

CS-807の安全性に関する研究 (第1報) —マウス及びラットによる急性毒性試験—

平野光一・森 昌弘・木村邦男・戸塚繁夫・増田 裕

三共株式会社 安全性研究所

経口用のセファロsporin剤であるCS-807について、マウス及びラットを用いた急性毒性試験を、経口・腹腔内・皮下の3適用にて実施した。この結果、マウスにおけるLD₅₀値は、経口(雌雄とも8000mg/kgより大)・腹腔内(雄3502mg/kg, 雌2535mg/kg)・皮下(雌雄とも10000mg/kgより大)となり、ラットでは経口(雌雄とも4000mg/kgより大)・腹腔内(雌雄とも4000mg/kgより大)・皮下(雌雄とも2000mg/kgより大)となった。また投与期間中の一般状態・平均体重の推移・途中死亡例及び試験終了時の肉眼的剖検観察結果等に、CS-807固有であると見做されるような変化は、いずれの動物においても観察されなかった。以上より、CS-807は非常に低毒性の薬剤である事が判明した。

経口用セファロsporin剤として開発中であるCS-807に対する毒性試験の一環として、マウス及びラットを用いた急性毒性試験を実施したので報告する。

I. 材料と方法

1. 被験物質

本試験において用いたCS-807(分子量557.61)は水に難溶性の白色から淡黄色を呈する結晶性粉末であり、25°C・1年の保存下での含量低下は1~2%程度、また2年間の場合でも3%程度である事が確認されている安定な物質である(中西, 他:未発表データ)。

各試験でのCS-807のロット及び純度はマウスの経口投与でS-12(93.8%)を用いた以外、SS-2(90.2%)を使用した。

2. 使用動物

1) マウス

三共安全性研究所の施設(barrier system)で生産育成した雌雄RFVLを、4週齢で試験室(barrier system)に搬入し、環境に5日間馴化させた後、5週齢で試験に供した。マウスは室温23±2°C・湿度55±5%・照明13時間/日及び換気回数15回/時の条件下、ステンレス製マウスケージ(テーパー式プラケット型:新東洋製作所)を用いた1匹飼育とし、放射線滅菌した固型飼料(NMF:オリエンタル酵母工業株式会社)及び自動給水装置よりの水道水を自由摂取させた。また各動物の個体識別は、ピクリン酸塗布及び耳パンチによる耳

介の穿孔の二種類で行った。なお供試時の動物の体重範囲(g)は、経口・腹腔・皮下でそれぞれ(♂20-24, ♀17-20), (♂23-28, ♀20-24), (♂23-28, ♀19-23)であった。

2) ラット

動物繁殖研究所の施設(barrier system)で生産育成された雌雄Wistar-Imamichiラットを5週齢で購入して三共安全性研究所の試験室(barrier system)に搬入し、環境に1週間馴化させた後、6週齢で試験に供した。ラットは室温23±2°C・湿度55±5%・照明13時間/日及び換気回数15回/時の条件下でステンレス製ラットケージ(テーパー式プラケット型:新東洋製作所)を用いた2ないし3匹飼育とし、放射線滅菌した固型飼料(NMF:オリエンタル酵母工業株式会社)及び自動給水装置よりの水道水を自由摂取させた。また各動物の個体識別は、油性インクによる尾根部への連続番号記入或いはこれとピクリン酸塗布を併用する事により行った。なお供試時の動物の体重範囲(g)は経口・腹腔・皮下でそれぞれ(♂138-151, ♀116-129), (♂157-174, ♀150-169), (♂137-182, ♀143-165)であった。

3. 検体の調製

CS-807は水に難溶性であるため、マウスの経口投与試験で1%のカルボキシメチルセルローズ・ナトリウム/滅菌蒸留水を用いた以外は1%トラガント末/生理食塩

水(経口投与では滅菌蒸留水)を懸濁化剤として用い、終濃度10%のCS-807懸濁液を調製した。なお、いずれの試験においても検体は投与直前に調製した事から、懸濁液中におけるCS-807の安定性が試験に影響を及ぼす事はないと判断した。また、各懸濁液中におけるCS-807の均一性についても別途確認済みである(青木、他:未発表データ)。

4. 投与方法及び投与量

特に断わらない限り、投与量範囲を決めるための予試験が必要な場合は1群・雌雄各10匹の動物を用いた3群、LD₅₀値を求めるための本試験では1群・雌雄各10匹の動物を用いた5群で試験を構成した。なお経口投与試験においては、投与18時間前より絶食させ、投与後に再び給餌を開始した。

1) 経口投与

金属製経口胃ゾンデを用い、マウス及びラットにおいて投与可能な最大量である、それぞれ80ml/kg及び40ml/kgを基準として投与量設定を行った。

2) 腹腔内投与

1/1注射針を用い、マウス及びラットでの投与可能な最大量である、それぞれ100ml/kg及び40ml/kgを基準として投与量の設定を行った。

3) 皮下投与

1/1皮下針を用い、マウス及びラットでの投与可能な最大量である、それぞれ100ml/kg及び20ml/kgを基準として投与量の設定を行った。いずれの動物の場合も、背部皮下に投与した。

5. 観察

いずれの動物の場合も、体重は投与直前を含め投与後14日間にわたり3回、自動天秤(EB-2800M 或いはED-2000M:島津製作所)を用いて計測し、また動物の一般状態及び死亡の有無についても、投与後14日間毎日観察して記録した。観察期間中の死亡例については発見後速やかに、また試験終了時の生存例はエーテルを用いた軽麻酔下に頸動脈を切断する事により放血致死させた後、解剖して諸臓器等の観察を行った。

6. 数値処理

体重に関する平均値及び標準誤差(S.E.M.)並びに各動物でのLD₅₀値は、メインフレーム(4341型:日本IBM株式会社)により計算した。なお、LD₅₀値の算出にはプロビット法を採択した¹⁾。

II. 成績

1. マウス

各投与方式における投与量・死亡動物数・最終死亡率及びLD₅₀値、並びにその信頼限界をTable 1に示し

た。

1) 経口投与

投与可能な最大量である8000mg/kgを最高量とし、以下公比2で漸減させた4000, 2000mg/kgの3用量について試験を実施した。

投与後3時間より8000mg/kg群の全動物に、また4000及び2000mg/kgにおける雌雄の少数例に白色を呈する便の排泄が一過性に認められたが、投与に起因すると思われる一般状態の変化は観察されなかった。試験期間中の平均体重は、雄の2000mg/kg群及び雌の全群で一過性の軽度な減少が観察されたが、投与14日後には雌雄各群とも初体重を上回っていた。また試験終了時の肉眼的剖検所見においても、雌雄全例に異常は認められなかった。

2) 腹腔内投与

LD₅₀値を求めるための本試験に先立ち、投与可能な最大量である10000mg/kgを最高量とし、以下公比2で漸減させた5000及び2500mg/kgの3用量にて、用量設定のための予試験を行った。この結果、1群10匹中の死亡動物数は雄・雌について最高用量よりそれぞれ9, 10, 2及び10, 9, 4匹となった。これを参考に、本試験での最高量を雌雄とも4000mg/kgとし、以下公比約1.2で漸減させた3300, 2800, 2300及び1900mg/kgについて試験を実施した。

4000及び3300mg/kg群では、投与後10分より雌雄全例に呼吸不整、投与後30分から1時間にかけて多数例に動作緩慢が認められ始め、更に投与後6時間には全例が上記症状を伴い腹這いを呈した。また投与後1日には、これら症状に加え雌雄4000mg/kg群の半数例以上及び3000mg/kg群の少数例にふらつき歩行が観察された。2800mg/kg群では、雌において投与後6時間より腹這いが、また投与後1日にふらつき歩行が高率に認められ、さらに雌雄とも呼吸不整・動作緩慢が高用量群と同様な経過で全例に観察された。2300mg/kg群では、雌雄とも投与後10分より呼吸不整、投与後6時間より動作緩慢が全例に認められ、雌では投与後2日以後の少数例に腹這い及びふらつき歩行等が観察された。1900mg/kg群では、雌雄とも投与後1時間より全例に呼吸不整、雄においては投与後6時間の全例に動作緩慢が認められたのみであった。各群の14日間生存例においては、投与後1日目より回復傾向を示し、投与後2から4日にかけて投与前の状態に復帰した。試験期間中の雄の平均体重推移では、投与後2日目に雄の全群で体重減少が見られ、2800及び2300mg/kg群ではこの傾向が5日迄継続して認められた。一方雌では、投与後2日までに4000及び

Table 1 Acute toxicity of CS-807 in RFVL mice

Route	Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Distribution of death							Mortality	LD ₅₀ mg/kg (95% fiducial limits)
				1	2	3	4	5	6	7		
po	male	8000	10								0/10	> 8000
		4000	10								0/10	
		2000	10								0/10	
	female	8000	10								0/10	
		4000	10								0/10	
		2000	10								0/10	
ip	male	4000	10	2	3	2	1				8/10	3502 (3020 - 4062)
		3300	10	1	2						3/10	
		2800	10		1	1					2/10	
		2300	10					1			0/10	
		1900	10								1/10	
			10								/	
	female	4000	10	7	3						10/10	
		3300	10	7	3						10/10	
		2800	10	1	5			2			8/10	
		2300	10				1	1			2/10	
		1900	10								0/10	
			10								/	
sc	male	10000	10	2							2/10	>10000
		5000	10								0/10	
		2000	10								0/10	
	female	10000	10								0/10	
		5000	10								0/10	
		2000	10								0/10	

CS-807 was prepared as 10% suspension with 1% tragacanth powder/physiological saline solution except in the oral experiment, where 1% sodium carboxymethyl cellulose/distilled water solution was used. Five-weeks-old animals were used in the experiments.

3300mg/kg群の全例が死亡したが、2800mg/kg群で投与後5日まで、また2300及び1900mg/kg群では投与後2日まで体重減少が認められた。しかしながら雌雄各群の生存例とも以後は体重が増加傾向を示し、試験終了時には全群とも初体重値を上回っていた。雌雄各群における死亡例の大多数は、上記症状の回復を見る事なく投与後1日目から3日目を中心にして、投与後6日までの間に出現した。肉眼的剖検観察を行ったところ、途中死亡例においては雌雄各群の大多数例の腹腔内に乳白色の検体様物質が認められた。また投与後1日以後に出現した死亡例では、胃底腺部に糜爛・脾臓の萎縮・胃内容物の色調変化(赤褐色・黒褐色)等が観察された。一方、14日間生存した動物では、雌雄各群の少数例に軽度な肝臓被膜の肥厚が認められ、肝臓各葉の辺縁部は鈍角化していた。

3. 皮下投与

投与可能な最大量である10000mg/kgを最高量とし、以下公比2で漸減させた5000と2500mg/kgの3用量につ

いて試験を実施した。

10000mg/kg群では、投与後3時間より雄の2例に呼吸不整・動作緩慢が観察され、投与後24時間にこの2例は死亡した。残りの8例については、観察期間を通じて一般状態に変化は見られなかった。雌では1例に投与後2日から5日にかけて呼吸不整・動作緩慢が認められたが、投与後6日には投与前の状態に回復した。残りの9例については一般状態に変化は見られなかった。5000及び2500mg/kg群では、雌雄全例とも試験期間を通じて一般状態の変化は認められなかった。試験期間中の平均体重は、雄の10000mg/kg群で投与後4日、5000mg/kg群で投与後4日と11日、2500mg/kg群で投与後7日に、また雌の10000mg/kg群では投与後4日と14日、2500mg/kg群で投与後7日にそれぞれ軽度の減少が観察されたが、試験終了時には雌雄各群とも初体重値を上回っていた。肉眼的剖検観察を行った所、途中死亡例では、背部皮下に乳白色の検体と思われる物質が残存していた以外に異常は観察されなかった。また14日間生存した例におい

では、1000mg/kg群の雄8例・雌の全例、500mg/kg群の雌雄各5例、250mg/kg群の雄2例に投与部皮下の変色(赤褐色)が認められ、少数例には水腫が観察された。

2. ラット

各投与方式における投与量・死亡動物数・最終死亡率及びLD₅₀値並びにその信頼限界値をTable 2に示した。

1) 経口投与

投与可能な最大量である4000mg/kgを最高量とし、以下公比2で漸減させた2000と1000mg/kgの3用量について試験を実施した結果、雌雄全例とも投与後3時間から6時間の間に白色を呈する便の排泄が認められたが、投与に起因したと思われる一般状態の変化は観察されなかった。また、試験期間中の平均体重についても、投与期間を通じ雌雄とも順調な増加推移を示した。試験終了時における肉眼的剖検観察では雌雄全例とも異常は観察されなかった。

2) 腹腔内投与

投与可能な最大量である4000mg/kgを最高量とし、以下公比2で漸減させた2000と1000mg/kgの3用量について試験を実施した。

雌雄全例とも投与後10分より6時間まで呼吸不整・動作緩慢を示したが、投与後1日には何れも投与前の状態に回復しており、以後試験終了時まで一般状態に変化は認められなかった。試験期間中の平均体重については、雌雄とも4000mg/kg群で投与後2日に軽度の減少が認められたが、3日目以後は増加傾向を示し、試験終了時には初体重値を上回っていた。2000及び1000mg/kg群では、雌雄とも順調な体重増加を認め、いずれも試験終了時には初体重値を上回っていた。試験終了時における肉眼的剖検観察では、試験群のほぼ全例で大量の内容物を伴った盲腸の膨大が認められた。また雌雄4000及び2000mg/kg群のほぼ全例及び雌雄1000mg/kg群の1ないし2例に肝臓と脾臓の被膜肥厚・肝臓各葉の相互癒着・肝臓と横隔膜の相互癒着が認められ、肝臓各葉の辺縁は鈍角を呈していた。4000mg/kgの雄3例・雌1例及び2000mg/kg群の雄1例の腹腔内には直径1~3mm大の乳白色・検体様物質の残存が認められた。

3) 皮下投与

投与可能な最大量である2000mg/kgを最高量とし、以下公比2で漸減させた1000と500mg/kgの3用量について試験を実施した。

Table 2 Acute toxicity of CS-807 in Wistar-Imamichi rats

Route	Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Distribution of death							Mortality	LD ₅₀ mg/kg
				1	2	3	4	5	6	7		
po	male	4000	10								0/10	>4000
		2000	10								0/10	
		1000	10								0/10	
	female	4000	10								0/10	
		2000	10								0/10	
		1000	10								0/10	
ip	male	4000	10								0/10	>4000
		2000	10								0/10	
		1000	10								0/10	
	female	4000	10								0/10	
		2000	10								0/10	
		1000	10								0/10	
sc	male	2000	10								0/10	>2000
		1000	10								0/10	
		500	10								0/10	
	female	2000	10								0/10	
		1000	10								0/10	
		500	10								0/10	

CS-807 was prepared as 10% suspension with 1% tragacanth powder/distilled water solution in the oral experiment or with 1% tragacanth powder/physiological saline solution in the intraperitoneal and the subcutaneous treatments. Six-weeks-old animals were used in the experiments.

この結果、雌雄全例の投与部位には投与後5日より試験終了時まで浮腫が認められたが、投与に起因したと思われる一般状態の変化は観察されなかった。試験期間中の平均体重は全体的に順調な増加を示したが、雌2000mg/kg群のみで投与後7日に一過性の軽度な減少を示した。しかしながら、この群についても以後回復し、試験終了時には初体重を上回っていた。試験終了時の肉眼的剖検観察においては、雌雄全例の投与部皮下に淡黄色ないし赤褐色を呈した粘液性の水腫が限局性に認められた。また試験群の大多数例に、内容物を伴った盲腸の軽度な膨大が観察された。

III. 考 察

経口適用の抗生物質であるCS-807についてマウス及びラットを用いた急性毒性試験を実施した結果、マウスにおいては腹腔内投与の雄4000mg/kg以上及び雌2800mg/kg以上の高用量で大多数の動物に死亡が見られたが、腹腔内投与での低用量群及び皮下投与での雄の最高投与群で認められた数例の死亡動物を含めた途中剖検観察、並びに経口投与における全動物、腹腔内及び皮下投与での生存例について試験終了時に行った剖検観察の結果ではCS-807固有と見做されるような毒性を示唆する変化は認められなかった。一般状態についても、途中死亡例を含め本薬物固有の毒性に起因すると思われるような変化は見られず、また平均体重も試験終了時には初体重を上回っていた。ラットでは経口・腹腔・皮下の3適用とも、投与可能な最大量にて死亡動物は認められず、また試験期間中の一般状態及び試験終了時の肉眼的剖検観察においても何ら特別な変化は見られなかった。平均体重の推移についても、一過性の軽度な減少が認められたのみであり、いずれの動物も試験終了時には初体重

を上回っていた。

これらの結果を他の経口セファロスポリン剤であるcephradine²⁾、cephalexin³⁾及びcefaclor⁴⁾と比較すると、いずれの場合もマウスにおける腹腔内投与でのLD₅₀値は経口・皮下におけるその1/5から1/10であり、それぞれ(♂805, ♀785mg/kg), (♂410, ♀560mg/kg)及び(♂1575, ♀1891mg/kg)と報告されている。一方ラットではcefaclorの腹腔内投与で雌雄とも1259mg/kgと若干低い値が見られているが、全般に投与方式間における大きな差は認められていない。今回実施したCS-807の結果でも、他の経口セファロスポリン剤と同様な傾向が認められたが、マウスにおける腹腔内投与でのLD₅₀値は、他剤と比較して2から8倍高い値であった事から、CS-807は非常に低毒性な経口セファロスポリン剤である事が確認された。

(試験期間：昭和58年8月～昭和59年9月)

文 献

- 1) FINNEY D. J.: "Probit Analysis", Cambridge University Press (1952)
- 2) 増田裕, 鈴木善雄, 小此木丘: Cephadrineの実験動物に対する毒性試験および胎仔に及ぼす影響について. *Chemotherapy*, 23 (1): 37-68, 1975
- 3) 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試験. *Chemotherapy*, 3 (3): 229-247, 1969
- 4) 長谷川隆司, 三好幸二, 清水康資, 野村章, 中澤政雄: Cefaclorの急性・亜急性ならびに慢性毒性試験. *Chemotherapy*, 27 (S-7): 765-811, 1979

ACUTE TOXICITY STUDIES OF CS-807 IN MICE AND RATS

KOICHI HIRANO, MASAHIRO MORI, KUNIO KIMURA, SHIGEO TOTSUKA, HIROSHI MASUDA
Laboratory Animal Science & Toxicology Laboratories, Sankyo Company Limited, Shizuoka

Acute toxicity studies on CS-807, a cephalosporin antibiotic for per oral administration, were conducted in RFVL mice and Wistar-Imamichi rats by oral, intraperitoneal and subcutaneous treatments. LD₅₀ values obtained after oral, intraperitoneal and subcutaneous administration were : in mice, more than 8000mg/kg in both sexes ; 3502mg/kg in the male and 2535mg/kg in the female ; and more than 10000mg/kg in both sexes. In rats, more than 4000mg/kg ; more than 4000mg/kg ; and more than 2000mg/kg. There were no drug-related changes both in general symptoms and increasing of mean body weights the course of the experiments and any gross findings by autopsy of animals who died during or sacrificed at the end of the experiments.