Tazobactam と Piperacillin の配合剤および Tazobactam のラット腹腔内投与による 6 ヶ月間反復投与毒性試験

林 泰司, 矢田 英昭, Carol S. Auletta*, Ira W. Daly*,
Aleksandar L. Knezevich*, Beverly Y. Cockrell*

大鵬薬品工業株式会社 製薬センター 安全性研究所

*Bio/dynamics, Inc.

A SIX-MONTH INTRAPERITONEAL REPEATED DOSE TOXICITY STUDY OF TAZOBACTAM/PIPERACILLIN AND TAZOBACTAM IN RATS

Taiji HAYASHI, Hideaki YADA, Carol S. AULETTA*, Ira W. DALY*,
Aleksandar L. KNEZEVICH* and Beverly Y. COCKRELL*

*Drug Safety Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.,
224-2, Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan*

**Bio/dynamics, Inc., Mettlers Road, East Millstone,
New Jersey 08875-2360, USA.*

Received February 25, 1994 ; Accepted June 20, 1994

ABSTRACT – Tazobactam (TAZ) is a newly developed β -lactamase inhibitor. Tazobactam/Piperacillin (TAZ/PIPC) is a formulation consisting of TAZ and PIPC in a ratio of 1 : 4. A six-month intraperitoneal repeated dose toxicity study of TAZ/PIPC and TAZ including a one-month recovery period were carried out using male and female rats. The doses were 200, 400 and 800 mg/kg/day for TAZ/PIPC, and 40, 80 and 160 mg/kg/day for TAZ. The results were as follows.

1. No test article-related deaths occurred during the study period. No effect on clinical finding of survival rats was evident.

2. There was no dose-related increases of food consumption in both the males and females given TAZ/PIPC and PIPC. Slight reductions in body weight gain occurred in males given 800 mg/kg/day of TAZ/PIPC.

3. Decreases in erythrocyte, hemoglobin and hematocrit, and increases in reti-

連絡先：〒771-01 徳島市川内町平石夷野224-2

大鵬薬品工業株式会社

製薬センター 安全性研究所 林 泰司

culocytes were seen only at study termination in the group given 800 mg/kg/day of TAZ/PIPC. Increases in reticulocytes were seen only at study termination in the females given 80 or 160 mg/kg/day of TAZ.

4. A decrease in triglyceride levels was observed in the males given 800 mg/kg/day of TAZ/PIPC or 160 mg/kg/day of TAZ.

5. The ophthalmoscopic examination or urinalysis show no test article-related changes.

6. Enlarged ceca in all groups of animals given TAZ/PIPC and in the females given 160 mg/kg/day of TAZ were observed.

7. An increase of relative organ weight in liver was noted in the males and females given 800 mg/kg/day of TAZ/PIPC, in the males given 80 or 160 mg/kg/day of TAZ and in the females given 160 mg/kg/day of TAZ.

8. In the hepatocytes, accumulation of PAS-positive materials which was identified histochemically and ultrastructurally as glycogen, was present in the males given 800 mg/kg/day of TAZ/PIPC and in the males given 80 or 160 mg/kg/day of TAZ.

9. After a one-month recovery period, the changes of liver had generally disappeared, suggesting that they were reversible.

10. From the histopathological changes of liver, the no-toxic dose level in both the males and females was 400 mg/kg/day and 40 mg/kg/day for TAZ/PIPC and TAZ, respectively.

KEY WORDS : Tazobactam, Piperacillin, β -lactamase inhibitor, 6 month repeated dose study, Rat.

緒 言

Tazobactam（以下 TAZ と省略する）は大鵬薬品工業株式会社で新規に合成された β -ラクタマーゼ阻害作用を有する物質である。一方、富山化学工業株式会社で開発された Piperacillin（以下 PIPC と省略する）は長年臨床使用されており、安全性、有効性の面で高い評価を受けてきた広域ペニシリン製剤である。しかし、PIPC は三橋らの分類（1981）の penicillinase (PCase), oxyiminocephalosporinase (CXase) および一部の cephalosporinase (CEPase) 型の β -ラクタマーゼに対して不安定であるために各種細菌において耐性株がみられるようになってきた。そこで、これらの β -ラクタマーゼに対して阻害活性を有する TAZ と PIPC を 1 対 4 の割合で配合（以下 TAZ/PIPC と省略する）することにより、各種 β -ラクタマーゼ産生菌に対して PIPC に比べ抗菌力の増強が期待される。

今回、我々は TAZ/PIPC の安全性試験の一環とし

て、ラットを用いた腹腔内投与による 6 ヶ月間の回復投与毒性試験および 1 ヶ月間の回復試験を実施したので報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質

TAZ は化学名 (+)-(2S, 3S, 5R)-3-methyl-7-oxo-3-((1H-1, 2, 3-triazol-1-ylmethyl)-4-thia-1-azabicyclo[3. 2. 0]heptane-2-carboxylic acid 4, 4-dioxide で分子量 300.30 である。ジメチルホルムアミドに溶解やすく、水、メタノールまたはエタノールに溶けにくく、エーテルにほとんど溶けない白色ないし微黄色の結晶性の粉末で、においはないか、または、わずかに特異なにおいがある。

PIPC は化学名 sodium (2S, 5R, 6R)-6-((2R)-2-[(4-ethyl-2, 3-dioxo-1-piperazinyl)formamido]-2-phenylacetamido)-3, 3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3. 2. 0]heptane-2-carboxylate で分子量 539.54 である。水およびメタノールに溶解やすく、

エタノールにやや溶けにくく、アセトン、酢酸エチルまたはクロロホルムにはほとんど溶けない白色の粉末でにおいはなく、味はわずかに苦い。

2. 使用動物および飼育条件

Charles River Breeding Laboratories, Inc. (Kingston, New York, U.S.A.) から購入した41日齢のSD (CD) 系雌雄ラット (雄: 339匹, 雌: 338匹) を, 2週間検疫馴化した後, 健康状態の良好な動物を選び実験に供した。

動物は予備飼育期間を含む全実験期間中, 温度19~24℃, 湿度30~70%, 12時間照明に設定された動物室で, ステンレス製金網ケージに入荷1週間は2匹, その後は個別に収容し飼育した。また, 飼料 (Purina Certified Rodent Chaw #5002) および水は自由に摂取させた。

実験開始時の体重範囲は, 雄175~218 g, 雌140~172 gであった。

3. 被験物質の調製

TAZ および PIPC とも, 溶解補助剤として炭酸水素ナトリウムを用いて注射用蒸留水に溶解し, TAZ/PIPC 8/32, 16/64, 32/128 mg/ml および TAZ 8, 16, 32 mg/ml の濃度に調製し, 投与溶液とした。

4. 投与量および投与方法

投与量は, ラットを用いた腹腔内投与による1ヵ月間の反復投与毒性試験 (未発表) の結果, TAZ/PIPC 3200 mg/kg/day および TAZ 640 mg/kg/day で肝重量の増加, TAZ/PIPC 800, 3200 mg/kg/day および TAZ 160, 640 mg/kg/day で肝にグリコーゲン顆粒の蓄積がみられた。従って, TAZ/PIPC 800 mg/kg/day を最高用量とし, 以下, 公比2で除した400, 200 mg/kg/day, TAZ/PIPC の各用量に含有される TAZ 160, 80, 40 mg/kg/day および対照群の計7群を設定した。

投与方法は PIPC の1日あたりの臨床投与回数に準じて1日2回とし, 投与回数および期間を考慮し静脈内投与に変わる投与経路として腹腔内投与とした。従って, 1日の総投与容量としていずれも5 ml/kg を2分割し, 約5時間の間隔を置いて1日2回腹腔内に投与した。なお, 対照群には投与群と

同様な方法で生理食塩液を投与した。

5. 投与期間および回復期間

動物は, 体重を指標としてコンピュータにより無作為に各群に振り分け, TAZ/PIPC 400, 800 mg/kg/day 群, TAZ 80, 160 mg/kg/day 群および対照群は雌雄各30例, TAZ/PIPC 200 mg/kg/day 群, TAZ 40 mg/kg/day 群は雌雄各20例とした。各群とも6ヵ月間投薬後に雌雄各群20例を解剖し, さらに, 対照群, TAZ/PIPC 400, 800 mg/kg/day および TAZ 80, 160 mg/kg/day 群については, 雌雄各10例により1ヵ月間の休薬による回復試験を実施した。

6. 観察および検査項目

全例について投与および回復期間を通し1日2回, 死亡の有無および一般状態の観察を行った。

体重は投与開始日, その後週1回, 摂餌量は投与前1回, その後週1回の頻度でいずれも全例について測定した。

眼科学的検査として, 全例について投与前, 投与開始後1, 3, 6ヵ月に眼瞼, 結膜を肉眼的に観察した後, アトロピンを用いて散瞳させ角膜, 前房, 水晶体, 虹彩, 硝子体, 網膜, 視神経乳頭を間接検眼鏡によって検査した。

投与開始後3ヵ月に雌雄各群10匹, 投与期間終了時に雌雄各群20匹 (投与開始後3ヵ月に検査した雌雄各群10匹を含む) および回復期間終了時に雌雄各群の全生存例について, 採血前に一晩絶食させた後, エーテル麻酔下で眼窩静脈叢から採取して EDTA 処理した血液にて血液学的検査, 血漿にて凝固系検査, 血清にて血液生化学的検査を実施した。さらに, 一晩絶食水にて16時間の蓄積尿を採取し尿検査を実施した。なお, 上記臨床検査項目および使用機器を Table 1 に示した。

投与および回復期間終了時には, エーテル麻酔下で放血致死させ全身諸臓器の肉眼的な観察および脳, 下垂体, 甲状腺 (上皮小体を含む), 胸腺, 肺, 肝臓, 心臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 前立腺, 精巣 (精巣上体を含む), 精囊, 卵巣, 子宮の重量 (絶対重量) を測定し, 比重量 (相対重量) を算出した。上記重量測定臓器のほか, 眼球 (視神経およびハーダー腺を含む), 顎下腺, 舌, 喉頭, 気管, 食道, 胃, 十

Table 1. Summary of clinical pathology determinations.

Parameter	Instrument Used
Urinalysis	
Volume	Measuring cylinder
Specific Gravity (Spec. Grav)	National Refractometer
Microscopic Elements	Microscopy
pH, Protein, Glucose, Ketones, Bilirubin, Occult Blood, Urobilinogen	Ames
Hematology	
Leukocyte Count (WBC), Erythrocyte Count (RBC)	Ortho ELT-8
Hemoglobin (Hb), Hematocrit (Ht), MCV, MCH, MCHC, Platelet (PLAT)	
Differential Leukocyte Count, Reticulocyte (Retic.)	Microscopy
Prothrombin Time (PT)	COAG-A-MATE®
Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)	
Biochemistry	
Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT), Lactic Dehydrogenase (LDH), Alkaline Phosphatase (ALP), Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ-GTP), Glucose, Cholesterol, Triglyceride (TG), Total Protein (TP), Albumin, Total Bilirubin (T. Bil), Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine, Calcium (Ca), Inorganic Phosphorus (IP), Sodium (Na) Potassium (K), Chloride (Cl)	Hitachi 717
Globulin, Albumin/Globulin ratio (A/G)	Calculated

MCV : Mean Corpuscular Volume, MCH : Mean Corpuscular Hemoglobin,
MCHC : Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，臍臓，大動脈，大腿骨，胸骨，骨髓（胸骨），脊髓（胸部），坐骨神経（大腿二頭筋），骨格筋（大腿二頭筋），リンパ節（腸間膜，縦隔），尿管，尿道，膀胱，膣，乳腺，皮膚，投与部位，肉眼的病変組織，腫瘍は10%中性緩衝ホルマリン液（眼球，精巣，精巣上体はブアン液）で固定後，常法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して病理組織学的検査に供した。肝については，過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色および消化PAS染色（ジアスターゼ消化法）を行った。胸骨骨髓については，塗抹標本作製し

ライト染色により観察した。さらに，対照群，TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群および TAZ 160 mg/kg/day 群については，投与期間終了時には雌雄各4例および回復期間終了時には雌雄2例の肝の小片を採取し5%緩衝グルタルアルデヒド液で固定後，常法に従って電子顕微鏡用ブロックを作製し電子顕微鏡による観察を行った。

7. 統計学的方法

計量データの統計学的解析は，バートレット法による等分散性の検定を行い，等分散の場合パラメトリック手法を，不分散の場合ノンパラメトリック手

法を用いた。パラメトリック手法による有意差検定は、一元配置分散分析を行い、有意な場合はダネット型の有意差検定を行った。ノンパラメトリック手法の場合は、クラスカル・ワリス検定を行い、有意な場合ダン型の有意差検定を行った。なお、等分散検定は両側1%で有意差ありとし、他のすべての統計学的検定は両側5および1%で有意差ありとした。

実験成績

1. 一般状態の観察

投与期間中に、対照群では雄1例（投与開始後5週）、雌2例（5および6週）、TAZ/PIPC投与群では200 mg/kg/day群で雄1例（3週）、400 mg/kg/day群で雄1例（2週）、800 mg/kg/dayで雄1例（3週）、雌2例（4および5週）、TAZ投与群では40 mg/kg/day群で雄2例（1および6週）、雌1例（3週）、80 mg/kg/day群で雄1例（6週）が死亡した。

TAZ/PIPC および TAZ 投与群では、雌雄とも投与および回復期間を通して死亡例の発現以外には、一般状態に著変はみられなかった。

2. 体重の推移（Fig. 1 および 2）

TAZ/PIPC 投与群の雄では、800 mg/kg/day 群で増加抑制がみられ、投与開始後10および13週には統計学的に有意であった。400 mg/kg/day 以下の群では軽度な増加抑制がみられたが、統計学的に有意な変化ではなかった。一方、雌では対照群とほぼ同様な推移を示した。

TAZ 投与群では、雄に軽度な増加抑制がみられたが、統計学的に有意な変化ではなく、雌では対照群とほぼ同様な推移を示した。

3. 摂餌量の推移（Fig. 3 および 4）

TAZ/PIPC および TAZ 投与群では、雌雄とも投与および回復期間を通して、摂餌量の増加がみられたが、用量反応性は明らかではなかった。

4. 眼科学的検査

TAZ/PIPC および TAZ 投与群では、雌雄ともい

Fig. 1. Changes of mean body weight in male rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Fig. 2. Changes of mean body weight in female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Fig. 3. Changes of mean food consumption in male rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Fig. 4. Changes of mean food consumption in female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

ずれの検査時期にも著変はみられなかった。

5. 尿検査 (Table 2)

TAZ/PIPC 投与群では、雌雄全群で投与開始後3ヵ月および投与期間終了時に pH の低下傾向がみられたが、回復期間終了時には変化はみられなかった。

TAZ 投与群では、雌雄ともいずれの検査時期にも著変はみられなかった。

6. 血液学的検査 (Table 3 および 4)

TAZ/PIPC 投与群では、800 mg/kg/day 群の雌雄で投与期間終了時に赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の減少および網状赤血球率の増加あるいは増加傾向がみられた。

TAZ 投与群では、80および160 mg/kg/day 群の雌で投与期間終了時に網状赤血球率の増加傾向がみられた。

回復期間終了時には、TAZ/PIPC および TAZ 投与の雌雄とも著変はみられなかった。

その他、統計学的に有意な変化が散発的にみられ

たが、いずれも用量反応性のある変化ではなかった。

7. 血液生化学的検査 (Table 5 および 6)

TAZ/PIPC 投与群では、800 mg/kg/day 群の雄および雌全群で投与開始後3ヵ月あるいは投与期間終了時に中性脂肪の減少がみられたが、雌では用量反応性は明らかでなかった。

TAZ 投与群でも、160 mg/kg/day 群の雄および雌全群で投与開始後3ヵ月あるいは投与期間終了時に中性脂肪の減少がみられたが、雌では用量反応性は明らかでなかった。

回復期間終了時では、TAZ/PIPC および TAZ 投与群の雄では、特記すべき変化はみられなかった。一方、雌全群では中性脂肪の減少が残存した。

その他、統計学的に有意な変化が散発的にみられたが、いずれも用量依存性のある変化ではなかった。

8. 臓器重量および比重量 (Table 7 および 8)

TAZ/PIPC 投与群では、800 mg/kg/day 群の雌雄に肝の比重量の増加がみられ、雌全群に腎の比重量の増加がみられた。

Table 2. Urinalysis in male and female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound		Control	TAZ/PIPC				TAZ		
Dose (mg/kg/day)		0	200	400	800	40	80	160	
No. of animals		10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	10 ^{a)} 20 ^{b)}	10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	10 ^{a)} 20 ^{b)}	10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	
Item (Unit)	Period								
Male									
pH	3	8±0.6	7±0.6	7±0.8	7±0.6	8±0.4	8±0.5	7±0.6	
	6	8±0.5	7±0.7 ^{e)}	7±0.7	7±0.7	8±0.5 ^{e)}	8±0.6	8±0.6	
	Re	7±0.6 ^{g)}	—	8±0.7	8±0.4 ^{g)}	—	8±0.3 ^{g)}	7±0.6	
Volume (ml)	3	9±3.2	7±4.4	7±1.8	9±3.6	9±2.6	8±3.4	8±3.7	
	6	9±3.5 ^{e)}	8±2.1 ^{e)}	8±2.9 ^{e)}	8±4.0 ^{d)}	8±3.7 ^{e)}	7±2.4 ^{f)}	8±2.2 ^{d)}	
	Re	6±2.5 ^{g)}	—	8±3.3	6±1.6 ^{g)}	—	7±5.4 ^{g)}	6±2.5	
Spec. Grav	3	1.065±0.0203	1.063±0.0279	1.066±0.0175	1.072±0.0164	1.060±0.0186	1.068±0.0142	1.061±0.0178	
	6	1.051±0.0201 ^{d)}	1.059±0.0219 ^{e)}	1.059±0.0189	1.066±0.0244	1.051±0.0225 ^{e)}	1.061±0.0203	1.058±0.0205	
	Re	1.057±0.0274 ^{g)}	—	1.054±0.0214	1.054±0.0185 ^{g)}	—	1.059±0.0219 ^{g)}	1.052±0.0113	
Female									
pH	3	8±0.9	7±0.9	6±0.5	6±0.4	7±0.9	7±0.7	7±0.8	
	6	7±0.6	7±0.8 ^{d)}	7±0.8 ^{d)}	6±0.8 ^{d)}	8±0.8 ^{e)}	7±1.0	7±0.7	
	Re	7±0.8 ^{h)}	—	7±0.8	8±0.8 ^{h)}	—	8±0.8	7±1.0	
Volume (ml)	3	5±3.1	5±1.8	5±2.7	5±1.6	5±1.8	5±1.6	6±2.4	
	6	4±2.6	4±1.9	5±2.2 ^{d)}	6±3.2 ^{d)}	5±3.0	4±2.2	4±2.3	
	Re	2±1.7 ^{h)}	—	6±2.8	6±3.8 ^{h)}	—	2±1.2	3±2.9	
Spec. Grav	3	1.071±0.0169	1.066±0.0292	1.071±0.0161	1.081±0.0151	1.057±0.0245	1.068±0.0221	1.077±0.0168	
	6	1.061±0.0198	1.069±0.0208	1.062±0.0215 ^{d)}	1.072±0.0200 ^{d)}	1.051±0.0176 ^{d)}	1.063±0.0168	1.073±0.0162	
	Re	1.063±0.0252 ^{h)}	—	1.042±0.0127	1.043±0.0167 ^{h)}	—	1.068±0.0267	1.063±0.0232	

a) : No. of animals examined at 3-month. b) : No. of animals examined at 6-month. c) : No. of animals examined at recovery period. d) : The number of animals was 19.

e) : The number of animals was 18. f) : The number of animals was 17. g) : The number of animals was 9. h) : The number of animals was 8.

Values are Mean±S.D.

Table 3. Hematology in male and female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound		Control	TAZ/PIPC			TAZ		
Dose (mg/kg/day) No. of animals		0 10 ^{a)} 20 ^{b)} 9 ^{c)}	200 10 ^{a)} 18 ^{b)}	400 10 ^{a)} 19 ^{b)} 10 ^{c)}	800 10 ^{a)} 20 ^{b)} 9 ^{c)}	40 10 ^{a)} 18 ^{b)}	80 10 ^{a)} 20 ^{b)} 9 ^{c)}	160 10 ^{a)} 20 ^{b)} 9 ^{c)}
Item (Unit)	Period							
WBC ($\times 10^3/\text{cmm}$)	3	12.9 $\pm$ 4.1	11.3 $\pm$ 3.5	12.5 $\pm$ 1.6	12.9 $\pm$ 2.1	13.7 $\pm$ 2.3	10.8 $\pm$ 1.9	13.2 $\pm$ 2.2
	6	11.9 $\pm$ 2.8	9.4 $\pm$ 2.9	10.8 $\pm$ 2.6	10.2 $\pm$ 3.3	11.0 $\pm$ 2.1	10.5 $\pm$ 2.6	11.3 $\pm$ 2.7
	Re	13.5 $\pm$ 4.5	—	10.7 $\pm$ 2.6	8.8 $\pm$ 1.4	—	11.1 $\pm$ 3.7	10.6 $\pm$ 2.6
RBC ($\times 10^6/\text{cmm}$)	3	6.56 $\pm$ 0.79	6.37 $\pm$ 0.90	6.63 $\pm$ 0.61	6.36 $\pm$ 0.50	6.76 $\pm$ 0.25	6.90 $\pm$ 0.42	6.63 $\pm$ 0.82
	6	7.84 $\pm$ 0.32	7.56 $\pm$ 0.46	7.42 $\pm$ 0.68	7.32 $\pm$ 0.70*	7.48 $\pm$ 0.47	7.54 $\pm$ 0.70	7.83 $\pm$ 0.54
	Re	7.75 $\pm$ 0.64	—	7.90 $\pm$ 0.41	7.69 $\pm$ 0.58	—	7.63 $\pm$ 0.56	7.86 $\pm$ 0.42
Hb (g/dl)	3	15.9 $\pm$ 1.6	15.8 $\pm$ 1.5	15.9 $\pm$ 1.3	15.4 $\pm$ 1.3	16.2 $\pm$ 0.6	16.1 $\pm$ 0.9	15.7 $\pm$ 1.9
	6	15.6 $\pm$ 0.8	15.2 $\pm$ 1.0	14.9 $\pm$ 1.1	14.8 $\pm$ 0.9*	15.1 $\pm$ 1.0	14.6 $\pm$ 1.1*	15.0 $\pm$ 1.0
	Re	15.9 $\pm$ 1.3	—	15.9 $\pm$ 0.8	15.9 $\pm$ 1.2	—	15.6 $\pm$ 1.3	15.9 $\pm$ 0.3
Ht (%)	3	42 $\pm$ 4	41 $\pm$ 5	42 $\pm$ 4	41 $\pm$ 4	43 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	42 $\pm$ 5
	6	45 $\pm$ 2	44 $\pm$ 3	43 $\pm$ 3	42 $\pm$ 3*	43 $\pm$ 3	42 $\pm$ 3*	43 $\pm$ 3
	Re	44 $\pm$ 3	—	43 $\pm$ 2	43 $\pm$ 3	—	43 $\pm$ 3	43 $\pm$ 1
MCV (μm^3)	3	64 $\pm$ 4	65 $\pm$ 4	64 $\pm$ 3	65 $\pm$ 3	64 $\pm$ 2	62 $\pm$ 3	63 $\pm$ 2
	6	57 $\pm$ 2	58 $\pm$ 2	58 $\pm$ 3	58 $\pm$ 4	58 $\pm$ 2	56 $\pm$ 3	55 $\pm$ 3*
	Re	56 $\pm$ 1	—	55 $\pm$ 3	56 $\pm$ 2	—	56 $\pm$ 2	55 $\pm$ 2
MCH (pg)	3	24.3 $\pm$ 1.7	25.0 $\pm$ 1.7	24.1 $\pm$ 1.2	24.3 $\pm$ 1.0	24.0 $\pm$ 0.8	23.4 $\pm$ 1.2	23.8 $\pm$ 1.0
	6	19.9 $\pm$ 1.0	20.2 $\pm$ 0.8	20.1 $\pm$ 1.2	20.3 $\pm$ 1.5	20.2 $\pm$ 0.7	19.4 $\pm$ 0.9	19.1 $\pm$ 0.7*
	Re	20.5 $\pm$ 0.4	—	20.1 $\pm$ 1.1	20.6 $\pm$ 0.5	—	20.5 $\pm$ 1.3	20.2 $\pm$ 1.1
MCHC (%)	3	38.2 $\pm$ 0.7	38.2 $\pm$ 0.9	37.6 $\pm$ 1.3	37.6 $\pm$ 1.0	37.6 $\pm$ 0.6	37.8 $\pm$ 0.7	37.5 $\pm$ 0.6
	6	35.0 $\pm$ 1.2	34.8 $\pm$ 0.8	34.9 $\pm$ 1.0	35.0 $\pm$ 0.9	34.8 $\pm$ 0.9	34.8 $\pm$ 0.7	35.0 $\pm$ 1.0
	Re	36.5 $\pm$ 0.6	—	36.5 $\pm$ 1.1	36.7 $\pm$ 0.8	—	36.6 $\pm$ 0.9	36.5 $\pm$ 0.7
PLAT ($\times 10^3/\text{cmm}$)	3	10.04 $\pm$ 1.28	9.70 $\pm$ 1.19	10.12 $\pm$ 2.06	10.39 $\pm$ 2.16	10.47 $\pm$ 1.48	10.10 $\pm$ 1.09	10.11 $\pm$ 1.53
	6	12.88 $\pm$ 2.22	12.20 $\pm$ 1.35	12.66 $\pm$ 2.33	14.40 $\pm$ 2.70	12.67 $\pm$ 2.66	12.42 $\pm$ 2.43	13.26 $\pm$ 1.96
	Re	11.22 $\pm$ 1.42	—	11.94 $\pm$ 1.06	12.26 $\pm$ 1.28	—	11.38 $\pm$ 1.88	12.42 $\pm$ 2.25
Retic. (% RBC)	3	1.1 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 2.7	0.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2
	6	1.8 $\pm$ 1.0	2.4 $\pm$ 1.7	3.2 $\pm$ 2.0	2.8 $\pm$ 2.4	2.3 $\pm$ 1.8	2.7 $\pm$ 1.9	3.1 $\pm$ 2.1
	Re	2.4 $\pm$ 0.9	—	2.4 $\pm$ 1.0	2.3 $\pm$ 0.7	—	2.8 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 1.0

*P $\leq$ 0.05 ; Significant difference from control. Values are Mean $\pm$ S.D.

a) : No. of animals examined at 3-month. b) : No. of animals examined at 6-month. c) : No. of animals examined at recovery period.

Table 4. Hematology in female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound		Control		TAZ/PIPC			TAZ		
Dose (mg/kg/day)		0		200	400	800	40	80	160
No. of animals		10 ^(a) 20 ^(b) 8 ^(c)		9 ^(a) 20 ^(b)	10 ^(a) 19 ^(b) 10 ^(c)	10 ^(a) 20 ^(b) 8 ^(c)	10 ^(a) 19 ^(b)	10 ^(a) 20 ^(b) 10 ^(c)	10 ^(a) 20 ^(b) 10 ^(c)
Item (Unit)	Period								
WBC (×10 ³ /cmm)	3	10.6±4.3		9.1±4.1	9.1±3.7	10.2±3.6	11.1±3.3	9.8±3.6	9.8±4.1
	6	6.6±1.5		6.1±1.5	6.2±1.7	6.8±2.0	8.0±2.6	7.0±1.7	8.1±3.8
	Re	6.4±1.7		—	5.7±1.4	6.7±1.5	—	6.3±1.7	5.9±1.6
RBC (×10 ⁶ /cmm)	3	6.29±0.41		5.59±1.06	5.93±0.47	5.74±0.77	6.02±0.57	6.06±0.59	5.70±0.77
	6	6.73±0.98		6.70±0.86	6.74±0.58	5.82±1.03**	6.53±0.90	6.16±1.18	6.26±1.15
	Re	7.03±0.43		—	6.91±0.25	7.13±0.37	—	6.96±0.86	7.18±0.39
Hb (g/dl)	3	15.8±1.2		14.8±2.4	15.6±0.9	15.0±1.2	15.2±1.2	15.8±1.3	15.6±1.4
	6	14.6±2.1		14.6±1.5	14.7±1.0	13.3±2.1	14.3±1.6	13.6±2.2	13.8±2.1
	Re	15.5±1.2		—	16.1±0.8	16.4±0.8	—	15.8±1.7	16.3±0.7
Ht (%)	3	42±3		39±7	41±2	40±4	41±3	42±3	41±4
	6	42±6		42±4	43±3	38±6*	41±4	39±7	40±6
	Re	43±3		—	44±2	45±2	—	43±5	45±2
MCV (μm ³)	3	67±2		70±4	69±4	70±4	68±2	69±3	73±6*
	6	63±2		64±4	64±3	66±4**	64±4	64±3	65±5
	Re	61±2		—	64±2*	64±3	—	62±2	63±2
MCH (pg)	3	25.1±0.9		26.7±1.9	26.3±1.6	26.5±2.3	25.3±1.0	26.0±1.2	27.6±2.0**
	6	21.7±0.8		22.0±1.4	21.9±1.3	23.0±1.3**	22.0±1.3	22.2±1.2	22.2±1.5
	Re	22.0±0.9		—	23.4±0.9*	22.9±1.2	—	22.7±0.9	22.8±1.1
MCHC (%)	3	37.6±0.7		38.2±0.9	38.0±0.9	37.9±1.0	37.5±1.1	37.6±0.4	38.0±0.8
	6	34.5±1.0		34.6±0.9	34.2±1.6	34.7±0.9	34.5±0.6	34.5±0.7	34.5±0.7
	Re	36.3±0.4		—	36.5±0.5	36.2±0.5	—	36.4±0.4	36.4±0.8
PLAT (×10 ³ /cmm)	3	9.56±1.84		10.70±2.62	10.74±1.89	11.22±1.48	10.88±1.82	10.65±2.53	10.33±1.78
	6	11.58±2.45		12.58±2.51	12.66±3.07	14.00±2.08*	13.08±3.04	12.73±2.69	14.07±3.54
	Re	12.19±3.45		—	10.61±1.49	11.10±1.42	—	10.70±1.28	11.14±1.17
Retic. (% RBC)	3	0.4±0.3		3.6±8.3	1.0±1.6	2.1±2.6	1.2±1.2	0.6±0.5	1.5±2.1
	6	2.7±3.3		3.7±6.2	3.7±2.1	5.8±4.3**	4.2±6.7	5.7±4.2	5.9±6.1
	Re	1.7±0.7		—	1.9±0.6	1.4±0.8	—	1.3±0.3	1.4±0.6

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$; Significant difference from control. Values are Mean $\pm$ S.D.

a) : No. of animals examined at 3-month. b) : No. of animals examined at 6-month. c) : No. of animals examined at recovery period.

Table 5. Biochemistry in male rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound	Dose (mg/kg/day) No. of animals	Period	Control	TAZ/PIPC			TAZ		
				200 10 ^{a)} 19 ^{b)}	400 10 ^{a)} 19 ^{b)} 10 ^{c)}	800 10 ^{a)} 20 ^{b)} 9 ^{c)}	40 10 ^{a)} 18 ^{b)}	80 10 ^{a)} 20 ^{b)} 9 ^{c)}	160 10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}
AST (IU/l)	3		76±13	95±20	100±29	112±57	82±12	96±36	110±47
	6		111±176	98±29	135±46 ^{e)} **	101±44	80±18	96±24	98±47
	Re		103±36	—	77±27	76±23	—	82±24	80±15
ALT (IU/l)	3		28±5	25±6	28±5	30±18	22±5	27±8	28±8
	6		112±366	31±11	41±20	26±6	26±7	37±13	29±9
	Re		38±12	—	33±8	30±11	—	28±8	31±10
LDH (IU/l)	3		1041±398	1134±545	1034±322	1062±606	1109±499	1111±594	1175±552
	6		822±483	1016±602	918±417	990±625	770±432	900±389	897±684
	Re		1075±398	—	739±403	706±406	—	788±436	940±526
AIP (IU/l)	3		60±10	68±16	70±20	70±16	65±11	67±12	63±10
	6		79±89	77±29	77±27	67±18	59±13	73±40	70±19
	Re		61±24	—	62±24	55±12	—	55±15	65±14
γ-GTP (IU/l)	3		2±1 ^{l)}	2±1 ^{m)}	2±1 ^{l)}	1±1 ⁿ⁾	2±1 ^{l)}	2±1 ^{l)}	2±2 ^{m)}
	6		1±1 ^{e)}	1±1 ^{l)}	1±1 ^{e)}	1±1 ^{l)}	1±1 ^{l)}	1±1 ^{d)}	1±1
	Re		1±2 ^{l)}	—	0±0 ^{l)}	1±1 ^{l)}	—	0±0 ^{k)}	1±1 ^{l)}
Glucose (mg/dl)	3		153±30	157±21	160±15	141±24	157±20	153±24	161±24
	6		152±29	147±21	148±22	138±17	146±13	143±17	145±21
	Re		160±25	—	160±19	154±16	—	151±13	153±16
TG (mg/dl)	3		92±46	78±35	72±28	39±8**	102±68	113±51	63±13
	6		137±73	87±36	99±37	53±17**	139±57	112±39	70±28**
	Re		127±61	—	121±91	123±83	—	163±81	110±32
TP (g/dl)	3		6.8±0.2	6.5±0.2*	6.9±0.3	6.6±0.2	6.8±0.3	6.9±0.4	6.7±0.3
	6		6.9±0.3	6.8±0.4	6.9±0.5	6.9±0.2	6.8±0.2	7.0±0.4	7.1±0.4
	Re		7.3±0.2	—	7.3±0.2	7.3±0.4	—	7.4±0.3	7.3±0.3
BUN (mg/dl)	3		14.4±1.6	15.0±1.4	14.8±1.8	13.7±1.1	14.2±1.5	15.9±1.4	14.7±2.6
	6		14.1±1.6	12.8±1.6*	12.8±1.2*	12.9±1.5*	13.4±2.3	14.7±3.1	15.0±3.3
	Re		14.3±1.6	—	16.2±5.1	13.8±1.3	—	15.1±4.0	15.1±1.3

*P≤0.05, **P≤0.01; Significant difference from control. Values are Mean±S.D.

a) : No. of animals examined at 3-month. b) : No. of animals examined at 6-month. c) : No. of animals examined at recovery period. d) : The number of animals was 19.
e) : The number of animals was 18. f) : The number of animals was 17. i) : The number of animals was 14. j) : The number of animals was 9. k) : The number of animals was 8.
l) : The number of animals was 7. m) : The number of animals was 6. n) : The number of animals was 5.

Table 6. Biochemistry in female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound	Dose (mg/kg/day) No. of animals Item (Unit) Period	Control		TAZ/PIPC			TAZ		
		0 10 ^{a)} 20 ^{b)} 8 ^{c)}	200 10 ^{a)} 20 ^{b)}	400 10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	800 10 ^{a)} 20 ^{b)} 8 ^{c)}	40 10 ^{a)} 19 ^{b)}	80 10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	160 10 ^{a)} 20 ^{b)} 10 ^{c)}	
AST (IU/l)	3 6 Re	87±41 132±147 116±118	107±21 134±144 —	105±24 95±33 70±26	109±35 108±39 69±24	98±30 102±37 —	88±19 107±55 95±51	94±24 80±21 65±14	
ALT (IU/l)	3 6 Re	33±15 56±54 60±48	30±10 43±30 —	31±8 38±16 30±10	36±11 38±18 28±8	31±8 36±13 —	25±6 34±18 37±15	28±6 26±6* 27±7	
LDH (IU/l)	3 6 Re	804±381 603±241 582±328	1314±492 786±489 —	1101±583 611±384 444±198	1034±494 667±358 453±240	1103±608 727±325 —	999±407 679±245 486±281	947±266 667±237 445±213	
ALP (IU/l)	3 6 Re	49±13 36±11 35±11	45±15 34±14 —	40±14 37±16 33±13	52±9 42±17 32±11	46±20 36±12 —	48±18 32±11 30±11	43±15 47±62 38±8	
γ-GTP (IU/l)	3 6 Re	3±1 ^{m)} 1±1 ^{d)} 0±0 ^{b)}	2±2 ⁿ⁾ 0±1 ^{h)} —	3±2 ^{o)} 1±1 ^{h)} 0±0 ^{m)}	2±1 ^{m)} 1±1 ^{g)} 0±1 ^{p)}	2±2 ^{m)} 1±1 ^{e)} —	2±2 ⁿ⁾ 1±1 ^{f)} 0±0 ^{m)}	3±1 ⁿ⁾ 1±1 ^{d)} 0±0 ^{b)}	
Glucose (mg/dl)	3 6 Re	130±24 129±17 131±23	126±24 129±17 —	115±20 131±21 121±10	122±15 121±18 117±8	122±30 129±20 —	120±12 132±16 122±15	116±16 119±20 120±11	
TG (mg/dl)	3 6 Re	60±15 72±28 92±62	34±10 ^{**} 54±21 —	34±9 ^{**} 59±31 70±34	37±15 ^{**} 53±25 52±11	37±9 ^{**} 62±20 —	40±12 ^{**} 61±24 76±33	37±8 ^{**} 59±21 60±15	
TP (g/dl)	3 6 Re	6.7±0.7 7.4±0.5 7.9±0.4	6.7±0.6 7.6±0.6 —	6.9±0.5 7.7±0.5 8.1±0.2	6.9±0.6 7.5±0.5 7.8±0.3	6.7±0.4 7.4±0.4 —	6.8±0.5 7.3±0.5 8.1±0.4	6.6±0.4 7.3±0.7 8.0±0.4	
BUN (mg/dl)	3 6 Re	17.7±2.9 17.5±2.9 15.9±3.1	15.3±2.2 17.3±2.2 —	16.6±2.4 15.6±2.0 16.7±5.6	16.4±2.5 16.0±2.8 15.0±1.9	16.3±1.1 16.5±5.1 —	17.1±2.1 16.1±3.1 15.8±1.8	15.8±2.1 16.0±3.8 15.1±1.4	

*P≤0.05, **P≤0.01; Significant difference from control. Values are Mean±S.D.

a) : No. of animals examined at 3-month. b) : No. of animals examined at 6-month. c) : No. of animals examined at recovery period. d) : The number of animals was 19.

e) : The number of animals was 18. f) : The number of animals was 17. g) : The number of animals was 16. h) : The number of animals was 15. i) : The number of animals was 7.

m) : The number of animals was 6. n) : The number of animals was 5. o) : The number of animals was 4. p) : The number of animals was 3.

Table 7. Absolute and relative organ weight in male rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound	Dose (mg/kg/day) No. of animals Item (Unit)	Period	TAZ/PIPC				TAZ		
			Control 0 20 ^{a)} 9 ^{b)}	200 19 ^{a)}	400 19 ^{a)} 10 ^{b)}	800 20 ^{a)} 9 ^{b)}	40 18 ^{a)}	80 20 ^{a)} 9 ^{b)}	160 20 ^{a)} 10 ^{b)}
Adrenal	(g)	6	0.0549±0.0100	0.0624±0.0087	0.0605±0.0094	0.0615±0.0084	0.0580±0.0097	0.0577±0.0092	0.0551±0.0083
	Re		0.0577±0.0095	—	0.0510±0.0109	0.0553±0.0092	—	0.0516±0.0065	0.0527±0.0093
Kidney	(%×10 ³)	6	8.32±1.22	10.20±1.82**	9.70±1.85*	10.15±1.71**	9.21±1.44	8.91±1.86	8.56±1.34
	Re		8.84±1.73	—	8.42±1.89	9.03±1.30	—	8.41±1.32	8.60±1.53
Liver	(g)	6	3.872±0.412	3.808±0.425	3.923±0.306	4.008±0.503	3.885±0.421	4.009±0.449	3.945±0.450
	Re		3.798±0.256	—	3.883±0.527	3.953±0.374	—	3.944±0.528	3.791±0.450
Spleen	(%×10)	6	5.89±0.59	6.19±0.75	6.26±0.60	6.59±0.86	6.19±0.94	6.15±0.69	6.12±0.68
	Re		5.79±0.44	—	6.40±0.95	6.50±0.89	—	6.41±0.94	6.15±0.22
Thymus	(g)	6	17.795±2.615	15.392±2.395*	18.115±2.034	18.265±3.094	16.803±2.529	19.869±4.049	22.103±3.489**
	Re		16.904±2.330	—	17.814±3.252	20.224±2.759	—	18.348±2.314	20.257±3.697
Thymus	(%)	6	2.69±0.21	2.48±0.24*	2.88±0.23	2.97±0.31*	2.65±0.20	3.01±0.39**	3.40±0.33**
	Re		2.56±0.19	—	2.89±0.27*	3.30±0.27**	—	2.96±0.22**	3.26±0.22**
Spleen	(g)	6	0.899±0.107	0.827±0.170	0.969±0.187	0.928±0.273	0.870±0.160	0.928±0.293	0.924±0.199
	Re		0.889±0.143	—	0.766±0.162	0.842±0.073	—	0.837±0.132	0.799±0.136
Thymus	(%×10)	6	1.37±0.16	1.33±0.20	1.55±0.32	1.52±0.50	1.38±0.24	1.43±0.52	1.43±0.33
	Re		1.35±0.15	—	1.24±0.17	1.39±0.23	—	1.36±0.23	1.30±0.23
Thymus	(g)	6	0.171±0.032	0.132±0.037 ^{c)} *	0.139±0.051*	0.138±0.034*	0.175±0.054	0.142±0.056	0.175±0.062
	Re		0.132±0.034	—	0.120±0.050	0.114±0.037 ^{d)}	—	0.124±0.044 ^{d)}	0.140±0.042
Thymus	(%×10 ²)	6	2.60±0.50	2.12±0.62 ^{c)}	2.21±0.79	2.27±0.58	2.82±0.98	2.19±0.89	2.68±0.86
	Re		2.02±0.51	—	1.96±0.89	1.91±0.58 ^{d)}	—	1.97±0.68 ^{d)}	2.32±0.82

*P≤0.05, **P≤0.01 ; Significant difference from control. Values are Mean±S.D.

a) : No. of animals examined at 6-month. b) : No. of animals examined at recovery period. c) : The number of animals was 17. d) : The number of animals was 8.

Table 8. Absolute and relative organ weight in female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Compound	Dose (mg/kg/day) No. of animals	Period	Control			TAZ/PIPC			TAZ		
			0 20 ^{a)} 8 ^{b)}	200 20 ^{a)}	400 20 ^{a)} 10 ^{b)}	800 20 ^{a)} 8 ^{b)}	40 19 ^{a)}	80 20 ^{a)} 10 ^{b)}	160 20 ^{a)} 10 ^{b)}		
Adrenal	(g)	6	0.0708±0.0121	0.0737±0.0141 ^{c)}	0.0774±0.0140	0.0760±0.0099	0.0701±0.0149	0.0682±0.0111	0.0721±0.0120		
	Re		0.0697±0.0123	—	0.0807±0.0174	0.0776±0.0064	—	0.0733±0.0165	0.0725±0.0127		
(%×10 ²)		6	2.18±0.37	2.50±0.49 ^{c)}	2.48±0.47	2.58±0.50*	2.25±0.39	2.19±0.39	2.25±0.41		
	Re		2.10±0.51	—	2.52±0.45	2.48±0.13	—	2.19±0.46	2.31±0.44		
Kidney	(g)	6	2.260±0.273	2.230±0.237	2.377±0.323	2.395±0.285	2.392±0.528	2.438±0.234	2.395±0.276		
	Re		2.218±0.118	—	2.502±0.360	2.373±0.206	—	2.287±0.431	2.250±0.149		
(%×10)		6	6.95±0.82	7.59±0.93*	7.59±0.72**	8.04±0.77**	7.68±1.28*	7.78±0.62*	7.45±0.82		
	Re		6.65±0.92	—	7.80±0.46**	7.62±0.82*	—	6.79±0.76	7.15±0.37		
Liver	(g)	6	8.850±1.231	8.460±1.075	9.285±1.541	9.454±1.339	8.843±1.531	8.970±1.166	9.786±1.333		
	Re		8.895±1.196	—	10.076±1.622	9.908±0.852	—	9.345±1.955	8.857±0.758		
(%)		6	2.71±0.28	2.87±0.36	2.96±0.32	3.16±0.31**	2.83±0.33	2.87±0.36	3.04±0.36*		
	Re		2.65±0.37	—	3.13±0.16**	3.17±0.22**	—	2.77±0.32	2.81±0.21		
Spleen	(g)	6	0.481±0.089	0.460±0.166	0.497±0.139	0.515±0.124	0.524±0.175	0.472±0.078	0.546±0.126		
	Re		0.418±0.053	—	0.486±0.079	0.492±0.040*	—	0.453±0.065	0.434±0.049		
(%×10)		6	1.49±0.36	1.56±0.54	1.58±0.35	1.73±0.38	1.69±0.53	1.51±0.26	1.70±0.38		
	Re		1.26±0.23	—	1.52±0.21*	1.58±0.21*	—	1.35±0.17	1.38±0.18		
Thymus	(g)	6	0.138±0.045	0.119±0.039	0.126±0.049	0.123±0.029	0.129±0.052	0.179±0.228	0.145±0.040 ^{d)}		
	Re		0.113±0.048	—	0.122±0.041	0.131±0.031 ^{e)}	—	0.102±0.046	0.136±0.031		
(%×10 ²)		6	4.25±1.48	4.02±1.13	3.98±1.41	4.15±0.96	4.11±1.45	5.94±8.28	4.49±1.30 ^{d)}		
	Re		3.39±1.58	—	3.79±1.05	4.18±0.75 ^{e)}	—	3.05±1.34	4.29±0.90		
Uterus	(g)	6	0.877±0.230	1.152±0.637	0.983±0.403	0.917±0.183	1.026±0.429	0.869±0.205	0.988±0.242 ^{c)}		
	Re		0.768±0.224	—	1.082±0.443	1.391±0.489*	—	0.964±0.153	0.882±0.234		
(%×10)		6	2.72±0.80	3.85±1.89	3.15±1.24	3.10±0.67	3.34±1.54	2.80±0.73	3.07±0.85 ^{c)}		
	Re		2.32±0.72	—	3.38±1.26	4.50±1.74*	—	2.90±0.56	2.82±0.81		

*P≤0.05, **P≤0.01; Significant difference from control. Values are Mean±S.D.

a) : No. of animals examined at 6-month. b) : No. of animals examined at recovery period. c) : The number of animals was 19. d) : The number of animals was 17.

e) : The number of animals was 7.

Table 9. Histopathology in male and female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months.

Sex	Compound	Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Organ/Findings	Male					Female						
					Control	TAZ/PIPC			TAZ		Control	TAZ/PIPC			TAZ	
						0	200	400	800	40		80	160	0	200	400
					20	19	19	20	18	20	20	20	20	19	20	20
Liver																
	Hepatocellular enlargement, slight				0	0	0	12	0	4	7	0	0	0	0	0
	moderate				0	0	0	2	0	2	6	0	0	0	0	0
	severe				0	0	0	1	0	1	6	0	0	0	0	0
	Hepatocellular vacuolation/vesiculation, slight				4	3	4	2	5	6	7	1	2	3	4	7
	moderate				0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
	Coagulative necrosis, slight				0	0	0	1	0	1	1	0	3	2	1	3
	moderate				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Hemorrhage, slight				0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2
	moderate				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Acute inflammation, slight				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
	moderate				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Hepatocytes																
	PAS positive material, slight				1	2	5	13	3	9	7	4	1	1	3	2
	moderate				0	0	0	3	0	1	7	0	0	0	0	0
	severe				0	0	0	1	0	2	6	0	0	0	0	0
Spleen																
	Congestion/Hemorrhage, slight				1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
	Extramedullary hematopoiesis, slight				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	moderate				0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
Kidney																
	Chronic nephropathy, slight				2	1	5	3	1	3	1	1	2	1	2	3
	moderate				0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Congestion, slight				0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Hydronephrosis, slight				1	0	0	0	0	1	1	0	3	1	1	1
	moderate				1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2
	severe				0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

Table 9. (continued)

Sex	Compound	Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Organ/Findings	Male					Female				
					Control	TAZ/PIPC			TAZ	Control	TAZ/PIPC			TAZ
						0	200	400	800		200	400	800	
					20	19	19	20	160		20	20	20	160
						40	18	20	20		40	19	20	20
Mesentery														
	Acute/Subacute inflammation, slight				0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	moderate				0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Granulomatous inflammation, slight				0	1	1	1	1	1	2	4	1	3
	moderate				0	0	4	4	1	0	7	7	7	3
	severe				0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
	Hemorrhage, slight				0	0	0	2	0	1	0	3	1	4
	moderate				0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
	severe				0	1	1	0	0	1	1	3	4	1
	Subacute/Chronic inflammation, slight				0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
	moderate				0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
					0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Reticuloendothelial cell														
	Brown pigment, slight				0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	moderate				0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
Abdominal wall														
	Hemorrhage, slight				4	3	4	5	3	4	3	3	2	4
	moderate				2	2	0	2	0	0	1	2	1	0
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Granulomatous inflammation, slight				1	0	0	1	0	0	1	3	1	1
	moderate				0	0	0	0	0	0	0	2	3	0
	Subacute/Chronic inflammation, slight				0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
	moderate				0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
Peritoneum														
	Chronic inflammation/Adhesions, slight				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Granulomatous inflammation, slight				1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	moderate				0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	severe				0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Uterus														
	Lumen													
	Dilation, slight				—	—	—	—	—	1	4	0	1	1
	moderate				—	—	—	—	—	1	1	0	0	2
	severe				—	—	—	—	—	0	1	0	0	3

Table 10. Histopathology in male and female rats treated intraperitoneally with TAZ/PIPC and TAZ for 6 months followed by one month recovery period.

Sex	Compound	Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Organ/Findings	Male				Female			
					Control	TAZ/PIPC			Control	TAZ/PIPC		
						400	800	160		400	800	160
						10	9	10		10	8	10
Liver												
	Hepatocellular enlargement, slight		0		0	0	2	1	0	0	0	0
	moderate		0		0	0	0	0	0	0	0	0
	Hepatocellular vacuolation/vesiculation, slight		2		3	3	3	2	1	1	5	2
	moderate		1		0	0	0	0	0	0	0	0
Hepatocytes												
	PAS positive material, slight		0		1	6	5	5	0	1	1	0
	moderate		0		0	0	0	4	0	0	0	0
	severe		0		0	0	0	1	0	0	0	0
Kidney												
	Chronic nephropathy, slight		1		1	6	3	3	1	2	2	3
	moderate		0		1	0	0	0	1	1	1	0
	Hydronephrosis, slight		1		2	0	1	1	1	0	0	0
	Mediastinal lymph node											
	Congestion/Hemorrhage, slight		1		0	0	3	1	0	2	2	0
	moderate		0		0	0	0	0	1	0	0	0
	Plasma cell hyperplasia, moderate		0		0	0	0	0	0	0	0	1
	Reticuloendothelial cell hyperplasia, slight		0		0	0	0	0	0	0	1	0
	moderate		0		0	1	0	0	0	0	0	0
Reticuloendothelial cell												
	Brown pigment, slight		3		1	2	4	5	1	4	3	2
	moderate		0		1	2	0	0	0	0	0	0
Mesentery												
	Granulomatous inflammation, slight		0		1	2	0	0	0	2	0	2
	moderate		0		0	0	0	0	0	0	0	2
Uterus												
	Lumen											
	Dilation, slight		—		—	—	—	—	0	2	2	1
	moderate		—		—	—	—	—	0	0	3	0

TAZ 投与群では、80, 160 mg/kg/day 群の雄および160 mg/kg/day 群の雌に、肝の比重量の増加がみられ、160 mg/kg/day 群の雄では重量も増加した。また、雌全群に腎の比重量の増加がみられた。

回復期間終了時には、TAZ 160 mg/kg/day 群の雌を除いて上記肝の変化に明らかな回復性はみられず、TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群の雄では肝重量の増加がみられた。また、雌では TAZ/PIPC 400 mg/kg/day 群で腎の比重量の増加、800 mg/kg/day 群で腎および子宮の比重量の増加がみられた。

その他、TAZ/PIPC 投与群で副腎の比重量の増加、胸腺重量の軽度な減少などに統計学的な有意差がみられた。

9. 病理学的検査

(1) 剖検

TAZ/PIPC 投与の雌雄全群および TAZ 160 mg/kg/day 群の雌では、軽度～高度な盲腸の拡張がみられた。

回復期間終了時には、TAZ/PIPC および TAZ 投与の雌雄とも著変はみられなかった。

その他、投与終了時には腸管、腸間膜などに血腫が、TAZ/PIPC あるいは TAZ 投与群に多数みられる傾向があった。また、対照群を含む雌の全群で子宮の拡張がみられた。

(2) 組織学的検査 (Table 9 および10)

TAZ/PIPC 投与群では、800 mg/kg/day 群の雄に肝細胞の腫大および細胞内に PAS 陽性物質の蓄積が認められた。また、PAS 陽性物質はジアスターゼ消化法によって消失した。一方、雌では肝の変化は明らかではなかった。

TAZ 投与群では、80, 160 mg/kg/day 群の雄に上記 TAZ/PIPC 投与群でみられた肝細胞の腫大および PAS 陽性物質の蓄積が認められ、同様に PAS 陽性物質はジアスターゼ消化法によって消失した。一方、雌では肝の変化は明らかではなかった。

回復期間終了時には、上記変化は明らかに減少したが、完全な回復ではなかった。

その他、投与終了時には腹壁の出血が対照群を含む雌雄ほぼ全群にみられ、腸管、腸間膜などの出血あるいは炎症性変化は、TAZ/PIPC あるいは TAZ

投与群に多数みられる傾向があった。また、対照群を含む雌のほぼ全群で子宮の拡張がみられた。

(3) 電子顕微鏡学的検査

TAZ/PIPC 投与群では、800 mg/kg/day 群の雄で肝細胞内に中等度なグリコーゲン顆粒の蓄積 (Photo. 1) が認められた。

TAZ 投与群では、160 mg/kg/day 群の雌でグリコーゲン顆粒と少数のコレステロール様の裂隙がみられた。

その他、粗面および滑面小胞体、核、ミトコンドリアおよび毛細胆管等には異常は観察されなかった。

回復期間終了時では、TAZ/PIPC および TAZ 投与群でグリコーゲン顆粒の増加は認められなかった。

考 察

雌雄ラットに TAZ/PIPC 200, 400, 800 mg/kg/day および TAZ 40, 80 および160 mg/kg/day を6ヵ月間腹腔内投与し、その反復投与毒性ならびに回復性について検討した。

対照群、TAZ/PIPC および TAZ 投与群でみられた死亡例は、いずれも投与過誤あるいは事故によるものであり、生存例では一般状態の異常は認められなかった。

摂餌量では、TAZ/PIPC および TAZ 投与の雌雄で用量反応性のない増加がみられた。TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群の雄では体重の増加抑制もみられ、一見、矛盾する結果であった。しかし、一般状態にも異常はみられないことから、本変化は偶発的な、あるいは一過性の変化と考えられた。

血液学的検査では、TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群の雌雄および TAZ 80, 160 mg/kg/day 群の雌で、赤血球数、ヘモグロビン量あるいはヘマトクリット値の減少および網状赤血球率の増加がみられた。しかし、本変化は軽度であり骨髄の病理変化を伴わない回復性が認められる変化であった。

血液生化学的検査では、TAZ/PIPC 投与の雌全群および800 mg/kg/day の雄、TAZ 投与の雌全群およ

Photo. 1. Electronmicrograph of the liver showing aggregation of glycogen granules from a male rat treated intraperitoneally with 800 mg/kg/day of TAZ/PIPC for 6 months. Double staining with uranyl acetate and lead citrate. $\times 6,300$.

Bc; Bile Canaliculus, Gl; Glycogen, M; Mitochondrion, N; Nucleus, MC; Mononuclear cell, Nu; Nucleolus, V; Fat Vacuoles.

び160 mg/kg/day の雄に中性脂肪の減少がみられた。同様な変化は他の β -ラクタム系抗生剤や β -ラクタマーゼ阻害剤でも雌雄ともに報告（野口ら，1984；幸嶋ら，1983；倉片ら，1986；菜畑ら，1988）されており，いずれの報告でも変化の発現機序は明らかではないが，本試験のTAZ/PIPCあるいはTAZの変化の程度は類薬と比し同等あるいは軽度であった。また，雌の本変化については，投与後3ヵ月の

みにみられた一過性の毒性変化である可能性は否定できないが，用量反応性が認められない軽度な変化であり用量および時間との関連性から判断すると偶発的な変化と考えられた。

尿検査および眼科学的検査では，TAZ/PIPCあるいはTAZ投与による影響は認められなかった。

剖検では，盲腸の拡張がTAZ/PIPCの雌雄全群およびTAZ 160 mg/kg/day 群の雌に認められたが，組

組織学的変化はみられなかった。抗生剤投与による盲腸の拡張は、一般的によく知られ腸内フローラの変動に伴う変化と考えられている。また、子宮の拡張が対照群を含む雌のほぼ全群でみられたことは、動物の解剖時期が発情周期に一致したことによる変化と推測された。

臓器重量では、TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群の雌雄および TAZ 80 mg/kg/day 群の雄、160 mg/kg/day 群の雌雄で、肝の比重量の増加がみられ後述するグリコーゲン顆粒の蓄積との関連性が示唆された。その他、TAZ/PIPC 投与群で副腎の比重量の増加、胸腺重量の軽度な減少などが統計学的に有意な変化としてみられたが、用量反応性がない生理的変動範囲内の変化であった。

病理組織学的検査では、肝に PAS 陽性物質の蓄積が TAZ/PIPC 投与群の 800 mg/kg/day 群および TAZ 投与群の 80, 160 mg/kg/day 群のいずれも雄のみで増加した。この PAS 陽性物質はジアスターゼによって消失したことおよび電顕による形態からもグリコーゲンと考えられた。グリコーゲン顆粒の蓄積機序は不明であるが、他に肝障害を示唆する所見は認められず回復期間終了時には軽減していることから、回復性のある変化と考えられた。また、PAS 陽性物質の蓄積は上述の β -ラクタマーゼ阻害剤でも報告されており、 β -ラクタマーゼ阻害剤に共通の変化であると考えられた。一方、腹壁にみられた出血については、本変化が対照群でもみられることから腹腔内投与による変化であり、また、炎症性変化については本剤が刺激性を有していることから、刺激性のある物質を腹腔内に反復投与したこと起因する変化と考えられた。

以上の結果から、盲腸の拡張は抗生物質の薬効による変化であり、子宮の拡張は動物の発情周期と解剖時期が一致したことによる変化と考えられた。従って、肝の重量増加、PAS 陽性物質の蓄積などによる変化から、TAZ/PIPC および TAZ の無毒性量は雌雄ともそれぞれ 400 および 40 mg/kg/day であり、反復投与での TAZ/PIPC の毒性は配合された TAZ の毒性を反映したものであった。

要 約

雌雄ラットに TAZ/PIPC 200, 400, 800 mg/kg/day および TAZ 40, 80, 160 mg/kg/day を 6 ヶ月間腹腔内投与し、その反復投与毒性ならびに回復性について検討し、以下の知見を得た。

1. 投薬および回復期間を通して、TAZ/PIPC および TAZ 投与に起因した死亡例はみられず、生存例の一般状態の観察では異常はみられなかった。

2. 摂餌量では、TAZ/PIPC および TAZ 投与の雌雄で用量反応性のない増加がみられ、TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群の雄で体重の増加抑制がみられた。

3. 血液学的検査では、TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群の雌雄で、赤血球系の減少および網状赤血球の増加がみられ、TAZ 80, 160 mg/kg/day 群の雌で、網状赤血球の増加がみられた。

4. 血液生化学的検査では、中性脂肪の減少が雄の TAZ/PIPC 800 mg/kg/day 群および TAZ 160 mg/kg/day 群でみられた。

5. 尿検査および眼科学的検査では、著変はみられなかった。

6. 剖検では盲腸の拡張が TAZ/PIPC 投与群の雌雄全群および TAZ 投与群の雌の 160 mg/kg/day 群に認められた。

7. 臓器重量では、肝比重量の増加が TAZ/PIPC 投与群の雌雄の 800 mg/kg/day 群および TAZ 投与群の雄の 160, 80 mg/kg/day 群と雌の 160 mg/kg/day 群でみられた。

8. 病理組織学的検査では、組織化学および電顕検査でグリコーゲンとみなされた肝細胞内の PAS 陽性物質の蓄積が TAZ/PIPC 投与群の雄の 800 mg/kg/day 群および TAZ 投与群の雄の 80, 160 mg/kg/day 群でみられた。

9. 肝の変化は、1 ヶ月間の回復試験によりいずれも回復あるいは回復傾向がみられ、可逆性の変化であった。

10. 肝の病理組織学的変化から判断し、TAZ/PIPC および TAZ の無毒性量は雌雄ともそれぞれ 400 mg/kg/day および 40 mg/kg/day であった。

文 献

- 幸嶋祥亘, 倉片康雄, 日浦謙一郎, 他 (1983) : BRL 14151K および BRL28500 の急性毒性および亜急性毒性試験. *Chemotherapy*, **31**(S-2), 113-141.
- 倉片康雄, 植村昌平, 西岡佳隆, 他 (1986) : Potassium clavulanate および BRL 28500 の急性毒性および亜急性毒性試験. *Chemotherapy*, **34**(S-4), 69-95.
- Mitsuhashi, S. and Inoue, M. (1981) : Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In *Beta Lactam Antibiotics* (Mitsuhashi, S., ed.), pp. 41-56, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- 菜畑博司, 飯島護丈, 山田幸子, 他 (1988) : Sulbactam Ampicillin の急性, 亜急性, 慢性毒性試験および一般薬理試験. *Chemotherapy*, **36**(S-8), 58-65.
- 野口晏弘, 橘正克, 菜畑博司, 他 (1984) : Sulbactam および Sulbactam/Cefoperazone の毒性試験. *Chemotherapy*, **32**(S-4), 97-107.