Difluprednate のイヌにおける慢性毒性試験

樋口 高裕, 倉島 康彰, 三井田均司, 樋口 守

三菱油化薬品株式会社・研究所

CHRONIC TOXICITY STUDY ON DIFLUPREDNATE IN DOGS

**Takahiro HIGUCHI, Yasuaki KURASHIMA,
Hitoshi MIIDA and Mamoru HIGUCHI**

Research Laboratory, Mitsubishi Yuka Pharmaceutical CO., Ltd.,

500, Wakaguri, Ami Machi, Inashiki-gun, Ibaraki, Japan

Accepted March 11, 1985

Abstract.....The chronic toxicity of a new topical glucocorticoid, difluprednate (DFBA) was studied in Beagle dogs. DFBA ointment (0.05%) was percutaneously treated to the back of dogs at daily doses of 125, 12.5 and 1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 6 months.

1. The local effects of DFBA

In the treated area, thinning of the skin and inhibition of the fur-growth were observed with scale and erythema. The skin showed histological atrophy of the epidermis, a decrease of the adipose tissue and atrophy of the adnexa. These changes returned to normal after the 2-month withdrawal period.

2. The systemic effects of DFBA

(1) In the 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group, the following changes were observed, although neither death nor severe symptoms occurred:

- a) General observations were seen an increase of water intake and urinary volume.
- b) A decrease of lymphocytes and eosinophils, and an increase of neutrophils were observed in the hematological examination.
- c) There were high sodium and low potassium levels, and an increase of alkaline phosphatase and γ -glutamyltranspeptidase activities in the biochemical examination.
- d) The organ weights showed a decrease of the thymus, adrenals, prostate and ovaries, and an increase of the liver and kidney.

e) An atrophy of the lymphatic tissues and adrenal cortex, retardation of the sexual maturation, glycogen deposit in the hepatic cells, slight degeneration of the renal tubuli, and slight thinning of the sternum and non-treated skin were noted in the pathological examination.

These changes returned to normal after the 2-month withdrawal period.

(2) In the 12.5 μ g/kg group, the atrophic changes in the thymus, adrenal and non-treated skin appeared slight.

(3) In the 1.25 μ g/kg group, no changes were found.

3. Conclusively, all the local and systemic changes observed by DFBA in this study were due to the already known pharmacological effects of glucocorticoids. It is considered that a 12.5 μ g/kg dosage is similar to a non-effect dose.

Key words : Difluprednate, glucocorticoid, chronic toxicity, dogs

緒 言

Difluprednate (6 α , 9 α -difluoroprednisolone-17-butyrate-21-acetate : DFBA) は Warner - Lambert 社 (米国) で合成された新規の外用 glucocorticoid である。DFBA は外用塗布によって強い抗炎症作用及び抗アレルギー作用を有していることが実験的に証明されており (高橋ら, 1985a), 臨床的にも湿疹・皮膚炎群・atopy 性皮膚炎・接触性皮膚炎・蕁麻疹等の諸種皮膚疾患に対して優れた効果が期待される。

他方, glucocorticoid は多様の生理活性を有することが知られていること (梅原ら, 1971, 田所, 1972, など), 外用塗布であってもその種類や使い方によっては皮膚の萎縮など局所的副作用のみならず副腎皮質機能の抑制など全身的副作用も発現するという報告があること (原田, 1984, 石原, 1984, 高野, 1984) から、DFBA の場合にも局所作用・全身作用が危惧される。

そこで、著者らは軟膏製剤化した DFBA を用いてイヌの皮膚に 6 ヶ月間連日塗布し、DFBA の投与局所への影響、併せて全身に及ぼす影響を観察した。また、2 ヶ月間の休薬期間を設け、得られた結果の回復性についても検討を加えた。

材料および方法

被験物質：

DFBA は分子量 508.57, m. p. 約 190°C の白色ないし微黄白色の結晶性粉末で、有機溶媒には溶けるが水に極めて溶けにくい性状を有し、室温下で長期間の安定性を示す。本試験では DFBA を 0.05% 含有する軟膏製剤 (軟膏基剤はワセリンが主体) を使用した。

DFBA の構造式を Fig. 1 に示す。

試験系：

5～6 ヶ月齢のビーグル犬 (富士アニマルファーム生産) を購入し、1 ヶ月間の馴化・検疫を経て、健康で発育順調な動物雄 20 頭、雌 20 頭を試験に供した。試験開始時の体重は雄 7.3～10.

Fig. 1 Chemical structure of DFBA.

8 kg, 雌 6.3～8.5 kg であった。

動物は温度：22±2℃，相対湿度：55±10%，照明時間：12時間の飼育室に個別飼いし，餌は犬用固型飼料 CD-5（日本クレア製）を1日1回雄 300 g，雌 250 g 与え，飲水には次亜塩素酸ソーダにより殺菌処理した井水を自由に摂取させた。

試験方法：

塗布量の設定に当たっては，塗布面をイヌが舐めないでかつ薬剤の影響が確実に得られることを勧告し，背肩甲間部を中心とする頸椎から胸椎部位までの背部皮膚を塗布部位としてまず限定した。体重 10 kg のイヌでは最大塗布面積が約 250 cm² と計測され，1 g の軟膏を 100 cm² の割合で塗布した場合に，軟膏量は 0.25 g/kg，DFBA の量は 125μg/kg となる。この 125μg/kg を高用量として設定し，以下公比 10 で減じた 12.5μg/kg（中用量），1.25μg/kg（低用量）の計 3 用量を DFBA の塗布群とした。さらに，DFBA の軟膏基剤を 0.25 g/kg (DFBA 高用量に相当する軟膏量) の割合で塗布する対照群を設けた。群構成を Table 1 に示す。なお，塗布期間中は 1 週に 1 度電気バリカンで除毛を行うと共に，温湯に浸したタオルで残存する前日の軟膏を可能な限り拭い去り，新たに塗布を繰返した。

検査項目を次に示す。

Table 1 Experimental design of percutaneous toxicity study in dogs with DFBA for 6 months

Drug	Group	Ointment volume (mg/kg)	Dose (μg/kg)	Treatment	No. of animals		Withdrawal	period (2M)
					period (6M)			
				Male	Female	Male	Female	
Base	Control	250	0	4	4	2	2	
0.05% DFBA ointment	Low dose	2.5	1.25	4	4	-	-	
	Middle dose	25	12.5	4	4	-	-	
	High dose	250	125	4	4	2	2	

塗布部位の観察

塗布部位の皮膚の状態を毎日観察（休日を除く）した。また、背肩甲間部の皮膚の厚さと1週間の被毛伸長を Harpenden Skin-fold Caliper (British Indicators 製) 及びノギス（三豊製）を用いて塗布開始前、塗布1, 3, 6ヵ月目及び休薬後に計測した。

一般観察

(1) 一般状態

一般症状は毎日（休日を除く）、体重・体温・心拍数・呼吸数の測定と心音・呼吸音の聴診は毎週、摂餌量と摂水量の測定は隔週に実施した。

(2) 尿検査

尿量は24時間蓄積尿として隔週に測定した。また、新鮮尿を用いて色調の観察、比重の測定（屈折計；アタゴ製）、pH・蛋白・糖・ケトン体・潜血・ビリルビン・ウロビリノーゲンの半定量検査（N-Multistix[®]；マイルス・三共製）及び尿沈渣（赤血球、白血球、上皮細胞、円柱、微生物、結晶）の鏡検を塗布開始前、塗布1, 3, 6ヵ月目及び休薬後に行った。さらに、塗布6ヵ月目及び休薬後には、24時間蓄積尿を用いてNa・K・Cl・クレアチン・クレアチニンを血液生化学的測定方法に準じて定量し、体重当りの1日総排泄量を算出した。

(3) 眼科的検査

眼の状態（角膜・結膜・鞏膜・虹彩）を肉眼的に観察すると共に、眼底カメラ（RC-2；興和製）により眼底検査を塗布開始前、塗布1, 3, 6ヵ月目及び休薬後に実施した。

(4) 心電図検査

ポータブル心電計（ECG-5303；日本光電製）を使用してA-B誘導及び標準肢誘導による心電図を塗布開始前、塗布1, 3, 6ヵ月目及び休薬後に記録した。

(5) 血圧測定検査

塗布6ヵ月目及び休薬後に、前腕部を用いて最大血圧及び最小血圧の測定を非観血的に無麻酔下で行った。

血液学的および血液生化学的検査

塗布開始前、塗布1, 3, 6ヵ月目及び休薬後、約20時間の絶食・無麻酔下に橈側皮静脈より血液を抗凝固剤（EDTA, citrate 及び heparin）を加えて採取し、3,000r. p. m., 15分間の遠心処理にて血漿を得た。また、胸骨を解剖の際に摘出し、骨髓組織を採取した。得られた全血、血漿あるいは骨髓組織を用いて Table 2 に示す項目を血液学的及び血液生化学的に検査した。

病理検査

塗布及び休薬終了時に、約20時間絶食させた動物を pentobarbital 麻酔下に総頸動脈より放血・致死させ、可及的速やかに解剖し、肉眼的に精査した。脳、下垂体、唾液腺（顎下腺）、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、精巣又は卵巣、前立腺又は子宮の重量を秤量し、体重に対する相対重量も算出した。全例の諸臓器を10%中性緩衝 formalin 溶液で固定し、常法に従って paraffin 切片となし、H. E. 染色標本を作製した。また、PAS 及び Azan 染色標本（肝臓、腎臓）、Oil red O 染色標本（肝臓、腎臓、副腎）も作製した。

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Table 2 Items and methods for hematological and biochemical examinations

Sample	Item	Abbreviation	Method
Blood	Red blood cell	RBC	Toa micro cell counter
	Hematocrit	Ht	Toa micro cell counter
	Hemoglobin	Hb	Toa micro cell counter
	Reticulocyte	Ret	Brecher's method
	Mean corpuscular volume	MCV	Computed from RBC & Ht
	Mean corpuscular hemoglobin	MCH	Computed from RBC & Hb
	Mean corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	Computed from Ht & Hb
	White blood cell	WBC	Toa micro cell counter
	Hemogram		May-Grünwald & Giemsa's stain
	Basophil	Baso	
	Eosinophil	Eos	
	Stab form leucocyte	Stab	
	Segmented leucocyte	Seg	
	Lymphocyte	Ly	
	Monocyte	Mon	
	Platelet	Plat	Toa platelet counter
	Myelogram		May-Grünwald & Giemsa's stain
Plasma	Prothrombin time	PT	Quick method
	Activated partial thromboplastin time	APTT	APTT method with elaidic acid
	Plasma recalcification time	PRT	Test tube method
	Blood sugar	BS	Enzyme
	Total protein	TP	Biuret
	Albumin	Alb	BCG
	Albumin. Globulin ratio	A/G	BCG
	Triglyceride	TG	Enzyme
	Total cholesterol	TC	Enzyme
	Phospholipid	PL	Enzyme
	Urea nitrogen	UN	Urease-Indophenol
	Uric acid	UA	Phosphotungstic acid.
	Creatine	CREAT	Jaffe
	Creatinine	CREATN	Jaffé
	Total bilirubin	TB	Modified Tendrassic-Gróf
	Glutamic oxaloacetic transaminase	GOT	U-V
	Glutamic pyruvic transaminase	GPT	U-V
	Lactate dehydrogenase	LDH	U-V
	Alkaline phosphatase	ALP	Kind-King
	r-Glutamyltranspeptidase	r-GTP	Modified Orłowski
	Creatine phosphokinase	CPK	Modified Nuttall-Wedin
	Sodium	Na	Flame photometric
	Potassium	K	Flame photometric
	Chloride	Cl	Thiocyanate
	Calcium	Ca	O-CPC
	Phosphate	P	Molybdenum oxide

DFBA の局所作用を検討するため、塗布部位の皮膚を病理組織学的に観察した。また、全身作用を検索する目的で、循環器系(心臓、大動脈)、造血器系(胸腺、脾臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、口蓋扁桃、大腿骨骨髓)、神経系(大脳、脳幹、小脳、脊髄、末梢神経、網膜、視神経)、内分泌系(下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、睪島)、呼吸器系(気管、気管支、肺)、消化器系(舌、顎下腺、耳下腺、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、胆嚢、脾臓)、泌尿器系(腎臓、膀胱)、生殖器系(精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺)、その他(胸骨、大腿骨、骨格筋、涙腺、腹部皮膚、異常部位)を組織学的に検討した。

塗布終了時の解剖の際に各群から雌雄2頭を選び、また、休薬終了時には全例から、副腎、肝臓及び腎臓を速かに摘出し、小片を2.5% glutaraldehyde 0.1 M, pH 7.4 リン酸緩衝液中で固定後、2% osmium tetroxide 0.1M, pH 7.4 リン酸緩衝液で再固定し、常法に従いエポキシ樹脂包埋・超薄切片を作製した。酢酸ウラン及び硝酸鉛染色を施し、電子顕微鏡(JEM-100CX II; 日本電子製)検査を行った。

統計処理

一元配置分散分析法により群間の差異を検索し、LSD 法により対照群と各 DFBA 塗布群の有意性を検定した。

結 果

塗布部位の観察

DFBA を塗布した全例に皮膚の鱗屑及び発赤が塗布期間中軽度に散見されたが、休薬後には観察されなかった。また、対照群を含む各群で皮膚の紅疹が塗布期間中しばしば見られ、出血斑・痂皮・膿疱などを一過性に伴う例も認められた。

塗布開始前の皮膚の厚さに対する割合とその推移を Fig. 2 に示す。

DFBA を塗布した動物は塗布を重ねるにつれて皮膚が薄くなり、塗布6ヵ月目には塗布開始前値に比べ雌雄共に約50%の減少が認められた。休薬後においては回復性を示し、雄では塗布開始前値を上回った。

被毛伸長の推移を Fig. 3 に示す。

DFBA 塗布群に塗布1ヵ月頃より被毛伸長の抑制が認められた。休薬後は回復傾向を示した。

一般観察

(1) 一般状態

塗布期間中、異常は何ら認められず、死亡の発現もなかった。

雌において初発情の有無を観察したところ、高用量群の全例で発情徴候を示さなかった。その他、高用量群の少数例で四肢、体幹部、眼周囲、耳等の皮膚に脱毛・紅疹・発赤、鱗屑などが複合する皮膚病変が散見された。

体重の推移を Fig. 4 に示す。

中用量群の雄及び高用量群の雌雄で体重増加の抑制傾向が軽度に認められたが、統計学的有意差は認められなかった。

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Fig. 2 Skin-thickness of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Fig. 3 Fur-growth of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Fig. 4 Body weight of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

体温・心拍数・呼吸数の測定及び心音・呼吸音の聴診では対照群及び各 DFBA 塗布群共に何ら異常は認められなかった。

摂餌量の推移を Fig. 5 に示す。

対照群と比較して、雌雄の各 DFBA 塗布群に摂餌量の減少は認められなかった。

摂水量の推移を Fig. 6 に示す。

雌雄共、高用量群において塗布初期より顕著な増加を示し、塗布終了時まで継続したが、休薬により速やかな回復を示した。

(2) 尿 検 査

尿量及び尿比重の推移を一括して Fig. 7 に示す。

雌雄の高用量群で塗布初期から尿色の淡調及び比重の低下を伴う顕著な尿量の増加が観察され、塗布終了時まで認められたが、休薬により速やかな回復を示した。

半定量検査及び尿沈渣の結果から塗布 6 ヶ月目に出現した変化を Fig. 8 に示す。

雌雄の高用量群で沈渣赤血球の出現が約半数に認められ、潜血反応が陽性を呈する例も見られた。Fig. 9 に示すように休薬後には異常が見られなかった。

尿定量検査では、雄の高用量群で塗布 6 ヶ月目に尿中 Na の排泄増加が認められた以外には、対照群と大差はなかった。

(3) 眼科的検査

高用量群の雌 1 例で塗布 6 ヶ月目に軽度の眼結膜の充血が見られた以外には肉眼的観察及び眼底検査で異常を示す所見は認められなかった。

(4) 心電図検査

雌雄の対照群及び各 DFBA 塗布群のいずれにも異常を示す所見は認められなかった。

(5) 血圧測定検査

対照群及び各 DFBA 塗布群の雌雄全例が異常値を示さなかった。

血液学のおよび血液生化学的検査

(1) 血液学的検査

塗布 6 ヶ月目の結果を一括して Table 3 に示す。

雄の中用量群及び雌雄の高用量群で Ht, Hb が有意な増加を示し、RBC が増加傾向であった。

また、WBC に差異は認められなかったが、hemogram において雌雄の高用量群で Ly・Eos の減少、Stab(雄は増加傾向)・Seg の増加、雄で Mon の増加を認めた。中用量群では雌に Eos の軽度の減少を認めたにすぎなかった。

高用量群に見られた Ly, Eos 及び好中球 (Neu: Stab と Seg) の変動に着目して塗布開始前からの経時的推移を Fig. 10 に示す。

図からも明らかな様に塗布を重ねるにつれて Ly, Eos が漸次減少し、Neu が増加した。これらは休薬後に回復を示した。

Myelogram においては、対照群と比較して DFBA 塗布群に差異は認められなかった。

(2) 血液生化学的検査

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Fig. 5 Food intake of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Fig. 6 Water intake of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Fig. 7 Urinary volume and specific gravity of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Fig. 8 Urinary findings of dogs treated percutaneously with DFBA for 6 months.

Fig. 9 Urinary findings of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Table 3 Hematological findings of dogs treated percutaneously with DFBA for 6 months

Sex	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	(n)	RBC ($10^3/\text{mm}^3$)	Ht (%)	Hb (g/dl)	Ret (‰)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)
Male	Control	(6)	725 $\pm$ 60	48.0 $\pm$ 3.0	16.4 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 1.0	66.3 $\pm$ 3.1	22.7 $\pm$ 2.4	34.3 $\pm$ 2.9	122 $\pm$ 25
	1.25	(4)	777 $\pm$ 41	50.2 $\pm$ 1.6	17.1 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 1.5	64.7 $\pm$ 2.5	22.1 $\pm$ 1.2	34.1 $\pm$ 2.3	116 $\pm$ 20
	12.5	(4)	808 $\pm$ 64	53.2 $\pm$ 4.0**	18.5 $\pm$ 0.6**	1.0 $\pm$ 0.8	65.8 $\pm$ 1.3	23.0 $\pm$ 1.9	34.9 $\pm$ 2.7	102 $\pm$ 24
	125	(6)	804 $\pm$ 48	55.8 $\pm$ 1.5**	18.2 $\pm$ 0.5**	3.0 $\pm$ 1.4	69.5 $\pm$ 3.3	22.7 $\pm$ 1.7	32.7 $\pm$ 1.1	91 $\pm$ 8
Female	Control	(6)	713 $\pm$ 36	43.2 $\pm$ 1.9	16.3 $\pm$ 0.9	1.7 $\pm$ 1.2	60.6 $\pm$ 1.4	22.9 $\pm$ 0.4	37.8 $\pm$ 0.9	90 $\pm$ 19
	1.25	(4)	701 $\pm$ 70	42.5 $\pm$ 2.7	16.1 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 1.7	60.7 $\pm$ 2.5	23.1 $\pm$ 1.6	38.0 $\pm$ 1.3	122 $\pm$ 42
	12.5	(4)	727 $\pm$ 70	44.9 $\pm$ 5.4	16.7 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 5.2	61.9 $\pm$ 1.5	23.1 $\pm$ 2.1	37.3 $\pm$ 3.0	104 $\pm$ 33
	125	(6)	835 $\pm$ 121	51.9 $\pm$ 6.1**	18.0 $\pm$ 0.8**	2.5 $\pm$ 1.6	62.4 $\pm$ 2.0	21.9 $\pm$ 2.8	35.0 $\pm$ 3.4	102 $\pm$ 34
Hemogram (%)							Plat	PT	APTT	PRT
Baso	Eos	Stab	Seg	Ly	Mon	($10^3/\text{mm}^3$)	(sec)	(sec)	(sec)	(sec)
0	6.5 $\pm$ 3.5	2.2 $\pm$ 1.5	60.3 $\pm$ 5.4	27.0 $\pm$ 4.5	4.0 $\pm$ 2.3	254 $\pm$ 58	7.2 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 0.5	51.7 $\pm$ 6.3	
0	10.0 $\pm$ 2.5	1.8 $\pm$ 1.5	56.5 $\pm$ 6.0	30.0 $\pm$ 5.5	1.8 $\pm$ 0.5	299 $\pm$ 43	7.0 $\pm$ 0.1	12.7 $\pm$ 0.4	52.6 $\pm$ 5.1	
0	8.3 $\pm$ 5.3	3.8 $\pm$ 2.4	59.0 $\pm$ 4.3	24.5 $\pm$ 2.5	4.5 $\pm$ 1.0	283 $\pm$ 26	6.9 $\pm$ 0.4	13.4 $\pm$ 0.8	51.7 $\pm$ 0.5	
0	0.8 $\pm$ 1.6**	5.2 $\pm$ 3.5	74.8 $\pm$ 5.3**	11.2 $\pm$ 3.9**	8.0 $\pm$ 2.0**	335 $\pm$ 67	6.8 $\pm$ 0.5	12.5 $\pm$ 1.1	47.0 $\pm$ 9.3	
0	8.0 $\pm$ 4.0	1.3 $\pm$ 1.2	56.2 $\pm$ 7.5	30.7 $\pm$ 8.3	3.8 $\pm$ 2.0	281 $\pm$ 39	6.8 $\pm$ 0.3	11.9 $\pm$ 1.0	42.5 $\pm$ 8.6	
0	4.5 $\pm$ 2.1	1.0 $\pm$ 0.8	62.8 $\pm$ 7.7	27.0 $\pm$ 8.5	4.8 $\pm$ 3.3	265 $\pm$ 16	7.2 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 1.3	39.4 $\pm$ 4.0	
0	3.0 $\pm$ 2.6**	4.0 $\pm$ 1.4	64.5 $\pm$ 4.8	24.8 $\pm$ 5.7	3.8 $\pm$ 0.5	304 $\pm$ 62	6.8 $\pm$ 0.1	12.4 $\pm$ 0.7	43.9 $\pm$ 5.0	
0	0.2 $\pm$ 0.4**	6.0 $\pm$ 4.5**	77.3 $\pm$ 6.1**	12.3 $\pm$ 5.9**	4.2 $\pm$ 2.1	348 $\pm$ 58	6.7 $\pm$ 0.2	12.6 $\pm$ 1.4	45.8 $\pm$ 7.2	

*, **; Significantly different from control $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

Mean $\pm$ S. D.

塗布 6 ヶ月目の結果を一括して Table 4 に示す。

高用量群で統計学的有意差が出現した項目は、雌雄において ALP・ γ -GTP の上昇、CREAT・CREATN・K の減少、雄に Alb・TG・LDH・CPK の上昇及び Cl の減少、雌に GOT の低下と Na の増加であった。これらのうち、Alb の増加は TP 及び A/G に動きがなく軽微な変動であった。その他、統計学的に有意ではなかったが、雌雄で UN の減少傾向が見られた。

中用量群では雌に K の減少が認められたにすぎなかった。

高用量群で変動が見られた項目について、塗布開始前からの経時的な推移を Fig. 11 に一括する。

ALP・ γ -GTP の上昇、CREAT・CREATN の減少は雌雄共に塗布 1 ヶ月目より経時的にも明らかに認められた。これらの変動は休薬により回復性を示した。一方、UN, TG, GOT, LDH, CPK については、対照群の推移と比較して明らかではなかった。電解質関連では、Na の増加及び K の減少が雌雄共に塗布 1 ヶ月目より認められ、休薬により回復性を示した。

病理検査

(1) 剖検所見及び臓器重量

主要な肉眼所見を Table 5 に示す。

Fig. 10 Ly, Eos and Neu ratio of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

Table 4 Biochemical findings of dogs treated percutaneously with DFBA for 6 months

Sex	Dose (μ g/kg)	BS (n)	TP (mg/dl)	Alb (g/dl)	A/G	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	PL (mg/dl)	UN (mg/dl)	UA (mg/dl)	CREAT (mg/dl)	CREATN (mg/dl)	
Male	Contron	(6)	97 $\pm$ 3	6.0 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.2	0.88 $\pm$ 0.04	33 $\pm$ 6	145 $\pm$ 12	308 $\pm$ 19	12.2 $\pm$ 1.4	0.50 $\pm$ 0.00	1.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1
	1.25	(4)	96 $\pm$ 4	6.0 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.2	0.93 $\pm$ 0.10	35 $\pm$ 3	143 $\pm$ 8	305 $\pm$ 10	10.5 $\pm$ 0.5	0.60 $\pm$ 0.12	1.9 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2
	12.5	(4)	94 $\pm$ 9	6.2 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.1	0.88 $\pm$ 0.12	36 $\pm$ 6	151 $\pm$ 9	314 $\pm$ 3	10.9 $\pm$ 1.0	0.60 $\pm$ 0.12	1.6 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
	125	(6)	99 $\pm$ 5	6.4 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.1**	0.94 $\pm$ 0.11	47 $\pm$ 6**	162 $\pm$ 29	333 $\pm$ 59	9.1 $\pm$ 2.9	0.62 $\pm$ 0.13	0.9 $\pm$ 0.2**	0.3 $\pm$ 0.1**
Female	Control	(6)	94 $\pm$ 7	6.3 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.1	0.89 $\pm$ 0.12	37 $\pm$ 5	193 $\pm$ 58	377 $\pm$ 95	13.6 $\pm$ 2.4	0.63 $\pm$ 0.10	1.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
	1.25	(4)	90 $\pm$ 7	6.1 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.1	1.00 $\pm$ 0.13	40 $\pm$ 5	163 $\pm$ 14	332 $\pm$ 20	13.1 $\pm$ 1.9	0.55 $\pm$ 0.10	1.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
	12.5	(4)	96 $\pm$ 7	6.1 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.1	0.93 $\pm$ 0.08	41 $\pm$ 2	185 $\pm$ 39	389 $\pm$ 87	10.3 $\pm$ 1.7	0.65 $\pm$ 0.10	1.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
	125	(6)	97 $\pm$ 5	6.2 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	0.96 $\pm$ 0.08	43 $\pm$ 7	164 $\pm$ 37	331 $\pm$ 75	9.0 $\pm$ 4.2	0.57 $\pm$ 0.10	1.0 $\pm$ 0.2**	0.3 $\pm$ 0.1**
TB (mg/dl)	GOT (K-U)	GPT (K-U)	LDH (U)	ALP (KA-U)	r-GTP (mU/ml)	CPK (IU)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Ca (mEq/l)	P (mg/dl)		
0.2 $\pm$ 0.2	30 $\pm$ 2	29 $\pm$ 3	97 $\pm$ 21	4.3 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 0.9	18.0 $\pm$ 3.2	148 $\pm$ 2	4.1 $\pm$ 0.2	110.4 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2		
0.1 $\pm$ 0.0	32 $\pm$ 2	37 $\pm$ 11	95 $\pm$ 13	3.1 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.0	17.9 $\pm$ 5.1	149 $\pm$ 1	4.3 $\pm$ 0.2	109.7 $\pm$ 0.7	5.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2		
0.1 $\pm$ 0.0	28 $\pm$ 4	32 $\pm$ 4	97 $\pm$ 6	3.4 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 1.3	17.4 $\pm$ 2.1	149 $\pm$ 1	4.2 $\pm$ 0.1	111.1 $\pm$ 1.4	5.1 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.6		
0.1 $\pm$ 0.1	27 $\pm$ 5	26 $\pm$ 5	126 $\pm$ 18**	10.7 $\pm$ 2.6**	11.6 $\pm$ 1.4**	25.0 $\pm$ 6.1*	150 $\pm$ 2	3.5 $\pm$ 0.3**	106.1 $\pm$ 2.3**	5.1 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.6		
0.2 $\pm$ 0.1	27 $\pm$ 5	25 $\pm$ 4	99 $\pm$ 15	5.4 $\pm$ 1.5	3.8 $\pm$ 0.6	20.5 $\pm$ 10.0	146 $\pm$ 1	4.3 $\pm$ 0.2	109.5 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2		
0.1 $\pm$ 0.0	28 $\pm$ 4	26 $\pm$ 5	90 $\pm$ 11	4.5 $\pm$ 1.5	3.8 $\pm$ 0.6	20.0 $\pm$ 3.2	147 $\pm$ 1	4.0 $\pm$ 0.2	111.0 $\pm$ 1.7	5.3 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.3		
0.1 $\pm$ 0.1	24 $\pm$ 5	21 $\pm$ 2	116 $\pm$ 25	4.8 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.9	22.4 $\pm$ 6.4	148 $\pm$ 1	3.9 $\pm$ 0.2*	110.5 $\pm$ 1.7	5.3 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.3		
0.1 $\pm$ 0.0	17 $\pm$ 2**	21 $\pm$ 7	88 $\pm$ 9	13.6 $\pm$ 5.2**	10.9 $\pm$ 2.3**	16.4 $\pm$ 2.2	153 $\pm$ 5**	3.9 $\pm$ 0.1**	109.4 $\pm$ 4.9	5.2 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.9		

*, **; Significantly different from control P<0.05 and P<0.01, respectively

Mean±S. D.

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Fig. 11 Biochemical findings of dogs in 6-month treatment with DFBA percutaneously and 2-month withdrawal.

胸腺及び副腎の萎縮が雌雄共に中用量群から用量に依存して認められ、高用量群ではより著しい変化を示した。高用量群の胸腺では全例が退縮・消失を示し、脂肪織に置き換わっていた。副腎でも対照群の約1/3の大きさとなり、剖面は皮質の萎縮が明瞭であった。その他、雌雄の高用量群でリンパ節・口蓋扁桃の萎縮、肝臓の腫大、腎臓表面の不整が観察され、前立腺及び卵巣・子宮が対照群に比較して小さかった。

休薬後における剖検では、胸腺は対照群でも退縮・消失が認められ、回復の検討はできなかったが、他の臓器は回復あるいは回復傾向を示した。

臓器重量を Table 6-1 と 6-2 に示す。

胸腺及び副腎の実重量と相対重量の減少が雌雄共に中用量群から認められ、高用量群ではより顕著であった。さらに、高用量群では雌雄において肝臓の実重量・相対重量の増加及び腎臓の実重量・相対重量の増加が認められ、雄に顎下腺の増加傾向と前立腺の減少、雌に卵巣の減少と子宮の減少傾向が認められた。

Table 5 Macroscopical findings of dogs treated percutaneously with DFBA for 6 months and followed by a withdrawal period for 2 months

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		Control		1.25		12.5		125	
Sex		M	F	M	F	M	F	M	F
No. of animals		4	4	4	4	4	4	4	4
		(2)*	(2)					(2)	(2)
Atrophy or undergrowth									
Thymus	+++	0	0	0	0	3	3	0	0
		(1)	(0)					(0)	(0)
	D**	0	0	0	0	0	0	4	4
		(0)	(2)					(2)	(2)
Submaxillary lymph node	+	0	0	0	0	0	0	4	4
		(0)	(0)					(0)	(0)
Mesenteric lymph node	+	0	0	0	0	0	0	1	4
		(0)	(0)					(0)	(0)
Palatine tonsil	+	0	0	0	0	0	0	3	3
		(0)	(0)					(0)	(0)
	++	0	0	0	0	0	0	1	1
		(0)	(0)					(0)	(0)
Adrenal	+	0	0	0	0	3	2	0	0
		(0)	(0)					(2)	(2)
	++	0	0	0	0	0	0	3	2
		(0)	(0)					(0)	(0)
	+++	0	0	0	0	0	0	1	2
		(0)	(0)					(0)	(0)
Testis	+	0		0		0		1	
		(0)						(0)	
Prostate	+	0		0		0		3	
		(1)						(1)	
	++	0		0		0		1	
		(0)						(0)	
Ovary	+		1		0		0		4
			(0)						(0)
Uterus	+		0		0		0		4
			(0)						(0)
Swelling of liver	+	0	0	0	0	0	0	4	3
		(0)	(0)					(1)	(0)
Irregular surface of kidney	+	0	0	0	0	0	0	3	2
		(0)	(0)					(1)	(1)
	++	0	0	0	0	0	0	1	0
		(0)	(0)					(0)	(0)

* ; No. of withdrawal animals

** ; Disappearance in the thymus

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Table 6-1 Organ weights of dogs treated percutaneously with DFBA for 6 months and followed by a withdrawal period for 2 months

Sex	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	Month	(n)	² BW	Brain	Hypoph- -ysis	Salivary glands	Thyroids	Thymus	Heart	Lungs
Male	Control	6	(4)	³ A)10.6 $\pm$ 1.0	72 $\pm$ 4	48 $\pm$ 8	11.4 $\pm$ 1.6	0.70 $\pm$ 0.10	3.4 $\pm$ 0.2	88 $\pm$ 9	76 $\pm$ 5
				⁴ R) -	69 $\pm$ 5	46 $\pm$ 7	10.9 $\pm$ 1.6	0.66 $\pm$ 0.12	3.2 $\pm$ 0.3	83 $\pm$ 7	72 $\pm$ 8
		¹ W	(2)	A)10.8 $\pm$ 1.1	72 $\pm$ 2	61 $\pm$ 6	12.4 $\pm$ 1.5	0.58 $\pm$ 0.16	2.9 $\pm$ 2.4	94 $\pm$ 6	72 $\pm$ 8
				R) -	68 $\pm$ 5	57 $\pm$ 0	11.6 $\pm$ 2.6	0.55 $\pm$ 0.20	2.6 $\pm$ 2.0	87 $\pm$ 3	68 $\pm$ 14
	1.25	6	(4)	A)11.2 $\pm$ 0.8	71 $\pm$ 2	59 $\pm$ 11	12.2 $\pm$ 2.4	0.68 $\pm$ 0.13	5.1 $\pm$ 1.1**	91 $\pm$ 11	81 $\pm$ 10
				R) -	64 $\pm$ 4	53 $\pm$ 6	10.9 $\pm$ 1.6	0.61 $\pm$ 0.09	4.5 $\pm$ 0.8	81 $\pm$ 7	73 $\pm$ 8
	12.5	6	(4)	A) 9.8 $\pm$ 1.2	76 $\pm$ 1*	57 $\pm$ 4	10.9 $\pm$ 1.5	0.60 $\pm$ 0.06	1.3 $\pm$ 0.8**	85 $\pm$ 6	74 $\pm$ 8
				R) -	79 $\pm$ 9	59 $\pm$ 6	11.1 $\pm$ 0.4	0.62 $\pm$ 0.08	1.3 $\pm$ 0.9**	88 $\pm$ 11	76 $\pm$ 4
	125	6	(4)	A)10.4 $\pm$ 1.5	70 $\pm$ 3	52 $\pm$ 13	15.2 $\pm$ 4.0	0.77 $\pm$ 0.22	0.0 $\pm$ 0.0**	81 $\pm$ 8	71 $\pm$ 6
				R) -	69 $\pm$ 8	50 $\pm$ 12	14.5 $\pm$ 2.3**	0.73 $\pm$ 0.15	0.0 $\pm$ 0.0**	79 $\pm$ 6	69 $\pm$ 14
		W	(2)	A)10.4 $\pm$ 0.9	79 $\pm$ 3	67 $\pm$ 14	12.7 $\pm$ 0.1	0.89 $\pm$ 0.20	0.0 $\pm$ 0.0	87 $\pm$ 9	85 $\pm$ 2
				R) -	76 $\pm$ 9	65 $\pm$ 19	12.2 $\pm$ 0.9	0.87 $\pm$ 0.26	0.0 $\pm$ 0.0	85 $\pm$ 15	82 $\pm$ 5
Female	Control	6	(4)	A) 8.5 $\pm$ 0.6	69 $\pm$ 3	59 $\pm$ 6	10.1 $\pm$ 1.1	0.62 $\pm$ 0.14	4.8 $\pm$ 2.3	68 $\pm$ 6	67 $\pm$ 7
				R) -	82 $\pm$ 7	69 $\pm$ 6	11.9 $\pm$ 1.4	0.72 $\pm$ 0.17	5.7 $\pm$ 2.8	80 $\pm$ 12	79 $\pm$ 4
		W	(2)	A) 8.8 $\pm$ 0.5	64 $\pm$ 0	62 $\pm$ 28	9.5 $\pm$ 2.2	0.49 $\pm$ 0.02	0.0 $\pm$ 0.0	66 $\pm$ 2	53 $\pm$ 2
				R) -	73 $\pm$ 4	70 $\pm$ 28	10.8 $\pm$ 1.9	0.56 $\pm$ 0.01	0.0 $\pm$ 0.0	76 $\pm$ 2	61 $\pm$ 6
	1.25	6	(4)	A) 8.5 $\pm$ 0.4	70 $\pm$ 1	60 $\pm$ 9	12.0 $\pm$ 2.6	0.54 $\pm$ 0.08	3.3 $\pm$ 0.6	73 $\pm$ 5	67 $\pm$ 7
				R) -	83 $\pm$ 4	71 $\pm$ 10	14.0 $\pm$ 2.6	0.64 $\pm$ 0.12	3.9 $\pm$ 0.8	86 $\pm$ 6	79 $\pm$ 8
	12.5	6	(4)	A) 8.0 $\pm$ 0.9	66 $\pm$ 4	45 $\pm$ 9	9.1 $\pm$ 0.7	0.55 $\pm$ 0.08	1.5 $\pm$ 1.2**	68 $\pm$ 4	62 $\pm$ 4
				R) -	83 $\pm$ 7	56 $\pm$ 12	11.4 $\pm$ 1.2	0.69 $\pm$ 0.08	1.8 $\pm$ 1.4**	86 $\pm$ 7	78 $\pm$ 6
	125	6	(4)	A) 8.3 $\pm$ 0.8	67 $\pm$ 4	54 $\pm$ 12	10.5 $\pm$ 2.0	0.45 $\pm$ 0.11	0.0 $\pm$ 0.0**	69 $\pm$ 12	63 $\pm$ 8
				R) -	81 $\pm$ 4	65 $\pm$ 9	12.7 $\pm$ 2.2	0.55 $\pm$ 0.14	0.0 $\pm$ 0.0**	84 $\pm$ 9	77 $\pm$ 15
		W	(2)	A) 8.2 $\pm$ 0.5	60 $\pm$ 1*	60 $\pm$ 8	11.3 $\pm$ 1.4	0.54 $\pm$ 0.01	0.0 $\pm$ 0.0	69 $\pm$ 7	63 $\pm$ 5
				R) -	74 $\pm$ 3	73 $\pm$ 14	14.0 $\pm$ 2.6	0.66 $\pm$ 0.03	0.0 $\pm$ 0.0	85 $\pm$ 4	77 $\pm$ 1

¹W; Withdrawal period for 2 months

Mean $\pm$ S. D.

²BW; Final body weight (kg)

³A; Absolute organ weights show grams except hypophysis (mg)

⁴R; Relative organ weights show g/10 kg BW except hypophysis (mg/10 kg BW)

*, **; Significantly different from control $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

(2) 病理組織学的検査

主要な病理組織学的所見を Table 7-1 と 7-2 に示す。

塗布部位の皮膚では、DFBA 塗布群に表皮・皮膚付属器官の萎縮及び皮下脂肪組織の減少が観察された (Photo 1)。休薬例では対照群と差異がなかった。

諸臓器に対する影響としては、造血器系のリンパ組織を有する器官；胸腺・脾臓・下顎リンパ節・腸間膜リンパ節・口蓋扁桃，内分泌系の下垂体・副腎，消化器系の肝臓・胆嚢，泌尿器系の腎臓，生殖器系の前立腺・卵巣・子宮・陰・乳腺，その他胸骨及び腹部の皮膚の変化であった。

Table 6-2 Continued

Sex	Dose (μg/kg)	Month	(n)	^a BW	Liver	Spleen	Pan- creas	Kidneys	Adrenals	Testes & Ovaries	Prostate & Uterus
Male	Control	6	¹¹ W	^a A)10.6±1.0	272±29	27±3	23±5	45± 8	0.98±0.16	16.2±3.9	6.8±1.3
				^a R) —	259±22	26±3	22±3	42± 7	0.93±0.10	15.2±2.7	6.4±1.0
				(2) A)10.8±1.1	259±21	28±3	27±1	49±13	0.89±0.09	15.1±4.5	5.7±3.8
				R) —	241± 4	27±5	26±1	45± 8	0.83±0.17	13.9±2.8	5.1±3.0
	1.25	6	(4)	A)11.2±0.8	254±13	28±5	24±2	52± 4	0.90±0.08	17.0±2.3	5.9±0.8
				R) —	227±16	25±3	22±3	46± 2	0.80±0.10	15.1±1.5	5.3±0.9
	12.5	6	(4)	A) 9.8±1.2	253±29	24±4	22±3	52± 6	0.58±0.10**	13.8±1.9	7.8±2.3
				R) —	257±10	25±2	23±5	53± 8*	0.60±0.09	14.2±2.3	8.0±2.4
	125	6	W	A)10.4±1.5	450±76**	29±7	24±1	62± 5**	0.35±0.06**	12.6±2.1	3.9±0.8*
				R) —	435±41**	28±6	24±3	61± 8**	0.35±0.11**	12.5±3.4	3.9±1.1*
				(2) A)10.4±0.9	298±27	28±3	22±4	58± 6	0.63±0.06	16.3±0.5	5.9±2.1
				R) —	286± 3**	27±0	21±2	55± 1	0.61±0.10	15.7±0.8	5.6±1.6
Female	Control	6	W	A) 8.5±0.6	244±32	22±5	19±2	34± 2	0.92±0.13	1.06±0.38	8.0± 3.8
				R) —	285±22	26±4	22±2	40± 4	1.08±0.12	1.24±0.45	9.3± 4.4
				(2) A) 8.8±0.5	200±20	26±1	18±3	32± 1	0.92±0.13	0.62±0.06	2.9± 0.1
				R) —	228±10	30±0	21±3	37± 1	1.05±0.09	0.71±0.03	3.3± 0.0
	1.25	6	(4)	A) 8.5±0.4	232±39	25±4	19±2	34± 1	1.07±0.06	0.99±0.26	7.1± 8.8
				R) —	272±37	30±5	22±2	40± 2	1.26±0.03	1.17±0.33	8.4±10.6
	12.5	6	(4)	A) 8.0±0.9	217± 8	24±3	19±2	34± 5	0.62±0.13**	0.94±0.12	4.4± 2.3
				R) —	273±39	30±5	24±4	42± 3	0.79±0.23**	1.18±0.17	5.3± 2.2
	125	6	W	A) 8.3±0.8	350±82**	21±4	20±3	47± 5**	0.29±0.04**	0.52±0.12**	1.4± 0.4
				R) —	420±73**	25±3	25±4	57± 9**	0.35±0.04**	0.63±0.17	1.7± 0.4
				(2) A) 8.2±0.5	254±15	31±7	18±0	41± 1*	0.55±0.07	0.75±0.41	2.4± 0.6
				R) —	312± 0**	38±7	22±1	50± 2*	0.68±0.13	0.91±0.45	2.9± 0.5

¹¹W; Withdrawal period for 2 monthsMean $\pm$ S.D.^aBW; Final body weight (kg)^aA; Absolute organ weights show grams except hypophysis (mg)^aR; Relative organ weights show g/10 kg BW except hypophysis (mg/10 kg BW)

*, **; Significantly different from control p<0.05 and p<0.01, respectively

リンパ組織を有する器官においては、いずれもリンパ球の減少を伴った萎縮性の変化であった。胸腺では中用量群から萎縮が認められ (Photo 2), 高用量群では全例が退縮・消失を示した。脾臓・リンパ節・口蓋扁桃では、高用量群で萎縮が観察された (Photo 3, 4, 5)。この変化は、消失した胸腺を除いて、休薬により回復した。

下垂体では、中用量群から雌のみに前葉の好酸性細胞の相対的な増加が認められた。この変化は休薬によって観察されなかった。

副腎においては、雌雄共に中用量群から皮質束状層及び網状層の萎縮が見られ、高用量群ではより著しく、脂肪染色により脂肪滴の減少が観察された (Photo 6)。この変化は、休薬により軽減した。

肝臓では、雌雄の高用量群に、小葉周辺性に肝細胞の淡明化を伴う細胞の腫脹が観察された

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Table 7-1 Histological findings of dogs treated percutaneously with DFBA for 6 months and followed by a withdrawal period for 2 months

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		Control		1.25		12.5		125	
Sex		M	F	M	F	M	F	M	F
No. of animals		4 (2)*	4 (2)	4	4	4	4	4 (2)	4 (2)
Back skin (treated)									
Atrophy of epidermis	+	0 (0)	0 (0)	4	4	4	4	4 (0)	4 (0)
Atrophy of adnexa	+	0 (0)	0 (0)	4	4	4	4	4 (0)	4 (0)
Decrease of adipose tissue	+	0 (0)	0 (0)	1	0	1	0	2 (0)	2 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	3	4	3	4	2 (0)	2 (0)
Hematopoietic system									
Thymus :									
Atrophy with decrease of lymphocytes	+	0 (0)	0 (0)	0	0	0	1	0 (0)	0 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	0	0	1	1	0 (0)	0 (0)
	+++	0 (0)	0 (0)	0	0	3	2	0 (0)	0 (0)
Disappearance		0 (0)	0 (2)	0	0	0	0	4 (2)	4 (2)
Spleen :									
Atrophy of white pulp with decrease of lymphocytes	+	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	4 (0)	4 (0)
Submaxillary lymph node :									
Atrophy with decrease of lymphocytes	+	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	4 (0)	4 (1)
Mesenteric lymph node :									
Atrophy with decrease of lymphocytes	+	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	4 (0)	2 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	2 (0)
Palatine tonsil :									
Atrophy with decrease of lymphocytes	+	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	3 (0)	3 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	1 (0)	1 (0)
Endocrine system									
Hypophysis :									
Relative increase of acidophiles in anterior lobe	+	0 (0)	0 (0)	0	0	0	4	0 (0)	4 (0)
Adrenal :									
Atrophy of zona fasciculata and reticularis	+	0 (0)	0 (0)	0	0	4	4	0 (2)	0 (2)
	++	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	4 (0)	4 (0)
Decrease of fatty droplets in zona fasciculata and reticularis in fat staining	+	0 (0)	0 (0)	-	-	0	0	3 (0)	4 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	-	-	0	0	1 (0)	0 (0)
Appearance of large vacuoles in zona glomerulosa	+	0 (0)	0 (0)	0	0	4	3	1 (0)	0 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	3 (0)	4 (0)
Decrease of fatty droplets in zona glomerulosa in fat staining	+	0 (0)	0 (0)	-	-	0	0	3 (0)	2 (0)
	++	0 (0)	0 (0)	-	-	0	0	1 (0)	2 (0)

* ; No. of withdrawal animals

Table 7-2 Continued

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		Control		1.25		12.5		125	
Sex		M	F	M	F	M	F	M	F
No. of animals		4	4	4	4	4	4	4	4
		(2)*	(2)					(2)	(2)
Digestive system									
Liver :									
Swelling of peripheral hepatocytes	+	0	0	0	0	0	0	1	1
		(0)	(0)					(0)	(0)
	++	0	0	0	0	0	0	3	2
		(0)	(0)					(0)	(0)
Increase of PAS positive substances in hepatocytes	+	0	0	0	0	0	0	4	2
		(0)	(0)					(0)	(0)
Epithelial vacuoles in large bile ducts	+	2	0	0	0	0	0	1	2
		(0)	(0)					(0)	(0)
	++	0	0	0	0	0	0	1	1
		(0)	(0)					(0)	(0)
Gallbladder :									
Epithelial vacuoles	+	0	0	0	0	0	0	1	0
		(0)	(0)					(0)	(0)
	++	0	0	0	0	0	0	3	4
		(0)	(0)					(0)	(0)
Urinary system									
Kidney :									
Hyperemia of glomeruli	+	0	0	0	0	0	0	4	1
		(0)	(0)					(0)	(0)
Focal degeneration and regeneration in cortical tubes	+	0	0	0	0	0	0	3	3
		(0)	(0)					(0)	(0)
	++	0	0	0	0	0	0	1	0
		(0)	(0)					(0)	(0)
Hyaline casts in tubular lumen	+	0	0	0	0	0	0	2	2
		(0)	(0)					(0)	(0)
Erythrocytic casts in tubular lumen	+	0	0	0	0	0	0	1	1
		(0)	(0)					(0)	(0)
Genital system									
Testis :									
Hypospermatogenesis	++	0		0		0		1	
		(0)						(0)	
Prostate :									
Atrophy or undergrowth of acini	+	0		0		0		4	
		(1)						(1)	
Ovary :									
Lack of corpus luteum	+		1		1		0		4
			(0)						(0)
Uterus :									
Thinning of wall	+		1		3		2		3
			(0)						(0)
	++		0		0		0		1
			(0)						(0)
Vagina :									
Thinning of epithelium	+		0		1		1		4
			(0)						(0)
Mammary gland :									
Atrophy or undergrowth of acini	+		1		1		1		4
			(0)						(0)
Others									
Sternum :									
Thinning of substantia compacta	+	0	0	0	0	0	0	3	3
		(0)	(0)					(0)	(0)
Abdominal skin (untreated) :									
Atrophy of epidermis	+	0	0	0	0	2	2	4	3
		(0)	(0)					(0)	(0)

* ; No. of withdrawal animals

(Photo 7)。淡明化した細胞を含め肝細胞内に PAS 染色陽性物質の増加がみられた。また、胆管及び胆嚢上皮内に空胞も認められ、脂肪染色で陽性に染め出された。これらの変化は休薬により回復した。

腎臓においては、雌雄の高用量群で糸球体の充血及び皮質尿細管上皮の限局的な変性・再生像が観察され、尿細管腔に円柱を認める例もあった (Photo 8)。これらの変化は休薬により回復を示した。

生殖器官においては、高用量群で前立腺の腺房が小さく、卵巢に黄体がなく、子宮壁・膈上皮が菲薄化し、乳腺の腺房が小さかった。休薬によって、これらの変化は認められなかった。

胸骨においては、雌雄の高用量群で緻密質が軽度になくなっていったが、休薬によって回復を示した。骨髄の変化は認められなかった。

腹部の皮膚では、雌雄の中用量群から用量依存的に表皮の萎縮が認められたが、皮膚付属器官及び皮下脂肪組織への影響は観察されなかった。休薬例では、皮膚の萎縮が回復した。

他に、寄生虫性の病変が対照群を含めてリンパ節、肺、肝臓に散見され、高用量群の雌雄 1 例では十二指腸と皮膚に虫体が観察された。

(3) 電顕検査

副腎では、雌雄の高用量群において皮質細胞の減少、萎縮、解離が束状層と網状層に認められ、細胞質内は脂肪滴が減少し、mitochondria の小泡状 cristae が変形または消失し、核は濃縮を示した (Photo 9)。また、lysosome に富む細胞も認められた。皮質球状層においては細胞の配列が乱れ、細胞の萎縮と解離、細胞質内の脂肪滴の減少あるいは大型脂肪滴の出現などが観察されたが、mitochondria 等の小器官には影響を認めなかった。中用量群では、上記変化がほとんど認められなかった。休薬によって、これらの変化の回復性が明らかであった。

肝臓では、雌雄の高用量群において肝細胞の腫脹と細胞質内に glycogen 顆粒の増加、滑面小胞体の増生が認められ、mitochondria、粗面小胞体等の小器官は細胞辺縁に圧迫され、島状に局在していた (Photo 10)。休薬によって、これらの変化は回復を示した。その他、毛細胆管・kupffer 細胞等には異常は認められなかった。

腎臓では、糸球体、尿細管上皮共に微細構造上の変化は認められなかった。

Photo. 1 Back skin (treated) from a male dog treated with DFBA $125\mu\text{g/kg}$ for 6 months. H. E. staining $\times 100$. Atrophy of epidermis.

Photo. 2 Thymus from a female dog treated with DFBA $12.5\mu\text{g/kg}$ for 6 months. H. E. staining $\times 100$. Atrophy with decrease of lymphocytes.

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Photo. 3 Spleen from a male dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. H. E. staining $\times 100$. Atrophy of white pulp with decrease of lymphocytes.

Photo. 4 Mesenteric lymph node from a female dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. H. E. staining $\times 40$. Atrophy with decrease of lymphocytes.

Photo. 5 Palatine tonsil from a female dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. H. E. staining $\times 100$. Atrophy with decrease of lymphocytes.

Photo. 6 Adrenal from a male dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. H. E. staining $\times 100$. Atrophy of zona fasciculata and reticularis.

Chronic toxicity on difluprednate in dogs.

Photo. 7 Liver from a male dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. H. E. staining $\times 100$. Swelling of peripheral hepatocytes.

Photo. 8 Kindney from a male dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. H. E. staining $\times 200$. Hyperemia of glomeruli.

Photo. 9 Adrenal from a male dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. $\times 3250$. Decrease of fatty droplets, disappearance of mitochondria cristae, and pycnosis in zona fasciculata and/or reticularis cells.

Photo. 10 Liver from a female dog treated with DFBA 125 μ g/kg for 6 months. $\times 3250$. Swelling of hepatocytes, accumulation of glycogen and insular or peripheral localization of cell organelles in hepatocytes.

考 察

Glucocorticoid 外用剤をヒトに使用した際に発現する副作用には、感染症の誘発・増悪、皮膚萎縮、毛細血管拡張、steroid 潮紅・紫斑、酒皰様皮膚炎・口囲皮膚炎などの局所的副作用が知られており、また全身療法で報じられている緑内障、白内障、皮膚の菲薄化と出血、筋萎縮、骨粗鬆症、大腿骨頭壊死、消化管潰瘍、急性肺炎、精神障害、高血圧、浮腫、低 K 血症、steroid 糖尿、脂肪肝、高脂血症、成長抑制（小児）、月経異常、間脳・下垂体・副腎系の抑制（副腎不全、steroid 離脱症候群など）、血栓形成、好中球増加、リンパ球・好酸球の減少、免疫反応の抑制（全身性感染症の誘発・増悪）等の全身的副作用も、外用剤の種類やその使い方によっては、発現する虞れがあるといわれている（原田，1984，石原，1984，高野，1984，森本，1984）。

従って、本試験の場合にも局所と全身に及ぼす影響の観点から考察したい。

まず、局所への影響としては、皮膚の萎縮と被毛の発育抑制が主要な変化であった。皮膚の萎縮については、表皮細胞の turn over 抑制作用、線維芽細胞の増殖抑制作用に基づくとの見解（肥田野，1978，石原，1984，高野，1984）があり、また皮膚の萎縮に伴って体毛の発育も妨げられるといわれている（梅田ら，1971）。いずれの変化も休薬により回復性を示し、可逆的な変化であった。

次に、全身に及ぼす影響については、イヌに塗布できる最大量 $125\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ （軟膏量として $0.25\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）の DFBA を 6 ヶ月間連続塗布しても死亡及び重篤な症状はなかった。因みに、この高用量 $125\mu\text{g}/\text{kg}$ をヒトに外挿した場合、体重（60 kg）換算で $7.5\text{ mg}/\text{man}/\text{day}$ （軟膏量として $15\text{ g}/\text{man}/\text{day}$ ）となり、イヌと同一条件で塗布した場合 $50\times 30\text{ cm}^2$ の面積（大略背部全面）に塗布したことになる。

一方、各種検査の結果から DFBA の血中移行が示唆される変化が主として高用量群に出現した。DFBA は glucocorticoid なるが故に蛋白・糖・脂質代謝への影響が予測される。事実、glucocorticoid の長期投与により、末梢蛋白の異化亢進作用の結果、体幹部皮膚・筋肉の萎縮及び骨の粗造化（成長期には発育抑制）が起こり、それに源を発するアミノ酸等を材とする gluconeogenesis, lipogenesis の促進が肝臓で起こり、glycogen の増加を伴う肝臓の腫大・高血糖・尿糖あるいは脂肪肝・高脂血症・脂肪分布の異常が招来されるといわれている（梅原ら，1971，田所，1972，宮地，1984，森本，1984，白井ら，1984，鎮目，1984）。DFBA の場合では、ラットで皮膚の萎縮、骨格筋及び骨の発育抑制を伴う体重増加抑制、血中の蛋白・総コレステロール・中性脂肪の増加、肝臓の脂肪増加などが認められている（樋口ら，1985，倉島ら，1985）が、イヌでは腹部の皮膚萎縮、胸骨の菲薄化、glycogen の増加を伴う肝臓の腫大（重量は約1.5 倍増）が認められたにすぎなかった。

造血器系に及ぼす影響として、末梢血中の RBC・Ht・Hb の増加（10～20%増）が認められた。この結果はラット（亜急性：赤血球延命作用，樋口ら，1985，及び慢性：造血亢進作用，倉島ら，1985）の結果と類似するが、網状赤血球，myelogram，骨髓像に変化がなかったこと、また、血液貯蔵臓器（肝臓，脾臓など）の血液量が減少することに因るとの報告もあり（梅原

ら, 1971), イヌの場合には体内分布の移動に基づくと推察される。末梢血中の白血球では, リンパ球・好酸球の減少と好中球の増加が認められた。胸腺などリンパ組織の萎縮性変化と共に免疫抑制作用に関連すると言われるリンパ球の減少(坂根ら, 1984)と好酸球の減少は glucocorticoid の周知な作用である(梅原ら, 1971, 田所, 1972, 宮地, 1984, 鎮目, 1984)。一方, 好中球の増加作用についても多くの報告がある(梅原ら, 1971, 田所, 1972, 宮地, 1984, 鎮目, 1984)。ラットでも, 血中リンパ球の減少・好中球の増加, リンパ組織の萎縮, 胸腺・脾臓の重量減少などが認められている(樋口ら, 1985, 倉島ら, 1985)。

肝臓への影響として, 前述した glycogen の増加以外に, 血中 ALP・ γ -GTP の上昇が認められ, 胆道系への影響が示唆されたが, 形態学的に胆管及び胆嚢上皮の空胞化(脂肪滴)を示した以外には変化が観察されなかった。Badylak ら(1980)も, ビーグル犬において肝胆道系への障害がなく, 血中 ALP・ γ -GTP の上昇が誘導されたと報告している。

水・電解質代謝・腎機能への影響として, glucocorticoid は腎臓の糸球体濾過値(GFR)及び血流量を増加させ, また遠位尿細管では抗利尿ホルモンと拮抗作用を示し, 加えて, 尿細管での Na の吸収及び K の排泄を亢進させ, 水利尿・高 Na 血症・低 K 血症をおこすと言われている(梅原ら, 1971, 田所, 1972, 宮地, 1984, 鎮目, 1984)。本試験でも水利尿, 血中 Na の増加及び K の減少が血中 CREAT・CREATN の減少と共に明らかであった。しかしながら, 水代謝については血液濃縮, 浮腫性変化, また細胞外液の増量によるといわれる高血圧(田所, 1972, 宮地, 1984, 鎮目, 1984)などがなかったことから, 水収支バランスはうまく保持されていると推察される。他の glucocorticoid でもイヌに対して水利尿が認められている(垣下ら, 1980, 樽本ら, 1981)。電解質代謝についても Na・K の尿中総排泄量に著変はなく, 心電図への影響も見受けられないので, 体内電位バランスを崩すような影響ではなかったと察せられた。ラットでは, Na・K の尿中総排泄量に異常なく尿量が増加したと報告されている(高橋ら, 1985b)。なお, 血中 CREAT・CREATN の減少については GFR 増加に伴う二次的な変動であると考えられる。前述した利尿等の作用の他, 腎臓への障害性変化が軽度認められた。ラットでは, 尿蛋白・潜血, 腎重量の増加, 肉眼的に点状出血及び微細白斑, 組織学的に尿細管上皮の変性などが観察され, 障害の発生起点として糸球体からの血液漏出を指摘している(樋口ら, 1985)。イヌの場合もラットと同様と考えられるが, ラットに比較して軽微な変化であった。

内分泌系への影響として, 副腎では形態学的に皮質の萎縮性変化が観察された。Glucocorticoid の過剰投与により副腎皮質の萎縮がおこることはよく知られている(梅原ら, 1971, 田所, 1972, 宮地, 1984)。下垂体では組織学的に前葉細胞中の好酸性細胞数の相対的増加が雌に観察された。ビーグル犬では ACTH 分泌細胞が含まれる好塩基性細胞数がわずかに 8%に対して好酸性細胞数が 58%, 色素嫌性細胞数が 29%と報告されていること(Michaelson, 1970)を考えると, 好塩基性細胞数の減少とは言いがたく, また, 好塩基性細胞の質的变化も明らかではなかったため, 好酸性細胞の増加ではないかと考えられる。しかしながら, 前葉の部位によって population に差異があることも知られており(Michaelson, 1970), その本質を明らかにするまでにはいたらなかった。いずれにせよ, 下垂体の重量には変動もなく, 雌に認められる軽微な変化であった。

生殖器系への影響としては雌雄、殊に雌に対して性腺の発育抑制が示唆された。Glucocorticoid は蛋白異化作用によって性腺に対して二次的に影響を与えと言われ、また、下垂体からの gonadotropin 分泌の抑制などによって suppressive に働くともいわれている（梅原ら，1971，田所，1972，森本，1984，鎮目，1984）が，gonadotropin を分泌する下垂体好塩基性細胞に形態的变化がなかったことから，蛋白異化作用に基づく性成熟の遅延として発現したのではないかと考えたい。

その他，眼病，筋肉疾患，消化管障害，神経障害，血栓形成及び steroid 離脱症候群など臨床上前問題となるような重篤な影響は認められなかった。

以上，高用量群では種々の systemic な影響が認められたが，いずれも glucocorticoid の持つ生理活性の過剰発現と考えられ，DFBA が持つ特異的な作用は認められなかった。また，これらの変化はいずれもが回復性を有する可逆的なものであった。

中用量群では胸腺・副腎皮質・腹部皮膚表皮の萎縮性変化など高用量群に出現した変化の一部が雌雄に認められたにすぎなかった。したがって，DFBA の $12.5\mu\text{g}/\text{kg}$ は glucocorticoid の作用が軽微に出現する用量であったが，無影響量に近いものと考えられた。

低用量群では，DFBA によると考えられる変化は何ら認められなかった。

結 論

新規の外用 glucocorticoid，difluprednate (DFBA) の 125 ， 12.5 ， $1.25\mu\text{g}/\text{kg}$ を軟膏製剤 (0.05%) としてイヌの背部に 6 ヶ月間塗布し，局所への影響と全身に及ぼす影響を観察した。また，2 ヶ月間の休薬期間を設け，得られた結果の回復性についても併せて検討し，以下の知見を得た。

1. DFBA の局所への影響

塗布部位の皮膚では，鱗屑・発赤を伴う皮膚の菲薄化及び被毛伸長の抑制が認められ，組織学的に表皮，皮膚付属器官の萎縮及び皮下脂肪組織の減少が観察された。これらは，休薬により回復性を示す可逆的な変化であった。

2. DFBA の全身に及ぼす影響

(1) $125\mu\text{g}/\text{kg}$ では，血中リンパ球・好酸球の減少，胸腺などリンパ組織及び副腎の萎縮，血中好中球の増加，肝臓の glycogen の増加，摂水量・尿量の増加，血中ナトリウムの増加・カリウムの減少，軽度な腎障害，血中アルカリフォスファターゼ・ γ -グルタミルトランスペプチダーゼの上昇，骨及び皮膚（腹部）の軽度な菲薄化，性成熟の遅延性変化などが認められた。しかしながら，死亡の発現もなく，重篤な症状さえ見られなかった。これらの変化は，休薬により回復性を示し可逆的なものであった。

(2) $12.5\mu\text{g}/\text{kg}$ では，雌雄の胸腺，副腎，皮膚などに軽度の変化が認められたにすぎなかった。したがって，本用量は，無影響量に近いものであった。

(3) $1.25\mu\text{g}/\text{kg}$ では，DFBA の影響は何ら認められなかった。

3. DFBA の特異作用

上記の局所及び全身への影響は, glucocorticoid として有する生理活性作用の過剰発現と考えられ, DFBA の特異作用は認められなかった。

謝 辞

本試験実施の際に協力を得た当研究所の大塚正之, 山本恭之, 長島智恵子, 樋口邦子, 石井和子および安全性グループの諸氏に感謝致します。

文 献

- Badylak, S. F., Van Vleet, J. F. (1980): Sequential morphologic and clinicopathologic alterations in dogs with experimentally induced glucocorticoid hepatopathy. *Am. J. Vet. Res.*, **42** (8), 1310-1317.
- 原田昭太郎(1984): 皮膚科領域の疾患, 月刊薬事, **26** (8) 特集・副腎皮質ホルモン療法と製剤の評価, 55-57.
- 肥田野信(1978): コルチコイド外用による皮膚萎縮, 皮膚科学, p. 365. 日本医事新報社.
- 樋口守, 倉島康彰, 今田貴子(1985): Difluprednate のラットにおける亜急性毒性試験. 医薬品研究, **16** (1), 55-77.
- 石原勝(1984): 皮膚科領域, 最新医学, **39** (8) 特集・ステロイドセラピー '84, 1637-1644.
- 垣下奉史, 加藤靖, 秋葉知英 他(1980): Prednisolone 17-valerate 21-acetate の安全性試験(第6報). イヌ塗布による慢性毒性試験(軟膏)一. 薬理と治療, **8** (6), 99-120.
- 倉島康彰, 長瀬美智子, 三井田均司 他(1985): Difluprednate のラットにおける慢性毒性試験, 医薬品研究, **16** (2), 257-280.
- Michaelson, S. M. (1970): Endocrine system, The Beagle as an experimental dog (A.C. Anderson, ed.), p. 412-414. The Iowa State University Press, Iowa.
- 宮地幸隆(1984): 生体代謝に及ぼす作用. 最新医学, **39** (8) 特集・ステロイドセラピー '84, 1526-1531.
- 森本靖彦(1984): グルココルチコイドの副作用とその対策, 最新医学, **39** (8) 特集・ステロイドセラピー '84, 1578-1589.
- 坂根剛, 鈴木登(1984): 免疫抑制作用, 最新医学, **39** (8) 特集・ステロイドセラピー '84, 1551-1555.
- 白井厚治, 鏡味正勝, 森聖二郎 他(1984): 脂質代謝に及ぼす作用. 最新医学, **39** (8) 特集・ステロイドセラピー '84, 1532-1537.
- 鎮目和夫(1984): 副腎皮質ホルモンの生物作用と薬理作用, 月刊薬事, **26** (8) 特集・副腎皮質ホルモン療法と製剤の評価, 29-31.
- 田所作太郎(1972): 合成副腎皮質ステロイド. 臨床薬理学大系 第12巻ホルモン, p. 37-59. 中山書店.
- 高橋和雄, 門脇修一郎, 荒井安洋 他(1985a): 合成ステロイド Difluprednate の抗炎症作用(第2報). 一軟膏塗布による作用. 応用薬理, **29** (3), 355-362.
- 高橋和雄, 荒井安洋, 門脇修一郎 他(1985b): 抗炎症ステロイド Difluprednate の一般薬理作用. 応用薬理, **29** (3), 363-379.
- 高野正彦(1984): 外用コルチコステロイド. 今日の皮膚外用剤, p. 499-700. 南山堂.
- 樽本保男, 阪川隆司, 筒井良文 他(1981): Hydrocortisone 17-butyrate 21-propionate の毒性研究. 6. イヌの経皮投与における亜急性毒性試験, —J. Toxicol. Sci., **6**, Suppl., 121-140.
- 梅原千治, 佐藤武雄(1971): 糖コルチコイドの中間代謝に及ぼす影響と薬理作用. ステロイドホルモン V 糖質副腎皮質ホルモン, p. 829-916. 南江堂.