

表 28 1年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
750 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制、摂餌量低下</li> <li>・PLT 増加</li> <li>・ALT 及び GGT 増加</li> <li>・TP 及び Alb 低下</li> <li>・T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 及び TSH 増加</li> <li>・肝腫大、胆嚢壁肥厚</li> <li>・肝比重量増加</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制、摂餌量低下</li> <li>・PLT 増加</li> <li>・TP 低下</li> <li>・肝腫大</li> <li>・肝比重量増加</li> <li>・胆嚢上皮過形成</li> </ul>
200 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ALP 増加</li> <li>・肝絶対重量増加</li> <li>・胆嚢上皮過形成</li> <li>・肝細胞肥大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ALT 及び GGT 増加</li> <li>・Alb 及びカルシウム低下</li> <li>・甲状腺絶対及び比重量増加</li> <li>・肝細胞肥大</li> </ul>
40 ppm 以上	40 ppm 以下毒性所見なし	・ALP 増加
20 ppm		毒性所見なし

(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 60 匹）を用いた混餌（原体：0、50、200、1,000 及び 3,000（雄のみ）または 4,000（雌のみ）ppm：平均検体摂取量は表 29 参照）投与による 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 29 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		50	200	1,000	3,000	4,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.5	10.3	52.7	170	/
	雌	3.6	14.6	75.4		

各投与群で認められた毒性所見は表 30 に示されている。

1,000 ppm 以上投与群の雄及び 200 ppm 以上投与群の雌で赤血球 ChE 活性阻害（20%以上）が認められた。さらに雌では、4,000 ppm 投与群で脳 ChE 活性阻害（20%以上）も認められた。

検体投与との関連が考えられる腫瘍性病変のうち、雌の尿路（膀胱及び尿道）移行上皮乳頭腫及び癌、雄の甲状腺ろ胞細胞腺腫及び癌の発生は、傾向検定で有意であった。また、雌の膀胱における免疫組織化学的検査の結果、4,000 ppm 投与群において、膀胱移行上皮の過形成を呈した部分にのみ PCNA の有意な増加がみられた。

本試験において、1,000 ppm 以上投与群の雄及び 200 ppm 以上投与群の雌で赤血球 ChE 活性阻害（20%以上）等が認められたことから、無毒性量は雄で 200 ppm（10.3 mg/kg 体重/日）、雌で 50 ppm（3.6 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 38）

表 30 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
4,000 ppm		<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・脳 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>・削瘦 (5例、剖検時)</li> <li>・肝絶対及び比重量増加</li> <li>・小葉中心性肝細胞肥大</li> <li>・肝紫斑病変巣、単細胞壊死</li> <li>・膀胱移行上皮過形成 (び漫性)</li> <li>・骨格筋萎縮</li> <li>・筋線維変性 (大腿筋)</li> <li>・坐骨神経髄鞘変性</li> <li>・甲状腺ろ胞コロイド内鉍質沈着</li> <li>・膀胱移行上皮癌 (1例) 及び乳頭腫 (2例)</li> </ul>
3,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・削瘦 (6例、剖検時)</li> <li>・肝絶対及び比重量増加</li> <li>・肝変異細胞巣 (好酸性)</li> <li>・限局性肝細胞変性 (門脈周辺性)</li> <li>・肝細胞質変化 (小葉中心性～門脈周辺性)</li> <li>・膀胱移行上皮過形成 (限局性及びび漫性)</li> <li>・甲状腺ろ胞細胞過形成、ろ胞コロイド内鉍質沈着</li> <li>・副腎束状帯の空胞化</li> <li>・尿道移行上皮癌 (1例)</li> <li>・甲状腺ろ胞細胞癌 (1例)</li> </ul>	
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>・坐骨神経髄鞘変性</li> <li>・甲状腺ろ胞細胞腺腫 (1,000 ppm : 1例、3,000 ppm : 2例)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肝細胞質変化 (小葉中心性)</li> </ul>
200 ppm 以上	200 ppm 以下毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> </ul>
50 ppm		毒性所見なし

(3) 2年間発がん性試験 (マウス)

B6C3F<sub>1</sub> マウス (一群雌雄各 50~70 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、20、100、500 及び 2,000 ppm : 平均検体摂取量は表 31 参照) 投与による 2年間発がん性試験が実施された。

表 31 2年間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		20	100	500	2,000
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	5.4	28.0	131	575
	雌	7.7	41.9	201	831

各投与群で認められた毒性所見は表 32、発生頻度が増加した腫瘍性病変は表 33 に示されている。

全投与群の雄及び 500 ppm 以上投与群の雌で T.Chol の増加が認められた。この変化は、用量相関性及び期間の一貫性を欠いたが、病理組織学的検査において、500 ppm 以上投与群の雌雄で胆嚢の好酸性不定形物質や上皮過形成が見られており、胆汁酸組成の変化が考えられたことから、雌雄とも、500 ppm 以上投与群で認められた T.Chol 増加は検体投与の影響であると考えられた。

2,000 ppm 投与群の雄で、腎近位尿細管上皮細胞空胞の発生頻度及び程度が有意に減少したが、この空胞は一般的に雄マウスにみられるとされており、空胞減少はしばしば体重低下に伴ってみられることから、腎臓への直接的な毒性作用とは考えられなかった。

100 ppm 以上投与群の雄において、肝細胞腺腫が傾向検定で有意な増加を示した。しかし、これらの発生数は背景データ (0~22%) の範囲内であり、さらに、肝細胞腺腫と癌を合計した場合には有意差は認められなかったことから、肝腫瘍に対する投与の影響は考えられなかった。

2,000 ppm 投与群の雌では、子宮内膜間質肉腫及び乳腺腺癌が傾向検定で有意な増加を示したが、いずれもほぼ背景データ (子宮内膜間質肉腫: 0~6%、乳腺腺癌: 0~10%) の範囲内であったことから偶発性のものと考えられた。

本試験において、500 ppm 以上投与群の雌雄で胆嚢の好酸性不定形物質等が認められたことから、無毒性量は 100 ppm (雄: 28.0 mg/kg 体重/日、雌: 41.9 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 39)

表 32 2年間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重低下</li> <li>・肝比重量増加</li> <li>・肝細胞肥大及び細胞質好酸性化 (計画と殺動物のみ)</li> <li>・胆嚢粘液分泌過多 (計画と殺動物のみ)</li> <li>・胆嚢上皮過形成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>・肝絶対重量増加</li> <li>・胆嚢の好酸性不定形物質</li> <li>・肝細胞肥大及び細胞質好酸性化 (計画と殺動物のみ)</li> <li>・胆嚢粘液分泌過多 (計画と殺動物のみ)</li> </ul>
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・T.Chol 増加、TG 低下</li> <li>・胆嚢の胆汁黒色化、好酸性不定形物質</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・T.Chol 増加</li> <li>・胆嚢の胆汁黒色化、好酸性不定形物質</li> <li>・肝比重量増加</li> <li>・胆嚢上皮過形成</li> </ul>
100 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 33 発生頻度が増加した腫瘍性病変

投与量 (ppm)		0	20	100	500	2,000
雄	肝細胞腺腫	#3/50	3/50	5/50	7/50	8/50
	肝細胞癌	3/50	2/50	9/50	7/50	2/50
	腺腫+癌	6/50	5/50	14/50	14/50	10/50
雌	子宮内膜間質肉腫	#1/50	1/47	0/49	0/50	3/49
	乳腺腺癌	§0/49	0/49	0/49	1/50	3/49

# : p<0.05、§ : p<0.01 (Peto の傾向検定)

## 1 2. 生殖発生毒性試験

### (1) 2 世代繁殖試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体: 0、20、300 及び 1,800 ppm : 平均検体摂取量は表 34 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 34 2 世代繁殖試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群 (ppm)			20	300	1,800
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	1.4	21.4	139
		雌	1.8	28.1	204
	F <sub>1</sub> 世代	雄	1.6	25.0	202
		雌	2.2	32.1	259

各投与群で認められた毒性所見は表 35 に示されている。

親動物において、P 世代雌の対照群、20 ppm 投与群及び 300 ppm 投与群で各 1 例が妊娠 11~28 日に死亡し、さらに F<sub>1</sub> 世代雌の 20 ppm 投与群及び 1,800 ppm 投与群の各 1 例が切迫と殺されたが、いずれも検体投与に起因するものではなかった。1,800 ppm 投与群の F<sub>1</sub> 世代において、膀胱上皮過形成が雄で 3 例、雌で 1 例認められた。例数は少なかったが、この病変はラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験 [10. (1)] 及び 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] でみられたものと同様、膀胱上皮における細胞毒性とその再生に起因したものと推察され、検体投与の影響であると考えられた。

児動物の F<sub>2</sub> 世代で哺育率低下が認められ、300 ppm 投与群でも統計学的に有意であったが、この群については背景データの範囲内であったことから、検体投与による作用とは考えられなかった。また、1,800 ppm 投与群児動物の F<sub>2</sub> 世代で出生時同腹児数低下が認められたが、これは繁殖能に対する影響というより親動物の毒性による影響であると考えられた。

本試験において、親動物では 300 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞質変化等、児動物では 1,800 ppm 投与群で体重増加抑制等が認められたことから、無毒性量は親動物で 20 ppm (P 雄 : 1.4 mg/kg 体重/日、P 雌 : 1.8 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雄 : 1.6 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雌 : 2.2 mg/kg 体重/日)、児動物で 300 ppm (P 雄 : 21.4 mg/kg 体重/日、P 雌 : 28.1 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub> 雄 : 25.0 mg/kg 体重/日、F<sub>1</sub>

雌：32.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 40)

表 35 2 世代繁殖試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	親：P、児：F <sub>1</sub>		親：F <sub>1</sub> 、児：F <sub>2</sub>		
	雄	雌	雄	雌	
親動物	1,800 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>肝比重量増加</li> <li>肝細胞質変化</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>摂餌量増加</li> <li>赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>脳 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>肝絶対及び比重量増加</li> <li>肝細胞質変化及び肝細胞肥大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>体重増加抑制</li> <li>摂餌量増加</li> <li>赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>肝比重量増加</li> <li>膀胱上皮過形成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>体重増加抑制</li> <li>摂餌量増加</li> <li>赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>脳 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> <li>肝絶対及び比重量増加</li> <li>膀胱上皮過形成</li> </ul>
	300 ppm 以上	300 ppm 以下 毒性所見なし	300 ppm 以下 毒性所見なし	肝細胞質変化	肝細胞質変化及び肝細胞肥大 副腎皮質空胞化
	20 ppm			毒性所見なし	毒性所見なし
児動物	1,800 ppm	<ul style="list-style-type: none"> <li>4 日生存率低下</li> <li>体重増加抑制 (哺育期)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>出生時同腹児数低下</li> <li>哺育率低下</li> <li>体重増加抑制 (哺育期)</li> </ul>	
	300 ppm 以下	毒性所見なし		毒性所見なし	

### (2) 発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 28 匹) の妊娠 6~15 日に強制経口 (原体：0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日、0.5% Tylose 水溶液に懸濁) 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物に検体投与に関連した所見は認められなかった。胎児では、1,000 mg/kg 投与群でダンベル型の第 12 胸椎弓、第 4 仙椎体と第 2 尾椎弓ならびに第 6 尾椎体の骨化促進、舌骨体の未骨化、泉門の拡張が胎児単位で有意に増加した。第 4 仙椎体の骨化促進のみは母動物単位でも有意な増加であった。しかし、これらのすべての所見は本系統のラットでの他試験と同様な頻度であるか、または用量相関性が明らかでないことから、投与に関連した所見とは考えられなかった。

本試験において、いずれの投与群の母動物及び胎児にも毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は母動物及び胎児とも 1,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 41)

### (3) 発生毒性試験 (ウサギ)

ヒマラヤウサギ (一群雌 16 匹) の妊娠 6~19 日に強制経口 (原体：0、2.5、10、40、160 及び 640 mg/kg 体重/日、0.5% Tylose 水溶液に懸濁) 投与する発生毒性試験が実施された。なお、試験開始時は 40 mg/kg 体重/日を最低用量として実施されたが、母動物への毒性をより明確にするため、2.5 及び 10 mg/kg 体

重/日投与群が追加された。

各投与群で認められた毒性所見は表 36 に示されている。

母動物では、流産が 40、160 及び 640 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 1、2 及び 3 例にみられた。流産及び切迫と殺動物では、摂餌量の顕著な減少、糞量減少、糞の退色等がみられ、検体が母動物に強い毒性を示したことが推測された。追加された 10 mg/kg 体重/日投与群では、流産は観察されなかったが、赤血球 ChE 活性阻害が用量相関性に認められた (10、40、160 及び 640 mg/kg 体重/日投与群の妊娠 13~20 日でそれぞれ 33~59%、58~80%、92~97% 及び 98~100% の阻害)。さらに 2.5 mg/kg 体重/日投与群が追加された結果、この阻害は認められなかった。また、脳 ChE 活性阻害はいずれの投与群においても認められなかった。

胎児では、検体投与に関連した所見は認められなかった。

本試験において、母動物では 10 mg/kg 体重/日以上投与群で赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められ、胎児では毒性所見が認められなかったことから、無毒性量は母動物で 2.5 mg/kg 体重/日、胎児で 640 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 42)

表 36 発生毒性試験 (ウサギ) で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
640 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・切迫と殺 (2 例)</li> <li>・体重低下及び体重増加抑制</li> <li>・摂餌量低下</li> <li>・糞量低下、糞の退色</li> </ul>	毒性所見なし
160 mg/kg 体重/日 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・軟便</li> <li>・GGT、ALT 及び TG 増加</li> <li>・肝臓中 TG 増加</li> </ul>	
40 mg/kg 体重/日 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・流産</li> <li>・小葉中心性~中間帯肝細胞肥大</li> <li>・肝細胞質変化 (すりガラス様)</li> </ul>	
10 mg/kg 体重/日 以上	<ul style="list-style-type: none"> <li>・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)</li> </ul>	
2.5 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	

#### (4) 代謝物VIの発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 30 匹) の妊娠 6~15 日に代謝物VIを強制経口 (代謝物 IV : 0 及び 1,000 mg/kg 体重/日、0.5% Tylose 水溶液に懸濁) 投与する発生毒性試験が実施された。

本試験において、母動物及び胎児に検体投与の影響は認められなかったことから、無毒性量は母動物及び胎児とも 1,000 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 43)

### 13. 遺伝毒性試験

フェントラザミドの細菌を用いた DNA 修復試験及び復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた染色体異常試験及び前進突然変異試験、ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、マウスを用いた小核試験、ラットを用いた <sup>32</sup>P-ポストラベリングアッセイ (DNA アダクトの検出) が実施された。

試験結果は表 37 に示されており、すべて陰性であったことから、フェントラザミドに遺伝毒性はないと考えられた。(参照 44~50)

表 37 遺伝毒性試験概要 (原体)

	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
in vitro	DNA 修復試験	<i>Bacillus subtilis</i> (H17、M45 株)	① 0.75~12 µg/7 <sup>+</sup> イスク (+/-S9) ② 3~48 µg/7 <sup>+</sup> イスク (+S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 µg/7 <sup>+</sup> レト (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	5~50 µg/mL (-S9) 10~100 µg/mL (+S9)	陰性
	前進突然変異試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	5~60 µg/mL (-S9) 1.88~60 µg/mL (+S9)	陰性
	UDS 試験	SD ラット肝細胞	1.0~50 µg/mL	陰性
in vivo	小核試験	NMRI マウス (骨髄細胞) (一群雌雄 5 匹)	1,500 mg/kg 体重 (1 回腹腔内投与)	陰性
	<sup>32</sup> P-ポストラベリングアッセイ	Wistar ラット (膀胱上皮) (一群雌 6 匹)	2,500、5,000 mg/kg 体重 (1 回経口投与)	陰性

フェントラザミドの代謝物 VI 及び X II の細菌を用いた DNA 修復試験、II、IV、VI、VII、X I、X II 及び分解物 X X III の細菌を用いた復帰突然変異試験、VI を用いた染色体異常試験及び前進突然変異試験が実施された。

試験結果は表 38 に示されているとおり、すべて陰性であった。(参照 51~61)

表 38 遺伝毒性試験概要 (代謝物)

被験物質	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
代謝物 II	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、 TA1535、TA1537 株)	75~4,800 µg/7 <sup>+</sup> レト (+/-S9)	陰性
代謝物 IV	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156~5,000 µg/7 <sup>+</sup> レト (+/-S9)	陰性
代謝物	DNA 修復試験	<i>B. subtilis</i> (H17、M45 株)	63~2,000 µg/7 <sup>+</sup> イスク (+/-S9)	陰性

VI	復帰突然変異試験	<i>S.typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E.coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	2,040~4,590 µg/mL (+/-S9)	陰性
	前進突然変異試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	125~4,000 µg/mL (+/-S9)	陰性
代謝物 VII	復帰突然変異試験	<i>S.typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E.coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
代謝物 XI	復帰突然変異試験	<i>S.typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E.coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156~5,000 µg/プレート (-S9) 78~2,500 µg/プレート (+S9)	陰性
代謝物 XII	DNA修復試験	<i>B. subtilis</i> (H17、M45 株)	63~1,000 µg/ディスク (+/-S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>S.typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E.coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性
分解物 XXIII	復帰突然変異試験	<i>S.typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E.coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156~5,000 µg/プレート (+/-S9)	陰性

#### 14. その他の試験

##### (1) 赤血球におけるフェントラザミド及び代謝物の分析 (ラット)

[phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミドを用いた体内分布試験[1. (1)④]において、血漿中に比べて赤血球中で高い放射能分布が認められており、ラットの垂急性[10. (1)]及び慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]でみられた赤血球関連項目の変動への関与が疑われた。赤血球中の放射能残留性と、血液に対する影響との関連について考察する目的で、Wistar ラット (一群雄 4 匹) に[phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミドを 75 mg/kg 体重で単回経口投与し、1 時間後の赤血球におけるフェントラザミド、II、XI、XIV 及び XII の残留濃度について検討された。

投与 1 時間後の赤血球からフェントラザミドが 0.026 µg/g 検出された。これはいずれの代謝物よりも低濃度であった。

代謝物 II は 3.37 µg/g 検出され、分析した化合物の中で最も高い濃度を示した。ラット体内における消長及び動態試験[1. (3)]において、II は X とともに血漿中の主要代謝物であることが認められているが、赤血球においても同様の分布を示したものと推察された。したがって、動物体内運命試験でみられた血球中での高い放射能分布は、主に II 及び X (II のグルクロン酸抱合体) が関与していたものと考えられた。

一方、シクロヘキシル環を有する代謝物については、XIV が最も高く、0.83 µg/g



を示した。次いでXIIが0.14 µg/g、XIが0.032 µg/g 検出された。この分布パターンは、ラット体内における消長及び動態試験[1. (3)]における血漿中の代謝物分布と同様であった。またIIより低レベルでの分布であった。

以上のように、フェントラザミドを経口投与後のラット赤血球からは、血漿と同様に、主な代謝物としてII、このほか量的には少ないがXIV、XII及びXIが検出された。(参照 62)

## (2) 代謝物VIの血漿中動態及び排泄試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 1~3 匹) に、代謝物VIを 0 及び 2,000 mg/kg 体重で単回強制経口投与し、血漿中動態、尿及び糞への排泄試験が実施された。

経口投与後の吸収は速やかであり、血漿中濃度は投与 30 分後に最高 (雄 : 230 µg/mL、雌 : 197 µg/mL) となり、その後減少した。

主要排泄経路は尿中であり、投与後 72 時間の尿中に、雄で 41.6% TAR、雌で 38.3% TAR が排泄された。IVは未変化のまま、速やかに排泄され、尿中排泄の約 80%が投与後 24 時間に排泄された。糞の分析は、技術的な問題により雄 1 例のみで実施されたが、糞中排泄量は 4.5% TAR と少なかった。(参照 63)

## (3) 神経病変についての解明試験 (ラット)

フェントラザミドの亜急性及び慢性毒性試験[10. 及び 11.]において、本剤はChE 活性阻害作用を持つことが示されており、また、ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性試験[11. (2)]の最高用量群 (雄 : 3,000 ppm、雌 : 4,000 ppm) において、最終と殺動物で坐骨神経に変性髄鞘病変の増加が観察された。しかし、神経病変がみられた動物の臨床観察では、行動等に異常は認められなかった。

この所見及び本剤のChE 活性阻害作用を考慮して、NTE 活性阻害性ととともに、ラットでの神経病変とある種の有機リン剤誘発遅発性神経障害 (OPIDN) との類似性について検証する目的で、以下の①~③の試験が実施された。

### ① NTE 活性阻害能力及びその機序 (*in vitro*)

ChE 活性阻害作用を持つ有機リン剤のうち、ある種のもの、急性中毒後に生存した場合 OPIDN を誘発することがあり、有機リン剤による OPIDN 誘発性は神経組織の NTE 活性の強い阻害 (>70~80%) に相関している。

したがって、フェントラザミドが NTE 活性も同様に阻害するかどうか、また本剤のラットへの慢性投与による髄鞘の変性が OPIDN に類似した変化であるかどうかを検査するため、ニワトリ及びラットの脳 10% ホモジネート液 (脳 1 g / 9 mL 50 mM tris、0.2 mM EDTA、pH 8.0) の 50 倍 (脳 4.0 mg/mL) または 25 倍 (脳 2.0 mg/mL) 希釈液を用いて、以下の試験が実施された。

#### a) NTE 活性の測定

フェントラザミド及び陽性対照物質（ジクロロボス及びラセミ体のメタミドホス）を処理して、ニワトリ及びラットの脳 NTE 活性を測定し、その阻害程度について検討された。

フェントラザミドで濃度依存的な NTE 活性阻害が認められた。阻害の程度は、ジクロロボスより軽度であったが、メタミドホスより強かった。また、ジクロロボスとメタミドホスはラット及びニワトリの脳 NTE 活性を同等に阻害したが、フェントラザミドはニワトリの脳 NTE 活性よりもラットの脳 NTE 活性を強く阻害した。

また、プレインキュベーション時間を通常の 20 分から 2 時間 20 分に延長して同様に実施された結果、ニワトリ及びラットの脳 NTE 活性阻害の程度は、フェントラザミド及びメタミドホスで増加し、ともに NTE 活性の進行的な阻害が示唆された。

#### b) 反応基質の濃度による影響

基質の吉草酸フェニルの濃度のみを変え（0.27、0.55 及び 1.37 mM）、通常の条件下で試験を実施し、基質濃度とフェントラザミドによるラットの脳 NTE 活性阻害との関係について検討された。

フェントラザミドによるラットの脳 NTE 活性阻害の程度は基質濃度に反比例したが、メタミドホスによる阻害は基質濃度に影響されなかった。さらに、Lineweaver-Burk 法による解析では、フェントラザミドによる NTE 活性の競合的な阻害が強く示唆された。一方、メタミドホスでは非競合的な阻害が示され、触媒中心部の速やかなリン酸化が示唆された。

インキュベーション時間が 2 時間 20 分に延長された場合では、フェントラザミドにおいても基質濃度に関係なく同程度にラットの脳 NTE 活性を阻害し、競合的な阻害が非競合的な阻害へ変化したことが示唆された。これにより、フェントラザミドが NTE を共有結合的に修飾して、持続的に酵素を阻害していることが考えられた。

#### c) 阻害されたラット脳 NTE 活性の賦活化

フェントラザミド及びメタミドホスにより阻害されたラットの脳 NTE 活性の賦活化について検討された。

ラット脳ホモジネート液にフェントラザミドまたはメタミドホスを加え、37°C で 30 分間インキュベーションして NTE 活性を阻害した後、フッ化カリウムを加えて同条件でインキュベーションし、賦活化処理された。

フェントラザミドによる NTE 活性阻害は、フッ化カリウム処理によって全く賦活化されなかった。一方、メタミドホスによって阻害された NTE 活性は、フッ化カリウム処理によってほぼ完全に賦活化された。したがって、フェントラザ

ミドが NTE と共有的に結合しているものと推察された。

また、ラット脳ホモジネート液に、メタミドホスを加えて 37°C で 30 分間インキュベートして NTE 活性を阻害後、さらにフェントラザミドを加えて同条件でインキュベートした試料についても、フッ化カリウムを加えて同様に賦活化処理された。

メタミドホスの単独処理によって、NTE 活性の十分な阻害が認められた。メタミドホス処理後にフェントラザミド処理した結果、さらに NTE 活性阻害のわずかな増加が認められた。また、フェントラザミドの単独処理では、メタミドホスとフェントラザミドの併用処理により得られたものと同程度で NTE 活性を阻害した。

賦活化処理については、メタミドホスとフェントラザミドの併合処理により NTE 活性を阻害した場合、メタミドホスの単独処理と同様に十分に賦活できたが、その一部は非賦活的であった。加えて、フェントラザミド単独処理による NTE 活性阻害は全く賦活化されなかったことから、フェントラザミドはメタミドホスと同じく NTE の触媒中心部と結合すると考えられた。

#### d) まとめ

フェントラザミドは、初めから賦活できないような形で NTE 活性を阻害することが示唆され、既知の NTE 阻害剤（特に有機リン剤）と構造的に異なっていることから、遅発性神経障害誘発性の結論は *in vitro* の本試験のデータのみでは得られなかった。フェントラザミドによる *in vitro* の NTE 活性阻害が遅発性神経障害の誘発性を示唆しているかどうかを判断するためには、*in vivo* でのさらなる検証が必要と考えられた。（参照 64）

#### ② 2 週間混餌投与による発生機序解明試験

本試験は、フェントラザミド及び主要代謝物である II の血漿中濃度を評価することに加えて、脳、脊髄及び坐骨神経 NTE 活性と脳 AChE 活性を測定し、ラットでみられた髄鞘変性の病態を明らかにする目的で実施された。また、尿検査を実施し、同じく慢性毒性試験でみられた膀胱病変の発生機序の解明についても検討された。

Wistar ラット（一群雌雄各 5 匹）にフェントラザミドを 2 週間混餌投与（原体：0、50、200、1,000 及び 4,000 ppm：平均検体摂取量は表 39 参照）し、試験終了時における血漿中のフェントラザミド及び II の濃度、脳、脊髄及び坐骨神経 NTE 活性及び脳 AChE 活性の測定、投与 1 週間後における尿の Na<sup>+</sup>、pH 及び尿量が測定された。なお、陽性対照群にはリン酸トリ- $\sigma$ クレジル（TOCP）を 500 mg/kg 体重で 1 回強制経口投与し、NTE 活性の測定のみ実施された。

表 39 2 週間混餌投与による発生機序解明特殊試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		50	200	1,000	4,000
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	3.5	14.4	74.0	366
	雌	4.1	15.5	88.5	405

すべての群において、死亡、検体投与に起因する行動、外観及び体重の変化は観察されなかった。4,000 ppm 投与群では摂餌量が増加した（雄で 28%、雌で 24%）。

フェントラザミドの血漿中濃度は、4,000 ppm 投与群では極めて低く、雄で 0.52  $\mu\text{M}$ 、雌で 1.10  $\mu\text{M}$  と定量限界（1  $\mu\text{M}$ ）付近であり、その他の群では検出限界（0.5  $\mu\text{M}$ ）未満であった。II の濃度は、200 ppm 以上投与群で用量相関的に増加し、4,000 ppm 投与群の雄では 9.8  $\mu\text{M}$ 、雌では 13.9  $\mu\text{M}$  であった。したがって、フェントラザミドは初回通過効果により代謝されることが示唆された。

NTE 活性について、陽性対照群では、投与 1 日後には試験した神経組織のすべてで強い NTE 活性阻害（脳及び脊髄：約 90%、坐骨神経：77%阻害）がみられた。一方、検体投与群では、4,000 ppm 投与群の雄では脳のみ、雌ではすべての神経組織で統計的に有意な阻害（13~29%阻害）が認められたが、有機リン酸エステルでみられるような、神経毒性に関連する程度ではなく、生物学的に有意な阻害ではなかった。他の群の NTE 活性阻害もわずかであり、用量相関性もなく、雌雄いずれかのみの変化であったことから、検体によるものとは考えられなかった。

脳 AChE は、4,000 ppm 投与群の雌でのみ有意な阻害（47%阻害）が認められ、本試験においても、脳は慢性毒性試験と同等な影響を受けたものと考えられた。

なお、投与開始 1 週間後の尿（16 時間採取）を用いた尿検査では、全投与群で  $\text{Na}^+$ 、pH 及び尿量のいずれも統計的に有意な変化は認められず、これらと慢性毒性試験でみられた膀胱病変との関連は否定できると判断された。

*in vivo* の本試験では、①の *in vitro* の試験で認められたような強い NTE 活性阻害は認められなかった。さらに、ニワトリを用いた急性及び 28 日間亜急性遅発性神経毒性試験 [8. (4) 及び 10. (5)] においても、遅発性神経毒性を示唆する所見は認められていないことから、ラットでみられた髄鞘変性の増加は、有機リン酸エステルに起因する神経病変とは異なる作用機序によるものと推察された。（参照 65）

### ③ 神経細胞に対する影響 (*in vitro*)

ラットで認められた神経障害について、分子レベルでの研究を参考にし、神経細胞内のエネルギー代謝、神経細胞骨格（神経フィラメント）への影響について検討するため *in vitro* での試験が実施された。さらに、非神経細胞や既知の神経毒性物質も併用し、神経系への影響の機序について検討された。

#### a) 初代培養神経細胞への影響

神経細胞への影響の指標として、細胞毒性（細胞への Calcein 色素の取込みに伴う蛍光の測定による細胞生存率で判定）、エネルギー代謝（細胞内でのグルコース消費と細胞内 ATP の測定、ローダミン 123 色素の取込みに伴う蛍光の測定によるミトコンドリア内膜電位の測定）及び神経フィラメント（マウス抗体及び抗マウス抗体で処理後に細胞フィラメントに付着した抗体を測定）について検討された。

ラット胎児由来の神経初代培養細胞に、フェントラザミドを 0.1、1、5、10 及び 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （調製可能最大濃度）の処理濃度で添加し、14 日間（うち 7 日間は回復期間）インキュベートされた。各測定は、処理 3 または 7 日後及び試験終了時に実施された。

フェントラザミドは、細胞エネルギーの項目であるグルコース消費、ATP 量及びミトコンドリア活性を著しく減少させた。細胞骨格（神経フィラメント）には、遅延的に試験終了時にわずかに影響がみられた。ATP は最も感受性の高いパラメータであり、50%阻害濃度（ $\text{IC}_{50}$ ）は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。細胞毒性にはあまり強い作用はみられなかった。

これらの結果から、フェントラザミドの作用による ATP 量減少による遅延的な神経フィラメントへの影響が考えられたため、培養液にピルビン酸を添加し、前述と同じ試験系で試験が実施された。その結果、いずれの測定項目にも著明な作用はみられなかったことから、フェントラザミドによるエネルギー項目への影響は、解糖系の代謝物（ピルビン酸）により改善されたものと考えられた。

#### b) 6 種の継代培養細胞株への影響

a) と同様の試験系において、初代培養細胞の代わりにマウスの N-18 細胞（神経芽細胞腫）株、ラット腎臓 NRK52e 細胞株、ラット骨格筋 L6 細胞株、ラット心筋 H9C2 細胞株、マウス肝臓 Hepa 1-6 細胞株及びマウス線維芽細胞 3T3 細胞株を用いた試験が実施された。

フェントラザミドは、神経芽細胞腫由来の N-18 株のみに初代継代培養神経細胞と同様な作用を示したが、その程度は弱いものであった。その他の非神経系細胞株には、検体の作用は認められなかった。

a) 及び b) の結果から、フェントラザミドの細胞エネルギー系への作用は神経細胞に限定されるものと考えられた。

#### c) 各種神経毒性物質の初代培養神経細胞への影響

末梢神経障害を誘発することが知られている 7 種の化合物（名称、標的部位及び症状は表 40 参照、処理濃度：0.1、1、5、10 及び 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いて、a) 及び b) と同様の条件下で初代培養神経細胞への影響を調べ、フェントラザミドでの結果と比較し、作用機序について検討された。

表 40 試験に用いた末梢神経障害誘発性化合物

化合物	標的部位	症状
2,5-ヘキサンジオン	細胞骨格、解糖系	遠位軸索障害
アクリルアミド	細胞骨格、解糖系、ATP枯渇	遠位軸索障害
パラコート	レドックス循環	振戦麻痺、神経節変性
青酸カリウム	チトクローム C 酸化酵素	遅発性振戦麻痺
ミパホックス	細胞骨格、NTE、AChE	遅発神経毒性
TOCP	細胞骨格、NTE、AChE	遅発神経毒性
パラオキソン	AChE	コリン作動性症状

2,5-ヘキサンジオン及びアクリルアミドは、細胞骨格に直接作用することが特徴であるが、同時に細胞エネルギー供給に対する作用も示した。パラコート及び青酸カリウムは、ミトコンドリアや細胞エネルギー供給に対する強い作用を示したが、ピルビン酸添加条件では明らかな改善はみられなかった。遅発性神経毒性有機リン酸エステルであるミパホックス及び TOCP は、細胞骨格に直接及び選択的な作用を示した。これとは対照的に、パラオキソンではいずれの項目にも影響を及ぼさなかった。

したがって、フェントラザミドのラット神経細胞に対する作用は、細胞エネルギー供給に関わっているという点ではパラコートや青酸カリウムと概ね同じであったが、ピルビン酸添加により改善される点、ならびに作用発現が青酸カリウムに比べ比較的遅発性である点から、作用機序はこれらの物質とは異なったものであることが推察された。

#### d) 呼吸鎖及びミトコンドリアの機能に対する作用

a) の試験結果から、フェントラザミドはまず神経細胞でのグルコース利用を阻害することが示された。神経細胞内の ATP のエネルギー源はグルコースのみであり、グルコースの利用段階としては、神経細胞内へのグルコースの取込み、解糖系、クエン酸サイクル及び呼吸鎖が考えられる。これらのどの段階での作用が重要であるかを検討するため、ラット肝臓のミトコンドリアを用い、フェントラザミド、2,5-ヘキサンジオン、アクリルアミド、パラコート及び青酸カリウムがグルタミン酸/リンゴ酸誘起呼吸及びコハク酸誘起呼吸時に、ミトコンドリア呼吸とそれに続く ATP 産生を直接阻害するかどうかを検討した。

脱共役活性はいずれの化合物においても認められなかった。

青酸カリウムは、グルタミン酸/リンゴ酸誘起呼吸及びコハク酸誘起呼吸を用量相関的に阻害した。青酸カリウムはチトクローム C オキシダーゼ阻害剤であることから、これは予想される反応であった。フェントラザミドでは、グルタミン/リンゴ酸誘起呼吸をわずかに阻害した。このときの 50% 効果濃度 (EC<sub>50</sub>) は 100 µg/mL 超であり、ミトコンドリア膜活性 (ローダミン) への影響の濃度 (EC<sub>50</sub> 値: 9 µg/mL) と比較すると高値であった。したがって、フェントラザミドのミ

トコンドリアに対する作用は、神経細胞へのエネルギー供給不全が主な理由ではないことが示唆された。

#### e) グルコース利用の中間代謝物への作用

d)に関連して、グルコースの取込みや利用への影響を検討するため、継代神経芽細胞株(神経芽細胞腫株)にフェントラザミドを処理し、処理3及び7日後のグルコースの取込量、細胞内グルコース、ピルビン酸及び乳酸濃度が測定された。

グルコース消費(細胞外グルコース量)は、処理7日後に用量相関的に顕著に減少したが、細胞内のグルコース濃度は逆に増加しており、フェントラザミドが細胞内へのグルコースの取込みに関与していないこと、またグルコースの利用が減少したことが示唆された。

ピルビン酸(解糖系の代謝物)及び乳酸(嫌気的条件下でピルビン酸から生成)の細胞内における測定では、いずれも用量相関的な減少が認められた。フェントラザミドは極めて低濃度で作用し、ATP濃度の抑制を示す濃度よりも明らかに低い濃度で作用した。

これらの結果により、フェントラザミドはピルビン酸と乳酸を同時に減少させるが、これは乳酸濃度を増加させるべき嫌气的解糖系への移行というよりは、むしろ好气的解糖系におけるピルビン酸産生を抑制することが示唆された。また、ピルビン酸のクエン酸回路及び呼吸鎖を経由しての代謝は影響されず、ピルビン酸が徐々に欠乏していくことにより、呼吸鎖に対する基質の供給も減少し、ミトコンドリア膜の機能とATP産生能が低下すると考えられた。

#### f) 神経細胞への作用の濃度

a)の結果から、初代培養神経細胞でフェントラザミドに対して最も感受性の高い項目はATPの減少であり、0.1 µg/mLという低濃度で影響を受けた。しかし、細胞培養液中の培地成分に検体が結合することが懸念されたことから、培養液中の蛋白と検体の結合を明らかにするため、培養液中の遊離(非結合)検体濃度を限外濾過法により測定された。

フェントラザミドは、細胞培養に使用した培養液成分に約50%結合していた。したがって、*in vitro*における遊離の検体濃度は、最も感受性のATPに対しては、約0.05 µg/mLであったと推定された。

#### g) まとめ

a)~f)の結果から、*in vivo*における神経細胞のエネルギー需給状態に対するフェントラザミドの作用は、*in vivo*で細胞に到達した量が非常に少ないことを考慮すれば、非常に弱くかつ選択的なものであったことが予測された。ラットの慢性毒性/発がん性併合試験において、髄鞘変性は対照群での老齢のラットにも観察されたが、エイジングによるミトコンドリア機能の低下と、それによっておこ