

代謝される過程が必要となる。このため、葉酸よりもホリナートを培地に添加した場合の方が効率的に作用すると考えられる。一方、本薬の臨床使用における葉酸とビタミン B₁₂ の補充の目的は、葉酸/ビタミン B₁₂ 欠乏症によりホモシステイン量が上昇し、副作用発現のリスクが亢進することを予防することである。ホモシステインがメチオニンへ代謝される際の補因子の一つとして、5-メチルテトラヒドロ葉酸が必要となるが、葉酸はホリナートより 5-メチルテトラヒドロ葉酸への変換効率が高い。過量投与等に対してはホリナートカルシウム注射剤（6 時間毎に 1 回 50～100mg/m²）、また本薬投与中の毒性の発現抑制には経口投与が可能で安価な葉酸（1 日 1 回 500μg）が適していると考ええる。

機構は、本薬の臨床試験においては副作用の発現予防を目的としてホリナートカルシウム又はレボホリナートカルシウム製剤の検討はなされておらず、ホリナートと葉酸の 5-メチルテトラヒドロ葉酸への変換効率の違いが副作用の発現リスクに及ぼす影響は不明であるが、主に利便性や経済性の観点から本薬の併用薬剤として葉酸が選択されたものと理解した。

3) 耐性について

申請者は、本薬に対する耐性について以下のように説明している。

本薬の存在下で数週間培養した細胞では、酵素発現レベルの変化を伴う耐性を獲得して薬剤に対する感受性が低下する（Semin Oncol 26(Suppl 6): 68-73, 1999）。腫瘍細胞は葉酸代謝拮抗剤の存在下でも増殖できるように順応していくことが知られており、その機序として、薬剤の細胞内取り込みやポリグルタミン酸化の割合の変化、TSやDHFR等の標的酵素の活性変化等、複数の機序が考えられている。これらの変化は単独あるいは同時に発現し、特定蛋白質（キャリアや酵素）の突然変異や異常発現によるものと考えられる。

また、本薬に感受性を示す細胞にMRP2やMRP5を発現させると耐性を獲得する。これらのトランスポーターはいずれも、ATP依存的な本薬の輸送に関与している。さらに本薬のトリグルタミン酸塩は、MRP2によるロイコトリエンC4（MRP2の内因性基質）の取り込みを阻害する。このATP依存性のトランスポーターがRFCと比べてどの程度寄与しているかについては、本薬に対する細胞の感受性に影響を与えるという観点から、現在盛んに研究が行われている。

機構は、本薬に対する耐性化におけるATP依存性トランスポーターの関与についても、今後文献調査を含め情報収集していく必要があると考える。

4) 安全性薬理試験成績について

機構は、安全性薬理試験では本薬 200 及び 600mg/kg 投与で認められた音刺激に対する驚愕反応の変化、60mg/kg 投与での尿中 Na 濃度上昇及び尿 pH 低下について、これらを本薬の薬理作用あるいは毒性と判断しなかった理由について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

聴覚驚愕反応検査では、本薬 200 及び 600mg/kg 投与において、対照群と有意差が認められる block が存在するが、いずれも一過性の変動であり、さらに 200mg/kg 群では増加、600mg/kg では減少というように変動方向に一貫性を欠いていることから、本薬投与の影響とは考え難く、偶発的な変動と考えている。水・電解質排泄については、60mg/kg 投与で認められた変化は、200 及び 600mg/kg 群では認められない用量反応性を欠いた変動であることから、60mg/kg 群で認められた変動は偶発的な変動と考えた。

機構は、回答を了承した。

3.2 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料

<提出された資料の概略>

動物における本薬の薬物動態（PK）プロファイルはマウス及びイヌにおいて、また、本薬の血漿タンパク結合率はマウス、イヌ及びヒト試料を、シトクロムP450の阻害作用はヒト試料を用いた *in vitro* 試験において、さらに、本薬のアスピリン及びイブプロフェンとの薬物動態学的相互作用についてはイヌにおいて、各々検討されている。なお、CDDP製剤については、吸収、分布、代謝、排泄に関する評価資料は提出されていない。

1) 吸収

(1) 単回投与

マウスに本薬を20mg/kg単回静脈内投与した際の血漿中未変化体濃度が検討された。本薬の血漿中濃度は、投与5分後に40.8µg/mLを示し48時間後には0.028µg/mLに低下した。20mg/kgを静脈内投与した際の本薬のAUC_{0-t}は30.8µg・hr/mLであった。なお、本薬20又は200mg/kg腹腔内投与のPKについても検討され、本薬20及び200mg/kg腹腔内投与時のバイオアベイラビリティ（BA）は各々100%超及び70%であった。

イヌに本薬を25mg/kg単回静脈内投与した際、血漿中からの本薬の消失は速やかであり、消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は3.7～4.4時間であった。

イヌに¹⁴C標識した本薬を7.5mg/kg単回静脈内投与した際、放射能のAUC_{0-24hr}は26.6µg・eq・hr/mLであり、本薬を7.87mg/kg単回静脈内投与した場合のAUC_{0-12hr}及びAUC_{0-∞}（いずれも33.1µg・hr/mL）と同程度であった。

Species	Mouse	Mouse	Mouse	Dog	Dog	Human
Sex (M/F)/Number of animals	4M	4-5M ^a	4-5M ^a	4F	4F	
Feeding condition	Fasted ^b	Fasted ^b	Fasted ^b	Fed	Fed	NA
Route	IV	IP	IP	IV	IV	IV
Dose (mg/kg)	20	20	200	25	25	500 mg/m ²
PK parameters:						
C ₀ /C _{max} (ng/mL) ^c	40779	33052	196000	141157	149577	65700
AUC (ng•hr/mL) ^d	30794	43792	216741	119678	125902	NC
AUC _{0-∞} (ng•hr/mL)	NC	NC	NC	119993	126046	159000
T _{1/2} (hr)	7.0	7.8	10.0	4.4	3.7	3.5
CL (mL/min/kg)	NC	NC	NC	3.53	3.32	91.8
Vd (L/kg)	NC	NC	NC	1.43	1.08	16.1

(Continued)

Abbreviations: # = number, M = male, F = female, NA = not applicable, IV = intravenous, IP = intraperitoneal, C₀/C_{max} = maximal observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, AUC_{0-∞} = total systemic exposure (area under the plasma concentration-time curve from 0 to infinity), NC = not calculated, T_{1/2} = half-life, CL = clearance, Vd = volume of distribution.

- ^a 4 animals/timepoint for 0.083-12 hours and 5 animals/timepoint for 12-48 hours.
^b Food was withheld 16 hours prior to start and throughout study, except for mice used for the 48-hour timepoint, which received food ad libitum 0-32 hours post dose.
^c After IV administration, the values reported for C₀ were extrapolated to zero; the values reported for C_{max} represent the first time point measured post dose. The concentration at time zero was not extrapolated for the reported C_{max}.
^d AUC = 0-30 hours for dogs, 0-48 hours for mouse and 0-48 hours for human.

(2) 反復投与

マウスに本薬を70、300又は700mg/kg週1回、6カ月間反復腹腔内投与し、投与初日と182日目の血漿中未変化体濃度が検討された。本薬の血漿中濃度推移及びPKパラメータに性差は認められず、また反復投与に伴うC_{max}及びAUCの変化は認められなかった。AUCは300mg/kgまで用量依存的に増加したが、700mg/kgでは増量比からの予想値よりも高値を示した。血漿からのt_{1/2}は消失相に直線性が得られずに算出できないケースもあったが、平均6.26時間（範囲1.88～8.74時間）であった。

イヌに本薬を6週間反復静脈内投与した際の血漿中濃度が検討された。試験開始時は、連日投与群（0.11、0.53mg/kg）、週2回投与群（3.15、7.87mg/kg）及び週1回投与群（104.96mg/kg）が設定されたが、投与開始約1週間後から毒性徴候が発現し、試験を完遂できないと判断された連日投与0.53mg/kg群及び週1回投与104.96mg/kg群は、各々0.37及び26.24mg/kgに減量して試験が継続された。本薬の血漿中からの消失は速やかで、t_{1/2}は0.8～5.1時間であり、高用量ほど長くなる傾向が認められた。初回投与時のAUC_{0-∞}は多くの場合は用量依存的に増加した。血漿中未変化体濃度推移に明らかな性差は認められなかった。反復投与により血漿中濃度推移に明らかな変化は認められなかったが、試験途中で用量を変更したため、反復投与による蓄積の可能性については明確な結論を導くことができなかったとされている（機構注：0.11mg/kg連日投与群のday 1とday 15の比較、及び26.24mg/kg

週1回投与群のday 15とday 36の比較では、反復投与に伴うC_{5min}及びAUCの低下傾向、t_{1/2}の短縮傾向が認められ、3.15mg/kg週2回投与群のday 15とday 32の比較では、反復投与に伴うC_{5min}及びAUCの上昇傾向、t_{1/2}の延長傾向が認められている。）。)

イヌに本薬を1回5、10又は25mg/kg、3週間間隔で9カ月間反復静脈内投与した際の血漿中濃度が検討された。血漿中未変化体濃度推移に明らかな性差は認められなかった。t_{1/2}は3.31～5.44時間で、投与量、性、投与期間による違いは認められなかった。C₀ (C_{max}から外挿した0時間の血漿中濃度) 及びAUCは用量依存的に増加した。反復投与によりAUCは僅かに上昇したが、t_{1/2}は最高値を示した個体でも10.4時間であり、投与間隔の21日に比べて極めて短く、最終投与の直前には血漿中に未変化体は検出されなかったことから、反復投与によるAUCの増加は定常状態に至る蓄積によるものではないと考察されている。

Dose, mg/kg Sex: Number of Animals	5		10		25	
	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Day 1						
C ₀ (ng/mL)	23791	24631	43507	45525	122967	121616
AUC _{0-infinity} (ng•hr/mL)	21227	21427	38123	36734	104898	105877
Half life (hr)	6.98	3.90	2.96	3.66	4.19	4.94
Day 274						
C ₀ (ng/mL)	25910	29010	60876	52016	167460	139844
AUC _{0-infinity} (ng•hr/mL)	22214	20212	41400	40080	109585	117586
Half life (hr)	4.15	2.78	4.05	3.93	4.50	6.34

2) 分布

(1) 組織分布

マウスに¹⁴C標識した本薬を20mg/kg単回静脈内投与した際、放射活性は5分以内に各組織に分布した。投与1時間後には、尿、胆嚢内胆汁、糞、腸内容物、腎臓及び肝臓に比較的高い放射活性が検出され、本薬が投与後速やかに尿中及び胆汁中に排泄されることが示唆された。投与後3～12時間には腸内容物に強い放射活性が確認された。投与後3時間以降も放射活性が検出された臓器は腎臓（投与後6時間まで）と肝臓（投与後48時間まで）のみであり、これらの臓器においてもその放射活性の大部分は投与3時間以内に消失していた。t_{1/2}は腎臓で11時間、肝臓で97時間であり、他の組織では0.14時間（骨髄及び脾臓）～0.53時間（精巣上体）と極めて短かった。肝臓からの放射活性の消失が遅いのは、本薬が肝臓に移行しやすくポリグルタミン酸塩として細胞内に留まるためと申請者は考察している。

(2) タンパク結合

¹⁴C標識した本薬を用いて*in vitro*における血漿タンパク結合率が検討された。マウス及びイヌでは、本薬0.5又は5μg/mLで各々53.5～57.7%及び46.0～46.8%であった。ヒトでは本薬0.5～200μg/mLで約80%とほぼ一定であったが、本薬220μg/mLから結合率は濃度依存的に低下し、1100μg/mLでは58.5%まで低下した。

ヒト血清アルブミンに対する¹⁴C標識した本薬の結合率は、アルブミン濃度が10、30、50

mg/mLの時、本薬200 μ g/mLで各々44.6%、74.4%、84.3%、本薬400 μ g/mLで各々38.8%、68.8%、82.1%とアルブミン濃度に依存して増加した。ヒト α 1-酸性糖タンパク (0.3~3mg/mL) に対する 14 C標識した本薬 (200又は400 μ g/mL) の結合率は24.9~26.4%であった。

3) 代謝・排泄

14 C標識した本薬をマウスに20mg/kg単回静脈内又は経口投与あるいはイヌに7.5mg/kg単回静脈内投与した際の尿中排泄及び尿中代謝物が検討された。

マウスに静脈内投与した際の投与後24時間までの糞中及び尿中の放射能排泄率は、各々54.9%及び33.6%、投与後96時間までは各々57.4%及び34.9%であり、経口投与時では投与後96時間までは各々88.4%及び4.55%であった。静脈内投与後7時間までに尿中排泄された放射活性の約90% (投与総放射能の約22%) は未変化体であった。

また、イヌに静脈内投与した際の、投与後24時間までの糞及び尿中の放射能排泄率は各々22.4%及び65.1%、投与後168時間までは各々30.6%及び68.8%であった。静脈内投与後24時間までに尿中排泄された放射活性の約68% (投与総放射能の約44%) は未変化体であった。

尿中代謝物として代謝物338979 (2種類のジアステレオマーとして存在) 及び代謝物368962が検出され、両代謝物の投与総放射能に占める割合はマウスで1%以下、イヌで6%以下であった。

4) 薬物動態学的相互作用

(1) アスピリン又はイブプロフェンとの相互作用

癌患者ではNSAIDsが併用される可能性があること、並びに本薬と化学構造の類似するメトトレキサートでは、アスピリン (Clin Pharmacol Ther 10: 849-857, 1969、J Pharm Sci 79: 782-786, 1990、Arthritis Rheum 34: 1514-1520, 1991) 及びイブプロフェン (J Rheumatol 17: 1008-1010, 1990、Eur J Clin Pharmacol 42: 121-125, 1992) との相互作用が検討されていることから、本薬のPKに及ぼすアスピリン又はイブプロフェンの影響が検討された。

イヌにアスピリン10mg/kg又はイブプロフェン5mg/kgを単回又は2週間連日経口投与し、最終投与30分後に本薬25mg/kgが静脈内投与された。本薬のAUC_{0- ∞} 、t_{1/2}、クリアランス (CL) 及び分布容積 (V_d) に対してアスピリン前投与による明らかな影響はなく、本薬のPKがアスピリンにより変化する可能性は低いと申請者は考察している。また、本薬のV_dについては、イブプロフェン単回投与による影響は認められなかったが、イブプロフェン反復投与後では単剤投与時より32%増加した。しかしながら、イブプロフェン反復投与後においても本薬のAUC_{0- ∞} 、t_{1/2}及びCLには差が認められなかったことから、イブプロフェンにより本薬のPKが変化する可能性は低いと申請者は考察されている。

(2) シトクロムP450分子種に対する阻害効果

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP450分子種のうち様々な医薬品の代謝に関与する分子種であるCYP3A、CYP2D6、CYP2C9、CYP1A2に対する本薬の阻害作用が検討された。CYP2D6によるブフラロール ($5\mu\text{mol/L}$) の代謝は殆ど本薬の影響を受けなかった。本薬の最高濃度 ($885\mu\text{mol/L}$ 又は $1000\mu\text{mol/L}$) で、CYP3Aによるミダゾラム ($5\mu\text{mol/L}$) の代謝が21%、CYP2C9によるジクロフェナク ($2.5\mu\text{mol/L}$) の代謝が7%、CYP1A2によるフェナセチン ($12.5\mu\text{mol/L}$) の代謝が8%阻害された。しかし、ヒトにおける臨床推奨用量での C_{max} は約 $200\mu\text{g/mL}$ ($468\mu\text{mol/L}$) であることから、上記のCYP分子種の基質となる薬剤の代謝に対して本薬が临床上問題となるような阻害を起こす可能性は低いと考察されている。

<機構における審査の概要>

機構は、提出された資料及び以下の検討から、非臨床における本薬の吸収、分布、代謝、排泄及び薬物動態学的相互作用に関する申請者の考察は概ね受け入れられるものと判断した。ただし、他の臓器に比して肝臓からの消失が遅延する理由、代謝及び排泄過程の種差の可能性、並びにアスピリン及びイブプロフェン以外の NSAIDs や本薬に類似した化学構造を有する化合物において薬物動態学的相互作用が認められている薬剤と本薬の相互作用の可能性について、それらの機序を含めて検討・考察し、本薬の薬物動態に関する基礎的な情報を更に収集すべきであると機構は考える。

1) 反復投与時の薬物動態

機構は、イヌ 6 週間投与試験において、本薬 0.11mg/kg 連日投与群及び 26.24mg/kg 週 1 回投与群では、反復投与に伴う $C_{5\text{min}}$ 及び AUC の低下傾向、 $t_{1/2}$ の短縮傾向が認められた一方で、 3.15mg/kg 週 2 回投与群では、反復投与に伴う $C_{5\text{min}}$ 及び AUC の上昇傾向、 $t_{1/2}$ の延長傾向が認められている点について（「3.2 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 1) 吸収」の項参照）、その理由を考察するよう求めた。

申請者は、当該試験実施中に試験条件の変更等があったため、当該試験の結果からは本薬反復投与時の PK プロファイルについて明確な結論を導くことは適切ではないと考えている旨を回答した。

機構は、以下のように考える。

申請者は、申請資料中では本薬の蓄積の可能性については当該試験からは明確な判断ができない点に言及しているが、他の薬物動態学的特性（血漿中濃度推移、線形性、性差等）に関する考察を行い、当該試験内容を評価資料と位置付けて提出している。しかし、回答では、上記のような見解を示し、PK プロファイルについての明確な議論を避けている。申請者は申請時点で、当該試験成績から本薬の PK の評価・解析を行うことの可否を判断すべきであったと機構は考える。本薬反復投与時の PK プロファイルは、他の反復投与試験によ

り評価可能であると考え、今後の他の申請品目では、申請に用いるデータの取扱いについて十分留意することを切望する。

2) 組織内分布

機構は、マウスの肝臓における本薬の $t_{1/2}$ が他の臓器に比して高値を示した理由として、本薬は肝臓に移行しやすくポリグルタミン酸塩として細胞内に留まるためであるとの申請者の考察の根拠となるデータを示すよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。

本薬がポリグルタミン酸塩として細胞内に滞留している可能性があるとの考察は、本薬がホリルポリグルタミン酸シンターゼによりポリグルタミン酸化されること (Mol Pharmacol 48: 326-333, 1995)、ヒト白血病細胞を用いた *in vitro* 試験において細胞内に本薬のグルタミン酸塩が認められたこと (「3.1 薬理試験に関する資料 1」効力を裏付ける試験) の項参照) 等の検討結果を考慮し、最も妥当と考えられる解釈と考える。

機構は、本薬のポリグルタミン酸化に関する検討結果に基づく考察は、細胞内貯留性に関する説明であり、肝臓での $t_{1/2}$ が高値を示したことを説明し得る直接的なデータではないと考えるものの、一つの要因の可能性もあると考え、申請者の回答を概ね了承した。ただし、申請者の考察の根拠となるデータは不十分であり、本薬の肝臓と他の臓器との消失速度の違いについて申請者が推察している機序を直接裏付けるデータを収集し、他の要因の関与の有無についても更に検討・考察すべきと機構は考える。

3) 代謝及び排泄と薬物動態学的相互作用

機構は、イヌにおいてイブプロフェン併用投与時の本薬の V_d が、単剤投与時に比べて 32% 上昇した理由を考察するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。

当該試験における本薬単剤投与とイブプロフェン併用投与の分布容積の個体別の変化割合には大きな変動 (各個体で各々 19% 低下、38% 上昇、60% 上昇、69% 上昇であった) が認められたため、分布容積は平均値として 32% 上昇したものの、全例が上昇していないこと及び V_d 以外の他の PK パラメータに併用に伴う顕著な影響は認められなかったことから、イヌにおける本薬の PK はイブプロフェンの影響を受けないと考える。

機構は、マウス及びイヌにおける本薬の主な排泄経路の差異について (「3.2 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 3」代謝・排泄) の項参照)、本薬の代謝及び排泄過程に及ぼす種差の影響を踏まえて考察するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。

現在までにマウス及びイヌにおいて、本薬の代謝及び排泄メカニズムに明確な種差が存在することを示唆するデータは得られていないため、両種間で主要な排泄経路が異なる原

因は明らかではない。マウスの尿中排泄が低用量から飽和した結果、糞中排泄がこれを補っている可能性も考えられるが、これを裏付けるデータはない。

また、機構は、本薬とトランスポーターの薬物動態学的相互作用に関する知見を示し、本薬の腎排泄過程においてトランスポーターが関与する可能性について、申請者の見解を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

本薬の腎排泄に関与すると考えられるトランスポーターとその寄与率等の詳細は不明である。現在、本薬の腎排泄における有機アニオン及び有機カチオントランスポーター (OAT1、OAT3、OAT4、OATP1A2、OATP2B1、OCT1、OCT2) の関与について、*in vitro* で検討中である。

本薬は還元型葉酸キャリア及び葉酸結合型膜タンパク質により細胞内に取り込まれる。葉酸結合型膜タンパク質は近位尿細管において葉酸を再吸収すると考えられており、本薬も同様に再吸収されていると考えられる。また、本薬の腎クリアランスは腎血流速度よりも高値を示すことから、腎排泄において本薬は尿細管分泌を受けていると推察され、この過程にトランスポーターが関与している可能性が高いと考えられる。なお、アスピリン及びイブプロフェン以外の薬剤との薬物動態学的相互作用について、現在までにトランスポーター介在性のものは確認されていないが、本薬と化学構造が類似するメトトレキサートは還元型葉酸キャリアの基質であるため、当該キャリアを介した本薬との相互作用の可能性は否定できない。

機構は、本薬の尿中及び糞中排泄率から、マウスとイヌにおける本薬の主な排泄経路（マウス：糞中、イヌ：尿中）は異なる可能性が示唆されていると考える。排泄経路に関する種差の有無の詳細を検討し、種差の存在が明らかになった場合にはその機序を含めて解明すべきと機構は考える。また、本薬とトランスポーターの薬物動態学的相互作用の可能性については、現在検討中の試験成績を踏まえて適切に情報提供及び注意喚起することに加え、化学構造が類似する他の薬剤の知見も含めて、本薬とトランスポーターの相互作用の可能性について考察し、必要があれば今後も本薬について更なる検討を速やかに実施し、本薬の適正使用に貢献し得る非臨床データの収集、蓄積及び活用に努めていく必要があると機構は考える。

なお、CYP2C9 の阻害作用の検討において、本薬 600、800 及び 1000 μ mol/L での阻害作用が各々 26%、21% 及び 7% と低下した理由については照会中である。

3.3 急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他の毒性に関する資料

<提出された資料の概略>

本薬の毒性試験成績として、単回投与、反復投与、遺伝毒性及び生殖発生毒性に関する試験成績が提出された。なお、CDDP 製剤については毒性に関する評価資料は提出されていない。

1) 単回投与毒性

本薬の単回静脈内投与毒性はマウス（1574mg/kg、雌雄）及びラット（787、1112、1574mg/kg、最高投与量群のみ雌雄、その他は雄のみ）を用いて検討されており、概略の致死量はマウスでは雄 1574mg/kg、雌 1574mg/kg 以上、ラットでは雄 787mg/kg、雌 1574mg/kg と判断されている。死亡動物では痙攣等が認められ、マウス及びラットともに投与後 70 分以内に死亡が認められている。イヌでは反復静脈内投与試験の用量設定試験（10、25、50、100mg/kg、単回静脈内投与）のデータから急性毒性について検討がなされ、死亡動物は認められていないが、50mg/kg（1000mg/m²）以上の投与群では嘔吐、摂餌量減少、軟便、リンパ球数及び好中球数の減少が観察されている。なお、イヌ 6 週間反復静脈内投与試験では 104.96mg/kg（2099.2mg/m²）初回投与後に死亡が雌雄とも 1/3 例に認められており、当該用量は概略の致死量に相当するものと推察されている。

2) 反復投与毒性

本薬の反復投与毒性は、マウス及びイヌを用いて検討されている。マウス 6 週間反復腹腔内投与試験では、0、10.6、26.2mg/kg/日（0、31.8、78.6mg/m²/日）の連日投与、105mg/kg/回（315mg/m²/回）の週 2 回投与及び 314.8mg/kg/回（944.4mg/m²/回）の週 1 回投与が実施されており、本薬投与に明らかに起因すると考えられる死亡又は瀕死屠殺動物は認められず、また本薬投与に関連すると考えられる一般状態の変化は認められていない。病理組織学的検査においては、本薬群で精巣の精子形成低下（中等度～重度）、腸の陰窩上皮細胞の壊死（軽微～中等度）、骨髄壊死（軽微）等が認められている。以上より、無毒性量は得られていないが、連日投与の 26.2mg/kg/日（78.6mg/m²/日）群を除き、忍容性はあるものと判断されている。

マウス 6 カ月反復腹腔内投与試験では、0、70、300、700mg/kg/回（0、210、900、2100mg/m²/回）の週 1 回投与が実施され、死亡又は瀕死屠殺動物が対照群を含む各投与群に散見されているが、いずれも本薬投与との明らかな関連性は認められていない。また、いずれの群においても本薬投与に関連すると考えられる一般状態の変化は認められていない。本薬群では精巣における精細管変性（軽度～重度）とライディッヒ細胞の過形成（軽微～中等度）が認められており、精巣上体においても精子数の顕著な減少が認められている。脾臓重量は 700mg/kg/回群で増加を示しているが、腹腔内投与による二次的変化又は反応性変化であると考えられている。無毒性量は雄で 70mg/kg/回（210mg/m²/回）未満、雌で 700mg/kg/回（2100mg/m²/回）と判断されている。

イヌ 6 週間反復静脈内投与試験では、0、0.11、0.53mg/kg/日（0、2.2、10.6mg/m²/日）の連日投与、7.87mg/kg/回（157.4mg/m²/回）の週 2 回投与及び 104.96mg/kg/回（2099.2mg/m²/回）の週 1 回投与が実施され、連日投与の 0.53mg/kg/日群では、投与 1 週目から死亡動物が認められたため、4 日間休薬後の試験 12 日目から 0.37mg/kg/日（7.4mg/m²/日）に減量して投与が継続されている。週 2 回投与の 7.87mg/kg/回群では、3

週目までに全例の動物が死亡したため、3.15mg/kg/回（63.0mg/m²/回）の週 2 回静脈内投与群が追加されている。また、週 1 回投与の 104.96mg/kg/回群では、初回投与後に死亡が認められたため、2 回目以降は 26.24mg/kg/回（524.8mg/m²/回）に減量が行われている。試験に用いた各群の雌雄各 3 例のうち試験終了時の生存動物は、0.11mg/kg/日の連日投与群の雄 3 例、雌 2 例、3.15mg/kg/回の週 2 回投与群の雌 2 例、104.96→26.24mg/kg/回の週 1 回投与群の雌雄各 1 例であった。主な所見として摂餌量減少、体重減少、嘔吐、下痢・軟便、脱水、粘膜部位の炎症性所見、白血球数の減少等、また組織学的には壊死性の腸病変（軽度～中等度）、リンパ組織や骨髄における細胞数減少（軽度～中等度）、精巣の変性変化（軽度～中等度）等が認められ、腸管バリアの破綻や免疫機能低下によると考えられる肺炎も多くの動物で認められている。無毒性量はいずれの投与群でも得られておらず、忍容性もないものと考えられる。

イヌ 4 週間反復静脈内投与試験（回復群は最終投与後 3 週間休薬）では、0、10、25mg/kg/回（0、200、500mg/m²/回）の週 1 回投与が実施され、死亡動物は認められていない。主な所見として、摂餌量減少、体重減少、嘔吐、下痢・軟便、腹部皮膚の紅斑・痂皮、好中球数・リンパ球数・血小板数・網状赤血球数の減少等、組織学的には腸管において粘膜部位の出血、炎症、浮腫、陰窩部の壊死等からなる腸管病変（軽微～軽度）が認められている。これらの所見のうち、25mg/kg/回群における血小板数減少を除き回復あるいは回復傾向が認められている。無毒性量はいずれの投与群でも得られていないが、25mg/kg/回（500mg/m²/回）の週 1 回、4 週間投与までは忍容性があるものと考えられる。

イヌ 6 カ月反復静脈内投与試験では、0、10、25mg/kg/回（0、200、500mg/m²/回）の週 1 回投与が実施されたが、血液毒性のために、全群で試験 3 カ月目から投与間隔は 3 週間毎 1 回に変更されている。また、25mg/kg/回群では、試験 84 日から 154 日までの投与が中断されている。一般状態の悪化のため、10mg/kg/回群で 1 例、25mg/kg/回群で 2 例の動物が安楽死させられた。主な所見として、摂餌量減少、体重減少、下痢・軟便、皮膚病変（紅斑、落屑、表皮剥離等）、好中球数・リンパ球数・血小板数・網状赤血球数の減少等が認められている。血液毒性は投与期間の長期化とともに悪化し、本試験における投与量制限毒性と考えられている。組織学的にはリンパ組織や骨髄における細胞数減少（軽微～重度）、精巣の変性所見（軽微～中等度）、腸管粘膜の鬱血/出血（軽微～重度）等が認められている。無毒性量はいずれの投与群でも得られていないが、10mg/kg/回（200mg/m²/回）の 3 週 1 回投与は、3 カ月投与までは忍容性があるものと考えられる。

イヌ 9 カ月反復静脈内投与試験では、0、5、10、25mg/kg/回（0、100、200、500mg/m²/回）の 3 週 1 回投与が実施され、死亡は認められていない。主な所見として、嘔吐、摂餌量減少（投与後一過性）、下痢、体重増加量の減少、赤血球数・白血球数・血小板数の減少等が認められている。25mg/kg/回群の雌では、ALT 及び総ビリルビン値の上昇が認められているが、これに関連する病理組織学的所見は認められていない。また、本薬群のすべての雄動物では精上皮の変性・壊死が認められ、腎臓では尿細管で核の巨大化や変性所見が