ゼオマイン筋注用 50 単位
ゼオマイン筋注用 100 単位
ゼオマイン筋注用 200 単位

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.6　毒性試験の概要文

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 4
2.6.6.1　まとめ 4
2.6.6.2　単回投与毒性試験 12
2.6.6.3　反復投与毒性試験 16
2.6.6.4　遺伝毒性試験 21
2.6.6.5　がん原性試験 21
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 21
2.6.6.7　局所刺激性試験 28
2.6.6.8　その他の試験 29
2.6.6.9　考察及び結論 31
2.6.6.10　図表 33
2.6.6.11　参考文献 33

略語一覧表

略号	英名	日本語・定義
CD / CD-1	-	マウスの系統名
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
LD_{50}	Lethal Dose, 50%	50%致死量
LDU	Lethal Dose Unit	致死量単位
NZW	New Zealand White	ウサギの系統名
SD	Sprague-Dawley	ラットの系統名
U	Unit(s)	単位

略号一覧表（製剤・有効成分）

略号	英名	日本語・定義
Botox®	Botox® for Injection	ボトックス® 複合タンパク質を含むA型ボツリヌス毒素［一般名：A型ボツリヌス毒素（JAN)］を有効成分とする注射剤 （製造販売元：グラクソ・スミスクライン(株) 他）
Dysport®	Dysport® for Injection	複合タンパク質を含むA型ボツリヌス毒素 ［一般名：abobotulinumtoxinA（USAN)］を有効成分とする注射剤 （製造販売元：Ipsen 他）
NT 101	incobotulinutoxinnA	XEOMIN®の有効成分 複合タンパク質を含まないA型ボツリヌス毒素 一般名：インコボツリヌストキシンA（JAN）
NT 201 XEOMIN®	XEOMIN 50 units for Intramuscular injection XEOMIN 100 units for Intramuscular injection XEOMIN 200 units for Intramuscular injection	インコボツリヌストキシンAを有効成分とする注射剤 NT 201はXEOMIN®の治験成分記号 販売名：ゼオマイン筋注用50単位 ゼオマイン筋注用100単位 ゼオマイン筋注用200単位

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

NT 201 の毒性評価は ICH S6（R1）ガイドラインを参考に、NT 201 及び NT 101 を用いて、主要な試験を GLP に準拠して実施した（表 2.6.6-1）。サルを用いた 13 週間及び 9 カ月間の反復投与毒性試験は 4 週間の投与間隔で行われた。ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験は、主に 1 又は 2 週間の投与間隔で行われた。NT 201 の薬理作用である筋弛緩作用の効果は、臨床において通常 12 から 16 週間で消失するとされ、10 週間未満の再投与は避けることとされており、毒性試験における用法及び投与間隔は、ヒトでの安全性を検討するのに適切であると考えられた。また、A 型ボツリヌス毒素は非常に力価が高く、生体試料中のごく微量の A 型ボツリヌス毒素を特異的かつ高感度に定量することは技術的に困難である。そのため、NT 201 及び NT 101 についてトキシコキネティクス試験を実施せず、一般状態観察、摂餌量測定及び体重測定で認められた変化を、全身暴露の代替指標とした。なお、NT 201 及び NT 101 の力価は、マウス腹腔内投与によって算出された LD_{50} を 1 単位と規定し、本文中では「致死量単位：LDU」で示した。毒性試験の投与量は、腹腔内投与による単回投与毒性試験を除き、LDU/kg 又は LDU/animal で表した。また、一部の試験に用いた市販の A 型ボツリヌス毒素製剤についても、マウス腹腔内投与 LD_{50} が 1 単位と規定されており、投与量は LDU/kg 又は LDU/animal で表した。

単回投与毒性試験は、NT 201 又は NT 101 を用いて、筋肉内、経口、静脈内及び腹腔内投与で実施した。動物種としてマウス及びラットを用いた。NT 201 又は NT 101 投与後、これらの薬理作用である筋弛緩作用に関連する変化又は自律神経伝達の遮断による全身的影響と考えられる変化として、運動性低下、運動失調、筋緊張低下、立毛、眼瞼下垂、流涙、散瞳、体温低下又は呼吸困難などが認められ、高用量では死亡例も認められた。死亡は呼吸筋麻痺によるものと考えられた。臨床投与経路である筋肉内投与で、NT 201 をマウスに単回投与したときの概略の致死量は 50 LDU/kg であった。

反復投与毒性試験では、サルを用いて、NT 201 を 4 週間間隔で 13 週間又は 9 カ月間筋肉内投与した。その結果、投与部位である左腓腹筋では、本剤の薬理作用に関連した変化として筋萎縮及び筋重量低値などが認められ、一般状態変化として跛行も認められた。投与部位の病理組織学的検査では、筋線維萎縮及び線維化などが認められた。また高用量群では、薬理作用に関連する全身性の一般状態変化として削痩及び体重低下も認められた。さらに、非投与部位である骨格筋でも筋重量低値、病理組織学的変化として筋線維萎縮などが認められた。非投与部位の骨格筋に認められた所見は、NT 201 が投与部位に及ぼした影響に伴うと思われる活動性低下による二次的な作用（廃用性筋萎縮）又は NT 201 の投与部位以外の筋への拡散による直接影響の可能性が疑われた。サルを用いた 9 カ月間反復投与毒性試験では、6 カ月間の休薬期間により、投与部位及び非投与部位の骨格筋の変化について回復性が認められた。13 週間及び 9 カ月間反復投与毒性試験の無毒性量は、それぞれ 8 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 4 回投与）及び 12 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 10 回投与）と考えられ、1 回あたりの臨床最大用量 400 U（6.67 U/kg/回）の 1.2 及び 1.8 倍であった。

またサルを用いて、16 LDU/kg/回の NT 201 を 4 週間、8 週間又は 12 週間の投与間隔でそれぞれ計 4 回筋肉内投与したときの毒性を比較した。その結果、いずれの投与間隔でも薬理作用に関連する変化が認められ、4 週間間隔投与では全身毒性として体重低下が認められた。全身毒性が認められない投与間隔は 8 週間及び 12 週間間隔と考えられた。

遺伝毒性及びがん原性試験は、ICH S6（R1）ガイドラインを踏まえて実施しなかった。なお、反復投与毒性試験において前がん病変は認められなかった。また、NT 201 の欧米での臨床使用成績では、投与との関連性が疑われる腫瘍発生の報告はない。

生殖発生毒性試験は、ラット及びウサギを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。また、ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、NT 201 を連日投与する群も設けた。いずれの試験も親動物では反復投与毒性試験と同様の変化が認められた。

ウサギを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、親動物で後肢麻痺、体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたが、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する影響は認められなかった。親動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量は 3.5 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）と考えられた。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物で投与肢の跛行、体重増加抑制、体重低下、摂餌量減少、投与部位である左腓腹筋の小型及び重量低値が認められた。胚・胎児に投与の影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 10 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）及び 6 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）と考えられた。また、母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量は、30 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）、18 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）及び 7 LDU/kg/回（妊娠 6 日から 19 日にかけての連日投与）と考えられた。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物で流産、後肢麻痺、運動障害、不安定姿勢、跛行、糞量減少、体重増加抑制、体重低下及び摂餌量減少が認められた。胚・胎児に投与の影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、母動物の生殖機能に対する無毒性量は 2.5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）及び胚・胎児に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）と考えられた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、投与部位の筋萎縮、投与肢の跛行及び投与肢に隣接する腹部に限局性膨隆が認められた。限局性膨隆は投与部位の変化と同様に薬理作用に関連していると考えられた。出生児については、離乳前後の発達に NT 201 投与の影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）、母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する無毒性量は 20 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）及び 3 LDU/kg/回（妊娠 6 日から分娩後 21 日にかけて連日投与）と考えられた。

幼若動物を用いた試験は、3 週齢のラットを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。その結果、離乳後の発達に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 5 回投与）未満と考えられた。

局所刺激性については、ウサギを用いた眼刺激性試験を実施した。その結果、眼粘膜に対する刺激性は認められなかった。また、筋肉内投与による反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験、並びに皮内投与による抗原性試験で、投与部位の肉眼観察又は病理組織学的検査により、投与部位の局所刺激性を評価した。その結果、明白な局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

抗原性については、ウサギを用いて皮内への間歇投与で実施した。その結果、NT 201 は中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体を誘導しなかった。また、NT 101 を用いた in vitro 溶血性試験では、ヒト血液に対する溶血性は認められなかった。

一部の単回及び反復投与毒性試験では、NT 201 及びボトックス®の毒性像を比較した。その結果、NT 201 はボトックス®と同様の毒性プロファイルを有すると考えられた。

表 2.6.6-1 毒性試験一覧

試験の種類	投与物質	投与経路	動物種	投与量	試験番号	GLP 適用
単回投与毒性試験						
単回投与	NT 201 ボトックス®	筋肉内	CD 系マウス	0、5、50、150 LDU/kg	[redacted]	適
単回投与	NT 101	経口	CD-1 系マウス	0、100、1000、10000 LDU/animal	[redacted]	適
単回投与	NT 101	経口又は 腹腔内	CD-1 系マウス	NT 101（経口投与） 0、1000、10000、100000 LDU/animal NT 101（腹腔内投与、陽性対照） 1.5、3.0 LDU/animal	[redacted]	適
単回投与	NT 201 ボトックス® Dysport®	静脈内	CD-1 系マウス	0、9、20、30、45、68 LDU/kg	[redacted]	適
単回投与	NT 101	腹腔内	CD-1 系マウス	2.500、3.125、3.910、4.890、6.110、7.640、 9.550 pg/animal	[redacted]	適
単回投与	NT 201	腹腔内	CD-1 系マウス	3.910、4.890、6.110、7.640、9.550、 11.940 pg/animal	[redacted]	適
単回投与	NT 201	筋肉内	SD 系ラット	0、16、32、64 LDU/kg	[redacted]	否
単回投与	NT 101 A 型 ボツリヌス 毒素複合体 a)	経口又は 腹腔内	SD 系ラット	NT 101（経口投与） 0、300000、1000000、3000000 LDU/animal A 型ボツリヌス毒素複合体 (a)（経口投与） 4000、8000、12000 LDU/animal NT 101（腹腔内投与、陽性対照） 10、15 LDU/animal	[redacted]	適

a）複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素複合体

表 2.6.6-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類	投与物質	投与経路	動物種	投与量	試験番号	GLP 適用
反復投与毒性試験						
重要な試験以外の試験						
28 週間 [(a)]	NT 201 ボトックス® Dysport®	筋肉内	CD-1 系マウス	NT 201 及びボトックス® 0.262、0.328、0.410、0.512、0.641 LDU/animal/回 Dysport® 0.640、0.800、1.000、1.250 及び 1.562 LDU/animal/回 （6 及び 13 週間間隔で計 3 回投与）	[redacted]	適
約 3 又は 5 週間 [(a)]	NT 201	筋肉内	NZW 系ウサギ	2.5、3.5、5、10、20、40 LDU/kg/回 （2 週間間隔で最大 3 回投与）	[redacted]	否
重要な試験						
13 週間 [(a)]	NT 201 ボトックス®	筋肉内	カニクイザル	0、4、8、16 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回投与）	[redacted]	適
9 カ月間 [(a)]	NT 201	筋肉内	カニクイザル	0、4、8、12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回投与）	[redacted]	適
13、25 又は 37 週間 [a)]	NT 201	筋肉内	カニクイザル	0、16 LDU/kg/回 （4、8 又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回投与）	[redacted]	適
遺伝毒性試験	該当試験なし					
がん原性試験	該当試験なし					

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。

表 2.6.6-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類	投与物質	投与経路	動物種	投与量	試験番号	GLP 適用
生殖発生毒性試験						
受胎能及び初期胚発生	NT 201	筋肉内	NZW 系ウサギ	0、1.25、2.5、3.5 LDU/kg/回 （雄：交配前 2 週間から剖検前日まで 2 週間間隔で計 5 回投与、雌：交配前 2 週間から妊娠 13 日まで約 2 週間間隔で計 3 回投与）	[redacted]	適
胚・胎児発生に関する試験						
重要な試験以外の試験						
妊娠ラットを用いた用量設定試験	NT 201	筋肉内	SD 系妊娠ラット	0、3、10、30 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日に投与）	[redacted]	否
重要な試験						
胚・胎児発生（ラット）	NT 201	筋肉内	SD 系妊娠ラット	3、10、30 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日に投与） 2、6、18 LDU/kg/回 （妊娠 6、9、12、16、19 日に投与） 0、7 LDU/kg/回 （妊娠 6 から 19 日に連日投与）	[redacted]	適
胚・胎児発生（ウサギ）	NT 201	筋肉内	NZW 系妊娠ウサギ	0、1.25、2.5、5 LDU/kg/回 （妊娠 6、18、28 日に投与）	[redacted]	適
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	NT 201	筋肉内	SD 系妊娠ラット	2、6、20 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日、分娩後 6、13、20 日に投与） 0、3 LDU/kg/回 （妊娠 6 日から分娩後 21 日に連日投与）	[redacted]	適

表 2.6.6-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類	投与物質	投与経路	動物種	投与量	試験番号	GLP 適用
幼若動物を用いた試験						
重要な試験以外の試験						
離乳後幼若ラット を用いた用量設定試験	NT 201	筋肉内	SD 系ラット （投与開始時 3 週齢）	10、20、30 LDU/kg/回 （2 週間間隔で計 3 回投与） 10 LDU/kg/回 （1 週間間隔で計 5 回投与）	[redacted]	否
重要な試験						
離乳後幼若ラット の毒性試験	NT 201	筋肉内 a)	SD 系ラット （投与開始時 3 週齢）	0、5、10、30 LDU/kg/回 （2 週間間隔で計 5 回投与）	[redacted]	適
局所刺激性試験						
眼刺激性	NT 201	結膜嚢内	Himalayan 系 ウサギ	100 LDU/0.1 mL/匹	[redacted]	適
投与部位 局所刺激性	NT 201	筋肉内 又は皮内	CD-1 系マウス SD 系ラット NZW 系ウサギ カニクイザル SD 系妊娠ラット NZW 系妊娠ウサギ	該当試験の投与量を参照のこと （筋肉内投与による反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験、並びに皮内投与による抗原性試験で、投与部位の肉眼観察又は病理組織学的検査により評価）	[redacted]	適 b)

a）一部の動物の最終投与は皮下投与で実施した。
b）試験番号[redacted]は非 GLP として実施した。試験番号[redacted]及び[redacted]の抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

表 2.6.6-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類	投与物質	投与経路	動物種	投与量	試験番号	GLP 適用
抗原性試験						
10 週間 a)	NT 201 ボトックス®	皮内	NZW 系ウサギ	25 LDU/animal/回 （2 週間間隔で計 5 回投与）	[redacted]	適 b)
36 週間 a)	NT 201 ボトックス® Dysport®	皮内	NZW 系ウサギ	NT 201 及びボトックス® 16（1-8 回目）又は 25 LDU/animal（9 回目） （2-10 週間間隔で計 9 回投与） Dysport® 40（1-5 回目）又は 20 LDU/animal（6 回目） （2 又は 5 週間間隔で計 6 回投与）	[redacted]	適 b)
その他の試験						
溶血性	NT 101	In vitro	ヒト血液	0、100、200、400 LDU/mL （終濃度として）	[redacted]	適

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。
b）抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は、NT 201 又は NT 101 を用いて、筋肉内、経口、静脈内及び腹腔内投与で実施した。動物種としてマウス及びラットを用いた。

2.6.6.2.1　NT 201 のマウスにおける筋肉内投与による単回投与毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-1、概要表：2.6.7.5）

NT 201 を CD 系マウス（入荷時 23 又は 24 日齢）の各群雌雄 10 匹の腓腹筋に単回筋肉内投与し、急性毒性を評価した。投与量は、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、5、50 及び 150 LDU/kg とした。A 型ボツリヌス毒素製剤のボトックス®と毒性像を比較するため、NT 201 と同じ投与量及び投与経路でマウスにボトックス®を投与した。投与後 14 日間、死亡有無の確認、一般状態観察及び体重測定を行い、最終日に剖検を行った。

NT 201 では、50 LDU/kg 群の雄 1 例が投与後 5 日目に死亡した。また、150 LDU/kg 群の全例が投与後 3 から 8 日目に死亡した。一般状態観察では、50 及び 150 LDU/kg 群で運動性低下、運動失調、筋緊張低下、眼瞼下垂及び呼吸困難が投与後 3 日目以降に観察された。体重測定では、50 及び 150 LDU/kg 群で、体重増加抑制及び体重低下が認められた。剖検では、150 LDU/kg 群で、脱水、閉眼及び削痩が認められた。

ボトックス®では、150 LDU/kg 群の全例が投与後 4 から 7 日目に死亡した。一般状態観察、体重測定及び剖検では、50 又は 150 LDU/kg 群で、NT 201 と同様の所見が認められた。

本試験条件下、マウスに NT 201 及びボトックス®を単回筋肉内投与したとき、NT 201 の 50 LDU/kg 群の雄 1 例の死亡を除き、同様な所見が認められた。NT 201 及びボトックス®の概略の致死量は、それぞれ 50 LDU/kg 及び 150 LDU/kg と考えられた。また、マウスにおける単回筋肉内投与 LD_{50} は、NT 201 は 41（雄）及び 87 LDU/kg（雌）、ボトックス®は 87 LDU/kg（雌雄）と考えられた。

2.6.6.2.2　NT 101 のマウスにおける経口投与による単回投与毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-2、概要表：2.6.7.5）

NT 101 を CD-1 系マウス（入荷時 24 日齢）の各群雄 10 匹に単回経口投与し、急性毒性を評価した。投与量は 0（0.1%ウシ血清アルブミン含有 10%ショ糖水溶液）、100、1000 及び 10000 LDU/animal とした。投与後 14 日間、死亡有無の確認、一般状態観察及び体重測定を行い、最終日に剖検を行った。

いずれの投与量でも、NT 101 投与に関連する死亡、一般状態変化、体重変化及び剖検所見は認められなかった。

本試験条件下、マウスに NT 101 を単回経口投与したとき、10000 LDU/animal まで NT 101 投与に関連する変化は認められなかった。概略の致死量及び単回経口投与 LD_{50} は 10000 LDU/animal より大きいと考えられた。

2.6.6.2.3　NT 101 のマウスにおける経口投与による単回投与毒性試験（追加試験）

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-3、概要表：2.6.7.5）

NT 101 を CD-1 系マウス（入荷時 24 日齢）の各群雄 10 匹に単回経口投与し、急性毒性を追加評価した。NT 101 の投与量は、0（0.1%ウシ血清アルブミン含有 10%ショ糖水溶液）、1000、10000 及び 100000 LDU/animal とした。投与後 14 日間、死亡有無の確認、一般状態観察及び体重測定を行い、最終日に剖検を行った。また、陽性対照群として NT 101 の 1.5 及び 3.0 LDU/animal を単回腹腔内投与した。

100000 LDU/animal 群の 4 例が投与後 2 日目までに死亡した。一般状態観察では、100000 LDU/animal 群で眼瞼腫脹、立毛、運動性低下、眼窩周囲の脱毛、筋緊張低下及び体温低下が認められた。体重測定では、10000 LDU/animal から体重増加抑制が認められ、100000 LDU/animal では統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。剖検では、すべての投与群で投与に関連する所見は認められなかった。

陽性対照群では、1.5 LDU/animal 群の 9 例及び 3.0 LDU/animal 群の全例が、それぞれ投与後 2 及び 1 日目までに死亡した。

本試験条件下、マウスに NT 101 を単回経口投与したとき、1000 LDU/animal では NT 101 投与に関連する変化は認められなかった。10000 LDU/animal から体重増加抑制、100000 LDU/animal で一般状態変化及び死亡が認められた。単回経口投与 LD_{50} は約 100000 LDU/animal と考えられた。

2.6.6.2.4　NT 201 のマウスにおける静脈内投与による単回投与毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-4、概要表：2.6.7.5）

NT 201、ボトックス®及び Dysport®を CD-1 系マウス（馴化開始時 28 日齢）の各群雄 10 匹に単回静脈内投与し、急性毒性を比較評価した。投与量は 0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、9、20、30、45 及び 68 LDU/kg とした。投与後 14 日間、死亡有無の確認、一般状態観察及び自発運動量測定（投与 24、48 及び 72 時間後）を行った。

NT 201 では、45 LDU/kg 群の 2 例が投与後 4 日目に、68 LDU/kg 群の全例が投与後 2 から 4 日目に死亡した。ボトックス®では、45 LDU/kg 群の 3 例が投与後 3 から 5 日目に、68 LDU/kg 群の全例が投与後 2 から 4 日目に死亡した。Dysport®では、68 LDU/kg 群の 8 例が投与後 2 から 6 日目に死亡した。

一般状態観察では、3 つの製剤で同様の所見が認められた。NT 201 では、20 LDU/kg で立毛、30 LDU/kg では立毛に加えて体温低下、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下及び散瞳、45 及び 68 LDU/kg では 30 LDU/kg でのいくつかの所見に加えて運動性低下及び運動失調も認められた。ボトックス®では 30 LDU/kg 以上で、立毛、体温低下、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下、散瞳、運動性低下及び運動失調が認められた。Dysport®では 20 LDU/kg から体温低下、30 LDU/kg

以上で立毛、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下、散瞳、運動性低下又は運動失調が認められた。

自発運動測定では、いずれの製剤も、20 LDU/kg の投与 48 時間後に静的及び動的動作回数の減少が認められ、30 LDU/kg 以上では投与 24 時間後から静的及び動的動作回数が減少した。

本試験条件下、マウスに NT 201、ボトックス®及び Dysport®を単回静脈内投与したとき、同様な一般状態変化を示した。マウスにおける単回静脈内投与の概算の LD_{50} は、NT 201 及びボトックス®は約 50 LDU/kg、Dysport®は 68 LDU/kg 未満と考えられた。

2.6.6.2.5　NT 101 のマウスにおける腹腔内投与による単回毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-5、概要表：2.6.7.5）

Schantz 及び Kautter らの方法 [1] に従い、NT 101 を CD-1 系マウス（試験開始時体重 19.5 から 23.2 g）の各群雄 10 匹に単回腹腔内投与し、LD_{50} を算出した。投与量は 2.500、3.125、3.910、4.890、6.110、7.640 及び 9.550 pg/animal とした。本試験は LD_{50} 算出を目的とし対照群を設けなかった。投与後 4 日間、死亡有無の確認及び一般状態観察を行った。

2.500、3.125 及び 3.910 pg/animal 群では、死亡例は認められなかった。4.890 及び 6.110 pg/animal 群では、それぞれ 3 例が投与後 48 時間以内に死亡した。7.640 pg/animal 群では、6 例が投与後 72 時間以内に死亡した。9.550 pg/animal 群では、8 例が死亡し、そのうち 5 例が投与後 24 時間以内、2 及び 1 例がそれぞれ投与後 48 及び 72 時間以内に死亡した。生存動物の一般状態観察において異常は認められなかった。

本試験条件下、マウスに NT 101 を単回腹腔内投与したとき、プロビット解析による LD_{50} は 6.9698 pg/animal であった。

2.6.6.2.6　NT 201 のマウスにおける腹腔内投与による単回投与毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-6、概要表：2.6.7.5）

Schantz 及び Kautter らの方法 [1] に従い、NT 201 を CD-1 系マウス（試験開始時体重 18.1 から 22.0 g）の各群雄 10 匹に単回腹腔内投与し、LD_{50} を算出した。投与量は 3.910、4.890、6.110、7.640、9.550 及び 11.940 pg/animal とした。本試験は LD_{50} 算出を目的とし対照群を設けなかった。投与後 4 日間、死亡有無の確認及び一般状態観察行った。

3.910 pg/animal 群では、死亡例は認められなかった。4.890 pg/animal 群では、5 例が投与後 72 時間以内に死亡した。6.110 pg/animal 群では、7 例が投与後 72 時間以内に死亡した。7.640、9.550 及び 11.940 pg/animal 群では、それぞれ 9、10 及び 9 例が投与後 48 時間後以内に死亡した。生存動物の一般状態観察において異常は認められなかった。

本試験条件下、マウスに NT 201 を単回腹腔内投与したとき、プロビット解析による LD_{50} は 5.37 pg/animal であった。

2.6.6.2.7　NT 201 のラットにおける筋肉内投与による用量設定試験（非 GLP）

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-7、概要表：2.6.7.5）

本試験では､NT 201 のラットにおける筋肉内投与による消化管輸送能評価（試験番号:[redacted]）のための用量設定を行った。NT 201 を SD 系ラット（投与時 6 から 7 週齢）の各群雄 3 匹の左腓腹筋に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、16、32 及び 64 LDU/kg の投与量で単回筋肉内投与し、投与後 4 日間、死亡有無の確認、一般状態観察、後肢麻痺症状評価（スコアリング）及び体重測定を行った。

すべての投与群で死亡は認められなかった。64 LDU/kg 群の動物は、体重低下及び重度麻痺のため、投与後 3 日目に安楽死の処置が取られた。

一般状態観察では、すべての投与群で、後肢麻痺に関連すると考えられる不安定姿勢及びこわばり運動が投与後 48 時間から又は投与後 72 時間に認められ、64 LDU/kg 群では運動性低下なども認められた。

後肢麻痺症状評価では、すべての投与群で投与肢の麻痺が認められた。この麻痺は投与後 24 時間から認められ、その重症度は投与後 48 から 96 時間に最大となった。

体重測定では、16 及び 32 LDU/kg 群で体重増加抑制、64 LDU/kg 群で体重低下が認められた。

以上の結果を考慮すると、NT 201 のラットにおける筋肉内投与による消化管輸送能評価（試験番号：[redacted]）の投与量として 8、16 及び 32 LDU/kg、また、charcoal meal 投与のタイミングとして、32 LDU/kg の NT 201 が最大の麻痺スコアを示した投与後 96 時間が適切と考えられた。

2.6.6.2.8　NT 101 のラットにおける経口投与による単回投与毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.1-8、概要表：2.6.7.5）

NT 101 及び複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素複合体（以下、A 型ボツリヌス毒素複合体）を SD 系ラット（投与時、雄 6 から 7 週齢、雌 7 から 8 週齢）の各群雌雄 5 匹に単回経口投与し、その毒性を比較した。NT 101 の投与量は 300000、1000000 及び 3000000 LDU/animal、A 型ボツリヌス毒素複合体の投与量は 4000、8000 及び 12000 LDU/animal に設定した。陰性対照群には溶媒（0.1%ヒト血清アルブミン及び 0.9% 塩化ナトリウム含有 20 mM リン酸緩衝液）を単回経口投与した。投与後 14 日間、死亡有無の確認、一般状態観察及び体重測定を行い、最終日に剖検を行った。また、陽性対照群として NT 101 の 10 及び 15 LDU/animal を単回腹腔内投与する群（各群雌 3 例）も設けた。

NT 101 の単回経口投与では、300000 LDU/animal 群の雄 1 例及び雌 3 例が投与後 2 日目に、1000000 LDU/animal 群の雄 3 例及び雌 2 例、並びに 3000000 LDU/animal 群の雌雄各 4 例が投与後 2 から 3 日目に死亡した。体重測定では、300000 LDU/animal 群の雌 2 例で体重増加抑制が認められた。剖検では、NT 101 投与に関連する所見は認められなかった。

A 型ボツリヌス毒素複合体の単回経口投与では、8000 LDU/animal 群の雌雄各 2 例が投与後 2 から 5 日目に、12000 LDU/animal 群の雄 1 例及び雌 3 例が投与後 2 から 8 日目に死亡した。体重測定では、8000 LDU/animal 群の雌 1 例で体重増加抑制が認められた。剖検では、A 型ボツリヌス毒素複合体投与に関連する所見は認められなかった。

陽性対照群では、全例が投与後 3 から 9 日目までに死亡した。

本試験条件下、ラットに NT 101 及び A 型ボツリヌス毒素複合体を単回経口投与したとき、概略の致死量はそれぞれ 300000 及び 8000 LDU/animal と考えられた。また、ラットにおける単回経口投与 LD_{50} は、それぞれ 636600 及び 11060 LDU/animal と考えられた。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は、NT 201 を用いて、臨床投与経路である筋肉内投与で実施した。動物種としてサル、マウス及びウサギを用いた。なお、マウスを用いた試験では、NT 201 に加えてボトックス®及び Dysport®を用いて、後肢の麻痺作用を比較評価した。また、ウサギを用いた試験では、生殖発生毒性試験のための用量設定を行った。

2.6.6.3.1　重要な試験以外の試験

2.6.6.3.1.1　NT 201 のマウスにおける筋肉内投与による局所麻痺作用評価

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.2-1、概要表：2.6.7.6）

NT 201、ボトックス®及び Dysport®を CD-1 系マウス（入荷時 8 週齢）の各群雄 10 匹の右腓腹筋に、6 及び 13 週間間隔で計 3 回筋肉内投与し、後肢の麻痺作用を比較評価した。投与量は、NT 201 及びボトックス®では 0.262、0.328、0.410、0.512 及び 0.641 LDU/animal/回、Dysport®では 0.640、0.800、1.000、1.250 及び 1.562 LDU/animal/回とした。本試験の主要評価項目である麻痺症状は、投与前後の後肢機能比較によって評価されるため、対照群を設定しなかった。死亡有無の確認、一般状態観察、右後肢の麻痺症状評価（スコアリング）、体重測定及び後肢下腿径測定を行い、3 回目投与の 9 週間後に解剖し、病理組織学的検査（各最高用量群 5 又は 6 例の左右腓腹筋のみ）を実施した。

いずれの試験群も投与に関連する死亡は認められなかった。

一般状態観察では、3 種類の製剤すべての投与群において、右後肢の麻痺が認められ、投与量に応じて重症化及び持続した。また、初回投与後と比べ、2 回目及び 3 回目投与後に麻痺の程度が強くなるとともに持続時間が延長する傾向を示した。NT 201 及びボトックス®の麻痺は同程度であった。

体重測定では、3 種類の製剤すべての投与群において、投与後の一過性の体重低下が認められた。

後肢下腿径測定では、3 種類の製剤すべてにおいて、3 回目投与前及び最終測定時の右後肢下腿径が、左後肢下腿径と比べて低値を示した。

病理組織学的検査では、3 種類の製剤すべての最高用量群において、右腓腹筋における限局性筋線維萎縮、限局性再生筋線維、限局性リンパ組織球性浸潤及び限局性筋線維サイズの大小不同が

認められた。これらの発生率に関して、3 種類の製剤間に差は認められず、変化の程度は NT 201 とボトックス®投与群の間で差がなかったが、限局性筋線維萎縮及び限局性再生筋線維については、NT 201 及びボトックス®投与群の動物よりも程度の強い動物が Dysport®投与群に認められた。左腓腹筋について、NT 201 投与群に所見は認められなかったが、ボトックス®及び Dysport®投与群の一部の動物では、限局性筋線維萎縮、限局性再生筋線維及び限局性リンパ組織球性浸潤が認められた。投与部位については、NT 201 の局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

本試験条件下、3 種類の製剤の麻痺作用及び体重への影響に質的な差は認められなかった。また、NT 201 及びボトックス®では量的な差も認められなかった。すべての NT 201 投与群で一過性の体重低下が認められたことから、NT 201 の無毒性量は 0.262 LDU/animal/回（6 及び 13 週間間隔で計 3 回投与）未満と考えられた。

2.6.6.3.1.2　NT 201 の非妊娠ウサギにおける筋肉内投与による用量設定試験（非 GLP）

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.2-2、概要表：2.6.7.6）

NT 201 を NZW 系の非妊娠ウサギ（投与開始時 17 から 20 週齢）の各群雌 3 匹の左腰部筋に筋肉内投与し、生殖発生毒性試験のための用量設定を行った。投与量は 2.5、3.5、5、10、20 及び 40 LDU/kg/回に設定し、2 週間間隔で最大 3 回投与した。一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、最終投与の 5 又は 9 日後に剖検を実施した。

5 LDU/kg/回以上の投与動物は、初回又は 2 回目投与後に死亡、又は状態悪化（運動性低下、運動失調、呼吸困難、体重低下及び摂餌量減少）のため安楽死の処置が取られた。3.5 LDU/kg/回では後肢のこわばりが 1 例に認められたのみで、死亡及び瀕死例は認められなかった。2.5 LDU/kg/回では NT 201 投与に関連する一般状態変化は認められなかった。すべての投与量で、体重低下及び摂餌量減少が認められた。2.5 及び 3.5 LDU/kg/回における体重低下及び摂餌量減少は、他の投与量のそれらと比較して軽度であった。投与部位の肉眼観察では、3.5 LDU/kg/回以上の一部の動物で、紅斑、浮腫、血腫又は落屑が認められたが、明白な局所刺激性は認められなかった。剖検では、一般状態悪化に関連する所見以外に、NT 201 投与に関連する所見は認められなかった。

本試験条件下、ウサギの投与量として、2.5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 3 回投与）の忍容性が良好であり、3.5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 2 回投与） が最大耐量と考えられた。

2.6.6.3.2　重要な試験

2.6.6.3.2.1　NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.2-3、概要表：2.6.7.7-1）

NT 201 をカニクイザル（投与開始時、雄は 32 から 36 カ月齢、雌は 32 から 43 カ月齢）の各群雌雄 3 匹の左腓腹筋に、4 週間間隔で計 4 回筋肉内投与した。また、A 型ボツリヌス毒素製剤であるボトックス®と毒性像を比較した。両剤の投与量は、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、4、8 及び 16 LDU/kg/回とした。死亡有無の確認、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、

眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、血圧測定及び心拍数測定を行い、最終投与の約 1 週間後に剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

その結果、試験期間中に NT 201 及びボトックス®投与に関連する死亡は認められず、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、血圧及び心拍数測定において、NT 201 及びボトックス®投与に関連する変化は認められなかった。

一般状態観察では、すべての NT 201 投与群で左腓腹筋の減少、4 LDU/kg/回の雄を除くすべての NT 201 投与群で跛行が認められた。また、8 及び 16 LDU/kg/回で運動障害、16 LDU/kg/回の雌で削痩が認められた。NT 201 投与群と同様にボトックス®投与群でも、4 LDU/kg/回から左腓腹筋の減少及び跛行、8 LDU/kg/回の雄及び 16 LDU/kg/回の雌雄で運動障害、8 及び 16 LDU/kg/回の雌で削痩が認められた。投与部位の肉眼観察では、NT 201 及びボトックス®投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

体重測定では、NT 201 及びボトックス®の 16 LDU/kg/回群で明らかな体重低下が認められ、最終体重は対照群と比べ低値を示した。

摂餌量測定では、NT 201 投与に関連する変化は認められなかったが、ボトックス®の雌の 16 LDU/kg/回群で最終投与後に摂餌量の減少が認められた。

剖検及び器官重量測定では、すべての NT 201 及びボトックス®投与群で、左腓腹筋の小型並びに絶対及び相対重量低値が認められた。また、右腓腹筋も、8 及び 16 LDU/kg/回の NT 201 及びボトックス®投与群で絶対重量低値を示した。

病理組織学的検査では、すべての NT 201 及びボトックス®投与群で、左腓腹筋のびまん性筋線維萎縮、核の密集、炎症細胞を伴う筋線維の変性及び線維化の増加が認められた。右腓腹筋では、すべての NT 201 及びボトックス®投与群で、筋線維サイズの大小不同が認められた。また、8 及び 16 LDU/kg/回の NT 201 投与群で核の密集及び線維化の増加、並びにすべてのボトックス®投与群で核の密集が認められた。左腓腹筋において、NT 201 及びボトックス®投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

本試験条件下、NT 201 のすべての投与群に認められた変化は薬理作用に関連しており、16 LDU/kg/回では明らかな体重低下が認められた。したがって、NT 201 の無毒性量は 8 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 4 回投与）と考えられた。NT 201 で認められた所見とボトックス®のそれらに差異はなかった。

2.6.6.3.2.2　NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.2-4、概要表：2.6.7.7-2）

NT 201 をカニクイザル（投与開始時 26 から 30 カ月齢）の左腓腹筋に、4 週間間隔で計 10 回筋肉内投与した。投与量は、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、4、8 及び 12 LDU/kg/回とし、0 及び 12 LDU/kg/回群については、6 カ月の休薬期間も設定した（投与期間終了時剖検動物として各群雌雄 4 匹、休薬期間終了時剖検動物として各群雌雄 2 匹）。死亡有無の確認、一般状態

観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、血圧測定及び心拍数測定を行い、最終投与の約 1 週間後（投与期間終了時）又は休薬期間終了時に剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び免疫組織学的検査（0 及び 12 LDU/kg/回群の左腓腹筋のネスチン免疫組織染色）を実施した。

その結果、NT 201 投与に関連する死亡は認められず、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、血圧測定及び心拍数測定において、NT 201 投与に関連する変化は認められなかった。

一般状態観察では、すべての投与群において、左腓腹筋の萎縮が投与期間中及び休薬期間中に認められた。また、8 LDU/kg/回群の雄 2 例で、腓腹筋の萎縮を呈した左後肢に関連する跛行が投与期間中一過性に認められた。NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は、左腓腹筋に認められなかった。

体重測定では、雄の 8 及び 12 LDU/kg/回群、雌のすべての投与群で、対照群と比較して体重増加抑制が認められたが、個体差が大きく、また、投与期間終了時の体重は投与前値と比べて低下していないことから、毒性学的意義は低いと判断した。

投与期間終了時の剖検及び器官重量測定では、すべての投与群で、左腓腹筋の小型並びに絶対及び相対重量低値が認められた。また、雌のすべての投与群で、右腓腹筋の軽度な絶対及び相対重量低値が認められた。

投与期間終了時の病理組織学的検査では、すべての投与群で、左腓腹筋の筋線維サイズの減少（筋線維萎縮）が認められた。また、この変化と関連して、筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加（線維化）、筋線維の変性及び脂肪細胞増加も認められた。対照群のネスチン免疫組織染色では、左腓腹筋の神経筋接合部のシナプス後膜と考えられる領域が陽性を示したが、12 LDU/kg/回群のそれでは、左腓腹筋の筋線維萎縮領域において異なる陽性像（筋形質全体の陽性反応及び筋鞘膜下に限局した陽性反応）が観察された。今回の免疫組織学的検査結果は、NT 201 を投与した左腓腹筋における神経筋接合部の破綻を示唆していると考えられた。右腓腹筋では、8 LDU/kg/回以上の群の雌雄で筋線維サイズの減少（筋線維萎縮）が、4 LDU/kg/回以上の群の雌雄で筋線維サイズの大小不同が認められ、これら変化と関連して、8 LDU/kg/回以上の群の雄で筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加（線維化）が、8 LDU/kg/回群の雌雄で脂肪細胞増加が認められた。また、左大腿四頭筋では、4 及び 8 LDU/kg/回群の雄、並びに 12 LDU/kg/回群の雌雄で筋線維サイズの減少（筋線維萎縮）が、4 LDU/kg/回以上の群の雌雄で筋線維サイズの大小不同が認められ、これら変化と関連して、8 LDU/kg/回以上の群の雌で脂肪細胞増加が認められた。右腓腹筋及び左大腿四頭筋の筋線維サイズの減少の程度は左腓腹筋のそれよりも軽度であった。左腓腹筋では、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

休薬期間終了時、12 LDU/kg/回群の左腓腹筋の剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査では、投与期間終了時の所見が依然として認められたものの、筋線維サイズの大小不同が認められ、正常の大きさの筋線維も散在性に認められたことから、左腓腹筋について回復性が示唆された。また、右腓腹筋では、投与期間終了時に認められた重量低値は認められず、さらに、右腓腹筋及び左大腿四頭筋では、投与期間終了時に認められた筋線維サイズの減少が認められず、右腓腹筋及び左大腿四頭筋についても回復性が示唆された。

本試験条件下、NT 201 の筋肉内投与で薬理作用に関連する一過性の跛行及び骨格筋の変化が認められたものの、毒性変化はなかったことから、無毒性量は 12 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 10 回投与）と考えられた。また、6 カ月間の休薬期間により回復性が認められた。

2.6.6.3.2.3　NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与毒性比較

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.2-5、概要表：2.6.7.7-3）

NT 201 をカニクイザル（投与開始時 27 から 29 カ月齢）の各群雌雄 4 匹の左腓腹筋及び左上腕二頭筋にそれぞれ半量ずつ、4 週間間隔、8 週間間隔又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回筋肉内投与し、毒性像を比較した。投与量は 16 LDU/kg/回とした。対照群には、溶媒（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）を 12 週間間隔で計 4 回筋肉内投与した。死亡有無の確認、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、血圧測定及び心拍数測定を実施し、最終投与の 1 週間後に剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

その結果、NT 201 投与に関連する死亡は認められず、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、心電図検査、血圧及び心拍数測定において、NT 201 投与に関連する変化は認められなかった。

一般状態観察では、すべての NT 201 投与群で、左腓腹筋及び左上腕二頭筋の萎縮が認められた。投与部位の観察では、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

体重測定では、4 週間間隔投与群で投与前値と比べて体重低下が認められた。

剖検では、すべての NT 201 投与群で、左腓腹筋及び左上腕二頭筋の小型が認められた。

器官重量測定では、すべての NT 201 投与群の左腓腹筋及び左上腕二頭筋の絶対及び相対重量はそれぞれ、対照群の左腓腹筋及び左上腕二頭筋のそれらと比べて低値を示した。また、すべての NT 201 投与群の左腓腹筋及び左上腕二頭筋の絶対及び相対重量はそれぞれ、同群の右腓腹筋及び右上腕二頭筋のそれらと比べて低値を示した。さらに、4 週間間隔投与群の右腓腹筋及び右上腕二頭筋の絶対及び相対重量はそれぞれ、対照群の右腓腹筋及び右上腕二頭筋のそれらと比べて低値を示した。

病理組織学的検査では、すべての投与群で、左腓腹筋及び左上腕二頭筋の筋線維サイズの減少（筋線維萎縮）が認められた。また、この変化と関連して、筋線維サイズの大小不同、筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加（線維化）、筋線維の変性及び脂肪細胞増加も認められた。これらの病理組織学的変化の程度は、12 週間間隔投与群で全般的に最も強かった。右腓腹筋及び右上腕二頭筋では、すべての投与群で、筋線維サイズの大小不同が認められた。この病理組織学的変化の程度は、右腓腹筋及び右上腕二頭筋の筋重量低値を示した 4 週間間隔投与群で最も強かった。左腓腹筋及び左上腕二頭筋では、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

本試験条件下、カニクイザルに 16 LDU/kg/回の NT 201 を 4 週間間隔、8 週間間隔又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回筋肉内投与したとき、いずれの投与間隔でも薬理作用に関連する変化が認

められ、4 週間間隔投与では全身毒性として体重低下が認められた。全身毒性が認められない投与間隔は 8 週間及び 12 週間間隔と考えられた。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

（添付資料：4.2.3.3、概要表：2.6.7.8-2.6.7.9）

ICH S6（R1）ガイドラインにおいて、化学合成医薬品について通常実施される標準的な遺伝毒性試験は、バイオ医薬品には適切でなく必要ないとされていることから、NT 201 の遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.5　がん原性試験

（添付資料：4.2.3.4、概要表：2.6.7.10）

ICH S6（R1）ガイドラインにおいて、バイオ医薬品においては、標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験は一般的に不適切とされていることから、NT 201 のがん原性試験は実施しなかった。なお、反復投与毒性試験において前がん病変は認められなかった。NT 201 は 2005 年に上市され、現在では米国及び欧州をはじめ世界 73 ヵ国で承認されているが、臨床の使用実績で投与との関連性が疑われる腫瘍発生の報告はない。また、本薬と薬理作用発現機序が類似し既に上市されている A 型ボツリヌス毒素製剤ボトックス®の臨床使用成績でも、投与との関連性が疑われる腫瘍発生の報告はない[2)]。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

NT 201 の生殖発生毒性試験は、ICH S5（R2）ガイドラインに従って実施した。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験はウサギを用いて実施した。胚・胎児発生に関する影響はラット及びウサギを用いて評価した。出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験、及び離乳後幼若動物の毒性試験はラットを用いて実施した。

2.6.6.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1　NT 201 のウサギにおける筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.1-1、概要表：2.6.7.12-1）

NT 201 を NZW 系ウサギ（投与開始時の雄は 16 から 19 週齢、雌は 16 から 17 週齢）の各群雌雄 20 匹の左腰部筋に、雄は 2 週間間隔で計 5 回、雌は約 2 週間間隔で計 3 回、筋肉内投与し、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験を実施した。雌雄とも交配開始の前日に 2 回目の投与を実施し、剖検前日に最終投与を実施した。NT 201 の投与量は、非妊娠ウサギを用いた用量設定試験（試験番号：[redacted]）を参考に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、1.25、2.5

及び 3.5 LDU/kg/回に設定した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、剖検、器官重量測定（雄：精巣、精巣上体及び前立腺、雌：卵巣）、交配検査、精子検査、帝王切開による検査（妊娠 14 日：黄体数及び着床数を含む）及び病理組織学的検査（雄の下垂体、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢及び投与部位）を実施した。

その結果、器官重量測定、交配検査、精子検査及び帝王切開による検査において、NT 201 投与に関連する変化は認められなかった。

3.5 LDU/kg/回群の雄 1 例が死亡し、他の雄 1 例が状態悪化のため途中解剖となった。

一般状態観察では、2.5 及び 3.5 LDU/kg/回群の雄で後肢麻痺が認められた。

体重測定では、雌雄共に用量依存的な体重増加抑制が認められた。雄では、2.5 及び 3.5 LDU/kg/回群で体重低下が認められた。雌では、2.5 及び 3.5 LDU/kg/回群の妊娠時の体重が、対照群と比べて低値を示した。

摂餌量測定では、雌雄共に 2.5 及び 3.5 LDU/kg/回群で摂餌量減少が認められた。

剖検では、雄の 0、1.25 及び 3.5 LDU/kg/回群、雌の 2.5 及び 3.5 LDU/kg/回群で、投与部位の暗色又は暗色巣が認められた。

病理組織学的検査では、下垂体、精巣、精巣上体、前立腺及び精嚢について、NT 201 投与と関連する所見は認められなかった。剖検で暗色又は暗色巣が認められた雄の投与部位については、溶媒対照群を含むすべての群で、炎症性細胞浸潤、筋細胞壊死及び出血が認められた。1.25 及び 3.5 LDU/kg/回群では、それら所見に加えて筋線維萎縮、3.5 LDU/kg/回群では脂肪細胞浸潤も認められた。

本試験条件下、親動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量は 3.5 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）と考えられた。

2.6.6.6.2　胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1　重要な試験以外の試験

2.6.6.6.2.1.1　NT 201 のラットにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験（非 GLP）

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.2-1、概要表：2.6.7.11）

NT 201 を SD 系妊娠ラット（交配時 10 から 13 週齢）の各群雌 5 から 6 匹の左腓腹筋に筋肉内投与し、胚・胎児発生に関する用量設定試験を実施した。投与量は、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、3、10 及び 30 LDU/kg/回に設定し、妊娠 6、12 及び 19 日（剖検前日）に投与した。一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、妊娠 20 日に帝王切開して剖検及び器官重量測定（左右の腓腹筋のみ）を実施した。母動物については、妊娠状況、黄体数、着床数、生存胎児数及び胚・胎児死亡数を評価した。胎児については、体重測定、性別判定及び外表検査を実施した。

すべての NT 201 投与群で死亡例は認められなかった。

一般状態観察では、10 及び 30 LDU/kg/回群のすべての動物で、妊娠期間終了時に左後肢の跛行が認められた。

体重測定では、すべての NT 201 投与群で、妊娠 6 から 11 日に体重増加抑制が認められ、30 LDU/kg/回群の妊娠 20 日の体重は、対照群と比べて低値を示した。

摂餌量測定では、30 LDU/kg/回群で軽度な減少を示した。

剖検及び器官重量測定では、すべての NT 201 投与群で、左腓腹筋の小型及び重量低値が認められた。また、右腓腹筋も、10 及び 30 LDU/kg/回群で軽度な重量低値が認められた。

母動物の黄体数、着床数及び後期吸収胚、並びに胎児の体重、性比及び外表に関して、NT 201 投与の影響は認められなかった。30 LDU/kg/回群では、早期吸収胚数及びそれに関連して着床後胚損失率が対照群と比較してわずかに増加した。この増加は主に 2 例の母動物に起因していた。

本試験条件下、今後実施するラット胚・胎児発生に関する試験の低用量及び高用量として、それぞれ 3 及び 30 LDU/kg/回（約 1 週間間隔で計 3 回投与）が適切と考えられた。

2.6.6.6.2.2　重要な試験

2.6.6.6.2.2.1　NT 201 のラットにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.2-2、概要表：2.6.7.12-2）

NT 201 を SD 系妊娠ラット（交配時 10 から 13 週齢）の各群雌 22 から 25 匹の左腓腹筋に筋肉内投与し、器官形成期における母体毒性及び胚・胎児発生に関する影響を評価した。試験群として、NT 201 の週 1 回投与群、週 2 回投与群及び連日投与群を設定した。週 1 回投与群では、3、10 及び 30 LDU/kg/回を妊娠 6、12 及び 19 日に投与、週 2 回投与群では、2、6 及び 18 LDU/kg/回を妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与、連日投与群では、7 LDU/kg/回を妊娠 6 から 19 日に投与した。また、対照群には溶媒（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）を妊娠 6 から 19 日に連日投与した。一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、妊娠 20 日に帝王切開して剖検、器官重量測定（左及び右腓腹筋）を実施した。母動物については、妊娠状況、黄体数、着床数、生存胎児数及び胚・胎児死亡数を評価した。胎児については、体重測定、性別判定、並びに外表、内臓及び骨格検査を実施した。

その結果、すべての NT 201 投与群において、NT 201 投与に関連する死亡は認められず、黄体数、着床数、着床前胚損失率、死亡胚・胎児数、胚・胎児死亡率、生存胎児数及び性比、並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査において、NT 201 投与の影響は認められなかった。

一般状態観察では、すべての NT 201 投与群で左後肢の跛行が認められた。

体重測定では、30 LDU/kg 週 1 回投与群、18 LDU/kg 週 2 回投与群及び 7 LDU/kg 連日投与群で体重増加抑制が認められ、妊娠 11 又は 15 日以降の体重は対照群と比較して低値を示した。

摂餌量測定では、30 LDU/kg 週 1 回投与群、18 LDU/kg 週 2 回投与群及び 7 LDU/kg 連日投与群で、摂餌量が減少した。

母動物の剖検及び器官重量測定では、すべての NT 201 投与群で、左腓腹筋の小型、絶対及び相対重量の低値が認められた。重量低値の程度は、30 LDU/kg 週 1 回投与群、18 LDU/kg 週 2 回投与

群及び 7 LDU/kg 連日投与群で強かった。右腓腹筋では、10 及び 30 LDU/kg 週 1 回投与群、18 LDU/kg 週 2 回投与群、並びに 7 LDU/kg 連日投与群で、絶対及び／又は相対重量の低値が認められた。右腓腹筋の重量低値の程度は、左腓腹筋のそれと比べて軽度であった。

胎児体重は 30 LDU/kg 週 1 回投与群及び 18 LDU/kg 週 2 回投与群で低値傾向、7 LDU/kg 連日投与群で統計学的に有意な低値が認められたが、対照群との差はわずかであった。なお、7 LDU/kg 連日投与群の雄の胎児体重に統計学的に有意な低値が認められたものの、雌のそれでは有意差は認められなかった。

本試験条件下、母動物の一般毒性学的無毒性量は、10 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）又は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）と考えられた。母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量は、30 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）、18 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）及び 7 LDU/kg/回（妊娠 6 日から 19 日にかけての連日投与）と考えられた。

2.6.6.6.2.2.2　NT 201 のウサギにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.2-3、概要表：2.6.7.12-3）

NT 201 を NZW 系妊娠ウサギ（交配時 16 から 19 週齢）の各群雌 21 又は 22 匹の左腰部筋に筋肉内投与し、器官形成期における母体毒性及び胚・胎児発生に関する影響を評価した。投与量は、非妊娠ウサギを用いた用量設定試験（試験番号：[redacted]）を参考に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、1.25、2.5 及び 5 LDU/kg/回に設定し、妊娠 6、18 及び 28 日（帝王切開前日）に投与した。一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、妊娠 29 日に帝王切開して剖検を行った。母動物については、妊娠状況、黄体数、着床数、生存胎児数及び胚・胎児死亡数を評価した。胎児については、体重測定、性別判定、並びに外表、内臓及び骨格検査を実施した。

その結果、すべての NT 201 投与群において、黄体数、着床数、着床前胚損失率、死亡胚・胎児数、胚・胎児死亡率、生存胎児数、性比及び胎児体重に NT 201 投与の影響は認められなかった。胎児検査では、外表、内臓及び骨格検査について、NT 201 投与の影響は認められなかった。

5 LDU/kg/回群の 1 例は、後肢麻痺のため妊娠 24 日に途中解剖となった。また、同群の他の 5 例は、妊娠 23 から 29 日にかけて流産し途中解剖となった。流産した動物では、流産前に体重低下及び摂餌量減少が認められた。

一般状態観察では、5 LDU/kg/回群で運動障害、不安定姿勢及び跛行が認められた。また、2.5 及び 5 LDU/kg/回群で糞量減少が認められた。投与部位の肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

体重測定及び摂餌量測定では、投与量に応じて母動物の体重増加抑制及び摂餌量減少が認められ、2.5 及び 5 LDU/kg/回群の妊娠 29 日の体重は対照群と比較して低値を示した。

剖検では、流産で途中解剖となった動物 2 例で肺の暗色巣、肝臓の表面粗造及び蒼白化が認められた。

本試験条件下、母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、母動物の生殖機能に対する無毒性量は 2.5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、胚・胎児に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）と考えられた。

2.6.6.6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.3.1　NT 201 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.3-1、概要表：2.6.7.12-4）

NT 201 を SD 系妊娠ラット（交配時 10 から 13 週齢）の各群雌 22 から 25 匹の左又は右腓腹筋に筋肉内投与した。NT 201 の投与量は、ラット胚・胎児発生毒性試験（試験番号：[redacted]）を参考に 2、6 及び 20 LDU/kg/回とし、妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に週 1 回投与した。また、3 LDU/kg/回の NT 201 を妊娠 6 日から分娩後 21 日まで連日投与する群も設けた。対照群には、溶媒（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）を連日筋肉内投与した。母動物（F0）については、死亡の有無、一般状態、体重、摂餌量、妊娠期間及び着床数について評価し、離乳時（分娩後 21 日）に剖検を実施した。F1 出生児については、出生児数、生存率、性別、体重、外形分化、性成熟、機能行動及び生殖機能について評価し、剖検も実施した。

F0 母動物では、NT 201 投与に関連する死亡は認められなかった。一般状態観察では、すべての NT 201 投与群で、投与部位である左腓腹筋の萎縮及び左後肢の跛行が認められた。また、左後肢に隣接する腹部の限局性膨隆が、20 LDU/kg 週 1 回投与群では妊娠 15 日から、3 LDU/kg 連日投与群では妊娠 17 日から、6 LDU/kg 週 1 回投与群では授乳期間中に、それぞれ認められた。剖検では、腹壁及びその直下の臓器に腹部膨隆に関連する変化は認められなかった。腹部膨隆は投与部位の変化と同様に薬理作用に関連していると考えられた。

体重測定では、20 LDU/kg 週 1 回投与群及び 3 LDU/kg 連日投与群で、妊娠期間中に体重増加抑制が認められ、これら投与群の体重は離乳まで低値だった。

摂餌量測定では、20 LDU/kg 週 1 回投与群及び 3 LDU/kg 連日投与群で、妊娠期間中及び授乳期間中に摂餌量減少傾向が認められた。母動物の剖検では、すべての NT 201 投与群で左腓腹筋の小型が認められた。投与部位観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

着床数、妊娠期間、出生児数、出生児生存率及び性比は、対照群と NT 201 投与群で同程度であった。

母動物への投与は、F1 出生児の離乳前の一般状態、体重増加量及び発達に影響を及ぼさなかった。

F1 出生児については、いずれの群でも、母動物への投与に関連する死亡は認められなかった。離乳後の一般状態、体重、性成熟、機能行動、生殖機能及び剖検に対して、母動物への投与は影響を及ぼさなかった。

本試験条件下、母動物の一般毒性学的無毒性量は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）、母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する

無毒性量は 20 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）及び 3 LDU/kg/回（妊娠 6 日から分娩後 21 日にかけて連日投与）と考えられた。

2.6.6.6.4　幼若動物を用いた試験

2.6.6.6.4.1　重要な試験以外の試験

2.6.6.6.4.1.1　NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による用量設定試験（非 GLP）

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.4-1、概要表：2.6.7.11）

3 週齢の SD 系ラットの各群雌雄 5 匹に NT 201 を 7 週齢まで投与し、離乳後幼若ラットの毒性試験のための用量設定を行った。投与量は、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、10、20 及び 30 LDU/kg/回とし、ラットの左又は右臀筋に、2 週間間隔で計 3 回筋肉内投与した。また、10 LDU/kg/回を 1 週間間隔で左又は右臀筋に計 5 回筋肉内投与する群、及び 20 LDU/kg/回を 2 週間間隔で左又は右腓腹筋に計 3 回筋肉内投与する群も設けた。一般状態、体重、摂餌量及び性成熟の評価を行い、投与期間終了時として最終投与の 1 週間後（8 週齢時）に血液学的検査、血液生化学検査、剖検及び器官重量測定を実施した。

すべての投与群で死亡は認められなかった。一般状態観察では、すべての NT 201 投与群で投与部位である左臀筋又は左腓腹筋の萎縮が認められた。また、20 LDU/kg/回を 2 週間間隔で左又は右腓腹筋に計 3 回筋肉内投与した群では、左後肢の不全麻痺が認められた。体重測定では、雄の 10 LDU/kg/回を 2 週間間隔で投与した群を除いたすべての NT 201 投与群で、体重増加抑制が認められ、最終体重は対照群と比べ低値となった。摂餌量測定では、すべての NT 201 投与群で摂餌量が減少し、30 LDU/kg/回を 2 週間間隔で投与した群の減少が顕著であった。性成熟、血液学的検査及び血液生化学検査で、NT 201 投与に関連する変化は認められなかった。剖検及び器官重量測定では、すべての NT 201 群で、投与部位である臀筋及び腓腹筋の小型及び重量低値が認められた。

本試験条件下、30 LDU/kg/回 2 週間間隔投与群で、全身性の毒性として体重低値及び摂餌量減少が認められた。20 LDU/kg/回 2 週間間隔投与群及び 10 LDU/kg/回 1 週間間隔投与群の全身毒性に明確な差は認められなかった。今後実施する離乳後幼若ラットの毒性試験の高用量として、30 LDU/kg/回（2 週間間隔）が適切と考えられた。

2.6.6.6.4.2　重要な試験

2.6.6.6.4.2.1　NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.5.4-2、概要表：2.6.7.12-5）

本試験では、3 週齢の SD 系ラットの各群雌雄 16 匹に NT 201 を 11 週齢まで投与した。投与量は、用量設定試験（試験番号：[redacted]）を参考に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、

5、10 及び 30 LDU/kg/回とし、ラットの左又は右臀筋に、2 週間間隔で計 5 回筋肉内投与した。一部の動物の最終投与は、臀筋萎縮のため、皮下投与で行った。また、すべての投与群に雌雄 15 又は 16 匹の休薬群を設定した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、脛骨長測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、性成熟評価及び行動学的評価（驚愕反射、聴覚反射及び恐怖反応）を実施した。投与期間終了時として最終投与の 1 週間後（12 週齢時）に剖検、器官重量測定、骨密度測定（大腿骨及び腰椎）及び病理組織学的検査（0 及び 30 LDU/kg/回群では、中枢神経系及び生殖器官の詳細な病理組織学的検査も実施）を実施した。休薬群の雌雄動物は、14 週齢時に交配させ、性周期検査及び交配検査（交尾率及び受授胎率）を実施した。妊娠ラットは、妊娠 13 日目に帝王切開による検査（黄体数、着床前胚損失率、着床後死亡率及び生存胎児数）を実施した。休薬期間終了時として、休薬群の雄及び交配不成立の雌ラットは最終投与の約 6 週間後（約 17 週齢時）に、妊娠ラットは帝王切開時に、それぞれ剖検、器官重量測定、骨密度測定及び病理組織学的検査を実施した。

すべての投与群で、NT 201 投与に関連する死亡は認められず、眼科学的検査、血液学的検査、尿検査、性成熟評価、行動学的評価、性周期検査、交配検査の受授胎率及び帝王切開において、投与に関連する変化は認められなかった。

一般状態観察では、すべての投与群で、投与期間中に臀筋の萎縮が認められ、この筋萎縮は休薬期間終了時まで持続した。また、雌雄の 30 LDU/kg/回群では、最終投与後に後肢の麻痺が認められたが、休薬期間終了時には認められなかった。雌雄の 10 及び 30 LDU/kg/回群では、後肢の跛行が 4 又は 5 回目投与後に認められ、30 LDU/kg/回群では、休薬期間終了時も後肢の跛行が認められた。投与部位の肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

体重測定では、すべての投与群で体重増加抑制が投与期間を通して認められ、投与期間終了時の体重は対照群と比べて低値であった。休薬期間中、NT 201 投与群の体重増加抑制に回復性が認められたが、休薬期間終了時の体重は対照群と比べて低値であった。

摂餌量測定では、雄のすべての投与群、並びに雌の 10 及び 30 LDU/kg/回群において、摂餌量の減少が、主に投与開始後 42 日目から投与期間終了時の 63 日目にかけて認められた。休薬期間中、NT 201 投与群の摂餌量は、対照群と変わらなかった。

脛骨長測定では、投与期間中、雄のすべての投与群、並びに雌の 10 及び 30 LDU/kg/回群で、脛骨長低値が認められた。この低値は休薬期間終了時にも認められた。

血液生化学的検査では、投与期間終了時、雌雄のすべての投与群で、投与量の増加に応じて血清クレアチニンの低値が認められた。この低値は NT 201 投与による筋重量低値に関連する変化と考えられた。

器官重量測定では、投与期間終了時、臀筋の絶対及び相対重量低値が雌雄のすべての投与群に、精巣及び精巣上体の絶対重量低値が 30 LDU/kg/回群に認められた。休薬期間終了時、臀筋の重量低値は認められたが、精巣及び精巣上体の重量低値は認められなかった。

剖検では、投与期間終了時、臀筋の小型が雌雄のすべての投与群に、精巣及び精巣上体の小型が 10 及び 30 LDU/kg/回群に認められた。同様な変化は、休薬期間終了時にも認められた。

骨密度測定では、投与期間終了時、雌雄のすべての投与群で、投与量の増加に応じて総骨密度、総骨面積及び総骨量の低値が認められた。また、この変化と関連して、骨内膜長、骨膜長及び皮質骨厚の低値も認められた。休薬期間終了時、雌雄の 30 LDU/kg/回群で、同様な変化が認められた。

病理組織学的検査では、投与に関連する変化が、臀筋、精巣、精巣上体、骨髄（胸骨及び大腿骨）、骨（大腿骨及び脛骨）及び投与部位以外の骨格筋（左上腕筋、左腓腹筋及び大腿二頭筋）に認められた。臀筋では、雌雄のすべての投与群で筋線維萎縮が認められた。また、この変化と関連して、筋線維変性及び脂肪細胞増加も認められた。休薬期間終了時、30 LDU/kg/回群で同様な変化が認められたが、筋線維萎縮の程度が低下したことから部分的な回復性を示したと考えられた。精巣及び精巣上体では、30 LDU/kg/回群で精巣における精細管萎縮、精巣上体における精子減少及び精子肉芽腫が認められた。休薬期間終了時、精巣における精細管萎縮、及び精巣上体における精子減少は依然として認められたものの、発生率及び程度が低下したことから、部分的な回復性を示したと考えられた。大腿骨の骨髄では、投与期間終了時、雄のすべての投与群及び雌の 30 LDU/kg/回群で脂肪細胞増加が認められた。胸骨の骨髄でも、雄の 10 及び 30 LDU/kg/回群で同様の所見が認められた。大腿骨及び脛骨では、投与期間終了時、雄のすべての投与群並びに雌の 10 及び 30 LDU/kg/回群で骨量減少が認められた。投与部位以外の骨格筋の大腿二頭筋では、投与期間終了時、雄のすべての投与群並びに雌の 10 及び 30 LDU/kg/回群で筋線維萎縮が認められた。左上腕筋及び左腓腹筋では、雌雄の 30 LDU/kg/回群で同様な変化が認められた。これら骨格筋では、投与部位である臀筋と異なり、筋線維変性はわずかに認められたのみであった。

中枢神経系（脳、脊髄及び末梢神経系）に対する詳細な病理組織学的検査の結果、投与期間終了時のいずれの投与群においても、中枢神経系に対する影響は認められなかった。

休薬群の動物を用いた交配検査では、30 LDU/kg/回群の雌 7 例が交配不成立となったが、交配成立の雌 9 例はすべて妊娠した。この交尾率低下は、低体重又は後肢麻痺に起因するものと考えられた。

本試験条件下、NT 201 投与に関連する変化がすべての投与群で認められ、離乳後の発達に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 5 回投与）未満と考えられた。

2.6.6.7　局所刺激性試験

2.6.6.7.1　NT 201 のウサギを用いた眼刺激性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.6-1、概要表：2.6.7.13）

NT 201 溶液のウサギの眼における刺激性を評価した。0.1 mL の 100 LDU 含有 NT 201 溶液を Himalayan 系ウサギ（投与時 27 から 28 カ月齢）の雄 3 匹の右眼結膜嚢内に滴下した。適用前、適用後 1、24、48 及び 72 時間に、細隙灯顕微鏡によって、眼（角膜、虹彩、結膜など）を検査した。また、適用後 24 時間の検査では、フルオレセインを点眼し、角膜病変の有無も評価した。

その結果、角膜、虹彩及び結膜において NT 201 投与の影響は認められず、NT 201 は眼刺激性を示さないと考えられた。

2.6.6.7.2　各試験における投与部位の局所刺激性評価

（添付資料：4.2.3.6-2、概要表：2.6.7.13）

NT 201 の投与部位の局所刺激性は、マウス（試験番号[redacted]）、ウサギ（試験番号[redacted]）及びサル（試験番号：[redacted]、[redacted] 及び[redacted]）を用いた筋肉内投与による反復投与毒性試験、ウサギ（試験番号：[redacted]及び[redacted]）及びラット（試験番号：[redacted]及び[redacted]）を用いた筋肉内投与による生殖発生毒性試験、並びにウサギを用いた皮内投与による抗原性試験（試験番号：[redacted] 及び[redacted]）において、投与部位の肉眼観察又は病理組織学的検査により評価した。その結果、一部の試験の投与部位肉眼観察において、一過性の炎症反応を示唆する所見（紅斑、浮腫、血腫、落屑又は痂皮形成）が認められたが、明白な局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

2.6.6.8　その他の試験

2.6.6.8.1　NT 201 のウサギにおける 10 週間反復皮内投与による抗原性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.7.1-1、概要表：2.6.7.14）

NT 201 を NZW 系ウサギ（投与開始時 65 日齢）の雌 12 匹の背部皮膚に、2 週間間隔で計 5 回皮内投与し、抗原性を検討した。また、ボトックス®を雌 8 匹に同様に投与した。NT 201 及びボトックス®の投与量は 25 LDU/animal/回とした。試験開始時として初回投与の 1 週間前、3 回目投与の 1 週間後及び試験終了時として 5 回目投与の 2 週間後に伏在静脈から採血し、抗体評価用の検体として血清を調製した。抗原性については、2.6.4.2.2 項に記載した分析法を用いて評価した。初めに、酵素結合免疫測定法で検体中の抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の有無を評価した。その後、抗 A 型ボツリヌス毒素抗体陽性であった検体の中和活性を、マウスの横隔神経及び片側横隔膜を用いた in vitro（ex. vivo）アッセイにより評価した。

両製剤ともに、初回又は 2 回目投与後から、運動性低下及び運動失調が認められた。NT 201 投与群の 2 例は、3 回目投与後に体温低下及び呼吸数低下などが認められ死亡した。剖検では、これら死亡例で重度の削痩及び脱水が認められた。NT 201 投与群の死亡例を除き、顕著な体重低下は認められなかった。剖検時の投与部位肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

抗体測定では、NT 201 投与群の検体からは、抗 A 型ボツリヌス毒素抗体は検出されなかった。ボトックス®投与群では、試験終了時の 4 検体で抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が確認され、それら抗体は中和活性を示した。

本試験条件下、NT 201 は抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の産生を誘導しなかった。ボトックス®は中和活性を有する抗体を誘導した。

2.6.6.8.2　NT 201 のウサギにおける 36 週間反復皮内投与による抗原性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.7.1-2、概要表：2.6.7.14）

NT 201、ボトックス®及び Dysport®を NZW 系ウサギ（投与開始時約 3.5 カ月齢）の各群雌 20 匹の背部皮膚に皮内投与し、抗原性を検討した。NT 201 及びボトックス®の 16 LDU/animal/回、並びに Dysport®の 40 LDU/animal/回を、それぞれ 2 週間間隔で計 5 回投与し、5 回目投与の 5 週間後（初回投与後 13 週目）に、NT 201 及びボトックス®は 16 LDU/animal/回、Dysport®は 20 LDU/animal/回を投与した。初回投与の 1 週間前、初回投与後 7、12 及び 15 週目に伏在静脈から採血し、抗体評価用の検体として血清を調製した。Dysport®については、初回投与後 21 週目に採血を行い、安楽死させた。NT 201 及びボトックス®については投与を継続し、初回投与後 21 及び 23 週目に 16 LDU/animal/回、並びに初回投与後 33 週目に 25 LDU/animal/回をそれぞれ投与し、初回投与後 25 及び 36 週目に採血を行い、安楽死させた。抗原性については、2.6.4.2.2 項に記載した分析法を用いて評価した。初めに、酵素結合免疫測定法で検体中の抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の有無を評価した。その後、抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の中和活性を、マウスの横隔神経及び片側横隔膜を用いた in vitro（ex. vivo）アッセイにより評価した。

すべての群で、投与に関連する死亡は認められなかった。また、すべての群で運動性低下、体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。投与部位の肉眼観察では、NT 201 及びボトックス®投与群で、一過性の炎症性変化（紅斑、浮腫及び痂皮形成）が認められた。

初回投与後 15 週目の NT 201 及びボトックス®投与群の検体において、それぞれ 7 及び 9 検体で、抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が検出されたが、いずれも中和活性は認められなかった。これに対し Dysport®投与群では、19 検体で抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が確認され、このうち 15 検体が中和活性を示した。初回投与後 36 週目の NT 201 投与群の検体では、1 検体から抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が検出されたが、中和活性は認められなかった。一方、ボトックス®投与群の検体では、7 検体から抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が検出され、このうちの 4 検体で中和活性が認められた。

本試験条件下、NT 201 は中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体を誘導しなかった。ボトックス®及び Dysport®は中和活性を有する抗体を誘導した。

2.6.6.8.3　In vitro 溶血性試験

（試験番号：[redacted]）

（添付資料：4.2.3.7.7-1、概要表：2.6.7.14）

NT 101 溶液のヒト血液における溶血性を検討した。健常人 3 名から採血したクエン酸ナトリウム加全血を遠心分離し、赤血球含有溶液を調製した。この赤血球含有溶液 1 mL に NT 101 溶液を 5 mL 加えて、終濃度が 100、200 及び 400 LDU/mL の NT 101 添加調製液を調製した。この NT 101 添加調製液を 37° C で 30 分間インキュベートし、遠心分離した上清の 540 nm における吸光度を 10%ショ糖水溶液と比較して溶血度を評価した。

その結果、すべての NT 101 濃度で溶血性は認められなかった。

2.6.6.9　　考察及び結論

NT 201 の毒性を評価するため、NT 201 又は NT 101 を用いて一連の非臨床試験（一般毒性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、抗原性試験及び溶血性試験）を実施した。主な毒性所見は、本剤の薬理作用である筋弛緩作用に関連する変化（筋萎縮、筋緊張低下、筋重量低値、跛行、運動性低下、運動失調、体重低下及び摂餌量減少）及び自律神経伝達の遮断による全身的影響と考えられる変化（立毛、眼瞼下垂、流涙、散瞳、体温低下、呼吸困難及び死亡）であった。単回投与毒性試験の高用量で認められた死亡は、呼吸筋麻痺によるものと考えられた。臨床投与経路である筋肉内投与で、NT 201 をマウスに単回投与したときの概略の致死量は 50 LDU/kg であった。反復投与毒性試験では、投与部位となった骨格筋での局所作用、及び非投与部位である骨格筋の二次的作用又は NT 201 の投与部位以外の筋への拡散による直接影響が疑われる変化を除き、明確な臓器毒性は認められなかった。サル反復投与毒性試験の無毒性量は、1 回あたりの臨床最大用量 400 U（6.67 U/kg/回）の 1.2 又は 1.8 倍であった（表 2.6.6-2）。

表 2.6.6-2　NT 201 の反復投与毒性試験の無毒性量及び安全域

試験期間	投与経路	動物種	無毒性量	安全域	試験番号
13 週間	筋肉内	カニクイザル	8 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回投与）	1.2	[redacted]
9 カ月間	筋肉内	カニクイザル	12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回投与）	1.8	[redacted]

安全域は 1 回あたりの臨床最高用量（400 U）のヒト 60kg 換算量（6.67 U/kg/回）に対して算出した。

遺伝毒性及びがん原性試験は、ICH S6（R1）ガイドラインを踏まえて実施しなかった。なお、反復投与毒性試験において前がん病変は認められなかった。また、NT 201 の欧米での臨床使用成績では、投与との関連性が疑われる腫瘍発生の報告はない。

生殖発生毒性試験は、ラット及びウサギを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。また、ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、NT 201 を連日投与する群も設けた。いずれの試験も親動物では反復投与毒性試験と同様の変化が認められた。ウサギを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、親動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量は 3.5 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）と考えられた。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の一般毒性学的無毒性量は 10 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）及び 6 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）と考えられた。また、母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量は、30 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）、18 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）及び 7 LDU/kg/回（妊娠 6 日から 19 日にかけての連日投与）と考えられた。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、母動物の生殖機能に対する無毒性量は 2.5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に

投与)、及び胚・胎児に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）と考えられた。ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、母動物の一般毒性学的無毒性量は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与)、母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する無毒性量は 20 LDU/kg/回(妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）及び 3 LDU/kg/回（妊娠 6 日から分娩後 21 日にかけて連日投与）と考えられた。幼若動物を用いた試験は、3 週齢のラットを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。その結果、離乳後の発達に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 5 回投与）未満と考えられた。

局所刺激性については、ウサギを用いた眼刺激性試験を実施した。その結果、眼粘膜に対する刺激性は認められなかった。また、筋肉内投与による反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験、並びに皮内投与による抗原性試験で、投与部位の肉眼観察又は病理組織学的検査を行い局所刺激性について評価した。その結果、明白な局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

抗原性については、ウサギを用いて皮内への間歇投与で実施した。その結果、NT 201 は中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体を誘導しなかった。また、NT 101 を用いた in vitro 溶血性試験では、ヒト血液に対する溶血性は認められなかった。

一部の単回及び反復投与毒性試験では、NT 201 及びボトックス®の毒性像を比較した。マウスに NT 201 及びボトックス®を単回筋肉内投与（試験番号 : [redacted]）又は単回静脈内投与（試験番号 : [redacted]）したとき、同様な所見が認められた。また、両製剤の概略の致死量及び LD_{50} に大きな差はなかった。カニクイザルに NT 201 又はボトックス®を 4 週間間隔で計 4 回筋肉内投与したときに認められた変化に差異はなく、無毒性量も両製剤で同じであった（試験番号 : [redacted]）。これら試験の結果を表 2.6.6-3 に示す。さらに、マウスに NT 201、ボトックス®又は Dysport®を 6 及び 13 週間隔で計 3 回筋肉内投与し局所麻痺作用を比較評価した試験（試験番号 : [redacted]）では、NT 201 及びボトックス®の麻痺作用及び体重への影響に質的及び量的な差は認められなかった。なお、効力を裏付ける薬理試験（試験番号 : [redacted]）において、サルに NT 201 及びボトックス®を単回筋肉内投与したとき、筋活動電位の変化及び経時的推移は同程度であった。以上のことから、NT 201 はボトックス®と同様の毒性プロファイルを有すると考えられた。

表 2.6.6-3　NT 201 及びボトックス®の単回及び反復投与毒性試験結果

試験の種類（試験期間）	動物種	投与経路	投与物質	概略の致死量、LD_{50} 又は無毒性量	試験番号
単回	マウス	筋肉内	NT 201	概略の致死量：50 LDU/kg	[redacted]
			ボトックス®	概略の致死量：150 LDU/kg	
単回	マウス	静脈内	NT 201	LD_{50}：約 50 LDU/kg	[redacted]
			ボトックス®	LD_{50}：約 50 LDU/kg	
反復	サル	筋肉内	NT 201	無毒性量：8 LDU/kg/回	[redacted]

（13 週間）				（4 週間間隔で計 4 回投与）	
			ボトックス®	無毒性量：8 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回投与）	

2.6.6.10　図表

図表は本文中に示した。

2.6.6.11　参考文献

1）E.J. Schantz and D.A. Kautter. Microbiological Methods: Standardized Assay for Clostridium botulinum Toxins. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Vol.61, No.1; 1978
2）医薬品インタビューフォーム　ボトックス注用　2018 年 5 月改訂（第 14 版）

ゼオマイン筋注用 50 単位
ゼオマイン筋注用 100 単位
ゼオマイン筋注用 200 単位

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.7　毒性試験概要表

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.7　毒性試験概要表 3
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 10
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 11
2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧 12
2.6.7.5　単回投与毒性試験 14
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 20
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 22
2.6.7.7.1　反復投与毒性試験　サル 13 週間反復投与毒性試験 22
2.6.7.7.2　反復投与毒性試験　サル 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験 27
2.6.7.7.3　反復投与毒性試験　様々な投与間隔での筋肉内投与毒性比較 36
2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験 42
2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験 43
2.6.7.10　がん原性試験 44
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 45
2.6.7.12　生殖発生毒性試験：重要な試験 47
2.6.7.12.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験　ウサギ受胎能試験 47
2.6.7.12.2　胚・胎児発生毒性試験　ラット胚・胎児発生毒性試験 52
2.6.7.12.3　胚・胎児発生毒性試験　ウサギ胚・胎児発生毒性試験 55
2.6.7.12.4　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 58
2.6.7.12.5　離乳後幼若ラットを用いた試験 62
2.6.7.13　局所刺激性試験 79
2.6.7.14　その他の毒性試験 83

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：NT 101 及び NT 201

試験の種類	動物種 ／系統	投与方法	投与物質 投与量	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
単回投与 毒性試験	CD 系 マウス	筋肉内投与	NT 201 及びボトックス® 0、5、50、150 LDU/kg	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-1
	CD-1 系 マウス	経口投与	NT 101 0、100、1000、10000 LDU/animal	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-2
	CD-1 系 マウス	経口及び 腹腔内投与	NT 101 0、1000、10000、100000 LDU/animal（経口） 1.5、3.0 LDU/animal（腹腔内、陽性対照）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-3
	CD-1 系 マウス	静脈内投与	NT 201、ボトックス®及び Dysport® 0、9、 20、 30、 45、 68 LDU/kg	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-4
	CD-1 系 マウス	腹腔内投与	NT 101 2.500、3.125、3.910、4.890、6.110、7.640、9.550 pg/animal	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-5

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：NT 101 及び NT 201

試験の種類	動物種 ／系統	投与方法	投与物質 投与量	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
単回投与 毒性試験	CD-1 系 マウス	腹腔内投与	NT 201 3.910、4.890、6.110、7.640、9.550、 11.940 pg/animal	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-6
	SD 系 ラット	筋肉内投与	NT 201 0、16、32 、64 LDU/kg	否	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-7
	SD 系 ラット	経口又は 腹腔内投与	NT 101（経口） 0、300000、1000000、3000000 LDU/animal A 型ボツリヌス毒素複合体 a)（経口） 4000、8000、12000 LDU/animal NT 101（腹腔内、陽性対照） 10、15 LDU/animal	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-8

a）複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素複合体

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：NT 201

試験の種類	動物種／系統	投与方法（投与期間 a)）	投与物質 投与量 b)	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
反復投与毒性試験	CD-1 系マウス	筋肉内投与（28 週間）	NT 201 及びボトックス® 0.262、0.328、0.410、0.512、0.641 LDU/animal/回 Dysport® 0.640、0.800、1.000、1.250 及び 1.562 LDU/animal/回 （6 及び 13 週間間隔で計 3 回投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-1
	NZW 系ウサギ	筋肉内投与（約 3 又は 5 週間）	NT 201 2.5、3.5、5、10、20、40 LDU/kg/回 （2 週間間隔で最大 3 回投与）	否	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-2
	カニクイザル	筋肉内投与（13 週間）	NT 201 及びボトックス® 0、4、8、16 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-3

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。
b）サルを用いた反復投与毒性試験（試験番号：[redacted]）で下線を施した投与量は NT 201 無毒性量を示す。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：NT 201

試験の種類	動物種／系統	投与方法（投与期間 a)）	投与物質 投与量 b)	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
反復投与毒性試験	カニクイザル	筋肉内投与（9 カ月間）	NT 201 0、4、8、12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-4
	カニクイザル	筋肉内投与（13、25 又は 37 週間）	NT 201 16 LDU/kg/回 （4、8 又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-5
遺伝毒性試験	該当試験なし						
がん原性試験	該当試験なし						
生殖発生毒性試験							
受胎能及び初期胚発生	NZW 系ウサギ	筋肉内投与	NT 201 0、1.25、2.5、3.5 LDU/kg/回 （雄：交配前 2 週間から剖検前日まで 2 週間間隔で計 5 回投与、雌：交配前 2 週間から妊娠 13 日まで約 2 週間間隔で計 3 回投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.1-1
胚・胎児発生（用量設定試験）	SD 系妊娠ラット	筋肉内投与	NT 201 0、3、10、30 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日に投与）	否	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.2-1

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。
b）サルを用いた反復投与毒性試験（試験番号：[redacted]）で下線を施した投与量は NT 201 無毒性量を示す。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：NT 201

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与物質 投与量	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
胚・胎児発生	SD 系 妊娠 ラット	筋肉内投与	NT 201 3、10、30 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日に投与） 2、6、18 LDU/kg/回 （妊娠 6、9、12、16、19 日に投与） 0、7 LDU/kg/回 （妊娠 6 から 19 日に連日投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.2-2
	NZW 系 妊娠 ウサギ	筋肉内投与	NT 201 0、1.25、2.5、5 LDU/kg/回 （妊娠 6、18、28 日に投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.2-3
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	SD 系 妊娠 ラット	筋肉内投与	NT 201 2、6、20 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日、分娩後 6、13、20 日に投与） 0、3 LDU/kg/回 （妊娠 6 日から分娩後 21 日に連日投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.3-1

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：NT 201

試験の種類	動物種／系統	投与方法（投与期間 a)）	投与物質 投与量	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
幼若動物を用いた試験	SD 系ラット	筋肉内投与（3 から 8 週齢まで）	NT 201 10、20、30 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 3 回投与） 10 LDU/kg/回（1 週間間隔で計 5 回投与）	否	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.4-1
	SD 系ラット	筋肉内投与 b)（3 から 12 週齢まで）	NT 201 0、5、10、30 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 5 回投与）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.4-2
局所刺激性試験	Himalayan 系ウサギ	結膜嚢内適用（単回）	NT 201 100 LDU/0.1 mL/匹	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.6-1
	該当試験を参照のこと（筋肉内投与による反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験、並びに皮内投与による抗原性試験で、投与部位の局所刺激性について肉眼観察又は病理組織学的検査により評価）			適 c)	該当試験を参照のこと	[redacted]	4.2.3.6-2

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。
b）一部の動物の最終投与は皮下投与で実施した。
c）試験番号[redacted]は非 GLP として実施した。試験番号[redacted]及び[redacted]の抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：NT 101 及び NT 201

試験の種類	動物種 ／系統	投与方法 （投与期間 a)）	投与物質 投与量	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載場所
抗原性試験	NZW 系 ウサギ	皮内投与 （10 週間）	NT 201 及びボトックス® 25 LDU/animal/回 （2 週間間隔で計 5 回投与）	適 b)	[redacted]	[redacted]	4.2.3.7.1-1
	NZW 系 ウサギ	皮内投与 （36 週間）	NT 201 及びボトックス® 16（1-8 回目）又は 25 LDU/animal（9 回目）（2-10 週間間隔で計 9 回投与） Dysport® 40（1-5 回目）又は 20 LDU/animal（6 回目）（2 又は 5 週間間隔で計 6 回投与）	適 b)	[redacted]	[redacted]	4.2.3.7.1-2
その他の試験 （溶血性試験）	ヒト 血液	In vitro	NT 101 0、100、200、400 LDU/mL （終濃度として）	適	[redacted]	[redacted]	4.2.3.7.7-1

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。
b）抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

該当試験なし。

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

該当試験なし。

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧

被験物質：NT 101 及び NT 201

被験物質	ロット番号	力価又は含有量 a)	試験番号	試験の種類
NT 101	SPA3/1	$1x10^6$ LDU/mL	[redacted]	単回投与毒性試験（経口、マウス）
	14-99	$2x10^7$ LDU/mL	[redacted]	単回投与毒性試験（経口及び腹腔内、マウス）
	SPA3/1-3	NA	[redacted]	単回投与毒性試験（腹腔内、マウス）
	MP 070203	$1.89x10^8$ LDU/mg	[redacted]	単回投与毒性試験（経口、ラット）
	SPA3/2-3/7	$0.47x10^6$ LDU/20 µL	[redacted]	溶血性試験（in vitro）
NT 201	SPA3/1 batch 0	700 pg/vial	[redacted]	単回投与毒性試験（静脈内、マウス）
	Batch 0 （ SPA3/1–3/4）	100 LDU/vial	[redacted]	反復投与毒性試験（筋肉内、マウス）
	SPA3/1–3/4	700 pg/vial	[redacted]	単回投与毒性試験（腹腔内、マウス）
		100 LDU/vial	[redacted]	抗原性試験（皮内、ウサギ）
	8/09/02	90.8 LDU/vial	[redacted]	抗原性試験（皮内、ウサギ）
	01001	100 LDU/vial		
	21103	100.6 LDU/vial	[redacted]	単回投与毒性試験（筋肉内、マウス）

NA：該当データなし。
a）マウス腹腔内投与 LD_{50} を 1 LDU と規定した。

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧（続き）

被験物質：NT 201

被験物質	ロット番号	力価又は含有量 a)	試験番号	試験の種類
NT 201	020902	105.7 LDU/vial	[redacted]	反復投与毒性試験（筋肉内、サル）
			[redacted]	反復投与毒性試験（筋肉内、ウサギ、用量設定試験）
			[redacted]	生殖発生毒性試験（筋肉内、ウサギ）
			[redacted]	生殖発生毒性試験（筋肉内、ウサギ）
	60506	101.9 LDU/vial	[redacted]	単回投与毒性試験 b)（筋肉内、ラット、用量設定試験）
			[redacted]	生殖発生毒性試験（筋肉内、ラット、用量設定試験）
			[redacted]	幼若動物を用いた試験 （筋肉内、離乳後幼若ラット、用量設定試験）
	60707	105.36 LDU/vial	[redacted]	刺激性試験（眼刺激性、ウサギ）
			[redacted]	生殖発生毒性試験（筋肉内、ラット）
			[redacted]	反復投与毒性試験（筋肉内、サル）
			[redacted]	反復投与毒性試験（筋肉内、サル）
			[redacted]	幼若動物を用いた試験 （筋肉内、離乳後幼若ラット）
	61111	100 LDU/vial	[redacted]	生殖発生毒性試験（筋肉内、ラット）

a）マウス腹腔内投与 LD_{50} を 1 LDU と規定した。
b）安全性薬理試験（試験番号：[redacted]）の用量設定試験として実施した。

2.6.7.5 単回投与毒性試験

被験物質：NT 201

動物種 ／系統	投与方法 （溶媒／投与形態）	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	最大 非致死量	概略の 致死量	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
マウス ／CD 系	筋肉内投与 （0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	NT 201 及びボトックス® 0、 5、 50、150 LDU/kg	10／群、雌雄	NT 201 5 LDU/kg ボトックス® 50 LDU/kg	NT 201 50 LDU/kg ボトックス® 150 LDU/kg	NT 201 150 LDU/kg 群では、すべてのマウスが投与後 3 から 8 日目に死亡した。50 LDU/kg 群では、雄 1 例が投与後 5 日目に死亡した。一般状態観察では、50 及び 150 LDU/kg 群で運動性低下、運動失調、筋緊張低下、眼瞼下垂及び呼吸困難が認められた。これらの一般症状の重症度は投与量に応じて重症化した。体重測定では、50 及び 150 LDU/kg 群で、体重増加抑制及び体重低下が認められた。剖検では、150 LDU/kg 群で脱水、閉眼及び削痩が認められた。 ボトックス® 150 LDU/kg 群のすべてのマウスが投与後 4 から 7 日目に死亡した。一般状態観察、体重測定及び剖検では、50 又は 150 LDU/kg 群で、NT 201 と同様の所見が認められた。	適	[redacted]

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

被験物質：NT 101

動物種 ／系統	投与方法 （溶媒／投与形態）	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	最大 非致死量	概略の 致死量	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
マウス ／CD-1 系	経口投与 （0.1%ウシ血清アルブミン含有 10%ショ糖水溶液／水溶液）	NT 101 0、 100、1000、 10000 LDU/animal	10／群、雄	10000 LDU/animal	>10000 LDU/animal	10000 LDU/animal まで NT 101 投与に関連する変化は認められなかった。	適	[redacted]
マウス ／CD-1 系	経口又は腹腔内投与 （0.1%ウシ血清アルブミン含有 10%ショ糖水溶液／水溶液）	NT 101 経口投与 0、 1000、10000、100000 LDU/animal 腹腔内投与（陽性対照） 1.5、3.0 LDU/animal	10／群、雄	10000 LDU/animal	NA	100000 LDU/animal 群の 4 例が投与後 2 日目までに死亡した。一般状態観察では、100000 LDU/animal 群で眼瞼腫脹、立毛、運動性低下、眼窩周囲の脱毛、筋緊張低下及び体温低下が認められた。体重測定では 10000 LDU/animal から体重増加抑制が認められ、100000 LDU/animal では統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。 陽性対照群 1.5 LDU/animal 群の 9 例及び 3.0 LDU/animal 群の全例が、それぞれ投与後 2 及び 1 日目までに死亡した。	適	[redacted]

NA：該当データなし。

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

被験物質：NT 201

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与物質 投与量	動物数／群、性	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
マウス／CD-1 系	静脈内投与（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	NT 201、ボトックス®及びDysport® 0、9、20、30、45、68 LDU/ kg	10／群、雄	NT 201 30 LDU/kg ボトックス® 30 LDU/kg Dysport® 45 LDU/kg	NT 201 NA ボトックス® NA Dysport® NA	NT 201 45 及び 68 LDU/kg 群では、それぞれ 2 及び全例が、投与後 4 日目までに死亡した。一般状態観察では、20 LDU/kg 以上で立毛、体温低下、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下、散瞳、運動性低下及び運動失調が認められた。自発運動測定では、20 LDU/kg から静的及び動的動作回数の減少が認められた。 ボトックス® 45 及び 68 LDU/kg 群では、それぞれ 3 及び全例が、投与後 5 日目までに死亡した。一般状態観察及び自発運動測定では、それぞれ 30 及び 20 LDU/kg から、NT 201 と同様の変化が認められた。 Dysport® 68 LDU/kg 群では、8 例が投与後 6 日目までに死亡した。一般状態観察及び自発運動測定では、それぞれ 20 LDU/kg から NT 201 と同様の変化が認められた。	適	[redacted]

NA：該当データなし。

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

被験物質：NT 101 及び NT 201

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与物質 投与量	動物数／群、性	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
マウス／CD-1 系	腹腔内投与（ヒト血清アルブミン溶液／水溶液、ヒト血清アルブミンの含有割合は最終報告書に未記載）	NT 101 2.500、3.125、3.910、4.890、6.110、7.640、9.550 pg/animal	10／群、雄	3.910 pg /animal	NA	プロビット解析による LD_{50} は 6.9698 pg/animal であった。生存動物の一般状態観察において異常は認められなかった。	適	[redacted]
マウス／CD-1 系	腹腔内投与 (0.2%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液)	NT 201 3.910、4.890、6.110、7.640、9.550、11.940 pg/animal	10／群、雄	3.910 pg /animal	NA	プロビット解析による LD_{50} は 5.37 pg/animal であった。生存動物の一般状態観察において異常は認められなかった。	適	[redacted]

NA：該当データなし。

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

被験物質：NT 201

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与物質 投与量	動物数／群、性	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ラット／SD 系	筋肉内投与（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	NT 201 0、16、32、64 LDU/kg	3／群、雄	64 LDU/kg	NA	すべての投与群で死亡は認められなかった。64 LDU/kg 群の動物は、体重低下及び重度麻痺のため、投与後 3 日目に安楽死の処置が取られた。一般状態観察では、すべての投与群で、不安定姿勢及びこわばり運動が投与後 48 時間から又は投与後 72 時間に認められ、64 LDU/kg 群では運動性低下なども認められた。後肢麻痺症状評価では、すべての投与群で投与肢の麻痺が認められた。後肢麻痺は投与後 24 時間から認められ、その重症度は投与後 48 から 96 時間に最大となった。体重測定では、16 及び 32 LDU/kg 群で体重増加抑制、64 LDU/kg 群で体重低下が認められた。	否	[redacted]

NA：該当データなし。

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

被験物質：NT 101

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与物質 投与量	動物数／群、性	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
ラット／SD 系	経口又は腹腔内投与 (0.1%ヒト血清アルブミン及び 0.9% 塩化ナトリウム含有 20 mM リン酸緩衝液／水溶液)	NT 101 経口投与 0、300000、1000000、3000000 LDU/animal A 型ボツリヌス毒素複合体 a) 経口投与 4000、8000、12000 LDU/animal NT 101 腹腔内投与（陽性対照） 10、15 LDU/animal	5／群、雌雄又は 3／群、雌（陽性対照）	NT 101 NA A 型ボツリヌス毒素複合体 a) 4000 LDU/animal	NT 101 300000 LDU/animal A 型ボツリヌス毒素複合体 a) 8000 LDU/animal	NT 101（経口投与） 300000 LDU/animal 群の雄 1 例及び雌 3 例が投与後 2 日目に、1000000 LDU/animal 群の雄 3 例及び雌 2 例、並びに 3000000 LDU/animal 群の雌雄各 4 例が投与後 3 日までに死亡した。体重測定では、300000 LDU/animal 群の雌 2 例で体重増加抑制が認められた。 A 型ボツリヌス毒素複合体 a)（経口投与） 8000 LDU/animal 群の雌雄各 2 例が投与後 5 日までに、12000 LDU/animal 群の雄 1 例及び雌 3 例が投与後 8 日までに死亡した。体重測定では、8000 LDU/animal 群の雌 1 例で体重増加抑制が認められた。 陽性対照群 全例が投与後 9 日までに死亡した。	適	[redacted]

NA：該当データなし。
a）複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素複合体

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：NT 201

動物種 ／系統	投与経路 (溶媒／投与形態)	投与期間	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
マウス ／CD-1 系	筋肉内投与 （右腓腹筋） （0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	28 週間 （6 及び 13 週間間隔で計 3 回投与し、最終投与後 9 週間目に剖検を実施した）	NT 201 及びボトックス® 0.262、0.328、0.410、0.512 及び 0.641 LDU/animal/回 Dysport® 0.640、0.800、1.000、1.250 及び 1.562 LDU/animal/回	10／群、雄	いずれの試験群も投与に関連する死亡は認められなかった。一般状態観察では、3 種類の製剤すべての投与群において、右後肢の麻痺が認められ、投与量に応じて重症化及び持続した。また、初回投与後と比べ、2 及び 3 回目投与後に麻痺の程度が強くなるとともに持続時間が延長する傾向を示した。NT 201 及びボトックス®投与群の麻痺は同程度であった。体重測定では、3 種類の製剤すべての投与群において、投与後の一過性の体重低下が認められた。後肢下腿径測定では、3 種類の製剤すべてにおいて、3 回目投与前及び最終測定時の右後肢下腿径が、左後肢のそれと比べて低値を示した。病理組織学的検査では、3 種類の製剤すべての最高用量群において、右腓腹筋における限局性筋線維萎縮、限局性再生筋線維、限局性リンパ組織球性浸潤及び限局性筋線維サイズの大小不同が認められた。これらの発生率に差は認められず、NT 201 及びボトックス®投与群で程度に差はなかったが、限局性筋線維萎縮及び限局性再生筋線維については、NT 201 及びボトックス®投与群の動物よりも程度の強い動物が Dysport®投与群に認められた。左腓腹筋について、NT 201 投与群に所見は認められなかったが、ボトックス®及び Dysport®投与群の一部の動物で、限局性筋線維萎縮、限局性再生筋線維及び限局性リンパ組織球性浸潤が認められた。NT 201 の無毒性量は 0.262 LDU/animal/回（6 及び 13 週間間隔で計 3 回投与）未満と考えられた。	適	[redacted]

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

被験物質：NT 201

動物種 ／系統	投与経路 (溶媒／投与形態)	投与期間	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ウサギ ／NZW 系	筋肉内投与 （左腰部筋） （0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	最大 5 週間 （2 週間間隔で最大計 3 回投与し、最終投与の 5 又は 9 日後に剖検を実施）	NT 201 2.5、3.5、5、10、20、40 LDU/kg/回（2 週間間隔で最大 3 回投与）	3 ／群、 雌	5 LDU/kg/回以上の投与動物は、初回又は 2 回目投与後に死亡、又は状態悪化のため安楽死の処置が取られた。3.5 LDU/kg/回では後肢のこわばりが 1 例に認められた。2.5 LDU/kg/回では NT 201 投与に関連する一般状態変化は認められなかった。すべての投与量で、体重低下及び摂餌量減少が認められ、2.5 及び 3.5 LDU/kg/回における体重低下及び摂餌量減少は、他の投与量のそれらと比較して軽度であった。投与部位の肉眼観察では、3.5 LDU/kg/回以上の一部の動物で、紅斑、浮腫、血腫又は落屑が認められたが、明白な局所刺激性は認められなかった。ウサギの投与量として、2.5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 3 回投与）の忍容性が良好であり、3.5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 2 回投与） が最大耐量と考えられた。	否	[redacted]

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 反復投与毒性試験 サル 13 週間反復投与毒性試験

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験		試験番号：[redacted]
動物種／系統：カニクイサル	投与期間： 13 週間（4 週間間隔で計 4 回投与し、最終投与の約 1 週間後に剖検を実施した）	被験物質：NT 201
投与開始時月齢：雄 32-36、雌 32-43 カ月齢	休薬期間 ：なし	CTD における記載箇所：4.2.3.2-3
初回投与年月日：20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日	投与方法：筋肉内投与（左腓腹筋）	
無毒性量：8 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 4 回投与）	溶媒／投与形態： 0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液	GLP 適用：適
特記事項：NT 201 投与群と同じ投与条件のボトックス®投与群を設定し、毒性像の比較を行った。		

投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201						ボトックス®					
	0		4		8		16		4		8		16	
動物数	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
特記すべき所見														
死亡及び途中解剖動物数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態観察 [a)]														
左腓腹筋 減少	-	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
跛行	-	-	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
運動障害	-	-	-	-	P	P	P	P	-	-	P	-	P	P
削痩	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	P	-	P
体重（kg）														
投与開始日	2.8	2.4	2.8	2.6	2.7	2.6	2,7	2.5	3.0	2.6	2.7	2.7	2.7	2.5
最終測定日	2.8	2.6	2.9	2.6	2.7	2.4	2.4	2.0	2.6	2.7	2.6	2.6	2.4	2.2
体重増加量（kg） [b)]	+0.03	+0.18	+0.09	-0.05	-0.06	-0.13	-0.26	-0.56	-0.03	+0.14	-0.07	-0.07	-0.30	-0.28

M：雄、F：雌 NE：実施しなかった。- ：所見なし。

a）P：所見あり。

b）投与開始日から最終測定日にかけての体重増加量を示す。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験（続き）														試験番号：[redacted]
投与量	溶媒対照		NT 201						ボトックス®					
（LDU/kg/回）	0		4		8		16		4		8		16	
動物数	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
摂餌量（g/animal/day）														
投与開始日	92	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
2 回目投与日	100	83	100	92	100	100	100	100	100	100	92	75	100	100
3 回目投与日	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	92
4 回目投与日	100	92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
最終測定前日	100	100	100	100	100	83	100	100	100	100	100	100	67	42
最終測定日	100	67	100	75	100	83	100	50	100	83	100	67	100	25
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血圧及び心拍数測定	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M：雄、F：雌　-：特記すべき所見なし。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験（続き）														試験番号：[redacted]
投与量	溶媒対照		NT 201						ボトックス®					
（LDU/kg/回）	0		4		8		16		4		8		16	
動物数	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
剖検 a)														
左腓腹筋　小型	0	0	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
器官重量														
左腓腹筋														
絶対重量（g）	13.5	10.6	9.4	5.8	6.6	4.4	4.3	3.9	6.7	6.7	6.3	5.1	5.7	5.3
相対重量（体重比%）	0.438	0.418	0.337	0.235	0.252	0.192	0.185	0.181	0.238	0.254	0.241	0.204	0.256	0.244
右腓腹筋														
絶対重量（g）	12.5	11.3	14.8	10.9	11.3	9.4	9.4	7.1	15.9	12.0	11.7	10.6	9.8	8.9
相対重量（体重比%）	0.407	0.447	0.525	0.440	0.433	0.395	0.396	0.331	0.540	0.454	0.452	0.426	0.436	0.410

M：雄、F：雌
a）動物数を示す。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験（続き）														試験番号：[redacted]
投与量	溶媒対照		NT 201						ボトックス®					
（LDU/kg/回）	0		4		8		16		4		8		16	
動物数	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
病理組織学的検査														
左腓腹筋														
びまん性筋線維萎縮	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
軽度	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
中等度	0	0	3	2	3	2	2	1	2	3	3	2	2	2
重度	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	1	1
核の密集	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
軽度	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
中等度	0	0	3	2	3	2	2	2	3	2	3	3	2	2
重度	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
炎症細胞を伴う筋線維の変性	0	0	1	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2
軽微	0	0	1	2	3	2	1	1	2	2	3	2	2	1
軽度	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
中等度	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
線維化の増加 a)	0	0	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	2	1
軽微	0	0	2	2	1	1	2	0	1	0	2	1	2	0
軽度	0	0	1	0	2	1	0	1	2	2	1	1	0	0
中等度	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1

M：雄、F：雌

a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験（続き）														試験番号：[redacted]
投与量	溶媒対照		NT 201						ボトックス®					
（LDU/kg/回）	0		4		8		16		4		8		16	
動物数	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
病理組織学的検査														
右腓腹筋														
筋線維サイズの大小不同	0	0	1	2	3	2	3	3	1	2	3	3	3	3
軽微	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2	2	2	2	2
軽度	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	1	1	1	1
中等度	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
核の密集	0	0	0	0	3	2	3	3	0	2	3	3	2	1
軽微	0	0	0	0	2	2	1	2	0	2	3	2	1	0
軽度	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	1	1	1
線維化の増加 a)														
軽微	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0

M：雄、F：雌
a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

2.6.7.7.2　反復投与毒性試験　サル 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験		試験番号：[redacted]
動物種/統：カニクイザル	投与期間：37 週間（4 週間間隔で計 10 回投与し、最終投与の約 1 週間後に剖検を実施した）	被験物質：NT 201
投与開始時月齢：26-30 カ月齢	休薬期間：6 カ月	CTD における記載箇所：4.2.3.2-4
初回投与年月日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法： 筋肉内投与（左腓腹筋）	
無毒性量：12 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 10 回投与）	溶媒／投与形態： 0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液	GLP 適用系：適
特記事項：0 及び 12 LDU/kg/回群の投与部位である左腓腹筋について、免疫組織学的検査（ネスチン免疫組織染色）を実施した。		

投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		4		8		12	
動物数	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6
トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
特記すべき所見								
死亡及び途中解剖動物数	0	0	0	0	1 [a)]	0	0	0
一般状態観察 [b)]								
左腓腹筋　萎縮	0	0	4	4	4	4	6	6
跛行	0	0	0	0	2 [c)]	0	0	0
体重（kg）								
投与開始前日	2.390	2.118	2.363	2.190	2.418	2.168	2.388	2.115
投与期間終了時	2.683	2.458	2.670	2.420	2.463 [d)]	2.353	2.482	2.128
体重増加量（kg） [e)]	0.293	0.340	0.308	0.230 *	0.103 [d)]*	0.185 **	0.093 *	0.013**

M：雄、F：雌　NE：実施しなかった。* p< 0.05、 ** p< 0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）

a）Day 85 以降、非投与部位である右後肢に腫脹等の変化が認められ、有効な治療を見出すことができなかったため、Day 176 に安楽死処置が施された。病理組織学的に慢性活動性炎症に関連した表皮潰瘍／痂疲が認められた。

b）動物数を示す。

c）跛行が投与期間中一過性に認められた。

d）途中解剖動物のデータを除く（n=3）。

e）投与開始前日から投与期間終了時にかけての体重増加量を示す。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		4		8		12	
動物数	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血圧及び心拍数測定	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検 a)								
検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
左腓腹筋　小型	0	0	4	4	3	4	4	4
器官重量								
検査数	4	4	4	4	3	4	4	4
左腓腹筋								
絶対重量（g）	11.36	12.36	5.38	4.21**	4.11 b)**	4.26**	5.09	4.45**
相対重量（体重比%）	0.41483	0.48735	0.20876	0.17048**	0.17460 b)**	0.17708**	0.21137	0.20327**
右腓腹筋								
絶対重量（g）	11.82	12.61	13.05	11.17	10.26 b)	10.63	10.35	9.18**
相対重量（体重比%）	0.43217	0.49656	0.50477	0.45236	0.43725 b)	0.44288	0.43058	0.42118

M：雄、F：雌　-：特記すべき所見なし。* p< 0.05、 ** p< 0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）

a）動物数を示す。

b）途中解剖動物のデータを除く（n=3）。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		4		8		12	
動物数	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6
病理組織学的検査								
検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
左腓腹筋								
筋線維サイズの減少	2	0	4	4	4	4	4	4
軽微	2	0	0	0	0	0	0	0
軽度	0	0	3	1	0	0	0	0
中等度	0	0	1	3	2	1	2	2
重度	0	0	0	0	2	3	2	2
筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加 a)	0	0	4	4	4	4	4	4
軽微	0	0	2	1	0	0	0	0
軽度	0	0	1	2	3	3	3	2
中等度	0	0	1	1	1	1	1	2
筋線維の変性	0	0	2	3	4	3	4	4
軽微	0	0	1	1	3	2	2	3
軽度	0	0	1	2	1	1	2	0
中等度	0	0	0	0	0	0	0	1

M：雄、F：雌
a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		4		8		12	
動物数	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6
病理組織学的検査								
検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
左腓腹筋								
脂肪細胞増加	0	0	1	2	4	4	4	4
軽微	0	0	1	2	4	1	2	2
軽度	0	0	0	0	0	2	2	2
中等度	0	0	0	0	0	1	0	0
ネスチン免疫組織染色								
神経筋接合部の陽性反応								
所見あり	4	4	NE	NE	NE	NE	0	0
筋形質全体の陽性反応	0	0	NE	NE	NE	NE	4	4
軽微	0	0					1	0
軽度	0	0					2	3
中等度	0	0					1	1
筋鞘膜下に限局した陽性反応								
軽微	0	0	NE	NE	NE	NE	2	4

M：雄、F：雌　NE：実施しなかった。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		4		8		12	
動物数	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6
病理組織学的検査								
検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
右腓腹筋								
筋線維サイズの減少	0	0	0	0	2	1	4	3
軽微	0	0	0	0	1	1	3	1
軽度	0	0	0	0	0	0	1	2
中等度	0	0	0	0	1	0	0	0
筋線維サイズの大小不同	0	0	2	4	3	4	4	4
軽微	0	0	2	4	2	3	2	1
軽度	0	0	0	0	1	1	2	3
筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加 a)	0	0	0	0	1	0	3	0
軽微	0	0	0	0	0	0	3	0
軽度	0	0	0	0	1	0	0	0
脂肪細胞増加								
軽微	0	0	0	0	2	1	0	0

M：雄、F：雌

a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		4		8		12	
動物数	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6
病理組織学的検査								
検査数	4	4	4	4	4	4	4	4
左大腿四頭筋								
筋線維サイズの減少								
軽微	0	0	1	0	2	0	1	1
筋線維サイズの大小不同								
軽微	0	0	2	1	3	3	4	4
脂肪細胞増加								
軽微	0	0	0	0	0	1	0	2

M：雄、F：雌

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		4		8		12	
動物数	M:2	F:2	NE	NE	NE	NE	M:2	F:2
回復性の評価								
体重（kg）								
休薬期間開始時	2.505	2.435					2.470	2.075
休薬期間終了時	2.710	2.810					3.415	2.665
体重増加量（kg）[a]	0.205	0.375					0.945	0.590
一般状態観察 [b]								
左腓腹筋　萎縮	0	0					2	2
剖検 [b]								
左腓腹筋　小型	0	0					2	2
器官重量								
左腓腹筋								
絶対重量（g）	12.53	11.21					6.64	5.97
相対重量（体重比%）	0.44980	0.42109					0.19514	0.23108
右腓腹筋								
絶対重量（g）	11.09	10.96					13.86	11.41
相対重量（体重比%）	0.40219	0.41438					0.40825	0.43917

M：雄、F：雌　NE：実施しなかった。
a）休薬期間開始時から休薬期間終了時にかけての体重増加量を示す。
b）動物数を示す。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		4		8		12	
動物数	M:2	F:2	NE	NE	NE	NE	M:2	F:2
回復性の評価								
病理組織学的検査								
左腓腹筋								
筋線維サイズの減少	0	0					2	2
中等度	0	0					2	1
重度	0	0					0	1
筋線維の変性	0	0					2	2
軽微	0	0					1	2
軽度	0	0					1	0
脂肪細胞増加	0	0					2	2
軽微	0	0					0	1
軽度	0	0					2	1
筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加 a)	0	0					2	2
中等度	0	0					1	1
重度	0	0					1	1
筋線維サイズの大小不同	0	0					2	2
中等度	0	0					0	1
重度	0	0					2	1

M：雄、F：雌　NE：実施しなかった。
a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 カ月間反復投与毒性試験及び 6 カ月間回復性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		4		8		12	
動物数	M:2	F:2	NE	NE	NE	NE	M:2	F:2
回復性の評価								
病理組織学的検査								
左腓腹筋								
ネスチン免疫組織染色								
神経接合部の陽性反応								
所見あり	2	2					0	0
筋形質全体の陽性反応								
軽微	0	0					2	2
筋鞘膜下に限局した陽性反応								
軽度	0	0					2	2
右腓腹筋								
筋線維サイズの大小不同								
軽微	0	0					0	2

M：雄、F：雌　NE：実施しなかった。

2.6.7.7.3　反復投与毒性試験　様々な投与間隔での筋肉内投与毒性比較

報告書の題名：NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与毒性比較		試験番号：[redacted]
動物種／系統：カニクイザル	投与期間： 13、25 又は 37 週間（4、8 又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回投与し、最終投与 1 週間後に剖検を実施した）	被験物質：NT 201
投与開始時月齢： 27-29 カ月齢	休薬期間：なし	CTD における記載箇所：4.2.3.2-5
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日	投与方法：筋肉内投与（左腓腹筋及び左上腕二頭筋）	
無毒性量：16 LDU/kg/回（8 週間及び 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回投与）	溶媒/投与形態： 0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液	GLP 適用：適
特記事項：なし		

投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		16		16		16	
投与間隔（週）	12		12		8		4	
動物数	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4
トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
特記すべき所見								
死亡及び途中解剖動物数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態観察 [a]								
左腓腹筋及び左上腕二頭筋　萎縮	0	0	4	4	4	4	4	4
体重（kg）								
投与開始前日	2.405	2.235	2.415	2.293	2.393	2.260	2.375	2.158
最終測定日	2.783	2.655	3.115	2.493	2.540	2.435	2.248	1.950*
体重増加量 (g) [b]	+378	+420	+700	+200	+148	+175	-128*	-208**
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

M：雄、F：雌　NE：実施しなかった。-：特記すべき所見なし。

* p<0.05、** <0.01 vs. 溶媒対照群（Student’s test 又は Mann-Whitney test、8 及び 4 週間間隔群の最終測定日と同一日の溶媒対照群のデータと比較した）。

a）動物数を示す。

b）投与開始前日から最終測定日にかけての体重増加量を示す。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与による毒性比較（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		16		16		16	
投与間隔（週）	12		12		8		4	
動物数	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血圧及び心拍数測定	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検								
左腓腹筋　小型	0	0	4	4	4	4	4	4
左上腕二頭筋　小型	1	0	4	4	4	4	3	3
器官重量 [a)]								
左腓腹筋								
絶対重量（g）	10.93	9.66	4.92*	4.57	5.93	5.10	2.92	2.61
相対重量（体重比%）	0.39076	0.35701	0.15725*	0.17862	0.22539	0.21109	0.12616	0.12903
右腓腹筋								
絶対重量（g）	11.20	9.83	10.57	10.62	11.61	9.54	5.37	4.43
相対重量（体重比%）	0.39877	0.36572	0.35219	0.41454	0.44596	0.39184	0.23079	0.22341

M：雄、F：雌　-：特記すべき所見なし。
* p<0.05、** <0.01 vs. 溶媒対照群（Student’s test）
a）統計解析は 12 週間間隔群のみ実施した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与による毒性比較（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		16		16		16	
投与間隔（週）	12		12		8		4	
動物数	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4
器官重量 a)								
左上腕二頭筋								
絶対重量（g）	10.14	9.95	4.26#	3.95**	3.53	4.08	4.33	3.90
相対重量（体重比%）	0.35862	0.36966	0.13853**	0.15603**	0.13483	0.16464	0.18909	0.19428
右上腕二頭筋								
絶対重量（g）	10.80	9.21	10.64	10.30	9.87	10.27	7.03	6.91
相対重量（体重比%）	0.38164	0.34475	0.33957	0.40482	0.37765	0.41550	0.30498	0.34882
病理組織学的検査								
左腓腹筋								
筋線維サイズの減少	0	0	4	4	4	4	4	4
軽微	0	0	0	0	0	0	1	0
軽度	0	0	1	0	1	0	0	2
中等度	0	0	2	0	1	2	1	0
重度	0	0	1	4	2	2	2	2
筋線維サイズの大小不同	0	0	4	4	4	3	1	0
軽微	0	0	0	0	2	0	0	0
軽度	0	0	2	1	0	3	1	0
中等度	0	0	2	3	2	0	0	0

M：雄、F：雌
* p<0.05、** <0.01 （Student’s test）、# p<0.05（Mann-Whitney test） vs. 溶媒対照群
a）統計解析は 12 週間間隔群のみ実施した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与による毒性比較（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		16		16		16	
投与間隔（週）	12		12		8		4	
動物数	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4
病理組織学的検査								
左腓腹筋								
脂肪細胞増加	0	0	4	4	3	4	3	1
軽微	0	0	1	0	2	2	3	1
軽度	0	0	3	3	1	2	0	0
中等度	0	0	0	1	0	0	0	0
筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加 a)	0	0	4	4	4	4	3	3
軽微	0	0	0	0	1	1	3	2
軽度	0	0	1	0	2	3	0	1
中等度	0	0	2	3	1	0	0	0
重度	0	0	1	1	0	0	0	0
筋線維の変性								
軽微	0	0	1	1	1	0	1	0
左上腕二頭筋								
筋線維サイズの減少	0	0	4	4	4	4	4	4
軽度	0	0	0	0	0	0	3	2
中等度	0	0	1	1	2	1	1	2
重度	0	0	3	3	2	3	0	0

M：雄、F：雌

a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与による毒性比較（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		16		16		16	
投与間隔（週）	12		12		8		4	
動物数	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4
病理組織学的検査								
左上腕二頭筋								
筋線維サイズの大小不同	0	0	4	4	1	3	3	4
軽微	0	0	2	0	1	3	2	3
軽度	0	0	2	4	0	0	1	1
脂肪細胞増加	0	0	4	3	4	4	1	1
軽微	0	0	3	3	3	4	1	1
軽度	0	0	1	0	1	0	0	0
筋内膜／筋周膜のコラーゲン増加 a)	0	0	4	4	4	4	4	4
軽微	0	0	0	0	0	0	4	4
軽度	0	0	0	0	2	1	0	0
中等度	0	0	4	3	2	3	0	0
重度	0	0	0	1	0	0	0	0
筋線維の変性	0	0	3	3	4	2	0	4
軽微	0	0	1	3	3	2	0	4
軽度	0	0	2	0	1	0	0	0

M：雄、F：雌

a）マーチウス・スカーレット・ブルー染色にて評価した。

報告書の題名：NT 201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与による毒性比較（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		16		16		16	
投与間隔（週）	12		12		8		4	
動物数	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4	F：4
病理組織学的検査								
右腓腹筋								
筋線維サイズの大小不同	0	0	3	3	1	4	4	4
軽微	0	0	3	3	1	3	1	1
軽度	0	0	0	0	0	1	3	3
右上腕二頭筋								
筋線維サイズの大小不同	0	0	0	3	3	4	4	4
軽微	0	0	0	3	3	4	3	3
軽度	0	0	0	0	0	0	1	1

M：雄、F：雌

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.10　がん原性試験

該当試験なし。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：NT 201

動物種／系統	投与経路（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質投与量	動物数／群、性	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
ラット／SD 系（妊娠ラット）	筋肉内投与（左腓腹筋） （0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	2 週間（妊娠 6、12 及び 19 日に投与し、妊娠 20 日に帝王切開検査を実施した）	NT 201 0、3、10、30 LDU/kg/回	5-6／群、雌	すべての投与群で死亡例は認められなかった。一般状態観察では、10 及び 30 LDU/kg/回群のすべての動物で、妊娠期間終了時に左後肢の跛行が認められた。体重測定では、すべての投与群で、妊娠 6 から 11 日に体重増加抑制が認められ、30 LDU/kg/回群の妊娠 20 日の体重は低値を示した。摂餌量測定では、30 LDU/kg/回群で軽度な減少を示した。剖検及び器官重量測定では、すべての投与群で左腓腹筋の小型及び重量低値が、10 及び 30 LDU/kg/回群で軽度な右腓腹筋の重量低値が認められた。母動物の黄体数、着床数及び後期吸収胚、並びに胎児の体重、性比及び外表に関して、NT 201 投与の影響は認められなかった。30 LDU/kg/回群では、早期吸収胚数及びそれに関連して着床後胚損失率が対照群と比較してわずかに増加したが、この増加は主に 2 例の母動物に起因していた。	否	[redacted]

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

動物種／系統	投与経路（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質投与量	動物数／群、性	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
ラット／SD 系（離乳後幼若ラット）	筋肉内投与（左右臀部筋又は左右腓腹筋） （0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液）	5 週間（3 週齢から 7 週齢まで投与し、8 週齢時に剖検を実施した）	NT 201 0、10、20、30 LDU/kg/回（2 週間隔で計 3 回投与） 10 LDU/kg/回（1 週間間隔で計 5 回投与）	5／群、雌雄	すべての投与群で死亡は認められなかった。一般状態観察では、すべての投与群で投与部位の筋萎縮が認められた。また、20 LDU/kg/回を 2 週間間隔で腓腹筋に投与した群では、左後肢の不全麻痺が認められた。雄の 10 LDU/kg/回を 2 週間間隔で投与した群を除いたすべての投与群で、体重増加抑制が認められ、最終体重は低値となった。摂餌量測定では、すべての投与群で摂餌量が減少し、30 LDU/kg を 2 週間間隔で投与した群の減少が顕著であった。剖検及び器官重量測定では、すべての投与群で、投与部位の小型及び重量低値が認められた。	否	[redacted]

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：重要な試験

2.6.7.12.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 ウサギ受胎能試験

報告書の題名：NT 201 のウサギにおける筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験				試験番号：[redacted]
試験計画：ICH4.1.1 準拠：適	投与期間：雄 8 週間、雌 4 週間（雄は交配前 2 週間から剖検前日まで 2 週間間隔で計 5 回投与、雌は交配前 2 週間から妊娠 13 日まで約 2 週間間隔で計 3 回投与し、最終投与の翌日に剖検を実施）		被験物質：NT 201	
動物種／系統：ウサギ／NZW 系	休薬期間：なし		CTD における記載箇所：4.2.3.5.1-1	
投与開始時週齢：雄 16-19 週齢、雌 16-17 週齢	投与方法：筋肉内投与（左腰部筋）			
初回投与年月日：20[redacted] 年[redacted]月[redacted]日	溶媒／投与形態： 0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液		GLP 適用：適	
無毒性量： 親動物の一般毒性学的無毒性量：1.25 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与） 親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量：3.5 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）			交尾成立日：妊娠 0 日 帝王切開日：妊娠 14 日	
特記事項：なし				

投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	1.25	2.5	3.5
雄	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE
	評価動物数	20	20	20	20
	死亡及び途中解剖動物数	0	0	0	2 [a)]
	一般状態観察				
	後肢麻痺 [b)]	0	0	1	2

NE：実施しなかった。
a）1 例が死亡、もう 1 例は状態悪化のため途中解剖となった。
b）動物数を示す。

報告書の題名：NT201 のウサギにおける筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）		0 (溶媒対照)	1.25	2.5	3.5
雄	体重（g） a)	3631	-4.1	-18.2**	-27.0**
	体重増加量（g） b)	+492	+427	-20**	-308**
	摂餌量 c)	145	+0.7	-53.8**	-53.8**
	交配検査				
	交尾動物数	19	18	17	18
	授胎動物数	18	16	16	16
	精子検査				
	評価動物数	20	20	20	18
	精子数（10^6 sperm/gram of testis）	84.7	76.2	87.8	94.0
	総運動率（%）	95.5	95.2	96.2	97.3
	運動率（curvilinear velocity, %）	355.3	347.6	366.8	352.3
	運動率（linearity, %）	41.1	40.6	40.7	43.4
	剖検 d)				
	暗色又は暗色巣（投与部位）	2	4	0	4
	器官重量（精巣、精巣上体、前立腺）	-	-	-	-
	病理組織学的検査				
	下垂体、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢	-	-	-	-

- ：特記すべき所見なし。** p<0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett test）

a）Day52 の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。
b）Day0 から Day52 にかけての体重増加量を示す。
c）Day49 から Day52 にかけての摂餌量を示す。溶媒対照群は平均摂餌量（g/animal/day）を、被験物質投与群は対照群との差を%で示す。
d）動物数を示す。

報告書の題名：NT201 のウサギにおける筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	1.25	2.5	3.5
雄	病理組織学的検査				
	投与部位				
	炎症性細胞浸潤	1	2	0	3
	軽微	0	1	0	0
	軽度	1	0	0	0
	中等度	0	1	0	3
	筋細胞壊死	1	1	0	3
	軽微	0	1	0	0
	軽度	1	0	0	2
	重度	0	0	0	1
	出血	1	2	0	3
	軽微	0	1	0	0
	軽度	1	0	0	0
	中等度	0	1	0	2
	重度	0	0	0	1
	筋線維萎縮				
	重度	0	1	0	3
	脂肪細胞浸潤	0	0	0	3
	軽微	0	0	0	1
	軽度	0	0	0	1
	中等度	0	0	0	1

報告書の題名：NT201 のウサギにおける筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	1.25	2.5	3.5
雌	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE
	評価動物数	20	20	20	20
	死亡及び瀕死動物数	0	0	0	0
	一般状態観察	-	-	-	-
	交配前体重（g） a)	3412	-1.3	-3.3	-5.0
	交配前体重増加量（g） b)	+182	+92*	+29**	+18**
	妊娠時体重（g） c)	3708	-4.3	-9.1**	-12.8**
	妊娠時体重増加量（g） d)	+303	+215*	+118**	+52**
	交配前摂餌量 e)	153	-9.8	-18.3*	-15.0
	妊娠時摂餌量 f)	170	-12.9	-27.1**	-31.2**
	剖検 g)				
	暗色巣（投与部位）	0	0	1	2
	器官重量（卵巣）	-	-	-	-
	病理組織学的検査	NE	NE	NE	NE

NE：実施しなかった。- ：特記すべき所見なし。* p<0.05、** p<0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett test）

a）交配前（Day14）の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

b）交配前期間（Day0-14）の体重増加量を示す。

c）妊娠 13 日の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

d）妊娠期間（妊娠 0-13 日）の体重増加量を示す。

e）交配前期間（Day10-14）の摂餌量を示す。溶媒対照群は平均摂餌量（g/animal/day）を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

f）妊娠期間（妊娠 9-13 日）の摂餌量を示す。溶媒対照群は平均摂餌量（g/animal/day）を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

g）動物数を示す。

報告書の題名：NT201 のウサギにおける筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	1.25	2.5	3.5
雌	交配検査				
	平均交配所要日数	1.60	1.89	1.95	1.95
	精子が確認された雌動物数（交尾率%）	20（100）	19（95）	19（95）	20（100）
	妊娠動物数（受胎率%）	19（95）	16（84）	18（95）	17（85）
	流産又は全胚吸収母体数	0	0	0	0
	帝王切開				
	平均黄体数	11	11	11	11
	平均着床数	9	9	9	9
	平均着床前胚損失率（%）	13.3	14.1	14.8	12.5
	平均生存胎児数	9	9	9	9
	平均着床後死亡率（%）	1.1	2.1	0.6	1.9

2.6.7.12.2 胚・胎児発生毒性試験 ラット胚・胎児発生毒性試験

報告書の題名：NT 201 のラットにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験							試験番号：[redacted]		
試験計画：ICH4.1.3 準拠：適		投与期間： 妊娠 6 から 19 日（連日又は間歇投与）					被験物質： NT 201		
動物種/系統：ラット／SD 系		交尾成立日：妊娠 0 日					CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-2		
交配開始時週齢：10-13 週齢		帝王切開日：妊娠 20 日					GLP 適用：適		
初回投与年月日： 20[redacted] 年[redacted]月[redacted] 日及び[redacted]月[redacted] 日		投与方法： 筋肉内投与（左腓腹筋）					溶媒／投与形態：0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液		
無毒性量： 母動物の一般毒性学的無毒性量：10 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）又は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与） 母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量：30 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）、18 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）及び 7 LDU/kg/回（妊娠 6 日から 19 日にかけての連日投与）									
特記事項：週 1 回投与群では NT 201 の 3、10 及び 30 LDU/kg を妊娠 6、12 及び 19 日に投与した。週 2 回投与群では NT 201 の 2、6 及び 18 LDU/kg を妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与した。連日投与群では、NT 201 の 7 LDU/kg を妊娠 6-19 日に投与した。									
投与量（LDU/kg/回）		0 （溶媒対照）	7	3	10	30	2	6	18
投与間隔		連日		週 1 回			週 2 回		
母体／雌動物	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	妊娠動物数	25	24	25	25	24	22	24	25
	死亡及び途中解剖動物数	0	0	0	0	1 a)	0	0	0
	流産又は全胚吸収母体数	0	0	0	0	1	0	0	0
	一般状態								
	左後肢 跛行 b)	0	25	23	25	25	25	25	25

NE：実施しなかった。
a）妊娠 19 日に死亡した。剖検で毒性所見が認められなかったことから偶発的なものと判断した。
b）動物数を示す。

報告書の題名：NT 201 のラットにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験（続き）							試験番号：[redacted]		
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	7	3	10	30	2	6	18
投与間隔		連日		週 1 回			週 2 回		
母体／雌動物	体重（g） a)	379.4	-10.1**	+2.2	+1.4	-8.5**	+2.1	-1.2	-9.1**
	体重増加量（g） b)	+113.4	+72.8**	+123.5	+116.2	+86.2 **	+121.4	+110.6	+78.9**
	摂餌量 c)	27.2	-14.7**	+5.5	+6.3	-6.3	+5.5	+1.8	-7.4*
	器官重量 d)								
	左腓腹筋　絶対重量（g）	1.12	-46.5**	-37.1**	-41.3**	-48.3**	-42.9**	-45.7**	-48.1**
	相対重量（体重比%）	0.30	-39.3**	-36.7**	-43.3**	-40.0**	-40.0**	-43.3**	-43.3**
	右腓腹筋　絶対重量（g）	1.12	-23.5**	-5.4	-11.6*	-22.2**	-4.5	-5.4	-15.9**
	相対重量（体重比%）	0.30	-13.3**	-6.7	-13.3**	-13.3**	0.0	-3.3	-6.7
	剖検 e)								
	左腓腹筋　小型	0	14	20	23	23	24	25	23
	帝王切開								
	平均黄体数	13.9	14.1	13.9	15.2	13.7	13.8	13.9	14.0
	平均着床数	13.1	13.2	13.4	14.2	12.9	13.1	13.4	12.8
	平均着床前胚損失率 (%)	6.9	7.3	5.1	6.0	6.5	4.8	3.7	8.8

* p<0.05、** p<0.01 vs.溶媒対照群（体重及び摂餌量：Dunnett test、体重増加量及び器官重量：Dunn’s test）

a）妊娠 20 日の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

b）妊娠 6-20 日の体重増加量を示す。

c）妊娠 6-20 日の摂餌量を示す。溶媒対照群は平均摂餌量（g/animal/day）を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

d）溶媒対照群は平均重量を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

e）動物数を示す。

報告書の題名：NT 201 のラットにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験（続き）							試験番号：[redacted]		
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	7	3	10	30	2	6	18
投与間隔		連日		週 1 回			週 2 回		
胎児	評価母体数	25	24	25	25	23	22	24	25
	平均生存胎児数	11.3	12.3	12.3	12.9	12.0	12.3	12.7	12.2
	平均死亡胚・胎児数	1.8	0.9	1.1	1.3	0.8	0.8	0.7	0.6
	平均胚・胎児死亡率（%）	13.7	8.9	8.9	9.8	10.4	6.5	5.0	4.8
	平均胎児体重（g、雄）	4.2	4.0*	4.3	4.2	4.0	4.2	4.2	4.0
	平均胎児体重（g、雌）	3.9	3.8	4.1	4.0	3.8	3.9	4.0	3.7
	胎児の性比（雄%）	54.3	44.6	48.6	51.5	44.3	52.2	48.5	47.8
	胎児の奇形及び異常								
	外表検査	-	-	-	-	-	-	-	-
	内臓検査	-	-	-	-	-	-	-	-
	骨格検査	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特機すべき所見なし。* $p<0.05$ vs. 溶媒対照群（Dunn test）

2.6.7.12.3 胚・胎児発生毒性試験 ウサギ胚・胎児発生毒性試験

報告書の題名：NT 201 のウサギにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験				試験番号：[redacted]	
試験計画：ICH4.1.3 準拠：適		投与期間：妊娠 6、18 及び 28 日		被験物質： NT 201	
動物種/系統：ウサギ／NZW 系		交尾成立日：妊娠 0 日		CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-3	
初回投与年月日：20[redacted] 年[redacted]月[redacted]から[redacted] 日		帝王切開日：妊娠 29 日			
交配開始時週齢：16-19 週齢		投与方法：筋肉内投与（左腰部筋）		GLP 適用：適	
無毒性量： 母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日投与） 母動物の生殖機能に対する無毒性量は 2.5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日投与） 胚・胎児に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日投与）				溶媒／投与形態：0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液	
特記事項: NT 201 を妊娠 6、18 及び 28 日（剖検前日）に筋肉内投与した。					
投与量 (LDU/kg/回)		0 （溶媒対照）	1.25	2.5	5
母体／雌動物	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE
	妊娠動物数	21	21	22	21
	死亡及び途中解剖動物数	0	0	0	1 [a)]
	流産又は全胚吸収母体数	0	0	0	5 [b)]
	一般状態 [c)]				
	運動障害	0	0	0	9
	不安定姿勢	0	0	0	6
	跛行	0	0	0	2
	糞量減少	12	12	19	21
	後肢麻痺	0	0	0	1 [d)]

NE：実施しなかった。

a）後肢麻痺のため、妊娠 24 日に途中解剖となった。

b）妊娠 23 から 29 日にかけて流産した。これら動物では、流産前に体重及び摂餌量の低値が認められた。

c）動物数を示す。

d）途中解剖動物で認められた。

報告書の題名：NT201 のウサギにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験（続き）				試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）		0 （溶媒対照）	1.25	2.5	5
母体／雌動物	体重（g） a)	3722	-3.1	-6.7 *	-13.7 **
	体重増加量（g） b)	+358	+249	+51 **	-222 **
	摂餌量 c)	125	-13.6	-40.0 **	-56.8 **
	剖検				
	肺　暗色巣	0	0	0	2 d)
	肝臓　表面粗造	0	0	0	2 d)
	肝臓　蒼白化	0	0	0	2 d)
	帝王切開				
	平均黄体数	12.1	12.0	12.7	10.5
	平均着床数	10.2	10.6	10.6	8.5
	平均着床前胚損失率（%）	16.5	12.1	16.0	17.6

** p<0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett test）

a）妊娠 29 日の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

b）妊娠 6-29 日の体重増加量を示す。

c）妊娠 24-29 日の摂餌量を示す。溶媒対照群は平均摂餌量（g/animal/day）を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

d）流産のため途中解剖した動物で認められた。

報告書の題名：NT201 のウサギにおける筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験（続き）				試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）		0 （溶媒対照）	1.25	2.5	5
胎児	評価母体数	21	21	22	15
	平均生存胎児数	9.1	9.9	10.0	7.8
	平均死亡胚・胎児数	1.1	0.7	0.5	0.7
	平均胚・胎児死亡率（%）	12.0	6.1	5.6	10.5
	平均胎児体重（g、雄）	35.7	35.5	36.3	36.9
	平均胎児体重（g、雌）	34.3	36.4	34.7	33.7
	胎児の性比（% 雄）	49.5	42.5	51.1	53.6
	胎児の奇形/異常				
	外表検査	-	-	-	-
	内臓異常	-	-	-	-
	骨格検査	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし。

2.6.7.12.4 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

報告書の題名：NT 201 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験						試験番号：[redacted]
試験計画：ICH4.1.2 準拠：適		投与期間：妊娠 6 日から分娩後 21 日（連日又は間歇投与）				被験物質：NT 201
動物種/系統：ラット／SD 系		交尾成立日：妊娠 0 日				CTD における記載箇所：4.2.3.5.3-1
交配開始時週齢：10-13 週齢		投与方法：筋肉内投与（左又は右腓腹筋）				
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日		溶媒／投与形態：0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液				GLP 適用：適
同腹児数の調整/非調整：調整あり						
無毒性量： 母動物の一般毒性学的無毒性量：6 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与） 母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する無毒性量：20 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）及び 3 LDU/kg/回（妊娠 6 日から分娩後 21 日にかけて連日投与）						
特記事項：NT 201 の 2、6 及び 20 LDU/kg/回を、妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に週 1 回投与した。また、3 LDU/kg/回の NT 201 を妊娠 6 日から分娩後 21 日まで連日投与する群も設けた。						
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	2	6	20	3
投与間隔		連日	週 1 回	週 1 回	週 1 回	連日
F0 雌	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE	NE
	妊娠動物数	25	24	24	22	25
	死亡及び途中解剖母動物数	0	0	0	0	0
	全胎児死亡動物数	2	1	0	1	1
	全胚吸収母動物数	0	1	0	0	0
	一般状態観察 a)					
	左腓腹筋　萎縮	0	24	24	22	25
	左後肢　跛行	0	23	24	22	25
	腹部の限局性膨隆	0	0	10	20	22

NE：実施しなかった。
a）動物数を示す。

報告書の題名：NT201 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	2	6	20	3
投与間隔		連日	週 1 回	週 1 回	週 1 回	連日
F0 雌	妊娠 20 日体重（g） a)	378.8	+1.9	+1.8	-5.8*	-5.6*
	体重増加量（g、妊娠 6-20 日）	+115.6	+121.4	+119.4	+93.1 **	+95.2 **
	分娩後 21 日体重（g） a)	316.2	-1.9	-2.7	-13.3**	-14.2**
	体重増加量（g、分娩後 1-21 日）	+25.2	+13.6*	+15.2	+15.1	+5.0**
	妊娠 11-15 日摂餌量 a)	26.9	+4.5	+2.6	-6.7	-8.2*
	妊娠 6-20 日摂餌量 a)	27.3	+5.9	+4.0	-2.9	-3.7
	分娩後 4-7 日摂餌量 a)	53.3	-1.7	-1.5	-4.3	-9.0**
	分娩後 1-21 日摂餌量 a)	57.4	+2.4	+2.4	-1.9	-5.9
	平均妊娠期間（日数)	22.0	22.0	22.1	22.0	22.0
	剖検 b)					
	左腓腹筋　小型	0	24	24	22	25
F1 出生児	評価母体数	25	22	24	21	25
（離乳前）	平均着床痕数	13.4	14.0	13.8	13.6	12.9
	平均出産児数	12.1	12.4	12.5	11.9	11.8
	平均出生率（生存児／出産時）（%）	98.3	96.5	97.0	98.1	95.9
	出生体重（g）雄／雌	7.7／7.3	7.6／7.2	7.5／7.2	7.2**／7.0	7.6／7.1
	出生児の性比 (%雄)	48.5	48.0	52.8	46.7	49.3
	生後 4 日生存率 (%)	93.3	99.3	98.6	94.2	98.2
	離乳率 (%)	95.8	98.9	100	100	100
	離乳時体重（g）雄／雌	61.0／59.4	61.3／59.3	60.9／59.4	58.3／57.4	59.7／57.1

* p<0.05、** p<0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett test or Dunn test）

a） 溶媒対照群は平均体重（g）、又は平均摂餌量（g/anima/day）を示す。被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

b） 動物数を示す。

報告書の題名：NT201 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	2	6	20	3
投与間隔		連日	週 1 回	週 1 回	週 1 回	連日
F1 出生児（離乳前）	外形分化	-	-	-	-	-
F1 雄（離乳後）	離乳後評価動物数	25	25	25	25	25
	死亡及び途中解剖動物数	0	0	1[a)]	0	0
	一般状態	-	-	-	-	-
	交配前体重（g） [b)]	457.1	+3.4	+2.1	+1.9	+4.8
	交配前体重増加量（g、Day 0-77）	+395.8	+411.7	+404.8	+407.4	+419.2
	性成熟（亀頭分離）	-	-	-	-	-
	機能行動検査 [c)]	-	-	-	-	-
	交配検査					
	交尾動物数	25	25	24	25	25
	受胎動物数	20	22	20	21	18
	剖検	-	-	-	-	-
F1 雌（離乳後）	離乳後評価動物数	25	25	25	25	25
	死亡及び途中解剖動物数	0	0	1[d)]	0	0
	一般状態	-	-	-	-	-
	交配前体重（g） [b)]	262.2	+0.0	+2.1	+1.6	-1.0
	交配前体重増加量（g、Day 21-77）	+203.1	+203.0	+207.8	+209.2	+203.0
	妊娠 13 日体重（g） [e)]	332.2	0.0	+2.5	+1.5	-0.2
	妊娠時体重増加量（g、Day 0-13）	+59.3	+60.5	+58.7	+58.0	+59.6

- ：特記すべき所見なし。

a）一般状態悪化（運動失調、呼吸困難、閉眼及び立毛）のため Day84 に安楽死させた。剖検では、脳内に液体及び癒着が認められ、外傷に起因した状態悪化と考えられた。
b）雄は Day77、雌は Day 77 の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。
c）オープンフィールド及びモリス水迷路検査で評価した。
d）交配前の Day64 に死亡した。剖検では、肺に暗調部、暗色の胸水及び消化管に貯留物が認められた。死亡は偶発的と考えられた。
e）溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

報告書の題名：NT201 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）					試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）		0（溶媒対照）	2	6	20	3
投与間隔		連日	週 1 回	週 1 回	週 1 回	連日
F1 雌	性成熟（膣開口）	-	-	-	-	-
（離乳後）	機能行動検査 [a)]	-	-	-	-	-
	交配検査					
	交配所要日数	3.28	2.92	2.74	3.04	2.08
	精子が確認された雌動物数（交尾率%）	25（100）	25（100）	24 [b)]（96）	25（100）	25（100）
	妊娠動物数（受胎率%）	20（80）	22（88）	20（83）	21（84）	18（72）
	帝王切開					
	平均黄体数	17.7	17.7	18.1	16.8	16.3
	平均着床数	17.0	16.9	17.0	15.8	15.8
	平均着床前胚損失率 (%)	3.9	4.5	6.5	5.7	3.3
	剖検	-	-	-	-	-
F2 胎児	評価動物数	20	21 [(b)]	20	21	18
	平均生存胎児数/腹	16.1	16.2	16.6	14.6	14.8
	平均着床後胚損失率（%）	5.1	4.3	2.5	7.8	10.6

-：特記すべき所見なし。
a）オープンフィールド及びモリス水迷路検査で評価した。
b） 1 例は交配日不明のため除外した。

2.6.7.12.5　離乳後幼若ラットを用いた試験

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験		試験番号：[redacted]
動物種/系統：ラット／SD 系	投与期間：9 週間（3 週齢から 11 週齢まで投与し、12 週齢時に剖検を実施した）	被験物質：NT 201
試験開始時週齢：3 週齢	休薬期間：最終投与後 6 週間（約 17 週齢時に剖検を実施した）	CTD 記載箇所：4.2.3.5.4-2
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日	投与方法：筋肉内投与（左右臀筋に交互に投与、一部の動物の最終投与は皮下投与）	
無毒性量：5 LDU/kg/回未満（2 週間間隔で計 5 回投与）	溶媒／投与形態： 0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液／水溶液	GLP 適用：適
特記事項：NT 201 を 2 週間間隔で 5 回投与（投与日：Days 0、14、28、42 及び 56）した。投与期間終了時として、最終投与の 1 週間後（12 週齢時、Day 62/63）に、半分の動物を剖検に供した。残りの半分の動物は 14 週齢時（Day 81 から）に交配させ、妊娠ラットは妊娠 13 日目に帝王切開を、雄及び交配不成立の雌ラットは最終投与の約 6 週間後（約 17 週齢時、Day 102 及び 103）に剖検を実施した。 当該試験は 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に最終報告書が最終化されたが、その後、追加の病理組織学的検査が実施された（20[redacted]年[redacted]月[redacted]日最終報告書訂正）。		

投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：32	F：31	M：32	F：32	M：32	F：32	M：32	F：32
トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
特記すべき所見								
死亡	0	2 [a)]	1 [a)]	0	0	0	0	0
体重（g） [b)]	400.6	256.2	-6.7**	-10.4**	-17.1**	-15.5**	-30.4**	-29.5**
体重増加量（g） [c)]	+336.4	+205.4	+314.2*	+175.5**	+265.5**	+166.8**	+204.7**	+125.4**
摂餌量 [d)]	29.0	21.3	-9.1	-8.9	-9.6	-14.6	-23.6**	-29.1**

M：雄　F：雌　NE：実施しなかった。*p<0.05、 **p<0.01 vs 溶媒対照群（Dunnett’s test）

a） 投与時の麻酔又は剃毛/保定の影響によると考えられる死亡が認められた。
b） Day 60 の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。
c） Day0 から Day 61 にかけての体重増加量を示す。
d） 投与期間最終（Day 56-63）の摂餌量（g/animal/day）を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：32	F：31	M：32	F：32	M：32	F：32	M：32	F：32
一般状態 a)								
臀筋　萎縮	0	0	32	32	32	32	32	32
後肢　麻痺	0	0	0	0	0	0	4	4
後肢　跛行	0	0	0	0	12	11	29	25
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
脛骨長（mm、Day 57） b)	55.5	49.9	-1.0	0.0	-1.6**	-0.6	-2.9**	-1.3*
性成熟（膣開口又は亀頭分離）	-	-	-	-	-	-	-	-
行動学的評価								
（驚愕反射、聴覚反射、恐怖反応）	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査 c)								
血清クレアチニン（μmol/L）	41.3	46.8	37.4 **	41.3 **	33.4**	37.9**	30.2**	33.1**
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-

M：雄　F：雌　-：特記すべき所見なし。*p<0.05、 **p<0.01 vs 溶媒対照群（Dunnett’s test）

a） 動物数を示す。

b） 溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

c）溶媒対照群の雌は n=28、5 LDU/kg/回群の雄は n=31 で評価した。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
器官重量 a)								
検査数	16	16	15	16	16	16	16	16
精巣　絶対重量（g）	3.63	NA	0.0	NA	-6.3	NA	-20.9**	NA
相対重量（体重比%）	1.00	NA	+6.5	NA	+15.0**	NA	+22.0**	NA
精巣上体　絶対重量（g）	1.26	NA	-5.6	NA	-7.9	NA	-19.8**	NA
相対重量（体重比%）	0.35	NA	+0.7	NA	+12.6*	NA	+23.0**	NA
左臀筋　絶対重量（g）	2.38	1.46	-61.1*	-73.2**	-79.3**	-74.1**	-83.5**	-83.7**
相対重量（体重比%）	0.66	0.62	-59.6**	-69.0**	-74.8**	-68.9**	-75.2**	-75.1**
右臀筋　絶対重量（g）	2.14	1.47	-61.5**	-74.2**	-77.4**	-74.7**	-80.9**	-82.6**
相対重量（体重比%）	0.60	0.63	-60.0**	-70.2**	-72.5**	-70.0**	-72.0**	-73.5**
剖検								
精巣　小型	0	NA	0	NA	1	NA	10	NA
精巣上体　小型	0	NA	0	NA	1	NA	5	NA
左臀筋　小型	0	0	14	15	16	16	16	15
右臀筋　小型	0	0	14	15	16	16	16	15

M：雄　F：雌　NA：該当データなし。* p<0.05、** p<0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）

a)　溶媒対照群は平均重量を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
病理組織学的検査								
左臀筋								
筋線維萎縮	0	0	16	16	16	16	16	16
軽微	0	0	9	3	2	2	0	1
軽度	0	0	6	8	6	6	2	2
中等度	0	0	1	5	7	8	11	12
重度	0	0	0	0	1	0	3	1
筋線維変性	1	0	4	10	12	13	13	16
軽微	1	0	2	10	11	12	11	13
軽度	0	0	2	0	1	1	2	3
脂肪細胞増加	0	0	3	1	3	4	11	9
軽微	0	0	3	1	3	4	10	6
軽度	0	0	0	0	0	0	1	3

M：雄　F：雌

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
病理組織学的検査								
右臀筋								
筋線維萎縮	0	0	16	16	16	16	16	16
軽微	0	0	9	6	4	0	0	1
軽度	0	0	7	6	11	8	6	1
中等度	0	0	0	4	1	8	8	9
重度	0	0	0	0	0	0	2	5
筋線維変性	0	0	4	9	5	11	14	14
軽微	0	0	3	9	5	11	8	10
軽度	0	0	1	0	0	0	6	4
脂肪細胞増加	0	0	4	6	1	8	14	7
軽微	0	0	4	3	1	8	10	7
軽度	0	0	0	3	0	0	4	0

M：雄　F：雌

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
病理組織学的検査								
精巣								
精細管萎縮（片側性）	0	NA	0	NA	1	NA	8	NA
軽微	0		0		1		0	
軽度	0		0		0		1	
中等度	0		0		0		4	
重度	0		0		0		3	
精細管萎縮（両側性）	0	NA	1	NA	1	NA	4	NA
軽度	0		1		0		0	
中等度	0		0		0		2	
重度	0		0		1		2	
精巣上体								
精子減少（片側性）	1	NA	0	NA	2	NA	12	NA
軽微	0		0		0		2	
軽度	0		0		1		0	
中等度	0		0		0		1	
重度	0		0		0		8	
強度	1		0		1		1	

M：雄　F：雌　NA：該当データなし。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
病理組織学的検査								
精巣上体								
精子減少（両側性）								
重度	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA
精子肉芽腫（片側性）								
中等度	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
骨髄（胸骨）								
脂肪細胞増加	1	0	0	1	3	1	7	1
軽微	1	0	0	1	3	1	4	1
軽度	0	0	0	0	0	0	3	0
骨髄（大腿骨）								
脂肪細胞増加	8	0	11	1	12	1	16	3
軽微	4	0	6	0	4	1	0	1
軽度	4	0	5	1	6	0	8	1
中等度	0	0	0	0	2	0	8	1

M：雄　F：雌　NA：該当データなし。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
病理組織学的検査								
骨（大腿骨及び脛骨）								
骨量減少	0	0	2	0	14	7	16	13
軽微	0	0	2	0	14	7	0	9
軽度	0	0	0	0	0	0	16	4
骨格筋（大腿二頭筋）								
筋繊維萎縮	0	0	6	0	11	10	16	16
軽微	0	0	6	0	11	7	12	7
軽度	0	0	0	0	0	3	4	9
筋繊維変性								
軽微	0	0	1	1	0	0	2	0
検査数	14	14	14	16	14	16	14	16
骨格筋（左上腕筋）								
筋繊維萎縮								
軽微	0	0	0	0	0	0	5	5
筋繊維変性								
軽微	0	0	1	0	0	0	0	2

M：雄　F：雌

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
病理組織学的検査								
検査数	14	14	14	16	14	16	14	16
骨格筋（左腓腹筋）								
筋繊維萎縮	0	0	0	0	0	4	11	15
軽微	0	0	0	0	0	4	11	14
軽度	0	0	0	0	0	0	0	1
筋繊維変性								
軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
中枢神経系（脳、脊髄、末梢神経）	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

M：雄　F：雌　NE：実施しなかった。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）								試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
骨密度測定								
検査数	16	16	16	16	14	16	13	16
大腿骨（遠位）								
総骨量 (mg/mm)	11.34	11.25	9.25**	8.98**	7.99**	8.37**	6.66**	6.79**
総骨面積 (mm^2)	20.60	16.02	19.52	15.08	17.24*	14.52**	15.10*	12.80**
総骨密度 (mg/cm^3)	549.0	704.7	473.8*	596.0**	464.1*	577.2**	442.5*	531.4**
大腿骨（中央部）								
総骨量 (mg/mm)	9.97	7.99	8.65**	7.17**	7.91**	6.96**	6.98**	6.33**
総骨面積 (mm^2)	11.73	9.22	10.87**	8.50*	9.65**	8.18*	8.67**	7.40*
総骨密度 (mg/cm^3)	851.0	861.4	790.7**	846.1**	820.7	853.2	806.4**	857.4
骨内膜長 (mm)	7.743	6.771	7.773	6.617	7.211*	6.486	6.913*	6.113*
骨膜長 (mm)	12.134	10.751	11.664**	10.328*	11.010**	10.129*	10.425**	9.636*
皮質骨厚 (mm)	0.699	0.633	0.619**	0.591**	0.605**	0.580**	0.559**	0.561**
腰椎								
総骨量 (mg/mm)	4.65	4.49	4.23	4.04*	4.26**	3.90*	3.66**	3.63*
総骨面積 (mm^2)	7.71	6.85	7.19	6.46	7.48	6.39	6.58*	6.09*
総骨密度 (mg/cm^3)	603.9	655.0	584.4	625.1	568.7*	609.5*	554.6*	595.1*
骨内膜長 (mm)	7.068	6.477	9.479*	9.001*	9.686*	8.953*	6.710	6.392
骨膜長 (mm)	9.838	9.264	7.004*	6.395*	7.148*	6.285*	9.083*	8.733*
皮質骨厚 (mm)	0.441	0.444	0.394*	0.415	0.404	0.425	0.378*	0.373*

M：雄　F：雌　*p<0.05 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）、**p<0.05 vs. 溶媒対照群（Wilcoxon test）

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）								試験番号：[redacted]
投与量	溶媒対照		NT 201					
（LDU/kg/回）	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：15	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
性周期及び交配検査								
評価動物数		15		16		16		16
精子が確認された雌動物数		15		16		15		9
妊娠動物数		15		15		13		9
平均交配所要日数		2.40		3.31		5.14		3.00
交尾率		100		100		94		56*
受胎率		100		94		87		100
帝王切開								
評価動物数		15		16		13		9
平均黄体数		17		17		16		17
平均着床前胚損失率		9.2		5.4		15.8		22.0
平均着床後死亡率		3.4		7.4		4.5		8.5
平均生存胎児数		15		15		13		12**

M：雄　F：雌　*p<0.05、**p<0.01 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）								試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：15	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
回復性の評価								
一般状態 a)								
臀筋　萎縮	0	0	16	16	16	16	16	16
後肢　跛行	0	0	0	0	0	0	3	3
体重（g） b)	472.4	329.6	-4.9	-6.2*	-8.6**	-9.2**	-18.5**	-20.9**
体重増加量（g） c)	+61.6	+18.5	+71.6	+17.5	+88.6	+21.9	+86.6	+21.2
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
脛骨長（mm、Day 92） d)	58.7	52.1	-2.4**	-1.4	-2.2**	-1.9*	-4.4**	-3.2**
器官重量 d)								
精巣　絶対重量（g）	3.84	NA	-5.2	NA	-2.6	NA	-0.8	NA
相対重量（体重比%）	0.84	NA	-0.2	NA	+5.7	NA	+21.8**	NA
精巣上体　絶対重量（g）	1.48	NA	0.0	NA	-1.4	NA	-1.4	NA
相対重量（体重比%）	0.32	NA	+4.9	NA	+6.9	NA	+21.1**	NA
左臀筋　絶対重量（g）	2.61	1.98	-62.1**	-63.5**	-70.8**	-71.6**	-76.9**	-74.8**
相対重量（体重比%）	0.56	0.61	-59.4**	-60.6**	-68.2**	-67.6**	-71.9**	-67.5**
右臀筋　絶対重量（g）	2.44	1.97	-69.3**	-67.4**	-69.3**	-73.7**	-76.0**	-77.4**
相対重量（体重比%）	0.52	0.61	-66.9**	-64.8**	-66.1**	-70.5**	-70.7**	-71.5**

M：雄　F：雌　-：特記すべき所見なし。NA：該当データなし。*p<0.05、 **p<0.01 vs.溶媒対照群（Dunnett’s test）

a） 休薬期間終了時の動物数を示す。

b） 雄は Day 102、雌は妊娠 13 日の体重を示す。溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

c） 雄は Day 60 から Day 102、雌は Day 60 から Day 81 にかけての体重増加量を示す。

d） 溶媒対照群は平均値を、被験物質投与群は溶媒対照群との差を%で示す。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）								試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：15	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
回復性の評価								
剖検								
精巣　小型	0	NA	1	NA	0	NA	2	NA
精巣上体　小型	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA
左腓腹筋　小型	0	0	14	15	16	16	16	16
右腓腹筋　小型	0	0	14	16	16	16	16	16
検査数	16	15	NE	NE	NE	NE	16	16
病理組織学的検査								
左臀筋								
筋繊維萎縮	0	0	NE	NE	NE	NE	16	16
軽微	0	0					6	5
軽度	0	0					5	10
中等度	0	0					5	1
筋繊維変性								
軽微	0	0	NE	NE	NE	NE	10	4
脂肪細胞増加	0	0	NE	NE	NE	NE	6	4
軽微	0	0					5	4
軽度	0	0					1	0

M：雄　F：雌　NA：該当データなし。NE：実施しなかった。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：15	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
回復性の評価								
検査数	16	15	NE	NE	NE	NE	16	16
右臀筋								
筋繊維萎縮	0	0	NE	NE	NE	NE	15	16
軽微	0	0					3	3
軽度	0	0					9	7
中等度	0	0					3	6
筋繊維変性	0	0	NE	NE	NE	NE	3	10
軽微	0	0					3	7
軽度	0	0					0	3
脂肪細胞増加	0	0	NE	NE	NE	NE	10	9
軽微	0	0					9	6
軽度	0	0					1	3

M：雄　F：雌　NE：実施しなかった。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
回復性の評価								
病理組織学的検査								
精巣								
検査数	2	NA	NE	NA	NE	NA	16	NA
精細管萎縮（片側性）	0						4	
軽度	0						2	
中等度	0						2	
精巣上体								
検査数	16	NA	NE	NA	NE	NA	16	NA
精子減少（片側性）	0						4	
軽微	0						1	
軽度	0						1	
中等度	0						1	
重度	0						1	

M：雄　F：雌　NE：実施しなかった。 NA：該当データなし。

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）								試験番号：[redacted]
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
回復性の評価								
骨密度測定								
検査数	16	15	NE	NE	NE	NE	16	15
大腿骨（遠位）								
総骨量（mg/mm）	12.07	12.74	NE	NE	NE	NE	9.05**	8.40*
総骨面積（mm^2）	20.45	16.32	NE	NE	NE	NE	15.82*	13.74*
総骨密度（mg/cm^3）	590.3	778.7	NE	NE	NE	NE	574.9	612.4*
大腿骨（中央部）								
総骨量（mg/mm）	11.88	9.31	NE	NE	NE	NE	8.82*	6.89*
総骨面積（mm^2）	13.10	9.96	NE	NE	NE	NE	9.58*	7.16*
総骨密度（mg/cm^3）	909.3	936.5	NE	NE	NE	NE	923.9	966.7
骨内膜長（mm）	7.917	6.768	NE	NE	NE	NE	6.735*	5.547*
骨膜長（mm）	12.810	11.178	NE	NE	NE	NE	10.954*	9.467*
皮質骨厚（mm）	0.779	0.702	NE	NE	NE	NE	0.672*	0.624*

M：雄　F：雌　NE：実施しなかった。*p<0.05 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）、**p<0.05 vs. 溶媒対照群（Wilcoxon test）

報告書の題名：NT 201 の離乳後幼若ラットにおける筋肉内投与による毒性試験（続き）							試験番号：[redacted]	
投与量（LDU/kg/回）	溶媒対照		NT 201					
	0		5		10		30	
動物数	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16	M：16	F：16
回復性の評価								
骨密度測定								
検査数	16	15	NE	NE	NE	NE	16	16
腰椎								
総骨量（mg/mm）	4.96	4.95	NE	NE	NE	NE	4.07*	4.38*
総骨面積（mm^2）	8.04	7.16	NE	NE	NE	NE	6.86*	6.72*
総骨密度（mg/cm^3）	616.1	689.8	NE	NE	NE	NE	595.2	650.5*
骨内膜長（mm）	7.185	6.456	NE	NE	NE	NE	6.586*	6.410
骨膜長（mm）	10.048	9.478	NE	NE	NE	NE	9.274*	9.184*
皮質骨厚（mm）	0.456	0.481	NE	NE	NE	NE	0.428	0.442**

M：雄　F：雌　NE：実施しなかった。*p<0.05 vs. 溶媒対照群（Dunnett’s test）、**p<0.05 vs. 溶媒対照群（Wilcoxon test）

2.6.7.13 局所刺激性試験

被験物質：NT201

動物種 ／系統	投与方法	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ウサギ ／Himalayan 系	右眼結膜嚢内 適用 （単回）	NT 201 100 LDU	3／群、 雄	NT 201 は眼刺激性を示さないと考えられた。	適	[redacted]
マウス ／CD-1 系	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201、ボトックス® 0.262、0.328、0.410、0.512、 0.641 LDU/animal/回 （6 及び 13 週間間隔で計 3 回投与） Dysport® 0.640、0.800、1.000、 1.250、1.562 LDU/animal/回	10／群、 雄	投与部位の病理組織学的検査において、NT 201 の局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]
ウサギ ／NZW 系	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201 2.5、3.5、5、10、20、40 LDU/kg/回 （2 週間間隔で最大 3 回投与）	3／群、 雌	投与部位の肉眼観察では、3.5 LDU/kg/回以上の一部の動物で、紅斑、浮腫、血腫又は落屑が認められたが、明白な局所刺激性は認められなかった。	否	[redacted]
カニクイザル	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201、ボトックス® 0、4、8、16 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回投与）	3／群、 雌雄	投与部位の肉眼観察及び病理組織学的検査において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]

2.6.7.13 局所刺激性試験（続き）

被験物質：NT201

動物種 ／系統	投与方法	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
カニクイザル	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201 0、4、8、12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回投与）	4-6／群、 雌雄	投与部位の肉眼観察及び病理組織学的検査において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]
カニクイザル	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201 0、16 LDU/kg/回 （4、8 又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回投与）	4／群、 雌雄	投与部位の肉眼観察及び病理組織学的検査において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]
ウサギ ／NZW 系	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201 0、1.25、2.5、3.5 LDU/kg/回 （雄：交配前 2 週間から剖検前日まで 2 週間間隔で計 5 回投与、雌：交配前 2 週間から妊娠 13 日まで約 2 週間間隔で計 3 回投与）	20／群、 雌雄	剖検時、雄の 0、1.25 及び 3.5 LDU/kg/回群、雌の 2.5 及び 3.5 LDU/kg/回群で、投与部位の暗色又は暗色巣が認められた。剖検で暗色又は暗色巣が認められた雄の投与部位の病理組織学的検査において、溶媒対照群を含むすべての群で、炎症性細胞浸潤、筋細胞壊死及び出血が認められた。	適	[redacted]

2.6.7.13 局所刺激性試験（続き）

被験物質：NT201

動物種 ／系統	投与方法	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
妊娠ウサギ ／NZW 系	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201 0、1.25、2.5、5 LDU/kg/回 （妊娠 6、18、28 日に投与）	21 又は 22 ／群、雌	投与部位の肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]
妊娠ラット ／SD 系	筋肉内投与 （反復投与）	NT 201 2、6、20 LDU/kg/回 （妊娠 6、12、19 日、分娩後 6、13、20 日に投与） 0、3 LDU/kg/回 （妊娠 6 日から分娩後 21 日まで連日投与）	22-25／ 群、雌	剖検時の投与部位観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]
ラット ／SD 系	筋肉内投与 a) （反復投与）	NT 201 0、5、10、30 LDU/kg/回 （3 週齢より、2 週間間隔で計 5 回投与）	16／群、 雌雄	投与部位の肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適	[redacted]

a）一部の動物の最終投与は皮下投与で実施した。

2.6.7.13 局所刺激性試験（続き）

被験物質：NT201

動物種 ／系統	投与方法	投与物質 投与量	動物数／ 群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ウサギ ／NZW 系	皮内投与 （反復投与）	NT 201、ボトックス® 25 LDU/animal/回 （2 週間間隔で計 5 回投与）	12／群、 雌	剖検時の投与部位肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。	適 a)	[redacted]
ウサギ ／NZW 系	皮内投与 （反復投与）	NT 201、ボトックス® 16（1-8 回目）又は 25 LDU/animal（9 回目） （2-10 週間間隔で計 9 回投与） Dysport® 40（1-5 回目）又は 20 LDU/animal（6 回目） （2 又は 5 週間間隔で計 6 回投与）	20／群、 雌	投与部位の肉眼観察において、一過性の炎症性変化（紅斑、浮腫及び痂皮形成）が認められた。	適 a)	[redacted]

a）抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

2.6.7.14 その他の毒性試験

被験物質：NT 201

試験の種類	動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与物質投与量	動物数／群、性	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
抗原性試験	ウサギ／NZW 系	皮内投与（背部皮膚） （生理食塩液／水溶液）	10 週間（2 週間間隔で計 5 回投与し、最終投与の 2 週間後に安楽死させた）	NT 201 及びボトックス® 25 LDU/kg/回	NT 201 12／群、雌 ボトックス® 8／群、雌	両製剤ともに、初回又は 2 回目投与後から、運動性低下及び運動失調が認められた。NT 201 投与群の 2 例は、3 回目投与後に体温低下及び呼吸数低下などが認められ死亡した。剖検では、これら死亡例で、重度の削痩及び脱水が認められた。NT 201 投与群の死亡例を除き、顕著な体重低下は認められなかった。剖検時の投与部位肉眼観察において、NT 201 投与に関連する局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。 抗体測定では、NT 201 群の検体からは、抗 A 型ボツリヌス毒素抗体は検出されなかった。ボトックス®投与群では、試験終了時の検体で中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が認められた。	適 [a]	[redacted]

a）抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

2.6.7.14 その他の毒性試験（続き）

被験物質：NT 201

試験の種類	動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与物質 投与量	動物数／群、性	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
抗原性試験	ウサギ／NZW 系	皮内投与（背部皮膚） （生理食塩液／水溶液）	NT 201 及びボトックス® 36 週間（2-10 週間間隔で計 9 回投与し、最終投与の 3 週間後に安楽死させた） Dysport® 21 週間（2-5 週間間隔で計 6 回投与し、最終投与の 8 週間後に安楽死させた）	NT 201 及びボトックス® 16（1-8 回目）又は 25 LDU/animal（9 回目） Dysport® 40（1-5 回目）又は 20 LDU/animal（6 回目）	20／群、雌	すべての群で、投与に関連する死亡は認められなかった。また、すべての群で運動性低下、体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。投与部位の肉眼観察では、NT 201 及びボトックス®群で、一過性の炎症性変化（紅斑、浮腫及び痂皮形成）が認められた。 NT 201 群では、いずれの時点から採取した検体でも、中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体は認められなかった。 ボトックス®群では、初回投与後 36 週目の一部の検体で、Dysport®群では、初回投与後 15 週目の多くの検体で、それぞれ中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体が認められた。	適 a)	[redacted]

a）抗体評価は非 GLP として実施され、その評価結果を本体試験最終報告書の補遺とした。

2.6.7.14 その他の毒性試験（続き）

被験物質：NT 101

試験 の種類	動物種 ／系統	投与方法	投与期間	被験物質 投与量	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
溶血性試験	ヒト血液	In vitro	該当なし	NT 101 0、100、200、400 LDU/mL（終濃度として）	3（健常人 3 例の血液を用いた）	すべての NT 101 濃度で溶血性は認められなかった。	適	[redacted]