10% Nitroglycerin (NT-1 原薬) の ウサギにおける経皮亜急性毒性試験

谷口 雄三, 島田かおる, 神山 八郎
浜井 義則, 平尾 隆一, 西森 司雄
菊森 幹人, 山本 博昭
株式会社環境保健生物研究センター

PERCUTANEOUS SUBACUTE TOXICITY STUDY OF 10% NITROGLYCERIN (NT-1 OINTMENT) IN RABBITS

Yuzo TANIGUCHI, Kaoru SHIMADA, Hachiro KOHYAMA
Yoshinori HAMAI, Ryuichi HIRAO, Tsukao NISHIMORI,
Mikito KIKUMORI and Hiroaki YAMAMOTO

The Biological Research Center for the Protection of Environment.
555 Inaba, Ukawa, Minakuchi-cho, Koka-gun, Shiga-ken 529-17, Japan

Accepted February 21, 1986

Abstract......NT-1 ointment is a compound containing 10% nitroglycerin which is topically applied to the skin for angina pectoris. The subacute toxicity of this compound was examined by the continuous application for 5 weeks to the shaven skin of rabbit back at dose levels of 240, 120 and 60 mg/kg, and the recovery was examined 3 weeks after withdrawal of the drug. No special skin response to the NT-1 ointment was observed other than an erythema of the grading 2-3 Draize points, while the control ointment, which was the base ointment without nitroglycerin, showed a higher grade of erythema equivalent to 4 Draize point with crusta formation. No relationship between the dose level of NT-1 ointment and the skin response was observed, and skin response was thought to be caused mainly by the base ointment. The skin response gradually reduced even during the application period, and the skin response disappeared within a few days after withdrawal of the ointment. Histological examination of the treated skin at the respective ends of the application and recovery periods showed thickening of the corneum and epithelial layer, round cell infiltration and fibrosis in the corium, and development of hair folliculi in the subdermis. No systemic effect of the topically applied NT-1 ointment was observed in the majority of the animals, either in behavior, hematologic and

連絡先: ☎529-17 滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場555番地

株式会社 環境保健生物研究センター 谷口 雄三

electrocardiographic examination, food consumption, body weight change or urinalysis.

Key words: 10% nitroglycerin (NT-1 ointment), subacute toxicity study, rabbit.

緒 言

ニトログリセリンは狭心症発作に特効ありとして古くより汎用されてきた。その多くは舌下錠として内服されてきたが、近年その持続時間の持長を求めて軟膏剤として皮膚貼付による方法が用いられている。しかしこの場合には皮膚局部の炎症などが問題になる。本試験ではウサギを用いて剪毛皮膚にニトログリセリンテープの原薬（NT-1 原薬）の5週間連続塗布および3週間の休薬によって、皮膚局部の反応および全身的影響を検討した。

実験材料および方法

1. 被験物質

被験物質の NT-1 原薬 (Lot No. NGO-11110B および NGO-11110C) は、大鵬薬品工業株式会社より供与されたニトログリセリン (Fig. 1) を10%含有する親油性原薬（基剤としてラノリン誘導体を使用）である。

Chemical formula : $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_9$

Molecular weight : 227.09

Fig. 1 Chemical structure of glyceryl trinitrate

2. 使用動物および飼育方法

動物は、株式会社ケアリー（大阪）より購入（昭和58年4月11日）した7～13週齢（1.6～2.8 kg）の雌雄各々50匹の SPF New Zealand White ウサギを使用した。1週間以上予備飼育の後、動物の体重と外観所見を指標として健康な9～15週齢（2.25～3.40 kg）の雌34匹、雄36匹を選出し試験に供した。

飼育は、当研究センターの barrier system のウサギ室〔温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 10\%$ ，換気回数15回／時，照明時間14時間／日（7時から21時）〕内でステンレス製自動飼育ラックにアルミ製ケージ〔日本クレア社製，305(W)×505(D)×350(H)mm〕を収納し，各ケージに個別飼育した。

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

各ケージの識別法は試験番号、動物番号、被験物質番号、塗布量、投与経路および投薬期間を記入した色カード（雄性を白、雌性を赤）をケージ前面に吊した。また、個体識別は、ウサギの耳介内側にマジックインキで動物番号を記入した。飼料は株式会社ケアリー製の固型飼料（RG-1， γ 線照射，昭和58年3月23日製造）を，飲料水は水口町営水道水をノズル（日本クレア社製）よりそれぞれ摂取させた。ケージは週に1回滅菌し，交換した。

3. 試験群構成

試験群構成は Table 1 に示した。各塗布群の動物数は1群6～8匹とし，そのうち1～3匹を回復群とした。動物は，試験開始当日に体重を測定し，各塗布群の平均体重が均等になるように動物を体重別層化無作為抽出法（小田嶋，1978）に従って各塗布群に群分けした。

Table 1 Experimental design

Sex	Group	No. of animals	
		Application	Withdrawal
M	No-treatment	7	2
	Control	7	2
	60mg/kg	8	3
	120mg/kg	7	2
	240mg/kg	7	2
F	No-treatment	7	2
	Control	7	2
	60mg/kg	6	1
	120mg/kg	7	2
	240mg/kg	7	2

4. 塗布方法および塗布量

投与経路は，NT-1 の臨床適用経路に準じて皮膚表面塗布とし，1日1回（週7日）5週間に亘り剪毛せるウサギ背部皮膚に NT-1 原薬を塗布した。塗布の約2～3日前に無麻酔下で電気バリカンを用いて短く背部被毛を刈りとした。塗布面積は5 cm × 10 cm (Fig. 2) とした。塗布日に規定面積に原薬を塗布し，その上からリント布と不浸透性ポリプロピレンフィルムで二重に覆い，周囲をシアテープ（ニチバン製）またはサージカルテープで止めた。なお，塗布部位の汚損，ウサギにより嘗めとられることを防ぐため胴体に着衣をつけ保護した。

塗布量は，漏出をおこさない可及的大量を考慮し，ニトログリセリンとして 240 mg/kg を最大塗布量と設定し，以下公比2にて 120 mg/kg，60 mg/kg を設けた。これら塗布量は，臨床投与量の体重換算でそれぞれ約30倍，約15倍および約7.5倍に相当する（山田ら，1981）。対照群には，被験物質の溶媒として用いた原薬基剤を塗布した。また，背部の被毛を剪毛し，単にリント布（5 × 10 cm²）と不浸透性ポリプロピレンフィルムで覆うだけの無処置対照群も設けた。なお，NT-1 原薬の均一性および安定性は，大鵬薬品工業株式会社で確認された。

基剤対照群および 240 mg/kg 塗布群では背部の左右 2 箇所塗布し、120 mg/kg および 60 mg/kg 塗布群は背部左側 1 箇所塗布した (Fig. 2)。

Fig. 2 Application sites of ointment

5. 一般症状および皮膚の変化

一般症状は毎日 2 回 (午前, 午後) Irwin の多次元観察法 (Irwin, 1964) に準じて, 主として視診を以って行った。

皮膚所見は, 紅斑, 痂皮, 浮腫性変化等については Draize 法 (Draize et al., 1944) による皮膚反応の判定基準 (Table 2) に基づいて点数で評価し, その他の皮膚の弛緩, 落屑等については記録にとどめた。

6. 摂餌量および体重の測定

給餌は 200 g の制限食とし, 残量を毎日測定し摂餌量を算出した。体重はバネ天秤 (OKAZAKI SANGYO Co., LTD.) で毎日測定した。各塗布群の体重増加量をそれぞれの摂餌総量で除し, それに 100 を乗じ, 食餌効率をパーセントとして表示した。

7. 心電図検査

心電図検査は NT-1 原薬の塗布前, 塗布 32 回目および回復期間中の 17 日目の計 3 回, 全例について腹位保定で第 II 誘導法を用いて測定 [日本光電 (株), RM-6100 型] した。

8. 尿 検 査

尿検査は屈折計および検尿試験紙 [マイルス・三共 (株) 製, マルティスティックス III] を用い, NT-1 原薬の塗布前, 塗布 32 日目および回復期間中の 18 日目の計 3 回, 全例について Table 3 に示す項目, すなわち, 24 時間尿量, 比重, pH, 蛋白, 糖, ketone 体, bilirubin, urobilinogen, 潜血について実施した。

9. 血液学的検査

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

Table 2 Evaluation of skin reactions

A. Erythema and Eschar Formation	
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth) ...	4
Total possible erythema score	4
B. Edema Formation	
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (area raised approximately 1 mm.)	3
Severe edema (raised more than 1 mm. and extending beyond area of exposure)	4
Total possible edema score	4
Total possible score for primary irritation	8

According to Draize et al.

Table 3 Test items and methods on the urine analysis

Item	Unit	Method
Volume	ml/24hrs	Natural collection
Specific gravity	—	Refraction meter
pH	—	Multistix
Protein	—	Multistix
Glucose	—	Multistix
Ketone	—	Multistix
Bilirubin	—	Multistix
Urobilinogen	—	Multistix
Occult blood	—	Multistix

採血は、NT-1 原薬の塗布前、塗布34日目および回復期間中の20日目の計3回、全例について無麻酔下で耳静脈より行った。検査項目および方法は Table 4 に示す通りである。すなわち、赤血球数、白血球数、hemoglobin 量、hematocrit 値、MCV, MCH, MCHC, 血小板数、網状赤血球%, 白血球百分率の算定を行った。

10. 血清生化学的検査

NT-1 原薬の塗布前、塗布34日目および回復期間中の20日目の計3回、全例について無麻酔下で採血した血液を、遠心分離機（久保田製作所製、KR-700型）にて 2800 r.p.m. で10分間遠心分離して得た血清を用いた。

検査項目および方法は、Table 5 に示す通りである。すなわち、GOT, GPT, LDH, alkaline phosphatase, creatin phosphokinase, 総 bilirubin, BUN, creatinine, 総蛋白, albumin, A/G 比, ブドウ糖, 総 cholesterol, 遊離 cholesterol, 尿酸, Na^+ , K^+ , Ca^{++} , 無機磷, Cl^- について検査した。

Table 4 Test items and methods on the blood examination

Item	Unit	Method
RBC	$10^4/\text{mm}^3$	Microcell counter
WBC	$10^2/\text{mm}^3$	Microcell counter
Hb	g/dl	Microcell counter
Ht	%	Microcell counter
MCV	μm^3	Wintrobe
MCH	pg	Wintrobe
MCHC	%	Wintrobe
Platelet	$10^3/\text{mm}^3$	Platelet counter
REC	%	Modified from Brecher
Differential counts of WBC	%	May-Giemsa staining

Table 5 Test items and methods on the blood serum examination

Item	Unit	Method
GOT	Karmen	POP-P-chlorophenol
GPT	Karmen	POP-P-chlorophenol
LDH	Wroblewski	Lactic acid substrate diaphorase
ALP	K-A	Kind-king
CPK	mU/ml	Enzyme assay
T-bilirubin	mg/dl	Enzyme assay
BUN	mg/dl	Urease-indophenol
Creatinine	mg/dl	Folin-Wu
T-protein	g/dl	Biuret
Albumin	g/dl	BCG
A/G	—	Alb/TP-Alb
Glucose	mg/dl	GOD-POD
T-cholesterol	mg/dl	Enzyme assay
F-cholesterol	mg/dl	Enzyme assay
Uric acid	mg/dl	MEHA
Na	mEq/l	Ion electrode
K	mEq/l	Ion electrode
Ca	mg/dl	OCPC
IP	mg/dl	Molybdenum blue
Cl	mEq/l	Chloride counter

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

11. 剖検および臓器重量測定

試験終了後すべての生存動物は、ラボナール〔田辺製薬(株)製〕麻酔下で断頭し、放血屠殺し剖検を行い肉眼的に精査したのち、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、脾臓、肺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮、睪丸について重量を測定し10%ホルマリン液に固定した。

12. 病理組織学的検査

病理組織学的検査は、途中死亡例および試験終了後のすべての生存動物について、前記の諸臓器（13臓器）のほかに顎下腺、耳下腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、腸間膜リンパ節、膀胱、大腿筋、坐骨神経、皮膚（処置部および非処置部）、胸骨および肉眼的異常部位について実施した。固定臓器は中性緩衝ホルマリン液で再固定を行い脱水機（フィッシャー製、166型）を用いて脱水包埋を行った後、包埋機（マイルス・三共(株)製、4603型）でパラフィンブロックとした。ブロックは、ミクロトーム（大和製、ユング型）で約3 μ のパラフィン切片とし、自動染色機（AMES 製、4446型）にて Hematoxylin-Eosin 染色を行い鏡検した。

13. 統計学的処理

本試験での各データは手法で集計し、有意差はパーソナルコンピューター（オリベッティ製、P6066型）を用いて Student の t -検定および Aspin-Welch 法の検定を行った。

実験結果

1. 一般症状および途中死亡

NT-1 原薬の塗布期間中の動物の一般症状については大多数のものに著変はみられなかった。稀に軟便あるいは下痢を呈するものがみられた。これらは NT-1 原薬塗布群にも無処置対照群にも基剤対照群の中にもあった。また結膜の充血、喘鳴などを呈する例もあった。塗布期間が3週目、4週目に及んで6例の死亡がみられた。これらは3、4日前から自発運動は減じ、うずくまり姿勢あるいは腹臥位をとり、他動的に運動させても不活発な失調歩行で、摂餌量も少なく、触診上体温低く、尿失禁をきたし、呼吸数少なく喘鳴を伴い、衰弱状態を呈して死亡した。

実験期間中の死亡例は使用動物70匹中6例で無処置対照群雌1例（21日目）、基剤対照群雌1例（21日目）、60 mg/kg 群雌1例（28日目）、120 mg/kg 雌1例（28日目）、雄1例（22日目）、240 mg/kg 雌1例（29日目）であった。すなわち、NT-1 原薬塗布とは直接無関係に死亡例が発生した。後述の如くこれらは剖検の結果肺炎と判明した。

休薬回復試験期間中には特記すべき一般症状を呈する例は認めなかった。唯だ無処置対照群のなかに軟便を呈する雄1例がみられた。

2. 皮膚局部所見

1) 塗布期間中の所見

NT-1 原薬塗布期間中の皮膚局部は紅斑を呈し（Photo 1）、極く稀に（雌雄各1例ずつ）浮腫を併発した。すなわち NT-1 原薬塗布の 60, 120, 240 mg/kg 群は雌雄ともに Draize 紅斑評点の中心は第1週から第2週にはそれぞれ、2～3、3～2、3～3を示し、第3週を過

Photo 1 Skin reaction by application of NT-1 ointment (240mg/kg) for 4 days. Moderate erythema (point 3 by Draize's evaluation) is observed.

ぎると 2～1, 2～2, 2～1へと少しずつ軽い方へ移動がみられた。要するに NT-1 原薬の塗布量に応じて紅斑は多少は強く現れるようであるし、しかも初期ほど反応は強いが繰返し塗布しているうちに少しずつ軽くなる慣れの現象がみられる。対照群のうち無処置対照群は全く紅斑は認めないが、基剤対照群雄では塗布 3～5 日間は評点の中心は 4～2 を示し、以後 2～1 に移り、4 週間から 1～2 が中心であった。この傾向は基剤対照群の雌でもみられた。皮膚反応のうち浮腫を呈したのは例外的に NT-1 原薬塗布群雄 1 例と基剤対照群雌 1 例で、しかも期間は 4 日と 1 日の一過性のものであった。

このように基剤対照群の皮膚反応と NT-1 原薬塗布群の皮膚反応を比較すると両者は質的にも量的にも近似している。したがって NT-1 原薬塗布群の皮膚反応は主に溶媒としての基剤自体によるものと推察される。

2) 休薬回復試験期間中の皮膚局部所見

休薬後、数日間は Draize 評点 1 程度の紅斑が塗布の跡に遺るが基剤対照群を含んで雄では 7～10 日目に、雌では 5～6 日目に紅斑は消失した。浮腫はこの期間には全く認めなかった。

3. 摂餌量および体重変化

NT-1 原薬を塗布することに依って摂餌量が影響を受ける事実はみられなかった。すなわち NT-1 原薬塗布群の毎日平均摂餌量 (約 130～150 g) は多くあるいは少なく上下しながら経日的には少しずつ漸次増加して行き、したがって平均体重も増加した (Fig. 3, 4)。例外的に途中死亡例では約 1 週間位の不食状態を続け、したがって体重も数日の間に著減して死の転帰をたどった。

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

Fig. 3 Body weight changes of male rabbits during application and withdrawal periods of NT-1 ointment

Fig. 4 Body weight changes of female rabbits during application and withdrawal periods of NT-1 ointment

休薬回復期間中の摂餌量および体重については NT-1 原薬塗布休薬の影響は現れないが、唯だそれらの群の雌雄に 1 例ずつ不食例があり、これの所属する群は平均摂餌量は半減し、それらの食餌効率も著しく低値を示した。この特例 2 例は後日剖検により肺炎に罹患していたことが判明した。

4. 尿検査所見

NT-1 原薬塗布前の検査で潜血反応を呈する雌 1 例があったが、塗布 32 日目の時点では消失し、別の雄 1 例に潜血反応が現れた。それ以外に異常所見は休薬回復期間を含んでもみられなかった。

5. 血液学的検査所見

NT-1 原薬塗布によって血液学的検査所見に異常値を呈することはなかった。塗布 34 日目の検査値で塗布群の雄 (60 mg/kg, 120 mg/kg 群) の赤血球数が基剤対照群に比して軽度増加傾向を示し、関連の MCV, MCH の減少がみられたが用量依存性を欠いていた (Table 6, 7)。

休薬回復期間での所見に異常値を示すものはなかった。

6. 血清生化学的検査所見

NT-1 原薬塗布 34 日目の検査で塗布群の尿酸、クレアチニン、A/G 比、GPT などの値が基剤対照群と比較して増減がみられたが何れも僅少で、用量依存性を欠きあるいは雌雄間に関連性なく偶発的な変化が考えられた (Table 8, 9)。

休薬回復期間の検査値にも塗布群のものに 2, 3 の増減はみられたが生理的範囲内の動揺であった。

7. 心電図検査所見

NT-1 原薬塗布前、塗布 32 日目および休薬回復期間のそれぞれの検査値に異常値をみなかった。

8. 剖検所見

前述の通り NT-1 原薬塗布 5 週間中に 6 匹の途中死亡例がみられ、これらはその都度剖検した。塗布実験を終了した時点で、死亡例も含んで各群 5 例ずつを屠殺剖検し、残りの各群 1 ~ 3 例は 3 週間の休薬回復期間の後に屠殺剖検した。

1) 途中死亡例の剖検所見

NT-1 原薬の 240 mg/kg 群 (雌) の 1 例のみが肺気腫を主所見としたのに対し他の 5 例は著明な肺炎像を呈した。すなわち、膿胸、分泌物充満の気管支炎、肺葉および両肺の癒着、心嚢、横隔膜との癒着からさらに進んで横隔膜穿孔、肝臓との癒着などがみられた。また肝臓は肝葉の癒着をきたし、腹水あるいは膿の貯留を伴った腹膜炎を呈するものもあった。以上の如くこれらは感染症所見が濃厚であった。

2) 塗布期間終了時の剖検所見

全例を通じて最も所見に富んだ臓器は肺であった。すなわち肺炎像を呈したものが雄では基剤対照群および 120 mg/kg 群 (既に塗布期間中死亡例を出している) を除いて各群 1 ないし 2 例、雌では 5 群とも既に 1 例ずつの途中死亡例を出しているが生存例でも 60 mg/kg 群およ

Table 6 Hematological findings of male rabbits during application and withdrawal periods of NT-1 ointment

Group	No. of animals	RBC 10 ⁴ /mm ³	Hb g/dl	Ht %	Platelet 10 ³ /mm ³	WBC 10 ³ /mm ³	Hemogram (%)					MCV µm ³	MCH pg	MCHC %	Rec. %	
							Neutrophil St.		Lympho.	Mono.	Eosino.					Baso.
							Seg.									
No-treatment	7	666 ±75	14.8 ±1.3	44.7 ±3.3	313 ±82	61 ±12	6.1 ±2.0	22.9 ±6.8	63.3 ±10.3	5.1 ±2.3	2.6 ±1.9	0 ±0	67 ±4	22 ±1	33 ±1	3.5 ±0.8
Control	7	656 ±73	14.9 ±1.2	44.6 ±3.8	295 ±61	61 ±13	5.6 ±2.5	25.9 ±6.8	61.9 ±7.5	3.6 ±1.7	3.1 ±1.7	0 ±0	68 ±3	23 ±1	33 ±2	3.5 ±1.2
60mg/kg	8	655 ±61	14.5 ±1.1	43.9 ±3.7	282 ±51	60 ±16	5.0 ±2.8	21.4 ±6.6	66.8 ±9.2	3.5 ±2.1	3.1 ±1.1	0.3 ±0.5	67 ±4	22 ±1	33 ±1	3.9 ±1.1
120mg/kg	7	638 ±101	14.4 ±1.5	43.0 ±4.7	295 ±60	52 ±12	4.3 ±1.8	21.9 ±8.8	67.7 ±10.0	3.1 ±1.1	3.0 ±1.3	0 ±0	68 ±6	23 ±2	34 ±1	3.5 ±1.1
240mg/kg	7	665 ±70	14.3 ±1.3	45.2 ±5.1	303 ±85	54 ±12	4.7 ±1.4	21.7 ±2.1	67.0 ±2.8	3.9 ±1.5	2.4 ±1.7	0.3 ±0.5	68 ±4	22 ±2	32 ±2	3.5 ±0.9
No-treatment	7	628 ±73	14.4 ±1.0	42.5 ±3.2	318 ±77	81 ±26	3.4 ±1.5	35.4* ±9.3	50.1 ±10.8	4.9 ±1.8	5.6 ±4.8	0.6 ±0.5	68 ±6	23 ±2	34 ±1	4.3 ±1.3
Control	7	595 ±49	14.3 ±1.5	43.4 ±3.6	390 ±124	120 ±40	4.6 ±1.4	46.9* ±9.2	38.3 ±11.9	3.3 ±1.9	6.7 ±5.0	0.3 ±0.5	72 ±4	24 ±1	33 ±1	4.7 ±1.9
60mg/kg	8	674* ±66	14.7 ±1.1	44.2 ±3.7	285 ±64	94 ±15	3.8 ±2.9	34.8* ±8.1	51.8* ±11.0	4.6 ±1.8	5.0 ±3.0	0.1 ±0.4	65*** ±4	22*** ±1	33 ±1	3.7 ±1.1
120mg/kg	6	670* ±42	14.9 ±1.0	43.0 ±3.2	289 ±34	70* ±8	4.3 ±1.4	33.8* ±10.9	54.3* ±11.6	4.5 ±1.5	2.8 ±1.2	0.2 ±0.4	64*** ±4	22*** ±1	35*** ±1	4.0 ±1.3
240mg/kg	7	602 ±60	13.0* ±1.3	40.3 ±3.6	334 ±79	78 ±36	5.3 ±2.1	46.1 ±12.2	41.3 ±12.0	4.0 ±2.5	3.0 ±1.6	0.3 ±0.5	66*** ±3	22*** ±1	32** ±1	4.8 ±1.8
No-treatment	2	641 ±48	15.2 ±0.1	44.9 ±4.4	307 ±84	63 ±24	3.0 ±0	23.5 ±7.8	63.5 ±7.8	9.0 ±0	1.0 ±0	0 ±0	70 ±2	24 ±1	34 ±3	2.1* ±0.2
Control	2	575 ±77	14.8 ±1.1	42.0 ±2.4	220 ±15	70 ±35	6.0 ±2.8	29.5 ±4.9	58.5 ±0.7	5.0 ±2.8	1.0 ±1.4	0 ±0	73 ±6	26 ±1	36 ±1	1.4* ±0.1
60mg/kg	3	627 ±32	15.1 ±1.1	44.2 ±0.8	301 ±87	80 ±12	4.0 ±1.7	35.7 ±10.7	54.0 ±14.4	5.0 ±4.4	1.3 ±1.5	0 ±0	70 ±5	24 ±1	34 ±3	1.5* ±0.2
120mg/kg	2	527 ±51	13.4 ±0.9	37.4 ±1.5	352*** ±4	45 ±10	5.0 ±2.8	26.5 ±16.3	62.0 ±18.4	6.0 ±0	0.5 ±0.7	0 ±0	71 ±4	26 ±1	36 ±1	1.2* ±0.1
240mg/kg	2	578 ±8	13.8* ±0.3	41.2 ±0.1	390 ±147	111 ±85	5.5 ±2.1	37.0 ±7.1	44.5 ±9.2	11.5 ±13.4	1.5 ±0.7	0 ±0	71 ±1	24 ±0	34 ±1	1.1* ±0.1

Values are mean ± S.D.

* : Significant difference from no-treatment control (p < 0.05)

** : Significant difference from no-treatment control (p < 0.01)

* : Significant difference from control (p < 0.05)

** : Significant difference from control (p < 0.01)

Table 7 Hematological findings of female rabbits during application and withdrawal periods of NT-1 ointment

Group	No. of animals	RBC 10 ⁴ /mm ³	Hb g/dl	Ht %	Platelet 10 ³ /mm ³	WBC 10 ² /mm ³	Hemogram(%)					MCV		MCHC %	Rec. %		
							Neutrophil St.		Lympho.	Mono.	Eosino.	Baso.	Others			μm ³	pg
No-treatment	7	635 [*] ±30	14.7 [*] ±0.3	43.0 [*] ±2.1	224 [*] ±28	52 ±9	5.9 ±2.2	23.6 ±7.3	65.0 [*] ±7.8	3.0 ±0.8	2.4 ±1.5	0.1 ±0.4	0 ±0	67 ±3	23 ±1	34 ±1	3.3 ±0.9
Control	7	587 [*] ±48	14.1 [*] ±0.5	40.4 [*] ±2.0	308 [*] ±86	60 ±13	6.7 ±2.5	29.6 ±5.7	56.6 [*] ±6.1	3.4 ±1.6	3.4 ±1.7	0.3 ±0.5	0 ±0	69 ±6	24 ±2	35 ±2	3.5 ±0.8
60mg/kg	6	595 ±55	14.1 [*] ±0.5	40.4 [*] ±1.7	334 ±119	55 ±17	5.8 ±2.5	22.8 ±8.3	65.2 ±8.1	3.7 ±1.2	2.5 ±1.6	0 ±0	0 ±0	68 ±5	24 ±2	35 ±1	3.5 ±0.7
120mg/kg	7	615 ±53	14.2 ±0.8	41.4 ±2.5	295 ±92	65 [*] ±8	4.4 ±2.4	21.1 [*] ±5.9	68.9 ^{**} ±8.0	3.6 ±2.1	1.9 ±0.9	0.1 ±0.4	0 ±0	67 ±3	23 ±1	34 ±1	3.8 ±1.4
240mg/kg	7	627 ±115	14.6 ±1.8	42.1 ±5.7	245 ±103	55 ±9	4.6 ±3.0	18.7 ^{**} ±4.3	72.0 ^{**} ±7.7	2.6 ±1.3	2.1 ±1.3	0 ±0	0 ±0	67 ±5	24 ±2	35 ±1	3.7 ±0.4
No-treatment	6	629 ±53	14.4 ±0.8	43.2 ±2.2	271 [*] ±59	68 ±34	2.8 ±2.1	31.8 ±9.0	58.7 ±12.8	3.2 ±1.0	3.3 ±2.1	0.2 ±0.4	0 ±0	68 ±5	23 ±2	33 ±1	4.3 ±0.7
Control	6	624 ±11	13.7 ±0.5	42.4 ±2.0	372 [*] ±79	90 ±35	4.7 ±1.6	37.8 ±7.4	48.5 ±12.0	4.3 ±2.1	4.5 ±5.1	0.2 ±0.4	0 ±0	68 ±4	22 ±1	33 ±1	3.7 ±1.6
60mg/kg	5	661 ±62	14.4 ±0.9	43.9 ±1.5	295 ±73	66 ±26	3.4 ±0.5	29.2 ±10.0	59.6 ±17.6	2.0 ±1.0	5.4 ±7.1	0.4 ±0.5	0 ±0	66 ±6	22 ±1	33 ±2	4.1 ±0.9
120mg/kg	6	660 ±40	14.6 [*] ±0.7	44.0 ±2.2	278 [*] ±63	69 ±16	3.5 ±1.0	35.0 ±2.3	55.5 ±5.2	2.7 ±2.0	3.2 ±2.0	0.2 ±0.4	0 ±0	66 ±3	22 ±1	33 ±1	4.9 ±1.9
240mg/kg	6	662 ±84	14.1 ±1.5	43.3 ±3.6	303 ±83	79 ±18	2.7 ±1.9	38.0 ±21.1	51.5 ±24.6	2.8 ±1.5	4.7 ±5.6	0.3 ±0.5	0 ±0	65 ±5	21 ±1	33 ±1	3.8 ±0.6
No-treatment	2	654 [*] ±1	15.9 ±0.3	45.3 ±1.8	305 ±17	51 ±16	5.5 ±2.1	32.0 ±4.2	57.0 ±8.5	5.0 ±1.4	0.5 ±0.7	0 ±0	0 ±0	69 ±3	25 ±1	36 ±1	1.6 ±0.4
Control	2	610 [*] ±13	15.0 ±0	41.4 ±0.6	290 ±78	42 ±3	5.0 ±2.8	28.5 ±23.3	57.0 ±33.9	8.0 ±7.1	1.5 ±0.7	0 ±0	0 ±0	68 ±1	25 ±1	37 ±1	1.8 ±0.6
60mg/kg	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120mg/kg	2	645 ±35	14.4 ±0.8	42.9 ±3.3	248 ±47	79 ±27	3.0 ±1.4	20.0 ±8.5	69.5 ±10.6	7.5 ±3.5	0 ±0	0 ±0	0 ±0	66 ±1	22 ±0	34 ±1	1.1 ±0.8
240mg/kg	2	639 ±13	15.2 ±0.1	42.9 ±0.3	361 ±28	70 ±30	3.5 ±2.1	37.5 ±12.0	47.5 ±17.7	10.5 ±7.8	1.0 ±0	0 ±0	0 ±0	67 ±2	24 ±1	35 ±0	1.6 ±0.6

Values are mean ± S.D. * : Significant difference from no-treatment control (p < 0.05)

1: Reticulocyte † : Significant difference from control (p < 0.05)

†† : Significant difference from control (p < 0.01)

Table 8 Biochemical findings of male rabbit serum during application and withdrawal periods of NT-1 ointment

Group	No. of animals	GOT K.U.	GPT K.U.	ALP K-A.U.	Glucose mg/dl	LDH W.U.	CPK mU/ml	BUN mg/dl	TC' mg/dl	FC' mg/dl	TB ³ mg/dl	UA mg/dl	IP mg/dl	TP ⁴ g/dl	Alb ⁵ g/dl	A/G	Ca mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Cre ⁶ mg/dl
No-treatment	7	7.9 ± 2.8	11.6 ± 3.6	11.5 ± 1.4	128.0 ± 13.4	146.2 ± 26.8	459.3 ± 254.2	24.7 ± 3.8	63.0 ± 24.0	9.8 ± 6.8	0.29 ± 0.09	0.42 ± 0.14	7.5* ± 0.4	5.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4	5.3 ± 1.1	15.4 ± 0.7	145.4 ± 1.9	4.66 ± 0.40	99.5 ± 2.2	1.01 ± 0.15
Control	7	11.0 ± 5.7	9.7 ± 1.8	13.2 ± 2.6	140.2 ± 21.9	151.8 ± 26.4	304.1 ± 89.0	26.1 ± 3.3	57.9 ± 20.4	8.4 ± 5.3	0.21 ± 0.07	0.36 ± 0.09	8.0* ± 0.4	5.3 ± 0.2	4.5 ± 0.2	5.7 ± 0.6	15.1 ± 0.5	145.5 ± 2.2	4.60 ± 0.19	96.9 ± 2.8	1.16 ± 0.25
Before 60mg/kg	8	9.1 ± 2.9	10.9 ± 2.0	11.0 ± 2.2	126.2 ± 14.8	152.3 ± 20.3	545.4 ± 502.8	22.6 ± 4.5	60.9 ± 21.2	9.1 ± 5.8	0.23 ± 0.09	0.47 ± 0.18	7.4 ± 0.8	5.3 ± 0.4	4.4 ± 0.4	5.2 ± 1.1	15.2 ± 0.8	145.1 ± 2.1	4.56 ± 0.36	99.3 ± 2.6	0.97 ± 0.15
120mg/kg	7	9.1 ± 2.8	8.7 ± 1.4	13.3* ± 1.6	144.5 ± 19.2	146.7 ± 27.7	326.3 ± 186.7	24.8 ± 4.6	81.5 ± 48.3	14.4 ± 12.1	0.21 ± 0.09	0.35 ± 0.11	7.8 ± 0.5	5.4 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.5 ± 1.0	15.3 ± 0.9	146.0 ± 1.0	4.42 ± 0.37	99.4 ± 3.5	1.07 ± 0.22
240mg/kg	7	7.9 ± 3.1	10.1 ± 2.3	10.2* ± 1.5	139.1 ± 11.6	162.9 ± 26.7	256.9 ± 48.3	27.0 ± 3.5	81.1 ± 20.0	15.0* ± 6.0	0.23 ± 0.12	0.37 ± 0.12	7.2* ± 0.6	5.4 ± 0.2	4.5 ± 0.1	5.1 ± 1.1	15.4 ± 0.5	145.0 ± 2.3	4.75 ± 0.34	97.1 ± 2.8	0.96 ± 0.12
No-treatment	7	5.6 ± 2.5	10.3 ± 4.3	7.9 ± 0.9	143.3 ± 13.8	130.4 ± 28.5	252.7 ± 83.5	22.0 ± 3.8	36.4 ± 9.8	5.2 ± 2.5	0.24 ± 0.09	0.40* ± 0.13	5.9 ± 0.6	4.9* ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.9** ± 1.0	13.7 ± 1.1	144.1 ± 2.5	3.94 ± 0.39	99.4 ± 4.8	1.06 ± 0.22
Control	7	6.1 ± 2.2	8.4 ± 2.9	6.6 ± 3.2	130.7 ± 13.1	154.1 ± 33.3	281.1 ± 129.1	21.3 ± 5.5	46.8 ± 11.2	6.7 ± 1.5	0.21 ± 0.07	0.56* ± 0.10	5.5 ± 0.7	5.3* ± 0.3	4.0 ± 0.3	3.2** ± 1.0	13.9 ± 1.1	146.2 ± 3.0	3.98 ± 0.36	101.5 ± 2.9	1.11 ± 0.09
60mg/kg	8	5.3 ± 1.4	7.8 ± 1.6	7.5 ± 1.5	131.9 ± 12.5	120.8* ± 23.6	229.7 ± 33.6	18.4* ± 2.6	44.0 ± 10.3	7.4 ± 2.5	0.20 ± 0.05	0.35** ± 0.07	5.6 ± 0.5	5.2 ± 0.4	4.2 ± 0.2	4.5* ± 1.1	14.6 ± 0.7	143.7 ± 3.9	3.97 ± 0.31	100.8 ± 4.2	0.91** ± 0.12
120mg/kg	6	7.1 ± 2.3	8.9 ± 2.3	8.0 ± 1.7	131.4 ± 21.3	109.9* ± 20.8	240.3 ± 63.3	18.8 ± 2.7	41.9 ± 7.3	7.2 ± 1.8	0.23 ± 0.05	0.41 ± 0.15	6.0 ± 1.4	5.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.3* ± 0.7	14.3 ± 0.6	144.0 ± 5.5	4.02 ± 0.22	98.5 ± 4.9	0.95* ± 0.12
240mg/kg	7	4.3 ± 1.4	6.0* ± 2.2	5.7* ± 1.9	143.8 ± 16.2	110.9* ± 29.1	190.8 ± 56.5	16.6** ± 1.9	40.2 ± 11.7	6.9 ± 2.6	0.19 ± 0.05	0.51 ± 0.25	5.6 ± 0.3	5.1 ± 0.6	3.9 ± 0.3	3.8 ± 1.4	13.8 ± 0.7	144.3 ± 5.0	3.94 ± 0.56	102.0 ± 1.6	0.89** ± 0.08
No-treatment	2	5.0 ± 0.6	6.9 ± 3.0	7.7 ± 0.3	129.5 ± 22.2	91.2 ± 8.3	234.8 ± 125.8	20.7 ± 4.5	41.9 ± 11.9	4.8 ± 2.6	0.11 ± 0.04	0.16 ± 0.01	5.6 ± 0.9	4.9 ± 0.2	4.0 ± 0.4	4.5 ± 1.1	14.4 ± 0.4	144.1 ± 4.5	4.23 ± 0.18	96.8 ± 1.5	0.97 ± 0.04
Control	2	10.3 ± 7.9	13.0 ± 2.1	7.4 ± 1.2	137.3 ± 2.0	117.9 ± 20.1	282.7 ± 116.1	22.7 ± 2.3	42.4 ± 10.0	2.8 ± 0.8	0.13 ± 0.04	0.23 ± 0.06	6.1 ± 0.2	5.7 ± 0.4	4.4 ± 0.1	3.6 ± 1.2	14.3 ± 0.9	146.1 ± 1.6	4.20 ± 0.20	98.0 ± 1.3	1.10 ± 0.08
60mg/kg	3	4.6 ± 4.6	6.1* ± 1.1	7.7 ± 0.7	150.2 ± 7.1	115.2 ± 29.3	223.4 ± 103.4	21.0 ± 3.5	41.2 ± 13.8	5.0 ± 2.3	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.03	5.7 ± 0.3	5.3 ± 0.3	4.2 ± 0.2	3.9 ± 0.6	15.0 ± 0.4	146.6 ± 3.5	3.92 ± 0.39	98.0 ± 1.6	1.07 ± 0.05
120mg/kg	2	3.7 ± 0.6	5.0* ± 1.3	8.6 ± 1.6	146.6 ± 7.8	89.3 ± 2.4	156.0 ± 22.2	27.6 ± 0.2	45.5 ± 4.3	8.7* ± 1.2	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01	6.2 ± 0.6	5.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.0 ± 0.6	15.9* ± 0.1	146.9 ± 7.4	4.53 ± 0.16	97.3 ± 4.4	1.06 ± 0.17
240mg/kg	2	6.9 ± 0.3	7.5 ± 3.5	5.8 ± 0.7	153.7 ± 24.5	120.0 ± 57.3	176.8 ± 46.0	21.8 ± 4.3	64.9 ± 53.0	8.9 ± 9.4	0.13 ± 0.04	0.67 ± 0.72	7.3 ± 0.6	5.5 ± 0.6	4.0 ± 0.5	3.5 ± 2.7	14.2 ± 0.4	147.3 ± 3.9	4.59 ± 0.01	97.9 ± 2.5	1.17 ± 0.27

Values are mean ± S.D.

1 : Total Cholesterol

2 : Free Cholesterol

3 : Total Bilirubin

*

**

4 : Total Protein

5 : Albumin

6 : Creatinine

: Significant difference from no-treatment control (p<0.05)

: Significant difference from no-treatment control (p<0.01)

: Significant difference from control (p<0.05)

: Significant difference from control (p<0.01)

Table 9 Biochemical findings of female rabbit serum during application and withdrawal periods of NT-1 ointment

Group	No. of animals	GOT K.U.	GPT K.U.	ALP K-A.U.	Glucose mg/dl	LDH W.U.	CPK mU/ml	BUN mg/dl	TC' mg/dl	FC' mg/dl	TB' mg/dl	UA mg/dl	IP mg/dl	TP' g/dl	Alb ³ g/dl	A/G	Ca mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Cre ⁴ mg/dl
No-treatment	7	7.3 ± 3.2	9.7 ± 2.6	11.0* ± 2.5	131.0 ± 20.8	133.0 ± 28.8	265.8 ± 64.6	27.3 ± 5.2	96.8 ± 50.6	19.9 ± 14.6	0.24 ± 0.04	0.46 ± 0.21	6.5 ± 0.6	5.6 ± 0.7	4.8 ± 0.5	6.3 ± 1.1	15.2 ± 1.0	145.0 ± 2.4	4.71 ± 0.42	103.1 ± 3.5	0.94 ± 0.29
Control	7	13.1 ± 10.1	18.4 ± 9.7	15.0* ± 2.9	129.0 ± 19.9	149.2 ± 19.9	425.6 ± 46.8	24.1 ± 5.0	78.2 ± 22.6	15.0 ± 8.4	0.31 ± 0.09	0.48 ± 0.19	7.0 ± 1.1	5.5 ± 0.4	4.6 ± 0.2	5.8 ± 1.3	14.6 ± 0.4	144.9 ± 4.3	4.44 ± 0.36	101.9 ± 2.4	0.91 ± 0.19
Before	6	6.1 ± 1.1	8.6* ± 2.3	11.4* ± 2.5	141.0 ± 19.9	151.5 ± 46.1	461.3 ± 540.9	26.6 ± 5.7	96.7 ± 19.9	19.9 ± 5.1	0.26 ± 0.04	0.44 ± 0.16	7.3 ± 0.8	5.6 ± 0.7	4.8 ± 0.6	6.0 ± 1.8	15.1 ± 0.6	146.6 ± 2.3	4.63 ± 0.36	101.8 ± 4.7	0.87 ± 0.07
120mg/kg	7	6.2 ± 1.4	10.7 ± 4.3	11.6* ± 2.5	130.8 ± 20.1	146.9 ± 23.2	286.1 ± 87.3	25.2 ± 4.8	75.3 ± 18.4	15.0 ± 6.7	0.26 ± 0.05	0.40 ± 0.06	7.5** ± 0.6	5.3 ± 0.2	4.5 ± 0.1	5.9 ± 1.4	14.7 ± 0.5	142.4 ± 2.5	4.33 ± 0.33	100.2 ± 2.5	0.83 ± 0.14
240mg/kg	7	6.3 ± 2.0	8.1* ± 3.9	11.8 ± 2.9	129.0 ± 20.2	125.7 ± 21.2	244.5 ± 83.7	24.9 ± 2.5	63.4 ± 15.6	11.0 ± 4.9	0.25 ± 0.05	0.38 ± 0.08	6.6 ± 0.8	5.2 ± 0.2	4.4* ± 0.1	5.7 ± 1.2	14.6 ± 0.8	144.8 ± 1.8	4.62 ± 0.25	104.0 ± 3.3	0.84 ± 0.16
No-treatment	6	5.1 ± 1.2	9.5 ± 3.1	8.8 ± 2.5	137.5 ± 17.1	144.7 ± 72.2	271.1 ± 212.3	24.4** ± 3.5	56.8 ± 15.6	10.5 ± 5.6	0.23 ± 0.05	0.37** ± 0.06	6.1 ± 0.4	5.3 ± 0.2	4.5** ± 0.2	6.0* ± 1.6	13.4 ± 1.0	148.3 ± 20.9	4.33 ± 0.90	100.6 ± 4.5	0.97 ± 0.11
Control	6	6.7 ± 2.2	12.0 ± 2.2	8.1 ± 2.6	134.1 ± 14.2	124.0 ± 29.8	246.0 ± 86.4	18.6** ± 2.6	56.2 ± 8.0	8.3 ± 0.9	0.20 ± 0.06	0.44* ± 0.03	6.1 ± 0.9	5.3 ± 0.3	4.1** ± 0.2	3.7* ± 0.8	12.8 ± 1.3	142.4 ± 4.7	3.85 ± 0.22	102.0 ± 4.8	0.92 ± 0.08
Application 5 weeks	5	4.8 ± 0.9	7.6** ± 1.7	8.6 ± 2.0	133.9 ± 11.5	83.0* ± 11.2	180.5 ± 50.2	19.2* ± 3.0	55.4 ± 15.2	9.5 ± 4.3	0.19 ± 0.06	0.32** ± 0.02	5.5 ± 0.8	5.2 ± 0.3	4.4 ± 0.3	5.5** ± 0.3	13.7 ± 0.5	141.7 ± 4.1	3.72 ± 0.14	100.8 ± 2.8	0.83* ± 0.06
120mg/kg	6	6.8 ± 2.7	7.4** ± 2.5	8.4 ± 1.0	146.3 ± 21.5	91.9* ± 5.2	205.6 ± 76.6	20.6 ± 3.9	47.4 ± 7.5	8.0 ± 2.8	0.16* ± 0.05	0.43 ± 0.08	5.4 ± 0.8	5.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.6 ± 0.8	13.3 ± 1.5	144.6 ± 2.2	3.86 ± 0.28	103.2 ± 2.6	0.95 ± 0.15
240mg/kg	6	5.9 ± 1.0	5.9** ± 3.0	6.8 ± 1.4	135.4 ± 19.6	110.9 ± 34.3	275.2 ± 174.1	19.6 ± 5.1	52.8 ± 8.7	7.9 ± 1.4	0.11** ± 0.03	0.45 ± 0.10	5.6 ± 0.6	5.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.2* ± 0.8	13.5 ± 0.7	147.9 ± 5.0	4.06 ± 0.70	101.4 ± 4.6	0.98 ± 0.07
No-treatment	2	6.0 ± 0.6	8.4* ± 1.0	9.5 ± 6.2	136.0 ± 4.6	83.9 ± 25.7	307.0 ± 162.6	27.0 ± 5.2	73.7** ± 5.7	12.8* ± 1.1	0.12 ± 0.05	0.24 ± 0.06	5.5 ± 0.9	5.5 ± 0.4	4.2 ± 0.1	3.4 ± 0.4	14.5 ± 0.6	145.8 ± 4.2	4.23 ± 0.16	102.3 ± 0	1.07 ± 0.18
Control	2	8.9 ± 2.6	16.5* ± 2.3	9.2 ± 0.6	136.7 ± 3.6	94.3 ± 18.4	217.5 ± 171.1	22.9 ± 5.2	53.0* ± 1.2	7.1* ± 0.8	0.10 ± 0	0.26 ± 0.01	5.2 ± 0	5.5 ± 0.1	4.3 ± 0.3	3.9 ± 1.6	15.1 ± 0.1	143.2 ± 0	3.96 ± 0.23	99.9 ± 4.7	1.08 ± 0.01
Withdrawal 3 weeks	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60mg/kg	2	12.4 ± 7.6	7.4* ± 1.0	5.2 ± 0.3	153.5 ± 24.8	171.0 ± 91.8	166.6 ± 27.2	22.8 ± 9.1	68.4 ± 5.7	12.3* ± 0.9	0.08 ± 0.04	0.28 ± 0.07	4.2* ± 0.1	4.8 ± 0.6	3.8 ± 0.4	3.6 ± 0.4	14.0 ± 1.2	144.2 ± 2.9	3.69 ± 0.38	101.4 ± 2.1	1.17 ± 0.08
120mg/kg	2	5.7 ± 0.1	10.0 ± 0.7	7.6 ± 1.0	164.8 ± 23.1	118.7 ± 11.3	157.2* ± 8.3	17.0 ± 4.7	54.8 ± 2.5	7.9* ± 1.0	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.05	5.6 ± 0.6	5.2 ± 0.4	3.7 ± 0.2	2.7 ± 1.2	13.9 ± 1.8	142.9 ± 3.7	3.64 ± 0.31	99.9 ± 2.3	1.08 ± 0.16

Values are mean ± S.D.

1 : Total Cholesterol

2 : Free Cholesterol

3 : Total Bilirubin

4 : Total Protein

5 : Albumin

6 : Creatinine

* : Significant difference from no-treatment control (p < 0.05)

** : Significant difference from no-treatment control (p < 0.01)

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

**** : Significant difference from control (p < 0.01)

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

び 120 mg/kg 群にそれぞれ 1 および 2 例の肺炎所見がみられた。これら肺炎は無処置対照群にも基剤対照群にも等しく認められたことは注目に値する。

その他、隣接臓器との癒着、肺気腫、結節、癒痕、リンパ節腫大、膿胸、腹水、嚢胞など炎症関連所見が散発的に諸臓器にみられた。

3) 休薬回復試験期間後の剖検所見

供試動物数は少ないが上述 2) の所見の連続と見做せるだけによく似た所見を呈した。すなわち塗布群雄に 3 例、雌に 1 例の肺炎がみられた。その他概して著変なく、特に主要臓器に散発的に所見がみられたが肝臓、腎臓、心臓には意外に所見に乏しかった。

9. 臓器重量

主要臓器の実重量ならびに相対重量について、塗布 240 mg/kg 群雄の平均肝重量値が有意に大きく注目されたが、肉眼的にも組織学的にも異常は認められなかった。

10. 病理組織学的所見

1) 塗布期間終了時の皮膚所見

NT-1 原薬塗布群および基剤対照群の雌雄を問わず角質層ならびに扁平上皮の肥厚は著明であった (Photo 2)。また雄では全塗布群に、雌でも多くの例に扁平上皮細胞の小空胞がみられた (Photo 3)。真皮では NT-1 原薬塗布群も基剤対照群も円形細胞の浸潤および軽度の線維化がみられた (Photo 4)。さらに散発的ではあるが巨細胞あるいはマクロファージが出現していた。皮下組織では NT-1 原薬塗布群も基剤対照群も毛包の発達が著明であった (Photo 5)。無処置対照群の皮膚では特記すべき変化は認められなかった。

2) 休薬回復期間終了時の皮膚所見

この時期の皮膚所見として NT-1 原薬塗布群も基剤対照群ともに扁平上皮の肥厚と毛包の発達がみられた (Photo 6)。

3) 途中死亡例の内臓所見

前述の如く NT-1 原薬の塗布期間中に 6 例の死亡がみられたが、これらは何れも肺炎所見を呈していた (Photo 7)。すなわち、肺組織は充血、出血とともに気管支を中心に細胞浸潤が著明なもの、あるいは肺泡に漿液を充たして肺水腫像を呈した。他の主要臓器にも充血、出血、細胞浸潤、壊死、膿瘍のほか石灰化、線維化等が散見された。

4) 塗布期間終了時の内臓所見

5 週間の塗布期間終了後各試験群のうち 5 匹迄を屠殺剖検の後、組織学的に検索した。肺では NT-1 原薬塗布群および無処置対照群、基剤対照群ともに 1～2 例の肺炎巣を呈し、これらは軽度のリンパ濾胞の過形成、うっ血、出血、血管の肥厚、肺胞壁の肥厚および細胞浸潤等がみられた。肝臓では散発的に肉芽腫を、まれに肝細胞の萎縮および空胞化がみられた。脾臓では無処置対照群を含んで散発的にヘモジデリン沈着、うっ血および急性脾炎がみられた。腎臓では尿管腔内に円柱物質が散発的に、また尿管上皮細胞に小空胞がみられた。また間質のうっ血、細胞浸潤、尿管の拡張、石灰化等がみられた。心臓では稀に心筋炎を、また心筋変性を認めた。顎下腺では散発的に細胞浸潤がみられ、腺組織は消失し、線維化あるいは壊死

を呈しているものもあった。その他消化器系、生殖器系の諸臓器に大体上記と類似の変化を認めたが、上記の諸変化は何れも NT-1 原薬塗布との関連性に乏しいものであった。

5) 休薬回復期間終了時の内臓所見

この時期の組織学的内臓所見は概して上述の NT-1 原薬塗布終了時のそれと大差なかった。唯だ NT-1 原薬塗布群雌の回腸に特発性リンパ性腫瘍を認めたが、単に 1 例で、用量依存性を欠き、NT-1 原薬塗布との関連は考えられない。

Photo 2 Histological finding of treated skin of a male rabbit with base ointment of NT-1 for 5 weeks. Hyperkeratosis and squamous epithel thickening are observed. (H-E stain $\times 40$)

Photo 3 Histological finding of treated skin of a female rabbit with NT-1, 240mg/kg for 5 weeks. Vacuolization of epithelial cells is observed. (H-E stain $\times 200$)

Photo 4 Histological finding of treated skin of a male rabbit with base ointment of NT-1 for 5 weeks. Cell infiltration and fibrosis are observed in corium. (H-E stain $\times 100$)

Photo 5 Histological finding of treated skin of a female rabbit with base ointment for 5 weeks. Development of hair folliculi is observed in subcutaneous tissues. (H-E stain $\times 100$)

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

Photo 6 Histological finding of treated skin of a female rabbit after 3 weeks withdrawal following 5 weeks application of NT-1, 240mg/kg. Thickening of squamous epithelium is observed. (H-E stain $\times 100$)

Photo 7 Histological finding of the lung of a female rabbit in no-treatment control group. Bronchopneumonia is observed. (H-E stain $\times 100$)

考 察

1879年, Murrell (1879) が nitroglycerin を狭心症発作に特効あることを提唱して以来すでに100年以上になるが今日も依然その声価は高く汎用されている。その剤形には舌下錠が最も一般的であるが nitroglycerin 軟膏としての皮膚適用は作用時間の持続に有利として推賞されているが (Davis et al., 1955; Reichel et al., 1974; Davidov and Mroczek, 1976), 一面局部の皮膚炎症の報告もみられる (William and Colfred, 1978; Hendrich and William, 1979)。

我々はウサギの背部を剪毛し, $10 \times 5 \text{ cm}^2$ の皮膚面にニトログリセリンテープ (NT-1) の原薬をニトログリセリンとして 240 mg/kg (実験可能最大量), 120 mg/kg, 60 mg/kg の3段階量を毎日1回ずつ塗布し35日間続け, その35日時点で大部分のウサギを屠殺し NT-1 原薬による変化の有無を調べ, 一部の動物は以後休薬し回復期間を21日間もうけて観察した。対照試験としては無処置対照群と基剤対照群をおいて同一環境下の実験した。

NT-1 原薬塗布局部に軽度の発赤がみられた (Draize 評点で2~3)。この発赤は用量依存的に強くなることもなく, 日を重ねるにつれて強くなることもなくむしろ漸次に軽くさえなっていた。浮腫を伴ったのは70例中2例に過ぎず, しかも一過性のものであった。休薬すれば数日にして発赤は消えた。無処置対照群では全然変化はないが, 基剤対照群では NT-1 原薬塗布群より皮膚反応は幾分強く特に初期には痂皮を伴った。したがって NT-1 原薬による発赤はニトログリセリンの溶媒としての基剤自体によるものと考えられる。組織学的には角質層ならびに扁平上皮の肥厚と真皮層で円形細胞の浸潤, 線維化がみられ, 皮下組織に毛包の発達が見られ, これらの所見は休薬後3週後にも幾分残っていた。

動物の一般症状は全般的には著変を認めなかったが, 一部に喘鳴がきかれ, 軟便, 下痢を発

するものがあった。NT-1 原薬塗布試験開始後約 2 週間を過ぎた頃から元気がうずくまり、摂餌量著減し、体重軽減し、喘鳴を發し、衰弱甚だしく触診で低体温を呈して数日後試験第 3 週から第 4 週にかけて死の転帰をとるものが現れた。斯くして 70 匹中 6 匹（雌 5，雄 1）が死亡したがこれらは剖検的にも組織学的にも肺炎所見を認め、肺病巣、鼻腔よりの材料を培養し *Bordetella bronchiseptica* を検出した。何故にこの感染が起ったかについて考えられることは飼育室内にニトログリセリンより蒸散する亜硝酸が注目される。したがってその悪環境の下に抵抗性の弱いものから発病し死亡したもので、無処置対照群、基剤対照群の別なく、NT-1 原薬の用量依存性もなく発症した。しかしこの感染経路についてはあきらかにすることはできない。

途中死亡動物以外の動物は摂餌量、体重、食餌効率ともに異常なく、検尿所見に潜血反応が雄 1 例にみられたが、それ以外に異常なかった。血液学的検査で NT-1 原薬塗布群雄の赤血球数の増加傾向と MCV、MCH の減少がみられたが用量依存性を欠いていて偶発性と察せられた。血清生化学的検査結果に特記に値する所見なく、心電図検査にも異常値は認めなかった。要するに死亡例以外の動物は NT-1 原薬塗布によって一般状態に影響を及ぼすことはなかった。

塗布期間終了時での屠殺剖検所見および組織学的検索所見で NT-1 原薬塗布群、無処置対照群、基剤対照群を問わず肺炎の散発を認めた。その他の主要臓器にも散発的に細胞浸潤、壊死巣、癒着など感染症関連所見がみられた。この時期の感染症の原因菌について改めて検索しなかったが恐らく先に述べた *Bordetella bronchiseptica* によるものであろう。これら感染症所見は休薬回復期間終了後の剖検時でも依然散発的に認められた。

以上のことから、NT-1 原薬の 240 mg/kg によっては、一般症状、摂餌量、体重、食餌効率に変化はなく、また、尿検査、血液学的検査、血清生化学的検査および組織学的検査においても変化はみられず、全身的に何ら障害は認められないことより、NT-1 原薬は安全性の高い薬物と考えられる。

要 約

ニトログリセリンテープ (NT-1) の原薬をウサギ背部皮膚に連続 5 週間塗布してその皮膚局部の反応と全身への影響を検査し下記の結果を得た。

1. NT-1 原薬塗布によって皮膚は軽度の発赤 (Draize 評点 2～3) を生ずるがこの発赤は塗布日数を重ねるにつれて軽くなって行き、休薬すると間もなく消失する。またこの発赤は親油性軟膏に依っても生じ、むしろ NT-1 原薬より強く (Draize 評点 4, 痂皮を伴う) 現れる。組織学的には角質層ならびに扁平上皮の肥厚、真皮の細胞浸潤、皮下組織の毛包の発達がみられる。NT-1 原薬による上述の皮膚反応はニトログリセリン自体によるものでなくその溶媒たる基剤によるものと察せられる。

2. 動物の一般状態および諸種検査結果は大多数のものについては変化は認めなかったが、一部のものに *Bordetella bronchiseptica* の感染を惹起して肺炎による死亡を来した。これは

Subacute toxicity study of 10% nitroglycerin in rabbits

NT-1 原薬塗布と無関係の群にも発症し、恐らくニトログリセリンの亜硝酸が遊離蒸散して飼育室内空気を汚染しその刺激性が呼吸器を障害し感染を誘発したものと察せられる。

3. 以上要するに NT-1 原薬の 240 mg(ニトログリセリンとして)/kg (物理的に塗布可能な最大量) によっては、塗布皮膚面の局部的にも、動物個体の全身的にも何ら障害は認められなかった。従って NT-1 原薬の 240 mg/kg/day は最大無影響量で、確実中毒量はこれ以上と推定される。

文 献

- Davidov, M. E. and Mroczek, W. J. (1976): The effect of nitroglycerin ointment on the exercise capacity in patients with angina pectoris, *Angiology*, **27**, 205-211.
- Davis, J. A. and Wiesel, B. H. (1955): The treatment of angina pectoris with a nitroglycerin ointment, *Am. J. Med. Sci.*, **230**, 259-263.
- Draize, J. H. Woodard, G. and Caluery H. O. (1944): Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Expt. Ther.*, **83**, 377-390.
- Hendricks, A. A. and William, G. D. (1979): Contact dermatitis due to nitroglycerin ointment, *Arch Derm.*, **115**, 853-855.
- Irwin, S. (1964): Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In animal and clinical pharmacological techniques in drug evaluation. (Nodine, J. H. and Siegler, P. E. ed.), p. 36-54 Year Book Medical Publisher, Chicago.
- Murrell, W. (1879): Nitroglycerine as a remedy for angina pectoris, *Lancet*, **1**, 80-81.
- 小田嶋成和 (1978): 動物による癌原性検索法, 蛋白質, 核酸, 酵素, **23**, 739-747.
- Reichek, N. Goldstein, R. E., Redwood, D. R. et al (1974): Sustained effects of nitroglycerin ointment in patients with angina pectoris, *Circulation*, **50**, 348-352.
- William, M. F. and Colfred, L. D. (1978): Allergic contact dermatitis secondary to topical nitroglycerin, *J. A. M. A.* **239**, 1743-1744.
- 山田和生, 外山淳治, 林 博史, 他 (1981): 狭心症に対する Nitroglycerin ointment (SK-106N Ointment) の使用経験, 基礎と臨床, **15**, 109-118.