

ルナベル配合錠 ULD

2.6.1 緒言

ノーベルファーマ株式会社

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

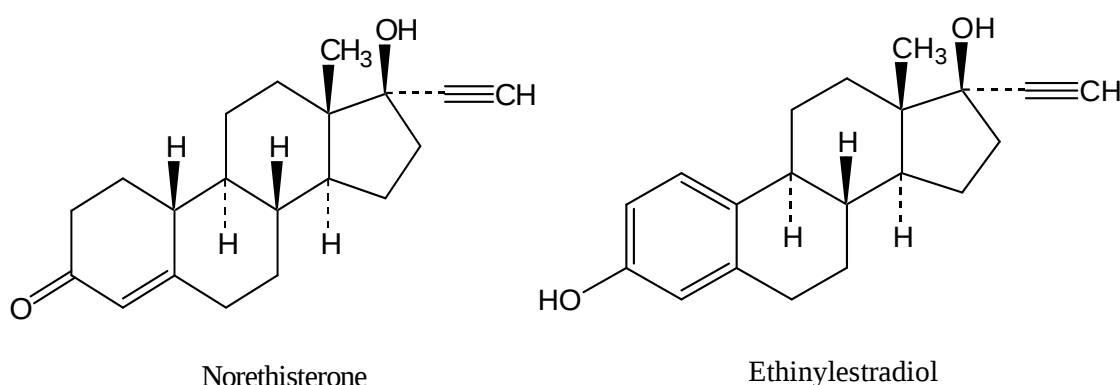
2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理的特性に関する簡潔な情報

(1) 医薬品の構造

本剤は、合成プロゲステロンのノルエチステロン（Norethisterone：NET）1 mgと、合成エストロゲンのエチニルエストラジオール（Ethinylestradiol：EE）0.02 mgの配合剤である。

本剤の構造式を以下に示す。



(2) 薬理的特性

本剤の有効成分であるNET及びEEは、以下に示す作用及び作用機序に基づき、月経困難症を改善すると考えられる。

- 1) 視床下部、脳下垂体に作用し、ゴナドトロピンの産生・分泌を抑制し、排卵を抑制する。同時に内因性の性ホルモンの周期的な変動を抑制し、子宮内膜の増殖を抑制する。
- 2) 子宮内膜の増殖抑制に伴うPGの産生抑制により、子宮平滑筋収縮及び神経末端刺激を抑制する。
- 3) 子宮内膜の増殖抑制に伴うプロスタグランジンの産生抑制により、子宮平滑筋収縮及び神経末端刺激を抑制する。

2.6.1.2 申請された効能・効果及び用法・用量に関する情報

申請品目	ルナベル配合錠 ULD
効能・効果	月経困難症
用法・用量	1日1錠を毎日一定の時刻に21日間経口投与し、その後7日間休薬する。以上28日間を投与1周期とし、出血が終わっているか続いているかにかかわらず、29日目から次の周期の錠剤を投与し、以後同様に繰り返す。

ルナベル配合錠 ULD

2. 6. 2 薬理試験の概要文

ノーベルファーマ株式会社

略語一覧

略語	内容	略語	内容
Ach	Acetylcholine	LH	Luteinizing hormone
ADP	Adenosine 5'-diphosphate	LPS	Lipopolysaccharide
Al-P	Alkaline phosphatase	LVEDP	左心室拡張末期圧
ALT	Alanine aminotransferase (GPT)	MAP	平均動脈圧
ANOVA	分散分析	MBP	平均血圧
APTT	活性化部分 thromboplastin 時間	MCH	平均赤血球血色素量
AST	Aspartate aminotransferase (GOT)	MCHC	平均赤血球血色素濃度
BCO	頸動脈閉塞	MCV	平均赤血球容積
BUN	Blood urea nitrogen	MPAP	平均肺動脈圧
CMC	Carboxymethylcellulose	MPVR	平均肺血管抵抗
CO	心拍出量	NET	Norethisterone
DBP	拡張期血圧	NETA	Norethisterone acetate
DMSO	Dimethyl sulfoxide	P	Progesterone
dP/dt _{max}	左心室圧最大収縮速度	pCO ₂	二酸化炭素分圧
dP/dt/P ₄₀	収縮速度(左心室圧 40 mmHg 時)	PG	Prostaglandin
ED ₅₀	50%有効用量	po	経口投与
EE	Ethinylestradiol	PR	Progesterone receptor
E2	17 β -estradiol	PRL	Prolactin
ECG	心電図	PT	Prothrombin time
FFA	遊離脂肪酸	RBC	赤血球
FSH	Follicle-stimulating hormone	SBP	収縮期血圧
γ -GTP	γ -glutamyl transpeptidase	sc	皮下投与
Gn	Gonadotropin (LH、FSH)	SV	一回拍出量
GnRH	Gonadotropin releasing hormone	SW	一回仕事量
Hb	Hemoglobin	T	Testosterone
Hist	Histamine	T ₃	Triiodothyronine
Ht	Hematocrit	T ₄	Thyroxine
HR	心拍数	TP	Testosterone propionate
IC ₅₀	50%有効濃度	VS	迷走神経刺激
id	十二指腸内投与	WBC	白血球
ip	腹腔内投与		

2.6.2 薬理試験の概要文

ルナベル配合錠ULD（以下、「本剤」という）は、黄体ホルモンとしてノルエチステロン（以下、「NET」という）1mg、卵胞ホルモンとしてエチニルエストラジオール（以下、「EE」という）0.02mgを含む経口の超低用量エストロゲン／プロゲステン配合剤（以下、「EP配合剤」という）である。本剤が既承認薬ルナベル配合錠LDと同一有効成分であることから、本剤の薬理作用の評価はルナベル配合錠LDの承認申請資料（2008年4月承認）及び一部変更承認申請資料（2010年12月承認）で利用したデータを再構築して行った。なお、新たな非臨床薬理試験は実施していない。

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

本剤の月経困難症に対する薬理作用を、配合成分であるNETとEEそれぞれで検討した。なお、配合剤の効力を裏付ける試験は、CTD2.7.2U.2.2に記載した。

NETは、ウサギのプロゲステロン（P）受容体に対して、Pの2.45倍の相対結合親和力を示した。内分泌機能への影響の検討では、成熟ラットの卵巢重量の低下をもたらした。また、卵胞の成熟を抑制した。また、脳下垂体機能を抑制し、卵胞刺激ホルモン（FSH）濃度を低下させた。生殖機能については、成熟ラット、成熟ウサギにおける排卵を抑制し、それぞれ150 mg/kg、16.0 mg/kgの用量で100%抑制した。また、成熟ラットで卵の輸送促進作用、着床阻害作用を示した。

一方、EEは、ウサギのエストロゲン受容体に対して、17 β -エストラジオール（E2）の1.10倍の相対結合親和力を示した。内分泌機能への影響の検討では、成熟ラットの卵巢重量の低下をもたらした。また、卵胞の成熟を抑制した。また、脳下垂体機能を抑制し、FSH濃度を低下させた。生殖機能については、成熟ラット、成熟ウサギにおける排卵を抑制し、それぞれ15 mg/kgで100%、8 mg/kgで60%抑制した。また、成熟ラットで卵の輸送促進作用、着床阻害作用を示した。

これらの試験結果から、本剤は動物においてゴナドトロピン（Gn）遊離を抑制し、卵の熟成と排卵を抑制することにより、卵の着床に必要な子宮内膜の増殖を抑制すると考えられた。

本剤の有効成分であるNET及びEEは、非臨床及び臨床薬理試験の結果から、以下に示す作用及び作用機序に基づき、月経困難症を改善すると考えられる。

- ① 視床下部、脳下垂体に作用し、Gnの産生・分泌を抑制し、排卵を抑制する。同時に内因性の性ホルモンの周期的な変動を抑制し、子宮内膜の増殖を抑制する。
- ② 子宮内膜のアポトーシスを誘導し、内膜組織を萎縮させることにより、子宮内膜の増殖を抑制する。
- ③ 子宮内膜の増殖抑制に伴うプロスタグランジン（PG）の産生抑制により、子宮平滑筋収縮及び神経末端刺激を抑制する。

本剤の有するこれらの薬理作用のうち、排卵抑制作用については、CTD 2.6.2.2.1、CTD 2.6.2.2.2及びCTD2.7.2U.2.2に記載した。子宮内膜増殖抑制作用及び子宮収縮抑制作用については、CTD2.7.2U.2.2に記載した。

なお、器質性月経困難症の代表的疾患である子宮内膜症では、炎症性サイトカインが炎症の進展に関与しており、配合剤、特にプロゲステンは、サイトカインの産生を抑制することにより、抗炎症作用を発現していることが報告されている。抗炎症作用については、CTD2.7.2U.2.2に記載した。

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

NETとEEの20:1の混合物を用いて検討した。臨床推定用量の10倍から1,000倍の高用量が生体に対してどのような影響を及ぼすかを、in vitro及びin vivoの薬理学的試験系で検討した。中枢神

経系、循環器系、呼吸器系、末梢神経系及び平滑筋、消化器系について評価し、血液凝固系、肝・腎機能、蛋白代謝等についても検討した。

中枢神経系に対する検討では、NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgの混合物は、一般症状、瞳孔径、rotarodで測定した協調運動、ヘキシバルビタールによる麻酔時間、ペンチレンテトラゾールによる痙攣、直腸温に対して影響を与えなかったが、酢酸によるライジング数を抑制した (in vivo、マウス、po)。しかし、この作用はアセチルサリチル酸よりはるかに弱いものであった。また、同側の多シナプス屈筋反射又は単シナプス膝蓋脊髄反射を遮断しなかったことから、交感神経節の伝導及び脊髄反射に対して影響を与えなかった (in vivo、ネコ、十二指腸内投与)。一般行動及び皮質脳波に対して影響を与えなかった (in vivo、ウサギ、po)。

循環器系に対する検討では、NET 10^{-6} M + EE 5×10^{-8} Mの混合物は、摘出乳頭筋の等尺性収縮及び摘出心房の等尺性収縮と自発拍動数に対して影響を与えなかった (in vitro、フェレット)。NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgの混合物は、動脈圧、心拍数、心収縮力、心拍出量、一回仕事量、一回拍出量又は肺動脈圧、心電図(第Ⅱ誘導)、種々の自律神経系刺激(頸動脈閉塞、迷走神経刺激、ノルエピネフリン、アセチルコリン、ヒスタミン、イソプロテレノール)による平均動脈圧及び心拍数の反応に対して影響を与えなかった (in vivo、イヌ、十二指腸内投与)。

呼吸器系に対する検討では、NET 10^{-6} M + EE 5×10^{-8} Mの混合物は、摘出気管のカルバコール、ヒスタミン又はKClによる収縮に対して影響を与えなかった (in vitro、モルモット)。NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgの混合物は、呼吸数 (in vivo、ラット、po)、気道抵抗、肺コンプライアンス、呼吸終末炭酸ガス分圧及び動脈血炭酸ガス分圧 (in vivo、イヌ、十二指腸内投与) に対して影響を与えなかった。

末梢神経系及び平滑筋に対する検討では、NET 10^{-6} M + EE 5×10^{-8} Mの混合物は、瞬目反射に対して影響を与えなかった (in vivo、モルモット、点眼)。NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgの混合物は、頸部交感神経節前刺激、頸部交感神経節後刺激、エピネフリン静脈内投与による瞬膜収縮 (in vivo、ネコ、十二指腸内投与)、オキシトレモリンによる振戦 (in vivo、マウス、po)、生体位妊娠子宮の収縮及びオキシトシン誘発子宮収縮、生体位非妊娠子宮の収縮 (in vivo、モルモット、po) に対して影響を与えなかったが、生体位非妊娠子宮のオキシトシン誘発子宮収縮 (in vivo、モルモット、po) を抑制した。NET 10^{-6} M + EE 5×10^{-8} Mの混合物は、妊娠及び非妊娠摘出子宮の収縮及びオキシトシン誘発子宮収縮 (in vitro、モルモット)、輸精管の収縮及びノルエピネフリン誘発輸精管収縮 (in vitro、ラット) に対して影響を与えなかった。

消化器系に対する検討では、NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kg の混合物は、総酸分泌を軽度であるが有意に減少させた (in vivo、ラット、十二指腸内投与)。また、炭末の胃排出能と小腸輸送能を軽度ではあるが有意に低下させたが (in vivo、マウス、po)、ガラスビーズの胃排出能 (in vivo、ラット、po)、エタノールによる胃病変 (in vivo、ラット、po) に対して影響を与えなかった。

その他の薬理作用の検討では、NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgの混合物は、血液学的、血液凝固線溶系パラメータ、溶血反応 (in vivo、イヌ、po)、血小板凝集 (ex vivo、イヌ、po) に対して影響を与えなかった。また、肝腎機能及び蛋白代謝の臨床化学的パラメータに対して毒性学的、生物学的に意味のある変化を与えなかった (in vivo、ラット、po)。カラゲニン足浮腫に対して、有意な炎症促進作用及び抗炎症作用を示さなかった (in vivo、ラット、po)。

以上より、臨床推定用量の10から1,000倍以上の範囲のNETとEEの混合物は有意な生物学的作用をほとんど示さないものと考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 NETの効力を裏付ける試験（添付資料 4.2.1.1-1）

(1) 標準バイオアッセイによる検討

標準的に確立されたバイオアッセイの手法を用いて、NETの各種ホルモン様作用（受容体結合能、プロゲステロン様作用、エストロゲン作用、アンドロゲン作用、同化ホルモン作用、抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用及び抗同化ホルモン作用）を検討した。

1) プロゲステロン様作用

a) プロゲステロン受容体結合能

ウサギの子宮由来のP受容体に対するNETの結合親和力は、Pの2.45倍であった。

表 2.6.2.2-1 ウサギ子宮由来プロゲステロン受容体に対する NET の結合親和力(in vitro)

	IC ₅₀ (nM) (平均値±SE) ^{a)}	相対結合親和力 ^{b)}
P	3.22±0.90	1.00
NET	1.31±0.35	2.45

a) IC₅₀ 値は3回の実験の平均値で示した

b) 相対結合親和力はPとNETのIC₅₀の比で表した

b) 妊娠維持作用

妊娠した成熟雌ラットの卵巣を8日目に摘出し、妊娠8～17日の間、NETを皮下投与した。妊娠18日目に開腹し、正常胎児数を計測した。

NETは投与量4.0～5.0 mg/kgの範囲で妊娠維持作用を示したが、より高用量では妊娠維持作用は認められなかった。妊娠維持能力においてNETの4.5 mg/kgは、Pの16.0ないし32.0 mg/kgに相当した。

表 2.6.2.2-2 皮下投与による卵巣摘出ラットでの妊娠維持作用

投与量 (mg/kg)	正常胎児数 (平均値±SE)		
	対照群	P (sc)	NET (sc)
0(摘出)	0		
0(非摘出)	12.2±0.5		
3.0			0
4.0			4.8±1.0
4.5			6.4±2.0
5.0			3.1±1.5
6.7			0
8.0		1.9±1.1	0
16.0		5.9±1.7	0
32.0		5.6±1.6	

(n=8)

2) エストロゲン作用

a) 腔角化促進作用（腔スメア法）

卵巣摘出後1週間以上経過した成熟雌ラットに、NETを2日間経口投与した後、3日及び4日目に腔洗浄液中の角化細胞数を計測した。

NET 20.0 mg/kg 投与群で、80%のラットにおいて角化細胞が認められた。

表 2.6.2.2-3 成熟卵巣摘出ラットにおける腔角化促進作用

投与量 (mg/kg)	角化を認めたラット数/全ラット数
対照群	0/10
2.0	0/10
20.0	8/10

3) アンδροゲン作用及び同化ホルモン作用

精巣摘出した幼若雄ラットに、NET を 7 日間経口投与した後、腹側前立腺及び肛門挙筋重量を測定した。

20.0 mg/kg 投与群において、有意な変化は認められなかった。

表 2.6.2.2-4 去勢幼若雄ラットにおけるアンδροゲン作用及び同化ホルモン作用

投与量 (mg/kg)	臓器重量 (mg) (平均値±SE)	
	腹側前立腺	肛門挙筋
対照群	12.8±0.9	23.4±1.5
20.0	15.7±1.2	24.6±1.8

(n=10)

4) 抗エストロゲン作用

卵巣摘出後1週間以上経過した成熟雌ラットに、NETとE2を4日間同時投与した後、腔細胞診を行った。

同時投与群とE2単独投与群との間で、角化を認めたラット数に差は見られず、NETは50.0～150.0 mg/kgの範囲で、E2のエストロゲン作用に対して拮抗作用を有さないと考えられた。

一方、PとE2の同時投与では、角化を認めたラット数がPの用量に依存して減少した。

表 2.6.2.2-5 成熟卵巣摘出ラットにおけるエストラジオールによる腔角化に対する抑制作用

投与量 (mg/kg)	角化を認めたラット数/総ラット数			
	対照群	E2	P+E2 (0.5 µg/kg)	NET+E2 (0.5 µg/kg)
0	0/10			
0.0005		10/10		
2.0			10/10	
5.0			6/10	
10.0			1/10	
25.0			0/10	
50.0				5/5
100.0				10/10
150.0				10/10
ED ₅₀ (mg/kg) (95% 信頼区間)			5.7 (3.9～7.7)	

ED₅₀ was calculated using a probit analysis. (NET : po, E2 and P : sc)

5) 抗アンδροゲン作用及び抗同化ホルモン作用

精巣摘出した幼若雄ラットに対し、NETとプロピオン酸テストステロン (TP) を7日間同時投与した後、腹側前立腺及び肛門挙筋の重量を測定した。

併用投与群とTP単独投与群の間に、いずれの臓器重量にも差はみられず、NET 20.0 mg/kgは、アンδροゲン作用及び同化ホルモン作用に対して拮抗作用を有さないと考えられた。

表 2.6.2.2-6 去勢幼若雄ラットにおける抗アンドロゲン作用及び抗同化ホルモン作用

投与量 (mg/kg)	臓器重量 (mg) (平均値±SE)	
	腹側前立腺	肛門挙筋
対照群	12.8±0.9	23.4±1.5
TP (2.8)	77.8±5.1*	46.2±2.3*
TP + NET (2.8 + 20.0)	78.4±5.3*	47.5±2.6*

(NET : po, TP : sc). *: P<0.05 (一元配置分散分析及びFisher's 最小有意差検定) (n=10)

(2) 内分泌機能への影響

1) 臓器重量

成熟雌ラットにNETを7日間経口投与した後、8日目に卵巣、子宮、副腎、甲状腺及び脳下垂体重量を測定した。

20.0 mg/kg/日投与群で卵巣重量の減少、また0.2 mg/kg/日投与群で甲状腺重量の増加が認められた。子宮、副腎及び脳下垂体重量には有意な変化は認められなかった。

表 2.6.2.2-7 雌ラットにおける臓器重量への影響

投与量 (mg/kg/日)	臓器重量 (mg) (平均値±SE)				
	卵巣	子宮	副腎	甲状腺	脳下垂体
対照群	89.4±2.4	425.9±18.9	82.8±1.2	18.9±1.0	12.1±0.4
0.2	93.2±3.2	492.4±24.0	82.9±3.3	23.1±1.0*	12.0±0.4
2.0	89.6±4.3	474.8±21.5	81.8±3.8	21.4±1.0	11.7±0.5
20.0	70.5±2.6*	402.2±15.9	87.3±3.4	21.3±1.0	11.0±0.4

*: P<0.05 (Dunnett's t-test) (n=11~12)

2) 血清ホルモン濃度

成熟雌ラットにNETを7日間経口投与した後、8日目に血清中のLH、FSH、プロラクチン (PRL)、E2、P、コルチコステロン及び甲状腺ホルモン (T₃、T₄) を測定した。

0.2 mg/kg/日投与群で遊離T₄の有意な減少、20.0 mg/kg/日投与群でFSH、遊離T₄、総T₃、遊離T₃の有意な減少及びE2、Pの有意な増加がみられた。LH、コルチコステロン、PRL及び総T₄には有意な変化は認められなかった。高用量群に認められた甲状腺ホルモンの減少は甲状腺の萎縮による機能低下によるものと考えられた。

表 2.6.2.2-8 雌ラットにおける血清中ホルモン濃度への影響(1)

投与量 (mg/kg/日)	LH (ng/mL)	FSH (ng/mL)	PRL (ng/mL)	E2 (pg/mL)	P (ng/mL)
対照群	0.10±0.05	19.1±0.7	6.6±2.0	12.9±0.7	14.9±1.5
0.2	0.09±0.00	18.8±0.8	2.2±0.5	11.8±1.6	12.5±0.8
2.0	0.12±0.02	17.6±0.5	4.5±0.9	34.2±2.9	11.8±1.0
20.0	0.08±0.00	16.9±0.5*	4.2±1.0	89.9±12.6*	44.6±9.0*

*: P<0.05 (Dunnett's t-test). 平均値±SE (n=11~12)

表 2.6.2.2-8 雌ラットにおける血清中ホルモン濃度への影響(2)

投与量 (mg/kg/日)	コルチコステロン (ng/mL)	総T ₃ (ng/dL)	遊離T ₃ (pmol/L)	総T ₄ (μg/dL)	遊離T ₄ (pmol/mL)
対照群	107.7±41.5	82.1±7.6	4.0±0.2	4.5±0.3	70.1±3.2
0.2	219.5±52.4	59.5±4.9	3.6±0.4	3.9±0.6	54.3±2.9*
2.0	175.5±47.3	62.4±8.4	4.4±0.4	4.8±0.7	62.7±3.2
20.0	170.1±38.1	39.0±7.6*	2.5±0.3*	3.9±0.7	53.6±2.6*

*: P<0.05 (Dunnett's t-test). 平均値±SE (n=10~12)

(3) 生殖機能に及ぼす影響

1) 排卵

a) ラット

正常な発情周期を有する成熟雌ラットに対して、NETを発情後期、発情間期、発情前期の3日間経口投与し、4日目に卵管中の卵の有無を顕微鏡下で観察した。

NETは用量依存的に排卵を抑制し、そのED₅₀は55.43 mg/kgであった。

表 2.6.2.2-9 成熟雌ラットにおける排卵に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)	排卵を認めたラット数/総ラット数	
	P (sc)	NET (po)
0.5	9/10	
1	5/10	
2	1/10	
5	0/10	
25		9/10
50		5/10
100		3/10
150		0/10
ED ₅₀ (mg/kg) (95%信頼区間)	1.00 (0.70~1.40)	55.43 (37.34~76.71)

ED₅₀ was calculated using a probit analysis.

b) ウサギ

成熟雌ウサギに、NETを単回経口投与した翌日に交配させ、その翌日に排卵の指標として卵巣内の黄体の有無を観察した。

NETは用量依存的にウサギの排卵を抑制し、そのED₅₀は1.13 mg/kgであった。

表 2.6.2.2-10 成熟雌ウサギの排卵に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)	排卵を認めたウサギ数/総ウサギ数	
	P (sc)	NET (po)
0.016	10/10	
0.062	5/10	
0.250	1/10	8/10
0.5		4/10
1.0		7/10
2.0		5/10
4.0		2/10
8.0		3/10
16.0		0/10
ED ₅₀ (mg/kg) (95%信頼区間)	0.074 (0.04~0.13)	1.13 (0.41~2.27)

ED₅₀ was calculated using a probit analysis.

2) 卵輸送

成熟雌ラットに対し、妊娠1日目より3日間NETを経口投与した後、妊娠3日目と6日目に卵管及び子宮内の卵数を観察した。

20.0 mg/kg/日投与により、卵管及び子宮内の卵数は有意に減少しており、卵輸送速度が促進されたと考えられた。

表 2.6.2.2-11 成熟雌ラットにおける卵輸送に及ぼす影響

投与量 (mg/kg/日)	観察日	卵を認めたラット数/ 全ラット数	卵の位置	
			卵管内	子宮内
対照群	3日目	10/10	94	7
20.0	3日目	1/10	9*	0
対照群	6日目	10/10	0	97
20.0	6日目	0/10	0	0*

*: P<0.05 (Dunnett's *t*-test)

3) 着床

成熟雌ラットに対して妊娠第1日目から6日間NETを経口投与した後、妊娠第11日目に子宮内の着床の状態を調べた。

20.0 mg/kg/日投与群では、全例において着床阻害が認められた。

表 2.6.2.2-12 妊娠ラットにおける卵の局在に及ぼす影響

投与量 (mg/kg/日)	着床を認めたラット数 /全ラット数	1匹あたりの着床部位数 (平均値±SE)
対照群	10/10	14.5±0.4
0.2	10/10	14.6±0.6
2.0	9/10	12.3±2.1
20.0	0/10 ⁺	0*

+: P<0.05 (Chi-squared test), *: P<0.05 (Dunnett's *t*-test)

4) 発情周期

正常な発情周期を有する成熟雌ラットに対して、発情後期より7日間NETを経口投与した後、8日目に膣細胞診を行った。

NET投与群では、用量依存的に発情休止期様の細胞像を呈する個体数が増加しており、正常な発情周期が阻害されていた。

表 2.6.2.2-13 成熟雌ラットにおける発情周期に及ぼす影響

投与量 (mg/kg/日)	正常細胞像を呈したラット数/全ラット数
対照群	12/12
0.2	10/11
2.0	7/12
20.0	0/12

5) 乳汁分泌

妊娠ラットの分娩後、2日～16日の間NETを連日経口投与した。分娩後14日目と16日目に、母ラットにオキシトシン1 USP単位を皮下投与した後、児ラットに30分間授乳させ、授乳前後の体重差から乳汁分泌量を推定した。その結果、分娩後14日目及び16日目ともに体重差は用量依存的に減少しており、乳汁分泌の抑制が認められた。

表 2.6.2.2-14 ラットの乳汁分泌量に対する影響

投与量 (mg/kg/日)	授乳前後での体重差 (平均値±SE)	
	分娩後 14 日目	分娩後 16 日目
対照群	11.64±0.94	13.00±0.65
0.2	10.08±0.61	11.00±0.59
2.0	9.50±0.80	8.25±0.79*
20.0	6.91±1.47*	6.45±1.26*

*: P<0.01 (n=11~12)

2.6.2.2.2 EEの効力を裏付ける試験

(1) 標準バイオアッセイによる検討

1) エストロゲン作用 (添付資料 4.2.1.1-1)

a) エストロゲン受容体結合能

ウサギの子宮由来のエストロゲン受容体に対するEEの結合親和力は、E2の1.10倍であった。

表 2.6.2.2-15 ウサギ子宮由来エストロゲン受容体に対するEEの結合親和力(in vitro)

	IC ₅₀ (nM) (平均値±SE) ^{a)}	相対結合親和力 ^{b)}
E2	2.53±0.63	1.00
EE	2.30±0.96	1.10

a) IC₅₀ 値は3～5回の実験の平均値で表した

b) 相対結合親和力はE2とEEのIC₅₀の比で表した

b) 腔角化促進作用 (腔スミア法)

卵巣摘出後1週間以上経過した成熟雌ラットに、EEを2日間経口投与した後、3日及び4日目に腔洗浄液中の角化細胞数を計測した。

EEは25 µg/kg/日投与群で30%、50 µg/kg投与群で90%のラットにおいて角化細胞が認められた。EEのED₅₀は31 µg/kgであった。

表 2.6.2.2-16 成熟卵巣摘出ラットにおける腔角化促進作用

投与量 (µg/kg)	角化を認めたラット数/全ラット数
対照群	0/10
12.5	0/10
25.0	3/10
50.0	9/10
ED ₅₀ (µg/kg) (95%信頼区間)	31 (23~41)

ED₅₀ was calculated using a probit analysis.

2) アンドロゲン作用及び同化ホルモン作用 (添付資料 4.2.1.1-2)

幼若雄ラットにEEを10日間経口投与した後、腹側前立腺、精囊及び肛門挙筋重量を測定した。

EEの12.0 mg/rat投与において、有意な変化は認められなかった。

表 2.6.2.2-17 去勢幼若雄ラットにおけるアンドロゲン作用及び同化ホルモン作用

投与量(mg/rat)	組織重量 (mg) (平均値)			
	動物数	腹側前立腺	精囊	肛門挙筋
対照群	a)	9.5	8.0	23.0
0.6	5	9.1	6.8	27.7
12.0	5	10.7	10.8	25.3

a) Historical Data

3) 抗エストロゲン作用 (添付資料 4.2.1.1-2)

幼若雌マウスに、エストロンとEEを3日間経口投与した。最終投与翌日に子宮重量を測定した。

エストロンによって増加した子宮重量に対して、EEは50～10,000 µg/mouseの用量で用量相関性のない抑制効果を示したが、これはEEが抗エストロゲン作用を有するのではなく、強力なエストロゲン作用を有するEEの過剰量の投与により、子宮の重量増加がむしろ抑制されたものと考えられた。

表 2.6.2.2-18 幼若マウスにおける抗エストロゲン作用

	用量 (μ g/mouse)		動物数	子宮重量 (mg) (平均値)
	EE	エストロン		
溶媒対照	0	0	10	13.6
対照群	0	0.32	8	49.5
EE	50	0.32	8	32.0
EE	1,000	0.32	8	37.1
EE	10,000	0.32	8	40.6
EE	10,000	0	8	25.7

4) 抗アンドロゲン作用 (添付資料 4.2.1.1-2)

精巣摘出した幼若雄ラットに対し、EEとテストステロン (T) を7日間皮下投与した後、腹側前立腺及び精囊の重量を測定した。

Tを単独投与した群では、前立腺、精囊の重量が、溶媒投与群に比べそれぞれ約7倍及び約9倍に増加した。TとEEを併用投与した群では、Tの臓器重量増加反応に対して3~18%の弱い抑制が認められた。用量相関性もないことから、EEは抗アンドロゲン作用を示さないと考えられた。

表 2.6.2.2-19 去勢幼若雄ラットにおける抗アンドロゲン作用

	用量 (mg/rat)		動物数	組織重量 (mg) (平均値)	
	EE	T		腹側前立腺	精囊
溶媒対照	0	0	10	11.7	8.9
対照群	0	2.4	10	83.3	77.7
EE	0.5	2.4	10	70.7	74.3
EE	2	2.4	10	77.7	80.2
EE	10	2.4	10	81.0	81.5

(2) 内分泌機能への影響 (添付資料 4.2.1.1-1)

1) 臓器重量

成熟雌ラットに、EEを発情後期より7日間経口投与した後、8日目に卵巣、子宮、副腎、甲状腺及び脳下垂体重量を測定した。

0.7 mg/kg/日投与群で卵巣重量の減少が認められた。子宮、副腎、甲状腺及び脳下垂体重量には有意な変化は認められなかった。

表 2.6.2.2-20 雌ラットにおける臓器重量への影響

投与量 (mg/kg/日)	臓器重量 (mg)				
	卵巣	子宮	副腎	甲状腺	脳下垂体
対照群	89.4 $\pm$ 2.4	425.9 $\pm$ 18.9	82.8 $\pm$ 1.2	18.9 $\pm$ 1.0	12.1 $\pm$ 0.4
0.007	95.0 $\pm$ 2.7	464.5 $\pm$ 19.2	82.2 $\pm$ 2.9	19.6 $\pm$ 0.9	11.4 $\pm$ 0.5
0.07	87.4 $\pm$ 3.6	435.8 $\pm$ 23.2	79.6 $\pm$ 2.7	18.2 $\pm$ 0.6	11.2 $\pm$ 0.4
0.7	73.7 $\pm$ 3.5*	418.8 $\pm$ 13.0	77.2 $\pm$ 4.0	20.2 $\pm$ 1.0	13.4 $\pm$ 0.5

*: P<0.05 (Dunnett's t-test). 平均値 $\pm$ SE (n=10~12)

2) 血清ホルモン濃度

成熟雌ラットにEEを7日間連続経口投与した後、8日目に血清中のLH、FSH、PRL、E2、P、コルチコステロン及び甲状腺ホルモン (T₃、T₄) を測定した。

0.07 mg/kg/日投与群でLHの有意な増加、0.7 mg/kg/日投与群でFSH、総T₃、遊離T₃の減少及びPの有意な増加がみられた。PRL、E2、コルチコステロン、総T₄、遊離T₄に有意な変化は認められなかった。高用量群に認められた甲状腺ホルモンの減少は甲状腺の萎縮による機能低下によるものと考えられた。

表 2.6.2.2-21 雌ラットにおける血清中ホルモン濃度への影響(1)

投与量 (mg/kg/日)	LH (ng/mL)	FSH (ng/mL)	PRL (ng/mL)	E2 (pg/mL)	P (ng/mL)
対照群	0.10±0.05	19.1±0.7	6.6±2.0	12.9±0.7	14.9±1.5
0.007	0.16±0.03	17.6±0.4	2.2±0.4	34.4±8.8	17.6±2.5
0.07	0.23±0.05*	17.3±0.4	2.2±0.4	30.2±3.3	12.2±1.3
0.7	0.08±0.00	16.4±0.2*	10.8±3.1	29.0±5.2	35.4±6.0*

*: P<0.05 (Dunnett's *t*-test). 平均値±SE (n=11~12)

表 2.6.2.2-21 雌ラットにおける血清中ホルモン濃度への影響(2)

投与量 (mg/kg/日)	コルチコステロ ン (ng/mL)	総T ₃ (ng/dL)	遊離T ₃ (pmol/L)	総T ₄ (μg/dL)	遊離T ₄ (pmol/mL)
対照群	107.7±41.5	82.1±7.6	4.0±0.2	4.5±0.3	70.1±3.2
0.007	174.6±77.0	72.1±7.9	4.0±0.2	4.8±0.7	73.3±2.6
0.07	202.0±44.0	57.6±8.4	3.1±0.2	4.8±0.3	63.8±2.7
0.7	114.6±31.1	37.8±5.9*	2.3±0.2*	5.3±0.6	66.1±3.5

*: P<0.05 (Dunnett's *t*-test). 平均値±SE (n=10~12)

(3) 生殖機能に及ぼす影響 (添付資料 4.2.1.1-1)

1) 排卵

a) ラット

正常な発情周期を有する成熟雌ラットに対して、EEを発情後期、発情間期、発情前期の3日間経口投与し、4日目に卵管中の卵の有無を顕微鏡下で観察した。

EEは排卵を抑制し、そのED₅₀は1.42 mg/kgであった。

表 2.6.2.2-22 成熟雌ラットにおける排卵に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)	排卵を認めたラット数/総ラット数
0.25	7/10
0.5	8/10
1.0	4/10
2.0	5/10
5.0	6/10
15.0	0/10
25.0	0/10
ED ₅₀ (mg/kg) (95%信頼区間)	1.42 (0.03~11.64)

ED₅₀ was calculated using a probit analysis.

b) ウサギ

成熟雌ウサギに、EEを単回経口投与した翌日に交配させ、その翌日に排卵の指標として卵巣内の黄体の有無を観察した。

EEは用量依存的にウサギの排卵を抑制し、そのED₅₀は7.84 mg/kgであった。

表 2.6.2.2-23 成熟雌ウサギにおける排卵に及ぼす影響

投与量 (mg/kg)	排卵を認めたウサギ数/総ウサギ数
2.0	9/10
4.0	6/10
8.0	4/10
16.0	4/10
ED ₅₀ (mg/kg) (95%信頼区間)	7.84 (3.85~41.2)

ED₅₀ was calculated using a probit analysis.

2) 卵輸送

成熟雌ラットに対し、妊娠1日目より3日間EEを経口投与した後、妊娠3日目と6日目に卵管及び子宮内の卵数を観察した。

0.7 mg/kg/日投与により、卵管及び子宮内の卵数は有意に減少しており、卵輸送速度が促進されたと考えられた。

表 2.6.2.2-24 成熟雌ラットにおける卵輸送に及ぼす影響

投与量 (mg/kg/日)	観察日	卵を認めたラット数/ 全ラット数	卵の位置	
			卵管内	子宮内
対照群	3日目	10/10	94	7
0.7	3日目	3/10	3*	2
対照群	6日目	10/10	0	97
0.7	6日目	0/10	0	0*

*: $P < 0.05$ (Dunnett's t -test)

3) 着床

成熟雌ラットに対して妊娠第1日目から6日間EEを経口投与した後、妊娠第11日目に子宮内の着床の状態を調べた。

0.07及び0.7 mg/kg/日投与群で着床阻害が認められた。

表 2.6.2.2-25 妊娠ラットにおける卵の局在に及ぼす影響

投与量 (mg/kg/日)	着床を認めたラット数 /全ラット数	1匹あたりの着床部位数 (平均値±SE)
対照群	10/10	14.5±0.4
0.007	10/10	14.4±1.0
0.07	7/10	4.9±1.4*
0.7	0/10 ⁺	0*

+ : $P < 0.05$ (Chi-squared test), * : $P < 0.05$ (Dunnett's t -test)

4) 発情周期

正常な発情周期を有する成熟雌ラットに対して、発情後期より7日間EEを経口投与した後、8日目に膣細胞診を行った。

EE投与群では、用量依存的に発情休止期様の細胞像を呈する個体数が増加しており、正常な発情周期が阻害された。

表 2.6.2.2-26 成熟雌ラットにおける発情周期に及ぼす影響

投与量(mg/kg/日)	正常細胞像を呈したラット数/全ラット数
対照群	12/12
0.007	9/12
0.07	4/12
0.7	0/12

2.6.2.2.3 作用機序

本剤の有効成分であるNET及びEEは、以下に示す薬理作用に基づき、月経困難症の改善をもたらすと考えられた。

- ① 視床下部、脳下垂体に作用し、Gn の産生・分泌を抑制し、排卵を抑制する。同時に内因性の性ホルモンの周期的な変動を抑制し、子宮内膜の増殖を抑制する
- ② 子宮内膜のアポトーシスを誘導し、内膜組織を萎縮させることにより、子宮内膜の増殖を抑制する。
- ③ 子宮内膜の増殖抑制に伴う PG の産生抑制により、子宮平滑筋収縮及び神経末端刺激を抑制する

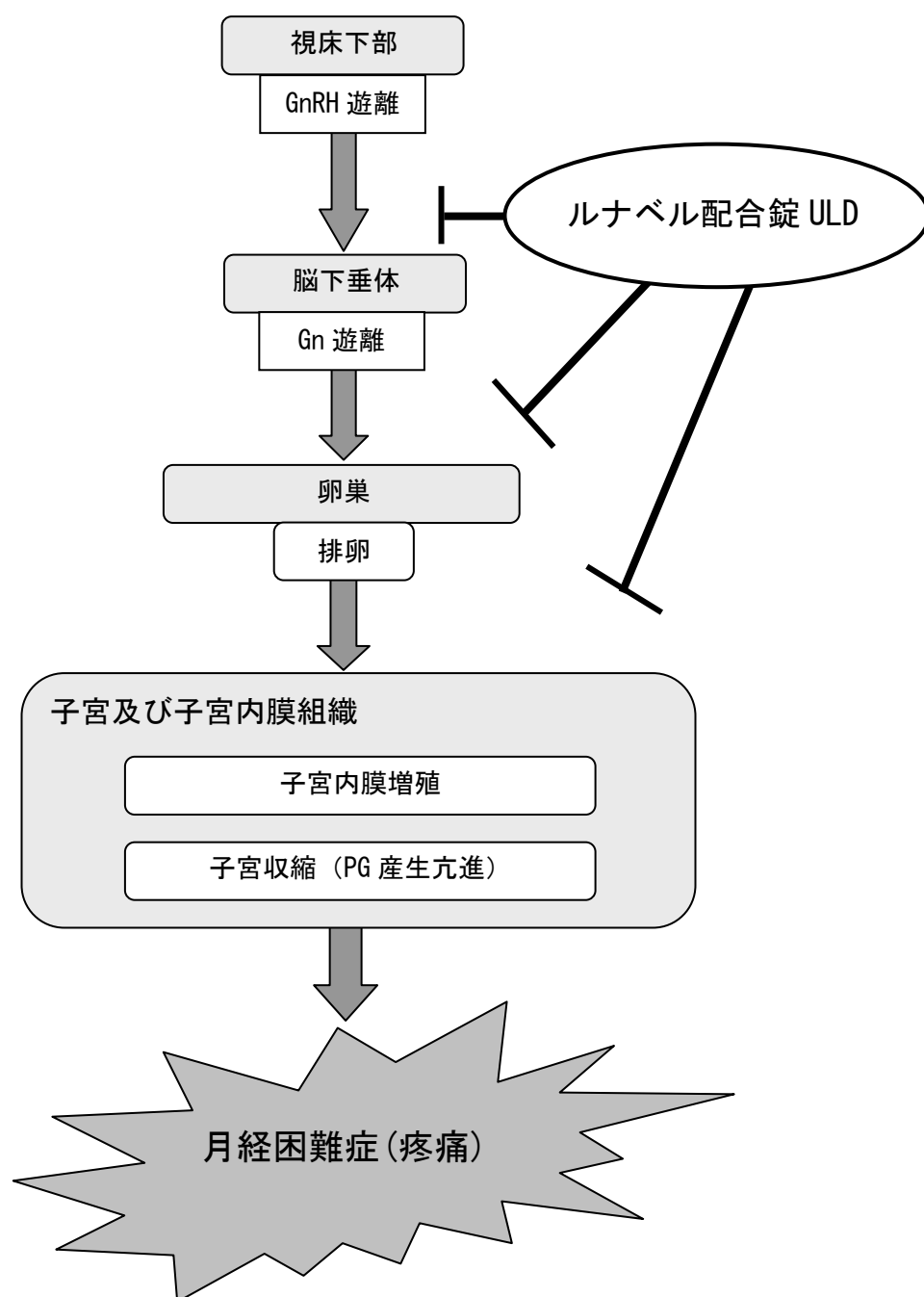


図 2.6.2.2-1 月経困難症に対する本剤の作用機序

2.6.2.3 副次的薬理試験

実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験（添付資料 4.2.1.3-1）

NETとEEの20:1の混合物（以下、「混合物」という）を用いて検討した。臨床推定用量の10倍から1,000倍の高用量が生体に対してどのような影響を及ぼすかを、*in vitro*及び*in vivo*の薬理学的試験系で検討した。すなわち*in vitro*試験では血中濃度の少なくとも1,000倍のNET 1×10^{-6} M + EE 5×10^{-8} Mを最高濃度とした。*in vivo*試験では、臨床用量の1,000倍以上と考えられるNET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgを用いた。*in vivo*試験における測定は投与後2時間に行ったが、これは経口投与後の最大血中濃度がほぼこの時間であるためである。

なお、本剤（NET 1 mg + EE 0.02 mg）の配合比はNET:EE=50:1であり、それぞれの含量（%）は以下に示す通りである。EEの含量は、配合比50:1の場合、1.96%であるが、20:1では4.76%と含量が高くなることから、20:1の配合比の試験成績を使用しても安全性薬理の評価に問題はないと判断した。

配合比 (NET:EE)	NET含量 (%)	EE含量 (%)	合計 (%)
20:1	95.24	4.76	100.0
50:1	98.04	1.96	100.0

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

(1) 一般症状・自発運動に対する作用

マウスの一般症状に対する混合物の作用について、Irwinの観察チェックリストに準じて検討した。マウスの中枢抑制作用（自発運動量、催眠又は運動失調を含む）又は中枢刺激作用（振戦、攣縮、痙攣を含む）を観察した。自発運動及び症状を肉眼的に観察し、溶媒投与群と比較した。協調運動、筋弛緩、カタレプシー及び麻酔に対する作用を検討した。骨格筋弛緩作用は、軀幹筋状態、皮膚の柔軟性、後肢における伸展反射の筋緊張度を触覚評価した。鎮痛作用は最大30秒間、尾を挟むことにより評価した。自律神経系に対する作用は瞳孔径、下痢、排尿、眼瞼下垂の有無、眼球突出、流涙、流涎、立毛、耳介血管の拡張又は末梢蒼白などにより評価した。触覚、跳上反射、正向反射についても評価した。

雌 Swiss-derived (18~20 g) マウスを使用前18時間絶食させて用いた。混合物は、0.5 w/v% カルボキシメチルセルロース (CMC) を溶媒として用いて経口投与した。まず、投与90から120分の間に刺激を与える試験を行った。その後、投与4時間後まで観察した。投与24時間まで遅延性の反応と予備的な毒性所見の観察を行った。瞳孔径に対する作用については、Dunnettの両側検定により比較した。

溶媒投与群と比較して判定すると、混合物投与群はマウスの一般症状に対して影響を与えなかった。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の経口投与群では、顕著な中枢神経系の抑制を示した (表 2.6.2.4-1)。ペントバルビタールの作用は、投与後15分以内に発現し、4時間以上持続した。ペントバルビタール投与群において、投与90から120分の間に観察した瞳孔径は、溶媒投与群に比較して小さかった。混合物投与群では、投与90から120分後の間又は4時間後に観察した瞳孔径は溶媒投与群と異ならなかった (表 2.6.2.4-2)。

表 2.6.2.4-1 マウスの一般症状・自発運動に及ぼす影響

Observed response	No. of mice exhibiting the response	
	Treatment (mg/kg, po)	
	Sodium Pentobarbital (50)	NET (20)+EE (1)
Decreased open field activity	12	0
Palpebral ptosis	12	0
Abnormal posture (hind limbs splayed)	12	0
Locomotor ataxia	12	0
Loss of skin plasticity	12	0
Soft body tone	12	0
Decreased extensor reflex/limb tone	11	0
Decreased flexor withdrawal	11	0
Decreased startle reflex	12	0
Impairment of vertical screen performance	11	0
Impairment of horizontal screen performance	11	0
Loss of corneal reflex	11	0
Loss of pinna reflex	5	0
Analgesia vs tail pinch	11	0
Loss of righting reflex	11	0

(n=12)

表 2.6.2.4-2 NET と EE 混合物のマウスの瞳孔径に及ぼす影響

Treatment (mg/kg, po)	Pupil size (mm)	
	Time after administration (min)	
	90 to 120	240
Vehicle	0.4±0.0	0.4±0.0
NET (20) + EE (1)	0.4±0.0	0.4±0.0
Sodium pentobarbital (50)	0.2±0.0*	0.4±0.0

*: Different from the vehicle group (p<0.05). 平均値±SE (n=12)

(2) 協調運動

Dunham and Miya の方法により検討した。雌 Swiss-derived マウスを 16 rpm の回転棒 (rotarod) 上で訓練し、60 秒間 rotarod 上で歩行できるものを選別し使用した。選別したマウス (18-20 g) を使用前 18 時間絶食させた。試験前に 1 分間使用前テストを行った後、NET と EE の混合物又は溶媒 (0.5%CMC) を経口投与した。薬物投与 120 分後に協調運動抑制作用の有無を見た。他の群にはペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg、経口) を投与し、60 分後に同様に試験した。薬物投与群及び溶媒投与群における協調運動抑制が発現した動物数を、Fisher's exact test の両側検定を用い比較した。

溶媒投与群と比較して混合物投与群では、マウスの rotarod で測定した協調運動に対して影響を認めなかった。一方、ペントバルビタールナトリウム投与群では、rotarod で測定した協調運動に対して抑制を示した (表 2.6.2.4-3)。

表 2.6.2.4-3 NET と EE 混合物のマウス協調運動に及ぼす影響

Treatment (mg/kg, po)	n	No. of mice with rotarod impairment
Vehicle	12	1
NET (20) + EE (1)	12	1
Sodium pentobarbital (50)	12	11*

*: Different from the vehicle group (p<0.001).

(3) ヘキソバルビタール誘発麻酔時間

混合物のヘキソバルビタールによる麻酔に与える作用について、雌 Swiss-derived マウス (18～20 g) を使用前 18 時間絶食させて検討した。マウスをヘキソバルビタール 70 mg/kg の腹腔内投与の 120 分前に、NET と EE の混合物又は溶媒 (0.5%CMC) を経口投与した。対照群には、ヘキソバルビタール投与 60 分前に、塩酸クロルジアゼポキサイド (10 mg/kg) を経口投与した。正向反射の消失までの時間及び正向反射復活までの時間を記録した。薬物投与群と溶媒投与群の麻酔時間を Dunnett の両側検定により比較した。

溶媒投与群と比較して混合物投与群では、マウスのヘキソバルビタールによる麻酔時間に対して影響を認めなかった。一方、クロルジアゼポキサイド投与群では、ヘキソバルビタールによる麻酔時間を延長した (表 2.6.2.4-4)。

表 2.6.2.4-4 NET と EE 混合物のヘキソバルビタールによるマウスの麻酔時間に及ぼす影響

Treatment (mg/kg, po)	Sleep time (min)
Vehicle	40.6±7.7
NET (20) + EE (1)	56.7±8.5
Chlordiazepoxide HCl (10)	135.0±4.7*

*: Different from the vehicle group ($p<0.05$). 平均値±SE (n=12)

(4) 抗痙攣作用

ペンチレンテトラゾールによる痙攣に対する作用を Swinyard の方法にて検討した。雌 Swiss-derived マウス (18～20 g) を使用前 18 時間絶食させた。ペンチレンテトラゾール 125 mg/kg 皮下投与の 120 分前に、混合物又は溶媒 (0.5%CMC) を経口投与した。対照群には、ペンチレンテトラゾール投与 60 分前にクロルジアゼポキサイド (10 mg/kg) を経口投与した。各マウスの痙攣の有無を 30 分間観察した。ペンチレンテトラゾールによる痙攣は、間代性と強直性の混合型であった。溶媒投与群の痙攣発現動物数と比較して、薬物投与群での痙攣抑制 (痙攣遮断) を示した動物数が有意 ($p<0.05$, Fisher's exact test の両側検定) の場合に陽性と判定した。

溶媒投与群と比較して混合物投与群では、ペンチレンテトラゾールによる痙攣に対して影響は認められなかった。一方、クロルジアゼポキサイド投与群はペンチレンテトラゾールによる痙攣を抑制した (表 2.6.2.4-5)。

表 2.6.2.4-5 NET と EE 混合物のペンチレンテトラゾール痙攣に及ぼす影響

Treatment (mg/kg, po)	n	No. of animals exhibiting convulsions	
		Clonic	Tonic
Vehicle	12	12	12
NET (20) + EE (1)	12	12	12
Chlordiazepoxide HCl (10)	12	0*	0*

*: Different from the vehicle group ($p<0.001$).

(5) 鎮痛作用

混合物の酢酸誘発腹部攣縮 (ライジング) に対する作用を、Taber らの方法にて検討した。雌 Swiss-derived マウス (18～19 g) を使用前 18 時間絶食させて用いた。0.6% (v/v) 酢酸の腹腔内投与の 120 分前に混合物又は溶媒を経口投与した。対照群には、酢酸投与 60 分前にアセチルサリチル酸 (250 mg/kg) を経口投与した。酢酸投与 10 分後より 5 分間、各動物の腹部攣縮数を計測した。腹部攣縮反応には背中を完全にまるくしたもの、骨盤の回転及び後肢の伸展を示したものも含めた。薬物投与による反応は、溶媒投与群の反応に対し、Dunnett の両側検定により比較した。

溶媒投与群と比較して混合物低用量投与群では、マウスの酢酸投与によるライジングに対して影響が認められなかった。一方、混合物高用量投与群とアセチルサリチル酸投与群では有意な抑制作用が認められた（表 2.6.2.4-6）。

表 2.6.2.4-6 NET と EE 混合物の酢酸ライジング反応に及ぼす影響

Treatment (mg/kg, po)	No. of writhes
Vehicle	16.4±1.1
NET (2) + EE (0.1)	14.3±1.2
NET (20) + EE (1)	10.4±1.2*
Acetylsalicylic acid (250)	1.8±0.8*

*: Different from the vehicle group (p<0.05). 平均値±SE (n=12)

(6) 脊髄反射

混合物の脊髄反射に及ぼす影響を Berger の変法により検討した。一夜絶食した雌ネコ（2.0～2.2 kg）を使用した。麻酔はフローセンの吸入により導入し、 α -クロラロース（55 mg/kg）の静注により維持した。気道確保のため気管内挿管を行い、血圧のモニターのために頸動脈にカテーテルを挿入した。左大腿神経及び坐骨神経の膝腱分岐部を露出した。ネコを背屈位に固定し、右大腿部末梢にドリルで穴を開け、棒を通し固定した。膝蓋、アキレス腱につないだ絹糸を force displacement transducer に接続し、骨を断続的に叩き、脚の等張性伸縮（膝蓋反射）を測定した。左坐骨神経を単離し、脛骨及び腓骨分岐部を露出した。脛骨神経を腓骨神経との結合部より約 4 cm 遠方で結紮し、結紮部より遠方を切断した。踵と脚先の間の肢中央端の骨節にボーンクリバーを取り付け、脛骨前方筋（屈筋）の腱を結節上で絹糸にて結紮した。糸先を force displacement transducer に接続し、等尺性筋収縮をポリグラフ上に記録した。腓骨神経及び脛骨神経の中央より、白金電極を用い一定条件（1 pulse/5 sec、5 msec duration）で電気刺激した。両神経とも温めたミネラルオイルの中に漬け、37 から 38℃に保持した。

混合物（NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kg）又は溶媒（0.5%CMC）の十二指腸内投与前及び 2 時間後に脛骨神経を刺激し、屈筋の収縮を記録した。また、対側脚の膝蓋腱を薬物投与前後に断続的に叩き、膝蓋反射を観察した。同側の屈筋の反射が遮断された場合（又は、対側の伸筋反射があった場合）、薬物が陽性反応をしたと判定し、これらの多シナプス反射が遮断されない場合は、この標本が十分に反応することを確認するために、メフェネジン（40 mg/kg iv）を投与した。メフェネジンのような、同側の屈筋反射を遮断するか、対側の伸筋を膝蓋反射の遮断を伴わず対側の伸筋に反射を示すものは、Berger が示したように選択的な脊髄の神経伝達抑制作用を有する。実験の最後に、腓骨神経を刺激し伸筋の収縮を確かめ、神経筋の伝達を抑制していないことを確認した。

溶媒又は混合物投与群では、120 分の実験中、同側の多シナプス屈筋反射又は単シナプス膝蓋脊髄反射を遮断しなかった。メフェネジン投与群では、同側の腓腹神経刺激による膝蓋反射又は収縮を遮断することなく、屈筋反射を遮断した。

(7) 体温

混合物の体温に対する作用について、雌 Swiss-derived マウス（18～20 g）を使用 18 時間絶食させて検討した。体温を測定する 120 分前に、NET と EE の混合物又は溶媒（0.5% CMC）を経口投与した。対照群には、メタンスルホン酸テトラベナジン（40 mg/kg、経口）を体温測定の前 60 分前に投与した。直腸温をフレキシブル熱電対プローブにより測定した。溶媒投与群の平均直腸温と薬物投与群との値を Dunnett の両側検定により比較した。

溶媒投与群と比較して混合物投与群では、直腸温に対して影響を与えなかった。一方、テト

ラベナジン投与群では、体温低下作用が認められた（表 2.6.2.4-7）。

表 2.6.2.4-7 NET と EE 混合物のマウス直腸温に及ぼす影響

Treatment (mg/kg, po)	Rectal body temperature (°C)
Vehicle	36.8±0.4
NET (20) + EE (1)	36.5±0.4
Tetrabenazine MeSO ₄ (40)	28.9±0.6*

*: Different from the vehicle group (P<0.05). 平均値±SE (n=12)

(8) 自発脳波

混合物のウサギの皮質脳波に対する影響を一般行動とともに検討した。実験には一夜絶食したウサギ (3.8～4.2 kg) を用いた。ウサギはペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg, ip) で麻酔し、Horovitz と Chow の方法により電極を歯科用アクリル樹脂で頭蓋内に植え込んだ。電極の位置は、次に示す両側脳皮質の数ヶ所とした（対極は前頂部）。前頭感覚領域 (anterior, 8 mm : lateral, 3 mm)、帯状皮質 (posterior, 2 mm : lateral, 2 mm)、頭頂皮質 (posterior, 4 mm : lateral, 8 mm)、後頭皮質 (posterior, 13 mm : lateral, 5 mm)。電極はコネクタに接続し、コネクタを頭骨にアクリル樹脂で固定した。傷口を縫合し、少なくとも 2 週間、回復期間をおいた。被験物質を投与し、電気シールドチャンバー内に動物を入れた。電気シールド及びアースされたケーブルを頭骨に接続し、薬物投与後数回皮質脳波を記録した。測定時には一般行動も観察した。混合物 (NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kg) 又は溶媒 (0.5%CMC) 投与前及び投与後 100～120 分の脳波を比較した。

溶媒投与群と比較して混合物投与群において、投与後 100 から 120 分間の一般行動及び皮質脳波に影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 循環器系に対する作用

(1) フェレットの摘出乳頭筋及び心房

雄フェレット (700～1200 g) の乳頭筋及び心房を摘出し、30 mLのTyrode液を含んだ槽内に懸垂した。乳頭筋は 37℃に、心房は自発拍動数の安定する 32℃に保った。自発拍動数及び等尺性収縮を心房で、等尺性収縮を乳頭筋で測定した。溶媒 (DMSO) 又は混合物を槽内に直接加え、溶媒最終濃度が 1% (v/v)、混合物の最終濃度が NET 10⁻⁶M + EE 5×10⁻⁸Mとなるようにした。測定は 30 分後に行った。溶媒と混合物の作用をStudent'sのt-testで比較した。

フェレット乳頭筋の等尺性収縮に対して混合物は、溶媒と比較して収縮に対して有意な作用を示さなかった（表 2.6.2.4-8）。また、摘出フェレット心房の等尺性収縮及び自発拍動数に対して混合物投与群は、溶媒投与群と比較して有意な作用を示さなかった（表 2.6.2.4-9）。

表 2.6.2.4-8 NET と EE 混合物の摘出乳頭筋の等尺性収縮に及ぼす影響

Treatment	Percent change isometric tension
Vehicle	3±10
NET (10 ⁻⁶ M) + EE (5×10 ⁻⁸ M)	4±2

平均値±SE (n=6)

表 2.6.2.4-9 NET と EE 混合物の摘出心房の等尺性収縮と自発拍動数に及ぼす影響

Treatment	Percent change	
	Twitch tension	Spontaneous rate
Vehicle	-5±6	-3±2
NET (10 ⁻⁶ M) + EE (5×10 ⁻⁸ M)	-6±6	-1±2

平均値±SE (n=6)

(2) 循環動態に与える影響(麻酔下イヌ)

麻酔下の正常イヌの循環動態に、混合物がどのような影響を与えるかを検討した。10匹の雌雑種イヌ(13~19kg)をペントバルビタールナトリウム(30 mg/kg, iv)にて麻酔し、気管内チューブを挿管後、人工呼吸器を用い呼吸調節を行った。右大腿動脈及び静脈にカテーテルを挿入し、収縮期及び拡張期動脈圧(SBP, DBP)を測定した。肋骨下の右腹部を開腹し、十二指腸を露出し薬物投与用のカテーテルを挿入した。バルーンカテーテルを、外頸静脈より右心を経て肺動脈に挿入し、平均肺動脈圧(MPAP)を測定した。トランスデューサー付カテーテルを総頸動脈より左心室に挿入し、左心室拡張末期圧(LVEDP)及び心収縮力の指標である dP/dt_{max} 、 $dP/dt/P_{40}$ の測定を行った。第4肋間にて開胸し、心膜を開き心臓を露出した。上行大動脈を周囲の脂肪組織より剥離し、心拍出量(CO)測定用の電磁血流計プローブを装着した。第II誘導心電図(ECG)及びタコメーターによる心拍数(HR)測定のために針電極を装着した。手術終了後30~60分間、状態を安定させた。

SBP、DBP、心拍数(HR)、左心室拡張末期圧(LVEDP)、左心室圧最大収縮速度(dP/dt_{max})、左心室圧40 mmHg時の dP/dt ($dP/dt/P_{40}$)、CO及びMPAPを測定した。これらのパラメータを用い次式により、以下の項目を算出した。平均動脈圧(MAP) = $(1/3 \text{ SBP} + 2/3 \text{ DBP})$ 、一回拍出量(SV) = $(\text{CO}/\text{HR}) \times 1000$ 、一回仕事量(SW) = $(\text{MAP} - \text{LVEDP}) \times \text{SV}$ 、全末梢血管抵抗(TPR) = $(\text{MAP} - \text{LVEDP}) / \text{CO}$ 、平均肺血管抵抗(MPVR) = $(\text{MPAP} - \text{LVEDP}) / \text{CO}$

薬物投与直前に投与前値を測定した。投与前値に対する変化を、薬物の十二指腸内投与後60及び120分後に測定した。その後、ノルエピネフリン(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iv: bolus)の昇圧反応に対する影響、ヒドララジン(5 mg/kg, id)の降圧反応に対する影響を検討した。薬物投与群と溶媒投与群とのデータの比較は、repeated measures analysisにより検定し、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

両群の投与前値には有意な差はなかった(表2.6.2.4-10)。投与60及び120分後の混合物の作用を表2.6.2.4-11に示した。投与60分後において、混合物は有意な作用を示さなかった。溶媒投与群のDBPが軽度低下し、混合物投与群と有意な差が認められた。投与120分後には、全末梢血管抵抗(TPR)の上昇傾向($37 \pm 17\%$)及び心拍出量(CO)の低下傾向が認められた。しかし、TPR及びCOに対する作用は溶媒投与群と同様の変化であった。心拍数は軽度($-8 \pm 3\%$)減少したが、心電図(第II誘導)に変化の無かったことから、混合物は電気生理的に心臓に影響しないものと考えられた。また、投与120分後の心収縮力、一回拍出量、一回仕事量などの心機能に対するパラメータは、溶媒投与群と差が認められなかった。投与120分後に肺血管抵抗の軽度の上昇が認められたが、この上昇は溶媒投与群と有意な差はなかった(表2.6.2.4-11)。溶媒又は混合物投与による変化を検討後、昇圧剤又は降圧剤に対する反応を検討した。その結果、混合物は、ノルエピネフリンの昇圧反応又はヒドララジンの降圧反応に影響を及ぼさなかった(表2.6.2.4-12)。

表 2.6.2.4-10 正常血圧イヌにおける循環パラメータの投与前値

Parameter	Treatment (mg/kg, id)	
	Vehicle	NET (20) + EE (1)
SBP (mmHg)	128.0±7.8	122.0±11.0
DBP (mmHg)	86.2±7.0	81.4±8.1*
MBP (mmHg)	98.8±7.1	94.4±9.3
HR (beats/min)	143.4±8.6	167.8±13.3
dP/dt _{max} (mmHg/sec)	2711.6±318.9	2759.6±610.8
dP/dt/P ₄₀ (mmHg/sec)	1954.4±204.8	2070.6±258.7
CO (L/min)	1.9±0.1	2.1±0.2
SV (mL/beat)	13.6±0.7	12.5±1.5
SW (mmHg×mL)	1345.2±131.9	1205.4±205.0
TPR (mmHg/L/min)	51.6±5.1	46.0±2.3
MPAP (mmHg)	22.4±2.5	21.8±1.4
MPVR (mmHg/L/min)	11.8±1.5	10.8±0.6

SBP: Systolic arterial blood pressure, DBP: Diastolic arterial blood pressure,
 MBP: Mean arterial blood pressure, HR: Heart rate, dP/dt_{max}: Maximum contractility,
 dP/dt/P₄₀: Contractility at a pressure of 40 mmHg, CO: Cardiac output,
 SV: Stroke volume, SW: Stroke work, TPR: Total peripheral resistance,
 MPAP: Mean pulmonary arterial pressure, MPVR: Mean pulmonary vascular resistance,
 * Significantly different from vehicle group (p<0.05). 平均値±SE (n=5)

表 2.6.2.4-11 NET と EE 混合物投与による正常イヌにおける循環パラメータに及ぼす影響

Parameter	Percent change from baseline			
	Treatment (mg/kg)			
	60 min post-drug		120 min post-drug	
	Vehicle	NET (20)+EE (1)	Vehicle	NET (20)+ EE (1)
SBP (mmHg)	-3±2	1±2	0±4	11±5
DBP (mmHg)	-9±3	1±2*	-5±6	7±6
MBP (mmHg)	-6±3	0±2	-2±6	9±5
HR (beats/min)	-2±1	-5±3	-1±1	-8±3
dP/dt _{max} (mmHg/sec)	5±3	-6±7	-3±7	-13±8
dP/dt/P ₄₀ (mmHg/sec)	9±4	-1±7	2±6	7±6
CO (L/min)	-5±5	3±9	-15±8	-18±6
SV (mL/beat)	-4±5	7±8	-14±6	-11±6
SW (mmHg×mL)	-10±2	8±9	-17±4	-4±5
TPR (mmHg/L/min)	1±8	1±9	19±13	37±17
MPAP (mmHg)	-7±2	1±7	-11±4	13±10
MPVR (mmHg/L/min)	-1±6	2±11	7±6	39±12

SBP: Systolic arterial blood pressure, DBP: Diastolic arterial blood pressure,
 MBP: Mean arterial blood pressure, HR: Heart rate, dP/dt_{max}: Maximum contractility,
 dP/dt/P₄₀: Contractility at a pressure of 40 mmHg, CO: Cardiac output,
 SV: Stroke volume, SW: Stroke work, TPR: Total peripheral resistance,
 MPAP: Mean pulmonary arterial pressure, MPVR: Mean pulmonary vascular resistance.
 * Significantly different from vehicle group (p<0.05). 平均値±SE (n=5)

表 2.6.2.4-12 NET と EE 混合物のノルエピネフリン及びヒドララジンによる循環動態反応に及ぼす影響

Parameter	Percent change from baseline			
	Norepinephrine (1.0 μ g/kg, iv)		Hydralazine (5mg/kg, id)	
	Vehicle	NET (20) +EE (1)	Vehicle	NET (20) +EE (1)
SBP (mmHg)	60 $\pm$ 11*	63 $\pm$ 20*	-23 $\pm$ 5*	-27 $\pm$ 8*
DBP (mmHg)	69 $\pm$ 13*	58 $\pm$ 19*	-41 $\pm$ 5*	-49 $\pm$ 5*
MBP (mmHg)	65 $\pm$ 13*	60 $\pm$ 18*	-36 $\pm$ 4*	-40 $\pm$ 5*
HR (beats/min)	2 $\pm$ 5	9 $\pm$ 6	1 $\pm$ 3	3 $\pm$ 7
dP/dt _{max} (mmHg/sec)	148 $\pm$ 24*	208 $\pm$ 74*	3 $\pm$ 5	43 $\pm$ 26
CO (L/min)	54 $\pm$ 21	42 $\pm$ 15	9 $\pm$ 10	27 $\pm$ 14
MPAP (mmHg)	35 $\pm$ 5*	39 $\pm$ 7*	7 $\pm$ 3	7 $\pm$ 8

There were no differences between vehicle and NET/EE results for any of the parameters for either the norepinephrine or hydralazine treated dogs ($p < 0.05$).

*: Significantly different from pre-test values ($p < 0.05$). 平均値 $\pm$ SE (n=5)

(3) 自律神経反射に対する作用

イヌにおいて自律神経刺激に対する作用を検討した。6 つの異なった刺激、すなわち生理的刺激である頸動脈閉塞 (BCO)、迷走神経刺激 (VS)、又は薬理的刺激であるノルエピネフリン (NE)、アセチルコリン (Ach)、ヒスタミン (Hist)、イソプロテレノール (Iso) 添加に対して、混合物の心血管系反応に対する影響を検討した。6 頭の雌雑種イヌ (14-20 kg) を、ペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg, iv) により麻酔し、気管内挿管後、自発呼吸下においた。大腿動脈にカテーテルを挿入し動脈圧の測定に用い、左右大腿静脈にカテーテルを挿入し薬物投与及びペントバルビタールの追加投与に用いた。平均動脈圧 (MAP)、心拍数 (HR)、及び ECG (第 II 誘導) を記録した。両側頸動脈を 4~5cm 剥離し、30 秒間閉塞及び再開通を行った。右迷走神経を 4~5cm 剥離し、電気刺激装置を取り付けた。手術操作後 30 分間、循環器系パラメータが安定するのを待った。溶媒 (0.5%CMC) を十二指腸内に投与し、各パラメータ (HR、MAP、ECG) の変化を 30 分間観察した。その後、BCO、VS、NE、Ach、Hist、Iso の順で自律神経系刺激を行った。各薬理的アゴニストの投与は静脈内一回投与とし (NE 1 μ g/kg、Iso 1 μ g/kg、Ach 5 μ g/kg、Hist 3 μ g/kg)、各アゴニスト投与後 MAP 及び HR が投与前値に戻るまで時間をあけた。その後、新しく投与前値の測定を行い、混合物を十二指腸内投与し、2 時間後に ECG、MAP 及び HR を観察した。その後、各自律神経系刺激を再び行い、前に行った溶媒投与の場合と比較した。薬物投与による MAP 及び HR の影響は、絶対変化及び投与前値からのパーセント変化で示した。溶媒投与と、混合物投与の差は、paired Student's t-test を用い検定した。

溶媒又は混合物の投与は、平均動脈圧及び心拍数の絶対値を変化させなかった (表 2.6.2.4-13)。混合物投与後の自律神経系刺激によるベースラインからの変化は、溶媒投与群の反応と有意差はなかった (表 2.6.2.4-14)。

表 2.6.2.4-13 NET と EE 混合物の麻酔イヌにおける平均動脈圧及び心拍数に及ぼす影響

	Treatment (mg/kg)			
	Vehicle		NET (20) + EE (1)	
	MAP (mmHg)	HR (beats/min)	MAP (mmHg)	HR (beats/min)
Control	110.3 $\pm$ 4.5	158.2 $\pm$ 5.6	109.3 $\pm$ 4.4	157.0 $\pm$ 6.3
Post treatment	111.0 $\pm$ 4.0	157.7 $\pm$ 5.9	112.0 $\pm$ 3.1	158.0 $\pm$ 7.8

平均値 $\pm$ SE (n=6)

表 2.6.2.4-14 NET と EE 混合物の麻酔イヌにおける種々の自律神経刺激反応に及ぼす影響

Challenges	Percent change from baseline			
	Treatment (mg/kg)			
	Vehicle		NET (20) + EE (1)	
	MAP (mmHg)	HR (beats/min)	MAP (mmHg)	HR (beats/min)
Carotid occlusion	20.6±3.0	9.5±3.1	28.3±4.2	9.8±2.0
Vagal stimulation	-38.8±8.8	-56.8±7.6	-43.1±10.4	-64.0±7.6
Norepinephrine (1 μg/kg)	71.2±6.3	-3.1±5.4	64.5±6.6	-13.4±6.6
Acetylcholine (5 μg/kg)	-43.4±5.8	5.0±1.1	-42.3±6.6	4.8±0.7
Histamine (3 μg/kg)	-57.0±1.6	-6.5±1.3	-60.3±1.8	-8.0±1.1
Isoproterenol (1 μg/kg)	-62.0±3.0	59.7±5.6	-61.1±2.6	52.7±3.7

平均値±SE (n=6)

2.6.2.4.3 呼吸器系に対する作用

(1) モルモット摘出気管

混合物のモルモット摘出気管に対する作用を検討した。Hartley系雌モルモット (200～400 g) から気管を摘出し、通気、冷却したmodified Krebs-Henseleit buffer [NaCl (121 mM)、KCl (5.4 mM)、CaCl₂ (2.5 mM)、MgSO₄ (1.2 mM)、NaH₂PO₄ (1.2 mM)、NaHCO₃ (15 mM)、glucose (11.5 mM)] 中に懸垂した。気管は静止張力4 gにて60分間平衡させた。各アゴニスト (50 μM ヒスタミン、20 μMカルバコール、55 mM KCl) による収縮を2回観察し、2回目の収縮を対照時の反応 (control response) として他の収縮と比較した。対照時の収縮を観察した後、組織を45分間洗浄し平衡させた。続いて薬物を加え15分間インキュベートした。各標本にアゴニストを加え、最大反応 (peak response) を観察した。パーセント変化は以下の式より算出した。

$$\text{パーセント変化} = (\text{peak response}) / (\text{control response}) \times 100$$

結果はmultiple comparison t-testにて分析した。

混合物は最高濃度においても、溶媒と比較してモルモット摘出気管のカルバコール、ヒスタミン又はKClによる収縮に対して有意な作用を示さなかった (表2.6.2.4-15)。

表 2.6.2.4-15 NETとEE混合物のモルモット摘出気管のカルバコール、ヒスタミン又はKClによる収縮に及ぼす影響

Treatment	n	Percent change contraction		
		カルバコール	ヒスタミン	KCl
Vehicle	7	108±9	131±10	151±21
NET (10 ⁻⁶ M) + EE (5×10 ⁻⁸ M)	6	97±4	107±9	127±26
NET (10 ⁻⁷ M) + EE (5×10 ⁻⁹ M)	6	125±16	124±17	133±14
NET (10 ⁻⁸ M) + EE (5×10 ⁻¹⁰ M)	4	113±9	119±6	134±10

平均値±SE

(2) ラット呼吸数

Sprague-Dowley 系雌ラット (190～250 g) に、溶媒 (0.5%CMC) 又は混合物を経口投与した。ラットを全身プレチスモグラフ内に置き、投与前の1分間の呼吸数を記録した。有意差の検定にはStudent's t-testを用いた。

溶媒投与群と混合物投与群との間に、呼吸数に対する作用の差は認められなかった (表2.6.2.4-16)。

表 2.6.2.4-16 NET と EE 混合物のラット呼吸数に対する影響

Treatment (mg/kg)	Respiratory rate (breaths/min)				
	Time (min)				
	0	30	60	90	120
Vehicle	154.7±6.6	154.0±7.5	152.0±5.8	154.0±5.1	140.0±5.5
NET (20) +EE (1)	143.3±8.7	150.0±14.8	130.0±13.4	138.0±6.6	152.0±7.3

平均値±SE (n=5)

(3) イヌにおける換気力学

雑種雌イヌ (11～16 kg) をペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg, iv) で麻酔した。

大腿動脈にカテーテルを挿入し、血液ガス分析装置による動脈血炭酸ガス分圧測定用採血に用いた。気管内挿管を行い、大動物用人工呼吸器にて換気回数13回/分、一回換気量約225 mLにて調節呼吸を行った。呼吸気流速はニューモタコグラフを用い、差圧トランスデューサー (+/- 20 cm H₂O) にて測定した。肺内外圧差は、差圧トランスデューサー (+/- 2 cm H₂O) を用い、第6肋間より胸腔内に挿入したカテーテルと、気管内チューブの側孔との圧差により測定した。呼気終末ガスのサンプリングは気管内チューブの側孔より行い、呼気終末炭酸ガス分圧を測定した。ダイナミック肺コンプライアンス及び気道抵抗は、Buxco pulmonary mechanics computer を用い、呼吸流速及び肺内外圧差よりオンラインで算出した。

被験物質は、正中開腹後十二指腸内に直接挿入した小児用栄養チューブにて投与した。溶媒 (0.5%CMC) 又は混合物を投与する10、5及び1分前に投与前の測定を行った。投与後30、60、90及び120分に各パラメータを測定し、repeated measurement analysisにより溶媒投与群と混合物投与群との比較を行った。各実験の最後にヒスタミン (20 µg/kg, iv) による急性の気管収縮を起こし、動物標本の反応性を確認した。

混合物は雑種イヌの気道抵抗、肺コンプライアンス、呼気終末炭酸ガス分圧、動脈血炭酸ガス分圧に生物学的に有意な作用は示さなかった。Multivariate repeated analysisにより、4つのパラメータに対しては、有意な影響を及ぼさないことが示された。4つのパラメータにつきt-testを行った結果、-1分及び30分の気道抵抗のみが有意性 (p<0.05) を示した。しかし、これらの結果は溶媒投与群での抵抗値が高かったためであり、混合物による生理学的に有意な作用ではないと考えられた (表2.6.2.4-17)。

表 2.6.2.4-17 NET と EE 混合物の雑種イヌの肺機能に及ぼす影響

Parameter	Treatment (mg/kg)	Time (min)						
		-10	-5	-1	30	60	90	120
Resistance (cm H ₂ O/L/ sec)	Vehicle	2.2 ±0.5	1.9 ±0.6	2.4 ±0.5	2.2 ±0.4	2.3 ±0.3	2.1 ±0.3	2.2 ±0.4
	NET (20)+ EE (1)	1.2 ±0.3	1.0 ±0.3	0.9 ±0.2	0.8 ±0.2	1.2 ±0.3	1.3 ±0.4	1.4 ±0.6
Compliance (L/cmH ₂ O)	Vehicle	55.2 ±8.8	53.5 ±8.9	51.4 ±8.3	45.6 ±5.9	42.8 ±6.9	40.7 ±6.1	39.9 ±5.9
	NET (20)+ EE (1)	34.5 ±1.9	35.0 ±2.1	35.6 ±2.2	34.2 ±2.2	31.7 ±1.7	31.1 ±1.1	28.3 ±3.3
Endtidal CO ₂ (mmHg)	Vehicle	28.2 ±4.9	27.4 ±4.3	27.4 ±4.2	27.9 ±4.4	29.0 ±5.0	28.5 ±4.2	28.8 ±4.6
	NET (20)+ EE (1)	35.4 ±2.1	34.2 ±2.4	34.2 ±2.7	34.8 ±2.3	33.8 ±3.0	33.5 ±2.4	32.6 ±2.4
Arterial pCO ₂ (mmHg)	Vehicle	20.2 ±3.6	18.8 ±2.8	19.2 ±2.8	20.3 ±3.2	21.5 ±3.5	23.7 ±4.6	21.0 ±3.5
	NET (20)+ EE (1)	26.2 ±1.5	23.7 ±1.4	23.3 ±1.4	24.8 ±1.2	24.8 ±1.3	24.7 ±1.9	23.6 ±1.7

平均値±SE (n=4)

2.6.2.4.4 末梢神経系及び平滑筋に対する作用

(1) 局所麻酔作用

NET (10^{-6} M) と EE (5×10^{-8} M) の混合物の局所麻酔作用について、雌モルモット (200~400 g) を用いて検討した。対照群には塩酸エチドカイン (30 mg/mL) を投与した。

実験は Chance and Lobstein の方法により実施した。角膜反射は、フレキシブルな合成繊維を斜めに圧した場合の瞬目反射により検討し、瞼を閉じるものを含めて瞬きをする動物を選別して使用した。被験物質は、第三者が一方の鼻眼角に点眼した。投与量は 50 μ L とした。溶媒 (1%DMSO) を各動物の対側の鼻眼角に投与し、各モルモットの反対側で対照も観察した。投与 5 分後に試験を開始し、溶媒投与眼及び被験物質投与眼の反射を投与 60 分後まで観察した。各動物において瞬目反射がなくなった場合に、局所麻酔作用ありと判定した。24 時間後にも眼の状態を観察した。溶媒投与群と被験物質投与群の局所麻酔作用を示した動物数を、Fisher の exact test で有意差検定した。

溶媒投与群と比較して混合物のモルモットの角膜への局所適用は瞬目反射に影響しなかった。一方、局所麻酔剤である塩酸エチドカインの局所適用は、溶媒適用に比して瞬目反射を有意に抑制した (表 2.6.2.4-18)。

表 2.6.2.4-18 NET と EE 混合物のモルモットの角膜における局所麻酔作用

Treatment ^{a)}	n	No. of guinea pigs with local anesthetic response ^{b)}
Vehicle	6	0
NET (10^{-6} M) + EE (5×10^{-8} M)	6	0
Ethidocaine HCl (30 mg/mL)	6	6*

a) Vehicle (1%, v/v DMSO in distilled water) or test compound was applied topically to the right or left eye, respectively. The vehicle was instilled into both eyes of control guinea pigs.

b) Animals were tested for 60 min after treatment. *: Different from the vehicle group ($p < 0.001$)

(2) 瞬膜反射

混合物の自律神経節における神経インパルスの伝達に対する影響を、Thompsonの変法にて検討した。雌ネコ（2.4～3.2 kg）を一夜絶食し、35 mg/kgのペントバルビタール腹腔内投与により麻酔した。左上頸交感神経及び節を迷走神経より剥離し、節に向かって頭部方向へトレースした。左大腿動脈にカテーテルを挿入し動脈圧の測定に、右大腿静脈にカテーテルを挿入し薬物投与に用いた。また、気道確保のために気管内挿管を行った。ネコの頭部をホルダーに完全に固定し、糸のついたフックを瞬膜の外端に付けた。糸をforce displacement transducerに接続し、眼角の内側から外側へ引き十分に緊張させた。交感神経の節前及び節後部を電気刺激（40 Hz, 1.0 msec constant current pulses）し、瞬膜の最大等尺性収縮を示す最小電位を求めた。また、瞬膜の最大等尺性収縮を示す1-エピネフリン（EPI）の最小量を検討し実験に使用した。混合物又は溶媒（0.5%CMC）を十二指腸内に投与し、その120分後に交感神経の節前及び節後部を刺激し、またEPIを投与し、その際の瞬膜の最大収縮力を記録した。自律神経節の神経インパルスの伝達を抑制するヘキサメトニウム（2 mg/kg、iv）を投与し、節後神経刺激では収縮作用には影響しないが、節前神経刺激で収縮抑制があることを確かめた。

最後に、神経末端の α 受容体遮断剤であるプラゾシン（0.3 mg/kg、iv）を投与し、節後神経刺激又はEPI静脈内投与による収縮が抑制されることを確かめた。静脈内投与の場合の溶媒としては生理食塩液を用いた。データは分散分析によって解析した。混合物又は溶媒投与前後の瞬膜収縮力の比較は、Fisherのleast-significant difference test for paired comparisonsにより検定した。

1) 頸部交感神経節前刺激

投与前の頸部交感神経節前刺激による瞬膜の収縮は、溶媒投与群で 13.3 ± 2.5 gであり、混合物投与群では、 10.3 ± 2.2 gであった。投与前の値は両群でほぼ同様の値であった。投与前の値と比較して、混合物又は溶媒の十二指腸内投与120分後に再び刺激した場合の瞬膜収縮は変化しなかった。節伝達抑制薬であるヘキサメトニウム（2 mg/kg、iv）を実験終了時に投与したが、溶媒投与の場合と比較して混合物投与の影響は認められなかった（表2.6.2.4-20）。

2) 頸部交感神経節後刺激

投与前の頸部交感神経節後刺激による瞬膜の収縮は、溶媒投与群で 13.0 ± 2.7 gであり、混合物投与群では 10.0 ± 1.5 gであった。投与前の値は両群でほぼ同様の値であった。投与前の値と比較して、混合物又は溶媒の十二指腸内投与120分後に再び刺激した場合の瞬膜収縮は変化しなかった（表2.6.2.4-19）。 α 遮断剤であるプラゾシン（0.3 mg/kg、iv）を実験終了時に投与したが、いずれの群においても収縮力の有意な低下が認められた（表2.6.2.4-19、表2.6.2.4-20）。プラゾシンを実験終了時に投与したが、いずれの群においても収縮力の有意な低下が認められた。この反応に対して、溶媒投与群と比較して混合物投与の影響は認められなかった。

3) エピネフリン静脈内投与

投与前の1-エピネフリン（3～6 μ g/kg、iv）投与による瞬膜の収縮は、溶媒投与群で 3.5 ± 0.7 gであり、混合物投与群では 3.1 ± 0.3 gであった。投与前の値は両群でほぼ同様の値であった。

投与前の値と比較して、混合物又は溶媒の十二指腸内投与120分後に再び1-エピネフリンを投与した場合の瞬膜収縮は変化しなかった（表2.6.2.4-19、表2.6.2.4-20）。プラゾシンを実験終了時に投与したが、いずれの群においても収縮力の有意な低下が認められた。この反応に対して、溶媒投与群と比較して混合物投与の影響は認められなかった。

表 2.6.2.4-19 溶媒のネコの瞬膜収縮に及ぼす影響

Treatment ^{a)} (mg/kg)	Route	Contraction of nictitating membrane change from pre-treatment tension (g)		
		Preganglionic cervical nerve ^{b)}	Postganglionic cervical nerve ^{c)}	l-epinephrine (3~6 μ g/kg, iv)
Vehicle	id	-3.1 $\pm$ 4.0	-3.9 $\pm$ 3.8	+0.5 $\pm$ 0.5
Hexamethonium Cl (2)	iv	-11.5 $\pm$ 2.4*	-5.6 $\pm$ 4.0	N. T. ^{d)}
Prazosin HCl (0.3)	iv	N. T. ^{d)}	-11.8 $\pm$ 3.4*	-3.4 $\pm$ 0.8*

*: Different from the force of contraction measured before the administration of vehicle ($p<0.05$). 平均値 $\pm$ SE a) Animals were tested before and 120 min after administration of the vehicle (0.5%CMC). Finally, hexamethonium and prazosin were administered and the animals were retested. b) The pretreatment current was 0.3 to 0.5 mA. After 120 min, the current required to elicit a maximal contraction of the membrane was 0.5 to 1.0 mA. c) The pretreatment current was 1.0 to 3.0 mA, After 120 min, the current required to elicit a maximal contraction of the membrane was 1.0 to 5.0 mA. d) Not tested

表 2.6.2.4-20 NET と EE 混合物のネコの瞬膜収縮に及ぼす影響

Treatment ^{a)} (mg/kg)	Route	Contraction of nictitating membrane change from pre-treatment tension (g)		
		Preganglionic cervical nerve ^{b)}	Postganglionic cervical nerve ^{c)}	l-epinephrine (3~6 μ g/kg, iv)
NET (20) + EE (1)	id	+0.5 $\pm$ 1.2	+0.3 $\pm$ 0.9	-0.1 $\pm$ 0.2
Hexamethonium Cl (2)	iv	-7.0 $\pm$ 2.2*	+0.2 $\pm$ 1.1	N. T. ^{d)}
Prazosin HCl (0.3)	iv	N. T. ^{d)}	-6.8 $\pm$ 1.8*	-3.1 $\pm$ 0.3*

*: Different from the force of contraction measured before the administration of 20 mg/kg NET and 1 mg/kg EE ($p<0.05$). 平均値 $\pm$ SE a) Animals(n=3) were tested before and 120 min after administration of NET and EE. Finally, hexamethonium and prazosin were administered and the animals were retested. b) The pretreatment current was 1 to 3.0 mA. After 120 min, the current required to elicit a maximal contraction of the membrane was not different from pretreatment. c) The pretreatment current was 2.0 to 4.0 mA. After 120 min, the current required to elicit a maximal contraction of the membrane was not different from pretreatment. d) Not tested

(3) マウスの抗トレモリン作用

混合物のオキシトレモリンによる振戦に対する作用を、LeslieとMaxwellらの方法にて検討した。Swiss-derived雌マウス（18~20 g）を使用前18時間絶食させた。混合物又は溶媒（0.5% CMC）を、オキシトレモリン0.5 mg/kgを投与する105分前に経口投与し、オキシトレモリン投与15分後に振戦の有無を観察した。対照群には、硫酸アトロピン（8 mg/kg, po）を、オキシトレモリン投与45分前に投与した。筋の振戦の強度は第三者が観察し、振戦の評価は次の通りとした。

No tremor=0、mild tremor=1、strong tremor=2。

尾でマウスを持ち上げたときに必ず振戦が出現するが、平静時には間歇的あるいは出現しない場合にmildと判定し、平静時にも常に振戦が出現するものをstrongと判定した。有意差は、薬物投与群の振戦数を、溶媒投与群とChi square test ($p<0.05$) により比較し検討した。

溶媒投与群と比較して混合物の経口投与はオキシトレモリンによる振戦に対して影響しなかった。一方、硫酸アトロピン（8 mg/kg）の経口投与は、オキシトレモリンによる振戦を抑制した（表2.6.2.4-21）。

表 2.6.2.4-21 NET と EE 混合物のオキシトレモリンによるマウスの振戦に及ぼす影響

Treatment ^{a)} (mg/kg, po)	n	No. of animals with score ^{b)}		
		0	1	2
Vehicle	12	0	0	12
NET (20) + EE (1)	12	0	0	12
Atropine sulfate (8)*	12	11	1	0

a) Mice were tested 120 min after administration of NET and EE or their vehicle or 60 min after atropine sulfate. b) No tremor:0, Mild tremor:1, Strong tremor:2

*: Different from the vehicle group (p<0.05)

(4) モルモットの生体位子宮収縮（妊娠及び非妊娠）

混合物の生体位の子宮収縮を、非妊娠（発情1日）及び妊娠（妊娠20日）モルモットの灌流子宮を用いて検討した。非妊娠モルモットは発情1日の動物を使用した。妊娠モルモットは数週間の交配期間をもうけて作製した。右子宮角への着床を防ぐため右子宮卵管結合部を結紮した。これらの動物の性周期を観察し、妊娠可能であることを確認した。妊娠20日にペントバルビタールナトリウム（35 mg/kg, ip）にて麻酔し、外頸静脈に薬物投与用のカテーテルを挿入した。結紮しておいた右の非妊娠子宮角から子宮卵管結合部にカテーテルを挿入し、他のカテーテルを子宮頸部経由で子宮内に挿入した。灌流（0.5 mL/min）は子宮卵管結合部より子宮頸部へと行った。子宮収縮圧の変化はBeckman圧トランスデューサーにて測定し、Beckman Dynograph recorderに記録した。子宮収縮は10分間の圧変化を測定し、圧曲線下の面積を積分により求め検討した。結果は面積単位（mmHg/10 min）の変化で示した。モルモットに混合物又は溶媒（0.5% CMC）を経口投与した。2時間後、子宮の灌流圧を10分間測定し、自発子宮収縮に対するNETとEE混合物の作用を検討した。次にオキシトシン（妊娠モルモットには10 μ g/kg、非妊娠モルモットには0.1 μ g/kg）を静脈内投与し、オキシトシン（10 μ g/kg, iv）による子宮収縮に対する混合物の作用を検討した。結果はANOVAを用いStudent-Newman-Keuls testにより分析した。

混合物は、妊娠20日のモルモットの生体位子宮収縮には影響しなかった。溶媒投与群において、オキシトシンは子宮収縮を増大させた。混合物投与群では、オキシトシンによる子宮収縮作用に影響を与えなかった。低用量での試験は行わなかった（表2.6.2.4-22）。さらに混合物は、発情1日目のモルモットの生体位子宮収縮には影響しなかった（表2.6.2.4-23）。溶媒投与群においてオキシトシンは収縮を増大させた。混合物投与群では、オキシトシン誘発収縮の有意な抑制が認められた。

表 2.6.2.4-22 NET と EE 混合物の妊娠モルモットの生体位子宮収縮に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	mmHg/10 min		
	Spontaneous activity	Oxytocin-induced activity	Oxytocin-induced change
Vehicle	25.26 $\pm$ 5.29	58.70 $\pm$ 12.78	33.45 $\pm$ 8.37
NET (20) + EE (1)	24.41 $\pm$ 5.05	50.22 $\pm$ 8.24	25.81 $\pm$ 3.54

平均値 $\pm$ SE (n=6)

表 2.6.2.4-23 NET と EE 混合物の非妊娠モルモットの生体位子宮収縮に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	mmHg/10 min		
	Spontaneous activity	Oxytocin-induced activity	Oxytocin-induced change
Vehicle	29.27±3.17	60.65±5.20	30.04±4.73
NET (0.2) + EE (0.01)	21.77±1.49	45.55±4.10	23.78±2.69
NET (2) + EE (0.1)	32.68±3.95	57.91±5.58	25.22±2.97
NET (20) + EE (1)	33.77±4.68	45.32±5.29	11.55±3.35*

*: Values significantly different from oxytocin-induced activity in vehicle treated group (p<0.05).
 平均値±SE (n=6)

(5) モルモットの子宮収縮 (in vitro 妊娠及び非妊娠)

混合物のin vitroにおけるの子宮収縮を、非妊娠（発情 1 日）及び妊娠（妊娠 20 日）子宮を用いて検討した。モルモット（400～700 g）の発情 1 日又は妊娠 20 日に子宮を摘出した。子宮角の中央より 10 から 15 mmの長方形の子宮標本を作製した。標本は 37℃、5%CO₂ + 95%O₂で通気したKrebs-Henseleit bicarbonate bufferで満たした 25 mLのorgan bath内に懸垂し、45 分間安定させた。薬物適用前に 15 分間、静止張力 2.0gで等尺性子宮筋収縮を、トランスデュースーサーを用い測定し、レコーダーに記録した。混合物又は溶媒（DMSO）の溶液を、最終濃度が NET 10⁻⁸M + EE 5×10⁻¹⁰M、NET 10⁻⁷M + EE 5×10⁻⁹M及びNET 10⁻⁶M + EE 5×10⁻⁸Mになるように加えた（DMSOの最終濃度は 1%）。混合物を加えた後 15 分間にわたり子宮筋収縮を記録した。続いて、混合物存在下での各子宮筋標本のオキシトシンによる反応を検討した。結果はANOVAを用いStudent-Newman-Keuls testにより分析した。

混合物は、発情 1 日目及び妊娠 20 日目の子宮筋標本に対して単独作用はなく、オキシトシンによる収縮にも影響しなかった（表 2.6.2.4-24、表 2.6.2.4-25）。

表 2.6.2.4-24 NET と EE 混合物の非妊娠モルモットの摘出子宮収縮に及ぼす影響

Treatment	Grams force/15 min				
	Pre-treatment	Treatment	Treatment-induced change	Oxytocin	Oxytocin-induced change
Vehicle	4.69±0.41	3.58±0.32	-1.11±0.20	9.58±1.56	4.90±1.27
NET (10 ⁻⁸ M) + EE (5×10 ⁻¹⁰ M)	4.87±0.88	3.67±0.58	-1.20±0.41	9.75±1.58	4.88±1.09
NET (10 ⁻⁷ M) + EE (5×10 ⁻⁹ M)	4.81±0.54	3.49±0.44	-1.32±0.42	8.98±0.04	4.16±1.08
NET (10 ⁻⁶ M) + EE (5×10 ⁻⁸ M)	5.71±0.81	3.62±0.47	-2.10±0.46	9.75±1.30	4.03±0.61

平均値±SE (n=6)

表 2.6.2.4-25 NET と EE 混合物の妊娠モルモットの摘出子宮収縮に及ぼす影響

Treatment	Grams force/15min				
	Pre-treatment	Treatment	Treatment-induced change	Oxytocin	Oxytocin-induced change
Vehicle	4.36±0.28	2.95±0.11	-1.41±0.30	8.53±0.44	4.18±0.64
NET (10 ⁻⁸ M) + EE (5×10 ⁻¹⁰ M)	4.42±0.69	3.14±0.57	-1.29±0.29	9.12±1.18	4.69±1.05
NET (10 ⁻⁷ M) + EE (5×10 ⁻⁹ M)	5.00±0.65	3.40±0.30	-1.60±0.45	9.90±0.56	4.80±0.30
NET (10 ⁻⁶ M) + EE (5×10 ⁻⁸ M)	6.27±0.84	4.13±0.75	-2.13±0.39	9.20±1.02	2.93±0.40

平均値±SE (n=6)

(6) ラット輸精管収縮 (in vitro)

混合物の in vitro におけるラット輸精管収縮に対する作用を検討した。Wistar 系雄ラット (350~500 g) より輸精管を摘出した。輸精管は organ bath 内に懸垂し、上述のモルモット子宮の場合と同様に薬物投与し、筋収縮を観察した。混合物の適用後、5 分間収縮の変化を記録した。その後、各標本のノルエピネフリン (NE) (最終濃度 10 μ M) に対する反応を検討した。データは ANOVA を用い Student-Newman-Keuls test により分析した。

混合物は、ラット輸精管に対して単独作用を示さず、ノルエピネフリンによる収縮反応に対しても影響を与えなかった (表 2.6.2.4-26)。

表 2.6.2.4-26 NET と EE 混合物のラット輸精管収縮に及ぼす影響 (in vitro)

Treatment	Grams force/5 min				
	Pre-Treatment	Treatment	Treatment-induced change	NE	NE-induced change
Vehicle	0.47 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.03	-0.01 $\pm$ 0.00	0.69 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.02
NET (10 ⁻⁸ M) + EE (5 $\times$ 10 ⁻¹⁰ M)	0.45 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.02	-0.01 $\pm$ 0.00	0.68 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.04
NET (10 ⁻⁷ M) + EE (5 $\times$ 10 ⁻⁹ M)	0.49 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.02	-0.03 $\pm$ 0.00	0.74 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.05
NET (10 ⁻⁶ M) + EE (5 $\times$ 10 ⁻⁸ M)	0.48 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.03	-0.02 $\pm$ 0.00	0.72 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.04

平均値 $\pm$ SE (n=6)

2.6.2.4.5 消化器系に対する作用

(1) 胃排出能

CD系雌ラット (約180 g) を一夜絶食させた。体重測定後、混合物を経口投与した。その120 分後に、20個の1 mmのガラスビーズをポリエチレンチューブ内に入れ、約0.5 mLの水とともに胃内に投与した。60分後、ラットを屠殺し、胃を摘出し胃内に残存するガラスビーズ数を記録した。溶媒投与群との比較はpooled error varianceを用いt-comparisonにて行った。

混合物の投与は雌ラットにおけるガラスビーズの胃排出能に有意な作用を示さなかった (表2.6.2.4-27)。

表 2.6.2.4-27 NET と EE 混合物の雌ラット胃排出能に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	Beads remaining in the stomach (1hr)
Vehicle	10.4 $\pm$ 2.2
NET (20) + EE (1)	5.8 $\pm$ 2.0

平均値 $\pm$ SE (n=10)

(2) 胃酸分泌

Sprague-Dowley系雌ラット (約200 g) を使用前18時間絶食させた。麻酔下に開腹し、Shayらの方法により幽門を結紮した。結紮時に混合物又は溶媒 (0.5%CMC) を十二指腸内投与した。4時間後にラットを屠殺し、胃を摘出し胃内容物を採取し遠心分離した。酸濃度は1 mLの胃液を0.1N NaOHでpH 7.0~7.4に中和することにより求めた。総酸分泌量 (TAO) は量と濃度を乗して求めた。溶媒投与群とのデータの比較はpooled error varianceを用いt-comparisonにて行った。

混合物は総酸分泌を減少させたが、用量依存的ではなかった。酸濃度はどの用量でも変化しなかった。胃液量と総酸分泌はNET 20 mg/kgとEE 1 mg/kg混合物投与で25%、NET 0.2 mg/kgとEE 0.01 mg/kgの混合物投与で26%減少した。しかし、NET 2 mg/kgとEE 0.1 mg/kgの混合物は、

胃液量及び総酸分泌を変化させなかった。H₂受容体遮断剤であるシメチジン（40 mg/kg、id）は溶媒投与群と比較して、総酸排出量を76%抑制した（表2.6.2.4-28）。

表 2.6.2.4-28 NET と EE 混合物の幽門結紮ラットの胃酸分泌に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	n	Response		
		Volume (mL)	Acid concentration (mEq/mL)	Total acid output (mEq)
Vehicle	9	8.6±0.3	0.111±0.003	0.96±0.05
cimetidine(40)	10	3.2±0.4*	0.071±0.004*	0.23±0.03*
Vehicle	10	7.5±0.7	0.111±0.004	0.84±0.08
NET(0.2) + EE(0.01)	9	5.6±0.5*	0.110±0.0004	0.62±0.06*
NET(2) + EE(0.1)	9	6.3±0.5	0.119±0.002	0.76±0.07
NET(20) + EE(1)	9	5.6±0.3*	0.110±0.003	0.62±0.04*

* Significantly different from vehicle control (p<0.05). 平均値±SE (n=10)

(3) 胃潰瘍に対する作用

Sprague-Dowley系雌ラット（約200 g）を一夜絶食させた。混合物又は溶媒（0.5%CMC）を経口投与し、その120分後に50%（v/v）エタノールを1mL投与した。60分後にラットを屠殺した。胃を摘出し、胃粘膜出血の有無を観察した。粘膜の出血を記録した後、胃をティッシュでぬぐい、少なくとも1つの粘膜内出血部位の病変を有するラットの発現率を記録した。また、粘膜内出血部位の重症度についても記録した。障害部の径が3 mm未満の場合にはスコア1、3 mm以上の場合にはスコア2とした。障害の無い場合はスコア0とした。各ラットの障害スコアは、障害部のスコアを合計し求めた。データはpooled error varianceを用いt-comparisonにて分析した。混合物は、雌ラットのエタノールによる胃病変に影響を与えなかった（表2.6.2.4-29）。

表 2.6.2.4-29 NET と EE 混合物のエタノールによるラットの胃粘膜障害に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	n	Incidence		Submucosal severity scores (平均値±SE)
		Mucosal bleeding	Submucosal lesions	
Vehicle	10	10	10	11.0±3.1
NET(20) + EE(1)	10	10	10	10.8±2.4

(4) 炭末輸送能

炭末輸送能を Macht と Babe-Gose の変法により検討した。CD-1 系雌マウス（18～20 g）を使用前18時間絶食させた。混合物又は溶媒（0.5%CMC）を経口投与し、その2時間後に0.5%メチルセルローズに懸濁した0.5%炭末懸濁液0.5mLを経口投与した。20分後、マウスを屠殺し、盲腸より幽門までの小腸を摘出した。小腸の長さに対する炭末を含んだ部位の長さを記録した。

混合物は、雌マウスにおける炭末の胃排出能と小腸輸送能を、軽度（8%）ではあるが有意に低下させた（表2.6.2.4-30）。

表 2.6.2.4-30 NET と EE 混合物のマウス炭末輸送能に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	Percent of small intestine containing charcoal marker
Vehicle	77±2
NET(20) + EE(1)	71±2*

* : Significantly different from vehicle control (p<0.05). 平均値±SE (n=10)

2.6.2.4.6 その他の薬理作用

(1) 血液凝固系及び血液学的パラメータ

雌ビーグル犬（8～10 kg）を使用し、混合物の血液学的パラメータ、血液凝固、溶血に対する影響を検討した。混合物又は溶媒（0.5%CMC）を経口投与し、その2時間後に頸静脈よりEDTA又はクエン酸加試験管に血液を採取した。ELT-B Hematology Analyzerを用いて、赤血球（RBC）、白血球（WBC）、ヘモグロビン（Hb）及びヘマトクリット（Ht）を測定した。平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）及び平均赤血球血色素濃度（MCHC）は計算により求めた。白血球分画は末梢血塗末染色により算出した。好中球（Neut）、桿状核好中球（Band）、リンパ球（Lymph）、単球（Mono）、好酸球（Eos）等を測定し、赤血球の形態学的変化も検討した。クエン酸加血漿を用いヘモグロビン、プロトロンビン時間（PT）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を測定した。さらに、クエン酸加血を次項での血小板凝集抑制作用を検討するために採取した。

混合物投与2時間後において、血液学的、血液凝固線溶系パラメータ、溶血反応に変化は認められなかった（表 2. 6. 2. 4-31、表2. 6. 2. 4-32、表2. 6. 2. 4-33）。

表 2. 6. 2. 4-31 NET と EE 混合物の雌ビーグル犬の血液学的パラメータに及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu\text{g}$)	MCHC (%)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Vehicle	5.970 ± 0.25	15.82 ± 0.60	44.15 ± 1.73	74.0 ± 0.7	26.52 ± 0.26	35.82 ± 0.22	10.25 ± 1.27
NET(20) + EE(1)	6.475 ± 0.05	17.05 ± 0.23	47.63 ± 0.74	73.5 ± 0.8	26.33 ± 0.33	35.82 ± 0.19	10.67 ± 1.06

平均値 $\pm$ SE (n=6)

表 2. 6. 2. 4-32 NET と EE 混合物の雌ビーグル犬の白血球分画に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	No. of cells ($\times 10^3/\text{mm}^3$)						
	Neut	Band	Lymph	Mono	Eos	Atyplym	Atypneut
Vehicle	6.658 ± 0.846	0.033 ± 0.022	2.573 ± 0.189	0.455 ± 0.146	0.303 ± 0.078	0.205 ± 0.124	0.000 ± 0.000
NET(20) + EE(1)	7.422 ± 1.106	0.018 ± 0.018	2.395 ± 0.328	0.415 ± 0.056	0.298 ± 0.058	0.065 ± 0.022	0.032 ± 0.020

平均値 $\pm$ SE (n=6)

表 2. 6. 2. 4-33 NET と EE 混合物の雌ビーグル犬の凝固系パラメータ、溶血に及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	PT (sec)	APTT (sec)	Plasma-Hb (mg/dL)
Vehicle	7.28 $\pm$ 0.08	13.80 $\pm$ 0.25	10.70 $\pm$ 3.67
NET(20) + EE(1)	7.35 $\pm$ 0.06	13.68 $\pm$ 0.20	7.03 $\pm$ 0.94

平均値 $\pm$ SE (n=6)

(2) 血小板凝集 (ex vivo)

クエン酸加血を室温にて 15 分間遠心分離（120 $\times$ g）し、上清の platelet rich plasma (PRP) を採取した。さらに残渣を室温にて 10 分間遠心分離（2000 $\times$ g）した。上清の platelet poor plasma (PPP) を 100%凝集の標準として用いた。ADP 凝集を血小板凝集計にて測定した。400 μ L の PRP をキュベットに取り、攪拌下で 37 $^{\circ}$ C に温め、ADP（20 μ M）を 50 μ L 添加し、血小板凝集の過程を 3 分間記録した。

ADP 20 μ M による凝集の正常値は、最大凝集の 80～100%と報告されている。溶媒又は混合物投与群の平均値は正常範囲であり、両群の間に差は認められなかった（表 2. 6. 2. 4-34）。

表 2.6.2.4-34 NETとEE混合物のイヌ血小板ADP凝集に及ぼす影響(ex vivo)^{a)}

Treatment (mg/kg)	n	Degree of maximum aggregation (%)
Vehicle	5 ^{b)}	85±3
NET(20) + EE(1)	6	85±5

平均値±SE、a) Platelet count was between $1.1 \sim 2.5 \times 10^8/\text{mL}$

b) One sample was eliminated because of hemolysis of red blood cells prior to the preparation of platelet rich plasma. Red cell hemolysis can occur during collection of blood and will interfere with platelet aggregation.

(3) ラットにおける臨床化学的パラメータの変動

Wistar 系雌ラットを用いて、混合物の肝腎機能及び蛋白代謝の臨床化学的パラメータに対する影響を検討した。混合物又は溶媒（0.5%CMC）を経口投与し、その2時間後にラットの眼窩静脈より採血した。臨床化学的パラメータとして、塩素（Cl）、カルシウム（Ca）、リン（P）、グルコース、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT/GPT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST/GOT）、アルカリフォスファターゼ（Al-P）、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（ γ -GTP）及び総ビリルビン（T-BIL）を測定した。また、ナトリウム（Na）及びカリウム（K）はイオン電極にて測定した。総蛋白、アルブミン、グロブリン、蛋白分画は電気泳動により測定し、遊離脂肪酸（FFA）は比色法にて測定した。

混合物による毒性学的、生物学的に意味のある変化は認められなかった（表 2.6.2.4-35）。

表 2.6.2.4-35 NET と EE 混合物のラットの臨床化学的パラメータに及ぼす影響

Treatment (mg/kg)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
Vehicle	14.75 ±1.01	0.514 ±0.021	146.38 ±0.49	6.368 ±0.113	103.6 ±0.5	10.59 ±0.21	11.07 ±0.15	77.60 ±3.56
NET(20)+ EE(1)	13.83 ±0.53	0.501 ±0.027	145.74 ±0.64	6.055 ±0.205	103.0 ±0.2	10.52 ±0.17	10.86 ±0.25	84.15 ±4.18

Treatment (mg/kg)	ALT/GPT (U/L)	AST/GOT (U/L)	Al-P (U/L)	T-BIL (mg/dL)	γ -GTP (U/L)	FFA (mmol/L)
Vehicle	28.6 ±1.8	111.3 ±5.1	161.3 ±10.7	0.188 ±0.024	2.0 ±0.0	0.59 ±0.03
NET(20)+ EE(1)	28.3 ±1.3	110.5 ±3.4	135.9 ±7.9	0.178 ±0.019	1.0 ±0.0	0.61 ±0.03

平均値±SE (n=10)

(4) カラゲニン足浮腫に対する作用

ラットの足浮腫はWinterらの方法により作製した。Sprague-Dawley系雌ラット（150～175g）を一夜絶食させた。炎症は、生理食塩液に溶解した1%（w/w）カラゲニン溶液0.1 mLを左後肢足底に注入し作製した。混合物又は溶媒（0.5%CMC）を経口投与し、その30分後にカラゲニンを投与した。カラゲニン投与直後に、後肢の容量を水銀容積排除量により測定し前値とした。後肢容量はカラゲニン投与2、3及び4時間後に測定した。炎症反応の抑制率を算出し、溶媒投与群とDunnettの両側検定により比較した。

混合物投与群は、有意な炎症促進作用も抗炎症作用も示さなかった。非ステロイド系消炎剤であるインドメタシン3 mg/kgの経口投与では、カラゲニン投与2、3及び4時間後に抑制作用が認められた。ステロイド系抗炎症剤であるプレドニゾロンは、カラゲニン投与3及び4時間後に49.0、56.9%の有意な抑制作用を示した（表2.6.2.4-36）。

表 2.6.2.4-36 NET と EE の経口投与後 2、3、4 時間のカラゲニン足浮腫に対する作用

	Treatment (mg/kg)	Δ Paw volume (mL)	Percent inhibition
2 hours post injection	Vehicle	0.472 $\pm$ 0.022	
	Indomethacin(3.0)	0.336 $\pm$ 0.036	31.1
	Prednisone(20.0)	0.265 $\pm$ 0.066	44.0
	NET(20) + EE(1)	0.431 $\pm$ 0.061	8.9
3 hours post injection	Vehicle	0.815 $\pm$ 0.029	
	Indomethacin(3.0)	0.630 $\pm$ 0.083	22.7
	Prednisone(20.0)	0.416 $\pm$ 0.090*	49.0
	NET(20) + EE(1)	0.630 $\pm$ 0.073	22.7
4 hours post injection	Vehicle	1.01 $\pm$ 0.031	
	Indomethacin(3.0)	0.724 $\pm$ 0.064*	28.7
	Prednisone(20.0)	0.435 $\pm$ 0.072*	56.9
	NET(20) + EE(1)	0.810 $\pm$ 0.055	19.8

*: Significantly different from vehicle group ($p<0.05$). 平均値 $\pm$ SE (n=8)

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

本剤は既承認薬ルナベル配合錠LDと同一有効成分であることから、本剤の薬理作用の評価はルナベル配合錠LDの承認申請資料（2008年4月承認）及び一部変更承認申請資料（2010年12月承認）で使用したデータを再構築して行った。なお、新たな非臨床薬理試験は実施していない。

月経困難症では、月経時のPGの産生亢進と、PGによる過度な子宮収縮、虚血、痛覚過敏が、疼痛発現の大きな原因となっている。NETとEEの配合剤である本剤は、以下に示す作用及び作用機序に基づき、PGの産生を抑制し、PGによる子宮収縮と痛覚過敏を抑制することにより、疼痛を緩和させると考えられた。

- ① 視床下部、脳下垂体に作用し、Gnの産生・分泌を抑制し、排卵を抑制する。同時に内因性の性ホルモンの周期的な変動を抑制し、子宮内膜の増殖を抑制する。

CTD2.6.2.2：NET及びEEは、ラット及びウサギの排卵を抑制した。

CTD2.7.2U.2.2：動物において明確にプロゲステロン（P）及び17 β -エストラジオール（E2）の分泌を抑制した報告はないが、新たに実施した臨床薬理試験においてP及びE2の分泌抑制を確認した。

CTD2.7.2U.2.2：月経困難症患者を対象とした本剤の第Ⅲ相比較試験において、本剤投与群はプラセボ投与群と比較して、総月経血量を有意に減少させた。

- ② 子宮内膜のアポトーシスを誘導し、内膜組織を萎縮させることにより、子宮内膜の増殖を抑制する。

CTD2.7.2U.2.2：ヒトの正所性子宮内膜組織において、EP配合剤によるアポトーシスの増加が報告されている。

- ③ 子宮内膜の増殖抑制に伴うPGの産生抑制により、子宮平滑筋収縮及び神経末端刺激を抑制する。

CTD2.7.2U.2.2：月経困難症患者において、EP配合剤による総月経血量、PGF2 $_a$ 量の抑制作用が報告されている。

以上より、①、②により子宮内膜の増殖が抑制された結果、③のPG産生が低下し、月経困難症が改善すると考えられた。

なお、器質性月経困難症の代表的疾患である子宮内膜症では、炎症性サイトカインが病巣の進展に関与しており、合成黄体ホルモンは、サイトカイン産生を抑制する、すなわち抗炎症作用を発現していることが報告されている（CTD2.7.2U.2.2）。

安全性薬理作用については、NETとEEの20:1の混合物を用いて検討した。臨床推定用量の10倍から1,000倍の高用量が生体に対してどのような影響を及ぼすかを、in vitro及びin vivoの薬理的試験系で検討した。中枢神経系に対する検討では、臨床用量の1,000倍であるNET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgで、鎮痛作用（ライジング法）が認められたが、それ以外の項目で影響は認められなかった。循環器系、呼吸器系に対する検討では、各試験項目で影響は認められなかった。末梢神経系及び平滑筋に対する検討では、NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgで、生体位非妊娠子宮のオキシトシン誘発子宮収縮の抑制が認められたが、それ以外の項目で影響は認められなかった。消化器系に対する検討では、NET 20 mg/kg + EE 1 mg/kgで、総酸分泌を軽度であるが有意に減少させた。また、炭末の胃排出能と小腸輸送能を軽度ではあるが有意に低下させたが、それ以外の項目で影響を与えなかった。その他、血液学的、血液凝固線溶系パラメータ、溶血反応、血小板凝集に対して影響を与えなかった。また、肝腎機能及び蛋白代謝の臨床化学的パラメータに対して毒性学的、生物学的に意味のある変化を与えなかった。カラゲニン足浮腫に対して、有意な炎症促進作用及び抗炎症作用を示さなかった。

以上の薬理的及び生化学的試験から、臨床推定用量の10から1,000倍の範囲のNETとEEの混合物は有意な生物学的作用をほとんど示さないものと考えられた。

以上のことから、本剤はルナベル配合錠LDと同様の作用機序で月経困難症に対する効果が期待できると考えられた。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に挿入した。

ルナベル配合錠 ULD

2. 6. 3 薬理試験概要表

ノーベルファーマ株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

(1) NET の効力を裏付ける試験.....	1
(2) EE の効力を裏付ける試験.....	2
(3) 安全性薬理試験.....	3

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

(1) NET の効力を裏付ける試験.....	5
(2) EE の効力を裏付ける試験.....	6

2.6.3.3 副次的薬理試験..... 実施していない

2.6.3.4 安全性薬理試験..... 8

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験..... 実施していない

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表 (1) NET の効力を裏付ける試験

試験の種類			動物種	投与方法	実施施設	CTD における 記載場所
法による検討 標準バイオアッセイ	プロゲステロン作用	プロゲステロン受容体結合能	ウサギ	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		妊娠維持作用	ラット	sc	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	エストロゲン作用	陰角化促進作用	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	アンドロゲン作用	腹側前立腺重量測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	同化ホルモン作用	肛門挙筋重量測定				
	抗エストロゲン作用	陰角化抑制作用	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	抗アンドロゲン作用	腹側前立腺重量測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	抗同化ホルモン作用	肛門挙筋重量測定				
内分泌機能への影響	臓器重量	卵巣	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		子宮				
		副腎				
		甲状腺				
		脳下垂体				
	血清ホルモン濃度	LH	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		FSH				
		PRL				
		E2				
		P				
		コルチコステロン				
		総T ₄				
		遊離T ₄				
		総T ₃				
		遊離T ₃				
生殖機能への影響	排卵	卵管中の卵を測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		卵巣中の黄体を測定	ウサギ	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	卵輸送	卵管及び子宮内の卵の数を測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	着床	子宮内の着床数を測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	発情周期	陰スメア法	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	乳汁分泌	授乳前後の体重差測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1

2.6.3.1 薬理試験一覧表 (2) EE の効力を裏付ける試験

試験の種類			動物種	投与方法	実施施設	CTD における記載場所
イ 標準バイオアッセイ法による検討	エストロゲン作用	エストロゲン受容体結合能	ウサギ	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		陰角化促進作用	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	
	アンドロゲン作用 同化ホルモン作用	腹側前立腺、精囊、肛門挙筋重量測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-2
	抗エストロゲン作用	エストロンによる子宮重量増加に対する作用	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-2
	抗アンドロゲン作用	腹側前立腺及び精囊重量測定	ラット	sc	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-2
内 分泌機能への影響	臓器重量	卵巣	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		子宮				
		副腎				
		甲状腺				
		脳下垂体				
	血清ホルモン濃度	LH	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		FSH				
		PRL				
		E2				
		P				
		コルチコステロン				
		総T ₄				
		遊離T ₄				
		総T ₃				
		遊離T ₃				
の 生殖機能への影響	排卵	卵管中の卵を測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
		卵巣中の黄体を測定	ウサギ	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	卵輸送	卵管及び子宮内の卵の数	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	着床	子宮内の着床数を測定	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1
	発情周期	陰スメア法	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.1-1

2.6.3.1 薬理試験一覧表 (3) 安全性薬理試験

試験の種類			動物種	投与方法	実施施設	CTD における 記載場所
中枢神経系	一般症状	Irwin 法	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	自発運動	Open field test	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	瞳孔径	瞳孔径測定	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	協調運動	Rotarod 法	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	麻酔時間	ヘキソバルビタール誘発	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	抗痙攣	ペンチレンテトラゾール誘発	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	鎮痛作用	酢酸ライジング法	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	脊髄反射	Berger 法	ネコ	id	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	体温	直腸温測定	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	自発脳波	皮質脳波	ウサギ	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	摘出乳頭筋	等尺性収縮	フェレット	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	摘出心房	等尺性収縮、拍動数	フェレット	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
循環器系	循環動態	SBP, DBP, MBP, HR, dP/dt_{max} , $dP/dt/P_{40}$, CO, SV, SW, TPR, MPAP, MPVR	イヌ	id	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	自律神経反射	頸動脈閉塞、迷走神経刺激 Norepinephrine, acetylcholine, histamine, isoproterenol 投与	イヌ	id	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
呼吸器系	摘出気管	カルバコール、ヒスタミン、KCl 収縮に対する反応	モルモット	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	呼吸数	一分間呼吸数	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	換気力学	Resistance, Compliance 炭酸ガス分圧 (動脈血、呼気終末)	イヌ	id	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1

2.6.3.1 薬理試験一覧表 (3) 安全性薬理試験 (続き)

試験の種類			動物種	投与方法	実施施設	CTD における 記載場所
末梢神経系 及び平滑筋	局所麻酔作用	角膜反射	モルモット	局所	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	瞬膜反射	頸部交感神経節前刺激 頸部交感神経節後刺激 epinephrine 投与	ネコ	id	R. W. Johnson 薬品研究所 (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	抗トレモニン	振戦の有無	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	生体位子宮 (妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	モルモット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	生体位子宮 (非妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	モルモット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	摘出子宮 (妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	モルモット	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	摘出子宮 (非妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	モルモット	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	摘出輸精管	筋収縮、Norepinephrine 収縮	ラット	in vitro	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
消化器系	胃排出能	ガラスビーズ排出	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	胃酸分泌	胃液量、酸濃度	ラット	id	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	抗潰瘍	エタノール潰瘍	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	炭末輸送能	炭末輸送能	マウス	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
その他の薬理作用	血液凝固系 血液学的パラメータ	RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC, WBC, 白血球分画, PT, APTT, plasma-Hb	イヌ	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	血小板凝集	ADP 凝集	イヌ	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	臨床化学的パラメータ	BUN, クレアチニン, Na, K, Cl, Ca, P, Glucose, ALT/GPT, AST/GOT, AL-P, ビリルビン, GGT, FFA	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1
	抗炎症作用	カラゲニン足浮腫	ラット	po	██████████ (██████████ 社)	4.2.1.3-1

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (1) NET の効力を裏付ける試験

試験の種類			動物種/ 性別	例数/群	投与方法	投与期間	投与量	試験結果	CTD におけ る記載場所
標準バイオアッセイ法による検討	プロゲステロン作用	プロゲステロン受容体結合能	ウサギ子宮	3	in vitro			IC ₅₀ : 1.31±0.35 nM	4.2.1.1-1
		妊娠維持作用	卵巣摘出雌ラット	8	sc	10 日間	3.0～16.0 (mg/kg)	4.0～5.0mg/kg で妊娠を維持	4.2.1.1-1
	エストロゲン作用	腔角化促進作用	卵巣摘出雌ラット	10	po	2 日間	2.0, 20.0 (mg/kg)	20.0 mg/kg で 80%のラットで角化促進	4.2.1.1-1
	アンドロゲン作用 同化ホルモン作用	腹側前立腺重量測定 肛門挙筋重量測定	去勢幼若雄ラット	10	po	7 日間	20.0 (mg/kg)	有意な重量変化を認めず	4.2.1.1-1
	抗エストロゲン作用	腔角化抑制作用	卵巣摘出雌ラット	5～10	po	4 日間	50.0～150.0 (mg/kg)	E2 の 0.5 μg/kg による角化を抑制せず	4.2.1.1-1
	抗アンドロゲン作用 抗同化ホルモン作用	腹側前立腺重量測定 (TP 同時投与) 肛門挙筋重量測定 (TP 同時投与)	去勢雄ラット	10	po	7 日間	NET:20.0 TP : 2.8 (mg/kg)	TP 単独投与と比べ臓器重量に差を認めず	4.2.1.1-1
内分泌機能への影響	臓器重量	卵巣	雌ラット	11～12	po	7 日間	0.2, 2.0, 20.0 (mg/kg/日)	20.0 mg/kg/日で有意な減少	4.2.1.1-1
		子宮						変化なし	
		副腎						変化なし	
		甲状腺						0.2 mg/kg/日で有意な増加	
		脳下垂体						変化なし	
	血清ホルモン濃度	LH	雌ラット	10～12	po	7 日間	0.2, 2.0, 20.0 (mg/kg/日)	変化なし	4.2.1.1-1
		FSH						20.0 mg/kg/日で有意な減少	
		PRL						変化なし	
		E2						20.0 mg/kg/日で有意な増加	
		P						20.0 mg/kg/日で有意な増加	
		コルチコステロン						変化なし	
		総T ₄						変化なし	
		遊離T ₄						有意な減少 (0.2, 20.0 mg/kg/日)	
		総T ₃						20.0 mg/kg/日で有意な減少	
		遊離T ₃						20.0 mg/kg/日で有意な減少	

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (1) NET の効力を裏付ける試験 (続き)

試験の種類			動物種/ 性別	例数/群	投与方法	投与期間	投与量	試験結果	CTD における記載場所
生殖機能への影響	排卵	卵管中の卵を測定	雌ラット	10	po	3 日間	25～150 mg/kg/日	用量依存的な排卵抑制 ED ₅₀ =55.43 mg/kg	4.2.1.1-1
		卵巣中の黄体を測定	雌ウサギ	10	po	単回	0.25～16.0 mg/kg	用量依存的な排卵抑制 ED ₅₀ =1.13 mg/kg	4.2.1.1-1
	卵輸送	卵管及び子宮内の卵の数を測定	雌ラット	10	po	3 日間	20 mg/kg/日	卵管・子宮内共に卵数の有意な減少	4.2.1.1-1
	着床	子宮内の着床数を測定	雌ラット	10	po	6 日間	0.2～20.0 mg/kg/日	20.0 mg/kg/日で全例着床阻害	4.2.1.1-1
	発情周期	膣スメア法	雌ラット	11～12	po	7 日間	0.2～20.0 mg/kg/日	用量依存的な発情周期阻害	4.2.1.1-1
	乳汁分泌	授乳前後の体重差測定	雌ラット	11～12	po	15 日間	0.2～20.0 mg/kg/日	用量依存的な体重差の減少(乳汁分泌抑制)	4.2.1.1-1

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (2) EE の効力を裏付ける試験

試験の種類			動物種/ 性別	例数/群	投与方法	投与期間	投与量	試験結果	CTD における記載場所
標準バイオアッセイ法による検討	エストロゲン作用	エストロゲン受容体結合能	ウサギ子宮	3～5	in vitro			IC ₅₀ : 2.30±0.96 nM	4.2.1.1-1
		膣角化促進作用	卵巣摘出雌ラット	10	po	2 日間	12.5～50.0 μg/kg	角化促進 ED ₅₀ =31 μg/kg	
	アンドロゲン作用 同化ホルモン作用	腹側前立腺、精囊、肛門挙筋重量測定	幼若雄ラット	5	po	10 日間	0.6, 12.0 mg/rat	有意な変化なし	4.2.1.1-2
	抗エストロゲン作用	エストロンによる子宮重量増加に対する作用	幼若雌マウス	8	po	3 日間	50, 1,000, 10,000 μg/mouse	有意な変化なし	4.2.1.1-2
	抗アンドロゲン作用	腹側前立腺及び精囊重量測定	去勢雄ラット	10	sc	7 日間	0.5～10 mg/rat	EE はテストステロンによる精囊及び前立腺重量の増加に対して影響を及ぼさなかった	4.2.1.1-2

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (2) EE の効力を裏付ける試験 (続き)

試験の種類			動物種/ 性別	例数/群	投与方法	投与期間	投与量	試験結果	CTD における記載場所
内分泌機能への影響	臓器重量	卵巣	雌ラット	10～12	po	7 日間	0.007, 0.07 0.7mg/kg/日	0.7 mg/kg/日で有意な減少	4.2.1.1-1
		子宮						変化なし	4.2.1.1-1
		副腎						変化なし	4.2.1.1-1
		甲状腺						変化なし	4.2.1.1-1
		脳下垂体						変化なし	4.2.1.1-1
	血清ホルモン濃度	LH	雌ラット	10～12	po	7 日間	0.007, 0.07 0.7mg/kg/日	0.07 mg/kg/日で有意な上昇	4.2.1.1-1
		FSH						0.7 mg/kg/日で有意な減少	
		PRL						変化なし	
		E2						変化なし	
		P						0.7 mg/kg/日で有意な上昇	
		コルチコステロン						変化なし	
		総T ₄						変化なし	
		遊離T ₄						変化なし	
		総T ₃						0.7 mg/kg/日で有意な減少	
		遊離T ₃						0.7 mg/kg/日で有意な減少	
生殖機能への影響	排卵	卵管中の卵を測定	雌ラット	10	po	3 日間	0.25～25.0 mg/kg	用量依存的な排卵抑制 ED ₅₀ : 1.42 mg/kg	4.2.1.1-1
		卵巣中の黄体を測定	雌ウサギ	10	po	単回	2～16 mg/kg	用量依存的な排卵抑制 ED ₅₀ : 7.84 mg/kg	4.2.1.1-1
	卵輸送	卵管及び子宮内の卵の数	雌ラット	10	po	3 日間	0.7 m/kg/日	卵管、子宮内における卵数の有意な減少	4.2.1.1-1
	着床	子宮内の着床数を測定	雌ラット	10	po	6 日間	0.007, 0.07 0.7 mg/kg/日	0.7 mg/kg/日 全例着床阻害 0.07mg/kg/日 着床部位数減少	4.2.1.1-1
	発情周期	膣スメア法	雌ラット	12	po	7 日間	0.007, 0.07 0.7 mg/kg/日	0.07 mg/kg/日から発情周期延長 0.7 mg/kg/日で発情なし	4.2.1.1-1

2.6.3.3 副次的薬理試験：実施していない

2.6.3.4 安全性薬理試験

試験の種類			動物種/ 性別	例数/群	投与方法	投与期間	投与量 (NET+EE mg/kg)	試験結果	CTD におけ る記載場所
中枢神経系	一般症状	Irwin 法	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	自発運動	Open field test	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	瞳孔径	瞳孔径測定	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	協調運動	Rotarod 法	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	麻酔時間	ヘキソバルビタール誘発	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	抗痙攣	ペンチレンテトラゾール誘発	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	鎮痛作用	酢酸ライジング法	雌マウス	12	po	単回	2 + 0.1, 20 + 1	20 + 1 で作用あり	4.2.1.3-1
	脊髄反射	Berger 法	雌ネコ	代表例	id	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	体温	直腸温測定	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	自発脳波	皮質脳波	ウサギ	代表例	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	摘出乳頭筋	等尺性収縮	雄フェレット	6	in vitro		$10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
循環器系	摘出心房	拍動数、等尺性収縮	雄フェレット	6	in vitro		$10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
	循環動態	SBP, DBP, MBP, HR, $dP/dt_{\max}$, $dP/dt/P_{40}$, CO, SV, SW, TPR, MPAP, MPVR	雌イヌ	5	id	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	自律神経反射	頸動脈閉塞、迷走神経刺激 Norepinephrine, acetylcholine, histamine, isoproterenol 投与	雄イヌ	6	id	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	呼吸数	一分間呼吸数	雌ラット	5	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
呼吸器系	摘出気管	カルバコール、ヒスタミン、KCl 収縮に対する反応	雌モルモット	4~6	in vitro		$10^{-8} + 5 \times 10^{-10} \text{M} \sim$ $10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
	換気力学	Resistance, Compliance 炭酸ガス分圧（動脈血、呼吸終末）	雌イヌ	4	id	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

試験の種類			動物種/ 性別	例数/群	投与方法	投与期間	投与量 (NET+EE mg/kg)	試験結果	CTD におけ る記載場所
末梢神経系及び平滑筋	局所麻酔作用	角膜反射	雌モルモット	6	局所	単回	$10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
	瞬膜反射	頸部交感神経節前刺激 頸部交感神経節後刺激 epinephrine 投与	雌ネコ	3	id	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	抗トレモニン	振戦の有無	雌マウス	12	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	生体位子宮 (妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	雌モルモット	6	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	生体位子宮 (非妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	雌モルモット	6	po	単回	0.2 + 0.01, 2 + 0.1, 20 + 1	20+1 でオキシトシン収縮抑制	4.2.1.3-1
	摘出子宮 (妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	雌モルモット	6	in vitro		$10^{-8} + 5 \times 10^{-10} \text{M} \sim 10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
	摘出子宮 (非妊娠)	自発収縮、オキシトシン収縮	雌モルモット	6	in vitro		$10^{-8} + 5 \times 10^{-10} \text{M} \sim 10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
	摘出輸精管	筋収縮、Norepinephrine 収縮	雄ラット	6	in vitro		$10^{-8} + 5 \times 10^{-10} \text{M} \sim 10^{-6} + 5 \times 10^{-8} \text{M}$	作用なし	4.2.1.3-1
消化器系	胃排出能	ガラスビーズ排出	雌ラット	10	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	胃酸分泌	胃液量、酸濃度	雌ラット	9	id	単回	0.2 + 0.01, 2 + 0.1, 20 + 1	軽度胃酸分泌抑制 (用量に非依存的)	4.2.1.3-1
	抗潰瘍	エタノール潰瘍	雌ラット	10	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	炭末輸送能	炭末輸送能	雌マウス	10	po	単回	20 + 1	軽度抑制	4.2.1.3-1
その他の薬理作用	血液凝固系 血液学的パラメータ	RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC, WBC, 白血球分画, PT, APTT, plasma-Hb	雌イヌ	6	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	血小板凝集	ADP 凝集	雌イヌ	6	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	臨床化学的パラメータ	BUN, クレアチニン, Na, K, Cl, Ca, P, Glucose, ALT/GPT, AST/GOT, AL-P, ビリルビン, GGT, FFA	雌ラット	10	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1
	抗炎症作用	カラゲニン足浮腫	雌ラット	8	po	単回	20 + 1	作用なし	4.2.1.3-1

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験：実施していない