

テモダールカプセル 20 mg
テモダールカプセル 100 mg

第2部 CTDの概要

(4) 非臨床に関する概括評価

シェリング・プラウ株式会社

目次

略語一覧表	1
2.4 非臨床に関する概括評価	3
2.4.1 非臨床試験計画概略	3
2.4.1.1 薬理試験	3
2.4.1.2 薬物動態試験	3
2.4.1.3 毒性試験	4
2.4.2 薬理試験	5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験	5
2.4.2.1.1 抗腫瘍作用	5
2.4.2.1.1.1 <i>In vitro</i> 細胞増殖抑制作用	5
2.4.2.1.1.2 <i>In vivo</i> 抗腫瘍作用	5
2.4.2.1.2 作用機序	6
2.4.2.2 副次的薬理試験	7
2.4.2.3 安全性薬理試験	7
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験	8
2.4.3 薬物動態試験	9
2.4.3.1 吸収	10
2.4.3.2 分布	13
2.4.3.3 代謝	14
2.4.3.4 排泄	15
2.4.3.5 薬物動態学的相互作用	16
2.4.4 毒性試験	17
2.4.4.1 単回投与毒性	17
2.4.4.2 反復投与毒性	17
2.4.4.3 遺伝毒性	19
2.4.4.4 がん原性	19
2.4.4.5 生殖発生毒性	20
2.4.4.6 皮膚感作性	21
2.4.4.7 不純物の毒性	21
2.4.5 総括及び結論	22
2.4.6 参考文献一覧	24

略語一覧表 (1 of 2)

略語	名称
ACNU	ニムスチン (nimustine)
AIC	5-amino-1 <i>H</i> -imidazole-4-carboxamide
AUC	濃度-時間曲線下面積 (area under concentration-time curve)
AUC _{0-t}	最終測定可能時点までの AUC
AUC _{0-∞}	無限大時間までの AUC
BA	絶対バイオアベオラビリティ (absolute bioavailability, F)
BCNU	カルムスチン (carmustine)
CL	全身クリアランス (total body clearance)
CL/F	見かけの全身クリアランス (apparent total body clearance)
C _{max}	最高濃度 (maximal drug concentration)
CRC	Cancer Research Campaign
不純物 A*	
DMF	ジメチルホルムアミド (dimethylformamide)
DNA	デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid)
DTIC	ダカルバジン (dacarbazine)
HPLC	高速液体クロマトグラフ法 (high performance liquid chromatography)
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
LC-MS/MS	高速液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
MCNU	ラニムスチン (ranimustine)
MGMT	O ⁶ -メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase)
MMR	ミスマッチ修復 (mismatch repair)
MTIC	5-[(1 <i>Z</i>)-3-methyltriaz-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -imidazole-4-carboxamide
PET	positron emission tomography
PK	ファーマコキネティクス (pharmacokinetics)
SD	Sprague-Dawley
t _{1/2}	末端排泄相の消失半減期 (elimination half-life)
TK	トキシコキネティクス (toxicokinetics)
TMA	3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxylic acid
t _{max}	最高濃度到達時間 (time of maximal concentration)
V _d	分布容積 (distribution volume)

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

略語一覧表 (2 of 2)

略 語	名 称
Vd/F	見かけの分布容積 (apparent distribution volume)
WBA	全身オートラジオグラフィ (whole body autoradiography)

2.4 非臨床に関する概括評価

テモゾロミド (JAN) は、英国 Cancer Research Campaign (CRC) により 1984 年に合成されたイミダゾテトラジン誘導体であり、アルキル化剤に分類される抗悪性腫瘍剤である。テモゾロミドは経口投与された後、迅速かつ完全に吸収され、生理的 pH 条件下で非酵素的に 5-[(1Z)-3-methyltriazol-1-en-1-yl]-1H-imidazole-4-carboxamide (MTIC) に分解される。MTIC はさらにメチルジアズニウムイオンに分解された後、DNA をアルキル化し、抗腫瘍作用を発揮する。

テモゾロミドの第 I 相試験及び前期第 II 相臨床試験は 19 年 から 19 年にかけて CRC によって実施された。その後、19 年に米国シエリング・プラウ社がテモゾロミドの開発に関する権利を CRC から譲り受け、欧米にて 19 年 月より臨床試験を開始した。米国では 1999 年 8 月に再発の退形成性星細胞腫 (anaplastic astrocytoma) に対して単独療法が、2005 年 3 月には初発の膠芽腫患者に対して放射線療法との併用療法が優先審査により FDA から承認された。欧州では European Medicines Evaluation Agency (EMA) より 1999 年 1 月に再発の膠芽腫 (glioblastoma)、同年 8 月に再発の退形成性星細胞腫の適応でそれぞれ承認された。さらに、2005 年 6 月には初発の膠芽腫に対して放射線療法との併用療法が承認された。

本邦では、20 年 月から第 I 相薬物動態試験 (C016*), 20 年 月から初回再発した退形成性星細胞腫を対象とした第 II 相臨床試験 (C029*) が実施された。また、20 年 月から初発の膠芽腫を対象とした第 II 相臨床試験 (C036*) が実施された。

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 薬理試験

本邦で臨床試験が開始されるまでに、テモゾロミドの効力を裏付ける試験として、*in vitro* における腫瘍細胞増殖抑制作用、各種腫瘍細胞移植マウスにおける抗腫瘍作用及び作用機序に関する成績が公表論文として報告されていた。また、安全性薬理試験としてラット及びイヌにおける 1 クール経口投与毒性試験 (GLP 試験)、胃腸管系に及ぼす影響に関する試験 (非 GLP 試験) を実施し、さらに公表論文の結果に基づいて安全性薬理試験を評価した。

本邦での臨床試験開始後、ヒト脳腫瘍由来細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* における抗腫瘍作用、並びに作用機序の解明の一端として、ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性腫瘍細胞に対する作用を検討した。

2.4.1.2 薬物動態試験

テモゾロミドの非臨床薬物動態試験は 19 年 から 19 年にかけて実施され、本邦における臨床試験開始時 (20 年 月) には以下のすべての試験が完了していた。吸収に関する試験としては、ラット及びイヌに ¹⁴C- テモゾロミド又は非標識テモゾロミドを単回静脈内及び経口投与した際の

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

血漿中薬物濃度について検討し、本薬の吸収の程度及び薬物動態について評価した。分布に関する試験としては、ラットに ^{14}C - テモゾロミドを単回経口投与した際の組織内分布、ラットにおける脳内移行性、ラット及びイヌ脳脊髄液中への移行性、血球移行性及び血漿蛋白結合について検討し、本薬の各種臓器及び組織への分布特性、経時的变化等について評価した。代謝に関する試験としては、ラット及びイヌに ^{14}C - テモゾロミドを単回静脈内及び経口投与した際の血漿、尿及び糞中代謝物について検討し、本薬の主要な代謝または分解経路及びその特性について評価した。また、排泄に関する試験としては、ラット及びイヌに ^{14}C - テモゾロミドを投与した際の尿・糞中排泄ならびにラットにおける胆汁中排泄について検討し、本薬の主排泄経路並びに排泄の程度について評価した。

2.4.1.3 毒性試験

本邦における臨床試験の開始時までには、マウス、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、ラット及びイヌを用いた 1, 3 及び 6 クール投与（臨床試験と同様に 1 日 1 回 5 日間投与、23 日間休薬の計 28 日間を 1 クール）毒性試験及び TK 試験、*in vitro* 遺伝毒性試験（復帰突然変異試験及び染色体異常試験）、胚・胎児発生に関する試験（ラット本試験及びウサギ予備試験）、モルモット皮膚感作性試験を実施した。これらの試験結果から、本薬の毒性プロファイルは他のアルキル化剤と類似していると考えられた。本薬でも他のアルキル化剤と同様に精巣毒性、遺伝毒性、胚・胎児毒性及び催奇形性が認められたことから、臨床試験開始にあたり、被験者の選択基準として「治験期間中の避妊が可能な患者（性別は問わない）」、また、除外基準に「妊婦及び授乳婦の患者」及び「妊娠の可能性のある女性で避妊していない患者」を設けた。

その後、本薬の *in vivo* 遺伝毒性試験（マウス小核試験）、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験（ウサギ本試験）、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を実施した。また、本薬の原体あるいは製剤に含まれる不純物の毒性を検討するため、ラット 1 クール投与毒性試験及び *in vitro* 遺伝毒性試験（復帰突然変異試験及び染色体異常試験）を実施した。

上記の各種毒性試験については、「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドライン」（平成元年 9 月 11 日薬審 1 第 24 号）、「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」（平成 14 年 12 月 16 日医薬審発第 1216001 号）、「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」（平成 15 年 6 月 24 日医薬審発第 0624001 号）に準拠している。また、予備試験以外の毒性試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（昭和 57 年 3 月 31 日薬発第 313 号及び平成 9 年 3 月 26 日厚生省令第 21 号）に準拠している。

他のアルキル化剤と同様に本薬は遺伝毒性物質であり、ラットの反復投与試験で腫瘍発生が認められたことから、本薬ががん原性を有することは明らかであること、進行性のがんの治療を目的とした抗悪性腫瘍剤であることから、「医薬品のがん原性試験に関するガイドライン」（平成 11 年 11 月 1 日薬審第 1607 号）に従い、がん原性試験は実施しなかった。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

テモゾロミドの脳腫瘍に対する抗腫瘍作用を裏付ける試験として、*in vitro*における細胞増殖抑制作用及び各種腫瘍細胞移植マウスにおける抗腫瘍作用を検討した成績を示した。また、現在までに明らかとなっている作用機序について記載した。

2.4.2.1.1 抗腫瘍作用

2.4.2.1.1.1 *In vitro* 細胞増殖抑制作用

テモゾロミドはヒト膠芽腫由来 U87 MG 細胞に対して、添加 2 日後より細胞増殖抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は 6.5 μ g/mL であった (2.6.2.2.1.1.1; 5 頁参照)。また、テモゾロミドはヒト脳腫瘍由来細胞を含む各種腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は 1.9 ~ 202 μ g/mL であった (2.6.2.2.1.1.2; 7 頁参照)。一方、ニトロソウレア系抗腫瘍薬であるニムスチン (ACNU) 及びカルムスチン (BCNU、本邦では未承認) はテモゾロミドよりも低濃度で細胞増殖抑制作用を示した。また、テモゾロミド及び BCNU に対する腫瘍細胞の感受性は、DNA 修復酵素の一つであり、テモゾロミドに対する耐性発現に関与する O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) 活性と逆相関傾向を示した。さらに、放射線の細胞増殖抑制作用に及ぼすテモゾロミドの影響を *in vitro* にて検討した結果、テモゾロミドはヒト脳腫瘍由来細胞の放射線感受性を相加的又はそれ以上に増強することが示された (2.6.2.2.1.1.3; 9 頁参照)。

テモゾロミドは本邦で神経膠腫に適応のあるニトロソウレア系抗腫瘍薬である ACNU 及びラニムスチン (MCNU) による治療後の再発例又は無効例に用いられることが想定されており、これらの症例ではニトロソウレア系抗腫瘍薬に対して耐性化している可能性があることから、ニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性腫瘍細胞に対してテモゾロミドが細胞増殖抑制作用を示すか否かを *in vitro* で検討した (2.6.2.2.1.1.4; 10 頁参照)。その結果、ヒト白血病由来 CCRF-CEM 細胞より樹立された BCNU 耐性細胞は、ACNU に対しても耐性を示したが、テモゾロミドに対しては逆に親株と比べて高い感受性を示した。このことから、ACNU 等のニトロソウレア系抗腫瘍薬耐性細胞に対してテモゾロミドが細胞増殖抑制作用を示す可能性のあることが示された。

2.4.2.1.1.2 *In vivo* 抗腫瘍作用

テモゾロミドは退形成性星細胞腫、膠芽腫等を含むヒト脳腫瘍由来細胞を頭蓋内又は皮下に移植したマウスにおいて臨床推奨用量である 150 ~ 200 mg/m²/日よりも低用量から高用量までの広範囲 (14.7 ~ 約 1210 mg/m²/日) で抗腫瘍作用を示した (2.6.2.2.1.2; 13 頁参照)。*In vivo* においても、腫瘍細胞の MGMT 活性とテモゾロミドに対する感受性に逆相関傾向が認められていることから、腫瘍細胞の MGMT 活性の程度がテモゾロミドの有効用量に影響を及ぼす一因であると考えられた。なお、投与経路は異なるが、BCNU はこれら腫瘍細胞移植マウスにおいて、テモゾロミドよ

り低用量で抗腫瘍作用を示した。テモゾロミドはまた、同系腫瘍細胞頭蓋内移植マウスにおいても約 300 mg/m²/日の反復投与により抗腫瘍作用を示した。

2.4.2.1.2 作用機序

テモゾロミドは DNA にメチル基を付加する一価アルキル化薬であり、一方、ACNU, MCNU 等のニトロソウレア系抗腫瘍薬は 2 個の官能基を有するアルキル基を生成し、DNA をアルキル化する二価アルキル化薬である。前者が DNA にメチル基のみを付加することにより抗腫瘍作用を示すのに対し、後者は DNA の鎖間にクロスリンクを形成することにより (図 2.6.2-8 ; 20 頁参照), DNA の複製及び転写の阻害, 並びに二本鎖切断を誘導することで抗腫瘍作用を示すことが報告されている¹⁾。このように、テモゾロミドとニトロソウレア系抗腫瘍薬の抗腫瘍作用の発現に関わるアルキル化様式が異なることから、両者の作用機序は異なると考えられた (2.6.2.6.1.2.3 ; 46 頁参照)。

テモゾロミドの *in vitro* 細胞培養系における安定性を検討した結果、テモゾロミドは約 50 分の半減期で MTIC に分解され、さらに約 5 分の半減期でメチル化を行うメチルジアゾニウムイオンに分解された (2.6.2.2.2.1 ; 21 頁参照)。また、細胞増殖抑制作用におけるテモゾロミドの処理時間依存性を検討した結果、処理時間が 1 時間の時点で細胞増殖抑制作用はプラトーとなったことから (2.6.2.2.2.2 ; 24 頁参照)、比較的短時間の暴露で DNA のメチル化が終了し、抗腫瘍作用を誘導し得ることが明らかとなった。テモゾロミドの MTIC への分解が生理的 pH 条件下で非酵素的に起こるのに対して、ダカルバジン (DTIC) は代謝酵素により MTIC に代謝されるが、テモゾロミドと DTIC は MTIC を経て DNA をメチル化することから、両薬の作用機序は等しいと考えられる。

O⁶-アルキル化グアニンを特異的に修復する MGMT を欠損した細胞に MGMT を遺伝子導入することにより、テモゾロミドに対する感受性が低下することから (2.6.2.2.2.4.1 ; 27 頁参照)、テモゾロミドの抗腫瘍作用の発現に O⁶-グアニンのメチル化が関与すると考えられる。テモゾロミドにより生じた O⁶-メチルグアニンは DNA の複製の際にシトシン以外にチミンとも対合できるため、新生 DNA 鎖には誤ってチミンが取り込まれ、ミスマッチ塩基対が誘導された結果、ミスマッチ修復 (MMR) 系による認識及び修復過程が誘導される。しかし、MMR は新生 DNA 鎖上のチミンを除去し、鋳型 DNA 鎖上の O⁶-メチルグアニンを修復できないため、無効な修復が繰り返され、修復が完結せず、次の DNA の複製時に二本鎖切断が誘導された結果、細胞増殖が抑制されると考えられる。テモゾロミドに耐性を示す MMR 変異細胞に MMR 遺伝子を発現させることによりテモゾロミドに対する感受性が増加するという成績から (2.6.2.2.2.5 ; 30 頁参照)、テモゾロミドの抗腫瘍作用に MMR による修復過程が関与していることが証明された。また、テモゾロミド処理により細胞周期の停止並びにアポトーシスが誘導されるという報告がある (2.6.2.2.2.6 ; 31 頁参照)。

テモゾロミドの抗腫瘍作用発現には O⁶-メチルグアニンが関与し、*in vitro* 及び *in vivo* において MGMT 活性とテモゾロミドの抗腫瘍作用には逆相関傾向が認められていることから、MGMT がテモゾロミドに対する耐性形成に関与していると考えられる。さらに、テモゾロミドの抗腫瘍作用の発現に関与する MMR の変異により、腫瘍細胞はテモゾロミドに対して耐性となることが明らかとなった。

以上のことから、テモゾロミドは短時間で DNA の O^6 -グアニンをメチル化し、その後 MMR による無効な修復過程を介して細胞周期の停止及びアポトーシスを誘導した結果、抗腫瘍作用を発現すると考えられる。また、臨床使用において、MGMT 活性が高い、又は MMR 活性の低下した腫瘍細胞を有する患者では、テモゾロミドによる治療に対して感受性が低い可能性があると考えられる。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

テモゾロミドの安全性薬理試験成績として、GLP 試験であるラット及びイヌにおける 1 クール経口投与毒性試験、非 GLP 試験である胃腸管系に及ぼす影響を検討した試験及び公表論文より、生体機能に関連した試験項目である安全性薬理試験のコアバッテリー試験項目（中枢神経系、心血管系及び呼吸系）、腎 / 泌尿器系、胃腸管系、造血器系及び免疫系に関して、テモゾロミドの影響を評価することが可能であった成績を要約して記載した（2.6.2.4 ; 37 頁参照）。

一般症状に対しては、テモゾロミドをラット及びイヌに反復投与することにより 50 mg/m^2 以上で体重増加の抑制及び嘔吐、また、 200 mg/m^2 以上ではこれらの症状以外にも摂餌量の減少、下痢等の胃腸管系への影響が認められ、ラットでは 200 mg/m^2 以上で、イヌでは 125 mg/m^2 以上で死亡又は全身状態悪化のため切迫屠殺された。これらはいずれも臨床推奨用量又はそれ以下の用量で認められ、また、他のアルキル化薬の反復投与毒性試験で認められる所見であった。心血管系及び呼吸系に対しては、テモゾロミドは 1000 mg/m^2 までイヌに反復投与しても影響を及ぼさなかった。腎 / 泌尿器系に対しては、ラットにテモゾロミドの 400 mg/m^2 以上を反復投与することにより、尿量の増加並びにそれに伴う浸透圧及び電解質の減少が認められたが、クレアチニンクリアランスを含むその他の測定値に腎機能の悪化を示唆する異常はみられず、また、イヌに 1000 mg/m^2 まで反復投与しても尿量を含むいずれの測定項目にも影響は認められなかった。胃腸管系に対して、テモゾロミドは 200 mg/m^2 の単回投与によりラットで胃潰瘍形成作用を示さず、小腸炭末輸送能に影響を及ぼさなかったが、同じ用量で胃内容物排出能を 47% 抑制した。造血器系に対して、テモゾロミドはラット及びイヌにおいて、それぞれ臨床推奨用量以下である 25 及び 50 mg/m^2 以上の反復投与により末梢血白血球、血小板の減少等がみられた。さらに、*in vitro* において、テモゾロミドは、薬理作用（細胞増殖抑制作用）を示す濃度であり、また、癌患者（外国人）にテモゾロミドの 200 mg/m^2 を 1 日 1 回、5 日間反復投与した際の 5 日目の C_{max} 値 $13.0 \mu\text{g/mL}$ （2.7.2.2.4 参照）とほぼ同濃度又は低濃度でヒト骨髄細胞の増殖・分化を抑制した。免疫系に対しては、テモゾロミドは、ヒト末梢血単核細胞の NK 活性、IL-2 に対する増殖応答及び LAK 活性を抑制し、その IC_{50} 値は約 $14 \sim 78 \mu\text{g/mL}$ であった。

以上のことから、テモゾロミドの臨床推奨用量又はそれ以下の用量で、他のアルキル化薬と同じく主に胃腸管系、造血器系及び免疫系への影響が認められた。また、胃内容物排出能の抑制作用の機序については不明であるが、反復投与後のそれら組織 / 器官への影響についてはいずれも細胞増

殖が比較的早い組織 / 器官であること、及びテモゾロミドの薬効発現用量で認められることから、薬理作用に基づくものと推察された。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施しなかった。

2.4.3 薬物動態試験

テモゾロミドの薬物動態学的特性の評価に際しては、本薬の特異的な生体内変換（化学的変換）プロフィールを把握しておく必要がある。すなわち、テモゾロミドはオキソイミダゾテトラジン骨格を有する化合物であり、4位のカルボニル基の炭素原子は電気陰性度の高い窒素原子及び酸素原子と結合しているため極めて求電子性の高い状態となっている。このため、4位のカルボニル基の炭素は生体内で血漿中などの生理的 pH 条件下で塩基と反応し容易に加水分解される。この加水分解によってテトラジン環が開裂し、続いて起こる脱炭酸によりメチルトリアゼン誘導体の MTIC に変換する（図 2.4.3-1 参照）。MTIC はテモゾロミドよりもさらに不安定であり、速やかに AIC（5-amino-1*H*-imidazole-4-carboxamide）に分解し、同時に DNA のアルキル化分子であるメチルジアゾニウムイオンを産生する^{2~6}。また、AIC はプリン生合成系の中間体であり、生体内物質として核酸のサルベージ回路に取り込まれて再利用されるか排泄過程に移行する。

一方、テモゾロミドと構造類似のアルキル化剤であるダカルバジンは、同様に MTIC に変換された後にメチルジアゾニウムイオンを生成し、抗腫瘍効果を発揮するが、ダカルバジンの MTIC への変換は主として肝薬物代謝酵素による N-脱メチル化反応である（図 2.4.3-1 参照）⁷。

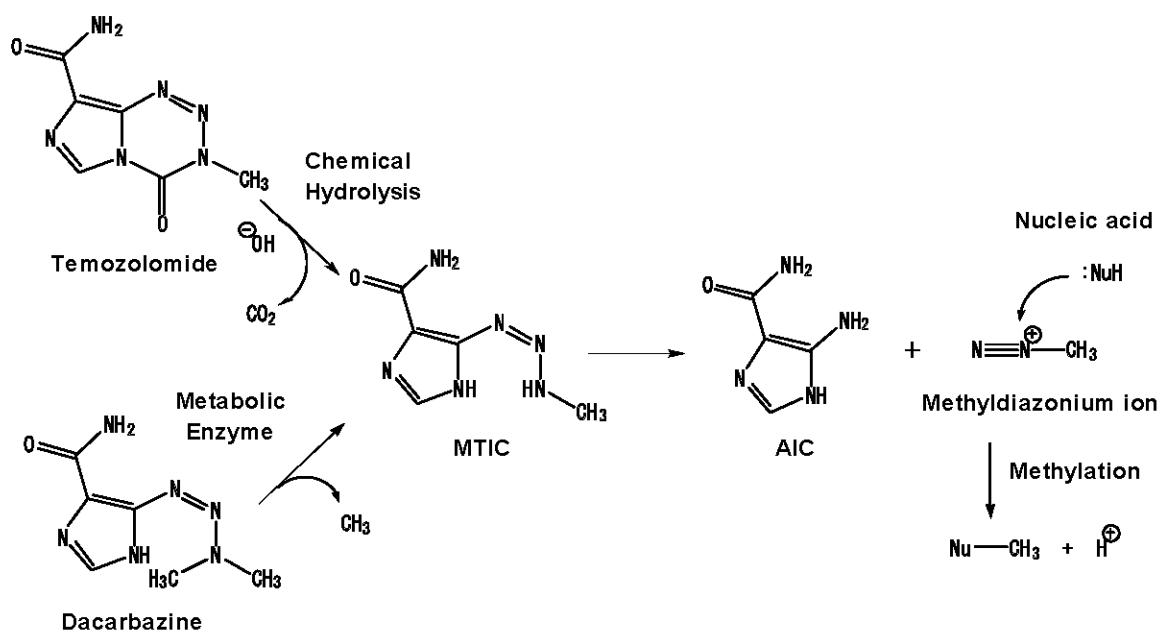


図 2.4.3-1 テモゾロミド及びダカルバジンの MTIC 及び AIC への変換

テモゾロミド及び MTIC の分解はいずれも pH 依存的であり、テモゾロミドは pH 7 以上の塩基性条件下では不安定であるが、酸性条件下 (pH<5) では比較的安定である⁴。一方、MTIC はテモゾロミドとは逆に酸性条件下 (pH<7) では極めて不安定であり、塩基性条件下 (pH>7) で安定性が

増大する⁴⁾。リン酸緩衝液 (pH 7 又は 7.4) 中でのテモゾロミドの分解半減期は 74 ~ 110 分 (1.24 ~ 1.83 時間) であり^{2, 4, 5)}, MTIC の分解半減期は 2 ~ 8 分と短い^{4, 8)}。

テモゾロミドの非臨床薬物動態試験 (試験項目の一覧は概要表 2.6.5.1 参照) において, 使用した動物種は, 安全性薬理試験及び毒性試験において選択されたラット (SD 系, 分布試験では Long-Evans 系) 及びイヌ (ビーグル犬) とした。被験薬物の主要な投与経路は臨床投与経路である経口投与とし, 一部の試験では主として吸収率及び絶対バイオアベイラビリティの評価のために静脈内投与を設定した。

血漿, 尿, 脳及び脳脊髄液中テモゾロミド濃度は高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) により, 血漿中 MTIC 濃度は高速液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) により測定した。¹⁴C 標識化合物を用いた試験では, 血漿, 尿・糞, 胆汁, 組織/臓器, 限外ろ過液などの各生体試料中放射能の測定を行い, また, 組織分布試験の一環として全身オートラジオグラフィ (WBA) を実施した。さらに, 代謝物プロフィール試験では, 生体試料中の代謝物を HPLC により分離した後, UV 検出器及び放射能検出器による分析に供した。

2.4.3.1 吸収

テモゾロミドの吸収に関する薬物動態試験としては, 主にラット及びイヌに ¹⁴C- テモゾロミド又は非標識テモゾロミドを単回静脈内及び経口投与した際の血漿中薬物濃度プロフィールについて検討した。

ラット及びイヌに ¹⁴C- テモゾロミドを投与した試験において, 経口投与時と静脈内投与時の血漿中放射能濃度の AUC 比から算出した吸収率は約 100% であったこと, また, 放射能の主要排泄経路は尿中排泄であり, 胆汁中排泄及び糞中排泄は極めて少なかったこと (後述の排泄の項参照) から, 本薬は放射能としてほぼ完全に吸収されることが確認された。

ラット及びイヌに経口投与時の血漿中未変化体濃度の t_{max} は, 表 2.4.3-1 に示したとおり, 投与後 30 分前後に認められ, 本薬の速やかな吸収性が示唆された。本薬は血漿中からの消失も速やかで, t_{1/2} はラットで約 1.2 時間, イヌで約 1.5 時間であった。静脈内投与との AUC 比較により算出した絶対バイオアベイラビリティ (BA) はラット及びイヌともに約 100% であり, テモゾロミドは消化管及び肝臓において初回通過代謝を受けないことが示唆された。このことは本薬の主要な生体内変換が非酵素的な分解反応 (化学的な加水分解) であることに起因するものと考えられた。また, テモゾロミドは, 消化管からの吸収過程において化学的分解をほとんど受けていないことが示唆された。

一方, 血漿中 MTIC 濃度は, ラット及びイヌともに未変化体濃度と平行して推移し, t_{max} 及び t_{1/2} は未変化体濃度とほぼ一致していた。未変化体に対する MTIC の血漿中濃度比 (AUC について算出) は, ラットで 1.9% ~ 2.1%, イヌで 2.7% ~ 3.0% であった (表 2.4.3-1 参照)。これら成績から, 血漿中 MTIC 濃度は同時に存在する未変化体の濃度に依存することが示唆され, この現象は

MTIC から AIC への分解がテモゾロミドから MTIC の生成よりも明らかに速い (MTIC の分解半減期が短い) ことに起因するものと考えられた (すなわち, MTIC の動態は生成律速である)。

ラット及びイヌともに, 血漿中未変化体及び MTIC 濃度に性差は認められなかった。

反復投与毒性試験の一環として実施したトキシコキネティクス試験成績から, ラットでは 25 ~ 800 mg/m², イヌでは 25 ~ 1000 mg/m² の広い投与量範囲における本薬の体内動態の線形性が確認された。また, テモゾロミドの反復投与による薬物動態の変化及び蓄積性はないことが確認された。

表 2.4.3-1 ラット, イヌ及びヒトにおける薬物動態パラメータ (平均値)

(1) 血漿中未変化体濃度

動物種	投与経路	投与量 (mg/m ²)	t _{max} (hr)	C _{max} (μg/mL)	AUC _{0-t} (μg•hr/mL)	t _{1/2} (hr)	CL or CL/F (mL/min/kg)	Vd or Vd/F (L/kg)	BA ^b (%)
ラット (雌雄)	静脈内	200	-	-	50.6-55.6 ^a	1.12-1.23	8.50-10.5	0.90-1.00	-
	経口	200	0.25-0.75	21.5-31.4	50.3-55.7 ^a	1.17-1.26	8.80-10.5	1.00-1.10	96-100
イヌ (雌雄)	静脈内	40	-	-	6.04	1.45-1.51	5.58-5.71	0.71-0.73	-
	経口	200	0.38-0.58	8.50-14.1	20.5-31.4	1.36-1.68	5.70-5.96	0.67-0.73	95-101
ヒト (男女)	経口	150	1.42	7.87	25.7	2.14	2.57	0.468	-
		200	0.58	15.3	35.1	2.03	2.37	0.415	^c

(2) 血漿中 MTIC 濃度

動物種	投与経路	投与量 (mg/m ²)	t _{max} (hr)	C _{max} (μg/mL)	AUC _{0-t} (μg•hr/mL)	t _{1/2} (hr)	AUC% ^d / 未変化体
ラット (雌雄)	経口	200	0.50-1.00	0.329-0.385	1.00-1.11	1.35-1.64	1.88-2.07
イヌ (雌雄)	経口	200	0.50	0.186-0.223	0.502-0.586	1.57-1.61	2.71-2.96
ヒト (男女)	経口	150	1.42	0.145	0.426	1.98	1.78
		200	0.75	0.272	0.594	1.93	1.85

ラット: 非標識テモゾロミドを用いた PK 試験 (A018* 及び A015*) より抜粋

イヌ: 非標識テモゾロミドを用いた PK 試験 (A019* 及び A017*) より抜粋

ヒト: 日本人における第 I 相 PK 試験 (C016*) より抜粋

a: 一部 AUC_{0-∞} を含む (なお, AUC_{0-t} と AUC_{0-∞} は近似している)。

b: 絶対バイオアベイラビリティ

c: 文献では約 100% との報告がある⁹⁾。

d: 未変化体に対する MTIC の存在比 [(MTIC の AUC / 未変化体の AUC) × 100]

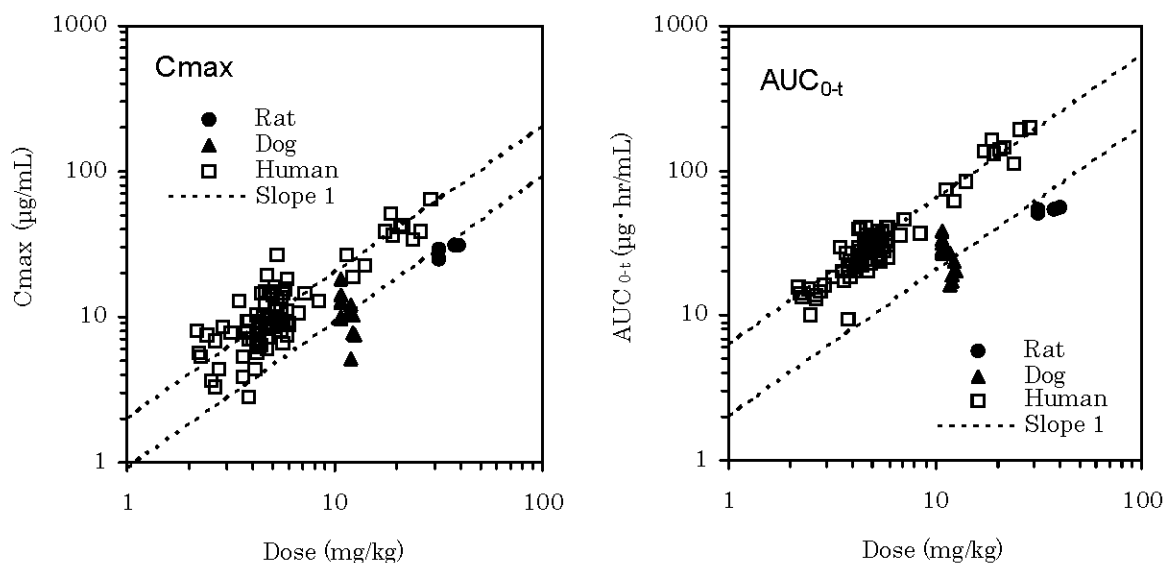
テモゾロミドの全身曝露について, ラット, イヌ及びヒトで比較した。

テモゾロミドの薬物動態試験における投与量はいずれも体表面積当たり (m²) で調製されている。そこで, 血漿中未変化体濃度の C_{max} 及び AUC_{0-t} について, 体表面積当りで同一投与量の 200 mg/m² 群での種間比較を行った。その結果, 表 2.4.3-1 に示したとおり, ラット及びイヌの C_{max} 及び AUC_{0-t} はヒトとほぼ同程度から 2 倍程度の値を示し, いずれの種においても大きな違いは認められなかった。また, 血漿中 MTIC 濃度についても未変化体の場合と同様であった。

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

ラット、イヌ及びヒトでは体のサイズに極端な違いがあり、体水分量/体表面積比が種によって異なる。また、Cmax 及び AUC は単位液量当たり (mL) で示されるパラメータである。そこで、単位液量当たり (mL) の値は単位重量当たり (g) の値とほぼ等価であるため、ラット、イヌ及びヒトの投与量を体表面積当たり (mg/m²) から体重当たり (mg/kg) に換算し、Cmax 及び AUC_{0-t} について種間比較を試みた。なお、同じ 200 mg/m² を投与した場合であっても、ラット、イヌ及びヒトにおける単位体重当たりの投与量はそれぞれ平均 33.0, 11.3 及び 5.2 mg/kg (約 6:2:1) となる。

ラット、イヌ及びヒトにおける血漿中未変化体濃度の Cmax 及び AUC_{0-t} と体重当たりの投与量 (mg/kg) との関係を両対数表示で図 2.4.3-2 に示した。ヒト (100 ~ 1000 mg/m²) においては、Cmax 及び AUC_{0-t} に明瞭な用量比例性が認められ、投与量との間に両対数表示で傾き 1 の直線と平行関係が認められた。一方、ラット及びイヌ (200 mg/m²) における Cmax 及び AUC_{0-t} は、上述のヒトにおける Cmax 及び AUC_{0-t} と投与量の関係を示す傾き 1 の直線よりも低濃度領域にプロットされ、動物とヒトでは乖離が認められた。以上より、テモゾロミドの血漿中未変化体濃度は、体重当たりで同一投与量 (mg/kg) を投与した場合には、動物においてヒトよりも低値となることが示唆された。



ラット：非標識テモゾロミドの 200 mg/m² を単回経口投与した PK 試験 (A018* 及び A015*) より抜粋
 イヌ：非標識テモゾロミドの 200 mg/m² を単回経口投与した PK 試験 (A019* 及び A017*) より抜粋
 ヒト：テモゾロミドの 100, 150, 200, 250, 500, 750 及び 1000 mg/m² を単回経口投与した PK 試験 (C017* , C018* , C024* , C023* , C019* , C016*) より抜粋。

図 2.4.3-2 ラット、イヌ及びヒトにテモゾロミドを経口投与した際の血漿中未変化体濃度の Cmax (µg/mL) 及び AUC_{0-t} (µg·hr/mL) と投与量 (mg/kg) の関係

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

また、ラット、イヌ及びヒトにおける血漿中未変化体濃度の薬物動態パラメータ（表 2.4.3-1 参照）として、 $t_{1/2}$ についてはラット<イヌ<ヒトの順に短い傾向がみられ、また、単位体重当りの CL/F についてはラット>イヌ>ヒトの順に大きい値を示した。これらのことから、本薬の動物における体内からの消失は、ヒトに比べて少し速いことが示唆された。

2.4.3.2 分布

テモゾロミドの分布に関する薬物動態試験としては、ラットに ^{14}C - テモゾロミドを単回経口投与した際の組織内分布プロファイルについて検討し、また、脳内移行性（ラット）、脳脊髄液中への移行性（ラット及びイヌ）、血球移行性（ラット及びイヌ）及び血漿蛋白結合について検討した。

雌雄ラットに ^{14}C - テモゾロミドを単回経口投与した際、放射能の速やかな吸収と広範な組織移行性が確認され、また、放射能の組織分布パターンに性差は認められなかった。組織内放射能濃度は、いずれの組織においても投与後 6 時間までに最高濃度付近まで到達し、腎臓及び肝臓で最も高く、次いで、脾臓、肺、副腎、腸間膜リンパ節、顎下腺、骨髄、胸腺、甲状腺に血漿とほぼ同濃度かやや下回る濃度の放射能が検出された。脳では、他の組織と比較するとやや低かったが、最高値を示した投与 2 時間後で血漿中濃度の 36% ~ 37% の濃度が認められ、本薬が血液 - 脳関門を通過することが示唆された。また、雄ラットで実施した全身オートラジオグラフィの結果は、上記の組織内放射能濃度の測定結果を反映するものであった。以上の組織内分布試験では、血漿中に未変化体が検出されなくなった投与後 24 時間以降においても、同時点における血漿中放射能濃度と比較して 100 ~ 1000 倍高値を示し、その消失も緩徐であり、組織中放射能の残留性が示唆された。この理由としては、本薬の生体内変換の最終生成物である ^{14}C -AIC が生体成分としてプリン生合成系で再利用されたことに起因するものと推察された。

テモゾロミドの脳内及び脳脊髄液中への移行性について検討したところ、ラットに単回静脈内及び経口投与した際の脳内への未変化体移行率（脳/血漿の AUC 比）は 35% ~ 40% であり、また、ラット及びイヌに単回経口投与した際の脳脊髄液中への未変化体移行率（脳脊髄液/血漿の AUC 比）はラットで約 40%、イヌで約 30% であった。この成績から、テモゾロミドは、未変化体として血液 - 脳関門及び血液 - 脳脊髄関門を通過することが示唆され、本薬の脳腫瘍に対する有効性が組織内分布の観点で支持されるものと考えられた。

テモゾロミドのヒトにおける脳脊髄液中への移行については、脳転移を有する悪性黒色腫患者（1 名）に $150 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ を反復経口投与した試験データが得られており、脳脊髄液中の未変化体濃度は血漿中濃度との AUC 比で 28% ~ 30% となり、本薬が未変化体として中枢神経系に移行することが確認されている（C020*）。また、最近、脳腫瘍（神経膠腫）患者にテモゾロミドの $75 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ を 42 ~ 49 日間経口投与した場合（23 例）及び $200 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ を 5 日間経口投与した場合（32 例）の脳脊髄液中及び血漿中未変化体濃度を測定し、脳脊髄液/血漿の AUC 比はいずれの場

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

合も約 20% であったと報告されている¹⁰⁾。上述のラット及びイヌでの脳脊髄液中への移行 (30% ~ 40%) は、これらのヒトにおける成績よりもやや高濃度かほぼ同程度であった。

ラット及びイヌに ¹⁴C- テモゾロミドを経口投与した試験において、本薬は血球中に血漿中濃度と同程度かあるいはやや低レベルで移行することが明らかとなった (血球移行性)。テモゾロミドの血漿蛋白結合率については、本薬が生理的条件下で不安定であり、*in vitro* でのインキュベーション試験が実施不可能であったため、¹⁴C- テモゾロミドを経口投与した際の血漿における放射能の蛋白結合率 (*in vivo*) を測定した。その結果、血漿蛋白結合率は、ラットで 21% ~ 27%、イヌで 14% ~ 46% であり、ヒトでの成績 (12% ~ 16%) (C015*) と同様に本薬は蛋白結合率の低い薬物であることが確認され、また、血漿蛋白との結合部位の競合による薬物相互作用が発現する可能性は低いことが示唆された。

2.4.3.3 代謝

テモゾロミドの主要な生体内変換経路は、MTIC への加水分解と続いて起こる AIC への変換であり (図 2.4.3-1 参照)、この一連の変換過程は pH 依存的で薬物代謝酵素に非依存的な (化学的な) 分解反応であることが確認されている^{2~6)}。その他には、テモゾロミドの副次的な代謝物として 8 位カルボン酸代謝物である TMA (3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxylic acid) (薬物動態試験の概要表 2.6.5.11 参照) の生成が認められているが、TMA は血漿中には検出されず、尿中にわずかに排泄される程度であった。

生体内におけるテモゾロミドから MTIC への変換が非酵素的な反応であることは、マウス肝ミクロソーム存在下でインキュベートした際のテモゾロミドから MTIC への分解半減期が、肝ミクロソーム非存在下でインキュベートした際の分解半減期とほぼ同じであったこと⁷⁾ からも支持される。また、少なくとも *in vitro* のインキュベーション実験においては、テモゾロミドはほぼ定量的に AIC に変換することが確認されている⁴⁾。

テモゾロミドの代謝に関する薬物動態試験としては、ラット及びイヌに ¹⁴C- テモゾロミドを単回静脈内及び経口投与した際の血漿及び尿中代謝物プロフィールについて検討した。

ラット及びイヌに ¹⁴C- テモゾロミドを経口投与した際の血漿試料中の代謝物組成分析データにおいて、投与後の早い時間帯については、血漿中に存在する放射能の大部分が未変化体であることが確認され、テモゾロミドが薬物代謝酵素による初回通過効果を受けない薬物であることが支持された。投与放射能の主排泄経路である尿中では、投与 0 ~ 4 時間において未変化体及び AIC の存在割合が多く、少量の TMA 及び構造未定の複数の高極性代謝物が検出されたが、投与後時間の経過に従って、未変化体、AIC 及び TMA の割合が低下し、徐々に高極性代謝物の割合が増加した。また、投与後 0 ~ 24 時間の尿中に排泄された未変化体、AIC、TMA 及び高極性代謝物の投与量に対する割合を算出すると、ラットでそれぞれ 25%、11%、2.5% 及び 18%、イヌでそれぞれ 4.8%、11%、1.3% 及び 18% であった。以上の動物における血漿及び尿中代謝物プロフィールは、静脈内投与と

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

経口投与でほぼ同様の組成比パターンを示し、本薬が初回通過効果を受けないことが支持された。また、ヒトにおける代謝物プロフィールと質的及び量的にほぼ同様であった。

テモゾロミドの生体内分解における最終生成物 AIC は、動物及びヒトにおける内因性物質であり、プリン生合成系における中間体であるため、核酸のサルベージ経路に取り込まれる。すなわち、AIC は生体内でアデニン及びグアニンに変換され、最終的に尿酸などのプリン分解産物として排泄される。したがって、ラット及びイヌに ^{14}C -テモゾロミドを投与した試験の尿中代謝物分析で検出された高極性代謝物は、 ^{14}C -AIC がプリン生合成系に取り込まれて生成した分解産物である可能性が高い。

また、テモゾロミドから TMA が生成するもう一つの代謝過程については、薬物代謝酵素による反応と推定される。テモゾロミドから TMA の生成反応は、酸アミドからカルボン酸への変換反応であり、一般的には加水分解反応である。このような酸アミドの加水分解に関与する酵素の代表的な酵素としてはカルボキシエステラーゼが挙げられる。なお、その具体的な分子種まで推定することは困難であるが、ラット、イヌ及びヒトにおけるテモゾロミドの経口投与による絶対バイオアベイラビリティがいずれも約 100% であることを踏まえると、小腸や肝臓での本薬に対する代謝活性が比較的低い加水分解酵素であると考えられた。また、*in vitro* インキュベーション試験において、テモゾロミドから MTIC への加水分解半減期はマウス肝ミクロソームの有無によって変化せず（上述参照）⁷⁾、本薬について薬物代謝酵素に由来する反応は加水分解反応に比べて極めてマイナーであると考えられること、テモゾロミドから MTIC への加水分解反応が飽和するとは考えられないこと、血漿中代謝物として TMA は検出されなかったこと、 ^{14}C -標識体投与時の放射能の主排泄経路は腎を介しての尿中排泄であり（後述の排泄の項参照）、尿中に排泄された TMA は投与量の 1% ～ 3% とわずかであったこと（上述参照）などから、テモゾロミドの代謝物として TMA の生成量はごく少量であると考えられた。以上のことから、テモゾロミドから TMA への変換過程が本薬のクリアランスに及ぼす影響はほとんどないものと判断された。

2.4.3.4 排泄

テモゾロミドの排泄に関する薬物動態試験としては、ラット及びイヌに ^{14}C -テモゾロミドを投与した際の尿・糞中排泄ならびにラットにおける胆汁中排泄について検討した。

ラット及びイヌに ^{14}C -テモゾロミドを経口投与した際、投与後 168 時間までに、ラットでは投与量の 74% ～ 82% が、イヌでは 61% が尿中に回収された。糞中放射能排泄率はラット及びイヌでそれぞれ 2.8% ～ 6.4% 及び 2.6%、また、ラット呼気中排泄率も 2% 前後と低値であった。これらの尿・糞中排泄パターンは静脈内投与と経口投与及び雄と雌で同様であった。また、ラット経口及び静脈内投与時の胆汁中への放射能排泄率は、投与量の 1.4% ～ 1.6% とごくわずかであった。

以上のように、ラット及びイヌともに ^{14}C -テモゾロミド投与後の放射能の大部分は尿中に回収され、動物における放射能の主排泄経路は、ヒトの場合（C015*）と同様に、腎臓を介しての尿

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

中排泄であることが確認された。また、経口投与時の放射能の糞中排泄率ならびに経口及び静脈内投与時の胆汁中排泄率が極めて低かったことから、テモゾロミドの経口投与における吸収は良好であることが支持される。なお、投与後 168 時間において、ラットでは組織及び屍体中に放射能の残存が認められ、イヌでは総放射能回収率が低値であったが、これは分解産物である ^{14}C -AIC が核酸合成系で再利用され、放射能として長期間残留したためと考えられた。

2.4.3.5 薬物動態学的相互作用

テモゾロミドの薬物動態学的相互作用に関する非臨床薬物動態試験は実施していない。しかしながら、以下の理由により、テモゾロミドの薬物動態学的相互作用発現の可能性は低いと考えられた。

吸収過程では、テモゾロミドは脂溶性の薬物であるため、経口投与時の吸収は主として消化管上皮の脂質二重層を介する単純受動拡散に由来する可能性が高いと考えられること、テモゾロミドは経口投与によりほぼ完全に全身循環血中に移行するため、消化管粘膜上皮における薬物の排出に関与するトランスポーター（P 糖蛋白質、等）の基質ではないと考えられることなどから、薬物動態学的相互作用が発現する可能性は低いと推定される。代謝過程では、テモゾロミドの主要な生体内変換は非酵素的（化学的）な分解反応であるため、薬物代謝酵素（チトクローム P-450 等）に対して競合的に反応する可能性は少ないこと、薬物代謝酵素に対するメカニズム依存性阻害作用や酵素誘導作用を有する薬物により本薬の分解及び代謝過程は影響を受けないと考えられること、テモゾロミドは胆汁排泄型の薬物ではないことなどから、薬物動態学的相互作用を発現する可能性は低いと推定される。また、排泄過程では、テモゾロミドの未変化体としての尿中排泄は少なく、全身クリアランスに対する腎クリアランスの寄与は小さいこと、ヒトにおいてテモゾロミドのクリアランスと糸球体ろ過能の指標であるクレアチニンクリアランスとの間に相関性が認められなかったことなどから、薬物動態学的相互作用が発現する可能性は低いと推定される。

2.4.4 毒性試験

テモゾロミドの安全性を検討するため、単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験、皮膚感作性試験を実施した。また、不純物の安全性の検討のために、不純物を添加した原末を用いて反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験を実施した。

2.4.4.1 単回投与毒性

単回投与試験は、マウス及びラット（経口及び腹腔内投与）、イヌ（経口投与）を用いて検討した。経口投与時の概略の致死量は、マウスで 1000 mg/m^2 、ラットで $1500 \sim 2500 \text{ mg/m}^2$ 、イヌで 600 mg/m^2 であり、経口投与時の毒性症状及び死亡は概して遅延性を示した。腹腔内投与時の概略の致死量は、マウスで 1000 mg/m^2 、ラットで 2000 mg/m^2 であり、経口投与と差がなかった。明らかな雌雄差はなかった。

主な毒性症状（表 2.6.6-2；27 頁参照）としては、マウス及びラットに共通して自発運動低下及び体重増加抑制がみられ、概略の致死量以上では円背位、半眼、マウスでは振戦、虚脱、歩行失調、ラットでは全身蒼白化、糞便量減少、摂餌低下等がみられた。イヌでは嘔吐、糞便異常、歯肉蒼白化がみられ、概略の致死量以上では体温上昇、自発運動低下、体重減少、歩行失調、虚脱、散瞳等がみられた。剖検では、各動物種に共通して、致死量以上で出血又はうっ血を示唆する変色（暗赤色化又は暗色化）が、リンパ系器官、胃腸管、又は雄生殖器等の細胞分裂の比較的速い組織・器官にみられ、死因は明らかではないが、これらの組織・器官の機能低下により全身状態が悪化したことによるものと推察された。これらの所見は、他のアルキル化剤でも報告されているものであった¹¹⁻¹³。

2.4.4.2 反復投与毒性

反復投与毒性試験はラット及びイヌを用い、臨床投与スケジュールと同じ間歇投与とし、1クール（5日間連続投与後、23日間休薬）、3クール及び6クールの各経口投与試験を実施した。

1) 血中薬物濃度、主要な毒性所見及び標的器官

血漿中テモゾロミド濃度は投与量の増加に応じた上昇を示し、雌雄差はなかった。また、6クール投与後でも蓄積性は認められなかった。本薬投与により、最も低い用量（ 25 mg/m^2 ）から嘔吐（イヌのみ）、体重増加抑制、摂餌量減少及び脱毛（ラット3クール試験のみ）、又は末梢白血球及び血小板の減少がラット又はイヌにみられた。病理組織学的検査の結果から、ラット及びイヌに共通した本薬の毒性の標的器官は、骨髄（骨髄細胞減少）、リンパ系器官（胸腺、脾臓、腸管及びリンパ節のリンパ球減少）、胃腸管（胃のうっ血、出血あるいは浮腫、小腸及び大腸の陰窩壊死）及び精巣（変性）であり（表 2.6.6-3 及び表 2.6.6-4；30 及び 31 頁参照）、他のアルキル化剤と同様に細胞分裂が比較的速い組織・器官に強い毒性が認められた。

なお、致死量のみにもみられた網膜の病理学的所見（変性、壊死）は、1クール投与試験の最小致死量（ラット：200 mg/m²、イヌ：125 mg/m²）の3～8倍の高用量でみられた変化であった。ラットの3クール投与試験の200 mg/m²でみられた乳癌は、6クール投与試験ではより低用量の25 mg/m²から認められ、同試験の125 mg/m²では皮膚及び間葉系組織の腫瘍もみられた。この結果及び考察はがん原性の項に別途記載した。

2) 回復性について

ラット及びイヌとも末梢血白血球及び血小板は、各クールの投与期間中及び休薬期間の初期に減少を示したが、休薬終了時には回復し6クール投与後でも増強はみられなかった（図 2.6.6-1；32頁参照）。他の血球パラメータの変化もほぼ同様な回復を示した。また、本薬の標的器官でみられた毒性所見のほとんどは回復性を示したが、精巣についての回復性はみられなかった。精巣への影響は、他のアルキル化剤の毒性試験でも報告されている^{14, 15}。また、ヒトでも報告されており、その回復性については、投与量、曝露期間あるいは年齢等が関与していると考えられている^{16, 17}。

3) 死因について

1クール投与試験では休薬期間中に、ラットの200 mg/m²以上、イヌでは125 mg/m²以上で死亡がみられた。死亡の主な原因は、本薬の細胞毒性作用による胃腸管の障害及び骨髄抑制による全身状態悪化が考えられた。また、諸臓器に細菌感染を示唆する所見（敗血症）がみられたことから、二次的な影響も考えられた。ラット6クール投与試験における死亡例の一部は、乳癌（雌）、乳癌以外の悪性腫瘍あるいは泌尿生殖器における広範囲の炎症（雄）に起因するものと考えられた。

4) ヒトへの安全性

反復投与試験でみられた毒性所見の多くは、本薬の薬理作用に基づく細胞増殖抑制作用によるもので、アルキル化剤に共通したものであった。反復投与試験での無毒性量（ラット：25 mg/m²未満、イヌ：25 mg/m²＜嘔吐を除く＞）は臨床推奨最高用量（200 mg/m²）よりも低く、また最小致死量（ラット：200 mg/m²、イヌ：125 mg/m²）は臨床推奨最高用量と同等かあるいは低かった。同一投与量（200 mg/m²）ではラット、イヌ及びヒトの間に全身曝露量に大きな違いはなく（2.4.3.1；10頁参照）、これら動物の最小致死量と臨床推奨最高用量での全身曝露量は動物の方がヒトより低い（表 2.6.6-5；31頁参照）ため、毒性の種差は全身曝露量の違いによるものではなかった。本薬投与により発現する骨髄、リンパ系器官、胃腸管及び精巣の各毒性は、他のアルキル化剤と同様に細胞増殖抑制作用に起因するため、ヒトへの投与においては注意が必要である。動物試験では末梢血白血球及び血小板の減少が他の毒性所見に比べて、同等あるいはより低用量から発現したことから、これらは骨髄及び他の毒性をモニターする良い指標と考えられた。添付文書（案）には、ヒトの安全性確保のために末梢血の好中球及び血小板をモニターしながら、用法・用量を調節する基準が記載されている。

2.4.4.3 遺伝毒性

本薬は細菌を用いる復帰突然変異試験，ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験及びマウス小核試験でいずれも陽性を示し，他のアルキル化剤と同様に遺伝毒性が本薬に認められた。

2.4.4.4 がん原性

本薬はアルキル化剤であり，長期延命が望めない悪性神経膠腫患者の治療に効果が期待されているため，ICH ガイドライン¹⁸⁾に従い，がん原性試験は実施していない。しかし，2.4.4.4 の 1) に示すように，他のアルキル化剤と同様に各種腫瘍が，本薬のラットの 3 及び 6 クール投与試験で認められた。イヌの 1, 3 及び 6 クール投与試験では腫瘍及び前がん病変は認められなかった。本薬のラット腫瘍発生については 2.6.6.9.4 の項で他のアルキル化剤との比較（腫瘍の種類及び投与量，乳癌の発生時期及び頻度）を詳細に記載した。以下に，その主な内容，並びに本薬の主な発がん機序，修復機構，感受性及びヒトでの発がん性リスクについてまとめた。

1) 腫瘍発生の可能性について本薬と他のアルキル化剤の比較

本薬投与でラットに乳腺腫瘍（癌及び上皮内癌）が 3 及び 6 クール投与試験で認められ，また，6 クール投与試験では，皮膚腫瘍及び間葉系腫瘍が複数部位にみられた（表 2.6.6-3 ; 30 頁参照）。これらの腫瘍の多くについては自然発生することや他のアルキル化剤を含む抗腫瘍剤で報告されている¹⁹⁻²⁸⁾。また，他のアルキル化剤で本薬と同様に，臨床用量付近又はそれ以下の用量で腫瘍の誘発が認められている（表 2.6.6-6 ; 34 頁参照）。

本薬投与により発生した腫瘍のうち，特に乳癌は悪性腫瘍であり，またその発生頻度が高いため，本薬の発がん性の比較に最も重要であると考えられる。即ち，乳腺腫瘍（癌及び上皮内癌）が 3 クール投与試験の 200 mg/m²，6 クール投与試験ではより低用量の 25 mg/m² から雌で多く認められ，125 mg/m² では高頻度（94%）に観察された。乳癌はダカルバジン（DTIC）²²⁾，プロカルバジン²⁰⁾，シクロホスファミド²³⁾でも雌ラットでの発生が報告されている。

また，特に乳癌の高い発生頻度（約 50 ~ 100%）が，類薬の DTIC やプロカルバジンでも同様の時期に報告されている（表 2.6.6-7 ; 35 頁参照）ことから，本薬と類薬とで乳癌の発生時期及び発生頻度に明らかな差はないと考えられた。

要約すると，本薬投与により発生する腫瘍のプロフィールは他のアルキル化剤と類似しており，また本薬の発がん性の強さ（発生時期及び発生頻度）は類薬とほぼ同様であろうと推測された。次に本薬投与により，ラット乳癌が比較的早期から高頻度に発生するため，その発生の機序を評価することがヒトの発がんリスクを知る上で重要と考えられ，以下に考察を加えた。

2) 主な発がん機序及び修復機構

本薬はアルキル化剤であり DTIC と同様に MTIC に加水分解された後，活性本体のメチルジアゾニウムイオンに変換され DNA をメチル化する。DNA のメチル化産物のうち，特にグアニンの O⁶ 位のメチル化産物が，抗腫瘍作用（2.4.2.1.2 ; 6 頁参照）のみならず遺伝毒性及び発がん性とも関

連すると考えられている²⁹⁾。また、グアニンのO⁶位に生じた付加物はO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (MGMT) により修復されるため、MGMTの活性は本薬やDTICの抗腫瘍作用、遺伝毒性及び発がん性に重要な役割を果たすと考えられている³⁰⁻³⁴⁾。また、MGMTの活性は動物種及び組織により異なると報告されている³⁵⁻³⁷⁾。イヌの各組織中のMGMTに関する報告は見当たらないが、ヒト組織におけるMGMT活性はラットより高い³⁵⁾ため、ヒトではグアニンのO⁶位におけるDNA障害の修復能がラットより高いものと考えられる。

3) 乳癌の誘発に対する感受性について

他のアルキル化剤と同様に、本薬投与によるラット乳癌の発生頻度は、他の腫瘍に比べて高かった。このため、ラット乳癌の発生の評価がヒトの発がんリスクを知る上で最も重要と考えられる。しかし、ラット乳腺のMGMT活性とアルキル化剤で誘発される腫瘍形成との関連性については次の報告がある。即ち、本薬の反復投与試験での投与開始時期に相当する50日齢付近の雌ラットの乳腺ではMGMT活性が最低値を示すとの報告³⁷⁾や乳癌誘発に対するSDラットの感受性は、生後20日齢から55日齢で最も高くなり^{38,39)}、この期間は乳腺上皮の発達する時期に一致するとの報告³⁹⁾がある。このため、本薬や他のアルキル化剤に対するラット乳腺の感受性は他の組織に比べてより高いものと推定された。

4) ヒトでの発がん性リスクの評価

本薬投与によりラット乳癌が高頻度に発生したが、イヌでは腫瘍及び前がん病変を示す所見はみられなかった。また、上記の様に本薬や他のアルキル化剤に対する乳腺の感受性は高いこと、ラットに比べヒトでのグアニンのO⁶位のアルキル化に対する修復能が高い³⁵⁾ことも報告されている。ヒトにおける二次がん（特に乳癌）の発生の危険性の評価に際しては、顧慮されるべき点と考えられる。また、ラットの文献調査の結果では、本薬の腫瘍のプロフィールは他のアルキル化剤に類似しており、発がん性の強さ（腫瘍発生の時期及び発生頻度）は類薬のDTIC及びプロカルバジンとほぼ同様であろうと推定された。ヒトでは、アルキル化剤を含む抗腫瘍剤は二次がんを発生することが知られており、本薬投与を含む治療を受けた患者で、非常にまれではあるが骨髄異形成症候群や骨髄性白血病を含む二次がんが発生したとの報告がある（2.7.4.6.6.2.2 参照）。しかし、現在までのところ、本薬投与後に報告された二次がんの推定発生頻度は、ホジキン病患者における他のアルキル化剤と放射線療法の併用療法後の二次がんの推定発生頻度より高くはない（表 2.7.4-144 参照）。また、今後も米国本社は、継続的に推定発現頻度の評価を行う予定である（2.7.4.6.6.3 参照）。

2.4.4.5 生殖発生毒性

ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、50 mg/m² から親動物の摂餌量減少を伴う体重の増加抑制又は減少がみられ、着床後の胚死亡が観察された。交尾能及び授精能に本薬の影響はみられなかった（表 2.6.6-8 ; 38 頁参照）が、本薬のラット及びイヌの反復投与試験でみ

られた精巣への影響については回復性が確認されていない。他のアルキル化剤でも胚・胎児^{40,41)}への影響や精巣への影響^{14,15)}が報告されている。

ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験では、ラット母動物で 25 mg/m² から体重増加抑制及び摂餌量減少、ラット及びウサギとも胎児では 50 mg/m² から体重増加抑制あるいは胚・胎児死亡及び奇形（横隔膜ヘルニア、小眼球、脳の異常、頭部、中軸骨格、尾及び四肢の多様な骨格異常等）がみられた（表 2.6.6-8；38 頁参照）。本薬投与では、他のアルキル化剤と同様^{40,42-44)}に胚・胎児致死作用及び催奇形性作用が臨床推奨用量以下でみられており、妊娠又は妊娠している可能性のある婦人には投与すべきではないと考えられた。

ラットの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では、母動物の 25 mg/m² 以上で体重増加抑制及び摂餌量減少、出生児では 75 mg/m² で生存率低下、体重の減少又は増加抑制、発育遅延及び奇形がみられた（表 2.6.6-8；38 頁参照）。出生児への影響は他のアルキル化剤でもみられている^{40,45)}。本薬の乳汁中への移行は明らかではないが、本薬では広範な組織移行性が確認されている（2.4.3.2；13 頁参照）。また、臨床推奨用量よりも低い用量で出生児に影響がみられており、乳汁を介した出生児の成長及び発達への影響も予想されるため、授乳中の婦人は授乳を避けるべきと考えられた。

2.4.4.6 皮膚感作性

モルモットを用いて皮膚感作性試験を実施したが異常はみられず、本薬がヒトの皮膚に接触しても感作性を示す可能性は低いと考えられた。

2.4.4.7 不純物の毒性

本薬の不純物としては 不純物 B*（原薬規格値：■%以下、製剤規格値：■%以下）、不純物 A*（原薬規格値：■%以下）及び AIC（製剤規格値：■%以下）が報告されている。AIC は本薬の主要な代謝物で、プリン生合成系にかかわる内因性物質であるため、不純物 B* 及び不純物 A* を添加したテモゾロミドの原薬（含量：それぞれ 0.69% 及び 0.54%）を用いて、ラット 1 クール経口投与毒性試験及び遺伝毒性試験（復帰突然変異試験及び染色体異常試験）を実施した。ラットへの各不純物の投与量は、ヒトの 1 日最大摂取量の約 1.2 及び 1.1 倍に相当する量であったが、不純物を添加しない原薬と同様な毒性所見がみられた。また、遺伝毒性にも差はみられなかった。

以上のことから、本薬にこれらの不純物が含まれていても規格値の範囲内であれば、新たな毒性が発生する可能性は少ないと考えられた。

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.4.5 総括及び結論

テモゾロミドはDNAにメチル基を付加する一価アルキル化薬である。In vitro 及び in vivo における薬理試験では、テモゾロミドは脳腫瘍を含む各種腫瘍細胞に対して抗腫瘍作用を示した。その作用機序として、テモゾロミドは短時間でDNAのO⁶-グアニンをメチル化し、その後MMRによる無効な修復過程を介して細胞周期の停止及びアポトーシスを誘導した結果、抗腫瘍作用を発現すると考えられた。

テモゾロミドの主要な生体内変換は、pH依存的で非酵素的（化学的）な加水分解によるMTICへの変換と、続いて起こるAICとメチルジアゾニウムイオンへの分解である。本薬のラット及びイヌにおける経口吸収性は良好であり、絶対オアベイラビリティはほぼ100%であった。また、血漿中からの消失も速やかで、 $t_{1/2}$ は1.2～1.5時間であった。血漿中MTIC濃度は未変化体濃度と平行して推移し、 t_{max} 及び $t_{1/2}$ は未変化体とほぼ一致していた。MTIC/未変化体のAUC比は2%～3%と低く、MTICの分解が未変化体からの生成よりも明らかに速いことが示唆された。ラットに¹⁴C標識体を経口投与した際、放射能の広範な組織移行性が認められ、特に腎臓及び肝臓で高濃度であった。ラット脳内への未変化体移行率（脳/血漿のAUC比）は35%～40%、ラット及びイヌの脳脊髄液中への未変化体移行率（脳脊髄液/血漿のAUC比）はそれぞれ約40%及び約30%であり、テモゾロミドは未変化体として血液-脳関門及び血液-脳脊髄関門を通過することが確認された。血漿蛋白結合率（in vivo）は21%～46%と低かった。ラット及びイヌに経口投与後の血漿中では大部分が未変化体として存在し、本薬が薬物代謝酵素による初回通過効果を受けないことが支持された。尿中では未変化体の他にAICの存在割合が多く、投与後時間の経過に伴い徐々に高極性代謝物の割合が増加した。AICはプリン生合成系の中間体であり、生体内成分（核酸）として再利用される。ラット及びイヌに¹⁴C標識体を経口投与した際、放射能の主排泄経路は腎を介しての尿中排泄であり、また、ラット胆汁中への排泄はほとんど認められなかった。

本薬の単回経口投与時の概略の致死量は、マウスで1000 mg/m²、ラットで1500～2500 mg/m²及びイヌで600 mg/m²であった。ラット及びイヌの1クール（5日間投与、23日間休薬）、3クール及び6クール経口投与試験の主要な毒性の標的器官は、骨髄、リンパ系器官、胃腸管及び精巣であり、高用量では網膜変性等がみられた。多くの毒性所見は休薬により回復性を示したが、精巣の変化は回復性を示さなかった。網膜の変化は最小致死量の3～8倍の高用量のみでみられた所見であるが、精巣への影響は低用量からみられ他のアルキル化剤でも報告されている。このため、本薬の添付文書（案）の「使用上の注意」9.その他の注意の項に、動物実験でみられた精巣毒性の情報を記載した。

ラット及びイヌの1クール経口投与試験では臨床推奨最大用量（200 mg/m²）で死亡がみられ、本薬に対する動物の感受性はヒトより強かった。動物実験では最も低い用量から末梢血白血球及び血小板の減少が認められており、骨髄及び他の毒性をモニターするための良い指標と考えられた。ヒトでは本薬投与により骨髄機能抑制の重篤な副作用が起こることがあるので、添付文書（案）の

「用法・用量」には、末梢血好中球及び血小板の各検査値に基づく＜用法・用量に関連する使用上の注意＞が記載されている。

本薬は遺伝毒性、胚・胎児致死作用及び催奇形性作用を示し、出生児の発育遅延及び生存児数の減少が認められた。このため、本薬の添付文書（案）の「使用上の注意」5. 妊婦、産婦、授乳婦等への投与の項には「(1) 妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には投与しないこと。妊娠する可能性のある婦人に投与する場合には、妊娠を避けるよう指導すること。[ラット、ウサギにおいて、胚・胎児死亡及び奇形 (50 mg/m²/日) が報告されている。]」「(2) 授乳中の婦人には授乳を避けさせること。[安全性は確立していない。]」と記載した。

ラットの3及び6クール経口投与毒性試験では乳腺あるいは皮膚等に腫瘍がみられた。イヌでは腫瘍及び前がん病変は全く認められず、本薬の発がん作用に対する感受性はラットでは高いと考えられた。しかし、抗腫瘍剤、特にアルキル化剤は骨髄異形成症候群や骨髄性白血病を含む二次がんを発生することが報告されている。本薬の海外の市販後調査では、本薬投与を含む治療法を受けた患者で、非常にまれではあるが骨髄異形成症候群や骨髄性白血病を含む二次がんが発生したとの報告があるため、本薬の添付文書（案）の「使用上の注意」の2. 重要な基本的注意及び9. その他の注意の項にヒト及びラットの腫瘍発生についての情報を記載した。なお、本薬には皮膚感作性はなく、不純物に特有の毒性所見も認められなかった。

2.4.6 参考文献一覧

- 1) Spiro T, Liu L, Gerson S. New cytotoxic agents for the treatment of metastatic malignant melanoma: temozolomide and related alkylating agents in combination with guanine analogues to abrogate drug resistance. *Forum*. 2000;10:274-85.
- 2) Slack JA, Goddard C, Stevens MFG, Baig GU, Griffin MJ. The analysis and murine pharmacokinetics of a new antitumor agent : CCRG 81045. *J Pharm Pharmacol* 1986; 38: 63.
- 3) Wheelhouse RT, Stevens MFG. Decomposition of the antitumor drug temozolomide in deuterated phosphate buffer : methyl group transfer is accompanied by deuterium exchange. *J Chem Soc Chem Commun* 1993; 15: 1177-8.
- 4) Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MFG, Tsang LLH, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 1994; 33: 9045-51.
- 5) Stevens MFG, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vicker L, Stone R, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045: M&B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Research* 1987; 47: 5846-52.
- 6) Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews* 1997; 23: 35-61.
- 7) Tsang LLH, Quarterman CP, Gescher A, Slack JA. Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 27: 342-6.
- 8) Shealy YF, Krauth CA. Imidazoles, II. 5(or 4)-(Monosubstituted triazeno)imidazole-4(or 5)-carboxamides. *J Med Chem* 1996; 9: 34-8.
- 9) Newland ES, Blackledge GRP, Slack JA, Rustin GJS, Smith DB, Stuart NSA, et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer* 1992; 65: 287-91.
- 10) Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R. Plasma and Cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3728-36.
- 11) 西川智, 納屋聖人, 原卓司, 宮崎英治, 大黒友路. 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide の安全性に関する研究 (第1報) マウス, ラットによる急性毒性試験. *薬理と治療* 1981;9:177-81.
- 12) 江角吉造, 中尾寿夫. 抗腫瘍剤 Procarbazine Hydrochloride の毒性研究 (1) ラット, マウスにおける急性毒性試験. *応用薬理* 1972;6:355-64.
- 13) 村岡義博, 松村彰一, 矢原功, 伊東文雄, 渡辺弘, 森茂栄一 他. Ifosfamide (Z4942) の急性毒性試験. *基礎と臨床* 1982;16(2):431-8.
- 14) 西川智, 納屋聖人, 原卓司, 宮崎英治, 大黒友路. 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide の安全性に関する研究 (第2報) イヌ静脈内投与による1ヵ月間の亜急性毒性試験. *薬理と治療* 1981;9:183-207.
- 15) 江角吉造, 中尾寿夫, 林正. 抗腫瘍剤 Procarbazine Hydrochloride の毒性研究 (2) ラットとマウスにおける亜急性毒性試験. *応用薬理* 1972;6:365-80.
- 16) Kinsella TJ. Effects of radiation therapy and chemotherapy on testicular function. In: Burger EJ, Tardiff RG, Scialli AR, Zenick H, editors. *Sperm Measures and Reproductive Success: Institute for Health Policy Analysis*. New York: Alan R. Liss, Inc.;1989.p.157-77.

- 17) Costabile RA. The effects of cancer and cancer therapy on male reproductive function. *J Urol* 1993;149:1327-30.
- 18) 厚生省医薬安全局審査管理課長. 医薬品のがん原性試験に関するガイドライン. 医薬審第1607号. 平成11年11月1日
- 19) International Agency for Research on Cancer (IARC). Dacarbazine. In: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 1981;26:203-15.
- 20) International Agency for Research on Cancer (IARC). Procarbazine Hydrochloride. In: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 1981;26:311-39.
- 21) Weisburger JH, Griswold DP, Prejean JD, Casey AE, Wood HB, Weisburger EK. The carcinogenic properties of some of the principal drugs used in clinical cancer chemotherapy. *Recent Results Cancer Res* 1975;52:1-17.
- 22) Beal DD, Skibba JL, Croft WA, Cohen SM, Bryan GT. Carcinogenicity of the antineoplastic agent, 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide, and its metabolites in rats. *J Natl Cancer Inst* 1975;54:951-57.
- 23) Schmähl D, Habs M. Carcinogenic action of low-dose cyclophosphamide given orally to Sprague-Dawley rats in a lifetime experiment. *Int J Cancer* 1979;23:706-12.
- 24) Dactinomycin. In: Physicians' Desk Reference 58 edition. New Jersey: Thomson PDR;2004.p.1947-9.
- 25) Daunorubicin HCl. In: Physicians' Desk Reference 58 edition. New Jersey: Thomson PDR;2004. p.896-8
- 26) Melphalan. In: Physicians' Desk Reference 58 edition. New Jersey: Thomson PDR;2004.p.1120-1.
- 27) National Cancer Institute. Bioassay of procarbazine for possible carcinogenicity. National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series No.19; 1979.
- 28) McMartin DN, Sahota PS, Gunson DE, Hsu HH, Spaet RH. Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies. *Toxicol Pathol* 1992;20:212-25.
- 29) Singer B. N-nitroso alkylating agents: Formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1979;62(6):1329-39.
- 30) Catapano CV, Broggin M, Erba E, Ponti M, Mariani L, Citti L, D'Incalci M. In vitro and in vivo methazolastone-induced DNA damage and repair in L-1210 leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. *Cancer Res* 1987;47:4884-9.
- 31) D'Incalci M, Citti L, Taverna P, Catapano CV. Importance of the DNA repair enzyme *O*⁶-alkyl guanine alkyltransferase (AT) in cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 1988;15:279-92.
- 32) Pegg AE. Mammalian *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* 1990;50:6119-29.
- 33) Lee SM, Thatcher N, Crowther D, Margison GP. Inactivation of *O*⁶-alkyl guanine-DNA alkyltransferase in human peripheral blood mononuclear cells by temozolomide. *Br J Cancer* 1994;69:452-6.
- 34) Gerson SL. MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:296-307
- 35) Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA. Comparison of *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 1986;7:745-9.
- 36) Jun GL, Ro JY, Kim MH, Park GH, Paik WK, Magee PN, Kim S. Studies on the distribution of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in rat. *Biochem Pharmacol* 1986;35:377-84.

- 37) Fong LYY, Jensen DE, Magee PN. DNA methyl-adduct dosimetry and O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase activity determinations in rat mammary carcinogenesis by procarbazine and N-methylnitrosourea. *Carcinogenesis* 1990;11:411-7.
- 38) Welsch CW. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas. *Cancer Res* 1985;45:3415-43.
- 39) Russo J, Russo IH. Biology of disease: Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 1987;57:112-37.
- 40) Thompson DJ, Molello JA, Strebing RJ, Dyke IL. Reproduction and teratology studies with oncolytic agents in the rat and rabbit. II. 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide (DTIC). *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;33:281-90.
- 41) 永岡隆晴, 高塚和彦, 奈良間功. Ifosfamide (Z4942) の生殖試験 ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験. *基礎と臨床* 1982;16(2):84-92.
- 42) 江角吉造, 巴山潤吉. 妊娠中に経口投与された Procarbazine Hydrochloride のラットおよびマウス胎仔の発生および生後発育におよぼす影響. *応用薬理* 1972;6:381-97.
- 43) 永岡隆晴, 奈良間功. Ifosfamide (Z4942) の生殖試験 ラットにおける器官形成期投与試験. *基礎と臨床* 1982;16(2):93-117.
- 44) 永岡隆晴, 奈良間功. Ifosfamide (Z4942) の生殖試験 ウサギにおける器官形成期投与試験. *基礎と臨床* 1982;16(2):118-28.
- 45) 永岡隆晴, 大石雅彦, 奈良間功. Ifosfamide (Z4942) の生殖試験 ラットにおける周産期および授乳期投与試験. *基礎と臨床* 1982;16(2):129-44.