

AM-715 の毒性学的研究 第2報

——イヌにおける亜急性毒性試験——

杉本 勉・棚瀬 裕文・斎藤 次郎・今井 繁

杏林製薬株式会社開発技術センター

伊藤由規男・佐藤 裕和・土屋 剛・入倉 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

新しい合成抗菌剤である AM-715 をイヌに5週間、50, 100, および 200 mg/kg/day 経口投与した時の亜急性毒性について検討し、次の結果を得た。

ヒトの推定常用量 (12 mg/kg/day) の 16.7 倍量に相当する 200 mg/kg/day を5週間経口的に投与しても、死亡、中毒症状は認められなかった。雌の 200 mg/kg 群で軽度の体重減少がみられたが、その他は対照群と差がなかった。

血液学的検査あるいは血液生化学的検査では、いずれの用量においても AM-715 による影響は認められなかった。

尿検査でも AM-715 による異常値は認められなかった。主要臓器の重量は薬物投与各群に多少の変動は認められたが、用量依存性はなかった。

病理組織学的検索でも AM-715 投与によると思われる明らかな変化は認められなかった。

以上の結果から、AM-715 はイヌにおいても極めて低毒性であることが明らかになった。

AM-715 の安全性を確認するために行なったイヌによる亜急性毒性試験成績について報告する。本報では次の略号を用いた。

ALB: Albumin, A/G: Albumin/Globulin ratio. ALP: Alkaline phosphatase. ATPase: Adenosinetriphosphatase. BIL: Bilirubin. β -Glase: β -Glucuronidase. BUN: Blood urea nitrogen. ChE: Choline esterase. CRNN: Creatinine. G-6-Pase: Glucose-6-phosphatase. Glu: Glucose, GOT: Glutaminoxaloacetic transaminase. GPT: Glutamic pyruvic transaminase. FFA: Free fatty acid. Hb: Hemoglobin, Ht: Hematocrit. Ket: Ketone body. LDH: Lactic dehydrogenase. O-bl: Occult blood. T-CHO: Total cholesterol. TG: Triglyceride. TP: Total protein, Uro: Urobilinogen.

I. 実験材料および方法

1. 実験動物

約1ヶ月予備飼育、検疫した雌 (生後11ヶ月令, 7.4~11.4 kg), 雄 (生後3年6ヶ月~4年2ヶ月令, 10.2~13.1 kg) ビーグル犬を実験に供した。

予備飼育および試験期間中、動物は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の環境条件で1~3頭ずつ個別ケースに入れ飼育した。飼

料はイヌ用固型飼料 (DB, オリエンタル酵母) 400 g/day を2分して、それぞれ午前、午後に1回ずつ与え、水 (水道水) は自由に摂取させた。

2. 投与量および投与方法

投与量の設定はまず、ヒトの推定1回常用量 4 mg/kg の25倍に相当する 100 mg/kg を1日2回、1日量では 16.7 倍に当る 200 mg/kg を高用量とし、以下等比的に中間用量を 100 mg/kg, 低用量を 50 mg/kg とした。上記の各群に対照群を加え、4群で実施し、それぞれ雌雄各3頭を用いた。AM-715 はゼラチンカプセルに充填したものをを用い、上記投与量を2分して、それぞれ午前、午後に1回ずつ5週間、日曜日を除く毎日強制経口投与した。対照群は無処置とした。

3. 一般症状および体重

一般症状の観察、体重測定および摂飼量の観察を毎日薬物投与前に行なった。

4. 血液学的検査

投与5週間目に後耳介静脈 (雌は橈側皮静脈) より採血し、白血球数および赤血球数を計算板法 (雌は自動血球計数器) により計測し、シアメントヘモグロビン法で Hb 量を測定し、白血球の種別分類は血液塗沫標本を MAY-GIEMSA 染色して計測した。また、頸動脈 (雌は橈側皮静

脈)より採血して Ht 値(雄: WINTROBE 法, 雌: 毛細管法)を測定した。

5. 血液生化学的検査

投与開始前, 投与 1, 2, 3, 4 および 5 週間目に桡側皮静脈より採血しその血清について TP, ALB, A/G, BUN, CRNN, Glu, T-CHO, TG, BIL, Ca^{++} , GOT, GPT, ALP, ChE および LDH を自動分析装置(日立 706D 型)を用いて測定した。また, その他に Na^+ および K^+ (炎光分析法) β -Gl-ase および FFA (ITAYA-UI 法)を測定した。

6. 各種臓器の酵素

新鮮な各臓器のホモジネイトを調製し, $10,000 \times g$ で 15 分遠心して得た上清につき, 以下の測定を行なった。

肝については SWANSON の方法に従って G-6-Pase, KIELLEY らの方法に従って, ATPase, さらに p-ニトロフェニルグルクロナイド法に従って β -Gl-ase を測定し

た。腎および心筋については上記の方法で ATPase を測定し, 骨髄(大腿骨)については, KIND-KING 法に従って ALP を測定した。

7. 尿検査

投与 5 週間目に膀胱より採取した尿につき, pH (pH 試験紙), 蛋白(雄: Exton 法, 雌: ラブスティックス), Glu, Ket および O-bl (ラブスティックス試験紙) BIL (イクトスティックス試験紙) Uro (ウロビリスティックス試験紙), および Na^+ , K^+ (炎光分析法)を測定した。

8. 病理学的検索

ペントバルビタール麻酔下で頸動脈より放血致死せしめ, 脳, 下垂体, 顎下腺, 甲状腺(雄), 胸腺, 心, 肺, 肝, 脾, 盲腸(雄), 脾, 腎, 副腎, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 卵巣, 子宮につき剖検するとともに湿重量を測定した。上記の臓器および眼球(視神経を含む), 脊髓, 気管, 後大動脈, 食道, 胃, 十二指腸, 結腸, リンパ節

Table 1 Hematological findings in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)
Control	3	70.7 $\pm$ 26.8a)	740 $\pm$ 61	15.8 $\pm$ 1.1	48.4 $\pm$ 1.1
50	3	75.0 $\pm$ 22.6	685 $\pm$ 30	15.1 $\pm$ 1.0	46.8 $\pm$ 1.8
100	3	74.5 $\pm$ 28.0	717 $\pm$ 52	15.7 $\pm$ 0.7	52.2 $\pm$ 2.0
200	3	72.2 $\pm$ 25.0	736 $\pm$ 70	16.6 $\pm$ 0.6	46.7 $\pm$ 2.6

*: Administered in two divided doses

a): Mean $\pm$ SD

Table 2 Hematological findings in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)
Control	3	66.3 $\pm$ 34.3a)	781 $\pm$ 206	15.9 $\pm$ 1.9	47.8 $\pm$ 7.8
50	3	59.0 $\pm$ 7.5	612 $\pm$ 96	14.2 $\pm$ 2.5	43.7 $\pm$ 8.6
100	3	60.3 $\pm$ 7.4	754 $\pm$ 81	16.2 $\pm$ 2.5	49.5 $\pm$ 5.2
200	3	69.0 $\pm$ 30.8	731 $\pm$ 68	14.9 $\pm$ 0.5	47.0 $\pm$ 2.6

*: Administered in two divided doses

a): Mean $\pm$ SD

Table 3 Differeintial counts of leucocytes in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Differential counts of leucocytes (%)				
		Lymphocyte	Neutrocyte	Eosinophil	Basophil	Monocyte
Control	3	27.7 $\pm$ 10.1a)	65.5 $\pm$ 8.4	4.3 $\pm$ 2.9	0	2.5 $\pm$ 0.5
50	3	30.2 $\pm$ 7.3	64.2 $\pm$ 6.8	3.2 $\pm$ 2.3	0	2.5 $\pm$ 1.3
100	3	28.2 $\pm$ 6.4	64.3 $\pm$ 4.9	4.0 $\pm$ 2.3	0	3.5 $\pm$ 1.0
200	3	26.7 $\pm$ 9.5	65.7 $\pm$ 6.8	4.2 $\pm$ 2.5	0	3.5 $\pm$ 1.3

*: Administered in two divided doses

a): Mean $\pm$ SD

Table 4 Differential counts of leucocytes in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Differential counts of leucocytes (%)				
		Lymphocyte	Neutrocyte	Eosinophil	Basophil	Monocyte
Control	3	63.3±11.1 ^a	34.2±11.1	1.8±1.1	0	1.0±0.9
50	3	52.8±17.2	42.3±16.1	3.2±1.6	0	1.7±0.9
100	3	61.4± 3.1	35.7± 2.3	1.9±1.4	0	1.0±0.6
200	3	45.3±13.5	51.9±13.5	1.6±0.3	0	1.3±0.3

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD

Fig. 1 Mean body weight in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

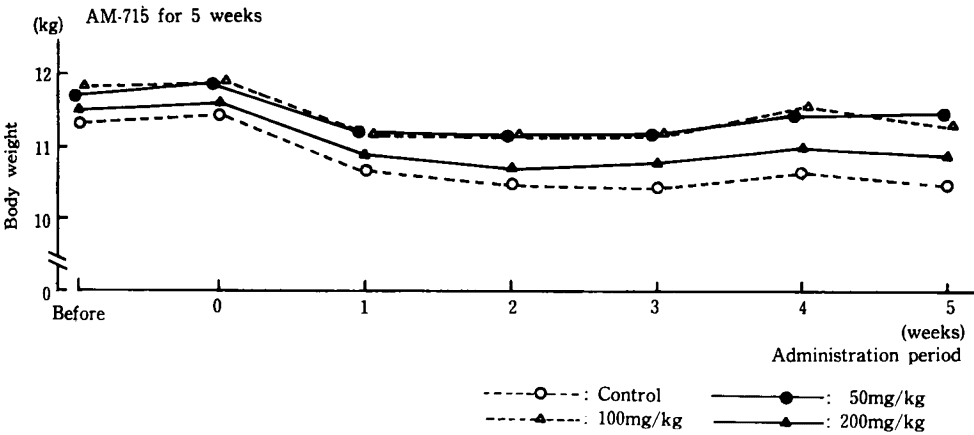
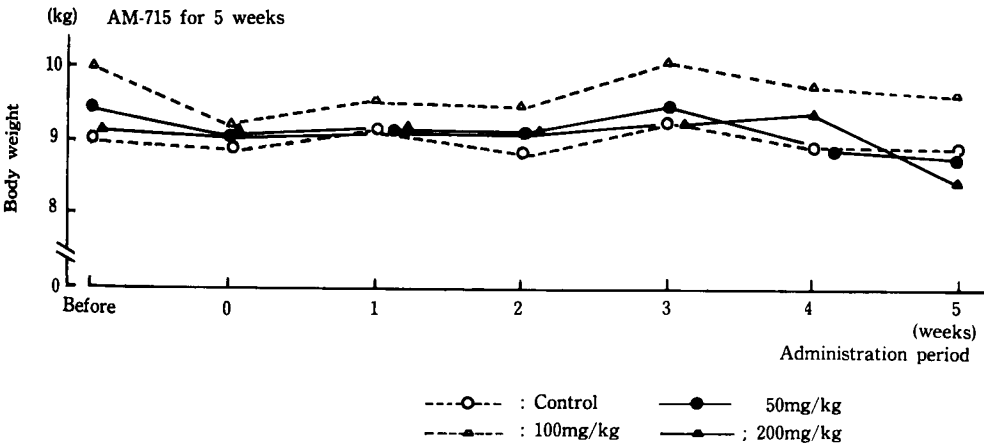


Fig. 2 Mean body weight in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks



(腸間膜), 膀胱, 筋肉(大腿部), 骨(肋骨), 軟骨(肋軟骨)および骨髓(大腿骨)を10%ホルマリン溶液で固定後, 常法に従ってパラフィン包埋, 薄切し, HE染色して鏡検した。

電顕検査では肝および腎の組織を採取し, 4%グルタルアルデヒドおよび1%オスミウム酸溶液で固定, 上昇アルコール系列で脱水後, エポン812に包埋した。薄切片は酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛の二重染色を施し電子顕微鏡(HU-11D型, 日立)で観察した。

II. 実験結果

1. 一般症状および体重推移

AM-715による中毒様症状は出現せず, 対照群および薬物投与の各群に死亡例は生じなかった。また各群の1週間毎の体重の推移をFig. 1~2に示した。投与5週間目の雌の200 mg/kgに軽度の体重減少がみられた以外には薬物投与各群とも対照群との間に差は認められず, 摂飼量にも差はなかった。

2. 血液学的検査

検査結果をTable 1~4に示した。各群においての測定値に顕著な差はみられず, 薬物による異常は認められなかった。

3. 血液生化学的検査

検査結果をTable 5-1~5-4, 6-1~6-4に示した。雄では投与2週間目の200 mg/kg群にてGOTが軽度上昇したものが1/3例みられ, 投与前の対照群, 投与2週間目の200 mg/kg群にGPTの上昇したものがそれぞれ2/3例, 1/3例見られた。しかし, いずれもそれ以後は正常範囲内に回復した。雌では投与前の50 mg/kg群で, TG, BIL, GPTがやや上昇していたが, 投与1週間目以降は正常範囲内に回復した。その他多少の変動を示す測定値が散見されたが, いずれも投与前あるいは対照群の変動範囲内にある軽度のものであった。

4. 各種臓器の酵素

結果をTable 7-1~7-4, 8-1~8-4に示した。肝のG-6-Pase, β -Gl-ase, ATPase, 腎および心筋のATPase, 骨髓のALPはいずれも各群の間に顕著な差は認められなかった。

5. 尿検査

検査結果をTable 9, 10に示した。潜血陽性が雄の対照群に1/3例みられた。また雌の薬物投与群ではpHがやや低値であった。その他にはAM-715投与による異常値は認められなかった。

6. 肉眼的観察

剖検所見をTable 11に要約した。雌で50 mg/kg群を除く全群の各1/3例に子宮の肥大がみられた。その他,

薬物投与各群にいくつかの病変が散見されたが用量依存性の関係は認められなかった。

7. 臓器重量

雄の絶対重量, 相対重量をそれぞれTable 12, 13に, 雌のそれらをTable 14, 15に示した。薬物投与各群にみられた各臓器の絶対重量あるいは相対重量の変動には用量依存性の関係はなく, 対照群でも同程度にみられた。

8. 病理組織学的検索

1) 光顕所見

鏡検結果を総括してTable 16に示した。200 mg/kg群で唾液腺に限局性細胞浸潤(Photo 1)が雄の2/3例, 雌の1/3例に, 尿細管の軽度拡張(Photo 2)が雌の1/3例に認められた。また雄の薬物投与各群の1/3~2/3例に小腸粘膜剝離(Photo 3)が認められた。さらに, 雄では対照群および薬物投与群の各群に肝, 腎, リンパ節, 精巣および前立腺の極めて軽微な炎症性変化が, またほぼ全例に胸腺および骨髓の脂肪化がみられた。

対照群の1/3例に亜急性性甲状腺炎が認められた。

雌で肉眼的に子宮肥大を示した例のうち, 対照群の1/3例のみ内膜の増殖像(Photo 4)がみられた。

その他の臓器には異常所見はみられなかった(Photo 5, 6)。

2) 電顕所見

肝臓では各投与群のいずれにも薬物投与に起因すると思われる変化は認められなかった(Photo 7)

腎では雌で光顕的に尿細管拡張を認めた200 mg/kg群の1/3例に遠位尿管の内腔拡張と上皮細胞内の空胞様構造の出現および膨化像(Photo 8)がみられた以外, 他の異常所見はみられなかった(Photo 9, 10)。

考 察

イヌにAM-715を50, 100および200 mg/kg 5週間連続投与した。亜急性毒性試験においてつぎのことが確められた。

1) 投与中死亡例はみられず, 特異的な一般症状も出現しなかった。体重の推移では, 雌(200 mg/kg)で軽度の体重減少がみられた以外は対照群と同様な推移を示した。

2) 血液学的検査では対照群と薬物投与各群との間に顕著な差はみられず, AM-715による異常は認められなかった。血液生化学的検査において, GOT, GPT, LDH, TG, BILなどの上昇が散見されたが, いずれも短期間の変化で以後は正常範囲内に回復した。また, 肝の酵素活性にも特異的な変化が認められなかったことから, AM-715は肝機能や肝組織に影響をおよぼさないことが示唆された。

Table 5-1 Biochemical findings in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	CRNN (mg/dl)
Before administration	Control	3	6.60±0.20 ^{a)}	3.00±0.17	0.8±0.1	17.4±0.8	—
	50	3	6.40±0.26	2.83±0.12	0.8±0.1	19.9±4.5	—
	100	3	6.17±0.42	2.77±0.31	0.8±0.1	19.1±1.5	—
	200	3	6.53±0.12	2.80±0.17	0.8±0.1	17.8±1.4	—
1	Control	3	6.53±0.25	2.97±0.06	0.8±0.1	12.6±0.7	0.87±0.12
	50	3	6.33±0.15	2.83±0.06	0.8±0.1	11.7±1.3	0.93±0.06
	100	3	6.20±0.10	2.90±0.17	0.9±0.1	15.0±2.8	1.00±0.10
	200	3	6.33±0.38	2.73±0.16	0.8±0.1	13.6±2.3	0.80±0.00
2	Control	3	6.47±0.29	2.87±0.06	0.8±0.1	13.6±2.6	0.73±0.06
	50	3	6.57±0.25	2.90±0.10	0.8±0.1	14.6±1.0	0.77±0.06
	100	3	6.17±0.21	2.83±0.06	0.9±0.1	18.0±3.9	0.87±0.06
	200	3	6.23±0.15	2.73±0.16	0.8±0.1	17.1±1.9	0.73±0.06
3	Control	3	6.67±0.32	2.97±0.06	0.8±0.1	13.0±1.2	0.80±0.00
	50	3	6.50±0.10	2.93±0.12	0.8±0.1	11.8±0.9	0.87±0.06
	100	3	6.33±0.06	2.97±0.21	0.9±0.1	14.6±2.1	0.97±0.12
	200	3	6.50±0.30	2.90±0.10	0.8±0.1	12.6±0.4	0.80±0.00
4	Control	3	6.43±0.38	2.87±0.06	0.8±0.1	11.9±2.6	0.77±0.06
	50	3	6.30±0.26	2.77±0.12	0.8±0.1	11.3±1.2	0.73±0.06
	100	3	6.10±0.10	2.80±0.17	0.9±0.1	12.9±2.5	0.90±0.10
	200	3	5.87±0.32	2.60±0.10	0.8±0.1	11.3±0.8	0.77±0.06
5	Control	3	6.33±0.15	2.87±0.12	0.8±0.1	12.2±1.1	0.80±0.10
	50	3	6.23±0.25	2.77±0.06	0.8±0.1	11.9±1.3	0.80±0.10
	100	3	6.07±0.21	2.80±0.17	0.9±0.1	13.3±1.8	0.90±0.10
	200	3	6.23±0.06	2.80±0.20	0.8±0.1	13.1±1.3	0.73±0.06

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

Table 5-2 Biochemical findings in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Glu (mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFA (μ Eq/l)
Before administration	Control	3	81.3 $\pm$ 0.6 ^{a)}	151.0 $\pm$ 26.7	44.7 $\pm$ 8.1	—
	50	3	88.3 $\pm$ 5.1	147.7 $\pm$ 37.8	49.0 $\pm$ 13.0	—
	100	3	82.7 $\pm$ 5.5	134.0 $\pm$ 26.1	43.0 $\pm$ 2.7	—
	200	3	76.3 $\pm$ 3.8	135.7 $\pm$ 16.0	47.0 $\pm$ 3.6	—
1	Control	3	89.0 $\pm$ 4.4	157.0 $\pm$ 14.0	46.3 $\pm$ 5.5	—
	50	3	93.0 $\pm$ 6.0	146.7 $\pm$ 23.6	42.7 $\pm$ 9.0	—
	100	3	85.7 $\pm$ 4.0	149.0 $\pm$ 16.0	40.0 $\pm$ 7.0	—
	200	3	82.7 $\pm$ 6.5	137.0 $\pm$ 10.4	40.7 $\pm$ 8.1	—
2	Control	3	95.7 $\pm$ 0.6	146.7 $\pm$ 23.4	40.0 $\pm$ 1.0	—
	50	3	91.0 $\pm$ 3.0	145.0 $\pm$ 31.5	43.0 $\pm$ 2.7	—
	100	3	95.3 $\pm$ 0.6	141.7 $\pm$ 22.6	43.0 $\pm$ 7.2	—
	200	3	89.3 $\pm$ 7.8	129.7 $\pm$ 17.2	36.3 $\pm$ 1.5	—
3	Control	3	82.0 $\pm$ 6.6	152.7 $\pm$ 13.0	40.3 $\pm$ 1.5	—
	50	3	87.3 $\pm$ 3.1	153.3 $\pm$ 30.6	36.3 $\pm$ 4.2	—
	100	3	87.0 $\pm$ 5.3	159.0 $\pm$ 26.0	39.3 $\pm$ 0.6	—
	200	3	81.3 $\pm$ 5.1	148.0 $\pm$ 15.9	41.7 $\pm$ 9.3	—
4	Control	3	93.3 $\pm$ 3.1	154.0 $\pm$ 9.6	41.7 $\pm$ 7.2	—
	50	3	93.3 $\pm$ 6.4	146.0 $\pm$ 27.6	37.6 $\pm$ 5.9	—
	100	3	96.0 $\pm$ 2.7	153.0 $\pm$ 21.2	38.0 $\pm$ 2.7	—
	200	3	92.7 $\pm$ 5.5	135.7 $\pm$ 11.9	35.0 $\pm$ 5.3	—
5	Control	3	104.7 $\pm$ 4.0	144.0 $\pm$ 18.7	44.3 $\pm$ 9.1	419.3 $\pm$ 207.1
	50	3	108.6 $\pm$ 5.6	144.0 $\pm$ 20.7	39.7 $\pm$ 9.0	367.7 $\pm$ 64.7
	100	3	105.3 $\pm$ 3.1	147.7 $\pm$ 19.9	41.3 $\pm$ 4.6	567.7 $\pm$ 180.6
	200	3	92.7 $\pm$ 11.7	136.0 $\pm$ 21.3	42.0 $\pm$ 6.2	552.7 $\pm$ 196.8

*: Administered in two divided doses

a): Mean $\pm$ SD

Table 5-3 Biochemical findings in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Total BIL (mg/dl)	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)	GOT (IU/l)
Before administration	Control	3	0.63±0.06 ^{a)}	8.8±0.5	133.9±1.6	4.8±0.2	29.3± 3.2
	50	3	0.73±0.40	8.5±0.3	135.3±3.6	4.6±0.1	25.7± 2.5
	100	3	0.77±0.35	8.5±0.5	132.9±1.6	4.8±0.0	26.0± 2.7
	200	3	0.73±0.21	8.9±0.3	134.8±0.0	4.7±0.0	26.7± 5.0
1	Control	3	0.33±0.06	8.9±0.5	136.3±2.5	5.2±0.1	22.7± 1.5
	50	3	0.46±0.17	8.7±0.1	136.3±2.5	5.0±0.0	23.3± 3.1
	100	3	0.30±0.00	8.7±0.2	136.3±2.5	5.3±0.2	23.0± 1.0
	200	3	0.33±0.15	8.8±0.2	134.8±0.0	5.0±0.3	23.3± 5.5
2	Control	3	0.37±0.06	9.0±0.5	129.1±2.5	4.4±0.0	35.0± 9.5
	50	3	0.63±0.42	8.8±0.5	129.1±2.5	4.4±0.1	30.3± 5.9
	100	3	0.47±0.38	9.1±0.4	129.1±2.5	4.5±0.1	26.7± 1.2
	200	3	0.60±0.26	8.7±0.4	132.0±0.0	4.5±0.1	52.0±39.9
3	Control	3	0.50±0.17	9.2±0.3	145.0±2.4	4.8±0.2	22.3± 2.1
	50	3	0.27±0.06	9.1±0.1	145.0±2.4	4.6±0.1	24.0± 4.0
	100	3	0.43±0.15	9.4±0.2	146.4±0.0	4.8±0.2	25.0± 2.7
	200	3	0.37±0.12	9.4±0.4	146.4±0.0	4.9±0.2	24.7± 5.7
4	Control	3	0.17±0.06	9.4±0.4	134.8±0.0	5.1±0.1	21.3± 3.8
	50	3	0.37±0.21	9.1±0.4	138.7±3.7	5.0±0.2	24.0± 2.0
	100	3	0.20±0.10	9.1±0.2	139.7±4.3	5.1±0.2	22.7± 0.6
	200	3	0.20±0.10	9.1±0.3	137.7±2.5	4.9±0.1	20.7± 7.2
5	Control	3	0.13±0.06	9.9±0.2	137.7±2.5	4.8±0.1	30.7±10.0
	50	3	0.27±0.15	9.4±0.5	133.9±1.6	4.7±0.2	24.7± 4.2
	100	3	0.30±0.17	9.7±0.3	133.9±1.6	4.7±0.4	25.7± 6.7
	200	3	0.53±0.29	9.6±0.1	136.3±2.5	4.7±0.1	26.7± 6.1

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

Table 5-4 Biochemical findings in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	GPT (IU/l)	ALP (K-A-U/dl)	ChE (Δ pH)	LDH (IU/l)	β -Glase (U/dl)
Before administration	Control	3	133.3 $\pm$ 131.6 ^{a)}	8.8 $\pm$ 2.1	0.60 $\pm$ 0.06	243 $\pm$ 70	5621 $\pm$ 558
	50	3	37.0 $\pm$ 6.2	6.6 $\pm$ 2.2	0.65 $\pm$ 0.19	267 $\pm$ 95	5414 $\pm$ 2854
	100	3	33.3 $\pm$ 5.1	5.5 $\pm$ 2.2	0.50 $\pm$ 0.06	288 $\pm$ 154	5372 $\pm$ 398
	200	3	49.0 $\pm$ 20.8	5.7 $\pm$ 0.5	0.64 $\pm$ 0.07	258 $\pm$ 94	5124 $\pm$ 1143
1	Control	3	41.0 $\pm$ 13.0	5.6 $\pm$ 1.0	0.62 $\pm$ 0.07	197 $\pm$ 69	4608 $\pm$ 784
	50	3	28.7 $\pm$ 5.1	4.7 $\pm$ 0.4	0.66 $\pm$ 0.20	215 $\pm$ 100	2425 $\pm$ 1024
	100	3	27.3 $\pm$ 5.8	3.6 $\pm$ 0.5	0.60 $\pm$ 0.05	174 $\pm$ 17	3650 $\pm$ 892
	200	3	34.3 $\pm$ 4.2	4.0 $\pm$ 0.6	0.70 $\pm$ 0.06	190 $\pm$ 96	3804 $\pm$ 349
2	Control	3	43.0 $\pm$ 17.4	5.4 $\pm$ 1.1	0.58 $\pm$ 0.10	186 $\pm$ 51	5353 $\pm$ 405
	50	3	33.3 $\pm$ 8.5	5.3 $\pm$ 1.2	0.67 $\pm$ 0.23	219 $\pm$ 152	4954 $\pm$ 1886
	100	3	30.3 $\pm$ 10.1	4.0 $\pm$ 1.7	0.60 $\pm$ 0.06	197 $\pm$ 114	4581 $\pm$ 776
	200	3	87.7 $\pm$ 92.2	4.6 $\pm$ 0.8	0.69 $\pm$ 0.10	207 $\pm$ 109	4758 $\pm$ 506
3	Control	3	30.3 $\pm$ 4.0	5.9 $\pm$ 2.0	0.55 $\pm$ 0.08	245 $\pm$ 104	5231 $\pm$ 822
	50	3	27.2 $\pm$ 6.0	4.6 $\pm$ 0.8	0.62 $\pm$ 0.22	132 $\pm$ 23	3824 $\pm$ 838
	100	3	28.0 $\pm$ 3.6	4.2 $\pm$ 0.8	0.51 $\pm$ 0.05	190 $\pm$ 32	4402 $\pm$ 530
	200	3	44.7 $\pm$ 22.0	4.5 $\pm$ 0.2	0.63 $\pm$ 0.09	166 $\pm$ 70	4333 $\pm$ 461
4	Control	3	33.3 $\pm$ 9.0	5.8 $\pm$ 3.2	0.58 $\pm$ 0.09	85 $\pm$ 20	4116 $\pm$ 618
	50	3	29.3 $\pm$ 8.7	5.3 $\pm$ 1.9	0.67 $\pm$ 0.23	119 $\pm$ 66	3337 $\pm$ 992
	100	3	29.3 $\pm$ 9.1	3.7 $\pm$ 1.0	0.57 $\pm$ 0.04	86 $\pm$ 19	3438 $\pm$ 964
	200	3	35.7 $\pm$ 10.8	4.0 $\pm$ 0.3	0.63 $\pm$ 0.05	89 $\pm$ 39	4052 $\pm$ 158
5	Control	3	29.0 $\pm$ 7.8	4.8 $\pm$ 1.4	0.58 $\pm$ 0.07	97 $\pm$ 5	3418 $\pm$ 245
	50	3	23.7 $\pm$ 3.5	5.3 $\pm$ 0.2	0.64 $\pm$ 0.21	112 $\pm$ 68	2895 $\pm$ 1085
	100	3	27.3 $\pm$ 4.2	4.3 $\pm$ 1.7	0.56 $\pm$ 0.02	128 $\pm$ 56	2686 $\pm$ 1020
	200	3	36.0 $\pm$ 2.7	5.2 $\pm$ 0.8	0.68 $\pm$ 0.09	181 $\pm$ 80	3353 $\pm$ 238

*: Administered in two divided doses a): Mean $\pm$ SD β -Glase: One unit is defined as μ g of *p*-nitrophenol liberated per 100ml of serum in 60min at 37°C

Table 6-1 Biochemical findings in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	CRNN (mg/dl)
Before administration	Control	3	6.13±0.46 ^{a)}	2.73±0.29	0.8±0.04	19.3±3.0	0.77±0.15
	50	3	6.30±0.26	2.70±0.10	0.7±0.02	23.5±2.9	0.70±0.00
	100	3	6.30±0.10	2.63±0.15	0.7±0.09	22.2±9.6	0.77±0.12
	200	3	6.70±0.30	2.63±0.15	0.7±0.11	19.1±4.1	0.73±0.06
1	Control	3	6.10±0.10	2.67±0.25	0.8±0.12	18.2±1.0	0.73±0.06
	50	3	6.10±0.26	2.70±0.10	0.8±0.02	14.5±2.2	0.70±0.00
	100	3	6.07±0.25	2.57±0.15	0.7±0.05	19.3±3.2	0.73±0.06
	200	3	6.73±0.21	2.77±0.15	0.7±0.10	17.6±5.0	0.80±0.00
2	Control	3	5.93±0.12	2.63±0.15	0.8±0.08	17.2±0.1	0.70±0.10
	50	3	6.10±0.17	2.73±0.06	0.8±0.01	17.5±2.6	0.67±0.06
	100	3	6.00±0.17	2.60±0.10	0.8±0.07	20.2±3.4	0.73±0.06
	200	3	6.57±0.31	2.86±0.15	0.8±0.07	19.0±2.7	0.70±0.00
3	Control	3	5.90±0.17	2.70±0.10	0.8±0.10	19.7±3.8	0.70±0.10
	50	3	6.07±0.21	2.73±0.06	0.8±0.02	17.2±1.8	0.63±0.06
	100	3	6.07±0.25	2.70±0.00	0.8±0.06	19.5±3.1	0.73±0.06
	200	3	6.37±0.21	2.83±0.12	0.8±0.06	24.5±4.0	0.77±0.06
4	Control	3	5.63±0.12	2.60±0.20	0.9±0.12	21.0±6.6	0.83±0.06
	50	3	5.90±0.72	2.77±0.15	0.9±0.12	15.9±3.0	0.70±0.10
	100	3	5.70±0.10	2.63±0.06	0.9±0.05	18.8±2.3	0.80±0.00
	200	3	6.13±0.21	2.77±0.15	0.8±0.05	19.5±2.6	0.83±0.06
5	Control	3	5.57±0.29	2.57±0.12	0.9±0.14	15.8±1.6	0.77±0.12
	50	3	5.67±0.35	2.70±0.10	0.9±0.05	14.5±6.3	0.70±0.00
	100	3	5.73±0.29	2.70±0.17	0.9±0.02	17.4±2.1	0.80±0.00
	200	3	6.10±0.30	2.87±0.06	0.9±0.06	19.8±5.1	0.70±0.10

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD

Table 6-2 Biochemical findings in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Glu (mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFA (μ Eq/l)
Before administration	Control	3	63.7 $\pm$ 16.7 ^{a)}	179.3 $\pm$ 32.6	58.0 $\pm$ 9.2	248.0 $\pm$ 137.1
	50	3	69.3 $\pm$ 8.6	193.7 $\pm$ 76.4	105.3 $\pm$ 54.2	229.7 $\pm$ 142.4
	100	3	73.3 $\pm$ 10.2	146.0 $\pm$ 12.5	54.7 $\pm$ 13.2	330.0 $\pm$ 293.3
	200	3	72.7 $\pm$ 10.4	169.7 $\pm$ 32.6	49.3 $\pm$ 11.8	549.0 $\pm$ 64.1
1	Control	3	65.3 $\pm$ 6.7	177.3 $\pm$ 5.0	54.3 $\pm$ 16.2	431.0 $\pm$ 158.0
	50	3	68.7 $\pm$ 9.5	203.7 $\pm$ 89.5	57.0 $\pm$ 20.7	511.7 $\pm$ 87.1
	100	3	68.3 $\pm$ 10.1	155.3 $\pm$ 18.5	43.3 $\pm$ 3.1	441.3 $\pm$ 96.6
	200	3	78.0 $\pm$ 7.0	163.7 $\pm$ 11.7	44.3 $\pm$ 20.0	582.0 $\pm$ 111.9
2	Control	3	78.7 $\pm$ 10.0	175.0 $\pm$ 36.0	54.0 $\pm$ 28.7	223.7 $\pm$ 129.0
	50	3	81.7 $\pm$ 9.7	203.0 $\pm$ 85.0	81.7 $\pm$ 53.6	262.0 $\pm$ 94.2
	100	3	87.7 $\pm$ 6.8	167.0 $\pm$ 17.3	51.0 $\pm$ 15.1	272.7 $\pm$ 210.8
	200	3	90.3 $\pm$ 7.5	158.7 $\pm$ 13.1	44.7 $\pm$ 6.7	584.0 $\pm$ 119.1
3	Control	3	78.7 $\pm$ 9.3	170.7 $\pm$ 42.5	52.0 $\pm$ 23.9	162.7 $\pm$ 95.9
	50	3	87.3 $\pm$ 11.2	182.0 $\pm$ 44.2	48.3 $\pm$ 21.6	342.7 $\pm$ 165.7
	100	3	87.0 $\pm$ 5.3	173.3 $\pm$ 18.2	42.3 $\pm$ 11.2	393.7 $\pm$ 325.5
	200	3	93.3 $\pm$ 10.3	156.7 $\pm$ 19.6	53.0 $\pm$ 24.6	306.0 $\pm$ 270.4
4	Control	3	64.3 $\pm$ 17.9	157.7 $\pm$ 35.3	54.7 $\pm$ 11.9	156.7 $\pm$ 133.7
	50	3	72.7 $\pm$ 3.1	149.3 $\pm$ 9.7	40.3 $\pm$ 11.5	427.3 $\pm$ 15.3
	100	3	72.7 $\pm$ 9.1	166.7 $\pm$ 15.2	41.0 $\pm$ 11.3	419.3 $\pm$ 90.6
	200	3	84.7 $\pm$ 4.0	156.7 $\pm$ 11.6	48.0 $\pm$ 18.4	475.3 $\pm$ 233.9
5	Control	3	76.0 $\pm$ 12.8	149.0 $\pm$ 31.2	33.3 $\pm$ 8.7	416.0 $\pm$ 172.9
	50	3	78.3 $\pm$ 10.4	145.3 $\pm$ 19.3	43.7 $\pm$ 7.6	455.7 $\pm$ 118.9
	100	3	83.7 $\pm$ 4.2	167.3 $\pm$ 19.1	34.3 $\pm$ 1.5	366.3 $\pm$ 39.9
	200	3	84.3 $\pm$ 5.9	172.0 $\pm$ 17.8	38.0 $\pm$ 15.7	554.0 $\pm$ 31.8

*: Administered in two divided doses

a): Mean $\pm$ SD

Table 6-3 Biochemical findings in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Total BIL (mg/dl)	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)	GOT (IU/l)
Before administration	Control	3	0.33±0.15 ^{a)}	9.4±0.6	136.3±2.5	5.2±0.4	18.7±1.5
	50	3	1.00±0.66	9.3±0.4	140.7±5.0	5.3±0.3	19.3±9.3
	100	3	0.47±0.21	9.2±0.3	143.6±0.0	5.6±0.2	22.0±1.7
	200	3	0.33±0.06	9.5±0.2	137.8±5.0	5.3±0.5	19.3±2.9
1	Control	3	0.53±0.32	9.4±0.4	140.7±5.0	5.5±0.1	21.7±2.9
	50	3	0.40±0.17	9.5±0.3	134.9±0.0	5.1±0.3	18.7±4.7
	100	3	0.37±0.06	9.6±0.4	135.4±3.6	5.1±0.3	22.7±4.2
	200	3	0.47±0.12	9.6±0.6	140.7±5.0	5.4±0.3	22.7±4.0
2	Control	3	0.37±0.31	10.0±0.6	139.2±4.4	5.1±0.4	19.0±2.0
	50	3	0.57±0.46	10.3±0.3	144.6±1.7	5.5±0.1	19.7±5.8
	100	3	0.30±0.10	10.2±0.1	143.6±0.0	5.1±0.1	22.3±6.1
	200	3	0.33±0.06	10.2±0.2	143.1±3.7	4.8±0.2	18.0±1.7
3	Control	3	0.27±0.06	10.1±0.4	138.3±5.9	5.1±0.4	22.0±3.6
	50	3	0.50±0.10	10.0±0.2	139.2±4.4	5.1±0.1	21.3±5.5
	100	3	0.33±0.06	10.1±0.3	137.8±2.5	5.1±0.2	24.0±5.6
	200	3	0.40±0.17	10.1±0.1	140.7±5.0	5.2±0.3	20.3±0.6
4	Control	3	0.47±0.21	8.5±0.6	143.1±3.7	5.5±0.3	27.7±2.1
	50	3	0.93±1.01	8.9±0.6	145.5±1.7	5.6±0.4	24.7±7.2
	100	3	0.63±0.40	8.9±0.5	143.6±0.0	5.7±0.5	28.3±2.5
	200	3	0.33±0.06	9.0±0.4	143.6±0.0	5.1±0.3	27.3±0.6
5	Control	3	0.40±0.10	8.9±0.7	144.6±1.7	5.6±0.6	29.0±1.7
	50	3	0.50±0.17	8.0±0.2	144.6±1.7	5.6±0.3	29.7±6.5
	100	3	0.40±0.00	8.8±0.6	143.6±0.0	5.6±0.1	31.0±3.0
	200	3	0.40±0.00	8.9±0.4	137.8±2.5	5.1±0.1	29.3±4.2

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

Table 6-4 Biochemical findings in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Weeks	Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	GPT (IU/l)	ALP (K-A·U/dl)	CHE (ΔpH)	LDH (IU/l)	β-Gl-ase (U/dl)
Before administration	Control	3	19.7± 7.4 ^{a)}	6.6±0.6	0.61±0.13	203± 87	2892± 911
	50	3	36.0±32.1	6.3±0.0	0.50±0.06	376±136	3853± 298
	100	3	22.7± 3.5	8.0±1.0	0.64±0.14	280±113	4588±1860
	200	3	18.4± 1.5	7.4±2.0	0.59±0.14	284± 75	3643± 899
1	Control	3	22.3± 9.3	6.3±0.5	0.60±0.15	362± 98	4118± 551
	50	3	21.3± 6.5	4.6±1.0	0.54±0.04	380±270	2441± 460
	100	3	18.3± 7.1	6.5±1.3	0.64±0.12	297±115	4284±1545
	200	3	21.7± 1.5	6.4±1.1	0.59±0.10	318± 58	4304± 911
2	Control	3	22.3±10.1	5.3±1.0	0.51±0.10	208±160	2883± 290
	50	3	20.7± 6.7	4.7±0.5	0.54±0.03	266±151	2539±1189
	100	3	20.0± 7.5	6.5±0.9	0.60±0.12	185±115	3314± 885
	200	3	24.0± 4.6	6.2±2.2	0.53±0.06	179± 4	3441± 516
3	Control	3	23.0±10.4	5.3±0.7	0.54±0.08	200±100	3716± 843
	50	3	21.0± 4.6	5.5±1.3	0.60±0.08	320±247	2755±1343
	100	3	22.0± 2.6	7.1±1.4	0.65±0.17	233±122	3127± 800
	200	3	26.7± 4.0	5.9±1.3	0.51±0.04	170± 13	3784± 721
4	Control	3	30.0±17.3	5.0±1.0	0.57±0.09	196± 51	3490± 359
	50	3	25.0± 5.3	5.5±3.4	0.63±0.07	474±506	3608±2938
	100	3	24.7± 1.2	6.5±1.5	0.68±0.11	284±163	3608± 641
	200	3	31.3± 5.9	4.9±1.2	0.57±0.03	176± 66	3627± 824
5	Control	3	29.0±11.3	4.5±1.0	0.60±0.14	258± 73	3529± 486
	50	3	32.0± 5.6	3.9±1.4	0.60±0.03	345±242	3431±1665
	100	3	29.0± 1.0	5.3±1.4	0.71±0.09	182± 64	3255± 898
	200	3	26.0± 0.0	4.5±1.6	0.58±0.05	188± 63	3823±1175

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD

β-Gl-ase: One unit is defined as μg of *p*-nitrophenol liberated per 100ml of serum in 60 min at 37°C

Table 7-1 Enzymatic activity of liver fractionations in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks**ATPase**

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	138.0±22.5 ^{a)}	20.0±2.9	0.15±0.02
50	3	144.5±11.9	19.7±0.8	0.14±0.01
100	3	137.2±24.9	22.9±3.1	0.17±0.02
200	3	145.0± 5.9	21.6±1.9	0.15±0.01

G-6-Pase

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	138.0±22.5	40.0±2.5	0.29±0.03
50	3	144.5±11.9	46.1±4.4	0.32±0.02
100	3	137.2±24.9	47.2±9.1	0.35±0.01
200	3	145.0± 5.9	52.5±2.7	0.36±0.01

β-Glase

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	138.7± 3.1	3627±740	26.2±5.9
50	3	145.0±13.8	3530±367	24.3±0.3
100	3	142.1± 9.4	3540±822	25.1±7.2
200	3	154.3± 1.9	3471±769	22.5±5.0

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

ATPase U : μmoles Pi/10 min at 28°C

G-6-Pase U : μmoles Pi/30 min at 30°C

β-Glase U : μg *p*-nitrophenol/60 min at 37°C

Table 7-2 ATPase activity of heart fractionations in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g heart)	Activity (U/g heart)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	21.9±1.9 ^{a)}	17.2±1.7	0.79±0.05
50	3	20.5±0.3	19.5±2.6	0.95±0.11
100	3	20.0±0.5	22.0±1.2	1.10±0.06
200	3	22.9±4.0	22.4±4.8	0.98±0.08

*: Administered in two divided doses
ATPase U: μ moles Pi/10 min at 28°C

a): Mean $\pm$ SD

Table 7-3 ATPase activity of kidney fractionations in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g kidney)	Activity (U/g kidney)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	119.6± 6.9 ^{a)}	41.7± 4.1	0.35±0.04
50	3	129.8±14.2	61.1± 4.9	0.47±0.05
100	3	114.4± 6.4	50.3± 4.4	0.44±0.02
200	3	123.8± 7.4	66.6±19.4	0.53±0.13

*: Administered in two divided doses
ATPase U: μ moles Pi/10 min at 28°C

a): Mean $\pm$ SD

Table 7-4 ALP activity of bone marrow fractionations in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g marrow)	Activity (U/g marrow)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	26.5±9.4 ^{a)}	0.66±0.46	0.023±0.008
50	3	16.1±2.0	0.37±0.17	0.023±0.008
100	3	23.3±5.7	0.51±0.25	0.021±0.007
200	3	36.9±9.4	0.70±0.23	0.019±0.002

*: Administered in two divided doses
ALP U: mg phenol/15 min at 37°C

a): Mean $\pm$ SD

Table 8-1 Enzymatic activity of liver fractionations in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

ATPase

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	134.6±11.9 ^{a)}	20.5±1.3	0.15±0.01
50	3	155.6±11.1	23.8±3.3	0.15±0.02
100	3	138.9± 6.5	21.5±3.3	0.16±0.03
200	3	148.4±16.7	24.3±4.2	0.16±0.02

G-6-Pase

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	134.6±11.9 ^{a)}	59.9± 9.8	0.44±0.03
50	3	155.6±11.1	74.2±10.3	0.48±0.04
100	3	138.9± 6.5	62.9± 3.8	0.45±0.05
200	3	148.4±16.7	75.3±10.1	0.51±0.05

β-Gl-ase

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	148.6± 7.8 ^{a)}	2549±898	17.0±5.1
50	3	160.9±10.4	2608±709	16.2±4.3
100	3	148.1± 0.2	2490±669	16.8±4.5
200	3	152.8±22.4	2745±601	17.8±1.6

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD

ATPase U: μmoles Pi/10 min at 28°C

G-6-Pase U: μmoles Pi/30 min at 30°C

β-Gl-ase U: μg p-nitrophenol/60 min at 37°C

Table 8-2 ATPase activity of heart fractionations in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g heart)	Activity (U/g heart)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	43.6±1.8 ^{a)}	82.4±4.8	1.89±0.06
50	3	42.3±4.6	74.4±11.7	1.76±0.22
100	3	43.3±2.4	83.6±12.6	1.93±0.26
200	3	40.8±3.3	81.5±10.5	1.99±0.11

*: Administered in two divided doses a): Mean ±SD
 ATPase U: μ moles Pi/10 min 28°C

Table 8-3 ATPase activity of kidney fractionations in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g kidney)	Activity (U/g kidney)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	97.0±11.2 ^{a)}	54.7± 6.2	0.56±0.01
50	3	105.9± 9.3	58.6± 6.3	0.55±0.05
100	3	96.7± 4.6	54.8±10.6	0.56±0.10
200	3	95.1± 5.2	53.4±14.1	0.56±0.15

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD
 ATPase U: μ moles Pi/10 min at 28°C

Table 8-4 ALP activity of bone marrow fractionations in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g marrow)	Activity (U/g marrow)	Specific activity (U/mg protein)
Control	3	30.6±4.3 ^{a)}	1.08±0.34	0.027±0.009
50	3	41.9±9.7	1.20±0.65	0.027±0.010
100	3	25.7±4.3	0.79±0.21	0.031±0.007
200	3	42.7±0.6	1.27±0.44	0.030±0.011

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD
 ALP U: mg phenol/15 min at 37°C

Table 9 Urinary findings in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	pH	K ⁺ (mEq/ml)	Na ⁺ (mEq/ml)	Protein - ~ ±	Glu - ±	Ket - +	O-bl - ± +	BIL - +	Uro ± +
Control	3	6.3±0.6 ^{a)}	76.2±37.9	48.8±31.8	3 ^{b)}	3 0	3 0	2 0 1	3 0	1 2
50	3	6.3±0.6	36.5± 8.4	66.4±29.6	3	3 0	3 0	2 1 0	3 0	0 3
100	3	6.3±0.6	29.5±25.3	50.4±30.9	3	3 0	3 0	3 0 0	2 1	0 3
200	3	6.3±0	27.5±16.0	50.0±19.8	3	3 0	3 0	3 0 0	2 1	1 2

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

b): Number of dogs

Table 10 Urinary findings in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day)	No. of dogs	pH	K ⁺ (mEq/ml)	Na ⁺ (mEq/ml)	Protein - ~ ±	Glu - ±	Ket - ±	O-bl - +	BIL - +	Uro ± +
Control	3	8.0±0.9 ^{a)}	69.7±36.8	117.2±51.0	3 ^{b)}	3 0	3 0	3 0	3 0	1 2
50	3	6.5±0.3	94.5±23.4	95.2±48.6	3	3 0	3 0	3 0	3 0	2 1
100	3	6.3±0.4	127.0±25.5	171.6±83.2	2	2 0	2 0	2 0	2 0	1 1
200	3	6.7±1.1	69.8±91.4	45.6±56.1	3	3 0	3 0	3 0	3 0	2 1

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

b): Number of dogs

Table 11 Macroscopic findings in dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day) No. of dogs	Control		50		100		200	
	M	F	M	F	M	F	M	F
	3	3	3	3	3	3	3	3
Brain (Piriform lobe)								
Helcoid defect (less than 3 mm)	0 ^{a)}	0	0	0	1	0	0	0
Thymus								
Fatty change	0	0	0	0	0	0	1	0
Lung and hilus lymph node								
Small black spots	0	0	1	0	1	0	0	0
Heart								
Parasitism of <i>Dirofilaria immitis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0
Abdominal cavity								
Slight ascites	0	0	2	0	0	0	1	0
Liver								
Slight yellowish	0	0	0	0	1	0	1	0
Gallbladder								
Retention of bile	0	0	0	0	1	0	1	0
Kidney								
Hyperemia of medulla	0	0	1	0	1	0	0	0
Difficulties for decapsulation	0	0	2	0	0	0	1	0
Testis and epididymis								
Atrophy	0	—	0	—	0	—	1	—
Bone marrow (Femur)								
Yellow marrow	0	0	1	0	0	0	0	0

*: Administered in two divided doses

a): Number of dogs

Table 12 Absolute organ weights in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

(g)

Dose* (mg/kg/day) No. of dogs	Control 3	50 3	100 3	200 3
Final body weight (kg)	10.7 ± 1.0 ^{a)}	11.5 ± 1.2	11.4 ± 0.8	10.9 ± 0.7
Brain	88.0 ± 2.7	84.0 ± 7.0	86.7 ± 6.7	89.0 ± 9.6
Hypophysis	0.07± 0.01	0.07± 0.02	0.06± 0.00	0.05± 0.01
Submandibular gland	15.2 ± 3.0	14.4 ± 1.4	12.8 ± 0.6	13.0 ± 1.3
Thyroid	0.64± 0.13	0.88± 0.19	0.77± 0.22	0.86± 0.14
Thymus	6.8 ± 3.1	7.5 ± 3.3	6.1 ± 1.2	6.4 ± 5.1
Heart	102.3 ± 7.5	93.5 ± 4.6	97.0 ± 9.2	90.0 ± 10.2
Lung	76.3 ± 2.1	86.7 ± 11.7	90.7 ± 9.3	85.3 ± 6.0
Liver	324.7 ± 28.4	297.3 ± 15.8	302.0 ± 14.4	284.7 ± 18.2
Pancreas	26.7 ± 1.2	25.3 ± 2.1	25.0 ± 2.7	22.3 ± 1.2
Caecum	9.7 ± 1.2	7.8 ± 0.6	8.8 ± 0.9	9.4 ± 1.6
Caecum (with contents)	21.2 ± 7.8	11.1 ± 2.2	12.3 ± 5.2	16.7 ± 8.1
Spleen	34.3 ± 3.5	21.7 ± 4.7	26.7 ± 4.2	31.0 ± 7.0
Adrenal gland	1.44± 0.16	1.41± 0.08	1.43± 0.13	1.38± 0.02
Kidney	61.7 ± 8.7	51.7 ± 1.2	50.3 ± 5.9	51.0 ± 3.0
Testis	13.3 ± 1.7	16.0 ± 1.8	14.4 ± 2.8	15.3 ± 8.6
Epididymis	4.2 ± 0.8	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.9 ± 1.3
Prostate	10.2 ± 2.0	9.7 ± 4.7	6.6 ± 2.5	9.1 ± 1.8

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

Table 13 Relative organ weights in male dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

		(g/kg b.w.)			
Dose* (mg/kg/day)	Control	50	100	200	
No. of dogs	3	3	3	3	
Brain	8.276±0.899 ^{a)}	7.346±0.796	7.616±0.637	8.161±0.638	
Hypophysis (mg/kg)	6.507±0.776	6.217±0.725	5.645±0.033	4.743±1.178	
Submandibular gland	1.422±0.228	1.262±0.147	1.129±0.108	1.167±0.102	
Thyroid	0.061±0.006	0.078±0.025	0.067±0.014	0.079±0.083	
Thymus	0.634±0.279	0.639±0.225	0.533±0.110	0.566±0.436	
Heart	9.597±0.814	8.185±0.638	8.535±0.991	8.313±1.419	
Lung	7.162±0.479	7.659±1.858	7.979±1.005	7.832±0.405	
Liver	30.533±4.080	26.104±3.667	26.631±3.022	26.236±3.178	
Pancreas	2.502±0.195	2.219±0.299	2.205±0.327	2.055±0.179	
Caecum	0.902±0.089	0.684±0.022	0.779±0.113	0.857±0.095	
Caecum (with contents)	1.980±0.647	0.970±0.213	1.064±0.369	1.509±0.699	
Spleen	3.208±0.197	1.872±0.236	2.338±0.318	2.874±0.823	
Adrenal gland	0.136±0.025	0.124±0.020	0.125±0.006	0.127±0.009	
Kidney	5.825±1.282	4.522±0.421	4.447±0.776	4.687±0.318	
Testis	1.246±0.142	1.414±0.302	1.265±0.230	1.424±0.816	
Epididymis	0.394±0.041	0.339±0.082	0.327±0.027	0.361±0.134	
Prostate	0.945±0.110	0.864±0.483	0.585±0.238	0.844±0.216	

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

Table 14 Absolute organ weights in female dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

	(g)			
Dose* (mg/kg/day)	Control	50	100	200
No. of dogs	3	3	3	3
Final body weight (kg)	8.9 ± 0.5 ^{a)}	8.8 ± 1.0	9.7 ± 2.0	8.5 ± 0.6
Brain	82.3 ± 4.9	72.3 ± 3.8	81.0 ± 5.6	78.0 ± 7.2
Hypophysis (mg/kg)	0.06± 0.02	0.06± 0.01	0.06± 0.01	0.06± 0.02
Submandibular gland	8.5 ± 1.1	8.8 ± 1.3	8.3 ± 1.6	9.4 ± 1.2
Thymus	9.4 ± 2.2	7.1 ± 2.5	11.5 ± 3.8	7.4 ± 5.1
Heart	75.3 ± 1.2	70.3 ± 8.5	80.3 ± 18.8	76.3 ± 5.7
Lung	61.0 ± 7.9	65.3 ± 4.7	67.7 ± 17.5	61.0 ± 3.6
Liver	267.3 ± 35.6	266.7 ± 14.6	279.3 ± 49.0	283.7 ± 42.9
Pancreas	21.3 ± 5.7	18.0 ± 2.0	22.0 ± 4.4	20.3 ± 3.5
Spleen	37.7 ± 16.7	31.7 ± 9.6	33.0 ± 6.6	26.3 ± 5.9
Adrenal gland	1.23± 0.24	0.99± 0.23	1.10± 0.12	1.09± 0.25
Kidney	36.3 ± 3.1	35.7 ± 3.8	44.0 ± 7.0	35.0 ± 1.0
Ovary	0.97± 0.47	0.78± 0.17	0.98± 0.44	1.05± 0.17
Uterus	5.53± 5.22	2.79± 0.63	5.10± 3.41	5.92± 5.61

*: Administered in two divided doses a): Mean ± SD

Table 15 Relative organ weights in female dogs orally treated with for 5 weeks

	(g/kg b.w.)			
Dose* (mg/kg/day)	Control	50	100	200
No. of dogs	3	3	3	3
Brain	10.536±2.243 ^{a)}	8.480±1.484	8.502±1.247	9.108±1.244
Hypophysis (mg/kg)	7.094±1.302	6.670±1.458	6.636±0.955	7.412±2.074
Submandibular gland	0.956±0.140	1.029±0.250	0.960±0.064	1.087±0.120
Thymus	1.054±0.180	0.801±0.171	1.161±0.142	0.852±0.588
Heart	8.519±0.597	8.125±0.110	8.264±0.729	8.884±0.693
Lung	6.867±0.599	7.602±0.861	6.916±0.293	7.113±0.706
Liver	30.302±5.323	31.109±4.109	29.233±5.947	32.995±4.820
Pancreas	2.416±0.696	2.082±0.101	2.272±0.248	2.362±0.379
Spleen	4.263±1.926	3.617±0.725	3.400±0.192	3.047±0.540
Adrenal gland	0.138±0.025	0.118±0.040	0.118±0.037	0.127±0.032
Kidney	4.101±0.330	4.128±0.201	4.558±0.269	4.074±0.170
Ovary	0.107±0.045	0.093±0.031	0.098±0.024	0.123±0.022
Uterus	0.604±0.542	0.332±0.111	0.490±0.232	0.690±0.652

*: Administered in two divided doses

a): Mean ± SD

Table 16 Microscopic findings in dogs orally treated with AM-715 for 5 weeks

Dose* (mg/kg/day) No. of dogs	Control		50		100		200	
	M	F	M	F	M	F	M	F
	3	3	3	3	3	3	3	3
Salivary gland								
Small focus of round cell infiltration	0 ^{a)}	0	0	0	0	0	2	1
Thyroid								
Subacute thyroiditis	1	0	0	0	0	0	0	0
Thymus								
Fatty change	3	0	2	0	1	0	3	0
Liver								
Slight dilatation of sinusoid	1	0	0	0	0	0	0	0
Slight hydropic change	1	0	0	0	0	0	0	0
Small intestine								
Desquamation of mucosa	0	0	2	0	1	0	2	0
Kidney								
Slight dilatation of renal tubules	0	0	0	0	0	0	0	1
Thickened proximal tubules	0	0	1	0	0	0	0	0
Slight pyelitis	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node								
Hemorrhage	1	0	0	0	0	0	1	0
Testis								
Regional lymphocytic infiltration	0	—	0	—	0	—	1	—
Uterus								
Hyperplasia of endometrium	—	1	—	0	—	0	—	0
Prostate								
Round cell infiltration	0	—	0	—	0	—	1	—
Bone marrow (Femur and lib)								
Fatty change	3	0	3	0	3	0	3	0

*: Administered in two divided doses

a): Number of dogs

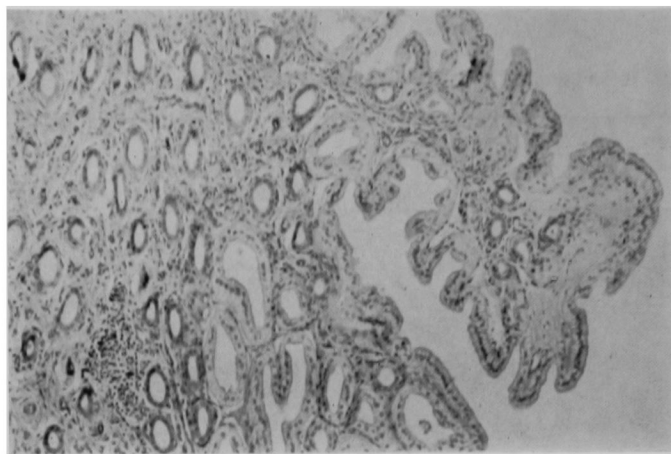


Photo. 1 The salivary gland of a female beagle in 200 mg/kg group
Small focus of round cell infiltration $\times 66$

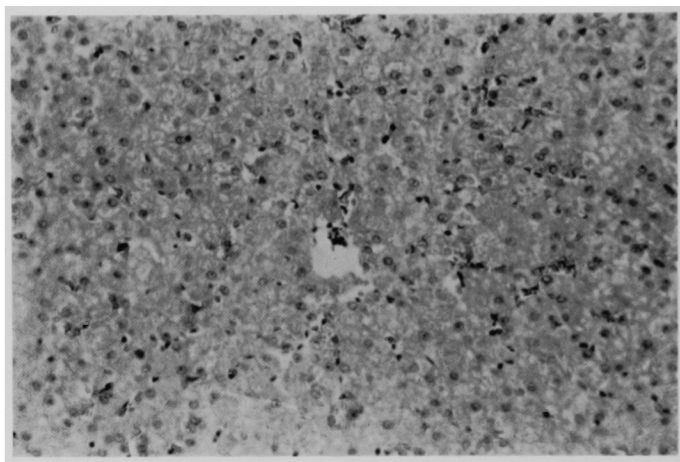


Photo. 2 The renal cortex of a female beagle in 200 mg/kg group
Dilatation of renal tubules $\times 66$

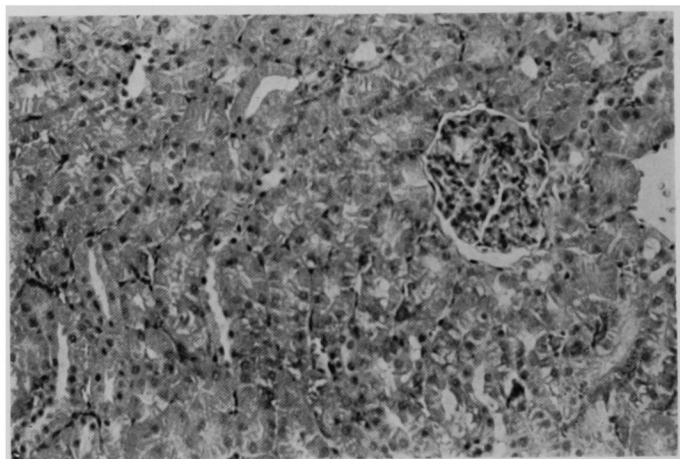


Photo. 3 The small intestine of a male beagle in 200 mg/kg group
Desquamation of mucosa $\times 33$

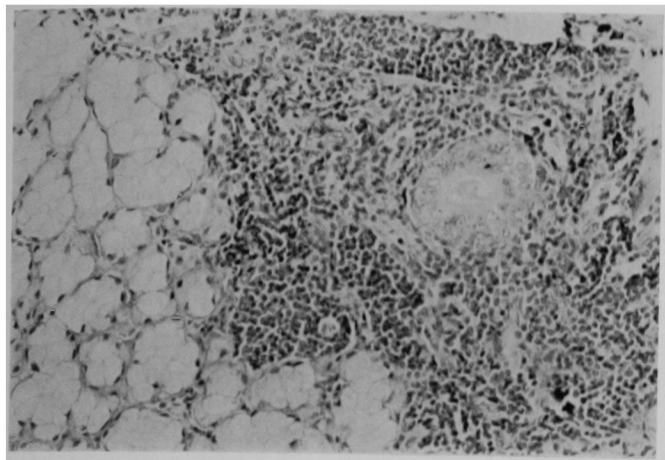


Photo. 4 The uterus of a female beagle in control group

Hyperplasia of endometrium $\times 66$

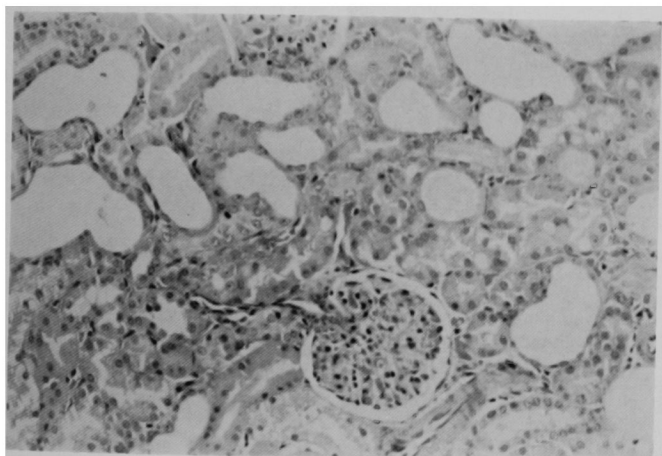


Photo. 5 The liver of a male beagle in 200 mg/kg group

Within normal limits $\times 66$

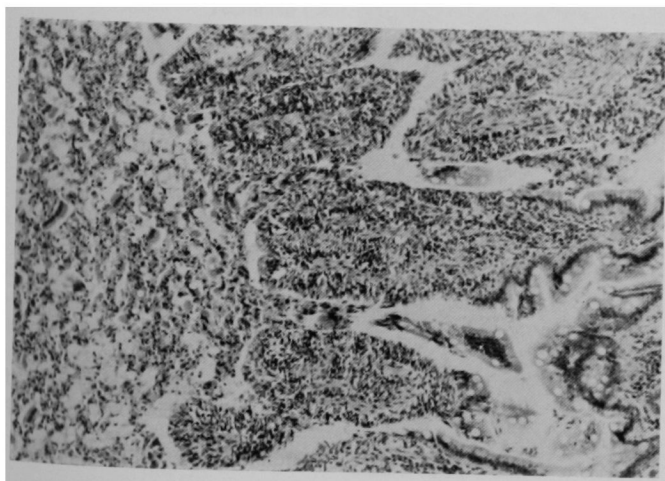


Photo. 6 The kidney of a male beagle in 200 mg/kg group

Within normal limits $\times 66$

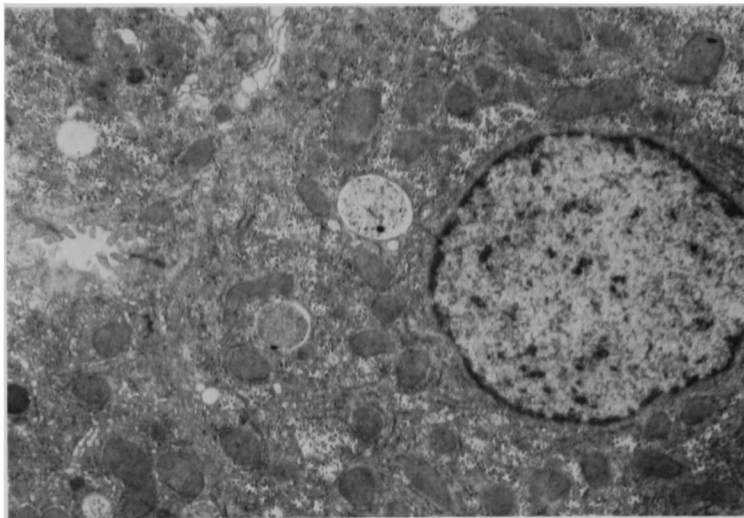


Photo. 7 The liver of a female beagle in 200 mg/kg group

Within normal limits $\times 6,500$

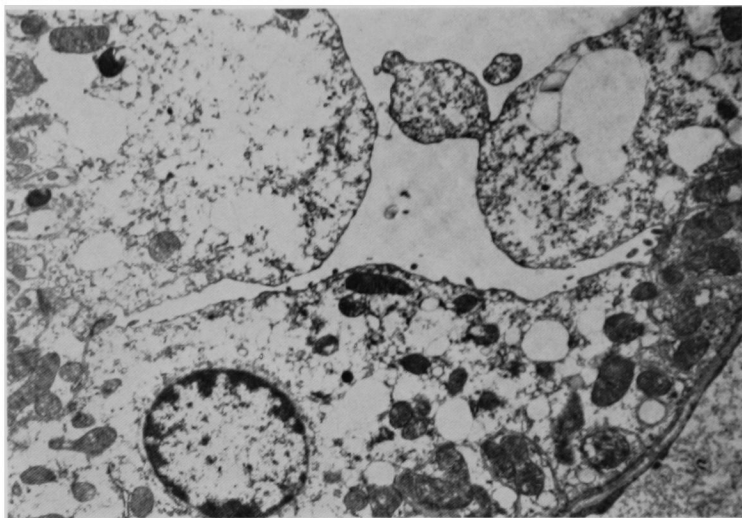


Photo. 8 The kidney (tubular epithelial cell) of a female beagle in 200 mg/kg group

Enlargement and vacuolation of epithelial cell $\times 6,500$

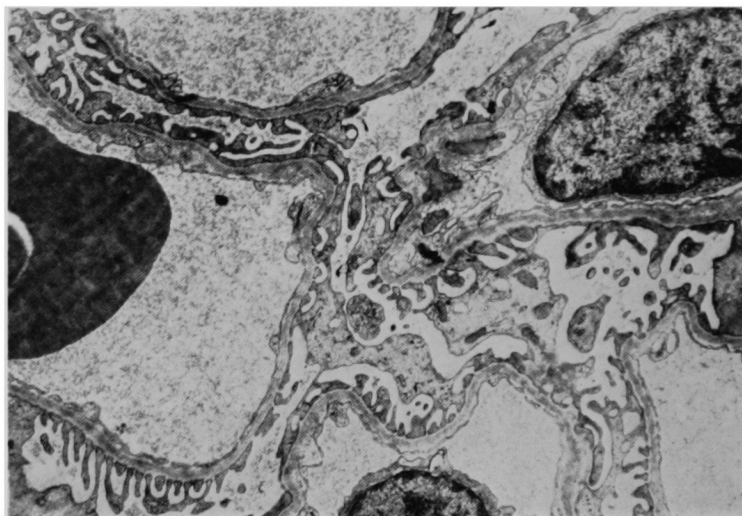


Photo. 9 The kidney (glomerulus) of a female beagle in 200 mg/kg group

Within normal limits $\times 6,500$

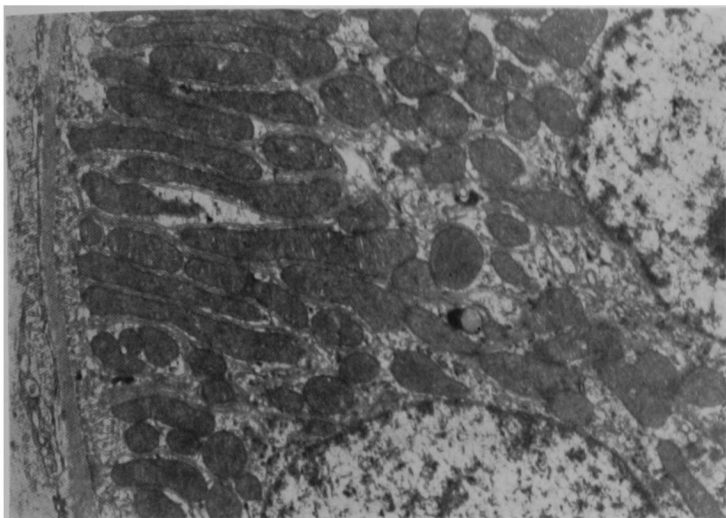


Photo. 10 The kidney (proximal tubule) of a male beagle in 200 mg/kg group

Within normal limits $\times 8,000$

3) 尿検査においては、雄の対照群に潜血反応陽性が1例みられたが、偶発的なものであろう。その他には、AM-715による異常値はみられず、腎ATPaseに対する影響もみられなかった。したがって腎に対する障害などもないものと思われた。

4) 主要臓器の重量では、各群に多少の変動が認められたが、薬物による用量依存性の関係はなく、雄ではむしろ年齢による影響と思われた。

5) 病理学的検索において、雌にみられた子宮肥大は肉眼的にも組織学的にも発情周期による変化と考えられ

た。また雄で胸腺、骨髄の脂肪化が多数認められたが、これは年齢による生理的な変化と思われた。小腸に認められた粘膜剥離所見は小腸自体に炎症性変化を伴わず、また腸陰窩の深さも正常であるところから薬物の影響とは考えられなかった。その他各投与群に散見された病理的異常所見は用量依存性が無く軽微であることから自然発生的な病変によるものと考えられた。

以上の結果から、AM-715はイヌにおいても極めて低毒性であることが認められた。

TOXICOLOGICAL STUDIES OF AM-715 II. SUBACUTE TOXICITY STUDY IN DOGS

TSUTOMU SUGIMOTO, HIROSHI TANASE, JIRO SAITO and SIGERU IMAI
Technical Center of Development, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

YUKIO ITO, YASUKAZU SATO, TAKESHI TSUCHIYA
and TSUTOMU IRIKURA

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Subacute toxicity study of AM-715 was carried out in beagle dogs. AM-715 was orally administered twice a day at two divided dose levels of 50, 100 and 200 mg/kg/day for 5 weeks.

No remarkable changes in gross behavior, food consumption and body weight were observed in all dose groups, except for a slight loss in body weight in the female group of 200 mg/kg/day. There were no abnormalities with regard to hematological examination, serum biochemical analysis and urinalysis. Slight changes in the main organ weights were observed in each dose groups, but the changes were not dose-related. No abnormalities were also observed in the histopathological examination.

From these results, it is concluded that AM-715 has little toxic effects on dogs in a short term administration.