第 2 部　CTD の概要
一般名：アルチカイン塩酸塩・アドレナリン酒石酸水素塩
版番号：1.1

2.6.6　毒性試験の概要文

セプトカイン配合注カートリッジ

目次

2.6.6.1　まとめ 5
2.6.6.2　単回投与毒性試験 5
2.6.6.2.1　アルチカイン塩酸塩単独の単回投与毒性試験 5
2.6.6.2.1.1　Study No.870975－アドレナリン非含有カルチカイン 4%のマウス単回皮下投与毒性－GLP 試験 5
2.6.6.2.1.2　Study No.880001－調製直後及び調製後一定期間保存した血管収縮剤非含有アルチカイン溶液の Swiss マウスを用いた単回皮下投与安全性比較　－GLP 試験 6
2.6.6.2.2　アドレナリン含有アルチカイン塩酸塩の単回投与毒性試験 7
2.6.6.2.2.1　Study No.870973－Carticaine®と Alphacaine SP®のマウス皮下投与毒性比較　－GLP 試験 7
2.6.6.2.2.2　Study No.870974－Carticaine®と Alphacaine SP®のマウス皮下投与安全性比較　－GLP 試験 7
2.6.6.2.2.3　Study No.871299－調製直後（新鮮）のアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン溶液と調製後一定期間保存（保存）したアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン溶液の Swiss マウス単回皮下投与安全性比較　－GLP 試験 8
2.6.6.3　反復投与毒性試験 8
2.6.6.3.1　アルチカイン単独の反復投与毒性試験 8
2.6.6.3.1.1　Study No.10376/97 – ビーグル犬におけるアルチカイン塩酸塩の 4 週間亜急性毒性試験のための 14 日間皮下投与用量設定試験 – GLP 試験 8
2.6.6.3.2　アドレナリン含有アルチカインの反復投与毒性試験 10
2.6.6.3.2.1　Study No.10652/97 – Sprague-Dawley ラットにおける 1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の 4 週間皮下投与毒性試験　–　GLP 試験 10
2.6.6.3.2.2　Study No.10653/97 – ビーグル犬における 1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の 4 週間皮下投与毒性試験　– GLP 試験 11
2.6.6.3.2.3　Study No.10652/97 – Sprague-Dawley ラットにアドレナリン含有 Septanest®を 4 週間皮下投与した時のトキシコキネティクス試験　– GLP 試験 13
2.6.6.3.2.4　Study No.10653/97 – ビーグル犬にアドレナリン含有 Septanest®を 4 週間皮下投与した時のトキシコキネティクス試験　– GLP 試験 14
2.6.6.4　遺伝毒性試験 15
2.6.6.4.1　*In vitro* 試験 15
2.6.6.4.1.1　Study No.10089/96－アルチカイン塩酸塩のサルモネラ菌を用いた復帰突然変異試験(*in vitro*)－GLP 試験 15
2.6.6.4.1.2　Study No.10090/96－アルチカイン塩酸塩の培養 CHO 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性評価－GLP 試験 16

2.6.6.4.1.3　Study No.10373/97－アルチカイン塩酸塩の哺乳類培養細胞(V79)を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験（*HPRT* 試験）－GLP 試験 16
2.6.6.4.2　*In vivo* 試験 17
2.6.6.4.2.1　Study No.10374/97－アルチカイン塩酸塩の *NMRI* マウス骨髄細胞を用いた皮下投与による小核試験－GLP 試験 17
2.6.6.4.2.2　Study No.10651/97－1/100,000 アドレナリン含有 Septanest の *NMRI* マウス骨髄細胞を用いた皮下投与による小核試験－GLP 試験 18
2.6.6.5　がん原性試験 19
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 19
2.6.6.6.1　生殖発生毒性　－受胎能及び着床までの初期胚発生への影響検討 19
2.6.6.6.1.1　Study No. 10654/97 – 1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の F0 世代 SD ラットへの皮下投与による受胎能及び着床までの初期胚発生への影響検討（Seg. I 試験）– GLP 試験 19
2.6.6.6.2　生殖発生毒性　－胚胎児発生への影響検討（主要試験） 21
2.6.6.6.2.1　Study No. 10379/97 – アルチカイン塩酸塩の妊娠ウサギへの皮下投与による影響検討のための用量探索試験 – GLP 試験 21
2.6.6.6.2.2　Study No. 10137/96 – アルチカイン塩酸塩の F0 世代の妊娠動物への皮下投与によるラット出生前後発育及び胎児毒性検討のための用量探索試験　– GLP 試験 23
2.6.6.6.2.3　Study No. 10655/97 –1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与による妊娠ラット及び胎児への影響検討　– GLP 試験 25
2.6.6.6.2.4　Study No. 10656/97 –1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与による妊娠ウサギ及び胎児への影響検討 – GLP 試験 28
2.6.6.6.3　生殖発生毒性　－出生前及び出生後の発育並びに母機能への影響検討（主要試験） 30
2.6.6.6.3.1　Study No. 10138/96 – アルチカイン塩酸塩の F0 世代への皮下投与による出生前及び出生後の発育（母機能への影響を含む）への影響検討 – GLP 試験 30
2.6.6.6.4　幼若動物を用いた試験 33
2.6.6.7　投与部位の忍容性 33
2.6.6.7.1.1　Study No.871225－Magnusson と Kligman のマキシマイゼーションテストを参考にした皮膚感作性試験－非 GLP 試験 33
2.6.6.8　その他の毒性試験 34
2.6.6.8.1　Study No.20110153TRP－アドレナリン・スルホン酸塩のラットを用いた静脈内投与による急性毒性試験－GLP 試験 34
2.6.6.8.2　Study No.FSR-IPL 100901－アドレナリン・スルホン酸塩－B.N.Ames の手技による His(-)サルモネラ菌 5 株を用いた細菌を用いる復帰突然変異試験－GLP 試験 35
2.6.6.8.3　Study No.FSR-IPL 100902－アドレナリン・スルホン酸塩－哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験－GLP 試験 38

2.6.6.8.4　18 種類のセプトドント不純物のデレック・ネクサスを用いた評価（4.2.3.7.6: Derek Nexus Assessment）.....42
2.6.6.9　考察及び結論.....42
2.6.6.10　図表.....42

2.6.6.1　まとめ

Septanest®の毒性試験を以下に示す。

・マウスを用いた単回投与毒性試験(5 試験)
・ラット及びイヌを用いた反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験(3 試験)
・ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生及び周産期毒性試験(5 試験)
・ラットを用い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毒性試験(1 試験)
・遺伝毒性試験(3 in vitro 及び 2 in vivo 試験)
・モルモットを用いた過敏症試験

Septanest®の毒性試験は、すべて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に準拠して実施した。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

アルチカイン塩酸塩の単回投与毒性試験として、マウスを用いた 5 試験を実施した。アルチカイン塩酸塩は、0.005 及び 0.01 mg/mL のアドレナリンと併用又は非併用の条件で投与した。また、最近実施した 2 試験において、調製直後及び 37℃で 6 カ月間保存したアルチカイン塩酸塩（0.01 mg/mL のアドレナリンと併用或いは非併用）の毒性を比較した。

2.6.6.2.1　アルチカイン塩酸塩単独の単回投与毒性試験

2.6.6.2.1.1　Study No.870975－アドレナリン非含有カルチカイン 4%のマウス単回皮下投与毒性－GLP 試験

本試験の目的は、マウスにおけるアルチカイン塩酸塩の 50%致死量（LD_{50}）を求めることであった。

75 匹の Swiss マウス（5/sex/group）にアドレナリン非存在下でアルチカインを皮下投与した。投与液は、生理食塩液を用いてアルチカイン 40 mg/mL 溶液を 12.5 mL/kg の投与容量に調製した。アルチカイン塩酸塩の投与量は、雌雄動物共に 100、138、190、260、360、500 mg/kg とした。雌動物には更に 430 mg/kg を投与した。対照群には 0.9%整理食塩液を 12.5 mg/kg 投与した。一般状態及び体重などの一般的な評価項目については投与 1、3、7 及び 14 日に観察や測定を行った。

試験の結果、100 mg/kg では一般状態に変化はなかったが、138 mg/kg では眼瞼下垂が認められた。

190 mg/kg では、呼吸速迫を伴うよろめき歩行と強直性痙攣が雌で、眼球突出が雌雄で認められた。眼球突出は消失したが、立毛は 2 時間以上にわたって観察された。

260 mg/kg では、同じ反応が雄で認められた。更に、投与 5 分後より痙攣を伴う自発運動の亢進が認められた。

360 mg/kg では雄の 20%が死亡した。死亡は投与数分後から約 2 時間の間に発現した呼吸停止に起因した。

430 mg/kg では、2 時間後でも全例の雌で痙攣が認められ、40%の雌が死亡した。

500 mg/kg では、全例の雌と 40%の雄が死亡した。

● 結論

LD_{50}は、雌で 440 mg/kg（404～480 mg/kg の範囲）、雄で 500 mg/kg を超えると計算された。最高用量においても雄の死亡率は 40%であり、LD_{50}を算出することができなかった。

2.6.6.2.1.2　Study No.880001－調製直後及び調製後一定期間保存した血管収縮剤非含有アルチカイン溶液の Swiss マウスを用いた単回皮下投与安全性比較　－GLP 試験

本試験の目的は、37℃で 3 カ月間保存（以下「保存」と略す）した血管収縮剤を含まないアルチカイン塩酸塩 40 mg/mL 溶液の毒性について、調製直後（以下「新鮮」と略す）の血管収縮剤を含まないアルチカイン塩酸塩 40 mg/mL 溶液と比較し、評価することであった。

両グループ共に 72 mg/kg のアルチカイン塩酸塩を投与した。対照群は 12.5 mL/kg の水を投与した。

一般状態及び体重などの一般的な評価パラメータについて、14 日間の試験期間の第 1、3、7 及び 14 日に観察や測定を行った。全ての動物は、第 1 日に 1 回のみ投与した。これらの動物は、投与後 4 時間、24 時間或いは 14 日に屠殺した。

試験の結果、新鮮溶液と保存溶液のいずれを投与した動物においても投与直後に症状変化はみられなかった。一方、投与 5 分後には、新鮮溶液と保存溶液を投与した全ての動物において、自発運動の低下と眼瞼下垂が認められ、うずくまりもみられた。

新鮮溶液を投与した全ての動物で、強直性痙攣、呼吸促迫(呼吸の加速)及び眼球突出が認められた。

投与 4 時間後には、保存溶液を投与した全ての動物が対照群の動物と同様な行動（無症状）を示した。新鮮溶液を投与した動物においては依然として自発運動の軽度低下と眼瞼下垂が認められた。

投与 6 時間後には、いずれの溶液でも一般状態変化は認められなかった。全ての動物において、行動は正常に復した。

14 日の試験期間中、死亡はなかった。

投与 4 時間後に屠殺した動物の剖検において、肝臓及び腎臓の退色が保存溶液及び新鮮溶液のいずれを投与した動物でも観察された。投与 24 時間後に屠殺した動物の剖検では、肉眼的な異常は検出されなかった。投与 14 日後に屠殺した動物の剖検では、肝臓の退色又は大理石紋理が観察され、数例では腎臓の大理石紋理を伴っていた。これら所見の発現例数は、保存溶液投与では雌 6 例（6/10）、雄 2 例（2/10）であり、新鮮溶液では雌 5 例（5/10）、雄 3 例（3/10）であった。

更に、保存溶液を投与した動物において、雌雄各 1 例（2/20）の左腎に部分的な浮腫が観察された。

投与部位に近接した皮下組織において、肉眼的な異常は検出されなかった。

● 結論

いずれの溶液も全ての動物に眼瞼下垂を伴う自発運動の低下を誘発した。新鮮溶液を投与した動物では、強直性痙攣の発現もみられた。これらの所見は投与 5 分後より発現し、6 時間後に消失した。

血管収縮剤非含有アルチカイン保存溶液の局所及び全身毒性は、血管収縮剤非含有アルチカイン新鮮溶液のそれと差が無かった。

2.6.6.2.2　アドレナリン含有アルチカイン塩酸塩の単回投与毒性試験

2.6.6.2.2.1　Study No.870973－Carticaine®と Alphacaine SP®のマウス皮下投与毒性比較－GLP 試験

本試験の目的は、Carticaine®（アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン 40 mg/mL） の単回皮下投与後に観察される毒性について、Alphacaine SP®（アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン 40 mg/mL）と比較し、評価することであった。

全てのマウスを 2 群に分けた。1 群には Carticaine®を、他群には Alphacaine SP®を投与した。アルチカインの皮下投与用量は、72 mg/kg とした。14 日間の試験期間中、一般状態及び体重などの一般的な評価項目について第 1、3、7 及び 14 日に観察を行った。

試験の結果、両製剤群共に、投与直後に毒性症状は認められなかった。投与約 15 分後には、雌雄数例で自発運動の軽度低下が認められたが、投与約 1 時間後には回復した。14 日間の投与期間中に死亡例は観察されず、剖検でも異常は認められなかった。

- 結論

単回皮下投与において、数例の動物で自発運動の低下を特徴とする毒性症状が認められた。この所見は、最終的に投与約 1 時間後には回復した。

雌雄の Swiss マウスにおいて、72 mg/kg のアルチカイン塩酸塩は安全であることが確認された。

2.6.6.2.2.2　Study No.870974－Carticaine®と Alphacaine SP®のマウス皮下投与安全性比較－GLP 試験

本試験の目的は、Carticaine®（アドレナリン 0.005 mg/mL 含有アルチカイン 40 mg/mL） の単回皮下投与後に観察される毒性について、Alphacaine SP®（アドレナリン 0.005 mg/mL 含有アルチカイン 40 mg/mL）と比較し、評価することであった。

全てのマウスを 2 群に分けた。1 群には Carticaine®を、他群には Alphacaine SP®を投与した。アルチカイン塩酸塩の皮下投与用量は、72 mg/kg とした。14 日間の試験期間中、一般状態及び体重の様な一般的な評価項目について、1、3、7 及び 14 日に観察を行った。

試験の結果、両製剤群共に、投与直後に毒性症状は認められなかった。

投与約 15 分後には、雌雄全例で自発運動の軽度低下が認められたが、投与約 2 日後には回復した。

14 日間の投与期間中、死亡例は観察されず、剖検でも異常は認められなかった。

- 結論

単回皮下投与において、全ての動物で自発運動の低下を特徴とする毒性症状が認められた。この所見は、最終的に投与 2 日後には回復した。

雌雄の Swiss マウスにおいて、72 mg/kg のアルチカインは安全であることが確認された。

2.6.6.2.2.3　Study No.871299－調製直後（新鮮）のアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン溶液と調製後一定期間保存（保存）したアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン溶液の Swiss マウス単回皮下投与安全性比較　－GLP 試験

本試験の目的は、37℃で 6 カ月間保存（保存）したアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン溶液の毒性について、調製直後（新鮮）のアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン溶液と比較し、評価することであった。

用いた試験計画書は、Study No.880001 と同じであった。

試験の結果、新鮮と保存のいずれかの溶液を投与した全動物において投与直後に一般状態変化は認められなかった。しかし、投与 5 分後には、両溶液を投与した全ての動物において、眼瞼下垂を伴う自発運動の低下が認められた。投与 2 時間後には、数例の動物において依然として自発運動の軽度低下が認められたが、その他の変化は消失した。投与 4 時間後には、両溶液共に一般状態変化は観察されず、全ての動物の行動は正常に復した。

投与 4 時間後に屠殺した動物の剖検において、アルチカイン保存溶液を投与された雌雄動物で肝臓の退色が観察された。同じ所見が新鮮溶液を投与した雌動物においても観察された。投与 24 時間後に屠殺した動物の剖検において、肉眼的に確認できる異常は検出されなかった。投与 14 日後に屠殺した動物の剖検において、肝臓の軽度退色が観察された。この所見の発現例数は、保存溶液では雌 3 例（3/10）、雄 2 例（2/10）、新鮮溶液では雌 2 例（2/10）、雄 2 例（2/10）であった。更に、雌雄各 1 例（2/20）において、腎臓に大理石紋理が観察された。

投与部位近傍の皮下組織では、肉眼的に確認できる異常は検出されなかった。

- 結論

アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカインの保存及び新鮮溶液の局所及び全身毒性は類似していた。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

主要な試験として 3 試験をラットとイヌで実施した。アルチカイン塩酸塩の投与量は 2 試験では 25、50 及び 100 mg/kg/日とし、この内の 1 試験（ラット 4 週間試験）ではアドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン塩酸塩を、他の 1 試験（イヌ 14 日間用量設定試験）ではアルチカイン塩酸塩単独を投与した。その他の 1 試験（イヌ 4 週間試験）では、アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン塩酸塩を 20、40 及び 80 mg/kg/日の用量で投与した。

トキシコキネティクスはラットとイヌの 4 週間試験で評価した。成績は反復投与毒性試験成績の後に記載している。

2.6.6.3.1　アルチカイン単独の反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1　Study No.10376/97 – ビーグル犬におけるアルチカイン塩酸塩の 4 週間亜急性毒性試験のための 14 日間皮下投与用量設定試験 – GLP 試験

本試験の目的はビーグル犬におけるアルチカイン塩酸塩の 4 週間皮下投与亜急性毒性試験の用量を設定するための十分な情報を得ることであった。

本試験には 8 匹の動物（雌雄各 4 匹）を用い、アルチカイン塩酸塩の 0（対照）、25、50 及び 100 mg/kg/日を雌雄各 1 匹/群に投与した。被験物質は注射用水で希釈し、対照群には注射用水を投与した。

一般状態、体重及び摂餌量は試験期間中に定期的にモニターした。試験期間は、馴化期間が 4 週間で投与期間が 14 日間であった。

- 投与部位の忍容性

毎日の肉眼観察において、投与部位の軽度な硬結が 25 mg/kg 群の雌雄では投与 4 又は 11 日目から、50 mg/kg 群の雌では投与 10 日目から、100 mg/kg 群の雌雄では投与 3 又は 7 日目からみられた。

- 全身の忍容性

いずれの群にも投与期間中の死亡例はなかった。

25 mg/kg 群では、14 日間の投与期間中に行動や外観に異常はみられなかったが、雄で軽度な唾液分泌亢進が投与 4 日目にみられた。

摂餌量や摂水量へのアルチカイン塩酸塩の影響はみられなかった。

心電図検査では、心拍数並びに PQ、QT 及び QRS 間隔は正常範囲内の値であった。

50 mg/kg 群では、雄で投与 1, 7, 8. 10, 12 及び 14 日目に 1～2 回の嘔吐がみられ、雌では投与 9 日目及び 10 日目に 1 回みられた（10 日目は投与後 10 分）。

唾液分泌亢進及び鎮静が雌への投与後にみられたが、投与後 20～30 分で消失した。

脱糞が 14 日間の投与期間中に雄では 9 日間、雌では 4 日間認められた。

投与 3 及び 4 日目において投与直後から 3～5 分間、引っ掻き行動が雄でみられた。

更に、より重篤な症状が雄で投与第 2 週にみられた。投与 14 日目では、歩行失調に続いて強直性－間代性痙攣を伴う側臥位が 15 分間みられ、その後振戦に移行し、40 分後に消失した。

摂餌量や摂水量へのアルチカイン塩酸塩の影響はみられなかった。

心電図検査では、心拍数並びに PQ、QT 及び QRS 間隔は正常範囲内の値であった。

100 mg/kg 群では、雄で投与 2, 3, 6 及び 8 日目の投与 50 又は 60 分後に 1～2 回の嘔吐がみられた。

軽度から中等度の唾液分泌亢進が雄では投薬期間中 10～14 日間、雌では 7～14 日間みられたが、投与後 10～60 分で消失した。

脱糞が雄では投与期間中に 8 日間、雌では 2 日間認められた。さらに、雌では鎮静も 10 日間みられた。

さらに、歩行失調、脱糞や排尿を伴う強直性－間代性痙攣、振戦及び側／腹臥位といった重篤な症状がみられた。すなわち、投与 8、10 及び 14 日目において投与後 10 分から歩行失調がみられ、10 分間続いた。これらの症状は、投与後 5～60 分で発現し、75 分後には消失した。

摂餌量や摂水量へのアルチカイン塩酸塩の影響はみられなかった。

心電図検査では、心拍数並びに PQ、QT 及び QRS 間隔は正常範囲内の値であった。

- 結論

アルチカイン塩酸塩を皮下投与した場合の無毒性量は 25 mg/kg/日であった。

本試験の結果に基づいた場合、4 週間皮下投与毒性試験の用量としては、20，40 及び 80 mg/kg/日が適切と考えられた。

2.6.6.3.2　アドレナリン含有アルチカインの反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1　Study No.10652/97 – Sprague-Dawley ラットにおける 1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の 4 週間皮下投与毒性試験　–　GLP 試験

本試験の目的は、アドレナリン 0.01 mg/mL 含有 Septanest®をラットに 4 週間毎日皮下投与した時の投与部位や全身に対する忍容性及びトキシコキネティクスのような亜急性毒性に関する情報をえることであった。投与部位や全身に対する忍容性に関する成績はこの後に記載しているが、トキシコキネティクスについては 2.6.4.1.5 代謝の段落に記載している。

毒性評価には 80 匹（雌雄各 40 匹）を、トキシコキネティクス評価には 108 匹（雌雄各 54 匹）を用い、アドレナリン 0.01 mg 含有アルチカイン塩酸塩の 25 （第 2 群）、50 (第 3 群）及び 100 mg/kg（第 4 群）を雌雄のラットに投与した。被験物質は希釈しなかった。対照群には注射用水を投与した。試験期間は、馴化期間が 1 週間で投与期間が 4 週間であった。

一般状態、体重、摂餌量及び摂水量は試験期間中、定期的にモニターした。

- 投与部位の忍容性

25 mg/kg 群では、投与部位周囲組織の硬結及び小さな血腫（直径約 15～20 mm）が毎日の肉眼観察において雌雄全例にみられた。血腫は投与 3 及び 4 週目には瘡蓋で覆われていた。

50 及び 100 mg/kg 群でも上述と同様の硬結がみられた。血腫径は、50 mg/kg 群で約 20～30 mm、100 mg/kg 群では 30 mm を超えていた。更に、これらの群では、投与 2 日から投与部位に脱毛がみられ、100 mg/kg 群では壊死部分も投与 7 日からみられた。

剖検での肉眼所見では、いずれの被験物質投与群でも投与部位に瘡蓋形成を伴う皮膚の硬結及び無毛化並びに皮下の血腫がみられた。このような所見は対照群には観察されなかった。

病理組織学的検査では、最後の投与部位とそれ以前の投与部位のいずれにおいても多くの限局性病変の頻度と程度の増加が被験物質投与動物で認められた。

- 全身の忍容性

25 mg/kg 群では、4 週間の投与期間中に行動や外観に異常はみられなかった。雌雄いずれにおいても被験物質に起因した体重への影響はみられなかった。摂餌量が主に雌において投与 1 及び 2 週目に一過性に低下した。摂水量への影響はみられなかった。糞は正常であった。眼球やその周囲に病変はみられなかった。血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量測定でも異常はみられなかった。

病理組織学的検査では、対照群と比較して脾臓に髄外造血の軽度な亢進がみられたが、被験物質による直接的な毒性とは考えられなかった。

50 mg/kg 群では、雄 2 例が投与 16 及び 27 日目に死亡発見された。体重は、雌では被験物質起因の影響はみられなかったが、雄では対照群に比較して投与 3 週（-7%)及び 4 週（-8%)目に低下した。これらの低下はいずれも $p \leq 0.01$ レベルの有意差を示すには至らなかった。

摂餌量が主に雌において投与 1 及び 2 週目に一過性に低下した。摂水量への影響はみられなかった。糞は正常であった。眼球やその周囲に病変はみられなかった。

血液学的検査値に影響がみられた。雌雄においてヘモグロビン量の減少（雄で $p \leq 0.01$）並びに白血球、網状赤血球（$p \leq 0.01$）及び血小板数の増加がみられた。更に、分葉核好中球百分比の高値及びリンパ球百分比の低値もみられた。これらの変化はすべて被験物質起因と考えられた。

血液生化学検査値にも影響がみられた。雌雄において尿素窒素が増加し、その増加率は雄で24%、雌で 11%であった（$p \leq 0.01$ には達せず）。これらの所見は、被験物質起因と考えられた。

尿検査値は、雌雄で正常であった。また、器官重量測定でも異常はみられなかった。

病理組織学的検査では、対照群と比較して脾臓に髄外造血の軽度な亢進がみられたが、被験物質による直接的な毒性とは考えられなかった。

100 mg/kg 群では、雄 3 例が投与 6 日 (2 例）及び 8 日目に、雌 2 例が投与 10 及び 27 日目に死亡発見された。全ての生存動物で投与 16 日目以降 24 時間にわたって立毛がみられた。

体重は、雌では被験物質起因の影響はみられなかったが、雄では対照群に比較して投与 3 週（-7%）及び 4 週（-9%）目に低下した。これらの低下はいずれも $p \leq 0.01$ レベルの有意差を示すには至らなかった。

摂餌量が主に雌において投与 1 及び 2 週目に一過性に低下した。摂水量への影響はみられなかった。糞は正常であった。眼球やその周囲に病変はみられなかった。

血液学的検査値に影響がみられた。雌雄においてヘモグロビン量の減少（雄で $p \leq 0.01$）並びに白血球（雌で $p \leq 0.01$）、網状赤血球（$p \leq 0.01$）及び血小板数の増加（雌で $p \leq 0.01$）がみられた。さらに、分葉核好中球百分比の高値及びリンパ球百分比の低値もみられた。これらの変化はすべて被験物質起因と考えられた。

血液生化学検査値にも影響がみられた。雌雄において総ビリルビン（雄で+26%, $p \leq 0.01$、雌で+10%）、尿素窒素（雄で+22%、雌で+15%）、ALT （雄で+30%、雌で+42%) AST（雄で+77%、雌で+96%、雌雄ともに $p \leq 0.01$）が増加した。これらの所見は、被験物質起因と考えられた。

尿検査値は、雌雄で正常であった。また、器官重量測定でも異常はみられなかった。

病理組織学的検査では、対照群と比較して脾臓に髄外造血の軽度な亢進がみられたが、被験物質による直接的な毒性とは考えられなかった。

- 結論

アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン塩酸塩をラットに 4 週間皮下投与した場合の全身に対する無毒性量は 25 mg/kg/日であった。50 及び 100 mg/kg/日は致死量の範囲であった。病理組織学的検査では、100 mg/kg/日でも全身性の病理変化はみられなかった。

2.6.6.3.2.2　Study No.10653/97 –ビーグル犬における 1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の 4 週間皮下投与毒性試験　– GLP 試験

本試験の目的は、アドレナリン 0.01 mg/mL 含有 Septanest®をビーグル犬に 4 週間皮下投与し、一般状態、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査値への影響等の毒性に関する情報を得ることであった。

本試験には 24 匹の動物（雌雄各 12 匹）を用い、アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン塩酸塩の 0（対照）, 20（第 2 群）、 40（第 3 群）及び 80 mg/kg/日（第 4 群）を雌雄各 3 匹/群に投与した。対照群（第 1 群）には注射用水を投与した。

一般状態、体重、摂餌量及び摂水量等の一般的検査項目は試験期間中、定期的にモニターした。試験期間は、馴化期間が 4 週間で投与期間が 4 週間であった。

● 投与部位の忍容性

20 mg/kg 群では、毎日の肉眼観察において、投与部位に軽度な硬結や触診可能な小さな腫瘤が認められた。

40 及び 80 mg/kg 群でも同様の所見がみられたが、その程度はより顕著であった。

剖検時の肉眼観察では、すべての動物で投与部位に皮下の硬結、浮腫及び/又は複数の血腫がみられたが、被験物質投与動物と対照物質投与動物との間に差はみられなかった。

病理組織学的検査では、皮下の壊死、出血、線維化、炎症性細胞浸潤等の軽度から重度の反応性変化がすべての動物で認められた。被験物質投与動物と対照物質投与動物との間に差はみられなかったが、これらの病変の程度は被験物質投与動物で軽度に増加しているように思われた。これらの所見は、直接的な毒性作用というよりは、むしろ投与操作に関連していると考えられる。

● 全身の忍容性

いずれの群にも投薬期間中の死亡例はなかった。

20 mg/kg 群では、投薬期間中に行動や外観に異常はみられず、すべての動物の体重も対照群値の範囲内であった。摂餌量や摂水量への影響はみられなかった。すべての動物の器官重量も絶対重量や相対重量ともに対照群値の範囲内であった。眼や聴力への影響もみられなかった。心電図検査では、心拍数並びに PQ、QT 及び QRS 間隔に対して被験物質に起因する影響はみられなかった。4 週間投与終了後の血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査でも異常はみられなかった。

投与部位の忍容性の項で記載した投与部位の所見を除いて、剖検時の肉眼観察及び病理組織学的検査において、いずれの器官/組織にも被験物質に起因する全身性の病理変化は認められなかった。

40 mg/kg 群では、投薬期間中に行動や外観に異常はみられず、すべての動物の体重も対照群値の範囲内であった。摂餌量や摂水量への影響はみられなかった。すべての動物の器官重量も絶対重量や相対重量ともに対照群値の範囲内であった。眼や聴力への影響もみられなかった。心電図検査では、心拍数並びに PQ、QT 及び QRS 間隔に対して被験物質に起因する影響はみられなかった。4 週間投与終了後の血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査でも異常はみられなかった。

投与部位の忍容性の項で記載した投与部位の所見を除いて、剖検時の肉眼観察及び病理組織学的検査において、いずれの器官/組織にも被験物質に起因する全身性の病理変化は認められなかった。

80 mg/kg 群では、嘔吐、唾液分泌亢進、歩行失調、鎮静、脱糞、間代性又は強直性－間代性痙攣、腹臥位及び／又は側臥位等の行動学的変化がみられた。脱糞は投与後 20 分以内に、嘔吐は 60 分以内にみられた。唾液分泌亢進及び歩行失調は投与直後から 20 分後に、腹臥位及び痙攣は 6 から 20 分後に、側臥位及び鎮静は 20 分から 2 時間後に発現した。これらの症状は最短で 5 分、最長で 1 時間持続した。体重は、すべての動物で対照群値の範囲内であった。

摂餌量や摂水量への影響はみられなかった。すべての動物の器官重量も絶対重量や相対重量ともに対照群値の範囲内であった。眼や聴力への影響もみられなかった。

心電図検査では、心拍数並びに PQ、QT 及び QRS 間隔に対して被験物質に起因する影響はみられなかった。4 週間投与終了後の血液学的検査及び尿検査でも異常はみられなかった。

血液生化学的検査では、ALT 及び AST の高値がみられ、被験物質起因と考えられた。

投与部位の忍容性の項で記載した投与部位の所見を除いて、剖検時の肉眼観察及び病理組織学的検査において、いずれの器官/組織にも被験物質に起因する全身性の病理変化は認められなかった。

- 結論

アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン塩酸塩を皮下投与した場合の無毒性量は 40 mg/kg/日であった。

行動学的変化及び ALT 及び AST の高値が 80 mg/kg/日の皮下投与で認められた。

病理組織学的検査では、4 週間投与による被験物質に起因した投与部位あるいは全身性の病理変化はみられなかった。

Septanest®の皮下投与により、アルチカインの血漿 Cmax は用量依存的に上昇し、20 mg/kg で約 2700 ng/mL、80 mg/kg で約 8900 ng/mL であった。また、この血漿中濃度の用量依存的な上昇に伴い、AUC も上昇した（約 102～293 μg・min/mL）。

アルチカインに加えて、アルチカイン酸が血漿中代謝物として同定された。いくつかの採血時点で血漿中アルチカイン酸濃度はアルチカイン濃度と同程度であった。

2.6.6.3.2.3　Study No.10652/97 – Sprague-Dawley ラットにアドレナリン含有 Septanest®を 4 週間皮下投与した時のトキシコキネティクス試験　– GLP 試験

本試験の目的は、Sprague-Dawley ラットに 0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®を 4 週間皮下投与した時の Cmax や AUC 等のトキシコキネティクスに関する情報を得ることであった。

トキシコキネティクス試験には、108 匹（雌雄各 54 匹）を用い、アドレナリン 0.01 mg/mL 含有アルチカイン塩酸塩の 25 （第 2 群）、50 (第 3 群）及び 100 mg/kg（第 4 群）を雌雄のラットに投与した。被験物質は希釈しなかった。対照群（第 1 群）には注射用水を投与した。試験期間は、馴化期間が 1 週間で投与期間が 4 週間であった。

一般状態、体重、摂餌量及び摂水量は試験期間中、定期的にモニターした。

0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®の 4 週間皮下投与亜急性毒性試験中に得られた血漿サンプル中のアルチカイン量は、UV 検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。アルチカインは、固相抽出法で血漿から抽出し、乾燥させた後に移動相で再構成した。

サンプル分析に先行して、真度、精度、感度、-80℃での保存安定性、特異性や較正曲線の直線性に関して分析法を検証した。サンプル分析中に得られた較正データの検証結果及びサンプルと並行して分析した品質管理用サンプルの結果は、用いた分析法が適切であり、信頼できる結果をもたらすことを示している。

全部で 162 血漿サンプルが投与 1 及び 28 日目目の被験物質投与後 0（投与前、投与 28 日目のみ）、10, 20, 40 及び 90 分後に被験物質群の第 2、3 及び 4 群（3 匹/性/群）から得られた。これらのサンプルは血漿分離後直ちに-80℃（名目）で凍結し、分析までこの温度で保管した。

Septanest®の皮下投与により、アルチカインの血漿 Cmax は用量依存的に上昇し、低用量（25 mg/kg）で約 1900 ng/mL、高用量（100 mg/kg）で約 7400 ng/mL であった。また、この血漿中濃度の用量依存的な上昇に伴い、AUC も上昇した（約 100～372 μg・min/mL）。

血漿アルチカイン濃度が最高値を示す時間（Tmax）は投与 1 及び 28 日目でそれぞれ 20～40 分及び 10～20 分であった。

アルチカイン酸が血漿中代謝物として同定された。血漿中アルチカイン酸濃度はアルチカイン濃度と同程度であった。

薬物動態学的評価には TopFit 2.0 を用いた。

- 結論

0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与により、アルチカインの血漿 Cmax は用量依存的に上昇し、低用量（25 mg/kg）で約 1900 ng/mL、高用量（100 mg/kg）で約 7400 ng/mL であった。また、この血漿中濃度の用量依存的な上昇に伴い、AUC も上昇した（約 100～372 μg・min/mL）。

アルチカイン酸が血漿中代謝物として同定された。血漿中アルチカイン酸濃度はアルチカイン濃度と同程度であった。

2.6.6.3.2.4　Study No.10653/97 –ビーグル犬にアドレナリン含有 Septanest®を 4 週間皮下投与した時のトキシコキネティクス試験　– GLP 試験

本試験の目的は、ビーグル犬に 0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®を 4 週間皮下投与した時の Cmax や AUC 等のトキシコキネティクスに関する情報を得ることであった。

トキシコキネティクス試験には、24 匹（雌雄各 12 匹）を用い、アドレナリン 0.01 mg 含有アルチカイン塩酸塩の 20 （第 2 群）、40 (第 3 群）及び 80 mg/kg（第 4 群）を雌雄のイヌに投与した。対照群（第 1 群）には注射用水を投与した。

一般状態、体重、摂餌量及び摂水量は試験期間中定期的にモニターした。

試験期間は馴化期間が 4 週間で投与期間が 4 週間であった。

0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®の 4 週間皮下投与亜急性毒性試験中に得られた血漿サンプル中のアルチカイン量は、UV 検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー（HPLC)を用いて測定した。アルチカインは、固相抽出法で血漿から抽出し、乾燥させた後移動相で再構成した。

サンプル分析に先行して、真度、精度、感度、-80℃での保存安定性、特異性や較正曲線の直線性に関して分析法を検証した。サンプル分析中に得られた較正データの検証結果及びサンプルと並行して分析した品質管理用サンプルの結果は、用いた分析法が適切であり、信頼できる結果をもたらすことを示している。

全部で 162 血漿サンプルが投与 1 及び 28 日目の被験物質投与後 0（投与前、投与 28 日目のみ）、10、 20、 40 及び 90 分後に被験物質群の第 2、3 及び 4 群（3 匹/性/群）から得られた。これらのサンプルは血漿分離後直ちに-80℃（名目）で凍結し、分析までこの温度で保管した。薬物動態学的評価には TopFit 2.0 を用いた。

0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与により、アルチカインの血漿 Cmax は用量依存的に上昇し、20 mg/kg で約 2700 ng/mL、80 mg/kg で約 8900 ng/mL であった。また、この血漿中濃度の用量依存的な上昇に伴い、AUC も上昇した（約 102～293 μg・min/mL）。概して大きな個体間のバラツキがみられたが、これは皮下投与、特に大きな投与容量（高用量群で約 20 mL/イヌ)に起因すると考えられる。

血漿アルチカイン濃度が最高値を示す時間（Tmax）は投与 1 及び 28 日目でそれぞれ 20～40 分及び 10～20 分であった。

アルチカインに加えて、アルチカイン酸が血漿中代謝物として同定された。いくつかの採血時点で血漿中アルチカイン酸濃度はアルチカイン濃度と同程度であった。

- 結論

0.01 mg/mL アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与により、アルチカインの血漿 Cmax は用量依存的に上昇し、20 mg/kg で約 2700 ng/mL、80 mg/kg で 8900 ng/mL であった。また、この血漿中濃度の用量依存的な上昇に伴い、AUC も上昇した（約 102～293 μg・min/mL）。アルチカインに加えて、アルチカイン酸が血漿中代謝物として同定された。いくつかの採血時点で血漿中アルチカイン酸濃度はアルチカイン濃度と同程度であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

アルチカインを用いて 3 試験を実施した。

2.6.6.4.1　*In vitro* 試験

2.6.6.4.1.1　Study No.10089/96－アルチカイン塩酸塩のサルモネラ菌を用いた復帰突然変異試験(*in vitro*)－GLP 試験

本試験の目的は、アルチカイン塩酸塩の変異原性(遺伝子突然変異)について、AMES 試験と呼ばれるサルモネラ菌を用いた哺乳類の代謝活性化系の存在下と非存在下で実施する試験で評価することであった。

独立した 2 試験が代謝活性化系の存在下と非存在下で 5 種類の試験菌株(TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537)を用いて実施された。それぞれの試験は、1 濃度につき 3 プレートを用いて実施した。

TA100 を用いた予備試験において、アルチカイン塩酸塩は最高濃度である 10,000 μg/plate まで生育阻害を示さなかったため、10,000 μg/plate を独立した 2 試験におけるアルチカイン塩酸塩の最高濃度とした。プレート当たり 100 から 10,000 μg 、計 5 濃度のアルチカイン塩酸塩について、代謝活性化系の存在下と非存在下で独立した 2 回の試験を実施した。

- 予備試験

予備試験は、0.316 から 10,000 μg/plate の 10 濃度のアルチカイン塩酸塩について、TA100 を用いて実施した。アルチカイン塩酸塩は水を用いて溶解した。最高濃度である 10,000 μg/plate まで生育阻害が認められなかったため、本試験の最高濃度として 10,000μg/plate を設定した。

- 本試験

本試験は、100 から 10,000 μg/plate の 5 濃度のアルチカイン塩酸塩について、代謝活性化系の存在下と非存在下で独立した 2 試験を実施した。

何れの試験濃度においても生育阻害は認められなかった。アルチカイン塩酸塩は、代謝活性化系の存在下と非存在下で実施された独立した 2 試験において、5 種の試験菌株の何れに対しても変異原性を示さなかった。

- 結論

5 種の試験菌株を用いて 2 回実施した試験において、アルチカイン塩酸塩は、代謝活性化系の有無にかかわらず、何れの試験濃度においても生育阻害を示さず、また、変異原性も示さなかった。

2.6.6.4.1.2　Study No.10090/96－アルチカイン塩酸塩の培養 CHO 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性評価－GLP 試験

本試験の目的は、代謝活性化系の存在下及び非存在下において CHO 細胞を用いて染色体異常を検出することであった。

処理濃度は、細胞毒性試験の結果より選択した。即ち、代謝活性化系の非存在下では 2,000 μg/mL を、代謝活性化系の存在下では 3,000 μg/mL をアルチカイン塩酸塩の処理濃度とした。

試験は、代謝活性化系の非存在下では 2 つの処理時間：4 及び 20 時間を設け、代謝活性化系の存在下では 1 つの処理時間：4 時間を設けて実施した。細胞の採取時期は、暴露後 20 時間とした。試験は 2 回繰り返し実施した。マイトマイシン C とシクロフォスファミドを、それぞれ代謝活性化系の非存在下及び存在下の陽性対照物質として用いた。

試験の結果、代謝活性化系の非存在下において、アルチカイン塩酸塩の 125、250、500 及び 1,000 μg/mL を 4 及び 20 時間処理した細胞における染色体異常の平均出現率(ギャップを除く)は、2.5～5.5%の範囲であった。これらの成績は、陰性対照群の正常範囲内であり、同時に実施した陰性対照群における染色体異常出現率(ギャップ除く)は 2.0～4.0%であった。なお、細胞毒性の認められる濃度(1,000 及び 2,000 μg/mL、分裂指数 0.19～0.58)において、異常が 10.0%へと増加した($p \leq 0.05$)が、細胞毒性に起因した二次的な反応と考えられた。代謝活性化系の存在下において、アルチカイン塩酸塩の 500、1,000 及び 2,000 μg/mL を 4 時間処理した細胞における染色体異常の平均出現率(ギャップを除く)は、6.0～6.5%の範囲であった。これらの成績は、陰性対照群の正常範囲内であり、同時に実施した陰性対照群における染色体異常出現率(ギャップ除く)は 3.0～4.0%であった。なお、細胞毒性の認められる 3,000 μg/mL(分裂指数 0.50)において、異常が 7.3%へと増加したが、細胞毒性に起因した二次的な反応と考えられた。陽性対照群は代謝活性化系の存在下及び非存在下のいずれにおいても、期待される範囲の染色体異常を誘発した。

- 結論

本試験条件下において、アルチカイン塩酸塩は細胞毒性を示す濃度である 2,000 μg/mL（代謝活性化系の非存在下：2 種類の処理時間)及び 3,000 μg/mL(代謝活性化系の存在下：1 処理時間)まで処理された。これらの濃度において、アルチカイン塩酸塩は染色体型及び染色分体型のいずれの染色体異常も誘発しなかった。一方、同一試験において、マイトマイシン C とシクロフォスファミドは有意な染色体異常を誘発した。

2.6.6.4.1.3　Study No.10373/97－アルチカイン塩酸塩の哺乳類培養細胞(V79)を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験（*HPRT* 試験）－GLP 試験

本試験の目的は、アルチカイン塩酸塩の哺乳類培養細胞（V79） における変異原性を評価することであった。

アルチカイン塩酸塩を、ラット肝ミクロソーム分画（S9 mix）を用いた代謝活性化系の存在下及び非存在下で哺乳類培養細胞（V79、遺伝子マーカーHPRT）の遺伝子突然変異試験により評価した。被験物質の処理時間は S9 mix 存在下では 4 時間、非存在下では 24 時間であった。被験物質の処理濃度は、代謝活性化の有無にかかわらず、アルチカイン塩酸塩の 250 から 4,000 μg/mL であった。

代謝活性化系の非存在下の主試験において、細胞毒性の最初の兆候は、2 試験共にアルチカイン塩酸塩の 500 μg/mL で認められた。代謝活性化系の存在下の試験において、細胞毒性は 4,000 μg/mL で認められた（2 試験共）。陽性対照としてエチルメタンスルホン酸（EMS）を代謝活性

化系の非存在下の試験に、9, 10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン（DMBA）を代謝活性化系の存在下の試験に使用した。

- 結論

本試験条件下で、アルチカイン塩酸塩は、代謝活性化系の存在下及び非存在下における細胞毒性濃度である 4,000 μg/mL まで、2 回の哺乳類培養細胞 HPRT-V79 を用いた遺伝子突然変異試験において陰性であった。一方、陽性対照物質は強い遺伝毒性を示した。

2.6.6.4.2　*In vivo* 試験

アドレナリン含有及び非含有のアルチカインを用いた 2 試験を実施した。

2.6.6.4.2.1　Study No.10374/97－アルチカイン塩酸塩の *NMRI* マウス骨髄細胞を用いた皮下投与による小核試験－GLP 試験

本試験の目的はマウスを用い、小核を有する骨髄細胞を指標に、*in vivo* でアルチカイン塩酸塩が誘発する染色体異常を検出することであった。

投与用量は用量設定のための予備試験により決定した。小核主試験では、アルチカイン塩酸塩の 75 mg/kg を 1 群 10 匹（雌雄各 5 匹）の動物に皮下投与し、投与 24、48、72 時間後に屠殺した。陰性対照である水も同様に皮下投与した。

陽性対照であるシクロフォスファミド（27 mg/kg）は、単回腹腔内投与した。アルチカイン塩酸塩は投与 24、48 及び 72 時間後、陰性及び陽性対照は投与 24 時間後に標本を作製した。

- 予備試験

アルチカイン塩酸塩の 10、21.5、46.4、100 及び 215 mg/kg を皮下投与した。いずれの投与量においても死亡例はなかった。

10 及び 21.5 mg/kg の用量において、変化は認められなかった。

46.4 mg/kg の用量において、投与後 10 から 40 分の間に、自発運動の低下、運動失調、筋緊張低下、呼吸困難などの一般状態変化が見られた。

100 及び 215 mg/kg の用量において、呼吸困難、間代性痙攣、全身性の弛緩が観察された。発現時期は、投与後 10 から 50 分（100 mg/kg）及び 5 から 90 分（215 mg/kg）であった。

- 主試験

アルチカイン塩酸塩の 75 mg/kg を主試験の投与量とした。本投与量では、自発運動の低下、筋緊張低下及び呼吸困難が投与 5 分後から約 60 分後まで、また、全身性の弛緩が投与約 30 分後まで見られた。

3 回の標本採取時期の全ての被験物質群において、同時陰性対照群と比較して被験物質に起因した小核を有する多染性赤血球（PCE）数の増加は認められなかった。

最大耐量であるアルチカイン塩酸塩の 75 mg/kg は小核を有する PCE 出現率を増加させなかった。即ち、PCE1000 個当たりの出現細胞数は投与 24、48 及び 72 時間後の標本採取時期において、それぞれ 1.1、0.8 及び 1.5 であった（対照群： 投与 24 時間後の標本採取において 0.8）。

シクロフォスファミド（27 mg/kg）は、PCE1000 個当たり 12.5 個と有意な小核を有する PCE 数の増加を示した。正染性赤血球に対する PCE の割合に影響はなかった。

● 結論

アルチカイン塩酸塩は、最大耐量である 75 mg/kg を皮下投与しても 3 回の標本採取時期を設けたマウス骨髄小核試験において変異原性を示さなかった。一方、同じ試験系において、シクロフォスファミドは有意な変異原性を誘発した。

2.6.6.4.2.2　Study No.10651/97－1/100,000 アドレナリン含有 Septanest の *NMRI* マウス骨髄細胞を用いた皮下投与による小核試験－GLP 試験

本試験の目的は、マウスを用い、小核を有する骨髄細胞を指標に、*in vivo* でアドレナリン 0.01 mg/kg 含有アルチカイン塩酸塩によって誘発される染色体異常を検出することであった。

用量設定は、用量設定のための予備試験に基づいて設定した。アドレナリン 0.01 mg/kg 含有 Septanest®を用いた小核主試験では、アルチカイン塩酸塩の 75 mg/kg を 1 群 10 匹（雌雄各 5 匹）の動物に皮下投与し、投与 24、48 及び 72 時間後に屠殺した。陰性対照である水も皮下投与した。陽性対照であるシクロフォスファミド（27 mg/kg）は、単回腹腔内投与した。アドレナリン 0.01 mg/kg 含有 Septanest®では、投与 24、48 及び 72 時間後の 3 回、陰性及び陽性対照では投与 24 時間後の 1 回のみ標本採集した。

● 予備試験

アルチカイン塩酸塩の 10 、21.5、46.4、100 及び 215 mg/kg を皮下投与した。死亡例はなかった。

10 及び 21.5 mg/kg で変化は認められなかった。

46.4 mg/kg では、運動性低下、歩行失調、筋緊張低下及び呼吸困難が見られた。発現時期は投与後 10～40 分であった。

100 及び 215 mg/kg では、呼吸困難、間代性痙攣及び全身性の弛緩が見られた。発現時期は、投与 10～50 分（100 mg/kg）及び 5～90 分（215 mg/kg）であった。

● 主試験

本試験では、アルチカイン塩酸塩の 75 mg/kg を投与量とした。本用量において、投与約 5 分後から約 30 分後まで運動性低下、筋緊張低下及び呼吸困難が見られた。

3 回の標本採取時期の全ての被験物質群において、同時陰性対照群と比較して被験物質に起因した小核を有する多染性赤血球（PCE）の増加は認められなかった。

最大耐量である 75 mg/kg は小核を有する PCE の出現頻度を増加させなかった。即ち、PCE1000 個当たりの出現細胞数は投与 24、48 及び 72 時間後の標本採取時期において、それぞれ 1.8、2.3 及び 3.1 であった（対照群： 投与 24 時間後の標本採取において 2.2）。一方、シクロフォスファミド（27 mg/kg）は、PCE1000 個当たり 11.9 個と有意な小核を有する PCE 数の増加 を示した。正染性赤血球に対する PCE の割合に影響はなかった。

● 結論

アドレナリン 0.01 mg/kg 含有 Septanest®は、最大耐量である 75 mg/kg を皮下投与しても 3 回の標本採取時期を設けたマウス骨髄小核試験において変異原性を示さなかった。一方、同じ試験系において、シクロフォスファミドは有意な変異原性を誘発した。

2.6.6.5　がん原性試験

特定のがん原性試験は実施していない。何故ならば、歯科領域におけるアルチカイン単独或いはアドレナリン併用の処置は通常単回投与に限られているか、或いは数回の投与を行う場合でも、一度に 1 回の投与に限られているからである。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1　生殖発生毒性　－受胎能及び着床までの初期胚発生への影響検討

1 種動物（ラット）を用いた 1 試験を実施した。

2.6.6.6.1.1　Study No. 10654/97 – 1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の F0 世代 SD ラットへの皮下投与による受胎能及び着床までの初期胚発生への影響検討（Seg. I 試験）– GLP 試験

本試験の目的は、1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の F0 世代動物への皮下投与による受胎能及び着床までの初期胚発生への影響に関する情報を得ることであった。

本試験では、雌雄計 160 匹（20 匹/性/群）を用い、アドレナリンの 0.01 mg/mL とともにアルチカイン塩酸塩の 20（第 2 群）、 40（第 3 群）及び 80 mg/kg/日（第 4 群）を皮下投与した。対照群（第 1 群）には水を注射した。

雄には交配の 4 週間前から交配期間終了まで毎日投与した。雌には交配の 2 週間前から妊娠 7 日まで毎日投与した。精子の存在で交尾を確認した。試験期間中は一般症状、体重、摂餌量及び飲水量といった一般的なパラメータを定期的にモニターした。

- 投与部位の忍容性

20 mg/kg/日の用量では、毎日の肉眼による外観観察では雄 6 例と雌 9 例の皮下投与部位に痂皮形成がみられた。

40 及び 80 mg/kg/日の用量でも 20 mg/kg 群と同様の局所変化が全例にみられた。数例の変化部位の周囲には脱毛がみられ、皮下硬結を伴うこともあった。時間経過とともに当変化を示す動物数は増加し、変化の程度も増強した。変化の程度には用量相関がみられた。剖検時の観察では皮下組織の赤色化がみられた。雄でみられた局所変化は雌よりも顕著であったが、これは投与期間が雌に比べて雄のほうが長期であったためと考えられる。

- 全身の忍容性

20 mg/kg/日の用量では、行動、外観及び糞便に変化を示した動物はなかった。交配前、交配中及び妊娠期間中の体重は正常範囲内であった。全試験期間（交配前、交配中及び妊娠期間）を通じて、摂餌量と飲水量に変化はなかった。雌雄の親動物の剖検では投与に起因した肉眼的変化はみられなかった。投与群の動物の子宮、精巣上体及び精巣の重量は正常範囲内であった。

精子/精子細胞の数、運動性及び生存率は、対照群と被験物質投与群で差はなかった。

雌動物の受精能に投与の影響はなかった。

黄体数及び着床数の平均や、吸収胚率、着床前胚損失率、生存胎児数から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差や投薬関連の変化はなかった。胎盤数は

胎児数と同じであった。胎児の外形観察では被験物質起因の奇形はみられなかった。この用量では死亡胎児はなかった。

40 mg/kg/日の用量では、雄 1 例で運動性低下、腹臥位及び強直性–間代性痙攣が交配期間の 19 日に観察された。この用量群の他の全雌雄動物の行動、外観及び糞便に変化はみられなかった。交配前、交配中及び妊娠期間中の体重は正常範囲内であった。これらの全試験期間（交配前、交配中及び妊娠期間）を通じて、摂餌量及び飲水量に変化はなかった。まれに対照群と比較して有意差のある変化がみられたが、自然発生性か又は被験物質とは関連しないものと考えられた。

雌雄の親動物の剖検で投与に起因した肉眼的変化はみられなかった。

投薬群の動物の子宮、精巣上体及び精巣の重量は正常範囲内であった。

精子/精子細胞の数、運動性及び生存率は、対照群と被験物質投与群で差はなかった。

雌動物の受胎能には被験物質投与の影響はなかった。

黄体数及び着床数の平均や、吸収胚率、着床前胚損失率、生存胎児数から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差や被験物質投与に関連した変化はみられなかった。胎盤数は胎児数と同じであった。胎児の外形観察では、被験物質起因の異常はみられなかった。この用量では死亡胎児はなかった。

80 mg/kg/日の用量では、雄 3 例及び雌 1 例が死亡した。雄の死亡は交配前期間の 13 日と交配期間中の 9 日の間にみられた。死亡前には嘔吐、強直性痙攣、運動性低下、腹臥位及び強直性–間代性痙攣といったいくつかの一般状態変化がみられた。雌の死亡は妊娠 7 日であった。

これらの死亡は被験物質起因であった。

一般状態の変化が数匹の雌雄で主に交配前期間にみられた。これらの症状変化は被験物質起因であり、運動性低下、振戦、嘔吐、流涎、強直性–間代性痙攣、呼吸数増加及び腹臥位は、雌では投与 4 日から、雄では投与 7 日からの 1 日だけに観察された。まれに、雄では交配前期間の後半と交配期間に、雌では妊娠期間中にみられた。

この用量では、雄の体重の低下は交配前の 1～4 週目では軽度であったが、その後の交配期間中に顕著になった。雌では軽度の体重低下が交配前の 2 週目と妊娠 2～13 日でみられた。

交配前、交配中及び妊娠中の全期間を通じて、摂餌量と飲水量に変化はなかった。まれに対照群と比較して有意差のある変化がみられたが、自然発生性又は被験物質投与とは関連しないものと考えられた。雌雄の親動物の剖検では被験物質投与に起因した肉眼的変化はみられなかった。途中死亡した雄動物の剖検では 1 例の肺に重度の赤色化がみられた。被験物質投与群の動物の子宮、精巣上体及び精巣の重量は正常範囲内であった。

精子/精子細胞の数、運動性及び生存率は、対照群と被験物質投与群で差はなかった。

雌動物の受胎能に投与の影響はなかった。

黄体数及び着床数の平均や、吸収胚率、着床前胚損失率、生存胎児数から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差や被験物質投与に関連した変化はみられなかった。

胎盤数は胎児数と同じであった。胎児の外形観察では被験物質起因の異常はみられなかった。この用量では死亡胎児はなかった。

- 結論

交配前の雌雄と妊娠雌に対する作用については、アルチカイン塩酸塩の無毒性量は、雄では 20 mg/kg/日、雌では 40 mg/kg/日であった。

生殖能（受胎能及び初期胚発生）についてのアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 80 mg/kg/以上であった。

アドレナリン 0.01 mg/mL 含有 Septanest は、親動物に毒性を示す用量においても、受胎能及び着床までの初期胚発生に影響しなかった。

2.6.6.6.2　生殖発生毒性　－胚胎児発生への影響検討（主要試験）

ラットとウサギの 2 種動物を用いた 4 試験を実施した。アルチカイン単独を用いた最初の 2 試験は、後述する Septanest®を用いた 2 試験の用量探索を目的として実施した。

2.6.6.6.2.1　Study No. 10379/97 – アルチカイン塩酸塩の妊娠ウサギへの皮下投与による影響検討のための用量探索試験 – GLP 試験

本試験の目的は、アルチカイン塩酸塩の妊娠ウサギへの皮下投与による影響検討のための用量探索であった。

本試験は計 10 匹（妊娠雌 2 匹/群）（のちに 5 匹を追加）の雌を用いて実施した。雌動物は 5 群に群分けした。4 群にはアルチカイン塩酸塩の 20、40、80 及び 120 mg/kg/日を、対照群には水を投与した。妊娠動物にはそれらを妊娠 6～18 日に投与した。妊娠動物は妊娠 29 日に剖検し検査した。雄は無処置とした。行動、外観、糞便性状、体重、摂餌量及び飲水量は毎日モニターした。

- 投与部位の忍容性

20 mg/kg/日の用量では、毎日の肉眼による外観観察では皮下投与部位あるいはその周囲には特記すべき強い変化はみられなかった。皮下投与期間終了後には明瞭な回復過程が認められた。

40 mg/kg/日の用量では、2 例中 1 例の母動物で投与部位あるいはその周囲に部分的に硬結や痂皮を伴った赤色化が妊娠 15～28 日にみられた。

皮下投与期間終了後には明瞭な回復過程が認められた。

80 mg/kg/日の用量では、2 例中 1 例で投与部位あるいはその周囲に部分的に硬結や痂皮を伴った赤色化が妊娠 15～26 日にみられた。皮下投与期間終了後には明瞭な回復過程が認められた。

120 mg/kg/日の用量では、赤色化, 微小出血、硬結及び痂皮形成といった重度の皮下組織傷害が妊娠 8～27 日にみられた。皮下投与期間終了後には明瞭な回復過程が認められた。

- 全身の忍容性

20 mg/kg/日の用量では、行動や外観に変化を示した動物はなかった。糞便は試験期間を通じて正常であった。2 例の妊娠雌の体重は正常範囲内であった。妊娠動物の剖検時体重は妊娠 0 日に比べて 26%増であった（対照群は 36%増）。摂餌量及び飲水量は対照群と同等であった。妊娠動物の剖検では投与部位も含めて被験物質投与に起因した病理学的変化はみられなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質投与に関連した生物学的な変化はみられなかった。

剖検では、生存胎児の数及び体重は正常範囲内であった。

剖検では、死亡胎児はなかった。子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の生存率は正常範囲内であった。

この用量群では奇形や肉眼的な変異を示す胎児はなかった。

この被験物質投与群の胎児の性比は対照群のそれと同等であった。平均胎盤重量にも被験物質投与の影響はみられなかった。

40 mg/kg/日の用量では、行動及び外観に変化を示した動物はなかった。全例の糞便は試験期間を通じて正常であった。2 例の妊娠雌の体重は正常範囲内であった。妊娠動物の剖検時体重は妊娠 0 日に比べて 33%増であった（対照群は 36%増）。摂餌量及び飲水量は対照群と同等であった。妊娠動物の剖検では投与部位も含めて被験物質投与に起因した病理学的変化はみられなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質投与に関連した生物学的な変化はみられなかった。

剖検では、生存胎児の数及び体重は正常範囲内であった。

剖検では、死亡胎児はなかった。子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の生存率は正常範囲内であった。

この用量群では奇形や肉眼的な変異を示す胎児はなかった。

この投与群の胎児の性比は対照群のそれと同等であった。平均胎盤重量にも被験物質投与の影響はみられなかった。

80 mg/kg/日の用量では、途中死亡動物はなかった。妊娠雌で側臥位、強直性–間代性痙攣、軽度振戦、運動性低下、呼吸数の軽度増加といった一般状態変化が、1 例では試験の 8 または 10 日目に、また、他の 1 例では 1～5 日目にみられた。これらの症状は注射の 5～20 分後にみられはじめ、20 分間～2 時間持続した。更に 8 及び 11 回目投与の 1 日の注射 20 分以内に弛緩がみられ始め、60 分間持続した。全動物の糞便は試験期間を通じて正常であった。2 例の雌の体重は正常範囲内であった。妊娠動物の剖検時体重は妊娠 0 日に比べて 36%増であった（対照群は 36%増）。摂餌量及び飲水量は対照群と比較して正常であった。妊娠動物の剖検では投与部位も含めて被験物質投与に起因した病理学的変化はみられなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質投与に関連した生物学的な変化はみられなかった。

剖検では、生存胎児の数及び体重は正常範囲内であった。

剖検では、死亡胎児はなかった。子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の生存率は正常範囲内であった。発育不良胎児が 1 例みられた（対照群では発育不良胎児なし）。

この用量群では奇形や肉眼的な変異を示す胎児はなかった。

この群の胎児の性比は対照と同等であった。平均胎盤重量に被験物質投与の影響はみられなかった。

120 mg/kg/日の用量では、2 例が中等度の振戦、強直性痙攣、運動性低下及び呼吸数増加を示した後に途中死亡した。

これらの症状には投与回数の増加による増強や長時間持続が認められた。生存雌では妊娠 7～18 日にかけて、運動性低下（10 日間）、側臥位（6 日間）、強直性痙攣（4 日間）、呼吸数の軽度の低下又は増加（3 日間）、軽度振戦（1 日間）の症状変化がみられた。全動物の糞便は試験期間を通じて正常であった。

この途中死亡した 2 例では、体重増加抑制が投与開始から死亡した妊娠 13 又は 14 日までみられた。生存雌では軽度の体重増加抑制が投与初期の数日にみられたが、その後は増加が認められた。妊娠動物の計画剖検時体重は妊娠 0 日に比べて 18%増であった（対照群は 36%増）。死亡動物の体重増加抑制は明らかな摂餌量低下と関連していた。死亡により途中剖検した 2 例の絶対及び相対体重は妊娠 8 日から死亡した妊娠 13 又は 14 日まで明らかに低下した（妊娠 10 日の体重は対照の 72%まで低下）。生存例の摂餌量及び飲水量は対照群と比較して正常であった。

妊娠動物の剖検では投与部位も含めて被験物質投与に起因した病理学的変化はみられなかった。途中死亡した 2 例の妊娠動物の剖検時の肉眼的検査では、1 例で投与部位周囲の皮下組織に軽度の赤色化部位が、また、他の 1 例に部分的に硬結や瘡蓋を伴った赤色化が複数個所にみられた。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質投与に関連した生物学的な変化はみられなかった。

剖検では、生存胎児の数及び体重は正常範囲内であった。

剖検では、死亡胎児はなかった。子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の生存率は正常範囲内であった。

この用量群では奇形や肉眼的な変異を示す胎児はなかった。

この群の胎児の性比は対照と同等であった。平均胎盤重量に被験物質投与の影響はみられなかった。

- 結論

アルチカイン塩酸塩の母動物における全身毒性に対する無毒性量は 40 mg/kg/日であった（妊娠 6～18 日に投与）。

80 mg/kg/日以上のアルチカイン塩酸塩投与では、側臥位、強直性痙攣、軽度振戦、運動性低下、呼吸数の軽度増加及び弛緩がみられた。

120 mg/kg のアルチカイン塩酸塩投与では、試験期間中に 3 例中 2 例の母動物が途中死亡した。

胎児に対するアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 120 mg/kg/日以上であった。

これらの結果から、アルチカイン塩酸塩のウサギにおける主試験の用量として 20、40 及び 80 mg/kg/日を選択した。

2.6.6.6.2.2　Study No. 10137/96 – アルチカイン塩酸塩の F0 世代の妊娠動物への皮下投与によるラット出生前後発育及び胎児毒性検討のための用量探索試験 – GLP 試験

本試験の目的は、アルチカイン塩酸塩の F0 世代の妊娠動物への皮下投与による出生前後発育及び胎児毒性検討のための用量を設定することであった。

本試験は 14 匹の妊娠動物（2 匹/群で 7 群構成）を用いた。被験物質は注射用水に溶解して皮下投与した。アルチカイン塩酸塩の 25、 50、 100、 200、 300 及び 500 mg/kg/日を計 6 群に投与し、水を 1 群（対照群）に投与した。妊娠雌は妊娠 6～17 日に被験物質を投与した。妊娠 20 日に動物を剖検し検査した。毎日、行動、外観、体重、摂餌量及び摂水量といった一般的パラメータをモニターした。

- 投与部位の忍容性

25 及び 50 mg/kg/日を投与したラットの毎日の肉眼による外観観察及び剖検では皮下投与部位に硬結がみられた。50 mg/kg 群動物の投与部位では、まれに痂皮形成を伴った腫脹と化膿巣/浸出巣がみられることもあった。

100 及び 200 mg/kg/日の用量でも同質の変化がみられたが、より顕著であった。更に、投与部位に腫脹、部分的に開放性傷害、出血部位及び/又は赤～青色の変色もみられた。

300 及び 500 mg/kg/日の用量では、多発性の硬結、顕著な腫脹、暗赤色～紫色の変色、出血及び/又は開放性傷害が、初回投与時から計画剖検時又は途中死亡時まで観察された。

300 mg/kg/日群の 1 例では黄色の化膿巣/浸出巣がみられた。

すべての局所変化は脱毛を伴っていた。

- 全身の忍容性

25 mg/kg/日の用量では、行動や外観に変化を示した動物はなかった。体重は正常範囲内であった。また、摂餌量と飲水量は対照群と同等で正常であった。剖検時の肉眼観察では両動物の投与部位に、硬結、部分的な開放性傷害、腫脹、変色、痂皮形成及び脱毛がみられた。これらの変化には用量相関がみられた。剖検では被験物質起因の病理学的所見は認められなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質投与に関連した生物学的な変化はみられなかった。

胎児の性比は対照群と同等であった。平均胎児体重に被験物質投与の影響はみられなかった。アルチカイン塩酸塩のこの用量における胎児の外形検査では、奇形や肉眼的な変異はみられなかった。この群では死亡胎児はなかった。

50 mg/kg/日の用量では、行動及び外観に変化を示した動物はなかった。体重は正常範囲内であった。摂餌量と飲水量は対照群と同等で正常であった。剖検時の肉眼観察では両動物の投与部位に、硬結、部分的な開放性傷害、腫脹、変色、痂皮形成及び脱毛がみられた。これらの変化には用量相関がみられた。剖検では被験物質投与に起因した病理学的所見は認められなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び生存胎児体重については、出生前の胎児の発育に対する被験物質投与の影響はみられなかった。着床前後の胚損失率は正常範囲内であった。胎児の性比は対照と同等であった。平均胎児重量に投薬の影響はなかった。アルチカイン塩酸塩のこの用量における胎児の外形検査では、奇形や肉眼的な変異はみられなかった。この群では死亡胎児はなかった。

100 mg/kg/日の用量では、母動物の 2 例に立毛が、1 例に振戦がみられた。体重は正常範囲内であった。摂餌量と飲水量は対照群と同等で正常であった。剖検時の肉眼観察では両動物の投与部位に、硬結、部分的な開放性傷害、腫脹、変色、痂皮形成及び脱毛がみられた。これらの変化には用量相関がみられた。剖検では被験物質投与に起因した病理学的な所見は認められなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び生存胎児体重については、出生前の胎児の発育に対する被験物質投与の影響はみられなかった。着床前後の胚損失率は正常範囲内であった。胎児の性比は対照と同等であった。平均胎児重量に被験物質投与の影響はなかった。アルチカイン塩酸塩のこの用量における胎児の外形検査では、奇形や肉眼的な変異はみられなかった。この群では死亡胎児はなかった。

200 mg/kg/日の用量では、母動物の 2 例に立毛が、1 例に振戦と運動性低下がみられた。体重は正常範囲内であった。摂餌量と飲水量は対照群と同等で正常であった。剖検時の肉眼観察では両動物の投与部位に、硬結、部分的な開放性傷害、腫脹、変色、痂皮形成及び脱毛がみられた。これらの変化には用量相関がみられた。剖検では被験物質投与に起因した病理学的な所見は認められなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び生存胎児体重については、出生前の胎児発生に対する被験物質投与の影響はみられなかった。着床前後の胚損失率は正常範囲内であった。胎児の性比は対照と同等であった。平均胎児体重は対照と比較して明確な低値を示した（14.9%減）。アルチカイン塩酸塩のこの用量における胎児の外形検査では、奇形や肉眼的な変異はみられなかった。この群に死亡胎児はなかった。2 例の胎児に発育不良が認められた。

300 mg/kg/日の用量では、妊娠 7 日の夜間に母動物の 1 例が途中死亡した。死亡前には、2 回目投与 （妊娠 7 日）の 5 分後から活動性低下が 6 時間にわたってみられた。生存動物では立毛、弛緩及び運動性低下がみられた。体重は正常範囲内であった。死亡例の体重は死亡前には顕著に低下したが、これは重度の摂餌量低下と関連していた。死亡した動物の摂餌量には著明な低下が認められた。生存動物の摂餌量と飲水量は対照と同等で正常であった。剖検時の肉眼観察では両動物の投与部位に、硬結、部分的な開放性傷害、腫脹、変色、痂皮形成及び脱毛がみられた。これらの変化には用量相関がみられた。剖検では被験物質投与に起因した病理学的な所見は認められなかった。

黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数及び生存胎児体重については、出生前の胎児の発育に対する被験物質投与の影響はみられなかった。着床前後の胚損失率は正常範囲内であった。

胎児の性比は対照群と同等であった。生存した母動物の胎児の平均体重は対照群と比較して顕著な低値を示した（36.4%減）。アルチカイン塩酸塩のこの用量における胎児の外形検査では、奇形や肉眼的な変異はみられなかった。この群では死亡胎児はなかった。

500 mg/kg/日の用量では、2 例の母動物が妊娠 7 日（No. 19）又は 16 日（No. 20）に途中死亡した。死亡前、1 例（No. 20）では注射後 20 分以内に間代性痙攣がみられた。この動物では初回投与（妊娠 6 日）以後に運動性低下及び弛緩がみられた。更に、振戦と立毛がそれぞれ投与 2 回目（妊娠 7 日）以後及び 3 回目（妊娠 8 日）に認められた。また、この動物では妊娠 11, 12 及び 13 日に鎮静とストラウブ現象がみられた。この動物（No.20）の体重は死亡前には顕著に低下したが、これは大幅な摂餌量低下と関連していた。この死亡例の摂餌量には著明な低下が認められた。No. 19 の動物の死亡時には摂餌量に投薬の影響はみられなかった。当群の飲水量には投薬の影響はみられなかった。

剖検時の肉眼観察では両動物の投与部位に、硬結、部分的な開放傷害、腫脹、変色、痂皮形成及び脱毛がみられた。これらの変化には用量相関がみられた。剖検では No. 19 の死亡例の肺には暗赤色化がみられた。

- 結論

アルチカイン塩酸塩の母動物に対する無毒性量は 50 mg/kg/日であった。

100 mg/kg/日以上のアルチカイン塩酸塩投与では、立毛及び振戦がみられた。300 mg/kg/日以上は致死量と考えられた（300 mg/kg で 1 例が死亡）。アルチカイン塩酸塩の 500 mg/kg/日では 2 例の母動物が死亡した。

アルチカイン塩酸塩の胎児に対する無毒性量は 100 mg/kg/日であった。これらの結果に基づいて、アルチカイン塩酸塩のラットにおける主試験の用量として 25、75 及び 225 mg/kg/日を推奨した。

2.6.6.6.2.3　Study No. 10655/97 –1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与による妊娠ラット及び胎児への影響検討　– GLP 試験

本試験の目標は、アドレナリン 0.01 mg/mL 含有 Septanest®を器官形成感受期に皮下投与して妊娠ラット及び胎児への影響を検討することであった。

本試験には計 80 匹（20 匹/群）の妊娠動物を用いた。全 60 匹にはアルチカイン塩酸塩の 20、40 及び 80 mg/kg/日を投与し、20 匹の対照妊娠動物と比較した。対照群には水を投与した。

被験物質は妊娠 6~17 日に皮下投与した。雄は無処置とした。妊娠 20 日に動物を剖検し検査した。行動、外観、糞便性状、体重、摂餌量、摂水量といった一般的なパラメータを毎日モニターした。

● 投与部位の忍容性

20 mg/kg/日の用量では、皮下投与部位周囲に赤色化、硬結及び/又は瘡蓋が妊娠 7～20 日の 1 日～数日間に雌 20 例中 8 例にみられた。

40 mg/kg/日の用量でも同様の投与部位変化が妊娠 7～20 日に全例にみられた。

80 mg/kg/日の用量でも同様の投与部位変化が妊娠 7 日に 7 例に、また、妊娠 9 日から剖検日である妊娠 20 日まで全例にみられた。

● 全身の忍容性

<妊娠動物の検査>

20 mg/kg/日の用量では、母動物に途中死亡はなく、行動や外観にも変化はなかった。全試験期間を通じて全動物の糞便は正常であった。体重は正常範囲内であった。摂餌量と飲水量は対照と比較して正常であった。

40 mg/kg/日の用量でも、母動物に途中死亡はなく、行動や外観にも変化はなかった。全試験期間を通じて全動物の糞便は正常であった。体重は対照群の正常範囲内であり、摂餌量と飲水量は対照と比較して正常であった。

80 mg/kg/日の用量でも、母動物に途中死亡はなかった。運動低下と振戦が妊娠 12 日の投与 5～20 分後に発現し、20～60 分間持続した。全試験期間を通じて全動物の糞便は正常であった。母体の平均体重は妊娠 18～20 日には対照の 28%減であり、妊娠 6 日からの増加量は対照に比べて統計学的に有意に低く（p≦0.01）36%減であった。摂餌量は妊娠 12～17 日には対照群に比べてやや低く、妊娠 12～15 日では統計学的有意差 (p≦0.01)が認められた。

<屠殺時の妊娠動物検査>

20 mg/kg/日の用量では、母動物の剖検時に 20 例中 17 例の動物の投与部位の皮下組織に赤色化又は軽度赤色化がみられた。対照群でも、投与部位の皮下組織の軽度の赤色化が 20 例中 9 例にみられた。アルチカイン塩酸塩の 20 mg/kg/日ではそれに関連した全身性の病理学的変化はみられなかった。黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前後の胚損失率から算出した値についても、対照群と投薬群の間に生物学的な差はなかった。軽度ではあるが対照群と比較して統計学的に有意な変化は自然発生性の範囲内であった。対照と比較した場合のこの差に生物学的な意義はなかった。

40 mg/kg/日の用量では、母動物の剖検時に 20 例中 9 例の投与部位の皮下組織に軽度の赤色化がみられた。同皮下組織の肉眼検査では赤色化又は軽度赤色化、部分的な硬結及び／又は瘡蓋が全例にみられた。アルチカイン塩酸塩のこの用量では被験物質に関連した全身性の病理学的変化はみられなかった。黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前後の胚損失率から算出した値についても、対照群と投薬群の間に生物学的な差はなかった。軽度ではあるが対照群と比較して統計学的に有意な変化は自然発生性の範囲内であった。対照と比較した場合のこの差に生物学的な意義はなかった

80 mg/kg/日の用量では、母動物の剖検時に 20 例全例の投与部位の皮下組織に軽度の赤色化がみられた。同部位の肉眼検査では 40 mg/kg/日群と同様の変化がみられたが、皮下組織の赤色化又は軽度の赤色化、部分的な硬結及び／又は瘡蓋の程度に全例で増強がみられた。アルチカイン塩酸塩のこの用量ではそれに関連した全身性の病理学的変化はみられず、また、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前後の胚損失率から算出した値についても、対照群と被験物質投与

群の間に生物学的な差はなかった。軽度ではあるが対照群と比較して統計学的に有意な変化は自然発生範囲内であった。対照と比較した場合のこの差に生物学的な意義はなかった。

<胎児検査>

20 mg/kg/日の用量では、胎児の性比は対照群のそれと同等であった。この用量群の平均胎児体重には被験物質投与の影響はみられなかった。

外形検査では奇形胎児はなく、分類不能な肉眼的な変異（肝臓に出血巣）が 1 例にみられた。剖検で同群と対照群にそれぞれ 3 例及び 2 例の発育不良がみられたが、いずれも自然発生性の範囲内であった。

胎児の外形、骨格、軟部組織検査では奇形例はなかった。肋骨と胸骨に関する骨格変異がみられたが、その数と型は対照群と同程度であった。

骨化遅延の徴候として、頭骨の不完全骨化、胸骨分節・胸椎椎体・尾椎椎体の不完全骨化・欠損・短小、椎体のダンベル状骨化及び/又は二分骨化、第 5 中手骨及び第 5 中足骨の未骨化といった所見がみられたが、いずれも対照群のそれと同頻度であった。

Wilson 法による胎児器官検査では、この用量で奇形は認められなかった。

40 mg/kg/日の用量では、胎児の性比は対照群のそれと同等であった。この用量群の平均胎児体重には投薬の影響はみられなかった。剖検では、同群に 3 例（うち 1 例の発育不良胎児は死亡）及び対照群に 2 例の発育不良胎児がみられたが、いずれも自然発生性の範囲内であった。

胎児の外形、骨格、軟部組織検査では奇形例はなかった。肋骨と胸骨に関する骨格変異がみられたが、その数と型は対照群と同程度であった。

骨化遅延の徴候として、頭骨の不完全骨化、胸骨分節・胸椎椎体・尾椎椎体の不完全骨化・欠損・短小、椎体のダンベル状骨化及び/又は二分骨化、第 5 中手骨及び第 5 中足骨の未骨化といった所見がみられたが、いずれも対照のそれと同頻度であった。

Wilson 法による胎児器官検査では、この用量で奇形は認められなかった。

80 mg/kg/日の用量では、胎児の性比は対照群のそれと同等であった。平均胎児体重には被験物質投与の影響はみられなかった。剖検では、同群と対照群にそれぞれ 2 例の発育不良がみられた。この高用量群の 2 例は双生児であった。これらの所見は自然発生性の範囲内であった。

胎児の外形、骨格、軟部組織検査では奇形例はなかった。肋骨と胸骨に関する骨格変異がみられたが、その数と型は対照群と同程度であった。

骨化遅延の徴候として、頭骨の不完全骨化、胸骨分節・胸椎椎体・尾椎椎体の不完全骨化・欠損・短小、椎体のダンベル状骨化及び/又は二分骨化、第 5 中手骨及び第 5 中足骨の未骨化といった所見がみられたが、いずれも対照のそれと同頻度であった。

Wilson 法による胎児器官検査では、この用量で奇形は認められなかった。

- 結論

アドレナリン 0.01 mg/mL と併用投与したアルチカイン塩酸塩の母動物における無毒性量は 40 mg/kg/日であった。80 mg/kg/日の用量では、運動低下、振戦、体重増加抑制及びカーカス重量低値などの母動物毒性が認められた。

胎児に関しては、アドレナリン 0.01 mg/mL と併用投与したアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 80 mg/kg/日以上であった。

被験物質に催奇形性はなかった。母動物に毒性を示す用量においても胎児毒性は認められなかった。

2.6.6.6.2.4　Study No. 10656/97 –1/100,000 アドレナリン含有 Septanest®の皮下投与による妊娠ウサギ及び胎児への影響検討 – GLP 試験

本試験の目的は、器官形成の感受期に皮下投与したアドレナリン 0.01 mg 含有 Septanest®の妊娠ウサギ及び胎児への影響を調べることであった。

投与量は、「アルチカイン塩酸塩の皮下投与による妊娠ウサギ及び胎児への影響検討用の用量探索試験」という予備試験 10379/97 の結果に基づいて、選択した。

当試験では 64 匹（16 匹/群）の妊娠ウサギを用いた。全 48 匹の妊娠雌には 20、40 及び 80 mg/kg/日のアルチカイン塩酸塩を投与し、対照の 16 匹の妊娠動物と比較した。対照群には水を注射した。被験物質は妊娠 6～20 日に皮下投与した。雄は無処置とした。交配から 29 日後に母動物を剖検し検査した。行動、外観、糞便性状、体重、摂餌量及び摂水量といった一般的なパラメータを毎日モニターした。

- 投与部位の忍容性

40 及び 80 mg/kg/日の用量では、それぞれ 1 及び 3 例の母動物の投与部位及び／又はその周囲に、瘡蓋を伴った赤色化が妊娠 11～29 日の間に数日間みられた。

- 全身の忍容性

<妊娠動物の検査>

20 mg/kg/日の用量では、途中死亡した母動物はなかった。行動、外観及び糞便も正常であった。体重は正常範囲内であった。また、摂餌量と飲水量は対照群と比較して正常であった。

40 mg/kg/日の用量では、途中剖検した母動物はなかった。1 例に振戦と腹臥位が妊娠 15 日の注射 5 分後から最長 5 分間みられた。他の 1 例の母動物では、強直性-間代性痙攣が妊娠 7 日の注射 5 分後から最長 2 時間みられた。他の動物の行動や外観は正常であった。全動物の糞便は全試験期間を通じて正常であった。摂餌量と飲水量は対照群と比較して正常であった。

80 mg/kg/日の用量では、2 例の母動物が途中死亡し、そのうちの 1 例は妊娠 6 日の初回投与の 60 分以内に死亡した。死亡前の徴候として、運動低下、強直性-間代性痙攣、側臥位及び呼吸数の軽度増加がみられた。もう 1 例は死亡前には徴候を示さず、妊娠 18 日の投与の 60 分以内に死亡した。

一般状態の変化としては、妊娠 6～20 日の投与期間のうちの数日に、数例から全例の母動物で、運動低下、側臥位及び/又は腹臥位、強直性-間代性痙攣又は痙攣傾向、呼吸数の軽度増加がみられた。更に、振戦、後弓反張、中等度～重度の流涎、鎮静、呼吸困難が、1～4 例の母動物にそれぞれの検査日にみられた。これらの症状変化は投与後 5～20 分で発現し、腹臥位は投与後 60 分以内に発現して 5～60 分間持続し、また、運動低下及び呼吸数の増加は最長 2 時間後まで続いた。

全動物の糞便の性状は全試験期間を通じて正常であった。体重は正常範囲内であった。摂餌量と飲水量は対照群と比較すると正常であった。妊娠 5～6 日の摂餌量の軽度低下（対照群より 21%低値）及び妊娠 24 日の摂餌量の軽度ではあるが統計学的に有意な増加 ($p \leqq 0.01$)は、背景データの正常範囲にあり、被験物質起因ではないと考えられた。

<屠殺時の妊娠動物検査>

20 mg/kg/日の用量では、母動物の剖検時に被験物質と関連した全身性又は局所性の病理学的変化はみられなかった。また、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質に関連した生物学的な差異はみられなかった。

40 mg/kg/日の用量では、母動物の剖検時に 16 例中 2 例の皮下組織に軽度の赤色化がみられた。被験物質と関連した全身性の病理学的変化はみられなかった。また、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質に関連した生物学的な差異はみられなかった。

80 mg/kg/日の用量では、母動物の肉眼観察では 2 例の投与部位の皮下組織に赤色化がみられた。死亡例では、痂皮形成, 硬結、皮下組織の赤色化がみられた。被験物質と関連した全身性の病理学的変化はみられなかった。黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前後の胚損失率から算出した値については、対照群と被験物質投与群の間には被験物質に関連した生物学的な差異はみられなかった。

<胎児検査>

20 mg/kg/日の用量では、胎児の性比は対照のそれと同等であった。平均胎児体重には被験物質投与の影響はみられなかった。外形検査では奇形はなく、肉眼的変異もみられなかった。剖検で 2 例の発育不良がみられたが（対照群では発育不良例なし）、いずれも自然発生性の範囲内であった。子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の胎児生存率は正常範囲内であったが、同群では 3 例の胎児（対照群では 1 例）が 6 時間以内に死亡し、4 例（対照群では 6 例）が 6～24 時間後に死亡した。

Dawson 法を用いた胎児骨格検査では奇形はみられなかった。

骨格変異は、肋骨（第 13 肋骨）、頭骨（頭頂部が部分的に未骨化）及び胸骨分節（軽度の二分骨化及び/又は癒合）に観察された。

この用量では、これらの変異の数と型は背景データの範囲内であった。第 13 肋骨の増加は軽度ではあるが対照群と比較して統計学的に有意であった（$p \leqq 0.05$）。この変化は背景データ範囲内にあることから、偶発的なものと考えられた。

骨化遅延の徴候として、胸骨分節の不完全骨化及び/又は欠損、胸椎椎体二分骨化、未骨化距骨, 未骨化・不完全座骨がみられたが、被験物質起因ではなく生物学的意義のない変化であった。

40 mg/kg/日の用量では、胎児の性比は対照のそれと同等であった。平均胎児体重には被験物質投与の影響はみられなかった。外形検査では奇形はなく、肉眼的変異もみられなかった。剖検で 4 例の発育不良胎児がみられたが（対照群では発育不良例なし）、自然発生性の背景データ範囲内であった。剖検では胎児死亡が 1 例にみられた（対照群では胎児死亡例なし）。子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の胎児生存率は正常範囲内であったが、同群では 6 例の胎児（対照では 6 例）が 6～24 時間以内に死亡した。Dawson 法を用いた胎児骨格観察では奇形はみられなかった。骨格変異は、肋骨（第 13 肋骨）、頭骨（頭頂部が部分的に未骨化）及び胸骨分節（軽度の二分骨化及び/又は癒合）に観察された。

この用量では、これらの変異の数と型は背景データの範囲内であった。第 13 肋骨の増加は、軽度ではあるが対照群と比較して統計学的に有意であった（$p \leqq 0.05$）。この変化は背景データの範囲内にあることから、偶発的なものと考えられた。骨化遅延の徴候として、胸骨分節の不完全骨化及び/又は欠損、胸椎椎体二分骨化、未骨化距骨、未骨化・不完全座骨がみられたが、被験物質起因ではなく生物学的意義のない変化であった。

80 mg/kg/日の用量では、胎児の性比は対照群のそれと同等であった。平均胎児体重には投薬の影響はみられなかった。外形検査では奇形はなく、肉眼的な変異もみられなかった。剖検で 1 例の発育不良胎児がみられたが（対照群では発育不良例なし）、自然発生性の背景データ範囲内であった。

子宮からの摘出の 6 又は 24 時間後の胎児生存率は正常範囲内であったが、同群では 5 例の胎児が 6 時間以内に（対照では 1 例）が、また、6 例の胎児（対照では 6 例）が 6～24 時間に死亡した。軽度ではあるが統計学的に有意な胎児死亡の増加（p≦0.05）はほぼ背景データ範囲内にあり、被験物質起因とは判断しなかった。

Dawson 法を用いた胎児骨格検査では奇形はみられなかった。

骨格変異は、肋骨（第 13 肋骨）、頭骨（頭頂部が部分的に未骨化）及び胸骨分節（軽度の二分骨化及び／又は癒合）に観察された。これらの用量では、これらの変異の数と型は背景データの範囲内であった。骨格変異の総数には、軽度ではあるが対照群と比較して統計学的な有意な増加（p≦0.05）がみられた。この変化は背景データ範囲内にあることから、偶発的なものと考えられた。第 13 肋骨の頻度には軽度の増加がみられた（p≦0.01）。

骨化遅延の徴候として、胸骨分節の不完全骨化及び/又は欠損、胸椎椎体二分骨化、未骨化距骨、未骨化・不完全座骨がみられたが、被験物質起因ではなく生物学的意義のない変化であった。

- 結論

母動物におけるアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 20 mg/kg/日であった。40 mg/kg/日以上の用量では振戦、強直性-間代性痙攣及び腹臥位がみられた。80 mg/kg/日の用量は母動物に致死的であった。

胎児に関しては、アルチカイン塩酸塩の無毒性量は 40 mg/kg/日（母動物には毒性量）であった。80 mg/kg/日では第 13 肋骨（骨格変異）の頻度の軽度の増加がみられた。

結論として、被験物質は母動物に毒性を示す用量においても胎児毒性や催奇形性を示さなかった。

2.6.6.6.3　生殖発生毒性　－出生前及び出生後の発育並びに母機能への影響検討（主要試験）

1 種動物（ラット）を用いて 1 試験を実施した。

2.6.6.6.3.1　Study No. 10138/96 – アルチカイン塩酸塩の F0 世代への皮下投与による出生前及び出生後の発育（母機能への影響を含む）への影響検討 – GLP 試験

本試験の目的は、着床から離乳まで母体に暴露させた場合の妊娠/授乳中の母体及び胚・胎児・出生児の発育に対する有害作用を調べることであった。

投与量は、用量探索試験 No. 10137/96 を実施して選択した。当試験には計 80 匹（20 匹/群）の妊娠雌を用いた。全 60 匹にはアルチカイン塩酸塩の 20、40 及び 80 mg/kg/日を投与し、20 匹の対照妊娠動物と比較した。対照群には水を投与した。被験物質は皮下投与した。F0 世代の妊娠動物は着床時（妊娠 6 日）から離乳時（授乳 22 日）まで投与した。自然分娩後、F1 世代の動物を検査した。自然分娩しなかった妊娠雌は分娩予定日から 3 日目に剖検した。各腹雌雄各 1 例の F1 世代動物は成熟期まで育てて、交配に供した。雄動物は交配期間終了後に屠殺した。

自然分娩で出生した F2 世代の新生児は離乳させ、発育を観察した。自然分娩しなかった妊娠雌は分娩予定日から 3 日目に剖検した。母動物と出生児は 3 週間の授乳期間後に屠殺した。行動、外観、糞便性状、体重、摂餌量及び摂水量といった一般的なパラメータを毎日モニターした。

- F0 母動物検査

<投与部位の忍容性>

毎日の肉眼的な外観観察ではアルチカイン塩酸塩投与群の全母動物の投与部位に瘡蓋形成がみられた。その変化部位の周囲の皮膚には硬結を伴った脱毛がみられた。その程度には用量相関がみられた。更に、変化がみられた動物の数と局所変化の大きさは時間とともに増大し、被験物質投与期間（授乳期間）の終了時点で最大の変化がみられた。剖検時の肉眼観察では被験物質投与群の全動物に痂皮形成がみられた。

<全身の忍容性>

20 mg/kg/日の用量では、F0 雌の行動、外観及び糞便に変化はみられなかった。妊娠期間及び授乳期間中の体重は正常範囲内であった。妊娠期間及び授乳期間中の摂餌量と飲水量には変化はなかった。Salewski 法で検査した着床数には影響はみられなかった。F0 雌動物の剖検時の肉眼検査では、いずれの例にも被験物質起因の全身性変化はみられなかった。妊娠期間は全動物について正常範囲内であり、分娩及び生存児数にも影響はみられなかった。この用量の 1 例の児に下顎短小奇形がみられた。この所見は被験物質投与起因ではなかった。発育不良例はなかった。出生時の児の体重に影響はみられなかった。

40 mg/kg/日の用量では、F0 雌の行動、外観及び糞便に変化はみられなかった。妊娠期間及び授乳期間中の体重は正常範囲内であった。また、妊娠期間及び授乳期間中の摂餌量と飲水量にも変化はなかった。Salewski 法に準じて検査した着床数には影響はみられなかった。F0 雌動物の剖検時の肉眼検査では、いずれの例にも被験物質起因の全身性変化はみられなかった。妊娠期間は全動物について正常範囲内であり、分娩にも影響はみられなかった。生存児数には影響はみられなかった。発育不良例はなかった。出生時の児の体重に影響はみられなかった。

80 mg/kg/日の用量では、1 例が妊娠 15 日に強直性-間代性痙攣と腹臥位を示した後に死亡した。この死亡は被験物質起因と考えられた。3 例の母動物では、いくつかの症状変化がみられた。1 例目の母動物では軽度の振戦と運動性低下が妊娠 17 日にみられた。2 例目では出血性鼻、運動性低下及び嘔吐が授乳 9 日にみられ、3 例目では呼吸数の増加、強直性-間代性痙攣及び腹臥位が授乳 8 日にみられた。

軽度の体重低下が授乳期間中にみられた（2～3%低下, $p \leqq 0.01$ では有意差を示すには至らなかった)。一過性の軽度～中等度の相対的摂餌量の低下が妊娠 7～16 日にみられた。対照に対する差異は-7%～-19%であり、妊娠 7, 11, 12, 13, 14 及び 16 日で有意であった（$p \leqq 0.01$）。試験期間中の飲水量に影響はなかった。Salewski 法に準じて検査した着床数には影響はみられなかった。

剖検時の肉眼検査では、被験物質起因の全身性変化はいずれの F0 雌動物にもみられなかった。妊娠期間は全動物について正常範囲内であり、分娩にも影響はみられなかった。生存児数に影響はみられなかった。10 例の死産がみられた（対照群の死産は 3 例）。おそらく、この増加は投与量が母動物の致死量に近かったことが原因であろう。発育不良例はなかった。出生時の児の体重に影響はみられなかった。

- 離乳までの F1 世代の検査

20 mg/kg/日の用量では、胎児の性比に影響はみられなかった。対照群との比較でみられた差は生物学的に意義のあるものではなかった。離乳前後の全期間の体重は正常範囲内であった。児の外形検査では 1 例の奇形（下顎短小）がみられた。この所見は試験結果の正常範囲内にあり、被験物質投与起因ではなかった。形態には影響はなかった。耳介開展、上切歯萌出、耳道開口、眼瞼開裂、亀頭包皮分離及び膣開口の時期は正常範囲内にあった。機能テストでは全てで対照群と同様の結果が得られた。

40 mg/kg/日の用量では、胎児の性比に影響はみられなかった。対照群との比較でみられた差は生物学的に意義のあるものではなかった。離乳前後の全期間の体重は正常範囲内であった。この用量群では奇形はみられなかった。形態にも影響はなかった。耳介開展、上切歯萌出、耳道開口、眼瞼開裂、亀頭包皮分離及び膣開口の時期は正常範囲内にあった。機能テストの結果は全て対照群と同様の結果が得られた。

80 mg/kg/日の用量では、胎児の性比に影響はみられなかった。対照群と比較でみられた差は生物学的に意義のあるものではなかった。雄児の体重は 14 及び 21 日齢並びに亀頭包皮分離時期においてわずかに低かった（それぞれ約 8～10%減及び約 8%減）。しかし、統計学的な有意差を $p \leqq 0.01$ で示すには至らなかった。この用量群では奇形はみられなかった。眼瞼開裂の遅延は軽度であったが、統計学的には $p \leqq 0.01$ で有意差がみられた。耳介開展、上切歯萌出、耳道開口、眼瞼開裂、亀頭包皮分離及び膣開口の時期は正常範囲内にあった。この群の受動的回避学習テストにおける成績は低かった。剖検では、雌雄児ともに被験物質に起因した病理学的変化はみられなかった。

- F1 母動物及びそのパートナーである F1 雄の検査

20 mg/kg/日の用量では、雌雄の F1 親動物の行動、外観及び糞便に変化はみられなかった。途中死亡もなかった。雌雄動物の交配前の数週間の体重は正常範囲内であった。また、母動物の妊娠及び授乳期間中の体重は正常範囲内であった。妊娠中の摂餌量と飲水量は対照と差がなかった。

Salewski 法で検査した着床数には F0 世代への投与の影響はみられなかった。剖検時の肉眼検査では、被験物質起因の全身性変化はいずれの F1 動物にもみられなかった。妊娠期間は全動物について正常範囲内であり、分娩にも影響はみられなかった。生存児数には影響はみられなかった。2 例の死産がみられたが（対照群では 3 例）、個別値は正常範囲内であった。奇形児や発育不良児はなかった。この用量のアルチカイン投与では、出生時の児の体重には遅延性の影響はみられなかった。

40 mg/kg/日の用量では、雌雄の F1 動物の行動、外観及び糞便に変化はみられなかった。途中死亡もなかった。雌雄動物の交配前の数週間の体重は正常範囲内であった。また、母動物の妊娠及び授乳期間中の体重は正常範囲内であった。妊娠中の摂餌量と飲水量は対照と差がなかった。軽度ではあるが統計学的に有意差がみられた妊娠初日の摂餌量変化は自然発生性の範囲内であった。Salewski 法で検査した着床数には F0 世代への投与の影響はみられなかった。剖検時の肉眼検査では、被験物質起因の全身性変化はいずれの F1 動物にもみられなかった。妊娠期間は全動物について正常範囲内であり、分娩にも影響はみられなかった。生存児数には影響はみられなかった。3 例の死産（対照群も 3 例）がみられたが、個別値は試験データの正常範囲内であった。奇形児や発育不良児はなかった。この用量のアルチカイン投与では、出生時の児の体重には遅延性の影響はみられなかった。

80 mg/kg/日の用量では、雌雄の F1 動物の行動、外観及び糞便に変化はみられなかった。途中死亡もなかった。雌雄動物の交配前の数週間の体重は正常範囲内であった。また、母動物の全妊娠期間中の体重は対照よりも低値であった。妊娠中の摂餌量と飲水量は対照と差がなかった。

Salewski 法で検査した着床数には F0 世代への投与の影響はみられなかった。剖検時の肉眼検査では、被験物質起因の全身性変化はいずれの F1 動物にもみられなかった。妊娠期間は全動物について正常範囲内であり、分娩にも影響はみられなかった。生存児数には影響はみられなかった。3 例の死産（対照群も 3 例）がみられたが、個別値は正常範囲内であった。奇形児や発育不良児はなかった。この用量のアルチカイン投与では、出生時の児の体重には遅延性の影響はみられなかった。

- 離乳までの F2 世代の検査

20 mg/kg/日の用量では、児の性比に影響はみられなかった。離乳前後の期間中の体重は正常範囲内であった。すべての値は対照群の値と同等であった。児の肉眼的な外形検査では奇形はみられなかった。

40 mg/kg/日の用量では、児の性比に影響はみられなかった。離乳前後の期間中の体重は正常範囲内であった。すべての値は対照群の値と同等であった。児の肉眼的な外形検査では奇形はみられなかった。

80 mg/kg/日の用量では、児の性比に影響はみられなかった。離乳前後の期間中の体重は正常範囲内であった。すべての値は対照群の値と同等であった。児の肉眼的な外形検査では奇形はみられなかった。

- 結論

妊娠期間及び授乳期間中の F0 母動物におけるアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 40 mg/kg/日であった。受胎能及び哺育能に関する生殖能力についてのアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 40 mg/kg/日であった。児については、F1 世代の出生後の発育と生存に関してのアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 40 mg/kg/日であった。F2 世代におけるアルチカイン塩酸塩の無毒性量は 80 mg/kg/日以上であった。

以上のように、今回の試験条件下でみられた、出生前後の死産児数の軽度増加、眼瞼開裂の軽度遅延及び”受動回避学習テスト”成績への影響は、いずれも母毒性を示した 1 用量で生じていたことから、これらの児の変化は母毒性に関連したものと判断した。

2.6.6.6.4　幼若動物を用いた試験

該当なし。

2.6.6.7　投与部位の忍容性

一種類の動物(モルモット)を用いた 1 試験を実施した。

2.6.6.7.1.1　Study No.871225－Magnusson と Kligman のマキシマイゼーションテストを参考にした皮膚感作性試験－非 GLP 試験

本試験の目的は、血管収縮剤を含まないアルチカイン 40 mg/mL のアレルギー及び感作性効果を評価することであった。試験は、Hartley モルモットにフロイント完全アジュバントを用い、皮内投与及び局所塗布により密封包帯下で実施した。

感作性試験は 60 匹の動物(1 群雌雄各 10 匹)を用いて実施した。陰性対照群には水を投与し、陽性対照群には 1%DNCB(1%ジニトロクロロベンゼン)を投与した。初回惹起の為、動物は 1 日目に皮内投与を受けた。動物は脊柱の両側にそれぞれ 1 か所、計 2 か所の皮内投与を計 3 回受けた。感作誘導は、投与 9 日目に実施し、剃毛 24 時間後に初回惹起部位に当てた四角いガーゼ上にアルチカイン 40 mg/mL を 500 µl、希釈せずに滴下した。四角いガーゼは保護絆創膏下で 48 時間維持した後除去した。陰性対照群には、同様な条件下で注射用水を処置した。陽性対照群には、同様な条件下で DNCB を処置した。

感作後 13 日(投与 22 日目)に動物の脇腹を剃毛して 24 時間後、上述と同じ条件下で、アルチカイン塩酸塩、水(陰性対照群)及び DNCB(陽性対照群)をアレルギー物質や絆創膏に一度も接触していない部位に塗布した。局所反応の判定は、包帯を除去後 6、24 及び 48 時間後に実施した。反応の有無については、Magnusson と Kligman の基準に従い、無反応：0、軽度のびまん性発赤：1、中等度のびまん性発赤：2、強い赤色腫脹：3 と計数された。

アレルギー誘発性の程度判定は反応の強さよりも反応を示した動物の数に基づいて実施した。以下の基準に基づき、5 つのアレルギー誘発性に分類した。

反応を示した動物の頻度（%）	アレルギー誘発性のクラス	アレルギーの強さ
0～8	I	非常に弱い
9～28	II	弱い
29～64	III	中等度
65～80	IV	強い
81～100	V	非常に強い

試験の結果、陰性対照群とアルチカイン処置群は皮膚感作性を示さなかった。

- 結論

薬剤処理群に対照群と異なる皮膚感作性は認められなかった。いずれの動物も反応性を示さなかったため、薬剤処理群はクラス I と分類された。分類法に従うとクラス I と II の化合物はアレルギー誘発性なしと判定される。

以上、血管収縮剤を含有しないアルチカイン塩酸塩 40 mg/mL はアレルギー誘発性なしと考えられた。

2.6.6.8　その他の毒性試験

アドレナリンが亜硫酸塩と反応して生じる分解生成物のアドレナリン・スルホン酸塩(またはエピネフリン・スルホン酸塩)について 3 試験が実施された。

考えられる全てのアドレナリン分解生成物について、1 つの *in silico* 試験が実施された。

2.6.6.8.1　Study No.20110153TRP－アドレナリン・スルホン酸塩のラットを用いた静脈内投与による急性毒性試験－GLP 試験

本試験の目的は、アドレナリン・スルホン酸塩をラットに漸増法により単回静脈内投与した時の毒性を評価することであった。

試験は、1 群 6 匹(雌雄各 3 匹)の Sprague Dawley ラットを用いて 3 用量(150 µg/kg, 1.5 mg/kg, 及び 50 mg/kg)について実施された。

動物には、アドレナリン・スルホン酸塩を溶媒(注射用水或いは 0.9%Nacl)に 5 mL/kg の用量で溶解したものを(急速)静脈内投与した。死亡率について、1 日 2 回観察し記録した。一般状態観察は、投与前及び投与日の投与後 1 時間±30 分及び投与 3 から 4 時間後に行ない、その後、2 日から 14 日目までは 1 日 1 回観察した。機能及び神経行動学的検査は、1、7 及び 14 日目に実施した。動物の体重は 1、2、8、11、及び 14 日目に測定した。15 日目に動物を安楽死させ、剖検を行った。

試験の結果、いずれの投与量においても、試験期間中に死亡例は無かった。被験物質を投与した動物の平均体重と平均体重増加量は正常であった。アドレナリン・スルホン酸塩の 50 mg/kg を投与した 1 例の雄で、投与直後から投与 1 時間後までの間に、呼吸困難、横臥位、横臥位、眼瞼下垂、自発運動低下及び腹部弛緩が認められた。これらの所見を除いて、いずれの投与群においてもその他の一般状態変化は認められなかった。最終的に、いずれの被験物質投与群の動物においても、剖検時に特記すべき組織の肉眼的所見は認められなかった。

- 結論

実施した試験条件下において、アドレナリン・スルホン酸塩を 150 µg/kg 及び 1.5 mg/kg の用量で雌雄の Sprague Dawley ラットに単回静脈内投与しても死亡例は見られず、毒性症状も認められなかった。

アドレナリン・スルホン酸塩の 50 mg/kg を静脈内投与しても死亡例は見られなかった。なお、自律神経系、姿勢、運動性及び筋緊張関する変化が雄 1/3 例で認められたが、雌では認められなかった。

2.6.6.8.2　Study No.FSR-IPL 100901－アドレナリン・スルホン酸塩－B.N.Ames の手技による His(-)サルモネラ菌 5 株を用いた細菌を用いる復帰突然変異試験－GLP 試験

本試験の目的は、アドレナリン・スルホン酸塩の遺伝毒性について復帰突然変異試験を用いて評価することである。

試験に使用した菌株は、TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び TA102 であった。本試験に先立ち、雑菌汚染がないことを確認するために無菌試験を実施した。細菌に対する阻害活性を調べるための予備試験を、48 時間の培養時間で 5 菌株について実施した。変異原性試験は、Aroclor1254 で誘導したラット肝由来のミクロゾームを用いて代謝活性化を行う場合と行わない場合について、5 菌株を用いて実施した。対照薬としてレボドーパを用いた試験も実施した。

初回試験において、以下の用量のアドレナリン・スルホン酸塩が代謝活性化系の存在下及び非存在下で全ての菌株に対して処理された：0、10、30、100、300、1000 µg/plate。

2 回目の試験では、以下の用量の被験物質が代謝活性化系の存在下及び非存在下で代謝活性化系の存在下の TA102 を除く全ての菌株に対して処理された：0、10、30、100、300、1000 µg/plate。ビタミン C 存在/非存在下、プレインキュベーション実施/非実施、且つ、代謝活性化系の存在下において、以下の用量の被験物質が TA102 に処理された：0、30、100、200、300、500、1000 µg/plate。

3 回目の試験は、TA102 のみを用い、以下の用量について代謝活性化系の存在下でプレインキュベーションをしない条件で実施された：0、10、30、100、300、500、1000 µg/plate。

初回及び 2 回目の試験において、以下の用量のレボドーパが代謝活性化系の存在下/非存在下で全菌株に処理された（代謝活性化系の存在下で実施した 2 回目の試験はプレインキュベーション

法で実施）：0、10、30、100、300、1000 μg/plate。ただし、2 回目の試験の代謝活性化系の存在下の TA102 に対しては、以下の用量が用いられた：0、30、100、200、300、500 μg/plate。

予備試験の結果、アドレナリン・スルホン酸塩及びレボドーパは、代謝活性化の有無にかかわらず、試験に用いた菌株に対して全ての用量で沈殿や生育阻害を示さなかった。したがって、両化合物の初回遺伝毒性試験における最高用量は、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての試験菌株に対して 1,000 μg/plate とした。

アドレナリン・スルホン酸塩の遺伝毒性評価結果を以下に示した。

プレインキュベーションを行わない代謝活性化系の存在下で、初回に実施した TA102 を用いた試験において、統計学的には有意であるが生物学的に無意味な復帰変異コロニー数の増加が認められた。この反応性は判定をするには不明瞭であったため、この傾向を確認するために 2 回目の試験をこの菌株のみを用いてプレインキュベーションを行う場合と行わない場合について実施した。更に、この反応性が酸化反応に起因したものであるか否かを調べるため、抗酸化剤として 5 mg/plate のビタミン C を添加した場合としない場合について、代謝活性化系の存在下で TA102 を用いた試験を実施した。試験は、プレインキュベーションを行う場合と行わない場合の両方の条件下で実施した。

試験 1	TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102	
	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg /plate	誘発比	用量 μg /plate	誘発比	用量 μg /plate	誘発比	用量 μg /plate	誘発比
非代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	1.1	10	0.8	10	1.3	10	1.0	10	1.0
	30	0.9	30	0.5	30	0.7	30	1.1	30	1.2
	100	1.3	100	0.9	100	1.2	100	1.1	100	1.2
	300	0.9	300	1.2	300	0.9	300	1.0	300	1.2
	1000	1.4	1000	0.6	1000	0.9	1000	1.0	1000	1.1
代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	0.8	10	0.7	10	1.2	10	0.9	10	1.2
プレインキュベーションなし	30	1.4	30	0.8	30	1.2	30	1.0	30	1.2
	100	0.9	100	1.1	100	1.2	100	0.9	100	1.5
	300	1.1	300	1.3	300	1.2	300	0.9	300	1.6
	1000	1.0	1000	0.8	1000	0.9	1000	0.8	1000	1.5

誘発比：被験物質群の復帰変異コロニー数/対照群の復帰変異コロニー数

プレインキュベーションを行う場合と行わない場合の代謝活性化系の存在下で TA102 を用いて実施した 2 回目の試験では、試験に用いた全ての用量において 5 mg/plate のビタミン C の有無にかかわらず、統計学的及び生物学的に有意な復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方で、プレインキュベーションを行わない代謝活性化系の存在下で TA102 を用いた試験において、ビタミン C 添加の有無にかかわらず、最高用量で復帰変異コロニー数の著しい減少が認められた。初回試験では認められなかったこの反応は、おそらく被験物質の毒性に起因すると考えられ、変異原性に関するハザードの観点からは意味の無いものと考えられた。

試験 2-1	TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102	
	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比
非代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	1.1	10	1.5	10	1.5	10	1.0	10	0.7
	30	1.0	30	1.3	30	1.1	30	0.9	30	1.0
	100	1.2	100	1.0	100	1.2	100	1.0	100	1.1
	300	0.9	300	1.0	300	1.0	300	1.0	300	1.1
	1000	1.1	1000	1.4	1000	1.1	1000	1.1	1000	1.0
代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	下表参照	
	10	1.2	10	1.1	10	1.1	10	1.0		
プレインキュベーション	30	1.3	30	2.0	30	0.9	30	0.9		
	100	1.5	100	2.3	100	1.1	100	1.0		

	300	1.0	300	1.1	300	1.0	300	0.9		
	1000	1.0	1000	1.4	1000	0.9	1000	1.0		

誘発比：被験物質群の復帰変異コロニー数/対照群の復帰変異コロニー数

試験 2-2	TA102			試験 2-3	TA102	
	用量 μg/plate	誘発比			用量 μg/plate	誘発比
非代謝活性化	0	-		非代謝活性化	0	-
	30	0.9			30	1.0
	100	0.9			100	1.1
	200	1.0			200	1.2
	300	1.0			300	1.1
	500	1.0			500	1.2
	1000	0.0			1000	0.1
代謝活性化	0	-		代謝活性化	0	-
	30	1.0		プレインキュベーション	30	1.1
プレインキュベーション	100	1.0			100	1.1
	200	1.1			200	1.2
	300	1.1			300	1.2
	500	1.1			500	1.1
	1000	1.1			1000	1.0

誘発比：被験物質群の復帰変異コロニー数/対照群の復帰変異コロニー数

毒性に関する矛盾した結果を考慮し、プレインキュベーションを行わない代謝活性化系の存在下で TA102 を用いた 3 回目の試験を実施することとなった。この追加試験において、統計学的に有意な復帰変異コロニー数の増加が確認された。しかしながら、これらの反応性は、生物学的に有意なものではなく、明確な用量相関性が認められなかった。以上のことから、被験物質は、本試験条件下で変異原性を有さないと判断された。

試験 3	TA102	
	用量 μg/plate	誘発比
代謝活性化	0	-
	10	1.4
プレインキュベーションなし	30	1.3
	100	1.6
	300	1.5
	500	1.3
	1000	1.3

誘発比：被験物質群の復帰変異コロニー数/対照群の復帰変異コロニー数

レボドーパの変異原性評価結果を以下に記載した。

初回試験において、統計学的及び生物学的に有意な増加は認められなかった。

試験 1	TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102	
	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比
非代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	1.4	10	1.0	10	0.9	10	1.0	10	0.9
	30	1.4	30	0.4	30	1.4	30	1.1	30	1.1
	100	1.0	100	0.6	100	0.9	100	1.2	100	1.0
	300	1.3	300	0.7	300	1.0	300	1.3	300	1.4
	1000	1.5	1000	1.0	1000	1.2	1000	1.3	1000	1.1
代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	1.1	10	1.6	10	1.3	10	0.9	10	0.9
プレインキュベーションな	30	1.5	30	1.8	30	1.0	30	1.0	30	1.0
	100	1.0	100	1.6	100	1.2	100	0.8	100	1.1

し	300 1000	1.0 0.9	300 1000	1.5 1.2	300 1000	1.1 1.0	300 1000	0.9 0.9	300 1000	0.9 1.2

誘発比：被験物質群の復帰変異コロニー数/対照群の復帰変異コロニー数

試験 2	TA1535		TA1537		TA98		TA100		TA102	
	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比	用量 μg/plate	誘発比
非代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	1.2	10	1.2	10	1.4	10	1.1	10	1.0
	30	1.7	30	2.3	30	1.6	30	1.2	30	1.3
	100	0.9	100	1.1	100	1.2	100	1.0	100	1.2
	300	1.0	300	1.9	300	1.1	300	1.3	300	1.3
	1000	1.1	1000	1.4	1000	1.3	1000	1.3	1000	1.1
代謝活性化	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	0.8	10	0.6	10	0.7	10	1.0	30	1.1
プレインキュベーション	30	0.8	30	0.6	30	0.8	30	1.1	100	1.1
	100	0.7	100	0.8	100	0.9	100	1.1	200	1.1
	300	0.8	300	0.6	300	0.9	300	1.2	300	1.3
	1000	0.8	1000	0.7	1000	1.1	1000	1.5	500	1.3
									1000	1.7

誘発比：被験物質群の復帰変異コロニー数/対照群の復帰変異コロニー数

代謝活性化系の存在下及び非存在下における TA100 を用いた 2 回目の試験において、統計学的に有意ではあるが生物学的に有意でない増加が認められたが、これらの反応は、妥当なものとは考えられなかった。プレインキュベーションと代謝活性化を行った TA102 を用いた試験において、統計学的に有意、且つ、生物学的に弱いながらも有意な増加が観察されたが、独立した他の試験では観察されなかったことから、判定不能と判断された。

- 結論

試験の成立条件は満たされていた。実際のところ、無菌試験の条件下で 37°C48 時間の培養でもコロニー形成は認められなかった。統計学的及び生物学的に有意な復帰変異コロニー数の増加が陽性対照物質群において認められた。加えて、溶媒対照群における自然発生復帰変異コロニーの出現頻度は、本試験条件下において一般的に観察される範囲内であった。以上のことから、試験は妥当に実施されていた。アドレナリン・スルホン酸塩の変異原性は、サルモネラ菌 TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び TA102 の 5 株を用いた復帰突然変異試験により、代謝活性化系の存在下及び非存在下で実施され、更に、TA102 を用いた代謝活性化系の存在下の 2 或いは 3 回の独立した試験も実施された。これらの試験条件下において、変異原性は認められなかった。

2.6.6.8.3　Study No.FSR-IPL 100902－アドレナリン・スルホン酸塩－哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験－GLP 試験

本試験の目的は、i*n vitro* でヒトリンパ球の中期分裂像を観察する染色体異常試験を用い、アドレナリン・スルホン酸塩の遺伝毒性を調べる事であった。

予備細胞毒性と遺伝毒性試験は Aroclor1254 処理で誘導したラット肝 S9 を用いる代謝活性化系の存在下と非存在下で実施した。

化合物	非代謝活性化/4 時間処理		代謝活性化(5%S9)	
	処理濃度 μg/ml	分裂指数(%)	処理濃度 μg/ml	分裂指数(%)
溶媒	0	-	0	-

アドレナリン 硫酸塩	1000	111.8	1000	112.2
	500	101.2	500	106.1
	250	91.8	250	103.7
	125	85.9	125	119.5
	62.5	78.8	62.5	102.4
	31.25	114.1	31.25	103.7
	15.63	103.5	15.63	91.5

分裂指数(%)：被験物質群の 1000 細胞中の分裂細胞数/溶媒対照群の 1000 細胞中の分裂細胞数×100

化合物	非代謝活性化/20 時間処理		非代謝活性化/44 時間処理		代謝活性化(10%S9)	
	処理濃度 μg/ml	分裂指数(%)	処理濃度 μg/ml	分裂指数(%)	処理濃度 μg/ml	分裂指数(%)
溶媒	0	-	0	-	0	-
アドレナリン 硫酸塩	1000	115.4	1000	89.8	1000	100.0
	500	85.9	500	66.1	500	87.0
	250	110.3	250	45.8	250	93.0
	125	92.3	125	61.0	125	75.7
	62.5	88.5	62.5	71.2	62.5	88.7
	31.25	107.7	31.25	74.6	31.25	83.5
	15.63	69.2	15.63	74.6	15.63	75.7

分裂指数(%)：被験物質群の 1000 細胞中の分裂細胞数/溶媒対照群の 1000 細胞中の分裂細胞数×100

予備細胞毒性試験で用いた濃度は、1,000、500、250、125、62.5、31.25 及び 15.63 μg/mL であった。代謝活性化系(S95%或いは 10%)の存在下及び非存在下で実施した試験(4-、20-及び 44-時間処理)において、最高濃度である 1,000 μg/mL の分裂指数は、溶媒対照群の 89.8 から 115.4%であり、細胞毒性は無し、または軽度と考えられた。これらの試験条件下で、1,000 μg/mL が全ての試験における最高濃度であった。

遺伝毒性試験において、アドレナリン・スルホン酸塩は、ヒトリンパ細胞を用いた S9 を 5 或いは 10%含む代謝活性化系の存在下で 4 時間処理した場合、代謝活性化系の非存在下で 4、20 及び 44 時間処理した場合のいずれにおいても、1 細胞当たりの切断の数及びギャップを含む或いは含まない異常細胞の出現率に統計学的有意差は認められなかった。更に、数的異常を持つ細胞数にも統計学的有意差は認められなかった。

2.6.6　毒性試験の概要文
セプトカイン配合注カートリッジ

化合物	試験 1　短時間処理：4 時間						試験 2　持続処理：20 時間					
	処理濃度 μg/mL	分裂指数 (%)	数的異常 /200 細胞	構造異常/200 細胞			処理濃度 μg/mL	分裂指数 (%)	数的異常 /200 細胞	構造異常/200 細胞		
			倍数性	切断数/細胞 平均±SD	ギャップを含まない異常細胞数	ギャップを含む異常細胞数			倍数性	切断数/細胞 平均±SD	ギャップを含む異常細胞数	ギャップを含まない異常細胞数
溶媒対象	0	-	0	0.045±0.208	9	10	0	-	0	0.045±0.208	9	16
マイトマイシン C	0.25	83.6	0 N.T.	0.650±1.201 <0.001	42 <0.001	43 <0.001	0.25	66.5	1 N.S.	0.800±0.974 <0.001	50 <0.001	51 <0.001
アドレナリン・スルホン酸塩	1000	93.5	0 N.T..	0.030±0.198 N.S.	5 N.S.	9 N.S.	1000	86.8	1 N.S.	0.050±0.218 N.S.	10 N.S.	11 N.S.
	500	91.6	0 N.T.	0.035±0.184 N.S.	7 N.S.	10 N.S.	500	88.5	1 N.S.	0.050±0.218 N.S.	10 N.S.	15 N.S.
	250	90.2	0 N.T.	0.040±0.221 N.S.	7 N.S.	8 N.S.	250	98.7	0 N.T.	0.035±0.184 N.S.	7 N.S.	9 N.S.

化合物	試験 2　持続処理：44 時間					
	処理濃度 μg/mL	分裂指数 (%)	数的異常 /200 細胞	構造異常/200 細胞		
			倍数性	切断数/細胞 平均±SD	ギャップを含む異常細胞数	ギャップを含まない異常細胞数
溶媒対象	0	-	0	0.050±0.218	10	10
アドレナリン・スルホン酸塩	1000	105.2	0 N.T.	0.065±0.302 N.S.	10 N.S.	12 N.S.
	500	92.7	0 N.T.	0.085±0.344 N.S.	13 N.S.	18 N.S.
	250	92.7	0 N.T.	0.060±0.238 N.S.	12 N.S.	13 N.S.

Student’s t-test：細胞当たりの切断数　　Chi2：数的異常及び構造異常(ギャップを含む場合と含まない場合の異常を有する細胞数)
N.S.：統計学的有意差なし(p<0.05)　　分裂指数(%)：被験物質群の 2000 細胞中の分裂細胞数/溶媒対照群の 2000 細胞中の分裂細胞数×100
数的及び構造異常観察細胞数：陽性対照物質は 100 細胞　　N.T.：統計学的解析は未実施

2.6.6　毒性試験の概要文
セプトカイン配合注カートリッジ

	試験 1　短時間処理：4 時間(5%S9-mix)						試験 2　短時間処理：4 時間(10%S9-mix)					
化合物	処理濃度 μg/mL	分裂指数(%)	数的異常/200 細胞	構造異常/200 細胞			処理濃度 μg/mL	分裂指数(%)	数的異常/200 細胞	構造異常/200 細胞		
			倍数性	切断数/細胞 平均±SD	ギャップを含まない異常細胞数	ギャップを含む異常細胞数			倍数性	切断数/細胞 平均±SD	ギャップを含む異常細胞数	ギャップを含まない異常細胞数
溶媒対象	0	-	1	0.030±0.171	6	7	0	-	3	0.045±0.208	9	12
シクロフォスファミド	10	33.2	0 N.S.	1.250±1.828 <0.001	54 <0.001	55 <0.001	10	33.5	1 N.S.	0.900±1.210 <0.001	52 <0.001	54 <0.001
アドレナリン・スルホン酸塩	1000	92.0	0 N.S.	0.045±0.208 N.S.	9 N.S.	10 N.S.	1000	98.6	0 N.S.	0.040±0.221 N.S.	7 N.S.	10 N.S.
	500	90.9	0 N.S.	0.020±0.140 N.S.	4 N.S.	10 N.S.	500	98.2	1 N.S.	0.050±0.218 N.S.	10 N.S.	13 N.S.
	250	92.7	0 N.S.	0.025±0.211 N.S.	3 N.S.	6 N.S.	250	98.6	0 N.S.	0.040±0.196 N.S.	8 N.S.	11 N.S.

Student’s t-test：細胞当たりの切断数　　Chi2：数的異常及び構造異常(ギャップを含む場合と含まない場合の異常を有する細胞数)
N.S.：統計学的有意差なし(p<0.05)　　分裂指数(%)：被験物質群の 2000 細胞中の分裂細胞数/溶媒対照群の 2000 細胞中の分裂細胞数×100
数的及び構造異常観察細胞数：陽性対照物質は 100 細胞　　N.T.：統計学的解析は未実施

- 結論

試験成立の条件は全て満たされていた。アドレナリン・スルホン酸塩のヒトリンパ細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験は、代謝活性化系の存在下及び非存在下で実施された（OECD473）。これらの試験条件下において、ヒトリンパ細胞に対する染色体異常誘発性は認められなかった。

2.6.6.8.4　18 種類のセプトドント不純物のデレック・ネクサスを用いた評価（4.2.3.7.6: Derek Nexus Assessment）

本試験の目的は、18 種類の不純物について、デレック・ネクサス(v2.0.2)を用いた変異原性、遺伝毒性、染色体異常誘発性及びがん原性についてのポテンシャルを評価することであった。この 18 種類の不純物は、質量分析装置から得られた推定化学構造に基づいている。

試験の結果、提示された 18 種類の化合物全ての化学構造にはカテコール(3, 4--ジヒドロキシフェニル)グループが含まれていることが示された。カテコールグループはカテコラミンである API アドレナリンに由来している。全てのカテコール含有化合物において、*in vitro* 染色体異常誘発性に関する比較的特異性の低いアラートであるデレックアラート 625 が示された。化合物 5 は、より有意な変異原性(アラート 027)及びがん原性(アラート 073)デレック・アルキル化剤アラートを示した。アラート 027 と 073 が示されたことから、化合物 5 はクラス 3 不純物(2－4)と考えるべきである。しかしながら、化合物 5 については、同じ警告構造を有する化合物 18 (Adrenaline sulfonic acid)の Ames 試験により変異原性が陰性であることを確認したため（資料：Study No. FSR-IPL 100901 Epinephrine Sulfonic Acid - Bacterial Reverse Mutation Test on five strains of Salmonella typhimurium）、クラス 4 の非変異原性不純物として管理する（資料：Derek Nexus Assessment Computational Toxicology Services LLC, Maryland 25 May 2012）。

2.6.6.9　考察及び結論

アドレナリン 0.01 mg/mL 或いは 0.005 mg/mL 含有アルチカインの一般毒性試験が実施された。何種類かの動物を用いた単回及び 4 週間反復皮下投与試験において、それぞれ 72 及び 25 mg/kg/日が最大耐量であり、安全域は単回投与で 10 倍、反復投与で 3 倍であった。

アルチカインは受胎能への影響を示さなかった。また、本剤は直接的な胚毒性及び催奇形性も示さなかった。更に、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験も陰性であった。18 種類の可能性のある不純物の *in silico* 試験及び Ames 試験において、低用量投与による懸念は示されなかった。したがって、アルチカイン塩酸塩、アドレナリン及びその可能性のある分解物の毒性に懸念はなかった。

2.6.6.10　図表

該当なし。