

(資料 毒-25)

5) 代謝物 AF02-M1 のマウスにおける急性経口毒性試験

検体純度 :

供試動物 : ICR 系 SPF マウス[Crlj:CD1 (ICR)]、雌、投与時 8 週齢、
投与時体重 24.3~30.8 g、一群各 3 匹

観察期間 : 14 日間

投与方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、約 3 時間前より絶食させたマウスに 20 mL/kg 容量で 1 回強制経口投与した。

観察・検査項目 : 一般状態および死亡の有無を投与当日は投与 30 分、3 時間および 6 時間後に、1 日後から 14 日後までは 1 日 1 回観察した。体重は投与直前、投与後 7 日、14 日あるいは死亡発見時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物を剖検した。急性毒性の程度は、毒性等級法 (農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-1、2000 年) により評価した。

結果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、300、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	300<LD ₅₀ ≤2000 (GHS カテゴリー4)
死亡開始時間および終了時間	2000 mg/kg : 投与後 1 日から発現 投与後 2 日までに全例死亡 300 mg/kg : 死亡なし
症状発現時間および消失時間	2000 mg/kg : 投与後 30 分から発現 投与後 2 日までに全例死亡 300 mg/kg : 異常なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

一般状態の観察において 300 mg/kg 用量では異常は認められなかったが、2000 mg/kg 用量でははいずり姿勢、横臥位、うずくまり、鎮静、昏迷、よろめき歩行、攣縮、振戦、呼吸緩徐、体温下降、外陰部被毛の湿潤および全身被毛の湿潤が観察された。体重は、300 mg/kg 用量では投与後 7 日に 4 例が、14 日には 1 例が投与前の値と比べ減少した。

剖検所見においては 300 mg/kg 用量では異常は認められなかったが、2000 mg/kg 用量の死亡例では腺胃部の黒色斑散在および胃のガス貯留が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-26)

6) 代謝物 のマウスにおける急性経口毒性試験

検体純度：

供試動物：ICR系SPFマウス[Crj:CD1(ICR)]、雌、投与時8週齢、
投与時体重25.2~30.3g、一群各3匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を0.5%メチルセルローズ水溶液に懸濁して、約3時間前より絶食させたマウスに20mL/kg容量で1回強制経口投与した。

観察・検査項目：一般状態および死亡の有無を投与当日は投与30分、3時間および6時間後に、1日後から14日後までは1日1回観察した。体重は投与直前、投与後7日、14日に測定した。試験終了時に全生存動物を剖検した。急性毒性の程度は、毒性等級法（農林水産省、12農産第8147号、2-1-1、2000年）により評価した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、300、2000、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	2000<LD ₅₀ (GHS カテゴリー5)
死亡開始時間および終了時間	死亡なし
症状発現時間および消失時間	2000 mg/kg： 投与後30分から発現 投与後3時間までに消失 300 mg/kg： 異常なし
毒性兆候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	300
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

一般状態の観察において300mg/kg用量では異常は認められなかったが、2000mg/kg用量では鎮静が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

体重は 2000 mg/kg 用量では投与後 7 日に 2 例が、14 日には 1 例が投与前の値と比べ減少した。

剖検所見においては、全ての動物に異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-27)

7) 代謝物 AF02-M1 の細菌を用いる復帰突然変異試験

検体：代謝物 AF02-M1

検体純度：

試験方法：ヒステジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537 株) と、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、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で、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を行った。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、代謝活性化系を用いない場合においては 39.1~5000 µg/プレート、代謝活性化系を用いる場合においては 313~5000 µg/プレートの範囲の 5 あるいは 6 濃度で実施した。試験は各濃度 2 プレートをを用いて評価した。

用量設定根拠：

代謝活性化の有無	最高用量 (µg/プレート)						公比	用量段階
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537			
無	5000	5000	5000	5000	1250	2	6	
有	5000	5000	5000	5000	5000	2	5	

試験結果：結果を表 1 に示す。

検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群は溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

以上の結果より、本試験条件下における本剤の細菌に対する突然変異誘発性は、陰性であると結論付けられた。

表 1

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均)				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	-	-	124	6	14	16	10
検体	39.1	-	/	/	/	/	9
	78.1	-	/	/	/	/	9
	156	-	119	7	20	26	8
	313	-	116	9	20	23	6
	625	-	118	5	22	29	4*
	1250	-	119	3	20	21	5*
	2500 [†]	-	129*	5*	16*	22*	/
5000 [†]	-	111*	6*	14*	16*	/	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	638	/	215	/
		0.1	-	/	/	498	/
	NaN ₃	0.5	-	/	487	/	/
	9-AA	80	-	/	/	/	900
溶媒対照 (DMSO)	-	+	109	10	27	30	17
検体	313	+	101	6	20	24	11
	625	+	104	6	29	25	10
	1250	+	109	5	28	24	5
	2500 [†]	+	125	6	23	25	5
	5000 [†]	+	114	5	26	20	5
陽性 対照	2-AA	0.5	+	/	/	359	/
		1	+	849	/	/	/
		2	+	/	215	/	111
		10	+	/	/	368	/

[†] : 検体の析出がみられた。

* : 試験菌株に対し生育阻害が認められた。

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

NaN₃ : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-28)

8) 代謝物 の細菌を用いる復帰突然変異試験

検体:

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* (TA100、TA1535、TA98、TA1537 株) と、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、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で、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を行った。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、代謝活性化系を用いない場合においては 2.4~5000 µg/プレート、代謝活性化系を用いる場合においては 39.1~5000 µg/プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は各濃度 2 プレートを用いて評価した。
用量設定根拠;

最高用量 (µg/プレート)

代謝活性化の有無	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	公比	用量段階
無	5000	78.1	5000	1250	78.1	2	6
有	5000	1250	5000	5000	1250	2	6

用量設定試験において、代謝活性化系を用いない場合の TA1535 および TA1537 株について生育阻害を示さない用量が 4 用量以上得られなかった。そこでこれら 2 菌株を用いて本試験と同じ用量で代謝活性化系を用いない追加試験を行った。

試験結果: 結果を表 1 に示す。追加試験結果を表 2 に示す。

検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株で溶媒対照群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

一方、陽性対照群は溶媒対照群に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、本試験条件下における本剤の細菌に対する突然変異誘発性は、陰性であると結論した。

表1

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均)				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	-	-	135	5	27	18	4
検体	2.4	-	/	6	/	/	6
	4.9	-	/	8	/	/	5
	9.8	-	/	5	/	/	3
	19.5	-	/	7	/	/	4
	39.1	-	/	6	/	16	7
	78.1	-	/	3*	/	15	2*
	156	-	/	101	/	27	13
	313	-	/	96	/	31	12
	625	-	/	91	/	25	10*
	1250 [†]	-	/	92	/	20	9*
	2500 [†]	-	/	90	/	28	/
5000 [†]	-	/	91*	/	22	/	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	540	/	168	/
		0.1	-	/	/	445	/
	NaN ₃	0.5	-	/	469	/	/
	9-AA	80	-	/	/	/	637
溶媒対照 (DMSO)	-	+	123	5	36	22	13
検体	39.1	+	/	7	/	/	19
	78.1	+	/	5	/	/	14
	156	+	/	130	7	29	13
	313	+	/	141	9	29	22
	625	+	/	125	5*	39	26
	1250	+	/	115	8*	28	23
	2500	+	/	109	/	29	20
	5000 [†]	+	/	108	/	31	18
陽性 対照	2-AA	0.5	+	/	/	303	/
		1	+	787	/	/	/
		2	+	/	173	/	99
		10	+	/	/	316	/

[†] : 検体の析出がみられた。

* : 試験菌株に対し生育阻害が認められた。

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

NaN₃ : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均)				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	-	-		8			6
検体	2.4	-		7			7
	4.9	-		7			7
	9.8	-		6			4
	19.5	-		5			6
	39.1	-		2			6
	78.1	-		7*			3*
陽性 対照	AF-2	0.01					
		0.1					
	NaN ₃	0.5		528			
	9-AA	80					749

*: 試験菌株に対し生育阻害が認められた。

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

NaN₃: アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

3. 製剤

(資料 毒-29)

1) AF-0201 粉剤 DL のラットにおける急性経口毒性試験

検体純度：2.03%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 2.03%
 鉍物質微粉等 ; 97.97%

供試動物：Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)]、雌、投与時 8 週齢、
 投与時体重 176~196 g、一群各 3 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を注射用水に懸濁して、一晚絶食させたラットに 20 mL/kg 容量で 1 回強制
 経口投与した。

観察・検査項目：一般状態および死亡の有無を投与当日は投与 30 分、3 時間および 6 時間
 後に、1 日後から 14 日後までは 1 日 1 回観察した。体重は投与直前、投与 7 日
 および 14 日後に測定した。試験終了時の全生存動物を剖検した。急性毒性の程
 度は、毒性等級法（農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-1、2000 年）により評
 価した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000, 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	2000<LD50 (GHS カテゴリー5)
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現時間および消失時間	一般状態の変化なし
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

一般状態の観察において異常は認められなかった。体重は全例で投与前の値と比べ
 増加した。剖検所見においても異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-30)

2) AF-0201 粉剤 DL のラットにおける急性経皮毒性試験

検体純度：2.03%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 2.03%
 鋳物質微粉等 ; 97.97%

供試動物：Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)]、雌雄、投与時 8 週齢、
 投与時体重 雄 328~341 g、雌 203~215 g、一群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：2000 mg/kg の検体を注射用水 0.5 mL で湿らせた 4×5 cm のパッドの上に均一に
 載せ、前日剪毛したラットの背部中央に当てて閉塞性サージカルテープで固定
 し 24 時間貼付投与した。投与終了後、残存する検体を微温湯で除去した。

観察・検査項目：一般状態および死亡の有無を投与当日は投与 1、3 および 6 時間後に、1
 日後から 14 日後 (試験終了日) までは 1 日 1 回観察した。体重は投与直前、投
 与 7 日および 14 日後に測定した。試験終了時に全生存動物を剖検した。

結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
性		
投与量 (mg/kg)	2000	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現および消失時間	一般状態の変化なし	一般状態の変化なし
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

雌雄ともに死亡は認められず、毒性を示す臨床症状も認められなかった。体重は 7、
 14 日とも投与前の値と比べて増加していた。剖検においては、雌雄ともに異常は認
 められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-31)

3) AF-0201 粉剤 DL のウサギにおける皮膚刺激性試験

検体純度：2.03%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 2.03%

鉍物質微粉等 ; 97.97%

供試動物：ニュージーランドホワイト種 SPF ウサギ[KbI:NZW]、雌、投与時 11 週齢、
投与時体重 2210~2452 g、一群各 3 匹

観察期間：3 日間

投与方法：検体 0.5 g を刈毛した動物の背側部の皮膚(約 2.54 cm 四方)に処理し、脱イオン水(0.5 mL)で湿らせた 2.5×2.5 cm のガーゼで覆った。さらに、その上をリント布およびサージカルテープを用いて半閉塞貼付した。暴露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は脱イオン水を用いて洗い流した。

観察項目：暴露終了後、1、24、48 および 72 時間後に適用部分の刺激性変化(紅斑・痂皮、浮腫)の有無などを観察し、毒性試験指針(農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-4、2000 年)に従って採点した。

結果：いずれの観察においても、紅斑、痂皮、浮腫およびその他の刺激性変化は認められなかった。

観察した刺激性変化の採点を下表に示す。

項目	最高評点	暴露後時間			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0

注) 数値は 3 匹の平均値

以上の結果から、AF-02 2.03%粉剤はウサギの皮膚に対して無刺激性であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-32)

4) AF-0201 粉剤 DL のウサギにおける眼刺激性試験

検体純度：2.03%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 2.03%

鉱物質微粉等 ; 97.97%

供試動物：ニュージーランドホワイト種 SPF ウサギ[Kbl:NZW]、雌、投与開始時 11 週齢、
投与開始時体重 2200 g~2725 g、一群各 3 匹

観察期間：3 日間

投与方法：検体 0.1 g を左眼に適用し、洗眼群 3 匹は 30 秒後に微温湯で 30 秒間洗眼した。
非洗眼群 3 匹については洗眼しなかった。右眼は無処理対照とした。

観察項目：適用 1、24、48 および 72 時間後に、角膜、虹彩、結膜を観察し、その刺激性
変化を毒性試験指針（農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-5、2000 年）に従っ
て採点した。結膜の分泌物は以下の基準に従い採点した。

	評点
分泌物なし.....	0
正常よりわずかに多い分泌物（正常動物の鼻側眼角に見られる 少量は含まない）.....	1
眼瞼および眼瞼に接する被毛を浸潤する分泌物.....	2
眼瞼、眼瞼に接する被毛および眼の周囲を相当範囲浸潤する分泌物.....	3

結果： 観察した刺激性変化の採点を下表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

項目			最高 評点	適用後時間				
				1時間	24時間	48時間	72時間	
非洗眼群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	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	0	0
			分泌物	3	2	0	0	0
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	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	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0
	動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	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	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0
合計			60	9	6	0	0	
平均*			20	3.0	2.0	0	0	
MTS**			110	6.0	4.0	0	0	

項目			最高 評点	適用後時間				
				1時間	24時間	48時間	72時間	
洗眼群 (3匹平均)	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	
		浮腫	4	0.3	0	0	0	
		分泌物	3	0.3	0	0	0	
	合計			60	5	0	0	0
	平均*			20	1.7	0	0	0
MTS**			110	3.3	0	0	0	

* 農林水産省の毒性試験指針による評価点（最高20点）

** Draize法によるMean Total Score(MTS), 申請者が個体別の評価点表より算出した。
非洗眼群および洗眼群のMTSの最大値は適用後1時間の6.0および3.3であり、同法の刺激性分類では最小の刺激性の範囲内であった。

洗眼群、非洗眼群ともに角膜および虹彩に刺激性変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

結膜では、洗眼群に適用1時間後に発赤（最高評点1）、浮腫（最高評点1）および結膜分泌物（最高評点2）の刺激性変化が認められたが、何れの変化も適用48時間後までに消失した。一方、非洗眼群には適用1時間後に発赤、浮腫および結膜分泌物の刺激性変化が認められたが、何れの変化も適用24時間後までに消失した。

以上の結果から、AF-02 2.03%粉剤はウサギの眼粘膜に対して極軽度の刺激性を有するものと思われる。また、投与30秒後の洗眼による洗眼効果が認められた。

申請者註) Draize 法による Mean Total Score(MTS)では、AF-02 原体はウサギの眼粘膜に対して、最小の刺激性があるものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

(資料 毒-33)

5) AF-0201 粉剤 DL のモルモットを用いた皮膚感作性試験

検体純度：2.03%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 2.03%
鉍物質微粉等 ; 97.97%

供試動物： ハートレイ系 SPF モルモット [Slc:Hartley]、雌、
第 1 回感作投与時 7 週齢、第 1 回感作投与時体重 385~485 g、
試験群 (A 群) 20 匹、試験群の陰性対照群 (B 群) 10 匹、陽性対照群 (C 群)
10 匹、陽性対照群の陰性対照群 (D 群) 5 匹

観察期間： 惹起経皮貼付除去後 48 時間

試験操作： [Buehler 法]

投与量設定根拠：

感作経皮投与： 感作期間開始の前日に動物の肩部を剪毛・剃毛した。感作経皮投与開始日 (第 1 回)、投与開始後 7 日 (第 2 回) および 14 日 (第 3 回) に以下の物質を 2×2 cm のリント布に塗布し、肩部に 6 時間閉塞貼付した。

群	物質(媒体)	濃度(%)
A	検体 (白色ワセリン)	50
C	ヘキシルシンナムアルデヒド (HCA)	100

B 群では検体を用いず A 群と同様の処置を行い、D 群では HCA を用いず C 群と同様の処置を行った。

惹起経皮投与： 第 1 回感作投与後 28 日に、前日剪毛した側腹部左側に、A 群および B 群は 50%検体 (白色ワセリンに溶解) 0.2 g を塗布したリント布、C 群および D 群は HCA を 0.2 mL 滴下したリント布を貼付塗布し、約 6 時間閉塞貼付した。A 群および B 群の右側腹部は検体を用いず左側側部と同様の処置をした。C 群および D 群の右側腹部では HCA を用い

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

ずに左側側部と同様の処置をした。

観察項目： 惹起経皮貼付除去後 24 および 48 時間に、適用部位の紅斑および浮腫の有無等を肉眼的に観察した。紅斑、浮腫等の判定は農林水産省毒性試験ガイドラインの基準に従った。また感作性の評価は下表に示す Magnusson、B. and Kligman、A. M. (1969) の基準に従った。ただし、感作率が 0% であった場合は感作性を「陰性」と評価した。

感作率 (%)	区分	程度
0 - 8	I	微弱
9 - 28	II	軽度
29 - 64	III	中等度
65 - 80	IV	重度
81 - 100	V	極度

結果： 各観察時間における感作変化が認められた動物数を下表に示す。

群	感作経皮投与	惹起経皮投与	供試動物数	感作反応動物数										感作陽性率 (%)	
				24 時間後					48 時間後					24 時間	48 時間
				皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計		
				0	1	2	3		0	1	2	3			
A	50% 検体	50% 検体	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0	0
B	白色ワセリン	50% 検体	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
C	100% HCA	50% HCA	10	2	4	4	0	8/10	4	4	2	0	6/10	80	60
D	0% HCA	50% HCA	5	5	0	0	0	0/5	5	0	0	0	0/5	0	0

HCA：ヘキシルシンナムアルデヒド

試験群では、いずれの動物にも皮膚反応は認められず皮膚感作率は 0% であった。一方、陽性対照群における皮膚感作陽性率は 80% であり試験が被験物質の皮膚感作性を検出する方法として妥当であったことが確認された。

以上の結果から、AF-02 2.03% 粉剤の皮膚感作性は陰性であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

6) AF-0201 顆粒水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 毒-34)

検体純度：20.78%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 20.78%

賦物質微粉等 ; 79.22%

供試動物：Cri:CD(SD)系ラット (SPF 動物)、雌、投与時 9 週齢、

投与時体重 210~230 g、一群 3 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を 0.5%メチルセルロースに懸濁させ、10 mL/kg の容量で 1 回強制経口投与した。

観察・検査項目：一般状態および死亡の有無を投与当日は投与直前および投与 15、30 分後、投与 1、2、4 および 6 時間後に、投与後 1 日から 14 日 (実験終了日) までは 1 日 2 回観察した。体重は投与直前、投与後 1、3、5、7 および 14 日に測定した。実験終了時に全生存動物を剖検した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000, 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000
死亡開始および終了時間	投与 2 日後に 1 例死亡
症状発現および消失時間	投与後 30 分より鎮静、歩行異常を示す動物がみられたが、投与 2 日後までには回復
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	—
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	—

初回投与群では 3 例中 1 例の死亡例を認めたが、同一条件で投与した 2 回目の群では死亡例を認めなかった。一般状態では、投与後 30 分より鎮静、歩行異常を示す動物がみられたが、投与 2 日後までには回復した。体重では、投与 1 日後に体重減少が見られたが 3 日後には体重増加を認めた。剖検においては、死亡動物および 14 日後屠殺動物ともに異常所見は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

7) AF-0201 顆粒水和剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 毒-35)

検体純度：20.78%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 20.78%
 鋳物質微粉等 ; 79.22%

供試動物：CrI:CD(SD)系ラット (SPF 動物)、雌雄、投与時雄 7 週齢、雌 9 週齢
 投与時体重 雄 279~291 g、雌 202~252 g、一群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を少量の蒸留水で湿らせ、前日剪毛したラットの背部皮膚に 4×5 cm の広さ
 で塗布し、非刺激性テープで固定し、24 時間貼付投与した。投与終了後、残存す
 る検体を注射用水で除去した。

観察・検査項目：一般状態および死亡の有無を投与当日は投与直前および投与 15、30 分後、
 投与 1、2、4 および 6 時間後に、投与後 1 日から 14 日 (実験終了日) までは 1
 日 2 回観察した。体重は投与直前、投与後 3、7 および 14 日に測定した。実験終
 了時に全生存動物を剖検した。

結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
性	雄	雌
投与量 (mg/kg)	2000	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始および終了時間	投与 4 日後に 1 例死亡	死亡例なし
症状発現および消失時間	一般状態の変化なし	一般状態の変化なし
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

雌雄とも検体投与による死亡例を認めず、一般状態および体重にも影響はなかった。剖検
 においても、雌雄ともに異常は認められなかった。なお、投与 4 日後に死亡した雄の 1 例
 は肉眼的に水腎症と膀胱の拡張が認められ、これは自然発生的な尿路系の異常 (排尿障害)
 が、試験処置 (テープによる拘束) のストレスにより、状態を増悪させたものと考え
 られた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

8) AF-0201 顆粒水和剤のウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 毒-36)

検体純度：20.78%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 20.78%

賦物質微粉等 ; 79.22%

供試動物：日本白色種 SPF ウサギ (Kbl:JW)、雄 3 匹、投与時 10 週齢
投与時体重 2140~2424g

観察期間：3 日間

投与方法：投与前日に剪毛したウサギの背部に注射用水で湿らせたリント布 (2.5×2.5 cm) に検体 0.5 g をのせて閉塞貼布した。閉塞貼布 4 時間後に、微温湯の注射用水を含ませた脱脂綿で、皮膚に残留した検体を除去した。

観察項目：検体除去約 1, 24, 48 および 72 時間後に塗布部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無を観察し Draize 法に従って採点した。

結 果：

項目	最高評点	検体除去後時間			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0
合計	8	0	0	0	0

表の点数は 3 匹の平均値である。

検体除去 1, 24, 48 および 72 時間後の観察時点で皮膚刺激反応は認められず、皮膚一次刺激評点(PII)は 0 で「刺激性なし」に分類された。

以上の結果から、検体は、ウサギの皮膚に対して刺激性を有しないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

9) AF-0201 顆粒水和剤のウサギにおける眼刺激性試験

(資料 毒-37)

検体純度：20.78%製剤 (非 GLP 分析による)
 組成 AF-02 原体 ; 20.78%
 鋳物質微粉等 ; 79.22%

供試動物：日本白色種 SPF ウサギ (Kbl:JW)、雄、投与時 10 週齢、
 投与時体重 1976~2186 g、一群雄 3 匹

観察期間：3 日間

投与方法：検体 0.1 mL 容量 (0.049 g) を右眼に適用した。洗眼群については、点眼約 30 秒後に 30 秒間、微温湯の生理食塩液にて洗眼した。左眼は無処置対照とした。

観察項目：投与約 1, 24, 48 および 72 時間後に角膜、虹彩および結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法に従って採点した。

結果：以下の表に示した。

項目			最高 評点	投与後時間				
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
非洗眼群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度 ^{a)}	4	0	0	0	0
			面積 ^{b)}	4	0	0	0	0
		虹彩 ^{c)}		2	0	0	0	0
		結膜	発赤 ^{d)}	3	0	0	0	0
			浮腫 ^{e)}	4	0	0	0	0
			分泌物 ^{f)}	3	2	0	0	0
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4	0	1	0	0
			面積	4	0	1	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物	3	2	0	0	0
	動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
結膜		発赤	3	1	1	1	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	
合計*			330	16	7	2	0	
平均**			110	5.3	2.3	0.7	0.0	

* : Draize 法評価点の合計 : Score 1(a)×b)×5) + Score 2 (c)×5) + Score 3 (d)+e)+f)×2

** : Draize 法評価点の合計の平均値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

項目			最高 評点	投与後時間			
				1時間	24時間	48時間	72時間
非洗眼群 (3匹の平均*)	角膜	程度 ^{a)}	4	0	0.3	0	0
		混濁	面積 ^{b)}	4	0	0.3	0
	虹彩 ^{c)}		2	0	0	0	0
	結膜	発赤 ^{d)}	3	0.7	0.3	0.3	0
		浮腫 ^{e)}	4	0	0	0	0
		分泌物 ^{f)}	3	2.0	0	0	0
	合計**		110	5.3	2.3	0.7	0
洗眼群 (3匹の平均*)	角膜	程度	4	0	0	0	0
		混濁	面積	4	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0.3	0	0	0
	合計**		110	2.7	0	0	0

*：各採点の平均値は、原報に基づき申請者が算出した。

**：Draize法による評価点：Score 1(a)×b)×5) + Score 2 (c)×5) + Score 3 (d)+e)+f))×2

角膜では非洗眼群で投与 24 時間後に混濁がみられたが 48 時間後には消失した。洗眼群では刺激性変化はみられなかった。

虹彩では非洗眼群および洗眼群ともに刺激性変化はみられなかった。

結膜では非洗眼群および洗眼群ともに分泌物および発赤がみられた。非洗眼群ではこれらが投与 72 時間後に全て消失したのに対し、洗眼群では投与 24 時間後に全て消失した。

以上の結果から、検体のウサギの眼粘膜に対する刺激性はごく軽度であり、洗眼により刺激性は軽減されると判断する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

10) AF-0201 顆粒水和剤のモルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 毒-38)

検体純度：20.78%製剤 (非 GLP 分析による)

組成 AF-02 原体 ; 20.78%

賦物質微粉等 ; 79.22%

供試動物：Hartley 系 SPF モルモット (Slc:Hartley)、雄、投与時 6 週齢、

検体処置群 (20 匹)、陰性対照群 (10 匹)

陽性対照群 (10 匹)、陽性対照非感作群 (5 匹)

投与時体重 314~417 g

観察期間：惹起曝露除去後 48 時間

試験操作：Buehler 法

投与量設定根拠；

感作；感作までに適用部位（腹側部左側）を刈毛し、リント布に検体処置群は 50%濃度の検体 0.2 g をのせて閉塞貼付した。閉塞貼付 6 時間後に微温湯の注射用水を含ませた脱脂綿で皮膚に残留した検体を除去した。初回感作の 7 及び 14 日後に、再感作を実施した。陰性対照群及び陽性対照非感作群には同様の方法で白色ワセリン 0.2 g を、陽性対照群には 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) を 1%の濃度で 6 時間閉塞貼付した（溶媒：白色ワセリン）。

惹起；最終感作の 14 日後に刈毛した部位（腹側部右側）に、検体処置群及び陰性対照群には 50%濃度の検体 0.2 g を、陽性対照群および陽性対照非感作群には、0.5%DNCB を同様の方法で 6 時間閉塞貼付した。

観察項目：惹起貼付除去 24 及び 48 時間後に、適用部位の皮膚反応を肉眼的に観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

結果：以下の表に示した。

群	動物数	投与量		24 時間後皮膚反応評点					平均評点	48 時間後皮膚反応評点					平均評点	陽性率	
		感作	惹起	0	1	2	3	4		0	1	2	3	4			
検体処置群	20	検体 50%	検体 50%	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
陰性対照群	10	—	検体 50%	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
陽性対照群	10	DNCB 1%	DNCB 0.5%	0	0	8	2	0	2.2	0	0	6	4	0	2.4	100	
陽性対照非感作群	5	—	DNCB 0.5%	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	

検体処置群ではいずれの動物においても皮膚反応は認められなかった。また陰性対照群においても皮膚反応は認められなかった。一方、陽性対照群では、24,48時間後とも陽性率は 100%であり、陽性対照非感作群では、皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から、検体はモルモットの皮膚に対して、感作性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

11) AF-0201フロアブル20のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 毒-39)

検 体 : AF-0201 フロアブル 20

組 成 : テブフロキン 20%、その他の成分 80%

供試動物 : CD(SD)系ラット、各段階雌 3 匹

投与時週齢 ; 8 週齢、投与時体重 ; 172~184 g

観察期間 : 14 日間

試験方法 : 毒性等級法

投与方法 : 検体を蒸留水で希釈し、約 16 時間絶食させた動物に胃ゾンデを用いて、投与容量 10 mL/kg 体重で単回強制経口投与した。投与は第 1、2 及び 3 段階の 3 回実施した。絶食後の再給餌は投与後 4 時間を実施した。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を 14 日間観察し、体重測定を投与日、投与後 1、3、7 及び 14 日に実施した。死亡及び生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果 :

投 与 方 法	経 口
投与量 (mg/kg)	2000、300
LD ₅₀ (mg/kg)	300<LD50 値≤2000
死亡開始時間及び終了時間	投与 4 時間後から開始 投与 2 日後に終了
症状発現時間及び消失時間	投与 30 分後から発現*)
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300

*) : 消失は認められなかった。

死亡例は投与 4 時間及び 2 日後に認められた。中毒症状としては自発運動の減少、腹臥/横臥あるいは間代性痙攣が認められた。体重に検体投与の影響は認められなかった。剖検では死亡例に胃の暗赤色巣が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

1.2) AF-0201 フロアブル 20 のラットにおける急性経皮毒性試験 (資料 毒-40)

検 体 : AF-0201 フロアブル 20

組 成 : テブフロキン 20%、その他の成分 80%

供試動物 : CD(SD)系ラット、一群雌雄各 5 匹

投与時週齢 ; 8 週齢、投与時体重 ; 雄 264~273 g 雌 200~213 g

観察期間 : 14 日間

投与方法 : 所定量の検体をリント布 (約 20 cm²) にのせ、刈毛した背部皮膚 (約 30 cm²) に貼付して粘着性伸縮テープを用いて閉塞した。24 時間閉塞した後、リント布及び粘着性伸縮テープを除去し、適用部位を水及びガーゼを用いて清拭した。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を 14 日間観察し、体重測定を投与日、投与後 3、7 及び 14 日に実施した。観察期間終了時の全生存動物について投与部位を含む肉眼的病理検査を実施した。

結 果 :

投 与 方 法	経 皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 > 2000 雌 > 2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000

症状の発現及び死亡は認められず、体重及び剖検においても検体投与による影響は認められなかった。また、投与部位の皮膚にも異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

13) AF-0201フロアブル20のウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 毒-41)

検 体：AF-0201フロアブル20

組 成：テブフロキン 20%、その他成分 80%

供試動物：日本白色種雌性ウサギ、1群3匹、
使用時週齢；18週齢、使用時体重；3.47~3.57 kg

観察期間：72時間

投与方法：検体0.5 mLをリント布(2.5 cm × 2.5 cm)に塗布して、剪毛した背部の無傷皮膚1カ所に貼付・固定した。曝露時間は4時間とし、皮膚表面に付着した検体は注射用水を用いて拭き取った。

観察項目：検体除去1、24、48及び72時間後に適用部分の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無等を観察し、Draize法に従って採点した。また、試験期間中、一般状態を観察し、投与日及び観察終了日に体重を測定した。

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

表 AF-0201フロアブル20のウサギの皮膚に対する局所反応の強さ

動物番号	項目	最高評点	検体除去後の経過時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

検体除去 1、24、48 及び 72 時間後のいずれの観察時にも皮膚反応は認められなかった。
試験期間中、一般状態及び体重に異常は認められなかった。

以上の結果から、AF-0201 フロアブル 20 はウサギの皮膚に対して刺激性はないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

1.4) AF-0201 フロアブル 20 のウサギにおける眼刺激性試験

(資料 毒-42)

検 体：AF-0201 フロアブル 20

組 成：テブフロキン 20%、その他成分 80%

供試動物：日本白色種雌性ウサギ、1 群各 3 匹、

非洗眼群：使用時週齢；15 週齢、使用時体重；2.48～2.73 kg

洗眼群：使用時週齢；15 週齢、使用時体重；2.54～2.65 kg

観察期間：72 時間

投与方法：検体 0.1 mL をウサギの左眼瞼結膜嚢に適用した。非洗眼群では、適用後の洗眼を実施しなかった。洗眼群では、適用 30 秒後に、100 mL の注射用水で 30 秒間洗眼した。

観察項目：適用 1、24、48 及び 72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激反応を観察し、Draize 法に従って反応の強さを点数化して記録し、Kay and Calandra の方法により刺激性の強さを分類した。

結果： 観察した刺激反応の採点の結果を表 1 及び 2 に示す。

非洗眼群では、適用 1、24、48 及び 72 時間後のいずれの観察時にも角膜、虹彩及び結膜に刺激反応は認められなかった。刺激点数の平均合計点 (MTS) はいずれの観察時にも 0 であり、Kay and Calandra の区分により刺激性なしと判定された。

洗眼群でも、適用 1、24、48 及び 72 時間後のいずれの観察時にも角膜、虹彩及び結膜に刺激反応は認められなかった。非洗眼群及び洗眼群のいずれにも刺激反応は認められなかったことから、洗眼効果は確認できなかった。

以上の結果から、AF-0201 フロアブル 20 はウサギの眼に対して、刺激性なしと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 1 AF-0201 フロアブル 20 のウサギの眼に対する局所反応の強さ(非洗眼群)

項 目			最高 評点※	適用後時間 (時間)				
				1	24	48	72	
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0
	動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
結膜		発赤	3	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	
3 匹の合計点			330	0	0	0	0	
平均合計点 (MTS) *			110	0	0	0	0	

※：判定基準の最高評点、*：Draize 法による点数 (最高 110 点/匹)

表 2 AF-0201 フロアブル 20 のウサギの眼に対する局所反応の強さ(洗眼群)

項 目			最高 評点※	適用後時間 (時間)				
				1	24	48	72	
洗眼群 (3 匹平均)	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	
	虹 彩		2	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	
	平均合計点 (MTS) *			110	0	0	0	0

※：判定基準の最高評点、*：Draize 法による点数 (最高 110 点/匹)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

1.5) AF-0201 フロアブル 20 のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (資料 毒-43)

検 体 : AF-0201 フロアブル 20

組 成 : テブフロキン 20%、その他成分 80%

供試動物 : Hartley 系雌モルモット、検体処理群 20 匹、検体対照群 10 匹
投与開始時週齢 ; 6 週齢、投与開始時体重 ; 352~420 g

観察期間 : 感作開始後 30 日間

試験操作 : Buehler Test 法

投与量設定根拠 ;

感作 ; 前日に 5×5cm の大きさに刈毛、剃毛した動物の左側胴部に、100%被験液の 0.2mL を直径 2.5cm のパッチに均一に塗布して 6 時間閉塞貼付した。初回感作より 7 日及び 14 日後にも同様に処置し、計 3 回感作を行った。検体対照群には注射用水のみを使用し、検体処理群と同様に処置した。

惹起 ; 最終感作の 13 日後に 5×5cm の大きさに刈毛、剃毛した動物の右側胴部に、その翌日、100%被験液の 0.2mL を直径 2.5cm のパッチに均一に塗布して 6 時間閉塞貼付した。

観察項目 : 感作及び惹起の検体除去 24 及び 48 時間後に投与部位の紅斑及び浮腫の有無等を肉眼的に観察し、下記の Magnusson & Kligman 法の評価基準により採点した。

皮膚反応の程度	評点
肉眼的変化なし	0
散在性又は斑状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と浮腫	3

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

惹起後の観察において、検体対照群に認められない皮膚反応が検体処理群で認められた場合に陽性とした。

一般状態を観察終了日まで1日1回観察し、体重を感作開始日、最終感作日、惹起日及び観察終了日に測定した。

結果：惹起後の各観察時期における皮膚反応が認められた動物数およびその評点を下表に示す。

表 AF-0201 フロアブル 20 のモルモットの皮膚に対する惹起後の皮膚反応

群	供試動物数	検体濃度 感作 / 惹起	感作反応動物数								計		感作陽性率
			24時間				48時間				24時間	48時間	
			皮膚反応評点										
			0	1	2	3	0	1	2	3			
検体処理群	20	100% / 100%	20	0	0	0	20	0	0	0	0/20	0/20	0%
検体対照群	10	0% / 100%	10	0	0	0	10	0	0	0	0/10	0/10	0%

検体処理群では、検体除去 24 及び 48 時間後の観察で、20/20 全例に皮膚反応は認められず、陽性率は 0%であった。検体対照群においても、10/10 全例で皮膚反応は認められず、陽性率は 0%であった。

一般状態及び体重推移には検体適用による影響は認められなかった。

なお、陽性対照 (DNCB: 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene) を用いた試験 (株式会社ボゾリサーチセンター、試験期間: 2012年3月12日~5月30日、感作1%、惹起0.25%の濃度で実施) において、DNCB 処理群の陽性率は 100%であった。

以上の結果より、AF-0201 フロアブル 20 の皮膚感作性は陰性と判断された。

IX. 動植物及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 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
運-1 (GLP)	動物体内 における 代謝	ラット 雌雄	<p>試験項目：排泄パラ ンス</p> <p>試験方法： [¹⁴C]AF-02をラット 雌雄に 2mg/kg また は 100mg/kg の用量 で単回経口投与し た。</p> <p>投与96時間後に屠殺 し、残部体組織、消 化管（内容物を含む） 及びケージ洗液の放 射能を測定した。</p> <p>尿中の放射能を投与 6,12,24,48,72 及び 96 時間後に、糞中の 放射能を投与 24,48,72及び96時間 後に測定した。</p> <p>全時点の試料を合わ せ、糞尿中の代謝物 をHPLC及び LC-MS(MS)で同定、 定量した。</p>	<p>投与した[¹⁴C]AF-02は投与後96時 間までにほとんどが排泄された。低用 量/雄では尿と糞への排泄割合は同 じ（尿：46.2%、糞：45.5%）であっ たが、それ以外の試験群では尿への排 泄割合の方が比較的高かった（尿： 57.4~61.7%、糞：35.2~38.3%）。 投与96時間後における消化管（含内 容物）及び残部体組織の残留量はそれ ぞれ投与量の0.2~0.3%及び1.2~ 2.0%であった。</p> <p>尿中においていずれかの試験群で 投与量の5%を超えて検出された主要 代謝物は であった。</p>		287

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

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
				糞中においていずれかの試験群で 投与量の5%を超えて検出された主要 代謝物は		
運-2 (GLP)	動物体内 における 代謝	ラット 雌雄	試験項目：血中動態 試験方法： [¹⁴ C]AF-02を頸静脈 にカニューレを施し たラット雌雄に 2mg/kg または 100mg/kg の用量で 単回経口投与した。	血漿中の薬物動態パラメータは以下 の通りであった。 <低用量> T _{max} ：3時間 (雌雄) C _{max} ：4.38 μg eq/g (雄) : 5.10 μg eq/g (雌) AUC _{0-∞} ：57.16 μg eq/g·h (雄) : 72.80 μg eq/g·h (雌) T _{1/2} ：31.95時間 (雄)		282

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
			低用量投与群は、投与 0.5, 1, 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 時間後に、高用量投与群は投与 0.5, 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 時間後に採血し、血漿 (および全血) 中の放射能を測定した。	<p>: 33.32 時間 (雌)</p> <p><高用量></p> <p>Tmax : 12 時間 (雌雄)</p> <p>Cmax : 136.9 $\mu\text{g eq/g}$ (雄)</p> <p>: 132.2 $\mu\text{g eq/g}$ (雌)</p> <p>AUC_{0-∞} : 3373.2 $\mu\text{g eq/g}\cdot\text{h}$ (雄)</p> <p>: 3744.5 $\mu\text{g eq/g}\cdot\text{h}$ (雌)</p> <p>T_{1/2} : 30.56 時間 (雄)</p> <p>: 31.88 時間 (雌)</p> <p>用量に依りなく、性差は認められなかった。</p>		
運-2 (GLP)	動物体内における代謝	ラット 雌雄	<p>試験項目：組織分布</p> <p>試験方法： [¹⁴C]AF-02 をラット雌雄に 2mg/kg または 100mg/kg の用量で単回経口投与した。</p> <p>低用量投与群は、投与 3, 24, 96 時間後に、高用量投与群は投与 12, 48, 96 時間後に屠殺し、組織中の放射能を測定した。</p>	<p>低用量における Cmax 時点 (投与 3 時間後) では、消化管 (含内容物)、骨格筋、血液、肝臓、カーカス、脂肪及び骨 (雌のみ) に投与量の 1% 以上の分布を認めた。全ての臓器・組織中の ¹⁴C 濃度は投与後 96 時間までに減衰し、肝臓を除き 0.08 $\mu\text{g eq/g}$ 以下となった。</p> <p>高用量における Cmax 時点 (投与 12 時間後) においても投与量の 1% 以上の分布を認めた組織は、低用量と同じであった (骨を除く)。全ての臓器・組織中の ¹⁴C 濃度は投与後 96 時間までに減衰した。投与 96 時間後では、血液、肝臓、ハーダー腺、腎臓、副腎、消化管 (内容物含む)、カーカス (雄のみ) 及び卵巣 (雌のみ) で 1.0 $\mu\text{g eq/g}$ 以上の濃度を示した。</p>		294
運-3 (GLP)	動物体内における代謝	ラット 雌雄	<p>試験項目：胆汁排泄</p> <p>試験方法： [¹⁴C]AF-02 を胆管に</p>	<p>投与した [¹⁴C]AF-02 は投与 48 時間後において、低用量/雄では胆汁及び尿への排泄割合は同じ (胆汁: 42.8%、尿: 45.7%) であったが、それ以外の</p>		301

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
			<p>カニユーレを施したラット雌雄に2mg/kg または100mg/kg の用量で単回経口投与した。</p> <p>投与 6,24,48 時間後の胆汁及び尿中の放射能、24,48 時間後の糞中の放射能を測定した。</p> <p>また投与 48 時間後に屠殺し、残部体組織、消化管(内容物を含む)及びケージ洗液の放射能を測定した。</p> <p>全時点の試料を合わせ、胆汁中の代謝物を HPLC、LC-MS(MS)で同定、定量した。</p>	<p>試験群では尿の排泄割合の方が比較的高かった(胆汁:26.5~29.8%、尿:40.9~45.1%)。また、消化管(含内容物)に残留していた放射能は、4.1~6.3%(低用量)及び10.3~21.0%(高用量)であり、残部体組織(カーカス)より回収された放射能は3.3~4.0%(低用量)及び6.1~10.1%(高用量)であった。</p> <p>これらの結果より、AF-02の推定吸収率は投与後48時間で74.2~92.4%(低用量)及び73.5~82.5%(高用量)であった。</p> <p>胆汁中における代謝物は、</p>		
逡-4 (非GLP)	動物体内 における 代謝	ラット 雌雄	<p>試験項目： 予備試験(排泄パ ランス、血中キネテ イクス、組織分布、胆 汁排泄)</p> <p>試験方法： [¹⁴C]AF-02をラット</p>	<p>投与後96時間までの総排泄量は、92.1~97.5%であった。低用量/雄での尿及び糞への排泄率はそれぞれ48.0%及び47.5%であり、尿と糞への排泄割合は等しかった。それ以外の群での尿及び糞への排泄率は、それぞれ投与量の53.9~60.5%及び36.2~38.3%であり、尿中排泄が多い傾向で</p>		306

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
			<p>雌雄に 2mg/kg または 100mg/kg の用量で単回経口投与した(胆汁排泄は雌のみ 2 mg/kg の用量で投与)。</p> <p>試料の分析は投与後下記の時点で実施した。</p> <p>排泄バランス調査(体内分布調査を含む) 尿: 6,24,48,72,96 時間後 糞: 24,48,72,96 時間後 呼気: 6,24,48 時間後 臓器・組織: 96 時間後</p> <p>胆汁排泄調査 胆汁: 6,24,48 時間後 尿: 6,24,48 時間後 糞: 24,48 時間後</p> <p>血中キネティクス調査 血漿: 0.25,0.5,1,3,6, 8,12,24,48,72 時間後</p>	<p>あった。いずれの群でも呼気中に放射能は検出されなかった。投与 96 時間後の消化管(含内容物)及び残部体組織に残留していた放射能はそれぞれ 0.12~0.19%及び 0.92~1.44%であった。また、糞中の放射能は胆汁中と直接の糞への排泄がほぼ同程度であった。</p> <p>血漿中の放射能濃度は低用量では雌雄ともに 3 時間後、高用量では雌は 12 時間後、雌は 24 時間後に最大になり、半減期 10~13.5 時間で消失した。投与 96 時間後の体内残留量は 1.0~1.6%であり、わずかであった。</p> <p>尿試料において、性・用量に係わらず投与量の 5%以上検出された代謝物</p>		
運-5 (GLP)	植物体内 における 代謝	水稻	<p>試験項目: 分布、移行、代謝</p> <p>試験方法: [¹⁴C]AF-02 を 4mg/ポット (800 g</p>	<p>玄米および稲わらの TRR レベルはそれぞれ 0.62ppm 及び 11.0ppm であった。玄米では 0.16ppm(25%)、稲わらでは 1.7ppm (16%) が結合残渣に存在した。</p>		315

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

資料 No.	試験の 種類	供試験 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
			<p>a.i./ha 相当量) で3 回散布処理した。最 終処理 14 日後に莖葉 部(穂を含む)を中間 採取し、35 日後に玄 米、籾殻、籾わら、 根部を採取して、放 射能を測定した。 また、HPLC、 LC-MS(MS)、TLC で代謝物を同定、定 量した。</p>	<p>玄米においては、AF-02 が 0.08ppm(14%)、主要代謝物として</p>		
<p>運-6 (GLP)</p>	<p>植物体内 における 代謝</p>	<p>トマト</p>	<p>試験項目：分布、移 行、代謝 試験方法： [¹⁴C]AF-02 を 3mg/ポット (600 g a.i./ha 相当量) で3 回散布処理した。最 終処理 1、7 及び 14 日後にトマト果実 (14 日後のみ葉も採 取) を採取して、放 射能を測定した。ま た、HPLC、 LC-MS(MS)、TLC で代謝物を同定、定 量した。</p>	<p>トマト果実における TRR レベルは 最終散布 1、7 及び 14 日後でそれぞれ 0.34、0.35 及び 0.18ppm であり、そ の内 0.023ppm(7%)、0.042ppm(12%) 及び 0.017ppm(9%)が結合残渣に存在 した。葉における TRR レベルは 8.3ppm であり、その内 0.56ppm(7%) が結合残渣に存在した。 トマト果実における結果は次の通り であった。最終散布 1 日後では AF-02 が 0.1ppm(29%)、主要代謝物として</p>		<p>323</p>

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

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
				あった。 一方、葉においては AF-02 が 0.98ppm(12%)、主要代謝物として		
運-7 (GLP)	植物体内 における 代謝	ほうれ んそう	試験項目：分布、移 行、代謝 試験方法： [¹⁴ C]AF-02 を 1.2mg/ポット (600 g a.i./ha 相当量) で3 回散布処理した。最 終処理 1、7 及び 14 日後に地上部を採取 して、放射能を測定 した。また、HPLC、 LC-MS(MS)、TLC で代謝物を同定、定 量した。	ほうれんそうにおける TRR レベル は最終散布 1、7 及び 14 日後でそれぞ れ 20.7、17.5 及び 12.5ppm であり、 そのほとんどが表面洗浄液及び抽出 液画分に存在し、結合残渣に存在した 割合はわずかであった。 最終散布 1 日後では AF-02 が 8.6ppm(42%)、主要代謝物として M1 が 2.3ppm(11%)検出された。最終散 布 7 日後では AF-02 が 4.0ppm(23%)、 主要代謝物として 最終散布 14 日後での主要代謝物は		330
運-8 (GLP)	土壌分解 等 (好氣的 湛水土 壌)	水田土 壌(栃木 県宇都 宮市)	試験方法： [¹⁴ C]AF-02 を 0.8 mg/kg (最大慣行 施用量 800g a.i./ha 相当) で処理した。 25°C でインキュペー トし、0,1,3,7,28,56,	AF-02 の DT ₅₀ は 0.1 日、DT ₉₀ は 1.1 日であり、		336

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

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
			70,84日後の放射能を測定した。また、HPLC、TLCで代謝物を同定、定量した。また、揮発性成分の捕集も行った。	一方抽出残渣が84日目に26.9%まで増加した。その他の代謝物及びCO ₂ は痕跡量を検出したのみであった。		
運-9 (GLP)	土壌分解等 (好氣的土壌)	畑地土壌(北海道夕張市)	試験方法： [¹⁴ C]AF-02を0.7mg/kg(最大慣行施用量700g a.i./ha相当)で処理した。25℃でインキュベートし、0,3,7,14,28,56,84日後の放射能を測定した。また、HPLC、TLCで代謝物を同定、定量した。また、揮発性成分の捕集も行った。	AF-02のDT ₅₀ は0.5日、DT ₉₀ は1.6日であり、		347
運-10 (GLP)	土壌分解等 (嫌氣的土壌)	水田土壌(栃木県宇都宮市)	試験方法： [¹⁴ C]M1を0.8mg/kg(最大慣行施用量800g a.i./ha相当)で処理した。25℃でインキュベートし、0,3,7,14,28,56,84日後の放射能を測定した。また、HPLC、TLCで分解物を同定、定量した。	M1のDT ₅₀ は157日、DT ₉₀ は520日であり、分解は穏やかであった。抽出残渣が84日目に34.3%まで増加したが、その他の代謝物は痕跡量を検出したのみであった。		355
運-11 (GLP)	水中運命 (加水分解)	緩衝液 (pH 4、5、7、)	[¹⁴ C]AF-02を1ppmとなるように各緩衝液に添加し、25℃で	各pHにおけるDT ₅₀ 及びDT ₉₀ は以下の通りであった。		363

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																			
		9)	30日間インキュベートした。経時的に試料を採取し、HPLC、TLCで分解物の定量、同定を行った。	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>pH4</th> <th>pH5</th> <th>pH7</th> <th>pH9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DT₅₀</td> <td>3.3</td> <td>21.3</td> <td>40.6</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>DT₉₀</td> <td>10.8</td> <td>70.8</td> <td>135</td> <td>1.9</td> </tr> </tbody> </table> <p>単位：日</p> <p>分解物はほぼのみであり、その生成率はpH4では14日後で97%、pH5では30日後で65%、pH7では30日後で43%、pH9では2日後で94%であった。</p>		pH4	pH5	pH7	pH9	DT ₅₀	3.3	21.3	40.6	0.6	DT ₉₀	10.8	70.8	135	1.9						
	pH4	pH5	pH7	pH9																					
DT ₅₀	3.3	21.3	40.6	0.6																					
DT ₉₀	10.8	70.8	135	1.9																					
運-12 (GLP)	水中運命 (水中光分解)	緩衝液 (pH7) 田面水 (pH7.4)	[¹⁴ C]AF-02を1ppmとなるように添加し、25℃で21.4 W/m ² (300-400nm)の光強度のキセノンシヨートアークランプに14日間連続照射した。経時的に試料を採取し、HPLC、TLCで定量、同定を行った。 また、揮発性成分の捕集も行った。	緩衝液と自然水(田面水)におけるDT ₅₀ 及びDT ₉₀ は以下の通りであった。 <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">試験条件 (正味の光分解による)</th> <th colspan="2">太陽光 (東京、春) (加水分解を加味)</th> </tr> <tr> <th>緩衝液</th> <th>田面水</th> <th>緩衝液</th> <th>田面水</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DT₅₀</td> <td>3.0</td> <td>3.4</td> <td>6.7</td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>DT₉₀</td> <td>10.1</td> <td>11.3</td> <td>22.3</td> <td>6.4</td> </tr> </tbody> </table> <p>単位：日</p> <p>光照射終了時点での二酸化炭素の生成は緩衝液で13.1%、自然水で17.6%であった。</p>		試験条件 (正味の光分解による)		太陽光 (東京、春) (加水分解を加味)		緩衝液	田面水	緩衝液	田面水	DT ₅₀	3.0	3.4	6.7	1.9	DT ₉₀	10.1	11.3	22.3	6.4		369
	試験条件 (正味の光分解による)		太陽光 (東京、春) (加水分解を加味)																						
	緩衝液	田面水	緩衝液	田面水																					
DT ₅₀	3.0	3.4	6.7	1.9																					
DT ₉₀	10.1	11.3	22.3	6.4																					
運-12-1 (GLP)	水中運命 (水中光)	緩衝液 (pH7)	AF02-M1を1ppmとなるように添加	緩衝液(pH7)におけるDT ₅₀ 及びDT ₉₀ は以下の通りであった。		378																			

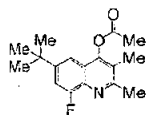
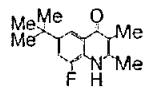
資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁									
	分解)		し、25℃で 21.7 W/m ² (300-400nm)の光強度のキセノンシヨートアークランプに24時間連続照射した。経時的に試料を採取し、HPLCで定量を行った。	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>試験条件</th> <th>太陽光 (東京、春)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DT₅₀</td> <td>2.91</td> <td>8.1</td> </tr> <tr> <td>DT₉₀</td> <td>9.65</td> <td>26.9</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">単位：時間</p>		試験条件	太陽光 (東京、春)	DT ₅₀	2.91	8.1	DT ₉₀	9.65	26.9		
	試験条件	太陽光 (東京、春)													
DT ₅₀	2.91	8.1													
DT ₉₀	9.65	26.9													
運-13 (GLP)	土壌吸着		<p>被験物質の分解により、フロイントリッヒの吸着等温線の作成は困難であったため、以下の条件で吸着係数 K^{ads}_{oc} を求めた。</p> <p>被験物質：AF-02 土/水比：1/5 濃度：5ppm 温度：25℃ 吸着平衡化時間：12時間</p>	<p>AF-02 の吸着係数 K^{ads}_{oc} は以下の通りであった。</p> <table border="1"> <tr> <td>3511</td> <td>535</td> <td>682</td> <td>744</td> <td>18000</td> </tr> </table>	3511	535	682	744	18000		382				
3511	535	682	744	18000											
運-13-1 (GLP)	土壌吸着		<p>以下の条件でフロイントリッヒの吸着等温線を作成し、吸着係数 K^{ads}_{foc} を求めた。</p> <p>被験物質：AF02 土/水比： 濃度：0.08, 0.2, 0.5,</p>	<p>AF02 の吸着係数 K^{ads}_{foc} は以下の通りであった。</p> <table border="1"> <tr> <td>789</td> <td>305</td> <td>234</td> <td>483</td> <td>1157</td> </tr> </table>	789	305	234	483	1157		388				
789	305	234	483	1157											

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

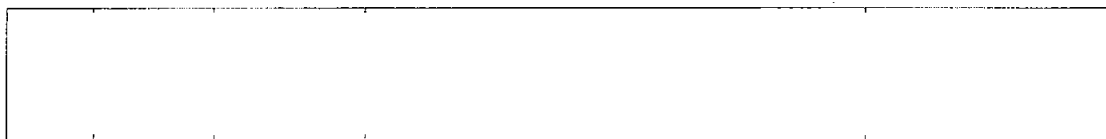
資料 No.	試験の 種類	供試動 植物等	試験項目・ 試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記 載 頁
			2, 5ppm 温度：25℃ 吸着平衡化時間： 24時間			
遅-14 (GLP)	生物濃縮 性試験	コイ	暴露条件：流水式 試験期間：28日間 試験濃度区： <第1濃度区> 10.0 μg/L 被験物質 溶液 (50μL/L 2-メト キシエタノール) <第2濃度区> 1 μg/L 被験物質溶液 (50μL/L 2-メトキシ エタノール) <対照区> 50μL/L 2-メトキシエ タノール	BCF _{SS} < 3.0 (試験濃度 9.79 μg/L) BCF _{SS} < 30 (試験濃度 0.956 μg/L)		393

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

<代謝分解物一覧表>

記号	由来	名称 (略称)	化学名	構造式
AF-02	親化合物	AF-02	6- <i>tert</i> -butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-quinolyl acetate	
M1	動物、植物 土壌、水中	AF02-M1	6- <i>tert</i> -butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4(1H)-quinolinone	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。



<[¹⁴C]AF-02 の合成法>

* : ¹⁴C 標識位置

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

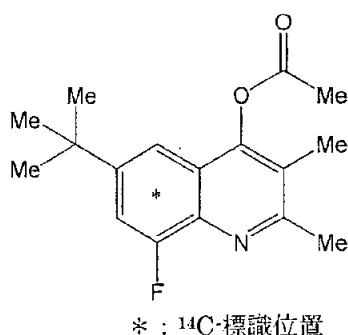
1. 動物代謝に関する試験

[¹⁴C]AF-02を用いたラットにおける代謝試験

(資料 連-1)

1) 排泄/バランス試験及び代謝物同定

放射能標識化合物 : [¹⁴C] AF-02



化学名 : 6-*tert*butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-¹⁴C]quinolyl acetate

放射化学的純度 :

比放射能 :

標識位置選定理由 :

試験方法 :

供試動物 ; 雌雄のフノッシャー系(F344/DuCrI CrIj) ラット、9 週齢 (投与時)

投与時体重 ; 低用量 (雄 : 208.2~213.8g、雌 : 124.9~133.6g)、高用量 (雄 : 178.4~186.8g、雌 : 131.0~132.8g)

飼育環境 ; 温度 23±2℃、湿度 55±15%、換気回数 20 回以上/時間、照明時間 12 時間 /日、水及び保証飼料 MF 固形を自由に摂取させて飼育した。

投与 ; [¹⁴C]AF-02 と非放射性 AF-02 を混合し、0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して投与液とした。

投与量・投与経路・投与回数 ; 低用量を 2 mg/kg 体重、高用量を 100 mg/kg 体重とし、ゾンデで胃内に単回強制経口投与した。投与液量は約 10 mL/kg 体重とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

投与量設定根拠：

試験群構成：

動物数；雌雄各 4 匹／用量

屠殺時点；投与 96 時間後

試料採取：

尿；投与 6, 12, 24, 48, 72, 96 時間後

糞；投与 24, 48, 72, 96 時間後

呼気；予備試験（資料 運4）で排泄が認められなかったため、採取しなかった。

ケージ洗液； 96 時間後（メタノール及び水洗液）

臓器・組織；最終調査時点（投与 96 時間後）に消化管（含内容物）と残部体組織（カーカス）を採取した。

分析法；液体試料は直接液体シンチレーション計測法（LSC 法）にて定量した。糞ホモジネートは可溶化処理、濾過後の濾紙上の残渣は酸化燃焼処理、消化管は酸性溶媒にて均一化（溶解）処理、及び残部体組織は磨砕・均一化後、酸化燃焼処理したのち、いずれも LSC 法で定量した。

代謝物分析；尿試料（0-96 時間）及び糞抽出試料（0-96 時間）について HPLC 分析法により定量した。同定は参照化合物との比較による HPLC コクロマトグラフィー、及び分取精製した尿と糞中の主要成分について LC-MS(MS)分析した。

結果：

排泄バランス（表 1）； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 投与後 96 時間で投与量の 94.0~98.1%が体外に排泄され、排泄の経路と速度に顕著な性差及び用量差はなかった。低用量／雄では尿及び糞への放射能の排泄率はそれぞれ 46.2 及び 45.8%であり、尿及び糞への排泄割合は等しかった。それ以外の試験群では、尿中に投与量の 57.4~61.7%、糞中に 35.2~38.3%が排泄され、尿中排泄の方が高い傾向が認められた。消化管(含内容物)には投与量の 0.2~0.3%、カーカスには 1.2~2.0%であり、体内残留量は微量であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 1 : ^{14}C IAF-02 単回経口投与後の排泄バランス

採取試料及び間隔		投与量%			
		低用量: 2 mg/kg		高用量: 100 mg/kg	
		雄	雌	雄	雌
尿	0-6 hr	22.52	19.54	6.36	3.66
	6-12 hr	10.43	21.71	6.74	5.69
	12-24 hr	9.41	10.94	23.54	25.77
	24-48 hr	3.11	4.36	23.44	21.95
	48-72 hr	0.57	0.61	1.29	1.11
	72-96 hr	0.20	0.20	0.34	0.31
	累積	46.24	57.36	61.72	58.50
糞	0-24 hr	25.93	10.70	3.26	4.92
	24-48 hr	16.77	22.34	24.86	24.37
	48-72 hr	2.57	2.50	5.69	7.69
	72-96 hr	0.56	0.45	1.43	1.26
	累積	45.82	35.98	35.24	38.25
ケージ洗液	0-96 hr	1.96	1.60	1.15	1.23
総排泄量		94.02	94.94	98.11	97.98
消化管(含内容物)		0.22	0.16	0.27	0.32
カーカス		1.29	1.19	2.00	1.67
総回収率		95.53	96.29	100.38	99.98

数値は4匹の平均値

代謝物分析: 表 2 に示すように用量及び雌雄に係わりなく糞試料中の放射能は、約 88% が抽出可能であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2 : 糞試料中の放射能の抽出率

投与用量	画分	雄		雌	
		糞中%	投与量%	糞中%	投与量%
低用量 (2mg/kg)	抽出	88.88	40.73	88.25	31.75
	非抽出残渣	11.12	5.10	11.75	4.23
	合計	100.00	45.82	100.00	35.98
高用量 (100mg/kg)	抽出	88.40	31.15	88.55	33.87
	非抽出残渣	11.60	4.09	11.45	4.38
	合計	100.00	35.24	100.00	38.25

尿中代謝物：尿中にいずれかの群で投与量の 5%を超えて検出された主要代謝物は

糞中代謝物：糞中においていずれかの群で投与量の 5%を超えて検出された主要代謝物

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 3 : 単回投与後(低用量 : 2mg/kg)の尿及び糞試料中の代謝物とその生成量

代謝物	低用量・雄			低用量・雌		
	尿	糞	計	尿	糞	計
	投与量%					
合計						

n.d. : 検出限界未満

a) :

b) : 複数の成分の合算値。個々の成分はそれぞれ2.0%未満。

c) : 尿における過残渣及び糞における非抽出残渣。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1 : [^{14}C] AF-02 のラットにおける推定代謝経路 (排泄バランス)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

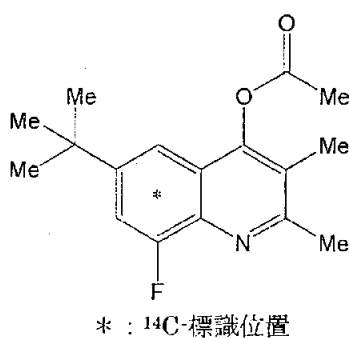
1. 動物代謝に関する試験

AF-02 を用いたラットにおける代謝試験

(資料 遡-2)

2) 薬物動態及び組織分布

放射能標識化合物：[¹⁴C] AF-02



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-¹⁴C]quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

供試動物；雌雄のフィッシャー系(F344/DuCrI) ラット、9～10 週齢 (投与時)

飼育環境；温度 19～25℃、湿度 30～70%、換気回数 10 回以上/時間、照明時間 12 時間/日で、水及びげっ歯飼料 (Harlan Teklad Global Diet#2016) を自由に摂取させて飼育した。

投与； [¹⁴C]AF-02 を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して投与液とした。

投与量・投与経路・投与回数；低用量を 2 mg/kg 体重、高用量を 100 mg/kg 体重とし、ゾンデで胃内に単回強制経口投与した。投与液量は約 10mL/kg 体重とした。

投与量設定根拠：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

試験項目：表 1 に示す試験項目を設定した。

表 1：試験設計

試験項目	試験群	性、動物数	最終屠殺時点 (hr)	試料採取	体重 (g)
血漿中薬物動態	低用量	雄 8 匹	96	投与 0.5, 1, 3 (低用量), 4 (高用量), 6(低用量), 8, 12, 24, 36(高用量), 48, 72, 96 時間後	176-201
		雌 8 匹	96		141-151
	高用量	雄 8 匹	96		182-195
		雌 8 匹	96		135-144
全血液薬物動態	低用量	雄 8 匹	96	48, 72, 96 時間後	189-207
		雌 8 匹	96		128-144
	高用量	雄 8 匹	96		180-199
		雌 8 匹	96		134-148
組織分布	低用量	雄 9 匹	3, 24, 96	臓器・組織、消化管 (含 内容物)、カーカス	173-190
		雌 9 匹			133-155
	高用量	雄 9 匹	12, 48, 96		166-192
		雌 9 匹			132-152

全血・血漿濃度測定は、2 個体の動物から交互に採血して実施した。

血漿・全血液中キネティクス調査：頸静脈にカニューレーション手術を施した動物を購入し、飼育環境に馴化した個体を使用した。各時点で約 0.25 mL を採血した。

放射能の計測：液体試料は直接、骨、血球、及び全血は酸化燃焼処理、その他の臓器・組織は可溶化したのち、いずれも液体シンチレーション計数法 (LSC 法) で放射能を定量した。

試験結果：

血漿薬物動態パラメーター；表 2 と表 3 に示すように、血漿中 ^{14}C 濃度は、雌雄とも

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

に低用量、高用量それぞれで投与後 3.0 時間、12.0 時間に最大値 (Tmax) となった。最高血漿中濃度 (Cmax) は低用量で 4.38~5.10 $\mu\text{g eq./g}$ であり、高用量で 132.2~136.9 $\mu\text{g eq./g}$ であった。ノンコンパートメント解析の結果、吸収された放射能は 30.6~33.3 時間の半減期で血漿中から消失した。Cmax 及び AUC の低用量と高用量の比率は Cmax で 25.9~31.3 倍、AUC で 51.4 ~59.0 倍であった。

全血薬物動態パラメーター；表 4 と表 5 に示すように、全血液中 ^{14}C 濃度は、雌雄ともに低用量、高用量それぞれで投与 3.0 時間、12.0 時間後に最大値 (Tmax) となった。最高血中濃度 (Cmax) は低用量で 2.71~3.08 $\mu\text{g eq./g}$ であり、高用量で 86.2~99.2 $\mu\text{g eq./g}$ であった。吸収された放射能は 2 相性の減衰曲線で、32.9~42.8 時間の半減期で全血中から消失した。Cmax 及び AUC の低用量と高用量の比率は Cmax で 28.0~36.1 倍、AUC で 59.3 ~60.3 倍であった。

表 2 : [^{14}C]AF-02 単回経口投与後の血漿中 ^{14}C 濃度の推移

投与後の時間(hr)	ppm equivalent of [^{14}C]AF-02			
	低用量:2mg/kg		高用量:100 mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
0.5	1.745	1.945	28.932	29.470
1	2.717	3.454	46.829	50.306
3	4.375	5.103	—	—
4	—	—	80.527	67.557
6	3.080	4.136	—	—
8	2.315	3.557	95.981	89.667
12	1.513	1.869	136.948	132.188
24	0.445	0.567	77.851	94.823
36	—	—	17.076	27.748
48	0.125	0.142	7.692	11.609
72	0.063	0.084	3.855	5.474
96	0.044	0.054	2.589	4.088

—) : 試料なし 数値は 4 匹の平均値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 3 : [¹⁴C]AF-02 単回経口投与後の血漿薬物動態パラメーター

性	投与用量 (mg/kg)	Tmax (h)	Cmax	AUC _{0-∞}	半減期 (h)
			(μ g equiv/g)	(μ g equiv/g·h)	
雄	2	3.0	4.38	57.16	31.95
雌	2	3.0	5.10	72.80	33.32
雄	100	12.0	136.95	3373.17	30.56
雌	100	12.0	132.19	3744.54	31.88

半減期の計算は、48～96 時間後のデータを選択して解析した。

表 4 : [¹⁴C]AF-02 単回経口投与後の全血中 ¹⁴C 濃度の推移

投与後の時間(h)	ppm equivalent of [¹⁴ C]AF-02			
	低用量: 2mg/kg		高用量: 100 mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
0.5	0.994	1.405	16.906	26.092
1	1.605	2.069	32.257	32.518
3	2.709	3.077	—	—
4	—	—	52.423	60.125
6	2.142	2.243	—	—
8	1.620	2.036	72.016	68.571
12	0.986	1.105	99.242	86.162
24	0.298	0.371	42.961	61.318
36	—	—	11.657	25.268
48	0.083	0.092	4.855	7.450
72	0.046	0.059	2.862	3.946
96	0.033	0.042	1.819	3.083

—) : 試料なし 数値は 4 匹の平均値

表 5 : [¹⁴C]AF-02 単回経口投与後の全血液薬物動態パラメーター

性	投与用量 (mg/kg)	Tmax (h)	Cmax	AUC _{0-∞}	半減期 (h)
			(μg equiv/g)	(μg equiv/g·h)	
雄	2	3.0	2.71	37.99	32.89
雌	2	3.0	3.08	45.05	42.78
雄	100	12.0	99.24	2252.74	33.91
雌	100	12.0	86.16	2716.47	37.70

半減期の計算は、48～96 時間後のデータを選択して解析した。

以上の結果から、投与された[¹⁴C]AF-02 の血漿中濃度は、雌雄に関係なく、低用量では 3 時間後、高用量では 12 時間後に最高値に達し、約 30 時間の半減期で体内から消失した。また、全血及び血漿中の薬物動態パラメーターから赤血球への移行は低いと推定された。

体内分布；表 6 と表 7 に示すように、最高血漿中濃度 (Cmax) 時点である投与 3 時間後の低用量では、消化管 (含内容物)、骨格筋、血液、肝臓、カーカス、脂肪及び骨 (雌のみ) に投与量の 1% 以上の分布を認めた。全ての臓器・組織中の ¹⁴C 濃度は投与後 96 時間までに減衰し、肝臓を除き 0.08 μg eq./g 以下となった。

高用量における Cmax 時点(投与 12 時間後)においても投与量の 1% 以上の分布を認めた組織は、低用量と同じであった(骨を除く)。全ての臓器・組織中の ¹⁴C 濃度は投与後 96 時間までに減衰した。投与 96 時間後では、血液、肝臓、ハーパー腺、腎臓、副腎、消化管 (含内容物)、カーカス (雄のみ) 及び卵巣(雌のみ)で 1.0 μg eq./g 以上の濃度を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 6 : [¹⁴C]AF-02 単回経口投与後の体内 ¹⁴C 濃度分布 (ppm AF-02 equiv)

臓器・組織	低用量：2 mg/kg						高用量：100 mg/kg					
	雄			雌			雄			雌		
	3hr	24 hr	96 hr	3 hr	24 hr	96 hr	12 hr	48 hr	96 hr	12 hr	48 hr	96 hr
全血液	2.115	0.317	0.027	2.529	0.299	0.039	76.771	6.812	2.200	73.168	7.334	2.566
血漿	3.236	0.523	0.039	3.836	0.466	0.058	108.306	10.442	2.690	103.478	9.818	3.438
血球	0.902	0.189	0.019	1.084	0.129	0.025	52.981	3.557	1.849	46.952	3.581	1.908
脾臓	0.526	0.034	0.007	0.839	0.035	0.010	20.006	1.447	0.433	18.024	1.459	0.212
胸腺	0.488	0.047	0.004	0.689	0.037	0.006	27.130	1.294	0.481	22.382	1.591	0.390
骨髄	0.515	0.049	0.005	0.694	0.038	0.003	20.934	1.455	0.097	10.073	0.938	0.165
副腎	1.763	0.229	0.046	2.427	0.312	0.074	39.655	3.121	1.098	35.948	2.869	1.328
甲状腺	0.724	0.069	0.008	0.824	0.096	0.010	29.849	1.869	0.631	27.959	3.062	0.724
脳下垂体	0.895	0.080	ND	1.134	0.068	0.005	19.129	1.712	ND	19.685	2.199	0.469
骨	0.247	0.038	0.005	0.419	0.037	0.006	14.145	0.953	0.414	14.687	1.046	0.331
骨格筋	0.334	0.060	0.004	0.487	0.046	0.006	20.228	1.027	0.242	16.184	0.991	0.188
心臓	1.168	0.059	0.014	1.458	0.047	0.017	43.772	3.180	0.608	39.572	3.056	0.769
脳	0.219	0.013	0.001	0.291	0.012	0.001	14.311	0.558	0.235	7.547	0.715	0.231
精巣上体	0.459	0.110	0.009	NA	NA	NA	23.845	2.560	0.668	NA	NA	NA
精巣	0.536	0.069	0.014	NA	NA	NA	18.902	1.714	0.580	NA	NA	NA
卵巣	NA	NA	NA	1.046	0.108	0.014	NA	NA	NA	30.010	2.626	1.010
前立腺	0.667	0.094	0.006	NA	NA	NA	34.067	1.700	0.536	NA	NA	NA
子宮	NA	NA	NA	0.884	0.086	0.014	NA	NA	NA	29.117	1.979	0.902
ハーパー腺	0.930	0.280	0.029	1.280	0.379	0.028	62.269	29.255	6.064	59.233	36.570	5.755
脂肪組織	0.709	0.010	0.001	1.130	0.004	0.001	18.346	1.780	ND	10.354	1.165	ND
皮膚	0.507	0.188	0.024	0.971	0.184	0.009	17.467	2.306	0.682	19.053	2.236	0.599
腎臓	3.003	0.138	0.036	2.774	0.136	0.035	42.112	3.865	1.274	42.874	3.976	1.043
肝臓	2.886	0.347	0.192	3.188	0.221	0.193	94.348	20.786	5.042	97.742	24.012	8.699
膀胱	2.431	0.273	0.015	2.919	0.419	0.020	61.190	5.467	0.804	50.984	4.222	0.950
消化管 (含内容物)	11.104	3.050	0.040	8.857	1.950	0.052	492.184	58.056	3.061	491.373	75.868	2.800
肺	1.597	0.102	0.013	1.835	0.106	0.017	42.269	4.446	0.873	28.729	5.084	0.869
膵臓	0.726	0.038	0.005	1.652	0.023	0.007	17.511	1.768	0.088	15.789	1.577	0.489
カーカス	0.448	0.108	0.015	0.672	0.108	0.013	20.666	3.149	1.054	17.625	2.551	0.819

数値は3匹の平均値 NA) : 試料無し ND) : 検出限界未満

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 7 : [¹⁴C]AF-02 単回経口投与後の¹⁴Cの体内分布 (投与量%)

臓器・組織	低用量 : 2 mg/kg						高用量 : 100 mg/kg					
	雄			雌			雄			雌		
	3hr	24 hr	96 hr	3 hr	24 hr	96 hr	12 hr	48 hr	96 hr	12 hr	48 hr	96 hr
全血液	6.00	0.91	0.08	7.14	0.84	0.11	4.94	0.43	0.14	4.66	0.47	0.17
脾臓	0.06	<0.005	<0.005	0.10	<0.005	<0.005	0.05	<0.005	<0.005	0.04	<0.005	<0.005
胸腺	0.04	<0.005	<0.005	0.07	<0.005	<0.005	0.05	<0.005	<0.005	0.04	<0.005	<0.005
骨髄	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
副腎	0.03	<0.005	<0.005	0.06	0.01	<0.005	0.02	<0.005	<0.005	0.02	<0.005	<0.005
甲状腺	0.02	<0.005	<0.005	0.02	<0.005	<0.005	0.02	<0.005	<0.005	0.02	<0.005	<0.005
脳下垂体	<0.005	<0.005	ND	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	ND	<0.005	<0.005	<0.005
骨	0.66	0.10	0.01	1.11	0.10	0.01	0.85	0.06	0.03	0.88	0.06	0.02
骨格筋	6.72	1.21	0.09	9.76	0.91	0.12	9.23	0.46	0.11	7.32	0.45	0.09
心臓	0.21	0.01	<0.005	0.29	0.01	<0.005	0.18	0.01	<0.005	0.17	0.01	<0.005
脳	0.09	0.01	<0.005	0.15	0.01	<0.005	0.13	0.01	<0.005	0.08	0.01	<0.005
精巣上部	0.05	0.01	<0.005	NA	NA	NA	0.09	0.01	<0.005	NA	NA	NA
精巣	0.30	0.04	0.01	NA	NA	NA	0.25	0.02	0.01	NA	NA	NA
卵巣	NA	NA	NA	0.04	<0.005	<0.005	NA	NA	NA	0.02	<0.005	<0.005
前立腺	0.04	<0.005	<0.005	NA	NA	NA	0.04	<0.005	<0.005	NA	NA	NA
子宮	NA	NA	NA	0.15	0.04	<0.005	NA	NA	NA	0.09	0.01	<0.005
ハーダー腺	0.03	0.01	<0.005	0.07	0.02	<0.005	0.06	0.03	0.01	0.06	0.04	0.01
脂肪組織	2.23	0.03	0.01	3.53	0.01	<0.005	1.31	0.13	ND	0.73	0.08	ND
皮膚	0.14	0.12	0.01	0.51	0.13	<0.005	0.20	0.04	<0.005	0.36	0.04	0.01
腎臓	0.92	0.04	0.01	0.90	0.04	0.01	0.30	0.03	0.01	0.32	0.03	0.01
肝臓	5.20	0.63	0.38	5.16	0.37	0.32	3.57	0.88	0.20	3.16	0.98	0.34
膀胱	0.04	0.01	<0.005	0.08	0.01	<0.005	0.03	<0.005	<0.005	0.04	<0.005	<0.005
消化管 (含内容物)	44.12	14.02	0.20	41.23	9.31	0.23	49.99	5.04	0.33	53.18	7.85	0.32
肺	0.49	0.03	<0.005	0.62	0.04	0.01	0.25	0.04	0.01	0.19	0.04	0.01
膵臓	0.05	<0.005	<0.005	0.15	<0.005	<0.005	0.04	<0.005	<0.005	0.04	<0.005	<0.005
カーカス	3.65	2.06	0.48	6.54	2.31	0.41	3.51	1.70	0.74	4.05	1.25	0.53

数値は3匹の平均値 NA) : 試料無し ND) : 検出限界未満

<0.005) : 放射能は検出されたが0.005%未満

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

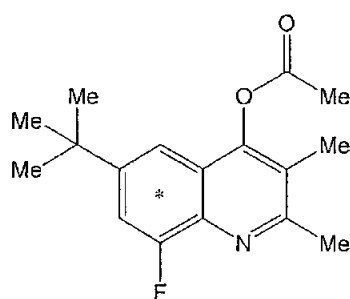
1. 動物代謝に関する試験

AF-02 を用いたラットにおける代謝試験

(資料 運-3)

3) 胆汁排泄試験

放射能標識化合物 : [^{14}C] AF-02



* : ^{14}C -標識位置

化学名 : 6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U- ^{14}C]quinolyl acetate

放射化学的純度 :

比放射能 :

標識位置選定理由 :

試験方法 :

供試動物 ; 雌雄のフィッシャー系(F344/DuCrIj) ラット、9 週齢 (投与時)

胆管カニュレーション手術を施し、無拘束下で飼育環境に馴化した個体を使用した。

投与时体重 ; 低用量 (雄 : 201.0~215.2g、雌 : 135.6~141.2g)、高用量 (雄 : 205.0~212.9g、雌 : 124.9~139.5g)

飼育環境 ; 温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、換気回数 20 回以上/時間、照明時間 12 時間/日で、水及び保証飼料 MF 固形を自由に摂取させて飼育した。

投与 ; [^{14}C]AF-02 と非放射性 AF-02 を混合し、0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して投与液とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

投与量・投与経路・投与回数；低用量を 2 mg/kg 体重、高用量を 100 mg/kg 体重とし、
ゾンデで胃内に単回強制経口投与した。投与液量は約 10 mL/kg 体重とした。

投与量設定根拠：

試験群構成：

動物数；雌雄各 4 匹／用量（高用量、雌試験群のみ 3 匹）

屠殺時点；投与 48 時間後

試料採取：

胆汁試料；投与 6, 24, 48 時間後

尿試料；投与 6, 24, 48 時間後

糞試料；投与 24, 48 時間後

ケージ洗液；投与 48 時間後

消化管(含内容物)・カーカス；最終調査時点（投与 48 時間後）

分析法；液体試料は直接液体シンチレーション計測法（LSC 法）にて定量した。糞ホモジネートは可溶化処理、濾過後の濾紙上の残渣は酸化燃焼処理、消化管は酸性溶媒にて均一化(溶解)処理、及び残部体組織は磨砕・均一化後、酸化燃焼処理したのも、いずれも LSC 法で定量した。

試験結果：

胆汁排泄バランス（表 1）；投与後 48 時間での排泄率は 72.8～93.9%であった。低用量／雄における胆汁及び尿への排泄率は、それぞれ投与量の 42.8%及び 45.7%であり、ほぼ等しかった。その他の試験群における胆汁及び尿への排泄率は、それぞれ投与量の 26.5～29.8%及び 40.9～45.1%であり、尿中排泄の方が高い傾向が認められた。これは排泄／バランス試験における非胆管カニュレーションラットと同様の結果であった。

また、消化管（含内容物）に残留していた放射能は、4.1～6.3%（低用量）及び 10.3～21.0%（高用量）であり、残部体組織(カーカス)より回収された放射能は 3.3～4.0%(低用量)及び 6.1～10.1%（高用量）であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

以上の結果より、胆汁中排泄率、尿中排泄率及び残部体組織の合計として算出された AF-02 の推定吸収率は投与 48 時間後までで 73.5~92.4%であり、比較的高い値であった。

表 1 : [¹⁴C]AF-02 胆管カニューレションラットの単回経口投与後 48 時間の¹⁴C 胆汁排泄バランス

採取試料	低用量 : 2 mg/kg		高用量 : 100 mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
胆汁	42.76	29.81	27.29	26.53
尿	45.68	41.06	45.14	40.91
糞	3.45	10.40	3.81	3.67
ケージ洗液	1.97	2.08	1.46	1.64
消化管 (含内容物)	4.06	6.27	10.34	21.04
カーカス	3.99	3.33	10.09	6.06
総回収率	101.91	92.97	98.13	99.85
*吸収率	92.42	74.21	82.51	73.50

※ 吸収率=胆汁+尿+カーカス

胆汁中代謝物 (表 2) ; いずれかの試験群において、投与量の 5%を超えて検出された主要代謝物は AF-02 であった。この代謝物のアグリコンである AF-02 は尿及び糞中での主要代謝物の 1 つでもあった。また、 AF-02 の合算での生成量は 10.34% であり、低用量/雄においてのみ 5%を超えて検出された。また、 AF-02 は合算での生成量が、雄において 10.34% であり、雌試料中の方が高い傾向があった。これらの代謝物は尿及び糞中においても雌での生成が高い代謝物であり、非胆管カニューレションラットを用いた排泄バランス試験と結果と同様であった。その他の微量代謝物として、

AF-02 は検出されなかった。また、その他に各成分 2.5%以下である未同定代謝物をいくつか認めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

代謝経路;胆汁における代謝物を解析した結果、

表 2 : 単回投与後の胆汁試料中の代謝物とその生成量

代謝物	低用量 (2mg/kg)		高用量 (100mg/kg)	
	雄	雌	雄	雌
	投与量%			

合計 (%胆汁中)				
--------------	--	--	--	--

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 1 : AF-02 のラットにおける推定代謝経路 (胆汁排泄及び排泄バランス)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

1. 動物代謝に関する試験

AF-02 を用いたラットにおける代謝試験

(資料 運-2 (血中キネティクス) 及び運-4 (排泄バランス及び胆汁排泄))

4) 予備試験

試験方法：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

試験項目・試験群：表 1 に示す試験群を設定した。

表 1：試験設計

試験項目	試験群	性、動物数	最終屠殺時 点 (hr)	試料採取	体重 (g)
予備 試験					

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

試料採取：

分析：

試験結果：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

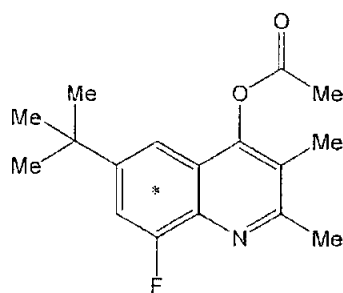
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

2. 植物代謝に関する試験

(資料 運・5)

1) AF-02 の水稲における代謝

放射性標識化合物： $[^{14}\text{C}]$ AF-02



* : ^{14}C -標識位置

化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl-4-[U-4a,5,6,7,8,8a- ^{14}C]quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

$[^{14}\text{C}]$ AF-02 の保存溶液の調製； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 をアセトニトリル 50 mL に溶解して保存溶液を調製した。

試験植物；ジャポニカ種イネ(*Oryza sativa* L.；品種；コシヒカリ)

栽培環境；ファイトトロン (光源：太陽光およびメタルハライドランプ) 内に設置したポットで栽培した。

ポット；埼玉県農林総合研究センター (熊谷市) の試験水田より採取した水田土壌を充填し、約 3 cm に湛水した 1/2000 a (処理区) または 1/5000 a (対照区) のワグネルポットを用いた。

温湿度；水稲慣行栽培期の東京地方の温湿度を基準に設定した。

水管理；最終収穫期 の約 1 ヶ月前まで湛水深約 3 cm を維持したのち、落水し、以降、収穫日まで畑条件に維持した。

栽培時期；2006 年 6 月～2006 年 10 月

施用液の調製および施用：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

施用液； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 の同位体希釈溶液の計算量を採り、エバポレーターで有機溶媒を留去して乾固した。これを少量のアセトンで溶解し、製剤白試料を添加した後、水を加えて超音波をかけながらよく攪拌して施用液とした。

施用量；4 mg/ポット（予定慣行最大施用量である 800 g a.i./ha 相当量）とした。

施用時期；出穂期およびその前後 2 週間目の計 3 回散布とした。

施用部位；水稻の全面に散布した。

試験区の配置と試料採取：

処理区と非処理対照区の 2 試験区を設けた。処理区と非処理対照区のポットは同一のフアイトロンに設置した。水稻試料は最終散布 35 日後（最終収穫期）に収穫し、根部、稲わら（枝梗を含む茎葉部）、玄米、籾殻を採取した。処理区については最終散布 14 日後にも茎葉部（穂を含む）を採取した（中間採取）。茎葉部、稲わら、根部（十分に水洗）はいずれも細切した。両収穫期ともに各処理区の植物体各部位毎に全ポット分をまとめ 1 点の混成試料にした。

採取時期（最終散布後日数）	試験区	ポット数	採取試料
中間採取期（14）	処理区	1	茎葉部（穂を含む）
最終収穫期（35）	処理区	5	玄米、籾殻、稲わら、根部
	非処理対照区	1	玄米、籾殻、稲わら、根部

分析方法：

試料の均質化と放射性総残留物（TRR）の測定；

処理区と非処理対照区の植物体各試料は、ドライアイスと共にミキサーで粉砕して均質化処理した。処理区の籾殻と根部、非処理対照区の植物体各試料中の TRR は、ドライアイスと共にミキサーで粉砕した試料を燃焼処理することにより測定した。茎葉部、玄米および稲わら中の TRR は抽出法により測定した。

茎葉部、玄米、稲わら試料の抽出と精製；

次の図に示すように、試料にアセトン/水=8/2(v/v)を加え、ホモジナイズおよび濾過により抽出し、含水アセトン抽出液と残渣に分離した。続けて残渣にアセトン/水=8/2(v/v)を加えてソックスレー抽出を行い、ソックスレー抽出液と残渣に分離した。各画分の ^{14}C を測定し、それらを合計して TRR を求めた。含水アセトン抽出液及びソックスレー抽出液は減圧濃縮した後、固相抽出による分画化を行った（中間収穫茎葉部はソックスレー抽出液の分画化は実施せず）。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図1 抽出操作フローシート

代謝物の定量；

抽出液中の代謝物は C18 カラムを用いてフロースルー型放射能検出付きの HPLC で分析した。得られたラジオクロマトグラムを解析して 44 画分に分画し、代謝物を定量した。

主代謝物の同定；

含水アセトン抽出液中のフリーの主放射性ピークについては、HPLC、及び一次元 TLC による参照標品との比較により同定を行った。抱合体については、単離した後、MS/MS スペクトルを取得、またはその酵素加水分解物を HPLC で参照標品と比較することによ

り同定を行った。

抽出残渣の特徴付け分析；

玄米抽出残渣はバッファーで洗浄した後、 α -アミラーゼとプロテアーゼで酵素加水分解し、蛋白質画分とデンプン画分に取り込まれた¹⁴Cのレベルを測定した。稲わら抽出残渣は、化学処理により、ペクチン画分とリグニン画分、ヘミセルロース画分、およびセルロース画分に分画し、各画分に取り込まれた¹⁴Cのレベルを測定した。

放射能測定；

すべての液体試料は液体シンチレーション計測(LSC)して定量した。固体中の放射能量は酸化燃焼処理したのち、LSC測定して定量した。

試験結果：

1) TRRの分布(本文中の濃度はすべて植物体重量ベースでのAF-02換算濃度)

表1に示すように、処理区の間採期(穂を含む)のTRRレベルは6.3189 mg eq./kgであった。最終収穫期ではTRRレベルは籾殻が最も高く(11.2849 mg eq./kg)、次いで稲わら(11.0455 mg eq./kg)、根部(1.2750 mg eq./kg)、および玄米(0.6163 mg eq./kg)の順であった。一方、対照区試料からは痕跡量程度の¹⁴Cが認められたのみであった。

表1 稲体中の放射性残留物の分布 (mg eq./kg)

	中間採取期 (最終処理 14 日後)	最終収穫期 (最終処理 35 日後)
茎葉(穂を含む)または稲わら	6.3189	11.0455
玄米	---	0.6163
籾殻	---	11.2849
根部	---	1.2750

---) : 試料なし

2) 抽出分析

表2に示すように、中間採取期の茎葉部(穂を含む)中の放射性残留物の含水アセトンによる抽出率は、TRRの83.7%であり、最終収穫期の稲わら中のそれはTRRの78.3%であった。また玄米中の放射性残留物の抽出率は、TRRの66.0%であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 2 稲体中の放射性残留物の抽出

	中間採取茎葉 (穂を含む) (最終処理 14 日後)		稲わら (最終処理 35 日後)		玄米 (最終処理 35 日後)	
	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR
含水アセトン抽出液	5.2878	83.69	8.6545	73.33	0.4067	66.04
ソックスレー抽出液	0.3532	5.59	0.6754	6.13	0.0531	8.65
抽出残渣	0.6780	10.72	1.7156	15.53	0.1565	25.30
計	6.3189	100.00	11.0455	100.00	0.6163	100.00

3) 放射性成分の分析

主要放射性ピークの定量値を表 3 に示す。中間採取茎葉部 (穂を含む)、最終収穫玄米、および最終収穫稲わらにおける主要放射性ピークは類似していたが、玄米からは
 及び
 は同定されなかった。AF-02 以外に TRR の
 10%を越える代謝物 (グルコース抱合体についてはアグリコンとしてフリー体と合算)
 は、中間採取期では 及び であり、玄米では であった。稲わらでは、 及
 び であった (AF-02 は TRR の 10%未満)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 3 稲体抽出液中の放射性成分の HPLC 分析

フラクション 番号	識別	中間採取茎葉(穂を含む) (最終処理 14 日後)		玄米 (最終処理 35 日後)		稲わら (最終処理 35 日後)	
		mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR
FH35(FH35-E)	AF-02	0.9031	14.28	0.0841	13.65	1.0421	9.48

…): 同定できなかった。

4) 抽出残渣

表 4 に示すように、玄米の抽出残渣の α -アミラーゼ処理で TRR の 4.4% が、またプロテアーゼ処理で TRR の 2.3% が、それぞれ可溶化した。また、表 5 に示すように稲わらの固形物残渣中の放射性残留物について、化学的抽出による特徴付けを行った結果、大部分がリグニンとヘミセルロース画分に分布していた。これらの結果は、 $[^{14}\text{C}]$ AF-02 由来の放射性残留物がデンプン、タンパク質、リグニンおよびヘミセルロースなどの植物体構成成分に取り込まれた可能性を示唆するものであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 4 玄米の抽出残渣中 ^{14}C の特徴付け分析結果

	mg eq./kg	% TRR
抽出残渣の初期値	0.1565	25.30
緩衝液洗液	0.0094	1.53
デンプン画分	0.0269	4.38
タンパク質画分	0.0142	2.31
最終残渣	0.1227	19.99

表 5 稲わらの抽出残渣中 ^{14}C の特徴付け分析結果

	mg eq./kg	% TRR
抽出残渣の初期値	1.7156	15.53
ペクチン画分	0.0550	0.50
リグニン画分	0.4557	4.13
ヘミセルロース画分	0.9569	8.68
セルロース画分	0.0776	0.70
最終残渣	0.1149	1.04

5) 保存安定性

最終収穫期の玄米試料を収穫後 216 日間凍結保存したのち、抽出し、HPLC で分析したところ、 ^{14}C AF-02 以外の主要代謝物についてはほぼ同じ定量値が得られた。 ^{14}C AF-02 についてのみ若干の分解が認められたが、実際の分析は収穫後 55 日以内に実施しており、分解の影響は少ないと考えられた。

6) 代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 2 : 水稻における AF-02 の推定代謝経路

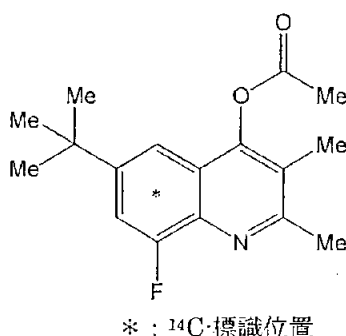
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

2. 植物代謝に関する試験

(資料 運-6)

2) AF-02 のトマトにおける代謝

放射性標識化合物： $[^{14}\text{C}]$ AF-02



化学名：6-*tert*-butyl-8-fluoro-2,3-dimethyl[U-4a,5,6,7,8,8a- ^{14}C]-4-quinolyl acetate

放射化学的純度：

比放射能：

標識位置選定理由：

試験方法：

$[^{14}\text{C}]$ AF-02 の保存溶液の調製； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 をアセトニトリル 200 mL に溶解して保存溶液を調製した。

試験植物；トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill. 品種：ルネッサンス)

栽培環境；ファイトトロン（光源：太陽光）内に設置したポットで栽培した。

ポット；埼玉県農林総合研究センター園芸研究所（久喜市）の畑圃場より採取した新鮮畑土壌を 1/2000 a のワグネルポットに充填して用いた。

温湿度；トマト慣行栽培期の東京地方の温湿度を基準に設定した。

栽培時期；2007年6月～2007年9月

施用液の調製および施用：

施用液； $[^{14}\text{C}]$ AF-02 の希釈溶液の計算量を採り、エバポレーターで有機溶媒を留去して乾固した。これを少量のアセトンで溶解し、顆粒水和剤白試料を添加した後、水を加えて超音波をかけながらよく攪拌して施用液とした。

施用量；3 mg/ポット（予定慣行最大施用量である 600 g a.i./ha 相当量）とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

施用時期;播種約 11 週後に初回散布し、その 1 週後および 2 週後に追加散布を行った。

施用部位 ; トマトの全面に散布した。

試験区の配置と試料採取 :

処理区と非処理対照区の 2 試験区を設けた。処理区と非処理対照区のポットは同一のフアイトロンに設置した。処理区は最終散布 1 日、7 日、および 14 日後にトマト果実を収穫した (14 日後のみ葉も収穫)。非処理区については最終散布 14 日後にトマト果実および葉を収穫した。処理区は各ポットから採取した試料を 1 点の混成試料にまとめた。

試験区	ポット数	採取時期	採取試料
処理区	3	最終散布 1 日後	トマト果実
		最終散布 7 日後	トマト果実
		最終散布 14 日後	トマト果実、葉
非処理対照区	1	最終散布 14 日後	トマト果実、葉

分析方法 :

試料の均質化と放射性総残留物 (TRR) の測定 ;

採取した各試料は、アセトニトリルで表面洗浄を行った後、ドライアイスと共にミキサーで粉碎して均質化処理した。TRR は抽出法により測定した。

トマト果実及び葉試料の抽出と精製 ;

次の図に示すように、トマト果実に関しては均質化した試料に NaOH 水溶液を加え、中和した。続いてアセトン/水=8/2(v/v)を加え、ホモジナイズおよび濾過により抽出し、抽出液と残渣に分離した。各画分の ^{14}C を測定し、それらを合計して TRR を求めた。抽出液は減圧濃縮した後、固相抽出による分画化を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図 1 抽出操作フローシート

代謝物の定量；

抽出液中の代謝物は C18 カラムを用いてフローズン型放射能検出付きの HPLC で分析した。得られたラジオクロマトグラムを解析して 44 画分に分画し、代謝物を定量した。

主代謝物の同定；

抽出液中のフリーの主放射性ピークについては、HPLC、及び一次元 TLC による参照標

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

品との比較により同定を行った。抱合体については、単離した後、MS/MS スペクトルを取得、またはその酵素加水分解物を HPLC で参照標品と比較することにより同定を行った。

抽出残渣の特徴付け分析；

トマト果実の抽出残渣は、化学処理により、ペクチン画分とリグニン画分、ヘミセルロース画分、およびセルロース画分に分離し、各画分に取り込まれた¹⁴Cのレベルを測定した。

放射能測定；

すべての液体試料は液体シンチレーション計測 (LSC) して定量した。固体中の放射能量は酸化燃焼処理したのち、LSC 測定して定量した。

試験結果：

1) 抽出分析 (本文中の濃度はすべて植物体重量ベースでの AF-02 換算濃度)

表 1 に示すように、最終散布 1、7、14 日後の果実中の TRR レベルは、0.3445、0.3471、0.1822 mg eq./kg であった。表面洗浄液中の放射能は最終散布 1 日後には TRR の 19.1% であったが、その後徐々に減少し、最終散布 14 日後には TRR の 7.3% となった。果実試料中に残留する放射能はその多くが抽出液中に回収され (TRR の 74.3~83.5%)、抽出残渣中の放射能は 6.6~12.1% であった。

表 1 トマト果実中の放射性総残留物レベル (mg eq./kg)

	最終散布 1 日後 果実試料		最終散布 7 日後 果実試料		最終散布 14 日後 果実試料		最終散布 14 日後 葉試料	
	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR
表面洗浄液	0.0657	19.06	0.0375	10.81	0.0133	7.30	1.0642	12.80
抽出液	0.2560	74.33	0.2677	77.14	0.1521	83.49	6.6900	80.48
抽出残渣	0.0228	6.61	0.0418	12.05	0.0168	9.21	0.5580	6.72
計	0.3445	100.00	0.3471	100.00	0.1822	100.00	8.3122	100.00

2) 放射性成分の分析

主要放射性ピークの定量値を表 2 に示す。果実試料においては、最終散布からの日数が経過するに伴い、AF-02 および が減少し、

が増加した。また、 も認められた。一方、葉試料から が検出された。AF-02 も代謝物として

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

以外に TRR の 10% を越える代謝物は、
であった。

表 2 トマト抽出液中の放射性成分の HPLC 分析

フラクション 番号	識別	最終散布 1 日後果実		最終散布 7 日後果実		最終散布 14 日後果実		最終散布 14 日後葉	
		mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR	mg eq./kg	% TRR
FS35+FH35	AF-02	0.0990	28.73	0.0305	8.80	0.0082	4.51	0.9797	11.77

<LOD) : 検出限界未満

3) 抽出残渣

表 3 に示すように、最終散布 7 日後の果実抽出残渣の化学的抽出による特徴付けを行った結果、ヘミセルロース、セルロースおよびリグニン画分に分布していた。これらの結果は、 $[^{14}\text{C}]$ AF-02 由来の放射性残留物がヘミセルロース、セルロースおよびリグニンなどの植物体構成成分に取り込まれた可能性を示唆するものであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

表 3 トマト果実の抽出残渣中 ^{14}C の特徴付け分析結果

	mg eq./kg	% TRR
抽出残渣の初期値	0.0418	12.05
ペクチン画分	0.0014	0.40
リグニン画分	0.0046	1.33
ヘミセルロース画分	0.0149	4.28
セルロース画分	0.0090	2.60
最終残渣	0.0097	2.80

4) 保存安定性

最終散布 14 日後の果実試料を収穫後 197 日間凍結保存したのち、抽出し、HPLC で分析したところ、収穫 30~34 日後に分析した結果とほぼ同じ定量値が得られ、 ^{14}C AF-02 及びその代謝物は凍結保存した試料中で安定であることが分かった。

5) 代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seikaファルマ株式会社にある。

図2 トマト中における AF-02 の推定代謝経路