Calcipotriol (MC903) の生殖・発生毒性試験 (第3報)

— ウサギ皮下投与による器官形成期投与試験 —

内山 長久, 鈴木 登志郎, 小池 嘉秀,
小野 正博*, 白川 清美*, 永田 充宏*, 小西 良士*

株式会社 日本セイギケン総合研究所

〒433 静岡県浜松市葵町95-10

*帝國製薬株式会社 研究開発本部

〒769-26 香川県大川郡大内町三本松567番地

REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDIES OF CALCIPOTRIOL (MC903) : (3)

— A Teratogenicity Study in Rabbits by
Subcutaneous Administration —

Hisashi UCHIYAMA, Toshiro SUZUKI, Yoshihide KOIKE,
Masahiro ONO*, Kiyomi SHIRAKAWA*, Mitsuhiro NAGATA*
and Ryoji KONISHI*

Japan Seigiken Research Center Co., Ltd.,

95-10 Aoi-cho, Hamamatsu, Shizuoka 433, Japan

**Research and Development Division, Teikoku Seiyaku Co., Ltd.,*

567 Sanbonmatsu, Ochi-cho, Ohkawa-gun, Kagawa 769-26, Japan

(Received November 7, 1995 ; Accepted March 6, 1996)

ABSTRACT — Teratogenicity of calcipotriol (MC903), an anti-psoriasis agent, was studied. MC903 at doses of 0.1, 0.5, 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g/kg/day}$ was subcutaneously administered to pregnant Std : NZW rabbits from day 6 to 18 of gestation.

1. A decrease in locomotor activity was observed in the group administered MC903 5 $\mu\text{g/kg/day}$. Food consumption and body weight gain decreased dose-dependently in groups administered MC903 1 $\mu\text{g/kg/day}$ or more. Granular whitish kidneys were observed in groups administered MC903 2.5 and 5 $\mu\text{g/kg/day}$. Rough and whitish aorta were noted in groups administered MC903 1 $\mu\text{g/kg/day}$ or more.

2. Significant fetotoxicity was not induced by administration of MC903 up to 0.5

連絡先 : 〒769-26 香川県大川郡大内町三本松567番地
帝國製薬株式会社 研究開発本部
小野 正博

$\mu\text{g/kg/day}$.

3. On the basis of results obtained in the present study, it is considered that no-toxic dose level of MC903 is $0.5 \mu\text{g/kg/day}$ for pregnant animals and fetuses.

KEY WORDS : Anti-psoriatic agent, Calcipotriol, MC903, Teratogenicity study, Rabbits

緒 言

Calcipotriol (以下, MC903 と略す) は, Leo Pharmaceutical Products Ltd. (Denmark) で開発された新規乾癬治療剤である。本剤はビタミン D_3 の活性本体である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の類縁化合物であり, 表皮細胞に対する細胞増殖抑制作用および分化誘導作用を有し, カルシウム代謝に及ぼす作用は活性型ビタミン D_3 の $1/100 \sim 1/200$ と報告されている (Binderup and Bramm, 1988)。欧米では本剤の $50 \mu\text{g/g}$ 濃度の軟膏が臨床適用されており, 本邦においても安全な乾癬治療剤として有用性が期待されている。

今回, 著者らは MC903 の安全性評価の一環として, ウサギを用いて器官形成期皮下投与試験を実施し, 母動物の妊娠および胎児の発生に及ぼす影響を検討したので報告する。

なお, 第1回試験において, MC903 の $1, 2.5$ および $5 \mu\text{g/kg/day}$ の全ての投与群に母動物の体重および摂餌量の減少あるいは増加抑制, 大動脈内腔の粗造白色化がみられたほか, 胎児でも胚・胎児死亡率が増加したことから, 母動物および胎児における MC903 の無毒性量を明らかにする目的で, 投与量を 0.1 および $0.5 \mu\text{g/kg/day}$ とした追加試験を実施した。

実験材料および方法

1. 被験物質

本試験には, Lot No. 9307-80 (純度: 98.2%) の MC903 を使用した。

MC903 は, 化学名を (+)-(5Z,7E,22E,24S)-24-cyclopropyl-9,10-secochola-5,7,10,(19),22-tetraene- $1\alpha,3\beta,24$ -triol と称し, 分子量412.61で, エタノー

ルに溶けやすく, クロロホルムおよびプロピレングリコールにやや溶けやすく, 水および流動パラフィンにはほとんど溶けない白色の結晶性粉末である。MC903 の化学構造式を Fig. 1 に示した。

2. 使用動物および飼育条件

第1回試験では, 日本エスエルシー(株)から New Zealand White 種 (Std: NZW, クリーン) 雌ウサギを22週齢および雄ウサギを26週齢にて購入した。その他に, 投与量設定のための予備試験に用いた同種雄ウサギを継続飼育し, 51週齢にて交配に用いた。追加試験では, 第1回試験同様に, 同種雌ウサギを20週齢および雄ウサギを26週齢にて購入した。その他に, 第1回試験に用いた雄ウサギを継続飼育し, 41および64週齢にて交配に用いた。

両試験とも約2週間の馴化期間終了後, 外陰部の状態から交配適期と判定した雌を, 雄と約10分間同居させ, 交尾行動の観察と腔垢中の精子の鏡検で交尾を確認した。同居は原則として午前中に2回実施した。交尾が確認された雌ウサギは妊娠成立とみな

Fig. 1. Chemical structure of calcipotriol.

し、各群に体重が均一になるように群分けし、両試験とも1群各18匹の構成とした。交尾確認時の体重範囲は、第1回試験では2.99～4.02 kg、追加試験では2.99～3.77 kgであった。

試験期間を通して、動物は温度 23 ± 2 °C、湿度 55 ± 15 %、換気回数約13回/時間、12時間照明（7：00～19：00）に設定した飼育室でアルミニウム製ケージ（40 W × 50 D × 33 H (cm)）に個別に収容した。飼料は固型飼料（ラボRストック、日本農産工業株）を予備飼育期間中は1日あたり150 g、妊娠期間中は自由摂取させた。また、飲料水は塩素消毒した井戸水を容積500 mlのポリエチレン製給水瓶で自由に摂取させた。

3. 投与量および群構成

第1回試験の投与量は、New Zealand White 種ウサギを用いて行った投与量設定のための予備試験の結果を参考に設定した。すなわち、MC903の1, 5, 10および15 $\mu\text{g/kg/day}$ を各群4～6匹に妊娠6～18日の間皮下投与し、妊娠29日に帝王切開して母動物および胎児に対する影響を検討した。母動物については、流産が5 $\mu\text{g/kg}$ 群（1/4匹）および15 $\mu\text{g/kg}$ 群（3/6匹）、死亡が10 $\mu\text{g/kg}$ 群（1/5匹）および15 $\mu\text{g/kg}$ 群（1/6匹）に認められた。また、5 $\mu\text{g/kg}$ 群以上では自発運動の減少、体重および摂餌量の減少ならびに大動脈内腔の粗造・白色化が、10 $\mu\text{g/kg}$ 群以上では腎臓の白色化が観察された。胎児については、15 $\mu\text{g/kg}$ 群で胚・胎児死亡率が増加傾向を、10および15 $\mu\text{g/kg}$ 群では胎児体重および胎盤重量が低下傾向を示した。1 $\mu\text{g/kg}$ 群では母動物および胎児ともに変化は認められなかった。以上のことから、本試験においては5 $\mu\text{g/kg/day}$ を最高用量に設定し、中間用量に2.5 $\mu\text{g/kg/day}$ 、最低用量に1 $\mu\text{g/kg/day}$ を設定した。これらに溶媒のみを投与する対照群を加え、計4群とした。

追加試験の投与量は、第1回試験において、MC903の1, 2.5および5 $\mu\text{g/kg/day}$ の全ての投与群で、母動物に体重および摂餌量の増加抑制あるいは減少、大動脈内腔の粗造・白色化および胎児に胚・胎児死亡率の増加が認められた。したがって、母動物および胎児に対する無毒性量を明らかにする

目的で、0.5および0.1 $\mu\text{g/kg/day}$ を設定した。これらに溶媒のみを投与する対照群を設け、計3群とした。

4. 投与液の調製および投与方法

MC903を99.5%エタノールに溶解し、各群の投与液の100倍濃度の保存液を調製した。これを0.2%の割合でTritonX-100を加えた生理食塩液（以下0.2% TritonX-100加生理食塩液）で希釈して、各群の投与液を調製した。保存液および投与液は、安定性試験の結果をふまえて、 -20 °Cで遮光・冷凍保管し、それぞれ調製後30日および7日以内に使用した。

臨床適用経路は経皮投与であるが、本試験では代替経路として皮下投与とした。投与期間は、ウサギ胎児の器官形成期である妊娠6日から18日までの13日間とした。投与は1日1回、剃毛したウサギの背部皮下に毎日部位を変えて注射した。投与容量は、各動物の毎日の体重をもとに0.5 ml/kgの割合で算出した。なお、対照群の動物には、0.2% TritonX-100加生理食塩液のみを同様の方法で投与した。

5. 検査方法

1) 母動物の観察

一般状態を毎日観察し、体重は妊娠0日、5日～19日、24, 27および29日に測定した。摂餌量は、妊娠5日以降の体重測定日と同日に測定した。母動物は妊娠29日に、全例をペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液、Dinabot Co., Ltd.）の深麻酔下で放血致死させた後、帝王切開し、黄体数、着床数、初期死亡（吸収胚）および後期死亡（浸軟、死亡）ならびに生存胎児の位置と数を調べた。その後、母動物を剖検して器官重量（絶対重量）を測定し、解剖当日の体重に対する比重量（相対重量）を算出した。

2) 胎児の観察

生存胎児および観察可能な死亡胎児全例について、外表異常の有無を検査した。生存胎児は個体別に体重を測定し、胎盤は形態を肉眼的に観察したのち、重量を測定した。生存胎児全例について、内生殖器の形態および位置から性別を判定した。各同腹児の生存胎児の約1/3は、10%ホルマリン液を腹部に注入後ブアン液で固定し、頭部および腹部をWil-

son (1965) の方法により、胸部を西村 (1974) の方法により内臓検査を行った。残りの胎児は95%エタノール液に固定後、Dawson (1926) の方法によりアリザリンレッドS染色骨格透明標本作製して骨格検査を行った。

なお、追加試験において、生存胎児の内臓および骨格検査は、第1回試験でMC903投与に起因すると考えられる異常所見が認められなかったことから実施しなかった。

6. 統計学的処理

得られた各成績について、下記の検定法により統計学的解析を行った。対照群と各投与群との間の有意水準は1%あるいは5%とした。ただし、胎児に関する成績については、1腹児を標本単位として集計した。なお、帝王切開時に不妊と判定された個体の測定値およびデータはすべて試験から除外した。

1) 多重比較検定

計測値は“平均値±標準偏差”で表し、各計測値について全群の等分散性をBartlett法で検定した。等分散の場合は一元配置型分散分析を行い、有意ならばDunnett法(群間例数が等しい)あるいはScheffé法(群間例数が異なる)で多重比較を行った。不等分散の場合はKruskal-Wallis法の順位検定を行い、有意ならばDunnett型あるいはScheffé法の順位による多重比較を行った。

母動物の体重、体重増加量、摂餌量、器官重量および相対重量、黄体数、着床数、生存胎児数、生存胎児体重、胎盤重量、骨化数

2) Wilcoxonの順位と検定

着床率、胚・胎児死亡率、性比、外表異常の出現率、内臓異常の出現率、骨格異常の出現率、骨格変異の出現率、骨化遅延胎児の出現率

実験結果

1. 母動物に及ぼす影響

第1回試験および追加試験ではともに各群18例の交尾成立雌動物を実験に供したが、不妊例を除く妊娠動物数は、第1回試験では対照、1, 2.5および5 $\mu\text{g/kg}$ 群でそれぞれ17, 17, 18および14例、追加試験

では対照、0.1および0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群でそれぞれ15, 13および11例であった。

1) 死亡および流産

第1回および追加試験において、MC903投与各群および対照群ともに死亡あるいは流産はみられなかった。

2) 一般状態

第1回試験では、5 $\mu\text{g/kg}$ 群において自発運動の抑制が投与8および10日に各1例、粘液便が投与6～8日に1例および血赤色尿が投与11日から投与期間終了後にかけて2例観察された。その他、投与部における創傷あるいは痂皮形成が対照群、1, 2.5および5 $\mu\text{g/kg}$ 群にそれぞれ3, 8, 7および3例、投与部における白色域が2.5および5 $\mu\text{g/kg}$ 群に各1例観察された。これら投与部における変化は、早いもので投与開始日より、遅いものでは投与期間終了後以降観察されはじめ、帝王切開日までほとんどの例で継続的に観察された。

追加試験では、妊娠期間を通じてMC903投与に起因すると考えられる一般状態の変化は認められなかった。その他、投与部の創傷が対照群、0.1および0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群にそれぞれ2, 4および2例観察された。投与部における変化は、第1回試験の変化と同様の経過がみられた。

3) 体重

妊娠期間中の体重推移をFig. 2, 3に、第1回試験の体重増加量をTable 1に示した。

第1回試験では、MC903投与各群の体重は、投与期間中および投与期間終了後を通じて用量依存的に対照群より低く推移し、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群で妊娠13～24日、5 $\mu\text{g/kg}$ 群では妊娠10～29日まで継続して有意に減少した。また、体重増加量では1 $\mu\text{g/kg}$ 群で妊娠8, 9, 12, 14, 24および27日、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群で妊娠8～29日、5 $\mu\text{g/kg}$ 群では妊娠7～29日まで継続して有意な減少が認められた。

追加試験では、いずれのMC903投与群においても対照群と同等に推移した。

4) 摂餌量

妊娠期間中の摂餌量をFig. 4, 5に示した。

第1回試験では、MC903投与各群の摂餌量は投与

Fig. 2. Body weight of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol.

Fig. 3. Body weight of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol (additional study).

Table 1. Changes of body weight gain (g) of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol.

Dose ($\mu\text{g/kg}$)	0	1	2.5	5
No. of dams examined	17	17	18	14
Day of pregnancy				
6	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
7	10.7 $\pm$ 31.0	-15.2 $\pm$ 23.0	-9.5 $\pm$ 35.3	-25.8 $\pm$ 31.8*
8	13.2 $\pm$ 43.7	-22.9 $\pm$ 25.1*	-30.7 $\pm$ 31.7**	-73.2 $\pm$ 38.3**
9	22.6 $\pm$ 48.2	-37.5 $\pm$ 40.9*	-52.6 $\pm$ 42.2**	-136.4 $\pm$ 73.1**
10	40.5 $\pm$ 56.3	-31.6 $\pm$ 32.8	-74.6 $\pm$ 64.8**	-178.2 $\pm$ 94.7**
11	48.6 $\pm$ 54.1	-24.4 $\pm$ 43.4	-81.9 $\pm$ 72.3**	-206.1 $\pm$ 105.1**
12	75.6 $\pm$ 61.0	-33.5 $\pm$ 47.4*	-87.9 $\pm$ 67.8**	-220.9 $\pm$ 115.9**
13	98.8 $\pm$ 56.7	-7.4 $\pm$ 42.5	-76.9 $\pm$ 81.1**	-227.9 $\pm$ 129.2**
14	150.1 $\pm$ 61.3	10.4 $\pm$ 47.4*	-59.1 $\pm$ 95.5**	-230.4 $\pm$ 133.4**
15	160.0 $\pm$ 72.0	30.6 $\pm$ 53.2	-53.7 $\pm$ 100.3**	-234.5 $\pm$ 136.8**
16	172.1 $\pm$ 74.8	50.7 $\pm$ 57.9	-62.7 $\pm$ 115.4**	-230.1 $\pm$ 154.9**
17	178.5 $\pm$ 72.5	51.2 $\pm$ 78.7	-48.8 $\pm$ 114.3**	-229.1 $\pm$ 157.0**
18	183.7 $\pm$ 74.6	62.4 $\pm$ 86.1	-64.2 $\pm$ 134.4**	-252.5 $\pm$ 168.7**
19	215.2 $\pm$ 83.5	88.8 $\pm$ 71.1	-41.9 $\pm$ 140.9**	-260.6 $\pm$ 148.6**
24	345.9 $\pm$ 91.8	218.8 $\pm$ 81.3*	137.1 $\pm$ 159.2**	39.4 $\pm$ 166.5**
27	405.0 $\pm$ 94.0	261.4 $\pm$ 89.4*	202.3 $\pm$ 157.7**	123.5 $\pm$ 172.9**
29	431.2 $\pm$ 106.2	315.4 $\pm$ 85.1	247.5 $\pm$ 140.2**	156.0 $\pm$ 183.1**

Values represent mean $\pm$ S.D.*, ** : Significantly different from 0 $\mu\text{g/kg}$ group ($P < 0.05$, 0.01). **Fig. 4.** Food consumption of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol.

Fig. 5. Food consumption of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol (additional study).

期間中、用量依存的に対照群より少なく推移した。

1 µg/kg 群で妊娠 8～18 日までほぼ継続して、2.5 µg/kg 群で妊娠 7～19 日、5 µg/kg 群で妊娠 8～19 日まで継続して有意に減少した。また、5 µg/kg 群では妊娠 27 および 29 日に投与期間中の摂餌量減少の反動と考えられる有意な増加が認められた。

追加試験では、いずれの MC903 投与群においても対照群と同等であった。

5) 剖検および器官重量

第 1 回試験では、大動脈内腔の粗造・白色化が 1, 2.5 および 5 µg/kg 群にそれぞれ 1, 3 および 12 例、腎臓の顆粒状白色化が 2.5 および 5 µg/kg 群に 3 および 4 例観察された。その他、対照群および MC903 投与各群に肺の褐色または暗赤色斑、肺の肝変化、肝臓の嚢胞、腎臓の白色斑、卵管の嚢胞、子宮内のペースト状内容物、膀胱の肥厚または充血が各 1 例にみられたほか、投与部における痂皮または創傷、投与部皮下における赤色斑あるいは白色域が散見(1～8 例)された。しかし、剖検時に観察されたこれら種々の変化は、単発または用量依存性がみられなかった。

追加試験での剖検では、MC903 投与に起因すると

考えられる変化は認められなかった。

器官重量の測定結果を Table 2, 3 に示した。第 1 回試験では 1 µg/kg 群で心臓の相対重量、2.5 µg/kg 群で肝臓および腎臓(左右)の相対重量、副腎(左)の絶対重量および相対重量、5 µg/kg 群で心臓、肝臓、副腎(左)および腎臓(左右)の相対重量に有意な増加が認められた。

追加試験での器官重量では、MC903 投与各群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 胎児に及ぼす影響

1) 帝王切開所見

帝王切開時における母動物の子宮内および胎児観察記録を Table 4, 5 に示した。

第 1 回試験では、MC903 投与群で初期死亡胚の増加傾向がみられ、初期死亡と後期死亡を合わせた胚・胎児死亡率が対照群と比べて有意に増加し、用量依存性がみられた。黄体数、着床数、着床率、性比、胎児体重および胎盤重量には、MC903 投与各群と対照群との間に有意差は認められなかった。

追加試験では、各検査項目に MC903 投与各群と対照群との間に有意差は認められなかった。

Table 2. Absolute and relative organ weights of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol.

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		0	1	2.5	5
No. of dams examined		17	17	18	14
Body weight	(g)	4108.1 $\pm$ 277.1	3977.9 $\pm$ 286.8	3859.2 $\pm$ 274.7	3798.9 $\pm$ 254.9*
Organ weight					
Heart	(g)	7.448 $\pm$ 0.700	7.865 $\pm$ 0.878	7.611 $\pm$ 1.010	7.996 $\pm$ 1.007
	(g%)	0.1812 $\pm$ 0.0109	0.1974 $\pm$ 0.0136*	0.1970 $\pm$ 0.0208	0.2108 $\pm$ 0.0247**
Lung	(g)	11.292 $\pm$ 1.127	11.634 $\pm$ 1.534	11.301 $\pm$ 1.245	10.993 $\pm$ 0.999
	(g%)	0.2750 $\pm$ 0.0227	0.2927 $\pm$ 0.0347	0.2934 $\pm$ 0.0312	0.2901 $\pm$ 0.0273
Liver	(g)	83.69 $\pm$ 7.40	86.19 $\pm$ 8.01	89.96 $\pm$ 9.68	88.58 $\pm$ 8.29
	(g%)	2.042 $\pm$ 0.185	2.170 $\pm$ 0.178	2.334 $\pm$ 0.228**	2.336 $\pm$ 0.208**
Spleen	(g)	1.168 $\pm$ 0.365	1.055 $\pm$ 0.224	1.085 $\pm$ 0.270	1.105 $\pm$ 0.250
	(g%)	0.0284 $\pm$ 0.0089	0.0265 $\pm$ 0.0055	0.0280 $\pm$ 0.0062	0.0291 $\pm$ 0.0062
Adrenal (Right)	(g)	0.1206 $\pm$ 0.0242	0.1301 $\pm$ 0.0270	0.1435 $\pm$ 0.0364	0.1357 $\pm$ 0.0357
	(g%)	0.0030 $\pm$ 0.0006	0.0033 $\pm$ 0.0007	0.0037 $\pm$ 0.0009	0.0036 $\pm$ 0.0009
Adrenal (Left)	(g)	0.1295 $\pm$ 0.0224	0.1474 $\pm$ 0.0333	0.1614 $\pm$ 0.0362*	0.1516 $\pm$ 0.0327
	(g%)	0.0032 $\pm$ 0.0006	0.0037 $\pm$ 0.0008	0.0042 $\pm$ 0.0009**	0.0040 $\pm$ 0.0009*
Kidney (Right)	(g)	9.017 $\pm$ 0.630	8.659 $\pm$ 0.649	9.354 $\pm$ 1.093	9.547 $\pm$ 1.052
	(g%)	0.2202 $\pm$ 0.0188	0.2181 $\pm$ 0.0154	0.2430 $\pm$ 0.0296*	0.2516 $\pm$ 0.0255**
Kidney (Left)	(g)	9.041 $\pm$ 0.585	8.703 $\pm$ 0.726	9.555 $\pm$ 1.143	9.765 $\pm$ 0.951
	(g%)	0.2209 $\pm$ 0.0194	0.2192 $\pm$ 0.0172	0.2482 $\pm$ 0.0308*	0.2574 $\pm$ 0.0235**
Ovary (Right)	(g)	0.478 $\pm$ 0.092	0.477 $\pm$ 0.075	0.471 $\pm$ 0.117	0.445 $\pm$ 0.130
	(g%)	0.0117 $\pm$ 0.0023	0.0120 $\pm$ 0.0021	0.0122 $\pm$ 0.0030	0.0117 $\pm$ 0.0032
Ovary (Left)	(g)	0.480 $\pm$ 0.098	0.490 $\pm$ 0.076	0.482 $\pm$ 0.077	0.425 $\pm$ 0.121
	(g%)	0.0117 $\pm$ 0.0021	0.0124 $\pm$ 0.0022	0.0125 $\pm$ 0.0021	0.0112 $\pm$ 0.0033

Values represent mean $\pm$ S.D.

*, **: Significantly different from 0 $\mu\text{g/kg}$ group ($P < 0.05, 0.01$).

2) 胎児の外表面および内臓検査

外表面および内臓検査の結果を Table 6 に示した。

第 1 回試験では、胎児の外表面異常として、対照群に膈ヘルニアが 1 例および頭蓋脊椎裂・眼瞼開存・口蓋裂・前肢形成不全の合併が 1 例観察された。また、1 $\mu\text{g/kg}$ 群に外脳・膈ヘルニア・内反足・四肢形成不全および前肢手関節屈曲拘縮の合併が 1 例、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群に前肢手関節屈曲拘縮が 1 例および短尾が 1 例、5 $\mu\text{g/kg}$ 群に前肢手関節屈曲拘縮が 2 例および短尾が 1 例観察された。これら各異常の出現

率には、MC903 投与各群と対照群との間に有意差は認められなかった。また、内臓異常としては、対照群に冠狀動脈口過剰が 3 例、1 $\mu\text{g/kg}$ 群に心室中隔欠損、単一冠狀動脈口、右鎖骨下動脈の食道背側走行が各 1 例および冠狀動脈口過剰が 10 例、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群に冠狀動脈口過剰が 4 例、5 $\mu\text{g/kg}$ 群に冠狀動脈口過剰が 5 例および臍動脈の片側性形成不全が 1 例観察された。1 $\mu\text{g/kg}$ 群の冠狀動脈口過剰の出現率および内臓異常を有する胎児の出現率は対照群と比べて有意に増加したが、用量依存性はみられなかつ

Table 3. Absolute organ weights of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol (additional study).

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		0	0.1	0.5
No. of dams examined		15	13	11
Body weight	(g)	3975.6 $\pm$ 308.9	3831.2 $\pm$ 207.2	3811.9 $\pm$ 200.2
Organ weight				
Heart	(g)	8.011 $\pm$ 1.210	7.585 $\pm$ 0.791	7.771 $\pm$ 0.920
Lung	(g)	11.474 $\pm$ 1.302	10.925 $\pm$ 1.535	10.890 $\pm$ 0.853
Liver	(g)	84.75 $\pm$ 8.75	81.64 $\pm$ 12.01	84.77 $\pm$ 6.52
Spleen	(g)	0.939 $\pm$ 0.178	0.939 $\pm$ 0.329	0.984 $\pm$ 0.223
Adrenal (Right)	(g)	0.1191 $\pm$ 0.0282	0.1228 $\pm$ 0.0260	0.1218 $\pm$ 0.0408
Adrenal (Left)	(g)	0.1273 $\pm$ 0.0312	0.1307 $\pm$ 0.0275	0.1337 $\pm$ 0.0486
Kidney (Right)	(g)	8.468 $\pm$ 1.117	8.439 $\pm$ 1.167	8.725 $\pm$ 0.823
Kidney (Left)	(g)	8.609 $\pm$ 1.115	8.528 $\pm$ 1.304	8.627 $\pm$ 0.684
Ovary (Right)	(g)	0.520 $\pm$ 0.100	0.468 $\pm$ 0.074	0.435 $\pm$ 0.080
Ovary (Left)	(g)	0.479 $\pm$ 0.097	0.474 $\pm$ 0.094	0.437 $\pm$ 0.065

Values represent mean $\pm$ S.D.**Table 4.** Litter data with cesarean section of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol.

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		0	1	2.5	5
No. of litters examined		17	17	18	14
No. of corpora lutea	(total)	170	187	190	141
	(mean $\pm$ S.D.)	10.0 $\pm$ 1.7	11.0 $\pm$ 1.7	10.6 $\pm$ 2.0	10.1 $\pm$ 1.3
No. of implantations	(total)	153	146	158	134
	(mean $\pm$ S.D.)	9.0 $\pm$ 2.2	8.6 $\pm$ 2.2	8.8 $\pm$ 2.7	9.6 $\pm$ 1.3
Implantation rate	(%)	90.0	78.6	82.2	95.0
Rate of resorbed or dead fetuses					
Total	(%)	8.8	23.8*	20.8*	32.7*
Early	(%)	5.5	22.4**	18.0	27.4
Late	(%)	3.3	1.4	2.8	5.3
No. of live fetuses	(total) (%)	138 (91.2)	113 (76.2)*	124 (79.2)*	93 (67.3)*
	(mean $\pm$ S.D.)	8.1 $\pm$ 2.1	6.6 $\pm$ 2.6	6.9 $\pm$ 2.9	6.6 $\pm$ 3.8
Sex ratio ^{a)}	(%)	48.3	51.3	47.4	48.0
Fetal body weight (g)					
Male	(mean $\pm$ S.D.)	36.64 $\pm$ 5.84	39.58 $\pm$ 6.23	36.92 $\pm$ 5.11	33.99 $\pm$ 4.45
Female	(mean $\pm$ S.D.)	38.91 $\pm$ 5.34	40.69 $\pm$ 5.48	35.83 $\pm$ 5.53	33.16 $\pm$ 6.24
Placental weight (g)					
Male	(mean $\pm$ S.D.)	4.99 $\pm$ 1.00	5.69 $\pm$ 0.95	5.05 $\pm$ 0.92	4.52 $\pm$ 0.73
Female	(mean $\pm$ S.D.)	5.05 $\pm$ 0.78	5.67 $\pm$ 0.85	4.81 $\pm$ 1.14	4.18 $\pm$ 0.57

^{a)} : (No. of male fetuses / No. of live fetuses) $\times$ 100.*, ** : Significantly different from 0 $\mu\text{g/kg}$ group ($P < 0.05$, 0.01).

Table 5. Litter data with cesarean section of rabbit dams (F₀) in teratogenicity study of calcipotriol (additional study).

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		0	0.1	0.5
No. of litters examined		15	13	11
No. of corpora lutea	(total)	146	128	106
	(mean $\pm$ S.D.)	9.7 $\pm$ 2.4	9.8 $\pm$ 2.1	9.6 $\pm$ 2.2
No. of implantations	(total)	128	99	90
	(mean $\pm$ S.D.)	8.5 $\pm$ 2.5	7.6 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 2.7
Implantation rate	(%)	87.6	78.0	85.9
Rate of resorbed or dead fetuses				
Total	(%)	8.3	12.6	8.9
Early	(%)	4.8	8.9	4.1
Late	(%)	3.5	3.7	4.8
No. of live fetuses	(total) (%)	118 (91.7)	86 (87.4)	81 (91.1)
	(mean $\pm$ S.D.)	7.9 $\pm$ 2.5	6.6 $\pm$ 2.0	7.4 $\pm$ 2.7
Sex ratio (%) ^{a)}		55.1	55.6	43.8
Fetal body weight (g)				
Male	(mean $\pm$ S.D.)	39.90 $\pm$ 4.32	38.52 $\pm$ 4.78	39.10 $\pm$ 4.89
Female	(mean $\pm$ S.D.)	38.83 $\pm$ 4.37	38.40 $\pm$ 4.18	35.44 $\pm$ 4.95
Placental weight (g)				
Male	(mean $\pm$ S.D.)	5.47 $\pm$ 0.92	5.36 $\pm$ 0.88	5.24 $\pm$ 0.78
Female	(mean $\pm$ S.D.)	5.43 $\pm$ 0.94	5.56 $\pm$ 1.15	4.69 $\pm$ 0.73
No. of fetuses with external abnormalities	(%)	1 (0.7) ^{b)}	1 (1.3) ^{c)}	0

a) : No. of male fetuses / No. of live fetuses.

b) : Flexion contracture of the wrist joint.

c) : Abdominal distention (slight).

た。

追加試験では、胎児の外表面異常として、対照群に前肢手関節屈曲拘縮が1例および0.1 $\mu\text{g/kg}$ 群に軽度の腹部の膨満が1例観察された。

3) 胎児の骨格検査

骨格異常および骨格変異の発現状況を Table 7 に、骨化進行状況を Table 8 に示した。

骨格異常として、対照群に前頭骨および頭頂骨の欠損・頭頂間骨の形成不全・頸椎の癒合・口蓋突起形成不全・胸骨核の癒合・四肢低形成の複合異常および胸骨裂が各1例、1 $\mu\text{g/kg}$ 群に頭骨の形成不全・肋骨の癒合・胸骨核の癒合・四肢低形成の複合異常および仙椎の欠損が各1例、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群に肋骨の欠損・胸椎弓の欠損・椎体の癒合の複合異常が2例、5 $\mu\text{g/kg}$ 群に仙尾椎の癒合および胸骨核の癒

合が各1例観察されたが、異常の多くは外表異常に付随した変化であった。これら各異常の出現率には、MC903 投与各群と対照群との間に有意差は認められなかった。

骨格変異として、頸肋骨、13本肋骨、8腰椎、9腰椎、腰椎横突起分離、仙椎の腰椎化、胸骨核の不相称、胸骨核の分離、垂鈴型の胸骨核、胸骨核の分岐、胸骨核の連結、あるいは胸骨核の過剰が対照群および MC903 投与各群に散見された。これら各骨格変異の出現率には、MC903 投与各群と対照群との間に有意差は認められなかった。

骨化状態については、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群において胸骨核の骨化遅延を有する胎児の出現率に対照群と比べて有意な増加が認められたが、用量依存性はみられなかった。

Table 6. External and visceral findings of rabbit fetuses (F₁) in teratogenicity study of calcipotriol.

Dose (μ g/kg)		0	1	2.5	5
External					
No. of fetuses examined (litter)		138 (17)	113 (17)	124 (18)	93 (12)
No. of fetuses with abnormality	(%)	2 (1.3)	1 (0.7)	2 (2.8)	3 (3.2)
Omphalocele	(%)	1 (0.6)	0	0	0
Craniorhachischisis, open eyelids, cleft palate and hypoplasia of fore limbs	(%)	1 (0.7)	0	0	0
Exencephaly, omphalocele, club foot, hypoplasia of limbs and flexion contracture of the wrist joint	(%)	0	1 (0.7)	0	0
Flexion contracture of the wrist joint	(%)	0	0	1 (0.9)	2 (2.3)
Brachyury	(%)	0	0	1 (1.9)	1 (0.9)
Visceral					
No. of fetuses examined (litter)		46 (17)	38 (17)	44 (18)	30 (12)
No. of fetuses with abnormality	(%)	3 (6.9)	12 (27.5)**	4 (7.4)	6 (18.1)
Ventricular septal defect	(%)	0	1 (2.0)	0	0
Single coronary artery	(%)	0	1 (2.0)	0	0
Retroesophageal right subclavian artery	(%)	0	1 (2.9)	0	0
Supernumerary coronary orifice	(%)	3 (6.9)	10 (22.5)*	4 (7.4)	5 (15.3)
Unilateral hypoplasia of umbilical artery	(%)	0	0	0	1 (2.8)

*, ** : Significantly different from 0 μ g/kg group ($P < 0.05, 0.01$).

考 察

MC903 の 1, 2.5, 5 μ g/kg/day を, New Zealand White 種 (Std: NZW) 妊娠ウサギの器官形成期に皮下投与し, 母動物および胎児に及ぼす影響を検討した。なお, 本試験では母動物および胎児に対する無毒性量を明らかにする目的で, 投与量を 0.1, 0.5 μ g/kg/day とした追加試験を実施した。

母動物の死亡および流産は, 第 1 回試験および追加試験のいずれの MC903 投与群においてもみられなかった。一般状態では, 第 1 回試験において, 5 μ g/kg 群に投与 8 および 10 日に自発運動の抑制が 2 例観察された。自発運動の抑制は, 予備試験においても 5 μ g/kg 以上の群で観察されていることから, MC903 投与による影響と考えられた。その他に, 粘液便が 1 例および血赤色尿が 2 例観察されたが, 粘液便については 1 例のみであったこと, また, 血赤色尿については, 予備試験において MC903 投与に関係なく観察されていることから, MC903 投与に

よる影響とは考えられなかった。なお, 第 1 回試験および追加試験において, 投与部における創傷, 痂皮形成および白色域が対照群および MC903 投与各群に観察された。しかし, 発現状況に用量依存性が見られないことから, 溶媒投与の影響あるいは投与手技に関連した変化と考えられた。

第 1 回試験において, 1, 2.5 および 5 μ g/kg 群で投与量に相関した体重の減少または増加抑制および摂餌量の減少が, 剖検では 1, 2.5 および 5 μ g/kg 群に大動脈内腔の粗造・白色化, 2.5 および 5 μ g/kg 群に腎臓の顆粒状白色化が観察された。剖検でみられたこれらの変化は, ラットにおいて, 活性型ビタミン D₃ の過剰投与によりカルシウムの異所性沈着が生じることが報告 (松沢ら, 1989 a) されていることから, MC903 の過剰投与による血清カルシウム濃度の上昇に起因すると推察された。

器官重量では, 1 μ g/kg 群に心臓の相対重量の増加, 2.5 μ g/kg 群に肝臓および腎臓 (左右) の相対重量, 副腎 (左) の絶対重量および相対重量の増加,

Table 7. Skeletal findings (abnormalities and variations) of rabbit fetuses (F₁) in teratogenicity study of calcipotriol.

Dose ($\mu\text{g/kg}$)		0	1	2.5	5
No. of fetuses examined (litter)		92 (17)	75 (17)	80 (18)	63 (12)
Skeletal abnormality					
No. of fetuses with skeletal abnormality	(%)	2 (2.0)	2 (2.4)	2 (3.9)	2 (2.8)
Multiple abnormality	(%)	1 (1.2) ^{a)}	1 (1.2) ^{b)}	2 (3.9) ^{c)}	0
Sternum cleft	(%)	1 (0.8)	0	0	0
Absence of sacral vertebrae	(%)	0	1 (1.2)	0	0
Fusion of sacral and coccygeal vertebrae	(%)	0	0	0	1 (1.4)
Fusion of sternbrae	(%)	0	0	0	1 (1.4)
Skeletal variation					
No. of fetuses with skeletal variations	(%)	81 (89.2)	63 (85.6)	63 (76.9)	55 (88.7)
Cervical rib	(%)	0	0	0	1 (1.2)
13 ribs (extra)	(%)	32 (36.7)	37 (52.4)	35 (35.9)	36 (52.9)
13 ribs (short)	(%)	33 (35.6)	25 (35.6)	20 (20.5)	18 (33.3)
8 lumbar vertebrae	(%)	67 (75.5)	55 (74.9)	57 (69.4)	50 (74.3)
9 lumbar vertebrae	(%)	1 (1.2)	0	0	0
Splitting of lumbar transverse process	(%)	1 (1.2)	3 (8.8)	1 (1.9)	0
Lumbarization of sacral vertebrae	(%)	3 (2.3)	4 (5.4)	1 (0.6)	2 (2.6)
Asymmetry of sternebra	(%)	2 (1.7)	0	0	1 (1.4)
Splitting of sternebra	(%)	3 (3.2)	1 (1.0)	2 (2.2)	0
Dumbbell shape of sternebra	(%)	1 (1.2)	0	0	1 (1.7)
Bifurcation of sternebra	(%)	1 (1.2)	0	0	0
Juncture of sternbrae	(%)	4 (4.4)	1 (5.9)	0	2 (5.8)
Accessory sternebra	(%)	0	2 (1.7)	2 (2.2)	0

^{a)} : Absence of frontal bone and parietal bone, hypoplasia of interparietal bone, fusion of cervical vertebrae, hypoplasia of palatal process, fusion of sternbrae and hypoplasia of limbs.

^{b)} : Hypoplasia of skull, fusion of ribs, fusion of sternbrae and hypoplasia of limbs.

^{c)} : Absence of rib, absence of thoracic vertebral arch and fusion of vertebral bodies.

5 $\mu\text{g/kg}$ 群に心臓、肝臓、副腎（左）および腎臓（左右）の相対重量の増加が認められた。このうち、1 $\mu\text{g/kg}$ 群の心臓の相対重量および2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群の副腎（左）の絶対重量の増加は、用量依存性がみられないことから MC903 投与の影響とは考えられなかった。その他の2.5および5 $\mu\text{g/kg}$ 群の相対重量の増加は、MC903 投与による体重増加抑制に起因した変化と推察された。

一方、追加試験においては、0.1および0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群で体重、摂餌量、剖検および器官重量に MC903 投与の影響は認められなかった。

胎児では、第1回試験において、MC903 の投与量

に相関して胚・胎児死亡率が増加した。これは母動物の体重の減少または増加抑制および摂餌量の減少とよく相関しており、ウサギでは給餌を1日当たり60 g に制限した場合に胎児死亡率が増加することが報告されている (Matsuzawa *et al.*, 1981)。追加試験においては、0.1および0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群で胚・胎児死亡率に増加は認められなかった。

第1回試験において、MC903 投与に起因すると考えられる外表および骨格異常の発生は認められなかった。内臓検査で比較的出现例数の多かった冠状動脈口過剰は、一般的に重篤な異常とは見做されず、本試験に使用した New Zealand White 種ウサギに

Table 8. Ossification of rabbit fetuses (F₁) in teratogenicity study of calcipotriol.

Dose ($\mu\text{g/kg}$)	0	1	2.5	5
No. of fetuses examined (litter)	91 (17)	74 (17)	80 (18)	63 (12)
No. of ossification centers (mean $\pm$ S.D.)				
Fore limb bones				
Distal phalanges	10.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.0
Middle phalanges	7.9 $\pm$ 0.4	8.0 $\pm$ 0.0	7.9 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.6
Proximal phalanges	9.9 $\pm$ 0.2	10.0 $\pm$ 0.1	9.9 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 0.3
Metacarpus	9.8 $\pm$ 0.4	9.9 $\pm$ 0.3	9.8 $\pm$ 0.4	9.8 $\pm$ 0.4
Hind limb bones				
Distal phalanges	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0
Middle phalanges	7.9 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.1
Proximal phalanges	8.0 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0
Metatarsus	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0
Cervical vertebral bodies	7.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0
Sacral and coccygeal vertebrae	19.3 $\pm$ 0.6	19.5 $\pm$ 0.4	19.3 $\pm$ 0.5	19.2 $\pm$ 0.8
Sternebrae	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.0
No. of fetuses with poor ossification				
Hyoid bone (%)	0	0	0	0
Sternebrae (%)	0	2 (1.8)	4 (4.3)*	1 (1.2)
Cervical vertebral arch (%)	0	0	0	0

* : Significantly different from 0 $\mu\text{g/kg}$ group ($P < 0.05$).

は、自然発生的 (Morita *et al.*, 1987) に認められている。さらに、本試験における出現率に用量依存性がみられないことから、MC903 投与に起因する異常とは考えられない。したがって、MC903 は母動物に毒性が現れる投与量でも胎児に対し催奇形作用はないと考えられた。

以上の結果から、本試験条件下における MC903 の母動物に対する一般毒性学的無毒性量、母動物の生殖に対する無毒性量ならびに胎児に対する無毒性量はそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/kg/day}$ であると推定された。

なお、ウサギの無毒性量はラットの無毒性量 (内山ら, 1996) と比較して著しく低いものであった。類似薬でも同様の結果が報告 (松沢ら, 1989 b; 塩崎ら, 1983) されていることから、ウサギはラットに比べて感受性が高いと考えられた。

要 約

MC903 の 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/kg/day}$ を、New Zealand White 種 (Std: NZW) 妊娠ウサギの器官形成期に皮下投与し、母動物および胎児に及ぼす影響を検討した。なお、本試験では、母動物および胎児に対する無毒性量を明らかにする目的で、投与量を 0.1, 0.5 $\mu\text{g/kg/day}$ とした追加試験を実施した。

母動物では、5 $\mu\text{g/kg}$ 群において自発運動の抑制が認められ、1 $\mu\text{g/kg}$ 群以上で投与量に相関して体重が減少または増加抑制および摂餌量が減少した。また、剖検では 1 $\mu\text{g/kg}$ 群以上で大動脈内腔の粗造・白色化が、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 群以上で腎臓の顆粒状白色化が観察された。0.1 および 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群以下では一般状態、体重、摂餌量、剖検および器官重量に MC903 投与による異常は認められなかった。

胎児では、1 $\mu\text{g/kg}$ 群以上で胚・胎児死亡率が増加した。しかし、生存胎児の外表検査、内臓検査お

および骨格検査に MC903 投与による異常は認められなかった。また、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群以下では胚・胎児死亡率，性比，胎児体重，胎盤重量および外表検査に MC903 投与による異常は認められなかった。

以上の結果から，本試験条件下における母動物に対する一般毒性学的無毒性量および母動物の生殖ならびに次世代の発生に関する無毒性量はそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/kg/day}$ であると推定された。

(試験期間：1994年3月～1994年9月)

文 献

- Binderup, L. and Bramm, E. (1988) : Effects of a novel vitamin D analogue MC903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 889-895.
- Dawson, A. B. (1926) : A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Technol.*, **1**, 123-124.
- 松沢景子, 遠乗弘美, 西沢紫乃, 小栗政子, 蒔田徳太郎 (1989 a) : TV-02 の生殖毒性研究 (第1報) ラットにおける妊娠前および妊娠初期皮下投与試験. *薬理と治療*, **17** (10), 213-221.
- 松沢景子, 西沢紫乃, 久田友世, 蒔田徳太郎 (1989 b) : TV-02 の生殖毒性研究 (第3報) ウサギにおける器官形成期皮下投与試験. *薬理と治療*, **17** (10), 245-253.
- Matsuzawa, T., Nakata, M., Goto, I. and Tsushima, M. (1981) : Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. *Toxicology*, **22**, 255-259.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N. *et al.* (1987) : Spontaneous malformations in laboratory animals : Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Cong. Anom.*, **27**, 147-206.
- 西村耕一 (1974) : マウスおよびラット胎仔の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法. *先天異常*, **14** (1), 23-40.
- 塩崎裕通, 中川信一, 宇高奎二 (1983) : Caicitriol の毒性に関する研究 (第4報) ウサギの器官形成期投与試験. *薬理と治療*, **11** (10), 75-87.
- 内山長久, 鈴木登志郎, 小池嘉秀, 他 (1996) : Calcipotriol (MC903) の生殖・発生毒性試験 (第2報) ラット皮下投与による器官形成期投与試験. *J. Toxicol. Sci.*, **21**, Suppl. II, 403-424.
- Wilson, J. G. (1965) : Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *Teratology; Principles and Techniques* (Wilson, J. G. and Warkany, J., eds.), pp. 262-277, The University of Chicago Press, Chicago.