

ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No.T-21)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd (英国)

報告書作成年：1997年

[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ、1群当り交尾成立雌 20 匹、
交配時週齢；雌 15～25 週齢、交配時体重；雌 2.9～4.2 kg

投与期間：妊娠 6 日から妊娠 28 日までの 23 日間

投与方法：検体を 1%メチルセルロース液に懸濁し、25、75 および 125 mg/kg/日の投与用量で、妊娠 6 日から 28 日までの 23 日間毎日 1 回、5 mL/kg の容量で強制経口投与した（交配日を妊娠 0 日とした）。対照群の動物には 1%メチルセルロース液を同様に投与した。懸濁液の調製は週 1 回行った。

観察・検査項目：

母動物；試験期間中、全例について臨床症状を毎日観察した。各動物の体重を、受領時（妊娠 0 日）ならびに妊娠 2、6、8、10、12、14、17、20、23、26 および 29 日に測定した。体重増加量は、各体重値から投与開始日である妊娠 6 日の体重値を減じて算出した。摂餌量は、妊娠期間中定期的に測定した。妊娠 29 日に母動物を屠殺後に剖検した。卵巣および子宮について、黄体数、生存胎児数と分布、胚胎児死亡数と分布、個体別胎児体重（これに基づいて同腹児重量算出）、胎児の肉眼的異常、胎盤の異常および妊娠子宮重量を検査した。胚胎児死亡は早期（胎盤のみが認められる）、後期（胎盤および胎児遺残の両者が認められる）および流産（着床部位の痕跡のみが認められる）に分類した。

胎児；生存胎児は外表検査を行った後、ベントバルピタルナトリウムの胸腔内投与で安楽死させた。胎児重量を測定して剖検し、内臓異常の有無および性別を調べた。胎児は剥皮して内臓を除去し、アルコール固定した。各胎児の頭部を開き、脳の肉眼的異常を検査した。次いで、胎児を Dawson 法により骨格標本を作製して骨格検査を行った。形態的变化については以下のように分類した。

奇形：稀なもの、または致死性となり得る変化。例えば無肢症、外脳症。

異常：比較的高頻度に認められる正常とのわずかな相違。内臓検査でみられる（例えば胆嚢の変異）、もしくは骨格検査において認められる（例えば椎骨半椎体）。

変異：対照群にも通常よくみられる形態的变化。恒久的な形態と思われるもの（例えば過剰肋骨）、あるいは発生の過渡的な段階と思われるもの（例えば胸骨分節の未骨化）。

試験結果：概要を以下の表に示す。

母動物；

投与群 (mg/kg/日)	対照(0)	25	75	125	
交配雌数	20	20	20	20	
不妊雌数	0	0	0	1	
流産雌数	1	1	0	0	
試験途中で屠殺した雌数	0	2 (この内の1例は挿管ミスがあった)	0	3 (この内の1例は挿管ミスがあった)	
生存胎児が得られた雌数	19	17	20	16	
一般状態	—	影響なし	長期間の食欲不振 (5例)	長期間の食欲不振 (5例)とそれに関連した切迫屠殺 (2例)	
体重増加量	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	
体重増加 (g)	妊娠 6-8 日	-16	+5	-15	-73
	妊娠 6-10 日	+7	-9	+4	-8
	妊娠 6-12 日	+65	+90	+83	+58
	妊娠 6-29 日	+402	+380	+393	+415
摂餌量	—	有意差なし	↓妊娠 6-7 日	↓妊娠 6-7 日	
着床所見	生存胎児が得られた雌数	19	17	20	16
	黄体数 ^a	11.5	10.6	10.7	10.6
	着床数 ^a	9.7	8.6	9.6	9.8
	子宮内死亡数 ^a				
	-早期	0.3	0.5	0.7	0.8
	-後期	0.4	0.2	0.4	0.4
	-合計	0.7	0.8	1.1	1.3
	生存胎児数 ^a	9.1	7.8	8.5	8.6
	胎児の性比(雄の比率) ^a	48.5	44.4	49.1	53.3
	同腹児重量(g) ^a	376.6	332.1	363.8	367.5
胎児体重(g) ^a	42.5	44.4	44.2	43.9	
妊娠子宮重量(g) ^a	552.3	481.1	530.7	542.1	

^a 平均値

Williams 検定/Shirley 検定 (体重増加量、摂餌量、黄体数、着床数、子宮内胚胎児死亡数、生存胎児数、胎児の性比、同腹児重量、胎児体重、妊娠子宮重量) ↑↓ : P≤0.05, ↑↓ : P≤0.01

- : 該当なし

胎児；

胎児奇形・異常のまとめ—同腹児の分布*

	n	投与群 (mg/kg/日)			
		対照(0)	25	75	125
検査腹数		19	17	20	16
奇形：	0	15	10	17	12
	1	3	6	2	4
	2	1	1	1	0
内臓異常：	0	14	10	16	11
	1	5	6	4	5
	2	0	1	0	0
骨格異常：	0	7	7	3	6
	1	7	3	8	5
	2	3	5	5	3
	3	2	1	3	1
	4	0	0	0	1
	5	0	1	0	0
	6	0	0	1	0
奇形(%)*		2.5	5.5	3.3	2.7
内臓異常(%)*		2.9	6.8	3.1	3.5
骨格異常(%)*		13.0	16.2	21.5	12.4

* : n匹の奇形・異常胎児がみられた腹数

n : 同腹児ごとの奇形・異常胎児数

* : 同腹児ごとの奇形・異常胎児の発生頻度の平均値

線形-線形連関検定、または Kruskal-Wallis 検定後の一対並び替え検定：統計学的有意差なし (p>0.05)

胎児（続き）；

内臓および骨格奇形

投与群 (mg/kg/日)	対照(0)	25	75	125
検査胎児数	172(19)	133(17)	170(20)	137(16)
奇形のある胎児数	5(4)	8(7)	4(3)	4(4)
頭部：				
水頭症	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)
猿頭症	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
扁平頭蓋と後頭部突出	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
鼻唇溝欠損を伴う単鼻孔	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
切歯欠損	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
切歯骨欠損	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
上切歯と切歯骨の癒合	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
前頭骨の部分的癒合	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
頭頂骨の部分的癒合	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
口蓋裂	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)
頸部：				
複数の不整椎骨	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
軽度の脊柱側弯症	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
胸部：				
頸胸部動脈の奇形	0(0)	0(0)	2(1)	1(1)
大動脈/肺動脈の奇形	1(1)	2(2)	3(2)	2(2)
心室中隔欠損	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
心室狭小	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
後主静脈遺残を伴う 不完全後大静脈	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
複数の不整椎骨	1(1)	2(2)	0(0)	0(0)
複数の不整肋骨	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
半椎	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
脊柱側弯症/軽度の脊柱側弯症	2(2)	1(1)	0(0)	0(0)
肋骨欠損	1(1)	2(2)	0(0)	0(0)
肋骨の部分的癒合	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
腰部/腹部：				
臍ヘルニア	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
二分脊椎	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
脊柱側弯症	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
複数の不整椎骨	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
その他(病理組織学的検査結果を含む)：				
腎臓；卵巣と癒着した腎臓被膜部にみられた囊胞状尿管	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)

1 胎児が2つ以上の奇形を有することがある

Fisherの直接確率計算法（申請者実施）：統計学的有意差なし（ $p>0.05$ ）

（ ）内は、腹数

胎児（続き）；

内臓異常

投与群 (mg/kg/日)	対照(0)	25	75	125
検査胎児数#	167(19)	125(17)	166(20)	133(16)
異常のある胎児数	5(5)	8(7)	4(4)	5(5)
頭部：				
眼球角膜混濁	1(1)	1(1)	0(0)	1(1)
小さい眼球	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
胸部：				
頸胸部動脈の異常	2(2)	3(3)	1(1)	1(1)
大動脈/肺動脈の異常	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)
肺の中葉欠損	1(1)	2(2)	1(1)	1(1)
腰部/腹部：				
胆嚢の二分/分岐	0(0)	1(1)	2(2)	1(1)

奇形を持つ胎児は除いてある

1 胎児が2つ以上の異常を有することがある

Fisherの直接確率計算法（申請者実施）：統計学的有意差なし（ $p>0.05$ ）

（ ）内は、腹数

骨格異常

投与群 (mg/kg/日)	対照(0)	25	75	125
検査胎児数#	167(19)	125(17)	166(20)	133(16)
異常のある胎児数	19(12)	21(10)	↑33(17)	18(10)
頭部：				
縫合骨形成	1(1)	4(3)	↑7(5)	2(1)
頬骨・上顎骨間橋状骨化	3(2)	4(4)	6(4)	7(5)
頭蓋骨不整骨化	3(3)	2(2)	6(6)	1(1)
頭頂骨間橋状骨化	0(0)	0(0)	2(1)	0(0)
頸部：				
椎骨不整骨化	2(2)	4(4)	6(5)	4(3)
頸肋	4(3)	4(2)	4(4)	1(1)
胸部：				
肋骨：肥厚	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
胸骨：胸骨分節の過剰骨化点	1(1)	0(0)	2(2)	0(0)
骨化点の癒合/橋状骨化	3(2)	2(2)	2(2)	1(1)
軽度の胸骨腹側湾曲	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
四肢：				
指骨の不完全骨化	3(3)	3(2)	4(2)	2(2)

奇形を持つ胎児は除いてある

1 胎児が2つ以上の異常を有することがある

Fisherの直接確率計算法（申請者実施） ↑↓： $P\leq 0.05$ 、↑↓： $P\leq 0.01$

（ ）内は、腹数

胎児（続き）；

骨格変異

投与群 (mg/kg/日)	対照(0)	25	75	125
検査胎児数#	167	125	166	133
12 肋骨	50.1	47.1	41.8	44.2
13 肋骨	49.9	52.9	58.2	55.9
変異のある胸骨分節	21.4	12.1	22.9	18.0

表中の数値は腹ごとの骨格変異のある胎児の発生頻度 (%) の平均値

奇形を持つ胎児は除いてある

線形-線形連関検定、または Kruskal-Wallis 検定後の一対並び替え検定：統計学的有意差なし (p>0.05)

75 および 125 mg/kg/日投与群において、投与開始後に摂餌量低下が認められ、検体投与の影響と考えられた。125 mg/kg/日投与群では投与初期に対照群と比較して顕著な体重減少がみられ、その結果、健康状態の悪化した母動物 2 匹が切迫屠殺された。一般状態の観察では検体投与に関連したトレイ紙の橙染がみられ、剖検所見でも泌尿生殖器部および足部の橙色着色が観察されたが、これは検体またはその代謝産物の排泄を示すものであると考えられ、毒性変化ではないと判断された。

黄体数、着床数、生存胎児数、胎児の性比、同腹児重量、胎児体重および妊娠子宮重量に投与の影響はみられなかった。75 および 125 mg/kg/日投与群では生存胎児が得られた母動物の早期子宮内胚死亡数が対照群と比べてやや高かったが、これはそれぞれの群で 1 腹ずつに異常値（各腹の早期子宮内胚死亡発生頻度は 5/10 と 6/9）がみられたことによるもので、偶発的なものと考えられた。

母動物に毒性が認められた 125 mg/kg/日投与群を含めたすべての検体投与群において、胎児の生存、発育および形態発生に対する影響はみられなかった。

（申請者注：75 mg/kg/日投与群の胎児において頭部の縫合骨形成並びに異常のある胎児数が有意に増加したが、投与用量との関連性はないことから、検体投与に起因する変化ではないと判断された。）

75 および 125 mg/kg/日投与群の母動物において、投与開始後に摂餌量が低下し、125 mg/kg/日投与群の母動物では顕著な体重減少もみられ、それに起因して 125 mg/kg/日投与群の母動物 2 匹が切迫屠殺されたが、胚・胎児についてはいずれの投与群においても検体投与の影響は観察されなかった。

以上の結果から、本試験における無毒性量 (NOAEL) は、母動物に関して 25 mg/kg/日、胚・胎児発生に関して 125 mg/kg/日であった。最高用量の 125 mg/kg/日でも催奇形性は認められなかった。

13) 変異原性

細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-22)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2001年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100 株) と、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 (CM891) 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、1 回目の試験は 5~5000 µg/プレート の範囲の 7 濃度でプレート法により実施し、2 回目の試験は 50~5000 µg/プレート の範囲の 5 濃度でプレインキュベーション法により実施した。試験は 3 反復で行った。

試験結果：結果を表 1 および 2 に示す。

2 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5000 µg/プレート) においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)、2-アミノアントラセンおよびベンツ[a]ピレンはすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、本剤は代謝活性化系の有無に関わらず本試験条件下で、復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

表 1.1 回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)		-	138	12	132	38	11	
検体	5000*	-	122	16	110	28	10	
	1500	-	133	16	106	29	10	
	500	-	130	15	123	34	11	
	150	-	129	18	131	34	13	
	50	-	126	13	119	30	10	
	15	-	120	14	115	31	10	
	5	-	113	11	105	36	9	
溶媒対照(DMSO)		+	164	19	160	44	21	
検体	5000*	+	125	14	135	33	11	
	1500	+	149	14	127	40	19	
	500	+	149	16	139	32	18	
	150	+	149	20	152	45	21	
	50	+	166	16	145	41	20	
	15	+	148	18	148	41	20	
	5	+	168	18	161	50	16	
陽性 対照	ベンツ[a]ピレン	5	+	881	-	-	796	226
	2-ニトロフルオレン	1	-	-	-	-	463	-
	アジ化ナトリウム	0.5	-	733	362	-	-	-
	2-アミノアントラセン	2	+	-	174	-	-	-
	2-アミノアントラセン	10	+	-	-	549	-	-
	9-アミノアクリジン	30	-	-	-	-	-	504
	AF-2	0.05	-	-	-	608	-	-

表中数値は3反復の平均値

試験はプレート法で実施した(インキュベーション約72時間、37℃)

*: 検体の析出がみられた。

DMSO: ジメチルスルホキシド

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

表 2.2 回目試験

薬物	濃度 (µg/ プレート)	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)		-	134	20	120	39	14	
検体	5000*	-	120	10	112	25	11	
	1500	-	125	15	123	36	10	
	500	-	142	18	125	34	11	
	150	-	133	20	139	39	11	
	50	-	112	17	120	32	11	
溶媒対照(DMSO)		+	152	22	154	48	24	
検体	5000*	+	129	13	129	34	18	
	1500	+	150	14	142	41	16	
	500	+	144	15	129	41	18	
	150	+	143	19	133	42	22	
	50	+	155	18	133	41	18	
陽性 対照	ベンツ[a]ピレン	5	+	698	-	-	637	285
	2-ニトロフルオレン	1	-	-	-	-	400	-
	アジ化ナトリウム	0.5	-	564	341	-	-	-
	2-アミノアントラセン	2	+	-	250	-	-	-
	2-アミノアントラセン	10	+	-	-	924	-	-
	9-アミノアクリジン	30	-	-	-	-	-	1086
	AF-2	0.05	-	-	-	795	-	-

表中数値は3反復の平均値

試験はプレインキュベーション法で実施した(プレインキュベーション 30分+インキュベーション約 72時間、37℃)

*: 検体の析出がみられた。

DMSO: ジメチルスルホキシド

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

哺乳類培養細胞を用いる突然変異試験（マウスリンホーマ TK 試験）

（資料 No.T-23）

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd.（英国）

報告書作成年：2001 年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：マウスリンホーマ L5178Y TK⁺ (3.7.2C 株) 細胞を用い、チミジンキナーゼ遺伝子座における検体の突然変異誘発性を評価した。試験はマイクロウェル法により、トリフルオロチミジン (TFT) の存在下で、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下、2 反復で 2 回実施した。試験濃度は以下の通りである。

試験 1：

S9 mix の存在下および非存在下：8 濃度 2.3～300 µg/mL の範囲

試験 2：

S9 mix 非存在下：8 濃度 0.25～10 µg/mL の範囲

S9 mix 存在下：8 濃度 10～300 µg/mL の範囲

溶媒対照はジメチルスルホキシド (DMSO) および陽性対照は S9 mix 非存在下ではメタンサルホン酸メチル (MMS)、存在下では 3-メチルコラントレン (MC) を用いた。

試験結果：結果を表 1～3 に示す。

S9 mix 非存在下の結果；

試験 1 では、2.3～300 µg/mL の用量で 3 時間処理した結果、Day₀ 相対生存率は 8～85% であり、Day₂ コロニー形成率は、溶媒対照群に対して 2～128%であった。

突然変異頻度には全試験濃度で有意な増加は認められなかった。

試験 2 では、0.25～10 µg/mL の用量で 24 時間処理した結果、Day₀ 相対生存率は 2～130%であり、Day₂ コロニー形成率は 12～121%であった。突然変異頻度には全試験濃度で有意な増加は認められなかった。

陽性対照物質である MMS では、試験 1 および試験 2 の両方で突然変異頻度に有意な増加が誘発された。

S9 mix 存在下の結果；

試験1では2.3~300 µg/mLの用量で3時間処理した結果、Day₀相対生存率は21~103%であり、Day₂コロニー形成率は溶媒対照群に対して2~109%であった。

突然変異頻度には全試験濃度で有意な増加は認められなかった。

試験2では、10~300 µg/mLの用量で3時間処理した結果、Day₀生存率は18~85%であり、Day₂コロニー形成率は溶媒対照群に対して0~107%であった。突然変異頻度には全試験濃度で有意な増加は認められなかった。

陽性対照物質であるMCでは、試験1および試験2の両方で突然変異頻度に有意な増加が誘発された。

以上の結果から、本剤は代謝活性化系の有無に関わらず本試験条件下で、突然変異原性を有さないと判断される。

表1. 細胞毒性検定の予備試験

薬物	濃度 (µg/mL)	Day ₀ 生存率					
		3 時間処理				24 時間処理	
		-S9mix		+S9mix		-S9mix	
		コロニー 形成率	相対 生存率	コロニー 形成率	相対 生存率	コロニー 形成率	相対 生存率
溶媒対照 (DMSO)	0	0.91	100	0.89	100	0.67	100
検体	2.3	0.98	91	1.05	113	0.55	87
	4.7	0.98	86	0.98	100	0.07	4
	9.4	1.05	92	0.92	85	0.04	2
	18.8	0.71	66	0.84	77	0.05	4
	37.5	0.69	62	1.16	111	0.08	5
	75	1.01	88	0.77	62	0.12	9
	150	0.56	17	0.87	31	0.03	1
300	0.49	14	0.71	23	0.07	1	

表中数値：陰性対照群；2反復の平均値、検体処理群；1反復の結果
DMSO：ジメチルスルホキシド

表 2. 本試験-試験 1

薬物		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	処理 時間	Day ₀ 相対 生存率	Day ₂ コロニー 形成率	突然変異 頻度
溶媒対照(DMSO)		0	-	3	100	100	0.000249
検体		2.3	-	3	85	100	0.000237
		4.7	-	3	64	84	0.000276
		9.4	-	3	62	128	0.000236
		18.8	-	3	61	88	0.000268
		37.5	-	3	59	100	0.000198
		75	-	3	55	83	0.000242
		150	-	3	23	2	nc
		300	-	3	8	nc	nc
溶媒対照(DMSO)		0	+	3	100	100	0.000248
検体		2.3	+	3	100	109	0.000198
		4.7	+	3	103	109	0.000218
		9.4	+	3	82	98	0.000252
		18.8	+	3	66	107	0.000283
		37.5	+	3	58	98	0.000325
		75	+	3	46	101	0.000304
		150	+	3	26	3	nc
		300	+	3	21	2	nc
陽性 対照	MMS	10	-	3	81	73	0.001463 **
	MC	2.5	+	3	72	92	0.000915 **

表中数値：溶媒対照群の相対生存率；2反復の結果

溶媒対照群のコロニー形成率および突然変異頻度；4反復の平均値

検体処理群の相対生存率、コロニー形成率および突然変異頻度；2反復の平均値

Robinson らの検定法 (1989 年)、** $p < 0.01$

nc：細胞毒性が強かったために計測しなかった

DMSO：ジメチルスルホキシド

MMS：メタンスルホン酸メチル

MC：3-メチルコラントレン

表 3. 本試験－試験 2

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	処理 時間	Day ₀ 相対 生存率	Day ₂ コロニー 形成率	突然変異 頻度	
溶媒対照(DMSO)	0	-	24	100	100	0.000219	
検体	0.25	-	24	130	109	0.000201	
	0.5	-	24	96	103	0.000223	
	1	-	24	111	109	0.000236	
	2	-	24	125	96	0.000219	
	3	-	24	50	121	0.000196	
	4	-	24	5	29	0.000292	
	5	-	24	2	27	0.000335	
	10	-	24	2	12	0.000638	
溶媒対照(DMSO)	0	+	3	100	100	0.000193	
検体	10	+	3	85	106	0.000163	
	25	+	3	63	82	0.000172	
	50	+	3	51	107	0.000178	
	75	+	3	43	93	0.000226	
	100	+	3	25	1	nc	
	125	+	3	24	0	nc	
	150	+	3	22	nc	nc	
	300	+	3	18	nc	nc	
陽性 対照	MMS	5	-	24	81	78	0.001974 **
	MC	2.5	+	3	61	89	0.000930 **

表中数値：溶媒対照群の相対生存率；2 反復の結果
 溶媒対照群のコロニー形成率および突然変異頻度；4 反復の平均値
 検体処理群の相対生存率、コロニー形成率および突然変異頻度；2 反復の平均値
 Robinson らの検定法 (1989 年)、** p<math><0.01</math>
 nc：細胞毒性が強かったために計測しなかった
 DMSO：ジメチルスルホキシド
 MMS：メタンスルホン酸メチル
 MC：3-メチルコラントレン

ヒト末梢リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-24)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2001 年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒト末梢リンパ球細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下において染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個 (2 反復) の分裂中期像について行い、試験は 2 回行った。

観察用量：

試験 1：S9 mix の存在下および非存在下 (処理 3 時間、回復 16 時間)、125、250 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

試験 2：S9 mix 非存在下 (処理 19 時間)、20、80 および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S9 mix 存在下 (処理 3 時間、回復 16 時間)、20、60 および 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$

溶媒対照はジメチルスルホキシド (DMSO) および陽性対照は S9 mix 非存在下ではマイトマイシン C (MMC)、存在下ではシクロホスファミド (CP) を用いた。

試験結果：結果を表 1 および 2 に示した。

1 回目の試験 (処理 3 時間) において、S9 mix の有無に関わらず、何れの処理群でも、通常細胞毒性の指標である分裂指数の減少は認められなかったが、濃度依存的な死細胞の増加ならびに観察不可能な分裂中期像の増加が認められた。一方、分裂指数の明らかな増加が 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の処理群で認められた。

染色体異常を有する分裂中期細胞の出現頻度については、S9 mix 非存在下では 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理群で、S9 mix 存在下では 125 および 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理群で統計学的に有意な増加が認められた。しかしながら S9 mix 非存在下で認められた増加には用量依存性がないこと、また S9 mix 存在下で認められた増加についても、用量依存性がないこと、2 反復間で増加に再現性がないこと、統計学的有意差は溶媒対照群の値が 0 であったことによるものと考えられることから、いずれの増加も生物学的意義はないと判断した。

2 回目の試験の S9 mix 非存在下（処理 19 時間）では、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理群を除く全ての処理群で分裂指数の明らかな増加が認められた。また、S9 mix 存在下では、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の処理群で分裂指数の明らかな増加が認められた。

染色体異常を有する分裂中期細胞の出現頻度については、S9 mix 非存在下（処理 19 時間）では観察可能な最高濃度の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理群で統計学的に有意な増加が認められた。一方、S9 mix 存在下（処理 3 時間）では何れの処理群でも統計学的に有意な増加は認められず、1 回目試験の増加の再現性は認められなかった。

両試験において溶媒対照群と染色体異常解析を行った最高濃度群に対して倍数体出現頻度を求めたところ、S9 mix の有無に関わらず有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照は両試験とも、染色体異常を示す中期分裂細胞数の明らかな増加を示した。

以上の結果から、本剤は S9 mix 非存在下（処理 19 時間）においてのみ軽度の染色体異常誘発性を示した。しかしながらこの染色体異常試験において、検体投与により低濃度から分裂中期細胞の増加が認められたため分裂指数の減少を指標として細胞毒性を評価することができず、軽度の染色体異常誘発性を示した 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群における細胞毒性を詳細に評価することはできなかった。この S9 mix 非存在下における染色体異常を有する分裂中期細胞の軽度の増加は、検体による強い細胞毒性に関連した二次的な影響による可能性がある*と考えられた。

* 申請者注：サイトカラシン B を用いる細胞毒性試験（資料 No.T-25）の結果、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で検体は強い細胞毒性を示すと結論された。認められた軽度の染色体異常誘発性は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という濃度であり、この濃度において検体は著しく強い細胞毒性を生じさせていたものと考えられた。以上のことから、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められた変化は過度の細胞毒性による二次的な影響により染色体異常が誘発されたものと考えられ、検体投与の直接的な影響ではないと結論した。

表 1.1 回目試験の結果—分裂指数データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (hr)	回復時間 (hr)	観察 細胞数*	S-9 Mix の 有無	相対 分裂指数 (%)	倍数体の 出現頻度 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	3	16	2000	-	100	0.3
検体	15.6	3	16	2000	-	90	
	31.3	3	16	2000	-	86	
	62.5	3	16	2000	-	77	
	125	3	16	2000	-	76	
	250	3	16	2000	-	147 a	
	500	3	16	2000	-	173 b	
	1000	3	16	864	-	321 b	1.1
	2000	3	16	c	-		
溶媒対照 (DMSO)	-	3	16	2000	+	100	0.3
検体	15.6	3	16	2000	+	100	
	31.3	3	16	2000	+	104	
	62.5	3	16	2000	+	100	
	125	3	16	2000	+	122	
	250	3	16	2000	+	215 a	
	500	3	16	2000	+	249 a	
	1000	3	16	2000	+	409 b	1.2
	2000	3	16	c	+		

表中数値は2反復の平均値

Fisher の直接確率計算法 ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

a : 弱い細胞毒性あり (わずかに死細胞あり)、b : 中程度の細胞毒性あり (少数の死細胞あり)、c : 強度の細胞毒性あり (多数の死細胞あり)

* : 観察細胞総数

1 培養あたり 1000 個の分裂中期像を観察

DMSO : ジメチルスルホキシド

表 1.1 回目試験の結果(続き) - 分裂中期像解析データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間 (hr)	回復 時間 (hr)	観 察 細 胞 数	S-9 Mix の 有 無	染色体異常を有する細胞数						異常細胞数				
						染色分体型			染色体型			そ の 他	ギ ャ ブ を 除 く	平均 %	ギ ャ ブ を 含 む	平均 %
						ギ ャ ブ	切 断	交 換	ギ ャ ブ	切 断	交 換					
溶媒対照 (DMSO)	-	3	16	100	-	2						0	0.5	2	2.0	
				100	-	1	1				1	2				
検体	125	3	16	100	-		2			1		3	2.5	3	2.5	
				100	-		3				2	2				
	250	3	16	100	-	1	4			1		5	4.5**	6	5.5	
				100	-	2	4			1	4	5				
	1000	3	16	75	-		1			1		1	1.3	1	1.3	
				75	-		1				1	1				
陽性対照 (MMC)	0.2	3	16	100	-	1	14	1		4		14	13.0	15	13.5	
				100	-		6			6	1	12	***	12	***	
溶媒対照 (DMSO)	-	3	16	100	+	1						0	0.0	1	2.0	
				100	+	3					0	3				
検体	125	3	16	100	+		3					2	3.0**	2	4.5	
				100	+	1	3		2	2	4	7				
	250	3	16	100	+	1	6			3		5	3.5**	6	4.0	
				100	+		2				2	2				
	1000	3	16	100	+		2			1		3	2.0	3	2.5	
				100	+	2	1				1	2				
陽性対照 (CP)	6	3	16	100	+		7			4		10	10.0	10	11.0	
				100	+	2	7			3	1	10	***	12	***	

その他：細粉化した細胞や染色体等 8 個以上の異常を含む細胞

Fisher の直接確率計算法 ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMC: マイトマイシン C

CP: シクロホスファミド

表 2.2 回目試験の結果—分裂指数データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (hr)	回復時間 (hr)	観察 細胞数*	S-9 Mix の 有無	相対 分裂指数 (%)	倍数体の 出現頻度 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	19	-	2000	-	100	0.0
検体	20	19	-	2000	-	626	
	40	19	-	2000	-	428	
	60	19	-	2000	-	464	
	80	19	-	2000	-	374 a	
	100	19	-	2000	-	265 a	0.5
	200	19	-	2000	-	33 c	
	400	19	-	2000	-	141 c	
600	19	-	2000	-	241 c		
溶媒対照 (DMSO)	-	3	16	2000	+	100	0.3
検体	20	3	16	2000	+	82	
	40	3	16	2000	+	116	
	60	3	16	2000	+	145 a	
	80	3	16	2000	+	207 b	0.8
	100	3	16	2000	+	373 b	
	200	3	16	2000	+	364 b	
	400	3	16	2000	+	338 b	
600	3	16	2000	+	412 b		

表中数値は 2 反復の平均値

Fisher の直接確率計算法 ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

a : 弱い細胞毒性あり (わずかに死細胞あり)、b : 中程度の細胞毒性あり (少数の死細胞あり)、c : 強度の細胞毒性あり (多数の死細胞あり)

* : 観察細胞総数

1 培養あたり 1000 個の分裂中期像を観察

DMSO : ジメチルスルホキシド

表 2.2 回目試験（続き）一分裂中期像解析データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間 (hr)	回 復 時間 (hr)	観 察 細 胞 数	S-9 Mix の 有 無	染色体異常を有する細胞数						異常細胞数				
						染色体分体型			染色体型			そ の 他	ギ ャ ブ を 除 く	平 均 %	ギ ャ ブ を 含 む	平 均 %
						ギ ャ ブ	切 断	交 換	ギ ャ ブ	切 断	交 換					
溶媒対照 (DMSO)	-	19	-	100	-	1						0	0.5	1	2.5	
				100	-	2	1			1	4					
検体	20	19	-	100	-	1	3		2	2		4	3.0	6	4.0	
				100	-		4			2	2					
	80	19	-	100	-		3					3	1.5	3	2.0	
				100	-	1				0	1					
	100	19	-	100	-	2	2			1		3	4.5**	5	6.5	
				100	-	4	6			6	8					
陽性対照 (MMC)	0.1	19	-	100	-	2	13		1	5		17	15.0	19	16.0	
				100	-		15			2		13	***	13	***	
溶媒対照 (DMSO)	-	3	16	100	+	2	1					1	0.5	3	2.0	
				100	+	1				0	1					
検体	20	3	16	100	+	1	1				6	2	2.0	2	2.5	
				100	+	1	2			2	3					
	60	3	16	100	+	1	3					3	3.5	4	4.5	
				100	+	1	4			4	5					
	80	3	16	100	+	2	1	1				2	2.5	4	3.5	
				100	+		3			3	3					
陽性対照 (CP)	6	3	16	100	+	4	10			3		10	13.0	11	13.5	
				100	+		12			6		16	***	16	***	

その他：細粉化した細胞や染色体等 8 個以上の異常を含む細胞

Fisher の直接確率計算法 *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシン C

CP : シクロホスファミド

ヒト末梢リンパ球におけるサイトカラシン B を用いる細胞毒性試験 [メカニズム試験]

(資料 No.T-25)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2003 年

[GLP 対応]

試験目的：ヒト末梢リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No.T-24) において、検体投与により低濃度から分裂中期細胞の増加が認められたため、分裂指数の減少を指標として検体の細胞毒性を評価することができなかった。よって、細胞毒性を詳細に評価するために、サイトカラシン B を用いた細胞毒性試験を実施した。

検体純度：

試験方法：ヒト末梢リンパ球細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下において培養し、検体処理後 3 時間培養後に新鮮培地に再懸濁し、サイトカラシン B を加え、16 時間培養した培養細胞を用いて、細胞毒性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 2000 個 (2 反復) の分裂中期細胞 (有糸分裂細胞) について行い、単核細胞、二核細胞および多核細胞を計数した。全細胞数に対する二核細胞の割合を求めて検体の細胞毒性を評価した。サイトカラシン B は核の分裂には影響を与えないが、細胞質の分裂を阻害するため、細胞分裂を経た細胞において二核細胞を形成させる。よって、細胞増殖の指標である全細胞に対する二核細胞の割合を調べることで、検体の細胞毒性を評価することができる。また、大単核細胞についても計数し、検体の倍数体誘発性についても評価をした。

検体の濃度は 10、20、40、60、80、100、200、400、600、800 および 1000 $\mu\text{g/mL}$ とし、サイトカラシン B の濃度は 6 $\mu\text{g/mL}$ とした。

結果：単核細胞、二核細胞および多核細胞の出現頻度および分裂指数を次表に示す。

40 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の二核細胞の出現頻度が 5.2%、相対出現頻度では 7% にまで減少し、強い細胞増殖抑制が認められた。また、いずれの濃度においても、大単核細胞の出現頻度の増加は観察されなかった。なお、20 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において、分裂中期細胞の割合の著しい増加が観察された。この増加は特に 40~1000 $\mu\text{g/mL}$ の各濃度で顕著であったが、用量依存性は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下で本剤は、40 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で強い細胞毒性を示すと結論された。また、大単核細胞の出現頻度の増加は観察されず、倍数体を誘発させなかった。なお、20 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において分裂中期細胞の割合を顕著に増加させた。

試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	単核細胞数	多核細胞数	二核細胞			相対 分裂指 数 (%)
				数	出現頻度 (%)	相対出現 頻度(%)	
溶媒対照 (DMSO)	-	236	8	756	75.6	100	-
		235	9	756			
検体	10	156	14	830	82.8	110	127
		164	11	825			
	20	245	26	729	72.0	95	862
		267	23	710			
	40	931	0	69	5.2	7	2385
		966	0	34			
	60	969	0	31	3.1	4	2450
		970	0	30			
	80	989	0	11	0.9	1	2304
		993	0	7			
	100	984	0	16	1.4	2	2223
		988	0	12			
	200	1000	0	0	0.4	1	1423
		993	0	7			
	400	990	0	10	1.0	1	181
		990	0	10			
	600	983	0	17	1.4	2	1596
		990	0	10			
	800	991	0	9	0.6	1	1519
		997	0	3			
1000	996	0	4	0.4	1	1508	
	997	0	3				

S9 mix 非存在下で培養

検体処理後3時間+サイトカラシンB (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加後16時間インキュベーション後、培養細胞標本を作成
観察は1培養あたり、1000個 (1濃度あたり2000個)

DMSO: ジメチルスルホキシド

ラットの骨髓細胞を用いた小核試験

(資料 No.T-26)

試験機関: Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年: 2001 年

[GLP 対応]

検 体:

試験動物: Sprague-Dawley 系 CD ラット、1 群 雄 7 匹 (陽性対照群雄 5 匹)、
投与時週齢; 約 7 週齢、投与时体重; 雄 181-223 g

試験方法: 検体は 0.5%メチルセルロース液を用い、500、1000 および 2000 mg/kg の用量とし (各 10 mL/kg 体重) 単回強制経口投与した。なお、対照群は 0.5%メチルセルロース (MC) を同様に投与した。投与 24 および 48 時間後 (対照群、2000 mg/kg 投与群) に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドグラス上で、メタノール固定、フォイルゲン染色変法で染色し骨髓標本を作製した。

陽性対照群は、シクロホスファミド (CP) 20 mg/kg を用い、24 時間後に動物を屠殺した。

各標本について小核保有細胞頻度を調べるため、2000 個の幼若赤血球について小核の有無を検査した。また、最低 1000 個の赤血球を調査し、幼若赤血球の割合を算出した。さらに 2000 個の成熟赤血球について小核を有する成熟赤血球の割合も求めた。

結 果: 骨髓標本の観察結果を次表に示した。

2000 mg/kg 投与群の 24 時間後の採取用のラット 1 例に投与後約 21 時間に死亡がみられた。しかしこの死亡は剖検の結果、検体が胸腔内に認められたことから、誤投与によるものであった。

一般症状として、500 および 1000 mg/kg 投与群で歩様異常、呼吸促迫、立毛、腹臥、自発運動低下、神経過敏行動、眼瞼下垂が観察され、1000 mg/kg 投与群ではさらに眼球突出も観察された。また 2000 mg/kg 投与群では歩様異常、深く速い不規則な呼吸、立毛、腹臥や円背位、自発運動低下、神経過敏行動、被毛や尾の着染、眼瞼下垂、眼球突出が観察された。その他の投与群の動物の一般状態には異常は認められなかった。いずれの検査時においても小核を有する幼若赤血球数の出現頻度に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、また幼若赤血球数の割合に統計学的に有意

な低下は認められなかった。さらに小核を有する成熟赤血球数の出現頻度に意義のある増加は認められなかった。

陽性対照であるシクロホスファミドでは、小核を有する幼若赤血球出現頻度に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められ、幼若赤血球数の割合には統計学的に有意な低下が認められた。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	性	投与量 (mg/kg)	観察動物数	% IE/ (IE+ME) (平均値±SD [#])	MIE (平均値±SD [#])	MME (平均値±SD [#])
24	陰性対照 (0.5% MC)	雄	-	7	39±3.6	0.9±0.9	0.0±0.0
	検体	雄	500	7	38±3.7	0.4±0.8	0.8±1.4
			1000	7	40±2.8	0.9±1.1	0.0±0.0
			2000	6	35±5.4	0.7±1.0	0.0±0.0
陽性対照(CP)	雄	20	5	34**±2.4	62.6** ±7.2	0.5±1.0	
48	陰性対照 (0.5% MC)	雄	-	7	40±3.3	0.9±0.7	0.0±0.0
	検体	雄	2000	7	36±3.8	1.0±0.8	0.4±1.0

MC：メチルセルロース

CP：シクロホスファミド

IE (Immature Erythrocytes)：幼若赤血球、ME (Mature Erythrocytes)：成熟赤血球

% IE/(IE+ME)：幼若赤血球の割合(%)=幼若赤血球数/1000個の赤血球(幼若赤血球+成熟赤血球)×100

MIE：幼若赤血球 2000 個当たりの小核を有する幼若赤血球の数

MME：成熟赤血球 2000 個当たりの小核を有する成熟赤血球の数

パーミュテーション法に基づく適切なノンパラメトリック法 (片側検定) **：P<0.01

[#]SD：申請者計算

以上の結果から本試験条件下において、本剤は染色体異常ならびに骨髄細胞毒性を誘発しないと判断される。

14) 生体機能に及ぼす影響試験

エタボキサムにおける生体機能に及ぼす影響に関する試験

(1) マウス中枢神経系への影響に関する試験

(資料 No.T-27)

試験機関: Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年: 2003 年

[GLP 対応]

検体純度:

供試動物: ICR 系マウス、投与時週齢: 5 週齢、投与時体重: 22~29 g、1 群雄 4 匹

投与方法: 検体を 1%メチルセルロース液に懸濁し、0、200、600 および 2000 mg/kg の用量を強制経口投与して、投与 30、90、150、300 分後および 24 時間後に Irwin の方法に従い一般状態を観察した。また、投与後 7 日間、肉眼的毒性症状および死亡について毎日観察した。

結果: 7 日間の観察期間中、死亡例はなかった。いずれの投与量においても、行動あるいは生理学的変化は認められなかった。

(2) ラット呼吸器系への影響に関する試験

(資料 No.T-28)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2003 年

[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：Wistar 系ラット、投与時週齢；6 週齢、投与時体重；171~205 g、1 群雄 8 匹

投与方法：検体を 1%メチルセルロース (MC) 液に懸濁し、0、200、600 および 2000 mg/kg 用量を経口投与した。陽性対照群には硫酸モルヒネ 200 mg/kg の用量を投与した。投与前、投与 30、90、150 および 300 分後の各測定時において前後 16 分間、プレストモグラフを用いて呼吸パラメーター (呼吸数、1 回換気量および分時換気量) を評価した。

結果：

1. 呼吸数に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)		平均呼吸数 (回/分) ; ±SD				
		投与前	30 分後	90 分後	150 分後	300 分後
溶媒対照群	0 (1% MC)	280±46.8	268±73.8	152±28.6	155±35.4	157±32.0
検体投与群	200	278±51.7	229±44.1	137±18.2	166±73.4	170±23.1
	600	278±59.4	236±56.3	151±35.3	170±60.6	143±20.7
	2000	276±61.3	221±57.9	148±26.2	195±56.5	152±22.3
陽性対照群	200 (硫酸モルヒネ)	280±62.6	↓ 183±35.6	156±46.5	155±60.8	163±45.6

SD：標準偏差、MC：メチルセルロース

統計検定：検体試験群；投与前の結果—分散分析後 Dunnett の対比較検定

投与後の結果—分散分析後 Williams の多重比較検定

硫酸モルヒネ投与群の結果—Student の *t* 検定 ↓：p<0.05

いずれの検体投与群においても、溶媒対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

陽性対照である硫酸モルヒネ投与群の呼吸数は投与 30 分後に溶媒対照群と比較して有意に減少した。

2. 1 回換気量に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)		平均 1 回換気量 (mL) ; ±SD				
		投与前	30 分後	90 分後	150 分後	300 分後
溶媒対照群	0 (1% MC)	1.55±0.14	1.38±0.13	1.67±0.23	1.73±0.26	1.84±0.18
検体投与群	200	1.39±0.13	1.46±0.15	1.61±0.14	1.67±0.22	1.83±0.16
	600	1.53±0.28	1.48±0.17	1.62±0.27	1.68±0.23	1.79±0.40
	2000	1.46±0.22	1.68±0.54	1.70±0.16	1.54±0.13	1.86±0.15
陽性対照群	200 (硫酸モルヒネ)	1.56±0.21	1.51±0.16	1.68±0.13	1.78±0.22	1.69±0.20

SD : 標準偏差、MC : メチルセルロース

統計検定 : 検体試験群 ; 投与前の結果一分散分析後 Dunnett の対比較検定

投与後の結果一分散分析後 Williams の多重比検定

硫酸モルヒネ投与群の結果 - Student の t 検定

いずれの検体投与群においても、溶媒対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

3. 分時換気量に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)		平均分時換気量 (mL) ; ±SD				
		投与前	30 分後	90 分後	150 分後	300 分後
溶媒対照群	0 (1% MC)	378±80.4	308±74.4	222±62.7	226±45.0	251±40.0
検体投与群	200	343±56.1	276±53.5	192±19.0	239±88.8	268±35.8
	600	365±54.8	296±82.5	208±42.0	238±66.7	228±55.0
	2000	359±99.1	293±36.5	220±47.6	251±62.4	252±33.4
陽性対照群	200 (硫酸モルヒネ)	381±56.6	256±48.1	248±52.1	253±53.8	249±38.1

SD : 標準偏差、MC : メチルセルロース

統計検定 : 検体試験群 ; 投与前の結果一分散分析後 Dunnett の対比較検定

投与後の結果一分散分析後 Williams の多重比検定

硫酸モルヒネ投与群の結果 - Student の t 検定

いずれの検体投与群においても、溶媒対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

以上の結果から、呼吸数、1 回換気量および分時換気量において検体投与による影響はみられなかった。

(3) イヌ循環器系への影響に関する試験

(資料 No.T-29)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2004年 [GLP 対応]

検体純度：

供試動物：ビーグル犬、搬入時月齢；約5月齢、試験開始時体重；13.6～15.1 kg
1群雌雄各2匹

実験方法：テレメトリー送信機およびセンサー類の麻酔下で埋め込み手術を行い、回復後、循環器パラメータ（血圧、心拍数および第II誘導心電図）を測定した。血圧カテーテルは腹部大動脈に、心電図電極は肋間筋上および右鎖骨直下に固定し、それぞれ血圧、心拍数および第二誘導による心電図波形を無麻酔下で記録した。投与は各動物に対し4回、1週間間隔でカプセルのみ、200、600、1000（限界用量）mg/kgと投与量を増やす漸増法で行った。血圧および心拍数は投与前30、15、10分、投与直前、ならびに投与後10分毎に12時間後まで測定した。心電図は投与30、15、10分前、投与直前、投与0.5、1、2、4、6、8、10、12時間後に測定した。

結果は0-6h、6-12hの平均値を用いて評価した。さらにRR間隔とQT間隔は0.5h、1、2、4、6hの平均値についても評価した。

また、一般症状および自律神経系の変化も投与0.5、1、2、3および4時間後に観察した。

投与方法：ゼラチンカプセル（サイズ12）に、検体を充填し、経口投与した。投与カプセル数は必要最小限とした。

結 果： (平均値)

項目 (単位)	期間	投与量 (mg/kg)			
		0(空カプセル)	200	600	1000
心拍数 (回/分)	0-6h	86	93	90	91
	6-12h	91	100	96	100
収縮期血圧 (mm Hg)	0-6h	139	143	140	140
	6-12h	126	137	139	↑ 139
弛緩期血圧 (mm Hg)	0-6h	89	90	88	89
	6-12h	77	85	85	87
平均血圧 (mm Hg)	0-6h	106	107	105	106
	6-12h	93	102	103	↑ 104
RR 間隔 (ms)	0-6h	805	745	765	821
	0.5h	748	886	809	↑ 1134
	1h	889	904	837	833
	2h	799	723	901	700
	4h	818	643	646	799
	6h	769	567	633	639
	6-12h	667	583	717	621
PR 間隔 (ms)	0-6h	122	121	123	125
	6-12h	110	114	114	113
QRS 間隔 (ms)	0-6h	44.8	44.9	45.3	44.3
	6-12h	43.5	42.5	41.3	43.8
QT 間隔 (ms)	0-6h	230	221	230	228
	0.5h	228	223	242	243
	1h	239	230	228	229
	2h	211	214	234	223
	4h	234	225	223	230
	6h	236	214	221	216
	6-12h	224	213	216	215
	QTcB (ms) [Bazett's 補正]	0-6h	267	264	260
	6-12h	276	282	258	274
QTcF (ms) [Fridericia's 補正]	0-6h	254	248	248	245
	6-12h	258	257	243	252
QTcR (ms) [回帰補正]	0-6h	226	218	225	223
	6-12h	226	221	216	220

Williams の多重比較検定 (媒体対照群との比較) ↑: p<0.05

1000 mg/kg 投与 6~12 時間後に統計学的に有意な収縮期血圧および平均血圧の上昇が認められたが、軽度の変化であり、薬理学的に意義のない変化であると判断された。また、1000 mg/kg 投与 0.5 時間後には統計学的に有意な RR 間隔の延長がみられた。しかしこの変化は 1000 mg/kg 投与後 0.5 時間の時点においてのみ認められた影響であり、心拍数の統計学的に有意な増加および QT 間隔延長がみられなかったことから、検体の投与に関連のない変化と判断された。その他の循環器パラメーターには、いずれの投与量においても対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

一般症状として、200 mg/kg 投与後、2 動物で投与日に嘔吐および 1000 mg/kg 投与後、投与当日に嘔吐および蒼白便が各 1 動物で、翌日に 2 動物に嘔吐が観察された。これらの変化は消化管への刺激に起因するものであり、偶発的な変化と考えられた。

以上のことから、本検体はイヌの循環器系に対し、ほとんど影響を及ぼさないと判断された。

「生体機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目		動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果 概要
中枢神経	一般状態 [Irwin 法]	マウス	経口 (1%メチルセルロース液)	0、200、 600、2000	雄 4	-	2000	影響 なし
呼吸器系	呼吸数、 1 回換気量、 分時換気量	ラット	経口 (1%メチルセルロース液)	0、200、 600、2000	雄 8	-	2000	影響 なし
循環器系	血圧、 心拍数、 心電図波形	イヌ (覚醒下)	経口 (ゼラチンカプセル)	0、200、 600、1000	雄 2 雌 2	-	1000	影響 なし

15) その他

雄ラットの生殖ホルモン濃度と生殖腺病理検査

「混餌投与した雄ラットにおける生殖ホルモン濃度および生殖管の病理に関する研究」

(資料No.T-30)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2002年

[GLP対応]

目的：検体の混餌投与でCrI:CD[®](SD)IGS BR系雄ラットの精巣に顕著な病理学的変化がみられたことから、検体の生殖ホルモンに及ぼす影響およびその器質的変化の発現機序の検討を目的とした。

検体純度：

試験動物：CrI:CD[®](SD)IGS BR系ラット、1群雄10匹、

投与開始時日齢；雄82～86日齢、投与開始時体重；雄400～472 g

投与期間：13週間（2002年1月23日～2002年4月24日）

投与方法：検体を650または2000 ppmの濃度で混合した飼料を13週間自由に摂取させた。なお、対照群の動物には基礎飼料のみを同様に摂取させた。

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態観察を毎日少なくとも2回、詳細な身体検査を毎週1回実施した。

性別	雄		
	投与量 (ppm)		
	0	650	2000
頭部の褐色着色	0/10 [*]	5/10	3/10
体表面被毛の黄色着色	0/10	1/10	10/10

*：所見のある動物数/検査動物数

Fisherの直接確率計算法 ↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01（申請者実施）

投与期間中に死亡あるいは切迫屠殺された動物はいなかった。

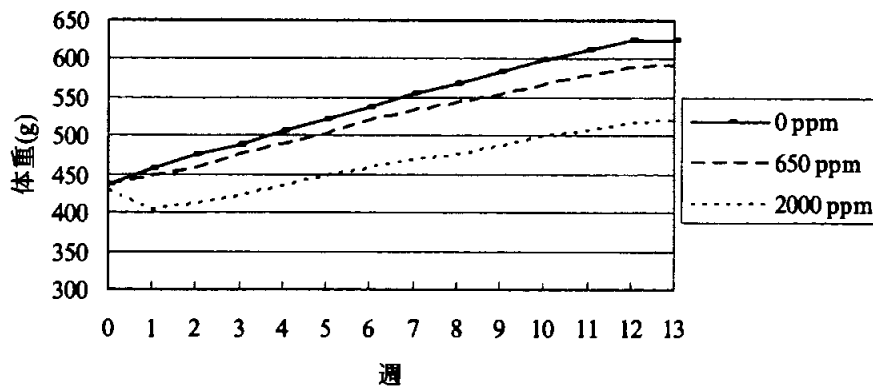
体表面被毛の黄色着色が、2000 ppm投与群に高頻度でみられ、頭部の褐色着色が650 および2000 ppm投与群に認められた。2000 ppm投与群ではトレイに敷いた紙の黄染も投与期間を通じて顕著であった。投与期間終了時に対照群にみられたトレイ紙の黄染は、被毛の着色を伴っていなかったのでその原因は明確ではなかった。これらの着色は親化合物または代謝産物の尿中への排泄を反映したものと思われ、毒性学的意義はないと考えられた。

(申請者注：統計検定の結果、2000 ppm投与群の体表面被毛の黄色着色および650 ppm投与群の頭部の褐色着色の発生頻度が統計学的に有意に高い値を示した。)

体重：投与開始1週間前（第1週）、投与開始日（第0週）、投与期間中毎週1回および剖検前に、全動物の体重を測定した。

以下に体重変化の図と体重増加量（g/動物）の表を示す。

雄ラットの体重変化



体重増加量（g/動物）

性別	雄		
	0	650	2000
投与量 (ppm)	0	650	2000
0-1週の体重増加量 (g)	21	10	↓27
1-13週の体重増加量 (g)	168	146	↓117
0-13週の体重増加量 (g)	189	155	↓91
対照群に対する%	—	82	48

Behrens-Fisher検定/Dunnett検定 ↑↓ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01, ↑↓ : p<0.001

2000 ppm投与群では、投与第1週に顕著な体重減少がみられ、650 ppm投与群の体重増加量も抑制がみられた。全投与期間を通じた体重増加量は対照群に対して650 ppm投与群で82%、2000 ppm投与群で48%であった。体重減少および体重増加量の抑制は検体の非特異的な毒性影響であると考えられた。

摂餌量；全ケージの摂餌量を週1回測定し、動物1匹あたりの摂餌量を算出した。

投与期間中の摂餌量の概要を以下の表に示す。

摂餌量 (g/ラット)

性別	雄		
	0	650	2000
投与量 (ppm)			
1週の摂餌量 (g)	204	188	140
2週の摂餌量 (g)	205	191	178
3週の摂餌量 (g)	203	198	190
4-13週の摂餌量 (g/週)	201-217	189-201	183-195
1-13週の総摂餌量 (g)	2721	2512	2386
対照群に対する%	—	92	88

統計検定は各群の測定検査数が2のため実施できなかった。

投与第1週の650および2000 ppm投与群の摂餌量は極めて低く、2000 ppm投与群では第2週も低かった。650および2000 ppm投与群でのその後の摂餌量は対照群よりわずかに低い程度であった。投与初期の摂餌量減少は検体の非特異的な毒性影響であると考えられた。

食餌効率；体重および摂餌量のデータから、投与期間中の食餌効率（体重増加量/摂餌量）を算出した。

全投与期間における食餌効率を以下の表に示す。

性別	雄		
	0	650	2000
投与量 (ppm)			
1-13週の食餌効率 (%)	6.9	6.2	3.8

2000 ppm投与群の食餌効率は対照群に比して極めて低かった。650 ppm投与群では概ね対照群と同様であった。

検体摂取量；全投与期間にわたる平均検体摂取量は以下の通りである。

性別	雄	
	650	2000
投与量 (ppm)		
1-13週の平均検体摂取量 (mg/kg/日)	34.8	114.3

血液生化学的検査；投与開始前、第7、14、28および91日にすべての動物の眼窩静脈叢から血液試料を採取し、遠心分離して得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

テストステロン、黄体化ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）

測定結果を次表に示す。

性別		雄		
投与量 (ppm)		0	650	2000
テストステロン (nmol/L)	投与前	8.4	7.7	10.3
	7日	6.2	5.9	↓1.9
	14日	4.4	4.8	↓1.4
	28日	6.2	7.1	2.7
	91日	1.9	1.0	2.2
LH (ng/mL)	投与前	1.8	2.1	1.8
	7日	1.8	2.0	1.8
	14日	2.3	2.4	2.1
	28日	2.4	2.3	2.2
	91日	2.1	2.2	↑2.5
FSH (ng/mL)	投与前	11.1	12.0	12.9
	7日	11.2	10.6	9.9
	14日	8.5	7.3	7.1
	28日	9.2	8.3	9.1
	91日	7.2	6.2	↑11.5

各群ともにn=10、数値は10匹の平均

WilliamsまたはDunnett検定/ShirleyまたはDunn検定 ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01、↑↓ : p<0.001

テストステロン濃度について2000 ppm投与群で投与第7および14日に対照群に比して統計学的に有意な低値がみられた。これらは投与前の値に比しても明らかに低かった。統計学的有意差はなかったが、第28日においても低かった。650 ppm投与群では影響は認められなかった。

LH濃度は第28日まで影響は認められなかった。第91日の2000 ppm投与群のLH濃度は、わずかではあるが対照群に比して有意に高かった。650 ppm投与群では影響は認められなかった。

FSH濃度は、650および2000 ppm投与群において、対照群に比して統計学的に有意ではないが第7および14日にわずかに低下した。第91日の2000 ppm投与群のFSH濃度は対照群の値よりも有意に高かった。

テストステロン血中濃度減少は視床下部による性腺刺激ホルモン放出ホルモンの代償的な上昇を導き、その結果、下垂体前葉でのLH産生量が増加することが予想される。2000 ppm投与群では、投与早期にはLH濃度への影響は明らかでなかったが、第91日のLH濃度に有意な増加がみられた。試験終了時に観察されたFSH増加は病理組織学的に認められた精子形成に相応する反応であると考えられた。

肉眼的病理検査；13週間投与終了後に全動物を二酸化炭素吸入により屠殺し、肉眼的病理検査を行った。

統計学的有意差が認められた所見を次表に示す。

性別	雄		
	投与量 (ppm)		
	0	650	2000
精巣上体小型化	0/10*	0/10	↑6/10
精巣小型化	0/10	0/10	↑10/10
精巣軟化	0/10	0/10	↑7/10

*：所見のある動物数/検査動物数。

Fisherの直接確率計算法 ↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001

2000 ppm投与群の大多数において、精巣上体小型化ならびに精巣の小型化および軟化が認められた。

臓器重量；13週間投与終了後に屠殺した各動物から以下の臓器を摘出し、重量（絶対重量）を測定した。両側性の臓器は左右一緒に測定した。相対重量は各臓器重量の体重比（%）として計算した。

精巣上体、前立腺、精囊、精巣

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別	雄			
	投与量 (ppm)			
	0	650	2000	
最終体重 (g)	626.4	591.6	↓522.7	
精巣上体	絶対重量 (g)	1.417	↓1.275	↓0.840
	相対重量 (%)	0.2266	0.2162	↓0.1625
前立腺	絶対重量 (g)	0.741	0.728	↓0.575
精巣	絶対重量 (g)	3.83	3.74	↓1.71
	相対重量 (%)	0.612	0.634	↓0.328

Behrens-Fisher検定/Dunnett検定↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001

2000 ppm投与群の精巣上体および精巣の絶対重量および相対重量が対照群に比して有意に低かった。650 ppm投与群の精巣上体の絶対重量もわずかに低かった。2000 ppm投与群では前立腺の絶対重量が低かったが、これは投与による直接的な影響よりは体重の群間差が大きいことによるものと考えられた。

病理組織学的検査；すべての動物の精巣、精巣上体および肉眼的異常部位について、常法に従ってHE染色を施した病理標本を作製し、検鏡した。ただし、精巣についてはPAS染色を施した。

雄ラットの精巣および精巣上体に投与に関連した所見が認められた。これらを以下の表に要約する。

精巣上体および精巣における投与に関連した変化

性別	雄		
	投与量 (ppm)		
	0	650	2000
検査動物数：	10	10	10
精巣上体：			
炎症	2 ^a	2	↑10
精子消失	0	0	1
上皮空胞化	0	0	4
管腔内細胞残屑	0	2	↑10
精子数減少	0	0	↑9
管腔内多核巨細胞	0	0	1
精巣：			
両側性生殖細胞消失/変性	0	2	↑10
両側性多核巨細胞形成	0	0	2
両側性間細胞過形成	0	0	↑10

^a： 所見のある動物数

Fisherの直接確率計算法 ↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001

精巣上体において、2000 ppm投与群で炎症、管腔内細胞残屑および精子数減少の出現頻度に統計学的に有意な増加が認められた。その他、精子消失、上皮空胞化、管腔内多核巨細胞が数例にみられた。650 ppm投与群では2例に管腔内細胞残屑がみられた。精巣において、2000 ppm投与群のすべての雄に両側性の生殖細胞消失/変性と間細胞過形成が認められ、2例に両側性の多核巨細胞形成もみられた。650 ppm投与群では2例に両側性の生殖細胞消失/変性がみられた。

精巣間細胞過形成は、血中の濃度上昇をきたしたLHの精巣間細胞に対する刺激増加に直接関連していると考えられた。今回の試験における検体の作用はテストステロン血中濃度減少であり、精巣間細胞の変化は黄体化ホルモンの介在に起因することが示唆された。

以上の結果から、2000 ppmの検体をラットに13週間混餌投与すると、精巣に顕著な病理学的変化を引き起こし、二次的に精巣上体の変化を伴うことが示された。これはラットの90日間反復経口投与（資料No.T-09）および飼料混入1年間反復経口投与/発がん性併合試験（資料No.T-16）における結果と一致していた。

さらに、ラットにみられた間細胞の増殖性病変（間細胞過形成および間細胞腺腫）は、検体の混餌投与によりテストステロンの血中濃度が減少し、それに対するフィードバック機構が働いた結果、黄体化ホルモンの血中濃度が増加し、間細胞に慢性的な刺激がもたらされて起きたものであり、非遺伝毒性的なメカニズムに伴うものであろうと判断した。

エタボキサムのヒトエストロゲンレセプター α 、ヒトアンドロゲンレセプターに対するインビトロ影響評価

(資料 No.T-35)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2010年 [GLP 対象外]

検体：エタボキサム原体

検体純度：

試験方法：ヒトエストロゲンレセプター α (hER α)、ヒトアンドロゲンレセプター (hAR) 2種の核内レセプターに対応するヒト遺伝子を用い、ヒト由来培養細胞 HeLa 細胞において転写活性を指標とした培養細胞レポーター遺伝子アッセイ試験を実施した。

試験結果：試験結果を次頁以降にまとめた。

hER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験において、hER α に対する陽性対照 (アゴニスト；17 β -エストラジオール(E2)、アンタゴニスト；4-ヒドロキシタモキシフェン(HTM)) はそれぞれアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を示したが、エタボキサム (1 μ M 以下) は本レセプターに対してアゴニストおよびアンタゴニスト活性のいずれも示さなかった(表 2 および 3)。

hAR のレポーター遺伝子アッセイ試験において、hAR に対する陽性対照 (アゴニスト；ジヒドロテストステロン(DHT)、アンタゴニスト；ヒドロキシフルタミド(HFT)) はそれぞれアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を示したが、エタボキサム (1 μ M 以下) は本レセプターに対してアゴニストおよびアンタゴニスト活性のいずれも示さなかった(表 4 および 5)。

以上の結果より、エタボキサムは上記の hER α および hAR に対する影響は陰性と結論した。

表 1 hER α 、および hAR と無関係に定常的にルシフェラーゼを発現するコントロール細胞を用いたエタボキサムのコントロールアッセイ

化合物	濃度	DMSO	100pM	1nM	10nM	100nM	1 μ M	10 μ M
エタボキサム	平均値	100	100	111	106	110	108	43
	\pm 標準偏差	± 15	± 5	± 12	± 16	± 8	± 7	± 10 *

表中の数字は溶媒対照群を 100 とした場合の値を示した(n=6)。

P<0.05 場合に*で示した。

表2 hER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験による陽性対照物質 E2 および被験物質 エタボキサムのアゴニスト活性の検討

化合物	濃度	DMSO	10pM	100pM	1nM	10nM	100nM	1 μ M
E2	平均値	100	163	484	622	644	655	731
	\pm 標準偏差	± 11	± 20 *	± 76 *	± 62 *	± 104 *	± 86 *	± 51 *
エタボキサム	平均値	100		100	93	106	89	100
	\pm 標準偏差	± 10		± 14	± 19	± 38	± 8	± 10

表中の数字は溶媒対照群を 100 とした場合の値を示した(n=6).
p<0.05 場合に*で示した.

表3 hER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験による陽性対照物質 HTM および被験物質 エタボキサムのアンタゴニスト活性の検討

化合物	濃度	DMSO	10pM	100pM	1nM	10nM	100nM	1 μ M
HTM	平均値	100	118	118	177	52	41	35
	\pm 標準偏差	± 21	± 17	± 15	± 37 *	± 5 *	± 6 *	± 2 *
エタボキサム	平均値	100		98	107	102	97	109
	\pm 標準偏差	± 13		± 10	± 26	± 9	± 7	± 12

表中の数字は溶媒対照群を 100 とした場合の値を示した(n=6).
p<0.05 場合に*で示した.

表4 hAR を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験による陽性対照物質 DHT および被験物質 エタボキサムのアゴニスト活性の検討

化合物	濃度	DMSO	10pM	100pM	1nM	10nM	100nM	1 μ M
DHT	平均値	100	120	771	2782	3446	3488	3533
	\pm 標準偏差	± 5	± 10 *	± 56 *	± 144 *	± 164 *	± 126 *	± 120 *
エタボキサム	平均値	100		90	90	84	88	91
	\pm 標準偏差	± 5		± 5	± 7	± 5 *	± 5 *	± 7

表中の数字は溶媒対照群を 100 とした場合の値を示した(n=6).
p<0.05 場合に*で示した.

表5 hARを用いたレポーター遺伝子アッセイ試験による陽性対照物質 HFL および被験物質 エタボキサムのアンタゴニスト活性の検討

化合物	濃度	DMSO	10pM	100pM	1nM	10nM	100nM	1 μ M
HFL	平均値	100	93	89	83	62	26	15
	\pm 標準偏差	± 4	± 7	± 5 *	± 8 *	± 6 *	± 3 *	± 1 *
エタボキサム	平均値	100		93	91	89	93	92
	\pm 標準偏差	± 3		± 6	± 6	± 7 *	± 8	± 7

表中の数字は溶媒対照群を 100 とした場合の値を示した(n=6).
p<0.05 場合に*で示した.

エタボキサムのテストステロン合成に対する影響評価

(資料 No.T-36)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2010年 [GLP 対象外]

検体：エタボキサム原体

検体純度：

試験方法：ヒト副腎皮質由来 NCI-H295R 細胞を用いて、そのテストステロン合成に対するエタボキサムの影響の有無を、24 時間培養後の細胞に被験物質を添加し、24 時間後の培地中のテストステロン濃度を酵素免疫測定法 (EIA) 法で測定することで評価した。

試験結果：試験の結果より、本試験条件下において、エタボキサムはテストステロン合成に影響しないと判定した。

表 1 エタボキサムのテストステロン合成への影響

濃度	0	100pM	1nM	10nM	100nM	1 μ M	10 μ M	100 μ M
平均値	100	102	63	103	120	107	143	114
±標準偏差	±10.1	±8.9	±41.0	±18.5	±21.9	±13.6	±47.2	±21.2

表中の数字は対照群を 100 とした場合の値を示す (n=3)。ダネットの多重比較検定を行った結果、エタボキサム全ての濃度において有意差はなかった。

2. 原体混在物および代謝物

1) 代謝物 LGC-35523 (G) のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.T-31)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2003年 [GLP 対応]

検体純度：

供試動物：CrI:CD BR 系 CD ラット、1 群雌各 3 匹、

投与時週齢；約 8~12 週齢、投与時体重；雌 185.2~209.2 g

観察期間：15 日間（投与日を試験 1 日とする）

試験方法：毒性等級法

投与方法：検体を 1% w/v メチルセルロース溶液で 500 mg/mL の濃度に調製し、10 mL/kg の用量を、経口投与した。投与前に一夜絶食した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 15 日間観察した。試験 1 日（投与前）、8 日および 15 日に体重を測定し、死亡動物および試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行なった。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 >5000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	なし
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000

試験期間を通して死亡は認められなかった。検体投与に対する反応として、尿量増加および黄青緑色あるいは青緑色尿といった症状がすべてのラットにみられ、また 3 例で立毛、1 例で流涎を伴った。これら症状は試験 5 日までに回復した。試験 15 日に 1 例で体重増加量の抑制が認められた。肉眼的病理検査では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

2) 代謝物 LGC-35523 (G) のラットにおける飼料混入投与による 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 No.T-32)

試験機関: Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年: 2006 年 [GLP 対応]

検体純度:

供試動物: Crl: CD (SD) IGS BR 系ラット、1 群雌雄各 10 匹、投与開始時週齢; 雌雄 約 6 週齢、
投与開始時体重; 雄 220~265 g、雌 168~198 g

投与期間: 13 週間 (2005 年 11 月 28 日~2006 年 2 月 28 日)

投与方法: 検体を 300、1250 および 5000 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって随時摂食
させた。検体を混入した飼料は 2 週間に 1 回調製した。

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 一般状態観察および動物の生死は 1 日 2 回観察した。

投与期間中に途中死亡および投与に起因した一般症状は認められなかった。

体重; 投与開始 1 週間前(-1 週)、投与開始日 (0 週)、投与期間中毎週 1 回および剖検前に全
動物の体重を測定した。

試験期間を通して全投与群の雌雄における体重および体重増加量は、対照群と同程度
であった。

摂餌量; 全ケージの摂餌量を週 1 回測定し、ケージ毎に動物 1 匹あたりの 1 週間平均摂餌量を
算出した。

全投与期間の全投与群の雌雄における群平均摂餌量は、対照群と同程度であった。

食餌効率；体重および摂餌量のデータから食餌効率を算出した。

全投与群の雌雄における食餌効率は、対照群と同程度であった。

検体摂取量；全投与期間にわたる平均検体摂取量 (mg/kg/日) は以下の通りである。

性別	雄			雌			
	投与量 (ppm)	300	1250	5000	300	1250	5000
1-13 週の平均検体摂取量 (mg/kg/日)		19.66	81.94	326.69	22.37	93.03	367.48

詳細な状態の観察： 投与開始前および投与期間中毎週 1 回全動物を対象として詳細な状態観察を実施し、ハンドリング中及び標準アリーナでの行動も観察した。

いずれの観察においても投与に関連した所見は認められなかった。

機能検査： 投与 12 週中に各群雌雄各 10 匹を対象として、以下の項目の測定を行った。

感覚反応（接近反応、接触反応、聴覚性驚愕反応、テイルピンチ反応）、握力（前肢及び後肢について各 2 回）、自発運動量（6 分間隔で 10 回、合計 1 時間測定）

感覚反応検査において、5000ppm 投与群の雄 3 匹及び雌 1 匹が接近反応で無反応を示し、このうち雄 1 匹は接触反応あるいは聴覚性驚愕反応でも無反応を示した。しかし大部分のこれら動物に他の所見が認められなかったこと、眼科学的異常も存在しなかったことから、この変化は正常変動であり、投与の影響ではないと判断された。

握力検査において、対照群との間に有意差はみられなかった。

自発運動量の測定では、5000ppm 投与群の雄の平均低ビームスコアが 36-60 分間の測定において対照群より約 2 倍高い値を示したが、有意差は認められなかったこと、雌で同様の変化がみられなかったことから、この変化は正常変動であり、投与の影響ではないと判断された。

従って、機能検査において、検体投与の影響はみられなかったと考えられた。

眼科学的検査；投与開始前の全供試動物および投与 13 週における対照群と高用量群の全動物について、眼科学的検査を実施した。

投与 13 週の検査で雌雄とも投与による影響は認められなかった。

血液学的検査；投与 13 週中に一晩絶食させた全動物を対象として、全身軽麻酔下で舌下静脈から血液を採取し、以下の項目を測定した。

ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、平均赤血球血色素濃度、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、総白血球数、白血球分画、細胞形態、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

性別	雄				雌			
	0	300	1250	5000	0	300	1250	5000
投与量 (ppm)	0	300	1250	5000	0	300	1250	5000
平均赤血球血色素濃度*	-	↑103			-			
平均赤血球容積*	-			↓97	-			
総白血球数*	-				-		<137>	↑147
白血球分画*	リンパ球	-			-		<133>	↑146
	単球	-			-		<150>	↑175
	大型非染色球	-			-		<100>	↑150
小赤血球	異常なし	7	4	7	1	10	10	10
	軽度	3	6	2	7	0	0	0
	中等度	0	0	1	2	0	0	0

Williams 検定又は Dunnett 検定 ↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01

用量依存性検定: Williams 検定

<>: 統計学的有意差はないが参考値として提示

*: 表中の数字は対照群を 100 とした場合の値を示す

5000 ppm 投与群の雌で平均リンパ球、単球、大型非染色球の有意な増加がみられ、その結果として総白血球数の有意な増加もみられた。同群の雄では小赤血球数の発生率及び程度が増加し、平均赤血球容積が有意に低下した。平均赤血球容積は対照群の個体別値と実質的に重複していたことから、投与の影響ではないと判断された。

(申請者注: 平均赤血球容積における対照群値の範囲; 50.5~56.2fl, 5000ppm 投与群で対照範囲からの逸脱は 4 例でそれぞれ 48.7, 48.7, 50.0 および 50.2fl, 背景データ範囲(平均); 47.7~58.4fl (52.48fl) であったことから投与の影響ではないと考えられる。)

1250ppm 投与群の雌では有意差はみられなかったが、平均リンパ球、単球、大型非染色球および総白血球数の増加が認められた。

300ppm 投与群の雌雄および 1250ppm 投与群の雄では投与に起因すると判断される変化はみられなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査と同時に採取した血液から得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、γ-グルタミントランスペプチターゼ（gGT）、総ビリルビン、尿素、クレアチニン、グルコース、総コレステロール、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、総蛋白質、アルブミン、A/G比

統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

性別	雄			雌		
	300	1250	5000	300	1250	5000
投与量 (ppm)						
ALT		↓78	↓71			<136>
AST		<86>	↓80			↑211
gGT		↓-	↓-			
グルコース			↓76			
ナトリウム	↑101	↑101	↑101			
カルシウム		↑102	↑103	↓89		
無機リン		↑108	↑107			
総蛋白質		<102>	↑105			
アルブミン		↑109	↑106			
ビリルビン						↑150
尿素						↓87

表中の数字は対照群を 100 とした場合の値を示し、測定値が"0"場合は"-"と表示した Williams 検定、Shirley 検定又は Steel 検定 ↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01

用量依存性検定：Williams 検定

<>：統計学的有意差はないが参考値として提示

1250 および 5000ppm 投与群の雄において、平均 ALT および平均 AST 濃度が用量依存性に減少し、平均アルブミン濃度及びその結果として 5000ppm 投与群の雄の平均総蛋白質濃度の有意な増加がみられたが用量依存性は明確ではなかった。これらの変化は、投与に起因する可能性が考えられたが、毒性学的重要性はないものと判断される。さらに平均 gGT 濃度の有意な減少、電解質濃度（カルシウム、無機リンおよびナトリウム）の有意な増加がみられたが、個別別値では対照群の範囲内又は重複した。また 5000ppm 投与群の雄ではグルコース濃度が有意に低下したが、個別別値では概して対照範囲の下限であったことから、投与の影響ではないと判断された。

5000ppm 投与群の雌において、平均 AST 濃度の有意な増加及び平均 ALT 濃度の増加がみられたが、これは 1 例（動物番号 56）が異常値を示したことによるものであり、残りの雌の個別別値は概ね対照範囲内であった。また、平均ビリルビン濃度の有意な増加および平均尿素有意的な低下も認められたが、個別別値の大部分は対照範囲内であったことから、投与に関連しないものと判断された。

300ppm 投与群の雄でもナトリウム濃度の有意な増加がみられた。

電解質の変化は、対照群の個体別値と重複しており、ナトリウムおよび無機リンでは用量依存性はみられなかったこと、雌で同様の影響がみられなかったことおよび電解質平衡異常を示す証拠所見がなかったことから、投与の影響ではないと判断された。

1250ppm および 300ppm 投与群の雌では投与による影響は認められなかった。

[申請者注]

ALT および AST は、雄で減少し、雌で増加したことから、毒性学的有意性はないものと考えられる。また、雄でみられた総蛋白質およびアルブミンの増加は、軽微であり、雌でみられなかったことから、毒性学的有意性はないものと考えられる。上記の個体別値と重複がみられた検査項目における対照群と投与群の個体別値の比較及び背景データを次表に示す。

性別	項目		投与量 (ppm)				背景データ
			0	300	1250	5000	
雄	gGT	逸脱動物数			0	0	
		範囲*	0-1				0-4
	グルコース	逸脱動物数				4	
		範囲*	3.86-7.40			2.46-3.78	4.47-10.38
		平均	5.41			4.10	6.843
	Na	逸脱動物数		6	5	8	
		範囲*	136-141	142-143	142-144	142-143	137-149
	Ca	逸脱動物数			6	6	
		範囲*	2.36-2.48		2.49-2.56	2.51-2.60	2.41-2.92
	無機リン	逸脱動物数			2	2	
範囲*		1.80-2.23		2.24-2.33	2.29-2.40	1.62-2.026	
雌	ビリルビン	逸脱動物数				3	
		範囲*	1-3			4-5	1-4
		平均	2			3	2.3
	尿素	逸脱動物数				2	
		範囲*	5.23-7.93			4.90-4.59	3.89-9.01

*: 投与群については、対照群の個体別値の範囲から逸脱した動物における個体別値の範囲を提示

雄のグルコースでは背景データを下回ったが、対照群も背景データの範囲及び平均を下回っていたことから、偶発的と考えられる。雌のビリルビンは背景データからの逸脱は極僅かなものであり、雄では変化がみられていないことから、毒性学的有意性はないものと思われる。その他の検査項目は背景データの範囲内であったため、投与の影響ではないと考えられる

尿検査; 投与 13 週中に一晚絶食・絶水下で全動物から採取した尿を対象として以下の項目を検査した。

外観、尿量、pH、比重、蛋白、グルコース、ケトン、胆汁色素、ヘム色素、尿沈渣

統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	300	1250	5000	300	1250
pH			↑108			
比重				↑101		

表中の数字は対照群を 100 とした場合の値を示す
Dunnnett 検定又は Shirley 検定 ↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01

5000 ppm 投与群の雄で平均尿比重が有意に高かったが、個体別値では対照群と実質的に重複していたため、投与の影響ではないと判断された（申請者追記：対照群値の範囲；1032～1047g/L、5000ppm 投与群で対照範囲からの逸脱は 2 例でそれぞれ 1048 および 1070g/L であった）。

投与の影響と判断されたその他の変化は認められなかった。

臓器重量；投与期間終了後に全動物を対象として以下の臓器重量（絶対重量）を測定した。

副腎、脾臓、脳、精巣、精巣上体、胸腺、心臓、上皮小体を伴った甲状腺、腎臓、肝臓、卵巣、子宮頸を伴った子宮

試験群内で臓器重量と体重との相関が 10%水準で有意である場合には、臓器重量については最終体重で補正し、共変量とした分散分析を行った。

統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別	投与量 (ppm)	雄			雌		
		300	1250	5000	300	1250	5000
脳*	絶対重量						↓96
	相対重量*						↑116
肝臓*	絶対重量						↑119
	相対重量*						

表中の数字は対照群を 100 とした場合の値を示す
Williams 検定 ↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01
*: 相対重量は申請者が算出し、統計検定（共分散分析後、Dunnnett 又は Steel の検定法/両側；↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01）を実施した。
*: 補正重量計算なし

5000 ppm 投与群の雌では平均絶対肝重量の有意な増加および平均絶対脳重量の減少が認められたが、1 例（動物番号 56）の異常値によるものであり、他の動物の個体別値は概ね対照値の範囲内であったため、投与に関連したものとは判断されなかった（申請者追記：脳重量の対照群値の範囲；1.83～2.04g、動物番号 56；1.81g、5000ppm 投与群のその他の雌は対照値の範囲内であった。肝重量の対照群値の範囲；9.22～12.72g、動物番号 56；19.63g、5000ppm 投与群のその他の雌では対照範囲からの逸脱は 3 例でそれぞれ 12.80、12.87 および 13.44g であった）。

その他の臓器および投与群では変化は認められなかった。

病理学的検査；13週間の投与終了後に全動物を二酸化炭素吸入により屠殺し、剖検を行った。
病理組織学的検査は実施しなかった。

全投与群において、投与に起因した変化は認められなかった。

以上の結果より、1250あるいは5000ppm投与群の雄において、ALTおよびASTの減少およびアルブミン濃度の増加が認められ、雌では白血球分画の増加による白血球数の増加が認められた。5000ppm投与群の雄では小赤血球症の増加もみられた。これら所見の原因は不明であったが、毒性影響を示すものではないと判断される。

(申請者注：これらの値はいずれも背景データの範囲内であり、平均値は背景データの平均値を下回っていたため、投与の影響ではないと考えられる。白血球数の背景データの範囲(平均)；3.08-18.41(8.807)、リンパ球；2.47-15.43(7.104)、単球；0.05-0.64(0.228)、大型非染色球；0.01-0.52(0.120))。

従って、代謝物 LGC-35523 (G) のラットにおける飼料混入投与による90日間反復経口投与毒性試験について毒性影響は認められなかったことから、無毒性量 (NOAEL) は5000 ppm (平均検体摂取量：雄 326.69 mg/kg/日、雌 367.48mg/kg/日) と判断した。

3) 代謝物 LGC-35523 (G) の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-33)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2003 年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100 株) と、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 (CM891) 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、1 回目の試験は 5~5000 µg / プレートの範囲の 7 濃度でプレート法により実施し、2 回目の試験は 50~5000 µg / プレートの範囲の 5 濃度でプレインキュベーション法により実施した。試験は 3 反復で行った。

試験結果：結果を表 1 および 2 に示す。

2 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5000 µg / プレート) においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)、2-アミノアントラセンおよびベンツ[a]ピレンはすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、本剤は代謝活性化系の有無に関わらず本試験条件下で、復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

表 1.1 回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照(DMSO)		-	174	17	115	37	17	
検体	5000	-	90	21	106	47	21	
	1500	-	167	21	116	43	10	
	500	-	159	22	126	32	14	
	150	-	153	30	104	44	17	
	50	-	149	21	109	42	14	
	15	-	158	22	103	36	18	
	5	-	132	20	107	36	20	
対照(DMSO)		+	166	18	175	55	34	
検体	5000	+	167	17	148	57	27	
	1500	+	175	9	180	47	35	
	500	+	178	26	184	56	26	
	150	+	144	18	204	50	28	
	50	+	162	21	176	53	37	
	15	+	156	22	183	47	41	
	5	+	156	16	175	59	32	
陽性 対照	ベンツ[a]ピレン	5	+	1113	-	-	771	289
	2-ニトロフルオレン	1	-	-	-	-	546	-
	アジ化ナトリウム	0.5	-	750	380	-	-	-
	2-アミノアントラセン	2	+	-	310	-	-	-
	2-アミノアントラセン	10	+	-	-	1467	-	-
	9-アミノアクリジン	30	-	-	-	-	-	1156
	AF-2	0.05	-	-	-	671	-	-

表中数値は3反復の平均値

試験はプレート法で実施した (インキュベーション約 72 時間、37°C)

DMSO : ジメチルスルホキシド

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

表 2.2 回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)		-	119	27	95	41	9	
検体	5000	-	203	21	98	55	11	
	1500	-	148	27	109	47	13	
	500	-	112	20	119	49	14	
	150	-	132	27	117	42	15	
	50	-	150	24	133	43	8	
溶媒対照(DMSO)		+	114	14	174	59	38	
検体	5000	+	167	28	168	67	30	
	1500	+	166	20	195	55	43	
	500	+	150	19	178	63	38	
	150	+	158	12	198	57	33	
	50	+	141	19	139	67	36	
陽 性 対 照	ベンツ[a]ピレン	5	+	721	-	-	482	246
	2-ニトロフルオレン	1	-	-	-	-	604	-
	アジ化ナトリウム	0.5	-	546	435	-	-	-
	2-アミノアントラセン	2	+	-	164	-	-	-
	2-アミノアントラセン	10	+	-	-	1036	-	-
	9-アミノアクリジン	30	-	-	-	-	-	368
	AF-2	0.05	-	-	-	318	-	-

表中数値は3反復の平均値

試験はプレインキュベーション法で実施した(プレインキュベーション30分+インキュベーション約72時間、37℃)

DMSO:ジメチルスルホキシド

AF-2:2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

4) 代謝物 LGC-35523 (G) のヒト末梢リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-34)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd. (英国)

報告書作成年：2003 年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒト末梢リンパ球細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下において染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個 (2 反復) の分裂中期像について行い、試験は 2 回行った。

試験用量：

試験 1：S9 mix の存在下および非存在下 (処理 3 時間、回復 17 時間)、488、976 および 1952 $\mu\text{g}/\text{mL}$

試験 2：S9 mix 非存在下 (処理 20 時間)、976、1464 および 1952 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S9 mix 存在下 (処理 3 時間、回復 17 時間)、976、1464 および 1952 $\mu\text{g}/\text{mL}$

溶媒対照はジメチルスルホキシド (DMSO) および陽性対照は S9 mix 非存在下ではマイトマイシン C (MMC)、存在下ではシクロホスファミド (CP) を用いた。

試験結果：結果を表 1 および 2 に示す。

1 回目の試験では染色体異常を有する細胞の比率に関して、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

2 回目の試験においても、染色体異常を有する細胞の比率に関して溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

両試験において溶媒対照群と染色体異常解析を行った最高濃度群に対して倍数体出現頻度を求めたところ、S9 mix の有無に関わらず有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照は両試験とも、染色体異常を示す中期分裂細胞数の明らかな増加を示した。

以上の結果から、本剤は代謝活性化系の有無に関わらず本試験条件下で、染色体異常誘発性を有さないと判断される。

表 1.1 回目試験の結果—分裂指数データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時 間 (hr)	回復時 間 (hr)	観察 細胞数	S-9 Mix の 有無	分裂指数 平均 (%)	相対 分裂指数 (%)	倍数体の 出現頻度 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	3	17	2000	-	9.6	100	0.0
検体	122	3	17	2000	-	9.2	96	
	244	3	17	2000	-	8.5	89	
	488	3	17	2000	-	7.7	80	
	976	3	17	2000	-	7.9	82	
	1952	3	17	2000	-	7.0	73	0.4
溶媒対照 (DMSO)	-	3	17	2000	+	8.7	100	0.2
検体	122	3	17	2000	+	7.6	87	
	244	3	17	2000	+	7.8	90	
	488	3	17	2000	+	8.0	92	
	976	3	17	2000	+	9.2	106	
	1952	3	17	2000	+	7.6	87	0.0

表中数値は 2 反復の平均値

1 培養あたり 1000 個の分裂中期像を観察

Fisher の直接確率計算法：*** $p < 0.001$

DMSO：ジメチルスルホキシド

表 1.1 回目試験の結果(続き) - 分裂中期像解析データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処 理 時 間 (hr)	回復 時間 (hr)	観察 細胞 数	S-9 Mix の 有 無	染色体異常を有する細胞数						異常細胞数				
						染色分体型			染色体型			そ の 他	ギ ャ ブ を 除 く	平均 %	ギ ャ ブ を 含 む	平均 %
						ギ ャ ブ	切 断	交 換	ギ ャ ブ	切 断	交 換					
溶媒対照 (DMSO)	-	3	17	100	-	1				1	2	2.0	3	3.0		
				100	-	1	1			1	2		3			
検体	488	3	17	100	-	1	4				4	2.5	5	4.5		
				100	-	3				1	1		4			
	976	3	17	100	-						0	0.5	0	0.5		
				100	-		1				1		1			
	1952	3	17	100	-		1			1	2	1.5	2	2.0		
				100	-		1		1		1		2			
陽性対照 (MMC)	0.2	3	17	50	-	5	4	2		2	8	20.0	10	22.0		
				50	-	1	5	6		5	12		***		12	***
溶媒対照 (DMSO)	-	3	17	100	+	2				1	1	1.0	3	3.0		
				100	+	3	1				1		3			
検体	488	3	17	100	+		3				3	1.5	3	2.0		
				100	+	1					0		1			
	976	3	17	100	+						0	1.0	0	1.0		
				100	+		2				2		2			
	1952	3	17	100	+		2	2			3	1.5	3	2.0		
				100	+	1					0		1			
陽性対照 (CP)	10	3	17	50	+	1	11	1	1	2	11	24.0	13	26.0		
				50	+		12	2		2	13		***		13	***

その他：細粉化した細胞や染色体等 8 個以上の異常を含む細胞

Fisher の直接確率計算法：*** $p < 0.001$

DMSO：ジメチルスルホキシド

MMC：マイトマイシン C

CP：シクロホスファミド

表 2.2 回目試験の結果-分裂指数データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時 間 (hr)	回復時 間 (hr)	観察 細胞数	S-9 Mix の 有無	分裂指数 平均 (%)	相対 分裂指数 (%)	倍数体の 出現頻度 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	20	-	2000	-	4.6	100	0.0
検体	122	20	-	2000	-	3.4	74	
	244	20	-	2000	-	4.2	91	
	488	20	-	2000	-	4.1	89	
	976	20	-	2000	-	4.6	100	
	1464	20	-			3.5	76	
	1952	20	-	2000	-	3.3	72	0.2
溶媒対照 (DMSO)	-	3	17	2000	+	5.9	100	0.0
検体	488	3	17	2000	+	5.2	88	
	976	3	17	2000	+	6.3	107	
	1464	3	17	2000	+	5.3	90	
	1952	3	17	2000	+	5.8	98	0.2

表中数値は2反復の平均値

1培養あたり1000個の分裂中期像を観察

Fisherの直接確率計算法: *** $p < 0.001$

DMSO: ジメチルスルホキシド

表 2.2 回目試験の結果 (続き) - 分裂中期像解析データ

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間 (hr)	回復 時間 (hr)	観察 細胞 数	S-9 Mix の 有 無	染色体異常を有する細胞数						異常細胞数				
						染色分体型			染色体型			そ の 他	ギ ャ ブ を 除 く	平均 %	ギ ャ ブ を 含 む	平均 %
						ギ ャ ブ	切 断	交 換	ギ ャ ブ	切 断	交 換					
溶媒対照 (DMSO)	-	20	-	100	-	1						0	0.5	1	1.0	
				100	-		1				1	1				
検体	976	20	-	100	-		1					1	0.5	1	1.0	
				100	-	1					0	1				
	1464	20	-	100	-							0	0.5	0	0.5	
				100	-		1				1	1				
	1952	20	-	100	-	1						0	1.0	1	1.5	
				100	-		1			1	2	2				
陽性対照 (MMC)	0.1	20	-	50	-		10	4				13	22.0	13	23.0	
				50	-		8	1	1	3	9	***		10		***
溶媒対照 (DMSO)	-	3	17	100	+		1					1	1.0	1	1.5	
				100	+	1	1		1		1	2				
検体	976	3	17	100	+	1	2					2	1.0	3	1.5	
				100	+						0	0				
	1464	3	17	100	+		1					1	1.0	1	1.5	
				100	+	1	1				1	2				
	1952	3	17	100	+							0	0.0	0	0.5	
				100	+	1					0	1				
陽性対照 (CP)	10	3	17	50	+	1	6	1	1	1		8	18.0	10	20.0	
				50	+		11			2	10	***		10		***

その他：細粉化した細胞や染色体等 8 個以上の異常を含む細胞

Fisher の直接確率計算法：*** $p < 0.001$

DMSO：ジメチルスルホキシド

MMC：マイトマイシン C

CP：シクロホスファミド

3.製剤毒性

1) 急性毒性

ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.F-01)

試験機関：(株) DIMS 医科学研究所

報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

検体の純度：エタポキサム 12.5%フロアブル (有効成分実測値 12.7%)

(組成) エタポキサム原体 ; 12.5%

有機溶剤、界面活性剤、水等 ; 87.5%

試験動物：Cri:CD SD 系ラット、1群雌3匹 (2反復)、9週齢、

開始時体重 第1群 216g (214~219g)、第2群 234.7g (233~237g)

試験期間：14日間観察

試験方法：毒性等級法

投与方法：絶食させたラットに本製剤2000 mg/kgの用量を1.90 mL/kg体重の液量で単回強制経口投与した。

試験項目：一般状態および生死を投与直前、投与後5、15、30分、1、2、4および6時間、投与の翌日以降は1日2回観察を行い14日まで観察を続けた。

体重は投与直前、投与後1、3、5、7および14日に測定した。

試験終了時に全ての供試ラットをエーテル麻酔下で放血致死させ、肉眼的病理学検査を実施した。

結果：

投与方法	経口
性別	雌
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時期 および消失時期	症状発現なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000

死亡例は認められず、観察期間を通して一般状態に変化はみられなかった。

体重推移および肉眼的病理所見では異常は認められなかった。

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No.F-02)

試験機関：(株) DIMS 医科学研究所

報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

検体の純度：エタボキサム 12.5%フロアブル (有効成分実測値 12.7%)

(組成) エタボキサム原体 ; 12.5%

有機溶剤、界面活性剤、水等 ; 87.5%

試験動物：Cri:CD SD 系ラット、1群雌雄各5匹、開始時週齢 雄7週齢、雌9週齢

開始時体重 雄 246.8g (237~260g)、雌 234.0g (227~240g)

試験期間：14日間観察

試験方法：本製剤 2000 mg/kg の用量を 1.90 mL/kg 体重の液量を 4枚重ねのガーゼ(4×5cm)に塗布し、剃毛した背部皮膚に 24時間閉塞貼付した。ガーゼ除去後、適用部位を清拭した。

試験項目：一般状態および生死を投与直前、投与後 5、15、30分、1、2、4 および 6時間、投与の翌日以降は 1日 2回観察を行い 14日まで観察を続けた。

体重は投与直前、投与後 1、3、5、7 および 14日に測定した。

試験終了時に全ての供試ラットをエーテル麻酔下で放血致死、肉眼的病理学検査を実施した。

結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	2000	
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000	
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし	
症状発現時期 および消失時期	症状発現なし	
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	2000

雌雄とも死亡は認められず、一般状態、体重および肉眼的病理所見に変化はみられなかった。

2) 皮膚および眼に関する刺激性
ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 No. F-03)

試験機関：(株) 富士バイオメディックス
報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

検体の純度：エタポキサム 12.5%フロアブル (有効成分実測値 12.7%)

(組成) エタポキサム原体 ; 12.5%
有機溶剤、界面活性剤、水等 ; 87.5%

試験動物：日本白色種ウサギ(Kbl:JW、SPF)、1群雄3匹、開始時週齢 10週齢
馴化終了時体重；1.90~2.21kg

観察期間：72時間

試験方法：検体 0.5 mL をリント布 (約 2.5×2.5cm) に塗布し、剃毛した背部皮膚に4時間閉塞貼付した。リント布除去後、適用部位を清拭した。未処置部分を対照として観察、評価した。

試験項目：検体除去後 30分、24、48 および 72 時間後に投与部位の刺激性反応 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無を観察し、試験法ガイドラインの基準 (2000年) に従って採点し、皮膚一次刺激評点を算出した。
一般状態は3日後まで1日1回観察を行った。

結果：観察した刺激性変化の採点は下表のとおりである。

動物番号	項目	最高評点	検体除去後時間			
			30分	24時間	48時間	72時間
1101	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	12	0	0	0	0
	浮腫	12	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

いずれの観察時点でも、刺激性反応は認められず、皮膚一次刺激評点は0であった。

2匹が餌を食べ残した以外は、一般状態および体重に特記すべき変化はみられなかった。

以上の結果から、本剤は、ウサギの皮膚に対して刺激性がないと判断された。

ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 No. F-04)

試験機関：(株)富士バイオメディックス
報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

検体の純度：エタポキサム 12.5%フロアブル (有効成分実測値 12.7%)

(組成) エタポキサム原体 ; 12.5%
有機溶剤、界面活性剤、水等 ; 87.5%

試験動物：日本白色種ウサギ(Kbl:JW、SPF)、1群雄6匹、開始時週齢 10週齢
非洗眼群；3匹、洗眼群；3匹、馴化終了時体重；2.12～2.32kg

観察期間：72時間

試験方法：検体 0.1 mL を右眼の結膜嚢内に投与した。左眼は無処置対照とした。
洗眼群は検体投与 30 秒後に生理食塩水で 30 秒間洗眼した。

試験項目：全例について、投与後 1、24、48 および 72 時間後に左眼を対照として、肉眼あるいは検眼鏡を用いて前眼部検査 (角膜、虹彩、結膜) ならびに投与後 24 時間にフローレス試験紙を用いて角膜異常の有無について検査し、Draize の判定基準に従って刺激性を評価した。刺激性の評価は Kay and Calandra の方法で行った。一般状態は 1 日 1 回観察した。

結果：観察した刺激性変化の採点を表 1 に示した。

角膜および虹彩の刺激性変化は洗眼群、非洗眼群ともに認められなかった。

結膜の刺激性変化は非洗眼群では、投与 1 時間後に結膜の発赤(2/3)、結膜浮腫(全例)が認められた。投与 24 時間後には、結膜の発赤(2/3)、結膜浮腫(2/3)が認められたが、投与 48 時間後には、結膜の発赤(2/3)は認められたが結膜浮腫は消失した。投与 72 時間後には、全例の刺激性反応が消失した。平均刺激評点の最大値は投与 1 時間後の 3.3 であった。

洗眼群では、投与 1 時間後に結膜発赤(全例)および結膜浮腫(全例)が認められたが、投与 24 時間後には、全例で刺激性反応は消失した。平均刺激評点の最大値は投与 1 時間後の 4.0 であった。

一般状態は 2 例に少量の残餌がみられた以外、観察期間を通して変化はみられなかった。

以上の結果から、本剤はウサギの眼粘膜に対して、極く軽度の刺激性がありと判断され、洗眼効果が認められた。

表1 刺激性変化の評点結果

項目			最高 評点	適用後時間				
				1時間	24時間後	48時間後	72時間後	
非 洗 眼 群	動物 番号 1101	角膜	混濁	4	0	0	0	0
			範囲	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	0
			浮腫	4	1	1	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0
	動物 番号 1102	角膜	混濁	4	0	0	0	0
			範囲	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0
	動物 番号 1103	混濁	混濁	4	0	0	0	0
			範囲	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
結膜		発赤	3	1	1	0	0	
		浮腫	4	1	1	1	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	
3匹の合計*			330	10	8	4	0	
3匹の平均			110	3.3	2.7	1.3	0	
洗 眼 群 (3匹 平均)	角膜	混濁	4	0	0	0	0	
		範囲	4	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	
		浮腫	4	1	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	
合計*			110	4	0	0	0	

*: 次式で算出した 固体値=角膜混濁×範囲×5+虹彩異常×5+ (発赤+浮腫+分泌物) ×2

3) 皮膚感作性

モルモットにおける皮膚感作性試験 (Buehler 法)

(資料 No. F-05)

試験機関: (株) 富士バイオメディックス

報告書作成年: 2007 年 [GLP 対応]

検体の純度: エタボキサム 12.5%フロアブル (有効成分実測値 12.7%)

(組成) エタボキサム原体 ; 12.5%

有機溶剤、界面活性剤、水等 ; 87.5%

試験動物: Std:Hertley 系モルモット、雄 30 匹 (感作群: 20 匹、非感作群: 10 匹)、

6 週齢 (感作開始時)、開始時体重: 370~429g

観察期間: 48 時間

試験方法: Buchler 法を用いて皮膚感作性を評価した。

投与量設定根拠: 製剤原液ならびに製剤の 25、50 および 75 v/v% 希釈液を 6 時間閉塞貼付した結果、いずれの濃度でも刺激性変化がみられなかったことから、感作および惹起の投与に原液を設定した。

感作: 剃毛した肩部の約 2×3cm の適用部位に検体の原液 0.2 mL を適用し、リント布で覆い、6 時間閉塞した。これらの操作を 7 日間隔で計 3 回行った。陰性対照群には、投与群と同様の方法で注射用水 0.2 mL を適用した。陽性対照群には、投与群と同様の方法で 1% DNCB オリーブ油溶液 0.2 mL を適用した。

惹起: 最終感作の 14 日後に、剃毛した腹側部 (約 1.5×1.5cm) に検体感作群および陰性対照群は検体の原液、陽性対照群には 0.5% DNCB およびワセリンをそれぞれ 0.2 mL を適用し、リント布で覆い、6 時間閉塞した。

試験項目: 惹起 24 および 48 時間後に適用部位の皮膚反応を観察し、試験法ガイドラインの基準 (2000 年) に従って観察した。

一般状態は全例について 1 日 1 回観察した。体重測定は全例について感作開始日および最終観察日に測定した。

結果: 各観察時間における平均皮膚反応評点および感作陽性率を表 1 に示した。

感作群および陰性対照群ともに惹起 24 および 48 時間後の観察において、いずれの動物にも皮膚反応は認められず、平均皮膚反応評点は 0、陽性率は 0% であった。

一方陽性対照群では明らかな皮膚反応が認められた。

一般状態及び体重に特記すべき変化はみられなかった。

以上の結果から、本剤は本試験条件下ではモルモットに対して皮膚感作性はないと判断された。

表1 皮膚反応評点および感作陽性率

	群		供試動物数	24 時間後			48 時間後		
	感作	惹起		皮膚反応 評点 (平均)	陽性 動物数	陽性率 (%)	皮膚反応 評点 (平均)	陽性 動物数	陽性率 (%)
検体	検体 原液	検体原液	20	0	0	0	0	0	0
	注射 用水	検体原液	10	0	0	0	0	0	0
陽性 対照*	1% DNCB	0.5% DNCB	10	1.9	10	100	2.0	10	100
		ワセリン	10	0	0	0	0	0	0

*陽性対照群 DNCB : 2, 4-ジニトロクロロベンゼン

IX 動植物および土壌等における代謝分解<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁																																											
M-01 (GLP)	動物代謝 吸収分布代謝排泄	ラット	<p>[投与方法] -チアソール標識エタボキサム ([Tz-¹⁴C]標識体) -チオフェン-2-メチレン-¹⁴C 標識エタボキサム ([Tp-¹⁴C]標識体)</p> <p>単回強制経口投与 低用量 10 mg/kg 高用量 150 mg/kg</p> <p>14日間反復強制経口投与用量 10 mg/kg ([Tz-¹⁴C]標識体のみ)</p> <p>吸収：血漿・血球中濃度推移を測定 (雌雄各4匹)</p> <p>分布：最終投与後120時間の組織分布を調査 (雌雄各4匹)。</p> <p>代謝：0-6、6-24、24-48、0-48時間の糞尿、0-48時間の胆汁および最終投与後120時間の肝臓の代謝物をHPLCで分析 (雌雄各4匹)。</p> <p>反復投与群は1日(0-24)、7日(0-24)、14日(0-48)の糞尿および最終投与後120時間の肝臓を分析。</p>	<p>血漿・血液中：</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>Cmax (μg/g)</th> <th>Tmax (時間)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">低用量</td> <td>血漿 雄</td> <td>2.23-2.31</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>血漿 雌</td> <td>2.80-3.09</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>血球 雄</td> <td>1.08-1.16</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>血球 雌</td> <td>1.81-1.90</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">反復</td> <td>血漿 雄</td> <td>3.08</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>血漿 雌</td> <td>3.81</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>血球 雄</td> <td>3.37</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>血球 雌</td> <td>5.14</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">高用量</td> <td>血漿 雄</td> <td>14.5-17.8</td> <td>3-4</td> </tr> <tr> <td>血漿 雌</td> <td>19.7-21.0</td> <td>4-6</td> </tr> <tr> <td>血球 雄</td> <td>9.13-12.4</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>血球 雌</td> <td>14.9-17.0</td> <td>4-6</td> </tr> </tbody> </table> <p>吸収は標識体、用量間に差はなく速やかであった。薬物動態パラメータは性差および標識体間に差はないが、用量間および単回/反復投与間で差が認められた。</p> <p>投与120時間後に血漿比が高レベルであった組織は、甲状腺 ([Tz-¹⁴C])、肝臓、腎臓および血球であった。反復投与後の放射能濃度は単回投与に比べて5-15倍高かった。</p> <p>糞中主代謝物は硫酸抱合体、未変化体および硫酸抱合体の水酸化物であった。尿中代謝物は共通にエノール体の加水分解物 LGC-32801 (D)、LGC-32800 (C) が検出された。胆汁中には LGC-32794 (B) が検出された。</p> <p>肝臓では代謝物を同定出来なかった。</p>			Cmax (μg/g)	Tmax (時間)	低用量	血漿 雄	2.23-2.31	1-2	血漿 雌	2.80-3.09	1-2	血球 雄	1.08-1.16	1-2	血球 雌	1.81-1.90	2	反復	血漿 雄	3.08	3	血漿 雌	3.81	1	血球 雄	3.37	3	血球 雌	5.14	2	高用量	血漿 雄	14.5-17.8	3-4	血漿 雌	19.7-21.0	4-6	血球 雄	9.13-12.4	4	血球 雌	14.9-17.0	4-6	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2003年)	M-14
		Cmax (μg/g)	Tmax (時間)																																														
低用量	血漿 雄	2.23-2.31	1-2																																														
	血漿 雌	2.80-3.09	1-2																																														
	血球 雄	1.08-1.16	1-2																																														
	血球 雌	1.81-1.90	2																																														
反復	血漿 雄	3.08	3																																														
	血漿 雌	3.81	1																																														
	血球 雄	3.37	3																																														
	血球 雌	5.14	2																																														
高用量	血漿 雄	14.5-17.8	3-4																																														
	血漿 雌	19.7-21.0	4-6																																														
	血球 雄	9.13-12.4	4																																														
	血球 雌	14.9-17.0	4-6																																														

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁															
			<p>排泄：120 時間の糞尿排泄量を測定した (雌雄各 4 匹)。</p> <p>胆汁排泄：胆管カニューレ挿管ラットで 48 時間の胆汁および糞尿への排泄量を測定 (雌雄各 4 匹)。</p>	<p>120 時間後の総回収率は 97.38-105.13%。</p> <p>低用量 糞 66-77% 尿 27-30% 高用量 糞 82-92% 尿 13-17% 反復 糞 73-74% 尿 23-26%</p> <p>糞が主排泄経路であり、呼吸排泄わずかであった。カーカス残留量は低用量および高用量で<1%、反復で 2-3%。排泄経路および速度に性および標識体間で差はなく速やかであった。</p> <p>胆汁排泄率；</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>低用量</th> <th>高用量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>胆汁</td> <td>37-45%</td> <td>26-35%</td> </tr> <tr> <td>尿</td> <td>24-32%</td> <td>21-22%</td> </tr> <tr> <td>糞</td> <td>15-22%</td> <td>27-40%</td> </tr> <tr> <td>吸収率</td> <td>71-72%</td> <td>48-61%</td> </tr> </tbody> </table> <p>胆汁排泄に性差・標識体間差なし。用量間差が認められた。</p>		低用量	高用量	胆汁	37-45%	26-35%	尿	24-32%	21-22%	糞	15-22%	27-40%	吸収率	71-72%	48-61%		
	低用量	高用量																			
胆汁	37-45%	26-35%																			
尿	24-32%	21-22%																			
糞	15-22%	27-40%																			
吸収率	71-72%	48-61%																			
M-02 (GLP)	動物代謝 組織内分布	ラット	<p>[投与方法] -[Tz-¹⁴C]標識体 -[Tp-¹⁴C]標識体</p> <p>単回強制経口投与 低用量 10 mg/kg 高用量 150 mg/kg</p> <p>分布：最終投与後 2、24、120 時間 (低用量) および 4、24、120 時間 (高用量) の組織分布を調査 (雌雄各 3 匹)。</p>	<p>[Tz-¹⁴C]標識体あるいは[Tp-¹⁴C]標識体 10 mg/kg 投与では、肝臓、腎臓に最高濃度が認められ、投与 120 時間後では、両用量群とも全組織中の濃度は<1µg/g であった。150 mg/kg 投与群でも同様の結果が得られた。</p> <p>標識体相当量の経時的組織濃度および消失は、雌雄、標識体位置に関わらず類似していた。</p> <p>[Tz-¹⁴C]標識体投与群の甲状腺組織において、これらと異なる傾向を示し、投与 120 時間後まで投与エタボキサムの濃度変化は小さかった。しかし、甲状腺の濃度は低く、全採取時点で投与量の<0.01%であった。</p>	WIL Research Laboratories, LLC (米国, 2009 年)	M-42															

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
M-03 (GLP)	植物代謝	ぶどう	[Tz- ¹⁴ C] 標識体および [Tp- ¹⁴ C] 標識体を 250 gai/ha の量で 5 回 茎葉散布し、経時的に果実を採取、最終的に第 1 回処理から 46 日後の果実および 茎葉部を採取し、HPLC および TLC で分析した。	放射能残留量 (最終茎葉散布 14 日後 (収穫時)) [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 果実 0.535 ppm 葉部 29.5 ppm [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 果実 0.845 ppm 葉部 34.9 ppm 移行性確認のための保護果実 [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 0.137 ppm [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 0.104 ppm 代謝物 (果実) [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 エタボキサム (A) 29.4%TRR 主な極性画分 28.5%TRR (4 成分) [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 エタボキサム (A) 27.4%TRR 主な極性画分 14.5%TRR (2 成分) LGC-35523 (G) 18.4%TRR	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2003 年)	M-53
M-04 (GLP)	植物代謝	ばれいしょ	[Tz- ¹⁴ C] 標識体および [Tp- ¹⁴ C] 標識体を 250 gai/ha の量で 5 回 茎葉散布し、経時的に塊茎および葉部を採取、最終的に第 1 回目処理から 46 日後の塊茎および葉部を HPLC および TLC で分析した。	放射能残留量 (最終茎葉散布 14 日後 (収穫時)) [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 塊茎 0.073 ppm 葉部 11.4 ppm [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 塊茎 0.029 ppm 葉部 7.02 ppm 代謝物 (塊茎中) エタボキサム (A) <1.3-2.7%TRR 主残留物 (未同定、極性画分) 58.4-64.2%TRR 収穫時塊茎中の放射能 (DMSO/水抽出による澱粉抽出) 澱粉 41.2-42.9%TRR グルコース 38.1-39.3%TRR グルコサゾン 18.3-22.8%TRR	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2002 年)	M-67

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
M-05 (GLP)	植物代謝	トマト	[Tz- ¹⁴ C] 標識体および [Tp- ¹⁴ C] 標識体を 200 gai/ha の量で3回 茎葉散布し、経時的に果実を採取、最終的に第1回目処理から37日後の果実および葉部を採取し、HPLC および TLC で分析した。	放射能残留量 (最終茎葉散布 21 日後 (収穫時)) [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 果実 0.399 ppm 葉部 55.2 ppm [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 果実 0.685 ppm 葉部 54.6 ppm 保護果実区 (移行性試験) [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 0.053 ppm [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 0.016 ppm 代謝物 [Tz- ¹⁴ C] 標識体処理区 エタボキサム (A) 49.2% TRR 主な極性画分 17.4% TRR (6 成分、4.3% 以下) [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区 エタボキサム (A) 57.7% TRR 主な極性画分 10.3% TRR (3 成分、4.3% 以下) LGC-35523 (G) 3.9% TRR	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2004 年)	M-79

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
M-06	好氣的 湛水土壌			水田において使用されないため試験省略		M-88
M-07 (GLP)	好氣的 土壌代謝	砂壤土	[Tz- ¹⁴ C]標識体および [Tp- ¹⁴ C]標識体を約 250g ai/ha 相当 (約 0.34 ppm) 処理し、180 日間インキュベーション (畑条件下 (水分張力 pF 2、20℃、暗所下)) した。標識体の消長を測定し、HPLC および TLC で代謝物を分析し、土壌抽出残渣は酸/アルカリ抽出し、LSC 分析した。	エタボキサム (A) の推定半減期 1.5 日 (一次速度式モデル) 1.8 日 (二相性指数関数モデル) エタボキサム (A) はインキュベーションの時間とともに減少した。代謝物 LGC-32533 (I) が [Tz- ¹⁴ C] および [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理区の 2 日目の試料に、それぞれ最大で 5.2% AR および 4.2% AR 認められた。LGC-32525 (H) も両標識体処理土壌から処理量の 1.4% AR 検出された。これらの代謝物は無機化による二酸化炭素への変換経路の中間体と考えられた。他の放射性成分はどの試料採取時においても 5.8% AR を超えることはなかった。	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2002 年)	M-89
M-08 (GLP)	好氣的 土壌代謝 (分解速度検討)	砂壤土 埴壤土 砂質シルト壤土	[Tz- ¹⁴ C]標識体 (約 0.33 ppm) を約 250g ai/ha 相当 (約 0.33 ppm) 処理し、120 日間インキュベーション (畑条件下 (水分張力 pF 2、20℃ および 10℃、暗所下)) した。 ¹⁴ C 標識体の消長を測定し、代謝物を HPLC および TLC で分析した。土壌抽出残渣は酸/アルカリ抽出し、LSC 分析した。	エタボキサム (A) の推定半減期 砂質シルト壤土 (20℃) 1.1 日 砂質シルト壤土 (10℃) 6.1 日 砂壤土 (20℃) 0.6 日 埴壤土 (20℃) 4.4 日 Sheringham 土壌 (砂質シルト壤土) において、20℃ および 10℃ でインキュベーションした場合、分解速度は温度の低下とともに減少した。 エタボキサム (A) はインキュベーションの時間とともに減少した。全ての供試土壌中で、エタボキサム (A) のほかに LGC-32533 (I) が検出され、14 日目の Evesham 3 土壌中に、最大で 6.6% AR が認められた。他の土壌中の全ての試料採取時においても、≤3.1% AR が認められた。LGC-32525 (H) も、全ての土壌中で検出されたが、0.6% AR を超えることはなかった。他の放射性成分は、どの採取時においても、8.3% AR を超えることはなかった。	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2003 年)	M-96
M-09	嫌氣的 土壌代謝	当該農薬は、好氣的土壌中における推定半減期が 100 日を超えないことから、好氣的土壌中における当該農薬の成分物質等の消失が速やかであるため試験省略				M-104

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
M-10 (GLP)	水/底質系における土壌代謝	埴埴土底質 砂質埴土底質	[Tz- ¹⁴ C]標識体および [Tp- ¹⁴ C]標識体 約 250g ai/ha 相当 (約 0.08 mg/L) を土壌へ処理し、20℃、暗所で 100 日間インキュベーションした。 ¹⁴ C 標識体の水/底質系における消長を測定し、HPLC で分析した。土壌抽出残渣は酸/アルカリ抽出し LSC 分析した。	エタボキサム (A) の推定半減期 埴埴土 水 6.0 日 水/底質 29 日 底質 81 日 砂質土 水 3.3 日 水/底質 12 日 底質 47 日 主代謝物である LGC-32533 (I) Bury Pond (埴埴土) では、[Tz- ¹⁴ C] 標識体および [Tp- ¹⁴ C] 標識体処理試料中、それぞれ、6.0% (水 1.1%+底質 4.9%) AR および 4.7% (水 1.2%+底質 3.5%) AR が最大値として検出された。Chatsworth Lake (砂質埴土) では、同様に、それぞれ、6.5% (水 2.7%+底質 3.8%) AR および 5.2% (水 2.7%+底質 2.5%) AR が検出された。LGC-32525 (H) も検出されたが、底質あるいは水のいずれにおいても <3% AR であった。 代謝物は未同定代謝物および二酸化炭素に無機化されると考えられた。	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2002 年)	M-105

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
M-11 (GLP)	水中運命 (加水分解)	滅菌緩衝液 pH 4, 7, 9	[Tz- ¹⁴ C]標識体および [Tp- ¹⁴ C]標識体を 5.0 mg/L の濃度で緩衝液に添加し、暗所、20℃で 30 日間インキュベーションした。標識体の消長を LSC 分析し、HPLC および TLC で代謝物を測定した。	<p>エタボキサム (A) の推定半減期 pH 4 : 194.4 日 pH 7 : 1348.7 日 pH 9 : 163.3 日</p> <p>pH4 および pH7 における主分解生成物は LGC-32533 (I) であり、[Tz-¹⁴C] 標識体および [Tp-¹⁴C] 標識体処理試料中、30 日後にそれぞれ回収放射能 (RR) の 7.0% (pH4) および 8.0% (pH4)、1.8% (pH7) であった。</p> <p>pH9 では、[Tz-¹⁴C] 標識体および [Tp-¹⁴C] 標識体処理試料中、主分解生成物として α-アミド化合物 (LGC-32525 (H)) が 30 日後に 6.5% RR および 7.6% RR が確認された。また微量の LGC-32523 (L) が検出された。 エタボキサム (A) は安定であった。</p>	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2002 年)	M-117
M-12 (GLP)	水中運命 (水中光分解)	滅菌緩衝液 pH 7	[Tz- ¹⁴ C]標識体および [Tp- ¹⁴ C]標識体を 5μg/mL 含む緩衝液に 20℃でキセノンアーク灯を用いて 143.62 時間照射し、標識体の消長を測定した。HPLC および TLC で代謝物を測定した。	<p>エタボキサム (A) の推定半減期 (東京春季太陽光換算) [Tz-¹⁴C]標識体 33.7 時間(6.99 日) [Tp-¹⁴C]標識体 30.6 時間(6.50 日) エタボキサム 32.2 時間(6.75 日(両標識体平均))</p> <p>主な分解生成物は、LGC-35525 (M) であり、[Tz-¹⁴C] 標識体および [Tp-¹⁴C] 標識体において、それぞれ最大値は 9.7% AR および 11.4% AR であった。</p>	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2003 年)	M-122
M-13 (GLP)	水中運命 (水中光分解)	滅菌自然水	[Tz- ¹⁴ C]標識体および [Tp- ¹⁴ C]標識体を 5mg/L 含む緩衝液に 25℃でキセノンアーク灯を用いて 72 時間照射し、標識体の消長を測定した。LC-MS、MS/MS および TLC で代謝物を測定した。	<p>エタボキサム (A) の推定半減期 (東京春季太陽光換算) [Tz-¹⁴C]標識体 12.7 時間(2.96 日) [Tp-¹⁴C]標識体 13.6 時間(3.17 日)</p> <p>[Tz-¹⁴C] 標識体処理区における分解生成物は、プロピオン酸 (Y) 33.6% AR および LGC-35525 (M) 10% AR であった。[Tp-¹⁴C] 標識体処理区における分解生成物は、2-チオフェンカルボン酸 (R) 13% AR および LGC-35525 (M) 10.6% AR であった。</p>	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2008 年)	M-129

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
M-14 (GLP)	土壌吸着	日本の4種類土壌 No.1: 砂丘未熟土 No.2: 黒ボク土 (火山灰土) No.3: 灰色低地土 No.4: 黒ボク土 (火山灰土)	濃度: 0.02、0.08、0.2、0.8 および 2mg/L 土壌/溶液比 (w/vol): 1/8 (No.1)、1/25 (No.2)、1/40 (No.3)、1/50 (No.4) 平衡化時間: 24 時間(No.3、4) 48 時間(No.1、2) 温度: 25℃	吸着等温パラメーター 土性 K _F ^{ads} K _{roc} ^{ads} No.1 No.2 No.3 No.4 2.31 8.02 13.0 14.8 335 251 903 286 土壌 No. 3 で有機炭素量により補正した吸着係数 (K _{roc} ^{ads}) が他の土壌よりもわずかに高かったが、エタポキサムが土壌吸着性を有すると判断するほどではなかった。	(財)化学物質評価研究機構 (2008年)	M-136
M-その他 (GLP)	水中運命 (加工処理条件下における加水分解)	緩衝液 pH 4、5、6	[Tz- ¹⁴ C]標識体および [Tp- ¹⁴ C]標識体を 1 µg/mL の濃度で以下条件下インキュベーションした。 標識体の消長を LSC 分析し、HPLC および TLC で代謝物を測定した。 pH 4、90℃、20 分 pH 5、100℃、60 分 pH 6、120℃、20 分	エタポキサム (A) は、インキュベーション終了時 120℃、pH 6 72.0-72.9% AR 100℃、pH 5 91.3-92.5% AR 90℃、pH 4 96.0-97.1% AR 加水分解の受けやすさの順序は、120℃ (殺菌処理条件下) > 100℃ (醸造・パン製造加熱・煮沸処理条件) > 90℃ (低温殺菌処理条件) であった。 [Tz- ¹⁴ C]標識体処理試料、120℃における主分解生成物は、LGC-32523 (L) で 16.8% AR であった。他の分解生成物は LGC-32533 (I) で 6.5% AR、LGC-32525 (H) 2.7% AR であった。 [Tp- ¹⁴ C]標識体処理試料、120℃における分解生成物は、LGC-32533 (I) で 6.7% AR、LGC-32525 (H) 2.7% AR であった。	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2002年)	M-143
M-参考 (GLP)	未知代謝物の同定に関する試験	—	HPLC、TLC、MS および NMR による代謝物の同定	各試験 (資料 No.M-01、M-03、M-07、M-10、M-11 および M-12) で同定された代謝物の確認および未同定代謝物の同定を行った。	Huntington Life Sciences Ltd. (英国、2003年)	M-147

<代謝分解物の名称および構造式一覧表>

記号	一般名または略称	化 学 名	構 造 式	由 来
[A]	エタボキサム (LGC-30473)	(RS)-N-(α -シアノ-2-テニ ル)-4-エチル-2-(エチルアミ ノ)-1,3-チアゾール-5-カルボ キサミド		親化合物

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

C

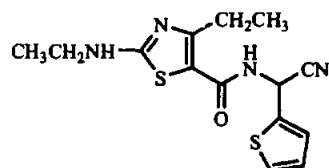
C

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

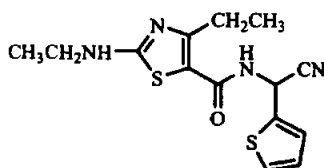
<各代謝試験で用いた供試標識化合物>

供試標識化合物：チアゾール環を ^{14}C で標識した (RS)-N-(α -シアノ-2-テニル)-4-エチル-2-(エチルアミノ)-1,3-チアゾール-5-カルボキサミド【チアゾール環 ^{14}C 標識エタボキサム】



* : ^{14}C 放射能標識位置

チオフェン-2-メチレン位を ^{14}C で標識した (RS)-N-(α -シアノ-2-テニル)-4-エチル-2-(エチルアミノ)-1,3-チアゾール-5-カルボキサミド【チオフェン-2-メチレン- ^{14}C 標識エタボキサム】



* : ^{14}C 放射能標識位置

1. 動物体内運命に関する試験

(1) ラットにおける代謝試験 (吸収・分布・排泄・代謝)

(資料 No.M-01)

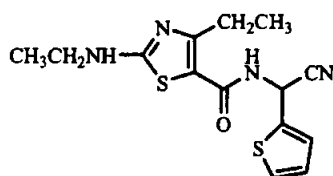
試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd (英国)

報告書作成年：2003年

[GLP 対応]

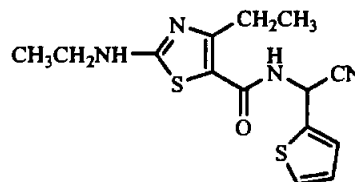
供試標識化合物：

構造式：



* : ^{14}C 放射能標識位置

チアゾール環 ^{14}C 標識エタボキサム
(以下、[Tz- ^{14}C] 標識エタボキサム)



* : ^{14}C 放射能標識位置

チオフェン-2-メチレン- ^{14}C 標識エタボキサム
(以下、[Tp- ^{14}C] 標識エタボキサム)

化学名：(RS)-N-(α -シアノ-2-テニル)-4-エチル-2-(エチルアミノ)-1,3-チアゾール-5-カルボキサミド

比放射能および放射化学的純度； 以下に表示する。

供試化合物	[Tz- ^{14}C] 標識エタボキサム	[Tp- ^{14}C] 標識エタボキサム
-------	---------------------------------	---------------------------------

供試動物：CrI:CD[®]BR SD 系ラット、1群雌雄各4匹、体重 182~263g

試験方法：

投与； [Tz- ^{14}C] 標識エタボキサムあるいは [Tp- ^{14}C] 標識エタボキサムを Tween 80 を 0.1 % 加えた 1% メチルセルロース液に溶解し投与液を調製した。低用量は 10 mg/kg、高用量は 150 mg/kg とし、単回強制経口投与した。また、10 mg/kg の用量で 14 日間反復経口投与した。

試験群の構成； 表 1 に示す。

表1 試験群の構成

グループ	試験項目	標識体	用量 (mg/kg)	投与 回数 経路	群数	群構成	採取試料および採取時点 (投与後時間)
1	予備試験/ 排泄	[Tz- ¹⁴ C]	10	単回 経口	1	雄1、雌1	尿; 0-6、6-24、24-48、48-72、72-96、96-120h
2	バランス	[Tp- ¹⁴ C]	10	単回 経口	1	雄1、雌1	糞; 0-24、24-48、48-72、72-96、96-120h 呼吸; 0-6、6-24、24-48、48-72、72-96、 96-120h ケージ洗浄液、カーカス; 120h
3	排泄/ 組織分布	[Tz- ¹⁴ C]	10	単回 経口	1	雄4、雌4	尿; 0-6、6-24、24-48、48-72、72-96、96-120h 糞; 0-24、24-48、48-72、72-96、96-120h 呼吸 ^a ; 0-24、24-48h ケージ洗浄液; 120h 血液、組織/臓器、カーカス; 120h (反復投与時は上記の他に投与1日およ び7日後に尿および糞を各24時間採取)
5			150	単回 経口	1	雄4、雌4	
13			10	14日反復 経口	1	雄4、雌4	
4		[Tp- ¹⁴ C]	10	単回 経口	1	雄4、雌4	
6			150	単回 経口	1	雄4、雌4	
7	胆汁排泄	[Tz- ¹⁴ C]	10	単回 経口	1	雄4、雌4 (+雄4) ^b	胆汁; 0-3、3-6、6-9、9-12、12-24、24-48h
8			150	単回 経口	1	雄4、雌4 (+雌4) ^b	尿、糞; 0-24、24-48h ケージ洗液、肝、GIT、カーカス; 48h
9	薬物動態	[Tz- ¹⁴ C]	10	単回 経口	3	雄4、雌4	血液; (試験群1); 投与前 ^c 、1、4、24、96h (試験群2); 0.25、2、6、48、120h (試験群3); 0.25 ^d 、3、12、72h (反復投与時は上記の他に投与7日(試 験群3)および14日(試験群1)直前に 血液採取)
11			150	単回 経口	3	雄4、雌4	
14			10	14日反復 経口	3	雄4、雌4	
10		[Tp- ¹⁴ C]	10	単回 経口	3	雄4、雌4	
12			150	単回 経口	3	雄4、雌4	

GIT: 消化管およびその内容物、

^a: [Tz-¹⁴C]のみ ^b: 追加動物(放射能回収率が低かったため)

^c: 反復投与時は採取せず ^d: 反復投与時は0.50h

放射能測定および分析；尿・血漿・ケージ洗液・捕集溶液は、直接液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。

全血および血球は、燃焼処理後に LSC で測定した。

糞は、アセトンで均一化し、超音波処理および遠心分離操作後に、上澄液をアセトンおよびアセトン：水（1：1、v/v）（2回）で抽出した。0～24時間の糞試料の抽出残渣については、アセトン：水（1：1、v/v）中で3時間加熱還流後、遠心分離操作を実施し、上澄液を LSC で測定した。糞残渣は燃焼処理後、LSC で測定した。

組織試料の肝臓、脾臓、消化管とその内容物および骨は燃焼処理後、LSC で測定した。

カーカスは、水、メタノールおよび水酸化ナトリウムを含む TritonX-405 で可溶化し、可溶化物を LSC で直接測定した。

その他の組織は、溶解液で可溶化した後、可溶化物にメタノールおよび permaflour を加え、LSC で測定した。

胆汁は、水を加え LSC で測定した。

肝試料については、図1に示す方法で抽出を行った。

尿、糞抽出物、胆汁および肝試料について、親化合物および代謝物は、HPLC で同定および定量し、また、TLC を用いて標準物質とのクロマトグラフィーにより同定した。

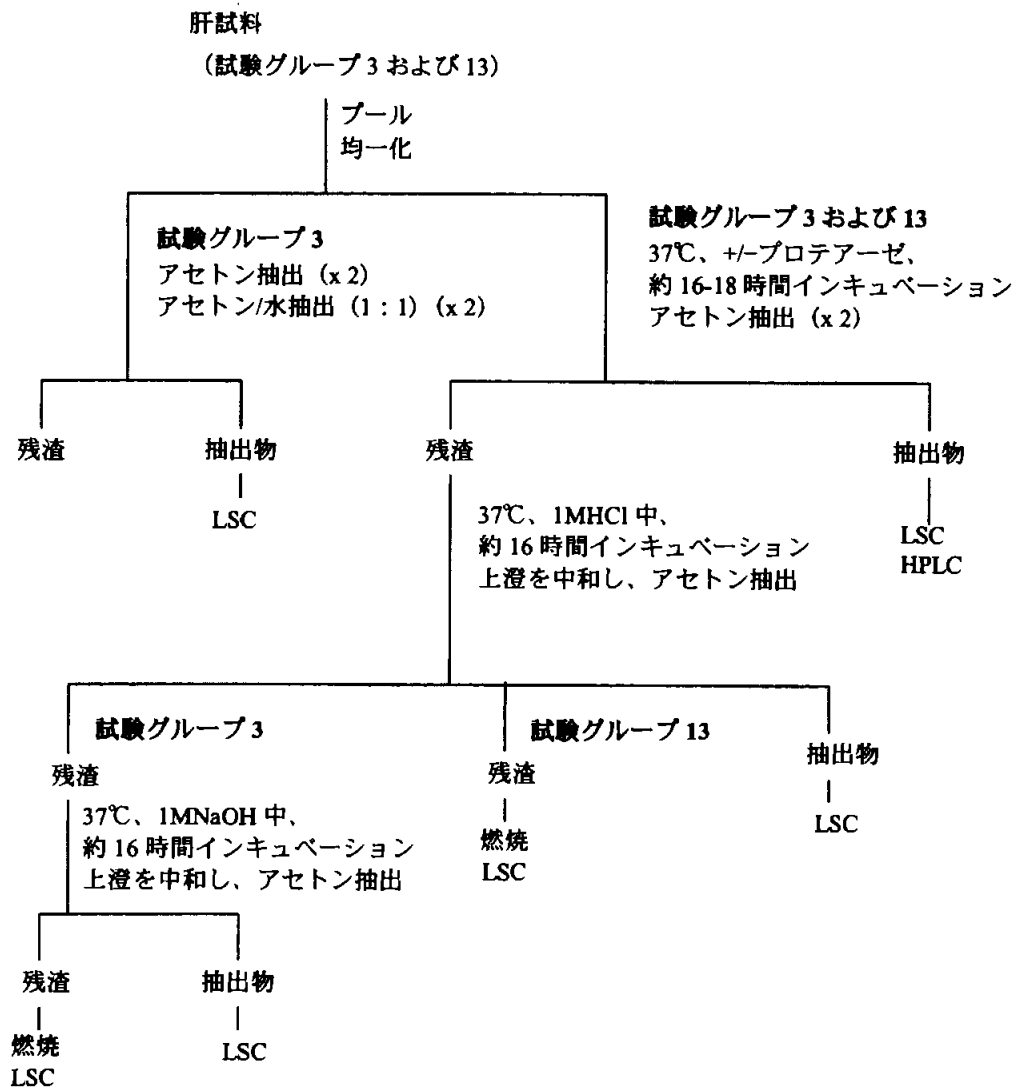


図 1 肝試料の抽出操作

結果：

予備試験；予備試験結果により投与溶液の溶媒を 1%メチルセルロースから 0.1%Tween 80 を含む 1%メチルセルロースに変更した。主要排泄経路は糞であった。従って[Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群の呼気モニタリングを 0-24 および 24-48 時間とし、[Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群の呼気のモニタリングは実施しないことにした（投与量比 0.1%以下）。

吸収・排泄；

排泄 — 放射能標識エタボキサム投与後の放射能排泄を表2に示す。

表2 [Tz-¹⁴C]あるいは[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム投与後の放射能排泄
(投与量に対する割合、%)

試料	投与後経過時間(時間)	[Tz- ¹⁴ C]標識エタボキサム投与群(単回投与)				[Tp- ¹⁴ C]標識エタボキサム投与群(単回投与)				[Tz- ¹⁴ C]標識エタボキサム投与群(14日間反復投与)	
		10 mg/kg		150 mg/kg		10 mg/kg		150 mg/kg		10 mg/kg	
		試験グループ3		試験グループ5		試験グループ4		試験グループ6		試験グループ13	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	0-6	14.07	13.97	2.50	3.22	16.28	14.89	4.08	2.45	12.64	14.31
	6-24	13.24	14.32	12.73	8.29	9.38	12.24	10.88	11.33	8.84	8.61
	24-48	0.67	0.77	1.75	0.97	0.93	2.08	0.56	0.80	0.77	1.36
	48-72	0.16	0.21	0.20	0.14	0.24	0.34	0.21	0.21	0.36	0.82
	72-96	0.09	0.25	0.06	0.06	0.13	0.15	0.10	0.12	0.23	0.51
	96-120	0.07	0.33	0.04	0.04	0.10	0.15	0.09	0.06	0.18	0.41
	合計	28.29	29.86	17.28	12.71	27.05	29.84	15.91	14.97	23.02	26.02
ケージ洗浄液	0.05	0.21	0.11	0.19	0.11	0.11	0.10	0.12	0.31	0.53	
糞	0-24	62.16	60.47	74.67	85.87	72.28	46.79	78.68	79.67	70.05	66.55
	24-48	5.05	4.87	8.13	5.34	4.17	20.26	3.26	3.42	3.08	4.99
	48-72	0.39	0.48	0.86	0.30	0.44	1.69	0.19	0.50	0.58	0.84
	72-96	0.13	0.16	0.09	0.07	0.14	0.25	0.10	0.12	0.33	0.52
	96-120	0.08	0.13	0.08	0.05	0.08	0.11	0.06	0.06	0.32	0.43
	合計	67.83	66.10	83.82	91.62	77.11	69.10	82.28	83.76	74.35	73.33
呼吸	0-24	0.63	0.63	0.28	0.30	-	-	-	-	-	-
	24-48	0.04	0.04	0.03	0.02	-	-	-	-	-	-
	合計	0.67	0.67	0.31	0.31	-	-	-	-	-	-
カーカス	0.74	0.54	0.51	0.31	0.40	0.49	0.29	0.32	3.16	2.69	
総回収率	97.59	97.38	102.02	105.13	104.66	99.53	98.58	99.17	100.84	102.56	

-: 測定せず

[Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群および[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム投与群共に、また、雌雄および投与量にかかわらず、尿中排泄(投与量の13~30%)は糞中排泄(投与量の66~92%)より低かった。いずれの投与群でも放射能の排泄は速やかで投与後48時間以内に投与量の>90%が尿および糞中に排泄された。単回低用量投与群と14日間反復投与群の排泄パターンにも実質的な違いはなかった。

胆汁排泄 — 胆汁排泄の結果を表 3 に示す。

表 3 胆管カニューレラットにおける 48 時間までの累積排泄率
(投与量に対する割合、%)

標識体	[Tz- ¹⁴ C] 標識エタボキサム			
	10 mg/kg		150 mg/kg	
用量	7		8	
試験グループ	7		8	
性	雄	雌	雄	雌
尿	23.93	31.86	21.12	21.55
ケージ洗浄液	0.39	0.37	0.41	1.04
胆汁	45.00	36.89	25.86	35.47
糞	22.47	14.84	39.59	26.96
肝臓	0.36	0.61	0.22	0.39
GIT	0.04	3.43	0.10	0.72
カーカス	1.72	2.38	0.87	2.69
計	93.90	90.38	88.17	88.82
吸収率 ^a	71.40	72.11	48.48	61.14

^a: 尿+ケージ洗浄液+胆汁+肝臓+カーカス/合計より算出

胆管カニューレを施したラットに[Tz-¹⁴C] 標識エタボキサムを投与した結果、低用量投与群の吸収率（雄、投与量の 71%；雌、投与量の 72%）は、高用量群の吸収率（雄、投与量の 48%；雌、投与量の 61%）よりも高かった。胆汁への排泄は低用量群（雄、投与量の 45%；雌、投与量の 37%）および高用量群（雄、投与量の 26%；雌、投与量の 35%）で比較的高かった。両用量群において、放射能は最終的には尿中よりもむしろ糞中に直接排泄された。

薬物動態 — 単回投与後の血漿および血球中放射能濃度の測定結果をそれぞれ表 4、図 2、3 および表 5、図 4、5 に示す。いずれの群においても雄より雌で放射能濃度が高かった。両標識体とも、血漿中の放射能濃度のピーク (Tmax) は低用量群 (1-2 時間) よりも高用量群 (3-6 時間) で、遅れて認められた。同様な傾向は血球中でも観察され、低用量および高用量でそれぞれ 1-2 時間および 4-6 時間に Cmax に達した。血漿中あるいは血球中の放射能濃度に標識体間の違いはなかった。

表 4 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群の血漿および血球中放射能濃度の推移 (μg eq./g)

試験グループ	10 mg/kg				150 mg/kg			
	9				11			
	血漿		血球		血漿		血球	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
0.25	0.458	0.842	0.236	0.492	2.21	2.5	1.26	1.70
0.5	1.00	1.57	0.504	0.845	6.04	5.25	3.10	3.10
1	2.31	2.70	1.16	1.44	5.86	8.27	3.51	5.03
2	2.14	3.09	1.10	1.90	9.70	11.8	6.68	8.48
3	2.11	2.56	1.13	1.54	14.5	14.3	8.89	9.86
4	1.82	1.84	1.04	1.15	13.5	18.3	9.13	13.8
6	1.41	1.31	0.834	0.928	13.9	19.7	8.60	14.9
12	0.543	0.633	0.458	0.597	7.60	15.7	4.96	12.0
24	0.280	0.321	0.333	0.432	5.24	3.77	4.08	4.02
48	0.158	0.195	0.228	0.395	2.09	1.75	2.45	2.91
72	0.096	0.120	0.222	0.360	0.695	1.28	1.63	2.57
96	0.063	0.081	0.214	0.278	1.02	0.794	2.26	2.37
120	0.029	0.055	0.166	0.241	0.534	0.556	1.56	2.05

表 5 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群の血漿および血球中放射能濃度の推移 (μg eq./g)

試験グループ	10 mg/kg				150 mg/kg			
	10				12			
	血漿		血球		血漿		血球	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
0.25	0.682	0.918	0.308	0.493	3.06	2.93	1.40	1.20
0.5	1.54	1.53	0.733	0.848	5.59	4.82	2.21	2.04
1	1.81	2.80	0.869	1.52	7.51	8.06	3.06	3.48
2	2.23	2.75	1.08	1.81	14.2	12.8	6.08	6.16
3	1.78	2.80	0.932	1.68	15.1	16.7	8.95	13.0
4	1.67	1.56	0.915	1.01	17.8	21.0	12.4	17.0
6	1.35	1.28	0.782	0.936	17.6	19.8	11.9	15.1
12	0.556	0.625	0.483	0.671	7.11	13.1	4.91	11.0
24	0.270	0.300	0.358	0.477	3.68	3.14	3.91	3.97
48	0.146	0.195	0.242	0.364	1.72	1.64	2.87	2.96
72	0.091	0.114	0.253	0.383	1.06	0.969	1.94	2.71
96	0.050	0.076	0.218	0.305	0.758	0.832	2.42	2.74
120	0.039	0.062	0.193	0.312	0.160	0.448	1.80	2.17

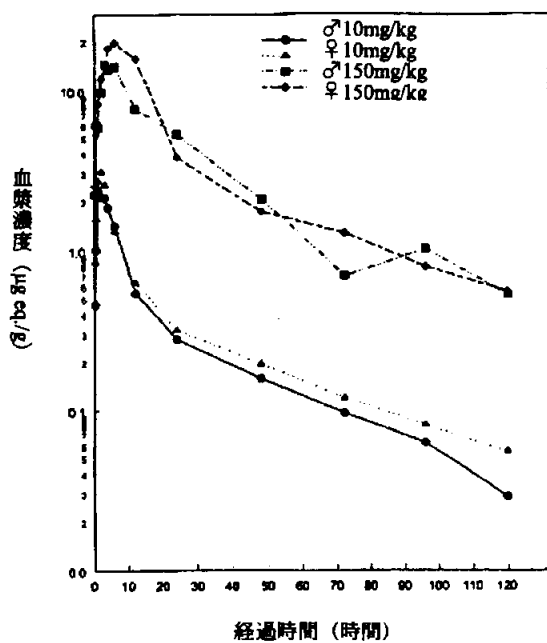


図2 [Tz-¹⁴C] 標識投与群の血漿濃度の推移

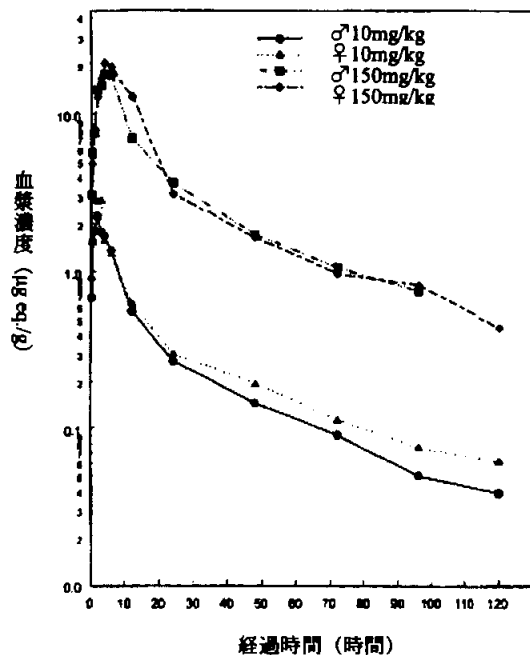


図3 [Tz-¹⁴C] 標識投与群の血球濃度の推移

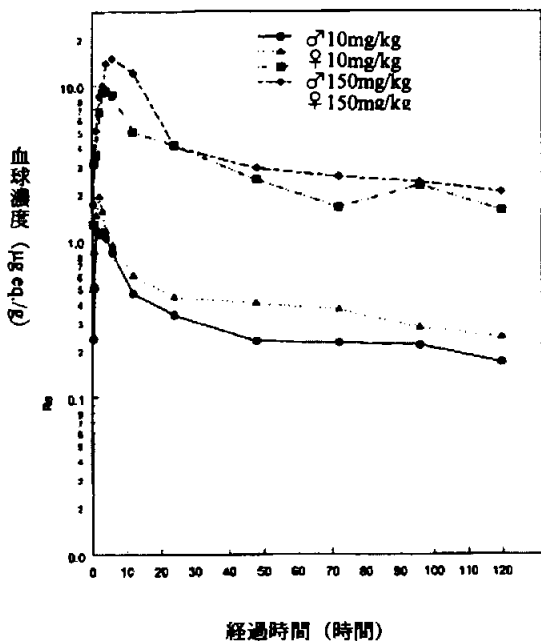


図4 [Tp-¹⁴C] 標識投与群の血漿濃度の推移

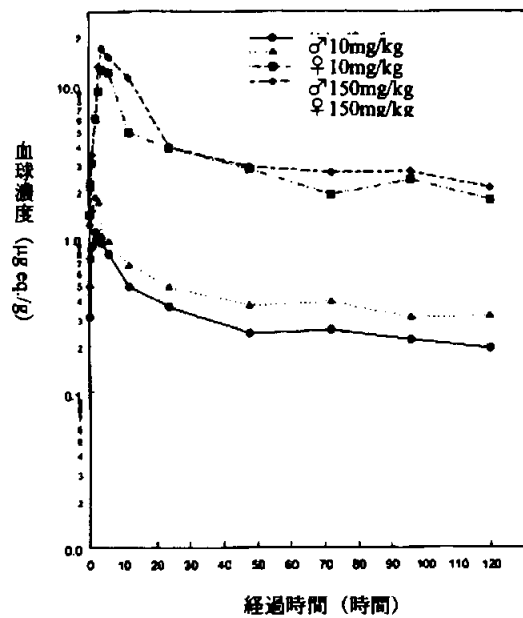


図5 [Tp-¹⁴C] 標識投与群の血球濃度の推移

薬物動態パラメーターを表6に示す。放射能の組織への暴露速度およびその程度は、用量とともに増加するが、これらの増加率は用量の増加率よりは低く、放射能の吸収能力に限界があることが示唆された。血漿中放射能の消失半減期は31-41時間であったが、血球中放射能の消失半減期は、69-162時間と推定され、血球中において半減期が長かった。

表6 薬物動態パラメーター

標識体		[Tz- ¹⁴ C] 標識エタボキサム				[Tp- ¹⁴ C] 標識エタボキサム			
用量		10 mg/kg		150 mg/kg		10 mg/kg		150 mg/kg	
試験グループ		9		11		10		12	
性		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
血漿	C _{max} (μg eq./g)	2.31	3.09	14.5	19.7	2.23	2.80	17.8	21.0
	T _{max} (h)	1	2	3	6	2	1	4	4
	AUC ₁₂₀ (μg eq./g)	32.7	38.1	367.7	448.8	31.2	36.9	350.0	411.1
	AUC ₁ (μg eq./g)	34.1	41.0	388.7 ^a	475.6	32.9	40.2	359.6	434.9
	t _{1/2} (h)	30.5	37.7	31.5 ^a	36.0	33.7	40.6	31.8	36.4
血球	C _{max} (μg eq./g)	1.16	1.90	9.13	14.9	1.08	1.81	12.4	17.0
	T _{max} (h)	1	2	4	6	2	2	4	4
	AUC ₁₂₀ (μg eq./g)	36.3	51.2	356.7	497.4	37.7	53.9	394.4	507.1
	AUC ₁ (μg eq./g)	64.2 ^a	90.1 ^a	500.2 ^a	804.5 ^a	71.6 ^a	123.2 ^a	639.9 ^a	919.2 ^a
	t _{1/2} (h)	114.3 ^a	109.6 ^a	69.3 ^a	107.2 ^a	124.1 ^a	162.2 ^a	96.6 ^a	129.4 ^a

^a 薬物動態分析の受入れ基準に合致しなかったため推定値

反復投与した ([Tz-¹⁴C] 標識エタボキサムの 10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与) 後の血漿および血球中放射能濃度を表7および図6、7に示す。また、薬物動態パラメーターを表8に示す。血漿より血球中で高い蓄積がみられた。

表7 血漿および血球中放射能濃度の推移 (μg eq./g)

標識体	[Tz- ¹⁴ C] 標識エタボキサム			
	試験グループ 14 (14日反復投与)			
	試料	血漿		血球
性	雄	雌	雄	雌
7日目 ^a	0.699	0.772	1.20	1.86
14日目 ^a	0.504	0.774	1.82	2.92
0.25時間 ^b	1.49	1.91	2.18	4.00
0.5時間 ^b	2.10	3.35	2.77	4.70
1時間 ^b	3.06	3.81	3.13	4.68
2時間 ^b	2.77	3.51	2.89	5.14
3時間 ^b	3.08	3.37	3.37	5.05
4時間 ^b	2.07	2.57	2.67	4.13
6時間 ^b	1.80	1.80	2.51	3.96
12時間 ^b	1.19	1.12	2.08	3.67
24時間 ^b	0.686	0.842	1.77	2.81
48時間 ^b	0.491	0.605	1.10	2.18
72時間 ^b	0.364	0.394	1.25	2.19
96時間 ^b	0.231	0.334	0.973	1.74
120時間 ^b	0.170	0.259	1.05	2.13

^a: 当日投与前に試料採取 ^b: 最終投与後時間

表 8 薬物動態パラメーター

標識体		[Tz- ¹⁴ C] 標識エタボキサム	
用量		10 mg/kg	
試験グループ		14 (14日間反復投与)	
性		雄	雌
血漿	C _{max} (μg eq./g)	3.08	3.81
	T _{max} (h)	3	1
	AUC ₂₄ (μg eq./g)	34.5	37.8
	AUC ₁₂₀ (μg eq./g)	70.8	83.0
	t _{1/2} (h)	46.9	56.4 ^a
血球	C _{max} (μg eq./g)	3.37	5.14
	T _{max} (h)	3	2
	AUC ₂₄ (μg eq./g)	53.8	88.8
	AUC ₁₂₀ (μg eq./g)	167.4	294.7
	t _{1/2} (h)	142.5 ^a	213.4 ^a

^a 薬物動態分析の受入れ基準に合致しなかったため推定値

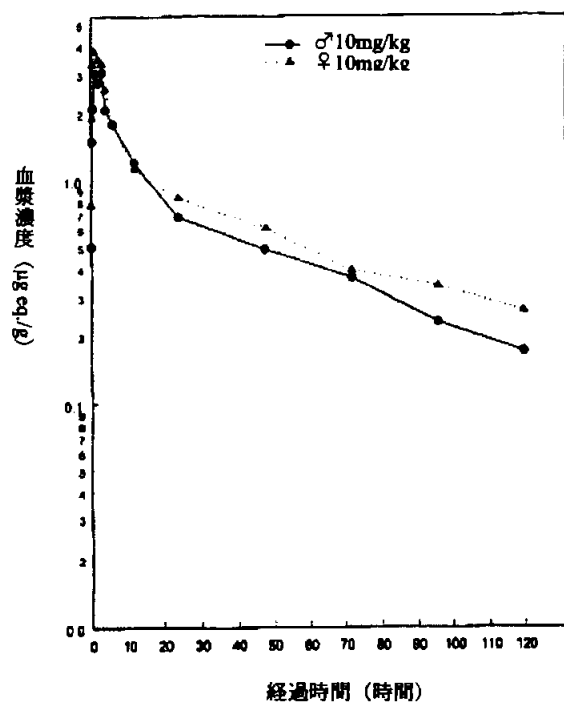


図 6 [Tz-¹⁴C] 標識投与群の血漿濃度の推移

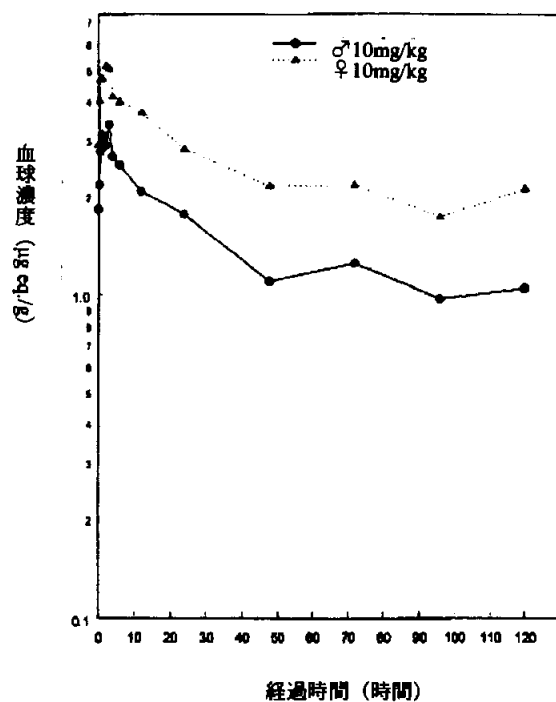


図 7 [Tz-¹⁴C] 標識投与群の血球濃度の推移

組織内分布；

組織内放射能分布を投与 120 時間後に測定した。結果を表 9 および表 10 に示す。組織内の放射能濃度は、概して甲状腺 ([Tz-¹⁴C] 標識エタボキサムのみ)、肝臓、腎臓および血球で高レベルであった。[Tz-¹⁴C] 標識エタボキサムを 10 mg/kg で 14 日間反復経口投与後に同様の放射能分布を測定したが、最終投与後 120 時間目の組織内の放射能濃度は、単回経口投与の濃度よりも、5~15 倍高かった。

表9 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム投与後 120 時間の体内組織分布

投与方法	単回 (µg eq./g) [投与量に対する割合、%]				14 日間反復 (µg eq./g) [投与量に対する割合、%]	
	10 mg/kg		150 mg/kg		10 mg/kg	
試験グループ	3		5		13	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌
副腎	0.060 [<0.01]	0.085 [<0.01]	0.153 [<0.01]	0.271 [<0.01]	0.404 [<0.01]	0.695 [<0.01]
骨	0.006 [0.01]	nd	nd	nd	0.098 [<0.01]	0.080 [<0.01]
骨髄	nd	nd	nd	nd	0.137 [<0.01]	0.179 [<0.01]
脳	0.011 [<0.01]	0.012 [<0.01]	nd	0.029 [<0.01]	0.063 [<0.01]	0.079 [0.01]
精巣上体	0.026 [<0.01]	ns	0.221 [<0.01]	ns	0.243 [0.01]	ns
脂肪	0.014 [0.02]	0.014 [0.01]	0.119 [0.01]	0.039 [<0.01]	0.209 [<0.01]	0.273 [0.01]
GIT	0.021 [0.03]	0.034 [0.04]	0.136 [0.02]	0.243 [0.02]	0.141 [0.01]	0.249 [0.02]
心臓	0.027 [<0.01]	0.036 [<0.01]	0.267 [<0.01]	0.234 [<0.01]	0.296 [<0.01]	0.365 [<0.01]
腎臓	0.181 [0.02]	0.196 [0.02]	1.75 [0.01]	1.78 [0.01]	1.22 [0.01]	1.63 [0.01]
肝臓	0.361 [0.22]	0.537 [0.34]	2.77 [0.12]	3.40 [0.11]	1.81 [0.08]	2.86 [0.10]
肺	0.066 [<0.01]	0.077 [<0.01]	0.556 [<0.01]	0.569 [<0.01]	0.454 [<0.01]	0.636 [<0.01]
筋肉	0.019 [0.12]	0.022 [0.12]	0.205 [0.08]	0.139 [0.05]	0.127 [<0.01]	0.164 [<0.01]
卵巣	ns	0.017 [<0.01]	ns	0.118 [<0.01]	ns	0.355 [<0.01]
膵臓	0.024 [<0.01]	0.027 [<0.01]	0.167 [<0.01]	0.087 [<0.01]	0.154 [<0.01]	0.189 [<0.01]
下垂体	nd	nd	nd	nd	0.090 [<0.01]	0.230 [<0.01]
前立腺	nd	ns	nd	ns	0.099 [<0.01]	ns
精囊	0.011 [<0.01]	ns	0.132 [<0.01]	ns	0.097 [<0.01]	ns
皮膚	0.088 [0.21]	0.044 [0.10]	0.428 [0.07]	0.220 [0.03]	0.675 [<0.01]	0.317 [<0.01]
脾臓	0.040 [<0.01]	0.052 [<0.01]	0.330 [<0.01]	0.379 [<0.01]	0.414 [<0.01]	0.865 [<0.01]
精巣	0.019 [<0.01]	ns	0.087 [<0.01]	ns	0.101 [<0.01]	ns
甲状腺	4.13 [<0.01]	4.82 [<0.01]	9.71 [<0.01]	nd	10.9 [<0.01]	2.36 [<0.01]
子宮	ns	0.028 [<0.01]	ns	0.208 [<0.01]	ns	0.221 [<0.01]
全血	0.095 [0.09]	0.126 [0.11]	1.00 [0.06]	0.997 [0.05]	0.972 [<0.01]	1.20 [<0.01]
血球	0.162 [0.07]	0.253 [0.09]	1.47 [0.04]	1.58 [0.04]	1.68 [<0.01]	2.45 [0.01]
血漿	0.054 [0.03]	0.054 [0.03]	0.492 [0.02]	0.372 [0.01]	0.209 [<0.01]	0.218 [<0.01]

nd : 検出されず、ns : 試料なし、GIT : 消化管 (内容物を含む)

表 10 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム投与後 120 時間の体内組織分布

投与方法	単回 (μg eq/g) [投与量に対する割合、%]			
	10 mg/kg		150 mg/kg	
試験グループ	4		6	
性	雄	雌	雄	雌
副腎	0.020 [<0.01]	0.083 [<0.01]	0.132 [<0.01]	0.692 [<0.01]
骨	nd	nd	nd	nd
骨髄	nd	nd	nd	nd
脳	nd	0.003 [<0.01]	nd	nd
精巣上体	0.018 [<0.01]	ns	0.194 [<0.01]	ns
脂肪	0.009 [0.01]	0.021 [0.02]	0.037 [<0.01]	0.051 [<0.01]
GIT	0.015 [0.02]	0.029 [0.03]	0.277 [0.03]	0.295 [0.02]
心臓	0.032 [<0.01]	0.050 [<0.01]	0.332 [<0.01]	0.398 [<0.01]
腎臓	0.213 [0.02]	0.311 [0.03]	1.39 [0.01]	1.64 [0.01]
肝臓	0.222 [0.12]	0.543 [0.25]	2.67 [0.11]	3.41 [0.11]
肺	0.041 [<0.01]	0.070 [<0.01]	0.438 [<0.01]	0.566 [<0.01]
筋肉	0.017 [0.09]	0.021 [0.10]	0.249 [0.09]	0.321 [0.10]
卵巣	ns	0.048 [<0.01]	ns	nd
脾臓	0.020 [<0.01]	0.027 [<0.01]	0.229 [<0.01]	0.205 [<0.01]
下垂体	nd	nd	0.748 [<0.01]	nd
前立腺	nd	ns	nd	ns
精嚢	0.014 [<0.01]	ns	0.036 [<0.01]	ns
皮膚	0.061 [0.13]	0.036 [0.07]	2.17 [0.31]	0.309 [0.04]
脾臓	0.028 [<0.01]	0.055 [<0.01]	0.317 [<0.01]	0.376 [<0.01]
精巣	0.014 [<0.01]	ns	0.057 [<0.01]	ns
甲状腺	0.058 [<0.01]	0.147 [<0.01]	0.418 [<0.01]	nd
子宮	ns	0.038 [<0.01]	ns	0.212 [<0.01]
全血	0.112 [0.10]	0.195 [0.15]	1.51 [0.09]	1.86 [0.09]
血球	0.203 [0.07]	0.356 [0.11]	3.90 [0.09]	2.95 [0.06]
血漿	0.051 [0.02]	0.062 [0.03]	0.457 [0.02]	0.430 [0.01]

nd: 検出されず, ns: 試料なし, GIT: 消化管 (内容物を含む)

代謝；代謝物検討用試料を表 11 に示す。

表 11 代謝物検討用試料の一覧

試料	標識体	試験グループ	用量 (mg/kg)	採取試料 (投与後時間 (h))	
尿	[Tz- ¹⁴ C]	3	排泄バランス	10	(雄のみ) 0-6、6-24、24-48 (雄および雌) 0-48
	[Tp- ¹⁴ C]	4			
	[Tz- ¹⁴ C]	5	排泄バランス	150	(雄および雌) 0-48
	[Tp- ¹⁴ C]	6			
	[Tz- ¹⁴ C]	13	排泄バランス	10 (反復)	(雄および雌) 0-24 (1日目)、0-24 (7日目) および 0-48 (14日目)
糞	[Tz- ¹⁴ C]	3	排泄バランス	10	(雄のみ) 0-24、24-48 (雄および雌) 0-48
	[Tp- ¹⁴ C]	4			
	[Tz- ¹⁴ C]	5	排泄バランス	150	(雄および雌) 0-48
	[Tp- ¹⁴ C]	6			
	[Tz- ¹⁴ C]	13	排泄バランス	10 (反復)	(雄および雌) 0-24 (1日目)、0-24 (7日目) および 0-48 (14日目)
胆汁	[Tz- ¹⁴ C]	7	胆汁排泄	10	(雄および雌) 0-48
肝	[Tz- ¹⁴ C]	3	組織内分布	10	120
	[Tz- ¹⁴ C]	13	組織内分布	10 (反復)	最終投与後 120

各試料中の放射性成分は HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより分析した。同定および構造決定した各試料中の代謝物を表 12 に示す。

表 12 各試料中の同定代謝物等一覧

試料	同定代謝物等
尿	LGC-32801 (D) (TzU13 および TpU13)、LGC-32800 (C) (TzU17 および TpU17)
糞	エタボキサム (A)、LGC-32801 (D) (TzFE14 および TpFE14)、 LGC-32803 (F) (TzFE15 および TpFE15)、LGC-32802 (E) (TzFE17 および TpFE17)
胆汁	LGC-32801 (D) (TzB15 および TpB15)、LGC-32794 (B) (TzB22 および TpB22)
肝	-

尿中代謝物 — 尿中代謝物の分析結果を表 13 および 14 に示す。経時的な尿中代謝物の推移を表 15 および 16 に示す。[Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム反復投与群の結果を表 17 に示す。また、酵素、酸および塩基処理した尿の代謝物分析結果を表 18 に示す。

代謝物プロファイルは標識体間および用量間で類似しており、実質的な性差も観察されなかった。主要代謝物は TzU13 および TpU13 で低用量群および高用量群それぞれ、投与量の 7.8~9.9% および 3.1%、8.5~9.2% および 2.7~2.9% が認められた。採取期間毎 (0-6 時間、6-24 時間および 24-48 時間) に分析した結果、各採取期間において代謝物プロファイルは類似しており、代謝物の多くは 0-24 時間に排泄された。β-グルクロニダーゼ/スルファターゼで尿試料を処理したところ、グルクロン酸抱合体あるいは硫酸抱合体は存在しないことが示唆された。酸および塩基処理により極性画分の割合が増加し、比較的極性の低い TzU17 は塩基処理後減少した。

[Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム反復投与後の代謝物プロファイルは、[Tz-¹⁴C] 標識エタボ

キサム単回投与後の結果と類似しており、実質的な性差は認められなかった。主代謝物はTzU13であり、他の代謝物（合計23種類）は $\leq 0.4\%$ であった。

表 13 [Tz- ^{14}C] 標識エタボキサム投与群の尿中の代謝物分布（投与量に対する割合、%）

: 排泄バランス試験 0-48h

代謝物	HPLC 保持時間 (分)	[Tz- ^{14}C] 標識エタボキサム投与群			
		10 mg/kg		150 mg/kg	
		試験グループ 3		試験群グループ 5	
		雄	雌	雄	雌
%投与量		27.98	29.06	16.98	12.48
TzU1	1.5-3.5	2.7	2.0	0.7	0.4
TzU2	3.5-5.0	2.6	2.0	2.3	1.4
TzU3	5.0-6.0	0.5	0.4	0.4	0.2
TzU4	6.0-7.5	0.5	0.4	0.3	0.1
TzU5	7.5-9.0	0.3	0.3	0.3	<0.1
TzU6	9.0-11.0	0.7	0.7	0.7	0.3
TzU7	11.0-12.5	0.7	0.7	0.4	0.3
TzU8	12.5-13.5	0.4	0.4	0.2	<0.1
TzU9	13.5-15.0	0.6	0.5	0.4	0.2
TzU10	15.0-16.5	0.7	0.8	0.4	0.3
TzU11	16.5-18.0	1.1	0.9	0.8	0.5
TzU12	18.0-20.0	1.1	1.0	0.8	0.6
TzU13 ^{a, b}	20.0-23.5	7.8	9.9	3.1	3.1
TzU13a ^a	20.0-23.5	1.7	1.4	0.6	0.6
TzU14	23.5-25.0	0.6	0.7	0.5	0.4
TzU15	25.0-26.0	0.6	0.6	0.4	0.4
TzU16	26.0-27.0	0.7	0.6	0.6	0.3
TzU17 ^c	27.0-28.5	2.2	2.9	2.1	1.5
TzU18	28.5-29.5	0.5	0.6	0.3	0.5
TzU19	29.5-30.5	0.6	0.5	0.4	0.3
TzU20	30.5-32.0	0.3	0.3	0.2	<0.1
TzU21	32.0-33.0	0.4	0.4	0.2	0.2
TzU22	33.0-34.0	0.3	0.4	0.3	0.1
その他		0.5	0.5	0.4	0.9

その他=(100-他代謝物の総和)であり、単一化合物ではない

^a: 分離能が低く、放射能検出器のデータを統合し定量した

^b: 資料 No.M-参考 1 において LGC-32801 (D) と同定

^c: 資料 No.M-参考 1 において LGC-32800 (C) と同定

表 14 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群の尿中の代謝物分布 (投与量に対する割合, %)

: 排泄バランス試験 0-48h

代謝物	HPLC 保持時間 (分)	[Tp- ¹⁴ C] 標識エタボキサム投与群			
		10 mg/kg		150 mg/kg	
		試験群グループ 4		試験群グループ 6	
		雄	雌	雄	雌
%投与量		26.59	29.21	15.52	14.58
TpU1	2.0-3.0	0.5	0.6	0.3	0.3
TpU2	3.0-4.5	0.7	0.8	0.3	0.2
TpU3	4.5-5.5	0.4	0.5	0.3	0.2
TpU4	5.5-7.0	0.3	0.3	0.3	0.2
TpU5	7.0-9.5	2.3	2.1	1.7	1.3
TpU6	9.5-11.0	0.5	0.4	0.5	0.3
TpU7	11.0-13.0	0.5	0.5	0.2	0.2
TpU8	13.0-15.0	0.9	0.4	0.3	0.3
TpU9	15.0-17.0	1.3	1.9	1.7	1.1
TpU10	17.0-18.5	1.1	1.1	0.7	0.8
TpU11	18.5-20.0	1.0	1.4	0.7	0.5
TpU12	20.0-22.0	1.3	1.1	0.9	0.6
TpU13 ^{a, b}	22.0-25.0	8.5	9.2	2.7	2.9
TpU13a ^a	22.0-25.0	1.0	1.1	0.5	0.6
TpU14	25.0-26.5	0.7	1.2	0.5	0.8
TpU15	26.5-28.0	0.8	1.1	0.6	0.8
TpU16	28.0-29.0	0.5	0.6	0.4	0.2
TpU17 ^c	29.0-30.5	2.3	2.7	1.6	2.1
TpU18	30.5-32.0	0.7	0.9	0.5	0.3
TpU19	32.0-35.0	0.5	0.9	0.5	0.5
TpU20	35.0-38.0	<0.1	<0.1	0.2	0.2
TpU21	39.0-40.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
TpU22	42.0-43.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
その他		0.7	0.6	0.1	0.2

その他= (100-他代謝物の総和) であり、単一化合物ではない

^a: 分離能が低く、放射能検出器のデータを統合し定量した

^b: 資料 No.M-参考 1 において LGC-32801 (D) と同定

^c: 資料 No.M-参考 1 において LGC-32800 (C) と同定

表 15 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム投与群の尿中の代謝物分布（投与量に対する割合、%）：
排泄バランス試験 0-6、6-24、24-48h

代謝物	HPLC 保持時間 (分)	10 mg/kg			
		試験グループ 3			
		雄			
		0-6	6-24	24-48	0-48 ^d
%投与量		14.07	13.24	0.67	27.98
TzU1	1.5-3.5	1.1	1.3	0.1	2.5
TzU2	3.5-5.0	1.1	1.6	0.1	2.8
TzU3	5.0-6.0	0.2	0.2	<0.1	0.4
TzU4	6.0-7.5	0.2	0.2	<0.1	0.4
TzU5	7.5-9.0	0.2	0.2	<0.1	0.4
TzU6	9.0-11.0	0.3	0.4	<0.1	0.7
TzU7	11.0-12.5	0.4	0.3	<0.1	0.7
TzU8	12.5-13.5	0.3	0.2	<0.1	0.5
TzU9	13.5-15.0	0.3	0.3	<0.1	0.6
TzU10	15.0-16.5	0.3	0.3	0.1	0.7
TzU11	16.5-18.0	0.5	0.5	<0.1	1.0
TzU12	18.0-20.0	0.7	0.6	<0.1	1.3
TzU13 ^{a, b}	20.0-23.5	4.4	3.6	0.1	8.1
TzU13a ^a	20.0-23.5	0.8	0.6		1.4
TzU14	23.5-25.0	0.3	0.3	<0.1	0.6
TzU15	25.0-26.0	0.3	0.2	<0.1	0.5
TzU16	26.0-27.0	0.4	0.3	<0.1	0.7
TzU17 ^c	27.0-28.5	1.0	1.2	<0.1	2.2
TzU18	28.5-29.5	0.3	0.3	<0.1	0.6
TzU19	29.5-30.5	0.4	0.2	<0.1	0.6
TzU20	30.5-32.0	0.2	0.1	<0.1	0.3
TzU21	32.0-33.0	0.3	0.2	<0.1	0.5
TzU22	33.0-34.0	0.1	0.1	<0.1	0.2
その他		0.2	0.1	0.3	0.6

その他= (100-他代謝物の総和) であり、単一化合物ではない

^a: 分離能が低く、放射能検出器のデータを統合し定量した

^b: 資料 No.M-参考 1 において LGC-32801 (D) と同定

^c: 資料 No.M-参考 1 において LGC-32800 (C) と同定

^d: 0-6、6-24、24-48 時間の各プール尿の合値

(2)ラットにおける代謝試験 (組織内分布)

(資料 No.M-02)

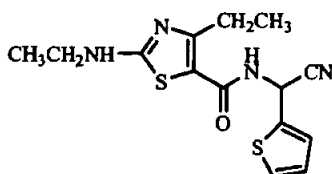
試験機関：WIL Research Laboratories, LLC (米国)

報告書作成年：2009年

[GLP 対応]

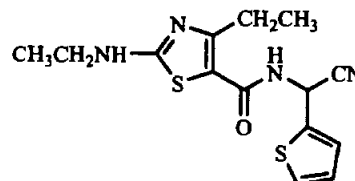
供試標識化合物：

構造式：



* : ^{14}C 放射能標識位置

チアゾール環 ^{14}C 標識エタポキサム
(以下、[Tz- ^{14}C] 標識エタポキサム)



* : ^{14}C 放射能標識位置

チオフェン-2-メチレン- ^{14}C 標識エタポキサム
(以下、[Tp- ^{14}C] 標識エタポキサム)

化学名； (RS)-N-(α -シアノ-2-テニル)-4-エチル-2-(エチルアミノ)-1,3-チアゾール-5-カルボキサミド

比放射能および放射化学的純度； 以下に表示する。

供試化合物	[Tz- ^{14}C] 標識エタポキサム	[Tp- ^{14}C] 標識エタポキサム
-------	---------------------------------	---------------------------------

供試動物：CrI:CD®BR SD 系ラット、1群雌雄各3匹、投与時体重 200~294g

試験方法：

投与； [Tz- ^{14}C] 標識エタポキサムあるいは [Tp- ^{14}C] 標識エタポキサムを Tween 80 を 0.1 % 加えた 1%メチルセルロース液に溶解し投与液を調製した。低用量は 10 mg/kg、高用量は 150 mg/kg とし、単回強制経口投与した。

試験群の構成； 表 1 に示す。

表 1 試験群の構成

試験群	小群	標識体	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	群構成	試料採取時期 (投与後時間)
1	A	[Tz- ¹⁴ C]	10	2.5	4	雄 3、雌 3	2 (ほぼ T _{max})
	B	[Tz- ¹⁴ C]	10	2.5	4	雄 3、雌 3	24
	C	[Tz- ¹⁴ C]	10	2.5	4	雄 3、雌 3	120
2	A	[Tz- ¹⁴ C]	150	37.5	4	雄 3、雌 3	4 (ほぼ T _{max})
	B	[Tz- ¹⁴ C]	150	37.5	4	雄 3、雌 3	24
	C	[Tz- ¹⁴ C]	150	37.5	4	雄 3、雌 3	120
3	A	[Tp- ¹⁴ C]	10	2.5	4	雄 3、雌 3	2 (ほぼ T _{max})
	B	[Tp- ¹⁴ C]	10	2.5	4	雄 3、雌 3	24
	C	[Tp- ¹⁴ C]	10	2.5	4	雄 3、雌 3	120
4	A	[Tp- ¹⁴ C]	150	37.5	4	雄 3、雌 3	4 (ほぼ T _{max})
	B	[Tp- ¹⁴ C]	150	37.5	4	雄 3、雌 3	24
	C	[Tp- ¹⁴ C]	150	37.5	4	雄 3、雌 3	120

採取試料；血液（全血、血漿、血球）、副腎、骨（大腿骨、一部）、骨髓（大腿骨、一部）、脳、精巣上体、脂肪（一部）、消化管および内容物、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉（大腿、一部）、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、精嚢、皮膚（一部）、脾臓、精巣、甲状腺、子宮

放射能測定および分析；血漿は直接、脂肪と皮膚はそれぞれ Ultima Gold™ と Soluene®-350 で可溶化し、液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。

全血、血球および脂肪・皮膚以外の組織試料は、燃焼処理後に LSC で測定した。

結 果：

[Tz-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の組織内分布； [Tz-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与 2 時間、24 時間および 120 時間後の組織内分布（平均値）を表 2 に示す。

血液成分および組織中の [Tz-¹⁴C]標識エタボキサム相当濃度は、投与後の評価期間を通じて雌雄動物でほぼ類似していた。

投与 2 時間後では、放射性エタボキサム相当量の最高濃度（消化管および内容物を除く）は肝臓（約 12 μg/g）および腎臓（約 9 μg/g）で認められた。さらに、肝臓では投与 24 および 120 時間後の時点を通じて常に最高レベルの放射能が認められ、甲状腺では投与後の評価時点を通じて比較的高濃度であった。投与量に対する濃度の最高パーセント（GI 管および内容物を除く）は筋肉、肝臓、皮膚、血漿、血液および脂肪で認められた。これらの組織でのみ、投与量の ≥ 1% が含まれていた。最高レベルの放射性残留物が筋肉で認められ、雄および雌でそれぞれ投与量の 6.0% および 7.9% であった。

投与 24 時間後では、肝臓（投与 24 時間後で 0.7-0.9%）を除き、残留レベルは全て投与量の < 0.5% であった。血液、血球成分、血漿、肝臓、筋肉および皮膚のみに投与量の > 0.1% が含まれていた。

投与 120 時間後では全組織の被験物質相当量は 1 μg/g 未満であり、肝臓および甲状腺で最高レベルであった。雌動物の骨髓では投与 120 時間後に平均濃度が約 0.5 μg/g であったが、

この時点のデータは1動物の異常な結果が顕著に影響していると思われた。投与量に対する残留濃度の傾向は投与24時間後と同様であった。

表2 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の体内組織分布

組織	投与後経過時間					
	2時間 (μg eq./g) (投与量に対する割合、%)		24時間 (μg eq./g) (投与量に対する割合、%)		120時間 (μg eq./g) (投与量に対する割合、%)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	3.02 (2.2)	3.49 (2.6)	0.339 (0.25)	0.447 (0.34)	0.121 (0.10)	0.184 (0.14)
血球	2.36 (0.73)	2.80 (0.90)	0.321 (0.10)	0.484 (0.16)	0.149 (0.06)	0.247 (0.08)
血漿	4.51 (1.9)	5.09 (2.2)	0.350 (0.15)	0.373 (0.16)	0.057 (0.03)	0.093 (0.04)
副腎	4.80 (0.01)	5.23 (0.02)	0.211 (<0.01)	0.290 (<0.01)	0.112 (<0.01)	0.099 (<0.01)
骨	0.745 (0.42)	0.671 (0.39)	0.055 (0.03)	0.061 (0.04)	0.019 (0.01)	0.036 (0.02)
骨髄	1.46 (0.05)	2.10 (0.08)	0.077 (<0.01)	0.119 (<0.01)	0.020 (<0.01)	0.529 (0.02)
脳	0.452 (0.03)	0.552 (0.05)	0.025 (<0.01)	0.026 (<0.01)	0.011 (<0.01)	0.009 (<0.01)
脂肪	1.46 (1.06)	1.29 (0.98)	0.044 (0.03)	0.042 (0.03)	0.026 (0.02)	0.022 (0.02)
心臓	2.17 (0.09)	2.73 (0.12)	0.122 (<0.01)	0.140 (0.01)	0.038 (<0.01)	0.051 (<0.01)
腎臓	8.93 (0.82)	8.40 (0.82)	0.700 (0.06)	0.788 (0.07)	0.193 (0.02)	0.288 (0.03)
肝臓	12.9 (6.0)	11.3 (5.1)	1.59 (0.74)	1.87 (0.86)	0.407 (0.25)	0.660 (0.27)
肺	2.75 (0.14)	3.38 (0.18)	0.200 (0.01)	0.248 (0.01)	0.063 (<0.01)	0.091 (<0.01)
筋肉	1.28 (6.0)	1.62 (7.9)	0.064 (0.31)	0.066 (0.32)	0.023 (0.13)	0.023 (0.11)
膵臓	2.14 (0.05)	2.60 (0.07)	0.089 (<0.01)	0.090 (<0.01)	0.024 (<0.01)	0.031 (<0.01)
下垂体	2.74 (<0.01)	1.97 (<0.01)	0.093 (<0.01)	0.163 (<0.01)	0.022 (<0.01)	0.051 (<0.01)
皮膚	1.84 (3.4)	3.31 (6.4)	0.251 (0.47)	0.251 (0.49)	0.198 (0.44)	0.054 (0.10)
脾臓	1.39 (0.04)	1.53 (0.04)	0.103 (<0.01)	0.146 (<0.01)	0.039 (<0.01)	0.094 (<0.01)
甲状腺	2.57 (<0.01)	2.20 (<0.01)	2.52 (<0.01)	1.16 (<0.01)	0.652 (<0.01)	0.399 (<0.01)
精巣上体	1.62 (0.04)	ns	0.092 (<0.01)	ns	0.038 (<0.01)	ns
前立腺	2.44 (0.06)	ns	0.076 (<0.01)	ns	0.019 (<0.01)	ns
精嚢	1.42 (0.04)	ns	0.058 (<0.01)	ns	0.015 (<0.01)	ns
精巣	1.07 (0.11)	ns	0.071 (0.01)	ns	0.017 (<0.01)	ns
卵巣	ns	2.14 (0.01)	ns	0.130 (<0.01)	ns	0.050 (<0.01)
子宮	ns	2.08 (0.04)	ns	0.138 (<0.01)	ns	0.043 (<0.01)
GIT	78.7 (76)	79.2 (75)	4.93 (5.0)	2.65 (2.9)	0.052 (0.06)	0.119 (0.12)

GIT: 消化管 (内容物を含む) ns: 試料なし * : およその定量限界値未満

[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の組織内分布 ; [Tp-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与 2 時間、24 時間および 120 時間後の組織内分布 (平均値) を表 3 に示す。

血液成分および組織中の [Tp-¹⁴C]標識エタボキサム相当量濃度は、試料採取期間を通じて雌雄動物でほぼ類似していた。投与 2 時間後では、エタボキサム相当量の最高レベル (GI 管および内容物を除く) は肝臓 (約 10 μg/g) および腎臓 (約 7 μg/g) で認められた。肝臓では試料採取期間を通じて常に最高レベルの放射能が認められたが、投与 120 時間後では雄および雌でそれぞれ約 0.36 μg/g および 0.62 μg/g に減少した。投与 2 時間後における最高投与量パーセント (GI 管および内容物を除く) は、雌雄とも肝臓、筋肉、皮膚、血液および血漿で認められた。これらの組織でのみ投与量の ≥ 1% が含まれていた。

放射性残留物の最高レベルは筋肉で認められ、全身に外挿した場合、雄および雌でそれぞれ投与量の 5.2% および 6.0% であった。投与 24 時間後では、多くの組織の残留物レベルは投与量の < 0.01% であった。投与 24 時間後に投与量の > 0.01% であった組織では、そのレベルは投与 2 時間後に比べ約 6-40 倍低かった。投与 120 時間後では肝臓、筋肉、血液、血球成分および皮膚のみに > 0.03% の残留物が含まれ、肝臓で最高レベルが認められ、雄および雌でそれぞれ投与量の 0.19% および 0.30% であった。

表 3 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の体内組織分布

組織	投与後経過時間					
	2 時間 (μg eq/g) (投与量に対する割合、%)		24 時間 (μg eq/g) (投与量に対する割合、%)		120 時間 (μg eq/g) (投与量に対する割合、%)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	2.54 (1.7)	3.07 (2.15)	0.363 (0.26)	0.406 (0.29)	0.138 (0.11)	0.187 (0.14)
血球	1.98 (0.58)	2.36 (0.71)	0.372 (0.12)	0.432 (0.13)	0.164 (0.06)	0.236 (0.08)
血漿	3.59 (1.4)	4.25 (1.7)	0.365 (0.15)	0.337 (0.14)	0.059 (0.03)	0.068 (0.03)
副腎	3.60 (0.01)	4.05 (0.01)	0.209 (<0.01)	0.219 (<0.01)	0.069 (<0.01)	0.099 (<0.01)
骨	0.647 (0.35)	0.641 (0.35)	0.046 (0.03)	0.046 (0.03)	0.017 (0.01)	0.018 (0.01)
骨髓	1.34 (0.05)	1.46 (0.05)	0.091 (<0.01)	0.067 (<0.01)	0.023 (<0.01)	0.055 (<0.01)
脳	0.414 (0.03)	0.529 (0.04)	0.045 (<0.01)	0.040 (<0.01)	0.008 (<0.01)	0.009 (<0.01)
脂肪	1.17 (0.81)	1.24 (0.88)	0.032 (0.02)	0.027 (0.02)	0.009 (<0.01)	0.009 (0.01)
心臓	2.03 (0.07)	2.40 (0.09)	0.136 (<0.01)	0.165 (0.01)	0.041 (<0.01)	0.049 (<0.01)
腎臓	6.67 (0.61)	7.08 (0.62)	0.699 (0.07)	0.764 (0.07)	0.217 (0.02)	0.275 (0.02)
肝臓	10.5 (4.5)	10.1 (4.2)	1.22 (0.58)	1.569 (0.74)	0.356 (0.19)	0.618 (0.30)
肺	2.52 (0.12)	2.99 (0.15)	0.220 (0.01)	0.246 (0.01)	0.070 (<0.01)	0.091 (<0.01)
筋肉	1.16 (5.2)	1.32 (6.0)	0.085 (0.40)	0.066 (0.31)	0.022 (0.12)	0.023 (0.11)
脾臓	2.02 (0.04)	2.18 (0.07)	0.101 (<0.01)	0.097 (<0.01)	0.021 (<0.01)	0.027 (<0.01)
下垂体	1.87 (<0.01)	1.73 (<0.01)	0.095 (<0.01)	0.129 (<0.01)	0.050 (<0.01)	0.088 (<0.01)

GIT: 消化管 (内容物を含む) ns: 試料なし : およその定量限界値未満

表3 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の体内組織分布 (つづき)

組織	投与後経過時間					
	2時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)		24時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)		120時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
皮膚	1.82 (3.2)	1.92 (3.5)	0.407 (0.78)	0.174 (0.32)	0.349 (0.72)	0.142 (0.28)
脾臓	1.17 (0.03)	1.49 (0.03)	0.109 (<0.01)	0.138 (<0.01)	0.041 (<0.01)	0.082 (<0.01)
甲状腺	1.75 (<0.01)	1.44 (<0.01)	0.201 (<0.01)	0.259 (<0.01)	0.085 (<0.01)	0.156 (<0.01)
精巣上体	1.23 (0.03)	ns	0.108 (<0.01)	ns	0.036 (<0.01)	ns
前立腺	1.35 (0.02)	ns	0.119 (<0.01)	ns	0.014 (<0.01)	ns
精囊	1.18 (0.03)	ns	0.068 (<0.01)	ns	0.013 (<0.01)	ns
精巣	0.927 (0.09)	ns	0.092 (0.01)	ns	0.018 (<0.01)	ns
卵巣	ns	1.82 (0.01)	ns	0.113 (<0.01)	ns	0.044 (<0.01)
子宮	ns	1.68 (0.03)	ns	0.118 (<0.01)	ns	0.042 (<0.01)
GIT	74.6 (76)	85.3 (79)	2.79 (3.2)	4.47 (4.5)	0.046 (0.06)	0.069 (0.07)

GIT: 消化管 (内容物を含む) ns: 試料なし * : およその定量限界値未満

[Tz-¹⁴C]標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の組織内分布; [Tz-¹⁴C]標識エタボキサム 150 mg/kg 投与 4 時間、24 時間および 120 時間後の組織内分布 (平均値) を表 4 に示す。

組織内分布の傾向は 10 mg/kg 投与群と同様であった。血液成分および組織中の [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム相当量の濃度は、試料採取期間を通じて雌雄動物でほぼ類似していた。

投与 4 時間後では放射性エタボキサム相当量の最高濃度 (GI 管および内容物を除く) は、肝臓 (約 47 µg/g) および腎臓 (約 27 µg/g) で認められた。雌雄における最高投与量パーセント (GI 管および内容物を除く) は筋肉、肝臓および皮膚で認められた。これらの組織でのみ投与量の ≥ 1% が含まれており、筋肉で最高レベルの放射性残留物が検出され、雄および雌でそれぞれ投与量の 2.3% および 3.1% であった。

投与 24 時間後では、残留レベルは全て投与 4 時間後のレベルの約半分以下に減少した。投与 120 時間後では、大部分の組織中の濃度は約 10 倍あるいはそれ以上の低下を示した。例外は皮膚および甲状腺の濃度で、その残留濃度の低下は約 1-4 倍であった。雌動物の骨髄では投与 120 時間後の平均濃度が約 5 µg/g であったが、このデータは 1 動物の異常な結果が顕著に影響していると思われた。

表4 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の体内組織分布

組織	投与後経過時間					
	4時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)		24時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)		120時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	11.6 (0.57)	16.8 (0.88)	5.36 (0.28)	7.88 (0.41)	1.14 (0.06)	1.53 (0.08)
血球	9.19 (0.19)	13.8 (0.31)	4.24 (0.09)	6.61 (0.15)	1.37 (0.03)	1.97 (0.04)
血漿	15.4 (0.43)	21.4 (0.64)	6.63 (0.19)	9.60 (0.28)	0.624 (0.02)	0.773 (0.02)
副腎	17.5 (<0.01)	26.0 (0.01)	6.39 (<0.01)	10.0 (<0.01)	0.591 (<0.01)	1.17 (<0.01)
骨	3.68 (0.14)	3.81 (0.16)	1.19 (0.05)	1.61 (0.06)	0.175 (0.01)	0.183 (0.01)
骨髓	7.12 (0.02)	10.4 (0.03)	2.31 (0.01)	4.14 (0.01)	0.203 (<0.01)	4.48 (0.01)
脳	2.50 (0.01)	3.35 (0.02)	0.842 (<0.01)	1.11 (0.01)	0.092 (<0.01)	0.117 (<0.01)
脂肪	8.30 (0.42)	11.6 (0.61)	2.08 (0.11)	2.74 (0.14)	0.265 (0.01)	0.199 (0.01)
心臓	10.4 (0.03)	14.6 (0.04)	3.54 (0.01)	5.13 (0.01)	0.375 (<0.01)	0.495 (<0.01)
腎臓	26.3 (0.18)	29.3 (0.19)	11.6 (0.08)	15.8 (0.11)	1.96 (0.02)	2.54 (0.02)
肝臓	44.4 (1.2)	49.1 (1.3)	18.6 (0.57)	26.5 (0.79)	3.27 (0.11)	4.66 (0.15)
肺	12.1 (0.04)	17.9 (0.06)	4.32 (0.01)	6.85 (0.02)	0.599 (<0.01)	0.843 (<0.01)
筋肉	7.23 (2.3)	9.17 (3.1)	2.16 (0.72)	3.08 (1.04)	0.212 (0.08)	0.342 (0.12)
脾臓	10.9 (0.02)	16.0 (0.05)	3.15 (<0.01)	4.44 (0.01)	0.218 (<0.01)	0.261 (<0.01)
下垂体	8.36 (<0.01)	9.43 (<0.01)	3.08 (<0.01)	4.23 (<0.01)	0.298 (<0.01)	0.442 (<0.01)
皮膚	8.78 (1.1)	10.6 (1.4)	5.27 (0.69)	5.53 (0.74)	2.27 (0.33)	2.99 (0.41)
脾臓	6.82 (0.01)	10.3 (0.02)	2.31 (<0.01)	3.53 (0.01)	0.379 (<0.01)	0.672 (<0.01)
甲状腺	8.19 (<0.01)	11.2 (<0.01)	16.4 (<0.01)	9.39 (<0.01)	7.67 (<0.01)	2.86 (<0.01)
精巣上体	7.16 (0.01)	ns	2.57 (<0.01)	ns	0.341 (<0.01)	ns
前立腺	7.33 (0.01)	ns	2.35 (<0.01)	ns	0.246 (<0.01)	ns
精囊	6.03 (0.01)	ns	1.87 (<0.01)	ns	0.141 (<0.01)	ns
精巣	4.83 (0.03)	ns	1.74 (0.01)	ns	0.175 (<0.01)	ns
卵巣	ns	12.7 (<0.01)	ns	4.10 (<0.01)	ns	0.406 (<0.01)
子宮	ns	8.49 (0.02)	ns	3.94 (0.01)	ns	0.345 (<0.01)
GIT	1526 (99)	1373 (98)	148 (9.8)	254 (16)	0.916 (0.07)	0.660 (0.04)

GIT: 消化管 (内容物を含む) ns: 試料なし * : およその定量限界値未満

[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の組織内分布 ; [Tp-¹⁴C]標識エタボキサム 150 mg/kg 投与4時間、24時間および120時間後の組織内分布 (平均値) を表5に示す。

組織内分布の傾向は10 mg/kg 投与群と同様であった。血液成分および組織中の[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム相当量濃度は雌雄ではほぼ類似していた。投与4時間後では、放射性エタボキサム相当量の最高濃度 (GI管および内容物を除く) は肝臓 (約40 µg/g) および腎臓 (約24 µg/g) で認められた。雌雄における最高投与量パーセント (GI管および内容物を除く) は肝臓、筋肉および皮膚で認められ、それぞれ投与量の1%-2%であった。投与24時間後

では、ほとんどすべての残留レベルが投与4時間後のレベルの約3分の1以下に低下した。残留レベルは投与後24時間から120時間後まで継続して低下し、投与120時間後には皮膚で最高組織レベルを示し、雄では投与量の約0.4%、雌では0.1%であった。投与4から120時間後では大半の組織中の濃度は約10倍あるいはそれ以上の低下を示した。

表5 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の体内組織分布

組織	投与後経過時間					
	4時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)		24時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)		120時間 (µg eq./g) (投与量に対する割合、%)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	10.9 (0.49)	13.3 (0.62)	2.51 (0.12)	3.18 (0.15)	0.985 (0.05)	1.42 (0.07)
血球	9.12 (0.17)	10.2 (0.20)	2.37 (0.05)	3.28 (0.07)	1.27 (0.03)	1.96 (0.04)
血漿	14.6 (0.37)	17.4 (0.46)	2.51 (0.07)	3.05 (0.08)	0.461 (0.01)	0.573 (0.02)
副腎	18.2 (0.00)	24.9 (<0.01)	1.71 (<0.01)	3.53 (<0.01)	0.543 (<0.01)	0.949 (<0.01)
骨	3.72 (0.13)	3.77 (0.14)	0.309 (<0.01)	0.473 (0.02)	0.102 (<0.01)	0.137 (<0.01)
骨髄	6.81 (0.02)	9.46 (0.02)	0.445 (<0.01)	0.873 (<0.01)	0.166 (<0.01)	0.222 (<0.01)
脳	2.51 (0.01)	2.96 (0.02)	0.328 (<0.01)	0.458 (<0.01)	0.061 (<0.01)	0.082 (<0.01)
脂肪	7.52 (0.34)	8.70 (0.41)	0.247 (0.01)	0.318 (0.02)	0.082 (<0.01)	0.112 (0.01)
心臓	10.4 (0.02)	13.6 (0.03)	0.972 (<0.01)	1.30 (<0.01)	0.301 (<0.01)	0.424 (<0.01)
腎臓	23.9 (0.14)	24.0 (0.14)	4.55 (0.03)	7.12 (0.04)	1.39 (0.01)	2.18 (0.01)
肝臓	42.7 (1.1)	39.9 (1.0)	9.14 (0.26)	12.7 (0.35)	2.37 (0.08)	3.50 (0.10)
肺	12.5 (0.04)	15.6 (0.05)	1.57 (0.01)	2.21 (0.01)	0.528 (<0.01)	0.743 (<0.01)
筋肉	6.29 (1.83)	7.79 (2.36)	0.588 (0.18)	0.703 (0.22)	0.191 (0.07)	0.279 (0.09)
膵臓	10.4 (0.02)	13.8 (0.03)	0.685 (<0.01)	0.918 (<0.01)	0.171 (<0.01)	0.248 (<0.01)
下垂体	8.13 (<0.01)	14.7 (<0.01)	0.524 (<0.01)	0.788 (<0.01)	0.330 (<0.01)	0.329 (<0.01)
皮膚	8.83 (1.0)	9.65 (1.2)	3.15 (0.37)	1.30 (0.16)	3.11 (0.43)	0.919 (0.11)
脾臓	7.10 (0.01)	8.61 (0.01)	0.799 (<0.01)	1.17 (<0.01)	0.337 (<0.01)	0.585 (<0.01)
甲状腺	10.2 (<0.01)	12.2 (<0.01)	1.84 (<0.01)	1.71 (<0.01)	0.465 (<0.01)	0.757 (<0.01)
精巣上体	7.46 (0.01)	ns	0.854 (<0.01)	ns	0.312 (<0.01)	ns
前立腺	6.71 (0.01)	ns	0.641 (<0.01)	ns	0.122 (<0.01)	ns
精囊	5.73 (0.01)	ns	0.548 (<0.01)	ns	0.107 (<0.01)	ns
精巣	4.34 (0.03)	ns	0.634 (<0.01)	ns	0.213 (<0.01)	ns
卵巣	ns	11.2 (<0.01)	ns	1.27 (<0.01)	ns	0.366 (<0.01)
子宮	ns	9.20 (0.01)	ns	1.09 (<0.01)	ns	0.364 (<0.01)
GIT	1451 (78.1)	1282 (90)	63.2 (3.8)	184 (11)	0.418 (0.03)	0.567 (0.03)

GIT: 消化管 (内容物を含む) ns: 試料なし * : およその定量限界値未満

[Tz-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比； [Tz-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与 2 時間、24 時間および 120 時間後の血漿中濃度に対する組織内濃度の比（平均値）を表 6 に示す。

投与 2 時間後に比が > 1 であった組織（GI 管および内容物を除く）は、雌雄とも副腎（約 1）、腎臓（約 2）および肝臓（雄は約 3、雌は 2）であった。投与 24 および 120 時間後では、組織—血漿比は概して雌雄の大部分の組織で上昇した。投与 120 時間後では腎臓、肝臓および甲状腺で最大比がみられた。肝臓の比は雄で約 7、雌で 5 であり、甲状腺の比は雄で 11、雌で 4 であった。血液および血球百分の比は、投与 120 時間後では雌雄とも、約 2-3 であった。投与 120 時間後に組織—血漿比が 5 以上だった雌の骨髄は前述の異常な動物に起因するものであった。

表 6 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比

組織	投与後経過時間					
	2 時間		24 時間		120 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	0.670	0.686	0.970	0.795	2.15	1.99
血球	0.523	0.550	0.922	1.32	2.66	2.67
副腎	1.06	1.03	0.608	0.798	2.12	1.08
骨	0.166	0.130	0.158	0.171	0.340	0.423
骨髄	0.323	0.408	0.219*	0.327*	0.357*	5.27
脳	0.100	0.108	0.073	0.073	0.186	0.066
脂肪	0.325	0.257	0.127	0.115	0.461	0.234
心臓	0.483	0.535	0.348	1.49	0.682	0.359
腎臓	1.98	1.66	2.00	2.12	3.42	3.15
肝臓	2.861	2.23	4.59	5.08	7.22	5.44
肺	0.609	0.667	0.571	0.668	1.11	0.678
筋肉	0.285	0.316	0.184	0.181	0.409	0.250
膵臓	0.475	0.510	0.256	0.246	0.415	0.231
下垂体	0.609	0.406	0.278*	0.437*	0.368*	0.545*
皮膚	0.407	0.631	0.717	0.738	3.63	0.576
脾臓	0.309	0.304	0.295	0.339	0.692	1.02
甲状腺	0.574	0.448	7.28	3.15	11.5	4.36
精巣上体	0.360	ns	0.263	ns	0.662	ns
前立腺	0.542	ns	0.219	ns	0.328	ns
精囊	0.314	ns	0.166	ns	0.260	ns
精巣	0.110	ns	0.008	ns	0.002	ns
卵巣	ns	0.424	ns	0.350	ns	0.547
子宮	ns	0.394	ns	0.382	ns	0.472
GIT	17.5	16.1	13.59	7.12	0.937	1.24

GIT：消化管（内容物を含む） ns：試料なし *：組織内濃度は、およその定量限界値未満

[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比； [Tp-¹⁴C]標識エタボキサム 10 mg/kg 投与 2 時間、24 時間および 120 時間後の血漿中濃度に対する組織内濃度の比（平均値）を表 7 に示す。

投与 2 時間後に比が > 1 であった組織（GI 管および内容物を除く）は、雌雄とも腎臓（約 1.8）および肝臓（雄で約 2.9、雌で 2.4）であった。投与 24 から 120 時間後では組織—血漿比は雌雄共に大部分の組織で上昇した。腎臓、肝臓および皮膚の比が最高であった。投

与 120 時間後では肝臓の比は雄で約 6、雌で 9 であり、腎臓の比は雌雄で約 4、皮膚の比は雄で 6、雌で 2 であった。血液および血球画分の比も投与 120 時間後で顕著であり、血液：血漿比は雌雄とも約 2.5、血球画分：血漿比は雄で 2.8、雌で 3.5 であった。投与 120 時間後の甲状腺—血漿比は雄で 1.4、雌で 2.3 であり、甲状腺—血漿比は $[Tz-^{14}C]$ エタボキサムを投与した動物より $[Tp-^{14}C]$ エタボキサムを投与した動物で低かった。

表 7 $[Tp-^{14}C]$ 標識エタボキサム 10 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比

組織	投与後経過時間					
	2 時間		24 時間		120 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	0.705	0.724	0.996	1.21	2.33	2.77
血球	0.546	0.556	1.02	1.28	2.75	3.50
副腎	0.991	0.953	0.574	0.655	1.17*	1.46
骨	0.180	0.148	0.126	0.137	0.277	0.262
骨髓	0.368	0.338	0.248*	0.207*	0.374*	0.819*
脳	0.115	0.124	0.123	0.120	0.135	0.130
脂肪	0.319	0.292	0.088	0.081	0.151*	0.133*
心臓	0.560	0.560	0.373	0.496	0.691	0.720
腎臓	1.87	1.68	1.93	2.27	3.68	4.06
肝臓	2.94	2.39	3.38	4.64	6.03	9.18
肺	0.697	0.698	0.602	0.732	1.19	1.36
筋肉	0.322	0.309	0.234	0.194	0.374	0.338
膵臓	0.551	0.508	0.278	0.289	0.353	0.404
下垂体	0.520	0.413	0.261*	0.381*	0.793*	1.29*
皮膚	0.502	0.455	1.08	0.517	5.87	2.13
脾臓	0.324	0.348	0.300	0.411	0.696	1.20
甲状腺	0.480	0.337	0.547	0.766	1.43*	2.25*
精巣上部	0.351	ns	0.297	ns	0.617	ns
前立腺	0.380	ns	0.321	ns	0.236	ns
精囊	0.331	ns	0.188	ns	0.215	ns
精巣	0.261	ns	0.250	ns	0.303	ns
卵巣	ns	0.426	ns	0.336	ns	0.648
子宮	ns	0.394	ns	0.351	ns	0.629
GIT	21.2	20.4	7.73	13.2	0.781	1.03

GIT：消化管（内容物を含む） ns：試料なし *：組織内濃度は、およその定量限界値未満

$[Tz-^{14}C]$ 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比；

$[Tz-^{14}C]$ 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与 4 時間、24 時間および 120 時間後の血漿中濃度に対する組織内濃度の比（平均値）を表 8 に示す。

投与 4 時間後に比が > 1 であった組織（GI 管および内容物を除く）は、雌雄とも副腎（約 1）、腎臓（約 1.5）および肝臓（約 2.5）であった。投与 4 から 120 時間後では、組織—血漿比は、概して雌雄の大部分の組織で僅かの変化しかみられなかった。組織—血漿比の最大増加が血液、血球画分、腎臓、肝臓、皮膚および甲状腺で認められた。投与 120 時間後には肝臓の比は雄で約 6、雌で 7 であり、甲状腺の比は雄で約 12、雌で 4 であった。血液および血球画分の比は投与 120 時間後には雌雄とも約 2 であった。投与 120 時間後に組織—血漿比がほぼ 8 であった雌の骨髓は、前述の異常な動物に起因するものであった。

表 8 [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比

組織	投与後経過時間					
	4 時間		24 時間		120 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	0.755	0.795	0.839	0.840	1.87	2.11
血球	0.598	0.652	0.695	0.729	2.26	2.74
副腎	1.137	1.22	0.860	1.03	1.03*	1.58
骨	0.239	0.187	0.167	0.164	0.289*	0.257*
骨髓	0.463	0.480	0.253*	0.495	0.379*	7.98
脳	0.162	0.159	0.121	0.114	0.163*	0.152
脂肪	0.539	0.540	0.222	0.265	0.405*	0.287*
心臓	0.675	0.677	0.428	0.514	0.626	0.672
腎臓	1.71	1.39	1.81	1.75	3.26	3.50
肝臓	2.89	2.32	2.94	2.99	5.50	6.58
肺	0.785	0.840	0.599	0.707	0.985	1.13
筋肉	0.469	0.432	0.273	0.310	0.360	0.480
膵臓	0.710	0.753	0.344	0.443	0.366	0.354
下垂体	0.543	0.440	0.424*	0.435*	0.446*	0.599*
皮膚	0.570	0.496	0.992	0.460	3.65	5.16
脾臓	0.443	0.486	0.297	0.364	0.615	0.911
甲状腺	0.531	0.501	4.32	0.998	12.0	3.92
精巣上体	0.466	ns	0.335	ns	0.565	ns
前立腺	0.477	ns	0.296	ns	0.390	ns
精囊	0.392	ns	0.212	ns	0.238	ns
精巣	0.314	ns	0.234	ns	0.293	ns
卵巣	ns	0.592	ns	0.423	ns	0.564*
子宮	ns	0.426	ns	0.417	ns	0.476
GIT	99.4	65.3	19.1	32.0	1.47	0.857

GIT：消化管（内容物を含む） ns：試料なし *：組織内濃度は、およその定量限界値未満

[Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比；

[Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与 4 時間、24 時間および 120 時間後の血漿中濃度に対する組織内濃度の比（平均値）を表 9 に示す。

投与 4 時間後に比が > 1 であった組織（GI 管および内容物を除く）は、雌雄とも副腎（約 1.3）、腎臓（約 1.5）および肝臓（約 2.6）であった。投与 4 および 120 時間後における組織—血漿比は、雌雄の約半分の組織で比較的同程度か、あるいは投与 120 時間後で高かった。

投与 120 時間後では、血液、血球画分、腎臓、肝臓、皮膚（雄のみ）の組織—血漿比が 2 以上であった。投与 120 時間後における雌の最大組織—血漿比は 6 であり、肝臓で認められ、雄における最大組織比は皮膚の 7 であった。腎臓：血漿比は雄で 3、雌で 4 であり、血液の比は約 2.5、血球画分の比は雄で 2.8、雌で 3.5 であった。投与 120 時間後には甲状腺組織—血漿比は雄で 1.1、雌で 1.3 であり、甲状腺—血漿比は [Tz-¹⁴C] 標識エタボキサムを投与した動物より [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサムを投与した動物で低かった。

表9 [Tp-¹⁴C] 標識エタボキサム 150 mg/kg 投与後の、血漿中濃度に対する組織内濃度の比

組織	投与後経過時間					
	4 時間		24 時間		120 時間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
全血	0.748	0.769	1.01	1.04	2.15	2.59
血球	0.631	0.591	0.948	1.08	2.75	3.51
副腎	1.22	1.42	0.687	1.15	1.31*	1.72*
骨	0.262	0.218	0.124	0.153	0.208*	0.241*
骨髓	0.463	0.549	0.176*	0.286*	0.330*	0.390*
脳	0.170	0.172	0.130	0.149	0.136*	0.156*
脂肪	0.486	0.492	0.099*	0.105	0.169*	0.204*
心臓	0.700	0.778	0.389	0.423	0.661	0.763
腎臓	1.67	1.40	1.81	2.32	3.09	3.81
肝臓	2.943	2.33	3.65	4.16	5.20	6.40
肺	0.834	0.898	0.627	0.722	1.16	1.35
筋肉	0.414	0.443	0.235	0.230	0.406	0.485
脾臓	0.696	0.798	0.272	0.300	0.371	0.476
下垂体	0.530	0.898	0.212*	0.254*	0.744*	0.458*
皮膚	0.594	0.568	1.27	0.426	6.86	1.96
脾臓	0.466	0.493	0.320	0.383	0.720	1.03
甲状腺	0.662	0.680	0.742*	0.556*	1.10*	1.32*
精巣上体	0.506	ns	0.341	ns	0.729	ns
前立腺	0.460	ns	0.256	ns	0.271	ns
精囊	0.389	ns	0.219	ns	0.250	ns
精巣	0.298	ns	0.252	ns	0.429	ns
卵巣	ns	0.642	ns	0.414	ns	0.643*
子宮	ns	0.531	ns	0.358	ns	0.676
GIT	115	79.1	24.8	61.4	0.938	1.06

GIT：消化管（内容物を含む） ns：試料なし *：組織内濃度は、およその定量限界値未満

結 論：

放射標識エタボキサム投与後における組織内濃度および消失の経時的変化には、性別または標識位置に関らず類似性が認められた。また、組織内濃度は投与量に比例した。例外として、1) 高用量投与群の雌雄で、投与 24 時間後の全組織において[Tz-¹⁴C]標識エタボキサム投与時の組織内濃度が[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム投与時より高く、また、2) 甲状腺では、投与 24 および 120 時間後の雌雄で[Tz-¹⁴C]標識エタボキサム投与時の濃度が[Tp-¹⁴C]標識エタボキサム投与時より高かった。血漿中濃度に対する組織内濃度の比は、投与後、経時的に増加する傾向が認められた。したがって、エタボキサム残留物は組織に比べ血漿からより速く消失すると推察された。