

最終報告書

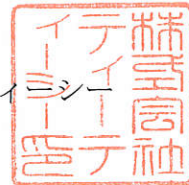
ラットを用いる単回経口投与試験

被験物質：バランス α

(試験番号：14596)

試験委託者：株式会社高橋剛商会

試験受託者：株式会社ティーテイ



2014年 5月 14日

要約

「バランス α 」の安全性に関する非臨床試験の一環として、「バランス α 」を Crl:CD(SD)ラットの雌雄にそれぞれ単回経口投与した時の安全性を検討した。本試験は GLP 非適用で実施した。

投与は被験物質原液（100%液）及び 50%液ならびに被験物質の調製媒体である注射用水を 20 mL/kg の投与容量にて雌雄各 5 匹に単回強制経口することにより行い、投与後 14 日まで一般状態の観察、投与直前及び投与後 1、3、7、10 及び 14 日に体重測定を行うとともに、投与後 14 日には剖検して肉眼的病理学検査を行った。

その結果、被験物質及び媒体投与群の全例について死亡は認められず、一般状態、体重及び肉眼的病理学検査においても異常は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下においてバランス α 原液を 20 mL/kg の投与容量にて単回経口投与しても毒性症状は認められなかったことから、バランス α の無毒性量は 20 mL/kg と推察された。

1. 概要

1.1 表題

ラットを用いる単回経口投与試験
被験物質：バランス α

1.2 試験目的

「バランス α 」の安全性に関する非臨床試験の一環として、「バランス α 」を CrI:CD(SD)ラットの雌雄にそれぞれ単回経口投与した時の安全性を検討した。本試験は GLP 非適用で実施した。

1.3 試験番号

13588

1.4 試験委託者

株式会社高橋剛商会
〒170-0002 東京都豊島区巢鴨 2-16-4-102
(TEL : 03-3576-5811、FAX : 03-3576-5815)

1.5 試験受託者

株式会社ティーティーシー
〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西 1-20-2 西武信用金庫恵比寿ビル
(TEL : 03-5459-5329、FAX : 03-5459-5685)
試験担当者：福地 早希、安居 桂、臼井 千尋

1.6 試験実施施設

株式会社 DIMS 医科学研究所
〒491-0113 愛知県一宮市浅井町西浅井郷裏 64

1.7 試験日程

試験開始日	: 2014 年 3 月 18 日
動物入荷日	: 2014 年 3 月 27 日
検疫・馴化期間終了日	: 2014 年 4 月 1 日
群分け日	: 2014 年 4 月 1 日
投与日	: 2014 年 4 月 2 日
観察期間終了日 (剖検日)	: 2014 年 4 月 16 日
最終報告書案作成日	: 2014 年 5 月 1 日

1.8 ガイドライン

本試験は「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について (薬新薬第 88 号 : 平成 5 年 8 月 10 日)」を参考に実施した。

1.9 動物愛護

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 環境省告示第 88 号)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 平成 18 年 6 月 科発第 0601005 号) 及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(平成 18 年 6 月 1 日 日本学術会議) に基づいた施設の動物実験指針 (平成 25 年 5 月 10 日) に従って実施した。

2. 被験物質及び媒体

2.1 被験物質

名称	: バランス α
英名 (略称)	: Balance α
剤形、性状	: 褐色液体
提供者	: 株式会社高橋剛商会
保存条件	: 常温 (実測値 17.0~21.0°C)
取り扱い上の注意	: 直射日光、高温、多湿を避ける。
残余物質の処理	: 提供者に返却する。

2.2 媒体

名称	: 日本薬局方注射用水
ロット番号	: 3J85N
供給源	: 株式会社大塚製薬工場
保存条件	: 室温

3. 被験物質の調製方法

3.1 調製方法

バランス α の 100%液には試験委託者より受領した原液をそのまま使用し、投与に必要な量 (50 mL) を分取した。50%液はバランス α 原液 25 mL を等容量の注射用水で希釈し、調製した。投与液は用時調製とし、投与液の濃度確認は実施しなかった。

3.2 保存

投与まで冷蔵保存した。

3.3 投与残液の処置

使用残液は廃棄した。

4. 試験系

4.1 動物種、系統及び性別

動物種	: ラット (SPF)
系統	: CrI:CD(SD)
性別	: 雌雄

4.2 選択理由

本系統は毒性試験に汎用されており、また、微生物学的に統御され、遺伝的に安定であり、評価のための背景データが豊富である。

4.3 供給元

日本チャールス・リバー株式会社 日野飼育センター

4.4 週齢、匹数

入荷時週齢	: 5 週齢
投与時週齢	: 6 週齢
入荷匹数	: 雌雄各 18 匹 (使用数: 雌雄各 15 匹)

4.5 検疫・馴化

- 検疫・馴化期間 : 6日間
期間中の検査 : 体重測定(期間中 2回以上;群分け時体重を含む)、一般状態観察(2回/日)

4.6 群分け

実験開始日の前日に、雌雄ラット各 18 匹よりそれぞれ各 15 匹の動物をコンピューターによる体重に基づく乱塊法により選び、次表の如く 1 群 5 匹の雌雄各 3 群に群分けした。各群間の体重に統計学的な有意差のないことを Bartlett 法による等分散検定(5%水準)及び Tukey 検定(両側 5%水準)で確認した。投与時におけるラットの体重範囲は雄で 149~168 g、雌で 132~142 g であり、雌雄ともに平均体重の±20%以内であった。

4.7 識別

- 検疫・馴化期間中 : ケージラベルに試験番号、仮ケージ番号、仮動物番号及び動物管理責任者名を明記した。動物個体識別は、上記内容と油性インク法(尾部)により識別した。
群分け後 : ケージラベルに試験番号、性別、群番号、ケージ番号、被験物質名及び投与濃度(投与濃度ごとに異なった色を用いて識別した)、動物番号、実験開始日及び剖検日、試験責任者名を明記した。動物個体識別はケージラベル及び油性インク法(尾部)で行った。

5. 動物管理

5.1 飼育条件

適切な生物学的防御がなされた環境の部屋で動物を飼育した。

- 温度 : 22±3℃(実測値:20.6~22.5℃)
相対湿度 : 55±15%(実測値:55~65%)
換気回数 : 10回以上/時間
照明時間 : 12時間/日(7:00~19:00)
飼育 : 1匹/ケージ(検疫・馴化期間中含め)
ケージ交換頻度 : 1回以上/週
給水瓶交換頻度 : 2回以上/週

5.2 収容ケージ及び床敷

- ケージ : プラスチック製ケージ(W257×D426×H200mm)
ケージ蓋 : ステンレス製
消毒方法 : プラスチック製ケージは常圧蒸気殺菌、ケージ蓋は高圧蒸気滅菌
床敷 : ソフトチップ((有)原商店)
消毒方法 : 高圧蒸気滅菌
床敷中の汚染物質 : 中部科学資材(株)より分析値を入手し、施設にて定める最大許容濃度以下であり、試験への影響がないことを確認した。

5.3 飼料及び給餌方法

- 飼料 : オリエンタル酵母工業(株)製固型飼料 MF
ロット番号 : 140117、140218
給餌方法 : ケージ蓋に取り付けられている給餌器に入れて、自由摂取させた。
給餌器消毒方法 : 高圧蒸気滅菌

飼料中の汚染物質：オリエンタル酵母工業(株)よりロットごとに分析値を入手し、施設における最大許容濃度以下であり、試験への影響がないことを確認した。

5.4 飲料水及び給水方法

飲料水 : 一宮市上水道水

給水方法 : 透明な給水瓶を用いて、自由摂取させた。

給水瓶消毒方法 : 給水瓶は常圧蒸気殺菌

給水栓はピューラックス (株)オーヤラックス製) 消毒

飲料水中の汚染物質：(株)環境科学研究所に分析を依頼し、施設における水質基準に適合していることを定期的 (年 2 回) に確認し、試験への影響がないことを確認した。

6. 群構成及び投与量

6.1 群構成

群	性別	被験物質	投与濃度	投与液量 (mL/kg)	匹数	動物番号
1	雄	Control ^a	—	20	5	14121001~005
2		バランス α	50%	20	5	14121006~010
3		バランス α	100%	20	5	14121011~015
4	雌	Control ^a	—	20	5	14121016~020
5		バランス α	50%	20	5	14121021~025
6		バランス α	100%	20	5	14121026~030

a: 媒体 (注射用水) を投与

6.2 投与経路とその選択理由

投与経路 : 強制経口投与

選択理由 : 予想される暴露経路に近い経口投与を選択した。

6.3 投与方法

投与前 1 晩絶食させたラットに、第 1 群及び第 4 群には被験物質の調製媒体である注射用水を、第 2 群及び第 5 群には被験物質 50%液を、第 3 群及び第 6 群には被験物質原液 (100%) をいずれも 20 mL/kg の投与容量で投与した。投与はディスポーザブル注射筒にディスポーザブル経口ゾンデを装着して行い、給餌は投与後 3 時間より再開した。

7. 観察及び検査項目

7.1 一般状態観察

すべての動物について一般行動、中毒症状、生死等について個体別に観察した。投与当日の観察は投与直前、投与直後、投与 0.5、2、4 及び 6 時間後に観察し、投与の翌日以降は 1 日 2 回 (午前・午後) 観察した。

7.2 体重測定

投与直前 (投与 0 日) に体重を測定し、これを投与量の基準にした。投与後 1、3、7、10 及び 14 日 (剖検日体重) に全生存動物について電子天秤 LA4200 型 (ザルトリウス(株)) を用いて個体別に体重を測定した。

7.3 剖検（病理学的検査）

すべての試験動物について投与後 14 日に、実験小動物用簡易吸入麻酔装置 NARCOBIT-E（KN1070、榊夏目製作所）を用い、イソフルラン麻酔下で採血（放血）致死させ、剖検した。全身諸器官・組織の肉眼的病理所見を記録した。その結果、すべての器官・組織に異常は認められなかったため、10%緩衝ホルマリン液による器官・組織の固定・保存は行わなかった。

8. 統計学的方法

媒体対照群と被験物質投与群（第 1 群と第 2 及び 3 群、第 4 群と第 5 及び 6 群）との間の統計学的な有意差検定を行い、危険率 5% ($P<0.05$)又は 1%($P<0.01$)のレベルで判定した。統計学的解析は、対照群と各投与群における体重の平均値の差の検定について、5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行った。すべて等分散であったため、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行った。なお、一般状態及び所見のみられなかった肉眼的病理学検査については統計処理を行わなかった。

試験結果

1. 生存率及び一般状態 (TABLE 1~2、APPENDIX A)

観察期間を通して、すべての動物に死亡は認められず、また一般状態においても異常は認められなかった。

2. 体重 (TABLE 3、APPENDIX B)

すべての動物において、投与後 1、3、7、10 及び 14 日の体重推移に異常は認められず、また、対照群との間に統計学的な有意差も認められなかった。

3. 肉眼的病理学検査 (TABLE 4、APPENDIX C)

すべての動物において、全身諸器官・組織に異常所見は認められなかった。

考察

CrI:CD(SD)系の雌雄ラットにバランス α 原液 (100%液) 及び 50%液ならびに被験物質の調製媒体である注射用水を 20 mL/kg の投与容量にて単回経口投与し、その毒性を検討した。

その結果、各被験物質及び媒体投与群の全例について死亡は認められず、一般状態、体重及び肉眼的病理学検査においても異常は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下においてバランス α 原液を 20 mL/kg の容量にて単回経口投与しても毒性症状は認められないことから、バランス α の無毒性量は 20 mL/kg と推察された。

TABLE 2
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 GENERAL CONDITION DATA
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	SIGNS AND SYMPTOMS	DAYS																			
				0						1													
				0 ^a h	0 ^b h	0.5h	2h	4h	6h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MALE	1	0	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	2	50	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	100	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
FEMALE	4	0	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	50	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	6	100	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

a : Immediately before treatment.

b : Immediately after treatment.

h : Hours

APPENDIX A
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 INDIVIDUAL GENERAL CONDITION DATA
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP	LEVEL (%)	ANIMAL NO.	DAYS																					
				0						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
				0 ^a h	0 ^b h	0.5h	2h	4h	6h																
MALE	1	0	14121001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
			14121002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
			14121003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2	50	14121006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
			14121007	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121008	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121009	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121010	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	3	100	14121011	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
			14121012	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121013	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121014	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121015	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

a : Immediately before treatment.

b : Immediately after treatment.

h : Hours

APPENDIX A
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 INDIVIDUAL GENERAL CONDITION DATA
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP	LEVEL (%)	ANIMAL NO.	DAYS																						
				0						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
				0 ^a h	0 ^b h	0.5h	2h	4h	6h																	
FEMALE	4	0	14121016	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
			14121017	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
			14121018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121020	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	5	50	14121021	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
			14121022	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121023	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121024	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121025	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	6	100	14121026	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
			14121027	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			14121028	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121029	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			14121030	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

a : Immediately before treatment.

b : Immediately after treatment.

h : Hours

TABLE 3
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 BODY WEIGHT DATA (G, MEAN \pm S.D.)
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	DAYS						
			0	1	3	7	10	14	
MALE	1	0	160.6 \pm 6.2	185.0 \pm 7.1	203.2 \pm 7.8	246.6 \pm 10.4	276.4 \pm 12.9	317.0 \pm 18.1	
	2	50	159.2 \pm 6.0	183.2 \pm 5.8	202.8 \pm 8.7	247.8 \pm 12.4	278.0 \pm 15.1	315.6 \pm 18.8	
	3	100	159.2 \pm 6.4	184.0 \pm 6.2	202.6 \pm 7.6	241.6 \pm 13.8	265.8 \pm 17.4	299.8 \pm 19.6	
FEMALE	4	0	138.0 \pm 2.2	157.4 \pm 4.2	171.2 \pm 4.9	191.6 \pm 6.1	203.2 \pm 7.3	220.6 \pm 10.4	
	5	50	137.0 \pm 3.1	157.2 \pm 1.9	168.4 \pm 2.4	186.4 \pm 4.7	199.4 \pm 5.6	213.8 \pm 8.7	
	6	100	137.0 \pm 3.8	156.8 \pm 1.8	166.8 \pm 3.6	185.6 \pm 7.8	198.4 \pm 9.7	217.4 \pm 12.1	

APPENDIX B
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 INDIVIDUAL BODY WEIGHT DATA (G)
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	ANIMAL NO.	DAYS											
				0	1	3	7	10	14						
MALE	1	0	14121001	167	189	208	250	278	310						
			14121002	158	183	202	245	273	312						
			14121003	153	177	196	242	277	332						
			14121004	158	181	196	234	259	293						
			14121005	167	195	214	262	295	338						
		N	5	5	5	5	5	5	5	5					
		MEAN	160.6	185.0	203.2	246.6	276.4	317.0							
		S.D.	6.2	7.1	7.8	10.4	12.9	18.1							
		2	50	14121006	158	183	202	250	280	322					
				14121007	162	190	212	261	296	340					
14121008				155	178	197	237	270	308						
14121009				168	188	211	258	287	319						
14121010				153	177	192	233	257	289						
		N	5	5	5	5	5	5	5	5					
		MEAN	159.2	183.2	202.8	247.8	278.0	315.6							
		S.D.	6.0	5.8	8.7	12.4	15.1	18.8							
		3	100	14121011	159	182	202	244	268	307					
				14121012	149	175	192	223	246	276					
	14121013			159	186	201	233	250	282						
	14121014			166	192	213	258	284	319						
	14121015			163	185	205	250	281	315						
		N	5	5	5	5	5	5	5	5					
		MEAN	159.2	184.0	202.6	241.6	265.8	299.8							
		S.D.	6.4	6.2	7.6	13.8	17.4	19.6							

APPENDIX B
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 INDIVIDUAL BODY WEIGHT DATA (G)
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	ANIMAL NO.	DAYS											
				0	1	3	7	10	14						
FEMALE	4	0	14121016	135	152	165	186	196	219						
			14121017	141	162	171	187	200	211						
			14121018	139	159	176	196	207	220						
			14121019	138	160	176	200	214	238						
			14121020	137	154	168	189	199	215						
			N	5	5	5	5	5	5						
		MEAN		138.0	157.4	171.2	191.6	203.2	220.6						
		S.D.		2.2	4.2	4.9	6.1	7.3	10.4						
		5	50	14121021	133	156	165	182	199	203					
				14121022	135	155	167	181	195	213					
14121023				138	157	171	192	204	223						
14121024				138	160	169	188	206	222						
14121025				141	158	170	189	193	208						
N				5	5	5	5	5	5						
		MEAN		137.0	157.2	168.4	186.4	199.4	213.8						
		S.D.		3.1	1.9	2.4	4.7	5.6	8.7						
		6	100	14121026	132	155	168	185	204	221					
				14121027	142	158	171	195	210	233					
	14121028			139	159	169	191	200	222						
	14121029			135	155	163	175	185	202						
	14121030			137	157	163	182	193	209						
	N			5	5	5	5	5	5						
		MEAN		137.0	156.8	166.8	185.6	198.4	217.4						
		S.D.		3.8	1.8	3.6	7.8	9.7	12.1						

TABLE 4
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 GROSS PATHOLOGY DATA
 STUDY NO. 14596

ORGAN AND FINDINGS	SEX -----		MALE		FEMALE	
	GROUP NO. -----					
	1	2	3	4	5	6
LEVEL (%) -----	0	50	100	0	50	100
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Not remarkable	5	5	5	5	5	5

APPENDIX C
 ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF BALANCE α IN RATS
 INDIVIDUAL GROSS PATHOLOGY DATA
 STUDY NO. 14596

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	ANIMAL NO.	GROSS PATHOLOGICAL FINDINGS
MALE	1	0	14121001	Not remarkable
			14121002	Not remarkable
			14121003	Not remarkable
			14121004	Not remarkable
			14121005	Not remarkable
	2	50	14121006	Not remarkable
			14121007	Not remarkable
			14121008	Not remarkable
			14121009	Not remarkable
			14121010	Not remarkable
	3	100	14121011	Not remarkable
			14121012	Not remarkable
			14121013	Not remarkable
			14121014	Not remarkable
			14121015	Not remarkable
FEMALE	4	0	14121016	Not remarkable
			14121017	Not remarkable
			14121018	Not remarkable
			14121019	Not remarkable
			14121020	Not remarkable
	5	50	14121021	Not remarkable
			14121022	Not remarkable
			14121023	Not remarkable
			14121024	Not remarkable
			14121025	Not remarkable
	6	100	14121026	Not remarkable
			14121027	Not remarkable
			14121028	Not remarkable
			14121029	Not remarkable
			14121030	Not remarkable