

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) のマウスにおける生殖試験 (第1報)

—妊娠前および妊娠初期投与試験—

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)

Polypeptide 系抗生物質である 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、妊娠前および妊娠初期投与試験を、ICR-JCL 系マウスを用いて行なった。CLM は 60, 125 および 250 mg/kg を、雄には交配前 63 日間と交配期間中、雌には交配前 14 日間と交配期間中および妊娠 6 日目まで、それぞれ静脈内に投与し、次に述べる結果を得た。

1. 雌雄マウスの一般状態、体重、摂餌量、交尾率および妊娠率に対し、CLM は影響を及ぼさなかった。
2. 妊娠母体の一般状態、摂餌量に対し、CLM は影響を及ぼさなかったが、母体体重は CLM 125 および 250 mg/kg 投与群で増加の増強が認められた。
3. 妊娠末期胎子の観察において、着床数、生存胎子数、吸収胚数および性比には、対照群と比較して著しい差を認めなかったが、生存胎子体重および胎盤重量は、CLM 125 および 250 mg/kg 投与群で増加が認められた。また、胎子の外形異常、内臓異常および骨格異常の発現ならびに化骨進行状態に対しては、CLM は影響を及ぼさなかった。

以上のことより、CLM は 60 mg/kg 以下の用量では、妊娠前および妊娠初期の投与においては、雌雄マウスの生殖機能ならびに胎子にほとんど影響を及ぼさないと考える。

Sodium colistin methanesulfonate (以下 CLM と略) は、塩基性 polypeptide 系抗生物質である colistin (以下 CL と略) の遊離の γ -amino 基を methanesulfonate 化 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$) した colistin 誘導体¹⁾、Gram 陰性菌による種々の感染症に対して、すぐれた治療効果を示している²⁻⁴⁾。

CLM の薬理作用^{5,6)}・悪急性⁷⁾・慢性毒性⁸⁾ならびに吸収・分布・排泄に関する研究は、すでに報告されているが、今回著者らは CLM の安全性研究の一環として、マウスを用いて生殖に及ぼす影響に関する試験を行なった。本報では、妊娠前および妊娠初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、*Bacillus polymyxa* var. *colistinus* の培養液から分離された白色粉末 (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、順調な体重増加を示した雄を 5 週令より、雌を 10 週令より使用した。動物の飼育は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の恒温恒湿室内で行なった。飼料は、雄および交尾前の雌には飼育用固型飼料 (CE-2, 日本クレア)、交尾後の雌には繁殖用固型飼料 (CA-1, 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、投与量設定のため予備実験として、生後 5 週令の ICR-JCL 系雄マウスおよび生後 10 週令の同系雌マウスを用い、一群 5 匹として、CLM を 1 日 1 回 14 日間連続静脈内投与した結果から、雌雄いづれも全例死亡した 500 mg/kg 投与群を除き、250 mg/kg を最高量とし、以下中間量を 125 mg/kg、最低用量を 60 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。なお、最低用量は推定臨床用量の約 9 倍に相当する。

4. 投与方法および投与期間

薬物は、雄では生後5週令から交配前までの63日間と交配期間中、雌では生後10週令から交配前までの14日間と交配期間中および始娠6日目まで、1日1回毎日一定時刻に尾静脈内に投与した。

5. 交配方法

雄では63日間、雌では14日間の交配前投与の終了したものを、同一群内で雌雄各1例ずつを同居させ交配させた。同居は、交尾が確認されるまで最長14日間継続させた。毎朝腔栓の有無を検査して交尾を確認し、交尾の成立した日を妊娠0日として、それぞれ小型ケージに独居させ飼育した。交尾の成立をみなかった動物は、雄は無処置の雌と、雌は生殖能力の確認された同一投与群の雄と、さらに1週間同居させ交尾の成立をはかった。これで交尾が成立しなかったものは、不交尾動物として処理した。

6. 観察項目および方法

各投与群の動物数を雌雄いずれも25匹として、薬物投与期間中、雄については一般状態の観察を毎日、体重および摂餌量の測定を週1回行ない、試験終了後屠殺して剖検した。雌については、一般状態の観察を毎日、体重および摂餌量の測定は交配前日までは週1回、妊娠期間中は毎日行なった。

妊娠母体は、妊娠18日に 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、子宮内の胎仔の分布、着床数、生存胎仔数、死亡胎仔数および吸収胚数を調べ、生存胎仔については、性別の判定、体重および胎盤重量の測定、外形（口腔内を含む）異常の有無を調べた。次いで各投与群とも生存胎仔の1/3を、Bouin 液で固定した後、WILSON の free hand razor blade section 法¹⁰⁾に従い、頭部および胸腹部臓器の異常を検索した。残りの2/3の胎仔は、99% alcohol で固定した後、DAWSON の変法¹¹⁾により alizarin red S 染色による骨格透明標本を作成し、骨格の異常および化骨の進行状態を検索した。

7. 統計処理

実験結果の統計処理には、母体死亡数、交尾率、妊娠率については χ^2 検定、胎仔の性比、死亡胎仔数、吸収胚数、胎仔外形異常、内臓異常、骨格異常および化骨進行度については WILCOXON の順位和検定、その他の項目については t 検定を用いた。

II. 実験成績

1. 雄動物に及ぼす影響

薬物投与期間中、対照群および60mg/kg投与群では特異な中毒症状は観察されなかった。125および250mg/kg投与群では、投与開始後10日間くらいは投与後自発運動の亢進がみられたが、その後は何ら異常は認め

Fig. 1 Mean body weight of male mice administered intravenously with CLM for 9 weeks before mating

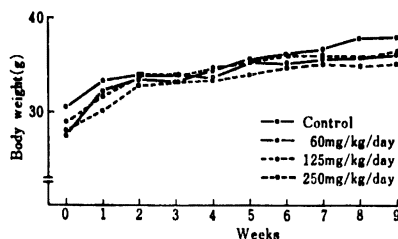


Fig. 2 Mean food consumption of male mice administered intravenously with CLM for 9 weeks before mating

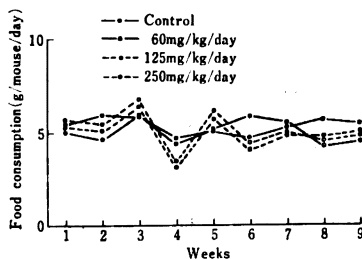
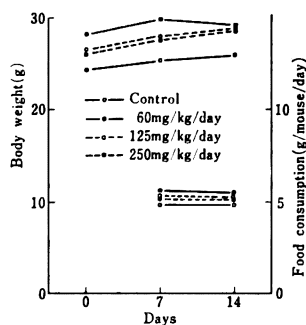


Fig. 3 Mean body weight and food consumption of female mice administered intravenously with CLM for 14 days before mating



られなかった。また、死亡例はいずれの投与群にも認められなかった。

薬物投与期間中の各投与群の平均体重の推移は、Fig. 1に示すとおりで、CLM投与群は対照群とほぼ同様の体重増加を示した。平均摂餌量はFig. 2に示すとおりで、若干の増減はみられたが、CLM投与群は対照群とほぼ同様の摂餌状況であった。

2. 雌動物に及ぼす影響

薬物投与期間中、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、死亡例も認められ

Table 1 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 ^{a)} (%)	Fertility ^{b)} (%)
Control	M 25	M 25	25	M 100	100
	F 25	F 25		F 100	
60	M 25	M 25	23	M 100	92
	F 25	F 25		F 100	
125	M 25	M 25	22	M 100	100
	F 25	F 22		F 88	
250	M 25	M 25	22	M 100	100
	F 25	F 22		F 88	

a) : % Copulated/mated M : Male

b) : % Pregnant/copulated F : Female

なかった。平均体重の推移および平均摂餌量は、Fig. 3に示すとおりで、体重は投与開始日に群差を示したので、絶対体重の増加量で比較すると、投与14日目に60 mg/kg 投与群は対照群に比べ有意な抑制がみられ、125 mg/kg 投与群では有意な増加がみられた。平均摂餌量は、対照群とCLM投与群はほぼ同様の摂餌傾向を示した。

3. 生殖能力及ばす影響

雌雄の交尾率および妊娠率は、Table 1に示した。雄の交尾率は、各投与群とも100%であった。雌の交尾率は、対照群および60 mg/kg 投与群は100%を示したが、125および250 mg/kg 投与群では、3例ずつ交尾の成立しない動物がみられた。不妊動物は、60 mg/kg 投与群に2例認められたが、その他の投与群はすべて妊娠率100%を示した。不妊動物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。また、妊娠動物の帝王切開時の剖検でも、肉眼的には異常は認められなかった。

4. 妊娠母体に及ぼす影響

薬物投与期間中、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なかった。また死亡例も認められなかった。

妊娠期間中の平均体重の推移は、Fig. 4に示すとおりで、60 mg/kg 投与群は対照群とほぼ同様の体重増加を示した。125および250 mg/kg 投与群では、妊娠末期に対照群と比較して、絶対体重の増加量には有意な増加がみられたが、その他の期間では対照群とほぼ同様の体重変化を示した。

平均摂餌量は、Fig. 5に示すとおりで、対照群とCLM投与群はほぼ同様の摂餌状況であった。

5. 胎仔に及ぼす影響

Fig. 4 Mean body weight of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational period)

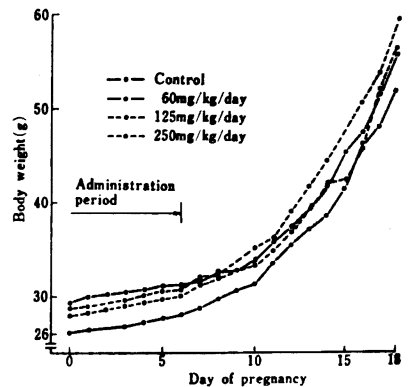
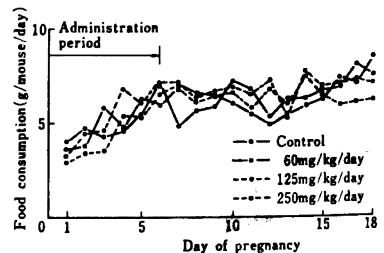


Fig. 5 Mean food consumption of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational period)



各投与群の胎仔観察の結果は、Table 2に示した。

着床数、吸収胚数、生存胎仔数および性比には、対照群とCLM投与群との間に有意の差は認められなかった。生存胎仔体重および胎盤重量については、125および250 mg/kg 投与群では対照群に比べ有意に重かった。

Table 2 Effect of CLM on mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	60	125	250
No. of pregnant animals	25	23	22	22
Body weight gain during gestation (g)	25.1±0.71	25.3±1.12	31.6±1.05**	28.9±1.03**
No. of implantation sites (litter size)	293 (11.7±0.91)	293 (12.7±0.34)	293 (13.3±0.44)	272 (12.4±0.40)
No. of embryo resorptions				
Placental remnant	7	19	16	9
Early resorption	0	4	4	5
Late resorption	2	0	1	1
Macerated embryo	1	4	1	5
Total (%)	10 (3.4)	27 (9.2)	22 (7.5)	20 (7.3)
No. of live fetuses (%) (per litter)	283(96.6) (11.3±0.41)	266(90.8) (11.6±0.40)	271(92.5) (12.3±0.54)	252(92.6) (11.5±0.57)
Sex ratio (male/female)	0.86 (131/152)	1.05 (136/130)	1.04 (138/133)	0.81 (113/139)
Mean body weight of live fetuses (g)	1.33±0.008	1.33±0.022	1.44±0.007**	1.42±0.007**
Mean placental weight (g)	0.10±0.001	0.10±0.001	0.11±0.005*	0.11±0.001**
No. of fetuses with external abnormalities (%)	0	6 (2.3) ^{a)}	0	1 (0.4) ^{b)}

Values are mean±standard error

a) : Open eyes (3), cleft palate (1), and club foot (2)

b) : Cleft palate (1)

Significant difference from control : *P<0.05, **P<0.005

外形異常は、60mg/kg 投与群で眼瞼開裂が3例(1.1%)、内反足が2例(0.8%)、口蓋裂が1例(0.4%)、250mg/kg 投与群で口蓋裂が1例(0.4%)認められたが、対照群および125mg/kg 投与群では異常は認められなかった。

内臓異常は、左臍帯動脈が対照群で9例(13%)と高頻度に見られ、その他の投与群では60mg/kg 投与群で3例(4%)、125mg/kg 投与群で5例(7%)、250mg/kg 投与群で4例(5%)認められた。その他の異常としては、眼球欠如が125mg/kg 投与群で1例(1.6%)認められるのみであった。

各投与群の骨格の観察結果は、Table 3 に示した。骨格異常として、胸骨核の癒合が250mg/kg 投与群に1例(0.5%)認められた。骨格変異は、舌骨体の2分、14肋骨、胸骨分節の非対称、2分核および副核などがみられたが、それらの発生頻度には、対照群とCLM投与群との間に有意差は認められなかった。化骨の進行状態では、後頭骨、口蓋骨、舌骨、脊椎の胸椎、腰椎および仙椎、胸骨および肋骨については、各投与群とも完全に化骨していた。また、中手骨および中足骨についてもほとんど完全化骨に近いものであった。その他の部位において、化骨不全のものが認められたが、各投与群間の

化骨率に大きな差はなく、対照群とCLM投与群との間に有意差は認められなかった。

III. 総括および考察

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の60, 125および250mg/kgならびに対照として生理食塩水を、1群雌雄各25匹からなるICR-JCL系マウスに、雄では生後5週令から交配前の63日間と交配期間中、雌では生後10週令から交配前14日間、交配期間中および妊娠第6日まで、1日1回毎日一定時刻に静脈内投与して、雄および雌動物の生殖能力および末期胎仔への影響について検討した。

一般症状の観察では、雄の125および250mg/kg投与群で、投与開始10日間くらいは投与後自発運動の亢進がみられたが、その他には雌雄いずれも特異な中毒症状の発現はみられなかった。また死亡例も認められなかった。

雄の体重は、対照群とCLM投与群はほぼ同様の増加を示した。しかし、雌では投与14日目に、絶対体重の増加量は60mg/kg投与群で抑制、125mg/kg投与群では増加が、対照群との間に有意に認められた。しかし、投与量との相関はみられず、薬物の影響とは思われない。摂餌量は、雌雄とも対照群とCLM投与群とは、は

Table 3 Skeletal examination of mouse fetuses from dams treated with CLM

Dose (mg/kg)	Control	60	125	250
No. of litters examined	18	16	16	16
No. of fetuses examined	207	195	197	195
No. of fetuses with abnormalities (%)	0	0	0	1 (0.5) ^{a)}
Variation (%)				
Hyoid body Bipartite	4 (1.9)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)
Lumbar rib (14 th rib)	107 (51.7)	83 (42.6)	67 (34.0)	60 (30.8)
Asymmetry	17 (8.3)	14 (7.1)	9 (4.6)	10 (5.1)
Sternebrae Bipartite	10 (4.9)	4 (2.1)	5 (2.5)	4 (2.0)
Accessory	52 (25.1)	31 (15.9)	35 (17.8)	23 (11.8)
State of ossification (%)				
Ossified Odontoid process	180 (87.0)	172 (88.2)	171 (86.8)	159 (81.5)
cervical Centra (1~7)	197 (95.2)	181 (92.8)	191 (97.0)	190 (97.4)
vertebrae Arches (1~7)	207(100)	195(100)	197(100)	195(100)
Ossified sternbrae (1~6)	207(100)	195(100)	197(100)	195(100)
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	207(100)	193 (99.0)	195 (99.0)	192 (98.5)
in Middle	13 (6.3)	10 (5.1)	15 (7.6)	11 (5.6)
forepaw Distal	199 (96.1)	184 (94.4)	192 (97.5)	182 (93.3)
Av. no. of ossified metatarsal	5.0	5.0	5.0	5.0
mean±S. E.	±0.00	±0.00	±0.00	±0.00
Phalanges Proximal	206 (99.5)	193 (99.0)	191 (97.0)	193 (99.0)
in Middle	6 (2.9)	6 (3.1)	11 (5.6)	15 (7.7)
hind paw Distal	203 (98.1)	194 (99.5)	194 (98.5)	187 (95.9)
Av. no. of ossified	7.3	7.0	6.7	6.8
caudal vertebrae, mean±S. E.	±0.12	±0.12	±0.12	±0.12
Tarsals Talus	25 (12.1)	28 (14.4)	26 (13.2)	21 (10.8)
Carcaneus	185 (89.1)	166 (85.1)	175 (88.8)	174 (89.2)

a) : Fusion of the 4 th and 5 th sternbrae

ほ同様の摂取傾向を示した。

生殖能力に関しては、交尾率は雄ではいずれの投与群も100%を示した。雌では、対照群および60mg/kg投与群は100%、125および250mg/kg投与群では88%で、対照群とCLM投与群との間に有意差は認められなかった。妊娠率は、60mg/kg投与群で92%、その他の投与群はいずれも100%を示し、薬物の影響は認められなかった。したがって、雌雄の生殖能力に対してCLMは影響を及ぼさなかった。

妊娠動物に対しては、妊娠期間中いずれの投与群においても、特異な中毒症状の発現ならびに死亡例は認められなかったが、妊娠期間中の母体体重の増加は、125および250mg/kg投与群では対照群に比較して有意に多かった。

末期胎仔の観察では、着床数、吸収胚数、生存胎仔数および性比については、対照群とCLM投与群との間に

有意差は認められなかった。しかし生存胎仔体重および胎盤重量は、125および250mg/kg投与群が有意に重く、上記の母体体重の増加は、これらの変化に伴ったものと考えられる。外形異常としては、眼瞼開裂、内反足および口蓋裂が60および250mg/kg投与群で認められたが、これらの発現率は低く、また内臓異常では、左臍帯動脈が対照群で最も高い発現率を示しており、その他には眼球欠如が1例みられたのみで、いずれも薬物投与の影響とは認められなかった。骨格系の観察においても、骨格異常として胸骨核の癒合が、また骨格変異では舌骨体の2分、14肋骨、胸骨核の非対称、2分核および副核などがみられたが、これらの発現率には対照群とCLM投与群との間に有意差はなく、CLM投与の影響は認められなかった。化骨進行状態については、対照群とCLM投与群の化骨率に有意差はみられず、薬物投与による遅延傾向は認められなかった。

以上の結果から、CLM 投与の影響とみなされる所見は、125 および 250 mg/kg 投与群で認められた、妊娠期間中の母体体重の増加の増強と、生存胎仔体重および胎盤重量の増加のみであり、その他には雌雄マウスの生殖機能、妊娠母体および末期胎仔に対する影響はほとんどないものと思われる。

IV. 結 論

Sodium colistin methanesulfonate (CLM) の生殖に及ぼす影響を検討する目的で、妊娠前および妊娠初期投与試験を、ICR-JCL 系マウスを用いて、CLM 60, 125 および 250 mg/kg の静脈内投与により行ない、次の結論を得た。

1. 雌雄マウスの一般状態、体重、摂餌量、交尾率および妊娠率に対し、影響は認められなかった。
2. 妊娠母体の一般状態および摂餌量に対しては影響は認められなかったが、母体体重は 125 および 250 mg/kg 投与群で増加の増強が認められた。
3. 末期胎仔の観察において、着床数、吸収胚数、生存胎仔数および性比には影響は認められなかったが、生存胎仔体重および胎盤重量は、125 および 250 mg/kg 投与群で増加が認められた。胎仔の外形異常、内臓異常および骨格異常の発現ならびに化骨に対しても、影響は認められなかった。

文 献

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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
- 4) 南條昭一：緑膿菌を抽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 : 185~188, 1976
- 5) 富沢摂夫、勝呂信雄：Colistin sodium methanesulfonate の一般薬理作用に関する研究。応用薬理, 7 : 541~550, 1973
- 6) 山田重男、馬屋原敬民、松本朋徳、松尾勝一、上条一也：循環器系に対するコリスチン塩類およびその誘導体メタンスルホン酸の作用。Jap. J. Antibiotics 24 : 130~140, 1971
- 7) 富沢摂夫、岡本良三、川村賢司、飯田知子：Colistin sodium methanesulfonate のマウスおよびラットに対する亜急性毒性試験。応用薬理, 7 : 915~928, 1973
- 8) 富沢摂夫、岡本良三、川村賢司、飯田知子：Colistin sodium methanesulfonate のラットにおける慢性毒性試験。応用薬理, 7 : 947~956, 1973
- 9) 山田重男、馬屋原敬民、三橋矩昭、若林一夫、平塚幸蔵、定岡啓三、中沢 進、渡辺 修、佐藤 豪、松本朋徳、野田伊津子：静注用メタンスルホン酸コリスチンナトリウム（メタコリマイシン）に関する研究、第一報、吸収分布ならびに排泄について。Jap. J. Antibiotics 27 : 8~14, 1970
- 10) WILSON, J. G.: Method for administering agents and detecting malformation in experimental animals. "Teratology : Principles and Techniques" edited by WILSON, J. G. and WARKANY, J. 262~277, Univ. Chicago Press, Chicago, 1965
- 11) DAWSON, A. B.: A note on the staining of skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain. Technol. 1 : 123~124, 1926

REPRODUCTION STUDIES OF SODIUM COLISTIN
METHANESULFONATE (CLM). I
FERTILITY STUDY IN MICE

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

Sodium colistin methanesulfonate (CLM), a polypeptide antibiotic, was administered intravenously to ICR-JCL mice at dosage levels of 60, 125 and 250 mg/kg/day to determine its effects on the reproductive process and fetal development. Male mice were continuously treated from day 63 prior to mating through copulation, and female mice from day 14 before mating through day 7 of gestation.

Results were obtained as follows;

1. CLM did not affect general behavior, body weight, food consumption, mating performance and fertility in all the treated groups of both sexes.
2. CLM did not affect general behavior and food consumption in pregnant mice, but body weight gain of dams was increased in 125 and 250 mg/kg groups.
3. There were no significant differences between the control group and the treated groups in number of implantations, live fetuses, resorptions in the uterus and sex ratio. However, body weight of live fetuses and weight of placentas were increased in 125 and 250 mg/kg groups.
4. No significant increase of the prevalence of external, visceral and skeletal anomalies of the fetuses was observed in any treated group. The progress of ossification was not affected, either.

It can be concluded that CLM, at lower dosage than 60 mg/kg, has no unfavorable influence on fertility and fetal development in mice.