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

2.6.6　毒性試験の概要文

富士製薬工業株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.1.1 エステトロール 5
2.6.6.1.2 ドロスピレノン 10
2.6.6.1.3 エステトロールとドロスピレノンの併用 11
2.6.6.1.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 12
2.6.6.2 単回投与毒性試験 13
2.6.6.2.1 エステトロールの単回投与毒性試験 13
2.6.6.2.2 ドロスピレノンの単回投与毒性試験 13
2.6.6.3 反復投与毒性試験 14
2.6.6.3.1 エステトロールの反復投与毒性試験 14
2.6.6.3.2 ドロスピレノンの反復投与毒性試験 26
2.6.6.3.3 エステトロールとドロスピレノンの併用 27
2.6.6.3.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 31
2.6.6.4 遺伝毒性試験 34
2.6.6.4.1 エステトロールの遺伝毒性試験 34
2.6.6.4.2 ドロスピレノンの遺伝毒性試験 41
2.6.6.5 がん原性試験 42
2.6.6.5.1 エステトロールのがん原性試験 42
2.6.6.5.2 ドロスピレノンのがん原性試験 47
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 47
2.6.6.6.1 エステトロールの生殖発生毒性試験 47
2.6.6.6.2 ドロスピレノンの生殖発生毒性試験 55
2.6.6.7 局所刺激性試験 57
2.6.6.8 その他の毒性試験 57
2.6.6.8.1 エステトロールのその他の毒性試験 57
2.6.6.8.2 ドロスピレノンのその他の毒性試験 68
2.6.6.9 考察及び結論 75
2.6.6.9.1 エステトロール 75
2.6.6.9.2 ドロスピレノン 82
2.6.6.9.3 エステトロールとドロスピレノンの併用 83
2.6.6.9.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用 84
2.6.6.9.5 結論 85
2.6.6.10 参考文献 87

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ACTH	Adrenocorticotropic hormone	副腎皮質刺激ホルモン
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［最終測定可能濃度（0-last）まで、投与間隔（0-tau）又は無限大時間まで外挿（0-inf）］
bid	bis in die	1 日 2 回
CE	cloning efficiency	コロニー形成率
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CMC	Carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleid acid	デオキシリボ核酸
DRF	Dose Range Finding	用量設定
DRSP	drospirenone	ドロスピレノン
dUTP	deoxy-uridine triphosphate	デオキシウリジン三リン酸
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］
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
ED_{50}	median effective dose	半数（50%）有効量
EE	ethinylestradiol	エチニルエストラジオール
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
[redacted]社	[redacted]	－
Gnn	gestation day nn	妊娠 nn 日齢
GEF	Global Evaluation Factor	総合的評価ファクター
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
HGPRT	hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase	ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ
ICH	International Conference on Harmonization	医薬品規制調和国際会議
(I)MF	(induced) mutation frequency	（誘発）突然変異頻度
LNG	levonorgestrel	レボノルゲストレル
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限値
MF	Master File	原薬等登録原簿
MNPCE	micronucleated polychromatic erythrocytes	小核を有する多染性赤血球
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
NCE	normochromatic erythrocytes	正染性赤血球
NO(A)EL	No-Observed-(Adverse-)Effect-Level	無影響（毒性）量
pc	post coitum	交配後の
PCE	polychromatic erythrocytes	多染性赤血球
pp	post partum	分娩後

(Q)SAR	(quantitative) Structure-Activity Relationship	（定量的）構造活性相関
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
RTG	adjusted relative total growth	相対総増殖率
SVM	Support Vector Machines	サポートベクターマシン
T_{max}	time of maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TS	Tabulated Summary	概要表
TTC	threshold of toxicological concern	毒性学的懸念の閾値
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ dUTP ニック末端標識

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 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）を 15 mg 及びプロゲスチンとしてドロスピレノン（DRSP）を 3 mg 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 社は、E4 の良好な薬物動態特性、薬理学的プロファイル及びヒトを対象とした臨床試験の安全性及び有効性の結果から、E4 がヒト用医薬品として適している可能性があると考えられることを示した（Visser, 2009）。さらに、Estetra 社は E4 による開発プログラムを完了した。

E4 の安全性を検討するため、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、臨床的安全性も実証されていること、並びに【「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」ついて】（平成 22 年 2 月 19 日付薬食審査発 0219 第 4 号）に基づき、雌カニクイザルを用いて DRSP 単剤投与群も含めて実施した E4 と DRSP の併用による 13 週間反復経口投与毒性試験（0030-NC-002）を除き、DRSP 単独又は E4 と DRSP の併用に関する毒性試験は実施していない。DRSP に関するさらなる安全性データは、入手可能な公表情報から得られている。

また、当初は E4 と配合するプロゲスチンとしてレボノルゲストレル（LNG）が有望な候補と考えられていたため、Estetra 社は、雌のカニクイザルを用いた E4 及び LNG の併用による 13 週間反復経口投与毒性試験（0031-NC-018）も実施した。

2.6.6.1.1 エステトロール

E4 を単独で用いて実施した毒性試験プログラムを表 2.6.6-1 に示す。臨床適応を考慮して、全ての *in vivo* 試験は雌動物を用いて実施した。概要表（TS）である表 2.6.7.1 に示すとおり、重要な試験は、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。

表 2.6.6-1 毒性試験プログラム

Study Type and Duration	Route of Administration	Species or Test System
Single-dose toxicity	oral (gavage)	rat; monkey
Repeated-dose toxicity		
2 weeks (DRF)	oral (gavage)	mouse
4 weeks	oral (gavage)	mouse, rat[1], monkey
13 weeks	oral (gavage)	mouse, rat, monkey[1]
26 weeks (with post-dose period)	oral (gavage)	rat
39 weeks (with post-dose period)	oral (gavage)	monkey
Genotoxicity		
In vitro reverse mutation assay	*in vitro*	*S. typhimurium*, *E. coli*
In vitro mouse lymphoma assay	*in vitro*	mouse lymphoma cells
In vivo micronucleus assay	oral (gavage)	rat
In vivo Comet assay	oral (gavage)	rat

Study Type and Duration	Route of Administration	Species or Test System
Carcinogenicity		
2-year carcinogenicity studies	oral (gavage)	mouse, rat
Reproductive & developmental toxicity		
Return-to-fertility[2]	oral (gavage)	rat
Inhibition of implantation	oral (gavage)	rabbit
Embryo-fetal development (incl. DRF)	oral (gavage)	rat, rabbit
Pre-/postnatal development (incl. DRF)	oral (gavage)	rat
Other Studies		
Induction of reactive oxygen species	*in vitro*	mouse lymphoma cells

[1] With post-dose period

[2] 4-Week treatment period followed by a 3-week treatment-free period prior to mating

単回及び反復投与毒性試験

雌 Sprague-Dawley ラット及び雌カニクイザルにおいて、単回経口投与後の E4 は、試験した最高用量である 1000 mg/kg まで良好な忍容性を示した（ES-T09、ES-T05、TS 表 2.6.7.5）。

E4 の反復経口投与毒性試験は、雌 CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット、Wistar Han ラット及びカニクイザルを用いて、それぞれ 30、150、6 及び 50 mg/kg/日の投与量まで実施した（ES-T31、ES-T34、ES-T40、ES-T09、ES-T10、ES-T18、ES-T39、ES-T11、ES-T15、ES-T20、TS 表 2.6.7.6 及び 2.6.7.7.A.1～2.6.7.7.A.8）。

投与に関連した死亡は認められなかった。マウスでは用量依存的な体重増加量の増加、ラット及びサルでは用量依存的な体重増加量の減少又は体重減少が認められた。摂餌量においても対応する変化が認められた。ラット及びサルで認められた投与に関連した一般状態の所見は、脱毛及び削痩などであった。評価した全ての動物種で、赤血球パラメータの軽微から中等度の減少が認められた。

ラットでは、用量依存的な白血球パラメータ（リンパ球及び好酸球）の減少並びに凝固時間の延長も認められた。重症度が軽微から中等度であった血液生化学的変化は、無機リン（マウス及びラットで増加）、総蛋白及びアルブミン（ラットで増加、サルで減少）、尿素（マウスで減少）、クレアチニン（マウス及びラットで減少）、コレステロール（ラットで減少、サルで増加）、トリグリセリド（全動物種で増加）、アルカリホスファターゼ（マウス及びラットで増加、サルで減少）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（サルで増加）並びに γ-グルタミルトランスフェラーゼ（サルで減少）などであった。評価した動物種の大半で、一般に肉眼的所見や病理組織学的所見を伴う副腎、肝臓、脾臓、胸腺及び生殖組織の重量の変化が認められた。E4 を 1 mg/kg/日以上の投与量で投与したサルでは、投与開始後 1 ヵ月以内に性周期が停止した。1.5 mg/kg/日以上の投与量で 26 週間投与したラットの大多数及び 1 mg/kg/日以上の投与量で 13 週間投与したマウスの大多数では、性周期の段階を判定することができなかった。生殖組織（卵巣、卵管、子宮及び腟）及び乳腺においては、E4 の薬理活性を反映した病理組織学的変化が認められた。さらに、副腎、骨髄、大腿骨、腎臓、肝臓、皮膚、脾臓及び胸腺において、重症度が軽微から中等度の病理組織学的所見が、主に用量依存的に認められた。副腎に関しては、マウス

では紡錘形細胞の過形成及び X 帯の変性、ラットではびまん性の皮質肥厚、サルでは束状層の肥大及び網状層の萎縮などの変化が認められた。ラット及びサルの骨髄では、細胞充実性の低下が認められた。マウス及びラットの大腿骨では、骨梁の増加が認められた。ラットの腎臓では、褐色色素の沈着及び尿細管の拡張／尿細管細胞の空胞化が認められた。肝臓の変化として、マウス及びラットでは肝細胞の肥大、ラットでは肝細胞の微小空胞化、サルではグリコーゲン含量の減少が認められた。脱毛の所見と一致して、ラット及びサルの皮膚では毛包の萎縮が認められた。脾臓に関しては、ラットでは褐色色素の沈着、マウス及びラットでは造血の増加、ラット及びサルではリンパ組織の萎縮が認められた。全ての動物種の胸腺で、リンパ組織の萎縮が認められた。

いずれの変化も投与中止後に可逆性のエビデンスを示したが、必ずしも回復期間の終了時に対照値まで完全に回復していたわけではなかった。

ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験及びサルを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）は、それぞれ 5 mg/kg/日及び 3 mg/kg/日[1]であった。これらの投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は、ラットでは 736 ng·hr/mL、サルでは 328 ng·hr/mL であった。また、これらの投与量における投与終了時の C_{max} は、ラットでは 238 ng/mL、サルでは 97.2 ng/mL であった。

遺伝毒性試験

ネズミチフス菌（*S. typhimurium*）株の TA1535、TA1537、TA98 及び TA100 又は大腸菌（*E. coli*）株の WP2 *uvrA* を用いた試験において、代謝活性化の有無に関わらず、E4 は 5000 µg/プレートまでの濃度で変異原性を示さなかった。*S. typhimurium* の TA102 株では、S9 ミックスの有無に関わらず、3 試験中 2 試験で復帰変異コロニーの増加が認められた。これらの増加は 1250 µg/プレートから認められ、5000 µg/プレートでは陰性対照の 3～4 倍に達した（ES-T21、ES-T29、ES-T48、TS 表 2.6.7.8.A～2.6.7.8.C）。

最初のマウスリンフォーマ試験で、E4 は代謝活性化の存在下で突然変異頻度を上昇させ、875 や 1000 µg/mL の濃度では総合的評価ファクターの閾値（126×10^{-6}）を上回った。これらの濃度は沈殿濃度であり、1000 µg/mL の場合は毒性が高かった（補正した相対総増殖率の 90%超の低下）。最高 1 mM までの非沈殿濃度で実施した次のマウスリンフォーマ試験では、代謝活性化の有無に関わらず、E4 は遺伝子突然変異を誘発しなかった（ES-T22、ES-T45、TS 表 2.6.7.8.D 及び 2.6.7.8.E）。

雌 Sprague-Dawley ラットに 2000 mg/kg までの投与量で単回経口投与した骨髄小核試験では、E4 は陰性であった。2000 mg/kg 投与時の血漿中 E4 濃度は、投与後 0.5 時間で 39.2～48.6 µg/mL であった（ES-T37、TS 表 2.6.7.9.A）。

[1] サルを用いた 39 週間試験の報告書では、主に 3 及び 10 mg/kg/日群で認められた平均体重の軽微な減少に基づき NOAEL を 1 mg/kg/日としているが、3 mg/kg/日群の個々の体重変化量はすべて対照の範囲内であったのに対し、10 mg/kg/日群の 12 例中 7 例ではこの範囲を超えて体重が減少した。また、10 mg/kg/日群では Week 38 に軽度な貧血が認められたが、3 mg/kg/日群では認められなかった。したがって、NOAEL は 1 mg/kg/日ではなく 3 mg/kg/日であると結論された。

雌 Sprague-Dawley ラットに 2000 mg/kg/日までの投与量で経口投与したコメット試験（2 試験）では、E4 は肝臓におけるテール強度の中央値（テール中の DNA の割合）を上昇させなかった。十二指腸では、最初の試験の 500 mg/kg/日群でテール強度の中央値の上昇が認められたが、1000 及び 2000 mg/kg/日群では認められなかった。また、1000 及び 2000 mg/kg/日ではゴースト細胞の割合が上昇したが、500 mg/kg/日では認められなかった。より広範な投与量（62.5～2000 mg/kg/日）を用いて、細胞毒性について詳細に評価した反復投与試験では、E4 は検討した最高用量である 2000 mg/kg/日まで（この投与量を含む）、十二指腸において DNA 損傷又は細胞毒性を誘発しなかった。この投与量における投与後 0.5 時間の平均血漿中 E4 濃度は、最初の試験では 39.8 µg/mL、次の試験では 22.8 µg/mL であった（ES-T46、0030-NC-001、TS 表 2.6.7.9.B 及び 2.6.7.9.C）。

がん原性試験

E4 の 2 年間がん原性試験を実施し、雌 CD-1 マウスには 0.125、0.25、0.5 及び 1 mg/kg/日の投与量で、雌 Wistar Han ラットには 0.08、0.27 及び 0.8 mg/kg/日の投与量で経口投与した。

マウスでは、投与開始後 3 ヵ月間に、特に 1 mg/kg/日で体重増加量の増加（0.5 mg/kg/日で＋15%、1 mg/kg/日で＋33%）及び体重の増加が認められたことから、最大耐量（MTD）に達したと判断された。E4 は、0.25 mg/kg/日以上の投与量で子宮及び子宮頸部の上皮及び間質腫瘍、0.5 mg/kg/日以上の投与量で乳腺腫瘍（腺癌、良性及び悪性の腺表皮癌）、1 mg/kg/日の投与量で下垂体腫瘍（前葉の腺腫及び癌腫）を増加させた。全生存率は E4 の影響を受けなかったが、0.25 mg/kg/日以上の投与量では、乳腺腫瘍及び子宮／腟脱（子宮や子宮頸部腫瘍による）によって死亡率が上昇した。非腫瘍性増殖性所見の増加が、全投与量では子宮（腺の嚢胞状過形成）及び乳腺（腺房細胞及び異型性過形成）において、1 mg/kg/日では下垂体（前葉の過形成）及び肺（気管支肺胞過形成）において認められた。投与に関連した非増殖性の所見は、E4 のエストロゲン作用と一致したもの、他の所見に続発したもの、あるいは、毒性学的重要性が低いものであった（0031-NC-004）。

ラットでは、体重増加量の減少（0.27 及び 0.8 mg/kg/日で投与開始後 12～18 ヵ月間に 10%以上、全投与期間でほぼ 10%）に基づき、MTD に達したと判断された。0.8 mg/kg/日の投与量で、乳腺腫瘍（腺癌）の発現率が上昇した。この組織では、全投与量で非腫瘍性増殖性所見（腺房細胞の過形成）の増加も認められた。また、0.27 mg/kg/日以上の投与量では、子宮（腺の嚢胞性及び異型性過形成）及び肝臓（明細胞巣）における非腫瘍性増殖性所見が増加した。卵巣の増殖性所見（間質細胞の過形成）及び肝臓の好塩基性細胞巣の発現率／重症度は、E4 投与群の方が対照群よりも低かった。ラットで認められた投与に関連した非増殖性所見は、E4 のエストロゲン作用と一致したもの、他の所見に続発したもの又は高齢動物で一般的に認められるものであった（0031-NC-003）。

E4 は、マウスでは 0.25 mg/kg/日以上の経口投与量で、ラットでは 0.8 mg/kg/日の経口投与量で、がん原性を示すと考えられた。マウスでは、0.125 mg/kg/日の投与量における $AUC_{0\text{-last}}$ は 4.60 ng·hr/mL、C_{max} は 3.75 ng/mL であり、がん原性は認められなかった。ラットでは、0.27 mg/kg/日の投与量における $AUC_{0\text{-last}}$ は 18.8 ng·hr/mL、C_{max} は 9.99 ng/mL であり、がん原性は認められなかった（0031-NC-003、0031-NC-004、TS 表 2.6.7.10.A 及び B）。

生殖発生毒性試験

雌 Wistar Han ラットを用いた E4 の受胎能回復性試験では、0.17、0.5 及び 1.5 mg/kg/日の経口投与量で、4 週間の投与期間中に用量依存的な体重増加量の減少及び摂餌量の減少が認められ、3 週間の回復期間中に部分的から完全な回復が認められた。性周期のない雌の数が増加し（0.5 及び 1.5 mg/kg/日）、3 日以上続く周期が数多く認められた（1.5 mg/kg/日）。性周期は、投与中止後 1 週間以内に完全に回復した。交尾、受胎能若しくは妊娠パラメータ、又は着床データに対する影響は認められなかった。母体耐性に関する NOAEL は 0.17～0.5 mg/kg/日、性周期に関する NOAEL は 0.17 mg/kg/日であった。受胎能及び初期胚発生に関する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった（ES-T27、ES-T43、TS 表 2.6.7.12A 及び 2.6.7.12.B）。

E4 は、ニュージーランドホワイトウサギに交尾 4 日前から妊娠 9 日目（G9）まで 0.1 mg/kg/日 *bid* 以上の投与量で経口投与したとき、着床を完全に抑制した。0.1 mg/kg/日の投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 12.1 ng·hr/mL、C_{max} は 4.11 ng/mL であった（ES-T04、TS 表 2.6.7.11）。

E4 の胚・胎児発生に関する試験を経口投与により実施し、妊娠中の雌 Wistar Han ラットには G6 から G17 まで 0.3、1 及び 3 mg/kg/日の投与量で、妊娠中の雌ニュージーランドホワイトウサギには G6 から G18（又は G15）まで 0.05、0.15 及び 0.45 mg/kg/日の投与量で投与した[2]。E4 の投与によって、ラットでは 3 mg/kg/日、ウサギでは 0.15 及び 0.45 mg/kg/日の投与量で、流産及び全胚死亡が生じた。両動物種とも、流産によって複数の動物が早期屠殺に至った。0.45 mg/kg/日の投与期間を短縮しても、ウサギの妊娠転帰は改善されなかった。ウサギにおける胎児の評価は、0.45 mg/kg/日群において同腹児が認められたのは 2 例のみであったため、0.05 及び 0.15 mg/kg/日群について行った。

両動物種とも、全投与量で体重増加量及び摂餌量の減少に基づく母体毒性が認められた。0.15 や 0.45 mg/kg/日群のウサギでは、一般状態の所見（脱毛、削痩、無便）が認められた。1 及び 3 mg/kg/日群のラットの剖検では、胎盤の肥大又は肥厚が認められた。いずれの動物種においても、生存胎児を有する雌では、着床前胚死亡率、生存胎児数又は胎児の性比に対する影響は認められなかった。ラットでは 3 mg/kg/日、ウサギでは 0.45 mg/kg/日で着床後胚死亡率が上昇した。ラットでは、3 mg/kg/日で胎児体重が減少した。

ウサギでは、投与に関連した形態異常は認められなかった。軽度な発育遅滞が認められ、0.05 及び 0.15 mg/kg/日群では第 13 肋骨過剰、0.15 mg/kg/日群では指骨、複数の骨及び椎体の不完全骨化や未骨化が認められた。

ラットでは、1 mg/kg/日群の 3 母体の胎児 3 例及び 3 mg/kg/日群の 4 母体の胎児 5 例において、長骨（上腕骨、橈骨）及び肩甲骨の短縮、肥厚又は弯曲が認められた。また、いずれの投与量においても、数例の胎児では足関節の異常回転及び重度の屈曲が認められた。同じ投与量で、胸骨分節の不完全骨化や未骨化、並びに肋骨の結節形成及び波状肋骨の増加が認められた。

ラットの胚・胎児発生に関する NOAEL は 0.3 mg/kg/日であり、この投与量における $AUC_{0\text{-last}}$ は 9.33 ng·hr/mL、C_{max} は 6.83 ng/mL であった。母動物の生殖パラメータ及び胚・胎児発生に関するウサギの NOAEL は 0.05 mg/kg/日であり、投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 6.84 ng·hr/mL、C_{max} は

[2] 0.45 mg/kg/日群では、複数の雌で床敷中に血液が認められたため、投与期間を妊娠 15 日まで短縮した。

0.925 ng/mL であった（ES-T01、ES-T02、ES-T03、ES-T04、ES-T16、ES-T19、TS 表 2.6.7.11、2.6.7.13.A 及び 2.6.7.13.B）。

妊娠中の雌 Wistar Han ラットを用いた E4 の出生前及び出生後の発生に関する試験では、0.5 又は 1.5 mg/kg/日の投与量で経口投与した F_0 雌の数例が、分娩困難（同腹児の死亡又は分娩の欠如）によって死亡又は早期屠殺に至った。1.5 mg/kg/日では、主に早期屠殺に至った雌において複数の一般状態の所見が認められ、0.5 及び 1.5 mg/kg/日では赤色の腟分泌物が記録された。いずれの投与量でも、F_0 雌では妊娠中や授乳中に体重増加量及び摂餌量の減少も認められた。

0.5 mg/kg/日では、F_1 の 1 同腹児が分娩後（*pp*）2 日に全て死亡した。1.5 mg/kg/日では、喰殺及び死亡の出生児の発現率が高かったため、分娩後 4 日の生存率が低下した。F_1 出生児にも F_1 動物にも他に特記すべき所見はなかったが、例外として 0.5 及び 1.5 mg/kg/日群の F_1 雄において軽度で毒性ではない体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。

F_0 雌の妊娠及び授乳に関する NOAEL は、それぞれ 0.5 及び 0.17 mg/kg/日であった。F_1 出生児の分娩後 4 日の生存に関する NOAEL は 0.17 mg/kg/日であり、分娩後 4 日以降の生存及び F_1 出生児の発育に対する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった。F_1 世代の発達、生殖能及び受胎能に関する NO(A)EL は 1.5 mg/kg/日であった（Es0001-NC-001、Es0001-NC-009、Es0001-NC-003、TS 表 2.6.7.14）。

その他の毒性試験

E4 は [redacted] 社から入手する。潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に記載されている。

E4 は、*in vitro* の L5178Y $TK^{+/-}$マウスリンパ腫細胞において、活性酸素種の形成を用量依存的に減少させた（ES-T44、TS 表 2.6.7.17）。

いずれの動物試験においても、光毒性の症状は認められなかった。E4 は光に曝露される組織への分布が比較的少なく、メラニンを含む構造に長時間滞留しないことが示されているため、ICH S10 に準じて、光毒性試験を実施しないことは妥当と考えた。

2.6.6.1.2 ドロスピレノン

反復投与毒性試験

雌カニクイザルに DRSP を 6（4）mg/kg/日の投与量で 13 週間経口投与したとき、忍容性は良好であった。特記すべき所見は以下のみであった：

- インスリン濃度の軽微な上昇
- 性周期の停止、生殖組織及び乳腺の重量変化や病理組織学的所見
- 血清アルドステロン濃度の上昇、軽微から軽度な球状層の肥厚を伴う副腎重量の増加
- 肝臓グリコーゲン含量のわずかな低値

いずれの所見も毒性とは考えられなかった（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

遺伝毒性試験

DRSP は、ICH S2(R1)の一連の標準的な遺伝毒性試験及びヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）試験において、遺伝毒性は陰性であった（Lang, 1993、

Reimann, 1996)。DRSP は、ラット肝細胞では不定期 DNA 合成を増加させたが、ヒト肝細胞では増加させなかった（Martelli, 2003)。

がん原性試験

DRSP による発がん作用は公表論文では報告されていないが、プロゲスチンは単独又はエストロゲンとの併用により動物やヒトへの発がん性が既に示唆されていることから、発がん性試験の実施は不要と判断した。

生殖発生毒性試験

DRSP はサルにおいて性周期抑制作用及びラットにおいて排卵抑制作用がみられ、E4/DRSP の配合剤は強い避妊効果を有しているため、臨床用量で女性の受胎能に影響を及ぼすことは明らかである。妊娠ラットにおいて DRSP 又は DRSP/EE の併用投与により、DRSP の抗アンドロゲン作用によると考えられる雄胎児の雌性化が認められた。

その他の毒性試験

DRSP は[redacted] 社及び[redacted] 社から入手する。潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（[redacted] 社：MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日、[redacted] 社：MF 登録番号；[redacted]、登録；令和[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日）に記載されている。

2.6.6.1.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

雌カニクイザルを用いた GLP 適用の 13 週間の反復投与毒性試験では、E4 を DRSP との併用で 30/6 mg/kg/日までの投与量で評価した（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1)。

30/6 mg/kg/日群の雌 3 例は、重度の高血糖及び関連する変化のため、Day 45 又は 47 に早期屠殺となった。Day 50 に 20/4 mg/kg/日に減量した後も高血糖が発現し、20/4 mg/kg/日群の雌 1 例及び 10/2 mg/kg/日群の雌 1 例では 2 日間の休薬が必要となった。

一般状態の所見は、30/6（20/4）mg/kg/日群で認められた一過性の低体温及び歯肉の蒼白化のみであった。E4/DRSP は体重に影響を及ぼさなかった。

血液学的及び血液生化学的パラメータの変化の重症度は軽微から中等度であり、血糖値の上昇（10/2 mg/kg/日以上の投与量での併用投与時のみ）及びアルドステロン値の上昇（DRSP による）を除き、ほとんどが E4 単独投与によって誘発された変化と同様であった。

生殖組織における所見は、E4 及び DRSP の薬理活性と一致していた。卵管、子宮及び腟における所見は主にプロゲステロン作用によるものであったが、卵巣、乳腺及び下垂体への影響は両化合物に起因すると考えられた。全ての投与量で、投与開始後に雌の性周期が停止した。

副腎における所見は、球状層の軽微から軽度な肥厚及び網状層の中等度の萎縮であった。その他の病理組織学的変化［骨髄の細胞充実性の軽微な低下、肝臓グリコーゲン含量の軽度から中等度の減少、皮膚の毛包の萎縮、リンパ組織の萎縮やリンパ節及び脾臓における胚中心の欠如又は発達の減少（脾臓及び胸腺重量の低下を伴う)］は、E4 の特性を反映したものであった。

ヘマトキシリン／エオジン染色した心臓の病理組織学的検査では、特記すべき所見は認められなかったが、E4/LNG 併用投与試験（0031-NC-018）で毒性所見が認められたため、マッソントリクローム染色による詳細な評価を実施した。30/6（20/4）mg/kg/日群の雌 2 例（早期死亡例 1

例を含む）の心臓において、心筋細胞の軽微な空胞化を伴う軽微な間質の線維化が認められた（特殊染色後においてのみ観察）。30/6（20/4）mg/kg/日群の別の 1 例では、軽微な心筋細胞の肥大も認められた。これらの変化は軽微で限局的であり、休薬期間の終了時には認められなかった。したがって、これらは毒性ではないと判断された。

いずれの変化も投与中止後に可逆性のエビデンスを示したが、必ずしも休薬期間の終了時に対照値まで完全に回復していたわけではなかった。

NOAEL は、高血糖及び関連する早期屠殺に基づき、3/0.6 mg/kg/日と判定された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は、E4 は 483 ng·hr/mL、DRSP は 630 ng·hr/mL であった。C_{max} は、E4 は 173 ng/mL、DRSP は 105 ng/mL であった。

2.6.6.1.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

雌カニクイザルを用いた GLP 適用の 13 週間の反復投与毒性試験では、E4 を LNG との併用で 30/0.225 mg/kg/日までの投与量で評価した（0031-NC-018、TS 表 2.6.7.7.C.1）。本試験を実施した理由は、当初は E4 と配合するプロゲスチンとして LNG が有望な候補と考えられていたためである。本試験における E4 と LNG の用量比（133/1）は、予定臨床用量比と同一であった。

30/0.225 mg/kg/日群の雌 1 例は、重度の高血糖及び関連する変化のため、Day 47 に早期屠殺となった。20/0.150 mg/kg/日への減量後も個々の動物において高血糖が認められ、雌 1 例では 2～4 日間の投与中断に至った。この投与群の別の雌は Day 83 に死亡した状態で発見されたが、それまでに一般状態の所見は認められなかった。死因は主に左心室の萎縮及び線維化であった。30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群の別の雌 2 例及び 10/0.075 mg/kg/日群の雌 1 例の心臓において、軽度な心筋細胞の空胞化を伴う軽度な間質の線維化並びに左心室及び中隔の筋線維の軽微から軽度な肥大が認められた。E4 単独投与群の雌 1 例でも、重症度が軽微な心臓の病理組織学的変化が認められたが、この群の血漿検体には LNG が混入していたため、これらの所見が E4 に起因するものであると判定することはできなかった。全体的に、心臓の変化は E4/LNG の併用により増強されるようであった。

[redacted]（20[redacted]）による独立した専門家のレビューにより、報告された心臓の病理組織学的所見が確認され、心筋細胞及び（細胞内）筋原線維の錯綜配列、左心室壁の肥厚、左心室腔容積の減少、心臓重量の増加、並びに血漿中乳酸脱水素酵素濃度の上昇傾向を伴っていることが認められた。総合的な所見は、ヒトの肥大型心筋症の所見と極めて類似しており、発病過程も同様であると推定された。

高用量群の生存動物では、乳頭からの白色分泌物の一過性の発現及び全身性脱毛症の発現率の軽度の上昇が認められた。E4/LNG の併用投与による体重への影響は認められなかった。

30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群では、心拍数の軽度な増加とともに、PQ 間隔の短縮及び血圧の低下が認められたが、心臓の病理組織学的所見との明らかな相関は認められなかった。

血液学的及び血液生化学的パラメータの変化（高血糖を除く）の重症度は軽微から中等度であり、E4 の単独投与による変化とほぼ同様であった。

生殖組織の変化は、E4 及び LNG の薬理活性を反映しており、主にプロゲステロン作用による卵管、子宮及び腟の所見、並びに両化合物に起因する卵巣、乳腺及び下垂体への影響が認められた。全ての投与量で、投与開始後に雌の性周期が停止した。

その他の病理組織学的変化［骨髄の細胞充実性の軽微な低下、皮膚の毛包の萎縮／空洞、リンパ組織の萎縮やリンパ節及び脾臓における胚中心の欠如又は発達の減少（胸腺重量の低下を伴う）］は、E4 の特性を反映していた。

心臓の病理組織学的所見を除き、いずれの変化も投与中止後に可逆性のエビデンスを示したが、必ずしも回復期間の終了時に対照値まで完全に回復していたわけではなかった。

NOAEL は、心臓の所見及び関連する死亡に基づき、3/0.0225 mg/kg/日と判定された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は、E4 は 282 ng·hr/mL、LNG は 145 ng·hr/mL であった。C_{max} は、E4 は 87.1 ng/mL、LNG は 20.7 ng/mL であった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 エステトロールの単回投与毒性試験

2.6.6.2.1.1 ラット

4 週間の反復投与毒性試験に適切な投与量を選択するため、雌 Sprague-Dawley ラットを用いた単回投与／10 日間反復投与非 GLP 用量設定試験を実施した（ES-T09、TS 表 2.6.7.5 及び 2.6.7.6）。本試験の反復投与部分については、2.6.6.3.1.2 項に示す。

本試験の単回投与部分では、E4 を 10、100 及び 1000 mg/kg の投与量で雌ラットに単回強制経口投与した。投与後には 14 日間の観察期間を設けた。

結果

E4 による死亡又は一般状態の変化は認められなかった。100 及び 1000 mg/kg 群の雌では、10 mg/kg 群の雌と比較し、体重増加量の減少が認められた。

2.6.6.2.1.2 サル

最大耐量（MTD）を確立し、4 週間の反復投与毒性試験に適切な投与量を選択するため、雌カニクイザルを用いて単回用量漸増試験を実施した（ES-T05、TS 表 2.6.7.5）。本試験は GLP を遵守して実施したが、重要な試験以外の試験とみなしている。

E4 を 4 例の雌カニクイザルに Day 1、3、6 及び 14 にそれぞれ 1、10、100 及び 1000 mg/kg の投与量で単回漸増経口投与した。対照群 3 例には、溶媒である 0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース（CMC）水溶液（10 mL/kg）を同じ日に投与した。トキシコキネティクスのため、Day 1、6 及び 14 に血液検体を採取した。

結果

E4 による死亡は認められなかった。1000 mg/kg 群の雌 1 例で嘔吐が認められ、同投与量では赤血球パラメータの軽度な低下が認められた。10 mg/kg 以上の投与量ではアルカリホスファターゼの軽度な減少が、100 mg/kg 以上の投与量では無機リンの減少が認められた。

本試験における NOAEL は 1000 mg/kg と結論された。この投与量における $AUC_{0\text{-}last}$ は 93303 ng·hr/mL、C_{max} は 13564 ng/mL であった。

2.6.6.2.2 ドロスピレノンの単回投与毒性試験

ICH M3（R2）に従い、DRSP の単回投与毒性データは不要である。臨床投与量である 3 mg/日を 15 mg/日の E4 と併用投与したとき、$AUC_{0\text{-}24}$ は Day 1 には 224 ng·hr/mL、Day 14 には 519 ng·hr/mL であった（MIT-Es0001-C103）。サルを用いた 13 週間反復併用投与毒性試験（0030-

NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）における DRSP 単独投与群の 6（4）mg/kg/日[3]の DRSP に対する曝露量（$AUC_{0\text{-last}}$）は、Day 1 には 6186 ng·hr/mL、試験終了時には 3150 ng·hr/mL であり、E4 の併用による影響は認められなかった。これらの曝露量は、Day 1 又は定常状態における臨床曝露量の 6～28 倍であったが、サルにおける忍容性は良好であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 エステトロールの反復投与毒性試験

E4 の反復投与毒性試験は、雌マウス（最長 13 週間）、雌ラット（最長 26 週間）、及び雌サル（最長 39 週間）を用いて実施した。

2.6.6.3.1.1 マウス

雌 CD-1 マウスを用いて、E4 の 4 週間及び 13 週間の反復経口投与毒性試験を実施した。この試験の目的は、同じ動物種及び系統を用いたがん原性試験に適した投与量を選択することであった。

4 週間の試験の前に、雌 CD-1 マウスを用いて 0、3、10 及び 30 mg/kg/日の投与量で 2 週間の非 GLP の経口投与による用量設定試験を実施した（ES-T31、TS 表 2.6.7.6）。この 2 週間の試験では、E4 の忍容性は良好であり、死亡又は一般状態変化は認められなかった。全ての投与量で体重増加量の増加が認められ、10 mg/kg/日群で最も顕著であった。10 及び 30 mg/kg/日群では、摂餌量が増加した。高用量群の雌 2 例で子宮拡張が認められ、1 例では卵巣嚢胞を伴っていた。トキシコキネティクスにより曝露量を確認したところ、3、10 及び 30 mg/kg/日群における Day 14 の $AUC_{0\text{-last}}$ は、それぞれ 205、590 及び 1255 ng·hr/mL であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。2 週間の投与後に全身毒性が認められなかったことから、4 週間毒性試験の投与量として 0.03、0.3、3 及び 30 mg/kg/日を選択した。

4 週間反復経口投与毒性試験（ES-T34、TS 表 2.6.7.7.A.1）

雌 CD-1 マウス（6～7 週齢、各群 12 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を 0.03、0.3、3、及び 30 mg/kg/日の投与量で 4 週間強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（10 mL/kg）を投与した。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査であった。剖検では、器官重量測定、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（各群 12 例）を用いて実施し、Day 1 及び 27/28 の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（4 例）からは、投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

[3] E4/DRSP の高用量併用投与群の投与量は、一般状態の悪化／早期屠殺により、Day 50 以降は減量した。DRSP 単独投与群の投与量も、同様に Day 53 に減量した。

トキシコキネティクスでは、T_{max} は全ての投与量で 0.5 時間であった。対照動物の検体における濃度は定量下限値（LLOQ）未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 の投与による死亡はなく、関連する一般状態の変化も認められなかった。

30 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量の顕著な増加（対照群の体重増加量の 4 倍）が認められた。無機リン、総蛋白及びトリグリセリドの中等度の増加並びに尿素及びクレアチニンの中等度の減少が認められた。病理組織学的変化は、生殖組織（卵管、子宮、膣）、乳腺及び下垂体、並びに大腿骨、肝臓、脾臓、及び胸腺で認められた。卵管では軽度な上皮の空胞化が認められた。子宮における変化として、子宮内膜腺の軽微から中等度の肥大及び過形成を伴う軽微から軽度の扁平上皮化生、子宮内膜腺の拡張／嚢胞、内腔の拡張のほか、間質細胞の軽微から中等度の過形成が認められた。膣では軽微から中等度の過角化が認められた。乳腺では軽微から軽度な小葉腺胞過形成が、下垂体では好酸球細胞の軽微な過形成／肥大が認められた。大腿骨では骨梁の軽微な増加が認められた。肝臓では、軽微から軽度な肝細胞肥大が認められ、肝臓重量の増加と相関していた。脾臓では髄外造血の重症度が高く、脾臓重量の増加と相関していた。胸腺における軽微から中等度のリンパ組織萎縮は、胸腺重量の減少と相関していた。

3 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量の顕著な増加（対照群の体重増加量の 5 倍）が認められた。尿素及びクレアチニンは低値であった。病理組織学的変化は 30 mg/kg/日群で認められた変化と同様であったが、全般的に発現率や重症度はやや低かった。肝臓及び脾臓における所見は、重量の増加と相関していた。

0.3 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量の中等度の増加（対照群の体重増加量の 2 倍）が認められた。クレアチニンは低値であった。卵管、乳腺及び脾臓では病理組織学的変化が認められたが、発現率や重症度は 3 mg/kg/日群よりも低かった。脾臓における変化は、重量の増加と相関していた。

0.03 mg/kg/日群の特記すべき所見は、子宮の扁平上皮化生のみであった。

本試験条件下では、体重に対する影響は毒性ではないと考えられ、病理組織学的変化は主に被験物質のエストロゲン活性によるものであったため、NOAEL は 30 mg/kg/日と結論された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は 2004 ng·hr/mL、C_{max} は 844 ng/mL であった。

13 週間反復経口投与毒性試験（ES-T40、TS 表 2.6.7.7.A.2）

E4（バッチ番号：CS02-032Am-1001）を、雌 CD-1 マウス（約 7 週齢、各群 10 例）に 0.3、1、3、及び 10 mg/kg/日の投与量で 13 週間強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（10 mL/kg）を投与した。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査であった。剖検では、器官重量測定、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査は、肉眼的病変、副腎及び生殖組織や器官に対してのみ実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（各群 18 例）を用いて実施し、Day 1 及び Week 13 の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（6 例）からは、投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} は全ての投与量で 0.5 時間であった。対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 の投与による死亡はなく、関連する一般状態の変化も認められなかった。

3 及び 10 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量の中等度の増加（対照群の体重増加量の 1.7～1.8 倍）が認められ、このため投与終了時の体重が増加した（対照群のそれぞれ＋10.6%及び＋5.3%[4]）。血液学的変化の重症度は軽微から中等度であり、赤血球数の減少、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量及び網赤血球率の増加、並びに白血球数（白血球百分率を含む）の減少が認められた。無機リン及びアルカリホスファターゼの中等度の増加、並びに尿素の中等度の減少が認められた。肝臓、脾臓及び子宮の重量が増加したが、相対腎臓重量の増加が記録されたのは 10 mg/kg/日群のみであった。ほとんどの雌で、被膜下紡錘形細胞の過形成及び副腎の X 帯の中等度から顕著な空胞化／変性が認められた。生殖組織の病理組織学的変化として、卵巣中の黄体の欠如又は軽微から軽度な発達（10 mg/kg/日）、卵管上皮の空胞化の増加、子宮における軽微から中等度の腺の嚢胞状過形成（10 mg/kg/日では子宮角の拡張を伴う）、及び腟における軽微から中等度の扁平上皮細胞の過形成などが認められた。生殖器の所見は、E4 に起因する性周期停止と一致していた。性周期の段階は、3 mg/kg/日群の 10 例中 2 例では特定することができたが、10 mg/kg/日群では全例で特定不能であった。

1 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量の軽度な増加（対照群の体重増加量の 1.5 倍）が認められた。投与終了時の体重の増加量は、対照群と比較して＋4.3%であった。血液学的変化は 3 及び 10 mg/kg/日群で認められた変化と同様であったが、程度は低かった。尿素値の軽度な低下が認められた。肝臓、脾臓及び子宮の重量は増加した。副腎、子宮及び腟における病理組織学的変化は、3 及び 10 mg/kg/日群で認められた変化と同様であったが、全般的に発現率や重症度はいくらか低かった。性周期の段階は、10 例中 3 例で特定可能であった。

0.3 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量のわずかな増加（対照群の体重増加量の 1.2 倍）が認められた。投与終了時の体重の増加量は、対照群と比較して＋1.6%であった。脾臓重量は増加した。副腎及び腟において病理組織学的変化が記録されたが、発現率や重症度は 1 mg/kg/日群よりも低かった。性周期の段階は、10 例中 6 例で特定可能であった。

本試験条件下では、3 及び 10 mg/kg/日群における体重増加量の増加（104 週間試験では生存率が制限される可能性がある）、並びに臨床病理検査及び病理組織学的検査で認められた変化（104 週間試験では毒性になる可能性がある腺の嚢胞状過形成）を考慮し、今後のがん原性試験の高用量としては 1 mg/kg/日の投与量が有望であると結論された。

[4] 10 mg/kg/日群の増加が小さかったことは、投与開始時にこの群の体重が低値（対照群と比較して－5.3%）であったことが理由であった。

2.6.6.3.1.2 ラット

雌 Sprague-Dawley ラットを用いて、E4 の 4 週間及び 26 週間経口反復投与毒性試験を実施し、投与後には休薬回復期間を設けた。また、雌 Wistar Han ラットを用いて 13 週間試験を実施し、この動物種及び系統を用いたがん原性試験の適切な投与量を選択することとした。

Sprague-Dawley ラット

雌 Sprague-Dawley ラットを用いた 4 週間試験の前に、単回投与及び 10 日間反復投与の非 GLP の用量設定試験を実施した（ES-T09、TS 表 2.6.7.5 及び 2.6.7.6）。本試験の単回投与部分については、2.6.6.2.1.1 項に示す。

本試験の 10 日間反復投与部分では、E4 を 0、100、300 及び 1000 mg/kg/日の投与量で雌ラットに強制経口投与した。E4 の投与による死亡は認められなかった。全ての投与量で体重及び摂餌量の減少が認められ、300 及び 1000 mg/kg/日では一般状態悪化の徴候を伴っていた。また、全ての投与量で赤血球パラメータの減少及び凝固パラメータの変化が認められ、300 及び 1000 mg/kg/日では白血球数の減少も認められた。複数の血液生化学的変化［ナトリウム、クロール、無機リン及び総コレステロールの低値、並びに総蛋白、総ビリルビン（全投与量）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（300 mg/kg/日以上）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（1000 mg/kg/日）の高値］が記録された。肉眼的変化としては、全ての投与量で明確な小葉像を伴う白色の肝臓及び胸腺の小型化が、300 や 1000 mg/kg/日では子宮の拡張及び卵巣嚢胞が認められた。病理組織学的所見としては、全ての投与量で軽微から中等度の肝細胞空胞化が、1000 mg/kg/日では軽微な肝細胞の単細胞壊死やアポトーシスが認められた。

これらの所見に基づき、4 週間毒性試験には 5、15、50 及び 150 mg/kg/日の投与量を選択した。

4 週間反復経口投与毒性試験（2 週間の休薬期間を設定）（ES-T10、TS 表 2.6.7.7.A.3）

雌 Sprague-Dawley ラット（約 8 週齢、各群 10 又は 16 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を 5、15、50 及び 150 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。4 週間の投与期間の終了時に動物（各群 10 例）を屠殺したが、0、50 又は 150 mg/kg/日群の最初の雌 6 例に対しては投与後 2 週間の休薬期間を設けた。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査であった。投与期間及び投与後の休薬期間の終了時の剖検では、器官重量測定、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（各群 9 例）を用いて実施し、Day 1 及び 29 の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（3 例）からは、Day 1 及び 28 の投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} は、Day 29 の 150 mg/kg/日群（1.0 時間）を除き、全ての投与量で 0.5 時間であった。対照動物の検体から微量の被験物質（5 mg/kg/日投与時の C_{max} の 0.8%

未満）が検出されたが、E4 の毒性評価に影響はないと判断された。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 の投与による死亡は認められなかった。

50 及び 150 mg/kg/日群では、一般状態悪化の徴候（円背、立毛、削痩）及び皮膚症状の徴候（被毛の菲薄化、脱毛）が認められた。投与期間を通じて摂餌量の減少を伴う体重減少が認められたが、最初の 1 週間においてより顕著であった。血液学的変化として、赤血球数、ヘモグロビン、血中血球容積、平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビンの減少が認められた。網赤血球百分率は影響を受けなかった。赤血球パラメータの変化は、非再生性貧血を示すものであった。白血球数（好酸球及びリンパ球）の減少が記録された。プロトロンビン時間の延長及びフィブリノーゲン値の低下が認められた。血液生化学的検査では、総蛋白、アルブミン及びアルカリホスファターゼの増加、並びにアルブミン／グロブリン比の低下及び総コレステロールの減少が認められた。150 mg/kg/日群においてのみ、クロールの軽微な低値及びクレアチニンの軽度な低値が認められた。副腎、肝臓、子宮（満重量、空重量及び満重量－空重量）及び腟重量の増加、並びに脾臓（150 mg/kg/日群）及び胸腺重量の減少が認められた。肉眼的所見としては、腎臓の緑変色、肝臓の肥大、不規則な色調又は白色化、皮膚の脱毛、脾臓の小型化（150 mg/kg/日群）、胸腺の小型化、並びに半透明な内容物を伴う子宮の拡張などが認められた。病理組織学的検査では、生殖組織（卵巣、子宮、腟）及び乳腺、並びに副腎、骨髄、腎臓、肝臓、皮膚、脾臓及び胸腺の変化が認められた。生殖組織の変化としては、卵巣の軽微から顕著な間質腺の萎縮及び閉鎖卵胞及び嚢胞状卵胞の軽微から中等度の増加、子宮の軽度な扁平上皮化生（150 mg/kg/日群のみ）及び内腔や内膜腺の軽微から中等度の過形成や肥大、並びに腟の軽微から中等度の上皮過形成や肥大及び軽微から顕著な上皮粘液産生が認められた。乳腺では、軽微から軽度な腺房細胞過形成及び導管拡張が認められた。副腎では、軽微から顕著なうっ血及び網状層の軽微から軽度な肥厚が認められた。骨髄では、軽微から軽度な細胞充実性の低下が認められた。腎臓では、軽微から軽度な褐色色素沈着が認められ、軽微から軽度な尿細管上皮細胞の空胞化も認められた。肝臓では、軽微から中等度の肝細胞の微小空胞化（150 mg/kg/日群のみ）及び重量の増加と一致する肝細胞の肥大が認められた。皮膚では、軽微から軽度な毛包の萎縮や減少が認められ、観察された脱毛と一致していた。脾臓では、軽微から軽度な褐色色素沈着の増加、軽微から軽度な造血、及び軽微から中等度のリンパ組織萎縮が認められた。胸腺では、軽微から顕著なリンパ組織萎縮が認められ、胸腺重量の減少と相関していた。病理組織学的所見の発現率及び重症度は、2 つの投与量でほぼ同様であった。

2 週間の休薬期間後、特に 150 mg/kg/日群では必ずしも完全な回復が認められたわけではなかったが、いずれの所見に関しても可逆性のエビデンスが認められた。3～5 日後には一般状態の悪化の徴候は認められなくなったが、一部の動物では回復期間の終了時にも被毛の菲薄化や脱毛が依然として認められた。体重増加量は対照群よりも優れていたが、回復期間の終了時においても体重は低値のままであった。血液学的パラメータは、50 mg/kg/日群ではほぼ完全な回復を、150 mg/kg/日群では部分的な回復を示した。血液生化学的パラメータは、いずれの投与量においても対照値まで回復した。相対肝臓重量を除き、器官重量は完全に回復した。回復期間の終了時に、肉眼的所見は認められなかった。卵巣、子宮、脾臓、胸腺、皮膚及び骨髄の病理組織学的変化も認められなくなっていた。副腎、腎臓、肝臓、乳腺及び腟の所見に関しては、不完全な回復が認められた。

15 mg/kg/日群では、一般状態悪化の徴候及び皮膚症状の徴候が認められたが、発現率は 2 つの高用量群よりも低かった。投与期間を通じて摂餌量の減少を伴う体重減少が認められたが、最初の 1 週間においてより顕著であった。白血球数の減少及びプロトロンビン時間の延長とともに、赤血球パラメータの軽微な減少が認められた。これらの変化はいずれも統計学的に有意ではなかった。血液生化学的変化として、総蛋白の増加、アルブミン／グロブリン比の低下、総コレステロールの減少、及びアルカリホスファターゼの増加が認められた。副腎及び肝臓重量は増加し、胸腺重量は減少した。肉眼的検査では、腎臓の緑変化、皮膚の脱毛及び胸腺の小型化が認められた。病理組織学的変化は、副腎、骨髄、腎臓、肝臓、乳腺、卵巣、胸腺、子宮及び腟において認められた。これらの組織で観察された変化は 50 mg/kg/日群で認められた変化と同様であったが、全般的に発現率や重症度はいくらか低かった。

5 mg/kg/日群では、一般状態悪化の一過性の徴候及び皮膚症状の徴候が認められた。体重増加量は、特に投与の最初の 1 週間は顕著に減少した。赤血球及び白血球パラメータの軽微な減少、並びにプロトロンビン時間の延長が認められた。これらの変化はいずれも統計学的に有意ではなかった。血液生化学的変化として、総蛋白の増加、総コレステロールの減少及びアルカリホスファターゼの増加が認められた。副腎及び肝臓重量の増加が記録された。病理組織学的変化は、副腎、腎臓、肝臓、乳腺、卵巣、子宮及び腟において認められた。観察された変化は、15 mg/kg/日群で認められた変化と同様であったが、発現率や重症度は低かった。

本試験条件下では、50 mg/kg/日以上で血液学的検査において赤血球数、ヘモグロビン濃度、PCV、MCH、白血球数の減少、及び PT の延長がみられたことから、NOAEL は 15 mg/kg/日と結論された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は 1958 ng·hr/mL、C_{max} は 1043 ng/mL であった。

<u>26 週間反復経口投与毒性試験（8 週間の休薬期間を設定）</u>（ES-T18、TS 表 2.6.7.7.A.4）

E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、雌 Sprague-Dawley ラット（約 8 週齢、各群 20 又は 26 例）に、1.5、5 及び 15 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。26 週間の投与期間の終了時に動物（各群 20 例）を屠殺したが、0 又は 15 mg/kg/日群の最初の雌 6 例に対しては、8 週間の休薬期間を設けた。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査であった。休薬期間中に性周期の段階を判定した。投与期間及び休薬期間の終了時の剖検では、器官重量測定、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（各群 9 例）を用いて実施し、Day 1、Week 13 及び投与終了時の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（3 例）からは、投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} は全ての投与量で 0.5 時間であった。対照動物の検体から微量の被験物質（最低用量投与時の C_{max} の 0.5%以下）が検出されたが、E4 の毒性評価に影響はないと判断された。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

1.5 mg/kg/日群の雌 1 例は、強制経口投与の過誤による一般状態悪化のため、Week 15 に早期屠殺となったが、他に投与に関連した死亡は認められなかった。

15 mg/kg/日群では、一般状態悪化の徴候（円背、立毛、削痩、外表の汚れ）及び皮膚症状の徴候（被毛の菲薄化、脱毛）が認められた。投与期間を通じて体重及び体重増加量は顕著に減少し、Week 1 には体重減少が認められた。摂餌量は Week 1～4 まで減少した。Week 12 及び 25 の血液学的変化は、赤血球パラメータの減少、好中球の増加、並びにリンパ球及び好酸球の減少であった。プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長、並びにフィブリノーゲン値の上昇が認められた。Week 12 及び 25 の血液生化学的検査では、無機リン及びトリグリセリドの増加、並びにアルブミン／グロブリン比の低下、クロール、総コレステロール及びクレアチニンの減少が認められた。副腎、腎臓及び肝臓重量の増加、並びに卵巣及び胸腺重量の減少が記録された。子宮重量（満重量―空重量）は減少した。病理組織学的変化は、生殖組織（卵巣、子宮、腟）及び乳腺、並びに副腎、大腿骨、腎臓、肝臓、脾臓及び胸腺で認められた。卵巣の変化として、黄体の欠如／発達の減少、軽微から軽度な間質の萎縮、及び軽微から中等度の嚢胞状卵胞の増加が認められた。子宮では、軽微から中等度の扁平上皮化生とともに、軽微から中等度の子宮内膜肥厚が認められ、腟では、軽微から軽度な上皮肥厚とともに、軽微から顕著な上皮粘液産生及び軽微から中等度の好酸球浸潤が認められた。性周期の段階は、雌 20 例中 1 例で判定可能であった。乳腺では、軽微から中等度の小葉腺胞過形成及び腺房内腔の拡張が認められた。副腎では、主に網状層における軽微から中等度のびまん性の皮質肥大、及び軽微から軽度な嚢胞変性が記録された。大腿骨では骨梁の増加が認められた。腎臓では、軽微から中等度の褐色色素沈着及び軽微から軽度な尿細管拡張が認められた。肝臓では、軽微から中等度の肝細胞の微小空胞化及び軽微から軽度な肝細胞の肥大が認められ、重量の増加と相関していた。脾臓では、軽度から中等度の褐色色素沈着の増加が認められた。胸腺では、中等度から重度のリンパ組織の萎縮が認められ、胸腺重量の減少と相関していた。

投与中止後、一般状態悪化の徴候は全般的に 6 週間にわたり持続した。体重増加量は対照群よりも多かったが、回復期間の終了時においても体重は対照群に比して低値であった。臨床病理学的変化は、ほぼ完全に回復した。副腎及び肝臓重量は増加したままであり、副腎の肥大も認められた。卵巣重量は休薬前に比して増加し、完全な回復が示された。同様に、卵巣、胸腺及び腟の病理組織学的変化に関しても、完全な回復が示された。副腎、大腿骨、腎臓、乳腺、脾臓及び子宮の所見については、不完全な回復が認められた。肝臓の微小空胞化は認められなかった。休薬期間の最初の 37 日間中の正常な性周期の回数は、高用量群の雌の方が対照群より少なかったが、休薬 20 日目には概して正常な周期の回復が認められた。

5 mg/kg/日群の一般状態の所見は、15 mg/kg/日群の所見と同様であったが、発現率はやや低かった。投与期間を通じて体重増加量の減少が認められ、最初の 1 週間は摂餌量の減少を伴っていた。血液学的検査では、Week 12 及び 15 の赤血球パラメータの減少、並びに白血球数の変化傾向が認められたが、15 mg/kg/日群で認められた変化よりも程度が低かった。凝固時間の延長及びフィブリノーゲン値の上昇が認められた。クレアチニン及び総コレステロール値の低下、並びにトリグリセリドの増加が認められた。副腎、腎臓及び肝臓重量の増加、並びに胸腺及び子宮重量（満重量－空重量）の減少が記録された。病理組織学的変化は 15 mg/kg/日群で認められた変化と同様であったが、全般的に発現率や重症度はやや低かった。性周期の段階は、雌 20 例中 1 例で判定可能であった。

1.5 mg/kg/日群の一般状態の所見は、被毛の菲薄化のみであった。投与期間を通じて体重増加量が減少した。Week 12 及び 25 には、赤血球パラメータの軽微な減少が、プロトロンビン時間の延長及びクレアチニンの減少とともに認められた。副腎、腎臓及び肝臓重量の増加、並びに子宮重量（満重量－空重量）の減少が記録された。5 及び 15 mg/kg/日群で記録された病理組織学的変化のほとんどは 1.5 mg/kg/日群でも認められたが、発現率や重症度は低かった。性周期の段階は、雌 19 例中 2 例で判定可能であった。

本試験条件下では、15 mg/kg/日で体重増加量の減少、及び一般状態の変化（削痩、円背、立毛、被毛の薄化、全身の脱毛）がみられたことから、NOAEL は 5 mg/kg/日と結論された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は 736 ng·hr/mL、C_{max} は 238 ng/mL であった。

Wistar Han ラット

雌 Wistar Han ラットを用いて 13 週間試験を実施し、この動物種及び系統を用いたがん原性試験に適切な投与量を選択した。Sprague-Dawley 系では乳がんの自然発生率が高いため、Sprague-Dawley ラットではなく Wistar Han ラットを選択した。

13 週間反復経口投与毒性試験（ES-T39、TS 表 2.6.7.7.A.5）

E4（バッチ番号：CS02-032Am-1001）を、雌 Wistar Han ラット（約 5 週齢、各群 10 例）に 0.2、0.6、2 及び 6 mg/kg/日の投与量で 13 週間強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査であった。剖検では、器官重量測定、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査は、肉眼的病変、副腎、腸管系リンパ組織及び生殖組織／器官に対してのみ実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（各群 9 例）を用いて実施し、Day 1 及び Week 13 の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（3 例）からは、投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} は全ての投与量で 0.5 時間であった。対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 による死亡はなく、関連する一般状態の変化も認められなかった。

2 及び 6 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加量の減少が記録され、このため投与終了時の体重が低値を示した（対照群のそれぞれ－13%及び－19%）。6 mg/kg/日群では、摂餌量の軽度な減少に伴って体重増加量が減少した。プロトロンビン時間の延長、総コレステロール値の低下及びアルカリホスファターゼの増加（6 mg/kg/日群のみ）が認められた。副腎及び肝臓重量は増加し、胸腺重量は減少した。6 mg/kg/日群では、子宮重量（満重量、空重量、満重量－空重量）が減少した。副腎では、軽微から中等度のびまん性の皮質肥大が認められた。乳腺の病理組織学的変化として、両投与群で軽微な腺房内腔の拡張が、6 mg/kg/日では腺房細胞の軽微な肥大や空胞化が認められた。子宮では、扁平上皮化生及び高上皮とともに、軽微から軽度な腺の嚢胞

性過形成、軽微から顕著な上皮腺の変性やアポトーシス、軽微から軽度な好酸球浸潤の増加及び腺部分数の減少（6 mg/kg/日群のみ）が認められた。腟では、軽微から軽度な扁平上皮細胞の過形成が認められ、2 mg/kg/日群の少数の雌では上皮粘液産生も認められた。性周期の段階は、2 mg/kg/日群の 10 例中 5 例では特定することができたが、6 mg/kg/日投与群では全例で判定不能であった。

0.6 mg/kg/日群では、投与終了時に体重増加量の減少及び体重の低値が認められた（対照群と比較して−9%）。総コレステロール値は低下した。副腎及び肝臓重量は増加した。副腎、乳腺、子宮及び腟における病理組織学的変化は、2 mg/kg/日群と比較して発現率や重症度が低かった。性周期の段階は、10 例中 4 例で判定可能であった。

0.2 mg/kg/日群の特記すべき所見は、投与期間終了時における体重増加量の減少及び体重の低値（対照群と比較して−8%）、並びに肝臓重量の増加のみであった。病理組織学的検査では、対照と比較して差異は認められなかった。性周期の段階は、全例で判定可能であった。

本試験条件下では、2 及び 6 mg/kg/日群における体重への影響、並びに臨床病理及び病理組織学的変化が主に被験物質のエストロゲン活性に関係していたことを考慮して、がん原性試験の高用量としては 0.6 mg/kg/日の投与量が有望であると結論された。

2.6.6.3.1.3 サル

雌カニクイザルを用いて、E4 の 4 週間反復経口投与毒性試験並びに投与後に休薬期間を設定した 13 週間及び 26 週間反復経口投与毒性試験を実施した。

4 週間反復経口投与毒性試験（ES-T11、TS 表 2.6.7.7.A.6）

雌カニクイザル（パーパスブレッド、モーリシャス原産、39〜47 ヵ月齢、各群 4 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を 5、15 及び 50 mg/kg/日の投与量で 4 週間強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、心電図、血圧、直腸温、体重、摂餌量（目視のみ）、血液学的検査、血液生化学的検査、血清ホルモン及び尿検査であった。剖検では、器官重量測定、肉眼的観察、病理組織学的検査及び子宮内膜の組織形態計測を実施した。トキシコキネティクスは、主試験の動物を用いて実施し、Day 1 及び 28 の投与前並びに投与後 0.5、1、2、4、8、16 及び 24 時間に検体を採取した（Day 28 の投与後 24 時間を除く）。対照の動物からは、投与後 0.5 及び 24 時間に検体を採取した。

本試験は、血清ホルモンの測定を除き、GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} の中央値は 0.5〜1.5 時間であり、投与量の増加に伴ってわずかに延長する傾向が認められた。対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 の投与による死亡は認められなかった。

50 mg/kg/日群では、投与期間の終了時に 1 例で削痩が認められた。この投与量での体重減少は対照群よりもわずかに大きく、摂餌量の減少と関連していた。血液生化学的検査では、クロール、グルコース、総蛋白及びアルブミンの減少、総コレステロール増加、並びにアルカリホスフ

ァターゼの減少が認められた。これらの変化の重症度は軽微から中等度であった。テストステロン濃度は中等度に低下した。副腎、胸腺及び卵巣重量の減少、並びに下垂体、卵管、子宮及び腟重量の増加が認められた。剖検時に、胸腺のサイズの減少が認められた。病理組織学的所見として、生殖組織（卵巣、卵管、子宮）、下垂体、副腎、肝臓及び胸腺の変化が認められた。全ての雌の卵巣で黄体が欠如していた。卵管では、軽度から中等度の上皮肥大や過形成が認められた。子宮では、子宮筋層の軽微な肥大、子宮内膜間質の軽微から中等度の硝子化、子宮頸部上皮の軽度な肥大や過形成、子宮頸部の軽微な好中球浸潤、及び軽微から軽度な扁平上皮化生が認められた。子宮内膜の組織形態計測では、子宮内膜厚の増大が認められた。下垂体では、好酸性細胞数の中等度の増加が認められた。副腎では網状層の軽微な萎縮が、肝臓ではグリコーゲン含量の減少が認められた。胸腺では、顕著なリンパ組織の萎縮が認められ、胸腺の重量及びサイズの減少と一致していた。

15 及び 5 mg/kg/日群では、50 mg/kg/日群と同様な血液生化学的変化が記録されたが、程度は小さく、概して統計学的有意性には達しなかった。器官重量（下垂体を除く）、病理組織学的所見（15 mg/kg/日群の副腎のみ）及び子宮内膜厚への影響も同様であった。

本試験条件下では、50 mg/kg/日で 1 例に削痩がみられ、試験期間を通じて摂餌量減少を伴う体重減少がみられたことから、NOAEL は 15 mg/kg/日と結論された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 3640 ng·hr/mL、C_{max} は 1098 ng/mL であった。

13 週間反復経口投与毒性試験（4 週間の回復期間を設定）（ES-T15、TS 表 2.6.7.7.A.7）

E4（バッチ番号：CS02-032A-1001）を、雌カニクイザル（パーパスブレッド、モーリシャス原産、48～56 ヵ月齢、各群 6 又は 10 例）に、3、10 及び 30 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。13 週間の投与期間の終了時に動物（各群 6 例）を屠殺したが、0 又は 30 mg/kg/日群の最後の雌 4 例に対しては、4 週間の投与後の休薬期間を設けた。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、心電図、血圧、直腸温、体重、摂餌量（目視のみ）、血液学的検査、血液生化学的検査、及び尿検査であった。投与期間及び休薬期間を通じて、性周期の段階を判定した。投与期間及び投与後の休薬期間の終了時の剖検では、器官重量測定、肉眼的観察、病理組織学的検査、及び子宮内膜の組織形態計測を実施した。トキシコキネティクスは、主試験の動物を用いて実施し、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 時間に検体を採取した（Week 13 の投与後 24 時間を除く）。対照の動物からは、投与後 1 及び 24 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} の中央値は 0.5～1.0 時間であり、投与量の増加に伴ってわずかに延長する傾向が認められた。対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 の投与による死亡は認められなかった。

30 mg/kg/日群では、対照群と比較して全身性の脱毛症の発現率が高かった。投与期間中に軽度な体重減少が認められ、これは摂餌量の減少と関連していた。赤血球パラメータの中等度の減少

が認められた。血液生化学的検査では、カルシウム、総蛋白、アルブミン、及びアルブミン／グロブリン比の減少や低下、総コレステロール及びトリグリセリドの増加、アルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素及びγ-グルタミルトランスフェラーゼの減少、並びにアラニンアミノトランスフェラーゼの増加が認められた。これらの変化の重症度は軽微から中等度であった。性周期は、投与開始後最初の 1 週間に停止した。卵巣重量の減少、並びに下垂体、卵管、子宮及び腟重量の増加が認められた。また、胸腺及び脾臓重量は減少した。卵巣、卵管及び胸腺重量の変化は、これらの器官の大きさの肉眼的変化と相関していた。病理組織学的変化は、生殖組織（卵巣、卵管、子宮及び腟）、乳腺及び下垂体、並びに副腎、リンパ節、皮膚、脾臓及び胸腺で認められた。卵巣に黄体は認められなかった。卵管の変化として、軽微から軽度な上皮肥大や過形成、軽微な筋層の肥厚及び軽微から顕著な内腔の拡張が認められた。子宮では、軽微から軽度な子宮筋層の肥厚、軽微から中等度の子宮内膜の萎縮、軽微から中等度の子宮内膜間質の硝子化、軽度から中等度の子宮頸部上皮の肥大や過形成、軽微な子宮頸部の炎症性変化及びびらんや潰瘍、及び軽微から中等度の扁平上皮化生が認められた。子宮内膜の組織形態計測では、子宮内膜厚の減少が認められた。腟では、軽微から軽度な上皮の萎縮及び軽微から中等度の角化が認められた。乳腺では、腺の発達の増加が認められ、腺房細胞の軽度から中等度の核大小不同や巨核症及び軽微から軽度な蛋白質性分泌を伴っていた。下垂体では、軽度から顕著な好酸性細胞の増加が記録された。副腎における所見は、球状層及び束状層の軽微から軽度な肥厚や空胞化、並びに網状層の軽度から顕著な萎縮であった。皮膚では、軽微から中等度の毛包の萎縮が認められ、観察された脱毛と一致していた。リンパ組織の萎縮は、リンパ節（軽微から軽度）、脾臓（軽微から中等度）及び胸腺（顕著）で認められた。胸腺に関しては、重量及び大きさの減少と一致していた。

休薬期間中にも、依然として脱毛が認められた。動物の体重は増加したが、休薬期間の終了時においても、対照群と比較すると依然として低体重であった。臨床病理学的変化、器官重量（卵巣重量を除き依然としてわずかに減少）及び肉眼的所見は、完全に回復した。生殖組織の病理組織学的変化のほとんどは可逆性のエビデンスを示したが、乳腺では核大小不同や巨核球が、下垂体では好酸性細胞の軽微な増加が、子宮では軽微から中等度の扁平上皮化生が依然として認められた。子宮内膜厚は対照値まで回復した。休薬期間中に性周期は判定されなかったが、病理組織学的所見は、休薬期間の終了時における性周期の回復と一致していた。胸腺では不完全な再生が認められ、皮髄境界が非常に不明瞭又は認められなく、有糸分裂の割合が高い大型の低色素細胞を含有する大型の小葉を特徴としていた。脾臓では、軽微から軽度なリンパ組織の萎縮が依然として認められた。

10 mg/kg/日群では、軽度な体重減少が認められた。血液学的及び血液生化学的パラメータにおける変化は、30 mg/kg/日群と同様であった。性周期は、投与開始後 2 週間以内に停止した。器官重量、肉眼的変化、病理組織学的変化及び組織形態計測値への影響は、30 mg/kg/日群と同様であったが、病理組織学的所見の発現率や重症度は低かった。

3 mg/kg/日群の血液生化学的パラメータにおける変化は、2 つの高用量群で認められた変化と同様であった。性周期は、投与開始後 2 週間以内に停止した。器官重量（下垂体を除く）、肉眼的変化、病理組織学的変化及び組織形態計測値への影響は、10 及び 30 mg/kg/日群と同様であったが、病理組織学的所見の発現率や重症度は低かった。

本試験条件下では、10 mg/kg/日で摂餌量減少を伴う軽度の体重減少、及び赤血球数、ヘモグロビン濃度、PCV の軽度減少がみられたことから、NOAEL は 3 mg/kg/日と結論された。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は 363 ng·hr/mL、C_{max} は 122 ng/mL であった。

39 週間反復経口投与毒性試験（6 週間の休薬期間を設定）（ES-T20、TS 表 2.6.7.7.A.8）

雌カニクイザル（パーパスブレッド、モーリシャス原産、44～61 ヵ月齢、各群 8 又は 12 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-1001）を 1、3 及び 10 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。39 週間の投与期間の終了時に動物（各群 8 例）を屠殺したが、0 又は 10 mg/kg/日群の最後の雌 4 例に対しては、6 週間の投与後の休薬期間を設けた。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、心電図、血圧、直腸温、体重、摂餌量（目視のみ）、血液学的検査、血液生化学的検査、及び尿検査であった。投与期間及び休薬期間を通じて、性周期の段階を判定した。投与期間及び投与後の休薬期間の終了時の剖検では、器官重量測定、肉眼的観察、病理組織学的検査、及び子宮内膜及び筋層の組織形態計測を実施した。トキシコキネティクスは、主試験の動物を用いて実施し、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 時間に検体を採取した（Week 39 の投与後 24 時間を除く）。対照動物からは、Day 1 及び Week 13 の投与後 1 及び 24 時間、並びに Week 26 及び 39 の全ての時点で検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製物中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} の中央値は 0.5 から 1.0 時間であり、投与量との関連性は認められなかった。対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

E4 の投与による死亡は認められなかった。

10 mg/kg/日群では、対照群と比較して全身性の脱毛症の発現率が高かった。この群では、投与期間中に軽微な体重減少が認められた。赤血球パラメータは、Week 25 及び投与終了時にやや減少していた。血液生化学的パラメータにおいて、軽微から中等度の変化が認められた。これらの変化は、カルシウム、総蛋白、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比の減少や低下、総コレステロール及びトリグリセリドの増加、アルカリホスファターゼ及びγ-グルタミルトランスフェラーゼの減少、アラニンアミノトランスフェラーゼの増加（Week 25 及び投与終了時の両方）、並びに総ビリルビンの増加（投与終了時）であった。性周期は、投与開始後 1 ヵ月以内に停止した。卵巣、脾臓及び胸腺重量の減少が認められた。肉眼的所見として、卵巣嚢胞、卵管の拡張及び皮膚の脱毛が認められた。病理組織学的変化は、生殖組織（卵巣、卵管、子宮、腟）、乳腺及び下垂体、並びに副腎、骨髄、肝臓、リンパ節、皮膚、脾臓及び胸腺で認められた。卵巣に黄体は認められず、卵胞発育の減少及び透明帯の残遺物の周囲の硝子化が認められた。卵管の変化として、軽微から中等度の上皮肥大や過形成、軽微な筋層の肥厚及び軽度から中等度の内腔の拡張が認められた。子宮では、軽微から中等度の子宮筋層の肥大、軽度から顕著な子宮内膜の萎縮、軽微から軽度な子宮内膜間質の硝子化、軽度な子宮内膜腺の拡張、軽微から軽度な子宮頸部上皮の肥大や過形成、軽微から軽度な子宮頸部の炎症性変化、軽微から軽度な子宮頸部腺の拡張、及

び軽微から軽度な扁平上皮化生が認められた。子宮内膜の組織形態計測では、子宮内膜厚の減少及び子宮筋層厚の増大が認められた。腟では、軽度から中等度の上皮萎縮が認められた。乳腺では、中等度から顕著な腺房の発達が認められ、軽微から軽度な腺房細胞の核大小不同や不同血球症を伴っていた。下垂体では、軽度から顕著な好酸性細胞の増加が記録された。副腎では、軽微から中等度の束状層の肥大及び網状層の萎縮が認められた。骨髄では、軽微から軽度な脂肪組織の増加が、細胞充実性の軽度な低下とともに認められた。肝臓では、グリコーゲン含量の減少が認められた。皮膚では、毛包の萎縮及び空洞の発現率が上昇しており、観察された脱毛と一致していた。下顎リンパ節及び脾臓では、胚中心の発達の減少傾向が認められた。胸腺では軽度から顕著なリンパ組織の萎縮がみられ、胸腺重量の減少と一致していた。

投与後の休薬期間中も、全ての動物で依然として脱毛が認められた。体重増加量は対照群と同程度であった。臨床病理学的変化及び器官重量に関しては、依然としてわずかに減少していた卵巣重量を除き、完全な回復が認められた。生殖組織では顕著な回復の徴候が認められたが、乳腺（腺房細胞の軽微な核大小不同や不同血球症）、卵管（軽微から軽度な子宮筋層肥大）、下垂体（軽度から顕著な好酸性細胞の増加）、及び子宮［軽度から中等度の子宮内膜腺の拡張、軽度な上皮肥大、扁平上皮化生、子宮頸部の粘膜固有層の粘液減少及び線維化（末期慢性炎症と考えられる）］では依然として病理組織学的所見が認められた。性周期は、4 例中 2 例で認められた。皮膚でも顕著な回復の徴候がみられ、リンパ組織では完全な回復が認められた。

3 mg/kg/日群では、全身性の脱毛症が対照群と比較して高い発現率で認められた。試験期間中の平均体重変化量は軽微に減少していたが、個々の体重変化量は対照の範囲内であった。赤血球パラメータは、Week 25 においてのみやや減少していた。血液生化学的変化及び器官重量への影響は 10 mg/kg/日群と同様であったが、程度はわずかに低かった。性周期は、投与開始後 1 ヵ月以内に停止した。病理組織学的検査では、10 mg/kg/日群で認められた変化と同様の変化が認められ、発現率及び重症度は基本的に同じであった。

1 mg/kg/日群の特記すべき所見は、3 mg/kg/日群よりも程度が低い血液生化学的変化のみであった。性周期は、投与開始後 1 ヵ月以内に停止し、3 及び 10 mg/kg/日群と同じ病理組織学的変化が認められたが、発現率や重症度は低かった。

本試験条件下では、NOAEL は 3 mg/kg/日と結論された[5]。この投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 328 ng·hr/mL、C_{max} は 97.2 ng/mL であった。

2.6.6.3.2 ドロスピレノンの反復投与毒性試験

動物種を用いた DRSP の反復投与毒性試験に関する公表文献はない。雌カニクイザルを用いて E4 と DRSP の併用について検討した 13 週間反復経口投与毒性試験では、DRSP 単独投与群を設定した（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

[5] 報告書では、3 及び 10 mg/kg/日群で認められた平均体重の軽微な減少に基づき NOAEL を 1 mg/kg/日としているが、3 mg/kg/日群の個々の体重変化量はすべて対照の範囲内であったのに対し、10 mg/kg/日群の 12 例中 7 例ではこの範囲を超えて体重が減少した。また、10 mg/kg/日群では Week 38 に軽度な貧血が認められたが、3 mg/kg/日群では認められなかった。したがって、NOAEL は 1 mg/kg/日ではなく 3 mg/kg/日であると結論された。

エステトロール及びドロスピレノンの併用による 13 週間反復経口投与毒性試験（4 週間の休薬期間を設定）（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）

雌カニクイザル（5 例）に、DRSP（バッチ番号：9037MO80112）を 6 mg/kg/日の投与量で経口投与した。高用量（30/6 mg/kg/日）の E4/DRSP の併用は、高血糖及び関連する変化によって早期屠殺に至ったため、Day 50 に 20/4 mg/kg/日に減量した。同様に、DRSP 単独投与群の投与量も Day 53 に 4 mg/kg/日に減量した。対照群には、0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。

観察及び検査項目の詳細は 2.6.6.3.3 項に示す。

本試験は、血清グルコースに関連した一部のパラメータの測定を除き、GLP を遵守して実施した（2.6.6.3.3 項参照）。

結果

DRSP の単独投与群では死亡はなく、投与に関連した一般状態の所見や体重（増加量）への影響も認められなかった。眼科学的検査、心電図検査、血圧及び体温のモニタリングでは、特記すべき所見は認められなかった。DRSP の投与は、血液学的パラメータや尿検査に影響を及ぼさず、血液生化学的パラメータに対する影響は、アルブミンの軽微な増加のみであった。対照群と比較して、グリコヘモグロビン又はフルクトサミン濃度に変化は認められなかった。DRSP の投与後に、血清アルドステロン値の上昇及び血清インスリン値の軽微な上昇が認められた。

性周期は、投与開始後に停止した。

器官重量の変化として、卵巣及び卵管重量の減少並びに副腎重量の増加が認められた。特記すべき肉眼的所見は認められなかった。病理組織学的変化は、生殖組織（卵巣、卵管、子宮、腟）、乳腺、並びに副腎、肝臓、及び膵臓で認められた。卵巣に黄体は認められず、卵管では軽度な上皮萎縮が認められた。子宮は子宮内膜間質の中等度から顕著な脱落膜化、及び軽微から顕著な子宮内膜肥厚（組織形態計測によって確認）を特徴とするプロゲステロンの作用の外観を呈していた。子宮内膜内に子宮内膜腺は認められなかったが、基底腺は軽度から中等度に拡張していた。らせん動脈の軽度から顕著な発達及び子宮筋層の肥大が認められた。子宮頸部のかなりの粘液存在を伴う中等度の拡張が認められた。腟では、軽微から軽度な上皮萎縮及び角化の減少が認められた。乳腺では、軽微な腺房細胞の空胞化（1 例のみ）、軽度な導管腺房の拡張、及び軽微なリンパ球細胞の浸潤が認められた。副腎における所見は、球状層の軽微から軽度な肥厚であり、1 例の雌のみ網状層の軽度な萎縮が認められた。肝臓のグリコーゲン含量は、対照動物に比べてわずかに低い傾向が認められた。1 例の膵臓では島細胞の軽微な空胞化が認められたが、毒性学的意義は不明であった。

2.6.6.3.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

エステトロール及びドロスピレノンの併用による 13 週間反復経口投与毒性試験（4 週間の回復期間を設定）（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）

雌カニクイザル（パーパスブレッド、モーリシャス原産、48～68 ヵ月齢、各群 5 又は 9 例）を用いて、E4/DRSP の併用による 13 週間経口投与毒性試験（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）を実施した。本試験の投与量は、E4 を単独投与した 13 週間反復投与毒性試験及び予想される 5：1 の臨床用量比に基づき設定した。

3 群のサルに、E4（バッチ番号：CS02-032A-1203）及び DRSP（バッチ番号：9037MO80112）を、3/0.6、10/2 又は 30/6 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。さらに 2 群のサルには、E4 又は DRSP を高用量（それぞれ 30 及び 6 mg/kg/日）で単独投与した。高用量併用投与群では、一般状態の悪化（高血糖及び関連する変化による）のために Day 45 又は 47 に 3 例を早期屠殺する必要が生じたため（以下の結果を参照）、この群の生存動物への投与は Day 48 及び 49 に中断し、Day 50 に E4/DRSP の投与量を 20/4 mg/kg/日に減量した。E4 又は DRSP を単独投与する群の投与量も、同様に Day 53 に減量した。

対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。13 週間の投与期間の終了時に動物（各群 3～5 例）を屠殺し、対照群の最後の 4 例及び 30/6（20/4）mg/kg/日群の最後の 2 例に対しては、投与後の 4 週間の休薬期間を設けた。

モニタリングしたパラメータは、死亡率、一般状態、眼科学的検査、心電図、血圧、直腸温、体重、摂餌量（目視のみ）、血液学的検査、血液生化学的検査、及び尿検査であった。投与期間及び休薬期間を通じて、性周期の段階を判定した。高用量の投与量の減量後、パラメータの追加側底を以下のように行った。

- 予防措置として、直腸温を毎日測定した[6]。
- 血液学的検査及び血液生化学的検査は、Week 8 以降試験終了時まで週 1 回測定した。
- Day 57 以降はグルコース反応試験紙（非 GLP）によって血糖を毎日モニタリングし、投与中断の基準を以下のように設定した。反応試験紙による血糖値が 2 日間連続で 120 mg/dL を超え、3 日目の ADVIA 1650 分析装置による血漿グルコース濃度が 10 mmol/L を超える場合は、2 日間投与を中断し、ADVIA 1650 分析装置による血漿グルコース濃度が 5.5 mmol/L 以下になった時点で投与を再開する。
- 血漿中フルクトサミン及び糖化ヘモグロビン濃度は、長期的な血糖状態を反映するため、Week 8 以降試験終了時までの複数の時点で測定した（非 GLP）。
- インスリン、コルチゾール、及びアルドステロンは、Week 8 以降は週 1 回測定し、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）は、Week 10 以降投与終了時まで測定した。

投与期間及び投与後の休薬期間の終了時の剖検では、器官重量測定、肉眼的観察、病理組織学的検査、及び子宮内膜の組織形態計測を実施した。トキシコキネティクスは、主試験の動物を用いて実施し、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 時間に検体を採取した（Week 13 の投与後 24 時間を除く）。対照動物では、投与後 1 及び 4 時間の検体を分析した。

本試験は、反応試験紙による血糖の分析並びに血漿中フルクトサミン及び糖化ヘモグロビン濃度の測定を除き、GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の E4 及び DRSP の濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} の中央値は、E4 は 0.5～1.0 時間、DRSP は 1.0～3.0 時間であった。E4 の曝露量は、DRSP と併用投与した場合の方が E4 を単独投与した場合よりも高かったが、DRSP の曝露量は、E4 の併用による影響を受けなかった。対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.3 項に示す。

[6] 一般状態悪化の症状の 1 つは低体温であった。

E4/DRSP 30/6 mg/kg/日群では、1 例が Day 36 に死亡した状態で発見された。肉眼的及び病理組織学的所見は、強制投与の過誤による外傷を示していた。

この群の他の 3 例は、一般状態悪化のため Day 45（1 例）又は Day 47（2 例）に早期屠殺となった。一般状態の悪化は重度の高血糖に起因するものであり、膵島の単細胞壊死やアポトーシス、血液生化学的変化（電解質バランスの異常、尿素、クレアチニン、総コレステロール、及びトリグリセリドの重度の増加）、顕著な腎臓の変化（軽微から軽度な肥大を伴う近位尿細管細胞のびまん性空胞化、集合管の尿細管変性や壊死、遠位尿細管の軽微から中等度の拡張及び扁平上皮）、肝臓の所見（肝細胞肥大、軽度な単細胞壊死やアポトーシス、欠如した又は軽微なグリコーゲン含量）及び副腎の所見（球状層及び束状層のびまん性肥大）を伴っていた。膵島の単細胞壊死／アポトーシスを伴う重度の高血糖は、一般状態悪化の主な原因と考えられた。この群の生存動物に関しては、早期屠殺により投与が 2 日間中断され、その後 Day 50 から 30/6 mg/kg/日の投与量が 20/4 mg/kg/日に減量された。

30/6（20/4）mg/kg/日群の生存動物では、一過性の低体温及び歯肉の蒼白が認められた。E4/DRSP は体重に影響を及ぼさなかった。赤血球パラメータ及びプロトロンビン時間の軽度な減少や短縮が認められた。1 例では、血糖値の顕著な上昇によってさらに 2 回の投与中断が必要となり（Day 69/70 及び 78/79）、この群の平均血糖値は投与終了時及び試験中に数回上昇した。高血糖は毒性と判断された。その他の血液生化学的変化の重症度は軽微から中等度であり、カルシウム、無機リン、総蛋白及びアルブミンの減少、総コレステロール及びトリグリセリドの増加、アルカリホスファターゼ、及びγ-グルタミルトランスフェラーゼの減少、並びにアラニンアミノトランスフェラーゼの増加であった。フルクトサミン値及び糖化ヘモグロビン値はいずれも低下した。コルチゾール値及びアルドステロン値は上昇したが、インスリン値及び ACTH 値は影響を受けなかった。血液学的検査値及び血液生化学的検査値に対する影響は、グルコース値の上昇（併用投与時のみ）及びアルドステロン値の上昇（DRSP に起因する）を除き、ほとんどが E4 に起因するものであった。

性周期は、投与開始後に停止した。

卵巣及び卵管重量の減少、並びに下垂体及び子宮重量の増加が認められた。また、胸腺及び脾臓重量は減少し、副腎重量は増加した。肉眼的観察所見として、子宮の肥大、胸腺のサイズの縮小及び皮膚の脱毛が認められた。

病理組織学的変化は、生殖組織（卵巣、卵管、子宮、腟）、乳腺及び下垂体、並びに副腎、骨髄、心臓、腸管系リンパ組織、肝臓、リンパ節、膵臓、皮膚、脾臓及び胸腺で認められた。卵巣に黄体は認められず、卵胞の発達が減少しており、卵管では軽微から軽度な上皮萎縮が認められた。子宮では軽度から顕著な脱落膜化が認められ、少数例では子宮内膜の肥厚が認められた。子宮内膜の組織形態計測では、子宮内の膜厚の減少が認められたが、E4 単独投与群と比較して顕著ではなかった。子宮内膜や基底腺は、軽微から軽度に拡張しており、軽度から中等度のらせん動脈の発達、軽度から顕著な子宮筋層の肥大、及び相当量の粘液を伴う中等度の子宮頸部肥大が認められた。腟では中等度の上皮萎縮が認められ、角化は認められなかった。乳腺では、中等度から顕著な腺の発達が認められ、軽微から軽度な腺房細胞の空胞化、軽度から中等度の導管腺房の拡張及びリンパ球細胞の軽微な浸潤を伴っていた。下垂体では、軽微から軽度な好酸性細胞の増加が記録された。卵管、子宮及び腟における変化は主にプロゲステロン作用によるものであったが、卵巣、乳腺及び下垂体への影響は E4 と DRSP の両方に起因すると考えられた。

副腎における所見は、球状層の軽微から軽度な肥大及び網状層の中等度の萎縮であった。骨髄では、軽微な細胞充実性の低下が認められた。肝臓のグリコーゲン含量は、対照動物に比べてわずかに低い傾向が認められた。膵臓では、島細胞の軽微な空胞化が認められたが、毒性学的意義は不明であった。皮膚では毛包の萎縮が認められ、観察された脱毛と一致していた。リンパ組織の萎縮は、腸管系リンパ組織（軽微から軽度）及び胸腺（重度；胸腺の重量及びサイズの減少と一致）において認められ、リンパ節及び脾臓では、胚中心の欠如又は発達の抑制が認められた。骨髄、肝臓、皮膚及びリンパ系の所見も、E4 単独投与時に認められたものであったが、副腎の所見に関しては E4 と DRSP の両方が寄与していた。

E4/LNG を 13 週間にわたり併用投与したサルの心臓で、毒性と思われる病理組織学的所見［左心室や中隔の軽微から顕著な間質の線維化及び心筋細胞の軽微から軽度な肥大や空胞化（0031-NC-018、2.6.6.3.4 項参照）］が認められたことから、心筋の線維化の可能性を評価するため、E4/DRSP の併用投与試験の全動物の心臓に対してマッソントリクローム染色を実施した。雌 2 例（早期死亡例 1 例を含む）の心臓において、心筋細胞の軽微な空胞化を伴う軽微な間質の線維化（特殊染色後においてのみ観察）が認められた。1 例では、心筋細胞の軽微な肥大も認められた。これらの変化は、剖検時の心臓重量の変化や肉眼的所見を伴っておらず、軽微で、散発的であり、休薬期間の終了時には認められなかったことから、毒性ではないと考えられた。

休薬期間の後、臨床病理学的変化に関しては完全な回復が認められた（総蛋白濃度の低下を除く）。器官重量は、卵巣、脾臓及び胸腺でやや減少したままであり、子宮では減少していた。剖検時にびまん性の脱毛が認められた。生殖組織の病理組織学的変化の大部分は可逆性のエビデンスを示していたが、乳腺では腺房の軽度な萎縮、下垂体では好酸性細胞の軽微な増加が依然として認められ、卵巣では顕著な卵胞の発達が、子宮では卵胞期を呈するエストロゲン様作用による所見が、腟では角化が認められた。子宮内膜厚は、いくらか減少したままであった。いずれの回復群においても、性周期が再開した。脾臓及び胸腺では部分的な回復が、その他全ての組織では完全な回復が認められた。

E4/DRSP 10/2 mg/kg/日群では死亡はなく、投与に関連した一般状態の所見も認められなかった。血液学的及び血液生化学的パラメータに対する影響は、30/6（20/4）mg/kg/日群で認められた影響と同様であり、1 例ではグルコース値の上昇のため 2 日間の投与中断が必要となった（Day 82/83）。性周期は、投与開始後に停止した。器官重量、肉眼的変化、病理組織学的変化及び組織形態計測値への影響は、30/6（20/4）mg/kg/日群と同様であったが、非生殖組織における病理組織学的所見の発現率や重症度は低かった。

3/0.6 mg/kg/日群では死亡はなく、投与に関連した一般状態の所見も認められなかった。2 つの高用量群と同様な血液学的及び血液生化学的パラメータの変化が認められたが、例外としてグルコース値は対照値の範囲内であった。性周期は、投与開始後に停止した。器官重量（下垂体を除く）、肉眼的変化、病理組織学的変化及び組織形態計測値への影響は、2 つの高用量群と同様であったが、病理組織学的所見の発現率や重症度は低かった。

本試験条件下では、高用量群における死亡、並びに高用量群及び中用量群において毒性と考えられた高血糖を考慮し、NOAEL は E4/DRSP 3/0.6 mg/kg/日と結論された。E4 3 mg/kg/日群における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は 483 ng·hr/mL、C_{max} は 173 ng/mL であった。DRSP 0.6 mg/kg/日群における投与終了時の $AUC_{0\text{-}last}$ は 630 ng·hr/mL、C_{max} は 105 ng/mL であった。

2.6.6.3.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

エステトロール及びレボノルゲストレルの併用による 13 週間反復経口投与毒性試験（4 週間の休薬期間を設定）（0031-NC-018、TS 表 2.6.7.7.C.1）

当初は COC において E4 と配合するプロゲスチンとして LNG が有望な候補と考えられていたため、雌カニクイザル（パーパスブレッド、モーリシャス原産、58～68 ヵ月齢、各群 5 又は 9 例）を用いて、E4/LNG の併用による 13 週間経口投与毒性試験を実施した。投与量は、E4 を単独投与した 13 週間反復投与毒性試験及び予想される 133：1 の臨床用量比に基づき設定した。

3 群のサルに、E4（バッチ番号：CS02-032A-1203）及び LNG（バッチ番号：PR130729）を、3/0.0225、10/0.075 又は 30/0.225 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。さらに 2 群のサルには、E4 又は LNG を高用量（それぞれ 30 及び 0.225 mg/kg/日）で単独投与した。高用量併用投与群では、一般状態の悪化（高血糖及び関連する変化による）のために Day 47 に 1 例が早期屠殺に至り（以下の*結果*を参照）、Day 51 に E4/LNG の高用量を 20/0.150 mg/kg/日に減量した。E4 又は LNG を単独投与する群の投与量も、同日に同様に減量した。

対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液／0.1%（v/v）Tween-80（5 mL/kg）を投与した。13 週間の投与期間の終了時に動物（各群 4～5 例）を屠殺したが、対照群の最後の雌 4 例及び 30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群の最後の雌 3 例に対しては、4 週間の投与後休薬期間を設けた。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、心電図、血圧、体重、摂餌量（目視のみ）、血液学的検査、血液生化学的検査、及び尿検査であった。E4/DRSP の併用による経験に基づき、潜在的な高血糖を予測する予防措置として、直腸温を毎日測定し、グルコース値を毎週又は 2 週間ごとに測定した。投与期間及び休薬期間を通じて、性周期の段階を判定した。投与期間及び投与後休薬期間の終了時の剖検では、器官重量測定、肉眼的観察、病理組織学的検査、及び子宮内膜の組織形態計測を実施した。トキシコキネティクスは、主試験の動物を用いて実施し、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 時間に検体を採取した（Week 13 の投与後 24 時間を除く）。対照動物では、投与後 1 及び 4 時間の検体を分析した。

本試験は GLP を遵守して実施した。E4 単独投与群は、Week 13 に血漿検体への LNG の混入が認められたため、GLP 試験から除外した（以下の*結果*を参照）。

結果

投与調製液中の E4 及び LNG の濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、対照動物の検体における濃度は LLOQ 未満であった。T_{max} の中央値は、E4 は 0.5～1.0 時間、LNG は 1.0～2.0 時間であった。Day 1 の E4 及び LNG の曝露量は、他の化合物の併用による影響を受けなかった。Week 13 の LNG の曝露量は、単独投与時の方が E4 と併用投与した場合よりも低かった。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.4 項に示す。E4 単独投与群の全ての動物で定量可能な濃度の LNG が認められ、最大測定値は、低用量の LNG を投与したときの C_{max} の約 16.4%であった。この LNG 混入の原因を確実に特定することはできなかったが、この群における曝露量が均一であったことから、LNG が混入した調製液を動物に投与した可能性が示唆された。この混入のため、この群の結果は E4 単独によるものであるとみなすことができなくなり、この群は GLP から除外した。

E4/LNG の 30/0.225 mg/kg/日群では、一般状態悪化のため Day 47 に 1 例が早期屠殺となった。この一般状態悪化は重度の高血糖に起因するものであり、膵島の単細胞壊死やアポトーシス、血液生化学的変化（電解質バランスの異常、尿素、クレアチニン、総コレステロール、及びトリグリセリドの重度の増加）、腎尿細管の空胞化及び糸球体症並びに小腸のびらんや潰瘍を伴っていた。早期屠殺により、Day 51 以降は 30/0.225 mg/kg/日の投与量を 20/0.150 mg/kg/日に減量した。

この投与群では別の動物が Day 83 に死亡した状態で発見されたが、それまでに一般状態の異常所見は認められなかった。死因は主に左心室の萎縮及び線維化であった。

30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群の生存動物では、乳頭からの白色分泌物の一過性の発現が認められたほか、全身性脱毛症の発現率がわずかに高かった。E4/LNG の併用投与による体重への影響は認められなかった。軽度な心拍数の増加に加え、PQ 間隔の短縮及び血圧の低下が記録された。

赤血球パラメータはやや減少していた。投与終了時には平均血糖値の有意な上昇は認められなかったが、3 例（早期死亡例を含む）では投与期間中の複数の時点でグルコース値の上昇が認められ、雌 1 例では Day 29/30、50/51/52/53 及び 61/62/63/64 に投与が中断された。その他の血液生化学的変化は、カルシウム、無機リン、総蛋白、アルブミン、アルブミン／グロブリン比及び尿素の減少、クロール、トリグリセリド、アラニンアミノトランスフェラーゼ及び乳酸脱水素酵素の増加、並びにアルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ及びアミラーゼの減少であった。尿量は増加した。

性周期は、投与開始後に停止した。

卵巣及び卵管重量の減少、並びに子宮重量の増加が認められた。さらに、胸腺重量が減少し、副腎、心臓及び肝臓重量はわずかに増加した。

肉眼的所見として、子宮の肥大、腟壁の菲薄化、下垂体の肥大、胸腺のサイズの減少及び皮膚の脱毛が認められた。

病理組織学的変化は、生殖組織（卵巣、卵管、子宮、腟）、乳腺及び下垂体、並びに骨髄、心臓、腸管系リンパ組織、リンパ節、皮膚、脾臓及び胸腺で認められた。卵巣に黄体は認められず、卵管では軽微から軽度な上皮萎縮が認められた。子宮では、中等度から顕著な脱落膜化、軽微から軽度な子宮内膜の萎縮、軽度ならせん動脈の発達、中等度から顕著な子宮筋層の肥大及び顕著な子宮頸部粘液の存在が認められた。子宮内膜の組織形態計測では、子宮内膜厚の減少が認められたが、E4 単独投与群と比較して顕著ではなかった。腟では、中等度の上皮萎縮、角化の欠如及び軽度から中等度の炎症が認められた。乳腺では、中等度から顕著な腺の発達が認められ、軽微な導管腺房の拡張、不同血球症や核大小不同、軽度な分泌及び軽微から軽度な単核細胞浸潤が認められた。下垂体では、中等度から顕著な好酸性細胞の増加が記録された。卵管、子宮及び腟における変化は主にプロゲステロン作用によるものであったが、卵巣、乳腺及び下垂体への影響は E4 と LNG の両方に起因すると考えられた。

心臓の病理組織学的所見は、軽度な間質の線維化であり、軽度な心筋細胞の空胞化並びに左心室及び中隔の筋線維の軽微から軽度な肥大を伴っていた。これらの変化は高用量群の雌 2 例及び Day 83 に死亡して発見された 1 例において認められ、毒性と判断された。E4 単独投与群の 1 例の雌でも、軽微な肥大、空胞化及び線維化が認められたが、この群では LNG の混入が認められたため、E4 が原因であると判定することはできなかった。全体的に、心臓の変化は併用により増強されるようであった。

骨髄では、軽微な細胞充実性の低下が認められた。皮膚では毛包の萎縮及び空洞が認められた。リンパ組織の萎縮は、腸管系リンパ組織（軽微から軽度）、リンパ節（軽微から軽度）及び胸腺（顕著から重度）において認められ、リンパ節及び脾臓では、胚中心の欠如又は発達の抑制が認められた。皮膚及びリンパ系の所見は、E4 に起因するものであった。

休薬期間の後も、全ての雌で依然として脱毛が認められた。心拍数の増加及び PQ 間隔の短縮が認められたが、重症度は低く、統計学的に有意ではなかった。臨床病理学的な変化に関しては、完全な回復が認められた。1 例では、卵管、子宮及び心臓重量が増加した。心臓の病理組織学的所見に関しては、休薬期間の終了時に回復は認められず、3 例中 2 例では、軽微から軽度な筋線維の肥大、心筋細胞の空胞化や間質の線維化が認められた。生殖組織の病理組織学的変化の大部分は可逆性のエビデンスを示していたが、下垂体では好酸性細胞の軽度な増加が依然として認められ、卵巣には黄体は認められず、卵管では上皮の軽微な肥大や過形成が、子宮では卵胞期を示すエストロゲン様外観が、腟では角化が認められた。子宮内膜厚は対照値まで回復した。全ての回復群において、性周期が回復した。脾臓及び胸腺では部分的な回復が、皮膚ではほぼ完全な回復が認められ、その他全ての組織では完全な回復が認められた。

E4/LNG の 10/0.075 mg/kg/日群では死亡はなく、投与に関連した一般状態の所見も認められなかった。血液学的、血液生化学的及び尿パラメータへの影響は、30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群で認められた影響と同様であったが、例外としてグルコース値は全ての動物で対照値の範囲内であった。性周期は、投与開始後に停止した。器官重量、肉眼的変化、病理組織学的変化及び組織形態計測値への影響は、30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群と同様であったが、非生殖組織における病理組織学的所見の発現率や重症度は低かった。この群の 1 例において、毒性と思われる心臓の病理組織学的変化が認められた。

3/0.0225 mg/kg/日群では死亡はなく、投与に関連した一般状態の所見も認められなかった。血液学的、血液生化学的及び尿検査パラメータにおいては、中用量併用群で認められた変化と同様な変化が認められたが、全般的に程度は低く、必ずしも統計学的に有意ではなかった。性周期は、投与開始後に停止した。器官重量に対する影響は生殖組織と胸腺に限られており、肉眼的所見、病理組織学的所見及び組織形態計測値は 2 つの高用量群と同様であったが、病理組織学的所見の発現率や重症度は低かった。毒性と思われる心臓の病理組織学的所見は認められなかった。

本試験条件下では、高用量群における死亡、並びに高用量群及び中用量群における毒性と思われる心臓の病理組織学的所見を考慮し、NOAEL は E4/LNG 3/0.0225 mg/kg/日と結論された。E4 3 mg/kg/日群における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 282 ng·hr/mL、C_{max} は 87.1 ng/mL であった。LNG 0.0225 mg/kg/日群における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 145 ng·hr/mL、C_{max} は 20.7 ng/mL であった。

<u>専門家による心臓所見の調査</u>

[redacted]（20[redacted]）は、サルを用いた E4/LNG 又は E4/DRSP の併用投与による 13 週間試験及びサルを用いた E4 単独の 39 週間試験による心臓の病理組織学的スライド及び報告されたデータについて、独立した専門家として調査を実施した。本調査の目的は、心臓所見の発現率又は重症度を検証することではなく、病理組織学的所見の性質を確認し、考えられる原因について洞察を得ることであった。

E4/LNG の 13 週間試験（0031-NC-018）で報告された心臓の病理組織学的所見（心筋細胞の肥大、心筋細胞や間質の空胞化、間質の線維化）を確認し、心筋細胞及び（細胞内）筋原線維の錯

綜配列という別の特徴的変化を伴っていたことを明らかにした。病理組織学的変化は、主に心筋層の左室壁及び心室中隔において認められた。

変化が認められた動物では、病理組織学的変化に加えて、左室壁厚の増大、両心室にわたる横断面のスライドで認められた左室腔容積の減少、心臓重量の増加及び血漿中の乳酸脱水素酵素値の上昇傾向が認められた。

E4/LNG の 13 週間試験（0031-NC-018）では、特に高用量群の複数の動物の心臓において前述の肉眼的及び病理組織学的変化が認められた。前述の肉眼的及び病理組織学的変化は、E4 を単独投与した 39 週間試験の 4 群の動物の心臓においても散発的に認められ、これには溶媒を投与した対照動物も 1 例含まれていた（ES-T20、[redacted], 20[redacted]）。E4/DRSP の 13 週間試験の高用量群の少数の動物において、心臓の病理組織学的変化が認められたが、これらの動物では左室壁厚の増加を示すエビデンスは認められなかった（0030-NC-002）。

[redacted]（20[redacted]）は、モーリシャス産のカニクイザルは心筋症を自然発症しやすいことが知られていることを示し、総合的な観察結果はヒトの肥大型心筋症で報告される所見と極めて類似していると結論した。また、これらの病因は同様であると考えられ、肥大刺激による肉腫蛋白質をコードする変異遺伝子の上方制御による可能性があることに言及した。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 エステトロールの遺伝毒性試験

2.6.6.4.1.1 非哺乳動物細胞系での *in vitro* 試験

E4 が細菌において復帰突然変異を誘発するかどうかを評価するため、3 回のエームス試験を実施した。

エームス試験 1（ES-T21、TS 表 2.6.7.8.A）

E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、*S. typhimurium* TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び TA102 株を用いた 2 回の独立した実験で、代謝活性化（Aroclor 1254 誘発ラット肝 S9 ミックス）の非存在下又は存在下で試験した。両実験とも直接プレート法によって実施したが、例外として S9 ミックスを用いて実施した 2 回目の実験は、プレインキュベーション法（60 分、37°C）によって実施した。

菌株を、6 段階の用量の E4（3 プレート/用量）に曝露させた。

- 最初の実験の TA1535 株及び両実験の TA100 株では、78.13、156.3、312.5、625、1250 及び 2500 µg/プレート
- 2 回目の実験の TA1535 株並びに両実験の TA1537、TA98 及び TA102 株では、156.3、312.5、625、1250、2500 及び 5000 µg/プレート

E4 は、陰性対照としても用いたジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した。いずれの試験でも、S9 ミックスの存在下及び非存在下で、各菌株に対する適切な陽性対照を用いた。プレートを 37°C で 48～72 時間培養した後、復帰変異コロニー数をカウントした。細胞毒性は、復帰変異コロニー数の減少や背景の菌の生育の減少や透明化に基づいて判定した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

陰性対照及び陽性対照は、有効な試験の基準に適合した。TA1535（2 回目の実験）、TA1537、TA98 及び TA102 株では、S9 ミックスの有無に関わらず、5000 µg/プレートで中等度から強度の沈殿が認められた。TA100 株では、いずれの用量でも沈殿は認められなかった。TA100 株では、S9 ミックスの有無に関わらず 2500 µg/プレートで中等度の毒性が記録されたが、その他のいずれの菌株でも特記すべき毒性は認められなかった。

TA102 株では、代謝活性化系の有無に関わらず、1250 µg/プレートの濃度から復帰変異コロニー数の増加が認められ、2500 や 5000 µg/プレートでは溶媒対照値の 2 倍を上回った（5000 µg/プレートで最大 3.3 倍）。これらの増加は両実験で認められた。このデータは陽性反応の基準に適合していた。その他の菌株では、S9 ミックスの有無に関わらず、復帰突然変異体数の特記すべき増加は認められなかった。

本試験条件下では、E4 は、*S. typhimurium* TA102 株を用いたエームス試験において、代謝活性化の有無に関わらず変異原性を示すと結論された。

エームス試験 2（ES-T29、TS 表 2.6.7.8.B）

上記の結果を得た後、5000 µg/プレートで認められた沈殿による干渉を除外するため、*S. typhimurium* TA102 株において、DMSO の代わりに 100%エタノールを溶媒及び陰性対照として用い、E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を再度試験した。

細菌を、5 段階の用量（312.5、625、1250、2500 及び 5000 µg/プレート）の E4（3 プレート/用量）に曝露させた。その他の条件は最初のエームス試験（ES-T21）と同様であった。被験物質の調製液の分析は行わず、本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

結果

陰性対照及び陽性対照は、有効な試験の基準に適合した。沈殿も毒性も認められなかった。E4 は、TA102 株において、S9 ミックスの有無に関わらず復帰変異コロニー数を増加させ、2500 及び 5000 µg/プレートでは溶媒対照値の 2 倍に達した（5000 µg/プレートで最大 4 倍）。

本試験条件下では、E4 は、*S. typhimurium* TA102 株を用いたエームス試験において、代謝活性化の有無に関わらず変異原性を示すと結論された。

エームス試験 3（ES-T48、TS 表 2.6.7.8.C）

同じバッチの E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を用い、別の実施施設[7]で 3 試験目のエームス試験を実施した。*S. typhimurium* TA102 株及び *E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いた 2 回の独立した試験において、代謝活性化（フェノバルビタール及び ß-ナフトフラボン誘発ラット肝 S9 ミックス）の存在下及び非存在下で、E4 を試験した。最初の実験は直接プレート法によって実施したが、2 回目の実験はプレインキュベーション法（30 分、37°C）によって実施した。

菌株を、4 又は 5 段階の用量の E4（3 プレート/用量）に曝露させた。

[7] 本試験（ES-T48）の前に、同じ実施施設において非 GLP 試験（ES-T47）を実施した。非 GLP 試験において、E4 は代謝活性化の有無に関わらず、TA102 では 5000 µg/プレートまで陰性であった。しかし、TA102 の陽性対照による復帰変異コロニー数の増加は 1.7 倍に過ぎず、陰性対照の 3 倍の増加という基準を満たさなかった。陽性対照の値が過去のデータの範囲内であったため、試験責任者は試験を許容することを決定したが、陽性対照によって適切な反応が得られなかったため、ES-T47 試験は無効と考えられ、要約は提示しない。

- 最初の実験の WP2 *uvrA* 株では、S9 ミックスの非存在下で 100、1000、3330 及び 5000 µg/プレート、S9 ミックスの存在下で 333、1000、3330 及び 5000 µg/プレート
- 2 回目の実験の WP2 *uvrA* 株及び両試験の TA102 株では、100、333、1000、3330 及び 5000 µg/プレート

E4 は、陰性対照としても用いたエタノールに溶解した。いずれの試験でも、S9 ミックスの存在下及び非存在下で、各菌株に対する適切な陽性対照を用いた。プレートを 37°C で 48±4 時間培養した後、復帰変異コロニー数をカウントした。細胞毒性は、復帰変異コロニー数の減少や背景の菌の生育の減少や透明化に基づいて判定した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

最初の実験では 5000 µg/プレートで、2 回目の実験では 3330 及び 5000 µg/プレートで、S9 ミックスの有無に関わらず一過性の沈殿が認められた。毒性は認められなかった。

最初の実験において、TA102 株の陽性対照は有効な試験の基準を満たさなかった。WP2 *uvrA* 株において、S9 ミックスの有無に関わらず、E4 は復帰突然変異体数を増加させなかった。2 回目の実験において、陰性対照及び陽性対照は有効な試験の基準に適合した。E4 は、S9 ミックスの有無に関わらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させず、陰性であった。

本試験条件下では、E4 は、*S. typhimurium* TA102 株及び E. coli WP2 *uvrA* 株を用いたエームス試験において、代謝活性化の有無に関わらず変異原性を示さないと結論された。

2.6.6.4.1.2 哺乳動物細胞系での *in vitro* 試験

E4 が哺乳動物細胞において遺伝子突然変異を誘発するかどうかを評価するため、2 回のマウスリンフォーマ試験を実施した（ES-T22、ES-T45）。

マウスリンフォーマ試験 1（ES-T22、TS 表 2.6.7.8.D）

L5178Y $TK^{+/-}$マウスリンパ腫細胞を、2 回の独立した実験で E4（バッチ番号：CS02-032A-801）に曝露させた。最初の実験では、5×10^5 細胞/mL の培養細胞を、代謝活性化（Aroclor 1254 誘発ラット肝 S9 ミックス）の存在下又は非存在下で 3 時間処理した。2 回目の実験では、2×10^5 細胞/mL の培養細胞を、S9 ミックスの非存在下では 24 時間、S9 ミックスの存在下では 3 時間曝露させた。処理期間中の細胞は、37°C、5% CO_2 の加湿インキュベーター内で、熱不活性化ウマ血清を 5%（3 時間処理）又は 10%（24 時間処理）添加した RPMI 1640 培地を用いて懸濁培養として維持した。

以下の用量を、0.5%（v/v）の処理容量で添加した。

- 1 回目の実験の S9 ミックスの存在下及び非存在下では 31.3、62.5、125、250、500、750 及び 1000 µg/mL
- 2 回目の実験の S9 ミックスの非存在下では 15.6、31.3、62.5、125、187.5、250 及び 375 µg/mL 並びに S9 ミックスの存在下では 62.5、125、250、500、750、875 及び 1000 µg/mL

E4 は、陰性対照としても用いた DMSO に溶解した。いずれの実験でも、S9 ミックスの存在下及び非存在下で適切な陽性対照を用いた。

曝露後、変異表現型の発現のために 48 時間の培養期間を設けた。発現期間の終了時に、生細胞数［コロニー形成率（CE)］を測定するため、平均 1.6 個/ウェルの細胞を 96 ウェルプレート（2 枚/培養）に播種した。細胞毒性は、補正した相対総増殖率（補正後 RTG）として表した。また、平均 2000 個/ウェルの細胞を 96 ウェルプレート（2 枚/培養）に播種し、小型と大型の変異コロニーを区別して突然変異頻度（MF）を判定した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

陰性対照及び陽性対照で得られた CE 及び MF の値に基づき、本試験は有効であると判断された。いずれの実験においても、500 µg/mL 以上の濃度で沈殿が認められた。

S9 ミックスの非存在下では、3 時間処理後には 750 µg/mL（補正後 RTG：69%）及び 1000 µg/mL（補正後 RTG：15%)、24 時間処理後には 62.5 µg/mL 以上（補正後 RTG：4～51%）で細胞毒性が認められた。3 時間処理後に、1000 µg/mL では誘発突然変異頻度（IMF＝$MF_{処理}$－$MF_{対照}$）が総合的評価ファクター（GEF）の閾値（126×10^{-6}）を上回ったが（IMF：204×10^{-6})、用量反応性が認められなかったため（p＝0.1376、Kendall 順位相関検定)、本実験の結果は陰性と判断された[8]。24 時間処理後には、いずれの用量でも GEF 閾値を超える IMF は認められず、この実験の結果も同様に陰性と判断された。

S9 ミックスの存在下では、両試験とも 750 µg/mL 以上の用量で細胞毒性が認められた（補正後 RTG はそれぞれ 9%～45%及び 7%～64%)。最初の実験では、1000 µg/mL で IMF が GEF 閾値を上回ったが（IMF：961×10^{-6})、細胞毒性が著しく強かった（補正後 RTG が 10%未満)。残りの用量では用量関係性が認められたが（p＝0.0243)、IMF が GEF 閾値を上回ることはなかった。2 回目の実験では、875 µg/mL で IMF が GEF 閾値を上回ったが（IMF：188×10^{-6})、明らかな用量関係性はなかった（p＝0.2931)。いずれの実験においても、データは陽性反応の基準を満たさなかったが、明らかに陰性というわけでもなかった。また、IMF が GEF 閾値を上回ったのは、沈殿が認められた用量のみであった。したがって、S9 ミックスの存在下における結果は不確定であると考えられた。

本試験条件下では、代謝活性化の非存在下のマウスリンフォーマ試験において、E4 は変異原性を示さないと結論された。代謝活性化の存在下での結果は不確定であった。

---

[8] 遺伝毒性試験に関する国際ワークショップの勧告によると、陽性の結果は以下の基準を満たす必要がある：
- 少なくとも 1 つの用量で IMF が GEF（126×10^{-6}）以上である、かつ
- 統計学的に有意な用量に関連した傾向が認められる

強度の毒性（補正後 RTG が 10%未満）で MF の顕著な上昇が認められるが、補正後 RTG として 10%から 20%の間で変異原性のエビデンスが認められない場合、陽性とはみなされない。補正後 RTG が 10%から 20%の間にあたる培養物がないときは、以下の場合に被験物質を陰性とみなすことができる：
- 補正後 RTG として 20%から 25%の間の少なくとも 1 点が陰性であり、補正後 RTG として 20%から 100%の間で陽性反応のエビデンスが認められない、又は
- 補正後 RTG として 25%から 100%の間で陽性反応のエビデンスが認められず、補正後 RTG として 1%から 10%の間に陰性の点がある

マウスリンフォーマ試験 2（ES-T45、TS 表 2.6.7.8.E）

代謝活性化系の存在下でのマウスリンフォーマ試験の結果が確定的ではなく、試験デザインが前版の ICHS2 ガイダンス（ICHS2A）に基づいていたことを考慮し、最新版の ICHS2［ICHS2（R1）］に従って再度試験を実施した。

E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、以下の用量で、0.5%（v/v）の処理容量で添加した。

- 最初の実験の S9 ミックスの非存在下では 0.031、0.063、0.13、0.25、0.5、1 mM（それぞれ 9.5、19、38、76、152、304 µg/mL に相当）、S9 ミックスの存在下では 0.031、0.063、0.13、0.25、0.5、0.75、1 mM
- 2 回目の実験の S9 ミックスの存在下及び非存在下では 0.031、0.063、0.13、0.25、0.5、0.75、1 mM（それぞれ 9.5、19、38、76、152、228、304 µg/mL に相当）

処理条件、陰性対照、陽性対照及び評価基準は、1 回目の実験と同一とした。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

陰性対照及び陽性対照で得られた CE 及び MF の値に基づき、本試験は有効であると判断された。

S9 ミックスの非存在下では、3 時間処理後に細胞毒性は認められなかった。24 時間処理後には、0.5 mM 以上の濃度で細胞毒性が認められた（補正後 RTG：3%～38%）。いずれの処理条件でも、MF が用量依存的に上昇した（Kendall Tau b 相関係数はそれぞれ 0.495 及び 0.497、$p<0.05$）。しかし、IMF（それぞれ 70×10^{-6} 以下及び 42×10^{-6} 以下）が GEF 閾値を上回ることはなく、結果は陽性反応の基準を満たさなかった。

S9 ミックスの存在下では、細胞毒性は認められなかった。いずれの実験でも、MF が用量依存的に上昇した（Kendall Tau b 相関係数はそれぞれ 0.466 及び 0.407、$p<0.05$）。いずれの用量においても、IMF（それぞれ 34×10^{-6} 以下及び 47×10^{-6} 以下）が GEF 閾値を上回ることはなく、結果は陽性反応の基準を満たさなかった。

本試験条件下では、代謝活性化の非存在下又は存在下のマウスリンフォーマ試験において、E4 は変異原性を示さないと結論された。

2.6.6.4.1.3 哺乳動物系での *in vivo* 試験

E4 の *in vivo* 遺伝毒性の可能性については、骨髄小核試験（ES-T37）及び雌 Sprague-Dawley ラットを用いた 2 回のコメット試験で評価した（ES-T46、0030-NC-001）。

骨髄小核試験（ES-T37、TS 表 2.6.7.9.A）

E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、雌 Sprague-Dawley ラット（約 6 週齢、各群 5 例）に 500、1000 又は 2000 mg/kg/日の投与量で単回経口投与した。投与量は、2000 mg/kg を投与した予備的な毒性試験に基づき設定した。当該試験では、死亡や一般状態の所見は認められなかったものの、骨髄の多染性赤血球や正染性赤血球比（PCE/NCE 比）の軽度な低下が認められた。陰性対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（10 mL/kg）を投与した。陽性対照としては、15 mg/kg のシクロホスファミドを単回経口投与した。

投与後 24 又は 48 時間に動物を屠殺し、骨髄塗抹標本を作製した。PCE/NCE 比を求めるため、2000 個の PCE のうち小核を有する PCE（MNPCE）の数を計数し、1000 個の赤血球をスコア化した。血漿中 E4 濃度は、2000 mg/kg を投与したサテライト群のラットを用いて投与後 0.5 及び 3 時間に測定した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

シクロホスファミドは、予想されるとおり MNPCE の頻度を増加させた。

E4 は、最高用量においても、死亡又は一般状態の所見を誘発しなかった。E4 のいずれの投与量においても、MNPCE の頻度の増加はなく、PCE/NCE 比の変化も認められなかった。

2000 mg/kg 投与時の平均血漿中 E4 濃度は、投与後 0.5 時間で 39.2～48.6 μg/mL、投与後 3 時間で 19.5～65.6 μg/mL であり、曝露が確認された。

本試験条件下では、E4 は 2000 mg/kg までの投与量の単回経口投与後に、ラット骨髄細胞の染色体又は分裂装置の損傷を誘発しないと結論された。

コメット試験 1（ES-T46、TS 表 2.6.7.9.B）

雌 Sprague-Dawley ラット（約 5～10 週齢、各群 4 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を 500、1000 及び 2000 mg/kg/日の投与量で、24 時間間隔で 2 回経口投与した。投与量は、2000 mg/kg を投与した予備的な毒性試験に基づき設定した。当該試験では、死亡や一般状態の所見は認められなかった。陰性対照群には、溶媒である 0.5% (w/v)CMC 水溶液（10 mL/kg）を投与した。陽性対照群（各群 3 例を分析）には、ジメチルヒドラジンを 10 mg/kg（肝臓）又は 20 mg/kg（十二指腸）の投与量で単回経口投与した。

最終投与後 3～6 時間の発現時間の後、酵素消化により肝細胞及び十二指腸細胞を単離した。各組織の細胞懸濁液から、動物 1 例につき 6 枚のスライドを作製した。すなわち、非変性のハロー法による細胞毒性試験のために 2 枚、アルカリコメット試験のために 4 枚を作製した。ハロー法による試験では、壊死細胞及びアポトーシス細胞の有無について、各動物の各組織につき 200 個の細胞をスコア化した。コメット試験では、テール強度（テールにおける DNA の割合）、オリーブテールモーメント及び重度に損傷したゴースト細胞の有無について、各動物の各組織につき 150 個の細胞をスコア化した。

血漿中 E4 濃度は、溶媒又は E4 2000 mg/kg を投与したサテライト群のラットを用いて、最終投与後 0.5 及び 3 時間に測定した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

陰性対照及び陽性対照の実験結果は、有効な試験の基準に適合した。

E4 は、最高用量においても、死亡又は一般状態の所見を誘発しなかった。

肝細胞では、E4 は壊死細胞の割合（ハロー法による試験）、ゴースト細胞の割合又はテール強度の中央値（コメット試験）の増加を誘発しなかった。

十二指腸細胞では、ハロー法による試験では壊死細胞の割合の増加は認められなかった。しかし、コメット試験では、1000 及び 2000 mg/kg でゴースト細胞の割合が増加した。E4 は、

500 mg/kg の投与量ではテール強度の中央値を増加させたが、それよりも高い 2 用量では増加は認められなかった。

2000 mg/kg 投与時の平均血漿中 E4 濃度は、最終投与後 0.5 時間で 39.8 µg/mL、3 時間で 28.5 µg/mL であり、曝露が確認された。溶媒投与群では、これらの時点で微量の被験物質（1.334 及び 1.338 ng/mL）が検出されたが、本試験における遺伝毒性の評価に影響はないと考えられた。

本試験条件下では、E4 は肝臓で遺伝毒性活性を示さないと結論された。E4 の十二指腸における遺伝毒性活性は、投与量に関連して通常とは異なる反応が認められたため、不確定であると考えられた。

コメット試験 2（0030-NC-001、TS 表 2.6.7.9.C）

より広範囲な投与量を用いて再度コメット試験を実施し、毒性をより詳細に評価した。E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、雌 Sprague-Dawley ラット（約 7～8 週齢、各群 5 例）に 62.5、125、250、500、1000 及び 2000 mg/kg/日の投与量で、0 時間及び 21 時間に 2 回経口投与した。陰性対照群には、溶媒である 0.5% (w/v)CMC 水溶液（10 mL/kg）を投与した。陽性対照群には、エチルメタンスルホン酸を 250 mg/kg の投与量で単回経口投与した。

最終投与後 3～4 時間の発現時間の後、機械的な方法[9]により肝細胞及び十二指腸細胞を単離した。各組織の細胞懸濁液から、動物 1 例につき 4 枚のスライドを作製した。すなわち、非変性のハロー法による細胞毒性試験のために 1 枚、アルカリコメット試験のために 3 枚を作製した。

ハロー法による試験では、ハローを有する細胞（壊死細胞又はアポトーシス細胞）の有無について、各スライドにつき 100 個の細胞をスコア化した。コメット試験では、テール強度、オリーブテールモーメント及びゴースト細胞の有無について、各動物の各組織につき 100 又は 200 個（溶媒及び 2000 mg/kg 群）の細胞をスコア化した。

血漿中濃度は、サテライト群のラットを用い、溶媒又は E4 の最終投与後 0.5 及び 3 時間に測定した。主試験の動物からは、血液生化学的検査のために終了時に血液検体を採取した。また、病理組織学的検査のため、肝臓及び十二指腸を、主試験の動物からは Day 2 に、サテライト群の動物からは Day 3 及び 5（2 回目の投与から 1 日後及び 3 日後）に採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

陰性対照及び陽性対照実験結果は、有効な試験の基準に適合した。

E4 は、最高用量においても、死亡又は一般状態の所見を誘発しなかった。血液生化学的パラメータの変化（全投与群におけるアルカリホスファターゼ及びクレアチニンの増加、並びに総コレステロールの減少）は、コメット試験に影響しないと考えられた。

E4 の投与後、肝細胞又は十二指腸細胞のいずれにおいても、ハローを有する細胞の割合又はゴースト細胞の割合の用量依存的な増加は認められなかった。

[9] 最初のコメット試験では、使用した酵素消化によって著しい損傷を受けた細胞が除去されたため、通常とは異なる用量反応が生じ、1000 及び／又は 2000 mg/kg 群のコメットパラメータが交絡された可能性があると考えられた。したがって、転帰に対するそのような影響を除外するため、酵素消化の代わりに機械的な方法を使用し、追加の毒性パラメータを設けた。

コメット解析では、E4 による肝細胞又は十二指腸細胞のテール強度の中央値又はオリーブテールモーメントに対する影響は認められなかった。処置群と溶媒対照群との間に統計学的有意差はなく、個々のデータは全て背景データの範囲内であった。

病理組織学的検査では、Day 2 に用量依存的な肝細胞の有糸分裂の増加が認められたが、Day 5 までに背景値まで回復した。TUNEL 染色（アポトーシスを示す）の増加が、Day 2 には 1000 及び 2000 mg/kg の投与量で、Day 3 及び 5 には 250 mg/kg 以上の投与量で認められた。肝臓において、この初期の増殖反応の後にアポトーシスによる回復が認められたことは、生体異物の投与に対する正常な適応反応と考えられた。十二指腸では、Day 2 及び 3 に軽微から軽度な陰窩の過形成が認められたが、Day 5 までにほぼ完全に回復した。この所見は、迅速な細胞のターンオーバーと一致していると考えられた。いずれの組織においても、E4 による細胞毒性のエビデンスは認められなかった。

2000 mg/kg 投与時の平均血漿中 E4 濃度は、最終投与後 0.5 時間で 22.8 µg/mL、3 時間で 14.5 µg/mL であり、曝露が確認された。溶媒投与群におけるこれらの時点の値は LLOQ 未満であった。

本試験条件下では、E4 は 2000 mg/kg/日までの投与量で経口投与したとき、肝臓又は十二指腸において DNA 損傷を誘発しないと結論された。

2.6.6.4.2 ドロスピレノンの遺伝毒性試験

In vitro において、DRSP は、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 及び TA100 株を用いたエームス試験で、直接プレート法では 5000 µg/プレートまで、プレインキュベーション法では 2500 µg/プレートまで、代謝活性化の有無に関わらず陰性であった。全ての菌株において、直接プレート法では 2500 µg/プレート以上、プレインキュベーション法では 1000 µg/プレート以上の濃度が、沈殿や細胞毒性が認められる濃度であった（Lang, 1993）。

チャイニーズハムスターV79 細胞を、S9 ミックスの非存在下では最大 125 µg/mL、存在下では最大 70 µg/mL の濃度の DRSP に 4 時間曝露させた HGPRT 試験では、最高用量で顕著な細胞毒性が認められたが、変異原性反応のエビデンスは認められなかった（Lang, 1993）。

DRSP は、*in vitro* の雌雄ラットの初代培養肝細胞における不定期 DNA 合成を、1～50 µM の濃度範囲で濃度依存的に増加させた。しかし、男女ドナーからのヒト肝細胞では、DRSP はこの濃度範囲で不定期 DNA 合成を誘導しなかった（Martelli, 2003）。

DRSP は、S9 ミックスの非存在下では 25 µg/mL、S9 ミックスの存在下では 100 µg/mL までの濃度で試験したとき、ヒト末梢血リンパ球において染色体異常を引き起こさなかった。最高濃度では、沈殿又は分裂指数の約 50%の低下が認められた（Reimann, 1996）。

In vivo では、DRSP は、雌雄マウスに 1000 mg/kg までの投与量で単回強制経口投与した小核試験において陰性であった。この投与量では、毒性の徴候が誘発された（軽度から中等度の感情鈍麻）（Reimann, 1996）。

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 エステトロールのがん原性試験

マウス及びラットを用い、2 年間のがん原性試験を実施した。がん原性試験のデザインは、FDA の発がん性評価委員会（Executive Carcinogenicity Assessment Committee）による SPA（Special Protocol Assessment）で承認された（FDA, 20[redacted]）。

2.6.6.5.1.1 マウス（0031-NC-004、TS 表 2.6.7.10A）

雌 CD-1 マウス（6 週齢、各群 100 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-1203）を、0.125、0.25、0.5 及び 1 mg/kg/日の投与量で 104 週間強制経口投与した。100 例の対照動物の 2 群には、溶媒である 0.5% (w/v) CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。対照群 1 は、E4 投与群とともに飼育した。対照群 2 は、様々な予防措置にも関わらず対照群 1 で E4 の交差汚染が生じた場合に備え、別の飼育室で飼育した。対照群 1 には 25 例の無処置マウスのサテライト群（サテライト群 2）を追加し、混入がないことを確認するため、月 1 回検体を採取した（トキシコキネティクス時を除く、下記参照）。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査及び血液生化学的検査であった。6 ヵ月目以降は、2 週間ごとに腫瘤の有無を触診した。剖検では、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（サテライト群 1、各群 18 例）を用いて実施し、Week 12 及び 25 の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（6 例）からは、投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} は全ての投与量で 0.5 時間であった。サテライト群の対照動物及びサテライト群 2 の動物の検体中の被験物質の濃度は LLOQ 未満であり、混入がなかったことが確認された。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

モニタリングしたいずれのパラメータにおいても、対照群 1 と対照群 2 との間に明らかな差は認められなかった。

E4 の投与は、全生存率又は平均投与期間に影響を及ぼさなかった。生存率は、対照群 1 で 36%、対照群 2 で 38%、0.125 mg/kg/日群で 36%、0.25 mg/kg/日群で 26%、0.5 mg/kg/日群で 42%、1 mg/kg/日群で 26%であった。平均投与期間は、対照群 1 及び 2 では 87～90 週間、E4 投与群では 82～89 週間であった。

死因に関して、0.25 mg/kg/日以上の投与量では、乳腺腫瘍及び子宮や膣脱（子宮や子宮頸部腫瘍の存在による）による死亡率が投与に関連して上昇した。

投与に関連した一般状態の所見は、膣、泌尿生殖器や外陰部の液体分泌物及び脱出であった。

全投与期間を通じた体重増加量は、対照群 1 と比較して 0.5 mg/kg/日群では 15%、1 mg/kg/日群では 33%高かった。特に 1 mg/kg/日群では、投与開始後 13 週間の平均体重において統計学的有意差が認められた。その後、対照との差は変化しなかった。

0.25 mg/kg/日以上の投与量では摂餌量の増加が認められ、投与 2 年目には数回にわたり 0.5 及び 1 mg/kg/日群で 10%を超える増加が認められた。

眼科学的検査では、投与に関連した所見は認められなかった。

白血球百分率に関しては、Week 52 に好中球の割合の用量依存的な増加及びリンパ球の割合の減少が認められた。Week 79 に好中球の割合の増加及びリンパ球の割合の減少が記録されたのは、1 mg/kg/日の高用量群のみであり、程度も Week 52 と比較して低かった。計画屠殺時（Week 105）に、0.25 mg/kg/日以上の投与量ではリンパ球数の減少が認められ、網赤血球数（相対数及び絶対数の両方）は、対照群と比較して 1 mg/kg/日群で高かった。

計画屠殺時（Week 105）の血液生化学的検査では、0.25 mg/kg/日以上の投与量でグルコース値の低下が認められた。

0.25 mg/kg/日以上の投与量では、触診可能な腫瘤が認められた雌の数が対照群よりも多かった。また、触診可能な腫瘤（腫瘍として確認）の数も多く、対照群よりも早い時点で認められた。

肉眼的所見として、0.25 mg/kg/日以上の投与量では子宮及び腟において、1 mg/kg/日の投与量では下垂体において、赤色や白色腫瘤の発現率が上昇した。これらの腫瘤は腫瘍と相関していた。0.25 mg/kg/day 以上の投与量で、子宮内膜及び間質ポリープの病理組織学的所見を伴う腟脱が認められた。全ての投与量で子宮の拡張及び肥大が認められ、腺の嚢胞性過形成と相関していた。1 mg/kg/日群では、下垂体の腫大及び赤変色の発現率が上昇し、それぞれ過形成及び血管拡張やうっ血の病理組織学的所見と関連していた。同じ投与量では、甲状腺の肥大の発現率が上昇し、拡張や嚢胞状濾胞と相関していた。

病理組織学的検査により、以下の腫瘍性、非腫瘍性増殖性、及び非増殖性の所見が明らかになった：

- 腫瘍性所見
  - 子宮及び子宮頸部：0.25 mg/kg/日以上の投与量における子宮及び子宮頸部の上皮腫瘍（腺ポリープ、子宮内膜腺腫及び子宮内膜腺癌）並びに子宮間質腫瘍（子宮内膜間質ポリープ、及び子宮内膜間質肉腫）の増加
  - 乳腺：0.5 mg/kg/日以上の投与量における乳腺腫瘍（腺癌、良性及び悪性の腺表皮癌）の増加
  - 下垂体：1 mg/kg/日における下垂体前葉腫瘍（腺腫）の増加
- 非腫瘍性増殖性所見
  - 子宮：全ての投与量における腺の嚢胞状過形成の増加
  - 乳腺：全ての投与量における腺房細胞過形成及び異型性過形成の増加
  - 下垂体：1 mg/kg/日における前葉の過形成の増加
  - 肺：1 mg/kg/日における気管支肺胞過形成の増加
- 非増殖性所見
  - 子宮、子宮頸部、腟：全ての投与量における子宮脱、子宮頸部扁平上皮及び腟扁平上皮の増加、並びに腟萎縮の減少；0.25 mg/kg/日以上の投与量における腟粘液産生の減少；0.5 mg/kg/日以上の投与量における子宮腺筋症及び腟脱の増加、並びに子宮頸部萎縮の減少
  - 乳腺：全ての投与量における導管の硝子物質の増加；0.5 mg/kg/日以上の投与量における乳腺嚢胞の増加
  - 下垂体：0.5 mg/kg/日以上の投与量における血管拡張の増加；1 mg/kg/日におけるうっ血の増加
  - 副腎：全ての投与量における皮髄境界部色素の増加；0.25 mg/kg/日以上の投与量における球状層のびまん性肥大の増加

脳：	1 mg/kg/日における下垂体腫瘍による圧迫の増加
肝臓：	1 mg/kg/日における造血、ヘモジデリン色素沈着及びクッパー細胞中の色素沈着の増加；0.25 mg/kg/日以上の投与量における肝細胞空胞化の減少
脾臓：	0.5 mg/kg/日以上の投与量における造血及びヘモジデリン色素沈着の増加
胸骨、大腿骨：	全ての投与量における胸骨及び大腿骨の骨線維化病変の増加
胃：	0.25 mg/kg/日以上の投与量における腺の拡張の増加
甲状腺：	1 mg/kg/日における拡張や嚢胞状濾胞の増加

体重増加及び体重増加量の増加の基準に基づき、本試験では MTD に達したと判断された。

本試験の条件下では、子宮及び子宮頸部、乳腺及び下垂体において観察された腫瘍の所見に基づき、E4 は 0.25 mg/kg/日以上の投与量で強制経口投与したマウスにおいてがん原性を示すと考えられた。

0.125 mg/kg/日の投与量では、がん原性は認められなかった。この投与量における投与 25 週の $AUC_{0\text{-}last}$ は 4.60 ng·hr/mL、C_{max} は 3.75 ng/mL であった。

2.6.6.5.1.2 ラット（0031-NC-003、TS 表 2.6.7.10B）

雌 Wistar Han ラット（6 週齢、各群 100 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-1203）を 0.08、0.27 及び 0.8 mg/kg/日の投与量で 105 週間強制経口投与した。100 例の対照動物の 2 群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。対照群 1 は、E4 投与群とともに飼育した。対照群 2 は、様々な予防措置にも関わらず対照群 1 で E4 の交差汚染が生じた場合に備え、別の飼育室で飼育した。対照群 1 には 25 例の無処置マウスのサテライト群（サテライト群 2）を追加し、混入がないことを確認するため、月 1 回検体を採取した（トキシコキネティクス時を除く、下記参照）。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査及び血液生化学的検査であった。対照群及び 0.8 mg/kg/日群の雌では、Week 13、26 及び 52 に性周期の段階を判定した。6 ヵ月目以降は、2 週間ごとに腫瘤の有無を触診した。剖検では、肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（サテライト群 1、各群 9 例）を用いて実施し、Week 12 及び 25 の投与前並びに投与後 0.5、1、3、6 及び 12 時間に検体を採取した。対照のサテライト群（3 例）からは、投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

T_{max} は全ての投与量で 0.5 時間であった。サテライト群の対照動物及びサテライト群 2 の動物の検体中濃度は LLOQ 未満であり、混入がなかったことが確認された。本試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

モニタリングしたいずれのパラメータにおいても、対照群 1 と対照群 2 との間に明らかな差は認められなかった。

全生存率及び平均投与期間は、対照群と E4 投与群とで同様であった。生存率は、対照群 1 及び 2 ではそれぞれ 69%及び 65%、E4 投与群では 64%～75%であった。平均投与期間は、対照群 1 及び 2 では 96～98 週間、E4 投与群では 99～101 週間であった。

主な死因は、対照群を含む全群で下垂体前葉の腺腫であった。死亡に至った下垂体腺腫の件数や割合は、全ての投与量の E4 投与群で増加していた。0.08 及び 0.8 mg/kg/日群では、この増加は、下垂体肥大の発現率の上昇、並びに脳室拡張及び脳圧迫の発現率及び重症度の上昇と相関していた。E4 投与群における死因としての発現率が高かった理由は、下垂体腫瘍のサイズが大きかったためであったが、この腫瘍の全体的な発現率の上昇は認められなかった。

対照群を含む全群における一部の死亡は、乳腺の腫瘍によるものであった。投与に関連した可能性があった乳腺腺癌を除き、発現率と投与との明らかな関連性は認められなかった。

全ての投与量の E4 投与群における非腫瘍性の死因には、子宮の炎症があった。影響を受けた動物では、子宮の肉眼的拡張及び液状の黒色や褐色内容物が認められ、軽度から顕著な炎症及び出血の病理組織学的所見と相関していた。

投与に関連した一般状態の所見又は眼科学的検査所見は認められなかった。

全ての投与量で、対照群 1 と比較して体重増加量が減少した。2 つの高用量群（0.27 及び 0.8 mg/kg/日）の試験の最初の 12～18 ヵ月間における体重増加量の減少は 10%以上であり、全投与期間ではほぼ 10%であった。体重増加量の減少によって、試験期間を通じて平均体重がわずかに低値を示したが、これらの投与量では投与開始後最初の 1 年間において最も顕著であった。この影響は、摂餌量に対する初期の影響と一致していた。

計画屠殺時（Week 105）に、E4 の 0.27 及び 0.8 mg/kg/日群では網赤血球数（相対数及び絶対数の両方）の増加が認められた。血液生化学的検査では、全ての投与量で総コレステロール値の低下が、0.27 mg/kg/日以上の投与量ではトリグリセリド値の上昇が示された。全ての投与量で無機リンの増加が、0.8 mg/kg/日群ではアルカリホスファターゼの増加及びカルシウムのわずかな増加が認められた。

E4 の 0.8 mg/kg/日群の雌では、性周期の障害は認められなかった。特記すべき唯一の所見として、Week 26 には 10 例中 3 例で性周期が停止していた。

触診可能な腫瘤の発現率、部位及び発現時期は、E4 投与群と対照群とで同様であった。

肉眼的所見として、0.27 や 0.8 mg/kg/日群では子宮の嚢胞及び拡張の発現率が上昇し、腺の嚢胞状過形成の病理組織学的所見と相関していることが多かった。全ての投与量で子宮の赤や黒変色及び黒褐色の内容物や分泌物、並びに腟の赤色内容物が認められ、子宮の炎症及び出血と関連していた。卵巣では、E4 の全ての投与量で、肉眼的嚢胞（病理組織学的検査で「他に特定されない」）の発現率が上昇した。0.08 及び 0.8 mg/kg/日群では、下垂体の黒や褐色や赤変色及び腫大の発現率が高く、脳室拡張及び脳圧迫の病理組織学的所見と関連していた。0.27 mg/kg/日以上の投与量では、副腎の肥大が認められ、皮質の嚢胞性変性及び皮質肥大と相関していた。また、変色［白色化（巣）の減少及びびまん性の褐色化の増加］が認められ、球状層の肥大の減少の病理組織学的所見と相関していた。

病理組織学的検査により、以下の腫瘍性、非腫瘍性増殖性、及び非増殖性の所見が明らかになった：

- 腫瘍性所見

乳腺：	0.8 mg/kg/日における乳腺腺癌及び線維腺腫内腺癌の増加 [10]

- 非腫瘍性増殖性所見

乳腺：	腺房細胞過形成の増加（全ての投与量で発現率が上昇、0.8 mg/kg/日では重症度が上昇）
子宮：	全ての投与量における腺の嚢胞状過形成の発現率及び重症度の上昇、並びに 0.27 mg/kg/day 以上の投与量における異型性過形成の発現率の軽微な上昇
卵巣：	0.27 mg/kg/日以上の投与量における間質細胞過形成の減少
肝臓：	0.27 mg/kg/日以上の投与量における明細胞巣の発現率の上昇、並びに好塩基性細胞巣の発現率及び重症度の低下

- 非増殖性所見

子宮、子宮頸部、膣：	全ての投与量における子宮の炎症（全般的に急性、限局性で、嚢胞性の腺過形成が認められた動物の拡張した腺に局在）の増加；全ての投与量における子宮及び膣の萎縮の発現率の低下、並びに子宮頸部及び膣上皮の粘液産生の発現率及び重症度の上昇
卵巣：	0.27 mg/kg/日以上の投与量における嚢胞の増加；0.8 mg/kg/日における褐色色素の重症度の上昇並びに萎縮の発現率及び重症度の軽微な上昇
肝臓：	全ての投与量における限局性の空胞化及び褐色色素沈着の発現率の上昇；0.8 mg/kg/日における肝細胞肥大の発現率及び重症度の上昇
副腎：	全ての投与量における束状層の嚢胞変性及び皮髄境界部色素の重症度の上昇；0.27 mg/kg/日以上の投与量におけるびまん性皮質肥大の発現率及び重症度の上昇、並びに球状層の限局性肥大の発現率及び重症度の低下
脳：	0.08 及び 0.8 mg/kg/日における大型の下垂体腫瘤 [11]による圧迫及び脳室拡張の発現率や重症度の上昇（剖検時の下垂体肥大の発現率の上昇と相関）
脾臓：	全ての投与量における褐色色素の発現率及び重症度の上昇；0.27 mg/kg/日以上の投与量における造血の重症度のわずかな上昇
腸間膜リンパ節：	0.8 mg/kg/日におけるリンパ組織の萎縮の発現率及び重症度の上昇；0.27 mg/kg/日以上の投与量における好酸球浸潤の発現率の上昇
胸腺：	0.27 mg/kg/日以上の投与量におけるリンパ組織の萎縮の重症度の上昇及び上皮過形成の発現率の上昇

体重増加量の減少の基準に基づき、本試験では MTD に達したと判断された。

本試験の条件下では、乳腺において観察された腫瘍性所見に基づき、E4 は 0.8 mg/kg/日の投与量で強制経口投与したラットにおいてがん原性を示すと考えられた。

0.27 mg/kg/日の投与量では、がん原性は認められなかった。この投与量における投与 25 週の $AUC_{0\text{-last}}$ は 18.8 ng·hr/mL、C_{max} は 9.99 ng/mL であった。

[10] Lin 及び Rahman（1998）によると、この変化は統計学的に有意ではなかったが、0.8 mg/kg/日群の発現率は、対照群や他の投与群に比べて明らかに高かった。エストロゲンはラットで乳腺腫瘍の発現率を上昇させることが知られているため、これは投与に関連した可能性が高いと考えられる。

[11] E4 投与群における下垂体腺腫の発現率は、対照群と同様であった。

2.6.6.5.2 ドロスピレノンのがん原性試験

DRSP のがん原性試験に関する公表文献は確認されていない。

プロゲスチンのマウスやラットにおけるがん原性試験では乳腺、肝臓及び下垂体の腫瘍の増加率を高めることが知られている（IARC, 2012c）。ホルモン補充療法のための長期間の DRSP 及びエストラジオール（E2）の併用投与による無作為化二重盲検多施設臨床試験の安全性情報が報告されている（Archer, 2005）。その結果、13 周期（1 周期 28 日間）の E2 単剤又は、E2 及び DRSP の併用投与により、E2 単剤に比べ、E2 及び DRSP の併用群で子宮内膜の肥厚及び過形成の低減効果が示され、その他の安全性に関する問題も認められなかったことが報告されている。

ヒトにおけるプロゲスチンと乳がんとの関係を検討したコホート研究において、40 歳以上の閉経前の女性でプロゲスチンのみの長期の服用で乳がんのリスクが高まることが報告されている（Fabre, 2007）。

IARC はプロゲスチンのみの避妊薬を「ヒトに対する発がん性が疑われる（Group 2B）」に分類しており（IARC, 1999）、エストロゲン及びプロゲスチンの配合剤の避妊薬及び閉経後ホルモン療法薬を「ヒトに対する発がん性が認められる（Group 1）」に分類している（IARC, 2012b、2012c）。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 エステトロールの生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1.1 受胎能回復性試験

E4 による受胎能の回復に対する影響は、ラットを用いた 2 試験で評価した。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の代わりに受胎能回復試験を実施する旨、並びに本試験の実験デザインについては、FDA の合意が得られている（FDA, 20[redacted]）。ウサギに交尾の 4 日前から G9 まで投与した非 GLP 試験において、E4 は排卵のみならず着床も阻害することが示されたため（ES-T04、TS 表 2.6.7.11）、ラットに G0 から G6 まで投与する初期胚発生に関する別試験は有用とは考えられず、実施しなかった。

受胎能回復性試験 1（ES-T27、TS 表 2.6.7.12.A）

E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、雌 Wistar Han ラット（10 週齢、各群 24 例）に 0.17、0.5 及び 1.5 mg/kg/日の投与量で 4 週間強制経口投与し、その後 3 週間の休薬回復期間を設けた。投与量は、ラットにおける排卵抑制の ED_{50}（約 0.2 mg/kg、*bid*、4 日間）に基づき選択した（試験番号：PR3015 及び PR3026）。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。休薬期間の後、雌を未処置の雄（8 週齢、各雌に対し 1 例）と交尾が確認されるまで、又はそれぞれ別の雄と各 2 週間、連続して 2 回交配させた。交尾後 15 日に雌を屠殺した。

観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、体重及び摂餌量であった。性周期の段階は、投与終了前の 2 週間、休薬期間中及び交尾の確認までの交配期間中に観察した。屠殺時に雌を肉眼的検査に供し、子宮を摘出した。黄体数、着床数及び受胎産物数を記録し、着床を生存胚若しくは死亡胚，又は早期吸収胚、若しくは後期吸収胚に分類した。トキシコキネティクスは実施しなかった。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

E4 による死亡はなく、投与に関連した一般状態変化又は肉眼的所見も認められなかった。

投与期間中に、用量依存的な体重増加量の減少が認められ、このため 0.5 及び 1.5 mg/kg/日群では投与終了時の体重が減少した。体重増加量の減少は、最初の 2 週間における摂餌量の減少と関連していた。

回復期間中に、体重増加量は用量依存的に増加し、体重は対照値まで回復した。しかし、高用量群の全体的な体重増加量（Day 1～50）は低いままであった。回復期間中の摂餌量は、対照群と同様であった。

妊娠期間中には、用量依存的な体重増加量及び摂餌量の減少が再び認められ、中用量群及び高用量群では交尾後 15 日の体重が減少した。

0.5 及び 1.5 mg/kg/日群では、投与期間中に性周期が停止した雌の数が多く（対照群の 24 例中 1 例に対して、それぞれ 24 例中 4 例及び 24 例中 9 例）、1.5 mg/kg/日群では平均発情期間が 3 日間以上持続することが多かった（対照群の 0.0 回に対して 1.3 回）。これらの影響に伴い、発情後期にある雌の割合が用量依存的に増加し（対照群の 27.1%に対し、0.17、0.5 及び 1.5 mg/kg/日群でそれぞれ 28.6%、30.1%及び 36.6%）、発情休止期にある雌の割合が減少した（対照群の 32.7%に対し、0.17、0.5 及び 1.5 mg/kg/日群でそれぞれ 29.8%、25.9%及び 15.8%）。性周期の平均期間に対する有意な影響は認められなかった。性周期は投与中止後 1 週間以内に対照値まで回復し、休薬期間の後は対照群と投与群との間に差は認められなかった。

E4 は、生殖パラメータ、受胎率及び妊娠率、又は着床データに明らかな影響を及ぼさなかった。しかし、妊娠した雌の数は非常に少なく、対照群を含む全群で着床前後の胚死亡率が高かったため、明確な結論を得ることはできなかった。これらの所見は、本試験で交配に使用した雄の性成熟が不完全であったためであった。これは、実施施設の非 GLP 試験（[redacted]）において、8 週齢の雄ラットでは、12 週齢の雄ラットの生殖能力と比較して、精巣上体の精子数及び運動性の精子細胞数が少なく、結果として雌 1 例あたりの妊娠率が低下し、平均着床痕が減少したことにより確認された。

本試験条件下では、母体の一般毒性及び性周期に関する E4 の NOAEL は 0.17 mg/kg/日と結論された。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する NOAEL は確認できなかった。

受胎能回復性試験 2（ES-T43、TS 表 2.6.7.12.B）

雌 Wistar Han ラットを用いた E4（バッチ番号：CS02-032Am-1001）の受胎能回復性試験を、同じ投与量及び実験デザインによって再度実施したが、以下の点を変更した：

- 雌を、13 週齢（前回は 8 週齢）の未処置の雄と交配させた
- 雌を、交尾が確認されるまで又はそれぞれ別の雄と各 3 日間連続して 3 期（前回はそれぞれ別の雄と各 2 週間連続して 2 期）交配させた
- 性周期に対する E4 の影響はモニタリングしなかった
- 雌を交尾後 14 日（1 例）又は 15 日に屠殺した

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

予定外の死亡、投与に関連した一般状態の変化及び剖検時の肉眼的所見は認められなかった。

投与期間中に、用量依存的な体重増加量の減少が認められ、投与終了時の体重がやや減少した。最初の 2 週間は、摂餌量が減少した。

休薬期間中の投与群の体重、体重増加量及び摂餌量は、対照群と比較して有意に異なっていなかった。しかし、中用量群及び高用量群の全体的な体重増加量（Day 1～50）は低いままであった。

妊娠期間中に、E4 の投与による体重、体重増加量又は摂餌量に対する有意な影響は認められなかった。

E4 は、交尾率、受胎率及び妊娠率、又は着床データに対して影響を示さなかった。

本試験条件下では、母体の一般毒性に関する E4 の NOAEL は 0.5 mg/kg/日と結論された。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する NOEL は、1.5 mg/kg/日と結論された。

ウサギにおける排卵及び着床の抑制（ES-T04、TS 表 2.6.7.11）

E4 による排卵及び着床に対する影響を、雌のニュージーランドホワイトウサギにおいて評価した。ウサギ（各群 3 例）に、E4 を 0.01、0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg *bid* の投与量で、交尾の 4 日前から G9 まで強制経口投与した。対照群には、溶媒である無菌水性懸濁溶媒（蒸留水、塩化ナトリウム、ベンジルアルコール、Tween 80 及び CMC；1 mL/kg）を投与した。

黄体数及び着床数を測定した。

本試験は GLP には非適用試験であった。

結果

1.0 mg/kg *bid* 投与群では、排卵が認められたのは 1 例のみであり、黄体は 3 個に過ぎなかった。E4 0.1 mg/kg *bid* 以上の投与量で、着床は完全に阻害された。排卵抑制及び着床抑制に対する経口投与の ED_{50} は、それぞれ 0.735 mg/kg *bid* 及び 0.055 mg/kg *bid* と算出された。

0.1 mg/kg/日の投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 12.1 ng·hr/mL、C_{max} は 4.11 ng/mL であった。1 mg/kg/日の投与量における G9 の $AUC_{0\text{-last}}$ は 83.9 ng·hr/mL、C_{max} は 17.8 ng/mL であった。トキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

2.6.6.6.1.2 胚・胎児発生に関する試験

E4 の胚・胎児発生に関する試験は、ラット及びウサギを用いて実施した。

ラット

Wistar Han ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験の前に、それぞれ 30～90 mg/kg/日及び 0.1～10 mg/kg/日の投与量で 2 回の用量設定試験を実施した（ES-T01 及び ES-T02；TS 表 2.6.7.11）。10 mg/kg/日以上の投与量では全胚・胎児死亡が認められ、3 mg/kg/日では着床後死亡率が上昇した。母動物では、0.1 mg/kg/日以上の投与量で体重増加量の減少が、1 mg/kg/日以上の投与量で摂餌量の減少が認められた。これらのデータに基づき、主試験の高用量としては 3 mg/kg/日を選択した。これら 2 回の用量設定試験のトキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2.項に示す。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（ES-T03、TS 表 2.6.7.13.A）

雌 Wistar Han ラット（9～11 週齢、交配雌各群 24 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を 0.3、1 及び 3 mg/kg/日の投与量で、G6 から G17（両日を含む）まで強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。雌は G20 に屠殺した。

母動物の観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、体重及び摂餌量であった。屠殺時に雌を肉眼的検査に供し、妊娠状態及び妊娠子宮重量を記録した。子宮内容物を、黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数について観察した。胎児の体重及び性別を記録し、外表、内臓及び骨格の肉眼的異常について検査した。

トキシコキネティクスは実施しなかったが、GLP を遵守した用量設定試験において実施した。本試験も、用量設定試験と同様に GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は表示値の許容範囲内であったが、例外として、試験開始時の 0.3 及び 1 mg/kg/日群の 1 回目の測定値は範囲外であった（それぞれ表示値の 111%及び 112%）。

対照群及び E4 投与群で妊娠した雌の数は、それぞれ 20、16、23 及び 19 例であった。

5 例の雌は早期屠殺に至った。0.3 mg/kg/日群の雌 1 例[12]は、一般状態の不良のため G6 に屠殺となった。剖検時に、膣が直腸に重度に癒着していることが認められた。3 mg/kg/日群の雌 4 例は、流産（流産の徴候）及び一般状態の悪化のために G14、G18、G18 及び G20 に屠殺となった。

投与に関連した母動物の一般状態の所見は認められなかった。全ての E4 投与群で、投与期間を通じて体重増加量及び摂餌量の用量依存的な減少が認められた。剖検時に、1 又は 3 mg/kg/日群の数例で胎盤の肥大又は肥厚が認められたが、投与による平均胎盤重量に対する影響は認められなかった。妊娠子宮重量も投与の影響を受けなかった。

計画屠殺時まで生存した雌のうち 10 例で全胚・胎児死亡が認められ、この内訳は 3 mg/kg/日群の 7 例、対照群の 1 例、並びに 0.3 及び 1 mg/kg/日群の各 1 例であった。

対照群及び E4 投与群で G20 に生存胎児が認められた雌の数は、それぞれ 19、15、22 及び 8 例であった。生存胎児が認められた雌では、平均黄体数又は着床数、着床前胚死亡率又は生存胎児数に対する投与による毒性作用は認められなかった。3 mg/kg/日群では、対照群と比較して着床後胚死亡率が上昇し、胎児体重が減少した。E4 の投与による性比に対する影響は認められなかった。

対照群の 2 母体の胎児 2 例、1 mg/kg/日群の 5 母体の胎児 6 例、3 mg/kg/日群の 6 母体の胎児 8 例において、胎児の形態異常が認められた。1 及び 3 mg/kg/日群で観察された異常の多くは、長骨（上腕骨、橈骨）及び肩甲骨の短縮、肥厚及び弯曲に関連したものであり、実施施設で観察される自然発生率を上回っていた。外表検査では、1 mg/kg/日群で影響が認められた胎児のうち 1 例[13]で前肢及び後肢の重度の短縮が認められ、これらの群では足首関節の異常回転及び重度の屈曲がある胎児も数例認められた。0.3 mg/kg/日群では、形態異常を有する胎児は認められなかった。

12 この雌は妊娠動物数には含めなかった。
13 この特定の胎児では複数の形態異常が認められた。

胎児の外表、内臓及び骨格の変異の全体的な発現率は、概して投与による影響を受けなかった。1 及び 3 mg/kg/日群では、胸骨分節の不完全骨化及び未骨化の増加、並びに肋骨の結節形成及び波状の増加が認められた。

本試験における胚・胎児発生に関する NOAEL は、0.3 mg/kg/日と判断された。母動物の一般毒性に関する NOAEL は、全ての E4 投与群で対照群に比べ、体重増加量及び摂餌量の用量依存的な減少が認められたことから 0.3 mg/kg/日未満であった。なお、生存胎児を有する母体の体重増加量及び摂餌量の減少は、1 及び 3 mg/kg/日群で統計学的に有意であったことから、NOAEL は 0.3 mg/kg/日に近いと推定される。母動物の生殖能に関する NOAEL は 1 mg/kg/日であった。

ウサギ

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の前に、2 回の用量設定試験を実施した（ES-T04 及び ES-T16；TS 表 2.6.7.11）。最初の用量設定試験では、雌ウサギに E4 を 0.01 mg/kg *bid* 以上の投与量で交尾の 4 日前から G9 まで（両日を含む）投与したところ、着床は完全に阻害された（2.6.6.6.1.1 項参照）。2 回目の用量設定試験では、E4 を 0.06 mg/kg/日以上の投与量で G7 から G15 まで（両日を含む）投与したところ、0.6 mg/kg/日の投与量で着床数が減少し、着床物のサイズも減少した。これらのデータに基づき、主試験の高用量としては 0.45 mg/kg/日を選択した。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（ES-T19、TS 表 2.6.7.13.B）

E4（バッチ番号：CS02-032A-801）を、雌ニュージーランドホワイトウサギ（18～20 週齢、交配雌各群 20 例）に、0.05、0.15 及び 0.45 mg/kg/日の投与量で強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（1 mL/kg）を投与した。対照群及び 0.05 又は 0.15 mg/kg/日群には、G6 から G18 まで（両日を含む）投与した。0.45 mg/kg/日群の投与は、当初は G6 から G18 まで（両日を含む）としていたが、G16 以降に床敷中に血液が認められたため、G6 から G15 まで（両日を含む）に短縮した（下記参照）。母動物は G29 に屠殺した。

モニタリングした母動物のパラメータは、死亡率、一般状態、体重及び摂餌量であった。屠殺時に雌を肉眼的検査に供し、妊娠状態及び妊娠子宮重量を記録した。選択した動物の子宮、胎盤及び卵巣に対して、病理組織学的検査を実施した。子宮内容物を、黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数について調査した。胎児の体重及び性別を記録し、外表、内臓及び骨格の肉眼的異常について検査した。

トキシコキネティクスは、サテライト群の動物（各群 4 例）を用いて実施し、G6 及び G15 又は G18 の投与前並びに投与後 0.5、1、2、4、8 及び 12 時間に検体を採取した（G15 又は G18 の投与前を除く）。対照のサテライト群の 2 例からは、G6 及び G18 両日の投与後 0.5 及び 12 時間に検体を採取した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

トキシコキネティクスでは、T_{max} の中央値は 2.0～3.0 時間であった。投与期間終了時の投与後 0.5 又は 12 時間に、対照群の血漿中に微量の被験物質が検出された。トキシコキネティクス解析の詳細は 2.6.4.3.1.2 項に示す。

対照群及び E4 投与群で妊娠した雌の数は、それぞれ 20、20、16 及び 19 例であった。

対照群の雌 1 例は G7 に死亡した状態で発見され、0.05 mg/kg/日群の雌 1 例は投与過誤により G7 に死亡した。0.15 mg/kg/日群の雌 7 例及び 0.45 mg/kg/日群の雌 17 例は、流産又は全胚吸収となった。0.15 mg/kg/日群の母動物のうち 6 例は、G21 又は G22 に流産し（床敷中に胎児や胎盤の遺残物が認められた）、屠殺となった。流産の前に、最長で 2 日間にわたり床敷に血液が観察されていた。0.45 mg/kg/日群では、G16 以降に床敷に血液が認められたが、胎児や胎盤の遺残物は認められず、流産や全胚吸収が確認されたのは G29 の最終剖検時のみであり、着床痕又は子宮の病理組織学的検査に基づき判定された。0.45 mg/kg/日群の雌 1 例は、過度の失血のために G21 に早期屠殺となった。0.45 mg/kg/日群の最初の 9 例で血液が付着した床敷が認められた時点で、投与期間を G6 から G15（両日を含む）に短縮したが、妊娠の転帰は改善しなかった。

0.15 及び 0.45 mg/kg/日群では、胸部、腹部や四肢に脱毛部位が認められた。0.45 mg/kg/日群では削痩及び無便が認められ、同群における顕著な摂餌量の減少及びその結果としての体重の減少と関連していた。

投与期間の開始時から、摂餌量が用量依存的に顕著に減少し、体重も用量依存的に減少した。摂餌量の減少は投与期間を通じて認められ、投与中止後には代償的な摂餌量の増加が認められた。全ての E4 投与群で、最初は平均体重が減少し、その後体重増加量が減少し、投与中止後には代償的に体重増加量が増加した。

流産又は全胚吸収となった雌の子宮を除き、剖検時に被験物質に関連した肉眼的変化は認められなかった。

対照群及び E4 投与群で G29 に生存胎児が認められた雌の数は、それぞれ 19、19、9 及び 2 例であった。0.45 mg/kg/日群の雌 2 例の平均黄体数、着床数及び着床前胚死亡率は、対照値と同様であった。1 母体で着床後胚死亡率が高かったため、平均生存胎児数は減少した。0.05 及び 0.15 mg/kg/日群では、生殖、母体（平均胎児数及び着床後胚死亡率）又は胎児（平均胎児体重及び胎児性比）のパラメータに対する E4 の影響は認められなかった。

高用量群は 2 母体のみとなったため、胎児異常の評価は、低用量群及び中用量群について実施した。外表、内臓の形態異常又は変異において、被験物質に関連した影響はなく、次世代に対する特異的な形態異常誘発作用は認められなかった。0.05 及び 0.15 mg/kg/日群では、観察された母体毒性に関連したわずかな発育遅滞が認められ、これを示す所見として、両群で過剰な第 13 肋骨、0.15 mg/kg/日群で指骨、前頭骨、上後頭骨及び頭頂骨、頸椎及び尾椎の不完全骨化や未骨化を有する胎児の発現率の上昇が認められた。

0.45 mg/kg/日群の雌の子宮の病理組織学的検査では、子宮内膜の顕著な間質及び子宮内膜上皮の軽微な萎縮が示された。この群の雌 8 例中 2 例では、軽微な限局性の出血性卵巣嚢胞が認められたが、その意義は不明であった。0.15 mg/kg/日群の雌 8 例中 1 例の子宮内膜では、顕著な間質の増殖、出血、軽微な上皮の変性やアポトーシス及び偽好酸球の浸潤が認められた。0.05 mg/kg/日群の雌の子宮には、有意な病理組織学的変化は認められなかった。

本試験条件下では、全ての E4 投与群で母動物の摂餌量及び体重増加量の減少が認められたことから、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 0.05 mg/kg/日未満であった。母動物の生殖能に関する E4 の NOAEL は 0.05 mg/kg/日と結論された。胚・胎児発生に関する NOAEL も、0.05 mg/kg/日群より胎児の骨格の軽度の発育遅滞が認められたことから、0.05 mg/kg/日と考えられた。この投与量における G18 又は G15 の $AUC_{0\text{-}last}$ は 6.84 ng·hr/mL、C_{max} は 0.925 ng/mL であった。

2.6.6.6.1.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Wistar Han ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験の前に、2 回の用量設定試験を実施した（Es0001-NC-001 及び Es0001-NC-009、TS 表 2.6.7.11）。最初の用量設定試験では、交配させた雌ラットに、E4 を 0、0.17、0.5、又は 1.5 mg/kg/日の投与量で交尾後 6 日から分娩後 21 日まで（両日を含む）投与した。0.5 及び 1.5 mg/kg/日の投与量では、分娩困難、分娩の欠如又は全同腹児死亡により、早期屠殺が必要となった。両投与量では、赤色の腟分泌物が認められた雌の発現率の上昇、及び出産児数の減少も認められた。全ての投与量で妊娠中の体重増加量の減少、1.5 mg/kg/日で妊娠中の摂餌量の減少が認められた。0.5 及び 1.5 mg/kg/日群では死亡又は喰殺された状態で発見された F_1 出生児数が増加したため、分娩後 4 日の生存率が低下した。これらの投与量では、母動物が出生児の世話をしなかったことを示すエビデンス（脱水や胃内の乳汁の欠如）が認められた。1.5 mg/kg/日では、分娩後 1 日の出生児の体重が減少した。

2 回目の用量設定試験では、分娩直前に短い休薬期間を設けた。交配させた雌ラットに、1.5 mg/kg/日の投与量で、交尾後 6 日から 18 日まで（両日を含む）及び分娩後 1 日から 4 日まで（両日を含む）投与した。交尾後 23 日に雌 1 例が死亡した状態で発見され、妊娠末期の死亡胎児が認められた。別の雌では分娩が 1 日遅れた。F_1 出生児の分娩後 4 日の生存率は低下した。

全ての所見は、分娩困難によるものと考えられた。これらのデータに基づき、本試験の投与量として 0.17、0.5 及び 1.5 mg/kg/日を選択し、分娩に重大な問題が生じるリスクを最小限に抑えるため、分娩直前に短い休薬期間を設けることとした。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（Es0001-NC-003、TS 表 2.6.7.14）

雌 Wistar Han ラット（10 週齢、交配雌各群 24 例）に、E4（バッチ番号：CS02-032A-1203）を 0.17、0.5 及び 1.5 mg/kg/日の投与量で、交尾後 6 日から 18 日（両日を含む）及び分娩後 1 日から 21 日まで強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5%（w/v）CMC 水溶液（5 mL/kg）を投与した。

F_0 雌には児を分娩させ、離乳まで出生児を哺育させた。分娩後 4 日に、一腹あたりの F_1 出生児が可能な限り雌雄各 4 例に近づくように、同腹児数を調整した。分娩後 22 日に、F_1 世代の動物数を各群雌雄各 20 例とするため、一腹あたり雌雄各 1 又は 2 例を選択した。12～15 週齢時に、F_1 雌を F_1 雄（雌 1 例につき雄 1 例、同腹児との交配は避けた）と、交尾が確認されるまで、又はそれぞれ別の雄と 14 及び 7 日間連続して交配させた。計画屠殺日は、F_0 雌は分娩後 22 日、同腹児数の調整時に選別されなかった F_1 出生児は分娩後 4 日、離乳時に選別されなかった F_1 出生児は分娩後 22 日、交尾が確認された F_1 雌は交尾後 15 日とした。大部分の F_1 雌の剖検が完了した後、F_1 雄を安楽死させた。

F_0 雌の観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、体重、摂餌量及び妊娠期間とした。屠殺時に雌を肉眼的検査に供し、着床数を記録した。

離乳前の F_1 出生児の観察及び検査項目は、同腹児数及び出生時の性別、出生後の生存率、一般状態、体重、摂餌量並びに身体的発達及び反射の発達とした。離乳時に F_1 世代用に選択されなかった F_1 出生児に対しては、肉眼的検査を実施した。

離乳後の F_1 動物の観察及び検査項目は、死亡率、一般状態、体重、摂餌量、性成熟、感覚機能、自発運動量、学習と記憶、並びに生殖能力とした。F_1 動物は屠殺時に肉眼的検査に供した。

F_1雌では、子宮内容物を、黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数について観察した。

本試験はGLPを遵守して実施した。

結果

投与調製液中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

- F_0雌

対照群及びE4投与群で妊娠した雌の数は、それぞれ20、17、19及び17例であった。

0.5 mg/kg/日群では、雌1例が分娩中又は分娩直後に死亡した状態で発見された。0.5及び1.5 mg/kg/日群では、それぞれ雌1例及び8例を、分娩困難（同腹児の死亡又は分娩の欠如）により早期屠殺した。1.5 mg/kg/日群で妊娠や授乳中に認められた一般状態の所見は、四肢蒼白、接触時の冷感、立毛、自発運動の低下、虚脱、半眼や眼球結膜の蒼白、及び床敷の血液であり、ほとんどは早期屠殺となった雌で認められた。0.5及び1.5 mg/kg/日群では、赤色の腟分泌物が認められた。これらの投与量では、妊娠や授乳中の体重（増加量）及び摂餌量の減少も認められ、1.5 mg/kg/日群ではより重度であった。0.17 mg/kg/日群の所見は、妊娠中の体重増加量の一過性の減少のみであった。

分娩中に死亡しなかった雌の妊娠期間に対する有意な影響は認められなかった。1.5 mg/kg/日群では、生存児を出産した雌の数及び平均出産児数が減少した。F_0雌の剖検所見として、1.5 mg/kg/日群では漿液性の内容物を伴う子宮角の拡張が認められた。

0.5及び1.5 mg/kg/日群の所見の多くは毒性であると考えられたことに基づき、F_0雌の一般毒性に関するNOAELは0.17 mg/kg/日と考えられた。

1.5 mg/kg/日群の複数の雌で分娩が認められず、早期屠殺に至ったことに基づき、F_0雌の妊娠に関するNOAELは0.5 mg/kg/日と考えられた。

分娩困難及び関連する早期屠殺に基づき、F_0雌の生殖能に関するNOAELは0.17 mg/kg/日と考えられた。

- F_1出生児

0.5 mg/kg/日群では、分娩後2日に1例の同腹児が全て死亡した。1.5 mg/kg/日群では、喰殺及び出生児の死亡の発現率が高かったため、分娩後4日の生存率が低下した。分娩後4日以降の出生児の生存、出生児の一般状態、体重（増加量）、肛門生殖突起間距離、身体的発達、反射の発達及び剖検所見において、投与に関連した影響は認められなかった。

0.5及び1.5 mg/kg/日群における分娩後4日の生存率の低下は、毒性と考えられた。

分娩後4日の生存に関するNOAELは、0.17 mg/kg/日であった。

F_1出生児の分娩後4日以降の生存及び発達に関するNOELは、1.5 mg/kg/日であった。

- F_1世代

F_1世代における特記すべき所見は、0.5及び1.5 mg/kg/日群の雄のみで認められた体重（増加量）及び摂餌量の軽度な毒性ではない減少に限られていた。雌の一般状態、体重（増加量）又は摂餌量、性成熟、感覚機能、自発運動量、学習と記憶、生殖能力、子宮摘出データ又は剖検所見において、投与に関連した影響は認められなかった。

F_1世代の発達、生殖能及び受胎能に関するNO(A)ELは、1.5 mg/kg/日であった。

2.6.6.6.2 ドロスピレノンの生殖発生毒性試験

2.6.6.6.2.1 受胎能回復性試験

ドロスピレノンの受胎能（受胎能回復性）及び着床までの初期胚発生に関する試験の公表文献は確認されていない。

DRSP は、経口投与後に雌ラットの排卵を抑制し、ED_{50} は 1 mg/日であった。また、DRSP は抗アンドロゲン活性を示し、去勢した幼若雄ラットに 0.1～10 mg/動物/日の投与量で皮下投与すると、テストステロンの刺激による精嚢及び前立腺の成長を阻害することが示された。雄サルに、DRSP を 4 mg/kg の投与量で 2 又は 3 日ごとに経口投与すると、テストステロン及び黄体形成ホルモンの血清中濃度が低下した（Muhn, 1995）（2.6.2.2.2.2 項及び 2.6.2.3.2.2 項参照）。雌ザルでは、DRSP の経口投与を 6（途中で 4 に変更）mg/kg/日の投与量で開始した後、性周期が停止した（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。これらの特性に基づき、DRSP は投与中に受胎能を低下させると予想される。

ヒトにおける避妊中止後の受胎能の回復性については、Girum によってメタアナリシスが報告されている（Girum, 2018）。このメタアナリシスには、妊娠のために避妊を中止した合計 14884 例の女性を登録した 22 試験が報告されている。そのうち、735 例の女性がインプラントを中止、139 例の女性が注射による避妊薬を中止、2374 例の女性が子宮内避妊用具を中止、さらに 11636 例の女性が経口避妊薬（DRSP 含有製剤を含む）を中止した。その結果、避妊薬の使用期間や種類に関係なく、避妊薬の使用が中止後の女性の受胎能に悪影響を及ぼさず、生殖機能の回復を大きく遅らせることはないことが示された。さらに、プロゲスチンの種類の違いは、短期及び長期にわたって妊娠率に大きな影響を及ぼさないことが示された。

本剤の受胎能の回復性については、臨床試験において検討されている。E4/DRSP 15 mg/3 mg 及び EE/DRSP 0.02 mg/3 mg の投与群による比較試験（MIT-Es0001-C202 試験）で排卵の再開について評価された。スクリーニング期間において排卵が確認された 19 歳以上 35 歳以下の女性 82 例を、2 群に無作為に割り付けた（各群 41 例）。治験薬投与中止後に、内分泌及び超音波検査を頻回に測定することにより、排卵の再開を評価した。

投与中止後の排卵の再開までの日数の頻度分布を図 2.6.6-1 に示す。EE/DRSP 群での最も早い排卵は、最後の錠剤（プラセボ）の服用から 6 日後に認められたが、この被験者では投与 1 周期目及び 3 周期目でも排卵が認められていた。E4/DRSP 群での最も早い排卵は、最後の錠剤（プラセボ）の服用から 9 日後に認められた。E4/DRSP を服用していた多くの被験者では、最後の錠剤の服用後 12～15 日の間に排卵が認められたが、EE/DRSP を使用した被験者の排卵は遅く、多くの被験者では最後の錠剤の服用後 15～18 日の間に排卵が認められた。最後の錠剤を服用してから排卵が起こるまでの平均期間は、E4/DRSP 群では 15.5 日で、EE/DRSP 群では 18.1 日であった。

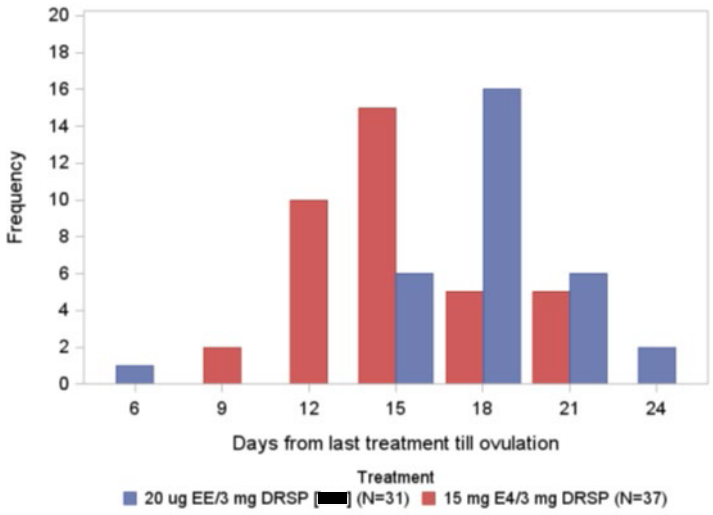


図 2.6.6-1 E4/DRSP 15 mg/3 mg 及び EE/DRSP 0.02 mg/3 mg の投与中止後の排卵再開までの日数の頻度分布（MIT-Es0001-C202 試験）

引用元：MIT-Es0001-C202 試験（資料番号 5.3.4.1-04）Figure 10
DRSP = drospirenone, E4 = estetrol, EE = ethinyl estradiol

投与中止後の周期中にほとんどの被験者では最大卵胞の安定した発育を示した。平均最大卵胞の直径は、E4/DRSP 群では 12 日目まで、EE/DRSP 群は 15 日目まで増加した。4 例の被験者では、投与後の周期中に排卵を確認できなかった。これらの被験者では、排卵が起こる前に中止された（E4/DRSP グループの被験者 1 例、EE/DRSP グループの被験者 2 例）、又は経腟超音波断層法及びプロゲステロンレベルを使用して治療後の周期の終了前に排卵が確認できなかった（EE/DRSP グループの被験者 1 例）。

本臨床試験の結果は、EE と共に DRSP を含有する経口避妊薬の投与後の排卵の回復性を調査した以前の研究と一致している（Girum, 2018、Rosenbaum, 2000、Duijkers, 2010）。

以上、公表文献によると、避妊中止後の受胎能の回復は、避妊の方法、避妊薬の種類、プロゲステロンの使用期間及び種類の影響を受けず、このことは、E4/DRSP 15 mg/3 mg 及び EE/DRSP 0.02 mg/3 mg の比較試験（MIT-Es0001-C202 試験）の結果によっても確認された。

2.6.6.6.2.2 胚・胎児発生に関する試験

ドロスピレノンの胚・胎児発生に関する試験の公表文献は確認されていない。

2.6.6.6.2.3 出生前及び出生後の発生に関する試験

妊娠 Wistar Han ラットに、DRSP を 0.1～10 mg/動物/日の投与量で交尾後 17 日から 20 日まで皮下投与したところ、3 mg/動物/日以上の投与量で雄胎児の雌性化が認められた（Muhn, 1995）（2.6.2.3.2.2 項参照）。雄胎児の雌性化（尿生殖洞や肛門生殖突起間距離の短縮）は、DRSP/EE を妊娠ラットに妊娠 14 日から 21 日まで 15/0.15 mg/kg/日以上の投与量で経口投与した場合にも認められた。この所見は、DRSP の抗アンドロゲン作用によるものと考えられた。5/0.05 mg/kg/日以上の投与量では雌胎児の雄性化（尿生殖洞や肛門生殖突起間距離の延長）が認められ、EE

による影響と考えられた。雄での所見の結果として、DRSP/EE は 45/0.45 mg/kg/日の投与量で F_1 動物の生殖能を低下させた（Battenfeld, 1995）。

いくつかのプロゲスチンは、分娩前の数日間に投与すると、ラットの分娩を遅延させることが示されている。例えば、Edgren 及び Peterson（1966）は、ノルエチンドロン及び LNG を妊娠 15 日以降のラットに皮下投与すると、分娩が遅延することを示している。

2.6.6.7 局所刺激性試験

E4、DRSP 及び配合剤の局所刺激性は、反復経口投与毒性試験において評価した。個別の局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 エステトロールのその他の毒性試験

2.6.6.8.1.1 不純物の毒性試験

E4 は [redacted] 社.から入手する。E4 原薬の潜在的な不純物及び分解生成物に関する「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて」（平成 27 年 11 月 10 日薬生審査発 1110 第 3 号）（ICH M7）に関する情報は原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示すとともに、以下に概略を記載する（2.3.S.3、3.2.S.3.2）。

ニトロソアミン類

E4 原薬の製造工程では、ニトロソ化剤は使用されない。またリスクアセスメントから、酸化剤により、N－ニトロソアミンが理論的に形成されるリスクはわずかである。また、[redacted] 社においてニトロソアミンの混入又は発生の根本原因を特定できていることからも E4 原薬においてニトロソアミンの定期的な管理は不要であると判断した。

変異原性不純物

ICH M7 に従い、各製造工程において、潜在的不純物につきデータベース及び文献調査を基に遺伝毒性に関する評価を実施した。結果は表 2.6.6-2 に示す通り、ICH M7 のクラス[redacted]及び[redacted]の不純物として分類された[redacted]化合物については、変異原性不純物の TTC に基づいて [redacted] あるいは [redacted] 未満で管理され、実際の分析結果、許容限度値未満であったことから、変異原性の可能性を示さなかった。

表 2.6.6-2 E4 原薬の ICH M7 クラス[redacted]及び[redacted]の不純物

化合物名	構造式	クラス	由来	評価結果
[redacted]				

その他の不純物として[redacted]の化合物を評価した。統計ベースの方法及び専門的経験に基づくルールベースの方法の 2 種類の(Q)SAR 法を適用して変異原性を評価した。統計ベースの方法として、Support Vector Machines（SVM）アルゴリズムに基づく変異原性評価ツールである CAESAR バージョン 2.1.13 を用い、専門的経験に基づくルールベースの方法として、Benigni & Bossa ルールベースを使用した TOXTREE バージョン 3.1.0 を用いてハザード評価を行った。詳細は表 2.6.6-3 に示す。その結果、ICH M7 に従い、クラス[redacted]及び[redacted]に分類され、非変異原性不純物として扱うことができるため、管理は不要と判断した。

不純物[redacted]及びエストラジオールの規格値に関する安全性評価[redacted]について、これまでに得られたエステトロールに関する利用可能な非臨床データの広範な評価を通じて行った安全性評価の報告がある（[redacted], 20[redacted]）。この評価では、ICH Q3A（R2）に基づく不純物の安全性の確認において考慮すべき主なエンドポイントである一般毒性（反復投与）と遺伝毒性（変異原性、染色体異常）を考慮している。この報告は、[redacted]社の非臨床医薬品安全性専門家により署名され、反復投与毒性試験および遺伝毒性データパッケージは、[redacted]以下の規格値を支持するものと考えられると結論づけられている。

なお、評価報告書中のサルの 39 週間反復投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）は原著の最終報告書のとおり 1 mg/kg/日と記載されているが、CTD では 3 mg/kg/日に変更されている（CTD 2.6.6 26 頁）。そのため、この報告の Table 2 中の 39 週間反復投与毒性試験の「Safety margin [redacted]」の値は[redacted]ではなく、[redacted]倍の[redacted]であるが、結論は変わらない。

また、[redacted]の *in silico* での遺伝毒性の評価では、ICH M7 ガイドラインでは、以下の 2 つの方法を推奨している。

相補的な 2 種類の（Q）SAR 予測法を適用すべきである。一つは、専門的経験に基づくルールベースの方法、二つ目は統計ベースの方法とする。これらの予測法を用いる（Q）SAR モデルは、経済協力開発機構（OECD）によって定められたバリデーションの一般原則に従っている必要がある。

このガイドラインに従い、今回は統計ベースの方法として変異原性モデル（CAESAR version 2.1.13）を用い、ルールベース方法として Benigni-Bossa 変異原性（TOXTREE version 3.1.0）を用いて[redacted]の変異原性を予測した。

欧州委員会の資金提供による CEASAR プロジェクトは、Mario Negri Institute for Pharmacological Research の協力のもと、Support Vector Machines（SVM）アルゴリズムに基づくモデルを開発し、開発の結果、80%の精度が得られている。開発された方法は、OECD の基準に従ってバリデートされた。このアルゴリズムは、EU プロジェクト CAESAR、ORCHESTRA 及び ANTARES からの貢献に基づいて開発された VEGA という自由にダウンロード可能な Java アプリケーションに実装されている。この実装では、「Read Across」と呼ばれる手順で評価専門家を支援することも可能で、既知の変異原性を有する化合物が化学的類似性の高い順に提示される。この実装では、SVM アルゴリズムによって陰性と判定された構造に対して適用される Benigni-Bossa ルールベースの方法の選択されたセットを採用しているが、このプログラムはいくつかのルールを誤って実装していることが判明したため、ルールベースの方法として TOXTREE プログラムを採用した。

TOXTREE プログラムは、欧州委員会共同研究センターの契約条件に基づき、Ideaconsult Ltd（ブルガリア、ソフィア）によって開発された。このソフトウェアは、科学研究者や化学物質の

毒性評価におけるコンピュータベースの推定法の適用に関心のある人なら誰でも、サービスとして自由に利用できる。これは Benigni-Bossa ルールベースを適用している。
これら 2 つのモデルの使用性能を評価するために、CAESAR バージョン 2.1.12 と TOXTREE バージョン 2.6.0 の結果を利用して、ネズミチフス菌を用いたエームス試験の実験結果を含む 6512 化合物を組み込んだ一般公開されているベンチマークデータセットの内部バリデーションが実施され、バリデーションの結果によると、CAESAR+TOXTREE 複合モデル（"or "演算子）は 80.6%の感度を示している。新規セットの陰性予測を考慮すると、この組み合わせは最も高い陰性的中率（62%）とトップランクの総合精度（67.1%）を示した。

その結果、不純物[redacted]は SVM アルゴリズムでは変異原性は予測されず、構造は適用領域内にあることが判明された。また、ルールベース法では、構造上のアラートは特定されなかった。解析の結果、不純物[redacted]は ICH M7 ガイドラインのクラス[redacted]に属し、この不純物の場合、規格閾値を制限する理由はないと思われる。
結論として、i*n silico*、*in vitro* 及び *in vivo* の試験を考慮すると、不純物[redacted]には変異原性、遺伝毒性はないと考えられる。

エストラジオールについてはよく知られた内因性物質であり、閉経後の健康な女性を対象に実施された臨床試験の蓄積により、エストラジオールの 0.3 mg/日を経口投与しても薬力学的な影響がないことが実証されていること、さらに、これらの試験は、世界保健機関（WHO）の食品添加物専門家委員会がエストラジオールの無影響量（NOEL）を設定する際に使用されている。したがって、エステトロール原薬に最大 0.20%のエストラジオールが含まれていても、科学文献から得られた適切なデータにより補足されるとおり、医薬品の安全性プロファイルを変更することはないと思われる。

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物（続き）

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物（続き）

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物（続き）

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物（続き）

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物（続き）

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

表 2.6.6-3 その他の変異原性不純物（続き）

化学名	構造式	ICHM7 分類
[redacted]		

2.6.6.8.1.2 光毒性試験

E4 は光に曝露される組織への分布が比較的少なく、メラニンを含む構造に長時間滞留しないことが示されているため、ICH S10 に準じて、光毒性試験を実施しないことは妥当と考えられた。また、いずれの動物試験においても、光毒性の症状は認められていない。

2.6.6.8.1.3 その他の試験

E4 が活性酸素種を誘導するかどうかを、*S. typhimurium* TA102 株を用いたエームス試験の結果を考慮して評価した（2.6.6.4.1.1 項）。

活性酸素種の誘導に関する試験（ES-T44、TS 表 2.6.7.17）

E4 が活性酸素種（ROS）の形成を誘導するかどうかを、L5178Y TK$^{+/-}$マウスリンパ腫細胞を用いて評価した。

3 回の独立した実験を実施した。L5178Y TK$^{+/-}$マウスリンパ腫細胞を、1、10、50、100、1000、及び 3000 µM の濃度の E4（バッチ番号：CS02-032A-801）に、37°C、5% CO_2 加湿インキュベーター内で 3 時間曝露させた。1000 及び 3000 µM（試験可能な最高濃度）の濃度は、3 回目の実験でのみ用いた。乳酸塩（100 µM まで）を ROS 誘導の陰性対照として、過酸化水素（100 µM まで）を陽性対照として用いた。溶媒対照は、0.1%（v/v）エタノール含有リン酸緩衝生理食塩水とした。

曝露後、細胞を ROS 試薬と 1.5 時間インキュベーションし、0.1%（w/v）トリパンブルーで背景蛍光をクエンチングし、492 nm の $\lambda_{励起}$、520 nm の $\lambda_{発光}$で蛍光を測定した。測定値は、細胞の自家蛍光について補正した。

本試験は非 GLP 適用試験であった。

結果

いずれの実験においても、陰性対照である乳酸塩は ROS を誘導しなかった。陽性対照である過酸化水素は、ROS の細胞内濃度を上昇させたが、最高濃度（100 µM）における上昇は実験間で大きく異なっていた（それぞれ 122%、400%及び 125%）。E4 は、全ての実験で ROS 濃度を用量依存的に低下させ、その作用は 3000 µM で最大であった（約 50%）。

陽性対照の結果にばらつきがあったことを考慮すると、データの解釈には注意が必要であるが、これらの結果から、本試験条件下では、E4 は酸化促進剤としてではなく、抗酸化剤として作用することが示唆された。

2.6.6.8.2 ドロスピレノンのその他の毒性試験

DRSP は、[redacted] 社及び [redacted] 社から入手する。[redacted] の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。[redacted] 社の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。以下に概略を記載する。

[redacted] 社 DRSP 原薬

ニトロソアミン

DRSP 原薬の製造工程においてニトロソ化剤は使用されておらず、また生成もされていないため、ニトロソアミンが混入するリスクはないと判断した。

変異原性不純物

ICH M7 に基づき、DRSP 原薬の製造工程中に混入する可能性のある変異原性不純物（実際の不純物、出発物質、中間体、試薬・試液、潜在的不純物）について評価を行い、管理戦略を確立した。変異原性不純物については統計ベース（CAESAR version 2.1.13［SVM アルゴリズムに基づく評価］）と知識ベース（TOXTREE version 3.1.0［Benigni & Bossa ルールベースを使用］）の 2 種類の相補的な(Q)SAR を用いて解析された。(Q)SAR により評価した 18 構造の結果を表 2.6.6-4 に示す。

表 2.6.6-4 DRSP 原薬の潜在的な不純物の QSAR 評価

化合物名	構造式	クラス	由来	評価結果
[redacted]				

表 2.6.6-4 DRSP 原薬の潜在的な不純物の QSAR 評価（続き）

化合物名	構造式	クラス	由来	評価結果
[redacted]				

表 2.6.6-4 DRSP 原薬の潜在的な不純物の QSAR 評価（続き）

化合物名	構造式	クラス	由来	評価結果
[redacted]				

TTC に基づいて [redacted] 未満の管理が提案された潜在的な不純物は以下の 3 化合物であった。しかし、ICH M7 Option 4 に従い、これらの化合物は製造工程中で完全に除去され、最終原薬中にこれらが残留しないことを確認したため、いずれも規格設定して管理しないこととした。

[redacted]

SVM アルゴリズムにより変異原性ありと予測され、その構造は適用範囲内と考えられた。SVM アルゴリズムとルールベースの両方の方法で [redacted] が警告構造として特定された。以上、この潜在的な不純物は、ICH M7 のクラス [redacted] に分類され、変異原性不純物の TTC に基づいて [redacted] 未満の管理が提案された。

[redacted]

SVM アルゴリズムにより変異原性ありと予測されたが、その構造は適用範囲外と考えられた。ルールベースの方法で警告構造は特定されなかった。以上、この潜在的な不純物は、ICH M7 のクラス[redacted]に分類され、変異原性不純物の TTC に基づいて[redacted]未満の管理が提案された。

[redacted]

Ames 試験が実施され、代謝活性化系の非存在下、*S. typhimurium* の TA98 株及び TA100 株において変異原性を有することが明らかになった。SVM アルゴリズムでは変異原性が疑われたが、その構造は適用範囲外であった。SVM アルゴリズムとルールベースの両方の方法で、[redacted]及び[redacted]が警告構造として特定された。以上、この潜在的な不純物は、ICH M7 のクラス[redacted]に分類され、変異原性不純物の TTC に基づいて[redacted]未満の管理が提案された。

他の潜在的な不純物の解析結果、知識ベースの(Q)SAR においては[redacted]が複数の化合物の警告構造として同定されたが、[redacted]は非変異原性のドロスピレノンにも存在するため、変異原性発現に寄与する部分構造ではないと判断した。

[redacted]社 DRSP 原薬

ニトロソアミン

DRSP 原薬に対してニトロソアミンのリスク評価を行った結果、ニトロソアミンを混入するリスクがないことを確認した。

変異原性不純物

ICH M7 ガイドラインに基づき、DRSP 原薬の製造方法及び出発物質、製造試薬、中間体及び反応副生成物を評価した。(Q)SAR により評価を行い、専門的経験に基づくルールベースの方法として Derek Nexus 及び統計ベースの方法として Sarah Nexus を使用した。DRSP に係る有機不純物の管理戦略を表 2.6.6-5 に示す。いずれの不純物においても実測値が 1 ppm 未満であり、最終原薬中にほとんど存在しないことから、規格設定して管理しないこととした。

表 2.6.6-5 ドロスピレノンに係る変異原性不純物の管理戦略

不純物名	構造式	由来	Classification	Purge factor	Concentration after purge	Concentration Limit	備考
[redacted]							

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 エステトロール

E4 を単独で用い、以下を含む広範な毒性試験プログラムを実施した。

- ラット及びサルを用いた単回投与用量設定試験
- マウス、ラット及びサルを用いた、それぞれ最長 13、26 及び 39 週間の反復経口投与毒性試験
- *In vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験
- マウス及びラットを用いたがん原性試験
- ラットを用いた受胎能回復性試験
- ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験
- ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験
- ICH M7（R1）に準拠した潜在的不純物の評価
- ROS 誘導能の *in vitro* 評価

これらの試験における所見を、以下に結論を含めて要約及び考察する。

単回及び反復投与毒性試験

E4 は、試験した最高用量である 1000 mg/kg まで、雌ラット及び雌ザルにおいて単回経口投与後に良好な忍容性を示した（ES-T09、ES-T05、TS 表 2.6.7.5）。

反復経口投与毒性試験では、E4 を 30 mg/kg/日までの投与量で雌マウスに、150 mg/kg/日（Sprague-Dawley）又は 6 mg/kg/日（Wistar Han）までの投与量で雌ラットに、50 mg/kg/日までの投与量で雌ザルに投与した（ES-T31、ES-T34、ES-T40、ES-T09、ES-T10、ES-T18、ES-T39、ES-T11、ES-T15、ES-T20、TS 表 2.6.7.6 及び 2.6.7.7.A.1～2.6.7.7.A.8）。

投与に関連した死亡は認められなかった。マウスでは、用量依存的な体重増加量の増大、ラット及びサルでは、用量依存的な体重減少が認められた。体重増加量の変化は摂餌量の変化と相関していた。ラット及びサルにエストロゲンを投与すると、体重増加量の減少が認められることが多い（Hart, 1990）。エストロゲンは、マウスにおいても体重増加量を減少させることが報告されているが（Heywood, 1980、Hart, 1990）、初期には体重増加量の増大が認められることがある。ラットでは、エストロゲンが食物摂取を大きく阻害することが知られており、肥満の治療として提唱されている（Santollo, 2008、Geary, 1999）。ラット及びマウスの体重変化に関与するいくつかのメカニズム（摂餌量及びエネルギー恒常性に関与する遺伝子の発現など）は、種特異的であると報告されている（Witte, 2010、Kim, 2010）。さらに、マウスの体重増加量に対する E4 の他とは異なる作用の原因は、種特異的なエストロゲン誘発性の尿閉に関連する可能性がある（Kuroda, 1985、Buhl, 1985、Pearse, 2009）。DRSP/EE 配合剤を用いたがん原性試験でも、同じ系統のマウス及びラットで同様の特定の変化が観察されているようである。

ラット及びサルで認められた投与に関連した一般状態の所見は、脱毛及び削痩などであった。病理組織学的検査では、毛包の萎縮や空洞が両動物種の皮膚に認められた。エストロゲンは毛包周期を阻害するが（Hu, 2012、Schardein, 1980、Ohnemus, 2006、Kroeker, 2014）、この所見は毒性とはみなされなかった。

E4 を 1 mg/kg/日以上の投与量で投与したサルでは、投与開始後 1 ヵ月以内に性周期が停止した。1.5 mg/kg/日以上の投与量で 26 週間投与したラットの大多数及び 1 mg/kg/日以上の投与量で

13 週間投与したマウスの大多数では、性周期の段階を判定することができなかった。これらの所見は、E4 の薬理学的特性と一致している。

評価した全ての動物種で、一般に肉眼的所見や病理組織学的所見を伴う生殖組織重量の変化が認められた。卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺及び下垂体には、E4 の薬理活性を反映する病理組織学的変化が認められたが（Hart, 1990）、毒性とは判断しなかった。

評価した全ての動物種で、赤血球パラメータの軽微から中等度の減少が認められた。ラットでは、白血球パラメータ（リンパ球、好酸球）の用量依存的な減少も認められた。ラット及びサルを用いた一部の試験では、骨髄の細胞充実性の軽微から軽度な低下が認められた。この所見は E4 のエストロゲン特性（Hart, 1990）と一致しており、毒性ではないと判断された。

ラットの脾臓では褐色色素沈着の増加（ヘモジデリンと推定）が、マウス及びラットの脾臓では造血亢進が認められた。これらの所見は、観察された赤血球パラメータの減少と関連している可能性が高いと思われた。

胸腺重量は全ての動物種で減少し、軽微から重度のリンパ組織の萎縮を伴っていた。ラット及びサルの脾臓でも軽微から中等度のリンパ組織の萎縮が認められ、サルでは胚中心の発達の軽度な減少も認められた。胸腺萎縮はエストロゲンの既知の作用である（Hart, 1990、Pearse, 2006）。二次感染が認められなかったことから、これらの所見は毒性ではないと判断された。

ラットでは、軽微から中等度の凝固時間（特にプロトロンビン時間）の延長が認められた。いくつかの血液生化学的パラメータでは、投与に関連した軽微から中等度の変化が認められた。これらの変化は、総蛋白及びアルブミン（ラットで増加、サルで減少）、総コレステロール（ラットで減少、サルで増加）、トリグリセリド（全動物種で増加）、アルカリホスファターゼ（マウス及びラットで増加、サルで減少）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（サルで増加）並びに γ-グルタミルトランスフェラーゼ（サルで減少）などであった。マウス及びラットでは、肝臓重量の増加が認められた。肝臓の病理組織学的変化として、マウス及びラットでは軽微から中等度の肝細胞肥大、ラットでは軽微から中等度の肝細胞微小空胞化、サルではグリコーゲン含量の減少が認められた。エストロゲンの投与に伴い、肝病理組織学的パラメータ、血液生化学的パラメータ及び凝固パラメータに対する様々な作用が報告されている（Hart, 1990、Maier, 2001、Heywood, 1980）。病理組織学的検査で肝臓の変性変化が認められなかったことから、これらの所見は毒性ではないと考えられた。

その他、投与に関連した軽微から中等度の変化が認められた血液生化学的パラメータは、無機リン（マウス及びラットで増加）、尿素（マウスで減少）、及びクレアチニン（マウス及びラットで減少）であった。ラットの腎臓では、軽微から中等度の褐色色素沈着（リポフスチン又はヘモジデリン）及び軽微から軽度な尿細管拡張や尿細管細胞空胞化が認められた。腎臓における褐色色素の沈着は、エストロゲンの投与によるものとみられている（Monserrat, 1978、Harris, 1966）。エストロゲンは、NaPi-II トランスポーターの上方制御によって無機リン酸塩の腸吸収を増強し（Xu, 2003）、下方制御によって近位尿細管における無機リン酸塩の再吸収を抑制すると報告されている（Uemura, 2000、Webster, 2016）。病理組織学的検査で腎臓の変性変化が認められなかったことから、これらの所見は毒性ではないと考えられた。

副腎に関しては、マウスでは紡錘形細胞の過形成及び X 帯の変性、ラットではびまん性の皮質肥厚、サルでは束状層の肥大及び網状層の萎縮などの変化が認められた。紡錘形細胞の過形成はマウス副腎で一般的な加齢に伴う所見であり、性腺摘出により増強される（Greaves, 2007）。

ラット及びサルにおける副腎皮質の変化は、E4 のエストロゲン特性と一致しており（Hart, 1990）、毒性ではないと判断された。

マウス及びラットでは大腿骨の骨梁の増加が認められたが、これは E4 のエストロゲン特性と一致しており（Tobias, 1991）、毒性ではないと判断された。

いずれの変化も投与中止後に可逆性のエビデンスを示したが、必ずしも回復期間の終了時に対照値まで完全に回復していたわけではなかった。

反復投与毒性試験で観察された作用は、E4 の薬理学的特性によって説明できるもので、NOAEL は主に体重（増加量）の減少に基づき決定した。長期反復投与試験における NOAEL は、ラットでは 5 mg/kg/日、サルでは 3 mg/kg/日であった。これらの投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び C_{max} は、ラットでは 736 ng·hr/mL 及び 238 ng/mL、サルでは 328 ng·hr/mL 及び 97.2 ng/mL であった。

遺伝毒性試験

S. typhimurium TA1535、TA1537、TA98 及び TA100 株又は E. coli WP2 *uvrA* 株を用いたエームス試験では、代謝活性化の有無に関わらず、ガイドラインで規定されている［ICH S2(R1)］5000 µg/プレートまでの濃度で、E4 の変異原性は認められなかった。しかし、*S. typhimurium* TA102 株では、S9 ミックスの有無に関わらず、3 試験中 2 試験で復帰変異コロニーの増加が認められた。これらの増加は 1250 µg/プレートから認められ、5000 µg/プレートでは陰性対照の 3～4 倍に達した。実施施設間で再現性が得られなかった原因は完全には明らかではないが、使用した菌株間で陰性対照及び陽性対照の反応に差異が認められたことから、菌株の感受性に差があった可能性が示唆された（[redacted], 20[redacted]）。TA102 株は酸化変異原性物質と架橋化剤の両方を検出する。E4 の 2-又は 4-位の水酸化により生成されるカテコール代謝物は、酸化還元サイクル及び ROS の生成を誘発する可能性があり、S9 ミックス存在下での反応の説明となるが、S9 ミックス非存在下での反応の説明とはならない。さらに、マウスリンパ腫細胞における ROS の誘導に関する試験では、E4 の酸化促進作用よりも抗酸化作用の方が示唆された（ES-T44；TS 表 2.6.7.17）。DNA アルキル化剤としてのキノロンの生成には、最初のステップとしてカテコールを形成する水酸化が必要であるため、同様に S9 ミックスの非存在下での所見を説明することはできない。マスバランス試験のヒト血漿や尿の分析から得られた質量分析データを用いて、E4 の水酸化代謝物の有無を検討したところ、E4 の水酸化代謝物は認められなかった（Es0001-NC-015；第 2 部（7.2））。E4 は TA102 株において弱い変異原性作用のエビデンスを示すが、作用機序は明らかではない（ES-T21、ES-T29、ES-T48、TS 表 2.6.7.8.A～2.6.7.8.C）。

最初のマウスリンフォーマ試験で、E4 は S9 ミックスの存在下で突然変異頻度の上昇を引き起こし、875 及び 1000 µg/mL の濃度では GEF の閾値（126×10^{-6}）を上回った。これらの濃度は沈殿が認められる濃度であったため、交絡因子となった可能性がある。さらに、E4 は 1000 µg/mL の濃度で高い毒性を示した（補正後 RTG の 90%超の低下）。E4 は、マウスリンフォーマ試験のフォローアップ試験において、S9 ミックスの有無に関わらず、1 mM（304 µg/mL）の限界濃度までの非沈殿濃度において遺伝子突然変異を誘発しなかった（ICH S2(R1)）。E4 は、臨床使用条件下における血漿中濃度（単回投与：18.0 ng/mL（MIT-Es0001-C103））の数万倍の濃度においても、哺乳動物細胞系では変異原性を示さないと結論された（ES-T22、ES-T45、TS 表 2.6.7.8.D 及び 2.6.7.8.E）。

In vivo 試験では、2000 mg/kg までの投与量を単回経口投与したラットの骨髄小核試験で E4 は陰性であり、概算の T_{max}（0.5 時間）での平均血漿中濃度は 42.4 μg/mL であった。*S. typhimurium* TA102 株を用いたエームス試験において E4 の変異原活性が弱陽性であり、明瞭な再現性がなかったことを考慮して、遺伝毒性試験プログラムにコメット試験を追加した。最初のコメット試験では、E4 は 2000 mg/kg/日までの投与量を経口投与したラットの肝臓で明らかに陰性であった。しかし、ラットの十二指腸では、500 mg/kg/日でテール強度の中央値の増加が認められたが、1000 又は 2000 mg/kg/日では認められなかったため、E4 の遺伝毒性は不明確であると考えられた。また、1000 及び 2000 mg/kg/日ではゴースト細胞の割合の増加が認められたが、500 mg/kg/日では認められなかった。用量に関連して通常とは異なる反応が認められたことを考慮して、より広範囲の用量（62.5～2000 mg/kg/日）で試験を再度実施し、細胞毒性についてより詳細に評価した（病理組織学的検査を含む）。2 回目のコメット試験では、E4 は試験した最高用量である 2000 mg/kg/日まで、肝臓又は十二指腸において DNA 損傷及び細胞毒性を誘発しなかった。この試験における 2000 mg/kg 投与時の E4 の平均血漿中濃度は、投与 0.5 時間後で 22.8 μg/mL であった（ES-T37、ES-T46、0030-NC-001、TS 表 2.6.7.9.A～2.6.7.9.C）。

遺伝毒性試験では、*in vitro* で E4 の遺伝毒性の可能性を示すいくつかの徴候が認められたが、*in vivo* では高用量（2000 mg/kg）でも遺伝毒性を示す信憑性の高いエビデンスは認められていない。

<u>がん原性試験</u>

マウスを用いた 2 年間がん原性試験では、投与開始後 3 ヵ月間に、特に 1 mg/kg/日で体重増加量の増加（0.5 mg/kg/日で＋15%、1 mg/kg/日で＋33%）及び体重の増加が認められたことから、MTD に達したと判断した。E4 は、0.25 mg/kg/日以上の投与量で子宮及び子宮頸部の腫瘍性所見（上皮及び間質腫瘍）、1 mg/kg/日の投与量で乳腺の腫瘍性所見（腺腫、腺癌、良性及び悪性の腺表皮癌）、及び下垂体の腫瘍性所見（前葉の腺腫及び癌腫）を増加させた。全生存率に対する E4 投与の影響は認められなかったが、乳腺腫瘍及び子宮や膣脱（子宮や子宮頸部腫瘍の存在による）による死亡率は、0.25 mg/kg/日以上の群で上昇した。子宮及び乳腺では全ての投与量で、下垂体及び肺では 1 mg/kg/日で、非腫瘍性増殖性所見が記録された。マウスにおける臨床病理所見及び非増殖性の所見（子宮、膣、乳腺、下垂体、甲状腺、副腎、肝臓、胃、胸骨や大腿骨、脳及び脾臓）は、E4 のエストロゲン作用と一致したもの、他の所見に続発したもの、及び毒性学的な重要性が低いものと考えられた（Greaves, 2012）。

ラットを用いた 2 年間がん原性試験では、体重増加量の減少（0.27 及び 0.8 mg/kg/日群で投与開始後 12～18 ヵ月間に 10%以上、全投与期間でほぼ 10%）に基づき、MTD に達したと判断された。0.8 mg/kg/日の投与量で、乳腺腫瘍（腺癌）の発現率が上昇した。非腫瘍性増殖性所見は、乳腺（全投与量）、並びに子宮、卵巣及び肝臓（0.27 mg/kg/日以上の投与量）において認められた。注意すべき点として、E4 投与群の方が対照群よりも卵巣の増殖性所見が少なく、肝臓の好塩基性細胞巣の発現率や重症度が低く、増大や上昇は認められなかった。肝臓では明細胞巣の増加が認められた。ラットで認められた臨床病理所見及び非増殖性所見（子宮、膣、卵巣、副腎、肝臓、脳、胸腺、腸間膜リンパ節及び脾臓）は、E4 のエストロゲン作用と一致したもの、他の所見に続発したもの、及び高齢動物でよくみられるものであった（Greaves, 2012、Laast , 2014、Mclnnes, 2011、Pearse, 2006）。

実施した試験の条件下において、E4 は、マウスでは 0.25 mg/kg/日以上の経口投与量で、ラットでは 0.8 mg/kg/日の経口投与量で、がん原性であると考えられた。マウスでは、0.125 mg/kg/日の投与量でがん原性は認められなかった。この投与量における Week 25 の $AUC_{0\text{-last}}$ は 4.60 ng·hr/mL、C_{max} は 3.75 ng/mL であった。ラットでは、0.27 mg/kg/日の投与量でがん原性は認められなかった。この投与量における Week 25 の $AUC_{0\text{-last}}$ は 18.8 ng·hr/mL、C_{max} は 9.99 ng/mL であった（0031-NC-003、0031-NC-004、TS 表 2.6.7.10.A 及び B）。

マウスの乳腺、子宮や子宮頸部、下垂体並びにラットの乳腺で観察された E4 による腫瘍性及び非腫瘍性の増殖性所見は、これらの動物種における EE 及びメストラノール等の他のエストロゲンで報告された所見と一致する。これらは、直接的なエストロゲン作用やエストロゲンによるプロラクチン分泌増加の結果である（IARC, 1999、IARC, 2007、Dixon, 2014、Greaves, 2012）。また、エストロゲンは、ラットにおいて肝病巣の変化を誘発することも報告されている（IARC, 1999、IARC, 2007）。E4 は、0.27 mg/kg/日以上の投与量で明細胞巣（グリコーゲンを含む）を増加させたが、好塩基性細胞巣は減少した。明細胞巣は増殖性とみなされるが、必ずしも腫瘍性病変を引き起こすわけではない（Thoolen, 2012）。マウスでは、E4 の最高用量である 1 mg/kg/日で気管支肺胞の過形成の増加が認められた。E2 は、*in vitro* で肺腺癌細胞株の増殖を刺激し、卵巣摘出マウスの肺腫瘍モデルにおいて、肺腫瘍の多重性及び腫瘍の悪性度を高めることが報告されている（Dougherty, 2006、Hershberger, 2005、Hammoud, 2008、Tang, 2013）。新生児マウスに 4 mg/kg までの投与量で E2 を経口投与した 2 試験中の 1 試験では、E2 は肺腫瘍の誘発についても陽性であった（McClain, 2001）。

全体的に、マウス及びラットで認められた E4 の腫瘍性及び非腫瘍性増殖性所見は、E4 のエストロゲン特性と一致している。

閉経期のエストロゲン単独療法、閉経期のエストロゲン・プロゲスチン配合療法及びエストロゲン・プロゲスチン配合経口避妊薬は、IARC によってグループ 1（ヒトに対する発がん性がある）に分類されている（IARC, 2012a、b 及び c）。

生殖発生毒性試験

E4 を雌ラットに 0.17、0.5、及び 1.5 mg/kg/日の投与量で経口投与した受胎能回復性試験では、投与中止後に受胎能が回復するという明らかなエビデンスが得られた。3 週間の休薬期間後に、交尾、受胎率若しくは妊娠率、又は着床データに対する影響は認められなかった。母動物の一般毒性及び性周期に関する NOAEL は 0.17 mg/kg/日であった。受胎能及び初期胚発生に関する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった（ES-T27、ES-T43、TS 表 2.6.7.12.A 及び 2.6.7.12.B）。

E4 は、ウサギに 0.1 mg/kg/日 *bid* 以上の投与量で交尾 4 日前から G9 まで経口投与したとき、着床を完全に抑制した。0.1 mg/kg/日の投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 12.1 ng·hr/mL、C_{max} は 4.11 ng/mL であった（ES-T04、TS 表 2.6.7.11）。

妊娠中の雌ラット及びウサギに E4 を経口投与した胚・胎児発生に関する試験では、ラットでは 3 mg/kg/日、ウサギでは 0.15 及び 0.45 mg/kg/日の投与量で流産や全胚死亡が認められ、両動物種で複数の雌が早期屠殺に至った。全ての E4 の投与量で母体毒性（体重増加量及び摂餌量の減少や一般状態の所見）が認められた。1 及び 3 mg/kg/日群のラットの剖検では、胎盤の肥大又は肥厚が記録された。

生存胎児が認められた雌では、両動物種の最高用量で着床後胚死亡率が上昇したが、着床前胚死亡、生存胎児数又は胎児の性比に対する影響は認められなかった。ラットでは、3 mg/kg/日で胎児体重が減少した。ラットでは 1 及び 3 mg/kg/日で、ウサギでは 0.05 及び 0.15 mg/kg/日で、胎児の発育遅滞が認められた。これらの発育遅滞として、両動物種で骨格の不完全骨化又は未骨化、ラットで肋骨の結節形成及び波状の発現率の上昇及び胎児体重の減少、並びにウサギで過剰な第 13 肋骨の発現率の上昇が認められた。母体毒性と関連した投与量で認められた胚致死作用及び胎児発育遅滞は、動物に高用量で投与した場合に、エストロゲンが胚死亡や流産及び胎児発育遅滞を引き起こす可能性があることと一致している（Bartholomeusz, 1999、IARC, 1999）。

ウサギを用いた試験では、被験物質に関連した形態異常は認められなかった。ラットを用いた試験では、1 mg/kg/日群の 3 母体の胎児 3 例及び 3 mg/kg/日群の 4 母体の胎児 5 例に、長骨（上腕骨、橈骨）及び肩甲骨の短縮、肥厚又は弯曲が認められ、数例の胎児では脚関節の異常回転及び重度の屈曲も認められた。観察された骨格異常は、形態異常と分類して報告された。しかし、Wistar Han ラット（E4 の試験で使用した系統）の胎児骨格所見に関する最近の公表文献は、これらの異常が一過性（すなわち、出生後にリモデリングされ、離乳時には消失する）であることを裏付けている（Mitchard, 2014、Kimmel, 2014、de Schaepdrijver, 2014）。[redacted]（20[redacted]）による専門家のレビューによれば、これらは一般に母体毒性に続発し、出生後の骨量の増加及びリモデリングにより修復されることから、ラットの妊娠期間が短いことを反映していると考えられた。Wistar Han ラットにおける上述の骨格所見の自然発生率は、経時的に変動するようである（Mitchard, 2014）。Kimmel（2014）は、多数の公表された胚・胎児発生に関する試験を評価し、母体毒性や胎児毒性が生じる条件下では、長骨の弯曲や短縮及び肩甲骨の屈曲が波状肋骨とともに発現することが多いと報告している（ただし、通常は発現率が低い）。また、長骨の弯曲や短縮及び肩甲骨の屈曲は一過性であり、四肢の外表観察で短縮や形態異常が示されない限り、形態異常ではなく変異に分類すべきであると結論付けている。ラットを用いた E4 の試験では、1 及び 3 mg/kg/日のいずれにおいても母体毒性及び胎児毒性又は発育遅滞が認められた。長骨の弯曲や短縮や肩甲骨の屈曲が認められた全ての動物で、肋骨の結節形成や波状も認められ、肋骨の結節形成や波状が認められた胎児の全体的な割合は、長骨や肩甲骨の異常が認められた胎児の割合よりも大きかった。外表観察時に前肢及び後肢の重度の短縮が認められたのは、1 mg/kg/日群の胎児 1 例（複数の形態異常が認められた個体）のみであった。ラットに 1.5 mg/kg/日までの投与量を投与した出生前及び出生後の発生に関する試験では（Es0001-NC-003、TS 表 2.6.7.14）、生存出生児において不可逆的異常の徴候は認められなかった。ラットで観察された骨格異常は、Kimmel（2014）が報告した一過性のものであると結論された。ただし、外表観察で四肢短縮が認められた 1 mg/kg/日群の胎児は例外と考えられた。したがって、ラットにおける胚・胎児の所見は、E4 に固有な催奇形性を示すものではないと思われる。

ラットにおける胚・胎児発生に関する NOAEL は、0.3 mg/kg/日と報告された。0.3 mg/kg/日の投与量で反復投与したときの $AUC_{0\text{-last}}$ は 9.33 ng·hr/mL、C_{max} は 6.83 ng/mL であった。ウサギの母動物の生殖パラメータ及び胚・胎児発生に関する NOAEL は、0.05 mg/kg/日であり、投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は 6.84 ng·hr/mL、C_{max} は 0.925 ng/mL であった（ES-T01、ES-T02、ES-T03、ES-T04、ES-T16、ES-T19、TS 表 2.6.7.11、2.6.7.13.A 及び 2.6.7.13.B）。

妊娠ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、0.5 又は 1.5 mg/kg/日の投与量で経口投与した F_0 雌の数例が死亡した状態で発見、又は分娩困難（同腹児の死亡又は分娩の欠

如）のために早期屠殺に至った。1.5 mg/kg/日群では複数の一般状態の所見が認められたが、そのほとんどが早期屠殺に至った雌の所見であり、両投与量で赤色の腟分泌物が記録された。いずれの投与量でも、妊娠中や授乳中の体重増加量及び摂餌量の減少が認められ、母体毒性と考えられた。

0.5 mg/kg/日では、F_1 の 1 同腹児が分娩後 2 日に全て死亡し、1.5 mg/kg/日では喰殺及び出生児の死亡の発現率が高かったため、分娩後 4 日の生存率が低下した。新生児の生存率の低下は、F_0 雌の分娩困難やそれによる母体の異常行動に起因した可能性が高い。F_1 出生児においても、F_1 動物においても、他に特記すべき所見は認められなかったが、例外として 0.5 及び 1.5 mg/kg/日群の F_1 雄では軽度で毒性ではない体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。

出生前や出生後試験における観察所見の大部分は、分娩困難や分娩困難に起因する母体の異常行動に起因すると考えられる。

F_0 雌の妊娠及び授乳に関する NOAEL は、それぞれ 0.5 及び 0.17 mg/kg/日と考えられた。F_1 出生児の分娩後 4 日の生存に関する NOAEL は 0.17 mg/kg/日であり、分娩後 4 日以降の生存及び F_1 出生児の発育に対する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった。F_1 世代の発達、生殖能及び受胎能に関する NO(A)EL は、1.5 mg/kg/日であった（Es0001-NC-001、Es0001-NC-009、Es0001-NC-003、TS 表 2.6.7.11 及び 2.6.7.14）。

妊娠中のげっ歯類へのエストロゲンの投与は、子宮運動を抑制し、妊娠期間への影響を含み分娩に影響を及ぼす（Yanagimachi. 1968、Kraus, 1993、Murakami, 2016）。E4 の出生前及び出生後試験で認められた分娩困難は、雌マウス（Mann, 1983）及び雌ラット（Inoue, 1981）へのエストロゲンの投与後にげっ歯類で報告された所見と一致しており、妊娠中の雌ラットに選択的エストロゲン受容体モジュレーターを投与した場合の分娩への影響とほぼ同様であると考えられる（Buelke-Sam, 1998a、Buelke-Sam, 1998b、Weisenburger, 2004）。

その他の毒性試験：不純物

E4 原薬の製造工程では、ニトロソ化剤は使用されない。またリスクアセスメントから、酸化剤により、N－ニトロソアミンが理論的に形成されるリスクはわずかである。また、[redacted] 社においてニトロソアミンの混入又は発生の根本原因を特定できていることからも E4 原薬においてニトロソアミンの定期的な管理は不要であると判断した。E4 原薬の潜在的不純物のうち、ICH M7 のクラス[redacted] 及び[redacted] の不純物として分類された[redacted] 化合物については、変異原性不純物の TTC に基づいて[redacted] あるいは[redacted] 未満で管理され、実際の分析結果は、許容限度値未満であったことから、変異原性の可能性を示さなかった。

その他の毒性試験：光毒性

光毒性の症状（皮膚刺激、紅斑、そう痒、浮腫など）は、どの動物試験でも認められていない。E4 は光に曝露される組織への分布が比較的少なく、メラニンを含む構造に長時間滞留しないことが示されているため、ICH S10 に準じて、光毒性試験を実施しないことは妥当と考えられた。

2.6.6.9.2 ドロスピレノン

雌ザルを用いた E4/DRSP の 13 週間反復経口投与毒性試験の DRSP 単独投与群において、反復投与毒性に関するデータが得られている。遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性に関するデータは、利用可能な科学的出版物に基づいている。

反復投与毒性試験

雌ザルに DRSP を 6（4）mg/kg/日の投与量で 13 週間経口投与したとき、忍容性は良好であった。特記すべき所見は以下のみであった：

- インスリン濃度の軽微な上昇
- 性周期の停止、生殖組織及び乳腺の重量変化や病理組織学的所見
- 血清アルドステロン濃度の上昇、軽微から軽度な球状層の肥厚を伴う副腎重量の増加
- 肝臓グリコーゲン含量のわずかな低値

いずれの所見も、DRSP の薬理学的特性（プロゲスチン特性及び抗鉱質コルチコイド特性）を反映したものであり、いずれの所見も毒性とは考えられなかった（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

遺伝毒性試験

ICH S2(R1)の一連の標準的な遺伝毒性試験及び HGPRT 試験において、DRSP による遺伝毒性は認められなかった（Lang, 1993、Reimann, 1996）。DRSP は、ラット肝細胞では不定期 DNA 合成を増加させたが、ヒト肝細胞では増加させなかった（Martelli, 2003）。ラット肝細胞における所見の臨床的意義には、疑問の余地があると考える。

がん原性試験

DRSP のがん原性試験に関する公表文献は確認されていない。

プロゲスチン単独の避妊薬は、IARC によりグループ 2B（ヒトに対する発がん性が疑われる）に分類されている（IARC, 1999）。

生殖発生毒性試験

ドロスピレノンの受胎能（受胎能回復性）試験、初期胚発生試験又は胚・胎児発生に関する試験に関する公表文献は特定されておらず、出生前/出生後の発達に関する公表文献も限られている。

DRSP は排卵抑制特性及び抗アンドロゲン作用を示すため、生殖発生毒性に特化した試験では受胎能を低下させると予想される。サルの性周期に対する E4/DRSP の影響は可逆的であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

妊娠後期のラットに DRSP を単独投与又は EE と併用投与したとき、抗アンドロゲン特性によって雄胎児の雌性化が生じた（Muhn, 1995、Battenfeld, 1995）。

全体として、生殖発生毒性データは、DRSP の薬理学的特性と一致している。

その他の毒性試験：不純物

[redacted]社 DRSP 原薬の製造工程において、ニトロソ化剤が使用されておらず、また生成もされていないため、ニトロソアミンが混入するリスクはないと判断した。DRSP 原薬の潜在的な不純物のうち、TTC に基づいて[redacted]未満の管理が提案された 3 化合物については、ICH M7 Option 4 に従い、製造工程中で完全に除去され、最終原薬中に残留しないことを確認したため、いずれも規格設定して管理しないこととした。

[redacted]社 DRSP 原薬の製造工程では、ニトロソアミンを混入するリスクがないことを確認された。DRSP 原薬の製造方法及び出発物質、製造試薬、中間体及び反応副生成物について(Q)SAR 方法により評価した。その結果、いずれの不純物においても実測値が 1 ppm 未満であり、最終原薬中にほとんど存在しないことから、規格設定して管理しないこととした。

2.6.6.9.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

雌カニクイザルを用いた 13 週間毒性試験において、E4 を DRSP との併用で 30/6 mg/kg/日までの投与量で評価した（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

30/6 mg/kg/日群の雌 3 例は、重度の高血糖及び関連する変化のため、早期屠殺となった。20/4 mg/kg/日への減量後も高血糖が認められ、20/4 mg/kg/日群の雌 1 例及び 10/2 mg/kg/日群の雌 1 例では投与中断に至った。耐糖能低下、末梢インスリン抵抗性及び関連する高血糖は、エストロゲンやプロゲスチン配合剤の既知のリスクである（[redacted], 20[redacted]、De Oliveira, 2019）。プロゲスチンはインスリン抵抗性を誘発する可能性がある。エストロゲンはコルチゾール濃度を上昇させることにより、この作用を増強する可能性がある。コルチゾールはインスリンの活性及びその代謝作用に拮抗する。さらに、コルチゾールはトリプトファンの代謝に影響を及ぼしてキサンツレン酸を蓄積させ、キサンツレン酸はインスリンと複合体を形成してその活性を低下させる可能性がある（[redacted], 20[redacted]）。E4 を単独又は DRSP との併用で投与したサルでは、コルチゾール濃度が上昇したが、個々の動物ではグルコース濃度との相関は認められなかった。

高血糖は毒性であると考えられる。

一般状態の所見は、30/6（20/4）mg/kg/日群で認められた一過性の低体温及び歯肉の蒼白化のみであった。E4/DRSP は体重に影響を及ぼさなかった。

生殖組織の変化は、E4 及び DRSP の薬理活性を反映しており、卵管、子宮及び腟の所見は主にプロゲステロン作用に起因し、卵巣、乳腺及び下垂体への影響は両化合物に起因するものであった。全ての投与量（3/0.6 mg/kg/日以上）で、投与開始後に性周期が停止した。

血液学的及び血液生化学的パラメータの変化の重症度は軽微から中等度であり、血糖値の上昇（10/2 mg/kg/日以上の投与量での併用投与時のみ）及びアルドステロン値の上昇（DRSP の抗鉱質コルチコイド活性による）を除き、ほとんどが E4 単独投与によって誘発された変化と同様であった。

リンパ組織での所見（リンパ組織の萎縮や胸腺及び脾臓重量の減少を伴う胚中心の発達の欠如又は減少）は E4 に起因するものであり、二次感染などのリンパ組織の萎縮に伴う免疫機能の低下を示唆する毒性変化がないことから毒性とは判断しなかった。

E4 単独投与では肝臓に関連する血液生化学的パラメータの変化及び肝臓のグリコーゲン含量の軽度から中等度の減少も認められたが、病理組織学的な変性変化がないことから、毒性ではないと考えられた。

副腎における所見は、球状層の軽微から軽度な肥大及び網状層の中等度の萎縮であり、それぞれ E4 及び DRSP（抗鉱質コルチコイド活性）に起因すると考えられた。これらの変化は毒性ではないと判断した。

皮膚の病理組織学的変化（毛包の萎縮）は E4 に起因するものであり、毒性ではなかった。

ヘマトキシリンやエオジン染色した心臓の病理組織学的検査では、特記すべき所見は認められなかったが、E4/LNG の併用投与で毒性として心臓の所見が認められたため、その後マッソントリクローム染色による詳細な評価を実施した。30/6（20/4）mg/kg/日群の雌 2 例（早期死亡例 1 例を含む）の心臓において、心筋細胞の軽微な空胞化を伴う軽微な間質の線維化（特殊染色後においてのみ観察）が認められた。1 例では、心筋細胞の軽微な肥大も認められた。これらの変化は軽微で散発的であり、回復期間の終了時には認められなかったため、本試験の条件下では毒性とはみなされなかった。さらに、E4/DRSP を投与したサルの心臓の病理組織学的変化は、E4/LNG の投与後に影響が認められた動物で観察された肉眼的変化（左室壁厚の増大及び左室腔容積の減少）を伴っていなかった（以下の 2.6.6.9.4 項参照）（[redacted], 20[redacted]）。

いずれの変化も投与中止後に可逆性のエビデンスを示したが、必ずしも休薬期間の終了時に対照値までの回復は認められなかった。

反復投与毒性試験で観察された作用は、E4 及び DRSP の薬理学的特性と一致していた。NOAEL は、高血糖及び関連する早期屠殺に基づき、3/0.6 mg/kg/日と判定された。これらの投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び C_{max} は、E4 は 483 ng·hr/mL 及び 173 ng/mL、DRSP は 630 ng·hr/mL 及び 105 ng/mL であった。

2.6.6.9.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

雌カニクイザルを用いた 13 週間毒性試験において、E4 を LNG との併用で 30/0.225 mg/kg/日までの投与量で評価した（0031-NC-018、TS 表 2.6.7.7.C.1）。

30/0.225 mg/kg/日群の雌 1 例は、重度の高血糖及び関連する変化のため、早期屠殺となった。20/0.150 mg/kg/日への投与量の減量後も個々の動物において高血糖が認められ、この群の雌 1 例では投与中断に至った。E4/DRSP で示されているとおり、高血糖はエストロゲンやプロゲスチンの併用で発現する可能性があることが知られており、毒性とみなされた。

この群の別の雌は死亡した状態で発見されたが、それまでに一般状態の所見は認められなかった。死因は主に左心室の萎縮及び線維化であった。30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群の別の雌 2 例及び 10/0.075 mg/kg/日群の雌 1 例では、計画屠殺時に、心臓の病理組織学的所見（軽度な心筋細胞空胞化を伴う軽度な間質の線維化並びに左室及び中隔の筋線維の軽微から軽度な肥大）が認められた。E4 単独投与群の雌 1 例でも、重症度が軽微な心臓の病理組織学的変化が認められたが、この群の血漿検体には LNG が混入していたため、これらの変化を E4 に帰することはできなかった。E4/LNG の高用量群では、心拍数の軽度な増加とともに、PQ 間隔の短縮及び収縮期血圧の低下が認められたが、病理組織学的所見との明らかな相関は認められなかった。全体的に、心臓の変化は E4/LNG の併用により増強されるようであった（0031-NC-018）。

[redacted]（20[redacted]）による独立した専門家のレビューにより、報告された心臓の病理組織学的所見が確認され、心筋細胞及び（細胞内）筋原線維の錯綜配列、左心室壁の肥厚及び左心室腔容積の減少を含む肉眼的変化、心臓重量の増加、並びに乳酸脱水素酵素濃度の上昇傾向を伴っていることが認められた。全体的な所見は、ヒトの肥大型心筋症で報告されている所見と極めて類似し

ている。この肥大型心筋症は、カニクイザルでは自然に発生するとみられている。上記の肉眼的及び病理組織学的変化は、E4 の 39 週間試験（ES-T20、[redacted], 20[redacted]）の溶媒投与群の 1 例の心臓でも認められた。また、Konishi（2018）も、11 歳齢の雄カニクイザルの自然発生性肥大型心筋症の症例について最近報告しており、この報告の心臓の病理学的所見は、E4/LNG 投与時の所見とほぼ同一であった（0031-NC-018；[redacted], 20[redacted]）。さらに、特に Zabka ら（2009）など、他の著者らによって報告されているカニクイザルで自然発生する心臓所見とも類似している。モーリシャス原産のカニクイザル（E4 の試験で使用）は、その他の地域のカニクイザルよりも心筋症を自然発症しやすいことが知られている（[redacted], 20[redacted]）。ヒト肥大型心筋症の発病機序には、サルコメア蛋白質をコードする変異遺伝子の肥大刺激による上方制御が関与している。カニクイザルのサルコメア遺伝子突然変異については現在のところ同定されていないが（Konishi, 2018）、病理組織学的所見が類似していることから、同様の発症機序が関与しているという仮説が支持される。

30/0.225（20/0.150）mg/kg/日群の生存動物の一般状態の所見として、乳頭からの白色分泌物の一過性の発現が認められたほか、全身性脱毛症の発現率がわずかに高かった。

皮膚の脱毛は、毛包の萎縮や空洞の病理組織学的所見と相関しており、E4 に起因するもので、毒性ではなかった。

生殖組織の変化は、E4 及び LNG の薬理活性を反映しており、主にプロゲステロン作用による卵管、子宮及び腟の所見、並びに両化合物に起因する卵巣、乳腺及び下垂体への影響が認められた。全ての投与量（3/0.0225 mg/kg/日以上）で、投与開始後に雌の性周期が停止した。

血液学的及び血液生化学的パラメータの変化（高血糖を除く）の重症度は軽微から中等度であり、E4 の単独投与による変化とほぼ同様であった。

リンパ組織での所見（リンパ組織の萎縮や胸腺重量の減少を伴う胚中心の発達の欠如又は減少）は E4 に起因するものであり、二次感染などのリンパ組織の萎縮に伴う免疫機能の低下を示唆する毒性変化がないことから毒性とは判断しなかった。

心臓の病理組織学的所見を除き、いずれの変化も投与中止後に可逆性のエビデンスを示したが、必ずしも回復期間の終了時に対照値まで完全に回復しなかった。

観察された影響は、心臓の病理組織学的所見を除き、E4 及び LNG の薬理学的特性に起因するものと考えられる。心臓の観察所見及び関連する死亡に基づき、NOAEL は 3/0.0225 mg/kg/日と判断した。これらの投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び C_{max} は、E4 が 282 ng·hr/mL 及び 87.1 ng/mL、LNG が 145 ng·hr/mL 及び 20.7 ng/mL であった。

2.6.6.9.5 結論

雌のマウス、ラット又はサルを用いた反復経口投与毒性試験において、E4 はそのエストロゲン特性と一致し、投与中止後には可逆性である影響を誘発した。長期反復投与試験における NOAEL は、ラットでは 5 mg/kg/日、サルでは 3 mg/kg/日であった。これらの投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ は、ラットでは 736 ng·hr/mL、サルでは 328 ng·hr/mL であった。また、これらの投与量における投与終了時の C_{max} は、ラットでは 238 ng/mL、サルでは 97.2 ng/mL であった。これらの動物種における E4 の全身曝露量は、臨床試験で認められた全身曝露量と比較し、安全域は 3.7～9 倍であった（2.4 Table 3）。

同様に、DRSP を 6（4）mg/kg/日の投与量で単独投与した雌ザルにおける 13 週間反復投与毒性試験の所見も、DRSP の薬理学的特性を反映していた。E4 と DRSP の併用は、それぞれのホルモンの特性に関連した変化のほかに、雌サルにおいて可逆的ではあるが毒性と思われる高血糖を誘発した。高血糖は、エストロゲンやプロゲスチン配合剤の既知のリスクである。この所見の NOAEL は 3/0.6 mg/kg/日であり、E4 の $AUC_{0\text{-last}}$ は 482 ng·hr/mL、C_{max} は 173 ng/mL、DRSP の $AUC_{0\text{-last}}$ は 630 ng·hr/mL、C_{max} は 105 ng/mL であった。

E4 と LNG の併用により、雌ザルでは心臓への毒性と思われる肉眼的及び病理組織学的変化が認められた。全体的な所見は、ヒトの肥大型心筋症で報告されている所見と極めて類似していた。これらの所見の可逆性は実証されていない。この所見の NOAEL は 3/0.0225 mg/kg/日であり、$AUC_{0\text{-last}}$ は E4 が 282 ng·hr/mL、LNG が 145 ng·hr/mL、C_{max} は E4 が 87.1 ng/mL、LNG が 20.7 ng/mL であった。E4/LNG の併用でも高血糖が誘発され、その他の変化はこの 2 つの化合物の薬理学的特性と一致していた。

E4 の *in vitro* 遺伝毒性試験では、陽性の結果がいくつか認められたが、*in vivo* で高用量（2000 mg/kg）の E4 が遺伝毒性を示すという信憑性の高いエビデンスはなかった。概算の T_{max}（0.5 時間）における E4 の平均血漿中濃度は、22.8～42.2 µg/mL であった。DRSP は、ICH S2(R1)の一連の標準的試験において遺伝毒性は陰性であった。

2 年間のがん原性試験で、E4 は、マウスにおいて子宮及び子宮頸部上皮腫瘍、子宮間質腫瘍、乳腺腫瘍及び下垂体腫瘍を増加させ、ラットでは乳腺腫瘍を増加させた。マウスでは、がん原性は認められなかった 0.125 mg/kg/日の投与量における $AUC_{0\text{-last}}$ は 4.60 ng·hr/mL、C_{max} は 3.75 ng/mL であった。ラットでは、がん原性は認められなかった 0.27 mg/kg/日の投与量における $AUC_{0\text{-last}}$ は 18.8 ng·hr/mL、C_{max} は 9.99 ng/mL であった。

プロゲスチン単独の避妊薬は、IARC によりグループ 2B（ヒトに対する発がん性が疑われる）に分類されている（IARC, 1999）。

雌ラットを用いた受胎能回復性試験では、E4 の投与中止後に受胎能が回復することが確認された。受胎能及び初期胚発生に関する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった。同様に、DRSP は一過性の受胎能低下を引き起こした。

ウサギでは、E4 は 0.1 mg/kg/日 *bid* 以上の投与量の経口投与により、着床を完全に阻害した。ラットに DRSP/EE を 10/0.1 mg/kg/日の投与量で着床前の期間に投与したところ、着床前後の胚死亡率が上昇した。

ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、E4 は母体毒性用量で胚致死作用及び胎児発育遅滞を誘発した。ラット又はウサギのいずれにおいても、E4 に固有な催奇形性を示す所見は認められなかった。ラットで認められた肋骨の結節形成や波状を伴う長骨の弯曲や短縮及び肩甲骨の屈曲は、一過性であると判断された。胚・胎児発生に関する NOAEL は、ラットでは 0.3 mg/kg/日、ウサギでは 0.05 mg/kg/日であり、この投与量における $AUC_{0\text{-last}}$ はそれぞれ 9.33 ng·hr/mL 及び 6.84 ng·hr/mL、C_{max} はそれぞれ 6.83 ng/mL 及び 0.925 ng/mL であった。

DRSP の単独投与又は EE との併用投与により、胚致死作用及び胚毒性作用、並びに胎児の発育遅滞が生じた。また、DRSP は、その抗アンドロゲン特性によって、妊娠後期のラットに投与した場合に雄胎児の雌性化を引き起こした。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、E4 は母体毒性用量で分娩困難を引き起こし、F_0 雌の早期屠殺及び死亡に至った。分娩困難やその後の異常な母性行動により、分

娩後 4 日の生存率が低下した。F_0 雌の妊娠及び授乳に関する NOAEL は、それぞれ 0.5 及び 0.17 mg/kg/日であった。F_0 出生児の分娩後 4 日の生存に関する NOAEL は、0.17 mg/kg/日であった。F_0 出生児の分娩後 4 日以降の生存、並びに F_1 世代の発達、生殖能及び受胎能に関する NO(A)EL は、1.5 mg/kg/日であった。

DRSP を EE との併用で妊娠後期のラットに投与した場合にも、分娩困難が生じた。また、5/0.05～45/0.45 mg/kg/日の投与量の併用投与では、F_1 出生児の出生後の発育が遅滞し、死亡率が上昇した。

E4 は[redacted]社から入手する。E4 原薬の潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。DRSP 原薬は[redacted]社及び[redacted]社から入手する。[redacted]の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。[redacted]社の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。

E4 は光に曝露される組織への分布が比較的少なく、メラニンを含む構造に長時間滞留しないことが示されているため、ICH S10 に準じて、光毒性試験を実施しないことは妥当と考えられた。また、光毒性の症状（皮膚刺激、紅斑、そう痒、浮腫など）は、どの動物試験でも認められていない。

結論として、毒性プログラムで評価した毒性プロファイルに基づき、E4/DRSP は、E4 及び DRSP の薬理学的特性に起因する作用を除き、予期せぬ安全性上の問題を引き起こすとは考えられない。

2.6.6.10 参考文献

Archer DF, Thorneycroft IH, Foegh M, Hanes V, Glant MD, Bitterman P, et al. Long-term safety of drospirenone-estradiol for hormone therapy: a randomized, double-blind, multicenter trial. Menopause. 2005 Nov-Dec;12(6):716-27.

Bartholomeusz RK, Bruce NW, Lynch AM. Embryo survival, and fetal and placental growth following elevation of maternal estradiol blood concentrations in the rat. Biol Reprod. 1999 Jul;61(1):46-50.

Battenfeld R, Putz B, Siegmund F, Blode H. Sexual development in the rat after treatment with ethinylestradiol (EE) together with drospirenone (DRSP) during the fetal phase of gestation. 23rd Annual Conference of the European Teratorogy Society. 1995.Sep;20A.

[redacted]. Pregnancy rate trial in Wistar Han rats.[redacted] Study Number: 38083 RDR.

Buelke-Sam J, Bryant HU, Francis PC. The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: an overview of nonclinical pharmacology and reproductive and developmental testing. Reprod Toxicol. 1998a May-Jun;12(3):217-21.

Buelke-Sam J, Cohen IR, Wierda D, Griffey KI, Fisher LF, Francis PC. The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: a segment II/III delivery study in rats. Reprod Toxicol. 1998b May-Jun;12(3):271-88.

Buhl AE, Yuan YD, Cornette JC, Frielink RD, Knight KA, Ruppel PL, et al. Steroid-induced urogenital tract changes and urine retention in laboratory rodents. J Urol. 1985 Dec;134(6):1262-7.

[redacted]. Assessment of the Reproductive Hazard of Estetrol and Review of the Reproductive Toxicology Reports on Estetrol. [redacted] Study Reference ERX0006. 20[redacted].

De Oliveira CAR, Dos Reis Araujo T, Aguiar GS, da Silva Junior JA, Vettorazzi JF, Freitas IN, et al. Combined oral contraceptive in female mice causes hyperinsulinemia due to β-cell hypersecretion and reduction in insulin clearance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019 Jun;190:54-63.

De Schaepdrijver L, Delille P, Geys H, Boehringer-Shahidi C, Vanhove C. In vivo longitudinal micro-CT study of bent long limb bones in rat offspring. Reprod Toxicol. 2014 Jul;46:91-7.

Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. J Toxicol Pathol. 2014;27(3-4 Suppl):1S-107S.

Dougherty SM, Mazhawidza W, Bohn AR, Robinson KA, Mattingly KA, Blankenship KA, et al. Gender difference in the activity but not expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung adenocarcinoma cells. Endocr Relat Cancer. 2006 Mar;13(1):113-34.

Duijkers IJ, Klipping C, Grob P, Korver T. Effects of a monophasic combined oral contraceptive containing nomegestrol acetate and 17 beta-oestradiol on ovarian function in comparison to a monophasic combined oral contraceptive containing drospirenone and ethinylestradiol. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2010 Oct;15(5):314-25.

Edgren RA, Peterson DL. Delay of parturition in rats by various progestational steroids. Proc Soc Exp Biol Med. 1966 Dec;123(3):867-9.

Fabre A, Fournier A, Mesrine S, Desreux J, Gompel A, Boutron-Ruault MC, et al. Oral progestagens before menopause and breast cancer risk. Br J Cancer. 2007 Mar 12;96(5):841-4.

Food and Drug Administration(FDA). MEMORANDUM OF MEETING MINUTES. Type B: PIND Meeting. Application Number: PIND [redacted]. Reference ID: [redacted]. 20[redacted]

Food and Drug Administration(FDA). Response to Carcinogenicity Special Protocol Assessment Request - Final CAC Report - IND [redacted]. Reference ID: [redacted]. 20[redacted].

[redacted]. Position paper concerning the effects of combined estrogens and progestogens on glucose metabolism and its consequences in animals and in women. 20[redacted].

Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. Physiol Behav. 1999 Aug 1;67(1):141-7.

Girum T, Wasie A. Return of fertility after discontinuation of contraception: a systematic review and meta-analysis. Contracept Reprod Med. 2018 Jul 23;3:9. Erratum in: Contracept Reprod Med. 2023 Apr 21;8(1):29.

Greaves P. Histopathology of Pre-clinical Toxicity Studies - Endocrine glands. Academic Press; 2007. 805-6.

Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies - .Chapter 13 Endocrine Glands. Academic Press; 2012. 725-797.

Hammoud Z, Tan B, Badve S, Bigsby RM. Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma. Endocr Relat Cancer. 2008 Jun;15(2):475-83.

Harris C. A lipofuscin-like pigment in the kidneys of estrogen-treated rats. Arch Pathol. 1966 Oct;82(4):353-5.

Hart JE. Endocrine pathology of estrogens: species differences. Pharmacol Ther. 1990;47(2):203-18.

Hershberger PA, Vasquez AC, Kanterewicz B, Land S, Siegfried JM, Nichols M. Regulation of endogenous gene expression in human non-small cell lung cancer cells by estrogen receptor ligands. Cancer Res. 2005 Feb 15;65(4):1598-605.

Heywood R, Wadsworth PF. The experimental toxicology of estrogens. Pharmac. Ther. 1980; 8:125-42.

Hu HM, Zhang SB, Lei XH, Deng ZL, Guo WX, Qiu ZF, et al. Estrogen leads to reversible hair cycle retardation through inducing premature catagen and maintaining telogen. PLoS One. 2012;7(7):e40124.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 72, Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy. 1999.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 91, Combined Estrogen- Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen-Progestogen Menopausal Therapy. 2007.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Estrogen-only menopausal therapy. Volume 100A, Pharmaceuticals. 2012a.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Combined estrogen-progestogen menopausal therapy. Volume 100A, Pharmaceuticals. 2012b.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Combined estrogen-progestogen contraceptives. Volume 100A, Pharmaceuticals. 2012c.

Inoué.S. Experimental simulation of neuroendocrine dynamics at periparturient periods--a synthetic approach to pregnancy maintenance, parturition and lactation by programmed infusion of sex steroids in ovariectomized rats. Endocrinol Jpn. 1981 Dec;28(6):747-55.

[redacted]. Toxicological evaluation of [redacted] impurity in estetrol monohydrate drug substance. [redacted], 20[redacted].

Kim JY, Jo KJ, Kim OS, Kim BJ, Kang DW, Lee KH, et al. Parenteral 17β-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. Life Sci. 2010 Sep 11;87(11-12):358-66.

Kimmel CA, Garry MR, DeSesso JM. Relationship between bent long bones, bent scapulae, and wavy ribs: malformations or variations? Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014 Oct;101(5):379-92.

[redacted]. UteronPharma in-house report: Expert review of the genotoxicity of estetrol (E4). 20[redacted].

Konishi S, Kotera T, Koga M, Ueda M. Spontaneous hypertrophic cardiomyopathy in a cynomolgus macaque (Macaca fascicularis). J Toxicol Pathol. 2018 Jan;31(1):49-54.

Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. Endocrinology. 1993 Jun;132(6):2371-9.

Kroeker R, Bellanca RU, Lee GH, Thom JP, Worlein JM. Alopecia in three macaque species housed in a laboratory environment. Am J Primatol. 2014 Apr;76(4):325-34.

Kuroda H, Kohrogi T, Uchida N, Imai I, Terada N, Matsumoto K, et al. Urinary retention induced by estrogen injections in mice: an analytical model. J Urol. 1985 Dec;134(6):1268-70.

Laast VA, Larsen T, Allison N, Hoenerhoff MJ, Boorman GA. Distinguishing cystic degeneration from other aging lesions in the adrenal cortex of Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2014 Jul;42(5):823-9.

Lang R, Reimann R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. Environ Mol Mutagen. 1993;21(3):272-304.

Lin KK, Rahman MA. Overall false positive rates in tests for linear trend in tumor incidence in animal carcinogenicity studies of new drugs. J Biopharm Stat. 1998 Mar;8(1):1-15; discussion 17-22.

Maier WE, Herman JR. Pharmacology and toxicology of ethinyl estradiol and norethindrone acetate in experimental animals. Regul Toxicol Pharmacol. 2001 Aug;34(1):53-61.

Mann MA, Kinsley C, Broida J, Svare B. Infanticide exhibited by female mice: genetic, developmental and hormonal influences. Physiol Behav. 1983 May;30(5):697-702.

Martelli A, Mattioli F, Angiola M, Reimann R, Brambilla G. Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. Mutat Res. 2003 Apr 20;536(1-2):69-78.

McClain RM, Keller D, Casciano D, Fu P, MacDonald J, Popp J, et al. Neonatal mouse model: review of methods and results. Toxicol Pathol. 2001;29 Suppl:128-37.

Mclnnes EF. Background Lesions in Laboratory Animals - Chapter 2 Wistar and Sprague–Dawley rats. Elsevier; 2011. 17-36.

Mitchard T, Stewart J. The novel use of a heterozygous knockout mouse for embryofetal development assessment of a glucokinase activator. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014 Apr;101(2):152-61.

Monserrat AJ, Porta EA. Studies on the renal pigment of estrogen-treated rats histochemistry and electron microscopy. Exp Mol Pathol. 1978 Oct;29(2):211-27.

Muhn P, Krattenmacher R, Beier S, Elger W, Schillinger E. Drospirenone: a novel progestogen with antimineralocorticoid and antiandrogenic activity. Pharmacological characterization in animal models. Contraception. 1995 Feb;51(2):99-110.

Murakami G. Distinct Effects of Estrogen on Mouse Maternal Behavior: The Contribution of Estrogen Synthesis in the Brain. PLoS One. 2016 Mar 23;11(3):e0150728.

Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, Gustafsson JA, Paus R. The hair follicle as an estrogen target and source. Endocr Rev. 2006 Oct;27(6):677-706.

Pearse G. Histopathology of the thymus. Toxicol Pathol. 2006;34(5):515-47.

Pearse G, Frith J, Randall KJ, Klinowska T. Urinary retention and cystitis associated with subcutaneous estradiol pellets in female nude mice. Toxicol Pathol. 2009 Feb;37(2):227-34.

Reimann R, Kalweit S, Lang R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. Environ Mol Mutagen. 1996;28(2):133-44.

Rosenbaum P, Schmidt W, Helmerhorst FM, Wuttke W, Rossmanith W, Freundl F, et al. Inhibition of ovulation by a novel progestogen (drospirenone) alone or in combination with ethinylestradiol. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2000 Mar;5(1):16-24.

Santollo J, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. Behav Brain Res. 2008 Aug 22;191(2):173-7.

Schardein JL. Studies of the components of an oral contraceptive agent in albino rats. I. Estrogenic component. J Toxicol Environ Health. 1980 Jul;6(4):885-94.

[redacted]. Study synopsis, Microscopic examination of hearts stained with Masson's trichrome for background/historical data collection in mature mauritius female cynomolgus monkeys. [redacted] France No. 41792 EPP. 20[redacted].

Tang H, Liao Y, Xu L, Zhang C, Liu Z, Deng Y, et al. Estrogen and insulin-like growth factor 1 synergistically promote the development of lung adenocarcinoma in mice. Int J Cancer. 2013 Nov 15;133(10):2473-82.

Thoolen B, Ten Kate FJ, van Diest PJ, Malarkey DE, Elmore SA, Maronpot RR. Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions. J Toxicol Pathol. 2012 Sep;25(3):189-99.

Tobias JH, Chow J, Colston KW, Chambers TJ. High concentrations of 17 beta-estradiol stimulate trabecular bone formation in adult female rats. Endocrinology. 1991 Jan;128(1):408-12.

Uemura H, Irahara M, Yoneda N, Yasui T, Genjida K, Miyamoto KI, et al. Close correlation between estrogen treatment and renal phosphate reabsorption capacity. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Mar;85(3):1215-9.

[redacted]. Cardiac Lesions in a 13-Week Study with Estetrol/Levonorgestrel Combination in Cynomolgus Monkeys. Review of Cardiac Findings - [redacted] Study 40427 TCP. 20[redacted].

[redacted]. New Insights in Cardiac Pathology Observed in Studies with Estetrol, Estetroi/Levonorgestrel and Estetroi/Drospirenone Combinations in Female Mauritian Cynomolgus Monkeys. Review of Cardiac Findings in E4 Studies. 20[redacted].

Visser M, Coelingh Bennink HJ. Clinical applications for estetrol. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Mar;114(1-2):85-9.

Webster R, Sheriff S, Faroqui R, Siddiqui F, Hawse JR, Amlal H. Klotho/fibroblast growth factor 23- and PTH-independent estrogen receptor-α-mediated direct downregulation of NaPi-IIa by estrogen in the mouse kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Aug 1;311(2):F249-59.

Weisenburger WP, Hagler AR, Tassinari MS. Pre- and postnatal development studies of lasofoxifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM), in Sprague-Dawley rats. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2004 Jun;71(3):171-84.

Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. Gen Comp Endocrinol. 2010 May 1;166(3):520-8.

Xu H, Uno JK, Inouye M, Xu L, Drees JB, Collins JF, et al. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Dec;285(6):G1317-24.

Yanagimachi R, Sato A. Effects of a single oral administration of ethinyl estradiol on early pregnancy in the mouse. Fertil Steril. 1968 Sep-Oct;19(5):787-801.

Zabka TS, Irwin M, Albassam MA. Spontaneous cardiomyopathy in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Toxicol Pathol. 2009 Oct;37(6):814-8.

FSN-013

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7　毒性試験概要表

富士製薬工業株式会社

目次

2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表 10
2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧表 13
2.6.7.3.A トキシコキネティクス試験成績：エステトロール 13
2.6.7.3.B トキシコキネティクス試験成績：エステトロール／ドロスピレノン 14
2.6.7.3.C トキシコキネティクス試験成績：エステトロール／レボノルゲストレル 15
2.6.7.4 毒性試験： 被験物質一覧 16
2.6.7.5 単回投与毒性試験 19
2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験 20
2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 22
2.6.7.7.A エステトロールの反復投与毒性試験 22
2.6.7.7.B エステトロール＋ドロスピレノンの反復投与毒性試験 104
2.6.7.7.C エステトロール＋レボノルゲストレルの反復投与毒性試験 123
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 143
2.6.7.8.A エームス試験 1 143
2.6.7.8.B エームス試験 2 146
2.6.7.8.C エームス試験 3 148
2.6.7.8.D マウスリンフォーマ試験 1 151
2.6.7.8.E マウスリンフォーマ試験 2 154
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 157
2.6.7.9.A 小核試験 157
2.6.7.9.B コメット試験 1 159
2.6.7.9.C コメット試験 2 161
2.6.7.10 がん原性試験 164
2.6.7.10.A マウス 164
2.6.7.10.B ラット 175
2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 189
2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 194
2.6.7.12.A ラットを用いた受胎能回復性試験 1 194
2.6.7.12.B ラットを用いた受胎能回復性試験 2 198
2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 202
2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 202
2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 210
2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 218
2.6.7.15 新生児を用いた試験 226
2.6.7.16 局所刺激性試験 226
2.6.7.17 その他の毒性試験 227

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：エステトロール

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）[1]	GLP 適用[2]	実施施設[3]	試験番号（CTD 番号）
単回投与毒性試験（エステトロール）						
ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	単回投与＋14 日間の観察期間	10、100、1000	非適	[redacted]（フランス）	ES-T09（4.2.3.1-01）
サル／カニクイザル	経口（強制）	Day 1、3、6、14 に単回漸増投与	0、1、10、100、1000	適	[redacted]（ドイツ）	ES-T05（4.2.3.1-02）
反復投与毒性試験（エステトロール）						
マウス／CD-1	経口（強制）	2 週間	0、3、10、30	非適	[redacted]（フランス）	ES-T31（4.2.3.2-01）
マウス／CD-1	経口（強制）	4 週間	0、0.03、0.3、3、30	適	[redacted]（フランス）	ES-T34（4.2.3.2-02）
マウス／CD-1	経口（強制）	13 週間	0、0.3、1、3、10[4]	適	[redacted]（フランス）	ES-T40（4.2.3.2-03）
ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	10 日間	0, 100, 300, 1000[5]	非適	[redacted]（フランス）	ES-T09（4.2.3.1-01）
ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	4 週間＋2 週間の休薬期間	0、5、15、50、150	適	[redacted]（フランス）	ES-T10（4.2.3.2-04）
ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	26 週間＋8 週間の休薬期間	0、1.5、5、15	適	[redacted]（フランス）	ES-T18（4.2.3.2-05）

1) 下線は反復投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）

2) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

3) 実施施設：[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，フランス
[redacted]（ドイツ）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，ドイツ

4) 本試験は、同じ動物種及び系統を用いたがん原性試験の用量設定試験であったため、NOAEL は判断されなかった。

5) 本試験は、同じ動物種及び系統を用い 4 週間反復投与試験の用量設定試験であったため、NOAEL は判断されなかった。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）[1]	GLP 適用 [2]	実施施設 [3]	試験番号（CTD 番号）
反復投与毒性試験（エステトロール）（続き）						
ラット／Wistar	経口（強制）	13 週間	0、0.2、0.6、2、6 [4]	適	[redacted]（フランス）	ES-T39（4.2.3.2-06）
サル／カニクイザル	経口（強制）	4 週間	0、5、<u>15</u>、50	適	[redacted]（フランス）	ES-T11（4.2.3.2-07）
サル／カニクイザル	経口（強制）	13 週間 ＋4 週間の休薬期間	0、<u>3</u>、10、30	適	[redacted]（フランス）	ES-T15（4.2.3.2-08）
サル／カニクイザル	経口（強制）	39 週間 ＋6 週間の休薬期間	0、1、<u>3</u>、10	適	[redacted]（フランス）	ES-T20（4.2.3.2-09）
反復投与毒性試験（エステトロール、ドロスピレノン）						
サル／カニクイザル	経口（強制）	13 週間 ＋4 週間の休薬期間	エステトロール／ドロスピレノン：0/0、<u>3/0.6</u>、10/2、30/6（20/4） [5] エステトロール：30（20） [5] ドロスピレノン：6（4） [5]	適	[redacted]（フランス）	0030-NC-002（4.2.3.2-10）

1) <u>下線</u>は反復投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）

2) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

3) 実施施設：[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，フランス

4) 本試験は、同じ動物種及び系統を用いたがん原性試験の用量設定試験であったため、NOAEL は判断されなかった。

5) 高用量併用投与群、及び、エステトロール又はドロスピレノン単剤の投与量は、一般状態悪化／早期屠殺のため、Day 50（エステトロール／ドロスピレノンの併用）又は Day 53（エステトロール又はドロスピレノン単剤）に減量した。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）[1]	GLP 適用[2]	実施施設[3]	試験番号（CTD 番号）
反復投与毒性試験（エステトロール、レボノルゲストレル）						
サル／カニクイザル	経口（強制）	13 週間 ＋4 週間の休薬期間	エステトロール／レボノルゲストレル：0/0、3/0.0225、10/0.075、30/0.225（20/0.150）[4] エステトロール：30（20）[4] レボノルゲストレル：0.225（0.150）[4]	適	[redacted]（フランス）	0031-NC-018（4.2.3.2-11）
遺伝毒性試験（エステトロール）						
エームス試験 1 ／*S. typhimurium* ／TA1535、TA1537、TA98、TA100、TA102	*In vitro*	48～72 時間	TA1535（試験 1）、TA100 －/＋S9 0、78.13、156.3、312.5、625、1250、2500 µg/プレート TA1535（試験 2）、TA1537、TA98、TA102 －/＋S9 0、156.3、312.5、625、1250、2500、5000 µg/プレート	適	[redacted]（フランス）	ES-T21（4.2.3.3.1-01）
エームス試験 2 ／*S. typhimurium*／TA102	*In vitro*	48～72 時間	－/＋S9 0、312.5、625、1250、2500、5000 µg/プレート	非適	[redacted]（フランス）	ES-T29（4.2.3.3.1-02）

1) 下線は反復投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）

2) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

3) 実施施設：[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，フランス

4) 高用量併用投与群、及び、エステトロール又はレボノルゲストレル単剤の投与量は、一般状態悪化／早期屠殺のため Day 51 に減量した。

略語：S9＝代謝活性化系、*S. typhimurium*＝ネズミチフス菌

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1]	実施施設 [2]	試験番号（CTD 番号）
遺伝毒性試験（エステトロール）（続き）						
エームス試験／*S. typhimurium*／TA102 及び *E. coli* WP2*uvrA*	*In vitro*	48±4 時間	－/＋S9 0、3、10、33、100、333、1000、3330、5000 µg/プレート	非適	[redacted]（オランダ）	ES-T47 [3]
エームス試験 3／*S. typhimurium*／TA102 及び *E. coli* WP2*uvrA*	*In vitro*	48±4 時間	－/＋S9 0、100、333、1000、3330、5000 µg/プレート	適	[redacted]（オランダ）	ES-T48（4.2.3.3.1-03）
マウスリンフォーマ試験 1／L5178Y *TK*$^{+/-}$マウスリンパ腫細胞	*In vitro*	－S9 3 時間又は 24 時間 ＋S9 3 時間	試験 1、－/＋S9 0、31.3、62.5、125、250、500、750、1000 µg/mL 試験 2、－S9 0、15.6、31.3、62.5、125、187.5、250、375 µg/mL 試験 2、＋S9 0、62.5、125、250、500、750、875、1000 µg/mL	適	[redacted]（フランス）	ES-T22（4.2.3.3.1-04）
マウスリンフォーマ試験 2／L5178Y *TK*$^{+/-}$マウスリンパ腫細胞	*In vitro*	－S9 3 時間又は 24 時間 ＋S9 3 時間	試験 1、－S9 0、0.031、0.063、0.13、0.25、0.5、1 mM 試験 2、－S9 試験 1 及び 2、＋S9 0、0.031、0.063、0.13、0.25、0.5、0.75、1 mM	適	[redacted]（フランス）	ES-T45（4.2.3.3.1-05）

[1] 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

[2] 実施施設：[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，フランス
[redacted]（オランダ）：[redacted]，（現[redacted].），[redacted]，オランダ

[3] 本試験のデータは提示しない。

略語：*E. coli*＝大腸菌、S9＝代謝活性化系、*S.typhimurium*＝ネズミチフス菌

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1)]	実施施設 [2)]	試験番号（CTD 番号）
遺伝毒性試験（エステトロール）（続き）						
小核試験／ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	単回投与	0、500、1000、2000	適	[redacted]（フランス）	ES-T37（4.2.3.3.2-01）
コメットアッセイ 1／ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	24 時間間隔で 2 回投与	0、500、1000、2000	適	[redacted]（フランス）	ES-T46（4.2.3.3.2-02）
コメットアッセイ 2／ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	0 時間及び 21 時間に 2 回投与	0、62.5、125、250、500、1000、2000	適	[redacted]（英国）	0030-NC-001（4.2.3.3.2-03）
がん原性試験（エステトロール）						
マウス／CD-1	経口（強制）	104 週間	0、0.125、0.25、0.5、1	適	[redacted]（フランス）	0031-NC-004（4.2.3.4.1-01）
ラット／Wistar	経口（強制）	104 週間	0、0.08、0.27、0.8	適	[redacted]（フランス）	0031-NC-003（4.2.3.4.1-02）
生殖発生毒性試験（エステトロール）						
受胎能回復性試験 1／ラット／Wistar	経口（強制）	交配前 4 週間＋3 週間の休薬期間	0、0.17、0.5、1.5 [3)]	適	[redacted]（フランス）	ES-T27（4.2.3.5.1-01）
受胎能回復性試験 2／ラット／Wistar	経口（強制）	交配前 4 週間＋3 週間の休薬期間	0、0.17、0.5、1.5 [4)]	適	[redacted]（フランス）	ES-T43（4.2.3.5.1-02）

1) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

2) 実施施設：[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，フランス
[redacted]（英国）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，英国
[redacted]（フランス）：[redacted]，フランス

3) 母体耐性及び性周期に関する無毒性量（NOAEL）は 0.17 mg/kg であったが、受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL は同定できなかった。

4) 母体耐性に関する無毒性量（NOAEL）は 0.5 mg/kg、受胎能及び初期胚発生に関する無影響量（NOEL）は 1.5 mg/kg であった。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1)]	実施施設 [2)]	試験番号（CTD 番号）
生殖発生毒性試験（エステトロール）（続き）						
DRF EFD／ラット／Wistar	経口（強制）	G6～G17	0、30、60、90	適	[redacted]（英国）	ES-T01（4.2.3.5.2-01）
DRF EFD／ラット／Wistar	経口（強制）	G6～G17	0、0.1、0.3、1、3、10	適	[redacted]（英国）	ES-T02（4.2.3.5.2-02）
EFD／ラット／Wistar	経口（強制）	G6～G17	0、0.3、1、3 [3)]	適	[redacted]（英国）	ES-T03（4.2.3.5.2-03）
受胎能及び着床に関する試験の DRF／ウサギ／NZW	経口（強制）	交配前の 4 日間、G9 までの交尾日	0、0.01、0.03、0.1、0.3、1 1 日 2 回（*bid*）	非適	[redacted]（米国）	ES-T04（4.2.1.1-09） ES-T04-BR1031（4.2.1.1-10）
DRF EFD／ウサギ／NZW	経口（強制）	G7～G15	0.06、0.2、0.6	非適	[redacted]（米国）	ES-T16（4.2.3.5.2-04）
EFD／ウサギ／NZW	経口（強制）	G6～G18	0、0.05、0.15、0.45 [4)]	適	[redacted]（フランス）	ES-T19（4.2.3.5.2-05）
DRF PPND／ラット／Wistar	経口（強制）	交尾後 6 日～分娩後 21 日	0、0.17、0.5、1.5	非適	[redacted]（フランス）	Es0001-NC-001（4.2.3.5.3-01）
DRF PPND／ラット／Wistar	経口（強制）	交尾後 6～18 日 ＋分娩後 1～4 日	1.5	非適	[redacted]（フランス）	Es0001-NC-009（4.2.3.5.3-02）
PPND／ラット／Wistar	経口（強制）	交尾後 6～18 日 ＋分娩後 1～21 日	0、0.17、0.5、1.5 [5)]	適	[redacted]（フランス）	Es0001-NC-003（4.2.3.5.3-03）

1) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

2) 実施施設： [redacted]（米国）：[redacted], 米国
[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]）, [redacted], フランス
[redacted]（英国）：[redacted]（現[redacted]）, [redacted], 英国

3) 胚・胎児発生に関する無毒性量（NOAEL）は 0.3 mg/kg であったが、母体毒性に関する NOAEL は同定できず、0.3 mg/kg 付近であると推定された。

4) 胚・胎児発生及び母体毒性に関する無毒性量（NOAEL）は 0.05 mg/kg であった。

5) F_1 世代の発達、生殖能及び受胎能に関する無毒性量（NOAEL）は 1.5 mg/kg であった。

略語： *bid*＝1 日 2 回、D＝Day、DRF＝用量設定、EFD＝胚・胎児発生、G＝妊娠日齢、NZW＝ニュージーランドホワイト、
PPND＝出生前及び出生後の発生並びに母体の機能

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1)]	実施施設 [2)]	試験番号（CTD 番号）
局所刺激性試験（エステトロール）：独立した試験ではなく、反復投与毒性試験の一部として実施した。						
その他の毒性試験（エステトロール）						
活性酸素種の誘導／L5178Y *TK*$^{+/-}$マウスリンパ腫細胞	*In vitro*	3 時間	実験 1 及び 2 0、1、10、50、100 µM 実験 3 0、1、10、50、100、1000、3000 µM	非適	[redacted]（フランス）	ES-T44（4.2.3.7.7-01）
不純物の毒性試験	潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、モジュール 2.3.S.3.2、3.2.S.3.2、2.6.6.8 及び原薬等登録原簿エステトロール水和物（登録番号：[redacted]、登録年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に記載されている。					
光毒性試験	いずれの動物試験においても、光毒性の症状は認められていない。エステトロールは光に曝露される組織への分布が比較的弱く、メラニン含有構造における長時間の滞留は認められないため、光毒性試験は不要であった（モジュール 2.4 参照）					
その他の毒性試験（ドロスピレノン）						
不純物の毒性試験	潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、モジュール 2.3.S.3.2、3.2.S.3.2、2.6.6.8、原薬等登録原簿ドロスピレノン「[redacted]」（登録番号：[redacted]、登録年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日）及び原薬等登録原簿ドロスピレノン（登録番号：[redacted]、登録年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に記載されている。					

1) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

2) 実施施設：[redacted]（フランス）：[redacted]（現[redacted]），[redacted]，フランス

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：エステトロール

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1)]	試験番号（CTD 番号）
TK（エステトロール）					
2 週間反復投与毒性試験	マウス／CD-1	経口（強制）	3、10、30	非適	ES-T31（4.2.3.2-01）
4 週間反復投与毒性試験	マウス／CD-1	経口（強制）	0.03、0.3、3、30	適	ES-T34（4.2.3.2-02）
13 週間反復投与毒性試験	マウス／CD-1	経口（強制）	0.3、1、3、10	適	ES-T40（4.2.3.2-03）
がん原性試験 [2)]	マウス／CD-1	経口（強制）	0.125、0.25、0.5、1	適	0031-NC-004（4.2.3.4.1-01）
4 週間反復投与毒性試験	ラット／SD	経口（強制）	5、15、50、150	適	ES-T10（4.2.3.2-04）
26 週間反復投与毒性試験	ラット／SD	経口（強制）	1.5、5、15	適	ES-T18（4.2.3.2-05）
13 週間反復投与毒性試験	ラット／Wistar	経口（強制）	0.2、0.6、2、6	適	ES-T39（4.2.3.2-06）
がん原性試験 [2)]	ラット／Wistar	経口（強制）	0.08、0.2、0.8	適	0031-NC-003（4.2.3.4.1-02）

1) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

2) Week 12 及び 25 に、トキシコキネティクス評価のために採血を実施した（サテライト群）。

略語： SD＝Sprague-Dawley、TK＝トキシコキネティクス

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表 （続き）

被験物質：エステトロール

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1)]	試験番号（CTD 番号）
TK（エステトロール）					
最大耐量 [2)]	サル／カニクイザル	経口（強制）	1、10、100、1000	適	ES-T05（4.2.3.1-02）
4 週間反復投与毒性試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	5、15、50	適	ES-T11（4.2.3.2-07）
13 週間反復投与毒性試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	3、10、30	適	ES-T15（4.2.3.2-08）
39 週間反復投与毒性試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	1、3、10	適	ES-T20（4.2.3.2-09）
DRF EFD	ラット／Wistar	経口（強制）	30、60、90	適	ES-T01（4.2.3.5.2-01）
DRF EFD	ラット／Wistar	経口（強制）	0.1、0.3、1、3、10	適	ES-T02（4.2.3.5.2-02）
受胎能及び着床に関する試験の DRF	ウサギ／NZW	経口（強制）	0.1、1 *bid*	非適	ES-T04（4.2.1.1-09） ES-T04-BR1031（4.2.1.1-10）
EFD	ウサギ／NZW	経口（強制）	0.05、0.15、0.45	適	ES-T19（4.2.3.5.2-05）

1) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

2) このデータは TS 表 2.6.7.3.A から除外した。エステトロールを 2～8 日間隔で単回漸増投与し、定常状態での AUC は算出しなかった。

略語： *bid*＝1 日 2 回、DRF＝用量設定、EFD＝胚・胎児発生、NZW＝ニュージーランドホワイト、TK＝トキシコキネティクス、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表 （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

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg/kg）	GLP 適用 [1)]	試験番号（CTD 番号）
TK（エステトロール、ドロスピレノン）					
13 週間反復投与毒性試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	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)]	適	0030-NC-002（4.2.3.2-10）
TK（エステトロール、レボノルゲストレル）					
13 週間反復投与毒性試験	サル／カニクイザル	経口（強制）	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）[3)] エステトロール：30（20）[3)] レボノルゲストレル：0.225（0.150）[3)]	適	0031-NC-018（4.2.3.2-11）

1) 試験に GLP 適合陳述書が含まれていることを示す。

2) 高用量併用投与群、及び、エステトロール又はドロスピレノン単剤の投与量は、一般状態悪化／早期屠殺のため、Day 50（エステトロール／ドロスピレノンの併用）又は Day 53（エステトロール又はドロスピレノン単剤）に減量した。

3) 高用量併用投与群、及び、エステトロール又はレボノルゲストレル単剤の投与量は、一般状態悪化／早期屠殺のため Day 51 に減量した。

略語：TK＝トキシコキネティクス

2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧表

2.6.7.3.A トキシコキネティクス試験成績：エステトロール

被験物質：エステトロール

	経口投与後の定常状態における $AUC_{0\text{-}last}$（ng·hr/mL）[1]						
動物種／系統：	**マウス／CD-1**	**ラット／SD**	**ラット／Wistar**	**ラット／Wistar [2]**	**ウサギ／NZW [2]**	**サル／カニクイザル**	**ヒト**
投与量（mg/kg） 0.03	1.99						
0.05					6.84		
0.08			6.62 / 6.73				
0.1				4.58	12.1 [3]		
0.125	4.14 / 4.60						
0.15					28.5		
0.2			21.4				
0.25	12.5 / 12.4						
0.27			14.7 / 18.8				
0.3	21.3 / 21.6			9.33			
0.45					57.5		
0.5	28.6 / 23.6						
0.6			57.6				
0.8			45.6 / 40.7				
1	87.2 / 50.6 / 54.6			37.7		163 / 109 / 123	
1.5		158 / 196					
2			173				6.90 [4]
3	205 / 227 / 292			139		363 / 402 / 312 / 328	
5		592 / 594 / 736				1153	
6			595				
10	590 / 872			350	83.9 [3]	1215 / 1420 / 1024 / 1250	37.2 [4]
15		1958 / 1958 / 2376				3640	59.1 [5]
20							78.9 [6]
30	1255 / 2004			1870		3497	
40							193 [6]
50		7179				9327	
60				6897			
90				7792			
150		40648					

1) 動物への投与は強制経口投与とした。データは雌動物のみから得た。

2) 交配させた動物や妊娠動物。

3) 1 日 2 回投与

4) 男性（試験番号 PR3077、モジュール 5.3.3.1）。

5) 妊娠可能な女性に、エステトロール 15 mg／ドロスピレノン 3 mg を 14 日間投与した（試験番号 MIT-Es0001-C103、モジュール 5.3.3.1）。

6) 閉経後の女性（試験番号 PR3054、モジュール 5.3.3.1）。

略語：$AUC_{0\text{-last}}$＝最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、NZW＝ニュージーランドホワイト、SD＝Sprague-Dawley

2.6.7.3.B トキシコキネティクス試験成績：エステトロール／ドロスピレノン

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

	経口投与後の定常状態における $AUC_{0\text{-last}}$（ng·hr/mL） [1]	
動物種／系統	サル／カニクイザル	
分析対象物	エステトロール	ドロスピレノン
エステトロール／ドロスピレノンの投与量（mg/kg）		
3 / 0.6	483	630
10 / 2	1608	1867
30 / 6（20 / 4） [2]	3733	2769
30 / 0（20 / 0） [2]	2281	—
0 / 6（0 / 4） [2]	—	3150

1) 動物への投与は強制経口投与とした。データは雌動物のみから得た。

2) 高用量併用投与群、及び、エステトロール又はドロスピレノン単剤の投与量は、一般状態悪化／早期屠殺のため、Day 50（エステトロール／ドロスピレノンの併用）又は Day 53（エステトロール又はドロスピレノン単剤）に減量した。

略語：$AUC_{0\text{-last}}$＝最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積

2.6.7.3.C トキシコキネティクス試験成績：エステトロール／レボノルゲストレル

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

	経口投与後の定常状態における $AUC_{0\text{-}last}$（ng·hr/mL）[1]	
動物種／系統	サル／カニクイザル	
分析対象物	エステトロール	レボノルゲストレル
エステトロール／レボノルゲストレルの投与量（mg/kg）		
3 / 0.0225	282	145
10 / 0.075	934	197
30 / 0.225（20 / 0.150）[2]	1858	291
30 / 0（20 / 0）[2]	1913 [3]	—
0 / 0.225（0 / 0.150）[2]	—	106

[1] 動物への投与は強制経口投与とした。データは雌動物のみから得た。

[2] 高用量併用投与群、及び、エステトロール又はレボノルゲストレル単剤の投与量は、一般状態悪化／早期屠殺のため Day 51 に減量した。

[3] 本群ではレボノルゲストレルの混入が認められた。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質一覧

被験物質：エステトロール

バッチ番号	純度（%）	水分含量（%）	規格設定された不純物（%）[1]					試験番号	試験の種類
			1	2	3	4	その他		
申請規格：	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
CS02-032A-801	99.8	5.5	ND	0.22/0.17 [2]	0.23 [2]	0.16 [2]	0.2	ES-T09	ラット単回投与及び10日間反復投与毒性試験
								ES-T10	ラット4週間反復投与毒性試験
								ES-T18	ラット26週間反復投与毒性試験
								ES-T11	サル4週間反復投与毒性試験
								ES-T01	ラットEFDのDRF
								ES-T02	ラットEFDのDRF
								ES-T03	ラットEFD
								ES-T19	ウサギEFD
CS02-032A-801	99.87 [3]	6.1 [3]	ND [3]	0.22/0.17 [2]	0.23 [2]	0.16 [2]	0.20	ES-T31	マウス2週間反復投与毒性試験
								ES-T34	マウス4週間反復投与毒性試験
								ES-T18	ラット26週間反復投与毒性試験
								ES-T21	エームス試験1
								ES-T29	エームス試験2
								ES-T22	マウスリンフォーマ試験1
								ES-T37	ラット骨髄小核試験
								ES-T27	ラット受胎能回復性試験1
								ES-T44	活性酸素種の誘導
								ES-T47	エームス試験

[1] 不純物1：[redacted]；不純物2：[redacted]（[redacted]）；不純物3：[redacted]（[redacted]）；不純物4：[redacted]（[redacted]）。ここに示す規格は現行の規格である（詳細はモジュール3.2.Sを参照）。その他の不純物：詳細はモジュール3.2.Sを参照。

[2] 改良したHPLC法を用いた再試験（2013年Q4）によるデータ。

[3] 再試験（2011年Q4）によるデータ。

略語：DRF＝用量設定、EFD＝胚・胎児発生、ND＝検出せず

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 （続き）

被験物質：エステトロール

バッチ番号	純度（%）	水分含量（%）	規格設定された不純物（%）[1]					試験番号	試験の種類
			1	2	3	4	その他		
申請規格：	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
CS02-032A-801	99.53 [2]	5.9 [2]	ND [2]	0.22/ 0.17 [3]	0.23 [3]	0.16 [3]	0.20	ES-T48 ES-T45 ES-T46 0030-NC-001	エームス試験 3 マウスリンフォーマ試験 2 ラットコメットアッセイ 1 ラットコメットアッセイ 2
CS02-032A-1001	99.6	4.8 [4]	ND	0.41	ND	ND	0.15	ES-T15 ES-T20	サル 13 週間反復投与毒性試験（エステトロール） サル 39 週間反復投与毒性試験
CS02-032Am-1001	99.5	4.8 [4]	0.08 [3]	0.36/ 0.33 [3]	1.1 [3]	0.26 [3]	0.16	ES-T40 ES-T39 ES-T43	マウス 13 週間反復投与毒性試験 ラット 13 週間反復投与毒性試験 ラット受胎能回復性試験 2
CS02-032-SB-231-3-1	99.3	5.9	ND	0.12 [3]	0.20 [3]	0.17 [3]	0.41	ES-T05 ES-T04 ES-T16	サルにおける最大耐量 ウサギ受胎能及び着床に関する試験の DRF ウサギ EFD の DRF

[1] 不純物 1：[redacted]；不純物 2：[redacted]（[redacted]）；不純物 3：[redacted]（[redacted]）；不純物 4：[redacted]（[redacted]）。
ここに示す規格は現行の規格である（詳細はモジュール 3.2.S を参照）。その他の不純物：詳細はモジュール 3.2.S を参照。

[2] 再試験（2013 年 Q1）によるデータ。

[3] 改良した HPLC 法を用いた再試験（2013 年 Q4）によるデータ。

[4] 水分含量は規格外であったが、水分含量について投与量を補正したため、許容された。

略語：DRF＝用量設定、EFD＝胚・胎児発生、ND＝検出せず

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 （続き）

被験物質：エステトロール

バッチ番号	純度（%）	水分含量（%）	規格設定された不純物（%）[1]					試験番号	試験の種類
			1	2	3	4	その他		
申請規格：	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
CS02-032A-1203	99.71	5.5	ND	0.13/ 0.11 [2]	0.17 [2]	0.08 [2]	0.12	0030-NC-002 0031-NC-018 0031-NC-004 0031-NC-003	サル 13 週間反復投与毒性試験（エステトロール／ドロスピレノン）[5] サル 13 週間反復投与毒性試験（エステトロール／レボノルゲストレル）[6] マウスがん原性試験 ラットがん原性試験
CS02-032A-1203	99.84	6.0	ND	0.16/ 0.11 [3]	0.17 [3]	0.08 [3]	ND	Es0001-NC-001 0031-NC-004	ラット PPND の DRF マウスがん原性試験
CS02-032A-1203	99.88	5.8	ND	0.12 / 0.11 [4]	0.17 [4]	0.08 [4]	ND	Es0001-NC-009 Es0001-NC-003	ラット PPND の DRF ラット PPND

[1] 不純物 1：[redacted]；不純物 2：[redacted]（[redacted]）；不純物 3：[redacted]（[redacted]）；不純物 4：[redacted]（[redacted]）。ここに示す規格は現行の規格である（詳細はモジュール 3.2.S を参照）。その他の不純物：詳細はモジュール 3.2.S を参照。

[2] 改良した HPLC 法を用いた再試験（2013 年 Q4）によるデータ。

[3] 再試験（2014 年 Q3）によるデータ。

[4] 再試験（2016 年 Q1）によるデータ。

[5] ドロスピレノンのバッチ番号は 9037MO80112、定量：101.6%、供給元：[redacted]，イタリア

[6] レボノルゲストレルのバッチ番号は PR130729、定量：99.7%、供給元：[redacted]，イタリア

略語：DRF＝用量設定、ND＝検出せず、PPND＝出生前及び出生後の発生並びに母体の機能

2.6.7.5 単回投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法（溶媒／投与形態）</th><th>投与量（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>最大非致死量（mg/kg）</th><th>概略の致死量（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>ラット／Sprague-Dawley [1)]</td><td>経口（強制）
［0.5%（w/v）CMC水溶液中に2、20、200 mg/mL］</td><td>10、100、1000</td><td>雌4例</td><td>1000</td><td>>1000</td><td>死亡又は一般状態変化なし
≥100: 体重増加量の減少（10 mg/kgとの比較）</td><td>ES-T09</td></tr>
<tr><td>サル／カニクイザル [2)]</td><td>経口（強制）
［0.5%（w/v）CMC水溶液中に0.1、1、10、100 mg/mL］</td><td>0、1、10、100、1000</td><td>雌3又は4例</td><td>1000</td><td>>1000</td><td>死亡なし
≥10: ALP減少
≥100: 無機リン減少
1000: 嘔吐（雌1/4例）; RBC、Hb、PCV減少
TK：
<table>
<tr><th>投与量（mg/kg）</th><th>$AUC_{0\text{-last}}$（ng·hr/mL）</th><th>C_{max}（ng/mL）</th><th>T_{max}（時間）</th></tr>
<tr><td>1</td><td>69.3</td><td>330.5</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>10</td><td>6816</td><td>2282</td><td>1.25</td></tr>
<tr><td>1000</td><td>93303</td><td>13564</td><td>4.5</td></tr>
</table></td><td>ES-T05</td></tr>
</table>

1) ラットを用いたES-T09試験は、同じ動物種及び系統を用いる4週間反復投与毒性試験の投与量設定を目的として、単回及び反復投与、用量設定試験の一部として実施した。

2) サルを用いたES-T05試験は最大耐量で実施した。Day 1、3、6及び14にエステトロールを4例のサルに単回漸増投与し、同じ日に溶媒を対照群の3例のサルに投与した。

略語： ALP＝アルカリホスファターゼ、$AUC_{0\text{-last}}$＝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、CMC＝カルボキシメチルセルロース、Hb＝ヘモグロビン、PCV＝血中血球容積、RBC＝赤血球数、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max}到達時間

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><th>動物種／
系統</th><th>投与方法
（溶媒／
投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量
（mg/kg/日）</th><th>性別及び
一群の
動物数</th><th>NOAEL
（mg/kg/日）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td>マウス／
CD-1</td><td>経口（強制）
［0.5%（w/v）
CMC 水溶液中
に 0、0.3、1、
3 mg/mL］</td><td>2 週間</td><td>0、3、10、30</td><td>雌 12 例</td><td>NR [1)]</td><td>死亡又は一般状態変化なし
≥3: 体重増加量の増加
10: 体重増加
≥10: 摂餌量増加
30: 半透明の内容物を伴う子宮拡張
（雌 2/12 例）；卵巣嚢胞（雌 1/12 例）
TK：
<table>
<tr><th>Day</th><th>投与量
(mg/kg)</th><th>$AUC_{0\text{-}last}$
(ng·hr/mL)</th><th>C_{max}
(ng/mL)</th><th>T_{max}
(時間)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>3</td><td>216</td><td>281</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>10</td><td>545</td><td>552</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>30</td><td>1656</td><td>1125</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>14</td><td>3</td><td>205</td><td>255</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>10</td><td>590</td><td>515</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>30</td><td>1255</td><td>1260</td><td>0.5</td></tr>
</table></td><td>ES-T31</td></tr>
</table>

1) NOAEL は判断されなかったが、エステトロールは本試験条件下で良好な忍容性を示し、全身毒性を誘発しなかったと結論されている。

略語： $AUC_{0\text{-}last}$＝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、CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量、NR＝報告なし、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験 （続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg/日）	性別及び一群の動物数	NOAEL（mg/kg/日）	特記すべき所見	試験番号
ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）［0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、20、60、200 mg/mL］	10 日間	0、100、300、1000	雌 4 例	NR [1)]	死亡なし ≥100: 体重減少 ; 摂餌量減少 ; RBC 減少 ; PT 延長 ; フィブリノーゲン減少 ; Na、Cl、無機リン、総コレステロール、A/G 比の減少／低下 ; 総蛋白、総ビリルビン、ALP の増加 ; 顕著な小葉像を伴う白色の肝臓（各群雌 1/4 例）; 胸腺の退縮（各群雌 3 又は 4/4 例）; 軽微～中等度の小葉中間帯～中心性の肝細胞空胞化（各群雌 1/4 例） ≥300: 円背 ; 立毛 ; 鼻口部の汚れ ; WBC（リンパ球）減少 ; ALT 増加 ; 子宮重量増加（300 で空重量、1000 で満重量又は空重量）; 半透明の内容物を伴う子宮拡張（各群雌 3 又は 4/4 例） 1000: 四肢の蒼白化 ; 削痩 ; AST 増加 ; 卵巣重量増加 ; 卵巣嚢胞（雌 1/4 例）; 肝臓の軽微な単細胞壊死／アポトーシス（雌 1/4 例）	ES-T09

[1)] NOAEL は判断されなかったが、報告書では 4 週間反復投与毒性試験の高用量として 150 mg/kg/日が適切であると結論されている。

略語： A/G 比＝アルブミン／グロブリン比、ALP＝アルカリホスファターゼ、ALT＝アラニンアミノトランスフェラーゼ、AST＝アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、Cl＝クロール、CMC＝カルボキシメチルセルロース、Na＝ナトリウム、NOAEL＝無毒性量、NR＝報告なし、PT＝プロトロンビン時間、RBC＝赤血球数、WBC＝白血球数

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

2.6.7.7.A エステトロールの反復投与毒性試験

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: 4-week toxicity study by the oral route (gavage) in mice</td><td>試験番号：ES-T34</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：マウス／CD-1
［CD1®Crl: CD-1®（ICR）IGS］</td><td>投与期間：4 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-02</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：6～7 週齢</td><td>休薬期間：なし</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.003、0.03、0.3 又は 3 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 6.1%であったため、1.07 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• Day 1 及び 27/28 に、エステトロール濃度分析のためサテライト群の雌から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：30 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**
TK					
サテライト群の動物数：	雌 4 例	雌 12 例	雌 12 例	雌 12 例	雌 12 例
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）		1.74	15.1	150	2280
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	1.13	9.96	99.7	1976
T_{max} （時間）		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）		2.01	1.52	2.77	2.00
反復投与：D27 / D28					
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）		1.99	21.3	227 [2)]	2004 [2)]
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	1.04	11.2	159	844
T_{max} （時間）		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）		2.68	1.59	3.28	2.21
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	0	0
体重（%） [1)]	27.6 g	-3	+3	+13**	+11**
体重増加量（g） D1～D28	+1.1	+1.1	+2.5*	+5.6**	+4.5**
摂餌量（%） [1)]	5.2 g/動物/日	-13	-10	+8	+2
摂水量	NP	NP	NP	NP	NP

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 投与前の検体が LLOQ 未満でなかった場合は、投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語： $AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、NP＝測定せず、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**
一般状態	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-
血液生化学的検査					
無機リン （mmol/L）	1.92	1.95	1.80	2.25	2.34*
尿素 （mmol/L）	10.4	9.3	8.3	7.5**	7.7*
クレアチニン （µmol/L）	35	34	32*	29**	30**
総蛋白 （g/L）	53	52	55	54	58*
トリグリセリド （mmol/L）	0.74	1.00	1.13	1.02	1.28**
尿検査	NP	NP	NP	NP	NP
器官重量（%） 1)					
評価動物数	12	12	12	12	12
肝臓 - 絶対重量	0.97050 g	0	+4	+39**	+54**
- 相対重量	3.94 %	+3	+1	+25**	+42**
脾臓 - 絶対重量	0.07167 g	+20	+33	+73**	+41*
- 相対重量	0.29081 %	+22	+28*	+55**	+28*
胸腺 - 絶対重量	0.04225 g	+19	+20	+14	-19
- 相対重量	0.17058 %	+24	+17	+3	-26*
剖検所見	-	-	-	-	-

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**
病理組織学的検査					
評価動物数	12	12	12	12	12
大腿骨					
骨梁増加					
• 軽微	0	0	0	2	1
肝臓					
肝細胞肥大					
• 軽微	0	0	0	7	7
• 軽度	0	0	0	0	5
過形成／肥大；クッパー細胞					
• 軽微	0	0	0	0	2
• 軽度	0	0	0	0	1
乳腺					
過形成；小葉腺胞					
• 軽微	0	0	1	1	3
• 軽度	0	0	0	1	2
卵管					
上皮の空胞化					
• 軽微	0	0	1	8	1
• 軽度	0	0	1	1	7

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**
病理組織学的検査（続き）					
下垂体					
過形成／肥大；好酸性細胞					
• 軽微	0	0	0	3	3
脾臓					
造血					
• 軽微	2	0	0	0	0
• 軽度	9	7	3	0	1
• 中等度	1	5	9	11	10
• 顕著	0	0	0	1	1
胸腺					
リンパ組織の萎縮					
• 軽微	0	1	3	5	3
• 軽度	1	2	0	0	3
• 中等度	0	0	0	0	2
子宮					
化生；扁平上皮					
• 軽微	0	1	0	0	7
• 軽度	0	0	0	1	4

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**
病理組織学的検査（続き）					
子宮（続き）					
肥厚；子宮内膜腺					
• 軽微	0	1	0	2	2
• 軽度	0	0	1	3	3
• 中等度	0	0	0	1	7
過形成；子宮内膜腺					
• 軽微	6	6	8	3	2
• 軽度	2	4	4	7	3
• 中等度	0	1	0	2	7
拡張／嚢胞；子宮内膜腺					
• 軽微	0	0	0	1	2
• 軽度	0	0	0	1	1
• 中等度	0	0	0	1	2
内腔の拡張					
• 軽微	1	3	7	4	5
• 軽度	1	3	2	6	3

2.6.7.7.A.1 マウス 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.03**	**0.3**	**3**	**30**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**	**雌 12 例**
病理組織学的検査（続き）					
子宮（続き）					
過形成；間質細胞					
• 軽微	0	1	0	2	2
• 軽度	0	0	0	0	5
• 中等度	0	0	0	1	4
膣					
単細胞壊死					
• 軽微	4	6	2	2	0
• 軽度	0	3	1	0	0
過角化					
• 軽微	0	1	1	1	3
• 軽度	2	3	1	3	3
• 中等度	2	1	0	0	3
• 顕著	0	2	0	0	0
その他の試験	NP	NP	NP	NP	NP
回復性の評価	NA	NA	NA	NA	NA

略語：NA＝該当せず、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.2 マウス 13 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: 13-week preliminary study by the oral route (gavage) in female mice</td><td>試験番号：ES-T40</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：マウス／CD-1
［CD1®Crl: CD-1®（ICR）］</td><td>投与期間：13 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-03</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：約 7 週齢</td><td>休薬期間：なし</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.03、0.1、0.3 又は 1 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 4.8%であったため、1.05 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• Day 1 及び投与期間の終了時に、エステトロール濃度分析のためサテライト群の雌から血漿を採取した。
• 病理組織学的検査は、肉眼的病変、副腎及び生殖組織／器官に対してのみ実施した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL： 報告なし（追加情報を参照）</td></tr>
<tr><td colspan="3">追加情報： 本試験の目的は、マウスを用いたがん原性試験の適切な投与量を設定することであった。この 13 週間試験の条件下では、最高用量である 10 mg/kg/日まで有害な所見は認められなかったが、認められた体重増加及び子宮腺の嚢胞状過形成が用量制限パラメータと考えられた。</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.2 マウス 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**	**10**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
TK					
サテライト群の動物数：	雌 6 例	雌 18 例	雌 18 例	雌 18 例	雌 18 例
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）		15.9	67.3	204	846
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	13.2	45.6	151	598
T_{max} （時間）		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）		2.09	1.41	1.85	1.89
反復投与：W13					
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）		21.6	87.2 [2)]	292 [2)]	872 [2)]
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	13.2	39.4	136	494
T_{max} （時間）		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）		1.59	2.88	3.03	2.68
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数	1 (D92)	0	0	0	0
体重（%） [1)]	32.2 g	+1.6	+4.3	+10.6**	+5.3
体重増加量（g） D1～D91	+4.1	+5.0	+6.1	+6.9*	+7.2*
摂餌量（%） [1)]	4.2 g/動物/日	+2.4	+9.5	+9.5	+2.4
摂水量	NP	NP	NP	NP	NP

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 投与前の検体が LLOQ 未満でなかった場合は、投与間隔毎の $AUC_{0\text{-last}}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：$AUC_{0\text{-last}}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、NP＝測定せず、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝週

2.6.7.7.A.2 マウス 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**	**10**
動物数：		**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
一般状態		-	-	-	-	-
眼科学的検査		-	-	-	-	-
血液学的検査						
赤血球数	（10^{12}/L）	10.55	10.13	9.41**	9.44**	9.16**
MCV	（fL）	48.6	47.2	50.9	51.0	53.4**
MCH	（pg）	15.3	14.9	16.3*	16.3*	17.1**
網赤血球	（%）	2.24	3.26	3.59*	3.39	3.97**
白血球数	（10^9/L）	8.75	9.02	6.16*	3.06**	3.81**
好酸球数	（10^9/L）	0.42	0.20	0.14	0.07**	0.09**
リンパ球数	（10^9/L）	6.61	6.60	4.93*	2.21**	2.71**
単球数	（10^9/L）	0.21	0.28	0.09	0.02**	0.03*
血液生化学的検査						
無機リン	（mmol/L）	1.74	1.93	1.86	2.18	2.37**
尿素	（mmol/L）	9.1	8.4	7.5*	5.5**	4.8**
ALP	（IU/L）	198	226	232	296	420*
尿検査		NP	NP	NP	NP	NP
器官重量（%） [1)]						
評価動物数		9	10	10	10	10
腎臓	- 絶対重量	0.33489 g	+2	+8	+6	+7
	- 相対重量	1.16 %	+3	+6	+0	+11*
肝臓	- 絶対重量	1.09 g	+5	+13	+25**	+25**
	- 相対重量	3.79 %	+7	+11	+19*	+31**

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、ALP＝アルカリホスファターゼ、MCH＝平均赤血球ヘモグロビン量、MCV＝平均赤血球容積、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.2 マウス 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**	**10**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
器官重量（%）[1]（続き）					
脾臓 - 絶対重量	0.0900 g	+26	+37*	+53*	+38*
- 相対重量	0.31285 %	+28	+34*	+45*	+44**
子宮 - 絶対重量	0.13778 g	-1	+30	+52*	+94**
- 相対重量	0.48315 %	+0	+27	+44	+102**
剖検所見					
評価動物数	10	10	10	10	10
子宮					
子宮角の拡張	0	0	1	0	2
病理組織学的検査					
評価動物数	10	10	10	10	10
副腎					
被膜下紡錘形細胞の過形成					
• 軽微	3	6	6	4	6
• 軽度	0	0	1	2	3
X 帯の空胞化／変性					
• 軽微	6	5	4	1	0
• 軽度	1	2	5	2	0
• 中等度	0	2	0	5	4
• 顕著	0	0	1	1	6

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

2.6.7.7.A.2 マウス 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**	**10**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
病理組織学的検査（続き）					
卵巣					
黄体（片側又は両側）					
• なし	1	2	0	2	5
• 軽微な発達	1	1	0	1	3
• 軽度の発達	1	3	4	3	3
• 中等度の発達	1	0	3	1	1
• 顕著な発達	6	4	3	5	1
卵管					
上皮の空胞化の増加	0	0	0	2	6
子宮					
嚢胞状過形成；腺					
• 軽微	0	0	1	1	0
• 軽度	0	0	1	2	3
• 中等度	0	0	1	5	6
膣					
過形成；扁平上皮細胞					
• 軽微	0	0	1	0	3
• 軽度	0	2	4	8	5
• 中等度	0	0	0	0	1
性周期の判定 [1)]	10	6	3	2	0
その他の試験	NP	NP	NP	NP	NP
回復性の評価	NA	NA	NA	NA	NA

[1)] 生殖組織の病理組織検査に基づく性周期ステージの判定。

略語：NA＝該当せず、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: 4-week toxicity study by the oral route (gavage) in rats followed by a 2-week treatment-free period</td><td>試験番号：ES-T10</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：ラット／Sprague-Dawley［Crl CD®（SD）IGS BR］</td><td>投与期間：4 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-04</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：約 8 週齢</td><td>休薬期間：2 週間</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、1、3、10、30 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 5.5%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 投与期間の終了時に動物を屠殺したが、0（対照）、50 及び 150 mg/kg/日群の動物番号の若い各 6 例に 2 週間の休薬期間を設けた。
• Day 1 及び 29 に、エステトロール濃度分析のためサテライト群の雌から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：15 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
TK					
サテライト群の動物数：	雌 3 例	雌 9 例	雌 9 例	雌 9 例	雌 9 例
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）		488	1968	10511	48990
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	285	1039	7430	14394
T_{max} （時間）	（投与後 12 時間に	0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）	0.198 ng/mL）	4.74	3.88	3.35	3.27
反復投与：D29					
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）		592	1958	7179	40648
C_{max} （ng/mL）	1.279	167	1043	2481	9781
T_{max} （時間）	（投与後 12 時間に	0.5	0.5	0.5	1.0
$T_{1/2}$ （時間）	0.966 ng/mL）	2.14	2.59	3.06	2.32
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	0	0
体重（%） [1)]	266 g	-10**	-19**	-22**	+24**
体重増加量（g） D1～D29	+56	+34	+18*	-2**	-5**
摂餌量（%） [1), 2)]	20.7 g/動物/日	+7	-12	-18	-3

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 15 mg/kg/日以上の投与量では、投与期間を通じて摂餌量が減少したが、投与開始後最初の 1 週間において最も顕著であった（15、50 及び 150 mg/kg/日でそれぞれ－13%、－42%及び－29%）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：		**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
摂水量		NP	NP	NP	NP	NP
一般状態						
削痩		0	2	3	9	11
円背		0	2	3	12	16
立毛		0	0	0	4	8
被毛の薄化		0	2	2	7	7
脱毛		0	2	1	5	6
眼科学的検査		-	-	-	-	-
血液学的検査						
赤血球数	（10^{12}/L）	7.75	7.45	7.56	6.96**	7.08**
ヘモグロビン	（g/dL）	14.3	13.6	13.5	12.3**	12.2**
PCV	（L/L）	0.41	0.40	0.40	0.36**	0.36**
MCV	（fL）	53.0	53.3	52.2	51.3	50.3**
MCH	（pg）	18.5	18.3	17.9	17.7*	17.3**
網赤血球	（%）	2.42	2.89	2.47	2.55	2.83
白血球数	（10^9/L）	7.44	6.52	5.89	5.32*	5.07*
好酸球数	（10^9/L）	0.15	0.10	0.09	0.09	0.07**
リンパ球＋LUC 数	（10^9/L）	6.19	5.43	4.90	4.18*	3.62**
PT	（秒）	15.2	16.1	16.6	17.1**	17.5**
フィブリノーゲン	（g/L）	2.43	2.53	2.37	2.24	1.89**

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語： －＝特記すべき所見なし、LUC＝大型非染色細胞、MCH＝平均赤血球ヘモグロビン量、MCV＝平均赤血球容積、NP＝測定せず、PCV＝血中血球容積、PT＝プロトロンビン時間

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：		**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
血液生化学的検査						
クロール	（mmol/L）	106.9	106.3	107.4	105.2	103.0**
クレアチニン	（μmol/L）	54	53	51	52	49**
総蛋白	（g/L）	63	67*	68**	69**	73**
アルブミン	（g/L）	38	39	38	40	41**
A/G 比		1.48	1.40	1.30**	1.34**	1.27**
総コレステロール	（mmol/L）	1.5	1.0**	0.8**	0.4**	0.4**
ALP	（μmol/L）	231	386**	348**	356**	408**
尿検査		-	-	-	-	-
器官重量（%） [1)]						
評価動物数		10	10	10	10	10
副腎	- 絶対重量	0.06780 g	+18	+19	+10	+12
	- 相対重量	0.02856 %	+34*	+50**	+51**	+57**
肝臓	- 絶対重量	6.33 g	+21*	+15	+22*	+49**
	- 相対重量	2.66 %	+38	+45*	+65**	+105**
脾臓	- 絶対重量	0.58910 g	-5	-21	-23*	-39**
	- 相対重量	0.24812 %	+7	-1	+4	-16*
胸腺	- 絶対重量	0.41370 g	-25	-45**	-54**	-70**
	- 相対重量	0.17436 %	-14	-30**	-39**	-58**
子宮（満重量）	- 絶対重量	0.65370 g	-23	-26	+38	+22
	- 相対重量	0.27750 %	-13	-7	+83**	+67**

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、ALP＝アルカリホスファターゼ、A/G 比＝アルブミン／グロブリン比

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
器官重量（%）[1]（続き）					
子宮（空重量） - 絶対重量	0.56130 g	-12	-16	+13	+9
- 相対重量	0.23722 %	0	+7	+53**	+51**
子宮（満重量－空重量）[2]					
- 絶対重量	0.0924 g	-92	-89	+186	+103
- 相対重量	0.0403 %	-91	-86	+286	+181
膣 - 絶対重量	0.17450 g	+5	-10	+10	+7
- 相対重量	0.07378 %	+18	+14	+49*	+49*
剖検所見					
評価動物数	10	10	10	10	10
腎臓					
緑変色	0	0	1	2	3
肝臓					
腫大	0	0	0	0	1 [3]
不規則な色調	0	0	0	0	3 [3]
白変色	0	0	0	1	1 [3]
皮膚					
脱毛	0	0	1	1	5
脾臓					
退縮	0	0	0	0	2

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 子宮内腔液（統計解析は実施せず）。

[3] 各動物の観察は 1 回のみ実施した。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
剖検所見（続き）					
胸腺					
退縮	0	0	1	4	9
子宮					
拡張、半透明の内容物	3	0	0	7	5
病理組織学的検査					
評価動物数	10	10	10	10	10
副腎					
うっ血					
• 軽微	0	1	0	1	2
• 軽度	0	0	2	6	2
• 中等度	0	0	0	2	3
• 顕著	0	0	0	0	1
肥大；網状層					
• 軽微	0	6	6	5	5
• 軽度	0	0	0	0	1
骨髄					
細胞充実性の低下					
• 軽微	0	0	2	4	2
• 軽度	0	0	0	3	5

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
病理組織学的検査（続き）					
腎臓					
褐色／緑色色素					
• 軽微	0	2	4	3	7
• 軽度	0	0	0	1	3
空胞化；尿細管上皮細胞					
• 軽微	0	0	3	8	4
• 軽度	0	0	0	2	6
肝臓					
微小空胞化；肝細胞					
• 軽微	0	0	0	0	3
• 軽度	0	0	0	0	3
• 中等度	0	0	0	0	1
肥大；肝細胞					
• 軽微	0	1	4	4	1
• 軽度	0	0	1	5	7
• 中等度	0	0	0	0	2
乳腺					
過形成；腺房					
• 軽微	0	2	2	1	2
• 軽度	0	5	7	9	8

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
病理組織学的検査（続き）					
乳腺（続き）					
分泌物の増加					
• 軽微	0	2	2	3	0
• 軽度	0	0	0	6	8
拡張；導管					
• 軽微	0	0	0	3	4
• 軽度	0	0	0	1	3
卵巣					
萎縮；間質腺					
• 軽微	0	4	0	0	1
• 軽度	0	0	10	3	1
• 中等度	0	0	0	7	7
• 顕著	0	0	0	0	1
閉鎖／嚢胞状卵胞の増加					
• 軽微	0	2	5	1	2
• 軽度	0	0	1	8	7
• 中等度	0	0	0	1	1
皮膚					
毛包萎縮／毛包数減少					
• 軽微	0	0	0	1	4
• 軽度	0	0	0	0	1

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
病理組織学的検査（続き）					
脾臓					
褐色色素増加					
• 軽微	0	0	0	4	3
• 軽度	0	0	0	5	7
リンパ組織の萎縮					
• 軽微	0	0	0	4	1
• 軽度	0	0	0	1	7
• 中等度	0	0	0	0	1
造血					
• 軽微	0	0	0	1	3
• 軽度	0	0	0	0	1
胸腺					
リンパ組織の萎縮					
• 軽微	0	0	1	3	1
• 軽度	0	0	1	2	2
• 中等度	0	0	1	2	5
• 顕著	0	0	0	0	2
子宮					
化生；扁平上皮					
• 軽度	0	0	0	0	2

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
病理組織学的検査（続き）					
子宮（続き）					
過形成／肥厚；内腔／子宮内膜腺					
• 軽微	0	1	3	1	0
• 軽度	0	0	0	8	8
• 中等度	0	0	0	0	1
膣					
過形成／肥厚；上皮					
• 軽微	0	0	1	0	0
• 軽度	0	8	4	4	4
• 中等度	0	2	5	6	6
粘液産生／空胞；上皮					
• 軽微	0	2	3	0	0
• 軽度	0	6	3	2	1
• 中等度	0	1	3	7	4
• 顕著	0	0	0	0	2
好酸球浸潤					
• 軽微	0	0	2	8	5
• 軽度	0	0	0	1	5
性周期異常 [1)]	0	10	9	9	7

[1)] 生殖組織の病理組織検査に基づく。

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
動物数：	**雌 16 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 16 例**	**雌 16 例**
その他の試験	NP	NP	NP	NP	NP
回復性の評価					
休薬群の動物数：	**雌 6 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 6 例**	**雌 6 例**
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数	0	NA	NA	0	0
体重（%） [1)]	287 g	NA	NA	-15**	-13**
体重増加量（g） D29～D43	+14	NA	NA	+29	+45**
摂餌量（%） [1)]	21.9 g/動物/日	NA	NA	+10	+25
一般状態					
削痩	0	NA	NA	0	4
円背	0	NA	NA	0	6
立毛	0	NA	NA	0	1
被毛の薄化	0	NA	NA	3	2
脱毛	0	NA	NA	3	2
血液学的検査					
赤血球数 （10^{12}/L）	7.81	NA	NA	7.91	7.38
ヘモグロビン （g/dL）	14.6	NA	NA	14.2	13.3**
MCH （pg）	18.6	NA	NA	18.1	18.0
網赤血球 （%）	1.82	NA	NA	2.14	2.58*

[1)] 休薬期間の終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：D＝Day、MCH＝平均赤血球ヘモグロビン量、NA＝該当せず、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
休薬群の動物数：	**雌 6 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 6 例**	**雌 6 例**
血液学的検査（続き）					
白血球数 （10^9/L）	7.77	NA	NA	7.64	5.59
好酸球数 （10^9/L）	0.11	NA	NA	0.10	0.08
リンパ球＋LUC 数 （10^9/L）	6.73	NA	NA	6.60	4.73
フィブリノーゲン （g/L）	2.02	NA	NA	2.29*	2.22
血液生化学的検査	-	NA	NA	-	-
器官重量（%） [1)]					
評価動物数	6	0	0	6	6
肝臓 - 絶対重量	7.02 g	NA	NA	-3	+5
- 相対重量	2.70 %	NA	NA	+14**	+21**
剖検所見	-	NA	NA	-	-
病理組織学的検査					
評価動物数	6	0	0	6	6
副腎					
うっ血					
• 軽微	0	NA	NA	1	0
• 軽度	0	NA	NA	0	1
腎臓					
褐色／緑色色素					
• 軽微	0	NA	NA	2	5
• 軽度	0	NA	NA	0	1

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、LUC＝大型非染色細胞、NA＝該当せず

2.6.7.7.A.3 ラット 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**	**150**
休薬群の動物数：	**雌 6 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 6 例**	**雌 6 例**
病理組織学的検査（続き）					
肝臓					
大空胞化；肝細胞					
• 軽度	0	NA	NA	0	1
乳腺					
評価動物数	6	0	0	6	5
過形成；腺房					
• 軽微	0	NA	NA	4	1
• 軽度	0	NA	NA	0	4
拡張；導管					
• 軽微	0	NA	NA	3	4
• 軽度	0	NA	NA	0	1
膣					
過形成／肥厚；上皮					
• 軽度	0	NA	NA	0	1
粘液産生／空胞；上皮					
• 軽度	0	NA	NA	0	2
性周期異常 [1)]	0	NA	NA	0	2

[1)] 生殖組織の病理組織検査に基づく。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: 26-week toxicity study by the oral route (gavage) in rats followed by an 8-week treatment-free period</td><td>試験番号：ES-T18</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：ラット／Sprague-Dawley［Crl CD®（SD）IGS BR］</td><td>投与期間：26 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-05</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：約 8 週齢</td><td>休薬期間：8 週間</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.3、1、3 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 試験期間中に被験物質を再分析したところ、水分含量が再分析前は 5.5%、再分析後は 6.1%であったため、Day 97 までは 1.06、Day 98 から投与終了時までは 1.07 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 投与期間の終了時に動物を屠殺したが、0（対照）及び 15 mg/kg/日群の最初の雌 6 例に対しては、8 週間の休薬期間を設けた。
• Day 1、Week 13 及び投与期間の終了時に、エステトロール濃度分析のため、サテライト群の雌から血漿を採取した。対照のサテライト群の動物から微量の被験物質が検出されたが（0.3 mg/kg/日投与時の C_{max} の 0.5%以下）、本試験における毒性評価への影響はないと判断された。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：5 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
動物数：		**雌 26 例**	**雌 20 例**	**雌 20 例**	**雌 26 例**
TK					
サテライト群の動物数：		雌 3 例	雌 9 例	雌 9 例	雌 9 例
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		139	553	1862
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	77.4	290	1048
T_{max}	（時間）		0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$	（時間）		6.24 [1)]	3.55	4.55 [1)]
反復投与：W13					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		158 [3)]	594 [3)]	1958 [3)]
C_{max}	（ng/mL）	0.160	58.0	189	551
T_{max}	（時間）		0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$	（時間）		2.61	2.46	2.69
反復投与：W26					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		196 [3)]	736 [3)]	2376 [3)]
C_{max}	（ng/mL）	0.091	56.8	238	574
T_{max}	（時間）		0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$	（時間）		2.36	3.03	2.72
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数		0	1（W15） [2)]	0	0

1) 濃度-時間曲線の最終部分の外挿の割合が 10%超であったため、推定した $T_{1/2}$ の信頼性は低いと考えられる。

2) 強制経口投与に関連した一般状態悪化による早期屠殺。

3) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
動物数：	**雌 26 例**	**雌 20 例**	**雌 20 例**	**雌 26 例**
体重（%） [1), 2)]	350 g	-13**	-16**	-22**
体重増加量（g） [2)] W1～W27	+139	+92**	+82**	+64**
摂餌量（%） [1), 3)]	21.4 g/動物/日	+18	-5	+5
摂水量	NP	NP	NP	NP
一般状態				
削痩	1	0	2	12
円背	0	0	10	24
立毛	0	0	6	18
体部位の汚れ	2	0	10	20
被毛の薄化	7	6	10	19
脱毛（全身）	0	0	2	7
眼科学的検査	-	-	-	-
血液学的検査				
赤血球数 （10^{12}/L）				
W12	8.49	8.10	7.93**	7.84**
W25	8.40	7.75*	7.50**	7.59**
ヘモグロビン （g/dL）				
W12	15.0	14.2**	13.8**	13.6**
W25	15.0	13.6**	13.2**	13.2**

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 投与期間を通じて、用量依存的な体重減少が認められた。体重増加量の減少が認められ（15 mg/kg/日群では体重減少）、特に W1 に顕著であった。

3) 5 及び 15 mg/kg/日群の摂餌量は、それぞれ Week 1 及び Week 1～4 に減少した。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定）。

略語：－＝特記すべき所見なし、NP＝測定せず、W＝Week

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1.5	5	15
動物数：	雌 26 例	雌 20 例	雌 20 例	雌 26 例
血液学的検査（続き）				
PCV （L/L）				
W12	0.45	0.43*	0.42**	0.41**
W25	0.44	0.40**	0.39**	0.40**
好中球数 （10^9/L）				
W12	0.77	0.77	0.81	0.93
W25	0.64	0.65	0.74	0.97**
好酸球数 （10^9/L）				
W12	0.12	0.12	0.10	0.10
W25	0.11	0.09	0.08	0.08
リンパ球＋LUC 数 （10^9/L）				
W12	7.47	6.01	7.19	5.80
W25	4.70	4.37	4.35	4.46
PT （秒）				
W12	19.3	20.8	21.0*	21.9*
W25	20.1	21.9*	21.8*	22.6*
APTT （秒）				
W12	14.0	16.2	15.7	17.9**
W25	13.6	14.8	15.4	16.8**
フィブリノーゲン （g/L）				
W12	2.27	2.57	2.68*	2.51
W25	2.28	2.53	2.60	2.66

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定）。

略語：APTT＝活性化部分トロンボプラスチン時間、LUC＝大型非染色細胞、PCV＝血中血球容積、PT＝プロトロンビン時間、W＝Week

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1.5	5	15
動物数：	雌 26 例	雌 20 例	雌 20 例	雌 26 例
血液生化学的検査				
クロール （mmol/L）				
W12	104.7	104.1	103.8	103.3
W25	107.4	106.1	107.4	105.4
無機リン （mmol/L）				
W12	1.79	1.68	1.77	1.95
W25	1.45	1.42	1.46	1.84**
クレアチニン （μmol/L）				
W12	59	55*	54*	54*
W25	60	58	57	59
総蛋白 （g/L）				
W12	70	73	73	76*
W25	73	75	75	76
A/G 比				
W12	1.42	1.34	1.35	1.23**
W25	1.40	1.36	1.41	1.29
総コレステロール（mmol/L）				
W12	1.6	1.3	1.3*	0.8**
W25	1.9	1.5	1.5	1.1**
トリグリセリド （mmol/L）				
W12	0.40	0.51	0.59*	0.48
W25	0.58	0.64	0.64	0.66
尿検査	-	-	-	-

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、A/G 比＝アルブミン／グロブリン比、W＝Week

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
動物数：	**雌 26 例**	**雌 20 例**	**雌 20 例**	**雌 26 例**
器官重量（%） [1]				
評価動物数	20	19	20	20
副腎 - 絶対重量	0.07030 g	+45**	+35**	+20
- 相対重量	0.02189 %	+66**	+60**	+55**
腎臓 - 絶対重量	1.90 g	+4	+3	+2
- 相対重量	0.58829 %	+21**	+25**	+33**
肝臓 - 絶対重量	7.70 g	+14*	+25**	+29**
- 相対重量	2.38 %	+31**	+50**	+68**
卵巣 - 絶対重量	0.15810 g	-5	-4	-23*
- 相対重量	0.04904 %	+10	+15	+1
胸腺 - 絶対重量	0.19485 g	-21	-26**	-38**
- 相対重量	0.06005 %	-8	-11	-20*
子宮（満重量－空重量）[2]				
- 絶対重量	0.1391 g	-85	-88	-83
- 相対重量	0.04754 %	-82	-85	-77
剖検所見	-	-	-	-

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 子宮内腔液（統計解析は実施せず）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1.5	5	15
動物数：	雌 26 例	雌 20 例	雌 20 例	雌 26 例
病理組織学的検査				
評価動物数	20	19	20	20
副腎				
肥大；皮質、びまん性				
• 軽微	0	4	7	6
• 軽度	0	0	0	7
• 中等度	0	0	1	4
• 顕著	0	0	1	0
嚢胞変性				
• 軽微	1	3	9	3
• 軽度	0	3	2	3
• 中等度	1	0	0	0
大腿骨				
骨梁増加	0	2	10	11
腎臓				
褐色色素				
• 軽微	3	8	12	6
• 軽度	0	1	6	10
• 中等度	0	0	0	3
尿細管拡張				
• 軽微	1	1	4	12
• 軽度	0	0	0	1

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1.5	5	15
動物数：	雌 26 例	雌 20 例	雌 20 例	雌 26 例
病理組織学的検査（続き）				
肝臓				
微小空胞化；肝細胞				
• 軽微	0	2	2	3
• 軽度	0	0	0	1
• 中等度	0	1	0	1
肥大；肝細胞				
• 軽微	0	9	8	9
• 軽度	0	1	8	10
乳腺				
過形成；小葉腺胞				
• 軽微	1	2	5	4
• 軽度	1	0	1	3
• 中等度	0	0	0	4
拡張；腺房内腔				
• 軽微	0	2	4	5
• 軽度	0	0	2	7
• 中等度	0	0	0	1

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
動物数：	**雌 26 例**	**雌 20 例**	**雌 20 例**	**雌 26 例**
病理組織学的検査（続き）				
卵巣				
黄体発達				
• なし	4	8	7	12
• 軽微	3	1	0	3
• 軽度	3	2	4	1
• 中等度	6	6	6	5
• 顕著	4	3	3	1
嚢胞；卵胞				
• 軽微	4	2	7	7
• 軽度	4	6	5	8
• 中等度	2	2	5	3
• 顕著	0	1	0	0
間質の萎縮				
• 軽微	0	5	7	7
• 軽度	0	0	0	6
脾臓				
褐色色素				
• 軽微	9	7	4	0
• 軽度	9	7	8	6
• 中等度	2	5	8	14

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1.5	5	15
動物数：	雌 26 例	雌 20 例	雌 20 例	雌 26 例
病理組織学的検査（続き）				
胸腺				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	0	0	0	0
• 軽度	0	0	0	0
• 中等度	9	8	4	1
• 顕著	11	11	16	18
• 重度	0	0	0	1
子宮				
化生；扁平上皮				
• 軽微	1	2	2	2
• 軽度	0	1	1	1
• 中等度	0	0	0	2
肥厚；子宮内膜				
• 軽微	4	11	13	10
• 軽度	0	0	0	4

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
動物数：	**雌 26 例**	**雌 20 例**	**雌 20 例**	**雌 26 例**
病理組織学的検査（続き）				
膣				
肥厚；上皮				
• 軽微	2	4	4	5
• 軽度	1	1	1	3
粘液分泌；上皮				
• 軽微	0	0	0	1
• 軽度	0	6	4	3
• 中等度	1	4	7	1
• 顕著	0	1	3	4
好酸球浸潤				
• 軽微	5	8	8	9
• 軽度	0	0	0	8
• 中等度	0	0	0	1
性周期の特定 [1)]	16	2	1	1
その他の試験	NP	NP	NP	NP
回復性の評価				
休薬群の動物数：	**雌 6 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 6 例**
特記すべき所見				
死亡及び屠殺動物数	0	NA	NA	0

[1)] 生殖組織の病理組織検査に基づく性周期段階の特定。

略語：NA＝該当せず、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
休薬群の動物数：	**雌 6 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 6 例**
体重（%） [1)]	372 g	NA	NA	-16**
体重増加量（g） W28～W35	+23	NA	NA	+26
摂餌量（%） [1)]	22.4 g/動物/日	NA	NA	+4
一般状態				
削痩	0	NA	NA	1
円背	3	NA	NA	6
立毛	1	NA	NA	5
体部位の汚れ	0	NA	NA	4
被毛の薄化	0	NA	NA	4
脱毛（全身）	0	NA	NA	1
血液学的検査				
リンパ球＋LUC 数 （10^9/L）	5.65	NA	NA	4.15*
血液生化学的検査				
総蛋白 （g/L）	77	NA	NA	80
器官重量（%） [1)]				
評価動物数	6	0	0	6
副腎 - 絶対重量	0.07650 g	NA	NA	+18
- 相対重量	0.02256 %	NA	NA	+42
肝臓 - 絶対重量	8.25 g	NA	NA	+18
- 相対重量	2.43 %	NA	NA	+40**

1) 休薬期間の終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Student の t 検定）

略語：LUC＝大型非染色細胞、NA＝該当せず、W＝Week

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1.5**	**5**	**15**
休薬群の動物数：	**雌 6 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 6 例**
器官重量（%）[1]（続き）				
卵巣 - 絶対重量	0.17350 g	NA	NA	+10
- 相対重量	0.05181 %	NA	NA	+30*
子宮（満重量－空重量）[2]				
- 絶対重量	0.15567 g	NA	NA	-66
- 相対重量	0.04283 %	NA	NA	-60
剖検所見				
評価動物数	6	0	0	6
副腎				
腫大	0	NA	NA	1
病理組織学的検査				
評価動物数	6	0	0	6
副腎				
肥大；皮質、びまん性				
• 軽微	0	NA	NA	1
嚢胞変性				
• 軽微	1	NA	NA	2
大腿骨				
骨梁増加	0	NA	NA	3

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 子宮内腔液（統計解析は実施せず）。

*p<0.05（Wilcoxon 検定）

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1.5	5	15
休薬群の動物数：	雌 6 例	雌 0 例	雌 0 例	雌 6 例
病理組織学的検査（続き）				
腎臓				
褐色色素				
• 軽微	0	NA	NA	2
• 軽度	0	NA	NA	2
• 中等度	0	NA	NA	1
乳腺				
過形成；小葉腺胞				
• 軽微	0	NA	NA	1
拡張；腺房管／腔				
• 軽微	0	NA	NA	1
• 軽度	0	NA	NA	2
• 中等度	0	NA	NA	1
子宮				
化生；扁平上皮				
• 軽度	1	NA	NA	2
• 顕著	0	NA	NA	1
その他の試験				
性周期 [1)]				
正常周期／総周期	24 / 39	NA	NA	10 / 35
平均周期長 [2)] （日）	5.0 ± 1.2	NA	NA	5.6 ± 1.8
正常周期のラット数	4	NA	NA	1

1) 37 日間の評価期間。投与終了から概して 20 日後に正常な周期の回復が認められた。

2) 平均±標準偏差。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.5 ラット（Wistar）13 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: 13-week preliminary study by the oral route (gavage) in female Wistar rats</td><td>試験番号：ES-T39</td></tr>
<tr><td>動物種／系統： ラット／
Wistar［Crl: WI（Han）］</td><td>投与期間：13 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-06</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：約 5 週齢</td><td>休薬期間：なし</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.04、0.12、0.4 又は 1.2 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 4.8%であったため、1.05 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• Day 1 及び投与期間の終了時に、エステトロール濃度分析のためサテライト群の雌から血漿を採取した。
• 病理組織学的検査は、肉眼的病変、副腎、腸管系リンパ組織及び生殖組織／器官に対してのみ実施した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL： 報告なし（追加情報を参照）</td></tr>
<tr><td colspan="3">追加情報： 本試験の目的は、マウスを用いるがん原性試験の適切な投与量を設定することであった。認められた体重（増加量）の減少が用量制限パラメータと考えられた。</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.5 ラット（Wistar）13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
TK					
サテライト群の動物数：	雌 3 例	雌 9 例	雌 9 例	雌 9 例	雌 9 例
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）		26.3	89.0	267	1104
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	10.2	41.2	98.4	454
T_{max} （時間）		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）		1.63	1.86	1.79	1.98
反復投与：W13					
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）		21.4	57.6	173 [3)]	595 [3)]
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	9.22	25.1	87.8	331
T_{max} （時間）		0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ （時間）		2.40	2.19	2.37	2.46
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	0	0
体重（%） [1)]	241 g	-8*	-9*	-13**	-19**
体重増加量（g） D1～D91	+150	+128**	+127**	+123**	+108**
摂餌量（%） [1)]	17.1 g/動物/日	+1.2	-3.5	-1.2	-11.1 [2)]

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 6 mg/kg/日群の摂餌量は Day 8 以降減少し、Week 2、6、8 及び 12 には統計学的に有意であった。

3) 投与前の検体が LLOQ 未満でなかった場合は、投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.A.5 ラット（Wistar）13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.2	0.6	2	6
動物数：		雌 10 例	雌 10 例	雌 10 例	雌 10 例	雌 10 例
摂水量		NP	NP	NP	NP	NP
一般状態		-	-	-	-	-
眼科学的検査		-	-	-	-	-
血液学検査						
PT	（秒）	21.1	21.0	22.7	23.4*	23.1*
血液生化学的検査						
総コレステロール	（mmol/L）	1.5	1.3	1.1*	1.1*	0.5**
ALP	（IU/L）	99	88	116	119	144*
尿検査		-	-	-	-	-
器官重量（%）[1)]						
評価動物数		10	10	10	10	10
副腎	- 絶対重量	0.07650 g	-5	+14	+18	+21*
	- 相対重量	0.03375 %	+2	+27*	+38**	+52**
肝臓	- 絶対重量	5.92 g	+5	+0	+8	+8
	- 相対重量	2.63 %	+13**	+11*	+25**	+36**
胸腺	- 絶対重量	0.37970 g	-7	-8	-18	-24**
	- 相対重量	0.16796 %	+1	+2	-5	-4
子宮（満重量）	- 絶対重量	0.75250 g	-4	-5	-8	-39*
	- 相対重量	0.33360 %	+3	+4	+4	+24
子宮（空重量）	- 絶対重量	0.58480 g	+2	-5	-12	-25*
	- 相対重量	0.25988 %	+9	+5	+0	-6

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、ALP＝アルカリホスファターゼ、NP＝測定せず、PT＝プロトロンビン時間

2.6.7.7.A.5 ラット（Wistar）13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
器官重量（%）[1]（続き）					
子宮（満重量－空重量）[2]					
- 絶対重量	0.16770 g	-24	-8	+8	-89
- 相対重量	0.07372 %	-18	+0	+18	-87
剖検所見					
評価動物数	10	10	10	10	10
子宮					
拡張、半透明の内容物	3	2	2	3	0
病理組織学的検査					
評価動物数	10	10	10	10	10
副腎					
肥大；皮質、びまん性					
• 軽微	0	0	4	4	2
• 軽度	0	0	0	3	5
• 中等度	0	0	0	2	3
乳腺					
拡張；腺房内腔					
• 軽微	0	0	2	5	7

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 子宮内腔液（統計解析は実施せず）。

$^{*}p<0.05$、$^{**}p<0.01$（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

2.6.7.7.A.5 ラット（Wistar）13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
病理組織学的検査（続き）					
乳腺（続き）					
肥大／空胞化；腺房細胞					
• 軽微	0	0	0	0	2
子宮					
内腔の拡張					
• 軽度	4	3	2	3	0
• 中等度	0	0	1	3	0
子宮内膜腺の見られる切片数					
• 軽微	1	0	0	0	8
• 軽度	5	3	3	7	2
• 中等度	4	4	7	3	0
• 顕著	0	3	0	0	0
平均グレード	*2.3*	*3.0*	*2.7*	*2.3*	*1.2*
化生；扁平上皮	0	1	0	1	1
高い；上皮	0	0	2	5	7
腺の拡張、嚢胞性					
• 軽微	1	1	0	7	5
• 軽度	0	0	0	0	1
好酸球浸潤の増加					
• 軽微	4	4	7	5	9
• 軽度	0	2	2	4	0

2.6.7.7.A.5 ラット（Wistar）13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**0.2**	**0.6**	**2**	**6**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**	**雌 10 例**
病理組織学的検査（続き）					
子宮（続き）					
腺変性／アポトーシス；上皮					
• 軽微	3	8	5	3	0
• 軽度	7	2	5	3	2
• 中等度	0	0	0	2	6
• 顕著	0	0	0	2	2
平均グレード	*1.7*	*1.2*	*1.5*	*2.3*	*3.0*
膣					
過形成；扁平上皮細胞					
• 軽微	0	0	1	0	1
• 軽度	0	0	3	4	9
粘液分泌；上皮					
• 軽微	0	0	2	1	0
• 中等度	0	0	1	0	0
• 顕著	0	0	1	1	0
性周期の特定 [1)]	10	10	4	5	0
その他の試験	NP	NP	NP	NP	NP
回復性の評価	NA	NA	NA	NA	NA

[1)] 生殖組織の病理組織検査に基づく性周期段階の特定。

略語：NA＝該当せず、NP＝実施せず

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: 4-week toxicity study by the oral route (gavage) in adult female cynomolgous monkeys</td><td>試験番号：ES-T11</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：サル／カニクイザル
（パーパスブレッド、モーリシャス原産）</td><td>投与期間：4 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-07</td></tr>
<tr><td>試験開始月齢：39～47 ヵ月齢</td><td>休薬期間：なし</td><td>GLP 適用：適 [1)]</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、1、3、10 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 5.5%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• Day 1 及び 28 に、エステトロール濃度分析のため主試験の動物から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：15 mg/kg/日</td></tr>
</table>

1) 血清ホルモン（プロゲステロン、テストステロン、卵胞刺激ホルモン）の測定に関しては、GLP に準拠して実施したものではない。

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	5	15	50
動物数：		雌 4 例	雌 4 例	雌 4 例	雌 4 例
TK					
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		492	1970	6157
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	141	834	1250
T_{max}	（時間）		0.5	0.75	1.0
$T_{1/2}$	（時間）		ND	ND	10.8
反復投与：D28					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		1153 [3)]	3640 [3)]	9327 [3)]
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	348	1098	2021
T_{max}	（時間）		1.0	1.0	1.5
$T_{1/2}$	（時間）		10.8	ND	ND
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数		0	0	0	0
体重（%） [1)]		3.7 kg	-8	-14	-14
体重増加量（kg）	D1～D28	-0.2	-0.2	-0.2	-0.4
摂餌量（%） [2)]		NP	NP	NP	NP
摂水量		NP	NP	NP	NP

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) サルは群飼いとし、摂餌量のみを目視検査した。

3) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、ND=未定、NP＝測定せず、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	5	15	50
動物数：	雌 4 例	雌 4 例	雌 4 例	雌 4 例
一般状態				
削痩	0	0	0	1
眼科学的検査	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-
血圧	-	-	-	-
体温	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-
血液生化学的検査				
クロール （mmol/L）	2.46	2.26	2.25	2.17**
グルコース （mmol/L）	4.57	3.54	3.17	2.60*
総蛋白 （g/L）	92	81	81	77**
アルブミン （g/L）	45	38	38*	38*
総コレステロール （mmol/L）	3.0	3.7	3.9	4.1**
ALP （IU/L）	1015	473	416*	442*
尿検査	-	-	-	-
血清ホルモン				
テストステロン （nmol/L）	1.7	0.3	0.4	0.4
器官重量（%） [1]				
評価動物数 [2]	4	4	4	4
副腎 - 絶対重量	0.83725 g	-27	-21	-30
副腎 - 相対重量	0.02238 %	-19	-9	-21

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 卵巣を除き：投与群の雌動物数は 3 例。

*p<0.05、**p<0.01（Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、ALP＝アルカリホスファターゼ

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	5	15	50
動物数：		雌 4 例	雌 4 例	雌 4 例	雌 4 例
器官重量（%）[1]（続き）					
卵巣	- 絶対重量	0.47775 g	-41	-52	-23
	- 相対重量	0.01240 %	-28	-42	-13
卵管	- 絶対重量	0.39975 g	+166	+207	+174*
	- 相対重量	0.01073 %	+195	+260	+208*
下垂体	- 絶対重量	0.06075 g	-1	-1	+23
	- 相対重量	0.00166 %	+9	+11	+38
胸腺	- 絶対重量	2.24 g	-59**	-72**	-67**
	- 相対重量	0.05790 %	-53**	-66**	-62**
子宮	- 絶対重量	6.51 g	+47	+107**	+44
	- 相対重量	0.17203 %	+68	+140**	+65
膣	- 絶対重量	6.21 g	+9	+5	+19
	- 相対重量	0.15766 %	+26	+26	+43
剖検所見					
評価動物数		4	4	4	4
卵管					
腫大		0	1	1	0
肥厚		0	0	1	0
胸腺					
退縮		0	1	2	2

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**
動物数：	**雌 4 例**	**雌 4 例**	**雌 4 例**	**雌 4 例**
病理組織学的検査				
評価動物数	4	4	4	4
副腎				
萎縮；網状層				
• 軽度	0	0	3	2
肝臓				
グリコーゲン含量の減少				
• 軽度	0	4	3	3
• 中等度	3	0	0	1
• 顕著	1	0	1	0
卵巣				
黄体の欠如	0	3	4	4
卵管				
肥大／過形成；上皮				
• 軽度	0	3	2	2
• 中等度	0	1	1	2
• 重度	0	0	1	0
下垂体				
好酸性細胞増加				
• 軽微	1	2	1	0
• 軽度	0	2	2	0
• 中等度	0	0	1	4

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**
動物数：	**雌 4 例**	**雌 4 例**	**雌 4 例**	**雌 4 例**
病理組織学的検査（続き）				
胸腺				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	4	0	0	0
• 中等度	0	1	0	0
• 顕著	0	3	4	4
子宮				
肥大；子宮筋層（体部）				
• 軽微	0	1	0	1
• 軽度	0	1	1	0
• 中等度	0	0	3	0
硝子化；子宮内膜間質（体部）				
• 軽微	0	0	1	1
• 軽度	0	1	1	2
• 中等度	0	0	0	1
拡張；子宮内膜腺（体部）				
• 軽微	0	1	3	0

2.6.7.7.A.6 サル 4 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**5**	**15**	**50**
動物数：	**雌 4 例**	**雌 4 例**	**雌 4 例**	**雌 4 例**
病理組織学的検査（続き）				
子宮（続き）				
肥厚／過形成；頸部上皮				
• 軽微	0	2	0	0
• 軽度	0	0	3	4
• 中等度	0	0	1	0
好中球浸潤；頸部上皮				
• 軽微	0	3	4	3
• 軽度	0	1	0	0
扁平上皮化生；頸部上皮				
• 軽微	3	3	1	2
• 軽度	0	1	3	1
その他の試験				
組織形態計測				
子宮内膜厚 [1)] （μm）	2344 ± 1015	2939 ± 540	2652 ± 398	2527 ± 274
対照からの変化率（%）	NA	+25	+13	+8
回復性の評価	NA	NA	NA	NA

1) 平均±標準偏差

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: 13-week toxicity study by the oral route (gavage) in adult female cynomolgus monkeys followed by a 4-week treatment-free period</td><td>試験番号：ES-T15</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：サル／カニクイザル
（パーパスブレッド、モーリシャス原産）</td><td>投与期間：13 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-08</td></tr>
<tr><td>試験開始月齢：48～56 ヵ月齢</td><td>休薬期間：4 週間</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.6、2、6 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 4.8%であったため、1.05 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 投与期間の終了時に動物を屠殺したが、0（対照）及び 30 mg/kg/日群の動物番号最後の雌 4 例に対しては、4 週間の休薬期間を設けた。
• Day 1 及び Week 13 に、エステトロール濃度分析のため主試験の動物から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：3 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	3	10	30
動物数：		雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
TK					
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		260	1067	2805
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	87.3	471	788
T_{max}	（時間）		0.5	0.5	1.0
$T_{1/2}$	（時間）		ND	14.4	10.4
反復投与：W13					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		363 [3)]	1215 [3)]	3497 [3)]
C_{max}	（ng/mL）	0.00349	122	357	871
T_{max}	（時間）		0.5	0.75	1.0
$T_{1/2}$	（時間）		18.7	12.9	15.0
特記すべき所見					
死亡及び屠殺動物数		0	0	0	0
体重（%） [1)]		3.9 kg	+0	-10	-10
体重増加量（kg）	D1～D91	+0.3	-0.2	-0.4**	-0.3**
摂餌量（%） [2)]		NP	NP	NP	NP
摂水量		NP	NP	NP	NP

1) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) サルは群飼いとし、摂餌量のみを目視検査した。

3) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

*p<0.01（Dunnett 検定）

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、ND=未定、NP＝測定せず、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
一般状態				
削痩	3	2	0	4
脱毛（全身）	4	5	5	9
眼科学的検査	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-
血圧	-	-	-	-
体温	-	-	-	-
血液学的検査				
赤血球数 （10^{12}/L）	6.86	6.42	6.13	5.98**
ヘモグロビン （g/dL）	13.5	12.1*	11.6**	11.3**
血中血球容積 （L/L）	0.45	0.42	0.40**	0.39**
血液生化学的検査				
カルシウム （mmol/L）	2.45	2.25**	2.16**	2.21**
総蛋白 （g/L）	88	81**	76**	80**
アルブミン （g/L）	46	38**	36**	38**
A/G 比	1.12	0.91**	0.93**	0.93*
総コレステロール （mmol/L）	2.8	3.6	3.6*	3.4
トリグリセリド （mmol/L）	0.65	1.10**	0.91	0.93**
ALP （IU/L）	766	261**	244**	242**
ALT （IU/L）	41	160**	190**	133**
乳酸脱水素酵素 （IU/L）	448	431	348*	356*
γ-GTP （IU/L）	75	56*	48**	51**
尿検査	-	-	-	-

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語： －＝特記すべき所見なし、A/G 比＝アルブミン／グロブリン比、ALP＝アルカリホスファターゼ、ALT＝アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-GTP＝γ-グルタミルトランスフェラーゼ

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**3**	**10**	**30**
動物数：		**雌 10 例**	**雌 6 例**	**雌 6 例**	**雌 10 例**
器官重量（%）[1]					
評価動物数		6	6	6	6
副腎	- 絶対重量	0.66883 g	-21	-19	+2
	- 相対重量	0.01802 %	-20	-10	+2
卵巣	- 絶対重量	0.57550 g	-36	-54**	-11
	- 相対重量	0.01608 %	-33	-51	-13
卵管	- 絶対重量	0.53333 g	+82	+170**	+151**
	- 相対重量	0.01536 %	+84	+172**	+140*
下垂体	- 絶対重量	0.05300 g	-7	+7	+20
	- 相対重量	0.00149 %	-6	+15	+19
脾臓	- 絶対重量	5.66 g	-22	-23	-15
	- 相対重量	0.16052 %	-21	-20	-19
胸腺	- 絶対重量	2.37 g	-64*	-74**	-63
	- 相対重量	0.06433 %	-66**	-71**	-62
子宮	- 絶対重量	8.87 g	+15	+9	+11
	- 相対重量	0.25060 %	+13	+12	+9
膣	- 絶対重量	6.54 g	+26	+2	+11
	- 相対重量	0.18001 %	+27	+12	+13

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
剖検所見				
評価動物数	6	6	6	6
卵巣				
小型化	0	0	2	0
嚢胞	0	0	0	1
卵管				
腫大	0	2	5	4
拡張	0	0	1	0
嚢胞	0	0	0	3
皮膚				
脱毛	0	1	0	2
胸腺				
小型化	1	5	6	4
子宮				
腫大	0	0	1	0
病理組織学的検査				
評価動物数	6	6	6	6
副腎				
肥大／空胞化；球状層				
• 軽微	0	3	4	1
• 軽度	0	0	0	3

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
病理組織学的検査（続き）				
副腎（続き）				
肥大；束状層				
• 軽微	0	1	1	2
• 軽度	0	0	0	2
萎縮；網状層				
• 軽微	0	2	4	0
• 軽度	0	1	1	1
• 中等度	0	1	1	2
• 顕著	0	0	0	2
乳腺				
腺の発達の増加				
• 軽微	1	0	0	0
• 軽度	1	1	0	0
• 中等度	4	1	2	2
• 顕著	0	4	3	2
• 重度	0	0	1	2
分泌（蛋白質性）				
• 軽微	5	1	3	4
• 軽度	0	5	3	2

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
病理組織学的検査（続き）				
乳腺（続き）				
核の大小不同／巨核症；腺房細胞				
• 軽度	0	0	0	2
• 中等度	0	0	0	1
下顎リンパ節				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	0	1	3	1
• 軽度	0	0	0	2
• 中等度	0	1	0	0
腸間膜リンパ節				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	0	1	1	3
• 軽度	0	0	1	0
卵巣				
黄体の欠如	2	6	6	6
卵管				
肥大／過形成；上皮				
• 軽微	1	5	3	2
• 軽度	1	1	3	3

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
病理組織学的検査（続き）				
卵管（続き）				
拡張；内腔				
• 軽微	1	2	2	2
• 軽度	0	1	1	1
• 中等度	0	0	1	0
• 顕著	0	1	2	1
肥大；筋層				
• 軽微	0	0	0	1
• 軽度	0	1	0	0
下垂体				
好酸性細胞増加				
• 軽微	2	2	1	0
• 軽度	0	3	2	1
• 中等度	0	1	3	4
• 顕著	0	0	0	1
皮膚				
毛包の萎縮				
• 軽微	0	0	0	1
• 中等度	0	0	0	2

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
病理組織学的検査（続き）				
脾臓				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	0	2	0	3
• 軽度	0	1	3	1
• 中等度	0	0	2	2
胸腺				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	5	1	0	0
• 軽度	1	1	0	0
• 中等度	0	3	1	0
• 顕著	0	1	5	6
子宮				
肥大；子宮筋層（体部）				
• 軽微	0	4	0	5
• 軽度	0	0	2	1
• 中等度	0	0	1	0
萎縮；子宮内膜（体部）				
• 軽微	0	3	1	1
• 軽度	0	2	4	3
• 中等度	0	0	1	2

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
動物数：	雌 10 例	雌 6 例	雌 6 例	雌 10 例
病理組織学的検査（続き）				
子宮（続き）				
硝子化；子宮内膜間質（体部）				
• 軽微	0	2	2	1
• 軽度	0	2	0	1
• 中等度	0	2	3	4
拡張；子宮内膜腺（体部）				
• 軽微	0	1	2	1
• 顕著	0	1	0	0
肥厚／過形成；頸部上皮				
• 軽度	1	1	4	1
• 中等度	2	3	2	4
• 顕著	0	1	0	0
びらん／潰瘍；頸部				
• 軽微	0	1	1	1
• 軽度	0	1	0	1
炎症；頸部				
• 軽微	0	1	1	3
• 軽度	0	2	0	0

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**3**	**10**	**30**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 6 例**	**雌 6 例**	**雌 10 例**
病理組織学的検査（続き）				
子宮（続き）				
好酸球浸潤；頸部；粘膜固有層				
• 軽微	0	1	2	2
扁平上皮化生；頸部上皮				
• 軽微	4	3	2	4
• 軽度	0	2	3	0
• 中等度	0	0	0	2
• 顕著	0	0	1	0
膣				
萎縮；上皮				
• 軽微	0	2	2	3
• 軽度	0	0	0	1
角化				
• 軽微	0	0	0	1
• 軽度	2	2	2	4
• 中等度	3	3	3	1
• 顕著	1	1	1	0
性周期の特定 [1)]	8	0	0	0

1) 生殖組織の病理組織検査に基づく性周期段階の特定。

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**3**	**10**	**30**
動物数：	**雌 10 例**	**雌 6 例**	**雌 6 例**	**雌 10 例**
その他の試験				
性周期				
性周期がある雌動物数	10	3	1	1
発生頻度	定期的	第 1 週又は第 2 週	第 2 週	第 1 週
組織形態計測				
子宮内膜厚 [1)] （μm）	2896 ± 525	1938 ± 463	1400 ± 381	1614 ± 355
対照からの変化率（%）	NA	-33	-52	-44
回復性の評価				
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 4 例**
特記すべき所見				
死亡及び屠殺動物数	0	NA	NA	0
体重（%） [2)]	4.3 kg	NA	NA	-16
体重増加量（kg） D91～D119	+0.3	NA	NA	+0.5
一般状態				
脱毛（全身）	1	NA	NA	3
血液学的検査	-	NA	NA	-
血液生化学的検査	-	NA	NA	-

1) 平均±標準偏差。

2) 休薬期間の終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

略語：D＝Day、NA＝該当せず

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**3**	**10**	**30**
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 4 例**
器官重量（%） [1)]				
評価動物数	4	0	0	4
卵巣 - 絶対重量	0.58875 g	NA	NA	-26
- 相対重量	0.01400 %	NA	NA	-9
剖検所見	-	NA	NA	-
病理組織学的検査				
評価動物数	4	0	0	4
乳腺				
核の大小不同／巨核症；腺房細胞				
• 軽度	0	NA	NA	2
• 中等度	0	NA	NA	1
卵巣				
黄体の欠如	1	NA	NA	4
下垂体				
好酸性細胞増加				
• 軽微	0	NA	NA	4
脾臓				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	0	NA	NA	2
• 軽度	0	NA	NA	2

[1)] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.7 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	3	10	30
休薬群の動物数：	雌 4 例	雌 0 例	雌 0 例	雌 4 例
病理組織学的検査（続き）				
胸腺				
不完全な再生 [1]	0	NA	NA	4
子宮				
扁平上皮化生；頸部上皮				
• 軽微	3	NA	NA	1
• 軽度	0	NA	NA	2
• 中等度	0	NA	NA	1
その他の試験				
性周期				
性周期がある雌動物数	4	NA	NA	0
組織形態計測				
子宮内膜厚 [2] （μm）	2148 ± 783	NA	NA	2449 ± 625
対照からの変化率（%）	NA	NA	NA	+14

[1] 皮髄境界が非常に不明瞭又はない大型の小葉を特徴とする。小葉は有糸分裂の程度が増加した大型の低染色性細胞を含んだ。

[2] 平均±標準偏差。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: 39-week toxicity study by the oral route (gavage) in adult female cynomolgus monkeys followed by a 6-week treatment-free period</td><td>試験番号：ES-T20</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：サル／カニクイザル
（パーパスブレッド、モーリシャス原産）</td><td>投与期間：39 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-09</td></tr>
<tr><td>試験開始月齢：44～61 ヵ月齢</td><td>休薬期間：6 週間</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.2、0.6、2 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 4.8%であったため、1.05 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 投与期間の終了時に動物を屠殺したが、0（対照）及び 10 mg/kg/日群の動物番号の最後の雌 4 例に対しては、6 週間の休薬期間を設けた。
• Day 1 並びに Week 13、26 及び 39 に、エステトロール濃度分析のため主試験の動物から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：3 mg/kg/日 [1)]</td></tr>
</table>

1) 報告書では、3 及び 10 mg/kg/日群で認められた平均体重の軽微な減少に基づき、NOAEL を 1 mg/kg/日としているが、3 mg/kg/日群の個々の体重増加量は全て対照の範囲内であったのに対し、10 mg/kg/日群の 12 例中 7 例ではこの範囲を超えて体重が減少した。また、10 mg/kg/日群では Week 38 に軽度の貧血が認められたが、3 mg/kg/日群では認められなかった。したがって、NOAEL は 1 mg/kg/日ではなく 3 mg/kg/日であると結論された。

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	1	3	10
動物数：		雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
TK					
単回投与：D1					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		120	340	1078
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	31.7	110	365
T_{max}	（時間）		0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$	（時間）		12.8	13.4	16.7
反復投与：W13					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		163 [1)]	402 [1)]	1420 [1)]
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	30.4	89.5	433
T_{max}	（時間）		0.75	0.75	1.0
$T_{1/2}$	（時間）		14.6	14.5	12.9
反復投与：W26					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		109 [1)]	312 [1)]	1024 [1)]
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	19.8	84.9	245
T_{max}	（時間）		0.5	0.75	1.0
$T_{1/2}$	（時間）		16.9	14.7	11.7
反復投与：W39					
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		123 [1)]	328 [1)]	1250 [1)]
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	33.0	97.2	452
T_{max}	（時間）		0.5	1.0	0.5
$T_{1/2}$	（時間）		14.2	14.2	14.3

1) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 8 例**	**雌 8 例**	**雌 12 例**
特記すべき所見				
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	0
体重（%）[1] D1	4.1 kg	-10	-20*	-17*
W39	4.6 kg	-20**	-30**	-33**
体重増加量（kg） D1～W39	+0.6	+0.0	-0.1	-0.3
摂餌量（%）[2]	NP	NP	NP	NP
摂水量	NP	NP	NP	NP
一般状態				
削痩	0	2	1	5
脱毛（全身）	10	7	8	12
眼科学的検査	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-
血圧	-	-	-	-
体温	-	-	-	-
血液学的検査				
赤血球数 （10^{12}/L）				
W25	7.02	6.46	6.36*	5.78**
W38	7.00	6.59	6.59	5.95**

[1] D1 及び W39 の体重を示す。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。D1 の体重には有意差が認められた。長期間にわたり確立された社会組織を妨げると、それがストレスの原因となり、臨床病理パラメータ及び性周期に影響を及ぼす可能性があるため、動物を各群への無作為割付けはしなかった。

[2] サルは群飼いとし、摂餌量のみを目視検査した。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定）。

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day、NP＝測定せず、W＝Week

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
血液学的検査（続き）				
ヘモグロビン （g/dL）				
W25	13.8	13.0	12.7*	11.8**
W38	13.7	13.2	13.1	12.1**
PCV （L/L）				
W25	0.46	0.43	0.43	0.39**
W38	0.47	0.44	0.45	0.41**
PT （L/L）				
W25	13.0	11.7**	12.2*	12.2**
W38	13.2	12.2**	12.5*	12.7
血液生化学的検査				
カルシウム （mmol/L）				
W25	2.46	2.35*	2.30**	2.23**
W38	2.35	2.20*	2.31	2.22**
総蛋白 （g/L）				
W25	87	82*	80**	77**
W38	86	81*	80**	79**
アルブミン （g/L）				
W25	46	41	39**	38**
W38	46	40**	38**	38**
A/G 比				
W25	1.15	0.99**	0.98**	0.96**
W38	1.14	0.99**	0.93**	0.95**

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：A/G 比＝アルブミン／グロブリン比、PCV＝血中血球容積、PT＝プロトロンビン時間、W＝Week

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 8 例**	**雌 8 例**	**雌 12 例**
血液生化学的検査（続き）				
総コレステロール （mmol/L）				
W25	2.6	3.5**	3.7**	3.9**
W38	2.5	3.3**	3.5**	3.8**
トリグリセリド （mmol/L）				
W25	0.65	1.05**	0.87	0.93**
W38	0.72	0.95	0.90	0.86
総ビリルビン （μmol/L）				
W25	-	-	-	-
W38	2	3	4*	6**
ALP （IU/L）				
W25	654	307**	308**	234**
W38	635	321**	312**	240**
ALT （IU/L）				
W25	48	104**	101*	131**
W38	46	111**	130**	124**
γ-GTP （IU/L）				
W25	66	58	58	46**
W38	65	63	62	48**
尿検査	-	-	-	-

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、ALP＝アルカリホスファターゼ、ALT＝アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-GTP＝γ-グルタミルトランスフェラーゼ、W＝Week

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
動物数：		**雌 12 例**	**雌 8 例**	**雌 8 例**	**雌 12 例**
器官重量（%） [1)]					
評価動物数		8	8	8	8
卵巣	- 絶対重量	0.54513 g	-20*	-50**	-14
	- 相対重量	0.01206 %	-13	-28	+22
脾臓	- 絶対重量	7.77 g	-39	-44*	-50**
	- 相対重量	0.17006 %	-22	-22	-28*
胸腺	- 絶対重量	3.10 g	-30	-58**	-71**
	- 相対重量	0.06846 %	-19	-41**	-58**
剖検所見					
評価動物数		8	8	8	8
卵巣					
嚢胞		0	2	1	2
卵管					
拡張		1	1	2	3
皮膚					
脱毛		1	4	4	6

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunn 検定）

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
病理組織学的検査				
評価動物数	8	8	8	8
副腎				
肥大／空胞化；束状層				
• 軽微	0	2	2	1
• 軽度	0	1	2	1
• 中等度	0	0	1	5
萎縮；網状層				
• 軽微	0	1	1	2
• 軽度	0	0	1	5
• 中等度	0	0	2	1
骨髄				
脂肪組織の増加				
• 軽微	7	3	2	2
• 軽度	1	4	5	6
• 中等度	0	0	1	0
細胞充実性の低下				
• 軽度	0	0	0	1
肝臓				
グリコーゲン含量				
• 軽微	1	4	4	5
• 軽度	3	4	4	2
• 中等度	4	0	0	0

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
病理組織学的検査（続き）				
乳腺				
腺房の発達				
• 軽微	2	0	0	0
• 軽度	3	2	0	0
• 中等度	2	6	8	7
• 顕著	1	0	0	1
核大小不同／不同血球症；腺房細胞				
• 軽微	1	3	6	8
下顎リンパ節				
胚中心の発達				
• 軽微	0	0	1	0
• 軽度	1	6	1	4
• 中等度	6	2	6	4
• 顕著	1	0	0	0
卵巣				
黄体の欠如	0	8	8	8
卵胞の発達の減少				
• 軽微	0	0	1	1
• 軽度	5	4	6	7
• 中等度	3	3	1	0
• 顕著	0	1	0	0
硝子化	0	2	3	5

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
病理組織学的検査（続き）				
卵管				
肥大／過形成；上皮				
• 軽微	0	3	2	4
• 軽度	1	5	4	2
• 中等度	0	0	1	2
拡張；内腔				
• 軽微	0	0	3	0
• 軽度	0	0	1	1
• 中等度	0	0	0	3
肥大；筋層				
• 軽微	0	0	3	5
扁平上皮化生				
• 軽度	0	0	1	0
下垂体				
好酸性細胞増加				
• 軽微	7	2	0	0
• 軽度	1	6	3	1
• 中等度	0	0	4	3
• 顕著	0	0	1	4

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
病理組織学的検査（続き）				
皮膚				
毛包の萎縮	0	1	2	4
毛包の空洞	1	3	3	4
脾臓				
胚中心の発達				
• 軽微	1	3	1	4
• 軽度	6	4	2	2
• 中等度	1	0	3	2
• 顕著	0	1	2	0
胸腺				
リンパ組織の萎縮				
• 軽微	2	0	1	0
• 軽度	4	2	3	2
• 中等度	0	6	4	2
• 顕著	0	0	0	4
子宮				
肥大；子宮筋層（体部）				
• 軽微	0	0	0	2
• 軽度	0	0	0	3
• 中等度	0	0	0	2

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
病理組織学的検査（続き）				
子宮（続き）				
萎縮；子宮内膜（体部）				
• 軽微	0	1	0	0
• 軽度	0	3	4	4
• 中等度	0	0	4	3
• 顕著	0	0	0	1
硝子化；子宮内膜間質（体部）				
• 軽微	0	2	3	1
• 軽度	0	1	2	3
拡張；子宮内膜腺（体部）				
• 軽微	0	1	1	0
• 軽度	0	4	1	3
• 中等度	0	0	1	0
肥厚／過形成；頸部上皮				
• 軽微	0	5	8	6
• 軽度	0	1	0	2
• 顕著	1	0	0	0

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照）	1	3	10
動物数：	雌 12 例	雌 8 例	雌 8 例	雌 12 例
病理組織学的検査（続き）				
子宮（続き）				
拡張；頸部腺				
• 軽微	0	6	8	6
• 軽度	0	0	0	1
慢性炎症；頸部				
• 軽微	0	0	2	1
• 軽度	0	0	0	4
リンパ球浸潤；頸部				
• 軽微	1	2	3	5
• 軽度	0	0	0	2
扁平上皮化生；頸部上皮				
• 軽微	2	3	2	5
• 軽度	1	3	1	3
• 中等度	0	1	4	0
• 顕著	0	0	1	0
膣				
萎縮；上皮				
• 軽微	0	1	1	0
• 軽度	0	2	5	5
• 中等度	0	0	0	1

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
動物数：	**雌 12 例**	**雌 8 例**	**雌 8 例**	**雌 12 例**
病理組織学的検査（続き）				
性周期の特定 [1)]	8	0	0	0
その他の試験				
性周期				
性周期がある雌動物数				
試験前	12	8	8	12
W1～W4	12	4	5	3
W5 後	12	0	0	0
組織形態計測				
子宮内膜厚 [2)] （μm）	2859 ± 538	2259 ± 469	1876 ± 345	1799 ± 266
対照からの変化率（%）	NA	-21	-34	-37
子宮筋層厚 [2)] （μm）	4060 ± 633	3895 ± 759	4093 ± 534	4743 ± 899
対照からの変化率（%）	NA	-4	+1	+17
回復性の評価				
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 4 例**
特記すべき所見				
死亡及び屠殺動物数	0	NA	NA	0
体重（%） [3)]	5.4 kg	NA	NA	-37*
体重増加量（kg） W40～W45	+0.5	NA	NA	+0.3

1) 生殖組織の病理組織検査に基づく性周期段階の特定。

2) 平均±標準偏差。

3) 休薬期間の終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05（Mann-Whitney 検定）

略語：NA＝該当せず、W＝Week

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 4 例**
一般状態				
脱毛（全身）	2	NA	NA	4
血液学的検査	-	NA	NA	-
血液生化学的検査	-	NA	NA	-
器官重量（%） [1), 2)]				
評価動物数	4	0	0	4
卵巣 - 絶対重量	0.71900 g	NA	NA	-37*
- 相対重量	0.01409 %	NA	NA	-4
剖検所見				
評価動物数	4	0	0	4
皮膚				
脱毛（びまん性）	0	NA	NA	3
病理組織学的検査				
評価動物数	4	0	0	4
乳腺				
核大小不同／不同血球症；腺房細胞				
• 軽微	0	NA	NA	3
拡張；腺房				
• 軽微	0	NA	NA	2

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 報告書には、脾臓重量の部分的な回復が示されている。平均絶対重量は対照と比較して－14%であるが、相対重量は＋33%である。したがって、絶対重量の減少は体重減少と関連している可能性が最も高く、脾臓重量は完全に回復したと結論された。

*p<0.05（Student の t 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、NA＝該当せず

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 4 例**
病理組織学的検査（続き）				
卵管				
肥大；筋層				
• 軽微	0	NA	NA	2
• 軽度	0	NA	NA	2
下垂体				
好酸性細胞増加				
• 軽微	1	NA	NA	0
• 軽度	1	NA	NA	1
• 中等度	0	NA	NA	2
• 顕著	0	NA	NA	1
皮膚				
毛包の萎縮	0	NA	NA	1
子宮				
拡張；子宮内膜腺（体部）				
• 軽度	0	NA	NA	2
• 中等度	0	NA	NA	1
過形成；上皮				
• 軽度	0	NA	NA	1
リンパ球浸潤；頸部				
• 軽微	0	NA	NA	1

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.A.8 サル 39 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照）**	**1**	**3**	**10**
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 4 例**
病理組織学的検査（続き）				
子宮（続き）				
扁平上皮化生；頸部上皮				
• 顕著	0	NA	NA	1
粘液の減少；頸部	0	NA	NA	3
線維化；頸部；粘膜固有層	0	NA	NA	4
その他の試験				
性周期				
性周期の認められる雌動物数	4	NA	NA	2
組織形態計測				
子宮内膜厚 [1)] （μm）	2847 ± 230	NA	NA	3447 ± 725
対照からの変化率（%）	NA	NA	NA	+21

1) 平均±標準偏差。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.B エステトロール＋ドロスピレノンの反復投与毒性試験

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol and Drospirenone: 13-week toxicity study by oral route (gavage) in adult female cynomolgus monkeys followed by a 4-week treatment-free period</td><td>試験番号：0030-NC-002</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：サル／カニクイザル
（パーパスブレッド、モーリシャス原産）</td><td>投与期間：13 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-10</td></tr>
<tr><td>試験開始月齢：48～68 ヵ月齢</td><td>休薬期間：4 週間</td><td>GLP 適用：適 [1)]</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： エステトロール／ドロスピレノン：0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0 / 0、0.6 / 0.12、2 / 0.4、6 / 1.2（4 / 0.8）、6 / 0（4 / 0）、0 / 1.2（0 / 0.8） mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• エステトロール原薬の水分含量が 5.5%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 高用量併用群における一般状態悪化／早期屠殺のため、高用量併用投与群では Day 50 に、エステトロール又はドロスピレノン単独投与群では Day 53 に投与量を減量した。Day 48 及び 49 には、高用量併用投与群の全ての生存雌動物の投与を中止した。
• 高血糖のため、高用量併用投与群［30 / 6（20 / 4） mg/kg/日］の雌 1 例では Day 69/70 及び 78/79 に、中用量併用投与群（10 / 2 mg/kg/日）の雌 1 例では Day 82/83 に投与を中止した [2)]。
• 投与期間の終了時に動物を屠殺したが、0 / 0（対照） mg/kg/日群の動物番号最後の雌 4 例及び 30 / 6（20 / 4） mg/kg/日群の動物番号最後の雌 2 例に対しては、4 週間の休薬期間を設けた。
• Day 1 及び Week 13 に、エステトロール及びドロスピレノン濃度分析のため、主試験の動物から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：エステトロール／ドロスピレノン：3 / 0.6 mg/kg/日</td></tr>
</table>

1) 反応試験紙による血糖値並びに血漿中のフルクトサミン及びグリコヘモグロビン濃度の測定を除く。

2) 高用量併用投与群の一般状態悪化／早期屠殺の原因は高血糖であると考えられたため、Day 57 以降は毎日グルコース反応試験紙により血糖値を測定し（非 GLP）、投与中止の基準を設定した。反応試験紙による血糖値が 2 日連続で 120 mg/dL を超え、3 日目に ADVIA 1650 分析装置による血漿グルコース値が 10 mmol/L を超えた場合は、2 日間にわたり投与を中止した。ADVIA 1650 分析装置による血漿グルコース値が 5.5 mmol/L 以下になった時点で投与を再開した。

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：		0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
動物数：		**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
TK（エステトロール）							
単回投与：D1							
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		341	1430	5733	3108	
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	173	658	1965	884	LLOQ 未満
T_{max}	（時間）		0.5	1.0	0.5	1.0	
$T_{1/2}$	（時間）		21.9	17.3	10.2	20.0	
反復投与：W13							
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		483 [1)]	1608 [1)]	3733 [1)]	2281 [1)]	
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	173	380	722	687	LLOQ 未満
T_{max}	（時間）		0.5	1.0	1.0	1.0	
$T_{1/2}$	（時間）		14.6	21.3	8.6	13.5	
TK（ドロスピレノン）							
単回投与：D1							
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		745	2490	6766		6186
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	116	435	930	LLOQ 未満	758
T_{max}	（時間）		1.0	2.0	2.0		3.0
$T_{1/2}$	（時間）		4.5	4.7	5.1		4.1
反復投与：W13							
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		630 [1)]	1867 [1)]	2769 [1)]		3150 [1)]
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	105	205	338	LLOQ 未満	399
T_{max}	（時間）		2.0	2.0	3.0		3.0
$T_{1/2}$	（時間）		5.3	6.1	5.3		6.5

1) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
動物数：	雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例	雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例
特記すべき所見						
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	4（D36、D45、D47、D47） [1)]	0	0
体重 [2)] （%）	3.6 kg	+17	+14	-3	-8	+6
体重増加量 D1～D90（kg）	+0.3	+0.4	+0.6	+0.2	-0.1	+0.1
摂餌量 [3)] （%）	NP	NP	NP	NP	NP	NP
摂水量	NP	NP	NP	NP	NP	NP
一般状態						
低体温	0	0	0	2	0	0
歯肉の蒼白	0	0	0	1	0	0
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-	-	-
血圧	-	-	-	-	-	-
体温	-	-	-	-	-	-

1) 雌 1 例が強制経口投与による外傷のため一般状態悪化で死亡した（D36）。雌 3 例は、膵島の単細胞壊死／アポトーシス、血液生化学的変化（電解質失調、尿素、クレアチニン、総コレステロール及びトリグリセリドの重度の増加）、顕著な腎臓の変化（近位尿細管細胞の軽度から中等度の空胞化、集合管の変性／壊死、遠位尿細管の軽微から中等度の拡張）及び肝臓の所見（門脈周囲から中間帯の肝細胞の軽度な肥大、軽度な単細胞壊死／アポトーシス）を伴う重度の高血糖による一般状態悪化（低体温、自発運動低下、虚脱及び横臥）のため、早期屠殺となった（D45、D47、D47）。

2) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

3) サルは群飼いとし、摂餌量のみを目視検査した。

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day、NP＝測定せず

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
血液学的検査 [1]						
赤血球数 （10^{12}/L）	5.76	5.54	5.40	5.36	5.10	6.19
ヘモグロビン （g/dL）	11.2	10.3	10.4	10.3	10.0*	12.0
PCV （L/L）	0.41	0.37	0.38	0.39	0.37	0.44
PT （秒）	12.3	11.7	11.3*	11.3*	11.2**	12.2
血液生化学的検査 [1]						
カルシウム （mmol/L）	2.39	2.22*	2.23*	2.25*	2.13**	2.44
総蛋白 （g/L）	84	78**	76**	74**	73**	83
アルブミン （g/L）	43	39**	39**	38**	36**	49**
グルコース （mmol/L）	4.57	3.86	6.10	6.71**	3.50	4.40
総コレステロール （mmol/L）	2.7	3.8** [3]	3.2 [3]	3.7* [3]	3.2	2.0
トリグリセリド （mmol/L）	0.39	2.38*	0.84*	1.38**	0.88*	0.32
ALP （IU/L）	595	230**	178**	152**	199**	697
ALT （IU/L）	42	67	73	56	158**	35
γ-GTP （IU/L）	58	34**	35**	30**	51	57
追加の血液生化学的検査 [2]						
フルクトサミン （μmol/L）	109	71.9	87.1	59.3**	69.3*	78.8
グリコヘモグロビン （eq%）	3.25	3.35	3.29	2.49	1.26	3.32

[1] 投与終了時。高用量群の投与量の減量後、Week 8 以降は血液学的検査及び血液生化学的検査を週 1 回実施した。所見は早期の時点では同様であった。エステトロールの単独投与群及びドロスピレノンとの併用投与群では、いくつかの時点で無機リンの減少が認められた。

[2] 投与終了時。フルクトサミン及びグリコヘモグロビンは、それぞれ Week 10 又は 8 以降に数回測定した（非 GLP）。エステトロール単独投与群及びドロスピレノンとの併用投与群では、全時点でフルクトサミンの減少が認められた。グリコヘモグロビンの減少は、エステトロール単独投与群及びドロスピレノンとの高用量併用投与群において全時点で認められた。

[3] LDL コレステロール及び HDL コレステロールは、いずれも対照と比較して増加する傾向を示した。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語： ALP＝アルカリホスファターゼ、ALT＝アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-GTP＝γ-グルタミルトランスフェラーゼ、PCV＝血中血球容積、PT＝プロトロンビン時間

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：		**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：		**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
ホルモン [1]							
インスリン	（mU/L）	43	86	58	61	38	80
コルチゾール	（nmol/L）	1512	2451	2223	2526	2138	1280
アルドステロン	（pg/mL）	663	1650	2156	3624	605	3104
ACTH	（pg/mL）	58	47	41	42	47	48
尿検査		-	-	-	-	-	-
器官重量 [2]	（%）						
評価動物数		5	5	5	3	5	5
副腎	- 絶対重量	0.70080 g	-2	+25	+15	-9	+33
	- 相対重量	0.02122 %	-17	0	+10	-11	+17
卵巣	- 絶対重量	0.57640 g	-44	-36	-43	-36	-45
	- 相対重量	0.01764 %	-54*	-49	-49	-35	-52
卵管	- 絶対重量	0.77820 g	-46	-38	-53	-3	-44
	- 相対重量	0.02435 %	-54	-51	-56	-6	-54
下垂体	- 絶対重量	0.05060 g	+26	+74**	+41	+40	+31
	- 相対重量	0.00157 %	+5	+37	+33	+36	+11
脾臓	- 絶対重量	4.67 g	-4	-13	-9	-22	+40
	- 相対重量	0.14125 %	-22	-29	-14	-24	+21
胸腺	- 絶対重量	2.18 g	-44	-43	-52	-58	-5
	- 相対重量	0.06513 %	-53	-55	-56	-58	-16

[1] 投与終了時。高用量併用投与群の投与量の減量後、Week 8 以降はインスリン、コルチゾール及びアルドステロンを週 1 回測定し、Week 10 以降は ACTH を測定した。早期の時点の所見は同様であった。

[2] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、ACTH＝副腎皮質刺激ホルモン

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
器官重量 [1]（%）（続き）						
子宮 - 絶対重量	9.29 g	+101	+362**	+197	-10	+2
- 相対重量	0.28467 %	+51	+271*	+177	-11	-12
剖検所見						
評価動物数	5	5	5	3	5	5
皮膚						
脱毛（びまん性）	3	3	4	2	3	0
胸腺						
退縮	0	1	2	1	2	0
子宮						
腫大	0	0	4	2	0	0
病理組織学的検査						
評価動物数	5	5	5	3	5	5
副腎						
肥大；球状層						
• 軽微	0	2	4	1	1	3
• 軽度	0	0	0	2	0	1
萎縮；網状層						
• 軽微	0	0	1	0	0	0
• 軽度	0	0	3	0	2	1
• 中等度	0	0	0	1	1	0

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunn 検定）

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
骨髄						
細胞充実性の低下						
• 軽微	0	0	1	3	0	0
GALT						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	0	0	0	1	3	0
• 軽度	0	0	0	2	0	0
心臓						
間質の線維化 [1]；心室／中隔						
• 軽微	0	0	3（f）[2]	1	0	1
空胞化；心筋細胞						
• 軽微	0	0	1（f）[2]	1	0	0
肥大；心筋細胞	0	0	0	1	0	0
肝臓						
グリコーゲン含量減少						
• 軽度	0	0	2	2	2	1
• 中等度	4	4	3	1	2	4
• 顕著	1	1	0	0	1	0

[1] マッソントリクローム染色においてのみ認められた。早期屠殺となった動物では、心筋細胞の軽微な空胞化を伴う軽微な間質の線維化も認められた。

[2] これらの変化は限局性で、境界が明瞭であり、空胞化を伴わない例もあることから、投与との関連性は疑わしく、可能性は低いと考えられた。

略語：（f）＝限局性、GALT＝腸管系リンパ組織

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
乳腺						
腺房の発達						
• 軽度	3	0	0	0	0	2
• 中等度	2	3	2	1	2	3
• 顕著	0	2	3	2	3	0
腺房細胞の空胞化						
• 軽微	0	0	1	2	0	1
• 軽度	0	0	1	1	0	0
導管腺房の拡張						
• 軽微	0	2	3	0	2	0
• 軽度	0	1	2	2	0	0
• 中等度	0	0	0	1	0	0
浸潤物；リンパ球 [1)]	0	3	4	3	3	4
細胞／核の大小不同 [1)]	0	3	3	1	4	0
アポトーシス [1)]	1	0	0	2	2	0
下顎リンパ節						
胚中心の発達						
• 軽微	0	0	1	0	1	0
• 軽度	0	0	1	2	3	1
• 中等度	5	5	3	1	1	4

[1)] 軽微な変化

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
下顎リンパ節（続き）						
傍皮質の発達						
• 軽微	0	0	3	1	2	0
• 軽度	5	4	2	2	1	5
• 中等度	0	1	0	0	2	0
腸間膜リンパ節						
胚中心の発達						
• 軽微	0	0	1	2	2	0
• 軽度	3	2	2	1	2	2
• 中等度	2	3	2	0	1	3
卵巣						
黄体の欠如	0	5	5	5	5	5
卵胞の発達						
• 軽微	0	0	1	1	1	0
• 軽度	2	3	1	2	4	2
• 中等度	2	1	3	0	0	3
卵管						
萎縮；上皮						
• 軽微	0	2	0	0	0	0
• 軽度	0	3	5	3	0	5

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
卵管（続き）						
肥大／過形成；上皮						
• 軽度	0	0	0	0	4	0
• 中等度	0	0	0	0	1	0
膵臓						
島細胞の空胞化						
• 軽微	0	0	1	3	0	1
下垂体						
好酸性細胞増加						
• 軽微	2	0	0	2	0	3
• 軽度	0	1	3	1	1	0
• 中等度	0	2	1	0	0	0
• 顕著	0	2	1	0	4	0
皮膚						
毛包の萎縮	1	2	3	2	2	0
脾臓						
胚中心の欠如	0	0	0	2	0	0
辺縁帯の減少 [1)]	0	0	0	3	0	0

[1)] 軽微から軽度の変化

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
胸腺						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	1	0	0	0	0	1
• 軽度	2	0	0	0	0	3
• 中等度	2	0	0	0	0	1
• 顕著	0	2	0	0	0	0
• 重度	0	3	5	2 [1)]	5	0
子宮						
間質密度の上昇（体部）						
• 中等度	0	0	0	0	5	0
硝子化；子宮内膜間質（体部）						
• 軽微	0	0	0	0	1	0
• 軽度	0	0	0	0	4	0
脱落膜化；子宮内膜間質						
• 軽度	0	2	1	1	0	0
• 中等度	0	0	0	1	0	3
• 顕著	0	2	1	1	0	2 [2)]

[1)] 2 例の動物を評価した。

[2)] 1 例では、中等度の子宮内膜壊死を伴っていた。

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
子宮（続き）						
子宮内膜厚の増加（体部）						
• 軽微	0	0	0	0	0	1
• 軽度	0	0	0	1	0	1
• 中等度	0	0	1	1	0	2
• 顕著	0	0	0	0	0	1
子宮内膜腺 [1)]（体部）						
• 軽微	0	1	0	3	0	0
• 軽度	3	2	3	0	5	0
• 中等度	1	0	1	0	0	0
• 顕著	1	0	0	0	0	0
基底腺（体部）						
• 軽微	0	2	1	2	0	0
• 軽度	0	3	1	0	0	2
• 中等度	0	0	0	1	0	2
• 顕著	0	0	0	0	0	1
腺の拡張（体部）						
• 軽微	3	2	4	2	3	0
• 軽度	0	3	1	1	2	1
• 中等度	2	0	0	0	0	4

[1)] 子宮内膜厚の所見。

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
子宮（続き）						
コイル状の腺（体部）						
• 軽微	3	2	3	0	3	0
• 軽度	0	1	1	0	0	2
• 中等度	2	0	0	0	0	3
らせん動脈（体部）						
• 軽微	2	1	2	0	1	0
• 軽度	1	4	2	2	3	2
• 中等度	0	0	0	1	0	2
• 顕著	0	0	0	0	0	1
子宮筋層の肥大（体部）						
• 軽微	0	0	0	0	1	0
• 軽度	0	4	0	1	0	0
• 中等度	0	1	2	1	0	0
• 顕著	0	0	3	1	0	0
頸部肥大						
• 軽度	0	2	2	0	0	0
• 中等度	0	1	3	3	0	0

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
子宮（続き）						
粘液（頸部）						
• 軽微	3	0	0	0	3	0
• 軽度	2	0	0	0	2	1
• 中等度	0	0	1	0	0	4
• 顕著	0	4	1	0	0	0
• 重度	0	1	3	3	0	0
上皮厚の減少（頸部）						
• 軽微	0	0	1	0	0	2
• 軽度	1	0	0	1	0	3
過形成；上皮細胞 [1)]（頸部）						
• 軽微	0	0	0	0	2	0
• 軽度	0	0	0	0	2	0
• 中等度	0	0	0	0	1	0
扁平上皮化生（頸部）						
• 軽微	0	0	0	0	1	0
• 軽度	0	0	0	0	2	0
• 中等度	0	0	0	0	1	0

[1)] 軽微な腺の拡張を伴っていた。

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
膣						
萎縮；上皮						
• 軽微	1	0	0	0	2	1
• 軽度	0	3	1	0	0	3
• 中等度	0	2	4	3	0	0
角化						
• 軽微	0	0	0	0	0	1
• 軽度	1	0	0	0	0	1
• 中等度	4	0	0	0	5	0
その他の試験						
性周期						
性周期がある雌動物数	9	0	0	1	1	0
発生頻度	定期的			第 1 週 [1)]	第 1 週	
組織形態計測						
子宮内膜厚 [2)] （μm）	3671 ± 581	2857 ± 1042	2884 ± 1584	3213 ± 737	2149 ± 280	4336 ± 1212
対照からの変化率 （%）	NA	-22	-21	-12	-41	+18

1) 投与前に性周期が始まった。

2) 平均±標準偏差。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの **1 日投与量（mg/kg）：**	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
回復性の評価						
休薬群の動物数：	雌 4 例	雌 0 例	雌 0 例	雌 2 例	雌 0 例	雌 0 例
特記すべき所見						
死亡及び屠殺動物数	0	NA	NA	0	NA	NA
体重 [1] （%）	4.4 kg	NA	NA	-14	NA	NA
体重増加量 D91～D119 （kg）	+0.4	NA	NA	+0.3	NA	NA
一般状態	-	NA	NA	-	NA	NA
体温 [2]	-	NA	NA	-	NA	NA
血液学的検査	-	NA	NA	-	NA	NA
血液生化学的検査						
総蛋白 （g/L）	81	NA	NA	75	NA	NA
追加の血液生化学的検査 [3]						
フルクトサミン （μmol/L）	110	NA	NA	90.5	NA	NA
器官重量 [4] （%）						
評価動物数	4	NA	NA	2	NA	NA
卵巣 - 絶対重量	0.63375 g	NA	NA	-50	NA	NA
- 相対重量	0.01524 %	NA	NA	-43	NA	NA

1) 休薬期間の終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 重度の高血糖状態下では、一般状態変化の 1 つとして低体温が認められたため、予防措置として体温を測定した。

3) フルクトサミン及びグリコヘモグロビン。

4) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

略語：D＝Day、NA＝該当せず

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 2 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**
器官重量 [1]（%）（続き）						
脾臓 - 絶対重量	7.32 g	NA	NA	-33	NA	NA
- 相対重量	0.17494 %	NA	NA	-23	NA	NA
胸腺 - 絶対重量	2.84 g	NA	NA	-41	NA	NA
- 相対重量	0.06664 %	NA	NA	-32	NA	NA
子宮 - 絶対重量	10.27 g	NA	NA	-38	NA	NA
- 相対重量	0.24651 %	NA	NA	-29	NA	NA
剖検所見						
評価動物数	4	NA	NA	2	NA	NA
皮膚						
脱毛（びまん性）	0	NA	NA	2	NA	NA
病理組織学的検査						
評価動物数	4	NA	NA	2	NA	NA
乳腺						
腺房の萎縮						
• 軽度	0	NA	NA	2 [2]	NA	NA
卵巣						
黄体の欠如	0	NA	NA	2	NA	NA
卵胞の発達						
• 軽度	3	NA	NA	0	NA	NA
• 中等度	1	NA	NA	0	NA	NA
• 顕著	0	NA	NA	2	NA	NA

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 1 例では、腺房細胞の空胞化が認められる管状房状の拡張した領域を伴っていた。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.6**	**10 / 2**	**30 / 6（20 / 4）**	**30 / 0（20 / 0）**	**0 / 6（0 / 4）**
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 2 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**
病理組織学的検査（続き）						
下垂体						
好酸性細胞増加						
• 軽微	3	NA	NA	0	NA	NA
• 軽度	0	NA	NA	1	NA	NA
• 中等度	0	NA	NA	1	NA	NA
脾臓						
胚中心の欠如	0	NA	NA	1	NA	NA
辺縁帯の減少 [1)]	0	NA	NA	1	NA	NA
胸腺						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	2	NA	NA	0	NA	NA
• 軽度	2	NA	NA	1	NA	NA
• 中等度	0	NA	NA	1	NA	NA
子宮						
子宮内膜腺（体部）						
• 軽微	0	NA	NA	1	NA	NA
• 軽度	1	NA	NA	1	NA	NA
• 中等度	2	NA	NA	0	NA	NA
• 顕著	1	NA	NA	0	NA	NA

[1)] 軽度

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、ドロスピレノン

エステトロール／ドロスピレノンの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.6	10 / 2	30 / 6（20 / 4）	30 / 0（20 / 0）	0 / 6（0 / 4）
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 2 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**
病理組織学的検査（続き）						
子宮（続き）						
腺の拡張（体部）						
• 軽微	1	NA	NA	1	NA	NA
• 軽度	1	NA	NA	0	NA	NA
• 中等度	2	NA	NA	0	NA	NA
コイル状の腺（体部）						
• 軽微	2	NA	NA	0	NA	NA
• 軽度	2	NA	NA	0	NA	NA
膣						
角化						
• 軽微	1	NA	NA	2	NA	NA
• 軽度	3	NA	NA	0	NA	NA
その他の試験						
性周期						
性周期がある雌動物数	4	NA	NA	2	NA	NA
組織形態計測						
子宮内膜厚 [1)] （μm）	3420 ± 958	NA	NA	2476 ± 291	NA	NA
対照からの変化率（%）	NA	NA	NA	-28	NA	NA

1) 平均±標準偏差。高用量併用投与群の動物の個々の値は、対照群の範囲内であった。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.C エステトロール＋レボノルゲストレルの反復投与毒性試験

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol and Levonorgestrel: 13-week toxicity study by the oral route (gavage) in adult female cynomolgus monkeys followed by a 4-week treatment-free period</td><td>試験番号：0031-NC-018</td></tr>
<tr><td>動物種／系統： サル／カニクイザル（パーパスブレッド、モーリシャス原産）</td><td>投与期間：13 週間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.2-11</td></tr>
<tr><td>試験開始月齢：58～68 ヵ月齢</td><td>休薬期間：4 週間</td><td>GLP 適用：適 [1)]</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20■年 ■月 ■日</td><td colspan="2">投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="2">溶媒／投与形態： エステトロール／レボノルゲストレル：0.5%（w/v）CMC／0.1%（v/v）Tween-80 水溶液中に 0 / 0、0.6 / 0.0045、2 / 0.015、6 / 0.045（4 / 0.030）、6 / 0（4 / 0）、0 / 0.045（0 / 0.030） mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• エステトロール原薬の水分含量が 5.5%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 高用量併用投与群及びエステトロール又はレボノルゲストレル単独投与群の投与量を、高用量併用投与群における一般状態悪化／早期屠殺のため、Day 51 に減量した。
• 高用量併用投与群［30 / 0.225（20 / 0.150） mg/kg/日］の 1 例では、高血糖のため、Day 29/30、50/51/52/53 及び 61/62/63/64 に投与を中止した [2)]。
• 投与期間の終了時に動物を屠殺したが、0 / 0（対照） mg/kg/日群の動物番号最後の 4 例及び 30 / 0.225（20 / 0.150） mg/kg/日群の動物番号最後の 3 例に対しては、4 週間の休薬期間を設けた。
• Day 1 及び Week 13 に、エステトロール及びレボノルゲストレル濃度分析のため、主試験の動物から血漿を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL：エステトロール／レボノルゲストレル：3 / 0.0225 mg/kg/日</td></tr>
</table>

1) エステトロール単独投与群は、GLP から除外した。Week 13 に血漿検体へのレボノルゲストレルの混入が認められたため、この群の結果をエステトロール単独の結果とみなすことはできなかった。

2) グルコース値は、投与期間中は週 1 回又は 2 週間に 1 回の頻度で測定し、投与中止の基準を設定した。血漿グルコース値が 10 mmol/L を超えた場合は、投与を 2 日間中止し、血漿グルコース値が 5.5 mmol/L 以下になった時点で投与を再開した。

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：		0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
動物数：		雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例	雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例
TK（エステトロール）							
単回投与：D1							
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		238	835	3043	2585	
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	116	360	1344	1129	LLOQ 未満
T_{max}	（時間）		0.5	1.0	1.0	1.0	
$T_{1/2}$	（時間）		15.5	21.6	9.5	12.7	
反復投与：W13							
$AUC_{0\text{-}last}$	（ng·hr/mL）		282 [1)]	934 [1)]	1858 [1)]	1913 [1)]	
C_{max}	（ng/mL）	LLOQ 未満	87.1	262	557	1324	LLOQ 未満 [2)]
T_{max}	（時間）		0.5	1.0	1.0	0.5	
$T_{1/2}$	（時間）		18.8	16.9	20.2	10.7	

1) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-}last}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

2) 1 例で微量のエステトロール（3 mg/kg/日投与時の C_{max} の 1.1%）が検出されたが、これによる試験への影響はないと考えられた。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.0225**	**10 / 0.075**	**30 / 0.225 （20 / 0.150）**	**30 / 0 （20 / 0）**	**0 / 0.225 （0 / 0.150）**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
TK（レボノルゲストレル）						
単回投与：D1						
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）		202	429	451		500
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	32.7	45.1	56.2	LLOQ 未満	57.5
T_{max} （時間）		1.0	2.0	1.0		1.0
$T_{1/2}$ （時間）		3.6	6.0	4.4		6.9
反復投与：W13						
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）		145 [1)]	197 [1)]	291 [1)]		106 [1)]
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	20.7	22.0	32.1	≤3.40 [2)]	14.6
T_{max} （時間）		1.0	2.0	2.0		2.0
$T_{1/2}$ （時間）		4.0	4.7	4.2		6.1

1) 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-last}}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

2) エステトロール単独投与群の全ての動物の血漿検体から、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、最大測定値は低用量のレボノルゲストレルを投与した場合の C_{max} の約 16.4%であった。この群の曝露量が一様であることを考慮すると、汚染された投与液が動物に投与された可能性があるが、汚染源を確実に特定することはできなかった。

略語：$AUC_{0\text{-last}}$＝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、D＝Day、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、$T_{1/2}$＝消失半減期、W＝Week

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
動物数：	雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例	雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例
特記すべき所見						
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	2 （D47, D83） 1)	0	0
体重 2) （%）	3.7 kg	+8	+14	+5	-5	+22*
体重増加量 D1～D91 （kg）	+0.2	+0.4	+0.6	+0.4	-0.1	+0.8
摂餌量 3) （%）	NP	NP	NP	NP	NP	NP
摂水量	NP	NP	NP	NP	NP	NP
一般状態						
脱毛（全身）	5	4	3	8	5	2
乳頭からの白色の分泌液	0	0	0	3	0	0
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-

1) 1 例は、膵島の単細胞壊死、血液生化学的変化（電解質失調、尿素、クレアチニン、総コレステロール及びトリグリセリドの重度の増加）、腎臓の尿細管の空胞化及び糸球体症並びに小腸のびらん／潰瘍を伴う重度の高血糖による一般状態悪化（低体温、活動性低下、横臥位）のため、早期屠殺に至った（D47）。他の 1 例は、心臓の変化（間質の線維化及び左室の限局性萎縮を伴う心室及び中隔の筋線維肥大及び空胞化）により死亡した（D83）。

2) 投与終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

3) サルは群飼いとし、摂餌量のみを目視検査した。

*p<0.05（Dunnett 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day、NP＝測定せず

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
心電図検査 [1]						
心拍数 （bpm）						
投与前	186	202	203	209**	205	178
投与後 3～4 時間	160	190*	185*	191**	174	166
PQ 間隔 （msec）						
投与前	82	76	86	69*	80	83
投与後 3～4 時間	88	76	87	73*	84	85
血圧 [1]						
SBP （mm Hg）						
投与前	102	106	96	89	94	93
投与後 3～4 時間	102	100	91	77**	102	86
DBP （mm Hg）						
投与前	58	63	55	52	56	48
投与後 3～4 時間	63	61	54	42**	62	55
体温	-	-	-	-	-	-
血液学的検査 [2]						
赤血球数 （10^{12}/L）	6.09	5.57	5.37	5.11**	5.23*	6.46
ヘモグロビン （g/dL）	11.7	11.2	10.1*	10.0**	10.0**	12.9
PCV （L/L）	0.41	0.40	0.37*	0.37**	0.37*	0.45
網赤血球 （%）	0.96	1.02	2.27	1.71	1.61	1.01

[1] 投与終了時。

[2] 投与終了時。血液学的検査は試験中に数回実施した。早期の時点の所見は同様であった。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、DBP＝拡張期血圧、PCV＝血中血球容積、SBP＝収縮期血圧

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：		0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
動物数：		雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例	雌 9 例	雌 5 例	雌 5 例
血液生化学的検査 [1]							
カルシウム	（mmol/L）	2.43	2.12**	2.08**	2.09**	2.19**	2.41
クロール	（mmol/L）	106.9	110.9*	114.2**	110.8*	108.5	110.6*
無機リン	（mmol/L）	1.42	0.94*	0.85**	1.13	1.13	1.41
尿素	（mmol/L）	6.2	6.0	5.1	4.8*	6.2	3.9**
総蛋白	（g/L）	84	72**	73**	75**	76**	79
アルブミン	（g/L）	42	35**	34**	34**	34**	44
A/G 比		1.02	0.93	0.89	0.84**	0.81**	1.27**
グルコース	（mmol/L）	3.30	3.19	2.75	3.63 [2]	3.50	3.01
総コレステロール	（mmol/L）	2.5	2.6	2.5	2.7	3.4** [3]	1.6** [3]
トリグリセリド	（mmol/L）	0.59	0.76	0.75	0.82	1.35**	0.42
ALP	（IU/L）	652	221**	182**	207**	284**	540
ALT	（IU/L）	49	106	123*	140**	283**	41
乳酸脱水素酵素	（IU/L）	463	384	513	773*	547	503
γ-GTP	（IU/L）	59	38**	43**	49	58	65
アミラーゼ	（IU/L）	372	277	293	250*	336	256
尿検査							
尿量	（mL）	90	170	298**	391**	356**	307**

[1] 投与終了時。血液生化学的検査は試験中に数回実施した。早期の時点の所見は同様であった。

[2] この群の 3 例（早期死亡例を含む）では、投与期間中に複数回グルコース値の上昇が認められた。

[3] LDL コレステロール及び HDL コレステロールは、いずれも対照と比較してこの方向に変化する傾向を示した。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

略語： A/G 比＝アルブミン/グロブリン比、ALP＝アルカリホスファターゼ、ALT＝アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-GTP＝γ-グルタミルトランスフェラーゼ

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：		0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：		**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
器官重量 [1]	（%）						
評価動物数		5	5	5	4	5	5
副腎	- 絶対重量	0.68680 g	-8	+16	+21	+16	+3
	- 相対重量	0.01915 %	-19	+0	+11	+17	-17
心臓	- 絶対重量	13.74 g	+4	+16	+24	+12	+24
	- 相対重量	0.38243 %	-8	+0	+12	+13	+0
肝臓	- 絶対重量	76.83 g	+18	+32**	+24	+25*	+4
	- 相対重量	2.14 %	+5	+14	+14	+27**	-18*
卵巣	- 絶対重量	0.63920 g	-38	-50*	-25	-33	-26
	- 相対重量	0.01772 %	-45*	-57**	-31	-31	-41
卵管	- 絶対重量	0.77380 g	-36	-31	-50	+42	-39
	- 相対重量	0.02145 %	-43	-40	-54	+45	-53
胸腺	- 絶対重量	2.09 g	-69*	-59	-79**	-68*	-23
	- 相対重量	0.05804 %	-73*	-65	-81**	-68	-39
子宮	- 絶対重量	9.48 g	+30	+117	+156*	+8	+3
	- 相対重量	0.26371 %	+15	+86	+133*	+9	-23
剖検所見							
評価動物数		5	5	5	4	5	5
卵管							
嚢胞（半透明）		0	1	0	0	2	0
腫大		0	0	0	0	1	0

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定又は Dunn 検定）

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
剖検所見（続き）						
評価動物数	5	5	5	4	5	5
下垂体						
腫大	0	0	2	1	1	0
皮膚						
脱毛	0	4	4	4	5	1
胸腺						
退縮	0	4	5	4	5	1
子宮						
腫大	0	0	3	3	0	1
膣						
壁の菲薄化	0	1	4	4	0	1
病理組織学的検査						
評価動物数	5	5	5	4	5	5
骨髄						
細胞充実性の低下						
• 軽微	0	0	0	1	0	0
GALT						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	0	0	4	1	0	0
• 軽度	0	0	0	2	0	0

略語： GALT＝腸管系リンパ組織

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
心臓						
間質の線維化；心室／中隔						
• 軽微	0	0	1	0	1	0
• 軽度	0	0	0	2	0	0
空胞化；心筋細胞						
• 軽微	1	1	0	0	2	0
• 軽度	0	0	1	2	0	0
肥大；筋線維						
• 軽微	0	0	1	1	1	0
• 軽度	0	0	0	1	0	0
乳腺						
腺房の発達						
• 軽微	5	0	0	0	0	5
• 軽度	0	3	0	0	2	0
• 中等度	0	2	5	3	3	0
• 顕著	0	0	0	1	0	0
導管腺房の拡張						
• 軽微	0	0	3	2	1	0

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.0225**	**10 / 0.075**	**30 / 0.225 (20 / 0.150)**	**30 / 0 (20 / 0)**	**0 / 0.225 (0 / 0.150)**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
乳腺（続き）						
浸潤物；単核細胞						
• 軽微	0	0	1	2	1	0
• 軽度	0	0	1	1	0	0
不同血球症／核の大小不同						
• 軽微	0	0	1	1	2	0
• 軽度	0	0	0	0	1	0
• 中等度	0	0	0	0	1	0
分泌						
• 軽微	0	0	2	0	0	0
• 軽度	0	0	0	1	0	0
過形成；導管上皮						
• 軽微	0	0	0	0	1	0
下顎リンパ節						
リンパ組織の萎縮						
• 軽度	0	0	0	1	1	1
胚中心の発達						
• 軽微	0	0	0	0	1	1
• 軽度	0	1	0	1	1	1
• 中等度	3	4	5	3	2	1
• 顕著	2	0	0	0	1	2

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	**0 / 0（対照）**	**3 / 0.0225**	**10 / 0.075**	**30 / 0.225 (20 / 0.150)**	**30 / 0 (20 / 0)**	**0 / 0.225 (0 / 0.150)**
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
腸間膜リンパ節						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	0	0	1	1	0	0
• 軽度	0	0	0	1	0	0
胚中心の欠如	0	0	1	3	1	0
胚中心の発達						
• 軽微	2	4	2	1	4	3
• 軽度	3	1	2	0	0	2
卵巣						
黄体の欠如	5	5	5	4	4	5
嚢胞；網管	0	0	1	1	1	0
卵管						
萎縮；上皮						
• 軽微	0	1	0	1	0	0
• 軽度	0	2	4	3	0	4
• 中等度	0	0	0	0	0	1
嚢胞	0	0	0	0	2	0

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
下垂体						
好酸性細胞増加						
• 軽微	0	1	0	0	0	0
• 軽度	0	2	0	0	0	0
• 中等度	0	2	3	1	2	0
• 顕著	0	0	2	3	3	0
皮膚						
毛包の萎縮						
• 軽微	0	1	1	1	1	0
• 軽度	0	2	1	0	0	0
• 中等度	0	0	1	1	1	0
• 顕著	0	0	0	0	1	0
毛包の空洞						
• 軽微	1	0	1	2	0	1
• 軽度	0	4	1	1	1	0
• 中等度	0	0	2	1	2	0
• 顕著	0	0	0	0	2	0
脾臓						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	0	2	1	0	1	0
• 軽度	0	0	0	0	1	0

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
脾臓（続き）						
胚中心の欠如	0	2	2	1	2	0
胚中心の発達						
• 軽微	2	2	3	1	3	0
• 軽度	2	1	0	1	0	4
• 中等度	1	0	0	1	0	1
胸腺						
リンパ組織の萎縮						
• 軽度	2	0	0	0	0	0
• 中等度	3	0	0	0	0	3
• 顕著	0	2	2	3	1	2
• 重度	0	3	3	1	4	0
子宮						
硝子化；子宮内膜間質（体部）						
• 軽微	0	0	0	0	2	0
• 軽度	0	0	0	0	1	0
脱落膜化；子宮内膜（体部）						
• 中等度	0	0	0	1	0	0
• 顕著	0	1	1	1	0	0

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
子宮（続き）						
萎縮；子宮内膜（体部）						
• 軽微	0	2	0	3	0	2
• 軽度	0	1	2	1	1	2
• 中等度	0	2	1	0	2	1
• 顕著	0	0	1	0	2	0
顕著ならせん動脈（体部）						
• 軽微	1	2	2	0	1	2
• 軽度	0	0	1	2	0	0
• 中等度	0	1	0	0	0	0
• 顕著	0	0	0	0	0	1
子宮筋層の肥大（体部）						
• 軽微	0	0	0	0	1	0
• 軽度	0	2	0	0	3	0
• 中等度	0	3	2	3	1	1
• 顕著	0	0	3	1	0	0

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
子宮（続き）						
粘液（頸部）						
• 軽微	0	0	0	0	1	1
• 軽度	0	0	0	0	0	1
• 中等度	0	4	1	0	0	3
• 顕著	0	1	3	4	0	0
• 重度	0	0	1	0	0	0
萎縮；上皮（頸部）						
• 軽微	0	0	0	0	0	1
• 軽度	0	0	0	0	0	3
• 中等度	0	0	0	0	0	1
肥厚；上皮（頸部）						
• 軽微	0	0	0	0	4	0
扁平上皮化生（頸部）						
• 軽微	0	0	0	0	2	0

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
病理組織学的検査（続き）						
膣						
萎縮；上皮						
• 軽微	0	0	0	0	1	0
• 軽度	0	3	0	0	0	3
• 中等度	0	2	4	4	0	2
• 顕著	0	0	1	0	0	0
角化なし	0	5	5	4	0	4
炎症						
• 軽微	3	0	0	0	0	1
• 軽度	0	1	3	2	0	4
• 中等度	0	4	2	2	0	0
その他の試験						
性周期						
性周期がある雌動物数	9	1	0	0	1	0
発生頻度	定期的	第 1 週			第 1 週	
組織形態計測						
子宮内膜厚 [1)] （μm）	3309 ± 1106	2272 ± 604	2152 ± 876	2778 ± 674	1813 ± 401	2560 ± 1151
対照からの変化率（%）	NA	-31	-35	-16	-45	-23

1) 平均±標準偏差。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
動物数：	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**	**雌 9 例**	**雌 5 例**	**雌 5 例**
回復性の評価						
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 3 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**
特記すべき所見						
死亡及び屠殺動物数	0	NA	NA	0	NA	NA
体重 [1)] （%）	3.9 kg	NA	NA	-3	NA	NA
体重増加量 D91～D119 （kg）	+0.0	NA	NA	+0.0	NA	NA
一般状態						
脱毛（全身）	1	NA	NA	3	NA	NA
心電図検査						
心拍数 （bpm）	158	NA	NA	173	NA	NA
PQ 間隔 （msec）	79	NA	NA	71	NA	NA
血圧	-	NA	NA	-	NA	NA
体温	-	NA	NA	-	NA	NA
血液学的検査	-	NA	NA	-	NA	NA
血液生化学的検査	-	NA	NA	-	NA	NA
尿検査	-	NA	NA	-	NA	NA

1) 休薬期間の終了時。対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day、NA＝該当せず

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 3 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**
器官重量 [1] **（%）**						
心臓 - 絶対重量	13.99 g	NA	NA	+16 [2]	NA	NA
- 相対重量	0.37107 %	NA	NA	+17 [2]	NA	NA
卵管 - 絶対重量	0.63450 g	NA	NA	+135 [2]	NA	NA
- 相対重量	0.01788 %	NA	NA	+126 [2]	NA	NA
子宮 - 絶対重量	8.75 g	NA	NA	+11 [2]	NA	NA
- 相対重量	0.22861 %	NA	NA	+13 [2]	NA	NA
剖検所見						
評価動物数	4	NA	NA	3	NA	NA
心臓						
不規則な色調	0	NA	NA	1	NA	NA
卵管						
腫大	0	NA	NA	2	NA	NA
皮膚						
脱毛	0	NA	NA	2	NA	NA
病理組織学的検査						
評価動物数	4	NA	NA	3	NA	NA
心臓						
間質の線維化；心室／中隔						
• 軽度	0	NA	NA	1	NA	NA

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 全ての増加は 1 例によるものであった。

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 （20 / 0.150）	30 / 0 （20 / 0）	0 / 0.225 （0 / 0.150）
休薬群の動物数：	雌 4 例	雌 0 例	雌 0 例	雌 3 例	雌 0 例	雌 0 例
病理組織学的検査（続き）						
心臓（続き）						
空胞化；心筋細胞						
• 軽微	0	NA	NA	1	NA	NA
• 軽度	0	NA	NA	1	NA	NA
肥大；筋線維						
• 軽微	0	NA	NA	1	NA	NA
• 軽度	0	NA	NA	1	NA	NA
卵巣						
黄体の欠如	0	NA	NA	3	NA	NA
卵胞嚢胞	0	NA	NA	2	NA	NA
卵管						
肥大／過形成；上皮						
• 軽微	0	NA	NA	1	NA	NA
下垂体						
好酸性細胞増加						
• 軽度	0	NA	NA	3	NA	NA
皮膚						
空の毛包						
• 軽微	3	NA	NA	0	NA	NA
• 軽度	0	NA	NA	2	NA	NA

略語：NA＝該当せず

2.6.7.7.C.1 サル 13 週間反復投与毒性試験 （続き）

被験物質：エステトロール、レボノルゲストレル

エステトロール／レボノルゲストレルの 1 日投与量（mg/kg）：	0 / 0（対照）	3 / 0.0225	10 / 0.075	30 / 0.225 (20 / 0.150)	30 / 0 (20 / 0)	0 / 0.225 (0 / 0.150)
休薬群の動物数：	**雌 4 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**	**雌 3 例**	**雌 0 例**	**雌 0 例**
病理組織学的検査（続き）						
脾臓						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	0	NA	NA	1	NA	NA
胚中心の欠如	0	NA	NA	1	NA	NA
胸腺						
リンパ組織の萎縮						
• 軽微	1	NA	NA	0	NA	NA
• 軽度	2	NA	NA	0	NA	NA
• 中等度	1	NA	NA	2	NA	NA
• 顕著	0	NA	NA	1	NA	NA
子宮						
卵胞期	1	NA	NA	3	NA	NA
子宮内膜萎縮（体部）						
• 軽微	0	NA	NA	1	NA	NA
粘液（頸部）						
• 軽微	0	NA	NA	3	NA	NA
その他の試験						
性周期						
性周期がある雌動物数	3	NA	NA	3	NA	NA
組織形態計測						
子宮内膜厚 [1)] （μm）	2769 ± 599	NA	NA	2851 ± 617	NA	NA
対照からの変化率（%）	NA	NA	NA	+3	NA	NA

[1] 平均±標準偏差

略語：NA＝該当せず

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.A エームス試験 1

報告書の題名：Estetrol: Bacterial reverse mutation test		**被験物質：エステトロール**
試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験	**独立して実施した試験数：**2	**試験番号：**ES-T21
菌株： ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA98、TA100、TA102	**プレート数：**3 枚/用量	**CTD における記載箇所：**4.2.3.3.1-01
代謝活性化系： Aroclor 1254 誘導ラット肝 S9 ミックス	**分析細胞数／培養：** プレート当たりの復帰変異コロニー数をカウント	**GLP 適用：**適
溶媒（被験物質）： ジメチルスルホキシド（DMSO） [1)]	**溶媒（陽性対照）：**DMSO［NaN_3、9AA、2NF、2AM、B(a)P］又は蒸留水（MMC）	**処理年月日：** 実験 1： 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日 実験 2： 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日（全菌株） 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日（TA100） [2)]
処理： 実験 1： －/＋S9 ミックス：直接プレート法、37°C で 48～72 時間培養 実験 2： －S9 ミックス： 直接プレート法、37°C で 48～72 時間培養 ＋S9 ミックス： プレインキュベーション（60 分、37°C）後、プレートに載せ 37°C で 48～72 時間培養		
細胞毒性： TA100 では 2500 µg/プレート以上で細胞毒性；TA1535、TA1537、TA98 及び TA102 では 5000 µg/プレートで中等度から強度の沈殿		
遺伝毒性： TA102 では、代謝活性化系の有無に関わらず、2500 及び 5000 µg/プレートで復帰変異コロニー数が増加し、溶媒対照の 2 倍を超えた。		

[1)] DMSO 中のエステトロールの安定性は、50 及び 300 mg/mL の濃度で、室温遮光下 48 時間保管することにより評価・確認した［試験番号 ES-T26（モジュール 4.2.3.3.1）］。

[2)] 陽性対照の反応が得られなかったため、TA100 の実験 2 を再度実施した。

略語： 9AA＝9-アミノアクリジン、2AM＝2-アントラミン、BaP＝ベンゾ（a）ピレン、DMSO＝ジメチルスルホキシド、MMC＝マイトマイシン C、2NF＝2-ニトロフルオレン、NaN3＝アジ化ナトリウム

2.6.7.8.A エームス試験１ （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/プレート)	実験 1：復帰変異コロニー数（平均±標準偏差）				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
代謝活性化なし	DMSO	0（50 μL/プレート）	15 ± 4	9 ± 2	23 ± 4	118 ± 9	342 ± 5
	エステトロール	78.13	18 ± 6	NT	NT	102 ± 11	NT
		156.3	16 ± 2	11 ± 3	23 ± 6	111± 4	358 ± 13
		312.5	20 ± 5	9 ± 3	18 ± 6	120 ± 11	368 ± 37
		625	15 ± 1	13 ± 9	22 ± 5	115 ± 2	438 ± 25
		1250	16 ± 3	8 ± 2	23 ± 6	123 ± 10	619 ± 44
		2500	8 ± 3	13 ± 5	34 ± 7	24 ± 14 MT)	1116 ± 70
		5000	NT	NA SP)	NA SP)	NT	1130 ± 83 SP)
	NaN_3	1	638			778	
	9AA	50		137			
	2NF	0.5			135		
	MMC	0.5					1638
代謝活性化あり	DMSO	0（50 μL/プレート）	16 ± 3	12 ± 5	29 ± 7	109 ± 19	484 ± 10
	エステトロール	78.13	14 ± 3	NT	NT	96 ± 6	NT
		156.3	14 ± 4	7 ± 4	30 ± 2	117 ± 24	563 ± 29
		312.5	14 ± 7	11 ± 1	34 ± 6	118 ± 18	480 ± 32
		625	16 ± 4	12 ± 4	44 ± 2	100 ± 4	463 ± 66
		1250	17 ± 6	11 ± 4	40 ± 1	116 ± 12	787 ± 43
		2500	9 ± 4	14 ± 7	52 ± 5	23 ± 13 MT)	1211 ± 120
		5000	NT	NA SP)	25 ± 4 SP)	NT	884 ± 219 SP)
	2AM	2	243	95	840		
	2AM	10					2503
	B(a)P	5				678	

略語：9AA＝9-アミノアクリジン、2AM＝2-アントラミン、BaP＝ベンゾ（a）ピレン、DMSO＝ジメチルスルホキシド、MMC＝マイトマイシン C、MT＝中等度の毒性、NA＝該当せず、2NF＝2-ニトロフルオレン、NaN_3＝アジ化ナトリウム、NT＝検査せず、SP＝強度の沈殿

2.6.7.8.A エームス試験１ （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度（μg/プレート）	実験 2：復帰変異コロニー数（平均±標準偏差）				
			TA1535	**TA1537**	**TA98**	**TA100**	**TA102**
代謝活性化なし	DMSO	0（50 μL/プレート）	15 ± 7	7 ± 2	29 ± 3	106 ± 6	338 ± 15
	エステトロール	78.13	NT	NT	NT	108 ± 3	NT
		156.3	15 ± 7	11 ± 1	22 ± 9	98 ± 16	289 ± 29
		312.5	17 ± 3	9 ± 3	25 ± 6	91 ± 15	415 ± 26
		625	19 ± 6	12 ± 1	21 ± 6	116 ± 16	429 ± 61
		1250	12 ± 2	13 ± 4	30 ± 4	118 ± 17	512 ± 35
		2500	9 ± 3	11 ± 3	36 ± 11	54 ± 16 MT)	796 ± 155
		5000	NA SP)	NA SP)	NA SP)	NT	975 ± 80 MP)
	NaN_3	1	711			721	
	9AA	50		257			
	2NF	0.5			113		
	MMC	0.5					1491
代謝活性化あり	DMSO	0（50 μL/プレート）	13 ± 5	7 ± 1	37 ± 1	126 ± 2	481 ± 59
	エステトロール	78.13	NT	NT	NT	146 ± 17	NT
		156.3	19 ± 1	11 ± 1	45 ± 4	122 ± 2	479 ± 84
		312.5	15 ± 3	6 ± 2	44 ± 9	108 ± 14	582 ± 103
		625	11 ± 5	10 ± 4	43 ± 8	121 ± 19	481 ± 39
		1250	11 ± 3	8 ± 2	60 ± 6	130 ± 4	755 ± 123
		2500	7 ± 3	16 ± 3	55 ± 2	7 ± 4 MT)	826 ± 142
		5000	NA SP)	NA SP)	NA SP)	NT	1088 ± 90 MP)
	2AM	2	138	172	1475		
	2AM	10					2120
	B(a)P	5				295	

略語：9AA＝9-アミノアクリジン、2AM＝2-アントラミン、２NF＝2-ニトロフルオレン、BaP＝ベンゾ（a）ピレン、DMSO＝ジメチルスルホキシド、MMC＝マイトマイシン C、MP＝中等度の沈殿、MT＝中等度の毒性、NA＝該当せず、NaN_3＝アジ化ナトリウム、NT＝検査せず、SP＝強度の沈殿

2.6.7.8.B エームス試験 2

報告書の題名：Estetrol: Bacterial reverse mutation test		**被験物質：エステトロール**
試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験	**独立して実施した試験数：**2	**試験番号：**ES-T29
菌株： ネズミチフス菌 TA102	**プレート数：**3 枚/用量	**CTD における記載箇所：**4.2.3.3.1-02
代謝活性化系： Aroclor 1254 誘導ラット肝 S9 ミックス	**分析細胞数／培養：** プレート当たりの復帰変異コロニー数をカウント	**GLP 適用：**非適
溶媒（被験物質）：EtOH [1)]	**溶媒（陽性対照）：**DMSO（2AM）又は蒸留水（MMC）	**処理年月日：** 培養終了：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日 コロニーカウント終了：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日
処理： 実験 1： －/＋S9 ミックス：直接プレート法、37°C で 48～72 時間培養 実験 2： －S9 ミックス： 直接プレート法、37°C で 48～72 時間培養 ＋S9 ミックス： プレインキュベーション（60 分、37°C）後、プレートに載せ 37°C で 48～72 時間培養		
細胞毒性： なし		
遺伝毒性： TA102 では、代謝活性化系の有無に関わらず、2500 及び 5000 µg/プレートで復帰変異コロニー数が増加し、溶媒対照の 2 倍を超えた。		

1) 本試験の目的は、DMSO を溶媒として用いた 5000 µg/プレートで認められた沈殿による干渉を除外することであった（2.6.7.8.A 参照）。

略語：2AM＝2-アントラミン、DMSO＝ジメチルスルホキシド、EtOH＝エタノール、MMC＝マイトマイシン C

2.6.7.8.B エームス試験２ （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/プレート)	実験 1：復帰変異コロニー数 (平均±標準偏差)	実験 2：復帰変異コロニー数 (平均±標準偏差)
			TA102	**TA102**
代謝活性化なし	EtOH	0（25 μL/プレート）	410 ± 42	321 ± 81
	エステトロール	312.5	405 ± 22	373 ± 42
		625	507 ± 29	397 ± 31
		1250	739 ± 10	538 ± 99
		2500	1134 ± 25	930 ± 84
		5000	1304 ± 85	1300 ± 204
	MMC	0.5	3093	2274
代謝活性化あり	EtOH	0（25 μL/プレート）	531 ± 126	516 ± 48
	エステトロール	312.5	510 ± 92	477 ± 30
		625	557 ± 6	478 ± 120
		1250	724 ± 102	516 ± 73
		2500	1191 ± 26	1005 ± 119
		5000	1183 ± 71	1063 ± 34
	2AM	10	3409	1510

略語：2AM＝2-アントラミン、DMSO＝ジメチルスルホキシド、EtOH＝エタノール、MMC＝マイトマイシン C

2.6.7.8.C エームス試験 3

報告書の題名： Evaluation of the mutagenic activity of Estetrol in the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay with the tester strain TA102 and in the *Escherichia coli* reverse mutation assay with the tester strain WP2*uvrA* (with independent repeat)		**被験物質：エステトロール**
試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験	**独立して実施した試験数：**2	**試験番号：**ES-T48
菌株： ネズミチフス菌 TA102 及び大腸菌 WP2*uvrA*	**プレート数：**3 枚/用量	**CTD における記載箇所：**4.2.3.3.1-03
代謝活性化系： フェノバルビタール／ß-ナフトフラボン誘導ラット肝 S9 ミックス	**分析細胞数／培養：**10^8	**GLP 適用：**適
溶媒（被験物質）：EtOH	**溶媒（陽性対照）：**DMSO	**処理年月日：** 実験 1：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日 実験 2：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日
処理： 実験 1： －/＋S9 ミックス：直接プレート法、37°C で 48±4 時間培養 実験 2： －/＋S9 ミックス：プレインキュベーション（30 分、37°C）後、プレートに載せ 37°C で 48±4 時間時間培養		
細胞毒性：なし		
遺伝毒性：なし		
追加情報： ES-T48 試験に先立って、同施設において非 GLP 試験（ES-T47）を実施したところ、代謝活性化系の有無に関わらず、エステトロールは TA102 において 5000 µg/プレートまで陰性であった。しかし、TA102 の陽性対照による復帰変異コロニー数の増加は陰性対照の 1.7 倍に過ぎず、3 倍の増加という基準を満たさなかった。陽性対照の値が過去のデータの範囲内であったため、試験責任者は試験を許容することを決定したが、陽性対照によって適切な反応が得られなかったため、本試験は無効と考えられ、表は示さない。		

略語：DMSO＝ジメチルスルホキシド、EtOH＝エタノール

2.6.7.8.C エームス試験 3 （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度（μg/プレート）	実験 1：復帰変異コロニー数（平均±標準偏差）	
			TA102 [1)]	**WP2*uvrA***
代謝活性化なし	EtOH	0（100 μL/プレート）	165 ± 20	21 ± 5
	エステトロール	100	163 ± 17	25 ± 1
		333	149 ± 8	NT
		1000	159 ± 21	21 ± 3
		3330	178 ± 9	22 ± 4
		5000	233 ± 26 [TP)]	26 ± 5 [TP)]
	CuOOH	0.1	401	
	4NQ	10		1091
代謝活性化あり	EtOH	0（100 μL/プレート）	156 ± 9	28 ± 6
	エステトロール	100	118 ± 10	NT
		333	114 ± 5	22 ± 2
		1000	149 ± 6	25 ± 2
		3330	133 ± 7	26 ± 3
		5000	206 ± 7 [TP)]	27 ± 5 [TP)]
	1,8DHA	30	289	
	2AM	10		371

[1)] 陽性対照は、代謝活性化系の非存在下及び存在下のいずれにおいても、復帰変異コロニー数が溶媒対照と比較して 3 倍の増加という基準を満たさなかった。代謝活性化系の存在下では、陽性対照における復帰変異コロニー数はヒストリカルコントロールデータの範囲を下回っていた。したがって、TA102 を用いた実験 1 は無効と判断した。

略語：2AM＝2-アントラミン、CuOOH＝クメンヒドロペルオキシド、1,8DHA＝1,8-ジヒドロキシアントラキノン、EtOH＝エタノール、4NQ＝4-ニトロキノリン、
TP＝一過性の沈殿（培養開始時）

2.6.7.8.C エームス試験 3 （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度（μg/プレート）	実験 2：復帰変異コロニー数（平均±標準偏差）	
			TA102	WP2*uvrA*
代謝活性化なし	EtOH	0（100 μL/プレート）	157 ± 5	19 ± 3
	エステトロール	100	157 ± 15	19 ± 5
		333	146 ± 3	19 ± 3
		1000	108 ± 7	17 ± 3
		3330	176 ± 29 TP)	20 ± 3 TP)
		5000	203 ± 19 TP)	20 ± 4 TP)
	CuOOH	0.1	716	
	4NQ	10		140
代謝活性化あり	EtOH	0（100 μL/プレート）	187 / 187	16 ± 4
	エステトロール	100	204 ± 13	21 ± 2
		333	204 ± 5	18 ± 4
		1000	195 ± 3	17 ± 1
		3330	253 ± 19 TP)	16 ± 4 TP)
		5000	269 ± 24 TP)	19 ± 5 TP)
	1,8DHA	30	799	
	2AM	10		265

略語：2AM＝2-アントラミン、CuOOH＝クメンヒドロペルオキシド、1,8DHA＝1,8-ジヒドロキシアントラキノン、EtOH＝エタノール、4NQ＝4-ニトロキノリン、
TP＝一過性の沈殿（培養開始時）

2.6.7.8.D マウスリンフォーマ試験 1

報告書の題名： Estetrol: *In vitro* mammalian cell gene mutation test in L5178Y *TK*$^{+/-}$ mouse lymphoma cells		**被験物質：エステトロール**
試験の種類：マウスリンフォーマ *tk* 試験	**独立して実施した試験数：**2	**試験番号：**ES-T22
菌株：L5178Y *TK*$^{+/-}$マウスリンパ腫細胞	**プレート数：**1 枚/用量	**CTD における記載箇所：**4.2.3.3.1-04
代謝活性化系： Aroclor 1254 誘導ラット肝 S9 ミックス	**培養細胞数：** 3 時間処理：5×10^5 細胞/mL、24 時間処理：2×10^5 細胞/mL **分析細胞数：** 生存率：1.6 個／ウェル（96 ウェルプレート 2 枚/培養） 変異体の選択：2000 個／ウェル（96 ウェルプレート 2 枚／培養）	**GLP 適用：**適
溶媒（被験物質）： DMSO[1)]	**溶媒（陽性対照）：**注射用水	**処理年月日：** 実験 1：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日 実験 2：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
処理： 実験 1：－/＋S9 ミックス：37°C、5% CO_2 で 3 時間培養 実験 2：－S9 ミックス：37°C、5% CO_2 で 24 時間培養 ＋S9 ミックス：37°C、5% CO_2 で 3 時間培養 発現期間：いずれの試験においても 37°C、5% CO_2 で 48 時間		
細胞毒性： －S9 ミックス、3 時間：750 µg/mL 以上の用量で軽度から重度の毒性 －S9 ミックス、24 時間：62.5 µg/mL 以上の用量で中等度から重度の毒性 ＋S9 ミックス、3 時間：750 µg/mL 以上の用量で軽度から重度の毒性		
遺伝毒性： －S9 ミックス、3 時間及び 24 時間：陰性 ＋S9 ミックス、3 時間：不確定；結果は陽性反応の基準を満たさなかった[2)]が、明確に陰性でもなかった。		

1) DMSO 中のエステトロールの安定性は、50 及び 300 mg/mL の濃度で、室温遮光下 48 時間保管することによって評価・確認した［ES-T26 試験（モジュール 4.2.3.3.1-06）］。

2) 遺伝毒性試験に関する国際ワークショップの勧告では、以下の基準を満たす場合、陽性と判定される：

- 少なくとも 1 つの用量で IMF が GEF（126×10^{-6}）以上であり、かつ、統計学的に有意な用量に関連した傾向が認められる

過剰な毒性（Adjust. RTG が 10%未満）が認められる処理濃度で MF の顕著な上昇が認められるが、Adjust. RTG として 10%から 20%の間で変異原性のエビデンスが認められない場合、陽性とはみなされない。

Adjust. RTG が 10%から 20%の間にあたる細胞培養がないときは、以下の場合に被験物質を陰性とみなすことができる：

- Adjust. RTG として 20%から 25%の間の少なくとも 1 点が陰性であり、Adjust. RTG として 20%から 100%の間で陽性反応のエビデンスが認められない、又は
- Adjust. RTG として 25%から 100%の間で陽性反応のエビデンスが認められず、Adjust. RTG として 1%から 10%の間に陰性の点がある

略語：Adjust. RTG＝補正した相対総増殖率、DMSO＝ジメチルスルホキシド、GEF＝総合的評価ファクター、IMF＝誘発突然変異頻度（MF 処理－MF 対照）、MF＝突然変異頻度

2.6.7.8.D マウスリンフォーマ試験 1 （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/mL)	実験 1（2 回の平均値）				
			Adjust. RTG (%)	MF×10^{-6}			IMF×10^{-6}
				合計	LC	SC	
代謝活性化なし	DMSO	0（0.5%）	100	78	50	26	NA
	エステトロール	31.3	101	101	59	40	24
		62.5	89	123	79	40	45
		125	93	100	52	46	22
		250	101	115	66	44	37
		500 P)	79	88	55	31	10
		750 P)	69	109	58	50	31
		1000 P)	15	282	120	142	204
	MMS	25	37	690	267	337	612
代謝活性化あり	DMSO	0（0.5%）	100	93	56	33	NA
	エステトロール	31.3	86	123	69	50	30
		62.5	103	129	59	65	36
		125	83	187	90	90	94
		250	93	169	77	83	76
		500 P)	82	166	80	77	73
		750 P)	45	202	83	109	110
		1000 P)	9	1054	277	580	961
	CP	3	68	491	181	254	399
追加情報：	代謝活性化なし：用量相関性に関する Kendall 順位相関検定は p＝0.1376。 代謝活性化あり：用量相関性に関する Kendall 順位相関検定（31.3～750 μg/mL の用量）は p＝0.0243。						

略語： Adjust. RTG＝補正した相対総増殖率、CP＝シクロホスファミド、DMSO＝ジメチルスルホキシド、LC＝大型コロニー、
IMF＝誘発突然変異頻度（MF 処理－MF 対照）、MF＝突然変異頻度、MMS＝メチルメタンスルフォネート、NA＝該当せず、P＝沈殿、SC＝小型コロニー

2.6.7.8.D マウスリンフォーマ試験 1 （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/mL)	実験 2（2 回の平均値）				
			Adjust. RTG (%)	MF×10^{-6}			IMF×10^{-6}
				合計	LC	SC	
代謝活性化なし	DMSO	0（0.5%）	100	56	41	14	NA
	エステトロール	15.6	95	74	52	22	18
		31.3	79	66	36	29	10
		62.5	51	74	43	29	18
		125	47	82	49	32	26
		187.5	21	96	45	48	40
		250	7	107	47	55	50
		375	4	131	76	52	74
	MMS	5	42	379	192	155	323
代謝活性化あり	DMSO	0（0.5%）	100	143	67	69	NA
	エステトロール	62.5	99	137	70	61	-
		125	87	219	107	96	76
		250	94	178	92	76	35
		500 P)	106	128	76	47	-
		750 P)	64	207	98	91	63
		875 P)	24	331	132	163	188
		1000 P)	7	585	180	343	442
	CP	3	46	1701	422	842	1558
追加情報：	代謝活性化なし：用量相関性に関する Kendall 順位相関検定は実施せず。 代謝活性化あり：用量相関性に関する Kendall 順位相関検定（62.5～875 μg/mL の用量）は p＝0.2931。						

略語： Adjust. RTG＝補正した相対総増殖率、CP＝シクロホスファミド、DMSO＝ジメチルスルホキシド、LC＝大型コロニー、
IMF＝誘発突然変異頻度（MF 処理－MF 対照）、MF＝突然変異頻度、MMS＝メチルメタンスルフォネート、NA＝該当せず、P＝沈殿、SC＝小型コロニー

2.6.7.8.E マウスリンフォーマ試験 2

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: In vitro mammalian cell gene mutation test in L5178Y TK^{+/-} mouse lymphoma cells</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>試験の種類：マウスリンフォーマ tk 試験</td><td>独立して実施した試験数：2</td><td>試験番号：ES-T45</td></tr>
<tr><td>菌株：L5178Y TK^{+/-}マウスリンパ腫細胞</td><td>プレート数：1 枚/用量</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-05</td></tr>
<tr><td>代謝活性化系： Aroclor 1254 誘導ラット肝 S9 ミックス</td><td>培養細胞数：
3 時間処理：5×10⁵ 細胞/mL、24 時間処理：2×10⁵ 細胞/mL
分析細胞数：
生存率：1.6 個／ウェル（96 ウェルプレート 2 枚/培養）
変異体の選択：2000 個／ウェル（96 ウェルプレート 2 枚／培養）</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td>溶媒（被験物質）： DMSO [1)]</td><td>溶媒（陽性対照）：注射用水</td><td>処理年月日：
実験 1： 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
実験 2： 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日</td></tr>
<tr><td colspan="3">処理： 実験 1： －/＋S9 ミックス：37°C、5% CO_2 で 3 時間培養
実験 2： －S9 ミックス：37°C、5% CO_2 で 24 時間培養
＋S9 ミックス：37°C、5% CO_2 で 3 時間培養
発現期間：いずれの試験においても 37°C、5% CO_2 で 48 時間</td></tr>
<tr><td colspan="3">細胞毒性： －S9 ミックス、3 時間：なし； －S9 ミックス、24 時間：0.5 mM 以上の用量で顕著から重度の毒性
＋S9 ミックス、3 時間：なし</td></tr>
<tr><td colspan="3">遺伝毒性： なし [2)]</td></tr>
</table>

1 DMSO 中のエステトロールの安定性は、50 及び 300 mg/mL の濃度で、室温遮光下 48 時間保管することによって評価・確認した［ES-T26 試験（モジュール 4.2.3.3.1-06）］。

2 遺伝毒性試験に関する国際ワークショップの勧告によると、陽性の結果は以下の基準を満たす必要がある：

- 少なくとも 1 つの用量で IMF が GEF（126×10^{-6}）以上である、かつ
- 統計学的に有意な用量に関連した傾向が認められる

過剰な毒性（Adjust. RTG が 10%未満）が認められる処理濃度で MF の顕著な上昇が認められるが、Adjust. RTG として 10%から 20%の間で変異原性のエビデンスが認められない場合、陽性とはみなされない。

Adjust. RTG が 10%から 20%の間にあたる培養物がないときは、以下の場合に被験物質を陰性とみなすことができる：

- Adjust. RTG として 20%から 25%の間の少なくとも 1 点が陰性であり、Adjust. RTG として 20%から 100%の間で陽性反応のエビデンスが認められない、又は
- Adjust. RTG として 25%から 100%の間で陽性反応のエビデンスが認められず、Adjust. RTG として 1%から 10%の間に陰性の点がある

略語：Adjust. RTG＝補正した相対総増殖率、DMSO＝ジメチルスルホキシド、GEF＝総合的評価ファクター、IMF＝誘発突然変異頻度（MF 処理－MF 対照）、MF＝突然変異頻度

2.6.7.8.E マウスリンフォーマ試験２ （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度 (mM)	実験 1（2 回の平均値）				
			Adjust. RTG (%)	MF×10^{-6}			IMF×10^{-6}
				合計	LC	SC	
代謝活性化なし	DMSO	0	100	118	79	37	NA
	エステトロール	0.031	107	126	94	29	8
		0.063	76	141	106	33	23
		0.13	114	98	66	29	-
		0.25	99	152	99	49	34
		0.5	101	173	120	45	55
		1	77	189	132	51	70
	MMS	25	22	1425	774	515	1307
代謝活性化あり	DMSO	0	100	173	97	67	NA
	エステトロール	0.031	136	131	78	47	-
		0.063	106	155	90	57	-
		0.13	101	190	103	77	17
		0.25	126	187	109	65	14
		0.5	86	206	107	83	34
		0.75	82	204	108	85	31
		1	94	202	105	84	30
	CP	3	51	1363	437	693	1190
追加情報：	代謝活性化なし及びあり：用量相関性の係数に関する Kendall 順位相関検定の p 値は、それぞれ 0.495 及び 0.466。						

略語： Adjust. RTG＝補正した相対総増殖率、CP＝シクロホスファミド、DMSO＝ジメチルスルホキシド、LC＝大型コロニー、
IMF＝誘発突然変異頻度（MF 処理－MF 対照）、MF＝突然変異頻度、MMS＝メチルメタンスルフォネート、NA＝該当せず、SC＝小型コロニー

2.6.7.8.E マウスリンフォーマ試験２ （続き）

被験物質：エステトロール

代謝活性化	被験物質	濃度 (mM)	実験 2（2 回の平均値）				
			Adjust. RTG (%)	MF×10^{-6}			IMF×10^{-6}
				合計	LC	SC	
代謝活性化なし	DMSO	0	100	95	50	41	NA
	エステトロール	0.031	119	62	35	26	-
		0.063	91	83	44	36	-
		0.13	115	82	48	32	-
		0.25	76	81	52	26	-
		0.5	38	118	64	49	23
		0.75	13	137	62	69	42
		1	3	162	65	88	67
	MMS	5	67	638	262	244	543
代謝活性化あり	DMSO	0	100	104	57	45	NA
	エステトロール	0.031	100	109	58	47	5
		0.063	107	79	47	31	-
		0.13	110	117	64	47	13
		0.25	106	119	70	45	14
		0.5	94	151	83	63	47
		0.75	99	141	68	71	36
		1	94	132	68	61	27
	CP	3	47	735	225	423	630
追加情報：	代謝活性化なし及びあり：用量相関性の係数に関する Kendall 順位相関検定の p 値は、それぞれ 0.497 及び 0.407。						

略語： Adjust. RTG＝補正した相対総増殖率、CP＝シクロホスファミド、DMSO＝ジメチルスルホキシド、LC＝大型コロニー、
IMF＝誘発突然変異頻度（MF 処理－MF 対照）、MF＝突然変異頻度、MMS＝メチルメタンスルフォネート、NA＝該当せず、SC＝小型コロニー

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.A 小核試験

報告書の題名：Estetrol: Bone marrow micronucleus test by oral route in rats		**被験物質：エステトロール**
試験の種類：ラットを用いる小核試験	**処理計画：**単回投与	**試験番号：**ES-T37
動物種／系統：ラット／Sprague-Dawley	**計測時間：**24 時間及び 48 時間	**CTD における記載箇所：**4.2.3.3.2-01
週齢：約 6 週齢	**投与方法：**経口（強制）	
評価した細胞： 骨髄の PCE 及び NCE	**溶媒／投与形態：** エステトロール：0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、50、100 又は 200 mg/mL シクロホスファミド： 注射用水中に 1.5 mg/mL	**GLP 適用：**適
分析細胞数／動物： MNPCE の有無については 2000 個の PCE PCE/NCE 比については 1000 個の赤血球		**投与年月日：**20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日
特記事項： エステトロール濃度（曝露証明）分析のため、2000 mg/kg を投与したサテライト群の 3 例から、投与後 0.5 時間及び 3 時間に血漿を採取した。		
毒性／細胞毒性： 2000 mg/kg まで死亡又は一般状態変化なし。予備試験では 2000 mg/kg で PCE/NCE 比が軽度に低下したが、主試験では低下は認められなかった		
遺伝毒性：なし		
曝露証明：2000 mg/kg 投与時のエステトロールの血漿中濃度は、投与後 0.5 時間で 39.2～48.6 µg/mL、3 時間で 19.5～65.6 µg/mL であった。		

略語：MNPCE＝小核を有する多染性赤血球、NCE＝正染性赤血球、PCE＝多染性赤血球

2.6.7.9.A 小核試験 （続き）

被験物質：エステトロール

被験物質	投与量（mg/kg）	動物数	屠殺時刻（時間）	MNPCE/1000 個の PCE（平均±標準偏差）	PCE/NCE 比（平均±標準偏差）
溶媒	0	雌 5 例	24	1.2 ± 0.4	0.89 ± 0.28
エステトロール	500	雌 5 例	24	1.5 ± 0.8	0.78 ± 0.08
	1000	雌 5 例	24	1.3 ± 1.0	0.93 ± 0.20
	2000	雌 5 例	24	1.3 ± 1.3	1.02 ± 0.14
シクロホスファミド	15	雌 5 例	24	27.6 ± 8.8*	0.74 ± 0.27
被験物質	**投与量（mg/kg）**	**動物数**	**屠殺時刻（時間）**	**MNPCE/1000 個の PCE（平均±標準偏差）**	**PCE/NCE 比（平均±標準偏差）**
溶媒	0	雌 5 例	48	1.7 ± 0.8	0.98 ± 0.22
エステトロール	2000	雌 5 例	48	1.6 ± 0.9	0.80 ± 0.15

*p<0.05（Dunnett 検定）

略語：MNPCE＝小核を有する多染性赤血球、NCE＝正染性赤血球、PCE＝多染性赤血球

2.6.7.9.B コメット試験 1

報告書の題名： Estetrol: *In vivo* COMET assay in the rat - Study performed on liver and duodenum (two treatments, one sampling time)		**被験物質：エステトロール**
試験の種類：コメットアッセイ（DNA 損傷：一本鎖及び二本鎖切断、アルカリ不安定部位、切除修復部位及び架橋部位）	**処理計画：** 24 時間間隔で 2 回投与 陽性対照：単回投与	**試験番号：**ES-T46
動物種／系統：ラット／Sprague-Dawley	**計測時間：**2 回目の投与後 3～6 時間	**CTD における記載箇所：**4.2.3.3.2-02
週齢：5～10 週齢	**投与方法：**経口（強制）	
評価した細胞：肝細胞及び十二指腸細胞	**溶媒／投与形態：** エステトロール：0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、50、100 又は 200 mg/mL ジメチルヒドラジン： 0.9%（w/v）NaCl 水溶液中に 1 又は 2 mg/mL	**GLP 適用：**適
分析細胞数／動物： テール強度 [1]及びゴースト細胞数に関しては、細胞 150 個／組織／動物 ハロー細胞数に関しては、細胞 200 個／組織／動物		**投与年月日：**20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日
特記事項： エステトロール濃度分析（曝露証明）のため、溶媒又は 2000 mg/kg を投与したサテライト群の動物（各群 3 例）から、2 回目の投与後 0.5 時間及び 3 時間に血漿を採取した。		
毒性／細胞毒性： 2000 mg/kg まで死亡又は一般状態変化なし 肝臓：細胞毒性なし 十二指腸：ハローアッセイでは、壊死細胞の割合の増加なし。1000 及び 2000 mg/kg では、ゴースト細胞の割合が増加		
遺伝毒性： 肝臓：なし 十二指腸：不確定。500 mg/kg では十二指腸におけるテール強度の中央値が増加したが、1000 及び 2000 mg/kg では増加は認められなかった		
曝露証明： 2000 mg/kg 投与時のエステトロールの平均血漿中濃度は、最終投与後 0.5 時間では 39.8 µg/mL、3 時間では 28.5 µg/mL。溶媒投与群では、これらの時点で 1.334 及び 1.338 ng/mL と、微量が検出された		

[1] テール強度：テール中の DNA の割合（%）

略語：DNA＝デオキシリボ核酸、NaCl＝塩化ナトリウム

2.6.7.9.B コメット試験 1 （続き）

被験物質：エステトロール

被験物質	投与量（mg/kg/日）	動物数 [1]	肝臓			
			ハローアッセイ	コメットアッセイ		
			壊死細胞の割合（%、平均）	ゴースト細胞の割合（%、平均）	テール強度中央値 [2]（平均）	テールモーメント中央値 [2]（平均）
溶媒	0	雌 4 例（雌 5 例）	4.3	13.19	1.81	0.15
エステトロール	500	雌 4 例（雌 5 例）	2.9	10.14*	0.73#	0.04
	1000	雌 4 例（雌 5 例）	4.1	13.25	0.61#	0.03
	2000	雌 4 例（雌 5 例）	4.6	7.87***	0.97	0.04
ジメチルヒドラジン	10	雌 3 例（雌 4 例）	4.3	19.71**	68.86#	23.18
被験物質	投与量（mg/kg/日）	動物数 [1]	十二指腸			
			ハローアッセイ	コメットアッセイ		
			壊死細胞の割合（%、平均）	ゴースト細胞の割合（%、平均）	テール強度中央値 [2]（平均）	テールモーメント中央値 [2]（平均）
溶媒	0	雌 4 例（雌 5 例）	18.5	22.13	5.42	0.61
エステトロール	500	雌 4 例（雌 5 例）	19.5	24.70	27.30#	4.02
	1000	雌 4 例（雌 5 例）	18.8 [3]	32.27***	6.35	0.68
	2000	雌 4 例（雌 5 例）	16.4	29.35**	4.86	0.39
ジメチルヒドラジン	20	雌 3 例（雌 4 例）	24.0*	21.14	58.49#	13.94

[1] 評価動物数（投与動物数）

[2] テール強度：テール中の DNA の割合（%）

[3] 4 例中 1 例にアポトーシス細胞が 0.5%認められた。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001（χ^2-検定）

#p<0.05（Mann-Whitney 検定）

2.6.7.9.C コメット試験 2

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol (E4): Detection of DNA damage in the liver and duodenum of treated rats using the Comet assay</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>試験の種類：コメットアッセイ（DNA 損傷：一本鎖及び二本鎖切断、アルカリ不安定部位、切除修復部位及び架橋部位）</td><td>処理計画： 0 及び 21 時に 2 回投与
陽性対照：単回投与（21 時）</td><td>試験番号：0030-NC-001</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：ラット／Sprague-Dawley</td><td>計測時間：2 回目の投与後 3～4 時間</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.3.2-03</td></tr>
<tr><td>週齢：7～8 週齢</td><td>投与方法：経口（強制）</td><td></td></tr>
<tr><td>評価した細胞：肝細胞及び十二指腸細胞</td><td>溶媒／投与形態：
エステトロール：0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、6.25、12.5、25、50、100、200 mg/mL
メタンスルホン酸エチル：精製水中に 25 mg/mL</td><td>GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td colspan="2">分析細胞数／動物： 100 個の細胞／組織／動物
0 及び 2000 mg/kg 群の十二指腸では各動物につき 200 個の細胞</td><td>投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項： エステトロール濃度分析（曝露証明）のため、溶媒又は 2000 mg/kg を投与したサテライト群の動物（各群 6 例）から、2 回目の投与後 0.5 時間及び 3 時間に血漿を採取した。
血液生化学的検査のため、終了時に採血した。
病理組織検査を目的として、主試験の動物（各群 5 例）からは Day 2 に、サテライト群の動物（各群 3 例）からは Day 3 及び 5（2 回目の投与から 1 及び 3 日後）に肝臓及び十二指腸を採取した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">毒性／細胞毒性：2000 mg/kg まで死亡又は一般状態変化なし。細胞毒性なし。</td></tr>
<tr><td colspan="3">遺伝毒性：肝臓及び十二指腸：なし</td></tr>
<tr><td colspan="3">曝露証明： 全てのエステトロール投与群では、血漿中濃度が定量可能であった。平均血漿中濃度は投与量の増加に伴い増加し、2000 mg/kg の最終投与後 0.5 時間では 22.8 µg/mL、3 時間では 14.5 µg/mL であった。これらの時点における溶媒投与群の検体は、LLOQ 未満であった。</td></tr>
</table>

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース、DNA＝デオキシリボ核酸、LLOQ＝定量下限値、NaCl＝塩化ナトリウム

2.6.7.9.C コメット試験 2 （続き）

被験物質：エステトロール

被験物質	投与量（mg/kg/日）	動物数	肝臓			
			ハローアッセイ	コメットアッセイ		
			ハローを有する細胞の割合（%、平均）	ゴースト細胞の割合（%、平均）	テール強度中央値 [1]（平均）	テールモーメント中央値 [2]（平均）
溶媒	0	雌 5 例	4.00	5.12	1.75	0.20
エステトロール	62.5	雌 5 例	5.00	6.48	1.82	0.18
	125	雌 5 例	3.40	6.16	1.84	0.19
	250	雌 5 例	4.67	5.98	1.96	0.21
	500	雌 5 例	4.80	7.94	2.23	0.25
	1000	雌 5 例	5.20	6.72	1.85	0.18
	2000	雌 5 例	5.60	8.18	2.14	0.22
EMS	250	雌 5 例	8.20	11.80	31.84***	4.97

追加情報：肝臓の病理組織所見：
Day 2：用量依存的な肝細胞有糸分裂の増加；1000 及び 2000 mg/kg/日で TUNEL 染色 [3] の増加
Day 3：用量依存的な肝細胞有糸分裂の増加；Day 2 と比較し、250 mg/kg/日以上で TUNEL 染色の増加
Day 5：250 mg/kg/日以上で TUNEL 染色の増加
観察所見は、生体異物投与に対する正常な適応反応と一致しており、肝臓では細胞毒性のエビデンスは認められなかった。

[1] テール強度：テール中の DNA の割合（%）。

[2] オリーブテールモーメント：テール強度とコメットのヘッドとテールの強度重心間の距離の積。

[3] アポトーシスの増加を示す。

***p<0.001（2 標本 t 検定、上側検定）

略語：D＝Day、DNA＝デオキシリボ核酸、dUTP＝デオキシウリジン三リン酸、EMS＝メタンスルホン酸エチル、
TUNEL＝末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ dUTP ニック末端標識

2.6.7.9.C コメット試験 2 （続き）

被験物質：エステトロール

被験物質	投与量（mg/kg/日）	動物数	十二指腸			
			ハローアッセイ	コメットアッセイ		
			ハローを有する細胞の割合（%、平均）	ゴースト細胞の割合（%、平均）	テール強度中央値 [1]（平均）	テールモーメント中央値 [2]（平均）
溶媒	0	雌 5 例	8.60	7.19	1.54	0.16
エステトロール	62.5	雌 5 例	8.60	8.57	1.32	0.15
	125	雌 5 例	6.40	7.89	1.81	0.19
	250	雌 5 例	8.40	9.07	1.94	0.19
	500	雌 5 例	8.20	10.35	1.65	0.16
	1000	雌 5 例	10.20	8.56	1.05	0.12
	2000	雌 5 例	6.60	7.37	2.23	0.23
EMS	250	雌 5 例	8.40	8.22	14.71***	1.78
追加情報：十二指腸の病理組織所見： Day 2：少数の動物で軽微から軽度な陰窩の過形成が認められたが、用量依存性はなかった Day 3：ほとんどの投与群で軽微から軽度な陰窩の過形成が認められ、500 mg/kg/日以上ではわずかに重症度が高かった Day 5：500 及び 1000 mg/kg/日群の各 1 例で、軽微な陰窩の過形成が認められた 観察所見は、正常な急速な細胞回転と一致しており、十二指腸では細胞毒性のエビデンスは認められなかった						

[1] テール強度：テール中の DNA の割合（%）。

[2] オリーブテールモーメント：テール強度とコメットのヘッドとテールの強度重心間の距離の積。

***p<0.001（2 標本 t 検定、上側検定）

略語：D＝Day、DNA＝デオキシリボ核酸、EMS＝メタンスルホン酸エチル

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10.A マウス

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: Carcinogenicity study by the oral route (gavage) in female mice</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：マウス／CD-1
［CD1®Crl：CD-1®（ICR）IGS］</td><td>投与期間：104 週間</td><td>試験番号：0031-NC-004</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：6 週齢</td><td>投与方法：経口（強制）</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.4.1-01</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td>溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.025、0.05、0.1 又は 0.2 mg/mL</td><td rowspan="2">GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td>対照群の処理： 経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="3">高用量の設定根拠：同じ動物種を用いた 13 週間反復投与毒性試験（試験番号 ES-T40、TS 表 2.6.7.7.A.2）で認められた体重増加及び体重増加量の増加</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
被験物質の水分含量が 5.5%又は 6.0%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
本試験では 2 つの溶媒対照群を設けた。対照群 1 はエステトロール投与群と同じ部屋で飼育し、対照群 2 は混入を防止するための予防措置が成功しなかった場合に備えて別の飼育室を使用した。
エステトロール濃度分析のため、Week 12 及び 25 にサテライト群 1 から血漿を採取した。混入がないことを確認するため、対照群 1 に加えて無処置のサテライト群 2 から月 1 回血漿を採取した（TK 評価時を除く）。
本試験のデザインは、FDA の発がん性評価委員会（Executive Carcinogenicity Assessment Committee）による SPA（Special Protocol Assessment）で承認された（FDA, 20[redacted]）。</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、TK＝トキシコキネティクス、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
TK						
サテライト群 1 の動物数：	雌 6 例	雌 6 例	雌 18 例	雌 18 例	雌 18 例	雌 18 例
W12						
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）			4.14	12.5	28.6	50.6
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	LLOQ 未満	2.97	9.71	17.0	29.3
T_{max} （時間）			0.5	0.5	0.5	0.5
W25						
$AUC_{0\text{-}last}$ （ng·hr/mL）			4.60	12.4	23.6	54.6
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	LLOQ 未満	3.75	8.91	14.9	29.1
T_{max} （時間）			0.5	0.5	0.5	0.5
特記すべき所見						
開始時の雌動物数	100	100	101	100	100	100
死亡／瀕死屠殺の雌動物数	64	62	65	74	58	74
最終剖検の雌動物数	36	38	36	26	42	26
生存率（%）	36	38	36	26	42	26
平均投与期間（週）	90	87	89	82	89	86
死因 [1)]						
乳腺腫瘍	2	1	0	4	5	8
子宮／膣脱	0	0	0	1	2	5

1) 投与との関連あり。

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝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、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、W＝Week

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
体重（%） [1)]						
W1（D1）	26.8 g	26.9 g	-2.6	+0.4	-2.2	-3.7**
W13	32.8 g	32.9 g	-0.9	+1.8	+2.7*	+4.0**
W26	35.6 g	35.4 g	-2.0	-0.3	+0.3	+2.5
体重増加量（g） [2)]						
W1～W13	+6.0	+6.0	+6.4	+6.5	+7.5**（+25%）	+8.2**（+37%）
W1～W26 [3)]	+8.8	+8.5	+8.8	+8.6	+9.5（+8%）	+10.7（+22%）
W1～W104	+10.7	+11.0	+11.7	+11.0	+12.3（+15%）	+14.2**（+33%）
摂餌量（%） [1), 4)]	g/動物/日	g/動物/日				
W1/2	4.0	4.2**	+0.0	+2.5	+5.0**	+2.5
W13/14	4.2	4.4	+2.4	+2.4	+4.8	+7.1**
W25/26	4.6	4.6	-2.2	-4.3	-2.2	+0.0
W53/54	4.2	4.5**	+4.8	+7.1	+4.8	+4.8*
W77/78	4.5	4.7	+4.4	+8.8	+4.4	+8.8*
W101/102	4.2	4.6	+4.8	+26.2**	+16.7*	+28.6**
一般状態						
腟／泌尿生殖器／外陰部の分泌液	7	12	18	29	21	25
腟／泌尿生殖器脱	0	0	1	4	7	8
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-

1) 対照群は平均値、投与群は対照群 1 との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 括弧内の値は、対照群 1 に対する割合（%）。

3) 報告なし。Week 26 及び Day 1 の平均体重の差を算出した。統計解析は実施されていない。

4) 摂餌量の増加は、特に 0.5 及び 1 mg/kg/日群で、主に試験の後半に認められた。

*p<0.05、**p<0.01、対照群 1 との Dunnett 又は Dunn 検定

略語：D＝Day、W＝Week

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
血液学的検査 [1)]						
W52						
好中球 (%)	30	27	35*	38**	40**	42**
リンパ球 (%)	66	68	60*	58**	54**	53**
W79						
好中球 (%)	39	39	45	47	45	49**
リンパ球 (%)	53	54	47	48	50	46*
W105						
リンパ球数 (G/L)	4.53	5.18	5.59	2.03	2.65	2.98
網赤血球数 (T/L)	0.24	0.25	0.31	0.29	0.30	0.41*
網赤血球 (%)	2.69	2.82	3.90	3.14	3.96	5.88*
血液生化学的検査 [1)]						
W105						
グルコース (mmol/L)	5.55	4.95	4.39	3.62*	3.67*	3.41*
触診可能な腫瘤						
触診可能な腫瘤を有する動物数	7	4	7	10	12	13
触診可能な腫瘤数	7	4	9	12	14	18
悪性腫瘍と確定された数	7	2	8	12	14	14
初発週	63	94	89	49	47	49

[1)] 血液学的検査：Week 52 及び 79 に全生存例の血液塗抹標本を作製した。Week 105（計画解剖時）に各群動物番号の若い生存例 10 例から採血した。
血液生化学的検査：Week 105（計画解剖時）に血液学的検査に続いて各群動物番号が若い生存例 10 例から採血した。

*p<0.05、**p<0.01、対照群 1 との Dunnett 又は Dunn 検定

略語： W＝Week

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
剖検所見						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
下垂体						
腫大	3	8	5	4	6	11
腫瘤；赤色／白色	0	1	2	1	1	6
赤変色	2	2	3	3	5	13
甲状腺						
腫大	3	3	3	4	6	7
子宮						
拡張	5	4	15	21	20	14
腫大	7	5	11	19	16	21
腫瘤；赤色／白色	8	7	9	11	14	27
膣						
腫瘤；赤色／白色	0	0	0	1	4	5
脱	0	0	0	1	4	6

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査						
腫瘍性病変						
子宮 [1)]						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
腺性ポリープ	3	5	3	16*	31*	26*
子宮内膜腺腫	1	1	0	2	2	1
子宮内膜腺癌	0	0	1	2	6*[#]	4*
ミュラー管混合悪性腫瘍	0	0	0	1	0	0
子宮内膜間質ポリープ	7	6	2	9	16*	20*
子宮内膜間質腫瘍	0	1	1	0	1	0
子宮内膜間質肉腫	0	1	1	2	3	8*
平滑筋肉腫	0	0	0	0	1	2**
平滑筋腫	5	2	3	3	2	0
子宮頸部 [1)]						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
腺性ポリープ	0	0	0	1	0	1
子宮内膜間質ポリープ	1	0	0	0	0	0
平滑筋肉腫	0	0	0	0	0	1

[1)] 子宮及び子宮頸部の所見（腺及び子宮内膜の所見、並びに子宮内膜間質の所見）の併合解析ではそれぞれ、0.25 mg/kg/日以上及び 0.5 mg/kg/日以上の投与量で傾向（p≦0.005）が認められた。

* p≦0.005（傾向検定） [#] p≦0.01（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）						
腫瘍性病変（続き）						
乳腺 [1)]						
評価動物数	雌 95 例	雌 92 例	雌 96 例	雌 90 例	雌 95 例	雌 96 例
腺表皮癌；良性	0	0	0	1	1	1
腺表皮癌；悪性	0	1	1	3	1	4
腺癌	4	2	1	5	8*	8*
腺腫	1	0	0	0	0	0
下垂体 [1)]						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
下垂体前葉腺腫	4	7	5	6	6	15*
下垂体前葉癌	1	3	2	1	1	3
非腫瘍性増殖性病変						
子宮						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
腺の嚢胞状過形成	28	29	52	74	78	87
乳腺						
評価動物数	雌 95 例	雌 92 例	雌 96 例	雌 90 例	雌 95 例	雌 96 例
過形成；腺房細胞	2	2	5	7	7	15
過形成；異型性	0	0	2	3	2	4

1) 下垂体及び乳腺の所見を併合して統計解析したところ、1 mg/kg/日の投与量で傾向が認められた（p≦0.005）。

* p≦0.005（傾向検定）

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）						
非腫瘍性増殖性病変（続き）						
下垂体						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
過形成；限局性；前葉	2	4	1	5	5	10
肺						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
過形成；細気管支－肺胞	2	4	1	3	1	9
非増殖性病変						
子宮						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
腺筋症	5	9	11	11	31	33
脱	0	0	4	3	3	2
子宮頸部						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
萎縮	6	14	21	10	0	1
扁平；上皮	40	30	69	78	67	81

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）						
非増殖性病変（続き）						
膣						
評価動物数	雌 99 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例	雌 100 例
萎縮；上皮	32	30	18	5	5	1
角化；上皮	22	18	26	25	18	11
粘液分泌；上皮	46	46	47	31	15	9
扁平；上皮	28	37	90	94	93	92
脱	2	0	2	3	5	11
乳腺						
評価動物数	雌 95 例	雌 92 例	雌 96 例	雌 90 例	雌 95 例	雌 96 例
乳腺嚢胞	0	1	0	1	6	8
導管の硝子内容物	32	32	48	52	68	67
下垂体						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
血管拡張	0	0	1	1	6	8
うっ血	1	0	1	4	1	5
副腎						
評価動物数	雌 99 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
肥大；びまん性；球状層	4	8	5	16	27	52
色素；皮髄境界部	30	38	56	59	80	93

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）						
非増殖性病変（続き）						
脳						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
圧迫	1	4	2	1	3	7
肝臓						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
造血	9	13	12	13	15	19
色素；ヘモジデリン	2	3	0	0	4	11
色素；クッパー細胞	2	1	3	3	5	13
空胞化；肝細胞	16	8	8	4	5	0
脾臓						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
造血	35	46	40	48	55	71
色素；ヘモジデリン	38	43	48	41	56	57
胸骨及び大腿骨						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99/100 例
骨形成性の線維性病変；胸骨	24	25	64	74	78	58
骨形成性の線維性病変；大腿骨	3	4	6	8	13	15
胃						
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
拡張；腺	16	11	22	33	41	42

2.6.7.10.A マウス （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 101 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）						
非増殖性病変（続き）						
甲状腺						
評価動物数	雌 99 例	雌 100 例	雌 101 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 98 例
嚢胞状拡張／濾胞	48	47	49	47	54	67

2.6.7.10.B ラット

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: Carcinogenicity study by the oral route (gavage) in female Wistar rats</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：ラット／Wistar
［Crl: WI （GLX/BRL/Han） IGS BR0］</td><td>投与期間：105 週間</td><td>試験番号：0031-NC-003</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：6 週齢</td><td>投与方法：経口（強制）</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.4.1-02</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td>溶媒／投与形態：0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.016、0.054 又は 0.16 mg/mL</td><td rowspan="2">GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td>対照群の処理：経口（強制）</td></tr>
<tr><td colspan="3">高用量の設定根拠：同じ動物種を用いた 13 週間反復投与毒性試験（試験番号 ES-T39、TS 表 2.6.7.7.A.5）で認められた体重増加量の減少</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
被験物質の水分含量が 5.5%又は 6.0%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
本試験では 2 つの溶媒対照群を設けた。対照群 1 はエステトロール投与群と同じ部屋で飼育し、対照群 2 は混入を防止するための予防措置が成功しなかった場合に備えて別の飼育室を使用した。
エステトロール濃度分析のため、Week 12 及び 25 にサテライト群 1 から血漿を採取した。混入がないことを確認するため、対照群 1 に加えて無処置のサテライト群 2 から月 1 回血漿を採取した（TK 評価時を除く）。
本試験のデザインは、FDA の発がん性評価委員会（Executive Carcinogenicity Assessment Committee）による SPA（Special Protocol Assessment）で承認された（FDA, 20[redacted]）。</td></tr>
</table>

略語： CMC＝カルボキシメチルセルロース、TK＝トキシコキネティクス、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
TK					
サテライト群 1 の動物数：	雌 3 例	雌 3 例	雌 9 例	雌 9 例	雌 9 例
W12					
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）			6.62	14.7	45.6
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	LLOQ 未満	3.20	7.30	34.4
T_{max} （時間）			0.5	0.5	0.5
W25					
$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）			6.73	18.8	40.7
C_{max} （ng/mL）	LLOQ 未満	LLOQ 未満	3.39	9.99	25.5
T_{max} （時間）			0.5	0.5	0.5
特記すべき所見					
開始時の雌動物数	100	100	100	100	100
死亡／瀕死屠殺の雌動物数	31	35	35 [1)]	25 [1)]	36 [1)]
最終剖検の雌動物数	69	65	65	75	64
生存率（%）	69	65	65	75	64
平均投与期間（週）	96	98	99	101	99

[1)] Day 300 までの死亡数は、エステトロール群［1 例（0.08 mg/kg）、0 例（0.27 mg/kg）、0 例（0.8 mg/kg）］の方が対照群（3 又は 2 例）よりもわずかに少なかった。

略語：$AUC_{0\text{-last}}$＝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、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間、W＝Week

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
死因 [1]					
下垂体前葉腺腫	10（32%）	10（29%）	17（49%）	11（44%）	22（61%）
乳腺腺癌	0	1	1	2	2
子宮炎症	0	0	2	2	1
体重（%） [2]					
W1	141 g	139 g	+0.0	-1.4	-0.7
W14	263 g	264 g	-2.7*	-6.1**	-7.6**
W26	281 g	282 g	-3.2**	-6.8**	-7.5**
W54	314 g	304 g	-3.2	-8.6**	-5.7**
体重増加量（g） [3]					
W1～W14	+121	+125	+115*	+108**（-11%）	+104**（-14%）
W1～W26	+140	+143	+131**	+123**（-12%）	+120**（-14%）
W1～W54	+173	+182	+163	+148**（-14%）	+157**（-9%）
W1～W78	+212	+213	+207	+185**（-13%）	+197（-7%）
W1～W104	+236	+248	+233	+222（-6%）	+222（-6%）

[1] 投与と関連あり又は投与との関連性を除外することができない。

[2] 対照群は平均値、投与群は対照群 1 との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[3] 括弧内の値は、対照群 1 に対する割合（%）。

*p<0.05、**p<0.01、対照群 1 との比較（Dunnett 又は Dunn 検定）

略語：W＝Week

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
摂餌量（%） [1]	g/動物/日	g/動物/日			
W1/2	16.8	16.0**	-3.0	-1.8	-1.2
W13/14	17.5	16.8	+12.6	-2.3	-0.6
W25/26	17.7	17.6	-0.6	-7.9**	+0.0
W53/54	17.2	16.9	-5.2*	-9.3**	-1.2
W77/78	17.9	18.3	-3.9	-7.8**	-0.6
W101/102	17.8	17.7	+1.1	-5.6	-2.2
一般状態	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-
血液学的検査 [2]					
W52	-	-	NA	NA	-
W105					
網赤血球数 （T/L）	0.15	0.18	0.18	0.22**	0.22**
網赤血球 （%）	1.93	2.34	2.84	2.91**	2.86**
血液生化学的検査 [2]					
W105					
カルシウム （mmol/L）	2.81	2.83	2.82	2.82	2.92**
無機リン （mmol/L）	1.08	1.10	1.32**	1.31**	1.48**
総コレステロール （mmol/L）	2.58	3.15[2]	1.81*	1.75*	1.76*
トリグリセリド （mmol/L）	1.87	1.45	2.24	3.86**	3.65*
ALP （U/L）	73	84	87	88	125*

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群 1 との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 血液学的検査：Week 52 に全生存例の血液塗抹標本を作製し、対照群及び高用量群を検査した。Week 105（計画解剖時）に各群動物番号の若い生存例 10 例から採血した。

*p<0.05、**p<0.01、対照群 1 との比較（Dunnett 又は Dunn 検定）

略語：ALP＝アルカリホスファターゼ、NA＝分析せず、W＝Week

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
性周期					
W13					
性周期が認められない動物数	0/10	0/10	NP	NP	0/10
性周期期間（日）	4.6	5.1	NP	NP	4.9
W26					
性周期が認められない動物数	0/10	1/10	NP	NP	3/10
性周期期間（日）	4.0	4.1	NP	NP	4.6
W52					
性周期が認められない動物数	0/10	0/10	NP	NP	0/10
性周期期間（日）	3.7	4.2	NP	NP	4.6
触診可能な腫瘤					
触診可能な腫瘤を有する動物数	21	29	16	22	20
触診可能な腫瘤数	25	34	20	22	25
悪性腫瘍と確定された数	5	9	6	6	8
初発週	79	41	47	79	63
剖検所見					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
副腎					
腫大	3	4	5	20	45
白変色	19	14	8	6	4
褐変色	2	2	4	8	19

略語：NP＝実施せず、W＝Week

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
剖検所見（続き）					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
卵巣					
嚢胞	12	12	16	17	27
下垂体					
腫大	35	35	43	33	46
黒／褐色／赤変色	35	32	46	37	57
子宮					
嚢胞	10	9	14	30	44
拡張	5	2	7	16	4
赤／黒変色	0	0	2	3	2
黒／褐色の内容物	0	0	1	0	2
膣					
赤色の内容物	0	0	2	3	1
病理組織学的検査					
腫瘍性病変					
乳腺 [1)]					
評価動物数	雌 99 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
腺癌	3	3	6	6	12 [1)]
線維腺腫内腺癌	0	1	1	0	2 [1)]

[1)] 統計学的に有意ではなかったが、0.8 mg/kg/日群で認められた発現率の上昇は、おそらく投与に関連したものと考えられた。

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
病理組織学的検査（続き）					
非腫瘍性増殖性病変					
乳腺					
評価動物数	雌 99 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
過形成；腺房細胞					
• 軽微	18	17	18	22	11
• 軽度	34	23	31	20	26
• 中等度	14	24	33	42	31
• 顕著	8	8	10	10	20
子宮					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
過形成；腺性、嚢胞性					
• 軽微	19	16	19	20	16
• 軽度	7	9	14	17	18
• 中等度	2	3	8	15	23
• 顕著	1	3	3	22	28
過形成；腺性、異型性					
• 軽微	0	2	1	5	9
• 軽度	1	1	0	1	0
• 中等度	0	0	0	2	0

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
病理組織学的検査（続き）					
非腫瘍性増殖性病変（続き）					
卵巣					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
過形成；間質細胞					
• 軽微	23	21	22	16	7
• 軽度	23	13	12	6	4
• 中等度	1	1	1	1	3
肝臓					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
細胞巣の変化；明細胞					
• 軽微	2	4	4	14	25
• 軽度	0	1	0	0	0
• 顕著	0	0	1	0	0
細胞巣の変化；好塩基性					
• 軽微	35	38	46	45	38
• 軽度	36	31	32	16	8
• 中等度	15	13	9	3	1
• 顕著	3	3	0	0	0

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）					
非増殖性病変					
子宮					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
炎症 [1)]					
• 軽微	4	5	9	17	35
• 軽度	1	0	1	3	2
• 中等度	1	0	1	1	1
• 顕著	0	0	2	0	0
粘液分泌；上皮					
• 軽微	44	38	28	14	20
• 軽度	16	14	44	35	27
• 中等度	2	2	9	32	24
• 顕著	0	1	1	2	8
萎縮					
• 軽微	1	2	0	1	0
• 軽度	8	8	1	0	1
• 中等度	6	4	0	0	0
• 顕著	1	0	0	0	0

[1)] 全般的に軽微で、急性であり（好中球浸潤）、限局性で、嚢胞性の腺過形成の影響を受けて拡張した腺に局在していた。

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	**0（対照 1）**	**0（対照 2）**	**0.08**	**0.27**	**0.8**
動物数：	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**	**雌 100 例**
病理組織学的検査（続き）					
非増殖性病変（続き）					
腟					
評価動物数	雌 99 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
粘液分泌；上皮					
• 軽微	27	27	12	12	12
• 軽度	28	23	18	9	7
• 中等度	10	7	30	19	20
• 顕著	8	9	25	39	32
• 重度	2	3	2	7	9
萎縮；上皮					
• 軽微	0	2	0	0	0
• 軽度	4	2	1	0	0
• 中等度	10	6	0	0	0
• 顕著	2	5	0	0	0
卵巣					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
嚢胞；NOS					
• 軽微	19	11	12	16	14
• 軽度	5	8	11	12	13
• 中等度	2	3	1	4	8
• 顕著	0	0	0	1	1

略語：NOS（not otherwise specified）＝他に何らの説明や記載のない所見

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
病理組織学的検査（続き）					
非増殖性病変（続き）					
卵巣（続き）					
色素					
• 軽微	75	73	74	74	46
• 軽度	18	20	26	26	52
萎縮					
• 軽微	24	25	22	21	17
• 軽度	29	32	38	41	37
• 中等度	27	29	28	21	25
• 顕著	13	7	7	11	19
肝臓					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
空胞化；限局性					
• 軽微	9	14	23	32	28
• 軽度	0	1	1	6	7
色素					
• 軽微	9	3	17	18	17
• 軽度	2	2	1	0	2
• 中等度	0	1	0	0	2
肥大；肝細胞					
• 軽微	0	3	2	5	17
• 軽度	2	2	1	4	10
• 中等度	1	0	0	0	0

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
病理組織学的検査（続き）					
非増殖性病変（続き）					
副腎					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
嚢胞性変性；束状層					
• 軽微	49	51	35	23	9
• 軽度	37	40	49	44	39
• 中等度	4	2	11	25	41
• 顕著	0	0	0	2	7
• 重度	0	0	0	0	1
色素；皮髄境界部					
• 軽微	77	81	68	52	31
• 軽度	14	15	25	44	60
• 中等度	0	0	0	0	4
肥大；びまん性；皮質					
• 軽微	3	2	7	8	16
• 軽度	2	5	2	9	22
• 中等度	0	0	0	0	2
肥大；限局性；球状層					
• 軽微	57	53	56	49	47
• 軽度	17	18	14	7	0

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
病理組織学的検査（続き）					
非増殖性病変（続き）					
脳					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
拡張；脳室					
• 軽微	10	7	13	7	6
• 軽度	7	7	7	5	16
• 中等度	0	0	1	2	3
圧迫					
• 軽微	3	3	7	8	6
• 軽度	9	4	12	5	9
• 中等度	5	7	9	7	10
脾臓					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
色素；マクロファージ					
• 軽微	47	44	42	47	36
• 軽度	18	27	31	21	35
• 中等度	0	2	11	9	12
• 顕著	0	0	0	1	4
造血					
• 軽微	48	44	46	31	12
• 軽度	24	28	20	37	35
• 中等度	5	11	10	19	26
• 顕著～重度	13	10	10	6	12

2.6.7.10.B ラット （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：	0（対照 1）	0（対照 2）	0.08	0.27	0.8
動物数：	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
病理組織学的検査（続き）					
非増殖性病変（続き）					
腸間膜リンパ節					
評価動物数	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 99 例
浸潤；好酸球					
• 軽微	9	5	5	13	21
• 軽度	0	0	1	2	5
萎縮；リンパ組織					
• 軽微	21	13	23	23	27
• 軽度	7	10	13	14	23
• 中等度	3	1	3	0	2
• 顕著	0	0	0	0	1
胸腺					
評価動物数	雌 97 例	雌 99 例	雌 100 例	雌 100 例	雌 100 例
萎縮；リンパ組織					
• 軽微	0	1	1	0	0
• 軽度	12	13	8	6	4
• 中等度	57	51	56	47	44
• 顕著	22	29	28	41	47
• 重度	2	0	3	2	1
過形成；上皮					
• 軽微	25	34	31	39	41
• 軽度	5	3	5	7	9

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法
（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量
（mg/kg/日）</th><th>一群の
動物数</th><th colspan="5">特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td rowspan="10">ラット／Wistar［Crl:WI(Han)］</td><td rowspan="10">経口（強制）［0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、6、12、18 mg/mL］</td><td rowspan="10">G6～G17</td><td rowspan="10">0、30、60、90</td><td rowspan="10">交尾雌
7 例</td><td colspan="5">≥30: 立毛；体重減少；摂餌量減少；全妊娠例における全胚・胎児死亡
≥60: 泌尿生殖器領域の赤色分泌物
TK：</td><td rowspan="10">ES-T01</td></tr>
<tr><td>Day</td><td>投与量
(mg/kg)</td><td>$AUC_{0\text{-}last}$
(ng·hr/mL)</td><td>C_{max}
(ng/mL)</td><td>T_{max}
(時間)</td></tr>
<tr><td>G6</td><td>30</td><td>2715</td><td>2304</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>60</td><td>9570</td><td>5890</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>90</td><td>14825</td><td>7796</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>G17</td><td>30</td><td>1870</td><td>760</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>60</td><td>6897</td><td>3422</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td></td><td>90</td><td>7792</td><td>4464</td><td>0.5</td></tr>
</table>

略語： $AUC_{0\text{-}last}$＝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、CMC＝カルボキシメチルセルロース、G＝妊娠日齢、TK＝トキシコキネティクス
T_{max}＝C_{max} 到達時間

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 （続き）

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法
（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量
（mg/kg/日）</th><th>一群の
動物数</th><th colspan="5">特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td rowspan="16">ラット／Wistar［Crl:WI(Han)］</td><td rowspan="16">経口（強制）［0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.02、0.06、0.2、0.6、2 mg/mL］</td><td rowspan="16">G6～G17</td><td rowspan="16">0、0.1、0.3、1、3、10</td><td rowspan="16">交尾雌
7 例</td><td colspan="5">0.1: 1 例における全胚・胎児死亡
≥0.1: 体重増加量の減少（10 mg/kg/日で体重減少）; 胎児及び胎盤重量の軽度減少（用量依存性なし）
≥0.3: 妊娠子宮重量の減少
≥1: 摂餌量の減少
3: 1 例における全胚・胎児死亡；着床後胚死亡率の上昇
≥3: 円背
10: 全胚・胎児死亡
TK：</td><td rowspan="16">ES-T02</td></tr>
<tr><td>Day</td><td>投与量
(mg/kg)</td><td>$AUC_{0\text{-last}}$
(ng·hr/mL)</td><td>C_{max}
(ng/mL)</td><td>T_{max}
(時間)</td></tr>
<tr><td rowspan="6">G6</td><td>0.1</td><td>2.90</td><td>2.09</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>0.3</td><td>9.41</td><td>5.77</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>1</td><td>36.1</td><td>25.5</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>3</td><td>102</td><td>99.0</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>10</td><td>485</td><td>540</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td rowspan="6">G17</td><td>0.1</td><td>4.58</td><td>3.03</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>0.3</td><td>9.33</td><td>6.83</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>1</td><td>37.7</td><td>20.9</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>3</td><td>139</td><td>67.8</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>10</td><td>350</td><td>141</td><td>1.0</td></tr>
</table>

略語： $AUC_{0\text{-last}}$＝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、CMC＝カルボキシメチルセルロース、G＝妊娠日齢、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}＝C_{max} 到達時間

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 （続き）

被験物質：エステトロール

<table>
<tr><th>動物種／系統</th><th>投与方法
（溶媒／投与形態）</th><th>投与期間</th><th>投与量
（mg/kg/日）</th><th>一群の
動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号</th></tr>
<tr><td rowspan="6">ウサギ／
ニュージーランドホワイト</td><td rowspan="6">経口（強制）
（ASV[1]中に0、0.01、0.03 、 0.1 、 0.3 、 1 mg/mL）</td><td rowspan="6">交配前の 4 日間、
交尾後 G9 まで[2]</td><td rowspan="6">0、0.01、0.03、0.1 、 0.3 、 1 mg/kg（bid）</td><td rowspan="6">雌
3 例[3]</td><td>≥0.1: 着床なし
1: 黄体数の減少又は黄体の欠如

<u>TK</u>：</td><td rowspan="6">ES-T04</td></tr>
<tr><td>
<table>
<tr><th>Day</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>$AUC_{0\text{-}last}$
（ng·hr/mL）</th><th>C_{max}
（ng/mL）</th><th>T_{max}
（時間）</th></tr>
<tr><td rowspan="4">D1
（G-4）
G9</td><td>0.1</td><td>13.1</td><td>4.51</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>1</td><td>65.9</td><td>34.0</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>0.1</td><td>12.1</td><td>4.11</td><td>0.5</td></tr>
<tr><td>1</td><td>83.9</td><td>17.8</td><td>0.5</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>ウサギ／
ニュージーランドホワイト</td><td>経口（強制）
（ASV[1]中に 0.06、0.2、0.6 mg/mL）</td><td>G7～G15</td><td>0.06、0.2、0.6</td><td>交尾雌
3 例</td><td>0.6: 黄体数に比し着床数減少（2/3 例）; 50～100%の着床数の減少</td><td>ES-T16</td></tr>
</table>

[1] ES-T04 試験によると、ASV は蒸留水中に塩化ナトリウム、ベンジルアルコール、Tween 80 及び CMC を含有するが、添加剤の濃度は記載されていなかった。

[2] 計 14 日間。

[3] 0.01 mg/kg の 1 日 2 回投与群では 1 例が交配に失敗したため、雌 2 例。

略語： ASV＝水性懸濁溶媒、$AUC_{0\text{-}last}$＝最終測定可能濃度までの濃度-時間曲線下面積、*bid*＝1 日 2 回、C_{max}＝最高血漿中濃度、G＝妊娠日齢、TK＝トキシコキネティクス
T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間、

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 （続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg/日）	一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
ラット／Wistar（RjHan:WI）	経口（強制）［0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.034、0.1、0.3 mg/mL］	交尾後 6 日～分娩後 21 日	0、0.17、0.5、1.5	交尾雌 7 例	F_0 世代 ≥0.17: 妊娠中の体重（増加量）の減少 0.5: 分娩後 2 日に 1 例及び分娩後 11 日に 1 例の早期屠殺（全同腹児が死亡）；1 例の乳頭の腫大／有色化 [1)] ≥0.5: 妊娠中の赤／褐色がかった腟分泌物の発現率の上昇；着床後胚死亡率の上昇；出産児数の減少 1.5: 交尾後 26 日に 1 例（分娩せず）及び分娩後 3 日に 1 例（分娩困難）の早期屠殺；分娩時間の延長（1 例）；妊娠中の摂餌量減少；雌 1 例における胸腺の萎縮並びに副腎及び脾臓の腫大（1 例）[1)] F_1 世代 ≥0.5: 死亡／喰殺された出生児；4 日生存率の低下；脱水や胃内に乳汁が認められない 1.5: 出生後 1 日の体重の減少	Es0001-NC-001

[1)] 早期屠殺に至った。

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 （続き）

被験物質：エステトロール

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg/日）	一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
ラット／Wistar（RjHan:WI）	経口（強制）［0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0.3 mg/mL］	交尾後 6～18 日 + 分娩後 1～4 日	1.5	交尾雌 5 例	F_0 世代 1.5: 1 例は交尾後 23 日に死亡した状態で発見され、妊娠末期の死亡胎児が認められた；1 例における分娩遅延 F_1 世代 1.5: 死亡／喰殺された出生児；4 日生存率の低下	Es0001-NC-009

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース

2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.7.12.A ラットを用いた受胎能回復性試験 1

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: Study of return to female fertility and early enbryonic development to implantation by oral route (gavage) in rats</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>試験計画：ICH 4.1.1 準拠？
該当せず；試験計画は FDA の同意取得済（FDA, 20[redacted]）</td><td>投与期間：
雌：4 週間、その後交配前 3 週間の休薬期間
連続して最大 2 回までの各 14 日間の休薬交配期間
15 日間の休薬妊娠期間</td><td>試験番号：ES-T27</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：ラット／Wistar［Crl:WI（Glx/BRL/Han）IGS BR］</td><td>交尾成立日：交尾後 0 日</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.5.1-01</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：10 週齢</td><td>帝王切開日：交尾後 15 日</td><td rowspan="3">GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td>投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td>溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.034、0.1 又は 0.3 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 6.1%であったため、1.07 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 雌の性周期ステージを、投与期間終了前 2 週間、休薬期間中及び交尾が確認されるまでの交配期間中、毎朝判定した。
• 雄（8 週齢）は交配のみを目的とし、投与はしなかった。生殖データの観察に基づき、本試験で使用した雄の性成熟は不完全であった。</td></tr>
<tr><td colspan="3">高用量の設定根拠： ラットにおける 1 日 2 回、4 日間投与による排卵抑制の ED_{50} は、約 0.17 mg/kg であった［試験番号 PR3015（3392-006、CTD 4.2.1.1-07）及び試験番号 PR3026（3392-007、CTD 4.2.1.1-08）］。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL： F_0 雌（母動物の一般毒性及び性周期）： 0.17 mg/kg/日
F_0 雌（受胎能）： 判定せず
F_1 同腹児（初期胚発生）： 判定せず</td></tr>
</table>

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース、ED_{50}＝50%有効量、NOAEL＝無毒性量

2.6.7.12.A ラットを用いた受胎能回復性試験１ （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.17**	**0.5**	**1.5**
母動物：	**TK**	NP	NP	NP	NP
	供試雌動物数	24	24	24	24
	死亡及び瀕死屠殺動物数	0	0	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	剖検所見	-	-	-	-
	投与期間				
	体重（%） [1), 2)]				
	D29	223 g	-3.6	-3.6*	-7.2***
	体重増加量（g） [1)]				
	D1～D29	+29	+22**	+20***	+14***
	摂餌量（%） [1), 2)]	g/動物/日			
	D1～D8	19	-5.3	0.0	-10.5*
	D8～D15	19	-5.3*	-5.3**	-10.5***
	D15～D22	17	+5.9	+5.9	-5.9
	D22～D29	18	0.0	0.0	0.0
	休薬期間				
	体重（%） [1), 2)]				
	D50	233 g	-1.3	-0.9	-3.0

[1)] 投与終了時、休薬又は妊娠期間中の体重、体重増加量及び摂餌量を示す。

[2)] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001（Dunnett 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day、NP＝実施せず、TK＝トキシコキネティクス

2.6.7.12.A ラットを用いた受胎能回復性試験 1 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.17**	**0.5**	**1.5**
母動物：	休薬期間（続き）				
	体重増加量（g） [1]				
	D29～D50	+10	+15*	+16**	+19***
	D1～D50	+39	+37	+36	+32*
	摂餌量（%） [1), 2)]	g/動物/日			
	D29～D36	18	0.0	+11.1*	0.0
	D36～D43	18	-5.6	+5.6	0.0
	D43～D50	18	-5.6	0.0	0.0
	妊娠期間				
	評価雌動物数	8	11	13	15
	体重（%） [1), 2)]				
	交尾後 15 日	290 g	-3.8	-6.6*	-7.2*
	体重増加量（g） [1]				
	交尾後 0 日～15 日	+49	+44	+39	+40
	摂餌量（%） [1), 2)]	g/動物/日			
	交尾後 1 日～8 日	22	-9.1	+4.5	-9.1
	交尾後 8 日～15 日	24	-12.5*	-8.3*	-12.5**

1) 投与終了時、休薬又は妊娠期間中の体重、体重増加量及び摂餌量を示す。

2) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001（Dunnett 検定）

略語：D＝Day

2.6.7.12.A ラットを用いた受胎能回復性試験１ （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.17	0.5	1.5
母動物：	受胎能				
	性周期（性周期が認められない動物数） 投与期間 休薬期間	 1 0	 1 0	 4 2	 9 0
	平均交配所要日数	3.5	4.5	4.3	4.8
	交尾雌動物数	24	24	24	24
	妊娠雌動物数	9	11	15	16
	受胎率（%）	37.5	45.8	62.5	66.7
	生存胚が認められた雌動物数	8	11	13	15
	妊娠率（%）	88.9	100.0	86.7	93.8
	着床までの初期胚発生				
	平均黄体数	13.0	11.5	10.0	10.4
	平均着床数	9.1	8.2	6.0	7.6
	平均着床前胚死亡率（%）	32.7	33.1	44.5	33.1
	平均生存胚数	8.2	7.7	5.3	7.2
	平均吸収胚数	0.9	0.5	0.6	0.4
	死亡胚数	0	0	1	0
	平均着床後胚死亡率（%）	21.9	8.3	24.8	14.6

2.6.7.12.B ラットを用いた受胎能回復性試験 2

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名： Estetrol: Study of return to female fertility and early enbryonic development to implantation by oral route (gavage) in rats</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>試験計画：ICH 4.1.1 準拠？
該当せず；試験計画は FDA の同意取得済（PreIND [redacted]、20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日の面談）</td><td>投与期間：
雌：4 週間、その後交配前 3 週間の休薬期間
連続して最大 3 回までの各 3 日間の休薬交配期間
14 又は 15 日間の休薬妊娠期間</td><td>試験番号：ES-T43</td></tr>
<tr><td>動物種／系統：ラット／Wistar［Crl:WI（Glx/BRL/Han）IGS BR］</td><td>交尾成立日：交尾後 0 日</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.5.1-02</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：10 週齢</td><td>帝王切開日：交尾後 15 日</td><td rowspan="3">GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td>投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td>溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.034、0.1 又は 0.3 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
• 被験物質の水分含量が 4.8%であったため、1.07 の補正係数を投与液の調製に適用した。
• 雄（13 週齢）は交配のみを目的とし、投与はしなかった。雌は、それぞれ別の雄と最大 3 回まで 3 日間ずつ交配させるか、交尾が生じるまで交配させた。
• 性周期については試験番号 ES-T27（TS 表 2.6.7.12.A）で評価したため、投与及び休薬期間中にモニタリングしなかった。</td></tr>
<tr><td colspan="3">高用量の設定根拠： ラットにおける 1 日 2 回、4 日間投与による排卵抑制の ED_{50} は、約 0.17 mg/kg であった［試験番号 PR3015（3392-006、CTD 4.2.1.1-07）及び試験番号 PR3026（3392-007、CTD 4.2.1.1-08）］。</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL： F_0 雌（母動物の一般毒性）： 0.5 mg/kg/日</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOEL： F_0 雌（受胎能）： 1.5 mg/kg/日
F_1 同腹児（初期胚発生）： 1.5 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース、ED_{50}＝50%有効量、NOAEL＝無毒性量、NOEL=無影響量、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.12.B ラットを用いた受胎能回復性試験２ （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.17**	**0.5**	**1.5**
母動物：	**TK**	NP	NP	NP	NP
	供試雌動物数	24	24	24	24
	死亡及び瀕死屠殺動物数	0	0	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	剖検所見	-	-	-	-
	投与期間				
	体重（%） [1), 2)]				
	D29	235 g	-3.4	-2.6	-5.1 [3)]
	体重増加量（g） [1)]				
	D1～D29	+32	+26	+26*	+20***
	摂餌量（%） [1), 2)]	g/動物/日			
	D1～D8	20	0.0	-5.0**	-10.0***
	D8～D15	20	-5.0	-5.0	-5.0*
	D15～D22	19	0.0	0.0	0.0
	D22～D29	19	0.0	0.0	-5.3
	休薬期間				
	体重（%） [1), 2)]				
	D50	247 g	-2.8	-2.8	-4.0

1) 投与終了時、休薬又は妊娠期間中の体重、体重増加量及び摂餌量を示す。

2) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

3) 投与の D18（$p<0.05$）及び D22（$p<0.01$）に統計学的に有意な体重減少が認められた。

*$p<0.05$、**$p<0.01$、***$p<0.001$（Dunnett 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day、NP＝実施せず、TK=トキシコキネティクス

2.6.7.12.B ラットを用いた受胎能回復性試験２ （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.17**	**0.5**	**1.5**
母動物：	休薬期間（続き）				
	体重増加量（g） [1]				
	D29～D50	+12	+12	+11	+13
	D1～D50	+44	+38	+36*	+33**
	摂餌量（%） [1), 2)]	g/動物/日			
	D29～D36	19	+5.3	0.0	+5.3
	D36～D43	19	+5.3	0.0	0.0
	D43～D50	19	0.0	-5.3	-5.3
	妊娠期間				
	評価雌動物数	21	22	19	22
	体重（%） [1), 2)]				
	交尾後 15 日	299 g	-2.3	-2.0	-4.0
	体重増加量（g） [1]				
	交尾後 0 日～15 日	+52	+51	+50	+48
	摂餌量（%） [1), 2)]	g/動物/日			
	交尾後 1 日～8 日	22	0.0	-4.5	-9.1
	交尾後 8 日～15 日	24	0.0	0.0	-4.1

[1] 投与終了時、休薬又は妊娠期間中の体重、体重増加量及び摂餌量を示す。

[2] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定）。

略語：D＝Day

2.6.7.12.B ラットを用いた受胎能回復性試験２ （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.17	0.5	1.5
母動物：	受胎能				
	平均交配所要日数	2.2	2.6	2.7	2.3
	交尾雌動物数	24	23	21	24
	妊娠雌動物数	21	22	19	22
	受胎率（%）	87.5	95.7	90.5	91.7
	生存胚が認められた雌動物数	21	22	19	22
	妊娠率（%）	100.0	100.0	100.0	100.0
	着床までの初期胚発生				
	平均黄体数	15.2	14.2	13.7	13.8
	平均着床数	12.6	13.0	12.3	12.3
	平均着床前胚死亡率（%）	16.5	7.6	9.5	10.5
	平均生存胚数	11.5	11.7	11.7	11.7
	平均吸収胚数	1.1	1.2	0.5	0.5
	死亡胚数	0	0	0	0
	平均着床後胚死亡率（%）	8.6	9.5	4.0	4.1

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol (E4): Oral (gavage) study of embryo-foetal development in the rat</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>試験計画：ICH 4.1.3 に準拠？ 適</td><td>投与期間：G6～G17</td><td>試験番号：ES-T03</td></tr>
<tr><td>動物種／系統： ラット／Wistar
（HsdHan™: WIST）</td><td>交尾成立日：G0</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-03</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：9～11 週齢</td><td>帝王切開日：G20</td><td rowspan="3">GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日</td><td>投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td>溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.06、0.2 又は 0.6 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：なし</td></tr>
<tr><td colspan="3">高用量の設定根拠： 用量設定試験である ES-T01 及び ES-T02 において、10 mg/kg/日以上における全胚・胎児死亡、並びに 3 mg/kg/日における着床後胚死亡率の上昇（TS 表 2.6.7.11）</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL： F_0 雌： 報告なし；0.3 mg/kg/日付近と推定
F_1 胎児： 0.3 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース、G＝妊娠日齢、NOAEL＝無毒性量、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
母体／雌動物：	**TK**	NP	NP	NP	NP
	供試動物数	24	24	24	24
	妊娠動物数	20	16	23	19
	死亡及び瀕死屠殺動物数	0	1 [1)]	0	4 [1)]
	流産あるいは全胚吸収母体数	1	1	1	7
	一般状態	-	-	-	-
	剖検所見				
	肥大；胎盤	0 / 19	1 / 15	3 / 22	4 / 8
	肥厚；胎盤	0 / 19	0 / 15	0 / 22	3 / 8
	体重（%） [2)]				
	G6 [3)]	207.6 g（207.3 g）	+1.1（+1.3）	+0.0（+0.2）	-1.0（+1.2）
	G17 [3)]	254.3 g（255.5 g）	-1.0（-1.0）	-4.8（-4.7）	-12.3（-4.5）
	G20 [3)]	280.5 g（283.0 g）	-0.6（-0.6）	-5.1（-5.1）	-14.（-3.5）
	体重増加量（g）				
	G6～G17 [3)]	+46.7（+48.2）	+41.9（+43.1）	+34.3*（+35.8）*	+17.5*（+34.2）*
	G17～G20 [3)]	+26.2（+27.5）	+27.0（+28.4）	+24.1（+25.0）	+17.5（+29.1）
	G6 からの総変化量 [4)]	+27.3	+29.2#	+18.1#	+12.9#

1) 0.3 mg/kg/日：G6 に瀕死屠殺；一般状態不良、腟の直腸への重度の癒着；この動物は妊娠動物数には含めなかった。
3 mg/kg/日：G14、G18（2 例）及び G20 に瀕死屠殺；一般状態不良、流産／流産の徴候

2) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

3) 妊娠した全ての雌のデータを示す。括弧内には、流産／全胚吸収が認められた雌を除く妊娠した雌のデータを示す。

4) 最終体重－妊娠子宮重量－G6 の体重。生存胎児が認められた雌のみ。

*p<0.05（Dunnett 検定）

#p<0.05（用量反応性の検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、G＝妊娠日齢、NP＝実施せず、TK＝トキシコキネティクス

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
母体／雌動物：	**摂餌量（%）** [1]	g/動物/日			
	G6～G16 [2]	20.2（20.1）	-7.4（-7.5）	-13.4***（-12.4）***	-28.2***（-21.4）***
	G17～G19 [2]	20.6（20.8）	+6.3（+5.8）#	-6.8（-6.7）#	-19.4**（-13.9）#
	妊娠子宮重量（%） [1]	48.4 g	-12.6	-10.5	+3.9
	平均黄体数	12.1	11.7	11.9	11.6
	平均着床数	9.9	9.0	8.5	10.3
	平均着床前胚死亡率（%）	17.5	22.9	29.5	12.5
胎児：	**評価母体数**	19	15	22	8
	平均胎児数	8.9	7.9	7.7	9.0
	生存胎児数	169	118	169	72
	死亡胎児数	0	0	0	1
	平均早期吸収胚数	1.1	1.0	0.8	1.1
	平均後期吸収胚数	0.0	0.1	0.0	0.0
	平均着床後胚死亡率（%）	10.3	11.9	9.9	16.4
	平均胎児体重（g）	3.49	3.41	3.43	3.10
	胎児の性比（%雄）	48.7	53.2	51.4	59.3

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 妊娠した全ての雌のデータを示す。括弧内には、流産／全胚吸収が認められた雌を除く妊娠した雌のデータを示す。

p<0.01、*p<0.001（Dunnett 検定）

#p<0.05（用量反応性の検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、G＝妊娠日齢

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
胎児：	**胎児の異常**				
	外表／内臓異常				
	形態異常				
	足関節、重度の屈曲				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（1.2）	2（2.8）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（9.1）[#]	2（25.0）[#]
	足関節、異常回転				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（1.2）	3（4.2）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（9.1）[#]	2（25.0）[#]
	髄膜瘤				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（1.4）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（12.5）
	口蓋裂				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	1（0.6）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	1（4.5）	0（0.0）
	横隔膜ヘルニア				
	胎児数（%）[1)]	1（0.6）	0（0.0）	0（0.0）	1（1.4）
	母体数（%）[1)]	1（5.3）	0（0.0）	0（0.0）	1（12.5）
	大脳半球及び頭頂／後頭部、重度の形成異常				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	1（0.6）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	1（4.5）	0（0.0）

[1)] 影響が認められた母体数について統計学的有意性を評価した。統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

[#]$p<0.05$（用量反応性の検定）

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
胎児：	形態異常（続き）				
	頭蓋顔面領域、重度の短縮				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	1（0.6）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	1（4.5）	0（0.0）
	鼻領域、重度の短縮				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（1.4）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（12.5）
	頸部、重度の浮腫				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（1.2）	1（1.4）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（9.1）	1（12.5）
	心房、重度の肥大				
	胎児数（%）[1)]	1（0.6）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	1（5.3）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	外表／内臓形態異常の合計				
	胎児数（母体数）	2（2）	0（0）	5（4）[#]	4（3）[#]
	変異	-	-	-	-
	外表／内臓変異の合計				
	胎児数（母体数）	90（19）	63（15）	95（21）	35（8）

[1)] 影響が認められた母体数について統計学的有意性を評価した。統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

[#]$p<0.05$（用量反応性の検定）

略語：－＝特記すべき所見なし

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
胎児：	**骨格異常**				
	形態異常				
	前肢、上腕骨肥厚				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	2（1.2）[2]	5（6.9）[2]
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	2（9.1）	4（50.0）**
	前肢、橈骨弯曲				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	3（4.2）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	2（25.0）
	前肢、橈骨及び尺骨の短縮				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（0.6）[3]	0（0.0）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（4.5）	0（0.0）
	後肢、大腿骨、腓骨及び脛骨の短縮、中足骨の欠損				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（0.6）[3]	0（0.0）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（4.5）	0（0.0）
	胸帯、肩甲骨の弯曲				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	3（1.8）[4]	5（6.9）[4]
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	3（13.6）	4（50.0）**
	胸帯、鎖骨の弯曲				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（1.4）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（12.5）

[1] 影響が認められた母体数について統計学的有意性を評価した。統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 1 及び 3 mg/kg/日両群の胎児 1 例では、短縮や捻転も認められた。

[3] 同一の胎児で、前肢や後肢の指の融合、欠損、又は境界が不明瞭な状態も認められ、外表検査では前肢及び後肢の短縮が認められた。

[4] 1 及び 3 mg/kg/日両群の胎児 1 例では、短縮も認められた。

**$p<0.01$（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
胎児：	形態異常（続き）				
	頭蓋、前上顎骨の重度の短縮、口蓋骨分離				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（0.6）	0（0.0）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（4.5）	0（0.0）
	頭蓋骨、下顎骨の短縮、矢状縫合の重度の拡大				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（1.4）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）	1（12.5）
	骨格形態異常の合計				
	胎児数（母体数）	0（0）	0（0）	3（3）	5（4）**
	変異				
	肋骨、結節形成				
	胎児数（%）[1]	21（12.4）	18（15.3）	42（24.9）	20（27.8）
	母体数（%）[1]	11（57.9）	9（60.0）	20（90.9）*	7（87.5）
	肋骨、波状肋骨				
	胎児数（%）[1]	2（1.2）	1（8.5）	6（3.6）	6（8.3）
	母体数（%）[1]	2（10.5）	1（6.7）	4（18.2）	4（50.0）*
	胸骨分節、不完全骨化				
	胎児数（%）[1]	33（19.5）	29（24.6）	33（19.5）	24（33.3）
	母体数（%）[1]	13（68.4）	10（66.7）	16（72.7）	8（100.0）*

[1] 影響が認められた母体数について統計学的有意性を評価した。統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.13.A ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.3**	**1**	**3**
胎児：	変異（続き）				
	胸骨分節、未骨化				
	胎児数（%）[1)]	10（5.9）	8（6.8）	16（9.5）	12（16.7）
	母体数（%）[1)]	7（36.8）	4（26.7）	10（45.5）	7（87.5）*
	骨格変異の合計				
	胎児数（母体数）	76（19）	60（15）	79（22）	34（8）
	形態異常が認められた総胎児数（母体数）	2（2）	0（0）	6（5）	8（6）**

1) 影響が認められた母体数について統計学的有意性を評価した。統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

*p<0.05、**p<0.01（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

<table>
<tr><td colspan="2">報告書の題名：Estetrol: Study for effects on embryo-fetal development by oral route (gavage) in rabbits</td><td>被験物質：エステトロール</td></tr>
<tr><td>試験計画：ICH 4.1.3 に準拠？ 適</td><td>投与期間：G6～G18</td><td>試験番号：ES-T19</td></tr>
<tr><td>動物種／系統： ウサギ／ KBL ニュージーランドホワイト</td><td>交尾成立日：G0</td><td>CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-05</td></tr>
<tr><td>試験開始週齢：18～20 週齢</td><td>帝王切開日：G29</td><td rowspan="3">GLP 適用：適</td></tr>
<tr><td rowspan="2">初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日</td><td>投与方法：経口（強制）</td></tr>
<tr><td>溶媒／投与形態： 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.05、0.15 又は 0.45 mg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="3">特記事項：
被験物質の水分含量が 5.5%であったため、1.06 の補正係数を投与液の調製に適用した。
0.45 mg/kg/日群：最初の 9 例で G16 から床敷に血液が認められたため、最後の 11 例及びサテライト群の全例に対しては、G6 から G15 までの間のみ投与した。投与期間を短縮しても妊娠転帰が改善しなかったため、高用量群のデータを、2 つのサブセットではなく、1 つの群として評価した。
投与開始時及び終了時に、エステトロール濃度分析のため、交配させたサテライト群（対照の 2 例又は投与した 4 例）から血漿を採取した。
G18 の投与後 0.5 又は 12 時間に採取した対照群の 4 例中 3 例の血漿から微量の被験物質が検出されたが、本試験の科学的信頼性への影響はないと判断した。</td></tr>
<tr><td colspan="3">高用量の設定根拠： 用量設定試験（ES-T16）において、0.6 mg/kg/日で着床数及び着床物のサイズの減少が認められたが、0.2 mg/kg/日では影響が認められなかったため（TS 表 2.6.7.11）</td></tr>
<tr><td colspan="3">NOAEL： F_0 雌： 0.05 mg/kg/日
F_1 胎児： 0.05 mg/kg/日</td></tr>
</table>

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース、G＝妊娠日齢、NOAEL＝無毒性量、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.05**	**0.15**	**0.45**	
母体／雌動物：	**妊娠した雌における TK**					
	単回投与：G6	LLOQ 未満（0.5 及び 12 時間）				
	$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）		4.19	19.7	50.8	
	C_{max} （ng/mL）		0.802	3.69	9.38	
	T_{max} （時間）		2.0	2.0	2.0	
	反復投与：G18 又は G15 [1]	62.2 pg/mL（0.5 時間）、19.7 pg/mL（12 時間）				
	$AUC_{0\text{-last}}$ （ng·hr/mL）		6.84 [2]	28.5 [2]	57.5 [2]	
	C_{max} （ng/mL）		0.925	4.14	4.17	
	T_{max} （時間）		2. 0	2.0	3.0	
					G18 [3]	G15 [3]
	供試雌動物数	20	20	20	9	11
	妊娠雌動物数	20	20	16	9	10
	死亡及び瀕死屠殺動物数	1 [4]	1 [4]	6 [4]	1 [4]	0
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	7 [5]	8 [5]	9
	一般状態					
	床敷中の血液	0	0	7	17	
	脱毛	0	0	4	4	
	削痩	0	0	1	8	
	無便	0	0	0	5	

[1] 0.05 及び 0.15 mg/kg/日群では G18、0.45 mg/kg/日群では G15。

[2] 投与間隔毎の $AUC_{0\text{-last}}$ を算出した。投与前値は投与後 24 時間値とした。

[3] G6～G18 又は G6～G15 に投与（2.6.7.13.B 参照）。

[4] 溶媒又は 0.05 mg/kg/日：投与過誤により G7 に死亡した状態で発見又は死亡。0.15 mg/kg/日：流産のため G21 又は G22 に早期屠殺に至った。0.45 mg/kg/日：過度の失血のため G21 に早期屠殺に至った。

[5] 流産又は過度の失血のため早期屠殺に至った雌を含む。

略語：$AUC_{0\text{-last}}$＝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、LLOQ＝定量下限値、TK＝トキシコキネティクス、T_{max}（中央値）＝C_{max} 到達時間

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
母体／雌動物：	**剖検所見**	-	-	-	-
	体重（%） [1]				
	G6 [2]	3460 g	-2	0	0
	G19 [2]	3683 g	-5	-7**	-13***
	G29	3890 g	-4	-5	-9***
	体重増加量（g）				
	G6～G19 [2]	+223	+134	-29***	-251***
	G19～G24	+84	+142*	+167*	+229***
	G24～G29	+123	+96	+85	+144
	G6 からの総変化量 [3]	-97	-127	-116	+58
	摂餌量（%） [1]	g/動物/日			
	G6～G9 [2]	165	-19*	-36***	-66***
	G9～G12 [2]	163	-18	-44***	-74***
	G12～G15 [2]	139	-18	-39**	-56***
	G15～G19 [2]	155	-8	-19	-41***
	G19～G24	129	+20*	+22	+24*
	G24～G29	120	+2	+5	+41***
	妊娠子宮重量（%） [1]	526.7 g	-5	-12	-24
	平均黄体数	11.6	11.3	11.7	12.5
	平均着床数	9.9	9.3	9.4	10.0
	平均着床前胚死亡率（%）	13.9	19.4	18.2	19.6

[1] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[2] 全妊娠例。流産／全胚吸収が認められた例を含む。

[3] 最終体重－妊娠子宮重量－G6 の体重。生存胎児を認めた例のみ。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001（Dunnett 検定）

略語：－=特記すべき所見なし、G＝妊娠日齢

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.05	0.15	0.45
胎児：	評価母体数	19	19	9	2
	平均胎児数	9.6	8.8	8.7	6.0
	生存胎児数	174	166	76	12###
	死亡胎児数	9	2	2	0
	平均早期吸収胚数	0.3	0.2	0.7	0.5
	平均後期吸収胚数	0.0	0.2	0.1	3.5***
	平均着床後胚死亡率（%）	7.0	6.2	10.6	37.4**
	平均胎児体重（g）	38.7	40.2	36.6	40.1
	胎児の性比（%雄）	51.4	47.9	40.6	37.5
	胎児の異常				
	外表異常	-	-	-	-
	外表形態異常の合計				
	胎児数（母体数）	2（2）	0（0）	0（0）	0（0）
	外表変異の合計				
	胎児数（母体数）	10（6）	2（2）	2（2）	0（0）
	内臓異常				
	形態異常				
	心臓壁の菲薄化				
	胎児数（%） 1)	1（0.6）	1（0.6）	0（0.0）	0（0.0）
	母体数（%） 1)	1（5.3）	1（5.3）	0（0.0）	0（0.0）

1) 統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

p<0.01、*p<0.001（Dunnett 検定）

###p<0.001（Fisher の直接確率検定）

略語：－＝特記すべき所見なし

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
胎児：	形態異常（続き）				
	食道背方大動脈弓				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（1.3）	0（0.0）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（11.1）	0（0.0）
	肺動脈幹狭窄				
	胎児数（%）[1]	1（0.6）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	母体数（%）[1]	1（5.3）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	過剰動脈				
	胎児数（%）[1]	2（1.1）	1（0.6）	0（0.0）	0（0.0）
	母体数（%）[1]	1（5.3）	1（5.3）	0（0.0）	0（0.0）
	内臓形態異常の合計				
	胎児数（母体数）	3（2）	2（2）	1（1）	0（0）
	変異	-	-	-	-
	内臓変異の合計				
	胎児数（母体数）	32（13）	16（10）	11（6）	1（1）
	骨格異常				
	形態異常				
	口蓋骨分離				
	胎児数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（1.3）	0（0.0）
	母体数（%）[1]	0（0.0）	0（0.0）	1（11.1）	0（0.0）

[1] 統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

略語：－＝特記すべき所見なし

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
胎児：	形態異常（続き）				
	頸椎椎体癒合				
	胎児数（%）[1)]	1（0.6）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	1（5.3）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	尾椎癒合又は配列異常				
	胎児数（%）[1)]	2（1.2）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	2（10.6）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
	胸骨分節癒合				
	胎児数（%）[1)]	1（0.6）	4（2.4）	3（3.9）	2（16.7）[#]
	母体数（%）[1)]	1（5.3）	1（5.3）	2（22.2）	1（50.0）
	骨格形態異常の合計				
	胎児数（母体数）	2（2）	4（1）	3（2）	2（1）
	変異				
	前頭骨不完全骨化				
	胎児数（%）[1)]	1（0.6）	0（0.0）	4（5.3）[#]	1（8.3）
	母体数（%）[1)]	1（5.3）	0（0.0）	3（33.3）	1（50.0）
	上後頭骨不完全骨化				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（2.6）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（22.2）	0（0.0）

[1)] 統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

[#]$p<0.05$（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
胎児：	変異（続き）				
	頭頂骨不完全骨化				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	3（3.9）[#]	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	3（33.3）[#]	0（0.0）
	頚椎椎体不完全骨化				
	胎児数（%）[1)]	5（2.9）	3（1.8）	5（6.6）	1（8.3）
	母体数（%）[1)]	5（26.3）	3（15.8）	4（44.4）	1（50.0）
	尾椎椎体未骨化				
	胎児数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（2.6）	0（0.0）
	母体数（%）[1)]	0（0.0）	0（0.0）	2（22.2）	0（0.0）
	前肢基節骨不完全骨化				
	胎児数（%）[1)]	2（1.1）	3（1.8）	6（7.9）[#]	1（8.3）
	母体数（%）[1)]	1（5.3）	2（10.5）	3（33.3）	1（50.0）
	前肢基節骨未骨化				
	胎児数（%）[1)]	2（1.1）	0（0.0）	4（5.3）	1（8.3）
	母体数（%）[1)]	2（10.5）	0（0.0）	3（33.3）	1（50.0）

[1)] 統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

[#]$p<0.05$（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.13.B ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.05**	**0.15**	**0.45**
胎児：	変異（続き）				
	後肢中節骨不完全骨化				
	胎児数（%）[1)]	4（2.3）	3（1.8）	5（6.6）	2（16.7）[#]
	母体数（%）[1)]	3（15.8）	3（15.8）	3（33.3）	1（50.0）
	後肢中節骨未骨化				
	胎児数（%）[1)]	2（1.1）	2（1.2）	6（7.9）[#]	1（8.3）
	母体数（%）[1)]	2（10.5）	2（10.5）	4（44.4）	1（50.0）
	過剰肋骨（第 13）				
	胎児数（%）[1)]	74（42.5）	107（64.5）[###]	54（71.1）[###]	6（50.0）
	母体数（%）[1)]	14（73.7）	18（94.7）	9（100.0）	2（100.0）
	骨格変異の合計				
	胎児数（母体数）	160（19）	159（19）	74（9）	12（2）
	形態異常が認められた総胎児数（母体数）	7（6）	5（2）	4（3）	2（1）
追加情報：	選択した動物の子宮、胎盤、卵巣の病理組織学的検査を実施した。 0.45 mg/kg：4/8 例では子宮内膜の間質がわずかに顕著であり、5/8 例では子宮内膜上皮の軽微な萎縮が認められた。2/8 例で軽微な限局性の出血性卵巣嚢胞が認められた。 0.15 mg/kg：1/8 例では子宮内膜の間質の増殖がより顕著であり、軽度な出血及び偽好酸球の浸潤、並びに上皮細胞の軽微な変性／アポトーシスを伴っていた。 剖検時に早期吸収、生存／死亡胎児が認められた対照群の胎盤と比較し、エステトロール投与群の雌の胎盤に有意な病理組織学的所見は認められなかった。				

1) 統計学的有意差は実測値に基づく（%ではない）。

[#]p<0.05、[###]p<0.001（Fisher の直接確率検定）

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

報告書の題名：Estetrol: Study for effects on pre- and post-natal development by oral route (gavage) in rats		**被験物質：エステトロール**
試験計画：ICH 4.1.2？に準拠 適	**投与期間：**交尾後 6～18 日＋分娩後 1～21 日	**試験番号：**Es0001-NC-003
動物種／系統： ラット／Wistar (RjHan: WI)	**交尾成立日：**交尾後 0 日	**CTD における記載箇所：**4.2.3.5.3-03
試験開始週齢：10 週齢	**投与方法：**経口（強制）	**GLP 適用：**適
初回投与年月日：20[redacted]年 [redacted]月 [redacted]日	**溶媒／投与形態：** 0.5%（w/v）CMC 水溶液中に 0、0.034、0.1 又は 0.3 mg/mL	
	同腹児数の調整／非調整： 可能であれば、分娩後 4 日に雄 4 例及び雌 4 例に調整	
特記事項：	• 被験物質の水分含量が 5.8%であったため、投与液調製の計算では補正係数 1.06 を適用した。 • 母動物の重篤な分娩への影響を避けるため、分娩予定日の直前に約 3 日間の休薬期間を設けた。	
高用量の設定根拠：	• 0.5 及び 1.5 mg/kg/日（交尾後 6 日～分娩後 21 日に投与）群で分娩困難又は全同腹児死亡により早期屠殺、1.5 mg/kg/日で赤／褐色の腟分泌物の発現率の上昇、用量依存的な体重（増加量）の減少、摂餌量の減少、死亡／喰殺出生児の発現率の上昇、分娩後 4 日生存率の低下、分娩後 1 日の出生児の体重減少（試験番号 Es0001-NC-001、TS 表 2.6.7.11） • 1.5 mg/kg/日（交尾後 6～18 日及び分娩後 1～4 日に投与）群の 1 例が交尾後 23 日に死亡、妊娠末期の死亡胎児が認められた。他の 1 例では分娩が 1 日遅れ、分娩後 4 日生存率が低下した（試験番号 Es0001-NC-009、TS 表 2.6.7.11）	
NOAEL： F_0 雌： 0.5 mg/kg/日（妊娠）及び 0.17 mg/kg/日（授乳） F_1 出生児： 0.17 mg/kg/日（分娩後 4 日の生存率）及び 1.5 mg/kg/日（分娩後 4 日以降の生存及び発達） F_1 雄： 1.5 mg/kg/日 F_1 雌： 1.5 mg/kg/日		

略語：CMC＝カルボキシメチルセルロース、NOAEL＝無毒性量、TS＝Tabulated Summary

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.17**	**0.5**	**1.5**
F_0 雌：	**TK**	NP	NP	NP	NP
	供試雌動物数	24	24	24	24
	妊娠雌動物数	20	17	19	17
	死亡及び瀕死屠殺動物数	0	0	2 [1)]	8 [1)]
	分娩後の生存雌動物数	20	17	18	11[#]
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0
	一般状態				
	妊娠中				
	四肢蒼白、接触時の冷感、立毛、自発運動の低下、虚脱、半眼／眼の蒼白	0	0	0	1 [2)]
	床敷中の血液	0	0	0	1 [2)]
	赤色膣分泌物	0	0	1	4 [2)]
	授乳中				
	四肢蒼白、接触時の冷感、立毛、自発運動の低下、呼吸困難、腹式呼吸、半眼／眼の蒼白、床敷中の胎盤	0	0	0	1 [2)]
	四肢蒼白、接触時の冷感、立毛、眼の蒼白	0	0	0	1
	赤色膣分泌物	0	0	1	0

1) 0.5 mg/kg/日：1 例が分娩中又は分娩直後に死亡、床敷中に生存出生児が 1 例認められた。他の 1 例は、同腹児死亡のため分娩後 2 日に早期屠殺
1.5 mg/kg/日：1 例は交尾後 17 日に早期屠殺（一般状態所見、並びに剖検時の副腎腫大、膵臓及び胸腺の浮腫）、2 例は分娩後 1 日に早期屠殺（床敷中の胎盤、同腹児死亡）、他の 5 例は交尾後 24 日又は 26 日に早期屠殺（分娩の欠如）。

2) 早期屠殺例を含む。

[#]$p<0.05$（Fisher の直接確率検定）

略語：NP＝実施せず、TK＝トキシコキネティクス

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**	**0.17**	**0.5**	**1.5**
F_0 雌：	**剖検所見**				
	漿液性の内容物による子宮角の拡張	0 / 20	0 / 17	0 / 17	2 / 9
	妊娠時体重（%） [1)]				
	交尾後 6 日	263 g	+0.4	+0.4	-1.1
	交尾後 20 日	380 g	-2.4	-4.5	-9.2
	妊娠時体重増加量（g）				
	交尾後 6 日～交尾後 20 日	+118	+107	+99*	+83***
	授乳時体重（%） [1)]				
	分娩後 1 日	292 g	-1.4	-5.1	-7.5
	分娩後 21 日	333 g	-2.1	-5.1 [2)]	-7.5 [2)]
	授乳時体重増加量（g）				
	分娩後 1 日～分娩後 21 日	+41	+38	+38	+39
	妊娠時摂餌量（%） [1)]	g/動物/日			
	交尾後 6 日～交尾後 9 日	23	-4.3	-13.0**	-26.1***
	交尾後 9 日～交尾後 12 日	24	-4.2	-12.5*	-20.8***
	交尾後 12 日～交尾後 15 日	26	-3.8	-15.4***	-15.4***
	交尾後 15 日～交尾後 20 日	30	+0.0	-6.7*	-13.3***
	授乳時摂餌量（%） [1)]				
	分娩後 1 日～分娩後 7 日	39	-2.6	-7.7	-28.2***
	分娩後 7 日～分娩後 14 日	62	-4.8	-8.1	-24.2**
	分娩後 14 日～分娩後 21 日	76	-1.3	-1.3	-21.1*

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 授乳期間中の複数の時点で、0.5 mg/kg/日群では最大－8%、1.5 mg/kg/日では最大－12%の統計学的に有意な体重の減少が認められた。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001（Dunnett 検定）

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）		0.17		0.5		1.5	
F_0 雌：	平均妊娠期間	21.5		21.3		21.5		21.8	
	異常分娩	0		0		2 [1)]		8 [1)]	
	生存出生児が認められた雌動物数	20		17		18		11##	
	死産児を有する母体数	0		0		0		0	
	分娩後 4 日までに全胚死亡／喰殺が認められた母体数	0		0		1		2	
F_1 出生児：（離乳前）	評価母体数	20		17		18		11	
	平均出生児数／腹	10.6		10.5		10.5		6.7*	
	平均生存出生児数／腹	10.6		10.5		10.5		6.7*	
	平均死産児数／腹	0		0		0		0	
	分娩後 1 日～分娩後 4 日に死亡／喰殺／屠殺となった出生児数	14 / 211		5 / 178		16 / 189 [2)]		20 / 74#	
	出生後生存率（%）								
	分娩後 1 日～分娩後 4 日	93.4		97.2		91.5		73.0###	
	分娩後 4 日～分娩後 21 日	99.3		100		99.2		100	
	出生児一般状態	-		-		-		-	
	出生児剖検所見	-		-		-		-	
	出生児体重（g）	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	分娩後 1 日	7.2	6.9	7.1	6.7	6.9	6.6	6.6	6.1
	分娩後 4 日（同腹児数調整前）	11.2	10.8	10.8	10.5	10.7	10.5	10.9	10.0
	分娩後 21 日	56.5	54.6	52.3	51.0	53.6	51.5	52.3	48.5

1) 死亡及び早期屠殺は、分娩困難によるものであった。

2) 1 同腹児を全て含む。

*p<0.05（Dunnett 検定）

##p<0.01、###p<0.001（Fisher の直接確率検定）

略語：－＝特記すべき所見なし

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		**0（対照）**		**0.17**		**0.5**		**1.5**	
F_1 出生児：（離乳前）	**出生児体重増加量（g）**	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	分娩後 1 日～分娩後 4 日	+3.9	+3.9	+3.7	+3.8	+3.9	+3.8	+4.3	+3.9
	分娩後 4 日～分娩後 21 日	+45.3	+43.7	+41.5	+40.5	+42.9	+41.0	+41.1	+38.5
	出生児性比（%雄）	46.4		47.2		50.3		43.1	
	肛門生殖突起間距離（mm）	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	分娩後 4 日（同腹児数調整前）	6.79	4.18	7.35**	4.52**	6.96	4.29	7.15	4.26
	身体的及び反射発達 [1]	-		-		-		-	
F_1 雄（離乳後）	**離乳後評価動物数**	20		20		20		20	
	死亡又は瀕死屠殺動物数	1 [2]		0		0		0	
	一般状態	-		-		-		-	
	剖検所見	-		-		-		-	
	体重（%） [3]								
	D1	61		-3.3		-4.9		-8.2	
	D64	459		-5.7		-7.8*		-8.5**	
	体重増加量（g） [4]								
	D1～D64	+398		+374		+365*		+365**	

[1] 耳介開展、毛生開始、切歯萌出、眼瞼開裂、平面立ち直り反応、断崖回避、空中立ち直り反応

[2] 分娩後 25 日に死亡、補充された。

[3] 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

[4] 離乳から交配まで。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定）

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.17	0.5	1.5
F_1 雄（離乳後）	摂餌量（%） [1), 2)]				
	D1～D8	14	-7.1	-7.1	+0.0
	D15～D22	29	+20.7	-6.9	-6.9
	D29～D36	32	-6.3	-6.3*	-6.3*
	D43～D50	34	-5.9	-5.9*	-8.8**
	D57～D64	32	-6.3	-6.3	-6.3
	包皮の分離（日数）	51.0	50.4	50.9	52.3
	感覚機能	-	-	-	-
	運動機能	-	-	-	-
	学習及び記憶	-	-	-	-
	平均交配所要日数	2.7	3.8	2.1	1.9
	交尾動物数	19	18	17	20
	授胎動物数	18	14	14	18
F_1 雌（離乳後）	離乳後評価動物数	20	20	20	20
	死亡又は瀕死屠殺動物数	1 [3)]	1 [3)]	3 [3)]	0
	一般状態	-	-	-	-
	剖検所見	-	-	-	-
	交配前体重（%） [1)]				
	D1	58 g	-5.2	-3.4	-8.6
	D64	255 g	+0.7	+2.0	-2.4
	交配前体重増加量（g） [2)]				
	D1～D64	+197	+203	+204	+196

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 離乳から交配まで。

3) 交尾が確認されなかった雌 5 例は、妊娠が疑われたため屠殺した。

*p<0.05、**p<0.01（Dunnett 検定）； 略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.17	0.5	1.5
F_1雌（離乳後）	妊娠時体重（%）[1]				
	交尾後 0 日	270 g	+1.1	+2.2	-3.3
	交尾後 15 日	343 g	+0.6	-0.3	-2.9
	妊娠時体重増加量（g）				
	交尾後 0 日～交尾後 15 日	+73	+71	+66	+72
	交配前摂餌量（%）[1), 2)]	g/動物/日			
	D1～D8	12	+0.0	+0.0	+0.0
	D15～D22	22	+0.0	-4.5	-4.5
	D29～D36	22	+0.0	+0.0	-4.5
	D43～D50	21	+4.8	+4.8	+0.0
	D57～D64	22	+0.0	-4.5	-4.5
	妊娠時摂餌量（%）[1]	g/動物/日			
	交尾後 0 日～交尾後 8 日	24	+0.0	-4.2	-4.2
	交尾後 8 日～交尾後 15 日	26	+0.0	+0.0	+0.0
	膣開口までの平均日齢（日数）	33.2	34.5	32.7	32.6
	感覚機能	-	-	-	-
	運動機能	-	-	-	-
	学習及び記憶	-	-	-	-
	平均交配所要日数	2.7	3.8	2.1	1.9
	精子が確認された雌動物数	20	20	20	20
	妊娠動物数	19	14	17	18
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	1

1) 対照群は平均値、投与群は対照群との差（%）を示す。統計学的有意性は実測値に基づく（%ではない）。

2) 離乳から交配まで。

略語：－＝特記すべき所見なし、D＝Day

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

被験物質：エステトロール

投与量（mg/kg）：		0（対照）	0.17	0.5	1.5
F_1雌（離乳後）	平均黄体数	15.8	15.9	15.1	14.9
	平均着床数	13.7	13.8	12.9	13.3
	平均着床前胚死亡率（%）	12.3	14.2	14.5	12.7
F_2胎児	平均生存胚数／腹	12.9	12.9	11.5	12.8
	平均吸収胚数	0.8	0.8	1.4	0.4
	死亡胚数	0	0	0	0
	平均着床後胚死亡率（%）	6.3	7.8	11.7	7.8
	胎児体重（g）	ND	ND	ND	ND
	胎児の性比（%雄）	ND	ND	ND	ND
	胎児の異常	ND	ND	ND	ND

略語：ND＝判定せず

2.6.7.15 新生児を用いた試験

被験物質：エステトロール

新生児を用いた試験は実施していない。

2.6.7.16 局所刺激性試験

被験物質：エステトロール

局所刺激性については反復投与毒性試験で評価し、独立した試験としては実施していない。

2.6.7.17 その他の毒性試験

被験物質：エステトロール

試験の種類／ 動物種／系統	投与方法	曝露期間	濃度（μM）	特記すべき所見	試験番号
活性酸素種の誘導					
L5178Y *TK*$^{+/-}$マウス リンパ腫細胞	*In vitro*	3 時間 [1)]	実験 1～3 溶媒： 0［PBS 中に 1%（v/v）EtOH］ エステトロール： 1、10、50、100、 1000 [2)]、3000 μM [2)] 乳酸塩 [3)]： 1、10、50、100 μM H_2O_2 [3)]： 1、10、50、100 μM	エステトロールは全ての実験において細胞内 ROS 濃度を用量依存的に低下させた。 乳酸塩は、いずれの実験においても細胞内 ROS 濃度に影響を及ぼさなかった。 H_2O_2 は、100 μM の濃度で細胞内 ROS 濃度の有意な増加を誘発し、実験 1 では 122%、実験 2 では 400%、実験 3 では 125%の増加が認められた。	ES-T44
不純物の毒性試験	エステトロール原薬中の DNA 反応性（変異原性）不純物について、ICH M7 ガイドラインに従って、データベース及び文献検索、ならびに(Q)SAR［統計ベース（CAESAR、バージョン 2.1.13）及びエキスパートルールベース（TOXTREE、バージョン 3.1.0)］を用いてがん原性及び変異原性を評価し、管理戦略を策定した。潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、モジュール 2.3.S.3.2、2.6.6.8、3.2.S.3.2 及び原薬等登録原簿エステトロール水和物（登録番号：[redacted]、登録年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に記載されている。			
光毒性試験	いずれの動物試験においても、光毒性の症状は認められていない。エステトロールは光に曝露される組織への分布が比較的弱く、メラニン含有構造における長時間の滞留は認められないため、光毒性試験は不要と考えられた（モジュール 2.4 参照)。				

1) 3 時間の曝露後、細胞を ROS 試薬と 1.5 時間培養した。0.1%（w/v）トリパンブルーで背景蛍光をクエンチングした後、蛍光を測定した（励起波長 492 nm、蛍光波長 520 nm)。測定値は細胞自家蛍光について補正した。

2) 実施可能な最高濃度は 3000 μM であった。1000 及び 3000 μM のエステトロール濃度を試験したのは、実験 3 のみである。

3) 乳酸塩：ROS 誘導の陰性対照、H_2O_2：ROS 誘導の陽性対照（実験 2 では 1 及び 50 μM は試験しなかった)。

略語： EtOH＝エタノール、[redacted]、H_2O_2＝過酸化水素、
ICH M7＝潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理、PBS＝リン酸緩衝生理食塩水、
(Q)SAR［(Quantitative) Structure-Activity Relationship］＝定量的構造活性相関、ROS＝活性酸素種

2.6.7.17 その他の毒性試験 （続き）

被験物質：ドロスピレノン

不純物の毒性試験	[redacted]製ドロスピレノン原薬中の DNA 反応性（変異原性）不純物について、ICH M7 ガイドラインに従って、 (Q)SAR［統計ベース（CAESAR、バージョン 2.1.13）及びエキスパートルールベース（TOXTREE、バージョン 3.1.0)］を用いてがん原性及び変異原性を評価し、管理戦略を策定した。また、[redacted]製ドロスピレノン原薬の製造における出発物質、製造試薬、中間体及び反応副生成物について、ICH M7 ガイドラインに従って、(Q)SAR［統計ベース（Sarah Nexus）及びエキスパートルールベース（Derek Nexus)］を用いて、不純物の変異原性及びがん原性を評価し、管理戦略を策定した。 潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、モジュール 2.3.S.3.2、2.6.6.8、3.2.S.3.2、原薬等登録原簿ドロスピレノン「[redacted]」（登録番号：[redacted]、登録年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日）及び原薬等登録原簿ドロスピレノン（登録番号：[redacted]、登録年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に記載されている。

略語： [redacted]、ICH M7＝潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理、
(Q)SAR［(Quantitative) Structure-Activity Relationship］＝定量的構造活性相関、[redacted]