

(3) マンデストロビン原体のイヌを用いた飼料混入投与による 52 週間反復経口投与毒性試験
(資料 8-3)

試験機関：Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体：マンデストロビン原体

検体純度：

供試動物：ビーグル犬、1 群雌雄各 4 頭、投与開始時週齢：27～34 週齢、

投与開始時体重：雄 10.02～13.42 kg、雌 8.86～12.20 kg

投与期間：52 週間（投与開始；2010 年 4 月 28 日、最終屠殺；2011 年 4 月 27 日（雄）あるいは 2011 年 4 月 28 日（雌））

投与方法：検体を 0、200、800、4000 および 8000 ppm の濃度で飼料に混入し、少なくとも 52 週間にわたって毎日約 8 時間、約 300 g の飼料を自由に摂食させた。検体を混入した飼料は 1 週間に 1 回調製した。

用量設定根拠；

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；毎日、2 回全動物を観察し、健康状態を確認した。また、全動物について、毎日、一般症状を観察し、詳細な症状観察を行った。飼料を与え始めてから約 1 時間後および 4 時間後には投与後観察を行った。

800 ppm 群の雄 1 頭（投与 176～365 日）ならびに 8000 ppm 群の雄 1 頭（投与 358～365 日）と雌 1 頭（投与 114～366 日）に明らかな消瘦が認められた。また、対照群の雌 1 頭（投与 127～366 日）も消瘦が認められた。8000 ppm 群の雌 1 頭で認められた消瘦は体重減少、ならびに行動機能 (FOB) 観察で時折認められた筋緊張低下と相関性があった。800 ppm 群の雄 1 頭と 8000 ppm 群の雄 1 頭の消瘦については体重減少を伴わなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

毎日の一般症状観察で、検体投与群に認められた他の症状は、頻度が低いか、

雌の性周期に関連しているか、あるいは実験室の条件下に置かれたイヌに典型的な所見であるかのいずれかの理由により、偶発的なものと考えられた。

また、すべての動物が計画的屠殺時まで生存していた。

体重変化；投与前3週から週1回（投与前日の投与前を含む）、および剖検前に、全動物の体重を測定した。

検体投与群の雌雄において、対照群と比較して、平均体重または平均体重増加量の統計学的に有意な変化は認められなかった（二元配置分散分析後、Dunnett検定、有意水準0.05）。

52週間の投与後、8000 ppm群の雌において体重増加量が対照群と比較して低値を示したが（対照群の0.3倍）、これは、1頭（一般症状観察で消瘦が認められた動物）の体重減少（投与前開始時体重から6.0%の減少）が主な原因であった。認められた体重増加量の減少は群サイズが小さいことを反映しており、検体投与群と対照群との間で統計学的に有意な傾向がみられなかったこと、あるいは摂餌量データの変化と明らかな相関性がみられなかったことから毒性的意義はないと考えられた。

その他の用量群では検体投与に関連する体重の変化は認められなかった。

摂餌量；群分け時より毎日、全動物の摂餌量を測定した。

統計学的に有意（一元配置分散分析後、Dunnett検定、あるいはKruskal-Wallis検定後、Wilcoxonの順位和検定、有意水準0.05）あるいは明確な摂餌量への影響は認められなかった。

検体摂取量；投与前期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		200	800	4000	8000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	4.3	19.2	92.0	180.7
	雌	4.5	20.4	92.0	225.7

行動機能 (FOB) 観察；投与前開始前、およびそれ以降、週1回、全動物を対象として機能観察総合検査を行った。非拘束下での行動を約1~2分間観察し、以下の項目について調べた。

意識レベル、全体的な活動レベル、頭位、頭部協調性、首の姿勢、旋回、四肢の姿勢（立位）、足取り、振戦、異常行動、固視反応、聴覚性驚愕反応検査

また、非拘束下観察後に、神経学的検査を実施し、以下の項目について調べた。

固有受容性位置反応、立ち直り反応、半跳び直り反応、手押し車反応、筋緊張、眼瞼閉鎖状態、瞬膜、眼瞼反射、眼球位置、眼球運動、瞳孔の大きさ、瞳孔対光反射、流涙、流涎、全身反応、一般状態観察*

*: 体重、一般状態、心拍数および直腸温を神経行動学的影響評価の一環として測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		200	800	4000	8000	200	800	4000	8000
心拍数	17	101	104	↑111	108	99	96	100	97
	19	110	↑115	106	104	100	100	102	100
	20	↑114	↑115	↑↑126	↑113	96	105	101	104
	26	97	97	93	98	96	99	↓88	97
	49	100	105	102	99	104	↑113	98	104

二元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った
(↑↓: $P < 0.05$, ↑↑: $P < 0.001$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

全体的にみて、いずれの検査においても検体の神経毒性作用を示唆する所見はみられなかった。

心拍数の統計学的に有意な変化が 200 ppm 以上の群の雄ならびに 800 および 4000 ppm 群の雌で散発的に認められたが、これらの変化は一時的あるいは用量反応性のない変化であり、検体投与の影響ではないと考えられた。

血液学的検査；投与前（投与前 1 週）、投与 13、26 および 51 週に全動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

血色素量、赤血球数、血中血球容積、血小板数、網状赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、総白血球数、白血球分類、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		200	800	4000	8000	200	800	4000	8000
網状赤血球数	13	45	112	132	109	↓ 40	65	66	77
白血球分類;リンパ球数	13	109	103	100	116	115	118	↑ 148	121

二元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った
(↑ ↓: P < 0.05)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

200 ppm 群の雌で 13 週目に網状赤血球数の統計学的に有意な減少がみられたが、その平均値 ($27.7 \times 10^9/L$) が背景対照データの範囲内 ($18.6 \sim 113.9 \times 10^9/L$) であったこと、13 週目の雄、26 および 52 週目の雌雄において対照群と比較して有意差が認められなかったこと、ならびにこの変化に用量依存性が認められなかったことから、検体投与に関連しないものと考えられた。

4000 ppm 群の雌で 13 週目に平均リンパ球数の統計学的に有意な増加が認められた。その平均値 ($4.9 \times 10^9/L$) が背景対照データの範囲内 ($2.4 \sim 5.8 \times 10^9/L$) であったこと、その差が投与開始前にみられたものと同程度であったこと、13 週目の雄、26 および 52 週目の雌雄で有意差が認められなかったこと、ならびに用量依存性がなかったことから、この変化は検体投与と関連性がないものと考えられた。

血液生化学検査;投与前(投与前1週)、投与13、26 および 51 週に全動物を対象として、頸静脈から血液を採取し、得られた血漿を用いて、以下の項目の測定を行った。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、クロライド、トリグリセリド、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、総コレステロール、グルコース、尿酸、総ビリルビン、クレアチニン

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		200	800	4000	8000	200	800	4000	8000
アスパラギン酸アミノ トランスフェラーゼ	26	100	97	97	↑203	115	108	88	108
アルカリホスファターゼ	13	108	163	190	↑283	84	77	100	↑227
	26	98	189	226	↑264	105	88	104	↑264
	52	105	178	↑273	↑↑359	116	96	125	↑336
カルシウム	13	99	98	99	99	100	99	98	↓93
	26	100	98	100	98	101	99	100	↓95
	52	100	98	102	98	100	98	98	↓93
クロライド	13	99	98	↓97	↓97	101	100	100	100
総蛋白	13	100	102	104	104	97	95	93	↓92
	26	100	102	102	100	100	97	98	↓92
アルブミン	26	97	94	97	92	97	92	95	↓87
	52	100	94	106	94	95	95	92	↓87
総コレステロール	26	85	100	100	87	↓77	↓72	80	↓73
	52	85	95	105	92	81	↓73	79	↓72
トリグリセリド	26	91	133	↑148	136	94	94	102	98

二元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った(↑↓:P < 0.05、
 ↑↓: P < 0.01、↑↑ ↓↓: P < 0.001)。なお、アルカリホスファターゼの 52 週目およびトリ
 グリセリドの 26 週目については雌雄とも対数変換したデータについて統計解析を行った。
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

アルカリホスファターゼ活性の統計学的に有意な増加が 4000 ppm 群の雄で 52 週に、8000 ppm 群の雌雄で投与 13、26 および 52 週に認められた。また、アル
 ブミン濃度の統計学的に有意な減少が 8000 ppm 群の雌で投与 26 および 52 週に
 認められた。このアルブミンの減少はおそらく体重/体重増加量の減少、ある
 いは肝臓の病理組織学的変化を反映しているものと考えられた(病理組織学的
 検査の項目参照)。加えて、総コレステロールの統計学的に有意な減少が 8000
 ppm 群の雌で投与 26 および 52 週に認められた。しかしながら、このうち投与
 26 週の変化はその平均値(6.0 mmol/L)が投与開始前(5.8 mmol/L)と同程度
 であり、毒性学的意義はないものと考えられた。

8000 ppm 群の雄で投与 26 週に認められたアスパラギン酸アミノトランスフェ
 ラーゼの統計学的に有意な増加は同群の雄 1 頭での増加を強く反映したもので
 あったが、同例の投与 52 週における値は投与開始前と同程度であったことから
 (投与開始前: 30 IU/L、投与 26 週: 126 IU/L、投与 52 週: 26 IU/L)、同時期
 のみの変化に毒性学的意義はないものと考えられた。8000 ppm 群の雌で投与 13、
 26 および 52 週に認められたカルシウム濃度の統計学的に有意な減少は、いず

れの平均値（投与 13 週：2.70 mmol/L、投与 26 週：2.59 mmol/L、投与 52 週：2.53 mmol/L）も背景データの範囲内（2.35～3.00 mmol/L）であったことから、毒性学意義はないと考えられた。4000 および 8000 ppm 群の雄で投与 13 週にクロライドの統計学的に有意な減少が認められたが、平均値（110 mmol/L）が背景データの範囲内（19～344 mmol/L）であったこと、また、投与 26 あるいは 52 週には統計学的有意差が認められなかったことから、検体投与との関連性はないと考えられた。また、8000 ppm 群の雌で 13 および 26 週目に総蛋白の統計学的に有意な減少が認められたが、個別別値（52～59 g/L）がいずれも背景データの範囲内（50～66 g/L）であること、ならびに対照群との差は投与開始前における差（対照群を 100 とした場合 95）と大差ないことから、検体投与との関連性はないと考えられた。200 および 800 ppm 群の雌で認められた総コレステロールの統計学的に有意な減少については、経時的一貫性あるいは関連する病理組織学的所見が認められなかったことから、毒性学意義はないと考えられた。4000 ppm 群の雄で投与 26 週に認められたトリグリセリドの統計学的に有意な増加は、その平均値（0.49 mmol/L）が背景データの範囲内（0.17～0.71 mmol/L）であったことから、毒性学意義はないと判断された。

また、群平均値には統計学的に有意な差はなかったが、個別別に毒性学的に意義のある変動が認められた項目および検査週を次表に示す。

項目	検査 時期 (週)	雄				雌	
		4000 ppm		8000 ppm		8000 ppm	
		No. 13	No. 15	No. 18	No. 19	No. 38	No. 39
アスパラギン酸アミノ トランスフェラーゼ (IU/L)	-1			33			
	13			△55			
	26			44			
	52			△51			
アラニンアミノトランス フェラーゼ (IU/L)	-1			35	40	31	
	13			△362	△86	△201	
	26			△276	△83	△125	
	52			△371	△76	△134	
アルカリホスファターゼ (IU/L)	-1	113	124				
	13	134	△167				
	26	△154	△162				
γ-グルタミルトランス フェラーゼ (IU/L)	-1		5	<4		<4	<4
	13		△6	△7		<4	4
	26		△7	5		5	5
	52		△8	△6		△6	△6
トリグリセリド (mmol/L)	-1	0.36			0.43		
	13	△0.59			0.37		
	52	△0.67			△0.63		

△：毒性学的意義ありと判断された変動を示す。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの増加が8000 ppm群の別の雄1頭で投与13および52週に認められた。アラニンアミノトランスフェラーゼの増加が8000 ppm群の雄2頭および雌1頭で投与13、26および52週に認められた。アルカリホスファターゼの明らかな増加が、4000 ppm群の雄において、前述した投与52週における群平均値の統計学的に有意な高値に加えて2頭で投与13あるいは26週に認められた。γ-グルタミルトランスフェラーゼ活性の増加が4000 ppm群の雄1頭で投与13、26および52週、8000 ppm群の雄1頭で投与13および52週、8000 ppm群の雌2頭で投与52週に認められた。また、トリグリセリド濃度の増加が4000 ppm群の雄1頭で投与13および52週に、8000 ppm群の雄1頭で投与52週に認められた。

尿検査：投与前（投与前1週）、投与12、25および51週に全動物を対象として採取した尿について以下の項目を検査した。

尿量*、色、濁度、比重、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、尿沈渣

* ; 重量を測定し、1 g = 1 mLとして mL に換算した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		200	800	4000	8000	200	800	4000	8000
尿量	12	197	145	145	149	↓↓15	↓37	56	92

二元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ ↓ : P < 0.01, ↑ ↑ ↓ ↓ : P < 0.001)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

尿検査において、検体投与の明らかな影響は認められなかった。

200 および 800 ppm 群の雌で投与 12 週に、対照群と比較して、平均尿量の統計学的に有意な減少が認められたが、その値が投与開始前の値と同程度であったこと、用量相関性が認められないこと、投与 12 週目の雄や投与 25 あるいは 51 週の雌雄では統計学的有意差がみられなかったことから、これらの変化は偶発的であり、検体投与と関連しないものと考えられた。

眼科学的検査 ; 投与開始前と投与 51 週に全動物について検査した。

検体投与に関連すると考えられる眼の異常は認められなかった。

臓器重量 ; 試験終了時、全動物を対象として、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。なお、左右の臓器は合わせて測定した。

副腎、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、脳、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、胸腺、前立腺、精巣 (精巣上体を含む)、卵巣および子宮 (頸部を含む)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次頁の表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		200	800	4000	8000	200	800	4000	8000
体重		104	91	96	94	97	96	102	84
副腎	重量	101	94	97	102	112	119	72	109
	対体重比	100	100	100	110	115	131	↓69	↑131
腎臓	重量	88	84	↓82	↓81	102	102	93	96
	対体重比	84	92	85	86	104	106	90	115
肝臓	重量	97	94	111	112	102	102	104	106
	対体重比	93	103	113	120	103	106	103	↑127
心臓	重量	97	87	↓84	91	97	94	96	96
	対体重比	100	100	88	100	100	100	88	113
脳	重量	99	96	96	↓90	108	101	99	93
	対体重比	100	100	100	100	117	100	100	117
精巣/ 精巣上体	重量	78	↓75	85	78	—	—	—	—
	対体重比	↓75	85	89	84	—	—	—	—

一元配置分散分析後、Dunnett 検定を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: $P < 0.05$, ↑↓: $P < 0.01$, ↑↑ ↓↓: $P < 0.001$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

肝臓の絶対重量および対体重比の増加が、4000 ppm 以上の群の雄、および 8000 ppm 群の雌で認められ、8000 ppm 群の雌における対体重比の増加については統計学的有意差が認められた。

絶対重量の統計学的に有意な減少が腎臓では 4000 および 8000 ppm 群の雄で、また、脳では 8000 ppm 群の雄で認められた。しかし、これらの絶対重量の減少は、対体重比において統計学的有意差が認められなかったこと、個別値が背景値の範囲内であったこと (本文表 1)、関連する血液生化学検査パラメータに変化がみられなかったこと、あるいは病理学的検査で関連する所見が認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

また、精巣/精巣上体では、800ppm 群の雄において絶対重量が、200 ppm 群の雄において対体重比が統計学的に有意な低値を示し、心臓の絶対重量では 4000 ppm 群の雄で統計学的に有意な減少が認められたが、いずれも用量相関性が認められず毒性学的意義はないと考えられた。このほか、副腎の対体重比では 4000 ppm 群の雌において統計学的に有意な減少が認められたが、明確な用量相関性がなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。また、副腎の対体重比に関して、8000 ppm 群の雌では統計学的に有意な増加が認められたが、病理学的検査で関連する所見が認められなかった上、個別値が背景値の範囲内であったこと (本文表 1) から、毒性学的意義はないと考えられた。

本文表1:腎臓、脳および副腎重量の個体別値および背景値

		ppm	4000	8000
腎臓 (雄) 絶対重量	個体別値 (g) (最小値~最大値)		55.427-66.234	52.365-70.218
	背景値(n=14)		51.054-79.650	
脳 (雄) 絶対重量	個体別値 (g) (最小値~最大値)			74.8-82.6
	背景値(n=14)		74.9-100.1	
副腎 (雌) 対体重比	個体別値 (%) (最小値~最大値)			0.0159-0.0193
	背景値(n=11)		0.0106-0.0195	

肉眼的病理検査；試験終了時に全動物について剖検を行った。

認められた主要な肉眼的病理所見を下表に示す。

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	200	800	4000	8000	0	200	800	4000	8000
肝臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	暗化	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3

8000 ppm 群の雄1頭と雌3頭で肝臓の暗化が認められ、病理組織学的検査で認められた所見(死戦期うっ血/出血)と相関性が認められた(病理組織学的検査の項目参照)。

その他に検体の影響を示唆する肉眼的所見は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、眼球および視神経、大腿骨(骨髄および関節面を含む)、胆嚢、肉眼的病変、心臓、回腸(パイエル板を含む)、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺(主気管支および細気管支を含む)、乳腺、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、筋肉(大腿四頭筋)、鼻腔、鼻咽頭、食道、卵巣、卵管、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、顎下腺、舌下腺および耳下腺、坐骨神経、皮膚および皮下組織、頸髄、腰髄、胸髄、脾臓、胸骨(骨髄を含む)、後膝関節、胃、精巣および精巣上体、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、舌、気管、尿管、膀胱、子宮(頸部を含む)および膈

認められた主要な病理組織学的所見を次表に示した。

性別		雄					雌					
投与量 (ppm)		0	200	800	4000	8000	0	200	800	4000	8000	
肝臓	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	肝細胞肥大	軽微	0	0	0	2	2	0	0	0	1	3
		軽度	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
						*					*	
	肝細胞色素沈着	軽微	1	0	1	3	4	1	1	0	1	3
		軽度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
						*					*	
	色素沈着マクロファージ	軽微	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
		軽度	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
門脈域線維化/胆管増生	軽度	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
小葉中心性変性	軽微	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
死戦期うっ血/出血		0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	
胃	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	鉍質沈着	軽微	4	2	3	1	2	2	0	1	3	1
		軽度	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		中等度	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
				*								
下顎腺	所見\検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	炎症性細胞巣	軽微	2	2	2	1	2	1	3	2	0	3
		軽度	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1
										*		

程度分類のある所見については Wilcoxon の順位和検定 (両側)、程度を伴わない所見については Fisher の直接確率検定 (両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (*: P < 0.05)。

4000 および 8000 ppm 群の雌雄に肝細胞肥大が認められ、4000 および 8000 ppm 群の雄、ならびに 8000 ppm 群の雌で、対照群と比較して肝細胞色素沈着の増加がみられた。このうち、4000 ppm 群の雌で認められた肝細胞肥大については血液生化学的検査で関連する変化は認められなかったことから、毒性学的意義はないものと判断された。8000 ppm 群の雌雄では、肝細胞の肥大と色素沈着において対照群と比較して統計学的有意差が認められた。また、8000 ppm 群の雌雄で、対照群と比較して、色素沈着したマクロファージのわずかな増加が認められた。この肝細胞およびマクロファージの色素沈着は Schmorl および Long Ziehl Neelsen 染色によりリポフスチンと特定された。その他、8000 ppm 群の雌雄各 1 頭で小葉中心性変性が、また 8000 ppm 群の雄 1 頭で門脈域線維化/胆

管増生が認められた。

肝細胞肥大は、異物やその代謝体の代謝に関連する適応反応として通常みられるものである。リポスチン蓄積はイヌの正常な加齢過程で認められ、多くの生体異物の投与や外傷により促進される。肝細胞肥大および細胞変性の所見はリポスチンの増加と一致するものと考えられた。

また、8000 ppm 群の雄 1 頭と雌 3 頭で死戦期うっ血／出血が認められ、肉眼的病理検査で認められた肝臓の暗化と相関性が認められた。この所見は検体の直接作用ではなく、肝細胞肥大による二次的なものと考えられた。

検体投与群の雄で胃の鉍質沈着の発生頻度の減少、ならびに検体投与群の雌で舌下腺炎症性細胞巣の発生頻度の増加が認められ、統計学的有意差が認められたが、これらの病変は背景所見として一般に認められるものであり、いずれの所見にも用量依存性はなく、従って、生物学的意義はないものと考えられた。

その他、病理組織学的検査において検体投与によると考えられる所見は認められなかった。

以上の結果から、マンデストロピン原体のビーグル犬に対する飼料混入投与による 52 週間反復経口投与毒性試験における影響として、8000 ppm 投与群で消瘦および血液生化学検査パラメータ（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、アルブミン、総コレステロールおよびトリグリセリド）の異常が認められ、肝臓重量にも変化が認められた。肉眼的観察では肝臓に暗化がみられ、顕微鏡観察では、肝臓に検体投与と関連のある病理組織学的変化が認められた。4000 ppm 投与群では、血液生化学検査パラメータ（アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼおよびトリグリセリド；雄のみ）の異常が認められ、肝臓重量の変化（雄のみ）も認められた。顕微鏡観察では、肝臓で検体投与と関連のある組織病理学的変化が認められた。4000 ppm 群の雄で認められた肝臓の絶対重量および相対重量の増加、病理組織学的変化（肝細胞肥大と肝細胞色素沈着）、ならびに血液生化学検査パラメータの異常（アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼおよびトリグリセリドの増加）に基づき、無毒性量は雄においては 800 ppm (19.2 mg/kg/日) と判断された。雌の無毒性量は 4000 ppm (92.0 mg/kg/日) と判断された。

9. 繁殖性に及ぼす影響および催奇形性

(1) マンデストロピン原体のラットを用いた繁殖毒性試験 (資料 9-1)

試験機関：三菱化学メディエンス株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体：マンデストロピン原体

検体純度：

供試動物：Wistar 系ラット、P 世代；1 群雌雄各 26 匹、F₁ 世代；1 群雌雄各 24～26 匹、投与開始時 6 週齢、体重；雄 174～199 g、雌 122～147 g

(2010 年 10 月 26 日～2011 年 6 月 28 日)

投与期間：P 世代；交配の 10 週間前から F₁ 児離乳時までの約 16～18 週間、F₁ 世代；離乳時から F₂ 児離乳時までの約 16～18 週間

投与方法：検体を 0、1000、3000 および 10000ppm 含有した飼料を自由に摂食させた。

用量設定根拠；

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

一般状態および死亡；全動物について生死および一般状態の異常をケージ外から毎日観察し、親動物については詳細な観察を週 1 回以上行った。

体重および摂餌量；すべての親動物の体重を投与初日に測定し、その後は雄で剖検日までの間、雌で交尾確認までの間、週 1 回の頻度で体重を測定した。摂餌量は雄では投与開始から剖検前最終週までの間、雌では投与開始後 10 週間にわたり週 1 回測定した。また、交尾成立雌については妊娠 0、7、14 および 20 日ならびに哺育 0、4、7、14 および 21 日に体重および摂餌量を測定した。児動物の体重は生後 0、4、7、14 および 21 日に測定した。

交配および妊娠の確認;同群内の雄と雌を1対1で最長14日間同居させて交配を行った。
 膣垢中に精子が確認されるか、または膣栓が認められた場合に交尾成立と判断し、妊娠0日とした。

試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	育成期間(10週間)		生死および一般状態の観察を毎日 詳細な臨床観察を週1回 体重、摂餌量測定を週1回 投与7週目から3週間膣垢検査
	交配(最長14日間)	雌1対雄1で同居。交尾は膣栓 または膣垢中の精子で確認 (交尾確認日を妊娠0日)	膣垢検査、交尾成立までの日数を記録
	妊娠(約3週間)		妊娠0、7、14、20日に体重、摂餌量測定
	出産(F ₁)		分娩状況観察、妊娠期間、出産児数 (生存児数および死亡児数)、児動物 体重、性比、外表異常を記録
	哺育(21日間)	生後4日に各同腹児数を雄4匹 雌4匹に調整	親動物; 哺育0、4、7、14、21日に 体重、摂餌量測定 児動物; 生後0、4、7、14、21日に 体重測定
F ₁	離乳	F ₁ 児動物から継代用の各群雌 雄各24~26匹を選抜、その 他は安楽殺 P世代親動物の安楽殺	選抜されなかった児動物の肉眼的病 理検査、臓器重量測定 雄親動物の精子検査 親動物の肉眼的病理検査、臓器重量 測定、病理組織学的検査
	育成期間(10週間)		膣開口および包皮分離時の日齢およ び体重の記録 生死および一般状態の観察を毎日 詳細な臨床観察を週1回 体重、摂餌量測定を週1回 投与7週目から3週間膣垢検査
	交配(最長14日間) 妊娠(約3週間)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる) (P世代に準ずる)
	出産(F ₂)		(P世代に準ずる)
	哺育(21日間)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
F ₂	離乳	F ₂ 離乳児の安楽殺 F ₁ 親動物の安楽殺	F ₂ 児動物の肉眼的病理検査、臓器重 量測定 F ₁ 親動物の肉眼的病理検査、臓器重 量測定、病理組織学的検査

繁殖性に関する指標；交配、妊娠および哺育の各期間と剖検時の観察より以下の指標について調べた。

性周期；投与7週目から3週間、各雌から陰垢を採取して検査し、性周期を調べた。

交尾所要日数；交尾開始から交尾確認までの日数

妊娠期間；妊娠0日から分娩完了までの日数

交尾率 (%) = (交尾動物数 / 同居動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠動物数 / 交尾雌動物数) × 100

出産率 (%) = (生存児出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

出生率 (%) = (出産生存児数 / 着床数) × 100

出産時生存率 = (出産生存児数 / 出産児数) × 100

生後4日生存率 = (生後4日の生存児数 / 出産生存児数) × 100

生後7、14日生存率 = (生後7、14日の生存児数 / 児数調整後の生存児数) × 100

離乳率 = (離乳時の生存児数 / 児数調整後の生存児数) × 100

病理学的検査；PおよびF₁世代の雄親動物は交配期間終了の5~6週間後、母動物は哺育21日後、非分娩交尾雌は交尾確認の26日後、非交尾雌は交配期間終了の14日後にそれぞれ安楽殺して、肉眼的病理検査を行い、以下の臓器重量を測定した。

脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、精巣上体（全体および尾部）、前立腺（腹葉）、精囊（凝固腺を含む）、卵巣、子宮（頸部を含む）

対照群と10000ppm群の全ての雌雄の以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。また、PおよびF₁世代の雌雄の肝臓および雄の甲状腺ならびにP世代雌の腎臓についても病理標本を作成し、検鏡した。

下垂体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、凝固腺、前立腺（腹葉）、卵巣、卵管、子宮（頸部を含む）、膈、肝臓

さらに、1000および3000ppm群のPおよびF₁世代の雌雄の肝臓と雄の甲状腺ならびにF₁世代雌の副腎についても同様に検査を行った。児数調整時に除外された児動物は生後4日、継代用に選抜されなかったF₁児動物および全F₂児動物は生後21日に安楽殺し、肉眼的病理検査に供した。また、生後21日に屠殺したF₁およびF₂児動物から各腹雌雄各1匹を無作為に選抜し、以下の臓器重量を測定した。

脳、胸腺、脾臓、子宮

精子検査；剖検時に、全雄親動物を対象として、右精巣上体尾部から精子を採取し、運

動性を検査した。また、対照群および10000ppm群を対象として、精巢1g当りの精子細胞数および精巢上体尾部1g当りの精子数を測定した。さらに、エオジンY染色精子塗抹標本を作成して、完全精子200個中の形態的異常のある精子数および精子100個中の頭部と尾部が分離した無尾精子数を計測した。

卵胞数；F₁世代の対照群および10000ppm群を対象に、小型卵胞、中型卵胞および大型卵胞の数を計測した。

性成熟；F₁世代動物を対象として、雌の膈開口および雄の包皮分離が確認された日の日齢および体重を記録した。

結 果：概要を表1に示した。

親動物；

死 亡；PおよびF₁世代ともに死亡は認められなかった。

一般状態；PおよびF₁世代ともに検体投与に関連する変化はみられなかった。

体重および体重増加量；PおよびF₁世代の10000ppm群の雄では、観察期間を通じて体重および体重増加量の低値が認められた。P世代の10000ppm群の雌では、哺育期間中の体重および妊娠14日の体重増加量の低値が認められた。F₁世代の10000ppm群の雌では、観察期間を通じた体重および育成7日に体重増加量の低値がみられた。

PおよびF₁世代の10000ppm群の雌で哺育21日に体重増加量の高値が認められたが、同群では児動物の体重増加が顕著に抑制されていたことから、これらの児動物に対する授乳期間が延長され、母動物の乳腺の生理学的萎縮が遅延した結果、哺育期間後期の母動物体重の生理学的減少が抑制されたものと考えられた。したがって、10000ppm群でみられた哺育21日の体重増加量の高値は同群の児動物の成長遅滞に起因するものであり、毒性学的意義はないと考えられた。

1000および3000ppm群の雄では、両世代とも観察期間を通じて体重および体重増加量に対照群と差は認められなかった。雌では、F₁世代において1000および3000ppm群の体重ならびに3000ppm群の育成期間の体重増加量に高値を認めたが、用量相関性もなく一過性であったことから、偶発的なものと考えられた。

摂餌量；PおよびF₁世代の10000ppm群において、摂餌量の低値が雄ではそれぞれ観察期間および交配前期間中に、雌では主に妊娠および／または哺育期間中に認められた。その他の摂餌量の統計学的に有意な変化は用量相関性がなく一過性であったことから、偶発的なものと考えられた。

性周期；投与に関連する変化は認められなかった。

繁殖性；PおよびF₁世代ともに交尾能、受胎、妊娠、分娩または哺育行動に検体投与に関連した変化は認められなかった。

F₁世代の10000ppm群の妊娠期間（21.8日）が、対照群（22.2日）に比して有意

に短かった。しかしながら、P世代の妊娠期間には対照群と10000ppm群の間で差がなく、また、F₁世代の10000ppm群の母動物の妊娠期間はすべて21または22日で、これは同系統の正常範囲内（21～23日）^{*1}であった。したがって、毒性学的意義はないと考えられた。

臓器重量；PおよびF₁世代ともに肝臓重量の増加が3000および10000ppm群の雄ならびに1000ppm以上の群の雌で認められた。肝臓重量の増加は肝ミクロソーム薬物代謝酵素の誘導に伴う適応性変化であり、1000ppmの雌では後述するように病理組織学的検査で肝細胞肥大を認めたのみで、肝毒性を示唆するような傷害所見はみられなかった。また、ラットを用いたマンデストロピン原体の13週間反復投与毒性試験（資料No. 5-1）では、10000ppmの用量においても血液生化学的検査で肝臓への影響に関連する明らかな変化は認められなかった。したがって、1000ppm群の雌で認められた肝臓重量の増加は生理的適応であり、毒性学的意義はないと考えられた。さらに、甲状腺重量の増加がP世代の3000および10000ppm群の雄とF₁世代の10000ppm群の雌で認められ、また、PおよびF₁世代の10000ppm群の雌では卵巣重量の減少が、P世代の雌で子宮重量の減少が認められた。

腎臓重量の増加がP世代の10000ppm群の雌で認められたが、病理組織学的検査において関連した変化は認められず、また、F₁世代の雌あるいはPまたはF₁世代の雄の腎臓に変化はみられなかった。したがって、P世代の雌の腎臓にみられた変化に毒性学的意義はないと考えられた。また、その他の臓器重量の統計学的に有意な変化は、絶対重量あるいは相対重量のいずれか一方のみの変化であり、明確な用量相関性がないか、あるいは剖検時体重の低値に起因するものであり、毒性学的意義のない変化と考えられた。

肉眼的病理検査；P世代およびF₁世代の雌の10000ppm群では、肝臓が暗褐色を呈し、大型化が認められた。P世代の10000ppm群の雌では、腎臓皮質の緑色変化が認められたが、病理組織学的検査において剖検所見や臓器重量の増加に関連した変化は認められず、また、F₁世代の雌あるいはPまたはF₁世代の雄の腎臓に変化はみられなかった。したがって、P世代の雌の腎臓にみられた変化に毒性学的意義はないと考えられた。

病理組織学的検査；P世代およびF₁世代雌雄の3000および10000ppm群の肝臓、P世代雄の10000ppm群の甲状腺、ならびにF₁世代雌の10000ppm群の副腎に検体投与に関連した変化が認められた。胆管／門脈周囲の褐色色素沈着がP世代の10000ppm群の雌雄ならびにF₁世代の3000および10000ppm群の雌雄で、胆管周囲限局性炎症細胞浸潤がP世代雌雄とF₁世代雄の10000ppm群ならびにF₁世代の3000および

参考文献

- *1: Aoyama H, Kikuta M, Shirasaka N, Hojo H, Takahashi Ken L, Shimizu N, Harigae M, Taguchi F, and Teramoto S (2002) Historical control data on reproductive abilities and incidences of spontaneous fetal malformations in Wistar Hannover GALAS rats. *Cong Anom*, 42: 194-201 (動物数: 71匹、実施年: 不明)。

10000ppm群の雌で、小葉周辺部肝細胞褐色色素沈着および胆管増生がPおよびF₁世代の10000ppm群の雌で認められた。褐色色素は、Schmorl染色で濃い青色を呈し、HallおよびBerlin blue染色が陰性であったこと、また、偏光レンズを用いた検査で複屈折を示したことから、ポルフィリン色素と考えられた。肝細胞のびまん性肥大が両世代ともに3000および10000ppm群の雄ならびに1000ppm以上の投与群の雌で認められた。1000ppm群の変化は肝臓重量の増加を伴うのみであったことから、肝ミクロソーム薬物代謝酵素の誘導に起因する生理的適応であり、毒性学的意義はないと考えられた。10000ppm群では肝細胞肥大に伴う二次的変化と考えられる甲状腺濾胞細胞肥大がP世代の雄で、ストレス関連変化と考えられる副腎索状帯皮質細胞肥大がF₁世代の雌で認められた。一方、両世代の雌雄ともに生殖器（卵巣と子宮を含む）に病理組織学的変化は認められなかった。

精子検査；P世代およびF₁世代ともに精子運動率、精子細胞数、精子数、形態学的に異常な精子および無尾精子の発現率に変化は認められなかった。

卵巣検査；F₁世代の雌では、卵胞の数または分布に検体投与に関連した変化は認められなかった。なお、10000ppm群のF₁世代の雌において、中型卵胞数の有意な増加と大型卵胞数の増加傾向がみられたが、原子卵胞を含む小型卵胞数と総卵胞数ならびに各発生段階の卵胞の割合は対照群と同等であることから、卵子形成への影響はないと考えられた。さらに、性周期や着床数などに卵巣機能障害を示唆する変化はみられず、卵巣の病理組織学的変化も認められなかった。したがって、これは偶発的な変化であり、毒性学的意義はないと考えられた。

児動物；

分娩時検査；F₁およびF₂児動物とも出産児数、性別および外表に検体投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態；F₁およびF₂児動物とも検体投与に関連した変化は認められなかった。

生存率；F₁およびF₂児動物とも検体投与に関連した変化は認められなかった。

体重；F₁およびF₂児動物とも出生時体重に検体投与に関連した変化は認められなかったが、生後の体重増加抑制が10000ppm群の雌雄ともに認められた。

性成熟；F₁世代の10000ppm群の雌雄で発育遅延に関連すると考えられる性成熟の軽度な遅れが認められた（対照群との平均値の差：雌の膈開口が1.5日遅延、雄の包皮分離が1.6日遅延）。

臓器重量；離乳時の脾臓重量の軽度な減少がF₁世代の雄とF₂世代の雌の3000および10000ppm群ならびにF₂世代の雄の10000ppm群で認められたが、F₁世代の親動物では対照群と同等まで完全に回復した。その他の臓器重量の統計学的に有意な変化は、剖検時体重の低値に起因するものであり、毒性学的意義のない変化と考えられた。

肉眼的病理検査；F₁およびF₂児動物とも検体投与に関連した異常所見は認められな

った。

以上の結果より、2世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、3000ppm以上の投与群の両世代の雌雄で親動物に対する一般毒性学的影響が、10000ppm群の両世代児動物の雌雄で発育遅延が、また、3000ppm以上の投与群の両世代児動物の雄および/または雌で離乳時脾臓重量の軽度な低値が認められた。したがって、本試験条件下での無毒性量（NOEL）は、親動物の一般毒性および児動物に対して1000ppm（P：雄 56.15 mg/kg/日、雌 62.48 mg/kg/日；F₁：雄 84.73 mg/kg/日、雌 90.11 mg/kg/日）と判断された。繁殖性については最高用量の10000ppmでも影響がなかった。

表1 結果の概要

世代		親 : P				児 : F ₁				
投与量 (ppm)		0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000	
動物数	雄	26	26	26	26	25	26	26	24	
	雌	26	26	26	26	25	26	26	24	
死亡	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	
	雌	0	0	0	0	0	0	0	0	
一般状態		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし				
体重	雄	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7、91、105、112日 ↓ : 14~84、98、119日 最大7%	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 0~126日 最大15%	
	雌	育成期	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 21、35、42日 ↓ : 0~14日 最大16%
		妊娠	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7日 6%
		哺育	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7、14日 最大5%	-	↑ : 21日 5%	↑ : 21日 5%	↓ : 4~14日 最大6%
体重増加量	雄	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7~119日 最大14%	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 28、126日 ↓ : 7、14、35~119日 最大11%	
	雌	育成期	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	↑ : 7、14日 最大8%	↓ : 7日 15%
		妊娠	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 14日 11%	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし
		哺育	-	有意差なし	有意差なし	↑ : 21日 102%	-	有意差なし	有意差なし	↑ : 21日 83%
摂餌量	雄	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 56日 ↓ : 28~49、63日 最大10%	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 14日 ↓ : 7日 最大12%	
	雌	育成期	-	有意差なし	↑ : 7日 9%	有意差なし	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7、49、70日 最大19%
		妊娠	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7日 10%
		哺育	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 7日 14%	-	有意差なし	有意差なし	↓ : 4日 ↓ : 7、14日 最大14%

- : 対照群

太枠内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 < 0.05、↑ ↓ : P < 0.01)

多重比較検定 : 体重、体重増加量、摂餌量

(つづく)

表1 結果の概要 (つづき)

世代		親 : P				親 : F ₁				
投与量 (ppm)		0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000	
育成期検体採取量 (mg/kg/日)	雄	—	56.15	166.3	559.1	—	84.73	254.5	881.2	
	雌	—	62.48	195.3	628.5	—	90.11	274.9	929.3	
親動物 臓器重量 雄	最終体重	100	100	99	↓95	100	100	98	↓92	
	脳	重量	100	99	98	99	100	100	98	99
		対体重比	100	99	99	↑105	100	100	100	↑108
	甲状腺 左	重量	100	97	101	↑118	100	97	102	127
		対体重比	100	96	100	↑125	100	96	105	↑141
	甲状腺 右	重量	100	105	↑112	↑126	100	102	103	↑129
		対体重比	100	105	↑112	↑132	100	101	106	↑143
	甲状腺	重量	100	101	↑106	↑122	100	99	103	↑128
		対体重比	100	101	↑106	↑129	100	99	106	↑142
	肝臓	重量	100	103	↑112	↑123	100	101	105	↑115
		対体重比	100	103	↑113	↑130	100	101	↑108	↑126
	脾臓	重量	100	99	100	98	100	103	102	107
		対体重比	100	99	101	103	100	103	105	↑115
	腎臓 左	重量	100	100	102	99	100	102	100	99
		対体重比	100	101	102	105	100	102	102	↑108
	腎臓 右	重量	100	101	100	98	100	102	101	100
		対体重比	100	101	100	103	100	102	103	↑109
	腎臓	重量	100	100	101	99	100	102	100	100
		対体重比	100	101	101	104	100	102	103	↑108
	副腎 右	重量	100	98	99	99	100	100	100	99
		対体重比	100	98	100	105	100	100	102	↑108
	副腎	重量	100	99	100	99	100	101	100	99
		対体重比	100	99	100	105	100	101	103	↑109
	精巣 左	重量	100	97	96	99	100	99	101	101
		対体重比	100	97	96	104	100	98	104	↑110
	精巣 右	重量	100	99	96	100	100	98	102	101
		対体重比	100	99	96	106	100	98	104	↑110
	精巣	重量	100	98	96	100	100	99	102	101
対体重比		100	98	96	105	100	98	104	↑110	
精囊	重量	100	102	97	103	100	100	101	107	
	対体重比	100	103	98	↑109	100	99	103	↑116	

— : 対照群

臓器重量の数値は、変動の目安として対照群を100とした場合の値
太枠内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 < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

多重比較検定 : 最終体重、臓器重量

(つづく)

表1 結果の概要 (つづき)

世代		親 : P				親 : F ₁					
投与量 (ppm)		0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000		
親動物	雄	精巣	重量	100	100	99	100	100	104	102	102
		上体左	対体重比	100	101	100	105	100	104	105	↑111
		精巣	重量	100	101	97	99	100	102	102	102
		上体右	対体重比	100	102	97	104	100	101	104	↑112
		精巣	重量	100	101	98	99	100	103	102	102
		上体	対体重比	100	101	98	105	100	102	104	↑111
		精巣上	重量	100	100	98	99	100	101	102	105
		体尾部	対体重比	100	102	98	106	100	98	104	↑114
		最終体重		100	102	102	102	100	↑105	↑105	101
		脳	重量	100	101	99	101	100	100	99	↓98
			対体重比	100	99	97	99	100	↓96	↓94	97
		下垂体	重量	100	107	105	98	100	102	96	93
			対体重比	100	105	103	96	100	98	↓92	↓92
		肝臓	重量	100	↑110	↑117	↑165	100	↑110	↑120	↑152
	対体重比		100	↑108	↑115	↑162	100	106	↑114	↑152	
	腎臓左	重量	100	98	98	↑104	100	102	101	105	
		対体重比	100	96	96	↑102	100	98	97	104	
	腎臓右	重量	100	102	99	↑107	100	104	102	103	
		対体重比	100	101	97	↑105	100	100	98	102	
	腎臓	重量	100	100	99	↑105	100	103	102	104	
		対体重比	100	99	97	↑103	100	99	97	103	
	副腎左	重量	100	98	96	105	100	104	97	101	
		対体重比	100	96	94	103	100	100	↓93	100	
	卵巣左	重量	100	98	107	87	100	97	98	↓83	
		対体重比	100	96	104	↓85	100	92	94	↓83	
	卵巣	重量	100	99	107	90	100	99	101	↓87	
		対体重比	100	97	104	↓88	100	94	96	↓86	
	子宮	重量	100	121	115	↓85	100	108	107	96	
対体重比		100	119	112	↓82	100	103	102	95		
肉眼的病理検査 : 雌											
肝臓 ; 暗褐色		0	0	0	↑24	0	0	0	↑20		
大型		0	0	0	↑20	0	0	0	↑6		
腎臓 ; 皮質緑色		0	0	0	↑5	0	0	0	0		

臓器重量の数値は、変動の目安として対照群を 100 とした場合の値
太枠内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 < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

多重比較検定 : 最終体重、臓器重量

Fisher 直接確率検定 : 肉眼的病理検査所見

(つづく)

表1 結果の概要 (つづき)

世代		親:P			児:F ₁				親:F ₁		児:F ₂			
投与量 (ppm)		0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000	
親動物	病理組織学的検査: 雄													
	肝臓;													
	胆管/門脈周囲褐色色素沈着													
		1	0	0	0	↑	0	0	↑	↑	0	0	10	22
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
		1	0	0	0	↑4	0	0	0	0	0	0	↑24	
	胆管周囲限局性炎症細胞浸潤													
	びまん性肝細胞肥大													
		1	0	0	↑	↑	0	0	↑	↑	0	0	6	19
		2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4
	甲状腺;													
	びまん性濾胞細胞肥大													
		1	0	0	0	↑4	0	0	0	0	0	0	0	0
	病理組織学的検査: 雌													
	肝臓;													
	胆管/門脈周囲褐色色素沈着													
		1	0	0	0	↑	0	0	↑	↑	0	0	11	5
		2	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	16
		3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
	小葉周辺肝細胞褐色色素沈着													
	1	0	0	0	↑4	0	0	0	0	0	0	0	↑5	
胆管周囲限局性炎症細胞浸潤														
	1	0	0	0	↑10	0	0	3	↑24	0	0	0	0	
びまん性肝細胞肥大														
	1	0	↑	↑	↑	0	↑	↑	↑	0	4	18	11	
	2	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	13	
	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
胆管増生														
	1	0	0	0	↑	0	0	0	↑	0	0	0	7	
	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	8	
	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	
副腎;														
索状帯皮質細胞肥大														
	1	0	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0	↑5	
性周期		平均日数	4.05	4.02	4.00	3.99	4.12	4.08	4.12	4.09				
		異常周期率	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
卵巣の定量的病理検査		小型卵胞数	/	/	/	/	48.0	/	/	/	49.3			
		中型卵胞数	/	/	/	/	11.2	/	/	/	↑13.2			
		大型卵胞数	/	/	/	/	21.4	/	/	/	24.8			
		合計	/	/	/	/	80.6	/	/	/	87.3			

病理組織学的検査所見の程度; 1: 軽微、2: 軽度、3: 中等度
/ : 検査せず。

太枠内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 < 0.05, ↑ ↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 病理組織学的検査所見

多重比較検定: 性周期日数

Fisher 直接確率検定: 異常性周期動物の発現率

t 検定: 卵胞数

(つづく)

表1 結果の概要 (つづき)

世代		親 : P				親 : F ₁				
投与量 (ppm)		0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000	
親動物	精子検査	運動精子率 (%)	87.6	88.7	86.5	87.5	91.2	92.7	93.0	91.5
		精子細胞 (10 ⁶ /g)	76.46	/	/	79.47	73.65	/	/	68.86
		精子数 (10 ⁶ /g)	747.41	/	/	714.97	735.11	/	/	688.60
		異常精子率 (%)	0.40	/	/	0.52	1.32	/	/	0.81
		無尾精子率 (%)	1.15	/	/	1.42	1.92	/	/	1.00
	交尾所要日数	2.9	3.2	2.5	3.6	2.6	2.6	2.3	2.0	
	交尾率 (%)	100	100	100	96.2	100	100	100	100	
	受胎率 (%)	96.2	100	100	96.0	100	96.2	92.3	100	
	出産率 (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	
	妊娠期間 (日)	22.1	22.0	22.0	22.0	22.2	22.0	22.0	21.8	
	着床数	13.0	12.2	13.2	13.0	13.8	13.5	13.1	13.2	
	児動物	出生児数	12.2	11.7	12.2	12.3	13.0	12.9	12.5	12.3
出生率		93.78	95.86	92.64	95.40	93.96	95.29	95.44	93.04	
性比 ^{a)}		生後0日	138/167	143/160	156/161	140/156	157/167	155/167	134/166	146/148
		生後4日	138/166	136/152	154/159	137/152	157/166	148/164	133/164	146/146
生存率 (%)		生後0日	99.50	99.74	99.62	100	99.69	99.16	99.13	99.31
		生後4日	99.73	95.55	98.80	97.77	99.75	97.23	98.85	99.48
		生後7日	100	100	100	100	100	100	100	98.96
		生後14日	100	100	100	99.48	100	100	100	98.96
		離乳率	100	100	100	99.48	100	100	100	98.96
外表異常数		0	0	0	0	0	0	0	0	
一般状態		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし				
体重 (g)		哺育0日	雄	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7	5.9
	雌		5.5	5.5	5.4	5.5	5.5	5.5	5.6	5.4
	哺育4日 ^{b)}	雄	9.9	9.9	10.0	9.4	9.8	9.9	9.9	9.5
		雌	9.6	9.6	9.6	9.1	9.5	9.6	9.7	9.1
	哺育7日	雄	16.2	15.9	16.3	↓14.7	16.0	15.8	15.9	15.0
		雌	15.7	15.5	15.7	↓14.2	15.5	15.3	15.5	↓14.3
	哺育14日	雄	32.5	32.0	32.3	↓28.0	32.9	31.7	32.4	↓29.6
		雌	31.6	31.2	31.4	↓27.1	32.1	31.0	31.8	↓28.5
	哺育21日	雄	52.0	51.1	50.3	↓43.8	53.5	51.6	52.2	↓46.3
		雌	50.3	49.5	48.5	↓41.9	51.4	50.3	50.4	↓44.5

/: 検査せず。

a) 表中の数値は雄児動物総数/雌児動物総数を示す。

b) 同腹児数調整前。

太枠内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 < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

多重比較検定 : 着床数、出生児数、体重

Dunnett 型多重比較検定 : 精子運動率、交尾所要日数、妊娠期間、出生率、生存率、離乳率、
外表異常児の発現率

t 検定 : 精子細胞数、精子数

Fisher 直接確率検定 : 交尾率、受胎率、出産率、性比

Wilcoxon 順位和検定 : 形態異常精子の発現率

(つづく)

表1 結果の概要 (つづき)

世代		親:P				親:F ₁					
投与量 (ppm)		0	1000	3000	10000	0	1000	3000	10000		
体重増加量	哺育 0-4 ^{b)} 日	雄	4.1	4.1	4.3	3.6	4.0	4.2	4.0	3.7	
		雌	4.1	4.1	4.2	3.6	3.9	4.1	4.1	3.6	
	哺育 4 ^{c)} -7日	雄	6.2	6.0	6.2	↓5.2	6.1	5.8	6.0	↓5.4	
		雌	6.0	5.8	6.0	↓5.0	5.9	5.6	5.7	↓5.1	
	哺育 4-14日	雄	22.5	22.0	22.2	↓18.4	23.0	21.7	22.4	↓20.0	
		雌	21.9	21.5	21.6	↓17.9	22.5	21.3	22.0	↓19.4	
	哺育 4-21日	雄	42.0	41.2	40.2	↓34.3	43.6	41.7	42.2	↓36.7	
		雌	40.5	39.9	38.8	↓32.7	41.9	40.7	40.6	↓35.4	
	包皮分離	日齢	41.1	41.8	42.0	↑42.7	/	/	/	/	
		体重	173.96	181.38	179.62	167.17	/	/	/	/	
臍開口	日齢	31.0	30.9	31.0	↑32.5	/	/	/	/		
	体重	94.96	96.46	95.50	↓89.33	/	/	/	/		
児動物 臓器重量	雄	最終体重	100	99	97	↓85	100	97	97	↓88	
		脳	重量	100	101	100	98	100	101	100	100
			対体重比	100	102	103	↑117	100	105	103	↑115
		胸腺	重量	100	98	100	↓82	100	97	95	↓86
			対体重比	100	99	103	97	100	99	97	98
		脾臓	重量	100	93	↓87	↓75	100	93	90	↓77
	対体重比		100	94	↓90	↓88	100	95	92	↓87	
	雌	最終体重	100	98	96	↓82	100	98	98	↓86	
		脳	重量	100	100	101	98	100	100	100	100
			対体重比	100	101	104	↑121	100	103	102	↑115
		胸腺	重量	100	99	100	↓82	100	99	97	↓85
			対体重比	100	100	103	100	100	101	99	98
		脾臓	重量	100	99	92	↓79	100	96	85	↓74
			対体重比	100	101	95	97	100	96	↓87	↓86
子宮		重量	100	101	106	↓86	100	105	104	89	
	対体重比	100	102	109	105	100	107	106	103		
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし					

/: 検査せず。

b) 同腹児数調整前。

c) 同腹児数調整後。

臓器重量の数値は、変動の目安として対照群を100とした場合の値
太枠内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 < 0.05, ↑ ↓: P < 0.01)

多重比較検定: 体重増加量、臓器重量

Dunnett型多重比較検定: 包皮分離・臍開口時日齢および体重

(2) マンデストロピン原体のラットにおける催奇形性試験 (資料9-2)

試験機関: Covance Laboratories Ltd.

[GLP対応]

報告書作成年: 2012年

検体: マンデストロピン原体

検体純度:

供試動物: Cr1:WI (Han)系妊娠ラット、1群24匹、交配時9~10週齢、
体重175.5~224.0 g

投与期間: 妊娠6日から19日までの14日間

(2010年2月22日投与開始~2010年3月11日最終屠殺)

投与方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、100、300および1000 mg/kg/
日の投与量で妊娠6日^{*}から19日までの14日間、毎日1回強制経口投与した。な
お、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

^{*} 膈栓を認めた日を妊娠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; 全動物について、一般状態および生死を毎日観察し、さらに、投与直後ならび
に投与後0.5および1時間にも観察した。体重は妊娠3、6、7、8、9、12、15、17、
19および20日に測定し、摂餌量は妊娠3~5日、6日、7日、8日、9~11日、12~
14日、15~16日、17~18日および19日に測定した。妊娠20日に全母動物を帝王
切開し、肉眼的病理変化の有無を検査し、子宮および卵巣を摘出して妊娠子宮
重量、黄体数、着床数、生存および死亡胎児数および位置、早期および後期子
宮内死亡数の検査ならびに胎盤重量の測定を実施した。非妊娠とみられる雌動
物の子宮は、10%硫化アンモニウム溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。

生存胎児; 性別判定、体重測定および外表異常の検査を行った。各同腹児の約半数につ
いては内臓検査を行った後、アリザリンおよびアルシアンブルー染色により骨
格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。残りの胎児についてはブアン液
で固定し、脳の冠状切片の検査を含め、内臓異常の有無を検査した。

結果: 概要を次表に示した。

母動物; 死亡および毒性症状は認められなかった。なお、投与直後に口擦り (および稀

に流涎)が300および1000 mg/kg/日群で認められたが、これはげっ歯類でよくみられる味嫌悪に起因する所見であることから、毒性を示唆するものではないと考えられた。

軽度な摂餌量の減少が1000 mg/kg/日群で投与開始後3日間にみられた。

体重増加量、妊娠子宮重量および子宮内所見(黄体数、着床数、着床前および着床後損失率)に検体投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg/日群では、早期子宮内死亡または着床後損失がみられた母動物数に統計学的有意差が認められたが、早期子宮内死亡数および着床後損失率はともに背景データ(平均早期子宮内死亡数; 0.2~1.1、着床後損失率; 1.8~14.1%)¹⁾の範囲内であり、用量相関性も認められなかったことから、検体投与に起因する変化ではないと考えられた。

生存胎児; 性比、平均同腹児重量、平均胎盤重量および平均胎児体重のいずれにも検体投与の影響は認められなかった。胎児の外表、¹⁾内臓および骨格観察においても、胎児の異常または変異の発現頻度に検体投与の影響は認められなかった。なお、骨格変異の発現頻度に統計学的有意差が散見されたが、いずれも背景データの範囲内(表、脚注参照)であった。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに経口投与したときの母動物における無毒性量は300 mg/kg/日、胚・胎児動物における無毒性量は1000 mg/kg/日であった。また、最高投与量の1000 mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断された。

背景データ

1) : Laboratory standard data for Han Wistar rats used in embryo-foetal studies at Covance (試験数: 6、実施年: 不明)。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
1群あたり動物数		24	24	24	24
妊娠動物数		24	23	24	24
死亡数		0	0	0	0
一般状態		検体投与に起因する異常なし			
体重変化		—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
妊娠20日補正体重 ^{b)}		100	100	101	100
妊娠子宮重量 ^{b)}		100	96	107	97
摂餌量 (g/日)	妊娠6日	19.1	17.8	18.6	↓16.7
	妊娠7日	20.5	19.2	19.4	↓17.7
	妊娠8日	20.2	19.7	20.3	↓17.7
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常なし			
母動物 着床所見	検査母動物数	24	23	24	24
	平均黄体数	12.0	12.2	12.8	12.6
	平均着床数	10.8	10.8	11.7	10.7
	着床前損失率 (%) ^{a)}	10.2 (15)	12.0 (12)	7.6 (15)	14.8 (18)
	早期子宮内死亡数 ^{b)}	0.3 (7)	0.8 (10)	0.4 (8)	0.7 (↑14)
	後期子宮内死亡数 ^{b)}	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (2)	0.0 (0)
	平均死亡胎児数 ^{a)}	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
	着床後損失率 (%) ^{a)}	2.8 (7)	8.6 (10)	4.4 (10)	6.9 (↑14)
	平均生存胎児数	10.5	10.0	11.2	10.0
胎児動物	性比 (%)	50.0	47.3	53.8	55.6
	同腹児重量 ^{b)}	100	96	107	97
	胎盤重量 ^{b)}	100	104	100	104
	胎児体重 ^{b)}	雄	100	101	100
雌		100	102	101	103

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 — : 対照群

a) 括弧内の数値は該当する損失または胚・胎児死亡がみられた母動物数。

b) 数値は、変動の目安として対照群を100とした場合の値

妊娠20日補正体重 = 妊娠20日体重 - 妊娠子宮重量

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

性比 (%) = (雄胎児数 / 性別判定された胎児数) × 100

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

Dunnett 検定 : 体重増加量、妊娠20日補正体重、摂餌量、同腹児重量、妊娠子宮重量

Wilcoxon 順位和検定 : 胎児体重、胎盤重量、性比、黄体数、着床数、生存・死亡胎児数

Fisher 直接確率検定 : 損失または胚・胎児死亡がみられた母動物数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
胎児動物 外表・内臓検査	検査胎児 (腹) 数	253 (24)	230 (23)	269 (24)	240 (24)
	異常胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	腎臓重度腎盂拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	変異胎児 (腹) 数	77 (24)	78 (23)	103 (24)	101 (24)
	腹腔内血液/血塊	6 (5)	16 (8)	21 (13)	14 (10)
	膀胱軽度膨満-液貯留	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	腎臓暗色化域	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	尿管軽度膨満-液貯留*	0 (0)	1 (1)	1 (1)	4 (4)
	尿管内赤色/褐色物	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	腎臓軽度腔拡張	18 (9)	15 (12)	30 (12)	15 (9)
	肝臓過剰葉	9 (6)	4 (3)	10 (7)	9 (8)
	腎臓軽度下方変位	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肝臓軽度変形	1 (1)	3 (3)	2 (1)	2 (2)
	生殖器中央変位	1 (1)	2 (2)	2 (1)	0 (0)
	肝臓軽度肥厚	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	肝臓蒼白化/褐色化部位	0 (0)	0 (0)	1 (1)	2 (2)
	臍動脈左側	37 (19)	27 (14)	32 (17)	40 (19)
	嗅脳室軽度拡張	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
	軽度ドーム状頭	0 (0)	1 (1)	0 (0)	3 (3)
	下顎重度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
	下顎軽度皮下血腫	2 (2)	2 (2)	2 (2)	4 (3)
	眼窩域軽度皮下血腫	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	頭部皮膚点状出血	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	後頭部軽度皮下血腫	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	耳介軽度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
	後頭部重度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	舌暗色化域	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)

*: 統計学的に有意な用量相関性が認められた (Terpstra-Jonckheere 検定)

背景データ: 尿管軽度膨満-液貯留がみられた胎児 0.0~2.0%

対照群との有意差検定 (↑ ↓: P < 0.05、↑ ↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
胎児動物	検査胎児 (腹) 数	253 (24)	230 (23)	269 (24)	240 (24)
	外表・内臓検査				
	手首関節軽度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1 (1)
	前肢第2指軽度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	足首関節軽度皮下血腫	1 (1)	2 (2)	1 (1)	4 (4)
	後肢膝関節軽度皮下血腫	0 (0)	2 (2)	2 (2)	0 (0)
	後肢上腕軽度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	後肢前腕軽度皮下血腫	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	後肢裏軽度皮下血腫	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	肺辺縁部赤色化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	胸腺頸部遺残	7 (4)	15 (8)	10 (6)	7 (5)
	背部軽度皮下血腫	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	尾軽度皮下血腫	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	尾輪状出血	1 (1)	0 (0)	0 (0)	3 (3)
	尾皮膚付着	3 (3)	3 (2)	11 (4)	7 (5)
	腹部軽度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	頸部軽度皮下血腫	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
	頸胸部軽度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	腹部重度皮下血腫	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	胸部軽度皮下血腫	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	検査胎児 (腹) 数	129 (24)	115 (23)	133 (24)	121 (24)
	骨格検査				
	異常胎児 (腹) 数*	0 (0)	0 (0)	1 (1)	3 (3)
	第1肋軟骨短小	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	剣状軟骨分裂	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第5頸椎弓過剰骨化部位癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第5頸椎弓右過剰軟骨性腹板	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
頸椎弓軟骨性腹板過剰構造癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
第5頸椎体過剰骨化部位癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	

*: 統計学的に有意な用量相関性が認められた (Terpstra-Jonckheere 検定)

背景データ: Laboratory standard data (骨格異常胎児率 0.0~8.3%、試験数: 6、実施年: 不明)

対照群との有意差検定 (↑ ↓: P < 0.05、↑ ↓ ↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
胎 児 動 物	骨 格 検 査	検査胎児 (腹) 数	129 (24)	115 (23)	133 (24)	121 (24)
		変異胎児 (腹) 数	122 (24)	108 (23)	128 (24)	120 (24)
		第5中手骨未骨化	16 (8)	18 (11)	27 (12)	23 (12)
		上腕骨骨化不全	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
		中手骨骨化不全	19 (12)	18 (10)	24 (15)	24 (12)
		第5中足骨未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腸骨下方移動-仙椎前椎骨数27	1 (1)	4 (2)	4 (3)	7 (3)
		恥骨骨化不全	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第11肋軟骨離断	59 (23)	47 (21)	52 (22)	51 (20)
		第4肋骨骨化不全	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
		波状肋骨	1 (1)	0 (0)	3 (3)	3 (3)
		肋軟骨菲薄化	7 (7)	12 (8)	18 (9)	11 (8)
		肋骨結節形成	12 (6)	6 (5)	8 (6)	17 (10)
		第7頸椎短小	7 (5)	3 (3)	7 (5)	12 (8)
		第1腰椎正常長	2 (2)	2 (2)	4 (3)	3 (2)
		第1腰椎軟骨	5 (4)	3 (3)	6 (4)	7 (5)
		第7頸椎正常長	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第7頸椎軟骨隣接肋軟骨と癒着	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		腰椎片側短小/片側正常長	3 (2)	3 (3)	2 (2)	5 (4)
		腰椎痕跡状/短小	61 (22)	63 (20)	63 (20)	60 (19)
		前頭骨軽度骨化不全	9 (5)	16 (12)	14 (9)	16 (11)
		頭頂間骨軽度骨化不全*	18 (9)	26 (16)	32 (16)	38 (16)
		頭頂骨軽度骨化不全	23 (10)	↑41 (18)	40 (14)	↑47 (21)
		頭頂骨重度骨化不全	6 (4)	4 (3)	3 (3)	6 (5)
		鱗状骨軽度骨化不全	3 (3)	6 (5)	4 (2)	9 (7)
		上後頭骨重度骨化不全	3 (3)	1 (1)	0 (0)	4 (3)
		上後頭骨軽度骨化不全	10 (5)	13 (11)	14 (10)	↑26 (15)
		頬骨弓軽度骨化不全	2 (2)	4 (2)	1 (1)	↑9 (8)

* : 統計学的に有意な用量相関性が認められた (Terpstra-Jonckheere 検定)

背景データ : Control incidence of statistically significant foetal findings (試験数 : 11、実施年 : 2002~2010年) :

頭頂間骨軽度骨化不全胎児率 12.8~52.5%、頭頂骨軽度骨化不全胎児率 19.4~55.0%、
上後頭骨軽度骨化不全胎児率 3.7~28.3%、頬骨弓軽度骨化不全胎児率 0.0~10.1%

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05、↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
検査胎児 (腹) 数		129 (24)	115 (23)	133 (24)	121 (24)	
胎児動物	骨格検査	前頭骨重度骨化不全	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		舌骨弓骨化不全	4 (3)	7 (6)	3 (3)	7 (6)
		舌骨弓未骨化	1 (1)	2 (1)	1 (1)	2 (2)
		鼻骨重度骨化不全	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頭蓋鱗状骨重度骨化不全	1 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		頬骨弓重度骨化不全	2 (1)	3 (2)	0 (0)	4 (3)
		頭頂間骨重度骨化不全	3 (3)	3 (2)	0 (0)	4 (4)
		鼻骨軽度骨化不全	4 (4)	1 (1)	0 (0)	3 (2)
		上後頭骨未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頬骨弓未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		剣状軟骨分岐	38 (20)	37 (16)	40 (19)	43 (19)
		剣状軟骨穿孔	37 (17)	23 (13)	39 (18)	31 (18)
		第5胸骨分節骨化核不完全癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		第5胸骨分節骨化核未癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第6胸骨分節分岐	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第6胸骨分節軽度変形	3 (3)	2 (2)	3 (3)	1 (1)
		剣状軟骨軽度狭窄	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		胸骨分節未骨化	5 (5)	7 (6)	6 (4)	4 (4)
		胸骨分節軽度骨化不全	25 (12)	24 (14)	24 (10)	32 (12)
		胸骨分節非対称	1 (1)	3 (3)	0 (0)	1 (1)
		胸骨分節骨化停止	8 (7)	5 (5)	5 (4)	3 (3)
		頸椎弓軟骨性腹板軽度肥大	6 (4)	1 (1)	2 (2)	4 (2)
		第1頸椎弓軽度変形	1 (1)	1 (1)	2 (2)	0 (0)
		第1頸椎弓軟骨性腹板上変位	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		頸椎弓骨化不全	2 (2)	4 (3)	0 (0)	3 (3)
		第5腰椎弓骨化不全	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第4腰椎弓骨化促進	0 (0)	1 (1)	0 (0)	2 (2)
		仙椎弓骨化不全	2 (2)	0 (0)	1 (1)	5 (2)

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05、↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

		投与群 (mg/kg/日)	0	100	300	1000
胎児動物	骨格検査	検査胎児 (腹) 数	129 (24)	115 (23)	133 (24)	121 (24)
		仙椎弓椎体結合	18 (11)	22 (8)	18 (11)	16 (12)
第4仙椎体未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		
胸椎弓骨化不全	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
胸椎体骨化核不完全癒合	3 (3)	3 (3)	0 (0)	8 (7)		
胸椎体骨化不全	10 (7)	10 (8)	2 (2)	9 (8)		
胸椎体軟骨核不完全癒合	2 (2)	1 (1)	1 (1)	6 (5)		
胸椎体非対称骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)		
胸椎体骨化核未癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)		

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(3) マンデストロピン原体のウサギにおける催奇形性試験 (資料9-3)

試験機関：Covance Laboratories Ltd.

[GLP対応]

報告書作成年：2012年

検体：マンデストロピン原体

検体純度：

供試動物：New Zealand White種妊娠ウサギ、1群24匹、交配時4～5ヵ月齢、
体重2.60～4.05 kg

投与期間：妊娠7日から28日までの22日間

(2010年2月22日投与開始～2010年3月19日最終屠殺)

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、100、300および1000 mg/kg/
日の投与量で妊娠7日^{*)}から28日までの22日間、毎日1回強制経口投与した。な
お、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

*) 交尾を認めた日を妊娠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；全動物について、一般状態および生死を毎日観察し、さらに、投与直後ならび
に投与後0.5および1時間にも観察した。体重は妊娠3、7、8、9、12、15、17、
19、22、25、28および29日に測定し、摂餌量は妊娠3～29日の間毎日測定した。
妊娠29日に全母動物を帝王切開し、肉眼的病理変化の有無を検査し、子宮およ
び卵巣を摘出して妊娠子宮重量、黄体数、着床数、生存および死亡胎児数およ
び位置、早期および後期子宮内死亡数の検査ならびに胎盤重量の測定を実施し
た。非妊娠とみられる雌動物の子宮は、10%硫化アンモニウム溶液に浸漬し、着
床の有無を確認した。

生存胎児；体重を測定し、外表異常の検査を行った。全ての胎児を解剖して、性別判定
および内臓検査を行った後、アリザリン染色により骨格標本作製し、骨格異
常の有無を検査した。また、同腹児の約半数の胎児については頭部および心臓
をそれぞれブアン液で固定後に観察した。

結果：概要を次表に示した。

母動物；死亡および毒性症状は認められなかった。300 mg/kg/日群の1例が妊娠20日に

流産したが、1000 mg/kg/日群では流産はみられなかったことから、検体投与に関連するものではないと考えられた。

試験期間中の体重増加量は傾向検定で有意差がみられたものの、検体投与の明らかな影響は認められなかった。

摂餌量は対照群に比して軽度に低値を示し、300および1000 mg/kg/日群では統計学的な有意差が認められた。しかし、1000 mg/kg/日群では投与開始前期間の摂餌量も対照群に比して軽度の低値を示し、その差は投与期間中と同等であった。投与期間終了後の摂餌量においてもいずれの投与群で対照群に比して低値を示し、300および1000 mg/kg/日群では統計学的な有意差が認められたが、これらの対照群との差はわずかであり、明らかな全身毒性を示唆するものではないと考えられた。

剖検、平均妊娠子宮重量および子宮内所見（黄体数および着床数の平均値ならびに着床前および着床後損失率の平均値）に検体投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg/日群の1例で全胚児死亡がみられたが、1例のみの発現であることから検体投与の影響ではないと考えられた。また、100 mg/kg/日群において着床後損失がみられた母動物数に統計学的有意差が認められたが、背景データの範囲内（7.1～14.2%）²⁾であることから、毒性学的意義のある変化ではないと考えられた。

生存胎児；性比、平均同腹児重量、平均胎盤重量および平均胎児体重、胎児の異常または変異の発現頻度に検体投与による影響は認められなかった。胸椎体骨化核未癒合の発現頻度に傾向検定で有意差が認められたが、1000 mg/kg/日群での発現はわずか2例であり、背景データの範囲内（0～2例）³⁾であったことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに経口投与したときの母動物および胚・胎児動物における無毒性量は1000 mg/kg/日であった。また、最高投与量の1000 mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断された。

背景データ

2):Laboratory standard data for New Zealand White rabbits, supplied by Harlan (UK) Ltd used in embryo-foetal studies at Covance from April 2004 (試験数:6)。

3):Control incidence of statistically significant foetal findings (試験数:16、実施年:2004～2010年)。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
1群あたり動物数		24	24	24	24
妊娠動物数		23	23	22	18
死亡数		0	0	0	0
流産母動物数		0	0	1	0
全胚吸収母動物数		0	0	0	1
一般状態		検体投与に起因する異常なし			
体重変化 (g)	妊娠3-7日	1.3	0.7	0.6	-1.6
	妊娠7-28日	14.4	12.1	11.2	12.1
	妊娠7-8日*	10.0	-11.8	-8.3	-24.2
	妊娠17-19日*	19.4	17.6	-7.0	-15.4
	妊娠28-29日*	41.6	39.5	20.9	23.5
妊娠29日補正体重 ^{a)}		100	97	97	101
妊娠子宮重量 ^{a)}		100	98	92	98
摂餌量 (g/日)	妊娠7日	138	121	115	↓95
	妊娠8日	144	↓114	125	125
	妊娠9-11日	140	↓120	122	137
	妊娠12-14日	135	↓111	122	125
	妊娠15-16日*	135	128	119	114
	妊娠17-18日	145	135	↓119	↓121
	妊娠22-24日	129	120	118	↓114
	妊娠25-27日*	124	114	110	109
	妊娠28日	128	117	↓109	↓99
妊娠7-27日	135	124	↓118	↓120	
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常なし			

* : 線形対比で有意差が認められた。

a) 数値は、変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

妊娠 29 日補正体重 = 妊娠 29 日体重 - 妊娠子宮重量

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

Dunnnett 検定 : 体重増加量、妊娠 29 日補正体重、摂餌量、妊娠子宮重量

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000		
母動物	着床所見	検査母動物数	23	23	21	17 ^{a)}	
		全胚児死亡動物数	0	0	0	1	
		平均黄体数	10.3	10.1	10.0	9.7	
		平均着床数	8.9	9.4	8.8	8.8	
		着床前損失率 (%) ^{b)}	15.0 (13)	7.7 (8)	12.9 (12)	9.1 (8)	
		早期子宮内死亡数 ^{b)}	0.6 (7)	0.9 (13)	0.8 (10)	0.9 (9)	
		後期子宮内死亡数 ^{b)}	0.2 (4)	0.3 (5)	0.2 (4)	0.3 (3)	
		平均死亡胎児数 ^{b)}	0.0 (0)	0.0 (1)	0.0 (1)	0.1 (1)	
		着床後損失率 (%) ^{b)}	8.7 (10)	13.6 (↑17)	11.0 (11)	13.3 (11)	
		平均生存胎児数	8.0	8.2	7.8	7.5	
胎児動物	外表・内臓検査	性比 (%)	49.1	50.3	57.6	50.0	
		同腹児重量 ^{c)}	100	98	92	97	
		胎盤重量 ^{c)}	100	100	99	106	
		胎児体重 ^{c)}	雄	100	99	97	103
			雌	100	96	92	101
		検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)	
		異常胎児 (腹) 数	7 (6)	4 (3)	2 (2)	2 (2)	
		胃の肝臓上方変位	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	
		腹部内臓逆位	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
		腎臓欠損	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
		腎臓上方変位	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
		脾臓欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	
		尿管欠損	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
大動脈弓拡張	0 (0)	2 (2)	0 (0)	1 (1)			
大動脈弓食道背方走行	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
大動脈弓右側	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)			
動脈管欠損	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)			

a) 全胚児死亡の母動物は除外した。

b) 括弧内の数値は該当する損失または胚・胎児死亡がみられた母動物数。

c) 数値は、変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

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

性比 (%) = (雄胎児数 / 性別判定された胎児数) × 100

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05, ↑↓ : P < 0.01)

Dunnnett 検定 : 同腹児重量

Wilcoxon 順位和検定 : 胎児体重、胎盤重量、性比、黄体数、着床数、生存・死亡胎児数、変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 損失または胚・胎児死亡がみられた母動物数、変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
検査胎児 (腹) 数		185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)	
胎 児 動 物	外 表 ・ 内 臓 検 査	肺動脈の大動脈起始	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		肺動脈幹狭窄	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
		肺動脈幹非開存ひも状に縮小	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		鎖骨下動脈の下行大動脈起始	5 (5)	2 (2)	2 (2)	1 (1)
		大動脈弓分岐	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		上行大動脈拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		左鎖骨下動脈分岐の起始変位	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		総頸動脈の肺動脈幹起始	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		下行大動脈右側	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		動脈管狭窄	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		動脈管走行異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		肺動脈幹非開存	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		鎖骨下動脈食道背方走行*	5 (5)	3 (2)	2 (2)	0 (0)
		小眼球	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前頭部/頭頂部脳突出	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頭頂部扁平	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頭頂部/後頭部扁平	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前頭部扁平	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		眼窩部欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		眼窩縮小	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		耳介小型	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		口蓋裂	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		右心房肥大	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		右心室の大動脈開口	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		心室肥厚	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
		心尖部腹側転向	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		心室中隔不完全	1 (1)	2 (2)	0 (0)	1 (1)
		左心室縮小	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		右心房肥厚	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		心室変形	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)

* : Terpstra-Jonckheere 検定で有意差が認められた。

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05、↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
胎 児 動 物	外 表 ・ 内 臓 検 査	検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
		心室中隔肥厚	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		左心室動脈口欠損	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		右心室縮小	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		左心房欠損	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		後肢膝関節屈曲	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		肺分葉異常	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		肺小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		腹部体壁に臍帯関連開口部	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		背部皮膚に髄膜突出開口部	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		短尾	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		臍開口部上方変位	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		脊柱開放-腰部脊髄露出	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		変異胎児 (腹) 数	98 (22)	85 (23)	80 (21)	54 (15)
		腹腔内血液/血塊	0 (0)	1 (1)	3 (2)	0 (0)
	腹腔内淡色液	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	
	副腎小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	胆嚢血塊付着	8 (6)	5 (5)	10 (7)	9 (7)	
	胆嚢肝臓付着	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	胆嚢内淡色物	8 (7)	8 (6)	4 (4)	4 (3)	
胆嚢内顆粒状物	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)		
胆嚢過剰	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)		
胆嚢大型	3 (3)	3 (2)	1 (1)	0 (0)		
胆嚢変形	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
胆嚢小型	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
生殖腺嚢胞	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)		
腎臓小型	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		
肝臓暗色化域	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		
肝臓表面嚢胞性病変	3 (3)	2 (2)	1 (1)	7 (6)		
肝臓質感異常	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
脾臓蒼白化	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)		
脾臓変形	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)		
脾臓小型	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		

対照群との有意差検定 (↑ ↓: P < 0.05, ↑ ↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
胎 児 動 物	外 表 ・ 内 臓 検 査	検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
		胃膨張-ガス状内容物	3 (3)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
		生殖腺赤色点	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		肝臓過剰葉	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		肝臓緑色化域	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		肝臓辺縁部蒼白色化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		肝臓表面質感異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		膀胱拡張-液貯留	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		生殖腺上方変位	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		生殖腺肥大	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		生殖腺赤色/褐色化	2 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
		肝臓蒼白色化域	3 (2)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		大動脈弓拡張	1 (1)	3 (2)	0 (0)	0 (0)
		上行大動脈拡張	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
		左鎖骨下動脈分岐の大動脈直接起 始*	17 (10)	11 (9)	5 (4)	3 (3)
		総頸動脈副血管	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		総頸動脈の無名動脈起始	2 (1)	4 (2)	2 (2)	0 (0)
		下行大動脈拡張	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		下行大動脈右側	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		動脈管狭窄	1 (1)	4 (2)	0 (0)	0 (0)
		大動脈弓起始無名動脈/左総頸動 脈	22 (10)	9 (8)	10 (7)	8 (6)
		後大静脈分岐	31 (15)	26 (11)	36 (17)	15 (9)
		肺動脈幹拡張	1 (1)	2 (1)	2 (2)	0 (0)
		肺動脈幹狭窄	1 (1)	3 (2)	0 (0)	0 (0)
		臍帯動脈周囲出血	2 (1)	3 (1)	1 (1)	1 (1)
		左鎖骨下動脈分岐の起始変位	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
側脳室拡張	3 (3)	4 (3)	2 (1)	0 (0)		
下垂体嚢胞	5 (5)	3 (3)	3 (3)	5 (5)		
下垂体変形	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		

*: Terpstra-Jonckheere 検定で有意差が認められた。

対照群との有意差検定 (↑ ↓: P < 0.05、↑ ↓ ↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
検査胎児 (腹) 数		185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
胎児動物 外 表 ・ 内 臓 検 査	大脳半球暗色化域	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	大脳半球質感異常域	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	下垂体赤色点	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	横隔膜腱部菲薄化域	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	横隔膜筋肉部菲薄化域	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	中耳内出血	3 (3)	3 (3)	4 (3)	1 (1)
	眼不透明域退色	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	虹彩赤色化域退色	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	網膜皺壁	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	後頭部変形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	眼窩部大型	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
	耳介皺壁	2 (2)	4 (4)	1 (1)	1 (1)
	眼窩部縮小	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	切歯未萌出	18 (10)	8 (5)	5 (5)	8 (5)
	鼻腔暗色化	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
	心臓大型	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
	心室中隔肥厚	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	左心室縮小	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	左心室肥厚	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	左心室菲薄化域	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	右心室肥大	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	右心室縮小	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	右心室肥厚	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	右心室菲薄化域	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	心房肥厚	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	左心室変形	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	手首関節屈曲	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	肘関節屈曲	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	膝関節屈曲	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肺欠損	1 (1)	0 (0)	3 (2)	0 (0)
肺緑色化域	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
肺小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	

対照群との有意差検定 (↑ ↓: P < 0.05、↑ ↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
外表・内臓検査	検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
	肺表面嚢胞	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	食道背方変位	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	胸腺頸部遺残	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1 (1)
	甲状腺赤色/褐色化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	甲状腺大型	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肺赤色化域	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	肺膨張の痕跡無	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	胸腔内透明液	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	腹部膨満	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	頸胸部皮膚菲薄化域	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	曲尾	1 (1)	1 (1)	0 (0)	4 (2)
	尾起始部上方変位	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	胎児動物骨格検査	検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)
異常胎児 (腹) 数		3 (2)	4 (3)	7 (6)	2 (2)
鎖骨分裂		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第11肋骨欠損		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第4肋骨短小		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
肋骨1箇所欠損		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
肋骨異常接着		0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
肋骨分岐		0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
肋骨近位癒合		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
前頭骨間縫合骨		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
鼻骨間/前頭骨間縫合骨		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
頭頂間骨欠損		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
下顎骨異常彎曲		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
鼻骨欠損		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
口蓋裂		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
頭頂骨小型		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
前上顎骨変形		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
前上顎骨短小		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
大泉門縮小	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
外後頭部背側頭蓋縫合開存	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

		投与群 (mg/kg/日)	0	100	300	1000
		検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
胎 児 動 物	骨 格 検 査	前頭骨欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前頭骨小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		上顎骨変形	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頭頂骨扁平	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		上後頭骨弯曲	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		上後頭骨形成不全	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第1胸骨分節過剰胸骨分節と癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第6胸骨分節欠損	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		胸骨分節癒合	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸骨異常分裂	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		胸骨胸郭上方へ変位	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		尾椎基部離間	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		尾椎中間部形成異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		尾椎中間部配列異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第1頸椎弓小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第3頸椎体右側半椎体	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第7頸椎体左側半椎体	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頸椎体歯状突起欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第1頸椎体背側椎弓変形	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第5/6腰椎弓間左側過剰椎弓	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		腰椎弓間離間	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第6腰椎体隣接椎体と癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第6/7腰椎体癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第6腰椎骨左側半椎	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		腰椎骨変形	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		仙椎弓間離間	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第7/8胸椎弓癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第8胸椎弓小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		最終胸椎弓間離間	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第11胸椎体隣接椎体と癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第4胸椎体欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05、↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(つづき)

結果の概要 (つづき)

		投与群 (mg/kg/日)				
		0	100	300	1000	
胎 児 動 物	骨 格 検 査	検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
		第7/8胸椎体癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第8胸椎体左側半椎体	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第1胸椎体左側半椎体	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第11胸椎体左側半椎体	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸椎骨1箇所欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		脊柱腰部側弯	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		脊柱胸部側弯	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		変異胎児 (腹) 数	148 (22)	142 (23)	114 (21)	110 (17)
		第1中手骨骨化不全	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第1中手骨未骨化*	4 (3)	4 (3)	0 (0)	0 (0)
		第5中手骨未骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前肢第5中節骨未骨化	5 (4)	7 (4)	1 (1)	2 (2)
		前肢第5基節骨未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		前肢中節骨骨化不全	0 (0)	3 (2)	3 (3)	0 (0)
		後肢第5中節骨骨化不全	2 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		後肢第5中節骨未骨化	2 (2)	5 (4)	0 (0)	0 (0)
		肩甲骨変形	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		腸骨配列下方移動	34 (13)	22 (10)	19 (10)	35 (11)
		腸骨配列上方移動	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
		第1肋軟骨異常配列	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第8肋骨結節形成	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第6肋骨へら状	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		頸肋 (長/短) *	7 (7)	9 (7)	3 (3)	0 (0)
		腰肋 (長/短/痕跡)	99 (19)	66 (20)	72 (19)	80 (16)
		前頭骨変形	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
		前頭骨骨化不全	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		前頭骨未骨化細線	0 (0)	3 (3)	↑6 (6)	1 (1)
舌骨弓異常彎曲	3 (3)	3 (3)	1 (1)	1 (1)		
舌骨弓彎曲	2 (2)	0 (0)	4 (3)	1 (1)		
鼻骨間/前頭骨間縫合骨	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)		

* : Terpstra-Jonckheere 検定で有意差が認められた。

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : P < 0.05、↑ ↓ : P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定 : 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定 : 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
検査胎児 (腹) 数		185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)	
胎 児 動 物	骨 格 検 査	頭頂間骨骨化核不完全癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		頭頂間骨骨化不全	5 (4)	11 (8)	7 (5)	2 (2)
		頭頂骨間縫合骨	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		上顎骨骨化不全	11 (9)	6 (6)	3 (3)	6 (5)
		頭頂骨骨化不全	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頭頂骨未骨化細線	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		頭頂骨未骨化細線複数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頬骨弓部分癒合	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
		舌骨弓小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		上顎骨小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		鼻骨骨化不全	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第1胸骨分節上方過剰骨化部位	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第6胸骨分節分岐	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第6胸骨分節伸長	3 (2)	17 (4)	0 (0)	4 (3)
		第6胸骨分節拡幅	0 (0)	0 (0)	3 (1)	0 (0)
		第1胸骨分節上方過剰胸骨分節	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸骨分節骨化核未癒合	4 (3)	0 (0)	3 (3)	5 (5)
		胸骨分節骨化停止	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
		胸骨分節癒合	2 (2)	4 (4)	5 (3)	0 (0)
		胸骨分節片側骨化	4 (3)	5 (5)	1 (1)	3 (3)
		胸骨分節骨化不全	24 (11)	24 (13)	13 (7)	13 (7)
		胸骨分節骨化核不完全癒合	2 (2)	3 (3)	0 (0)	4 (3)
		胸骨分節未骨化	43 (16)	42 (13)	31 (11)	22 (10)
		胸骨分節骨化非対称	1 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
		尾椎末端変形/異常配列/癒合/ 欠損	2 (2)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		尾椎末端骨化核未癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第7頸椎弓小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頸椎弓伸長	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第2頸椎体側方変位	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)		
第4頸椎体骨化不全	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)		

対照群との有意差検定 (↑↓: P < 0.05、↑↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000	
胎 児 動 物	骨 格 検 査	検査胎児 (腹) 数	185 (23)	188 (23)	163 (21)	128 (17)
		頸椎体歯状突起骨化不全	1 (1)	5 (3)	0 (0)	1 (1)
		頸椎体歯状突起未骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第7頸椎体変形	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頸椎体歯状突起背側過剰骨化部位	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		腰椎弓異常配列	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第6腰椎体骨化核未癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		腰椎体異常配列	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		第1胸椎弓小型	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第4胸椎体骨化不全	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第5胸椎体非対称骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		第6胸椎体異常配列	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		胸椎体骨化不全	6 (6)	6 (5)	6 (4)	6 (4)
		胸椎体側方変位	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
		胸椎体骨化核不完全癒合	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
		胸椎体骨化核未癒合*	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		胸椎異常配列	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)

* : Terpstra-Jonckheere 検定で有意差が認められた。

対照群との有意差検定 (↑↓: P < 0.05、↑↓: P < 0.01)

Wilcoxon 順位和検定: 変異または異常がみられた胎児数

Fisher 直接確率検定: 変異または異常胎児を有する腹数

10. 変異原性

(1) マンデストロピン原体の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 10-1)

試験機関：住友化学株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：2010 年

検体：マンデストロピン原体

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* TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2*uvrA* 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) の存在下および非存在下で、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、9.77~5000 µg/プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は 3 連制とし、プレインキュベーション法で 2 回行った。なお、検体の用量については純度換算を行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、復帰変異コロニ数を溶媒対照群の 2 倍以上かつ用量依存的に増加させることはなかった。

一方、S9 mix 存在および非存在下の各菌株に対する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、9-アミノアクリジンおよび 2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の顕著な増加を示した。

以上の結果から、マンデストロピン原体は代謝活性化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と判断された。

本試験 I

(表中の数値は3連の平均値±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		
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	-	85±3.1	8±1.7	23±1.7	21±2.0	10±1.0	
マンデストロビン 原体	9.77	-	92±9.8	8±5.0			7±0.6	
	19.5	-	86±11.1	9±2.1			10±2.0	
	39.1	-	85±7.8	8±2.5			11±2.3	
	78.1	-	91±13.9	8±1.5			11±3.1	
	156	-	87±8.6	9±1.7	25±8.4	25±3.8	11±3.6	
	313	-	65±4.6*	5±1.2*	27±2.3	27±3.8	6±2.0*	
	625	-			28±3.2	23±0.6		
	1250†	-			23±1.7	23±2.5		
	2500†	-			22±2.1	19±4.4		
5000†	-			19±5.0	16±3.2			
対照 (DMSO)	0	+	81±1.5	8±1.5	29±6.4	24±1.0	15±2.1	
マンデストロビン 原体	39.1	+	96±3.6	5±2.1			16±1.5	
	78.1	+	88±10.7	9±3.6			7±1.5	
	156	+	93±6.1	6±2.5	29±5.3	34±3.8	11±0.0	
	313	+	79±0.6	7±4.0	33±5.5	24±6.4	11±4.2	
	625	+	82±11.7*	6±1.2*	25±8.1	25±8.1	12±3.2*	
	1250†	+	78±9.5*	5±2.1*	27±5.1	25±2.5	7±1.0*	
	2500†	+			19±2.3	29±2.5		
	5000†	+			20±1.5	24±2.5		
陽性 対照	AF-2	-	519±15.5		102±5.0			
		0.1				303±3.1		
	Na-azide	0.5		250±11.1				
	9-AA	80					366±17.1	
	2-AA	0.5	+				207±17.6	
		1	+	701±21.4				
		2	+		208±20.5			103±6.4
10		+			516±27.5			

陽性対照物質

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

Na-azide : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

* : 菌の生育阻害が認められた。

† : 検体の析出が認められた。

本試験 II

(表中の数値は3連の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 (μg/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	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	0	-	82±6.8	8±3.2	27±3.5	24±1.5	14±2.0
マンデストロピン 原体	9.77	-	81±8.3	10±4.7			9±5.0
	19.5	-	86±6.7	8±4.4			12±0.6
	39.1	-	84±4.9	12±2.0			10±2.1
	78.1	-	86±6.1	9±3.6			10±2.9
	156	-	93±11.7	9±3.6	17±5.6	23±2.6	11±1.5
	313	-	66±4.0*	5±1.0*	25±5.0	21±2.0	7±3.6*
	625	-			23±2.6	22±1.7	
	1250 †	-			26±5.0	24±2.0	
	2500 †	-			25±2.0	22±3.1	
	5000 †	-			22±2.9	20±1.5	
対照 (DMSO)	0	+	78±3.5	8±3.2	28±6.8	28±1.7	15±2.9
マンデストロピン 原体	39.1	+	81±7.0	8±2.0			11±2.6
	78.1	+	94±5.5	9±3.8			11±5.5
	156	+	96±5.3	10±4.6	33±4.2	25±3.6	13±0.6
	313	+	85±12.0	6±1.0	30±4.4	27±6.1	12±4.6
	625	+	72±4.4*	8±1.7*	28±8.6	26±4.0	13±1.5*
	1250 †	+	74±8.4*	9±1.5*	27±6.8	20±4.6	11±2.6*
	2500 †	+			26±2.1	23±6.8	
	5000 †	+			22±4.0	20±0.6	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	566±35.0		101±6.1	
		0.1	-			330±2.9	
	Na-azide	0.5	-		263±5.1		
	9-AA	80	-				326±24.0
	2-AA	0.5	+				197±5.9
		1	+	611±22.7			
		2	+		184±16.9		110±5.2
	10	+			503±41.6		

陽性対照物質

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

Na-azide : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

* : 菌の生育阻害が認められた。

† : 検体の析出が認められた。

- (2) マンデストロピン原体のチャイニーズハムスター肺由来の培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 10-2)

試験機関：住友化学株式会社
[GLP 対応]

報告書作成年：2010 年

検体：マンデストロピン原体

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの肺由来の培養細胞 (CHL/IU) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験 1 では S9 mix 存在下および非存在下ともに 6 時間処理、試験 2 では S9 mix 存在下で 24 時間、非存在下で 6 時間細胞を処理した。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行った。

用量設定根拠：

結果：結果を次頁の表に示した。

いずれの処理群においても、S9 mix の有無にかかわらず、染色体異常を有する細胞の出現頻度に増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C およびシクロホスファミドでは染色体異常を有する細胞の出現頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、マンデストロピン原体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下でチャイニーズハムスター肺由来の培養細胞 (CHL/IU) に対して染色体異常誘発性を有しないと判断された。

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間 (h)	標 本 作 製 時 間 (h)	観 察 細 胞 数	S9 mix の 有 無	構造異常							数的 異常 ^{c)}		増 殖 率 (%)		
							異常数					異常細胞		判定 ^{b)}	判定 ^{b)}			
							ギャ ップ	染色 分 体 型		染色 体 型		多 重 異 常 ^{a)}	+G (%)				-G (%)	
								切 断	交 換	切 断	交 換							
試 験 1	溶媒対照 (DMSO)	1%	6	24	200	-	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	0.0	-	100
	マンデス	40.0			200		2	1	0	0	0	0	1.5	0.5	-	2.5	-	56.6
	トロピン	60.0			200		0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	2.0	-	52.9
	原体	80.0			200		0	3	0	0	0	0	1.5	1.5	-	1.5	-	43.7
	陽性対照 (MMC)	0.06			200		6	23	35	0	1	1	26.0	24.0	+	0.0	-	75.0
	溶媒対照 (DMSO)	1%	6	24	200	+	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.5	-	100
	マンデス	100			200		1	2	6	0	0	0	2.0	1.5	-	2.0	-	62.9
	トロピン	125†			200		1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	-	2.0	-	55.6
	原体	150†			200		3	4	5	0	0	0	4.5	3.5	-	3.0	-	31.8
	陽性対照 (CP)	10			200		13	64	55	0	0	0	41.5	38.5	+	0.0	-	53.3
試 験 2	溶媒対照 (DMSO)	1%	24	24	200	-	1	2	0	0	0	1.5	1.0	-	0.5	-	100	
	マンデス	3.91			200		2	1	0	0	1	0	2.0	1.0	-	0.0	-	70.7
	トロピン	7.81			200		3	4	1	0	0	0	4.0	2.5	-	0.0	-	65.1
	原体	15.6			200		2	1	0	0	0	0	1.0	0.5	-	0.0	-	48.3
	陽性対照 (MMC)	0.02			200		4	29	10	0	1	0	19.5	18.0	+	0.0	-	85.8
	溶媒対照 (DMSO)	1%	6	24	200	+	2	0	0	0	0	1.0	0.0	-	0.0	-	100	
	マンデス	100			200		1	0	1	0	0	0	1.0	0.5	-	0.5	-	77.1
	トロピン	125†			200		1	4	3	0	1	0	3.0	2.5	-	2.5	-	61.6
	原体	150†			200		1	4	0	0	0	0	2.5	2.0	-	1.5	-	46.2
	陽性対照 (CP)	10			200		6	58	61	0	0	0	46.0	45.5	+	0.0	-	56.3

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) : 10 個以上の異常を持つ細胞

b) : - ; 陰性 (5%未満)、± ; 疑陽性 (5%以上、10%未満)、+ ; 陽性 (10%以上)

c) : 倍数体細胞および核内倍加細胞の割合

† : 処理開始時に析出が認められた。

(3) マンデストロビン原体のチャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた遺伝子突然変異試験
(資料 10-3)

試験機関: Harlan Cytotest Cell Research GmbH

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010 年

検体: マンデストロビン原体

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、6-チオグアニン (6-TG) 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) に溶解して用いた。試験は 2 連制とし、試験 I (S9 mix 存在下および非存在下)、および追加して実施した試験 IA (S9 mix 存在下) では、細胞を検体で 4 時間処理した。試験 II では S9 mix 存在下で 4 時間、S9 mix 非存在下で 24 時間処理した。

用量設定根拠:

結果: 結果を次表に示した。

試験 I の S9 mix 存在下の 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、試験 IA の S9 mix 存在下の 32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および試験 II の S9 mix 存在下の 144.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、2 連中片方のフラスコのみで、対応する溶媒対照群の 3 倍を超える突然変異率の増加が認められた。しかしながら、対応する陰性対照群の突然変異率との比較では 3 倍を超える増加は認められなかった。また、これらの突然変異率の 2 連のフラスコの平均値では溶媒対照群の突然変異率の平均値の 3 倍を超える増加は認められず、かつ

対照群の背景値の範囲内 ($0.6 \sim 31.7 / 10^6$ 細胞) であった。さらに、これらの突然変異率の増加は、線形回帰分析 (最小二乗法) において統計学的に有意な用量相関性を示さなかったことから、これらの増加は溶媒対照群の突然変異率 ($6.5 \sim 7.9 / 10^6$ 細胞) が低いことに起因するものであり、検体処理との関連性はないと判断された。

一方、陽性対照物質であるエチルメタンサルホン酸および 7,12-ジメチルベンズアントラセンでは明らかな突然変異率の増加が認められた。

以上の結果から、マンデストロビン原体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で突然変異誘発性を有しないと判断された。

試験 I (上段: フラスコ I、下段フラスコ II)

薬物	濃度 (μg/mL)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} /10 ⁶ 細胞 (2連の平均値) [†]
陰性対照 (培地)	0	4	-	100.0 100.0	100.0 100.0	20.1 12.9 (16.5)
溶媒対照 (DMSO)	0	4	-	100.0 100.0	100.0 100.0	22.7 9.3 (16.0)
マンデストロピン原体	1.0	4	-	90.7 87.6	109.0 91.6	15.0 7.7 (11.4)
				87.3 86.3	107.4 81.2	19.8 11.9 (15.9)
	4.0	4	-	65.6 83.2	100.2 103.8	24.8 6.0 (15.4)
				25.8 58.6	96.9 90.4	11.5 9.7 (10.6)
	8.0	4	-	5.9 42.4	99.3 92.5	13.3 7.8 (10.6)
				4.3 11.8	101.9 79.5	4.4 20.9 (12.7)
陽性対照 (EMS)	150.0	4	-	90.8 89.2	82.5 92.8	168.2* 84.2* (126.2)
陰性対照 (培地)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	7.8 23.2 (15.5)
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	11.4 7.9 (9.7)
マンデストロピン原体	8.0	4	+	97.6 100.5	89.1 94.0	12.9 25.0 (19.0)
				94.7 97.8	82.2 90.9	9.0 13.6 (11.3)
	32.0	4	+	98.7 96.8	93.5 100.5	8.2 11.7 (10.0)
				96.3 96.1	111.0 98.4	21.0 13.3 (17.2)
	128.0	4	+	67.4 81.5	86.6 105.1	15.5 22.3 (18.9)
63.0 70.8				73.4 83.5	528.9* 849.8* (689.4)	
陽性対照 (DMBA)	1.1	4	+	63.0 70.8	73.4 83.5	528.9* 849.8* (689.4)

a) 相対細胞生存率 = (検体処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の検体処理直後の生存コロニー数) × 100、2 反復の平均値

b) 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) × 100、2 反復の平均値

c) 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 / (接種細胞数 × コロニー形成率)) × 100、10 反復の平均値

EMS : エチルメタンサルホン酸

DMBA : 7, 12-ジメチルベンズアントラセン

*: 溶媒対照群および陰性対照群の突然変異率の 3 倍以上に、かつ背景値の範囲 (0.6~31.7 /10⁶細胞) を超える増加

†[申請者注]: 2 連の平均値は報告書に記載されていないが、個別データより算出して記載した。

試験 IA (上段:フラスコ I、下段フラスコ II)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} / 10^6 細胞 (2連の平均値) [†]
陰性対照 (培地)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	17.6 16.2 (16.9)
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	6.5 12.6 (9.6)
マンデス トロピン 原体	16.0	4	+	91.8 99.7	97.7 92.2	9.7 9.6 (9.7)
	32.0	4	+	85.7 100.4	81.9 99.9	20.2 17.3 (18.8)
	64.0	4	+	99.9 101.7	85.8 88.3	8.7 29.4 (19.1)
	128.0	4	+	11.0 64.5	97.8 87.9	9.4 15.8 (12.6)
	144.0	4	+	2.8 7.2	82.7 85.0	2.7 5.1 (3.9)
陽性対照 (DMBA)	1.1	4	+	75.0 80.0	69.6 80.7	761.8* 827.8* (794.8)

a) 相対細胞生存率 = (検体処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の検体処理直後の生存コロニー数) \times 100、2 反復の平均値

b) 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) \times 100、2 反復の平均値

c) 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)) \times 100、10 反復の平均値

DMBA : 7, 12-ジメチルベンズアントラセン

*: 溶媒対照群および陰性対照群の突然変異率の 3 倍以上に、かつ背景値の範囲 (0.6~31.7 / 10^6 細胞) を超える増加

†[申請者注]: 2 連の平均値は報告書に記載されていないが、個別データより算出して記載した。

試験 II (上段:フラスコ I、下段フラスコ II)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} / 10^6 細胞 (2連の平均値) [†]
陰性対照 (培地)	0	24	—	100.0 100.0	100.0 100.0	12.4 18.4 (15.4)
溶媒対照 (DMSO)	0	24	—	100.0 100.0	100.0 100.0	15.5 11.6 (13.6)
マンデス トロピン 原体	7.5	24	—	120.9 97.1	97.9 96.3	10.3 8.7 (9.5)
	15.0	24	—	176.4 94.3	101.6 98.1	12.7 6.4 (9.6)
	30.0	24	—	76.0 56.0	99.1 99.2	8.2 10.5 (9.4)
	40.0	24	—	46.0 35.3	98.2 95.5	11.7 11.4 (11.6)
	50.0	24	—	20.0 8.9	96.5 93.0	15.8 15.2 (15.5)
陽性対照 (EMS)	150.0	24	—	166.2 97.8	97.1 98.2	352.2* 396.4* (374.3)
陰性対照 (培地)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	10.8 18.2 (14.5)
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	9.3 7.8 (8.6)
マンデス トロピン 原体	16.0	4	+	98.8 105.2	103.1 98.8	10.0 18.8 (14.4)
	32.0	4	+	99.2 107.5	98.7 96.1	9.1 11.6 (10.4)
	64.0	4	+	98.3 104.3	100.3 93.9	13.6 8.8 (11.2)
	128.0	4	+	60.1 79.3	98.2 100.8	10.9 22.5 (16.7)
	144.0	4	+	10.9 27.5	102.7 94.4	6.3 38.0 (22.2)
陽性対照 (DMBA)	1.1	4	+	38.3 41.4	97.8 76.6	675.2* 816.8* (746.0)

a) 相対細胞生存率 = (検体処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の検体処理直後の生存コロニー数) \times 100、2 反復の平均値

b) 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) \times 100、2 反復の平均値

c) 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)) \times 100、10 反復の平均値

EMS : エチルメタンサルホン酸

DMBA : 7,12-ジメチルベンズアントラセン

*: 溶媒対照群および陰性対照群の突然変異率の 3 倍以上に、かつ背景値の範囲 (0.6~31.7 / 10^6 細胞) を超える増加

†[申請者注]: 2連の平均値は報告書に記載されていないが、個別データより算出して記載した。

(4) マンデストロビン原体のマウスを用いた小核試験

(資料 10-4)

試験機関：住友化学株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：2010 年

検体：マンデストロビン原体

検体純度：

供試動物：CD-1 (ICR) 系雄マウス、8 週齢、体重 32.4~39.2 g、1 群 5 匹

試験方法：検体を 0.5%メチルセルロース(MC)水溶液に懸濁し、500、1000 および 2000 mg/kg の投与量で、単回強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。なお、溶媒対照群には 0.5%MC を、陽性対照群にはシクロホスファミド 60 mg/kg (溶媒：精製水) を同様に投与した。

投与 24 時間後 (500、1000 および 2000 mg/kg) および 48 時間後 (2000 mg/kg) に各動物から大腿骨の骨髄を採取して、スライドガラス上にメタノールで固定後、5%ギムザ溶液で染色し骨髄標本を作製した。

各個体あたり 2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する細胞の出現頻度を調べた。また、骨髄細胞に対する毒性を調べるため、各個体あたり 1000 個の赤血球 (多染性赤血球および正染性赤血球) を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

投与量設定根拠：

結果：骨髄標本の観察結果を次頁の表に示した。

検体投与群に死亡および毒性症状は認められなかった。いずれの投与量、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溶媒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。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合にも有意な変化は認められず、検体は骨髄細胞に毒性を示さないと考えられた。

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、顕著な増加が認められた。

以上の結果から、マンデストロビン原体は本試験条件下において、マウス骨髄細胞に対して小核を誘発しないと判断された。

観察結果

採取時間 (h)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE ^{a)} % (平均値±SD)	PCE/ (PCE+NCE) ^{b)} % (平均値±SD)
24	溶媒対照 (0.5% MC)	0 ^{c)}	5	0.35±0.158	52.0±4.66
	マンデストロピ ン原体	500	5	0.28±0.057	54.7±5.10
		1000	5	0.42±0.211	55.9±2.08
		2000	5	0.42±0.160	57.1±2.41
	陽性対照 (CP)	60	5	4.09±0.783**	44.5±5.18*
48	溶媒対照 (0.5% MC)	0 ^{c)}	5	0.29±0.185	50.3±3.91
	マンデストロピ ン原体	2000	5	0.33±0.120	51.4±6.67

小核を有する多染性赤血球の出現頻度については Kastenbaum と Bowman の方法で行い、
全赤血球に対する多染性赤血球の割合については t 検定を行った。

* : P < 0.05、** : P < 0.01

PCE : 多染性赤血球 NCE : 正染性赤血球 MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

MC : メチルセルロース CP : シクロホスファミド

a) 1 個体につき 2000 個の多染性赤血球を観察した。

b) 1 個体につき 1000 個の赤血球を観察した。

c) 10 mL/kg

11. 生体機能に及ぼす影響

マンデストロピン原体の生体機能に及ぼす影響

(資料 11)

試験機関：三菱化学メディエンス株式会社
[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

検体：マンデストロピン原体

検体純度：

(1) ラットの循環器系に対する作用

供試動物：Cr1:CD(SD)雄ラット、6週齢、体重 126.5～141.2 g (入荷時)、1群各 6 匹

投与方法：フレキシブル胃管を装着したディスポーザブルシリンジを用いて、検体を 200、600 および 2000 mg/kg の用量で胃内に強制的に単回投与した。対照群には媒体 (0.5w/v%メチルセルロース 400 溶液) を投与した。投与液量は 10 mL/kg とし、投与当日に測定した体重を基に算出した。

測定方法：投与前、投与開始後 1、2、4、8 および 24 時間にラット・マウス用無加温型非観血式血圧計を用いて、無麻酔下で収縮期血圧および心拍数を測定した。投与前に 17 時間 15 分～19 時間 4 分絶食させ、引き続き投与後 8 時間まで絶食とした。投与開始前から投与後 8 時間まで絶水とした。投与後 24 時間の測定中は絶食および絶水とした。

結果：検体投与群の投与後 1～24 時間の収縮期血圧および心拍数の平均値に対照群と比較して有意な差はなかった。

(2) ラットの呼吸器系に対する作用

供試動物：Cr1:CD(SD)雄ラット、6週齢、体重 129.2～145.2 g (入荷時)、1群各 8 匹

投与方法：フレキシブル胃管を装着したディスポーザブルシリンジを用いて、検体を 200、600 および 2000 mg/kg の用量で胃内に強制的に単回投与した。対照群には媒体 (0.5w/v%メチルセルロース 400 溶液) を投与した。投与液量は 10 mL/kg とし、投与当日に測定した体重を基に算出した。

測定方法：投与前、投与開始後 1、2、4、8 および 24 時間に呼吸機能測定装置を用いた whole

body plethysmography 法にて、無麻酔下で1分間の呼吸数、1回換気量および分時換気量を測定した。投与前に17時間23分～17時間48分絶食させ、引き続き投与後8時間まで絶食とした。測定中（投与終了直後から投与後8時間まで）は絶水とした。投与24時間の測定中は絶食および絶水とした。

結果：検体投与群の1分間の呼吸数、1回換気量および分時換気量の平均値に対照群と比較して有意な差はなかった。

以上の結果より、マンデストロビン原体はラットの血圧、心拍数および呼吸に対して2000 mg/kgの用量まで影響を及ぼさなかった^{申請者注1}。

申請者注1：生体機能に及ぼす影響に関する試験の検査項目について

生体機能に及ぼす影響に関する試験において、通常実施すべき検査項目として症状観察、中枢神経系、呼吸・循環器系、腎機能がガイドライン¹⁾に定められているが、マンデストロビン原体のラットにおける急性経口毒性試験(資料1-1)の結果、急性毒性は弱い(LD₅₀>2000 mg/kg)ことから、ガイドラインの運用に関する通知²⁾に従い、最小限の検査項目(呼吸・血圧に対する影響、状態観察)を対象とした。

また、状態観察については本剤のラットを用いた急性神経毒性試験(資料4)の総合機能観察(FOB)により詳細に評価されていることから、生体機能に及ぼす影響に関する試験において検査対象としなかった。同通知においても、通常実施すべき項目のうち他の毒性試験の結果等から十分影響が考察できる項目については検査を行う必要はないとされている。以上のことから、本剤における生体機能に及ぼす影響に関する試験の検査項目としては、「血圧及び心拍数」および「呼吸」のみを実施した。

参考資料：

- 1) 12農産第8147号(平成12年11月24日付)「農薬の登録申請に係る試験成績について」、別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」、生体機能影響試験(2-2-1)
- 2) 13生産第3986号(平成13年10月10日付)「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について、別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」について、生体機能影響試験(2-2-1)

マンデストロピン原体の「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 (媒体)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
循環器系 収縮期血圧 心拍数	ラット	経口 (0.5 w/v%メチル セルロース溶液)	0、200、 600、 2000	雄 6	>2000	2000	検体投与による影 響は認められなか った。
呼吸器系 呼吸数 1回換気量 分時換気量	ラット	経口 (0.5 w/v%メチル セルロース溶液)	0、200、 600、 2000	雄 8	>2000	2000	検体投与による影 響は認められなか った。

12. 補足試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

