

## Sodium colistin methanesulfonate (CLM) のマウスにおける生殖試験 (第2報)

## —器官形成期投与試験—

齊藤 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、器官形成期投与試験を ICR-JCL 系マウスを用いて行なった。CLM は 125, 250 および 500 mg/kg を、妊娠 6 日より 15 日までの 10 日間雌マウスにそれぞれ静脈内投与し、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、CLM は影響を及ぼさなかった。
2. 妊娠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、吸収胚数および胎盤重量に CLM の影響は認められず、また胎仔の外形異常、内臓異常および骨格異常の発現の上昇も認められなかった。しかし、化骨状態に対しては、250 および 500 mg/kg 投与群で、頸椎と尾椎の化骨遅延が認められた。
3. 自然分娩群の観察において、妊娠期間、生存仔数、生存仔体重、性比、着床痕数、母体の分娩率および哺育状態に対し、CLM の影響は認められず、死産仔および生存仔の外形異常の発現にも影響は認められなかった。
4. 新生仔の成長および発育・分化に CLM の影響は認められなかった。
5. 新生仔の生後の機能および行動観察では、感覚機能、神経・筋能力、情緒性および学習能力において、CLM の影響は認められなかった。しかし、250 および 500 mg/kg 投与群の雌雄において、自発運動の減少が認められた。

以上のことより、CLM のマウス器官形成期投与試験での最大無作用量は 125 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、第1報<sup>2)</sup>においてはマウスにおける妊娠前および妊娠初期投与試験について報告した。本報では、マウスにおける器官形成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>と同一のもので、*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、滅菌生理食塩液に溶解し、投与容量を体重 10 g 当たり 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、10~13 週令に達したの中から、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経産の雌を、同系の雄と 1 ケージに 5 対 5 の割合で 1 夜 (約 17 時間) 同居させ、翌朝腔栓を認めたものを妊娠 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)、その他のものには飼育用固型飼料 (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

投与量設定のために、本実験と同系の 10~13 週令の未経産の雌および妊娠マウスを用いて、予備実験を行なった。すなわち、未経産雌マウスを 1 群 5 匹として、

CLM 125, 250 および 500 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間連続静脈内投与した。その結果, 500 mg/kg 投与群で, 投与 11 日目以降に死亡例がみられ, 14 日目までに全例死亡した。しかし, 体重の減少は認められなかった。次に妊娠マウスを 1 群 5 匹として CLM 125, 250, 500 および 750 mg/kg を妊娠 6 日目から 15 日目まで 10 日間, 1 日 1 回連続静脈内投与した結果, 750 mg/kg 投与群では全例薬物投与期間中に死亡した。しかし, その他の投与群では中毒症状の発現や死亡例はなく, 体重増加の抑制傾向もみられず, 全例に正常な自然分娩がみられた。したがって本実験における最高用量を 500 mg/kg とし, 以下中間量を 250 mg/kg, 最低用量を 125 mg/kg と設定した。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量の約 18 倍に相当する。

#### 4. 投与方法および投与期間

薬物は, 妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間, 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 30 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。このうち各投与群とも 20 母体は妊娠末期に屠殺して胎仔の検索に, 残りの 10 母体は自然分娩させ, 新生仔の生後発育の検索に供した。

##### 2) 胎仔観察

妊娠母体を妊娠 18 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, 子宮内の胎仔分布, 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ならびに外形 (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<sup>9)</sup>に従い, 頸部および胸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<sup>10)</sup>により alizarin red S 染色による骨格透明標本を作製し, 骨格の異常および進行状態を観察した。

##### 3) 新生仔の発育・分化観察

妊娠母体を自然分娩させ, 分娩の状態を観察し, 妊娠期間を算定した。分娩後は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。母体は分娩後 21 日目に仔を離乳させた後, 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調べ, 分娩時にみられた生存仔数と対比して分娩率を算出した。

離乳後の新生仔は, 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陰開口について観察し, 生後 10 週令時に屠殺して, 主要臓器の肉眼的観察を行なった。

#### 4) 新生仔の行動・機能観察

新生仔は, 生後 21 日の離乳時に HAFNER 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, 情緒性および学習能力について検査した。自発運動量は回転カゴ法<sup>11)</sup>により, 筋・神経能力は回転棒法<sup>12)</sup>および傾斜板法<sup>13)</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>14)</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, 脱糞および排尿回数を測定した。学習能力は, Water T-maze 試験<sup>15)</sup>および Shuttle box 法<sup>16)</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には, 無条件刺激として電気刺激 (130 V, 0.2 mA) を 5 秒間与えた。

#### 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 の順位和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, 死亡例も認められなかった。

#### 2) 体重変化

試験期間中の各投与群の平均体重の推移は, 末期胎仔観察群を Fig. 1 に, 自然分娩群を Fig. 2 に示した。両群とも, CLM 投与群は対照群とほぼ同様の体重推移を示した。

#### 3) 摂餌量

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

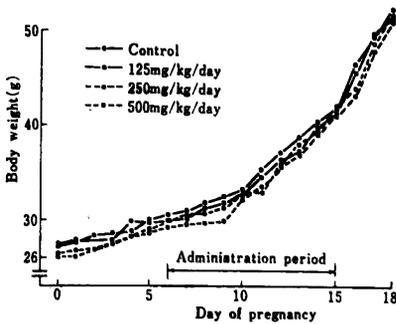
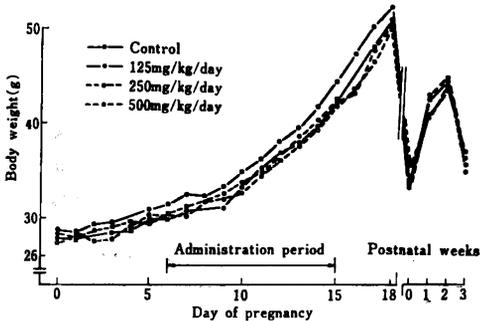


Fig. 2 Mean body weight of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational and postnatal period)



試験期間中の平均摂餌量は、末期胎仔観察群を Fig. 3 に、自然分娩群を Fig. 4 に示した。両群とも、CLM 投与群は対照群とはほぼ同様の摂餌傾向を示した。

## 2. 胎仔に及ぼす影響

### 1) 開腹時所見

各投与群の開腹時の所見は、Table 1 に示した。着床数、生存胎仔数、性比および吸収胚数には、対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。生存胎仔体重および胎盤重量については、125mg/kg 投与群で対照群に比べ有意に重かった。

### 2) 外形および内臓所見

各投与群の胎仔の外形および内臓検査の結果は、Table 1 および Table 2 に示した。外形異常は、対照群で外脳症と腹壁ヘルニアが各 1 例 (0.5%)、250mg/kg 投与群で眼瞼開裂が 2 例 (1%)、500mg/kg 投与群で外脳症が 1 例 (0.5%) みられたが、125mg/kg 投与群では異常はみられなかった。

内臓異常は、頭部および胸部にはいずれの投与群にも認められなかった。腹部においては、腎盂拡張が 250 および 500mg/kg 投与群に各 1 例 (3%)、左臍帯動脈が

Fig. 3 Mean food consumption of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational period)

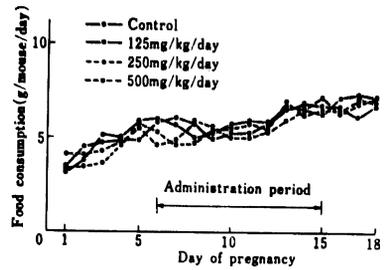
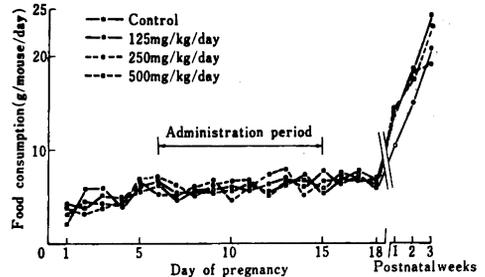


Fig. 4 Mean food consumption of pregnant mice administered intravenously with CLM (during gestational and postnatal period)



対照群に 8 例 (12%)、125mg/kg 投与群に 8 例 (12%)、250mg/kg 投与群に 11 例 (15%) および 500mg/kg 投与群に 12 例 (15%) 認められた。

### 3) 骨格所見

各投与群の骨格検査の結果は、Table 3 に示した。

骨格異常として、胸骨核癒合 (I-II または IV-V) が 125mg/kg 投与群に 1 例 (0.7%) および 250mg/kg 投与群に 2 例 (1.5%) 認められた。

骨格異常は、舌骨体の 2 分、14 肋骨、胸骨核の非対称、2 分核および副核が対照群を含むすべての投与群に散見されたが、その出現率には対照群と 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、舌骨、口蓋骨、脊椎の胸椎と腰椎および仙椎、胸骨、肋骨、中手骨については、各投与群とも完全に化骨していた。中足骨についても、ほとんど完全化骨に近いもので、対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。頸椎では、投与量の増加に伴って化骨の遅延する傾向がみられ、250 および 500mg/kg 投与群では対照群との間に有意差が認められた。また、250 および 500mg/kg 投与群では、

Table 1 Effect of CLM on mouse fetuses

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of pregnant animals	20	20	20	20
Body weight gain during gestation (g)	24.3 ± 0.51	25.5 ± 0.81	25.3 ± 0.69	25.0 ± 0.82
No. of implantation sites (litter size)	224 (11.2 ± 0.32)	231 (11.6 ± 0.29)	218 (10.9 ± 0.42)	228 (11.4 ± 0.39)
No. of embryo resorptions				
Placental remnant	12	11	13	10
Early resorption	1	1	1	0
Late resorption	0	0	1	1
Macerated embryo	1	3	0	3
Total (%)	14 (6.3)	15 (6.5)	15 (6.9)	14 (6.1)
No. of live fetuses (%) (per litter)	210(93.8) (10.5 ± 0.35)	216(93.5) (10.8 ± 0.33)	203(93.1) (10.2 ± 0.40)	214(93.9) (10.7 ± 0.41)
Sex <sub>r</sub> ratio (male/female)	1.06 (108/102)	1.12 (114/102)	1.07 (105/98)	1.30 (121/93)
Mean body weight of live fetuses (g)	1.34 ± 0.008	1.37 ± 0.007**	1.35 ± 0.012	1.34 ± 0.014
Mean placental weight (g)	0.09 ± 0.001	0.10 ± 0.001**	0.09 ± 0.001	0.09 ± 0.001
No. of fetuses with external abnormalities (%)	2 (1.0) <sup>a)</sup>	0	2 (1.0) <sup>b)</sup>	1 (0.5) <sup>c)</sup>

Values are mean ± standard error.

a) : Exencephaly (1), abdominal hernia (1)

b) : Open eyes (2), c) : Exencephaly (1)

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

Table 2 Visceral examination of mouse fetuses from dams treated with CLM

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of litters examined	7	6	7	7
No. of fetuses examined	65	68	71	80
Dilatation of renal pelvis (%)	0	0	1 (3)	1 (3)
Left umbilical artery (%)	8 (12)	8 (12)	11 (15)	12 (15)

尾椎の末端で化骨遅延が若干認められた。その他の部位においても、化骨不全のものが認められたが、各投与群間の化骨率には大きな差はなく、対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

### 3. 新生仔に及ぼす影響

#### 1) 母体の分娩時所見

各投与群の分娩時の所見は、Table 4 に示した。

平均妊娠期間は、対照群の 19.4 日に対して、125 mg/kg 投与群では 19.0 日と対照群に比べて有意に短かった。生存仔数は 250 mg/kg 投与群が対照群に比べて有意に少なかった。生存仔体重および性別は対照群と、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認められなかった。

#### 2) 母体の哺育状態

各投与群の哺育期間中の所見は、Table 5, Fig. 2 お

よび Fig. 5 に示した。

母体には各投与群とも死亡例はなく、体重推移にも対照群と CLM 投与群との間に差はみられなかった。死亡仔数は、対照群で 10 例、125 および 500 mg/kg 投与群で各 2 例認められたが、250 mg/kg 投与群ではみられなかった。

分娩後 21 日目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認められなかった。

新生仔の平均体重の推移は、各投与群は雌雄ともほぼ同様の体重増加を示した。

#### 3) 新生仔の発育・分化状態

各投与群の新生仔の離乳時から 70 日令に至るまでの生存数および平均体重の推移は、Table 5 および Fig. 5 に示した。死亡仔数は、125 mg/kg 投与群で 5 例、250

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

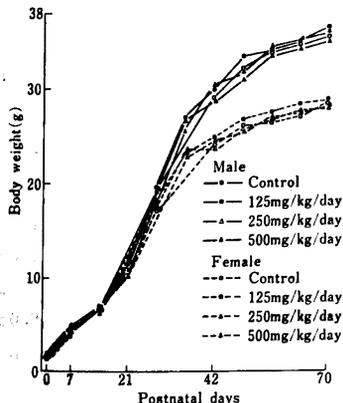
Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of litters examined	13	13	13	12
No. of fetuses examined	138	137	131	116
No. of fetuses with abnormalities (%)	0	1 (0.7) <sup>a)</sup>	2 (1.5) <sup>b)</sup>	0
Variation (%)				
Hyoid body Bipartite	0	1 (0.7)	2 (1.5)	3 (2.6)
Lumbar rib (14 th rib)	31 (22.5)	31 (22.6)	33 (25.2)	23 (19.8)
Asymmetry	6 (4.3)	11 (8.0)	16 (12.2)	5 (4.3)
Sternebrae Bipartite	11 (7.9)	6 (4.3)	8 (6.0)	2 (1.7)
Accessory	13 (9.4)	14 (10.2)	15 (11.5)	11 (9.5)
State of ossification (%)				
Ossified Odontoid process	86 (62.3)	77 (56.2)	69 (52.7)	59 (50.9)
cervical Centra (1~7)	133 (96.4)	122 (89.1)	109 (83.2)**	95 (81.9)**
vertebrae Arches (1~7)	138(100)	137(100)	131(100)	116(100)
Ossified sternebrae (1~6)	138(100)	137(100)	131(100)	116(100)
Av. no. of ossified metacarpal	4.0	4.0	4.0	4.0
mean ± S. E.	±0.02	±0.00	±0.00	±0.01
Phalanges Proximal	137 (99.3)	136 (99.3)	125 (95.4)	115 (99.1)
in Middle	4 (2.9)	8 (5.8)	8 (6.1)	5 (4.3)
forepaw Distal	91 (65.9)	120 (87.6)	117 (89.3)	103 (88.8)
Av. no. of ossified metatarsal	5.0	5.0	5.0	5.0
mean ± S. E.	±0.01	±0.01	±0.01	±0.00
Phalanges Proximal	136 (98.6)	135 (98.5)	121 (92.4)	115 (99.1)
in Middle	1 (0.7)	7 (5.1)	8 (6.1)	2 (1.7)
hind paw Distal	111 (80.4)	105 (76.6)	84 (64.1)	97 (83.6)
Av. no. of ossified caudal vertebrae	8.1	8.3	5.6	6.7
mean ± S. E.	±0.17	±0.13	±0.24**	±0.21**
Tarsals Talus	30 (21.7)	26 (19.0)	16 (12.2)	9 (7.8)
Carcaneus	100 (72.4)	96 (70.1)	81 (61.8)	76 (65.5)

a) : Fusion of the 1 st and 2 nd sternebrae

b) : Fusion of the 1 st and 2 nd sternebrae (1), fusion of the 4 th and 5 th sternebrae (1)

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

Fig. 5 Mean body weight of male and female offspring (F<sub>1</sub>) from mouse mothers administered intravenously with CLM



および 500mg/kg 投与群で各 2 例認められたが、対照群ではみられなかった。平均体重の推移は、CLM 投与群は雌雄とも対照群とはほぼ同様の推移を示した。一般状態についても異常は認められなかった。

各投与群の新生仔の発育・分化の状態は、Table 6 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認められなかった。しかし、脛開口時期は、125 および 250 mg/kg 投与群が対照群に比較して有意に早かった。

4) 新生仔の機能および行動観察

(1) 感覚機能

生後 21 日目の感覚機能検査の結果は、Table 7 に示すように、痛覚反射には対照群および CLM 投与群のい

Table 4 Observation of newborn mice from mothers administered with CLM

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of mothers	10	10	10	10
Duration of gestation (day)	19.4±0.16	19.0±0.00*	19.4±0.16	19.5±0.17
No. of implantation sites (litter size)	114 (11.4±0.45)	104 (10.4±0.62)	103 (10.3±0.60)	107 (10.7±0.34)
No. of newborns (per litter)	110 (11.0±0.36)	96 (9.6±0.75)	96 (9.6±0.50)*	102 (10.2±0.47)
No. of stillborns	0	0	0	0
No. of live borns (per litter)	110 (11.0±0.36)	96 (9.6±0.75)	96 (9.6±0.50)*	102 (10.2±0.47)
Sex ratio at birth (male/female)	1.04 (55/53)	1.33 (57/43)	0.83 (49/59)	1.40 (60/43)
Delivery rate % <sup>a)</sup>	96.5	92.3	93.2	95.3
No. of newborns with external abnormalities	0	0	0	0

Mean±Standard error

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

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

Table 5 Observation of postnatal development of mouse F<sub>1</sub> offspring

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of mothers	10	10	10	10
No. of dead mothers during lactation	0	0	0	0
No. of live F <sub>1</sub> offspring (male/female), at birth	108 (55/53)	100 (57/43)	108 (49/59)	103 (60/43)
Postnatal No. of live F <sub>1</sub> offspring day 7 viability (%)	98 (49/49) 90.7	100 (57/43) 100	108 (49/59) 100	103 (60/43) 100
Postnatal No. of live F <sub>1</sub> offspring day 21 viability (%)	98 (49/49) 90.7	98 (57/41) 98.0	108 (49/59) 100	101 (60/41) 98.1
Postnatal No. of live F <sub>1</sub> offspring day 35 viability (%)	98 (49/49) 90.7	94 (54/40) 94.0	107 (49/58) 99.1	101 (60/41) 98.1
Postnatal No. of live F <sub>1</sub> offspring day 56 viability (%)	98 (49/49) 90.7	93 (53/40) 93.0	107 (49/58) 99.1	99 (58/41) 96.1
Postnatal No. of live F <sub>1</sub> offspring day 70 viability (%)	98 (49/49) 90.7	93 (53/40) 93.0	106 (49/57) 98.1	99 (58/41) 96.1

Table 6 Effect of CLM on postnatal differentiation on mouse F<sub>1</sub> offspring

Dose (mg/kg)	Control	125	250	500
No. of litters	10	10	10	10
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±0.03	2.0±0.00	2.0±0.03	2.0±0.00
Descent of testis (week)	3.7±0.15	3.6±0.15	3.3±0.15	3.8±0.13
Opening of vagina (week)	6.1±0.10	5.3±0.22**	5.2±0.21**	6.0±0.26

Mean±Standard error

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

Table 7 Effect of CLM on pain response using Haffner method

Dose (mg/kg)	Response	
	(+)	(-)
Control	98	0
125	100	0
250	102	0
500	99	0

Values are the number of offspring tested.

Table 8 Effect of CLM on locomotor activity using rotating drum method

Dose (mg/kg)	Mean score(counts/5 minutes)	
	Male	Female
Control	54.0±2.2	53.8±2.2
125	54.3±2.0	53.7±2.1
250	47.0±2.3*	46.1±1.8**
500	43.3±1.9**	43.7±2.2**

Mean±Standard error

Significant difference from control: \*P<0.05,

\*\*P<0.01

ずれにも異常は認められず、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 8 に示すように、250 および 500 mg/kg 投与群の雌雄が対照群に比較して有意に減少した。その他の投与群では対

Table 9 Effect of CLM on the inclined plane test

Dose (mg/kg)	Degree of inclination	
	Male	Female
Control	44.9±0.5	46.1±0.6
125	45.1±0.4	45.3±0.6
250	45.6±0.5	44.3±0.6*
500	44.6±0.6	45.2±0.5

Mean±Standard error

Significant difference from control: \*P<0.05

Table 10 Effect of CLM on rotarod test

Dose (mg/kg)	Probability (%) <sup>a)</sup>	
	Male	Female
Control	84	88
125	72	81
250	75	84
500	78	88

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

Rubber rod: 3cm diameter, Rotation: 6 rpm

照群との間に有意差は認められなかった。

### (3) 神経・筋能力

傾斜板法により測定した結果は、Table 9 に示すように、250 mg/kg 投与群の雌が対照群に比較して有意に低かったほかは、対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

Table 11 Open field performance of mouse offspring (F<sub>1</sub>) 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>
Control	M	10	2.8±0.6	59.0±8.9	2.6±0.4	1.4±0.3	0.1±0.1
	F	10	5.1±1.7	60.8±11.2	0.8±0.2	1.6±0.3	0
125	M	10	3.8±0.8	59.7±8.3	1.3±0.2**	1.8±0.4	0.3±0.2
	F	10	3.4±1.1	77.2±9.3	2.0±0.1**	2.2±0.5	0
250	M	9	4.7±0.8	71.3±10.1	1.3±0.2*	0.4±0.2*	0.2±0.1
	F	10	3.5±1.3	74.1±14.6	1.3±0.2	1.6±0.3	0.1±0.1
500	M	9	4.9±1.2	62.2±8.9	1.9±0.6	1.3±0.2	0.7±0.2*
	F	10	2.8±0.5	60.7±6.9	0.8±0.2	1.3±0.3	0.1±0.1

Mean±Standard error

a): Mean number of times per offspring (F<sub>1</sub>) M: Male, F: Female

b): Mean number of sections entered per offspring (F<sub>1</sub>)

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

回転棒法により測定した結果は、Table 10 に示すように、対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

#### (4) 情緒性

Open field 法により観察した結果は、Table 11 に示すように、洗顔回数は 125 および 250 mg/kg 投与群の雄で減少、125 mg/kg 投与群の雌で増加、脱糞回数は 250 mg/kg 投与群の雄で減少、排尿回数は 500 mg/kg 投与群の雄で増加が、対照群との間に有意に認められた。しかし、区画移動数および立ち上がり回数には、対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

#### (5) 学習能力

Water T-maze 試験の結果は Table 12 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、それらの値には対照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

Shuttle box 法により測定した結果は、Table 13 に示すように、125 mg/kg 投与群の雄の 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。

Table 12 Water T-maze performance of mouse offspring (F<sub>1</sub>) at the 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	7 (3)	28.3±5.7	24.1±7.1	5.7±1.4	1.1±0.6
	F	8 (2)	38.8±11.0	15.9±4.4	6.1±1.6	1.5±0.3
125	M	10 (0)	31.8±6.5	16.2±3.4	5.1±1.1	1.0±0.4
	F	9 (1)	37.0±8.0	14.1±3.8	6.7±1.8	1.4±0.4
250	M	9 (1)	99.8±28.3	35.1±9.3	11.6±3.1	1.8±0.6
	F	9 (1)	48.8±24.1	19.0±3.4	5.3±2.4	1.9±0.9
500	M	8 (2)	69.5±26.4	23.5±10.6	10.3±2.3	1.4±0.5
	F	9 (1)	27.9±4.7	11.2±2.3	4.8±1.1	0.8±0.3

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

Table 13 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	1.0	13.0	17.0	32.5	68.5	71.5	65.0
	F	1.5	10.5	14.5	18.5	28.5	66.5	73.0	79.5
125	M	2.0	16	19.5	33.0	53.0	81.5	78.5	67.0
	F	1.0	3.5	5.0	15.5	41.5	71.0	78.0	67.5
250	M	4.0	3.5	13.0	19.5	29.0	68.0	68.5	74.0
	F	0.9	5.0	13.0	19.0	29.5	53.0	62.0	61.0
500	M	0	5.0	5.5	14.0	48.0	71.5	78.5	70.5
	F	2.0	8.0	10.5	15.0	35.0	54.0	54.5	63.0

Results are the mean percentage values of avoidance and escape for 20 trials from 10 animals.

M : Male, F : Female

### 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 30 匹からなる ICR-JCL 系雌マウスの妊娠 6 日目から 15 日までの 10 日間、1 日 1 回毎日一定時刻に静脈内投与して、末期胎仔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にも、对照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

末期胎仔の観察では、着床数、生存胎仔数、性比および吸収胚数には、对照群と CLM 投与群との間に有意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 mg/kg 投与群が对照群に比較して有意に重かったが、これらはいずれも正常範囲内での変化である。外形異常としては、外脳症、腹壁ヘルニアおよび眼瞼開裂が、对照群、250 および 500 mg/kg 投与群で認められ、内臓異常では、腎盂拡張が 250 および 500 mg/kg 投与群で認められたが、それらの発現率はいずれも低く、また左臍動脈が对照群を含むすべての投与群で認められたが、对照群が最も高い発現率を示しており、いずれも薬物投与の影響は考えられなかった。骨格系の観察においても、骨格異常としては胸骨核癒合が、125 および 250 mg/kg 投与群に認められたが、発現率は低く、骨格異常では舌骨体の 2 分、14 肋骨、胸骨核の非対称、2 分核および副核が对照群および CLM 投与群に散見されたが、その出現率には对照群と CLM 投与群との間に有意差はなく、いずれも自然発生的範囲内で認められるものと思われる。化骨進行状態では、250 および 500 mg/kg 投与群で頸椎と尾椎の化骨数に对照群と比較して差がみられ、化骨遅延の傾向が認められた。しかし、その他の部位においては、对照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかった。

富沢らは<sup>11)</sup>、マウスにおける CLM の腹腔内投与による器官形成期投与試験で、末期胎仔観察の結果、最高用量の 150 mg/kg 投与群で、胎仔生存率（着床数に対する生存胎仔数）の減少を認めた。しかし、今回の静脈内投与による実験では、末期胎仔観察群の着床数、生存胎仔数および吸収胚数には何ら影響はなく、これらの変化は認められなかった。CLM の急性毒性は静脈内投与よりも腹腔内投与が強く<sup>12)</sup>富沢らの報告による胎仔生存率の減少には、母体重の増加抑制が随伴しており、われわれの結果では、母体重に対しては何ら影響がなかったことから、これは CLM の毒性発現の差によるものと考えられる。外形異常、内臓異常および骨格異常については、

いずれも発現の上昇は認めておらず、また化骨に対しては頸椎および尾椎の化骨遅延傾向を認めており、われわれと同様の結果を示していた。

母体の分娩時観察では、125 mg/kg 投与群の妊娠期間が对照群と比較して有意に短く、また 250 mg/kg 投与群の生存仔数が有意に少なかったが、いずれも投与量との相関はなく、CLM 投与の影響によるものとは考えられない。そのほか、生存仔の体重および性比、ならびに着床痕数および分娩率には对照群と CLM 投与群との間に差はなく、死産仔および生存仔の外形異常も認められなかった。

哺育期間中は、各投与群とも母体の死亡例はなく、母体重の推移にも对照群と CLM 投与群との間に差はみられなかった。死亡仔数は对照群が最も多く、新生仔の体重推移には、对照群と 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。

新生仔の発育、分化の観察において、出生後 70 日令に至るまでの平均体重の推移には、对照群と CLM 投与群との間に差はみられず、一般状態にも異常は認められなかった。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も、对照群と CLM 投与群との間に有意差は認められなかったが、陰開口時期は 125 および 250 mg/kg が对照群に比較して有意に速かった。しかし、投与量との相関関係はなく、CLM 投与の影響とは認められなかった。

新生仔の生後の機能および行動観察では、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 CLM 投与の影響は認められなかった。自発運動量は、250 および 500 mg/kg 投与群の雌雄で对照群に比較して有意な減少がみられたが、神経・筋力に関しては、CLM 投与の影響は認められなかった。Open field 法による情緒性の試験では、CLM 投与群の洗顔回数、脱糞回数および排尿回数に、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 投与群との間に有意な差はみられず、いずれも CLM 投与による影響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、250 および 500 mg/kg 投与群で認められた胎仔の頸椎および尾椎の化骨遅延と、新生仔の自発運動量の低下のみであり、その他には、妊娠母体、末期胎仔および新生仔の生後発育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、器官形成期投与試験を、

ICR-JCL 系マウスを用いて、CLM 125, 250 および 500mg/kg の静脈内投与により行ない、次の結論を得た。

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、吸収胚数および胎盤重量に影響は認められなかった。胎仔の外形異常、内臓異常および骨格異常の発現はなく、化骨に対しては 250 および 500 mg/kg 投与群で、頸椎と尾椎の化骨遅延が認められた。
3. 自然分娩群の観察において、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認められなかった。
4. 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。
5. 新生仔の生後の機能および行動観察では、感覚機能、神経筋能力、情緒性、学習能力に対して、影響は認められなかった。しかし、250 および 500 mg/kg 投与群の雌雄において自発運動の減少が認められた。
6. CLM の器官形成期投与試験での最大無作用量は、125mg/kg であると考えられる。

#### 文 献

- 1) SCHWARTZ, B. S.; M. R. B. WARREN, F. A. BARKLEY & L. LANDIS: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistin methanesulfonate. *Antibiotics Annual* 1959/1960: 41~60, 1960
- 2) 齊藤太郎, 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) 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
- 4) Dawson, A.B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain. Technol.* 1: 123~124, 1926
- 5) 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
- 6) 四家喜一, 中田千津子, 小倉 豊, 玉田輝己, 藤本康夫: Methyl 0-(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
- 7) 植木昭和, 五味田裕, 荒木泰典, 山田勝士, 吉村裕之, 片岡泰文: 5-0-(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
- 8) 本間健實, 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
- 9) 石崎 繪: 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
- 10) 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
- 11) 富沢撰夫, 鎌田敏八: Colistin sodium methanesulfonate のマウスおよびラット胎仔におよぼす影響。応用薬理, 7: 1047~1060, 1973
- 12) 山田重男, 馬屋原敏民, 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

REPRODUCTION STUDIES OF SODIUM COLISTIN  
METHANESULFONATE (CLM). II  
TERATOGENICITY STUDY IN MICE

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

Teratogenicity study of sodium colistin methanesulfonate (CLM) was performed with ICR-JCL mice. CLM was administered intravenously at dosage levels of 125, 250 and 500 mg/kg/day from day 6 to day 15 of gestation. About two-thirds of pregnant mice in each group were sacrificed on day 18 of gestation and their fetuses were examined. The remaining mothers were allowed to deliver naturally.

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 in number of implantations, live fetuses, resorptions in the uterus, body weight of live fetuses, sex ratio and weight of placentas.
3. No significant increase of the prevalence of external, visceral and skeletal anomalies of the fetuses was observed in any treated group.
4. The ossifications of cervical and sacral vertebrae were delayed by treatment with CLM at dosage levels of 250 and 500 mg/kg.
5. There were no significant differences between the control and the treated groups of delivery in duration of pregnancy, number and body weight of liveborn, 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.
6. CLM did not affect postnatal growth, development and differentiation in newborn mice.
7. CLM did not affect sensory function of reflex, motor coordination, emotionality and learning ability in newborn mice. But, spontaneous activity of both sexes was reduced by treatment with CLM at dosage levels of 250 and 500 mg/kg.

It can be concluded that CLM, in this study, has little unfavorable influence on fetuses and newborn mice, and that the maximum non-toxic level of CLM is 125 mg/kg in mice.