AM-715の毒性学的研究 第5報
イヌにおける慢性毒性試験

入倉 勉
杏林製薬株式会社中央研究所

杉本 勉・今井 繁・池田 岳雄・棚瀬 裕文・神田 和実
杏林製薬株式会社開発技術センター

新しい合成抗菌剤であるAM-715の慢性毒性試験を雌雄のビーグル犬で行った。

AM-715は25, 50および100→200 mg/kg 1日1回13カ月間経口投与された。

高用量群では，最初の10カ月間は100 mg/kg，続いて残る3ケ月間は200 mg/kg投与された。用量依存的に帯白色便がみられたが，その他に病的な症状は観察されなかった。

体重増加は，AM-715投与群の方が対照群よりむしろ促進された。

血液生化学的検査において，GPTの軽度の上昇が雌の全ての群で観察され，時にはGOT, ALPの上昇もみられた。しかしながら，これらの変化は用量依存性のものではなく，他の検査，特に血中BIL値，BSP試験，組織像，肝酵素活性において，いずれの群でも肝障害を示唆する異常は認められなかった。また，肝の薬物代謝酵素にも影響はなかった。

血液学的検査，骨髄細胞の種別分類では薬物による変化はみられなかった。

尿検査，PSP試験，腎のATPaseについても腎障害を示唆する異常は認められなかった。

心電図，心ATPaseおよびCPK活性において，心に対する薬物の影響は認められなかった。

眼科的検査および眼房水の生化学的検査でも薬物による変化は認められなかった。

主要臓器の絶対重量および相対重量が共に増加したのは雌の50 mg/kg群の卵巣と子宮であったが，これらには用量依存性の関係はなく，また，これらの重量においては個体差が大きいことはよく知られている。

病理学的検索では，雌の50 mg/kg群に甲状腺腫が1/4例みられ，雄の100→200 mg/kg群の1/4例に，小腸のうっ血，膀胱結石，精巣の変性および壊死，精巣上体の萎縮がみられた。腎の組織あるいは機能には異常は認められなかかった。

以上の結果から，AM-715はイヌにおいて極めて低毒性であることが示された。

AM-715の安全性を確認するために行ったイヌにおける慢性毒性試験成績について報告する。

なお本報では次の略号を用いた。

ALB: Albumin, A/G: Albumin/Globulin ratio, ALP: Alkaline phosphatase, ATPase: Adenosine triphosphatase, BIL: Bilirubin, β-Gl-ase: β-Glucuronidase, BSP: Bromsulfophtalein, BUN: Blood urea nitrogen, ChE: Cholinesterase, CPK: Creatine phosphokinase, CRNN: Creatinine, ESR: Erythrocyte sedimentation rate, F-CHO: Free cholesterol, FFA: Free fatty acid, G-6-Pase: Glucose-6-phosphatase, Glu: Glucose, GOT: Glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: Glutamic pyruvic transaminase, H-E: Hematoxylin-eosin, Ket: Ketone body, LDH: Lactic dehydrogenase, O-bl: Occult blood, PL: Phospholipid, PSP: Phenolsulfonphthalein, T-CHO: Total cholesterol, TG: Triglyceride, TP: Total protein, TTT: Thymol turbidity test, Uro: Urobilinogen.

I. 実験材料および方法

1. 実験動物

約1カ月予備飼育，検疫した生後6カ月令のビーグル犬(日本クレア)，雌(5.6～7.7 kg) 雄(5.8～9.2 kg)を実験に供した。

予備飼育および実験期間中，動物は室温23±2°C，湿度60±20%，換気回数15回/時の環境条件で個別ケージに入れ飼育した。飼料はイヌ用固型飼料(DB, オリエンタル酵母)を予備飼育から投与開始1カ月目まで200～250 g/day，その後は300 g/day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

投与量の設定は先ず，ヒトの推定常用量(12 mg/kg)

の8.3倍量に相当する100 mg/kgを高用量とし，以下等比的に中間用量を50 mg/kg，低用量を25mg/kgとした。また，高用量群では，投与開始11カ月目より投与終了までの3ヶ月間，投与量をヒトの推定常用量の16.7倍に相当する200 mg/kgに増やした。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4頭を用いた。

AM-715は100 mg/錠のコーティング錠またはこれを分割したものを用い，1日1回13ヶ月間，日曜日を除く毎日，定時に強制経口投与した。対照群には，同型のplacebo錠を高用量群と同数投与した。

3. 一般症状および体重

一般症状の観察は毎日薬物投与前後に，摂餌量の測定は毎日薬物投与前に行い，体重測定は週1回行った。

4. 血液学的検査

投与開始前，投与3, 6, 9, および13カ月目に，後耳介静脈より採血し，白血球数および赤血球数を計算板法によって計測し，シアンメトヘモグロビン法でヘモグロビン量を測定した。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。また前腕正中皮静脈より採血してヘマトクリット値（WINTROBE法）およびESR（WINTROBE-LANDSBERG法）を測定した。

5. 血液生化学的検査

投与開始前，投与3, 6, 9, および13カ月目に，前腕正中皮静脈より採血し，その血清についてTP, ALB, A/G, BUN, CRNN, Glu, T-CHO, F-CHO, PL, TG, Ca^{++}, TTT, BIL, GOT, GPT, ALP, ChEおよびLDHを自動分析装置（日立，706 D型）を用いて測定した。また，その他にFFA（ITAYA-UI法），Na^+およびK^+（炎光分析法），CPK（NUTTAL & WEDIN法）およびβ-Gl-ase（p-ニトロフェニルグルクロナイド法）を測定した。

6. 眼房水の生化学的検査

左右両眼の眼房水を採取し，それぞれのTP（LOWRY法）およびGOT（REITMAN-FRANKEL法）を測定した。

7. 肝薬物代謝酵素

新鮮な肝を用い，CINTIらのCa^{++}凝集法[1]によりミクロゾーム分画を調製し，MURAらの方法[3]に従ってチトクローム P-450, NASHの方法[3]に従ってアミノピリン脱メチル化酵素，さらにIMAIらの方法[4]に従ってアニリン水酸化酵素を測定した。蛋白の定量はLOWRYの方法に従った。

8. 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×g, 15分間遠心して得た上清につき，以下の測定を行った。

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。

心筋および骨格筋（外側広筋）については，上記と同様の方法でATPase, NUTTAL & WEDIN法に従ってCPKを測定した。

また，腎については，上記と同様の方法で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。

9. BSP試験

投与13カ月目に，BSP（Hepatosulphalein注射液，第一製薬）15 mg/kgを左前腕正中皮静脈に注入し，30分後に右同静脈より採血し，血中BSP濃度を測定した。

10. PSP試験

投与13カ月目に，PSP（PSP注射液，第一製薬）3 mg/kgを左前腕正中皮静脈に注入し，30分後に右同静脈より採血し，血中PSP濃度を測定した。

11. 尿検査

投与13カ月目に，24時間尿を採取し，尿量，pH，蛋白，Glu, Ket, O-bl（ラブスティックス，マイルス・三共），BIL（イクトスティックス，マイルス・三共），Uro（ウロビリスティックス，マイルス・三共）を測定し，炎光分析法でNa^+およびK^+，自動分析装置（日立，706 D型）でCRNNを測定した。

12. 心電図検査

投与13カ月目に，心電計（フクダ電子，FD-23型）を用いて，A-B誘導（I, II），A-B増高単極誘導（aV_R, aV_L），標準肢誘導（I, II, III）および標準肢増高単極誘導（aV_R, aV_L, aV_F）による心電図を記録，検査した。

13. 眼科的検査

投与13カ月目に，外眼部の視診，眼瞼および瞳孔反射の確認，眼内圧の触診を行った後，散瞳剤（ミドリンP，参天製薬）を用いて散瞳させ，前眼部および中間透光体については，細隙灯顕微鏡（興和，SL-2型）により，眼底は携帯用眼位カメラ（興和，RC-2型）により観察，撮影した。

14. 抗AM-715抗体の検索

解剖時に採血し，その血清について，オクタロニー寒天ゲル内沈降反応およびモルモットPCA反応により，抗AM-715抗体の存在を検討した。抗原としては，AM-715のアルカリ溶液（pH 11.0）およびAM-715と牛血清アルブミンの複合体（AM-715—BSA）を先いた。また，PCA反応では10倍希釈血清を用いた。

15. 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，胸腺，心臓，肺臓，肝臓，膵臓，盲腸，脾臓，腎臓，副腎，精巣，精巣上体，肺，前立腺，卵巣および子宮につき，剖検するとともに湿重量を秤量した。上記の臓器および眼球（視神経を含む），

内耳(蝸牛管), 脊髄, 気管, 大動静脈, 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸, 直腸, リンパ節(腸間膜), 膀胱, 筋肉(大腿直筋), 骨(肋骨), 軟骨(肋軟骨), 骨髄(肋骨)および関節軟骨(肩および膝関節)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H-E, トルイジンブルー(関節軟骨)で染色して検鏡した。

16. 骨髄細胞の種別分類

右大腿骨々髄の塗抹標本を作製し, MAY-GIEMSA 染色して検鏡下で分類を行った。

17. 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表わし, 有意差の検定はSTUDENT の t 検定に従った。

II. 結　果

1. 一般症状および体重

対照群および薬物投与の各群に死亡例および重篤な症状を示す例は見られなかった。

軽度なものとしては, 嘔吐および軟便が全実験期間を通じて対照群および薬物投与各群に同程度の頻度でみられ, また, 雌の対照群に投与8ヶ月目以降に黄色粘血便を時々排泄したものが1/4例みられた。一方薬物投与各群においては, 25 mg/kg 群の雌の2/4例にごくまれに, 50 mg/kg 群の雌雄全例に時々, 100→200 mg/kg 群の雌雄全例に高頻度に, 帯白色便の排泄がみられた。

投与期間中の体重の推移を Fig. 1 に示した。薬物投与各群においては雄では投与2ヶ月目頃から投与終了時まで, 雌では投与1ヶ月目頃から6ヶ月目頃までの間, それぞれ対照群に比べ体重増加が促進される傾向が認められたが, いずれも用量依存性の関係はなかった。また, 対照群および薬物投与各群の摂餌量に差は認められなかった。

2. 血液学的検査

検査結果を Table 1-1～2-2 に示した。投与6ヶ月目の雌の100→200 mg/kg 群に対照群と比べ赤血球数の有意な減少がみられ, また, 白血球の種別分類では, 雄の投与3ヶ月目と13ヶ月目の100→200 mg/kg 群の単球, 雌の投与6ヶ月目の25 mg/kg 群と13ヶ月目の100→200 mg/kg 群の単球にそれぞれ対照群との間に有意な差がみられたが, いずれの値にも用量依存性の関係はなく, 投与経過に伴う変動差の増大も認められなかった。

3. 血液生化学的検査

検査結果を Table 3-1～4-4 に示した。

雄では, 投与3ヶ月目の50 mg/kg 群の A/G, Glu, FFA, 100→200 mg/kg 群の BIL, ALP, 9ヶ月目の100→200 mg/kg 群の ALB, Glu, FFA, Ca^{++}, ChE, 13ヶ月目の50 mg/kg 群の TG, 100→200 mg/kg 群の ALB, Ca^{++}, ChE に, 雌では投与3ヶ月目の25 mg/kg 群の Glu, T-CHO, F-CHO, PL, GPT, 50 mg/kg 群の TP, Glu, GOT, ALP, 100→200 mg/kg 群の TP, BUN, 9ヶ月目の25 mg/kg 群の Glu, 100→200 mg/kg 群の A/G, Glu, 13ヶ月目の25 mg/kg 群の Glu, CPK, 50 mg/kg 群の ALP にそれぞれ対照群との間に有意な差がみられたが, いずれの値にも用量依存性の関係はなく, 投与経過に伴う変動差の増大も認められなかった。その他, 主に雌の薬物投与各群において, GOT, GPT, ALP の上昇する傾向が各投与期間毎に散見されたが, いずれも有意な上昇ではなく, また用量依存性の関係も認められなかった。

4. 眼房水の生化学的検査

検査結果を Table 5 に示した。TP, GOT ともに, 対照群と薬物投与各群に有意な差は認められなかった。

5. 肝薬物代謝酵素

検査結果を Table 6 に示した。ミクロゾーム蛋白量, チトクローム P-450, アミノピリン脱メチル化酵素およびアニリン水酸化酵素のいずれも, 対照群と薬物投与各群に有意な差は認められなかった。

6. 各種臓器の酵素

検査結果を Table 7～11 に示した。肝の酵素に, 対照群と薬物投与群での有意な差が散見されたが, いずれも軽度の活性低下であり, 心筋, 骨格筋の ATPase および CPK, 腎の ATPase, 骨髄の ALP には有意な差は認められなかった。

7. BSP 試験

検査結果を Table 12 に示した。対照群と薬物投与群に有意な差は認められなかった。

8. PSP 試験

検査結果を Table 13 に示した。対照群と薬物投与各群に有意な差は認められなかった。

9. 尿検査

検査結果を Table 14 に示した。雄では 50 mg/kg の K^+ に対照群との間に有意な差がみられ, 雌では25および100→200 mg/kg 群に潜血反応陽性が各1/4例認められたが, いずれの値にも用量依存性の関係はなかった。

10. 心電図検査

対照群および薬物投与各群の典型例を Fig. 2 に示した。いずれの誘導法による心電図にも, 対照群にみられたような変化以外, 薬物投与群に特徴的な変化は認められなかった。

11. 眼科的検査

眼底像を Photo 1～3 に, 前眼部撮影像を Photo 4 に示した。外眼部については, 雌の50 mg/kg 群に左側内

Fig. 1 Body weight changes in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

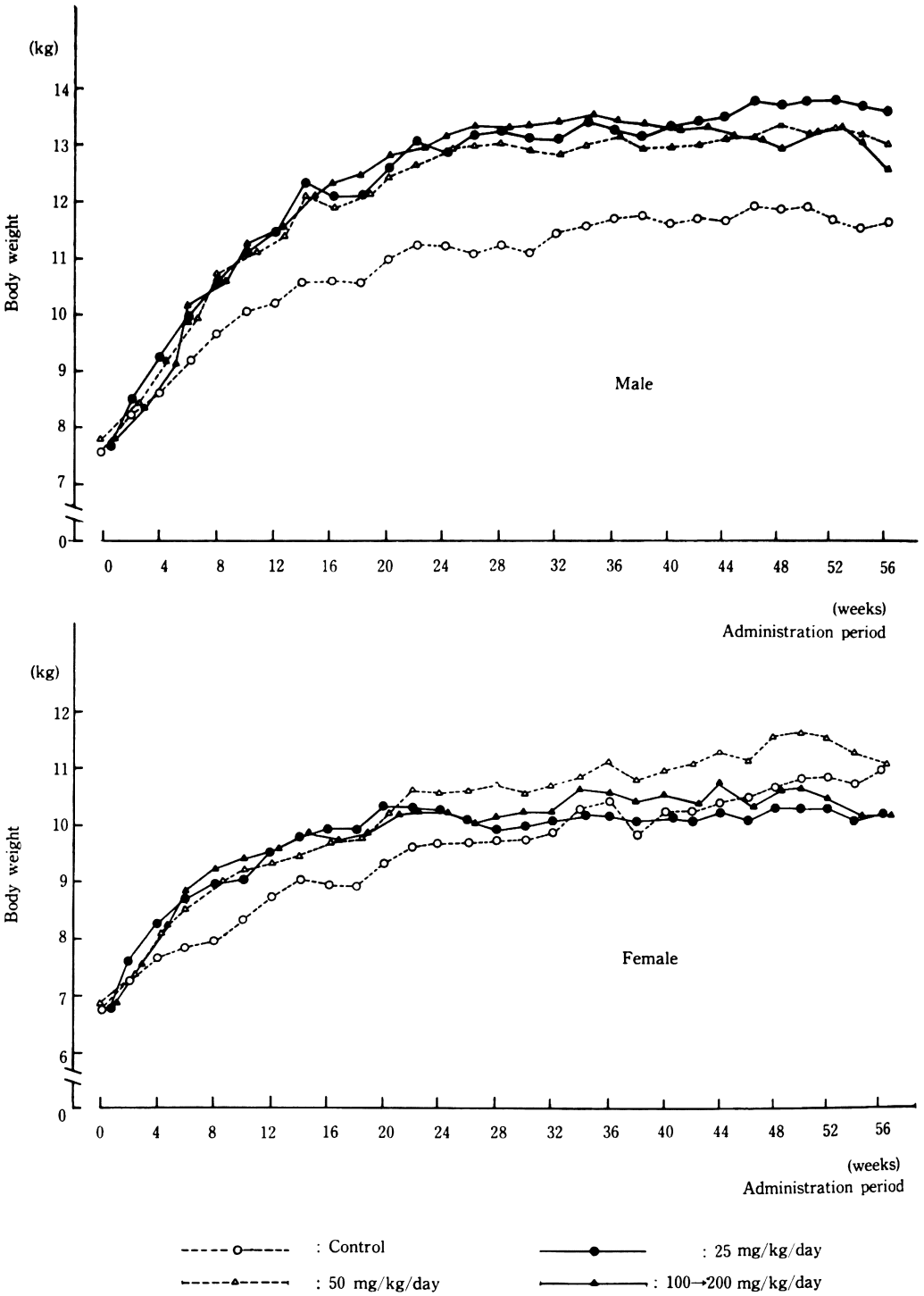


Table 1-1 Hematological findings in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Leucocyte ($\times 10^2$/mm^3)	Erythrocyte ($\times 10^4$/mm^3)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	ESR (mm/hr)
Before admin.	Control	4	95.0±16.8	654.8± 76.8	14.8±1.0	47.9±4.5	0.80±0.28
	25	4	117.5±21.0	652.0± 42.2	14.3±0.8	45.0±3.4	1.33±0.50
	50	4	107.0±11.7	681.8± 66.9	15.2±1.4	49.1±4.2	1.85±2.11
	100→200	4	86.5±16.5	683.0±106.8	14.5±1.5	47.4±4.0	3.18±4.22
3	Control	4	115.3±22.4	750.0± 91.0	16.2±1.1	51.0±5.1	0.53±0.19
	25	4	134.0±19.2	658.8± 89.2	14.2±1.1	44.8±3.4	4.18±2.57
	50	4	116.3±26.9	721.8± 91.4	15.2±2.1	49.1±6.3	2.00±1.17
	100→200	4	123.3±19.6	745.5± 62.0	14.3±1.1	46.4±1.4	2.50±1.74
6	Control	4	111.0± 6.7	761.5± 42.2	15.0±1.8	52.1±4.9	2.05±0.99
	25	4	116.3±18.5	770.3± 77.0	14.0±1.3	49.8±4.4	2.55±1.61
	50	4	101.0± 6.5	773.5± 16.4	14.8±0.6	52.4±3.1	1.40±0.71
	100→200	4	106.3± 7.9	779.5± 44.5	14.6±1.3	51.0±4.6	2.93±4.09
9	Control	4	114.0±17.4	835.8± 23.2	16.4±1.1	52.1±2.5	0.48±0.22
	25	4	101.5±11.8	810.3± 94.9	16.3±1.6	51.8±4.5	0.68±0.22
	50	4	111.0±15.2	781.8±103.6	16.7±1.1	52.1±2.9	0.40±0.14
	100→200	4	100.5±17.9	794.8± 91.2	16.7±1.5	51.6±4.2	0.45±0.17
13	Control	4	93.8±12.7	847.3± 41.0	16.9±1.2	48.6±3.8	0.85±1.12
	25	4	119.8±29.6	845.8± 59.7	15.3±1.2	47.1±3.9	0.78±0.59
	50	4	105.8±37.5	798.8± 56.9	17.0±1.0	50.0±5.1	0.75±1.17
	100→200	4	94.5±20.2	841.0± 96.7	16.0±1.8	50.1±5.6	0.35±0.17

Table 1-2 Hematological findings in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Differential counts of leucocytes (%)				
			Lymphocyte	Neutrocyte	Eosinophil	Basophil	Monocyte
Before admin.	Control	4	40.1±10.8	56.8±10.4	2.5±0.4	0	0.6±0.5
	25	4	38.4± 8.4	58.1± 7.5	2.4±2.1	0	1.1±0.9
	50	4	41.3± 6.2	56.0± 7.6	1.5±0.9	0	1.3±0.9
	100→200	4	31.0± 9.7	65.1± 6.5	3.5±3.0	0	0.4±0.5
3	Control	4	35.4± 8.7	61.5± 7.8	1.9±0.9	0	1.3±0.3
	25	4	38.1±14.2	57.9±14.4	2.1±0.6	0	1.9±0.6
	50	4	40.4±11.1	57.0±11.8	1.9±0.9	0	0.9±0.3
	100→200	4	43.3± 9.8	53.1± 8.8	1.9±1.3	0	1.8±0.3*
6	Control	4	39.9± 6.7	55.4± 8.0	2.3±2.5	0	2.5±1.1
	25	4	44.9± 2.4	50.6± 4.2	3.1±2.5	0	1.4±0.8
	50	4	39.0±13.9	56.4±14.3	3.3±1.8	0	1.4±0.5
	100→200	4	40.0± 9.2	56.5± 9.8	2.4±2.1	0	1.1±0.8
9	Control	4	28.5± 9.9	70.8±11.7	2.3±1.3	0	1.0±0.7
	25	4	28.5± 6.4	68.4± 5.0	2.3±1.3	0	0.9±0.6
	50	4	29.4± 4.9	68.4± 4.6	1.8±1.2	0	0.5±0.4
	100→200	4	27.3± 5.4	69.6± 6.7	2.1±1.7	0	1.0±0.8
13	Control	4	40.3±10.1	56.5±10.7	2.9±0.9	0	0.4±0.5
	25	4	35.0±13.6	63.0±12.5	1.3±1.9	0	0.8±0.6
	50	4	35.0±15.7	61.9±16.0	2.6±0.8	0	0.5±0.4
	100→200	4	36.6± 5.5	60.9± 4.6	2.5±1.5	0	0.0±0.0*

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 2-1 Hematological findings in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Leucocyte ($\times 10^3$/mm^3)	Erythrocyte ($\times 10^4$/mm^3)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	ESR (mm/hr)
Before admin.	Control	4	94.0±25.8	690.0± 48.5	15.3±1.4	50.6±2.8	0.78±0.49
	25	4	84.3± 6.9	746.8± 35.3	14.7±0.8	49.4±2.7	0.78±0.39
	50	4	109.3±15.2	701.0± 55.1	14.0±1.2	49.0±2.7	0.65±0.38
	100→200	4	119.5±23.1	666.5± 21.1	14.9±1.0	47.0±2.7	0.68±0.38
3	Control	4	102.3±22.4	779.0± 28.2	16.1±1.3	49.5±2.8	1.08±0.30
	25	4	102.5±11.4	784.0± 40.6	15.9±1.1	52.1±2.8	0.98±0.62
	50	4	110.8±17.8	767.3±107.2	14.8±1.2	47.3±4.6	1.23±0.21
	100→200	4	104.3±10.6	761.5± 50.0	14.8±2.1	48.5±4.8	1.20±0.60
6	Control	4	94.8± 9.4	859.3± 46.3	16.4±1.8	53.9±4.3	0.80±0.43
	25	4	102.3±16.3	812.8± 63.3	17.2±1.2	56.0±3.0	0.40±0.22
	50	4	105.0±16.7	764.5± 65.9	16.4±1.8	51.1±7.3	0.95±0.10
	100→200	4	93.8±14.8	730.3± 54.6*	16.2±1.2	51.3±3.7	0.40±0.14
9	Control	4	104.8±20.8	711.3± 14.3	16.3±0.3	49.4±1.9	0.60±0.16
	25	4	109.5±24.8	852.0±113.8	16.7±2.3	53.4±8.3	0.60±0.16
	50	4	103.3±13.9	808.3± 66.5	16.9±0.7	52.4±1.9	0.50±0.08
	100→200	4	108.0±20.6	744.5± 64.1	16.0±1.0	50.6±2.5	0.55±0.13
13	Control	4	79.8±13.9	762.8± 75.9	16.0±2.3	51.0±5.5	1.13±1.66
	25	4	84.8±19.0	813.5± 94.3	15.9±1.5	51.8±1.3	0.23±0.05
	50	4	109.0±36.6	839.0± 51.4	16.2±1.6	52.6±4.0	0.30±0.34
	100→200	4	79.0±14.0	815.3± 55.5	16.6±0.8	53.1±3.6	0.28±0.10

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 2-2 Hematological findings in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Differential counts of leucocytes (%) Lymphocyte	Neutrocyte	Eosinophil	Basophil	Monocyte
Before admin.	Control	4	51.4±12.1	44.8±12.1	1.8±1.0	0	2.1±1.0
	25	4	48.1± 4.5	48.4± 4.8	2.6±0.8	0	0.9±0.3
	50	4	45.4±13.4	52.6±13.5	1.0±0.6	0	1.0±0.9
	100→200	4	42.8±14.6	54.3±13.6	2.0±0.9	0	1.0±0.7
3	Control	4	41.8± 2.0	55.1± 2.3	1.8±1.7	0	1.4±0.6
	25	4	47.5± 8.0	49.4± 6.9	1.5±1.8	0	1.6±1.0
	50	4	45.5± 4.4	50.9± 5.3	2.1±1.7	0	1.5±0.8
	100→200	4	41.8±11.2	54.3±11.1	2.6±1.3	0	1.4±0.8
6	Control	4	38.0± 8.2	58.1± 6.5	2.9±1.5	0	1.0±0.4
	25	4	35.5± 9.8	61.8± 9.3	0.8±0.9	0	2.0±0.7*
	50	4	39.3± 4.1	57.4± 3.0	1.3±0.6	0	2.1±1.3
	100→200	4	35.0± 8.0	61.1± 7.3	2.4±1.0	0	1.5±1.1
9	Control	4	35.0± 7.7	61.5± 8.2	3.1±1.1	0	0.4±0.5
	25	4	42.1± 5.0	54.5± 3.7	2.8±2.5	0	0.6±0.3
	50	4	37.6±10.7	60.4±10.4	1.6±0.9	0	0.4±0.5
	100→200	4	39.1±12.0	58.3±12.8	2.0±2.0	0	0.6±0.3
13	Control	4	43.1±11.5	52.8±11.2	3.0±2.8	0	1.1±0.6
	25	4	49.9±10.9	46.0± 9.0	3.8±2.2	0	0.4±0.5
	50	4	35.1± 7.2	61.0± 8.4	3.4±1.3	0	0.5±0.4
	100→200	4	41.4± 5.4	55.9± 6.0	2.8±0.6	0	0.0±0.0*

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 3-1 Biochemical findings of serum in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	A/G ratio	BUN (mg/dl)	CRNN (mg/dl)	Glu (mg/dl)
Before admin.	Control	4	5.68±0.17	2.65±0.10	0.88±0.05	13.5±1.0	0.75±0.13	106.0± 3.9
	25	4	5.55±0.19	2.58±0.13	0.87±0.07	13.7±0.7	0.75±0.06	95.8± 9.9
	50	4	5.70±0.35	2.60±0.14	0.84±0.05	14.1±3.8	0.75±0.06	95.3± 4.3*
	100→200	4	5.90±0.14	2.68±0.13	0.83±0.07	15.2±3.2	0.78±0.05	98.8± 3.3*
3	Control	4	5.60±0.14	2.50±0.08	0.80±0.02	17.5±1.9	0.80±0.00	90.5± 4.0
	25	4	5.60±0.16	2.50±0.14	0.81±0.08	19.0±5.4	0.80±0.00	92.5±12.4
	50	4	5.58±0.25	2.63±0.13	0.89±0.02*	16.0±1.8	0.83±0.05	105.5±11.4*
	100→200	4	5.63±0.22	2.58±0.10	0.84±0.05	16.9±3.0	0.80±0.08	98.5±10.1
6	Control	4	5.93±0.39	2.60±0.08	0.78±0.07	14.0±0.9	0.80±0.08	80.0±10.4
	25	4	5.93±0.10	2.58±0.17	0.77±0.09	13.1±2.3	0.73±0.15	75.3± 5.4
	50	4	5.78±0.10	2.70±0.08	0.88±0.05	15.5±3.2	0.78±0.25	85.5± 3.5
	100→200	4	5.88±0.10	2.75±0.13	0.88±0.06	13.7±1.8	0.83±0.05	83.8± 3.3
9	Control	4	6.10±0.37	2.65±0.06	0.77±0.08	14.7±2.7	0.85±0.06	84.3± 6.2
	25	4	6.23±0.10	2.73±0.13	0.78±0.08	15.1±1.8	0.88±0.10	85.8± 3.9
	50	4	6.30±0.22	2.78±0.10	0.79±0.08	15.7±1.7	0.90±0.08	92.0± 3.7
	100→200	4	6.13±0.05	2.83±0.10*	0.85±0.06	15.2±1.3	0.88±0.10	98.3± 7.9*
13	Control	4	6.15±0.52	2.70±0.00	0.79±0.11	15.3±4.0	0.85±0.06	92.8± 6.7
	25	4	6.10±0.14	2.75±0.13	0.82±0.10	13.4±2.8	0.85±0.10	98.3± 2.4
	50	4	6.28±0.25	2.83±0.15	0.82±0.08	12.9±2.5	0.93±0.05	95.3± 4.9
	100→200	4	6.05±0.06	2.93±0.10*	0.93±0.06	13.4±1.9	0.93±0.05	100.5± 6.6

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 3-2 Biochemical findings of serum in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	T-CHO (mg/dl)	F-CHO (mg/dl)	PL (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFA (μEq/l)
Before admin.	Control	4	231.8±28.4	–	–	68.5± 7.7	1047.2±152.2
	25	4	226.0±39.3	–	–	66.5±16.9	1327.8±542.7
	50	4	249.8±48.0	–	–	73.8±13.5	1044.5±322.9
	100→200	4	275.3±56.6	–	–	76.0± 6.8	1233.3±484.4
3	Control	4	177.5±26.1	40.5± 4.9	361.5±26.4	58.3± 4.0	906.6±190.7
	25	4	172.0±25.1	38.5± 5.5	341.5±50.5	60.8±11.8	565.7±214.4
	25	4	197.8±24.6	41.8± 4.5	362.3±28.1	60.3± 8.1	549.2±206.8*
	100→200	4	208.8±43.0	44.8± 8.6	369.0±44.1	58.5± 5.8	930.6±467.7
6	Control	4	187.0±16.6	41.5± 3.1	385.3±21.9	49.5± 7.5	674.2±278.7
	25	4	187.0±32.5	40.5± 6.6	364.5±53.6	48.8± 9.5	783.7±663.6
	50	4	199.0±27.7	42.8± 4.3	383.5±29.4	43.0± 2.2	699.5±216.3
	100→200	4	220.3±44.2	47.3± 9.5	407.0±56.6	45.3± 2.1	747.2±280.2
9	Control	4	184.8±22.3	46.0± 4.3	393.0±33.9	51.0±11.5	481.3±170.1
	25	4	183.3±31.7	46.5±13.0	384.5±53.4	46.3± 7.8	962.5±665.7
	50	4	200.3±20.0	47.5± 4.2	408.0±28.1	41.0± 6.4	502.1±165.0
	100→200	4	218.8±44.6	54.3±12.0	416.0±55.4	42.5± 5.0	839.6±110.9*
13	Control	4	182.3±31.9	42.5± 7.3	382.3±47.7	55.5± 8.2	1395.0±677.1
	25	4	187.8±41.1	44.3±12.3	389.0±70.0	54.8±20.1	1015.0±848.9
	50	4	186.8±21.7	42.3± 4.6	381.8±27.4	39.8± 1.7*	810.0±209.4
	100→200	4	216.5±43.8	48.0±11.6	394.3±53.4	46.0± 4.2	975.0±702.8

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 3-3 Biochemical findings of serum in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Ca^{++} (mg/dl)	Na^{+} (mEq/l)	K^{+} (mEq/l)	TTT (Maclagen U)	BIL (mg/dl)	CPK (IU/l)
Before admin.	Control	4	10.5±0.3	141.5±1.5	5.20±0.29	–	0.18±0.10	–
	25	4	10.5±0.5	140.7±1.7	5.10±0.22	–	0.20±0.00	–
	50	4	10.4±0.6	141.5±1.5	5.28±0.30	–	0.20±0.08	–
	100→200	4	10.7±0.4	141.5±1.5	5.43±0.36	–	0.20±0.08	–
3	Control	4	9.2±0.5	137.0±2.5	4.55±0.26	0.28±0.10	0.23±0.05	47.0±23.4
	25	4	9.2±0.4	133.4±1.6	4.48±0.10	0.28±0.15	0.25±0.06	56.0±32.2
	50	4	9.1±0.4	137.8±3.6	4.58±0.22	0.20±0.00	0.33±0.10	50.8± 9.1
	100→200	4	9.4±0.3	134.8±0.0	4.80±0.28	0.23±0.05	0.33±0.05*	65.1±20.6
6	Control	4	9.3±0.3	134.1±1.4	4.33±0.17	0.25±0.06	0.35±0.06	45.3±20.6
	25	4	9.5±0.3	134.8±0.0	4.25±0.06	0.23±0.05	0.38±0.10	39.2±10.9
	50	4	9.5±0.4	133.4±1.6	4.53±0.22	0.20±0.08	0.38±0.05	40.0± 9.5
	100→200	4	9.8±0.3	134.8±0.0	4.35±0.34	0.20±0.00	0.38±0.05	52.3±10.1
9	Control	4	9.9±0.4	136.7±3.7	4.35±0.40	0.28±0.05	0.13±0.05	61.8± 6.4
	25	4	10.3±0.3	134.8±0.0	4.30±0.18	0.23±0.05	0.10±0.00	60.3± 9.5
	50	4	10.6±0.5	137.4±3.6	4.20±0.16	0.28±0.05	0.10±0.00	61.8± 6.2
	100→200	4	10.6±0.4*	134.8±0.0	4.18±0.17	0.20±0.00	0.10±0.00	63.0± 4.9
13	Control	4	9.9±0.4	149.7±2.2	4.60±0.29	0.23±0.05	0.13±0.10	59.4±20.7
	25	4	10.2±0.3	147.2±4.2	4.48±0.25	0.20±0.08	0.08±0.05	46.1± 8.0
	50	4	10.1±0.6	146.9±3.0	4.45±0.17	0.20±0.00	0.03±0.05	49.3± 6.8
	100→200	4	10.5±0.3*	148.7±2.5	4.50±0.08	0.20±0.00	0.13±0.05	51.5± 9.2

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 3-4 Biochemical findings of serum in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (K-A·U/dl)	ChE (ΔpH)	LDH (IU/l)	β-Gl-ase (U/dl)
Before admin.	Control	4	25.5± 6.4	25.8±18.1	10.9±2.3	0.64±0.10	175.3± 68.2	3897± 477
	25	4	23.5± 9.1	19.8± 2.8	11.8±2.4	0.61±0.12	178.5± 71.6	3699± 893
	50	4	22.0± 2.4	20.3± 3.0	12.4±2.0	0.72±0.14	157.3± 39.5	4258± 703
	100→200	4	20.5± 2.5	19.5± 2.6	12.7±1.2	0.76±0.11	151.0±102.2	3839± 376
3	Control	4	29.0±10.6	32.5± 4.4	5.9±1.7	0.53±0.06	306.5±224.5	4500± 394
	25	4	28.5± 3.1	32.3± 7.9	6.8±0.4	0.51±0.09	205.8± 62.9	4549±1080
	50	4	27.3± 3.0	33.3± 1.5	8.9±2.0	0.59±0.10	155.3± 40.4	4485± 884
	100→200	4	34.3± 7.9	57.3±40.0	9.1±1.6*	0.63±0.09	240.0±147.6	4294±1009
6	Control	4	32.3± 5.1	34.5± 3.3	4.7±0.5	0.60±0.05	203.0±113.6	3922± 634
	25	4	28.5± 4.2	38.8±14.3	6.4±1.9	0.58±0.12	225.3±102.6	3804± 754
	50	4	28.5± 3.9	35.8± 2.8	6.0±1.1	0.66±0.06	169.3± 44.0	3780± 674
	100→200	4	33.8± 3.4	65.0±41.6	6.7±1.9	0.69±0.06	207.0± 62.5	3422± 424
9	Control	4	27.3± 4.6	34.3± 3.4	3.6±0.1	0.58±0.03	131.0± 43.7	3583± 608
	25	4	24.3± 4.4	31.5± 7.4	5.2±1.5	0.57±0.11	125.8± 67.7	3564± 765
	50	4	25.8± 1.7	36.0± 8.2	5.0±1.3	0.65±0.09	145.0±116.3	3437± 879
	100→200	4	26.0± 3.4	65.5±42.3	5.7±2.8	0.70±0.04*	93.8± 12.8	2917± 575
13	Control	4	28.5± 6.4	43.0±13.6	3.4±0.8	0.51±0.05	107.0± 59.1	2760± 674
	25	4	23.0± 2.8	34.8±12.1	5.0±2.9	0.49±0.08	93.3± 16.3	2539± 471
	50	4	23.8± 2.8	32.8± 7.7	4.1±1.0	0.57±0.10	96.3± 30.3	2505± 553
	100→200	4	26.0± 3.8	63.5±34.4	5.2±2.4	0.62±0.06*	90.8± 24.9	2285± 964

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 4-1 Biochemical findings of serum in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	A/G ratio	BUN (mg/dl)	CRNN (mg/dl)	Glu (mg/dl)
Before admin.	Control	4	5.68±0.17	2.60±0.22	0.84±0.09	14.6±2.2	0.80±0.08	90.8± 9.3
	25	4	5.70±0.23	2.60±0.16	0.84±0.11	11.8±1.8	0.68±0.05*	105.3± 3.0
	50	4	5.53±0.19	2.60±0.16	0.89±0.06	13.4±0.7	0.73±0.05	95.5±10.1
	100→200	4	5.48±0.15	2.58±0.13	0.89±0.06	10.9±1.8*	0.68±0.05	95.3±15.4
3	Control	4	5.78±0.15	2.68±0.05	0.86±0.05	18.1±4.0	0.83±0.13	86.8± 4.7
	25	4	5.73±0.13	2.70±0.14	0.89±0.07	15.7±5.8	0.78±0.10	105.3± 2.2*
	50	4	5.43±0.15*	2.55±0.13	0.88±0.05	19.8±5.9	0.78±0.10	102.5± 8.2*
	100→200	4	5.45±0.06*	2.63±0.15	0.93±0.09	14.7±2.8	0.73±0.05	95.0± 5.0
6	Control	4	6.03±0.28	2.75±0.10	0.84±0.04	20.9±5.2	0.78±0.10	74.5± 5.8
	25	4	5.73±0.10	2.65±0.06	0.86±0.05	15.0±3.6	0.60±0.40	95.8±10.7*
	50	4	5.58±0.17*	2.63±0.15	0.89±0.05	21.2±5.1	0.73±0.10	85.3± 8.3
	100→200	4	5.60±0.18*	2.68±0.13	0.91±0.06	14.0±2.0*	0.65±0.31	81.8± 7.5
9	Control	4	6.15±0.40	2.68±0.13	0.77±0.04	18.9±5.4	0.83±0.17	72.3± 8.5
	25	4	6.03±0.17	2.70±0.16	0.81±0.05	16.1±3.6	0.83±0.05	86.8± 7.8*
	50	4	5.88±0.15	2.70±0.14	0.85±0.06	18.4±6.0	0.78±0.05	85.0±10.7
	100→200	4	5.78±0.15	2.70±0.08	0.88±0.08*	22.5±10.5	0.80±0.08	87.0± 4.3*
13	Control	4	6.28±0.36	2.88±0.17	0.84±0.06	17.8±5.1	0.78±0.15	78.0± 5.4
	25	4	6.00±0.14	2.83±0.13	0.89±0.04	16.3±2.6	0.80±0.08	87.8± 3.0*
	50	4	6.08±0.19	2.85±0.19	0.88±0.08	16.5±2.9	0.80±0.08	82.3±15.8
	100→200	4	5.98±0.25	2.95±0.13	0.98±0.09	20.8±5.6	0.80±0.08	85.3± 8.3

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 4-2 Biochemical findings of serum in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	T-CHO (mg/dl)	F-CHO (mg/dl)	PL (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFA (μEq/l)
Before admin.	Control	4	198.5±15.3	–	–	61.5± 9.7	1386.1±251.3
	25	4	221.8±2.30	–	–	80.3±13.9	1125.0±313.9
	50	4	188.3±18.5	–	–	62.0±10.4	675.0±220.6*
	100→200	4	231.8±37.3	–	–	64.5±15.5	661.1±156.7*
3	Control	4	173.8±10.2	37.0± 2.3	369.5± 8.7	41.3± 4.6	489.9±184.6
	25	4	216.0±18.1*	47.3± 4.0*	400.3±14.5*	50.0± 6.8	498.8±188.2
	50	4	178.3±31.4	37.8± 5.1	349.8±43.7	44.3± 6.9	445.7±173.5
	100→200	4	171.3± 9.7	37.0± 4.0	357.0±14.9	42.8± 3.5	566.8±259.8
6	Control	4	182.3±42.5	38.8± 9.8	377.3±64.6	52.5±17.7	806.2±427.0
	25	4	220.8±36.4	48.5± 7.8	417.5±67.7	59.8±20.5	598.3±312.1
	50	4	204.0±43.9	43.5± 7.5	401.8±36.8	56.8±15.3	457.9±163.5
	100→200	4	186.0±25.2	39.3± 5.4	382.0±26.8	50.0± 7.9	800.6±240.3
9	Control	4	190.8±27.3	48.8± 7.2	402.0±44.4	59.8±21.5	495.8±366.5
	25	4	223.3±20.3	54.8± 3.9	434.3±28.2	56.3± 9.3	589.6±512.8
	50	4	208.3±34.0	53.5± 8.1	417.0±58.8	69.5±28.9	364.6±225.6
	100→200	4	203.3±39.8	49.3±10.5	422.0±54.9	70.5±20.1	581.3±601.8
13	Control	4	209.8±48.0	48.3±11.4	429.5±82.3	69.0±30.1	1117.5±476.3
	25	4	277.3±46.0	64.0±13.5	490.5±83.9	58.0±15.3	1235.0±283.6
	50	4	237.8±74.2	53.8±15.7	453.8±85.2	53.8± 7.8	765.0±162.6
	100→200	4	204.3±39.2	46.3± 9.6	408.5±45.7	72.3±18.2	712.5±170.6

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 4-3 Biochemical findings of serum in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Ca^{++} (mg/dl)	Na^{+} (mEq/l)	K^{+} (mEq/l)	TTT (Maclagen U)	Total BIL (mg/dl)	CPK (IU/l)
Before admin.	Control	4	11.0±0.6	142.2±0.0	5.15±0.06	–	0.13±0.05	–
	25	4	10.8±0.5	142.2±0.0	5.15±0.24	–	0.25±0.10	–
	50	4	10.3±0.2	141.5±1.5	5.38±0.33	–	0.25±0.13	–
	100→200	4	10.6±0.2	141.5±1.5	5.40±0.42	–	0.18±0.05	–
3	Control	4	9.7±0.4	138.9±3.0	4.58±0.42	0.20±0.00	0.33±0.05	46.3±24.0
	25	4	9.8±0.7	138.5±4.3	4.55±0.29	0.18±0.05	0.33±0.05	34.0±14.6
	50	4	9.4±0.8	137.8±3.6	4.58±0.13	0.18±0.05	0.33±0.05	54.0±25.4
	100→200	4	9.7±0.5	138.1±2.2	4.58±0.21	0.15±0.06	0.30±0.00	30.3±10.7
6	Control	4	9.5±0.2	135.9±2.2	4.45±0.30	0.30±0.00	0.30±0.08	44.8±10.2
	25	4	9.5±0.2	136.0±4.4	4.43±0.52	0.38±0.29	0.33±0.05	36.0± 8.3
	50	4	9.2±0.3	134.1±1.4	4.40±0.08	0.33±0.13	0.35±0.10	44.5±15.4
	100→200	4	9.1±0.3	137.0±2.5	4.43±0.17	0.25±0.06	0.35±0.06	52.8±21.9
9	Control	4	10.2±0.8	137.8±3.6	4.70±0.26	0.33±0.13	0.20±0.12	74.3± 4.8
	25	4	10.1±0.6	137.1±4.5	4.70±0.29	0.23±0.10	0.15±0.06	71.4± 6.6
	50	4	10.3±0.3	138.9±3.0	4.45±0.19	0.40±0.27	0.28±0.17	70.2± 5.5
	100→200	4	10.3±0.6	141.8±3.5	4.50±0.22	0.35±0.17	0.30±0.14	70.3± 7.0
13	Control	4	9.8±0.3	147.9±3.5	4.80±0.14	0.25±0.06	0.25±0.17	67.1± 8.5
	25	4	9.8±0.4	148.7±2.5	4.80±0.54	0.25±0.10	0.15±0.06	50.0±10.2*
	50	4	9.6±0.4	149.7±2.2	4.85±0.19	0.28±0.05	0.23±0.10	79.0±19.3
	100→200	4	9.9±0.5	149.7±2.2	4.80±0.16	0.40±0.22	0.28±0.10	71.6±20.4

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 4-4 Biochemical findings of serum in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Months	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (K-A·U/dl)	ChE (ΔpH)	LDH (IU/l)	β-Gl-ase (U/dl)
Before admin.	Control	4	24.3± 1.0	24.8± 5.2	9.1± 1.2	0.72±0.16	183.0± 18.9	4379± 425
	25	4	26.5± 3.9	41.5± 36.4	11.6± 1.2*	0.78±0.25	199.0± 45.0	3699± 438
	50	4	24.8± 1.0	27.8± 12.3	12.0± 2.7	0.71±0.21	194.8± 65.1	3710± 591
	100→200	4	22.0± 6.1	32.0± 27.5	10.7± 1.3	0.64±0.05	134.8± 53.6	3515± 367*
3	Control	4	28.3± 3.3	27.0± 2.9	5.8± 1.2	0.60±0.12	188.5± 49.0	3598± 545
	25	4	24.8± 3.5	38.3± 5.0*	7.1± 0.1	0.65±0.23	151.3± 28.4	3578± 456
	50	4	36.3± 4.3*	103.5± 87.5	8.7± 0.9*	0.63±0.10	198.3±180.6	3995± 511
	100→200	4	27.8±10.0	72.5± 82.4	8.0± 2.7	0.60±0.05	157.5± 89.3	3191± 578
6	Control	4	28.3± 6.8	25.0± 6.2	5.3± 0.9	0.62±0.13	215.0±110.5	3911± 854
	25	4	25.3± 3.4	39.0± 3.8*	5.8± 1.1	0.73±0.23	194.8± 93.7	3520± 709
	50	4	54.3±29.5	110.3± 91.9	6.7± 1.0	0.67±0.11	245.5±169.6	3726± 688
	100→200	4	73.0±76.4	143.0±199.3	7.0± 3.5	0.72±0.10	201.0± 74.0	3309± 397
9	Control	4	30.3±11.2	144.3±243.8	10.9±12.9	0.72±0.12	272.3± 91.2	3814± 808
	25	4	28.0± 6.8	126.8±194.9	11.2± 9.9	0.84±0.18	271.8± 91.3	3343±1050
	50	4	39.5±22.3	114.5± 93.3	7.3± 2.0	0.66±0.09	159.3± 44.5	3686± 769
	100→200	4	54.5±57.0	120.3±155.2	6.1± 3.1	0.68±0.10	181.0± 79.3	3804±1390
13	Control	4	22.8± 3.6	29.5± 21.1	4.0± 0.8	0.54±0.05	163.8± 35.9	2628± 446
	25	4	19.5± 1.7	45.3± 16.8	5.4± 0.9	0.72±0.25	157.8± 46.7	2270± 276
	50	4	41.8±26.1	96.0± 77.4	5.4± 0.6*	0.64±0.18	222.0± 44.7	2922±1094
	100→200	4	28.5±14.9	102.0± 67.7	4.7± 1.5	0.59±0.06	154.5± 72.2	2868± 392

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 5 Biochemical findings of aqueous humor in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	TP (mg/dl) Left	TP (mg/dl) Right	GOT (Karmen unit) Left	GOT (Karmen unit) Right
Male	Control	4	44.5±30.7	49.7±31.4	4.0±0.7	4.6±1.4
	25	4	32.4± 4.7	44.2±24.6	5.0±1.3	5.5±2.7
	50	4	31.1± 4.3	31.4± 3.5	4.9±1.1	5.3±1.3
	100→200	4	29.1± 6.2	45.3±38.1	4.3±2.1	5.1±2.8
Female	Control	4	37.5±16.3	31.7± 1.6[a)]	3.1±1.3	4.5±2.6[a)]
	25	4	39.7± 7.7	35.3± 5.0[a)]	4.4±1.5	4.3±0.6[a)]
	50	4	38.2± 5.4	34.8± 5.7	4.6±1.5	5.4±1.1
	100→200	4	41.6±13.2[a)]	43.7±16.4[a)]	5.7±1.3[a)]	5.4±2.1

a): The value is the mean of 3 samples because one of 4 samples was contaminated with the other tissue fragments of the eyeball.

Table 6 Hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Microsomal Protein (mg/g liver)	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	Aminopyrine demethylase (nmoles/mg protein/30 min)	Aniline hydroxylase (nmoles/mg protein/30 min)
Male	Control	4	13.87±2.10	0.43±0.15	125.5±20.0	8.5±0.1
	25	4	13.05±1.82	0.41±0.15	140.6±12.5	8.6±1.1
	50	4	12.91±2.11	0.48±0.06	131.8±16.8	9.0±1.4
	100→200	4	11.19±2.55	0.34±0.10	155.7±18.1	8.9±0.7
Female	Control	4	12.66±1.73	0.37±0.13	177.9±16.9	11.0±0.7
	25	4	11.53±1.78	0.33±0.17	158.7± 7.7	9.8±1.6
	50	4	12.62±5.17	0.28±0.12	171.3±38.3	10.1±1.9
	100→200	4	13.95±2.62	0.46±0.18	163.2±36.0	9.4±1.3

Table 7 Enzymatic activity of liver in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

ATPase

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	123.5±10.6	18.9±0.7	0.15±0.01
	25	4	115.5± 8.4	15.8±1.5*	0.14±0.01
	50	4	113.7± 9.1	15.7±3.0	0.14±0.04
	100→200	4	111.8±33.9	16.6±3.7	0.16±0.04
Female	Control	4	115.7± 6.6	15.0±2.8	0.13±0.02
	25	4	117.0± 8.2	17.4±3.9	0.15±0.03
	50	4	118.3±17.0	15.8±1.4	0.14±0.02
	100→200	4	103.3±16.5	14.0±1.0	0.14±0.03

G-6-Pase

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	123.5±10.6	45.0± 5.9	0.37±0.07
	25	4	115.5± 8.4	45.7± 5.4	0.40±0.03
	50	4	113.7± 9.1	33.8± 4.1*	0.30±0.02
	100→200	4	111.8±33.9	45.6±13.7	0.41±0.02
Female	Control	4	115.7± 6.6	36.5± 8.0	0.31±0.06
	25	4	117.0± 8.2	42.0± 4.4	0.36±0.04
	50	4	118.3±17.0	44.7±11.7	0.37±0.05
	100→200	4	103.3±16.5	41.0± 5.5	0.40±0.05

β-Glucuronidase

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g liver)	Activity (U/g liver)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	135.9± 5.4	3765± 882	27.8±7.2
	25	4	131.7±11.4	4427± 950	33.5±5.8
	50	4	128.7± 3.0	3824± 721	29.7±5.5
	100→200	4	134.5±14.8	3780± 870	27.8±3.7
Female	Control	4	135.4± 5.7	4794±1109	35.5±8.3
	25	4	132.1± 3.0	3471± 488	26.3±3.7
	50	4	128.0±18.0	3471±1067	26.7±4.8
	100→200	4	131.4± 9.2	2868± 502*	22.0±4.9*

*: Significant difference from control ($p<0.05$
ATPase : μmoles Pi/10 min at 28°C
G-6-Pase : μmoles Pi/30 min at 30°C
β-Glucuronidase: μg *p*-nitrophenol/60 min at 37°C

Table 8 Enzymatic activity of heart in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

ATPase

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g heart)	Activity (U/g heart)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	33.0±2.7	48.4± 8.4	1.47±0.21
	25	4	30.6±0.3	54.0± 5.6	1.75±0.19
	50	4	33.3±2.4	51.0±10.4	1.54±0.36
	100→200	4	31.5±0.9	50.0±10.4	1.58±0.31
Female	Control	4	33.1±3.0	52.1±25.2	1.55±0.70
	25	4	33.8±5.0	61.1±16.6	1.81±0.40
	50	4	32.9±2.9	39.1± 8.9	1.18±0.20
	100→200	4	33.2±1.0	48.6± 5.1	1.47±0.15

CPK

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g heart)	Activity (U/g heart)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	72.4±1.2	430±38	5.9±0.6
	25	4	71.8±2.8	416±39	5.8±0.5
	50	4	74.3±5.3	422±22	5.7±0.4
	100→200	4	70.7±3.2	386±61	5.5±0.8
Female	Control	4	76.6±7.5	452±37	5.9±0.4
	25	4	76.0±7.0	483±47	6.3±0.7
	50	4	71.0±4.6	450±56	6.3±0.6
	100→200	4	76.7±3.5	450±35	5.9±0.5

ATPase: μmoles Pi/10 min at 28°C
CPK : μmoles pyruvate/min at 30°C

Table 9 Enzymatic activity of kidney in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

ATPase

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g kidney)	Activity (U/g kidney)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	87.8± 6.4	38.5±6.8	0.44±0.08
	25	4	83.6± 9.9	40.1±3.8	0.49±0.04
	50	4	90.8± 7.1	45.0±5.7	0.50±0.07
	100→200	4	90.3± 5.6	42.2±2.0	0.47±0.04
Female	Control	4	85.4± 9.7	37.1±6.2	0.43±0.03
	25	4	85.1± 7.5	42.5±2.3	0.51±0.05
	50	4	91.8± 9.5	44.0±4.5	0.48±0.05
	100→200	4	88.4±10.0	43.3±4.2	0.50±0.08

ATPase: μmoles Pi/10 min at 28°C

Table 10 Enzymatic activity of skeletal muscle in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

ATPase

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g muscle)	Activity (U/g muscle)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	40.8±4.7	30.1±15.9	0.71±0.33
	25	4	40.9±4.5	35.0±20.2	0.84±0.46
	50	4	38.0±4.1	62.7±75.5	1.75±2.20
	100→200	4	38.4±3.1	21.3± 9.2	0.54±0.20
Female	Control	4	47.7±5.6	31.1±10.3	0.66±0.24
	25	4	44.4±3.6	37.5±10.9	0.86±0.31
	50	4	48.1±3.9	35.4± 8.8	0.74±0.14
	100→200	4	46.8±3.5	25.2± 6.6	0.55±0.17

CPK

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g muscle)	Activity (U/g muscle)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	64.3±1.4	835± 77	13.0±1.4
	25	4	63.5±5.2	885±123	13.9±1.2
	50	4	62.7±1.6	883± 77	14.1±1.5
	100→200	4	64.2±0.8	926± 79	14.5±1.3
Female	Control	4	62.1±3.2	760±211	12.2±3.0
	25	4	63.1±3.6	784±109	12.4±1.3
	50	4	61.8±6.1	815±129	13.1±1.0
	100→200	4	63.3±2.2	730±143	11.5±1.9

ATPase: μmoles Pi/10 min at 28°C
CPK : μmoles pyruvate/min at 30°C

Table 11 Enzymatic activity of bone marrow in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

ALP

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein (mg/g marrow)	Activity (U/g marrow)	Specific activity (U/mg protein)
Male	Control	4	23.1±10.1	0.22±0.08	0.011±0.004
	25	4	31.6±15.1	0.38±0.26	0.012±0.004
	50	4	28.2± 6.6	0.30±0.10	0.011±0.005
	100→200	4	21.2± 9.5	0.20±0.07	0.010±0.002
Female	Control	4	25.4± 9.5	0.42±0.23	0.015±0.005
	25	4	30.1± 3.1	0.35±0.13	0.012±0.005
	50	4	26.7± 8.3	0.41±0.20	0.016±0.010
	100→200	4	17.9± 4.9	0.22±0.12	0.012±0.006

ALP: mg phenol/15 min at 37°C

Table 12 BSP test in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

	Dose (mg/kg/day)	BSP (μg/ml)[a] Dog No. 1	2	3	4	Mean±SD
Male	Control	10.9	10.2	17.4	11.8	12.6±3.3
	25	10.7	25.1	20.9	14.5	17.8±6.4
	50	11.8	16.8	14.8	10.7	13.5±2.8
	100→200	16.1	14.9	13.9	16.8	15.4±1.3
Female	Control	22.0	20.6	11.2	11.6	16.4±5.7
	25	23.6	12.1	19.7	13.3	17.2±5.4
	50	17.2	14.2	11.6	21.5	16.1±4.3
	100→200	17.1	10.9	17.3	23.6	17.2±5.2

a): Blood level at 30 min after intravenous injection of BSP (15 mg/kg)

眼角部の結膜に充血を伴った炎症性浮腫が1/4例みられた。眼瞼，前眼部ならびに中間透光体および瞳孔反射については，対照群および薬物投与各群のいずれにも異常はみられなかった。また，眼底については，雄の50 mg/kg群に左側眼底の3乳頭径鼻側およびその上方に大小の限局した反射亢進部がみられ，さらにタペタム領域に慢性の色素沈着がみられたものが1/4例認められた。

12. 抗 AM-715 抗体の検索

オクタロニー寒天ゲル内沈降反応およびモルモットPCA反応による検査の結果，薬物投与各群の各個体から採取した血清のいずれにも抗 AM-715 抗体は検出されなかった。

13. 臓器重量

諸臓器の絶対重量を Table 15, 16 に，相対重量を Table 17, 18 に示した。雄では 50 mg/kg 群の盲腸，100→200 mg/kg 群の精巣の絶対重量において対照群に比べ有意な差が認められたが，相対重量に差はなかった。雌では 50 mg/kg 群の脳および脾の絶対重量，卵巣および子宮の絶対重量と相対重量，100→200 mg/kg 群の脳の絶対重量，腎の相対重量に，それぞれ対照群に比べ，

Table 13 PSP test in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

	Dose (mg/kg/day)	PSP (μg/ml)[a) Dog No. 1	2	3	4	Mean±SD
Male	Control	3.8	4.3	6.4	4.2	4.7±1.2
	25	5.3	5.1	4.7	5.4	5.1±0.3
	50	5.2	4.8	4.4	5.1	4.9±0.4
	100→200	4.9	5.9	5.0	5.4	5.3±0.5
Female	Control	7.0	7.0	6.6	6.1	6.7±0.4
	25	6.6	5.5	6.2	6.3	6.2±0.5
	50	6.1	6.6	5.6	8.2	6.6±1.1
	100→200	5.6	5.4	5.8	6.6	5.9±0.5

a): Blood level at 30 min after intravenous injection of PSP (3 mg/kg)

有意な差が認められた。また，薬物投与各群において，内容物を含めた盲腸重量に増加傾向がみられたが，有意な変化ではなかった。

14. 剖検所見

剖検結果を総括して Table 19 に示した。雄では，100→200 mg/kg 群に，右腎の無形成が認められたものが 1/4 例，十二指腸から空腸にかけてのうっ血，膀胱結石（直径 0.5～5 mm で約 30 個），右精巣の褐色変性および右精巣上体の萎縮を合併したものが 1/4 例みられた。雌では，対照群に，肝の軽度黄色化ならびに小腸内の胆汁貯留が認められたものが 1/4 例みられ，黄色粘血便を排泄していた 1/4 例に大腸の出血およびうっ血が認められた。また 100→200 mg/kg 群において，十二指腸に直径約 5 mm のうっ血斑が認められたものが 1/4 例みられた。

環椎後頭，環軸，肩，肘，手，指節間，股，膝，足および趾節間関節の関節軟骨あるいは滑液については，全例に異常はなかった。

15. 病理組織学的検索

病理学的検鏡結果を総括して Table 20 に示した。また，雄の対照群，50 mg/kg 群および 100→200 mg/kg 群の肝臓，腎臓の光顕像を Photo 5～10 に示した。

対照群にのみ認められた病変としては，乳腺の肥大による泌乳乳腺様が雌に 1/4 例，大腸の粘膜層の出血が雌に 1/4 例みられた。

対照群および薬物投与群に認められた病変は，下垂体前葉のコロイドを含む嚢胞，唾液腺の限局性細胞浸潤であったが，いずれも薬物投与による頻度の上昇は認められなかった。一方，薬物投与群のみに認められた病変は甲状腺の濾胞間のリンパ小節が雄の 25 mg/kg 群および 100→200 mg/kg 群，雌の 25 mg/kg 群にそれぞれ 1/4 例みられ，雌の 50 mg/kg 群に甲状腺腫が 1/4 例みられた。また，小腸の粘膜層のうっ血が，雌雄の 100→200 mg/kg 群に各 1/4 例，膀胱の粘膜上皮細胞の限局性剝脱が雄の 100→200 mg/kg 群に 1/4 例，精細管の壊死が雄の 100→200 mg/kg 群に 1/4 例みられた。

上記以外の諸臓器の組織には，特筆すべき病変は認められなかった。

16. 骨髄細胞の種別分類

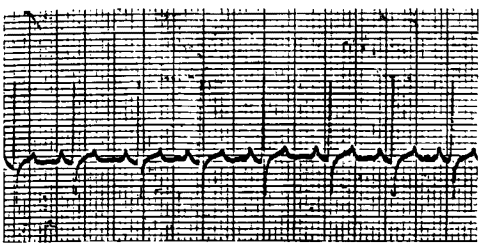
分類結果を Table 21 に示した。雄の 50 mg/kg 群，雌の 25 mg/kg 群および 50 mg/kg 群の好塩基性顆粒球，雌の 100→200 mg/kg 群の後好中性顆粒球，赤血球系細胞および全顆粒球に，それぞれ対照群に比べ有意な差がみられたが，いずれの値にも用量依存性の関係は認められなかった。

III. 考察および結語

ビーグル犬に AM-715 を 25 および 50 mg/kg 13カ月

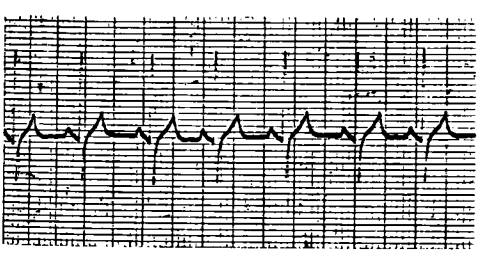
Fig. 2 Electrocardiogram in dogs orally treated with AM-715 for 13 months (A-B lead I)

Male

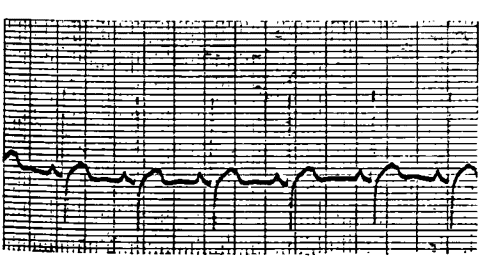


Control (Dog No.3)

25 mg/kg/day (Dog No.2)

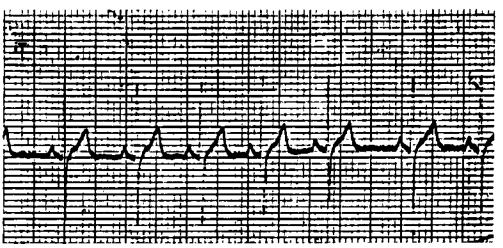


50 mg/kg/day (Dog No.4)

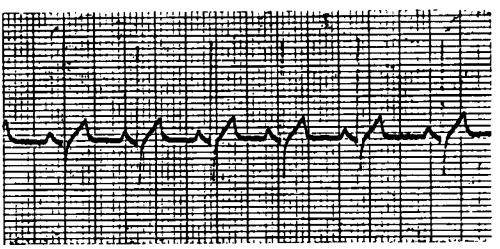


100→200 mg/kg/day (Dog No.2)

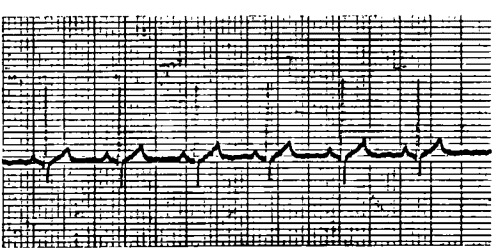
Female



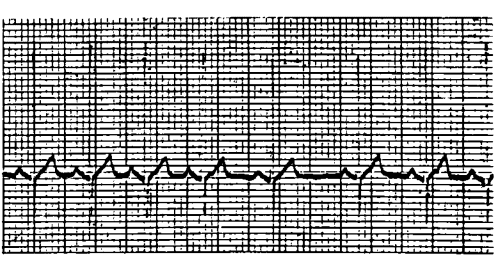
Control (Dog No.4)



25 mg/kg/day (Dog No.2)



50 mg/kg/day (Dog No.4)



100→200 mg/kg/day (Dog No.3)

1 mV

1 sec

Photo 1 The ocular fundus of a male dog in control group (Dog No. 4, left eye)
Within normal limits

Photo 2 The ocular fundus of a female dog in 50 mg/kg/day group (Dog No. 2, left eye)
Within normal limits

間および100 mg/kg 10カ月間続いて200 mg/kg 3カ月間連続経口投与した慢性毒性試験において次のことが認められた。

1) 投与中死亡例はみられず，一般症状においても重篤な病的症状は認められなかった。軽度に認められた嘔吐は対照群，薬物投与各群共に同程度の頻度でみられ，AM-715に催吐作用はないものと考えられた。また，薬物投与各群にみられた帯白色便の排泄は，その程度や頻度が用量依存的に上昇したが，これは未吸収のAM-715自体の排泄によるものと考えられた。

体重の推移では，対照群に比べ，薬物投与各群の方が，体重増加が促進される傾向がみられたが，摂餌量に差はなく，用量依存性の関係もなかった。

2) 血液学的検査や骨髄細胞の種別分類で薬物投与群に，対照群に比べて有意な差が散見されたが，いずれも軽度な変動で，用量あるいは投与期間に相関したものではなく，AM-715には血球および造血器官に対する影響はないことが示唆された。

3) 血液生化学的検査において，TP, ALB, Glu, FFA, Ca^{++}, ChE, ALP, GPT等に対照群に比べ有意な差がみられた群があったが，いずれも各測定値は成書[5]に示されている正常値の範囲内かあるいは，それに近い値であり，また，いずれの値も用量あるいは投与期間に相関するものではなく，AM-715による影響とは断定できない。特に，測定値の変動の大きかった雌の薬物投与各群のGPT, ALPさらにGOTについては，個体差が大きく，しかも血中BIL値，BSP試験，肝酵素活性あるいは肝の組織像において異常が認められなかったことから，重篤な肝の障害を示唆するものではなく，また，AM-715によるものとも考え難い。

さらに，AM-715は肝の薬物代謝酵素に対しても何らの影響も与えなかった。

4) 尿検査において，雌の25および100→200 mg/kg群に潜血反応陽性がみられたが，剖検所見や組織学的検索結果から，それを示唆する異常は認められず，むしろ生殖器からの生理的な出血の混入によるものと考えられた。

その他の尿検査ならびにPSP試験において，AM-715による異常値はみられず，また，腎のATPaseにも影響はなく，BUNや血中CRNNの増加も認められず，さらに腎の組織像においても異常はみられず，AM-715による腎への影響は認められなかった。

5) 心電図検査で，AM-715による特異的な変化は認められず，心筋のATPase, CPKにも影響はなく，心の組織像においても異常は見られず，AM-715による心への機能的あるいは器質的な影響は認められなかった。

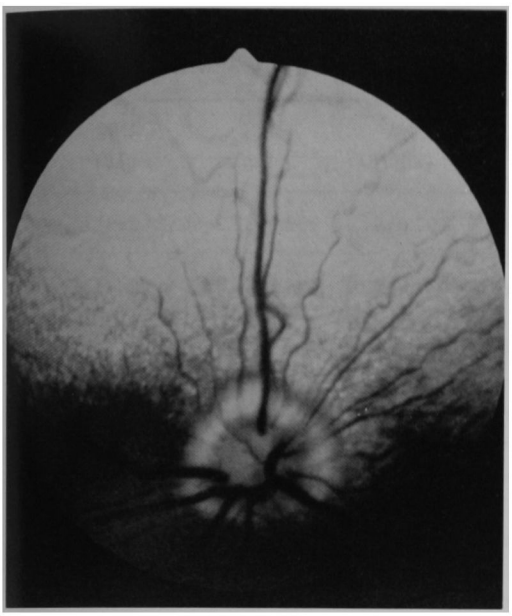


Photo 3 The ocular fundus of a male dog in 100→200 mg/kg/day group (Dog No. 4, left eye)
Within normal limits

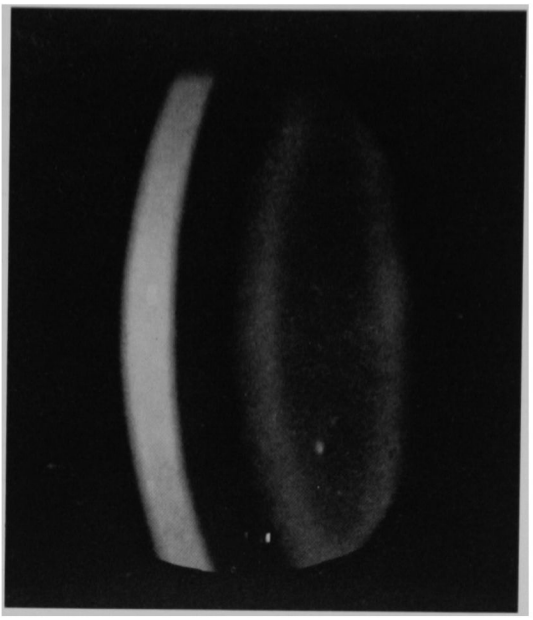


Photo 4 The anterior ocular localization of a female dog in 25 mg/kg/day group (Dog No. 4, left eye)
Within normal limits

6) 眼科的検査においてみられた，雌の 50 mg/kg 群の結膜の炎症性浮腫および雄の 50 mg/kg 群の眼底異常はその頻度に用量依存性の関係がなく，いずれも偶発的な病変と考えられ，AM-715 によるものとは考え難い。

また，眼房水の生化学的検査でも，AM-715 による異常は認められず，眼球および視神経の組織像も正常であった。

7) 主要臓器の臓器重量において，対照群に比べ絶対重量と相対重量ともに有意差の認められたのは雌の 50 mg/kg 群の卵巣および子宮であった。しかしこれらの変動には用量依存性の関係はなく，組織上の異常も認められず，また，成犬において，これらの重量に個体差が大きいことは成書[5]にもしるされるところであり，AM-715 の影響によるものとは考え難い。

その他，絶対重量または相対重量のどちらか一方に有意差のあった臓器については，いずれの変動にも用量依存性の関係はなく，組織織像においても AM-715 による異常は認められなかった。

8) 病理学的検索において，薬物投与にのみ認められた病変，すなわち，雄の 25 および 100→200 mg/kg 群，雌の 25 mg/kg 群にみられた甲状腺のリンパ小節は，動物ではしばしば認められ，反応性のあるいは炎症性の細胞もみられないことから生理的な変化と考えられる。雌の 50 mg/kg 群に 1/4 例みられた甲状腺腫は，発生頻度は低く，用量依存性もなく，AM-715 に起因するものとは考え難い。

剖検時にも確認された雌の 100→200 mg/kg 群の小腸のうっ血は軽微なもので，AM-715 による特異的な病変とは考え難い。

また，雄の 100→200 mg/kg 群の 1/4 例に小腸のうっ血，膀胱結石および結石によると思われる膀胱粘膜の剝脱，右精巣の変性，精細管の壊死，右精巣上体の萎縮が剖検所見とともに認められたが，これらは 1 例にのみ出現したもので，偶発的なものと考えられ，AM-715 による影響とは言えない。また，この 1 例には腎，尿管に組織上の異常は見られず，腎機能にも障害は認められなかった。

9) AM-715 が高濃度に分布する肝，腎[6]の光顕像 (Photo 5～10) を示したが，いずれにも AM-715 による障害は認められなかった。

10) 以上の如く，ヒトの推定常用量の 8.3 倍から 16.7 倍量に相当する 100→200 mg/kg を高用量として以下 50 mg/kg, 25 mg/kg をビーグル犬に 13 カ月間連続経口投与したが，AM-715 による異常はいずれの検査においても認められず，AM-715 はイヌにおいて極めて低毒性であることが示された。

Table 14 Urinary findings in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Volume (ml/24 hr)	pH	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)	CRNN (mg/dl)
Male	Control	4	83±28	6.5±0.7	162.0±81.4	162.5±32.2	178.8±31.8
	25	4	165±86	6.3±0.5	81.8±17.3	128.3±73.4	148.8±72.4
	50	4	110±12	6.0±0.0	86.5±12.0	109.5±22.9*	159.5±17.7
	100→200	4	82±39	6.1±0.3	141.5±43.4	192.5±71.3	234.7±83.3
Female	Control	4	160±83	6.5±0.6	72.0±16.1	101.0±28.6	140.5±51.7
	25	4	146±30	6.8±0.5	75.0±13.1	95.3±10.2	120.5±29.1
	50	4	97±30	6.9±0.6	64.0±13.3	99.8±36.2	185.7±75.3
	100→200	4	104±23	6.5±0.4	59.0±22.5	80.5±27.1	174.9±45.4

	Dose (mg/kg/day)	No. of dogs	Protein			Glu	Ket	O-bl			BIL			Uro	
			−	±	+	−	−	−	±	+	−	±	+	±	+
Male	Control	4	0	3	1[a)]	4	4	4	0	0	0	2	2	1	3
	25	4	0	3	1	4	4	4	0	0	4	0	0	2	2
	50	4	0	3	1	4	4	4	0	0	0	3	1	1	3
	100→200	4	0	3	1	4	4	4	0	0	1	0	3	1	3
Female	Control	4	1	3	0	4	4	4	0	0	2	1	1	0	4
	25	4	0	4	0	4	4	3	0	1	3	1	0	1	3
	50	4	0	3	1	4	4	3	1	0	4	0	0	0	4
	100→200	4	0	4	0	4	4	3	0	1	4	0	0	1	3

a): Number of dogs *: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 15 Absolute organ weight in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

(g)

Dose (mg/kg/day) No. of dogs	Control 4	25 4	50 4	100→200 4
Final body weight (kg)	11.8 ± 1.6[a)]	13.4 ± 1.6	12.7 ±0.6	12.4 ± 1.8
Brain	83.8 ±12.7	87.3 ±10.0	89.5 ±6.0	95.0 ± 7.6
Hypophysis (mg)	69.0 ± 7.6	75.8 ±14.4	78.0 ±9.5	72.5 ± 6.0
Submandibular gland	12.67± 4.44	14.06± 1.91	14.61±2.23	13.58± 1.28
Thyroid	0.88± 0.28	1.04± 0.28	1.07±0.30	0.96± 0.17
Thymus	3.52± 1.81	5.08± 2.47	6.23±2.87	3.59± 1.17
Heart	86.8 ±11.4	104.3 ±19.3	97.5 ±5.4	104.5 ±13.9
Lung	76.8 ±16.4	85.3 ± 9.8	82.3 ±5.7	82.0 ± 8.7
Liver	300.5 ±28.1	332.8 ±46.8	335.3 ±9.7	345.8 ±37.3
Pancreas	24.5 ± 3.3	29.5 ± 5.5	28.8 ±4.9	26.0 ± 3.6
Caecum	8.46± 1.04	8.55± 1.74	10.42±0.66*	9.70± 1.60
Caecum (with contents)	11.87± 4.08	12.83± 3.53	14.19±3.86	15.13± 4.40
Spleen	25.8 ± 4.3	30.3 ± 7.9	29.3 ±4.3	30.3 ± 3.0
Adrenal gland	1.31± 0.39	1.32± 0.78	1.35±0.34	1.33± 0.24
Kidney	54.5± 6.8	55.3 ± 2.2	50.0 ±3.46	49.8 ± 8.46
Testis	13.98± 1.87	15.19± 4.71	17.47±2.41	16.91± 1.10*
Epididymis	3.40± 0.59	3.70± 0.81	3.88±0.73	3.99± 1.09
Prostate	8.19± 1.54	8.13± 1.61	8.34±3.55	7.81± 1.20

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 16 Absolute organ weight in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

(g)

Dose (mg/kg/day) No. od dogs	Control 4	25 4	50 4	100→200 4
Final body weight (kg)	10.7 ± 2.6	10.0 ± 1.2	11.5 ± 2.3	10.1 ± 1.2
Brain	74.5 ± 4.8	84.8 ±10.8	86.0 ± 5.0*	89.3 ± 5.3*
Hypophysis (mg)	70.0 ± 2.6	79.5 ±14.6	86.0 ±15.1	74.5 ±16.3
Submandibular gland	9.91± 1.82	10.58± 0.39	9.66± 1.56	9.85± 1.37
Thyroid	0.94± 1.59	0.81± 0.12	1.09± 0.21	0.89± 0.21
Thymus	7.67± 5.29	4.16± 1.54	4.91± 3.01	3.88± 0.65
Heart	79.8 ±14.9	82.3 ± 7.1	79.3 ±12.7	81.5 ±14.5
Lung	60.8 ± 8.2	66.8 ± 5.9	64.5 ± 2.5	67.3 ± 6.3
Liver	274.5 ±91.8	281.8 ±17.0	348.0 ±58.6	287.8 ±10.6
Pancreas	23.5 ± 3.9	24.3 ± 4.3	26.0 ± 2.9	25.3 ± 3.5
Caecum	7.36± 0.51	6.92± 1.01	9.27± 1.67	7.54± 0.86
Caecum (with contents)	8.07± 0.98	9.22± 2.62	13.78± 3.99	12.55± 9.65
Spleen	21.8 ± 2.2	28.5 ± 5.1	28.0 ± 2.9*	23.3 ± 5.6
Adrenal gland	1.39± 0.24	1.37± 0.18	1.40± 0.22	1.44± 0.09
Kidney	41.5 ± 6.4	42.3 ± 3.8	47.0 ± 3.6	47.3 ± 3.7
Ovary	0.82± 0.40	0.98± 0.29	1.95± 0.53*	1.05± 0.09
Uterus	4.75± 3.08	6.01± 3.04	15.78± 7.62*	8.93± 7.50

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 17 Relative organ weight in male dogs orally treated with AM-715 for 13 months

(g/kg b.w.)

Dose (mg/kg/day) No. of dogs	Control 4	25 4	50 4	100→200 4
Brain	7.127±0.417	6.560±0.608	7.072±0.780	7.829±1.775
Hypophysis (mg/kg)	5.985±1.244	5.719±1.127	6.158±0.878	5.963±1.217
Submadnibular gland	1.078±0.362	1.052±0.051	1.155±0.214	1.115±0.225
Thyroid	0.074±0.016	0.077±0.014	0.084±0.025	0.078±0.014
Thymus	0.302±0.169	0.367±0.160	0.488±0.216	0.293±0.098
Heart	7.450±1.160	7.798±1.043	7.682±0.403	8.454±0.893
Lung	6.574±1.502	6.401±0.447	6.497±0.697	6.639±0.573
Liver	25.87 ±3.79	25.51 ±6.85	26.46 ±1.81	28.24 ±4.66
Liver/Brain ratio	3.628±0.485	3.882±0.936	3.759±0.281	3.663±0.543
Pancreas	2.103±0.315	2.215±0.356	2.263±0.347	2.099±0.196
Caecum	0.723±0.066	0.638±0.087	0.824±0.091	0.779±0.054
Caecum (with contents)	1.029±0.397	0.987±0.379	1.115±0.280	1.215±0.309
Spleen	2.205±0.390	2.287±0.604	2.300±0.282	2.497±0.601
Adrenal gland	0.110±0.019	0.100±0.013	0.106±0.026	0.110±0.034
Kidney	4.732±0.992	4.177±0.460	3.948±0.393	4.030±0.652
Testis	1.192±0.097	1.117±0.246	1.376±0.186	1.387±0.245
Epididymis	0.289±0.028	0.275±0.040	0.304±0.047	0.330±0.105
Prostate	0.698±0.093	0.611±0.108	0.655±0.266	0.631±0.081

Table 18 Relative organ weight in female dogs orally treated with AM-715 for 13 months

(g/kg b.w.)

Dose (mg/kg/day) No. of dogs	Control 4	25 4	50 4	100→200 4
Brain	7.260± 1.791	8.446±0.128	7.752±1.747	8.940±0.999
Hypophysis (mg/kg)	6.806±1.524	7.914±0.844	7.579±1.082	7.457±1.715
Submandibular gland	0.946±0.199	1.065±0.113	0.885±0.289	0.977±0.046
Thyroid	0.089±0.016	0.082±0.014	0.097±0.024	0.089±0.022
Thymus	0.665±0.272	0.411±0.136	0.456±0.337	0.390±0.090
Heart	7.523±0.857	8.346±1.686	7.108±1.694	8.080±0.926
Lung	5.780±0.759	6.685±0.451	5.802±1.219	6.739±0.933
Liver	25.36 ±3.60	28.32 ±2.84	30.60 ±3.84	28.89 ±3.72
Liver/Brain ratio	3.707±1.324	3.355±0.354	4.080±0.893	3.230±0.156
Pancreas	2.230±0.306	2.481±0.718	2.300±0.280	2.550±0.577
Caecum	0.709±0.133	0.696±0.111	0.824±0.165	0.760±0.151
Caecum (with contents)	0.771±0.122	0.926±0.251	1.262±0.498	1.300±1.095
Spleen	2.116±0.538	2.871±0.627	2.480±0.287	2.288±0.335
Adrenal gland	0.132±0.223	0.138±0.027	0.123±0.019	0.144±0.011
Kidney	3.934±0.433	4.227±0.197	4.178±0.583	4.711±0.292*
Ovary	0.079±0.044	0.098±0.029	0.169±0.036*	0.106±0.019
Uterus	0.463±0.342	0.607±0.338	1.341±0.557*	0.919±0.839

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

Table 19 Macroscopic findings in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Dose (mg/kg/day)	Control		25		50		100→200	
No. of dogs	Male 4	Female 4	Male 4	Female 4	Male 4	Female 4	Male 4	Female 4
Liver								
Discoloration (Slight yellowish)	0[a)]	1	0	0	0	0	0	0
Small intestine								
Congestion	0	0	0	0	0	0	1	1
Retention of bile	0	1	0	0	0	0	0	0
Large intestine								
Hemorrhage and congestion	0	1	0	0	0	0	0	0
Mammary gland								
Thickening	0	1	0	0	0	0	0	0
Root of tongue								
Bulla (Opague jelly-like)	1	0	0	0	0	0	0	0
Kidney								
Aplasia of right kidney	0	0	0	0	0	0	1	0
Urinary bladder								
Vesical calculus (Size: 0.5–5mm, about 30 pieces)	0	0	0	0	0	0	1	0
Testis								
Degeneration (Right)	0	0	0	0	0	0	1	0
Epididymis								
Atrophy (Right)	0	0	0	0	0	0	1	0
Nictitating membrane								
Swelling and hyperemia	0	0	0	0	0	1	0	0

a): Number of dogs

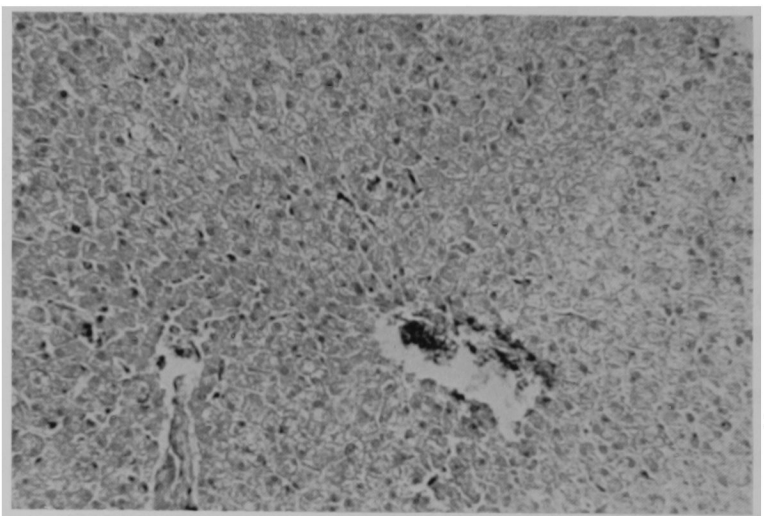


Photo 5 The liver of a male dog in control group (Dog No. 3)
Within normal limits (Light micrograph: LM, H&E, ×140)

Photo 6 The liver of a male dog in 50 mg/kg/day group (Dog No. 4)
Within normal limits (LM, H&E, ×140)

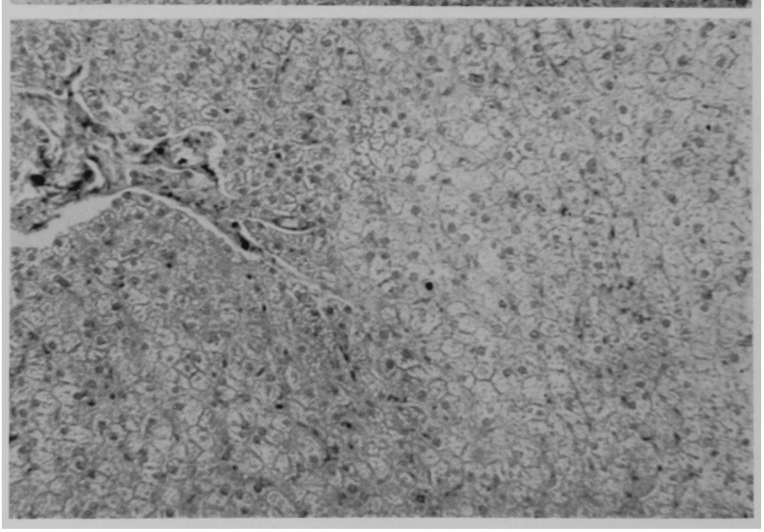


Photo 7 The liver of a male dog in 100→200 mg/kg/day group (Dog No. 3)
Within normal limits (LM, H&E, ×140)

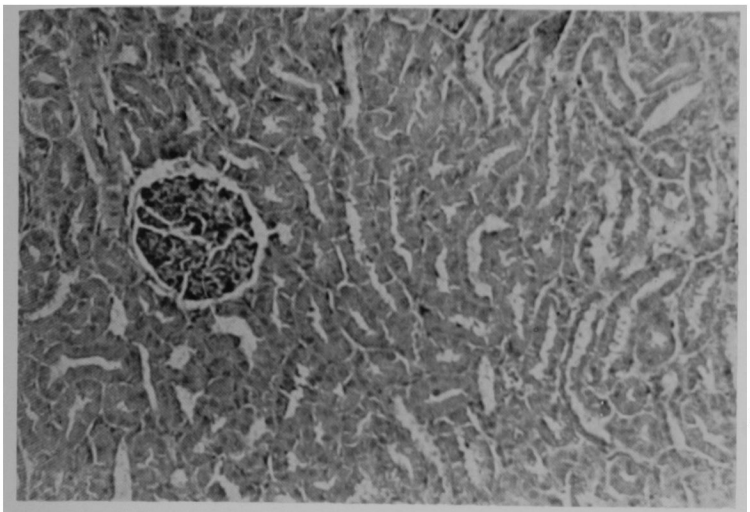


Photo 8 The kidney of a male dog in control group (Dog No. 4)
Within normal limits (LM, H&E, ×140)

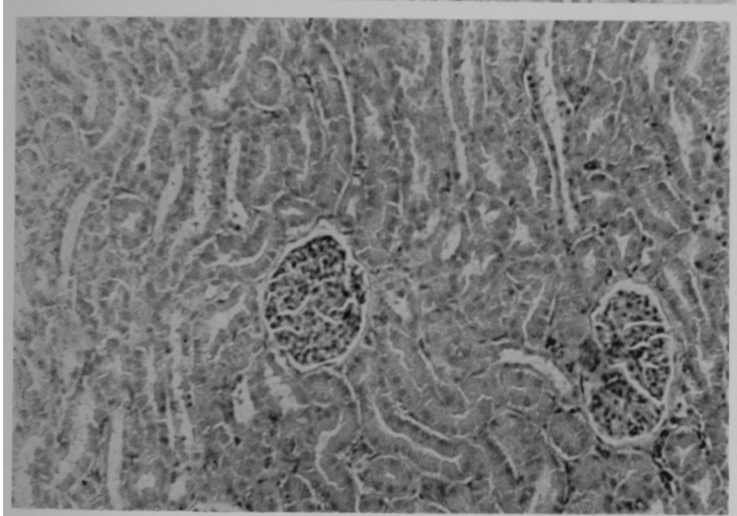


Photo 9 The kidney of a male dog in 50 mg/kg/day group (Dog No. 4)
Within normal limits (LM, H&E, ×140)

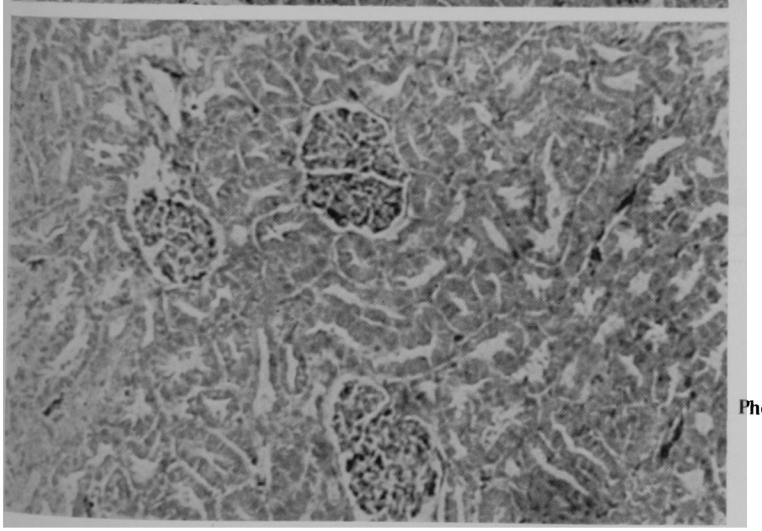


Photo 10 The kidney of a male dog in 100→200 mg/kg/day group (Dog No. 4)
Within normal limits (LM, H&E, ×140)

Table 20 Microscopic findings in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

Dose (mg/kg/day)	Control		25		50		100→200	
No. of dogs	Male 4	Female 4	Male 4	Female 4	Male 4	Female 4	Male 4	Female 4
Hypophysis								
Cyst in anterior lobe	0[a)]	1	1	0	1	0	0	0
Thyroid								
Lymph nodules among follicles	0	0	1	1	0	0	1	0
Struma	0	0	0	0	0	1	0	0
Salivary gland								
Cellular infiltration locally	2	1	1	3	2	0	0	0
Mammary gland								
Hypertrophy, Lactation-like	0	1	0	0	0	0	0	0
Small intestine								
Congestion	0	0	0	0	0	0	1	1
Large intestine								
Hemorrhage	0	1	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder								
Exfoliation of epithelial cells locally	0	0	0	0	0	0	1	0
Testis								
Necrosis of seminiferous tubules	0	–	0	–	0	–	1	–

a): Number of dogs

Table 21 Myelogram in dogs orally treated with AM-715 for 13 months

(%)

	Dose (mg/kg/day)	Control	25	50	100→200
	No. of dogs	4	4	4	4(3[a])
Male	Blast cells	0.58±0.52	0.56±0.15	0.31±0.27	0.48±0.41
	Young neutrophilic G.	15.21±1.64	15.48±3.17	15.08±1.97	13.38±2.39
	Old neutrophilic G.	9.01±1.56	9.35±4.40	9.49±3.01	9.40±2.46
	Eosiniphilic G.	1.12±0.91	0.41±0.32	0.93±0.76	1.03±0.84
	Basophilic G.	0.25±0.17	0.48±0.42	0.73±0.34*	0.64±0.59
	Erythroid cells	72.01±1.90	71.79±1.98	71.32±2.25	73.08±1.80
	Lymphocytes	1.02±0.51	1.04±0.57	1.25±0.55	1.03±0.39
	Megakaryocytes	0.00±0.00	0.08±0.16	0.00±0.00	0.00±0.00
	Others	0.82±0.58	0.82±0.45	0.88±0.97	0.95±0.68
	Total G.	26.16±1.35	26.27±1.78	26.55±1.44	24.93±0.98
	G/E ratio	0.36±0.03	0.37±0.04	0.37±0.03	0.34±0.02
Female	Blast cells	1.05±0.58	0.91±0.89	1.00±0.28	0.31±0.32
	Young neutrophilic G.	14.87±1.31	13.14±1.93	17.79±3.71	15.92±2.91
	Old neutrophilic G.	8.94±0.98	9.25±3.95	6.48±3.44	12.32±1.57*
	Eosinophilic G.	1.17±1.12	1.69±0.83	1.42±0.41	1.58±0.83
	Basophilic G.	1.20±0.44	0.38±0.15*	0.33±0.28*	0.63±0.01
	Erythroid cells	70.95±1.03	72.06±3.45	70.56±2.09	67.13±2.37*
	Lymphocytes	1.07±0.68	1.74±0.80	1.09±0.33	1.47±0.96
	Megakaryocytes	0.00±0.00	0.00±0.00	0.08±0.16	0.00±0.00
	Others	0.77±0.60	0.84±0.38	1.25±0.30	0.63±0.32
	Total G.	27.21±0.71	25.37±2.95	27.03±2.19	30.76±1.68*
	G/E ratio	0.38±0.01	0.36±0.06	0.38±0.04	0.46±0.04

a): Female group

G: granulocytes

*: Significant difference from control ($p<0.05$)

文　献

1) CINTI, D. L.; P. MOLDEUS & J. B. SCHENKMAN: Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca^{++}-sedimented microsomes from rat liver. Biochem. Pharmacol. 21: 3249～3256, 1972
2) IMAI, Y.; A. ITO & R. SATO: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. J. Biochem. (Tokyo) 60: 417～428, 1966
3) NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55: 416～421, 1953
4) OMURA, T. & R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239: 2370～2378, 1964
5) 福井正信，友田　勇，上田　雄，編：実験用ビーグルの研究—その繁殖，成長，薬理，生理，疾病．ソフトサイエンス社 (東京)，1976
6) 永津芳雄，遠藤恭平，入倉　勉：^{14}C 標識 AM-715 による体内動態に関する研究。Chemotherapy 29 (S-4): 105～118, 1981

TOXICOLOGICAL STUDIES OF AM-715
V. CHRONIC TOXICITY STUDY IN DOGS

TSUTOMU IRIKURA
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

TSUTOMU SUGIMOTO, SHIGERU IMAI, TAKEO IKEDA, HIROBUMI TANASE and KAZUMI KANDA
Technical Center of Development, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Chronic toxicity study of 1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid (AM-715), a new synthetic antibacterial agent, was carried out in male and female beagle dogs. AM-715 was orally administered once a day at dose levels of 25, 50 and 100→200 mg/kg/day for 13 months. In the highest dose group, AM-715 was administered at dose level of 100 mg/kg/day for the initial 10 months and 200 mg/kg/day for the last 3 months.

Whitish feces was observed in a dose-related manner. No other changes were observed in gross behavior. Body weight gain was rather greater in the AM-715 treated groups than in the control groups.

In serum biochemical examination, slight increase in GPT activity was observed in all female groups, and sometimes accompanied with slight increase in GOT or ALP activity. But these changes were not dose-dependent and the other examinations, especially serum bilirubin level, BSP test, histological findings of the liver and hepatic enzymes, showed no evidence for the liver damage in all dogs. Hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes were not affected with AM-715 treatment.

Hematological examination and myelogram showed no drug-related changes. Urinalysis, PSP test and renal ATPase activity examination did not show any evidence for renal damage in all groups. Electrocardiogram and cardiac ATPase and CPK activity showed no drug-related changes in the heart. In ophthalmological examination and biochemical examination of aqueous humor, no dose-dependent changes were observed.

In both absolute and relative organ weight, the increases of the weights of ovaries and the uterus in the 50 mg/kg/day group were observed, but dose-dependent relationship was not revealed and it is well-known that these organs weight have large variation in each animal. Pathological examination showed the struma in a female dog received 50 mg/kg/day and congestion of the small intestine, calculi in the urinary bladder, degeneration and necrosis of the testis and atrophy of the epididymis in a male dog received 100 → 200 mg/kg/day. In this male dog, no organic or functional abnormality of the kidney was observed.

From these results, it is suggested that AM-715 has little toxic effect on dogs.