

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2-1) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. T-17-1)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1999年

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley系妊娠ラット、試験開始時約12~15週齢、体重: 186.4~299.9g
1群30匹

投与期間: 妊娠6~19日の14日間(1997年9月29日投与開始)

投与方法: 検体を0.5%カルボキシメチルセルロース-0.4% Tween 80水溶液に懸濁し、0、15、100及び300 mg/kg/日の投与レベルで妊娠後6日目*)から19日目までの14日間、毎日1回強制経口投与した。対照群には0.5%カルボキシメチルセルロース-0.4% Tween 80水溶液を同様に投与した。なお、投与容量は10 mL/kgとし、投与期間中の体重に基づき毎日投与容量を調整した。

*) 膣垢中の精子が確認された日を妊娠0日として起算した。

投与量設定根拠:

観察・検査項目:

母動物;妊娠動物について、生死の観察を1日2回、臨床徴候に関する詳細な観察を1日1回実施した。体重は妊娠0、2、4、6~19及び20日に測定し、妊娠2、4、6~19及び20日に摂餌量を測定した。妊娠20日に、すべての生存妊娠動物を屠殺し、肉眼的病理検査を行い、肝臓、甲状腺及び子宮を摘出して重量を測定した。子宮を切開して胎児を摘出し、着床所見を記録するとともに、胎盤重量を測定した。

生存胎児;性別判定、体重測定及び外表検査を行った。各同腹児の半数については70%エタノールで固定した後骨格標本を作製して骨格異常の有無を検査し、残りの胎児についてはブアン液で固定して内臓異常の有無を検査した。又、頭蓋内検査の前に胎児を70%

エタノールに移し、頭部を Wilson の方法に従って薄切した。

結 果： 概要を次表に示した。

母動物；100 及び 300 mg/kg 投与群では、検体投与に関連した母動物への影響が観察された。臨床徴候としては 100 及び 300 mg/kg 投与群では硬化便、300 mg/kg 投与群では間代性痙攣が認められ、1 例が死亡した。300 mg/kg 投与群の妊娠動物は体重増加量、摂餌量、正味体重及び正味体重増加量（妊娠子宮重量を引いた値）で統計学的に有意な減少を示した。さらに、300 mg/kg 投与群では、相対及び絶対肝臓重量における統計学的に有意な増加が認められた。100 mg/kg 投与群で観察された母動物への影響は体重及び摂餌量における統計学的に有意な減少並びに相対肝臓重量における統計学的に有意な増加であった。15 mg/kg 投与群の母動物では検体投与に関連した所見は認められなかった。15 mg/kg 投与群で観察された体重増加量の統計学的に有意な低値は、投与前からみられており、検体投与による影響とは考えられなかった。又、同群では妊娠 9～10 日の摂餌量が一過性に統計学的に有意に減少したが、正常な変動の範囲内にあると考えられた。相対肝臓重量（肝臓/体重×100）にも統計学的に有意な増加がみられたが、背景対照の範囲内であった（15 mg/kg 投与群の平均相対肝臓重量：4.100、背景対照：3.608～4.374）。

繁殖パラメーター（交尾率、受胎率及び妊娠率）に関する検体投与の影響は認められなかった。なお、15 mg/kg 群の 1 例及び 300 mg/kg 群の 2 例で死亡胎児が認められたが、100 mg/kg 群では認められなかった^{申請者註 1}。

生存胎児；検体投与群の同腹児数、腹当たりの生存児数及び性比は、いずれの用量においても対照群と大差なく、検体投与の影響は認められなかった。300 mg/kg 投与群において、死亡胎児の発現頻度の増加及び胎児体重の統計学的に有意な減少が認められた。胎児の外表検査又は内臓検査では、偶発的な所見が認められたのみで、検体投与に関連した影響は認められなかった。検体投与に関連した胎児の骨格奇形は認められなかった。100 mg/kg 投与群の胎児 1 例で腰椎弓及び椎体の欠損が認められたが、偶発的な所見と考えられた。検体投与に関連した胎児の骨格所見として、主として不完全骨化が 100 及び 300 mg/kg 投与群で観察された。種々の骨格変異が対照群及び 15 mg/kg 群においても認められたが、上後頭骨不完全骨化^{申請者註 2}を除くいずれの変異も本系統ラットの背景データの範囲内（資料 No. T-17-2 参照）であった。なお、上後頭骨不完全骨化を含め当該試験においては変異の出現頻度が高かった。背景データがアリザリンレッド S 単染色標本の観察結果であるのに対し、今回は二重染色を施しており、青色の暗さが赤色を見難くしたため、あたかも不完全骨化とみなされ、標本作製方法に起因する人

申請者註 1

申請者註 2

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

工産物と考えられた。

以上のように、検体を妊娠 6～19 日に経口投与したときの母動物に対する影響として、100 及び 300 mg/kg 投与群で硬化便、体重、体重増加量及び摂餌量の減少、絶対及び／あるいは相対肝臓重量の増加並びに 300 mg/kg 群で間代性痙攣が認められた。胎児に対する影響として、100 及び 300 mg/kg 群で不完全骨化を主とする骨格変異、300 mg/kg 群で体重の減少が認められ、母動物及び胎児動物における無毒性量は 15 mg/kg/日と判断された。又、最高投与量の 300 mg/kg/日でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断された。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	15	100	300	
1 群当り動物数		30	30	30	30	
妊娠動物数		25	28	20	26 or 27 ^a	
母動物	途中死亡/切迫殺数 ^a	0	0	0	1	
	一般状態 ^a ; 硬化便	0	0	9	22	
	間代性痙攣	0	0	0	3	
	体重増加量 (g) ¹⁾	妊娠 2~19 日	106.4	100.2	↓ 91.4	↓ 67.1
		妊娠 0~20 日	138.5	↓ 126.7	↓ 120.9	↓ 94.2
	正味体重 (g) ¹⁾		296.4	↓ 279.7	↓ 274.6	↓ 258.9
	正味体重増加量 (g) ¹⁾		57.8	53.1	48.2	↓ 24.4
	摂餌量 (g) ¹⁾	妊娠 6~7 日	80.2	69.8	↓ 46.3	↓ 26.7
		妊娠 7~8 日	84.3	79.8	↓ 59.3	↓ 33.8
		妊娠 8~9 日	85.8	76.9	↓ 64.9	↓ 36.7
		妊娠 9~10 日	82.4	↓ 73.8	71.2	↓ 42.8
		妊娠 10~11 日	74.0	73.3	69.2	↓ 55.9
		妊娠 11~12 日	80.9	82.4	75.1	↓ 59.7
	妊娠 14~15 日	77.2	76.7	76.9	↓ 66.0	
	交尾率 (%)		100	100	100	100
	受胎率 (%)		83.3	93.3	66.7	90.0
	出産率 (%)		100	100	100	96.2
	肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常は認められなかった			
最終体重 (g) ¹⁾		377	↓ 354	↓ 347	↓ 329	
肝臓重量 ¹⁾	絶対 (g)	14.675	14.472	15.517	↑ 16.426	
	体重比	3.896	↑ 4.100	↑ 4.466	↑ 4.996	

太枠は検体投与の影響であることを示す。

交尾率 (%) = (受精した雌動物数 / 雄と同居させた雌動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠雌動物数 / 受精した雌動物数) × 100

出産率 (%) = (生存児出産雌動物数 / 妊娠雌動物数) × 100

着床前損失率 (%) = [(黄体数 - 着床数) / 黄体数] × 100

着床後損失率 (%) = [(着床数 - 生存胎児数) / 着床数] × 100

対照群との有意差の検定 (↓ ↑ : p ≤ 0.05, ↓ ↑ : p ≤ 0.01)

1) Dunnett 検定

a : 300 mg/kg 投与群では途中死亡が 1 例認められたため、検査項目により母動物数が異なる。検査項目に a の符号を付した項目は母動物数が 27 である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	15	100	300	
1 群当り動物数		30	30	30	30	
妊娠動物数		25	28	20	26 or 27	
母動物	着床所見	検査母動物数	28	28	20	25 or 26 ^b
		平均黄体数 ²⁾	15.9	16.2	16.0	17.3
		平均着床数 ²⁾	14.6	13.6	13.6	14.3
		着床前損失率 (%) ^{2) 4)}	8.5	14.8	14.1	12.7
		着床後損失率 (%) ^{2) 4)}	3.5	7.2	3.7	8.9
		平均生存胎児数 ²⁾	14.1	12.7	13.1	13.3
		死亡胎児総数 ²⁾	0	1	0	3
		平均早期吸収胚数 ²⁾	0.5	0.8	0.5	0.9
		平均後期吸収胚数 ²⁾	0.0	0.0	0.0	0.0
		妊娠子宮重量 (g) ³⁾	80.7	73.7	72.7	69.8
胎児	平均胎児体重 (g) ³⁾	雄	3.9	3.9	3.7	↓ 3.4
		雌	3.7	3.7	3.6	↓ 3.1
	胎盤重量 (g) ³⁾	0.56	0.56	0.59	0.59	
	性比 (雄胎児%中央値) ²⁾	50	46	50	53	

太枠は検体投与の影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$, ↓↓↑↑: $p \leq 0.01$)

2) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定、3) Healy 検定、4) Mann-Whitney U 検定

b: 300 mg/kg 投与群では死亡胎児しか有しない母動物が 1 例認められたため、検査項目により母動物数が異なる。本ページの項目は母動物数 26 であり、次頁以降は 25 である。

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	0	15	100	300
外表検査)	検査胎児 (腹) 数	353 (25)	356 (28)	261 (20)	345 (25)
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		全身浮腫	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		ドーム頭	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
内臓検査)	変異を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		検査胎児 (腹) 数	171 (25)	170 (28)	126 (20)	165 (25)
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		変異を有する胎児 (腹) 数	8 (6)	10 (9)	5 (4)	13 (12)
		胸腔内液貯留	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		左臍動脈遺残	3 (2)	2 (2)	0 (0)	3 (3)
		心臓小型	0 (0)	3 (2)	1 (1)	2 (2)
		肝臓変色	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腹腔内液貯留	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		水尿管	5 (4)	6 (6)	4 (3)	7 (7)
腎盂拡張	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)		
胎児動物)	検査胎児 (腹) 数	182 (25)	186 (28)	135 (20)	180 (25)
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		腰椎弓欠損	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]	0 (0) [0.0]
		腰椎体欠損	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]	0 (0) [0.0]
		変異を有する胎児 (腹) 数	182 (25)	186 (28)	134 (20)	180 (25)
		鼻骨不完全骨化	8 (7) [5.4]	7 (5) [3.9]	12 (7) [10.0]	↑76 (↑18) [↑41.4]
		前頭骨不完全骨化	7 (5) [4.7]	7 (3) [4.3]	↑15 (6) [11.1]	↑30 (↑15) [↑16.8]
		頭頂骨不完全骨化	25 (13) [15.1]	↑46 (20) [25.3]	↑58 (17) [↑43.8]	↑91 (↑22) [↑50.8]
		頭頂骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (2) [0.9]
		頭頂間骨不完全骨化	103 (25) [56.8]	112 (25) [59.2]	↑108 (19) [↑81.0]	↑154 (25) [↑85.9]
		頭頂間骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (2) [0.9]
		上後頭骨不完全骨化	71 (23) [38.1]	97↑ (24) [51.7]	↑86 (19) [↑62.6]	↑128 (25) [↑72.7]
		上後頭骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	3 (2) [1.5]
		側頭鱗骨不完全骨化	25 (11) [13.7]	37 (17) [20.8]	↑43 (↑17) [↑33.3]	↑56 (19) [32.8]
		頬骨不完全骨化	14 (6) [7.7]	22 (14) [12.9]	↑30 (↑13) [22.1]	↑36 (14) [20.7]
		頬骨未骨化 (軟骨存在)	3 (1) [1.7]	2 (2) [1.0]	4 (3) [2.7]	7 (4) [4.8]
		上顎骨不完全骨化	8 (4) [4.5]	10 (6) [6.3]	6 (4) [4.1]	8 (6) [4.1]
		顎間骨不完全骨化	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]	1 (1) [0.8]
		下顎骨不完全骨化	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]	1 (1) [0.8]
		骨格検査)	変異		
鼻骨不完全骨化	8 (7) [5.4]			7 (5) [3.9]	12 (7) [10.0]	↑76 (↑18) [↑41.4]
前頭骨不完全骨化	7 (5) [4.7]			7 (3) [4.3]	↑15 (6) [11.1]	↑30 (↑15) [↑16.8]
頭頂骨不完全骨化	25 (13) [15.1]			↑46 (20) [25.3]	↑58 (17) [↑43.8]	↑91 (↑22) [↑50.8]
頭頂骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]			0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (2) [0.9]
頭頂間骨不完全骨化	103 (25) [56.8]			112 (25) [59.2]	↑108 (19) [↑81.0]	↑154 (25) [↑85.9]
頭頂間骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]			0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (2) [0.9]
上後頭骨不完全骨化	71 (23) [38.1]			97↑ (24) [51.7]	↑86 (19) [↑62.6]	↑128 (25) [↑72.7]
上後頭骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]			0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	3 (2) [1.5]
側頭鱗骨不完全骨化	25 (11) [13.7]			37 (17) [20.8]	↑43 (↑17) [↑33.3]	↑56 (19) [32.8]

太枠は検体投与の影響であることを示す。

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数、[] 内の数値は1腹当たりの発生率の平均 (%) を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$, ↓↓↑: $p \leq 0.01$)

2) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定

5) 胎児 (腹) 数; Bonferroni 補正 Fisher 正確検定、発生率: Non-parametric Dunnett 検定

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	15	100	300	
胎 児 動 物	骨 格 検 査 変 異	検査胎児 (腹) 数	182 (25)	186 (28)	135 (20)	180 (25)
		変異を有する胎児 (腹) 数	182 (25)	186 (28)	134 (20)	180 (25)
		舌骨未骨化 (軟骨存在)	31 (14) [16.2]	28 (16) [15.0]	13 (6) [10.1]	↑66 (22) [38.5]
		舌骨不完全骨化	48 (18) [25.9]	58 (23) [30.1]	↑63 (16) [46.0]	39 (19) [21.2]
		舌骨未骨化 (皮膚存在)	4 (1) [2.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [↓0.7]	0 (0) [↓0.0]
		舌骨未骨化	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.4]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.5]
		前頭縫合拡張	3 (2) [1.8]	5 (3) [2.9]	7 (4) [5.8]	↑14 (6) [8.5]
		矢状縫合拡張	13 (7) [8.0]	27 (15) [14.2]	↑32 (↑14) [24.1]	↑66 (↑20) [37.2]
		冠状縫合拡張	2 (2) [1.1]	0 (0) [0.0]	2 (2) [1.4]	↑13 (6) [6.9]
		大泉門拡張	15 (8) [9.0]	21 (13) [10.9]	↑31 (14) [↑24.1]	↑79 (↑21) [↑43.7]
		小泉門拡張	22 (11) [13.1]	40 (17) [22.0]	↑50 (↑17) [↑38.1]	↑74 (19) [↑42.3]
		肋骨骨化中心	4 (3) [2.0]	5 (5) [3.4]	3 (3) [2.3]	0 (0) [0.0]
		肋骨波状肋骨	1 (1) [0.5]	9 (7) [6.5]	↑12 (↑9) [↑9.9]	↑23 (↑10) [↑14.6]
		肋骨不完全骨化	1 (1) [0.6]	5 (4) [2.7]	↑9 (↑7) [↑6.2]	↑18 (8) [↑11.2]
		肋骨痕跡状	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.4]	1 (1) [0.8]	0 (0) [0.0]
		肋骨短小	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.4]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.5]
		頸椎弓不完全骨化	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]	0 (0) [0.0]
		胸椎体不完全骨化	68 (22) [37.2]	62 (22) [31.2]	47 (18) [35.5]	75 (22) [42.3]
		胸椎体二分	3 (2) [1.6]	2 (2) [1.0]	3 (3) [2.9]	3 (3) [↑1.8]
		腰椎弓不完全骨化	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	↑18 (↑9) [↑9.3]
		腰椎体不完全骨化	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.4]	0 (0) [0.0]	3 (3) [↑1.7]
		仙椎弓不完全骨化	140 (24) [78.0]	140 (25) [71.7]	111 (19) [81.8]	↑173 (25) [95.9]
		仙椎弓未骨化 (軟骨存在)	2 (1) [0.9]	8 (4) [4.1]	6 (4) [4.2]	↑36 (↑14) [↑20.4]
		仙椎体不完全骨化	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.6]	0 (0) [0.0]	↑8 (5) [4.3]
		仙椎体未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	4 (2) [2.3]
		尾椎弓不完全骨化	135 (25) [73.6]	127 (26) [66.1]	↓73 (18) [53.7]	↓84 (23) [47.1]
		尾椎弓未骨化 (軟骨存在)	86 (23) [48.8]	↑117 (26) [61.8]	↓84 (18) [63.1]	↑153 (25) [↑84.3]
		尾椎弓未骨化 (皮膚存在)	12 (6) [6.0]	3 (3) [1.5]	10 (5) [6.8]	8 (4) [4.0]
		尾椎体未骨化 (軟骨存在)	1 (1) [1.3]	1 (1) [0.6]	2 (2) [1.4]	↑15 (6) [8.3]
		尾椎体不完全骨化	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.6]	1 (1) [0.6]	↑15 (5) [↑7.7]
坐骨不完全骨化	3 (3) [1.8]	4 (3) [1.8]	6 (4) [4.3]	11 (5) [5.4]		
坐骨未骨化 (軟骨存在)	1 (1) [0.4]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (1) [1.0]		
坐骨未骨化	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.5]		
恥骨不完全骨化	11 (7) [7.0]	13 (10) [6.5]	↑20 (12) [14.7]	↑41 (12) [21.3]		
恥骨未骨化 (軟骨存在)	1 (1) [0.4]	2 (2) [1.0]	2 (1) [1.4]	4 (3) [2.4]		

太枠は検体投与の影響であることを示す。

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数、[] 内の数値は1腹当たりの発生率の平均 (%) を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: p ≤ 0.05、↓↑↑: p ≤ 0.01)

2) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定、5) 胎児 (腹) 数; Bonferroni 補正 Fisher 正確検定、発生率; Non-parametric Dunnett 検定

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	15	100	300	
胎 児 動 物	骨 格 検 査 変 異 ⁵⁾	検査胎児 (腹) 数	182 (25)	186 (28)	135 (20)	180 (25)
		変異を有する胎児 (腹) 数	182 (25)	186 (28)	134 (20)	180 (25)
		恥骨未骨化	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]	2 (2) [1.0]
		中手骨未骨化 (軟骨存在)	39 (13) [21.1]	↑62 (19) [32.5]	34 (10) [26.1]	↑92 (19) [48.4]
		中手骨未骨化 (皮膚存在)	40 (12) [21.2]	52 (14) [26.8]	↑60 (14) [43.7]	↑73 (18) [42.5]
		中手骨不完全骨化	82 (25) [47.4]	69 (22) [35.4]	↓37 (↓11) [28.2]	↓51 (21) [29.0]
		中足骨未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	5 (2) [2.8]
		中足骨不完全骨化	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.5]	2 (1) [1.4]	↑30 (↑12) [14.9]
		中足骨未骨化 (皮膚存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (2) [1.0]
		胸骨柄不完全骨化	13 (9) [6.8]	9 (5) [4.7]	13 (7) [9.2]	↑33 (15) [↑17.1]
		胸骨柄未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.5]
		第2胸骨分節不完全骨化	29 (16) [16.4]	↑53 (19) [26.7]	27 (13) [19.3]	↑91 (↑24) [↑47.5]
		第2胸骨分節未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.6]	1 (1) [0.7]	1 (1) [0.5]
		第3胸骨分節不完全骨化	13 (10) [7.5]	17 (9) [8.1]	15 (10) [10.4]	↑58 (↑20) [30.1]
		第3胸骨分節未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	2 (2) [1.3]
		第4胸骨分節不完全骨化	110 (25) [60.0]	↑135 (28) [69.8]	89 (20) [64.9]	↑141 (25) [78.3]
		第4胸骨分節未骨化 (軟骨存在)	0 (0) [0.0]	2 (1) [1.2]	0 (0) [0.0]	2 (2) [1.3]
		第4胸骨分節二分	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.7]
		第4胸骨分節非対称	0 (0) [0.0]	1 (1) [0.5]	0 (0) [0.0]	0 (0) [0.0]
		第5胸骨分節不完全骨化	145 (25) [79.8]	159 (28) [85.9]	109 (20) [80.2]	↓73 (22) [↓42.6]
		第5胸骨分節未骨化 (軟骨存在)	34 (17) [18.7]	24 (12) [12.4]	22 (11) [17.0]	↑101 (↑25) [↑54.7]
		第5胸骨分節未骨化 (皮膚存在)	2 (1) [1.0]	1 (1) [0.5]	2 (1) [1.4]	0 (0) [0.0]
		剣状骨不完全骨化	152 (25) [83.3]	154 (27) [79.9]	↓91 (20) [66.9]	↓58 (↓18) [↓31.9]
		剣状骨未骨化 (軟骨存在)	18 (10) [10.2]	17 (8) [8.8]	↑30 (11) [22.4]	↑116 (↑23) [↑64.8]
ラムダ縫合拡張	0 (0) [0.0]	2 (2) [0.9]	1 (1) [↑0.7]	↑15 (5) [↑7.7]		
鱗状縫合拡張	14 (7) [7.5]	27 (17) [15.5]	↑30 (12) [23.3]	↑48 (↑17) [28.2]		

太枠は検体投与の影響であることを示す。

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数、[] 内の数値は1腹当たりの発生率の平均 (%) を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$ 、↓↑↑: $p \leq 0.01$)

2) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定

5) 胎児 (腹) 数: Bonferroni 補正 Fisher 正確検定、発生率; Non-parametric Dunnett 検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No. T-17-2)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3-1) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No. T-18-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

検体純度：

供試動物： CHBB：HM 系妊娠ヒマラヤウサギ、妊娠 0 日時 106～181 日齢、体重 1,856～2,920 g、
1 群 22 匹

投与期間： 妊娠 6～28 日の 23 日間（1998 年 2 月 23 日～1998 年 6 月 4 日）

投与方法： 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、0、5、20 及び 70 mg/kg/日の
投与レベルで妊娠後 6 日目^{*}から 28 日目までの 23 日間、毎日 1 回強制経口投与した。
対照群には 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液を同様に投与した。なお、投与容
量は 5 mL/kg とし、毎日投与直前に測った体重に基づいて調整した。

^{*} 交尾が確認された日を妊娠 0 日として起算した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；一般状態を 1 日 1 回以上観察した。体重は、妊娠 0 日及び妊娠 6 日から 29 日まで毎日
測定し、補正体重増加量は、妊娠 0 日から 29 日までの体重増加量から、妊娠 29 日に
おける子宮重量を差し引いて算出した。摂餌量は、妊娠 0～6 日、6～9 日、9～12 日、
12～15 日、15～18 日、18～21 日、21～24 日、24～27 日及び 27～29 日間の摂取量を測
定した。妊娠 29 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、早期及び
後期吸収胚数を検査するとともに、子宮重量及び胎盤重量を測定した。

生存胎児；性別判定、体重測定及び外表検査を行った。全生存胎児について内臓異常の有無を検
査した。又、アルシアンブルーで軟骨を染色した後、胎児を希釈した水酸化カリウム

水溶液で洗浄し、アリザリンレッド S で染色して骨格標本を作製して骨格異常の有無を検査した。

結 果： 概要を「結果の概要」の表に示した。

母動物；70 mg/kg 群の雌 1 例が、重度の全身毒性の徴候（摂餌量の重度減少、体重の重度減少、耳介温度低下）を示した後、妊娠 21 日に流産した。70 mg/kg 群の別の雌 1 例は、一時的に耳介温度低下を示した。いずれも検体投与に関連する影響と判断された。

試験期間中死亡例は認められなかった。

摂餌量の減少とそれに相応する糞量の減少が、70 mg/kg 群で認められ、さらに、摂水量も減少し、尿が濃縮され、着色尿がみられた。検体投与期間中の 20 mg/kg 以上の用量で体重増加抑制が認められたが、これは主として投与開始直後の体重の減少によるものであった。

肉眼的剖検所見では、70 mg/kg 群の雌 1 例に胃及び腸の大型化が認められ、この個体については摂餌量の減少を含む母動物毒性所見がみられたことから、検体投与の影響である可能性を完全には否定できなかった。

子宮内発生に関しては、70 mg/kg 群において 1 例が流産したために、出産率がごくわずかに減少したが、この流産は、繁殖性に対する特異的影響ではなく、全身的母動物毒性が原因であると考えられた。

粗粒状胎盤の発現頻度の増加が 70 mg/kg 群でみられたが、胎盤重量には、70 mg/kg まで影響がなかった

その他のパラメーターには 70 mg/kg まで影響がなく、全てのパラメーターに検体投与の影響が認められなかった用量は 5 mg/kg であった。

生存胎児；生存胎児数並びに胎児の性比には、70 mg/kg まで影響がなかった。平均胎児体重は、70 mg/kg 群でごくわずかに減少したが、20 mg/kg 以下では明確な変化は認められなかった。このため、70 mg/kg 群では、骨化段階に対してごくわずかな検体投与の影響（軽度、前肢第 5 中節骨のみ）が認められた可能性を完全に否定することはできなかった。胎児又は腹の奇形の発生率（奇形を有する胎児（腹）数を生存胎児（腹）数で除し、100 を乗じた値）は、検体投与をした全群で対照群と比較して増加傾向がみられ、20 mg/kg 群のみで統計学的な有意差が認められた。これは対照群における奇形の発生率が異常に低かった（0.7%）ことに起因するもので、用量相関性は明らかではなく、しかも各群の奇形発生率（3.9～6.9%）は、この試験に用いたウサギの系統の最新の背景値（最大 7.3%）内であった。したがって、外表、内臓及び骨格の奇形の種類及び発現頻度には、70 mg/kg まで影響を受けなかったものと判断した。70 mg/kg まで検体投与に起因する奇形がなかったことは、追加して実施したウサギを用いた経口催奇形性試験（資料 No. T-18-2）においても確認された。さらに、外表及び内臓の変異にも、70 mg/kg まで検体投与に起因する影響が認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

以上のように、検体を妊娠 6~28 日に経口投与した結果、母動物における影響として 70 mg/kg 群で、重度の全身毒性（摂餌量の重度減少、体重の重度減少、耳介温度低下）を示す個体が 1 例認められ、妊娠 21 日流産した。又、さらに 1 例で一時的に耳介温度低下を示した。その他に、同群で摂餌量の減少と相応する糞量の減少、摂水量の減少と着色尿、胃腸の大型化及び粗粒状胎盤が認められた。20 mg/kg 以上の用量では体重増加抑制が認められたことから、母動物の無毒性量は 5 mg/kg/日と判断された。胎児動物に対する影響としては、70 mg/kg 群で平均胎児重量のわずかな減少とそれに相応して骨化遅延が認められたことから、胎児動物における無毒性量は 20 mg/kg/日と判断した。又、最高投与量の 70 mg/kg/日でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断された。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	5	20	70		
1 群当り動物数		22	22	22	22		
母動物	妊娠動物数		22	20	22	21	
	途中死亡		0	0	0	0	
	流早産数		0	0	0	1	
	一般状態 ;	糞量減少	6	4	5	12	
		尿量減少	8	9	5	11	
		着色尿	0	0	0	4	
		飲水量減少	3	7	1	8	
	耳介温度低下		0	0	0	2	
	平均体重増加量 ¹⁾ (g)	妊娠 0~6 日	10.2	18.4	-14.0	48.7	
		妊娠 6~12 日	3.4	-8.0	-32.2	↓ -86.8	
		妊娠 6~29 日	252.0	228.9	↓ 179.8	↓ 175.3	
		妊娠 0~29 日	262.3	247.3	↓ 165.8	224.0	
	補正体重増加量 ¹⁾ (g)		-71.5	-68.3	↓ -157.5	-78.9	
	平均摂餌量 ¹⁾ (g)	妊娠 6~9 日	90.3	86.4	77.9	↓ 53.1	
		妊娠 9~12 日	86.2	83.7	76.4	↓ 49.2	
		妊娠 12~15 日	80.4	80.7	75.3	↓ 55.4	
		妊娠 15~18 日	85.8	87.6	79.2	↓ 66.0	
		妊娠 18~21 日	95.3	95.5	84.9	↓ 81.8	
	肉眼的病理所見 ; 胃腸大型化		0	0	0	1	
	粗粒状胎盤		0	1	0	3	
	着床所見	検査母動物数		22	20	22	20
		平均黄体数 ¹⁾		7.8	7.3	7.7	7.6
		平均着床数 ¹⁾		7.3	6.8	7.2	6.9
平均着床前胚損失数 ²⁾		0.5	0.5	0.5	0.7		
平均着床後胚損失数 ²⁾		0.5	0.8	0.7	0.6		
平均生存胎児数 ¹⁾		6.7	6.0	6.5	6.3		
死亡胎児数 ²⁾		0	0	0	0		
平均早期吸収胚数 ²⁾		0	0	0	0		
平均後期吸収胚数 ²⁾		0.5	0.8	0.7	0.6		
妊娠子宮重量 ¹⁾ (g)		333.7	315.5	323.3	302.9		
胎児	平均胎児体重 ¹⁾ (g)	雄	34.87	36.56	34.92	32.99	
		雌	33.85	35.98	34.96	33.05	
	胎盤重量 ¹⁾ (g)		4.03	4.13	4.06	4.11	
	性比 ²⁾ (雄%)		59.2	52.3	53.2	56.9	

太枠は検体投与の影響であることを示す。

着床前損失率 (%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後損失率 (%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

対照群との有意差の検定 (↓↑: p ≤ 0.05, ↓↓↑↑: p ≤ 0.01) 1) Dunnett 検定、2) Kruskal-Wallis 検定

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	0	5	20	70	
胎児動物	外表検査 ¹⁾	検査胎児 (腹) 数	148 (22)	120 (20)	144 (22)	127 (20)	
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0) [0.0%]	2 (2) [1.3%]	3 (3) [2.5%]	1 (1) [0.6%]	
		奇形	前肢位置異常	0 (0) [0.0%]	2 (2) [1.3%]	2 (2) [1.4%]	1 (1) [0.6%]
			両後肢変形、腹壁ヘルニア、 脊椎側弯	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [1.1%]	0 (0) [0.0%]
	内臓検査 ¹⁾	検査胎児 (腹) 数	148 (22)	120 (20)	144 (22)	127 (20)	
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	3 (3) [2.5%]	1 (1) [0.6%]	
		奇形	心室中隔欠損	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.6%]	1 (1) [0.6%]
			心臓/大血管奇形	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [1.1%]	0 (0) [0.0%]
			外水頭症/側脳室萎縮	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.8%]	0 (0) [0.0%]
		変異	小副肝葉	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	肝臓白色化		0 (0)	0 (0)	3 (3)	0 (0)	
	骨格検査 ²⁾	検査胎児 (腹) 数	148 (22)	120 (20)	144 (22)	127 (20)	
		奇形を有する胎児 (腹) 数	1 (1) [0.6%]	4 (4) [3.2%]	6 (6) [5.5%]	3 (3) [2.7%]	
		奇形	右第4及び5肋骨癒合	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.6%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]
			右第6及び7肋骨癒合/右 第6肋骨二分	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.8%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]
			右第4及び5肋骨癒合・二 分/13肋骨	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.5%]	0 (0) [0.0%]
			右第7頸肋骨及び第1肋骨 の癒合	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.7%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]
			右13肋骨を伴う腰椎過剰	0 (0) [0.0%]	1 (1) [1.0%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]
			腰椎欠損	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	3 (3) [2.7%]	2 (2) [2.1%]
			尾椎体癒合	1 (1) [0.6%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]
右第5肋骨及び第5胸椎体 欠損			0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [1.1%]	0 (0) [0.0%]	
右第1仙骨椎弓欠損及び骨 盤のゆがみ			0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [0.6%]	
胸椎及び腰椎域の側弯、肋 骨屈曲、胸骨片の位置異常			0 (0) [0.0%]	0 (0) [0.0%]	1 (1) [1.1%]	0 (0) [0.0%]	
外表、内臓及び骨格奇形を有する 胎児 (腹) 数		1 (1) [0.6%]	6 (6) [4.5%]	↑10 (↑10) [7.5%]	5 (5) [3.9%]		

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示し、[] 内に1腹当たりの発生率の平均を示す。
対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$, ↓↓↑: $p \leq 0.01$)

1) Yates 補正 χ^2 検定、2) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	5	20	70	
胎児動物	骨格検査 1) 変異	検査胎児 (腹) 数	148 (22)	120 (20)	144 (22)	127 (20)
		前肢第 4 右中節骨不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前肢第 5 右中節骨不完全骨化	34 (11)	25 (10)	41 (13)	↑50 (14)
		前肢第 5 右中節骨未骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		前肢第 4 左中節骨不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前肢第 5 左中節骨不完全骨化	34 (13)	26 (10)	41 (13)	↑52 (14)
		前肢第 5 左中節骨未骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		前肢第 1 右基節骨不完全骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前肢第 1 左基節骨不完全骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第 1 右中手骨不完全骨化	3 (2)	1 (1)	0 (0)	3 (2)
		第 1 左中手骨不完全骨化	3 (2)	1 (1)	1 (1)	3 (2)
		後肢第 5 右中節骨不完全骨化	16 (9)	17 (10)	11 (6)	25 (11)
		後肢第 5 左中節骨不完全骨化	16 (9)	14 (9)	11 (6)	22 (10)
		両側距骨不完全骨化	2 (1)	0 (0)	0 (0)	4 (1)
		第 1 胸骨分節不完全骨化	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
		第 2 胸骨分節不完全骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第 4 胸骨分節不完全骨化	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第 5 胸骨分節不完全骨化	95 (20)	77 (19)	102 (22)	79 (18)
		第 6 胸骨分節不完全骨化	4 (3)	0 (0)	3 (3)	2 (2)
		第 5 胸骨分節未骨化	50 (18)	38 (13)	40 (17)	46 (14)
		第 2 胸骨分節非対称	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第 4 胸骨分節非対称	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第 5 胸骨分節二分	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		第 5 胸骨分節過剰骨化中心	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第 6 胸骨分節分岐	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸骨分節癒合	6 (5)	2 (2)	4 (3)	5 (3)
		第 12 左肋骨短小	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第 12 右肋骨短小 (軽度)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
		第 6 右肋骨肥厚 (軽度)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	3 (3)
		第 7 右肋骨肥厚 (軽度)	1 (1)	2 (1)	3 (3)	1 (1)
第 8 右肋骨肥厚 (軽度)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		
第 4 左肋骨肥厚 (軽度)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)		
第 6 左肋骨肥厚 (軽度)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	3 (3)		
第 7 左肋骨肥厚 (軽度)	0 (0)	4 (4)	3 (2)	1 (1)		
第 8 左肋骨肥厚 (軽度)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		

太枠は検体投与の影響であることを示す。
 変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。
 対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$, ↓↓↑↑: $p \leq 0.01$)

1) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	5	20	70	
胎 児 動 物	骨 格 検 査 II 変 異	検査胎児 (腹) 数	148 (22)	120 (20)	144 (22)	127 (20)
		第 7 右頸肋	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第 7 左頸肋	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		13 肋骨 (不完全骨化)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第 1 頸椎体骨化 (不完全骨化)	5 (4)	4 (2)	2 (2)	10 (5)
		第 2 頸椎体亜鈴型	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第 4 胸椎体亜鈴型	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第 8 尾椎弓骨化	15 (9)	23 (11)	27 (12)	16 (9)
		第 15 尾椎体骨化	100 (22)	83 (20)	99 (22)	72 (18)
		第 16 尾椎体骨化	6 (4)	8 (6)	8 (8)	9 (6)
		第 8 尾椎体不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		第 9 尾椎体不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		第 10 尾椎体不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		第 11 尾椎体不完全骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	3 (2)
		第 12 尾椎体不完全骨化	2 (2)	2 (2)	0 (0)	2 (2)
		第 13 尾椎体不完全骨化	10 (6)	5 (4)	4 (3)	16 (10)
		第 14 尾椎体不完全骨化	28 (12)	20 (14)	24 (11)	32 (14)
		第 15 尾椎体不完全骨化	62 (19)	56 (18)	69 (21)	52 (18)
		第 16 尾椎体不完全骨化	5 (4)	6 (5)	7 (7)	8 (6)
		舌骨体不完全骨化	113 (21)	96 (20)	107 (22)	100 (20)
		泉門縫合骨	4 (4)	6 (5)	1 (1)	3 (3)
		右前頭骨不完全骨化	3 (3)	2 (2)	6 (6)	3 (2)
		左前頭骨不完全骨化	4 (4)	4 (4)	3 (2)	3 (3)
		両側前頭骨不完全骨化	3 (3)	6 (5)	11 (8)	5 (5)
右頭頂骨不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		
両側頭頂骨不完全骨化	1 (1)	4 (3)	6 (6)	1 (1)		
頭頂骨周囲未骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)		

変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$, ↓↓↑↑: $p \leq 0.01$)

1) Bonferroni 補正 Fisher 正確検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No. T-18-2)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(13) 変異原性

1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-19)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA1535、TA100、TA1537 及び TA98 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、16~5,000 µg/プレートの範囲の 6 用量で実施した。試験は 4 連制とし、1 回目試験はプレート法、2 回目試験はプレインキュベーション法を用いて 2 回行った。

少なくとも 1 菌株で再現性があり、用量に相関して復帰変異コロニー数が増加 (TA1535、TA100 及び TA98 株では陰性対照の 2 倍、TA1537 株では同 3 倍に達した場合) した場合に陽性と判断した。

投与量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

2 回の試験において、検体は S9 mix の有無にかかわらず、最高用量 5,000 µg/プレート (ただし、2 回目のプレインキュベーション法ではプレート法との区別を明確にするため、単位を µg/チューブで示したが意味は同じである) まで、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、ニトロフラントイン及び 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミンは S9 mix 非存在下において、2-アミノアントラセンは S9 mix 存在下において、各試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、アミカルバゾン原体は、代謝活性化系の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

I 回目試験 (プレート法)

(表中の数値は4反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	12±3	129±8	9±2	25±7	
検体	16	-	14±2	95±8	10±2	22±2	
	50	-	11±3	100±13	9±3	26±3	
	158	-	13±3	109±9	9±3	23±5	
	500	-	10±2	97±17	8±3	20±8	
	1,581	-	8±3	102±5	9±2	20±5	
	5,000	-	13±3	100±12	9±3	19±4*	
対照 (DMSO)	0	+	10±1	103±4	11±2	26±4	
検体	16	+	11±3	107±10	12±2	29±5	
	50	+	12±3	115±14	8±2	36±5	
	158	+	12±3	115±3	12±3	28±8	
	500	+	12±4	109±13	9±3	34±4	
	1,581	+	12±3	106±7	8±3	28±6	
	5,000	+	14±3	113±8	7±1	28±1*	
陽性 対照	Na-azide	10	-	782±20			
	NF	0.2	-		264±14		
	4-NPDA	0.5	-				176±29
		10	-			119±6	
	2-AA	3	+	166±6	1661±126	304±47	1646±102

陽性対照物質

Na-azide : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

2-AA : 2-アミノアントラセン

* : 菌株に対する毒性が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2回目試験（プレインキュベーション法）

（表中の数値は4反復の平均値±標準偏差）

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{チューブ}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/チューブ				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	11 \pm 1	126 \pm 17	11 \pm 1	25 \pm 5	
検体	16	-	14 \pm 3	116 \pm 8	11 \pm 2	23 \pm 4	
	50	-	14 \pm 4	116 \pm 19	12 \pm 1	22 \pm 3	
	158	-	13 \pm 1	114 \pm 13	9 \pm 3	20 \pm 4	
	500	-	12 \pm 3	122 \pm 3	12 \pm 3	21 \pm 8	
	1,581	-	14 \pm 3	114 \pm 14	11 \pm 4	26 \pm 8	
	5,000	-	12 \pm 2	89 \pm 9	7 \pm 2	26 \pm 3	
対照 (DMSO)	0	+	12 \pm 3	124 \pm 3	11 \pm 2	27 \pm 3	
検体	16	+	13 \pm 3	124 \pm 11	11 \pm 3	33 \pm 3	
	50	+	15 \pm 4	113 \pm 7	9 \pm 1	32 \pm 3	
	158	+	12 \pm 4	107 \pm 17	9 \pm 2	30 \pm 6	
	500	+	14 \pm 3	117 \pm 15	11 \pm 2	32 \pm 5	
	1,581	+	11 \pm 3	118 \pm 9	10 \pm 2	30 \pm 6	
	5,000	+	12 \pm 4	121 \pm 13	13 \pm 1	31 \pm 4	
陽性 対照	Na-azide	10	-	717 \pm 12			
	NF	0.2	-		356 \pm 17		
	4-NPDA	0.5	-				166 \pm 24
		10	-			124 \pm 8	
	2-AA	3	+	218 \pm 19	1562 \pm 68	227 \pm 31	1216 \pm 50

陽性対照物質

Na-azide : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

2-AA : 2-アミノアントラセン

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-20)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体純度：

試験方法： ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA1535、TA100、TA1537 及び TA98 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、156~5,000 µg/プレートの範囲の用量で実施した。試験は2連制とし、プレインキュベーション法を用いた。

少なくとも1菌株で再現性があるか、用量相関性に復帰変異コロニー数が増加(陰性対照の2倍以上)した場合に陽性と判断した。

投与量設定根拠：

試験結果： 結果を次表に示した。

2回の試験において、検体はS9 mixの有無にかかわらず、最高用量5,000 µg/プレートまで、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム及び9-アミノアクリジンはS9 mix非存在下において、2-アミノアントラセンはS9 mix存在下において、各試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、アミカルバゾン原体は、代謝活性化系の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

用量設定試験 (表中の数値は2反復の平均値を示す)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA1535	TA100	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	-	14	130	30	23	14	
検体	8.19	-	18	120	35	19	13	
	20.5	-	14	119	30	21	20	
	51.2	-	9	108	28	18	18	
	128	-	12	113	26	24	25	
	320	-	14	117	31	32	18	
	800	-	12	117	35	22	20	
	2,000	-	11	117	30	27	11	
	5,000	-	16	87	34	26	13	
対照 (DMSO)	0	+	13	118	27	34	27	
検体	8.19	+	10	128	26	31	33	
	20.5	+	7	119	34	35	40	
	51.2	+	12	112	28	31	30	
	128	+	11	102	23	34	23	
	320	+	13	117	30	33	36	
	800	+	13	117	31	34	30	
	2,000	+	13	125	32	31	32	
	5,000	+	12	122	31	27	23	
陽性 対照	Na-azide	0.5	-	696				
	AF-2	0.01	-		577	126		
		0.1	-				751	
	9-AA	80	-					433
	2-AA	1.0	+		1036			
		2.0	+	450				161
		10	+			818		
		0.5	+				453	

陽性対照物質

Na-azide : アジ化ナトリウム

AF-2 : 2- (2-フリル) -3- (5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本試験

(表中の数値は2反復の平均値を示す)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA1535	TA100	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	-	10	110	28	22	14	
検体	156	-	7	116	26	25	15	
	313	-	12	110	23	29	12	
	625	-	14	117	30	19	14	
	1,250	-	10	108	21	22	11	
	2,500	-	13	122	27	27	16	
	5,000	-	11	113	26	26	17	
対照 (DMSO)	0	+	12	126	25	34	24	
検体	156	+	10	122	30	34	31	
	313	+	10	112	33	32	24	
	625	+	13	124	26	34	29	
	1,250	+	15	119	33	47	31	
	2,500	+	16	110	32	43	25	
	5,000	+	15	104	30	39	29	
陽性 対照	Na-azide	0.5	-	686				
	AF-2	0.01	-		637	103		
		0.1	-				620	
	9-AA	80	-					205
	2-AA	1.0	+		849			
		2.0	+	417				152
		10	+			778		
		0.5	+				500	

陽性対照物質

Na-azide : アジ化ナトリウム

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) チャイニーズハムスター肺細胞 (V79 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料No.T-21)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1997 年

検体純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスター肺細胞 (V79 細胞) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検討した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。1 濃度当たり 2 培養器を用い、検体処理 4 時間後に培養液を除去し、検体非添加の新鮮な培養液に交換して、さらに 14 (18 時間群) 及び 26 時間 (30 時間群 ; 溶媒対照及び検体 3,000 µg/mL 群のみ) 培養した後、1 培養器当たり 2 枚の標本を作製した。観察は、1 濃度当たり 200 個 (1 培養器当たり 100 個) の分裂中期像について行った。又、生存細胞数 (生存指数) 及び有糸分裂指数決定のために 1 濃度当たり 2,000 個 (1 培養器当たり 1,000 個) の細胞を観察した。試験は 1 回実施した。

陽性対照群として、代謝活性化系の非存在下ではマイトマイシン C (MMC) 0.1 µg/mL、代謝活性化系の存在下ではシクロホスファミド (CP) 2 µg/mL を用いた。

判定は、染色体構造異常を有する細胞の数が同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加し、かつ、その増加に用量相関性が認められた場合を陽性とした。

投与量設定根拠 : 細胞を S9 mix の存在下及び非存在下で、10~5,000 µg/mL の濃度の検体に 4 時間暴露し、処理開始後 24 時間に分裂指数及び生存細胞数 (生存指数) を調べた予備試験の結果を下表に示す。

検体濃度 (µg/mL)	分裂指数 (%)		生存指数 (%)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0 (DMSO)	100.0	100.0	100.0	100.0
10	100.0	108.2	111.1	119.6
50	120.7	97.4	108.4	131.8
100	112.2	90.0	112.6	144.6
250	115.9	95.2	113.7	183.1
500	125.0	93.1	108.9	160.1
1,000	101.2	76.6	88.9	152.7
2,500	156.1	97.4	74.7	93.9
5,000	63.4	23.4	23.7	31.8

上記の結果より、本試験では 1,000~3,000 µg/mL を設定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

試験結果： 結果を次表に示した。

本試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、3,000 µg/mL 以上の濃度で検体の析出が認められ、濃度に相関して分裂指数の減少が認められた。本試験の生存指数及び分裂指数の結果に基づいて、S9 mix 存在下及び非存在下ともに 1,000、2,000 及び 3,000 µg/mL の 3 用量を染色体異常誘発性の評価に使用した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、全ての処理群で、生物学的に意義のある構造異常を有する分裂中期細胞数の増加を示さなかった。

S9 mix 存在下及び非存在下のいずれにおいても、18 時間群には、生物学的に意義があり、統計学的に有意な構造異常を有する分裂中期細胞数の増加は認められなかった。30 時間群には、S9 mix 存在下及び非存在下ともに 3000 µg/mL の濃度で統計学的に有意な構造異常を有する分裂中期細胞数の増加（ギャップを除く：-S9 mix 4.5%、+S9 mix 4.0%）が認められたが、陰性対照（DMSO 処理）背景データ（-S9 mix メジアン平均 1.5、最低値 0.0%及び最高値 6.5%、+S9 mix メジアン平均 1.9、最低値 0.0%及び最高値 4.0%（1994～1996 年））の範囲内であり、18 時間の陰性対照（DMSO 処理）値（ギャップを除く：-S9 mix 2.5%、+S9 mix 1.5%）と比較しても、有意な差は認められなかった。従って、認められた有意差は、生物学的に意義がないと判断された^{申請者註}。

一方、陽性対照として用いた MMC 及び CP は染色体構造異常を示す分裂中期細胞の明らかな増加を示した。

以上の結果から、アミカルバゾン[®]は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下において染色体異常誘発性を有さないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (h)	標本作製時間 (h)	S9 mix の有無	a) 分裂 指数 (%)	観 察 細 胞 数	構造異常														
							異常数									異常細胞 (%)					
							染色分体型				染色体型				その他	+G ²⁾	-G ²⁾	交 換			
							ギャ ップ	切 断	断 片	欠 失	ギャ ップ	切 断	断 片	欠 失	交 換				多重 異常 ^{b)}	多重 異常	
溶媒対照 (DMSO)	0	4	18	-	100.0	200	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	2.5	2.5	0.0	
無処理 対照 ^{c)}	0				92.6	200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1.0	1.0	0.5
検体	1,000				106.3	200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0
	2,000				98.2	200	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1.0	1.0	0.5
	3,000				↓67.9	200	0	4	0	0	1	1	3	4	4	0	0	0	6.0	6.0	2.0
陽性対照 (MMC)	0.1				100.0	200	0	31	1	0	0	35	14	5	33	0	0	0	↑40.5	↑40.5	↑15.5
溶媒対照 (DMSO)	0	4	30	-	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0		
検体	3000				90.9	200	0	2	0	0	0	2	1	3	0	3	0	↑4.5	↑4.5	1.5	
溶媒対照 (DMSO)	0	4	18	+	100.0	200	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0		
無処理 対照 ^{c)}	0				101.6	200	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	0	2.5	2.5	1.0	
検体	1,000				103.9	200	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0.5	0.5	0.5	
	2,000				109.8	200	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1.5	1.5	0.5	
	3,000				↓70.3	200	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1.5	1.5	0.0	
陽性対照 (CP)	2				↓70.7	200	0	18	1	0	0	36	7	4	30	1	0	↑35.5	↑35.5	↑13.0	
溶媒対照 (DMSO)	0	4	30	-	100.0	200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0		
検体	3,000				110.5	200	0	1	0	0	0	2	3	4	2	1	0	↑4.0	↑4.0	1.0	

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$, ↓↑: $p \leq 0.01$)

1) 片側カイ二乗検定

2) Fisherの正確検定

DMSO: ジメチルスルホキシド、MMC: マイトマイシンC、CP: シクロホスファミド

+G: ギャップを含む異常、-G: ギャップを除く異常

a: 各群 2000 個の細胞について調べた。

b: 交換を有する多重異常

c: 溶媒無添加

4) マウスを用いた小核試験

(資料No.T-22)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1997 年

検体純度：

供試動物： Hsd/Win:NMRI 系マウス、入荷時約 6～12 週齢、体重；雄 38～43 g、雌 26～33 g (馴化期間最低 5 日間)、1 群雌雄各 5 匹

試験方法： 検体を 0.5%水性クレモホアー乳剤に懸濁し超音波処理後、100 mg/kg の投与量で、単回腹腔内投与した。陰性対照群には 0.5 %水性クレモホアー乳剤、陽性対照にはシクロホスファミド 20 mg/kg を同様に投与した。いずれの場合も投与容量は 10 mL/kg とした。投与 16、24 及び 48 時間後に動物を屠殺した。各動物の大腿骨から牛胎児血清を用いて骨髄を採取し、塗抹標本作製した。乾燥後、Ames Hema-Tek Slide Stainer を使用して、自動染色した。

陰性対照群及び陽性対照群は投与 24 時間後のみに動物を屠殺し、骨髄標本作製した。各標本をコード化し、細胞毒性を調べるために 1,000 個の多染性赤血球を観察し、1,000 個の多染性赤血球当たりの正染性赤血球数を求めた。又、各個体当たり 1,000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

いずれかの標本作製時期において、陰性対照と比較して小核を有する多染性赤血球数に検体投与による有意な増加が認められた場合を陽性とした。

投与量設定根拠：

試験結果： 骨髄標本の観察結果を次表に示した。

検体投与群では、24 時間まで、検体投与に関連した症状として、無気力、痙攣、筋攣縮、横転、後肢開脚拡大及び呼吸困難が認められた。その後、外観及び身体活動に影響は認められなかった。摂食行動は正常で、死亡は認められなかった。

染色体異常誘発性の評価に関しては、雌雄間で結果に有意な差がなかったことから、雌雄を併せて評価した。

いずれの標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して、生物学的に重要な、又は統計学的に有意な増加は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

多染性赤血球と正染性赤血球の比率に、48 時間の検体投与群において、わずかな変化が認められた。

一方、陽性対照であるシクロホスファミドでは、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して明らかな増加が認められた。多染性赤血球と正染性赤血球の比率に変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において、アミカルバゾンではマウス骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE ^{a)} % (平均値±SD)	NCE/1,000 PCE ^{b)} (平均値±SD)
16	検体	100	雌雄各 5 匹	0.16±0.14	1,012±336
24	陰性対照 (0.5%水性クレモラー乳剤)	0	雌雄各 5 匹	0.22±0.14	796±143
	検体	100	雌雄各 5 匹	0.21±0.12	978±274
48	陽性対照 (シクロホスファミド ^{c)})	20	雌雄各 5 匹	↑1.75±0.65	821±169
	検体	100	雌雄各 5 匹	0.17±0.12	↑1,375±901

Wilcoxon のノンパラメトリック順位和検定 (↓↑: P < 0.01)。

PCE: 多染性赤血球、NCE: 正染性赤血球

a) 1,000 個の多染性赤血球当たりの小核を有する多染性赤血球数

b) 1,000 個の多染性赤血球当たりの正染性赤血球数

5) ラットを用いた小核試験

(資料No.T-23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体純度：

供試動物： Crl:CD (SD) 系ラット、投与時 8 週齢、体重；306～359 g、 1 群雄各 5 匹

試験方法： 検体を 0.5 w/v%メチルセルロース溶液に懸濁し、500、1,000 及び 2,000 mg/kg の投与量で、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続経口投与した。陰性対照群には 0.5 w/v%メチルセルロース溶液、陽性対照にはマイトマイシン C 2 mg/kg (MMC、溶媒；注射用水) を尾静脈から単回静脈内投与した。陰性対照群及び検体投与群の投与容量は 10.0 mL/kg とし、陽性対照群の投与容量は 5.0 mL/kg とした。

最終投与 24 時間後（対照群は投与後 24 時間後）に動物を屠殺した。各動物の大腿骨から牛胎児血清を用いて骨髄を採取し、1,000 rpm で 5 分間遠心分離により余剰血清を除去した。残渣細胞をリン酸緩衝液で洗浄した後、10%中性緩衝ホルマリン液 5 mL を加えて固定した。細胞懸濁液を適量滴下したカバーガラスをアクリジンオレンジ塗布済みスライドガラスに載せ、顕微鏡観察に供した。

各標本をコード化し、細胞毒性を調べるために 500 個の赤血球を観察し、幼若赤血球数を求めた。又、各個体当たり 2,000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球数を計数した。

条件付二項検定を行い、陰性対照と比較して小核を有する幼若赤血球数に検体投与による有意な増加が認められた場合を陽性とした。

投与量設定根拠：

試験結果： 骨髄標本の観察結果を次表に示した。

検体投与群では、いずれも体重減少傾向が認められた。また、2,000 mg/kg 投与群では、検体投与に関連した症状として、眼瞼下垂及び流涎が認められた。

小核を有する幼若赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加は認められなかった。

幼若赤血球の比率にも、有意な減少は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

一方、陽性対照である MMC では、小核を有する幼若赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、アミカルバゾン はラット骨髄幼若赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

小核試験観察結果

投与群	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNIE ^{a)} % (平均値±SD)	Ratio of IE ^{b)} (平均値±SD)
陰性対照 (0.5% (w/v) MC)	0	5	0.12±0.04	58.0±4.8
検体	500	5	0.15±0.08	54.5±8.2
	1,000	5	0.07±0.04	54.9±4.1
	2,000	5	0.13±0.08	58.9±8.7
陽性対照 (MMC)	2	5	↑3.69±0.35 ¹⁾	↓45.0±5.4 ²⁾

対照群との有意差の検定 (↓↑ : $p \leq 0.05$, ↓↓↑ : $p \leq 0.025$)

1) 条件付二項検定 (Kastenbaum and Bowman 法)

2) アスピノーウェルチ t-検定

0.5% (w/v) MC : 0.5% (w/v) メチルセルロース溶液、 MMC : マイトマイシン C

IE : 幼若赤血球

a) 2,000 個の幼若赤血球当たりの小核を有する幼若赤血球数

b) 500 個の赤血球当たりの幼若赤血球数

6) チャイニーズハムスター肺細胞 (V79 細胞) を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験

(資料 No.T-24)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1997 年

検体純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスター肺細胞 (V79 細胞) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とするヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下及び非存在下ともに培養液に 1% (v/v) 添加し、細胞を 5 時間処理した。陰性対照には溶媒の DMSO を、陽性対照には S9 mix 存在下でジメチルベンズアントラセン (DMBA)、非存在下でエチルメタンサルホン酸 (EMS) を用いた。1 濃度当たり 2 個のフラスコ (250 mL) 中に 4×10^6 細胞を播種し、付着 (16~24 時間) 後血清濃度を減じた (2%) 培養液中で検体、溶媒及び陽性対照を 5 時間暴露した。細胞を剥離し、細胞毒性確認用に 3 枚のシャーレ (60 mm) に 200 細胞を再播種し 7 日間培養した後、形成されたコロニー数を計数した。一方、突然変異試験用には、フラスコに 1.5×10^6 細胞を播種し培養を続け突然変異を発現させた。細胞は 4 及び 7 日に継代した。発現期間 (7 日) 終了後、変異細胞選抜用に 6-チオグアニン (6-TG) を含有し、ヒポキサンチンを除去した培養液を入れたシャーレ 8 枚に 3×10^5 細胞を再播種した。さらに、各濃度の絶対コロニー形成率測定用に 3 枚のシャーレの培養液に 200 細胞を播種した。6~7 日間培養後、細胞を固定し Giemsa 染色を施した後、突然変異試験用及びコロニー形成率測定用シャーレに形成された 50 細胞を超える細胞から成るコロニー数を計数した。試験は、S9 mix 存在下及び非存在下でそれぞれ 2 回行った。

用量相関性を伴って有意に増加が認められ、併行して実施した 2 試験で再現性が認められた場合に陽性と判定した。

投与量設定根拠 :

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

試験結果： 結果を次表に示した。

S9 mix 非存在下では、検体投与群において相対生存率がわずかに減少し、弱い細胞毒性が認められた。S9 mix 存在下では、細胞毒性は認められなかった。

検体投与群において、S9 mix の有無にかかわらず、有意な用量相関性又は再現性のある、突然変異頻度の増加は認められなかった。なお、いずれも二連の結果のバラツキが大きく、S9 mix 非存在下の1回目試験で、4,000 µg/mL 群の片方の培養細胞において、わずかな突然変異頻度の増加が認められたが、併行して処理した他方の培養細胞及び2回目の試験で再現性は認められなかった。

一方、陽性対照物質である EMS 及び DMBA では明らかな変異原性作用が認められた。

以上の結果から、アミカルバゾン は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下において、突然変異誘発性を有しないものと判断された。

S9 mix 非存在下

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	絶対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)	
1 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	—	74.7 121.4	97.0 83.3	8.6 10.0	
	溶媒対照 (DMSO)	0	—	100.0 100.0	85.7 104.8	7.8 7.6	
	検体	250	—	87.0 93.5	59.8 63.5	4.9 14.4	
				500	—	84.4 100.2	80.0 102.8
		1,000	—			79.3 100.0	54.5 78.7
				2,000	—	59.2 87.6	66.8 89.3
		4,000 P	—			58.9 69.8	68.5 103.7
		陽性対照 (EMS)	900	—	9.7 9.4	37.0 40.2	845.7 680.5
	2 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	—	101.7 89.8	75.8 84.2	0.5 0.5
		溶媒対照 (DMSO)	0	—	100.0 100.0	80.0 87.7	0.5 4.3
検体		250	—	69.6 93.9	83.7 86.5	1.5 2.9	
				500	—	111.9 93.7	76.8 84.2
		1,000	—			88.3 70.3	83.2 96.0
				2,000	—	92.0 84.4	84.3 81.3
		4,000 P	—			57.7 32.4	35.7 93.2
				陽性対照 (EMS)	900	—	51.2 32.2

2回の試験結果を合わせた Dunnett 検定において検体試料に対照群との有意差は認められなかった

EMS : エチルメタンサルホン酸

P : 検体の析出が認められた。

a) : 相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) \times 100
3 反復の平均値

b) : 絶対コロニー形成率 = (発現期間後のシャーレ当たりの平均生存コロニー数 / 接種細胞数 200) \times 100
3 反復の平均値

c) : 突然変異頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] \times 100
但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) \times (3×10^5)

S9 mix 存在下

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	絶対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
1 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	+	90.5 95.7	87.7 88.3	0.5 2.8
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0 100.0	94.8 86.7	0.9 0.5
	検体	250	+	84.3	74.0	1.1
				84.3	92.2	0.5
		500	+	92.1	92.2	0.5
				82.5	82.5	0.5
		1,000	+	114.8	92.5	3.2
				94.9	87.5	0.5
	2,000	+	112.4	75.3	0.6	
			95.1	84.0	3.0	
4,000 P	+	92.3	60.0	4.2		
		95.3	75.7	2.2		
陽性対照 (DMBA)	20	+	79.7 65.7	84.0 77.3	82.8 52.3	
2 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	+	88.5 119.0	56.0 71.2	17.9 12.9
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0 100.0	79.5 63.5	7.3 20.3
	検体	250	+	113.1	58.2	9.3
				95.1	53.0	13.4
		500	+	130.8	71.0	11.2
				132.6	82.7	5.0
		1,000	+	118.5	66.8	12.5
				118.4	70.5	8.9
	2,000	+	116.4	53.7	18.6	
			117.0	56.8	13.9	
4,000 P	+	97.3	74.8	7.8		
		111.2	67.5	2.5		
陽性対照 (DMBA)	20	+	57.9 67.1	70.0 59.8	194.6 191.5	

2回の試験結果を合わせた Dunnett 検定において検体試料に対照群との有意差は認められなかった

DMBA: ジメチルベンズアントラセン

P: 検体の析出が認められた。

a): 相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$
3 反復の平均値

b): 絶対コロニー形成率 = (発現期間後のシャーレ当たりの平均生存コロニー数 / 接種細胞数 200) $\times 100$
3 反復の平均値

c): 突然変異頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] $\times 100$
但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) $\times (3 \times 10^5)$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(14) 生体機能影響

1) アミカルバゾンの生体機能に及ぼす影響 (Irwin 変法)

(資料 No.T-25)

試験機関 : Bayer AG

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1996 年

試験目的 : 単回投与によるラットの行動及び生理学的な状態への影響を評価するため、実施した。

検体純度 :

供試動物 : HsdCbp : WU 系ラット、入荷時 7 週齢、体重 174~204g、1 群雄 6 匹

投与方法 : 検体を 0.5 % (w/v) タイローズ+0.4% Tween 80 水溶液に懸濁し、0 (媒体対照)、1、20 及び 100 mg/kg の用量で経口投与 (容量 : 5 mL/kg) し、その投与直後から 3 時間後まで 15 分毎に Irwin 変法で行動及び症状を個別に観察した。その後、投与 24 時間後に最終観察を実施した。なお、当該試験では純度補正を行った。

結果 : 1 mg/kg の用量では、異常所見は認められず、検体投与の影響はなかった。20 mg/kg の用量では、眼瞼下垂、流涎及び鎮静が数例に観察された。100 mg/kg の用量では、眼瞼下垂、流涎及び鎮静が全例に、立毛、挙尾及び腹臥位が数例に観察された。これらの症状は投与 30 分後から認められ、20 mg/kg の用量では投与 90 分後まで、100 mg/kg の用量では投与 135 分後まで観察された。

以上の結果から、中枢神経系に軽度の影響を有すると考えられた。当該試験の無毒性量は 1 mg/kg と判断された。

最小毒性量は生体機能に及ぼす影響 (資料 No. T-26) にて検討した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2) アミカルバゾンの生体機能に及ぼす影響 (Irwin 変法) —最小毒性量の検討—

(資料 No.T-26)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1996 年

試験目的: ラットの生体機能に及ぼす影響 (Irwin 変法) に関する試験 (資料 No.T-25) において最小毒性量が推定できなかったため、当該試験を実施した。

検体純度:

供試動物: HsdCbp: WU 系ラット、入荷時 6 週齢、体重 172~200g、1 群雄 6 匹

投与方法: 検体を 0.5% (w/v) タイローズ+0.4% Tween 80 水溶液に懸濁し、0 (媒体対照)、2.5、5 及び 10 mg/kg の用量で経口投与 (容量: 5 mL/kg) し、その投与直後から 3 時間後まで 15 分毎に Irwin 変法で行動及び症状を個別に観察した。その後、投与 24 時間後に最終観察を実施した。なお、当該試験では純度補正を行った。

投与量設定根拠:

結果: 2.5 及び 5 mg/kg の用量では、異常所見は認められず、検体投与の影響はなかった。10 mg/kg の用量では、投与 30 分後に 1/6 例で眼瞼下垂及び鎮静が、2/6 例で流涎が観察された。投与 90 分後では全例が正常状態であった。以上の結果から、当該試験の最小毒性量は 10 mg/kg、無毒性量は 5 mg/kg と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) アミカルバゾンの生体機能に及ぼす影響—中枢神経系への影響—

(資料 No.T-27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1996 年

試験目的: 単回投与後のマウスの中枢神経系に及ぼす影響を評価するため実施した。

検体純度:

供試動物: HsdWin: NMRI 系マウス、入荷時 3 週齢、体重 24~29g、1 群雄 10 匹

投与方法: 検体を 0.5% (w/v) タイローズ+0.4% Tween 80 水溶液に懸濁し、0 (媒体対照)、1、20 及び 100 mg/kg の用量で経口投与 (容量: 10 mL/kg) した。なお、当該試験では純度補正を行った。投与後各時点で、下記の項目について検査した。

観察・検査項目及び結果:

① ホットプレート法 (鎮痛作用試験)

投与前、投与後 30、45、60 及び 120 分に、約 56°C に加温したウォーターバスに設置したホットプレート上にマウスを個別に置き、最初の疼痛反応 (後肢をなめる、飛び上がる) が現れるまでの時間 (反応潜時) を測定した。

結果を下表に示す。

投与後検査時間 (分)		反応潜時 (秒)				
		投与前	30	45	60	120
投与量 (mg/kg)	媒体対照	10.2	8.0	8.0	7.9	9.2
	1	10.5 [103]	9.2 [115]	8.9 [111]	8.1 [103]	9.4 [102]
	20	11.0 [108]	9.0 [113]	7.4 [93]	8.1 [103]	9.1 [99]
	100	11.4 [112]	9.9 [124]	11.6 [145]	↑13.2 [167]	12.1 [132]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定 ↑↓: p<0.05

100 mg/kg の用量では、投与後 60 分の反応潜時が有意に延長した。1 及び 20 mg/kg の用量では反応潜時に影響は認められなかった。なお、100 mg/kg の用量では、投与後約 20 分に鎮静及び眼瞼下垂が観察された。

② 懸垂試験、バランスロッド試験及び電撃刺激試験

投与後 30 分に、マウスを高さ 25 cm で水平に張ったワイヤ (直径 3 mm) に前肢を握らせて吊り下げた。5 秒以内に後肢をワイヤに掛けない場合、懸垂力低下とした (懸垂試験)。懸垂試験の 10 分後 (投与後 40 分)、マウスを高さ 72 cm で水平に設

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

置した木製のロッド（直径 8 mm）に乗せた。3 分以内に 3 回落下した場合に協調運動障害有りとした（バランスロッド試験）。バランスロッド試験の 10 分後（投与後 50 分）、マウスの両眼（局所麻酔実施）から電撃刺激を加えた。刺激後、強直性痙攣が認められない場合に検体は抗痙攣作用を有するとした。

結果を下表に示す。

懸垂試験

投与量 (mg/kg)	発生数 (懸垂力低下例数/試験動物数)
媒体対照	0/10
1	0/10
20	0/10
100	2/10

統計解析なし

100 mg/kg の用量では、10 例中 2 例が陽性（懸垂力低下）を示した。なお、100 mg/kg の用量では、投与後約 20 分に鎮静及び眼瞼下垂が観察された。

バランスロッド試験

投与量 (mg/kg)	発生数 (落下例数/試験動物数)
媒体対照	0/10
1	0/10
20	0/10
100	2/10

統計解析なし

100 mg/kg の用量では、10 例中 2 例が陽性（協調運動障害）を示した。なお、100 mg/kg の用量では、鎮静及び眼瞼下垂が観察された。

電撃刺激試験

投与量 (mg/kg)	発生数 (強直性痙攣を示さない例数/試験動物数)
媒体対照	0/10 [0]
1	0/10 [1]
20	0/10 [1]
100	0/10 [4]

統計解析なし

[] 内は電撃刺激後の死亡数

1 及び 20 mg/kg の用量で各 1 例、100 mg/kg の用量で 4 例が電撃刺激後に死亡した。なお、100 mg/kg の用量では、鎮静及び眼瞼下垂が観察された。

③ ペンチレンテトラゾール (PTZ) 試験 (痙攣作用試験)

投与 45 分後に、5 mg/mL の PTZ 溶液を 0.3 mL/分 の速度でゆっくりと尾静脈から投与した。マウスが間代性痙攣を示したときに PTZ の投与を止め、痙攣を誘発する PTZ 溶液の量 (痙攣誘発最小量) を測定した。対照群と比較して PTZ の量が増加した場合に抗痙攣作用を、減少した場合に痙攣誘発作用を有すると示唆される。結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)	PTZ 投与量 (mg/kg)
媒体対照	32.52
1	31.91 [98]
20	33.03 [102]
100	↑37.70 [116]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定 ↑↓: p<0.05、↑↑: p<0.01

100 mg/kg の用量では、対照群と比べ有意な PTZ の痙攣誘発最小量の増加が認められた。なお、100 mg/kg の用量では、投与後約 20 分に鎮静及び眼瞼下垂が観察された。

④ ヘキソバルビタール試験 (睡眠作用試験)

投与 60 分後に、75 mg/kg のヘキソバルビタールナトリウムを静脈内投与した (容量: 10 mL/kg)。麻酔したマウスは、30 度のウォームベンチ上で片側に横たえた。各マウスについて麻酔時間 (睡眠時間: 正向反射の消失から回復までの時間) を測定した。麻酔時間を比較することで、ヘキソバルビタール誘発麻酔に及ぼす検体影響を評価した。

結果を下表に示す。

投与量 (mg/kg)	睡眠時間 (分)
媒体対照	50.7
1	51.3 [101]
20	47.3 [93]
100	61.5 [121]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定で有意差なし

検体投与群と対照群で麻酔時間に有意差は認められなかった。なお、100 mg/kg の用量では、投与後 20 分に鎮静及び眼瞼下垂が観察された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

4) アミカルバゾンの生体機能に及ぼす影響 (中枢神経系)

(資料 No.T-28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1996 年

試験目的: 単回投与後のラットの中枢神経系に及ぼす影響を評価するため実施した。

検体純度:

供試動物: HsdCbp: WU 系ラット、入荷時 7 週齢、体重 166~256 g、1 群雄 5~10 匹

投与方法: 検体を 0.5% (w/v) タイローズ+0.4% Tween 80 水溶液に懸濁し、0 (媒体対照)、1、20 及び 100 mg/kg の用量で経口投与 (容量: 5 mL/kg) した。なお、当該試験では純度補正を行った。投与後各時点で、下記の項目について検査した。

観察・検査項目及び結果:

①カタレプシー試験

投与後 30、60、90、120、180 及び 240 分に、各群 5 匹について下記の項目を検査した。

1. コルクブロックに乗せた前肢を引っ込めることができる
2. 口に入れた木片を取り除くことができる
3. 開脚状態の後肢を元に戻すことができる
4. 正向反射
5. 角膜反射
6. 接触時の発声の有無

ラットが不自然な姿勢 (上記 1~3) を少なくとも 15 秒間継続する場合又は反射反応が認められない場合に陽性 (カタレプシー) と判定した。各検査項目は最大 30 ポイント (5 匹×6 時点) とした。

検体投与群でカタレプシーは認められなかった。20 mg/kg 投与群では、投与後約 20 分に流涎、鎮静及び眼瞼下垂が認められた。100 mg/kg 群では、全例に流涎、鎮静及び眼瞼下垂が認められ、挙尾及び立毛が 2 例に認められた。これらの症状は投与 120 分後まで継続した。

②体温測定

投与前、投与後 30、60、90、120、180 及び 240 分に、各群 6 匹について胃ゾンデを用いて電子的に体温を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結果を下表に示す。

投与後測定時間 (分)		体温 (°C)						
		投与前	30	60	90	120	180	240
投与量 (mg/kg)	媒体対照	36.7	36.8	37.0	36.9	36.8	36.9	37.0
	1	36.8 [100]	37.1 [101]	37.2 [101]	37.2 [101]	37.1 [101]	37.0 [100]	37.0 [100]
	20	36.8 [100]	↑37.2 [101]	37.2 [101]	37.1 [101]	37.0 [101]	37.0 [100]	37.0 [100]
	100	36.7 [100]	36.5 [99]	↓36.1 [98]	↓36.2 [98]	↓36.5 [99]	↓36.6 [99]	36.8 [99]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定 ↑↓ : p<0.05

100 mg/kg の用量では、投与後 60～180 分に有意な体温の低値が認められた。また、20 mg/kg の用量で、投与後 30 分に有意な高値が認められたが、一時的で、用量相関性も認められなかったため、偶発的な変化と考えられた。

③ オープンフィールド検査

投与後 30、60 及び 120 分に、各群 10 匹についてオープンフィールド(45 cm×45 min)内に動物を置き、5 分間の移動距離、休息时间及び立ち上がりを記録した。結果を下表に示す。

移動距離

投与後測定時間 (分)		移動距離 (m)		
		30	60	120
投与量 (mg/kg)	媒体対照	19.9	12.7	7.3
	1	19.6 [98]	12.8 [101]	8.6 [118]
	20	↓16.5 [83]	9.8 [77]	7.3 [100]
	100	↓14.4 [72]	10.3 [81]	7.5 [103]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定 ↑↓ : p<0.05

20 及び 100 mg/kg の用量で、投与後 30 分に用量に関連した移動距離の低値が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

休息时间

投与後測定時間 (分)		休息时间 (秒)		
		30	60	120
投与量 (mg/kg)	媒体対照	110.3	166.2	211.8
	1	113.0 [102]	164.3 [99]	198.8 [94]
	20	↑131.4 [119]	184.1 [111]	211.2 [100]
	100	↑149.9 [136]	192.8 [116]	208.2 [98]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定 ↑↓ : p<0.05

20 及び 100 mg/kg の用量で、投与後 30 分に用量に関連した休息時間の高値が認められた。

立ち上がり回数

投与後測定時間 (分)		立ち上がり回数 (回)		
		30	60	120
投与量 (mg/kg)	媒体対照	33.2	14.0	5.8
	1	36.8 [111]	16.1 [115]	8.5 [147]
	20	30.4 [92]	9.2 [66]	7.0 [121]
	100	↓15.9 [48]	↓6.4 [46]	5.0 [86]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

Duncan の多重検定 ↑↓ : p<0.05

100 mg/kg の用量で、投与後 30 及び 60 分に有意な立ち上がり回数の減少が認められた。20 mg/kg の用量においても投与後 60 分に統計学的な有意差は認められないものの減少傾向が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

5) アミカルバゾンの生体機能に及ぼす影響—呼吸及び腎機能への影響—

(資料 No.T-29)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

目的：単回投与後のラットの一般状態、呼吸及び腎機能に及ぼす影響を評価するため実施した。

検体純度：

供試動物： Crl:CD (SD) 系ラット、試験開始時 7 週齢、体重 症状観察群 154.7～168.1 g、呼吸群 142.8～158.5 g、腎機能群 156.0～177.9 g、1 群雌 5 匹

投与方法： 検体を 0.5% (w/v) メチルセルロース溶液 (0.5% MC) に懸濁し、0 (媒体対照)、80、400 及び 2000 mg/kg の用量で約 18 時間絶食させたラットに経口投与 (容量：10 mL/kg) した。投与後各時点で、下記の項目について検査した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

①症状観察

投与前、投与後 0.5、1、2、3、6 及び 24 時間に、Irwin の観察方法を参考にした方法で個別に行動及び症状を観察した。

2000 mg/kg の用量で眼瞼下垂が投与後 0.5 から 3 時間に認められ、投与後 3 時間では 4/5 例に発現し、有意な発現数の高値を示した。また、流涎及び筋攣縮も認められ、投与後 6 時間及び 48 時間に各 1 例 (計 2/5 例) が死亡した。400 mg/kg の用量では、眼瞼下垂及び流涎が少数例に散見されたが、死亡動物は認められなかった。80 mg/kg の用量では異常所見及び死亡動物は認められなかった。

②呼吸に及ぼす影響

投与前、投与後 0.5、1、2、3 及び 6 時間に、呼吸数 (回/分) 及び 1 回換気量 (mL) を whole body plethysmography を用いて計測し、これらの投与前値からの変化量も算出した。

結果を次表に示す。

呼吸数

投与後検査時間 (時間)		呼吸数 (回/分)					
		投与前	0.5	1	2	3	6
投与量 (mg/kg)	媒体対照	95.2	112.4 (17.2)	104.8 (9.6)	96.0 (0.8)	87.8 (-7.4)	86.0 (-9.2)
	80	115.4	89.6 [80] (-25.8)	77.2 [74] (-38.2)	↓68.4 [71] (-47.0)	77.6 [88] (-37.8)	79.4 [92] (-36.0)
	400	89.4	82.6 [73] (-6.8)	68.6 [65] (-20.8)	↓52.6 [55] (-36.8)	58.4 [67] (-31.0)	68.2 [79] (-21.2)
	2,000	83.2	65.8 [59] (-17.4)	66.4 [63] (-16.8)	↓54.6 [57] (-28.6)	71.0 [81] (-12.2)	74.0 [86] (-9.2)

() 内の数値は投与前値からの変化量。[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。
Dunnett の多重比較検定 ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01

投与後 2 時間の呼吸数が全ての検体投与群で有意な低値を示したが、同時間の投与前値からの変化量には明らかな用量との関連が認められず、偶発的な変化と考えられた。従って、呼吸数に検体影響は認められなかった。

1 回換気量

投与後検査時間 (時間)		1 回換気量 (mL)					
		投与前	0.5	1	2	3	6
投与量 (mg/kg)	媒体対照	1.08	1.27 (0.19)	1.17 (0.09)	1.27 (0.19)	1.33 (0.26)	1.35 (0.27)
	80	1.01	1.11 [87] (0.10)	1.12 [96] (0.11)	1.11 [87] (0.10)	1.09 [82] (0.08)	1.13 [84] (0.12)
	400	0.94	0.85 [67] (-0.09)	0.81 [69] (-0.13)	0.85 [67] (-0.09)	0.89 [67] (-0.05)	0.85 [63] (-0.09)
	2,000	0.91	1.19 [94] (0.28)	1.00 [85] (0.10)	0.83 [65] (-0.08)	0.98 [74] (0.07)	1.01 [75] (0.10)

() 内の数値は投与前値からの変化量。[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。
Dunnett の多重比較検定で有意差なし。

1 回換気量に、検体の影響は認められなかった。

③腎機能に対する作用

検体投与後、1 匹ずつ採尿ケージに入れ、無給餌・無給水条件下で検体投与後 6 時間まで尿を採取した。採取した尿について、尿量及び尿浸透圧を測定し、尿中電解質（ナトリウム、カリウム、塩素）排泄量を算出した。
結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

投与量 (mg/kg)	0	80	400	2,000
検査匹数	5	5	5	2
尿量 (mL/6 時間)	3.2	3.7 [116]	1.9 [59]	1.0 [31]
尿中電解質 (mmol/6 時間)				
Na	0.34	0.46 [135]	0.47 [138]	0.33 [97]
K	0.10	↑0.19 ¹⁾ [190]	0.12 [120]	0.10 [100]
Cl	0.35	0.49 [140]	0.41 [117]	0.26 [74]
尿浸透圧 (mOsm/kg)	594	726 [122]	↑1,229 ²⁾ [207]	1,526 [257]

[] 内の数値は媒体対照群を 100 としたときの値を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: p<0.05)

1) Dunnett の多重比較検定

2) Steel の検定

400 及び 2,000 mg/kg の用量で尿量が低値傾向を示し、尿浸透圧が 400 mg/kg の用量で有意な高値、2,000 mg/kg の用量で高値傾向を示した。また、80 mg/kg の用量でカリウムの総排泄量が有意な高値を示したが、用量に関連のない変化であり、検体影響とは考えなかった。なお、2,000 mg/kg の用量では尿採取中に 3/5 例が死亡した。

【アミカルバゾンの生体機能に及ぼす影響 (No. T-25~No. T-29) のまとめ】

以上の試験結果から、検体は、投与後症状の変化として眼瞼下垂、鎮静及び腹臥位が、中枢神経系に対する作用として、疼痛抑制 (ホットプレート法)、筋力及び平衡感覚の低下 (懸垂試験、バランスロッド試験)、体温低下及びオープンフィールド検査における運動量の減少が認められ、中枢神経系に対し抑制的に作用することが示唆された。その他、症状変化として、流涎、立毛、挙尾、筋攣縮及び死亡が観察された。また、痙攣誘発作用はなく、PTZ 痙攣試験では抗痙攣作用を示した。腎機能に対しては、尿量の減少及び尿浸透圧の高値が認められた。呼吸に及ぼす影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

アミカルバゾンの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無毒性量 (mg/kg)	結果の概要
症状観察 (Irwin 変法) (No. T-25)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 6	20	1	20mg/kg 群: 眼瞼 下垂、流涎、鎮 静 100mg/kg 群: 眼 瞼下垂、流涎、 鎮静、立毛、挙 尾、腹臥位
症状観察 (Irwin 変法) (No. T-26)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 2.5, 5, 10	雄 6	10	5	10mg/kg 群: 眼瞼 下垂、流涎、鎮 静
症状観察 (Irwin 変法) (No. T-29)	ラット	経口 (0.5%MC)	0, 80, 400, 2,000	雌 5	400	80	400mg/kg 群: 眼 瞼下垂、流涎 2000mg/kg 群: 眼 瞼下垂、流涎、 筋攣縮、死亡(2/5 例)
中枢神経系 (ホットプレート法) (No. T-27)	マウス	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	100	20	100mg/kg 群: 反 応潜時延長
中枢神経系 (懸垂試験) (No. T-27)	マウス	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	100	20	100mg/kg 群 : 2/10 例陽性
中枢神経系 (バランスロッド) (No. T-27)	マウス	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	100	20	100mg/kg 群 : 2/10 例陽性
中枢神経系 (電撃刺激) (No. T-27)	マウス	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	100	20	100mg/kg 群 : 4/10 例が刺激後 に死亡、鎮静及 び眼瞼下垂
中枢神経系 (PTZ 痙攣) (No. T-27)	マウス	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	100	20	100mg/kg 群 : PTZ 痙攣閾値増 加

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無毒性量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 (ヘキソバルビタールによる睡眠作用試験) (No. T-27)	マウス	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	100	20	100mg/kg 群: 鎮静及び眼瞼下垂 (投与後 20 分)
中枢神経系 (カタレプシー) (No. T-28)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 5	>100	>100	影響なし
中枢神経系 (体温) (No. T-28)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 6	100	20	100mg/kg 群: 低下 (投与後 60-180 分)
中枢神経系 (オープンフィールド: 移動距離) (No. T-28)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	20	1	20、100mg/kg 群: 低下 (投与後 30 分)
中枢神経系 (オープンフィールド: 休息時間) (No. T-28)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	20	1	20、100mg/kg 群: 高値 (投与後 30 分)
中枢神経系 (オープンフィールド: 立ち上がり回数) (No. T-28)	ラット	経口 (0.5%タイロース +0.4%Tween80)	0, 1, 20, 100	雄 10	20	1	20mg/kg 群: 減少 傾向 (投与後 60 分) 100mg/kg 群: 減 少傾向 (投与後 30~60 分)
呼吸器系 (呼吸数、1 回換気量) [Whole body plethysmography] (No. T-29)	ラット	経口 (0.5%MC)	0, 80, 400, 2,000	雌 5	>2,000	>2,000	影響なし
腎機能 (尿量、尿中電解 質、尿浸透圧) (No. T-29)	ラット	経口 (0.5%MC)	0, 80, 400, 2,000	雌 5	400	80	400mg/kg 群: 尿 量減少傾向、尿 浸透圧高値 2000mg/kg 群: 尿 量減少傾向、尿 浸透圧高値傾 向、死亡 (3/5 例)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-30)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

1)

1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。