

T-1220 の 毒 性 試 験 (第 4 報)

——ビーグル犬筋注における亜急性毒性試験——

高井 明・米田豊昭・河村泰仁

柴田哲夫・正谷博之・佐藤 盛

富山化学工業株式会社総合研究所

T-1220に関しては、急性毒性¹⁾、ラット腹腔内投与亜急性慢性毒性²⁾、ラット静脈内投与亜急性毒性³⁾、についてすでに報告した。ここでは、T-1220の安全性試験の一環として行なったビーグル犬1カ月筋肉内投与実験の結果を報告する。対照薬としてアミノベンジルペニシリン(Na塩、ABPC)を用いた。

I. 実験材料および方法

日本クレア(株)由来のビーグル犬雌11頭を6カ月齢で購入し、室温22±2°C、湿度60±5%でイヌ用固型飼料(日本クレアCD-5)1日300gと水道水を自由に与えて1カ月間予備飼育し、健康状態を確認した後実験に使用した。飼育は個別ケージで行なった。本実験での高用量を、予備実験の結果から、筋肉内投与における可及的大量と思われる1000mg/kgとし、他にその1/4量である250mg/kg投与群を設定した。250mg/kgは、臨床使用量を2g/man/dayと推定した場合、約6倍に相当する量である。実験計画をTable 1に示す。

検体は用時調製とし、蒸留水に溶解した後、濾過滅菌を行ない、1日1回左右の後肢大腿部筋肉に分割して注射した。対照群には滅菌生理食塩水を同様に投与した。30日間の投与期間中、毎日一般症状を観察し、3日毎に体重と摂餌量、摂水量の測定を行なった。実験開始前と実験期間中に次の項目について検査を行なった。

i) 尿検査

尿量(ml/20hr)、糖、蛋白、ケトン体、潜血、pH(Ames Labstix)、ウロビリノーゲン(Ames Urobilistix)、ビリルビン(Ames Ictostix)。

ii) 血液検査

赤血球数、白血球数(コールターカウンター)、ヘマトクリット(毛細管法)、ヘモグロビン(シアンメトヘモグロビン法)、網赤血球数(超生体染色)、血小板数(Rees and Ecker法)、白血球百分率(マイーギムザ染色)。

iii) 血液化学検査

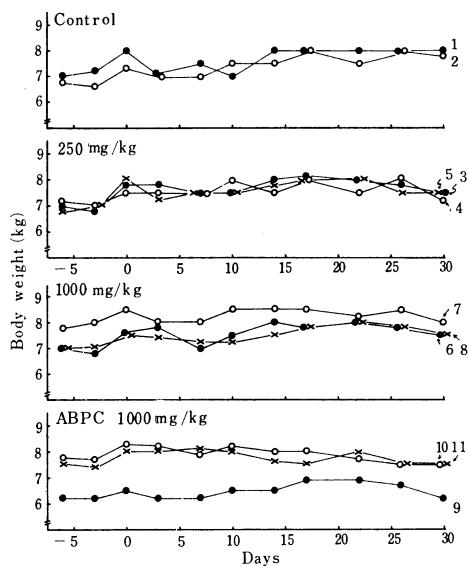
GOT, GPT(Reitman-Frankel法)、ALP(Kind-King法)、Ch-E(高橋、柴田法)、Chol.(Zurkowski法)、BUN(Urease-Indophenol法)、T.Bilirubin(Evelyn-Malloy法)、LDH(Babson変法)以上8項目は、オリンパスACA自動分析装置により測定。総蛋白(屈折率法)、A/G比(セルローズアセテート膜電気泳動法)、血糖(Ames Dextrostix Reflectance meter)、Na、K(炎光光度計)。

30日間の投与終了後、全例について糞を培養し、光岡⁴⁾の方法により腸内細菌叢の変動を調べた。最後に全例をペントバルビタール深麻酔下で頸動脈より放血死させ、剖検を行なった。肉眼的観察の後、脳、心、肺、肝、腎、脾、胸腺、甲状腺、脾、副腎、頸下腺、卵巣の重量を測定し、これに胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、子宮、腸間膜リンパ節、鼠径部リンパ節、骨髓、下垂体および投与局所の筋肉を加えてホルマリン固定、H・E染色し、組織学的観察を行なった。肝、腎については、グルタルアルデヒド前固定、オスミウム酸固定、エポン包埋、酢酸ウラニル、クエン酸鉛二重染色を行なって、電子顕微鏡による微細構造の観察を行なった。

Table 1 Experimental design for subacute toxicity test of T-1220 in beagle dogs (i.m., 1 month)

Exp. group	Concentration and volume	No. of beagle dogs(female)
Control (saline)		2
T-1220 250mg/kg	25%sol. 1ml/kg	3
T-1220 1000mg/kg	50%sol. 2ml/kg	3
ABPC 1000mg/kg	50%sol. 2ml/kg	3

Fig. 1 Body weight changes in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month



II. 実験結果

1. 一般症状と発育におよぼす影響

T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与群では、投与直後、動物は悲鳴をあげ、狂乱状態に陥り、手当たり次第に噛みつく反応を示した。この痛みを表わす症状は投与後 3 分以内に軽減されるが、約 30 分間は後肢を引きずる歩行がみられた。T-1220 250mg/kg 投与群ではこれらの症状は認められなかった。眼には肉眼的異常がみられず、また行動にも、視覚障害によると思われる異常はみられなかった。発育に関しては Fig. 1 に示すように、各投与群とも抑制はみられなかった。

2. 摂餌量と摂水量

各投与群とも毎日 300g の飼料を完全に食べており、検体投与による影響がみられなかった。摂水量にも変化を認めなかった。

3. 尿検査 (Table 2)

T-1220 1000mg/kg 投与の 3 例中 1 例に軽度の潜血反応をみたほか、ABPC 1000mg/kg 投与の 2 例に、軽度の蛋白とビリルビンの出現を認めた。尿量、pH、糖、ケトン体、ウロビリノーゲンには著しい変化がなかった。

4. 血液検査 (Table 3-1, 3-2, 3-3)

T-1220 250mg/kg, 1000mg/kg 投与群には赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、網赤血球数、血小板数に異常が認められなかった。白血球数にも異常が認められ

Table 2 Urinalysis in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

Dog No.	Volume (ml/20hrs)	pH	Protein	Glucose	Ketone body	Occult blood	Bilirubin				
							-1 w	2 w	4 w	-1 w	
1	190	220	290	6.5	6.0	6.5	+	+	+	-	-
2	190	340	150	6.8	6.0	6.0	+	+	+	0.3	0.3
Mean	190	280	220	6.7	6.0	6.3	+	+	+	0.5	0.4
Control							-	-	-	-	-
T-1220	3	140	180	120	6.5	6.0	6.0	+	+	0.8	0.6
250 mg/kg	4	380	190	200	6.5	7.0	6.0	+	+	0.2	0.5
	5	350	320	170	6.5	6.5	6.5	+	+	0.5	0.5
Mean		290	230	163	6.5	6.5	6.2	+	+	0.5	0.5

T-1220	6	320	170	220	6.0	6.5	6.0	—	±	—	—	—	—	—	—	0.2	0.2	0.3	—
1000 mg/kg	7	275	210	225	6.8	7.0	6.5	±	±	—	—	—	—	—	—	0.3	0.3	0.3	—
1000 mg/kg	8	230	160	200	6.7	6.5	6.5	±	±	—	—	—	—	—	—	0.3	0.5	0.5	—
1000 mg/kg	Mean	275	180	215	6.5	6.7	6.3	—~±	±	—	—	—	—	—~±	—~±	0.3	0.3	0.4	—
ABPC	9	66	210	170	7.0	7.0	7.0	+	+	—	—	—	—	—	—	0.7	0.5	0.6	—
1000 mg/kg	10	340	310	345	6.1	7.5	7.5	—	+	—	—	—	—	—	—	0.2	0.5	0.5	—
1000 mg/kg	11	310	70	190	6.6	7.5	8.0	±	++	+	—	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	—
1000 mg/kg	Mean	239	197	235	6.6	7.3	7.5	—~†	+~†	+	—	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	—~±

Table 3-1 Hematological findings in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

	Dog No.	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)				WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)				Hemoglobin (g/dl)				Hematocrit (%)							
		0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
Control	1	770	787	932	813	802	78	99	94	125	103	13.8	15.2	14.0	15.4	14.9	46	49	46	51	48
	2	742	751	903	668	712	138	135	128	121	110	14.2	14.7	13.8	13.5	13.7	47	45	43	42	43
	Mean	756	769	918	741	757	108	117	111	123	107	14.0	15.0	13.9	14.5	14.3	47	47	45	47	46
T-1220	3	768	726	844	665	688	105	93	89	82	90	14.1	13.8	12.9	13.0	13.1	48	45	40	43	43
	4	788	817	903	736	764	123	84	124	104	99	15.2	16.4	14.5	14.8	14.7	52	50	47	47	47
	Mean	777	759	857	708	732	126	83	106	102	92	14.5	15.0	13.9	13.9	13.9	47	49	46	44	44
T-1220	6	707	687	796	668	698	130	119	107	124	95	13.0	13.5	13.6	12.8	13.5	44	45	44	42	45
	7	771	711	797	695	738	103	125	103	122	103	14.3	14.7	14.3	13.5	14.8	48	46	45	44	49
	Mean	751	737	835	721	761	119	121	109	123	104	13.9	15.3	14.7	13.9	14.8	47	49	47	46	49
ABPC	9	783	800	839	825	819	151	139	145	105	111	14.2	15.0	14.2	15.4	14.7	48	50	46	51	51
	10	773	716	790	570	689	96	192	355	208	99	13.7	14.0	10.5	11.3	13.7	42	44	33	36	45
	Mean	775	754	827	706	746	121	148	217	139	103	14.2	14.8	12.9	13.8	14.3	46	48	41	45	48
1000mg/kg	8	775	813	912	800	848	123	120	118	123	115	14.5	17.6	16.1	15.5	16.0	50	56	51	52	54
	11	770	746	851	722	730	116	114	152	103	99	14.7	15.5	14.1	14.7	14.5	49	50	45	47	48
	Mean	775	754	827	706	746	121	148	217	139	103	14.2	14.8	12.9	13.8	14.3	46	48	41	45	48

Table 3-2 Hematological findings in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

		Reticulocyte (%)				Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)						
		0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	
Dog No.		1	10	14	2	4	2	104	116	158	132	140
Control	2	6	4	4	12	4	144	102	160	130	116	116
	Mean	8	9	3	8	3	124	109	159	131	128	128
T-1220	3	6	8	4	22	8	102	114	132	136	128	128
	4	12	20	2	12	4	132	98	134	124	126	126
250mg/kg	5	6	8	4	10	4	130	106	128	124	136	136
	Mean	8	12	3	15	5	121	106	131	128	130	130
T-1220	6	4	20	6	4	22	164	122	134	140	120	120
	7	10	6	6	12	4	166	122	120	144	132	132
1000mg/kg	8	8	10	24	10	14	134	164	104	130	118	118
	Mean	7	12	12	9	13	155	136	119	138	123	123
ABPC	9	10	12	10	2	12	148	106	110	124	124	124
	10	6	10	10	8	4	142	134	104	122	124	124
1000mg/kg	11	14	8	10	10	6	130	112	156	124	134	134
	Mean	10	10	10	7	7	140	117	123	123	127	127

Table 3-3 Hematological findings in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

		Total and differential leucocyte count*																							
		0 w						1 w						2 w						3 w					
		WBC	N	L	M	E	B	WBC	N	L	M	E	B	WBC	N	L	M	E	B	WBC	N	L	M	E	B
Control	1	78	68	28	4	0	0	99	62	29	6	3	0	94	55	37	5	3	0	125	41	56	2	1	0
	2	138	47	41	3	9	0	135	46	39	8	7	0	128	71	20	3	6	0	121	58	34	3	5	0
	Mean	108	58	35	4	5	0	117	54	34	7	5	0	111	63	29	4	5	0	123	50	45	3	2	0
T-1220 250mg/kg	3	105	56	33	7	4	0	93	72	22	1	5	0	89	58	26	7	9	0	82	61	31	2	6	0
	4	123	77	16	4	3	0	84	43	48	7	2	0	124	67	21	6	6	0	104	60	33	4	3	0
	5	151	51	38	5	6	0	73	67	20	10	3	0	106	76	15	5	4	0	119	75	20	4	1	0
Mean	126	61	29	5	4	0	83	61	30	6	3	0	106	67	21	6	6	0	102	65	28	3	3	0	
	92	76	17	2	6	0	92	76	17	2	6	0	99	70	24	1	5	0	87	80	12	2	6	0	

T-1220 1000mg/kg	6	130	73	20	5	2	0	119	67	26	2	5	0	107	75	19	1	5	0	124	67	30	2	1	0	95	66	29	3	2	0
	7	103	45	52	2	1	0	125	64	28	6	2	0	103	71	21	3	5	0	122	77	17	4	2	0	103	83	14	2	1	0
	8	123	53	36	6	5	0	120	69	17	9	5	0	118	82	10	7	1	0	123	82	16	2	0	0	115	80	19	0	1	0
ABPC 1000mg/kg	9	151	67	27	5	1	0	139	68	20	6	6	0	145	68	25	3	4	0	105	69	27	2	2	0	111	74	24	2	0	0
	10	96	55	34	6	5	0	192	67	22	11	0	0	355	85	9	5	1	0	208	84	14	2	0	0	99	69	23	1	7	0
	11	116	58	29	7	6	0	114	65	30	5	0	0	152	61	23	7	9	0	103	74	22	1	3	0	99	80	16	3	1	0
ABPC 1000mg/kg	Mean	121	60	30	6	4	0	148	67	24	7	2	0	217	71	19	5	5	0	139	76	21	2	2	0	103	74	21	2	3	0

*WBC : $\times 10^2/\text{mm}^3$ N : Neutrophils L : Lymphocytes M : Monocytes E : Eosinophils B : Basophils

Table 4-1 Biochemical examinations in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

	Dog No.	GOT (Karmen unit)				GPT (Karmen unit)				ALP (K-A unit)				LDH (Wroblewski unit)								
		0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w						
Control	1	22	42	28	36	22	13	38	18	25	26	5.6	4.7	4.5	3.9	5.1	110	170	150	260	190	
	2	34	39	44	27	31	37	38	24	34	31	9.6	6.3	6.9	5.1	5.9	100	220	160	150	260	
	Mean	28	41	36	32	27	25	38	21	30	29	7.6	5.5	5.7	4.5	5.5	105	195	165	205	225	
T-1220 250mg/kg	3	25	35	30	29	28	13	31	15	22	24	4.8	4.7	3.1	2.9	3.7	60	120	150	130	110	
	4	30	48	47	31	36	20	41	20	24	24	4.5	4.9	4.5	4.6	5.1	120	160	200	140	160	
	Mean	28	41	39	27	28	17	36	26	28	41	5.4	2.6	3.1	3.1	2.8	130	150	180	160	200	
T-1220 1000mg/kg	5	29	40	39	20	21	17	36	26	28	41	4.9	4.1	3.6	3.5	3.8	103	143	177	143	157	
	6	24	44	35	28	18	17	56	35	32	38	5.2	5.2	4.0	3.9	5.1	200	490	610	340	380	
	Mean	26	53	44	46	22	19	66	37	43	43	6.8	5.4	5.1	5.0	6.1	170	317	610	277	287	
ABPC 1000mg/kg	7	30	47	52	44	30	22	62	37	47	52	6.2	4.3	4.0	4.0	5.1	130	180	820	170	160	
	8	25	68	44	65	17	17	79	38	49	38	9.1	6.6	7.4	7.2	8.0	180	280	400	320	320	
	Mean	20	97	71	45	42	14	94	59	40	40	5.4	2.9	6.3	5.4	4.9	127	177	523	183	277	

Table 4-2 Biochemical examinations in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

	Dog No.	Bilirubin (mg/dl)				BUN (mg/dl)				Glucose (mg/dl)				Total protein (g/dl)						
		0 w	1 w	2 w	3 w	0 w	1 w	2 w	3 w	0 w	1 w	2 w	3 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w		
Control	1	0.3	0.2	0.2	0.3	16.1	8.2	7.7	8.7	8.6	88	96	88	82	86	6.0	5.8	5.9	6.0	5.8
	2	0.5	0.2	0.2	0.2	17.2	8.2	7.5	7.0	7.4	83	88	89	106	92	5.9	5.8	5.6	5.2	5.2
	Mean	0.4	0.2	0.2	0.3	16.7	8.2	7.6	7.9	8.0	86	92	89	94	89	6.0	5.8	5.8	5.6	5.5
T-1220	3	0.3	0.1	0.1	0.2	16.5	6.5	6.1	6.8	8.8	90	105	96	111	95	5.9	5.9	5.7	5.4	5.3
	4	0.3	0.2	0.2	0.3	15.8	7.0	7.2	7.8	9.4	84	90	99	104	98	6.5	5.8	6.1	5.4	5.4
	Mean	0.3	0.2	0.2	0.2	15.9	6.0	6.2	6.5	6.7	99	100	100	100	94	5.2	6.0	6.1	6.1	5.8
250mg/kg	5	0.3	0.2	0.2	0.2	16.1	6.5	6.5	7.0	8.3	91	97	98	105	96	5.9	5.9	6.0	5.6	5.5
	6	0.3	0.1	0.1	0.2	17.1	12.5	6.1	7.4	7.7	97	96	110	106	98	5.9	5.2	5.8	5.6	5.7
	Mean	0.3	0.2	0.2	0.2	15.3	8.6	5.9	7.6	8.2	88	84	100	90	80	5.5	5.8	6.2	6.2	6.0
T-1220	7	0.2	0.2	0.2	0.2	17.1	12.5	6.1	7.4	7.7	97	96	110	106	98	5.9	5.2	5.8	5.6	5.7
	8	0.3	0.2	0.2	0.2	15.5	10.1	6.4	6.4	7.8	88	90	101	104	78	5.7	5.9	6.5	6.0	6.2
	Mean	0.3	0.2	0.2	0.2	16.0	10.4	6.1	7.1	7.9	91	90	104	100	85	5.7	5.6	6.2	5.9	6.0
1000mg/kg	9	0.3	0.1	0.1	0.2	14.5	7.2	5.7	6.7	7.6	98	90	102	94	90	5.1	5.8	6.1	6.0	6.0
	10	0.3	0.2	0.2	0.3	17.1	10.8	8.7	9.3	8.1	95	85	106	98	92	5.6	6.1	6.0	6.1	5.8
	Mean	0.3	0.2	0.2	0.3	17.9	7.8	11.7	6.9	9.8	84	113	108	107	91	5.9	6.0	5.9	5.6	5.6
ABPC	11	0.3	0.3	0.3	0.3	16.5	8.6	8.7	7.6	8.5	92	96	105	100	91	5.5	6.0	6.0	5.9	5.8
	Mean	0.3	0.2	0.2	0.3	16.5	8.6	8.7	7.6	8.5	92	96	105	100	91	5.5	6.0	6.0	5.9	5.8

Table 4-3 Biochemical examinations in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

	Dog No.	Chol.(mg/dl)				γ -GTP (mu/ml)				LAP (C-R unit)				Ca (mg/dl)			
		0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	
Control	1	142	164	106	115	123	4.3	4.0	4.0	4.0	186	158	175	11.2	11.7	11.5	
	2	143	177	115	136	119	4.6	4.3	4.0	4.0	160	135	140	11.9	10.9	10.8	
	Mean	143	171	111	126	121	4.5	4.2	4.0	4.0	173	147	158	11.6	11.3	11.2	
T-1220	3	131	132	115	127	120	5.2	3.8	3.5	3.5	113	115	115	10.5	10.9	11.7	
	4	168	158	120	136	125	6.3	3.9	3.7	3.7	116	150	148	11.0	11.4	10.1	
	Mean	143	157	147	150	152	5.0	3.6	3.5	3.5	159	105	100	11.4	10.9	10.3	
250mg/kg	5	147	149	127	138	132	5.5	3.8	3.6	3.6	129	123	121	11.0	11.1	10.7	

T-1220 1000mg/kg	6	138	142	134	136	126	4.4	3.8	3.0	117	98	105	11.5
	7	142	160	160	171	154	4.2	4.0	3.5	144	125	135	11.1
	8	142	173	169	163	155	4.5	4.0	3.5	164	140	135	11.2
	Mean	141	158	154	157	145	4.4	3.9	3.3	142	121	125	11.3
ABPC 1000mg/kg	9	122	141	143	146	129	5.9	4.0	3.6	164	161	170	11.7
	10	135	169	275	205	149	4.3	4.0	3.2	160	125	135	11.1
	11	153	100	162	174	164	4.6	4.0	3.5	148	128	132	11.1
	Mean	137	137	193	175	147	4.9	4.0	3.4	157	138	146	11.3
													11.2
													10.8

Table 4-4 Biochemical examinations in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

	Dog No.	Ch-E (4pH)				Na (mEq/l)				K (mEq/l)				Cl (mEq/l)			
		0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w	
Control	1	.51	.72	.64	.71	.69	131	145	139	138	141	4.7	5.0	4.5	5.1	4.5	
	2	.43	.53	.48	.51	.46	139	141	141	135	141	5.2	4.7	4.7	4.4	4.5	
	Mean	.47	.62	.56	.61	.58	135	143	140	137	141	5.0	4.9	4.6	4.8	4.5	
T-1220 250mg/kg	3	.46	.57	.54	.55	.54	141	141	141	133	143	5.1	4.3	4.5	4.4	4.3	
	4	.58	.72	.60	.66	.61	136	139	141	130	139	4.6	4.1	4.7	4.0	4.1	
	Mean	.52	.65	.57	.63	.60	139	141	141	135	141	4.8	4.3	4.7	4.1	4.1	
T-1220 1000mg/kg	6	.46	.57	.53	.56	.57	139	141	139	138	141	4.7	4.8	4.9	4.7	4.8	
	7	.40	.46	.43	.49	.46	134	143	136	143	145	4.9	4.8	4.8	4.5	4.5	
	Mean	.52	.71	.77	.75	.79	.78	134	141	141	140	148	4.7	5.2	4.9	5.0	
ABPC 1000mg/kg	9	.47	.61	.52	.64	.58	129	136	139	140	143	4.5	5.1	5.0	5.1	5.2	
	10	.67	.75	.60	.70	.73	131	136	139	143	143	4.5	4.8	4.7	5.4	5.2	
	Mean	.61	.69	.84	.71	.70	.71	134	139	136	135	139	5.0	4.3	4.8	4.7	4.7

ないが、白血球分画では、1000mg/kg 投与で好中球のわずかな増加がみられる例 (No. 8) があった。ABPC 投与の 1 例 (No. 10) は、投与 2~3 週後に赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの減少と白血球数の増加 (分画では好中球が増加している) を示した。

5. 血液化学検査 (Table 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5)

T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与群で、GOT, GPT の上昇があり、投与 1~2 週後をピークとして以後徐々に低下する傾向を示した。この変化は、T-1220 投与群よりも ABPC 投与群に若干強く現われていた。また投与 2 週後をピークとする LDH の上昇が、T-1220, ABPC 投与群にはほぼ同程度に認められた。他の検査項目には検体投与に起因すると思われる異常がなかった。

6. 腸内細菌叢の変動 (Table 5-1, 5-2)

T-1220 投与群では総菌数がわずかな減少を示したが、その主因は Bifidobacteria の消失によるものと思われた。その他 Staphylococci の著明な減少、Clostridia の消失が特徴的であり、また Bacteroidaceae のわずかな減少がみられた。これを ABPC 投与群と比較すると、総菌数減少、Clostridia 消失、Staphylococci 減少の点で共通し、Bifidobacteria 消失、Bacteroidaceae 減少は T-1220 に特徴的であるようにみえた。

7. 剖検所見と臓器重量、臓器重量体重比
肉眼所見では、T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与全例の投与部位筋肉に高度の出血や壞死があり (Photo. 1, 2), これらの例では鼠径部リンパ節の肥大が認められるものもあった。T-1220 250mg/kg 投与群では投与部位の筋にほとんど肉眼的な異常がなく、生理食塩水投与の対照群との間に差がみられなかった。他には脾の周辺部に、暗赤色に帶状に隆起した、限局したうっ血が、T-1220 250mg/kg 投与の 2 例、1000mg/kg 投与の 1 例、ABPC 投与の 2 例に認められた。

臓器重量を Table 6-1 に、臓器重量体重比を Table 6-2 に示す。臓器重量では、T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与群に、軽度の肝重量増加が、両検体とも同程度に認められた。T-1220 250mg/kg 投与ではこれがみ

Table 4-5 Biochemical examinations in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

Dog No.	T. P.	A	0 w						4 w						A/G	
			α		β		γ		α		β		γ			
			0	1	1	2	1	2	0	1	1	2	1	2		
Control	1	6.0	48.2	10.3	8.1	8.5	9.2	9.8	6.0	0.93	5.8	50.8	6.3	6.9	9.4	
	2	5.9	48.2	9.6	10.1	8.5	6.2	8.0	9.5	0.93	5.2	46.2	7.1	8.4	8.9	
	Mean	6.0	48.2	10.0	9.1	8.5	7.7	8.9	7.8	0.93	5.5	48.5	6.7	7.7	9.2	
T-1220 250mg/kg	3	5.9	51.8	8.5	7.7	7.7	8.1	8.5	7.7	1.07	5.3	45.5	5.6	7.0	10.9	
	4	6.5	50.7	8.9	7.1	7.5	10.4	7.5	7.9	1.03	5.4	51.3	6.2	7.1	13.4	
	Mean	5.9	50.8	9.0	7.7	7.7	9.4	8.0	7.3	1.03	5.5	50.2	6.1	7.7	11.3	
T-1220 1000mg/kg	6	5.9	49.4	10.1	8.2	8.9	9.7	8.5	4.7	0.99	5.7	48.9	6.3	6.6	12.1	
	7	5.5	50.2	9.4	7.8	8.1	9.4	8.1	6.8	1.01	6.0	49.5	7.8	7.4	10.1	
	Mean	5.7	50.0	9.4	8.1	8.4	9.4	9.7	5.2	1.00	6.2	52.3	7.1	7.1	8.8	
ABPC	9	5.1	49.6	7.4	7.8	8.5	9.6	8.9	8.1	0.99	6.0	50.4	8.9	7.3	6.6	
	10	5.6	49.2	9.5	8.0	7.3	8.3	8.3	9.5	0.97	5.8	49.4	9.2	7.8	7.0	
	Mean	5.5	49.2	8.2	7.9	8.2	8.7	9.3	8.5	0.97	5.8	49.7	9.0	7.8	7.1	
1000mg/kg	11	5.9	48.8	7.7	8.0	8.7	8.2	10.6	8.0	0.95	5.6	49.3	9.0	8.2	7.8	
	Mean	5.5	49.2	8.2	7.9	8.2	8.7	9.3	8.5	0.97	5.8	49.7	9.0	7.8	7.1	

Table 5-1 Numbers of organisms in the intestinal bacterial flora of beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month (log/g of feces)

Organisms	Control		T-1220 250mg/kg			T-1220 1000mg/kg			ABPC 1000mg/kg			
	Dog No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Total		10.7	10.7	10.7	10.5	10.1	10.5	10.3	9.7	10.1	10.3	10.1
Bacteroidaceae		10.1	9.9	9.6	9.3	9.1	9.6	9.5	9.4	9.7	9.9	9.7
Catenabacteria		9.7	10.1	10.3	10.1	9.8	10.1	10.0	8.9	8.3	9.4	8.3
Bifidobacteria		9.9	9.5	0	0	0	0	0	0	8.3	9.3	0
Peptostreptococci		9.6	9.4	8.8	8.8	8.8	9.6	8.9	8.6	8.3	9.4	9.4
Lactobacilli		10.0	9.4	9.8	9.0	9.1	8.4	0	8.3	8.3	8.8	3.4
Streptococci		9.6	9.9	7.6	10.2	7.8	9.9	8.5	9.0	7.7	8.1	9.0
Enterobacteriaceae		9.5	9.0	10.3	9.1	9.3	9.4	9.8	8.6	9.9	9.6	9.7
Clostridia		4.3	2.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Veillonellae		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococci		8.0	3.4	0	2.3	3.0	2.6	4.6	2.9	0	2.3	5.3
Bacilli		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Molds		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yeasts		2.6	3.3	0	0	3.8	0	4.0	0	5.3	0	3.3
Spirochaetaceae		0	9.8	0	9.1	0	0	9.2	0	0	0	0

Table 5-2 Mean numbers of organisms (log/g of feces) and detection rates of the intestinal bacterial flora from beagle dogs treated intramuscularly T-1220 for 1 month

Organisms	Control (2 cases)		T-1220 250mg/kg (3 cases)		T-1220 1000mg/kg (3 cases)		T-1220 Total (6 cases)		ABPC 1000mg/kg (3 cases)	
	No.	Detection rate (%)	No.	Detection rate (%)	No.	Detection rate (%)	No.	Detection rate (%)	No.	Detection rate (%)
Total	10.7		10.4		10.2		10.3		10.2	
Bacteroidaceae	10.0	100	9.3	100	9.5	100	9.4	100	9.8	100
Catenabacteria	9.9	100	10.1	100	9.7	100	9.9	100	8.7	100
Bifidobacteria	9.7	100	0	0	0	0	0	0	8.8	67
Peptostreptococci	9.5	100	8.8	100	9.0	100	8.9	100	9.0	100
Lactobacilli	9.7	100	9.3	100	8.4	67	8.9	83	6.8	100
Streptococci	9.8	100	8.5	100	9.1	100	8.8	100	8.3	100
Enterobacteriaceae	9.3	100	9.6	100	9.3	100	9.4	100	9.7	100
Clostridia	3.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Veillonellae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococci	5.7	100	2.7	67	3.4	100	3.1	83	3.8	67
Bacilli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Molds	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yeasts	3.0	100	3.8	33	4.0	33	3.9	33	4.3	67
Spirochaetaceae	9.8	50	9.1	33	9.2	33	9.2	33	0	0

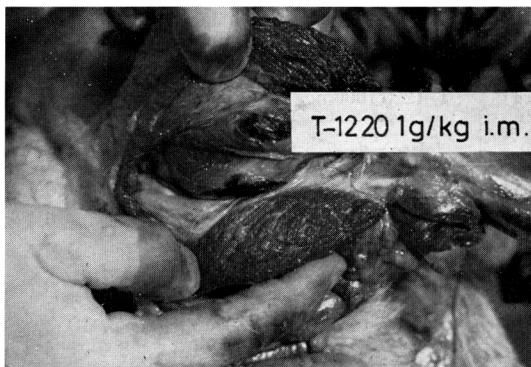


Photo. 1 The injection site (*Musculus femoris*) from a beagle dog given T-1220 at 1000 mg/kg with intramuscular injection for 1 month. Focus of muscular necrosis, which was formed by the injection of T-1220, is shown.

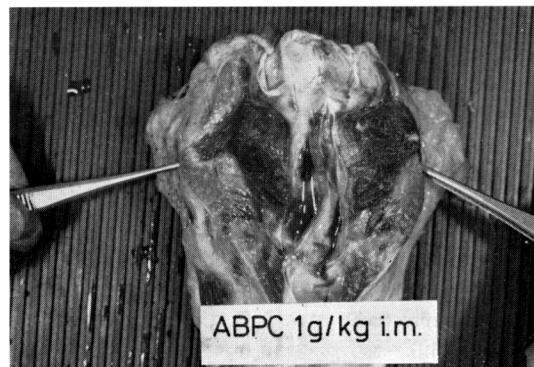


Photo. 2 The injection site (*Musculus femoris*) from a beagle dog given ABPC at 1000 mg/kg with intramuscular injection for 1 month. Granulation tissue is formed surrounding the broad muscular necrosis.

Table 6-1 Organ weight in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month (g)

	Dog No.	B. W. (kg)	Heart	Lung	Liver	Kidney (L) (R)	Spleen	Thymus	Thyroids	Adrenals	Submaxillary g.	Ovaries	Pancreas	Brain
Control	1	8.0	73	59	209	16 19	17	9	.92	0.90	9.0	1.13	12	60
	2	7.8	57	66	196	18 19	23	10	.86	1.13	9.6	0.62	19	75
	Mean	7.9	65	63	203	17 19	20	10	.89	1.01	9.3	0.87	16	68
T-1220	3	7.5	64	59	221	19 19	21	14	.49	0.87	8.6	0.46	18	69
	4	7.2	62	56	188	17 18	20	20	.69	0.99	8.5	0.81	16	75
	Mean	7.5	62	67	237	19 17	22	7	.72	1.07	11.7	0.65	17	70
T-1220	5	7.5	62	67	215	18 18	21	14	.63	0.98	9.6	0.64	17	71
	6	7.5	75	51	284	20 19	19	12	.67	1.24	7.6	0.92	17	79
	7	8.0	72	78	273	21 23	24	8	.87	1.36	10.0	0.73	23	77
ABPC	8	7.5	66	72	330	22 23	23	6	.71	1.31	7.8	0.91	29	62
	Mean	7.7	71	67	296	21 22	22	9	.75	1.30	8.5	0.85	23	73
	9	6.2	66	56	219	22 21	22	4	.75	1.06	9.0	0.70	16	69
ABPC	10	7.5	72	68	318	26 28	18	4	.82	1.20	11.0	0.71	13	75
	11	7.5	54	60	294	23 22	32	7	.61	0.88	—	0.78	18	69
	Mean	7.1	64	61	277	24 24	24	5	.73	1.05	10.0	0.73	16	71

Table 6-2 Relative organ weight per 100 g body weight in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

	Dog No.	Heart	Lung	Liver	Kidney		Spleen	Thymus	Thyroids	Adrenals	Submaxillary g.	Ovaries	Pancreas	Brain
					(L)	(R)								
Control	1	.91	.74	2.61	.20	.24	.21	.113	.012	.011	.113	.014	.15	.75
	2	.73	.85	2.51	.23	.24	.30	.128	.011	.014	.123	.008	.24	.96
	Mean	.82	.80	2.56	.22	.24	.26	.121	.012	.013	.118	.011	.20	.86
T-1220 250mg/kg	3	.85	.79	2.95	.25	.25	.28	.187	.007	.012	.115	.006	.24	.92
	4	.86	.78	2.61	.24	.25	.28	.278	.010	.014	.118	.011	.22	1.04
	5	.83	.89	3.16	.25	.23	.29	.093	.010	.014	.156	.009	.23	.93
T-1220 1000mg/kg	Mean	.85	.82	2.91	.25	.24	.28	.186	.009	.013	.130	.009	.23	.96
	6	1.00	.68	3.79	.27	.25	.25	.160	.009	.017	.101	.012	.23	1.05
	7	.90	.98	3.41	.26	.29	.30	.100	.011	.017	.125	.009	.29	.96
ABPC 1000mg/kg	8	.88	.96	4.40	.29	.31	.31	.080	.009	.017	.104	.012	.39	.83
	Mean	.93	.87	3.87	.27	.28	.29	.113	.010	.017	.110	.011	.30	.95
	9	1.07	.90	3.53	.36	.34	.36	.065	.012	.017	.145	.011	.26	1.11
ABPC 1000mg/kg	10	.96	.91	4.24	.35	.37	.24	.053	.011	.016	.147	.009	.17	1.00
	11	.72	.80	3.92	.31	.29	.43	.093	.008	.012		.010	.24	.92
	Mean	.92	.87	3.90	.34	.33	.34	.070	.010	.015	.146	.010	.22	1.01

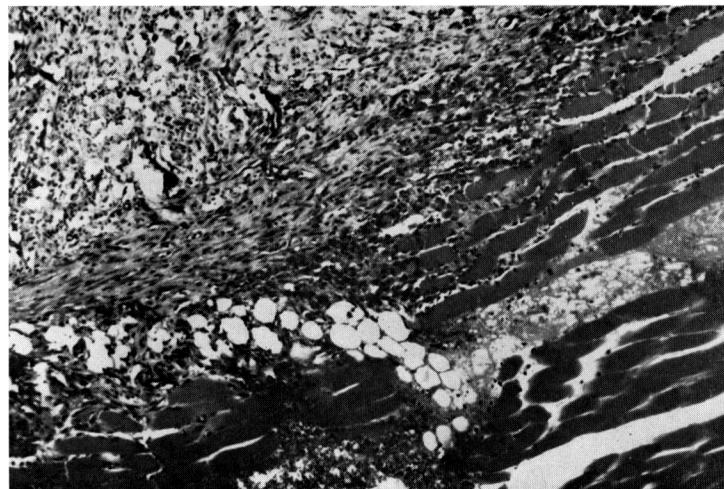


Photo. 3 The muscle of the injection site from a beagle dog given T-1220 at 1000 mg/kg with intramuscular injection for 1 month. Hemorrhage, cell infiltration, muscular necrosis and granulation tissue are observed. $\times 80$, H. E. staining.

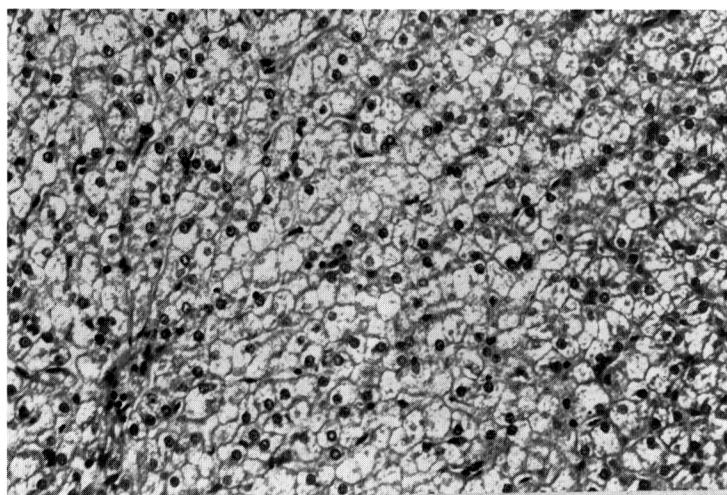


Photo. 4 The liver cells from a beagle dog given T-1220 at 1000mg/kg with intramuscular injection for 1 month. Hydropic change of the liver cell can be observed, but the cord-like pattern of the liver cell shows no significant changes. $\times 200$, H. E. staining.

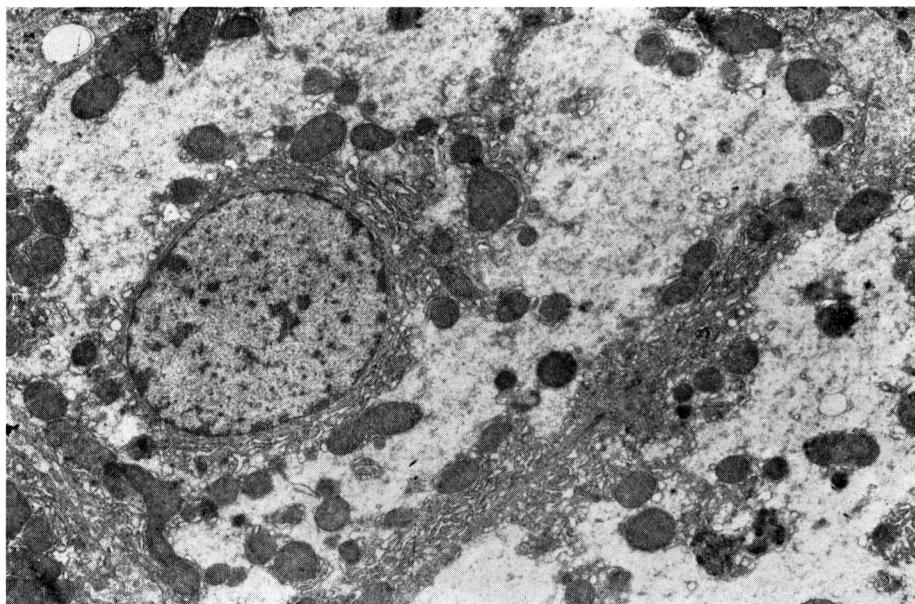


Photo. 5 Electron microscopic observation of the liver cell from a beagle dog given T-1220 at 1000mg/kg with intramuscular injection for 1 month. Glycogen granules are undistinguishable and its area are enlarged. The rough surfaced endoplasmic reticulum is confined in the cytoplasmic matrix. $\times 7500$, Double fixation with glutaraldehyde and osmic acid. Double staining with uranyl acetate and lead citrate.

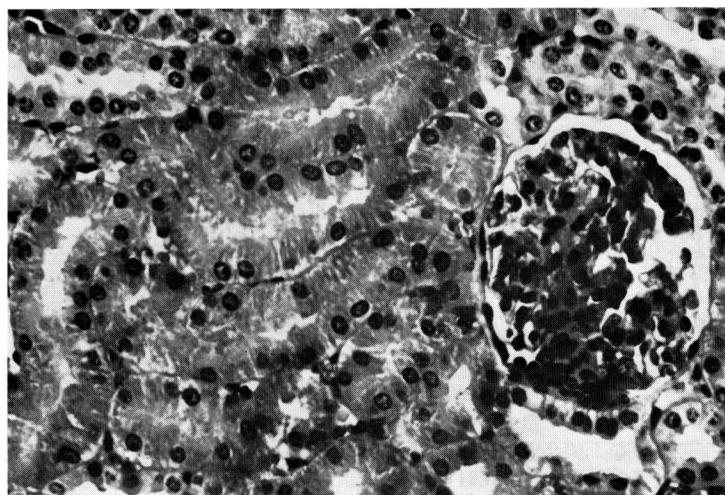


Photo. 6 The kidney from a beagle dog given T-1220 at 1000 mg/kg with intramuscular injection for 1 month. No significant changes are seen both in the renal glomerulus and tubule. $\times 400$, H. E. staining.

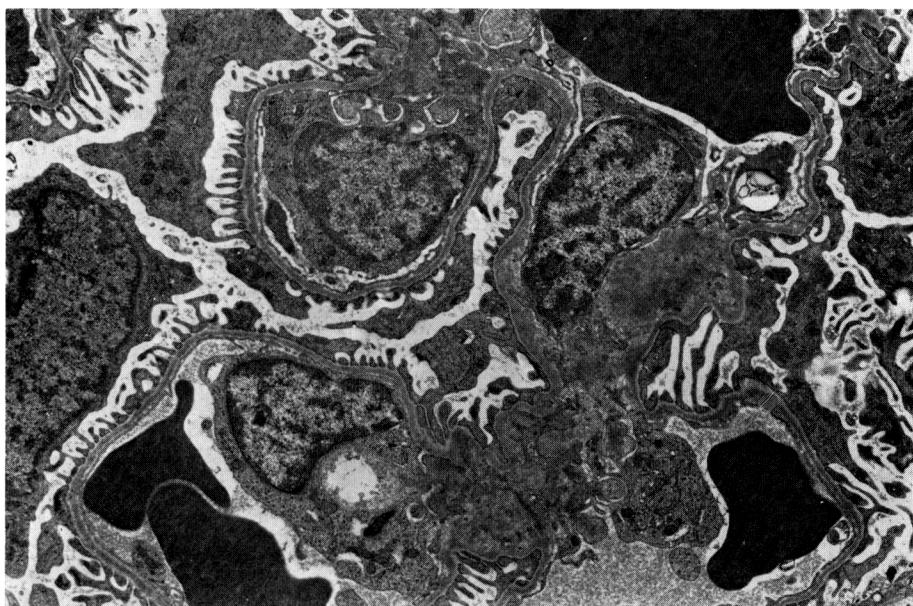


Photo. 7 Electron microscopic observation of the glomerulus of the kidney from a beagle dog given T-1220 at 1000 mg/kg with intramuscular injection for 1 month. There are no gross changes. $\times 7500$, Double fixation with glutaraldehyde and osmic acid. Double staining with uranyl acetate and lead citrate.

られなかった。他には ABPC 1000 mg/kg 投与群にのみ、腎重量の軽度増加と胸腺重量の減少があった以外、検体投与に起因すると思われる重量の変化がなかった。

8. 組織学的検査と電子顕微鏡的観察

組織学的検査の結果を Table 7 に示す。T-1220 と ABPC の 1000mg/kg 投与全例に、投与部位の筋壊死とその周囲の肉芽組織 (Photo. 3) が高度に認められた。また、可逆性の肝細胞の水腫様変性 (Photo. 4) が全例にみ

Table 7 Histological observation in beagle dogs treated intramuscularly with T-1220 for 1 month

Dog No.	Control (Saline)			T-1220 250mg/kg			T-1220 1000mg/kg			ABPC 1000mg/kg		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Injected site Muscular necrosis and granulation tissue	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Liver Hydropic change of hepatic cells	—	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Spleen Focal congestion	—	—	+	+	—	—	+	—	+	—	—	卅
Inguinal lymph nodes Hyper trophy and increase of lymphocyte	—	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅	卅

No significant changes were observed in brain, hypophysis, heart, lung, kidney, thyroids, thymus, submaxillary glands, adrenals, pancreas, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, rectum, colon, uterus, ovaries, urinary bladder, mesentery lymph nodes and bone marrow.

られたが、肝細胞索の配列は正常であり、炎症性変化は認められなかった。この肝細胞を電子顕微鏡的に観察すると(Photo. 5), 細胞質の endoplasmic reticulum は疎くなっている、核膜と mitochondria 周辺にわずかにみられるだけであった。細胞質の glycogen area は異常に拡大しており、glycogen granules の電子密度は対照群より低い傾向を示していた。この変化は、T-1220 と ABPC の 1000mg/kg 投与群でほぼ同程度に認められた。腎には各投与群とも、組織学的(Photo. 6) にも、電子顕微鏡的(Photo. 7) にも異常を認めなかった。他には、鼠径部リンパ節の腫大とリンパ球の増加が T-1220 と ABPC の 1000 mg/kg 投与群にみられ、脾の限局性のうっ血が対照群を除く各投与群に投与量と無関係に散発的にみられた。

III. 総括と考察

T-1220 250mg/kg, 1000mg/kg を 1 群 3 頭の雌性ビーグル犬に 1 カ月間筋肉内投与し、その安全性を ABPC と比較検討した。投与後、T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与群の動物は激しい痛みを表わす症状を示した。これは 50% 溶液の 2ml/kg 筋注という本実験のためにやむなく設定した高濃度の検体の大量筋注による影響に加えて、T-1220, ABPC とも局所刺激作用を有する⁵⁾という要因が加わったためと思われた。これらの動物の投与部位には出血や限局した筋壊死が認められた。しかし、T-1220 250mg/kg (25% 溶液, 1ml/kg) 投与群では、

症状、投与部位の肉眼的所見とも生理食塩水投与対照群との間に差がみられなかった。T-1220 投与に起因すると思われる変化としては、1000mg/kg 投与群において、投与開始 1 ~ 2 週後をピークとする GOT, GPT, LDH の中等度の上昇と肝重量の増加、および組織学的に肝細胞の水腫様変性と脾の限局したうっ血があった。肝の電子顕微鏡所見では、細胞質 glycogen area の拡大がみられたことから、検体による肝の糖質代謝に対する何らかの影響が考えられるが、この変化は形態的には可逆的範囲を超えない程度のものであった。また GOT, GPT, LDH の上昇は、この肝の変化のみならず、投与部位の骨筋壊死による影響をもいく分反映して現われたものと思われた。上記変化は ABPC 1000mg/kg 投与でも同程度に認められた。T-1220 250mg/kg 投与群では検体投与に起因すると思われる異常がなかった。

結論

- 1) T-1220 250mg/kg, 1000mg/kg を 1 群 3 頭の雌性ビーグル犬に 1 カ月間筋肉内投与した。対照薬として ABPC 1000mg/kg を同様に投与し、対照群には生理食塩水を投与した。
- 2) T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与群では、投与後激しい痛みを表わす症状がみられ、剖検では投与局所の筋肉に出血、壊死が認められたが、その程度は両検体間に差がなかった。
- 3) T-1220 および ABPC の 1000mg/kg 投与群で、

GOT, GPT, LDH の中等度上昇が一過性にみられ、肝の組織学的検査では肝細胞の水腫様変性が認められたが、肝細胞索の配列は正常であった。その程度には両検体間に差がなかった。

4) T-1220 250mg/kg 投与群には検体投与に起因する異常がなかった。

謝 辞

実験の遂行にあたり、組織標本の観察、診断と校閲を賜わった金沢大学医学部第2病理学教室太田五六教授と、腸内細菌叢の検査に関して、実験、解析全般にわたってご協力を頂いた東京医科歯科大学医学部微生物学教室中谷林太郎教授、ならびに千田俊雄、石津景子の各氏に深甚なる感謝の意を表します。

また、協力を頂いた当研究所 中田弘子、大森雅春、荒井博敏、池上輝久、中村昌三、稻場淳子、伊山照美、鷲塚康子、古川裕美、折川真佐子の各氏に感謝します。

文 献

- 1) 高井 明、米田豊昭、中田弘子、正谷博之、室田恒夫、柴田哲夫、中村昌三、河村泰仁、佐藤 盛：T-1220 の毒性試験（第1報）、マウス、ラット、イス、サルにおける急性毒性試験。Chemotherapy 25(5) : 816~828, 1977
- 2) 高井 明、米田豊昭、中田弘子、正谷博之、柴田哲夫、河村泰仁、佐藤 盛：T-1220 の毒性試験（第2報）、ラット腹腔内投与における亜急性、慢性毒性試験。Chemotherapy 25(5) : 829~857, 1977
- 3) 高井 明、米田豊昭、正谷博之、柴田哲夫、河村泰仁、佐藤 盛、中田弘子、稻場淳子：T-1220 の毒性試験（第3報）、ラット静脈内投与における亜急性毒性試験。Chemotherapy 25(5) : 857~868, 1977
- 4) 光岡知足：腸内フローラの調べ方と決め方。腸管感染研究会編「感染モデルの組み方」。p. 165~192. 近代出版。1973
- 5) 高井 明、米田豊昭、中田弘子、室田恒夫、中村昌三、岡野悦子：T-1220 の局所刺激性試験。Chemotherapy 25(5) : 934~940, 1977

TOXICITY TESTS OF T-1220 (IV): SUBACUTE TOXICITY OF T-1220 IN BEAGLE DOGS WITH THE INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION

AKIRA TAKAI, TOYOAKI YONEDA, YASUHITO KAWAMURA,
TETSUO SHIBATA, HIROYUKI MASATANI and SHIGERU SATO
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The subacute toxicity of T-1220 was tested using female beagle dogs treated with the daily intramuscular administration for a month, and compared with that of amebenylpenicillin (ABPC). T-1220 was injected to the dogs with daily doses of 250 and 1,000 mg/kg, and ABPC was with daily dose of 1,000 mg/kg. Control dogs were treated with physiological saline.

The results are as follows.

- 1) The signs showing severe pain were observed immediately after the administration in groups of T-1220 and ABPC, respectively, at 1,000 mg/kg.
- 2) The bacterial flora of the bowel of the beagle dogs treated with T-1220 for a month was examined. The administration of T-1220 produced a slight decrease in total number of organisms that was mainly due to the disappearance of *Bifidobacteria* and *Clostridia*.
- 3) The GOT, GPT and LDH increased slightly in groups of T-1220 and ABPC at 1,000 mg/kg. The histological examination, however, showed only hydropic changes of the hepatic cells and did not any inflammatory changes throughout the livers in both groups.
- 4) The group of T-1220 at 250 mg/kg had no abnormalities produced by the administration.