

AT-2266 の毒性学的研究 第1報

マウス、ラット、イヌおよびサルにおける急性毒性試験

仙田博美・中野幸穂・山吉迪子・矢寺成次・吉田耕一

大日本製薬株式会社総合研究所

新しいピリドンカルボン酸系の合成抗菌性物質 AT-2266 の急性毒性をマウス、ラット、イヌおよびサルを用いて検討し、次の結果を得た。

1) LD₅₀ 値は静脈内投与時マウスの雄 327 mg/kg, 雌 391 mg/kg, ラットの雄 236 mg/kg, 雌 294 mg/kg, 皮下投与時マウスの雄 1,237 mg/kg, 雌 1,320 mg/kg, ラットで 2,000 mg/kg 以上, 経口投与時マウスとラットで 5,000 mg/kg 以上, イヌとサルで 1,600 mg/kg 以上であった。

2) 中毒症状として致死量に近い量の AT-2266 を静脈内あるいは皮下に投与したマウスおよびラットでは、歩行異常、眼瞼下垂、鎮静などのほか、死亡例には間代性あるいは強直性痙攣がみられた。経口投与時マウス、ラットでは何らの異常症状もみられなかったが、イヌでは嘔吐が発現しやすく、サルでも 400 mg/kg 以上の高用量投与例の一部の例に発現した。

3) 剖検の結果、マウスおよびラットの非経口投与例では注射局所に刺激性障害がみられたが、実質臓器に対する障害はいずれの種族、投与経路の場合にも認められなかった。

AT-2266 はピリドンカルボン酸系の新しい合成抗菌性物質であって、化学療法的にグラム陰性菌および陽性菌に対し広い抗菌スペクトラムを有していることが報告されている¹⁾。AT-2266 は Fig. 1 に示す化学構造を有し、白色ないし微黄色の結晶または結晶性粉末で、臭いはなく苦味を呈し、アセトン、エーテルおよび水にはほとんど溶けず、クロロホルムには極めて溶けにくい化合物である。

著者らは AT-2266 の安全性を検討するにあたり、数種の動物を用いてその急性毒性試験を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 実験動物および飼育条件

1) マウス

日本クレア(株)産の Jcl: ICR 系マウスを 4 ないし 5 週齢で購入し、温度 24 ± 2℃, 湿度 55 ± 5%, 人工照明 12 時間 (午前 6 時～午後 6 時) の動物室で 4 匹を 1 ケージに収容して固型飼料 (日本クレア製, CE-2) と水道水を自由に摂らせて飼育し、6 週齢 (体重: 雄 29～38 g, 雌 23～28 g) に達してから、雌雄それぞれ 1 群を 8 匹として使用した。

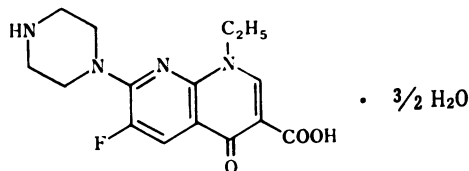
2) ラット

日本クレア(株)産の Jcl: SD 系ラットを 4 週齢で購入し、1 ケージに 1 匹ずつ収容してマウスと同じように飼育し、6 週齢 (体重: 雄 163～264 g, 雌 131～191 g) に達してから、雌雄それぞれ 1 群を 8 匹として使用した。

3) イヌ

約 7 ケ月齢の日本 EDM (株) 産および約 14 ケ月齢の

Fig. 1 Chemical structure of AT-2266



Marshall Research Animal Inc. 産の雄ビーグル犬 (体重 8.6～12.4 kg) を用いた。イヌを室温約 24℃, 人工照明 12 時間 (午前 6 時～午後 6 時) の動物室内のケージに個別に収容し、一定量の飼料 (オリエンタル酵母製 DS 約 400 g に水を加えたもの) を 1 日 1 回与え、水道水を自由に摂らせた。1 用量当りの動物数は 3～6 頭で、AT-2266 の 400 mg/kg 以下の用量の試験では 1～3 週間隔で反復使用した。

4) サル

東南アジア産の推定 5～10 歳, 体重 2.3～5.6 kg の雌のカニクイザルを用いた。購入後 2～6 年間当研究所で飼育されていたもので、ケージに個別に収容し、一定量の固型飼料 (オリエンタル酵母製, AB 約 40 g), りんご等を与え、水は自由に摂らせた。1 用量当りの動物数は 3 または 6 匹で、多くのサルは 1～2 週間隔で反復使用した。

2. 投与方法ならびに観察項目

使用した被験物質は AT-2266 の無水物で、当社技術

部で合成され、品質試験に適合したものである。AT-2266は水にほとんど溶けないため、非経口投与時にはメタンスルホン酸塩としたAT-2266を水に溶解(pH 7前後)させ、経口投与時には0.2または0.5% Carboxymethylcellulose (CMC) 水溶液に懸濁させた。なお投与量およびLD₅₀値はすべて無水物換算量で示した。

マウスおよびラットにおいては静脈内(尾部)、皮下(背、腰部)と経口の3経路、イヌおよびサルにおいては経口投与のみで実施した。投与量はマウスでは体重10g 当り静脈内0.2 ml(静注速度0.3 ml/min)、皮下0.08~0.17 mlおよび経口0.25 ml、ラットでは体重100g 当り静脈内0.2 ml(静注速度0.3 ml/min)、皮下1.0 mlおよび経口2.0 mlとした。イヌおよびサルでは低用量(25 mg/kg)から投薬を開始し、明らかな中毒症状が発現するまで1~3週間隔で漸次増量した。この時の投与量は体重1kg 当りイヌ1.0~8.0 ml、サル2.0~16.0 mlであった。

検体投与後、一般症状を観察するとともに、死亡例は発見後速やかに剖検し、マウスおよびラットの生存例は投薬7日後にエーテル麻酔下に放血殺して剖検した。イヌおよびサルについては一般症状の観察を行うにとどめ、剖検は行わなかった。体重は各種族とも1日1回測定し、摂餌状況はラット、イヌおよびサルについて測定または観察した。

LD₅₀値は7日間の死亡数からLitchfield-Wilcoxon法により算出した。

II. 実験成績

1. LD₅₀ 値

マウス、ラット、イヌおよびサルのLD₅₀値とその95%信頼限界をTable 1に示し、マウスおよびラットにおける投与量と致死経過をそれぞれTable 2および3に、イヌとサルにおける投与量と主な所見をそれぞれTable 4および5に示した。

静脈内投与時のLD₅₀値はマウスの雄327 mg/kg、雌391 mg/kg、ラットの雄236 mg/kg、雌294 mg/kg、皮下投与ではマウスの雄1,237 mg/kg、雌1,320 mg/kg、ラット2,000 mg/kg以上であった。経口投与時のLD₅₀値はマウスおよびラットで共に投与可能な最大量の5,000 mg/kg以上、イヌおよびサルで共に1,600 mg/kg以上であった。

2. 一般症状および剖検所見

1) マウスおよびラット

静脈内投与(マウス雄228~385 mg/kg、雌320~500 mg/kg; ラット雄191~400 mg/kg、雌231~400 mg/kg)では、致死例は投与直後から間代性痙攣、呼吸困難の症

Table 1 LD₅₀ values of AT-2266 in mice, rats, dogs, and monkeys

| Species | Sex | LD ₅₀ values and 95% confidence limits (mg/kg) | | |
|---------|--------|-----------------------------------------------------------|---------------------|--------|
| | | i. v. | s. c. | p. o. |
| Mice | Male | 327 (297~360) | 1237 (1027~1489) | > 5000 |
| | Female | 391 (366~419) | 1320 (1102~1582) | > 5000 |
| Rats | Male | 236 (202~276) | > 2000 | > 5000 |
| | Female | 294 (240~360) | > 2000 | > 5000 |
| Dogs | Male | — | — | > 1600 |
| Monkeys | Female | — | — | > 1600 |

The LD₅₀ values were calculated by Litchfield-Wilcoxon's method.

状を呈して死亡し、生存例は投与後数分間、軽度の鎮静症状を呈していたが、その後正常に復した。体重は投薬翌日においてもほとんど抑制されず順調に増加した。投薬2~3日後から生存例の約半数の注射局所(尾静脈部)に腫脹、壊死が認められた以外、死亡例および生存例の剖検で異常所見はなかった。

マウスへの皮下投与は雌雄とも796~1,690 mg/kgの用量で実施したが、各群とも投与約30分後より鎮静、眼瞼下垂、横臥および立毛がみられ、致死例には振顫、強直性痙攣、時に間代性痙攣が観察された。死亡例の多くは投与3~6時間後にみられ、一部は6~24時間後に死亡した。6時間以内の死亡マウスでは注射局所の背部皮下に軽度の出血、浮腫および少量の白色結晶物の析出が剖検時に認められた。投薬6時間以降の死亡例およびすべての生存例の剖検では上記の注射局所の所見のほか、腹腔内に結晶性物質の析出が認められ、さらに生存例の多数例に注射局所における肉芽組織の形成および肝臓、腎臓あるいは脾臓と腹膜の癒着が認められた。

ラットへの皮下投与は2,000 mg/kgの単一用量で行った。雄の8例中2例が投与約5時間後に死亡したが、雌では死亡例はなかった。投与約30分後から全例に歩行異常、鎮静、横臥、立毛などが4~6時間観察された。剖検で注射局所に雄の死亡例では浮腫、血行障害などが、生存例では多量の白色結晶性物質の析出、脱毛、肉芽組織の形成などが認められた。

体重増加は皮下投与後、マウスでは軽度抑制され、ラットでは投与後1~2日間、軽微に抑制された。ラッ

[illegible]

トの摂餌量は投与2〜3日後まで減少した。

経口投与はマウス、ラット共に5,000 mg/kgの単一用量で行ったが、一般症状、体重などに対する影響はなく、死亡例もなかった。

2) イヌ

Table 4に示すように嘔吐が25 mg/kgから一部の例に認められ、200 mg/kg以上では全例に認められ、その程度も100 mg/kg以下におけるよりもやや強かった。食欲は400 mg/kg以上で投与当日やや低下したが翌日には正常に復していた。体重に対する影響は認められなかった。1例のイヌ(No. 13)では100, 200および400 mg/kg投与の2〜3時間後、顔面および耳介の浮腫状腫脹が認められた。1,600 mg/kgの用量では投与翌朝に検体様物を含む軟便がみられた。

3) サル

Table 5に示すように、嘔吐と食欲の低下が400 mg/kg以上の一部の例に一過性に認められた。一時的な便の変化が各投与群にみられ、100 mg/kg以下を投与した一部の例では硬い糞便の排泄、または軟便、400 mg/kg以上の群の全例で軟便ないし下痢がみられ、1,600 mg/kg投与例では検体様物を交えた便が排泄された。投与後24時間の採尿を行った25〜200 mg/kg投与例の蓄尿中には白濁あるいは白色沈澱物を認めたが、質量スペクトルおよび赤外スペクトル分析の結果、主体は未変化のAT-2266であった。400〜1,600 mg/kg投与の一部の例では症状観察時の放尿中に同様の物質を認めた。

III. 考 察

AT-2266の安全性試験の一環として、その急性毒性をマウス、ラット、イヌおよびサルを用いて検討した。マウスおよびラットにおける非経口投与時の中毒症状

Table 4 Acute toxicity study of AT-2266 in dogs

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Vomiting | | Appetite* | Other findings |
|-----------------|---------------|-----------|---------------------------|-------------|-------------------------------------------------|
| | | Frequency | Appearance time (hour) | | |
| 25 | 11 | 1 | 1.5 | good | |
| | 12 | 0 | | good | |
| | 13 | 0 | | good | |
| 50 | 11 | 0 | | good | |
| | 12 | 0 | | good | |
| | 13 | 1 | 1.7 | good | |
| | 14 | 0 | | good | |
| | 15 | 1 | 0.1 | good | |
| | 16 | 1 | 0.8 | good | |
| 100 | 11 | 0 | | good | |
| | 12 | 1 | 0.8 | good | |
| | 13 | 2 | 0.6〜3.0 | good | Swelling in face and ear auricle |
| 200 | 11 | 6 | 1.3〜2.2 | good | |
| | 12 | 3 | 1.2〜4.0 | good | |
| | 13 | 2 | 1.9〜4.0 | good | Soft feces and swelling in face and ear auricle |
| 400 | 11 | 3 | 1.2〜4.8 | good | Soft feces |
| | 12 | 3 | 0.8〜4.0 | fairly good | |
| | 13 | 3 | 1.3〜4.0 | good | Swelling in face and ear auricle |
| 1,600 | 2 | 2 | 1.5〜3.9 | fairly good | Soft feces |
| | 3 | 2 | 2.3〜4.0 | good | |
| | 101 | 5 | 1.0〜3.8 | fairly good | |
| | 102 | 5 | 1.3〜3.8 | poor | Soft feces |
| | 103 | 10 | 0.03〜5.7 | poor | Soft feces |

*: Finding until 24 hours after dosing

として鎮静，眼瞼下垂，横臥，振顫および立毛が致死量近くの投与量で発現し，強直性または間代性痙攣とこれによる呼吸困難の症状が死亡例にみられた。これらの症状は AT-2266 と構造の類似した Piromidic acid (PA)²⁾ や Pipemidic acid (PPA)³⁾ の急性毒性試験で認められた所見と本質的に同じであった。LD₅₀ 値はマウスおよびラットの静脈内投与時 240~390 mg/kg で著しい性差，種族差はなかった。皮下投与時マウスで約 1,300 mg/kg，ラットで 2,000 mg/kg 以上でかなり毒性は低かった。AT-2266 の LD₅₀ 値は静脈内投与の場合，PA または Norfloxacin⁴⁾ と同程度であり，PPA よりもやや低く，皮下投与では PA や PPA と同程度であった。

経口投与時の LD₅₀ 値はマウスとラットでは 5,000 mg/kg 以上，イヌとサルでは 1,600 mg/kg 以上であった。マウスとラットでは何らの中毒症状も観察されなかったが，イヌでは 25 mg/kg から嘔吐が散発的に出現し，200 mg/kg 以上ではその程度と頻度は 100 mg/kg 以下におけるよりもやや強かった。イヌは嘔吐しやすい種族であるが，サルでも 400 mg/kg 以上の投与で嘔吐が発現していることから，AT-2266 の催吐作用は PA²⁾ や PPA³⁾ よりもやや強いと考えられる。

AT-2266 の 100, 200 および 400 mg/kg を経口投与したイヌの 1 例に，一過性の顔面および耳介の浮腫状腫脹が認められたが，その毒性学的意義は明らかでない。

Table 5 Acute toxicity study of AT-2266 in monkeys

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Vomiting | | Appetite* | Feces | Urine |
|-----------------|---------------|-----------|---------------------------|-------------|---------------|----------|
| | | Frequency | Appearance time (hour) | | | |
| 25 | 194 | 0 | | good | hard | normal |
| | 201 | 0 | | good | hard | normal |
| | 214 | 0 | | good | hard | cloudy |
| 50 | 12 | 0 | | good | normal | cloudy |
| | 14 | 0 | | good | hard | cloudy |
| | 192 | 0 | | poor | normal | normal |
| 100 | 12 | 0 | | good | normal | normal |
| | 14 | 0 | | good | hard | cloudy |
| | 192 | 0 | | fairly good | soft | cloudy |
| | 194 | 0 | | good | normal | cloudy |
| | 201 | 0 | | good | normal | cloudy |
| | 214 | 0 | | good | normal | cloudy |
| 200 | 72 | 0 | | good | / | cloudy** |
| | 198 | 0 | | good | / | cloudy** |
| | 200 | 0 | | good | / | cloudy |
| 400 | 72 | 1 | 5.3 | good | soft | / |
| | 198 | 0 | | fairly good | diarrhea | cloudy |
| | 200 | 0 | | poor | soft | / |
| 800 | 72 | 3 | 1.7~3.8 | good | soft | cloudy |
| | 198 | 0 | | poor | soft | / |
| | 200 | 0 | | poor | soft | / |
| 1,600 | 72 | 2 | 2.2~5.0 | good | soft-diarrhea | / |
| | 198 | 1 | 6.0~7.0 | poor | soft-diarrhea | cloudy** |
| | 200 | 2 | 5.0~9.7 | poor | soft-diarrhea | / |

*: Finding until 24 hours after dosing

**: Presence of crystalloid materials in urine

/: No data

Cephalosporin 系抗生物質 Cefotiam をイヌに静脈内投与した場合に内因性 histamine が遊離され、類似の現象の起こることが報告¹⁾されているが、今回発現した変化との異同については明らかでない。いずれにしても一部のイヌにおいてのみ起こった特異的現象と考えられる。

剖検で静脈内および皮下投与局所に障害が認められたが、実質臓器に対する障害作用はなかった。PA や PPA の致死量を非経口的に投与すると腎臓に対する影響のあることをすでに報告^{2,3)}しているが、AT-2266 にはそのような作用のないことが示唆された。マウスの皮下投与例では皮下注局所のみならず、腹腔内諸臓器の漿膜面にも検体の結晶様物が析出していたが、これは AT-2266 のメタンスルホン酸溶液が局所またはマウスの薄い腹壁を透過し、腹腔内で free 体となって析出したものと考えられる。腹腔内諸臓器あるいは腹膜との相互癒着はこの結晶析出によるものと考えられる。

以上の急性毒性試験の結果から、AT-2266 の催吐作用はやや強いが、その他の作用は他の構造類似化合物との比較においても特異な作用はなく、LD₅₀ 値にも大き

な差異はないと考えられる。

(本実験は昭和54年9月から55年7月までの間および56年9月に実施した。)

文 献

- 1) 中村信一, 片江宏巳, 南 明, 中田勝久, 井上 了, 山岸純一, 高瀬善行, 清水常尚: AT-2266 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 32(S-3): 70~85, 1984
- 2) 仙田博美, 大西久美雄, 岡 武哲, 辰巳 照: Piromidic acid の毒性学的検討。Chemotherapy 19: 404~421, 1971
- 3) 仙田博美, 藤本勝造, 大西久美雄, 辰巳 照: Pipemidic acid の毒性学的研究, 第1報, マウス, ラット, イヌおよびサルにおける急性毒性試験。Chemotherapy 23: 2,734~2,739, 1975
- 4) 入倉 勉, 相島 博, 土屋 剛, 杉本 勉, 棚瀬裕文: AM-715 の毒性学的研究, 第1報, マウスおよびラットにおける急性毒性ならびにラットにおける亜急性毒性試験。Chemotherapy 29 (S-4): 766~784, 1981
- 5) 高野喜一: Cefotiam (SCE-963) の亜急性および慢性毒性試験。Chemotherapy 27 (S-3): 163~171, 1979

TOXICOLOGICAL STUDIES OF AT-2266
I. ACUTE TOXICITY STUDY IN MICE, RATS, DOGS AND MONKEYS

HIROMI SENDA, SACHIHO NAKANO, MICHIKO YAMAYOSHI,
SEIJI YATERA and KOUICHI YOSHIDA
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Acute toxicities of AT-2266, a newly synthesized antibacterial agent, were assessed using mice, rats, dogs and monkeys.

The results obtained were summarized as follows:

- 1) The LD₅₀ values in intravenous administration were 327 mg/kg in male and 391 mg/kg in female of mice and 236 mg/kg in male and 294 mg/kg in female of rats; in subcutaneous administration, 1,237 mg/kg in male and 1,320 mg/kg in female of mice and 2,000 mg/kg or more in rats; in oral administration, 5,000 mg/kg or more in mice and rats and 1,600 mg/kg or more in dogs and monkeys, respectively.
- 2) As for the toxic signs in nearly lethal intravenous and subcutaneous doses, mice and rats developed ataxia, ptosis and sedation. The dead animals showed further myoclonus and tonic convulsion.
- 3) With regard to oral administration, mice and rats developed no toxic sign; however, there found vomiting in a few dogs receiving the lower dose (25 mg/kg) and in a few monkeys receiving the relatively higher dose (400 mg/kg), respectively.
- 4) Necropsy findings revealed that parenteral doses elicited not only irritable responses in the injected area but also, in subcutaneous route of mice, peritonitis due probably to deposition of the compound-like crystal in the abdominal cavity; however, the other systemic alterations could not be detected in all administration routes.