

F₁ 新生児では、250 mg 投与群で次のような所見がみられた。生後1日の新生児の体重に有意な低値がみられた。哺乳期間中に児の死亡率が有意に増加し、生存児の立ち直り反射および眼瞼開裂に有意な遅延が認められた。離乳後も、精巣下降の遅延と11週齢までの体重に増加抑制が認められた。F₁の生殖能については、交尾率および妊娠率ともに影響は認められなかったが、黄体数、着床数および生存胎児(F₂)数は有意に少なかった。

次々世代胎児(F₂)および次産胎児(F_{1b})には、薬物投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

本試験の母動物(F₀)に対するNOAELは0.05 mg/kg 体重/日、次世代(F₁)に対するNOAELは、2.5 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照27)

Chbb: THOM ラット(雌20匹/群)を用いた強制経口(0、1.5、3、30 mg/kg 体重/日)投与による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠6日から15日までの間行い、妊娠21日に帝王切開して2/3例の胎児は骨格検査に、残りの1/3例は内臓検査に供した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般的な臨床症状観察では、投与に関連した異常は認められなかった。体重変化では30 mg 投与群では投与10日後に有意な低値が認められたが、試験終了時には回復傾向が認められた。剖検では、薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

胎児への影響は認められなかった。

本試験の母動物に対するNOAELは3 mg/kg 体重/日と考えられ、胎児に対するNOAELは30 mg/kg 体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照28)

SD系ラット(雌15匹/群)を用いた強制経口(0、10、30、250、500 mg/kg 体重/日)投与による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠7日から17日までの間行い、妊娠21日に帝王切開して胎児の観察を行なった。

母動物の一般的な臨床症状観察では、10 mg 以上投与群で投与10~30分後に鎮静が認められ、3~4時間持続した。なお、鎮静の持続時間および程度は、投与回数を重ねるごとに短縮あるいは軽減した。また、数例において色素涙が認められた。体重変化では10 mg 以上投与群で有意な低値がみられ、250 mg 以上投与群では投与終了後に顕著な低下が認められた。摂餌量についても10 mg 以上投与群で有意な低値が認められ、250 mg 以上投与群ではより顕著であった。摂水量は10 mg 以上投与群で有意な高値が認められた。剖検では、薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

胎児観察では、250 mg 投与群以上で胎児体重の有意な低下、500 mg 投与群で胚/胎児死亡(特に胎児死亡)の増加が認められた。外表観察では無尾が500 mg 投与群の3例で認められた。内臓観察では大動脈右位が250 mg 投与群の2例、500 mg 投与群の1

例で認められたほか、500 mg 投与群では胸腺の頸部残留が観察された。骨格変異では、30 mg 以上投与群で 14 肋骨の出現頻度が有意に上昇し、250 mg 以上投与群では仙椎の腰椎化の出現頻度が有意に上昇し、骨化遅延が認められた。

本試験の母動物に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 10mg/kg 体重/日と考えられた。一方、胎児に対しては、30 mg 投与群以上で 14 肋骨の出現頻度の上昇が認められたことから、NOAEL は 10 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 29)

表 10 器官形成期投与試験 (第 II 節) (ラット)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ラット	器官形成期 投与試験	0, 0.05, 2.5, 250	母動物 : 0.05 胎児 : 2.5 母動物 : 弱い鎮静 児(F ₁) : 体重の低値、趾骨の化骨数の低値、14 肋骨および仙椎の腰椎化の発現頻度の上昇、死亡率の増加 (哺乳期間中)、立ち直り反射および眼瞼開裂の遅延、精巣下降の遅延、体重の増加抑制 (11 週齢まで)
		0, 1.5, 3, 30	母動物 : 3 胎児 : 30 母動物 : 体重の低値 (催奇形性は認められなかった)
		0, 10, 30, 250, 500	母動物 : - 胎児 : 10 母動物 : 鎮静、体重増加の低値 胎児 : 14 肋骨の出現頻度の上昇

(3) 器官形成期投与試験 (第 II 節) (ウサギ) (参照 27,30)

ヒマラヤウサギ (妊娠雌 15 匹/群) を用いた強制経口 (0、0.05、0.5、3 mg/kg 体重/日) 投与による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は妊娠 6 日から 18 日までの間行い、妊娠 29 日に帝王切開して胎児を検査した。

母動物の一般的な臨床症状観察では、0.5 mg 以上投与群で投与開始直後から弱い鎮静が 1~4 時間みられたが、投与回数を重ねるにつれて持続時間は短くなり、およそ 1 週間後にはほとんど見られなくなった。3 mg 投与群の 1 例が妊娠 27 日に 8 匹の胎児を流産した。0.5 mg 以上投与群で投与期間中の体重増加が有意に抑制されたが、投与期間終了後は急速に回復した。また、体重の低下と並行して摂餌量および摂水量は低下した。

胎児では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は、0.05 mg/kg 体重/日と考えられ、胎児に対する

NOAELは3 mg/kg 体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 27)

ヒマラヤウサギ (13 匹/群) を用いた強制経口 (0, 1.5, 3, 9 mg/kg 体重/日) 投与による催奇形性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は妊娠 6 日から 18 日まで行い、妊娠 29 日に帝王切開して胎児を検査した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般的な臨床症状観察では、投与に関連した異常は認められなかった。いずれの投与群においても投与初期に著しい体重低下が認められ、9 mg 投与群では投与 7 日目に 100 g 低下した。剖検では、薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

胎児には投与の影響は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 1.5mg/kg 体重/日と考えられ、胎児に対する NOAEL は 9 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 30)

表 11 器官形成期投与試験 (第II節) (ウサギ)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ウサギ	器官形成期 投与試験	0, 0.05, 0.5, 3	母動物 : 0.05 胎児 : 3 母動物 : 弱い鎮静、体重増加抑制、摂餌量の低下、摂水量の低下 (催奇形性は認められなかった)
		0, 1.5, 3, 9	母動物 : - 胎児 : 9 母動物 : 体重低下 (催奇形性は認められなかった)

(4) 周産期及び授乳期投与試験 (第III節) (ラット) (参照 19,27,31,32)

SD系ラット (雌 23 匹/群) を用いた強制経口 (0, 0.05, 2.5, 25 mg/kg 体重/日) 投与による試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠 17 日から分娩後 21 日までの間行った。母動物 (F₀) は自然分娩させ、児 (F₁) の成長、機能および行動に及ぼす影響を検討した。また、離乳時に各母体から雌雄各 1 匹を選抜・飼育し、交配させ生殖能への影響を検査した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

F₀母動物の一般的な臨床症状観察では、2.5 mg/kg 投与群で弱い鎮静が投与後約 2 時間続き、25 mg 投与群では投与 10 分後から鎮静が 2~3 時間持続したが、分娩後は次第に軽減し、やがて現れなくなった。体重変化は、2.5 mg 以上投与群で用量依存的に低値が認められた。また、2.5 mg 以上投与群で摂餌量に低値がみられ、摂水量は 25 mg 投与群で妊娠末期に高値が認められた。

F₀母動物の妊娠期間については、25 mg 投与群の6例で対照群に比べて1日延長した。剖検所見に薬物投与の影響は認められなかった。

児 (F₁) では、2.5 mg 以上投与群で生後3日までの生存率の有意な低下がみられ、25 mg 投与群では離乳時の児生存率が有意に低かった。25 mg 投与群の生後1日および21日の雌児の体重、0.05 mg 投与群以上の生後21日の雄児の体重が有意に低かった。また、25 mg 投与群ではオープンフィールド試験で立ち上がりの回数が有意に低下した。

F₁の交配試験では、25 mg 投与群で交尾率および妊娠率には影響は認められなかったが、黄体数、着床数および生存胎児 (F₂) 数に有意な低値が認められた。

本試験の母動物 (F₀) に対する NOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日と考えられ、次世代 (F₁) に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日と考えられた。

SD系ラット (雌10匹/群) を用いた強制経口 (0、25 mg/kg 体重/日) 投与による交差乳母哺育試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。本試験では、母動物 (F₀) の分娩、哺育状態および交換した新生児 (F₁) の死亡率、成長への影響を検査した。母動物 (F₀) は自然分娩させ、以下に示す組み合わせに従って、いずれも生後4時間以内に児を交換し観察を行なった。

Cc : 溶媒投与母動物 (C) + 溶媒投与母動物の児 (c)

Ct : 溶媒投与母動物 (C) + 薬物投与母動物の児 (t)

Tc : 薬物投与母動物 (T) + 溶媒投与母動物の児 (c)

Tt : 薬物投与母動物 (T) + 薬物投与母動物の児 (t)

F₀母動物の一般的な臨床症状観察は、上記第III節試験の25 mg 投与群の母動物と同様であった。

F₁児を交換した後3日齢までの児の死亡はTt群で多発し、CtおよびCc群では少なかったことから、児死亡は投薬中の母動物側に要因があることが確認された。3日齢から離乳までの児死亡はTt群で多数認められ、Tc群でも有意に多かった。哺乳期間中の体重変化は、Cc群では良好な増加がみられ、Tt群では児数の減少に伴って生存児の体重は特に哺乳期間の後半に増加し、Cc群に近づいた。離乳時におけるTc群の体重は最も低かった。(参照27)

Chbb: THOM (SPF)ラット (雌24匹/群) を用いた強制経口 (0、1、2、10 mg/kg 体重/日) 投与による試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠15日から分娩後20日までの間行った。また、児 (F₁) の機能 (遊泳試験、聴覚および視覚機能試験)、行動 (水迷路試験による学習能および記憶能) および生殖能について検査した。

母動物の一般的な臨床症状観察では、妊娠および哺乳期間を通して、被験物質による影響は認められなかった。体重変化にも投与群と対照群で有意な差は認められなかった。

児 (F₁) では、10 mg 投与群で死産児数の増加および哺乳期間中の死亡率の増加が認

められたが、行動・機能および生殖能に被験物質投与による影響は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は 10 mg/kg 体重/日、F₁に対する NOAEL は 2 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 31)

Chbb: THOM ラット (雌 24 匹/群) を用いた強制経口 (0, 400 mg/kg 体重/日) 投与による試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。被験物質の投与は、妊娠 15 日から離乳時 (分娩後 20 日) までの間行った。また、児 (F₁) の行動・機能および生殖能について検査した。なお、本試験では、前述の試験 (資料番号: ②-5) で母動物に投与による影響が認められなかったことから、ラットを用いた 13 週間亜急性毒性試験 (資料番号: ①-7) で体重低下作用が確認されている用量 (400 mg) について影響評価が行われた。

母動物の一般的な臨床症状観察では、投与後 30 分から立毛、鎮静および運動失調が認められ、それらの症状は数時間持続した。体重変化では、体重の低値が認められた。

F₁ では、死産児数の増加および体重の有意な低値が認められた。生存例では、母動物の鎮静作用に起因する哺育能欠如による死亡率の増加が認められ (死亡率 90%: 15 腹/17 腹)、特に生後 3 日までに高頻度に認められた。また、生存例では体重増加抑制および歩行遅延が認められたが、感覚機能、生殖能力および児の発生に異常は認められなかった。

本試験の母動物および F₁ に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 400mg/kg 体重/日であった。(参照 19,32)

表 12 周産期及び授乳期投与試験 (第Ⅲ節) (ラット)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ラット	周産期及び授乳期投与試験	0, 0.05, 2.5, 25	母動物: 0.05 児(F ₁): 0.05 未満 母動物: 弱い鎮静、体重の低値、摂餌量の低値、 児(F ₁): 雄; 体重の低値
		0, 1, 2, 10	母動物: 10 児(F ₁): 2 児(F ₁): 死産児数の増加、死亡率の増加
		0, 400	母動物: - 児(F ₁): - 母動物: 立毛、鎮静、運動失調、体重の低値 児(F ₁): 死産児数の増加、体重の低値、歩行遅延

6. 遺伝毒性試験

遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を次表にまとめた。

表 13 *in vitro* 試験

試験	対象	投与量	結果
Ames 試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	10-5,000 µg/plate (±S9) ¹	陰性 (参照 33)
	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538	0.3、10、200 mg/kg/day ² ① 200 µL/plate ³ ② マウス：100 µL/plate ⁴ ラット：200 µL/plate ⁴	陰性 (参照 34)
不定期DNA 合成試験	ヒト胎児肺由来の線維芽細胞 (MRC-5)	20、60、100、140、180、220、 260、300 µg/mL (±S9) ^{3,5}	陰性 (参照 35)
形質転換試 験	マウス胎児線維芽細胞 (C3H/10T1/2 Cl 8 cells)	50、100、150 µg/mL (±S9) ³	陰性 (参照 36)
遺伝子変換 試験	酵母(<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> D4)	62.6、125、250、500、1,000 µg/mL (±S9) ³	陰性 (参照 37)
HGPRT 突 然変異試験	チャイニーズハムスター肺由来 V79 細胞	10、100、250、350 g/mL ³ (±S9)	陰性 (参照 38)
点突然変異 試験 ⁶	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 (ラット・マウ ス), TA1538 (ラット)	0、100、200 mg/kg/day ⁷ 100 µL/plate (±S9) ³	陰性 (参照 39)

1. S9 はラット由来を使用。

2. Chbi: NMRI マウス (雄 3 例) および Chbb: THOM ラット (雄 3 例) にプロチノラムをそれぞれ 6 日間
および 8 日間強制経口 (0.3、10、200 mg/kg 体重/日) 投与し、採取した尿 (マウス: 3 例のプール尿、
ラット: 個体別の尿) を試験に供した。

3. マウスおよびラットから採取した各尿を 200 µL/plate の濃度で培地上にまいて検査を行なった。

4. マウスおよびラット共に 200 mg/kg 投与群から得られた尿を蒸留水で 10 倍希釈し、マウスは 100
µL/plate、ラットは 200 µL/plate の濃度で同様に検査を行なった。

5. 260 µg/mL 以上の濃度で沈殿が認められた。

6. ラットおよびマウスにおける血漿中の高極性代謝物に対する試験。

7. Chbb: THOM ラット (雄 5 例/群) および Chbb: NMRI マウス (雄 5 例/群) にプロチノラムをそれぞ
れ 2 週間強制経口 (0、100、200 mg/kg 体重/日) 投与し、最終投与後に採取した血液から血漿を分離・
凍結乾燥し、メタノール抽出の後、試験に供した。

表 14 *in vivo* 試験

試験	対象	投与量	結果
染色体異常 試験	チャイニーズハムスター骨髄細 胞	62、311 mg/kg 体重/day 5 日間経口投与	陰性 (参照 40)

小核試験	マウス骨髄細胞	80、400、2,000 mg/kg 体重/day 2日間経口投与	陰性 (参照 41)
優性致死試験	CD-1BR マウス	200、640、2,000 mg/kg 体重/day 単回経口投与	陰性 (参照 42)

上記のように、*in vitro*の細菌、酵母、ヒトを含む動物細胞を用いた Ames 試験、不定期 DNA 合成試験、形質転換試験、遺伝子変換試験および突然変異試験、及び *in vivo*のげっ歯類を用いた染色体異常試験、小核試験および優性致死試験のいずれも陰性であり、プロチゾラムは遺伝毒性を有さないものと考えられる。

7. 一般薬理試験 (参照 43,44,45,46)

(1) 呼吸・循環器系への作用 (参照 43)

雌雄のビーグル雑種犬 (各 3 匹/群、プロチゾラム 1、5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下) の呼吸数、血圧、心拍数、心電図を観察したところ、1 mg および 5 mg 投与群共に投与後 120 分まで心拍数の明らかな低下とこれに伴う T 波の増高および RR 間隔の延長がみられ、呼吸数の低下が投与後 120 分以上にわたり認められた。なお、血圧には明らかな影響は認められなかった。

雄ウサギ (プロチゾラム 5、10 mg/kg の静脈内投与、ウレタン麻酔下) の呼吸、血圧、心拍数を観察したところ、10 mg 投与群で呼吸数にわずかな低下が認められた。血圧と心拍には明らかな影響は認められなかった。なお、非麻酔下のウサギでも同様の影響が認められた。

モルモットの摘出心房 (プロチゾラム 1-10 mg/L、5 分間隔で累積作用) の心筋収縮力と心拍数について観察したところ、心筋収縮力には明らかな影響は認められなかったが、心拍数は 10 mg/L の濃度で軽度な低下が認められた。

雌雄の雑種犬 (プロチゾラム 0.05、0.5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下) の椎骨動脈流および内頸動脈流について観察したところ、0.5 mg 投与群で椎骨動脈流の増加と頸動脈流の軽度な増加が認められた。なお、これらの変動は 3 分以内に投与前値まで回復した。また、同様の方法でプロチゾラム 0.5、1 mg/kg の静脈内投与により、血圧、心拍数、心拍出量、冠血流および大腿動脈流について観察したところ、1 mg 投与群で血圧と心拍数の低下に伴い心拍出量および冠血流の軽度な減少が認められた。なお、これらの変動は投与 30 分後に正常値まで回復した。いずれの投与群においても、大腿動脈流に変化は認められなかった。

雌雄の雑種犬 (プロチゾラム 5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下) の頸動脈洞反射、迷走神経刺激、星状神経節の節前および節後神経刺激に対する反射性昇圧について観察したところ、頸動脈洞反射刺激 (30 秒間の閉塞) に対する血圧反応およ

び迷走神経刺激に対する陰性変時作用にプロチゾラム投与による影響は認められなかった。また、プロチゾラムは星状神経節の節前および節後神経刺激における陽性変時作用を増強したが、有意な増強（プロチゾラム投与 15 分後）が認められたのは節前神経刺激に対する影響であった。

雌雄の雑種犬（プロチゾラム 5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下）に、ノルエピネフリンおよびエピネフリンを 1 μ g/kg 投与した際の心血管系への作用に対するプロチゾラム投与の影響について確認したところ、両被験物質の投与による血圧および心拍数への作用はプロチゾラム投与 15 分後および 60 分後で増強され、エピネフリン投与時の血圧に対する影響は有意であった。

(2) 自律神経系および平滑筋への作用 (参照 43,45)

瞬膜反射に対する作用は、ネコ（プロチゾラム 10 μ g-3 mg/kg の舌動脈内投与、ウレタン麻酔下）の上頸神経節の節前神経刺激による瞬膜の収縮について確認したところ、プロチゾラム投与による明らかな影響は認められなかった。(参照 43)

瞳孔径（マウス）に対する作用は、プロチゾラム（3、30、100 mg/kg、経口）、ニトラゼパムおよびエスタゾラム（各 30、100 mg/kg）について比較検討されている。プロチゾラムは 30 mg 投与群まで瞳孔径に明らかな影響を及ぼさず、100 mg 投与群では投与 30 分後から 60 分後に縮瞳が認められた。エスタゾラムは 30 mg 以上投与群で、ニトラゼパムは 100 mg 投与群で縮瞳が認められた。(参照 45)

ラット摘出血管（胸部大動脈、Krebs 液）では、プロチゾラムは 10 mg/L の濃度まで平滑筋収縮に影響を及ぼさないが、塩化カリウム（5-30 mM）による収縮およびノルエピネフリン（3 mg/L）による持続性収縮に対して抑制作用を示した。なお、ノルエピネフリンによる一過性収縮には影響は認められなかった。(参照 43)

ウサギ摘出回腸（自動運動測定）に対する作用がプロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 0.001-1.0 mg/L の濃度まで自発運動に影響はみられなかったが、静止張力については 10 mg/L でわずかな減少が認められた。(参照 45)

モルモット摘出回腸（アセチルコリン誘導収縮）に対する作用がプロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 10 mg/L でアセチルコリン収縮の抑制作用を示した。(参照 45)

ラット摘出子宮（妊娠および非妊娠子宮）に対する作用がプロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。摘出非妊娠子宮では、プロチゾラム 0.1-10 mg/L の濃度まで自発運動の振幅に影響は認められなかった。ニトラゼパムについても 10 mg/L の濃度で自発運動に影響は認められなかった。摘出妊娠子宮では、両被験物質ともに自発運動に明らかな影響は認められなかった。(参照 45)

ラット生体位子宮に対する作用がプロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。プロチゾラムを 10 mg/kg の濃度まで静脈内投与しても、自発運動能に影響は認められなかった。一方、ニトラゼパムでは同様の濃度で自発運動能にわずかな亢進が認められた。(参照 45)

モルモットの摘出気管 (自発収縮) に対する作用がプロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 10 mg/L の濃度で摘出気管のヒスタミンによる収縮反応を低下させた。(参照 45)

モルモット摘出輸精管に対する作用がプロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。プロチゾラムは 0.01-10 mg/L の濃度まで影響はみられなかった。一方、ニトラゼパムは 1.0-10 mg/L の濃度で収縮反応が認められた。(参照 45)

(3) 血液系への作用 (参照 43)

溶血に対する作用は、ウサギの耳介静脈から得られた血液を用いて、プロチゾラム、エスタゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。各被験物質を 125-500 mg/L の濃度で血球とインキュベートした結果、いずれにおいても溶血作用は認められなかった。

凝固に対する作用は、プロチゾラム、エスタゾラムおよびニトラゼパムをウサギに強制経口 (各 25 mg/kg 体重/日) 投与し、投与 15、30 および 60 分後に耳介静脈から得られた血液を用いて確認されている。いずれの被験物質についても、凝固作用に影響は認められなかった。

(4) 中枢神経系への作用 (参照 44,45,46)

脊髄反射に対する作用が、プロチゾラムとエスタゾラムについて比較検討されている。エーテル麻酔下で第一および第二頸椎間の脊髄神経を遮断した雌雄のネコに、プロチゾラムを静脈内 (0.1 mg/kg) あるいは強制経口 (1 mg/kg) 投与し、投与 30、60 および 120 分後に単シナプス反射 (MSR) および多シナプス反射 (PSR) の活動電位について確認したところ、いずれの投与経路および用量においても PSR に影響を及ぼし、弱い抑制作用を有することが確認された。一方、エスタゾラムを強制経口 (1 mg/kg) 投与した場合は、MSR および PSR 共に投与後 30 および 60 分で抑制作用が認められた。プロチゾラムの脊髄反射に対する抑制作用は、エスタゾラムに比べて軽度であった。(参照 44)

エチルアルコールおよびヘキソバルビタールで誘導される睡眠に対する作用は、プロチゾラム、ニトラゼパムあるいはエスタゾラムを前投与した際の影響について比較検討されている。エチルアルコールをマウスに皮下 (6.25 mg/kg) 投与した際に誘導される睡眠時間 (30 分) は、各被験物質を投与 30 分前に経口 (0.125 mg/kg) 投与することにより有意な延長が認められた。ヘキソバルビタールをマウスに腹腔内 (85 mg/kg) 投

与する 30 分前に各被験物質を経口 (5、15、45 mg/kg) 投与すると、用量非依存的ではあるが睡眠時間は 2.7~3.6 倍に延長した。(参照 45)

メタンフェタミンを投与した際の自発運動量および咀嚼行動に対する作用は、プロチゾラム、ニトラゼパムあるいはエスタゾラムを前投与した際の影響について比較検討されている。自発運動量は、メタンフェタミンをマウスに皮下 (5 mg/kg) 投与する 30 分前にプロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラム (各 10、30 mg/kg)、陽性対照としてジアゼパム (10 mg/kg) をそれぞれ経口投与すると、プロチゾラム、ニトラゼパム、ジアゼパムは 10 mg 投与群、エスタゾラムは 30 mg 投与群で自発運動量の亢進が認められた。咀嚼行動は、メタンフェタミンをマウス (6 匹/群) に静脈内 (16 mg/kg) 投与する 30 分前に、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラム (各 30、90 mg/kg)、陽性対照としてハロペリドール (5 mg/kg) をそれぞれ経口投与すると、ハロペリドールは全例に抑制作用を示したが、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムでは明らかな抑制は認められなかった。(参照 45)

無麻酔下の自発脳波に対する作用は、ウサギを用いて実施されている。ウサギ (雌雄、14 匹) にプロチゾラムを静脈内 (0.001、0.003、0.01 mg/kg 体重/日) 投与し、投与前 30 分 (最後の 10 分間 : ベースライン) から投与後 2 時間まで脳波を測定したところ、0.003 mg 投与群以上では明らかにプロチゾラムの鎮静催眠作用が認められた。一方、0.001 mg 投与群では、脳波に鎮静や中枢興奮作用を示す明らかな変動は認められなかった。

本試験における NOEL は 0.001 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 46)

鎮痛作用がプロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。ラット (計 6 匹) に各被験物質を強制経口 (プロチゾラム : 1、10、50、100 mg/kg 体重/日、ニトラゼパムおよびエスタゾラム : 1、10、100 mg/kg 体重/日) 投与 30、60、120、180 および 240 分後に、ラットの尾を動脈鉗子で摘んだ際の疼痛に対する鎮痛作用を確認した。プロチゾラムに鎮痛作用は認められなかったが、ニトラゼパムでは 10 mg 以上投与群で、エスタゾラムは 100 mg 投与群では明らかな鎮痛作用が認められた。プロチゾラムの鎮静作用の程度は、高用量においてもニトラゼパムおよびエスタゾラムの約 1/3 であった。(参照 44)

正常体温に対する作用が、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムについて比較検討されている。ラット (Wistar 系、雄) を用いて、各被験物質を強制経口 (プロチゾラム : 1、10、50、100 mg/kg 体重/日、ニトラゼパムおよびエスタゾラム : 1、10、50 mg/kg 体重/日) 投与 30、60、120、180 および 240 分後に体温を測定した。プロチゾラムでは、10 mg 以上投与群で投与 30 分後から用量依存的な下降が認められたが、投与 240 分以内には正常範囲まで回復あるいは回復傾向が認められた。同様に、ニトラゼパムは 10 mg 以上投与群で、エスタゾラムは 1 mg 以上投与群で用量依存的な下降がみられた。いずれの被験物質も高用量で体温下降作用を示し、類似の作用が認められた。(参照 44)

(5) 消化器系への作用 (参照 45)

腸管運動 (雄イス、3匹、空腸) に対する作用は、プロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 0.01-1 mg/kg の静脈内投与では影響は認められなかった。

腸管輸送能 (マウス) に対する作用は、プロチゾラムおよびニトラゼパムを経口投与した時のバリウム液の移動率について比較検討されている。プロチゾラムは 1-100 mg/kg で、ニトラゼパムは 30 mg/kg で影響は認められなかった。

唾液分泌 (マウス) に対する作用として、カルバコール刺激時の唾液分泌作用への影響についてプロチゾラムおよびニトラゼパムで比較検討されている。プロチゾラムは 3 mg/kg までの皮下投与で影響は認められなかった。一方、両被験物質ともに 10 mg/kg では軽度ながら有意な分泌低下を示した。

胃液分泌 (ラット) に対する作用は、プロチゾラム 1-10 mg/kg までの経口投与では胃液量および酸分泌量ともに影響は認められなかった。

胆汁分泌 (ラット: 各被験物質ともに 12.5、25、50 mg/kg、経口) に対する作用は、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムについて比較検討されている。プロチゾラムおよびニトラゼパムでは 50 mg まで排泄量および胆汁量ともに影響は認められなかった。一方、エスタゾラムでは 12.5 mg で胆汁量の増加、25 mg では排泄量の増加が認められた。

(6) 体性神経系への作用 (参照 44,45)

局所麻酔作用は、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。モルモット (Hartley 系、雄) およびウサギ (日本白色種、雄) の目に各被験物質を 1 および 2% の濃度で 0.5 mL 滴下し、同様にもう片方の目には溶媒 (0.5% メチルセルロース) を滴下した。滴下 10、20、30、60、90 および 120 分後に角膜をウマの尾の毛で刺激して角膜反射を確認したところ、各被験物質ともにいずれの濃度および測定ポイントにおいても角膜反射は認められ、局所麻酔作用は認められなかった。プロチゾラムの局所麻酔作用は、ニトラゼパムおよびエスタゾラムと同様の傾向を示した。(参照 44)

横隔膜神経筋標本 (Wistar 系ラット、雄) の電気刺激に対する作用が、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびツボクラリン (陽性対照) で比較検討されている。電気刺激に対する攣縮反応に対し、プロチゾラムは 0.1 mg/L まで影響はみられなかったが、1-10 mg/L の濃度では軽度な抑制が認められた。ニトラゼパムは 10 mg/L で軽度な抑制が、ツボクラリンでは 0.1 mg/L で明らかな抑制が認められた。(参照 45)

(7) 水および電解質代謝への作用 (参照 44)

尿量、電解質代謝 (Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Na/K)、pH、グルコースおよび総タンパクに対する作用が、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。ラット (Wistar 系、雄、5 匹/群) に各被験物質をそれぞれ強制経口 (プロチゾラム: 1、10、50、100 mg/kg 体重/日、ニトラゼパムおよびエスタゾラム: 1、10、100 mg/kg 体重/日) 投与し、採取した尿について確認したところ、尿量の増加がプロチゾラムでは 50 mg 以上投与群で、ニトラゼパムおよびエスタゾラムでは 100 mg 投与群で認められた。尿中電解質、pH、グルコースおよび総タンパクについては、いずれの被験物質においても明らかな影響は認められなかった。プロチゾラムは高用量で尿排泄量を増加させたが、尿中電解質、pH、グルコースおよび総タンパクに影響を及ぼさず、ニトラゼパムおよびエスタゾラムと類似の作用がみられた。

(8) 抗炎症作用 (参照 44)

抗炎症作用は、ラット (Wister 系、雄) を用いた浮腫 (カラゲニン誘発の足蹠浮腫) に対する影響について、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。1%のカラゲニン 0.1 mL をラットの足蹠に投与後、直ちに各被験物質を強制経口 (1、10、100 mg/kg 体重/日) 投与し、足蹠の体積を 1 時間毎に測定した。カラゲニン足蹠浮腫に対する抑制作用はプロチゾラムには認められず、ニトラゼパムおよびエスタゾラムにも明らかな抑制作用は認められなかった。プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムとの間に作用差異は認められなかった。

(9) 1 週間あるいは 1 ヶ月間投与試験による血液生化学的パラメーターおよび体重への影響 (ラット) (参照 45)

ラットを用いたプロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムの 1 週間あるいは 1 ヶ月間強制経口 (10 mg/kg) 投与による血清中のグルコース、乳酸、TG、Tcho、非エステル化脂肪酸、インスリンおよび体重への影響について検討されている。

① 1 週間投与試験

体重変化は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。

グルコース、TG および Tcho は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。一方、非エステル化脂肪酸はプロチゾラムおよびエスタゾラムで低値がみられ、乳酸はプロチゾラムで高値、エスタゾラムで軽度な高値、ニトラゼパムは軽度な低値を示し、インスリンはプロチゾラムおよびニトラゼパムで軽度な低値、エスタゾラムでは低値が認められた。

② 1 ヶ月間投与試験

体重変化は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。

グルコース、TG およびインスリン値は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。一方、非エステル化脂肪酸はプロチゾラムで高値、Tcho はプロチゾラムおよびニトラゼパムで高値、乳酸はプロチゾラムで低値が認められた。

8. その他

ラットを用いた2年間発がん性試験において、200 mg 投与群の雌雄で甲状腺に結節性および腺腫性病変が認められていることから、以下に示す甲状腺機能に関する特殊毒性試験が実施されている。

(1) 甲状腺機能に関する特殊毒性試験 (ラット) (参照 47,48,49)

Chbb: THOM (Wistar) ラット (雌雄各 24 匹/対照群、雌雄各 12 匹/投与群) を用いた強制経口 (0、100、400 mg/kg 体重/日) 投与による 78 週間の特殊毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、甲状腺ホルモン (T_3 および T_4) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定は、投与 28 週に全例について、投与 32 週には対照群の雄 8 例、400 mg 投与群の雄 4 例について実施した。

T_3 値は、投与 28 週に 100 mg 投与群以上の雄および 400 mg 投与群の雌で有意な高値が認められ、その程度には用量相関性が認められた (100 mg: $p \leq 0.05$ 、400 mg: $p \leq 0.01$)。また、400 mg 投与群では投与 32 週においても有意 ($p \leq 0.01$) な高値が認められ、いずれの例も投与 28 週の測定値より高値を示した。一方、 T_4 値は投与 28 週に 400 mg 投与群の雄で有意 ($p \leq 0.01$) な低値が認められたが、32 週には回復が認められた。TSH 値については、100 mg 投与群以上で軽度ながら高値傾向がみられ、400 mg 投与群の雌では有意 ($p \leq 0.01$) であった。(参照 47)

Chbb: THOM (Wistar) ラット (雌 12 匹、雄 36 匹/対照群、雌 12 匹、雄 12-24 匹/投与群) を用いた強制経口 (0、100、400 mg/kg 体重/日) 投与による 65 週間の特殊毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、 T_3 および T_4 および TSH の測定は、投与 28 週に全投与群の雌雄各 12 例について、投与 32、53 および 65 週には対照群の雄 8 例、400 mg 投与群の雄 4 例について実施した。

T_3 値は、投与 28 週に 100 mg 投与群以上の雄および 400 mg 投与群の雌で有意な高値が認められ、その程度には用量相関性が認められた (100 mg: $p \leq 0.05$ 、400 mg: $p \leq 0.01$)。また、400 mg 投与群では投与 32 週においても有意 ($p \leq 0.01$) な高値が認められ、平均値は投与 28 週より高値を示した。投与 53 および 65 週では、いずれも各 1 例に高値が認められた。一方、 T_4 値には低値傾向が認められ、400 mg 投与群の雄では投与 28 および 53 週に有意 (各々 $p \leq 0.01$ 、 $p \leq 0.05$) であった。

TSH 値は、投与 28 週に 100 mg 投与群以上で高値がみられ、400 mg 投与群の雌では有意 ($p \leq 0.01$) であった。なお、投与群では対照群に比べて雄で 2.5 倍、雌では 5.7 倍の高値が認められた。投与 32 およ 53 週では 400 mg 投与群の 2 例で高値が認められたが、投与 65 週にはいずれの例においても対照群と同程度の値であった。(参照 48)

Chbb: THOM (Wistar) ラット (雄各 60/群) を用いた強制経口 (試験番号 G44: 0、200 mg/kg 体重/日、試験番号 G61: 0、0.5、2.5 mg/kg 体重/日) 投与による 13 週間の特殊毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。なお、本試験では高用量試験 (G44) および低用量試験 (G61) の 2 種類の試験が実施されている。G44 で