新規頻尿・尿失禁治療剤 (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl
2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate
(NS-21) の活性代謝物, 光学異性体, 加水分解物, 副生成物のマウスに
おける腹腔内投与による単回投与毒性試験

西村信雄, 小林淳一, 茂呂光男, 勝亦俱慶,
西口保幸*, 岩倉啓子*, 鷺見信好*

株式会社 ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412 静岡県御殿場市かまど1284
*日本新薬株式会社 創薬研究本部
〒601 京都市南区西大路通八条下ル

INTRAPERITONEAL SINGLE-DOSE TOXICITY STUDIES OF
ACTIVE METABOLITE, OPTICAL ISOMERS, HYDROLYSIS
PRODUCTS AND BI-PRODUCT OF (±)-4-DIETHYLAMINO-1,
1-DIMETHYLBUT-2-YN-1-YL 2-CYCLOHEXYL-2-HYDROXY-2-
PHENYLACETATE MONOHYDROCHLORIDE
MONOHYDRATE(NS-21), A NOVEL DRUG FOR URINARY
FREQUENCY AND INCONTINENCE, IN MICE

Nobuo NISHIMURA, Junichi KOBAYASHI, Mitsuo MORO, Tomoyoshi KATSUMATA,
Yasuyuki NISHIGUCHI *, Keiko IWAKURA * and Nobuyoshi SUMI *

*Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.,
1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka 412, Japan
*Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.,
Nishiohji Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan*

(Received September 2, 1996; Accepted January 31, 1997)

ABSTRACT— NS-21, (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate, is a new drug for the treatment of urinary frequency and incontinence. To evaluate acute toxicities of its related compounds including the optical isomers of NS-21 ((S)NS-21 and (R)NS-21), the active metabolite of

連絡先: 岩倉啓子 〒601 京都市南区西大路通八条下ル
日本新薬株式会社 創薬研究本部

NS-21 ((R/S)RCC-36), the optical isomers of (R/S)RCC-36 ((S)RCC-36 and (R)RCC-36), the hydrolysis products of NS-21 (RCC-32 and RCC-38) and the bi-product of NS-21 (RCC-66), single-dose intraperitoneal toxicity studies were conducted in ddY mice.

The LD₅₀ values of these compounds in male and female mice were as follows: 199 and 184 mg/kg for (S)NS-21, 261 and 240 mg/kg for (R)NS-21, 74 and 100-150 mg/kg for (R/S)RCC-36, 93 mg/kg for (S)RCC-36 in both sexes, 83 and 104 mg/kg for (R)RCC-36, higher than 510 mg/kg for RCC-32 in both sexes, 340-510 mg/kg for RCC-38 in both sexes, and 1000-2000 mg/kg for RCC-66 in both sexes, respectively.

The clinical signs included decreased spontaneous locomotor activity, prone or lateral position, ataxic gait, clonic convulsion, hypopnea, hypothermia, pale skin, mydriasis, abdominal distention and unkempt fur for (S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36 and (R)RCC-36, decreased spontaneous locomotor activity, prone position, ataxic gait, clonic convulsion, tail elevation and hypopnea for RCC-32 and RCC-38, and decreased spontaneous locomotor activity and unkempt fur for RCC-66. Body weight was decreased or its gain was suppressed for every compound examined.

Pathological examination of the dead mice showed atrophy of the thymus and spleen, intestinal distention with the retention of dark red contents, white spots or white materials in the abdominal fatty tissue for (S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36, (R)RCC-36 and RCC-66, but no treatment related change for RCC-32 and RCC-38. Adhesion between the abdominal organs was observed in survivors treated with (S)NS-21, (R)NS-21, (S)RCC-36, (R)RCC-36, RCC-32 and RCC-66.

KEY WORDS : NS-21, Urinary frequency, Urinary incontinence, (S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36, (R)RCC-36, RCC-32, RCC-38, RCC-66, Single-dose toxicity, i.p., Mice

要 約

NS-21の光学異性体である(S)NS-21, (R)NS-21, 活性代謝物である(R/S)RCC-36およびその光学異性体である(S)RCC-36, (R)RCC-36, 加水分解物であるRCC-32, RCC-38ならびに副生成物であるRCC-66について, マウスを用いた腹腔内投与による単回投与毒性試験を実施し, 以下の成績を得た。

LD₅₀値は, (S)NS-21の雄で199mg/kg, 雌で184mg/kg, (R)NS-21の雄で261mg/kg, 雌で240mg/kg, (R/S)RCC-36の雄で74mg/kg, 雌で100~150mg/kg, (S)RCC-36で雌雄ともに93mg/kg, (R)RCC-36の雄で83mg/kg, 雌で104mg/kgであった。また, RCC-32で雌雄ともに510mg/kg以上,

RCC-38で雌雄ともに340~510mg/kg, RCC-66で雌雄ともに1000~2000mg/kgと推定された。

一般状態では, (S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36および(R)RCC-36で, 主に自発運動の減少, 腹臥位ないしは横臥位, 異常歩行, 間代性痙攣, 呼吸数の減少, 体温の低下, 皮膚の蒼白化, 散瞳, 腹部膨満, 粗毛などが認められた。RCC-32およびRCC-38では自発運動の減少, 腹臥位, 異常歩行, 間代性痙攣, 挙尾, 呼吸数の減少が認められ, RCC-66では自発運動の減少, 粗毛が認められた。体重推移では, いずれの被験物質においても減少ないしは増加抑制が認められた。

剖検では, (S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36, (R)RCC-36およびRCC-66の死亡動物で主に胸腺および脾臓の萎縮, 消化管の拡張およ

び暗赤色内容物の貯留、腹腔内脂肪織に白色斑ないしは白色物などが認められた。RCC-32およびRCC-38の死亡動物では特に記すべき変化は認められなかった。また、(S)NS-21, (R)NS-21, (S)RCC-36, (R)RCC-36, RCC-32およびRCC-66の生存動物で腹腔内諸器官の癒着が認められた。

緒 言

(±)-4-Diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride (以下、NS-21と略称)は日本新薬(株)にて開発中の頻尿・尿失禁治療剤である。NS-21をヒトに経口投与すると、NS-21のモノ脱エチル体である(±)-4-ethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride (以下、RCC-36と略称)が活性代謝物として血漿中に生じる。NS-21とRCC-36はともに抗コリン作用およびカルシウム拮抗作用を有し、両者の作用により膀胱平滑筋での過剰興奮に基づく頻尿や尿失禁等の症状を改善すると考えられている。臨床ではNS-21のラセミ体として1日1回10mgの用法用量が想定されている。

今回、著者らはNS-21の安全性評価の一環として、NS-21の光学異性体 [(S)NS-21, (R)NS-21], 活性代謝物RCC-36 [ラセミ体: 以下, (R/S)RCC-36] およびその光学異性体 [(S)RCC-36, (R)RCC-36] ならびに製剤中に0.5%以下ではあるが含まれるNS-21の加水分解物 (RCC-32, RCC-38) および副生成物 (RCC-66) について、マウスを用い単回投与毒性を検討した。投与経路としてNS-21で最も致死毒性が強く現れた腹腔内投与 (西口ら, 1997) を選択し、NS-21の毒性と比較し臨床での安全性について検討したので報告する。

実験材料および方法

被験物質

NS-21の光学異性体である (S)NS-21, (R)NS-21, 活性代謝物である (R/S)RCC-36およびその光学異性体である (S)RCC-36, (R)RCC-36, 加水分解物であるRCC-32, RCC-38ならびに副生成物である

RCC-66の化学名、化学構造および物性などはTable1に示した通りである。

(S)NS-21はロット2 (純度99.7%) を, (R)NS-21はロット2 (純度99.3%) を, (R/S)RCC-36はロット8 (純度98.7%) を, (S)RCC-36はロット2 (純度98.0%) を, (R)RCC-36はロット2 (純度97.9%) を, RCC-32はロット3 (純度100.0%) を, RCC-38はロット2 (純度100.0%) を, RCC-66はロット1 (純度99.8%) をそれぞれ使用した。

使用動物および飼育条件

4週齢のSlc:ddY系のSPF雌雄マウスを日本エスエルシー(株) (浜松) より購入し、馴化飼育の後、健康な動物を選択し、6週齢で試験に供した。

動物は、バリアーシステムの飼育室で、温度21～26℃、湿度37～65%、人工照明12時間および換気回数11～13回/時間の環境下で、床敷 [ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー(株)、横浜] を入れたプラスチック製ケージに5匹ずつ収容し、水道水および固型飼料 [CRF-1, オリエンタル酵母工業(株)、東京] を自由に与えて飼育した。

投与用量および群分け

(S)NS-21および (R)NS-21では150～760mg/kgの用量範囲で、(R/S)RCC-36, (S)RCC-36および (R)RCC-36では30～150mg/kgの用量範囲でいずれも5用量を設定した。RCC-32およびRCC-38は100～510mg/kgの用量範囲で5用量を、RCC-66は500～2000mg/kgの用量範囲で3用量を設定した。ただし、(S)NS-21については最低用量である150mg/kg投与群で死亡動物が発現したため、雌雄両動物について100mg/kgを追加した。

動物は、体重により層別化し、無作為抽出法により各被験物質とも各群雌雄各5匹に群分けした。なお、投与日の体重範囲は、(S)NS-21の雄で32.5～38.4g、雌で25.1～29.2g、(R)NS-21の雄で32.3～35.6g、雌で26.1～29.7g、(R/S)RCC-36の雄で30.9～35.1g、雌で24.3～28.9g、(S)RCC-36の雄で32.3～36.2g、雌で25.5～29.5g、(R)RCC-36の雄で31.8～38.5g、雌で26.0～29.6g、RCC-32の雄で32.6～36.9g、雌で25.5～29.1g、RCC-38の雄で33.0～39.7g、雌で25.4～30.9g、RCC-66の雄で

Table 1. Chemical structures and physical properties of related compounds of NS-21.

Code number	Chemical name	Chemical structure	Molecular formula	M.W.	Origin	Appearance
(S)NS-21	(+)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride		$C_{24}H_{35}NO_3$ · HCl	422.01	Optical isomer(S)	White crystal
(R)NS-21	(-)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride		$C_{24}H_{35}NO_3$ · HCl	422.01	Optical isomer(R)	White crystal
(R/S)RCC-36	(±)-4-ethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride		$C_{22}H_{31}NO_3$ · HCl	393.95	Active metabolite	White crystalline powder
(S)RCC-36	(+)-4-ethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride		$C_{22}H_{31}NO_3$ · HCl	393.95	Optical isomer(S) of active metabolite	White crystalline powder
(R)RCC-36	(-)-4-ethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride		$C_{22}H_{31}NO_3$ · HCl	393.95	Optical isomer(R) of active metabolite	White crystalline powder
RCC-32	(±)-2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetic acid		$C_{14}H_{18}O_3$	234.30	Hydrolysis product	White crystal
RCC-38	5-diethylamino-2-methyl-3-pentyn-2-ol		$C_{10}H_{19}NO$	169.27	Hydrolysis product	Colorless oily substance
RCC-66	(±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-(4-cyclohexylphenyl)acetate monohydrochloride		$C_{30}H_{45}NO_3$ · HCl	504.15	Bi-product	White crystalline powder

M.W. : Molecular weight

34.7～38.9g, 雌で26.3～28.9gであった。

被験物質の調製方法および投与方法

(S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36, (R)RCC-36およびRCC-38は, 0.5 % methylcellulose [メトロース SM-400, 以下 MC と略称, 信越化学工業(株), 東京] 滅菌生理食塩水溶液に懸濁調製した後, 腹腔内に単回投与した。投与液は投与容量が10ml/kgとなるように濃度を調整した。RCC-32はcellulose系高分子含有滅菌生理食塩水溶液ではゲル化することから, 溶媒として0.1 % polyoxyethylene sorbitan monooleate [以下 Tween 80 と略称, ナカライテスク(株), 京都] 含有5 %ブドウ糖液を選択し, 懸濁調製した後, 腹腔内に単回投与した。投与液は投与容量が10ml/kgとなるように濃度を調整した。RCC-66は0.5 % partially hydrolyzed polyvinyl alcohol [以下 PVA と略称, 日本合成化学工業(株), 大阪] 滅菌生理食塩水溶液に懸濁調製した後, 腹腔内に単回投与した。投与液は2000mg/kgでは投与容量が20ml/kgとなるように, それ以外の用量では投与容量が10ml/kgとなるように濃度を調整した。

また, 各被験物質ごとに対照群を設け, (S)NS-21, (R)NS-21, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36, (R)RCC-36およびRCC-38の対照群には0.5 % MC 滅菌生理食塩水溶液を, RCC-32の対照群には0.1 % Tween 80 含有5 %ブドウ糖液を各々10ml/kgの容量で, RCC-66の対照群には0.5 % PVA 滅菌生理食塩水溶液を20ml/kgの容量で投与した。

検査項目および方法

一般状態を投与日には投与後6時間観察し, その後は2週間にわたり1日1回観察した。体重は投与直前(投与0日), 投与後1, 2, 3, 7, 10および14日に測定した。ただし, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36および(R)RCC-36では, 投与14日後においても一部の動物に症状が残存していたことから, 観察期間を1週間延長し, 投与後17日および21日の体重も測定した。死亡動物は発見後速やかに, 生存動物は観察終了日にether麻酔下で放血致死させ剖検した。LD₅₀値ならびに95 %信頼限界値は観察終了時までの死亡率に基づき, Weil氏法(Weil,

1952)により算出した。また, 体重については, 群毎に平均値および標準偏差を算出した。

実験結果

各被験物質における死亡率およびLD₅₀値をTable 2に示した。

(S)NS-21

雄の150mg/kg以上, 雌の230mg/kg以上の投与群で死亡が認められ, 雄は340mg/kg以上, 雌は230mg/kg以上の投与群で全例が死亡した。LD₅₀値(95 %信頼限界値)は, 雄で199mg/kg(150～264mg/kg), 雌で184mg/kgであり, 雌では信頼限界値の算出ができなかった。

一般状態に関し, 死亡動物では投与直後より自発運動の減少, 腹臥位ないしは横臥位, 異常歩行, 間代性痙攣, 呼吸数減少がみられ, 一部の動物では散瞳, 体温低下, チアノーゼを呈し投与後15分～4時間に死亡した。他の動物では投与翌日にこれらの症状は一旦消失したが, 投与後3日より自発運動の減少, 腹臥位ないしは横臥位, 呼吸数減少, 体温低下, 皮膚の蒼白化, 腹部膨満, 粗毛を示し, 投与後4～8日にかけて散発的に死亡した。生存動物では投与直後より死亡動物とほぼ同様の症状を示したが, 投与後4時間以内に回復した。しかし, 230mg/kg投与群の雄1例では投与後3～12日に自発運動の減少, 腹部膨満, 粗毛がみられた。

体重推移では, 150および230mg/kg投与群の雄で, 投与後3日まで減少が認められた。150mg/kg投与群ではそれ以後は増加を示し, 観察終了時には対照群とほぼ同程度となったが, 230mg/kg投与群では観察終了時まで増加抑制が認められた。その他の投与群では投与翌日に減少がみられたが, 以後は対照群とほぼ同様の推移を示した。

剖検では, 投与後4時間以内に死亡した760mg/kg投与群の一部の動物で, 腹腔内に白色物の貯留が認められたほか, 特に記すべき変化はみられなかった。一方, 投与後4日以降に死亡した例では, 粗毛, 胸腺および脾臓の萎縮, 消化管(胃, 小腸, 大腸)の拡張が認められ, 胃および小腸には暗赤色内容物の貯留および腹腔内脂肪織に白色

Table 2. Mortality and LD₅₀ values of related compounds of NS-21 in mice.

Test article	Dose (mg/kg)	Mortality		LD ₅₀ [95% confidence limits] (mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
(S)NS-21	0	0/5	0/5		
	100	0/5	0/5		
	150	2/5	0/5	199	184
	230	2/5	5/5	[150-264]	
	340	5/5	5/5		
	510	5/5	5/5		
	760	5/5	5/5		
(R)NS-21	0	0/5	0/5		
	150	0/5	0/5	261	240
	230	2/5	2/5	[200-343]	[195-296]
	340	4/5	5/5		
	510	5/5	5/5		
	760	5/5	5/5		
(R/S)RCC-36	0	0/5	0/5		
	30	0/5	0/5	74	100-150
	40	0/5	0/5	[56-97]	
	70	2/5	1/5		
	100	5/5	1/5		
	150	5/5	5/5		
(S)RCC-36	0	0/5	0/5		
	30	0/5	0/5	93	93
	40	0/5	0/5	[67-127]	[67-127]
	70	1/5	1/5		
	100	4/5	4/5		
	150	5/5	5/5		
(R)RCC-36	0	0/5	0/5		
	30	0/5	0/5	83	104
	40	0/5	0/5	[66-104]	[73-148]
	70	1/5	1/5		
	100	5/5	3/5		
	150	5/5	5/5		
RCC-32	0	0/5	0/5		
	100	0/5	0/5		
	150	0/5	0/5	> 510	> 510
	230	0/5	0/5		
	340	0/5	0/5		
	510	2/5	2/5		
RCC-38	0	0/5	0/5		
	100	0/5	0/5		
	150	0/5	0/5	340-510	340-510
	230	0/5	0/5		
	340	0/5	0/5		
	510	5/5	5/5		
RCC-66	0	0/5	0/5		
	500	0/5	0/5	1000-2000	1000-2000
	1000	0/5	0/5		
	2000	3/5	4/5		

斑がみられるものもあった。生存動物では、一部の動物で胸腺の萎縮および腹腔内諸器官の癒着が認められた。

(R)NS-21

雌雄ともに230mg/kg以上の投与群で死亡が認められ、雄は510mg/kg以上、雌は340mg/kg以上の投与群で全例が死亡した。LD₅₀値（95%信頼限界値）は、雄で261mg/kg（200～343mg/kg）、雌で240 mg/kg（195～296mg/kg）であった。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少、腹臥位ないしは横臥位、異常歩行、間代性痙攣、呼吸数減少、散瞳がみられ、一部の動物ではチアノーゼ、体温低下を示し、投与後15分～1時間に死亡した。他の動物では投与翌日にこれらの症状は一旦消失したが、投与後3日より自発運動の減少、粗毛が認められ、呼吸数減少、体温低下、皮膚の蒼白化、腹部膨満を示し、投与後4～13日にかけて散発的に死亡した。生存動物では、投与直後より死亡動物とほぼ同様の症状がみられ、投与翌日には全例が回復したが、340mg/kg投与群の雄1例で投与後3～9日に粗毛がみられた。

体重推移では、150mg/kg投与群の雌雄で投与翌日、230mg/kg投与群の雌雄で投与後3日まで減少ないしは増加抑制が認められたが、その後は増加を示し、観察終了時には対照群とほぼ同程度となった。340mg/kg投与群の雄では観察期間を通して減少ないしは増加抑制が認められ、観察終了時の体重は投与日より下回っていた。

剖検では、投与後1時間以内に死亡した一部の動物で、腹腔内に白色物の貯留が認められたほか、特に記すべき変化は認められなかった。一方、投与後4日以降に死亡した例では、粗毛、胸腺および脾臓の萎縮、消化管（胃、小腸、大腸）の拡張が認められ、胃および小腸には暗赤色内容物の貯留および腹腔内脂肪織に白色斑がみられるものもあった。生存動物では、一部の動物で腹腔内諸器官の癒着および腹腔内脂肪織に白色斑が認められた。

(R/S)RCC-36

雌雄ともに70mg/kg以上の投与群で死亡が認められ、雄は100mg/kg以上、雌は150mg/kg投与群で全例が死亡した。LD₅₀値（95%信頼限界値）は、雄で74mg/kg（56～97mg/kg）であった。雌ではLD₅₀値は算出できず、100～150mg/kgと推定された。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少、腹臥位ないしは横臥位、間代性痙攣、呼吸数減少および散瞳がみられ、投与後15分～4時間に死亡した。また、投与後3日以降に死亡した例では、上記症状に加えて異常歩行を示したものもあったが、投与翌日にこれらの症状は一旦消失した。しかし、投与後2日以降に自発運動の減少および粗毛がみられ、投与後3～6日に死亡した。さらに100mg/kg投与群の雄2例では、投与後7ないしは10日から腹部膨満が、14日から自発運動の減少、皮膚の蒼白化が発現し、うち1例では呼吸数減少、体温低下および消瘦を呈し、いずれも投与後17日に死亡した。生存動物では、投与直後より死亡動物とほぼ同様の症状を示したが、投与後2時間より消失し始め、投与翌日には回復した。しかし、一部の動物では投与後2ないしは4日より、自発運動の減少、皮膚の蒼白化、腹部膨満、粗毛、軟便がみられた。これらの症状は投与後7日から順次消失し、投与後12日までに全例が回復した。

体重推移では、各投与群の雌雄で減少が認められ、40mg/kg以下の投与群および70mg/kg投与群の雌では投与後2ないし3日で回復し、対照群とほぼ同様の推移を示した。70mg/kg投与群の雄では投与後10日まで、100mg/kg投与群の雌では投与後14日まで増加抑制が認められたが、以後は対照群とほぼ同様の推移が認められた。

剖検に関し、投与後4時間以内に死亡した動物では、特に記すべき変化はみられなかった。一方、投与後3日以降に死亡した例では、粗毛、胸腺および脾臓の萎縮、消化管（胃、小腸、大腸）の拡張、胃および小腸に暗赤色内容物の貯留、腹腔内脂肪織に白色物の付着、肺の暗赤色化、気管泡沫液の流出が認められた。また、投与後17日に死亡

した例では、消瘦もみられた。生存動物では特に記すべき変化はみられなかった。

(S)RCC-36

雌雄ともに70mg/kg以上の投与群で死亡が認められ、150mg/kg投与群で全例が死亡した。LD₅₀値（95%信頼限界値）は、雌雄ともに93mg/kg（67～127mg/kg）であった。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少、腹臥位ないしは横臥位、異常歩行、間代性痙攣、呼吸数減少および散瞳がみられ、投与後15分～1時間に死亡した。また、投与後2～6時間で一旦回復した例でも投与翌日ないし投与後3日以降、自発運動の減少や粗毛が発現し、一部の動物では腹臥位ないしは横臥位、呼吸数減少、皮膚の蒼白化、腹部膨満を呈し、投与後2～9日に死亡した。生存動物では、70mg/kg以上の投与群で死亡動物とほぼ同様の症状を示したが、投与後2～4時間で一旦消失した。しかしながら、一部の動物では投与翌日ないし投与後2日より粗毛が発現し、皮膚の蒼白化、腹部膨満を伴うものもあった。これらは投与後7日から順次消失し、最後の1例が正常となったのは投与後21日であった。40mg/kg以下の投与群では特に記すべき変化は認められなかった。

体重推移では、各投与群の雌雄で投与翌日に減少が認められ、70mg/kg以上の投与群の雄および100mg/kg投与群の雌で投与後3日まで減少が認められた。その後各投与群とも増加を示し、投与後2ないし7日には対照群とほぼ同程度となった。しかしながら、100mg/kg投与群の雄では投与後10日以降再び減少を示し、観察終了時の体重は投与日よりも下回っていた。

剖検に関し、投与後1時間以内に死亡した動物では、特に記すべき変化は認められなかった。一方、投与後2日以降に死亡した例では、粗毛、胸腺および脾臓の萎縮、消化管（胃、小腸、大腸）の拡張、胃および小腸に暗赤色内容物の貯留、大腸では暗赤色化、腹腔内脂肪織に白色物の付着が認められた。生存動物では、一部の動物で腹腔内諸器官の癒着、脾臓の腫大、消化管（小腸、大腸）の拡張がみられた。

(R)RCC-36

雌雄ともに70mg/kg以上の投与群で死亡が認められ、雄は100mg/kg以上、雌は150mg/kg投与群で全例が死亡した。LD₅₀値（95%信頼限界値）は、雄で83mg/kg（66～104mg/kg）、雌で104mg/kg（73～148mg/kg）であった。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少、腹臥位ないしは横臥位、異常歩行、間代性痙攣、呼吸数減少、散瞳がみられ、投与後30分に死亡した。投与翌日までにこれらの症状が一旦消失したものもみられたが、多くは粗毛を呈しており、自発運動の減少、体温低下、皮膚の蒼白化、腹部膨満を呈し、投与後2～8日に死亡した。さらに70mg/kg投与群の雌雄各1例では、これらの症状に加え腹臥位ないしは横臥位、深大呼吸、呼吸数減少、消瘦を呈し、投与後14または15日に死亡した。生存動物では死亡動物とほぼ同様の症状がみられたが、ほとんどが投与翌日までに一旦消失した。しかし、一部の動物では投与翌日以降自発運動の減少、粗毛がみられた。これらは投与後6日から消失し始め、投与後14日には全例が回復した。

体重推移では、各投与群の雌雄で投与翌日に減少が認められ、70mg/kg以上の投与群の雄および各投与群の雌で投与後2～7日まで減少ないしは増加抑制が認められた。その後40mg/kg以下の投与群では増加を示し、観察終了時には対照群とほぼ同程度となった。70mg/kg投与群では雌雄とも投与後14日まで対照群を下回り、投与後17日に対照群とほぼ同程度になった。100mg/kg投与群の雌では観察期間を通して対照群を下回った。

剖検に関し、投与後30分に死亡した動物では、特に記すべき変化はみられなかった。一方、投与後2日以降に死亡した例では、粗毛、胸腺および脾臓の萎縮、消化管（胃、小腸）の拡張、胃および小腸に暗赤色内容物の貯留、腹腔内脂肪織に白色物の付着、肝臓の白色化が認められ、投与後15日に死亡した例では消瘦もみられた。生存動物では、一部の動物で腹腔内諸器官の癒着、脾臓の腫大、小腸の拡張がみられた。

RCC-32

雌雄ともに510mg/kg投与群で2例の死亡が認められたのみであり、LD₅₀値は雌雄ともに510mg/kg以上と推定された。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少、腹臥位、異常歩行、呼吸数減少がみられ、雌1例では挙尾を伴い、投与後15分～4時間に死亡した。生存動物では投与直後より死亡動物と同様の症状を示したが、投与後2～4時間から軽減し始め、投与翌日までには全例が回復した。

体重推移では、510mg/kg投与群の雌で投与翌日に減少が認められたが、その後は増加を示し、対照群とほぼ同程度の推移を示した。その他の投与群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

剖検に関し、死亡動物では特に記すべき変化はみられなかった。生存動物では各投与群の雄、230および510mg/kg投与群の雌で1ないしは2例に腹腔内諸器官の癒着が認められた。

RCC-38

雌雄ともに510mg/kg投与群で全例の死亡が認められた。他の投与群では死亡例は認められず、LD₅₀値は雌雄ともに340～510mg/kgと推定された。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少、腹臥位、異常歩行、間代性痙攣、挙尾、呼吸数減少がみられ、投与後5分以内に死亡した。生存動物では死亡動物とほぼ同様の症状を示したが、投与後15～30分で軽減し始め、投与2時間後には全例が回復した。

体重推移では、340mg/kg投与群の雄で投与後2日以降、観察期間を通して対照群を下回って推移した。その他の投与群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

剖検では、死亡動物、生存動物とも特に記すべき変化は認められなかった。

RCC-66

2000mg/kg投与群で雄3例と雌4例が死亡した。他の投与群では死亡例は認められず、LD₅₀値

は雌雄ともに1000～2000mg/kgと推定された。

一般状態に関し、死亡動物では投与直後より自発運動の減少がみられたが、投与後30分以内に一旦消失した。しかし、投与翌日～3日後に自発運動の減少、粗毛がみられ始め、投与後2～8日に死亡した。生存動物では2000mg/kg投与群の雌雄で死亡動物と同様の症状を示したが、投与後6～8日で回復した。

体重推移では、2000mg/kg投与群の雌雄で投与後3日まで減少し、その後増加を示した。雌では投与後10日で対照群とほぼ同程度となったが、雄では観察期間を通して対照群を下回った。その他の投与群では投与翌日に減少がみられたが、その後は増加を示し、500mg/kg投与群の雄で投与後3日、雌で投与後2日、1000mg/kg投与群の雄で投与後14日、雌で投与後7日に対照群とほぼ同程度になった。

剖検では、死亡動物で粗毛、胸腺および脾臓の萎縮、消化管（胃、小腸）の拡張ならびに暗赤色内容物の貯留、腹腔内諸器官に白色物の付着が認められた。生存動物では、腹腔内諸器官の癒着が1000mg/kg以上の投与群の雌雄および500mg/kg投与群の雄にみられ、腹腔内諸器官に白色物の付着が500mg/kg以上の投与群の雌雄で認められた。

考 察

NS-21の光学異性体、活性代謝物RCC-36およびその光学異性体、加水分解物ならびに副生成物について、マウスを用いた腹腔内投与による単回投与毒性試験を実施した。

NS-21の光学異性体のLD₅₀値は（S）NS-21の雄で199mg/kg、雌で184mg/kg、（R）NS-21の雄で261mg/kg、雌で240mg/kgであった。一般状態では、両被験物質で自発運動の減少、腹臥位ないしは横臥位、異常歩行、間代性痙攣、呼吸数減少、散瞳、体温低下、皮膚の蒼白化、腹部膨満、粗毛などが認められた。散瞳はNS-21あるいは（R/S）RCC-36の抗コリン作用に基づく変化と考えられ、腹部膨満は剖検で認められた消化管の拡張に起因すると考えられた。痙攣性の変化は、NS-21の類薬であるoxybutynin（伊藤ら、1984）やpropiverine（山下

ら、1989)のマウス、ラットおよびイヌの単回投与毒性試験においても認められている。その他の症状についても、NS-21のマウスおよびラットの単回投与時(西口ら、1997)あるいはラットの(R/S)RCC-36の単回投与時(古川ら、1997)に観察されたものと同様であった。体重推移では、両被験物質で投与翌日より3日に減少ないしは増加抑制が認められた。剖検では、投与当日の死亡動物では両被験物質で腹腔内に被験物質と思われる白色物の貯留がみられた以外、特に記すべき変化は認められなかった。投与後4日以降の死亡例では、両被験物質でほぼ共通して胸腺および脾臓の萎縮、消化管の拡張、胃および小腸での暗赤色内容物の貯留、腹腔内脂肪織に白色斑が認められた。生存動物では両被験物質で腹腔内諸器官の癒着がみられ、さらに(S)NS-21で胸腺の萎縮が、(R)NS-21で腹腔内脂肪織に白色斑が認められた。腹腔内でみられた白色物は被験物質が残存していたものと考えられ、腹腔内脂肪織での白色斑は網内系細胞による被験物質の取り込みもしくは吸収後に脂肪織に沈着したものと考えられた。胸腺および脾臓の萎縮はストレスや栄養不良によるものと推察された。腹腔内諸器官の癒着は被験物質の刺激に起因するものと考えられるが、その発現例数を考慮するとごく軽度なものと考えられた。また、消化管の拡張はNS-21の単回投与でみられた変化と同様であり、抗コリン作用ないしはカルシウム拮抗作用による腸管運動の抑制に起因するものと考えられた。上述したごとく、(S)NS-21と(R)NS-21のLD₅₀値、一般状態、体重推移、剖検所見に大きな差は認められず、NS-21の光学異性体間の毒性に明らかな差はないと考えられた。また、NS-21の腹腔内への単回投与時(西口ら、1997)との比較では、NS-21のLD₅₀値(雄324mg/kg、雌390mg/kg)との比較で致死毒性は両光学異性体ともやや強く認められたが、一般状態、剖検所見などに明らかな差はみられなかった。

活性代謝物(NS-21のモノ脱エチル体)である(R/S)RCC-36およびその光学異性体(S)RCC-36、(R)RCC-36では、LD₅₀値は(R/S)RCC-36の雄で74mg/kg、雌で100~150mg/kg、(S)RCC-36では雌雄ともに93mg/kg、(R)RCC-36では雄で83mg/kg、

雌で104mg/kgであった。これらの3被験物質にはほぼ共通してNS-21の光学異性体でみられたと同様に、自発運動の減少、腹臥位ないしは横臥位、異常歩行、間代性痙攣、呼吸数減少、散瞳、体温低下、皮膚の蒼白化、腹部膨満、粗毛などがみられ、3被験物質ともに投与翌日から3ないし14日目まで体重減少あるいは増加抑制が認められた。剖検では、投与当日の死亡動物には特に変化は認められなかったが、その後の死亡例で3被験物質にはほぼ共通して胸腺および脾臓の萎縮、消化管の拡張、胃および小腸での暗赤色内容物の貯留、腹腔内脂肪織に白色物の付着が認められた。生存動物では(S)RCC-36、(R)RCC-36に共通して腹腔内諸器官の癒着、脾臓の腫大、消化管の拡張がみられた。LD₅₀値をはじめとする今回の結果から、3被験物質間の毒性に明らかな差はないと考えられた。一方NS-21およびその光学異性体と比較すると、一般状態等ではほぼ同様の変化がみられたが、致死毒性は約2~4倍程度強いと考えられた。ヒトではNS-21は経口投与後血漿中で速やかにRCC-36に代謝され、RCC-36がNS-21より高い血漿中濃度推移を示ことが確認されているものの、代謝されたRCC-36はNS-21とほぼ同様の抗コリン作用及びカルシウム拮抗作用を持ち薬効発現に寄与することを考えるならば、RCC-36の致死毒性がRCC-21より強いことが、臨床使用において特に問題になることはないと考えられた。

加水分解物および副生成物のLD₅₀値は、RCC-32の雌雄とともに510mg/kg以上、RCC-38の雌雄とともに340~510mg/kg、RCC-66の雌雄とともに1000~2000mg/kgと推定された。RCC-32および38で、自発運動の減少、腹臥位、異常歩行、挙尾、呼吸数減少が観察され、RCC-38では間代性痙攣も認められた。RCC-66では自発運動の減少、粗毛が認められたのみであった。体重推移では、3被験物質で投与翌日ないしは3日に減少ないしは増加抑制が認められた。剖検では投与当日の死亡例で特に記すべき変化は認められなかったが、RCC-66の投与後2日以降の死亡例で胸腺および脾臓の萎縮、消化管の拡張、胃および小腸での暗赤色内容物の貯留、腹腔内脂肪織に白色物の付着が認められた。生存動物では腹腔内諸器官の癒着が

RCC-32, RCC-66に共通してみられた。NS-21との比較では、加水分解物であるRCC-32, RCC-38, 副生成物であるRCC-66のいずれも致死毒性は同程度ないしは弱いものであり、一般状態等にもNS-21でみられた以外の変化はみられなかった。これらのことに加え、加水分解物、副生成物ともに臨床使用される製剤における含量規格を0.5%以下と設定しており、これらの毒性が臨床使用において問題となる可能性は低いと考えられた。

[試験期間：(S)NS-21, (R)NS-21；1995年7月20日～1995年12月25日, (R/S)RCC-36, (S)RCC-36, (R)RCC-36；1995年8月2日～1995年12月25日, RCC-32, RCC-38, RCC-66；1995年8月2日～1995年12月25日]

文 献

古川茂典, 神山八郎, 菊森幹人, 谷口雄三, 西森司雄, 石橋成太良, 岩倉啓子, 鷺見信好(1997)：新規頻尿・尿失禁治療剤(±)-4-diethylamino-1, 1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-

21)の活性代謝物(RCC-36, NS-21のモノ脱エチル体)のラットにおける単回ならびに13週間反復経口投与毒性試験. J. Toxicol. Sci., 22, Suppl. I, 93-124.

伊藤隆太, 中井修三, 阿久沢一夫, 佐野光栄(1984)：Oxybutynin Chlorideのマウスおよびラットにおける急性毒性. 基礎と臨床, 18, 4373-4382.

西口保幸, 吉田勝, 垂井睦, 中沢素邦, 岡高明, 岩倉啓子, 鷺見信好(1997)：新規頻尿・尿失禁治療剤(±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-21)のマウス, ラットおよびイヌにおける単回投与毒性試験. J. Toxicol. Sci., 22, Suppl. I, 1-13.

山下和正, 中野茂樹, 桑田雅彦, 矢田英昭, 入村兼司, 森永秀信, 森田健一(1989)：Propiverine hydrochlorideの急性毒性試験. J. Toxicol. Sci., 14, Suppl. II, 1-11.

Weil, C.S. (1952)：Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD₅₀ or ED₅₀) and instructions in their use, Biometrics, 8, 249-263.