アリッサ配合錠
に関する資料

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は富士製薬工業株式会社に帰属するものであり、当該情報を適正使用以外の営利目的に利用することはできません。

富士製薬工業株式会社

FSN-013

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.4　薬物動態試験の概要文

富士製薬工業株式会社

目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文 4
2.6.4.1 まとめ 4
2.6.4.1.1 エステトロール 4
2.6.4.1.2 ドロスピレノン 8
2.6.4.1.3 エステトロールとドロスピレノンの併用 8
2.6.4.1.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 9
2.6.4.2 分析法 9
2.6.4.2.1 エステトロール 9
2.6.4.2.2 ドロスピレノン 13
2.6.4.2.3 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 13
2.6.4.3 吸収 14
2.6.4.3.1 エステトロール 14
2.6.4.3.2 ドロスピレノン 31
2.6.4.3.3 エステトロールとドロスピレノンの併用 32
2.6.4.3.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 36
2.6.4.4 分布 39
2.6.4.4.1 エステトロール 39
2.6.4.4.2 ドロスピレノン 41
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較） 41
2.6.4.5.1 エステトロール 41
2.6.4.5.2 ドロスピレノン 50
2.6.4.6 排泄 50
2.6.4.6.1 エステトロール 50
2.6.4.6.2 ドロスピレノン 52
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 52
2.6.4.7.1 エステトロール 52
2.6.4.7.2 ドロスピレノン 52
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 52
2.6.4.9 考察及び結論 52
2.6.4.9.1 エステトロール 52
2.6.4.9.2 ドロスピレノン 56
2.6.4.9.3 エステトロールとドロスピレノンの併用 57
2.6.4.9.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 57
2.6.4.9.5 結論 57
2.6.4.10 参考文献 58

略語・略号一覧

ABC	ATP-binding cassette	ATP 結合カセット
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area-under-the-concentration-versus-time-curve (up to the last measurable concentration (0-last), over a dosing interval (0-tau) or extrapolated to infinity (0-inf))	濃度-時間曲線下面積［濃度測定可能最終時点まで（0-last）、投与間隔における（0-tau）又は無限大時間まで外挿（0-inf）］
Caco-2	human colon adenocarcinoma cell line	ヒト結腸癌由来細胞
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
COC	combined oral contraceptive	配合経口避妊薬
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DRSP	drospirenone	ドロスピレノン
E2	estradiol	エストラジオール
E4	estetrol hydrate	エステトロール水和物 ［ただし、*in vitro* での添加濃度、動物での投与量及び生体試料中薬物濃度はエステトロールのフリー体（無水物）換算］
EE	ethinylestradiol	エチニルエストラジオール
eq	equivalent	当量
GLP	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-質量分析
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
LNG	levonorgestrel	レボノルゲストレル
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数法
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
RBA	relative binding affinity	相対結合親和性
SLC	solute carrier	溶質キャリア
SHBG	sex hormone binding globulin	性ホルモン結合グロブリン
SULT	sulfotransferase	硫酸転移酵素
$T_{1/2}$	half-life of elimination	消失半減期
T_{max}	time of maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TS	Tabulated Summary	概要表
UDP	uridine diphosphate	ウリジン二リン酸
UGT	UDP-glucuronosyltransferase	UDP-グルクロン酸転移酵素
ULOQ	upper limit of quantification	定量上限
UHPLC-MS/MS	ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
(v/v)	volume/volume	体積／体積
(w/v)	weight/volume	重量／体積

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

FSN-013 は、エストロゲンとしてエステトロール水和物（E4）15 mg 及びプロゲスチンとしてドロスピレノン（DRSP）3 mg を含有する。E4 は、天然由来のエストロゲンの合成化合物である。DRSP は、エチニルエストラジオール（EE）を含有するヤーズ®配合錠及びヤーズフレックス®配合錠としての使用が十分に確立されたプロゲスチンである。海外において、DRSP は、配合経口避妊薬（COC）のプロゲスチン成分として配合されている（Yasmin®など）。

Pantarhei Bioscience 社は、良好な薬物動態特性、薬理学的プロファイル、並びにヒトを対象とした臨床試験における安全性及び有効性の結果から、E4 がヒト用医薬品に適している可能性があることを示した（Visser, 2009）。さらに、Estetra SPRL 社は E4 による開発プログラムを完了した。

E4 の薬物動態特性を明らかにするため、広範な試験プログラムを実施した。DRSP の使用については十分に確立されており、臨床的有効性及び安全性も証明されていることから、DRSP 単独投与群を含む雌サルを用いた E4/DRSP の 13 週間反復経口投与毒性試験（0030-NC-002）におけるトキシコキネティクス評価を除き、DRSP 単独又は E4 と DRSP の併用投与による薬物動態試験は実施していない。動物における薬物動態に関するデータは確認されなかったため、DRSP に関するさらなる薬物動態データは、*in vitro* や臨床試験に関する公表文献から入手した。

2.6.4.1.1 エステトロール

E4 を用いて実施した薬物動態試験プログラムの概要を表 2.6.4-1 及び概要表（TS）の表 2.6.5.1 に示す。なお、本概要中では *in vitro* での添加濃度、動物での投与量及び生体試料中薬物濃度は E4 のフリー体（無水物）換算で表記した。

表 2.6.4-1 薬物動態試験プログラム

Study Type	Route of Administration	Species or Test System
Absorption		
Single-dose	oral (gavage) subcutaneous (injection)	mouse, rat, monkey rat
Repeat-dose	oral (gavage)	mouse, rat, rabbit, monkey
Distribution		
Tissue distribution	oral (gavage)	rat
Protein binding	*in vitro*	mouse, rat, monkey, human plasma
RBA for SHBG	*in vitro*	human SHBG
Plasma/blood partitioning	*in vitro*	human blood
Metabolism[1]		
Hepatocyte metabolism	*in vitro*	mouse, rat, rabbit, monkey, human hepatocytes
In vivo metabolism incl. interspecies comparison	oral	mouse, rat, monkey, human
In vivo metabolism[2]	NR	rat urine
Excretion		
Excretion in urine, feces, air, bile[3]	oral (gavage)	mouse, rat
Pharmacokinetic Drug Interactions[4]		

[1] Studies on human CYP reaction phenotyping (PR3100, 0031-102), glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases (0031-106, Es0001-NC-011), and sulfation by human sulfotransferases (PR3099) have been summarized and are discussed in clinical Module 2.7.2

[2] Preliminary metabolite identification study

[3] Bile only in rat

[4] Studies on induction of CYP (0031-100, Es0001-NC-019), inhibition of CYP (PR3038, 0031-101, Es0001-NC-017) and UDP-glucuronosyltransferases (0031-105), bidirectional transport in Caco-2 cells (0031-NC-017), substrate and inhibitor interactions with ABC efflux transporters (0031-103, Es001-NC-013, Es0001-NC-018) and uptake and efflux SLC transporters (0031-107, Es0001-NC-020, Es0001-NC-021) have been summarized and are discussed in clinical Module 2.7.2

Abbreviations: ABC = ATP-binding cassette, CYP = cytochrome P450, incl. = including, NR = not reported, RBA = relative binding affinity, SHBG = sex hormone binding globulin, SLC = solute carrier, UDP = uridine diphosphate

試験は毒性試験と同じ動物種／系統を用いて実施した。臨床適応を考慮して、試験は雌動物のみで実施した。トキシコキネティクス試験及び一部の *in vitro* 薬物相互作用試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（GLP）を遵守して実施した。トキシコキネティクス試験における E4、DRSP 又はレボノルゲストレル（LNG）濃度、及び *in vitro* 血漿蛋白結合試験における E4 の生体試料分析は、バリデートされた分析法を用いて、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）法又は超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（UHPLC-MS/MS）法により実施した（2.6.4.2.1.1～2.6.4.2.3 項）（ES-T07、ES-T08、ES-T14、ES-T28、ES-T33-VR00914、0030-NC-014、0030-NC-015、0030-NC-016、0031-NC-021、0031-NC-024、0031-NC-025、TS 表 2.6.5.2）。

吸収

雌 CD-1 マウス又は雌 Sprague-Dawley ラットに 15 mg/kg の[^{14}C]標識 E4 を単回経口投与後、血液及び血漿のいずれにおいても投与後 0.5 時間に最高濃度の放射能が認められた（0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.3.A）。

雌 Sprague-Dawley ラットにおいて、皮下投与経路と比較した E4 の経口バイオアベイラビリティは、70%以上と推定された（PR3002、TS 表 2.6.5.3.B）。

雌カニクイザルに E4 を 1、100 又は 1000 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、T_{max}（最高血漿中濃度到達時間）は用量の増加に伴って延長し、C_{max}（最高血漿中濃度）の増加は用量比例性を下回ったとみられたことから、高用量では吸収が遅延することが示唆された（ES-T05、TS 表 2.6.5.3.B）。

E4 の反復経口投与トキシコキネティクス試験では、T_{max} は雌 CD-1 マウス及び Sprague-Dawley 又は Wistar ラットで 0.5 時間、雌カニクイザルで 0.5～1.5 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-last}}$（濃度測定可能最終時点までの濃度-時間曲線下面積）はいずれも用量の増加に伴って増加した。同じ動物種内の試験間で若干のばらつきがみられたが、E4 の全身曝露量は、マウスで 30 mg/kg/日、ラットで 50 mg/kg/日、サルで 30 mg/kg/日の投与量まで、用量比例性からの大きな逸脱を示さなかった。13 週間投与後の Wistar ラットにおける E4 の全身曝露量は、同程度の用量では Sprague-Dawley ラットよりもわずかに低い傾向があった（AUC 換算）。

マウス及びラットにそれぞれ 10 mg/kg/日及び 15 mg/kg/日までの用量を単回及び反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ はおおむね同程度であったことから、血漿中に蓄積しないことが示唆された。これらの用量を超えると、$AUC_{0\text{-last}}$ は初回投与後と比較して反復投与後にわずかに低下した。サルでは、$AUC_{0\text{-last}}$ は初回投与後と比較して反復投与後でわずかに高い傾向が認められた。

血漿中消失半減期（$T_{1/2}$）はマウスで 1.4～3 時間、ラットで 2～6 時間、サルで 10～19 時間であった。サルでは、血漿中濃度-時間曲線に第 2 のピークが認められたことから、E4 が腸肝循環を受けることが示唆された（ES-T31、ES-T34、ES-T40、0031-NC-004、ES-T10、ES-T18、ES-T39、0031-NC-003、ES-T11、ES-T15、ES-T20、TS 表 2.6.5.4.A.1～2.6.5.4.A.5）。

交配済み／妊娠 Wistar ラット及び妊娠ニュージーランドホワイトウサギにおける T_{max} は、それぞれ 0.5 時間及び 0.5～3.0 時間であった。E4 に対する曝露量は、ラットでは 10 mg/kg/日まで、ウサギでは 0.45 mg/kg/日まで実質的に用量に比例した。ラットでは 10 mg/kg/日以上、ウサギでは 0.45 mg/kg/日の投与量で、C_{max} は初回投与後より反復投与後の方が低かった。これらの用量における反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ は、初回投与後と比較してラットでは低かったが、ウサギではわずかに高かった（ES-T01、ES-T02、ES-T04、ES-T04-BR1031、ES-T19、TS 表 2.6.5.4.A.6）。

<u>分布</u>

[^{14}C]標識 E4 を 15 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、放射能は雌のアルビノの Sprague-Dawley ラット及び部分的有色の Lister Hooded ラットの組織に広範に分布した。投与後の全ての時点において、肝臓で最も高い放射能濃度が認められた。アルビノラットでは投与後 48 時間（最終試料採取時点）までに、部分的有色ラットでは投与後 7 日までに、肝臓及び甲状腺（アルビノのみ）を除く全組織で組織中放射能濃度は定量限界未満となった（メラニン含有組織を含む）（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.5）。

雌マウス（CD-1）、ラット（Sprague-Dawley）、サル（カニクイザル）及びヒト血漿中で、E4 は中等度の血漿蛋白結合（45%～67%）を示した。動物血漿では 937.8 ng/mL、ヒト血漿では 46.9 ng/mL まで、種差や濃度依存性は認められなかった（ES-T33、TS 表 2.6.5.6.A）。

E4 は、ヒト性ホルモン結合グロブリン（SHBG）と結合しなかった（PR3025、TS 表 2.6.5.6.B）。

E4 は 1 μM までヒト血液中で血漿と血球に均等に分布した（0031-104、TS 表 2.6.5.8.A）。

代謝

E4 は、*in vitro* で雌マウス（CD-1）、ラット（Sprague-Dawley）、ウサギ（ニュージーランドホワイト）、サル（カニクイザル）、並びにヒト肝細胞で広範に代謝された。代謝経路は、直接グルクロン酸抱合及び硫酸抱合、水酸化＋硫酸抱合、水酸化＋メチル化並びに水酸化＋メチル化＋グルクロン酸抱合／硫酸抱合であった。3-グルクロニド（A 環）を除き、正確な代謝物構造を決定することはできなかった。グルクロン酸抱合及び硫酸抱合は、全ての動物種の肝細胞における主たる反応であった。ヒト肝細胞では、直接グルクロニド（D 環）及び直接硫酸抱合体（未確認部位）のみが認められた。これらの代謝物は他の動物種、特にラット及びサルでも生成された。ラット肝細胞における重要な代謝経路はメチル化反応であった。3 系統のマウス由来肝細胞では、E4 の代謝に系統差は認められなかった（PR3041、ES-T06、ES-T32、TS 表 2.6.5.10.A～2.6.5.10.C）。

雌 CD-1 マウスに[^{14}C]-E4 を 15 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、尿中の主要代謝物はヒドロキシ-E4-硫酸であり、糞中の主要化合物はヒドロキシ-E4-硫酸及びヒドロキシ-E4-ケトンであった。雌 Sprague-Dawley ラットに 15 mg/kg の[^{14}C]標識 E4 を単回経口投与したとき、糞中の主要代謝物はヒドロキシ-E4 であり、胆汁中の主要代謝物は E4-グルクロニドであった。置換基の正確な付加位置は特定されなかった。予備的な代謝物同定試験では、ラット尿中の代謝物として 2-ヒドロキシ-3-メトキシ-E4 が同定された（ES-T35、0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.9.A 及び B、2.6.5.11）。

種間比較試験において、ヒトの血漿及び尿中に認められた 2 つの主要なグルクロニドは、合成標準物質とのコクロマトグラフィーにより E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドと同定された。E4-16-グルクロニドが定量的に最も重要であった。ヒト血漿中の別の代謝物として E4-グルクロニド-硫酸抱合体が同定され、硫酸置換基の位置は C3 であり、グルクロニド置換基の位置は C16 の可能性が最も高いと考えられた。

E4-3-グルクロニドはマウス及びラット血漿中の重要な代謝物でもあった。また、この代謝物はマウス尿中及びラット胆汁中でも認められた。E4-16-グルクロニドは、マウス試料又はラット血漿中では有意な量で検出されなかったが、ラット尿中及びラット胆汁中の重要な代謝物であった。E4-グルクロニド-硫酸抱合体はラット胆汁中にわずかな量でのみ認められた。同定されたヒトのグルクロニドに加え、E4-15-グルクロニドが、一部のマウス及びラット試料中に検出された（Es0001-NC-012、Es0001-NC-010、MIT-Es0001-C105、TS 表 2.6.5.9.D）。

E4 のヒト血漿中主代謝物である E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、サルの血漿中にも認められた（Es0001-NC-016、TS 表 2.6.5.9.C）

排泄

雌 CD-1 マウス及び雌 Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]標識 E4 を 15 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、投与後 7 日までに排泄は完了し、投与量の大部分は糞中に回収された（マウスで 67%、ラットで 87%）（0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.13）。

2.6.4.1.2 ドロスピレノン

吸収

雌カニクイザルでは 3.0 時間以内に C_{max} に達した。DRSP 曝露量は、Day 1 と比較して Week 13 の方が低かった。$T_{1/2}$ は約 4～7 時間であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）。

女性における経口バイオアベイラビリティは約 76%である。T_{max} は経口投与後 1～2 時間である。単回投与時の曝露量は 10 mg まで用量に比例して増加する。血漿中濃度は約 1 週間以内に定常状態に達し、反復投与により曝露量にわずかな蓄積（2～3 倍）が認められる。$T_{1/2}$ は 25～33 時間である。EE の併用投与は、DRSP 曝露量に重大な影響を及ぼさない（Krattenmacher, 2000、Blode, 2012、Blode, 2000）。

分布

ヒトにおける DRSP のみかけの分布容積は平均で 3.7 L/kg である（Blode, 2002）。

DRSP のヒト血清蛋白結合率は 95%～97%である。DRSP は SHBG 及びコルチコステロイド結合グロブリンと結合しない（Krattenmacher, 2000）。

ヒト乳汁中への DRSP の排泄量（24 時間）は、投与量の約 0.02%であった（Blode, 2001）。

代謝

Wiesinger（2015）は、ヒト肝細胞により生成される主要代謝物は、ラクトンの還元／硫酸抱合及び開裂により生成されると述べている。

ヒト血漿中の主要代謝物は DRSP の酸性型及び 4,5-ジヒドロドロスピレン-3-硫酸である。尿中及び糞中に検出された DRSP はごく微量であり、代謝物の大部分はグルクロニド及び硫酸抱合体であった（Krattenmacher, 2000）。

排泄

女性における DRSP 及びその代謝物の排泄は投与後 10 日以内にほぼ完了し、未変化体としての尿及び糞中への排泄はごくわずかである（Krattenmacher, 2000、Blode, 2002）。

2.6.4.1.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

雌カニクイザルに E4 と DRSP を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験において、30/6（20/4）[1] mg/kg/日までの用量でトキシコキネティクス評価を実施した。DRSP との併用投与により E4 の全身曝露量が増加したが、E4 を併用投与しても DRSP の曝露量に影響はなかった。反復投与後の曝露量は、E4 はほぼ用量に比例し、DRSP は用量比例性を下回った。反復投与後の E4 に対する曝露量は初回投与後と同程度であったが、DRSP に対する曝露量は減少した。DRSP の $T_{1/2}$ は約 4～7 時間、E4 の $T_{1/2}$ は 9～22 時間であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）。

[1] Day 50 に一般状態不良や早期屠殺のため、30/6 mg/kg/日の用量を 20/4 mg/kg/日に減量した。Day 53 に E4 単独群及び DRSP 単独群の用量を減量した。

2.6.4.1.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

雌カニクイザルに E4 と LNG を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験において、30/0.225（20/0.150）[2] mg/kg/日までの用量でトキシコキネティクス評価を実施した。初回投与後では LNG の併用投与により E4 の全身曝露量に影響はなく、E4 の併用投与により LNG 曝露量に影響はなかったが、反復投与後には E4 の併用により LNG 曝露量が増加した[3]。単回及び反復投与後のいずれにおいても、曝露量は E4 ではほぼ用量に比例したが、LNG は用量比例性を下回った。反復投与後の E4 に対する曝露量は初回投与後と同程度であったが、LNG に対する曝露量は減少した。LNG の $T_{1/2}$ は約 4～7 時間、E4 の $T_{1/2}$ は 10～22 時間であった（0031-NC-018、TS 表 2.6.5.4.C.1）。

2.6.4.2 分析法

2.6.4.2.1 エステトロール

2.6.4.2.1.1 LC-MS/MS 法：血漿

E4 のトキシコキネティクス試験のためにバリデートされた分析法には、複数の動物種の血漿中 E4 の生体試料分析のための分析法、並びにカニクイザル血漿中 E4 及び LNG の同時生体試料分析のための分析法が含まれた（TS 表 2.6.5.2）。

E4 のみを用いた反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験で採取した血漿中 E4 の生体試料分析を、重水素化 E4-d_3 を内標準物質として、LC-MS/MS 法により実施した。動物血漿試料をジエチルエーテルで液液抽出により処理後、塩基性条件下においてダンシルクロリドで誘導体化した。誘導体化試料は、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法を用いた逆相 HPLC で分析した。CD-1 マウス、Wistar ラット、ニュージーランドホワイトウサギ及びカニクイザルの血漿を用いた LC-MS/MS 法について、表 2.6.4-2 に示すパラメータのバリデーションを行った（ES-T28、ES-T14、ES-T07、ES-T08）。Wistar ラット血漿を用いてバリデートした分析法（ES-T14）が、Sprague-Dawley ラットの試料の生体試料分析にも同等に有効であることを確認するため、適合性試験を実施した（ES-T10）。

がん原性試験におけるマウス及びラット血漿中の E4 の生体試料分析は、重水素化 E4-d_4 を内標準物質として、LC-MS/MS 法により実施した。試料は tert-ブチルメチルエーテルで液液抽出後、塩基性条件下におけるダンシルクロリドでの誘導体化により処理した。誘導体化試料は、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法を用いた逆相 HPLC で分析した。CD-1 マウス及び Wistar ラットの血漿を用いた LC-MS/MS 法（0031-NC-024、0031-NC-025）について、表 2.6.4-2 に示すパラメータのバリデーションを行った。

Sprague-Dawley ラットの血漿を用いて UHPLC-MS/MS 法をバリデートし（0030-NC-016）、コメットアッセイ（0030-NC-001）で曝露証明を得るために適用した。内標準物質として E4-d_4 を用いた。血漿試料は酢酸エチルで液液抽出後、塩基性条件下におけるダンシルクロリドでの誘導

---

[2] Day 51 に一般状態不良や早期屠殺のため、30/0.225 mg/kg/日の用量を 20/0.150 mg/kg/日に減量した。同日に E4 単独投与群及び LNG 単独投与群の用量を減量した。

[3] E4 単独投与群では血漿試料に LNG の混入が認められたため、Week 13 の E4 曝露量に対する LNG の影響は評価できなかった。

体化により処理した。誘導体化試料は、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法を用いた逆相 UPLC で分析した。ラット血漿の UHPLC-MS/MS 法について、表 2.6.4-2 に示すパラメータのバリデーションを行った。

カニクイザルの血漿を用いた UHPLC-MS/MS 法のバリデーションも実施し（0030-NC-015）、E4 及び DRSP の併用投与による 13 週間反復投与毒性試験（0030-NC-002）に適用した。内標準物質として E4-d_4 を用いた。血漿試料は酢酸エチルで液液抽出後、塩基性条件下におけるダンシルクロリドでの誘導体化により処理した。誘導体化試料は、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法を用いた逆相 UHPLC で分析した。サル血漿の UHPLC-MS/MS 法について、表 2.6.4-2 に示すパラメータのバリデーションを行った。

ヒト血漿では 3 種類の LC-MS/MS 法を初期に開発した（PR3053-VP200、PR3053-VR0671、PR3053-VR0719）。このうち直近の方法（PR3053-VR0719）では、内標準物質として E4-d_3 を使用した。血漿試料をジエチルエーテルで液液抽出後、塩基性条件下におけるダンシルクロリドでの誘導体化により処理した。誘導体化試料は、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法を用いた逆相 HPLC で分析した。ヒト血漿の LC-MS/MS 法について表 2.6.4-2 に示すパラメータのバリデーションを行った。

ヒト血漿を用いた先の 2 種類の方法（PR3053-VP200 及び PR3053-VR0671）では、それぞれ 1, 3, 5 (10)-エストラトリエン-2, 3, 15β, 16β, 17β-ペントール 2-メチルエーテル及びエストリオール-d_2 を内標準物質として用いた。血漿試料をジエチルエーテルで液液抽出により処理したが、誘導体化は行わなかった。試料は、負モードの大気圧化学イオン化を用いて、MS/MS 検出法による逆相 HPLC で分析した。ヒト血漿を用いた先の 2 種類の方法では、選択性、検量線パラメータ、真度、精度、希釈及び安定性（オートサンプラー、凍結融解）についてバリデーションを行った。

いずれのバリデーションも GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

E4-d_3 を内標準物質とした LC-MS/MS 法のバリデーションパラメータ及び結果を表 2.6.4-2 に示す。

バリデーションパラメータは設定基準を満たし、全ての分析法が血漿中 E4 の分析に有効と考えられた（ES-T28、ES-T14、ES-T07、ES-T08）。

Wistar ラットの血漿を用いてバリデートされた LC-MS/MS 法は、Sprague-Dawley ラットの試料の生体試料分析にも同等に有効であることが確認された。Sprague-Dawley ラットのブランク血漿で調製した品質管理試料を、Wistar ラットのブランク血漿で作製した検量線に対して分析したところ、許容可能な真度及び精度が示された（ES-T10）。

表 2.6.4-2 LC-MS/MS 法バリデーションパラメータ：エステトロール-d_3 を内標準物質とする方法（ES-T28、ES-T14、ES-T07、ES-T08、PR3053-VR0719）

Plasma	**Mouse**	**Rat**	**Rabbit**	**Monkey**	**Human**
Selectivity	+	+	+	+	+
Matrix Effect	None	ND	ND	ND	ND
Calibration Curve					
Range (pg/mL)	40 - 25000	25 - 25000	25 - 25000	25 - 25000	25 - 10000
Weighting Factor[1]	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$
Corr. Coefficient	≥0.9981	≥0.9981	≥0.9966	≥0.9987	≥0.9956
LLOQ (pg/mL)	40	25	25	25	25
ULOQ (pg/mL)	25000	25000	25000	25000	10000
Accuracy (% Bias)					
Intra-assay	-6.0 – 7.4 (LLOQ -15.3 – 2.7)[3]	-6.3 – 4.6 (LLOQ -1.1 – 8.1)	-12.3 – 7.8 (LLOQ 12.5 – 15.2)	-4.7 – 3.4 (LLOQ -17.0 – 5.6)[3]	-7.1 – 7.9 (LLOQ -14.9 – -6.3)
Inter-assay	-3.8 – 4.0 (LLOQ -9.2)	-3.4 – 1.5[4] (LLOQ 2.8)	-5.7 – 1.7[4] (LLOQ 13.5)	-3.3 – 2.0[4] (LLOQ -7.1)	-5.4 – 5.6[4] (LLOQ -10.4)
Precision (CV%)					
Intra-assay	4.4 – 13.8 (LLOQ 11.6)	3.3 – 4.0 (LLOQ 10.0)	5.6 – 7.4 (LLOQ 10.8)	5.0 – 8.4 (LLOQ 17.3)	2.3 – 5.5 (LLOQ 9.1)
Inter-assay	4.4 – 12.2 (LLOQ 13.5)	6.4 – 7.6 (LLOQ 11.4)	3.3 – 17.4[5] (LLOQ 3.2)	3.6 – 5.5 (LLOQ 25.6)[5]	1.4 – 7.0 (LLOQ 11.4)
Stability [2]					
Autosampler	+, 18 hr	+, 24 hr	+, 24 hr	+, 24 hr	+, 24 hr
Freezing/Thawing	+, 4 cycles	+, 3 cycles	+, 3 cycles	+, 3 cycles	+, 3 cycles
Extracts (2-8 °C)	+, 3 days	+, 6 days	+, 6 days	+, 5 days	ND
Bench top (RT)	+, 24 hr	+, 24 hr	+, 24 hr	+, 24 hr	+, 24 hr
Long-Term	≥6 months	≥16 months	≥9 months	≥7 months	≥16 months
Recovery (%)	76.7 - 94.1 (IS 91.0)	ND	ND	ND	ND
Dilution	10000 x in blank plasma	10000 x in buffer[6]	10000 x in buffer[6]	10000 x in buffer[6]	10 x in blank plasma
Carry-Over	None	None	None	None	None
ISR	+ (85% of samples)	+ (95% of samples)	+ (100% of samples)	+ (100% of samples)	ND

1 Linear model

2 Stock solution stability at 2-8 °C: 35 months for E4; E4-d3 lost 10% of response in 10 months (ES-T14)

3 Without suspected values

4 Average inter-assay accuracy from 3 batches

5 Overall precision met the criteria (± 20% at LLOQ, ± 15% for low-, mid-, high-level Quality Control samples); however inter-assay precision was rather high at the LLOQ for monkey plasma and for the midand high-level Quality Control samples for rabbit plasma, indicating that samples from one animal should preferably be analyzed in one batch

6 Phosphate buffered saline pH 7.2 containing 1% (w/v) bovine serum albumin

Abbreviations: + = within criteria, Corr. Coefficient = correlation coefficient, hr = hour, IS = internal standard, ISR = incurred sample reanalysis, LLOQ = lower limit of quantification, ND: not determined, NR = not reported, NZW = New Zealand White, Quant. = quantification, RT = room temperature, ULOQ = upper limit of quantification

E4-d_4 を内標準物質として用いた CD-1 マウス及び Wistar ラットの血漿の LC-MS/MS 法は選択的で、マトリックス効果は認められなかった。一部キャリーオーバーが認められたが、高濃度試料の後にブランク血漿抽出物を 3 回注入することで回避可能であった。重み付け係数 $1/x^2$ で線形モデルを用いて作成した結果、検量線の決定係数は 0.9886 以上（マウス）及び 0.9882 以上（ラット）であった。LLOQ（定量下限）及び ULOQ（定量上限）は、いずれの動物種でもそれぞれ 25 及び 25000 pg/mL であった。真度及び精度は基準を満たし、10 倍希釈でも分析に影響を及ぼさなかった。分析対象の回収率は、マウス血漿で 92%～94%（CV：4.6%以下）、ラット血漿で 86%～93%（CV：11%以下）であった。安定性が確認された（0031-NC-024、0031-NC-025）。

Sprague-Dawley ラット血漿における UHPLC-MS/MS 法は選択的であり、マトリックス効果やキャリーオーバーは認められなかった。重み付け係数 $1/x^2$ で線形モデルを用いて作成した結果、検量線の決定係数は 0.9967 以上であった。LLOQ 及び ULOQ はそれぞれ 20 及び 4000 pg/mL であった。真度及び精度は基準を満たし、50000 倍希釈でも分析に影響を及ぼさなかった。分析対象の回収率は 100%に近く、ばらつきは小さかった（CV：6.2%以下）。安定性が確認された（0030-NC-016）。

カニクイザル血漿における UHPLC-MS/MS 法は選択的であり、マトリックス効果やキャリーオーバーは認められなかった。重み付け係数 $1/x^2$ で線形モデルを用いて作成した結果、検量線の決定係数は 0.9986 以上であった。LLOQ 及び ULOQ はそれぞれ 1 及び 1000 ng/mL であった。真度及び精度は基準を満たし、10 倍希釈でも分析に影響を及ぼさなかった。分析対象の回収率は 100%に近く、ばらつきは小さかった（CV：4.7%以下）。安定性が確認された（0030-NC-015）。

ヒト血漿を用いた先の 2 種類の方法では、十分な選択性及び感度、並びに許容可能な真度及び精度が認められた。これらの分析法における LLOQ 及び ULOQ は、それぞれ 25 及び 10000 pg/mL であった（PR3053-VP200、PR3053-VR0671）。

2.6.4.2.1.2 LC-MS/MS 法：その他の試料

血漿蛋白結合試験

血漿蛋白結合の評価に使用するため、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中 E4 を分析する LC-MS/MS 法のバリデーションを実施した（ES-T33-VR00914）[4]。E4-d_3 を内標準物質とし、PBS を検量線及び品質管理試料のマトリックスとして使用した。試料処理手順及び LC-MS/MS 条件は、動物血漿を用いた LC-MS/MS 法（2.6.4.2.1.1 項）と同一とした。本分析法の選択性、検量線パラメータ、真度及び精度、希釈、キャリーオーバー及び安定性（オートサンプラー、凍結融解、ベンチトップ、長期）についてバリデーションを行った。

バリデーションは GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

重み付け係数 $1/x^2$ で線形モデルを用いて作成した結果、検量線の相関係数は 0.9979 以上であった。LLOQ 及び ULOQ はそれぞれ 0.05 及び 50 ng/mL であった。真度及び精度は設定基準を満

[4] 同じ試験番号の下で、エタノール添加溶液中の E4 の測定についても分析法のバリデーションを行ったが、この分析法は試験では使用しなかったため、ここでは示さない。

たした。微量のキャリーオーバーが認められたが、20 倍希釈では分析に影響はなく、安定性が確認された。

2.6.4.2.2 ドロスピレノン

E4 及び DRSP を併用投与した 13 週間反復投与毒性試験（0030-NC-002）における DRSP の生体試料分析のため、カニクイザルの血漿を用いて UHPLC-MS/MS 法のバリデーションを実施した（0030-NC-014）。内標準物質として 16α-ヒドロキシテストステロンを用いた。血漿試料を酢酸エチルで液液抽出し、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法による逆相 UHPLC で分析した。

バリデーションは GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

カニクイザルの血漿における DRSP の UHPLC-MS/MS 法は選択的であり、顕著なマトリックス効果又はキャリーオーバーは認められなかった。重み付け係数 $1/x^2$ で線形モデルを用いて作成した結果、検量線の決定係数は 0.9982 以上であった。LLOQ 及び ULOQ はそれぞれ 1 及び 1000 ng/mL であった。真度及び精度は基準を満たし、5 倍希釈まで分析に影響を及ぼさなかった。分析対象の回収率は 100%を超えたが（124%～130%）、回収率のばらつきは小さかった（CV：6.08%以下）。安定性が確認された。

2.6.4.2.3 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

E4 及び LNG を併用投与した 13 週間反復投与毒性試験（0031-NC-018）におけるトキシコキネティクス評価のため、カニクイザル血漿を用いて E4 及び LNG を同時測定する LC-MS/MS 法のバリデーションを実施した（0031-NC-021）。重水素化 E4-d_4 及び LNG-d_6 をそれぞれの内標準物質として用いた。血漿試料は tert-ブチルメチルエーテルを用いた液液抽出により処理した。抽出物を蒸発乾固し水に再溶解後、2 本に分注した。

- 1 本は E4 を定量するため、塩基性条件下でダンシルクロリドで誘導体化し、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法による逆相 HPLC で分析した。
- もう 1 本は LNG を定量するため、正モードのエレクトロスプレーインターフェースを用いてイオン化後に、MS/MS 検出法による逆相 HPLC（異なる条件）で分析した。

バリデーションは GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

E4 及び LNG の分析法は選択的であり、顕著なマトリックス効果又はキャリーオーバーは認められなかった。重み付け係数 $1/x^2$ で線形モデルを用いて作成した結果、検量線の決定係数は E4 が 0.9890 以上、LNG が 0.9902 以上であった。LLOQ 及び ULOQ は、E4 が 0.500 及び 500 ng/mL、LNG が 0.200 及び 200 ng/mL であった。いずれの分析対象についても、真度及び精度は基準を満たした。5 倍希釈まで E4 の分析に影響を及ぼさなかったが、LNG では希釈完全性は確認されなかった。分析対象の回収率は、E4 が 90%～111%（CV：12.9%以下）、LNG が 78%～99%（CV：8.9%以下）であった。いずれの分析対象についても安定性が確認された。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 エステトロール

2.6.4.3.1.1 単回投与後の吸収

E4 の単回投与後の吸収について、雌マウス及び雌ラットを用いた放射性標識体試験、雌ラットを用いた相対的経口バイオアベイラビリティ予備試験、並びに雌サルを用いた最大耐量試験で評価した。

マウスにおける放射能-時間プロファイル（0031-NC-023、TS 表 2.6.5.3.A）

雌 CD-1 マウス（n=15）に[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で単回経口投与した。[^{14}C]標識 E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。投与後 0.5、1、3、6 及び 24 時間に 3 例／時点から血液試料を採取した。血漿及び血液中の放射能濃度は、液体シンチレーション計数法（LSC）により測定した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

血液及び血漿のいずれにおいても、投与後 0.5 時間に最高濃度の放射能（それぞれ 2.516 及び 3.259 µg eq/g）が認められた。その後、濃度は速やかに低下した。

ラットにおける放射能-時間プロファイル（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.3.A）

雌 Sprague-Dawley ラット（n=3）に、[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で単回経口投与した。[^{14}C]標識 E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4、6、8、12 及び 24 時間に血液試料を採取した。血漿及び血液中の放射能濃度を LSC により測定した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

血液及び血漿のいずれにおいても、投与後 0.5 時間に最高濃度の放射能（それぞれ 1.392 及び 1.561 µg eq/g）が認められた。その後、濃度は速やかに低下した。

ラットを用いた相対的経口バイオアベイラビリティ予備試験（PR3002、TS 表 2.6.5.3.B）[5]

雌 Sprague-Dawley ラット（n=3/用量）に、E4 を 0.05、0.5 及び 5 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。対照投与経路は同用量の皮下投与とした。E4 は、エタノール 1%（v/v）を含有するラッカセイ油を用いて調製し、投与容量は 0.5 mL とした。投与後 0.5、1、2、4、8 及び 24 時間に血液試料を採取した。血漿中濃度はバリデートされていない LC-MS/MS 法で測定した［LLOQ：10～25 nmol/L（3～7.6 ng/mL）］。薬物動態パラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 3.3）を用いて算出した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

[5] Coelingh Bennink HJ, 2008b により公表された成績

＜結果＞

主要薬物動態パラメータを表 2.6.4-3 に示す。

$AUC_{0\text{-last}}$ から求めた皮下投与に対する経口バイオアベイラビリティの推定値は、低用量 2 群で 70%以上であった。5 mg/kg では相対的経口バイオアベイラビリティが低かったが、E4 皮下投与群のラット 1 例の血漿中濃度が他の 2 例のラットより一貫して高かったことにより、バイオアベイラビリティ値が下方に歪曲した可能性が高い。

表 2.6.4-3 ラットを用いた相対的経口バイオアベイラビリティ試験（PR3002）

Dosing Route		**Oral**			**Subcutaneous**	
Dose (mg/kg)	**0.05**	**0.5**	**5**	**0.05**	**0.5**	**5**
Parameters (Mean)						
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	33.9	230	1090	42.4	171	2920
$AUC_{0\text{-inf}}$ (ng·hr/mL)	ND	ND	1265	ND	211	3053
C_{max} (ng/mL)	14.6	52.0	204	21.3	86.9	600
T_{max} (hr)[1]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
$T_{1/2}$ (hr)	ND	ND	6.4	ND	3.7	2.7

[1] Median values

Abbreviations: $AUC_{0\text{-inf}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve extrapolated to infinity, $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, ND = not determined, T_{max} = time of C_{max}, $T_{1/2}$ = half-life of elimination

雌サルを用いた最大耐量試験（ES-T05、TS 表 2.6.5.3.B）

雌サル（n=4）に対し、Day 1、Day 6 及び Day 14 に、それぞれ 1、100 及び 1000 mg/kg の E4 を単回漸増経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4、8 及び 12 時間に血液試料を採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-4 に示す。

表 2.6.4-4 サルを用いた最大耐量試験（ES-T05）

Dose (mg/kg)	**1**	**100**	**1000**
Parameters (Mean)			
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	69.3	6816	93303
C_{max} (ng/mL)	30.5	2282	13564
T_{max} (hr)[1]	0.5	1.0	4.0

[1] Median values

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, ND = not determined, T_{max} = time of C_{max}

用量で標準化した値に基づくと、C_{max} の増加は用量の増加に伴う比例性を下回った。また、用量の増加に伴い T_{max} が延長し、用量の増加に伴う吸収の遅延が示唆された。$AUC_{0\text{-}last}$ に用量比例性からの逸脱は認められなかった。

2.6.4.3.1.2 反復投与後の吸収

雌のマウス、ラット及びサルを用いたトキシコキネティクス試験において、反復投与後の E4 の吸収に関する情報を入手した。また、交配済み／妊娠ラット及びウサギを用いたトキシコキネティクス評価を実施した。

2.6.4.3.1.2.1 マウス

雌 CD-1 マウスを用いた E4 の 2、4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験、並びにがん原性試験において、トキシコキネティクスパラメータを測定した。

2 週間経口投与用量設定試験（ES-T31、TS 表 2.6.5.4.A.1）

雌 CD-1 マウス（サテライト動物、約 6 週齢）に、E4 を 3、10、30 mg/kg/日の用量で 14 日間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.1 項に示す。血液試料（雌 2 例／群／時点）を Day 1 及び Day 14 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2 及び 4 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

投与及び試料採取は GLP に準拠しなかったが、生体試料分析及びトキシコキネティクス評価は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-5 に示す。

表 2.6.4-5 雌 CD-1 マウスを用いた 2 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T31）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**3**	**10**	**30**
Day 1			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	216	545	1656
C_{max} (ng/mL)	281	552	1125
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5
Day 14			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	205	590	1255
C_{max} (ng/mL)	255	515	1260
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

Day 1 及び Day 14 ともに、血漿中濃度は全ての用量で投与後 0.5 時間に C_{max} に達し、C_{max} は用量の増加に伴う用量比例性を下回る増加を示した。同様に、反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ の増加は用量比例性をわずかに下回った。反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ は、3 及び 10 mg/kg/日では初回投与後と同程度であったが、30 mg/kg/日では初回投与後よりもわずかに低かった。

4 週間反復経口投与毒性試験（ES-T34、TS 表 2.6.5.4.A.1）

雌 CD-1 マウス（サテライト動物、6～7 週齢）に、E4 を 0.03、0.3、3 及び 30 mg/kg/日の用量で 4 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.1 項に示す。血液試料（雌 2 例／群／時点）を Day 1 及び Day 28 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-6 に示す。

表 2.6.4-6 雌 CD-1 マウスを用いた 4 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T34）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
Day 1				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	1.74	15.1	150	2280
C_{max} (ng/mL)	1.13	9.96	99.7	1976
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5
Day 28				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	1.99	21.3	227 [1]	2004 [1]
C_{max} (ng/mL)	1.04	11.2	159	844
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5

[1] Represents $AUC_{0\text{-tau}}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr; pre-dose values at 0.03 and 0.3 mg/kg/day were <LLOQ

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, LLOQ = lower limit of quantification, T_{max} = time of C_{max}

Day 1 及び Day 28 のいずれにおいても、血漿中濃度は全ての用量で投与後 0.5 時間に C_{max} に達した。C_{max} の増加は、単回投与では 3 mg/kg まで、反復投与では 0.3 mg/kg まで用量に比例した。$AUC_{0\text{-last}}$ の増加は同様に、単回投与では 3 mg/kg まで用量に比例し、反復投与でも用量比例性からの大きな逸脱は認められなかった。反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ は、0.03、0.3 及び 3 mg/kg/日では初回投与後よりもわずかに高かったが、30 mg/kg/日ではわずかに低かった。$T_{1/2}$ は全用量で 1.52～3.28 時間であった。

13 週間反復経口投与毒性試験（ES-T40、TS 表 2.6.5.4.A.2）

雌 CD-1 マウス（サテライト動物、約 7 週齢）に、E4 を 0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日の用量で 13 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.1 項に示す。血液試料（雌 3 例／群／時点）を Day 1 及び Week 13 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

反復投与後の血漿中濃度-時間曲線を図 2.6.4-1 に示す。主要曝露パラメータを表 2.6.4-7 に示す。

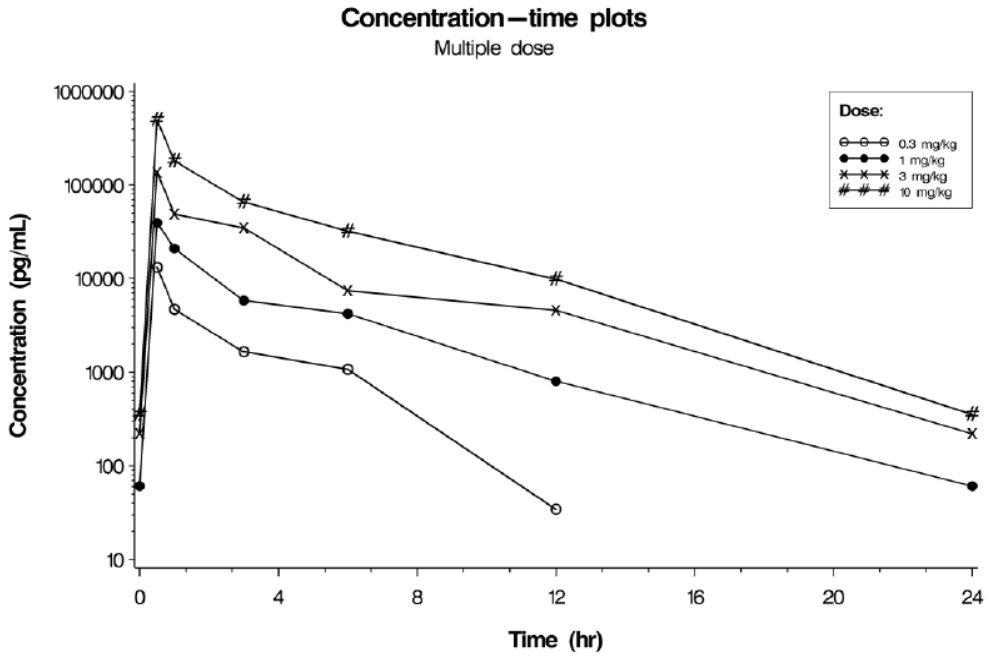


図 2.6.4-1 雌 CD-1 マウスにエステトロールを 13 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線（ES-T40）

注：LLOQ 未満でない場合、投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

表 2.6.4-7 雌 CD-1 マウスを用いた 13 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T40）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**0.3**	**1**	**3**	**10**
Day 1				
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	15.9	67.3	204	846
C_{max} (ng/mL)	13.2	45.6	151	598
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5
Week 13				
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	21.6	87.2 [1]	292 [1]	872 [1]
C_{max} (ng/mL)	13.2	39.4	136	494
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5

[1] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr; pre-dose value at 0.3 mg/kg/day was <LLOQ

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, LLOQ = lower limit of quantification, T_{max} = time of C_{max}

Day 1 及び Week 13 のいずれにおいても、血漿中濃度は全ての用量で 0.5 時間後に C_{max} に達した。C_{max} の増加は単回投与では用量比例性をわずかに上回り、反復投与ではほぼ用量に比例した。$AUC_{0\text{-}last}$ については、反復投与の 1 mg/kg/日以上で用量比例性からの顕著な逸脱は認められなかった。反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は、0.3、1 及び 3 mg/kg/日では初回投与後よりもわずかに高かったが、10 mg/kg/日では差は認められなかった。$T_{1/2}$ は全用量で 1.41～3.03 時間であった。

がん原性試験（0031-NC-004、TS 表 2.6.5.4.A.2）

雌 CD-1 マウス（サテライト動物、約 6 週齢）に、E4 を 0.125、0.25、0.5 及び 1 mg/kg/日の用量で 25 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。がん原性試験の詳細は 2.6.6.5.1.1 項に示す。血液試料（雌 3 例／群／時点）を Week 12 及び 25 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 6.3）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-8 に示す。

表 2.6.4-8 雌 CD-1 マウスを用いたがん原性試験（0031-NC-004）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
Week 12				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	4.14	12.5	28.6	50.6
C_{max} (ng/mL)	2.97	9.71	17.0	29.3
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5
Week 25				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	4.60	12.4	23.6	54.6
C_{max} (ng/mL)	3.75	8.91	14.9	29.1
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, LLOQ = lower limit of quantification, T_{max}: time of C_{max}

Week 12 及び Week 25 のいずれにおいても、血漿中濃度は全ての用量で 0.5 時間に C_{max} に達した。C_{max} はいずれの時点でも用量に比例して増加した。$AUC_{0\text{-last}}$ は、0.25～1 mg/kg/日では用量に比例して増加し、0.125～0.25 mg/kg/日では用量比例性をわずかに上回る増加を示した。Week 12 及び 25 の曝露量に差は認められず、定常状態と一致していた。

2.6.4.3.1.2.2 ラット

雌 Sprague-Dawley ラットを用いた E4 の 4 及び 26 週間反復経口投与毒性試験において、トキシコキネティクスパラメータを測定した。雌 Wistar ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験及びがん原性試験においても、トキシコキネティクスパラメータを測定した。

Sprague-Dawley ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（ES-T10、TS 表 2.6.5.4.A.3）

雌 Sprague-Dawley ラット（サテライト動物、約 8 週齢）に、E4 を 5、15、50 及び 150 mg/kg/日の用量で 4 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.2 項に示す。血液試料（雌 3 例／群／時点、2 時点／例）を Day 1 及び Day 29 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-9 に示す。

表 2.6.4-9 雌 Sprague-Dawley ラットを用いたエステトロールの 4 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T10）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**5**	**15**	**50**	**150**
Day 1				
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	488	1968	10511	48990
C_{max} (ng/mL)	285	1039	7430	14394
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5
Day 29				
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	592	1958	7179	40648
C_{max} (ng/mL)	167	1043	2481	9781
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	1.0

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max}: maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

Day 1 及び Day 29 において、血漿中濃度は Day 29 の 150 mg/kg/日（1.0 時間）を除く全ての用量で 0.5 時間に C_{max} に達した。初回投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ の増加は用量比例性を上回った。反復投与後の C_{max} 及び 50 mg/kg/日までの反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ に用量比例性からの顕著な逸脱は認められなかった。反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は、50 及び 150 mg/kg/日では初回投与後よりも低かった。$T_{1/2}$ は全用量で 2.14～4.74 時間であった。

Sprague-Dawley ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（ES-T18、TS 表 2.6.5.4.A.3）

雌 Sprague-Dawley ラット（サテライト動物、約 8 週齢）に、E4 を 1.5、5 及び 15 mg/kg/日の用量で 26 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.2 項に示す。血液試料（雌 3 例／群／時点、2 時点／例）を Day 1、Week 13 及び Week 26 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

26 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線を図 2.6.4-2 に示す。主要曝露パラメータを表 2.6.4-10 に示す。

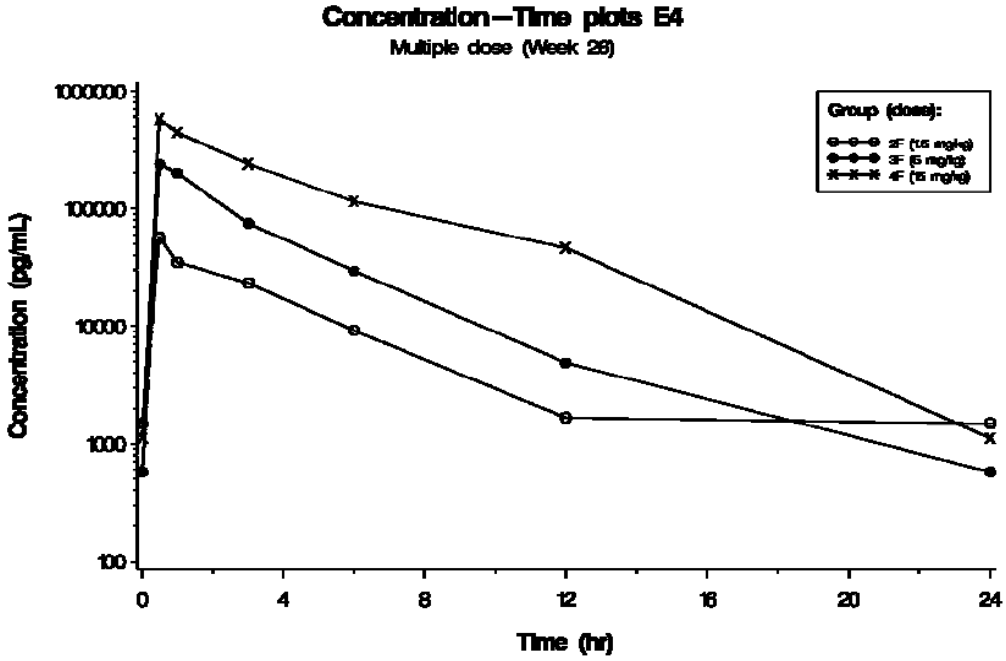


図 2.6.4-2 雌 Sprague-Dawley ラットにエステトロールを 26 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線（ES-T18）

投与量：○-○：1.5 mg/kg/日、●-●：5 mg/kg/日、x-x：15 mg/kg/日
注：投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

表 2.6.4-10 雌 Sprague-Dawley ラットを用いたエステトロールの 26 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T18）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**1.5**	**5**	**15**
Day 1			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	139	553	1862
C_{max} (ng/mL)	77.4	290	1048
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5
Week 13			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	158 [1]	594 [1]	1958 [1]
C_{max} (ng/mL)	58.0	189	551
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5
Week 26			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	196 [1]	736 [1]	2376 [1]
C_{max} (ng/mL)	56.8	238	574
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5

[1] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr
Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

Day 1 及び反復投与後のいずれにおいても、血漿中濃度は全ての用量で 0.5 時間に C_{max} に達した。初回投与後及び反復投与後のいずれにおいても、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ の増加はほぼ用量に比例

した。$AUC_{0\text{-last}}$ は Day 1 及び Week 13 には同程度であり、Week 26 までにわずかに増加した。$T_{1/2}$ は反復投与後では 2.36～3.03 時間であったが、初回投与後ではよりばらつきが大きくやや高値を示した（3.55～6.24 時間）。

Wistar ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験（ES-T39、TS 表 2.6.5.4.A.4）

雌 Wistar ラット（サテライト動物、約 5 週齢）に、E4 を 0.2、0.6、2 及び 6 mg/kg/日の用量で 13 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.2 項に示す。血液試料（雌 3 例／群／時点、2 時点／例）を Day 1 及び Week 13 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

反復投与後の血漿中濃度-時間曲線を図 2.6.4-3 に示す。主要曝露パラメータを表 2.6.4-11 に示す。

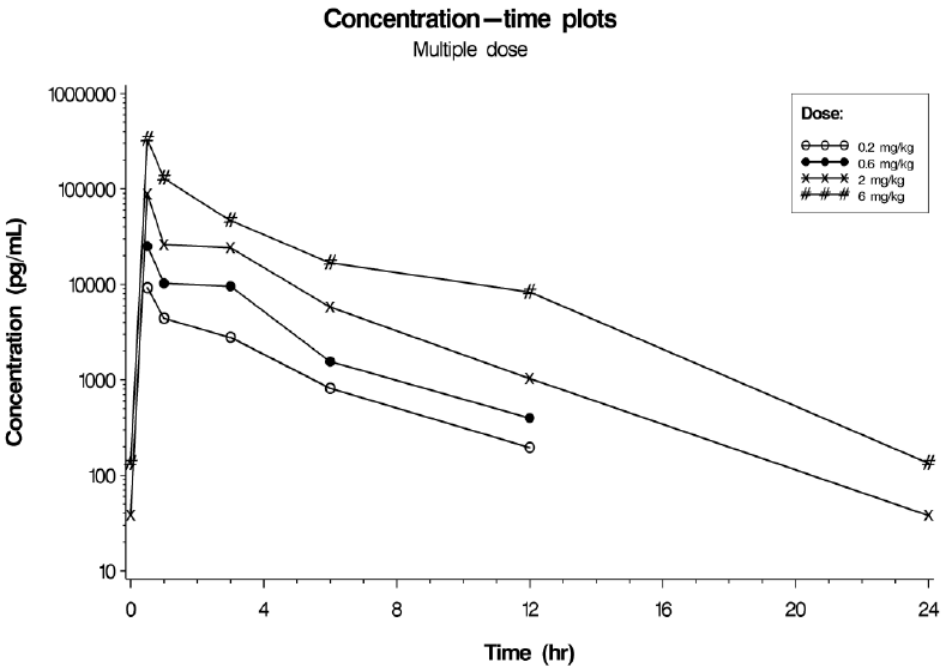


図 2.6.4-3 雌 Wistar ラットにエステトロールを 13 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線（ES-T39）

注：LLOQ 未満でない場合、投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

表 2.6.4-11 雌 Wistar ラットを用いたエステトロールの 13 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T39）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**
Day 1				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	26.3	89.0	267	1104
C_{max} (ng/mL)	10.2	41.2	98.4	454
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5
Week 13				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	21.4	57.6	173 [1]	595 [1]
C_{max} (ng/mL)	9.22	25.1	87.8	331
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5

[1] Represents $AUC_{0\text{-tau}}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr; pre-dose values at 0.2 and 0.6 mg/kg/day were <LLOQ

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, LLOQ = lower limit of quantification, T_{max} = time of C_{max}

Day 1 及び Week 13 のいずれにおいても、血漿中濃度は全ての用量で 0.5 時間後に C_{max} に達した。反復投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-last}}$ の増加は用量に比例したが、初回投与後には用量比例性からのわずかな逸脱が認められ、曝露量は 2～6 mg/kg の範囲で用量比例性を上回って増加した。$AUC_{0\text{-last}}$ は Day 1 と比較し Week 13 では 19%～46%低かった。$T_{1/2}$ は全用量で 1.63～2.46 時間であった。

Wistar ラットを用いたがん原性試験（0031-NC-003、TS 表 2.6.5.4.A.4）

雌 Wistar ラット（サテライト動物、約 6 週齢）に、E4 を 0.08、0.27 及び 0.8 mg/kg/日の用量で 25 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。がん原性試験の詳細は 2.6.6.5.1.2 項に示す。血液試料（雌 3 例／群／時点、2 時点／例）を Week 12 及び Week 25 の投与前、並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 6.3）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-12 に示す。

表 2.6.4-12 雌 Wistar ラットを用いたエステトロールの 25 週間経口投与トキシコキネティクス試験（0031-NC-003）

Doses (mg/kg) **Parameters**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
Week 12			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	6.62	14.7	45.6
C_{max} (ng/mL)	3.20	7.30	34.4
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5
Week 25			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	6.73	18.8	40.7
C_{max} (ng/mL)	3.39	9.99	25.5
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

Week 12 及び Week 25 のいずれにおいても、血漿中濃度は全ての用量で 0.5 時間に C_{max} に達した。$AUC_{0\text{-}last}$ の増加は、いずれの時点でも用量比例性をわずかに下回る傾向を示した。C_{max} の増加は Week 12 ではほぼ用量に比例し、Week 25 では用量比例性をわずかに下回る傾向を示した。評価した期間を通じて、$AUC_{0\text{-}last}$ 及び C_{max} に蓄積を示す兆候は認められなかった。

2.6.4.3.1.2.3 サル

雌カニクイザルを用いた E4 の 4、13 及び 39 週間反復経口投与毒性試験において、トキシコキネティクス評価を実施した。

4 週間反復経口投与毒性試験（ES-T11、TS 表 2.6.5.4.A.5）

雌カニクイザル（研究用繁殖動物、39～47 ヵ月齢、4 例／用量）に、5、15 及び 50 mg/kg/日の用量で E4 を 4 週間強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.3 項に示す。Day 1 及び Day 28 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4、8、16 及び 24 時間（Day 1 のみ）に血液試料を採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-13 に示す。

表 2.6.4-13 雌カニクイザルを用いたエステトロールの 4 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T11）

Doses (mg/kg) **Parameters (Mean)**	**5**	**15**	**50**
Day 1			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	492	1970	6157
C_{max} (ng/mL)	141	834	1250
T_{max} (hr) [1]	0.50	0.75	1.00
Day 28			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [2]	1153	3640	9327
C_{max} (ng/mL)	348	1098	2021
T_{max} (hr) [1]	1.00	1.00	1.50

[1] Median values

[2] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

T_{max} の中央値は 0.5～1.5 時間であり、用量の増加に伴ってわずかに延長傾向を示した。Day 1 の C_{max} は用量で標準化した 15 mg/kg 投与時の値が 5 及び 50 mg/kg 投与時の値より高く、C_{max} の増加に明らかな用量比例性は認められなかった。Day 1 の $AUC_{0\text{-}last}$ は用量にほぼ比例して増加した。Day 28 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ の増加は、15 mg/kg/日までは用量に比例し、15～50 mg/kg/日では用量比例性を下回った。反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は初回投与後よりも高かった。血漿中濃度-時間曲線には第 2 のピークが認められたことから、腸肝循環の可能性が示唆された。したがって、ほとんどの動物で $T_{1/2}$ を求めることはできなかった。

13 週間反復経口投与毒性試験（ES-T15、TS 表 2.6.5.4.A.5）

雌カニクイザル（研究用繁殖動物、48～56 ヵ月齢、6 又は 10 例／用量）に、E4 を 3、10 及び 30 mg/kg/日の用量で強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.3 項に示す。Day 1 及び Week 13 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4、8、16 及び 24 時間（Day 1 のみ）に血液試料を採取した。サルは試料採取日の少なくとも投与後 2 時間まで絶食とした。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-14 に示す。

表 2.6.4-14 雌カニクイザルを用いたエステトロールの 13 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T15）

Doses (mg/kg) **Parameters (Mean)**	**3**	**10**	**30**
Day 1			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	260	1067	2805
C_{max} (ng/mL)	87.3	471	788
T_{max} (hr) [1]	0.50	0.50	1.00
Week 13			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [2]	363	1215	3497
C_{max} (ng/mL)	122	357	871
T_{max} (hr) [1]	0.50	0.75	1.00

[1] Median values

[2] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

T_{max} の中央値は 0.5～1.0 時間であり、用量の増加に伴ってわずかに延長傾向を示した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ の増加は、初回投与後及び反復投与後のいずれにおいてもおおむね用量に比例した。反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は Day 1 よりもわずかに高かった。血漿中濃度-時間曲線から腸肝循環の可能性が示され、特に Day 1 では全ての動物で $T_{1/2}$ を求めることはできなかった。$T_{1/2}$ の平均値は 10.4～18.7 時間であった。

39 週間反復経口投与毒性試験（ES-T20、TS 表 2.6.5.4.A.5）

雌カニクイザル（研究用繁殖動物、44～61 ヵ月齢、8 又は 12 例／用量）に、E4 を 1、3 及び 10 mg/kg/日の用量で強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.1.3 項に示す。Day 1 並びに Week 13、26 及び 39 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4、8、16 及び 24 時間（Day 1 のみ）に血液試料を採取した。サルは試料採取日の少なくとも投与後 2 時間まで絶食とした。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

39 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線を図 2.6.4-4 に示す。主要曝露パラメータを表 2.6.4-15 に示す。

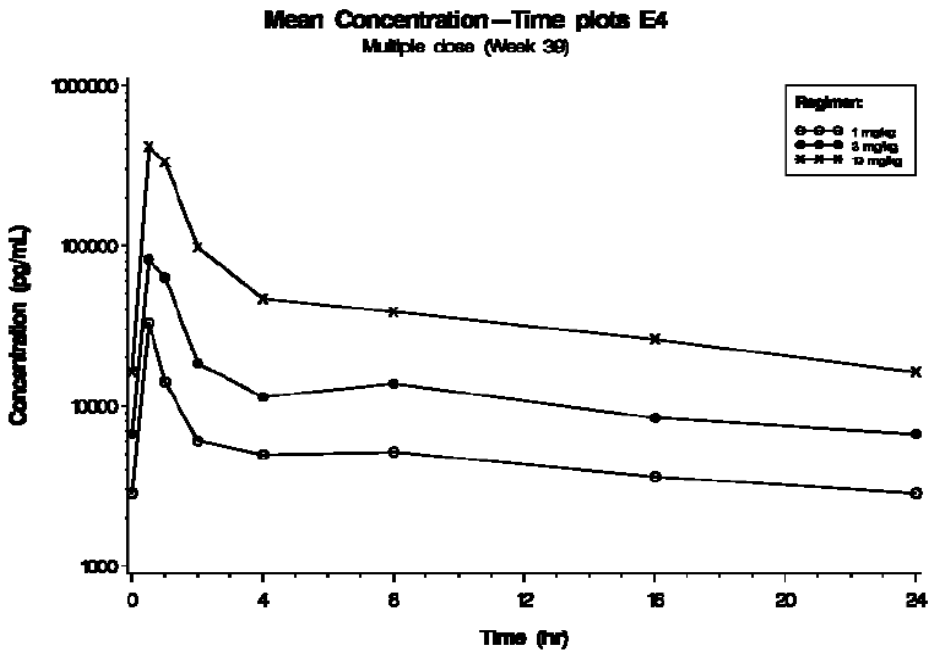


図 2.6.4-4 雌カニクイザルにエステトロールを 39 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線（ES-T20）

投与量：○-○：1 mg/kg/日、●-●：3 mg/kg/日、x-x：10 mg/kg/日
注：曲線は各時点の平均血漿中濃度に基づく

表 2.6.4-15 雌カニクイザルを用いたエステトロールの 39 週間経口投与トキシコキネティクス試験（ES-T20）

Doses (mg/kg) **Parameters (Mean)**	**1**	**3**	**10**
Day 1			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	120	340	1078
C_{max} (ng/mL)	31.7	110	365
T_{max} (hr) [1]	0.50	0.50	0.50
Week 13			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [2]	163	402	1420
C_{max} (ng/mL)	30.4	89.5	433
T_{max} (hr) [1]	0.75	0.75	1.00
Week 26			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [2]	109	312	1024
C_{max} (ng/mL)	19.8	84.9	245
T_{max} (hr) [1]	0.50	0.75	1.00
Week 39			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [2]	123	328	1250
C_{max} (ng/mL)	33.0	97.2	452
T_{max} (hr) [1]	0.50	1.00	0.50

[1] Median values

[2] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr: hour, T_{max} = time of C_{max}

T_{max} の中央値は 0.5～1.0 時間であり、用量との関連性は認められなかった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ の増加は、初回投与後及び反復投与後のいずれにおいても用量にほぼ比例した。$AUC_{0\text{-}last}$ は Day 1 と比較して Week 13 でやや高値を示したが、Week 26 及び 39 では初回投与後と同程度であった。個体別の血漿中濃度-時間曲線において、投与後約 8～16 時間に第 2 のピークが認められたことから、腸肝循環の可能性が示唆された。したがって、全ての動物で $T_{1/2}$ を求めることはできなかった。$T_{1/2}$ の平均値は 11.7～16.9 時間であった。

2.6.4.3.1.2.4 交配済み／妊娠動物

トキシコキネティクスパラメータは、交配済み／妊娠 Wistar ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験、ニュージーランドホワイトウサギを用いた受胎能及び着床に関する用量設定試験、並びに妊娠ニュージーランドホワイトウサギを用いた胚・胎児発生試験で測定した。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（ES-T01、ES-T02、TS 表 2.6.5.4.A.6）

2 件の胚・胎児発生に関する用量設定試験において、雌 Wistar ラット（8～10 週齢）に対し、妊娠 6 日（G6）から G17 まで E4 を強制経口投与した。用量は、最初の試験では 30、60 及び 90 mg/kg/日、2 回目の試験では 0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日とした。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。胚・胎児発生毒性の詳細を 2.6.6.6.1.2 項に示す。血液試料（交配済み雌 3 例／群／時点）を G6 及び G17 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4 及び 6 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により E4 の血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。報告書にトキシコキネティクスパラメータの算出方法（WinNonLin™、バージョン 4.1）は記載されていなかったが、ラットを用いた 4 及び 26 週間トキシコキネティクス試験と試験実施機関が同じであったため、ノンコンパートメント法であると考えられる。

いずれの試験も GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

2 試験の主要曝露パラメータを表 2.6.4-16 に示す。

表 2.6.4-16 Wistar ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験におけるトキシコキネティクス試験（ES-T01、ES-T02）

Doses (mg/kg)	**0.1**	**0.3**	**1**	**3**	**10**	**30**	**60**	**90**
Parameters			**Study ES-T02**				**Study ES-T01**	
G6								
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	2.90	9.41	36.1	102	485	2715	9570	14825
C_{max} (ng/mL)	2.09	5.77	25.5	99.0	540	2304	5890	7796
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
G17								
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	4.58	9.33	37.7	139	350	1870	6897	7792
C_{max} (ng/mL)	3.03	6.83	20.9	67.8	141	760	3422	4464
T_{max} (hr)	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max}: maximum plasma concentration, G = gestation day, hr: hour, T_{max} = time of C_{max}

G6 及び G17 の T_{max} は、G17 の 10 mg/kg/日（1.0 時間）を除き、いずれの用量においても 0.5 時間であった。ES-T02 試験においては、初回投与後及び反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ の増加は用量にほぼ比例した。ES-T01 試験の $AUC_{0\text{-}last}$ に関しては、G6 の 30～60 mg/kg/日で用量比例性を上回る増加傾向がみられたが、G17 では明確でなかった。10 mg/kg/日以上の用量では、$AUC_{0\text{-}last}$ 及び C_{max} は初回投与時と比較し反復投与後に明らかな低値を示した。

ウサギを用いた用量設定受胎能及び着床試験（ES-T04、ES-T04-BR1031、TS 表 2.6.5.4.A.6）

雌ニュージーランドホワイトウサギ（年齢未記載）に、交配前 4 日から G9 まで 0.1 及び 1 mg/kg/日の用量で E4 を 1 日 2 回強制経口投与した。E4 は、無菌水性懸濁溶媒 ASV（蒸留水、塩化ナトリウム、ベンジルアルコール、Tween 80、カルボキシメチルセルロース）を用いて週 1 回調製した。ウサギの排卵及び着床に対する E4 の影響の詳細を 2.6.6.6.1.1 項に示す。血液試料（雌 3 又は 4 例／用量）を Day 1（G-4）及び G9 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、4、8 及び 12 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により E4 の血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

両用量の全例で、Day 1 及び G9 のいずれにおいても T_{max} は 0.5 時間であった。初回及び最終投与後の C_{max} は、0.1 mg/kg 投与時でそれぞれ 4.51 及び 4.11 ng/mL であり、1 mg/kg 投与時で 34.0 及び 17.8 ng/mL であった。初回及び反復投与後 $AUC_{0\text{-}last}$ は、0.1 mg/kg 投与時でそれぞれ 13.1 及び 12.1 ng·hr/mL であり、1 mg/kg 投与時で 65.9 及び 83.9 ng·hr/mL であった。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（ES-T19、TS 表 2.6.5.4.A.6）

雌ニュージーランドホワイトウサギ（18～20 週齢）に、E4 を 0.05、0.15 及び 0.45 mg/kg/日の用量で、G6 から G18（0.05 及び 0.15 mg/kg/日）又は G15（0.45 mg/kg/日）[6]まで強制経口投与した。E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 1 mL/kg とした。胚・胎児発生毒性の詳細を 2.6.6.6.1.2 項に示す。血液試料（交配済み雌各 3 又は 4 例／用量）を投与前（G6 のみ）、並びに投与後 0.5、1、2、4、8、12 及び 24 時間に採取した。バリデートされた LC-MS/MS 法により E4 の血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.1.1 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 4.1）を用いて算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

主要曝露パラメータを表 2.6.4-17 に示す。

---

[6] 0.45 mg/kg/日の投与期間は、当初は G6 から G18 までとしていたが、G16 以降に床敷に血液が認められたため、G6 から G15 までに短縮した。

表 2.6.4-17 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験におけるトキシコキネティクス（ES-T19）

Doses (mg/kg) **Parameters (Mean)**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
G6			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	4.19	19.7	50.8
C_{max} (ng/mL)	0.802	3.69	9.38
T_{max} (hr) [1]	2.0	2.0	2.0
G18 or G15			
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [2]	6.84	28.5	57.5
C_{max} (ng/mL)	0.925	4.14	4.17
T_{max} (hr) [1]	2.0	2.0	3.0

[1] Median values

[2] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; 24 hr value was implemented at pre-dose

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, hr = hour, T_{max} = time of C_{max}

T_{max} の中央値は 2.0～3.0 時間であった。C_{max} の増加は初回投与後には用量に比例したが、反復投与後には用量に比例しなかった。G6 及び反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ の増加はほぼ用量に比例した。最高用量の 0.45 mg/kg/日での C_{max} は G6 よりも G15 で明らかに低かったが、吸収の程度（$AUC_{0\text{-}last}$）は G6 よりも G15 でわずかに高かったことから、G15 でこの用量での吸収が遅延したことと関連している可能性がある。

2.6.4.3.2 ドロスピレノン

動物における DRSP の薬物動態に関する公表文献は確認されていない。雌カニクイザルに E4 及び DRSP を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験においては、6（4） mg/kg/日 [7]の DRSP 単独投与群が含まれていた（0030-NC-002、2.6.4.3.3 項）。

血漿中 DRSP 濃度は投与後 3.0 時間以内に C_{max} に到達した。DRSP の曝露量は Day 1 と比較して Week 13 で低値を示したが（AUC 比 0.51）、これは用量を 2/3 に減量したことでは部分的にのみ説明できた。$T_{1/2}$ は初回投与後で 4.1 時間、13 週間投与後で 6.5 時間であった。

DRSP の薬理学的及び薬物動態学的特性に関する総説（Krattenmacher, 2000）では、若年の健康女性における経口投与の絶対バイオアベイラビリティは約 76%であり、単回投与時の曝露量は 10 mg まで用量に比例して増加すると述べられている。

白人及び日本人女性（20～35 歳）に 1、3 又は 6 mg を単回投与したとき、並びに 3 mg を EE 20 µg と併用で単回又は反復投与したときの DRSP の薬物動態データが（Blode, 2012）によって報告されている。白人女性のデータを表 2.6.4-18 に示す。臨床的に意味のある民族差を示す所見は認められなかった。

[7] 30/6 mg/kg/日の用量は、一般状態悪化や早期屠殺のため、Day 50 に 20/4 mg/kg/日に減量した。E4 及び DRSP 単独投与群では、Day 53 に用量を減量した。

表 2.6.4-18 ドロスピレノン単回投与、あるいはドロスピレノン／エチニルエストラジオール単回又は反復投与時の白人女性におけるドロスピレノンの薬物動態パラメータ（Blode, 2012）

Treatment	**DRSP**	**DRSP**	**DRSP**	**DRSP/EE**	**DRSP/EE**	**DRSP/EE**
Doses (mg)	**1**	**3**	**6**	**3/0.02**	**3/0.02**	**3/0.02**
Parameters (Mean)	**SD**	**SD**	**SD**	**SD**	**Day 1**	**Day 21**
AUC (ng·hr/mL)	140	506	1007	458	ND	1811
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (ng·hr/mL)					268	763
C_{max} (ng/mL)	9.85	33.9	62.5	30.9	38.4	70.3
T_{max} (hr)[1]	1.25	1.5	1.75	1.5	1.5	1.5
$T_{1/2}$ (hr)	25.5	28.5	26.3	27.7	ND	30.8

[1] Median values

Abbreviations: AUC = area-under-the-concentration-versus-time-curve, C_{max}: maximum plasma concentration, DRSP = drospirenone, EE = ethinylestradiol, hr = hour, ND = not determined, SD = single dose, T_{max} = time of C_{max}, $T_{1/2}$ = half-life of elimination

単回投与後、DRSP の曝露量（C_{max}、AUC）は評価した用量範囲で用量線形性を示した。投与後 1～2 時間以内に C_{max} に到達し、平均 $T_{1/2}$ は 25～29 時間であった。EE の併用投与は、DRSP の曝露量に重大な影響を及ぼさなかった。

反復投与後、約 8 日間の投与で DRSP 濃度は定常状態に達した。Day 21 の平均 C_{max} は Day 1 より約 2 倍高く、AUC 換算の蓄積では約 3 倍であった。最終投与後 7 日間の休薬期間中、DRSP 濃度は平均で 0.96 ng/mL まで低下した。

健康な女性被験者（年齢 24±3 歳）を対象に実薬 21 日＋休薬 7 日のレジメンで DRSP 3 mg 及び EE 30 µg を併用投与した 1 年間の薬物動態試験（Blode, 2000）では、DRSP は投与後 1.5～2 時間で C_{max} に到達し、投与サイクル 1 では Day 1 から Day 21 で C_{max} が 36.9 ng/mL から 87.5 ng/mL に増加した。投与サイクル 6、9 及び 13 終了時の C_{max} は、投与サイクル 1 終了時と同程度であった。曝露量（AUC 換算）は、投与サイクル 1 の Day 1（288 ng·hr/mL）から Day 21（827 ng·hr/mL）にかけて 3 倍の増加を示した。DRSP の AUC は投与サイクル 1 から 6 の間にさらに増加したが（930 ng·hr/mL にまで）、その後のサイクルでは一定に維持された。この蓄積は、7 日間の休薬期間中に DRSP の血清中濃度が完全には低下しなかったという所見と一致していた。$T_{1/2}$ は 31～33 時間であった。

2.6.4.3.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

雌カニクイザルに E4 及び DRSP を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験において、トキシコキネティクス評価を実施した。

13 週間反復経口投与毒性試験（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）

雌のカニクイザル（研究用繁殖動物、45～68 ヵ月齢、5 又は 9 例／用量）に、E4/DRSP を 3/0.6、10/2 及び 30/6（20/4）[8] mg/kg/日の用量で併用強制経口投与した。2 群のサル（5 例／群）に、E4 又は DRSP をそれぞれ 30（20）及び 6（4） mg/kg/日の用量で単独投与した。被験物質は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.3 項に示す。Day 1 及び Week 13 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、3、4、8、16 及び 24 時間（Day 1 のみ）に血液試料を採取した。サルは試料採取日の少なくとも投与後 4 時間まで絶食とした。血漿中濃度は、バリデーション済みの UHPLC-MS/MS 法を用いて測定した（2.6.4.2.1.1 及び 2.6.4.2.2 項）。トキシコキネティクスパラメータは、ノンコンパートメント法（WinNonLin™、報告書にバージョン記載なし）を用いて算出した。

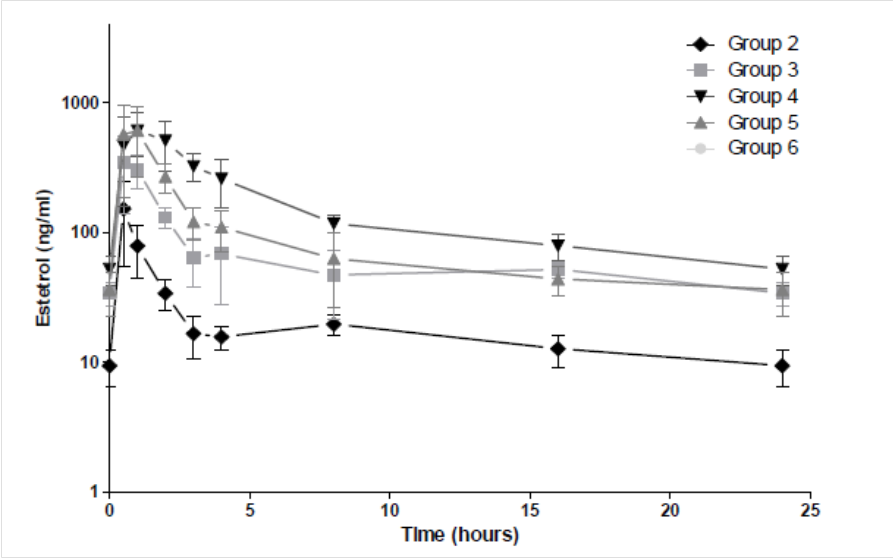
本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

13 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線を図 2.6.4-5 に示す。主要曝露パラメータを表 2.6.4-19 に示す。

[8] 30/6 mg/kg/日の用量は、一般状態悪化や早期屠殺のため、Day 50 に 20/4 mg/kg/日に減量した。E4 及び DRSP 単独投与群では、Day 53 に用量を減量した。

A. エステトロール



B. ドロスピレノン

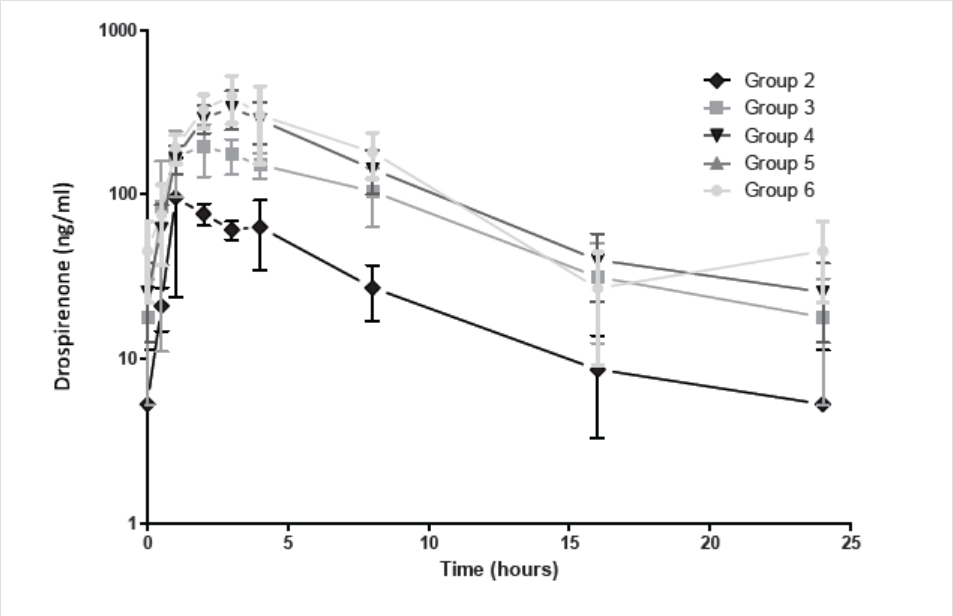


図 2.6.4-5 雌カニクイザルにエステトロール／ドロスピレノンを 13 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線（0030-NC-002）

第 2 群：E4/DRSP 3/0.6 mg/kg/日
第 3 群：E4/DRSP 10/2 mg/kg/日
第 4 群：E4/DRSP 30/6（20/4）mg/kg/日
第 5 群：E4 30（20）mg/kg/日
第 6 群：DRSP 6（4）mg/kg/日
注：曲線は各時点の平均血漿中濃度に基づく

表 2.6.4-19 雌カニクイザルを用いたエステトロール／ドロスピレノンの 13 週間経口投与トキシコキネティクス試験（0030-NC-002）

Test Article	**E4/DRSP**	**E4/DRSP**	**E4/DRSP**	**E4**	**DRSP**
Doses (mg/kg)	**3/0.6**	**10/2**	**30/6 (20/4) [1]**	**30 (20) [1]**	**6 (4) [1]**
Parameters (Mean)					
			Estetrol		
Day 1					
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	341	1430	5733	3108	NA
C_{max} (ng/mL)	173	658	1965	884	NA
T_{max} (hr) [2]	0.5	1.0	0.5	1.0	NA
Week 13					
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [3]	483	1608	3733	2281	NA
C_{max} (ng/mL)	173	380	722	687	NA
T_{max} (hr) [2]	0.5	1.0	1.0	1.0	NA
			Drospirenone		
Day 1					
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL)	745	2490	6766	NA	6186
C_{max} (ng/mL)	116	435	930	NA	758
T_{max} (hr) [2]	1.0	2.0	2.0	NA	3.0
Week 13					
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·hr/mL) [3]	630	1867	2769	NA	3150
C_{max} (ng/mL)	105	205	338	NA	399
T_{max} (hr) [2]	2.0	2.0	3.0	NA	3.0

[1] Dose reduced on Day 50 (combination) or Day 53 (compounds alone)

[2] Median values

[3] Represents $AUC_{0\text{-}tau}$, *i.e.,* AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, DRSP = drospirenone, E4 = estetrol, hr: hour, NA = not applicable, T_{max} = time of C_{max}

T_{max} の中央値は、E4 で 0.5～1.0 時間、DRSP で 1.0～3.0 時間であった。E4 については、C_{max} の増加は Day 1 ではほぼ用量比例性であったが、Week 13 では用量比例性を下回った。一方、$AUC_{0\text{-}last}$ の増加は Day 1 では用量比例性を上回っており、Week 13 ではほぼ用量に比例した。DRSP については、C_{max} の増加は Day 1 及び Week 13 のいずれにおいても用量比例性を下回ったが、$AUC_{0\text{-}last}$ の増加は Day 1 ではほぼ用量比例性を示し、Week 13 では用量比例性を下回った。

E4 の $AUC_{0\text{-}last}$ は Day 1 と Week 13 で同程度であったが、C_{max} は Week 13 に低下傾向を示した。DRSP の $AUC_{0\text{-}last}$ 及び C_{max} は Day 1 と比較して Week 13 で低下した。

DRSP の併用投与により E4 曝露量が増加したが、E4 の併用投与は DRSP 曝露量に影響を及ぼさなかった。

DRSP の平均 $T_{1/2}$ は 4.1～6.5 時間であった。E4 の平均 $T_{1/2}$ は 8.6～21.9 時間であった。

2.6.4.3.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

雌カニクイザルに E4 及び LNG を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験において、トキシコキネティクス評価を実施した。

13 週間反復経口投与毒性試験（0031-NC-018、TS 表 2.6.5.4.C.1）

雌のカニクイザル（研究用繁殖動物、58～68 ヵ月齢、5 又は 9 例／用量）に、E4/LNG を 3/0.0225、10/0.075 及び 30/0.225（20/0.150）[9] mg/kg/日の用量で併用強制経口投与した。2 群のサル（5 例／群）に、E4 又は LNG をそれぞれ 30（20）及び 0.225（0.150） mg/kg/日の用量で単独投与した。被験物質は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液/0.1%（v/v）Tween 80 を用いて調製し、投与容量は 5 mL/kg とした。この試験の毒性結果の詳細を 2.6.6.3.4 項に示す。Day 1 及び Week 13 の投与前、並びに投与後 0.5、1、2、3、4、8、16 及び 24 時間（Day 1 のみ）に血液試料を採取した。サルは Day 1 の少なくとも投与後 4 時間まで、及び Week 13 の試料採取日の少なくとも投与後 1 時間までは絶食とした。バリデートされた LC-MS/MS 法により血漿中濃度を測定した（2.6.4.2.3 項）。トキシコキネティクスパラメータはノンコンパートメント法（WinNonLin™、バージョン 6.3）を用いて算出した。

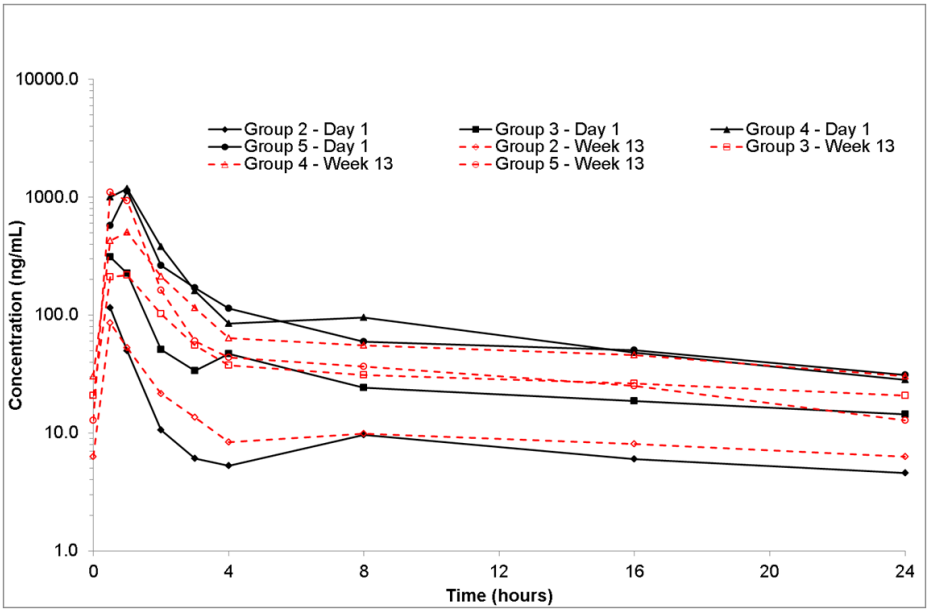
本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

13 週間投与したときの血漿中濃度-時間曲線を図 2.6.4-6 に示す。主要曝露パラメータを表 2.6.4-20 に示す。

[9] 30/0.225 mg/kg/日の用量は、一般状態悪化や早期屠殺のため、Day 51 に 20/0.150 mg/kg/日に減量した。E4 及び LNG 単独投与群でも、同日に用量を減量した。

A. エステトロール



B. レボノルゲストレル

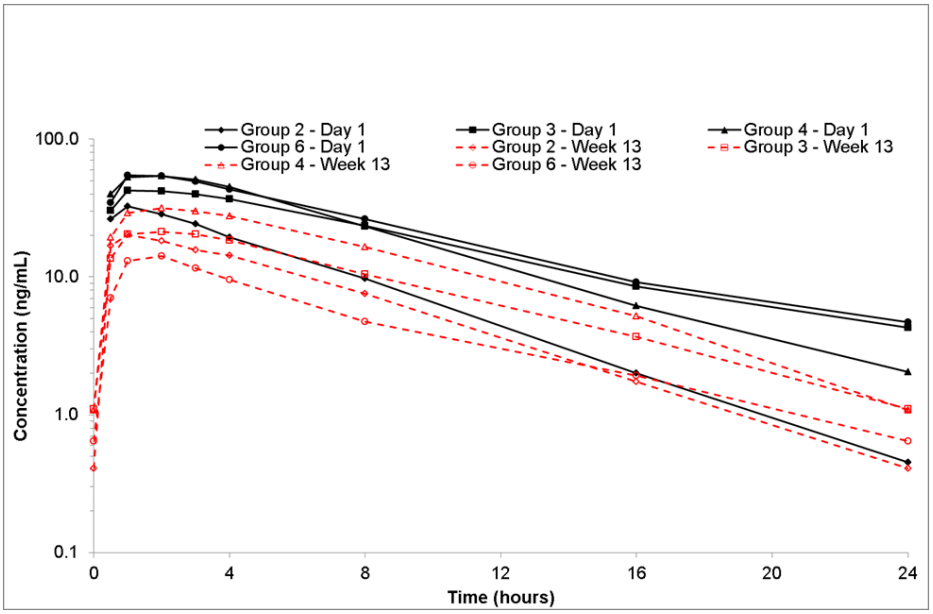


図 2.6.4-6 雌カニクイザルにエステトロール／レボノルゲストレルを 13 週間投与したときの Day 1 及び最終投与後の血漿中濃度-時間曲線（0031-NC-018）

第 2、3 及び 4 群：E4/LNG 3/0.0225、10/0.075 及び 30/0.225（20/0.150）mg/kg/日
第 5 群：E4 30（20）mg/kg/日
第 6 群：LNG 0.225（0.150）mg/kg/日
注：曲線は各時点の平均血漿中濃度に基づく

表 2.6.4-20 雌カニクイザルを用いたエステトロール／レボノルゲストレルの 13 週間経口投与トキシコキネティクス試験（0031-NC-018）

Test Article	**E4/LNG**	**E4/LNG**	**E4/LNG**	**E4**	**LNG**
Doses (mg/kg)	**3/0.0225**	**10/0.075**	**30/0.225 (20/0.150) [1]**	**30 (20) [1]**	**0.225 (0.150) [1]**
Parameters (Mean)					
			Estetrol		
Day 1					
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	238	835	3043	2585	NA
C_{max} (ng/mL)	116	360	1344	1129	NA
T_{max} (hr) [2]	0.5	1.0	1.0	1.0	NA
Week 13					
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL) [3]	282	934	1858	1913[4]	NA
C_{max} (ng/mL)	87.1	262	557	1324[4]	NA
T_{max} (hr) [2]	0.5	1.0	1.0	0.5	NA
			Levonorgestrel		
Day 1					
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL)	202	429	451	NA	500
C_{max} (ng/mL)	32.7	45.1	56.2	NA	57.5
T_{max} (hr) [2]	1.0	2.0	1.0	NA	1.0
Week 13					
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL) [3]	145	197	291	NA[4]	106
C_{max} (ng/mL)	20.7	22.0	32.1	NA[4]	14.6
T_{max} (hr) [2]	1.0	2.0	2.0	NA	2.0

[1] Dose reduced on Day 51

[2] Median values

[3] Represents $AUC_{0\text{-tau}}$, *i.e.*, AUC over a 24-hr dosing interval; pre-dose value was implemented at 24 hr

[4] Contamination with levonorgestrel was noted in the estetrol-only group in Week 13

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, C_{max} = maximum plasma concentration, E4 = estetrol, hr = hour, LNG = levonorgestrel, NA = not applicable, T_{max} = time of C_{max}

T_{max} の中央値は、E4 で 0.5～1.0 時間、LNG で 1.0～2.0 時間の範囲であった。初回投与後及び反復投与後のいずれにおいても、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-last}}$ の増加は E4 ではほぼ用量に比例したが、LNG では用量比例性を下回った。

E4 単独投与群における C_{max} の増加を除き、E4 の反復投与時に蓄積は認められなかった。LNG 曝露量は、いずれの併用投与群でも Day 1 よりも Week 13 に低値を示し、LNG 単独投与群で顕著であった。

Day 1 において LNG の併用投与は E4 曝露量に、E4 の併用投与は LNG 曝露量に重大な影響を及ぼさなかった。Week 13 における LNG 曝露量は、E4 との併用投与時よりも単独投与時に低値を示した。E4 曝露量については、E4 単独投与群で血漿試料に LNG の混入が認められたため、Week 13 での比較は行わなかった。汚染源は特定されなかったが、この群で均一な LNG の曝露が認められたことから、動物は汚染された製剤を投与された可能性がある。

LNG の平均 $T_{1/2}$ は 3.6～6.9 時間であった。E4 の平均 $T_{1/2}$ は 9.5～21.6 時間であった。

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 エステトロール

2.6.4.4.1.1 組織分布試験

アルビノ及び部分的有色雌ラットを用いて、放射性標識 E4 の組織分布を検討した。

ラットにおける組織分布（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.5）

雌アルビノ Sprague-Dawley ラット（n=7）及び部分的有色 Lister Hooded ラット（n=6）に、[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で単回経口投与した。[^{14}C]標識 E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。投与後 0.5、1、2、5、8、24 及び 48 時間にアルビノラットを、投与後 0.5、8、24 時間、7、14 及び 35 日に部分的有色ラットを屠殺した（n=1/時点）。屠殺直後に屍体を凍結させ、切片を作製し、定量的全身オートラジオグラフィーにより放射能の組織分布を分析した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

アルビノラットでは、放射能濃度は最初の測定時点である投与後 0.5 時間におおむね最高値を示した。消化管及び膀胱の構成部分（特に内容物）は除き、放射能濃度が最も高かったのは肝臓（12.5 µg eq/g）であった。さらに、副腎、大動脈、腎臓、膵臓及び唾液腺に放射能濃度が顕著であった（4.19～7.51 µg eq/g）。放射能は速やかに消失し、その後の全時点で肝臓が最も高い濃度を示した。投与後 24 時間までに定量可能であったのは、消化管及び膀胱の構成部分に加えて、副腎、腎臓、肝臓、膵臓、唾液腺及び甲状腺のみであった。投与後 48 時間の最終試料採取時点では、肝臓（1.73 µg eq/g）及び甲状腺（0.132 µg eq/g）並びに消化管及び膀胱の構成部分を除き、全ての組織が定量限界（0.076 µg eq/g）未満であった。

部分的有色ラットでは、放射能濃度は最初の測定時点である投与後 0.5 時間におおむね最高値を示した。放射能の組織分布は、アルビノラットとほぼ同様であった。消化管及び膀胱の構成部分（特に内容物）以外では、放射能濃度は肝臓で最も高く（13.7 µq eq/g）、大動脈、腎臓及び膵臓でも顕著な放射能濃度が認められた（6.37～7.17 µg eq/g）。放射能は速やかに消失し、投与後 24 時間までに大半の組織で定量限界未満となった。投与後 7 日に定量可能な濃度を示したのは、大腸内容物を除くと肝臓（0.410 µg eq/g）のみであった。メラニン含有組織を含む他の全ての組織で定量限界未満であった。

組織／血液比は、アルビノ及び部分的有色ラットのいずれにおいても投与後 0.5～8 時間において約半数の組織で 1 を上回った。8 時間以降は血液中の放射能が定量不能であったため、比は算出できなかった。消化管の構成部分以外で、投与後 8 時間に組織／血液比が最も大きかったのは肝臓であった（アルビノラットで 25.67、部分的有色ラットで 22.36）。

2.6.4.4.1.2 蛋白結合及び血球中への移行

マウス、ラット、サル及びヒト血漿を用いて、E4 の血漿蛋白結合を評価した。さらに、性ホルモン結合グロブリン（SHBG）に対する E4 の相対結合親和性（RBA）を算出した。ヒト血液を用いて血液／血漿間の分配を検討した。

血漿蛋白結合（ES-T33、TS 表 2.6.5.6.A）

平衡透析法により、E4 の血漿蛋白への *in vitro* 結合を測定した。雌 CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルからプールした血漿に 0.938、9.38、93.78、又は 937.8 ng/mL の E4 を添加した。健康な女性被験者の血漿に 0.938、4.69、9.38、又は 46.9 ng/mL の E4 を添加した。カットオフ値 5000 Da の膜を用い、添加血漿をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して 37°C で 6 時間透析した。平衡到達時間は 3～6 時間であった。血漿及び PBS 試料中の E4 濃度を、バリデーション済みの LC-MS/MS 法で分析した（2.6.4.2 項）。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

非特異的結合率は 0.3%～6.4%であり、蛋白結合の測定への影響はないと考えられた。蛋白結合率は、マウス血漿で 44.8%～55.9%、ラット血漿で 49.2%～66.0%、サル血漿で 50.3%～67.2%、ヒト血漿で 45.4%～50.4%であった。ラット及びサル血漿では 937.8 ng/mL で最高値が認められた。明確な濃度依存性又は種差は認められなかった。

性ホルモン結合グロブリンに対する相対結合親和性（PR3025、TS 表 2.6.5.6.B）

ヒト SHBG の RBA を[^{3}H]-ジヒドロテストステロン又は[^{3}H]-E2 をリガンドとする競合的結合アッセイで評価した。ヒト SHBG（トランスジェニックマウス血清より精製。PBS 中 1 nM）を 10 nM の[^{3}H]-ジヒドロテストステロン又は[^{3}H]-エストラジオール（E2）及び 0.17～33 μM の E4 とともに室温で 1 時間インキュベートした。デキストラン被覆炭末で非結合のステロイドを除去した後、結合した[^{3}H]-リガンドの量を LSC で測定した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

いずれの試験においても、E4 は SHBG の放射標識リガンドを置換しなかった。EE の RBA は[^{3}H]-ジヒドロテストステロンに対して 0.08、[^{3}H]-E2 に対して 2.02 であった。

血液／血漿間の分配（0031-104、TS 表 2.6.5.8.A）

健康な女性被験者 3 例のプールしたヒト血液を用いて、[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）の *in vitro* 血液／血漿間の分配を測定した。血液に 0.1 又は 1 μM の E4 を添加し、37°C で 0、10、30、60 又は 120 分間インキュベートした。ヘマトクリットを測定し、血漿（直接）及び血液（サンプルオキシダイザーで燃焼後）中の放射能濃度を LSC により測定した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

＜結果＞

血球中放射能の割合は、[^{14}C]標識 E4 の 0.1 μM で 49.3%、1 μM で 48.6%であった。血液／血漿間の分配はインキュベーション時間に依存しなかった。

2.6.4.4.1.3 胎盤通過試験

E4 を用いた胎盤通過試験は実施されていない。

E4 は妊娠期間中にヒト胎児の肝臓で産生される天然型エストロゲンであり（Holinka, 2008b）、妊娠女性の血漿・血清及び尿中にも妊娠の進展とともに胎児由来の E4 が認められること（Coelingh Bennink F, 2008、Heikkilä, 1971）から、E4 がヒトにおいて胎盤を通過することは既知であると考えられる。

2.6.4.4.2 ドロスピレノン

動物における DRSP の組織分布に関する公表文献は確認されていない。

Blode（2002）によると、ヒトにおける DRSP のみかけの分布容積は平均で 3.7 L/kg である。

動物血漿における DRSP の蛋白結合に関する公表文献、並びに動物又はヒト血液を用いた血液分布試験に関する公表文献は確認されていない。

DRSP の薬理学的特性及び薬物動態特性に関する総説（Krattenmacher, 2000）では、ヒト血清中での DRSP の蛋白結合率は 95%～97%であり、主にアルブミンへの結合が関与すると考えられると報告されている。DRSP はヒト血清アルブミンのサイト 1 に結合することが判明した（Wang, 2016）。DRSP は SHBG 及びコルチコステロイド結合グロブリンと結合しない（Krattenmacher, 2000）。

動物を用いた DRSP の胎盤通過試験に関する公表文献は確認されていない。

2.6.4.5 代謝（動物種間の比較）

2.6.4.5.1 エステトロール

2.6.4.5.1.1 *In vitro* 代謝試験

ヒト肝細胞を含む複数の動物種の肝細胞を用いて、E4 の代謝経路を *in vitro* で検討した。マウスを用いたがん原性試験における系統選択を裏付けるため、3 種のマウス系統由来の肝細胞を比較する試験を実施した。

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト肝細胞（ES-T06、TS 表 2.6.5.10.B）

雌 CD-1 マウス及び Sprague-Dawley ラット、雌ニュージーランドホワイトウサギ及びカニクイザル、並びにヒトドナー10 例の男女混合プールから凍結保存肝細胞を入手した。肝細胞（細胞 1×10^6 個/mL）を 10 µM（動物肝細胞）又は 1 µM（ヒト肝細胞）の E4 とともに 37°C で 0、1、2、又は 4 時間インキュベートした。アセトニトリルを添加してインキュベーションを停止し、遠心分離を行った。上清中の代謝物プロファイルを LC-MS により解析した。暫定構造推定に LC-MS/MS を適用した。肝細胞非存在下及び 50 µM の[^{14}C]-7-エトキシクマリン存在下でのインキュベーションを、それぞれ安定性及び代謝活性の対照とした。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

肝細胞非存在下では、4 時間のインキュベーション中に E4 が 30%減少したが、これは吸着に起因する可能性があると考えられた。全ての肝細胞標本で許容可能な 7-エトキシクマリンの代謝が認められた。

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトの肝細胞と 4 時間インキュベートしたとき、未変化の E4 は総ピーク面積のそれぞれ 0%、10.5%、3.6%、0.65%及び 4.8%であった。

計 13 種類の代謝物が認められ、M1～M13 とした[10]。各動物種で生成した代謝物及び主要代謝物（t=4 時間での総ピーク面積の 10%以上）の生成に関する推定代謝経路を表 2.6.4-21 に示す。

表 2.6.4-21 複数の動物種の肝細胞における代謝物（ES-T06）

Species	Metabolites Observed[1]	Main Metabolic Pathways
Mouse	M4, M6, M10, M13	Hydroxylation + sulfation (M4)
Rat	M2, M3, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13	Hydroxylation + methylation + glucuronidation (M2, M5) Glucuronidation (D-ring) (M6) Sulfation (M8)
Rabbit	M1, M2, M4, M8, M12	Glucuronidation of 3-OH (A-ring) (M1)
Monkey	M3, M4, M6, M8, M10, M11, M13	Glucuronidation of D-ring (M3, M6) Sulfation (M8)
Human	M6, M8	Glucuronidation of D-ring (M6) Sulfation (M8)

[1] Metabolites representing ≥10% of total peak area at t=4 hours are underlined

マウス肝細胞では、水酸化及び硫酸抱合により生成された代謝物 M4 が、4 時間で総ピーク面積の 96%を占めた。ラット肝細胞では、代謝物 M2、M5、M6 及び M8 が 4 時間でピーク面積のそれぞれ 15%、32%、11%及び 12%を占めた。M2 及び M5 は水酸化、メチル化及びグルクロン酸抱合の組み合わせにより生成され、M6 及び M8 はそれぞれ直接グルクロン酸抱合及び硫酸抱合により生成された。ウサギ肝細胞における 4 時間での主要代謝物は M1（E4-3-グルクロニド）であった（総ピーク面積の 81%）。サル肝細胞では、M3、M6 及び M8 が 4 時間での総ピーク面積のそれぞれ 28%、56%及び 10%を占め、直接グルクロン酸抱合（M3、M6）又は硫酸抱合（M8）によって生成された。ヒト肝細胞では、4 時間に認められた代謝物はグルクロニド M6 及び硫酸抱合体 M8 のみであり、それぞれ総ピーク面積の 45%及び 51%を占めた。ヒト代謝物は動物（特にラット及びサル）の肝細胞でも生成された。

マウス肝細胞（3 系統）（ES-T32、TS 表 2.6.5.10.C）

雌 CD-1、B6C3F1 又は C57BL/6 マウスの凍結保存肝細胞（細胞 1×10^6 個/mL）を、10 μM の E4 とともに 37℃ で 0 又は 10 分間、あるいは 0.5、1 又は 4 時間インキュベートした。アセトニトリルを添加してインキュベーションを停止し、遠心分離を行った。上清中の代謝物プロファイルを LC-MS により解析した。暫定構造推定に LC-MS/MS を適用した。50 μM の[^{14}C]-7-エトキシクマリン存在下でのインキュベーションを代謝活性の対照とした。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

全ての肝細胞標本で許容可能な 7-エトキシクマリンの代謝が認められた。

[10] ES-T06 試験における代謝物のナンバリングは、PR3041 試験におけるナンバリングと無関係である。

CD-1、B6C3F1 及び C57BL/6 マウスの肝細胞と 4 時間インキュベートしたとき、未変化の E4 は総ピーク面積のそれぞれ 18%、5%及び 12%であった。

E4 の代謝は、マウス全 3 系統で同様であった。3 種類の代謝物 M3、M4 及び M6[11]が認められ、いずれのマウス系統の肝細胞においても M4 が主要代謝物（総ピーク面積の 80%以上）であった。M4 は水酸化及び硫酸抱合により生成され、M3 及び M6 は E4 の直接グルクロン酸抱合（D 環）により生成された。

ラット及びヒト肝細胞（PR3041、TS 表 2.6.5.10.A）[12]

雌 Sprague-Dawley ラットからの新鮮単離肝細胞及び[redacted]歳の白人女性から採取した凍結保存肝細胞（細胞 4×10^5 個/mL）を、1 又は 10 µM の E4 とともに 37°C、95%（v/v）空気/5%（v/v）CO_2 下で 0、0.5、1、2 又は 4 時間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを添加してインキュベーションを停止し、遠心分離を行った。上清中の代謝物プロファイルを LC-MS により解析した。肝細胞非存在下及びブフラロール 20 µM 存在下でのインキュベーションを、それぞれ安定性及び代謝活性の対照とした。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

E4 はインキュベーション条件下で安定であり、ラット及びヒトのいずれの肝細胞も代謝的に活性であった。1 又は 10 µM の E4 と 4 時間インキュベーション後の未変化体の残存率は、ラット肝細胞で 48%及び 30%、ヒト肝細胞で 27%及び 49%であった。

5 種類の代謝物が認められ、M1～M5 とした。ラット肝細胞では M1 及び M2 が認められ、M1 が主要代謝物であった。M1 の m/z 値（m/z 333）は水酸化及びメチル化による生成、あるいは脱水素化及びジヒドロキシル化による生成と一致していた。ヒト肝細胞では M3、M4 及び M5 が認められ、1 µM では M4、10 µM では M5 が主要代謝物であった。M4（m/z 383）及び M5（m/z 479）の m/z 値は、それぞれ直接硫酸抱合及びグルクロン酸抱合による生成と一致した。

2.6.4.5.1.2 *In vivo* 代謝試験

雌のマウス及びラットを用いて *in vivo* で代謝経路を検討した。また、2 種のげっ歯類におけるヒトの主要代謝物の生成を評価するために動物種間の比較を行った。

マウスにおける代謝（0031-NC-023、TS 表 2.6.5.9.A）

[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で投与した雌 CD-1 マウス（9 例）の尿（12～48 時間）及び糞（0～48 時間）試料（詳細は 2.6.4.6.1 項参照）をオフライン放射能検出を伴う LC-MS/MS により分析し、代謝物プロファイル及び構造推定を行った。選択した試料は、投与した放射能の合計 80.2%を占め、そのうち 14.5%が尿中、65.7%が糞中に排泄された。

---

[11] ES-T32 試験における代謝物のナンバリングは、ES-T06 試験におけるナンバリングと同一とした。

[12] Visser, 2008 により公表された成績

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

尿中から 9 種類（U1～U9）、糞中から 4 種類（F1～F4）の代謝物が検出された。未変化体 E4（U9、F4）の尿中及び糞中排泄率は、それぞれ投与量の 2.19%及び 2.30%であった。推定代謝経路を表 2.6.4-22 に示す。主要代謝物は、尿中及び糞中におけるヒドロキシ-E4-硫酸（それぞれ U4、投与量の 4.72%及び F2、投与量の 7.75%）及び糞中におけるヒドロキシ-E4-ケトン（F1、投与量の 8.47%）であった。置換基の正確な付加位置は特定できなかった。

表 2.6.4-22 雌マウスの尿及び糞中代謝物（0031-NC-023）

Metabolites Observed[a]		Metabolic Pathways
Urine	**Feces**	
U1, U2		Hydroxylation + glucuronidation
U3, U6		Glucuronidation
U3		Hydroxylation + methylation + sulfation
	F1	Hydroxylation + ketone formation
U4	F2	Hydroxylation + sulfation
U5	F3	Sulfation
U7, U8		Hydroxylation
U9	F4	Estetrol (parent compound)

[a] Main metabolites are underlined.

ラットにおける代謝（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.9.B）

[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で投与した雌 Sprague-Dawley ラット（9 例）の血漿（0.5、6 時間）、尿（0～24 時間）、糞（0～48 時間）及び胆汁（0～12 時間）試料（詳細は 2.6.4.3.1.1 及び 2.6.4.6.1 項参照）を、オフライン放射能検出を伴う LC-MS/MS により分析し、代謝物プロファイル及び構造推定を行った。選択した排泄物は、投与した放射能の合計 94.7%を占め、そのうち 9.9%が尿中、84.8%が糞中に排泄された。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

血漿中から 7 種類の代謝物（P1～P7）が検出された。P4 は E4 と同定され、投与後 0.5 及び 6 時間のいずれにおいても主要化合物であった。

尿中から 9 種類（U1～U9）[13]、糞中から 5 種類（F1～F5）の代謝物が検出された。未変化体 E4（U7、F5）が尿中の主成分であり（投与量の 3.74%）、糞中の未変化体は投与量の 6.40%であった。推定代謝経路を表 2.6.4-23 に示す。糞中の主要代謝物はヒドロキシ-E4 であった（F4、投与量の 15.82%）。胆汁中の主要代謝物は、グルクロン酸抱合体（B1、投与量の 22.35%）及び E4 のメトキシル化グルクロン酸抱合体（B2、投与量の 11.75%）であった。一部の代謝物に複数の異性体が認められたが、置換基の正確な付加位置は特定できなかった。

[13] 0031-NC-022 及び 0031-NC-023 試験の尿及び糞中代謝物のナンバリングは無関係である。

表 2.6.4-23 雌ラットの血漿、尿、糞及び胆汁中代謝物（0031-NC-022）

Metabolites Observed[a]				Metabolic Pathways
Plasma	**Urine**	**Feces**	**Bile**	
P1	U1		B1, B4	Glucuronidation (2)[b]
P2, P3	U2		B2, B3, B5	Hydroxylation + methylation + glucuronidation (3)
		F1, F2		Hydroxylation + sulfation (2)
	U3	F3		Sulfation (3)
	U4			Hydroxylation + methylation + sulfation (3)
		F4		Hydroxylation
	U5, U6			Glucosylation (2)
P4	U7	F5	B6	Estetrol (parent compound)
P5, P6, P7	U8, U9			Hydroxylation + methylation (3)

[a] Main metabolites are underlined
[b] Number of isomers is given in parentheses

ラット尿中代謝物の同定（ES-T35）

ラット凍結乾燥尿を用いて予備的なフィージビリティ及び代謝物同定試験を実施した（ES-T35）。投与又は試料採取手順に関する詳細は報告されなかった。最初の LC-MS プロファイルでは、3 種類の代謝物の存在が示唆され、それぞれメトキシ-E4 と同等の質量を有していた（m/z 333.17）。HPLC でさらに精製後、これら 3 つのうち主要代謝物は、^{1}H-NMR 及び ^{14}C-NMR により 2-ヒドロキシ-3-メトキシ-E4 と同定された（図 2.6.4-7）。

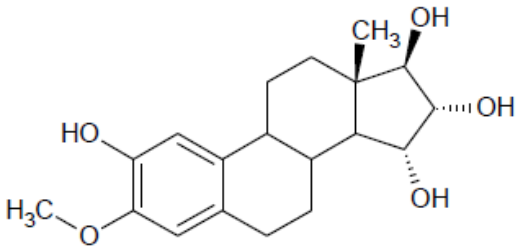


図 2.6.4-7 2-ヒドロキシ-3-メトキシ-エステトロールの構造（ES-T35）

動物種間の比較（Es0001-NC-012、Es0001-NC-010、MIT-Es0001-C105、TS 表 2.6.5.9.D）

2 つのヒト主要代謝物におけるグルクロニド置換基の位置を特定し、マウス及びラットでそれらの生成を評価する試験を実施した（Es0001-NC-012）。

この動物種間の比較のための動物試料は、Es0001-NC-010 試験の雌マウス 4 例及び雌ラット 2 又は 3 例から作製した。マウス及びラットに、0031-NC-023 及び 0031-NC-022 試験と同じ用量を投与し、試料採取時点はこれらの試験に基づき、T_{max}（血漿）又は投与量の大部分が回収された時点（排泄物）とした。ヒト試料は、MIT-Es0001-C105 試験（モジュール 2.7.2 参照）から採取した。

妊娠の可能性がない（閉経後又は外科的不妊）女性に 15 mg（2.8 MBq）の[^{14}C]標識 E4 を投与した代謝／排泄試験では、投与量の約 69%及び 22%がそれぞれ尿及び糞中に回収された（MIT-Es0001-C105）。

血漿中に認められた主要代謝物は、2 種類の E4-グルクロニド（T_{max} 0.25～0.5 時間で放射能の 17%及び 62%）及び 1 種類の E4-グルクロニド-硫酸抱合体（T_{max} 0.25～0.5 時間で放射能の 9%）であった（MIT-Es0001-C105-UTN/14、モジュール 2.7.2 参照）。

2 種類の E4-グルクロニドは尿中の主要化合物であった。尿中では、E4 及び E4-グルクロニド-硫酸抱合体は顕著な量で認められなかった。糞中に認められた化合物は E4 のみであった（MIT-Es0001-C105-UTN/14）。

以下の試料を分析した（表 2.6.4-24）。

表 2.6.4-24 動物種間の比較のためのマウス、ラット及びヒト試料（Es0001-NC-010、MIT-Es0001-C105）

Sample	Mouse		Rat		Human	
	Time (hr)	Radioactivity[a] (ng eq/mL)	Time (hr)	Radioactivity[a] (ng eq/g)	Time (hr)	Radioactivity[a] (ng eq/g)
Plasma	0.5	2549	0.5	1595	0-2[b](S001)	231[b]
Sample	**Mouse**		**Rat**		**Human**	
	Time (hr)	**Radioactivity[a] (% of dose)**	**Time (hr)**	**Radioactivity[a] (% of dose)**	**Time (hr)**	**Radioactivity[a] (% of dose)**
Urine	12-48	4.01	0-24	9.92	0-6	21.74
Bile	-	-	0-12	79.17	-	-
Feces	0-48	74.29	0-48	1.62	48-72	7.57

[a] Data from Study Nos. Es001-NC-010 (animal samples) and MIT-Es0001-C105 (human samples)

[b] For human plasma the indicated value represents C_{max} (geometric mean) from subjects [redacted]-[redacted]; 0.25-0.5 hr pooled plasma from subjects [redacted]-[redacted] ($T_{max,\ 1st\ peak}$) showed variable retention times, but there was insufficient sample for re-analysis; consequently a pooled human plasma extract (subject [redacted], 0-2 hr), considered representative of the metabolite profile at $T_{max,\ 1st\ peak}$, was used for re-analysis

オフライン放射能検出を伴う LC-MS/MS により試料を分析し、代謝物プロファイル及び構造解析を行った。4 種類の合成標準化合物（C3、C15、C16 又は C17 位にグルクロニド置換基を有する E4）とのコクロマトグラフィーに基づき、さらに同定を行った。

本試験は GLP を遵守して実施した[14]。

＜結果＞

ヒト血漿中（HP1、HP4）及び尿中（HU1、HU4）の 2 種類の主要グルクロニドは、E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドと同定された。E4-グルクロニド-硫酸抱合体の MS 断片化は、C3 位に位置する硫酸置換基と一致した。グルクロニド置換基の位置は確定されなかったが、E4-16-グルクロニドのヒト代謝物としての重要性（下記参照）を考慮すると、C16 位である可能性が最も高いと推定される。

[14] Es0001-NC-010 試験（動物試料の作製）は GLP に準拠して実施されたものではない。

E4-3-グルクロニドは、0～2 時間のヒト血漿中放射能の 15.3%[15]（T_{max} で 231×0.153＝約 35 ng eq/mL に相当）[16]、0～6 時間のヒト尿中放射能の 16.3%（投与量の 21.74×0.163＝3.5%に相当）[17]を占めた。

E4-3-グルクロニドは以下の試料の主要代謝物であった。

- 0.5 時間マウス血漿（MP5、放射能の 19.9%、2549×0.199＝507 ng eq/g に相当）
- 0.5 時間ラット血漿（RP1、放射能の 19.4%、1595×0.194＝309 ng eq/g に相当）
- 12～48 時間マウス尿（MU5、放射能の 10.0%、投与量の 4.01×0.10＝0.4%に相当）
- 0～12 時間ラット胆汁（RB1、放射能の 23.7%、投与量の 79.17×0.237＝18.8%に相当）

E4-3-グルクロニドは、ラットの尿中又は両動物種の糞中において有意な量（放射能の 1%以上）で検出されなかった。

E4-16-グルクロニドは、0～2 時間のヒト血漿中放射能の 61.3%（231×0.613＝約 142 ng eq/mL）及び 0～6 時間のヒト尿中放射能の 77.7%（投与量の 21.74×0.777＝16.9%）を占めた。E4-16-グルクロニドは以下の試料の重要な代謝物であった。

- 0～24 時間ラット尿（RU10、放射能の 14.9%、投与量の 9.92×0.149＝1.5%に相当）
- 0～12 時間ラット胆汁（RB10：放射能の 16.4%、投与量の 79.17×0.164＝13.0%に相当）

E4-16-グルクロニドは、マウス又はラット血漿、マウス尿及び両動物種の糞中において有意な量（放射能の 1%以上）で検出されなかった。

E4-グルクロニド-硫酸抱合体（HP2、HU2）は、0～2 時間のヒト血漿中放射能の 11.0%（231×0.11＝約 25 ng eq/mL）及び 0～6 時間のヒト尿中放射能の 2.1%を占めた。E4-グルクロニド-硫酸抱合体はラット胆汁中にごくわずか認められた。

同定されたヒトグルクロニドに加え、マウス及びラット試料中に E4-15-グルクロニドが認められた。

- 0.5 時間マウス血漿（MP12、放射能の 3.9%、2549×0.039＝99 ng eq/g に相当）
- 12～48 時間マウス尿（MU12、放射能の 3.4%、投与量の 4.01×0.034＝0.14%に相当）
- 0～24 時間ラット尿（RU8、放射能の 7.0%、投与量の 9.92×0.070＝0.69%に相当）
- 0～12 時間ラット胆汁（RB8、放射能の 2.0%、投与量の 79.17×0.020＝1.6%に相当）

E4-15-グルクロニドは、ラット血漿又は糞試料において、有意な量（放射能の 1%以上）で検出されなかった。

---

[15] Es0001-NC-012 報告書では、試料中の総放射能率を%ROI（関心領域の%）として表す。

[16] 0～2 時間のプール試料は T_{max} における代謝物プロファイルを表していると考えられ、グルクロニドの割合は MIT-Es0001-C105-UTN/15 試験において T_{max} で確認された割合に近い（E4-3-グルクロニドが 17.0%、E4-16-グルクロニドが 61.7%）。

[17] MIT-Es0001-C105 試験では、0～120 時間の尿中放射能排泄率は投与量の 65.17%であり、このうち 15.9%は E4-3 グルクロニド、46.0%は E4-16-グルクロニドであった［MIT-Es0001-C105-UTN/14 報告書 Table 2 における被験者 [redacted] ～ [redacted] の代謝物存在比の平均値（それぞれ 24.4%及び 70.6%）に放射能排泄率 65.17%を乗じて算出］。

サルにおける代謝（Es0001-NC-016、TS 表 2.6.5.9.C）

雌カニクイザルに E4 を 10 mg/kg の用量で 13 週間反復経口投与したときの最終投与後 1 時間の血漿を用い、LC-MS/MS により代謝物プロファイルを検討した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

E4 のヒト血漿中主代謝物である E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、サルの血漿中にも認められた。また、サルの血漿中には E4-15-グルクロニド及び E4-17-グルクロニドも認められた。

2.6.4.5.1.3 推定代謝経路

E4 の代謝経路に関する知見は、肝細胞を用いた *in vitro* 試験、マウス及びラットを用いた *in vivo* 試験、並びに動物種間の比較に基づく（2.6.4.5.1.1 及び 2.6.4.5.1.2 項）。

大部分の代謝物について、置換基の正確な付加位置は確認されておらず、一部の代謝物に複数の異性体が認められた。*In vitro* や *in vivo* で認められた代謝経路は以下のとおりである。

- 水酸化
- 直接グルクロン酸抱合（グルクロニドの位置は C3、C15 又は C16 位）
- 直接硫酸抱合
- 水酸化＋グルクロン酸抱合（マウスの *in vivo* 試験のみ）又は硫酸抱合
- 水酸化＋メチル化
- 水酸化＋メチル化及びグルクロン酸抱合又は硫酸抱合
- 水酸化＋ケトン生成（マウスの *in vivo* 試験のみ）
- グルコシル化（ラットの *in vivo* 試験のみ）

各動物種及び女性の肝細胞における推定代謝経路を図 2.6.4-8 に示す。マウスやラットで同定されたヒト代謝物を図 2.6.4-9 に示す。

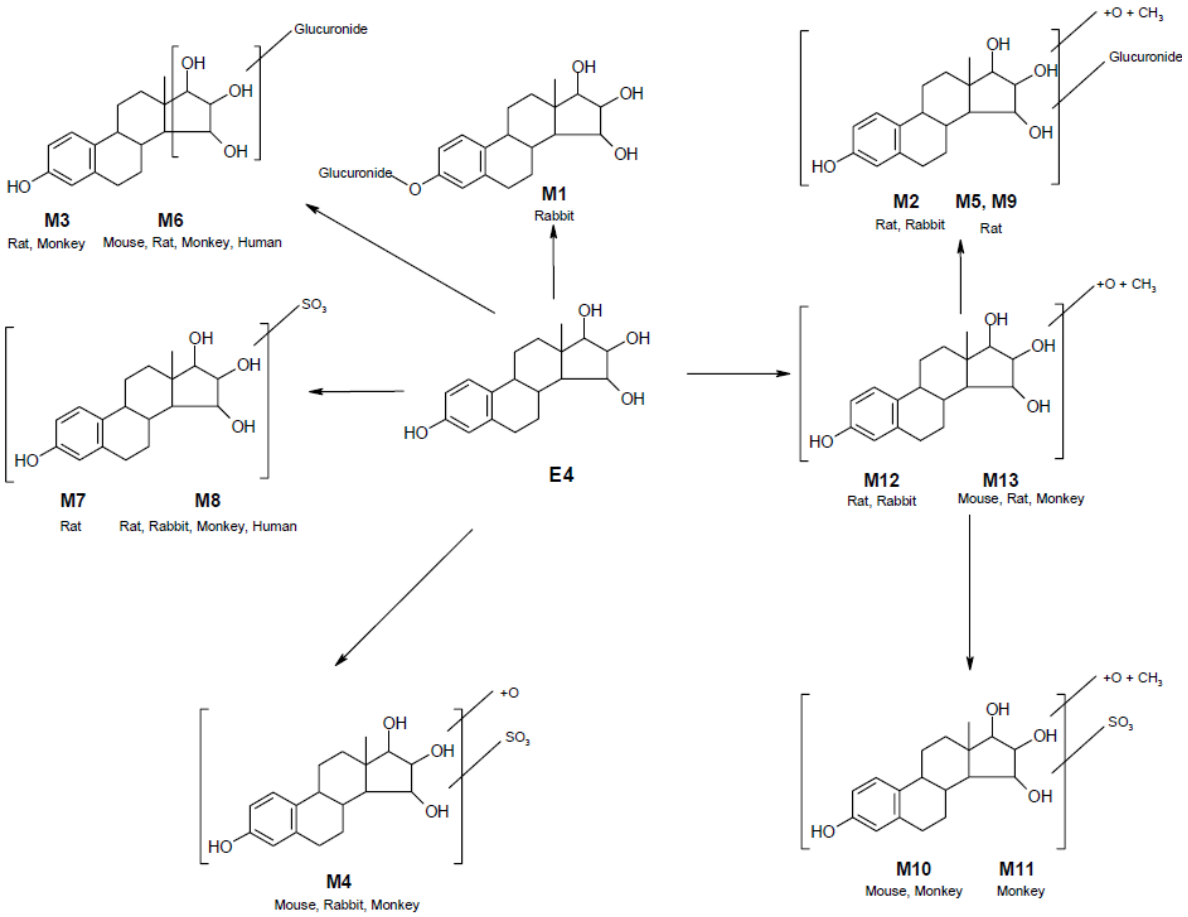
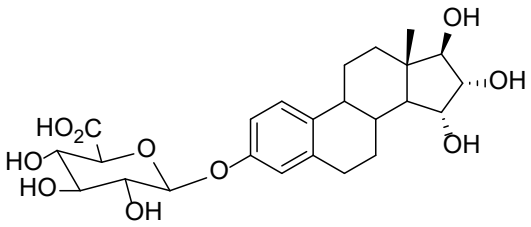


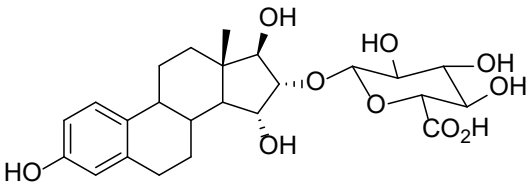
図 2.6.4-8 数種の動物種の肝細胞における推定代謝経路（ES-T06）

estetrol-3-glucuronide



Observed in: mouse plasma, rat plasma, mouse urine, rat bile

estetrol-16-glucuronide



Observed in: rat urine, rat bile

図 2.6.4-9 マウスやラットで同定されたヒト代謝物（Es0001-NC-013）

2.6.4.5.1.4 代謝に関与するヒト酵素

ヒトチトクローム P450（CYP）酵素（PR3100、0031-102）、UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）（0031-106、Es0001-NC-011）及び硫酸転移酵素（SULT）（PR3099）の E4 の酸化的代謝及び抱合における役割を評価する試験を実施した。これらの試験をモジュール 2.7.2 で詳細に示し、考察する。

これらの試験の結論は以下のとおりである。

- ヒト CYP は E4 の *in vitro* 肝代謝に主要な役割を果たしていないと思われる。
- UGT2B7 は *in vitro* で E4-16-グルクロニドの生成を触媒する主要 UGT アイソフォームである。
- SULT1E1 は、*in vitro* で直接硫酸抱合体（E4-3-硫酸の可能性が高い）の生成を触媒する主要な SULT アイソフォームである。

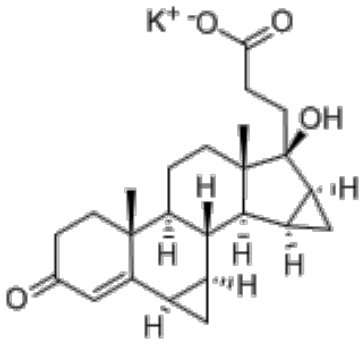
2.6.4.5.2 ドロスピレノン

動物における DRSP の代謝に関する公表文献は確認されていない。

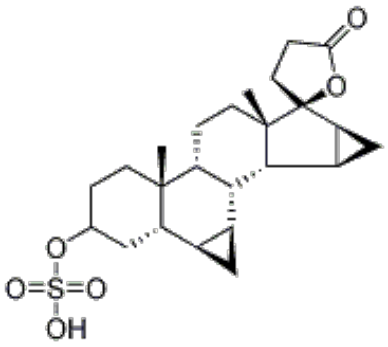
Wiesinger（2015）は、ヒト肝細胞により生成される主要代謝物は、ラクトンの還元／硫酸抱合及び開裂により生成されると述べている。

Krattemacher（2000）は、DRSP はヒトにおいて経口投与後に広範に代謝されると報告している。尿中及び糞中に未変化体として排泄されるのはごく微量であり、20 種類以上の代謝物が認められている。尿中（38%～47%）及び糞中（17%～20%）に認められた代謝物の大部分はグルクロニド及び硫酸抱合体であり、これらの排泄物から自由に抽出可能であった代謝物はそれぞれ 10%未満及び約 30%であった。

血漿中の 2 種の主要代謝物は、DRSP の酸性型（ラクトン環開環）及び 4,5-ジヒドロドロスピレノン-3-硫酸（図 2.6.4-10）として同定された（Blode, 2002）。



acid form of drospirenone
(given as potassium salt)



4,5-dihydrodrospirenone-3-sulfate

図 2.6.4-10 ヒト血漿中におけるドロスピレノンの主要代謝物の構造

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 エステトロール

2.6.4.6.1.1 排泄の経路及び程度

雌マウス及び雌ラットにおける排泄経路及び排泄率を検討した。

マウスにおける排泄（0031-NC-023、TS 表 2.6.5.13）

雌 CD-1 マウス（n=9）に[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で単回経口投与した。[^{14}C]標識 E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。各ケージ 3 例について、投与後 168 時間まで 24 時間間隔で

尿、糞及び呼気を採取した（尿については最初の 24 時間はより高頻度で採取）。投与後 168 時間にマウスを屠殺し、屍体を保存及び可溶化した。屠殺時にケージ洗浄液を採取した。放射能濃度は LSC により測定した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

投与後 0～168 時間の尿及び糞中放射能回収率は、それぞれ 16.45%及び 66.91%であった。投与した放射能の大部分（75.04%）が投与後 24 時間以内に排泄された。呼気（0.80%）及びケージ洗浄液（1.38%）から検出された放射能はごくわずかであり、屍体から放射能は検出されなかったことから、投与後 168 時間で排泄は基本的に完了することが示された。

ラットにおける排泄（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.13 及び 2.6.5.14）

雌 Sprague-Dawley ラット（カニューレ未挿入 3 例、胆管カニューレ挿入 3 例）に、[^{14}C]標識 E4（純度 99%超）を 15 mg/kg（3.7 MBq/kg）の用量で単回経口投与した。[^{14}C]標識 E4 は 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液を用いて調製し、投与容量は 10 mL/kg とした。カニューレ未挿入ラットでは、投与後 168 時間まで 24 時間間隔で尿、糞及び呼気を採取した（尿については最初の 24 時間はより高頻度で採取）。胆管カニューレ挿入ラットでは、投与後 0～3、3～6、6～12 及び 12～24 時間に尿、糞及び胆汁を採取した。最終試料採取後にラットを屠殺し、屍体を保存及び可溶化した。屠殺時にケージ洗浄液を採取した。放射能濃度は LSC により測定した。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

＜結果＞

カニューレ未挿入ラットにおける投与後 0～168 時間の放射能の回収率は尿中で 11.11%、糞中で 86.86%であった。投与した放射能の大部分（78.76%）が投与後 24 時間以内に排泄された。呼気（0.15%）及びケージ洗浄液（0.14%）からの検出量はごくわずかであった。投与した放射能のうち屍体中に回収されたのは 0.36%のみであったことから、投与後 168 時間で排泄は基本的に完了することが示された。

胆管カニューレ挿入ラットでは、投与した放射能の尿中及び胆汁排泄率は、それぞれ 18.42%及び 71.93%であった。排泄は速やかであり、投与した放射能の 50%超が投与後 3 時間以内に、70%超が投与後 6 時間以内に回収された。

2.6.4.6.1.2 乳汁排泄

E4 を用いた乳汁中排泄試験は実施されていない。

E4 と同じくステロイド骨格を有する他のエストロゲン（Wijmenga, 1969、Nilsson, 1978a 及び 1978b）やプロゲスチン（Van der Molen, 1969、Nilsson, 1977a 及び 1977b）はヒトで乳汁中に移行することが報告されていることから、E4 も同様に乳汁中に移行する可能性はあると考えられる。

2.6.4.6.2 ドロスピレノン

2.6.4.6.2.1 排泄の経路及び程度

動物における DRSP の排泄に関する公表文献は確認されていない。

ヒトにおける DRSP 及びその代謝産物の排泄は、経口投与後 10 日以内にほぼ完了する。未変化体としての尿及び糞中への排泄はごくわずかであった（Krattenmacher, 2000、Blode, 2002）。

2.6.4.6.2.2 乳汁排泄

動物における DRSP の乳汁中排泄に関する公表文献は確認されていない。

健康な授乳期の女性を対象に、DRSP 3 mg 及び EE 30 µg を単回経口投与した試験において、投与後 0～24 時間の乳汁中からの DRSP 回収率は投与量の約 0.02%であった。これは、乳児に対する DRSP 3 µg 投与に相当すると推定された（Blode, 2001）。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1 エステトロール

ヒト CYP 酵素に対する E4 の誘導能（0031-100、Es0001-NC-019）、ヒト CYP 酵素（PR3038、0031-101）又は UGT（0031-105）に対する E4 の阻害能、及びヒト CYP 酵素に対する E4 代謝物の阻害能（Es0001-NC-017）を評価する試験を実施した。

また、ヒト Caco-2 細胞を用いた双方向輸送（0031-NC-017）、基質又は阻害剤としての E4 と ABC 排出トランスポーター（0031-103、Es0001-NC-013）又は SLC 取り込み及び排出トランスポーター（0031-107、Es0001-NC-020、Es0001-NC-021）との相互作用、並びに E4 代謝物と ABC 及び SLC トランスポーターとの相互作用（Es0001-NC-018）を検討する試験も実施した。

これらの試験をモジュール 2.7.2 で詳細に示し、考察する。

2.6.4.7.2 ドロスピレノン

DRSP と CYP 酵素及びトランスポーターとの相互作用の可能性に関する公表データをモジュール 2.7.2 に示す。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

E4 に関するその他の薬物動態試験は実施されていない。DRSP のその他の薬物動態試験に関する公表文献は確認されていない。

2.6.4.9 考察及び結論

2.6.4.9.1 エステトロール

E4 を用いて実施した薬物動態試験プログラムは以下のとおりである。

- ラットを用いた単回投与の相対的バイオアベイラビリティ予備試験、及びサルを用いた単回用量漸増投与トキシコキネティクス試験
- 反復投与トキシコキネティクス試験（マウス：最長 25 週間、ラット：最長 26 週間、サル：最長 39 週間）、並びに交配済み／妊娠ラット及びウサギを用いた E4 単独投与によるトキシコキネティクス試験

- アルビノ及び部分的有色ラットにおける組織分布
- *In vitro* 血漿蛋白結合及び SHBG に対する相対結合親和性
- *In vitro* 血液／血漿間の分配
- マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験
- ヒト代謝との比較を含むマウス及びラットを用いた *in vivo* 代謝及び排泄試験
- サルを用いた *in vivo* 代謝試験

E4 の代謝におけるヒト酵素の役割、ヒト酵素の誘導及び阻害、並びに排出 ABC トランスポーター及び取り込み又は排出 SLC トランスポーターとの相互作用について、*in vitro* 試験を実施した。これらの試験をモジュール 2.7.2 で示し、考察する。

分析法

トキシコキネティクス試験及び *in vitro* 血漿蛋白結合試験における E4 の生体試料分析は、適切な LLOQ（血漿中 25 又は 40 pg/mL、PBS 中 50 pg/mL）を設定したバリデーション済みの LC-MS/MS 法又は UHPLC-MS/MS 法を用いて実施した。

吸収

雌マウス又は雌ラットに 15 mg/kg の[^{14}C]標識 E4 を単回経口投与後、血液及び血漿のいずれにおいても投与後 0.5 時間に最高濃度の放射能が認められた（0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.3.A）。

雌ラットを用いた予備試験では、E4 の経口バイオアベイラビリティは、皮下投与と比較して 70%以上と推定された（PR3002、TS 表 2.6.5.3.B）。

雌サルに E4 を 1、100 又は 1000 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、T_{max} は用量の増加に伴って延長し、C_{max} の増加は用量比例性を下回った。これは、高用量で吸収が遅延したことと一致している（ES-T05、TS 表 2.6.5.3.B）。

反復経口投与トキシコキネティクス試験では、雌動物を用いて、マウスでは 30 mg/kg/日まで、ラット（2 系統）では 150 mg/kg/日まで、サルでは 50 mg/kg/日までの用量で E4 を評価した。

マウス及びラットでは、血漿中濃度は最初の試料採取時点である 0.5 時間時点で C_{max} に達した。サルにおける T_{max} の中央値は 0.5～1.5 時間であった。これらの動物種では E4 は速やかに吸収された。いずれの動物種でも、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ は用量の増加に伴い増加した。試験間で同一動物種内に多少のばらつきが認められたものの、マウスで 30 mg/kg/日、ラットで 50 mg/kg/日、サルで 30 mg/kg/日の用量まで、曝露量はおおむね用量に比例して増加した。

$T_{1/2}$ はマウスで 1.4～3 時間、ラットで 2～6 時間であった。これと一致して、マウス及びラットでは、1 日 1 回反復投与後に E4 の蓄積は認められなかった。これらの動物種における単回及び反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は、それぞれ 10 mg/kg/日及び 15 mg/kg/日までの用量で同程度であった。高用量では、マウス及びラットに反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は、初回投与後よりもわずかに低かった。同程度の用量では、13 週間投与後の Wistar ラットにおける E4 曝露量（AUC 換算）は、Sprague-Dawley ラットよりもわずかに低い傾向があった。

サルでは、E4 の $T_{1/2}$ は 10～19 時間であった。個体別の血漿中濃度-時間曲線に第 2 のピークが認められたことから、腸肝循環が示唆された。そのため数例の動物で $T_{1/2}$ 値の算出ができなかった。腸肝循環はエストロゲンの既知の特性である（Loose, 2006）。サルに 1 日 1 回反復投与したときの $AUC_{0\text{-last}}$ は、初回投与時と比較してやや高い傾向が認められた（ES-T31、ES-T34、ES-T40、0031-NC-004、ES-T10、ES-T18、ES-T39、0031-NC-003、ES-T11、ES-T15、ES-T20、TS 表 2.6.5.4.A.1～2.6.5.4.A.5）。

交配済み／妊娠ラットでは、0.5 時間で C_{max} に達し、$AUC_{0\text{-last}}$ はほぼ用量に比例して増加した。10 mg/kg/日以上では、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-last}}$ はいずれも、初回投与時に比べ反復投与時に低値を示した（ES-T01、ES-T02、TS 表 2.6.5.4.A.6）。妊娠ウサギにおける T_{max} の中央値は 0.5～3.0 時間であった。$AUC_{0\text{-last}}$ は用量に比例して増加し、G6 での初回投与後よりも反復投与後の方がわずかに高かった（ES-T04、ES-T04-BR1031、ES-T19、TS 表 2.6.5.4.A.6）。

分布

単回経口投与後、[^{14}C]標識 E4 はラットの組織に広く分布し、投与後の全ての時点において、肝臓で最も高い放射能濃度が認められた。放射能は速やかに消失した。アルビノラットでは投与後 48 時間（最終測定時点）までに、部分的有色ラットでは投与後 7 日までに、肝臓及び甲状腺（アルビノのみ）を除く全組織で放射能濃度が定量限界未満となった。メラニン含有組織において、長期残留の徴候は認められなかった（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.5）。

雌のマウス、ラット及びサル血漿中では 937.8 ng/mL まで、ヒト血漿中では 46.9 ng/mL まで、E4 は中等度の血漿蛋白結合（45%～67%）を示した。種差及び濃度依存性は認められなかった（ES-T33、TS 表 2.6.5.6.A）。E4 はヒト SHBG に対し親和性を示さなかった（PR3025、TS 表 2.6.5.6.B）。E4 は 1 μM までヒト血液中で血漿と血球に均等に分布した（0031-104、TS 表 2.6.5.8.A）。

E4 やその代謝物の胎盤通過性に関する試験は実施されていない。E4 は妊娠期間中にヒト胎児の肝臓で産生される天然型エストロゲンであり（Holinka, 2008b）、胎児は生理学的に E4 に曝露されていると考えられる。さらに、妊娠女性の血漿・血清及び尿中には E4 が認められ（Coelingh Bennink F, 2008、Heikkilä, 1971）、これらの E4 は胎児内で生成し、母体循環血に移行後尿中に排泄されたものと考えられる。このように母体の血漿・血清及び尿中に胎児由来の E4 が認められることから、E4 がヒトにおいて胎盤を通過することは既知であると考えられる。

E4 やその代謝物の乳汁中排泄に関する試験は実施されていない。E4 と同じくステロイド骨格を有する他のエストロゲン（Wijmenga, 1969、Nilsson, 1978a 及び 1978b）やプロゲスチン（Van der Molen, 1969、Nilsson, 1977a 及び 1977b）は授乳婦に投与したとき乳汁中に移行することが報告されており、E4 も同様に乳汁中に移行する可能性はあると考えられる。

代謝

E4 は、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト肝細胞で広範に代謝された。グルクロン酸抱合及び硫酸抱合は、全ての動物種の肝細胞における主たる反応であった。ヒト肝細胞では、D-環の直接グルクロン酸抱合及び未確認部位の直接硫酸抱合により生成された 2 つの代謝物のみが認められた。これらの代謝物は、動物肝細胞でも水酸化及びメトキシル化化合物に加えて生成され

た。E4-3-グルクロニド（ウサギ肝細胞における主要代謝物）を除き、正確な代謝物構造を決定することはできなかったが、ヒトに特異的な代謝物の痕跡は認められなかった。マウス肝細胞による E4 の代謝に系統差は認められなかった（PR3041、ES-T06、ES-T32、TS 表 2.6.5.10.A～2.6.5.10.C、2.6.5.11）。

マウスでは、ヒドロキシ-E4-硫酸が尿中及び糞中の主要代謝物であり、ヒドロキシ-E4-ケトンが糞中の主要化合物であった。ラットでは、ヒドロキシ-E4 が糞中の、E4-グルクロニドが胆汁中の主要代謝物であった。置換基の正確な付加位置は特定されなかった。予備的な代謝物同定試験では、ラット尿中の代謝物として 2-ヒドロキシ-3-メトキシ-E4 が同定された（ES-T35、0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.9.A 及び B、2.6.5.11）

マウス及びラットにおけるヒトの主要代謝物の生成の評価を目的として実施した試験において、ヒト血漿及び尿中で認められた 2 種の主要グルクロニドは、E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドと同定された。E4-16-グルクロニドが定量的に最も重要であった。T_{max} における E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドの血漿中濃度は、それぞれ約 35 及び 142 ng eq/mL であった。投与後 0～120 時間の尿中排泄率（臨床試験 MIT-Es0001-C105、モジュール 2.7.2 のデータ）は、それぞれ投与量の 15.9%及び 46.0%であった。

E4-3-グルクロニドはマウス及びラット血漿中の重要な代謝物でもあり、15 mg/kg の単回経口投与後の T_{max} における濃度はそれぞれ 507 及び 309 ng eq/g であった。また、この代謝物はマウス尿中及びラット胆汁中でも認められた。

E4-16-グルクロニドは、マウス試料又はラット血漿中では有意な量では検出されなかったが、0～24 時間のラット尿中（投与量の 1.5%）及びラット胆汁中（投与量の 13.0%）の重要な代謝物であった。データからこの動物種では、投与された E4 の 14.5%以上が C16-グルクロニドに変換されることが示される。

別の代謝物である E4-グルクロニド-硫酸抱合体は、ヒト血漿中放射能の 9%（T_{max} 0.25～0.5 時間試料）～11%（0～2 時間試料）を占めたが、ラット胆汁中では微量でのみ認められた。同定されたヒトグルクロニドに加え、E4-15-グルクロニドが複数のマウス及びラット試料中に認められた（Es0001-NC-012、Es0001-NC-010、MIT-Es0001-C105、TS 表 2.6.5.9.D）。

E4 のヒト血漿中主代謝物である E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、サルの血漿中にも認められた（Es0001-NC-016、TS 表 2.6.5.9.C）。

総合して、ヒトに特異的な代謝物を示唆するものはなかった。マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験ではそれぞれ 30 mg/kg/日、150 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日までの用量が投与されたことを考慮すると、2 種の主要ヒトグルクロニドの潜在的毒性は適切に評価されたと考えられる。

排泄

マウス及びラットにおける[^{14}C]標識 E4 の排泄は投与後 7 日までに完了し、投与量の大部分は糞中に回収された（0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.13）。

2.6.4.9.2 ドロスピレノン

動物における DRSP の薬物動態に関する公表文献は確認されていない。雌サルに E4 及び DRSP を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験には、DRSP 単独投与群が含まれた。その他のデータは、*in vitro* や臨床試験に関する公表文献から入手した。

分析法

トキシコキネティクス試験における DRSP の生体試料分析は、LLOQ を 1 ng/mL に設定したバリデーション済みの UHPLC-MS/MS 法を用いて実施した。

吸収

雌サルでは血漿中濃度は 3.0 時間以内に C_{max} に達した。DRSP の曝露量は Day 1 と比較して Week 13 で低値を示したが（AUC 比 0.51）、これは Day 53 に用量を 6 から 4 mg/kg/日に減量したことでは部分的にのみ説明できた。$T_{1/2}$ は約 4～7 時間であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）。

女性における経口バイオアベイラビリティは約 76%である。T_{max} は経口投与後 1～2 時間である。単回投与時の曝露量は用量 10 mg まで用量に比例して増加する。血漿中濃度は約 1 週間以内に定常状態に達し、反復投与により曝露量にはわずかな蓄積（2～3 倍）が認められる。$T_{1/2}$ は 25～33 時間である。EE の併用投与は、DRSP の曝露量に重大な影響を及ぼさない（Krattenmacher, 2000、Blode, 2012、Blode, 2000）。

分布

ヒトにおける DRSP のみかけの分布容積は平均で 3.7 L/kg である（Blode, 2002）。

DRSP のヒト血清蛋白結合率は 95%～97%である。DRSP は SHBG 及びコルチコステロイド結合グロブリンと結合しない（Krattenmacher, 2000）。

DRSP やその代謝物の胎盤通過性に関する公表文献は確認されていない。ヒト乳汁中への DRSP の排泄量（24 時間）は、投与量の約 0.02%であった（Blode, 2001）。

代謝

ヒト肝細胞により生成される主要代謝物は、ラクトンの還元／硫酸抱合及び開裂によって生成される（Wiesinger, 2015）。

ヒト血漿中の主要代謝物は DRSP の酸性型及び 4,5-ジヒドロドロスピレン-3-硫酸である。尿中及び糞中から検出された未変化体はごく微量であり、代謝物の大部分はグルクロニド及び硫酸抱合体であった（Krattenmacher, 2000）。

排泄

女性における DRSP 及びその代謝物の排泄は投与後 10 日以内にほぼ完了し、未変化体としての尿及び糞中への排泄はごくわずかである（Krattenmacher, 2000、Blode, 2002）。

2.6.4.9.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

30/6（20/4） mg/kg/日までの用量で E4 及び DRSP を 13 週間投与した雌サルでは、DRSP の併用投与により E4 曝露量が増加したが、E4 の併用投与は DRSP 曝露量に影響を及ぼさなかった。反復投与後、曝露量の増加は E4 ではほぼ用量比例性であり、DRSP では用量比例性を下回った。反復投与後の E4 に対する曝露量は初回投与後と同程度であったが、DRSP に対する曝露量は減少した。DRSP の $T_{1/2}$ は約 4～7 時間、E4 の $T_{1/2}$ は 9～22 時間であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）。

2.6.4.9.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

30/0.225（20/0.150） mg/kg/日までの用量で E4 及び LNG を 13 週間投与した雌サルでは、初回投与後では LNG の併用投与は E4 曝露量に影響を及ぼさず、E4 の併用投与は LNG 曝露量に影響を及ぼさなかった。反復投与後では、E4 は LNG の曝露量を増加させた[18]。初回投与後及び反復投与後のいずれにおいても、曝露量の増加は E4 ではほぼ用量比例性であったが、LNG では用量比例性を下回った。反復投与後の E4 曝露量は初回投与後と同程度であったが、LNG 曝露量は減少した。LNG の $T_{1/2}$ は約 4～7 時間、E4 の $T_{1/2}$ は 10～22 時間であった（0031-NC-018、TS 表 2.6.5.4.C.1）。

2.6.4.9.5 結論

E4 は、雌のマウス、ラット及びサルへの経口投与後に速やかに吸収され、マウスでは 30 mg/kg/日、ラットでは 50 mg/kg/日、サルでは 30 mg/kg/日まで、用量比例的な曝露量増加からの重大な逸脱は認められない。また、交配済み／妊娠ラットでは 10 mg/kg/日まで、妊娠ウサギでは検討した最高用量である 0.45 mg/kg/日まで、曝露量に用量比例性が認められた。$T_{1/2}$ はマウスで 1.4～3 時間、ラットで 2～6 時間、サルで 10～22 時間であり、反復投与後の E4 の蓄積は認められない、又は限定的である。サルでは、E4 が腸肝循環を受ける可能性がある。

DRSP の吸収はやや速やかである。臨床曝露量は 10 mg/日まで用量に比例して増加する。初回投与と比較して、雌サルでは反復投与後に曝露量が減少するが、女性ではわずかな蓄積（2～3 倍）が生じる。女性の $T_{1/2}$ は 25～33 時間である。

雌サルに DRSP を併用投与したとき、定常状態で E4 曝露量が増加した（AUC のみ）。E4 の併用投与は DRSP の動態に影響を及ぼさなかった。DRSP は、治療用量での臨床試験において E4 の薬物動態に影響を及ぼさないと考えられるため、このことは臨床的意義が低いと考えられる（モジュール 2.7.2 参照）。

E4 を併用投与すると LNG 曝露量が増加するが、それは反復投与後のみである。

ラットに単回経口投与後、E4 やその代謝物は広範な組織分布を示し、速やかに排泄され、メラニン含有組織における長期滞留の兆候は認められなかった。

[18] E4 単独投与群では血漿試料に LNG の混入が認められたため、Week 13 の E4 曝露量に対する LNG の影響は評価できなかった。

E4 は、ヒトを含む評価した動物種に依存せず、中等度の血漿蛋白結合（約 50%）を示す。DRSP のヒト血清蛋白結合率は 95%～97%である。E4 も DRSP もヒト SHBG とは結合しない。

E4 は妊娠中にヒト胎児の肝臓で生成され、胎盤を介して母体循環系に移行する天然エストロゲンであり、E4 が胎盤を通過することは既知であると考えられる。また、他のエストロゲン及びプロゲスチンで乳汁中への移行が報告されていることから、E4 も乳汁中に移行する可能性はあると考えられる。DRSP やその代謝物の胎盤通過性に関する公表文献は確認されていない。DRSP は少量（0.02%）が乳汁中に移行する。

マウス、ラット、ウサギ及びサルの肝細胞、並びにマウス及びラットの *in vivo* における E4 の代謝経路には、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、水酸化及びメチル化が含まれる。ヒト肝細胞で認められる代謝経路はグルクロン酸抱合及び硫酸抱合のみであり、2 種類の直接グルクロニド（E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニド）がヒトの血漿及び尿中の主要代謝物である。

E4-3-グルクロニドはマウス及びラット血漿中においても重要な代謝物であり、マウスの尿及びラットの胆汁中にも認められた。E4-16-グルクロニドは、マウス試料又はラット血漿中では有意な量では検出されなかったが、ラット尿中及び胆汁中の重要な代謝物であり、投与量の 14.5%以上を占めた。別の代謝物である E4-グルクロニド-硫酸抱合体は、ヒト血漿中放射能の約 9%～11%を占めたが、ラット胆汁中では微量でのみ認められた。この代謝物の硫酸置換基の位置は C3 位であり、グルクロニド置換基の位置は C16 位である可能性が最も高いと考えられた。同定されたヒトグルクロニドに加え、E4-15-グルクロニドが複数のマウス及びラット試料で認められた。また、E4 のヒト血漿中主代謝物である E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、サルの血漿中にも認められた。

全体として、ヒトに特異的な代謝物の痕跡はなく、データから、マウス、ラットやサルにおいて E4 が C3 及び C16 グルクロニドに有意に変換されることが示されている。マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験でそれぞれ 30 mg/kg/日、150 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日までの用量を投与したことを考慮すると、ヒトの主要な 2 種類のグルクロニドの潜在的毒性は十分評価されたと考えられる。

ヒト血漿中 DRSP の主要代謝物は DRSP の酸性型及び 4,5-ジヒドロドロスピレノン-3-硫酸である。尿中及び糞中の代謝物の大部分はグルクロニド及び硫酸抱合体である。

2.6.4.10 参考文献

Blode H, Wuttke W, Loockt W, Roll G, Heitheckert R. A 1-year pharmacokinetic investigation of a novel oral contraceptive containing drospirenone in healthy female volunteers. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2000;5:256-64.

Blode H, Foidart JM, Heithecker R. Transfer of drospirenone to breast milk after a single oral administration of 3 mg drospirenone + 30 microg ethinylestradiol to healthy lactating women. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2001;6(3):167-71.

Blode H. Pharmacokinetics of drospirenone. Gynaecol Forum. 2002;7(1):18-22.

Blode H, Kowal K, Roth K, Reif S. Pharmacokintics of drospirenone and ethinylestradiol in Caucasian and Japanese women. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2012;17:284-97.

Coelingh Bennink HJ, Heegaard AM, Visser M, Holinka CF, Christiansen C. Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. Climacteric. 2008b;11(Suppl 1):2-14.

Coelingh Bennink F, Holinka CF, Visser M, Coelingh Bennink HJT. Maternal and fetal estetrol levels during pregnancy. Climacteric. 2008;11(Suppl 1):69-72.

Heikkilä J. Excretion of 15α-hydroxyestriol and estriol in maternal urine during normal pregnancy. Journal of Steroid Biochemistry. 1971;2:83-93.

Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT, Estetrol: a unique steroid inhuman pregnancy. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2008b;110:138-43.

Krattenmacher R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. Contraception. 2000;62(1):29-38.

Loose DS, Stancel GM. Estrogens and progestins. In: Brunton LL, editor. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill Co; 2006. p.1541-71.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. d-Norgestrel concentrations in maternal plasma, milk, and child plasma during administration of oral contraceptives to nursing women. Am.J.Obstet.Gynecol. 1977a;129(2):178-84.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. Megestrol actetate concentrations in plasma and milk during administration of an oral contraceptive containing 4 mg megestrol acetate to nursing. Contraception. 1977b;16(6):615-24.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. Ethinyl estradiol in human milk and plasma after oral administration. Contraception. 1978a;17(2):131-9.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. Transfer of estradiol to human milk. Am J Obstet Gynecol. 1978b;132(6):653-7.

Van der Molen HJ, Hart PG, Wijmenga HG. Studies with 4-14C-lynestrenol in normal and lactating women. Acta Endocrinol (Copenh). 1969;61(2):255-74.

Visser M, Foidart JM, Coelingh Bennink HJT. In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. Climacteric. 2008;11(Suppl 1):64-8.

Visser M, Coelingh Bennink HJT. Clinical applications for estetrol. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009;114:85-9.

Wang Q, Ma X, He J, Sun Q, Li Y, Li H. Binding properties of drospirenone with human serum albumin and lysozyme in vitro. Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc. 2016;153:612-8.

Wiesinger H, Berse M, Klein S, Gschwend S, Höchel J, Zollmann FS, Schütt B. Pharmacokinetic interaction between the CYP3A4 inhibitor ketoconazole and the hormone drospirenone in combination with ethinylestradiol or estradiol. Br J Clin Pharmacol. 2015;80(6):1399-410.

Wijmenga HG, van der Molen HJ. Studies with 4-^{14}C-mestranol in lactating women. Acta Endocrinol (Copenh). 1969;61:665-77.

FSN-013

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.5　薬物動態試験概要表

富士製薬工業株式会社

目次

2.6.5 薬物動態試験概要表 3
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 3
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 11
2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与 13
2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与 17
2.6.5.5 薬物動態試験：分布 40
2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合 43
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 45
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 46
2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：In Vivo 47
2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：In Vitro 54
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 62
2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 65
2.6.5.13 薬物動態試験：排泄 66
2.6.5.14 薬物動態試験：排泄：胆汁中 68
2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用 69
2.6.5.16 薬物動態試験：その他 70

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2]	試験番号 （CTD 番号）
分析方法及びバリデーション（エステトロール）					
アッセイバリデーション	血漿 マウス／CD-1	NA	適	[redacted], NL	ES-T28 （4.2.2.1-01）
アッセイバリデーション	血漿 マウス／CD-1	NA	適	[redacted], FR	0031-NC-024 （4.2.2.1-02）
アッセイバリデーション	血漿 ラット／Wistar	NA	適	[redacted], NL	ES-T14 （4.2.2.1-03）
アッセイバリデーション	血漿 ラット／Sprague-Dawley	NA	適	[redacted], BE	0030-NC-016 （4.2.2.1-04）
アッセイバリデーション	血漿 ラット／Wistar	NA	適	[redacted], FR	0031-NC-025 （4.2.2.1-05）
アッセイバリデーション	血漿 ウサギ／ニュージーランド ホワイト	NA	適	[redacted], NL	ES-T07 （4.2.2.1-06）
アッセイバリデーション	血漿 サル／カニクイザル	NA	適	[redacted], NL	ES-T08 （4.2.2.1-07）
アッセイバリデーション	血漿 サル／カニクイザル	NA	適	[redacted], BE	0030-NC-015 （4.2.2.1-08）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設：[redacted]、BE：[redacted], Belgium
[redacted], FR：[redacted], France
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands [redacted]
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

略語：NA = 該当なし

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2]	試験番号（CTD 番号）
分析法及びバリデーション（エステトロール）（続き）					
アッセイバリデーション	血漿 ヒト	NA	適	[redacted], NL	PR3053-VP200 （5.3.1.4-01） PR3053-VR0671 （5.3.1.4-02） PR3053-VR0719 （5.3.1.4-03）
アッセイバリデーション	リン酸緩衝生理食塩水 [3]	NA	適	[redacted], NL	ES-T33-VR00914 （4.2.2.1-11）
分析方法及びバリデーション（ドロスピレノン）					
アッセイバリデーション	血漿 サル／カニクイザル	NA	適	[redacted], BE	0030-NC-014 （4.2.2.1-09）
分析法及びバリデーション（エステトロール+レボノルゲストレル）					
アッセイバリデーション	血漿 サル／カニクイザル	NA	適	[redacted], FR	0031-NC-021 （4.2.2.1-10）
吸収（エステトロール）					
単回投与時の放射能-時間プロファイル	マウス／CD-1	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-023 （4.2.2.2-01）
単回投与時の放射能-時間プロファイル	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-022 （4.2.2.2-02）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設：[redacted]、BE：[redacted], Belgium
[redacted], FR：[redacted], France
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands [redacted]
[redacted], UK：[redacted], United Kingdom
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

[3] エタノール中のエステトロールを測定する定量法のバリデーションも実施したが、試験では使用しなかった。

略語：NA = 該当なし

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2, 3]	試験番号 （CTD 番号）
吸収（エステトロール）（続き）					
単回投与薬物動態試験	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制） 皮下	非適	[redacted], NL [redacted], NL	PR3002 （4.2.2.2-03）
単回投与トキシコキネティクス試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T05 （4.2.3.1-02）
2 週間反復投与 DRF トキシコキネティクス試験	マウス／CD-1	経口（強制）	非適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T31 （4.2.3.2-01）
4 週間反復投与トキシコキネティクス試験	マウス／CD-1	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T34 （4.2.3.2-02）
13 週間反復投与トキシコキネティクス試験	マウス／CD-1	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T40 （4.2.3.2-03）
トキシコキネティクスがん原性試験	マウス／CD-1	経口（強制）	適	[redacted], FR	0031-NC-004 （4.2.3.4.1-01）
4 週間反復投与トキシコキネティクス試験	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T10 （4.2.3.2-04）
26 週間反復投与トキシコキネティクス試験	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T18 （4.2.3.2-05）
13 週間反復投与トキシコキネティクス試験	ラット／Wistar	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T39 （4.2.3.2-06）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設：[redacted], NL：[redacted], The Netherlands
[redacted], FR：[redacted], France

[3] 生体試料分析及び薬物動態評価の実施機関：
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

略語：DRF = 用量設定

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2, 3]	試験番号 （CTD 番号）
吸収（エステトロール）（続き）					
トキシコキネティクスがん原性試験	ラット／Wistar	経口（強制）	適	[redacted], FR	0031-NC-003 （4.2.3.4.1-02）
4 週間反復投与トキシコキネティクス試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T11 （4.2.3.2-07）
13 週間反復投与トキシコキネティクス試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T15 （4.2.3.2-08）
39 週間反復投与トキシコキネティクス試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T20 （4.2.3.2-09）
DRF EFD トキシコキネティクス試験	ラット／Wistar	経口（強制）	適	[redacted], UK [redacted] NL	ES-T02 （4.2.3.5.2-02）
DRF EFD トキシコキネティクス試験	ラット／Wistar	経口（強制）	適	[redacted], UK [redacted] NL	ES-T01 （4.2.3.5.2-01）
DRF 受胎能及び着床試験	ウサギ／ニュージーランドホワイト	経口（強制）	非適	[redacted], USA [redacted], NL	ES-T04 （4.2.1.1-09） ES-T04-BR1031 （4.2.1.1-10）
EFD トキシコキネティクス試験	ウサギ／ニュージーランドホワイト	経口（強制）	適	[redacted], UK [redacted], NL	ES-T19 （4.2.3.5.2-05）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設：[redacted], USA：[redacted], USA
[redacted], FR：[redacted], France
[redacted], UK：[redacted], United Kingdom

[3] 生体試料分析及び薬物動態評価の実施機関：
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

略語：DRF = 用量設定、EFD = 胚・胎児発生

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2, 3]	試験番号 （CTD 番号）
吸収（エステトロール+ドロスピレノン）					
13 週間反復投与トキシコキネティクス試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR [redacted], BE	0030-NC-002 （4.2.3.2-10）
吸収（エステトロール+レボノルゲストレル）					
13 週間反復投与トキシコキネティクス試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR	0031-NC-018 （4.2.3.2-11）
分布					
組織分布	ラット／Sprague-Dawley ラット／Lister Hooded	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-022 （4.2.2.2-02）
血漿蛋白結合	血漿 マウス／CD-1 ラット／Sprague-Dawley サル／カニクイザル ヒト	*In vitro* 試験	非適	[redacted], FR [redacted], NL	ES-T33 （4.2.2.3-01）
ヒト性ホルモン結合グロブリンに対する相対結合親和性	ヒト性ホルモン結合グロブリン	*In vitro* 試験	非適	[redacted], CAN	PR3025 （5.3.2.1-01）
血液／血漿間の分配	ヒト血液	*In vitro* 試験	適	[redacted], UK	0031-104 （5.3.2.1-02）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設： [redacted], FR： [redacted], France
[redacted], UK： [redacted], United Kingdom
[redacted], CAN： [redacted], Canada

[3] 生体試料分析及び薬物動態評価の実施機関：
[redacted]、BE： [redacted], Belgium
[redacted], NL： [redacted], The Netherlands

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2]	試験番号 （CTD 番号）
代謝					
In vitro 代謝	マウス／CD-1、 マウス／B6C3F1 及びマウス／C57BL/6 由来 肝細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], UK	ES-T32 （4.2.2.4-02）
In vitro 代謝	マウス／CD-1、 ラット／Sprague-Dawley、 ウサギ／ニュージーランド ホワイト、 サル／カニクイザル 及びヒト由来肝細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], UK	ES-T06 （4.2.2.4-01）
In vitro 代謝	ラット／Sprague-Dawley 及びヒト由来肝細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted]、CAN	PR3041 （4.2.2.4-03）
---ヒト CYP、UGT 及び SULT 反応表現型試験（PR3100、0031-102、0031-106、PR3099）、UGT2B7 によるヒト代謝物の同定（Es001-NC-011）、CYP 誘導（0031-100、Es0001-NC-019）、並びに CYP 及び UGT 阻害（PR3038、0031-101、0031-105、Es0001-NC-017）に関する *in vitro* 試験をモジュール 2.7.2 で示し、考察する。---					
In vivo 代謝	マウス／CD-1	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-023 （4.2.2.2-01）
In vivo 代謝	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-022 （4.2.2.2-02）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設： [redacted], UK： [redacted], United Kingdom
[redacted]、CAN： [redacted], Canada
[redacted], UK： [redacted], United Kingdom

略語：CYP = チトクローム P450、SULT = 硫酸転移酵素、UDP = ウリジン二リン酸、UGT = UDP-グルクロン酸転移酵素

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設 [2]	試験番号 （CTD 番号）
代謝（続き）					
In vivo 代謝 [3]	ラット尿	報告なし	非適	[redacted], NL	ES-T35 （4.2.2.4-04）
In vivo 代謝	サル／カニクイザル	経口（強制）	非適	[redacted], UK	Es0001-NC-016 （4.2.2.4-07）
In vivo 代謝：動物種間の比較	マウス／CD-1 ラット／Sprague-Dawley ヒト	経口（強制） 経口（強制） 経口投与	適	[redacted], UK	Es0001-NC-010 [4] （4.2.2.4-05） Es0001-NC-012 （4.2.2.4-06） MIT-Es0001-C105 （5.3.3.1-06）
排泄					
排泄	マウス／CD-1	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-023 （4.2.2.2-01）
排泄	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-022 （4.2.2.2-02）
胆汁排泄	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], UK	0031-NC-022 （4.2.2.2-02）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設：[redacted], UK：[redacted]
[redacted], UK：[redacted], United Kingdom
[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

[3] ラット凍結乾燥尿を用いた予備的な代謝物同定試験。投与及び試料採取の詳細は報告なし。

[4] Es0001-NC-012 試験における動物種間の比較用の動物試料は、Es0001-NC-010 試験において作製した。試料の作製は GLP に準拠して実施したものではない。

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [1]	試験施設	試験番号 （CTD 番号）
薬物動態学的薬物相互作用					
--- Caco-2 細胞を用いた双方向輸送（0031-NC-017）並びに取り込み及び排出トランスポーターを用いた基質及び阻害薬相互作用（0031-103、0031-107、Es0001-NC-013、Es0001-NC-018、Es0001-NC-020、Es0001-NC-021）に関する *in vitro* 試験をモジュール 2.7.2 で示し、考察する。---					
その他の薬物動態試験					
---試験なし---					

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：Caco-2 = ヒト結腸癌由来細胞

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

被験物質：エステトロール

試験番号	ES-T28	0031-NC-024	ES-T14	0031-NC-025	0030-NC-016	ES-T07	ES-T08
CTD 番号	4.2.2.1-01	4.2.2.1-02	4.2.2.1-03	4.2.2.1-05	4.2.2.1-04	4.2.2.1-06	4.2.2.1-07
測定施設	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
動物／系統種	マウス／CD-1	マウス／CD-1	ラット／Wistar	ラット／Wistar	ラット／SD	ウサギ／NZW	サル／カニクイザル
測定試料	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿
測定対象物質	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4
分析方法	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	UHPLC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
内標準物質	E4-d_3	E4-d_4	E4-d_3	E4-d_4	E4-d_4	E4-d_3	E4-d_3
定量下限（pg/mL）	40.0	25.0	25.0	25.0	20	25.0	25.0
濃度範囲（pg/mL）	40.0 – 25,000	25.0 – 25,000	25.0 – 25,000	25.0 – 25,000	20 – 4000	25.0 – 25,000	25.0 – 25,000
測定内真度（%） ［定量下限］	-6.0 – 7.4 ［-15.3 – 2.7］	-11.1 – -0.6 ［-17.5 – 6.1］	-6.3 – 4.6 ［-1.1 – 8.1］	-21.0 – 4.8 a) ［-1.8 – 19.3］	-2.3 – 6.0 ［-0.5 – 2.8］	-12.3 – 7.8 ［12.5 – 15.2］	-4.7 – 3.4 ［-17.0 – 5.6］
測定間真度（%） ［定量下限］	-3.8 – 4.0 ［-9.2］	-8.7 – -3.6 ［-7.6］	-3.4 – 1.5 ［2.8］	-9.1 – -2.7 ［8.4］	-0.8 – 3.3 ［1.3］	-5.7 – 1.7 ［13.5］	-3.3 – 2.0 ［-7.1］
測定内精度（%） ［定量下限］	4.4 – 13.8 ［11.6］	1.0 – 11.6 ［12.3 – 23.1］	3.3 – 4.0 ［10.0］	0.7 – 14.0 ［9.6 – 22.8 b)］	2.91 – 5.48 ［5.66］	5.6 – 7.4 ［10.8］	5.0 – 8.4 ［17.3］
測定間精度（%） ［定量下限］	4.4 – 12.2 ［13.5］	3.6 – 8.1 ［18.0］	6.4 – 7.6 ［11.4］	6.3 – 10.3 ［16.9］	2.91 – 5.48 ［5.66］	3.3 – 17.4 c) ［3.2］	3.6 – 5.5 ［25.6 d)］
対象の 非臨床試験	ES-T31, ES-T34, ES-T40	0031-NC-004	ES-T01, ES-T02, ES-T10, ES-T18, ES-T39	0031-NC-003	0030-NC-001	ES-T04, ES-T19	ES-T05, ES-T11, ES-T15, ES-T20

[redacted]：[redacted]（ベルギー）、[redacted]：[redacted]（フランス）、E4：エステトロール、LC-MS/MS：液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法、NZW：ニュージーランドホワイト、[redacted]：[redacted]（オランダ）、SD：Sprague-Dawly、UHPLC-MS/MS：超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法、[redacted]：[redacted]（オランダ）、a)：測定 4 バッチ中 1 バッチで高濃度 QC（quality control）試料の測定内真度が基準（±15%）を超えたが、測定間真度は基準を満たした。b)：測定 4 バッチ中 1 バッチで定量下限 QC 試料の測定内精度が基準（20%）を超えたが、測定間精度は基準を満たした。c)：高濃度 QC 試料の測定間精度が基準（15%）を超えたが、分散分析により算出した overall の測定間精度は 6.5 – 9.2%［10.2%］と基準を満たした。d)：定量下限 QC 試料の測定間精度が基準（20%）を超えたが、分散分析により算出した overall の測定間精度は 4.9 – 8.1%［18.9%］と基準を満たした。

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：エステトロール+ドロスピレノン+レボノルゲストレル

試験番号	0030-NC-015	0031-NC-021		0030-NC-014	ES-T33-VR00914
CTD 番号	4.2.2.1-08	4.2.2.1-10		4.2.2.1-09	4.2.2.1-11
測定施設	[redacted]	[redacted]		[redacted]	[redacted]
動物／系統種	サル／カニクイザル	サル／カニクイザル		サル／カニクイザル	該当せず
測定試料	血漿	血漿	血漿	血漿	リン酸緩衝生理食塩水
測定対象物質	E4	E4	LNG	DRSP	E4
分析方法	UHPLC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	UHPLC-MS/MS	LC-MS/MS
内標準物質	E4-d_4	E4-d_4	LNG-d_6	16α-hydroxy testosterone	E4-d_3
定量下限（ng/mL）	1	0.500	0.200	1	0.0500
濃度範囲（ng/mL）	1 – 1000	0.500 – 500	0.200 – 200	1 – 1000	0.0500 – 50.0
測定内真度（%） ［定量下限］	-5.2 – 2.1 ［-0.8 – 5.2］	-8.8 – 10.0 ［-21.1 – -7.4 a)］	-7.3 – 18.3 b) ［-14.8 – -11.3］	-4.8 – 5.9 ［-2.0 – 5.9］	-7.8 – 5.2 ［-20.0 – 3.7］
測定間真度（%） ［定量下限］	-3.65 – 1.64 ［1.96］	-3.6 – 2.8 ［-13.0］	-0.4 – 6.7 ［-12.8］	-1.29 – 4.21 ［2.76］	-3.6 – 2.3 ［-10.0］
測定内精度（%） ［定量下限］	1.84 – 4.05 ［2.50］	1.2 – 5.5 ［5.8 – 7.8］	1.7 – 9.6 ［7.4 – 8.0］	1.10 – 6.62 ［5.41］	1.9 – 9.5 ［8.5 – 19.6］
測定間精度（%） ［定量下限］	2.22 – 4.05 ［3.79］	3.7 – 5.9 ［9.4］	2.8 – 9.4 ［7.5］	1.27 – 6.68 ［6.39］	3.7 – 13.6 ［17.4］
対象の 非臨床試験	0030-NC-002	0031-NC-018		0030-NC-002	ES-T33

[redacted]：[redacted]（ベルギー）、[redacted]：[redacted]（フランス）、DRSP：ドロスピレノン、E4：エステトロール、LC-MS/MS：液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法、LNG：レボノルゲストレル、[redacted]：[redacted]（オランダ）、UHPLC-MS/MS：超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法、a)：測定 3 バッチ中 1 バッチで定量下限 QC（quality control）試料の測定内真度が基準（±20%）を超えたが、測定間真度は基準を満たした。b)：測定 3 バッチ中 1 バッチで高濃度 QC 試料の測定内真度が基準（±15%）を超えたが、測定間真度は基準を満たした。

2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与

2.6.5.3.A マウス及びラットへの単回投与時の放射能-時間プロファイル

被験物質：エステトロール

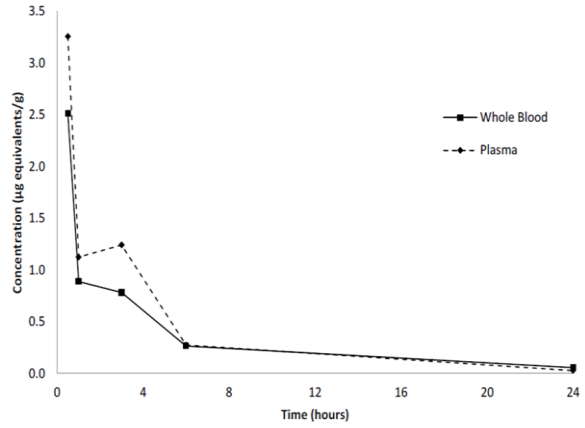
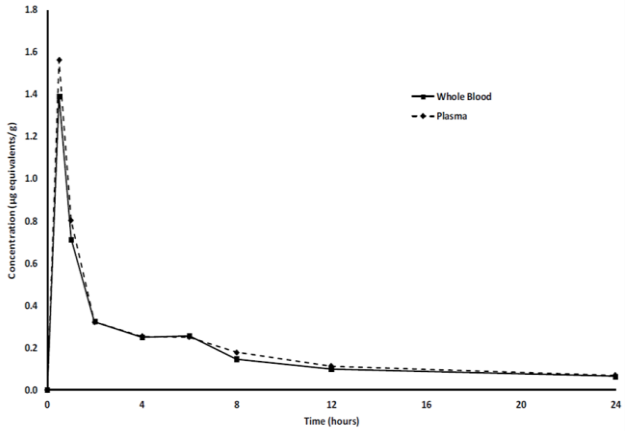
試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-023（4.2.2.2-01）**	**0031-NC-022（4.2.2.2-02）**
GLP 適用[1]：	非適	非適
動物種／系統：	マウス／CD-1	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄／雌）／動物数：	雌 3 例／時点	雌 3 例
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	15（3.7 MBq/kg）	15（3.7 MBq/kg）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol	2.18 GBq/mmol
放射化学的純度：	> 99%	> 99%
試料：	全血及び血漿	全血及び血漿
採取時間（時間）：	0.5、1、3、6、24	0、0.5、1、2、4、6、8、12、24
分析対象物質：	放射能	放射能
定量法：	LSC：直接又はサンプルオキシダイザーで燃焼後	LSC：直接又はサンプルオキシダイザーで燃焼後
追加情報：	吸収・代謝・排泄試験	吸収・分布・代謝・排泄試験 投与後 0.5 及び 6 時間の血漿中の代謝物プロファイルを測定した（TS 表 2.6.5.9.B）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LSC = 液体シンチレーション計数法

2.6.5.3.A マウス及びラットへの単回投与時の放射能-時間プロファイル（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	マウス		ラット	
	放射能（µg eq/g）		**放射能（µg eq/g）**	
試料：	**血漿**	**血液**	**血漿**	**血液**
採取時間（時間）：				
0.5	3.259	2.516	1.561	1.392
1	1.125	0.888	0.801	0.713
2			0.321	0.323
3	1.242	0.782		
4			0.253	0.249
6	0.274	0.264	0.250	0.257
8			0.178	0.146
12			0.112	0.099
24	0.027	0.056	0.069	0.064
				

略語：eq = 当量

2.6.5.3.B ラット及びサルへの単回投与による薬物動態／トキシコキネティクス

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**PR3002（4.2.2.2-03）**	**ES-T05（4.2.3.1-02）**
GLP 適用[1]：	非適	適
動物種／系統：	ラット／Sprague-Dawley	サル／カニクイザル
性別（雄／雌）／動物数：	雌 3 例／群	雌 4 例
給餌状態：	報告書に未記載	投与前後各 2 時間絶食
溶媒／投与形態：	エタノール 1%（v/v）を含有するラッカセイ油に溶解し、0.5 mL を各動物に投与。	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.1、10、100 mg/mL
投与方法：	経口（強制） 皮下（注射）	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	0.05、0.5、5	1、100、1000（Day 1、6 及び 14 に単回漸増投与）
試料：	血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0.5、1、2、4、8、24	0、0.5、1、2、4、8、12
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション未実施）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	経口投与時と皮下投与時の相対的バイオアベイラビリティ比較試験	最大耐量試験のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.3.B ラット及びサルへの単回投与による薬物動態／トキシコキネティクス（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	ラット						サル		
投与経路：	経口投与			皮下			経口投与		
投与量（mg/kg）：	**0.05**	**0.5**	**5**	**0.05**	**0.5**	**5**	**1**	**100**	**1000**
PK パラメータ（平均値）									
単回投与									
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	33.9	230	1090	42.4	171	2920	69.3	6816	93303
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	69.3	68.2	93.3
時間間隔 AUC（hr）	0-4/8	0-8/24	0-8/24	0-1/8/24	0-8	0-8/24	0-12	0-12	0-12
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	ND	ND	1265	ND	211	3053	119	9087	47130 [4]
C_{max} （ng/mL）	14.6	52.0	204	21.3	86.9	600	30.5	2282	13564
NC_{max} [1]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	30.5	22.8	13.6
T_{max} [2] （hr）	0.5 (0.5-1.0)	0.5 (0.5-1.0)	0.5 (0.5-0.5)	0.5 (0.5-1.0)	0.5 (0.5-0.5)	1.0 (0.5-2.0)	0.5 (0.5-0.5)	1.0 (1.0-2.0)	4.0 (2.0-8.0)
$T_{1/2}$ [3] （hr）	ND	ND	6.4	ND	3.7	2.7	9.6	7.4	7.3
追加情報：	0.05 及び 0.5 mg/kg 投与時の $AUC_{0\text{-}last}$ から、皮下投与に対する経口投与の相対的バイオアベイラビリティは 70%以上と推定された。5 mg/kg における相対的経口バイオアベイラビリティは、E4 を皮下投与したラット 1 例の血漿中濃度が他の 2 例よりも一貫して高かったため、判定できなかった。						-		

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] サルにおける $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[4] 報告書に示された $AUC_{0\text{-}inf}$ は、$AUC_{0\text{-}last}$ の平均値及び平均値のもととなる 3 例中 2 例のサルの $AUC_{0\text{-}last}$ よりも低い。AUC の外挿%は 2 例のサルについて±80%であり、これらの値は提示した値より 10 倍高いと推定される。正しい平均値は 177397 ng·hr/mL と見積もられる。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、ND = 未測定、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与

2.6.5.4.A エステトロールのトキシコキネティクス試験

2.6.5.4.A.1 マウス

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T31（4.2.3.2-01）**	**ES-T34（4.2.3.2-02）**
GLP 適用[1]：	非適[2]	適
動物種／系統：	マウス／CD-1	マウス／CD-1
性別（雄／雌）／動物数：	雌 2 例／群／時点	雌 2 例／群／時点
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.3、1、3 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.003、0.03、0.3、3 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	3、10、30	0.03、0.3、3、30
試料：	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、2、4	0、0.5、1、3、6、12
採取日：	Day 1、Day 14	Day 1、Day 28
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	2 週間 DRF 毒性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ	4 週間毒性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 試験施設で実施した GLP 非適用 DRF 試験で試料を採取したが、生体試料分析及び薬物動態評価は、実施機関において GLP を遵守して実施した。

略語：DRF = 用量設定、LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.A.1 マウス（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	**マウス／CD-1**				**マウス／CD-1**			
用量（mg/kg/日）：	**3**	**10**	**30**		**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
PK パラメータ								
単回投与	**Day 1**				**Day 1**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	216	545	1656		1.74	15.1	150	2280
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	72.2	54.5	55.2		57.9	50.4	50.1	76.0
時間間隔 AUC（hr）	0-4	0-4	0-4		0-6	0-6	0-12	0-12
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	239	659	1844		1.98	16.1	155	2312
C_{max} （ng/mL）	281	552	1125		1.13	9.96	99.7	1976
NC_{max} [1]	93.7	55.2	37.5		37.7	33.2	33.2	65.9
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ [2] （hr）	1.47	1.82	1.07		2.01	1.52	2.77	2.00
反復投与	**Day 14**				**Day 28**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	205	590	1255		1.99	21.3	227 [3]	2004 [3]
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	68.5	59.0	41.8		66.3	71.0	75.7	66.8
時間間隔 AUC（hr）	0-4	0-4	0-4		0-12	0-12	0-24	0-24
$AUC_{0\text{-}tau}$ （ng·hr/mL）	ND	ND	ND		ND	ND	227	2004
C_{max} （ng/mL）	255	515	1260		1.04	11.2	159	844
NC_{max} [1]	84.9	51.5	42.0		34.7	37.4	52.9	28.1
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ [2] （hr）	NC	NC	NC		2.68	1.59	3.28	2.21
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比	0.95	1.08	0.76		1.14	1.41	1.51	0.88

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 投与前試料が定量下限未満でなかった場合は、$AUC_{0\text{-}last}$ を $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、ND = 未測定、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.2 マウス

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T40（4.2.3.2-03）**	**0031-NC-004（4.2.3.4.1-01）**
GLP 適用[1]：	適	適
動物種／系統：	マウス／CD-1	マウス／CD-1
性別（雄／雌）／動物数：	雌 3 例／群／時点	雌 3 例／群／時点
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.03、0.1、0.3、1 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.025、0.05、0.1、0.2 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	0.3、1、3、10	0.125、0.25、0.5、1
試料：	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、3、6、12	0、0.5、1、3、6、12
採取日：	Day 1、Week 13	Week 12、Week 25
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	13 週間毒性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ	がん原性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.A.2 マウス（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	**マウス／CD-1**				**マウス／CD-1**			
用量（mg/kg/日）：	**0.3**	**1**	**3**	**10**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
PK パラメータ								
単回投与–Day 1	**Day 1**				**NA**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	15.9	67.3	204	846				
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	52.9	67.3	68.0	84.6				
時間間隔 AUC（hr）	0-6	0-12	0-12	0-12				
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	17.8	67.4	206	854				
C_{max} （ng/mL）	13.2	45.6	151	598				
NC_{max} [1]	43.9	45.6	50.2	59.8				
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5				
$T_{1/2}$ [2] （hr）	2.09	1.41	1.85	1.89				
反復投与–Week 13	**Week 13**				**Week 12**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	21.6	87.2 [3]	292 [3]	872 [3]	4.14	12.5	28.6	50.6
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	71.8	87.2	97.3	87.2	33.1	50.1	57.1	50.6
時間間隔 AUC（hr）	0-12	0-24	0-24	0-24	0-6	0-12	0-12	0-12
$AUC_{0\text{-}tau}$ （ng·hr/mL）	21.8	87.2	292	872	4.14	12.5	28.6	50.6
C_{max} （ng/mL）	13.2	39.4	136	494	2.97	9.71	17.0	29.3
NC_{max} [1]	43.9	39.4	45.3	49.4	23.8	38.8	34.1	29.3
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ [2] （hr）	1.59	2.88	3.03	2.68	NC	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比	1.36	1.29	1.43	1.03	NA	NA	NA	NA

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 投与前試料が定量下限未満でなかった場合は、$AUC_{0\text{-}last}$ を $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、NC = 算出せず、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.2 マウス（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	**マウス／CD-1**				**マウス／CD-1**			
用量（mg/kg/日）：	**0.3**	**1**	**3**	**10**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
反復投与–Week 26	**NA**				**Week 25**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）					4.60	12.4	23.6	54.6
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]					36.8	49.5	47.2	54.6
時間間隔 AUC（hr）					0-12	0-12	0-12	0-12
$AUC_{0\text{-}tau}$ （ng·hr/mL）					4.60	12.4	23.6	54.6
C_{max} （ng/mL）					3.75	8.91	14.9	29.1
NC_{max} [1]					30.0	35.7	29.7	29.1
T_{max} （hr）					0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （hr）					NC	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比					NA	NA	NA	NA

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、NC = 算出せず、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.3 ラット（Sprague-Dawley）

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T10（4.2.3.2-04）**	**ES-T18（4.2.3.2-05）**
GLP 適用[1]：	適	適
動物種／系統：	ラット／Sprague-Dawley	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄／雌）／動物数：	雌 3 例／群／時点（2 時点／例）	雌 3 例／群／時点（2 時点／例）
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1、3、10、30 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.3、1、3 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	5、15、50、150	1.5、5、15
試料：	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、3、6、12	0、0.5、1、3、6、12
採取日：	Day 1、Day 29	Day 1、Week 13、Week 26
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	4 週間毒性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ	26 週間毒性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.A.3 ラット（Sprague-Dawley）（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	ラット／**Sprague-Dawley**				ラット／**Sprague-Dawley**			
用量（mg/kg/日）：	**5**	**15**	**50**	**150**	**1.5**	**5**	**15**	
PK パラメータ								
単回投与–Day 1	**Day 1**				**Day 1**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	488	1968	10511	48990	139	553	1862	
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	97.6	131	210	327	92.7	111	124	
時間間隔 AUC（hr）	0-12	0-12	0-12	0-12	0-12	0-12	0-12	
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	556	2110	11136	53461	173	599	2092	
C_{max} （ng/mL）	285	1039	7430	14394	77.4	290	1048	
NC_{max} [1]	56.9	69.3	149	96.0	51.6	58.0	69.8	
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
$T_{1/2}$ [2] （hr）	4.74	3.88	3.35	3.27	6.24	3.55	4.55	
反復投与–Week 4	**Day 29**				**NA**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	592	1958	7179	40648				
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	118	131	144	271				
時間間隔 AUC（hr）	0-12	0-12	0-12	0-12				
$AUC_{0\text{-}tau}$ （ng·hr/mL）	606	2014	7462	41870				
C_{max} （ng/mL）	167	1043	2481	9781				
NC_{max} [1]	33.4	69.5	49.6	65.2				
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	1.0				
$T_{1/2}$ [2] （hr）	2.14	2.59	3.06	2.32				
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比	1.21	0.99	0.68	0.83				

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.3 ラット（Sprague-Dawley）（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	ラット／**Sprague-Dawley**				ラット／**Sprague-Dawley**			
用量（mg/kg/日）：	**5**	**15**	**50**	**150**	**1.5**	**5**	**15**	
PK パラメータ（続き）								
反復投与–Week 13	**NA**				**Week 13**			
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）					158[3]	594[3]	1958[3]	
$NAUC_{0\text{-last}}$ [1]					105	119	131	
時間間隔 AUC（hr）					0-24	0-24	0-24	
$AUC_{0\text{-tau}}$ （ng·hr/mL）					158	594	1958	
C_{max} （ng/mL）					58.0	189	551	
NC_{max} [1]					38.7	37.7	36.7	
T_{max} （hr）					0.5	0.5	0.5	
$T_{1/2}$ [2] （hr）					2.61	2.46	2.69	
$AUC_{0\text{-last}}$ の MD/SD 比					1.14	1.07	1.05	
反復投与–Week 26	**NA**				**Week 26**			
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）					196[3]	736[3]	2376[3]	
$NAUC_{0\text{-last}}$ [1]					130	147	158	
時間間隔 AUC（hr）					0-24	0-24	0-24	
$AUC_{0\text{-tau}}$ （ng·hr/mL）					196	736	2376	
C_{max} （ng/mL）					56.8	238	574	
NC_{max} [1]					37.9	47.6	38.2	
T_{max} （hr）					0.5	0.5	0.5	
$T_{1/2}$ [2] （hr）					2.36	3.03	2.72	
$AUC_{0\text{-last}}$ の MD/SD 比					1.41	1.33	1.28	

[1] $NAUC_{0\text{-last}}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 投与前試料が定量下限未満でなかった場合は、$AUC_{0\text{-last}}$ を $AUC_{0\text{-tau}}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-inf}}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-last}}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-tau}}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.4 ラット（Wistar）

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T39（4.2.3.2-06）**	**0031-NC-003（4.2.3.4.1-02）**
GLP 適用[1]：	適	適
動物種／系統：	ラット／Wistar	ラット／Wistar
性別（雄／雌）／動物数：	雌 3 例／群／時点（2 時点／例）	雌 3 例／群／時点（2 時点／例）
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.04、0.12、0.4、1.2 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.016、0.054、0.16 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	0.2、0.6、2、6	0.08、0.27、0.8
試料：	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、3、6、12	0、0.5、1、3、6、12
採取日：	Day 1、Week 13	Week 12、Week 25
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	13 週間毒性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ	がん原性試験のサテライト動物のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.A.4 ラット（Wistar）（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	ラット／**Wistar**				ラット／**Wistar**			
用量（mg/kg/日）：	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**	**0.08**	**0.27**	**0.8**	
PK パラメータ **単回投与–Day 1**	**Day 1**				**NA**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	26.3	89.0	267	1104				
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	132	148	134	184				
時間間隔 AUC（hr）	0-12	0-12	0-12	0-12				
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	26.5	89.9	269	1118				
C_{max} （ng/mL）	10.2	41.2	98.4	454				
NC_{max} [1]	50.7	68.6	49.2	75.7				
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5				
$T_{1/2}$ [2] （hr）	1.63	1.86	1.79	1.98				
反復投与–Week 13	**Week 13**				**Week 12**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	21.4	57.6	173[3]	595[3]	6.62	14.7	45.6	
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	107	96.0	86.3	99.1	82.7	54.4	57.1	
時間間隔 AUC（hr）	0-12	0-12	0-24	0-24	0-12	0-12	0-12	
$AUC_{0\text{-}tau}$ （ng·hr/mL）	22.5	60.0	173	595	6.62	14.7	45.6	
C_{max} （ng/mL）	9.22	25.1	87.8	331	3.20	7.30	34.4	
NC_{max} [1]	46.1	41.9	43.9	55.2	40.0	27.0	43.0	
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
$T_{1/2}$ [2] （hr）	2.40	2.19	2.37	2.46	NC	NC	NC	
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比	0.81	0.65	0.65	0.54	NA	NA	NA	

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 投与前試料が定量下限未満でなかった場合は、$AUC_{0\text{-}last}$ を $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、NC = 算出せず、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.4 ラット（Wistar）（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	ラット／**Wistar**				ラット／**Wistar**			
用量（mg/kg/日）：	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**	**0.08**	**0.27**	**0.8**	
反復投与–Week 26	**NA**				**Week 25**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）					6.73	18.8	40.7	
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]					84.1	69.6	50.9	
時間間隔 AUC（hr）					0-12	0-12	0-12	
$AUC_{0\text{-}tau}$ （ng·hr/mL）					6.73	18.8	40.7	
C_{max} （ng/mL）					3.39	9.99	25.5	
NC_{max} [1]					42.3	37.0	31.8	
T_{max} （hr）					0.5	0.5	0.5	
$T_{1/2}$ [2] （hr）					NC	NC	NC	
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比					NA	NA	NA	

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 投与前試料が定量下限未満でなかった場合は、$AUC_{0\text{-}last}$ を $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、NC = 算出せず、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.5 サル

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T11（4.2.3.2-07）**	**ES-T15（4.2.3.2-08）**	**ES-T20（4.2.3.2-09）**
GLP 適用[1]：	適	適	適
動物種／系統：	サル／カニクイザル	サル／カニクイザル	サル／カニクイザル
性別（雄／雌）／動物数：	雌 4 例／群	3 及び 10 mg/kg：雌 6 例／群 30 mg/kg：雌 10 例	1 及び 3 mg/kg：雌 8 例／群 10 mg/kg：雌 12 例／群
給餌状態：	非絶食	投与後 2 時間以上経過後に給餌。	投与後 2 時間以上経過後に給餌。
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1、3、10 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.6、2、6 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.2、0.6、2 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	5、15、50	3、10、30	1、3、10
試料：	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、2、4、8、16、24（Day 1 のみ）	0、0.5、1、2、4、8、16、24（Day 1 のみ）	0、0.5、1、2、4、8、16、24（Day 1 のみ）
採取日：	Day 1、Day 28	Day 1、Week 13	Day 1、Week 13、Week 26、Week 39
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	4 週間毒性試験のトキシコキネティクスデータ	13 週間毒性試験のトキシコキネティクスデータ	39 週間毒性試験のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.A.5 サル（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	サル			サル			サル		
用量（mg/kg/日）：	**5**	**15**	**50**	**3**	**10**	**30**	**1**	**3**	**10**
PK パラメータ（平均値）									
単回投与	**Day 1**			**Day 1**			**Day 1**		
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	492	1970	6157	260	1067	2805	120	340	1078
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	98.3	131	123	86.5	107	93.5	120	113	108
時間間隔 AUC（hr）	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	ND	ND	7106	ND	1477	3879	177	500	1476
C_{max} （ng/mL）	141	834	1250	87.3	471	788	31.7	110	365
NC_{max} [1]	28.2	55.6	25.0	29.1	47.1	26.3	31.7	36.7	36.5
T_{max} [2] （hr）	0.5	0.75	1.0	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5
	(0.5-0.5)	(0.5-1.0)	(0.5-1.0)	(0.5-2.0)	(0.5-0.5)	(0.5-2.0)	(0.5-1.0)	(0.5-0.5)	(0.5-4.0)
$T_{1/2}$ [3] （hr）	ND	ND	10.8	ND	14.4	10.4	12.8	13.4	16.7
反復投与–Week 4	**Day 28**			**NA**			**NA**		
$AUC_{0\text{-}last}$ [4] （ng·hr/mL）	1153	3640	9327						
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	231	243	187						
時間間隔 AUC（hr）	0-24	0-24	0-24						
C_{max} （ng/mL）	348	1098	2021						
NC_{max} [1]	69.6	73.2	40.4						
T_{max} [2] （hr）	1.0	1.0	1.5						
	(0.5-1.0)	(1.0-1.0)	(1.0-2.0)						
$T_{1/2}$ [3] （hr）	10.8	ND	ND						
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比	2.35	1.85	1.51						

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[4] 反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、ND = 未測定、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.5 サル（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	サル			サル			サル		
用量（mg/kg/日）：	**5**	**15**	**50**	**3**	**10**	**30**	**1**	**3**	**10**
PK パラメータ（続き）									
反復投与–Week 13	**NA**			**Week 13**			**Week 13**		
$AUC_{0\text{-}last}$ [4] （ng·hr/mL）				363	1215	3497	163	402	1420
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]				121	121	117	163	134	142
時間間隔 AUC（hr）				0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{max} （ng/mL）				122	357	871	30.4	89.5	433
NC_{max} [1]				40.5	35.7	29.0	30.4	29.8	43.3
T_{max} [2] （hr）				0.5	0.75	1.0	0.75	0.75	1.0
				(0.5-8.0)	(0.5-4.0)	(0.5-2.0)	(0.5-1.0)	(0.5-4.0)	(0.5-4.0)
$T_{1/2}$ [3] （hr）				18.7	12.9	15.0	14.6	14.5	12.9
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比				1.40	1.14	1.25	1.36	1.18	1.32
反復投与–Week 26	**NA**			**NA**			**Week 26**		
$AUC_{0\text{-}last}$ [4] （ng·hr/mL）							109	312	1024
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]							109	104	102
時間間隔 AUC（hr）							0-24	0-24	0-24
C_{max} （ng/mL）							19.8	84.9	245
NC_{max} [1]							19.8	28.3	25.4
T_{max} [2] （hr）							0.5	0.75	1.0
							(0.5-8.0)	(0.5-2.0)	(0.5-1.0)
$T_{1/2}$ [3] （hr）							16.9	14.7	11.7
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比							0.91	0.92	0.96

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[4] 反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.5 サル（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	サル			サル			サル		
用量（mg/kg/日）：	**5**	**15**	**50**	**3**	**10**	**30**	**1**	**3**	**10**
PK パラメータ（続き） **反復投与–Week 39**	**NA**			**NA**			**Week 39**		
$AUC_{0\text{-last}}$ [4] （ng·hr/mL）							123	328	1250
$NAUC_{0\text{-last}}$ [1]							123	109	125
時間間隔 AUC（hr）							0-24	0-24	0-24
C_{max} （ng/mL）							33.0	97.2	452
NC_{max} [1]							33.0	32.4	45.2
T_{max} [2] （hr）							0.5	1.0	0.5
							(0.5-2.0)	(0.5-1.0)	(0.5-1.0)
$T_{1/2}$ [3] （hr）							14.2	14.2	14.3
$AUC_{0\text{-last}}$ の MD/SD 比							1.02	0.96	1.16
追加情報：	血漿中濃度-時間曲線から、腸肝循環の可能性が示された。			血漿中濃度-時間曲線から、腸肝循環の可能性が示された。			血漿中濃度-時間曲線から、腸肝循環の可能性が示された。		

[1] $NAUC_{0\text{-last}}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[4] 反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ は $AUC_{0\text{-tau}}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-inf}}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-last}}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-tau}}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、MD/SD = 反復投与／単回投与、NA = 該当なし、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.6 交配済み／妊娠動物

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T02（4.2.3.5.2-02）**	**ES-T01（4.2.3.5.2-01）**	**ES-T04（4.2.1.1-09）** **ES-T04-BR1031（4.2.1.1-10）**	**ES-T19（4.2.3.5.2-05）**
GLP 適用[1]：	適	適	非適	適
動物種／系統：	ラット／Wistar	ラット／Wistar	ウサギ／ニュージーランドホワイト	ウサギ／ニュージーランドホワイト
性別（雄／雌）／動物数：	交配済み雌 3 例／群／時点（3 時点／例）	交配済み雌 3 例／群／時点（3 時点／例）	雌 3 又は 4 例／群	交配済み雌 3 又は 4 例／群
給餌状態：	非絶食	非絶食	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.02、0.06、0.2、0.6、2 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 6、12、18 mg/mL	ASV[2] 中に 0.1、1 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 0.05、0.15、0.45 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）	経口（強制）	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	0.1、0.3、1、3、10	30、60、90	0.1、1（1 日 2 回）	0.05、0.15、0.45
試料：	血漿	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、2、4、6	0、0.5、1、2、4、6	0、0.5、1、2、4、8、12	0（G6 のみ）、0.5、1、2、4、8、12、24
採取日：	G6、G17	G6、G17	D1（G-4）、G9	G6、G18 又は G15[3]
分析対象物質：	エステトロール	エステトロール	エステトロール	エステトロール
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	DRF EFD 試験のトキシコキネティクスデータ	DRF EFD 試験のトキシコキネティクスデータ	DRF Fert./Implant. 試験のトキシコキネティクスデータ	EFD 試験のトキシコキネティクスデータ

1 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

2 ES-T04 試験によると、水性懸濁溶媒（ASV）は蒸留水に塩化ナトリウム、ベンジルアルコール、Tween 80 及びカルボキシメチルセルロースが含まれており、添加剤の濃度は記載されていなかった。

3 0.45 mg/kg/日投与群の G15。失血が認められたため、この用量の投与期間を短縮した。

略語：ASV＝ 水性懸濁溶媒、DRF＝ 用量設定、EFD＝ 胚・胎児発生、G＝ 妊娠日齢、LC-MS/MS＝ 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.A.6 交配済み／妊娠動物（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	ラット					ラット			ウサギ		ウサギ		
用量（mg/kg/日）：	**0.1**	**0.3**	**1**	**3**	**10**	**30**	**60**	**90**	**0.1**	**1**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
PK パラメータ													
単回投与	**G6**					**G6**			**D1（G-4）**		**G6**		
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	2.90	9.41	36.1	102	485	2715	9570	14825	13.1	65.9	4.19	19.7	50.8
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	29.0	31.4	36.1	34.1	48.5	90.5	159	165	131	65.9	83.8	131	113
時間間隔 AUC（hr）	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-12	0-12	0-12	0-12	0-12
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	ND	ND	ND	ND	614	2895	10379	16010	25.4	83.1	4.71	ND	ND
C_{max} （ng/mL）	2.09	5.77	25.5	99.0	540	2304	5890	7796	4.51	34.0	0.802	3.69	9.38
NC_{max} [1]	20.9	19.2	25.5	33.0	54.0	76.8	98.2	86.6	45.1	34.0	16.0	24.6	20.8
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5[3]	0.5[3]	2.0[3] (2.0-4.0)	2.0[3] (1.0-2.0)	2.0[3] (1.0-2.0)
$T_{1/2}$ [2] （hr）	ND	ND	ND	ND	3.97	1.79	1.55	1.49	9.85	7.88	15.0	ND	ND

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 中央値（最小値-最大値）。ES-T04 試験における T_{max} は全例 0.5 時間。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、G = 妊娠日齢、ND = 未測定、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.A.6 交配済み／妊娠動物（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	ラット					ラット			ウサギ		ウサギ		
用量（mg/kg/日）：	**0.1**	**0.3**	**1**	**3**	**10**	**30**	**60**	**90**	**0.1**	**1**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
PK パラメータ													
反復投与	**G17**					**G17**			**G9**		**G18 又は G15[4]**		
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	4.58	9.33	37.7	139	350	1870	6897	7792	12.1	83.9	6.84[5]	28.5[5]	57.5[5]
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	45.8	31.1	37.7	46.3	35.0	62.3	115	86.6	121	83.9	137	190	128
時間間隔 AUC（hr）	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-12	0-12	0-24	0-24	0-24
C_{max} （ng/mL）	3.03	6.83	20.9	67.8	141	760	3422	4464	4.11	17.8	0.925	4.14	4.17
NC_{max} [1]	30.3	22.8	20.9	22.6	14.1	25.3	57.0	49.6	41.1	17.8	18.5	27.6	9.27
T_{max} （hr）	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5[3]	0.5[3]	2.0[3] (2.0-4.0)	2.0[3] (2.0-4.0)	3.0[3] (1.0-12.0)
$T_{1/2}$ [2] （hr）	ND	ND	ND	2.09	2.60	1.67	1.96	2.02	8.29	6.03	13.4	ND	18.0
$AUC_{0\text{-}last}$ の MD/SD 比	1.58	0.99	1.04	1.36	0.72	0.69	0.72	0.53	0.93	1.27	1.63	1.45	1.13

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] $T_{1/2}$ は、C_{max} 後の連続 3 時点以上を用いて算出した。

[3] 中央値（最小値-最大値）。ES-T04 試験における T_{max} は全例 0.5 時間。

[4] 0.45 mg/kg/日投与群の G15。失血が認められたため、この用量の投与期間を短縮した。

[5] 反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は $AUC_{0\text{-}tau}$ として算出した。投与後 24 時間値を投与前値に適用した。

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}tau}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、G = 妊娠日齢、MD/SD = 反復投与／単回投与、ND = 未測定、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.B エステトロール+ドロスピレノンのトキシコキネティクス試験

2.6.5.4.B.1 サル

被験物質：エステトロール+ドロスピレノン

試験番号（CTD 番号）：	**0030-NC-002（4.2.3.2-10）**
GLP 適用[1]：	適
動物種／系統：	サル／カニクイザル
性別（雄／雌）／動物数：	エステトロール／ドロスピレノン 3/0.6 及び 10/2 mg/kg、並びにエステトロール 30（20）mg/kg 及びドロスピレノン 6（4）mg/kg の雌 5 例／群 エステトロール／ドロスピレノン 30/6（20/4）mg/kg の雌 9 例／群
給餌状態：	投与後 4 時間以上経過後に給餌。
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中にエステトロール/ドロスピレノン 0.6/0.12、2/0.4、6/1.2（4/0.8）mg/mL、エステトロール 6（4）mg/mL、ドロスピレノン 1.2（0.8）mg/mL
投与方法：	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	エステトロール/ドロスピレノン：3/0.6、10/2、30/6（20/4）[2] エステトロール：30（20）[2] ドロスピレノン：6（4）[2]
試料：	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、2、3、4、8、16、24（Day 1 のみ）
採取日：	Day 1、Week 13
分析対象物質：	エステトロール及びドロスピレノン
定量法：	UHPLC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	エステトロール及びドロスピレノンの 13 週間毒性試験のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 高用量併用群における一般状態悪化や早期屠殺のため、Day 50（エステトロール／ドロスピレノン併用）又は Day 53（エステトロール又はドロスピレノン単独）に用量を減量した。高用量併用群の全生存雌において、Day 48 及び 49 に投与を中断した。

略語：UHPLC-MS/MS = 超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 UHPLC

2.6.5.4.B.1 サル（続き）

被験物質：エステトロール+ドロスピレノン

分析対象物質：	エステトロール				ドロスピレノン			
E4/DRSP 投与量（mg/kg/日）：	**3/0.6**	**10/2**	**30/6 (20/4)**	**30/0 (20/0)**	**3/0.6**	**10/2**	**30/6 (20/4)**	**0/6 (0/4)**
PK パラメータ（平均値）								
単回投与	**Day 1**				**Day 1**			
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）	341	1430	5733	3108	745	2490	6766	6186
$NAUC_{0\text{-last}}$ [1]	114	143	191	104	1242	1245	1128	1031
時間間隔 AUC（hr）	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
$AUC_{0\text{-inf}}$ （ng·hr/mL）	498	1919	6463	4090	785	2563	7084	6356
C_{max} （ng/mL）	173	658	1965	884	116	435	930	758
NC_{max} [1]	57.7	65.8	65.5	29.5	193	217	155	126
T_{max} [2] （hr）	0.5 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-1.0)	0.5 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-3.0)	1.0 (1.0-3.0)	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (2.0-4.0)	3.0 (2.0-3.0)
$T_{1/2}$ （hr）	21.9	17.3	10.2	20.0	4.5	4.7	5.1	4.1
反復投与	**Week 13**				**Week 13**			
$AUC_{0\text{-last}}$ [3] （ng·hr/mL）	483	1608	3733	2281	630	1867	2769	3150
$NAUC_{0\text{-last}}$ [1]	161	161	187	114	1049	934	692	787
時間間隔 AUC（hr）	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24[4]	0-24	0-24	0-24
C_{max} （ng/mL）	173	380	722	687	105	205	338	399
NC_{max} [1]	57.7	38.0	36.1	34.3	176	102	84.4	99.8
T_{max} [2] （hr）	0.5 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-2.0)	1.0 (0.5-2.0)	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-8.0)	3.0 (2.0-3.0)	3.0 (2.0-3.0)
$T_{1/2}$ （hr）	14.6	21.3	8.6	13.5	5.3	6.1	5.3	6.5
$AUC_{0\text{-last}}$ の MD/SD 比	1.42	1.12	0.65	0.73	0.85	0.75	0.41	0.51

[1] $NAUC_{0\text{-last}}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] 反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ は $AUC_{0\text{-tau}}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

[4] 1 例で投与前値が定量下限未満であったため投与後 0～16 時間

略語：$AUC_{0\text{-inf}}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-last}}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-tau}}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、DRSP = ドロスピレノン、E4 = エステトロール、MD/SD = 反復投与／単回投与、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.C エステトロール+レボノルゲストレルのトキシコキネティクス試験

2.6.5.4.C.1 サル

被験物質：エステトロール+レボノルゲストレル

試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-018（4.2.3.2-11）**
GLP 適用[1]：	適
動物種／系統：	サル／カニクイザル
性別（雄／雌）／動物数：	エステトロール及びレボノルゲストレル 3/0.0225 及び 10/0.075 mg/kg、並びにエステトロール 30（20）mg/kg 及びレボノルゲストレル 0.225（0.150）mg/kg の雌 5 例／群 エステトロール/レボノルゲストレル 30/0.225（20/0.150）mg/kg の雌 9 例／群
給餌状態：	Day 1 は投与後 4 時間以上、Week 13 は投与後 1 時間以上経過後に給餌。
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液/0.1%（v/v）Tween 80 中にエステトロール/レボノルゲストレル 0.6/0.0045、2/0.015、6/0.045（4/0.03）mg/mL、エステトロール 6（4）mg/mL、レボノルゲストレル、0.045（0.03）mg/mL
投与方法：	経口（強制）
用量（mg/kg/日）：	エステトロール／レボノルゲストレル：3/0.0225, 10/0.075, 30/0.225（20/0.150）[2] エステトロール：30（20）[2] レボノルゲストレル：0.225（0.150）[2]
試料：	K_2EDTA 血漿
採取時間（時間）：	0、0.5、1、2、3、4、8、16、24（Day 1 のみ）
採取日：	Day 1、Week 13
分析対象物質：	エステトロール及びレボノルゲストレル
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）
追加情報：	エステトロール及びレボノルゲストレルの 13 週間毒性試験のトキシコキネティクスデータ

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 高用量併用群における一般状態悪化や早期屠殺のため、Day 51 に用量を減量した。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.4.C.1 サル（続き）

被験物質：エステトロール+レボノルゲストレル

分析対象物質：	エステトロール				レボノルゲストレル			
E4/LNG 投与量（mg/kg/日）：	**3/0.0225**	**10/0.075**	**30/0.225 (20/0.150)**	**30/0 (20/0)**	**3/0.0225**	**10/0.075**	**30/0.225 (20/0.150)**	**0/0.225 (0/0.150)**
PK パラメータ（平均値） **単回投与**	**Day 1**				**Day 1**			
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）	238	835	3043	2585	202	429	451	500
$NAUC_{0\text{-}last}$ [1]	79.4	83.5	101	86.2	8987	5723	2004	2221
時間間隔 AUC（hr）	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24[3]	0-24	0-24	0-24
$AUC_{0\text{-}inf}$ （ng·hr/mL）	NR	NR	3438	2832	205	402	465	477
C_{max} （ng/mL）	116	360	1344	1129	32.7	45.1	56.2	57.5
NC_{max} [1]	38.7	36.0	44.8	37.6	1454	602	250	256
T_{max} [2] （hr）	0.5 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-4.0)	1.0 (0.5-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	2.0 (1.0-4.0)	1.0 (1.0-3.0)	1.0 (1.0-2.0)
$T_{1/2}$ （hr）	15.5	21.6	9.5	12.7	3.6	6.0	4.4	6.9

[1] $NAUC_{0\text{-}last}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] 1 例、0～16 時間

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、E4 = エステトロール、LNG = レボノルゲストレル、NR = 報告なし、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.4.C.1 サル（続き）

被験物質：エステトロール+レボノルゲストレル

分析対象物質：	エステトロール				レボノルゲストレル			
E4/LNG 投与量（mg/kg/日）：	**3/0.0225**	**10/0.075**	**30/0.225 (20/0.150)**	**30/0 (20/0)**	**3/0.0225**	**10/0.075**	**30/0.225 (20/0.150)**	**0/0.225 (0/0.150)**
PK パラメータ 反復投与	**Week 13**				**Week 13**			
$AUC_{0\text{-last}}$ [3] （ng·hr/mL）	282	934	1858	1913	145	197	291	106
$NAUC_{0\text{-last}}$ [1]	94.0	98.4	92.9	95.7	6464	2630	1941	704
時間間隔 AUC（hr）	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24[4]	0-24	0-24	0-24
C_{max} （ng/mL）	87.1	262	557	1324	20.7	22.0	32.1	14.6
NC_{max} [1]	29.0	26.2	27.8	66.2	919	293	214	97.1
T_{max} [2] （hr）	0.5 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-1.0)	1.0 (0.5-2.0)	0.5 (0.5-1.0)	1.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-3.0)	2.0 (1.0-4.0)	2.0 (1.0-2.0)
$T_{1/2}$ （hr）	18.8	16.9	20.2	10.7	4.0	4.7	4.2	6.1
$AUC_{0\text{-last}}$ の MD/SD 比	1.21	1.19	0.66	0.75	0.75	0.47	0.66	0.22
追加情報：	30（20）mg/kg/日のエステトロール単独投与群全例の血漿試料で、Week 13 に定量可能な濃度のレボノルゲストレルが検出され、その最大測定値はレボノルゲストレルの低用量での C_{max} の約 16.4%であった。汚染源は確定できなかったが、この群における曝露が均一であったことを考慮すると、動物は汚染された製剤の投与を受けた可能性がある。							

[1] $NAUC_{0\text{-last}}$ 及び NC_{max} は、それぞれ単位（ng·hr/mL）/（mg/kg）及び（ng/mL）/（mg/kg）として、用量で標準化する。

[2] 中央値（最小値-最大値）

[3] 反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ は $AUC_{0\text{-tau}}$ として算出した。投与前値を投与後 24 時間値に適用した。

[4] 1 例で投与前値が定量下限未満であったため投与後 0～16 時間

略語：$AUC_{0\text{-inf}}$ = 無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-last}}$ = 最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-tau}}$ = 投与間隔における濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、E4 = エステトロール、LNG = レボノルゲストレル、MD/SD = 反復投与／単回投与、T_{max} = C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$ = 消失半減期

2.6.5.5 薬物動態試験：分布

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-022（4.2.2.2-02）**	
GLP 適用[1]：	非適	
動物種／系統：	ラット／Sprague-Dawley	ラット／Lister Hooded
性別（雄／雌）／動物数：	雌 1 例／時点	雌 1 例／時点
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	15（3.7 MBq/kg）	15（3.7 MBq/kg）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol	2.18 GBq/mmol
放射化学的純度：	> 99%	> 99%
試料採取時間：	0.5、1、2、5、8、24、48 時間	0.5、8、24 時間、7、14、35 日
分析対象物質：	放射能	放射能
定量法：	定量的全身オートラジオグラフィー	定量的全身オートラジオグラフィー
追加情報：	Lister Hooded（有色）ラットを用いて、メラニン含有組織における残留性を評価した	

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	**ラット／Sprague Dawley**							**ラット／Lister Hooded**					
試料採取時間：	**濃度（μg eq/g）[1]**							**濃度（μg eq/g）**					
	0.5 時間	**1 時間**	**2 時間**	**5 時間**	**8 時間**	**24 時間**	**48 時間**	**0.5 時間**	**8 時間**	**24 時間**	**7 日**	**14 日**	**35 日**
組織：													
副腎	4.19	1.59	0.894	0.461	0.777	0.140	BLQ	3.78	0.451	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
大動脈	4.95	1.54	0.668	0.126	0.534	BLQ	BLQ	6.37	0.120	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
骨	0.082	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.092	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
骨髄	1.80	0.537	0.205	BLQ	0.154	BLQ	BLQ	1.69	0.083	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脳：小脳	0.288	0.130	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NR	NR	NR	NR	NR	NR
脳：皮質	0.288	0.126	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NR	NR	NR	NR	NR	NR
脳：海馬	0.180	0.139	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NR	NR	NR	NR	NR	NR
脳：全体	0.276	0.133	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.323	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
盲腸内容物	1.70	1.70	2.69	*332*	*961*	16.7	1.14	1.88	125	24.6	BLQ	BLQ	BLQ
盲腸粘膜	1.70	0.861	1.01	6.82	8.70	1.17	0.094	2.18	6.94	2.07	BLQ	BLQ	BLQ
脈絡叢	0.992	0.176	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1.48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
眼窩外涙腺	3.36	1.31	0.307	0.119	0.231	BLQ	BLQ	3.65	0.122	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
眼：水晶体	0.416	0.123	0.091	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.107	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
眼：ぶどう膜	1.39	0.276	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	4.01	0.304	0.140	BLQ	BLQ	BLQ
眼：全体	0.771	0.237	0.170	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.932	0.091	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脂肪：褐色	1.82	0.372	0.192	0.088	0.079	BLQ	BLQ	1.50	0.085	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脂肪：白色	0.107	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.082	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
胃粘膜	6.33	2.31	1.67	0.573	1.27	0.253	BLQ	4.57	0.890	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
ハーダー腺	3.16	0.915	0.339	0.110	0.201	BLQ	BLQ	3.77	0.112	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
心臓（血液）	2.47	0.777	0.271	0.114	0.204	BLQ	BLQ	2.66	0.160	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
腎臓：皮質	6.69	2.23	1.34	0.500	1.06	0.179	BLQ	6.97	0.573	0.100	BLQ	BLQ	BLQ
腎臓：髄質	9.57	2.78	1.16	0.643	1.05	0.112	BLQ	8.86	0.560	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
腎臓：全体	7.21	2.28	1.33	0.593	1.04	0.176	BLQ	7.17	0.654	0.078	BLQ	BLQ	BLQ

[1] イタリック体の値は正確な定量限界（130 μg eq/g）を上回った値。

略語：- = 試料なし、BLQ = 正確な定量限界（0.076 μg eq/g）未満、eq = 当量、NR = 報告なし

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統：	**ラット／Sprague Dawley**							**ラット／Lister Hooded**					
試料採取時間：	**濃度（μg eq/g）[1]**							**濃度（μg eq/g）**					
	0.5 時間	**1 時間**	**2 時間**	**5 時間**	**8 時間**	**24 時間**	**48 時間**	**0.5 時間**	**8 時間**	**24 時間**	**7 日**	**14 日**	**35 日**
組織：													
大腸内容物	BLQ	0.403	2.27	*278*	*665*	56.4	1.79	0.497	*195*	63.8	0.076	BLQ	BLQ
大腸粘膜	1.95	2.07	1.48	3.04	4.38	1.17	0.150	3.13	9.89	0.896	BLQ	BLQ	BLQ
肝臓	12.5	6.01	4.36	4.06	5.24	3.64	1.73	13.7	3.58	2.56	0.410	BLQ	BLQ
肺	2.69	0.810	0.268	0.130	0.221	BLQ	BLQ	3.07	0.163	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
リンパ節	2.05	0.682	0.208	0.076	0.138	BLQ	BLQ	2.27	0.093	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
心筋	2.63	0.649	0.273	0.103	0.185	BLQ	BLQ	2.71	0.108	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
卵巣	3.11	1.30	-	0.131	0.237	BLQ	BLQ	2.85	0.154	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
膵臓	7.51	2.73	1.17	0.364	0.641	0.096	BLQ	6.95	0.292	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
松果体	2.23	0.538	0.145	-	0.141	BLQ	-	-	-	-	BLQ	BLQ	BLQ
下垂体	2.69	0.750	0.289	0.169	0.186	BLQ	BLQ	3.04	0.115	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
唾液腺	6.43	3.74	2.92	1.53	2.04	0.179	BLQ	3.59	0.278	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
骨格筋	2.28	0.650	0.223	BLQ	0.128	BLQ	BLQ	2.14	0.081	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
皮膚：アルビノ	2.59	0.771	0.465	0.189	0.361	BLQ	BLQ	1.89	0.090	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
皮膚：有色	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.85	0.161	0.113	BLQ	BLQ	BLQ
小腸内容物	*654*	*281*	119	*249*	142	15.3	0.797	*301*	11.9	2.27	BLQ	BLQ	BLQ
小腸粘膜	11.3	16.1	2.52	4.76	7.74	1.98	0.109	8.83	5.98	0.938	BLQ	BLQ	BLQ
脊髄	0.237	0.129	0.092	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.275	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脾臓	2.01	0.576	0.207	0.105	0.150	BLQ	BLQ	2.30	0.122	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
胃内容物	*217*	*359*	106	*179*	*291*	102	BLQ	*448*	*188*	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
胸腺	2.14	0.554	0.202	BLQ	0.112	BLQ	BLQ	2.27	0.089	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
甲状腺	3.07	1.09	0.787	0.460	0.790	0.288	0.132	3.21	0.351	0.116	BLQ	BLQ	BLQ
膀胱内容物	41.6	12.0	-	0.160	-	0.108	0.170	32.0	-	-	-	-	BLQ
膀胱壁	3.05	0.816	-	0.080	0.191	BLQ	BLQ	4.60	-	-	-	-	BLQ
子宮	2.63	0.647	0.275	0.240	0.221	BLQ	BLQ	1.93	0.150	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

[1] イタリック体の値は正確な定量限界（130 μg eq/g）を上回った値。

略語：- = 試料なし、BLQ = 正確な定量限界（0.076 μg eq/g）未満、eq = 当量、NA = 該当なし

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合

2.6.5.6.A マウス、ラット、サル及びヒトの血漿蛋白結合

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T33（4.2.2.3-01）**			
GLP 適用[1]：	非適			
試験系：	血漿			
動物種／系統：	マウス／CD-1	ラット／Sprague-Dawley	サル／カニクイザル	ヒト／30～40 歳
性別（雄／雌）／動物数：	雌／プール	雌／プール	雌／プール	女性 1 例
エステトロール濃度（ng/mL）：	0.938、9.38、93.78、937.8（マウス、ラット、サル） 0.938、4.69、9.38、46.9（ヒト）			
溶媒：	エタノール（血漿中最終濃度 1%（v/v））			
方法：	リン酸緩衝生理食塩水に対する 37°C、6 時間の平衡透析（カットオフ 5000 Da の膜）			
分析対象物質：	エステトロール			
定量法：	LC-MS/MS（バリデーション実施済み）			
追加情報：	• 非特異的結合率は 0.3%～6.4%であった。 • 平衡に達するまでの時間は 3～6 時間であった。			
	血漿蛋白結合（結合率%）			
濃度（ng/mL）：	**0.938**	**9.38**	**93.78**	**937.8**
動物種： マウス	48.3	55.9	44.8	49.9
ラット	54.7	49.2	59.3	66.0
サル	53.0	50.3	56.5	67.2
濃度（ng/mL）：	**0.938**	**4.69**	**9.38**	**46.9**
動物種： ヒト	47.8	45.5	45.4	50.4

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.6.B ヒト性ホルモン結合グロブリンに対する相対結合親和性

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**PR3025（5.3.2.1-01）**	
GLP 適用[1]：	非適	
試験系：	ヒト性ホルモン結合グロブリン（トランスジェニックマウス血清より精製）	
方法：	[^{3}H]-ジヒドロテストステロン又は[^{3}H]-エストラジオールをリガンドとする競合的ステロイド結合アッセイ	
追加情報：	• 1 nM の性ホルモン結合グロブリンを 10 nM の[^{3}H]リガンド及び漸増濃度の競合品とともにインキュベートした。 • エステトロールを 0.17～33 µM の濃度で適用した。	
	相対結合親和性[2]	
	ジヒドロテストステロン競合アッセイ	**エストラジオール競合アッセイ**
競合品： ジヒドロテストステロン	100.0	ND
テストステロン	40.0	ND
エストラジオール	6.80	100.0
エチニルエストラジオール	0.08	2.02
エステトロール	0.00[2]	0.00[3]

1 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

2 [^{3}H]リガンドの特異的結合を 50%減少させるステロイド競合品の濃度と、同じ効果を得るために必要な非標識リガンドの濃度との比に 100 を乗じた値。

3 [^{3}H]-ジヒドロテストステロン又は[^{3}H]-エストラジオールの置換は認められなかった。

略語：ND = 未測定

2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

被験物質：エステトロール

胎盤通過及び乳汁排泄試験は実施されていない。

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

2.6.5.8.A ヒト血液における *in vitro* 血液／血漿間の分配

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**0031-104（5.3.2.1-02）**	
GLP 適用 [1]：	適	
試験系：	ヒト血液	
性別（雄／雌）／動物数：	女性／健康被験者 3 例	
エステトロール濃度（μM）：	0.1、1	
溶媒：	メタノール（血中最終濃度 1%（v/v））	
方法：	37°C で 0、10、30、60、120 分間インキュベート	
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール	
比活性及び純度：	2.18 GBq/mmoL、100%	
分析対象物質：	放射能	
定量法：	LSC：直接（血漿）又はサンプルオキシダイザーで燃焼後（血液）	
追加情報：	培養条件下での[^{14}C]標識エステトロールの安定性は、HPLC によるオンライン放射能検出で確認した。	
	120 分後の血液／血漿間の分配	
	0.1 μM [^{14}C]標識エステトロール	**1 μM [^{14}C]標識エステトロール**
血液／血漿比： **血球中放射能（%）：**	1.21 49.3	1.18 48.6
追加情報：	[^{14}C]標識エステトロールの血液／血漿分布はインキュベーション時間に依存しなかった。 血漿中の放射能量は HPLC ピークの正確な定量には不十分であったが、0 及び 120 分の HPLC クロマトグラムではエステトロールが主成分として検出され、著しい分解は示されなかったことから、適用条件においてエステトロールは血漿［及び全血（推定）］中で安定であった可能性が高いことが示唆された。	

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：HPLC = 高速液体クロマトグラフィー、LSC = 液体シンチレーション計数法

2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：In Vivo

2.6.5.9.A マウス

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-023（4.2.2.2-01）**
GLP 適用 [1]：	非適
動物種／系統：	マウス／CD-1
性別（雄／雌）／動物数：	雌 9 例
給餌状態：	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL
投与方法：	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	15（3.7 MBq/kg）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol
放射化学的純度：	> 99%
定量法：	LC-MS/MS によるオンライン放射能検出（代謝物プロファイル及び構造推定）
追加情報：	• 投与後 0.5、1、3、6 及び 24 時間に血漿及び血液中放射能濃度を測定した（3 例／時点、TS 表 2.6.5.3.A） • 排泄バランスを投与後 168 時間後まで測定した（TS 表 2.6.5.13）。

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.9.A マウス（続き）

被験物質：エステトロール

試料：	**時間（時間）**	**試料中の投与量に対する%**	**化合物ごとの投与量に対する%[1]**								
尿	12-48	14.49	U1 0.45	U2 0.79	U3 2.06	U4 **4.72**	U5 0.90	U6 0.86	U7 0.74	U8 0.75	U9 2.19
糞	0-48	65.74	F1 **8.47**	F2 7.75	F3 4.60	F4 2.30					
追加情報：	エステトロール（m/z 303）の推定代謝経路： U1、U2 （m/z 495）： 水酸化+グルクロン酸抱合 U3、U6 （m/z 479）： グルクロン酸抱合 U3 （m/z 413）： 水酸化+メチル化+硫酸抱合 F1 （m/z 333）： 水酸化+ケトン生成 U4 F2 （m/z 399）： 水酸化+硫酸抱合 U5 F3 （m/z 383）： 硫酸抱合 U7、U8 （m/z 319）： 水酸化 U9 F4 （m/z 303）： エステトロール（未変化体）										

[1] 太字は主要代謝物

2.6.5.9.B ラット

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-022（4.2.2.2-02）**
GLP 適用[1]：	非適
動物種／系統：	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄／雌）／動物数：	雌 9 例
給餌状態：	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL
投与方法：	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	15（3.7 MBq/kg）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol
放射化学的純度：	> 99%
定量法：	LC-MS/MS によるオンライン放射能検出（代謝物プロファイル及び構造推定）
追加情報：	• 投与後 0、0.5、1、3、6 及び 24 時間に血漿及び血液中放射能濃度を測定した（3 例、TS 表 2.6.5.3.A） • 排泄バランスを投与後 168 時間後まで測定した（3 例、TS 表 2.6.5.13） • 胆汁排泄は投与後 24 時間まで測定した（胆管カニューレ挿入動物 3 例、TS 表 2.6.5.14）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.9.B ラット（続き）

被験物質：エステトロール

試料：	**時間（時間）**	**試料中の投与量に対する%**	**化合物ごとの µg eq/g（血漿）又は投与量に対する%（排泄物）[1]**								
血漿			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7		
	0.5	1.561 µg eq/g	0.53	0.05	0.12	**1.10**	0.07	0.16	0.03		
	6	0.250 µg eq/g	0.02	0.01	0.01	0.06	0.06				
尿	0-24	9.85	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9
			0.74	0.34	0.30	0.29	0.63	0.30	**3.74**	0.65	0.09
糞	0-48	84.83	F1	F2	F3	F4	F5				
			3.41	3.13	2.07	**15.82**	6.40				
胆汁	0-12	68.52	B1	B2	B3	B4	B5	B6			
			22.35	**11.75**	7.47	3.87	1.55	0.60			
追加情報：	エステトロール（m/z 303）の推定代謝経路：										
	P1	U1		B1、B4		（m/z 479）：	グルクロン酸抱合（2）[2]				
	P2、P3	U2		B2、B3、B5		（m/z 509）：	水酸化+メチル化+グルクロン酸抱合（3）				
			F1、F2			（m/z 399）：	水酸化+硫酸抱合（2）				
		U3	F3			（m/z 383）：	硫酸抱合（3）				
		U4				（m/z 413）：	水酸化+メチル化+硫酸抱合（3）				
			F4			（m/z 319）：	水酸化				
		U5、U6				（m/z 465）：	グルコシル化（2）				
	P4	U7	F5	B6		（m/z 303）：	エステトロール（未変化体）				
	P5、P6、P7	U8、U9				（m/z 333）：	水酸化+メチル化（3）				

[1] 太字は主要代謝物

[2] 括弧内は異性体数

略語：eq = 当量

2.6.5.9.C カニクイザル

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**Es0001-NC-016（4.2.2.4-07）**			
GLP 適用[1]：	非適			
動物種／系統：	サル／カニクイザル			
性別（雄／雌）／動物数：	雌 5 例			
給餌状態：	報告書に未記載			
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース			
投与方法：	経口（強制）			
投与量（mg/kg/day）：	10			
投与期間：	13 週間			
試料：	血漿			
採取時間：	13 週間投与後 1 時間			
分析法：	LC-MS/MS			
LC-MS/MS クロマトグラム上でのピーク面積	ピーク成分	保持時間（min）	ピーク面積	E4 に対するピーク面積比
	E4-3-グルクロニド	17.04	190,304,993	0.281
	E4-グルクロニド-硫酸抱合体	21.22	5,562,849	0.008
	E4-17-グルクロニド	25.95	21,091,073	0.031
	E4-15-グルクロニド	26.59	638,748,018	0.945
	E4-16-グルクロニド	28.89	867,484,011	1.283
	E4	32.65	676,129,292	1.000
追加情報：	• E4 のヒト血漿中主代謝物である E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、サルの血漿中にも認められた。 • サルの血漿中には E4-15-グルクロニド及び E4-17-グルクロニドも認められた。			

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：E4 = エステトロール、LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.9.D 動物種間の比較：マウス、ラット、ヒト

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**Es0001-NC-012（4.2.2.4-06）**		
GLP 適用[1]：	適		
動物種／系統：	マウス／CD-1	ラット／Sprague-Dawley	妊娠の可能性がない女性
性別（雄／雌）／動物数：	雌 4 例（血漿）、雌 4 例（尿、糞）	雌 3 例（血漿）、雌 3 例[2]（尿、胆汁、糞）	6
給餌状態：	非絶食	非絶食	空腹時
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース：エタノール（98：2）中 1.5 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース：エタノール（98：2）中 1.5 mg/mL	未記載
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）	経口（液剤）
用量：	15 mg/kg（3.7 MBq/kg）	15 mg/kg（3.7 MBq/kg）	15 mg（2.8 MBq）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール	[^{14}C]標識エステトロール	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol	2.18 GBq/mmol	未記載
放射化学的純度：	> 99%	> 99%	未記載
試料：	血漿　0.5 時間 尿　12～48 時間 糞　0～48 時間	血漿　0.5 時間 尿　0～24 時間 糞　0～48 時間 胆汁　0～12 時間	血漿　0.25～0.5 時間[3] 血漿　0～2 時間（被験者 S001） 尿　0～6 時間 糞　48～72 時間
定量法：	LC-MS/MS によるオフライン放射能検出（代謝物プロファイル及び構造推定）[4]		
追加情報：	• 動物試料は試験番号 Es0001-NC-010 において作製した。 • ヒト試料は MIT-Es0001-C105 試験から入手した（臨床モジュール 2.7.2 参照）。 • 代謝物の保持時間及び質量特性を、C3、C15、C16 又は C17 位でグルクロニド置換したエステトロールの合成標準グルクロニド抱合体 4 種類と比較した。 • また、試料中の不純物 6-オキソ-エステトロールの有無を測定した。		

1 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

2 胆管カニューレ挿入

3 0.25～0.5 時間のプール血漿（T_{max}、第 1 のピーク）では保持時間にばらつきが認められたが、再分析には試料が不十分であった。そのため、ヒトプール血漿抽出物（被験者番号[redacted]、0～2 時間）を用いて再分析を行った。

4 以前に MIT-Es0001-C105 試験で使用した LC-MS/MS 法を適用した。

略語：LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.9.D. 動物種間の比較：マウス、ラット、ヒト（続き）

被験物質：エステトロール

	血漿			尿			胆汁	糞		
	ヒト **0.25～0.5 時間**	マウス **0.5 時間**	ラット **0.5 時間**	ヒト **0～6 時間**	マウス **12～48 時間**	ラット **0～24 時間**	ラット **0～12 時間**	ヒト **48～72 時間**	マウス **0～48 時間**	ラット **0～48 時間**
濃度[1]：	231 ng eq/mL	2549 ng eq/g	1595 ng eq/g	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
試料中の投与量に対する%[1]：	NA	NA	NA	21.74	4.01	9.92	79.17	7.57	74.29	1.62
	血漿			**尿**			**胆汁**	**糞**		
化合物における試料中放射能%[2]	ヒト **0～2 時間**	マウス **0.5 時間**	ラット **0.5 時間**	ヒト **0～6 時間**	マウス **12～48 時間**	ラット **0～24 時間**	ラット **0～12 時間**	ヒト **48～72 時間**	マウス **0～48 時間**	ラット **0～48 時間**
エステトロール-3-グルクロニド	15.3 (HP1)	19.9 (MP5)	19.4 (RP1)	16.3 (HU1)	10.0 (MU5)	-	23.7 (RB1)	-	-	-
エステトロール-グルクロニド-硫酸抱合体	11.0 (HP2)	-	-	2.1 (HU2)	-	-	15.2 (RB3)[3]	-	-	-
エステトロール-15-グルクロニド	-	3.9 (MP12)	-	-	3.4 (MU12)	7.0 (RU8)	2.0 (RB8)	-	-	-
エステトロール-16-グルクロニド	61.3 (HP4)	-	-	77.7 (HU4)	-	14.9 (RU10)	16.4 (RB10)	-	-	-
E4（未変化体）	6.9 (HP5)	29.6 (MP13)	49.7 (RP5)	-	13.4 (MU13)	35.9 (RU14)		94.6 (HF1)	5.0 (MF 22)	11.0 (RF15)
未同定	5.5	39.2	24.2	1.0	61.7	33.8	47.4/32.2[4]	-	73.7	76.1
合計[2]	100.0	92.6	93.4	97.1	88.6	91.4	89.4	94.6	78.8	87.1
追加情報：	• 1 例で胆汁の流れが止まり、この動物の排泄プロファイル（尿中で 70.89%、胆汁中で 15.48%、糞中で 2.68%）は他の 2 例のラットと異なった。動物種間の代謝比較用試料プールから当該ラットを除外した。 • 評価したいずれの動物種においても、6-オキソ-エステトロールは主要代謝物ではなかった。6-オキソ-エステトロールはマウス血漿及びマウス糞中にのみで検出され、試料中放射能の 1%未満であった。									

[1] MIT-Es0001-C105 試験のヒトデータ及び Es0001-NC-010 試験の動物データ

[2] 試料中総放射能の 1%未満を占める成分（<1% ROI）は重要ではないとみなし考慮しなかった。

[3] RB3 には微量の E4-グルクロニド-硫酸抱合体が含まれるが、主として未同定代謝物で構成された。

[4] RB3 を含む／含まない

略語：- = 観察されず、E4 = エステトロール、NA = 該当なし、ROI = 関心領域

2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：In Vitro

以下の試験をモジュール 2.7.2 で示し、考察する。

- ヒト CYP 酵素 1A1、1B1 及び 3A4 の役割（PR3100）
- ヒト CYP 反応表現型試験（0031-102）
- ヒト UGT 反応表現型試験（0031-106）
- UGT2B7 によるヒト代謝物の同定（Es0001-NC-011）
- ヒト SULT による硫酸抱合（PR3099）

2.6.5.10.A ラット及びヒト肝細胞

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**PR3041（4.2.2.4-03）**	
GLP 適用[1]：	非適	
試験系：	新たに単離した肝細胞	凍結保存した肝細胞
動物種／系統：	ラット／Sprague-Dawley	ヒト／白人、■歳
性別（雄／雌）／動物数：	雌 1 例	女性 1 例
1 mL あたりの細胞数：	4×10^5	
エステトロール濃度（μM）：	1、10	
溶媒：	DMSO［Hepatocyte Maintenance Medium™ 中の最終濃度 0.2%（v/v）］[2]	
培養条件：	95%空気／5% CO_2 で存在下において 37°C で 0、0.5、1、2 及び 4 時間培養	
定量法：	LC-MS（代謝物プロファイル及び構造推定）	
追加情報：	• 肝細胞の非存在下では、4 時間のインキュベーション中にエステトロールの消失は認められなかった。 • ラット及びヒト肝細胞標本は、陽性対照のブフラロール（20 μM）に対して代謝的に活性であった。 • 4 時間後の肝細胞生存率：1 μM 及び 10 μM で、ラット肝細胞の初期生存率（83%）のそれぞれ 98%及び 91%、ヒト肝細胞の初期生存率（58%）のそれぞれ 90%及び 94%	

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

[2] 改変ウィリアム E 培地

略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、LC-MS = 液体クロマトグラフィー-質量分析法

2.6.5.10.A ラット及びヒト肝細胞（続き）

被験物質：エステトロール

	代謝物の生成（総代謝物のピーク面積%）[1]							
動物種：	ラット				ヒト			
時間（時間）：	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**0.5**	**1**	**2**	**4**
1 µM エステトロール培養								
代謝物： M1	-	100	100	100	-	-	-	-
M2	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	77.8	68.8	70.0	75.1
M5	-	-	-	-	22.2	31.2	30.0	24.9
10 µM エステトロール培養								
代謝物： M1	79.6	80.7	77.1	79.8	-	-	-	-
M2	20.4	19.3	22.9	20.2	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-	2.5
M4	-	-	-	-	37.7	27.6	22.0	20.1
M5	-	-	-	-	62.3	72.4	78.0	77.4
追加情報：	• 4 時間後のエステトロール未変化体の割合（%）：1 µM 及び 10 µM でそれぞれ 48%及び 30%（ラット肝細胞）、27%及び 49%（ヒト肝細胞） • エステトロール（m/z 303）の暫定推定代謝経路： M1（m/z 333）：水酸化+メチル化（又は脱水素化+ジヒドロキシル化） M2（m/z 301）：メチル化+脱水酸化（又は脱水素化） M3（m/z 461）：脱水酸化+グルクロン酸抱合（又は脱水素化+2 硫酸抱合） M4（m/z 383）：硫酸抱合 M5（m/z 479）：グルクロン酸抱合							

[1] 3 検体の平均値。代謝物のイオン化の程度が異なるため、パーセンテージは完全に定量的なものではない。

略語：- = 検出限界未満、Mx = 代謝物番号

2.6.5.10.B マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトの肝細胞

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T06（4.2.2.4-01）**				
GLP 適用[1]：	非適				
試験系：	凍結保存した肝細胞				
動物種／系統：	マウス／CD-1	ラット／Sprague-Dawley	ウサギ／ニュージーランドホワイト	サル／カニクイザル	ヒト
性別（雄／雌）／動物数：	雌 22 例のプール	雌 3 例のプール	雌 1 例	雌 1 例	男女 10 例のプール
1 mL あたりの細胞数：	1×10^6 個				
エステトロール濃度（μM）：	10（マウス、ラット、ウサギ、サル肝細胞） 1（ヒト肝細胞）				
溶媒：	DMSO（Leibovitz L-15 培地中の最終濃度の報告なし）				
培養条件：	37°C の振盪水浴中で 0、1、2 又は 4 時間				
定量法：	LC-MS（代謝物プロファイル）及び LC-MS/MS（構造推定）				
追加情報：	• 初期肝細胞生存率：76.3%（マウス）、85.6%（ラット）、80.3%（ウサギ）、81.5%（サル）及び 79.6%（ヒト） • 肝細胞の非存在下では、4 時間のインキュベーション中にエステトロールのピーク面積が 30%減少した。これは、おそらく吸着に起因すると考えられた。 • 全ての肝細胞標本で、許容可能な 7-エトキシクマリンの第 I 相及び第 II 相代謝が認められた。				

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、LC-MS = 液体クロマトグラフィー-質量分析法、LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.10.B マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトの肝細胞（続き）

被験物質：エステトロール

	代謝物の生成（総ピーク面積に対する%）[1]														
動物種：	マウス			ラット			ウサギ			サル			ヒト		
時間（時間）：	**1**	**2**	**4**	**1**	**2**	**4**	**1**	**2**	**4**	**1**	**2**	**4**	**1**	**2**	**4**
エステトロール（未変化体）：	12.5	2.03	-	62.7	61.8	10.5	78.1	50.1	3.60	47.0	43.5	0.65	57.8	50.4	4.80
代謝物： M1	-	-	-	-	-	-	16.4	42.4	80.9	-	-	-	-	-	-
M2	-	-	-	1.24	1.60	15.2	-	1.12	8.24	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	0.50	1.10	-	-	-	16.6	16.2	28.1	-	-	-
M4	82.3	94.0	96.2	-	-	-	2.07	3.26	6.42	1.04	1.15	1.63	-	-	-
M5	-	-	-	6.17	7.80	31.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	2.64	3.39	3.03	2.11	3.50	10.9	-	-	-	31.7	33.8	56.0	25.7	28.8	44.7
M7	-	-	-	1.96	2.30	6.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	9.06	12.0	11.5	-	0.95	-	3.08	4.18	9.58	18.6	20.8	50.6
M9	-	-	-	-	-	4.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M10	-	0.53	0.79	-	-	0.30	-	-	-	0.57	0.80	3.12	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	0.70	-	-	-	-	0.21	0.92	-	-	-
M12	-	-	-	-	0.60	2.40	3.47	2.18	1.65	-	-	-	-	-	-
M13	2.57	-	-	16.8	10.0	5.70	-	-	-	-	0.45	-	-	-	-

[1] 2 検体の平均値。エステトロール及び代謝物のイオン化の程度が異なる可能性があるため、パーセンテージは完全に定量的ではなく指標的なものである。

略語：- = 検出限界未満、Mx = 代謝物番号

2.6.5.10.B マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトの肝細胞（続き）

被験物質：エステトロール

追加情報：	エステトロール（m/z 303）の推定代謝経路： M1（m/z 479）： グルクロン酸抱合（A 環） M2（m/z 509）： 水酸化+メチル化+グルクロン酸抱合 M3（m/z 479）： グルクロン酸抱合（D 環） M4（m/z 399）： 水酸化+硫酸抱合 M5（m/z 509）： 水酸化+メチル化+グルクロン酸抱合 M6（m/z 479）： グルクロン酸抱合（D 環） M7（m/z 383）： 硫酸抱合 M8（m/z 383）： 硫酸抱合 M9（m/z 509）： 水酸化+メチル化+グルクロン酸抱合 M10（m/z 413）： 水酸化+メチル化+硫酸抱合 M11（m/z 413）： 水酸化+メチル化+硫酸抱合 M12（m/z 333）： 水酸化+メチル化 M13（m/z 333）： 水酸化+メチル化

略語：Mx- = 代謝物番号

2.6.5.10.C マウス肝細胞（3 系統）

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**ES-T32（4.2.2.4-02）**		
GLP 適用[1]：	非適		
試験系：	凍結保存した肝細胞		
動物種／系統：	マウス／CD-1	Mouse/B6C3F1	Mouse/C57BL/6
性別（雄／雌）／動物数：	雌 20 例のプール	雌 16 例のプール	雌 14 例のプール
1 mL あたりの細胞数：	1×10^6		
エステトロール濃度（µM）：	10		
溶媒：	DMSO（Leibovitz L-15 培地中の最終濃度の報告なし）		
培養条件：	37°C の振盪水浴中で 0、10、30 分、1 又は 4 時間		
定量法：	LC-MS（代謝物プロファイル）及び LC-MS/MS（構造推定）		
追加情報：	• 初期肝細胞生存率：85.6%（CD-1）、85.9%（B6C3F1）及び 84.1%（C57BL/6） • 全ての肝細胞標本で、許容可能な 7-エトキシクマリンの第 I 相及び第 II 相代謝が認められた。		

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、LC-MS = 液体クロマトグラフィー-質量分析法、LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

2.6.5.10.C マウス肝細胞（3 系統）（続き）

被験物質：エステトロール

	代謝物の生成（総ピーク面積に対する%）[1]											
動物種／系統：	マウス／CD-1				Mouse/B6C3F1				Mouse/C57BL/6			
時間（時間）：	**0.16**	**0.5**	**1[2]**	**4**	**0.16**	**0.5**	**1**	**4**	**0.16**	**0.5**	**1**	**4**
エステトロール（未変化体）：	61.9	41.9	NR	18.4	62.4	37.1	24.0	5.40	66.5	41.9	41.7	12.0
代謝物： M3	-	0.80	NR	1.40	-	-	-	1.00	0.30	0.90	1.10	3.50
M4	38.1	57.3	NR	80.3	37.6	61.0	73.2	87.5	33.2	57.2	57.2	84.4
M6	-	-	NR	-	-	1.90	2.80	6.00	-	-	-	-
追加情報：	• ピーク番号付けは ES-T06 試験（TS 表 2.6.5.10.B）に基づく。 • エステトロール（m/z 303）の推定代謝経路： M3（m/z 479）： グルクロン酸抱合（D 環） M4（m/z 399）： 水酸化+硫酸抱合 M6（m/z 479）： グルクロン酸抱合（D 環）											

[1] 2 検体の平均値。エステトロール及び代謝物のイオン化の程度が異なる可能性があるため、パーセンテージは完全に定量的ではなく指標的なものである。

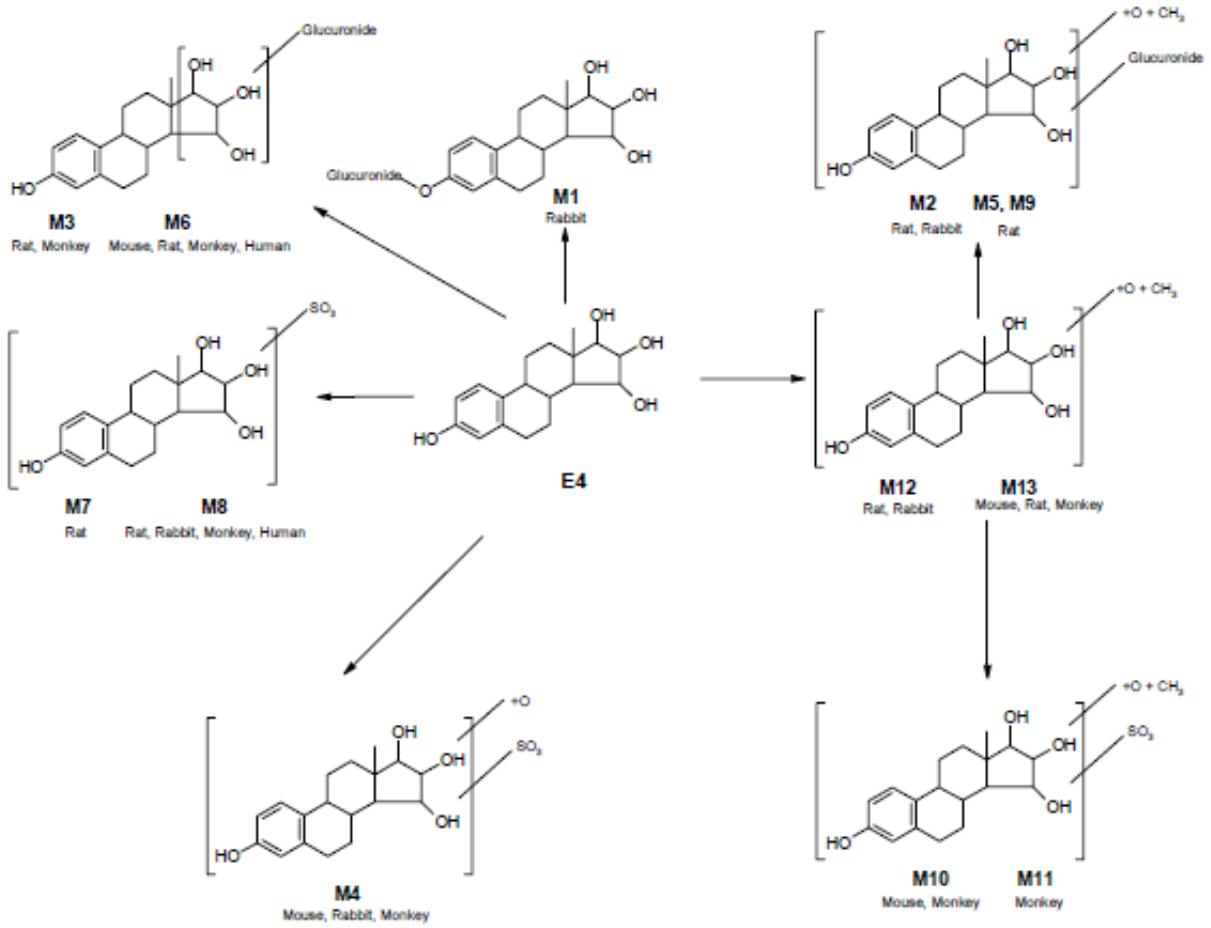
[2] 非定型データ、報告なし

略語：- = 検出限界未満、Mx = 代謝物番号、NR = 報告なし

2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：ES-T06（4.2.2.4-01）
マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト肝細胞中代謝物（TS 表 2.6.5.10.B 参照）



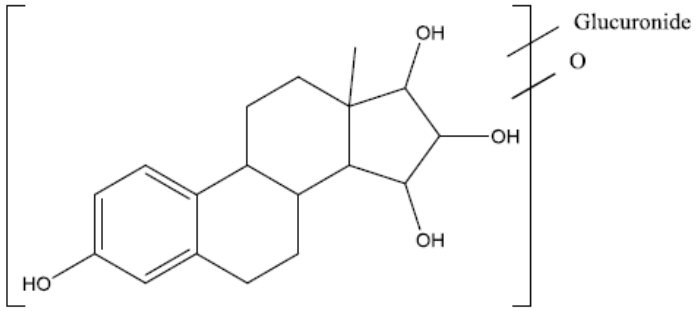
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路（続き）

被験物質：エステトロール

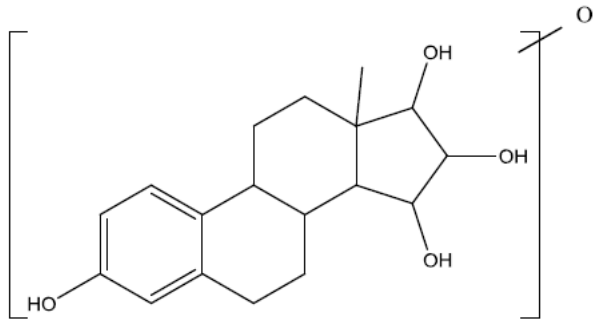
試験番号（CTD 番号）：0031-NC-023（4.2.2.2-01）及び 0031-NC-022（4.2.2.2-02）

マウス及び／又はラットにおいて *in vivo* で認められたその他の代謝物（TS 表 2.6.5.9.A 及び表 2.6.5.9.B 参照）

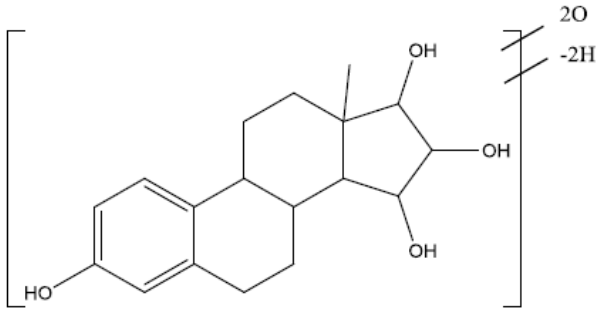
マウス



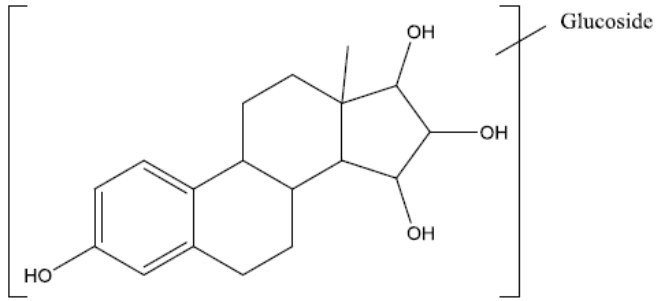
マウス+ラット



マウス



ラット
(2 isomers)



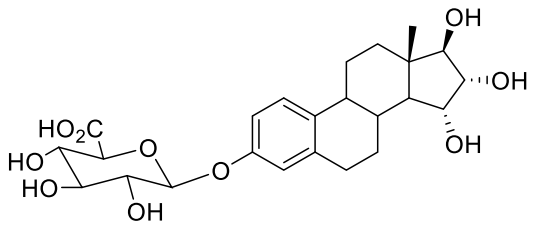
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路（続き）

被験物質：エステトロール

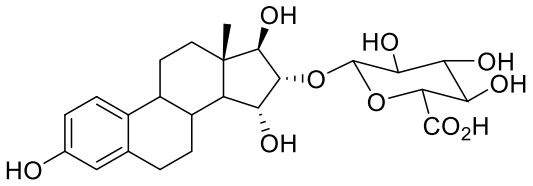
試験番号（CTD 番号）：0031-NC-023（4.2.2.2-01）及び 0031-NC-022（4.2.2.2-02）

マウス及び／又はラットにおいて *in vivo* で同定されたヒトグルクロニド（TS 表 2.6.5.9.A 及び表 2.6.5.9.B 参照）

マウス+ラット：
エステトロール-3-グルクロニド

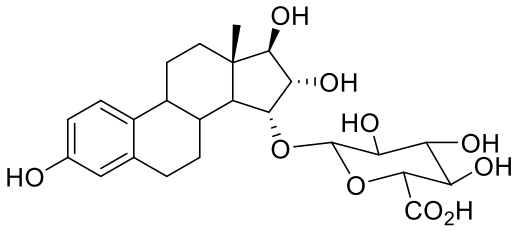


ラット：エステトロール-16-グルクロニド



マウス及びラットにおいて *in vivo* で同定されたその他のグルクロニド

マウス+ラット：
エステトロール-15-グルクロニド



2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

以下の試験をモジュール 2.7.2 で示し、考察する。

- ヒト肝細胞における CYP 誘導（0031-100、Es0001-NC-019）
- CYP 酵素阻害（予備蛍光定量試験）（PR3038）
- CYP 酵素阻害（0031-101）
- UGT 阻害（0031-105）
- 代謝物の CYP 酵素阻害（Es0001-NC-017）

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-023（4.2.2.2-01）**	**0031-NC-022（4.2.2.2-02）**
GLP 適用[1]：	非適	非適
動物種／系統：	マウス／CD-1	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄／雌）／動物数：	雌 9 例	雌 3 例
給餌状態：	非絶食	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL
投与方法：	経口（強制）	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	15（3.7 MBq/kg）	15（3.7 MBq/kg）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol	2.18 GBq/mmol
放射化学的純度：	> 99%	> 99%
分析対象物質：	放射能	放射能
定量法：	LSC：直接又はサンプルオキシダイザーで燃焼後	LSC：直接又はサンプルオキシダイザーで燃焼後
追加情報：	• 投与後 12～48 時間の尿中及び投与後 0～48 時間の糞中の代謝物プロファイルを測定した（TS 表 2.6.5.9.A）	• 投与後 0～24 時間の尿中及び投与後 0～48 時間の糞中の代謝物プロファイルを測定した（TS 表 2.6.5.9.B）

[1] 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

略語：LSC = 液体シンチレーション計数法

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄（続き）

被験物質：エステトロール

動物種：	マウス						ラット					
試料：	**回収率（投与量に対する%）**						**回収率（投与量に対する%）**					
	尿	**糞**	**呼気**	**ケージ洗浄液**	**屍体**	**合計**	**尿**	**糞**	**呼気**	**ケージ洗浄液**	**屍体**	**合計**
採取期間（時間）：												
0-6	0.79	-	-	-	-	0.79	6.87	-	-	-	-	6.87
0-12	1.43	-	-	-	-	1.43	8.45	-	-	-	-	8.45
0-24	12.77	62.27	-	-	-	75.04	9.85	68.91	-	-	-	78.76
0-48	15.92	65.74	-	-	-	81.66	10.69	84.83	-	-	-	95.52
0-168[1]	16.45	66.91	0.80	1.38	BLD	85.54	11.11	86.86	0.15	0.14	0.36	98.62
追加情報：	• 総回収率が 90%未満であったのは、少量で高濃度の試料から完全な均一性を得るのが困難であったことに起因した。屍体は 168 時間で BLD であったため、排泄は完了したと考えられた。											

[1] 屍体は 168 時間

略語：- = 試料なし、BLD = 検出限界（バックグラウンド dpm の 2 倍）未満、dpm = 壊変毎分、NA = 該当なし

2.6.5.14 薬物動態試験：排泄：胆汁中

被験物質：エステトロール

試験番号（CTD 番号）：	**0031-NC-022（4.2.2.2-02）**
動物種／系統：	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄／雌）／動物数：	雌 3 例
給餌状態：	非絶食
溶媒／投与形態：	0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース水溶液中に 1.5 mg/mL
投与方法：	経口（強制）
投与量（mg/kg）：	15（3.7 MBq/kg）
放射性核種：	[^{14}C]標識エステトロール
比活性：	2.18 GBq/mmol
放射化学的純度：	> 99%
分析対象物質：	放射能
定量法：	LSC：直接又はサンプルオキシダイザーで燃焼後
追加情報：	• ラットに胆管カニューレを挿入した • 投与後 0～12 時間の胆汁中の代謝物プロファイルを測定した（TS 表 2.6.5.9.B）

試料：	**回収率（投与量に対する%）**					
	尿	**糞**	**胆汁**	**ケージ洗浄液**	**屍体**	**合計**
採取期間（時間）：						
0-3	8.12	BLD	44.71	-	-	52.83
0-6	13.32	BLD	59.84	-	-	73.16
0-12	17.52	0.29	68.53	-	-	86.34
0-24[1]	18.42	2.72	71.93	0.56	3.61	97.25

[1] 屍体は 24 時間

略語：- =（個別）試料なし、BLD = 検出限界（バックグラウンド dpm の 2 倍）未満、dpm = 壊変毎分、LSC = 液体シンチレーション計数法

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

以下の試験をモジュール 2.7.2 で示し、考察する。

- ヒト Caco-2 細胞を用いた双方向輸送（0031-NC-017）
- ヒト排出 ABC トランスポーターとの相互作用（0031-103、Es0001-NC-013）
- ヒト取り込み及び排出 SLC トランスポーターとの相互作用（0031-107、Es0001-NC-020、Es0001-NC-021）
- 代謝物の ABC 及び SLC トランスポーターとの相互作用（Es0001-NC-018）

2.6.5.16 薬物動態試験：その他

被験物質：エステトロール

その他の薬物動態試験は実施されていない。