

薬理と治療

Vol. 14 Suppl. 5
1986 December

特 集

Argipidine (MD-805) 注射剤の
基礎研究

薬 理

毒 性

代 謝

ライフ・サイエンス出版

薬理と治療 Vol. 14 Suppl. 5 1986

特集／Argipidine (MD-805) 注射剤の 基礎研究

目 次

圖 案 理

血液凝固に対する Argipidine (MD-805) の影響	三菱化成工業	玉尾 嘉邦他	7
血小板機能に対する Argipidine (MD-805) の影響	三菱化成工業	原 啓人他	13
肺静脈シャント法による血栓形成に対する Argipidine (MD-805) の抑制効果	三菱化成工業	生駒 英信他	21
脳虚血ラットの脳微小循環障害に対する Argipidine (MD-805) の効果	三菱化成工業	山本登志弘他	25
Argipidine (MD-805) の実験的脳梗塞症の進展に対する影響	第一製薬	熊田 敏彦他	33
Argipidine (MD-805) の末梢動脈閉塞症モデルに対する予防効果	第一製薬	岩本 政博他	41
新規抗ロニン薬 Argipidine (MD-805) の一般薬理作用	三菱化成工業	戸部 昭広他	51

圖 毒 性

Argipidine (MD-805) のラットおよび マウスにおける急性毒性試験	三菱化成安全科学研究所	土志田和夫他	71
Argipidine (MD-805) のラットにおける静脈内投与 による1ヵ月間亜急性毒性試験	三菱化成安全科学研究所	土志田和夫他	79
Argipidine (MD-805) のビーグル犬における 静脈内投与による1ヵ月間亜急性毒性試験	鈴ボソリサーチセンター	平川 哲孝他	89
Argipidine (MD-805) のラット26週間静脈内投与の 慢性毒性試験	第一製薬	大野 広志他	109
Argipidine (MD-805) のイヌ6ヵ月間静脈内投与の 慢性毒性試験	第一製薬	小野 承行他	133

Preclinical Studies of Argipidine (MD-805) Injection

CONTENTS

■ Pharmacology

Effect of argipidine (MD-805) on blood coagulation	Y. Tamao <i>et al.</i>	7
Effect of argipidine (MD-805) on platelet function	H. Hara <i>et al.</i>	13
Suppressive effect of argipidine (MD-805) on thrombogenesis by the arterio-venous shunt in rabbits	H. Ikoma <i>et al.</i>	21
Effect of argipidine (MD-805) on cerebral microcirculation after cerebral ischemia in rats	T. Yamamoto <i>et al.</i>	25
Effect of argipidine on cerebral water content and mortality in experimental rat cerebral infarction	T. Kumada <i>et al.</i>	33
Prophylactic effect of argipidine on development of lesions in rat peripheral arterial occlusion model	M. Iwamoto <i>et al.</i>	41
General pharmacological properties of a new thrombin inhibitor, argipidine (MD-805)	A. Tobe <i>et al.</i>	51

■ Toxicology

Acute toxicity of argipidine (MD-805) in rats and mice	K. Toshida <i>et al.</i>	71
One-month subacute intravenous toxicity of argipidine (MD-805) in rats	K. Toshida <i>et al.</i>	79
One-month subacute intravenous toxicity of argipidine (MD-805) in beagle dogs	T. Hirakawa <i>et al.</i>	89
Twenty six-week chronic intravenous toxicity study of argipidine (MD-805) in rats	H. Ohno <i>et al.</i>	109
Six month chronic intravenous toxicity of argipidine, a new antithrombotic agent, in dogs	Y. Ono <i>et al.</i>	133

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第1報〉 ラットにおける妊娠前および妊娠初期

静脈内投与試験 三菱化成安全科学研究所 阿部 武丸 他 153

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第2報〉 ラットにおける胎仔の器官形成期

静脈内投与試験 三菱化成安全科学研究所 阿部 武丸 他 161

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第3報〉 ラットにおける周産期および授乳期

静脈内投与試験 三菱化成安全科学研究所 阿部 武丸 他 175

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第4報〉 ウサギにおける胎仔の器官形成期静脈内投与試験 第一製薬 渡辺 敏樹 他 187

Argipidine (MD-805) の抗原性に関する検討 第一製薬 和賀井 信彦 他 197

新抗トロンビン薬 Argipidine (MD-805) の変異原性に関する検討

〈第1報〉 哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験 第一製薬 島田 弘康 他 207

新抗トロンビン薬 Argipidine (MD-805) の変異原性に関する検討

〈第2報〉 細菌を用いる復帰変異試験 第一製薬 恵比根 豊 他 215

圖代 謝

イヌにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究

—Argipidine 連続静脈内注入時の血中濃度推移

および抗血液凝固作用— 三菱化成工業 飯田 成宇 他 221

ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究

〈第3報〉 胎仔移行性および乳汁中移行性 三菱化成工業 飯田 成宇 他 229

ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究

〈第4報〉 肝ミクロソーム薬物代謝酵素系に対する

Argipidine の影響 三菱化成工業 飯田 成宇 他 237

Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究

—蛋白結合および血球結合— 三菱化成工業 龍野 淳 他 243

ヒトにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究

—Argipidine 点滴静脈内投与時の Argipidine および

代謝物の血漿、尿および糞中濃度— 三菱化成工業 井澤 修 他 251

Reproduction studies of argipidine (MD-805) (I)	
—Fertility study in rats treated intravenously	
with argipidine (MD-805)—	T. Abe <i>et al.</i> 153
Reproduction studies of argipidine (MD-805) (II)	
—Teratogenicity study in rats treated intravenously	
with argipidine (MD-805)—	T. Abe <i>et al.</i> 161
Reproduction studies of argipidine (MD-805) (III)	
—Perinatal and postnatal study in rats treated	
intravenously with argipidine (MD-805)—	T. Abe <i>et al.</i> 175
Reproduction studies of argipidine (MD-805) (IV)	
—Teratogenicity study in rabbits treated intravenously	
with argipidine (MD-805)—	T. Watanabe <i>et al.</i> 187
Studies on antigenicity of argipidine (MD-805)	N. Wakai <i>et al.</i> 197
Mutagenicity studies of argipidine (MD-805), a new thrombin inhibitor (I)	
— <i>In vitro</i> cytogenetic study using mammalian cells—	H. Shimada <i>et al.</i> 207
Mutagenicity studies of argipidine (MD-805), a new thrombin inhibitor (II)	
—Reversion test with bacteria—	Y. Ebine <i>et al.</i> 215
Pharmacokinetics	
Pharmacokinetic studies of argipidine (MD-805) in dogs	
—Plasma level profile and inhibitory effect of blood coagulation	
during and after continuous infusion of argipidine—	S. Iida <i>et al.</i> 221
Pharmacokinetic studies of argipidine (MD-805) in rats (II)	
—Excretion into milk and foeto-placental transfer—	S. Iida <i>et al.</i> 229
Pharmacokinetic studies of argipidine (MD-805) in rats (IV)	
—Effects of argipidine on drug-metabolizing enzymes	
of liver microsomes—	S. Iida <i>et al.</i> 237
Pharmacokinetic studies of argipidine (MD-805)	
—Protein binding and blood cell binding—	J. Tatsuno <i>et al.</i> 243
Pharmacokinetic studies of argipidine (MD-805) in human	
—Concentrations of argipidine and its metabolites in plasma,	
urine and feces during and after drip intravenous infusion—	O. Izawa <i>et al.</i> 251

血液凝固に対する Argipidine (MD-805) の影響

三菱化成工業株式会社総合研究所 第二研究部門 医薬研究所

玉 尾 嘉 邦 山 本 登志弘 平 田 倫 子

衣 笠 真 弓 菊 本 亮 二

Effect of Argipidine (MD-805) on Blood Coagulation

Yoshikuni Tamao, Toshihiro Yamamoto, Tomoko Hirata,
Mayumi Kinugasa and Ryoji Kikumoto

Pharmaceuticals Laboratory, Life Science Research Sector, Research Center,
Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

The effect of argipidine (MD-805) on thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) was studied in comparison with heparin in the plasma of human, dogs, rabbits and rats. Argipidine inhibited fibrinogen clotting by human thrombin as potently as that by bovine thrombin with an I_{50} of $0.036 \mu\text{M}$. Among TT, APTT and PT, TT was prolonged at the lowest concentration of argipidine with the coagulation time about twice that of control at $0.06 \mu\text{M}$ in human, rats and rabbits and $0.12 \mu\text{M}$ in dogs. APTT and PT were prolonged by argipidine at the concentration 10~30 times that required for the prolongation of TT. Although heparin prolonged TT at the lowest concentration, heparin prolonged APTT more potently than argipidine as compared on the basis of TT prolongation. For example, in human plasma argipidine prolonged APTT at the concentration 10 times that required for TT prolongation but heparin prolonged APTT at the concentration only three times that required for TT prolongation.

TT and APTT was prolonged more drastically with the increasing concentration of heparin than with that of argipidine. Argipidine prolonged APTT and PT at the same concentration range, while heparin prolonged PT at the concentration about 20 times that required for APTT prolongation.

KEY WORDS

Argipidine, Heparin, Blood coagulation, Thrombin inhibitor

緒 言

トロンビンを選択的に阻害する argipidine は種々の血栓症モデルで有効性を示し¹⁻⁴⁾、臨床的にも慢性動脈閉塞症および脳血栓症急性期に対し有用性が示されている。一方、血液凝固系に対しては、antithrombin III (AT-III) の存在下でトロンビンのみならずその他の凝固系酵素を阻害するヘパリンとは挙動が異なることがヒトの血漿を用いて示されている⁵⁾。

今回、ヒト、イヌ、ウサギ、ラットの血漿を用い argipidine のトロンビン時間 (TT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT) に対する影響をヘパリンと比較した。

I 実験材料

1 使用薬物

Argipidine は三菱化成工業で合成したものをを用いた。PT 測定のために Thromboplastin C (ミドリ十字) を、APTT 測定のために Pathromtin (Behring) を、TT 測定のためにトロンビン (ウシ) (持田製薬) を使用した。その他、以下に示した試薬を使用した。

フィブリノーゲン (ウシ) (Sigma)、トロンビン (ヒト) (Sigma)、ヘパリン (Novo)。

2 使用動物

ビーグル犬 (♂, 体重約 10 kg)、Wistar 系ラット (♂, 体重 220~240 g)、日本白色在来種ウサギ (♂, 体重 2.5~2.9 kg) を使用した。

3 血漿の調整

3.8% クエン酸ナトリウム 1 容を入れたプラスチック管に血液を 9 容採取し、3000 rpm で 15 分間遠心分離し血漿を採取した。採血は以下のように行った。

ヒト：健康男子の肘静脈より注射筒で採血した。

イヌ：ビーグル犬の前腕静脈より注射筒で採血した。

ウサギ：Pentobarbital 麻酔下で頸動脈に挿入したカニューレより採血した。

ラット：Pentobarbital 麻酔下で腹部大静脈より注射筒で採血した。

II 実験方法

1 ヒトトロンビンによるフィブリノーゲン凝固時間の測定

既報⁶⁾の方法に従いウシトロンビンのかわりにヒトトロンビンを用いて測定した。

2 血液凝固時間の測定

生理食塩液で希釈した argipidine 溶液またはヘパリン溶液を使用して凝固時間に対する影響を検討した。対照には生理食塩液のみを加えた。

1) TT の測定

血漿 0.1 ml に argipidine またはヘパリン溶液を 0.1 ml 加え、37°C で 30 秒間保温後、トロンビン 0.1 ml を加えクロットの生じるまでの時間を測定した。トロンビン濃度は対照の凝固時間が約 20 秒となるように調整し、ヒトでは 3 U/ml、イヌでは 2 U/ml、ラットでは 6 U/ml、ウサギでは 4 U/ml のものを使用した。

2) APTT の測定

カオリン懸濁液を加えた APTT 試薬 0.1 ml に血漿 0.09 ml、argipidine またはヘパリン溶液 0.01 ml を加え、37°C で 2 分間保温後、37°C で保温した 25 mM CaCl₂ 0.1 ml を加え、クロットの生じるまでの時間を測定した。

3) PT の測定

試験管 A に血漿 0.099 ml を入れ、argipidine またはヘパリン溶液 0.011 ml を加え、試験管 B にトロンボプラスチン C 0.2 ml を入れ、それぞれを 37°C で 1 分間保温後、試験管 A より 0.1 ml を取り試験管 B に加えてクロットの生じるまでの時間を測定した。

III 実験結果

1 ヒトトロンビンによるフィブリノーゲン凝固に対する影響

フィブリノーゲン溶液のトロンビンによる凝固時間は、argipidine の 0.036 μ M 濃度で 2 倍に延長された。この効果は、先に報告したウ

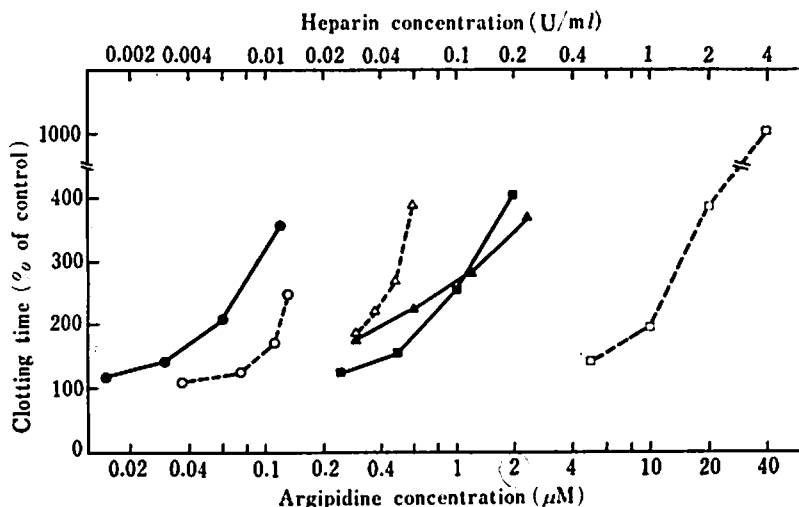


Fig. 1 Effect of argipidine and heparin on TT (●, ○), APTT (▲, △) and PT (■, □) of human plasma. Closed symbols; argipidine, open symbols; heparin. Each point represents the mean of three samples

シトロンビンによる凝固に対する効果とほぼ同程度の効果であり⁶⁾, argipidine はヒトロンビンおよびウシトロンビンを同程度に抑制することが認められた。

2 血液凝固に対する影響

1) ヒト血漿

Argipidine は 0.06 μM で TT を 2.1 倍に, 0.6 μM で APTT を 2.3 倍に, 1 μM で PT を 2.6 倍に, それぞれ延長させた。ヘパリンは 0.013 U/ml で TT を 2.5 倍に, 0.038 U/ml で APTT を 2.2 倍に, 1 U/ml で PT を 2.0 倍に, それぞれ延長させた (Fig. 1)。

2) イヌ血漿

Argipidine は 0.12 μM で TT を 2.2 倍に, 2.4 μM で APTT を 2.3 倍に, 1.0 μM で PT を 2.0 倍に, それぞれ延長させた。ヘパリンは 0.015 U/ml で TT を 2.3 倍に, 0.12 U/ml で APTT を 2.1 倍に, 2.0 U/ml で PT を 2.9 倍に延長させた (Fig. 2)。

3) ラット血漿

Argipidine は 0.06 μM で TT を 1.8 倍に, 0.6 μM で APTT を 2.0 倍に, 1.0 μM で PT を

2.8 倍に, それぞれ延長させた。ヘパリンは 0.026 U/ml で TT を 2.5 倍に, 0.12 U/ml で APTT を 2.4 倍に, 2.0 U/ml で PT を 2.2 倍に, それぞれ延長させた (Fig. 3)。

4) ウサギ血漿

Argipidine は 0.06 μM で TT を 1.9 倍に, 2.4 μM で APTT を 2.1 倍に, 1.0 μM で PT を 1.9 倍に, それぞれ延長させた。ヘパリンは 0.032 U/ml で TT を 2.3 倍に, 0.12 U/ml で APTT を 2.1 倍に, 2.0 U/ml で PT を 1.8 倍に, それぞれ延長させた。ヘパリンの TT に対する効果は, 濃度を少し上昇させることにより急激な凝固時間の延長が認められ, 個体差が大きかった (Fig. 4)。

IV 考 察

濃度-凝固時間延長率曲線で示されているように, ヘパリンの TT および APTT に対する効果は, 濃度を上昇させると急激に凝固時間が延長するのに対し, argipidine においては, 濃度の上昇に応じて凝固時間の延長は認められるが, ヘパリンのような急激な上昇は認められ

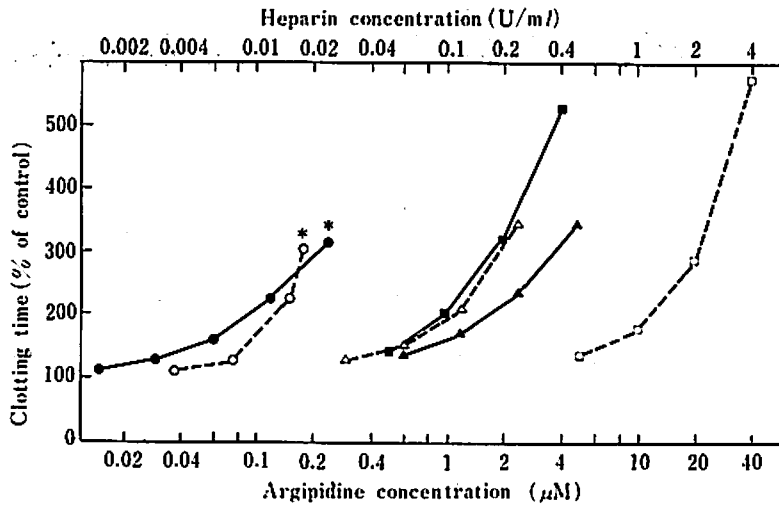


Fig. 2 Effect of argipidine and heparin on TT (●, ○), APTT (▲, △) and PT (■, □) of dog plasma.
Closed symbols; argipidine, open symbols; heparin. Each point represents the mean of three samples with the exception of the points marked by *, which represent the mean of two samples

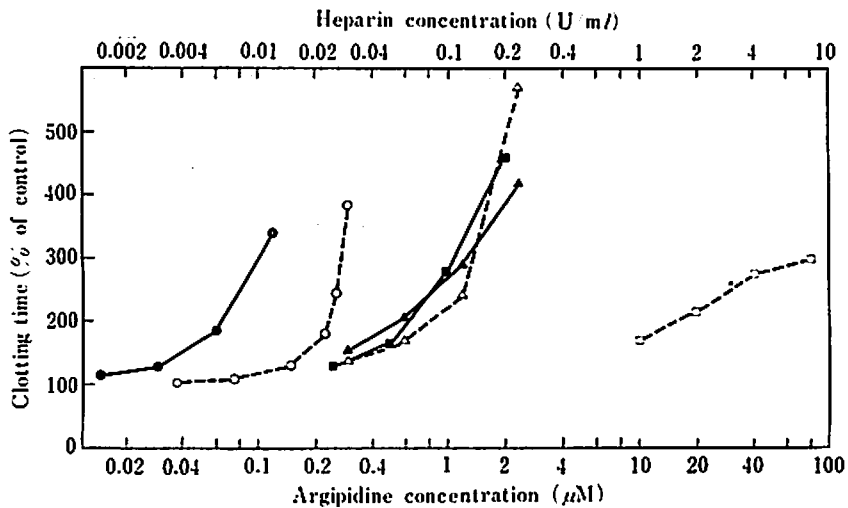


Fig. 3 Effect of argipidine and heparin on TT (●, ○), APTT (▲, △) and PT (■, □) of rat plasma.
Closed symbols; argipidine, open symbols; heparin. Each point represents the mean of three samples

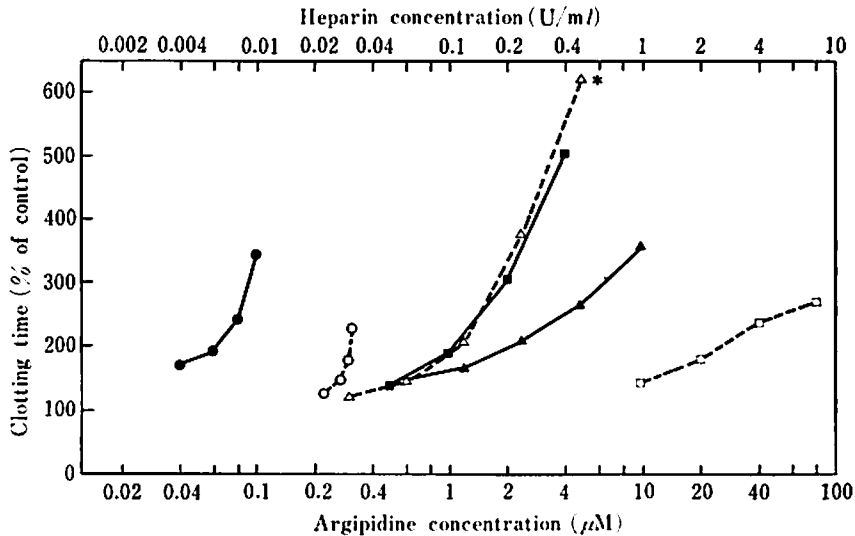


Fig. 4 Effect of argipidine and heparin on TT (●, ○), APTT (▲, △) and PT (■, □) of rabbit plasma.

Closed symbols; argipidine, open symbols; heparin. Each point represents the mean of three samples with the exception of the point marked by *, which represents the mean of two samples

なかった。このことは、ヘパリンが AT-Ⅲ の共存下でトロンビン以外の凝固系酵素を阻害することと⁷⁾、ヘパリンによる阻害が非可逆的であることによるものと思われる⁸⁾。

Argipidine は TT に対して最も低い濃度で延長作用を示し、ヒト、ラット、ウサギでは $0.06 \mu\text{M}$ 、イスでは $0.12 \mu\text{M}$ で TT を約 2 倍に延長させた。APTT と PT に対する argipidine の効果は、TT を延長させる濃度の 10~30 倍の濃度で延長作用を示した。ヘパリンも TT に対して最も強い作用を示したが、APTT に対する効果は TT を延長させる濃度の 3~8 倍の濃度で延長作用を示し、ヘパリンは argipidine と比較して相対的に APTT を強く延長することが認められた。特にヒトにおいて、argipidine は APTT を延長させるには TT を延長させる濃度の約 10 倍の濃度が必要であるのに対し、ヘパリンは APTT を延長させるには TT を延長させる濃度の約 3 倍で充分であ

ることが認められた。このように、ヘパリンと比較した場合、argipidine の APTT の延長効果が TT に比較して小さいことは argipidine が凝固系酵素のうちでトロンビンを選択的に阻害することによると思われる。

Argipidine は APTT と PT をほぼ同濃度域で延長させるのに対し、ヘパリンは PT を延長させるためには、APTT を延長させる濃度の約 20 倍を必要とした。PT は外因系凝固活性を強く反映する凝固検査であるため、factor VIIa に対する効果が強く現われるが、argipidine、ヘパリンともに factor VIIa に対する阻害効果は低いことが示されている⁹⁾ ので、PT に対する argipidine とヘパリンの挙動の差は、factor VIIa に対する阻害効果の差では説明できない。この挙動の差は、凝固時間の延長に AT-Ⅲ を必要とするヘパリンとトロンビンの活性点を直接阻害する argipidine の阻害機構の差によるものと考えられる。

文 献

- 1) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と血管 13: 72~77 (1982)
- 2) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemost.* (投稿中)
- 3) Kumada T. & Abiko Y.: Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor No. 805 (MD-805) in experimental antithrombin II-deficient animals, *Thrombosis Res.* 24: 285~298 (1981)
- 4) 山本登志弘, 平田倫子, 稲垣三重子, 伊藤仁堂, 菊本亮二, 玉尾嘉邦: 脳虚血ラットの脳微小循環障害に対する Argipidine の効果, 薬理と治療 14 (Suppl. 5): 887~894 (1986)
- 5) 丹羽知登世, 丹羽正弘, 前田美雪, 山岸良一, 近藤新一, 桜川信男: 新合成抗トロンビン剤 (MD-805) の凝血系へ及ぼす影響, 最新医学 40: 2677~2683 (1985)
- 6) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 440~446 (1981)
- 7) Rosenberg R.D.: Chemistry of the hemostatic mechanism and its relation to the action of heparin, *Fed. Proc.* 36: 10~18 (1977)
- 8) Rosenberg R.D. & Damus P.S.: The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor, *J. Biol. Chem.* 248: 6490~6505 (1973)
- 9) 藤巻道男, 池松正次郎, 福武勝幸, 細莊和子: 外因系凝血機転に対するヘパリン, FOY および MD-805 の影響, DIC 調査研究班, 昭和56年業績集 (1981), pp. 110~114

* * *

血小板機能に対する Argipidine (MD-805) の影響

三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 医薬研究所

原 啓 人 玉 尾 嘉 邦 菊 本 亮 二

Effect of Argipidine (MD-805) on Platelet Function

Hiroto Hara, Yoshikuni Tamao and Ryoji Kikumoto

Pharmaceutical Laboratory, Life Science Research Sector,
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.

ABSTRACT

Argipidine inhibited thrombin-induced platelet aggregation and its IC_{50} values were $0.009 \mu M$ (rabbit washed platelet), $0.027 \mu M$ (rabbit PRP) and $0.04 \mu M$ (human PRP). While, on collagen, ADP or arachidonic acid-induced platelet aggregation it showed only a weak inhibitory activity. Argipidine scarcely affected platelet adhesiveness to glass beads. These results indicate that the effect of argipidine on platelet function is selective to thrombin in the same manner as that on blood coagulation system.

Mortality induced by thrombin infusion to rats was reduced by argipidine administration. The potency of the suppressive effect on mortality depended on the blood level of argipidine.

Argipidine administration prolonged bleeding time in dose-dependent manner. But, the dosage which gave the prolongation of bleeding time was higher than the effective doses in animal models or the clinical dosage. Therefore the bleeding risk in the use of argipidine is considered low the usual dosage.

KEY WORDS

Argipidine, Platelet aggregation,
Bleeding time, Thrombin inhibitor

緒 言

新規な合成トロンビン・インヒビターである argipidine は、トロンビンに対し強力かつトロンビン特異的な阻害作用を有しており^{1,2)}, *in vivo* における各種血栓症モデル実験においても有効性が示された³⁻⁶⁾。血栓の初発反応における血小板の重要性については周知の事柄であり、また、argipidine の血小板系への有効性が示唆される実験結果が得られていることから argipidine が血小板機能にどのような作用をもっているのか興味のもたれる点である。本報告では、argipidine の血小板機能に及ぼす作用、ならびに、血小板機能により影響を受けるとされている出血時間に及ぼす作用について検討した。

I 実験方法および材料

1 採血および多血小板血漿の調製

ウサギ（日本在来白色種、雄性）では耳介中心動脈より、ヒト（健康人）では前腕正中皮静脈より、それぞれプラスチック製注射筒を用いて採血した。採血した血液は、ただちに血液9容に対し3.8%クエン酸ナトリウム1容と混合後、遠心分離（1000 rpm, 20分）し、上層の多血小板血漿（以下 PRP と略す）を得た。残った血液をさらに遠心分離（3000 rpm, 15分）することにより乏血小板血漿（PPP と略す）を得た。

2 洗浄血小板の調製

ゲル濾過法により洗浄血小板を調製した。Sephacryl 2B (Pharmacia) を用いたゲル濾過カラムに PRP をのせ GF Buffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.2, 0.14 M NaCl, 0.001 M MgCl₂, 0.1% グルコース, 0.35% ウシ血清アルブミン) にて流下させ血小板の流出画分を分取した。これを洗浄血小板浮遊液として使用した。

3 血小板凝集の測定

Sienco 社アグリゴメーター (DP-247 E) を用い Born らの方法⁷⁾に準じて血小板凝集の測定を行った。

PRP) または洗浄血小板浮遊液) 200 μ l に 25 mM CaCl₂ または生理食塩液 (ウサギ PRP 使用時のみ CaCl₂ 添加を行った。その他の場合は生理食塩液) 10 μ l 被験薬液 25 μ l を加え、37°C で3分間保温した後、凝集惹起剤 15 μ l を加え生ずる凝集の最大凝集値を求めた。被験薬液の濃度を変化させた測定結果より 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。

4 血小板粘着能

ウサギの血液9容に対し3.8%クエン酸ナトリウム1容を混合したクエン酸加血 2.5 ml をプラスチック注射筒にとり被験薬液 25 μ l を加えて良く混合し、37°C で3分間保温した。この血液を1.3 g のガラスビーズを含むガラスビーズカラム (栄研) に40秒かけて2 ml 通じ、カラム通過前後の血小板数を計測し、ガラスビーズへの血小板粘着能を求めた。なお、血小板数の計測は、Breckner Cronkite 法⁸⁾によった。

5 血小板プロスタグランジン生成

酸素源としてはウサギ洗浄血小板を超音波処理した sonicated platelet を用いた。反応組成は以下のとおりである。0.2 μ Ci ¹⁴C-アラキドン酸, 50 mM ホウ酸バッファー, pH 9.0, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM トリプトファン, これに被験薬液と sonicated platelet を加え全量 250 μ l で反応を行った。反応は 37°C, 15分間行い、1 M クエン酸 15 μ l を加えて反応を停止後、1 ml ずつのエチルエーテルにより2回反応生成物の抽出を行った。エチルエーテルを N₂ 気流下で除き、残渣をアセトンに溶解してシリカゲル薄層プレート (Merck silicagel 60 plate) にのせ、ベンゼン: ジオキサン: 酢酸 (60: 30: 3) にて展開した。この TLC について TLC-radio scanner にて放射能の分布を測定した。

6 トロンビン静注による致死率の測定

ウイスター系ラット (雄性、体重 $\sim$ 130 g) をウレタン麻酔下で固定し、大腿静脈よりトロンビン (ウシ) を 500 units/kg/min (0.3 ml/min) で3分間 (全量 1500 units/kg) 注入した。このトロンビン注入により20分以内に死亡

Table 1 Inhibition of platelet aggregation by argipidine

Animal	Platelet	Inducer		IC ₅₀ (μM)
Rabbit	Washed	Thrombin*	0.06 unit/ml	0.009
	PRP	Thrombin*	0.2 unit/ml	0.027
	PRP	Collagen	2 μg/ml	590
	PRP	Arachidonic acid	40 μM	200
	PRP	ADP	5 μM	500
Human	PRP	Thrombin#	1 unit/ml	0.040

* Bovine thrombin # Human thrombin

する動物数を計数した。被験薬液は静脈内投与の場合には生理食塩液に溶解して静注し、経口投与の場合には、1日絶食させたラットにトラガント懸濁液として投与した。

7 出血時間の測定

ウサギの耳を用い、Duke 法に準じた方法により出血時間を測定した。

体重2.8~3.2 kg のウサギ(日本在来白色種、雄性)を用い、ペントバルビタール麻酔下で家兎固定箱に固定した。左耳背部の毛を除毛クリームを用いて除毛し、水でよく洗浄した後、充分乾燥させた。この除毛された耳の血管が明瞭に見えない部分に先端の鋭い新しい外科用メスで3 mm のキズをつけ、出血を起こさせた。この出血を起こさせた時点を0 time とし、15秒おきに濾紙(Toyo, #2)を軽く押しあてて出血した血液を吸い取り、赤い点が認められなくなった時点を出血時間とした。まず薬物投与前にコントロールの出血時間を測定し、次いで薬物を投与して出血時間の測定を行った。1匹の家兎についてコントロールと薬物3 dose の出血時間をそれぞれ3ないし4回測定し、それらの平均をそれぞれの出血時間とした。

被験薬の投与は右耳の静脈から連続静注により行い、静注開始後30分より出血時間の測定を行った。なお、投与は、低投与量から順次高投与量へ移行させた。

8 APTT と血中濃度の測定

体重2.4~2.5 kg のウサギ(日本在来白色種、雄性)を用い、ペントバルビタール麻酔下

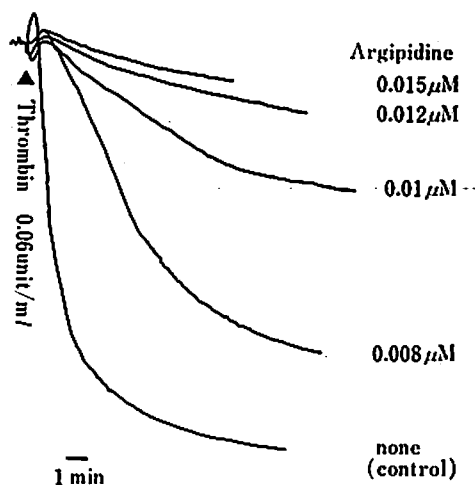


Fig. 1 Inhibitory effect of argipidine on thrombin-induced aggregation of rabbit washed platelets

に頸動脈に採血用カテーテルを挿入した。薬物投与は大腿静脈より5 ml/kg/hr の速度で連続静注を行った。argipidine の投与方法は、同一の個体に5, 10, 20 μg/kg/min の順でおのの1時間ずつ投与した。採血はargipidine 投与前、および各用量の連続静注開始時より45分経過時に行った。採血後ただちに血液9容に対し3.8% クエン酸ナトリウム1容を加え、3000 rpm で15分間遠心し血漿を得た。

APTT(活性化部分トロンボプラスチン時間)はPathromtin (Behring) を用い測定した。

血中 argipidine 濃度は argipidine の抗トロ

ンビン作用を利用し、トロンビン時間より求めた³⁾。

9 試 薬

Argipidine は、三菱化成工業で合成したものをを用いた。コラーゲンは、ウシアキレス腱コラーゲン (Sigma) を pH 3.0 酢酸緩衝液に懸濁したものをを用いた。その他の試薬は以下のとおりである。ウシトロンビン (持田製薬)、ヒト

トロンビン、アラキドン酸、ADP (Sigma)、¹⁴C-アラキドン酸 (Amersham)、ウシ血清アルブミン (生化学工業)。

II 実験成績

1 血小板凝集抑制作用

1) ウサギ血小板

トロンビン、コラーゲン、アラキドン酸、ADP によるウサギ血小板凝集に対する argipidine の抑制効果について Table 1 に示す。argipidine は、トロンビンによる血小板凝集を強く抑制した (Fig. 1)。その IC₅₀ 値は、洗浄血小板および PRP 使用時で、それぞれ 0.009 μ M, 0.027 μ M であった。洗浄血小板では血漿成分が存在していず、凝集に必要とされるトロンビン量も少ないため、低濃度の argipidine で強く抑制されたものと考えられる。一方、コラ

Table 2 Effect of argipidine on platelet adhesiveness to glass beads

Argipidine(μ M)	n	% Adhesion	p
None	3	57.8 $\pm$ 1.30	—
0.1	3	53.7 $\pm$ 2.93	N. S.
1	3	49.8 $\pm$ 2.76	N. S.
10	3	49.4 $\pm$ 0.10	<0.01

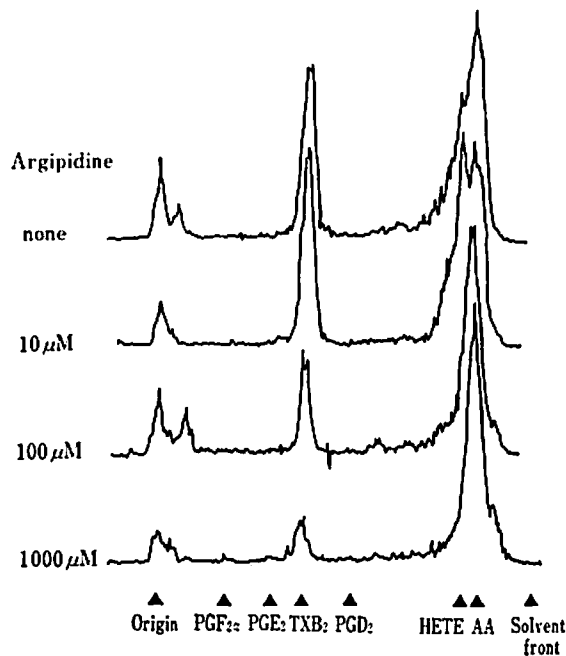


Fig. 2 Thin-layer chromatogram (radioscannogram) of arachidonic acid metabolites and effect of argipidine on the metabolite production

ーゲン, アラキドン酸, ADP による血小板凝集に対しては弱い阻害効果を示したのみであった。

2) ヒト血小板のヒトトロンビンによる凝集
ヒト PRP を用いヒトトロンビン添加による血小板凝集に対する argipidine の IC_{50} は $0.04 \mu M$ であり, ウサギの場合と同様トロンビン血小板凝集に対する強い阻害効果が認められた (Table 1)。

2 血小板粘着能に対する影響

Argipidine $0.1, 1, 10 \mu M$ の3濃度についてガラスビーズへの血小板粘着能に対する影響について測定した (Table 2)。argipidine $10 \mu M$ で有意な抑制が認められたが, 抑制率としては 14.5% と低値であり, 薬剤の効果としては弱いものであった。

3 血小板プロスタグランジン合成阻害作用

結果を Fig. 2 に示す。argipidine $10, 100, 1000 \mu M$ で濃度依存的に thromboxane B_2 (TXB_2) 生成が抑制されていた。radio-scanner の面積値より阻害率を求めた結果, $10 \mu M$ では阻害は認められなかったが, $100 \mu M$ では 40.7% , $1000 \mu M$ では 61% の阻害率を示した。

4 トロンビン静注による致死に対する抑制作用

ラットに対しトロンビン 1500 units/kg を3分間かけて静脈内注入すると摂食ラットにおいて $5/5$, 絶食ラットにおいても $6/7$ の致死率が得られた。この条件下で argipidine を投与し, argipidine による致死率抑制効果について試験を行った (Table 3)。argipidine を静脈内投与した際の血中濃度の減少が速やかであることが知られていたため投与後の時間を変化させた時

Table 3 Suppressive effect of argipidine on mortality caused by thrombin infusion in rats

Dose	Time after dose(min)	Mortality rate	Plasma level*(μM)
Vehicle (i.v.)	20	5/5	—
1 mg/kg i.v.	5	0/5	1.2
	20	2/5	0.35
	40	4/5	0.080
4 mg/kg i.v.	20	1/5	1.4
	40	1/5	0.33
	60	3/5	0.075
Vehicle (p.o.)	60	6/7	—
300 mg/kg p.o.	60	3/6	0.19

* plasma level presumed from the experiment of 2 mg/kg i.v. or 300 mg/kg p.o.

Table 4 Effect of argipidine administration on bleeding time

Dose	Bleeding time(min)	APTT (sec)	Plasma level (μM)
Vehicle	2.94 ± 0.13	25.4 ± 3.8	
5 $\mu g/kg$ min	4.09 ± 0.14	34.2 ± 4.5	0.65 ± 0.038
10 $\mu g/kg$ min	4.97 ± 0.18	42.7 ± 1.6	1.69 ± 0.140
20 $\mu g/kg$ min	7.93 ± 0.85	45.3 ± 2.5	2.47 ± 0.180

の致死率に及ぼす影響について検討した結果, argipidine の血中濃度に応じた致死率抑制効果が認められた。また, argipidine 経口投与後においても致死率抑制効果が認められ, 推定血中濃度と致死率抑制効果は静脈内投与の場合と対応できるものであった。

5 出血時間に及ぼす影響

Argipidine を 5, 10, 20 $\mu\text{g/kg/min}$ の用量で投与しておくとき出血時間はそれぞれ 1.4, 1.7, 2.7 倍に延長した (Table 4)。同じ投与量における APTT の変化は 1.35, 1.7, 1.8 倍であり, 出血時間と APTT の間に良い相関がみられた。

Argipidine のコラーゲンによる血小板凝集に対する作用は弱いことも考慮すると, この試験で認められた出血時間の延長は血液凝固時間延長に起因するものと考えられた。血中濃度は, 投与量が多いこともあってそれぞれ, 0.65, 1.69, 2.47 μM とかなりの高値を示したことより, argipidine の出血時間延長作用は比較的弱いものであることが示唆された。

III 考 察

Argipidine は, 強力かつトロンビン特異性の高い合成トロンビン・インヒビターである。トロンビン凝固時間 (トロンビン時間) に対する argipidine の IC_{50} 値は, 0.036 μM (フィブリノーゲン), 0.06 μM (血漿) であった⁹⁾。血小板に対する argipidine の作用もトロンビンに対し特異性が高く, トロンビンによる血小板凝集に対して強い阻害効果 (IC_{50} , ウサギ洗浄血小板: 0.009 μM , ウサギ PRP: 0.027 μM , ヒト PRP: 0.04 μM) を示したが, コラーゲン, ADP, アラキドン酸による血小板凝集には弱い作用を示すにすぎなかった。同様に, ガラスビーズへの血小板粘着能に対しても明らかな効果を示さなかった。PRP 系でのトロンビンによる血小板凝集の IC_{50} と血漿系でのトロンビン時間の IC_{50} とがほぼ同一であった。 IC_{50} 値に直接的に関与する反応系中の基質 (フィブリノーゲン+血小板) 濃度は, トロンビン時間

測定系では血漿が 1/3 に希釈されているため血小板凝集測定系の方が約 2.4 倍高濃度である。したがって, 血小板凝集系での IC_{50} が高値を示しそうであるが, 血小板のトロンビンに対する凝集反応性が高いと考えられること, および, 添加する酵素量がトロンビン時間系の方で 3~5 倍多いことが影響してほぼ同一の IC_{50} 値が得られたものと理解される。一方, 洗浄血小板系では, 反応基質は血小板のみであるため基質濃度としては低濃度であり, 必要とされるトロンビン添加量も少量であったことより argipidine による阻害効果が強く発揮され, 10^{-9} オーダーの IC_{50} 値が得られたものと考えられる。

Argipidine は, 高濃度では血小板における TXA_2 生成を抑制した。この際, PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 の生成に変化がみられないことより, cyclooxygenase に対する阻害であると考えられる。アラキドン酸あるいはコラーゲンによる血小板凝集に対する argipidine の IC_{50} はそれぞれ 200 μM , 590 μM であったことより, これらの血小板凝集に対する阻害作用は, argipidine による cyclooxygenase 阻害作用に起因するものと理解される。

In vivo における argipidine の効果を確認するためラットへのトロンビン注入による致死に対する薬効評価を行ったところ, argipidine の有効性が示された。この実験では, 注入されたトロンビンの作用により血小板の凝集塊, フィブリンの凝固塊が血中に生じ, 肺細血管への塞栓となってラットを死に至らしめると考えられ, このトロンビンの作用を argipidine が抑制したものと理解される。この実験における推定血中濃度と致死抑制効果とを比較すると, argipidine 0.2~0.3 μM の血中濃度で致死率を約 50% 抑制した。この血中濃度は他の血栓モデル実験における有効濃度とほぼ同一の値であった³⁻⁶⁾。

Argipidine の出血時間に対する影響について検討したところ投与量の増加に依存した出血時間の延長が認められた。しかしながら, 出血時

間延長の認められた投与量は動物実験における有効量あるいは臨床的な投与に比較して高投与量であり、実用的な投与量域においては出血時間への影響はほとんどないものと考えられる。また、投与量の増加に伴う出血時間延長も緩徐な変化であることより、万一、過剰投与に至っても急激な出血傾向の出現をもたらない性質を示しているものといえる。

Argipidine の血小板機能抑制作用は、低濃度域ではトロンビンによる血小板凝集に対してのみであった。一方、100 μ M 以上の高濃度域では cyclooxygenase 阻害作用に基づくアラキドン酸あるいはコラーゲンによる血小板凝集抑制がみられたが、*in vivo* での有効量から推定される血中濃度よりもはるかに高い濃度であることから、argipidine による抗血栓効果における血小板系の関与としてはトロンビンによる血小板凝集に対する抑制が主として現れるものと思われる。さらに、血栓症モデル実験において血小板優位と考えられる血栓症に対する有効性が認められたこと^{3,6)}、および、argipidine の有効性が血小板系パラメータにより強く発揮されたこと⁴⁾を考え合わせると、生体内における血小板血栓形成の段階にトロンビンが深く関与していることが示唆される。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 440~446 (1981)
- 2) Kikumoto R., Tamao Y., Tezuka T., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Hijikata A. & Okamoto S.: Selective inhibition of thrombin by (2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[(*N*²-(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolonyl) sulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid, *Biochemistry* **23**: 85~90 (1984)
- 3) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と脈管 **13**: 72~77 (1982)
- 4) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemost.* (投稿中)
- 5) Kumada T. & Abiko Y.: Comparative study on heparin and synthetic thrombin inhibitor No. 805 (MD-805) in experimental antithrombin III deficient animals, *Thrombosis Res.* **24**: 285~298 (1981)
- 6) 山本登志弘, 平田倫子, 稲垣三重子, 伊藤仁堂, 菊本亮二, 玉尾嘉邦: 脳虚血ラットの脳微小循環障害に対する Argipidine の効果, 薬理と治療 **14**(Suppl. 5): 887~894 (1986)
- 7) Born G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature* **194**: 927~929 (1961)
- 8) Brecker G. & Cronkite E.P.: Morphology and enumeration of human blood platelets, *J. Applied Physiol.* **3**: 365~377 (1950)
- 9) 玉尾嘉邦, 山本登志弘, 平田倫子, 衣笠真弓, 菊本亮二: 血液凝固に対する Argipidine の影響, 薬理と治療 **14**(Suppl. 5): 869~874 (1986)

動静脈シャント法による血栓形成に対する Argipidine (MD-805) の抑制効果

三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 医薬研究所

生 駒 英 信 原 啓 人

玉 尾 嘉 邦 菊 本 亮 二

Suppressive Effect of Argipidine (MD-805) on Thrombogenesis by the Arterio-venous Shunt in Rabbits

Hiddenobu Ikoma, Hiroto Hara,
Yoshikuni Tamao and Ryoji Kikumoto

Pharmaceuticals Laboratory, Life Science Research Sector, Research Center,
Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.

ABSTRACT

The effect of argipidine (MD-805) on thrombus formation was studied with thrombosis at the jugular vein in rabbits. The thrombus was generated by shunting the carotid artery to the jugular vein with a polyethylene tube and forming strictures at the venous side for 1 hr.

The thrombus consisted of the mixture of white thrombus and red thrombus. Argipidine reduced the thrombus formation significantly at doses of 2 and 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ i.v. infusion, which yielded the plasma argipidine level of 0.229 and 0.427 μM at the end of the infusion, respectively. Thus, argipidine was shown to suppress the thrombus formation in this experimental thrombosis at the plasma level of 0.2~0.4 μM .

KEY WORDS

MD-805, Argipidine, Thrombin inhibitor,
Experimental thrombosis

緒 言

倉井¹⁾によって考案された頸動静脈吻合部への血栓作製法(動静脈シャント法)は、肉眼的および組織学的に臨床における動脈硬化性血栓と同一視しうる血栓の作製法として優れたものであり、かつ、再現性の良好な実験方法であるため薬剤の抗血栓効果を判定法するうえでも優れた方法といえる。

今回、われわれは、選択的抗トロンビン剤である argipidine の動静脈シャント法による血栓形成に対する有効性について知見を得たので報告する。

I 実験材料および方法

1) 血栓作製法

体重 2.2~3.4 kg のウサギ(日本在来白色種, ♂)を用い、倉井の方法¹⁾に準じ、以下の方法により頸動脈吻合部に血栓を作製した。

ウレタン麻酔下でウサギを背位固定し、前頸部に正中切開を加えて左頸動静脈を露出させ側枝を結紮した。次いで総頸動脈の血流を動脈クランプで止め、生理食塩水で内腔を満たしたポリエチレン管(長さ 10 cm, 内径 1 mm)の一端を挿入し、他端を頸静脈に挿入した。Fig. 1 に示される静脈側吻合部(A)より、心臓寄り 1 cm の部分に goldblatt crump (内径 1 mm) をかけ第 1 狭窄部(B)を作った。次に動脈クランプをはずし血流を通じた後、(B)より心臓側 5 mm の部分(C)に外径 1 mm の針金をそえて静脈とともに糸で結び血液を停止させた。5 分後に針金を抜いて血流を再開させ、この時点を血栓形成の開始時点とした。1 時間後に(A)から(B)までの血管を取り出し切開後、肉眼的に血栓の形成度合を観察した。血栓の形成度合を以下の基準により 5 段階に分類した。

Occlusive : 完全閉塞にまで達した血栓

Large : (A)~(B) の部分の 70% 以上が血栓で占められるもの

Middle : 31~69%

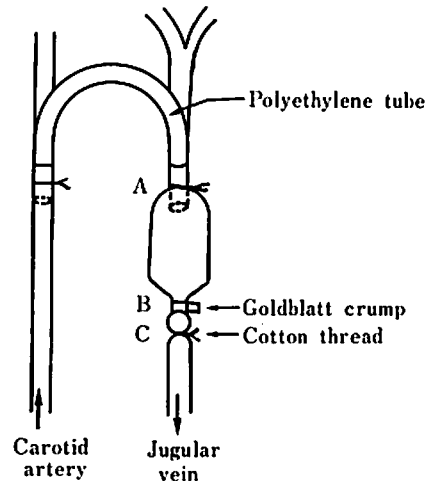


Fig. 1 Schematic illustration of the method of experimental thrombosis.

A; afteriovenous shunt made by polyethylene tube between carotid artery and jugular vein

Small : 30% 以下

None : 血栓が全く認められないもの

薬剤の投与は、生理食塩水に溶解した薬剤を股静脈より手術開始の 5 分前より実験終了まで 0.5556 ml/min の速度で持続注入することにより行った。

2) 血中濃度の測定

Argipidine の血中濃度は、反対側耳介辺縁静脈より採血して得た血漿を用い、トロンビン添加凝固時間(トロンビン時間)の測定による Bioassay 法によって測定した。

II 実験成績

Table 1 に示されるように control 実験では、形成された血栓は large 血栓を中心とした分布を示しており small 以下の血栓は認められなかった。この血栓形成条件下で argipidine を投与しておくと、small 血栓あるいは血栓が認められない例(none)への移行がみられ、2 µg/kg/min, 6 µg/kg/min いずれの用量でも有意な血栓縮小効果が認められた。

Table 1 Suppressive effect of argipidine on thrombus formation

	n	Thrombus					U-test
		Occlusive	Large	Middle	Small	None	
Control (saline)	7	2	3	2	0	0	—
Argipidine							
2 $\mu\text{g/kg/min}$	6	0	0	1	4	1	$p < 0.01$
6 $\mu\text{g/kg/min}$	5	0	0	0	3	4	$p < 0.01$

* Number of rabbits

Table 2 Blood levels of argipidine during the drug infusion

Dose	Blood level (μM)			
	start		1 hr later	
	mean	S.D.	mean	S.D.
2 $\mu\text{g/kg/min}$	0.119	0.046	0.229	0.092
6 $\mu\text{g/kg/min}$	0.574	0.137	0.427	0.220

Argipidine 投与時に測定した血中濃度は、2 $\mu\text{g/kg/min}$ で約 0.2 μM 、6 $\mu\text{g/kg/min}$ で約 0.5 μM であった (Table 2)。

III 考 察

今回の方法の動静脈シャントによって形成された血栓は、血小板に富んだ白色血栓とフィブリン網に赤血球を取り込んだ赤色血栓が層状に配列した混合血栓であり、肉眼的、組織学的に臨床上的動脈硬化性血栓と同一視しうる膠着性混合血栓であるとされている¹⁾。実際に観察された血栓も上記の形状を呈しており、血栓形成の機序としては、白色血栓部分は血小板凝集に基づいた血小板血栓であり、赤色血栓部分は凝固系亢進によって生じたフィブリン塊の生成によるものと考えられる。すなわち、血小板系と凝固系とが、比較的短時間内に並行あるいは連続して進行し血栓が形成されているものと想像される。

Argipidine は、強力かつ選択性の高い抗トロンビン物質であり^{2,3)}、いくつかの血栓症モデル実験において抗血栓作用が確認されてい

る⁴⁻⁶⁾。argipidine の強い抗トロンビン作用により血液凝固の抑制がみられることから⁷⁾、凝固系亢進による血栓症に対する有効性については合理的なものであるが、一方、血管壁の血小板血栓の形成に対しても argipidine は有効性を示した。本報における血栓は上述のごとく混合血栓であるが、argipidine による血栓形成抑制効果は強力であり、血栓が全く形成されない例が多数認められた。したがって argipidine の抗血栓作用は、フィブリン血栓のみならず血小板血栓にも及ぶものであることが確かめられたことになる。血小板凝集に対する argipidine の抑制効果は、低濃度域においてはトロンビンによる凝集に限られる⁸⁾ ことから、混合血栓に対する argipidine の有効性は、血小板血栓形成におけるトロンビンの重要性を示唆しているものといえる。

文 献

- 1) 倉井 亮：血栓予防に関する研究，お茶の水医学雑誌 13: 189-198 (1965)
- 2) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R.,

- Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereostructure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 440~446 (1981)
- 3) Kikumoto R., Tamao Y., Tezuka T., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Hijikata A. & Okamoto S.: Selective inhibition of thrombin by (2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinoliny) sulfonyl]-L-arginyl)-2-piperidinecarboxylic acid, *Biochemistry* **23**: 85~90 (1984)
- 4) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と脈管 **13**: 72~77 (1982)
- 5) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemost.* (投稿中)
- 6) 山本登志弘, 平田倫子, 稲垣三重子, 伊藤仁堂, 菊本亮二, 玉尾嘉邦: 脳虚血ラットの脳微小循環障害に対する Argipidine (MD-805) の効果, 薬理と治療 **14** (Suppl. 5): 887~894 (1986)
- 7) 玉尾嘉邦, 山本登志弘, 平田倫子, 衣笠真弓, 菊本亮二: 血液凝固に対する Argipidine (MD-805) の影響, 薬理と治療 **14** (Suppl. 5): 869~874 (1986)
- 8) 原 啓人, 玉尾嘉邦, 菊本亮二: 血小板機能に対する Argipidine (MD-805) の影響, 薬理と治療 **14** (Suppl. 5): 875~881 (1986)

脳虚血ラットの脳微小循環障害に対する Argipidine (MD-805) の効果

三菱化成工業株式会社 総合研究所 第二研究部門 医薬研究所

山 本 登志弘 平 田 倫 子 稲 垣 三重子

伊 藤 仁 堂 菊 本 亮 二 玉 尾 嘉 邦

Effect of Argipidine (MD-805) on Cerebral Microcirculation After Cerebral Ischemia in Rats

Toshihiro Yamamoto, Tomoko Hirata, Mieko Inagaki, Jindoh Itoh,
Ryoji Kikumoto and Yoshikuni Tamao

Pharmaceuticals Laboratory, Life Science Research Sector, Research Center,
Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.

ABSTRACT

The effect of argipidine (MD-805) on the cerebral microcirculation was studied with the so called "no-reflow-phenomenon" generated by blood recirculation after the cerebral ischemia produced by 4-vessel occlusion in rats as reported by Pulsinelli *et al.* No-perfusion region was detected by the infusion of India ink and no-perfusion area (NPA) was measured for 10 coronal sections of the stained brain. Argipidine reduced no-perfusion area with $5.8 \pm 2.1\%$ NPA at 5 mg/kg i.p. and $6.3 \pm 1.2\%$ NPA at 10 mg/kg i.p. as compared with $14.6 \pm 0.7\%$ NPA of the control group. Tissue culture urokinase at 48000 and 96000 U/kg i.v. did not reduce NPA.

Argipidine is considered to improve the cerebral microcirculation by the inhibition of platelet aggregation by its potent thrombin inhibitory effect, since electronmicroscopical observation of the the no-perfusion area of the brain showed that the platelet aggregates occluded the micro vessels.

KEY WORDS

Argipidine, Cerebral ischemia,
No-reflow phenomenon, Thrombin inhibitor

緒 言

脳血栓症は、動脈壁の動脈硬化性変化の基盤の上に血栓が生成して、動脈閉塞したことによるものが最も多いといわれているが、脳血栓症急性期では、血中の fibrinopeptide A および fibrinopeptide B β_{15-42} が上昇すること¹⁾, anti-thrombin III 濃度が低下すること²⁾, soluble fibrin monomer complex が出現すること³⁾等が報告され、凝固亢進状態にあることが認められている。

選択的抗トロンビン作用を有する argipidine⁴⁾は、種々の血栓症モデルに有効性を示すが^{5,6)}, 動脈壁損傷による血小板血栓の生成に対して、抑制効果を示すことが認められている⁷⁾。今回、われわれは argipidine が脳血栓症モデルに有効性を示すかどうかを、Pulsinelli ら⁸⁾の4血管閉塞による脳虚血後、血流を再開させることにより発現する脳微小循環障害モデルで検討した。このモデルにおいて、脳虚血により血小板凝集塊が脳細動脈を閉塞していることを電顕的に認め、血小板凝集塊による血管閉塞が、微小循環障害を起こさせているものと推定した。このような脳微小循環障害に対し argipidine が抑制効果を示したので報告する。

I 実験材料および方法

1 脳虚血ラットの作製および no-perfusion area (NPA) の測定

体重約300gの雄性ラット (Wistar) を使用した。椎骨動脈焼灼手術、総頸動脈閉塞ならびに血流再開は Pulsinelli らの方法⁸⁾に従った。すなわち、sodium pentobarbital 麻酔下にラットを腹位に固定し、背側頸部より切開し、第一頸椎を露出した。第一頸椎の両端にある alar foramina に高周波電気メス SUNTEC SLS-40 W (サンスター技研 K.K.) のチップを挿入して、椎骨動脈を両側性に電気焼灼切断した後、皮膚を縫合した。大脳皮質上にステンレス線を埋め込み、脳波測定用電極とした。翌日、ラットを背位に固定し、頸部を切開し両側総頸動脈

を露出した。続いて、脳波測定用電極をポリグラフ (日本光電) につなぎ双極誘導により血流再開時まで脳波を記録した。両側総頸動脈を variangle 動脈瘤クリップ (1.5 mm × 5 mm) で閉塞し、4血管閉塞を行った。4血管閉塞の間、脳波が平坦化しなかったラットは実験に使用しなかった。30分後に両側総頸動脈のクリップを除去し血流を再開させた。

血流再開後5分に開胸し、左心室にカテーテルを挿入し、下行大動脈を結紮後、墨汁 (喜寿園) 10 ml を4分間で灌流した。断頭後、脳を取り出し10%中性ホルマリン中で固定した。固定脳を Fig. 1 のように10個の冠状断に切断し、断面の写真撮影を行った。写真上の冠状断の面積および墨汁で灌流されていない no-perfusion area (NPA) を KONTRON MOP-AM 02 を用いて測定した。10個の冠状断についてそれぞれ測定し NPA (%) を次式により求めた。

$$\text{NPA (\%)} = \frac{10\text{個の脳断面中の NPA の和}}{10\text{個の脳断面積の和}} \times 100$$

2 薬物投与方法

7.5% D-sorbitol-4% ethanol 中に塩酸酸性下 (pH 1.5~1.7) で溶解した argipidine 溶液を 1 ml/kg の用量で総頸動脈閉塞 15 分前に腹腔内投与した。対照群には溶媒を投与した。一部の実験では cholesterol-methylcellulose- α -lactose を主成分とするベレットに 5 mg の argipidine を含有させたベレット (Innovative Research of America 製) を4血管閉塞を行う一日前に腹腔内に埋め込んだ。このときの対照群には、argipidine を含まないベレットを埋め込んだ。組織培養ウロキナーゼ (TCUK) (三菱油化薬品) は生理食塩液に溶解し 1 ml/kg を総頸動脈閉塞 5 分前に尾静脈より投与した。対照群には生理食塩液を投与した。

3 血中 argipidine 濃度の測定

正常ラットを用いて、argipidine 腹腔内投与後15分、45分、または argipidine ベレット投与後1日に pentobarbital 麻酔下で腹部大静脈から採血し1/10量の 3.8% クエン酸ナトリウムを加えて採取した血漿中の argipidine 濃度を、

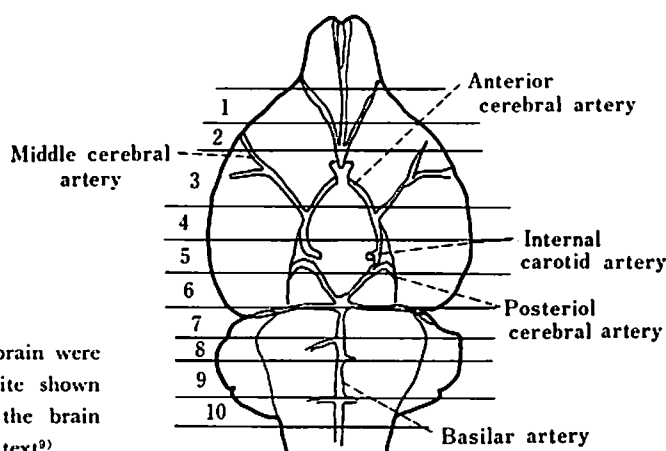


Fig. 1 Ten coronal sections of the brain were prepared by slicing at the site shown by lines. The illustration of the brain was drawn according to the text⁹⁾

先に報告⁷⁾した方法により, argipidine の抗トロンビン作用を利用したトロンビン時間法により測定した。

4 線溶活性の測定

正常ラットを用いて TCUK 投与後 5 分および 35 分に採血し, クエン酸血漿を採取し, ユーグロブリン溶解時間法およびフィブリン-寒天平板法により線溶活性を測定した。

a) ユーグロブリン溶解時間法

先に報告した plasma clot 溶解時間の測定方法¹⁰⁾の一部を改変して測定した。すなわち, ユーグロブリン分画 0.4 ml, 生理食塩液 0.17 ml, 100 U/ml 牛トロンビン (持田製薬) 0.03 ml をキューベットに入れて, 37°C で 608 nm 吸光度変化を測定し, トロンビンの添加時から吸光度がトロンビン添加前の値になるまでの時間をユーグロブリン溶解時間とした。

b) フィブリン-寒天平板法

アガロース (Miles) 中にフィブリノーゲン (Miles), トロンビンを加えて作製したフィブリン-寒天平板にユーグロブリン分画を 10 μ l 負荷した。standard として既知濃度のウロキナーゼ (ミドリ十字) を用いた。ユーグロブリン分画および standard のウロキナーゼを平板上に負荷し 37°C で 37 時間放置した後, フィブリン溶解窓の縦軸, 横軸の積に対してウロキナーゼ濃度 (対数) をプロットし検量線とした。血中

の線溶活性はサンプルの溶解窓の縦軸, 横軸の積からこの検量線を基にウロキナーゼ換算として求めた。

5 電顕標本の作製

薬物無投与で作製した脳虚血ラットを NPA の測定のとくと同様に墨汁灌流を行った後, 脳を取り出し, 2.5% glutaraldehyde 中で墨汁で灌流されていない部分を細切した。固定後, sodium cacodylate 緩衝液で洗浄し, さらに 1% osmium tetroxide 固定を行い, エタノール系列で脱水後, エポキシ系樹脂 (Quetol 812, 日新 EM) に包埋した。その後, 超薄切片を作製し, uranyl acetate および lead citrate で二重染色を施し観察した。

II 実験結果

1 脳虚血後に発現する脳微小循環障害に対する argipidine の効果

脳虚血後に発現する脳微小循環障害は脳に墨汁を灌流することによって墨汁で染色されない部分, 非灌流域として認められ, no-reflow 現象とよばれている。今回, われわれは実験方法に示したように, 脳を 10 個の冠状断に切断し, 冠状断の全断面積に対する非灌流域の面積 (no-perfusion area) (NPA) を求めることにより no-reflow 現象を定量化することを試みた。脳虚血時間と no-reflow 現象の発現の関係を検討した

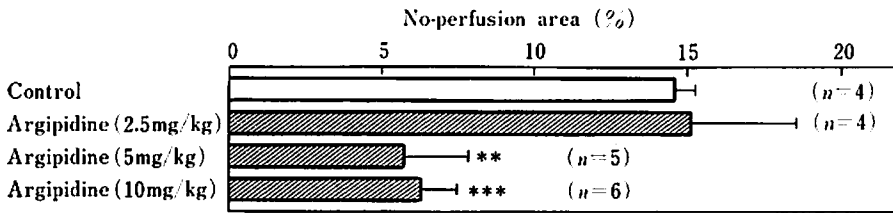


Fig. 2 Effect of argipidine on the cerebral microcirculation after reperfusion of the ischemic brain. Argipidine was given intraperitoneally. **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ significantly different from the control group by Student's *t*-test

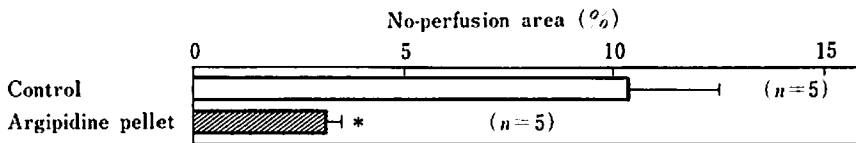


Fig. 3 Effect of argipidine on the cerebral microcirculation after reperfusion of the ischemic brain. Argipidine was given intraperitoneally. *: $p < 0.05$ significantly different from the control group by Student's *t*-test

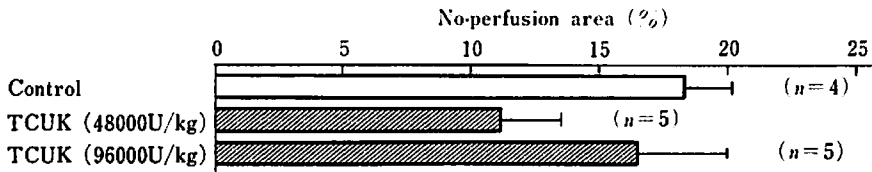


Fig. 4 Effect of TCUK on the cerebral microcirculation after reperfusion of the ischemic brain. TCUK was given intravenously

結果、15分間の脳虚血では非灌流域はほとんど出現しなかったが、30分間の脳虚血により再現性良い NPA を与えることを認めた。また、正常無処置ラットおよび椎骨動脈のみ閉塞し頸動脈の閉塞を行わなかったラットでは no-reflow 現象を認めなかった。以上の予備検討結果から、脳虚血時間を30分として虚血後に発現する脳微小循環障害に対する argipidine の効果を検討した。

Fig. 2 に示したように対照群では $14.6 \pm 0.7\%$ の NPA が認められたのに対し、argipidine 5 または 10 mg/kg, i.p. 投与群では NPA はそれぞれ、 $5.8 \pm 2.1\%$ 、 $6.3 \pm 1.2\%$ と対照群に

比べて有意に減少した。argipidine 2.5 mg/kg i.p. 投与群では NPA の減少は認められなかった。argipidine 10 mg/kg 投与群の argipidine の血中濃度を測定した結果、投与後5分（脳虚血開始時）で $6.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 、投与後45分（血流再開時）で $0.56 \pm 0.07 \mu\text{M}$ の濃度を示し、腹腔内投与後15分から45分にかけて血中からの消失が速いことを認めた。そこで安定した血中濃度を与える徐放性ペレットを argipidine として 25 mg/匹を腹腔内に投与して1日後の血中濃度を測定した結果 $0.40 \pm 0.10 \mu\text{M}$ の血中濃度を認めたので、argipidine 5 mg 含有ペレットをラット1匹あたり5個腹腔内に埋め込み、1日

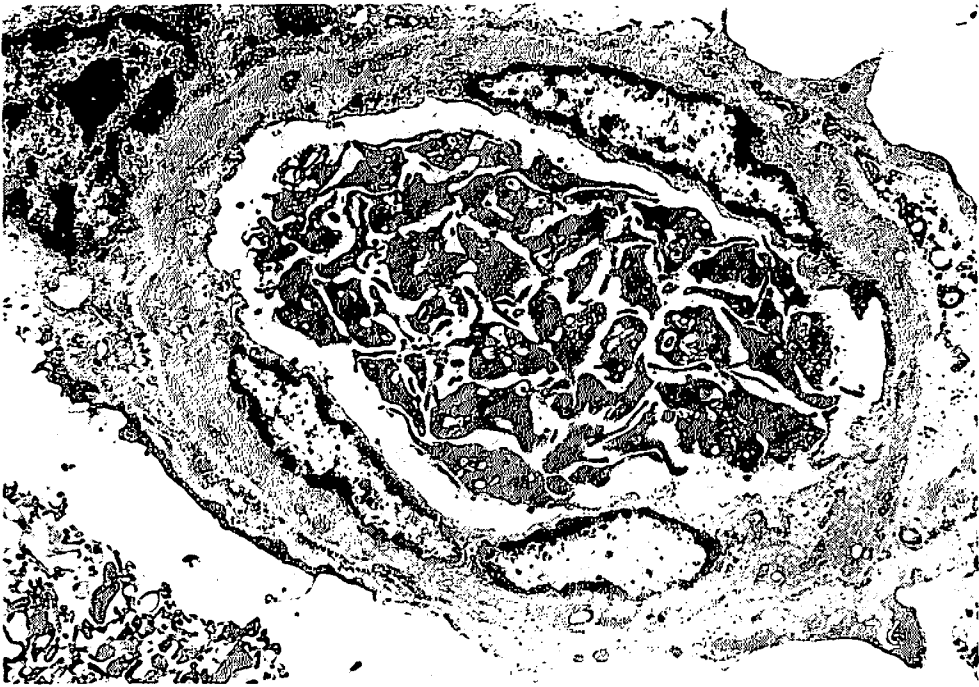


Photo. 1 Electronmicrograph of platelet aggregates occluding the cerebral arteriole

後に同様の実験を行った。その結果、Fig. 3に示したように対照群が $10.4 \pm 2.2\%$ のNPAを示したのに対し、argipidine投与群では、 $3.2 \pm 0.3\%$ のNPAを示し、対照群に比べ有意なNPAの減少を認めた。以上の結果から argipidineの効果は、血流再開時に血中に $0.4 \mu\text{M}$ 程度の濃度に存在することにより発現するものと考えられた。

一方、TCUKは脳梗塞の治療に用いられているが、今回試験した脳循環障害モデルにおいては、Fig. 4に示したように48000および96000 U/kg i.v. 投与群共にNPAの減少は認められず、循環障害の抑制効果を示さなかった。TCUK 96000 U/kg 静注5分後のユーグロブリン溶解時間は、対照群の5時間以上に対して約1時間と、短縮が認められたが、投与35分後では著しい短縮は認められなかった。しかし、フィブリン-寒天平板で線溶活性を測定した結果、対照群に比べウロキナーゼ換算で約4倍の線溶活性の増大を認めた。

2 透過型電顕による脳微小血管の観察

虚血後血流を再開させることによりno-reflow現象を示した脳内の微小血管がどのような変化を受けているかを透過型電顕で観察した。

Photo. 1に示したように脳内細動脈内に血小板が凝集し血管を閉塞している像が散見された。個々の血小板は偽足を形成し一部で密着している像も見られたが、強固な凝集塊に至ってはいなかった。血小板内の顆粒体の血小板中央への移動が認められた。血小板の崩壊像やフィブリンの析出は認められなかった。血小板凝集塊が血管を閉塞している部位の内皮細胞は軽度の変成像を示したが、血小板の内皮への明らかな付着は認められなかった。このような像以外の内皮細胞の剝離、フィブリンによる血管の閉塞などの像は認められなかった。

III 考 察

虚血後の脳微小循環障害 (no-reflow 現象) の発現機構として種々の観点より検討されてい

るが¹¹⁻¹³⁾、小池らは、今回われわれが用いたモデルと同一の脳虚血モデルにおいて脳微小循環障害と血小板機能との関係を検討し、脳虚血により循環血中に多数の血小板凝集塊を観察し、これらが機械的に微小脳血管腔の閉塞を起こしたと推定した¹⁴⁾。今回われわれは、虚血後の脳切片を電顕観察することにより、血小板凝集塊が脳細動脈を閉塞している像を認め、脳虚血後の血流再開による脳微小循環障害には血小板凝集が関与していることを確認した。このような脳虚血モデルにおいて、argipidine が脳微小循環障害の発現を抑制したことは、脳虚血後の血小板凝集塊の生成を抑制したことによると思われる。argipidine はトロンビンを選択的に阻害し⁴⁾、*in vitro* の血小板凝集に対してもトロンビンによる凝集を強く阻害するが、コラーゲン、ADP、アラキドン酸などの他の凝集惹起剤による凝集に対する阻害効果は弱い¹⁵⁾。このような血小板凝集阻害プロフィールをもつ argipidine が血小板凝集塊の生成を抑制したことは、脳虚血後の血小板凝集塊の生成にトロンビンが深く関与していることを示唆している。

脳虚血および血流再開により血液凝固系が活性化されることが知られている¹⁶⁾。また、脳虚血後、血流を再開することにより活性酸素が発生し、虚血中に増加したアラキドン酸などの遊離多価不飽和脂肪酸は、自動酸化を受けやすくなっており、過酸化脂質が生成することが小暮らにより示されている^{17,18)}。一方、アラキドン酸の過酸化物はアラキドン酸よりも著明な血小板凝集作用を有することが報告されており¹⁹⁾、虚血後血流再開により脳血管内に生成した不飽和脂肪酸過酸化物は血小板を強く活性化、凝集させると思われる。活性化された血小板は血小板第3因子の放出²⁰⁾、factor Xa の結合部位の出現²¹⁾などにより、血液凝固系の活性化を増幅させ、トロンビン生成を著しく加速させる。このように虚血脳では、血小板凝集とトロンビン生成がお互いに深い関連をもちつつ血液凝固-血小板凝集系を増幅させていることが推定される。微量のトロンビンが、フィブリンを形成さ

せることなく血小板を凝集させることなどからも、脳虚血時に生成した微量のトロンビンは血小板凝集塊の生成に重要な役割を占めている。これらのトロンビンの作用を argipidine が抑制することにより悪循環を断ち切り、脳微小循環障害を抑制したと考えられる。

血管内に生成したトロンビンの凝固活性の生体内不活化機構の一つとして、内皮細胞表面のトロンボモジュリンへの結合があり、トロンボモジュリンに結合したトロンビンはフィブリンノーゲン凝固活性および血小板凝集活性を失うことが報告されている^{22,23)}。またトロンビン-トロンボモジュリン複合体は protein C を活性化して、factor Va, factor VIIa を失活させることにより抗凝固作用を示す^{24,25)}。ところが、脳内の細動脈の血管内皮細胞にはトロンボモジュリンが存在しないことが報告され^{26,27)}、脳血管内では他の組織に比べて血中のトロンビン除去機能が弱いことが推定されている。虚血脳においては、上述のように種々の要因によりトロンビンが生成して脳循環障害を惹起させること、臨床的にも特に脳血栓症急性期において凝固亢進状態にあること¹⁻³⁾ を考えると、脳虚血時にトロンビンの選択的阻害剤である argipidine を使用して脳微小循環を改善させることの意義は大きい。

対照薬として用いた TCUK が微小循環障害に対し無効であったことは、今回の脳虚血モデルでは血小板凝集塊のみがみられ、フィブリン塊の生成がみられなかったことから、TCUK のもつフィブリン溶解作用では効果を示さなかったことによると思われる。

文 献

- 1) 新名主宏一, 大勝洋祐, 納 光弘ほか: 血漿 Fibrinopeptides による脳血管急性期における凝血病態の解析, 脳卒中 7: 411~417 (1985)
- 2) 山口修平, 小林祥泰, 恒松徳五郎: 虚血性脳血管障害における Antithrombin II の意義, 脳卒中 5: 111~116 (1983)
- 3) 丸山征郎, 今岡 満, 新名主宏一, 一瀬白帝,

- 井形昭弘：脳血栓症の予後と Soluble Fibrin Monomer Complex (SFMC), 医学のあゆみ **121**: 947~948 (1982)
- 4) Kikumoto R., Tamao Y., Tezuka T., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Hijikata A. & Okamoto S.: Selective inhibition of thrombin by (2R, 4R)-4-methyl-1-[(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinoliny) sulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid, *Biochemistry* **23**: 85~90 (1984)
 - 5) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemost.* (投稿中)
 - 6) Kumada T. & Abiko Y.: Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor No. 805 (MD-805) in experimental antithrombin III -deficient animals, *Thrombosis Res.* **24**: 285~298 (1981)
 - 7) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と脈管 **13**: 72~77 (1982)
 - 8) Pulsinelli W.A. & Brierly J.B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, *Stroke* **10**: 267~272 (1979)
 - 9) Greene E.C. (望月公子 監修): ラットの解剖図譜, 学窓社, 東京 (1982)
 - 10) Tamao Y., Yamamoto T., Kikumoto R., Hara H., Itoh J., Hirata T., Mineo K. & Okamoto S.: Effect of a selective thrombin inhibitor MCI-9038 on fibrinolysis *in vitro* and *in vivo*, *Thrombos. Haemost.* **56**: 28~34 (1986)
 - 11) Fischer E.G. & Ames A.: II . Studies on mechanisms of impairment of cerebral circulation following ischemia; Effect of hemodilution and perfusion pressure, *Stroke* **3**: 538~542 (1972)
 - 12) Hossmann K.-A. & Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations, *Brain Res.* **81**: 59~74 (1974)
 - 13) Fischer E.G.: Impaired perfusion following cerebro-vascular stasis. A Review, *Arch. Neurol.* **29**: 361~366 (1973)
 - 14) 小池順平, 畑下鎮男, 石井晶三: 脳虚血ラットの脳微小循環障害における血小板機能の変動と抗血小板剤 ticlopidine の影響について, 脳卒中 **5**: 28~37 (1983)
 - 15) 原 啓人, 玉尾嘉邦, 菊本亮二: 血小板機能に対する Argipidine (MD-805) の影響, 薬理と治療 **14** (Suppl. 5): 875~878 (1986)
 - 16) Hossmann K.-A.: Brain and heart infarct, Editors Zulch K.J. *et al.*, Springer-Verlag, (1977), pp. 107~124
 - 17) 小暮久也: 虚血と細胞障害, 早石 修, 他監修, 医歯薬出版, 東京 (1980), pp. 51~64
 - 18) 阿部康二, 荒井啓行, 小暮久也: 脳虚血と活性酸素, 最新医学 **39**: 1383~1387 (1984)
 - 19) Mickel H. & Horbar J.: The effect of peroxidized arachidonic acid upon human platelet aggregation, *Lipids* **9**: 68~71 (1974)
 - 20) Walsh P.N.: Different requirements for intrinsic factor Xa forming activity and platelet factor 3 activity and their relationship to platelet aggregation and secretion, *Brit. J. Haematol.* **40**: 311~331 (1978)
 - 21) Miletich J.P., Jackson C.M. & Majerus P.W.: Properties of the factor Xa binding site on human platelets, *J. Biol. Chem.* **253**: 6908~6916 (1978)
 - 22) Esmon C.T., Esmon N.L. & Harris K.W.: Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation, *J. Biol. Chem.* **257**: 7944~7947 (1982)
 - 23) Esmon N.L., Carroll R.C. & Esmon C.T.: Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets, *J. Biol. Chem.* **258**: 12238~12242 (1983)
 - 24) Kisiel W., Canfield W.M., Ericsson L.H. & Davie E.W.: Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin, *Biochemistry* **16**: 5824~5831

- (1977)
- 25) Vehar G.A. & Davie E.W.: Preparation and properties of factor VII(Antihemophilic factor), *Biochemistry* **19**: 401~410 (1980)
- 26) Maruyama I., Bell C.E. & Majerus P.W.: Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics and on syncytiotrophoblast of human placenta, *J. Cell Biol.* **101**: 363~371 (1985)
- 27) Ishii H., Salem H.H., Bell C.E., Laposata E.A. & Majerus P.W.: Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain, *Blood* **67**: 362~365 (1986)

* * *

Argipidine (MD-805) の 実験的脳梗塞症の進展に対する影響

第一製薬株式会社 中央研究所 生化学研究グループ

熊田 敏彦 岩本 政博 富川 宗博

Effect of Argipidine on Cerebral Water Content and Mortality in Experimental Rat Cerebral Infarction

Toshihiko Kumada, Masahiro Iwamoto and Munehiro Tomikawa
Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

Influence of argipidine, a potent inhibitor of thrombin, on progress of cerebral lesions was examined in two experimental models of rat cerebral infarction.

One cerebral infarction model was prepared by insertion of nylon thread from right internal carotid artery. The inserted thread was retained in the vessel from 2 to 24 hours after the operation. Argipidine of 25 mg/kg body weight was subcutaneously injected one to four times during complete occlusion of middle cerebral artery with nylon thread. In a separate experiment, argipidine of the same dose was given 3 times during reperfusion after complete occlusion for 2 hours. In these experiments with a single or multiple treatments, argipidine did not give any influence on cerebral water content, survival time and mortality at all.

The other model was prepared by injection of rat blood clot emboli from right internal carotid artery. A single treatment of argipidine (25 mg/kg, s.c.) before injection of clot emboli inhibited slightly increase in ipsilateral cerebral water content at 2 hours after injection of clot emboli but not at 6 and 24 hours. Argipidine treatment showed no effect on mortality of this model.

These findings indicate that argipidine has almost no effect on progress of cerebral edema which caused by ischemia and reperfusion of mainly middle cerebral artery areas, and that antithrombotic therapy with argipidine do not deteriorate the experimental rat cerebral infarction.

KEY WORDS

Argipidine, MD-805, Cerebral Infarction,
Rat, Thromboembolism

緒 言

脳塞栓は脳の虚血・梗塞をひき起こすために臨床で大きな問題の一つである。近年になって、脳卒中に対する抗凝固療法の是非が、有効性および副作用の面から検討されている。すなわち有効性を示す病態とその投与時期および副作用として出血性合併症とくに脳出血の危険性などが問題になっている¹⁻⁴⁾。

近年岡本らによって開発された argipidine (MD-805, 化学名 (2*R*, 4*R*)-4-メチル-1-[*N*²-((*RS*)-3-メチル-1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-8-キノリンスルフォニル)-*L*-アルギニル]-2-ピペリジンカルボン酸) (Fig. 1) は、トロンビンの特異的でしかも強力な阻害剤であり⁵⁾、各種血栓症モデル動物、特にアンチトロンビンⅢ減少症動物においても抗血栓作用を示す⁶⁾。

最近行われた脳血栓症急性期に対する第Ⅱ相臨床試験で、argipidine は有効性を示した⁷⁾。argipidine の脳疾患への臨床応用をさらに進展させるためには、各種脳疾患病態に対する argipidine 投与による副作用面の検討が重要である。今回、ラットに実験的脳塞栓症を作出し、argipidine の脳梗塞症に対する影響を脳虚血病変の重要な合併症である脳浮腫を指標に検討した。病態として右中大脳動脈開口部にナイロン糸を挿入後、留置または抜去し、永久または2時間閉塞させる方法と凝血塊を注入する方法で実験的急性脳虚血モデルを作出し、脳虚血中あるいは血流再開通後の脳含水量および死亡率・生存時間に対する argipidine 投与の影響を調べた。

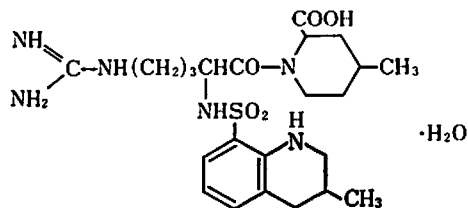


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

I 実験材料および方法

1 実験動物

Wistar-STD 雄性ラット (8~11 週齢, 体重 170~270 g, 静岡実動) を用いた。

2 薬物の調製・投与

Argipidine (三菱化成工業) 約 300 mg にイオン交換水約 6 ml を添加して 50 mg/ml 懸濁液とし、濃塩酸 50 μ l を滴下して溶解した。この溶液を、濃塩酸を添加した生理食塩水 (pH 2, 約 0.012N) の等容量で希釈し、25 mg/ml 溶液を調製した。argipidine は 25 mg/kg の用量 (1 ml/kg) で、実験中 1~4 回ラット腰部に皮下投与し、対照としては上記の生理食塩水 (pH 2, 1 ml/kg) を用いた。

3 ナイロン糸挿入脳梗塞症の作出

小泉ら⁸⁾の変法で行った。塩酸ケタミン (90 mg/kg i.p.; ケタラール, Parke-Davis) 麻酔下にラット頸部を正中切開して右側の総頸・内頸・外頸動脈の分岐部を周囲結合組織から剝離し、外頸動脈を糸で結紮した。次に、内頸動脈に結紮用の糸をかけたのち総頸動脈を結紮、切開し、先端を歯科用印象剤 (キサントブレイン, バイエル日本歯科) で被覆した外科用ナイロン手術糸 (エトー糸, No. 3-0, エトー糸 K.K.: 長さ 15.0 mm, 直径 0.25 mm) を内頸動脈へ向けて 14 mm 挿入後、結紮・固定したあと皮切部を縫合した。以上の操作によってナイロン糸の側部で中大脳動脈の開口部を閉塞することができる。

偽似手術群ではナイロン糸の挿入を 8 mm 以下にした。

再灌流モデルでは、ナイロン糸を 2 時間留置後、エーテル麻酔下に抜去した。

4 凝血塊注入脳梗塞症の作出

Kudo *et al.*⁹⁾ の変法で行った。上記と同様にして右内・外頸動脈の分岐部を露出し、外頸動脈を結紮した。分岐部まで逆行性に注射針 (26 G) を挿入し、ラット凝血塊浮遊液 0.1~0.4 ml を注入後 (10 秒間)、止血のために外頸動脈を結紮した。

5 凝血塊浮遊液の調製

ケタラール麻酔下の正常ラットから、頸動脈血 5 ml を採血し、2 ml をプラスチック試験管に分注した。室温で 2 時間以上放置後生理食塩液 3 ml を添加し、5 ml 注射筒に入れた。そして、26G 注射針をとおして圧迫噴射して碎片とした（5 回連続噴射、その後 3 回噴射・吸引を繰り返す）。

6 脳含水量の測定

ラットを断頭しすみやかに脳を摘出後、嗅脳さらには脳幹を上丘と下丘との間で離断した。左右大脳半球を大脳縦裂にそって分割し、それぞれの湿重量 (W) を計測した。次に、これを凍結後、真空凍結乾燥機で 40 時間以上乾燥して乾燥重量 (D) を計測した。含水量 (%) は次式により算出した。

$$\text{含水量}(\%) = (W - D) / W \times 100$$

7 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で表し、Welch の *t* 検定法にて検定した。

II 結 果

1 ナイロン糸挿入による脳梗塞症（永久閉塞モデル）に対する argipidine の影響

この脳梗塞症モデルのラットは、ナイロン糸挿入 9.5 時間後から 32.5 時間後までに死亡し、48 時間生存したラットはその後死ぬことはなかった。最終的な死亡率は 64.3% (9/14 例) であった。9.5 時間から 32.5 時間の間に死亡したラットの脳含水量は右側で約 5%，左側で約 1% 有意に増加した。一方、48 時間生存例では右側が約 2% 有意に増加するにとどまり、左側では増加がみられなかった (Fig. 2, Table 1)。これらの事実は、左側の脳含水量が増加するか否か、言い換えれば右側の脳浮腫の程度が大きいかな否かが、ラットの生死を決定することを示唆している。

a) ナイロン糸挿入前 argipidine 1 回投与の影響

ナイロン糸挿入 20 分前に argipidine (25 mg/kg) を 1 回皮下投与し、術後 6 時間の左右大脳

半球含水量に対する影響を調べた。偽似手術群についても同様に実験した。ナイロン糸挿入手術によって右側脳含水量は約 2.5% 有意に増加したが、argipidine の前投与はこの脳含水量増加に影響を与えなかった。なお、偽似手術群では左および右側脳含水量は変化せず、argipidine 前投与の影響もなかった。

b) ナイロン糸挿入後 argipidine 1 回投与の影響

ナイロン糸挿入 3 時間後に argipidine を 1 回投与し、術後 6 時間の左右大脳半球含水量に対する影響を調べた。なお、投与前値に相当する術後 3 時間の脳含水量も測定した。右側脳含水量は術後 3 時間で約 1.4% 有意に増加していた。この時期に argipidine を投与しても術後 6 時間の脳含水量の増加は対照とほとんど同じであった。

c) ナイロン糸挿入後 argipidine 連続投与の影響

ナイロン糸挿入 3 時間後から 6、12 および 24 時間にそれぞれ argipidine を連続投与し、ラットの生存時間を術後 48 時間まで調べた。脳含水量は、ラットが死亡した直後に、生存例では術後 48 時間の時点で測定した。argipidine 投与群においても、生存時間、死亡率および左右脳含水量の変化は、対照群とほとんど差がなかった (Fig. 2, Table 1)。

2 ナイロン糸挿入による脳梗塞症（再灌流モデル）に対する argipidine の影響

ラット右側脳の含水量はナイロン糸挿入後 2 時間で約 0.9% 有意に増加しその後はナイロン糸を抜去しても右側脳含水量は増加し、術後 24 時間までの死亡率は 44.4% (8/18 例) であった (Fig. 3)。生存例の右側脳含水量は術後 24 時間でピークとなり (約 3.4% 増加)、その増加は 48 時間後では約 2.5% に減少した。これらの変化は、永久閉塞モデルでの変化 (Fig. 2, Table 1) とほとんど同じであった。

また術後 24 時間および 48 時間の各 3 例についてエバンス・ブルーによる青染の有無により血液脳関門の障害を検索した。24 時間では青染は

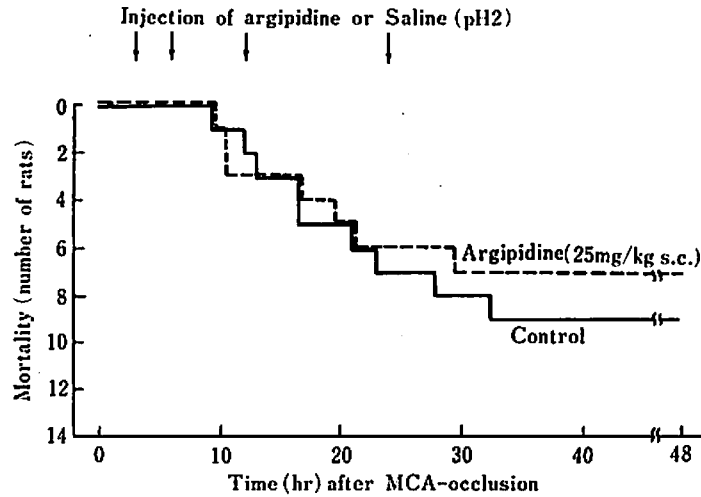


Fig. 2 Effect of multiple treatments of argipidine on mortality in cerebral infarction prepared by continuous insertion of nylon thread.

Table 1 Effect of multiple treatments of argipidine on cerebral water contents in cerebral infarction prepared by continuous insertion of nylon thread

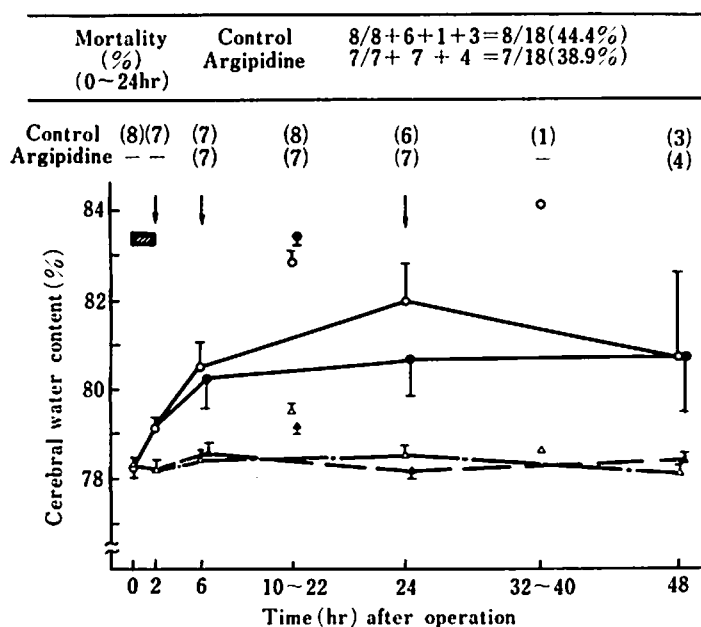
	Cerebral water content (%)		
	Survival time		
	9.5~32.5 hr	>48 hr	9.5~>48 hr
Saline (pH 2)	(9)	(5)	(14)
Contralateral	79.51 ± 0.14 _#	78.25 ± 0.06	79.06 ± 0.19
Ipsilateral	83.47 ± 0.16 _{###}	80.24 ± 1.14	82.32 ± 0.58 _{###}
Argipidine (25 mg/kg s.c.)	(7)	(7)	(14)
Contralateral	79.35 ± 0.21 _#	78.39 ± 0.14	78.87 ± 0.18
Ipsilateral	83.19 ± 0.25 _{###}	81.11 ± 0.93*	82.15 ± 0.55 _{###}

Administration time: 3, 6, 12 and 24 hr after operation Administration of saline (pH 2): 1 ml/kg s.c. Brain of rat was excised after sacrifice at 48 hr or after death Figures represent mean ± S.E. (): Number of rats *, ***: $p < 0.05$, $p < 0.001$ (vs. Contralateral hemisphere) #, ##: $p < 0.05$, $p < 0.01$ (vs. >48 hr-group)

みられなかったが、48時間後には1例に右中大脳動脈域に背脊がみられた。

このモデルで、ナイロン糸抜去直後および挿入後、6、24時間に argipidine を連続投与し、6、24、48時間後の左右大脳半球含水量に対す

る影響ならびに24時間後までの死亡率に対する影響を調べた。argipidine 投与群におけるこれらのパラメーターは対照群と差がなかった (Fig. 3)。



(): Number of rats ↓ : Administration of argipidine or saline (pH 2) ▨ : Duration of ischemia (2 hr) Argipidine (25 mg/kg sc): Ipsilateral (●), Contralateral (▲) (Mean ± S.E.) Saline (pH 2, 1 ml/kg sc): Ipsilateral (○), Contralateral (△) Brain of rat was excised after sacrifice at 0, 2, 6, 24 and 48 hr or after death (10~22 hr and 32~40 hr)

Fig. 3 Effect of multiple treatments of argipidine on cerebral water contents and mortality in cerebral infarction prepared by two hours insertion of nylon thread

3 凝血塊注入による脳梗塞症に対する argipidine の影響

ラット右側脳の含水量は凝血塊の投与に依存して増加するとともに、左前・後肢の不全麻痺などの神経症状の異常がみられ、高用量投与においては4時間後あるいは12~22時間後に死亡した。一方、左側脳含水量は死亡例以外では増加せず、脳浮腫は凝血塊投与側である右側に限局していた。

凝血塊注入5分後の墨汁注入法による検索で、虚血域は右側の大部分特に中大脳動脈域の皮質部であることが示された。

a) 生存時間に対する影響

凝血塊浮遊液 0.2 ml を右内頸動脈内に注入

して、生存時間ならびに左右大脳半球含水量を測定した。argipidine は注入前20分、注入後2時間および6時間の計3回投与した。生存例は術後24時間で屠殺し、その生存時間は計算上24時間とした。

対照群および argipidine 投与群の平均生存時間に対して、argipidine 投与の影響はなかった (Fig. 4)。次に、これらの動物の脳含水量を測定した。大半が死亡例である両群の右側ならびに左側脳含水量は有意に増加していたが、両群間に有意差はなかった。

b) 脳含水量に対する影響

凝血塊浮遊液 0.1 ml を右内頸動脈内に注入して後2, 6および24時間に屠殺して左右大脳

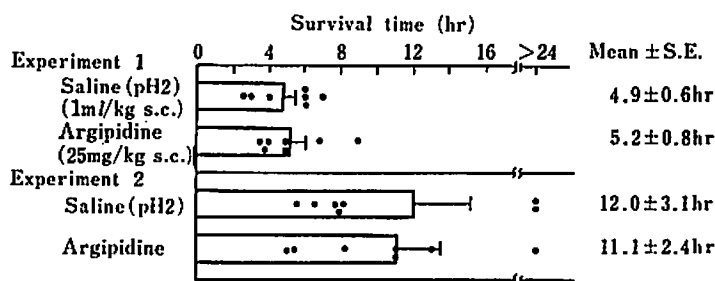


Fig. 4 Effect of multiple treatments of argipidine on survival time in cerebral infarction prepared by injection of blood emboli (0.2 ml/rat)

Table 2 Effect of multiple treatments of argipidine on cerebral water contents in cerebral infarction prepared by injection of blood emboli (0.1 ml/rat)

Time after operation	Cerebral water content (%)	
	Saline (pH 2)	Argipidine(25 mg/kg s.c.)
2 hr	(7)	(7)
Contralateral	78.73 ± 0.12	78.75 ± 0.06
Ipsilateral	79.97 ± 0.13***	79.44 ± 0.15** ‡
6 hr	(7)	(7)
Contralateral	78.64 ± 0.03	78.57 ± 0.12
Ipsilateral	79.78 ± 0.31*	79.89 ± 0.23***
24 hr	(6)	(6)
Contralateral	78.77 ± 0.03	78.70 ± 0.06
Ipsilateral	79.49 ± 0.38	80.36 ± 0.86

(): Number of rats used * , ** , *** : $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ (vs. Contralateral-value) ‡ : $p < 0.05$ (vs. Saline group)

Administration time: 20 min before and 2 and 6 hr after operation

Administration of saline: 1 ml/kg s.c.

半球含水量を測定した。argipidine は注入前20分、注入後2時間および6時間の計3回投与した。対照群および argipidine 投与群において各1例が13時間および10時間後に死亡した。

対照群の右側大脳半球含水量は有意に増加したが、経時的な変化は顕著にみられなかった。argipidine は、2時間後屠殺群において右側大脳半球含水量の増加をわずかに抑制したが、その抑制効果は6時間および24時間では消失した

(Table 2)。

III 考 察

実験的脳梗塞病態の進展、特に脳含水量、生存時間および死亡率に対する argipidine の影響を検討した。脳虚血モデルとして脳の一部の完全閉塞病態と考えられるナイロン糸挿入法と凝血塊注入法による梗塞病態を使用した。ナイロン糸挿入による永久閉塞モデルにおいて、小

泉ら⁸⁾は組織学的に中大脳動脈領域全般にわたる脳梗塞を確認している。また彼らの再灌流実験結果から脳虚血の臨界時間は約 1.5 時間と推測し、再灌流モデルとして 2 時間の閉塞時間を採用した。また凝血塊注入法においては、Kudo ら^{9,11)}は、中大脳動脈領域を主とする貧血性の梗塞が生じることを報告している。なお、注入物の一部は翼突口蓋動脈へも流入するため、投与直後にはラット右眼球の虚血がみられる。どちらのモデルにおいても、出血性梗塞はみられていない^{8,9)}。

脳梗塞病変の進展に対する argipidine の影響を上記 2 つのモデルで検討した。急性期脳梗塞症患者の死亡の主要な原因は虚血性脳浮腫であるといわれており¹¹⁾、今回の実験では脳の虚血、梗塞の病変進展の指標として脳浮腫（脳含水量）を測定した。argipidine はこれまで下大静脈血栓症⁶⁾、末梢動脈閉塞症¹²⁾等の実験的血栓症において、25~30 mg/kg の皮下投与で著明な抗血栓効果を示した。今回この投与量において、argipidine を 1~4 回皮下投与したが、2 つのモデルの浮腫の進展と死亡率に対してほとんど影響しなかった。argipidine はトロンビンの特異的な阻害剤であり、実験的脳浮腫の進展に argipidine が影響を与えなかったことは、虚血による脳障害の進展過程において、血液凝固系がほとんど関与していないことを示唆している。したがって虚血の原因となる血栓の形成を予防するために argipidine による抗凝固療法を行うことは、脳血栓症に対する有効な療法となろう。

Argipidine の脳血栓急性期に対する有効性評価では、天幕上（下）脳血栓に対する高用量 60 mg 群の 7 日後有用度において有意な改善効果がみられている⁷⁾。脳梗塞に対する抗凝固療法の最大の難点は脳出血の危険とされており^{14,15)}、治療の開始時期が問題とされている^{2,3,16)}。しかし、最近では、Computerized tomography などによる脳出血の診断技術の進歩に伴って出血の危険はある程度予防可能と考えられるようになってきた^{2,4)}。事実、抗凝

固療法に伴う脳出血の合併は少なく^{2,17~20)}、argipidine による抗凝固療法は抗凝固活性の調節を厳重に行いさえすれば、脳血栓症ばかりでなく脳虚血発作ならびに脳梗塞症に対しても有効な療法になりえると考える。

要 約

トロンビン阻害物質 argipidine の実験的脳梗塞症の進展に対する影響を調べた。

1) ラット右内頸動脈からナイロン糸を挿入する方法（永久および一時閉塞）において argipidine の 1~4 回の投与（25 mg/kg s.c.）は脳含水量変化、死亡率・生存時間に影響を与えなかった。

2) ラット右内頸動脈からラット凝血塊を注入する方法において、凝血塊注入後 2 時間の右側脳含水量の増加は、argipidine 前投与によりわずかに抑制された。6 および 24 時間では脳含水量は対照群と変わらなかった。死亡率に対しては影響を与えなかった。

以上の結果から、argipidine が主に中大脳動脈領域閉塞に起因する、虚血後あるいは再灌流時における脳浮腫の進展および死亡率・生存時間にはほとんど影響を与えないことを明らかにし、argipidine による抗凝固療法が実験的脳梗塞症を悪化させないことを示した。

文 献

- 1) Bousser M.-G., Chiras J., Bories J. & Castaigne P.: Cerebral venous thrombosis—A review of 38 cases, *Stroke* 16: 199~213 (1985)
- 2) Cerebral embolism study group: Immediate anticoagulation of emboli stroke: A randomized trial, *Stroke* 14: 668~676 (1983)
- 3) Shields Jr. R.W., Laureno R., Lachman T. & Victor M.: Anticoagulant-related hemorrhage in acute cerebral embolism, *Stroke* 15: 426~437 (1984)
- 4) Weksler B.B. & Lewin M.: Anticoagulation in cerebral ischemia, *Stroke* 14: 658~663 (1983)
- 5) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R. &

- Tamao Y.: A synthetic thrombin inhibitor taking extremely active stereo-structure, Abstract of the 7th International Congress of Thrombosis and Haemostasis (No. 0481) (1979), p. 205
- 6) Kumada T. & Akiko Y.: Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor No. 805 (MD-805) in experimental anti-thrombin II-deficient animals, *Thromb. Res.* 24: 285~298 (1981)
 - 7) 田崎義昭, 小林祥泰ほか: 抗トロンビン剤MD-805 の脳血栓症急性期に対する治療効果—二重盲検による第Ⅱ相臨床試験—, *臨牀と研究* 63: 3047~3057 (1986)
 - 8) 小泉仁一, 中沢貞二, 吉田洋二: 虚血性脳浮腫と血流再開通, 文部省特定研究「神経難病の発症機構 (I)」, 豊倉康夫編 (1985, March), pp. 553~558
 - 9) Kudo M., Aoyama A., Ichimori S. & Fukunaga N.: An animal model of cerebral infarction: Homologous blood clot emboli in rats, *Stroke* 13: 505~508 (1982)
 - 10) Kaneko D., Nakamura N. & Ogawa T.: Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model, *Stroke* 16: 76~84 (1985)
 - 11) 一森繁生ほか: 実験的ラット脳血栓症, 病変の推移と脂質の変動, *東邦医会誌* 26: 95~109 (1979)
 - 12) Ng L.K.Y. & Nimmannitya J.: Massive cerebral infarction with severe brain swelling, *Stroke* 1: 158~163 (1970)
 - 13) 岩本政博, 原 剛, 小河秀正, 富川宗博: Argipidine (MD-805)の末梢動脈閉塞症モデルに対する予防効果, *薬理と治療* 14(Suppl. 5): 41~49 (1986)
 - 14) Genton E., Barnett H.J.M., Fields W.S., Gent M. & Hoak J.C.: Report of the joint committee on stroke resources, XIV, Cerebral ischemia: the role of thrombosis and of anti-thrombotic therapy, *Stroke* 8: 150~175 (1977)
 - 15) Millikan C.H.: Reassessment of anticoagulant therapy in various types of occlusive cerebrovascular disease, *Stroke* 2: 201~208 (1971)
 - 16) Cerebral embolism study group: Immediate anticoagulation of embolic stroke: Brain hemorrhage and management options, *Stroke* 15: 779~789 (1984)
 - 17) Burén A. & Ygge J.: Treatment program and comparison between anticoagulants and platelet aggregation inhibitors after transient ischemic attack, *Stroke* 12: 578~580 (1981)
 - 18) Link H., Lebram G., Johansson I. & Radberg C.: Prognosis in patients with infarction and TIA in carotid territory during and after anticoagulant therapy, *Stroke* 10: 529~532 (1979)
 - 19) Lodder J. & Van der Lugt P.J.M.: Evaluation of the risk of immediate anticoagulant treatment in patients with embolic stroke of cardiac origin, *Stroke* 14: 42~46 (1983)
 - 20) Olsson J.-E., Brechter C., Backlund H., Krook H., Muller R., Nitelius E., Olsson O. & Tornberg A.: Anticoagulant vs. anti-platelet therapy as prophylaxis against cerebral infarction in transient ischemic attacks, *Stroke* 11: 4~8 (1980)

Argipidine (MD-805) の末梢動脈閉塞症 モデルに対する予防効果

第一製薬株式会社 中央研究所 生化学研究グループ

岩 本 政 博 原 剛
小 河 秀 正 富 川 宗 博

Prophylactic Effect of Argipidine on Development of Lesions in Rat Peripheral Arterial Occlusion Model

Masahiro Iwamoto, Tsuyoshi Hara,
Hidemasa Ogawa and Munehiro Tomikawa
Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

Peripheral arterial occlusion model was prepared by injection of 5 % lactic acid into rat femoral artery. Macroscopic changes of legs progressed as follows; change to violet color around whole paw, edema, gangrene of fingers and mummification of whole paw. Pathological examination demonstrated partial deletion of arterial endothelial cells and subsequent occlusive arterial thrombosis. Prophylactic effect on this model was tested by antithrombotic drugs such as argipidine, heparin and ticlopidine.

Single subcutaneous injection of argipidine, a potent and specific inhibitor of thrombin, inhibited significantly development of lesions of the lower limb at doses more than 10 mg/kg. Slight inhibitory effects were also found by oral administration of ticlopidine at 100 mg/kg or subcutaneous injection of heparin at a dose of 900 U/kg, but their effects were not significant.

These findings suggest that argipidine is clinically effective for inhibition of occurrence and progression of thrombotic peripheral arterial occlusive disorders.

KEY WORDS

Argipidine, MD-805, Rat, Arterial Occlusion,
Heparin, Ticlopidine

緒 言

近年岡本ら¹⁾により開発された抗トロンビン薬 argipidine (MD-805) は化学名 (2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-(*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl]-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate の構造を有する分子量526.66の合成化合物 (Fig. 1) で、トロンビンのみを特異的に、しかも極めて強力に阻害する^{1,2)}。

臨床上的末梢動脈閉塞症には閉塞性血栓性血管炎 (TAO) と閉塞性動脈硬化症 (ASO) の2種類がある。これらの閉塞症は共通して下肢に潰瘍ないし壊死をしばしば伴う慢性疾患であり、患部上流の動脈の血栓性の閉塞により病変が悪化する。したがってこれらの病態の進行に対し抗血栓薬が抑制的に作用することが期待できる。最近、抗血小板薬チクロピジンが本症に有効であることが示され³⁾、臨床的病態の進展に少なくとも血小板が関与することが判明した。しかし、チクロピジンが有効性を示さない病態も一部存在することから、この病態の多様性が示唆された。

現在、特異的抗トロンビン薬 argipidine により、第Ⅱ相臨床試験において末梢動脈閉塞症に対する有用性が検討されている。本薬の臨床上的有用性を予測するため今回は実験的末梢動脈閉塞症モデルにおける、argipidine の効果を検討したので報告する。

I 材料および方法

1 ラット乳酸動注による末梢動脈閉塞症モデルの作成

ウイスター今道系ラット (体重300~400 g) 7匹を一群として、ネンブタール麻酔下で、ラット大腿部を最少限に切開し、ピンセットを用いて動脈を露出し、歯科用1/5注射針を用いて、5%乳酸 0.1 ml を順行性に注入した。通常の飼育条件で14日間飼育し、その間経時的に下肢の病変を観察した。末梢動脈閉塞症のグレード付けは以下の基準で行った。

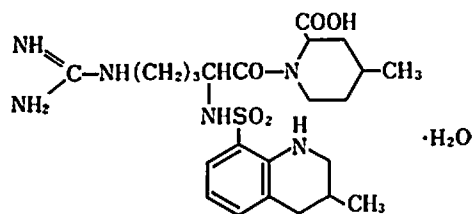


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

Grade 1: 黒変が爪先部に限られる

Grade 2: 黒変が指部におよぶ

Grade 3: 指の壊死

Grade 4: 指の脱落

各指ごとにグレード付けを行い、5本の指のグレードの総和を求めて病変指数とした。また足趾部にまでおよぶ壊死を示したものはさらに5点を加えた。

2 血漿凝固パラメーター等の測定

プロトロンビン時間 (PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) はグライナー社製マイクロコアギュロメーターで測定した。血小板数はトーア PLT-100 血小板カウンターで測定した。フィブリノーゲン濃度はクロシン法により測定した。

3 薬物投与

Argipidine (三菱化成, lot No. P-ATB-52406 S) は生理食塩液に微量の塩酸を加えて溶解し (溶解液の pH 約 2), 10および 30 mg/kg の投与量で乳酸投与30分前に皮下投与した。ヘパリン (清水製薬, lot No. 9 BA) は生理食塩液で希釈し、乳酸投与1時間前に皮下投与した。チクロピジン (第一製薬, lot No. 83/031) は乳酸投与3時間前に経口投与した。

4 組織学的観察

乳酸投与後3時間, 24時間および7日目にそれぞれ5例の下肢足趾部よりヘマトキシリン・エオジン染色標本, P.T.A.H. フィブリン染色標本を作成し鏡検した。

5 統計処理

実験結果は統計計算プログラム (Muscot (ユックムス K.K.), version 2.0) を使用し、ノンパラメトリック検定 (Williams の Wilcoxon

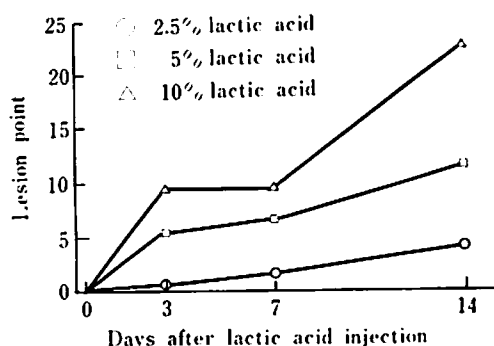


Fig. 2 Effect of lactic acid concentrations on progress of lesions

型検定)で解析した。

II 結 果

1 末梢動脈閉塞症病態の作成

a) 肉眼的所見

はじめに、各濃度(2.5, 5, 10%)の乳酸投与による病変の進行を肉眼的に観察した(Fig. 2)。乳酸投与3~24時間までに足全体の暗赤色の浮腫が乳酸濃度に比例して強く認められた。乳酸投与24時間後から指先の黒化が起こり、7日後には指の脱落が認められたが、その頻度は5%乳酸投与群で20%以下、10%乳酸投与群では80%以上であった。なお2.5%乳酸投与群では指先の黒化にとどまった。以上のような足病変の重症度および進行の速さから考え、5%乳酸投与が薬効評価系の病態として最も適した条件であると判断した。

Photo. 1 に5%乳酸投与による典型的な足病変の経時変化を示す。乳酸投与3時間後から軽度な暗赤色の浮腫が起こり、24時間後には著明な浮腫とともに指先の黒化が認められた。7日後には指全体が黒化と14日後には足趾部の皮膚潰瘍が見られた。この病態作成条件下において、末梢血の血小板数および凝固パラメーターの変化を検討したが、乳酸投与3時間後にはほとんど変化が認められなかった(Table 1)。しかし、24時間後には血漿フィブリノーゲン濃度は偽手術群(0.9% NaCl 動注)においても

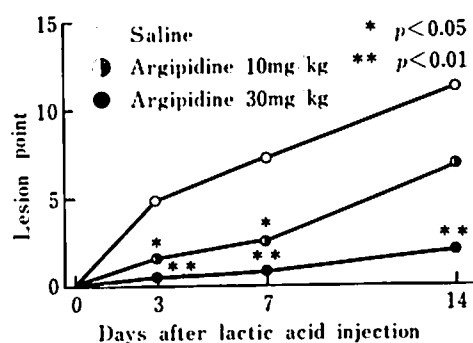


Fig. 3 Effect of subcutaneous injection of argipidine on progress of lesions induced by injection of lactic acid into rat femoral artery

有意に増加し、乳酸投与群ではさらに大きく増加した。

b) 組織学的所見

5%乳酸投与群の足の組織学的変化を経時的に検討した。乳酸投与3時間で末梢動脈壁内皮細胞の部分的剥離と内膜下に軽度の浮腫性変化がみられ、血小板の凝集、粘着が著明であった(Photo. 2 a)。このような変化は細動脈枝に、より顕著に認められた。

乳酸投与24時間後には、凝集血小板とフィブリンで構成された不完全閉塞性の血栓形成が、またその部の血管壁に内皮の剥離、浮腫性変化がみられたが、炎症像は認められなかった。また、この時期に限局性に筋線維の変性、間質の浮腫が認められた(Photo. 2 b, c)。

7日目には主として細動脈枝にほぼ閉塞性のフィブリン血栓が形成され、一部基質化していた。この時期にいたると循環障害に基因するやや広範囲の筋線維組織の壊死がみられた(Photo. 2 d, e)。また、フィブリン網を形成し血小板が凝集粘着した大型静脈血栓の形成も認められた。

2 薬剤の効果

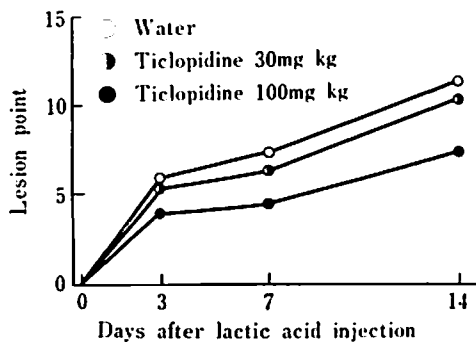
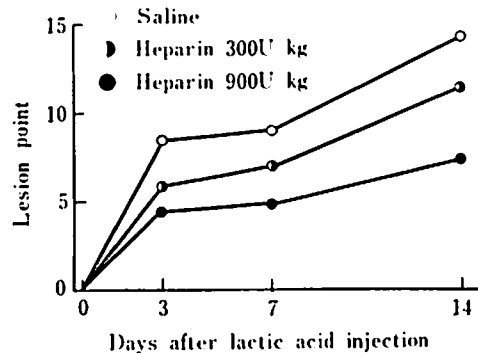
5%乳酸投与ラットにおいて、抗凝固薬と抗血栓薬の病変進行抑制作用を検討した。

a) Argipidine

Argipidine は乳酸投与30分前に皮下投与し

Table 1 Changes of platelet count and coagulo-parameters after injection of lactic acid into rat femoral artery

Parameter	Treatment	Before	3 hours	24 hours
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.9% NaCl	680 $\pm$ 134	722 $\pm$ 38	644 $\pm$ 52
	5% lactic acid	636 $\pm$ 68	659 $\pm$ 104	572 $\pm$ 61
PT (sec)	0.9% NaCl	16.5 $\pm$ 0.7	16.9 $\pm$ 0.8	14.1 $\pm$ 0.5
	5% lactic acid	16.6 $\pm$ 0.3	17.0 $\pm$ 0.5	15.6 $\pm$ 0.4*
APTT (sec)	0.9% NaCl	16.7 $\pm$ 2.5	15.6 $\pm$ 1.5	18.0 $\pm$ 0.8
	5% lactic acid	16.9 $\pm$ 1.2	16.2 $\pm$ 1.4	21.3 $\pm$ 0.8*
Fibrinogen (mg/ml)	0.9% NaCl	3.95 $\pm$ 0.44	4.10 $\pm$ 0.30	6.47 $\pm$ 1.33††
	5% lactic acid	3.66 $\pm$ 0.53	3.73 $\pm$ 0.67	13.58 $\pm$ 1.92*††

Mean $\pm$ S.E. (n=5)*: $p < 0.05$ vs 0.9% NaCl group at the same time††: $p < 0.01$ vs before treatment**Fig. 4** Effect of oral administration of ticlopidine on progress of lesions induced by injection of lactic acid into rat femoral artery**Fig. 5** Effect of subcutaneous injection of heparin on progress of lesions induced by injection of lactic acid into rat femoral artery

た。足の病変は argipidine 30 mg/kg 単回投与で 5/8 例に著明な抑制が認められた (Fig. 3, $p < 0.01$, Photo. 3)。また 10 mg/kg 投与群においても有意に病変を抑制した。

b) チクロピジン

乳酸投与 3 時間前にチクロピジンを 30 mg/kg または 100 mg/kg 経口投与した。30 mg/kg 投与群では対照群とほとんど差がなかった。100 mg/kg 投与群では 2/8 例に効果を認めたが、6/8 例には対照群とほぼ同程度の病変の進行が

認められた (Fig. 4)。

c) ヘパリン

ヘパリン 300 U/kg または 900 U/kg を乳酸投与 1 時間前に皮下投与し、このモデルに対する効果を検討した。用量依存的に病変の進行を抑制する傾向にあったが有意差はなかった (Fig. 5)。

III 考 察

末梢動脈閉塞症の発症および進展に血栓の形

ラット
10 or 30mg/kg
S.C.



Photo.1 Development of leg lesions by injection of 5% lactic acid into rat femoral artery
Before injection a), 3 hours b), 24 hours c) and 7 days d) after injection

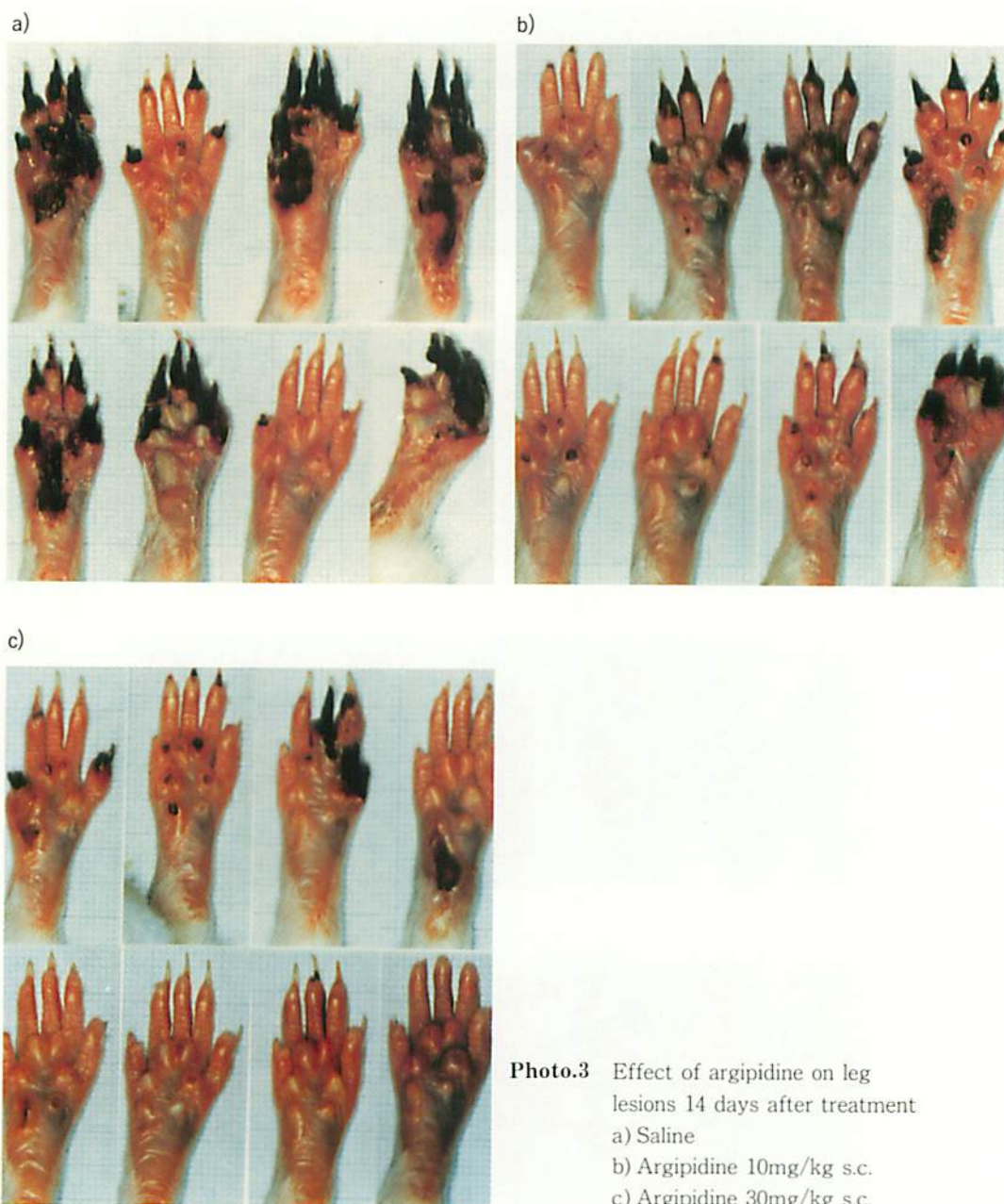


Photo.3 Effect of argipidine on leg lesions 14 days after treatment
a) Saline
b) Argipidine 10mg/kg s.c.
c) Argipidine 30mg/kg s.c.

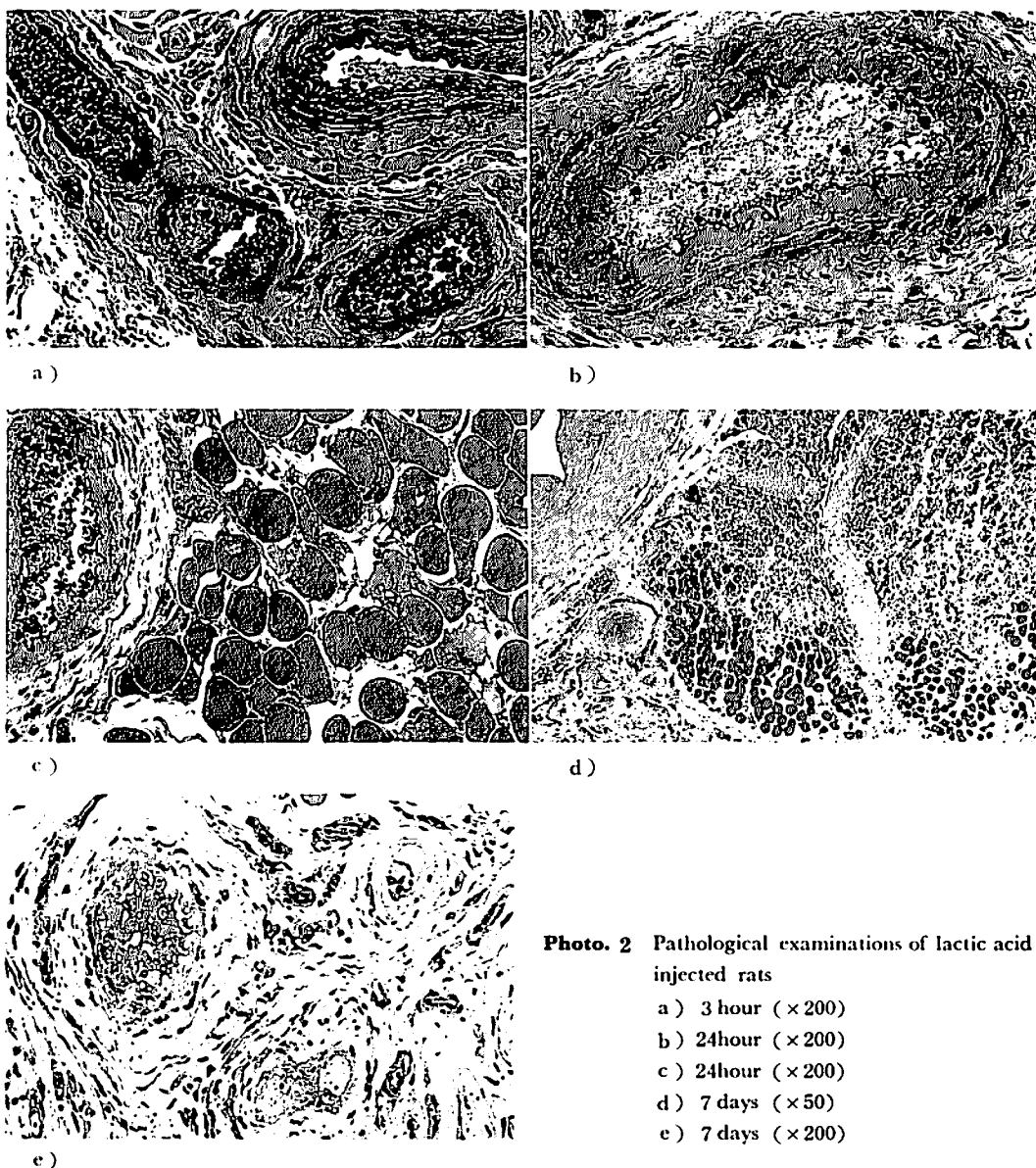


Photo. 2 Pathological examinations of lactic acid injected rats

- a) 3 hour (×200)
- b) 24hour (×200)
- c) 24hour (×200)
- d) 7 days (×50)
- e) 7 days (×200)

成は重要な役割を果たしている。血栓の形成は種々の要因によって惹起されるが、その大部分は血小板のみならず凝固系の活性化が重要な役割を担っている。argipidine の第Ⅱ相臨床試験において、本剤が末梢動脈閉塞症にチクロピジンにおとらない有効性を示し、特にチクロピジン無効の患者の11例中10例に有効であった⁴⁾ことから本疾患に対する抗凝固療法の有用性が示

唆された。このような臨床結果は末梢動脈閉塞症において血液凝固系の活性化を主体として血栓形成が起こる病態が存在することを示している。

今回の実験は血液凝固を主体とする末梢動脈閉塞症モデルを作成するため、動注する血管障害物質をラウリン酸から乳酸に変更した。すでに富川ら⁵⁾は乳酸投与によるアシドーシスが血

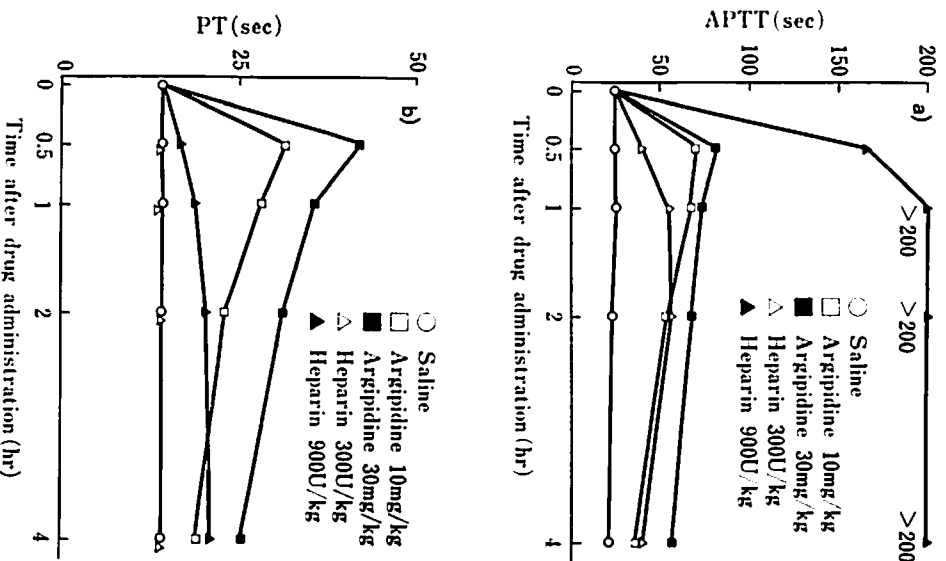


Fig. 6
Prolongation of plasma clotting times
by subcutaneous injection of argipidine and heparin

管内皮の障害を与えたとともに凝固系の活性化を惹起させることを報告している。また前川⁹⁾はエンドトキシン刺激により血管内皮細胞が tissue factor (以下「TF」) を著しく産生することを見いだした。さらに Nawroth ら¹⁰⁾ は、炎症反応のメデイエーターの一つであるイソタクロイキン1をウサギに投与したとき、血管内皮細胞において TF の産生が著しく増加することを報告している。したがって乳酸による動脈内皮細胞の損傷により TF が産生されることが充分考えられる。

今回の乳酸投与による末梢動脈閉塞症のモデルにおいてこれらの点を裏付ける所見が病理組織学的観察で認められた。すなわち、乳酸投与

初期の動脈壁内皮細胞の部分的剝離とともに血小板の凝集と粘着が顕著に認められた。この時期の肉眼的変化として足全体の暗赤色の浮腫が観察された。そしてこれらの壁血腔がフィブリンを主体とする血栓に変化する時期とはほぼ一致して指先の黒化が起こり組織学的には限局性の筋線維の壊死が認められた。このモデルに対し抗トロンビン薬である argipidine はヘパリンよりも明確な抑制効果を示した。チクロピジンも抑制傾向を示したが、argipidine はより明確ではなかった。また抗血小板剤であるチクロピジンの効果が少なかった理由として、血管障害物質をラウリン酸から乳酸に変えたため、血栓形成に関与する血液凝固の寄与が高くなったことに

よると考えられる。一方ヘパリンは *ex vivo* の抗凝固作用で比較すると、APTT においてはアルギピジンよりはるかに強かった (Fig. 6-a) が、PT で比較するとヘパリンの 900 U/kg は argipidine の 10 mg/kg とほぼ等しい延長作用を示した (Fig. 6-b)。これらの結果は、argipidine の凝固系に対する作用がヘパリンと異なることを示し、本薬の外因系凝固を強く延長する作用は、凝固系の関与する血栓形成の抑制に対し、より高い有効性を示すことを示唆している。

以上 argipidine は末梢動脈閉塞症モデルにおいて明確に病変の進行を抑制し、本薬の臨床上の有用性が期待できることが明らかになった。特にチクロピジン抵抗性の病態に対し、argipidine 単独およびチクロピジンとの併用により、より一層の効果が期待される。

要 約

ラットの大腿動脈から5%乳酸を注入 (0.1 ml/rat) して、動脈壁内皮細胞の剝離を伴う血栓性の末梢動脈閉塞症モデルを作成し、この病態に対する薬剤の効果を検討した。特異的で強力な抗トロンビン薬 argipidine は 10 mg/kg 以上の単回皮下投与により有意に病変の進行を抑制した。しかし、チクロピジン 100 mg/kg 経口投与およびヘパリン 900 U/kg 皮下投与において抑制傾向が認められたが、有意ではなかった。以上の結果から、argipidine は臨床におけ

る血栓性の末梢動脈閉塞症の発生および進展に対して効果が期待される。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R. *et al.*: A synthetic thrombin inhibitor taking extremely active stereostructure, *Thrombos. Haemostas.* 42: 205 (1979)
- 2) Hijikata A., Okamoto S., Mori E. *et al.*: *In vitro* and *in vivo* studies of synthetic thrombin inhibitors (OM-inhibitors), *Thromb. Res.* 8 (Suppl. 2): 83~89 (1979)
- 3) Ashida S., Ishihara M., Ogawa H. & Abiko Y.: Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats, *Thromb. Res.* 18: 55~67 (1980)
- 4) 田辺達三, 三島好雄ほか: 慢性動脈閉塞症に対する抗トロンビン剤MD-805の治療成績—多施設共同試験—, 臨床医薬 (投稿中)
- 5) Tomikawa M., Ogawa H. & Abiko Y.: Experimental model of pulmonary thrombosis in rats, *Thrombos. Diath. Haemorrh.* 31: 86~102 (1974)
- 6) 前川 正: 血管壁の凝固活性と血管病変, 最新医学 40: 2034~2041 (1985)
- 7) Nawroth P.P., Handley D.A., Esmon C.T. & Stern D.M.: Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity, *Pro. Nat. Acad. Sci.* 83: 3460~3464 (1986)

新規抗トロンビン薬 Argipidine (MD-805) の一般薬理作用

三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 医薬研究所

戸 部 昭 広 成 松 明 博 中 尾 健一郎
生 駒 英 信 江 川 三 生 田 中 唯 司
片 山 創 太 別 所 秀 樹 佐 藤 尚 哉
西 村 悦 子 伝 田 ひろみ 橋 本 紀 子
河 原 こずえ

General Pharmacological Properties of a New Thrombin Inhibitor, Argipidine (MD-805)

Akihiro Tobe, Akihiro Narimatsu, Ken-ichiro Nakao,
Hidenobu Ikoma, Mitsuo Egawa, Tadashi Tanaka,
Souta Katayama, Hideki Bessyo, Naoya Sato,
Etsuko Nishimura, Hiromi Denda, Noriko Hasimoto
and Kozue Kawahara

Pharmaceuticals Laboratory, Life Science Research Sector, Research Center,
Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

General pharmacological properties of an intravenously administered argipidine (MD-805), a new thrombin inhibitor, were examined in experimental animals. The results were summarized as follows.

1. Effects on central nervous system

In gross behavioral observation, slight decreases in exploratory behavior, alertness and muscle tone were noticed by 10~30 mg/kg i.v. of argipidine. Argipidine, at 10 mg/kg i.v., produced slight and transient SWS EEG pattern and suppression of EEG arousal response. Similar EEG pattern was also observed after continuous

infusion of argipidine (0.15 mg/kg/min). High doses (30~100 mg/kg i.v.) of argipidine caused a weak suppression of spontaneous motor activity and rotating rod performance. The drug had little effect on traction test, normal body temperature, convulsions and acetic acid writhing at the doses of 3 to 100 mg/kg i.v.

2. Effects on respiratory and cardiovascular systems

Argipidine showed little influence on various parameters at 0.3~3 mg/kg i.v. At 10 mg/kg i.v., argipidine caused slight changes in SBP (decrease), HR, respiratory rate and FAF (increases). These changes became more prominent after 30 mg/kg i.v. (anesthetized dogs). Argipidine had little effect on ECG. In open-chest dogs, argipidine slightly decreased LVP, dp/dt, HR and SBP at 10 mg/kg i.v. Similar but moderate changes were observed at 30 mg/kg i.v.

Argipidine caused a concentration dependent decrease of developed tension of isolated left atria ($3 \times 10^{-7} \sim 10^{-3}$ g/ml, 10~30% decreases). In isolated papillary muscle preparation, argipidine decreased the contractility at 300~1000 μ g and moderately increased the blood flow at 10~1000 μ g. Urinary volume and electrolyte excretion were little affected by 3~30 mg/kg i.v. of argipidine.

3. Effects on autonomic nervous system, smooth muscle and digestive system

Effects on various agonists (ACh, Hist, BaCl₂, NE, Iso and 5-HT) and carotid artery occlusion were examined in isolated smooth muscles (Guinea pig ileum, rat vas deferens, rat fundus strip, rat uterus) and anesthetized dogs. Except for the moderate inhibitory effect on 5-HT induced contraction in fundus strip, argipidine exhibited no influence on other responses. Argipidine showed a slight increase in frequency of contractions only in diestrous stage of uterus. Argipidine transiently suppressed the gastrointestinal motility at 10 mg/kg i.v. but showed no influence on propulsive activity and gastric acid secretion. Argipidine showed a moderate inhibition of corneal reflex (3%) and vascular permeability (100 mg/kg i.v.) There was no effect on neuro-muscular junction at 1~30 mg/kg i.v.

Considering both present results and effective dose levels for anti-thrombin effect (1 mg/kg i.v. or 0.2~2 μ g/kg/min infusion), it may be suggested that argipidine scarcely causes serious side effect in clinical application.

KEY WORDS

General pharmacology, Argipidine, MD-805,
Thrombin inhibitor

緒 言

抗トロンビン薬 argipidine はトロンビンによる fibrin 形成や血小板凝集を選択的かつ強力に阻害し^{1,2)}、さらに種々の血栓症動物モデルで抗血栓効果を示すことがすでに明らかにされている³⁻⁵⁾。一方、臨床試験では、DIC、慢性動脈閉塞症、脳血栓急性期等で有効であることが示されている⁶⁻⁸⁾。今回、われわれは argipidine の中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系、消化器系に対する作用を中心とした一般薬理作用を検討したのでここに報告する。

I 実験材料

1 使用動物

ddY 系雄性マウス (静岡県実験動物農業協同組合)、Wistar 系雄雌ラット (日本医科学動物資材研究所、日本医科と略)、Hartley 系雄性モルモット (日本医科)、日本白色種雄性ウサギ (日本医科)、雌雄ネコ (日本医科)、雌雄雑種成犬 (神奈川ドックセンター) を用いた。これらの動物は室温 20~25°C、湿度 45~60%、定時照明 (7:00 a.m.~7:00 p.m.) の環境下で飼育して実験に供した。

2 使用薬物

Argipidine は、0.1 あるいは 1 N HCl に溶解後、生理的食塩水で所要用量まで希釈し、さらに 1 N NaOH で pH を調整して用いた。その他、次の薬物を用いた。

Acetic acid (キシダ化学)、acetylcholine chloride (ACh, 第一製薬)、アラビアゴム (半井化学)、barium chloride (BaCl₂, 東京化成)、炭末 (活性炭、武田薬品)、ether (純正化学)、1 N HCl (キシダ化学)、heparin (Sigma)、hexobarbital (帝国化学産業、Na 塩として使用)、histamine diphosphate (Hist, sigma)、*dl*-isoproterenol hydrochloride (Iso, Sigma)、1 N NaOH (キシダ化学)、*l*-norepinephrine hydrochloride (NE, Sigma)、pentobarbital sodium (大日本製薬)、pentylene tetrazole (PTZ, Sigma)、pontamine sky blue (PSB, 東京化成)、reserpine

(第一製薬)、serotonin creatinine sulfate (5 HT, Sigma)、strychnine nitrate (日進製薬)、succinylcholine chloride (東京化成)、urethane (純正化学)。

II 実験方法

1 中枢神経系に対する作用

1) 症状観察

雄性ラット (180~220 g) 1 群 5 匹を用いた。Irwin⁹⁾ の方法に準じて薬物静脈内投与後の症状変化を 4 時間にわたり観察した。

2) 自発運動 (spontaneous motor activity, SMA と略) に対する作用

雄性マウス (23~30 g) 1 群 5 匹を用いた。薬物を静脈内投与した後、すみやかに動物を透明プラスチック製測定ゲージ (23×36×25 cm) に入れ、これを MK-ANIMEX[®] (室町機械) 上に置き、投与後 5 時間にわたり連続的に自発運動量を測定した。結果は 30 分ごとの累積 SMA で示した。

3) 懸垂試験

雄性マウス (22~24 g) 1 群 8 匹を用いた。薬物静脈内投与 30, 60, 180 分後にマウスを 30 cm の高さに水平に張りわたした針金に前肢をかけさせ、5 秒以内に後肢を針金にかけないものを筋弛緩作用陽性として検討した。

4) 協調運動抑制作用

雄性マウス (22~24 g) 1 群 6 匹を用いた。Rotating rod 法により、マウスを回転円筒 (Ugo-Basile, Italy) に乗せ、回転速度を 15 r.p.m. として 2 分以上とどまるものを選び実験に供した。薬物静脈内投与 30, 60, 120, 240 分後にマウスを回転円筒に乗せ、滞留時間を測定し、1 分以内に落下するものを協調運動抑制作用陽性として検討した。

5) 睡眠延長作用

雄性マウス (20~23 g) 1 群 8 匹を用いた。薬物静脈内投与 30 分後に hexobarbital-Na 80 mg/kg を腹腔内投与し、正向反射消失 (入睡時間) から正向反射回復までの時間を睡眠時間として測定した。

6) ウサギにおける正常体温下降作用

16時間絶食した雄性ウサギ (1.8~2.9 kg) 1群5匹を用いた。

木製固定器 (トキワ化学器械) にウサギを固定し、デジタル電子体温計 (TF-DN, テルモ) を用いて直腸温を薬物静脈内投与後4時間におたり連続測定した。なお、薬物投与前2時間におたり体温を測定し、正常体温が39.8°C以下のものを実験に供した。

7) 抗痙攣作用

a) Pentylentetrazole (PTZ) 痙攣に対する作用

雄性マウス (20~22 g) 1群8匹を用いた。

薬物静脈内投与30分後に、PTZ 100 mg/kgを腹腔内投与し、これにより生ずる最小痙攣 (minimal seizure, MS), 間代性痙攣 (clonic convulsion, CL), 強直性屈曲 (tonic flexor, TF), 強直性伸展 (tonic extensor, TE) および死亡 (death, D) の発現時間および発現数に対する影響を検討した。

b) Strychnine 痙攣に対する作用

雄性マウス (20~22 g) 1群8匹を用いた。

薬物静脈内投与30分後に strychnine 1.5 mg/kgを皮下投与し、発現する TE および D に対する抑制の有無を検討した。

c) 最大電撃痙攣に対する作用

雄性マウス (20~25 g) 1群8匹を用いた。

薬物静脈内投与30分後に電撃痙攣装置 (Ugo basile, Italy) を用い、両耳に 30 mA, 0.6 msec, 100 Hz, 0.2 秒の最大電気ショック (maximal electroshock seizure, MES) を負荷した。負荷後ただちに発現する TF および TE に対する影響を検討した。

8) 酢酸 writhing に対する作用

雄性マウス (18~23 g) 1群8匹を用いた。

薬物静脈内投与20分後に0.7%酢酸0.1 ml/10 gを腹腔内投与し、その10分後より10分間特徴的な writhing 数を測定した。

9) 自発脳波に対する作用

成熟したネコ (3.1~5.1 g, 雌1匹雄6匹) を用いた。

Ether 麻酔下に気管カニューレならびに薬物静脈注射用股静脈ポリエチレンカニューレを装着した後、脳定位固定装置 (東大脳研型, 成茂科学) に固定した。麻酔を中止し、0.2% succinylcholine chloride 溶液を股静脈から持続静注するとともに人工呼吸を開始した。次に頭部皮膚を切開し、前頭および後頭部の頭蓋骨に木ねじを装着して皮質電極とした (frontal and occipital cortex, FC and OC)。一方、海馬 (hippocampus, HPC) および扁桃核 (amygdala, AMY) には同心円双極電極を装着した。各電極より自発脳波を導出し、ポリグラフ (RM-6000, 日本光電) 上に記録した。なお、電極は Jasper and Ajimone-Marsan の脳図譜¹⁰⁾に従い、海馬 Fr: 2.0, L: 8.5, H: +4.0, 扁桃核 Fr: 10.5~11.0, L: 9.5, H: -5.5~-8.0 に挿入した。術後約2時間放置し、不動化の状態で実験を行った。薬物は股静脈カニューレより投与した。なお、持続注入の際には左側股静脈より 150 µg/kg/min の割合で注入し、注入開始後15, 30, 60, 120, 180分において右側股動脈より血液 1 ml をサンプリングし、薬物の血中濃度測定に供した。

血中濃度は argipidine によるトロンビン時間の延長作用を指標として測定した。

10) 脳波覚醒反応に対する作用

Succinylcholine chloride 不動化ネコ (3.5~4.5 kg, 雄3匹) を用いた。

9) と同様の部位に記録電極を刺入した。また刺激用電極として中脳網様体 (midbrain reticular formation, MRF, Fr: 2.8, L: 3.0, H: -0.5) に同心円双極電極を刺入し、電気刺激装置 (SEN-3201, 日本光電) により 0.15 msec, 2.5~4 V, 100 Hz の条件で5秒間短型波電気刺激を行い、出現する脳波覚醒反応をポリグラフ (RM-6000, 日本光電) 上に記録した。

2 呼吸循環器系に対する作用

1) 麻酔犬の血圧, 心拍数, 心電図, 呼吸および大動脈血流量に対する影響

雑種成犬 (13~15.5 kg, 雌1匹, 雄4匹) を pentobarbital-Na 30 mg/kg i.v. で麻酔し背位に

固定して用いた。

全身血圧 (systemic blood pressure SBP) は左大腿動脈内に挿入したカニューレを圧トランスデューサー (RP-5, 日本光電) に接続することにより、血流量 (femoral artery flow, FAF) は露出した右大腿動脈に装着した非観血的プローブを介して電磁流量計 (MF-26, 日本光電) に導きそれぞれ測定した。心電図は第Ⅱ誘導を記録し、心電図 (ECG) の R 波で心拍計 (RT-5, 日本光電) を駆動し心拍数を測定した。呼吸数および呼吸流量は気管チューブを呼吸流量計 (MFP-1 T, 日本光電) に接続して測定した。各パラメータはレクテコーダ (RJG-3004, 3008, 日本光電) 上に記録した。薬物は大腿静脈に挿入したゴム製カニューレにより投与した。

2) 麻酔開胸犬に対する作用

雑種成犬 (12~14 kg, 雌 1 匹, 雄 2 匹) を pentobarbital-Na 30 mg/kg i.v. で麻酔した後、気管チューブを挿入し、respirator (607, Harvard) により人工呼吸を行った。胸部を正中切開し、心のう膜を切り開き、心臓を露出した。両側の横隔膜神経を切断後、左心室壁をとおして左心室内にポリエチレンチューブを挿入し、一端を圧トランスデューサー (RP-5, 日本光電) に接続して左心室内圧を、左心室内圧を微分アンプ (S-3056, 日本光電) にて微分することにより変化率 (dp/dt) を求めた。

右心房には圧トランスデューサー (RP-5, 日本光電) に接続したポリエチレンチューブを挿入し、右心房内圧を測定した。上行大動脈を露出し、電磁流量計 (MF-26, 日本光電) の非観血式プローブを装着して上行大動脈流量 ($\equiv$ 心拍出量, CO) を測定した。全身血圧は圧トランスデューサー (RP-5, 日本光電) に接続した動脈カニューレを左大腿動脈に挿入することにより測定した。心電図は第Ⅱ誘導を記録し、心電図の R 波で心拍計 (RT-5, 日本光電) を駆動し、心拍数を測定した。すべてのパラメータはレクテコーダ (RJG-3004, 3008, 日本光電) 上に記録した。薬物は大腿静脈に挿入したゴム

製カニューレにより投与した。

3) モルモット摘出心房に対する作用

雄性モルモット (350~400 g) を 6 匹使用した。

モルモットを撲殺放血後、心臓を摘出し、左心房を切り取った。これを 37°C に保温し、95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 溶液を含むマグナス装置に懸垂した。標本には静止張力 0.5 g をかけ、白金双極電極を介して電気刺激装置 (MSE-3 R, 日本光電) より得られた矩形波 (2 Hz 1 msec 1.5 $\times$ 閾値電圧) で刺激し、そのとき発生する等尺性張力を FD-ピックアップ (SB-1 T, 日本光電) を介して測定し、レクテコーダ (RJG-3008, 日本光電) 上に記録した。

4) イヌ摘出乳頭筋標本の収縮力、血流量およびイヌ摘出洞房結節標本の心拍数に対する作用

雑種成犬 (11.5~31 g, 雌 2 匹, 雄 3 匹) を使用した。

摘出乳頭筋標本は Endoh ら¹¹⁾ の方法に従って作製した。すなわち、イヌの心室中隔を摘出した後ポリエチレンカニューレを前中隔動脈内に入れ、これを介して中隔をヘパリン処置した供血犬からの動脈血で定圧 (約 100 mmHg) 下に交叉環流した。標本は電氣的に駆動し、右心室前乳頭筋の収縮力および前中隔動脈の血流量を測定した。洞房結節標本は Ciba ら¹²⁾ および Kubota ら¹³⁾ の方法に従って作製した。すなわち、イヌの右心房を摘出し、ポリエチレンカニューレを洞房結節動脈内に入れ、これを介して乳頭筋標本の場合と同様に交叉環流を行った。心房のエレクトログラムにより心拍数を測定した。各パラメータはレクテコーダ (RJG-3004, 日本光電) 上に記録した。薬物は両標本ともカニューレに接合したゴムチューブ中に 30 ml の液量を約 4 秒で近接動注した。

5) ラットの尿量および尿中電解質に対する作用

一晩絶食した雄性ラット (135~160 g) 1 群 6 匹を用いた。

ラットに薬物を静脈内投与後ただちに生理的食塩水25 ml/kgを経口的に負荷し、すみやかに採尿用個別ケージに1匹ずつ入れ、以後5時間にわたり1時間ごとの尿量を測定した。この間は絶食、絶水とした。5時間までに排泄された尿を集め、尿中の Na^+ 、 K^+ および Cl^- 濃度はそれぞれ電解質自動分析装置(セラ301A, 堀場製作所)を用いて測定し、電解質排泄量を求めた。

3 自律神経及び消化器系に対する作用

1) 麻酔犬における各種アゴニストおよび頸動脈閉塞による血圧反応に対する作用

雑種成犬(8~11 kg, 雌3匹, 雄1匹)を2-1)と同様に麻酔固定した後、全身血圧を大腿動脈より測定した。NE 0.3 および $1 \mu\text{g/kg}$, ACh $3 \mu\text{g/kg}$, Iso $0.3 \mu\text{g/kg}$, Hist $1 \mu\text{g/kg}$ は大腿静脈に挿入したカニューレより投与した。また両側の総頸動脈を露出し45秒間閉塞した。各薬物および頸動脈閉塞による血圧の変化をそれぞれ2回測定した後、薬物を静脈内投与した。投与約10分後から再び上記各アゴニストの投与および頸動脈閉塞による血圧の変化を観察した。

2) モルモット摘出腸管に対する作用

16時間絶食したモルモット(610~710 g)を撲殺して回腸部を摘出し、95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 溶液を含むマグヌス装置に懸垂した。静止張力1 gを負荷し、等尺性張力変化をFD ピックアップ(SB-1, 日本光電)を介してポリグラフ(RM-6000, 日本光電)上に記録した。なお、槽内温度は 32°C とした。ACh および Hist は、 10^{-9}M (以下槽内最終濃度)よりそれぞれ累積的に加えた。また BaCl_2 は 10^{-3}M で検討した。対照反応の最大収縮力を100%として薬物の影響を調べた。実験例数は4例である。

3) ラット摘出輸精管に対する作用

雄性ラット(400~460 g)を撲殺して輸精管を摘出した。これを95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 溶液を含むマグヌス装置に懸垂し、静止張力0.5 gを負荷した。以下3-2)と同様の条件で行った。NEは 10^{-9}M

より累積的に添加し、対照反応の最大収縮力を100%として薬物の影響を調べた。実験例数は4例である。

4) ラット摘出胃条片に対する作用

16時間絶食した雄性ラット(370~440 g)を撲殺後胃を摘出し、前胃部条片を作製した。これを95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 溶液を含むマグヌス装置に懸垂した。静止張力を1 g負荷し、等張性張力変化をアイソトニックトランスジューサー(TD-112 S, 日本光電)を介してポリグラフ(RM-6000, 日本光電)上に記録した。なお、槽内温度は 32°C とした。5-HTは 10^{-10}M より累積的に添加し、対照反応の最大収縮力を100%として薬物の影響を調べた。実験例数は4例である。

5) ラット摘出子宮自動運動に対する作用

雌性ラット(210~230 g)および妊娠20日目のラット(400~430 g)を用いた。

腔スミア検査によりラットの性周期を判定し、非発情期、発情期に分類した。ラットを撲殺後子宮を摘出し、左右の子宮角に分けて95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した Locke-Ringer 溶液を含むマグヌス装置に懸垂し、静止張力0.5 gを負荷した。槽内温度は 37°C として、以下3-2)と同様の条件で行った。実験は約2時間以上経過して自動運動が安定して発現するようになってから、薬物を添加し、自動運動に対する影響を検討した。実験例数は各性周期共に5~7例である。

6) マウス腸管輸送能に対する作用

16時間絶食した雄性マウス(21~28 g) 1群8匹を用いた。

薬物静脈内投与直後に5%アラビアゴムに懸濁させた5%炭末液を0.2 ml/匹経口投与した。30分後にマウスを頸椎脱臼にて致死せしめ、腸管を摘出し、幽門部より回盲部までの長さに対する炭末到達先端部の割合を求めて腸管輸送能とした。

7) ウサギ生体位胃腸管運動に対する作用

24時間絶食した雄性ウサギ(2.7~3.0 kg) 4

匹を用いた。

Pentobarbital-Na 30 mg/kg を耳静脈に注入して麻酔し、股動脈および股静脈にそれぞれ動脈圧測定用カテーテル、薬物投与用カテーテルを挿入した。次いで胃の幽門部近傍より長さ約10 cm のゴム製バルーンを、回腸部に長さ約3 cm の小型バルーンをそれぞれ挿入し、いずれも低圧用トランスデューサー (LPU-0.1-350-O-II, 日本光電) に接続し、約 20 cm H₂O の静水圧を加えて胃および小腸自動運動をポリグラフ (RM-6000, 日本光電) 上に記録した。

8) ラット胃液分泌に対する作用

24時間絶食した雄性ラット (170~210 g) 1群6匹を用いた。ether 麻酔下に開腹し、幽門部を結紮 (Shay *et al.*¹⁴⁾) 後、ただちに薬物を静脈内投与し、4時間後に再び ether 麻酔下に胃を摘出し胃液を回収した。回収した胃液は遠心分離 (3000 r.p.m., 10分) し上清液について、その液量、pH、総酸度、ペプシン活性を測定した。酸度は自動滴定装置 (RADIOMETER COPENHAGEN) を用い、0.01 N の NaOH で pH 7.0 まで滴定し、ペプシン活性は Anson¹⁵⁾ 法にて測定した。

4 その他の作用

1) 局所麻酔作用

あらかじめ角膜反射が生ずることを確認した雄性モルモット (290~340 g) 1群5匹を用いた。

左右の眼結膜囊内に、溶媒および薬物溶液 (濃度1および3%) を滴下させて20秒間保持し、角膜に浸透させた。処理後5~60分にマンドリン線を用いて角膜中心部を5回刺激し、3回以上反射が消失した場合を局所麻酔作用陽性 (角膜反射消失) と判断した。

2) 坐骨神経-腓腹筋標本に対する作用

雄性ラット (270~320 g) 5匹を用いた。

Urethane (1.2 g/kg, i.p.) 麻酔下に左側腓腹筋を剝離し、その末梢端を切断し、FD ビックアップ (SB-1T, 日本光電) に装着した。双極白金電極を腓腹筋に刺入し、筋直接刺激を行った。さらに、同側の坐骨神経を大腿部で剝離切

断後、その末梢側に双極白金電極を装着し、神経刺激を行った。

刺激は電気刺激装置 (SEN-3201, 日本光電) により 0.1 Hz, 0.1 msec, supramaximal voltage の矩形波刺激を筋肉、神経交互に行い、惹起される筋肉の単収縮を等尺性にポリグラフ (RM-6000, 日本光電) 上に記録した。薬物は頸動脈に装着したポリエチレンチューブより投与した。

3) マウス血管透過性に対する作用

雄性マウス (21~35 g) 1群8~10匹を用いた。

薬物を皮下あるいは静脈内投与し、30分後に1% PSB 溶液 0.05 ml/10 g 静脈内投与した。10分後に0.7% 酢酸 0.1 ml/10 g を腹腔内投与し、さらに15分後にマウスを殺し、生理的食塩水 5 ml を腹腔内投与し、腹壁を小切開して腹腔内液を採取した。再度腹腔内を生理的食塩水で洗い、全量を 10 ml とした。これを 3000 r.p.m. で10分間遠心して上清を得、ダブルビーム分光光度計 (200-20 形, 日立) により波長 620 μ m における上清の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線より定量した。

統計的処理: 有意差検定は Student の *t*-test および χ^2 -test により行った。

III 実験成績

1 中枢神経系に対する作用

1) 症状観察

Argipidine 1~3 mg/kg i.v. では顕著な変化は認められなかった。10 mg/kg i.v. でも投与後1時間内に消失する程度のわずかな探索行動の低下が認められるにすぎなかった。30 mg/kg i.v. 投与例においても警戒性および筋緊張の軽度低下が投与30分後に観察されたのみであり、これ以外顕著な変化は認められなかった。

2) 自発運動に対する作用

Argipidine は、10および30 mg/kg i.v. では、マウスの自発運動量に影響を与えなかったが、100 mg/kg i.v. では軽度な減少を示した (Fig. 1)。

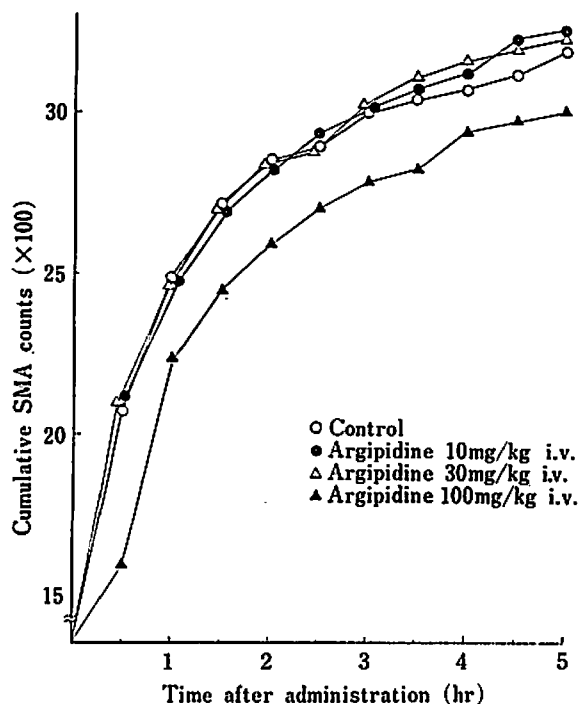


Fig. 1 Effect of argipidine on spontaneous motor activity (SMA) in mice

Table 1 Effect of argipidine on rotating-rod performance in mice

Drug	Dose (mg/kg i.v.)	Mean revolving time (sec)				
		0	0.5	1	2	4 (hr)
Control		180 ± 12 (8/8) ^{a)}	180 ± 11 (8/8)	156 ± 13 (8/8)	165 ± 16 (8/8)	197 ± 21 (8/8)
Argipidine	10	182 ± 13 (8/8)	200 ± 27 (8/8)	191 ± 27 (8/8)	200 ± 35 (8/8)	222 ± 32 (8/8)
	30	181 ± 10 (8/8)	128 ± 16* (8/8)	157 ± 17 (8/8)	153 ± 14 (8/8)	144 ± 28 (8/8)
	100	199 ± 21 (8/8)	106 ± 19* (7/8)	125 ± 38 (6/8)	142 ± 45 (5/8)	138 ± 38 (6/8)

^{a)} Number of mice which could stay on the rotating-rod more than 60 sec/number of mice used

* $p < 0.05$ vs. control Values are means ± S.E.

3) 懸垂試験

Argipidine は 10 mg/kg i.v. で影響を与えず、30および100 mg/kg i.v. でも投与後60分に1/8 例に筋弛緩作用を示すのみであった。

4) 協調運動抑制作用

Argipidine は 10 mg/kg i.v. で影響を与えなかったが 30 および 100 mg/kg i.v. では投与後30分に軽度ながら平均滞留時間を減少させた (Table 1)。

Table 2 Effect of argipidine on hexobarbital-Na induced sleeping time in mice

Drug	Dose (mg/kg i.v.)	Loss time of righting reflex (min)	Sleeping time (min)
Control		2.5 ± 0.2	42.3 ± 2.1
Argipidine	10	2.6 ± 0.3	34.6 ± 2.4*
	30	2.3 ± 0.2	39.5 ± 1.4
	100	3.4 ± 0.6	39.8 ± 5.3

Values are means ± S.E. (n=8) * p < 0.05 vs. control

Table 3 Effect of argipidine on pentylenetetrazole-induced convulsion in mice

Drug	Dose (mg/kg i.v.)	Minimal seizure	Clonic convulsion	Tonic flexor	Tonic extensor	Death
Control		0.89 ± 0.04 (8/8) ^{a)}	7.49 ± 2.68 (8/8)	6.33 ± 2.16 (8/8)	7.65 ± 2.68 (8/8)	7.96 ± 2.67 (8/8)
Argipidine	10	0.75 ± 0.05 (8/8)	5.31 ± 1.69 (8/8)	5.36 ± 1.69 (8/8)	5.39 ± 2.68 (8/8)	8.45 ± 2.16 (8/8)
	30	0.68 ± 0.02 (8/8)	13.43 ± 2.16 (8/8)	13.98 ± 2.21* (8/8)	14.26 ± 2.49 (7/8)	17.06 ± 2.92* (7/8)
	100	0.69 ± 0.04 (8/8)	3.80 ± 1.27 (8/8)	3.84 ± 1.27 (8/8)	4.26 ± 1.40 (7/8)	8.67 ± 3.24 (7/8)

^{a)} Number of mice showing positive response/number of mice used * p < 0.05 vs. control
Values are means ± S.E. (n=8)

Table 4 Effect of argipidine on maximal electroshock seizure in mice

Drug	Dose (mg/kg i.v.)	Tonic flexor	Tonic extensor	Clonic convulsion	Death
Control		8/8 ^{a)}	8/8	8/8	0/8
Argipidine	10	8/8	8/8	6/8	2/8
	30	8/8	8/8	6/8	2/8
	100	8/8	8/8	7/8	1/8

^{a)} Number of mice showing positive response/number of mice used

5) 睡眠延長作用

Argipidine 10 mg/kg i.v. で軽度な睡眠時間短縮が認められたが、30および100 mg/kg i.v. では影響は認められなかった (Table 2)。

6) ウサギにおける正常体温下降作用

Argipidine は 3 ~ 30 mg/kg i.v. で正常体温に対してほとんど影響を及ぼさなかった。

7) 抗痙攣作用

a) PTZ 痙攣に対する作用

Argipidine は 10 ~ 100 mg/kg i.v. で発現数に対して影響を示さなかった。なお、発現時間に対しては、30 mg/kg i.v. で強直性屈曲痙攣および死亡に至るまでの時間を有意に延長させた (Table 3)。

b) Strychnine 痙攣に対する作用

Argipidine は 30 および 100 mg/kg i.v. でstrychnineによる痙攣に影響を及ぼさなかった。

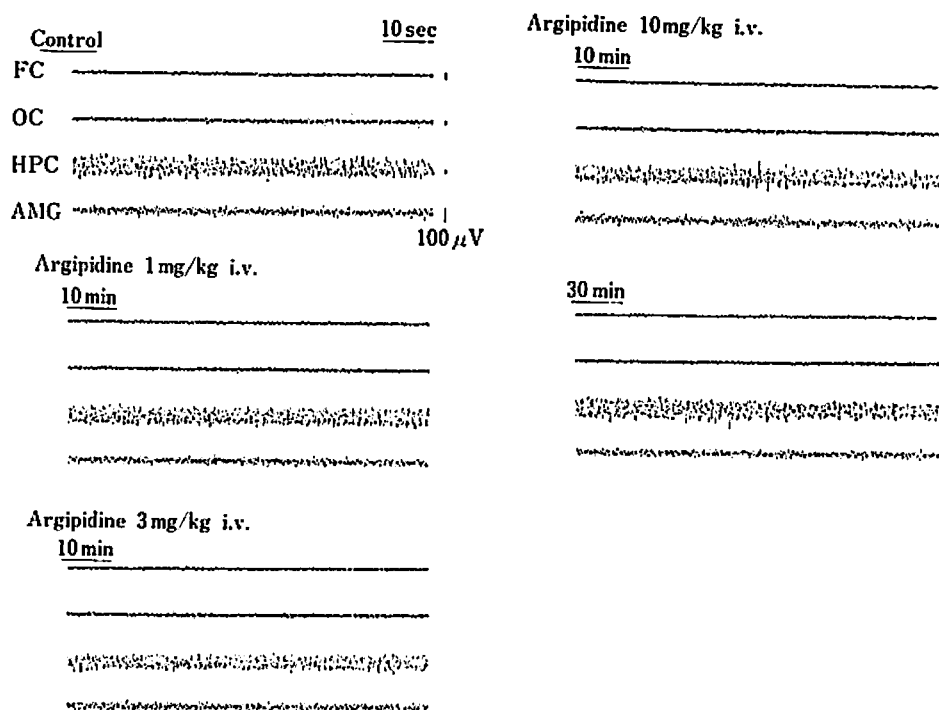


Fig. 2 Effect of argipidine on spontaneous EEG in succinylcholine immobilized cats. FC; frontal cortex, OC; occipital cortex, HPC; hippocampus, AMG; amygdala

c) 最大電撃痙攣に対する作用

Argipidine は 10~100 mg/kg i.v. で強直性伸展に対し拮抗せず、その他のパラメータに対しても有意な変化を与えなかった (Table 4)。

8) 酢酸 writhing に対する作用

Argipidine は 10~100 mg/kg i.v. ではほとんど影響を及ぼさなかった。

9) 自発脳波に対する作用

Argipidine 1~3 mg/kg i.v. では顕著な変化は観察されなかった。10 mg/kg i.v. においても、投与30分以内に回復する軽度な徐波化パターンが1/4例に認められたのみで、全体として顕著なものではなかった (Fig. 2)。Argipidine 150 μg/kg/min infusion 例では1/3例で徐波化傾向を認めたにすぎなかった (Fig. 3)。なお、infusion 時の argipidine 血中濃度推移を Fig. 4 に示したが、このときの血中濃度は抗トロン

ビン作用発現時の血中濃度 (0.02~0.2 μM) の50倍であった。

10) 脳波覚醒反応に対する作用

Argipidine は 1 および 3 mg/kg i.v. では脳波覚醒反応に対してほとんど影響を与えなかった。10 mg/kg i.v. でも 1/3 例において投与後5分にごくわずかな覚醒反応の低下傾向を認めたにすぎず、それも15分後には回復した (Fig. 5)。

2 呼吸循環器系に対する作用

1) 麻酔犬の血圧、心拍数、心電図、呼吸、大腿動脈血流量に対する影響

Argipidine 0.3~30 mg/kg i.v. の実験例を Fig. 6 に、そのときの心電図に対する影響を Fig. 7 に、5例についてまとめた結果を Fig. 8 に示す。

Argipidine 3 mg/kg i.v. 以下ではほとんど

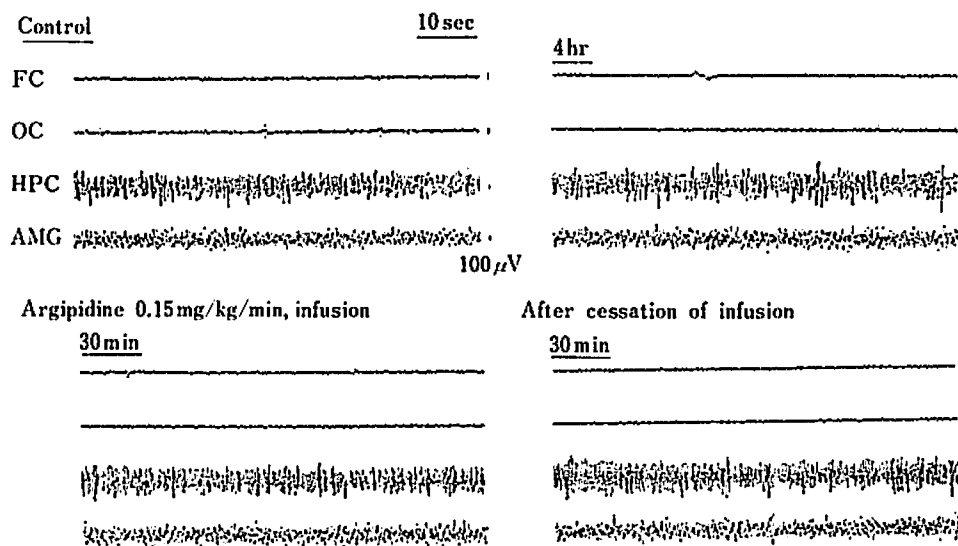


Fig. 3 Effect on spontaneous EEG by continuous infusion of argipidine in succinylcholine immobilized cats

影響ないか、ごくわずかな一過性の変化を示したにすぎなかった。10 mg/kg i.v. では SBP に対しては、拡張期圧で約 20 mmHg、収縮期圧で約 10 mmHg 下降したが、いずれも 10 分以内に回復した。HR は増加（平均 10 bpm、持続 2～3 分）した。呼吸に関しては呼吸数が増加し、流速は低下した。FAF は平均約 60% 増加したが、3 分以内に回復した。ECG にはほとんど影響は認められなかった。30 mg/kg i.v. では、SBP は、拡張期圧で約 45 mmHg、収縮期圧で約 30 mmHg 下降したが、収縮期圧は 5 分以内に回復し、拡張期圧は 10～20 分持続した。HR は 1/5 例が減少し、4/5 例は増加した。呼吸に関しては呼吸数が増加し、流速は低下した。FAF は平均約 70% 増加したが 5 分以内に回復した。ECG には顕著な変化は認められなかったが、T 波がわずかに変化した。

2) 麻酔開胸犬に対する作用

Argipidine 0.3～30 mg/kg 静脈内投与時の実験例を Fig. 9 に、3 例についてまとめた結果を Fig. 10 に示す。

Argipidine 3 mg/kg i.v. 以下では影響を示さないか、投与直後に一過性のわずかな変化を

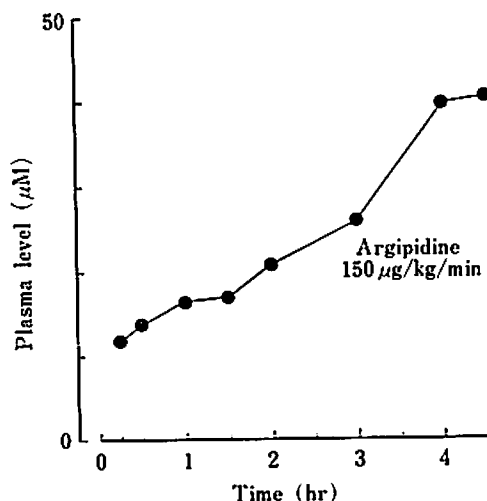


Fig. 4 Time course change in plasma level of argipidine by continuous infusion

示したにすぎなかった。

10 mg/kg i.v. では LVP, dp/dt および HR は軽度減少し、SBP も軽度下降したが、これらの変化は投与後 10 分以内にほぼ回復した。CO はほとんど変化しなかった。30 mg/kg i.v. では LVP および dp/dt max は約 28% 減少し

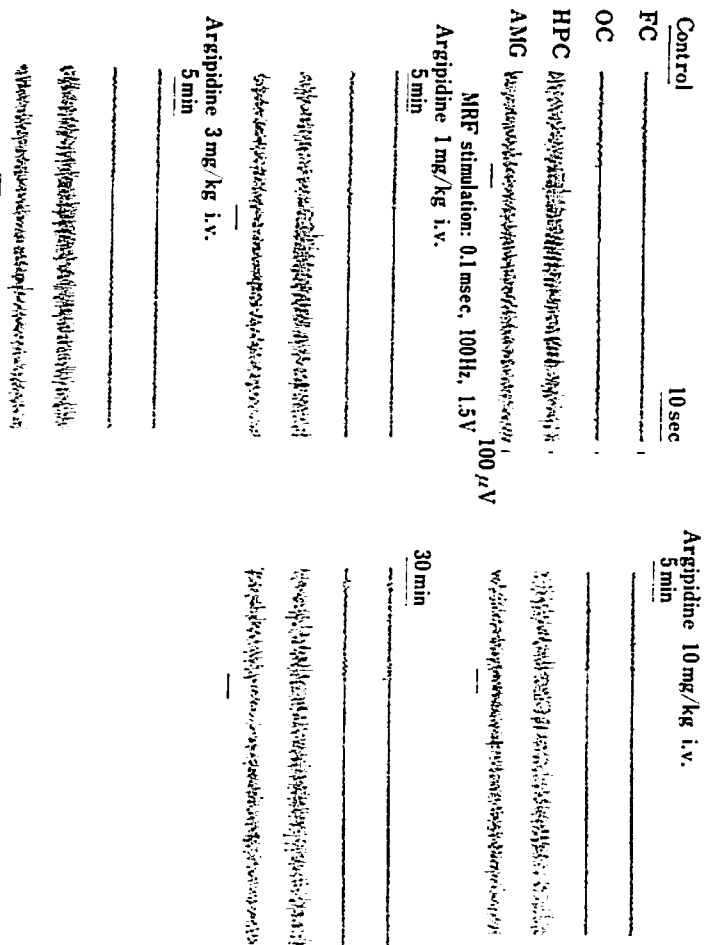


Fig. 5 Effect of argipidine on EEG arousal response to electrical stimulation of midbrain reticular formation (AMR) in succinylcholine immobilized cats

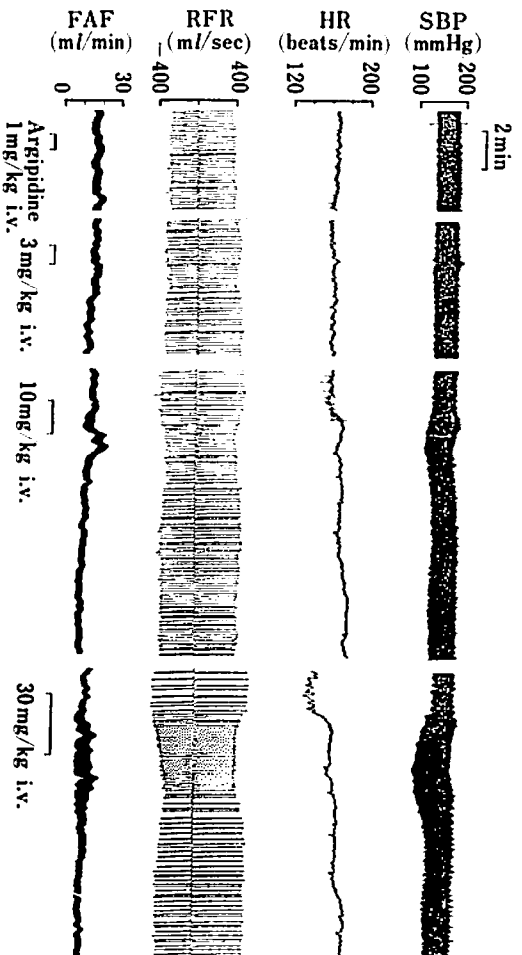


Fig. 6 Effect of argipidine on systemic blood pressure (SBP), heart rate (HR), respiratory flow rate (RFR) and femoral artery flow (FAF) in the anesthetized dog

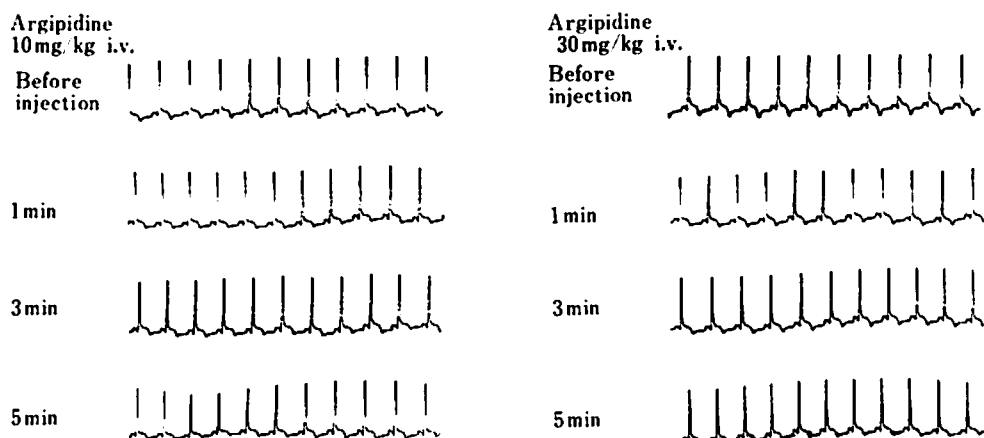


Fig. 7 Effect of argipidine on ECG change in the anesthetized dog

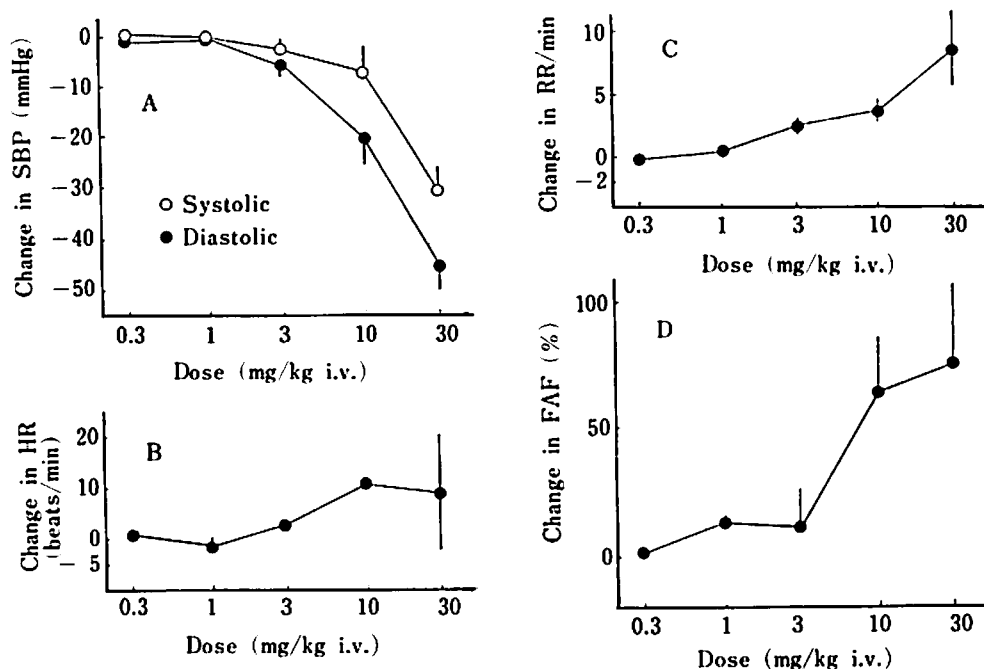


Fig. 8 Dose response curves of argipidine for changes in SBP (A), HR (B), respiratory rate (RR) (C) and FAF (D) in the anesthetized dog. Vertical bars indicate the mean $\pm$ S.E. ($n=5$)

た。SBP は24~29 mmHg 下降し、HR は約15 bpm 減少した。RAP は上昇した例と下降した例があった。これらの変化は10~30分で回復したが、1例では1時間以上持続した。

3) モルモット摘出心筋に対する影響
左心房収縮力について検討した。Argipidine は 10^{-7} ~ 10^{-3} g/ml で軽度ながら用量依存的に収縮力を減少させた (Fig. 11)。 10^{-3} g/ml で

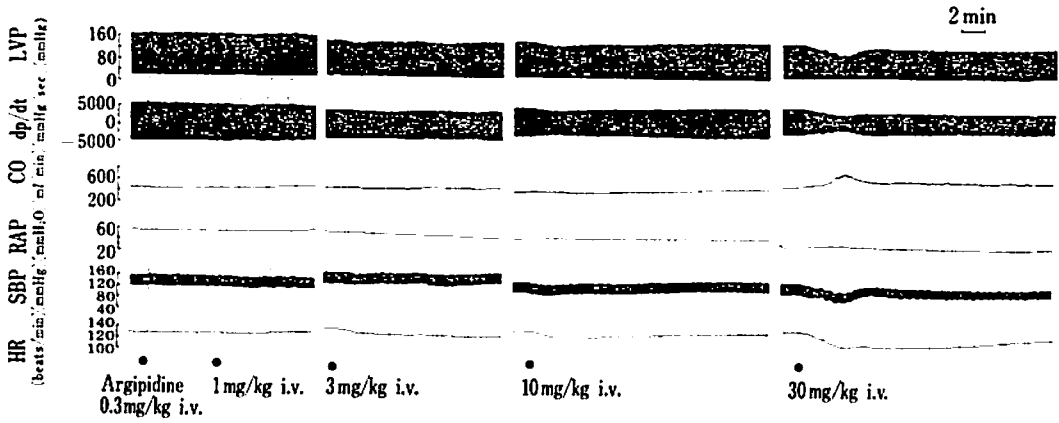


Fig. 9 Effect of argipidine of left ventricular pressure (LVP), dp/dt, cardiac output (CO), right atrial pressure (RAP), systemic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) in the open-chest dog

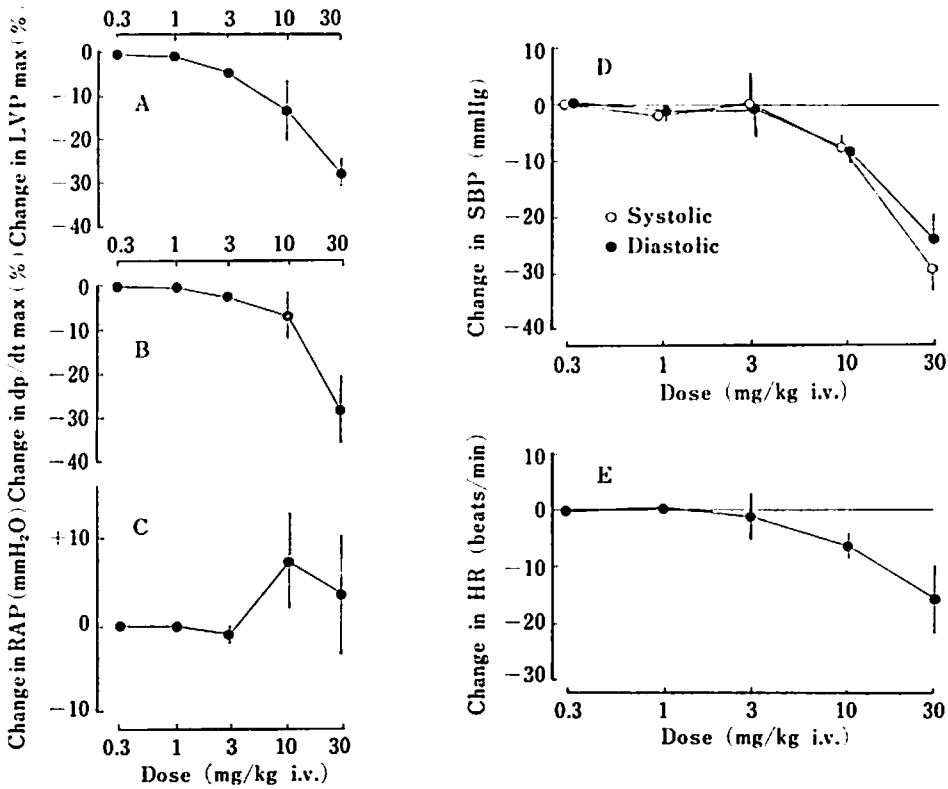


Fig. 10 Dose response curves of argipidine for change in LVP max (A), dp/dt max (B), RAP (C), SBP (D) and HR (E) Vertical bars indicate the mean $\pm$ S.E. ($n=3$)

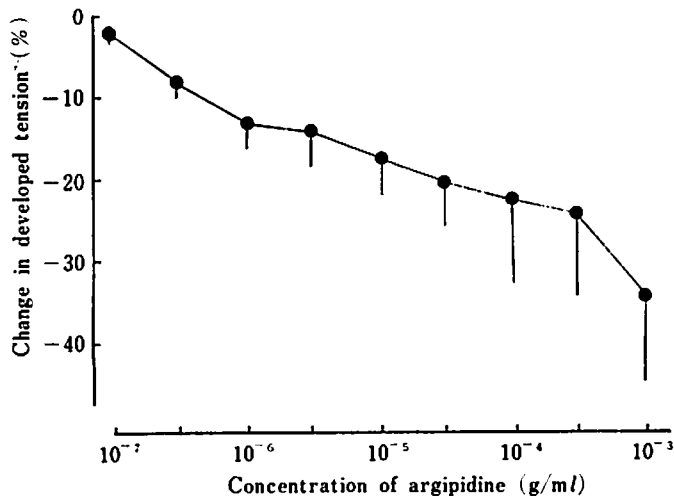


Fig. 11 Dose response curves of argipidine for changes in developed tension of the isolated left atrium
Vertical bars indicate the mean $\pm$ S.E. ($n=6$)

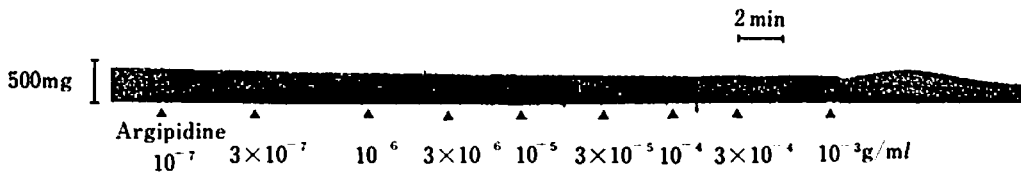


Fig. 12 Effect of argipidine on the contraction of the isolated and electrically driven left atrium of the guinea pig

は一時的に収縮力の増加が認められる例があった (Fig. 12)。

4) イス摘出乳頭筋標本の収縮力、血流量およびイス摘出洞房筋標本の心拍数に対する影響

Argipidine は収縮力に対して $100\mu\text{g}$ i.a. 以下の用量では影響せず、 $300\mu\text{g} \sim 1\text{mg}$ で減少させた。前中隔動脈の血流量は $10\mu\text{g} \sim 1\text{mg}$ で用量依存的に増加した。HR は $100\mu\text{g}$ 以上の用量で減少した。argipidine $30\mu\text{g} \sim 1\text{mg}$ に相当する溶媒では軽度な変化が認められたにすぎなかった (Fig. 13)。

5) ラットの尿量および尿中電解質に対する作用

Argipidine は $3 \sim 30\text{mg/kg}$ i.v. で尿量および尿中電解質に対してほとんど影響を及ぼさなかった。

3 自律神経系および消化器系に対する作用

1) 麻酔犬における各種アゴニストおよび頸動脈閉塞による血圧反応に対する作用

Argipidine 10mg/kg i.v. は各種アゴニストおよび頸動脈閉塞による血圧変化に対してほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。

2) モルモット摘出腸管に対する作用

ACh, Hist および BaCl_2 の収縮反応に対する argipidine の影響を検討したが、argipidine は $10^{-7} \sim 10^{-4}\text{M}$ でいずれのアゴニストによる収縮に対しても、ほとんど影響を及ぼさなかった。

3) ラット摘出輸精管に対する作用

Argipidine は $10^{-7} \sim 10^{-4}\text{M}$ で NE による輸精管の収縮に対して影響を及ぼさなかった。

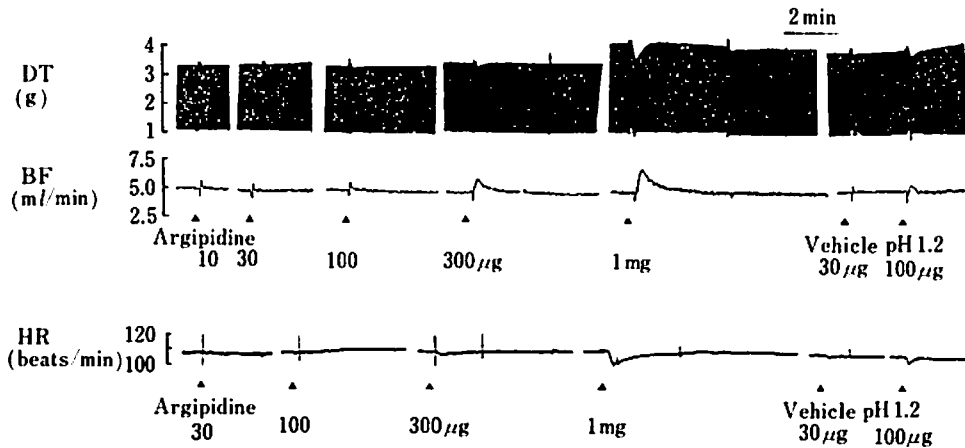


Fig. 13 Effect of argipidine on the developed tension (DT) and blood flow (BF) in the isolated papillary muscle preparation and on heart rate (HR) in the isolated SA node preparation of the dog

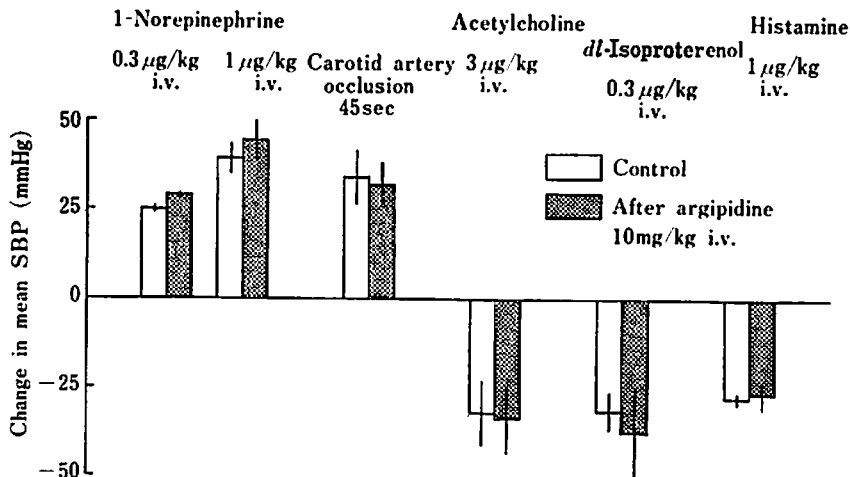


Fig. 14 Influence of argipidine on norepinephrine, bilateral carotid artery occlusion (45 sec), acetylcholine, *dl*-isoproterenol and histamine-induced mean systemic blood pressure (SBP) changes in anesthetized dogs. Each column indicates the mean $\pm$ S.E. ($n=4$)

4) ラット摘出胃条片に対する作用

Argipidine は 10^{-6} ~ 10^{-4} M で 5-HT による収縮を軽度ながら非競合的に抑制した (Fig. 15)。

5) ラット摘出子宮自動運動に対する作用

Argipidine は 10^{-7} ~ 10^{-4} M で自動運動の収縮張力に対しては、いずれの周期においてもほとんど影響を及ぼさなかった。自動運動の収縮頻

度に対しては、発情期において argipidine は 10^{-6} ~ 10^{-4} M で軽度な増加を示したが有意なものではなかった (Fig. 16)。

6) マウス腸管輸送能に対する作用

Argipidine は 10~100 mg/kg i.v. でほとんど影響を及ぼさなかった。

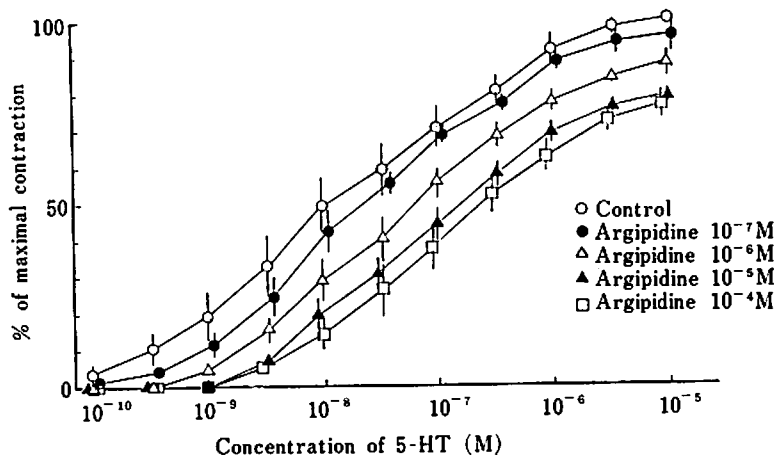


Fig. 15 Effect of argipidine on the contraction of isolated rat fundus strip to 5-HT Vertical bars indicate the mean $\pm$ S.E. ($n=4$)

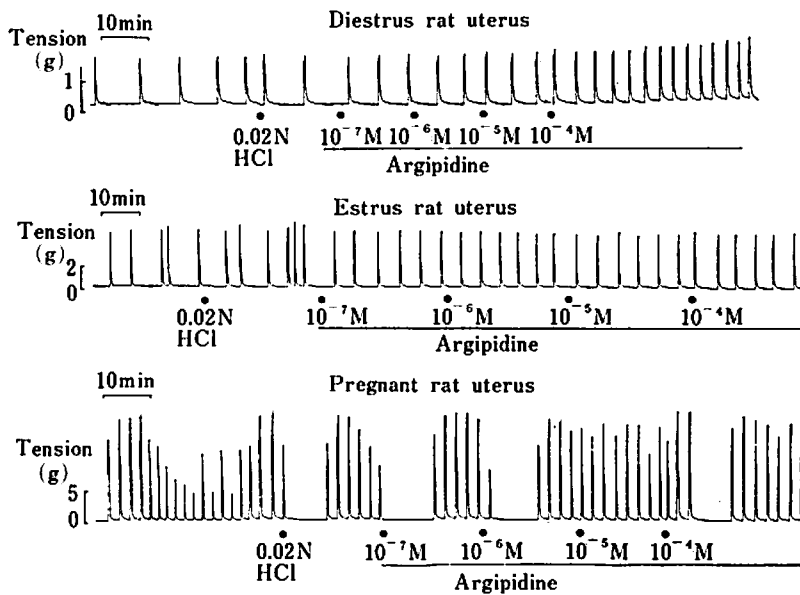


Fig. 16 Effect of argipidine on the spontaneous movement of isolated rat uterus in different sexual stages

7) ウサギ生体位胃腸管運動に対する作用

Argipidine は 1 ~ 3 mg/kg i.v. ではほとんど影響を及ぼさなかった。10 mg/kg i.v. 以上では、胃運動の一過性の抑制がみられ、回腸運動に対しては、振幅の大きな収縮波の頻度の増加

がみられた (Fig. 17)。

8) 胃液分泌に対する作用

Argipidine は 3 ~ 30 mg/kg i.v. ですべてのパラメータに対してほとんど影響を及ぼさなかった。

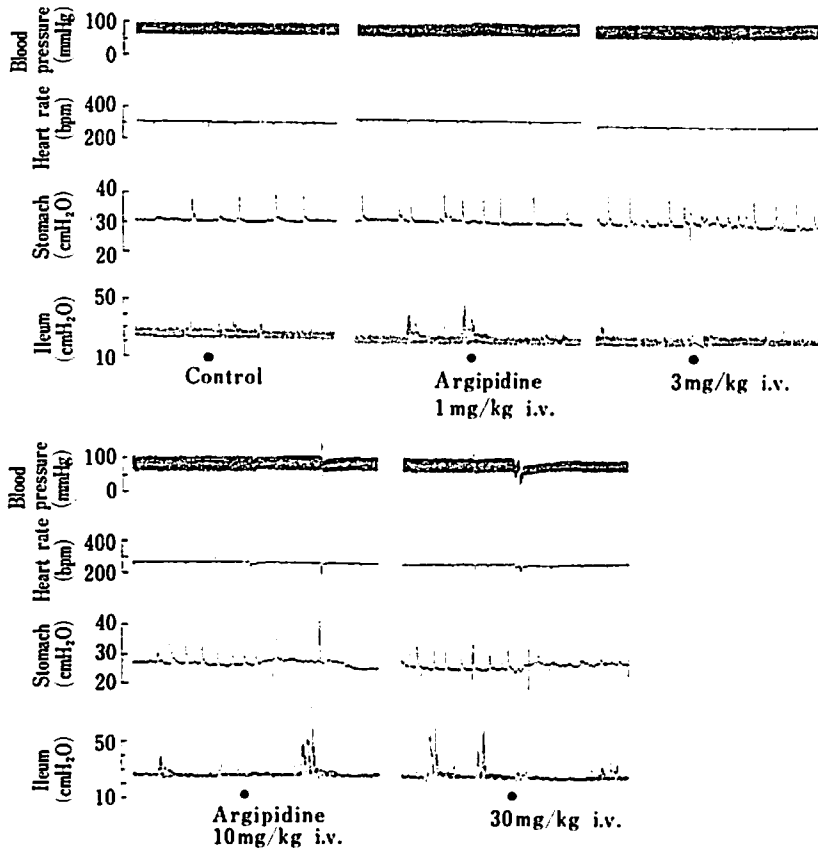


Fig. 17 Effect of argipidine of gastrointestinal motility in the anesthetized rabbit

4 その他の作用

1) 局所麻酔作用

Argipidine は 1% 溶液の適用では作用を示さなかった。3% 溶液では適用後 10 分までに軽度な角膜反射抑制作用を示したが、15 分後に作用は消失した (Table 5)。

2) 坐骨神経-腓腹筋標本に対する作用

Argipidine は 1~30 mg/kg i.v. で神経および筋いずれの刺激による収縮に対しても影響を及ぼさなかった。

3) マウス腹腔内血管透過性に対する作用

Argipidine は 10~300 mg/kg s.c. で血管透過性抑制はみられなかった。argipidine 10 mg/kg i.v. では色素透過に影響を与えなかったが、

100 mg/kg i.v. で約 25% の抑制を示した (Table 6)。

IV 考 察

新規構造を有する抗トロンビン剤 argipidine は各種血栓モデルにおいて有効性が明らかにされているが⁶⁻⁸⁾、今回、本剤の一般薬理作用を安全性の面から検討した。

1 中枢神経系に対する作用

Argipidine はラット一般症状に対し 10 mg/kg i.v. 以上で探索行動、警戒性、筋緊張のごくわずかな低下を示したにすぎず、マウスの自発運動量あるいは運動機能 (懸垂試験、協調運動性) に対しても、それぞれ 100 あるいは 30

Table 5 Effect of argipidine on corneal reflex in Guinea pigs

Drug	Concentration (%)	Before	Time after administration (min)					
			5	10	15	20	30	60
Control		0/5 ^{a)}	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Argipidine	1.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	3.0	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5

^{a)} Number of Guinea pigs lost corneal reflex/number of Guinea pigs used

Table 6 Effect of argipidine on increased vascular permeability induced by acetic acid in mice

Drug	Dose(mg/kg)	Route	PSB (μ g/body)	Inhibition (%)	n ^{a)}
Control			35.1 $\pm$ 3.0		8
Argipidine	10	s.c.	31.8 $\pm$ 4.0	9.4	10
	100	s.c.	35.7 $\pm$ 5.1	-1.7	9
	300	s.c.	34.5 $\pm$ 2.1	1.8	9
Control			38.3 $\pm$ 2.5		8
Argipidine	10	i.v.	36.7 $\pm$ 5.7	4.3	8
	100	i.v.	28.7 $\pm$ 4.1	25.1	8

Values are mean $\pm$ S.E. ^{a)} Number of animals used

mg/kg i.v. の高用量において軽度の抑制を発現するのみであった。ネコ自発脳波あるいは脳波覚醒反応に対しても、argipidine は 10 mg/kg i.v. で軽度の徐波化あるいは抑制傾向を示したにすぎず、argipidine は運動機能、一般行動変化あるいは覚醒レベルに対し高用量においてのみ抑制的にはたらく性質を有するものの、その影響はごく軽度なものであらうと考えられた。なお、脳波に対する影響については、抗トロンビン作用発現用量の 50 倍以上に匹敵する 150 μ g/kg/min infusion の影響も検討したが、顕著な影響は観察されなかった。中枢神経に対しては、上記以外に各種痙攣、正常体温、酢酸 writhing に対する影響も検討したが、30 mg/kg i.v. の高用量で PTZ 痙攣発現時間の延長を示す程度であった。以上のことより中枢神経系に対し argipidine が顕著な影響を与えることはないと考えられた。

2 呼吸循環器系に対する作用

Argipidine の呼吸循環機能に対する影響を麻酔自発呼吸犬および麻酔開胸犬で検討したところ、0.3~3 mg/kg i.v. では各種パラメータに対し、ほとんど影響がないかごく一過性の変化を示したにすぎなかった。本剤 10 mg/kg i.v. では麻酔自発呼吸犬において、SBP の下降、HR, RR, FAF の増加、麻酔開胸犬において SBP, HR, LVP max, dp/dt max の低下、RAP の増加がそれぞれみられたが、いずれも軽度な変化であった。30 mg/kg i.v. に増量すると、これらのパラメータは、RAP を除き、顕著な変化を示した。なお、両モデル間に心拍数に対する影響に相違が認められたが、イヌ洞房結節標本では高用量で心拍数減少を示しているため、麻酔開胸犬でみられた心拍数の減少は心臓への直接作用であり、麻酔自発呼吸犬でみられた心拍数の増加は、argipidine による血圧

下降に対する代償機構による間接的な作用と考えられる。一方、心筋収縮力に対しては、麻酔開胸犬では argipidine 10 mg/kg i.v. 以上で $dp/dt \max$ が減少し、右心房圧が上昇すること、モルモットの左心房標本およびイス摘出乳頭筋標本でも高用量で、収縮力の減少がみられたことから、高用量では心筋に対して抑制的にはたらくものと思われる。また乳頭筋標本で軽度な冠血流増加作用が認められたが、FAF に対する作用と同様、argipidine は弱い血管拡張作用を有すると考えられる。その他腎機能に対しても検討したが argipidine は高用量においてもほとんど影響を及ぼさなかった。以上のことから、全体として argipidine の呼吸循環器系に対する影響は少ないものと推測された。

3 自律神経、摘出平滑筋、消化器系に対する作用

摘出平滑筋および麻酔犬を用いて各種アゴニストとの相互作用を検討したが、argipidine は $10^{-6}M$ 以上で軽度な抗 5-HT 作用を示した以外、ACh, Hist, BaCl₂, NE, Iso の作用に影響を与えなかった。また頸動脈閉塞に対しても影響を示さず、摘出子宮の自動運動に対しても発情期における収縮頻度が軽度増加した以外にほとんど作用を示さなかったことから、argipidine は自律神経、平滑筋に顕著な影響を与えないものと考えられた。消化器系に対しても argipidine は 10 mg/kg i.v. で一過性の胃腸管運動抑制を示したにすぎず、腸管輸送能、胃液分泌に対しても影響を示さなかったことから、消化器系に対してもほとんど影響を及ぼさないものと推測された。

以上、argipidine の呼吸・循環器系、自律神経系、摘出平滑筋ならびに消化器系に対する影響について考察した。argipidine の抗ロソビン剤としての有効量は 1 mg/kg i.v. あるいは $0.2 \sim 2 \mu g/kg/min$ infusion と推測されているので、臨床適用時に本剤に起因する重篤な副作用が発現する可能性はほとんどないものと考えられる。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K. & Maruyama A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 440 (1981)
- 2) Kikumoto R., Tamao Y., Tezuka T., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Hijikata A. & Okamoto S.: *Biochemistry* **23**: 85 (1984)
- 3) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 血液と脈管 **13**: 72 (1982)
- 4) 風間睦美, 安部 英, 木下忠俊, 中村一路, 松田重三, 内藤 巖, 鎌倉正英, 田原千枝子, 森岡真知子, 大串利弘, 吉村祐一, 川杉和夫, 小林国男, 小島龍行, 岡本一弘, 榎本昌伊, 飯島徳政: DIC 調査研究班 昭和56年業績集, p. 82
- 5) Iwamoto M.: *Thrombosis. Res.* **24**: 285 (1981)
- 6) Kumon K. et al.: *Critical Care Medicine* **12**: 1039~1043 (1984)
- 7) 大城 孟, 上村純一, 高橋 顕ほか: 外科診療 **26**: 267 (1979)
- 8) 田崎義昭, 小林祥泰, 東儀英夫, 大友英一ほか: 臨床と研究 **63**: 3047 (1986)
- 9) Irwin S.: Animal and clinical pharmacological technique in drug evaluation, eds. Nodine J.H. & Siegler P.E., Year Book Medical Publisher, Inc., Chicago (1964), p. 36
- 10) Jasper H.H. & Ajimone-Marsan C.: "A Stereotaxic atlas of the dien cephalon of the cat" The National Research Council of Canada, Ottawa 2, Canada (1956)
- 11) Endoh M. & Hashimoto K.: *Am. J. Physiol.* **218**: 1459 (1970)
- 12) Chiba S., Kubota K. & Hashimoto K.: *Tohoku J. Exp. Med.* **107**: 101 (1972)
- 13) Kubota K. & Hashimoto K.: *Naunyn-Schmiedebert's Arch. Pharmacol.* **278**: 135 (1973)
- 14) Shay H., Kowarow, S.A., Fels S.S., Meranze D., Gruenstein M. & Sipler H.: *Gastroenterol.* **5**: 43 (1945)
- 15) Anson M.L.: *J. Gen. Physiol.* **21**: 79 (1938)

Argipidine (MD-805) の ラットおよびマウスにおける急性毒性試験

土志田 和 夫 関 真由美 小 島 由美子*,**

Acute Toxicity of Argipidine (MD-805) in Rats and Mice

Kazuo Toshida, Mayumi Seki and Yumiko Kojima*,**

* Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Sciences
** Present address: Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector,
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

This paper reports the acute toxicity of argipidine, a new thrombin inhibitor, in Wistar rats and ddY mice by the p.o., i.v., i.p. and s.c. route followed by 2-week observation period. No animal died at the maximum applicable dose of 15000 mg/kg at the p.o. administration and 81 mg/kg at the i.v. injection in rats and mice. The LD₅₀'s (mg/kg) in the other routes were as follows. (1) Wistar rats: i.p., 320 (M), 409 (F); s.c., 700 (M), 620 (F); (2) ddY mice: i.p., 475 (M), 640 (F); s.c., 3750 (M), 3900 (F).

In the p.o. administration, anemia was observed in rats and mice as toxic symptoms and the autopsy revealed hemorrhage in the thymus and lungs in rats. In the i.v. administration, no abnormality was observed in general appearance in rats and mice, while the autopsy at final sacrifice revealed hemorrhage in the thymus and lungs in rats.

In the i.p. and s.c. administration in rats and mice, anemia and a decrease of spontaneous movement were observed in general, a balling and disorder of breathing in some cases. The autopsy of dead animals revealed hemorrhage at injection site

* 株式会社三菱化成安全科学研究所

** 三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 安全性研究所

in most animals for both routes. In addition, the site of hemorrhaging was found to be as follows: in the subcutis for the i.p. injection in rats and mice, around the sternum and in the thymus for the i.p. injection in rats and in the stomach and the thymus for the s.c. injection in rats. The autopsy at final sacrifice revealed adhesion among the abdominal organs for the i.p. injection in rats and mice and an enlargement of the spleen for the s.c. injection in mice.

KEY WORDS

Argipidine, Thrombin inhibitor,
Acute toxicity, Rat, Mouse

緒 言

Argipidine は抗ロニン活性を有する抗凝固薬として開発が進められている薬物である。今回、著者らはラットおよびマウスにおける急性毒性試験を実施したので報告する。

I 実験材料および実験方法

1 被験物質

Argipidine は Fig. 1 に示す構造を有し、分子量526.66の無臭の白色粉末である。水に極めて溶けにくく、酢酸に溶けやすい。

2 供試動物および飼育条件

静岡県実験動物農業協同組合よりSlc: Wistar系のSPFラット、Slc: ddY系のSPFマウスを4週齢で購入し、約1週間の検疫、馴化の後健康な動物を実験に用いた。動物は温度20.0~24.5°C、相対湿度37.5~76.4%の環境下で飼育した。ラットは自動飼育装置(トキワ科学器械)のステンレス製網目ケージ(250W×360D×200H mm, トキワ科学器械)内で、マウスは

アルミ製ケージ(220W×320D×130H mm, トキワ科学器械)に床敷(ウッドベッディング: 日本医科学動物資材研究所)を詰め飼育した。1ケージ当たりの収容匹数はラットで5匹、マウスで10匹とし、固型飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業)および水道水を自由に摂取させた。投与時の体重はラットの雄で94~146g、雌で81~109g、マウスの雄で22.7~35.0g、雌で20.7~29.0gであった。

3 投与方法

経口、腹腔、皮下投与には被験物質を0.5%(w/v)トラガント水溶液に懸濁して投与液とした。静脈内投与には、0.86% NaCl水溶液に被験物質を混合し、高圧蒸気滅菌器で薬物の滅菌、溶解を行い投与液とした。

経口投与の場合、投与可能な懸濁液の上限濃度を30%(w/v)、投与可能な上限液量を50ml/kgと考え15g/kgまで投与した。なお、投与前の絶食は行わなかった。

静脈内投与の場合、生理食塩液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度が2.7mg/ml、投与可能な上限液量を30ml/kgと考え81mg/kgまで投与した。

腹腔内投与の場合、投与液量を10ml/kgと一定にし、投与液の濃度を変えることにより用量を調節した。

皮下投与の場合、あらかじめ実施したラット雄の予備検討において、死亡が1430mg/kgで5/10例、7680mg/kgで5/10例と100%死亡率

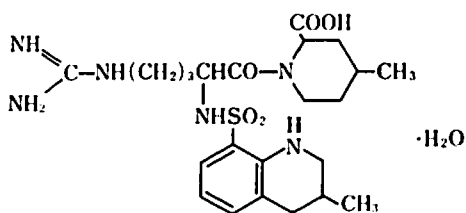


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

Table 1 LD₅₀ values (mg/kg) of argipidine in rats and mice

Species	Strain	Sex	LD ₅₀ (95% confidence limits) mg/kg			
			p.o.	i.v.	i.p.	s.c.
Rat	Wistar	M	>15000	>81	320 (282~363)	700 (281~1745)
		F	>15000	>81	409 (370~452)	620 (383~1005)
Mouse	ddY	M	>15000	>81	475 (402~561)	3750 (2190~6420)
		F	>15000	>81	640 (568~721)	3900 (3000~5080)

M : Male F : Female

と無死亡量との幅が広いことが予想されることから、かなり高濃度の投与液を調製しなければならない。しかし、本薬物が水に難溶なため、あまり高濃度の懸濁液では皮下吸収の低下をまねく恐れがあることから投与液の上限濃度を設定した。すなわち、ラットでは投与液の濃度 10% (w/v)、マウスの場合では 20% (w/v) を越えるものについては液量をふやし、それ以下の濃度については濃度を変え一定液量 10 ml/kg を投与した。また投与液量の限界は約 70 ml/kg とした。

4 観察、検査項目

一般状態を投与日には 4 時間後まで、必要に応じて 6 時間後まで観察した。その後は、1 日 1 回以上 14 日間にわたって観察した。投与日、投与後 1, 3, 7, 10 および 14 日に体重測定を行った。

剖検は全例について行った。観察期間終了時(投与後 14 日)まで生存した動物についてはペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル: ビットマンムーア)麻酔下で腹部大動脈を切断し放血、致死させ剖検した。

観察期間終了時での各群の死亡率から Litchfield-Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を算出した。

II 実験成績

ラットおよびマウスの投与経路ごとの LD₅₀ 値を Table 1 に示した。

1 ラット

各投与経路の死亡状況および死亡率を Table 2 に示した。

1) LD₅₀ 値

経口および静脈内投与ではそれぞれ投与限界である 15000 mg/kg および 81 mg/kg で死亡例はなく、LD₅₀ 値は求められなかった。他の経路の LD₅₀ 値は腹腔内投与では雄で 320 mg/kg、雌で 409 mg/kg、皮下投与では雄で 700 mg/kg、雌で 620 mg/kg であった。

2) 一般状態および死亡状況

経口投与では 1 例に軽度の貧血が認められたが、静脈内投与では異常はなく、いずれの経路でも死亡例はなかった。腹腔内および皮下投与では自発運動量の低下、眼瞼下垂、貧血、呼吸深度の増加がみられ、死亡が腹腔内投与で投与後 2 時間より 2 日、皮下投与で投与後 4 時間より 5 日まで認められた。腹腔内投与では投与後 4 日より回復が認められたが、皮下投与では投与後 4 日より回復傾向がみられるものの、ごく軽度の貧血が観察期間終了時まで残存する例もあった。そのほかに皮下投与では、投与部位の皮膚に、痂皮、びらんおよび潰瘍がみられた。

3) 体重

経口および静脈内投与では投与後 1 日に増加抑制が認められたが、以後順調な増加がみられた。腹腔内および皮下投与では投与後 3 日まで体重は減少したが、以後順調に増加した。

4) 剖検

経口投与では、胸腺と肺の暗赤色点が少数でみられたのみであった。静脈内投与では肺の暗赤色点少数でみられた。腹腔内投与では、死亡例で腹腔内の多量な出血とそれに基づく貧血

Table 2 Mortality in Wistar rats

Route	Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	No. of cumulative deaths													Mortality rate (%)
				Hours					Days								
				0.5	1	2	4	6	1	2	3	4	5	6	~14		
p.o.	M	15000	10	0											0	0	
	F	15000	9	0											0	0	
i.v.	M	81	10	0											0	0	
	F	81	10	0											0	0	
i.p.	M	726	10	0				1	10						10	100	
		605	10	0					7						7	70	
		504	10	0		1	2	3	5						5	50	
		420	10	0			1		3	4					4	40	
		350	10	0			1		2						2	20	
		292	10	0				2							2	20	
		203	10	0			2	3							3	30	
		141	10	0				1							1	10	
		98	10	0			1								1	10	
		68	10	0											0	0	
	F	726	10	0				1	10						10	100	
		605	10	0					10						10	100	
		504	10	0			1	2	8	9					9	90	
		420	10	0				1	4						4	40	
		350	10	0				1	2						2	20	
		292	10	0				1							1	10	
		203	10	0											0	0	
		141	10	0											0	0	
		M	7000	10	0				2	7						7	70
			5000	10	0				1	7	8					8	80
	2000		10	0				2	7						7	70	
	400		10	0					4						4	40	
	200		10	0					1	2	3				3	30	
	50		10	0											0	0	
	F		5000	10	0					8		9			10	10	100
			2000	10	0				1	5	6					6	60
			400	10	0					2						2	20
			200	10	0			1		2						2	20
		50	10	0											0	0	

M : Male F : Female

Table 3 Mortality in ddY mice

Route	Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	No. of cumulative deaths														Mortality rate (%)
				Hours					Days									
				0.5	1	2	4	6	1	2	3	4	5	6	~14			
p.o.	M	15000	10	0											0	0		
	F	15000	10	0											0	0		
i.v.	M	81	10	0											0	0		
	F	81	10	0											0	0		
i.p.	M	1037	10	0	1			5	10						10	100		
		864	10	0			1		9						9	90		
		720	10	0			1		3						3	30		
		500	10	0	1		2								2	20		
		347	10	0			1								1	10		
		241	10	0					1						1	10		
		167	10	0											0	0		
	F	1037	10	0				8	10							10	100	
		864	10	0				2	9							9	90	
		720	10	0			1		3							3	30	
		500	10	0						1						1	10	
		347	10	0			1		2							2	20	
		241	10	0												0	0	
s.c.	M	14860	10	0					5	6						6	60	
		8600	10	0				1	7							7	70	
		5970	10	0					4	6						6	60	
		4150	10	0					8							8	80	
		2880	10	0					2	3		4				4	40	
		2000	10	0					4							4	40	
		960	10	0					1	2						2	20	
		470	10	0					1							1	10	
		224	10	0				1								1	10	
		108	10	0												0	0	
	F	14860	10	0				1	3		4	5				5	50	
		8600	10	0			1		4	6						6	60	
		5970	10	0				2	5	6		7				7	70	
		4150	10	0				1	5							5	50	
2880		10	0					2	3	5					5	50		
2000		10	0					1	2						2	20		
960		10	0					2	3						3	30		
470		10	0												0	0		

M : Male F : Female

が主要所見で、他に皮下出血、胸骨周囲出血、胸腺の暗赤色点のみられた。観察期間終了時まで生存した例では、腹腔内、皮下の出血はみられず、肝臓の腫大、肝臓の各葉および周囲の組織との癒着のみられた。また胸腺の暗赤色点が散見され、被験物質様の白色物が腹腔内に残存していた。皮下投与では死亡例で投与部皮下の広範な血腫とそれに基づく貧血がみられ、他に胸腺の暗赤色点、胃内出血も認められ、投与部の皮下に被験物質様の白色物の残存がみられた。観察期間終了時まで生存した例では、投与部位の皮膚に痂皮、びらんおよび潰瘍のみられた。

2 マウス

各投与経路の死亡状況および死亡率を Table 3 に示した。

1) LD₅₀ 値

経口および静脈内投与ではそれぞれ投与限界である 15000 mg/kg および 81 mg/kg で死亡例はなく、LD₅₀ 値は求められなかった。他の経路の LD₅₀ 値は腹腔内投与では雄で 475 mg/kg、雌で 640 mg/kg、皮下投与では雄で 3750 mg/kg、雌で 3900 mg/kg であり、雌雄で大きな差はなかった。

2) 一般状態および死亡状況

経口投与では雌に貧血、呼吸深度の増加がみられ、1例の耳介に出血点のみられたが、死亡例はなかった。雄では一般状態に異常は認められなかった。静脈内投与では雌雄ともに一般状態に異常はなかった。腹腔内投与では、自発運動量の低下、眼瞼下垂、発赤、呼吸深度の増加、歩行失調、れん縮がみられ、死亡例は投与後1時間から2日に認められた。これらの症状は投与翌日には回復したが、粗毛がみられた。しかし、これも投与後5日には回復した。なお、雄の 167 mg/kg 群および雌の 241 mg/kg 群では一般状態に異常はなかった。皮下投与では自発運動量の低下、眼瞼下垂、貧血、呼吸深度の増加がみられ、死亡例は投与後4時間から4日まで認められた。諸症状は投与後4、5日には回復したが、貧血は軽度であったが、観察

期間終了時まで残存するものもあった。

3) 体重

経口投与では、雌で投与後3日まで増加抑制が認められたが、以後順調な増加がみられた。経口投与の雄、静脈内投与の雌雄では終始順調な増加を示した。腹腔内投与では、投与後1日に体重が減少したが、以後順調に増加した。皮下投与では全観察期間を通じてわずかな増加抑制が認められた。

4) 剖検

経口投与では雌の1例に被験物質との関連が明らかでない脾臓の萎縮が軽度のみられたのみで、雄では異常はなかった。静脈内投与では特に異常は認められなかった。腹腔内投与の死亡例では 720 mg/kg 以下の群の雌雄いずれにおいてもほぼ全例に腹腔内の多量な出血とそれに基づく貧血が認められ、皮下出血も散見された。しかし、864 および 1037 mg/kg 群においては腹腔内出血のみられない例が多く、あっても比較的軽度であった。また 1037 mg/kg 群では出血、貧血等の症状が全く認められない個体もみられた。観察期間終了時まで生存した例においては、肝臓の腫大ならびに肝臓の各葉および周囲の組織との癒着がみられた。皮下投与の死亡例では、投与部皮下の広範な血腫とそれに基づく貧血がみられた。観察期間終了時まで生存した例については、脾臓の腫大と皮下の腫瘍がみられた。また、投与部皮下に被験物質様の白色物が残存し、痂皮、びらんおよび潰瘍がみられた。

III 総括および考察

Argipidine をラットおよびマウスに経口、静脈内、腹腔内および皮下に投与し、その急性毒性について検討した。経口および静脈内投与ではラット、マウスいずれにおいても技術的に投与可能な最大量（経口で 15000 mg/kg、静脈内で 81 mg/kg）で死亡例はなかった。一方、腹腔内および皮下投与では死亡例がみられ、その LD₅₀ 値は、ラットの腹腔内投与の雄で 320 mg/kg、雌で 409 mg/kg、皮下投与の雄で 700 mg/kg

kg, 雌で 620 mg/kg, マウスの腹腔内投与の雄で 475 mg/kg, 雌で 640 mg/kg, 皮下投与の雄で 3750 mg/kg, 雌で 3900 mg/kg であった。腹腔内, 皮下投与いずれの場合もラットよりマウスで LD₅₀ 値が高い傾向を示した。また, 腹腔内投与ではラット, マウスともに雄より雌で LD₅₀ 値が高い傾向を示したが, 差は小さく偶発的なものと考えられる。

一般状態では, 静脈内投与で, ラット, マウスとも変化はなかった。経口投与ではラット, マウスいずれにも貧血傾向を示す個体が認められ, 剖検では, マウスに特に異常は認められなかったが, ラットで出血を示すと思われる暗赤色点が胸腺および肺に認められた。腹腔内および皮下投与では, 貧血, 自発運動量の低下, 眼瞼下垂, 呼吸深度の増加がみられ, 死亡例の剖検では投与部位の出血がみられた。その他の剖検所見として, マウスの腹腔内投与で皮下出血, ラットの腹腔内投与で皮下出血, 胸骨周囲の出血および胸腺の出血 (暗赤色点), ラットの皮下投与で胃内出血および胸腺の出血 (暗赤色点) が認められた。腹腔内投与の一般状態および体重からみて, 投与後 4 日頃より回復傾向が

みられたが, 皮下投与では投与後 14 日まで貧血, 投与部位のびらんおよび潰瘍などがみられ, 完全には回復しなかった。これは, 被験物質の残存による影響と考えられた。また, 皮下投与のマウスの生存例でみられた脾臓の腫大は, 皮下に残存した被験物質のため出血が持続したことに対する反応 (造血の亢進) であろうと推察されるが, 同様な出血があったラットでは認められず, 推測の域を出ない。腹腔内投与で認められた腹腔内臓器の癒着は, 大量の薬物の腹腔内残留, また死亡例にみられた腹腔内出血および投与時の切傷等が誘因となった腹膜炎によるものと考えられる。

以上のように, 腹腔内および皮下投与における死亡は, 一般状態および剖検所見から出血が主な死因と考えられた。この出血は本薬物の主薬理作用である抗トロンビン活性が大量投与により抗凝固作用を過度に亢進したことによるものと思われる。また, マウス腹腔内投与の高用量での死亡例では腹腔内出血を示さずにれん縮および発赤の症状を示して死亡した例も多数みられたことから, 中枢あるいは循環器系への作用も死に関与しているものと思われる。

* * *

Argipidine (MD-805) のラットにおける 静脈内投与による 1 ヶ月間亜急性毒性試験

土志田 和 夫^{*,**} 伊 藤 実^{*,**} 大 谷 裕 子^{*}

One-Month Subacute Intravenous Toxicity of Argipidine (MD-805) in Rats

Kazuo Toshida^{*,**}, Minoru Itoh^{*,**} and Yuhko Ohtani^{*}

^{*} Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Sciences

^{**} Present address: Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector,
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

Argipidine, a new thrombin inhibitor, was intravenously administered to male and female Wistar rats at dose levels of 3 mg/kg, 9 mg/kg and 27 mg/kg for one month to test the subacute toxicity, and the following information was obtained.

No significant influence on the general appearance or food consumption due to the administration of the test material was observed in any group.

Body weight gain decreased at 27 mg/kg for females in the early stage of treatment period, while the gain of that group became comparable to the control group thereafter.

Examinations of urine, serum biochemistry, organ weights, gross-pathology and histopathology showed no abnormal changes resulting from the administration of the test material.

Hematological examinations revealed a slight increase of the hematocrit value at 27 mg/kg for females.

From these results, no effect level is estimated to be 9 mg/kg.

KEY WORDS

Argipidine, Thrombin inhibitor,
Subacute toxicity, Rat

^{*} 株式会社三菱化成安全科学研究所

^{**} 三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 安全性研究所

緒 言

Argipidine は抗ロニン活性を有する抗凝固薬として開発が進められている薬物である。今回、著者らは argipidine のラットにおける 1 ヶ月間静脈内投与による亜急性毒性試験を行ったので、以下に得られた成績を報告する。

I 実験材料および実験方法

1 被験物質

Argipidine は、Fig. 1 に示す構造を有し、分子量 526.66 の無臭の白色粉末である。水に極めて溶けにくく酢酸に溶けやすい。

2 供試動物および飼育条件

Wistar シラット 92 匹 (雄 46, 雌 46) を静岡県実験動物農業協同組合より 4 週齢で購入した。6 日間の馴化期間の後、体重の重いものおよび軽いものを除外し、体重別層化無作為抽出法により群分けを行い、イヤーパンチ法により各個体の識別を行った。

動物は予備飼育期間および投与期間を通じ自動飼育装置 (トキワ科学器械) で飼育した。ステンレス製網目ケージ (250 W × 360 D × 200 H mm, トキワ科学器械) 内には 5 匹を収容し、自動環境調節を施した飼育室 (温度 22.0 ~ 23.0 °C, 湿度 51.6 ~ 68.2%) で固型飼料 (CRF-1: オリエンタル酵母工業) および水道水を自由に摂取させた。

3 投与方法

まず、被験物質を蒸留水に懸濁し、HCl により強酸性下 (pH 2) で溶解させた後、徐々に NaOH を加え、pH を 7.0 ~ 7.5 に調整した。その後、浸透圧不足分を NaCl で補充し、投与液量が 10 ml/kg 体重となるように容量を調整し、さらに pH を 7.0 ~ 7.5 に微調整した (最終浸透圧: 300 mOsm/l)。投与液は、オートクレーブにより滅菌した。

投与は 1 日 1 回、尾静脈より 1 個体 30 秒の速度で注入した。なお対照群には 0.96% NaCl 溶液を滅菌後同様に注入した。総投与回数は雄で 30 回、雌で 31 回とした。

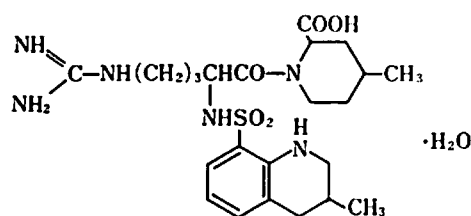


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

4 用量設定および群構成

本薬物の生理食塩液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度は 2.5 ~ 3.0 mg/ml であり、動物体重 1 kg 当たり 10 ml が投与液量の限界と考え、最高用量を 27 mg/kg に設定し、以下公比 3 で中用量を 9 mg/kg, 低用量を 3 mg/kg とした。対照群を含む各群に雌雄各 10 匹のラットを用いた。

5 検査方法

1) 一般状態

投与前および投与後 1 時間まで毎日動物の行動、健康状態を観察した。

2) 体重

毎投与時および最終投与日の翌日に測定した。

3) 摂餌量

週 2 回新たに飼料を加え、それぞれの時点で残量を秤量し摂餌量を算出した。

4) 尿検査

投与開始後 29 日に強制排尿により採尿し、pH, 潜血, ケトン体, ブドウ糖, 蛋白質 (ラブスティックス, マイルス三共) を測定した。

5) 血液学的検査

最終投与の翌日に動物をペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与により麻酔し、後大静脈より採血した。血液はヘパリンナトリウムで凝固を防止し、ヘマトクリット値 (毛細管遠心法), ヘモグロビン量 (シアノメトヘモグロビン法), 赤血球数, 白血球数 (コールターカウンター ZB 型, コールターエレクトロニクス), 血液像 (May-Giemsa 染色塗抹標本による鏡検) を測定した。計算により MCV, MCH および MCHC を求めた。

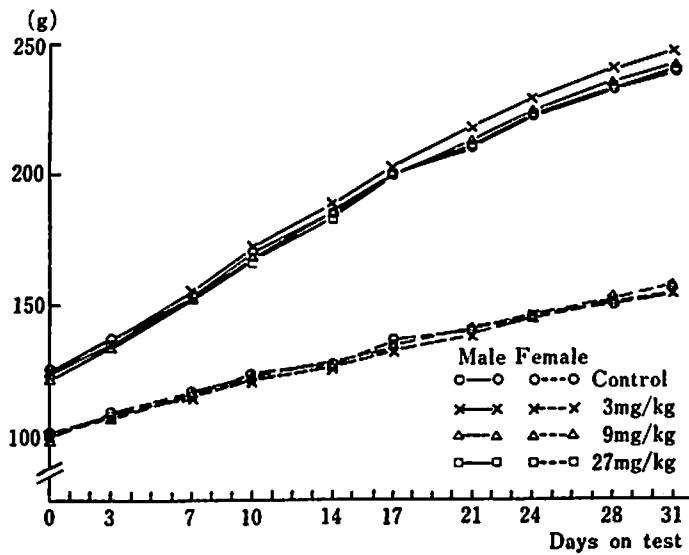


Fig. 2 Body weight changes in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Table 1 Qualitative urinalysis with test paper in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male		Female	
Compound		Control	Argipidine	Control	Argipidine
Dose (mg/kg)		—	27	—	27
No. of animals		10	10	10	10
pH	6.0	7	5	1	1
	6.5	3	3	5	3
	7.0		2	4	3
	7.5				1
	8.0				2
Protein	—		2	6	3
	±	6	5	2	7
	++	4	2	2	
Glucose	—	10	10	10	10
	+				
Ketone body	—	10	10	10	10
	+				
Occult blood	—	10	10	10	10
	+				
Bilirubin	—	10	10	10	10
	+				
Urobilinogen	±	9	9	10	7
	+	1	1		3

— : Negative ± : Trace + : Slight ++ : Moderate

Table 2 Hematological findings in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex	Male				Female			
Compound	Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)	—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Hematocrit (%)	41.9 ±1.2	42.4 ±0.9	41.8 ±1.5	41.9 ±1.3	39.9 ±0.8	39.3 ±1.5	40.5 ±1.5	41.4*** ±0.6
Hemoglobin (g/dl)	14.6 ±0.3	14.9 ±0.3	14.6 ±0.7	14.7 ±0.6	14.2 ±0.3	14.0 ±0.5	14.1 ±0.7	14.5 ±0.4
Red blood cell count (×10 ⁴ /cmm)	702 ±21	710 ±22	701 ±32	691 ±23	662 ±13	654 ±24	663 ±29	681 ±18
White blood cell count (×10 ³ /cmm)	50.5 ±6.1	56.0 ±12.5	55.2 ±7.2	52.5 ±11.2	50.5 ±7.6	49.0 ±6.8	53.2 ±8.6	52.9 ±9.2
MCV (μ ³)	59.8 ±1.1	59.8 ±1.4	59.8 ±1.5	60.6 ±1.0	60.2 ±1.4	60.1 ±1.2	61.0 ±1.3	60.8 ±1.2
MCH (γγ)	20.8 ±0.4	21.0 ±0.5	20.8 ±0.5	21.2 ±0.7	21.4 ±0.3	21.3 ±0.3	21.3 ±0.3	21.2 ±0.6
MCHC (%)	34.8 ±0.9	35.0 ±0.5	34.8 ±1.0	35.0 ±0.9	35.5 ±0.7	35.5 ±0.4	35.0 ±1.0	34.9 ±1.0
Differential leucocyte count (number of cells per hundred)								
Lymphocyte	90.9 ±2.7	93.4 ±2.8	91.1 ±3.9	91.4 ±3.0	94.1 ±2.6	92.0 ±3.4	93.1 ±2.5	91.7 ±3.9
Neutrophil segment	7.9 ±2.4	5.7 ±3.0	7.9 ±3.6	8.1 ±2.8	5.2 ±1.9	7.2 ±3.4	5.8 ±1.8	6.5 ±2.6
Neutrophil stab	1.0 ±0.8	0.5 ±0.5	0.7 ±0.7	0.4 ±0.8	0.3 ±0.7	0.0 ±0.0	0.1 ±0.3	0.1 ±0.3
Eosinophil	0.2 ±0.6	0.4 ±0.7	0.3 ±0.4	0.1 ±0.3	0.4 ±0.5	0.2 ±0.4	0.6 ±0.7	0.7 ±1.1
Basophil	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
Monocyte	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.6 ±0.8	0.4 ±0.7	1.0** ±0.9
Plasma cell	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0

Results are mean ± SD

Significantly different from control (Student's or Welch's *t*-test): ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

6) 生化学的検査

血液学的検査に用いた血液の残分を、採血後約30分に 3000 rpm, 10分遠心後に血清を分離し、GOT, GPT, LDH, Al-P, 尿素窒素, グルコース, 総コレステロール, カルシウム, 無機リン, 尿酸, 総蛋白質, A/G (セルロースアセテート膜電気泳動法), アルブミン (A/G 比および総蛋白質より算出) を測定した。

セルロースアセテート膜の読み取りには Densitron 20M (常光) を, その他の測定には

クリナライザー JCA-N6C6R (日本電子) を用いた。

7) 剖検

採血後の動物の腹部大動脈を切断し、放血致死させ肉眼的観察を行った。

8) 臓器重量

剖検後、脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 肺, 心, 肝, 腎, 副腎, 脾, 精巣あるいは卵巣を摘出し、湿重量を測定し屠殺日の体重 100 g 当たりの臓器重量体重比を算出した。

Table 3 Biochemical findings in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex	Male				Female			
Compound	Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)	—	3	9	27	—	3	9	27
No. of naimals	10	10	10	10	10	10	10	10
GOT (IU/l)	134.4 ±100.5	90.9 ±5.7	95.9 ±10.5	94.0 ±8.7	70.2 ±8.4	71.1 ±6.3	75.6 ±7.7	71.8 ±6.3
GPT (IU/l)	46.7 ±50.4	24.3 ±3.9	26.8 ±6.1	25.7 ±3.8	19.5 ±4.5	15.9 ±3.1	18.4 ±6.2	16.9 ±2.4
LDH (IU/l)	1180 ±545	1079 ±112	1170 ±192	1076 ±280	435 ±168	544 ±20	582 ±180	447 ±154
ALP (IU/l)	494 ±38	466 ±28	484 ±45	471 ±30	401 ±30	379 ±28	408 ±34	397 ±32
Urea nitrogen (mg/dl)	20.8 ±3.1	20.7 ±2.1	22.1 ±2.4	20.7 ±2.4	22.7 ±3.0	20.7 ±2.3	22.0 ±2.7	21.9 ±2.3
Glucose (mg/dl)	163 ±12	168 ±16	164 ±10	162 ±14	170 ±12	156* ±16	151* ±19	155* ±18
Total cholesterol (mg/dl)	46.2 ±4.3	49.4 ±3.3	48.6 ±4.5	45.2 ±3.6	52.1 ±7.6	51.7 ±5.1	55.0 ±6.0	53.9 ±3.8
Calcium (mg/dl)	10.2 ±0.1	10.2 ±0.2	10.2 ±0.2	10.0* ±0.2	9.2 ±0.7	8.5 ±1.1	8.6 ±1.0	9.0 ±0.8
Inorganic phosphorus (mg/dl)	7.6 ±0.7	7.6 ±1.0	8.3* ±0.5	8.5** ±0.4	6.9 ±0.8	6.4 ±1.0	6.7 ±0.5	7.2 ±0.7
Uric acid (mg/dl)	1.5 ±0.1	1.6 ±0.2	1.5 ±0.1	1.4* ±0.1	1.4 ±0.3	1.2 ±0.2	1.3 ±0.3	1.2 ±0.2
Total protein (g/dl)	5.6 ±0.2	5.7 ±0.2	5.6 ±0.2	5.5 ±0.2	5.3 ±0.3	5.2 ±0.4	5.4 ±0.4	5.4 ±0.3
Albumin (g/dl)	3.4 ±0.1	3.4 ±0.1	3.4 ±0.1	3.4 ±0.1	3.4 ±0.2	3.3 ±0.2	3.4 ±0.3	3.5 ±0.2
A/G	1.52 ±0.10	1.48 ±0.10	1.49 ±0.09	1.61* ±0.05	3.66 ±0.47	3.32 ±0.16	3.38 ±0.13	3.68 ±0.20

Results are mean ± SD

Significantly different from control (Student's or Welch's *t*-test): **p* < 0.05, ***p* < 0.01

9) 病理組織学的検査

脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 肺, 心, 肝, 腎, 副腎, 脾, 精巣, 卵巣, 子宮, 気管, 脾臓, 食道, 胃, 十二指腸, 結腸, 頸下リンパ節, 大腿骨(骨髓)を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し, 常法によりパラフィン包埋の後, 3~5 μ の薄切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。

10) 検定方法

体重増加量, 摂餌量, 血液学的検査, 生化学的検査, 臓器重量については *t* 検定を行い, 尿検査においては Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。ただし, *t* 検定の場合は, 対照群と投与群で分散に有意差が認められなければ Student

の *t* 検定を, 有意差が認められた場合は Welch の *t* 検定を用いた。

II 試験結果

1 一般状態

何ら異常は認められなかった。

2 体重

雄の 27 mg/kg 群で投与初期に軽度の体重増加抑制がみられたが, 以後, 対照群と同一レベルであった (Fig. 2)。

3 摂餌量

投薬群は, 対照群とほぼ同様の摂餌量を示し, 被験物質投与による影響は認められなかった。

Table 4 Absolute organ weight in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex	Male				Female			
Compound	Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)	—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Final body weight (g)	240.6 ±11.2	248.4 ±14.7	243.8 ±8.0	241.4 ±9.8	155.5 ±6.3	154.8 ±4.6	158.1 ±5.5	155.6 ±10.1
Brain (g)	1.87 ±0.03	1.88 ±0.03	1.87 ±0.04	1.88 ±0.03	1.78 ±0.04	1.78 ±0.03	1.78 ±0.03	1.79 ±0.04
Pituitary (mg)	7.35 ±0.73	7.65 ±0.63	7.50 ±0.46	7.41 ±0.66	9.88 ±0.87	10.36 ±1.54	9.84 ±1.23	9.98 ±1.83
Thyroids (mg)	11.67 ±0.95	11.07 ±2.18	12.05 ±1.94	12.46 ±1.37	9.10 ±1.21	8.80 ±0.76	8.19 ±0.96	8.54 ±1.10
Thymus (mg)	323 ±46	351 ±49	339 ±23	319 ±31	323 ±28	314 ±20	327 ±26	315 ±26
Lungs (mg)	774 ±26	793 ±40	796 ±26	762 ±33	651 ±31	658 ±33	666 ±22	657 ±31
Heart (mg)	713 ±42	720 ±52	737 ±30	699 ±39	519 ±30	538 ±27	525 ±25	523 ±31
Liver (g)	9.06 ±0.60	9.46 ±0.77	9.24 ±0.60	9.01 ±0.73	5.59 ±0.40	5.56 ±0.29	5.53 ±0.31	5.36 ±0.36
Kidneys (g)	1.61 ±0.10	1.63 ±0.12	1.61 ±0.07	1.55 ±0.10	1.14 ±0.06	1.15 ±0.08	1.12 ±0.04	1.13 ±0.06
Adrenals (mg)	34.7 ±2.8	34.0 ±1.8	33.3 ±2.6	36.9 ±2.1	40.6 ±3.3	41.6 ±3.2	40.1 ±3.5	41.2 ±3.7
Spleen (mg)	588 ±64	650* ±48	625 ±38	589 ±47	469 ±49	486 ±37	501 ±22	460 ±26
Testes (g)	2.70 ±0.08	2.73 ±0.08	2.65 ±0.10	2.73 ±0.08	—	—	—	—
Ovaries (mg)	—	—	—	—	63.1 ±5.0	62.5 ±9.0	58.3 ±11.7	63.3 ±6.4

Results are mean ± SD

Significantly different from control (Student's or Welch's *t*-test) : **p* < 0.05

4 尿 検 査

対照群と 27 mg/kg 群で差が認められなかったことから、3 および 9 mg/kg 群については検査を行わなかった (Table 1)。

5 血液学的検査

雌の 27 mg/kg 群でヘマトクリット値の増加が認められたが対照群との差はわずかであった。また同群では単球比率の有意な増加が認められたが、最も高い個体別値でも 2% であることから正常範囲内の変動とみなした (Table 2)。

6 生化学的検査

雄の 9 および 27 mg/kg 群に無機リンの有意な増加が認められた。そのほかには、用量依存

性のないグルコースの有意な減少が雌の 3, 9 および 27 mg/kg 群に認められた。雄の 27 mg/kg 群でカルシウムの有意な減少と A/G の有意な増加が認められたが、対照群との差あるいは対照群の変動範囲からみて被験物質との関連性はうかがえなかった (Table 3)。

7 剖 検

肺、胸腺、肝、脾、卵巣に軽度の変化が偶発的に認められたのみであり被験物質投与に起因する変化は認められなかった (Table 6)。

8 臓器重量

臓器重量体重比において、27 mg/kg 群の雄の腎臓および雌の肝臓に有意な減少が認められ

Table 5 Relative organ weight in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex	Male				Female			
Compound	Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)	—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Final body weight(g)	240.6 ±11.2	248.4 ±14.7	243.8 ±8.0	241.4 ±9.8	155.5 ±6.3	154.8 ±4.6	158.1 ±5.5	155.6 ±10.1
Brain (g %)	0.78 ±0.03	0.76 ±0.03	0.77 ±0.02	0.78 ±0.03	1.15 ±0.04	1.15 ±0.03	1.13 ±0.03	1.15 ±0.06
Pituitary (mg %)	3.06 ±0.18	3.06 ±0.18	3.09 ±0.18	3.05 ±0.23	6.35 ±0.53	6.70 ±1.04	6.22 ±0.71	6.42 ±1.18
Thyroids (mg %)	4.85 ±0.34	4.45 ±0.83	4.95 ±0.83	5.15 ±0.52	5.86 ±0.71	5.68 ±0.45	5.19* ±0.64	5.49 ±0.72
Thymus (mg %)	134 ±17	141 ±14	139 ±7	132 ±12	208 ±14	203 ±11	207 ±17	203 ±16
Lungs (mg %)	322 ±17	320 ±9	327 ±8	316 ±7	419 ±7	425 ±20	421 ±10	423 ±21
Heart (mg %)	297 ±13	290 ±12	302 ±10	290 ±7	334 ±12	347* ±12	332 ±12	337 ±22
Liver (g %)	3.76 ±0.10	3.81 ±0.11	3.79 ±0.15	3.73 ±0.18	3.59 ±0.12	3.60 ±0.17	3.50 ±0.12	3.44* ±0.10
Kidneys (g %)	0.67 ±0.02	0.66 ±0.02	0.66 ±0.01	0.64* ±0.02	0.73 ±0.02	0.74 ±0.03	0.71* ±0.02	0.73 ±0.02
Adrenals (mg %)	14.4 ±1.1	13.7 ±0.9	13.7 ±0.9	15.3 ±1.1	26.1 ±1.7	26.9 ±2.1	25.3 ±1.7	26.5 ±2.6
Spleen (mg %)	244 ±21	262* ±14	256 ±13	244 ±18	301 ±23	314 ±19	317 ±14	296 ±17
Testes (g %)	1.13 ±0.06	1.10 ±0.06	1.08 ±0.05	1.13 ±0.04	—	—	—	—
Ovaries (mg %)	—	—	—	—	40.7 ±3.3	40.2 ±5.1	37.1 ±7.6	40.8 ±4.2

Results are mean ± SD Significantly different from control (Student's or Welch's *t*-test) : **p* < 0.05

Table 6 Gross pathological findings in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex	Male				Female			
Compound	Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)	—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Organs and findings	— +	— +	— +	— +	— +	— +	— +	— +
Lung Reddish change (local)	10	8 2	9 1	10	10	10	10	10
Congestion	7 3	9 1	8 2	8 2	10	10	10	9 1
Thymus Congestion (local)	9 1	10	10	10	10	9 1	8 2	10
Yellowish white change (local)	10	10	10	10	10	10	8 2	10
Liver Adhesion to diaphragm	10	9 1	10	10	10	10	10	10
Yellowish white change (local)	10	9 1	10	10	10	10	9 1	10
Nodule	10	10	10	10	9 1	10	10	10
Spleen Congestion	10	10	10	9 1	10	10	10	10
Ovary Follicular cyst	10	10	10	10	10	10	9 1	10

— : Not observed + : Observed

Table 7 Histopathological findings in rats treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		10	10	10	10	10	10	10	10
Organs and findings		Degree	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††
Heart	Cell infiltration	10	9 1	10	10	10	10	10	10
Lung	Thickening of alveolar wall with interstitial cell reaction	1 9	1 2 7	1 4 5	2 8	1 9	10	5 1 4	3 4 3
	Congestion	9 1	10	9 1	9 1	9 1	9 1	10	10
	Foreign body granuloma (hair)	10	10	10	8 2	8 2	10	10	8 2
Liver	Cell infiltration	10	10	4 3 3	8 2	8 2	10	10	9 1
	Fibrosis with necrosis	10	9 1	10	10	10	10	10	10
	Granulation	10	10	10	10	9 1	10	9 1	9 1
Kidney	Hyaline droplet in epithelium of proximal tubules	6 2 2	4 3 3	3 6 1	6 4	10	10	10	10
	Basophilic change in epithelium of proximal tubules	10	10	10	9 1	10	9 1	9 1	10
	Calcification	10	10	10	10	9 1	10	10	10
Thyroid	Deciduation of follicle epithelium	2 7 1	8# 1	3# 1 4 1	1# 6 2	3# 1 5	3# 1 5	3# 5	2# 5 1
	Ultimobranchial tissue	10	9	8 1	9	9	9	8	7 1
Lymph node	Lymphadenitis	8 2	10	8 2	10	10	10	8 2	9 1
Pituitary	Colloidal change	10	10	9#	8#	8 2	8 2	10	10

— : Normal ± : Very slight + : Moderate ++ : Slight ††† : Severe
 # : Some samples were lost during preparation

たが、対照群との差あるいは対照群との変動範囲からみて被験物質投与との関連性はいくつか見えなかった。そのほかには用量依存性のない変動が散見された (Table 4, 5)。

9 病理組織学的検査

心臓の細胞浸潤、肺の間質細胞の反応を伴った肺胞壁の肥厚、うっ血および異物性肉芽腫(毛)、肝臓の細胞浸潤、壊死を伴う線維化および肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴と好塩基性変化および石灰化、上皮小体のろ胞上皮の脱落および胎児期遺残組織、リンパ節のリンパ節炎、上皮小体のコロイド変化が認められた。しかし、いずれの変化もラットでしばしば経験する偶発的变化であることや、発現頻度にも用量依存性がないことから、被験物質に起因した変化ではないと考えられた (Table 7)。

III 総括および考察

Argipidine を Wistar 系ラットに1ヵ月間、

3, 9, 27 mg/kg の用量で静脈内投与し、以下の知見を得た。

一般状態、摂餌量、尿検査、臓器重量、剖検、病理組織学的検査においては、被験物質によるとと思われる変化は見いだせなかった。

しかし、体重においては雌の 27 mg/kg 群で、試験終了時には差がみられないものの、投与初期に体重増加抑制が認められた。また、この群ではわずかな増加であるが、ヘマトクリット値に有意差が認められた。

血清無機リンの有意な増加が雄の 9 および 27 mg/kg 群に認められたが、顕著ではなく腎臓および骨に異常は認められなかったことから、偶発的なものと考えられる。

以上のように、27 mg/kg において投与初期の軽度な体重増加抑制、ヘマトクリット値の微増が投薬に関連する変化として認められたにすぎなかった。以上のことから、本試験条件下での最大無影響量は 9 mg/kg と考えられる。

* * *

Argipidine (MD-805) のビーグル犬 における静脈内投与による 1 ヲ月間亜急性毒性試験

平 川 哲 孝* 西 村 信 雄*
布 施 裕 輔** 土志田 和 夫***

One-Month Subacute Intravenous Toxicity of Argipidine (MD-805) in Beagle Dogs

Tetsutaka Hirakawa*, Nobuo Nishimura*,
Yusuke Huse** and Kazuo Toshida***

* Bozo Research Center Inc.

** Second Department of Pathology, National Defense Medical College
*** Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector, Research Center,
Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

Argipidine, a new thrombin inhibitor, was intravenously administered to male and female beagle dogs at dose levels of 3 mg/kg, 9 mg/kg and 27 mg/kg for one month to test the subacute toxicity, and the following information was obtained.

All dogs receiving 9 mg/kg occasionally licked their lips during or within three minutes after the administration, but the licking was not observed at the late stage of the treatment period. Vomiting was observed at a very low frequency in a few dogs of this group. A similar licking and vomiting were observed in all of the dogs administered 27 mg/kg about half the number of days treated during or within three minutes after the administration. The frequency of occurrence of these symptoms decreased at the late stage of the treatment. No death was observed in any of the test groups. No abnormal findings concerning general condition were noticed in any

* 株式会社ボゾリサーチセンター

** 防衛医科大学校 第二病理学教室

*** 三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 安全性研究所

of the dogs administered 3 mg/kg throughout the treatment period.

No significant influences on the body weight, food consumption or water consumption resulting from the administration of the test material were observed in any test group during the period of treatment. Examinations of urine and feces showed no abnormal changes caused by the administration of the test material.

Hematological examinations, clinical blood chemistry tests, electrocardiograms and ophthalmological examinations also disclosed no effect of the test material on the animals in any group tested.

Autopsy and histopathological examination revealed slight, incidental abnormalities in some of the organs, which did not seem to be attributable to the administration of the test material. The weight of organs were normal in all animals.

From these results, no effect level is estimated to be 3 mg/kg.

KEY WORDS

Argipidine, Thombin inhibitor,
Subacute toxicity, Beagle dog

緒 言

Argipidine は、抗トロンビン活性を有する抗凝固薬として開発が進められている薬物である。今回著者らは、argipidine のビーグル犬における 1 ヶ月間静脈内投与による亜急性毒性試験を行ったので、以下に得られた成績を報告する。

I 実験材料および実験方法

1 被験物質

Argipidine は、Fig. 1 に示す構造を有し、分子量 526.66 の無臭の白色粉末である。水に極めて溶けにくく酢酸に溶けやすい。

2 供試動物および飼育条件

ビーグル犬 24 頭（雄 12、雌 12）を日本化薬株

式会社より 9 ヶ月齢で購入し、約 1 ヶ月間予備飼育し環境に馴化させた後、体重により層化し各群の平均体重がほぼ等しくなるように群分けした。投与開始時の体重は雄 8.0~10.9 kg、雌 7.2~9.4 kg であった。

動物は予備飼育期間および投与期間を通じ、金属製犬用ケージ (700W×750D×750H mm：林田製作所) に個別に収容し、自動環境調節を施した飼育室（温度 22±2℃、湿度 55±5%）で固型飼料（ラボ D ストック：日本農産加工）および水道水を毎日午後 4~5 時に与えて飼育した。動物を耳介の入墨で識別するとともに、飼育ケージに試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号等を明記したラベルをつけた。

3 投与方法

被験物質を蒸留水に懸濁し HCl により強酸性下 (pH 2) で溶解させた後、徐々に NaOH を加え pH を 7.0~7.5 に調整した。その後、浸透圧不足分を NaCl で補充し、投与液量が 10 ml/kg 体重となるように容量を調整し、さらに pH を 7.0~7.5 に微調整した（最終浸透圧：300 mOsm/l）。投与液は、オートクレーブにより滅菌した。

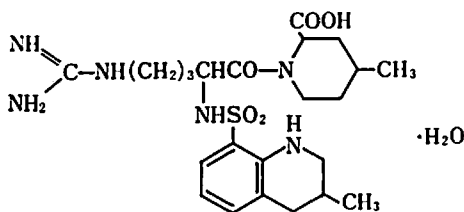


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

投与は1日1回前肢の橈側皮静脈内に20ml/minの速度で注入した。なお対照群には食塩水(300 mOsm/l)を滅菌後同様に注射した。

4 用量設定および群構成

本薬物の生理食塩液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度は2.5~3.0 mg/mlであり、犬1頭当たりの投与可能な液量は、技術的に100 mlが限度であることから、最大投薬量は犬1頭当たり270 mg/100 mlとした。犬の体重は約10 kgであるので、最高用量を27 mg/kgと設定した。以下公比3で中用量を9 mg/kg、低用量を3 mg/kgとした。対照群を含む各群に雌雄各3頭のビーグル犬を用いた。

5 検査方法

1) 一般状態

投与開始後1週間は毎投与時の投与前および投与後4時間まで、また、以後は毎投与時の投与前および投与後1時間まで毎日動物の一般行動、健康状態および糞便状態を観察した。

2) 体重

投与開始2週間前より投与期間を通じ、週2回それぞれ当該日の午前10時に体重測定を行った。

3) 摂餌量

投与期間を通じ、1日1頭500 gの固型飼料を毎日午後4~5時の間に与え、翌朝10時に残量を秤量し、摂餌量を算出した。

4) 摂水量

投与期間を通じ、週2回午後4~5時に1000 mlの水道水を与え、翌朝10時に残量を秤量し、摂水量を算出した。

5) 尿検査

投与開始直前、投与開始後2週および4週に動物を代謝ケージに入れて午前10時より翌朝9時まで絶水し、その間午後5時より翌朝9時までの16時間尿を採取し、尿量、尿の外観(肉眼的観察)、色調(肉眼的観察)、比重(フロートタイプ比重計)、pH、潜血、ケトン体、ブドウ糖、蛋白質、ウロビリノーゲン、ビリルビン(ウロラプスティックス、イクトスティックスーマイルス三共)、Na、K(170-50A型原子吸

光光度計、日立)、Cl(クロライドメータ、Corning)を測定した。

採取した尿を1500 rpmで5分間遠心し尿沈渣を鏡検した。

6) 糞便検査

投与開始直前、投与開始後2週および4週に0.1 gの糞便を100 mlの蒸留水にて懸濁し、潜血反応を検査した。

7) 血液学的検査

投与開始1週間前、投与開始直前、投与開始後2週および4週に橈側皮静脈より採血し、ヘマトクリット値(毛細管遠心法)、ヘモグロビン量、赤血球数、白血球数(Sysmex、東亜医用電子)、白血球百分比、血小板数(May-Giemsa染色塗抹標本による鏡検)、プロトロンビン時間(Quick一段法)、カルシウム再加時間(血漿カルシウム再加時間測定法)を測定した。計算によりMCV、MCHおよびMCHCを求めた。

8) 血液の臨床化学的検査

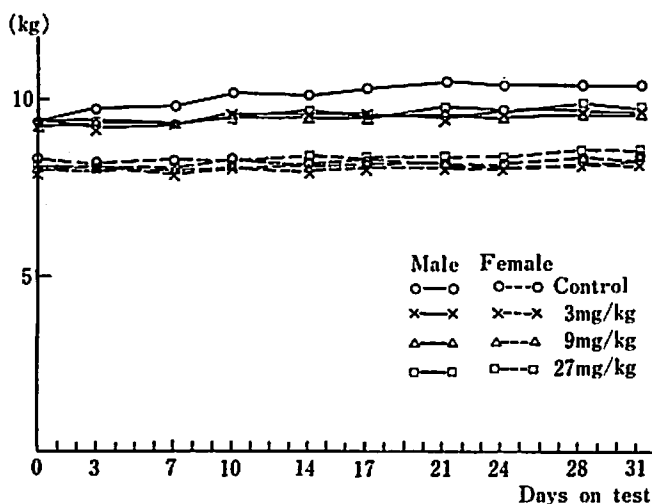
遠心分離後得られた血清を用いてGOT、GPT、Al-P、LDH、尿素窒素、glucose(以上Reaction-Rate法)、総コレステロール(Liebermann-Burchard法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Molybdenum-Blue法)、尿酸(Folin法)、総蛋白質(Biuret法)、A/G(セルロースアセテート膜電気泳動法)、albumin(A/G比および総蛋白質より算出)、ナトリウム、カリウム(以上原子吸光光度法)およびクロライド(銀電解クーロメーター法)を測定した。セルロースアセテート膜の読み取りにはアセテート電気泳動定量装置(富士理研)を、ナトリウムおよびカリウムの測定には170-50A型原子吸光光度計(日立)を、クロライドの測定にはChloride Meter 920(Corning)を用いた。その他の測定にはクリナライザーJCA-N6C6R(日本電子)を用いた。

9) 心電図検査

投与開始直前、投与開始後2週および4週の投与前に動物を無麻酔、立位の状態でポータブル心電計(東芝ECG-OIK)により誘導電圧を

Table 1 Frequency and distribution of licking and vomiting in beagle dogs treated with argipidine for 1 month

Sex		Male												Female												
Compound		Control			Argipidine									Control			Argipidine									
Dose (mg/kg)		—			3			9			27			—			3			9			27			
Animal number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Licking days on test	1~10	0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	2	2	1	4	7	7	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5	5	5
	11~20	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	7	6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	4	3
	21~31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2
Vomiting days on test	1~10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	9	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	6	8	
	11~20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	2	3	
	21~31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	

^{a)} Total number of days observed**Fig. 2** Body weight changes in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

1 mV/cm とし、四肢誘導法Ⅱで心電図を記録した。

10) 眼科学的検査

投与開始1週前、投与開始後2週および4週の投与前に肉眼およびスリットランプ (SL, コーワ) による結膜、虹彩および角膜の観察、眼底カメラ (RC-2, コーワ) による眼底の観察および写真撮影を行った。

11) 剖検

最終投与の翌日に動物をペントバルビタールナトリウム (25~30 mg/kg) の静脈内投与により麻酔し、腋窩動脈切断により放血致死させ、ただちに開胸・開腹して各臓器の肉眼的観察を行った。

12) 臓器重量

剖検後、脳、下垂体、甲状腺 (左・右)、胸腺、心、肺、肝、脾、腎 (左・右)、副腎 (左・右)、精巣 (左・右)、前立腺、卵巣 (左・右)、

Table 2 Quantitative urinalysis in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Amount of urine (ml)	Before ¹⁾	186	150	196	173	126	153	130	130
	2 Weeks ²⁾	146	213	143	213	190	153	150	176
	4 Weeks ³⁾	163	126	130	163	143	136	116	200
Specific gravity	Before	1.064	1.051	1.037	1.067	1.050	1.050	1.042	1.044
	2 Weeks	1.045	1.052	1.043	1.041	1.045	1.045	1.041	1.034
	4 Weeks	1.042	1.048	1.041	1.035	1.033	1.043	1.034	1.039
Na (mEq/l)	Before	284	297	215	289	228	232	245	203
	2 Weeks	240	253	312	259	199	323	265	213
	4 Weeks	302	293	282	254	230	316	218	220
K (mEq/l)	Before	213	273	179	250	218	179	211	221
	2 Weeks	187	203	165	173	171	181	180	139
	4 Weeks	172	216	167	148	134	186	129	180
Cl (mEq/l)	Before	285	266	273	205	238	232	266	256
	2 Weeks	248	220	277	322	220	248	219	158
	4 Weeks	267	302	300	226	165	298	175	218

¹⁾ Before treatment ²⁾ After 2 weeks of treatment ³⁾ After 4 weeks of treatment

子宮を摘出し、湿重量（臓器重量）を測定し、屠殺日の体重を基準に体重 100g 当たりの臓器重量体重比を算出した。

13) 病理組織学的検査

大脳、小脳、間脳、橋、延髄、脊髓、下垂体、甲状腺、下顎腺、胸腺、心、肺、肝、脾、膵、腎、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮、膈、膀胱、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、気管、胸部大動脈、大腿部骨格筋、乳腺、背部皮膚、胸骨、胸骨髄および投与部位をリン酸緩衝 10% ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋したのち薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。

ただし、眼球については 25% グルタルアルデヒド液と飽和ピクリン酸と氷酢酸を 10:30:0.4 の割合で含む固定液に固定した。肝および副腎については、Sudan III 染色による脂肪染

色も行った。

II 試験結果

1 一般状態

舌なめずりおよび嘔吐の発現状況を Table 1 に示した。

3 mg/kg 群では、投与期間を通じ行動・健康状態および糞便状態に異常は認められなかった。

9 mg/kg 群では、雌雄全例で、投与中あるいは投与終了後 3 分以内に散発的な舌なめずりが観察されたが、投与末期には認められなかった。また、雄で 1 例に 1 回、雌で 1 例に 2 回嘔吐が認められた。

27 mg/kg 群の雌雄全例で投与期間のほぼ半数日に、投与中より投与終了後 3 分以内に舌なめずりおよび嘔吐がみられたが、いずれも投与末期には発現頻度が少なくなった。ほか

Table 3 Qualitative urinalysis with test paper in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex			Male				Female			
Compound			Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)			—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals			3	3	3	3	3	3	3	3
Appearance ¹⁾	Before ⁶⁾	N Ab	3	3	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks ⁷⁾	N Ab	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks ⁸⁾	N Ab	3	3	3	3	3	3	3	3
Color ²⁾	Before	Y D	3	3	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks	Y D	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	Y D	3	3	3	3	3	3	3	3
pH	Before	6 7 8	2 1	2 1	3	1 2	3	2 1	1 2	1 2
	2 Weeks	6 7 8	1 2	1 2	1 1	3	1 2	1 2	2 1	2 1
	4 Weeks	6 7 8	2 1	2 1	1 1	2 1	2 1	2 1	3	2 1
Occult blood ³⁾	Before	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
Ketone body ⁴⁾	Before	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
Glucose ⁵⁾	Before	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks	— +	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	— +	3	3	3	3	3	3	3	3

Table 3 Continued

Sex			Male				Female			
Compound			Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)			—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals			3	3	3	3	3	3	3	3
Protein ⁴⁾	Before	—	1	1	1			1	1	1
		±	2	2	2	3	3	2	2	1
		+								1
	2 Weeks	—	1		2	2	2	1	2	1
		±	2	2	1	1	1	2	1	2
		+		1						
Bilirubin ⁵⁾	4 Weeks	—			1		2			
		±	3	2	2	3	1	3	3	3
		+		1						
	Before	—	3	3	3	3	3	3	3	3
		+								
	2 Weeks	—	3	3	3	3	3	3	3	3
Urobilinogen ⁶⁾		±								
		+								
	4 Weeks	—	3	3	3	3	3	3	3	3
		±								
		+								
	Before	±	3	3	3	3	3	3	3	3
Urobilinogen ⁶⁾		+								
	2 Weeks	±	3	3	3	3	3	3	3	3
		+								
	4 Weeks	±	3	3	3	3	3	3	3	3
		+								

¹⁾ N : Normal, Ab : Abnormal ²⁾ Y : Yellow, D : Dark yellow ³⁾ — : Negative, + : Small amount

⁴⁾ — : Negative, ± : Trace, + : Small amount ⁵⁾ ± : 0.1, + : 1 Ehrlich unit/100 ml

⁶⁾ Before treatment ⁷⁾ After 2 weeks of treatment ⁸⁾ After 4 weeks of treatment

には異常は認められなかった。なお、全群で動物の死亡は観察されなかった。

2 体重変動

投薬群は、対照群とほぼ同様な体重推移を示した (Fig. 2)。

3 摂餌量

投薬群は、対照群とほぼ同様な摂餌量を示した。

4 摂水量

投薬群は、対照群とほぼ同様な摂水量を示した。

5 尿検査

いずれの検査項目についても、それぞれの個体の投与前の成績および対照群の成績と比べ、投薬群で特に異常と思われるものはなかった

(Table 2, 3, 4)。

6 糞便検査

被験物質投与による潜血反応の増加は認められなかった。

7 血液学的検査

いずれの検査項目についても、それぞれの個体の投与前の値および対照群の値と比べ、投薬群で特に異常と思われるものはなかった (Table 5)。

8 血液の臨床化学的検査

いずれの検査項目についても、それぞれの個体の投与前の値および対照群の値と比べ、投薬群で特に異常と思われるものはなかった (Table 6)。

Table 4 Urinary sediment observation in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Degree		— ± + † † †	— ± + † † †	— ± + † † †	— ± + † † †	— ± + † † †	— ± + † † †	— ± + † † †	— ± + † † †
Epithelial cell	Before ¹⁾	3	2 1	2 1	3	3	3	2 1	2 1
	2 Weeks ²⁾	1 2	3	3	2 1	2 1	2 1	1 1 1	1 1 1
	4 Weeks ³⁾	1 2	3	2 1	2 1	2 1	2 1	3	2 1
Red blood cell	Before	3	3	3	3	3	3	3	2 1
	2 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	2 1
	4 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3
White blood cell	Before	3	3	3	3	3	3	3	2 1
	2 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3
Urinary cast	Before	3	3	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3
Phosphate	Before	1 2	3	1 2	1 2	1 2	3	1 2	3
	2 Weeks	3	1 2	3	2 1	2 1	1 2	3	3
	4 Weeks	3	3	1 2	3	2 1	3	1 2	3
Calcium oxalate	Before	3	2 1	3	3	3	3	3	3
	2 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3
	4 Weeks	3	3	3	3	3	3	3	3

— : Negative ± : Small amount in the whole field + : Small amounts in Several fields † : Small amounts in each field
 †† : Large amounts in each field ¹⁾ Before treatment ²⁾ After 2 weeks of treatment ³⁾ After 4 weeks of treatment

Table 5 Hematological findings in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Hematocrit (%)	1 Week before ¹⁾	43	41	43	40	45	44	42	47
	A few days before ²⁾	43	44	45	43	43	43	46	47
	After 2 weeks ³⁾	40	40	41	38	42	41	45	46
	After 4 weeks ⁴⁾	45	41	44	43	39	39	46	41
Hemoglobin (g/dl)	1 Week before	13.9	13.5	13.6	13.1	14.0	14.0	13.7	14.6
	A few days before	13.8	14.0	14.8	14.9	14.0	14.3	14.8	14.8
	After 2 weeks	13.3	13.3	13.8	12.7	14.2	13.8	14.7	15.2
	After 4 weeks	14.3	13.4	14.2	13.7	13.0	12.8	15.0	14.0
Red blood cell count ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	1 Week before	6.06	5.91	6.02	5.60	6.22	6.09	5.86	6.50
	A few days before	6.50	6.57	6.72	6.46	6.58	6.60	6.71	7.09
	After 2 weeks	6.07	6.07	6.25	5.67	6.35	6.16	6.45	6.43
	After 4 weeks	6.61	6.16	6.53	6.26	5.84	5.84	6.87	6.10
White blood cell count ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1 Week before	12.2	12.1	10.2	11.4	10.4	11.6	11.3	12.3
	A few days before	13.1	11.4	13.3	13.2	14.3	15.9	14.2	21.2
	After 2 weeks	13.1	13.1	14.8	14.1	12.6	13.4	16.0	14.7
	After 4 weeks	15.5	13.1	17.3	16.2	13.7	12.8	17.3	14.8
Differential leukocyte count Lymphocyte	1 Week before	25	27	31	29	23	28	28	25
	A few days before	26	25	25	29	25	26	31	28
	After 2 weeks	31	23	28	26	26	30	26	26
	After 4 weeks	30	28	29	28	29	32	27	27
Neutrophil band-form	1 Week before	2	2	1	2	2	2	2	3
	A few days before	1	1	0	2	1	2	1	1
	After 2 weeks	0	1	1	1	1	0	1	2
	After 4 weeks	1	1	1	2	1	2	2	1
Neutrophil segmented	1 Week before	67	61	55	58	64	61	62	64
	A few days before	67	69	65	61	65	64	58	64
	After 2 weeks	56	67	60	61	63	61	62	66
	After 4 weeks	60	65	61	63	62	61	62	67
Eosinophil	1 Week before	4	8	10	9	8	6	5	5
	A few days before	4	3	7	7	7	6	7	5
	After 2 weeks	9	6	9	8	8	7	9	4
	After 4 weeks	7	4	7	5	5	4	6	3

¹⁾ 1 Week before treatment ²⁾ A few days before treatment³⁾ After 2 weeks of treatment ⁴⁾ After 4 weeks of treatment

Table 5 Continued

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Differential leukocyte count Basophil	1 Week before ¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
	A few days before ²⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
	After 2 weeks ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
	After 4 weeks ⁴⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
Monocyte	1 Week before	0	1	1	1	1	2	1	1
	A few days before	1	0	0	0	1	1	0	1
	After 2 weeks	1	1	0	2	0	1	1	1
	After 4 weeks	0	0	0	0	1	0	1	0
Platelet count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	1 Week before	25.2	24.9	26.4	21.9	29.0	27.3	27.0	25.8
	A few days before	25.4	25.7	25.2	23.8	30.8	26.9	28.2	29.1
	After 2 weeks	27.5	23.7	22.7	23.5	28.6	26.0	24.6	26.4
	After 4 weeks	23.5	24.5	24.7	24.9	25.3	25.4	27.0	25.2
Prothrombin time (sec.)	A few days before	7.5	7.1	7.2	7.0	7.0	7.2	7.2	7.5
	After 2 weeks	7.1	7.6	8.1	7.7	7.3	7.2	7.5	7.4
	After 4 weeks	7.0	7.1	7.4	7.0	6.9	7.2	7.2	7.1
Recalcification time (sec.)	A few days before	50.2	48.2	46.2	51.4	59.0	51.3	57.0	48.7
	After 2 weeks	48.7	48.3	60.3	60.4	53.1	57.2	58.8	61.7
	After 4 weeks	50.8	55.8	54.4	59.4	59.0	61.1	62.3	65.4
MCV (μ^3)	1 Week before	71.3	70.4	71.8	71.4	73.3	72.0	72.8	72.2
	A few days before	66.1	67.4	66.8	67.5	65.1	65.9	68.5	66.6
	After 2 weeks	66.5	66.3	66.2	68.3	66.7	66.5	70.2	71.7
	After 4 weeks	68.1	66.4	67.3	68.6	66.8	67.8	67.8	68.2
MCH ($\gamma\gamma$)	1 Week before	22.8	22.8	22.6	23.4	22.8	22.9	23.4	22.4
	A few days before	21.3	21.3	22.0	23.0	21.3	21.6	22.0	20.8
	After 2 weeks	21.9	21.9	22.1	22.5	22.4	22.4	22.7	23.7
	After 4 weeks	21.5	21.6	21.7	21.8	22.2	21.9	21.8	22.8
MCHC (%)	1 Week before	32.0	32.3	31.4	32.7	30.7	31.8	32.1	31.0
	A few days before	32.2	31.6	32.9	34.1	32.7	32.9	32.1	31.3
	After 2 weeks	33.0	33.0	33.4	32.9	33.6	33.8	32.4	33.0
	After 4 weeks	31.7	32.6	32.3	31.7	33.2	32.3	32.2	33.6

¹⁾ 1 Week before treatment²⁾ A few days before treatment³⁾ After 2 weeks of treatment⁴⁾ After 4 weeks of treatment

Table 6 Biochemical findings in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
GOT (IU/l)	1 Week before ¹⁾	21.40	15.55	20.75	18.46	15.23	18.41	25.46	21.33
	A few days before ²⁾	19.03	17.53	21.50	20.12	22.31	21.68	25.60	22.42
	After 2 weeks ³⁾	19.21	16.39	17.22	17.03	16.02	22.84	16.45	16.08
	After 4 weeks ⁴⁾	19.80	14.06	17.61	19.36	16.99	18.80	16.55	20.65
GPT (IU/l)	1 Week before	22.76	24.57	24.37	22.15	20.79	18.75	26.88	20.57
	A few days before	22.53	24.27	20.59	18.86	19.72	19.38	29.45	20.85
	After 2 weeks	21.23	20.05	20.96	33.11	19.55	28.49	30.46	25.38
	After 4 weeks	23.77	21.29	26.91	20.71	20.52	21.57	20.65	21.69
Al-P (IU/l)	1 Week before	68.06	53.62	67.43	56.06	57.66	63.38	57.93	55.82
	A few days before	82.40	61.27	82.21	72.55	75.29	64.71	62.23	60.89
	After 2 weeks	66.65	66.36	68.93	67.60	68.89	60.66	58.00	47.84
	After 4 weeks	58.67	60.80	64.94	54.32	64.81	57.68	57.58	47.43
LDH (IU/l)	1 Week before	173.5	107.0	157.7	76.0	69.4	87.3	110.8	57.8
	A few days before	313.1	228.9	294.9	194.7	317.3	242.8	384.0	180.4
	After 2 weeks	240.5	190.5	120.5	134.5	151.2	115.6	115.2	179.8
	After 4 weeks	116.3	141.7	99.8	102.3	145.7	84.4	131.9	156.4
Total protein (g/dl)	1 Week before	6.61	6.59	7.00	6.88	6.58	6.49	6.79	6.69
	A few days before	6.06	6.27	6.54	6.44	6.76	6.47	6.79	6.70
	After 2 weeks	6.01	5.77	5.86	6.11	5.55	5.47	5.89	5.72
	After 4 weeks	6.44	6.47	6.74	6.50	6.40	6.01	6.38	6.04
Albumin (g/dl)	1 Week before	3.20	3.49	3.41	3.34	3.34	3.48	3.45	3.59
	A few days before	2.96	3.38	3.04	2.94	3.32	3.36	3.25	3.56
	After 2 weeks	2.97	2.88	2.73	2.83	2.80	2.94	2.79	3.09
	After 4 weeks	3.06	3.08	2.93	2.91	3.14	2.98	2.89	3.28
A/G	1 Week before	0.95	1.13	0.95	0.94	1.04	1.16	1.06	1.16
	A few days before	0.95	1.17	0.86	0.84	0.98	1.07	0.92	1.13
	After 2 weeks	0.97	1.00	0.86	0.86	1.03	1.17	0.88	1.18
	After 4 weeks	0.91	0.91	0.76	0.82	0.97	0.98	0.84	1.19
Total cholesterol (mg/dl)	1 Week before	131.8	143.1	120.5	130.5	159.8	147.9	124.1	136.4
	A few days before	138.3	143.6	113.5	131.4	174.6	140.9	115.9	139.6
	After 2 weeks	130.0	145.3	113.1	130.7	159.6	122.6	115.2	129.6
	After 4 weeks	128.4	146.4	103.6	114.0	160.4	115.1	117.6	127.5

¹⁾ 1 Week before treatment ²⁾ A few days before treatment³⁾ After 2 weeks of treatment ⁴⁾ After 4 weeks of treatment

Table 6 Continued

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Inorganic phosphorus (mg/dl)	1 Week before ¹⁾	4.40	4.68	4.77	4.83	4.50	4.57	4.36	4.43
	A few days before ²⁾	4.97	4.81	4.97	5.06	4.60	4.81	4.51	4.49
	After 2 weeks ³⁾	5.11	4.64	4.47	5.20	4.92	4.77	4.56	5.06
	After 4 weeks ⁴⁾	5.23	4.71	5.15	4.87	4.90	5.40	4.54	5.60
Uric acid (mg/dl)	1 Week before	1.26	1.20	1.22	1.15	1.10	1.02	1.08	1.00
	A few days before	1.11	1.06	1.21	1.16	1.22	1.15	1.10	1.19
	After 2 weeks	1.19	0.93	0.69	0.89	1.09	0.99	1.10	1.06
	After 4 weeks	1.29	0.95	1.02	1.13	1.23	1.11	1.25	1.40
Urea nitrogen (mg/dl)	1 Week before	14.87	18.86	16.29	18.08	15.75	14.43	14.66	16.55
	A few days before	17.11	17.27	16.90	18.24	16.21	15.72	16.18	16.10
	After 2 weeks	15.71	15.39	12.99	14.99	15.13	13.71	15.19	11.89
	After 4 weeks	18.06	16.89	22.48	17.60	18.38	20.70	17.66	19.98
Glucose (mg/dl)	1 Week before	87.56	80.77	78.92	81.36	88.64	87.59	96.04	87.47
	A few days before	69.67	74.74	67.22	66.62	71.57	68.27	69.37	73.98
	After 2 weeks	77.47	83.73	83.97	73.25	88.15	81.50	81.03	74.83
	After 4 weeks	92.39	91.26	88.19	90.53	87.55	94.07	82.56	86.35
Calcium (mg/dl)	1 Week before	10.17	10.53	10.54	10.67	10.53	10.22	10.66	10.62
	A few days before	10.19	10.43	10.41	10.18	10.10	10.14	10.36	10.41
	After 2 weeks	10.45	9.90	9.79	10.04	9.97	9.84	9.69	9.96
	After 4 weeks	10.47	10.16	9.83	9.87	9.97	9.80	10.10	10.20
Na (mEq/l)	A few days before	140	147	140	140	142	140	139	141
	After 2 weeks	141	142	143	141	145	143	141	143
	After 4 weeks	138	140	141	141	137	140	142	145
K (mEq/l)	A few days before	4.9	5.2	5.0	4.9	5.0	5.0	5.1	4.9
	After 2 weeks	4.8	5.1	5.1	6.1	5.0	4.5	5.2	4.6
	After 4 weeks	4.6	4.6	4.9	5.2	4.8	4.8	4.9	4.9
Cl (mEq/l)	A few days before	98	94	99	102	101	101	101	108
	After 2 weeks	108	106	109	113	107	108	109	112
	After 4 weeks	103	107	104	110	110	109	103	110

¹⁾ 1 Week before treatment²⁾ A few days before treatment³⁾ After 2 weeks of treatment⁴⁾ After 4 weeks of treatment

Table 7 Absolute organ weight of beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Final body weight (kg)		10.4	9.7	9.6	9.8	8.3	8.2	8.3	8.6
Brain	(g)	73.4	76.2	78.8	71.4	68.3	75.0	72.1	69.0
Pituitary	(mg)	83	85	81	88	70	75	77	83
Thyroids	Left	495	542	445	503	371	404	339	478
	Right	469	474	470	580	389	410	325	505
Thymus	(g)	6.7	6.7	4.1	4.9	3.5	4.3	4.8	5.7
Heart	(g)	84.5	71.4	75.3	72.3	66.6	66.0	64.3	65.3
Lungs	(g)	72.3	69.4	79.0	72.3	71.3	73.6	64.0	61.8
Liver	(g)	280	304	258	308	291	254	253	328
Spleen	(g)	23.2	21.6	25.5	23.2	16.8	17.7	20.6	20.5
Kidneys	Left	22.4	22.4	21.9	22.3	18.8	17.9	16.8	19.2
	Right	20.6	22.2	21.5	20.5	18.0	17.4	15.8	18.3
Adrenals	Left	559	627	533	516	545	590	644	601
	Right	588	646	522	557	593	563	694	633
Testes	Left	8.30	6.68	6.39	6.27				
	Right	7.98	6.43	6.38	6.58				
Ovaries	Left					652	426	872	918
	Right					462	367	803	785
Prostate	(g)	6.41	5.62	4.15	4.44				
Uterus	(g)					7.27	5.19	11.51	16.28

9 心電図検査

いずれの動物においても毎検査日の波形に特記すべき異常はみられなかった。また、P, PQ, QRS, QT および RR の各持続時間および心拍数についても、それぞれの個体の投与前の値および対照群の値に比べ投薬群で異常と思われるものはなかった。

10 眼科学的検査

全群のいずれの動物でも毎検査時に異常はみられなかった。

11 臓器重量

各臓器の湿重量および臓器重量体重比に異常値はみられず、いずれも正常範囲内であった (Table 7, 8)。

12 剖検

自然発生的な偶発所見がみられたのみであった。

13 病理組織学的検査

得られた所見を Table 9 に示したが、いずれも投薬に起因したと思われる変化はなかった。

すなわち、少数例に軽度な不顕性感染による

Table 8 Relative organ weight of beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex	Male				Female			
Compound	Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)	—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3
Final body weight (kg)	10.4	9.7	9.6	9.8	8.3	8.2	8.3	8.6
Brain (g %)	0.69	0.79	0.82	0.72	0.81	0.90	0.85	0.79
Pituitary (mg %)	0.79	0.87	0.85	0.89	0.82	0.90	0.92	0.96
Thyroids (mg %) Left	4.78	5.65	4.59	5.10	4.55	4.91	4.05	5.53
Right	4.54	4.94	4.88	5.90	4.75	4.98	3.88	5.88
Thymus (g %)	0.06	0.06	0.03	0.04	0.03	0.05	0.05	0.06
Heart (g %)	0.80	0.74	0.78	0.73	0.80	0.79	0.76	0.75
Lungs (g %)	0.69	0.71	0.81	0.73	0.84	0.88	0.75	0.71
Liver (g %)	2.67	3.14	2.67	3.12	3.48	3.08	3.03	3.79
Spleen (g %)	0.21	0.21	0.26	0.23	0.19	0.20	0.24	0.23
Kidneys (g %) Left	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.21	0.19	0.21
Right	0.19	0.22	0.22	0.20	0.21	0.20	0.18	0.20
Adrenals (mg %) Left	5.38	6.46	5.58	5.30	6.57	7.09	7.71	6.93
Right	5.67	6.66	5.46	5.72	7.20	6.77	8.30	7.33
Testes (g %) Left	0.07	0.06	0.06	0.05				
Right	0.07	0.06	0.06	0.06				
Ovaries (mg %) Left					7.72	5.12	10.47	10.55
Right					5.51	4.41	9.64	9.13
Prostate (g %)	0.05	0.05	0.03	0.04				
Uterus (g %)					0.08	0.05	0.13	0.18

ものと考えられる心臓の間質炎症性細胞浸潤、肺の気管支炎、気管支肺炎および肉芽腫、気管炎、肝臓のグリソン鞘内リンパ球浸潤および皮質肉芽腫、脾臓の間質リンパ球浸潤、下顎リンパ節の濾胞肥大、腸間膜リンパ節の濾胞肥大および皮質膿瘍、膈の粘膜下リンパ球浸潤、および背部皮膚の真皮リンパ球浸潤等の変化が認められた。これらの変化はいずれも軽度なものであり、対照群と投薬群ではほぼ同程度に認められた。また、寄生虫による偶発性変化として盲腸の寄生虫、直腸の筋層下肉芽腫および肺の寄生

虫膿瘍が認められた。用量依存性のない偶発性の変化として、延髄の出血、脊髄の中心管出血、甲状腺のコロイド減少、部分的無気肺、部分的肺気腫、空腸の粘膜出血、下顎リンパ節のリンパ洞出血および腸間膜リンパ節のリンパ洞出血、胸部大動脈の中膜平滑筋細胞の腫大等の変化が認められた。また、肝臓で 27 mg/kg 群の 1 例に屠殺時にやや放血不足であったことによると考えられる軽微なうっ血が認められた。副腎の球状帯および束状帯にそれぞれ軽微な空胞化（脂肪染色により脂肪滴であることを確認

Table 9 Histopathological findings in beagle dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Organs and findings		Degree	— ± + † ‡	— ± + † ‡	— ± + † ‡	— ± + † ‡	— ± + † ‡	— ± + † ‡	— ± + † ‡
Medulla oblongata	Bleeding	2 1	2 1	3	3	2 1	3	3	3
Spinal cord	Central canal bleeding	3	2 1	3	3	3	3	3	3
Pituitary	Intermediate lobular cyst	2 1	3	3	2 1	3	3	2 1	2 1
Thyroid	Decrease of colloid	3	3	3	3	3	3	2 1	3
Thymus	Atrophy	3	2 1	3	3	2 1	2 1	2 1	1 1 1
Heart (Left ventricle)	Interstitial inflammatory cell infiltration	3	3	3	3	3	3	2 1	3
Lung (Left)	Partial atelectasis	3	1 2	2 1	2 1	3	2 1	3	2 1
	Bronchitis	2 1	3	1 1 1	2 1	3	3	2 1	3
	Granuloma	3	3	2 1	2 1	3	3	3	3
Lung (Right)	Partial atelectasis	2 1	1 2	2 1	1 2	3	3	3	2 1
	Bronchitis	3	3	1 2	3	3	3	1 2	3
	Lobular pneumonia	3	3	3	2 1	3	3	3	3
	Granuloma	2 1	3	2 1	3	3	3	3	2 1
Lung (Apex)	Partial atelectasis	1 2	2 1	1 2	3	3	3	1 2	2 1
	Partial emphysema	2 1	3	2 1	3	1 2	3	3	3
	Bronchitis	3	3	2 1	2 1	2 1	2 1	3	3
	Granuloma	2 1	3	3	2 1	3	3	2 1	3
	Parasitic abscess	3	3	3	3	3	3	3	2 1

— : Normal ± : Very slight + : Slight † : Moderate ‡ : Severe

Table 9 Continued

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Organs and findings		Degree	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††	— ± + ++ †††
Liver (left lateral lobe)	Lymphocyte infiltration in Glisson's capsule	2 1	3	2 1	2 1	3	1 2	2 1	3
	Intralobular granuloma	3	3	2 1	3	3	3	3	3
	Congestion	3	3	3	3	3	3	3	2 1
Liver (Right medial lobe)	Lymphocyte infiltration in Glisson's capsule	2 1	3	2 1	3	2 1	3	2 1	3
	Intralobular granuloma	3	2 1	3	3	3	3	3	3
	Congestion	3	3	3	1 2	3	3	3	2 1
Liver (Papillary process)	Lymphocyte infiltration in Glisson's capsule	1 2	3	3	3	3	3	2 1	3
	Intralobular granuloma	3	3	2 1	3	3	3	3	3
	Congestion	3	3	3	2 1	3	3	3	2 1
Pancreas	Interstitial lymphocyte infiltration	3	2 1	3	3	3	3	3	3
Kidney (Left)	Distal tubular calcification	2 1	2 1	2 1	2 1	3	2 1	1 2	2 1
	Cortical lymphocyte infiltration	2 1	3	3	2 1	3	3	1 2	3
	Cortical granuloma	3	2 1	1 2	3	3	3	3	1 2

	1 2	1 2	3	3	3	3	1 2	1 2	1 2	2 1
Kidney (Right)										
Distal tubular calcification	1 2	1 2	3	3	3	3	3	3	3	3
Cortical granuloma	3	3	2 1	3	3	3	2 1	1 2	3	3
Adrenal										
Spherical zone vacuolation	3	1 2	3	2 1	3	3	3	2 1	3	3
Fascicular zone vacuolation	3	3	3	3	3	3	3	3	2 1	3
Adrenal (Sudan II staining)										
Increase of lipid droplet in spherical zone	3	1 2	3	3	3	3	3	2 1	3	3
Ovary										
Hyper-luteinization										
Cyst of corpus luteum										
Submucous lymphocyte infiltration										
Vagina										
Submucous lymphocyte infiltration										
Jejunum										
Mucosal bleeding	3	3	3	3	3	3	3	2 1	3	3
Parasite	3	2 1	2 1	3	3	3	2 1	2 1	3	2 1
Cecum										
Rectum										
Submucosal granuloma	3	3	3	3	3	3	2 1	3	3	3
Submaxillary lymph node										
Follicular hypertrophy	3	1 2	3	3	3	3	3	2 1	3	2 1
Lymph sinus bleeding	3	2 1	3	3	3	3	3	3	2 1	3
Mesenteric lymph node										
Follicular hypertrophy	1 2	3	1 2	3	3	3	3	1 2	1 1 1	3
Lymph sinus bleeding	1 2	1 1 1	2 1	2 1	2 1	3	3	1 1 1	1 1 1	3
Cortical abscess	3	3	2 1	3	3	3	2 1	3	3	3
Trachea										
Tracheitis	3	3	3	3	3	3	3	3	2 1	3
Aorta thoracica										
Swelling of mediocontractile cell	3	3	3	3	3	3	2 1	3	2 1	3

-- : Normal ± : Very slight + : Slight ++ : Moderate +++ : Severe

Table 9 Continued

Sex		Male				Female			
Compound		Control	Argipidine			Control	Argipidine		
Dose (mg/kg)		—	3	9	27	—	3	9	27
No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	3
Organs and findings		Degree	— ± + ++ ###	— ± + ++ ###	— ± + ++ ###	— ± + ++ ###	— ± + ++ ###	— ± + ++ ###	— ± + ++ ###
Mammary gland (Left second)	Involution	2	3	3	3	2 1	1 1 1	3	3
	Congestion of milk	2	3	3	3	2 1	3	3	3
Mammary gland (Right second)	Involution	2	2 1	2 1	1 1	3	1 1 1	3	3
	Congestion of milk	2	3	3	2	2 1	3	3	3
Mammary gland (Left third)	Involution	2 1	2 1	2 1	3	2 1	1 2	2 1	3
	Congestion of milk	3	3	3	3	2 1	3	3	3
Mammary gland (Right third)	Involution	1 2	1 1 1	1 2	3	2 1	1 1 1	3	3
	Congestion of milk	3	3	3	3	2 1	3	3	3
Dorsal skin	Lymphocyte infiltration in dermis	2 1	3	3	3	3	3	3	3
Site of treatment	Bleeding	1 2	3	1 2	3	3	2 1	1 2	1 2
	Cicatrical granulation	3	2 1	3	3	3	3	1 2	3
	Vascular wall organization	1 2	1 1 1	2 1	2 1	3	3	3	1 1 1

— : Normal ± : Very slight + : Slight ++ : Moderate ### : Severe

した)がみられたが、用量との相関性はなく、ストレスなどによる影響と考えられる。加齢性変化と考えられる胸腺の萎縮が各群の少数例に認められた。生理的变化と考えられる卵巣の黄体多発および黄体膜胞、乳腺の退縮、および乳汁うっ滞が用量とは関係なくみられた。投与部位においては、全例に軽微あるいは軽度な、新鮮あるいは古い出血および瘢痕性肉芽がみられた。またほぼ全例に血管壁の破壊に対する修復としての幼若な肉芽組織の形成、内膜の肥厚ならびに内皮細胞の肥大などの血管壁の器質化がみられた。

その他の臓器(大脳、小脳、間脳、橋、下顎腺、脾、精巣、精巣上体、前立腺、子宮、膀胱、食道、胃、十二指腸、回腸、結腸、大腿部骨格筋、胸骨、胸骨髄および眼球)にはいずれの動物においても異常所見は認められなかった。

III 総括および考察

Argipidine の 3 mg/kg, 9 mg/kg および 27 mg/kg を雌雄ビーグル犬に1ヵ月間連続静脈内投与し、その亜急性毒性について検討した。

3 mg/kg 群では投与期間を通じ一般状態に異常はみられなかった。9 mg/kg を投与した動物では全例で投与中あるいは投与終了後3分以内に散発的な舌なめずりが観察されたが、投与末

期には認められなかった。また、雄で1例に1回、雌で1例に2回嘔吐が認められた。27 mg/kg を投与した動物でも全例で投与期間のほぼ半数日に、投与中より終了後3分以内に舌なめずりおよび嘔吐がみられたが、いずれも投与末期には発現頻度が少なくなった。

体重推移、摂餌量、摂水量、尿検査、糞便検査、血液学的検査、血液の臨床化学的検査、心電図検査および眼科学的検査においては、被験物質の影響はみられなかった。

臓器重量および臓器重量体重比については、いずれの臓器にも被験物質の影響はみられなかった。

病理組織学的検査においては、被験物質の投与に起因すると思われる変化は認められなかった。なお、投与部位では出血、瘢痕性肉芽および血管壁器質化は対照群と投薬群でほぼ同程度にみられ、投与の繰り返しによる物理的な刺激に起因する変化と考えられ、被験物質による特異的な組織障害作用はないものと思われる。

以上のように被験物質投与に起因すると考えられる変化は 9 mg/kg 以上の群でみられた軽度な一過性の症状変化、すなわち舌なめずりおよび嘔吐であった。

したがって、ビーグル犬を用いて行った静脈内1ヵ月間投与の本試験における argipidine の最大無影響量は 3 mg/kg と結論される。

Argipidine (MD-805) のラット26週間 静脈内投与の慢性毒性試験

第一製薬株式会社 中央研究所 安全性研究センター

大野 広志 小野 承行 吉田 貢由
島田 信 小野寺 威

Twenty six-week Chronic Intravenous Toxicity Study of Argipidine (MD-805) in Rats

Hiroshi Ohno, Yoshiyuki Ono, Mitsuyoshi Yoshida,
Makoto Shimada and Takeshi Onodera

Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

Chronic toxicity of argipidine (MD-805), an anticoagulant agent, was investigated in rats by 26-week consecutive intravenous administration of a daily dose of 3, 9 or 27 mg/kg.

In the rats of 3 and 9 mg/kg groups, no changes were seen which were attributed to treatment. Male rats treated with 27 mg/kg showed increase in water consumption and urine volume together with potentiation of age-associated kidney disease.

From these results, no-effect dose of argipidine was considered to be 9 mg/kg under the present experimental condition.

KEY WORDS

Argipidine, MD-805, Anticoagulant agent,
Chronic toxicity, Rat

緒 言

Argipidine (MD-805) は三菱化成工業㈱で合成された抗血栓薬である。本薬物はトロンビ

ンに対し、可逆的かつ特異的な拮抗阻害作用を有し、トロンビンによるフィブリノーゲン凝固作用および血小板凝集作用をとともに阻害することが知られており、各種血栓症に対する治療薬

として開発が進められている。

本薬物の一般毒性に関してはこれまで急性毒性（ラット，マウス，ウサギ）¹⁾ および亜急性毒性（ラット1ヵ月静注²⁾，イヌ1ヵ月静注³⁾ および経口⁴⁾）がすでに実施されている。今回，われわれは安全性研究の一環としてラットにおける26週間静注慢性毒性を検討したので報告する。

I 実験材料および方法

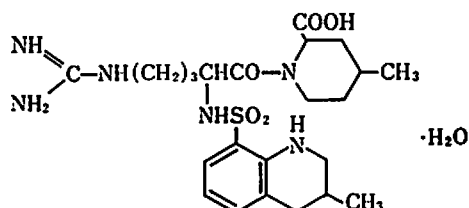
1 被験薬物

Argipidine (MD-805) は Fig. 1 に示す化学構造を有する白色の結晶または結晶性粉末で臭いはない。酢酸に溶けやすく，メタノールにやや溶けやすく，エタノールに溶けにくく，水に極めて溶けにくい。

本試験には三菱化成工業㈱で合成した Lot No. 791101 のサンプルを使用した。

2 使用動物

生後6週齢の CD (SD) 系ラット雌雄各60匹を使用した。動物は日本チャールス・リバーより4週齢時に購入し，2週間馴化および健康観察を行った後，外観上健康良好なものを試験に供した。実験開始時の体重は雄192～223 g，雌158～184 g であった。飼育はすべて室温 23±2 °C，湿度 55±10% および照明時間12時間に制御された動物室内で1ケージ5匹ずつ収容して行い，飼料（船橋農場製固型飼料，MB-1）および水（上水道水）を自由に摂取させた。



(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate

Fig. 1 Chemical structure of argipidine

3 薬物投与

1) 用量の設定

三菱化成工業㈱で先に実施したラット1ヵ月静注亜急性毒性試験の結果，3，9および27 mg/kg の投与では何ら投薬による変化はみられていない。しかし，本薬物の等張性塩化ナトリウム溶液中の比較的安定な過飽和溶液の限界濃度は 2.5～3 mg/ml であり，ラットの長期連続静注が可能な液量は 10 ml/kg がほぼ限界である。これらのことを考慮して本試験における最高用量を 27 mg/kg とし，以下9および3 mg/kg の計3用量を設定した。

2) 実験群の構成

実験群は上記各用量群に对照群を加えた計4群とし，各群雌雄ごとの平均体重および分散が均一になるように動物を配分した。各群の動物数および処置の内容は以下のとおりである。

a) 对照群

- ① 对照13週群（雄5，雌5）：13週間溶媒投与
- ② 对照26週群（雄10，雌10）：26週間溶媒投与

b) 3 mg/kg 群

- ① 3 mg/kg 13週群（雄5，雌5）：13週間 3 mg/kg 投与
- ② 3 mg/kg 26週群（雄10，雌10）：26週間 3 mg/kg 投与

c) 9 mg/kg 群

- ① 9 mg/kg 13週群（雄5，雌5）：13週間 9 mg/kg 投与
- ② 9 mg/kg 26週群（雄10，雌10）：26週間 9 mg/kg 投与

d) 27 mg/kg 群

- ① 27 mg/kg 13週群（雄5，雌5）：13週間 27 mg/kg 投与
- ② 27 mg/kg 26週群（雄10，雌10）：26週間 27 mg/kg 投与

3) 薬液の調製

毎日の投与前に各用量ごとに薬物の必要量を秤取し，10 ml/kg/day の一定液量となるように，また，薬液の浸透圧が 300 m Osm/l になる

ように0.9488% (3 mg/kg 群用), 0.9264% (9 mg/kg 群用) または0.8592% (27 mg/kg 群用) の塩化ナトリウム溶液を加えて, 高圧蒸気滅菌器により加熱溶解するとともに滅菌し, 一連の濃度 (0.03, 0.09, 0.27%) の薬液を調製した。対照群用には, 0.9600% の塩化ナトリウム溶液を同様にして滅菌した。

4) 投与経路および投与期間

各群のラットにそれぞれ所定の用量を25G注射針付ディスポーザブル注射筒 (テルモ製) を用いて尾静脈内に約 20 ml/min の速度で注入した。投与は1日1回, 週7日, 26週間 (1980年6月17日~1980年12月18日) 行った。

4 検 査

1) 一般観察

a) 一般症状

投与期間中は毎日, 投与前および投与後を含む2回以上, 各ラットの一般症状を観察した。

b) 体重

投与開始後1週間は毎日, それ以降は1週間に1回すべての動物の体重を測定した。

c) 摂餌量

投与開始後1週間は毎日の摂餌量を, それ以降は1週間に1回, 1週間の総摂餌量を各群雌雄ごとに測定し, 平均摂餌量 (g/rat/week) として算出した。

d) 飲水量

投与開始後1週間は毎日の摂餌量を, それ以降は1週間に1回, 連続する2日間の摂餌量を各群雌雄ごとに測定し, 平均摂餌量 (ml/rat/day) として算出した。

2) 臨床検査

a) 眼, 聴覚および心電図検査

投与開始前および投与4, 13および26週に对照26週群および 27 mg/kg 26週群の雌雄各5匹について, 眼検査, 聴覚検査および心電図検査を行った。

眼検査には, 眼底カメラを用い, 眼底検査を行うとともに写真撮影を行った。聴覚検査にはガルトン笛を用い, 9000 Hz の音振動に対するブライエル反射の有無をしらべた。心電図は生

体アンプ, トランジェントメモリー, タコメータ, 電磁記録計を用い, 第II誘導による心電図波形を記録するとともに心拍数, PQ, QRS, QT 間隔を計測した。

b) 尿検査

投与13および26週に, すべての動物を個別の代謝ケージに移し, 23時間採尿した。はじめの4時間尿を用い, Urolabstix 試験紙による定性検査 (pH, 糖, ウロビリノーゲン, 蛋白, ケトン体, 潜血) および尿沈渣の鏡検を行うとともに, 23時間尿につき, 尿量および Na^+ , K^+ (炎光光度計), Cl^- (クロライドカウンター) の各排泄量を測定した。

c) 血液学的検査

13および26週間の投与終了後, 各ラットをエーテル麻酔下で放血屠殺した。その際, 尾端, 頸静脈および頸動脈から採血するとともに, 大腿骨から骨髓を採取した。

尾端血については, 赤血球数 (RBC), ヘマトクリット値 (Ht), ヘモグロビン濃度 (Hb), 網赤血球数 (Ret), 白血球数 (WBC), 白血球型別百分率を, 頸静脈血について血小板数 (Plt), プロトロンビン時間 (PT), 部分トロンボプラスチン時間 (PTT) を, また骨髓については顆粒球/赤芽球比 (G/E) をそれぞれ測定した。

d) 血液生化学的検査

頸動脈血から血清を分離し, グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT), アルカリ性フォスファターゼ (Al-P), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), トリグリセライド (TG), コリンエステラーゼ (CHE), ビリルビン (BIL), クレアチニン (CRE), 尿素窒素 (UN), 尿酸 (UA), グルコース (GLU), 総蛋白 (TP), アルブミン (ALB), 無機リン (P), コレステロール (CHO) (以上日立 716 型自動分析装置), Na^+ , K^+ (炎光光度計), Cl^- (クロライドカウンター) および Ca^{++} (原子吸光度計) を測定した。

3) 病理学的検査

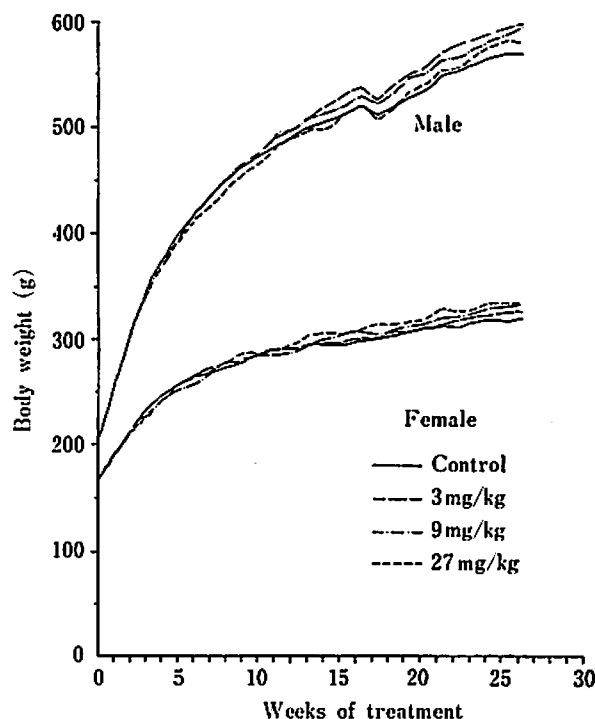


Fig. 2 Body weight curves of rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

a) 剖検および臓器重量の測定

屠殺後各動物を剖検するとともに、脳、心、脾、肺、肝、腎、精巣、卵巣、胸腺、下垂体、甲状腺および副腎を摘出し、重量を測定した。

b) 病理組織学的検査

重量測定臓器に加えて、胸大動脈、大腿骨骨髓、腸間膜リンパ節、唾液腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、脾、膀胱、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、乳腺、大腿骨、胸部脊椎、眼球、ハーダー氏腺および投与局所を摘出し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定したのち、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的に検索した。なお、腎についてはPAS染色を併用した。

5 統計解析

計量的検査値については、平均値±標準誤差を算出し、対照群と投薬群間の平均値の差の有

意性を Student の *t* 検定により解析した。

II 実験成績

1 一般観察

1) 一般症状

各投薬群の雌雄ともに投薬に基づく一般症状の変化は認められなかった。

脱毛が各群の少数例にみられ、その他に血尿などが観察されたがいずれも用量相関性がなく偶発的な変化とみなされた。

なお、対照群、投薬群を通じて大部分の例に流行性唾液腺炎の感染による下顎部の腫脹、眼周囲の腫脹が投与17週ごろに観察されたが投与19週にはこれらの症状は消失した。

2) 体重 (Fig. 2)

各投薬群の雌雄ともに、投与期間中対照群と同等の推移を示した。

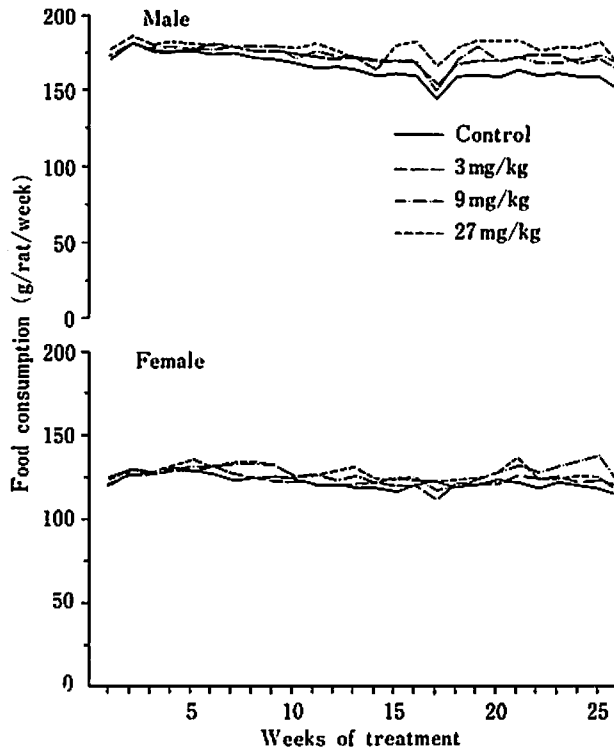


Fig. 3 Food consumption in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

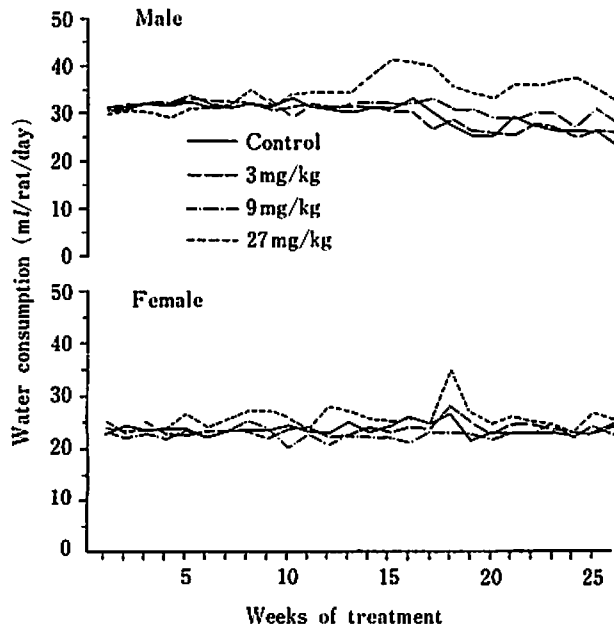


Fig. 4 Water consumption in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Table 1 Electrocardiography data in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Sex	Weeks	H.R. (B/min)		PQ (msec)		QT (msec)		QRS (msec)	
		Control	27 mg/kg	Control	27 mg/kg	Control	27 mg/kg	Control	27 mg/kg
Male	0	443±13	436±20	40.6±1.1	38.3±0.9	52.2±2.3	57.1±2.0	19.1±1.3	18.8±0.7
	4	409±22	475±16*	42.5±1.8	38.9±1.0	53.2±2.1	51.0±1.7	18.5±0.5	19.8±0.3
	13	453±18	486±18	40.8±1.7	39.0±1.4	48.4±1.5	58.0±1.7*	19.9±0.5	21.3±0.5
	26	431±27	432±24	43.0±1.3	40.3±1.5	54.9±1.4	51.6±2.0	18.4±0.8	20.5±0.8
Female	0	461±16	507±5*	41.3±0.5	37.8±0.8*	52.5±1.8	50.2±2.0	18.0±0.9	17.0±0.9
	4	484±16	510±12	40.8±1.8	35.3±1.4*	49.6±2.1	49.6±2.4	18.2±0.6	19.8±0.9
	13	495±26	492±11	38.1±1.0	38.6±0.5	50.2±0.7	52.5±2.0	20.4±0.9	20.4±0.8
	26	488±15	494±17	40.3±0.9	38.9±1.8	53.1±3.0	53.0±1.3	19.4±0.8	20.4±0.8

Each values represents mean and S.E. from 4 or 5 rats

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

3) 摂餌量および飲水量 (Fig. 3, 4)

摂餌量は、各投薬群の雌雄ともに、投薬期間中対照群と同等の推移を示した。

飲水量は、27 mg/kg 群の雄で投与15週ごろより投与期間終了時まで対照群と比較して30%前後の摂取量の増加が認められた。その他の投薬群は、対照群と同等の水摂取を示した。

2 臨床検査

1) 眼、聴覚および心電図検査 (Table 1)

眼および聴覚検査では、投薬に関連する変化は認められなかった。心電図検査では、心拍数、PQ および QT 間隔に軽度の変動がみられたが、投薬期間を通じて一定した傾向が認められず、また、いずれも正常範囲内のものであった。

2) 尿検査 (Table 2~5)

尿量の増加が投与26週の 27 mg/kg 群の雄に認められた。ほかにも、投与13および26週の各投薬群に対照群との間に有意差を示す項目が認められたが、いずれも軽度かまたは用量相関性がなかった。また、潜血反応陽性例が各群に観察されたが、これは尾の注射部位よりの出血かまたは尾に付着した血液による影響と考えられた。

3) 血液学的検査 (Table 6~9)

9 および 27 mg/kg 群に対照群と比較して有

意差を示す項目が散見されたが、いずれも正常範囲内の軽度な変化であり、用量または投薬期間に相関したものではなかった。

4) 血液生化学的検査 (Table 10~13)

各投薬群とも対照群との間に有意差を示す項目が散見されたが、いずれも正常範囲内の軽度な変化であった。

3 病理学的検査

1) 臓器重量 (Table 14~17)

3 および 9 mg/kg 群に、対照群と比較して有意な差を示す項目が散見されたが、いずれも用量相関性がなかった。

2) 病理学的所見 (Table 18~21)

13週屠殺例では投薬に関連すると思われる変化はみられなかった。

26週屠殺例では、27 mg/kg 群の雄の腎に投薬に関連すると思われる変化が認められた。すなわち、27 mg/kg 群の雄では、近位尿細管において上皮の変性、基底膜の肥厚および腔の拡張が、対照群に比して頻度の増加および程度の増強傾向を示した (Photo. 1, 2)。ほかに、心、肺、肝、脾、腎、膀胱、前立腺、甲状腺、乳腺、ハーダー氏腺、腸間膜、腹腔内脂肪組織、皮下、尾部の変化が認められたが、いずれも発生頻度に用量相関性がなく、加齢性ないし偶発性の病変または長期静注に伴う変化 (肺、

Table 2 Urinalysis data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
Volume (ml/h)	0.62 ± 0.10 ^{a)}	0.63 ± 0.08	0.71 ± 0.08	0.77 ± 0.07
Na ⁺ (μEq/h)	93 ± 5	89 ± 5	92 ± 8	94 ± 3
K ⁺ (μEq/h)	113 ± 6	126 ± 7	128 ± 12	120 ± 9
Cl ⁻ (μEq/h)	92 ± 6	93 ± 3	94 ± 7	95 ± 5
pH ^{b)}	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.2	7.1 ± 0.4	6.4 ± 0.2
Protein ^{b)}	+(5)	±(3), +(2)	±(1), +(4)	±(5)
Glucose ^{b)}	-(5)	-(5)	-(5)	-(5)
Ketones ^{b)}	-(5)	-(5)	-(5)	-(5)
Urobilinogen ^{b)}	±(5)	±(5)	±(5)	±(5)
Occult blood ^{b)}	+(4), ++(1)	-(2), +(3)	-(2), +(3)	-(2), +(3)
E	0(1), 1(4)	0(3), 1(2)	1(5)	0(1), 1(2), 2(2)
L	0(2), 1(3)	0(3), 1(2)	0(3), 1(2)	0(2), 1(3)
Sediments ^{c)} R	0(2), 1(2), 3(1)	0(4), 2(1)	0(3), 1(2)	0(3), 1(2)
O	0(2), 1(1), 3(2)	0(5)	0(2), 1(2), 2(1)	0(1), 1(2), 3(2)
C	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)

a) : Mean ± S.E. b) : Urolabstix unit c) : Score (0 : Signifies none observed, 1 : Signifies few in some fields, 2 : Signifies few in all fields, 3 : Signifies many in all fields) E : Epithelial cells L : Leucocytes R : Erythrocytes O : Organisms C : Casts () : No. of rats showing changes

Table 3 Urinalysis data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
Volume (ml/h)	0.48 ± 0.10 ^{a)}	0.39 ± 0.06	0.45 ± 0.04	0.47 ± 0.04
Na ⁺ (μEq/h)	63 ± 5	52 ± 6	46 ± 5*	62 ± 6
K ⁺ (μEq/h)	87 ± 6	78 ± 7	62 ± 10	92 ± 5
Cl ⁻ (μEq/h)	63 ± 6	56 ± 5	46 ± 5	65 ± 5
pH ^{b)}	6.7 ± 0.2	6.8 ± 0.2	7.2 ± 0.3	6.4 ± 0.2
Protein ^{b)}	±(5)	±(5)	±(4), +(1)	±(4), ++(1)
Glucose ^{b)}	-(5)	-(5)	-(5)	-(5)
Ketones ^{b)}	-(5)	-(5)	-(5)	-(5)
Urobilinogen ^{b)}	±(5)	±(5)	±(5)	±(5)
Occult blood ^{b)}	+(3), ++(2)	-(2), +(1), ++(2)	-(4), +(1)	-(4), +(1)
E	0(2), 1(3)	0(2), 1(3)	0(3), 1(2)	1(5)
L	0(3), 1(2)	0(3), 1(2)	0(4), 1(1)	0(4), 1(1)
Sediments ^{c)} R	0(2), 1(2), 3(1)	0(5)	0(3), 1(2)	0(5)
O	0(3), 1(2)	0(4), 1(1)	0(5)	0(4), 1(1)
C	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)

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

a) : Mean ± S.E. b) : Urolabstix unit c) : Score (0 : Signifies none observed, 1 : Signifies few in some fields, 2 : Signifies few in all fields, 3 : Signifies many in all fields) E : Epithelial cells, L : Leucocytes R : Erythrocytes O : Organisms C : Casts () : No. of rats showing changes

Table 4 Urinalysis data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals	10	10	10	10
Volume (ml/h)	0.52±0.05 ^{a)}	0.57±0.05	0.58±0.04	0.76±0.04*
Na ⁺ (μEq/h)	68±4	68±5	67±4	66±3
K ⁺ (μEq/h)	100±6	103±4	106±3	111±5
Cl ⁻ (μEq/h)	78±5	82±3	75±4	74±5
pH ^{b)}	7.3±0.2	7.2±0.2	7.1±0.2	6.6±0.1*
Protein ^{b)}	±(4), +(4), ‡(2)	±(1), +(8), ‡(1)	±(3), +(5), ‡(1), ‡(1)	±(4), +(6)
Glucose ^{b)}	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Ketones ^{b)}	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Urobilinogen ^{b)}	±(10)	±(10)	±(10)	±(10)
Occult blood ^{b)}	-(4), +(6)	-(1), +(6), ‡(2), ‡(1)	-(4), +(4), ‡(2)	-(4), +(4), ‡(1), ‡(1)
E	0(2), 1(6), 2(2)	0(3), 1(5), 2(2)	0(4), 1(5), 2(1)	0(1), 1(4), 2(5)
L	0(9), 1(1)	0(9), 2(1)	0(7), 1(3)	0(5), 1(4), 2(1)
Sediments ^{c)} R	0(6), 1(4)	0(2), 1(4), 2(1), 3(3)	0(5), 1(3), 3(2)	0(4), 1(4), 3(2)
O	0(4), 2(6)	0(5), 1(3), 2(1), 3(1)	0(3), 1(2), 2(2), 3(3)	0(6), 2(3), 3(1)
C	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean ± S.E. ^{b)} : Urolabstix unit ^{c)} : Score
 (0 : Signifies none observed, 1 : Signifies few in some fields, 2 : Signifies few in all fields, 3 : Signifies many in all fields)
 E : Epithelial cells L : Leucocytes R : Erythrocytes O : Organisms C : Casts
 () : No. of rats showing changes

Table 6 Hematology data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.88±0.18 ^{a)}	7.89±0.26	7.62±0.27	7.36±0.18
Ht (%)	46.6±0.6	47.2±1.1	46.0±1.0	45.6±0.5
Hb (g/dl)	15.4±0.3	15.4±0.2	15.3±0.4	15.0±0.3
Rct (%)	1.3±0.2	1.5±0.1	0.8±0.1	1.3±0.2
WBC (10 ³ /mm ³)	6.2±0.5	6.7±0.8	6.6±0.8	8.1±2.1
N	10.0±3.6	8.6±1.4	19.3±4.4	14.5±3.8
L	88.3±3.7	87.8±2.0	77.6±4.8	82.0±4.2
Differential (%) E	1.2±0.3	1.6±0.4	1.7±0.4	2.1±0.5
B	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
M	0.5±0.2	2.0±0.7	1.4±0.4	1.4±0.4
G/E	1.09±0.07	0.83±0.10	0.87±0.10	1.01±0.11
Plt (10 ³ /mm ³)	0.86±0.04	0.80±0.03	0.91±0.04	0.90±0.05
PT (sec)	10.1±0.1	10.1±0.2	10.4±0.2	10.2±0.3
PTT (sec)	27.0±2.0	26.4±1.8	25.0±1.9	26.5±3.7

^{a)} : Mean ± S.E.

N : Neutrophils L : Lymphocytes E : Eosinophils B : Basophils M : Monocytes

Table 5 Urinalysis data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals	10	10	10	10
Volume (ml/h)	0.32 ± 0.07 ^{a)}	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.38 ± 0.05
Na ⁺ (μEq/h)	31 ± 4	41 ± 2	40 ± 3	37 ± 4
K ⁺ (μEq/h)	53 ± 7	70 ± 3*	71 ± 7	69 ± 6
Cl ⁻ (μEq/h)	35 ± 4	47 ± 1*	50 ± 4*	42 ± 4
pH ^{b)}	7.0 ± 0.2	7.1 ± 0.3	6.8 ± 0.2	7.0 ± 0.2
Protein ^{b)}	-(1), ±(3), +(5), ++(1)	±(6), +(3), +++ (1)	±(8), +(1), +++ (1)	±(5), +(3), ++(1), +++(1)
Glucose ^{b)}	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Ketones ^{b)}	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Urobilinogen ^{b)}	±(10)	±(10)	±(10)	±(10)
Occult blood ^{b)}	-(8), +(1), ++(1)	-(9), +(1)	-(10)	-(9), +(1)
E	0(6), 1(3), 2(1)	0(5), 1(4), 2(1)	0(4), 1(6)	0(5), 1(5)
L	0(9), 2(1)	0(7), 1(3)	0(8), 1(2)	0(7), 1(3)
Sediments ^{c)} R	0(7), 1(1), 2(1), 3(1)	0(9), 1(1)	0(8), 1(1), 2(1)	0(6), 1(4)
O	0(6), 1(3), 2(1)	0(6), 1(2), 2(1), 3(1)	0(7), 1(2), 3(1)	0(7), 1(3)
C	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean ± S.E. ^{b)} : Urolabstix unit ^{c)} : Score
 (0 : Signifies none observed, 1 : Signifies few in some fields, 2 : Signifies few in all fields, 3 : Signifies many in all fields) E : Epithelial cells L : Leucocytes R : Erythrocytes O : Organisms
 C : Casts () : No. of rats showing changes

Table 7 Hematology data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
RBC (10 ⁶ /mm ³)	6.72 ± 0.14 ^{a)}	6.65 ± 0.15	6.60 ± 0.10	6.60 ± 0.09
Ht (%)	44.1 ± 0.6	42.3 ± 0.8	42.7 ± 0.8	42.5 ± 0.8
Hb (g/dl)	14.9 ± 0.2	14.2 ± 0.2	14.3 ± 0.3	14.3 ± 0.3
Ret (%)	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1
WBC (10 ³ /mm ³)	6.1 ± 0.5	7.8 ± 0.9	4.6 ± 0.6	6.9 ± 0.7
N	10.8 ± 1.3	15.7 ± 3.6	14.3 ± 4.7	13.1 ± 5.1
L	86.8 ± 1.7	82.3 ± 3.9	82.3 ± 5.1	84.5 ± 5.5
Differential (%) E	1.1 ± 0.2	1.6 ± 0.4	2.3 ± 0.3*	1.4 ± 0.3
B	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
M	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.4
G/E	0.92 ± 0.07	0.71 ± 0.07	0.75 ± 0.07	0.77 ± 0.14
Plt (10 ⁶ /mm ³)	0.79 ± 0.05	0.93 ± 0.06	0.86 ± 0.05	0.83 ± 0.06
PT (sec)	9.7 ± 0.2	9.8 ± 0.2	9.7 ± 0.6	9.7 ± 0.2
PTT (sec)	23.7 ± 1.0	26.0 ± 3.3	21.3 ± 1.6	18.9 ± 1.1*

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean ± S.E.
 N : Neutrophils L : Lymphocytes E : Eosinophils B : Basophils M : Monocytes

Table 8 Hematology data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals		10	10	10	10
RBC	($10^6/\text{mm}^3$)	7.98 ± 0.12^a	8.04 ± 0.12	8.07 ± 0.10	7.93 ± 0.17
Ht	(%)	45.5 ± 0.7	45.8 ± 0.8	45.7 ± 0.7	45.2 ± 1.0
Hb	(g/dl)	15.2 ± 0.2	15.3 ± 0.2	15.0 ± 0.2	15.1 ± 0.3
Ret	(%)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2
WBC	($10^3/\text{mm}^3$)	11.1 ± 1.4	10.2 ± 0.7	9.6 ± 0.4	11.0 ± 0.9
	N	18.4 ± 2.5	14.9 ± 1.7	15.6 ± 2.1	16.2 ± 1.9
	L	79.1 ± 2.8	82.6 ± 1.7	81.5 ± 2.4	81.4 ± 1.8
Differential (%)	E	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.3
	B	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.5
G/E		1.09 ± 0.09	1.08 ± 0.14	1.27 ± 0.08	1.29 ± 0.09
Plt	($10^5/\text{mm}^3$)	0.81 ± 0.03	0.88 ± 0.04	0.81 ± 0.03	0.79 ± 0.02
PT	(sec)	10.0 ± 0.1	10.0 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.0 ± 0.1
PTT	(sec)	28.1 ± 1.7	26.1 ± 1.1	26.6 ± 2.9	25.4 ± 1.3

^{a)} : Mean $\pm$ S.E.

N : Neutrophils

L : Lymphocytes

E : Eosinophils

B : Basophils

M : Monocytes

Table 10 Serum biochemistry data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
GOT	(IU/l)	104 ± 4^a	118 ± 6	114 ± 13	$131 \pm 5^*$
GPT	(IU/l)	22 ± 2	21 ± 2	28 ± 5	24 ± 1
Al-P	(KAU)	24.7 ± 3.4	24.7 ± 2.8	24.7 ± 2.4	18.4 ± 0.8
LAP	(IU/l)	64 ± 2	62 ± 3	61 ± 1	65 ± 2
TG	(mg/dl)	69 ± 7	72 ± 4	68 ± 3	77 ± 7
CHE	(Δ pH)	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.00	0.28 ± 0.01
BIL	(mg/dl)	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
CRE	(mg/dl)	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.45 ± 0.03
UN	(mg/dl)	19.5 ± 0.8	20.0 ± 0.5	19.7 ± 0.6	20.5 ± 1.0
UA	(mg/dl)	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1
GLU	(mg/dl)	191 ± 7	192 ± 7	197 ± 6	181 ± 5
TP	(g/dl)	5.52 ± 0.17	5.49 ± 0.09	5.54 ± 0.08	5.56 ± 0.09
ALB	(g/dl)	3.59 ± 0.13	3.63 ± 0.07	3.64 ± 0.03	3.66 ± 0.05
P	(mg/dl)	6.9 ± 0.3	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.2
CHO	(mg/dl)	46 ± 2	47 ± 3	44 ± 1	46 ± 3
A/G		1.87 ± 0.06	1.97 ± 0.08	1.93 ± 0.05	1.94 ± 0.10
Na ⁺	(mEq/l)	141 ± 0	141 ± 0	140 ± 0	140 ± 1
K ⁺	(mEq/l)	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.2
Cl ⁻	(mEq/l)	102 ± 1	102 ± 1	102 ± 1	103 ± 1
Ca ⁺⁺	(mEq/l)	4.34 ± 0.06	4.34 ± 0.03	4.31 ± 0.04	4.24 ± 0.03

* : Significant difference from control ($p < 0.05$)^{a)} : Mean $\pm$ S.E.

Table 9 Hematology data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals		10	10	10	10
RBC	($10^6/\text{mm}^3$)	6.90 ± 0.09^a	6.87 ± 0.08	7.06 ± 0.07	6.85 ± 0.06
Ht	(%)	41.6 ± 0.7	41.4 ± 0.8	42.6 ± 0.4	42.3 ± 0.5
Hb	(g/dl)	14.2 ± 0.2	14.1 ± 0.2	14.6 ± 0.1	14.3 ± 0.1
Ret	(%)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
WBC	($10^3/\text{mm}^3$)	7.8 ± 0.5	8.7 ± 0.6	9.3 ± 0.7	8.8 ± 0.5
	N	17.9 ± 2.4	15.5 ± 3.4	$11.8 \pm 0.8^*$	15.5 ± 3.2
	L	80.0 ± 2.7	81.4 ± 3.8	85.6 ± 0.8	82.2 ± 3.2
Differential (%)	E	1.7 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.3
	B	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.5 ± 0.2	1.4 ± 0.5	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.3
G/E		0.89 ± 0.09	0.77 ± 0.05	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.08
Plt	($10^6/\text{mm}^3$)	0.85 ± 0.02	0.84 ± 0.02	$0.79 \pm 0.02^*$	0.76 ± 0.04
PT	(sec)	9.3 ± 0.2	9.3 ± 0.2	9.4 ± 0.2	9.4 ± 0.2
PTT	(sec)	23.7 ± 1.1	25.5 ± 1.8	24.7 ± 0.9	23.5 ± 0.8

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean $\pm$ S.E.

N : Neutrophils L : Lymphocytes E : Eosinophils B : Basophils M : Monocytes

Table 11 Serum biochemistry data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
GOT	(IU/l)	120 ± 13^a	103 ± 6	114 ± 13	161 ± 31
GPT	(IU/l)	27 ± 3	26 ± 1	29 ± 5	38 ± 12
Al-P	(KAU)	19.4 ± 2.8	14.2 ± 1.6	14.1 ± 1.7	19.8 ± 3.8
LAP	(IU/l)	54 ± 1	55 ± 2	56 ± 1	53 ± 1
TG	(mg/dl)	66 ± 9	70 ± 17	70 ± 7	69 ± 10
CHE	(dpH)	0.81 ± 0.07	0.88 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.77 ± 0.09
BIL	(mg/dl)	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.18 ± 0.01
CRE	(mg/dl)	0.51 ± 0.03	0.48 ± 0.05	0.43 ± 0.03	0.51 ± 0.03
UN	(mg/dl)	23.7 ± 1.7	21.9 ± 2.2	21.0 ± 0.6	22.4 ± 1.0
UA	(mg/dl)	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.1
GLU	(mg/dl)	187 ± 8	179 ± 3	184 ± 9	184 ± 9
TP	(g/dl)	6.05 ± 0.10	6.22 ± 0.08	6.17 ± 0.18	5.98 ± 0.11
ALB	(g/dl)	4.01 ± 0.08	4.05 ± 0.11	4.19 ± 0.16	3.86 ± 0.07
P	(mg/dl)	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.3	5.2 ± 0.2
CHO	(mg/dl)	58 ± 4	58 ± 4	63 ± 6	64 ± 5
A/G		1.98 ± 0.09	1.89 ± 0.13	2.13 ± 0.12	1.82 ± 0.04
Na ⁺	(mEq/l)	139 ± 0	139 ± 0	138 ± 1	139 ± 1
K ⁺	(mEq/l)	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Cl ⁻	(mEq/l)	103 ± 1	103 ± 0	103 ± 1	103 ± 0
Ca ⁺⁺	(mEq/l)	4.36 ± 0.08	4.42 ± 0.07	4.41 ± 0.09	4.35 ± 0.08

^{a)} : Mean $\pm$ S.E.

Table 12 Serum biochemistry data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals		10	10	10	10
GOT	(IU/l)	138 ± 12 ^{a)}	122 ± 10	116 ± 9	117 ± 4
GPT	(IU/l)	47 ± 3	37 ± 3*	38 ± 1*	41 ± 2
Al-P	(KAU)	20.4 ± 2.3	21.0 ± 1.6	18.8 ± 1.2	21.3 ± 1.6
LAP	(IU/l)	65 ± 1	66 ± 2	62 ± 2	62 ± 2
TG	(mg/dl)	87 ± 7	94 ± 7	90 ± 8	77 ± 4
CHE	(ΔpH)	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01
BIL	(mg/dl)	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00
CRE	(mg/dl)	0.48 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.44 ± 0.03
UN	(mg/dl)	19.5 ± 0.8	19.1 ± 0.7	18.6 ± 0.4	20.3 ± 0.6
UA	(mg/dl)	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2
GLU	(mg/dl)	193 ± 8	189 ± 8	188 ± 6	191 ± 2
TP	(g/dl)	5.74 ± 0.06	5.95 ± 0.07*	5.88 ± 0.07	5.60 ± 0.11
ALB	(g/dl)	3.29 ± 0.03	3.37 ± 0.04	3.34 ± 0.05	3.24 ± 0.07
P	(mg/dl)	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1
CHO	(mg/dl)	51 ± 3	50 ± 3	51 ± 4	46 ± 3
A/G		1.34 ± 0.03	1.31 ± 0.03	1.32 ± 0.03	1.39 ± 0.04
Na ⁺	(mEq/l)	134 ± 1	134 ± 1	133 ± 1	134 ± 1
K ⁺	(mEq/l)	5.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.2 ± 0.2
Cl ⁻	(mEq/l)	100 ± 1	100 ± 1	98 ± 2	99 ± 1
Ca ⁺⁺	(mEq/l)	4.69 ± 0.07	4.75 ± 0.07	4.59 ± 0.14	4.58 ± 0.09

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean ± S.E.**Table 13** Serum biochemistry data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of animals		10	10	10	10
GOT	(IU/l)	215 ± 52 ^{a)}	171 ± 25	150 ± 19	160 ± 24
GPT	(IU/l)	68 ± 12	56 ± 6	60 ± 8	56 ± 7
Al-P	(KAU)	12.4 ± 1.1	14.1 ± 1.7	14.9 ± 1.7	17.8 ± 2.0*
LAP	(IU/l)	58 ± 2	53 ± 2	57 ± 2	59 ± 2
TG	(mg/dl)	60 ± 7	79 ± 6	74 ± 10	64 ± 10
CHE	(ΔpH)	0.89 ± 0.06	0.95 ± 0.05	1.00 ± 0.07	0.97 ± 0.06
BIL	(mg/dl)	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
CRE	(mg/dl)	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.47 ± 0.02
UN	(mg/dl)	22.0 ± 1.0	22.0 ± 0.5	21.7 ± 0.7	20.5 ± 1.0
UA	(mg/dl)	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1
GLU	(mg/dl)	173 ± 5	179 ± 6	177 ± 4	180 ± 6
TP	(g/dl)	6.63 ± 0.15	6.80 ± 0.12	6.47 ± 0.13	6.45 ± 0.13
ALB	(g/dl)	3.72 ± 0.09	3.84 ± 0.07	3.69 ± 0.08	3.67 ± 0.07

Table 13 Continued

Group		Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
P	(mg/dl)	4.5±0.2	4.9±0.1	4.9±0.2	4.6±0.1
CHO	(mg/dl)	70±7	66±5	56±3	70±6
A/G		1.28±0.03	1.30±0.02	1.33±0.03	1.32±0.03
Na ⁺	(mEq/l)	135±1	135±1	135±0	136±1
K ⁺	(mEq/l)	4.6±0.2	4.6±0.2	4.8±0.2	4.7±0.2
Cl ⁻	(mEq/l)	99±1	100±1	101±1	99±1
Ca ⁺⁺	(mEq/l)	4.95±0.04	5.01±0.04	4.89±0.11	4.86±0.10

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean ± S.E.

Table 14 Organ weight data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of rats	5	5	5	5
Body weight (g)	508.4 ± 14.9 ^{a)}	507.4 ± 11.9	510.0 ± 7.7	503.0 ± 11.7
Brain (g)	2.14 ± 0.07	2.12 ± 0.01	2.13 ± 0.03	2.13 ± 0.03
(g/100 g b.w.)	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01
Heart (g)	1.57 ± 0.06	1.58 ± 0.06	1.59 ± 0.07	1.55 ± 0.08
(g/100 g b.w.)	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02
Spleen (g)	0.78 ± 0.02	0.82 ± 0.04	0.82 ± 0.03	0.72 ± 0.03
(g/100 g b.w.)	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Lung (g)	1.38 ± 0.03	1.32 ± 0.07	1.36 ± 0.04	1.38 ± 0.07
(g/100 g b.w.)	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Liver (g)	14.38 ± 0.51	15.57 ± 0.39	14.56 ± 0.24	14.66 ± 0.32
(g/100 g b.w.)	2.83 ± 0.06	3.08 ± 0.11	2.85 ± 0.02	2.92 ± 0.05
Kidney (g)	3.01 ± 0.11	3.19 ± 0.08	3.05 ± 0.09	3.17 ± 0.14
(g/100 g b.w.)	0.59 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.60 ± 0.01	0.63 ± 0.03
Testis (g)	3.40 ± 0.13	3.60 ± 0.05	3.55 ± 0.08	3.32 ± 0.32
(g/100 g b.w.)	0.67 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.70 ± 0.02	0.66 ± 0.06
Thymus (mg)	321.94 ± 25.14	358.82 ± 33.32	335.44 ± 39.52	344.58 ± 24.87
(mg/100 g b.w.)	63.34 ± 4.59	70.03 ± 5.08	65.78 ± 7.72	68.77 ± 5.58
Hypophysis (mg)	13.68 ± 0.58	12.56 ± 0.53	13.60 ± 0.20	13.12 ± 1.07
(mg/100 g b.w.)	2.69 ± 0.06	2.48 ± 0.13	2.67 ± 0.01	2.60 ± 0.16
Thyroid (mg)	28.24 ± 2.01	30.08 ± 2.62	27.26 ± 1.45	27.76 ± 2.43
(mg/100 g b.w.)	5.58 ± 0.44	5.90 ± 0.38	5.36 ± 0.34	5.55 ± 0.56
Adrenal (mg)	66.20 ± 3.41	56.64 ± 0.93	60.62 ± 2.48	68.60 ± 3.73
(mg/100 g b.w.)	13.03 ± 0.57	11.18 ± 0.22*	11.90 ± 0.54	13.65 ± 0.73

* : Significant difference from control ($p < 0.05$) ^{a)} : Mean ± S.E.

Table 15 Organ weight data in female rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of rats	5	5	5	5
Body weight (g)	299.6 ± 12.3 ^{a)}	301.0 ± 9.5	293.4 ± 8.8	304.8 ± 9.2
Brain (g)	2.06 ± 0.07	2.01 ± 0.05	1.95 ± 0.03	1.98 ± 0.03
(g/100 g b.w.)	0.69 ± 0.04	0.67 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.65 ± 0.01
Heart (g)	1.04 ± 0.05	1.00 ± 0.02	1.02 ± 0.05	1.09 ± 0.04
(g/100 g b.w.)	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01
Spleen (g)	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.63 ± 0.03
(g/100 g b.w.)	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Lung (g)	1.13 ± 0.05	1.15 ± 0.04	1.09 ± 0.03	1.17 ± 0.05
(g/100 g b.w.)	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01
Liver (g)	9.47 ± 0.58	9.22 ± 0.36	9.78 ± 0.52	9.87 ± 0.47
(g/100 g b.w.)	3.15 ± 0.10	3.06 ± 0.06	3.34 ± 0.16	3.23 ± 0.08
Kidney (g)	1.98 ± 0.13	1.95 ± 0.05	1.97 ± 0.06	2.03 ± 0.11
(g/100 g b.w.)	0.66 ± 0.03	0.65 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.66 ± 0.02
Ovary (mg)	90.42 ± 6.12	93.08 ± 3.96	99.22 ± 4.39	92.44 ± 6.76
(mg/100 g b.w.)	30.14 ± 1.53	30.90 ± 0.76	33.99 ± 2.00	30.24 ± 1.73
Thymus (mg)	336.66 ± 21.45	311.96 ± 28.99	287.62 ± 22.95	345.70 ± 44.28
(mg/100 g b.w.)	112.37 ± 5.82	104.97 ± 11.93	98.36 ± 8.21	112.39 ± 11.70
Hypophysis (mg)	20.26 ± 0.63	21.46 ± 1.21	18.14 ± 1.10	17.62 ± 0.97
(mg/100 g b.w.)	6.81 ± 0.16	7.18 ± 0.57	6.19 ± 0.37	5.81 ± 0.38
Thyroid (mg)	23.40 ± 1.46	25.56 ± 0.88	22.94 ± 0.98	25.54 ± 1.50
(mg/100 g b.w.)	7.80 ± 0.28	8.56 ± 0.55	7.88 ± 0.54	8.38 ± 0.44
Adrenal (mg)	69.80 ± 2.40	74.82 ± 2.91	75.64 ± 4.34	80.42 ± 4.58
(mg/100 g b.w.)	23.44 ± 1.24	24.87 ± 0.66	25.83 ± 1.44	26.35 ± 1.10

^{a)} : Mean ± S.E.

Table 16 Organ weight data in male rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of rats	10	10	10	10
Body weight (g)	570.7 ± 22.7 ^{a)}	597.1 ± 25.3	596.4 ± 15.8	578.1 ± 13.5
Brain (g)	2.20 ± 0.02	2.19 ± 0.03	2.18 ± 0.02	2.21 ± 0.03
(g/100 g b.w.)	0.39 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01
Heart (g)	1.66 ± 0.04	1.74 ± 0.07	1.74 ± 0.06	1.66 ± 0.04
(g/100 g b.w.)	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Spleen (g)	0.87 ± 0.04	0.87 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.96 ± 0.05
(g/100 g b.w.)	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Lung (g)	1.51 ± 0.04	1.57 ± 0.04	1.57 ± 0.05	1.56 ± 0.05
(g/100 g b.w.)	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Liver (g)	15.37 ± 0.64	16.63 ± 0.81	16.92 ± 0.53	15.98 ± 0.43
(g/100 g b.w.)	2.70 ± 0.05	2.78 ± 0.03	2.84 ± 0.08	2.76 ± 0.05

Table 16 Continued

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
Kidney (g)	3.31 ± 0.09	3.54 ± 0.15	3.38 ± 0.10	3.43 ± 0.08
(g/100 g b.w.)	0.58 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.57 ± 0.02	0.60 ± 0.01
Testis (g)	3.61 ± 0.13	3.76 ± 0.12	3.69 ± 0.09	3.55 ± 0.10
(g/100 g b.w.)	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.62 ± 0.02
Thymus (mg)	262.17 ± 18.55	262.15 ± 36.40	297.88 ± 26.27	314.71 ± 38.67
(mg/100 g b.w.)	47.28 ± 4.36	43.82 ± 5.85	49.53 ± 3.50	54.28 ± 6.44
Hypophysis (mg)	14.31 ± 0.63	14.31 ± 0.60	14.44 ± 0.74	14.05 ± 0.69
(mg/100 g b.w.)	2.53 ± 0.13	2.43 ± 0.11	2.42 ± 0.10	2.44 ± 0.14
Thyroid (mg)	30.69 ± 2.49	34.47 ± 2.17	34.93 ± 1.72	33.19 ± 1.60
(mg/100 g b.w.)	5.42 ± 0.48	5.76 ± 0.24	5.89 ± 0.30	5.78 ± 0.32
Adrenal (mg)	63.31 ± 2.24	67.23 ± 2.64	62.39 ± 3.14	64.52 ± 2.74
(mg/100 g b.w.)	11.19 ± 0.45	11.31 ± 0.30	10.49 ± 0.50	11.20 ± 0.50

a) : Mean ± S.E.

Table 17 Organ weight data in female rats treated intravenously with argipidine(MD-805)for 26 weeks

Group	Control	3 mg/kg	9 mg/kg	27 mg/kg
No. of rats	10	10	10	10
Body weight (g)	319.2 ± 7.5 ^{a)}	326.3 ± 9.7	334.3 ± 8.5	337.2 ± 8.2
Brain (g)	1.96 ± 0.03	2.00 ± 0.03	2.03 ± 0.02	2.01 ± 0.02
(g/100 g b.w.)	0.62 ± 0.01	0.62 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.60 ± 0.02
Heart (g)	1.09 ± 0.03	1.09 ± 0.03	1.11 ± 0.02	1.14 ± 0.02
(g/100 g b.w.)	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Spleen (g)	0.57 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.61 ± 0.01
(g/100 g b.w.)	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Lung (g)	1.17 ± 0.03	1.20 ± 0.03	1.21 ± 0.03	1.23 ± 0.02
(g/100 g b.w.)	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.01
Liver (g)	9.34 ± 0.25	10.14 ± 0.47	10.13 ± 0.35	10.16 ± 0.33
(g/100 g b.w.)	2.93 ± 0.06	3.10 ± 0.08	3.03 ± 0.06	3.02 ± 0.09
Kidney (g)	2.07 ± 0.06	2.12 ± 0.07	2.15 ± 0.07	2.17 ± 0.03
(g/100 g b.w.)	0.65 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.01	0.64 ± 0.01
Ovary (mg)	85.50 ± 8.75	82.27 ± 7.02	89.44 ± 8.50	85.84 ± 7.49
(mg/100 g b.w.)	26.69 ± 2.55	25.29 ± 2.15	26.96 ± 2.72	25.38 ± 2.02
Thymus (mg)	204.70 ± 18.96	224.22 ± 20.23	244.75 ± 25.45	212.40 ± 16.01
(mg/100 g b.w.)	64.01 ± 5.63	68.86 ± 5.95	73.23 ± 7.67	63.16 ± 4.87
Hypophysis (mg)	26.82 ± 2.23	21.63 ± 2.31	22.04 ± 1.69	22.73 ± 1.60
(mg/100 g b.w.)	8.44 ± 0.76	6.65 ± 0.76	6.58 ± 0.47	6.80 ± 0.54
Thyroid (mg)	24.63 ± 1.23	24.68 ± 1.83	28.45 ± 1.34*	27.39 ± 1.54
(mg/100 g b.w.)	7.72 ± 0.34	7.51 ± 0.43	8.51 ± 0.34	8.17 ± 0.52
Adrenal (mg)	70.74 ± 2.48	77.71 ± 3.76	85.80 ± 3.25*	81.22 ± 4.44
(mg/100 g b.w.)	22.24 ± 0.81	23.85 ± 0.93	25.70 ± 0.87*	24.21 ± 1.46

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

a) : Mean ± S.E.

Table 18 Macroscopic findings in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose(mg/kg)	0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats	5	5	5	5	5	5	5	5
Lung: Grey-white spots		0	0	0	0	$\frac{1}{(0.2)^*}$	0	0	0
: Red spots		0	0	0	0	$\frac{1}{(0.2)}$	0	0	0
Liver: Dent foci		$\frac{1}{(0.2)}$	0	0	0	0	0	0	0
Kidney: Pyelectasia (Unilateral)		$\frac{1}{(0.2)}$	0	0	0	0	0	0	0
Testis: Atrophy (Unilateral)		0	0	$\frac{1}{(0.2)}$	$\frac{1}{(0.2)}$	/	/	/	/
Abdominal adipose tissue: Yellow nodule		$\frac{1}{(0.2)}$	$\frac{1}{(0.2)}$	$\frac{2}{(0.4)}$	$\frac{1}{(0.2)}$	0	0	0	0
Subcutis: Hemorrhage		0	0	0	0	0	0	0	$\frac{1}{(0.2)}$
Uterus: Hydrometra		/	/	/	/	0	0	$\frac{1}{(0.2)}$	$\frac{1}{(0.2)}$

*: Mean pathological score (Total score/No. of rats) Score (0.5 : Very slight, 1 : Slight, 2 : Moderate, 3 : Severe)

Table 19 Macroscopic findings in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose(mg/kg)	0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats	10	10	10	10	10	10	10	10
Thymus: Atrophy		0	0	0	$\frac{1}{(0.1)^*}$	0	0	0	0
: Red spots		0	0	0	0	0	$\frac{1}{(0.1)}$	0	$\frac{1}{(0.1)}$
: Milk-white foci		0	0	0	0	0	0	$\frac{1}{(0.1)}$	0
Mesenteric lympho-node: Enlargement		0	0	0	0	$\frac{1}{(0.1)}$	0	0	0
Lung: Transparent foci		$\frac{1}{(0.1)}$	0	0	0	0	0	0	0
: Red-brown foci		0	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{1}{(0.1)}$	0	0	0	0	0
: Dark-red foci		0	0	0	0	0	0	$\frac{1}{(0.1)}$	0
Liver: White spot		0	0	0	$\frac{1}{(0.1)}$	0	0	0	0

Table 19 Continued

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose(mg/kg)	0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats	10	10	10	10	10	10	10	10
Liver: Discoloration		1 (0.1)	0	1 (0.1)	0	0	0	2 (0.2)	0
Caecum: Thickening of wall		0	0	0	0	1 (0.1)	0	0	0
Kidney: Pyelectasia (Unilateral)		0	2 (0.4)	2 (0.2)	0	1 (0.1)	0	0	0
Kidney: Dent foci		0	0	0	0	0	1 (0.1)	0	0
: Granular surface		0	0	0	1 (0.2)	0	0	0	0
Urinary bladder: Thickening of wall and red spots with calculus		0	0	0	0	1 (0.2)	0	0	0
Ovary: Cyst		/	/	/	/	0	0	1 (0.1)	0
Mammary: Milk-white mass		0	0	0	0	1 (0.1)	0	0	0
: Brownish		0	1 (0.1)	0	0	1 (0.1)	0	0	0
Adrenal: Milk-white spots		0	0	0	0	1 (0.1)	0	0	0
: Brown spots		0	0	0	0	1 (0.1)	1 (0.1)	0	0
: Swelling		0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
Pituitary: Enlargement		0	0	0	0	0	1 (0.1)	0	0
Harderian gland: Dark-brown foci		3 (0.3)	3 (0.5)	3 (0.3)	3 (0.3)	4 (0.5)	4 (0.4)	3 (0.3)	4 (0.4)
: Swelling		0	0	0	0	0	1 (0.1)	0	0
Skin: Falling out of hair		0	0	0	0	1 (0.1)	1 (0.1)	0	0
Subcutis: Hemorrhage		0	0	0	0	0	0	0	0
: Grey-brown nodule		0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
Abdominal adipose tissue: Yellow nodule		1 (0.1)	4 (0.5)	1 (0.1)	1 (0.1)	0	0	0	0
Abdominal muscle: Hemorrhage		0	0	0	0	0	0	1 (0.1)	0

*: Mean pathological score (Total score/No. of rats) Score (0.5 : Very slight, 1 : Slight, 2 : Moderate, 3 : Severe)

Table 20 Microscopic findings in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 13 weeks

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose(mg/kg)	0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats	5	5	5	5	5	5	5	5
Heart: Focal myocarditis		0	—	—	$\frac{1}{(0.1)*}$	0	—	—	$\frac{1}{(0.1)}$
: Small round cell infiltration		$\frac{1}{(0.1)}$	—	—	$\frac{1}{(0.1)}$	0	—	—	0
Lung: Granuloma		$\frac{1}{(0.1)}$	—	—	$\frac{2}{(0.3)}$	$\frac{3}{(0.4)}$	—	—	0
: Appearance of foamy cells		$\frac{1}{(0.2)}$	—	—	$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	—	—	0
: Calcification of vessel wall		0	—	—	0	0	—	—	0
: Focal pleuritis		0	—	—	0	0	—	—	0
Liver: Innerlobular or periportal cell accumulation		$\frac{5}{(0.5)}$	—	—	$\frac{5}{(0.5)}$	$\frac{5}{(0.8)}$	—	—	$\frac{5}{(0.5)}$
: Calcification of vessel wall		$\frac{1}{(0.2)}$	—	—	0	0	—	—	0
: Cholangiofibrosis		$\frac{1}{(0.1)}$	—	—	0	0	—	—	0
: Cytoplasmic vacuolated liver cell foci		0	—	—	0	0	—	—	0
: Granuloma		0	—	—	0	0	—	—	0
Pancreas: Interstitial round cell accumulation		$\frac{4}{(0.4)}$	—	—	$\frac{3}{(0.3)}$	$\frac{5}{(0.5)}$	—	—	$\frac{3}{(0.3)}$
: Deposition of yellow pigment		0	—	—	0	0	—	—	0
: Acinar atrophy and fibrosis		0	—	—	0	0	—	—	0
: Focal inflammation		$\frac{1}{(0.2)}$	—	—	0	0	—	—	$\frac{1}{(0.2)}$
Kidney: Interstitial round cell infiltration		$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{3}{(0.3)}$	0	$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{1}{(0.1)}$
: Degeneration of proximal tubular epithelium		$\frac{4}{(0.4)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{4}{(0.6)}$	0	$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{3}{(0.3)}$
: Dilatation of tubular lumen		0	0	0	$\frac{3}{(0.3)}$	0	0	0	$\frac{2}{(0.2)}$
: Thickening of proximal tubular basement membrane		$\frac{4}{(0.4)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	0	$\frac{4}{(0.5)}$	0	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{2}{(0.2)}$
: Thickening of glomerular basement membrane		0	$\frac{1}{(0.1)}$	0	$\frac{2}{(0.2)}$	0	$\frac{2}{(0.2)}$	0	$\frac{1}{(0.1)}$
: Thickening of basement membrane of Bowman's capsule		$\frac{1}{(0.1)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{2}{(0.2)}$	$\frac{4}{(0.4)}$	0	$\frac{1}{(0.1)}$	0	0

Table 20 Continued

Findings	Sex		Male				Female			
	Dose(mg/kg)		0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats		5	5	5	5	5	5	5	5
Kidney: Deposition of PAS positive material in glomerular tuft			3 (0.3)	5 (0.5)	3 (0.3)	5 (0.5)	1 (0.1)	0	0	0
: Calcification of tubulus			0	0	0	0	0	0	0	0
: Eosinophilic body			0	0	0	0	0	0	0	0
: Hyaline cast			0	0	1 (0.1)	1 (0.1)	0	0	0	0
Urinary bladder: Cystitis			0	—	—	0	0	—	—	0
Prostate: Chronic inflammation			4 (1.0)	—	—	3 (0.6)	/	/	/	/
Thyroid: Ultimobranchial rest			0	—	—	0	1 (0.1)	—	—	0
Mammary: Adenocarcinoma			0	—	—	0	0	—	—	0
Harderian gland: Inflammation			0	—	—	0	0	—	—	0
Mesentery: Granuloma			0	—	—	0	0	—	—	1 (0.4)
Abdominal adipose tissue: Focal necrosis			0	—	—	0	0	—	—	0
Subcutis: Hemorrhage			0	—	—	0	0	—	—	1 (0.4)
Tail: Hemorrhage			0	—	—	2 (0.4)	3 (0.5)	—	—	1 (0.2)

*: Mean pathological score (Total score/No. of rats) Score (0.5: Very slight, 1: Slight, 2: Moderate, 3: Severe) —: Not examined histopathologically

肝、腸間膜の肉芽腫)とみなされた。

III 総括および考察

抗血拴薬 argipidine (MD-805) の 3, 9, 27 mg/kg をラットに 26 週間連続静脈内投与し、慢性毒性を検討した。

一般症状では、対照群、各投薬群を通じて流行性唾液腺炎の感染による下顎部の腫脹、眼周囲の腫脹が観察され、ほかに、脱毛血尿などがみられたが、いずれも発生頻度に用量相関性がなく偶発的な変化と考えられた。

体重、摂餌量および飲水量では、27 mg/kg 群の雄に 15 週ごろより飲水量の増加がみられたのみで、体重推移および摂餌量は各投薬群とも対照群と同様であった。

眼検査、聴覚検査および心電図検査では投薬に起因すると思われる変化はみられなかった。

尿検査では尿量の増加が 27 mg/kg 群の雄に観察された。argipidine は一般薬理において利尿作用はみられておらず、腎機能障害を示唆するような血清生化学値の変化もみられず、また、尿電解質排泄量にも変化はみられず、飲水

Table 21 Microscopic findings in rats treated intravenously with argipidine (MD-805) for 26 weeks

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose(mg/kg)	0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats	10	10	10	10	10	10	10	10
Heart: Focal myocarditis		2 (0.1)*	—	—	3 (0.2)	1 (0.1)	—	—	1 (0.1)
: Small round cell infiltration		0	—	—	0	0	—	—	0
Lung: Granuloma		7 (0.7)	—	—	4 (0.4)	3 (0.2)	—	—	5 (0.3)
: Appearance of foamy cells		3 (0.2)	—	—	3 (0.2)	3 (0.2)	—	—	0
: Calcification of vessel wall		2 (0.2)	—	—	1 (0.1)	0	—	—	0
: Focal pleuritis		1 (0.1)	—	—	0	0	—	—	0
Liver: Innerlobular or periportal cell accumulation		10 (0.7)	—	—	10 (0.6)	10 (0.7)	—	—	10 (0.6)
: Calcification of vessel wall		0	—	—	0	0	—	—	0
: Cholangiofibrosis		1 (0.1)	—	—	0	0	—	—	0
: Cytoplasmic vacuolated liver cell foci		1 (0.1)	—	—	2 (0.1)	0	—	—	0
: Granuloma		0	—	—	1 (0.2)	0	—	—	0
Pancreas: Interstitial round cell infiltration		4 (0.2)	—	—	8 (0.4)	5 (0.3)	—	—	4 (0.2)
: Deposition of yellow pigment		2 (0.2)	—	—	1 (0.1)	0	—	—	0
: Acinar atrophy and fibrosis		2 (0.2)	—	—	0	4 (0.3)	—	—	3 (0.2)
: Focal inflammation		0	—	—	0	0	—	—	0
Kidney: Interstitial round cell infiltration		3 (0.2)	3 (0.2)	6 (0.3)	4 (0.4)	1 (0.1)	3 (0.2)	6 (0.3)	3 (0.2)
: Degeneration of proximal tubular epithelium		5 (0.3)	2 (0.1)	3 (0.2)	10 (0.8)	0	1 (0.1)	5 (0.3)	2 (0.1)
: Dilatation of tubular cavity		1 (0.1)	0	0	7 (0.5)	0	0	0	0
: Hyaline cast		5 (0.3)	0	1 (0.1)	7 (0.4)	0	0	0	1 (0.1)
: Thickening of proximal tubular basement membrane		5 (0.3)	3 (0.2)	3 (0.2)	10 (0.8)	1 (0.1)	1 (0.1)	5 (0.3)	2 (0.1)
: Thickening of glomerular basement membrane		7 (0.4)	3 (0.2)	5 (0.3)	8 (0.5)	4 (0.2)	4 (0.2)	5 (0.3)	4 (0.2)

Table 21 Continued

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose(mg/kg)	0	3	9	27	0	3	9	27
	No. of rats	10	10	10	10	10	10	10	10
Kidney: Thickening of basement membrane of Bowman's capsule		9 (0.5)	7 (0.4)	8 (0.4)	10 (0.9)	6 (0.3)	2 (0.1)	7 (0.4)	6 (0.3)
: Deposition of PAS positive material in glomerular tuft		9 (0.5)	8 (0.5)	8 (0.6)	10 (0.6)	5 (0.3)	7 (0.4)	4 (0.2)	5 (0.3)
: Hyperplasia of pelvis mucosa with calcium deposition		0	0	2 (0.2)	0	0	0	0	0
: Pyelitis		0	0	0	1 (0.1)	1 (0.1)	0	0	3 (0.2)
: Calcification of tubulus		0	0	0	0	2 (0.1)	0	0	0
: Eosinophilic body		0	0	0	1 (0.2)	0	0	0	0
Urinary bladder: Cystitis		0	—	—	0	1 (0.2)	—	—	0
Prostate: Chronic inflammation		3 (0.2)	—	—	7 (0.6)	/	/	/	/
Thyroid: Ultimobranchial rest		2 (0.1)	—	—	3 (0.2)	0	—	—	2 (0.1)
Mammary: Adenocarcinoma		0	—	—	0	1 (0.1)	—	—	0
Hardarian gland: Inflammation		7 (0.7)	—	—	4 (0.5)	7 (1.5)	—	—	6 (1.4)
Mesentery: Granuloma		0	—	—	0	1 (0.2)	—	—	0
Abdominal adipose tissue: Focal necrosis		1 (0.1)	—	—	1 (0.1)	0	—	—	0
Tail: Hemorrhage		0	—	—	3 (0.3)	1 (0.1)	—	—	5 (0.6)

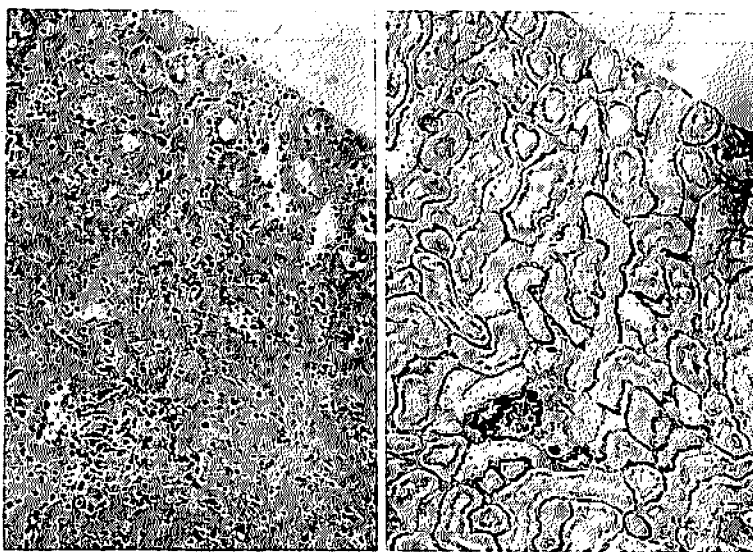
* : Mean pathological score (Total score/No. of rats) Score (0.5 : Very slight, 1 : Slight, 2 : Moderate, 3 : Severe) — : Not examined histopathologically

量の増加に伴った変化と考えられる。その他の項目の変化は正常範囲内の軽度の変化であるか用量相関性のないものであり投薬に起因する変化とは考えられない。

血液学的検査および血液生化学的検査では、各投薬群を通じて散発的に統計学的に有意な変化がみられたが、いずれも正常範囲内の軽度な変化であるか用量および投薬期間に相関した変化ではなく、投薬に起因する変化とは考えられ

ない。

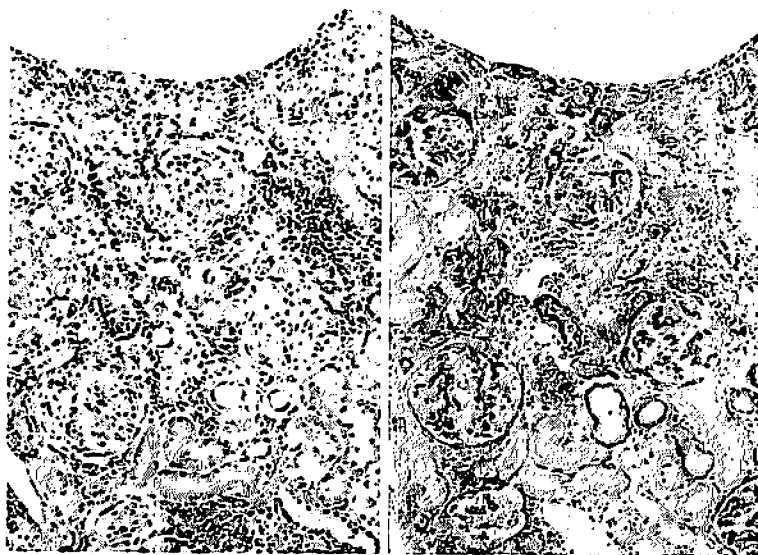
病理学的検査では、26週屠殺例の27 mg/kg 群雄の腎近位尿細管に、上皮の変性、基底膜の肥厚および腔の拡張が対照群に比して頻度の増加および程度の増強傾向がみられたが、これらの変化はその他にみられた腎の変化、すなわち間質への円形細胞浸潤、硝子円柱、糸球体基底膜の肥厚、糸球体のPAS陽性物質の沈着およびボーマン嚢基底膜の肥厚の諸変化と一連の関



A : Degenerative proximal tubular epithelia, H-E stain, $\times 100$

B : Thickening of basement membrane of proximal tubuli, PAS reaction, $\times 100$

Photo. 1 Kidney from a male control rat sacrificed after dosing for 26 weeks



A : Degenerative epithelia, dilatation of cavity and interstitial cell infiltration with fibrosis, H-E stain, $\times 100$

B : Thickening of basement membrane of proximal tubuli and Bowman's capsule, PAS reaction, $\times 100$

Photo. 2 Kidney from a male rat treated with 27 mg/kg of argipidine (MD-805) for 26 weeks

連した変化であると思われる。それはラットに特徴的な、加齢に伴って発生する慢性腎症⁵⁾あるいは慢性腎炎⁶⁾などと呼ばれる腎変化と同様の所見を示した。この一般的に知られた加齢に伴う腎病変は、初期病変として糸球体の病変(基底膜の肥厚, PAS 陽性物質の沈着など)が起こり、次いで尿細管の病変(上皮の変性, 腔の拡張, 硝子円柱および基底膜の肥厚)がみられることから本病変が糸球体起原によるものと考えられている。本試験の腎病変も上記報告と同様に初期病変である糸球体の変化が13週および26週屠殺例のいずれにおいても対照群を含めた全実験群にはほぼ同等の頻度, 程度でみられ, 尿細管の病変が糸球体病変と同等ないし低い頻度でみられた。また, 13週屠殺例よりも26週屠殺例で, 雌よりも雄で腎病変の頻度が高く, 程度も強くみられたのも過去の報告⁵⁾と同様な結果であった。

このように argipidine の投薬に起因する変化は, 27 mg/kg 群の雄に認められた水摂取量の増加, 尿量の増加および加齢性腎病変の増強であった。加齢性腎病変の病因はいまだ解明されていないが, 飼育条件や栄養状態によりその進行が修飾されることが知られている⁵⁾。加齢性腎病変を増悪する修飾因子として一側腎切除⁷⁾による残余腎への負担や thyroxin 投与⁸⁾による代謝速度の亢進による腎の負担が報告されている。今回の実験において, argipidine の腎病変増強の機作は不明であるが尿量の増加による腎への負担がその増強の一因となったことも考えられる。

以上の結果から argipidine を26週間ラットに静注したときの最大無作用量は 9 mg/kg と考えられた。

要 約

抗ロンビン薬 argipidine (MD-805) の 3, 9, 27 mg/kg を CD (SD) 系ラットに26週間連続静脈内投与し, 慢性毒性を検討した。

一般症状, 体重, 摂餌量, 飲水量, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 尿検査, 眼検査, 聴覚検査, 心電図検査, 臓器重量および病理組織学的検査を検討した結果, 27 mg/kg 群の雄に飲水量の増加, 尿量の増加および加齢性腎病変の増強が認められた。その他の投薬群にはすべての検査において投薬に起因する変化はみられなかった。

以上のことから, argipidine をラットに26週間静注したときの最大無作用量は 9 mg/kg と推定された。

文 献

- 1) 土志田和夫, 関真山美, 小島由美子: 三菱化成工業株式会社内報告書 (1982)
- 2) 加藤正信, 土志田和夫: 三菱化成工業株式会社内報告書 (1980)
- 3) 加藤正信, 土志田和夫: 三菱化成工業株式会社内報告書 (1980)
- 4) 加藤正信, 土志田和夫: 三菱化成工業株式会社内報告書 (1980)
- 5) 坂田 孝ほか: *Exp. Anim.* 29(2): 184 (1980)
- 6) Snel K.C.: *Pathology of laboratory rats and mice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1967), p. 104.
- 7) Lalich J., Faith G. & Harding G.: *Arch. Pathol.* 89: 548 (1970)
- 8) Berg B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121: 198 (1965)

Argipidine (MD-805) のイヌ 6 カ月間 静脈内投与の慢性毒性試験

第一製薬株式会社 中央研究所

小 野 承 行 吉 田 貢 山 岩 崎 利 郎
相 良 奈 美 関 口 正 保 相 原 清
小野寺 威

Six Month Chronic Intravenous Toxicity of Argipidine, a New Antithrombotic Agent, in Dogs

Yoshiyuki Ono, Mitsuyoshi Yoshida, Toshiroh Iwasaki,
Nami Sagara, Masayasu Sekiguchi, Kiyoshi Aihara
and Takeshi Onodera

Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

Chronic toxicity of argipidine, a new antithrombotic agent, was investigated in dogs by 6 month consecutive administration of a dialy dose 1, 3 or 9 mg/kg. At a dose of 1 mg/kg, no changes were seen which were attributed to treatment. Dogs treated with 3 or 9 mg/kg showed a low incidence of vomiting just after administration.

From these results, no-effect dose of argipidine was considered to be 1 mg/kg under the present experimental condition.

KEY WORDS

Argipidine, MD-805, Antithrombotic agent,
Chronic toxicity (Dog)

緒 言

Argipidine (MD-805) は、抗トロンビン作用を有し、血栓症（脳血栓症、慢性動脈閉塞症、播種性血管内凝固症候群）の治療薬として開発中である。今回、安全性評価の一環としてイヌ静脈 6 ヶ月慢性毒性試験を実施したので報告する。

I 材料および方法

1 被験薬物

1) 原薬の物理化学的性状 (Fig. 1)

2) 注射用製剤

注射用製剤は、下記の組成を有するものを 3 回に分けて調製した。

組成：5.4% D-ソルビトール液中に argipidine を 2.7, 0.9, 0.3 および 0 (溶媒対照群用) mg/ml の各濃度を含有する。

2 試験系

1) 使用動物

6 ヶ月齢のビーグル犬雌雄各 23 頭を加商社から購入 (1984 年 12 月 13 日入荷) し、約 6 週間馴化させた後、事前検査値を参考にして健康とみなされた雌雄各 16 頭を無作為抽出法にて投薬前日 (1985 年 1 月 28 日) に群分けを行い本試験に使用した。動物は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間照明 (7:00~19:00) のイヌ専用動物室内で個別犬房に収容し、市販の固形飼料 (オリエンタル酵母 K.K. 製 DS) を約 300 g/日与え、上水道水を給水ノズルを介して

自由に摂取させた。なお個体識別は、耳介内側の入れ墨で、群識別は各犬房のカードにて行った。

2) 薬物投与

a) 用量の設定

長期間連続静脈内投与する場合の投与可能な液量 (30~40 ml/dog 程度)、本薬物の溶解度 (0.96 mg/ml) および本剤の 5.4% D-ソルビトール溶液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度 (2.7 mg/ml) を考慮して最高用量 9 mg/kg とし、以下中用量を 3 mg/kg および低用量を 1 mg/kg とした。

b) 試験群の構成

3 用量群に溶媒対象群を加えて計 4 群を設定し、各群に雌雄各 4 頭を配分した。

c) 投与方法および投薬期間

22G あるいは 25G 翼状針付ディスプレイ注射筒を用いて各用量群に応じた注射用製剤を 3.33 ml/kg あて腕側皮静脈内に 1 日 1 回、6 ヶ月間 (1985 年 1 月 29 日~1985 年 8 月 1 日) 投与した。

3 検 査

1) 一般検査

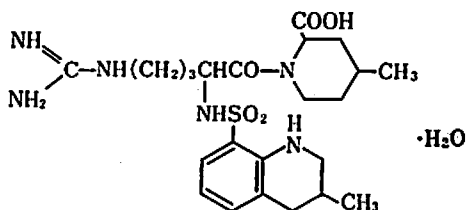
a) 症状観察

投薬期間中毎日投与前および投与後に原則として各 1 回行った。

b) 体重測定

投薬開始前、投薬開始後 3 ヶ月までは週 1 回、その後は 2 週に 1 回実施した。

c) 摂餌量測定



化学名：(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-(*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl]-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate

Fig. 1 Argipidine の化学構造

投薬開始前、投薬開始後3ヵ月までは週1回、その後は2週に1回300g/日を与え、翌朝残量を引いて測定した。

2) 臨床検査

a) 尿検査

投薬開始前、投薬13および25週目に生存するすべての動物から16時間尿を採取し、試験紙(マルティスティクス、マイルス三共製)により比重、pH、蛋白、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血およびウロビリノーゲンを検査した。合わせて尿量測定および尿沈渣検査を実施した。

b) 眼科的検査

投薬開始前、投薬12および26週目に全動物について前眼部の観察および眼底カメラによる眼底検査を実施した。

c) 血液学的検査

投薬開始前、投薬5、14および26週目にすべての動物について、桡側皮静脈から採血した3.8%クエン酸Na溶液1/10容添加血を用いて以下の検査を行った。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)を自動血球計数装置(E5000;東亜医用電子製)により、白血球型別分画は、塗抹標本を作製後ライト・ギムザ染色を施し好中球(N)、リンパ球(L)、単球(M)、好酸球(E)、好塩基球(B)、その他(O)を自動血球分類装置(ヘマトラック;Gemetric Data製)により測定した。その他、網状赤血球数をGrecher法により、プロトロンビン時間(PT)、部分トロンボプラスチン時間(PTT)、フィブリノーゲン量(Fbg)を血液凝固自動測定装置(KC-10;Amelung製)により測定した。

d) 骨髄検査

屠殺時に大腿骨骨髄より塗抹標本を作製し、ライト・ギムザ染色を施した後、鏡検により顆粒球/赤芽球比(G/E)を測定した。

e) 血清生化学的検査

投薬開始前、投薬5、14および26週目に桡側皮静脈から採血し、分離した血清を自動分析装置(736-30型;日立製)を用いて以下の項目について検査した。

グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、アルカリホスファターゼ(Al-P)、ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)、コリンエステラーゼ(CHE)、総ビリルビン(BIL)、クレアチニン(CRE)、尿素窒素(UN)、尿酸(UA)、グルコース(GLU)、総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)、A/G(演算処理)、無機リン(P)、総コレステロール(CHO)、トリグリセライド(TG)、ナトリウム、カリウム(Ca^{+})、クロライド(Cl^{-})、カルシウム(Ca^{++})。

3) 病理学的検査

a) 剖検および臓器重量

動物は、ペントバルビタール(iv, 25~30 mg/kg)麻酔下に頸動脈より放血屠殺し、全身諸臓器を肉眼的に観察し、以下の臓器組織を採材するとともに、胸腺、肺、心、甲状腺(上皮小体を含む)、肝、脾、腎、副腎、精巣/卵巣、腹側前立腺/子宮、脳、下垂体、脾の重量を測定した。

皮膚、乳腺、下顎部リンパ節、唾液腺、胸骨(骨髄を含む)、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、舌、食道、気管、肺および気管支、心、肝、脾、腎、副腎、膀胱、前立腺、精巣、卵巣、子宮、陰、脳、下垂体、脊髄、眼、投与局所、病変部位

b) 組織学的検査

採材した臓器組織は10%磷酸緩衝ホルマリン液に固定し(眼はDavidson液に固定)し、皮膚、下顎部リンパ節、大腿骨、舌、食道、気管、陰を除きパラフィン包埋、薄切後HE染色を施し組織学的に検査した。なお腎にはPAS反応も行った。

c) 電子顕微鏡的検査

対照群および最高用量群の雌雄各2頭の動物

Table 1 Individual clinical signs in dogs treated intravenously with argipidine for 6 months

	Dose	Animal No.	Signs
Male	Control	10101	N
		10102	Stool with blood (week 25)
		10103	N
		10104	Lacrimation of right eye (week 10~11)
	1 mg/kg	10201	Stool with blood (week 25)
		10202	N
		10203	Soft stool (week 4, 7)
		10204	N
	3 mg/kg	10301	N
		10302	N
		10303	Vomiting (week 26 ; 1*)
		10304	N
	9 mg/kg	10401	Soft stool (week 5, 7), Vomiting (week 9 ; 1*)
		10402	Soft stool (week 4~9, 11, 21), Diarrhea (week 4)
		10403	Bloody stool (week 4), Vomiting (week 14 ; 1*)
		10404	N Lacrimation of right eye (week 10)
Female	Control	20101	Bleeding from genital region (week 21~23)
		20102	N
		20103	Bleeding from genital region (week 15~16)
		20104	Soft stool (week 7)
	1 mg/kg	20201	N
		20202	Bleeding from genital region (week 23), Stool with blood (week 25)
		20203	Soft stool (week 10), Stool with blood (week 10, 25)
		20204	N
	3 mg/kg	20301	N
		20302	N
		20303	Vomiting (week 1, 4, 12, 15 ; 4*), Stool with blood (week 6~7)
		20304	Pus attached in genital region (week 6) N
	9 mg/kg	20401	Vomiting (week 1, 4, 5, 7~10, 12, 14, 15, 17, 24 ; 16*) Swelling of mammary region (week 17~26) Bleeding from genital region (week 14~17)
		20402	Vomiting (week 4 ; 1*)
		20403	Vomiting (week 3 ; 1*)
		20404	Vomiting (week 25 ; 1*), Soft stool (week 26) Bleeding from genital region (week 25~26)

* : Frequency of vomiting N : no change

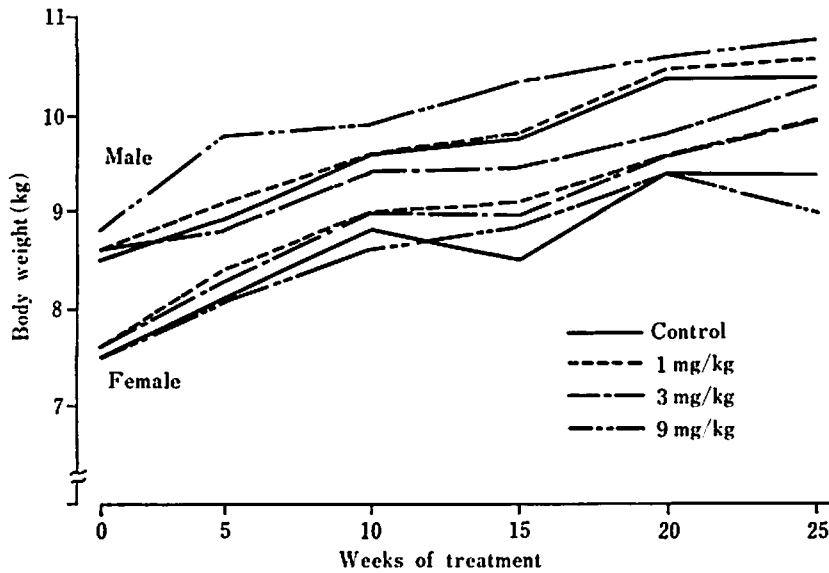


Fig. 2 Body weight curve of dogs treated intravenously with argipidine for 6 months

から麻酔下に肝および腎の一部分を摘出し、グルタールアルデヒドおよび1%磷酸緩衝オスミウム酸で固定後エポキシ樹脂 (quetol 812) で包埋した。

4) 統計解析

計量的データは、平均値±標準誤差を算出し、対照群と投与群間の平均値の差は Student の *t* 検定により検定した。

II 結 果

1 一般検査

1) 症状 (Table 1)

軟便 (一部は血様)、下痢、流涙、投与直後の嘔吐、外陰部の血液ないし膿様物の付着 (雌のみ) が対照群を含めた全群に投薬期間中に一過性ないし散発的に認められた。また 9 mg/kg 群の雌の 1/4 例に乳房肥大が投薬17週から投薬終了まで認められた。これらの諸症状のうち投与直後の嘔吐は、9 mg/kg 群の雌の 1/4 例を除き単発ないし散発ながら雌雄とも用量相関的発生傾向を示した。

2) 体重 (Fig. 2)

投薬期間を通じて雌雄とも意味のある変動は認められなかった。

3) 摂餌量

雄：すべての動物において給餌量の全量を摂取した。

雌：1 mg/kg 群の 1/4 例で投薬前の検査から投薬終了まで散発的に摂餌量の低下がみられた。3 mg/kg 群 1/4 例で投薬7週目に軽度の減少が、9 mg/kg の 1/4 例で投薬13, 16, 20週目に比較的著明な減少が認められた。

2 臨床検査

1) 尿検査 (Table 2)

雄：6ヵ月目の検査において 3 mg/kg 群で尿量の増加が認められた。

雌：3ヵ月目の検査において 3 mg/kg 群で比重の低下および pH の上昇が認められた。また 6ヵ月目の検査では 3 mg/kg 群で尿量の増加が認められた。

以上の変動は、事前検査値および用量相関性を考慮すると、いずれも正常範囲内ないし偶発的なものとみなされた。

Table 2-a Group mean urinalysis values in dogs before treatment of argipidine

Dose (mg/kg)		0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	U-Volume(ml/h)	18.6	6.9	12.9	4.2	16.2	2.8	12.6	1.7
	Specific gravity	1.018	0.004	1.020	0.004	1.016	0.002	1.014	0.002
	pH	6.6	0.2	6.5	0.0	6.6	0.1	6.9	0.2
	Protein	0.5	0.3	0.5	0.2	0.1	0.1	0.4	0.1
	Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ketone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Bilirubin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Blood Pig.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Urobilinogen	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
	Sediments-E	2	0	2	0	1	0	1	0
	Sediments-L	1	0	1	0	0	0	0	0
	Sediments-R	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-O	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-C	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sediments-A	CR (4)		CR (4)		CR (4) SP (1)		CR (4) SP (1)	
Female	U-Volume(ml/h)	15.0	1.2	15.9	5.7	10.9	1.8	9.5	1.1*
	Specific gravity	1.015	0.001	1.019	0.004	1.019	0.001*	1.024	0.001**
	pH	6.8	0.1	6.5	0.2	6.6	0.1	6.3	0.1*
	Protein	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.6	0.1
	Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ketone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Bilirubin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Blood pig.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Urobilinogen	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
	Sediments-E	2	0	2	0	1	0	1	0
	Sediments-L	1	0	1	0	1	0	0	0
	Sediments-R	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-O	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-C	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sediments-A	CR (4)		CR (3)		CR (4)		CR (4)	

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control) SP: Sperm CR: Crystal

2) 眼科的検査

3 mg/kg 群の雄 1/4 例の左眼眼底に暗赤色果が 1 箇所認められたが、片側性で用量相関性のないことから偶発的変化とみなした。

3) 血液学的および骨髄検査 (Table 3)

対照群に比して統計学的に有意の差がみられたのは、以下のようであった。

雄: 1 ヶ月目の検査では、1 mg/kg 群で好中球比率の低下およびリンパ球比率の上昇が、9 mg/kg 群で平均赤血球容積の増加および白血球数の減少が認められた。3 ヶ月目の検査では、3 mg/kg 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少ないし低下および血小板数の

Table 2-b Goup mean urinalysis values in dogs treated intravenously with argipidine for 3 months

Dose (mg/kg)		0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	U-Volume(ml/h)	14.8	4.5	13.5	1.5	22.9	7.0	12.7	4.5
	Specific gravity	1.019	0.004	1.021	0.001	1.018	0.004	1.023	0.005
	pH	6.8	0.1	6.5	0.0	6.4	0.2	6.8	0.3
	Protein	0.5	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.5	0.3
	Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ketone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Bilirubin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Blood Pig.	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
	Urobilinogen	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
	Sediments-E	1	0	2	0	1	0	2	0
	Sediments-L	0	0	1	0	1	0	1	0
	Sediments-R	2	0	2	0	1	0	2	0
	Sediments-O	3	0	2	0*	2	0*	2	0
	Sediments-C	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sediments-A	CR (4) SP (4)		CR (4) SP (4)		CR (4) SP (4)		CR (4) SP (3)	
Female	U-Volume(ml/h)	15.8	2.4	21.2	8.5	17.0	2.1	15.1	2.1
	Specific gravity	1.023	0.002	1.018	0.003	1.011	0.002**	1.016	0.004
	pH	6.4	0.1	6.4	0.1	7.3	0.3*	6.9	0.4
	Protein	0.4	0.2	0.1	0.1	0.4	0.2	0.4	0.2
	Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ketone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Bilirubin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Blood Pig.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Urobilinogen	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.4	0.1
	Sediments-E	1	0	1	0	2	0	1	0
	Sediments-L	1	0	0	0	1	0	2	0
	Sediments-R	2	0	1	0	1	0	2	0
	Sediments-O	2	0	2	1	2	0	1	0
	Sediments-C	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sediments-A	CR (3)		CR (3)		CR (4)		CR (4)	

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control) CR: Crystal SP: Sperm

増加, 9 mg/kg 群で平均赤血球容積の増加がみられた。また 6 ヶ月目の検査では, 1 および 9 mg/kg 群で血小板数の減少が, 3 mg/kg 群で赤血球数の減少が, 9 mg/kg 群で平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量の増加がみられた。

雄: 1 ヶ月目の検査では, 1 mg/kg 群で血小板数の増加およびプロトロンビン時間の短縮, 3 mg/kg 群で血小板数の増加, 9 mg/kg 群で部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。3 ヶ月目の検査では, 1 mg/kg 群で血小板数の増加が, 6 ヶ月目の検査では, 全投薬群でプロト

Table 2-c Group mean urinalysis values in dogs treated intravenously with argipidine for 6 months

Dose (mg/kg)		0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	U-Volume(ml/h)	11.3	2.6	14.4	1.9	21.4	2.9*	11.1	1.2
	Specific gravity	1.020	0.004	1.018	0.002	1.015	0.001	1.020	0.002
	pH	6.6	0.3	6.6	0.1	6.6	0.1	6.8	0.3
	Protein	0.5	0.2	0.4	0.1	0.3	0.1	0.8	0.1
	Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ketone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Bilirubin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Blood pig.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Urobilinogen	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
	Sediments-E	2	0	2	0	1	0	2	1
	Sediments-L	1	0	2	0*	0	0	2	1
	Sediments-R	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-O	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-C	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sediments-A	CR (4) SP (1)		CR (3) SP (2)		CR (3)		CR (4) SP (3)	
Female	U-Volume(ml/h)	10.5	3.5	13.8	5.8	27.4	5.2*	12.4	0.7
	Specific gravity	1.020	0.004	1.018	0.004	1.011	0.003	1.015	0.002
	pH	6.5	0.2	6.9	0.1	6.9	0.3	6.8	0.3
	Protein	0.5	0.2	0.8	0.1	0.1	0.1	0.6	0.2
	Glucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ketone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Bilirubin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Blood Pig.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
	Urobilinogen	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
	Sediments-E	2	0	2	0	2	0	2	0
	Sediments-L	1	0	1	0	1	0	1	0
	Sediments-R	1	0	2	0*	1	0	2	0
	Sediments-O	1	0	2	0*	3	0*	2	0
	Sediments-C	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sediments-A	CR (2)		CR (4)		CR (4)		CR (3)	

*: $p < 0.05$ (vs control) CR: Crystal SP: Sperm

ロンビン時間の短縮および 9 mg/kg 群で血小板数の増加が認められた。以上の変動は、事前検査値と同等か正常範囲内の変動とみなされるかあるいは用量相関性がみられないことから投薬に関連する変動とはみなされなかった。

4) 血清生化学的検査 (Table 4)

対照群に比して統計学的有意の差がみられたのは以下のようであった。

雄: 1 ヶ月目の検査では、9 mg/kg 群で AL-P の低下および TG の上昇が、3 ヶ月目の検査では、3 mg/kg 群で ALB の低下および 9 mg/kg 群で Ca の低下が認められた。また 6 ヶ月目の検査では 9

Table 3-a Group mean hematology data in dogs before treatment of argipidine

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.84	0.20	6.19	0.20	5.69	0.11	5.91	0.07
	Hb (g/dl)	13.3	0.5	14.1	0.5	13.3	0.3	14.0	0.3
	Ht (%)	37.4	1.4	39.8	1.3	37.2	1.1	39.2	0.3
	Ret (%)	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	0.0
	MCV (fl)	64.0	0.6	64.3	0.1	65.5	1.3	66.4	1.0
	MCH (pg)	22.7	0.2	22.8	0.1	23.5	0.3*	23.7	0.6
	MCHC (g/dl)	35.4	0.2	35.4	0.2	35.8	0.3	35.7	0.6
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	9.1	0.3	9.8	1.2	10.7	1.1	8.7	1.2
	N (%)	49	7	33	2	37	11	42	6
	L (%)	45	8	63	2	59	12	51	6
	M (%)	5	1	4	1	4	1	6	1
	E (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	O (%)	1	0	1	0	1	1	1	0
	PLT ($10^6/\text{mm}^3$)	0.20	0.03	0.19	0.03	0.28	0.03	0.25	0.03
	PT (sec)	5.6	0.1	7.2	1.4	5.7	0.1	5.8	0.2
	PTT (sec)	56.0	1.0	44.9	4.7	58.1	1.8	54.2	3.0
	Fib (mg/dl)	250	15	274	31	258	36	218	43
Female	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.88	0.14	6.10	0.11	6.01	0.21	5.74	0.20
	Hb (g/dl)	13.5	0.3	14.3	0.4	14.0	0.5	13.4	0.6
	Ht (%)	38.1	1.2	40.1	0.8	39.5	1.4	37.4	1.5
	Ret (%)	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.0
	MCV (fl)	64.8	1.3	65.8	0.4	65.8	0.6	65.2	1.0
	MCH (pg)	22.9	0.5	23.5	0.4	23.4	0.2	23.3	0.4
	MCHC (g/dl)	35.4	0.4	35.6	0.3	35.5	0.2	35.7	0.1
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.9	0.2	8.4	0.8	9.1	0.7	10.2	0.8
	N (%)	39	9	42	4	44	12	37	12
	L (%)	55	8	51	4	47	11	60	12
	M (%)	5	1	5	1	6	0	2	1
	E (%)	0	0	0	0	1	0	0	0
	B (%)	1	0	1	0	0	0	0	0
	O (%)	1	0	1	1	2	0	1	0
	PLT ($10^6/\text{mm}^3$)	0.16	0.01	0.18	0.03	0.25	0.03*	0.19	0.03
	PT (sec)	5.8	0.1	5.5	0.0**	5.6	0.1*	5.6	0.1
	PTT (sec)	57.2	6.9	56.5	201	53.6	2.2	57.7	2.7
	Fib (mg/dl)	186	46	224	15	201	26	224	5

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control)

Table 3-b Group mean hematology data in dogs treated intravenously with argipiline for 1 month

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
		4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.25	0.18	5.21	0.30	4.98	0.08	5.21	0.13
	Hb (g/dl)	12.0	0.5	12.1	0.8	11.6	0.3	12.5	0.2
	Ht (%)	33.8	1.5	34.3	2.1	32.7	1.0	35.0	0.6
	Rct (%)	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0
	MCV (fl)	64.2	0.7	65.8	0.3	65.7	1.1	67.3	0.8*
	MCH (pg)	22.9	0.3	23.2	0.2	23.2	0.2	23.9	0.3
	MCHC (g/dl)	35.6	0.1	35.3	0.2	35.4	0.5	35.6	0.1
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.7	0.2	9.0	0.4	10.3	1.5	7.5	0.4*
	N (%)	63	1	44	4**	41	11	34	10
	L (%)	33	2	52	4**	54	12	60	11
	M (%)	3	1	3	1	3	1	5	1
	E (%)	1	0	0	0	1	1	1	1
	B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	O (%)	2	1	1	0	1	1	0	0
Female	PLT ($10^6/\text{mm}^3$)	0.20	0.03	0.24	0.02	0.29	0.03	0.21	0.03
	PT (sec)	5.8	0.1	7.4	1.4	5.8	0.2	5.7	0.2
	PTT (sec)	44.1	5.9	44.5	2.4	45.7	5.8	51.8	7.2
	Fib (mg/dl)	193	32	194	3	246	40	189	10
	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.57	0.14	5.60	0.21	5.71	0.26	5.72	0.31
	Hb (g/dl)	12.9	0.1	13.2	0.6	13.4	0.6	13.4	0.6
	Ht (%)	36.9	0.3	37.3	1.5	37.8	1.8	37.9	1.7
	Rct (%)	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0*	0.1	0.0
	MCV (fl)	66.4	1.4	66.7	0.7	66.3	0.9	66.5	1.0
	MCH (pg)	23.2	0.6	23.5	0.4	23.5	0.0	23.5	0.4
	MCHC (g/dl)	35.0	0.3	35.2	0.4	35.5	0.4	35.4	0.2
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	10.0	0.4	8.8	0.4	9.0	0.5	8.6	0.8
	N (%)	36	9	47	13	50	6	43	9
	L (%)	60	10	48	15	43	8	53	10
	M (%)	3	1	5	2	5	1	4	1
	E (%)	1	0	0	0	2	1	0	0
	B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	O (%)	1	0	1	0	1	0	1	0
	PLT ($10^6/\text{mm}^3$)	0.13	0.03	0.28	0.04*	0.28	0.04*	0.21	0.04
	PT (sec)	5.9	0.1	5.4	0.0**	5.7	0.2	5.7	0.2
	PTT (sec)	44.6	4.9	49.0	9.5	49.8	5.2	61.0	2.7*
	Fib (mg/dl)	162	30	207	34	184	27	167	11

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control)

Table 3-c Group mean hematology data in dogs treated intravenously with argipidine for 3 month

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
		4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.75	0.13	5.64	0.19	4.94	0.10**	5.44	0.17
	Hb (g/dl)	13.6	0.4	13.2	0.6	11.7	0.4*	13.2	0.4
	Ht (%)	36.5	1.0	36.1	1.3	32.4	1.2*	36.2	1.1
	Ret (%)	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0
	MCV (fl)	63.5	0.6	63.9	0.3	65.5	1.3	66.6	0.7*
	MCH (pg)	23.6	0.5	23.3	0.4	23.6	0.3	24.2	0.2
	MCHC (g/dl)	37.1	0.4	36.5	0.4	36.0	0.2	36.3	0.2
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.6	0.8	9.2	0.3	12.4	2.6	9.2	0.6
	N (%)	42	10	31	8	41	12	31	4
	L (%)	54	12	64	10	53	13	62	4
	M (%)	2	2	4	1	4	0	5	1
	E (%)	1	1	1	1	1	1	1	0
	B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	O (%)	1	0	1	1	2	1	1	1
Female	PLT ($10^6/\text{mm}^3$)	0.17	0.02	0.18	0.02	0.26	0.03*	0.19	0.01
	PT (sec)	5.6	0.2	6.8	1.4	5.6	0.1	5.7	0.2
	PTT (sec)	40.6	7.0	48.0	1.5	37.8	5.4	43.0	2.3
	Fib (mg/dl)	223	33	198	15	237	33	194	18
	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.93	0.13	5.80	0.25	5.65	0.21	5.63	0.26
	Hb (g/dl)	13.8	0.4	13.6	0.6	13.2	0.5	13.2	0.5
	Ht (%)	38.3	0.8	37.9	1.6	36.7	1.3	36.3	1.6
	Ret (%)	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0
	MCV (fl)	64.7	1.4	65.3	0.3	65.0	0.4	64.5	0.8
	MCH (pg)	23.2	0.7	23.5	0.3	23.4	0.2	23.5	0.5
	MCHC (g/dl)	35.9	0.4	35.9	0.4	36.0	0.3	36.5	0.5
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	9.6	0.7	8.5	0.8	9.1	0.6	10.0	0.7
	N (%)	32	9	29	6	38	7	30	4
	L (%)	62	10	67	5	55	10	67	4
	M (%)	5	1	3	1	4	1	3	1
	E (%)	0	0	1	0	1	1	0	0
	B (%)	0	0	0	0	1	1	0	0
	O (%)	2	0	0	0*	0	0*	0	0*
	PLT ($10^6/\text{mm}^3$)	0.16	0.01	0.20	0.00*	0.23	0.04	0.21	0.03
	PT (sec)	5.7	0.1	5.5	0.0	5.7	0.1	5.7	0.1
	PTT (sec)	49.9	2.2	46.5	2.1	47.9	1.9	44.1	1.6
	Fib (mg/dl)	166	21	189	28	171	26	188	24

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control)

Table 3-d Group mean hematology data in dogs treated intravenously with argipidine for 6 month

Dose (mg/kg)		0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	6.15	0.19	6.23	0.15	5.54	0.15*	6.08	0.16
	Hb (g/dl)	13.7	0.5	14.1	0.4	12.6	0.5	14.3	0.4
	Ht (%)	39.1	1.6	40.4	1.0	36.3	1.5	40.8	1.3
	Ret (%)	0.2	0.1	0.2	0.0	0.3	0.1	0.2	0.1
	MCV (fl)	63.5	0.8	64.9	0.2	65.5	1.1	67.1	0.7*
	MCH (pg)	22.3	0.2	22.5	0.2	22.8	0.3	23.5	0.4*
	MCHC (g/dl)	35.1	0.4	34.8	0.3	34.8	0.2	35.1	0.4
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	10.3	0.6	9.8	0.5	12.5	1.5	9.0	1.2
	N (%)	23	3	16	2	39	8	24	5
	L (%)	74	4	81	3	57	8	72	6
	M (%)	3	1	3	1	4	1	3	1
	E (%)	0	0	0	0	0	0	1	0
	B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	O (%)	1	1	0	0	1	0	1	0
	PLT ($10^5/\text{mm}^3$)	0.23	0.04	0.22	0.01	0.24	0.02	0.23	0.02
	PT (sec)	5.5	0.1	6.7	1.1	5.3	0.1	5.3	0.2
	PTT (sec)	47.8	4.3	34.4	4.0	45.6	3.9	42.1	2.1
	Fib (mg/dl)	210	12	162	8*	234	23	163	9*
	G/E (ratio)	1.17	0.08	1.03	0.17	1.30	0.11	1.27	0.13
Female	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	5.89	0.19	6.07	0.09	6.26	0.38	6.09	0.28
	Hb (g/dl)	13.2	0.3	14.0	0.2	14.4	0.9	14.0	0.8
	Ht (%)	38.1	0.9	40.1	0.4	40.8	2.4	39.8	2.1
	Ret (%)	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0
	MCV (fl)	64.9	1.8	66.2	0.5	65.2	0.7	65.3	0.8
	MCH (pg)	22.5	0.7	23.1	0.3	23.0	0.3	22.9	0.5
	MCHC (g/dl)	34.7	0.1	34.9	0.3	35.2	0.2	35.2	0.4
	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	11.0	0.6	10.1	0.2	10.6	0.9	10.7	1.1
	N (%)	25	7	14	2	21	12	25	11
	L (%)	72	7	85	1	76	13	72	11
	M (%)	3	1	1	1	3	1	2	2
	E (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	B (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	O (%)	1	0	0	0	1	1	1	0
	PLT ($10^5/\text{mm}^3$)	0.18	0.01	0.28	0.03	0.25	0.05	0.23	0.02*
	PT (sec)	5.8	0.1	5.2	0.0*	5.1	0.1**	5.1	0.1**
	PTT (sec)	44.3	1.0	43.6	3.1	36.7	3.8	43.0	2.6
	Fib (mg/dl)	203	40	204	17	178	15	191	19
	G/E (ratio)	1.13	0.07	1.35	0.14	1.21	0.12	1.42	0.19

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control)

Table 4-a Group mean serum biochemistry values in dogs before treatment of argipidine

Dose (mg/kg)		0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	GOT (IU/l)	20	1	24	2	21	2	20	1
	GPT (IU/l)	18	2	21	2	20	4	15	1
	Al-P (KAU)	9.7	1.1	9.6	1.3	11.2	1.6	7.8	1.3
	LAP (IU/l)	29	3	32	5	27	3	29	4
	CHE (IU/l)	430	51	504	28	396	50	476	101
	BIL (mg/dl)	0.06	0.01	0.07	0.01	0.06	0.00	0.07	0.00
	CRE (mg/dl)	0.55	0.02	0.62	0.03	0.54	0.02	0.58	0.05
	UN (mg/dl)	14.1	0.7	14.9	0.7	12.2	0.4	12.3	0.6
	UA (mg/dl)	0.2	0.0	0.4	0.0*	0.2	0.0	0.3	0.0
	GLU (mg/dl)	80	3	82	5	89	3	81	2
	TP (g/dl)	5.41	0.19	5.49	0.17	5.19	0.11	5.29	0.10
	ALB (g/dl)	2.47	0.07	2.47	0.09	2.29	0.07	2.36	0.07
	A/G (ratio)	0.84	0.04	0.82	0.02	0.79	0.02	0.82	0.07
	P (mg/dl)	6.0	0.3	5.8	0.3	5.8	0.2	5.8	0.1
	CHO (mg/dl)	138	11	149	9	128	23	153	11
	TG (mg/dl)	30	4	47	6*	31	5	32	4
	Na ⁺ (mEq/l)	132	1	130	1	129	1	131	1
	K ⁺ (mEq/l)	4.7	0.2	4.6	0.0	4.9	0.2	4.8	0.1
	Cl ⁻ (mEq/l)	106	1	105	1	106	2	105	1
	Ca ²⁺ (mg/dl)	11.3	0.4	10.5	0.2	10.6	0.3	10.3	0.1
Female	GOT (IU/l)	23	2	22	2	20	4	24	2
	GPT (IU/l)	18	2	15	3	22	4	18	2
	Al-P (KAU)	10.6	1.9	7.5	0.3	8.1	0.7	11.0	2.7
	LAP (IU/l)	24	2	30	1*	26	2	39	11
	CHE (IU/l)	428	34	459	43	472	45	517	48
	BIL (mg/dl)	0.06	0.00	0.07	0.00	0.07	0.01	0.07	0.01
	CRE (mg/dl)	0.59	0.03	0.65	0.02	0.62	0.02	0.61	0.04
	UN (mg/dl)	12.1	1.2	13.1	0.6	14.0	1.3	14.1	0.8
	UA (mg/dl)	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0
	GLU (mg/dl)	89	1	87	4	90	3	86	3
	TP (g/dl)	5.07	0.04	5.25	0.12	5.35	0.08*	5.16	0.16
	ALB (g/dl)	2.33	0.07	2.43	0.09	2.47	0.11	2.39	0.04
	A/G (ratio)	0.86	0.05	0.87	0.03	0.86	0.05	0.87	0.03
	P (mg/dl)	5.4	0.3	5.0	0.2	5.6	0.3	5.8	0.2
	CHO (mg/dl)	129	9	152	10	142	13	140	21
	TG (mg/dl)	28	3	31	3	24	3	36	3
	Na ⁺ (mEq/l)	131	1	133	3	133	2	133	1
	K ⁺ (mEq/l)	4.5	0.1	4.5	0.1	4.5	0.1	4.6	0.1
	Cl ⁻ (mEq/l)	105	1	105	0	105	0	106	1
	Ca ²⁺ (mg/dl)	10.4	0.2	10.4	0.1	10.4	0.2	10.5	0.2

*: $p < 0.05$ (vs control)

Table 4-b Group mean serum biochemistry values in dogs treated intravenously with argipidine for 1 month

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	GOT (IU/l)	21	1	22	3	22	3	21	1
	GPT (IU/l)	20	1	20	3	21	6	19	2
	Al-P (KAU)	9.1	0.5	8.0	1.3	9.6	1.5	6.3	0.7*
	LAP (IU/l)	26	2	25	3	22	2	24	3
	CHE (IU/l)	463	42	468	58	404	43	392	72
	BIL (mg/dl)	0.05	0.00	0.05	0.01	0.06	0.01	0.06	0.01
	CRE (mg/dl)	0.58	0.02	0.61	0.06	0.61	0.02	0.65	0.04
	UN (mg/dl)	10.9	0.3	12.7	1.0	12.3	1.1	11.8	0.9
	UA (mg/dl)	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.1	0.3	0.0
	GLU (mg/dl)	78	1	72	5	85	3	79	2
	TP (g/dl)	5.31	0.14	4.90	0.44	5.28	0.06	5.38	0.14
	ALB (g/dl)	2.46	0.03	2.24	0.19	2.33	0.05	2.48	0.06
	A/G (ratio)	0.87	0.04	0.85	0.02	0.79	0.03	0.87	0.06
	P (mg/dl)	5.5	0.2	4.7	0.4	5.4	0.5	5.4	0.1
	CHO (mg/dl)	115	10	101	10	110	18	121	3
	TG (mg/dl)	26	1	29	5	27	6	37	1**
	Na ⁺ (mEq/l)	146	1	134	10	144	1	144	1
	K ⁺ (mEq/l)	5.0	0.0	4.5	0.3	5.2	0.2	5.2	0.1
	Cl ⁻ (mEq/l)	110	0	100	7	109	1	110	1
	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	10.3	0.1	8.9	0.9	10.0	0.2	10.2	0.2
Female	GOT (IU/l)	27	2	29	2	25	2	26	1
	GPT (IU/l)	26	1	19	2*	27	3	22	2
	Al-P (KAU)	10.5	1.7	7.5	0.5	8.2	0.9	11.3	2.8
	LAP (IU/l)	25	2	27	0	26	2	38	11
	CHE (IU/l)	473	37	521	62	528	59	573	45
	BIL (mg/dl)	0.08	0.01	0.12	0.02	0.06	0.00	0.07	0.00
	CRE (mg/dl)	0.65	0.02	0.70	0.01	0.65	0.02	0.64	0.03
	UN (mg/dl)	12.2	0.7	13.5	1.4	13.1	0.9	15.1	3.1
	UA (mg/dl)	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.0
	GLU (mg/dl)	81	1	80	4	84	2	78	1
	TP (g/dl)	5.43	0.16	5.39	0.07	5.51	0.06	5.39	0.08
	ALB (g/dl)	2.55	0.09	2.44	0.10	2.56	0.13	2.54	0.02
	A/G (ratio)	0.89	0.05	0.84	0.07	0.88	0.08	0.89	0.03
	P (mg/dl)	5.1	0.4	4.9	0.2	5.3	0.0	5.1	0.4
	CHO (mg/dl)	113	11	118	3	117	13	112	9
	TG (mg/dl)	32	6	29	3	22	2	39	6
	Na ⁺ (mEq/l)	145	1	146	0	145	1	147	1
	K ⁺ (mEq/l)	4.6	0.2	4.7	0.2	5.0	0.1	5.0	0.2
	Cl ⁻ (mEq/l)	109	1	109	0	108	1	111	1
	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	10.4	0.2	10.2	0.1	10.2	0.2	10.3	0.1

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (vs control)

Table 4-c Group mean serum biochemistry values in dogs treated intravenously with argipidine for 3 month

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	GOT (IU/l)	26	2	31	3	27	2	25	2
	GPT (IU/l)	30	5	33	4	28	8	31	6
	Al-P (KAU)	7.6	1.1	7.3	0.3	8.0	1.0	6.3	0.7
	LAP (IU/l)	26	2	29	4	22	2	26	2
	CHE (IU/l)	468	52	510	29	411	45	505	96
	BIL (mg/dl)	0.08	0.01	0.07	0.00	0.06	0.00	0.06	0.01
	CRE (mg/dl)	0.68	0.01	0.71	0.03	0.61	0.04	0.72	0.05
	UN (mg/dl)	13.2	1.1	14.5	1.1	10.6	0.6	13.4	1.8
	UA (mg/dl)	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.1	0.4	0.0
	GLU (mg/dl)	81	3	75	2	76	6	78	5
	TP (g/dl)	5.52	0.11	5.42	0.03	5.26	0.04	5.31	0.17
	ALB (g/dl)	2.51	0.06	2.49	0.05	2.25	0.06*	2.39	0.03
	A/G (ratio)	0.84	0.05	0.85	0.03	0.75	0.03	0.83	0.05
	P (mg/dl)	5.1	0.2	5.2	0.1	4.8	0.1	5.1	0.2
	CHO (mg/dl)	116	10	112	7	113	14	128	9
	TG (mg/dl)	32	4	38	5	23	2	32	2
	Na ⁺ (mEq/l)	146	1	146	0	144	1	146	1
	K ⁺ (mEq/l)	4.9	0.1	4.8	0.0	4.9	0.1	5.0	0.1
	Cl ⁻ (mEq/l)	111	1	110	1	110	1	112	1
	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	10.2	0.1	10.1	0.1	10.0	0.2	9.8	0.1*
Female	GOT (IU/l)	26	1	28	2	27	3	26	2
	GPT (IU/l)	26	3	20	2	33	7	24	3
	Al-P (KAU)	8.5	1.1	6.0	0.4	6.5	0.9	8.8	2.4
	LAP (IU/l)	23	2	26	1	26	3	35	10
	CHE (IU/l)	449	33	494	58	511	65	535	48
	BIL (mg/dl)	0.08	0.01	0.10	0.01	0.07	0.01	0.08	0.02
	CRE (mg/dl)	0.70	0.03	0.72	0.04	0.69	0.03	0.69	0.06
	UN (mg/dl)	12.2	0.4	13.5	1.2	13.4	1.6	14.9	1.1
	UA (mg/dl)	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0
	GLU (mg/dl)	73	1	77	4	77	3	75	1
	TP (g/dl)	5.19	0.01	5.24	0.08	5.24	0.10	5.07	0.09
	ALB (g/dl)	2.43	0.07	2.44	0.03	2.50	0.12	2.39	0.04
	A/G (ratio)	0.88	0.05	0.87	0.01	0.92	0.06	0.90	0.04
	P (mg/dl)	3.9	0.3	4.4	0.0	4.7	0.1	4.4	0.1
	CHO (mg/dl)	111	9	120	8	111	12	111	10
	TG (mg/dl)	30	4	37	2	28	5	43	13
	Na ⁺ (mEq/l)	146	0	147	1*	146	1	147	0
	K ⁺ (mEq/l)	4.7	0.1	4.7	0.1	4.5	0.1	4.8	0.2
	Cl ⁻ (mEq/l)	111	1	111	1	110	1	111	1
	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	9.7	0.2	10.1	0.0	10.0	0.1	10.0	0.2

*: $p < 0.05$ (vs control)

Table 4-d Group mean serum biochemistry values in dogs treated intravenously with argipidine for 6 months

Dose (mg/kg)		0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	GOT (IU/l)	28	1	29	3	29	5	31	2
	GPT (IU/l)	28	1	34	4	30	9	27	2
	Al-P (KAU)	5.5	0.4	5.4	0.5	6.6	1.6	4.8	0.5
	LAP (IU/l)	27	2	31	5	24	3	27	2
	CHE (IU/l)	454	42	540	23	390	40	521	86
	BIL (mg/dl)	0.09	0.01	0.10	0.00	0.08	0.01	0.10	0.01
	CRE (mg/dl)	0.80	0.04	0.86	0.02	0.73	0.03	0.84	0.07
	UN (mg/dl)	10.5	0.8	12.0	1.1	10.7	0.8	9.4	0.9
	UA (mg/dl)	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0
	GLU (mg/dl)	73	3	72	2	77	2	72	6
	TP (g/dl)	5.58	0.08	5.62	0.07	5.53	0.14	5.57	0.16
	ALB (g/dl)	2.39	0.08	2.55	0.03	2.21	0.05	2.48	0.09
	A/G (ratio)	0.75	0.03	0.83	0.01	0.67	0.04	0.80	0.03
	P (mg/dl)	3.9	0.1	4.0	0.1	4.0	0.0	3.8	0.2
	CHO (mg/dl)	128	14	113	5	118	12	135	5
	TG (mg/dl)	25	4	32	3	18	5	23	3
	Na ⁺ (mEq/l)	140	1	141	0	139	0	139	1
	K ⁺ (mEq/l)	4.7	0.1	4.5	0.1	4.6	0.1	4.6	0.1
	Cl ⁻ (mEq/l)	106	1	107	0	106	1	105	1
	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	10.5	0.1	10.6	0.1	10.4	0.1	10.2	0.1*
Female	GOT (IU/l)	26	2	32	2	26	3	29	4
	GPT (IU/l)	24	2	20	2	31	7	28	4
	Al-P (KAU)	6.8	1.1	5.1	0.8	5.8	1.4	8.6	2.4
	LAP (IU/l)	24	3	26	1	25	3	40	12
	CHE (IU/l)	511	58	497	48	514	56	649	49
	BIL (mg/dl)	0.10	0.02	0.11	0.01	0.09	0.01	0.11	0.02
	CRE (mg/dl)	0.80	0.02	0.83	0.03	0.78	0.01	0.74	0.08
	UN (mg/dl)	11.9	1.7	13.2	1.6	10.5	0.5	11.4	1.3
	UA (mg/dl)	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0
	GLU (mg/dl)	76	2	72	4	82	2	70	4
	TP (g/dl)	5.40	0.08	5.55	0.10	5.53	0.16	5.75	0.16
	ALB (g/dl)	2.49	0.07	2.44	0.13	2.50	0.15	2.67	0.05
	A/G (ratio)	0.85	0.03	0.79	0.06	0.84	0.10	0.87	0.03
	P (mg/dl)	3.4	0.4	3.6	0.2	3.9	0.2	4.0	0.4
	CHO (mg/dl)	137	7	142	11	124	14	141	17
	TG (mg/dl)	34	5	37	3	20	3*	30	4
	Na ⁺ (mEq/l)	140	0	141	0	141	0	142	2
	K ⁺ (mEq/l)	4.5	0.2	4.4	0.1	4.3	0.2	4.4	0.2
	Cl ⁻ (mEq/l)	106	0	106	0	106	0	106	1
	Ca ⁺⁺ (mg/dl)	10.5	0.2	10.7	0.2	10.6	0.1	10.8	0.3

*: $p < 0.05$ (vs control)

Table 5 Mean body and organ weights in dogs treated intravenously with argipidine for 6 months

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Male	Body weight (kg)	10.3	0.7	11.0	0.4	10.0	0.6	11.3	0.3
	Brain (g) (g/kg)	86.8 8.5	2.7 0.3	79.7 7.3	1.7 0.4	79.6 8.1	2.0 0.6	84.8 7.6	3.0 0.5
	Heart (g) (g/kg)	86.2 8.6	5.5 0.4	93.9 8.5	5.5 0.3	84.0 8.5	2.3 0.4	88.0 7.9	2.5 0.4
	Spleen (g) (g/kg)	26.0 2.5	2.2 0.1	22.1 2.0	2.7 0.2	21.8 2.2	3.9 0.4	27.1 2.4	4.3 0.5
	Lung (g) (g/kg)	86.0 8.4	3.4 0.4	85.1 7.7	5.4 0.3	78.1 7.9	1.4 0.6	90.8 8.1	5.2 0.7
	Liver (g) (g/kg)	275.0 27.1	7.2 1.5	297.8 27.1	18.7 1.5	316.2 31.7	12.8* 0.7*	306.7 27.3	12.9 1.3
	Kidney (g) (g/kg)	47.5 4.6	4.0 0.2	47.0 4.3	3.1 0.2	45.8 4.6	2.1 0.2	49.1 4.4	2.1 0.2
	Testis (g) (g/kg)	12.54 1.26	1.88 0.23	18.03 1.65	1.62 0.16	14.13 1.43	0.35 0.09	16.53 1.46	1.25 0.08
	Prostate (g) (g/kg)	5.34 0.53	1.13 0.13	7.39 0.66	1.19 0.09	7.22 0.72	0.96 0.07	5.96 0.53	1.25 0.11
	Thymus (g) (g/kg)	7.34 0.71	0.58 0.01	8.17 0.75	0.56 0.08	5.46 0.55	0.92 0.09	7.75 0.68	1.44 0.11
	Hypophysis (mg) (mg/kg)	80 8	5 1	66 6	5 0	72 7	3 1	83 7	6 1
	Thyroid (g) (g/kg)	0.94 0.09	0.10 0.01	0.89 0.08	0.10 0.01	1.04 0.10	0.10 0.01	0.86 0.08	0.09 0.01
	Adrenal (g) (g/kg)	1.05 0.10	0.08 0.01	1.17 0.11	0.08 0.00	1.15 0.12	0.08 0.01	1.10 0.10	0.05 0.00
	Pancreas (g) (g/kg)	21.2 2.1	2.8 0.3	20.8 1.9	2.3 0.2	23.4 2.3	5.7 0.4	23.4 2.1	1.6 0.1
Female	Body weight (kg)	9.4	0.8	10.3	0.7	10.3	0.4	9.8	0.8
	Brain (g) (g/kg)	84.6 9.2	2.8 0.8	72.1 7.1	4.0* 0.2	81.9 8.0	2.5 0.5	76.1 8.0	2.2 0.7
	Heart (g) (g/kg)	84.5 9.2	4.1 0.8	84.2 8.3	1.7 0.6	80.5 7.9	2.4 0.4	84.5 8.9	5.8 1.1
	Spleen (g) (g/kg)	26.6 2.8	3.4 0.1	21.6 2.1	0.9 0.1**	23.8 2.3	1.0 0.1*	24.7 2.5	2.8 0.2
	Lung (g) (g/kg)	72.7 7.9	5.6 1.0	72.5 7.2	1.6 0.5	75.7 7.4	0.9 0.4	71.1 7.5	3.3 0.8
	Liver (g) (g/kg)	253.0 27.1	18.0 0.5	256.3 25.2	8.8 1.4	264.8 25.9	5.9 0.7	242.9 25.1	18.4 1.4
	Kidney (g) (g/kg)	40.2 4.3	3.6 0.1	38.8 3.8	1.1 0.2	42.2 4.1	1.0 0.2	39.6 4.1	2.2 0.4

Table 5 Continued

	Dose (mg/kg)	0		1		3		9	
	No. of animals	4		4		4		4	
		Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.
Female	Ovary (g) (g/kg)	1.28 0.13	0.42 0.04	1.10 0.10	0.25 0.02	0.76 0.07	0.02 0.00	1.24 0.13	0.26 0.03
	Uterus (g) (g/kg)	9.01 0.89	4.94 0.46	11.09 1.02	4.62 0.39	4.41 0.44	1.55 0.16	11.10 1.18	3.66 0.44
	Thymus (g) (g/kg)	9.88 1.02	2.33 0.16	8.47 0.83	0.44 0.06	7.68 0.76	0.83 0.10	7.04 0.72	1.15 0.10
	Hypophysis (mg) (mg/kg)	71 7	7 0	70 7	2 0	71 7	9 1	70 7	5 0
	Thyroid (g) (g/kg)	0.86 0.09	0.06 0.01	0.93 0.09	0.08 0.00	0.85 0.08	0.08 0.00	0.74 0.08	0.06 0.01
	Adrenal (g) (g/kg)	0.98 0.11	0.02 0.01	1.16 0.11	0.12 0.01	1.29 0.13	0.08* 0.01	1.10 0.12	0.08 0.01
	Pancreas (g) (g/kg)	22.2 2.4	1.2 0.3	20.8 2.0	0.9 0.1	23.1 2.3	1.1 0.2	17.8 1.8	1.8 0.1

Significant difference from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)Table 6 Microscopical findings in dogs treated intravenously with argipidine for 6 months
Summary of microscopic findings

Sex		Male				Female			
Dose (mg/kg)		0	1	3	9	0	1	3	9
Findings	No. of animals	4	4	4	4	4	4	4	4
Liver : Cell accumulation		4 ⁰ (1.0)*	4 (1.0)	3 (0.8)	4 (1.0)	4 (1.0)	4 (1.0)	4 (1.0)	4 (1.0)
Pancreas : Acinous atrophy		0	0	1 (0.5)	0	0	0	0	0
Kidney : Calcium deposition in medulla		4 (1.3)	4 (1.3)	3 (1.3)	4 (1.0)	4 (1.5)	4 (1.8)	4 (1.5)	3 (0.8)
Urinary bladder : Round cell accumulation		0	0	0	0	1 (0.3)	0	0	0
Heart : Focal calcium deposition		0	0	0	0	1 (0.3)	0	0	0
: Interstitial mono nuclear cells infiltration		0	0	0	0	0	2 (0.5)	0	0
Lung : Bronchopneumonia		1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	0	0	0	0	0
: Leukocytes infiltration		0	0	0	0	1 (0.3)	0	0	0
Hypophysis : Micro hemorrhage		1 (0.3)	0	0	0	0	0	0	0

Table 6 Continued

Findings	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	1	3	9	0	1	3	9
	No. of animals	4	4	4	4	4	4	4	4
Mammary gl. : Proliferation		0*	0	0	0	2 (1.3)*	2 (1.0)	0	2 (1.0)
Testis : Hypospermatogenesis		1 (0.8)	0	0	0	—	—	—	—
Ovary : Periarthritis		—	—	—	—	1 (0.3)	0	0	0
: Cyst		—	—	—	—	0	0	0	1 (0.5)
Uterus : Endometrial proliferation		—	—	—	—	2 (1.3)	2 (1.5)	1 (0.3)	3 (1.8)
: Hemorrhage in submucosa		—	—	—	—	0	0	1 (0.3)	0
Vagina : Hypertrophy		—	—	—	—	—	—	—	1/1 (2.0)
Injection site : Hemorrhage		3 (2.3)	0	0	4 (2.3)	2 (1.0)	1 (0.3)	2 (1.5)	2 (0.8)
: Leukocytes infiltration		1 (0.3)	0	0	2 (0.5)	3 (1.0)	1 (0.5)	1 (0.3)	2 (0.5)

※: No. of animals showing the changes, *: The group mean microscopical score
Score; 0: No change(—), 1: Slight (+), 2: Moderate (++) , 3: Severe (+++)

mg/kg 群の Ca の低下が認められた。

雌: 1 ヶ月目の検査では, 1 mg/kg 群で GPT の低下が, 3 ヶ月目の検査では, 1 mg/kg 群で Na の上昇が認められた。また 6 ヶ月目の検査では, 3 mg/kg 群で TG の低下が認められた。

以上の変動値は, 事前検査値と同等ないし正常範囲内の変動で, かつ用量相関性も認められないことから投薬に関連しないものとみなした。

3 病理学的検査

1) 臓器重量 (Table 5)

対照群に比して統計学的な有意の差が 1 mg/kg 群の雌で脳の絶対重量および脾の相対重量の減少が, 3 mg/kg 群の雄で, 肝の絶対および相対重量の増加, 雌で脾の相対および副腎の絶対重量の増加が認められた。これらの変動は,

いずれも軽微で, 用量相関性がないことから偶発的なものとみなした。

2) 剖検

対照群を含めた全群に肺の淡褐色果および肺炎果, 精巣の片側性萎縮, 卵巣の肥大, 子宮壁の肥厚および乳房肥大が用量相関性を示さずに散発的にみられた。

3) 組織学的検査 (Table 6)

肝類洞内に組織球性細胞集簇果, 腎髄質内石灰沈着および投与局所の出血と白血球の浸潤が対照群を含めた全群に高率に発生した。また雌では, 乳腺組織の発達 (1 部例では乳汁分泌をみる) および子宮内膜増殖が投与量に関係なく比較的高率で, かつ同一個体に発現する傾向がみられた。その他脾臓組織の萎縮, 膀胱の円形細胞集簇果, 心の石灰沈着果および間質への単核性細胞浸潤, 下垂体の微少出血, 精巣の片

側性萎縮，卵巣の動脈周囲炎，卵巣嚢腫，子宮粘膜炎の出血および腔壁の肥厚が投与量に関係なく単発ないし散発して認められた。

III 総括および考察

抗トロンビン作用を有する argipidine の 1, 3 および 9 mg/kg/day をビーグル犬の雌雄に連日 6 ヶ月間静脈内投与し，慢性毒性を検討した。

一般検査では投与直後の嘔吐がほとんどの例で単発ないし散発ながら用量相関的発生傾向を示した。本剤のイス静注亜急性毒性試験¹⁾では，3, 9, 27 mg/kg/day を 1 ヶ月間投与したところ，9 mg/kg 投与の雄の 1/4 例に数回，27 mg/kg 投与では，雌雄の全例に投与期間の約半数日に同様の症状が認められていることから，投与直後の嘔吐は，本剤の投薬に関連する変化と考えられた。しかしながら，本症状はその発生頻度および程度から毒性学的意義は薄い

ものと思われた。

なお，長期連続投与による投与局所の障害に注目したが，本剤に関連する止血遅延，局所の炎症，組織の壊死などの変化は認められず，本剤の局所障害性はほとんどないものと思われた。

その他の諸検査では，投薬に関連すると思われる変化は認められなかった。

以上，argipidine の 1, 3 および 9 mg/kg/day を 6 ヶ月間静脈内投与したところ，3 mg/kg 以上の投与で投与直後の嘔吐が単発ないし散発した以外投薬に関連する明らかな変化は認められなかった。なお本試験条件下での最大無作用量は 1 mg/kg と推定された。

文 献

- 1) 加藤正信ほか：OM-7005 のイス 1 ヶ月静脈内投与亜急性毒性試験，三菱化成工業㈱社内報告 (1979)

* * *

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第1報〉 ラットにおける妊娠前および妊娠初期 静脈内投与試験

阿部 武丸* 松浦 郁夫* 大越 綾子*
田中 栄治** 大塚 孝子** 土志田 和夫**

Reproduction Studies of Argipidine (MD-805) (I)

—Fertility Study in Rats Treated Intravenously with Argipidine (MD-805)—

Takemaru Abe*, Ikuo Matsuura*, Ayako Ohkoshi*,
Eiji Tanaka**, Takako Ohtsuka**, and Kazuo Toshida**,**

* Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Sciences
** Present address: Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector,
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

Argipidine, (2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate, is a new thrombin inhibitor that shows a potent and highly selective inhibitory effect. The purpose of this study was to assess the influence of the compound upon general reproductive performance and fertility in rats. Argipidine was administered intravenously to male Sprague-Dawley rats at dosages of 3, 9 or 27 mg/kg/day for 64 days before pairing and throughout pairing. Female rats received the same dose levels for 14 days before pairing, through pairing and from Days 0 to 7 of gestation. Body weight gain of males and females receiving 27 mg/kg/day was slightly retarded up to pairing. Water intake of males receiving 27 mg/kg/day was increased during the latter half of the treatment period. Food consumption of males and females showed no treatment-related effect. The regularity of oestrus, mating performance and conception rate were unaffected by treatment. Litter size and fetal survival, and growth and develop-

* 株式会社三菱化成安全科学研究所

** 三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 安全性研究所

ment *in utero* showed no dosage-related changes attributable to treatment. No external, visceral or skeletal malformations were observed in the fetuses. It was concluded from this investigation the maximum no effective dose of argipidine is 27 mg/kg/day with regard to parental reproductive performance and fetal development.

KEY WORDS

Argipidine, Thrombin inhibitor,
Fertility study (Rat)

緒 言

今回、抗トロンビン薬 argipidine の生殖に及ぼす影響を検討する一環としてラットを用いた妊娠前および妊娠初期静脈内投与試験を行い、親動物の生殖機能および胎仔の発生に及ぼす影響を検索したので報告する。

I 実験材料および実験方法

1 被験物質

Argipidine は、Fig. 1 に示す構造を有し、分子量526.66の無臭の白色粉末である。水に極めて溶けにくく酢酸に溶けやすい。

2 供試動物および飼育条件

静岡県実験動物農業協同組合より、Slc: Wis. tar 系の SPF ラットを雄5週齢、雌10週齢で購入し、約1週間の検疫・馴化の後、健康な動物を実験に用いた。雄は体重別層化無作為抽出法により、各群に振り分け投与に供した。投与開始時の雄の体重は143~175 g であった。雌は2週間、性周期検査を行い、周期の安定した動物を体重別層化無作為抽出法により各群に振り分け投与に供した。投与開始時の雌の体重は

149~192 g であった。動物は温度 20.1~24.5 °C、相対湿度 37.3~76.8%、換気回数 10~15 回/hr、照明時間 12 hr (7時~19時) の環境下で飼育した。

動物の飼育には、床敷としてベータチップ (オリエンタル酵母工業) を入れたポリカーボネート製ケージ (日本チャールス・リバー) を使用し、1~2匹/ケージとした。動物には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業) および水道水を自由に摂取させた。

3 投与方法

Argipidine は、各濃度とも調製後の浸透圧が 300 mOsm/l になるように調製した食塩水に入れ、オートクレーブ (平山製作所, 121°C, 15 分間) により溶解、滅菌した。交尾成立前は至近日の体重を基準に、妊娠期間中は妊娠 0 日 (腔垢中の精子確認日) の体重を基準に 10 ml/kg の投与液量で、27 G 3/4 in. の注射針 (テルモ) を装着したシリンジ (テルモ) を用いて臨床適用経路に準じて尾静脈内に投与した。雄は交配開始前64日間および交配期間中、雌は交配開始前14日間および交配期間中、さらに交尾が確認された雌は妊娠 7 日まで1日1回投与した。

4 用量設定

Argipidine の生理食塩液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度は最大 2.5~3.0 mg/ml であり、動物体重 1 kg 当たり 10 ml が連続投与における投与液量の限界と考え、25~30 mg/10 ml/kg を最大投与可能量とした。一方、先に実施された亜急性毒性試験¹⁾の結果、最高

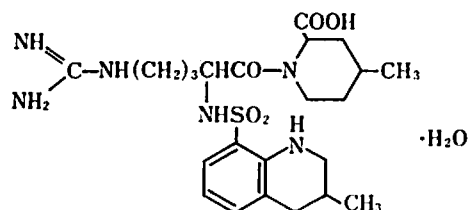


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

用量である 27 mg/kg 群において、投与初期にわずかな体重増加抑制が認められたが、死亡はなく、一般状態でも著変がなかったため、本実験では最高用量を投与限界量である 27 mg/kg とした。以下、公比 3 で中用量を 9 mg/kg、低用量を 3 mg/kg とし、対照群には生理食塩液 (300 mOsm/l) を投与した。

5 交配方法

雄は 64 日間、雌は 14 日間投与した後、同一用量群内で雌雄 1 対 1 で 14 日間同居させた (第 1 次交配)。毎朝、膣垢を検査し、精子が確認された場合を交尾成立とし、その日を妊娠 0 日とした。

第 1 次交配において、交尾が確認されなかった雄は無処置の雌と、雌は無処置の雄とさらに 14 日間同居させた (第 2 次交配)。

これらの処置によっても交尾が確認されなかった動物は投与を中止し、雌雄それぞれ別の無処置動物とさらに 14 日間同居させた (第 3 次交配)。

6 観察方法

1) 雄動物の観察

試験期間中は、一般状態を毎日観察し、投与開始後は体重、摂餌量および飲水量を週 1 回測定した。交配に使用した雄動物は、生殖器を中心に主要臓器の肉眼的異常の有無を観察した。

2) 雌動物の観察

試験期間中は、一般状態を毎日観察し、投与開始後は体重、摂餌量および飲水量を週 1 回測定し、交尾成立後は妊娠 0, 3, 7, 14 および 20 日にそれぞれ測定した。また、投与開始前後それぞれ 2 週間、性周期の観察を行った。交尾が確認されなかった雌動物は生殖器を中心に主要臓器の肉眼的異常の有無を観察した。

3) 胎仔の観察

交尾が確認された雌動物は、妊娠 20 日に diethyl ether 麻酔下で開腹し、卵巣および子宮を摘出し、妊娠黄体数、着床数、生存胎仔数および死亡胚数 (早期死亡、後期死亡) を観察した。なお、肉眼的に着床が観察されなかった子宮は、10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、着

床痕の有無を確認した²⁾。生存胎仔については、体重測定および性別判定を行い、口腔内を含む外表異常の有無を検査した。各腹約 1/2 の生存胎仔を acetone に、残り 1/2 を Bouin 液にそれぞれ固定した。

Acetone 固定胎仔は、Dawson の変法³⁾により、Alizarin red S 染色による骨格標本作製し、骨格異常の有無ならびに骨化進行度について検査した。Bouin 固定胎仔は Wilson 法⁴⁾および顕微解剖法⁵⁾の併用により内臓検査を実施した。

7 統計学的解析

性比、交尾率および受胎率については Fisher の直接確率法を、内臓検査および骨格検査成績については Mann-Whitney の U 検定を用いた。その他のデータについては、群間で等分散の仮説が棄却されないときは Student の t 検定を、棄却されるときは Welch の t 検定を用いた。また胎仔に関するデータについては、母動物 1 腹を標本単位として解析した。

II 実験成績

1 雄動物に及ぼす影響

各投与群とも死亡は認められず、27 mg/kg 群に投与後の止血不全によると思われる尾の汚れが認められた以外、特に投薬に起因すると考えられる一般状態の変化は観察されなかった。摂餌量には、投薬群と対照群との間に差は認められなかったが、27 mg/kg 群の投与 14 日目以降の体重増加量にわずかな抑制が認められた。また、27 mg/kg 群の投与 42 日目以降の飲水量に増加が認められた (Fig. 2, 3, 4)。

2 雌動物に及ぼす影響

各投与群とも死亡は認められず、27 mg/kg 群に投与後の止血不全によると思われる尾の汚れが認められた以外、特に投薬に起因すると考えられる一般状態の変化は観察されなかった。27 mg/kg 群の交配開始前の体重増加量にわずかな抑制が認められたが、摂餌量および飲水量には、投薬群と対照群との間に差は認められず、投薬によると思われる影響は認められな

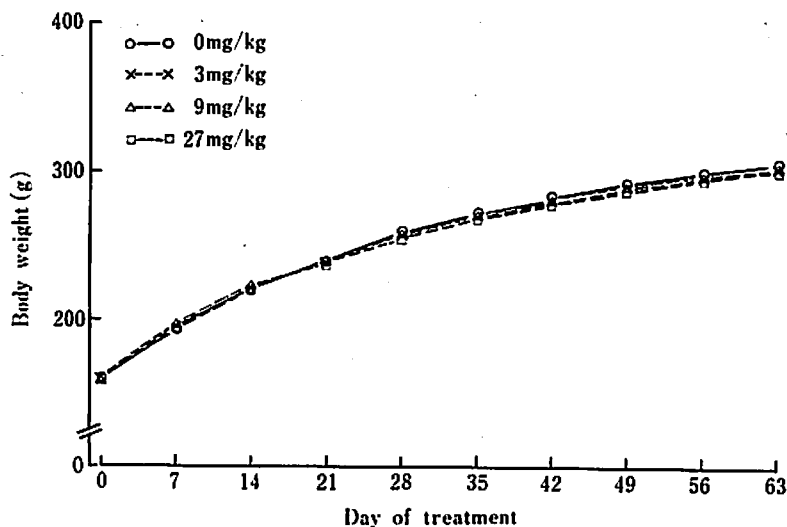


Fig. 2
Body weight of male rats
treated with argipidine

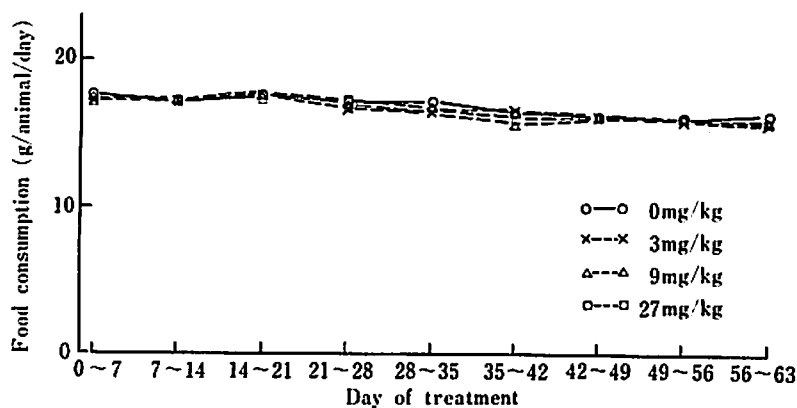


Fig. 3
Food consumption of
male rats treated
with argipidine

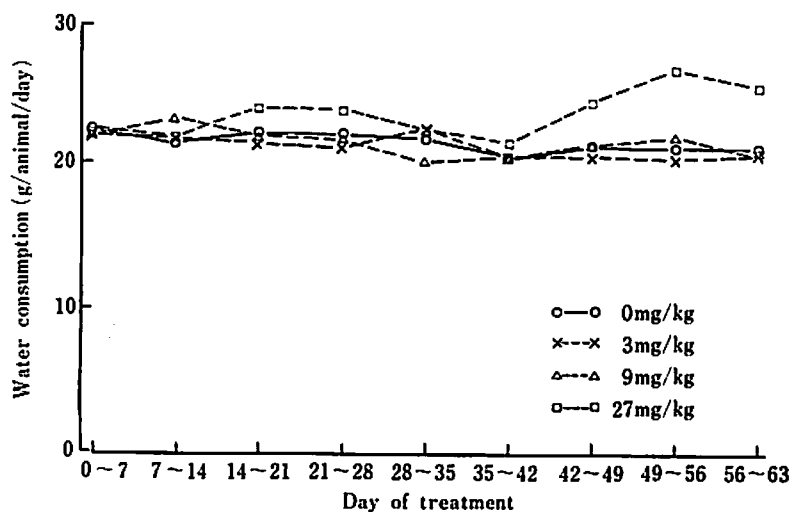


Fig. 4
Water consumption of
male rats treated
with argipidine

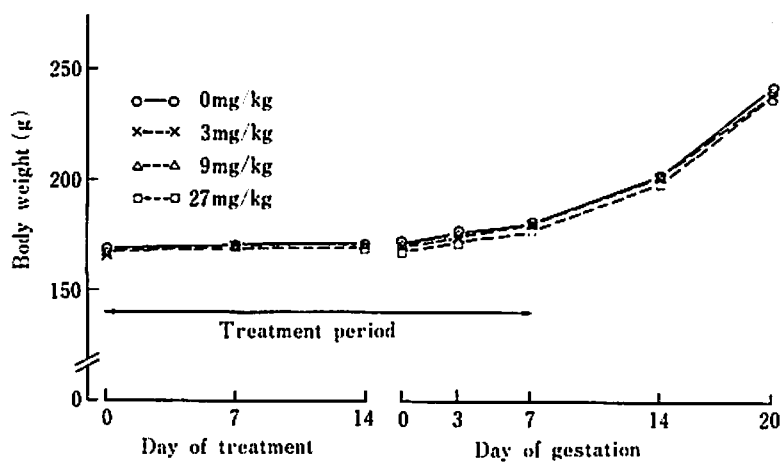


Fig. 5
Body weight of female rats treated with argipidine

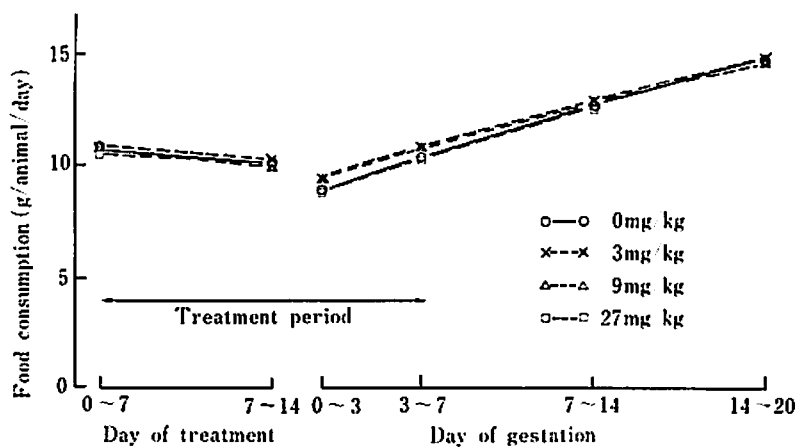


Fig. 6
Food consumption of female rats treated with argipidine

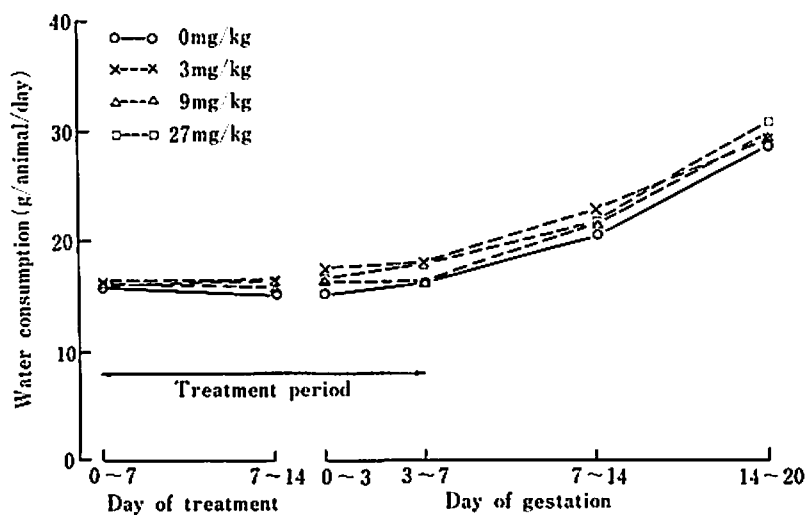


Fig. 7
Water consumption of female rats treated with argipidine

Table 1 Reproductive performance of rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of animals examined	28	27	28	27
Estrous cycle (day)				
Before treatment	4.9±0.2 ¹⁾	5.0±0.2	4.9±0.2	4.9±0.2
During treatment	5.1±0.8	5.3±0.9	5.0±0.4	5.0±0.5
No. of pairs	28	27	28	27
Coital rate (%) ²⁾	75.0 (21/28)	88.9 (24/27)	85.7 (24/28)	81.5 (22/27)
Pre-coital interval (day) ³⁾	5.9±3.0	5.4±4.0	3.5±2.6**	4.6±2.5
Conception rate (%) ⁴⁾	85.7 (18/21)	83.3 (20/24)	87.5 (21/24)	90.9 (20/22)

¹⁾ Mean±S.D. ²⁾ (No. of animals mated/No. of animals paired)×100 ³⁾ Days between initial pairing and mating ⁴⁾ (No. of animals achieved pregnancy/No. of animals mated)×100

** : Significantly different from control at $p<0.01$

Table 2 Litter data of rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pregnant animals	18	20	21	20
No. of corpora lutea	10.4±1.1 ¹⁾	10.4±0.8	10.5±0.9	10.8±1.1
No. of implantations	9.4±2.3	8.9±2.0	9.1±2.6	9.0±2.7
No. of resorptions				
Early ²⁾	0.28±0.46	0.60±1.05	0.71±0.90	0.50±0.83
Late ³⁾	0.11±0.47	0.00±0.00	0.05±0.22	0.05±0.22
Implantation loss (%)				
Pre-implantation ⁴⁾	10.0±20.4	14.0±19.8	13.5±22.6	16.8±22.1
Post-implantation ⁵⁾	3.9±6.4	5.9±10.0	10.9±22.1	5.7±8.7
No. of live fetuses				
Male	4.8±1.8	3.9±1.7	4.5±2.0	4.6±2.2
Female	4.2±1.8	4.4±1.8	3.9±2.2	3.8±1.9
Fetal weight (g)				
Male	3.21±0.20	3.30±0.21	3.28±0.21	3.27±0.25
Female	2.99±0.14	3.04±0.20	3.03±0.15	3.00±0.18

¹⁾ Mean±S.D. ²⁾ No recognisable fetal tissue present ³⁾ Fetal tissue present

⁴⁾ [(No. of corpora lutea—No. of implantations)/No. of corpora lutea]×100

⁵⁾ [(No. of implantations—No. of live fetuses)/No. of implantations]×100

った (Fig. 5, 6, 7)。

投与開始前後の性周期の検査において、投薬に起因すると思われる性周期の変化は認められなかった。

3 交配成績

第1次交配において、対照群を除く各投与群の交尾率はいずれも80%以上であり、受胎率は対照群を含め全群とも80%以上であった。9

mg/kg 群の交尾所要日数が対照群に比べて短かったが、用量に依存した変化ではなかった (Table 1)。第2次交配終了時点において交尾が確認されなかった雄動物は対照群4匹、3 mg/kg 群1匹、9 mg/kg 群3匹、27 mg/kg 群4匹、雌動物は各群4, 0, 1, 2匹であり、交配成績には投薬による影響は認められなかった。第3次交配において、新たな交尾の成立は

Table 3 Observation at visceral and skeletal examination of fetuses derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
Visceral examination				
No. of fetuses examined	76	78	84	81
Finding				
Abnormal origin of left subclavian artery	$2.4 \pm 6.6^{1,2)}(2)^{3)}$	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$
Skeletal examination				
No. of fetuses examined	86	89	92	88
Findings				
Separation of vertebral centra	$0.01 \pm 0.05^{4)}$ (1)	$0.05 \pm 0.17 (2)$	$0.01 \pm 0.04 (1)$	$0.09 \pm 0.24 (4)$
Separation of sternbrae $\pm^{3)}$	$0.02 \pm 0.06 (2)$	$0.01 \pm 0.06 (1)$	$0.00 \pm 0.00 (0)$	$0.00 \pm 0.00 (0)$
+	$0.07 \pm 0.14 (4)$	$0.05 \pm 0.09 (5)$	$0.03 \pm 0.08 (3)$	$0.11 \pm 0.25 (5)$
Asymmetry of sternbrae $\pm$	$0.63 \pm 0.33 (17)$	$0.48 \pm 0.28(19)$	$0.65 \pm 0.54(17)$	$0.59 \pm 0.45(16)$
+	$0.30 \pm 0.29 (11)$	$0.18 \pm 0.25 (8)$	$0.17 \pm 0.18(11)$	$0.26 \pm 0.30(13)$
++	$0.07 \pm 0.12 (5)$	$0.10 \pm 0.15 (8)$	$0.03 \pm 0.07 (3)$	$0.13 \pm 0.23 (8)$
Transverse foramen of the 7th cervical vertebra	$5.5 \pm 10.8^{2)}$ (4)	$3.5 \pm 8.6 (3)$	$2.8 \pm 7.0 (3)$	$1.3 \pm 5.6 (1)$
Cervical ribs	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$1.0 \pm 4.5 (1)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$
14th ribs	$0.9 \pm 3.9 (1)$	$1.7 \pm 7.4 (1)$	$8.5 \pm 15.6 (6)$	$3.5 \pm 11.8 (2)$
Closure of transverse foramen of the 5th cervical vertebra	$3.6 \pm 8.4 (3)$	$0.8 \pm 3.7 (1)$	$2.0 \pm 6.2 (2)$	$2.0 \pm 8.9 (1)$
Incomplete ossification of pubis	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$1.0 \pm 4.5 (1)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$
Incomplete ossification of cervical vertebral arches	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.0 \pm 0.0 (0)$	$0.8 \pm 3.7 (1)$

¹⁾ Mean $\pm$ S.D. ²⁾ % fetal incidence ³⁾ Number of litters affected ⁴⁾ Number of bones affected

⁵⁾ $\pm$: Minimal, + : Slight, ++ : Moderate

確認されなかった。

交配に用いた雄および交尾が確認されなかった雌の剖検において、投薬に起因すると考えられる肉眼的変化は認められなかった。

4 妊娠期間中の F₀ 母動物に及ぼす影響

各投与群とも死亡や流産は認められず、27 mg/kg 群に投与後の止血不全によると思われる尾の汚れが認められた以外、特に投薬に起因すると考えられる一般状態の変化は観察されなかった。第1次交配において交尾が成立した母動物の体重、摂餌量および飲水量には、投薬群と対照群との間に差は認められず、投薬によると思われる影響は認められなかった (Fig. 5, 6, 7)。妊娠 20 日の剖検において、特に投薬に起因すると考えられる肉眼的変化は認められな

かった。

5 F₁ 胎仔に及ぼす影響

妊娠 20 日の母動物の剖検時の検査において、妊娠黄体数、着床数、死亡胚数、着床前胚死亡率、着床後胚死亡率、生存胎仔数、性比および胎仔体重のいずれの項目についても投薬群と対照群との間に差は認められず、投薬によると思われる影響は認められなかった (Table 2)。F₁ 胎仔の外表面異常は認められなかった。

胎仔の内臓検査において、対照群の 2 例に左鎖骨下動脈の起始部異常が認められた以外、特に内臓異常は認められなかった (Table 3)。

胎仔の骨格検査において、骨化進行度には投薬群と対照群との間に差は認められず、投薬に起因すると考えられる骨格異常も認められな

った (Table 3)。

III 総括および考察

Argipidine を 3, 9 および 27 mg/kg の用量で Wistar 系ラットに、雄は交配開始前64日間および交配期間中、雌は交配開始前14日間および交配期間中、さらに交尾が確認された雌は妊娠 7 日まで尾静脈内に投与し、親動物の生殖機能および胎仔の発生に及ぼす影響を検討した。

雌雄とも 27 mg/kg 群に投与後の止血不全によると思われる尾の汚れが認められた以外、投薬に起因すると考えられる一般状態の変化は認められず、死亡例は観察されなかった。摂餌量には投薬による影響は認められなかったが、交配開始前の 27 mg/kg 群の雌雄の体重増加量にわずかな抑制が認められた。また、投与42日目以降 27 mg/kg 群の雄動物の飲水量に増加傾向が認められた。

投与開始前後の性周期の検査において投薬に起因すると考えられる性周期の変化は認められなかった。交配成績は、いずれの投薬群においても交尾率、受胎率ともに80%以上の高値を示し、argipidine は雌雄の交尾能や受精能力には影響を与えないものと考えられた。

妊娠期間中の F₀ 母動物に、死亡や流産は認められず、27 mg/kg 群の尾の汚れ以外に一般状態の変化は認められなかった。また、体重、摂餌量、飲水量および妊娠20日の剖検所見においても投薬による影響は認められなかった。

妊娠20日の F₀ 母動物の剖検時の検査において、妊娠黄体数、着床数、死亡胚数、生存胎仔数および胎仔体重には、投薬群と対照群との間に差は認められず、本薬物は配偶子形成、受精および妊娠に対し影響を与えないものと考えられた。

F₁ 胎仔の外表、内臓および骨格検査において投薬に起因すると考えられる異常は認められなかった。

以上のように、argipidine の 3, 9 および 27 mg/kg をラットの妊娠前および妊娠初期に静脈内投与した結果、交配開始前の雌雄の体重増加量の抑制および雄動物の飲水量の増加が 27 mg/kg で認められたが、親動物の生殖機能および胎仔の発生に及ぼす影響は 27 mg/kg においても認められなかった。

よって、親動物の一般毒性学的無影響量は 9 mg/kg、親動物の生殖および次世代に関する無影響量は、27 mg/kg であると考えられる。

文 献

- 1) 土志田和夫, 伊藤 実, 大谷裕子: 薬理と治療 14(Suppl. 5): 941 (1986)
- 2) Salewski E.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* 247: 367 (1964)
- 3) Dawson A.B.: *Stain Technol.* 1: 123 (1926)
- 4) Wilson J.G. & Warkany J.: *Teratology, Principles and Techniques*, Univ. of Chicago Press (1965), p. 262
- 5) 西村耕一: 先天異常 14(1): 23 (1974)

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第2報〉 ラットにおける胎仔の器官形成期 静脈内投与試験

阿部 武丸* 松浦 郁夫*

大塚 孝子** 土志田 和夫**

Reproduction Studies of Argipidine (MD-805) (II)

—Teratogenicity Study in Rats Treated Intravenously with Argipidine (MD-805)—

Takemaru Abe*, Ikuo Matsuura*, Takako Ohtsuka*,** and Kazuo Toshida*,**

* Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Sciences

** Present address: Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector,
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

Argipidine, (2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate, is a new thrombin inhibitor that shows a potent and highly selective inhibitory effect. The purpose of this study was to assess the embryo/fetal toxicity and teratogenic potential of the compound in rats. Argipidine was administered intravenously to pregnant Sprague-Dawley rats (*F*₀) at dosages of 3, 9 or 27 mg/kg/day from Day 7 to Day 17 of gestation. Two-thirds of the *F*₀ females were killed on Day 20 of gestation and their uterine contents were examined. One-third of the *F*₀ females were allowed to give birth and the growth, behavioral responses, reproductive performance and fertility of the offspring (*F*₁) were investigated. No maternal toxicity was seen up to 27 mg/kg/day with respect to body weight gain, food and water intake, parturition and lactation. Fetal survival, development and growth *in utero* were unaffected by treatment. The adrenal glands weights of *F*₁ females derived from *F*₀ females receiving 27 mg/kg/day were slightly increased. In all other respects, the performance of the *F*₁ offspring showed

* 株式会社三菱化成安全科学研究所

** 三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 安全性研究所

no treatment-related effect. It was concluded from this investigation the maximum no effective dose of argipidine was 27 mg/kg/day with regard to maternal reproductive performance and was 9 mg/kg/day with regard to the F₁ offspring.

KEY WORDS

Argipidine, Thrombin inhibitor,
Teratology study (Rat)

緒 言

今回、抗トロンビン薬 argipidine の生殖に及ぼす影響を検討する一環としてラットを用いた器官形成期静脈内投与試験を行い、母動物、胎仔および出生仔に及ぼす影響を検索したので報告する。

I 本 実 験

1 実験材料および実験方法

1) 被験物質

Argipidine は、Fig. 1 に示す構造を有し、分子量526.66の無臭の白色粉末である。水に極めて溶けにくく酢酸に溶けやすい。

2) 供試動物および飼育条件

静岡県実験動物農業協同組合より Slc: Wistar 系の SPF ラットを雄9週齢、雌8週齢で購入し、約1週間の検疫・馴化の後、健康な動物を実験に用いた。動物は温度 22.0~24.0°C、相対湿度 34.0~71.0%、換気回数 15回/hr、照明時間 12 hr (7時~19時)の環境下で飼育した。

動物の飼育には、検疫・馴化期間中は金網ケージ (トキワ科学器械) を、以後は床敷としてベータチップ (オリエンタル酵母工業) を入れ

たポリカーボネート製ケージ (トキワ科学器械) を使用し、1~4匹/ケージとした。動物には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業) および水道水を自由に摂取させた。

交配は、検疫・馴化終了後、雄と雌を1対1で一夜同居させ、翌朝陰垢中に精子の確認されたものを妊娠動物とみなし、この日を妊娠0日として起算した。雌の妊娠0日の体重は133~178gであった。

3) 投与方法

Argipidine は、各濃度とも調整後の浸透圧が 300 mOsm/l になるように調整した食塩水に入れ、オートクレーブ (平山製作所, 121°C, 20分間) により溶解、滅菌した。

妊娠6日の体重を基準に 10 ml/kg の投与液量で、27 G 3/4 in. の注射針 (テルモ) を装着したシリンジ (テルモ) を用いて臨床適用経路に準じて尾静脈内に妊娠7~17日まで1日1回投与した。

4) 用量設定

Argipidine の生理食塩液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度は最大 2.5~3.0 mg/ml であり、動物体重 1 kg 当たり 10 ml が投与液量の限界と考え、27 mg/kg を最高用量としてラットの妊娠7~17日に静脈内投与した予備実験を行った。その結果、27 mg/kg 群においても、母動物に死亡はなく、一般状態でも著変がなかったため、本実験では最高用量を投与限界量である 27 mg/kg とした。以下、公比3で中用量を 9 mg/kg、低用量を 3 mg/kg とし、対照群には生理食塩液 (300 mOsm/l) を投与した。

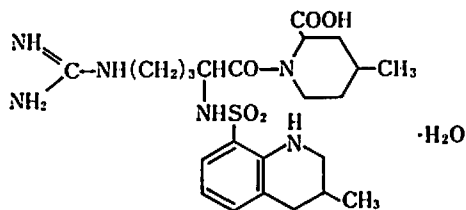


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

5) 観察方法

a) F₀ 母動物の観察

試験期間中は一般状態を毎日観察し、体重、摂餌量および飲水量を妊娠 0, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 日および分娩後 0, 7, 14, 21 日に測定した。

特に授乳期間中は、分娩および哺育状態に注目した。妊娠 20 日に母動物の主要臓器を肉眼的に観察した後、肝臓を摘出し、病理組織学的検査を行った。

F₁ 出生仔の離乳後、母動物の主要臓器を肉眼的に観察し、着床痕数を算定した。

b) F₁ 胎仔の観察

各群の約 2/3 の母動物は、妊娠 20 日に diethyl ether 麻酔下で開腹し、卵巣および子宮を摘出し、妊娠黄体数、着床数、生存胎仔数および死亡胚数（早期死亡、後期死亡）を観察した。なお、肉眼的に着床が観察されなかった子宮は、10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、着床痕の有無を確認した¹⁾。生存胎仔については、体重測定および性別判定を行い、口腔内を含む外表異常の有無を検査した。各腹約 2/3 の生存胎仔を acetone に、残り約 1/3 を Bouin 液にそれぞれ固定した。

Acetone 固定胎仔は、Dawson の変法²⁾により Alizarin red S 染色による骨格標本作製し、骨格異常の有無ならびに骨化進行度について検査した。Bouin 固定胎仔は、Wilson 法³⁾に従って内臓検査を実施した。

c) F₁ 出生仔の観察

各群の約 1/3 の母動物は出生仔の生後発育の検査を行うために自然分娩させた。出生日の生存仔数、死亡仔数、性別、口腔内を含む外表異常の有無を検査し、生存仔については体重を測定した。さらに、同腹生存仔数を 1 腹当たり雌雄各 4 匹計 8 匹に調整した。なお雌雄いずれかが 4 匹に満たない場合には、用量、出生日が同じである他の母動物の出生仔を補充した。以後、生存仔については、生後 21 日まで一般状態の観察を行い、体重測定を週 1 回行うとともに、被毛発生、耳介開展、上下歯芽萌出、外耳

道開口および眼瞼開裂を観察した。

離乳後、出生仔は雌雄別々に飼育し、毎日一般状態の観察を行い、精巣下降あるいは陰道口を観察するとともに 8 週齢まで体重、摂餌量および飲水量を週 1 回測定した。

4 週齢で全例について、平面正向反射、視覚性踏み直し反応、同側屈曲反射、断崖回避反応、聴覚性驚愕反応、角膜反射および棒保持反応について検査した。

5 週齢で各群雌雄それぞれ 10 例について、open field 試験を行い、3 分間当たりの ambulation, rearing, preening, grooming, defecation および urination の各行動を観察した。

6 週齢で各群雌雄それぞれ 10 例について、オーディオメーター（室町機械、リオン）を用いて、耳介反射による聴覚試験（500, 3200 および 20000 Hz）を行った。

聴覚試験に用いた動物について、9 週齢で pole-climbing 試験を 1 日 10 試行で連続 5 日間実施した。条件刺激はブザー（5 秒間）、無条件刺激は電気刺激（雄：3.0 mA、雌：2.6 mA、5 秒間）を用い、試行の間隔は 10~50 秒とした。

Open field 試験に用いた動物について、10 週齢で diethyl ether 麻酔下で開腹し、主要臓器を肉眼的に観察した後、脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣あるいは卵巣を摘出し、湿重量を測定した。また眼球を摘出した後、病理組織学的検査を実施した。

また、10 週齢で生殖機能試験として、各群雌雄それぞれ 20 例について同一群内で兄妹交配を避け、雌雄 1 対 1 で 14 日間同居させた。

交尾が確認されなかった交配対の雄は対照群の未交尾雌と、雌は対照群の交尾が確認された雄とさらに 14 日間同居させた。

交尾が確認された雌については、妊娠 0 日および 20 日に体重を測定し、全例妊娠 20 日に屠殺した。F₀ 母動物に準じて諸検査を行った後、生存胎仔を acetone および Bouin 液に浸漬、保存した。

6) 統計学的解析

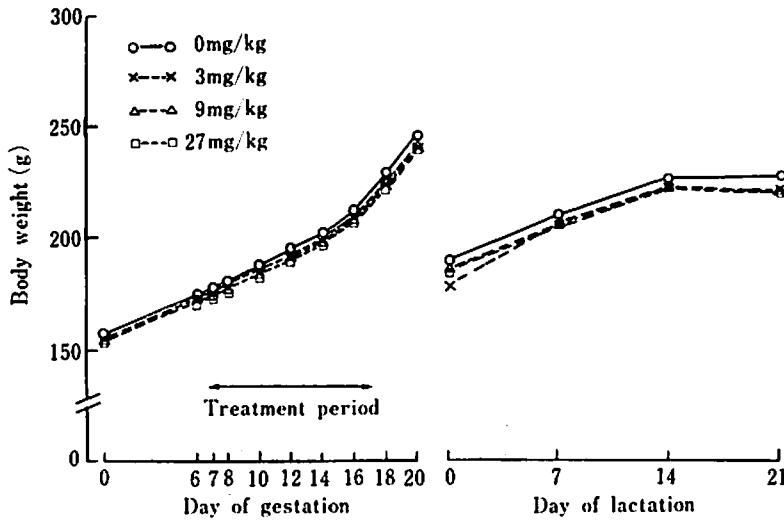


Fig. 2
Body weight of F_0 females treated with argipidine

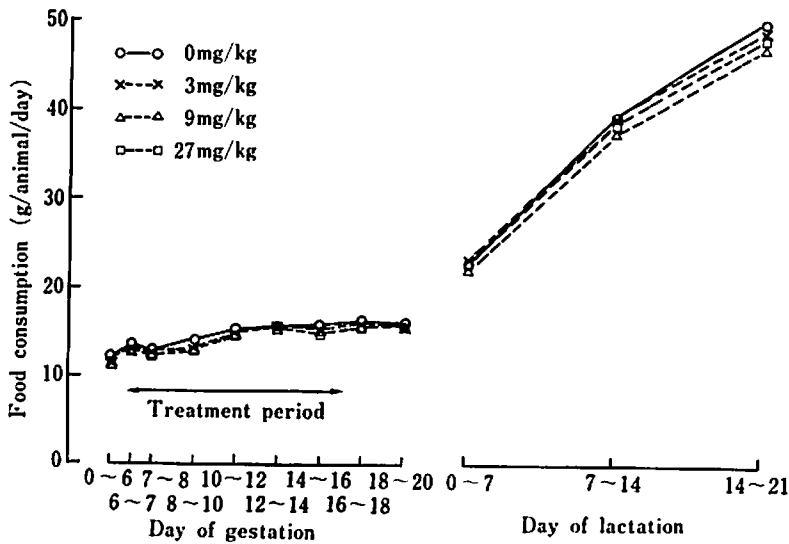


Fig. 3
Food consumption of F_0 females treated with argipidine

出産率, 生存率, 交尾率および受胎率については Fisher の直接確率法を, 内臓検査および骨格検査成績, 着床後胚生存率, 生後形態分化および交尾所要日数については Mann-Whitney の U 検定を用いた。その他のデータについては, 群間で等分散の仮説が棄却されないときは Student の t 検定を, 棄却される場合は Welch の t 検定を用いた。また, 胎仔あるいは出生仔 (4 週齢以前) に関するデータについては, 母動物 1 腹を標本単位として解析した。

2 実験成績

1) 妊娠期間中の F_0 母動物に及ぼす影響

各投与群とも死亡や流産は認められず, 特に投薬に起因すると考えられる一般状態の変化は観察されなかった。体重, 摂餌量および飲水量には, 投薬群と対照群との間に差は認められず投薬によると思われる影響は認められなかった (Fig. 2, 3, 4)。妊娠 20 日の剖検において, 対照群を含む全群に肺炎病巣が認められたが, 特に投薬に起因すると考えられる肉眼的変化は認

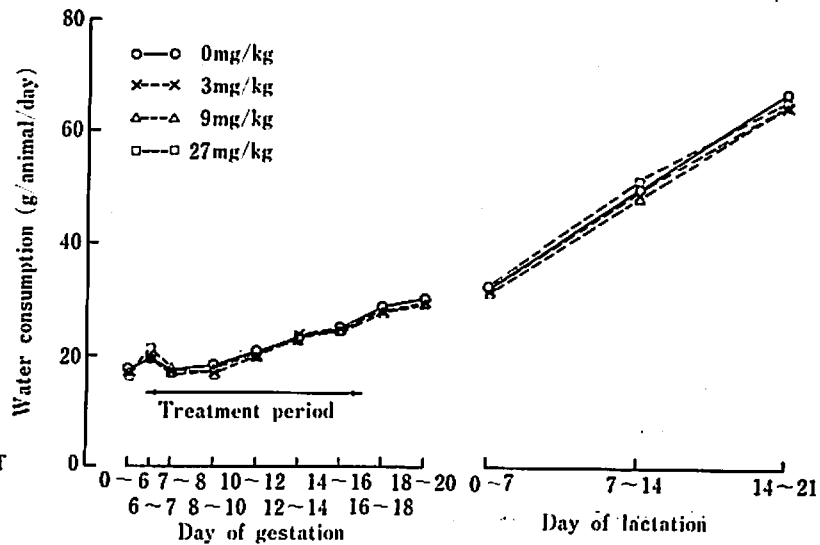


Fig. 4

Water consumption of
F₀ females treated with
argipidine

Table 1 Litter data of rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pregnant animals	22	23	24	23
No. of corpora lutea	12.6±1.7 ¹⁾	11.9±1.8	12.6±1.2	12.3±1.0
No. of implantations	10.9±2.6	8.6±3.4*	10.7±2.8	10.6±2.5
No. of resorptions				
Early ²⁾	0.36±0.85	0.17±0.39*	0.46±1.02	0.57±0.95
Late ³⁾	0.05±0.21	0.04±0.21	0.04±0.20	0.00±0.00
Implantation loss (%)				
Pre-implantation ⁴⁾	12.9±20.6	28.6±27.4*	15.7±19.8	14.1±20.8
Post-implantation ⁵⁾	4.6±10.5	2.1±4.2	6.5±15.4	5.6±9.1
No. of live fetuses				
Male	5.2±2.2	4.3±2.6	4.8±2.3	5.0±2.2
Female	5.3±2.3	4.0±2.5	5.3±2.3	5.0±1.8
Fetal weight (g)				
Male	3.40±0.23	3.42±0.62	3.34±0.25	3.36±0.18
Female	3.16±0.20	3.31±0.47	3.21±0.21	3.16±0.14

¹⁾ Mean±S.D. ²⁾ No recognisable fetal tissue present ³⁾ Fetal tissue present ⁴⁾ [(No. of corpora lutea—No. of implantations)/No. of corpora lutea] × 100 ⁵⁾ [(No. of implantations—No. of live fetuses)/No. of implantations] × 100

* : Significantly different from control at $p < 0.05$

められなかった。また、肝重量およびその病理組織学的検査においても投薬によると思われる変化は認められなかった。

2) F₁ 胎仔に及ぼす影響

妊娠20日の母動物の剖検時の検査において、

3 mg/kg 群の着床数、早期死亡胚数、着床前胚死亡率に有意差が認められたが、いずれも9および27 mg/kg 群に同様の変化が認められていないことから偶発的な変化であると考えられる (Table 1)。

Table 2 Observation at visceral and skeletal examination of fetuses derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
Visceral examination				
No. of fetuses examined	77	63	82	76
Findings				
Anophthalmia	0.0±0.0 ¹⁾ (0) ²⁾	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	1.1±5.2 (1)
Microphthalmia	0.0±0.0 (0)	1.2±5.5 (1)	0.0±0.0 (0)	1.1±5.2 (1)
Dilatation of renal pelvis	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	3.3±11.4 (2)
Skeletal examination				
No. of fetuses examined	154	129	161	154
Findings				
Separation of vertebral centra	0.03±0.08 ³⁾ (3)	0.03±0.06 (4)	0.05±0.07 (8)	0.05±0.10 (6)
Separation of sternebrae ± ⁴⁾	0.00±0.00 (0)	0.01±0.03 (1)	0.00±0.00 (0)	0.01±0.03 (1)
+	0.07±0.13 (7)	0.02±0.07 (2)	0.07±0.10 (9)	0.06±0.08 (9)
Asymmetry of sternebrae ±	0.32±0.27 (16)	0.33±0.42 (14)	0.27±0.24 (16)	0.38±0.46 (19)
+	0.13±0.18 (12)	0.14±0.21 (10)	0.12±0.16 (12)	0.09±0.13 (9)
++	0.00±0.00 (0)	0.01±0.05 (2)	0.06±0.13 (5)	0.01±0.04 (1)
Cervical ribs	1.2±3.8 ⁵⁾ (2)	0.0±0.0 (0)	1.2±6.0 (1)	0.0±0.0 (0)
14th ribs	5.5±7.7 (8)	1.7±5.8 (2)	5.1±8.7 (7)	6.0±12.7 (6)

¹⁾ Mean±S.D. ²⁾ % fetal incidence ³⁾ Number of litters affected ⁴⁾ Number of bones affected

⁵⁾ ± : Minimal, + : Slight, ++ : Moderate

F₁ 胎仔の外表異常は認められなかった。胎仔の内臓検査において、3 mg/kg 群に小眼球症が1例、27 mg/kg 群に無眼球症が1例認められた。また、27 mg/kg 群に腎盂拡張が2例認められ、うち1例は小眼球症を伴っていた (Table 2)。胎仔の骨格検査において、椎体二分、14本肋骨等の骨格異常の発生率に変化は認められず、骨化進行度についても特に異常は認められなかった (Table 2)。

3) 授乳期間中の F₀ 母動物および F₁ 出生仔に及ぼす影響

分娩時の観察において、分娩遅延、難産等の異常は認められず、その後の授乳行動についても、9および27 mg/kg 群に1例ずつ授乳不良の母動物が認められたのみで、投薬に起因すると思われる変化は認められなかった。また、出生

仔の外表異常も認められなかった。

9 mg/kg 群の雄の生存仔数が有意に少なく、雌雄の生存仔数の合計も少なかったが、着床後胚生存率には変化が認められないことから、これは着床数が少なかったことに起因した変化であり、投薬との関連はないと思われる。また、妊娠期間、出産率についても特に異常は認められなかった (Table 3)。授乳期間中の体重、摂餌量および飲水量については群間に差は認められなかった (Fig. 2, 3, 4)。分娩後21日に行った F₀ 母動物の剖検において、対照群を含む全群に肺炎病巣が認められたが、投薬に起因すると思われる肉眼的変化は認められなかった。

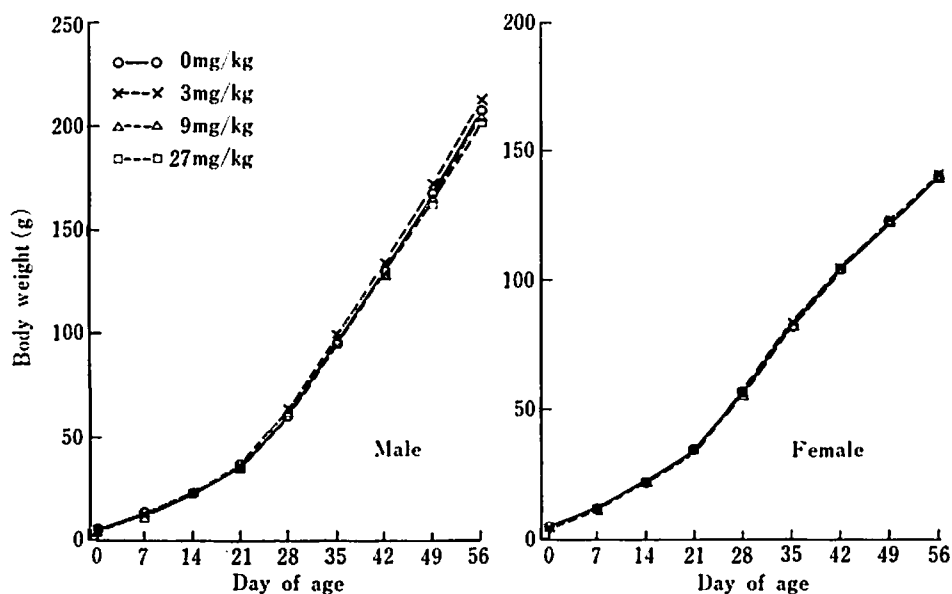
F₁ 出生仔の生後21日の生存率には群間に差は認められなかった。

Table 3 Litter data at birth and during lactation of rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pregnant animals	16	13	14	17
Gestation length	29.9 ± 0.3 ¹⁾	21.9 ± 0.3	21.9 ± 0.3	21.9 ± 0.4
Gestation index (%) ²⁾	100.0(16/16)	100.0(13/13)	100.0(14/14)	100.0(17/17)
No. of live offspring born				
Male	5.0 ± 2.0	6.2 ± 1.5	3.9 ± 2.1*	5.0 ± 2.6
Female	5.9 ± 2.5	4.2 ± 1.5	5.1 ± 2.2	4.4 ± 2.1
Post-implantation survival index (%) ³⁾	98.9 ± 3.1	96.6 ± 5.7	95.1 ± 6.6	93.9 ± 12.5
Viability index on Day 21 after birth (%) ⁴⁾	99.2(119/120)	100.0(96/96)	84.6(88/104)	90.4(94/104)

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ (No. of live litters/No. of females with evidence of implantation) × 100 ³⁾ (No. of live offspring born/No. of implantation sites) × 100 ⁴⁾ (No. of live offspring on Day 21 after birth/No. of live offspring after litter size adjustment on Day 1) × 100

* : Significantly different from control at $p < 0.05$

**Fig. 5** Body weight of F_1 offspring derived from rats treated with argipidine

授乳期間中の F_1 出生仔の体重には、群間に差は認められなかった (Fig. 5)。生後形態分化の観察において、3 mg/kg 群の雄および 9 mg/kg 群の雌雄の耳介開展、および 9 mg/kg 群の雌の下歯芽萌出に有意差が認められたが、

いずれも用量に依存した変化ではなく投薬との関連はないものと考えられた (Table 4)。また、対照群を含む全群に一過性の鼻炎症状が認められたが、投薬に起因すると考えられる一般状態の異常は認められなかった。

Table 4 Physical development of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
Hair growth				
Male	2.3±0.5 ^{1),2)}	1.9±0.5	2.0±0.1	2.1±0.3
Female	2.1±0.6	2.0±0.5	2.0±0.1	2.1±0.3
Pinna unfolding				
Male	3.3±0.4	3.0±0.4*	2.9±0.1**	3.0±0.3
Female	3.1±0.4	3.1±0.3	2.8±0.2*	3.1±0.3
Incisor eruption				
Male Upper	9.4±0.7	9.4±0.5	9.4±0.5	9.2±0.5
Lower	11.2±0.7	11.0±0.5	11.1±0.3	11.2±0.4
Female Upper	9.4±0.7	9.3±0.4	9.3±0.3	9.1±0.8
Lower	11.0±0.7	11.1±0.8	11.4±0.6*	11.2±0.8
Auditory canal opening				
Male	13.7±0.5	13.7±0.4	13.6±0.4	13.7±0.4
Female	13.3±0.6	13.2±0.3	13.2±0.2	13.3±0.4
Eye opening				
Male	17.1±0.7	16.9±0.5	17.0±0.1	17.0±0.4
Female	16.8±0.7	16.8±0.5	16.8±0.2	16.8±0.6
Testes descent	23.4±0.8	23.6±0.9	23.3±0.5	23.5±1.3
Vaginal opening	40.1±1.8	39.6±2.0	40.3±1.9	40.8±1.8

¹⁾ Days after birth on which the onset of the developmental parameters occurred ²⁾ Mean±S.D.* : Significantly different from control at $p < 0.05$ ** : Significantly different from control at $p < 0.01$

Table 5 Open field test of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
Male				
No. of animals examined	10	10	10	10
Ambulation	78.6±49.3 ¹⁾	75.0±36.8	69.2±44.9	75.1±38.7
Rearing	14.3±9.0	12.5±7.9	15.0±9.9	12.5±7.5
Preening	1.9±0.7	2.5±7.0	2.3±1.7	2.8±1.8
Grooming	0.2±0.6	0.4±1.0	0.0±0.0	0.2±0.4
Defecation	0.7±1.9	0.1±0.3	0.2±0.6	0.3±0.7
Urination	0.3±0.5	0.2±0.4	0.0±0.0	0.1±0.3
Female				
No. of animals examined	10	10	10	10
Ambulation	86.1±43.1	104.8±24.9	112.6±15.9	84.7±48.0
Rearing	15.2±8.1	21.2±8.9	20.6±5.8	15.7±9.7
Preening	3.4±2.5	1.6±1.1	2.3±1.3	2.4±1.5
Grooming	0.2±0.6	0.1±0.3	0.3±0.7	0.1±0.3
Defecation	0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Urination	0.2±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

¹⁾ Mean±S.D.

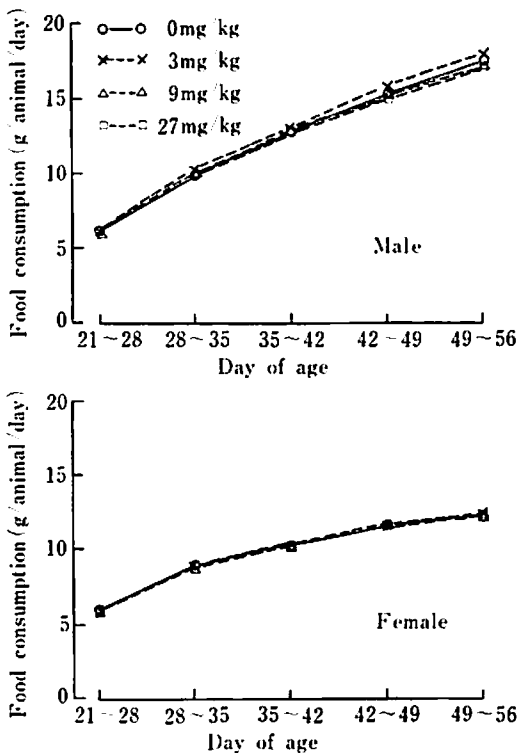


Fig. 6 Food consumption of F_1 offspring derived from rats treated with argipidine

4) 離乳後の F_1 出生仔に及ぼす影響

離乳後の F_1 出生仔の体重、摂餌量および飲水量に、投薬群と対照群との間に差は認められなかった (Fig. 5, 6, 7)。

4週齢で行った平面正向反射、断崖回避等の検査において群間に差は認められなかった。open field 試験において、投薬群と対照群との間に差は認められなかった (Table 5)。聴覚試験では投薬に起因すると思われる変化は認められなかった。pole-climbing 試験における条件回避反応数および無反応数に、群間の差は認められなかった (Fig. 8)。

10週齢の剖検において、27 mg/kg 群の雄の脳重量に有意な増加が認められたが、ごくわずかな変化であり、相対重量には有意差が認められないことから偶発的な変化であると考えられる。また 27 mg/kg 群の雌の副腎重量にわずか

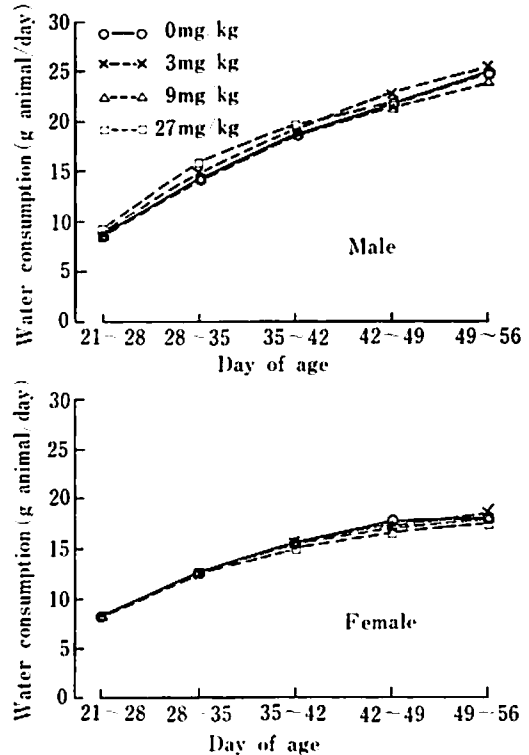


Fig. 7 Water consumption of F_1 offspring derived from rats treated with argipidine

な増加が認められた (Table 6, 7)。投薬に起因すると考えられる肉眼的変化は認められず、眼球の病理組織学的検査においても特に異常は認められなかった。

5) F_1 出生仔の生殖機能に及ぼす影響

生殖機能試験において、交尾率、交尾所要日数および受胎率に群間の差は認められなかった (Table 8)。また、 F_1 母動物の体重推移についても、投薬に起因した変化は認められなかった。

妊娠 20 日に行った F_1 母動物の剖検において、投薬に起因すると考えられる肉眼的変化は認められなかった。9 mg/kg 群の雌の生存仔数が有意に少なく、雌雄の合計も少なかったが、27 mg/kg 群には同様の変化が認められていないことから投薬とは関連のない偶発的な変化であると考えられる (Table 9)。 F_2 胎仔の

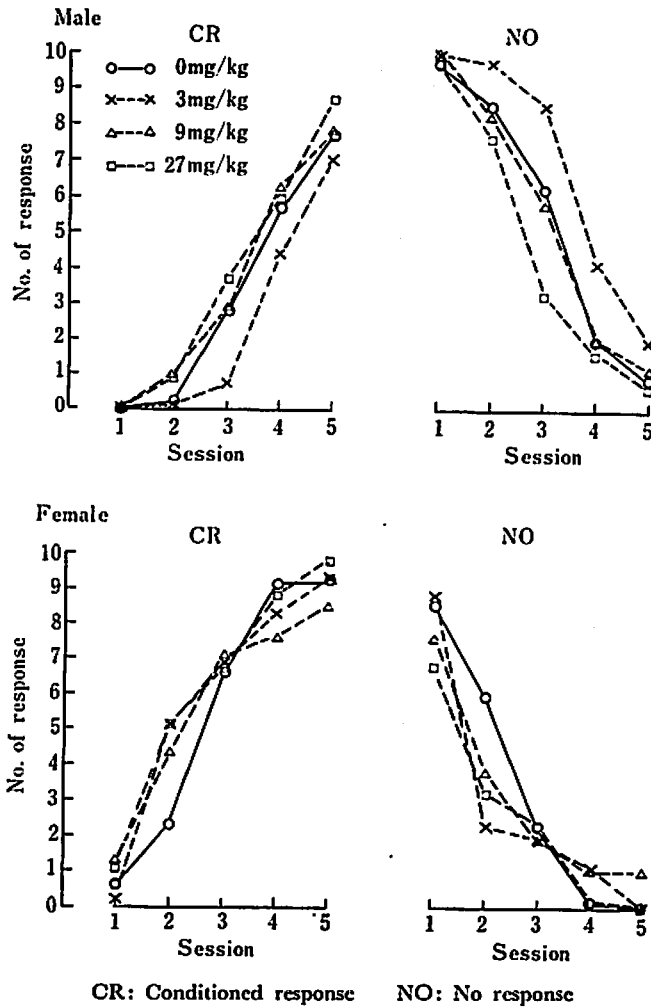


Fig. 8 Polc-climbing test of F_1 offspring derived from rats treated with argipidine

外表異常は認められなかった。

II 確認実験

本実験の F_1 胎仔の内臓検査において、3および27 mg/kg 群に小眼球症がそれぞれ1例ずつ認められた。いずれも低頻度でありかつ用量依存性の認められない変化であったが、投薬との関連をより明らかにするために確認実験（眼形成臨界期投与試験）を行った。

1 実験材料および実験方法

1) 被験物質

本実験と同一ロットの argipidine を使用した。

2) 供試動物および飼育条件

静岡県実験動物農業協同組合より Slc: Wistar 系の SPF ラットを、雌雄とも8週齢で購入し、約1週間の検疫・馴化の後、健康な動物を実験に用いた。動物は温度 20.2~23.7°C、相対湿度 43.6~70.8%、換気回数 10~15回/hr、照明時間 12 hr (7時~19時) の環境下で飼育した。

動物の飼育には、床敷としてペータチップ

Table 6 Organ weight of male offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of animals examined	10	10	10	9
Final body weight (g)	270 ± 14	273 ± 14	272 ± 13	264 ± 12
Brain (g)	1.93 ± 0.07 ¹⁾ , ²⁾ 0.72 ± 0.02 ³⁾	1.95 ± 0.06 0.72 ± 0.05	1.97 ± 0.06 0.72 ± 0.03	2.00 ± 0.06* 0.76 ± 0.05
Thymus (g)	0.42 ± 0.07 0.16 ± 0.02	0.43 ± 0.08 0.16 ± 0.04	0.44 ± 0.11 0.16 ± 0.04	0.45 ± 0.06 0.17 ± 0.02
Heart (g)	0.83 ± 0.06 0.31 ± 0.01	0.82 ± 0.07 0.30 ± 0.03	0.82 ± 0.05 0.30 ± 0.02	0.86 ± 0.06 0.33 ± 0.03
Lungs (g)	1.13 ± 0.15 0.42 ± 0.06	1.08 ± 0.15 0.40 ± 0.07	1.17 ± 0.17 0.43 ± 0.05	1.13 ± 0.10 0.43 ± 0.05
Liver (g)	10.55 ± 0.90 3.91 ± 0.17	10.30 ± 0.88 3.97 ± 0.41	10.65 ± 1.21 3.91 ± 0.33	10.36 ± 0.60 3.94 ± 0.30
Kidneys (g)	1.86 ± 0.18 0.69 ± 0.04	1.88 ± 0.11 0.69 ± 0.05	1.88 ± 0.17 0.69 ± 0.05	1.85 ± 0.13 0.70 ± 0.07
Spleen (g)	0.66 ± 0.04 0.24 ± 0.01	0.64 ± 0.04 0.24 ± 0.02	0.68 ± 0.06 0.25 ± 0.02	0.64 ± 0.02 0.24 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	39 ± 7 14 ± 2	37 ± 8 14 ± 3	42 ± 9 15 ± 2	40 ± 8 15 ± 3
Testes (g)	2.80 ± 0.14 1.04 ± 0.04	2.80 ± 0.09 1.03 ± 0.04	2.82 ± 0.13 1.04 ± 0.04	2.78 ± 0.12 1.06 ± 0.09

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ Absolute organ weight ³⁾ Organ weight to 100 g of body weight*: Significantly different from control at $p < 0.05$

Table 7 Organ weight of female offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of animals examined	10	10	10	10
Final body weight (g)	170 ± 9	169 ± 9	171 ± 5	168 ± 8
Brain (g)	1.81 ± 0.06 ¹⁾ , ²⁾ 1.06 ± 0.04 ³⁾	1.80 ± 0.06 1.07 ± 0.05	1.80 ± 0.04 1.06 ± 0.04	1.80 ± 0.05 1.07 ± 0.06
Thymus (g)	0.36 ± 0.06 0.21 ± 0.04	0.35 ± 0.04 0.21 ± 0.02	0.34 ± 0.05 0.21 ± 0.03	0.33 ± 0.03 0.20 ± 0.02
Heart (g)	0.55 ± 0.04 0.32 ± 0.03	0.58 ± 0.05 0.34 ± 0.02	0.54 ± 0.04 0.32 ± 0.03	0.56 ± 0.04 0.33 ± 0.02
Lungs (g)	0.82 ± 0.08 0.48 ± 0.05	0.78 ± 0.10 0.47 ± 0.04	0.83 ± 0.09 0.48 ± 0.06	0.80 ± 0.09 0.48 ± 0.04
Liver (g)	5.98 ± 0.43 3.52 ± 0.27	5.78 ± 0.51 3.40 ± 0.14	5.95 ± 0.28 3.47 ± 0.16	5.87 ± 0.43 3.49 ± 0.24
Kidneys (g)	1.22 ± 0.07 0.72 ± 0.04	1.19 ± 0.07 0.70 ± 0.03	1.19 ± 0.05 0.69 ± 0.03	1.20 ± 0.07 0.71 ± 0.03
Spleen (g)	0.45 ± 0.06 0.26 ± 0.02	0.47 ± 0.04 0.28 ± 0.03	0.45 ± 0.03 0.26 ± 0.02	0.45 ± 0.03 0.27 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	42 ± 4 25 ± 2	43 ± 4 25 ± 2	44 ± 3 26 ± 2	48 ± 7* 28 ± 4*
Ovaries (mg)	61 ± 7 36 ± 4	58 ± 8 34 ± 5	59 ± 13 35 ± 7	59 ± 9 35 ± 5

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ Absolute organ weight ³⁾ Organ weight to 100 g of body weight*: Significantly different from control at $p < 0.05$

Table 8 Reproductive performance of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pairs	20	20	20	20
Coital rate (%) ¹⁾	85.0 (17/20)	100.0 (20/20)	90.0 (18/20)	90.0 (18/24)
Pre-coital interval (day) ²⁾	4.2 ± 2.2 ³⁾	3.3 ± 1.8	4.3 ± 3.1	4.4 ± 2.5
Conception rate (%) ⁴⁾	94.1 (16/17)	100.0 (20/20)	88.9 (16/18)	83.3 (15/18)

¹⁾ (No. of animals mated/No. of animals paired) × 100 ²⁾ Days between initial pairing and mating³⁾ Mean ± S.D. ⁴⁾ (No. of animals achieved pregnancy/No. of animals mated) × 100

Table 9 Litter data of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pregnant animals	16	20	16	15
No. of corpora lutea	11.3 ± 0.9 ¹⁾	11.8 ± 1.0	12.0 ± 1.2	11.5 ± 1.2
No. of implantations	9.6 ± 2.6	10.2 ± 1.7	8.4 ± 3.2	9.7 ± 2.2
No. of resorptions				
Early ²⁾	0.13 ± 0.34	0.20 ± 0.41	0.31 ± 0.48	0.53 ± 0.64
Late ³⁾	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.25	0.00 ± 0.00
Implantation loss (%)				
Pre-implantation ⁴⁾	15.3 ± 22.1	13.3 ± 13.5	29.1 ± 27.7	15.9 ± 16.0
Post-implantation ⁵⁾	2.2 ± 5.2	2.1 ± 4.2	3.9 ± 5.3	6.5 ± 10.4
No. of live fetuses				
Male	4.4 ± 1.7	4.8 ± 2.1	4.3 ± 2.3	3.8 ± 1.7
Female	5.1 ± 1.7	5.3 ± 2.0	3.8 ± 1.7*	5.4 ± 2.3
Fetal weight (g)				
Male	3.21 ± 0.13	3.26 ± 0.19	3.25 ± 0.22	3.33 ± 0.48
Female	3.04 ± 0.15	2.95 ± 0.19	3.01 ± 0.16	3.19 ± 0.49

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ No recognisable fetal tissue present ³⁾ Fetal tissue present ⁴⁾ [(No. of corpora lutea - No. of implantations)/No. of corpora lutea] × 100 ⁵⁾ [(No. of implantations - No. of live fetuses)/No. of implantations] × 100*: Significantly different from control at $p < 0.05$

(オリエンタル酵母工業)を入れたポリカーボネート製ケージ(日本チャールス・リバー)を使用し、1~2匹/ケージとした。動物には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業) および水道水を自由に摂取させた。

交配は、検査・馴化終了後、雄と雌を1対2

で一夜同居させ、翌朝腔垢中に精子の確認されたものを妊娠動物とみなし、この日を妊娠0日として起算した。雌の妊娠0日の体重は143~172gであった。

3) 投与方法

投与液の調製方法および投与器材は、本実験

と同じとした。催奇形物質に対する眼の奇形の発現率は、妊娠 8～10日 が最も高いことが知られているので⁴⁾ 妊娠 6 日の体重を基準に 10 ml/kg の投与液量で、本実験と同じ尾静脈内に妊娠 8～10日 まで 1 日 1 回投与した。

4) 用量設定

本実験で用いた最高用量の 27 mg/kg を選択した。対照群には食塩水 (300 mOsm/l) を投与した。対照群 25 匹、27 mg/kg 群 26 匹の妊娠動物に投与した。

5) 観察方法

a) F₀ 母動物の観察

試験期間中は一般状態を毎日観察し、妊娠 0, 6, 8, 10, 14, 20 日に体重を測定した。妊娠 20 日に母動物の主要臓器を肉眼的に観察した。

b) F₁ 胎仔の観察

全母動物を妊娠 20 日に diethyl ether 麻酔下で開腹し、本実験に準じて検査を行った後、全生存胎仔を Bouin 液に固定して内臓検査を実施した。

2 実験成績

1) 妊娠期間中の F₀ 母動物に及ぼす影響

両群とも死亡や流産は認められず、特に投薬に起因すると考えられる一般状態の変化は観察されなかった。体重に、投薬によると思われる影響は認められなかった。妊娠 20 日の剖検において、特に投薬に起因すると考えられる肉眼的変化は認められなかった。

2) F₁ 胎仔に及ぼす影響

妊娠 20 日の母動物の剖検時の検査において、妊娠黄体数、着床数、生存胎仔数、死亡胚数および胎仔体重に、投薬によると思われる変化は認められなかった。

F₁ 胎仔の外表検査において、対照群の 1 胎仔に眼の異常が認められ、内臓検査において、無眼球症であることが確認された。その他には、特に投薬に起因すると考えられる変化は認められなかった。

III 総括および考察

Argipidine を 3, 9 および 27 mg/kg の用量

で、Wistar 系ラットの妊娠 7～17 日までの 11 日間尾静脈内に投与し、母動物、胎仔および出生子の生後発育および生殖機能に及ぼす影響を検討した。

試験期間中をとおして母動物の死亡あるいは流産は認められず、いずれも正常に妊娠を維持した。一般状態、体重、摂餌量、飲水量、分娩状態、哺育状態、剖検所見、肝臓重量およびその組織学的検査にも投薬による影響は認められなかった。

妊娠 20 日の F₀ 母動物の剖検時の検査において、妊娠黄体数、着床数、生存胎仔数および胎仔体重には投薬による影響は認められなかった。

F₁ 胎仔の内臓検査において、3 mg/kg 群に小眼球症が 1 例、27 mg/kg 群に小眼球症および無眼球症がそれぞれ 1 例ずつ認められた。いずれも低頻度であったが、投薬との関連をより明らかにするために眼形成臨界期投与試験を行った。その結果、対照群 (25 母動物) に 1 例の無眼球症が認められたのみで、投薬群には眼の異常は認められなかった。一方、加藤ら⁵⁾ や永岡ら⁶⁻⁸⁾ により、小眼球症あるいは無眼球症のような眼球異常が Slc: Wistar 系ラットでは偶発的に発現することが報告されている。これらのことから本実験で認められた眼の異常と投薬との関連はないものと思われる。

F₁ 胎仔の骨格検査において、骨格異常の発生率および骨化進行度に特に異常は認められなかった。

F₁ 出生子については、投薬によると思われる死亡仔の増加や一般状態の変化はなく、生後の発育はいずれの投薬群でも順調であり、体重、摂餌量および飲水量に異常は認められなかった。また、27 mg/kg 群の 10 週齢の雌の副腎重量に増加が認められた以外、生後形態分化、反射反応性、情動性、聴覚能および学習能に群間の差は認められなかった。F₁ 出生子の交尾率、受胎率には argipidine 投与の影響はみられず、F₂ 胎仔についても子宮内における発育に異常は認められなかった。

以上のように, argipidine の 3, 9 および 27 mg/kg をラットの胎仔の器官形成期に静脈内投与した結果, 母動物に対しては 27 mg/kg においても投薬による影響は認められなかった。次世代に対しては, 27 mg/kg において10週齢の雌の副腎重量に増加が認められた以外, 催奇形性や胎仔致死作用は認められず, 出生仔の発育, 反射反応性, 情動性, 聴覚能, 学習能および生殖機能に及ぼす影響は認められなかった。

よって, 母動物の一般毒性学的無影響量, 生殖に関する無影響量は 27 mg/kg, 次世代に関する無影響量は 9 mg/kg であると考えられる。

文 献

- 1) Salewski E.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* 247: 367 (1964)
- 2) Dawson A.B.: *Stain Technol.* 1: 123 (1926)
- 3) Wilson J.G. & Warkany J.: *Teratology, Principles and Techniques*, Univ. of Chicago Press (1965), p. 262
- 4) 高野喜一, 菊地康基, 飯島貞二, 土川 清: 薬物の特殊毒性(1), 胎仔毒性と遺伝毒性, 南江堂 (1975), p. 26
- 5) 加藤正夫, 松沢景子, 遠乗弘美, 蒔田徳太郎, 橋本喜信: *医薬品研究* 10(1): 149 (1979)
- 6) 永岡隆晴, 重村 隆, 奈良間功: *薬理と治療* 9 (3): 839 (1981)
- 7) 永岡隆晴, 重村 隆, 奈良間功: *薬理と治療* 9 (3): 851 (1981)
- 8) 永岡隆晴, 重村 隆, 奈良間功: *薬理と治療* 9 (3): 879 (1981)

* * *

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第3報〉 ラットにおける周産期および授乳期 静脈内投与試験

阿部 武丸* 大越 綾子* 田中 栄治**,
小松 恵子*** 水沢 礼子*** 大崎 佳子***

Reproduction Studies of Argipidine (MD-805) (III)

—Perinatal and Postnatal Study in Rats Treated Intravenously with Argipidine (MD-805)—

Takemaru Abe*, Ayako Ohkoshi*, Eiji Tanaka*,**,
Keiko Komatsu*,**, Reiko Mizusawa*,** and Yoshiko Ohsaki*,**

* Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Sciences
** Present address: Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector,
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

Argipidine, (2*R*,4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinoline-sulfonyl)-1-arginy]l]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate, is a new thrombin inhibitor that shows a potent and highly selective inhibitory effect. The purpose of this study was to assess the influence of the compound upon peri- and postnatal development in rats. Argipidine was administered intravenously to pregnant Sprague-Dawley rats (F₀) at dosages of 3, 9 or 27 mg/kg/day from Day 17 of gestation to Day 21 after parturition. All F₀ females were allowed to give birth and the growth, behavioral responses, reproductive performance and fertility of the offspring (F₁) were investigated. Water intake of F₀ females receiving 27 mg/kg/day was slightly increased during lactation. No maternal toxicity was seen up to 27 mg/kg/day with respect to body weight gain, food intake, parturition and lactation. The viability, growth, behavioral or functional parameters, or reproductive performance of the F₁ offspring

* 株式会社三菱化成安全科学研究所

** 三菱化成工業株式会社総合研究所第二研究部門 安全性研究所

showed no treatment-related effect. No external, visceral or skeletal malformations were observed in the F₂ fetuses. It was concluded from this investigation the maximum no effective dose of argipidine was 27 mg/kg/day with regard to maternal reproductive performance and the offspring.

KEY WORDS

Argipidine, Thrombin inhibitor,
Peri- and postnatal study (Rat)

緒 言

今回、抗トロンビン薬 argipidine の生殖に及ぼす影響を検討する一環として、ラットを用いた周産期および授乳期静脈内投与試験を行い、母動物および出生仔に及ぼす影響を検索したので報告する。

I 実験材料および実験方法

1 被験物質

Argipidine は、Fig. 1 に示す構造を有し、分子量526.66の無臭の白色粉末である。水に極めて溶けにくく酢酸に溶けやすい。

2 供試動物および飼育条件

静岡県実験動物農業協同組合より、Slc: Wistar 系の SPF ラットを雄9週齢、雌8週齢で購入し、10日間の検疫・馴化の後、健康な動物を実験に用いた。動物は温度 20.7~25.0°C、相対湿度37.0~77.3%、換気回数 10~15回/hr、照明時間 12 hr (7時~19時) の環境下で飼育した。

動物の飼育には、床敷としてベータチップ (オリエンタル酵母工業) を入れたポリカーボ

ネート製ケージ(トキワ科学器械)を使用し、1~4匹/ケージとした。動物には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業) および水道水を自由に摂取させた。

交配は、検疫・馴化終了後、雄と雌を1対1で一夜同居させ、翌朝腔垢中に精子の確認されたものを妊娠動物とみなし、この日を妊娠0日として起算した。雌の妊娠0日の体重は、149~164gであった。

3 投与方法

Argipidine は、各濃度とも調製後の浸透圧が 300 mOsm/l になるように調製した食塩水に入れ、オートクレーブ (平山製作所, 121°C, 15分間) により溶解、滅菌した。妊娠17日から分娩日 (分娩後0日) までは妊娠0日の体重を基準に、また分娩後1日から分娩後21日までは分娩日の体重を基準に 10 ml/kg の投与液量で、27 G 3/4 in. の注射針 (テルモ) を装着したシリンジ (テルモ) を用いて、臨床適用経路に準じて尾静脈内に1日1回投与した。

4 用量設定

Argipidine の生理食塩液における比較的安定な過飽和溶液の限界濃度は最大 2.5~3.0 mg/ml であり、動物体重 1 kg 当たり 10 ml が連続投与における投与液量の限界と考え、25~30 mg/10 ml/kg を最大投与可能量とした。一方、先に実施した argipidine のラットにおける胎仔の器官形成期静脈内投与試験¹⁾において、最高用量である 27 mg/kg 群においても、母動物に死亡はなく、一般状態でも著変がなかったため、本実験では最高用量を投与限界量である

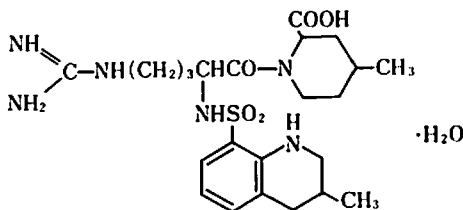


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

27 mg/kg とした。以下、公比 3 で中用量を 9 mg/kg, 低用量を 3 mg/kg とし、対照群には生理食塩液 (300 mOsm/l) を投与した。

5 観察方法

1) F₀ 母動物の観察

試験期間中は、一般状態を毎日観察し、妊娠 0, 3, 7, 10, 14日の各日および17~21日の毎日、また分娩後は0~21日まで毎日体重を測定した。摂餌量および飲水量は妊娠 0, 4, 7, 10, 14, 17, 19, 21日および分娩後 0, 4, 7, 14, 21日に測定した。

特に授乳期間中は、分娩および哺育状態に注目した。母動物は全例自然分娩させ、精子確認日から分娩日までの妊娠期間を算出した。F₁ 出生仔の離乳後、母動物の主要臓器を肉眼的に観察し着床痕数を算定した。

2) F₁ 出生仔の観察

出生日の生存仔数、死亡仔数、性別、口腔内を含む外表異常の有無を検査し、生存仔については、1腹ごとに雌雄それぞれまとめて体重を測定した。生後4日に同腹生存仔数を1腹当たり雌雄各4匹、計8匹に調整した。雌雄いずれかが4匹に満たない場合には、用量、出生日が同じである他の母動物の出生仔を補充した。

出生後毎日一般状態の観察を行い、被毛発生および耳介開展を観察した。生後4日の仔数調整前に1腹ごとに雌雄それぞれまとめて体重を測定し、仔数調整後個体別に測定した。生後7, 14および21日に個体別に体重を測定するとともに、上下歯芽萌出、外耳道開口および眼瞼開裂を観察した。

生後21日に離乳した後、出生仔は雌雄別々に飼育し、精巣下降あるいは睪開口を観察するとともに8週齢まで体重、摂餌量および飲水量を週1回測定した。

4週齢で全例について、平面正向反射、空中正向反射、視覚性踏み直し反応、聴覚性驚愕反応、同側屈曲反射、断崖回避反応、角膜反射および棒保持反応について検査した。

5週齢で各群雌雄それぞれ10例について、open field 試験を行い、3分間当たりの ambu-

lation, rearing, preening, grooming, defecation および urination の各行動を観察した。

6週齢で各群雌雄それぞれ10例について、オーディオメーター (室町機械, リオン) を用いて、耳介反射による聴覚試験 (500 および 20000 Hz) を行った。

聴覚試験に用いた動物について、8~9週齢で、pole-climbing 試験を1日10試行で連続5日間行い、その後2日の間隔をおいてさらに1日行った。条件刺激はブザー (5秒間)、無条件刺激は電気刺激 (雄: 3.0 mA, 雌: 2.3~2.5 mA, 5秒間) を用い、試行の間隔は15~25秒とした。

10週齢で生殖機能試験として、各群雌雄それぞれ20例について同一群内で兄妹交配を避け、雌雄1対1で7日間同居させた。雌については交配開始前2週間、性周期の検査を行った。交尾が確認された雌については、妊娠 0, 7, 14 および20日に体重、摂餌量および飲水量を測定した。全例妊娠20日に屠殺し卵巣および子宮を摘出し、妊娠黄体数、着床数、生存胎仔数および死亡胚数 (早期死亡、後期死亡) を観察した。生存胎仔については体重測定および性別判定を行い、口腔内を含む外表異常の有無を検査した。各腹約 1/2 の生存胎仔を acetone に、残り 1/2 を Bouin 液にそれぞれ固定した。

Acetone 固定胎仔は Dawson の変法²⁾により、Alizarin red S 染色による骨格標本作製し、骨格異常の有無ならびに骨化進行度について検査した。Bouin 固定胎仔は Wilson 法³⁾ および顕微解剖法⁴⁾ の併用により内臓検査を実施した。

交尾が確認された雌以外の F₁ 出生仔は、胸腔および腹腔内主要臓器の剖検を行った。

6 統計学的解析

出産率、生存率、交尾率および受胎率については Fisher の直接確率法を、着床後胚生存率、生後形態分化、内臓検査および骨格検査成績については Mann-Whitney の U 検定を用いた。その他のデータについては、群間で等分散の仮説が棄却されないときは Student の t 検定を、棄却されるときは Welch の t 検定を行った。

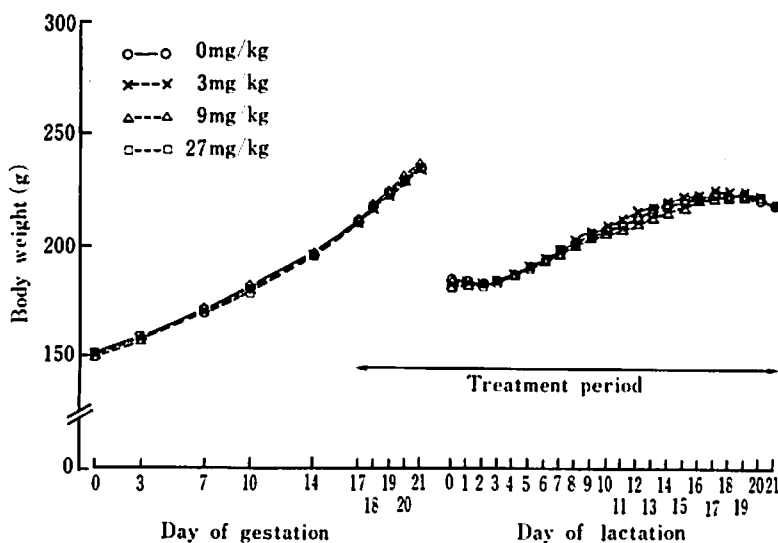


Fig. 2 Body weight of F_0 females treated with argipidine

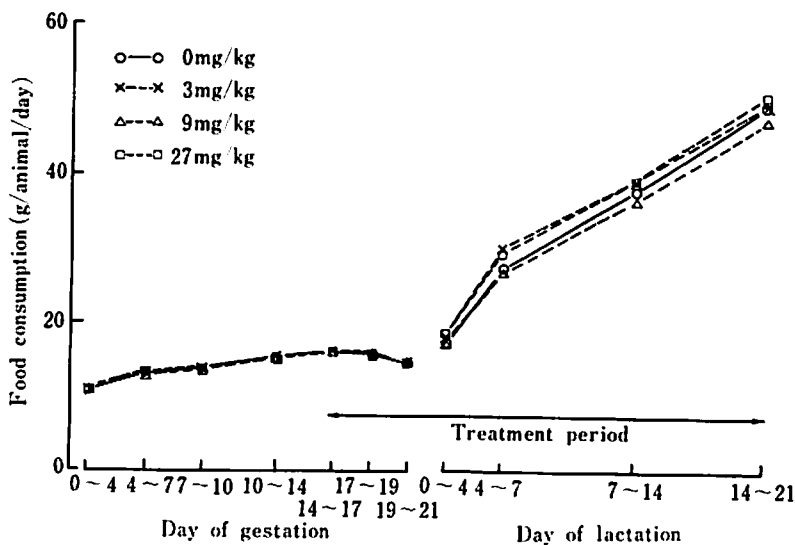


Fig. 3 Food consumption of F_0 females treated with argipidine

また、胎仔あるいは出生仔（4週齢以前）に関するデータについては、母動物1腹を標本単位として解析した。

II 実験成績

1 F_0 母動物に及ぼす影響

各投与群とも死亡や流産は認められず、特に

投薬に起因すると思われる一般状態の変化は観察されなかった。授乳期間中の27mg/kg群の飲水量にわずかな増加が認められたが、体重および摂餌量には、投薬群と対照群との間に差は認められず投薬によると思われる影響は認められなかった (Fig. 2, 3, 4)。

分娩時の観察において、分娩遅延、難産等の

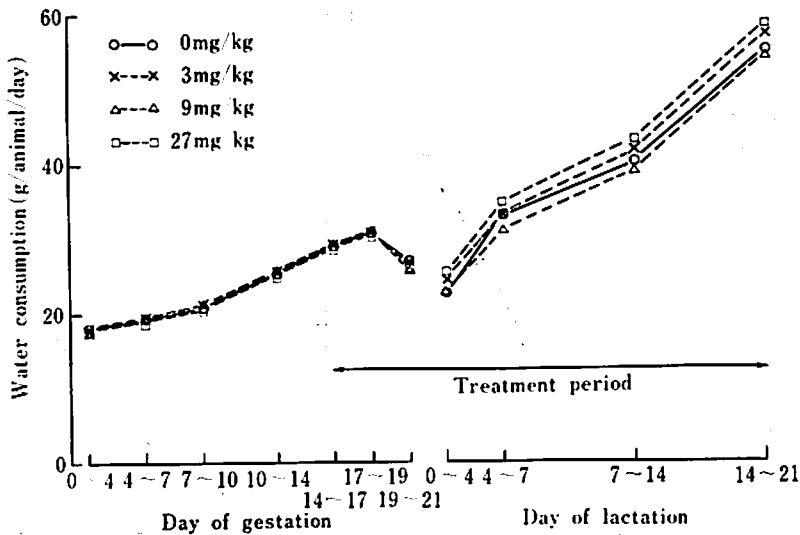
Fig. 4 Water consumption of F₀ females treated with argipidine

Table 1 Litter data at birth and during lactation of rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pregnant animals	21	22	23	21
Gestation length	22.2 ± 0.4 ¹⁾	22.2 ± 0.4	22.2 ± 0.4	22.1 ± 0.3
Gestation index (%) ²⁾	95.2 (20/21)	100.0 (22/22)	100.0 (23/23)	100.0 (21/21)
No. of live offspring born				
Male	3.5 ± 2.4	3.9 ± 2.7	4.0 ± 2.2	3.7 ± 1.9
Female	3.3 ± 1.8	3.5 ± 2.0	4.0 ± 2.0	4.3 ± 2.2
Post-implantation survival index (%) ³⁾	87.3 ± 24.0	96.9 ± 8.8*	94.4 ± 11.5	94.5 ± 8.1
Viability index				
On Day 4 after birth (%) ⁴⁾	99.3 (140/141)	99.4 (162/163)	99.5 (182/183)	99.4 (167/168)
On Day 21 after birth (%) ⁵⁾	99.3 (138/139)	100.0 (156/156)	98.9 (172/174)	99.4 (157/158)

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ (No. of live litters/ No. of females with evidence of implantation) × 100 ³⁾ (No. of live offspring born/No. of implantation sites) × 100 ⁴⁾ (No. of live offspring before litter size adjustment on Day 4/No. of live offspring born) × 100 ⁵⁾ (No. of live offspring on Day 21 after birth/No. of live offspring after litter size adjustment on Day 4) × 100

*: Significantly different from control at $p < 0.05$

異常は認められず、その後の授乳行動にも投薬に起因すると思われる変化は認められなかった。また、出生仔の外表面異常も認められなかった。3 mg/kg 群の着床後胚生存率が有意に高か

ったが、これは対照群が低値を示したことによる変化であると考えられる (Table 1)。分娩後21日に行った F₀ 母動物の剖検において、投薬に起因すると思われる肉眼的変化は認められ

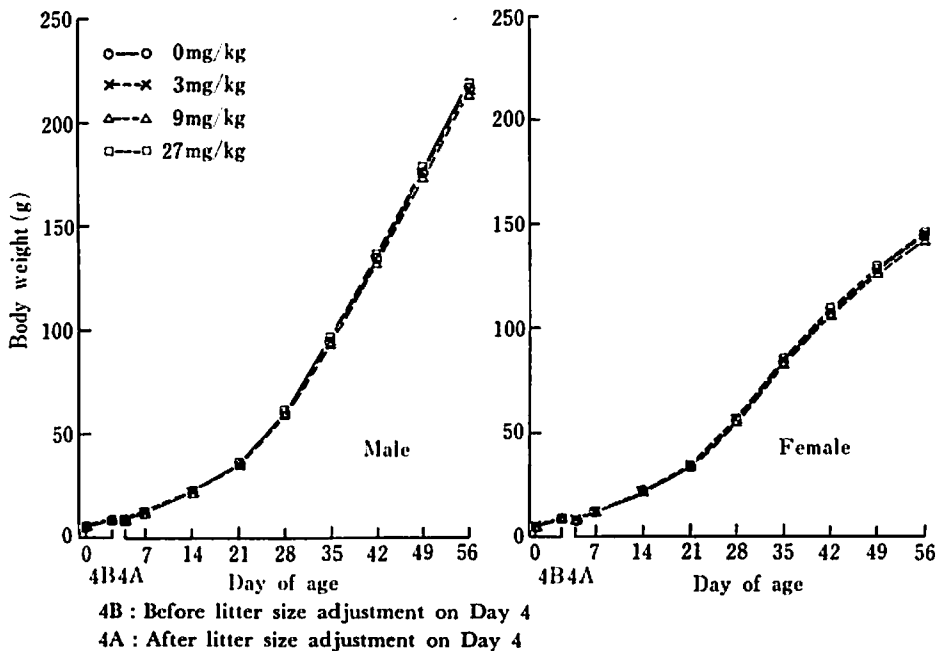


Fig. 5 Body weight of F_1 offspring derived from rats treated with argipidine

なかった。

2 授乳期間中の F_1 出生仔に及ぼす影響

対照群に 1 例、9 mg/kg 群に 2 例の死産仔が認められたが、出生仔数には特に異常は認められなかった。また、9 mg/kg 群の死産仔 1 例に小眼球症が認められた。

F_1 出生仔の死亡は、生後 1 日に 3 および 27 mg/kg 群に各 1 例、生後 19 日に 27 mg/kg 群に 1 例、生後 3 および 20 日に対照群に 1 例、生後 21 日に 9 mg/kg 群に 1 例認められたのみで、生後 4 日および 21 日の生存率には群間に差は認められなかった (Table 1)。

授乳期間中の体重推移には、群間の差は認められなかった (Fig. 5)。生後形態分化の観察において、3 mg/kg 群の雌雄および 27 mg/kg 群の雄の上歯芽の萌出が対照群に比べて有意に早かったがいずれも微差であり、生物学的に有意な変化ではないと考えられる。また、投薬群の生後 2 日の雄の耳介開展の発現率が対照群に比べて有意に高かったが、生後 3 日には対照群を含めすべて 100% 開展しており、雌には用量に相関した変化は認められなかった (Table 2)。

一般状態には、特に投薬に起因すると考えられる異常は認められなかった。

3 離乳後の F_1 出生仔に及ぼす影響

離乳後の F_1 出生仔の体重、摂餌量および飲水量には、投薬群と対照群との間に差は認められなかった (Fig. 5, 6, 7)。

4 週齢で行った平面正向反射、断崖回避等の検査において、群間に差は認められなかった。open field 試験において、投薬に起因すると思われる変化は認められなかった (Table 3)。聴覚試験では、雌雄ともに正常な反応を示し、投薬による影響は認められなかった。pole-climbing 試験における条件回避反応数および無反応数には、投薬に起因すると考えられる変化は認められなかった (Fig. 8)。生殖能試験において交尾が確認された雌以外の F_1 出生仔の剖検において、 F_0 母動物への投薬に起因すると考えられる異常は認められなかった。

4 F_1 出生仔の生殖機能に及ぼす影響

生殖機能試験において、性周期、交尾率、交尾所要日数および受胎率には、群間の差は認められなかった (Table 4)。 F_1 母動物の妊娠期

Table 2 Physical development of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)		0	3	9	27
Hair growth					
Male	Day 2 ¹⁾	5.5 ± 12.6 ²⁾	18.2 ± 39.5	23.4 ± 35.7	5.3 ± 13.7
	Day 3	91.5 ± 13.2	91.6 ± 16.2	94.5 ± 14.1	94.9 ± 13.6
	Day 4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Female	Day 2	18.3 ± 38.2	15.0 ± 36.6	9.6 ± 23.4	3.3 ± 14.9
	Day 3	88.8 ± 24.9	91.3 ± 21.8	86.5 ± 20.2	98.8 ± 5.6
	Day 4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Pinna unfolding					
Male	Day 2	18.1 ± 24.3	48.3 ± 41.9*	46.5 ± 41.7*	48.7 ± 37.3*
	Day 3	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Female	Day 2	41.9 ± 41.9	47.1 ± 41.1	41.8 ± 42.0	47.4 ± 30.2
	Day 3	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Incisor eruption					
Male	Upper	10.6 ± 0.6 ³⁾	10.2 ± 0.4*	10.4 ± 0.6	10.2 ± 0.3*
	Lower	11.2 ± 0.7	11.0 ± 0.6	11.2 ± 0.5	11.1 ± 0.6
Female	Upper	10.4 ± 0.5	10.2 ± 0.4*	10.2 ± 0.7	10.1 ± 0.5
	Lower	10.8 ± 0.7	10.5 ± 0.7	10.8 ± 0.9	11.0 ± 0.5
Auditory canal opening					
Male		13.5 ± 0.4	13.3 ± 0.5	13.5 ± 0.6	13.6 ± 0.3
Female		13.0 ± 0.3	13.1 ± 0.4	13.2 ± 0.6	13.1 ± 0.3
Eye opening					
Male		16.7 ± 0.3	16.6 ± 0.5	16.7 ± 0.6	16.7 ± 0.4
Female		16.5 ± 0.6	16.4 ± 0.5	16.5 ± 0.7	16.6 ± 0.5
Testes descent		23.1 ± 0.1	23.0 ± 0.4	23.1 ± 0.4	23.2 ± 0.3
Vaginal opening		38.0 ± 1.2	37.5 ± 1.2	38.7 ± 1.7	37.8 ± 1.2

¹⁾ Days after birth ²⁾ % incidence of offspring in which the onset of the developmental parameters occurred ³⁾ Mean ± S.D. ⁴⁾ Days after birth on which the onset of the developmental parameters occurred ⁵⁾ Mean ± S.D. *: Significantly different from control at $p < 0.05$

間中の体重、摂餌量および飲水量には、群間の差は認められなかった (Fig. 9)。妊娠20日の剖検において、投薬に起因すると考えられるF₁母動物の肉眼的変化は認められなかった。

5 F₂ 胎仔に及ぼす影響

妊娠20日に行った F₁ 母動物の剖検時の検査

において、9 mg/kg 群の着床数および雄の生存胎仔数が対照群に比べて有意に多く、着床前胚死亡率が有意に低かったが、27 mg/kg 群には同様の変化が認められないことから投薬との関連はないものと考えられる。投薬群の胎仔体重に有意差が散見されたが、いずれも微差であ

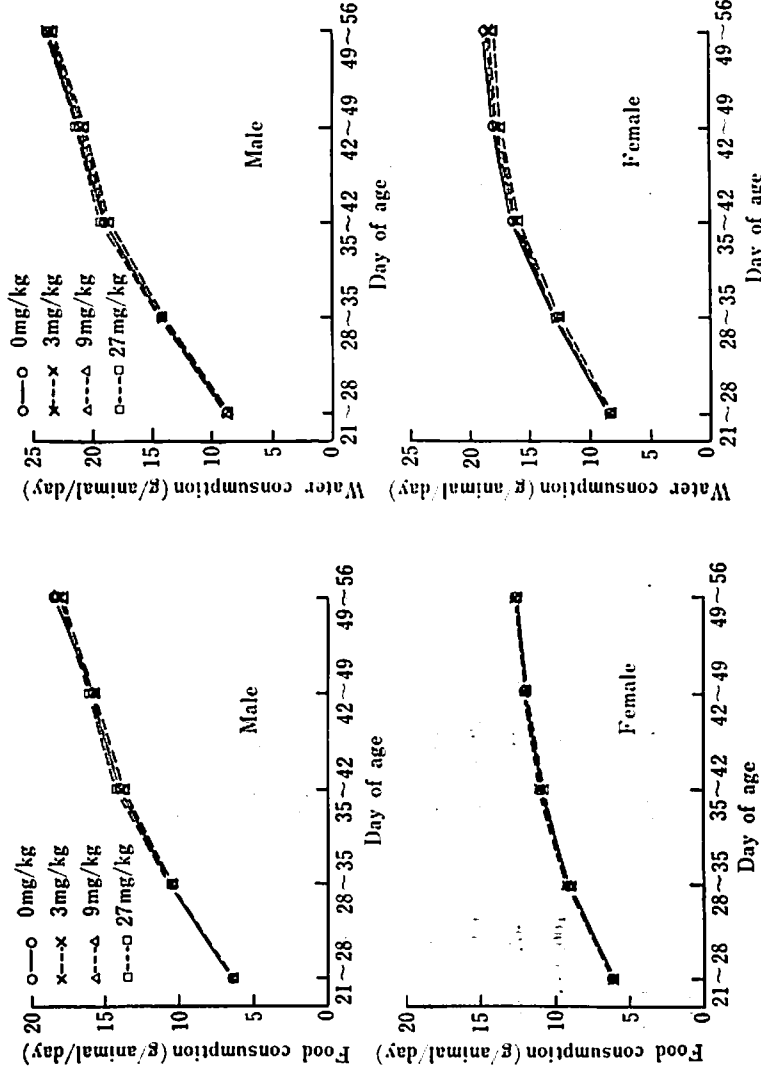


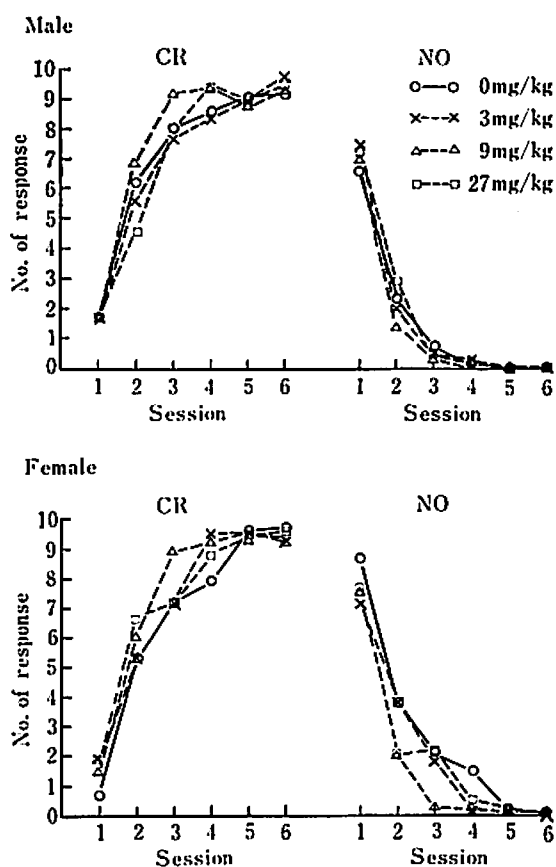
Fig. 6 Food consumption of F₁ offspring derived from rats treated with argipidine

Fig. 7 Water consumption of F₁ offspring derived from rats treated with argipidine

Table 3 Open field test of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)		0	3	9	27
Male					
No. of animals examined		10	10	10	10
Ambulation		46.2±34.2 ¹⁾	47.5±38.4	53.0±39.8	52.3±37.3
Rearing		8.0±5.3	7.8±6.1	6.5±5.3	8.6±7.7
Preening		4.3±2.6	3.5±2.8	3.2±1.3	2.8±1.8
Grooming		0.8±0.9	0.7±1.1	0.6±0.5	0.4±1.0
Defecation		0.8±1.0	1.1±0.9	0.5±0.8	0.9±1.1
Urination		0.4±0.5	0.3±0.5	0.3±0.5	0.4±0.5
Female					
No. of animals examined		10	10	10	10
Ambulation		73.5±43.7	71.7±36.5	78.7±52.9	99.0±43.8
Rearing		10.3±7.5	8.2±5.5	9.7±6.7	11.8±5.8
Preening		4.0±2.5	3.8±2.2	5.0±4.0	5.2±3.0
Grooming		0.9±1.1	1.2±1.4	2.1±3.0	1.9±2.6
Defecation		0.3±0.5	0.0±0.0	0.3±0.9	0.4±1.3
Urination		0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

¹⁾ Mean±S.D.



CR: Conditioned response NO: No response
 Fig. 8 Pole climbing test of F_1 offspring derived from rats treated with argipidine

Table 4 Reproductive performance of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of animals examined	20	20	20	20
Estrous cycle (day)	$4.9 \pm 0.2^{1)}$	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.9 ± 0.2
No. of pairs	20	20	20	20
Coital rate (%) ²⁾	95.0 (19/20)	90.0 (18/20)	95.0 (19/20)	80.0 (16/20)
Pre-coital interval (day) ³⁾	3.0 ± 1.7	3.1 ± 1.7	3.4 ± 1.6	3.0 ± 1.6
Conception rate (%) ⁴⁾	89.5 (17/19)	88.9 (16/18)	78.9 (15/19)	87.5 (14/16)

¹⁾ Mean $\pm$ S.D. ²⁾ (No. of animals mated/No. of animals paired) $\times 100$ ³⁾ Days between initial pairing and mating ⁴⁾ (No. of animals achieved pregnancy/No. of animals mated) $\times 100$

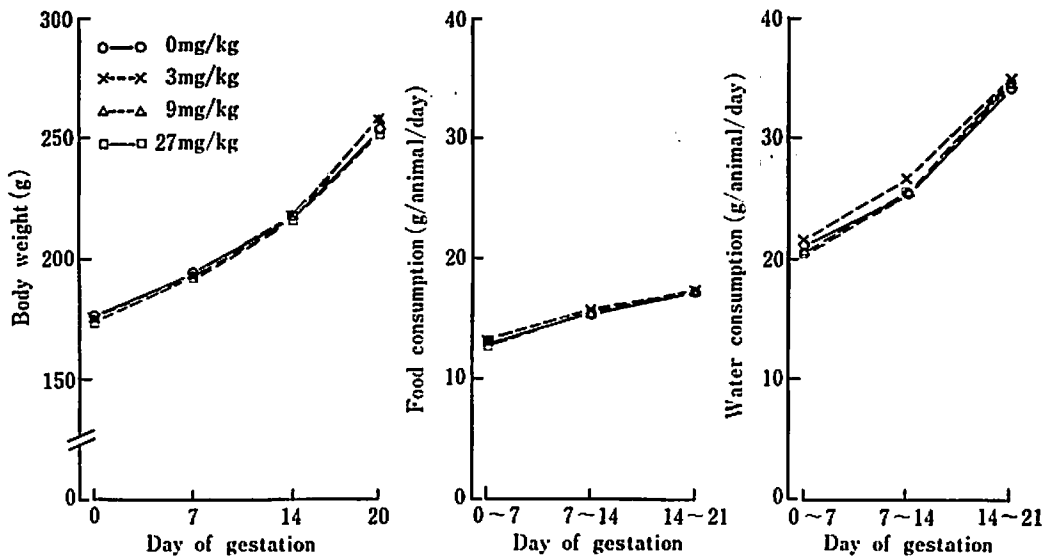


Fig. 9 Body weight, food consumption and water consumption of F₁ females

Table 5 Litter data of offspring derived from rats treated with argipidine

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
No. of pregnant animals	17	16	15	14
No. of corpora lutea	12.8 ± 1.1 ¹⁾	13.3 ± 1.0	13.0 ± 1.3	12.1 ± 1.8
No. of implantations	7.2 ± 3.5	8.5 ± 3.9	9.9 ± 3.2*	7.3 ± 4.3
No. of resorptions				
Early ²⁾	0.29 ± 0.47	0.56 ± 1.50	0.47 ± 0.64	0.36 ± 0.50
Late ³⁾	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.25	0.07 ± 0.26	0.00 ± 0.00
Implantation loss (%)				
Pre-implantation ⁴⁾	43.4 ± 28.0	36.3 ± 27.6	23.5 ± 25.2*	41.1 ± 34.3
Post-implantation ⁵⁾	4.8 ± 9.1	5.6 ± 14.0	5.4 ± 8.4	3.2 ± 4.6
No. of live fetuses				
Male	2.8 ± 2.2	4.3 ± 2.1	4.5 ± 1.7*	3.3 ± 2.4
Female	4.1 ± 2.0	3.6 ± 2.8	4.9 ± 2.7	3.6 ± 1.8
Fetal weight (g)				
Male	3.02 ± 0.14	3.15 ± 0.19*	3.04 ± 0.17	3.17 ± 0.19*
Female	2.90 ± 0.17	2.86 ± 0.14	2.74 ± 0.22*	2.89 ± 0.24

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ No recognisable fetal tissue present ³⁾ Fetal tissue present ⁴⁾ [(No. of corpora lutea - No. of implantations)/No. of corpora lutea] × 100 ⁵⁾ [(No. of implantations - No. of live fetuses)/No. of implantations] × 100 *: Significantly different from control at $p < 0.05$

Table 6 Observation at visceral and skeletal examination of F₂ fetuses

Dose (mg/kg)	0	3	9	27
Visceral examination				
No. of fetuses examined	55	57	67	46
Findings				
Anophthalmia	0.0±0.0 ^{1),2)} (0) ³⁾	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	2.6±9.2 (1)
Abnormal origin of right subclavian artery	0.0±0.0 (0)	1.3±5.2 (1)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)
Dilatation of renal pelvis	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	2.6±9.2 (1)
Thymic remnant in neck	48.3±34.4 (15)	26.3±25.1(9)	45.4±30.9(14)	24.6±24.4(8)
Skeletal examination				
No. of fetuses examined	62	69	73	51
Findings				
Separation of vertebral centra	0.24±0.42 ¹⁾ (7)	0.11±0.26(4)	0.13±0.36(4)	0.04±0.13(1)
Separation of sternbrae ± ³⁾	0.00±0.00 (0)	0.00±0.00(0)	0.00±0.00(0)	0.00±0.00(0)
+	0.07±0.11 (6)	0.06±0.11(4)	0.08±0.16(4)	0.01±0.04(1)
Asymmetry of sternbrae ±	0.33±0.37 (9)	0.27±0.32(8)	0.43±0.53(10)	0.30±0.51(7)
+	0.03±0.08 (2)	0.02±0.06(2)	0.10±0.16(5)	0.13±0.21(4)
++	0.03±0.10 (2)	0.03±0.13(1)	0.00±0.00(0)	0.01±0.04(1)
Closure of transverse foramen of one or more cervical vertebra	0.0±0.0 ²⁾ (0)	2.3±6.8 (2)	1.3±5.2 (1)	3.6±13.4(1)
Transverse foramen of the 7th cervical vertebra	1.2±4.9 (1)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	1.2±4.5 (1)
14th ribs	2.0±8.1 (1)	2.6±7.3 (2)	2.4±6.5 (2)	0.0±0.0 (0)
Incomplete ossification of thoracic vertebral centrum	2.0±8.1 (1)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)
Incomplete ossification of supraoccipital bone	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	1.0±3.7 (1)	0.0±0.0 (0)
Incomplete ossification of cervical vertebral arches	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	1.0±3.7 (1)	0.0±0.0 (0)
27 presacral vertebrae	2.0±8.1 (1)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)

¹⁾ Mean±S.D. ²⁾ % fetal incidence ³⁾ Number of litters affected ⁴⁾ Number of bones affected

⁵⁾ ± : Minimal, + : Slight, ++ : Moderate

り、用量依存性も認められないことから、投薬とは関連のない偶発的なものであると考えられる (Table 5)。

F₂ 胎仔の外表異常は認められなかった。胎仔の内臓検査において、3 mg/kg 群の1胎仔に右鎖骨下動脈起始部異常が、27 mg/kg 群の1

胎仔に腎盂拡張を伴った無眼球症が認められた。また、対照群を含む全群に胸腺の頸部残留が散見されたが、発生頻度に用量依存性が認められず、投薬との関連はないものと考えられる (Table 6)。

胎仔の骨格検査において、仙椎前27椎骨、椎

体二分, 14本肋骨等の骨格異常が認められたが, その発生頻度に用量依存性は認められなかった (Table 6)。骨化進行度についても, 投薬に起因すると考えられる変化は認められなかった。

III 総括および考察

Argipidine を 3, 9 および 27 mg/kg の用量で Wistar 系ラットの妊娠17日から分娩後21日まで尾静脈内に投与し, 母動物, 出生仔の生後発育および生殖機能に及ぼす影響を検討した。

試験期間中をととして母動物の死亡あるいは流産は認められず, いずれも正常に妊娠を維持した。授乳期間中の 27mg/kg 群の飲水量にわずかな増加が認められたが, 一般状態, 体重および摂餌量には, 妊娠期間, 授乳期間いずれにも投薬による影響は認められなかった。分娩遅延, 難産等の異常は認められず, その後の授乳行動, 剖検所見にも投薬に起因すると考えられる異常は認められなかった。

投薬によると思われる F_1 出生仔の死亡の増加や一般状態の変化はなく, 生後の発育はいずれの投薬群でも順調であり, 生後4日および21日の生存率, 体重, 摂餌量および飲水量に異常は認められなかった。

生後形態分化の観察において, 投薬群の雄の生後2日の耳介開展, 3 mg/kg 群の雌雄および 27 mg/kg 群の雄の上歯芽の萌出に有意差が認められたが, いずれも微差あるいは一時的な変化であり, 生物学的に有意な変化ではないと考えられる。反射反応性, 情動性, 聴覚能および学習能には群間の差は認められなかった。

F_1 出生仔の生殖機能試験において, 性周期, 交尾率, 交尾所要日数, 受胎率および妊娠期間中の F_1 母動物の体重, 摂餌量および飲水量には, argipidine 投与の影響は認められなかった。

F_1 母動物の妊娠20日に行った剖検時の検査において, 9 mg/kg 群の着床数, 雄の生存胎仔数, 着床前胚死亡率および投薬群の胎仔体重に有意差が認められたが, いずれも微差あるいは用量依存性の不明瞭な変化であり, 投薬との関

連はないものと考えられる。

F_2 胎仔の内臓検査において, 27 mg/kg 群の1胎仔に腎盂拡張を伴った無眼球症が, また 9 mg/kg 群の死産仔1例に小眼球症が認められた。これら眼球の異常については, 加藤ら⁵⁾ や永岡ら⁶⁻⁸⁾ によりこの系統の動物には偶発的に発現することが報告されており, 投薬とは関連のない変化であると考えられる。また, 3 mg/kg 群に右鎖骨下動脈起始部異常が認められたが, 3 mg/kg 群の1例に限られていることから偶発的な変化であると考えられる。胎仔の骨格検査において, 投薬に起因すると考えられる骨格異常は認められず, 骨化進行度にも群間の差はみられなかった。

以上のように, argipidine の 3, 9 および 27 mg/kg をラットの周産期および授乳期に静脈内投与した結果, 母動物に対しては, 授乳期間中の飲水量の増加が 27mg/kg 群で認められた以外, 投薬による影響は認められなかった。次世代に対しては, 27mg/kg 群においても出生仔の発育, 反射反応性, 情動性, 聴覚能, 学習能および生殖機能に及ぼす影響は認められなかった。

よって, 母動物の一般毒性学的無影響量は 9 mg/kg, 生殖に関する無影響量および次世代に関する無影響量は 27 mg/kg であると考えられる。

文 献

- 1) 阿部武九, 松浦郁夫, 大塚孝子, 土志田和夫: 薬理と治療 14(Suppl. 5):1023 (1986)
- 2) Dawson A.B.: *Stain Technol.* 1: 123 (1926)
- 3) Wilson J.G. & Warkany J.: *Teratology, Principles and Techniques*, Univ. of Chicago Press (1965), p. 262
- 4) 西村耕一: 先天異常 14(1): 23 (1974)
- 5) 加藤正夫, 松沢景子, 遠乗弘美, 時田徳太郎, 橋本喜信: 医薬品研究 10(1): 149 (1979)
- 6) 永岡隆晴, 重村 隆, 奈良間功: 薬理と治療 9(3): 839 (1981)
- 7) 永岡隆晴, 重村 隆, 奈良間功: 薬理と治療 9(3): 851 (1981)
- 8) 永岡隆晴, 重村 隆, 奈良間功: 薬理と治療 9(3): 879 (1981)

Argipidine (MD-805) の生殖試験

〈第4報〉 ウサギにおける胎仔の器官形成期 静脈内投与試験

第一製薬株式会社 中央研究所 安全性研究センター

渡 辺 敏 樹 松 橋 邦 夫 高 山 敏

Reproduction Studies of Argipidine (MD-805) (IV)

—Teratogenicity Study in Rabbits

Treated Intravenously with Argipidine (MD-805)—

Toshiki Watanabe, Kunio Matsuhashi
and Satoshi Takayama

Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

Argipidine, (2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-(*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl]-L-arginyl] 2-piperidinecarboxylic acid monohydrate, is a new thrombin inhibitor that shows a potent and highly selective inhibitory effect. The purpose of this study was to assess the embryo/fetal toxicity and teratogenic potential of the compound in rabbits. Argipidine was administered intravenously to New Zealand White rabbits at dosages of 0.5, 1.0, or 2.0 mg/kg/day from day 7 to 17 of gestation.

Food intake of dams receiving 1.0 and 2.0 mg/kg/day was increased during the latter half of gestation. No maternal toxicity was seen at doses of up to 2.0 mg/kg/day with respect to general signs, body weight gain. There was no significant difference in litter size fetal survival, fetal body weight and survival for 6 hours after birth in the argipidine treated groups compared to the control group, except for an increase in body weight of male fetuses in 2.0 mg/kg/day treated group. No external, visceral or skeletal malformations attributable to the treatment were observed in fetuses.

This investigation suggests that the maximum no effective dose of argipidine

may be 0.5 mg/kg/day in dams and 1.0 mg/kg/day in fetuses.

KEY WORDS

Argipidine, MD-805, A new thrombin inhibitor,
Teratogenicity study, Rabbits

緒 言

今回、われわれは argipidine の生殖試験の一環として argipidine の注射剤をウサギ胎仔器官形成期に静脈内投与して母動物およびその胎仔に対する影響を検討したのでその成績を報告する。

I 試験材料および方法

1 被験物質

Argipidine は下記の化学構造、化学名および分子量を有する白色の粉末である (Fig. 1)。

Argipidine は三菱化成工業株式会で合成された上記の argipidine の 10 mg および日局ソルビトールの 1080 mg を注射用蒸留水で全量を 20 ml とした溶液で、褐色ガラス製アンプルに封入したものである。本試験には第一製薬株式会社中央研究所製剤研究センターで製造された Lot No. 43 PI 01 を使用した。プラセボ (注射用蒸留水 20 ml 中に日局ソルビトール 1080 mg 含有) は Lot No. 43 PI 02 を使用した。

被験物質の含量および安定性は当研究所製剤

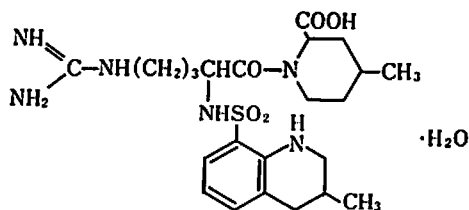
研究センターで検討された。試験開始前の含量は 101.8% (対表示量%) であり、原液は試験期間中安定であった。また各濃度に希釈された投与液についても室温放置で 24 時間安定であった。

2 使用動物および飼育法

未経産ニュージールランドホワイト種雌雄ウサギ (加商株式会社) を入手後、1 週間の検疫を行った。さらに数週間の予備飼育を行い、その間異常のみられない動物を試験に供した。雌ウサギは、妊娠 0 日に 6~8 ヶ月齢、体重 3.90~5.32 kg のものを 68 匹使用した。雄ウサギは、雌ウサギとの交配時に 8~10 ヶ月齢のものを 19 匹使用した。

動物の飼育は温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ および照明時間 12 時間 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に制御された動物室で行い、飼料 (オリエンタル酵母株式会社製固形飼料, GC 4) および水道水 (30 μm の孔径のフィルターにより濾過) を自由に摂取させた。また 1 ケージの収容匹数は 1 匹とした。

妊娠動物の作成は雄雌各 1 匹を交配用木製ケ



化学名: (2*R*, 4*R*)4-methyl-1-[(*N*²-(*(R,S*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate

化学式および分子量: $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_5\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 526.66

Fig. 1 Argipidineの化学構造式

Table 1 Observation of dams treated intravenously with argipidine in teratogenicity study

Dose (mg/kg/day)	0.0	0.5	1.0	2.0
No. of rabbits	17	17	17	17
Dead	2	0	0	1
Non-Pregnant	2	2	1	0
Abortion	2	3	0	1

ージに同居させ、交尾を確認したものを交配成立とみなし、その日を妊娠0日とした。

3 投与方法および投与期間

Argipidine はプラセボ（注射用蒸留水 20 ml 中に日局ソルビトール 1080 mg 含有）により所定濃度に希釈し、妊娠0日の体重を基準として 1 kg あたり 4 ml の投与液量で、20 ml のディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社、東京）および23Gのディスポーザブル注射針（テルモ株式会社、東京）を用いて耳静脈より投与した。argipidine の投与液は用時調製とした。なお対照群には、プラセボを同様に投与した。投与期間は妊娠6日から18日までとし、1日1回投与した。

4 投与量

本試験の最高用量群は、argipidine の溶解度およびウサギに連続して静脈内投与しうる限界容量から決定した。すなわち argipidine の注射剤の溶解度について、当研究所製剤研究センターで検討を加えたところ、本剤は安定な pH (5~8) 下で溶解補助剤を加えても 5 mg/10 ml 以上を溶解することは非常に困難であることが判明した¹⁾。そこで今回、治験用に製剤化された 5 mg/10 ml の濃度の注射液を用い、さらにウサギに連続して静脈内投与しうる限界量が 4 mg/kg と考えられることから、最高用量群を 2.0 mg/kg とした。最低用量群は、人体予想常用量に近い 0.5 mg/kg とし、また最高用量群と最低用量群の等比中項である 1.0 mg/kg を中間用量群とした。

5 観察方法

母動物については、実験期間中毎日の一般症

状の観察を行うとともに、妊娠0, 6, 9, 12, 15, 19, 24および29日に体重の測定を行った。摂餌量は0~3, 3~6, 6~9, 9~12, 12~15, 15~17, 17~19, 19~22, 22~24, 24~27および27~29日の各期間について測定した。

死亡および流産例を除く各群すべての母ウサギを、妊娠29日に空気栓塞により屠殺し、ただちに開腹して主要臓器を肉眼的に観察するとともに、卵巣および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胎仔数および死亡吸収胎仔数を調べた。生存胎仔は、外部および口腔の異常の検査後、体重測定を行い、28°C の恒温器にて6時間の生存性を観察した。その後、肉眼的に胸腔腔内諸臓器の異常および雌雄の判定を行った。ついで胎仔はすべて剥皮し99.5%エタノールで固定後、アリザリンレッドS染色透明骨格標本とし、骨格異常、骨格変異の有無および化骨進行状態を検索した。

6 推計学的処理

Argipidine 投与各群と対照群との平均値の差の検定には t 検定法を用いた。なお胎仔に関する成績は同腹仔の平均値を独立の標本値として扱い、1腹単位で集計した。また群内における出現率の検定には、母動物に関する成績は2×2分割表による χ^2 検定法を、また胎仔に関する成績については、1腹内の出現率を標本単位として扱い順位和検定法を用いて行った。

II 試験成績

1 母動物におよぼす影響

試験期間中、argipidine 投与の影響による一般症状の変化は1例も観察されなかった。なお

Table 2 Body weight of dams treated intravenously with argipidine in teratogenicity study

Dose (mg/kg/day)	0.0	0.5	1.0	2.0
Day of gestation				
0	4.79±0.07 (15)	4.58±0.07 (15)	4.51±0.08*(16)	4.54±0.08*(17)
6	4.81±0.06 (15)	4.62±0.07*(15)	4.56±0.06*(16)	4.58±0.08*(17)
9	4.79±0.06 (15)	4.56±0.07*(15)	4.54±0.07*(16)	4.52±0.08*(17)
12	4.79±0.08 (15)	4.58±0.08 (15)	4.53±0.07*(16)	4.51±0.08*(17)
15	4.78±0.08 (15)	4.58±0.08 (15)	4.54±0.07*(16)	4.50±0.08*(17)
19	4.70±0.09 (15)	4.56±0.08 (15)	4.50±0.08 (16)	4.46±0.08*(17)
24	4.62±0.10 (15)	4.50±0.08 (15)	4.46±0.09 (16)	4.43±0.09 (17)
29	4.58±0.10 (11)	4.45±0.09 (12)	4.43±0.10 (16)	4.44±0.11 (15)

Body weights (kg) are shown as mean±S.E. Figures in parentheses represent No. of dams

* Significantly different from control ($p<0.05$; t -test)

Table 3 Body weight gain of dams treated intravenous with argipidine in teratogenicity study

Dose (mg/kg/day)	0.0	0.5	1.0	2.0
During gestation				
6~9 Days	-0.02±0.02	-0.05±0.03	-0.02±0.02	-0.06±0.02
6~12 Days	-0.02±0.04	-0.03±0.02	-0.03±0.02	-0.07±0.03
6~15 Days	-0.04±0.05	-0.04±0.03	-0.03±0.02	-0.08±0.04
6~19 Days	-0.11±0.06	-0.05±0.04	-0.06±0.03	-0.13±0.05
6~24 Days	-0.19±0.09	-0.12±0.06	-0.11±0.05	-0.15±0.08
6~29 Days	-0.30±0.11	-0.13±0.08	-0.13±0.07	-0.11±0.08

Body weight gains(kg) are calculated from body weight on day 6 of gestation, and shown as mean±S.E.

不妊動物は対照群で2例, 0.5 mg/kg 投与群で2例および1.0 mg/kg 投与群で1例観察された (Table 1)。

試験期間中死亡した母動物は, 対照群で2例 (妊娠27日) および2.0 mg/kg 投与群で1例 (妊娠26日) であった。また早期産した動物は対照群で2例 (妊娠28日および29日), 0.5 mg/kg 投与群で3例 (妊娠28日2例および妊娠29日1例) ならびに2.0 mg/kg 投与群1例 (妊娠27日) 観察された。なお死亡および早期産した動物について剖検したところ肉眼的に異常所見は得られなかった。

Argipidine 投与各群の母動物体重は, Table 2

に示したように, 薬物投与前の妊娠0および6日目において対照群より軽かった。したがって薬物の母動物体重への影響を把握するために妊娠6日体重 (投与開始日) を基準としてその増減量を求めたところ, argipidine 投与各群の体重増減量は, 対照群に比べて有意な変化を示さなかった (Table 3)。

Argipidine 投与各群の摂餌量は, Fig. 2 に示したように妊娠初期から中期にかけては対照群と同程度であったが, 妊娠15日以降では対照群に比べ高値を示し, 1.0 mg/kg 投与群で妊娠27~29日に, また2.0 mg/kg 投与群では妊娠24~27日および妊娠27~29日の各期間に有意差

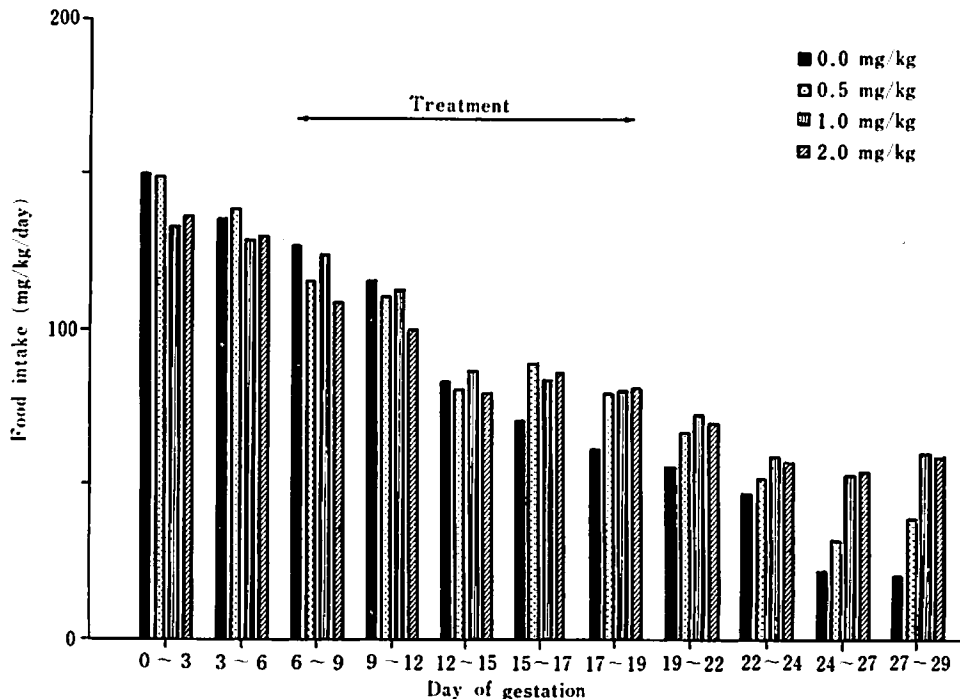


Fig. 2 Food intake of dams treated intravenously with argipidine in teratogenicity study

を示した。

2 胎仔におよぼす影響

胎仔摘出所見を Table 4 に示した。

Argipidine 投与各群の平均黄体数、平均着床数および生存胎仔数は、対照群と同程度であり有意差を示さなかった。胎仔死亡吸収率は、1.0および2.0 mg/kg 投与群で対照群に比べ増加したが、有意差は認められなかった。性比は、対照群と argipidine 投与群との間に差異を示さなかった。argipidine 投与各群の平均生存胎仔体重は対照群に比べむしろ重く、2.0 mg/kg 投与群の雄体重では対照群との間に有意差が認められた。胎仔摘出後6時間における生存率は、対照群と argipidine 投与各群いずれも同程度であり、有意差を示さなかった。

外部異常として、対照群に外脳症、欠指（左前肢）および無指（右前肢）が重複した奇形が1例（1.8%）、0.5 mg/kg 投与群で臍帯ヘルニ

ア2例および矮小仔（矮小仔は対照群の平均胎仔体重の1/2、すなわち15.7 g以下の体重の胎仔）6例の計8例（6.7%）、1.0 mg/kg 投与群で脳ヘルニア1例および矮小仔1例の計2例（1.9%）ならびに2.0 mg/kg 投与群で臍帯ヘルニア1例（0.8%）がそれぞれ観察されたが、それらの出現率に関して対照群と argipidine 投与各群との間に有意差は認められなかった（Table 4）。また内臓異常については、対照群および argipidine 投与群ともに1例も観察されなかった。

胎仔骨格所見を Table 5 に示した。

化骨進行度の指標として上後頭骨、胸骨核、中手骨、前肢基節骨、中足骨、後肢基節骨および尾椎骨の化骨状態を観察したところ、それらの化骨進行度に対照群と argipidine 投与各群との間で有意差は認められなかった。骨格変異に関して頸肋の形成は、対照群を含む全群に少数

Table 4 Teratological observation of fetuses from dams treated intravenously with argipidine in teratogenicity study

Dose (mg/kg/day)	0.0	0.5	1.0	2.0
No. of litter examined	11	12	16	15
No. of corpora lutea	112	126	162	149
Mean±S.E.	10.2±0.5	10.5±0.5	10.1±0.4	9.9±0.5
No. of implants	101	98	134	119
Mean±S.E.	9.2±0.5	8.2±1.0	8.4±0.4	7.9±0.8
No. of live fetuses	85	84	104	85
Mean±S.E.	7.7±0.6	7.0±0.9	6.5±0.6	5.7±0.8
No. of resorbed or dead fetuses	16	14	30	34
Implantation sites	0	0	6	0
Placental remnants	10	9	14	16
Macerated fetuses	4	5	9	11
Dead fetuses	2	0	1	7
Fetal mortality ^{a)}	16.4	13.8	23.0	23.0
Body weight (g) of live fetuses (Mean±S.E.)				
Male	31.2±2.1	33.6±2.5	36.3±1.8	38.9±2.4*
Female	31.7±1.9	31.3±2.4	34.4±1.9	34.5±2.1
Total	31.4±1.9	32.6±2.3	35.6±1.8	38.2±2.6
Sex ratio Male (%)	45 (53.2)	47 (59.3)	54 (51.6)	43 (55.1)
Female (%)	40 (46.8)	37 (40.7)	50 (48.4)	42 (44.9)
Survival rate (%) ^{b)}	96.1	96.3	95.6	95.8
No. of litters with external anomalies (%)	1 (9.1)	4 (33.3)	2 (12.5)	1 (6.7)
No. of fetuses with external anomalies (%)	1 (1.8)	8 (6.7)	2 (1.9)	1 (0.8)
Exencephaly	1 (1.8) ^{c)}	0	0	0
Encephalocele	0	0	1 (1.1)	0
Omphalocele	0	2 (2.4)	0	1 (0.8)
Dwarf	0	6 (4.3)	1 (0.7)	0
Malformations of fore limbs	1 (1.8) ^{d)}	0	0	0
Visceral anomaly	0	0	0	0

^{a)} (No. of dead or resorbed fetuses/No. of implants) × 100^{b)} Survival rate in 6hr^{c)} This fetus was accompanied with malformations of fore limbs.^{d)} Oligodactyly (left) and adactyly (right) of the fore limbs* Significantly different from control ($p < 0.05$: *t*-test)

Table 5 Skeletal observations of fetuses from dams treated intravenously with argipidine in teratogenicity study

Dose (mg/kg/day)	0.0	0.5	1.0	2.0
No. of litters examined	11	12	15	14
No. of fetuses examined	85	84	104	85
Degree of ossification (%)				
Incomplete ossification of supraoccipitals	0	0	0	0
Incomplete ossification of sternebrae	24 (30.9)	35 (35.7)	39 (37.5)	32 (35.8)
Non-ossified metacarpals	8 (9.9)	10 (7.2)	4 (3.7)	5 (5.2)
Non-ossified proximal phalanges of fore limb	1 (1.8)	3 (2.1)	0	0
Non-ossified metatarsals	0	0	0	0
Non-ossified proximal phalanges of hind limb	0	1 (0.7)	0	0
No. of ossified caudal vertebrae	15.9±0.1	15.9±0.2	16.1±0.1	16.2±0.1
Skeletal variation (%)				
No. of litters with skeletal variations	11 (100)	10 (83.3)	13 (86.7)	14 (100)
No. of fetuses with skeletal variations	52 (60.9)	32 (38.2)	52 (50.3)	62 (72.2)
Formation of cervical ribs	2 (2.7)	1 (0.8)	3 (3.0)	1 (0.9)
Formation of 13th ribs	50 (58.2)	31 (37.4)	50 (48.2)	61 (71.4)
Variation of sternebrae				
Separated	0	0	2 (2.4)	0
Dislocated	1 (1.8)	0	1 (1.1)	3 (3.4)
Asymmetry	0	0	0	1 (0.8)
Increase of number of lumbar vertebrae	0	0	1 (0.7)	0
Skeletal anomaly (%)				
No. of litters with skeletal anomalies	3 (27.3)	0	4 (26.7)	2 (14.3)
No. of fetuses with skeletal anomalies	3 (3.6)	0	4 (4.0)	2 (3.2)
Malformations of skull	1(1.8) ^{a, b)}	0	1 (1.1) ^{c)}	0
Shortening of the 1st cervical vertebral arches	1 (1.8)	0	0	0
Fusion of sternebrae	2 (1.8)	0	3 (2.9)	2 (3.2)
Malformations of fore limbs	1 (1.8) ^{d)}	0	0	0

^{a)} Defects of nasal bone, frontal bone, temporal bone, parietal bone, interparietal bone and supraoccipital^{b)} This fetus was accompanied with shortening of the 1st cervical vertebral arches and malformations of fore limbs^{c)} Defects of frontal bone and parietal bone^{d)} Oligodactyly (left) and adactyly (right) of the fore limbs

例(1~3例)観察されたにすぎなかった。一方、第13肋骨をもった胎仔の出現率は対照群で58.2%に対し、1.0 mg/kg 投与群は48.2%と同程度であったが、0.5 mg/kg 投与群では37.4%と低率を、また 2.0 mg/kg 投与群では71.4%と高率を示したが、それらの出現率は対照群との間に有意差を示さなかった。その他、胸骨核分離、胸骨核偏位、胸骨核非対称および腰椎数の増加(腰椎数:8)などの骨格変異が対照群、1.0および2.0 mg/kg 投与群で散見されたが、それらの出現率は対照群と argipidine 投与群との間に有意な差を示さなかった。骨格異常は、1.0 mg/kg 投与群で前頭骨および頭頂骨の一部欠損(外部異常として脳ヘルニアを有した胎仔)が1例および胸骨核の癒合3例の計4例(4.0%)、2.0 mg/kg 投与群で胸骨核の癒合が2例(3.2%)観察されたが、対照群においても鼻骨、前頭骨、側頭骨、頭頂骨、頭頂間骨および上後頭骨の欠損、第1頸椎弓短小、指骨の欠損の重複例(外部異常として外脳症、欠指および無指を重複した仔)が1例および胸骨核の癒合2例の計3例(3.6%)観察されており、それらの出現率は対照群と argipidine 投与群との間に有意差を示さなかった。

III 考察および総括

抗血栓剤 argipidine の0.5, 1.0および2.0 mg/kg をニュージーランドホワイト種雌ウサギの胎仔器官形成期に耳静脈内投与して母動物ならびに胎仔におよぼす影響を検討した。

母動物におよぼす影響をみると、argipidine 投与による一般症状および体重への影響は認められず、1.0および2.0 mg/kg 投与群で妊娠後期の摂餌量が対照群に比べ増加したにすぎなかった。一方、死亡が2.0 mg/kg 投与群で1例ならびに早期産が0.5 mg/kg 投与群で3例および2.0 mg/kg 投与群で1例観察されたが、対照群においても死亡および早期産が各2例ずつ観察されていることから、argipidine 投与群にみられた死亡および早期産は、薬物の影響によるものではないと考える。

次に胎仔に対する影響についてみると、生存胎仔体重が2.0 mg/kg 投与群の雄胎仔で増加した以外、argipidine 投与群の平均黄体数、平均着床数、平均生存胎仔数、胎仔死亡吸収率、性比および生存胎仔の6時間生存率は対照群とほぼ同程度であり、胎仔致死作用および胎仔発育抑制作用などの悪影響は認められなかった。外部異常として対照群に外脳症、左前肢の欠指および右前肢の無指の重複奇形が1例(1.8%)、0.5 mg/kg 投与群に臍帯ヘルニア2例および矮小仔6例の計8例(6.7%)、1.0 mg/kg 投与群に脳ヘルニア1例および矮小仔1例の計2例(1.9%)ならびに2.0 mg/kg 投与群で臍帯ヘルニアが1例(0.8%)観察された。Argipidine 投与群で観察された臍帯ヘルニアおよび脳ヘルニアは、それらの出現数が少なく(1~2例)、ウサギにおいて自然発生的によく出現することが報告^{2,3)}されていることから薬物投与の影響によるものではないと考えられる。また矮小仔についても、0.5 mg/kg 投与群に観察された出現率が若干高いが、それらの6例中5例が1腹に集中しており、矮小仔のみられた母動物は2例にすぎないこと、またその出現率は推計学的に有意な差を示さず、さらに用量相関性もみられないことなどから、0.5 mg/kg 投与群の矮小仔は、自然発生的に出現したものと考えられる。なお、内臓異常は1例も観察されなかった。

胎仔骨格検査では、上後頭骨、胸骨核、中手骨、前肢基節骨、中足骨、後肢基節骨および尾椎骨の化骨に argipidine 投与は影響を及ぼさなかった。骨格変異の出現率についても、argipidine 投与による影響はみられなかった。骨格異常として、対照群に胸骨核の癒合が2例ならびに外部異常として外脳症、前肢指の減形成を重複した仔にみられた鼻骨、前頭骨、側頭骨、頭頂骨、頭頂間骨および上後頭骨の欠損、第1頸椎弓短小および指骨の欠損の重複例が1例の計3例(3.6%)、1.0 mg/kg 投与群では胸骨核の癒合が3例ならびに外部異常として脳ヘルニアを有した仔にみられた前頭骨および頭頂骨の

一部欠損が1例の計4例(4.0%)および2.0 mg/kg 投与群では胸骨核の癒合が2例(3.2%)観察された。しかしこれらの異常は出現頻度に用量相関性が認められず、その型も自然発生的によく観察されることから、argipidine 投与の影響ではないものと考えられる。

以上の成績より、ウサギの胎仔器官形成期に argipidine を連続耳静脈内投与した場合、母動物では1.0および2.0 mg/kg 投与群に摂餌量の増加が、一方胎仔については2.0 mg/kg 投与群に雄体重の増加が、それぞれ認められたが、胎仔に対して催奇形作用を示さなかった。したがって最大無影響量は、母動物では0.5 mg/kg、および胎仔では1.0 mg/kg であると考えられる。

要 約

抗ロニン作用を有する抗血栓剤 argipidine の0.5, 1.0および2.0 mg/kg をニュージランドホワイト種雌ウサギの妊娠6日より18日までの13日間連続して耳静脈内投与し、母動物および胎仔に及ぼす影響を検討した。その成績の要約は次のとおりである。

1) 母動物に及ぼす影響としては、1.0および2.0 mg/kg 投与群の摂餌量が妊娠後期に増加した以外、一般症状の変化および体重に argipidine 投与による影響は認められなかった。

2) 平均黄体数、平均着床数、平均生存胎仔数、胎仔死亡吸収率、平均生存胎仔体重、性比および摘出胎仔の6時間生存性については、雄の生存胎仔体重が2.0 mg/kg 投与群で有意に増加したが、その他の項目は argipidine 投与群と対照群との間に差異を認めなかった。

3) 外部異常として、0.5 mg/kg 投与群で臍帯ヘルニア2例および矮小仔6例の計8例(6.7%)、1.0 mg/kg 投与群で脳ヘルニア1例および矮小仔1例の計2例(1.9%)および2.0 mg/kg 投与群で臍帯ヘルニア1例(0.8%)観察されたが、対照群においても外脳症、左前肢欠指

および右前肢無指の重複奇形が1例(1.8%)観察されており、それらの外部異常は、その出現率に有意差は認められず、用量相関性もみられないことから自然発生によるものと考えられる。また内臓異常は、対照群および argipidine 投与群ともに1例も観察されなかった。

4) 骨格検査では、上後頭骨、胸骨核、中手骨、前肢基節骨、中足骨、後肢基節骨および尾椎骨の化骨進行度に argipidine 投与の影響は認められなかった。骨格変異については対照群および argipidine 投与群に頸肋、第13肋骨、胸骨核分離、胸骨核偏位、胸骨核非対称および腰椎数の増加などが観察されたが、その出現率には対照群と argipidine 投与群との間に有意差は認められなかった。骨格異常として1.0 mg/kg 投与群では外部異常として脳ヘルニアを有した仔に前頭骨および頭頂骨の一部欠損が1例ならびに胸骨核癒合が3例の計4例(4.0%)および2.0 mg/kg 投与群では胸骨核癒合が2例(3.2%)観察されたが、対照群においても外脳症、前肢指の欠損および無指を重複した仔にみられた鼻骨、前頭骨、側頭骨、頭頂骨、頭頂間骨および上後頭骨の欠損、第1頸椎弓の短小、指骨の欠損の重複例が1例ならびに胸骨核癒合が2例の計3例(3.6%)が観察されており、それらの異常はその出現率に有意差は認められず、用量相関性もみられないことから自然発生的に出現したものとみなされた。

文 献

- 1) 林 泰三、関 裕充、望月信之: DK-7419 注射剤の製剤化研究(第1報)、第一製薬(株)社内報告(1980)
- 2) 亀山義郎、谷村 孝、安田峯生編: 実験動物における自然発生奇形、先天異常 20: 25~106 (1980)
- 3) Palmer A.K.: Methods in Prenatal Toxicology (Neubert D., Merker H.-J. & Kwasi-groch T.E., eds), Georg Thieme Publishers, Stuttgart Berlin (1977), pp. 52~71

Argipidine (MD-805) の 抗原性に関する検討

第一製薬株式会社 中央研究所 免疫研究グループ

和賀井 信彦 服部 浩之

Studies on Antigenicity of Argipidine (MD-805)

Nobuhiko Wakai and Hiroyuki Hattori

Research Institute, Daiichi Seiyaku Co. Ltd.

ABSTRACT

The antigenicity of argipidine (MD-805), a new synthetic anti-thrombin agent, was carried out in guinea pigs and mice with systemic anaphylaxis (SA), passive cutaneous anaphylaxis (PCA), passive hemagglutination (PHA) and precipitation reactions (PR).

Guinea pigs were sensitized intradermally with argipidine (2, 10 and 50 mg/kg) or argipidine • ovalbumin conjugate (argipidine • OA) emulsified in Freund's adjuvant three times at two-week interval. No SA was observed in the sensitized animals after injections of argipidine (10 mg/kg). No antibodies to argipidine was detectable by 4-hr PCA in guinea pigs, and PHA and PR in the sera obtained from argipidine sensitized animals, by using argipidine • bovine-serum-albumin conjugate and/or argipidine as antigens. Moreover, no PCA reaction was observed in the recipients sensitized with anti-argipidine serum (PCA titer 1 : 3566) passively, after the injections of argipidine.

Mice were sensitized intraperitoneally, twice at three-week interval, with argipidine (2, 10 and 50 mg/kg) or argipidine • OA in aluminum hydroxide. No IgE antibodies to argipidine was detectable, by 24-hr PCA in rat, in the sera obtained from argipidine sensitized animals. And no PCA reaction was observed in the recipients sensitized with anti-argipidine (PCA titer 1 : 160) passively, after the injection of argipidine.

These results suggest that argipidine has no antigenicity in guinea pigs and mice.

KEY WORDS

Argipidine, MD-805, Antigenicity, Guinea pig, Mouse, IgG, IgE

緒 言

Argipidine は強い抗トロンビン作用をもつアルギニンの誘導体¹⁻³⁾で、岡本彰祐博士(神戸大)および三菱化成工業(株)によって創製され、注射剤としての開発が第一製薬(株)と協同で進められている。

今回われわれは argipidine の抗原性を評価する目的で、アナフィラキシー反応、受身血球凝集反応およびゲル内沈降反応に関する検討をモルモットを用いて、また IgE 抗体に関する検討をマウスを用いて行ったので、それらの成績を報告する。

I 試験材料

1 被験物質

Argipidine は下記の構造式(Fig. 1)、化学名および分子量を有する白色の結晶性粉末で、水に溶けにくい、50%マクロゴール(ポリエチレングリコール400)水溶液には2.5 mg/ml 濃度まで溶け、また50%プロピレングリコールにはやや溶けやすい。

試験には当研究所から供給された標品(ロット No. P-ATB-52406S)を、生理食塩液(扶桑薬品工業)に溶解または懸濁(感作用)するか、50%マクロゴール(山田製薬)に溶解(誘発用)して用いた。

2 対照物質

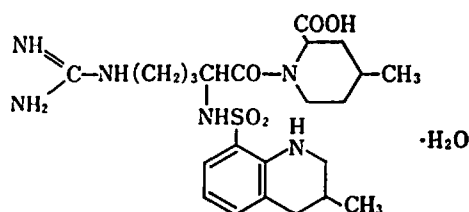
Sigma 社から購入した卵白アルブミン(OA;

Grade V, ロット No. 54 F-8150)を陽性対照物質とした。なお感作・誘発には生理食塩液に溶解して用いた。

3 Argipidine 蛋白結合物の調製

Argipidine の100 mgを50%プロピレングリコール(キンダ化学)の2.5 mlに溶解したのち、水溶性カルボジイミド[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide · HCl, 半井化学]の200 mg/ml 溶液2.5 mlを加え、室温で攪拌しながら1時間反応させた。0.6 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)の1 mlを加えて反応を止めたのち、この反応液を、卵白アルブミン(OA, Sigma 社)またはウシ血清アルブミン(BSA, Sigma 社)の100 mgを溶解した0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)2.5 mlに攪拌しながら滴下した。室温でさらに18時間反応させたのち、0.06 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)を含む0.15 M 塩化ナトリウム溶液に対して無限透析をすることにより未反応の argipidine を除き、argipidine · 蛋白結合物溶液を得た。蛋白1分子あたりに結合した argipidine の分子数を290および330 nmにおけるUV吸収から測定すると、担体がOAの場合は約4個、BSAの場合は約3個であった。なおOAとの結合物は沈澱を生じたので、10%ドデシル硫酸ナトリウムで可溶化し、孔径0.45 μmのフィルター(Millex®-HA, Millipore)でろ過したのちUV吸収を測定した。

化学構造式



化学名: (2R, 4R)-4-methyl-1-[N²-((RS)-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate

分子量: 526.66

Fig. 1 Argipidine の化学構造式

4 使用動物

感作用には、いずれも5週齢のハートレー系モルモットおよびBALB/c系マウスを購入した。入荷後1週間の検疫および馴化期間中に異常がみられず、体重が348~450gのモルモット50匹および16.0~19.7gのマウス40匹を試験に供した。

また、PCA反応用には体重400~560gのハートレー系モルモットおよび238~280gのSD系ラットを用いた。以上の動物はすべて雌性で、静岡県実験動物農業協同組合より購入した。

飼育は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ の動物室で行い、飼料(船橋農場製固型飼料モルモット用GB-1およびマウス・ラット用MB-1)と水は自由に摂取させた。専用のケージにモルモットおよびマウスは1ケージあたり5匹ずつ、ラットは3匹ずつ収容した。

感作用動物は体重を指標とした無作為抽出法により各群に振り分けた。個体識別はピクリン酸を用いた毛染法により行い、ケージには必要事項を記入したカードを貼付した。PCA反応動物は任意に抽出し、剃毛した背部にマジックインキで番号を付すことにより識別を行った。

II 試験方法

1 モルモット試験

1) 感作方法

モルモットの感作は、argipidineの2, 10または50 mg/kg, argipidine・OA結合物の2 mg/kgあるいは陽性対照としてOAの2 mg/kgを、フロイントアジュバント(FA, Difco)とともに、2週おきに3回投与することにより行った。なお1回目感作は完全アジュバント(CFA)を用いて足離内および皮内に、2および3回目感作は不完全アジュバント(IFA)を用いて皮内に、いずれも1ヵ所あたり0.1 mlを目安として投与した。感作に用いた被験液は、argipidineでは4, 20および100 mg/ml濃度に生理食塩液に懸濁、argipidine・OA結合物およびOAでは

4 mg/ml濃度に生理食塩液に溶解したのち、等量のFAを加え、完全なエマルジョンとなるまで混和することにより調製した。

2) 血清採取

感作処置終了後12日に全群のモルモットの眼窩静脈叢から部分採血を行い、血清を分離し、使用するまで -20°C に保存した。

3) 全身アナフィラキシー反応

感作処置終了後14日に各群のモルモットに誘発用被験液を静脈内投与して、全身アナフィラキシー反応発生の有無を調べた。

誘発用被験液としては、argipidineおよびargipidine・OA結合物感作群では、無理なく静脈内に投与できる最大用量である10 mg/4 ml/kgのargipidine溶液を、またOA感作群では充分量と考えられる2 mg/ml/kgのOA溶液を投与した。

全身アナフィラキシー反応の観察および判定はKoizumiら⁴⁾の方法に従い、挙動不安、搔鼻、咀嚼、咳・くしゃみなどの症状が2つ以上出現した場合を軽度陽性、呼吸困難、チアノーゼが加わった場合を中等度陽性、死亡を重度陽性とした。

4) 受身皮膚アナフィラキシー(PCA)反応

モルモットをレシビエントとした4時間PCA反応により検討した。感作処置終了後12日に採取した被験血清の2倍から始まる連続希釈液を生理食塩液で作り、その0.1 mlずつを毛刈りした健常モルモットの皮内に投与して受身感作した。4時間後に誘発用被験液と1%エバンスブルーの0.5 ml/匹とを静脈内に投与した。誘発用被験液としては、argipidineおよびargipidine・OA結合物感作群血清で受身感作したモルモットに対しては10 mg/4 ml/kgのargipidine溶液および2 mg/ml/kgのargipidine・BSA結合物溶液を、またOA感作群血清で受身感作したモルモットに対しては2 mg/ml/kgのOA溶液を用いた。

誘発投与30分後に動物を屠殺し、皮膚を剥離したのち、皮内投与局所の色素漏出反応を調べた。試験は2または3匹ずつのレシビエント動

物を用いて行い、直径5 mm以上の青色斑が形成された場合を陽性とみなし、陽性反応を示す最大希釈倍数をPCA価とした。各群のPCA価は相乗平均値で示した。

5) 受身血球凝集 (PHA) 反応

PHA反応による抗体の検出を以下の方法で行った。ホルマリン・タンニン酸処理ヒツジ赤血球の沈渣1容にリン酸緩衝生理食塩液(PBS, 日水製薬)2容およびPBSで調製したargipidine・BSA結合物溶液(10 mg/ml)またはOA溶液(10 mg/ml)3容を加えて37°Cで6時間反応させた。PBSで充分洗ったのち、正常モルモット血清を1%濃度を含むPBSで1%血球浮遊液を作り、感作血球液とした。

反応はマイクロプレート法で行った。被験血清を56°Cで30分間加温、血球で吸収したのち、1%正常モルモット血清添加PBSで5倍から始まる25 μ l ずつの2倍連続希釈列を作った。これに感作血球液25 μ l ずつを加えて振とう後、一晚放置して凝集の有無を観察した。1血清あたり2列ずつの希釈列を作り、2列とも陽性を示す最大希釈倍数をPHA価とした。各群のPHA価は相乗平均値で示した。被験血清と感作血球の組み合わせは、argipidineおよびargipidine・OA結合物感作群血清に対してはargipidine・BSA結合物感作血球、またOA感作群血清に対してはOA感作血球とした。

6) 寒天ゲル内沈降反応

Micro-Ouchterlony法により沈降抗体の有無を観察した。寒天(Difco)をPBSに1%濃度に溶解し、ゲルプレートを作製した。中央ウェルには検出用抗原液を、5 mm隔てた周囲のウェルには被験血清をそれぞれ10 μ l ずつ加えたのち、室温で反応させた。被験血清と検出用抗原液の組み合わせは、argipidineおよびargipidine・OA結合物感作群血清に対してはargipidine・BSA結合物、OA感作群血清に対してはOAとし、それぞれPBSで10 mg/ml濃度に調製して用いた。

7) 抗体の特異性についての検討

Argipidine・OA感作で得られた抗体がargi-

pidineに特異的であることを確認するため、同種PCAおよびPHA反応を用いた抑制試験により検討した。

同種PCAを用いた抑制試験は、被験血清の5倍から始まる2倍連続希釈列を作り、それぞれの希釈液に生理食塩液に溶解したargipidineの500 μ g/ml溶液を等量加えて室温で2時間反応させた場合のPCA価と、argipidine無添加の場合のそれとを同一のレシビエントモルモットで比較することにより行った。

PHA反応を用いた抑制試験は、argipidineを500 μ g/ml濃度を含む1%正常モルモット血清添加PBSと2倍連続希釈した被験血清とを室温で30分反応させた場合のPHA価と、無添加の場合のそれとを比較することにより行った。

2 マウス試験

1) 感作方法

マウスの感作は、argipidineの2, 10または50 mg/kg、あるいはargipidine・OA結合物の2 mg/kgを、水酸化アルミニウム・ゲルとともに、3週おきに2回腹腔内投与することにより行った。感作に用いた被験液は、argipidineでは160, 800または4000 μ g/ml濃度に生理食塩液に懸濁(または溶解)、argipidine・OA結合物では160 μ g/ml濃度に生理食塩液に溶解したのち、浜岡⁶⁾の方法により調製した水酸化アルミニウム・ゲル(16 mg/ml)を等量加えて混合することにより調製し、体重20 gあたり0.5 mlずつを投与した。

2) 血清採取

感作処置終了後7日に全採血を行い、血清を分離し、各群ごとにブールして、使用するまで-20°Cに保存した。

3) PCA 反応

マウスIgE抗体の測定は、ラットをレシビエントとした24時間PCA反応⁷⁾により行った。被験血清の5倍から始まる2倍連続希釈液0.05 mlずつを剃毛したラット背部皮内に投与して受身感作した。感作24時間後に誘発用被験液と1%エバンスブルーの0.5 ml/匹とを静脈内に投与した。誘発用被験液としては、10

Table 1 Systemic anaphylaxis in guinea pigs sensitized with argipidine, argipidine • ovalbumin (OA) conjugate or OA

Group	Sensitization ¹⁾		Elicitation(iv) ²⁾		Incidence of ³⁾ positive reaction
	Test article	Dose	Test article	Dose	
1	Argipidine	2 mg/kg	Argipidine	10 mg/kg	0/10
2	Argipidine	10 mg/kg	Argipidine	10 mg/kg	0/10
3	Argipidine	50 mg/kg	Argipidine	10 mg/kg	0/10
4	Argipidine • OA ⁴⁾	2 mg/kg	Argipidine	10 mg/kg	0/10
5	OA	2 mg/kg	OA	2 mg/kg	8/10 ⁵⁾

1) Guinea pigs were sensitized, 3 times at 2 weeks interval, with foot pads and intradermal injections of test articles emulsified with complete(1st) and incomplete (2nd, 3rd) Freund's adjuvant 2) Elicitation was done 14 days after the last sensitization 3) No. of animals with positive reaction/No. of animals used 4) Argipidine • OA conjugate 5) 2 cases of anaphylaxis were fatal

mg/4 ml/kg の argipidine 溶液および 2 mg/ml/kg の argipidine • BSA 結合物溶液を用いた。また OA 結合物感作群血清については、2 mg/ml/kg の OA による誘発をも行った。試験は 2 匹ずつのレシビエントを用いて行い、PCA 価の求め方はモルモットを用いた PCA 反応と同じ方法で行った。

4) 抗体のクラスおよび特異性についての検討

PCA 反応で測定された抗体が IgE 抗体であり、また argipidine • OA 結合物感作で得られた抗体が argipidine に特異的であることを確認するために、易熱性および PCA 抑制試験により検討した。

易熱性の検討は、被験血清を 56°C で 2 時間加温した場合の PCA 価と、加温処理しない場合のそれとを同一のレシビエントラットで比較することにより行った。

PCA 抑制試験は、モルモットの場合に準じて、レシビエント動物をラットとし、24 時間 PCA 反応を行って検討した。

III 試験成績

1 モルモット試験

1) 全身アナフィラキシー反応

各群感作モルモットにおける全身アナフィラキシー反応の成績を **Table 1** に示す。argipidine または argipidine • OA 結合物感作モルモットに argipidine の 10 mg/kg を静脈内に投与したところ、排尿が散見されたが、毒性症状あるいはアナフィラキシーショック類似症状は観察されず、全身アナフィラキシー反応は惹起されなかった。

一方、OA 感作群モルモット（陽性対照）に OA の 2 mg/kg を投与したところ、10 例中 8 例に咀嚼、咳・くしゃみ、搔鼻、呼吸困難あるいはチアノーゼなどのアナフィラキシーショック症状が出現し（軽度中等度陽性）、このうち 2 匹が死亡に至った（重度陽性）。

2) PCA 反応

感作処置終了後 12 日に採取した各群感作モルモット血清について、モルモットを用いた 4 時間 PCA 反応により測定した IgG₁ 抗体価を **Table 2** に示す。

Argipidine 感作群血清について、誘発用抗原を argipidine の 10 mg/kg あるいは argipidine • BSA 結合物の 2 mg/kg とした PCA 反応を試みたが、いずれの場合も 5 倍希釈血清で陰性の成績であった。

Argipidine • OA 感作群血清について、誘発用

Table 2 Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs with sera from guinea pigs sensitized with argipidine, argipidine · OA or OA

Group	Sensitization of donor guinea pigs ¹⁾		4-hr PCA elicited by iv injection with		
	Test article	Dose	Argipidine 10 mg/kg	Argipidine·BSA ²⁾ 2 mg/kg	OA 2 mg/kg
1	Argipidine	2 mg/kg	0/10 ³⁾ (<5) ⁴⁾	0/10 (<5)	NT ⁵⁾
2	Argipidine	10 mg/kg	0/10 (<5)	0/10 (<5)	NT
3	Argipidine	50 mg/kg	0/10 (<5)	0/10 (<5)	NT
4	Argipidine·OA	2 mg/kg	0/10 (<5)	10/10 (3566 : 1280~7241)	NT
5	OA	2 mg/kg	NT	NT	10/10 (13512 : 905~28963)

1) Animals were bled 12 days after the last sensitization 2) Argipidine · bovine-serum-albumin conjugate 3) No. of sera with positive reaction/No. of sera used 4) PCA titer (mean : range) 5) Not tested

Table 3 Passive hemagglutination (PHA) with sera from guinea pigs sensitized with argipidine, argipidine · OA or OA

Group	Sensitization of guinea pigs ¹⁾		Agglutination of SRBC coated with	
	Test article	Dose	Argipidine · BSA	OA
1	Argipidine	2 mg/kg	0/10 ²⁾ (<5) ³⁾	NT
2	Argipidine	10 mg/kg	0/10 (<5)	NT
3	Argipidine	50 mg/kg	0/10 (<5)	NT
4	Argipidine·OA	2 mg/kg	10/10 (260 : 80~640) ⁴⁾	NT
5	OA	2 mg/kg	NT	10/10 (905 : 320~1280)

1) Animals were bled 12 days after the last sensitization 2) No. of sera with positive reaction/No. of sera used 3) PHA titer (mean : range) 4) Two of 10 sera were tested by PHA inhibition assay. Titers were reduced from 320 or 160 to 40, respectively, after the incubation of the sera with argipidine (250 µg/ml) at room temperature for 30 min

抗原を BSA 結合物とした PCA 反応を試みたところ10例全例に argipidine に対する抗体が測定され、平均 PCA 価は3566倍(範囲 : 1280~7241倍)を示した。つぎに同感作群血清について、誘発用抗原を argipidine の 10 mg/kg として PCA 反応を試みたところ、いずれの血清についても 5 倍希釈血清で陰性の成績であった。

一方、OA 感作群血清について誘発抗原を OA の 2 mg/kg とした PCA 反応を試みたところ、10例全例に陽性反応が認められ、平均

PCA 価は13512倍(範囲 : 905~28963 倍)であった。

3) PHA 反応

各群感作モルモット血清について、PHA 反応の成績を Table 3 に示す。argipidine 感作群血清に対して、検出用抗原に argipidine · BSA 結合物を用いた感作血球で PHA 反応を試みたが、いずれの場合においても陽性反応は認められず、凝集抗体は測定されなかった。

Argipidine · OA 感作群血清に対して、argi-

Table 4 Micro-ouchterlony test with sera from sensitized guinea pigs with argipidine, argipidine · OA or OA

Group	Sensitization of guinea pigs ¹⁾		Precipitation reaction with	
	Test article	Dose	Argipidine · BSA	OA
1	Argipidine	2 mg/kg	0/10 ²⁾	NT
2	Argipidine	10 mg/kg	0/10	NT
3	Argipidine	50 mg/kg	0/10	NT
4	Argipidine · OA	2 mg/kg	0/10	NT
5	OA	2 mg/kg	NT	10/10

1) Animals were bled days after the last sensitization

2) No. of sera with positive reaction/No. of sera tested

pidine · BSA 結合物を用いた感作血球で PHA 反応を試みたところ、10例全例に陽性反応が認められ、平均 PHA 価は260倍（範囲：80～640倍）を示した。

一方、OA 感作群血清に対して、検出用抗原に OA を用いた感作血球で PHA 反応を試みたところ、10例全例に陽性反応が認められ、平均 PHA 価は905倍（範囲：320～1280倍）を示した。

4) 寒天ゲル内沈降反応

各群感作モルモット血清についてゲル内沈降反応の成績を Table 4 に示す。argipidine または argipidine · OA 結合物感作群血清に対して、抗原に argipidine · BSA 結合物を用いて反応を行ったが、いずれの場合も陰性の反応であった。

一方、OA 感作群血清では10例全例に、OA に対する沈降抗体が検出された。

5) 抗体の特異性

Argipidine · OA 結合物感作群血清のうち2例の血清を選んで PHA 反応による抑制試験を試みた。argipidine 無添加の場合、PHA 価は320および160倍を示したが、250 μ g/ml の argipidine 処理により PHA 価はそれぞれ40倍まで低下し、十分な抑制が認められた (Table 3)。しかしながら同感作群血清のうち1例を選んで PCA 反応による抑制試験を試みたところ、

PCA 価が5120から2560に低下したにすぎず、充分な抑制は認められなかった(成績示さず)。

2 マウス試験

1) PCA 反応

各群感作マウスのブール血清について、ラットを用いた24時間 PCA 反応により測定された IgE 抗体価を Table 5 に示す。

Argipidine 感作群血清について、誘発用抗原を argipidine の 10 mg/kg あるいは argipidine · BSA 結合物の 2 mg/kg とした PCA 反応を試みたが、いずれの場合にも5倍希釈血清で陰性の成績であった。

Argipidine · OA 結合物感作群血清について、誘発用抗原を argipidine · BSA 結合物とした PCA 反応を試みたところ、argipidine に対する抗体が測定され、PCA 価は160倍であった。つぎに同感作群血清について、誘発用抗原を argipidine の 10 mg/kg とした PCA 反応を試みたところ、5倍希釈血清でも陽性反応は認められず陰性の成績であった。また抗原の担体である OA に対する PCA 価を測定したが5倍希釈血清で陰性の成績であった。

2) 抗体のクラスおよび特異性

Argipidine · OA 感作群血清を56°C、2時間加熱処理したところ、PCA 価が10倍に低下し、ラット24時間 PCA 反応で測定される抗体は、ほとんどが IgE 抗体であることが確認された

Table 5 Specific IgE antibody production in mice

Group	Sensitization of donor mice ¹⁾		Rat 24-hr PCA by iv injections with		
	Test article	Dose	Argipidine 10 mg/kg	Argipidine-BSA 2 mg/kg	OA 2 mg/kg
1	Argipidine	2 mg/kg	<5 ²⁾	< 5	NT
2	Argipidine	10 mg/kg	<5	< 5	NT
3	Argipidine	50 mg/kg	<5	< 5	NT
4	Argipidine-OA	2 mg/kg	<5	160 ³⁾	<5

1) Mice were sensitized with intraperitoneal injections of test articles with Al (OH)₃ 200 mg/kg, twice at 21 days interval and bled 7 days after the last sensitization

2) Geometric means of the highest dilution of pooled serum given a positive reaction at rat 24-hr PCA

3) A titer was reduced from 160 to 10 after the heat treatment at 56°C of 2 hr, at rat 24-hr PCA

(Table 5)。また同感作群血清と argipidine とをモルモットの場合と同じ方法で反応させたところ、PCA 価が 320 倍以上 (≥ 320) または 80 倍から 160 または 80 倍に低下したにすぎず、十分な抑制は認められなかった (成績示さず)。

IV 考 察

注射剤として開発が進められている argipidine の抗原性を評価する 目的でアナフィラキシー反応の検討に加え、PHA およびゲル内沈降反応の検討をモルモットを用いて、また IgE 抗体に関する検討をマウスを用いて行った。

まずアナフィラキシー反応について、人工的な結合物を用いない感作方法で検討した。感作量は臨床予想最大用量 (100 mg/man/day) に相当する 2 mg/kg のほか、用量を上げた 10 および 50 mg/kg とした。これら用量を用いてモルモットおよびマウスをアジュバントとともに感作したが、argipidine の 10 mg/kg 投与による全身アナフィラキシーおよび PCA 反応はすべて陰性であった (Table 1, 2 および 5)。以上の成績から argipidine はモルモットおよびマウスにおいてアナフィラキシー反応を発現する可能性は極めて少ないと推察された。

つぎに本薬物の免疫原性およびアレルギー誘発原性を検討するために、OA または BSA を担体とする人工的な薬物・蛋白結合物を調製し

た。これらの抗原が完全抗原としての性質をもつことを確認するために、argipidine・OA 結合物をモルモットおよびマウスに投与して感作処置を行い、採取した血清についての抗 argipidine 抗体測定を BSA 結合物を抗原に用いて行った。結果は、モルモット血清では同種 PCA 反応で平均 3566 倍、マウス血清ではラット 24 時間 PCA 反応で 160 倍の抗体価となり、それぞれの薬物・蛋白結合物は完全抗原として使えることが確認された (Table 2 および 5)。また argipidine・OA 感作血清について BSA 結合物により測定される抗体は、モルモットの場合 PHA 抑制試験により argipidine に特異的であることが確認された (Table 3)。マウスの場合について特異性を PCA 抑制試験により確認を試みたが十分な成績は得られなかった。しかしながらモルモットの場合と同じ抗原を用いているので、マウスの場合も argipidine に対する特異抗体が測定されていると考えられた。またラットで測定されるマウスの抗体のクラスを易熱性の検討より調べたところ、56°C、2 時間の加温処理により十分な失活が認められたことより、IgE 抗体が主であることが確認された (Table 5)。

以上の確認の基に、まず免疫原性の検討を行った。抗体検出用抗原にはすべて argipidine・BSA 結合物 (argipidine : BSA $\approx$ 3 : 1) を用いた。薬物単独の FA エマルジョン または Al(OH)₃

混合液で感作処置をしたモルモットおよびマウス血清について、PCA 反応で検討したところ反応はすべて陰性でモルモット IgG₁ およびマウス IgE は検出されなかった (Table 2 および 5)。またモルモット血清について、PHA およびゲル内沈降反応を行ったが、抗体は検出されず陰性の成績であった (Table 3 および 4)。これらのことから、argipidine はモルモットおよびマウスにおいて免疫原性を示す可能性はきわめて少ないと考えられた。

つぎにアレルギー誘発原性の検討を、人工的な結合物を感作に用いたアナフィラキシー反応で行った。argipidine・OA 結合物で感作したモルモットで、あるいは同感作動物から採取した血清を用いての PCA 反応で、誘発に argipidine を用いたが、全身アナフィラキシーまたは PCA 反応のいずれも出現しなかった。また同抗原でマウスに誘導した抗 argipidine IgE 抗体で受身感作したラットを用いて検討を行ったが、argipidine 投与による PCA 反応は出現しなかった (Table 5)。これらのことから、argipidine はモルモットおよびラットにおいてアレルギー誘発原性を示す可能性は極めて少ないと考えられた。

以上のことから、argipidine はモルモットおよびマウスにおいて抗原性を示さない薬物であることが示唆された。

要 約

合成抗トロンビン薬 argipidine の抗原性についてモルモットおよびマウスを用いて検討した。

モルモット試験では、argipidine の 2, 10 または 50 mg/kg をフロイントアジュバントとともに 2 週おきに 3 回足蹠または皮内に投与して感作した。これらのモルモットに argipidine の 10mg/kg を静脈内に投与したが、いずれの群においても全身アナフィラキシー反応は出現しなかった。また採取した血清について同種 PCA 反応、受身血球凝集反応およびゲル内沈降反応を行ったが、argipidine に対する抗体は検出さ

れなかった。つぎに argipidine・卵白アルブミン結合物を用いて argipidine に対する抗体を誘導したモルモットに argipidine を静脈内投与したが、全身アナフィラキシー反応は出現しなかった。また採取した血清で受身感作したモルモットに argipidine を投与した場合にも PCA 反応は認められなかった。

マウス試験では、argipidine の 2, 10 または 50 mg/kg を水酸化アルミニウム・ゲルとともに 3 週おきに 2 回腹腔内に投与して感作した。これらのマウス血清について、argipidine に対する IgE 抗体をラットを用いた PCA 反応により測定したが、いずれの群においても抗体は検出されなかった。つぎに argipidine・卵白アルブミン結合物を用いて IgE 抗体を誘導し、採取した血清で受身感作したラットに、argipidine の 10 mg/kg を静脈内に投与したが、PCA 反応は全く出現しなかった。

以上の成績から、argipidine はモルモットおよびマウスにおいて抗原性を示さない薬物であると考えられた。

文 献

- 1) 原 啓人, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 強力な合成トロンビン阻害物質 MIC-9038 (No. 805) の実験的 DIC に対する効果, 第 3 回日本止血学会, 東京 (1980)
- 2) Hijikata A., Okamoto S., Mori E., Kinjo K., Kikumoto R., Tonomura S., Tamao Y. & Hara H.: *In vivo* and *in vitro* studies of a new series of synthetic thrombin inhibitors, *Thromb. Res.* 8(Suppl. 2): 83~89 (1976)
- 3) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MIC-9038 の作用, 血液と脈管 13: 72~77 (1982)
- 4) Koizumi K., Suzuki S., Fukuba S., Tado-koro K., Hirai K. & Muranaka M.: Antigenicity of semisynthetic penicillin preparation to evoke systemic anaphylactic reaction in animal models, *Allergy* 35: 657~664 (1980)
- 5) Ovary Z.: Passive cutaneous anaphylaxis, in

Immunological Method, Blackwell Scientific
Pub., Oxford/GBR (1964), pp. 259~283

- 6) 浜岡利之: マウスのレアギン抗体産生を誘発する免疫法とその検出法, 免疫実験操作法 B (1978), pp. 1009~1017

- 7) Mota I. & Wong D.: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization, *Life Science* 8: 813~820 (1969)

* * *

新抗トロンビン薬 Argipidine (MD-805) の 変異原性に関する検討

〈第1報〉 哺乳動物培養細胞を用いる
染色体異常試験

第一製薬株式会社 中央研究所

島田 弘 康 清水 千 春 佐藤 利 之
恵比根 豊 山田 明 甫

Mutagenicity Studies of Argipidine (MD-805), a New Thrombin Inhibitor (I)

—*In vitro* Cytogenetic Study Using Mammalian Cells—

Hiroyasu Shimada, Chiharu Shimizu, Toshiyuki Sato,
Yutaka Ebine and Akimoto Yamada

Research Institute of Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

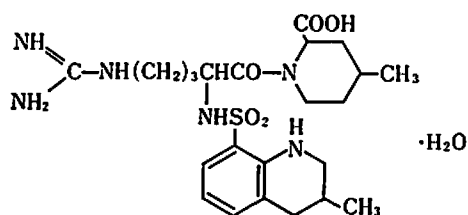
The mutagenic potential of argipidine (MD-805), a new thrombin inhibitor, was studied by the chromosomal aberration test using Chinese hamster cells in culture. The test concentrations evaluated were 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 and 2500 $\mu\text{g/ml}$ of culture medium. No clastogenicity was observed at any concentration of argipidine either in the presence or in the absence of metabolic activation system using rat liver homogenate. No cytotoxicity was observed at the highest concentration, though the drug was crystallized in the medium at concentration above 1000 $\mu\text{g/ml}$. These results suggest that argipidine has no clastogenicity on Chinese hamster cells under the condition of this experiment.

KEY WORDS

Cytogenetic study, Chinese hamster cells, Mutagenicity,
Thrombin inhibitor, Argipidine, MD-805

緒 言

Argipidine (MD-805) は、第一製薬㈱と三菱化成工業㈱が共同で開発した新タイプの抗тромビン薬で、静脈および動脈血栓症ならびに播種性血管内凝固症候群 (DIC) に対して優れた治療効果が期待されている。われわれは argipidine の変異原性を検討する目的で、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。



(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[[*N*²-((*R**S*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-piperidinecarboxylic acid hydrate

Fig. 1 Chemical structure of argipidine

I 実験材料および方法

1 被験物質

本実験に用いた argipidine (Lot No. P-ATB-52406 S) は、Fig. 1 に示す化学構造をもつ白色の粉末物質で、水に極めて溶けにくい。argipidine は dimethylsulfoxide (DMSO, Cica-Merck) に溶解したのち、ろ過滅菌して実験に

Table 1 S 15 Mix の組成

成 分	S 15 Mix 1 ml 中の量 (ml)
S 15	0.3
20 mM HEPES buffer (pH 7.2)	0.2
50 mM MgCl ₂	0.1
330 mM KCl	0.1
50 mM G-6-P ¹⁾	0.1
40 mM NADP ²⁾	0.1
D.W.	0.1

¹⁾ Glucose-6-phosphate (Sigma) ²⁾ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Sigma)

Table 2 Induction of Chromosomal aberrations on the Chinese hamster cells treated with argipidine

Compounds	Concentrations (μg/ml)	No. of cells examined	Structural					
			Gap ¹⁾		Break ¹⁾		Exchange ¹⁾	
			Chromatid	Chromosome	Chromatid	Chromosome	Chromatid	Chromosome
Control (DMSO)		200	0.5	0	0.5	0	0	0
Untreated		200	0	0	0	0	0	0
Argipidine	10	200	0.5	0	0	0	0.5	0
	25	200	1	0	0	0	0	0.5
	50	200	2	0	1	0	0	0
	100	200	0.5	0	0.5	0	0	0
	250	200	0.5	0	0	0	0	0
	500	200	2.5	0	0	0	0	0.5
	1000	200	3	0	0.5	0	0	0
	2500	200	3.5	0	0	0	0	0.5
MMC	0.05	200	30.5	1	34	6.5	2.5	1

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

¹⁾ Chromosomal aberrations per cell ($\times 100$)

²⁾ No. of cells with structural aberrations including gaps

³⁾ No. of cells with structural aberrations excluding gaps

使用した。

2 対照物質

陰性対照としては被験物質を溶解する媒体 (DMSO) を用い、さらに無処理対照を設けた。陽性対照としては、代謝活性化処理をしない場合には mitomycin C (MMC, 協和酸酵) を、代謝活性化処理をする場合には 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA, 和光純薬) を用いた。なお、MMC は局方生理食塩液 (扶桑薬品) に、DMBA は DMSO にそれぞれ溶解したのち、ろ過滅菌して実験に使用した。

3 処理濃度

Argipidine の試験用量は、あらかじめ実施した用量設定のための予備試験により決定した。すなわち、argipidine の 10, 30, 100, 300 および 1000 $\mu\text{g/ml}$ で本試験と同一方法による予備試験を実施したところ、1000 $\mu\text{g/ml}$ では培地中に薬物の析出が認められたが細胞毒性作用は認められなかった。そこで 1000, 2500, 5000 および 10000 $\mu\text{g/ml}$ の用量で追加検討を行ったところ、2500 $\mu\text{g/ml}$ 以上の処理濃度では析出

物は団塊状を呈し、培養終了時まで拡散しなかった。また 10000 $\mu\text{g/ml}$ においても細胞毒性作用は全く認められなかった。以上の予備試験の成績より、2500 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度処理は本実験系においては適切ではないと判断し、本試験における最高用量を 2500 $\mu\text{g/ml}$ とした。また、臨床試験における血中濃度などを勘案して最小用量を 10 $\mu\text{g/ml}$ とし、これらの用量を含み公比 2~2.5 で 8 段階の試験用量を設定した。

陽性対照として用いた MMC および DMBA の処理濃度は、予備試験の成績および文献より染色体異常を十分に誘発する用量として、それぞれ 0.05 および 5 $\mu\text{g/ml}$ を設定した。

4 使用細胞

使用した細胞はチャイニーズ・ハムスター胎仔肺組織由来の線維芽細胞 (D-6 細胞, $2n=22$)¹⁾ で、培地は 15% ウシ胎仔血清 (GIBCO) を含む Eagle's MEM (日本製薬) を用いた。培養には直径 60 mm のプラスチックシャーレ (Lux) を用い、37°C で 5% 炭酸ガス培養を行った。

for 24 hr

aberrations					Poly. (%)	Mutagenicity
Frag. ¹⁾	Multiple ¹⁾	Pulve. ¹⁾	TAG(%) ²⁾	TA(%) ³⁾		
0	0	0	2(1.0)	1(0.5)	0	
0	0	0	0	0	0	
0	0	0	2(1.0)	1(0.5)	0	—
0	0	0	2(1.0)	1(0.5)	0.5	—
0	0	0	3(1.5)	1(0.5)	0	—
0	0	0	2(1.0)	1(0.5)	0	—
0	0	0	1(0.5)	0	0	—
0	0	0	6(3.0)	1(0.5)	0	—
0	0	0	6(3.0)	1(0.5)	0	—
0	0	0	6(3.0)	1(0.5)	0	—
3.5	18	2.5	107(53.5)*	85(42.5)*	0	+

Frag.: Fragment Multiple: Multiple aberrations
Pulve.: Pulverization Poly.: Polyploid

Table 3 Induction of chromosomal aberrations on the Chinese hamster cells treated with argipidine

Compounds	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	No. of cells examined	Structural					
			Gap ¹⁾		Break ¹⁾		Exchange ¹⁾	
			Chromatid	Chromosome	Chromatid	Chromosome	Chromatid	Chromosome
Control (DMSO)		200	0	0	0	0	0	0.5
Untreated		200	2	0	0	0	0	0
Argipidine	10	200	1	0	0	0	0	0.5
	25	200	1	0.5	0	0	0	0.5
	50	200	1	0	0	0	0	0.5
	100	200	0.5	0.5	0	0	0	0
	250	200	1	0	0	0	0	0
	500	200	0	0	0.5	0	0	0.5
	1000	200	2	0	0.5	0	0	0.5
	2500	200	1	0	0	0	0	0
MMC	0.05	200	10	0.5	14	5	2.5	0.5

* Significant difference from control ($p < 0.05$)¹⁾ Chromosomal aberrations per cell ($\times 100$) ²⁾ No. of cells with structural aberrations including gaps³⁾ No. of cells with structural aberrations excluding gaps

5 代謝活性化法

ポリ塩化ビフェニール (PCB; カネクロール KC-500, ガスクロ工業) 500 mg/kg を腹腔内投与することにより薬物代謝酵素の誘導を行った Sprague-Dawley 系雄性ラットの肝臓より得た S 15 (肝ホモジネート 15000 g 上清分画) を用いた。なお, S 15 は調製後ただちに -80°C で凍結保存したものを, 使用直前に解凍して用いた。

また, S 15 Mix は, Natarajan ら²⁾ の方法に従い Table 1 の組成になるように使用直前に調製した。

6 実験方法

代謝活性化処理をしない場合 (直接法) には, 培地中に被験薬溶液を直接添加して24あるいは48時間の処理を行った。また代謝活性化処理をする場合には, 5%血清を含む培地で5倍に希釈した S 15 Mix と被験薬溶液を同時に加え, 6時間の処理を行ったのち正常培地に戻し, さらに18時間培養した。いずれの場合にも培養終了1.5時間前にコルセミド ($0.05 \mu\text{g/ml}$,

GIBCO) を加えたのち, 常法に従って染色体標本を作製し, ギムザ染色を施した。なお, 各処理濃度におけるプレート数は2枚とした。

7 観察 (染色体分析)

染色体標本スライドはコード化し, 盲検法により観察した。1処理につき100個の分裂中期像について観察し, 染色体異常の型および頻度を記録した。また, 染色体異常を有するすべての細胞について, その位置を記録し写真を撮影した。

8 染色体異常の判定基準

構造異常としては, ギャップ (染色分体型および染色体型), 切断 (染色分体型および染色体型), 交換 (染色分体型および染色体型), 断片, 多異常 (1つの中期像に異常が10以上あって異常頻度が数えにくいもの) ならびに非特定型異常 (細粉化, 粘着性など) に分類して記録した。また, 数的異常としては倍数性のみを記録した。

9 結果の表示と統計処理

染色体異常の出現頻度は, 染色体異常を有す

for 48 hr

aberrations					Poly. (%)	Mutagenicity
Frag. ¹⁾	Multiple ¹⁾	Pulve. ¹⁾	TAG(%) ²⁾	TA(%) ³⁾		
0	0	0	1(0.5)	1(0.5)	0	
0	0	0	4(2.0)	0	0	
0	0	0	2(1.0)	1(0.5)	0	—
0	0	0	4(2.0)	1(0.5)	0	—
0	0	0	3(1.5)	1(0.5)	0	—
0	0	0	2(1.0)	0	0	—
0	0	0	2(1.0)	0	0	—
0	0	0	2(1.0)	2(1.0)	0	—
0	0	0	5(2.5)	2(1.0)	0	—
0	0	0	2(1.0)	0	0	—
2.5	70	15	192(96.0)*	189(94.5)*	0	+

Frag.: Fragment Multiple: Multiple aberrations
Pulve.: Pulverization Poly.: Polyploid

る細胞の出現頻度または細胞あたりの染色体異常頻度で表示した。なお、構造異常の出現頻度としては、ギャップを含める場合と含めない場合とを区別して表示した。また、染色体異常を有する細胞の出現頻度については χ^2 検定により有意差検定を行った。

II 実験成績

代謝活性化をしない場合の成績を Table 2 (24時間処理) および Table 3 (48時間処理) に、代謝活性化をした場合の成績を Table 4 に示した。

Argipidine の 10~2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で試験した結果、代謝活性化処理の有無にかかわらず、染色体の構造異常出現率は、ギャップを含む場合で 0.5~3.0%、ギャップを含まない場合で 0~2.5% と極めて低率であり、溶媒対照群 (ギャップを含む場合 および 含まない場合ともに 0.5~1.5%) との間に推計学的な有意差は認められなかった。また、倍数体については、代謝活性化をした場合に 陰性対照群を含め 0.5~

5.0% 程度の出現率で観察されたが、argipidine 処理による 倍数体誘発作用は認められなかった。なお、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の処理濃度では、薬物処理時に培地中に薬物の析出が認められ、薬物処理終了時点においても溶解も拡散もしていなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC および DMBA 処理群では、それぞれ高率の染色体異常が誘発され、対照群との間に推計学的な有意差が認められた。

III 考 察

Argipidine の変異原性についてチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験により検討した。argipidine の 10~2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で試験した結果、代謝活性化処理の有無にかかわらず染色体異常誘発作用は認められなかった。なお、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の用量では培地中に結晶の析出が認められたが、細胞毒性作用は認められなかった。

本試験系においては、一般に 10 mM 以上の

Table 4 Induction of chromosomal aberrations on the Chinese hamster cells treated with argipidine

Compounds	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	No. of cells examined	Structural					
			Gap ¹⁾		Break ¹⁾		Exchange ¹⁾	
			Chromatid	Chromosome	Chromatid	Chromosome	Chromatid	Chromosome
Control (DMSO)		200	1.5	0	0.5	0	0	0
Untreated		200	2	0	0	0	0	0
Argipidine	10	200	3.5	0	3.5	0	0	0
	25	200	1	0	0	0	0.5	0
	50	200	0.5	0	0	0	0	0
	100	200	0.5	0	4	0	0.5	0
	250	200	1	0	1	0	0	0
	500	200	1	0	1	0	0	0
	1000	200	4.5	0	3.5	0	1	0
	2500	200	3	0	2	1	0	0
DMBA	5	200	33.5	0	19	0.5	5	0.5

* Significant difference from control ($p < 0.05$)¹⁾ Chromosomal aberrations per cell ($\times 100$)²⁾ No. of cells with structural aberrations including gaps³⁾ No. of cells with structural aberrations excluding gaps

高用量では培地の浸透圧が上昇し、それに伴ってギャップを主体とした染色体異常が増加することが報告されている³⁾。このため、細胞毒性の低い薬物では 10 mM 程度が処理濃度の限界として適切であるとされている⁴⁾。本試験においては、argipidine の 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1.9 mM) 以上の用量で薬物の析出が認められ、培養終了まで溶解しなかったこと、また用量設定のための予備試験において 10000 $\mu\text{g/ml}$ (19 mM) の用量においても細胞毒性作用がみられなかったことなどから判断して、1000 $\mu\text{g/ml}$ 以上の用量は、染色体異常試験としてその意義が薄いと考えられる。

染色体異常としてのギャップ (achromatic lesion) の生成機構に関しては不明の点が多いが^{5,6)}、現象面から見る限り変異原物質の用量に依存して増加する場合が多い⁷⁾。

今回の実験においては、argipidine 処理により、ギャップを含まない場合はもちろんのこと、含んだ場合においても染色体の構造異常の出現率は極めて低率であり、argipidine には染

色体の構造異常誘発作用はないものと推察された。一方、代謝活性化処理群において、陰性対照群を含め倍数体の微増が認められた。コルヒチンなどの紡錘体阻害剤や一部の蛋白質などが核内倍加 (endoreduplication) を惹起し、倍数体を形成することが報告されており⁸⁾、今回の実験においても、観察された倍数体のうち核内倍加は85%を占めることから、S15 蛋白が倍数体形成に特異的に関与している可能性も考えられる。なお、本試験において argipidine は、S15 Mix 処理の有無にかかわらず、倍数体の誘発作用を全く示さなかった。

以上のことより、argipidine は染色体異常誘発作用をもたないことが推察された。

要 約

抗トロンビン薬 argipidine の変異原性について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験により検討した。argipidine の 10~2500 $\mu\text{g/ml}$ の用量で試験した結果、代謝活性化処理の有無にかかわらず、染色体異常

for 6 hr in the presence of metabolic activation

aberrations					Poly. (%)	Mutagenicity
Frag. ¹⁾	Multiple ¹⁾	Pulve. ¹⁾	TAG(%) ²⁾	TA(%) ³⁾		
0	0	0	3(1.5)	1(0.5)	4	
0	0	0	4(2.0)	0	5	
0	0	0	5(2.5)	4(2.0)	1.5	—
0	0.5	0	4(2.0)	2(1.0)	0.5	—
0	1	0	3(1.5)	2(1.0)	2.5	—
1	0.5	0	5(2.5)	4(2.0)	0.5	—
0	0	0	4(2.0)	2(1.0)	1	—
0	0	0	4(2.0)	2(1.0)	1.5	—
2	0	0	6(3.0)	5(2.5)	1.5	—
0	0	0	3(1.5)	2(1.0)	0.5	—
3	1.5	0	62(31.0)*	39(19.5)*	0	+

Frag.: Fragment Multiple: Multiple aberrations

Pulve.: Pulverization Poly.: Polyploid

誘発作用は認められなかった。なお、1000 µg/ml 以上の処理濃度では培地中に薬物の析出が認められたが細胞毒性作用は認められなかった。

以上の成績より、argipidine はチャイニーズ・ハムスター培養細胞に対して染色体異常誘発作用をもたないことが示唆された。

文 献

- 1) Kato H. & Yoshida T.H.: *Chromosoma* (Berl.) 36: 272 (1972)
- 2) Natarajan A.T., Tales A.D., Van Buul P.P.W., Meijers M. & De Vogel N.: *Mutat. Res.* 37: 83 (1976)
- 3) 石館 基: 日本香粧品科学会誌 6: 31 (1982)
- 4) 厚生省: GLP 基準および毒性試験法ガイドライン解説, 薬事日報社 (1984)
- 5) Bender M.A., Griggs H.G. & Bedford J.S.: *Mutat. Res.* 23: 197 (1974)
- 6) Brøgger A.: *Hereditas* 80: 131 (1975)
- 7) Kato H. & Shimada H.: *Mutat. Res.* 28: 459 (1975)
- 8) Sutou S.: *Cancer Genetics and Cytogenetics* 3: 317 (1981)

新抗トロンビン薬 Argipidine (MD-805) の 変異原性に関する検討

〈第2報〉 細菌を用いる復帰変異試験

第一製薬株式会社 中央研究所

恵比根 豊 島 田 弘 康 佐 藤 利 之
清 水 千 春 山 田 明 甫

Mutagenicity Studies of Argipidine (MD-805), a New Thrombin Inhibitor (II)

—Reversion Test with Bacteria—

Yutaka Ebine, Hiroyasu Shimada, Toshiyuki Sato,
Chiharu Shimizu, Akimoto Yamada

Research Institute of Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

ABSTRACT

Mutagenicity test of argipidine (MD-805), a new thrombin inhibitor, was performed by the reversion test with bacteria. The results for argipidine was negative in *Salmonella typhimurium* (TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 and TA 100) and *Escherichia coli* (WP2 uvrA) both with and without metabolic activation system using rat liver homogenate (S9). These results suggest that argipidine is not mutagenic under the present experimental condition used.

KEY WORDS

Ames test, Reversion test, Mutagenicity,
Thrombin inhibitor, Argipidine, MD-805

緒 言

Argipidine (MD-805) は、第一製薬㈱と三菱化成工業㈱で共同開発した新タイプの抗トロンビン薬で、静脈および動脈血栓症ならびに播種性血管内凝固症候群 (DIC) に対して優れた治療効果が期待されている。われわれは、argipidine の変異原性を検討する目的で、*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰変異試験を実施したので報告する。

I 実験材料および方法

1 被験物質

本実験に用いた argipidine (Lot No. P-ATB-52406 S) は Fig. 1 に示す化学構造をした白色粉末物質で、水に極めて溶けにくい。

2 処理濃度の設定

Argipidine の処理濃度は、あらかじめ実施した処理濃度設定のための予備試験 (1, 10, 100 および 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) において、すべての濃度で使用菌株に対する抗菌作用が認められなかったことから、本試験では、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高濃度として7段階の処理濃度を設定した。

3 対照物質

陰性対照としては dimethylsulfoxide (DMSO, Cica-Merck) を、陽性対照としては下記の化合物を用いた。

9-Aminoacridine (9 AA, Sigma)

2-Aminoanthracene (2 AA, 和光純薬)

Benzo(a)pyrene (B(a)P, 和光純薬)

N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG, Aldrich)

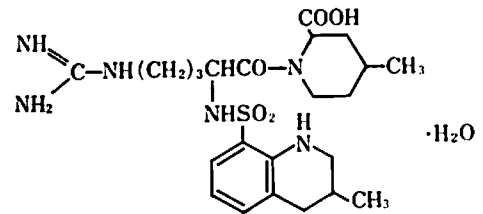
2-Nitrofluorene (2 NF, Aldrich)

4 被験物質および対照物質の調製

Argipidine, 9 AA, 2 AA, B(a)P および 2 NF は DMSO に溶解して実験に使用した。また、ENNG は蒸留水に溶解して用いた。

5 培 地

以下の培地を目的に応じて使用した。また、組成については毒性試験法ガイドライン (厚生省)¹⁾ に準拠した。



(2R, 4R)-4-methyl-1-[(N²-((RS)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-L-arginyl)-piperidine]carboxylic acid hydrate

Fig. 1 Chemical structure of argipidine

Table 1 S 9 Mix の組成 (1 ml 中)

S 9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μ mol
KCl	33 μ mol
G-6-P ¹⁾	5 μ mol
NADH ²⁾	4 μ mol
NADPH ³⁾	4 μ mol
Phosphate buffer (pH 7.4)	100 μ mol

¹⁾ G-6-P : Glucose phosphate (オリエンタル酵母)

²⁾ NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (オリエンタル酵母) ³⁾ NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (オリエンタル酵母)

Nutrient broth (Oxoid) … 菌株の培養および細菌数の調製

最少寒天平板培地 …… 反応菌株の培養用 (重層寒天平板培地の基礎培地)

軟寒天 …… 反応菌株の培養用 (重層寒天平板培地の菌懸濁用上層培地)

6 使用菌株

Salmonella typhimurium TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 および TA 100 ならびに *Escherichia coli* WP 2 uvrA の6菌株を用いた。

7 使用菌株の調製

凍結保存 (−80°C) してある菌株を試験前日に nutrient broth へ接種し、37°C で16時間培養した後、2 × 10⁹ cells/ml の細菌数に調製した。

Table 2 Induction of mutations by argipidine in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (Exp. 1)

Compounds	Conc. ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9Mix	Revertants per plate ¹⁾						Muta- genicity
			<i>S. typhimurium</i>					<i>E. coli</i>	
			TA 1535	TA 1537	TA 1538	TA 98	TA 100	WP2 uvrA	
Control		—	14	6	18	13	141	37	(—)
Argipidine	5	—	16	8	17	11	132	37	(—)
	10	—	15	8	16	20	140	36	(—)
	50	—	14	5	20	11	142	44	(—)
	100	—	19	6	13	12	121	41	(—)
	500	—	18	8	14	18	132	35	(—)
	1000	—	15	8	18	14	146	35	(—)
	5000	—	13	7	17	13	81	38	(—)
2 NF	1 or 2 ²⁾	—	NT	NT	459	213	NT	NT	(+)
ENNG	2, 3 or 5 ³⁾	—	298	NT	NT	NT	454	415	(+)
9 AA	80	—	NT	945	NT	NT	NT	NT	(+)
Control		+	17	10	25	30	140	40	(—)
Argipidine	5	+	16	9	31	27	135	37	(—)
	10	+	15	9	23	24	151	38	(—)
	50	+	14	9	24	26	146	36	(—)
	100	+	16	11	23	28	144	38	(—)
	500	+	19	9	24	21	132	38	(—)
	1000	+	15	12	28	31	150	31	(—)
	5000	+	13	13	29	26	91	38	(—)
2 AA	0.5, 2 or 80 ⁴⁾	+	244	221	270	NT	NT	1060	(+)
B(a)P	5	+	NT	NT	NT	818	1113	NT	(+)

NT: Not tested 2 NF: 2-Nitrofluorene ENNG: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 9 AA: 9-Aminoacridine 2 AA: 2-Aminoanthracene B(a)P: Benzo(a)pyrene

¹⁾ Mean of 3 plates ²⁾ TA 1538: 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 98: 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ³⁾ TA 1535: 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 100: 3 $\mu\text{g}/\text{plate}$; WP2 uvrA: 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ⁴⁾ TA 1535 and TA 1537: 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 1538: 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2 uvrA: 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

8 S9 Mixの調製

代謝活性化には、Table 1 に示した調製液 (S9 Mix) を用いた。なお、S9 は、Sprague-Dawley 系雄性ラットにポリ塩化ビフェニール (PCB, ガスクロ工業) 500 mg/kg を腹腔内投与

したのち、Ames らの方法²⁾ により調製した肝ミクロソーム分画を、使用直前まで -80°C に保存したものを用いた。

9 実験方法

使用菌懸濁液 0.1 ml, 被験物質溶液 0.1 ml,

Table 3 Induction of mutations by argipidine in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (Exp. 2)

Compounds	Conc. ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9Mix	Revertants per plate ¹⁾						Muta- genicity
			<i>S. typhimurium</i>					<i>E. coli</i>	
			TA 1535	TA 1537	TA 1538	TA 98	TA 100	WP2 uvrA	
Control		—	15	6	18	8	169	44	(—)
Argipidine	10	—	19	9	11	14	168	45	(—)
	50	—	17	10	23	15	152	45	(—)
	100	—	14	6	13	14	154	41	(—)
	500	—	15	6	11	12	152	46	(—)
	1000	—	18	8	19	12	154	42	(—)
	5000	—	10	5	16	11	114	43	(—)
2 NF	1 or 2 ²⁾	—	NT	NT	512	230	NT	NT	(+)
ENNG	2, 3 or 5 ³⁾	—	306	NT	NT	NT	391	438	(+)
9 AA	80	—	NT	1092	NT	NT	NT	NT	(+)
Control		+	13	12	25	27	184	44	(—)
Argipidine	10	+	18	16	24	19	176	44	(—)
	50	+	12	12	25	30	164	42	(—)
	100	+	13	9	29	24	157	45	(—)
	500	+	14	16	25	31	169	45	(—)
	1000	+	14	14	27	27	169	46	(—)
	5000	+	12	8	28	25	127	43	(—)
2 AA	0.5, 2 or 80 ⁴⁾	+	148	204	277	NT	NT	1129	(+)
B(a)P	5	+	NT	NT	NT	858	912	NT	(+)

NT : Not tested 2 NF : 2-Nitrofluorene ENNG : N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 9 AA : 9-Aminoacridine 2 AA : 2-Aminoanthracene B(a)P : Benzo(a)pyrene

¹⁾ Mean of 3 plates ²⁾ TA 1538: 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 98: 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ³⁾ TA 1535: 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 100: 3 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP 2 uvrA: 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ⁴⁾ TA 1535 and TA 1537: 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 1538: 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP 2 uvrA : 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

および S9 Mix (代謝活性化を要さない場合は 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)) 0.5 ml を試験管内で混和し、37°C で 20 分間の preincubation 後に 2 ml の軟寒天を加え、ただちに最少寒天平板培地に重層した。室温で冷却固化させた平板は 37°C で 48 時間培養し、生じた変異体コロニーを計数した。また、同時に background

lawn の状態も観察した。なお、本試験の再現性を確認するために、6 段階の用量で再度試験を実施した。

II 実験成績

1 回目の成績を Table 2 に示した。argipidine の 5~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ では S9 Mix による代謝

活性化の有無にかかわらず変異体コロニーは陰性対照の1.6倍以内であり用量-反応関係も認められなかった。一方、陽性対照として用いた 9AA, 2AA, B(a)P, ENNG および 2NF では変異体コロニーの顕著な増加(陰性対照の 3.2~157.5倍)が認められた。また、2回目の成績 (Table 3) により本試験の再現性が確認された。

III 結 論

抗トロンビン薬 argipidine の変異原性について、細菌を用いた復帰変異試験を実施したところ argipidine は代謝活性化の有無にかかわらず突然変異誘発性を示さなかった。

以上の結果より argipidine は本試験条件下では変異原性を有さないものと結論された。

要 約

Argipidine (MD-805) の変異原性について *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98および TA 100ならびに *E. coli* WP 2 uvrA の6菌株を用いた復帰変異試験により検討した。その結果, argipidine は代謝活性化の有無にかかわらず, すべての菌株に対して変異原性を示さなかった。

文 献

- 1) 厚生省薬務局審査課監修: GLP 基準および遺伝性試験法ガイドライン解説, 薬事日報社 (1984)
- 2) Ames B., McCann J. & Yamasaki E.: *Mutat. Res.* 31: 347 (1975)

* * *

イヌにおける Argipidine (MD-805) の 体内動態に関する研究

—Argipidine 連続静脈内注入時の血中濃度推移
および抗血液凝固作用—

三菱化成工業株式会社 総合研究所

飯 田 成 宇 中 井 弘 司 平 田 倫 子
香 月 正 行 玉 尾 嘉 邦

Pharmacokinetic Studies of Argipidine (MD-805) in Dogs

—Plasma Level Profile and Inhibitory Effect of Blood Coagulation
During and After Continuous Infusion of Argipidine—

Seiu Iida, Hiroshi Nakai, Tomoko Hirata,
Masayuki Katsuki and Yoshikuni Tamao
Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

The plasma level profile of unchanged argipidine and the inhibitory effect of blood coagulation (prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT)) were examined in male dogs during or after continuous infusion of argipidine from the cephalic vein for 5 hr at the rate of 0.02, 0.2 and 0.5 mg/kg/hr.

The concentration of unchanged argipidine in the plasma reached rapidly a maximum level after the start of infusion of argipidine and then remained almost constant till the end of infusion, after which the level decreased rapidly with the half-lives of 2.8~7.4 min and 25~43 min until 3 hr after the end of infusion. During the continuous infusion of argipidine, maximum levels of unchanged argipidine in

the plasma were closely correlated with doses at range of 0.02~0.5 mg/kg/hr.

On the other hand, during the continuous infusion of argipidine, the prolonged times of PT and APTT remained almost constant till the end of infusion, which were closely correlated with doses at range of 0.02~0.5 mg/kg/hr.

KEY WORDS

Argipidine, Plasma concentration,
Inhibitory effect of blood coagulation (Dog)

緒 言

Argipidine[(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate] はトロンビンによるフィブリン形成作用を極めて低濃度で阻害し¹⁾, 動物実験においても静脈系血栓症や播種性血管内凝固症候群モデル²⁾ および血小板凝集に起因すると考えられる動脈系血栓症モデル³⁾ に対して有効性を示す薬物であり, 臨床試験において脳血栓症急性期や末梢動脈血栓症などへの有効性が示されている化合物である。

Argipidine は連続静脈内注入での臨床応用が考えられている。薬物の血中濃度は薬効, 安全性を支配する重要な因子の一つであり, 臨床応用時の投与方法での血中薬物動態を調べることは重要である。そこで今回, argipidine を連続静脈内注入したときの argipidine の血中動態と薬効発現の関係を明らかにする目的で, イヌに argipidine を定速静脈内連続注入したときの血中 argipidine 濃度推移および argipidine の主薬理作用である抗トロンビン作用の指標であるプロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定し, 若干の知見が得られたので報告する。

I 実験方法

1 実験動物

実験動物として雄性ビーグル犬 (体重: 10.0~11.0 kg, 19ヵ月齢, Hazleton Research Ani-

mals Inc.) 3匹を使用した。イヌは恒温恒湿環境下 (温度: 23±2°C, 湿度: 55±10%) で予備飼育および実験を行った。またイヌは, 薬物投与前 18 hr から実験終了まで絶食し, 実験期間中は絶水とした。

2 投与薬液

投与薬液は, argipidine 注射剤 (0.5 mg/ml, Lot No. 3907, 三菱化成工業製造) を用い, 適宜生理食塩水で希釈 (0.02 mg/ml, 0.2 mg/ml) して使用した。

3 薬物の投与

イヌは無麻酔下に前腕頭静脈に留置針 (18G × 2 $\frac{1}{2}$ " , テルモ) を挿入固定し, この留置針にポリエチレンチューブ (トップエクステンションチューブ XI-150) を装着し, シリンジポンプ (テルフュージョンシリンジポンプ STC-521型, テルモ) に連結した。

Argipidine 投与薬液 0.02, 0.2 および 0.5 mg/ml を 1 ml/kg/hr の速度で 5 hr 定速静脈内連続注入した (0.1, 1 および 2.5 mg/kg/5hr)。

4 血液の採取

注入直前と開始後 0.5, 1, 2, 3, 4 および 5 hr に, 投与と反対側の前腕頭静脈より血液を 3.6 ml 採取した。さらに 0.2 mg/ml および 0.5 mg/ml の薬液を投与した場合は, 連続静脈内注入終了後 2, 5, 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 3 および 4 hr にも血液を 2.7 ml 採取した。採取した血液は, 血液に対し 3.8% クエン酸ナトリウム水溶液を 9:1 の割合で加え (3.6 ml に対し 0.4 ml, 2.7 ml に対し 0.3 ml), 3000 rpm で 15 min 遠心分離し血漿を得た。この

血漿を用い、未変化 argipidine 濃度、PT および APTT の測定を行った。

5 未変化 argipidine 濃度の測定

血漿 0.5 ml に精製水 0.5 ml およびエタノール 1.5 ml を加え、5 min 攪拌した。3000 rpm で 5 min 遠心分離した後上清を分取し、残渣には50%エタノール水 0.5 ml を加え再度攪拌、遠心分離を行った。上清を合わせ、クロロホルム 10 ml を加え10 min 振とうし、3000 rpm で10 min 遠心分離した。クロロホルム層を分取し、器壁はさらにエタノール-クロロホルム (1:4, v/v) 2 ml で2回洗浄後、洗液はクロロホルム層に合わせ減圧下、40°C で溶媒を留去した。残渣には50%メタノール水0.1 ml を加え、3000 rpm で5 min 遠心分離の後、その上清の一部 (50 μ l) を下記条件の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入した。argipidine に相当するピークの高さを求め、argipidine の標準溶液 (1~100 μ l/ml, メタノール) を添加した血漿と argipidine の外部標準溶液 (2 μ g/ml, 50%メタノール水) のピーク高さ比から作成した検量線により、未変化 argipidine 濃度の測定を行った。

HPLC は次の条件で行った。装置としては、ポンプに M-45型 (Waters)、インジェクターに日立高圧サンプリングバルブ (株式会社日立製作所)、恒温槽に CTO-2A 型 (株式会社島津製作所)、検出器に蛍光検出器 650-10S 型 (株式会社日立製作所) を組み合わせて使用した。カラムには Zorbax C₈ (25 cm $\times$ 4.6 mm ϕ , Du Pont) を使用し、溶離液には65%メタノール水 (2.5 mM PIC B-7(Waters) 含有) を用い、溶離はカラム温度 50°C で流速 1 ml/minで行った。検出は1N NaOH 水溶液を流速 0.32 ml/min (ベリスタポンプ mp-gs 型, Ismatec) で添加するポストカラム法による蛍光検出法 (Ex 330 nm および Em 400 nm) で行った。

6 プロトロンビン時間 (PT) の測定

Thromboplastin C (American Dade, Puerto Rico) 0.2 ml および試料血漿 0.1 ml をそれぞれ 37°C で 1 min プレインキュベートし

た。両者を混合し、37°C で振とうしながらフィブリンが凝固するまでの時間 (PT) を測定した。それぞれのイヌの注入直前の血漿0.1 ml を用い同様に PT を求め、それを100%として試料血漿の PT を表した。

7 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の測定

Pathromtin (Behring Institute, German) 0.1 ml に試料血漿 0.1 ml を加え 37°C で 2 min プレインキュベートした。1/40 M CaCl₂ 水溶液 0.1 ml を加え、37°C で振とうしながらフィブリンが凝固するまでの時間 (APTT) を測定した。それぞれのイヌの注入直前の血漿 0.1 ml を用い同様に APTT を求め、それを 100% として試料血漿の APTT を表した。

II 実験結果

1 血漿中 argipidine 濃度推移

雄性イヌに argipidine 投与薬液 0.02, 0.2 および 0.5 mg/ml を 1 ml/kg/hr の速度で 5 hr 定速静脈内連続注入したときの、注入継続中および注入終了後の血漿中未変化 argipidine 濃度を測定し Fig. 1 に示した。いずれの投与群においても血漿中未変化 argipidine 濃度は注入開始後の最初の測定時間である 30 min あるいは 2 hr より注入終了まではほぼ一定値で推移し、その濃度は 0.02 mg/kg/hr 投与群では 29~34 ng/ml, 0.2 mg/kg/hr 投与群では 239~296 ng/ml および 0.5 mg/kg/hr 投与群では 734~789 ng/ml であった。各投与群の注入開始後 2 hr から注入終了までの各測定時間における血漿中未変化 argipidine 濃度の平均値は、Fig. 2 に示したように投与量とよく相関した ($r=0.999$)。一方、0.2 mg/kg/hr および 0.5 mg/kg/hr 投与群において注入終了後の血漿中未変化 argipidine 濃度を測定したところ、血漿中の未変化 argipidine 濃度は半減期 2.8~7.4 min および 25.5~46.7 min で速やかに低下し、注入終了後 2 hr または 3 hr の血漿中には未変化 argipidine は検出されなかった。

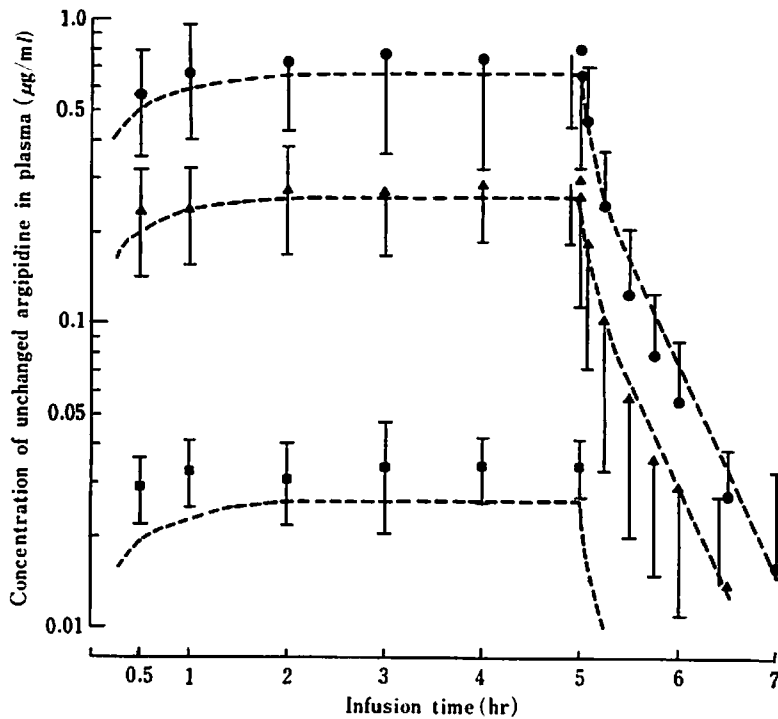


Fig. 1 Concentration of unchanged argipidine in plasma during or after constant rate intravenous infusion of argipidine to male dogs for 5 hours, at the rate of 0.02 (■), 0.2 (▲) and 0.5 (●) mg/kg/hr. Each point with the vertical line indicates the experimental mean value $\pm$ S.D. ($n=2\sim3$).

Each broken line indicates the calculated curve by the equation of two-compartment open model¹⁾ using the concentration of unchanged argipidine in plasma when singly administered intravenously to male dogs at the dose of 3 mg/kg¹⁾

2 抗血液凝固作用

Argipidine 投与薬液0.02, 0.2および0.5mg/ml を 1 ml/kg/hr の速度で 5 hr 定速静脈内連続注入したときの抗血液凝固作用を調べるため、注入継続中の血漿を随時的に採取して PT および APTT を測定し、注入開始直前の血漿の PT および APTT に対するパーセントで Fig. 3 に示した。各薬液投与群において、PT および APTT は注入開始後の最初の測定時間である 30 min から注入終了時までほぼ一定値で推移し、それぞれ注入直前の PT および APTT よりも 0.02 mg/kg/hr 投与群では 4～

14%および 4～10%, 0.2 mg/kg/hr 投与群ではそれぞれ16～26%および 7～19%, および 0.5 mg/kg/hr 投与群ではそれぞれ 44～59% および 28～38%延長した。各投与群の注入開始後 2 hr から注入終了までの各測定時間の PT および APTT 延長時間の平均値は、Fig. 2 に示したように血漿中未変化 argipidine 濃度と同様に投与量に相関した ($r=0.999$)。

III 考 察

雄性イヌに argipidine 投与薬液 0.02, 0.2 および 0.5 mg/ml を 1 ml/kg/hr の速度で定速

Fig. 2 Relation between doses and concentration of unchanged argipidine in plasma (■), prothrombin time (●) and activated partial thromboplastin time (▲) at stable states (2~5 hr) during constant rate intravenous infusion of argipidine to male dogs for 5 hours at the rate of 0.02, 0.2 and 0.5 mg/kg/hr.

Clotting time was represented as % of that before infusion of argipidine

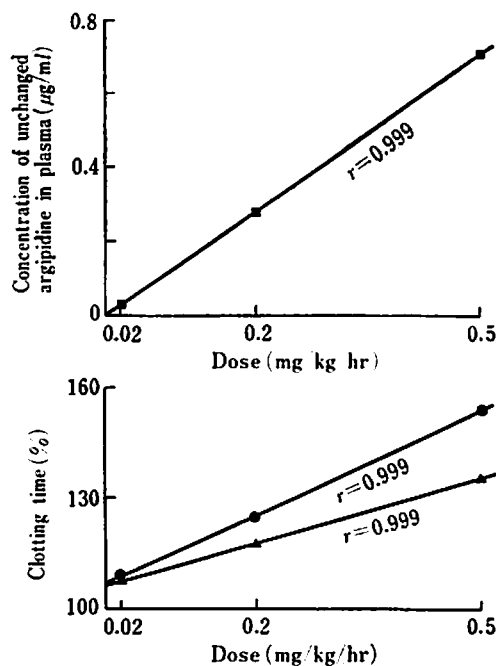
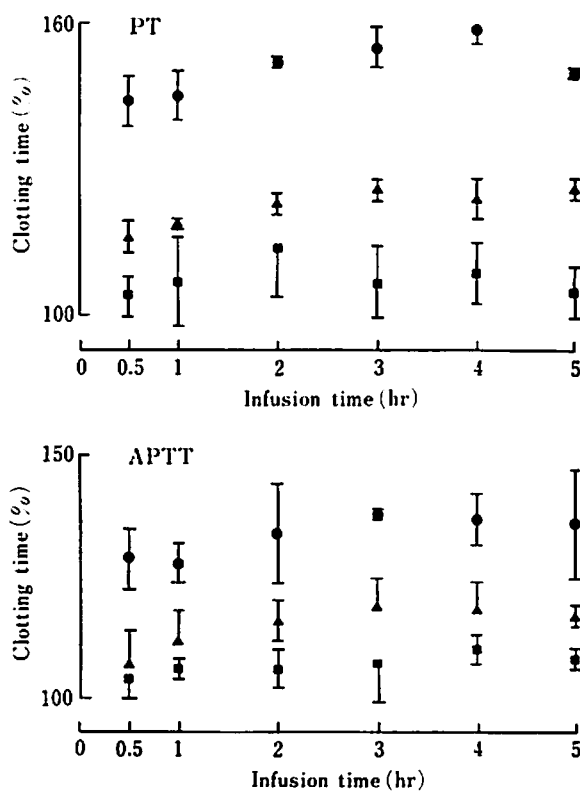


Fig. 3 Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) during constant rate intravenous infusion of argipidine to male dogs for 5 hours at the rate of 0.02 (■), 0.2 (▲) and 0.5 (●) mg/kg/hr.

Clotting time was represented as % of that before infusion of argipidine.

Each point with the vertical line indicates the mean value $\pm$ S.D. ($n=2\sim3$)



静脈内連続注入したとき、血漿中未変化 argipidine 濃度は注入開始後 2 hr までにいずれの投与群においても最高値に達し、それ以降注入終了時までほぼ一定濃度で推移した。これら定常状態に達したときの血漿中未変化 argipidine 濃度は投与量の増加に比例して上昇した。注入終了後血漿中未変化 argipidine は速やかな消失を示した。別報⁴⁾に示した argipidine 3 mg/kg を雄性イスに単回静脈内投与したときの血漿中未変化 argipidine 濃度推移を two compartment model にあてはめて求めた pharmacokinetic parameter を用いて、今回の argipidine 定速静脈内連続注入時の注入継続中および終了後の血漿中未変化 argipidine 濃度を計算⁵⁾すると、Fig. 1 に示すような simulation curve が得られた。今回の実験において得られた各投与群の定速静脈内連続注入継続中および終了後の血漿中未変化 argipidine 濃度推移はいずれもこの simulation curve と極めてよく一致した。これらのことは、argipidine を定速静脈内連続注入してもその体内動態は単回投与時のそれと変わらないことを示唆したものと考ええる。

一方、抗血液凝固作用の指標である PT および APTT の延長効果は、argipidine 定速静脈内連続注入開始後速やかに最高レベルに達し、注入終了までその効果は維持され、さらに定速静脈内注入した argipidine 濃度および血漿中 argipidine 濃度推移に相関した。これらのことは argipidine を定速静脈内注入したときの抗血液凝固作用は注入開始後速やかに定常状態に達し、その作用の強さは argipidine の血中濃度に比例することを示唆したものと考ええる。

要 約

雄性イスの前腕頭静脈より、argipidine を 0.02, 0.2 または 0.5 mg/kg/hr の速度で 5 hr 定速静脈内連続注入し、注入継続中および注入終了後の血漿中未変化 argipidine 濃度および抗血液凝固作用(プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT))

の推移を測定した。

血漿中未変化 argipidine 濃度は、注入開始後速やかに最高値に達し、注入終了時までほぼ一定で推移した。注入終了後 3 hr まで未変化 argipidine 濃度は 2.8~7.4 min および 25~43 min の半減期で速やかに消失した。血漿中未変化 argipidine 濃度の最高値は、0.02~0.5 mg/kg/hr の投与量範囲で投与量とよく相関した。

一方、argipidine の定速静脈内連続注入継続中の PT および APTT の延長時間は注入終了時までほぼ一定で推移し、それらは 0.02~0.5 mg/kg/hr の投与量範囲でそれぞれ投与量とよく相関した。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 440~446 (1981)
- 2) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemos.* (投稿中)

b) 風間睦美, 安部 英, 木下忠俊, 中村一路, 松田重三, 内藤 巖, 鎌倉正英, 田原千枝子, 森岡真知子, 大串利弘, 吉村祐一, 川杉和夫, 小林国男, 小島範行, 岡本一弘, 榎本昌伊, 飯島徳政: 実験 DIC の循環および凝血学的動態におよぼすヘパリンあるいは MD-805 の影響, DIC 調査研究班, 昭和 56 年業績集 (1981), pp. 82~89
- 3) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と血管 13: 72~77 (1982)
- 4) 飯田成宇, 小松貞子, 平野孝明, 藤村義幸, 中井弘司, 北沢 憲, 熊谷由美子, 佐藤朋以,

林 公子, 井口富夫: イヌおよびウサギにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究—Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 代謝, 排泄および蓄積性,

応用薬理 (投稿中)

5) Wagner J.G.: Fundamentals of clinical pharmacokinetics, Drug Intell. Pub. Inc., Illinois (1975), p. 90

* * *

ラットにおける Argipidine (MD-805) の 体内動態に関する研究

〈第3報*〉 胎仔移行性および乳汁中移行性

三菱化成工業株式会社 総合研究所

飯田 成 宇 小松 貞 子 佐藤 朋 以
林 公 子 井 口 富 夫

Pharmacokinetic Studies of Argipidine (MD-805) in Rats (III)

—Excretion into Milk and Foeto-Placental Transfer—

Seiu Iida, Teiko Komatsu, Tomoi Sato,
Kimiko Hayashi and Tomio Inokuchi

Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

The passages of radioactivity into the foetuses and milk were investigated in pregnant and lactating rats after intravenous administration of ^{14}C -argipidine at the dose level of 3 mg/kg.

1) In pregnant rats on day 19 of gestation, a little radioactivity passed through the placenta into the foetuses. The radioactivity in the foetuses except fetal intestine decreased rapidly. In pregnant rats on day 13 of gestation, passage of radioactivity into the foetuses was extremely low.

2) In lactation rats, the concentration of radioactivity in the milk reached a peak level of about 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 1 hr after dosing; thereafter, the level decreased gradually to 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 24 hr. The concentrations of radioactivity in the milk were about 1.5~10 times higher than those in the maternal blood between 1 and 6 hr after dosing.

KEY WORDS

Argipidine, Foeto-placental transfer,
Excretion into milk (Rat)

* 第1, 2報: 薬物動態 (投稿中)

緒 言

Argipidine [(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-(*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate] はトロンビンによるフィブリン形成作用を極めて低濃度で阻害し¹⁾, 各種静脈系血栓および動脈系血栓に対して有効性を示す薬物である²⁾。

今回著者らは, argipidine の体内動態研究の一環として, ¹⁴C-argipidine 静脈内投与後の胎仔移行性および乳汁中移行性について検討した。

I 実験方法

1 実験動物

実験動物には Wistar 系ラットを (株) 日本医科学動物資材研究所より購入して使用した。ラットは実験環境下 (室温 23±2°C, 湿度 55±10%) で予備飼育し, 体重増加の順調な個体を実験に供した。胎仔移行性実験は, 妊娠ラット (交配時 11 週齢) を購入し, 妊娠 13 日目 (体重 285~385 g) および 19 日目 (体重 325~430 g) に行った。乳汁中移行性実験は, 妊娠ラット (交配時 11 週齢) を購入し, 正常分娩後 6 日目 (母獣体重 296~318 g) に行った。ラットは, 薬物投与前 2 hr (哺乳ラット) または 18 hr (妊娠ラット) 絶食し, 食餌 (日本クレア (株), CAI) は薬物投与後 6 hr から再開した。その間水は自由に摂取させた。

2 標識化合物

¹⁴C-argipidine は別報³⁾に従い合成したもの (比放射能 9.0 μCi/mg, 放射化学的純度 99.0%) を, 非標識 argipidine で適宜希釈して使用した。

3 薬液の調製および投与方法

¹⁴C-argipidine を適宜非標識 argipidine で希釈し, その 2 mg に 0.4 N HCl-0.85% NaCl 水溶液を 50 μl 加え溶解し, 0.4 N NaOH-0.85% NaCl 水溶液を加え pH を 7.0 に調整した後, 0.85% NaCl 水溶液で 1 ml に定容し投与薬液とした (最終塩濃度 0.964%)。投与薬液の

比放射能は 9.93~11.31 μCi/ml であった。

投与薬液は尾静脈より, 体重 1 kg 当たり 1.5 ml (3 mg/kg) の用量で静脈内投与した。薬物投与後のラットは個別に代謝ケージに収容し実験に供した。

4 全身オートラジオグラフィ

妊娠 19 日目のラット 2 匹は, 投与後 30 min あるいは 24 hr に ether 麻酔下, dry ice-acetone 混液 (-70°C) に浸して凍結殺処分した。それぞれの凍結ラットからクライオミクローム (日本電子 (株), JCMT-1A) を用いて 40 μm の全身切片を作製し, -15°C の乾燥室にて凍結乾燥した。乾燥切片は X 線フィルム (Fuji, RX Medical XI-150) に密着させ, 6 週間冷暗所 (4°C) にて露出し, 全身オートラジオグラムを作製した。

5 組織内放射能濃度

妊娠ラット (13 日目および 19 日目) 16 匹は, 薬物投与後 30 min および 24 hr に ether 麻酔下, heparin 処理した注射筒にて腹部後大静脈より採血致死させた。採取した血液はその一部を放射能測定用にコンバストコーン (Packard) に分取し, 残りの血液は 15000 rpm で 1 min 遠心分離した。得られた血漿はその一部をコンバストコーンに分取した。血液および血漿は燃焼法により放射能を測定した。採血後のラットはただちに胎仔および所定の組織 (肝, 腎, 胎盤, 羊水) を摘出あるいは採取した。妊娠 19 日目の胎仔は, 1 母獣当たり 2 匹を全身用に, また別の 3 匹を胎仔組織内分布 (摘出後ただちに肝, 腎, 消化管を採取した) 用に使用した。臓器および組織は 0.9% 生理食塩液にて洗浄後全重量を秤量し, 凍結乾燥 (宮川科学資材 (株), Model MBM-6) を行った。乾燥後再び全重量を測定し, 一部の臓器は粉碎した後, その一部または全部をコンバストコーンに精秤し, 燃焼法により放射能を測定した。

6 乳汁中移行性

薬物投与前 2 hr 絶食させ, かつ乳仔と隔離した母獣 4 匹に ¹⁴C-argipidine 3 mg/kg を静脈内投与した。投与後所定の時間 (5, 30 min,

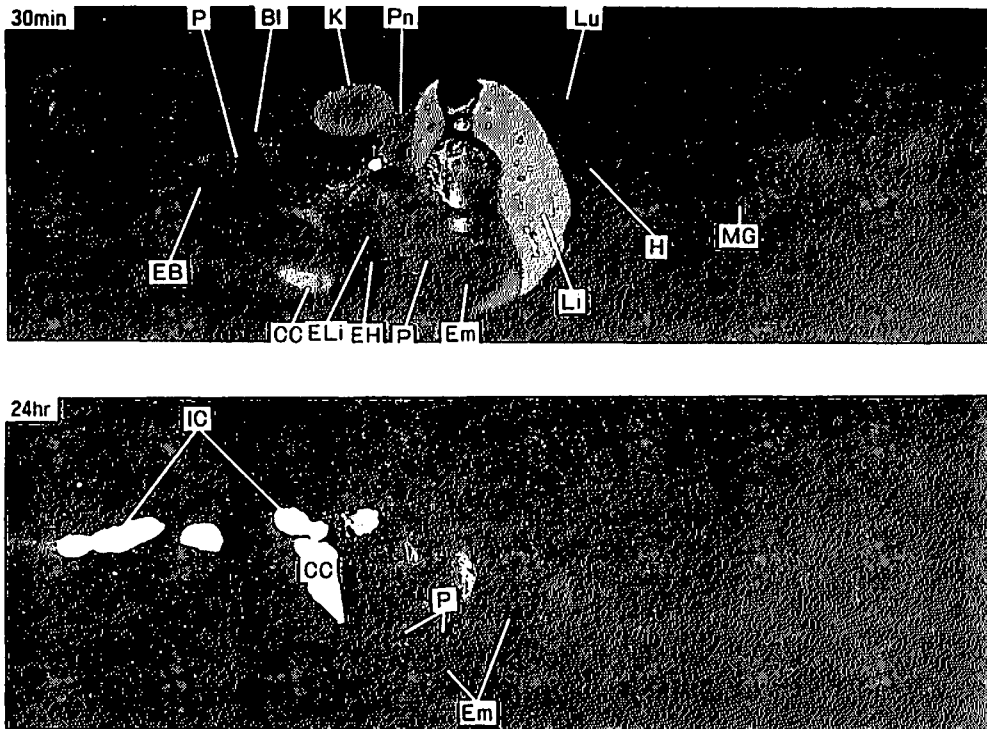


Fig. 1 Autoradiograms showing distribution of radioactivity at 30 min and 24hr after intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg) to pregnant rats on day 19 of gestation

Abbreviations:

Bl: blood CC: caecum contents EB: embryo brain EH: embryo heart
ELi: embryo liver Em: embryo H: heart IC: intestinal contents K: kidney
Li: liver Lu: lung MG: mammary gland P: placenta Pn: pancreas

1, 3, 6 および 24 hr) に、無麻酔下母獣を片手で軽く固定し、もう一方の手で軽く乳腺をしごいて搾乳を行った。搾乳後ただちに尾静脈より heparin 処理したマイクロピペットを用いて、血液 50 μl を採取した。なお、乳汁分泌を促進するため、搾乳 15 min 前に、oxytocin (帝國臓器製薬株) 0.5 unit/kg を皮下投与した。

7 放射能の測定

血液、血漿、および凍結乾燥後の各組織および臓器は、その一部または全部を精秤 (4 ~ 1077 mg) し、サンプルオキシダイザー (Packard, model 306) で燃焼させ、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を Carbo-Sorb (Packard) 6 ml に吸収させた後、toluene 系シンチレーター (Permafluor, Pac-

kard) 12 ml を加えて放射能測定用試料とした。乳汁 (0.05 ~ 0.3 ml) は、Solucene 350 (Packard) 1 ~ 2 ml に溶解し、toluene 系シンチレーター (PPO 4 g, POPOP 0.1 g, toluene 1000 ml) 15 ml を加えることにより放射能測定用試料とした。

放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (Packard, model 3385 または 4530) で行い、クエンチングの補正は ^{226}Ra による外部標準線源法により行った。

II 実験結果

1 胎仔移行性

1) 全身オートラジオグラフィー

Table 1 Distribution of radioactivity in pregnant rats on day 13 of gestation after intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg)

Organ	Concentration ($\mu\text{g/g}$ wet tissue)	
	0.5 hr	24 hr
Maternal Blood	0.349 ± 0.178	N.D.
Plasma	0.577 ± 0.294	0.005 ± 0.006
Liver	3.299 ± 1.450	0.090 ± 0.044
Kidney	1.985 ± 0.949	0.129 ± 0.056
Fetus Body	N.D.	0.002 ± 0.003
Placenta	0.369 ± 0.094	0.008 ± 0.007
Amniotic fluid	0.004 ± 0.005	N.D.

Radioactivity was converted to μg equivalent of argipidineEach value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=4$)

N.D.: Not detected

妊娠19日目の雌性ラットに ^{14}C -argipidine 3 mg/kg を静脈内投与した後 30 min および 24 hr の全身オートラジオグラムを作成し、Fig. 1 に示した。投与後 30 min では母獣の小腸内容物、胃、肝、腎に高い放射能が認められ、次いで肺、脾に血液より高い放射能が認められた。また胎盤には血液と同程度の放射能を認めたが、胎仔中には放射能はほとんど認められなかった。投与後 24 hr では放射能の大部分は母獣の消化管（小腸、大腸、盲腸、直腸）およびその内容物中に移動し、その他の組織には認められなかった。なお、胎盤および胎仔中にも放射能は認められなかった。

2) 組織内放射能濃度

妊娠13日目および19日目の雌性ラットに ^{14}C -argipidine 3 mg/kg を静脈内投与し、投与後30 min および 24 hr における胎仔ならびに母獣組織内の放射能濃度を argipidine 濃度 ($\mu\text{g/g}$) に換算して Table 1 および Table 2 に示した。

a) 妊娠13日目

薬物投与後 30 min における胎仔全身内放射能濃度は検出限界以下であった。胎盤内放射能濃度 ($0.369 \mu\text{g/g}$) は血液中放射能濃度 ($0.349 \mu\text{g/ml}$) と同程度であった。薬物投与後 24 hr

では胎仔内に放射能がわずかに検出されたが、胎盤内放射能濃度の1/4程度であった。

b) 妊娠19日目

薬物投与後 30 min における母獣の血漿、肝、腎および胎盤中の放射能濃度は $0.375 \mu\text{g/ml}$, $3.780 \mu\text{g/g}$, $1.488 \mu\text{g/g}$ および $0.255 \mu\text{g/g}$ であった。胎仔組織内放射能濃度は全身、肝、腎および腸管でそれぞれ $0.022 \mu\text{g/g}$, $0.041 \mu\text{g/g}$, $0.025 \mu\text{g/g}$ および $0.040 \mu\text{g/g}$ であった。羊水中には放射能は検出されなかった。胎仔1個体当たりへの移行量は投与量の0.005%であった。薬物投与後 24 hr では腸管を除く胎仔内放射能は母獣血漿中と同様に消失した。胎仔腸管内放射能濃度は投与後 30 min 値よりもやや高かった。また、羊水中にも放射能が検出された。

2 乳汁中移行性

分娩後6日目の哺乳ラットに ^{14}C -argipidine 3 mg/kg を静脈内投与した後の乳汁および血液中の放射能濃度を argipidine 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) に換算して Fig. 2 に示した。血液中放射能濃度は薬物投与後速やかに減少し、投与後 24 hr には消失した。一方、乳汁中放射能濃度は薬物投与後速やかに上昇し、1 hr 後に最高値 ($0.10 \mu\text{g/ml}$) を示し、その後緩やかに減少した。薬物

Table 2 Distribution of radioactivity in pregnant rats on day 19 of gestation after intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg)

Organ	Concentration ($\mu\text{g/g}$ wet tissue)	
	0.5 hr	24 hr
Maternal Blood	0.243 ± 0.062	0.004 ± 0.001
Plasma	0.375 ± 0.105	0.004 ± 0.001
Liver	3.780 ± 2.055	0.082 ± 0.024
Kidney	1.488 ± 0.408	0.097 ± 0.008
Fetus		
Body	0.022 ± 0.004	0.008 ± 0.001
Liver	0.041 ± 0.013	0.009 ± 0.001
Kidney	0.025 ± 0.017	N.D.
Intestine	0.040 ± 0.021	0.059 ± 0.016
Placenta	0.255 ± 0.030	0.019 ± 0.009
Amniotic fluid	N.D.	0.010 ± 0.002

Radioactivity was converted to μg equivalent of argipidineEach value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=4$)

N.D.: Not detected

投与後 24 hr における乳汁中放射能濃度は 1 hr 後のその約 1/3 ($0.03 \mu\text{g/ml}$) であった。なお、薬物投与後 1 hr 以降の乳汁中放射能濃度は血液中放射能濃度よりも高値で推移した。

III 考 察

妊娠末期（妊娠 19 日目）の雌性ラットに ^{14}C -argipidine 静脈内投与後の全身オートラジオグラムにおいて観察された組織内放射能の分布傾向は、別報⁴⁾において報告した雌性ラットにおけるそれと類似するものであり、argipidine の体内動態が妊娠により顕著に変動しないものと推察された。

妊娠末期のラットに ^{14}C -argipidine を静脈内投与したとき、放射能は胎仔にも移行したが、その濃度は母体血漿中および胎盤内のそれらの約 1/17 および約 1/12 であった。また、器官形成期（妊娠 13 日目）のラットでは胎仔への放射能の移行は極めて微量であった。このことは argipidine あるいはその代謝物の胎仔への移行が

血液-胎盤関門により大部分阻止されたものと推察された。

胎仔内に移行した放射能は消化管以外の特定の組織に集積・残留する傾向はなく、母体血漿中濃度と同様に速やかに消失した。胎仔消化管の放射能濃度は薬物投与後 0.5 hr より 24 hr の方がやや高い傾向を示し、これは成熟ラットと同様に胎仔においても胆汁中排泄が行われていることを示唆するものであり、胆汁中に排泄されやすい化合物についてこのような例がしばしば報告されている⁵⁾。

妊娠末期において薬物投与後 24 hr の羊水中に放射能が認められたが、これは argipidine あるいはその代謝物の一部が羊水中に排泄されたものと推察される。羊水中に排泄された薬物は羊膜に接する卵黄のうを経て子宮間腔へと排泄されるものと考えられる⁶⁾。

^{14}C -argipidine を静脈内投与した分娩後 6 日目のラットの乳汁中に放射能が検出されたことから、argipidine あるいはその代謝物の乳汁中

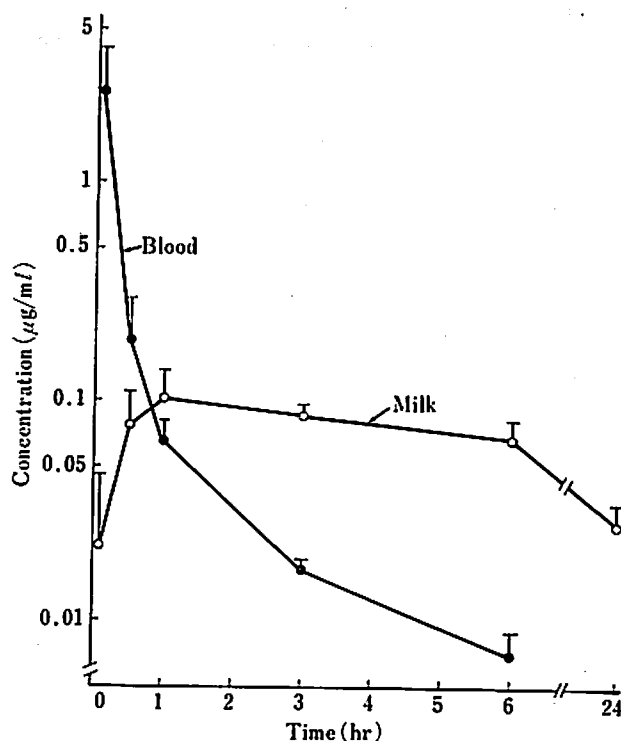


Fig. 2 Concentrations of radioactivity in the milk and maternal blood after intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg) to nursing rats

Radioactivity was converted to μg equivalent of argipidine

Each point represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3\sim 4$)

への移行が示された。一般に薬物の乳汁中への移行は非イオン型分子の受動拡散により行われ⁷⁾, その血中濃度に対する乳汁中濃度の比は, 薬物の pK_a , 脂溶性, 蛋白結合などによって大きく左右される⁸⁾ことが知られている。argipidine の乳汁中への移行は次のように考察される。argipidine は piperidine 環の carboxyl 基と guanidyl 基に基づく 0.5 および 11.0 の pK_a 値を示し, 血中の pH を 7.3 と仮定すると, 血中において argipidine は carboxyl ion と guanidinium ion による zwitterion を形成していると考えられる。また, argipidine は血清蛋白と結合性および血球成分との結合性も低い⁹⁾。これらのことから, 血中において argipidine は非イオン性の受動拡散を受け易い状態にあると

推察され, 乳汁中への移行が起こったものと考えられる。

要 約

妊娠ラットおよび授乳期のラットに ^{14}C -argipidine 3 mg/kg を静脈内投与し, 胎仔および乳汁中への薬物の移行について検討した。以下, その要約を示す。

1) 妊娠19日目のラットに ^{14}C -argipidine を静脈内投与した時, 胎仔内にわずかな放射能が移行した。胎仔内に移行した放射能は消化管を除き速やかに消失した。妊娠13日目のラットでは胎仔への放射能の移行は極めて低かった。

2) 授乳期のラットに ^{14}C -argipidine を静脈内投与した時, 乳汁中放射能濃度は投与後 1 hr

に最高濃度 ($0.10 \mu\text{g/ml}$) に達した。その後乳汁中放射能濃度は緩徐に減少し、投与後 24 hr における濃度は $0.03 \mu\text{g/ml}$ であった。乳汁中放射能濃度は投与後 1 hr から 6 hr において血液中濃度の約1.5~10倍の値を示した。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 440~446 (1981)
- 2) a) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemos.* (投稿中)
 b) 風間睦美, 安部 英, 木下忠俊, 中村一路, 松田重三, 内藤 巖, 鎌倉正英, 田原千枝子, 森岡真知子, 大串利弘, 吉村祐一, 川杉和夫, 小林国男, 小島範行, 岡本一弘, 榎本昌伊, 飯島徳政: 実験 DIC の循環および凝血学的動態におよぼすヘパリンあるいは MD-805 の影響, DIC 調査研究班, 昭和56年業績集 (1981), pp. 82~89
 c) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と脈管 13: 72~77 (1982)
- 3) 飯田成宇, 小松貞子, 斎藤芳男, 佐藤恵子, 北沢 憲, 井口富夫, 殿村信二, 菊本亮二, 井澤修: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (I)—Argipidine の *in vivo* および *in vitro* 代謝, 薬物動態 (投稿中)
- 4) 飯田成宇, 小松貞子, 岩本正人, 藤村義幸, 中井弘司, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (II)—Argipidine 単回または連日静脈内投与時の血中濃度推移, 分布, 代謝および排泄, 薬物動態 (投稿中)
- 5) La Du B.N., Mandel H.G. & Way E.L.: Fundamentals of drug metabolism and drug disposition, Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA (1971)
- 6) Waddel W.J.: Localization and metabolism of drugs in the fetus, *Fed. Proc.* 31: 52~61 (1972)
- 7) Rasmussen F.: Mammary excretion of benzylpenicillin, erythromycin and penethamate hydrochloride, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 16: 194~200 (1959)
- 8) 後藤 茂: ヒト母乳中への薬物の移行, 医学の歩み 115: 169~181 (1980)
- 9) 龍野 淳, 小松貞子, 飯田成宇: Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究—蛋白結合および血球結合, 薬理と治療 14(Suppl. 5): 1105~1108 (1986)

ラットにおける Argipidine (MD-805) の 体内動態に関する研究

〈第4報〉 肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系
に対する Argipidine の影響

三菱化成工業株式会社 総合研究所

飯田 成 宇 佐藤 恵 子 龍野 淳

Pharmacokinetic Studies of Argipidine (MD-805) in Rats (IV)

—Effects of Argipidine on Drug-Metabolizing Enzymes of Liver Microsomes—

Seiu Iida, Keiko Sato and Jun Tatsuno

Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

The effect of argipidine on the liver weight, liver microsomal protein content and liver microsomal drug-metabolizing enzymes were investigated in male rats. A single or repeated intravenous administration of argipidine at the dose level of 6 mg/kg/day did not affect the liver weight, the contents of liver microsomal protein, cytochrome P-450 and cytochrome b₅ and the activities of NADPH cytochrome c reductase, aminopyrine *N*-demethylase, aniline *p*-hydroxylase and UDP-glucuronyltransferase.

KEY WORDS

Argipidine, Drug-metabolizing enzyme,
Liver microsomes (Rat)

緒 言

Argipidine [(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate] はトロンビンによるフィブリン形成作用を極めて低濃度で阻害し¹⁾, 各種静脈系血栓および動脈系血栓に対して有効であることが報告されている²⁾。

本薬物はラット肝ミクロゾームにおける酸化酵素により速やかに、3-methyltetrahydroquinoline (3MTHQ) 環の芳香化代謝物 M-1, 3MTHQ 環の4位の水酸化代謝物 M-2 (*cis* 体) および M-3 (*trans* 体), および 3MTHQ 環の *N* 水酸化代謝物 M-4 に代謝される³⁾。

今回著者らは、argipidine をラットに21日間連続静脈内投与した場合の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に対する影響について検討した。

I 実験方法

1 実験動物

実験動物として Wistar 系雄性ラット (9 週齢, 体重 280~320 g) を、⁴⁾ 日本医科学動物資材研究所より購入し使用した。ラットは実験環境下 (室温 23±2°C, 湿度 55±10%) で予備飼育し、体重増加の順調な個体を実験に供した。ラットはミクロゾーム調製前または hexobarbital および zoxazolamine 投与前約 18 時間絶食した。予備飼育および実験期間中は固形飼料 (日本クレア⁵⁾, CA 1) および水道水を自由に摂取させた。

2 薬物投与方法

1) Argipidine

非標識 argipidine 4 mg を 0.4 N HCl-0.85% NaCl 水溶液 50 μ l に溶解し、0.4 N NaOH-0.85% NaCl 水溶液を加え pH を 7.0 に調整した後、0.85% NaCl 水溶液で 1 ml に定容し、投与薬液とした (最終塩濃度 0.964%)。

投与薬液はラット尾静脈より、体重 1 kg あたり 1.5 ml (6 mg/kg) の用量で 1 日 1 回単回または連続 (10日間または21日間) 静脈内投与

した。また、生理食塩水を 1.5 ml/kg 同様に単回または連続静脈内投与し、対照群とした。

2) Hexobarbital および zoxazolamine

Hexobarbital (Cyclopan, 帝国化学産業⁶⁾) を 0.1 N NaOH 水溶液に溶解後、0.1 N HCl 水溶液で pH 10.5 に調整し、100 mg/ml の投与薬液を調製した。

Zoxazolamine (Aldrich Chemical Co. Inc.) は propylene glycol に溶解し、26 mg/ml の投与薬液を調製した。

Argipidine 6 mg/kg 1 日 1 回21日間連続投与群およびその対照群の最終投与後 24 hr に、hexobarbital 投与薬液または zoxazolamine 投与薬液を 1 ml/kg (100 mg/kg) あるいは 2 ml/kg (52 mg/kg) それぞれ腹腔内投与した。

3 肝ミクロゾームの調製

単回投与または最終投与後 24 hr に頸動脈切断により瀉血し、ただちに門脈より氷冷した 1.15% KCl 水溶液にて灌流した。肝を摘出し全重量を測定後、Omura *et al.* の方法⁷⁾ に従いミクロゾーム画分を調製した。ミクロゾーム画分は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) または 1 mM の EDTA を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に懸濁させ、aniline *p*-hydroxylase 活性、aminopyrine *N*-demethylase 活性および UDP-glucuronyltransferase 活性の測定には前者を、NADPH cytochrome c reductase 活性、cytochrome P-450 含量および cytochrome b₅ 含量の測定には後者を使用した。ミクロゾーム懸濁液は -80°C で凍結保存し、使用時に注意深く解凍し、再びホモジナイズして使用した。

4 酵素活性の測定

Aniline *p*-hydroxylase 活性は生成する *p*-aminophenol を Imai *et al.* の方法⁸⁾ により、aminopyrine *N*-demethylase 活性は生成する formaldehyde を Nash の方法⁹⁾ に準じ測定した。NADPH cytochrome c reductase 活性は Williams *et al.* の方法¹⁰⁾ に従い、cytochrome P-450 含量および cytochrome b₅ 含量は Omura *et al.* の方法⁷⁾ に準じそれぞれ測定した。UDP-glucuronyltransferase 活性はミクロゾーム懸濁液を

Table 1 Effect of argipidine on liver weight, microsomal protein content and drug-metabolizing enzymes in rat liver microsomes at 24 hr after single or repeated intravenous administration of argipidine (6 mg/kg/day) to male rats

	Relative activity or content (percent of control)		
	Single administration	Repeated administration	
		for 10 days	for 21 days
Liver weight	96.64 ± 6.12	92.78 ± 3.71	97.43 ± 5.36
Microsomal protein	102.43 ± 4.14	89.11 ± 8.34	98.23 ± 4.70
Aniline <i>p</i> -hydroxylase	95.19 ± 8.54	111.44 ± 10.81	91.81 ± 5.64
Aminopyrine <i>N</i> -demethylase	94.83 ± 4.19	101.71 ± 19.64	89.82 ± 8.48
NADPH cytochrome c reductase	96.34 ± 9.29	110.97 ± 17.06	92.73 ± 22.99
Cytochrome P-450	100.53 ± 8.92	107.76 ± 16.96	100.76 ± 17.55
Cytochrome b ₅	103.58 ± 8.27	99.81 ± 6.70	101.34 ± 13.22
UDP-glucuronyltransferase	—	—	98.81 ± 10.41

Each value represents the mean ± S.D. (n=5~6)

Triton X-100 で可溶化した後、*p*-nitrophenol を基質として Gorski *et al.* の方法⁹⁾に準じて測定した。また蛋白量は Lowry *et al.* の方法⁹⁾により測定した。

5 Hexobarbitalの睡眠作用およびzoxazolamineの筋弛緩作用の測定

Hexobarbitalの睡眠作用およびzoxazolamineの筋弛緩作用は、いずれも薬物投与後の正向反射が消失してから回復するまでの時間を指標として測定した。

II 実験結果

Argipidine を 6 mg/kg 単回, 10および21日間連続静脈内投与した後 24 hr における肝体重比, ミクロゾーム蛋白量および各種薬物代謝酵素活性またはその含量を, 対照群に対する百分率として **Table 1** に示した。肝体重比, ミクロゾーム蛋白量, aniline *p*-hydroxylase 活性, aminopyrine *N*-demethylase 活性, NADPH cytochrome c reductase 活性, cytochrome P-450 含量, cytochrome b₅ 含量および UDP-glucuronyltransferase 活性はいずれも argipidine の連続静脈内投与により変化しなかった。また,

Table 2 *In vivo* effect of argipidine on hexobarbital sleeping time and zoxazolamine paralytic time at 24 hr after repeated intravenous administration of argipidine (6 mg/kg/day) for 21 days to male rats

	Percent of control
Hexobarbital sleeping time	91.09 ± 21.40
Zoxazolamine paralytic time	108.21 ± 25.43

Hexobarbital and zoxazolamine were administered intraperitoneally at the dose of 100 mg/kg or 52 mg/kg, respectively

Each value represents the mean ± S.D. (n=5)

Table 2 に示すように, argipidine を21日間連続静脈内投与した後 24 hr における hexobarbital による睡眠作用時間 および zoxazolamine による筋弛緩作用時間についても, argipidine 連続投与群と対照群で有意な差はなかった。

III 考 察

Argipidine はラット, ウサギおよびイスにおいて主に緒言に述べた4種の代謝物に代謝さ

れ¹⁰⁾, これら代謝物は肝ミクロゾームで速やかに生成される³⁾。種々の薬物が肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系により代謝され、薬物の中には連続投与することによりこの薬物代謝酵素系に影響を与えることが知られている。肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系は薬物の薬効・毒性を支配する重要な因子の一つであり、また、複数薬物服用時の薬物相互作用の面からも、薬物を連続投与した時の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系への影響を調べることは重要である。そこで今回 argipidine を連続投与し、argipidine の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に与える影響を検討したところ、肝体重比、肝ミクロゾーム蛋白量、cytochrome P-450 含量、cytochrome b₅ 含量、NADPH cytochrome c reductase 活性、aniline *p*-hydroxylase 活性、aminopyrine *N*-demethylase 活性、*p*-nitrophenol を基質とした UDP-glucuronyltransferase 活性、hexobarbital による睡眠時間および zoxazolamine による筋弛緩時間のいずれにも対照群との間に有意差は認められなかった。

一方、別報において報告したように^{10a)}, ラットに ¹⁴C-argipidine を連続投与したとき、血漿中放射能、未変化 argipidine および代謝物濃度は投与回数の増加によっても変化せず、また尿、糞中への代謝物の排泄率も単回投与時のそれと極めて類似するものであった。さらにイスに ¹⁴C-argipidine を連続投与したときも、最終投与後の血漿中放射能濃度推移および argipidine の薬理作用の指標であり、主に未変化 argipidine により発現していると考えられる血漿中抗トロンビン活性が単回投与時のそれとほぼ一致する経時的推移を示した^{10b)}。これらのことは、argipidine を連続投与しても argipidine 自身の体内動態に変化がないことを示唆しているものであり、argipidine 自身その一部が肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系により代謝されること³⁾ および今回の実験結果を考え合わせると、argipidine は連続投与しても肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に影響を与えないものと考えられる。

要 約

ラットにおける肝重量、肝ミクロゾーム蛋白量および肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に対する argipidine の影響について検討した。6 mg/kg/day の用量で argipidine を単回または連続静脈内投与した時、肝体重比、肝ミクロゾーム蛋白量、cytochrome P-450 含量、cytochrome b₅ 含量、NADPH cytochrome c reductase 活性、aminopyrine *N*-demethylase 活性、aniline *p*-hydroxylase 活性および UDP-glucuronyltransferase 活性はいずれも変化しなかった。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereostructure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 440~446 (1981)
- 2) a) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemos.* (投稿中)
b) 風間睦美, 安部 英, 木下忠俊, 中村一路, 松田重三, 内藤 巖, 鎌倉正英, 田原千枝子, 森岡真知子, 大串利弘, 吉村祐一, 川杉和夫, 小林国男, 小島鏡行, 岡本一弘, 榎本昌伊, 飯島徳政: 実験 DIC の循環および凝血学的動態におよぼすヘパリンあるいは MD-805 の影響, DIC 調査研究班, 昭和56年業績集 (1981), pp. 82~89
c) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血液と脈管 13: 72~77 (1982)
- 3) 飯田成字, 小松貞子, 斎藤芳男, 佐藤恵子, 北沢 憲, 井口富夫, 殿村信二, 菊本亮二, 井澤修: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (I) —Argipidine の

- in vivo* および *in vitro* 代謝, 薬物動態 (投稿中)
- 4) a) Omura T. & Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.* **239**: 2370~2378 (1964)
 b) Omura T. & Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties, *J. Biol. Chem.* **239**: 2379~2385 (1964)
 - 5) Imai Y. & Sato R.: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction, *J. Biochem. (Japan)* **60**: 417~428 (1966)
 - 6) Nash T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem. J.* **55**: 416~421 (1953)
 - 7) Williams Jr. C.H. & Kamin H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver, *J. Biol. Chem.* **237**: 587~595 (1962)
 - 8) Gorski J.P. & Kasper C.B.: Purification and properties of microsomal UDP-glucuronosyl-transferase from rat liver, *J. Biol. Chem.* **252**: 1336~1343 (1977)
 - 9) Lowry H., Rosebrough N.J., Farr, A.L. & Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**: 265~275 (1951)
 - 10) a) 飯田成宇, 小松貞子, 岩本正人, 藤村義幸, 中井弘司, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (II) —Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 分布, 代謝および排泄, 薬物動態 (投稿中)
 b) 飯田成宇, 小松貞子, 平野孝明, 藤村義幸, 中井弘司, 北沢 憲, 熊谷由美子, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: イスおよびウサギにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究—Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 代謝, 排泄および蓄積性, 応用薬理 (投稿中)

Argipidine (MD-805) の体内動態 に関する研究

—蛋白結合および血球結合—

三菱化成工業株式会社 総合研究所

龍 野 淳 小 松 貞 子 飯 田 成 宇

Pharmacokinetic Studies of Argipidine (MD-805)

—Protein Binding and Blood Cell Binding—

Jun Tatsuno, Teiko Komatsu and Seiu Iida

Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

1) Protein binding

The binding rates of argipidine to serum protein in rats, dogs and human were measured by the equilibrium dialysis method.

The binding rates of radioactive substances to serum protein in rats and dogs at 5 min and 30 min after intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg) were 47.1% and 54.4% in rats, and 45.2% and 47.8% in dogs, respectively.

The binding rates of argipidine (5×10^{-7} M) to serum protein of rats, dogs and human were 44.4%, 62.1% and 53.7%, respectively. No significant difference was found in protein binding extent among two species of animals and human.

The binding rates of argipidine (5×10^{-7} M) to albumin (HSA) and α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) in human serum were 20.3% and 34.0%, respectively.

2) Blood cell binding

In male rats subjected to single intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg), binding rates of radioactive substances to blood cell were 16.2% and 32.3% at 30 and 60 min after dosing, respectively. When ^{14}C -argipidine was administered intravenously (3 mg/kg) to male rats once a day continuously for 10, 15 and 21 days, those were 28.3~29.0% at 30 min after last dosing. When ^{14}C -

argipidine was administered intravenously (3 mg/kg) to male dogs, those were extremely low ($\leq 7.2\%$).

KEY WORDS

Argipidine, Protein binding,
Blood cell binding

緒 言

Argipidine [(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-(*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl]-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate] の体内動態を明らかにする目的の一環として、¹⁴C-argipidine を使用して本薬物の *in vitro* における血清蛋白結合性について検討した。また、ラットおよびイスに ¹⁴C-argipidine を静脈内投与して、代謝物を含めた本薬物の血清蛋白結合性および血球結合性についても検討した。

I 実験材料および方法

1 実験動物および被験者

動物は Wistar 系の雄性ラット（体重 137～317 g, 6～10 週齢, 財団法人日本医科学動物資材研究所）および雄性ビーグル犬（体重 9.0～10.0 kg, 15 ヶ月齢, Hazleton Research Animals Inc.）を用いた。また、*in vitro* 蛋白結合実験に使用したヒト血清の提供者として健康男子（体重 57～76 kg, 25～30 歳）4 名の協力を得た。薬物投与前（単回投与）または蛋白結合実験に使用する血液の採取前、ラットは 16 hr, イスは 24 hr, ヒトは約 10 hr それぞれ絶食した。なお、ラットにおける連続投与試験では、最終投与前 18 hr 絶食した。実験期間中水は自由に摂取させた。

2 ¹⁴C-argipidine 溶液の調製

In vitro の蛋白結合実験には、1～200 μ M の ¹⁴C-argipidine を含む 1/15 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を調製した (0.5～105.2 μ g/ml)。

また、*in vivo* の血清蛋白結合性または血球結

合性をみる実験では、非標識 argipidine で適宜希釈した ¹⁴C-argipidine 1 または 2 mg を 0.4 N HCl-0.85% NaCl 水溶液 50 μ l に溶解し、0.4 N NaOH-0.85% NaCl 水溶液を加え pH を 7.0 に調整した後、0.85% NaCl 水溶液で 1 ml に定容し、投与薬液とした（最終塩濃度 0.964%）。投与薬液の比放射能は、血清蛋白結合性をみる *in vivo* 実験ではラットで 10.44～10.62 μ Ci/2 mg/ml, イスで 3.33 μ Ci/2 mg/ml, 血球結合性をみる実験ではラットで 7.61 μ Ci/2 mg/ml（単回投与）または 3.41～4.54 μ Ci/mg/ml（連続投与）、イスでは 0.78 μ Ci/2 mg/ml であった。

3 薬物投与方法

雄性のラットおよびイスに体重 1 kg 当たり 1.5 ml（単回投与）または 3 ml（連続投与）の用量で、上記投与薬液をラットの尾静脈およびイスの前肢静脈より単回または連続（1日1回, 10, 15 および 21 日間）静脈内投与した (3 mg/kg/day)。投与放射能量は、ラットの単回投与実験および連続投与実験では 10.2～15.9 μ Ci/kg, イスの単回投与実験では 1.2～5.0 μ Ci/kg であった。薬物投与後の動物はそれぞれ個別に代謝ケージに入れ飼育した。なお、イスへの投与は 10 ml/min の速度で行った。

4 蛋白結合率の測定

1) 平衡透析法

平衡透析は、分子量 12000 以上の物質をとさない透析膜 (Spectrum Medical Industries Inc., USA) により隔てられた 2 つのチャンバー (A および B) を有するテフロン製のセミミクロセル (Spectrum Medical Industries Inc.) を用い行った。透析膜は、流水で 15 min, 精製

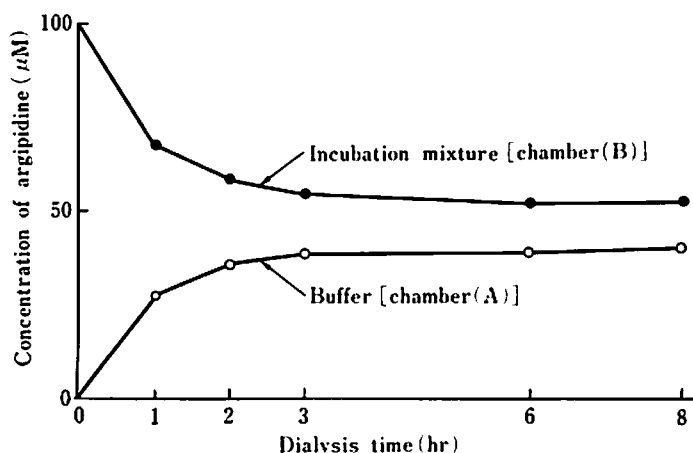


Fig. 1 Relationship between the dialysis time and the concentrations of argipidine in chamber

水で 30 min および 30% エタノール水で 15 min の順序で洗浄し、室温下精製水に少なくとも 1 hr、その後 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 1 hr 浸し、平衡に達してから使用した。

片方のチャンバー (A) に 1 ml の 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を入れ、もう一方のチャンバー (B) には、希釈した血清あるいはインキュベーション溶液 1 ml を入れ、4°C で回転させながら (20 rpm) 6 hr 透析を行った。

なお、透析時間の決定は次のように行った。 2×10^{-4} M のヒト血清アルブミン (HSA, Sigma Chemical Co.) のリン酸緩衝溶液 (13.3 mg/ml) 2 ml に 2×10^{-4} M の ^{14}C -argipidine リン酸緩衝溶液 2 ml を加え、37°C で 15 min インキュベートした後、上記と同様に操作し、1, 2, 3, 6 および 8 hr 平衡透析を行い、それぞれの透析時間における蛋白結合率を求めた。Fig. 1 に示すように、3 hr の透析により両チャンバー中の ^{14}C -argipidine 濃度は平衡に達し、その後 8 hr までその平衡は維持された。この結果を基に、本実験における透析時間は十分に平衡に達する 6 hr とした。

2) 蛋白結合率

透析終了後、各チャンバー内の放射能を測定し、蛋白結合率を求めた。

結合率の計算は下記の式によった。

$$\beta (\%) = [(B-A)/(A+B)] \times 100$$

β : 蛋白結合率

A : チャンバー A の放射能濃度

B : チャンバー B の放射能濃度

3) In vivo 実験

^{14}C -argipidine 3 mg/kg を雄性のラットおよびイスに静脈内投与し、投与後 5 min および 30 min に腹部後大静脈または前肢静脈より採血した。血液は室温に 30 min 放置後 15000 rpm で 1 min 遠心分離して血清を得た。それぞれの血清は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 倍に希釈した後、それらの 1 ml を用い、平衡透析法により蛋白結合率を求めた。

4) In vitro 実験

雄性のラット、イスおよびヒトの腹部後大静脈、前肢静脈および前腕静脈より血液を採取し、上記と同様に血清を得た。それぞれの血清は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 倍に希釈した。また、HSA は 2×10^{-4} M となるように、ヒト血清 α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP, Sigma Chemical Co.) は 0.4 mg/ml となるように 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。なお、これら HSA および α_1 -AGP 濃度は、希釈後のヒト血清中のそれぞれの濃度とは

ば等しい。これら希釈後の血清、HSA および α_1 -AGP 溶液のそれぞれ 2 ml に、 ^{14}C -argipidine 溶液 (1~200 μM) 2 ml を加え、37°C で 15 min インキュベートした。反応終了後、各インキュベーション溶液 1 ml を用い、平衡透析法により蛋白結合率を求めた。

5 血球結合率の測定

^{14}C -argipidine 3 mg/kg を雄性のラットおよびイスに単回または連続静脈内投与し、薬物投与後所定の時間 (30 min または 1 hr) に、ラットはエーテル麻酔下で腹部後大静脈から、またイスは投与した前肢と反対側の前肢静脈より、血液 3~8 ml を採取した。血液はヘパリンをコーティングした試験管に移すかまたは血液に対して 3.8% クエン酸ナトリウム水溶液を 9:1 の割合になるように加え、ヘマトクリット値 (Ht 値) を測定した後、その一部を正確にコンバストコーン (Packard) に秤量した。残りの血液は 15000 rpm で 1 min 遠心分離し、血漿を得た。血漿の一部をコンバストコーンに精秤した。血液および血漿中の放射能を測定し、それらの値と Ht 値から下記の式により血球結合率を計算した。なお、ヘパリン処理した血液の Ht 値はラットで 43.5~44.5%、イスでは 39.5~47.0% であり、3.8% クエン酸ナトリウム水溶液を添加したラットの血液の Ht 値は 31.5~41.5% であった。

$$T(\%) = [1 - C_p \times (100 - \text{Ht}) / C_b \times 100] \times 100$$

T: 血球結合率

C_b : 血液中放射能

C_p : 血漿中放射能

6 蛋白量の測定

血清中蛋白量は Lowry *et al.*¹⁾ の方法に従って測定した。

7 放射能の測定

血液および血漿はサンプルオキシダイザー (model 306, Packard) で燃焼し、生成する $^{14}\text{CO}_2$ を Carbo-Sorb (Packard) 6 ml に吸収させ、toluene 系シンチレーター (Permafluor, Packard) 12 ml を加えて測定用試料とした。平衡透析後の緩衝液および蛋白含有液はその

Table 1 Percent binding of radioactivity to serum proteins of male rats and dogs after intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg)

Species	Time (min)	Binding (%)
Rat	5	47.09
	30	54.36
Dog	5	45.20
	30	47.83

Each value represents the mean (rats, $n=4$; dogs, $n=2$)

0.2 ml を放射能測定用 バイアルビン に正確に取り、ACS-II (Amersham) 15 ml を加えて測定用試料とした。

放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (model 3385 または 4530, Packard) で行い、クエンチングの補正は ^{226}Ra による外部標準線源法により行った。

II 実験結果

1 血清蛋白との結合

1) *In vivo* 実験

Argipidine の代謝物を含めた血清蛋白結合率を測定するため、 ^{14}C -argipidine を 3 mg/kg の用量で雄性ラットおよびイスに静脈内投与し、投与後 5 min および 30 min における血液を採取後血清を分離し、放射能の血清蛋白に対する結合率を平衡透析法により測定した。その結果を **Table 1** に示す。ラットに静脈内投与後 5 min および 30 min における血清蛋白結合率はそれぞれ 47.1% および 54.4% であった。また、イスに静脈内投与したときのそれらはそれぞれ 45.2% および 47.8% であった。

2) *In vitro* 実験

雄性のラット、イスおよびヒトの血清、HSA および α_1 -AGP 溶液に ^{14}C -argipidine を 5×10^{-7} ~ 1×10^{-4} M の濃度になるように添加し、平衡透析法により argipidine の血清蛋白との結合率を測定した。その結果を **Table 2** に示す。ラ

Table 2 Percent binding of ^{14}C -argipidine to serum proteins

Argipidine conc. (μM)	Protein conc. (mg/ml)	Binding (%)				
		Rat serum (18.15)	Dog serum (19.29)	Human serum (23.30)	HSA (6.65)	α_1 -AGP (0.20)
0.5		44.39	62.13	53.68	20.27	34.04
1		41.64	59.90	50.47	17.68	31.21
5		40.15	45.86	47.60	19.89	28.34
10		39.38	41.02	42.85	16.32	22.15
100		36.89	35.07	34.10	14.93	4.89

Each value represents the mean of 3 or 4 experiments

Table 3 Percent binding of radioactivity to blood cells in male rats and dogs after single or consecutive intravenous administration of ^{14}C -argipidine (3 mg/kg/day)

		Species	Binding (%)	
			30 min	1 hr
After single administration		Rat	16.2	32.3
		Dog	7.2	4.6
After consecutive administration	for 10 days	Rat	28.6	—
	for 15 days	Rat	28.3	—
	for 21 days	Rat	29.0	—

Each value represents the mean ($n=4$ or 5)

ット、イヌおよびヒト血清蛋白との結合率はそれぞれ、36.9~44.4%、35.1~62.1%および34.1~53.7%であった。また、HSAとの結合率は14.9~20.3%であり、 α_1 -AGPとの結合率は4.9~34.0%であった。

2 血球との結合

雄性的ラットおよびイヌに ^{14}C -argipidine を単回または連続静脈内投与 (3 mg/kg/day) した後の血中放射性化合物の血球への結合率を求めた。その結果を Table 3 に示す。 ^{14}C -argipidine をラットに単回投与したときの放射能の血球結合率は、投与後 30 min および 1 hr でそれぞれ 16.2% および 32.3% であった。また、 ^{14}C -argipidine をラットに 10、15 および 21 回連

続投与したときの放射能の血球結合率は、最終投与後 30 min においてそれぞれ 28.6%、28.3% および 29.0% であった。イヌに単回投与したとき、投与後 30 min および 1 hr における放射能の血球結合率はそれぞれ 7.2% および 4.6% であった。

III 考 察

別報²⁾に示すように、雄性ラットおよびイヌに ^{14}C -argipidine 3 mg/kg を静脈内投与したときの血漿中 argipidine 濃度は、ラットでは投与後 5 min および 30 min でそれぞれ 5.69 μM および 0.17 μM であり、イヌではそれぞれ 9.64 μM および 1.36 μM であった。これらの

argipidine 濃度における血漿中での argipidine の血清蛋白に対する結合率は、*in vitro* の血清蛋白結合実験結果から概算すると、ラットで約 40~45%，イヌでは約 40~60% と推定され、 ^{14}C -argipidine 3 mg/kg を静脈内投与後の放射能の血清蛋白結合率、すなわちラットで約 47% (投与後 5 min) および 54% (投与後 30 min)、イヌでは約 45% (投与後 5 min) および 48% (投与後 30 min) と近似する値であった。このことは別報²⁾において明らかにしたように、 ^{14}C -argipidine を静脈内投与したラットおよびイヌの投与後 5 min および 30 min における血漿中には、血漿中放射能のそれぞれ約 15% および 70%，約 30% および 50% に相当する代謝物が存在していることと考え合わせると、argipidine の代謝物も argipidine と同程度の血清蛋白との結合性を有するものと推察された。

^{14}C -argipidine を $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の濃度で、ヒト血清、またはヒト血清中アルブミン濃度とほぼ等しくなるように調製した HSA 溶液とインキュベートしたときの、argipidine とそれぞれの血清蛋白との結合率は約 54% および 20% であり、ヒト血清蛋白との結合率のほうが HSA との結合率よりも高かった。このことは argipidine がヒト血清中においてアルブミン以外の血清蛋白と結合していることを示唆した。argipidine は両性化合物であることから、塩基性薬物と結合することが知られている血清中酸性糖蛋白である α_1 -AGP との結合が考えられる³⁾。そこでヒト血清中 α_1 -AGP 濃度とほぼ等しくなるように調製した α_1 -AGP 溶液中での、argipidine ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) と α_1 -AGP との結合率を平衡透析法により測定したところ、その結合率は約 34% であった。この α_1 -AGP と上記 HSA に対する結合率の合計は 54% であり、argipidine のヒト血清蛋白に対する結合率 (54%) と一致したことから、argipidine が結合する血清蛋白は主にアルブミンと α_1 -AGP であると考えられた。

ラットおよびイヌに ^{14}C -argipidine を単回または連続静脈内投与して、血液中放射性化合物 (未変化 argipidine または代謝物) の血球結合

性について検討した。ラットに単回投与したときには、放射性化合物の血球結合率は投与後 30 min よりも 1 hr において高い値を示し、投与後の時間経過とともに上昇する傾向が認められた。このことは次のように考えられる。すなわち、① 放射性化合物の血中からの消失速度が血球からの放射性化合物の血漿中への解離速度よりも速いことから、時間経過とともに血球結合率が上昇したか、あるいは、② 前報において明らかにしたように²⁾、 ^{14}C -argipidine をラットに静脈内投与したとき、投与後 1 hr の血漿中では未変化 argipidine は極めて低濃度であり、放射性化合物の大部分は代謝物として存在することから、生成した代謝物が未変化 argipidine よりも高い血球結合率を示したものと考えられる。

一方、ラットに ^{14}C -argipidine を 10, 15 および 21 回連続静脈内投与したときの最終投与後 30 min における血中放射性化合物の血球結合率は、10 回目の投与で単回投与時 (16.2%) の約 1.8 倍の値 (28.6%) を示し、放射性化合物の血球における残留が示唆された。しかし、その結合率は 10 回目から 21 回目の投与まではほぼ一定値で推移し (28.3~29.0%)、予想される血球残留性はさほど強いものではないと考えられた。なお、argipidine のラットにおける 6 ヶ月およびイヌの 12 ヶ月慢性毒性試験では、血液学的検査値に異常は認められていない。

イヌに ^{14}C -argipidine を単回静脈内投与した後 30 min および 1 hr における血中放射性化合物の血球結合率は、それぞれ 7.2% および 4.6% であった。これらの血球結合率はいずれもラットに比較して低値であり、また、投与後の時間経過によってもラットにおいて認められたような結合率の上昇は認められず、argipidine あるいはその代謝物のイヌ血球成分に対する親和性がラットに比較して低いことが示唆された。このことは、別報において報告したように²⁾、 ^{14}C -argipidine を単回静脈内投与した後の血漿中放射能の消失がイヌ (半減期 $t_{1/2\alpha} = 3.3 \text{ min}$, $t_{1/2\beta} = 28.8 \text{ min}$) の方がラット ($t_{1/2\alpha} = 4.0 \text{ min}$,

$t_{1/2} = 79.8 \text{ min}$) よりも速やかであることとも一致した。

要 約

1 蛋白結合

Argipidine のラット、イスおよびヒトの血清蛋白に対する結合率を平衡透析法により求めた。

雄性ラットおよびイスに ^{14}C -argipidine を単回静脈内投与 (3 mg/kg) した後 5 min および 30 min における放射性化合物の血清蛋白との結合率は、ラットでは 47.1% および 54.4%、イスでは 45.2% および 47.8% であった。

ラット、イスおよびヒトの血清蛋白に対する argipidine ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) の結合率はそれぞれ 44.4%, 62.1% および 53.7% であり、argipidine の血清蛋白結合性に動物とヒトで顕著な差は認められなかった。

Argipidine ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) のヒト血清中アルブミンおよび α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) に対する結合率はそれぞれ 20.3% および 34.0% であった。

2 血球結合

^{14}C -argipidine を単回静脈内投与 (3 mg/kg) した時の雄性ラットにおける放射性化合物の血球結合率は、投与後 30 min および 1 hr でそれぞれ 16.2% および 32.3% であった。また、 ^{14}C -argipidine を雄性ラットに 1 日 1 回 10, 15 および 21 日間連続静脈内投与 (3 mg/kg/day) した後 30 min の血球結合率は 28.3~29.0% であった。雄性イスに ^{14}C -argipidine を単回静脈内投与 (3 mg/kg) したときの血球結合率は極めて低かった ($\leq 7.2\%$)。

文 献

- 1) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 263~275 (1951)
- 2) a) 飯田成宇, 小松貞子, 岩本正人, 藤村義幸, 中井弘司, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (II)—Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 分布, 代謝および排泄, 薬物動態 (投稿中)
- b) 飯田成宇, 小松貞子, 平野孝明, 藤村義幸, 中井弘司, 北沢 恵, 熊谷由美子, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: イスおよびウサギにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究—Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 代謝, 排泄および蓄積性, 応用薬理 (投稿中)
- 3) a) Borga O., Pialsky K.M. & Nilsen G.: Plasma protein binding of basic drugs, *Clin. Pharmacol. Ther.* 22: 539~544 (1977)
- b) Sager G., Nilsen O.G. & Jacobsen S.: Variable binding of propranolol in human serum, *Biochem. Pharmacol.* 28: 905~911 (1979)
- c) Routledge P.A., Lazar J.D., Barchowsky, A., Stargel W.W., Wagner G.S. & Shand D.G.: A free lignocaine index as a guide to unbound drug concentration, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20: 695~698 (1985)
- d) Schley J. & Muller-Oerlinghausen B.: Investigation of the binding of various tricyclic neuroleptics and antidepressants to α_1 -acid glycoprotein, *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 102~106 (1986)

ヒトにおける Argipidine (MD-805) の 体内動態に関する研究

—Argipidine 点滴静脈内投与時の Argipidine
および代謝物の血漿，尿および糞中濃度—

三菱化成工業株式会社 総合研究所

井 澤 修 香 月 正 行

小 松 貞 子 飯 田 成 宇

Pharmacokinetic Studies of Argipidine (MD-805) in Human

—Concentrations of Argipidine and Its Metabolites in Plasma,
Urine and Feces During and After Drip Intravenous Infusion—

Osamu Izawa, Masayuki Katsuki,
Teiko Komatsu and Seiu Iida

Research Center, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.

ABSTRACT

Pharmacokinetics of argipidine was evaluated in five healthy male volunteers. Each subject was injected with the drug by drip intravenous infusion at a dosing rate of 300 $\mu\text{g}/\text{min}$ for 30 min. Plasma levels, urinary and fecal excretion of unchanged argipidine and its metabolites were determined by HPLC.

The concentration of unchanged argipidine in plasma reached a maximum level (0.766 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 30 min after the beginning of infusion. Following the infusion, the concentration of argipidine in plasma was decreased rapidly with half-lives of 6.7 min ($t_{1/2\alpha}$) and 39.8 min ($t_{1/2\beta}$).

Argipidine was excreted rapidly in urine within 3 hr after the beginning of infusion. Urinary excretion rate of argipidine was 22.8% of the dose within 24 hr post-medication. Metabolites M-1, M-2 and M-3 were detected in the urine. Urinary excretion rates of M-1, M-2 and M-3 were 1.0%, 0.47% and 0.23%

of the dose, respectively.

Argipidine and M-1 were found in feces within 24 hr post-medication. Fecal excretion rates of unchanged drug and M-1 were 1.6~24.0% and 1.3~25.7% of the dose, respectively.

KEY WORDS

Argipidine, Metabolism (Human)

緒 言

Argipidine [(2*R*, 4*R*)-4-methyl-1-[*N*²-((*RS*)-3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-*L*-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid hydrate] (Fig. 1) は水に極めて溶けにくい白色の粉末状結晶であり、トロンビンによるフィブリン形成作用を極めて低濃度で阻害し¹⁾、動物実験においても静脈系血栓症や播種性血管内

凝固症候群モデル²⁾ および血小板に起因すると考えられる動脈系血栓症モデル³⁾ に対して有効性を示す薬物であり、臨床試験において脳血栓症急性期や慢性動脈閉塞症などへの有効性が期待されている化合物である。

別報において飯田らは⁴⁾、ラット、イヌおよびウサギに argipidine を静脈内投与したときの血中濃度推移、分布、代謝および排泄について検討し、argipidine は投与後速やかに血中から消失すること、組織内へ移行するが消失も速やかであること、肝において代謝され Fig. 2 に示す4種の代謝物 (M-1~M-4) を生成し、血漿中、尿中および糞中の主代謝物は M-1 であること、および尿、糞を介して速やかにかつほぼ完全に体外に排泄されること等を明らかにし報告した。

ヒトにおける argipidine の体内動態について

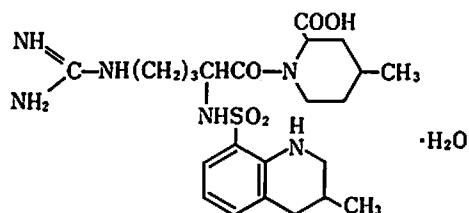


Fig. 1 Chemical structure of argipidine

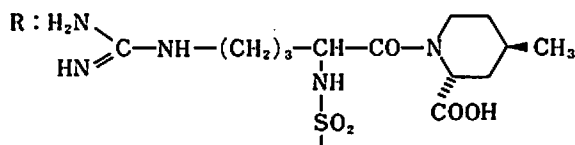
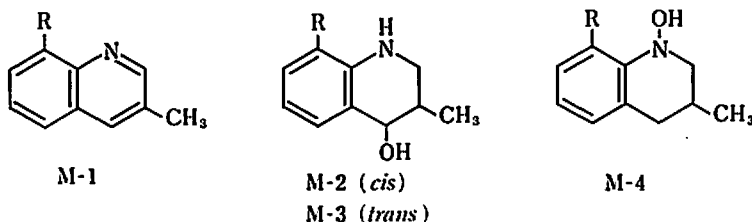


Fig. 2 Chemical structures of metabolites of argipidine

ては、長沢らが argipidine を点滴静脈内投与したときの未変化 argipidine の血漿中濃度推移と尿、糞中への排泄について報告している⁵⁾のみで、argipidine のヒトにおける体内動態の全容を解明するには至っていない。

今回著者らは、argipidine のヒトにおける体内動態をさらに明確にするため、健康成人男子に argipidine を点滴静脈内投与したときの、血漿、尿および糞中の代謝物について定量的に検討し、若干の知見を得たので報告する。

I 実験方法

1 被験者および試験スケジュール

被験者は Table 1 に示した健康成人男子 5 名で、試験実施前に健康診断を行い、理学的検査、血液検査、血液生化学的検査、尿検査および一般症状に異常所見のないことが確認された志願者である。また被験者には事前に本試験の目的および安全性について十分に説明し、試験への参加の同意書を得た。本試験のスケジュールを Table 2 に示した。

2 標品および試薬

1) Argipidine および M-1

Argipidine は Okamoto *et al.*¹⁾ に従い合成したものを、また、M-1 は別報⁶⁾ に従い合成したものをそれぞれ使用した。

2) M-2 および M-3

M-2 および M-3 は、別報⁶⁾ に準じて argipidine を NADPH 産生系共存下にラット肝 9000×g 上清と 30 min 好氣的にインキュベートし、生成した M-2、M-3 を標品とした。また、このインキュベーション混液に 2 倍量のメタノールを加え除タンパクした溶液を、M-2、M-3 の標準溶液とした。標準溶液中の M-2、M-3 の濃度は次のようにして規定した。まず、別報において飯田らが採取した ¹⁴C-argipidine 静脈内投与後のラット胆汁^{1a)}を、別項 (8 HPLC) に示した条件の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入し、M-2 および M-3 に相当するピークの高さを求め、かつ両代謝物に相当する部分の溶離液を分取して放射能を測定した。胆汁を採取するために投与した ¹⁴C-argipidine の比放射能から、胆汁中の

Table 1 Physical characteristics of volunteers

Subject	Age (y.)	Body weight (kg)
A	25	51
B	47	65
C	26	62
D	26	63
E	28	62
Mean	30.4	60.6
S.D.	9.3	5.5

Table 2 Time schedule of the study

Time	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	16:00	24:00
IV infusion	▨						
Physical examination	○	○	○	○	○	○	○
Clinical laboratory test	○	○	○	○	○	○	○
Blood sampling	○	○	○	○	○	○	○
Urine sampling	○	○	○	○	○	○	○
Feces sampling	○	○	○	○	○	○	○

M-2 および M-3 の濃度をそれぞれ計算した。次に、9000×g 上清とのインキュベーションにより得られた標準溶液を上記と同じ条件の HPLC に注入し、標準溶液中の M-2 および M-3 のピーク高さを求め、胆汁から得られた両代謝物のピーク高さとの比率から、標準溶液中の M-2 および M-3 の濃度を計算した。以上のようにして得られた標準溶液中の M-2 および M-3 の濃度はそれぞれ 11.6 nmol/ml および 22.2 nmol/ml であった。なお、標準溶液を 50%メタノール水で1~10倍の範囲に希釈したとき、標準溶液中の両代謝物のピーク高さは希釈倍率に依存した。

3) その他の試薬

9000×g 上清 (phenobarbital および 5,6-benzoflavone により前処理したもの、20.0 mg protein/ml), NADP および glucose-6-phosphate は Oriental 社より購入し使用した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品または最上級品を使用した。

3 投与薬および薬物の投与

投与薬液は argipidine 注射液 (0.5 mg/ml, 20 ml アンプル入り, Lot No. 3907, 三菱化成工業製造) の 18 ml を生理食塩液 (扶桑薬品工業) で 200 ml に希釈したもの (9 mg/200 ml) を用いた。この投与薬液を肘静脈より 300 μg/min の速度で 30 min 点滴静脈内投与した。

4 試料の採取

血液は点滴静脈内投与開始前 および 開始後 15, 30 (点滴終了時間), 35, 45, 60, 90, 120, 180, 240 min および 24 hr に、肘静脈より約 5 ml を採取した。採取した血液 (4.5 ml) はただちに 3.8% クエン酸ナトリウム水溶液 0.5 ml の入った試験管に移した後、3000 rpm で 10 min 遠心分離し血漿を得た。

尿は点滴開始前 3 hr および開始後 0~3 hr, 3~6 hr および 6~24 hr の間隔で採取し、尿量を測定した (80~1155 ml)。また糞は、点滴開始後 24 hr までを採取し、凍結乾燥 (MBM-6 型, 宮川科学資材) を行い、乾燥重量を正確に秤量 (19.7~37.5 g) 後、サンプルミル (MK

II 型, 共立理工) を用い粉碎した。なお、検量線作成のため、投与終了後10日目に各被験者から糞を再び採取した。

これらの試料は測定時まで -20°C で凍結保存した。

5 尿および糞中代謝物の検索

1) 尿中代謝物

点滴開始後 3 hr までの尿を代謝物の検索に用いた。尿はエキクロディスク13 (ゲルマン) でろ過したろ液の一部を、そのまま別項 (8 HPLC) に示した条件の HPLC に注入し、得られたクロマトグラムから代謝物を検索した。また、代謝物を濃縮するため、尿を Fig. 3 に従って20%エタノール含有クロロホルムで抽出した。抽出物を50%メタノール水に溶解し、その一部を上記と同条件の HPLC に注入して代謝物を検索した。なお、点滴開始前の尿も同様に処理し対照とした。

2) 糞中代謝物

点滴開始後 24 hr までの糞を代謝物の検索に用いた。糞は Fig. 3 に従って50%メタノール水抽出を行った。また、夾雑物を除くため50%メタノール水抽出物を SEP-PAK 処理後、さらにクロロホルム抽出を行った。得られた50%メタノール水抽出物およびクロロホルム抽出物はそれぞれ50%メタノール水に溶解し、その一部を別項 (8 HPLC) に示した条件の分光スペクトル検出器を接続した HPLC に注入し、クロマトグラムおよび代謝物と予想されるピークの紫外吸収 (UV) スペクトルを測定して代謝物を検索した。なお、代謝物検索の対照として、前項 (2-2) に従い argipidine とラット肝 9000×g 上清とをインキュベート後除タンパクした溶液を調製し、同条件の HPLC に注入後クロマトグラム および 代謝物の UV スペクトルを測定した。

6 Argipidine および代謝物の定量

血漿は Fig. 3 に従ってクロロホルム抽出を行った。尿および糞中の未変化 argipidine および代謝物は、前項の代謝物の検索実験と同様に Fig. 3 に準じて抽出操作を行った。得られ

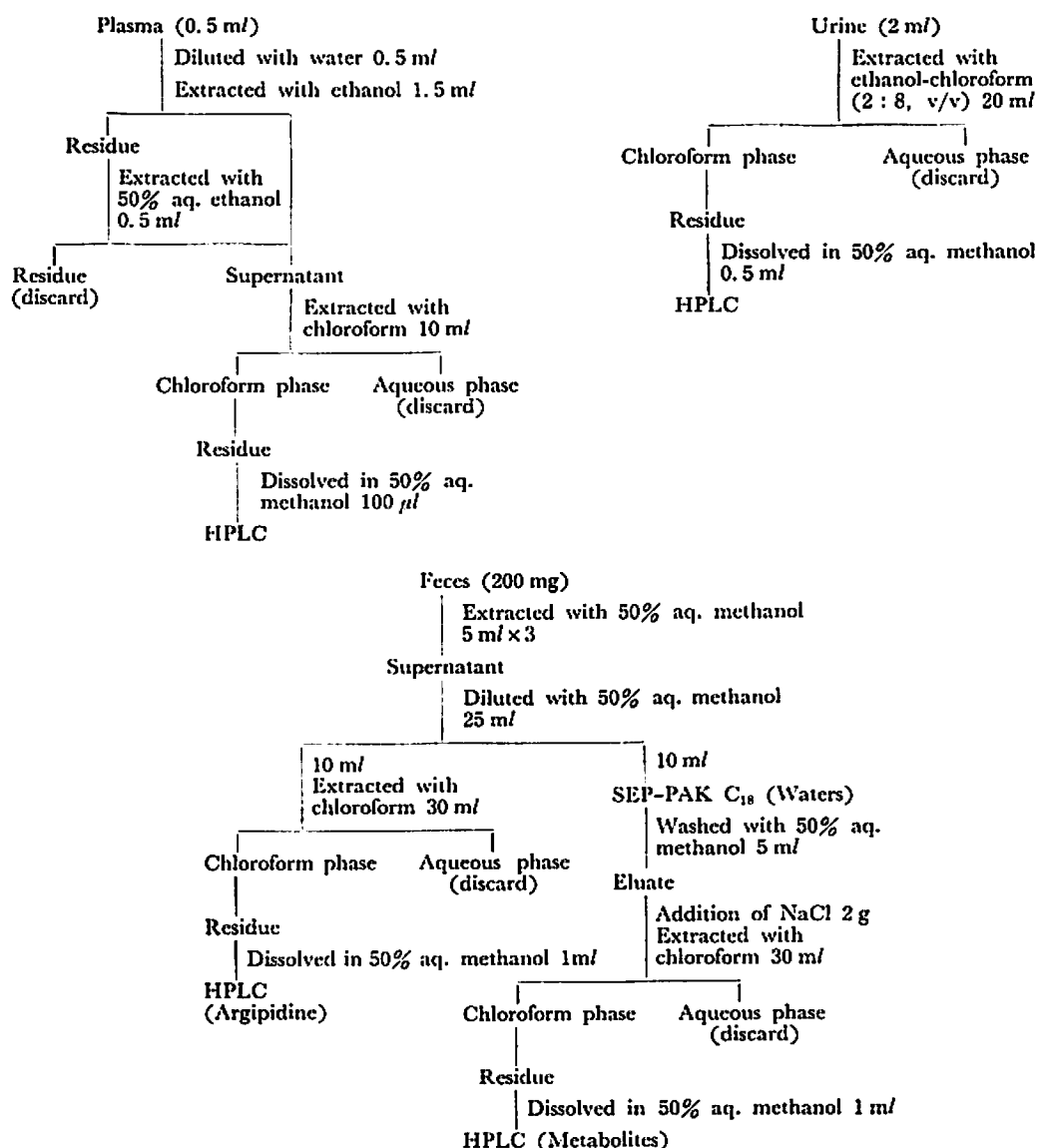


Fig. 3 Flow diagrams for the analysis of argipidine and its metabolites in plasma, urine and feces

たクロロホルムあるいは20%エタノール含有クロロホルム抽出液は 40°C において N₂ 気流下 (ジェットコンデンサーN型, 三田村理研) に溶媒を留去した後, 残渣を50%メタノール水 (0.1~1 ml) に溶解し分析試料とした。各分析試料の一部 (血漿 40 µl, 尿 25 µl (代謝物) または 50 µl (未変化 argipidine), 糞 50 µl) をそれぞれ別項 (8 HPLC) に示した条件の HPLC

に注入した。各試料中の未変化 argipidine, M-1, M-2 および M-3 の定量は HPLC クロマトグラムにおけるそれぞれのピーク高さを測定し, それぞれに対応する外部標準液のピーク高さとの比を求め, 以下に作成する検量線を用いて行った。

7 検量線の作成

Argipidine の標準溶液 (1~200 µg/ml, メタ

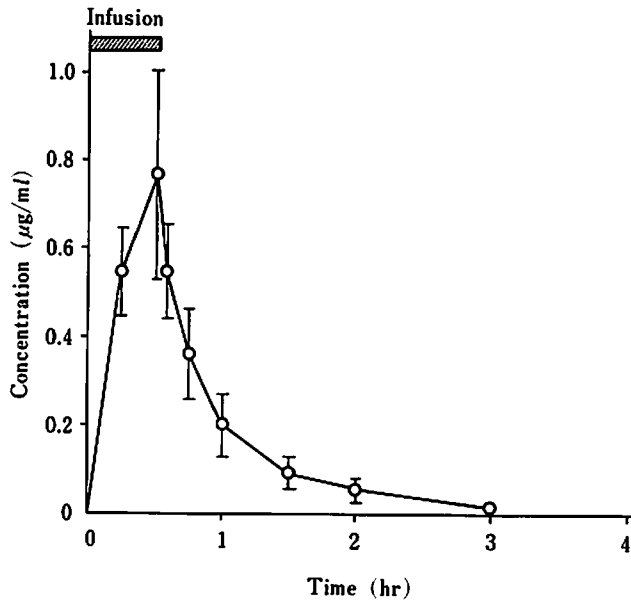


Fig. 4 Mean plasma levels of argipidine in male volunteers during and after intravenous infusion at the rate of 300 $\mu\text{g}/\text{body}/\text{min}$ for 30 min
Each point represents the mean $\pm$ S.D. ($n=5$)

ノール)を点滴開始前の血漿および尿,または点滴終了後10日目に採取した糞に適量添加し, **Fig. 3**の方法に従ってクロロホルムあるいは20%メタノール含有クロロホルムにより抽出した。得られた抽出液を N_2 ガス気流下(40 $^\circ\text{C}$)に溶媒を留去し,残渣は50%メタノール水1 mlに溶解後,別項(8 **HPLC**)に示す条件のHPLCに注入した。argipidineのピーク高さを測定し, argipidineの外部標準溶液(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50%メタノール水)とのピーク高さ比を計算し, argipidineの検量線を作成した。

同様にM-1の標準溶液(10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, メタノール)およびM-1の外部標準溶液(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50%メタノール水), M-2, M-3の標準溶液およびM-2, M-3の外部標準溶液(標準溶液を50%メタノール水で10倍に希釈した溶液)を用い, argipidineのそれらと同様に操作し, M-1およびM-2, M-3の検量線をそれぞれ作成した。なお, 血漿および糞中にはM-2およびM-3が検出されなかったことから, M-2,

M-3については尿に添加したときの検量線のみを作成した。

本分析法による血漿, 尿および糞における検出限界は, argipidineではそれぞれ0.02 nmol/ml(0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 0.04 nmol/mlおよび4 nmol/g, M-1ではそれぞれ0.09 nmol/ml, 0.22 nmol/mlおよび5 nmol/gであった。また, 尿におけるM-2およびM-3の検出限界は0.02 nmol/mlおよび0.05 nmol/mlであった。

8 HPLC

装置としてポンプに日立655型(日立製作所)を, インジェクターに日立638型サンプリングバルブ(日立製作所)を, 恒温槽にCTO-2 A型(島津製作所)を, 検出器にSPD-2 A型紫外検出器(島津製作所), HP 1040 A型分光スペクトル検出器(Hewlett Packard)または日立650-10 S型蛍光検出器(日立製作所)を, またポストカラム用送液ポンプとしてベリスタポンプmp-ge型(ISMATEC)を適宜組み合わせて使用した。

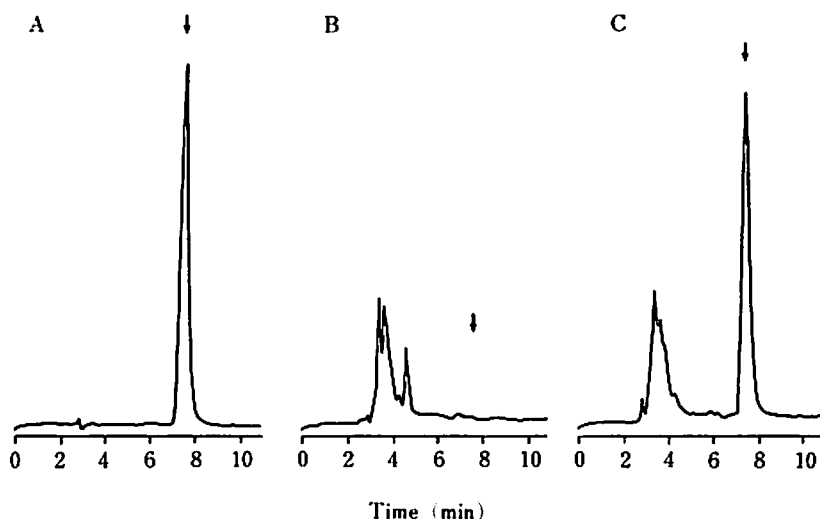


Fig. 5 Typical HPLC chromatograms of argipidine in human plasma extract
(A) External standard of argipidine ($2 \mu\text{g/ml}$), (B) Plasma collected from subject A before intravenous infusion of argipidine, (C) Plasma collected from subject A at 15 min after the beginning of infusion

HPLC condition: Column, Zorbax C_8 , $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ I.D.; Column temp., 50°C ; Mobile phase, methanol-water (65 : 35, v/v) containing PIC B-7; Flow rate, 1.0 ml/min ; Post column method, 1N sodium hydroxide is pumped at a rate of 0.32 ml/min ; Detection, fluorescence Ex 330 nm , Em 400 nm

カラムは Zorbax C_8 ($25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ I.D., Du Pont) を使用し、溶離液には 2.5 mM PIC B-7 (Waters) を含んだ $55 \sim 65\%$ メタノール水を用い、溶離はカラム温度 50°C で、流速 1 ml/min で行った。なお、溶離液のメタノール含量は、尿、糞中代謝物の検索では 55% および 65% 、未変化 argipidine の定量では 65% 、血漿および尿中代謝物の定量では 58% 、糞中代謝物の定量では 55% 、および M-2, M-3 の標準溶液中の M-2, M-3 濃度の測定では 58% とした。

検出は次のように行った。尿中代謝物の検索は UV 検出 (260 nm および 280 nm) および蛍光検出 (Ex 330 nm , Em 400 nm) で、糞中代謝物の検索は UV 検出 (260 nm および 280 nm)、蛍光検出 (Ex 330 nm , Em 400 nm) および分光スペクトル検出器による UV スペク

トル測定で、未変化 argipidine の定量は 1 N NaOH 水溶液を 0.32 ml/min の速度で加えるポストカラム法を用いた蛍光検出 (Ex 330 nm , Em 400 nm) で、M-1 の定量は UV 検出 (280 nm) で、および M-2, M-3 の定量は蛍光検出 (Ex 330 nm , Em 400 nm) でそれぞれ行った。ただし、標準溶液中の M-2, M-3 濃度の測定は UV 検出 (260 nm) で行った。

9 放射能の測定

^{14}C -argipidine 静脈内投与後の胆汁を HPLC により分取した溶離液は、 N_2 気流下 (40°C) に溶媒を留去し、xylene 系シンチレーター (ACS-II, Amersham) 15 ml を加え、放射能測定用試料とした。放射能は液体シンチレーションカウンタ (4530 型, Packard) にて測定した。クエンチングの補正は ^{226}Ra による外部標準線源法により行った。

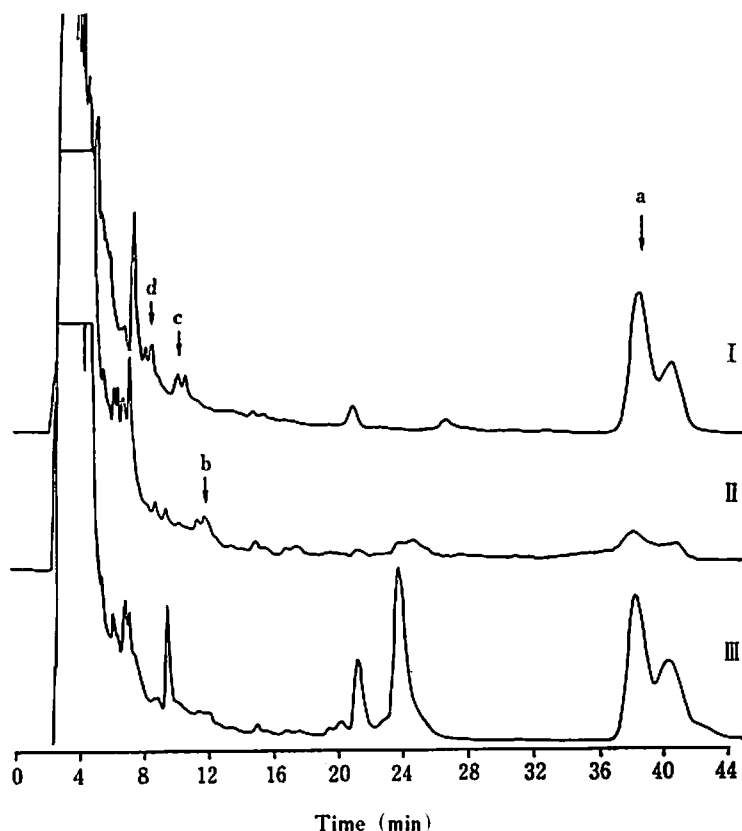


Fig. 6 Typical HPLC chromatograms of argipidine and its metabolites in human urine extract

Urine collected from subject A within 3 hr post-medication

Peak: a, argipidine; b, M-1; c, M-2; d, M-3

HPLC conditions: Column, Zorbax C_8 , 25 cm $\times$ 4.6 mm I.D.; Column temp., 50°C; Mobile phase, methanol-water (55 : 45, v/v) containing PIC B-7; Flow rate, 1.0 ml/min; Detection, (I) fluorescence Ex 330 nm, Em 400 nm, (II) UV 280 nm, (III) UV 260 nm

II 実験結果

1 血漿中濃度推移

健常成人男子5名にargipidineを300 μ g/minで30 min点滴静脈内投与(9 mg/body)したときの血漿中未変化argipidine濃度推移をFig. 4に、また血漿の代表的なHPLCクロマトグラムをFig. 5に示した。血漿中未変化argipidine濃度は点滴終了時に0.766 μ g/mlに達した後、 $t_{1/2\alpha}$ =6.7 minおよび $t_{1/2\beta}$ =39.8 minの半減期で速やかに消失し、投与開始後4

hrの血漿中には未変化argipidineは検出されなかった。また、血漿中にはいずれの測定時間においても、代謝物は検出されなかった(Fig. 5)。

2 尿および糞中代謝物の検索

健常成人男子5名にargipidineを300 μ g/minで30 min点滴静脈内投与(9 mg/body)したときの、点滴開始後3 hrまでに排泄された尿中代謝物を、点滴開始前の尿のHPLCクロマトグラムと比較することにより検索した。argipidine投与尿をそのまま注入したHPLC

Fig. 7

Typical HPLC chromatograms of argipidine and its metabolite M-1 in human fecal extract

Feces collected from subject A within 24hr post-medication

Peak: a, argipidine; b, M-1

HPLC conditions:

(I) Column, Zorbax C₈, 25 cm × 4.6 mm I.D.; Column temp., 50°C; Mobile phase, methanol-water (65 : 35, v/v) containing PIC B-7; Flow rate, 1.0 ml/min; Detection, fluorescence Ex 330 nm, Em 400 nm;

(II) Column, Zorbax C₈, 25 cm × 4.6 mm I.D.; Column temp., 50°C; Mobile phase, methanol-water (55 : 45, v/v) containing PIC B-7; Flow rate, 1.0 ml/min; Detection, UV 280 nm

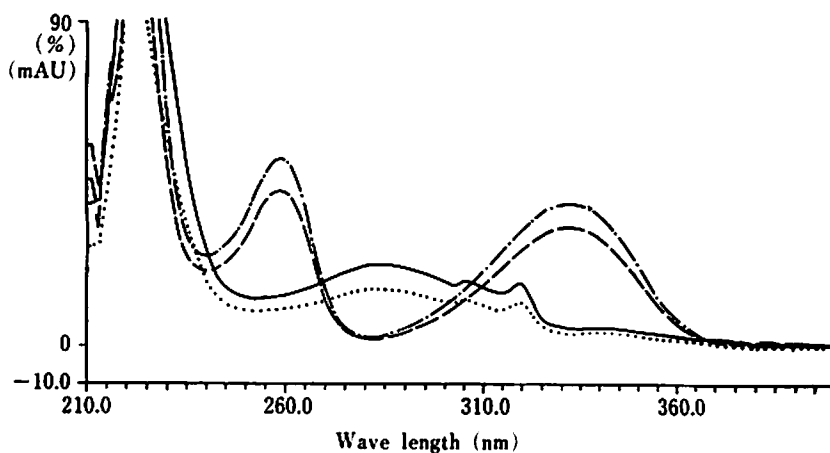
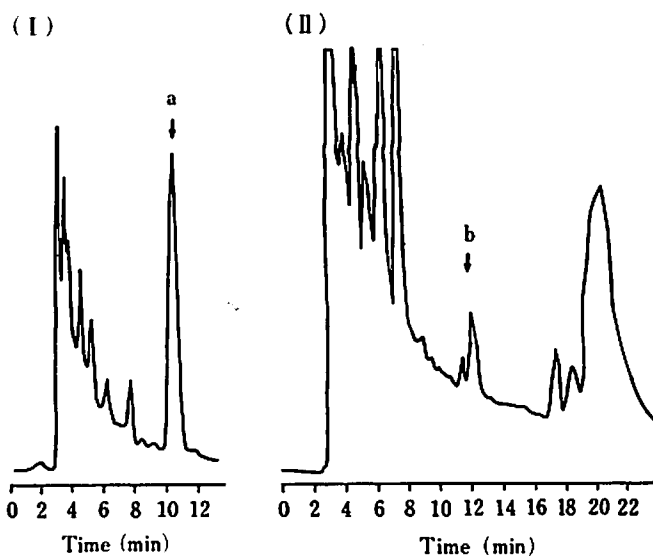


Fig. 8 UV spectra of argipidine and M-1 in human fecal extract and the incubation mixture of argipidine with rat liver 9000×g supernatant

----: Argipidine in human fecal extract, ---: Argipidine in the incubation mixture, —: M-1 in human fecal extract,: M-1 in the incubation mixture

The UV spectroscopy was performed with a HP 1040 A multichannel diode array uv/visible spectrophotometer

クロマトグラムからは、未変化argipidineのピーク以外に代謝物と予想されるピークは検出されなかった。また、Fig. 3に従って尿をクロロホルム抽出し、得られた抽出物のHPLCクロマトグラムからは、Fig. 6に示すように未

変化 argipidine の他に M-1, M-2 および M-3 が検出された。

同様に、argipidine 点滴開始後 24 hr までの糞中に排泄された代謝物を、argipidine と肝 9000×g 上清とのインキュベーション混液の

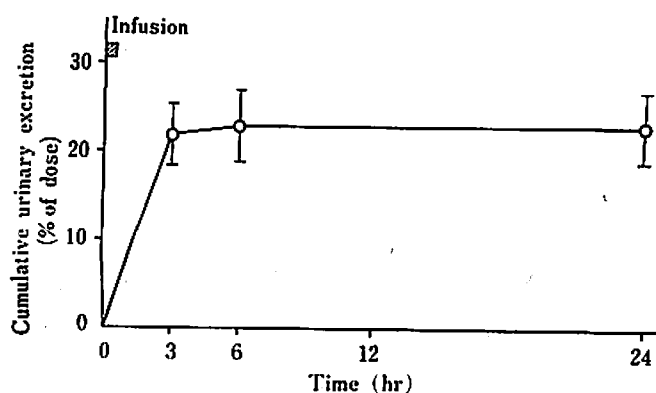


Fig. 9 Cumulative urinary excretion of argipidine in male volunteers after intravenous infusion of argipidine at the rate of 300 $\mu\text{g}/\text{body}/\text{min}$ for 30 min
Each point represents the mean $\pm$ S.D. ($n=5$)

Table 3 Urinary and fecal excretion of argipidine and its metabolites in male volunteers after intravenous infusion of argipidine at the rate of 300 $\mu\text{g}/\text{body}/\text{min}$ for 30 min

Subject	Percentage of excretion (% of dose) (0~24 hr)						Total
	Urine				Feces		
	Argipidine	M-1	M-2	M-3 ^{a)}	Argipidine	M-1	
A	21.4	0.96	0.50	0.24	24.0	18.7	65.8
B	23.9	1.15	0.44	0.25	21.1	17.5	64.3
C	26.6	0.88	0.71	0.28	1.6	2.4	32.5
D	25.7	1.57	0.54	0.00	3.9	1.3	33.0
E	16.6	0.46 ^{a)}	0.17	0.15	11.6	25.7	54.7
Mean	22.8	1.00	0.47	0.23	12.4	13.1	50.1
S.D.	4.0	0.40	0.20	0.06	10.0	10.8	16.4

^{a)} M-1 and M-3 in 3~6 hr urine were not detected by the presence of interfering peak in urine

HPLC クロマトグラムおよびその中の argipidine および代謝物 (M-1, M-2, M-3) の UV スペクトルと比較することにより検索した。糞を50%メタノール水で抽出して得られた抽出物の HPLC クロマトグラムでは、夾雑物による多数のピークが存在し、代謝物ピークは確認されなかった。また、50%メタノール水抽出物を Fig. 3 に従って SEP-PAK 処理後クロロホルム抽出を行い、得られた抽出物の HPLC クロマトグラムからは、Fig. 7 に示すように未変

化 argipidine の他に M-1 が検出され、M-2, M-3 は夾雑物による妨害ピークのため検出できなかった。Fig. 8 に示すようにクロロホルム抽出物中の argipidine および M-1 の UV スペクトルはインキュベーション混液中のそれらと完全に一致した。

3. 尿中排泄率

健康成人男子5名に argipidine を 300 $\mu\text{g}/\text{min}$ で 30 min 点滴静脈内投与 (9 mg/body) したとき、点滴開始後 24 hr までの尿中への

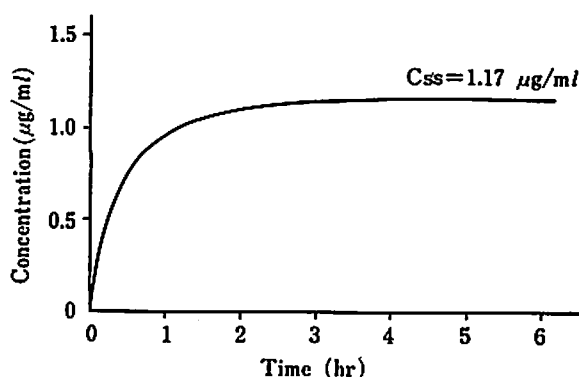


Fig. 10 Time course of simulated argipidine plasma concentrations in human during an infusion given at the rate of $300 \mu\text{g/body/min}$

Simulation curve is based on the equation of two compartment model using the parameters obtained from mean plasma levels of argipidine in Fig. 4

未変化 argipidine の累積排泄率を、投与量に対する割合として Fig. 9 に示した。未変化 argipidine は投与開始後 3 hr および 6 hr までにそれぞれ投与量の 21.8% および 22.8% が尿中に排泄され、6～24 hr の尿中には未変化 argipidine は検出されなかった。また Table 3 に示したように、点滴開始後 24 hr までの尿中に M-1, M-2 および M-3 がそれぞれ 1.00%, 0.47% および 0.23% 排泄された。なお、被験者 E の 3～6 hr 尿においては M-1 が、またすべての被験者の 3～6 hr 尿においては M-3 が、尿中の妨害ピークの存在のため測定できなかった。

4 糞中排泄率

健康成人男子 5 名に argipidine を $300 \mu\text{g/min}$ で 30 min 点滴静脈内投与したとき、点滴開始後 24 hr までの糞中への未変化 argipidine および M-1 の排泄率を、投与量に対する割合として Table 3 に示した。未変化 argipidine および M-1 は点滴開始後 24 hr までの糞中にそれぞれ投与量の 1.6～24.0% (平均 12.4%) および 1.3～25.7% (平均 13.1%) 排泄され、大きな個体差が認められた。被験者 C および D における未変化 argipidine および M-1 の糞中

排泄率は、被験者 A, B および E におけるそれらに比較し低値であった。

III 考 察

健康成人男子に argipidine を $300 \mu\text{g/min}$ で 30 min 点滴静脈内投与したとき、血漿中未変化 argipidine 濃度は点滴開始後速やかに上昇し、点滴終了時には $0.766 \mu\text{g/ml}$ に達した後、急速に消失した。この結果は長沢らが臨床第一相試験において報告している⁵⁾ 同条件の点滴静脈内投与時の血漿中未変化 argipidine 濃度推移と極めて類似するものであった。点滴継続中の血漿中未変化 argipidine 濃度は点滴開始後 15 min よりも 30 min においてより高い値を示し、血漿中未変化 argipidine 濃度がまだ定常状態に達していないものと推察された。そこで点滴静脈内投与後の血漿中未変化 argipidine の濃度推移が単回静脈内投与後のそれと変わらないものと仮定し、点滴終了後の血漿中未変化 argipidine 濃度推移を two compartment model に当てはめて、pharmacokinetic parameter を算出し、今回の投与量である $300 \mu\text{g/body/min}$ で点滴静脈内投与したときの投与継続中の血漿中未変化 argipidine 濃度を計算すると、Fig. 10

に示すような simulation curve が得られ、血漿中未変化 argipidine 濃度は 2~3 hr 点滴を継続することにより定常値に達するものと推察された。

第一相試験において長沢らは⁵⁾、点滴静脈内投与後 6 hr までの尿中および投与後 24 hr までの糞中に、未変化 argipidine が投与量の 15.5% および 14.0% 排泄されることを報告しているが、代謝物の有無およびその排泄率までは言及していない。そこで今回、第一相試験と同条件で argipidine をヒトに点滴静脈内投与し、投与後 3 hr までの尿および投与後 24 hr までの糞を用いて argipidine のヒトにおける代謝物を検索した。尿中には飯田らがラットおよびイスにおける代謝物として報告している⁴⁾ M-1, M-2 および M-3 が検出され、また糞中では未変化 argipidine のほかには M-1 のみが認められ、尿中で認められた M-2, M-3 は糞中の妨害ピークの存在により確認できなかった。また、尿、糞中にはラットおよびイスで報告された以外の代謝物は検出されず、argipidine のヒトにおける代謝経路は、ラットおよびイスにおけるそれと類似するものと推察された。

Argipidine 点滴開始後 3 hr までの尿中にすでに未変化 argipidine が投与量の 21.8% 排泄されており、この排泄率は上記の第一相試験の結果⁵⁾ およびラット、イスにおいて報告されている⁴⁾ argipidine 単回投与後 24 hr までの argipidine の尿中排泄率 (ラット: 7.0%, イス: 9.5%) よりも高い値を示した。一方、ヒトの投与後 24 hr までの尿中には、M-1, M-2 および M-3 がそれぞれ投与量の 1.0%, 0.5% および 0.2% 排泄され、これら排泄率はラット、イスにおいて報告された⁴⁾ それらとほぼ一致しており (ラット: 0.7%, 0.3% および 0.5%, イス: 0.6%, 0.5% および 0.5%), ヒトではラットおよびイスに比べ、argipidine は代謝を受けずにそのまま尿中へ排泄されやすいものと考えられた。

点滴静脈内投与後 24 hr までの糞中には、未変化 argipidine および M-1 が投与量の 1.6~

24.0% (平均 12.4%) および 1.3~25.7% (平均 13.1%) それぞれ排泄されており、大きな個体差が認められた。この個体差は、被験者 C, D において糞中への未変化 argipidine および M-1 の排泄量が少なかったことから、被験者 C, D における糞中への排泄が遅延したことによるものと考えられる。なお、argipidine および M-1 の糞中排泄率は、ラットおよびイスにおいて報告された⁴⁾ それら (ラット: 17.9% および 12.2%, イス: 21.9% および 9.1%) と類似していた。

点滴開始後 24 hr までの尿および糞中への未変化 argipidine および代謝物の総排泄率は、回収のよい被験者 A, B および E においては投与量の約 55~65% に達した。また、別報において飯田らは⁴⁾ ラットおよびイスの尿、糞中に、上記代謝物の他に構造は未定であるが極性の高い代謝物が存在することを報告しており、ヒトにおいても同様に極性の高い代謝物が排泄されていることが推察され、投与した argipidine の多くは投与後 24 hr 以内に体外へ排泄されるものと推察された。

要 約

健康成人男子 5 名に argipidine を 300 $\mu\text{g}/\text{min}$ の速度で 30 min 点滴静脈内投与したときの argipidine の体内動態について、血漿、尿および糞中の未変化 argipidine および代謝物濃度を HPLC 法で測定することにより検討した。

点滴開始後 30 min に、血漿中未変化 argipidine 濃度は最高値 (0.766 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に達し、投与終了後は半減期 6.7 min ($t_{1/2\alpha}$) および 39.8 min ($t_{1/2\beta}$) で速やかに消失した。

Argipidine は尿中に速やかに排泄され、点滴開始後 3 hr までに投与量の 21.8% が (未変化のまま) 排泄された。投与後 24 hr までには 22.8% であった。尿中には代謝物として M-1, M-2 および M-3 が検出され、それらの排泄率はそれぞれ投与量の 1.0%, 0.47% および 0.23% であった。

投与後 24 hr の糞中には argipidine および

M-1 が検出され、それらの排泄率はそれぞれ投与量の 1.6~24.0% および 1.3~25.7% であった。

文 献

- 1) Okamoto S., Hijikata A., Kikumoto R., Tonomura S., Hara H., Ninomiya K., Maruyama A., Sugano M. & Tamao Y.: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereostructure of its hydrophobic carboxamide portion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 440~446 (1981)
- 2) a) Hara H., Tamao Y., Kikumoto R. & Okamoto S.: Effect of a synthetic thrombin inhibitor, MCI-9038, on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits, *Thrombos. Haemos.* (投稿中)
b) 風間睦美, 安部 英, 木下忠俊, 中村一路, 松田重三, 内藤 巖, 鎌倉正英, 田原千枝子, 森岡真知子, 大串利弘, 吉村祐一, 川杉和夫, 小林国男, 小島龍行, 岡本一弘, 榎本昌伊, 飯島徳政: 実験 DIC の循環および凝血学的動態におよぼすヘパリンあるいは MD-805 の影響, DIC 調査研究班 昭和56年業績集 (1981), pp. 82~89
- 3) 生駒英信, 大津国幹, 玉尾嘉邦, 菊本亮二, 岡本彰祐: 新しい実験的動脈血栓症に対する強力な抗トロンビン剤 MCI-9038 の作用, 血管と脈管 **13**: 72~77 (1982)
- 4) a) 飯田成宇, 小松貞子, 岩本正人, 藤村義幸, 中井弘司, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (Ⅱ)—Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 分布, 代謝および排泄, 薬物動態 (投稿中)
b) 飯田成宇, 小松貞子, 平野孝明, 藤村義幸, 中井弘司, 北沢 憲, 熊谷由美子, 佐藤朋以, 林 公子, 井口富夫: イヌおよびウサギにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究—Argipidine 単回および連日静脈内投与時の血中濃度推移, 代謝, 排泄および蓄積性, 応用薬理 (投稿中)
- 5) 長沢 洋, 福武勝幸, 羽田雅夫, 高橋英二, 松原泰久, 佐守友博, 池松正次郎, 北原 武, 浮田 実, 藤巻道男, 福武勝博: 合成抗トロンビン剤 MD-805 の第一相試験—単回および連続投与試験, 臨床薬理 **12**: 359~375 (1981)
- 6) 飯田成宇, 小松貞子, 斎藤芳男, 佐藤恵子, 北沢 憲, 井口富夫, 殿村信二, 菊本亮二, 井澤修: ラットにおける Argipidine (MD-805) の体内動態に関する研究 (Ⅰ)—Argipidine の *in vivo* および *in vitro* 代謝, 薬物動態 (投稿中)

<ご寄稿のきまり>

- 本誌に関連する領域で、新薬の前臨床試験、各相臨床試験、および既存薬に関する再検討論文、ならびにシンポジウム講演録等を掲載します。
- 原稿は、編集会議にはかり、予定掲載号は、可及的速やかに文書によりお知らせします。
- 論文査読用として、原稿とともにコピーを1部添付してください。
- 原稿用紙の1枚目に、和・英両文で、表題、著者名、所属名を明記してください。
本誌は Excerpta Medica Database ならびに Abstract Journals のスクリーニングの対象誌に指定されています。英文アブストラクトのご執筆を歓迎します。
- 原稿は明瞭にお書きください。句読点等（、。：－・）は、なるべく1マスを用い、欧文は活字体で、大文字・小文字・イタリック体などの区別もはっきりお書きください。
- 図表等は、図1、表1、写真1のようにお書きください。
- 図・写真・表の原稿は、本文中に貼付けしないで、1枚ずつ別紙に貼付けてください。
- 参考・引用文献の表記は、本文の該当箇所の右側に 1,2,3,4 のように記し、本文末尾に、
1)…… 2)…… と一括して、次の順序でお書きください。

【雑誌】著者名：誌名 巻(号)：通巻ページ（発行年）

1) 塩川優一：薬理と治療 7(1)：3 (1979)

2) Fabre L.F. & Harris R.T.: *Curr. Ther. Res.* 16(9)：1010 (1974)

【書籍】著者名：書名、発行所（発行年）、ページ

論文投稿中の場合は投稿雑誌名を記入して下さい。

- 著者校正刷の送付先、所在地を書いて必ず原稿に添付してください。
- 別刷ご入用のときは実費（送料込み）で作製しますので、必要部数をあらかじめ原稿用紙に朱記してください。
- 欧文誌にご執筆の際の本誌からの引用文献表示には *Jpn. Pharmacol. Ther.*（本誌の国際登録誌名の Key Title）をご使用ください。

薬理と治療 (月刊)

昭和61年12月8日発行 ©1986

第14巻 臨時増刊 第5号

定価 1,500円 千 90円

前金購読料1ヵ年21,600円（千共）

（臨時号は別途）

【発行】ライフ・サイエンス出版株式会社

本社 東京都中央区京橋 2-5-10（マスカビル）

TEL. 03 (562) 2631 代表 千 104

支社 大阪市北区西天満 3-6-9（東宝ビル 311）

TEL. 06 (362) 6737 千 530

【印刷】三報社印刷株式会社