

Cefotetan (YM09330) のマウスおよびラットにおける急性毒性試験

今村和憲・鈴木 弘・塩原有一
山之内製薬株式会社開発研究所

要 旨

Cefotetan (CTT, YM09330) のマウスおよびラットにおける急性毒性を静脈内、腹腔内、皮下および経口の4投与経路について検討した。

Cefotetan の非経口投与により自発運動の減少、腹臥、眼瞼下垂、呼吸緩徐等の症状が程度の差はあるものの性および動物種に関係なく観察された。経口投与においても軽度ではあるが同様の症状を認めた。経口投与を除いた大量投与例および死亡例ではこれらの症状に加えて跳躍、挙尾、間代性痙攣、後弓反張、強直性痙攣がみられ、通常投与後24時間以内に呼吸停止により死に至った。生存例では上記の中毒症状は投与後6時間以内にほぼ消失し、投与後1～2日目に軟便の排泄を観察した以外、一般症状に異常は認められなかった。

Cefotetan のLD₅₀値は、マウスで静脈内投与雄6.35g/kg および雌4.99g/kg、腹腔内投与雄8.12g/kg および雌8.35g/kg、経口および皮下投与雌雄共に10.0g/kg 以上であった。ラットでは静脈内投与雄8.48g/kg および雌6.79g/kg、腹腔内投与雄8.37g/kg および雌8.25g/kg、経口および皮下投与雌雄共10.0g/kg 以上であった。

緒 言

Cefotetan (CTT, YM09330) は山之内製薬中央研究所で開発された Cephem (Cephamycin) 系抗生物質で β -lactamase に対して強い抵抗性を示し、従来の Cephem 系抗生物質に比し Indole 陽性 *Proteus*, *Citrobacter* 等のグラム陰性桿菌に優れた抗菌力を有することが知られている^{1,2)}。

今回我々は CTT のマウスおよびラットにおける急性毒性を検討したので、その成績を報告する。本試験は1979年1月～6月に行った。

実験材料および方法

1. 実験動物および飼育条件

7週令の ICR マウス(体重雄31～35g, 雌24～28g) および7週令の SPRAGUE-DAWLEY 系ラット(体重雄230～275g, 雌170～200g)を用いた。マウスおよびラットはいずれも6週令で日本チャールス・リバー株式会社より購入し、温度24±3℃に空調され、午前8時より12時間照明された飼育室で健康状態の確認および馴化のために1週間の予備飼育を行った後、被験物質を投与した。固型飼料(CE-7, 日本クレア株式会社)および飲料水(上水道水)は全期間を通じて自由に摂取させた。ただし、経口投与の場合のみ投与前3時間絶食をした。

2. 被験物質

CTT は Fig. 1 に示した化学構造を有する水にきわめて溶けやすい白色～淡黄色の粉末で、試験には当社開発研究所より提供された凍結乾燥品(Lot No. L1F)を用いた。

3. 実験方法

試験はマウスおよびラットともに静脈内、腹腔内、皮下および経口の4投与経路について実施した。

静脈内、腹腔内および経口投与の場合は CTT を生理食塩液に250mg/mlの濃度に用時溶解し、1回投与を行った。静脈内投与は0.6ml/min(ラット)あるいは0.2ml/min(マウス)の注射速度で尾静脈より、経口投与は胃ゾンデを用いて強制的に行った。皮下投与の場合は CTT を注射用蒸留水に250mg/mlの濃度に用時溶解し、背部皮下に1回投与を行った。

Fig. 1 Chemical structure of cefotetan (CTT, YM09330)

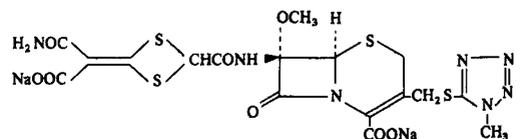


Table 1 LD₅₀ of CTT in mice and rats

| Species (strain) | Route | Sex | LD ₅₀ in g/kg (95% confidence limits)* | |
|------------------|-------|--------|---|---------------|
| Mouse (ICR) | i.v. | Male | 6.35 | (5.87 ~ 6.87) |
| | | Female | 4.99 | (4.59 ~ 5.39) |
| | i.p. | Male | 8.12 | (7.58 ~ 8.72) |
| | | Female | 8.35 | (7.83 ~ 8.91) |
| | s.c. | Male | >10.00 | |
| | | Female | >10.00 | |
| | p.o. | Male | >10.00 | |
| | | Female | >10.00 | |
| Rat (SD) | i.v. | Male | 8.48 | (8.05 ~ 8.93) |
| | | Female | 6.79 | (6.42 ~ 7.22) |
| | i.p. | Male | 8.37 | (7.69 ~ 9.28) |
| | | Female | 8.25 | (7.63 ~ 8.99) |
| | s.c. | Male | >10.00 | |
| | | Female | >10.00 | |
| | p.o. | Male | >10.00 | |
| | | Female | >10.00 | |

* Calculated by probit method

Table 2 Lethality in mice and rats administered CTT intravenously

| Species | Sex | Dose (g/kg) | Lethality (dead/used) | | |
|---------|--------|-------------|-----------------------|-------|-------|
| Mouse | Male | 9.13 | 10/10 | | |
| | | 7.94 | 8/10 | | |
| | | 6.90 | 7/10 | | |
| | | 6.00 | 4/10 | | |
| | | 5.22 | 2/10 | | |
| | | 4.54 | 0/10 | | |
| | Female | 7.60 | 10/10 | | |
| | | 6.61 | 9/10 | | |
| | | 5.75 | 7/10 | | |
| | | 5.00 | 6/10 | | |
| | | 4.35 | 3/10 | | |
| | | 3.78 | 0/10 | | |
| | | Rat | Male | 10.65 | 10/10 |
| | | | | 9.68 | 8/10 |
| 8.80 | 6/10 | | | | |
| 8.00 | 4/10 | | | | |
| 7.27 | 1/10 | | | | |
| 6.61 | 0/10 | | | | |
| Female | 8.80 | | 10/10 | | |
| | 8.00 | | 9/10 | | |
| | 7.27 | | 5/10 | | |
| | 6.61 | | 4/10 | | |
| | 6.01 | | 3/10 | | |
| | 5.46 | | 1/10 | | |
| | 4.96 | | 0/10 | | |

1 投与量当りの動物数は雌雄各々10匹とし、各投与経路の投与量は Table 2~4 に示した。

投与後は7日間にわたって一般症状および生死を観察し、途中死亡例は直ちに、生存例は投与後7日目に屠殺しそれぞれ剖検を行った。

LD₅₀値は投与後7日目の累積死亡率に基づいて Probit 法により算出した。

実験結果

1. LD₅₀値

マウスおよびラットの LD₅₀値(95%信頼限界)を一括して Table 1 に示した。各投与経路の観察期間中の死亡率は Table 2~4 に示した。

CTT の静脈内投与時の急性毒性(LD₅₀値)はマウス、ラットともに雄に比べて雌に強く、ラットに比べてマウスに強い傾向が認められた。他の3投与経路については雌雄間および動物種間の差は認められなかった。

経口投与の場合マウスおよびラットに投与限界量(10.0g/kg)を投与しても死亡例は認められなかった。皮下投与の場合も投与限界量(10.0g/kg)で1/10~2/10の死亡例を認めるのみであった。したがって、いずれの場合にも LD₅₀値は10.0g/kg 以上と推定された。

2. 一般症状および剖検所見

1) 静脈内投与

マウスおよびラットはほぼ同様の一般症状および剖検所見を呈した。

Table 3 Lethality in mice and rats administered CTT intraperitoneally

| Species | Sex | Dose (g/kg) | Lethality (dead/used) |
|---------|--------|-------------|-----------------------|
| Mouse | Male | 10.58 | 10/10 |
| | | 9.20 | 7/10 |
| | | 8.00 | 5/10 |
| | | 6.96 | 2/10 |
| | | 6.05 | 0/10 |
| | Female | 10.58 | 10/10 |
| | | 9.20 | 7/10 |
| | | 8.00 | 4/10 |
| | | 6.96 | 1/10 |
| | | 6.05 | 0/10 |
| Rat | Male | 10.58 | 9/10 |
| | | 9.20 | 6/10 |
| | | 8.00 | 4/10 |
| | | 6.96 | 3/10 |
| | | 6.05 | 0/10 |
| | Female | 10.58 | 9/10 |
| | | 9.20 | 7/10 |
| | | 8.00 | 5/10 |
| | | 6.96 | 2/10 |
| | | 6.05 | 0/10 |

Table 4 Lethality in mice and rats administered CTT subcutaneously or orally

| Species | Route | Sex | Dose (g/kg) | Lethality (dead/used) |
|---------|-------|--------|-------------|-----------------------|
| Mouse | s.c. | Male | 10.00 | 1/10 |
| | | | 8.70 | 0/10 |
| | | Female | 10.00 | 2/10 |
| | | | 8.70 | 0/10 |
| | p.o. | Male | 10.00 | 0/10 |
| | | Female | 10.00 | 0/10 |
| Rat | s.c. | Male | 10.00 | 2/10 |
| | | | 8.70 | 0/10 |
| | | Female | 10.00 | 2/10 |
| | | | 8.70 | 0/10 |
| | p.o. | Male | 10.00 | 0/10 |
| | | Female | 10.00 | 0/10 |

すなわち投与直後より自発運動の減少、眼瞼下垂、呼吸緩徐が観察され、さらに時間の経過に伴って立毛および体温低下が認められた。生存例ではこれらの症状は投与後1時間30分頃より漸次軽減し、6時間後にはほぼ正常状態に復した。投与後1～2日目にはマウスの全例およびラットの大量投与例で軟便の排泄を観察したが、それ以後一般症状に異常は認められなかった。

死亡例は通常、投与直後より呼吸困難および強直性痙

攣の症状を呈し、投与後5分以内に口および鼻孔より泡沫を流出し呼吸停止により死に至った。この時期を脱した動物はそれ以後跳躍、振顫、拳尾、後弓反張、間代性痙攣等の症状がみられ、投与後数時間以内に呼吸停止により死亡した。これらの動物の内、約半数のマウスでは投与後30分ごろより腹部の膨満が認められた。また、若干例のマウスで1日目以後消瘦および体温低下が著明となり全身衰弱により投与後1～4日目に死亡するものがみられた。

大半の死亡例の剖検では、肺のうっ血水腫、腎皮質の乏血がみられ、さらにラットでは胸腺の点状出血、腸間膜および後腹膜下の水腫が観察された。また若干例のラットでは腎包膜下の微小出血が認められた。腹部の膨満が認められたマウスでは肺のうっ血以外に腎包膜下および時としてその周囲の後腹膜下にまでおおよぶ出血が観察されたが腎実質には肉眼的な異常は認められなかった。

生存例の剖検では盲腸の拡張を観察した以外マウスおよびラットの若干例で腎包膜下の小血腫を認めた。

2) 腹腔内投与

マウスおよびラットはほぼ同様の一般症状および剖検所見を呈した。

すなわち9.20g/kg以上のマウスおよびラットの全例で投与直後に投与液の刺激によると思われる一過性のwrithing syndromeが観察された。投与後5～15分ごろからは大半の投与例で自発運動の減少、腹臥、眼瞼下垂の症状がみられ、さらにラットでは呼吸緩徐、攣縮が散見された。死亡例では上記症状の他に拳尾、跳躍、間代性痙攣、強直性痙攣がみられ投与後1～2時間前後に呼吸停止により死に至った。

生存例では上記の中毒症状は投与後1～2時間頃より漸次軽減し、3～4時間後にはほぼ正常状態に復した。投与後1～2日目にマウスおよびラットのほぼ全例で軟便の排泄を観察したが、それ以後一般症状に異常は認められなかった。

死亡例の剖検では黄色～赤色の腹水貯留、壁側腹膜の点状出血、肝臓のうっ血がみられ、さらにマウスでは腎周囲腹膜下の水腫、腎皮質の乏血、ラットでは腸間膜の水腫、消化管漿膜面の血管怒張、腎臓のうっ血がそれぞれ観察された。生存例の剖検では大半の投与例で用量に依存した盲腸の拡張を観察し、さらにラットの若干例で肝臓漿膜の軽度肥厚を認めた。

3) 皮下投与

マウスおよびラットともに投与後10～20分ごろより自発運動の減少、腹臥、眼瞼下垂が観察され、マウスでは時間の経過に伴って立毛、体温低下、振顫が散見された。

これらの症状は投与後2時間ごろより漸次回復に向い、6～8時間後にはほぼ完全に消失した。投与部位の皮下は浮腫を呈したが投与後2日目には正常状態に復した。生存例では投与後1日目に軟便の排泄を認めたが、2日目以後一般症状に異常は認められなかった。

死亡例では上記症状の他に時間の経過に伴って攣縮がみられ、ラットでは呼吸緩徐、間代性痙攣が観察された。死亡例はマウスで投与後2時間30分より8時間、ラットでは投与後1日目に認められた。

死亡例の肉眼所見としては投与部位皮下の軽度出血を伴う浮腫がマウスおよびラットの全例で認められ、さらにマウスでは肺のうっ血を観察した。ラットの生存例の剖検では全例に盲腸の拡張および若干例で投与部位皮下の小血液凝塊を認めた。

マウスの生存例には肉眼的な異常は観察されなかった。

4) 経口投与

マウスおよびラットともに投与後5～10分ごろより自発運動の減少、腹臥がみられ、さらにラットの約半数例では眼瞼下垂、軽度の呼吸緩徐が認められた。これらの症状はマウスで投与後30分、ラットでは投与後1時間でほぼ消失し、動物は正常状態に復した。投与後4～6時間ごろより全投与例で下痢が観察され、さらにマウスでは投与後1日目、ラットでは投与後1～2日目に軟便の排泄を認めたが、それ以後一般症状に異常は観察されなかった。

生存例の剖検ではラットの約半数で盲腸の軽度拡張を観察した以外、肉眼的な異常は認められなかった。

考 察

新規のCephem系抗生物質であるCTTの毒性研究の一環として、ICRマウスおよびSD系ラットに静脈内、腹腔内、皮下および経口投与した際の急性毒性を検討した。

本試験の成績よりCTTの静脈内投与時のLD₅₀値はマウスでは雄6.35g/kg、雌4.99g/kg、ラットでは雄8.48g/kg、雌6.79g/kgであった。この値を他剤と比較するとマウスではCephaloridine(CER)雄2.2g/kg、Cefazolin(CEZ)雄3.9g/kg、Cefoxitin(CFX)雄5.22g/kg、雌4.97g/kg、Cefmetazole(CMZ)雄9.33g/kg、雌8.69g/kg、ラットではCER雄1.4g/kg、CEZ雄3.2g/kg、CFX雄9.38g/kg、雌8.58g/kg、CMZ雌雄ともに5.0g/kg以上と報告されており³⁻⁶⁾、CTTの毒性は第1世代のCephalosporin系抗生物質であるCERおよびCEZに比べて弱く、第2世代のCephamicin系抗生物質であるCFXおよびCMZとはほぼ同程度のきわめて弱いものと思われる。また他の投与経路のLD₅₀値もCFXおよび

CMZのそれとほぼ同等であった。

CTTの静脈内投与時のLD₅₀値はマウスおよびラットともに雄に比べて雌に強く、ラットに比べてマウスに強い傾向が認められているが、他の3投与経路については性差および種差は認められなかった。投与経路別ではマウスおよびラットともに静脈内>腹腔内>皮下>経口の順に強く表われた。ただしラットでは腹腔内投与と静脈内投与との間に差は認められなかった。

中毒症状としては程度の差はあるものの種、性および投与経路に関係なく自発運動の減少、腹臥、眼瞼下垂、呼吸緩徐等の鎮静状態が観察され、経口投与を除いた大量投与例および死亡例では時間の経過に伴って跳躍、拳尾、間代性痙攣、後弓反張、強直性痙攣等の興奮症状が認められ呼吸停止により死に至った。

死亡例の剖検では、静脈内投与時肺のうっ血水腫および腎皮質の乏血、腹腔内投与時腹水の貯留および壁側腹膜の点状出血、皮下投与時投与部位皮下の軽度出血を伴う浮腫がそれぞれ認められた。これらの所見はいずれも高張溶液の大量投与による循環障害、呼吸困難および投与液の刺激等に起因するものでCTT特有の毒性ではないと思われる。

マウスの静脈内投与時に散見された腎包膜下および後腹膜下の出血は、投与後1時間以後に死亡したマウスの約半数に認められたもので、腎包膜下およびときとしてその周囲の後腹膜下におよぶ比較の広範囲な出血であるが、腎実質には肉眼的な変化は認められなかった。この出血の機序は明らかではないが、著者等の実験ではCTTと同様のdisodium塩の合成PenicillinであるSulbenicillinおよびCarbenicillinの静脈内投与によってもCTTと同様の腎包膜下出血がマウスで観察されており⁷⁾、CTT特有の毒性とは考え難い。なおdisodium塩のOxacephem抗生物質であるLatamoxefの急性毒性試験においても部位は異なるが同様に出血性的変化が報告されている⁸⁾。

生存例で認められた軟便の排泄および剖検時に観察された盲腸の拡張は、いずれもCephem系抗生物質の投与による腸内細菌叢の変動に起因する変化と思われる。

文 献

- 1) YANO, K.; K. SUZAKI, M. SAITO, M. TODA, T. SAITO & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of YM09330, a new cephamycin derivative. 11th International Congress of Chemotherapy and 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstr. No. 564, 1979
- 2) TODA, M.; T. SAITO, K. YANO, K. SUZAKI, M. SAITO &

- S. MITSUHASHI *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of YM09330, a new cephamycin derivative. *Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. vol. 1, pp. 280~281, 1980*
- 3) ATKINSON, R. M. ; J. P. CURRIE, B. DAVIS, D. A. H. PRATT, H. M. SHARPE & E. G. TOMICH : Acute toxicity of cephaloridine, an antibiotic derived from cephalosporin C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 8 : 398~406, 1966
 - 4) BIRKHEAD, H. A. ; G. B. BRIGGS & L. Z. SAUNDERS : Toxicology of cefazolin in animals. *J. Infect. Dis.* 128 (Suppl.): S 379~S 381, 1973
 - 5) 高山 敏, 古浜和久, 加藤道幸, 山田明甫, 小野寺 威, 小河秀正, 秋元 健 : Cefoxitin の安全性に関する研究, (第1報)急性, 亜急性および慢性毒性。 *Chemotherapy* 26 : 150~175, 1978
 - 6) 増田 裕, 木村邦男, 岡田忠彦, 松沼尚史, 棚瀬久雄, 真板敏三, 阿久沢正夫 : CS-1170 の安全性に関する研究 (第1報)各種実験動物による急性, 亜急性ならびに慢性毒性試験。 *三共研年報* 30 : 112~147, 1978
 - 7) 今村和憲, 鈴木 弘 : 未発表
 - 8) 小林文彦, 古川 仁, 原田喜男, 波多野宗利, 石村勝正 : 6059-S のマウスおよびラットにおける急性毒性試験。 *Chemotherapy* 28 : 1002~1006, 1980

ACUTE TOXICITY OF CEFOTETAN (YM09330) IN MICE AND RATS

KAZUNORI IMAMURA, HIROSHI SUZUKI and YUICHI SHIOBARA
Institute of Research and Development, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

Acute toxicity of cefotetan (CTT, YM09330), a new semisynthetic cephem antibiotic with a broad spectrum of antibacterial activity, was studied in ICR mice and SD rats after oral and parenteral administration. The animals were closely observed for mortality and clinical signs for 7 days after administration, and necropsies were performed on all animals. The LD₅₀ values were calculated by the probit method, based on 7 day mortality data.

The LD₅₀ values in male mice and female mice were 6.35 g/kg and 4.99 g/kg i.v., 8.12 g/kg and 8.35 g/kg i.p., respectively. The LD₅₀ values in male rats and female rats were 8.48 g/kg and 6.79 g/kg i.v., 8.37 g/kg and 8.25 g/kg i.p., respectively. Oral and subcutaneous LD₅₀ values were higher than 10.0 g/kg in both species.

In most of the animals, clinical signs observed after parenteral administration included decreased locomoter activity, prone, ptosis and bradypnea. Similar toxic signs were observed, but to a lesser extent, in animals given the drug orally. Additionally, jumping, clonic convulsion, opisthotonus and tonic convulsion were seen in animals which were treated with high doses parenterally and died within 24 hours due to respiratory arrest.