kg)	Control	125	250	500
No. of litters examined	42	44	45	44
No. of fetuses examined	489	536	544	551
No. of fetuses with abnormalities(%)	4(0.8) <sup>a)</sup>	4(0.7) <sup>b)</sup>	3(0.6) <sup>c)</sup>	2(0.4) <sup>d)</sup>
Variation(%)				
Hyoid body Bipartite	6(1.2)	2(0.4)	1(0.2)	4(0.7)
Lumber rib (14th rib)	202(41.3)	286(53.4)	134(24.6)	219(39.7)
Asymmetry	32(6.5)	45(8.4)	22(4.0)	55(10.0)
Sternebrae Bipartite	10(2.0)	10(1.9)	13(2.4)	21(3.8)
Accessory	51(10.4)	76(14.2)	71(13.1)	90(16.3)
State of ossification(%)				
Ossified Odontoid process	416(85.1)	475(88.6)	454(83.5)	436(79.1)
cervical Centra(1-7)	456(93.3)	524(97.8) *	513(94.3)	506(91.8)
vertebrae Arches(1-7)	489(100)	536(100)	544(100)	550(99.8)
Ossified sternbrae(1-6)	484(99.0)	535(99.8)	544(100)	549(99.6)
Av. no. of ossified metacarpal	4.0	4.0	4.0	4.0
mean ± S. E.	±0.00	±0.00	±0.00	±0.00
Phalanges Proximal	478(97.8)	526(98.1)	507(93.2)	495(89.8)
in forepaw Middle	37(7.6)	31(5.8)	28(5.1)	29(5.3)
Distal	474(96.9)	518(96.6)	390(71.7)	509(92.4)
Av. no. of ossified metatarsal	5.0	5.0	5.0	5.0
mean ± S. E.	±0.00	±0.00	±0.01	±0.01
Phalanges Proximal	472(95.5)	513(95.7)	493(90.6)	476(86.4)
in hind paw Middle	14(2.8)	5(0.9)	7(1.3)	9(1.6)
Distal	490(99.2)	530(98.9)	503(92.5)	514(93.3)
Av. no. of ossified caudal vertebrae	7.2	7.6	7.1	6.9
mean ± S. E.	±0.08	±0.07 **	+0.08	±0.10 *
Tarsals Talus	77(15.6)	94(17.5)	81(14.9)	88(16.0)
Carcaneus	383(77.5)	444(82.8)	429(78.9)	407(73.9)

a) : Fusion of sternbrae (2), fusion of the basioccipital bone and the cervical centrum (2)

b) : Fusion of sternbrae (3), fusion of the basioccipital bone and the cervical centrum (1)

c) : Fusion of sternbrae (3),

d) : Fusion of sternbrae (1), fusion of the basioccipital bone and the cervical centrum (1)

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

間に有意差はなく、いずれも CLM 投与の影響はみとめられなかった。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 98~100% を示した。また妊娠率も各投与群は 96~98% を示し、生殖能力に対する影響もみとめられなかった。

生殖能力試験で、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みとめられなかったが、体重増加量が 125 mg/kg 投与群で対照群に比較して有意に低かった。末期胎仔の観察では、吸収胚数、生存胎仔の性比、生存胎仔体重および胎盤重量には、対照群と CLM 投与群との間に有意差はみとめられなかったが、125 および 500 mg/kg 投与群では着床数が有意に多く、また生存胎仔数は 500 mg/kg 投与群で有意に多かった。しかし、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。外形異常には、眼瞼開裂、口蓋裂、尾彎曲および脳ヘルニアが対照群および CLM 投与群でみとめられたが、発現率は低く、自然発生の範囲内のものである。内臓異常は、いずれの投与群にもみとめられなかった。骨格系の観察では、骨格異常

および骨格変異は、いずれの投与群にもみとめられなかったが、化骨の進行状態においては、125 mg/kg 投与群で頸椎および尾椎の化骨数が対照群に比較して有意に多く、500 mg/kg 投与群では尾椎が有意に少なかったが、いずれも自然発生の範囲内の発現であると思われる。

以上の結果から、CLM 投与の影響とみなされる所見は、いずれの投与群においてもみとめられず、CLM 120, 250 および 500 mg/kg を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は、なんら影響を及ぼさないものと思われる。

## 結 論

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の生殖に及ぼす影響を検討する目的で、周産期および授乳期投与試験を、ICR-JCL 系マウスを用いて、CLM 125, 250 および 500 mg/kg の静脈内投与により行ない、つぎの結論を得た。

1. 妊娠母体の一般状態、体重、摂餌量に対して、影響はみとめられなかった。

2. 分娩時および授乳期の観察において、妊娠期間、

生存仔数, 生存仔体重, 性比, 着床痕数, 分娩率, 出生仔の哺育状態に対して影響はなく, 死産仔および生存仔の外形異常の発現もみとめられなかった。

3. 新生仔の生長および発育・分化に対して, 影響はみとめられなかった。

4. 新生仔の生後の行動および機能観察で, 感覚機能, 自発運動量, 神経・筋能力, 情緒性, 学習能力および生殖能力に対して, 影響はみとめられなかった。

5. CLM の周産期および授乳期投与試験における, 500mg/kg の投与量は無作用量であると考えられる。

#### 文 献

- 1) SCHWARTZ, B. S. M. R. B. WARREN, F. A. BAR-KLEY, and L. LANDIS: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistin methanesulfonate. *Antibiotics Annual 1959/1960*: 41~60, 1960
- 2) 齋藤太郎, 辻谷典彦, 大内 勝, 松本朋徳: Sodium colistin methanesulfonate (CLM) のマウスにおける生殖試験 (第1報)。一妊娠前および妊娠初期投与試験一 (未発表)
- 3) 齋藤太郎, 辻谷典彦, 大内 勝, 松本朋徳: Sodium colistin methanesulfonate (CLM) のマ

ウスにおける生殖試験 (第2報)。一器官形成期投与試験一 (未発表)

- 4) 小沢 光, 菅原和信, 市川美恵子, 笹島道忠, 相原弘和, 秋山二三雄, 酒井 健, 田中 一郎: Lithium 塩の薬理学的研究 (第2報)。応用薬理, 7: 1265~1275, 1973
- 5) 四家喜一, 中田千津子, 小倉 豊, 玉田輝己, 藤本康夫: Methyl *o*-(4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl) reserpate (CD-3400) の中枢神経抑制作用について。日薬理誌, 73: 717~734, 1977
- 6) 植木昭和, 五味田裕, 荒木泰豊, 山田勝上, 吉村裕之, 片岡泰文: 5-*o*-(chlorophenyl)-1-methyl-7-nitro-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (ID-690) の行動薬理学的研究。日薬理誌, 73: 243~255, 1977
- 7) 本間健資, 北川純男: Open-field test による minor tranquilizer および neuroleptics の評価。日薬理誌, 73: 337~345, 1977
- 8) 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
- 9) 高浜和夫, 宮田 健, 加瀬佳年: 新向精神薬 Benzocetamine の薬理作用。日薬理誌, 73: 151~176, 1977

## REPRODUCTION STUDIES OF SODIUM COLISTIN METHANESULFONATE (CLM) (III) PERINATAL AND POSTNATAL STUDY IN MICE

TARO SAITOH, MICHIIHIKO TSUJITANI, MASARU OHUCHI  
and TOMONORI MATSUMOTO

Pharmacological Research Center, Kayaku Antibiotic Research Co., Ltd.

A perinatal and postnatal study on sodium colistin methanesulfonate (CLM) was carried out in ICR-JCL mice. CLM was administered intravenously at dosage levels of 125, 250 and 500 mg/kg/day from day 15 of gestation to day 21 after birth.

Results were obtained as follows ;

1. CLM did not affect general behavior, body weight and food consumption in pregnant mice.
2. There were no significant differences between the control group and the treated groups during delivery and lactation in duration of pregnancy, number of liveborns, sex ratio, number of implantation sites, delivery rate and nursing rate. Moreover, no stillborn and external anomaly of liveborn were observed in any treated group of delivery.
3. CLM did not affect postnatal growth, development and differentiation in newborn mice.
4. CLM did not affect sensory function of reflex, spontaneous activity, motor coordination, emotionality, learning ability and reproductive ability in newborn mice.

It can be concluded that CLM, in this study, does not have any influence on the dams and postnatal development of their offspring, and that maximum non-toxic level of CLM is 500 mg/kg in mice.