

二. 単回投与、反復投与、生殖発生 その他の毒性

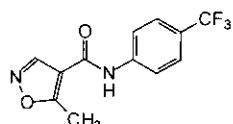
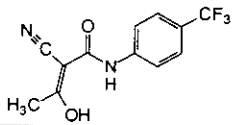
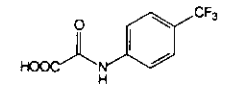
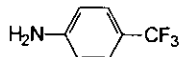
二. 単回投与、反復投与、生殖発生その他の毒性 目次

[総括]	1
1. 単回投与毒性試験	8
(1) マウスにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-1)	8
(2) ラットにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-2)	8
(3) イヌにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-3)	9
(4) A771726 のマウスにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-4)	10
(5) A771726 のラットにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-5)	10
(6) A771726 のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験 (添付資料ニ-6)	11
(7) A771726 のラットにおける単回腹腔内投与毒性試験 (添付資料ニ-7)	11
(8) 4-TFMA のマウスにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-8)	12
【単回投与毒性試験のまとめ】	13
2. 反復投与毒性試験	14
(1) マウスにおける 14 日間反復経口投与毒性試験 (参ニ-16)	14
(2) マウスにおける 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (参ニ-5)	14
(3) ラットにおける 4 週間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-10)	16
(4) ラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-11)	20
(5) ラットにおける 6 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-12)	22
(6) イヌにおける 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-13)	25
(7) イヌにおける 6 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-14)	27
(8) イヌにおける 1 年間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-15)	29
(9) サルにおける 14 日間反復経口投与毒性試験 (参ニ-17)	31
(10) サルにおける 30 日間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-17)	32
(11) A771726 のラットにおける 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-18)	34
(12) A771726 のイヌにおける 1 ヶ月間反復静脈内投与毒性試験 (添付資料ニ-19)	35
(13) A771726 のイヌにおける 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (添付資料ニ-20)	37
【反復投与毒性試験のまとめ】	40
3. 生殖発生毒性試験	46
(1) ラットの雄性生殖能試験 (添付資料ニ-21)	46
(2) ラットにおける受胎能試験及び出生前並びに出生後発生試験 (単一試験計画法) (添付資料ニ-22)	48
(3) ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 (添付資料ニ-23)	50
(4) ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 (添付資料ニ-24、25)	52
(5) ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (添付資料ニ-26)	54
(6) ラットにおける出生後の発生及び母体の機能に関する試験 (添付資料ニ-27)	56
【生殖毒性試験のまとめ】	60
4. 遺伝毒性試験	61

(1) 細菌を用いる復帰突然変異試験 (添付資料ニ-28、参ニ-14)	61
(2) 培養細胞を用いる HGPRT 試験 (添付資料ニ-29)	63
(3) ほ乳類細胞を用いる <i>in vitro</i> 不定期 DNA 合成試験 (添付資料ニ-30)	63
(4) 骨髄細胞を用いる <i>in vivo</i> 染色体異常試験 (添付資料ニ-31)	64
(5) マウスを用いる小核試験 (添付資料ニ-32)	64
(6) A771726 の細菌を用いる復帰突然変異試験 (添付資料ニ-33)	65
(7) A771726 の培養細胞を用いる HGPRT 試験 (添付資料ニ-34)	66
(8) A771726 のマウスを用いる小核試験 (添付資料ニ-35)	66
(9) 4-TFMA の細菌を用いる復帰突然変異試験 (添付資料ニ-36、37)	67
(10) 4-TFMA の培養細胞を用いる HGPRT 試験 (添付資料ニ-38)	69
(11) 4-TFMA のほ乳類細胞を用いる <i>in vitro</i> 染色体異常試験 (添付資料ニ-39)	70
(12) 4-TFMA の骨髄細胞を用いる <i>in vivo</i> 染色体異常試験 (添付資料ニ-40、41)	71
(13) 4-TFMA のマウスを用いる小核試験 (添付資料ニ-42、43)	72
(14) 4-TFMA のラットを用いる <i>in vitro/in vivo</i> 不定期 DNA 合成試験 (添付資料ニ-44)	73
【遺伝毒性試験のまとめ】	74
5. がん原性試験	75
(1) マウスを用いるがん原性試験 (添付資料ニ-45)	75
(2) ラットを用いるがん原性試験 (添付資料ニ-46)	78
【がん原性試験のまとめ】	81
6. その他の毒性試験	86
(1) モルモットを用いる抗原性試験-レフルノミド及び A771726- (添付資料ニ-47)	86
(2) モルモットを用いる皮膚感作試験 (maximization test 法) -レフルノミド及び A771726- (添付資料ニ-48, 49)	87
(3) 白内障誘発作用に関する検討試験 (添付資料ニ-50)	87
【その他の毒性のまとめ】	88
7. ヒトにおける副作用発現の予測	90
(1) ヒトにおける安全域の推定に関する考察	90
(2) 妊婦へのリスクに関する考察	91
(3) 中間代謝物 4-TFMA による遺伝毒性及び発がん性に関する考察	92
(4) 中間代謝物 4-TFMA による血液毒性に関する考察	94
(5) ヒトにおける副作用発現に関する安全性試験からの考察	94
1) 下痢	95
2) 脱毛	95
3) 高血圧/血圧上昇	95
4) 肝障害	95
5) 消化器痛/腹痛	96
6) 上気道感染	96
7) 血液系への影響	96
8. 安全性試験のまとめ	97

【引用文献】 98

二. 毒性の項の略号一覧表

略号	化学名	構造式	由来
レフルノミド (HWA486)	<i>N</i> -(4-trifluoromethylphenyl)-5-methylisoxazole-4-carboxamide		原薬
A771726	(<i>Z</i>)-2-cyano-3-hydroxy- <i>N</i> -(4-trifluoromethylphenyl)-2-butenamide		代謝物
TFMA oxanilic acid	<i>N</i> -(4-trifluoromethylphenyl)oxamic acid		代謝物
4-TFMA	4-trifluoromethylaniline		代謝物

略号	名称
2-AA	2-aminoanthracen
2-NF	2-nitrofluorene
9-AA	9-amino acridine
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT (GPT)	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ASA 反応	能動的全身性アナフィラキシー反応
AST (GOT)	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	曲線下面積
BZ	benzidine
B[a]P	benzo[a]pyrene
CG	congored
Cmax	最高血中濃度
DHODH	ジヒドロオロテートデヒドロゲナーゼ
DMSO	dimethyl sulfoxide
ENNG	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
FCA	フロイント完全アジュバント
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
IC ₅₀	50%阻害濃度
LDH	乳酸デヒドロゲナーゼ
MD	methylhydrazone derivative
MNNG	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
MTX	メトトレキサート
NSAID	非ステロイド抗炎症剤
NaN ₃	sodium azide
PCA 反応	受身皮膚アナフィラキシー反応
STZ	streptozotocin
Tmax	最高血中濃度到達時間

[総括]

レフルノミドは、経口投与後、腸管及び肝による初回通過効果を受けて、活性代謝物である A771726 に速やかに変換され、血中に未変化体はほとんど認められないことが明らかになっている（概要へ-7~10, 21, 22 頁参照）。したがって、レフルノミドに関する毒性試験は、いずれも実質的には主として A771726 による毒性発現の有無を検討した試験であると考えられた。しかしながら、A771726 がレフルノミドの活性代謝物であることから、この代謝物の毒性について、更に単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、抗原性試験及び皮膚感作試験を実施した。レフルノミドの主要代謝経路は、A771726 から TFMA oxanilic acid が直接生成される反応であるが、副代謝経路として A771726 から中間代謝物 4-TFMA を経由して TFMA oxanilic acid が生成される反応がある。この 4-TFMA は、レフルノミドを投与することにより動物及びヒトの血中に極めて微量検出された。4-TFMA は、ハイエンツ小体を伴う溶血性貧血、好中球増加、リンパ球増加、脾臓肥大及び骨髓細胞からの顆粒球/マクロファージの形成促進などの毒性作用を有すること¹⁻³⁾が報告されているため、4-TFMA の毒性についても、単回投与毒性試験及び遺伝毒性試験を実施した。レフルノミド、A771726 及び 4-TFMA の毒性試験の成績一覧を表ニ-1~6 に示した。

1. 単回投与毒性試験【GLP 適合】レフルノミド：マウス（添付資料ニ-1、参ニ-2）、ラット（添付資料ニ-2、参ニ-1,3）、イヌ（添付資料ニ-3）、A771726：マウス（添付資料ニ-4,6）、ラット（添付資料ニ-5,7）、4-TFMA：マウス（添付資料ニ-8）

レフルノミドあるいは活性代謝物である A771726 を経口あるいは腹腔内投与したとき、マウス及びラットでの概略の致死量は 100~500 mg/kg であった。レフルノミドをイヌに経口投与したときの概略の致死量は 40 mg/kg 以上であった。これらの動物に見られた主な所見は、自発運動減少、流涙及び下痢などであった。

中間代謝物である 4-TFMA をマウスに腹腔内投与したときの概略の致死量は 400 mg/kg であった。主な所見として、腹臥及びチアノーゼなどが見られた。

表ニ-1 単回投与毒性試験成績一覧表

動物種	投与(処置)経路	投与用量 (mg/kg)	成績	資料番号	実施施設
レフルノミド					
マウス	経口	200, 500	自発運動減少, 流涙, 歩行異常 概略の致死量: 500 mg/kg	ニ-1	ドイツ ^{a)}
ラット	経口	100, 250	自発運動減少, 歩行異常 概略の致死量: 100 mg/kg	参ニ-1	ドイツ ^{a)}
ラット	経口	30, 100, 300	自発運動減少, 赤色尿, 立毛 概略の致死量: 300 mg/kg	ニ-2	日本 ^{b)}
イヌ	経口	10, 20, 40	便の異常 概略の致死量: >40 mg/kg	ニ-3	日本 ^{b)}
マウス	腹腔内	200, 400	自発運動減少, 腹臥 概略の致死量: 400 mg/kg	参ニ-2	ドイツ ^{a)}
ラット	腹腔内	200, 400	自発運動減少, 立毛 概略の致死量: 200 mg/kg	参ニ-3	ドイツ ^{a)}
A771726					
マウス	経口	100, 200	自発運動減少, 立毛 概略の致死量: 200 mg/kg	ニ-4	ドイツ ^{c)}
ラット	経口	100, 200, 500	自発運動減少 概略の致死量: 200 mg/kg	ニ-5	ドイツ ^{c)}
マウス	腹腔内	100, 160	自発運動減少, 下痢, 振せん 概略の致死量: 100 mg/kg	ニ-6	ドイツ ^{c)}
ラット	腹腔内	63, 100	自発運動減少, 下痢, 振せん 概略の致死量: 100 mg/kg	ニ-7	ドイツ ^{c)}
4-TFMA					
マウス	経口	400, 1000	腹臥, チアノーゼ 概略の致死量: 400 mg/kg	ニ-8	ドイツ ^{d)}

a) Pharma Development, Central Toxicology, Hoechst AG

b)

c) Pharma Development, Toxicology, Hoechst AG

d) Pharma Development, Corporate Toxicology, Hoechst AG

2. 反復投与毒性試験【GLP 適合】レフルノミド：マウス（参ニ-4,5,16）、ラット（添付資料ニ-10,11,12、参ニ-6）、イヌ（添付資料ニ-13,14,15）、サル（添付資料ニ-17、参ニ-17）、A771726：ラット（添付資料ニ-18、参ニ-7,8）イヌ（添付資料ニ-19,20）

レフルノミドをマウス、ラット、イヌあるいはサルに 14 日から 1 年間反復経口投与したときの毒性について検討した。いずれの動物種においても、一般状態の悪化、体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。また、赤血球数、ヘモグロビン量、白血球数及び血小板数の減少などの血液学的パラメータに影響が認められ、骨髓内の造血細胞の減少が認められた。消化管及びリンパ節などに出血あるいは出血に起因した赤色化が認められた。胸腺重量の減少、胸腺の萎縮及び肺の血管周囲にリンパ系細胞の浸潤などが認められた。イヌでは、肝臓、脾臓及び骨髓にヘモジデリン沈着が認められた。サルでは、体重増加抑制、摂餌量の減少及び貧血傾向がわずかに認められたが、ラット及びイヌの反

復投与試験で見られたような顕著な毒性所見は認められなかった。

A771726をラットに3ヵ月間反復経口投与及びイヌに1ヵ月間反復静脈内あるいは3ヵ月間反復経口投与したときの毒性発現について検討した。レフルノミドを反復投与したときに認められた毒性所見以外に新たな異常所見は認められなかった。

表二-2 反復投与毒性試験成績一覧表

動物種	投与(処置)経路 投与期間	投与用量 (mg/kg/日)	成績	資料 番号	実施 施設
レフルノミド					
マウス	経口, 14日間	15, 30, 60, 100	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 生殖臓器の萎縮, 骨髄での造血細胞の亢進あるいは減少 無毒性量: 15 mg/kg/日	参ニ-4	米国 ^{a)}
	経口, 14日間	30	異常所見なし	参ニ-16	ドイツ ^{b)}
	経口, 3ヵ月間	3, 10, 30	ヘモグロビン量及び血小板数の減少, 雄副生殖臓器重量の減少, 肝細胞肥大 無毒性量: 3 mg/kg/日	参ニ-5	米国 ^{a)}
ラット	経口, 4週間	1, 3, 10	ヘモグロビン量の減少, 網状赤血球数の増加, 胸腺重量の減少 無毒性量: 3 mg/kg/日	ニ-10	日本 ^{c)}
	経口, 90日間	5, 10, 20	赤血球数, ヘモグロビン量の減少, 消化管の出血 無毒性量: 5 mg/kg/日未滿	ニ-11	ドイツ ^{d)}
	経口, 3ヵ月間	2, 4, 8	<i>Bacillus piliformis</i> 感染	参ニ-6	ドイツ ^{e)}
	経口, 6ヵ月間	0.5, 1, 2, 4	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 骨髄での造血細胞減少 無毒性量: 0.5 mg/kg/日	ニ-12	ドイツ ^{f)}
イヌ	経口, 3ヵ月間	4, 8, 16	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 骨髄での赤血球生産減少, 消化管の潰瘍 無毒性量: 4 mg/kg/日未滿	ニ-13	ドイツ ^{d)}
	経口, 6ヵ月間	0.8, 2.5, 8	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 血小板数の増加 無毒性量: 0.8 mg/kg/日	ニ-14	ドイツ ^{f)}
	経口, 1年間	0.25, 0.8, 2.5	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 網状赤血球数及び血小板数の増加 無毒性量: 0.25 mg/kg/日未滿	ニ-15	ドイツ ^{g)}
サル	経口, 14日間	20	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 網状赤血球数の増加 無毒性量: 20 mg/kg/日未滿	参ニ-17	フランス ^{h)}
	経口, 30日間	2, 6.3, 20	赤血球数及びヘモグロビン量の減少 無毒性量: 6.3 mg/kg/日	ニ-17	フランス ^{h)}
A771726					
ラット	静脈内, 30日間	3.2, 8, 20	<i>Bacillus piliformis</i> 感染	参ニ-7	ドイツ ^{b)}
	静脈内, 4週間	0.25, 1	<i>Bacillus piliformis</i> 感染	参ニ-8	ドイツ ^{b)}
	経口, 3ヵ月間	0.5, 1, 4	赤血球数及びヘモグロビン量の減少 無毒性量: 0.5 mg/kg/日	ニ-18	ドイツ ⁱ⁾
イヌ	静脈内, 1ヵ月間	0.8, 2.5, 8	下痢, 赤血球数, 血小板数及びヘモグロビン量の減少, 網状赤血球数の増加 無毒性量: 2.5 mg/kg/日	ニ-19	ドイツ ^{b)}
	経口, 3ヵ月間	0.8, 2.5, 8	赤血球数及びヘモグロビン量の減少, 消化管の潰瘍/炎症 無毒性量: 0.8 mg/kg/日	ニ-20	ドイツ ⁱ⁾

a) Syntex Discovery Research

b) Pharma Development, Corporate Toxicology, Hoechst AG

c)

d) Pharma Research, Toxicology, Hoechst AG

e) Pharma Development, Central Toxicology, Hoechst AG

f) Pharma Development, Toxicology, Hoechst AG

g) Preclinical Development, Drug Safety, Hoechst Marion Roussel AG

h) CIT

i) Development of Toxicity/Pathology, Hoechst Marion Roussel AG

3. 生殖発生毒性試験【GLP 適合】レフルノミド：ラット（添付資料ニ-21, 22, 23, 26, 27、参ニ-10）、ウサギ（添付資料ニ-24, 25、参ニ-12）【GLP 非適合】レフルノミド：ラット（参ニ-9, 13）、ウサギ（参ニ-11）

交配前の雌雄ラットにレフルノミドを経口投与したとき、受胎能及び初期発生にレフルノミドの影響は認められなかった。

ラットあるいはウサギの器官形成期にレフルノミドを経口投与したとき、胎児の心臓、頭部、頸椎及び肩甲棘などに奇形が認められた。

ラットにレフルノミドを妊娠末期から授乳期間まで投与したとき、母動物の出産及び出産直後の新生児に影響は認められなかったが、授乳期間中に出生児の生存率に顕著な低下が認められた。

表ニ-3 生殖発生毒性試験成績一覧表（1）

動物種	投与(処置)経路 投与期間	投与用量 (mg/kg/日)	成績	資料 番号	実施 施設
ラット	経口 雄: 交配前 70 日~交尾確認日	0.4, 1.25, 4.0	精子数減少 無毒性量: (生殖能) 4.0 mg/kg/日 (一般毒性, 精子) 1.25 mg/kg/日	ニ-21	ドイツ ^{a)}
	経口 雄: 交配前 70 日~交尾確認日 雌: 交配前 14 日~離乳日	0.4, 1.25, 4.0	生存胎児数減少, 発育遅滞, 骨格異常(四肢, 腰椎), 離乳率低下 無毒性量: (F0 雄)一般毒性:1.25 mg/kg/日、生殖能:4.0 mg/kg/日 (F0 雌)一般毒性:4.0 mg/kg/日、生殖能:1.25 mg/kg/日 (F1 児) 0.4 mg/kg/日	ニ-22	ドイツ ^{b)}
	経口 妊娠 7~16 日 (交尾確認日を妊娠 1 日目)	5, 10, 15, 20, 30	発育遅滞, 外表異常(眼), 骨格異常(頸椎, 胸椎) 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性: 15 mg/kg/日 (F1 児) 5 mg/kg/日	参ニ-9	ドイツ ^{c)}
	経口 妊娠 7~19 日 (交尾確認日を妊娠 1 日目)	1, 15	発育遅滞, 内臓異常(眼, 脳), 骨格異常(頭骨, 頸椎, 胸椎) 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性: 1 mg/kg/日 (F1 児) 1 mg/kg/日	参ニ-10	ドイツ ^{d)}
	経口 妊娠 7~17 日 (交尾確認日を妊娠 0 日目)	1, 3, 10	発育遅滞, 外表異常(眼, 脳), 内臓異常(眼, 脳), 骨格異常(頭骨, 頸椎, 胸椎) 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性: 3 mg/kg/日 (F1 児) 3 mg/kg/日	ニ-23	日本 ^{e)}
ウサギ	経口 妊娠 6~18 日 (交尾確認日を妊娠 0 日目)	5, 10, 15, 16, 20, 25, 30	外表異常(口, 鼻, 前肢), 骨格異常(鼻, 頸, 胸椎) 無毒性量: (母動物)一般毒性:5 mg/kg/日未 満、生殖毒性:10mg/kg/日 (F1 児) 20 mg/kg/日	参ニ-11	ドイツ ^{e)}
	経口 妊娠 6~18 日 (交尾確認日を妊娠 0 日目)	1, 10	骨格異常(胸椎) 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性:1 mg/kg/日 (F1 児) 1 mg/kg/日	参ニ-12	ドイツ ^{d)}
	経口 妊娠 6~18 日 (交尾確認日を妊娠 0 日目)	1, 3.2, 10	骨格異常(尾椎椎体, 胸骨) 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性: 3.2 mg/kg/日 (F1 児) 1 mg/kg/日	ニ-24, 25	ドイツ ^{f,g)}

- a) Development of Toxicity/Pathology, Hoechst Marion Roussel AG
b) Pharma Development, Central Toxicology, Hoechst AG
c) Pharma Research, Toxicology and Pathology, Hoechst AG
d) Pharma Development, Corporate Toxicology, Hoechst AG
e)
f) Drug Safety Evaluation, Aventis Pharma
g) Preclinical Development, Drug Safety, Hoechst Marion Roussel AG

表二-3 生殖発生毒性試験成績一覧表 (2)

動物種	投与(処置)経路 投与期間	投与用量 (mg/kg/日)	成績	資料 番号	実施 施設
ラット	経口 妊娠7日目~分娩21日目 (交 尾確認日を妊娠1日目)	0.4, 1.25, 4	歩行異常, 発育遅滞, 離乳率低下, 出生児減 少 無毒性量: (母動物)一般毒性: 0.4 mg/kg/日、 生殖毒性: 1.25 mg/kg/日未満 (F1 児) 0.4 mg/kg/日未満	ニ-26	ドイツ ^{d)}
	経口 分娩日~分娩13日目 (交尾確 認日を妊娠0日目)	0.5, 1.5, 4.5	出生児死亡の増加 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性: 4.5 mg/kg/日 (F1 児) 0.5mg/kg/日	参ニ-13	日本 ^{e)}
	経口 分娩日~分娩21日目 (交尾確 認日を妊娠0日目)	0.1, 0.3, 1	離乳率低下 無毒性量: (母動物)一般毒性, 生殖毒性: 1 mg/kg/日 (F1 児) 0.3 mg/kg/日	ニ-27	日本 ^{e)}

d) Pharma Development, Corporate Toxicology, Hoechst AG

e)

4. 遺伝毒性試験【GLP 適合】レフルノミド: 復帰突然変異試験 (添付資料ニ-28)、HGPRT 試験 (添付資料ニ-29)、不定期 DNA 合成試験 (添付資料ニ-30)、*in vivo* 染色体異常試験 (添付資料ニ-31)、小核試験 (添付資料ニ-32)、A771726: 復帰突然変異試験 (添付資料ニ-33)、HGPRT 試験 (添付資料ニ-34)、小核試験 (添付資料ニ-35)、4-TFMA: 復帰突然変異試験 (添付資料ニ-36, 37)、HGPRT 試験 (添付資料ニ-38)、*in vitro* 染色体異常試験 (添付資料ニ-39)、*in vivo* 染色体異常試験 (添付資料ニ-40, 41)、小核試験 (添付資料ニ-42, 43、参ニ-15)、*in vitro/in vivo* 不定期 DNA 合成試験 (添付資料ニ-44)【GLP 非適合】レフルノミド: 復帰突然変異試験 (参ニ-14)

レフルノミドについて、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験、V79 細胞を用いた HGPRT 試験、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験、チャイニーズハムスターの骨髓細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験、マウスを用いた小核試験を実施した結果、いずれの試験でも陰性であった。

A771726 について、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験、V79 細胞を用いた HGPRT 試験、マウスを用いた小核試験を実施した結果、いずれの試験でも陰性であった。

血中に微量検出される中間代謝物の 4-TFMA について、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験、V79 細胞を用いた遺伝子突然変異試験、V79 細胞を用いた染色体異常試験、チャイニーズハムスターの骨髓細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験、マウスを用いた小核試験、ラットを用いた *in vitro/in vivo* 不定期 DNA 合成試験を実施した結果、*in vitro* 試験では陽性であったが、*in vivo* 試験では陰性であった。

表二-4 遺伝毒性試験成績一覧表

試験方法 動物種又は試験条件	投与(処置)経路 期間	投与用量又は 処置濃度	成績	資料 番号	実施 施設
レフルノミド					
復帰突然変異 ネズミチフス菌及び大腸菌	直接法 代謝活性化法	0.8~2500 µg/plate	陰性	ニ-28 参ニ-14	ドイツ ^{a)}
遺伝子突然変異 V79 細胞	直接法 代謝活性化法	50~220 µg/mL	陰性	ニ-29	ドイツ ^{a)}
DNA 障害 A549 細胞	直接法 代謝活性化法	0.01~100 µg/mL	陰性	ニ-30	ドイツ ^{a)}
染色体異常 チャイニーズハムスター	経口 単回	60, 300, 600 mg/kg	陰性	ニ-31	ドイツ ^{a)}
小核試験 マウス	経口 単回	150, 200 mg/kg	陰性	ニ-32	ドイツ ^{a)}
A771726					
復帰突然変異 ネズミチフス菌及び大腸菌	直接法 代謝活性化法	16~5000 µg/plate	陰性	ニ-33	ドイツ ^{c)}
遺伝子突然変異 V79 細胞	直接法 代謝活性化法	2.5~1000 µg/mL	陰性	ニ-34	ドイツ ^{d)}
小核試験 マウス	経口 単回	10, 30, 100 mg/kg	陰性	ニ-35	ドイツ ^{c)}
4-TFMA					
復帰突然変異 ネズミチフス菌及び大腸菌	直接法 代謝活性化法	4~5000 µg/plate	陽性	ニ-36 ニ-37	ドイツ ^{e)}
遺伝子突然変異 V79 細胞	直接法 代謝活性化法	10~750 µg/mL	陽性	ニ-38	ドイツ ^{e)}
染色体異常 V79 細胞	直接法 代謝活性化法	10~500 µg/mL	陽性	ニ-39	ドイツ ^{f)}
染色体異常 チャイニーズハムスター	経口 単回	75 mg/kg	陰性	ニ-40 ニ-41	ドイツ ^{g)} 英国 ^{h)}
小核試験 マウス	腹腔内 単回	80 mg/kg	陰性	参ニ-15	ドイツ ^{e)}
小核試験 マウス	腹腔内 単回	8~300 mg/kg 80 mg/kg	陰性	ニ-42 ニ-43	ドイツ ^{e)} ドイツ ^{b)}
DNA 障害 ラット	経口 単回	40, 100 mg/kg	陰性	ニ-44	アメリカ ⁱ⁾

- a) Pharma Research, Toxicology and Pathology, Hoechst AG
 b) Pharma Research, Toxicology, Hoechst AG
 c) Development of Toxicology/Pathology, Hoechst Marion Roussel AG
 d) Drug Safety Evaluation, Aventis Pharma
 e) Pharma Development, Central Toxicology, Hoechst AG
 f) Pharma Development, Corporate Toxicology, Hoechst AG
 g) Drug Development (Milton Keynes), Hoechst Marion Roussel AG
 h) Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Hoechst Marion Roussel AG
 i) Covance Laboratories

5. がん性試験【GLP 適合】レフルノミド：マウス（添付資料ニ-45）、ラット（添付資料ニ-46）

レフルノミドをマウスあるいはラットに 24 ヶ月間反復経口投与してがん原性の有無を検討した。雄マウスの高用量投与群に悪性リンパ腫の増加が認められたが、この腫瘍は、レフルノミドの長期投与による免疫抑制作用が持続したことに起因したものと考えられた。また、雌マウスの全レフルノミド投与群に細気管支/肺胞上皮の腺腫が認められたが、この腫瘍は自然発生率の範囲内であった。マウスにおいて、これら以外のレフルノミドによると考えられる腫瘍は認められなかった。また、ラットにおいても、レフルノミドによると考えられる腫瘍は認められなかった。

表二-5 がん原性試験成績一覧表

動物種	投与(処置)経路 投与期間	投与用量 (mg/kg/日)	成績	資料 番号	実施 施設
マウス	経口 24ヵ月間	1.5, 5, 15	陰性	ニ-45	ドイツ ^{a)}
ラット	経口 24ヵ月間	0.5, 1.25, 3, 6	陰性	ニ-46	ドイツ ^{a)}

a) Preclinical Development, Drug Safety, Hoechst Marion Roussel AG

6. その他の毒性試験【GLP 適合】レフルノミド及び A771726：抗原性試験（添付資料ニ-47）、皮膚感作試験（添付資料ニ-48, 49）、白内障への影響（添付資料ニ-50）

(1) 抗原性試験

レフルノミドあるいは A771726 をモルモットに感作し、能動的全身性アナフィラキシー反応(ASA 反応)及び同種受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA 反応)を実施した結果、レフルノミド及び A771726 のいずれも、ASA 反応及び PCA 反応は陰性であった。

(2) 皮膚感作試験

レフルノミドあるいは A771726 をモルモットの皮膚に感作し、アレルギー反応の有無について実施した結果、レフルノミド及び A771726 のいずれも陰性であった。

(3) 白内障に関する試験

レフルノミドを正常ラットあるいは実験的白内障ラットに反復経口投与し、白内障の発症作用あるいは増悪作用を有するかについて検討した。いずれの動物においても陰性であった。

表二-6 その他の毒性試験成績一覧表

試験項目	動物種	投与(処置)経路 投与期間	投与用量又は 処置濃度	成績	資料 番号	実施 施設
抗原性	レフルノミド、A771726					
	モルモット	経口: 3週間 皮下: 4回 (+FCA)	レフルノミド: 0.2, 2 mg/個体 A771726: 0.02, 2 mg/個体	陰性	ニ-47	日本 ^{a)}
皮膚感作	レフルノミド、A771726					
	モルモット	皮内 単回	レフルノミド: 0.2% A771726: 1.0%	陰性	ニ-48 ニ-59	ドイツ ^{b)}
白内障	ラット	経口 42日間	1.25, 3.0 mg/kg/日	発症作用及び 増悪作用なし	ニ-50	ドイツ ^{c)}

a) 安全性研究室, ヘキストジャパン(株)

b) Pharma Development, Corporate Toxicology, Hoechst AG

c) Preclinical Development, Drug Safety, Hoechst Marion Roussel AG

1. 単回投与毒性試験

(1) マウスにおける単回経口投与毒性試験（添付資料ニ-1）

マウスに 200 及び 500 mg/kg のレフルノミドを経口投与後 3 週間観察し、急性毒性について検討した。

結果を表ニ-7 に示した。

500 mg/kg 投与群の雌雄 2 例とも投与 24 時間以内に死亡した。500 mg/kg 投与群に、自発運動減少、流涙及び歩行異常が認められた。死亡動物の 1 例に腎臓の退色が認められたが、生存動物を含めその他の動物に異常所見は認められなかった。

以上の結果から、概略の致死量は 500 mg/kg と推定された。

表ニ-7 マウスにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種 系統	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数/群	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
マウス NMRI 系	経口	200 500	2	♂, ♀	500	死亡: 500 mg/kg; ♂2 例, ♀2 例 (投与後 24 時間以内) 一般状態: 500 mg/kg; 自発運動減少, 流涙, 歩行異常 体重: 順調な体重推移 (200 mg/kg) 剖検所見: 生存動物; 異常所見なし 死亡動物; 腎臓の退色 (軽度)

(2) ラットにおける単回経口投与毒性試験（添付資料ニ-2）

ラットに 100 及び 250 mg/kg のレフルノミドを単回投与したとき、いずれの投与群にも死亡及び自発運動の減少がみられた（参ニ-1）。しかし、この試験では雌雄各 2 例の 2 用量であったことから、更に急性の毒性徴候を把握できる動物数及び用量を用いた試験が必要と判断した。したがって、ラットに 30、100 及び 300 mg/kg のレフルノミドを単回経口投与し、2 週間観察して、急性毒性について詳細に検討した。

結果を表ニ-8 に示した。

300 mg/kg 投与群の雄 5 例及び雌 4 例が投与後 6 日目までに死亡した。30 及び 100 mg/kg 投与群の雄、300 mg/kg 投与群の雌雄に赤色尿が認められ、100 mg/kg 投与群の雌及び 300 mg/kg 投与群の雌雄に排便量の減少が認められた。また、300 mg/kg 投与群の死亡動物には、自発運動の減少、立毛、体温低下、不規則呼吸、便の異常及び腹臥位などが認められた。30（雄のみ）、100 及び 300 mg/kg 投与群に投与後 1 から 3 日目に体重増加抑制が認められた。300 mg/kg 投与群の死亡動物に胃潰瘍、小腸及び回腸の暗赤色化などの所見が認められ、また、胸腺及び脾臓が軽度に萎縮していた。生存動物の剖検では、異常所見は認められなかった。

以上の結果から、概略の致死量は、雌雄ともに 300 mg/kg と推定された。

表ニ-8 ラットにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種 系統 週齢	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数/群	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
ラット Wistar系 6週齢	経口	30 100 300	5	♂, ♀	300	死亡: 300 mg/kg; ♂5例, ♀4例 (投与後 1~6 日目) 一般状態: 30 mg/kg; 赤色尿 (♂, 投与後 1 日目) 100 mg/kg; 赤色尿 (♂, 投与後 1~4 日目), 排便量減少 (♀, 投与後 1~5 日目) 300 mg/kg; 赤色尿及び排便量減少 (♂♀, 投与後 1~5 日目) 死亡動物; 自発運動減少, 立毛, 体温低下, 不規則呼吸, 便の異常, 腹臥位 体重: 30 mg/kg; 増加抑制 (♂, 1 日目) 100 mg/kg; 増加抑制 (♂♀, 1~3 日目) 300 mg/kg; 増加抑制 (♂♀, 1~3 日目) 剖検所見: 生存動物; 異常所見なし 死亡動物; 胃の出血, 赤色化及び潰瘍, 小腸及び回腸の暗赤色化, 胸腺及び脾臓の萎縮 (軽度)

(3) イヌにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-3)

イヌに 10、20 及び 40 mg/kg のレフルノミドを単回経口投与後 2 週間観察し、急性毒性について検討した。

結果を表ニ-9 に示した。

いずれの投与群にも死亡動物は認められなかった。20 及び 40 mg/kg 投与群に残餌及び便の異常、更に 40 mg/kg 投与群に嘔吐、排便量の減少及び潜血反応陽性を示す便の異常が認められた。20 及び 40 mg/kg 投与群では投与後 1 あるいは 3 日目に体重減少が認められた。その他の検査には異常は認められなかった。

以上の結果から、概略の致死量は >40 mg/kg と推定された。

表ニ-9 イヌにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種 系統 週齢	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数/群	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
ビーグル犬 6~7 カ月齢	経口	10 20 40	2	♂	>40	一般状態: 20 mg/kg; 残餌, 軟便, 泥状便 (投与後 1~6 日目) 40 mg/kg; 残餌, 軟便, 泥状便 (投与後 1~6 日目) 嘔吐, 排便量減少, 潜血陽性の泥状便あるいは水様便 体重: 20 mg/kg; 減少 (投与後 1, 3 日目) 40 mg/kg; 減少 (投与後 1, 3 日目) 体温, 心拍数, 血液検査, 生化学的検査, 剖検: 異常所見なし

(4) A771726 のマウスにおける単回経口投与毒性試験（添付資料ニ-4）

マウスに 100 及び 200 mg/kg の A771726 を経口投与後 3 週間観察し、急性毒性について検討した。結果を表ニ-10 に示した。

200 mg/kg 投与群の雌雄 2 例とも投与 6 から 8 日目に死亡した。200 mg/kg 投与群に、自発運動減少、立毛、うずくまりなどが認められた。200 mg/kg 投与群の体重は顕著に減少した。死亡動物において、暗赤色便あるいは腸の内容物の赤色化が認められたが、生存動物に異常所見は認められなかった。

以上の結果から、概略の致死量は 200 mg/kg と推定された。

表ニ-10 A771726 のマウスにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種 系統	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数/群	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
マウス NMRI 系	経口	100 200	2	♂, ♀	200	死亡: 200 mg/kg; ♂2 例, ♀2 例 (投与後 6-8 日目) 一般状態: 200 mg/kg; 自発運動減少, 立毛, うずくまり, 振せん, 腹臥, 変色便, 暗赤色便 体重: 200 mg/kg; 体重減少 剖検所見: 生存動物; 異常所見なし 死亡動物; 腸の内容物の赤色化

(5) A771726 のラットにおける単回経口投与毒性試験（添付資料ニ-5）

ラットに 100、200 及び 500 mg/kg の A771726 を経口投与後 3 週間観察し、急性毒性について検討した。

結果を表ニ-11 に示した。

200 mg/kg 投与群の雌雄が投与後 4 から 5 日目の間に死亡し、また、500 mg/kg 投与群の雌雄が投与後 2 から 4 日目の間に死亡した。200 mg/kg 投与群に自発運動減少、うずくまり及び下痢、500 mg/kg 投与群に自発運動減少が認められた。100 mg/kg 投与群に体重増加抑制（投与後 1 週目）が認められた。死亡動物において、胃及び腸粘膜の赤色化が認められた。

以上の結果から、概略の致死量は 200 mg/kg と推定された。

表ニ-11 A771726 のラットにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種 系統	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
ラット Wistar 系	経口	100 200 500	2 1 1	♂, ♀	200	死亡: 200 mg/kg; ♂♀1 例 (投与後 4-5 日目) 500 mg/kg; ♂♀1 例 (投与後 2-4 日目) 一般状態: 200 mg/kg; 自発運動減少, うずくまり, 下痢 500 mg/kg; 自発運動減少 体重: 100 mg/kg; 増加抑制 (投与後 1 週目) 剖検所見: 生存動物; 異常所見なし 死亡動物; 胃及び腸粘膜の赤色化

(6) A771726 のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験（添付資料ニ-6）

マウスに100及び160 mg/kgのA771726を腹腔内投与後3週間観察し、急性毒性について検討した。結果を表ニ-12に示した。

100 mg/kg 投与群の雄1例が投与後3日目に死亡し、160 mg/kg 投与群では雌雄2例ともに投与初日から2日目の間に死亡した。100 mg/kg 投与群に自発運動減少、振せん及び流涙など、160 mg/kg 投与群に自発運動減少、下痢、振せん及び腹臥などが認められた。100 mg/kg 投与群に体重増加抑制あるいは減少が投与後1週目に認められた。死亡動物において、肛門周囲に暗赤色便の付着が認められた。

以上の結果から、概略の致死量は100 mg/kgと推定された。

表ニ-12 A771726 のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験成績

動物種 系統	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数/群	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
マウス NMRI系	腹腔内	100 160	2	♂, ♀	100	死亡: 100 mg/kg; ♂1例 (投与後3日目) 160 mg/kg; ♂2例, ♀2例 (投与初日~2日目) 一般状態: 100 mg/kg; 自発運動減少, 振せん, 流涙, 浅速呼吸 (投与初日~3日目) 死亡動物-振せん, 腹臥, 暗赤色便 160 mg/kg; 自発運動減少, 下痢, 振せん, 腹臥, 呼吸異常 (死亡動物) 体重: 100 mg/kg; 増加抑制あるいは減少 (投与後1週目) 剖検所見: 生存動物; 異常所見なし 死亡動物; 肛門周囲に暗色便の付着

(7) A771726 のラットにおける単回腹腔内投与毒性試験（添付資料ニ-7）

ラットに63及び100mg/kgのA771726を腹腔内投与後3週間観察し、急性毒性について検討した。結果を表ニ-13に示した。

100 mg/kg 投与群の雌2例が投与後2から9日目の間に死亡した。63 mg/kg 投与群に虹彩の浮腫 (投与後2日目まで)、100 mg/kg 投与群に自発運動減少、下痢、失調歩行、立毛、振せん、虹彩の浮腫などが認められた。63 mg/kg 投与群に体重増加抑制、100 mg/kg 投与群に体重増加抑制あるいは減少が認められた。死亡動物に異常所見は認められなかったが、100 mg/kg 投与群の雄に肝葉の腫大及び一部癒着、肝臓表面に乳白色の被膜などが認められた。

以上の結果から、概略の致死量は100 mg/kgと推定された。

表ニ-13 A771726 のラットにおける単回腹腔内投与毒性試験成績

動物種 系統	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数/群	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
ラット Wistar 系	腹腔内	63 100	2	♂, ♀	100	死亡: 100 mg/kg; ♀2 例 (投与後 2-9 日目) 一般状態: 63 mg/kg; 虹彩の浮腫 (投与後 2 日目まで) 100 mg/kg; 自発運動減少, 下痢, 失調歩行, 立毛, 浅速呼吸, 振せん, 虹彩の浮腫 体重: 63 mg/kg; 増加抑制 (投与後 1 週間) 100 mg/kg; 増加抑制あるいは減少 (投与後 1 週間) 剖検所見: 生存動物; 肝葉の腫大及び一部癒着, 肝臓表面に乳白色の被膜, 肥大した肝葉に退色斑 (100 mg/kg) 死亡動物; 異常所見なし

(8) 4-TFMA のマウスにおける単回経口投与毒性試験 (添付資料ニ-8)

マウスに 400 及び 1000 mg/kg の 4-trifluoromethylaniline (4-TFMA) を経口投与後 3 週間観察し、急性毒性について検討した。

結果を表ニ-14 に示した。

400 mg/kg 投与群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌が投与初日に死亡した。400 mg/kg 投与群に腹ばい歩行、腹臥、チアノーゼ、1000 mg/kg 投与群には更に死亡前に呼吸異常が認められた。生存例では体重推移の異常は認められなかった。死亡動物に肺の変色が認められたが、生存動物の剖検では異常所見は認められなかった。

以上の結果から、概略の致死量は 400 mg/kg と推定された。

表ニ-14 4-TFMA のマウスにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種 系統	投与 経路	投与用量 (mg/kg)	例数	性	成 績	
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見
マウス ICR 系	経口	400	2	♂, ♀	400	死亡: 400 mg/kg; ♂1 例 (投与初日) 1000 mg/kg; ♀ (投与初日) 一般状態: 400 mg/kg; 腹ばい歩行, 腹臥, チアノーゼ 1000 mg/kg; 腹ばい歩行, 腹臥, チアノーゼ, 呼吸異常 (死亡前) 体重: 正常の体重推移 (生存例) 剖検所見: 生存動物; 異常所見なし 死亡動物; 肺の変色
		1000	1	♀		

【単回投与毒性試験のまとめ】

マウス、ラット及びイヌにレフルノミドを単回経口投与あるいは腹腔内投与し、急性毒性を検討した。マウスの経口投与では、自発運動減少、流涙、歩行異常などの症状が認められ、概略の致死量は 500 mg/kg と推定された。ラットの経口投与では、赤色尿、排便量の減少、自発運動減少などの症状が認められ、概略の致死量は 300 mg/kg と推定された。また、マウス及びラットの腹腔内投与では、経口投与と同様な症状及び同程度の概略の致死量であった（参ニ-2, 3）。イヌの経口投与では、体重減少、軟便、泥状便などが認められた。概略の致死量は 40 mg/kg 以上と推定された。

マウス及びラットに A771726 を経口あるいは腹腔内に単回投与し、急性毒性について検討した。マウス及びラットに経口投与すると自発運動が減少し、振せん、立毛、うずくまりなどの他に暗赤色便や胃腸粘膜の赤色化が認められ、概略の致死量はいずれも 200 mg/kg と推定された。マウス及びラットに腹腔内投与すると、自発運動減少、振せん、暗赤色便及び下痢などの症状が認められ、更にラットでは虹彩の浮腫も見られた。概略の致死量はいずれも 100 mg/kg と推定された。

A771726 を単回投与したときの概略の致死量は、レフルノミドに比べてやや低値を示したが、A771726 及びレフルノミドに見られた毒性症状及び死亡時期に大きな差異は認められなかったことから、A771726 及びレフルノミドによる急性毒性作用には差がないものと考えられた。

また、レフルノミドあるいは A771726 を単回投与した場合に、投与後数日を経過してからの死亡例が見られたが、この死亡時期と反復投与毒性試験で見られた骨髄毒性を考え合せると、投与後数日を経過してからの死亡は骨髄毒性に起因しているものと推察された。

マウスに 4-TFMA を単回経口投与し、急性毒性について検討した。異常歩行、腹臥あるいはチアノーゼなどの症状が認められた。マウスにおける経口投与の概略の致死量は、400 mg/kg と推定された。

2. 反復投与毒性試験

(1) マウスにおける 14 日間反復経口投与毒性試験 (参ニ-16)

マウスに 15、30、60 及び 100 mg/kg/日のレフルノミドを 14 日間反復経口投与した予備試験において、60 及び 100 mg/kg/日投与群に体重減少及び死亡例が見られた (参ニ-4)。従って、死亡の見られなかった 30 mg/kg/日を 14 日間反復経口投与して、血中 4-TFMA 濃度を測定した。

結果を表ニ-15 に示した。

一般状態、体重及び剖検において、レフルノミド投与による影響は認められなかった。血中 4-TFMA 濃度は、最終投与後 2 時間目で約 200~350 ng/mL、24 時間目で約 70~172 ng/mL であった。

表ニ-15 マウスにおける 14 日間反復経口投与毒性試験成績

動物種・系統・週齢・性・体重		マウス, CD-1 系, 6~8 週齢, ♂ 29~32g, ♀ 21~25g	
投与経路 (投与方法)		経口投与 (レフルノミドを 2% デンプン液に 6 mg/mL になるように懸濁し, 胃ゾンデを用いて 1 日 1 回投与した。投与容量は 5.0 mL/kg とした。)	
投与用量 (mg/kg/日)		30	
動物数		♂10	♀10
死亡数		0	0
一般状態		-	-
体重 (g)	1 日目	30.1±1.0	22.7±1.5
	8 日目	31.5±1.3	22.3±1.1
	14 日目	32.0±1.2	22.6±1.3
剖検		-	-
血中 4-TFMA 濃度 (ng/mL) (最小~最大)	2 時間目	241.2±36.1 (204~284)	297.3±67.1 (199~345)
	24 時間目	83.9±17.7 (65~108)	127.2±42.9 (70~172)

平均値±標準偏差

-: 特記すべき変化なし

(2) マウスにおける 3 ヶ月間反復経口投与毒性試験 (参ニ-5)

マウスに 15、30、60 及び 100 mg/kg/日のレフルノミドを 14 日間反復経口投与した予備試験において、60 及び 100 mg/kg/日投与群に体重減少及び死亡例が見られた (参ニ-4)。この成績から、14 日間反復経口投与では死亡例が見られなかった 30 mg/kg/日を高用量として設定し、マウスに 3、10 及び 30 mg/kg/日のレフルノミドを 3 ヶ月間反復経口投与し、反復投与による毒性について検討した。更に、投与 1、36 及び 90 日目の 24 時間後の血中 A771726 濃度を測定した。

結果を表ニ-16 に示した。

3 mg/kg/日投与群の雄 1 例及び 10 mg/kg/日投与群の雌 1 例に誤投与による死亡が認められたのみで、それ以外は、いずれの投与群にも一般状態に異常は認められなかった。10 及び 30 mg/kg/日投与群の雄に体重増加抑制が認められた。摂餌量では 30 mg/kg/日投与群の雌雄とも、対照群に比べて増加が認められた。血液学的検査において、30 mg/kg/日投与群の雄にヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低値、雌雄に血小板数の低値が認められた。血液生化学的検査及び尿検査には異常は認められなかった。肝臓重量の高値が 30 mg/kg/日投与群の雌に、脾臓重量の高値が 10 mg/kg/日投与群の雄及び 30 mg/kg/日投与群の雌雄に、副生殖器重量の低値が 30 mg/kg/日投与群の雄に、胸腺重量の低値が 30 mg/kg/日投与群の雌に認められた。病理組織学的検査では、30 mg/kg/日投与群に胸腺のリンパ組織の萎縮を示す例数の増加、小葉中心性の肝細胞肥大及び脾臓の髄外造血の亢進が認められた。投与 1、36 及び 90 日目の投与 24 時間後の血中 A771726 濃度は、投与用量の増加に伴って増加した。

以上の結果から、無毒性量は 3 mg/kg/日と推定された。

表ニ-16 マウスにおける3ヵ月間反復経口投与毒性試験成績

動物種・系統・週齢・性・体重		マウス, CD-1 系, 5~7 週齢, ♂25~35 g, ♀21~30 g								
投与経路 (投与方法)		経口投与 (レフルノミドを 0.4%ポリソルベート 80, 0.9%ベンジルアルコール, 1.0%カルボキシルメチルセルロースに 0.6, 2, 6 mg/mL になるように懸濁し, 胃ゾンデを用いて 1 日 1 回投与した。対照群には媒体を同様に投与した。投与容量は 5.0 mL/kg とした。)								
投与用量 (mg/kg/日)		0		3		10		30		
性		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
動物数	毒性試験用	10	10	10	10	10	10	10	10	
	血中濃度測定用	5	5	5	5	5	5	5	5	
死亡数		0	0	1 ^{a)}	0	0	1 ^{a)}	0	0	
一般状態		-		-		-		-		
体重増加量 (g)	1 週目	1.2±0.6	-1.0±0.9	1.0±1.0	-0.8±0.8	0.4±1.1*	-0.4±1.2	0.1±0.5**	-1.1±0.6	
	6 週目	2.7±1.1	2.0±1.0	2.0±1.4	2.1±1.3	1.4±1.1**	2.1±1.2	0.4±1.4**	1.0±0.6*	
	14 週目	3.6±1.8	2.4±1.1	3.3±1.7	2.0±1.5	2.7±1.7	3.2±1.3	1.2±1.6*	2.0±1.5	
摂餌量 (g/日)	1 週目	5.6±0.5	4.9±0.5	5.7±1.0	4.6±0.6	5.3±0.4	4.6±0.4	5.9±0.6	5.1±0.5	
	6 週目	5.7±0.5	5.3±0.4	5.8±0.7	5.4±0.5	5.7±0.4	5.4±0.6	6.0±0.6	5.6±0.6	
	14 週目	5.7±0.5	5.3±0.5	5.8±0.7	5.4±0.5	5.5±0.4	5.5±0.3	6.1±0.2*	6.1±0.6*	
血液学的検査	赤血球数 (10 ¹² /L)	8.6±0.6	8.9±0.7	8.8±0.6	9.1±0.4	8.9±0.6	9.2±0.5	7.7±1.0	8.6±0.6	
	ヘマトクリン量 (g/dL)	14.0±0.6	14.6±0.8	14.2±0.5	14.7±0.5	13.8±0.8	14.4±0.6	11.3±1.8**	12.7±0.6	
	ヘマトクリット値 (%)	40.6±2.7	41.9±2.8	41.2±2.3	41.5±1.9	40.8±2.9	43.2±2.0	35.0±5.4**	39.4±2.4	
	白血球数 (10 ⁹ /L)	2.5±1.0	3.0±1.3	3.0±0.6	3.2±0.6	4.3±2.3	3.0±1.2	1.9±0.7	3.0±1.5	
	血小板数 (10 ⁴ /μL)	126±34	132±16	132±9	126±14	122±14	129±13	81±22*	88±14**	
血液生化学的検査		-		-		-		-		
尿検査 (比重, 潜血)		-		-		-		-		
剖検		-		-		-		脾臓肥大(♂1♀1) 胸腺萎縮(♀1)		
臓器重量	絶対重量 (g)	副生殖器官	0.37±0.05	NT	0.37±0.06	NT	0.34±0.06	NT	0.28±0.05**	NT
		心臓	0.15±0.01	0.13±0.02	0.15±0.01	0.13±0.01	0.15±0.01	0.13±0.01	0.16±0.01	0.14±0.01
		腎臓	0.48±0.04	0.33±0.02	0.48±0.04	0.34±0.03	0.50±0.08	0.33±0.04	0.45±0.06	0.34±0.02
		肝臓	1.26±0.16	1.07±0.11	1.24±0.09	1.03±0.09	1.28±0.11	1.08±0.08	1.41±0.15	1.20±0.13*
		脾臓	0.05±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01**	0.06±0.01	0.11±0.04**	0.10±0.02**
	胸腺	0.02±0.01	0.03±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00	0.02±0.01**	
	相対重量 (g/100g BW)	副生殖器官	1.05±0.10	NT	1.04±0.17	NT	0.99±0.18	NT	0.87±0.15**	NT
		心臓	0.43±0.05	0.46±0.04	0.43±0.03	0.46±0.03	0.45±0.04	0.47±0.03	0.49±0.03**	0.51±0.05*
		腎臓	1.38±0.10	1.18±0.11	1.35±0.12	1.24±0.09	1.46±0.17	1.18±0.07	1.40±0.11	1.27±0.10
		肝臓	3.61±0.20	3.74±0.28	3.47±0.23	3.81±0.34	3.74±0.25	3.85±0.08	4.36±0.34**	4.45±0.47**
脾臓		0.14±0.02	0.21±0.04	0.16±0.02	0.20±0.04	0.19±0.03*	0.23±0.03	0.33±0.15**	0.37±0.07**	
胸腺	0.05±0.01	0.10±0.02	0.06±0.01	0.08±0.02	0.06±0.01	0.09±0.03	0.04±0.01	0.06±0.02**		
病理組織学的検査		胸腺: リンパ組織の萎縮(♂1♀2) 脾臓: 髄外造血の亢進(♀1)		胸腺: リンパ組織の萎縮(♀1)		胸腺: リンパ組織の萎縮(♂3♀1)		胸腺: リンパ組織の萎縮(♂8♀9) 肝臓: 小葉中心性の肝細胞肥大(♂9♀4) 脾臓: 髄外造血の亢進(♂7♀7)		
血中濃度 (μg/mL)	1 日目の 24 時間後	-		0.8±0.2	1.9±1.1	1.5±0.3	2.4±0.9	57.3±6.2	63.3±26.1	
	36 日目の 24 時間後	-		7.7±1.0	6.1±1.6	30.9±6.4	33.3±8.2	87.2±29.6	83.8±29.1	
	90 日目の 24 時間後	-		9.4±4.8	5.6±2.0	36.6±8.6	34.7±3.7	75.6±42.6	84.1±15.6	
無毒性量		3 mg/kg/日								

平均値±標準偏差, * p<0.05, ** p<0.01 (Mann-Whitney 検定)

-: 特記すべき変化なし

NT 測定項目なし

a) 誤投与