ピペラシリンの代謝物（脱エチル体）の
ラットにおける単回静脈内投与ならびに
28日間反復静脈内投与毒性試験

中村 昌三, 三善 隆広, 中川 重仁, 吉田 一晴, 柴田 哲夫,
河村 泰仁, 児玉 卓也

富山化学工業株式会社 総合研究所 安全性研究所

SINGLE-DOSE TOXICITY STUDY AND
TWENTYEIGHT-DAYS INTRAVENOUSLY
REPEATED DOSE TOXICITY STUDY OF
DESETHYL-PIPERACILLIN IN RATS

Shozo NAKAMURA, Takahiro SANZEN, Shigehito NAKAGAWA, Kazuharu YOSHIDA,
Tetsuo SHIBATA, Yasuhito KAWAMURA and Takuya KODAMA

*Drug Safety Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.,
4-1, Shimookui 2-Chome, Toyama 930, Japan*

Received March 22, 1994 ; Accepted July 7, 1994

ABSTRACT — Desethyl-piperacillin (desethyl-PIPC) is an active metabolite of PIPC which was newly found in clinical field. We carried out a single intravenous toxicity study at the dosage of 2000 mg/kg, and 28-days intravenous toxicity study at the daily dosage of 400 mg/kg followed by 28-days recovery study using both sexes of rats. The following results were obtained.

In the single dose toxicity study, no deaths occurred in rats injected 2000 mg/kg of desethyl-PIPC, therefore it is presumed that minimal lethal dose of desethyl-PIPC is over 2000 mg/kg in both sexes. As clinical signs, decrease in locomotor activity, deep breath and loose stool were observed. In the pathological study, dilatation of cecal lumen was observed macroscopically, but no significant changes were observed histologically.

In the repeated dose toxicity study, loose stool, increase in water consumption, dilatation of cecal lumen and increase in its weight were noted. These abnormal findings were considered to be due to antimicrobial activity of desethyl-PIPC. In addition, decrease in the ratio of serum γ -globulin and increase in the ratio of α_1 -globulin were observed, but A/G ratio was not affected. After withdrawal of desethyl-PIPC administration, these abnormal findings tended to disappear.

連絡先：〒930 富山市下奥井2丁目4の1
富山化学工業株式会社
総合研究所 安全性研究所 中村昌三

As mentioned above, the minimal lethal dose of desethyl-PIPC is over 2000 mg/kg in the single dose toxicity study and abnormal signs were slight in the repeated dose toxicity study at the dosage of 400 mg/kg of desethyl-PIPC for 28 days in rats. It is, therefore, concluded that desethyl-PIPC is a low toxic metabolite of PIPC.

KEY WORDS : Desethyl-piperacillin, Antibiotic, Metabolite, Toxicity, Rat.

緒 言

ピペラシリン（以下 PIPC と略す）は富山化学工業(株)で開発された広範囲の抗菌スペクトラムを有する注射用合成ペニシリンである。本剤は臨床において長年使用され、その安全性および有効性は高い評価を得ている。PIPC のヒトでの代謝物の存在は従来知られていなかったが、最近、抗菌活性を有する代謝物であるピペラシリン脱エチル体（以下 desethyl-PIPC と略す）がヒトの血漿中および尿に見いだされた（Minami *et al.*, 1991a, b）。そこで、desethyl-PIPC の毒性を検討するために、ラットにおける単回静脈内投与毒性試験ならびに28日間反復静脈内投与毒性試験を行ったので報告する。

被 験 物 質

Desethyl-PIPC は Fig. 1 に示す化学構造と化学名を有し、エタノールおよび水に溶けにくく、エーテルにほとんど溶けない白色の結晶性の粉末である。本試験には、富山化学工業(株)合成の desethyl-PIPC [Lot No. 920110, 純度（HPLC, 面積比）：99.8%, 水分：0.5%, 残留溶媒：酢酸エチル 3473 ppm] を使用した。

(2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-[(2,3-dioxo-1-piperazinyl)formamido]-2-phenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3,2,0]heptane-2-carboxylic acid

Fig. 1. Chemical structure and chemical name of desethyl-PIPC.

実験材料および方法

1. 単回静脈内投与毒性試験

(1) 使用動物および飼育条件

6週齢のSD-JCL系, SPFラット（日本クレア, 雄205～223 g, 雌151～173 g）雌雄それぞれ7匹を使用した。

飼育は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度40～60%, 換気回数15回以上/時間, 人工照明午前6時から午後6時の12時間照明に設定されたバリアーシステム飼育室で行い, 固型飼料（日本クレア, CE-2, オートクレーブ滅菌処理）と水（紫外線殺菌処理）を自由に摂取させ, 金属製ブラケットケージ（W 300×D 400×H 200 mm）に雌雄とも1ケージあたり3匹または4匹となるように収容した。個体識別は耳パンチ, 色素塗布（ピクリン酸）およびケージラベルにより行った。

(2) 被験物質の調製

Desethyl-PIPC は注射用水に懸濁した後, 等モルの炭酸水素ナトリウムを添加して10%（W/V）となるように溶解し, 投与液とした。desethyl-PIPC 10%溶液は, 室温で6時間まで安定であることが確認されているため, メンブランフィルター（日本ミリポア工業, MILLIPORE GV, 孔径 $0.22 \mu\text{m}$ ）で濾過滅菌して, 調製後6時間以内に使用した。投与液のpHは5.47, 生理食塩液に対する浸透圧比は1.00であった。

(3) 投与方法および観察事項

単回投与毒性試験の上限値の目安として示されている2000 mg/kg（医薬品非臨床試験ガイドライン解説, 1994）を, 1群雌雄各7匹に, 投与容量20 ml/kg, 注射速度5 ml/minで尾静脈内投与した。一般状態の観察は, 投与終了から2時間後までは連続

して行い、投与翌日から1日1回（午前中）行った。体重は、投与日（投与直前）から観察期間終了まで毎日1回測定し、雌雄それぞれの平均体重を算出した。

14日間の観察期間終了後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈および後大静脈を切断して放血死させた後、剖検した。なお、剖検時の肉眼観察で腔の拡張していた全例の盲腸は、10%ホルマリン液固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色をして組織学的検査を実施した。

2. 28日間反復静脈内投与毒性試験

(1) 使用動物および飼育条件

6週齢のSD-JCL系、SPFラット（日本クレア、雄199～217g、雌156～179g）雌雄それぞれ30匹を使用した。飼育条件および個体識別は単回静脈内投与毒性試験と同一としたが、1ケージあたりの収容匹数は雄では2匹または3匹、雌では5匹とした。

(2) 被験物質の調製

Desethyl-PIPCは生理食塩液に懸濁した後、等モルの炭酸水素ナトリウムを添加して4%（W/V）となるように溶解し、投与液とした。desethyl-PIPCの4%溶液は冷蔵保存で7日間以上安定であることが確認されているため、7日分をまとめて調製して冷蔵庫に保管し、用時に必要量を分取してメンブランフィルター（日本ミリポア工業、MILLIPORE GV、孔径0.22μm）で濾過滅菌後に使用した。投与液のpHは5.4、生理食塩液に対する浸透圧比は1.47であった。

(3) 投与量および投与方法

Desethyl-PIPCは、PIPCを投与したヒトの血漿中に投与量の10%以下の割合で生成される（Minami *et al.*, 1991b）。このことから本試験での投与量は、ヒトでの臨床用量である2～4 g/man/dayにおける生成量（投与量の10%）を参考にして、その約50～100倍量に相当する400 mg/kgとし、投与容量10 ml/kg、注射速度3 ml/minで尾静脈内に1日1回、28日間反復投与した。対照群には生理食塩液を同様に投与した。

なお、desethyl-PIPC投与群および対照群には平均体重が均等になるよう雌雄各15匹のラットを配分

し、このうち雌雄各10匹は28日間投与終了後に剖検し、残りの雌雄各5匹は回復試験例として28日間休養後に剖検した。

(4) 観察、測定および検査

症状観察：毎日全例について行った。

体重測定：週2回、全例について行った。

摂餌量、摂水量の測定：週1回、ケージ毎に24時間摂取量を測定した。

尿検査：投与期間終了時に各群雌雄各10匹を、回復期間終了時に各群雌雄各5匹を個別代謝ケージに入れ、非絶食下で午後4時から翌朝9時までの17時間蓄尿を採取して以下の検査を行った。

尿量（ml/17 hr）、pH、蛋白、糖、ケトン体、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲン（以上、マルチスティックス®、マイルス三共）、比重の測定（屈折計）および尿沈渣の観察（無染色、400倍で検鏡）。

血液学的検査：投与期間終了時と回復期間終了時の剖検時に全例について、一夜絶食後にエーテル麻酔下で大腿静脈から採血（EDTA-2K処理）し、以下の検査を行った。

赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数（以上、自動血球計数装置 東亜医用電子、F-800型）、網赤血球数（Brecher法）、白血球百分率（メイ・ギムザ染色）。

血液生化学検査：投与期間終了時と回復期間終了時の剖検時に全例について、一夜絶食後にエーテル麻酔下で後大静脈から採血して得られた血清を用いて以下の検査を行った。

GOT（Karmen法、オートセラ® GOT、第一化学）

GPT（Karmen法、オートセラ® GPT、第一化学）

ALP（PNP法、オートセラ® ALP、第一化学）
コリンエステラーゼ（DTNB法、CHE試薬、国際試薬）

総ビリルビン（アルカリアゾビリルビン法、オートセラ® BIL、第一化学）

総蛋白（Biuret法、オートセラ® TP、第一化

学)

血糖 (Glucose oxidase 法, オートセラ® GLU, 第一化学)

総コレステロール (CEH-COD-POD 系酵素法, オートセラ® CHO-2, 第一化学)

リン脂質 (PLD-COD-POD 系酵素法, オートセラ® PL-2, 第一化学)

トリグリセライド (GK-GPO-POD 系酵素法, オートセラ® TG-2, 第一化学)

尿素窒素 (Urease-Indophenol 法, オートセラ® UN, 第一化学)

クレアチニン (Jaffe 法, オートセラ® CRE, 第一化学)

CPK (GSCC 法, オートセラ® CPK, 第一化学)

Ca (OCPC 法, オートセラ® CA, 第一化学)

P (Fiske-Subarrow 法, オートセラ® IP, 第一化学)

以上, 日立705形自動分析装置で測定。

Na (炎光光度法, 日本分光メディカル FLAME 30C 型)

K (炎光光度法, 日本分光メディカル FLAME 30C 型)

Cl (電量滴定法, 常光クロライドメーター C-200AP 型)

蛋白分画と A/G 比 (セルロースアセテート膜電気泳動法)

眼科学的検査: 投与期間終了時と回復期間終了時に全例を散瞳剤 (参天製薬, ミドリン P®) で散瞳させ, 視覚器の外観検査の後に検眼鏡 (ナイツ, α-Jr.) で視神経乳頭周囲の眼底を観察した。また剖検時には, 各群の雌雄各 3 例および眼底観察で異常の見られた動物について, エーテル麻酔下で眼底撮影 (眼底カメラ, コーワ RC-2 型) した。

剖検および組織学的検査: 投与期間終了時と回復期間終了時に, 全例をエーテル麻酔下で腹大動脈および後大静脈切断により放血死させた後, 剖検した。その後, 脳, 下垂体, 唾液腺, 胸腺, 心, 肺, 肝, 腎, 脾, 副腎, 甲状腺, 精巣, 精巣上体, 精囊 (前立腺を含む), 卵巣, 子宮, 盲腸 (内容物を含む) を摘出し重量を測定した。これらに加えて, 左眼球,

ハーダー腺, 脊髄, 舌, 気管, 食道, 胃, 小腸, 大腸, 脾, 腸間膜リンパ節, 下顎部リンパ節, 大腿骨, 胸骨 (骨髄を含む), 大腿部骨格筋, 腔, 乳腺 (雌のみ), 膀胱, 皮膚, 投与部位 (尾) および肉眼的異常部位を, 10%ホルマリン液固定 (眼球は 5%グルタルアルデヒド・10%リン酸緩衝ホルマリン固定, pH 7.4), パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン染色をして組織学的に検査した。

(5) 統計学的処理

対照群と desethyl-PIPC 投与群の平均値と標準偏差を算出し, 平均値の差の検定は等分散の検定 (F 検定) を行った後, 等分散の場合は Student の t 検定を, 不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

試験結果

1. 単回静脈内投与毒性試験

(1) 死亡率

雌雄とも 2000 mg/kg を投与しても死亡例はなく, 最小致死量は 2000 mg/kg 以上だった。

(2) 症状, 体重および剖検所見

症状観察では, 雌雄の全例に投与直後から軽度の自発運動減少が認められ, さらに雄の 3 例と雌の 2 例に投与直後から呼吸深大が観察されたが, 自発運動は投与後 23 分以内に, 呼吸は投与後 5 分以内に回復した。また, 投与翌日から雌雄ともに軟便が観察され, 雄の 5 例には投与 2 日後から肛門周囲の被毛の汚れが観察されたが, 軟便は投与 9 日後に, 肛門周囲の被毛の汚れは投与 7 日後までに消失した。

体重は雌雄とも順調に増加し, desethyl-PIPC 投与の影響は認められなかった。

剖検時の肉眼観察では, 雄の全例と雌の 5 例に盲腸腔の拡張が認められたが, その他に異常は認めなかった。なお, 全例の盲腸の組織学的検査を行ったが異常は認めなかった。

2. 28日間反復静脈内投与毒性試験

(1) 症状

Desethyl-PIPC 投与群の雌雄で, 初回投与翌日から軟便が観察された。軟便の程度はその後しだいに

軽度となり、投与10日後までに回復した。他に異常は観察されなかった。

(2) 体重

Desethyl-PIPC 投与群の雌で、投与4日後より3週間にわたって対照群に比べ軽度増加したが、その後回復した。雄に異常は認められなかった (Fig. 2)。

(3) 摂餌量および摂水量

摂餌量に異常は認められなかった。摂水量は、desethyl-PIPC 投与群の雌雄で投与1週間後より投与期間終了時まで軽度増加した。この傾向は雄では休薬後も続いたが、雌では回復した (Fig. 3)。

(4) 尿検査

異常は認められなかった (Table 1)。

(5) 血液学的検査

Desethyl-PIPC 投与群では、白血球数の減少(雌)、分節核好中球比の減少とリンパ球比の増加(雄)が認められた。個体別にみると desethyl-PIPC 投与群の雄1例の分節核好中球比がバックグラウンドデータでの生理的範囲をわずかに越えたものの、他に生理的範囲からの逸脱はなく、いずれも毒性として重要視すべき変化ではなかった (Table 2)。

(6) 血液生化学検査

投与期間終了時の検査で、desethyl-PIPC 投与群の雌雄に A/G 比の変動を伴わない γ グロブリン比の減少と α_1 グロブリン比の増加が認められた。これらの変動は休薬により回復傾向を示した (Table 3, 4)。

他にも、対照群との間に統計学的有意差を伴う項目が認められたが、個体別にみるといずれも生理的範囲内の変動であった。

(7) 眼科学的検査

投与期間終了時の検査では、desethyl-PIPC 投与群の雄1例の右眼に角膜の創傷と眼底出血が、また、対照群の雌1例にも同程度の眼底出血が観察された。

(8) 剖検時肉眼所見および臓器重量・重量体重比

Desethyl-PIPC 投与群の雌雄で、盲腸腔の拡張と盲腸重量・重量体重比の増加が認められたが、休薬により回復傾向を示した。他に、desethyl-PIPC 投与群の回復試験例の雄に軽度の精巣重量減少が認められたが、精巣重量体重比では対照群との間に統計学的有意差はなく、体重の変動に起因したものであり、組織学的変化も認められないことから毒性とし

Fig. 2. Mean body weight changes in rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days.

Fig. 3. Food and water consumption in rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days.

Table 1. Urinalysis in rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days.

(28-days study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	Volume ^{a)} (ml/17hr)	Specific ^{a)} gravity	pH	Protein	Glucose	Ketone bodies	Occult blood	Bilurubin	Urobilinogen	Sediment ^{c)}			
												RBC	WBC	TC	SEC
					6.5 7.0 7.5	— ± +	—	—	—	—	0.1	—	— +	—	— ±
Male	Control (Saline)	10	23	1.027 0.011	6 4 5	1 4 5	10	10	10	10	10	10	10	10	9 1
	400	10	20	1.036 0.013	1 5 4	7 3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Female	Control (Saline)	10	15	1.034 0.011	1 7 2	2 8	10	10	10	10	10	10	9 1	10	10
	400	10	11	1.040 0.018	2 8	2 5 3	10	10	10	10	10	10	10	10	9 1

(Recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	Volume ^{a)} (ml/17hr)	Specific ^{a)} gravity	pH	Protein	Glucose	Ketone bodies	Occult blood	Bilurubin	Urobilinogen	Sediment ^{c)}			
												RBC	WBC	TC	SEC
					6.5 7.0 7.5	— ± +	—	—	—	—	0.1	—	—	—	—
Male	Control (Saline)	5	29	1.028 0.014	5	1 2 2	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	400	5	20	1.028 0.006	1 4	1 2 2	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	Control (Saline)	5	16	1.038 0.013	4 1	1 3 1	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	400	5	17	1.026 0.010	1 3 1	2 3	5	5	5	5	5	5	5	5	5

a) : Upper value : Mean, Lower value : S.D.

b) : Urobilinogen : Ehrlich unit/dl

— : Negative, ± : Trace, + : Slight change

c) : Sediment

TC : Transitional epithelial cells

SEC : Squamous epithelial cells

— : 0/10~2/5HPF (HPF : High power field)

± : 1~10/HPF

+ : 11~50/HPF

Table 2. Hematological findings in rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days.

(28-days study)																	
Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Reticulo -cyte (%)	WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	Differential leucocyte counts (%)					Platelets	
											Neutro.						
											Staff	Seg.	Eosino.	Baso.	Lymph. Mono.		
Male	Control (Saline)	10	805	16.7	54.4	67.9	20.9	30.8	27	97	0.2	13.3	1.2	0.1	84.4	1.0	110.3
			64	0.6	2.9	4.7	1.2	1.7	6	23	0.3	5.1	1.1	0.2	5.3	0.7	20.1
Male	400	10	829	16.8	55.7	67.4	20.4	30.2	30	115	0.3	6.6	0.8	0.1	91.5	0.9	109.4
			60	0.4	2.8	4.0	1.6	1.5	7	25	0.3	2.5	0.8	0.2	2.9	0.5	7.5
Female	Control (Saline)	10	778	16.2	53.0	68.3	20.9	30.7	24	102	0.2	7.9	1.5	0.1	89.5	1.0	121.8
			39	0.5	2.8	3.7	0.7	1.1	7	30	0.3	5.0	1.2	0.2	5.7	0.4	13.6
Female	400	10	815	16.4	52.2	64.2	20.2	31.4	22	75	0.1	6.8	2.0	0.1	90.4	0.8	125.8
			52	0.7	3.8	5.8	1.4	1.6	5	18	0.2	4.8	1.2	0.2	6.1	0.5	19.3
(Recovery study)																	
Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Reticulo -cyte (%)	WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	Differential leucocyte counts (%)					Platelets	
											Neutro.						
											Staff	Seg.	Eosino.	Baso.	Lymph. Mono.		
Male	Control (Saline)	5	904	16.3	54.3	60.2	18.1	30.1	24	151	0.1	10.4	0.9	0.0	87.8	0.8	105.4
			45	0.7	2.2	4.2	0.5	1.5	5	35	0.2	4.4	0.7	0.0	4.4	0.3	6.8
Male	400	5	930	16.9	55.8	60.1	18.1	30.2	23	117	0.1	10.0	1.4	0.0	87.5	1.0	98.0
			37	0.7	0.8	2.9	0.2	1.5	4	35	0.2	3.8	0.5	0.0	4.2	0.4	5.8
Female	Control (Saline)	5	870	16.0	51.8	59.6	18.4	31.0	20	71	0.2	20.8	1.5	0.0	76.6	0.9	99.6
			45	0.6	2.8	1.5	0.6	0.8	6	11	0.3	8.9	0.9	0.0	9.5	0.5	7.1
Female	400	5	872	16.8	54.4	62.4	19.3	31.0	20	58	0.2	13.8	1.9	0.0	83.3	0.8	99.2
			34	0.3	3.2	4.3	0.7	1.8	4	23	0.4	4.0	1.7	0.0	4.6	1.3	6.7

Upper value : Mean, Lower value : S.D.

Significantly different from control * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$.

Table 3. Biochemical findings in rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days.

(28-days study)													
Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Ch.E. (ΔpH)	T.Bil. (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Glucose (mg/dl)	T.Chol. (mg/dl)	TG (mg/dl)	P.L. (mg/dl)	U.N. (mg/dl)
Male	Control (Saline)	10	65	12	327	0.11	0.2	5.8	157	52	42	82	21.1
		15	4	49	0.02	0.0	0.3	34	8	18	14	14	3.3
	400	10	72	9	313	0.15	0.2	5.5	159	59	42	86	20.2
		21	2	45	0.03	0.1	0.2	27	8	14	8	8	4.4
Female	Control (Saline)	10	67	10	174	0.49	0.2	6.0	130	65	18	106	27.5
		13	2	35	0.13	0.0	0.3	17	7	7	7	13	5.3
	400	10	62	8	178	0.61	0.2	5.9	135	53	16	83	26.5
		8	1	30	0.13	0.0	0.3	27	3	6	9	9	7.0

(Recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Ch.E. (ΔpH)	T.Bil. (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Glucose (mg/dl)	T.Chol. (mg/dl)	TG (mg/dl)	P.L. (mg/dl)	U.N. (mg/dl)
Male	Control (Saline)	5	71	11	227	0.12	0.2	5.7	170	50	63	74	17.3
		17	2	26	0.04	0.1	0.2	30	10	24	18	18	2.6
	400	5	57	10	230	0.13	0.1	5.7	183	53	63	74	19.4
		11	3	24	0.02	0.1	0.2	4	5	21	7	7	0.6
Female	Control (Saline)	5	72	11	113	0.53	0.2	6.3	136	57	30	95	21.7
		19	2	38	0.06	0.0	0.4	21	7	24	14	14	4.8
	400	5	92	11	118	0.53	0.2	5.9	141	57	38	92	20.6
		75	4	17	0.05	0.0	0.1	10	8	26	13	13	2.4

Ch.E. : Cholinesterase, T.Bil. : Total bilirubin, T. Chol. : Total cholesterol, TG : Triglycerides, P.L. : Phospholipids, U.N. : Urea nitrogen

Upper value : Mean, Lower value : S.D.

Significantly different from control * : P<0.05, ** : P<0.01.

Table 4. Protein fraction and A/G in serum of rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days. (28-days study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rat	Protein fraction (%)					
			A/G	Albumin	Globulin			
					α_1	α_2	β	γ
Male	Control (Saline)	10	1.14 0.07	53.38 1.53	20.54 1.10	6.26 0.60	15.04 1.01	4.76 0.75
	400	10	1.15 0.05	53.51 1.17	22.28 0.83 **	6.54 0.46	14.24 0.66	3.41 0.34 **
Female	Control (Saline)	10	1.28 0.08	56.16 1.60	19.07 1.30	5.45 0.35	13.48 1.11	5.82 1.18
	400	10	1.30 0.10	56.45 2.00	20.61 0.90 **	5.47 0.71	12.76 1.06	4.69 1.09 *

(Recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rat	Protein fraction (%)					
			A/G	Albumin	Globulin			
					α_1	α_2	β	γ
Male	Control (Saline)	5	1.01 0.08	50.29 1.80	20.71 1.52	7.08 0.72	16.66 0.85	5.23 1.00
	400	5	1.09 0.04	52.10 1.03	22.16 1.16	6.95 0.52	15.27 0.66 *	3.49 0.39 **
Female	Control (Saline)	5	1.28 0.06	56.24 1.10	18.20 1.09	4.78 0.40	14.98 1.49	5.77 0.40
	400	5	1.33 0.05	57.09 0.90	18.46 0.97	5.47 0.56	14.02 0.69	4.94 1.21

Upper value : Mean, Lower value : S.D.

Significantly different from control *P<0.05, **P<0.01.

て重要視すべき異常ではなかった (Table 5)。

(9) 組織学的検査

desethyl-PIPC 投与群の雌雄で、投与部位 (尾) に限局した出血、炎症性細胞浸潤、線維化、血管壁の壊死、異物性肉芽腫、および血管内膜の軽度増殖が認められた (Table 6)。同様の変化は対照群でも認められており、注射針による組織の損傷が原因と思われた。他にも軽度の組織学的変化が散見されたが、対照群でもみられ desethyl-PIPC 投与に直接

起因するものではなかった。なお、剖検時に腔の拡張および重量増加が認められた desethyl-PIPC 投与群の雌雄の盲腸、および回復試験で重量の減少が認められた desethyl-PIPC 投与群の雄の精巣に組織学的な異常は認めなかった。

Table 5: Absolute and relative organ weights in rats injected intravenously with desethyl-PIPC for 28 days.

(Absolute organ weights) (unit : g)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	Body Weight	Brain	Hypo-physis	Salivary glands	Thyroids	Thymus	Heart	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Adrenals	Testis	Prostate & Seminal vesicle	Epididymis	Ovaries	Uterus	Cecum
Male	Control (Saline)	10	334	2.05	0.014	0.72	0.024	0.47	1.26	1.50	10.52	1.24	0.71	0.070	1.80	1.79	2.06	1.13		3.66
	400	10	335	2.10	0.014	0.67	0.024	0.43	1.23	1.48	10.08	1.30	0.71	0.069	1.80	1.79	2.01	1.18		6.64
		13		0.05	0.003	0.07	0.004	0.08	0.11	0.09	0.65	0.10	0.06	0.10	0.010	0.09	0.07	0.24	0.17	12.83
Female	Control (Saline)	10	212	1.94	0.016	0.48	0.018	0.40	0.88	1.21	6.34	0.80	0.82	0.54	0.072			0.104	0.64	2.90
	400	10	218	1.96	0.016	0.50	0.020	0.35	0.80	1.16	6.16	0.78	0.81	0.51	0.073			0.097	0.69	0.47
		8		0.05	0.004	0.06	0.003	0.07	0.12	0.11	0.45	0.05	0.06	0.07	0.007			0.017	0.29	14.89
Male	Control (Saline)	5	459	2.16	0.016	0.71	0.028	0.39	1.64	1.68	13.59	1.54	1.61	0.91	0.070	2.03	2.04	2.83	1.53	5.19
	400	5	435	2.14	0.015	0.65	0.027	0.44	1.51	1.66	12.92	1.45	1.45	0.87	0.061	1.85	1.82	2.85	1.49	1.22
		40		0.07	0.005	0.20	0.006	0.07	0.23	0.23	1.05	0.20	0.16	0.14	0.009	0.05	0.04	0.49	0.14	7.27
Female	Control (Saline)	5	251	2.02	0.017	0.48	0.021	0.32	1.00	1.18	6.94	0.86	0.89	0.56	0.068			0.102	0.72	3.04
	400	5	251	1.95	0.015	0.47	0.024	0.31	0.90	1.20	6.93	0.80	0.83	0.51	0.066			0.011	0.28	0.43
		7		0.08	0.003	0.04	0.005	0.04	0.10	0.05	0.31	0.07	0.08	0.05	0.005			0.108	0.77	4.45

(Relative organ weights) (unit : %)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of rats	Brain	Hypo-physis	Salivary glands	Thyroids	Thymus	Heart	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Adrenals	Testis	Prostate & Seminal vesicle	Epididymis	Ovaries	Uterus	Cecum
Male	Control (Saline)	10	0.617	0.0041	0.216	0.0071	0.139	0.378	0.451	3.149	0.370	0.385	0.212	0.0211	0.539	0.536	0.618	0.341	1.102
	400	10	0.627	0.0043	0.200	0.0072	0.130	0.367	0.442	3.008	0.388	0.387	0.213	0.0205	0.539	0.536	0.601	0.047	0.215
		10	0.035	0.0009	0.019	0.0011	0.024	0.029	0.038	0.144	0.029	0.018	0.030	0.0028	0.031	0.025	0.059	0.353	3.838
Female	Control (Saline)	10	0.917	0.0076	0.226	0.0087	0.188	0.416	0.574	2.995	0.378	0.388	0.255	0.0342			0.0492	0.302	1.370
	400	10	0.897	0.0074	0.230	0.0089	0.161	0.368	0.533	2.822	0.356	0.369	0.233	0.0332			0.0081	0.058	0.221
		10	0.038	0.0018	0.024	0.0011	0.028	0.051	0.045	0.164	0.019	0.020	0.031	0.0023			0.0077	0.126	0.664
Male	Control (Saline)	5	0.472	0.0035	0.155	0.0060	0.085	0.359	0.367	2.964	0.336	0.352	0.198	0.0153	0.445	0.445	0.620	0.333	1.132
	400	5	0.495	0.0035	0.151	0.0064	0.102	0.346	0.381	2.979	0.333	0.335	0.198	0.0140	0.428	0.422	0.653	0.024	0.263
		5	0.046	0.0010	0.046	0.0016	0.010	0.037	0.031	0.237	0.038	0.033	0.018	0.0020	0.040	0.033	0.068	0.013	1.660
Female	Control (Saline)	5	0.804	0.0070	0.190	0.0084	0.127	0.401	0.468	2.768	0.342	0.356	0.223	0.0273			0.0408	0.284	1.205
	400	5	0.776	0.0061	0.187	0.0094	0.122	0.359	0.478	2.759	0.319	0.331	0.203	0.0262			0.0056	0.102	0.127
		5	0.025	0.0011	0.017	0.0017	0.014	0.042	0.028	0.062	0.021	0.024	0.018	0.0014			0.0026	0.125	0.422

Upper value : Mean, Lower value : S.D.

Significantly different from control * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$.

Table 6. Incidence of histological changes in rats injected intravenously with desethyl-PPC for 28 days.

Histological findings		28 days study				Recovery study			
		Male		Female		Male		Female	
	Dose Number of animals	Control 10	400mg/kg 10	Control 10	400mg/kg 10	Control 5	400mg/kg 5	Control 5	400mg/kg 5
Eye ball	Focal hemorrhage in the vitreous	—	—	—	—	+(1)	—	—	—
Heart	Focal myocarditis	—	—	—	—	+(2)	+(1)	—	—
Lung	Foreign body granuloma in the alveoli	—	+(3)	+(2)	+(3)	—	+(1)	+(2)	+(1)
	Focal hemorrhage in the alveoli	—	—	—	—	+(2)	—	—	—
Adrenal gland	Accessory adrenocortical tissue in capsule	—	—	—	—	—	—	+(1)	—
Kidney	Mineralization at the cortico-medullary junction	—	—	+(2)	+(1)	—	—	—	—
	Cortical scar	—	—	—	+(1)	—	—	—	—
	Pyelitis	—	—	+(1)	—	—	—	—	—
Injection areas	Focal hemorrhage	+(4)	+(4)	+(3)	+(4)	+(1)	—	—	—
	Focal necrosis of the vascular wall	+(5)	+(3)	+(3)	+(5)	—	—	—	—
	Inflammatory cells infiltration	+(2)	+(3)	+(3)	+(2)	—	—	—	—
	Focal fibrosis	—	—	+(2)	+(6)	—	—	—	—
	Foreign body granuloma at the subcutaneous tissue	+(1)	+(1)	+(1)	+(5)	+(1)	+(1)	—	—
	Proliferation of the tunica intima	—	+(2)	—	+(2)	—	—	—	—

Grade of histological findings — : No abnormalities, + : Mild changes, ( ): Number of the rats which were observed the histological changes.
There were no abnormalities in other tissues examined.

総括および考察

注射用合成ペニシリンである PIPC のヒトでの代謝物の存在は従来知られていなかったが、最近、抗菌活性を有する代謝物である desethyl-PIPC がヒトの血漿中および尿中に見いだされた。desethyl-PIPC は PIPC を投与したヒトの血漿中に投与量の 10% 以下の割合で生成し、半減期は 1.21 時間と短く、排泄は主として尿中であることが知られている (Minami *et al.*, 1991a, b)。今回、desethyl-PIPC の毒性を検討するために、ラットにおける単回静脈内投与毒性試験ならびに 28 日間反復静脈内投与毒性試験を行った。

単回静脈内投与毒性試験では投与量の上限値の目安として示されている 2000 mg/kg を投与した。その結果、雌雄に死亡例はなく、症状観察でも投与直後からの一過性の自発運動の減少（軽度）と呼吸深大、投与翌日からの軟便および投与 2 日後からの肛門周囲の被毛の汚れ以外に異常は認められなかった。また、体重は順調に増加し、剖検時の肉眼観察でも盲腸腔の拡張以外に異常は認めなかった。

抗生物質を投与したラットでは、軟便と盲腸腔の拡張はしばしば観察される変化であり、腸内細菌叢の変動によるものと考えられている。desethyl-PIPC の抗菌活性はグラム陽性菌に対しては PIPC と同程度、グラム陰性菌に対しては PIPC よりも数倍低いことが知られており (Minami *et al.*, 1991a)，本試験で観察された軟便と盲腸腔の拡張は desethyl-PIPC の抗菌活性に起因した変化と考えられた。一方、PIPC の急性毒性試験では、8 週齢ラットに静脈内投与したときの LD₅₀ は、雄で 2710 mg/kg、雌で 2790 mg/kg であり、2000 mg/kg を投与しても一過性の自発運動の減少が観察されただけで、雌雄とも死亡例はなかったと報告されている (高井ら, 1997 a)。高井らの報告と本試験の結果を同投与量 (2000 mg/kg) で比較すると、どちらにも投与直後に一過性の自発運動の減少が観察されたものの、死亡例がなかったことから、ラットに対する単回静脈内投与での毒性はほぼ同程度であると考えら

れた。

28 日間反復静脈内投与毒性試験では、desethyl-PIPC が PIPC の代謝物であることから、臨床用量の PIPC 2~4 g/man/day を投与した時に生成される desethyl-PIPC の約 50~100 倍量に相当する 400 mg/kg を十分量と考え投与した。その結果、400 mg/kg 投与群の雌雄に desethyl-PIPC の抗菌活性に起因すると思われる軟便、摂水量増加および盲腸腔の拡張・重量増加が認められた。血清蛋白分画では γ グロブリン比の減少と α_1 グロブリン比の増加が認められたが、同様な変化は抗生剤 (枝長ら, 1979; 小林ら, 1980) や抗菌剤 (野村ら, 1988) のラット毒性試験でも報告されており、その作用機序は明らかでないものの desethyl-PIPC の抗菌活性に起因した変化と思われた。他に、血液学的検査、血液生化学検査、臓器重量等では対照群との間に統計学的有意差が散見されたが、個体別にみるとほぼ生理的範囲内の変動であり、desethyl-PIPC 投与との関連性は認められなかった。眼科学的検査で、desethyl-PIPC 投与群の雄 1 例の右眼に角膜の創傷と眼底出血が観察されたが、対照群にも同程度の眼底出血が観察されており、desethyl-PIPC 投与とは無関係な偶発所見と思われた。

高井ら (1977 b) は PIPC のラット 1 カ月間静脈内投与亜急性毒性試験 (2000, 1000, 500 mg/kg) を実施し、2000 mg/kg 投与で死亡例を認めたが、1000 および 500 mg/kg 投与では盲腸腔の拡張以外に PIPC 投与に起因した異常はなく、最大無作用量は 1000 mg/kg であったと報告している。高井らの報告にある 500 mg/kg 投与群の結果と本試験の 400 mg/kg 投与群の結果を比較すると、発現した変化はいずれも抗菌活性に起因した軽度なものであり、その毒性に明らかな差は認められなかった。

以上、desethyl-PIPC のラットにおける単回静脈内投与毒性試験での最小致死量は 2000 mg/kg を越える量であると推定され、その毒性は PIPC とほぼ同等であると考えられた。また、ラットにおける 28 日間反復静脈内投与毒性試験では、臨床用量の PIPC をヒトに投与した時に生成される desethyl-PIPC の約 50~100 倍量に相当する 400 mg/kg を投与

したが、発現した変化は軽度であった。ラットを用いたこれら二試験の結果から、desethyl-PIPCは毒性の低い代謝物であると考えられた。

要 約

PIPCの代謝物であるdesethyl-PIPCについて、ラット単回静脈内投与毒性試験ならびに28日間反復静脈内投与毒性試験を行い、以下の結果を得た。

単回静脈内投与毒性試験では、desethyl-PIPCの2000 mg/kg投与で雌雄に死亡例はなく、最小致死量は2000 mg/kg以上と推定された。発現した症状は、投与直後からの一過性の自発運動減少（軽度）と呼吸深大、および投与翌日からの軟便であった。剖検時の肉眼観察では盲腸腔の拡張以外に異常は認められなかった。

28日間反復静脈内投与毒性試験では、400 mg/kg投与でdesethyl-PIPCの抗菌活性に起因すると思われる軟便、摂水量増加および盲腸腔の拡張と重量増加が認められた。また、血清蛋白分画で、A/G比の変動を伴わない γ グロブリン比の減少と α_1 グロブリン比の増加が認められたが、いずれも休薬により回復傾向を示した。

以上、ラットにおける単回静脈内投与でのdesethyl-PIPCの最小致死量は2000 mg/kgを越える量であったこと、ならびに400 mg/kgの28日間反復静脈内投与において発現した変化は軽度であったことから、desethyl-PIPCは毒性の低い代謝物であると思われた。

文 献

- 枝長正修, 北敏郎, 奥田教隆, 堀添宏 (1979): Bacampicillin hydrochloride の急性, 亜急性および慢性毒性試験. *Chemotherapy*, **27**(4), 17-29.
- 厚生省薬務局新医薬品課監修 (1994): 医薬品非臨床試験ガイドライン解説. 薬事日報社.
- 小林文彦, 古川仁, 長谷川紀昭, 吉崎敏夫, 原田喜男 (1980): 6059-S のラットにおける亜急性毒性試験. *Chemotherapy*, **28**(7), 1007-1028.
- Minami, Y., Komuro, M., Sakawa, K. and Ishida, N. (1991a): Desethyl-piperacillin, a new active metabolite of piperacillin in human. *The J. Antibiotics*, **44** (2), 256-258.
- Minami, Y., Komuro, M., Sakawa, K., Ishida, N., Shindo, T., Matsumoto, K. and Oishi, K. (1991b): Human-specific metabolite of piperacillin (PIPC), desethyl-PIPC, newly found after 10-years clinical usage. 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago.
- 野村岳之, 渡辺満利, 河上喜之, 平田真理子, 鈴木修三, 柳田知司 (1988): NY-198のラット, 13週間経口投与亜急性毒性試験. *Chemotherapy*, **36**(2), 343-370.
- 高井明, 米田豊昭, 中田弘子, 正谷博之, 室田恒夫, 柴田哲夫, 中村昌三, 河村泰仁, 佐藤盛 (1977 a): T-1220の毒性試験 (第1報) - マウス, ラット, イヌ, サルにおける急性毒性試験 -. *Chemotherapy*, **25**(5), 816-828.
- 高井明, 米田豊昭, 正谷博之, 柴田哲夫, 河村泰仁, 佐藤盛, 中田弘子, 稲葉淳子 (1977 b): T-1220の毒性試験 (第3報) - ラット静脈内投与における亜急性毒性試験 -. *Chemotherapy*, **25**(5), 857-868.