

AT-2266 の毒性学的研究

第2報 ラットにおける亜急性ならびに慢性毒性試験

竹本勇一・仙田博美・中野幸穂・山添浩史
山吉迪子・松岡信男・大西久美雄・吉田耕一
大日本製薬株式会社総合研究所

新しい合成抗菌性物質 AT-2266 の亜急性および慢性毒性をラットを用いて検討した。投与量は亜急性毒性試験では 120, 600 および 3,000 mg/kg/日, 慢性毒性試験では 60, 300 および 1,500 mg/kg/日でそれぞれ 1 および 6 カ月間強制経口投与した。その結果, 以下の成績を得た。

- 1) 両試験ともに薬物投与による中毒死はなかった。一般症状では両試験の高用量群と亜急性毒性試験の中用量群の雄で軟便がみられた。
- 2) 両試験の高用量群の雄で体重増加抑制がみられた。
- 3) 用量依存性を示す盲腸重量の増加が両試験でみられた。
- 4) 関節軟骨における水泡様物の形成が両試験の中および高用量群の一部の動物に認められた。
- 5) 腎尿管上皮の軽度な剝離と水腫変性が亜急性毒性試験の高用量群の一部にみられた。
- 6) 精巣の萎縮性の変化および精巣上体管腔内に変性精細胞の出現が両試験の高用量群で認められた。
- 7) 盲腸重量および精巣, 精巣上体の変化は, 慢性毒性試験での休薬 1 カ月後には回復ないし軽減された。

以上より, AT-2266 の無作用量は亜急性毒性試験においては 120 mg/kg/日であり, 慢性毒性試験においては 60 mg/kg/日であると考えられる。

AT-2266 は広範囲の抗菌スペクトラムを有するピリドンカルボン酸系の新しい合成抗菌性物質である。本化合物の毒性試験の一環として, その亜急性ならびに慢性毒性をラットを用いて検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 実験動物および飼育条件

日本クレア(株)から購入した Jcl: SD 系の雌雄ラットを約 2 週間予備飼育し, 6 週齢に達してから投与を開始した。飼育は温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 1 日 12 時間の人工照明(午前 6 時~午後 6 時)とした barrier system の動物室で行い, 動物は 1 ケージに 1 匹ずつ収容し, 蒸気滅菌した固型飼料(日本クレア製 CE-2)と水道水を自由に摂らせた。1 群の動物数は亜急性毒性試験では雌雄それぞれ 10 匹, 慢性毒性試験では雄 18 匹, 雌 16 匹とし, 後者の試験では 6 カ月間の投与終了後, 雄では各群の 8 匹(一部は 7 匹), 雌では 6 匹(一部は 5 匹)を休薬してさらに 1 カ月間観察した(以下回復群と略)。

2. 投与方法および実験群

本試験における投与経路は臨床適用予定経路と同じ経口投与とした。

投与量は予備試験の成績, 本物質の物理化学的性質お

よび有効性を考慮して決定した。すなわち, 若齢(4 週齢)の雌ラットを用いた 1 カ月投与の予備試験(投与量: 100, 300, 1,000 および 3,000 mg/kg/日)において 3,000 mg/kg 群の 1/6 例が中毒死した。一方, 本物質は 0.2% Carboxymethylcellulose (CMC) 水溶液で高濃度の懸濁液を調製して保存すると粘稠性が増すために, 本物質の 15% 懸濁液が経口投与針による反復投与の限界であった。これらの事実から亜急性毒性試験の高用量として, 容量的に投与可能な最大量(体重 100 g 当り 2 ml)であり, かつ確実な中毒作用の発現が予測される 3,000 mg/kg/日を設定した。また慢性毒性試験の高用量は体重が増加しても容量的に投与が可能であり, かつ明瞭な毒性変化の発現が予測される 1,500 mg/kg/日とした。中用量, 低用量として亜急性毒性試験では 600 mg/kg/日, 120 mg/kg/日を, 慢性毒性試験では 300 mg/kg/日, 60mg/kg/日を設定した。低用量は推定臨床用量のそれぞれ約 10 倍, 5 倍に相当する。

被験物質は当社技術部で合成された AT-2266 無水物で, 品質基準に適合したものである。被験物質の調製は 0.2% CMC 水溶液を用いて 1 週毎に行い, 亜急性毒性試験においては 1 カ月間, 慢性毒性試験においては 6 カ

月間、1日1回、週7回、反復強制経口投与した。投与容量は亜急性毒性試験の120および600 mg/kgでは体重100 g当り0.5 ml、3,000 mg/kgでは2.0 ml、慢性毒性試験ではいずれの実験群においても体重100 g当り1.0 mlとなるように濃度を調整した。なお対照群には0.2% CMC 水溶液のみを同様に与えた。

3. 検査項目

1) 一般症状、体重および飼料摂取量

試験期間中は死亡例の確認を毎日行った。一般症状の観察、体重および飼料摂取量の測定は亜急性毒性試験では投与6日までは毎日、その後は3日毎に、慢性毒性試験では投与7日までは毎日、その後は週2回行った。また回復群においても雄で9日目まで、雌で7日目まで毎日、その後は週2回行った。

2) 飲水量

試験期間中定期的に24時間の飲水量を測定した。

3) 尿検査

亜急性毒性試験では投与2週および4週目に、慢性毒性試験では投与1週、1カ月、3カ月、6カ月および休薬4週目にラット用代謝ケージで24時間尿を個別に採取した。尿の外観を記録し尿量を測定した後、尿蛋白をLowry法で、 Na^+ 、 K^+ および Cl^- をTechnicon AutoAnalyzer Basic Typeで測定した。さらに慢性毒性試験では放尿直後の尿のpHを測定(東洋テストペーパー)した。なお、AT-2266はLowry法による測定でpseudoreactionを示すため尿をSephadex G-25により前処理しAT-2266を尿中より除去した後同法により測定した。

4) 血液学的検査

剖検前に断尾により採血し、次の検査を行った:赤血球数、白血球数、血小板数(以上TOA Microcell-counter)、ヘマトクリット値(毛細管遠心法)、血色素量(シアンメトヘモグロビン法)、白血球百分比(ギムザ染色)および慢性毒性試験では網状赤血球数(Kämerer法)。また剖検当日、クエン酸ナトリウム処理下に心臓採血しプロトロンビン時間(PT, Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, Proctor法)を測定した。

5) 血液生化学的検査

剖検直前に無麻酔下で眼窩静脈より少量の血液を採取し、次いでペントバルビタールナトリウム麻酔下で心臓から全採血した。眼窩静脈より採取した血液については全血中の血糖をFerricyanide法で測定し、心臓採血により得た血漿については Ca^{++} 、無機磷、尿素窒素、クレアチニン、総コレステロール、総蛋白、アルブミン、総

ビリルビン、アルカリフォスファターゼ(AI-P)、GOTおよびGPTをTechnicon AutoAnalyzer SMA 12/60で、 Na^+ 、 K^+ および Cl^- をTechnicon AutoAnalyzer Basic Typeで測定した。ただし慢性毒性試験の投与終了直後に剖検する群ではGOTおよびGPTをReitman-Frankel法で測定した。

6) 眼科学的検査

投与6カ月目に雄の全例について無麻酔下でミドリリンP(参天製薬)を点眼して散瞳させた後、両眼について角膜、虹彩、水晶体などを細隙灯顕微鏡(Kowa SL型)により検査した。さらに対照群と1,500 mg/kg群の全例については眼底カメラ(Kowa RC-2型)で眼底検査を行った。

7) 剖検および病理組織学的検査

投与終了時および回復期間終了時に心臓採血により致死させて剖検した。内景および外景を精査し、主な臓器の重量を測定した。病理組織学的検査は10%ホルマリン固定臓器のパラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて以下の組織について実施した:心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、脳、顎下腺、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、精巣、精巣上体、精のう、前立腺、卵巣、子宮、胃、十二指腸、空腸、回腸(亜急性の雌雄と慢性の雌)、盲腸、結腸(亜急性の雌雄と慢性の雌)、直腸(慢性の雄のみ)、膀胱、大腿骨およびその骨髄、坐骨神経(慢性の雄のみ)、乳腺を含む皮膚、大腿部の骨格筋、横隔膜(亜急性のみ)、大動脈、腸間膜のリンパ節(亜急性のみ)および眼球。また慢性毒性試験の投与終了時に剖検した動物についてはソフテックス(ソフテックス社製CMB型)を用いて大腿骨および上腕骨の軟X線写真を撮影し骨の成長に対する影響を検討した。

8) AT-2266の血漿中濃度および尿中排泄量の測定

(1)亜急性毒性試験および慢性毒性試験の投与終了時の剖検群は最終投与後に2分し、一方は1時間後、他方は24時間後に採血して血漿中薬物濃度を下記の蛍光法により測定した。さらに亜急性毒性試験における毒性発現と血漿中薬物濃度の関連を知る目的でAT-2266の600および3,000 mg/kg/日を本試験と同様に1カ月間、雄ラット(1群50匹)に経口投与し投与初日と1カ月目の血漿中AT-2266濃度の推移を経時的に測定した。慢性毒性試験に際しては3および6カ月目の尿検査時に採取した24時間の蓄尿中のAT-2266未変化体およびグルクロン酸抱合体の量を蛍光法により測定した。グルクロン酸抱合体の量は β -glucuronidase(シグマ社製、最終濃度125 U/ml)により、pH 7.0、37°Cで24時間消化した後AT-2266の測定値と未変化体の測定値との差により

Table 1 Hematological findings in rats receiving AT-2266 for one month

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Erythrocyte ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Platelet ($10^3/\text{mm}^3$)	PT (sec)	
Male	Control	10	822±13.2	16.0±0.30	49.7±0.54	739±52.6	16.6±0.39(10)	
	120	10	829±24.4	15.7±0.19	50.0±0.65	757±28.2	17.7±0.39(10)	
	600	10	853±18.2	16.1±0.22	51.2±0.55	748±18.7	16.6±0.31(10)	
	3,000	9	845±22.3	15.2±0.39	48.4±0.84	696±43.4	17.1±0.28(8)	
Female	Control	10	842±23.8	15.5±0.33	49.8±0.55	866±25.5	16.3±0.83(10)	
	120	10	790±7.1	15.5±0.21	49.2±0.81	892±43.6	16.8±0.74(10)	
	600	10	794±12.9	15.1±0.29	48.7±0.68	811±36.7	15.6±0.32(10)	
	3,000	10	855±24.4	15.5±0.19	48.9±0.37	839±38.9	15.5±0.96(9)	

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	APTT (sec)	Leucocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	Differential leucocyte count (%)				
					Bas	Eos	Neu	Lym	Mon
Male	Control	10	21.2±0.29(9)	179±11.9	0	0.5	9.9	85.3	4.3
	120	10	20.7±0.45(8)	172±8.5	0	0.8	10.0	85.8	3.4
	600	10	19.7±0.32(9)	165±6.5	0	0.9	12.9	82.7	3.5
	3,000	9	20.3±0.38(8)	209±26.0	0	0.3	21.9	74.6	3.2
Female	Control	10	24.2±1.25(9)	150±5.7	0	2.1	9.9	85.5	2.5
	120	10	24.1±1.31(10)	141±4.9	0	2.4	7.5	88.4	1.7
	600	10	25.8±1.73(9)	149±8.6	0	1.5	6.6	89.8	2.1
	3,000	10	24.9±1.04(9)	146±5.8	0	0.7	10.6	87.5	1.2

Mean±S. E.

Abbreviations used are: PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; Bas, basophile; Eos, eosinophile; Neu, neutrophil; Lym, lymphocyte; Mon, monocyte.

Numerals in parentheses represent number of examined animals.

求めた。

(2) 蛍光法による AT-2266 の測定

試料 0.1~0.5 ml に 1N 塩酸 0.3 ml と水を加えて 3 ml とし、クロロホルム 5 ml とよく混和したのち 3,000 r.p.m. 10 分間遠心分離した。次いで水層 2.0 ml を試験管にとり、これに 1N カセイソーダ 0.2 ml と 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 1.0 ml を加えて中性にもどしたのち、1% 無水酢酸含有クロロホルム 5.0 ml を加えて振盪し、AT-2266 をアセチル化してクロロホルム層に移行させ、3,000 r.p.m., 10 分間の遠心分離を行い、クロロホルム

層の蛍光を励起波長 350 nm, 蛍光波長 400 nm で測定した。

II. 実験成績

1. 亜急性毒性試験

1) 一般症状

いずれの群においても試験期間を通じて薬物による中毒死はなかった。一般症状では 3,000 mg/kg 群の雄で軟便が投与期間中頻繁にみられ、投与時には流涎も観察された。同群の雌と 600 mg/kg 群の雌においても軟便が投与初期にみられた。そのほか特に変化はなかった。

2) 体重, 飼料摂取量および飲水量

体重の増加曲線を Fig. 1 に示した。3,000 mg/kg 群の雄で投与期間を通じて有意な体重増加抑制がみられたが, 雌では逆に対照群をやや上回る傾向を示した。

摂餌量は600および3,000 mg/kg 群の雄で投与初日に減少したが, 600 mg/kg 群では2日目以降対照群と同程度に回復した。一方, 3,000 mg/kg 群では投与期間中対照群よりわずかに下回った。

飲水量は雌雄ともに600 mg/kg 以上の群で増加傾向を示した。

3) 尿検査

600 mg/kg 以上の投与群では24時間蓄尿中に微細な白色結晶状物質が沈澱していた。このものは質量スペクトル分析の結果, AT-2266 そのものであった。またこれらの群では Na^+/K^+ 比の低下もみられた。

4) 血液学的検査

Table 1 に結果をまとめた。3,000 mg/kg 群の雄で白血球数の増加傾向がみられたがこれは好中球の増加を反映したものであった。リンパ球百分の減少はこの好中球の増加に伴うもので, 絶対数の変化はなかった。その他の項目には異常はみられなかった。

5) 血液生化学的検査

Table 2 に示すように3,000 mg/kg 投与群の雄で Ca^{++} の減少, 尿素窒素および A/G 比の増加, 同群の雌雄で総蛋白の減少ないしその傾向がみられた。その他の項目には薬物による影響はなかった。

6) 臓器重量

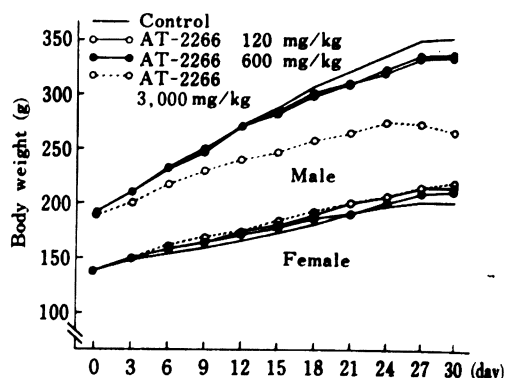
臓器重量 およびその体重比をそれぞれ Table 3-1 と 3-2 に示した。盲腸は雌雄ともに実重量, 体重比が用量に依存して増加した。雄については600 mg/kg 以上の群で心臓, 肝臓および脾臓の実重量と肝臓の体重比の減少が, また3,000 mg/kg 群で腎臓, 脳, 肺, 顎下腺, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 精巣上体, 精のうおよび前立腺の実重量と胸腺, 精のうおよび前立腺の体重比の減少, 脳, 肺, 下垂体, 副腎および精巣で体重比の増加がみられた。雌については600 mg/kg 以上の群の心臓および肝臓の体重比の減少, および3,000 mg/kg 群で甲状腺の実重量の増加と脳の体重比の減少がみられた。

7) 剖検および病理組織学的検査

剖検時, 盲腸の拡張が用量依存性にみられ, また実体顕微鏡下に大腿骨あるいは上腕骨の関節軟骨における水泡または糜爛の形成が600 mg/kg 群の雄1例, 雌2例, 3,000 mg/kg 群の雄1例, 雌4例にみられた。そのほか肉眼的には薬物によると思われる異常所見はなかった。

病理組織学的所見を Table 4 に総括した。3,000 mg/

Fig. 1 Body weight changes in male and female rats receiving AT-2266 for one month



kg 投与の雌雄の一部に腎尿細管上皮細胞の軽度な剝離と水腫変性がみられ, 雄ではさらに腎尿細管腔の拡張, 肝細胞の萎縮, 盲腸粘膜の水腫または糜爛, 精細管の萎縮 (Photo. 1, 2), 精巣上体管腔内に変性または壊死した精細胞 (Photo. 3, 4) の出現などが一部の例に観察された。600 mg/kg 以下の投与量では何ら異常はみられなかった。

8) 血漿中薬物濃度

最終投与1時間後と24時間後の血漿中 AT-2266 濃度は Table 5 に示すとおりであって血漿中濃度は各用量群とも雌より雄の方が高く, 高用量群ほどその差は大であった。600および3,000 mg/kg/日を雌ラットに投与したときの初回投与時と1カ月間反復投与後の血漿中 AT-2266 濃度の時間推移は Fig. 2 に示すとおりである。3,000 mg/kg 投与群の血漿中濃度は初回投与後に比べ, 1カ月投与後の方がやや高かった。600 mg/kg 投与群では反復投与後においてもこのような傾向は示さず, むしろ低かった。したがってこの用量範囲においては特に蓄積性を示すものではないと考える。3,000 mg/kg 群の1カ月後の血漿中濃度一時間曲線下面積 ($\text{AUC}_{0-24\text{hr}}$) は $432 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 生物学的半減期 ($t_{1/2}$) は 8.9 hr, 600 mg/kg 群ではそれぞれ $102 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 6.1 hr であった。

2. 慢性毒性試験

1) 一般症状

いずれの群にも試験期間を通じて薬物による死亡例はみられなかった。一般症状では1,500 mg/kg 投与の雄で投与初期に軟便が, 投与2週以降では投与時の流涎がみられた。流涎は同群の雌においても観察された。300 mg/kg 以下の群においては異常はみられなかった。

2) 体重, 飼料摂取量および飲水量

体重曲線を Fig. 3 に示した。投与16週以後, 1,500

Table 2 Blood biochemical findings in rats receiving AT-2266 for one month

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Glucose (mg/dl)	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	Inorganic phosphorus (mg/dl)	Urea nitrogen (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)										
Male	Control	10	95±1.6	9.8±0.07	8.1±0.29	19±1.1	0.7±0.03	76±4.2	5.0±0.10	2.7±0.07										
	120	10	94±1.4	9.7±0.07	7.8±0.32	19±1.0	0.7±0.03	72±2.7	5.0±0.05	2.8±0.03										
	600	10	90±3.4	9.9±0.09	8.4±0.37	20±0.5	0.8±0.02	76±4.3	5.0±0.07	2.8±0.05										
	3,000	9	95±5.7	9.4±0.09**	8.6±0.37	24±1.3**	0.7±0.03	78±3.9	4.7±0.12	2.7±0.07										
Female	Control	10	96±1.1	9.3±0.12	6.5±0.28	20±1.1	0.5±0.02	86±2.7	5.2±0.09	2.8±0.05										
	120	10	96±1.6	9.6±0.12	7.2±0.27	19±0.7	0.5±0.02	87±3.6	5.2±0.09	2.8±0.06										
	600	10	98±2.9	9.3±0.10	7.2±0.38	21±0.7	0.5±0.03	87±4.4	5.0±0.07	2.7±0.05										
	3,000	10	96±2.5	9.3±0.12	7.8±0.70	20±1.0	0.5±0.03	86±4.0	4.8±0.08**	2.6±0.07										
Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	A/G ratio	Total bilirubin (mg/dl)	Al-P (mU/ml)	GOT (mU/ml)	GPT (mU/ml)	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)	Cl ⁻ (mEq/l)										
											Control	10	1.19±0.038	0.07±0.008	243±16.2	144±21.4	15.1±4.97	144±0.6	4.1±0.14	101±0.8
											120	10	1.25±0.023	0.09±0.008	266±18.8	107± 6.1	10.7±3.41	144±0.6	3.8±0.13	100±0.4
											600	10	1.25±0.020	0.08±0.008	307±18.0*	123±12.3	11.5±3.71	145±0.6	3.9±0.12	100±0.4
3,000	9	1.36±0.033**	0.07±0.008	192±24.4	214±61.0	33.1±12.7	145±0.7	4.1±0.18	103±1.1											
Female	Control	10	1.14±0.032	0.11±0.005	186±17.6	152±17.6	9.6±0.99	145±0.5	3.6±0.12	105±0.6										
	120	10	1.17±0.017	0.10±0	169± 9.5	123± 9.7	10.0±2.69	146±0.4	3.5±0.06	104±0.5										
	600	10	1.19±0.037	0.10±0	240±26.1	148±16.9	11.6±2.26	147±0.4*	3.7±0.16	105±0.7										
	3,000	10	1.21±0.038	0.10±0	197±11.1	131±14.6	10.5±1.57	146±0.7	3.5±0.11	103±0.9										

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at p<0.05; **, p<0.01

Table 3-1 Absolute organ weights in rats receiving AT-2266 for one month

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Submaxillary gland (g)	Pituitary (mg)
Male	Control	10	1.09±0.029	1.22±0.030	15.0±0.44	2.56±0.044	0.75±0.033	1.86±0.019	0.59±0.015	11.5±0.45
	120	10	1.02±0.026	1.21±0.035	13.9±0.38	2.53±0.048	0.72±0.037	1.83±0.020	0.59±0.018	11.1±0.41
	600	10	0.98±0.024**	1.14±0.029	12.9±0.49**	2.46±0.091	0.65±0.028*	1.85±0.028	0.58±0.016	11.4±0.45
	3,000	9	0.79±0.017**	0.96±0.032**	10.3±0.43**	2.10±0.061**	0.56±0.046**	1.74±0.026**	0.44±0.020**	9.9±0.26**
Female	Control	10	0.76±0.024	0.94±0.019	8.7±0.27	1.60±0.045	0.52±0.016	1.73±0.014	0.43±0.011	14.1±0.61
	120	10	0.79±0.024	0.99±0.027	9.2±0.34	1.74±0.055	0.51±0.019	1.75±0.032	0.46±0.013	15.0±0.73
	600	10	0.72±0.013	0.93±0.032	8.2±0.29	1.65±0.040	0.53±0.031	1.71±0.027	0.44±0.012	14.2±0.44
	3,000	10	0.72±0.017	0.96±0.021	8.1±0.26	1.69±0.037	0.56±0.039	1.74±0.024	0.44±0.013	14.0±0.65
Male	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epididymis (g)	Seminal vesicle (g)	Prostate (g)	Cecum (g)
			20.4±0.81	0.48±0.014	53±3.2	3.14±0.238	0.88±0.032	1.32±0.065	0.52±0.035	7.8±0.50
			19.2±1.32	0.43±0.030	55±2.2	3.48±0.068	0.92±0.021	1.14±0.080	0.47±0.033	11.5±1.11**
			19.3±0.56	0.43±0.026	54±2.1	3.23±0.057	0.87±0.021	1.15±0.067	0.44±0.033	20.1±1.19**
3,000	9	15.2±0.81**	0.22±0.033**	56±3.1	3.00±0.133	0.67±0.037**	0.73±0.086**	0.29±0.047**	22.9±1.31**	
Female	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epididymis (g)	Seminal vesicle (g)	Prostate (g)	Cecum (g)
			14.7±0.47	0.40±0.021	64±2.7	83±2.5	0.52±0.027	0.52±0.027	0.52±0.027	4.5±0.24
			15.8±0.73	0.42±0.027	69±3.1	99±5.2*	0.52±0.039	0.52±0.039	0.52±0.039	6.9±0.25**
			15.9±1.01	0.38±0.033	60±2.9	85±5.2	0.47±0.041	0.47±0.041	0.47±0.041	11.0±0.37**
3,000	10	16.6±0.56*	0.41±0.026	68±1.7	93±5.0	0.49±0.038	0.49±0.038	0.49±0.038	18.0±1.20**	

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

Table 3-2 Relative organ weights in rats receiving AT-2266 for one month

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Heart (g/100g)	Lung (g/100g)	Liver (g/100g)	Kidney (g/100g)	Spleen (g/100g)	Brain (g/100g)	Submaxillary gland (g/100g)	Pituitary (mg/100g)	
											Male
	120	10	0.30±0.005	0.36±0.012	4.08±0.085	0.74±0.015	0.21±0.010	0.54±0.009	0.17±0.004	3.27±0.114	
	600	10	0.29±0.005*	0.34±0.005	3.80±0.087**	0.73±0.018	0.19±0.007	0.55±0.017	0.17±0.005	3.38±0.125	
	3,000	9	0.30±0.006	0.36±0.005*	3.84±0.066**	0.78±0.029	0.21±0.016	0.66±0.027**	0.17±0.005	3.72±0.109*	
Female	Control	10	0.36±0.009	0.45±0.006	4.14±0.099	0.76±0.018	0.25±0.005	0.83±0.012	0.20±0.004	6.74±0.310	
	120	10	0.36±0.007	0.45±0.014	4.17±0.099	0.79±0.021	0.23±0.010	0.79±0.018	0.21±0.005	6.78±0.342	
	600	10	0.33±0.003**	0.42±0.013	3.72±0.112*	0.75±0.014	0.24±0.012	0.78±0.023	0.20±0.005	6.49±0.220	
	3,000	10	0.32±0.007**	0.43±0.009	3.65±0.094**	0.76±0.015	0.25±0.016	0.78±0.019*	0.20±0.005	6.31±0.333	
Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg/100g)	Thymus (g/100g)	Adrenal (mg/100g)	Testis (g/100g)		Epididymis (g/100g)	Seminal vesicle (g/100g)	Prostate (g/100g)	Cecum (g/100g)
						Ovary (mg/100g)	Uterus (g/100g)				
Male	Control	10	5.73±0.226	0.14±0.005	15.0±1.04	0.88±0.065	0.25±0.009	0.25±0.009	0.37±0.018	0.15±0.011	2.20±0.155
	120	10	5.65±0.380	0.13±0.009	16.3±0.59	1.03±0.029	0.27±0.008	0.27±0.008	0.33±0.021	0.14±0.009	3.39±0.353**
	600	10	5.73±0.176	0.13±0.066	16.1±0.53	0.96±0.025	0.26±0.007	0.26±0.007	0.34±0.023	0.13±0.010	5.91±0.297**
	3,000	9	5.68±0.197	0.08±0.011**	21.3±1.66**	1.12±0.040**	0.25±0.011	0.25±0.011	0.27±0.029**	0.11±0.016*	8.65±0.569**
Female	Control	10	7.03±0.262	0.19±0.010	30.4±1.32	39.4±1.45	0.25±0.013	0.25±0.013			2.17±0.113
	120	10	7.16±0.346	0.19±0.013	31.3±1.30	44.5±2.19	0.24±0.018	0.24±0.018			3.09±0.064**
	600	10	7.22±0.371	0.17±0.013	27.6±1.37	38.9±2.28	0.21±0.018	0.21±0.018			5.04±0.205**
	3,000	10	7.44±0.234	0.19±0.010	30.7±0.78	41.8±2.40	0.22±0.018	0.22±0.018			8.08±0.558**

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

Table 4 Histopathological findings in rats receiving AT-2266 for one month

Histopathological findings	Sex Dose (mg/kg) No. of rat	Male				Female			
		0 10	120 10	600 10	3,000 9	0 10	120 10	600 10	3,000 10
Liver: slight atrophy of parenchymal cell		0	0	0	3	0	0	0	0
Kidney: slight desquamation of renal epithelium (focal)		0	0	0	2	0	0	0	1
: hydropic degeneration of epithelium cell		0	0	0	2	0	0	0	2
: dilatation of renal tubule		0	0	0	1	0	0	0	0
Testis: atrophy of seminiferous tubule	(slight)	0	0	0	4				
	(moderate)	0	0	0	1				
	(severe)	1	0	0	0				
Epididymis: appearance of degenerative or necrotic spermatid	(slight)	0	0	0	5				
	(moderate)	0	0	0	3				
Cecum: edema of lamina propria		0	0	0	2	0	0	0	0
: erosion of cecum epithelium		0	0	0	1	0	0	0	0

No remarkable changes were observed in the spleen, brain, submaxillary gland, pituitary, thyroid, thymus, adrenal, seminal vesicle, ovary, stomach, large intestine, pancreas, bone (bone marrow), skin (mammary gland), aorta, lymph node and eye ball. Spontaneous alterations in the heart, lung, small intestine, prostate, uterus, urinary bladder, skeletal muscle and diaphragm were found in a few rats.

Table 5 Plasma concentrations of AT-2266 in rats receiving AT-2266 for one month

Dose (mg/kg)	Time* (hr)	Plasma AT-2266 level ($\mu\text{g/ml}$)	
		male	female
120	1	7.2 \pm 0.60 (5)	5.5 \pm 1.07 (5)
	24	0.1 \pm 0.09 (5)	N. D. (5)
600	1	14.3 \pm 1.48 (5)	9.5 \pm 1.35 (5)
	24	1.1 \pm 0.18 (5)	0.6 \pm 0.16 (5)
3,000	1	25.8 \pm 2.81 (4)	15.8 \pm 0.83 (5)
	24	6.0 \pm 2.04 (5)	1.6 \pm 0.39 (5)

Mean \pm S. E.

*: Time after the last dosing.

N. D.: Not detected.

Numerals in parentheses represent number of examined animals.

mg/kg 群の雄の体重が対照群を下回ったが、休薬により回復した。その他の群においては対照群と有意な差はなかった。

摂餌量は300および1,500 mg/kg 群の雄で投与初日に減少したが以後は対照群の摂餌量と同程度であった。

飲水量は雄の300および1,500 mg/kg 群、雌の1,500

mg/kg 群で投与初期に軽度が増加したが以後対照群のそれとほぼ同様であった。

3) 尿検査

亜急性毒性試験と同様に蓄尿中に白色結晶状物質が雄の300および1,500 mg/kg 投与群にみられた。その他、投与1週目の検査で雌雄ともに投与量に依存したNa⁺の排泄増加が観察された。1カ月目においても雄でこの傾向がうかがわれたが以後の検査では変化はなかった。

4) 血液学的検査

Table 6-1に6カ月間投与群、Table 6-2に回復群の成績を示した。1,500 mg/kg 群の雄で血色素量および血小板数の軽度な減少がみられたが、1カ月間の休薬後には回復した。その他の検査項目に異常所見はみられなかった。

5) 血液生化学的検査

6カ月間投与群および回復群の検査結果をそれぞれTable 7-1および7-2に示した。1,500 mg/kg 群の雌雄で総蛋白、アルブミンの減少、さらに雌では尿素窒素の増加とクレアチニンの減少が、雄では無機燐の増加がみられた。同群の回復群においても総蛋白の減少、尿素窒素の増加がみられた。

6) 眼科学的検査

本検査は雄についてのみ実施した。1,500 mg/kg 群の

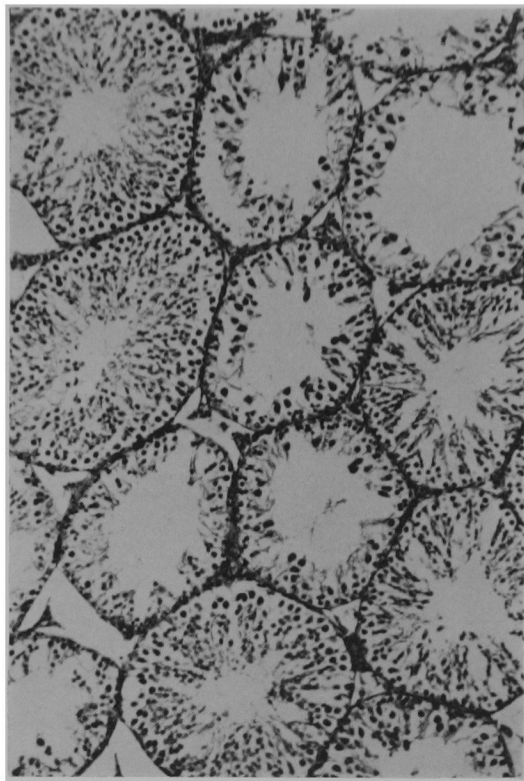
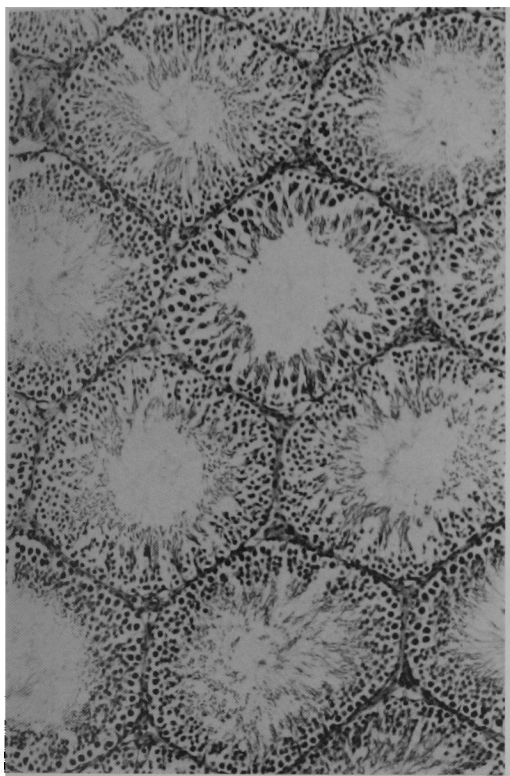
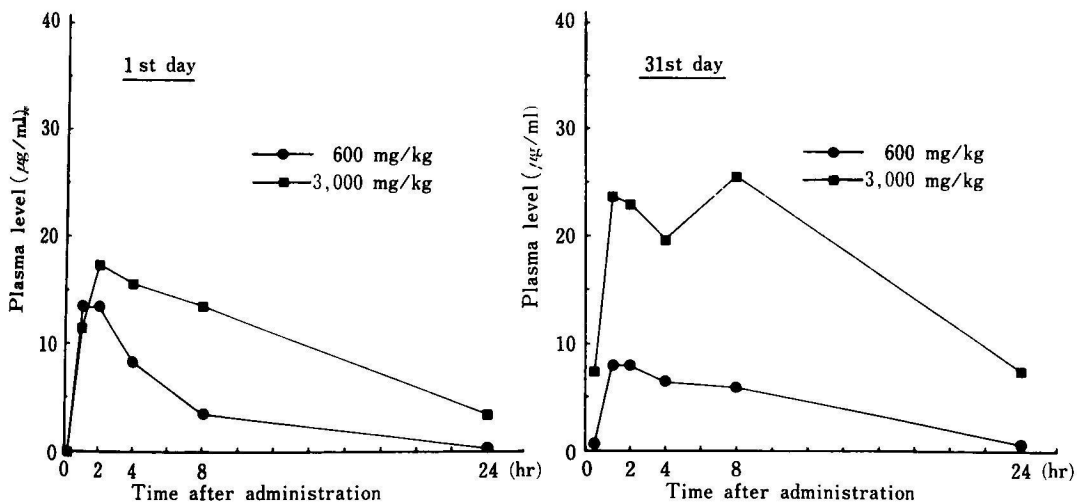


Photo. 1 The seminiferous tubules of control rat (No. 2), showing mature architecture composed of developmental process of sperm. $\times 100$ H. E. staining

Photo. 2 The seminiferous tubules of rat (No. 310) receiving 3,000 mg/kg of AT-2266. There found atrophy of some tubules with disappearance of spermatids. $\times 100$ H. E. staining

Fig. 2 Plasma concentrations of AT-2266 in male rats receiving single or consecutive doses of AT-2266



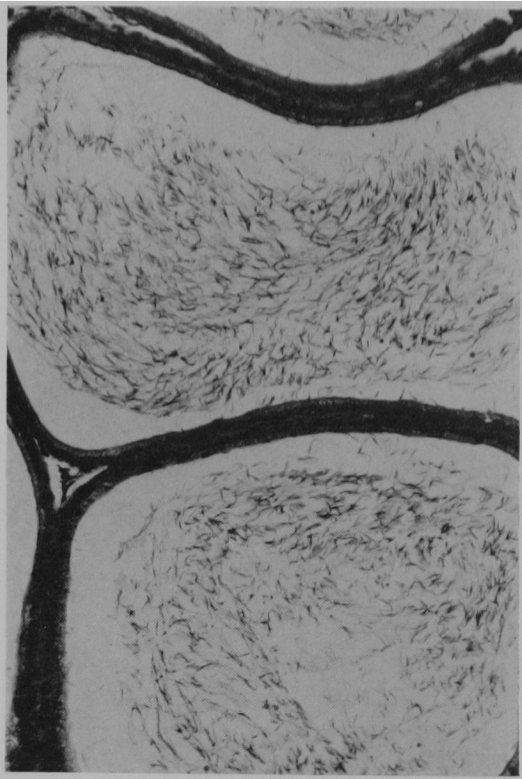


Photo. 3 The epididymal ducts of control rat (No. 1), showing a large amount of mature sperm. $\times 200$ H. E. staining

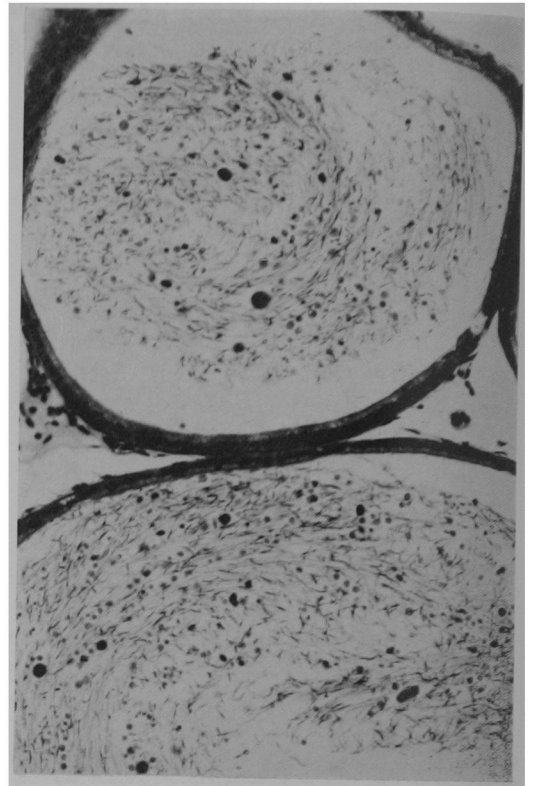


Photo. 4 The epididymal ducts of rat (No. 307). Appearance of degenerated spermatids and giant cells in the ducts. $\times 200$ H. E. staining

Fig. 3 Body weight changes in male and female rats receiving AT-2266 for six months and followed by one-month cessation period

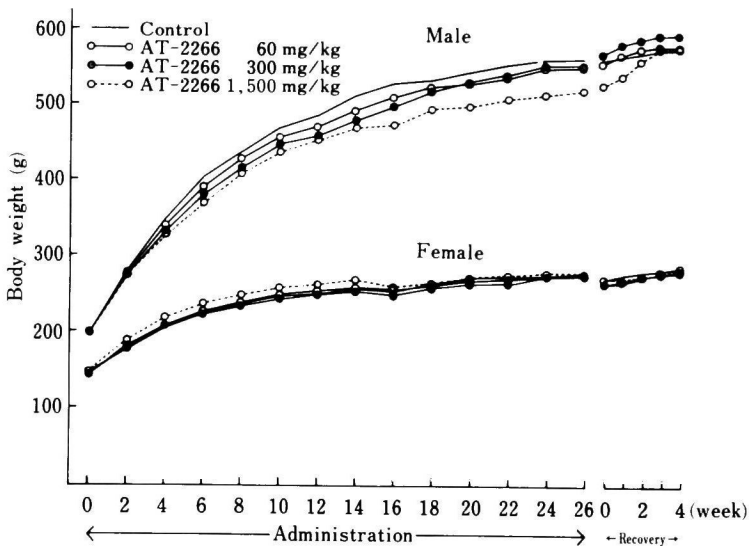


Table 6-1 Hematological findings in rats receiving AT-2266 for six months

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Erythrocyte (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Reticulocyte (%)	Platelet (10 ³ /mm ³)	PT (sec)	
Male	Control	10	886±14.4	14.9±0.16	48.1±0.59	1.4	749±30.7	17.1±0.60(10)	
	60	10	896±9.9	14.6±0.15	46.8±0.51	1.3	710±14.7	17.1±0.49(10)	
	300	9	884±17.0	14.7±0.17	48.7±0.53	1.4	752±35.8	15.8±0.60(9)	
	1,500	10	877±16.2	14.3±0.16*	47.1±0.67	2.2	671±16.1*	16.6±0.38(9)	
Female	Control	10	906±23.2	16.7±0.29	48.0±0.99	1.3	816±77.3	19.6±1.45(10)	
	60	9	827±38.3	16.1±0.75	46.4±1.06	1.5	797±53.0	18.9±1.30(9)	
	300	10	908±29.8	16.6±0.48	47.5±0.82	1.0	810±50.4	21.6±2.07(10)	
	1,500	9	900±23.7	16.7±0.47	47.8±1.01	1.1	688±35.0	19.2±1.36(9)	

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	APTT (sec)	Leucocyte (10 ³ /mm ³)	Differential nucleated cell count (%)					
					Bas	Eos	Neu	Lym	Mon	Rub
Male	Control	10	25.4±1.05(10)	149±7.7	0.1	2.0	14.8	82.9	0.3	0
	60	10	25.3±0.85(10)	153±6.8	0.1	2.3	16.6	80.2	0.9	0
	300	9	23.5±0.67(8)	154±11.5	0.1	2.0	13.2	84.2	0.6	0
	1,500	10	23.9±0.80(9)	144±11.7	0.1	1.7	20.0	77.6	0.7	0
Female	Control	10	25.8±1.07(10)	115±11.2	0	2.2	18.9	78.5	0.5	0
	60	9	25.4±1.31(9)	156±8.3**	0	2.9	26.6	69.8	0.6	0.2
	300	10	26.3±1.30(10)	128±10.4	0	2.2	17.2	80.1	0.6	0.1
	1,500	9	25.0±1.41(9)	142±11.9	0	1.3	25.6	72.8	0.1	0.3

Mean ± S. E. *: Significant difference from control at $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Abbreviations used are: PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time;

Bas, basophile; Eos, eosinophile; Neu, neutrophil; Lym, lymphocyte; Mon, monocyte; Rub, rubricyte.

Numerals in parentheses represent number of animals.

2例に一側性の軽度な角膜表面の凹凸が観察されたがその他の動物には異常はなかった。

7) 臓器重量

臓器重量およびその体重比を Table 8-1 ~ 8-4 に示した。盲腸重量は全投与群で用量依存性に増加したが休薬により 60 および 300 mg/kg 群では回復し、1,500 mg/kg 群では軽減された。その他、300 mg/kg 以上の群で精巢実重量の減少、さらに1,500 mg/kg 群では前立腺実重量の増加と精巢上体実重量の減少がみられ、また体重比においても同じ傾向を示した。これら生殖系臓器の重

量変化は休薬1ヵ月後には精巢上体実重量以外は回復した。

8) 剖検および病理組織学的所見

関節軟骨について実体顕微鏡下に検索した結果、1,500 mg/kg 群の雄3例と300 mg/kg 群の雌1例に水泡様物の形成が観察された。軟X線写真より測定した大腿骨および上腕骨の長さに対する影響はなかった。腎では雄の1,500 mg/kg 群(10例中2例)の腎盂に針頭大の灰白色結晶状集塊物がみられ赤外および質量スペクトルによる分析の結果、この結晶は AT-2266 そのものであった。雌ではこの変化はみられなかった。精巢では萎縮性の変

Table 6-2 Hematological findings in rats receiving AT-2266 for six months (recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Erythrocyte ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Differential nucleated cell count (%)					
						Bas	Eos	Neu	Lym	Mon	Rub
Male	Control	8	934±23.8	14.9±0.12	49.1±0.48						
	60	7	882±12.7	14.9±0.18	48.7±0.57						
	300	7	868±10.4*	14.9±0.19	48.6±0.69						
	1,500	8	872±11.6*	14.8±0.23	49.0±0.57						
Female	Control	6	846±20.7	15.6±0.33	48.5±0.99						
	60	5	809±14.9	15.4±0.34	48.2±0.80						
	300	6	826±23.2	15.1±0.36	47.7±0.99						
	1,500	5	871±51.0	15.2±0.28	48.8±0.86						
Male	Control	8	624±19.3	172±11.1	0	2.1	13.0	84.4	0.5	0	
	60	7	612±22.5	153±5.2	0	2.4	16.2	80.5	0.9	0	
	300	7	608±18.6	153±11.9	0	2.0	18.7	78.7	0.6	0	
	1,500	8	606±13.8	173±9.8	0	1.9	18.1	79.4	0.6	0	
Female	Control	6	744±43.9	129±9.7	0	1.6	15.7	82.6	0.2	0	
	60	5	725±30.3	133±6.8	0	1.7	16.9	80.8	0.6	0	
	300	6	712±50.6	117±13.0	0	1.7	18.7	79.2	0.5	0	
	1,500	5	675±40.6	123±10.0	0	2.0	20.5	77.1	0.4	0	

Mean ± S. E. * : Significant difference from control at $p < 0.05$

Abbreviations used are : Bas, basophile ; Eos, eosinophile ; Neu, neutrophil ;

Lym, lymphocyte ; Mon, monocyte ; Rub, rubricyte.

Numerals in parentheses represent number of animals.

化が 300 mg/kg 群 (10例中 1例) と 1,500 mg/kg 群 (10例中 6例) にみられ、病理組織学的には Table 9 に示すごとく精細管の萎縮および精子形成の低下像を認めた。精巣上体においても管腔内に変性精細胞を有する例が見られた。これらの変化は 1 カ月間の休薬とともに回復または軽減した。精巣および精巣上体における同質の変化は対照群の 2 例 (回復群) にも認められた。腎では尿管の拡張が各投与群に散見されたが、1,500 mg/kg 群の雌の 1 例以外、いずれもごく軽微な変化であった。

9) 血漿中薬物濃度および尿中排泄率

最終投与の 1 および 24 時間後における血漿中薬物濃度は Table 10 に示すとおりである。各用量群で雌雄の血中濃度を比較すると雌よりも雄において高く、1,500 mg/kg 群の雄では投与 24 時間後において 7.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の血漿中濃度を示した。尿中からの AT-2266 の回収率は Table 11 に示すとおりで雄では雌よりも高く、雄の 13.2 ~ 23.4% に対し雌は 4.2 ~ 7.9% であった。

III. 総括および考察

AT-2266 の 120, 600 および 3,000 mg/kg/日 を 1 カ月間、60, 300 および 1,500 mg/kg/日 を 6 カ月間、SD 系

Table 7-1 Blood biochemical findings in rats receiving AT-2266 for six months

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Glucose (mg/dl)	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	Inorganic phosphorus (mg/dl)	Urea nitrogen (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)
Male	Control	10	106±2.0	9.8±0.06	5.4±0.25	21±0.9	0.6±0.04	77±3.2	5.9±0.06	3.0±0.03
	60	10	107±3.4	9.7±0.11	5.4±0.43	20±0.6	0.7±0.04	76±4.5	5.7±0.11	2.9±0.07
	300	10	106±4.1	10.0±0.17	6.2±0.71	22±0.9	0.7±0.04	78±3.0	5.6±0.19	2.9±0.07
	1,500	10	105±4.2	9.6±0.08	6.5±0.45*	22±0.7	0.7±0.05	80±3.3	5.1±0.05**	2.7±0.05**
Female	Control	10	94±2.4	9.9±0.13	5.6±0.32	18±0.9	0.8±0.03	105±7.8	6.0±0.13	3.3±0.07
	60	8	99±3.6	9.9±0.13	5.6±0.37	18±1.2	0.7±0.04	107±6.3	5.9±0.15	3.3±0.14
	300	10	96±2.3	9.9±0.25	6.3±0.62	17±1.1	0.7±0.04	106±5.5	5.8±0.11	3.3±0.06
	1,500	9	92±5.4	9.9±0.40	5.3±0.35	21±0.8*	0.6±0.04**	104±7.0	5.4±0.13**	3.0±0.10*
Male	Control	10	1.06±0.028	0.14±0.010	135±12.2	60±5.1	17±2.1	141±1.1	3.6±0.07	100±0.4
	60	10	1.05±0.028	0.13±0.008	123±10.7	73±11.7	18±4.5	142±1.0	3.7±0.10	100±0.6
	300	10	1.13±0.049	0.14±0.007	134±13.4	70±10.3	14±3.5	141±0.9	4.1±0.45	100±0.6
	1,500	10	1.17±0.042**	0.13±0.008	133±15.0	74±10.4	10±2.6	143±1.1	3.7±0.12	101±1.0
Female	Control	10	1.26±0.043	0.11±0.016	73±3.3	101±14.5	24±5.0	145±0.8	3.8±0.24	104±0.6
	60	8	1.28±0.057	0.08±0.009	116±17.5*	121±41.2	24±3.8	145±0.5	3.6±0.17	103±0.8
	300	10	1.32±0.035	0.08±0.008	78±8.8	107±14.6	19±2.9	146±0.5	4.2±0.46	102±0.9
	1,500	9	1.33±0.052	0.08±0.009	86±14.9	82±9.0	15±1.8	145±0.3	3.7±0.11	102±0.6

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at p<0.05; **: p<0.01

Table 7-2 Blood biochemical findings in rats receiving AT-2266 for six months (recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Glucose (mg/dl)	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	Inorganic phosphorus (mg/dl)	Urea nitrogen (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)
Male	Control	8	93±1.7	9.5±0.13	5.1±0.21	19±0.7	0.7±0.05	65±5.8	5.6±0.07	3.0±0.07
	60	7	92±3.1	9.4±0.21	4.8±0.30	21±0.8	0.7±0.04	59±3.8	5.5±0.11	2.9±0.06
	300	7	97±2.2	9.4±0.09	4.4±0.25*	20±1.0	0.7±0.07	71±7.2	5.4±0.06*	2.8±0.07
	1,500	8	94±1.9	9.4±0.08	4.7±0.32	21±1.3	0.7±0.06	61±2.3	5.4±0.06*	3.0±0.04
Female	Control	6	96±2.5	10.0±0.19	5.5±0.76	19±0.8	0.7±0.05	95±4.9	6.4±0.23	3.4±0.14
	60	5	85±3.2*	10.1±0.14	6.4±0.48	21±1.6	0.6±0.03	96±8.3	6.3±0.21	3.3±0.22
	300	6	88±2.4*	10.2±0.11	5.9±0.48	20±1.0	0.7±0.05	104±7.9	6.7±0.23	3.6±0.12
	1,500	5	89±2.2	10.3±0.25	5.7±0.53	24±1.2*	0.7±0.04	103±8.0	6.5±0.28	3.4±0.15
Male	Control	8	1.13±0.041	0.13±0.009	133±16.9	114±16.1	27±9.2	144±0.6	3.7±0.06	103±0.6
	60	7	1.16±0.031	0.12±0.010	131±19.7	112±14.2	17±5.1	143±0.6	3.7±0.10	102±0.9
	300	7	1.12±0.054	0.13±0.010	104±10.6	97±13.6	19±4.1	143±1.0	3.9±0.13	104±0.6
	1,500	8	1.27±0.050	0.13±0.009	119±8.6	143±24.2	32±10.3	143±0.5	3.5±0.09	103±0.7
Female	Control	6	1.09±0.022	0.13±0.011	84±14.5	207±50.3	28±4.5	146±1.0	3.6±0.17	105±1.1
	60	5	1.10±0.077	0.11±0.010	74±15.8	219±49.4	34±16.2	146±1.2	3.5±0.15	104±0.6
	300	6	1.17±0.013*	0.12±0.011	84±15.0	239±51.4	36±22.0	146±0.8	3.7±0.13	105±0.6
	1,500	5	1.11±0.042	0.13±0.012	111±19.2	180±10.4	23±3.0	145±0.7	4.1±0.34	104±1.8

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at p<0.05

Table 8-1 Absolute organ weights in rats receiving AT-2266 for six months

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Submaxillary gland (g)	Pituitary (mg)
Male	Control	10	1.46±0.103	1.55±0.069	20.55±1.551	3.37±0.206	0.99±0.084	2.02±0.040	0.72±0.053	13.0±0.65
	60	10	1.46±0.040	1.55±0.055	18.62±0.637	3.27±0.099	0.96±0.036	2.07±0.024	0.71±0.035	13.6±0.50
	300	10	1.36±0.036	1.50±0.039	18.97±0.723	3.21±0.134	0.95±0.049	2.05±0.019	0.69±0.024	13.2±0.92
	1,500	10	1.33±0.029	1.47±0.050	17.79±0.611	3.35±0.075	0.90±0.050	2.05±0.021	0.71±0.022	14.7±0.83
Female	Control	10	0.86±0.018	1.14±0.020	8.93±0.244	1.66±0.035	0.54±0.016	1.86±0.018	0.49±0.013	16.7±1.02
	60	9	0.88±0.027	1.12±0.039	9.56±0.392	1.76±0.044	0.63±0.076	1.86±0.025	0.48±0.015	16.4±0.67
	300	10	0.81±0.024	1.21±0.052	8.22±0.145*	1.69±0.062	0.51±0.019	1.84±0.010	0.46±0.009	16.2±0.68
	1,500	9	0.84±0.033	1.28±0.083	8.80±0.422	1.79±0.060	0.55±0.024	1.83±0.026	0.44±0.014*	16.2±0.66
Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epididymis (g)	Seminal vesicle (g)	Prostate (g)	Cecum (g)
Male	Control	10	29.8±1.76	0.09±0.033	51±3.6	3.74±0.068	1.37±0.041	2.12±0.139	0.57±0.059	6.93±0.301
	60	10	25.8±1.75	0.16±0.019	49±2.5	3.82±0.092	1.36±0.050	2.11±0.099	0.71±0.080	11.19±0.985**
	300	10	23.3±1.38**	0.14±0.028	50±2.0	3.22±0.207*	1.21±0.067	2.05±0.110	0.59±0.040	13.32±0.705**
	1,500	10	25.2±1.31*	0.13±0.021	55±2.1	2.59±0.257**	0.87±0.063**	2.15±0.095	0.89±0.101*	19.27±1.254**
Female	Control	10	19.6±0.64	0.11±0.012	63±2.8	65±5.7	0.69±0.038			4.98±0.343
	60	9	19.8±0.88	0.11±0.014	67±4.3	72±6.4	0.75±0.043			7.08±0.404**
	300	10	18.1±0.96	0.11±0.010	59±1.3	68±3.9	0.66±0.062			9.23±0.708**
	1,500	9	19.7±1.60	0.15±0.018	61±3.7	68±4.4	0.70±0.046			17.74±1.639**

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Table 8-2 Absolute organ weights in rats receiving AT-2266 for six months (recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Submaxillary gland (g)	Pituitary (mg)	
Male	Control	8	1.45±0.073	1.60±0.070	19.96±1.763	3.44±0.104	0.95±0.034	2.07±0.035	0.71±0.034	12.6±0.96	
	60	7	1.42±0.040	1.52±0.050	19.91±0.917	3.25±0.094	0.85±0.049	2.05±0.021	0.64±0.048	15.1±1.18	
	300	7	1.46±0.065	1.69±0.120	20.60±1.303	3.19±0.156	0.93±0.059	2.06±0.037	0.74±0.028	14.1±1.14	
	1,500	8	1.45±0.074	1.47±0.054	21.06±1.029	3.27±0.178	0.85±0.044	2.02±0.041	0.76±0.035	14.4±0.71	
Female	Control	6	0.87±0.030	1.13±0.082	9.23±0.509	1.63±0.044	0.58±0.026	1.84±0.042	0.45±0.013	15.5±1.57	
	60	5	0.86±0.018	1.17±0.043	9.34±0.498	1.76±0.095	0.58±0.036	1.78±0.026	0.48±0.004	16.4±1.97	
	300	6	0.87±0.028	1.21±0.081	8.79±0.328	1.63±0.043	0.52±0.034	1.82±0.052	0.46±0.021	17.8±2.02	
	1,500	5	0.89±0.025	1.18±0.040	9.30±0.405	1.73±0.081	0.55±0.017	1.82±0.053	0.49±0.029	17.3±1.32	
Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)		Epididymis (g)	Seminal vesicle (g)	Prostate (g)	Cecum (g)
						Ovary (mg)	Uterus (g)				
Male	Control	8	26.8±2.40	0.12±0.021	49±2.3	3.43±0.219	1.34±0.058	2.15±0.168	0.69±0.075	8.13±0.685	
	60	7	22.1±1.28	0.10±0.023	48±1.7	3.47±0.221	1.11±0.099	2.28±0.188	0.61±0.101	9.89±0.471	
	300	7	25.6±2.41	0.13±0.032	46±2.2	3.58±0.139	1.32±0.047	2.37±0.128	0.87±0.075	9.96±1.035	
	1,500	8	25.0±1.02	0.10±0.011	46±1.9	3.11±0.203	1.10±0.058**	2.39±0.098	0.69±0.066	12.77±0.735**	
Female	Control	6	21.2±1.99	0.16±0.025	57±1.8	87±7.5	0.69±0.059			4.49±0.491	
	60	5	17.2±1.46	0.13±0.010	57±2.8	91±12.5	0.78±0.098			5.88±0.668	
	300	6	17.8±0.65	0.11±0.011	59±4.1	73±13.2	0.93±0.162			6.19±0.760	
	1,500	5	18.4±2.56	0.11±0.012	58±3.8	60±3.4*	0.80±0.077			7.75±0.632**	

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

Table 8-3 Relative organ weights in rats receiving AT-2266 for six months

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Heart (g/100g)	Lung (g/100g)	Liver (g/100g)	Kidney (g/100g)	Spleen (g/100g)	Brain (g/100g)	Submaxillary gland (g/100g)	Pituitary (mg/100g)
	60	10	0.27±0.006	0.28±0.006	3.40±0.074	0.60±0.013	0.18±0.007	0.38±0.012	0.13±0.004	2.48±0.075
	300	10	0.25±0.006	0.28±0.011	3.48±0.080	0.59±0.023	0.17±0.007	0.38±0.012	0.13±0.005	2.42±0.148
	1,500	10	0.26±0.003	0.29±0.011	3.44±0.075	0.65±0.009*	0.17±0.007	0.40±0.009	0.14±0.005	2.86±0.172*
Female	Control	10	0.31±0.010	0.41±0.013	3.21±0.125	0.60±0.022	0.19±0.006	0.67±0.018	0.18±0.007	6.03±0.423
	60	9	0.32±0.009	0.41±0.015	3.49±0.132	0.64±0.017	0.23±0.029	0.68±0.009	0.18±0.005	6.03±0.319
	300	10	0.30±0.014	0.44±0.025	3.00±0.096	0.61±0.016	0.19±0.004	0.67±0.024	0.17±0.006	5.93±0.324
	1,500	9	0.29±0.008	0.45±0.036	3.07±0.068	0.63±0.012	0.19±0.008	0.65±0.022	0.15±0.004*	5.67±0.166

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg/100g)	Thymus (g/100g)	Adrenal (mg/100g)	Testis (g/100g)	Epididymis		Seminal vesicle (g/100g)	Prostate (g/100g)	Cecum (g/100g)
							Ovary (mg/100g)	Uterus (g/100g)			
Male	Control	10	5.42±0.419	0.02±0.006	9.1±0.43	0.68±0.032	0.25±0.010	0.38±0.028	0.10±0.011	1.25±0.051	
	60	10	4.70±0.255	0.03±0.004	9.0±0.53	0.70±0.024	0.25±0.010	0.39±0.017	0.13±0.011	2.03±0.144**	
	300	10	4.33±0.329	0.03±0.005	9.2±0.51	0.60±0.044	0.22±0.015	0.38±0.027	0.11±0.009	2.46±0.143**	
	1,500	10	4.87±0.221	0.03±0.004	10.6±0.49*	0.50±0.052**	0.17±0.013**	0.42±0.021	0.17±0.019**	3.74±0.240**	
Female	Control	10	7.05±0.305	0.04±0.004	22.9±1.37	23.3±2.15	0.25±0.015			1.79±0.132	
	60	9	7.22±0.302	0.04±0.005	24.8±1.88	25.8±1.95	0.27±0.018			2.60±0.178**	
	300	10	6.60±0.379	0.04±0.004	21.6±1.00	24.8±1.53	0.24±0.024			3.34±0.235**	
	1,500	9	6.93±0.589	0.05±0.007	21.3±1.16	24.1±1.80	0.25±0.014			6.20±0.534**	

Mean ± S. E.

* : Significant difference from control at p<0.05; ** , p<0.01

Table 8-4 Relative organ weights in rats receiving AT-2266 for six months (recovery study)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Heart (g/100g)	Lung (g/100g)	Liver (g/100g)	Kidney (g/100g)	Spleen (g/100g)	Brain (g/100g)	Submaxillary gland (g/100g)	Pituitary (mg/100g)	
Male	Control	8	0.25±0.007	0.28±0.009	3.47±0.160	0.61±0.017	0.17±0.006	0.37±0.013	0.13±0.007	2.28±0.246	
	60	7	0.25±0.011	0.27±0.007	3.46±0.120	0.57±0.019	0.15±0.011	0.36±0.010	0.11±0.009	2.64±0.211	
	300	7	0.25±0.012	0.29±0.024	3.47±0.108	0.54±0.022*	0.16±0.009	0.35±0.017	0.13±0.006	2.38±0.146	
	1,500	8	0.25±0.007	0.26±0.010	3.67±0.130	0.57±0.020	0.15±0.004*	0.35±0.012	0.13±0.005	2.51±0.124	
Female	Control	6	0.31±0.005	0.41±0.032	3.30±0.134	0.59±0.013	0.21±0.006	0.66±0.032	0.16±0.004	5.51±0.425	
	60	5	0.31±0.007	0.42±0.021	3.36±0.166	0.63±0.029	0.21±0.010	0.64±0.023	0.17±0.006	5.91±0.685	
	300	6	0.31±0.009	0.44±0.036	3.19±0.161	0.59±0.019	0.19±0.009	0.66±0.030	0.17±0.007	6.54±0.862	
	1,500	5	0.32±0.013	0.42±0.027	3.32±0.179	0.62±0.048	0.20±0.010	0.65±0.032	0.18±0.011	6.40±0.550	
Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Thyroid (mg/100g)	Thymus (g/100g)	Adrenal (mg/100g)	Testis (g/100g)		Epididymis (g/100g)	Seminal vesicle (g/100g)	Prostate (g/100g)	Cecum (g/100g)
						Ovary (mg/100g)	Uterus (g/100g)				
Male	Control	8	4.67±0.353	0.02±0.005	8.8±0.66	0.61±0.049	0.24±0.017	0.38±0.028	0.12±0.013	1.42±0.080	
	60	7	3.87±0.255	0.02±0.004	8.3±0.31	0.61±0.045	0.19±0.018	0.40±0.035	0.11±0.020	1.73±0.090*	
	300	7	4.40±0.529	0.02±0.007	7.9±0.44	0.61±0.029	0.23±0.011	0.41±0.030	0.15±0.016	1.67±0.105	
	1,500	8	4.37±0.152	0.02±0.002	8.1±0.46	0.54±0.038	0.19±0.013	0.42±0.019	0.12±0.013	2.25±0.174**	
Female	Control	6	7.54±0.559	0.06±0.009	20.6±0.88	31.5±3.61	0.25±0.018			1.61±0.181	
	60	5	6.18±0.455	0.05±0.004	20.5±1.44	33.1±5.19	0.28±0.031			2.12±0.232	
	300	6	6.51±0.401	0.04±0.005	21.0±0.90	26.3±4.87	0.34±0.057			2.26±0.311	
	1,500	5	6.43±0.596	0.04±0.005	21.2±2.29	21.6±2.17	0.29±0.041			2.77±0.240**	

Mean ± S. E.

*: Significant difference from control at p<0.05; **, p<0.01

Table 9 Histopathological findings in male and female rats receiving AT-2266 for six months and followed by one-month cessation period

Histopathological findings		Treatment Dose (mg/kg) No. of rat	Administration				Recovery			
			0 10	60 10	300 10	1,500 10	0 8	60 7	300 7	1,500 8
Liver: vacuolization		(slight)	1	1	3	2	0	1	1	2
Kidney: dilatation of renal tubule		(slight)	0	2	2	3	0	0	0	0
Testis: aspermatogenesis		(slight)	0	0	0	0	0	0	0	2
		(moderate)	0	0	0	3	1	0	0	0
		(severe)	0	0	1	4	1	1	0	1
: atrophy of seminiferous tubule		(slight)	0	0	0	0	0	0	0	2
		(moderate)	0	0	0	4	1	0	0	0
		(severe)	0	0	1	3	1	0	0	1
: necrotic seminiferous tubule		(severe)	0	0	0	0	0	1	0	0
: edema of interstitial tissue		(moderate)	0	0	0	2	0	0	0	1
: calcification in seminiferous tubule		(slight)	0	0	0	0	1	0	0	0
		(moderate)	0	0	0	0	0	0	0	0
		(severe)	0	0	1	0	1	1	0	0
: proliferation of interstitial cell		(moderate)	0	0	0	3	0	1	0	1
Epididymis: disappearance of spermatozoa in tubule		(slight)	0	0	0	2	0	0	0	1
		(moderate)	0	0	0	2	0	0	0	1
		(severe)	0	0	1	3	1	0	0	0
: appearance of degenerated spermatid in tubule		(slight)	0	0	0	2	0	0	0	1
		(moderate)	0	0	0	1	0	0	0	1
		(severe)	0	0	0	4	1	0	0	0
: proliferation of interstitial cell		(moderate)	0	0	0	1	0	0	0	0
Prostate: interstitial prostatitis		(slight)	0	0	1	0	0	0	0	0
		(moderate)	0	0	0	1	0	0	0	0
Miscellanea: fibrosarcoma			0	0	1	0	0	0	0	0

-Female-

Histopathological findings		Treatment Dose (mg/kg) No. of rat	Administration				Recovery			
			0 10	60 9	300 10	1,500 9	0 6	60 5	300 6	1,500 5
Liver: vacuolization		(slight)	1	2	2	5	0	0	0	1
		(moderate)	0	0	1	0	0	0	0	1
Kidney: dilatation of renal tubule		(slight)	0	1	3	4	0	0	2	1
		(moderate)	0	0	0	1	0	0	0	0

No abnormalities due to treatment were observed in the heart, lung, spleen, brain, submaxillary gland, pituitary, thyroid, thymus, adrenal, uterus, ovary, seminal vesicle, stomach, small and large intestines, cecum, pancreas, urinary bladder, bone (bone marrow), skin (mammary gland), peripheral nerve, aorta, skeletal muscle, and eye ball.

ラットに強制経口投与して本薬物の亜急性および慢性毒性を検討した。その結果、死亡例は両試験の最大用量群でもみられなかったが、便および尿の性状変化、盲腸、可動関節、腎、雄の生殖器官に対する影響などが認められた。

一過性の便の性状変化は本物質の抗菌活性に関連したものであろう。尿検査では蓄尿中に白色結晶状物が亜急性毒性では600 mg/kg以上、慢性毒性では300 mg/kg以上の群に認められ、分析によりAT-2266そのものと確認された。この結晶は最終投与1時間後の剖検例の膀胱内にみられなかったことより排尿後の温度の低下、外気との接触、pHの変化などにより尿中のAT-2266が析出したものと考えられる。

Table 10 Plasma concentrations of AT-2266 in rats receiving AT-2266 for six months

Dose (mg/kg)	Time* (hr)	Plasma AT-2266 level ($\mu\text{g/ml}$)	
		male	female
60	1	5.6 \pm 0.45 (5)	3.5 \pm 0.44 (5)
	24	ND (5)	ND (3)
300	1	13.0 \pm 0.35 (5)	8.9 \pm 1.09 (5)
	24	0.4 \pm 0.17 (4)	0.1 \pm 0.05 (5)
1,500	1	22.0 \pm 2.63 (5)	14.3 \pm 2.16 (4)
	24	7.3 \pm 1.17 (5)	2.2 \pm 0.54 (5)

Mean \pm S. E.

ND: not detected * : Time after the last dosing

Numerals in parentheses represent number of examined animals.

Table 11 Recovery rates(%) of free and conjugated AT-2266 in urine of male and female rats given AT-2266

Duration	Group	Male			Female		
		free	conjugated*	total	free	conjugated*	total
3rd month	60 mg/kg	16.4 \pm 0.85	3.4 \pm 0.20	19.8 \pm 0.74 (6)	3.6 \pm 0.80	1.0 \pm 0.27	4.6 \pm 0.94 (6)
	300 mg/kg	13.6 \pm 1.31	3.5 \pm 0.37	17.0 \pm 1.56 (6)	3.9 \pm 0.83	2.0 \pm 0.50	5.9 \pm 1.20 (6)
	1,500 mg/kg	10.6 \pm 0.97	2.6 \pm 0.40	13.2 \pm 1.29 (6)	5.2 \pm 0.88	2.7 \pm 0.46	7.9 \pm 1.32 (6)
6th month	60 mg/kg	20.2 \pm 1.64	3.2 \pm 0.49	23.4 \pm 1.86 (6)	3.8 \pm 1.01	0.4 \pm 0.19	4.2 \pm 0.98 (6)
	300 mg/kg	15.4 \pm 0.98	0.9 \pm 0.52	16.3 \pm 0.99 (6)	4.3 \pm 1.05	1.8 \pm 0.51	6.1 \pm 1.29 (6)
	1,500 mg/kg	13.6 \pm 1.51	3.8 \pm 0.76	17.4 \pm 2.01 (6)	4.4 \pm 0.78	2.0 \pm 0.28	6.4 \pm 1.02 (5)

Numerals in parentheses represent number of examined animals.

Recovery rates in urine were calculated from daily dosage (mg/kg) of each rat.

* : Represent as the concentration of β -glucuronide-conjugated AT-2266 alone.

盲腸の拡張は両試験とも投与量に依存して出現したが、この変化は抗菌性物質を投与したゲツ歯類において広く認められる現象で、腸内細菌叢に変化を来すことにより惹起されるとされており、本物質の抗菌活性に付随したものであろう。亜急性毒性試験の雄の高用量群の一部のラット以外盲腸に病理組織学的変化はなく、慢性毒性試験では休薬とともに回復する可逆的变化であった。したがって低および中用量群の盲腸の変化に毒性学的な意義はないと考えられる。

関節軟骨における水泡様物の形成が両試験の中および高用量群の少数例に認められた。この変化は本系統の抗菌性薬物を幼若犬に投与したときにみられる現象⁹⁾と同一のものである。関節異常惹起の感受期に大量のAT-2266を投与したために形成され、剖検時まで完全に修復することなく残存していたものであろう。

慢性毒性試験の1,500 mg/kg群の2例に一側性の軽度な角膜表面の凹凸が観察されたが、この変化は病理組織学的には異常を認めず、かつ一側性であることより本物質によるものではなくむしろ自然発症性的変化であると考慮される。

亜急性毒性試験の600 mg/kg以上の群の雄ラットで心臓および肝臓重量の減少がみられたが、明確な用量依存性はなく、雌ラットでは両試験で認められず、さらにこれら臓器の機能を反映する検査項目や病理組織学的所見に異常は認められなかったことより毒性学的に問題となる所見ではないと考えられる。雄の3,000 mg/kg群における肺、脳、顎下腺、下垂体および甲状腺重量の減少は同群でみられた体重増加抑制にもとづく変化であろう。

腎臓に対する影響として亜急性毒性試験では3,000mg/kg 群の雌雄の一部に限局性ではあるが尿細管上皮の軽度な剝離、水腫変性などがみられ、さらに雄では血中の尿素窒素の軽度上昇がみられた。また慢性毒性試験においては1,500mg/kg 群の雌で軽度ではあるが尿素窒素の上昇がみられた。同群の雄では10例中2例の腎盂にAT-2266の針頭大の灰白色結晶状集塊物が認められたが、高濃度にAT-2266が濃縮された場合、結晶として析出することもあることを示すものであろう。なおこの結晶状集塊物は前述の蓄尿中に形成された結晶よりも大きく、外見的にも明らかに異なるものであった。これらの成績から亜急性毒性試験における3,000mg/kg、慢性毒性試験における1,500mg/kgは腎臓に対する毒性量と考えられる。なお慢性毒性試験の各投与群の一部に限局性の尿細管の拡張がみられたが、1,500mg/kg 群の1例以外正常域内の変化であると考えられる。また、同質の変化はPipemidic acidを投与したイヌにおいても一部に観察されており⁷⁾ 毒性的には問題とならないと判断されたものである。

生殖器に対する影響として3,000mg/kg 群の雄ラットで精巣上体の管腔内精細胞の変性または壊死が認められた。精巣の精細管についても軽度の萎縮が9例中4例に、中等度のものが1例にみられたが精母細胞は残存していることから精母細胞あるいはそれ以降の精子発生の段階が障害されたものと考えられる。慢性毒性試験でも1,500mg/kg 群に同様の変化がみられたが1カ月間の休業により回復の傾向を示した。この成績はAT-2266の生殖試験(連続交配試験)において雄ラットの妊孕能が投与中止により回復した成績⁶⁾と一致している。

以上の諸成績から亜急性および慢性毒性試験における無作用量はそれぞれ120mg/kg/日および60mg/kg/日と考えられる。中用量の600mg/kg/日および300mg/kg/日では、関節異常が少数例にみられるのみであり、この現象は成熟動物では惹起されないことからこの用量は成熟ラットに限って言えば最大無作用量と考えられる。両試験における高用量3,000mg/kg/日および1,500mg/kg/日は中毒量と判断される。中毒作用としての体重増加抑制は両試験とも雄ラットにおいてのみ認められた。このことは高用量で血中AT-2266濃度および尿中排泄率に雌雄差が認められたことに関連するものと考えられる。

マウス全身感染症に対するAT-2266の経口投与による有効量(ED₅₀)は1.73mg/kg(*E. coli* ML 4704)から19.4mg/kg(*S. marcescens*)であり²⁾、またこの最大有効量20mg/kgをマウスに単回投与したときのAUC_{0-24hr}は、1.80μg·hr/mlであり、ラットでも同一投与量でほぼ同じ薬物動態を示すことが明らかにされている⁷⁾。一方、成熟ラットに対する最大無作用量600mg/kgを1カ月間反復投与した場合のAUC_{0-24hr}は102μg·hr/mlであり、中毒量3,000mg/kgでは432μg·hr/mlであった。マウスとラットで同一用量で同じ薬効が期待されるとするならば、ラットにおける薬効発現に要する吸収量と成熟ラットにおける最大無作用量あるいは中毒量投与時の吸収量との間には大きなひらきがあることを示しており、AT-2266の安全性を裏付けるものであると考える。

稿を終えるにあたり本実験に終始協力された近藤澄子、宮島由巳、上田芳伸、西脇勉らの諸氏に深謝します。

(亜急性毒性試験は昭和55年1月から同年9月まで、慢性毒性試験は雌ラットでは昭和54年9月から56年6月まで、雄ラットでは昭和55年2月から56年6月までの間に実施した。)

文 献

- 1) 中村信一、片江宏巳、南 明、中田勝久、井上 了、山岸純一、高瀬善行、清水當尚：AT-2266の*in vitro*および*in vivo*抗菌作用。Chemotherapy 32(S-3)：70~85, 1984
- 2) 河野 薫、井上松久、三橋 進：ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤AT-2266の*in vitro*および*in vivo*抗菌作用。Chemotherapy 32(S-3)：1~17, 1984
- 3) SAVAGE, D. C. & R. DUBOS：Alterations in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs. J. Exp. Med. 128：97~110, 1968
- 4) TATSUMI H., H. SENDA, S. YATERA, Y. TAKEMOTO, M. YAMAYOSHI & K. OHNISHI：Toxicological studies on pipemidic acid. V. Effect on diarthrodial joints of experimental animals. J. Toxicol. Sci. 3：357~367, 1978
- 5) 仙田博美、松岡信男、藤本勝造、矢寺成次、大西久美雄、辰巳 照：Pipemidic acidの毒性的研究、第3報、イヌにおける亜急性ならびに慢性毒性試験。Chemotherapy 23：2748~2764, 1975
- 6) 寺田芳規、西村耕一、竹中秀子、吉田耕一：AT-2266の生殖試験(第2報)雄ラットの生殖能力及びその影響(連続交配試験)。Chemotherapy 32(S-3)：293~300, 1984
- 7) 山口俊和、鈴木玲子、関根 豊：AT-2266の生体内動態Ⅱ、動物におけるAT-2266と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄。Chemotherapy 32(S-3)：103~108, 1984

TOXICOLOGICAL STUDIES OF AT-2266 II. SUBACUTE AND CHRONIC TOXICITY STUDIES IN RATS

YUICHI TAKEMOTO, HIROMI SENDA, SACHIHO NAKANO, HIROSHI YAMAZOE,
MICHIKO YAMAYOSHI, NOBUO MATSUOKA, KUMIO OHNISHI and KOUICHI YOSHIDA
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

AT-2266, a newly synthesized antibacterial agent, was administered orally to rats at dose levels of 120, 600 and 3,000 mg/kg/day in one-month subacute toxicity study, and of 60, 300 and 1,500 mg/kg/day in six-month chronic toxicity study, respectively.

The results obtained were as follows:

- 1) In both toxicity studies, there found no animal death due to administration of the compound and, as for the toxic signs, the animals receiving the high dose in chronic study and receiving the moderate dose or more in subacute study developed soft stool.
- 2) The high dose of both studies caused the depression of growth rate.
- 3) Cecum weight increased dose-dependently in both studies.
- 4) Blister-like change at the intermediate zone of the articular cartilage was noted in a few animals receiving the moderate dose or more in both studies.
- 5) Slight desquamation and hydropic degeneration of the uriniferous tubules were observed in a few animals of the high dose group in subacute toxicity study.
- 6) There found atrophic testis and degenerated spermatids in ductus epididymides only in the high dose group of both studies.
- 7) With regard to increased cecum weight and atrophic testis, the changes were recognized to recover or to alleviate after the cessation period for one month in chronic toxicity study.

From the results mentioned above, the safety dose of AT-2266 was estimated to be 120 mg/kg/day in subacute toxicity and 60 mg/kg/day in chronic toxicity, respectively.