

Cefotiam (SCE-963) の亜急性および慢性毒性試験

高野 喜一

武田薬品工業株式会社中央研究所薬剤安全性研究所

Cefotiam (CTM, SCE-963) は当社中央研究所で合成された *e* phalosporin 系抗生物質である。本剤の亜急性および慢性毒性試験を各種の実験動物を用いて実施したので、その結果の概要を報告する。

I. 材料および方法

実施した7種の試験の内容を Table 1 に要約した。

1. 使用動物

a) ラット：当薬剤安全性研究所において閉鎖環境下で生産された Ta: Wistar ラットを用いた。いずれも、1週間一般症状の観察を行って異常の認められなかった動物について、5週齢から投薬実験を開始した。同性の2匹ずつを金属ケージに入れ、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の閉鎖環境動物室内で飼育した。飼料には固型飼料 (CE-2, 日本クレア) を高圧加熱滅菌 (121°C , 20分) 後細粉化したものを用い、水道水とともに自由に摂取させた。

b) イヌ：6~7カ月齢のビーグル犬 (日本 EDM) を使用した。これらの動物は、3週齢時にイヌシステンパーおよび伝染性肝炎の混合ワクチンの接種を受け、購入時 (5~6カ月齢) におけるブルセラ・カニス (血清) および内部寄生虫 (糞便) の検査結果はいずれも陰性であった。動物は自動水洗式個別金属ケージに入れ、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の動物室内で飼育した。飼料には、固型飼料 (CD-5, 日本クレア・雄, 270g, 雌, 250g) と缶詰肉 (Kalkan®, Kalkan Foods Co. 雌雄とも各 100g) とを混合し、毎日1回投薬処置直後に与えた。また、給水ノズルから水道水を自由に摂取させた。

c) サル：マレーシアあるいはインドネシア産のカキイザル (*Macaca irus*) の成体を使用した。体重は、実験開始時、雄：3.0~6.8kg, 雌：2.3~5.5kg であった。これらのサルは輸入後2~3カ月間静岡県実験動物農業協同組合で検疫 (ツベルクリン反応, 赤痢その他の疾病検査) を受けた。その後さらに当薬剤安全性研究所において2カ月間の検疫および健康管理 (体重, 一般状態, 血液検査) を行った。動物は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の動物室の自動水洗式個別ケージに収容し、固型飼料 (オリエンタル製, 雌雄とも 100g) とサツマイモ (雄, 250~350g; 雌, 200~300g) とを毎日与えた。水

は水道水を自由に摂取させた。

2. 検体およびその投与方法

CTM (free form, Lot Nos. 127~188, PDH-28 RZ) および CTM・2HCl (Lot Nos. PDH-52~80, 150, 151) を使用した。CTM (free form) は局方生理食塩液に溶解した。CTM・2HCl はその重量の24.6%に相当する Na_2CO_3 を加え注射用蒸留水に溶解した (注射用 CTM)。各実験における、CTM (free form として) の溶液の濃度および検体投与量を Table 1 に示した。Table には記載されていないが、対照群には局方生理食塩液を実験群におけると同じ経路で投与し、また一部の試験 (Table 1 の 1, 6) には比較対照薬として CET (ケフリン®, 塩野義製薬, Lot Nos. KF-5015, 5029, 5040) を投与した群を設けた。

筋肉内注射 (im) の場合は、いずれの動物種においても原則として大腿筋肉内に左右交互に、また静脈内注射 (iv) は、イヌでは橈側皮静脈に左右交互に、サルでは両側の前腕正中皮静脈および小伏在静脈および尾静脈に順次行った。原則として週7日の連日投与としたが、ラットおよびイヌにおける6か月投与試験 (Table 1 の 2, 5) では各週6日投与とした。

3. 検査項目

a) 一般症状, 体重および摂餌量：原則として、一般症状は毎日投与前後に観察し、体重は週2回 (イヌ6か月投与試験では投与2か月目以降週1回)、摂餌量はラットでは週2回イヌおよびサルでは毎日、測定した。

b) 尿検査：検査時期は、投薬開始前 (ラットを除く)、投薬期間終了時および回復期間終了時のほか、原則として、1か月試験では投薬1, 2週, 6か月試験では投薬1, 3か月に、それぞれ中間検査を行った。

ラットでは3~4時間尿, イヌおよびサルでは24時間尿を用い、pH, 蛋白, 糖, ケトン体, 潜血およびウロビリノーゲンを尿試験紙 (URO-LABSTIX®, マイルス・三共) で測定した。本法で蛋白反応が陽性の場合には、スルホサリチル酸法を用いて再度尿蛋白を検査した。なお一部の試験では、尿中の Na, K, Cl を血液生化学検査における同じ方法を用いて測定した。さらに、1000r.p.m. で5~10分間遠心して得た尿沈査について、円柱, 上皮細胞および血球の有無を顕微鏡にて検査

した。

c) 血液検査: 投薬開始前(ラットを除く), 投薬期間終了時あるいは回復期間終了時のほか, 原則として, 1カ月試験では投薬1, 2週, 6カ月試験では投薬1, 3カ月に, それぞれ中間検査を行った。

ラットではエーテル麻酔下にて腹大動脈より, イヌでは腕側皮静脈, サルでは大腿静脈より, それぞれヘパリン添加注射筒を用いて採血した。その一部を血液一般検査に, 残りは 3000 r.p.m. にて10分間遠沈して血漿を分離し血液生化学検査に供した。

赤血球, 白血球および血小板数は自動血球計数器(C-1002型, 東亜医用電子)を用い, ヘマトクリット値はマイクロヘマトクリット法, ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン法にて測定した。白血球百分比は血液塗抹標本の May-Giemsa 複染色, 検鏡により測定した。

血液生化学検査は, Ca, 糖, 尿素窒素, 尿酸, クレアチニン, 総ビリルビン, アルカリホスホターゼ(ALP), 乳酸脱水素酵素(LDH), トランスアミナーゼ(GPT, GOT)についてオートアナライザー(SMA 12/60, Technicon)を用いて行い, 総蛋白はビウレット法, 総コレステロールは Cholesterol C-Test Wako(和光純薬)で測定した。Na および K については原子吸光フレイム分光光度計(AA-600型, 島津), Cl はクロライドメーター(C-50, 常光産業)にてそれぞれ測定した。また血清のアルブミンおよびグロブリン画分の各蛋白組成はセルローズ・アセテート膜(Sartorius)電気泳動法による分画後, デンシトメーター(Densitometer Quick, アタゴ光機)で測定した。

d) 眼科学的検査: イヌ1カ月筋注および静注試験では高用量群および対照群について投薬期間の前後に, イヌ6カ月静注試験では全例について実験開始前, 投薬1, 3, 6カ月目に, 散瞳剤(ミドリンP®, 参天製薬)を点眼し, 手持式眼底カメラ(RC-2, 興和)を用いて眼底検査を実施した。イヌ6カ月試験ではこの際, 細隙灯(SL-2, 興和)を用いる観察も併せて実施した。

e) 骨髄検査: 後述する骨髄の病理組織学的検査に加えて, サル1カ月静注試験の高用量群, 中用量群, 対照群の一部の動物について実施した。大腿骨中央部の骨髄の塗抹検本に May-Giemsa 染色および Schilling's brilliant cresyl blue-Giemsa 染色を施し, 各個体毎に1000個の骨髄構成有核細胞を観察し, 同定分類した。

f) 剖検: 最終投薬後約24時間目, あるいは休薬期間終了時に, ラットはエーテル麻酔, イヌはペントバルビタール(大日本製薬)麻酔, サルはケタラルール(三共)麻酔下にてそれぞれ放血死させ, 投与局所および内臓諸

器官を観察した。脳, 心, 肺, 肝, 腎, 脾, 膵(イヌのみ), 顎下腺(ラット), 盲腸(ラット), 下垂体, 胸腺, 甲状腺, 副腎, 精巣/卵巣, 前立腺(ラット, イヌ), 子宮(イヌ, サル), およびカルカスについては各個体別に重量を測定した。

g) 病理組織学的検査: すべての動物種において, 前項にその器官名を掲げた諸臓器を対象としたほか, 舌(サル), 食道(サル), 胃, 小腸, 大腸, 膀胱, リンパ節, 骨髄, および筋肉内注射の場合にはその投与局所を10%中性緩衝ホルマリンで固定し, パラフィン包埋後4 μ に薄切し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。腎および肝については, 別途カルノア固定によるPAS染色を行うとともに, ホルマリン固定・凍結切片につき Sudan III 染色あるいは Sudan black B 染色を行った。その他, 必要に応じ, Schmorl 反応, ベルリン青反応, Masson trichrome 染色, アザン染色などを実施した。

h) 酵素組織化学的検査: 一部の動物の肝および腎について, acid phosphatase (ACP), ALP, および succinate dehydrogenase (SDH) の組織内活性分布を検索した。放血屠殺直後の肝・腎の一部をイソペンタン/ドライアイス・アセトンで凍結後, 10 μ の凍結切片を作製して所定の液に浸漬し, ACP は Barka-Anderson 法, ALP は Gomori 法, SDH は Nachlas らの方法で検出した。

i) 電子顕微鏡的検査: ラット筋注1カ月試験およびイヌ6カ月静注試験における高用量群および対照群の一部の個体の肝および腎について通常の方法で実施した。

II. 実験成績

1. ラットにおける1カ月筋肉内投与毒性試験およびその回復試験

CTM (free form) 100, 300, 1000 および 3000mg/kg/day を5週齢の Ta: Wistar ラットに1カ月間連日筋肉内に投与してその毒性を検討し, 対照薬 CET との比較を行うとともに, 1~3カ月休薬後の回復性についても検索した。

死亡例はいずれの群においても認められなかった。3000mg/kg 群では投薬1~2週目以後に腹部膨満と投与局所の脱毛が発現し, 貧血, 血清 GOT および GPT の軽度な増加, アルブミンおよびA/G比の軽度な低下, 腎重量の増加などが認められた。組織学的には, 腎の近位尿細管上皮細胞内に Schmorl 反応陽性の褐色顆粒(heterolysosome と考えられる)が多数認められ, また投与局所の筋肉内および筋間結合織に小出血斑, 肉芽組織および線維増生が認められた。1000mg/kg 群に

Table 1 Summary of subacute and chronic toxicity studies on CTM

Study number	Species (strain or breed)	Route of dosing	Period of dosing (months)	No. of animals in each group	Dosages (mg/kg/day)	Concentration of CTM in solution (%)	Local lesion	Target organs at high dose	Maximum non-toxic dose (mg/kg/day)
1	Rats (Ta : Wistar)	im	1	20 ♂ & 20 ♀ (10 ♂ & 10 ♀ for recovery study)	100 300 1000 3000	2 6 20 60	minimal minimal slight moderate	kidney & liver (?)	300
2	Rats (Ta : Wistar)	im	6	10 ♂ & 10 ♀	30 100 300 1000	3 10 30 50	minimal minimal slight moderate	kidney	100
3	Dogs (beagle)	im (sc for high dose)	1	3 ♂ & 3 ♀	100 300 1000	50 50 50	minimal slight moderate	kidney	300
4	Dogs (beagle)	iv	1	3 ♂ & 3 ♀	100 300 1000	20 20 20	— — —	kidney	300
5	Dogs (beagle)	iv	6	3 ♂ & 3 ♀	30 100 300	10 10 10	— — —	kidney	100
6	Monkeys (cynomolgus)	im	1	3 ♂ & 3 ♀	100 300 1000	50 50 50	slight moderate moderate	kidney & liver	100
7	Monkeys (cynomolgus)	iv	1	3 ♂ & 3 ♀	100 300 1000	10 10 10	— — —	kidney & liver	100

おいても、3000mg/kg 群にくらべてより軽度ではあるが、ほぼ同様な所見が認められた。

CET 1000mg/kg 投与群においても、投薬期間終了時において血清 GOT および GPT の軽度な増加があり、腎および投与局所に CTM 投与群におけると同様な組織学的所見が認められた。

休薬1カ月後において、腎における Schmorl 反応陽性顆粒のわずかな残存を除き、上記の所見はいずれの投薬群においても消失し、休薬3カ月後には腎所見もほとんど全ての例において正常に復した。

以上の結果から、本実験条件における CTM の最大無毒性量は 300mg/kg/day と判断され、また CTM と CET との間にラットに対する毒性に関して差はないと判断された。

2. ラットにおける6か月筋肉内投与毒性試験

CTM (free form) 30, 100, 300, および 1000mg/kg/day を5週齢の Ta:Wistar ラットに6か月間筋肉内投与した。

投薬期間中、死亡例はいずれの実験群にも認められず、また一般症状にも異常はなかった。

血液学的検査にて、ごく軽度な貧血と血清蛋白の減少が 1000mg/kg 群に認められたが、300mg/kg 以下では異常はみられなかった。腎重量の軽度な増加が 300 および 1000mg/kg 群にみられた。なお、100mg/kg 以上の投与量で腎の近位尿細管上皮に heterolysosome と考えられる色素顆粒が認められたが、この所見は毒性を示唆するものとは考えられなかった(考察参照)²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。

投与局所において、筋線維の変性と壊死、肉芽組織の形成がみられ、300 および 1000mg/kg 群では対照群にくらべて著しい変化を示していた。

以上の成績から、本実験条件下における CTM の最大無毒性量は 100mg/kg/day と結論した。

3. イヌにおける1カ月筋肉内(皮下)投与毒性試験

CTM (free form) 100, 300, および 1000mg/kg/day を6か月令のビーグル犬に1カ月間毎日筋肉内(1000mg/kg は投与量が多いため皮下)に投与した。

一般症状として、流涎が主に 1000mg/kg 群に認められ、投薬日数が進むにつれて著明になった。このほか、眼瞼周囲の潮紅と腫脹、腹部の潮紅および嘔吐が 300mg/kg 以上の投薬群の一部に観察されたが、これらの症状は各投薬後1時間以内に消失し、投薬日数の経過とともに軽減する傾向がみられた。体重、摂餌量、眼底所見、尿検査成績には異常は認められなかった。

血液検査では、1000mg/kg 群に軽度な貧血、血清 L DH, ALP, GOT および GPT の上昇、アルブミンお

よび A/G 比の減少が認められた。300mg/kg 以下の投与量ではこのような異常は認められなかった。

1000mg/kg 群において腎重量の軽度な増加が認められ、組織学的に近位尿細管上皮細胞内にラットにおいて認められたものと同様な褐色顆粒の沈着が認められた。また、投与局所における出血、炎症性細胞浸潤、肉芽形成も認められた。300mg/kg 群においても同様な変化が認められたが、1000mg/kg 群に比べその変化はきわめて軽微であった。

以上の結果から、本実験条件における CTM の最大無毒性量は 300mg/kg/day と判断した。

4. イヌにおける1カ月静脈内投与毒性試験

CTM (free form) 100, 300, および 1000mg/kg/day を6~7か月齢のビーグル犬に1カ月間毎日静脈内注射した。

300mg/kg 群の一部および 1000mg/kg 群の全例において、投薬期間の初期から流涎が認められ、また耳介、顔面あるいは腹部の潮紅ないし腫脹が各群に散見された。体重、摂餌量、眼底、血液および尿の検査成績にはいずれの例にも異常は認められなかった。

1000mg/kg 群においては、病理組織学的検査にて、腎の近位尿細管上皮における褐色顆粒の沈着、および脾リンパ節の軽度な肥大が認められた。

以上の成績から、本実験条件における CTM の最大無毒性量は 300mg/kg/day と判断した。

5. イヌにおける6カ月静脈内投与毒性試験

注射用 CTM の遊離体換算量 30, 100, および 300mg/kg/day を7か月齢のビーグル犬に6カ月間静脈内投与した。

一般症状として、投薬群全例において、投薬中から投薬直後にかけて、耳介および顔面の皮膚に種々の程度の潮紅が認められた。各群6(雄3, 雌3)例中、30mg/kg 群の2例、100mg/kg 群の1例、300mg/kg 群の5例においては、投薬日数の経過にともない潮紅は全身性となり、耳介および顔面の浮腫および脱毛も認められた。これらの動物の病理組織学的所見として、とくに 300mg/kg 群において、表皮に肥厚および単核円形細胞浸潤、アポクリン汗腺および皮脂腺の肥大増殖が認められた。これらの変化は、別途検索の結果、アレルギー反応によるものではなく、薬剤が皮膚組織内の mast cell に直接作用し、mast cell から遊離したヒスタミンの作用に由来するものであり、イヌにのみみられる種特異的な現象と判明した。

体重、摂餌量、眼底および尿の検査成績に関しては、いずれの実験群においても異常は認められなかった。血液検査では、300mg/kg 群の雄2例に赤血球数の軽度な

減少が認められたが、その他の個体では投薬の影響を示唆する異常は認められなかった。病理組織学的検査では、主として 300mg/kg 群において、腎の近位尿管上皮にラットにおいて認められたものと同様な ACP 活性をもつ褐色顆粒の沈着が認められ、電顕では dense body (lysosome) の増加および apical vacuole の拡張がみられた。これらの腎の所見は毒性を示唆するものではなく、検体の腎からの排泄に関連した変化と判断された⁵⁾。

以上の結果から、本実験条件における CTM の最大無毒性量は、300mg/kg 群における皮膚の所見を考慮して、100mg/kg/day であると結論した。

6. サルにおける1カ月筋肉内投与毒性試験

CTM (free form) 100, 300, および 1000mg/kg/day を成熟カニクイザルに5週間連日筋肉内投与を行ってその毒性を検討するとともに、対照薬 CET(1000mg/kg, 皮下投与)との比較を行った。

1000mg/kg 群の雄2例および雌1例は、摂餌量の減少、下痢、体重減少を示し、著しく衰弱したため、それぞれ4, 5および13日間投与後に切迫屠殺した。これらの動物ではいずれも、貧血、血清アルブミンおよび A/G 比の減少、血糖、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、GOT および LDH の上昇が認められた。さらに病理組織学的検査において、腎近位尿管上皮の壊死および再生、細胞性円柱や硝子様円柱の増加、肝細胞の混濁腫脹と脂肪化、投与局所の出血、肉芽組織の増生、筋線維の壊死が観察された。

投薬期間終了時における 1000mg/kg 群の生存例(雄1, 雌2)においては、散発的な下痢、投与部位の腫脹が全例に、体重および摂餌量の減少が雌1例に認められた。また血液検査では、軽度な貧血、アルブミンおよび A/G 比の減少、LDH の上昇が認められた。剖検時、腎、肝および脾の体重比重量が増加しているものと考えられた。病理組織学的検査では、近位尿管上皮の小巣状壊死、再生および腫脹、尿管の拡張、円柱の増加、近位尿管上皮の ACP 活性の軽度増加などの腎所見が全例に認められた。その他、肝細胞の脂肪化が1例に、肝細胞褐色色素沈着が他の1例に認められ、投与局所には出血、肉芽組織の増生、筋線維の壊死が全例に認められた。これらの病理組織学的変化は切迫屠殺例に比べいずれも軽度であった。

300mg/kg 群では、散発的な下痢が全例に、摂餌量および体重の軽度な減少、血清 LDH の軽度上昇が一部の例に認められたが、投薬期間終了時まで全例が生存した。剖検時、腎、肝および脾の体重比重量の増加傾向が認められ、病理組織学的検査では、腎における小円形細

胞浸潤が1例に、投与局所の軽度な出血、肉芽形成あるいは筋線維の壊死が一部の例にみられた。これらの組織学的変化はいずれも軽微であった。

100mg/kg 群では、血清 LDH の軽度な上昇が数例に認められたが、これは50%という高濃度の溶液を用いたためにおきた投与局所の筋の変化に由来するものと判断された。この他には薬剤投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。

CET 1000mg/kg 投与群においては、1例が CTM の 1000mg/kg 群におけると同様な経過で衰弱したため、16日間投薬後に切迫屠殺した。本例および本群の他の生存例にみられた変化は CTM の 1000mg/kg 群での変化と類似しており、毒性に関して両薬剤間に著しい差はないと判断された。

以上の結果から、本実験条件における CTM の最大無毒性量は 100mg/kg/day と結論した。

7. サルにおける1カ月静脈内投与毒性試験

注射用 CTM を用い、遊離体換算量として 100, 300 および 1000mg/kg/day を成熟カニクイザルに5週間連日静脈内投与を行ってその毒性を検討するとともに、CTM (free form) 300mg/kg を同様に投与した群を設け、両者の毒性の比較を行った。

1000mg/kg 群の雌雄各3例中各2例は、投薬開始後、下痢、摂餌量の減少および体重減少を示し、著しく衰弱したため、それぞれ投薬4~6日目に切迫屠殺した。これらの動物の血液検査では、総蛋白および Ca の減少、糖、尿素窒素、尿酸、クレアチニン、総ビリルビン、LDH、GOT の増加が認められた。剖検時に腎および副腎重量の増加が認められ、病理組織学的検査では、近位尿管上皮の壊死あるいは剝離と再生、尿管腔内の細胞性あるいは硝子様円柱の増加などの腎障害所見と、肝細胞の脂肪化が認められた。一方、本群の生存例(雌雄各1例)においては、血中総コレステロールの軽度な減少と総ビリルビンの軽度な増加、尿中 Na および Cl の軽度な増加が認められた。切迫屠殺例に類似した腎の病理組織学的変化も認められたが、いずれも比較的軽度な変化であった。

注射用 CTM 300mg/kg 群では、1例に摂餌量および体重の減少が認められた他、貧血傾向、および一部の個体で、1000mg/kg 群にくらべてはるかに軽微であるが、腎に病理組織学的変化が認められた。100mg/kg 群では投薬に関連したと考えられる異常は全く認められなかった。

CTM (free form) 300mg/kg 群では、1例に体重の減少が認められ、その他の検査成績を総括して、毒性に関して注射用 CTM との間に著しい差はないと判断

された。

以上の結果から、本実験条件における CTM の最大無毒性量は 100mg/kg/day と結論した。

III. 総括および考察

化学療法剤の副作用として最も注意すべきは腎毒性であるとされ¹⁾、このことは比較的毒性の弱いといわれる cephalosporin 系抗生物質についても例外ではない。CTM の毒性を各種の実験動物を用いて検索した本報告においても、腎はほとんどすべての場合に標的器官になっているものと判断された。とくにカニクイザルに高用量 (1000mg/kg/day) を連日投与した場合には、筋注でも静注でも顕著な腎障害を示す例が認められた。この際、1000mg/kg 投与時の CTM の血中濃度はきわめて高く、初回筋注後15分～2時間に亘って平均 1500 μ g/ml を超え、また静注の場合は初回投与後 5分～1時間に亘って平均 2000 μ g/ml を超えていた。一方、カニクイザルにおける本剤の最大無毒性量と判断された 100mg/kg を投与後の最高血中濃度は、初回筋注時平均約 200 μ g/ml (15～30分後)、初回静注時平均約 500 μ g/ml (5分後)～約200 μ g/ml (30分後) であり、連投による蓄積は認められなかった。Cephalosporin 剤のサルにおける毒性試験報告がほとんどないため、他剤との文献上の比較が困難であるが、本報において CET 1000mg/kg をカニクイザルに筋注した場合、CTM の同量投与群におけるとはほぼ同様な腎障害所見が認められている。CET の腎毒性は、CER とくらべれば勿論、CEZ と比較してもやや低いと報告されており²⁾、前述の結果は CTM の腎毒性が比較的低いことを示唆するものと判断される。

一方、ラットおよびイヌでは、サルでみられたような腎毒性所見は認められなかった。ラットでもイヌでも、比較的大量を連続投与した場合に、腎重量の軽度な増加があり、病理組織学的検査で近位尿細管上皮内に Schmorl 反応ないし ACP 活性が陽性の褐色顆粒が認められ、電顕によってこれらの顆粒は増生された lysosome であると判定された。CEZ や CET をラットに投与した場合にも近位尿細管上皮における lysosome の増生が認められており²⁾。また CET の大量投与によって“近位尿細管上皮の腫脹”と腎重量の増加とを認めた報告³⁾もあるが、いずれの場合もこれらの所見が直ちに腎毒性を示すものとは考えていない。これらの報告を参考にして、本報においても CTM と CET との比較をラットを用いて行ったが、尿細管上皮内の顆粒の発現状況および(回復試験における)その消失過程には両者間に全く差がなかった。またいずれの薬剤の場合も、

lysosome 以外の細胞小器官には変化が認められなかった。貯留の物質、例えば sucrose, glucose, dextran, mannitol など近位尿細管上皮にとりこまれて (hetero) lysosome を形成し、一定の過程を経て消失することが知られており⁴⁾。上述の所見も投与された薬剤が尿細管上皮にとりこまれて排泄されてゆく過程を示したものと推定される⁵⁾。

肝については、顕著な腎障害の認められたサルの高用量群において肝細胞内に脂肪あるいは褐色色素の沈着が認められたが、壊死などの所見はなく、CTM の肝毒性は比較的低いものと考えられた。また、ラットにおける1か月投与試験にて 3000mg/kg 群の雌において血清 GPT の軽度な上昇が認められたが病理組織学的には肝にとくに異常はなく、その他のラットあるいはイヌを用いた試験では本剤の肝障害作用はまったく認められなかった。なお、ラットにおける試験にて比較対照のため数けた CET 1000mg/kg 投与群では、CTM 3000mg/kg 投与群とはほぼ同様な GPT の上昇が認められている。Cephalosporin 剤の肝毒性についての報告は比較的少ないが、CEX⁶⁾ や CET⁷⁾ をラットに大量投与して、肝細胞の混濁腫脹や小葉周辺性の脂肪変性⁶⁾、あるいは肝細胞の腫大、淡明化および壊死⁷⁾が認められたとの報告もある。いずれにしても、以上の結果から、CTM の肝障害作用は他の常用されている cephalosporin 剤と同様にきわめて弱いものと推測される。

ビーグル犬を用いた試験では、筋注でも静注でも、投薬時に投与量に応じて著明な皮膚の潮紅ないし腫脹が認められた。このような症状はラットあるいはサルを用いた試験では全く認められず、イヌに特異的に起こる現象と考えられ、またその原因は薬剤がイヌの皮膚組織内の mast cell に直接作用し、mast cell から放出されたヒスタミンの薬理作用によるものと推定された。300mg/kg を6か月間投与した場合に皮膚に炎症症状が発現したのは、大量のヒスタミンが長期間に亘って繰返し作用した結果と考えられる。本剤の一般薬理作用として、ビーグル犬では 100mg/kg 以上の静注によって末梢血管の拡張と血圧低下とが認められており、この原因も (mast cell から放出された) ヒスタミンに由来すると考えられている⁸⁾。一方、サル、ネコ、ウサギ、モルモットおよびラットでは、本剤 300mg/kg を投与しても血圧はほとんど変動しなかった⁸⁾。要するに、CTM はイヌで特異的な一般薬理作用を示すが、これはイヌの mast cell が本剤に対して特異な感受性を有するためと判断される。

CTM を筋肉内に投与した場合には、ラット、イヌおよびサルのいずれの場合にも、高用量群において多少と

も局所刺激作用が認められた (Table 1)。要約すると、この局所作用の強さは溶液の濃度とその液量とに相関しており、濃度 50% 以上の溶液を大量 (0.6~5.0 ml/kg) に投与した場合には顕著であるが、20% 以下の濃度の溶液ではかなりの液量 (5.0 ml/kg) を連続投与しても比較的軽微であったといえる。注射用 CTM の局所忍容性を検討するために、濃度 16.7% の溶液をウサギの外側広筋の一定部位に 1 日 1 回 15 日間連日投与した実験では、CEZ よりはやや強いが CET にくらべてはるかに弱い局所作用が認められ、また投薬期間終了後 2 週目にはこの局所の変化はほぼ完全に回復することが明らかにされている。ちなみに、本報において、高用量を筋肉内に投与して局所作用が認められた場合、LDH や GOT など骨格筋に保有される酵素が血中に増加する他、軽度な貧血および血清アルブミンないし A/G 比の減少がしばしば認められているが、後者の諸変化は投与局所の非特異的な炎症反応に由来するものと考えられている⁹⁾。局所刺激作用が比較的強いとされている CET では、ラットに 1 カ月筋肉内投与した場合、臓器毒性の全く認められない 250~500 mg/kg 投与群で、血清 GOT の増加をはじめ、軽度な貧血と中等度の A/G 比低下とが認められており¹⁰⁾、上記の推論を支持する所見と考えられる。

最後に、この毒性試験に関連する本剤の剤型について総括する。注射用 CTM は CTM・2HCl にその重量の 24.6% に相当する (等モルの) Na_2CO_3 を加え、注射用蒸留水に溶解して使用される。したがってこの溶液中には、CTM (free form) の約 22% に相当する食塩が含まれており、亜急性毒性試験等において高用量を投与する際には、CTM の影響のみならず食塩による副作用が発現してくる可能性がある。このため本報においては、CTM (free form) による試験を中心に実施する一方、一部の試験において注射用 CTM を使用して、両者比較を行った。その結果、サルにおける 1 カ月静注試験では CTM (free form) 300mg/kg 投与群と注射用 CTM を 300mg/kg (free form 換算量) 投与した群との間に毒性所見に差はなかった。またイヌにおける CTM (free form) 300mg/kg の 1 カ月静注群における結果と注射用 CTM を用いたイヌにおける 6 カ月静注試験における同量投与群の 1 カ月経過時における所見との間にも差が認められなかった。このことは、注射用 CTM と CTM (free form) との間に毒性に関して差のないことを示すとともに、70mg/kg 程度の食塩を毎日余分に与えてもカニクイザルあるいはビーグル犬には副作用は現れないことを示唆しているといえよう。

以上の結果を総括して、ラット、イヌおよびサルの 3

動物種に 1~6 カ月間投与した一般毒性試験の結果、CTM の最大無毒性量は少なくとも 100mg/kg/day であったと結論することができる。

結 語

Cefotiam (CTM, SCE-963) は、比較的広い抗菌スペクトルをもち、とくにグラム陰性菌には CEZ, CET および CER にくらべて強い抗菌力を示す新しい cephalosporin 剤である。本剤の亜急性および慢性毒性試験をラット、イヌおよびサルを用いて行い、大要次の結果をえた。

1. Ta: Wistar ラットにおける 1 カ月および 6 カ月筋注試験では、高用量群で、局所刺激作用とこれに由来すると考えられる軽度な貧血および血清アルブミンの減少が認められた。GPT あるいは GOT の軽度な上昇のみられた例もあるが、肝にはいずれの場合も病理組織学的な変化は認められなかった。腎重量は投与量に応じて増加する傾向があり、高用量群では近位尿細管上皮内に lysosome の増生が認められた。しかし尿細管上皮に退行性変化は全く認められず、増生した lysosome は 1~3 カ月の休業期間後には完全に消失していた。

CET 1000mg/kg を 1 カ月投薬した群では、CTM の同量投与群におけると同様な所見が認められ、所見の回復性に関しても両群間に差がなかった。

2. ビーグル犬における 1 カ月筋注および静注試験、および 6 カ月静注試験では、いずれも高用量群において、ラットにて認められたと同様な投与局所への作用 (筋注時)、および腎の近位尿細管上皮における lysosome の増生が認められた。この他、イヌに特異的な現象として、皮膚の潮紅と腫脹が投薬時に認められた。この原因は、薬剤がイヌの mast cell に作用してヒスタミンが放出されることに由来すると推定された。

3. カニクイザルにおける 1 カ月筋注および静注試験では、1000mg/kg 群でいずれの投与経路でも腎毒性が発現し、一部の動物は投薬期間の途中で切迫屠殺された。病理組織学的検査にて、腎に近位尿細管上皮の壊死と再生が認められた他、肝に軽度な変化 (肝細胞への脂肪あるいは褐色色素の沈着) を示す例があった。300mg/kg 群では、1000mg/kg 群にくらべてはるかに軽微ではあるが、一部の個体の腎に所見が認められた。

CET 1000mg/kg を筋肉内に投与した群では、CTM の同量投与群におけると同様な変化が認められた。

4. 以上の実験結果を総括して、CTM の一般毒性は CET と類似しており、これら 3 動物種に 1~6 カ月間投与した実験における CTM の最大無毒性量は少なくとも 100mg/kg/day であるとの結論をえた。

文 献

- 1) APPEL, G.B. & H.C. NEU: The nephrotoxicity of antimicrobial agents. *New Engl. J. Med.* 296: 663~670, 1977
- 2) SILVERBLATT, F.; W.O. HARRISON & M. TURCK: Nephrotoxicity of cephalosporin antibiotics in experimental animals. *J. Infects. Dis.* 128: s367~s372, 1973
- 3) 倉本昌明, 石村泰子, 森本順子, 李 雄毅, 香取恒男, 大久保孝明: Sodium cephalothin (CET) 大量投与による毒性について。第2報, *Jap. J. Antibiotics* 28: 195~203, 1975
- 4) MAUNSBACH, A.B.: Ultrastructure of the proximal¹ tubule. In *Handbook of Physiology, Sect. 8; Renal Physiology* (ed. by Orloff, J. & R.W. Berliner), Am. Physiol. Soc., Washington, D.C., p.64, 1973
- 5) NOMURA, M.; T. ABE & Y. MURATA: Subacute toxicity of SCE-963, a new cephalosporin antibiotics, in rats and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 41: 149, 1977
- 6) 青山卓夫, 高橋淳一, 佐藤和一, 大野木滋, 星野恭治, 飯島カツ子, 野沢千鶴子: Cephalexin の急性・亜急性ならびに慢性毒性実験。応用薬理 3: 229~247, 1969
- 7) 土屋統司, 田中紀子, 倉科宏彰, 織田 茂: Cephacetrile と既知セファロスポリンの腎および肝障害作用の比較。 *Chemotherapy* 24: 94~105, 1976
- 8) 松本直彦, 志田 勝, 川添勝義, 菊地健三: Cefotiam (SCE-963) の一般薬理作用。 *Chemotherapy* 27 (S-3): 145~162, 1979
- 9) 山村雄一, 林秀雄 (監修): 炎症反応。医学書院, 東京, 278~293頁, 1976
- 10) 倉本昌明, 石村泰子, 森本順子, 大久保孝明, 李 雄毅: Sodium cephalothin (CET) 大量投与による毒性について。第1報, *Jap. J. Antibiotics* 27: 746~765, 1974

SUBACUTE AND CHRONIC TOXICITY STUDIES ON CEFOTIAM (SCE-963)

KIICHI TAKANO

Central Research Division, Takeda Chemical Ind., Ltd.

Cefotiam (SCE-963) is a new cephalosporin derivative with a broad antimicrobial spectrum and its activity against gram-negative bacteria is more potent than other cephalosporin antibiotics such as CET, CEZ and CER. Its subacute and chronic toxicity was examined in rats, dogs and monkeys and the results are summarized as follows:

1. In rats which were treated intramuscularly with high doses for 1 or 6 months, there were slight to moderate local lesions at the injection sites and, perhaps related, anemia and a decrease in serum albumin. A minimal increase in SGPT and/or SGOT was also seen in some of these animals but none of them showed treatment-related histopathological changes in the liver. There was a dose-related increase in weights of the kidney and, histologically, a prominence of lysosomes in the proximal tubular epithelium. However, no degenerative change was seen in these epithelial cells and the prominence of lysosomes disappeared after a 1~3 months recovery period.

The rats which received intramuscular dosing of CET at 1000mg/kg/day showed similar pathological changes and a similar process of recovery as those treated with the same dose of cefotiam.

2. In beagle dogs treated intramuscularly with high doses for 1 month, local lesion and related changes similar to those in the rat study were seen. Prominence of lysosomes in the kidney was also revealed in this and other dog studies (iv, 1 and 6 months). Species-specific changes in the dog were transient flush and/or swelling of the skin due to vasodilation at the time of injection. A separate examination revealed that mast cells of the dog are particularly susceptible to the agent and that their histamine-containing granules are released after each treatment with cefotiam at high doses.

3. Nephrotoxicity of cefotiam was found in cynomolgus monkeys at 1000mg/kg intramuscular and intravenous 1-month dosings. Some of the animals were sacrificed due to a moribund condition during the dosing period. Histopathological examination of these monkeys revealed degeneration (and regeneration) of proximal tubules in the kidney and, in some cases, a slight change in the liver such as accumulation of fat or brown granules in hepatocytes. At 300mg/kg (im or iv), a slight change in the kidney was seen in some of the animals.

Intramuscular dosing of CET at 1000mg/kg/day induced the similar pathological changes in monkeys as that of cefotiam at the same dosage.

4. From these results, it was concluded that toxicity of cefotiam was quite comparable to that of CET and that its maximum non-toxic dose in these animals was at least 100mg/kg/day.