

安全性薬理試験及び毒性試験

1. 安全性薬理試験³⁰⁾

	試験項目	動物種 (性、動物数)	投与経路 投与量	試験成績
中枢神経系	一般症状及び行動に及ぼす作用 (Irwinの変法)	ラット (雄、6)	経口、単回 500、1,000、 2,000mg/kg	影響なし
呼吸器系	呼吸数、1回換気量及び分時換気量に及ぼす作用	ラット (雄、6)	経口、単回 500、1,000、 2,000mg/kg	影響なし
心血管系	hERG電流に及ぼす作用 (パッチクランプ法)	ヒト胎児腎細胞株 HEK293	<i>in vitro</i> 30、100、300 μ g/mL	IC ₅₀ : > 300 μ g/mL 30 μ g/mL : 影響なし 100、300 μ g/mL : hERG電流抑制
	心筋活動電位持続時間に及ぼす作用 (微小電極法)	モルモット 摘出乳頭筋 標本	<i>in vitro</i> 30、100、300 μ g/mL	30 μ g/mL : 影響なし 100 μ g/mL : APD ₃₀₋₉₀ 相対値の高値 300 μ g/mL : APA、V _{max} 、APD ₃₀ 、APD ₅₀ 及びAPD ₉₀ 相対値の低値、並びにAPD ₃₀₋₉₀ 相対値の高値
	血圧、心拍数及び心電図に及ぼす作用 (テレメトリー法)	無麻酔イヌ (雄、4)	経口、単回 30、100、300 mg/kg	30、100mg/kg : 影響なし 300mg/kg : 可逆性のQRS時間の延長
腎・泌尿器系	尿量、尿中電解質及び尿浸透圧に及ぼす作用	ラット (雄、8)	経口、単回 200、600、 2,000mg/kg	200mg/kg : 尿中ナトリウム及びカリウム 排泄量の軽度な増加 600、2,000mg/kg : 尿量の増加、並びに尿中 ナトリウム、カリウム及び塩素排泄量の増加 いずれの用量においても、尿浸透圧に影響 なし
	糸球体濾過量、腎血漿流量及び濾過率に及ぼす作用	ラット (雄、8)	経口、単回 200、600、 2,000mg/kg	200mg/kg : 影響なし 600mg/kg : 糸球体濾過量の低下 2,000mg/kg : 糸球体濾過量及び腎血漿流 量の低下
胃腸管系	胃排出能に及ぼす作用	ラット (雄、8)	経口、単回 200、600、 2,000mg/kg	200mg/kg : 影響なし 600、2,000mg/kg : 胃排出率の低下
	小腸輸送能に及ぼす作用	ラット (雄、8)	経口、単回 200、600、 2,000mg/kg	200、600mg/kg : 影響なし 2,000mg/kg : 小腸輸送能の抑制
	胃液分泌に及ぼす作用	ラット (雄、8)	経口、単回 200、600、 2,000mg/kg	200、600mg/kg : 影響なし 2,000mg/kg : pHの上昇及びペプシン活性 の低下傾向
自律神経系	各種アゴニストによる収縮反応に及ぼす作用 (アセチルコリン、ヒスタミン、 塩化バリウム、セロトニン)	モルモット 摘出回腸 標本	<i>in vitro</i> 38.3、115、383 μ g/mL (100、300、 1,000 μ mol/L)	38.3 μ g/mL : 影響なし 115 μ g/mL : ヒスタミン収縮高比率の低下 383 μ g/mL : ヒスタミン及びアセチルコ リン収縮高比率の低下 塩化バリウム及びセロトニン収縮に対する 作用並びにアナグリップチン単独の作用はなし

APA : 活動電位振幅、V_{max} : 最大立ち上がり速度、APD₃₀ : 30%再分極時活動電位持続時間、APD₅₀ : 50%再分極時活動電位持続時間、APD₉₀ : 90%再分極時活動電位持続時間、APD₃₀₋₉₀ : APD₉₀とAPD₃₀との差

2. 毒性試験

(1) 単回投与毒性試験³¹⁾

動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量 (mg/kg)
ラット	経口	2,000	雌雄：>2,000
	静脈内	125、250、500、1,000、2,000	雌雄：500~1,000
イヌ	経口	100、300、1,000	雌雄：>1,000
サル	経口	30、100、300、1,000	雌雄：>1,000

(2) 反復投与毒性試験³²⁾

動物種	投与期間 投与経路	投与量 (mg/kg/日)	無毒性量 (mg/kg/日)	主な所見
ラット	4週 経口	200、600、 2,000	雌雄：200	600mg/kg/日以上：肝臓重量の増加、(雄)甲状腺濾胞上皮の肥大、(雄)摂水量の増加を伴う尿検査値の変動 2,000mg/kg/日：大脳の脈絡叢上皮の空胞化、縮腫、小葉中心帯肝細胞の肥大、(雌)甲状腺重量の増加、(雌)摂水量の増加を伴う尿検査値の変動、(雄)精細管上皮の変性、(雄)精巣上体で管腔内細胞残屑
	13週 経口	100、400、 2,000	雌雄：100	400mg/kg/日以上(主として2,000mg/kg/日)：摂水量の増加を伴う尿検査値の変動、(雄)貧血所見、(雄)脾臓での髄外造血の亢進 2,000mg/kg/日：大脳及び小脳の脈絡叢上皮の空胞化、縮腫、肝臓重量の増加、小葉中心帯肝細胞の肥大、(雄)甲状腺重量の増加、甲状腺濾胞上皮の肥大、血漿中T ₄ 濃度の減少傾向及びTSH濃度の増加傾向、(雄)精細管の萎縮及び空胞化、(雄)精巣上体で管腔内細胞残屑及び精子数の減少、(雌)卵巣重量の増加、(雌)子宮重量の減少、(雌)卵巣黄体の大型化、(雌)子宮内膜間質の萎縮、(雌)膣粘膜上皮の粘液変性、(雌)貧血所見、(雌)脾臓での髄外造血の亢進、網赤血球率の増加、小型球状赤血球の出現
	26週 経口	100、300、 1,000	雌雄：300	1,000mg/kg/日：大脳及び小脳の脈絡叢上皮の空胞化、摂水量の増加を伴う尿検査値の変動、(雌)膣粘膜上皮の粘液変性、(雌)性周期異常、貧血所見
イヌ	4週 経口	30、100、300	雌雄：100	300mg/kg/日：心拍数の増加、QRS時間及びQTc間隔の延長、縮腫、軟便又は粘液便、便潜血反応陽性、腸管粘膜固有層に好酸球の増加
サル	4週 経口	60、200、600	雄：60 雌：<60	60mg/kg/日以上：(雌)軽度な胃粘膜障害 200mg/kg/日以上：QRS時間の延長、(雄)軽度な胃粘膜障害 600mg/kg/日(一部200mg/kg/日)：肝臓重量の増加を伴うびまん性肝細胞の脂肪化
	13週 経口	10、50、300	雌雄：50	300mg/kg/日：QTc間隔の延長
	52週 経口	10、50、300	雌雄：50	300mg/kg/日：PR間隔の延長

(3) 生殖発生毒性試験³³⁾

1) 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験(ラット)

<雄投与試験(200、600及び2,000mg/kg/日)>

一般毒性学的影響として、2,000mg/kg/日で体重増加抑制、摂餌量の減少、摂水量の増加、肝臓重量の増加、精巣の小型化、精巣及び精巣上体重量の減少、精細管の萎縮及び空胞化、並びに精巣上体の管腔内精子の減少及び管腔内細胞残屑が見られた。雄動物の生殖機能に及ぼす影響として、2,000mg/kg/日で精子数及び運動精子率の低下が見られ、それにより受胎能は消失した。初期胚発生に及ぼす影響は600mg/kg/日まで認められなかった。一般毒性学的無毒性量及び生殖機能に関する無毒性量、並びに初期胚発生に関する無毒性量は、いずれも600mg/kg/日と推定された。

<雌投与試験(200、600及び2,000mg/kg/日)>

一般毒性学的影響として、600mg/kg/日以上で肝臓重量の増加、2,000mg/kg/日で体重増加量及び摂餌量の減少、並びに摂水量の増加が見られた。生殖機能に及ぼす影響として、2,000mg/kg/日で性周期の延長が見られた。初期胚発生に及ぼす影響は認められなかった。雌動物の一般毒性学的無毒性量は200mg/kg/日、生殖機能に関する無毒性量は600mg/kg/日、初期胚発生に関する無毒性量は2,000mg/kg/日と推定された。

2) 胚・胎児発生に関する試験(ラット、ウサギ)

<ラット(200、600及び2,000mg/kg/日)>

母動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600mg/kg/日以上で摂水量の増加、2,000mg/kg/日で体重増加量及び摂餌量の減少、並びに肝臓重量の増加が見られた。しかし、生殖機能に及ぼす影響は認められなかった。胚・胎児発生に及ぼす影響として、2,000mg/kg/日で胎児の発育遅延を示唆する生存胎児体重の減少、並びに仙椎骨の骨化数の減少及び第5胸骨核骨化率の減少傾向が見られた。しかし、催奇形性作用は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は200mg/kg/日、母動物の生殖機能に関する無毒性量は2,000mg/kg/日、胚・胎児発生に関する無毒性量は600mg/kg/日と推定された。

<ウサギ(150、300及び600mg/kg/日)>

母動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600mg/kg/日で排糞量の減少、無排便、体重増加抑制及び摂餌量の減少が見られた。母動物の生殖機能に及ぼす影響として、600mg/kg/日で流産が見られた。胚・胎児発生に及ぼす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及び生殖機能に関する無毒性量は300mg/kg/日、胚・胎児発生に関する無毒性量は600mg/kg/日と推定された。

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(ラット)

<ラット(200、600及び2,000mg/kg/日)>

母動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600mg/kg/日以上で摂餌量の減少、体重増加抑制及び摂水量の増加、2,000mg/kg/日で肝臓重量の増加が見られた。しかし、生殖機能に及ぼす影響は認められなかった。出生児に及ぼす影響として600mg/kg/日以上で発育抑制(体重増加抑制)が見られた。しかし、外表分化、感覚・反射機能、行動・学習及び生殖機能に対する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200mg/kg/日、母動物の生殖機能に関する無毒性量は2,000mg/kg/日、出生児に関する無毒性量は200mg/kg/日と推定された。

(4) その他の特殊毒性³⁴⁾

1) 抗原性試験 (モルモット、マウス)

モルモットを用いて能動全身性アナフィラキシー (ASA) 反応及び同種受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応を、マウスを用いて異種 (ラット) PCA 反応を行った結果、いずれの反応も陰性であり、アナグリプチンは抗原性を示す可能性は低いと考えられた。

2) 免疫毒性試験 (ラット)

ラットを用いて4週間反復経口投与による免疫毒性試験 (200、600及び2,000mg/kg/日) を実施した。T細胞依存性抗原に対する特異抗体産生能及びリンパ球サブセットに対する影響を指標にした。その結果、いずれの指標においてもアナグリプチン投与による影響は認められず、アナグリプチンは免疫毒性を示す可能性は低いと考えられた。

3) 遺伝毒性試験 (*in vitro*, *in vivo*)

In vitro 試験である細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、並びに *in vivo* 試験であるラットを用いた小核試験及び不定期DNA合成 (UDS) 試験を実施した。染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化系非存在下で陽性を示したが、極めて高用量 (3,835 μ g/mL) での変化であり、また他の試験では陰性であったことから、アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

4) がん原性試験 (マウス、ラット)

マウスを用いて104週間反復経口投与がん原性試験 (200、600及び2,000^{*1}mg/kg/日) を実施したところ、アナグリプチンにがん原性は認められなかった。

また、ラットを用いた104週間反復経口投与がん原性試験 (200、600^{*2}及び2,000^{*3}mg/kg/日) を実施したところ、2,000^{*3}mg/kg/日の雄で肝臓の血管肉腫の発生頻度の増加が見られ、2,000^{*3}mg/kg/日の雌1例の肝臓にも同様の血管肉腫が見られた。また、2,000^{*3}mg/kg/日の雄の膀胱において、結石及び移行上皮の単純性過形成の発生頻度が増加し、移行上皮乳頭腫の発生頻度の増加傾向が見られた。

※1: 雄は74週以降1,000mg/kg/日に減量し、102週で剖検した。

※2: 雌は101週で剖検した。

※3: 雌は99週で剖検した。雄は71週以降1,000mg/kg/日に減量し、84週で剖検した。