

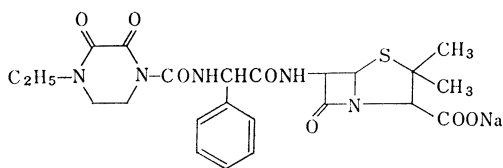
T-1220 の局所刺激性試験

高井 明・米田豊昭・中田弘子

室田恒夫・中村昌三・岡野悦子

富山化学工業株式会社総合研究所

T-1220 はグラム陽性菌および陰性菌にわたり幅広い抗菌スペクトルを有し、とくに緑膿菌および肺炎桿菌に対しすぐれた抗菌性を有する新しい抗生物質で、下記化学構造を有するアミノベンジルペニシリンの誘導体である。T-1220の局所刺激作用についてウサギ眼粘膜刺激、ラット皮内投与およびウサギ筋肉内投与刺激作用およびウサギ静脈内貯留法により検討したので、その結果を報告する。対照薬としてアミノベンジルペニシリン(ABPC)およびカルペニシリン(CBPC)を用いた。



T-1220: Sodium 6-[D(-)-α-(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)-α-phenylacetamido] penicillanate.

I. 実験材料および方法

1. ウサギ眼粘膜刺激作用

眼粘膜刺激作用は、FDA法¹⁾に準じ、1群6匹の雄性ウサギ(体重2.3~2.7kgの日本白色種)にT-1220の25%および50%水溶液を0.1ml点眼し、24, 48, 72時間後の作用を検討した。対照薬としてABPCおよびCBPCの50%水溶液を用い同様に実験した。

2. ラット皮内投与局所刺激作用

皮内投与局所刺激作用は、検体投与前日に腹部を剃毛したWistar系雄性ラット(体重490~570g)の腹部皮膚の左右各3カ所に検体を0.05mlずつ皮内注射し検討した。検体はT-1220, ABPCおよびCBPCの各25%, 35%および50%水溶液を用い、ラット腹部の1側に同一検体の3濃度を適用し、1匹のラットに2検体を組合わせ、1検体当たり6匹使用した。検体の皮内注射終了後直ちに2%エバンスブルー0.1ml/100gを尾静脈より注入し、検体投与部位の色素斑面積と色素量について測定した。検体投与部位の色素斑面積の測定は、各群の半数について3時間までは30分間隔で、3時間以後は1時間

間隔で5時間にわたり経時的に行なった。投与部位の色素量の測定は各群の残り半数を検体投与2時間後に屠殺し、局所の色素を抽出して行なった。その方法は色素斑部分の皮膚を切り取り、Benzalkonium chloride 5%水溶液とアセトンの1:4混合液10mlに一夜浸した後、さらに10mlの混合液を追加して、組織をホモジナイズし、汙液を610nmで比色を行ない、エバンスブルー溶液より作成した検量線より漏出色素量を求めた。

3. ウサギ筋肉内投与局所刺激作用

筋肉内投与局所刺激作用は、新谷らの方法²⁾に準じ、雄性成熟ウサギ(体重2.4~2.7kgの日本白色種)および離乳直後の幼若ウサギ(生後40日の日本白色種)の後肢大腿部外側広筋にT-1220およびCBPCのおおの25%および35%水溶液を1回および1日1回5日間連続注射し調べた。注射容量は成熟ウサギは1ml/bodyを用い、幼若ウサギでは外側広筋の重量が体重比ではほぼ成熟ウサギと一致しているため0.4ml/bodyとした。検体は左後肢大腿部外側広筋に注射し、右後肢には対照として生理食塩水を同様に注射した。局所刺激作用の評価は、

筋重量比 $\left(\frac{\text{検体投与筋の重量}}{\text{生理食塩水投与筋の重量}} \times 100 \right)$ 、下記の評

価基準による肉眼的評点法および組織学的観察により投与24時間後および7日後に行なった。なお、肉眼的評点基準については、24時間後と7日後では炎症のステージが異なるため、別々の基準を定めた。

(1) 検体投与24時間後の肉眼的評価基準

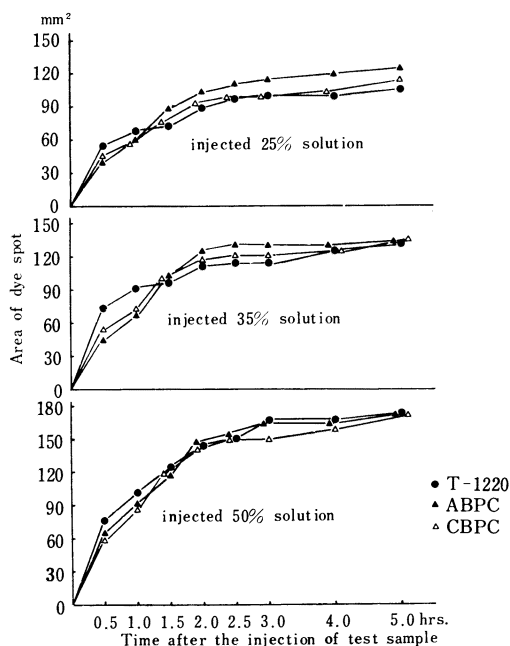
評点 肉眼的変化

- 0: 変化のないもの
- 1: 軽度の充血と変色が見られるもの
- 2: 中等度の充血と変色が見られるもの
- 3: 高度の充血と変色および限局した軽度の壊死が見られるもの
- 4: 高度の充血と筋肉の暗赤色変性および壊死巣の散在が見られるもの
- 5: 広範囲の壊死および筋肉の暗赤色変性、膿瘍、癒着、線維化が見られるもの

(2) 検体投与7日後の肉眼的評価基準

評点 肉眼的変化

Fig. 1 Area of dye spot at the site of the skin administered with test sample



0 : 変化のないもの

1 : 5 mm (2 mm)* 以下の結節および筋表面に軽度の出血がみられるもの

2 : 5~10 mm (2~4 mm) の結節および筋肉に軽度の出血がみられるもの

3 : 10~20 mm (4~8 mm) の結節および筋肉に中等度の出血がみられるもの

4 : 20 mm (8 mm) 以上の結節および筋肉に高度の出血がみられるもの

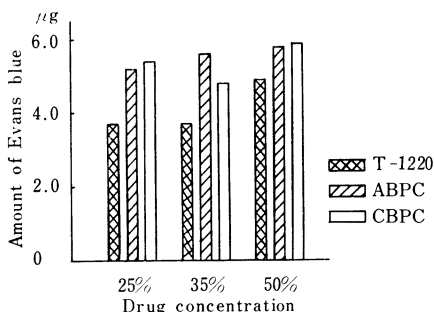
5 : 20 mm (8 mm) 以上の結節および膿瘍、線維化がみられ、中心部の壊死、癒着が高度なもの

* : () 内には幼若ウサギの場合の評価基準を示す。

4. ウサギ静脈内貯留局所刺激作用

静脈内貯留局所刺激作用は、府川らの方法³⁾に準じ、1群5匹の雌性成熟ウサギ(体重2.3~2.7 kgの日本白色種)の耳介後静脈腔にT-1220の20%水溶液を一定時間貯留させ、静脈壁、周囲組織におよぼす影響および血栓形成について検討した。実験方法は耳介右側後静脈をクリップで止血し、心臓側から検体0.025 mlを注入する。検体注入直後心臓側3 cmの部位を同様にクリップで止血し、この血管腔内にさらに検体0.025 mlの注入

Fig. 2 Leakage of Evans blue in the region administered with test sample



Amount of Evans blue is represented in average of 3 experiments.

を行ない、3分間貯留させた後、両方のクリップをはずし血流をもどした。同一部位でこの操作を3時間毎に1日3回、3日間続けて行なった。左側耳介後静脈には対照として生理食塩水を同時に注入し、同様に処置した。評価は炎症部位の面積および血栓の有無とその長さについて、検体注入前と1日3回注入終了2時間後の1日4回、3日間行なった。なお、血栓の長さについては触診によって血管腔に凝血塊を確認した部分を測定した。局所部位は10%ホルマリンで固定し、組織学的検査を行なった。対照薬としてABPCおよびCBPCを用い同様に実験を行なった。また、positive controlとして4% Bromsulphalein (BSP)を使用した。

II. 実験結果

1. ウサギ眼粘膜刺激作用

結膜の軽い充血がT-1220の50%水溶液点眼48時間後の検査で6例中1例、ABPCおよびCBPCの50%水溶液点眼24時間後の検査でおのおの6例中1例にみられた以外に、特記すべき変化はなかった。

2. ラット皮内投与局所刺激作用

検体投与部位の色素斑面積はFig. 1に示すように投与3時間後まで徐々に拡張し、以後これが維持される傾向を示し、5時間後の面積はほぼ検体濃度に比例して大きくなっていった。また、T-1220の25%、35%および50%の各濃度における色素斑面積はABPCおよびCBPCの同一濃度との間に差がみられなかった。

検体投与2時間後の皮膚漏出色素量はFig. 2に示す。T-1220は25%、35%、50%の各濃度においてABPCおよびCBPCの同一濃度よりも、わずかに低い値を示した。しかし、検体濃度と漏出色素量は比例しなかった。

3. ウサギ筋肉内投与局所刺激作用

Table 1に示すように成熟ウサギに対するT-1220の

Table 1 Local irritation effect of T-1220 after intramuscular injection in rabbit (M. vastus lateralis)

Test sample	Dose frequency and time after final injection	Adult rabbit			Juvenile rabbit		
		Number of animals	Muscle weight ratio (mean $\pm$ S.E.)	Irritation score (mean)	Number of animals	Muscle weight ratio (mean $\pm$ S.E.)	Irritation score (mean)
25% T-1220 25% CBPC	Single injection						
	24 hrs. after	3	107.1 $\pm$ 0.16	1.0	5	116.4 $\pm$ 1.55	2.8
25% T-1220 25% CBPC	24 hrs. after	3	120.3 $\pm$ 3.62	4.0	5	115.0 $\pm$ 3.04	3.2
25% T-1220 25% CBPC	7 days after	3	99.2 $\pm$ 0.90	1.3	4	100.0 $\pm$ 1.21	1.3
	7 days after	3	103.0 $\pm$ 1.03	2.3	5	106.1 $\pm$ 2.21	2.8
35% T-1220 35% CBPC	24 hrs. after	—	—	—	5	108.8 $\pm$ 2.78	2.8
	24 hrs. after	—	—	—	5	113.6 $\pm$ 1.60	3.4
35% T-1220 35% CBPC	7 days after	—	—	—	4	100.7 $\pm$ 7.62	2.3
	7 days after	—	—	—	5	110.5 $\pm$ 6.42	2.6
25% T-1220 25% CBPC	5 daily injections						
	24 hrs. after	3	134.5 $\pm$ 12.42	3.0	4	137.1 $\pm$ 4.73	3.5
25% T-1220 25% CBPC	24 hrs. after	3	156.2 $\pm$ 5.57	4.7	5	147.3 $\pm$ 2.71	4.4
25% T-1220 25% CBPC	7 days after	3	99.1 $\pm$ 1.35	1.7	3	103.6 $\pm$ 1.28	2.0
	7 days after	3	97.9 $\pm$ 2.44	2.7	4	105.2 $\pm$ 4.28	3.8

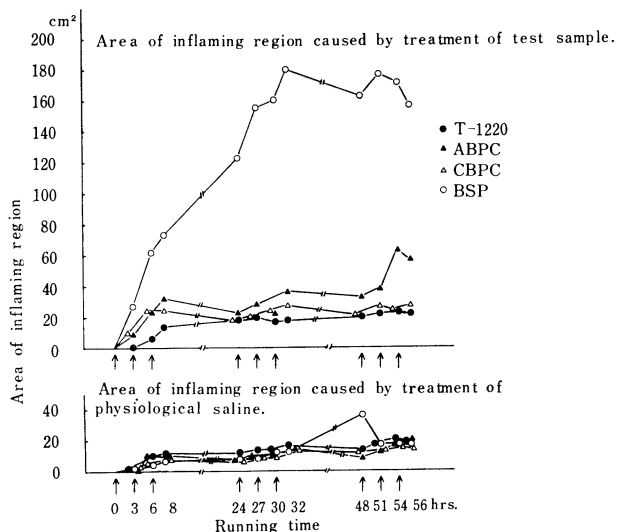
局所刺激作用は筋重量比，肉眼的評点とも1回投与24時間後，7日後の判定で，対照薬として使用したCBPCよりも弱い結果を得た(Photo. 1, 2, 3, 4)。しかし，5回連続投与24時間後，7日後の判定では，1回投与でみられたほどの明瞭な差が認められなかった。また，幼若ウサギに対するT-1220 1回投与24時間後，7日後および5回連続投与24時間後，7日後の局所刺激作用は，T-1220とCBPCの間に明瞭な差はないが，わずかにT-1220の方が弱い傾向を示した。

組織学的観察ではT-1220およびCBPC投与群の間に組織障害作用の質的な相違は認められず，出血，充血，浮腫，筋線維の変性壊死，細胞浸潤，投与部位周辺の肉芽形成，線維化などの炎症反応が全体に認められた。すなわち，1回投与24時間後ではすでに投与部位に筋壊死と肉芽形成がみられ(Photo. 5)，5回連続投与24時間後ではその程度がさらに強く現われていた(Photo. 6)。1回投与，5回連続投与7日後の所見では，充血や出血は軽減されていたが線維化はさらに進んでおり，癒着化への過程を示していた(Photo. 7)。

4. ウサギ静脈内貯留局所刺激作用

Fig. 3に肉眼的に判定した炎症部位の面積について1群5例の合計で示した。BSPを処置した positive control 群は，強い局所刺激作用による血管周囲の炎症が認められた。しかし，T-1220では3日

Fig. 3 Inflammation caused by T-1220 in rabbit



Test sample was allowed to remain in the sealed section of V. auricularis caudalis in rabbit for 3 min. after injection. Arrow indicates the time of this treatment. In each group, the area of inflaming region is represented in total of 5 rabbits.

Photograph of the *M. vastus lateralis* injected with T-1220 in rabbit. In each photograph, right side is test sample injected muscles and left side is physiological saline.

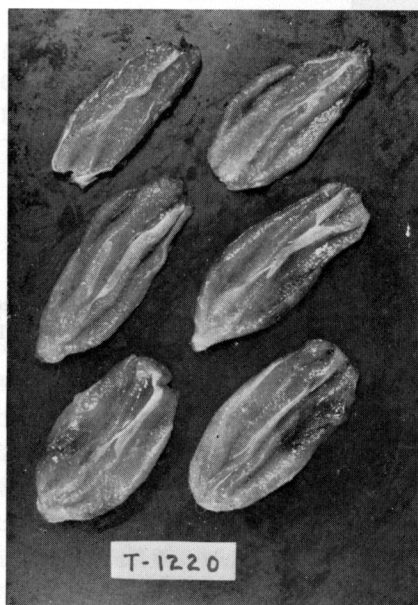


Photo. 1 24 hrs. after single injection of T-1220 (25% sol. 1 ml/body).

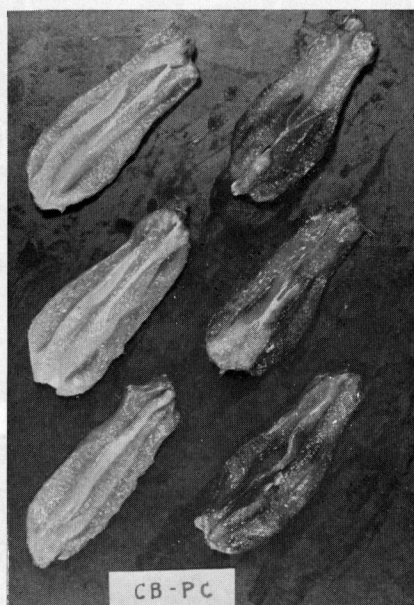


Photo. 2 24 hrs. after single injection of CBPC (25% sol. 1 ml/body).

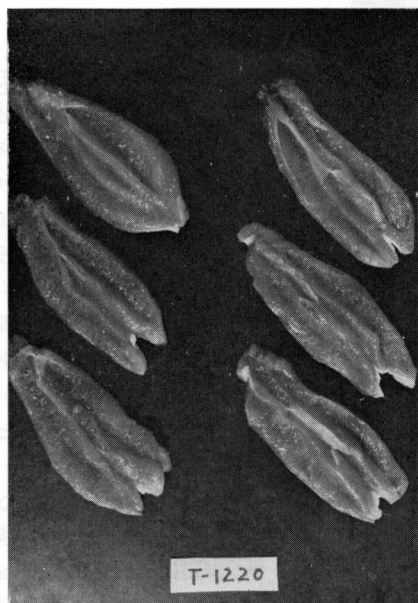


Photo. 3 7 days after single injection of T-1220 (25% sol. 1 ml/body).

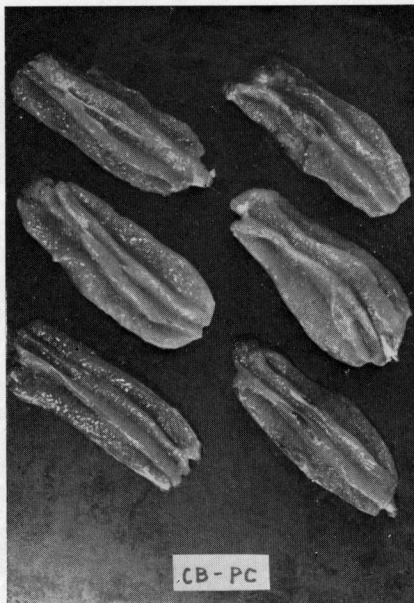
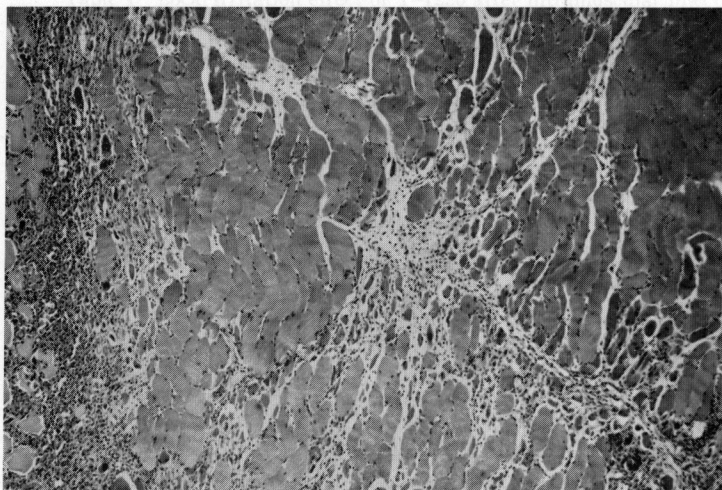


Photo. 4 7 days after single injection of CBPC (25% sol. 1 ml/body).



Photomicrograph of the M. vastus lateralis injected with T-1220 in rabbit

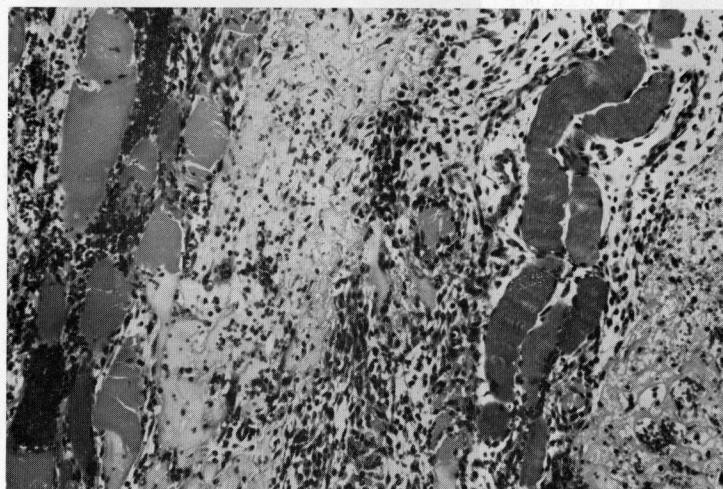


Photo. 5 24 hrs. after single injection of T-1220 (25% sol. 1 ml/body).

H. E. staining $\times 40$

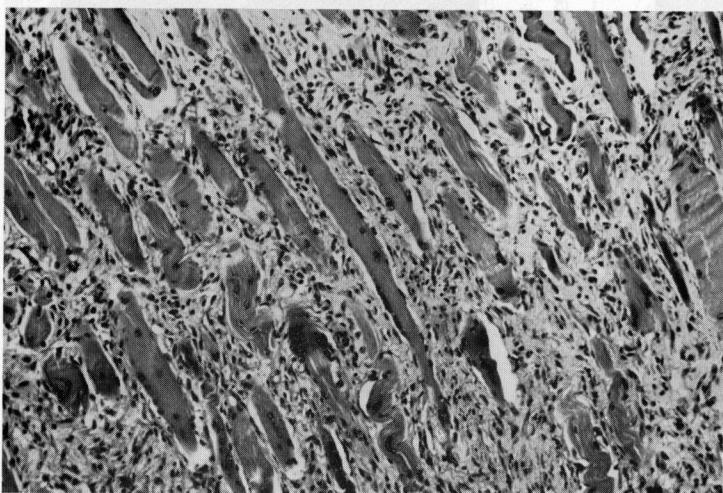


Photo. 7 7 days after single injection of T-1220 (25% sol. 1ml/body).

H. E. staining $\times 100$

Table 2 Frequency of thrombogenesis in 5 rabbits of each group

Time Sample	0	3	6	8	24	27	30	32	48	51	54	56 hrs.
T-1220	0(0)	2(0)	1(0)	0(0)	2(0)	2(1)	2(1)	2(1)	4(2)	4(4)	4(2)	4(4)
ABPC	0(0)	3(2)	3(1)	3(0)	4(0)	5(0)	5(0)	5(2)	5(2)	5(3)	5(2)	5(2)
CBPC	0(0)	2(0)	3(0)	3(0)	3(0)	4(0)	4(0)	5(3)	5(1)	5(3)	5(3)	5(2)
BSP	0(0)	5(0)	5(1)	5(1)	5(1)	5(1)	5(1)	5(1)	5(3)	5(3)	5(1)	5(0)

Test sample was treated in the same section of the vein at 0, 3, 6, 24, 27, 30, 48, 51, 54 hrs. The frequency of control is put in parentheses.

間にわたり処置を重ねても血管周囲の炎症の増強がみられず、対照薬のABPCおよびCBPCよりわずかに弱い反応を示した。

Table 2に1群5例中の血栓形成頻度、Fig. 4に血栓の長さを1群5例の合計で示した。BSP処置群は1日目ですでに高度の血栓形成が認められた。T-1220処置群は軽度の血栓形成がみられたが、生理食塩水を投与した対照側との間に差は認められなかった。対照薬として使用したABPCおよびCBPCも血栓形成が認められたが、その程度はBSP処置群よりも弱かった。

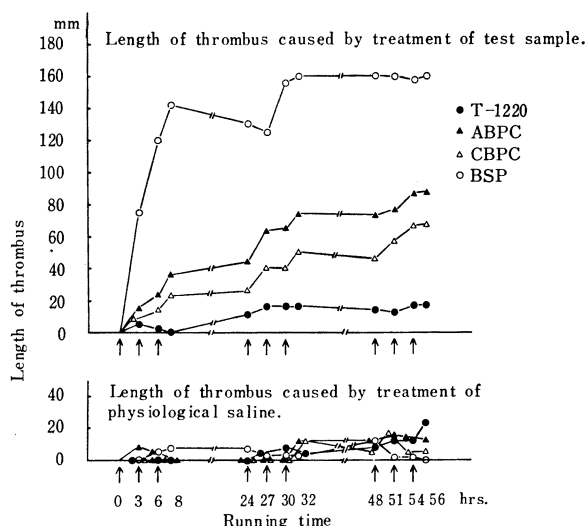
局所血栓について組織学的にみると、血管腔内には凝血および凝集赤血球と血小板の混合血栓が閉塞性に認められた。血管周囲組織には充血、出血、浮腫、細胞浸潤および軽度の線維化などの急性炎症の像が現われていた。

III. 総括および考察

T-1220の局所刺激作用についてウサギ眼粘膜、ラット皮内投与および推定される臨床適用経路のウサギ筋肉内投与、ウサギ静脈内貯留処置により検討した。T-1220のウサギ眼粘膜に対する刺激作用は極めて弱く、50%溶液の点眼でもみるべき炎症性の反応がなかった。ラット皮内投与での刺激作用は濃度に比例して作用が強くなる傾向があったが、その程度はABPCおよびCBPCとほぼ同程度であった。成熟ウサギに対する筋肉内投与での局所刺激作用は、1回投与ではT-1220が若干CBPCより弱かったが、5回連続投与では殆ど両検体間に差はみられなかった。幼若ウサギに対する局所刺激作用はT-1220、CBPC間に明瞭な差はなかった。また、その炎症性変化は成熟ウサギと類似しており、幼若ウサギに対する特異的な変化は認められなかった。T-1220のウサギ耳介血管およびその周囲組織に対する刺激作用はABPCおよびCBPCよりも若干弱い結果が得られた。また、T-1220の血栓形成作用は、生理食塩水を処置した対照側と差がなく、ABPCおよびCBPCよりも弱かった。

以上の結果から、T-1220に局所刺激作用があること

Fig. 4 Thrombogenesis induced by T-1220 in rabbit



Test sample was allowed to remain in the sealed section of V. auricularis caudalis in rabbit for 3 min. after injection. Arrow indicates the time of this treatment. In each group, the length of thrombus is represented in total of 5 rabbits.

は否定できないとしても、その程度はABPCおよびCBPCよりも若干弱いか、あるいは同程度と思われた。とくに筋肉内投与では新谷らの報文²⁾における“moderateな刺激”に相当していることを考慮すると、人に対しての筋肉内投与は慎重に行なった方がよいと思われた。

結 論

T-1220の局所刺激作用についてABPCおよびCBPCを対照として検討し、次の結果を得た。

1) ウサギ眼粘膜刺激作用は、T-1220の50%水溶液を点眼しても特記すべき変化はみられなかった。

2) ラット皮内投与局所刺激作用は、検体の25%、35%、50%水溶液を投与した結果、T-1220はABPCおよびCBPCとほぼ同程度であった。

3) ウサギ筋肉内投与における局所刺激作用は、検体の25%, 35%水溶液を投与した結果、T-1220はCBPCよりもわずかに弱い作用を示した。また、成熟ウサギと幼若ウサギでは、その反応に差が認められなかった。

4) ウサギ耳介静脈内貯留における局所刺激作用は、検体の20%水溶液を貯留させた結果、T-1220はABPCおよびCBPCよりもわずかに弱いか、あるいは同程度の作用を示した。また、血栓形成作用もT-1220はABPCおよびCBPCより弱い作用を示した。

稿を終るにあたり、本実験遂行に協力していただいた杉谷美登利、岡崎和子の各氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 小川俊太郎, 松田弘幸: 眼刺激性判定試験。The Journal of Pharmacy 20: 329~342, 1969
- 2) SHINTANI, S.; M. YAMAZAKI, M. NAKAMURA & I. NAKAYAMA: A New Method to Determine the Irritation of Drugs after Intramuscular Injection in Rabbits. Toxicology and Applied Pharmacology 11: 293~301, 1967
- 3) 府川和永, 伊藤義彦, 三崎則幸, 野村聡子: 静脈注射による血栓性静脈炎に関する実験的研究。日薬理誌71: 307~315, 1975

STUDIES ON LOCAL IRRITATION EFFECT OF T-1220

AKIRA TAKAI, TOYOAKI YONEDA, HIROKO NAKADA,
TSUNEO MURODA, SHOZO NAKAMURA and ETSUKO OKANO
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The local irritation effect of T-1220 was investigated as compared with that of ABPC or CBPC. The results obtained are as follows.

1) 25 and 50% solution of T-1220 and 50% solutions of ABPC or CBPC were dropped in the lower eyelid of rabbits. Appreciable inflammation of the cornea and conjunctiva was not caused by the solutions.

2) 25, 35 and 50% solutions of T-1220, ABPC or CBPC were administered intracutaneously to the abdominal skin of rats, and thereafter Evans blue was injected intravenously to the same rats. In the region administered with test sample, the area of dye spot and the amount of Evans blue were measured, and the results indicated that the local irritation effect of T-1220 was almost equal to that of ABPC or CBPC.

3) 25 and 35% solutions of T-1220 or CBPC were administered intramuscularly to adult and juvenile rabbits. Judging from the examinations, muscle weight, gross local reaction and the histological observation, the local irritation of T-1220 was a little milder than that of CBPC. The inflammatory reactions on the drugs were almost similar in adult and juvenile.

4) In the ear of rabbits, 20% solutions of T-1220, ABPC and CBPC were allowed to remain in the sealed section of the vein. The frequency of thrombogenesis, length of thrombus, area of inflaming region and histological observation were examined. The results showed that local irritation effect of T-1220 was a little milder or equal to that of ABPC or CBPC.