ボルズィ錠 2.5mg
ボルズィ錠 5mg
ボルズィ錠 10mg

CTD 第 2 部

2.4 非臨床試験の概括評価

大正製薬株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概要 4
2.4.1.1 薬理試験 4
2.4.1.2 薬物動態試験 5
2.4.1.3 毒性試験 6
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 8
2.4.2.3 安全性薬理試験 8
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 9
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 吸収 10
2.4.3.2 分布 10
2.4.3.3 代謝 11
2.4.3.4 排泄 11
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 11
2.4.4 毒性試験 13
2.4.4.1 単回投与毒性試験 13
2.4.4.2 反復投与毒性試験 13
2.4.4.3 遺伝毒性試験 14
2.4.4.4 がん原性試験 14
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 14
2.4.4.6 局所刺激性試験 15
2.4.4.7 その他の毒性試験 16
2.4.5 総括及び結論 17
2.4.5.1 薬理試験 17
2.4.5.2 薬物動態試験 17
2.4.5.3 毒性試験 18
2.4.5.4 結論 19
2.4.6 参考文献 20

表

表 2.4-1 効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験一覧 4
表 2.4-2 安全性薬理試験一覧 5
表 2.4-3 薬物動態試験一覧 5
表 2.4-4 毒性試験一覧 7

略号一覧

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-2h}	AUC from time 0 to 2 hours	投与後 2 時間までの AUC
AUC_{0-24h}	AUC from time 0 to 24 hours	投与後 24 時間までの AUC
$AUC_{0-24h_unbound}$	AUC_{0-24h} of unbound form	非結合型の AUC_{0-24h}
$AUC_{0-\infty}$	AUC extrapolated to infinity	無限大（∞）時間までの AUC
$AUC_{0-\infty_unbound}$	$AUC_{0-\infty}$ of unbound form	非結合型の $AUC_{0-\infty}$
BA	bioavailability	生物学的利用率
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性タンパク質
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
GLP	Good Laboratory Practice	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
HDL	high density lipoprotein	高密度リポ蛋白質
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
K_b	the equilibrium dissociation constant of a ligand determined by means of a functional assay	機能性試験から算出した平衡解離定数
K_i	the equilibrium dissociation constant of a ligand determined in inhibition studies	結合阻害定数
LDL	low density lipoprotein	低密度リポ蛋白質
MATE	multidrug toxic compounds extrusion	－
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
Tg rasH2	CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic	—
UVB	ultraviolet B	紫外線 B

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概要

ボルノレキサント水和物は選択的 OX_1 及び OX_2 受容体アンタゴニストである。オレキシン（オレキシン A 及びオレキシン B）は、神経細胞に発現するオレキシン受容体を刺激し、覚醒持続に関与している。ボルノレキサント水和物はこの刺激を遮断することで、不眠症患者の覚醒から睡眠への移行を促す不眠症治療薬として期待される。ボルノレキサント水和物の薬理、薬物動態及び毒性を評価するために、以下に示す非臨床試験を計画した。

なお、非臨床試験では、ボルノレキサント（無水物）としての濃度及び投与量で表記した。

2.4.1.1　薬理試験

ボルノレキサント水和物の薬理作用を評価するため、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した。

効力を裏付ける試験の *in vitro* 試験では、ボルノレキサント水和物の OX_1 及び OX_2 受容体に対する結合親和性及びアゴニスト／アンタゴニスト作用を評価した。*in vivo* 試験では、ラットの脳波及び筋電図測定により、ボルノレキサント水和物の睡眠誘発作用を評価した。

副次的薬理試験の *in vitro* 試験では、ボルノレキサント水和物の OX_1 及び OX_2 受容体に対する選択性を検証するため、90 種の標的分子（受容体、トランスポーター及びイオンチャネル）に対する結合性を評価した。*in vivo* 試験では、ラットの回転棒試験によりボルノレキサント水和物の協調運動機能に対する影響を評価した。

ボルノレキサントの代謝物である M1 及び M3 について、未変化体と同様に結合親和性及びアゴニスト／アンタゴニスト作用を評価した。また、ヒトの主要代謝物である M3 については、ラットの睡眠誘発作用及び選択性を評価した。

以下に、実施した効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の一覧を示す。

表 2.4-1　効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	被験物質
効力を裏付ける試験			
OX_1 及び OX_2 受容体に対する結合親和性	膜標品	*in vitro*	ボルノレキサント水和物、M1 及び M3
OX_1 及び OX_2 受容体に対するアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用	細胞	*in vitro*	ボルノレキサント水和物、M1 及び M3
睡眠に対する作用	ラット	経口	ボルノレキサント水和物及び M3
副次的薬理試験			
各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する結合性	膜標品	*in vitro*	ボルノレキサント水和物及び M3
協調運動機能に対する作用	ラット	経口	ボルノレキサント水和物

安全性薬理の評価として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を検討した。いずれも医薬品 GLP 適用下で、安全性薬理試験ガイドラインに準拠して実施した。

以下に、実施した安全性薬理試験の一覧を示す。

表 2.4-2　安全性薬理試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	GLP 適用
中枢神経系 一般症状及び行動（Irwin 変法）	ラット	経口	適用
心血管系 hERG 電流 （ホールセルパッチクランプ法） 血圧、心拍数、心電図 （テレメトリー法）	細胞 イヌ	*in vitro* 経口	適用 適用
呼吸系 呼吸数、1 回換気量、分時換気量 （whole body plethysmography 法）	ラット	経口	適用

2.4.1.2　薬物動態試験

ボルノレキサント水和物の吸収、分布、代謝及び排泄を明らかにするため、[^{14}C]標識体又は非標識体を用いて、*in vivo* 及び *in vitro* 試験を実施した。

吸収に関しては、ラット及びイヌを用いて BA 及び血漿中未変化体濃度推移を検討した。分布に関しては、ラットを用いて組織分布、胎児への移行を検討し、*in vitro* で血漿蛋白結合率及び血球移行率を評価した。代謝に関しては、ラット及びイヌを用いて血漿及び排泄物中の代謝物を定性的及び定量的に検討した。さらに、凍結肝細胞を用いて動物及びヒトの *in vitro* 代謝プロファイルを、また、ヒト肝ミクロソーム及び CYP 発現系ミクロソームを用いてヒトにおけるボルノレキサントの代謝に寄与する酵素について検討した。排泄に関しては、ラット及びイヌを用いて尿、糞及び胆汁中への排泄、ラットを用いて乳汁移行を検討した。

臨床での薬物動態学的薬物相互作用の可能性を *in vitro* にて評価するため、ヒト肝ミクロソーム、凍結肝細胞及び薬物トランスポーター発現細胞を用いて、ボルノレキサント及び M3 のヒト CYP に対する阻害及び誘導作用並びに薬物トランスポーターに対する基質性及び阻害作用を検討した。

以下に実施した薬物動態試験の一覧を示す。

表 2.4-3　薬物動態試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	被験物質
吸収			
単回投与（標識体）	ラット	経口 静脈内	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
	イヌ	経口 静脈内	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
単回投与（非標識体）	ラット	経口 静脈内	ボルノレキサント水和物
	イヌ	経口 静脈内	ボルノレキサント水和物

表 2.4-3　薬物動態試験一覧（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	被験物質
反復投与（非標識体）	ラット	経口	ボルノレキサント水和物
	イヌ	経口	ボルノレキサント水和物
分布			
単回投与後の組織中放射能濃度	有色ラット	経口	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
蛋白結合	マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ヒト血漿	*in vitro*	[^{14}C]ボルノレキサント水和物及び M3
	ヒト血漿中結合蛋白種	*in vitro*	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
血球移行	ヒト血液	*in vitro*	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
中枢移行	ラット	経口	ボルノレキサント水和物及び M3
胎盤通過・胎児移行	妊娠ラット	経口	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
代謝			
in vivo 代謝	ラット	経口	[^{14}C]ボルノレキサント水和物及びボルノレキサント水和物
	イヌ	経口	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
in vitro 代謝	ラット、イヌ、ヒト凍結肝細胞	*in vitro*	[^{14}C]ボルノレキサント水和物及びボルノレキサント水和物
CYP 分子種推定	ヒト CYP 発現系ミクロソーム、ヒト肝ミクロソーム	*in vitro*	[^{14}C]ボルノレキサント水和物及び M3
排泄			
単回投与後の尿糞中排泄	ラット	経口 静脈内	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
	イヌ	経口 静脈内	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
単回投与後の胆汁中排泄	ラット	経口 静脈内	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
乳汁移行	授乳期ラット	経口	[^{14}C]ボルノレキサント水和物
薬物動態学的薬物相互作用			
CYP 阻害	ヒト肝ミクロソーム	*in vitro*	ボルノレキサント水和物及び M3
CYP 誘導	ヒト初代培養凍結肝細胞	*in vitro*	ボルノレキサント水和物及び M3
P-gp、BCRP、OATP 基質性	ヒトトランスポーター発現細胞	*in vitro*	[^{14}C]ボルノレキサント水和物及び M3
P-gp、BCRP、OATP、OAT、OCT、MATE 阻害	ヒトトランスポーター発現細胞	*in vitro*	ボルノレキサント水和物及び M3

2.4.1.3　毒性試験

ボルノレキサント水和物の安全性を評価するため、主要な試験としてラット反復経口投与毒性試験（1 カ月間及び 26 週間）、イヌ反復経口投与毒性試験（1 カ月間、13 及び 39 週間）、遺伝毒性試験（復帰突然変異試験、*in vitro* 小核試験及びラット小核試験）、がん原性試験（ラット及び Tg rasH2 マウス）、生殖発生毒性試験（ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試

験、ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験、ラット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）、依存性試験及び光安全性試験を実施した。

主要な試験は医薬品 GLP に準拠し、試験法は安全性評価に関する ICH ガイドライン、OECD ガイドライン及び厚生労働省通知に従って実施した。

以下に、実施した毒性試験の一覧を示す。

表 2.4-4　毒性試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	GLP 適用
単回投与毒性試験	ラット	経口	非適用
	イヌ	経口	非適用
反復投与毒性試験			
7 日間	ラット	経口	非適用
1 カ月間	ラット	経口	適用
26 週間	ラット	経口	適用
7 日間	イヌ	経口	非適用
1 カ月間	イヌ	経口	適用
13 週間	イヌ	経口	適用
39 週間	イヌ	経口	適用
遺伝毒性試験			
復帰突然変異試験	*Salmonella typhimurium*、*Escherichia coli*	*in vitro*	適用
in vitro 小核試験	細胞	*in vitro*	適用
in vivo 小核試験 [a)]	ラット	経口	非適用
in vivo 小核試験	ラット	経口	適用
がん原性試験			
24 カ月間	ラット	経口	適用
7 日間	マウス	経口	非適用
4 週間	Tg rasH2 マウス	経口	適用
26 週間	Tg rasH2 マウス	経口	適用
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	ラット	経口	適用
胚・胎児発生に関する試験			
予備試験	ラット	経口	適用
本試験	ラット	経口	適用
用量設定試験	ウサギ	経口	非適用
予備試験	ウサギ	経口	適用
本試験	ウサギ	経口	適用
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	ラット	経口	適用
その他の毒性試験			
依存性試験			
用量設定試験	ラット	静脈内	非適用
自己投与試験	ラット	静脈内	適用
光安全性試験			
光反応性試験（ROS assay）	－	*in chemico*	適用

a) 7 日間反復投与毒性試験に組込み

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

膜標品を用いた結合親和性評価において、ボルノレキサント水和物はヒトの OX_1 及び OX_2 受容体に対する放射性リガンド結合を阻害し、その K_i 値はそれぞれ 0.460 及び 0.374 nmol/L であった。OX_1 及び OX_2 受容体発現細胞を用いた機能性評価において、ボルノレキサント水和物はオレキシン受容体作動性ペプチドによる細胞内カルシウム濃度上昇に対してアンタゴニスト作用を示し、ヒトの OX_1 及び OX_2 受容体の K_b 値はそれぞれ 0.67 及び 0.84 nmol/L であった。同様にボルノレキサント水和物はラットの OX_1 及び OX_2 受容体に対してもアンタゴニスト作用を示し、その K_b 値はそれぞれ 0.44 及び 0.80 nmol/L であった。一方、ボルノレキサント水和物はヒトの OX_1 及び OX_2 受容体に対してアゴニスト作用を示さなかった。

ラットを用いた睡眠に対する評価において、ボルノレキサント水和物の 1 mg/kg 以上の経口投与により入眠潜時が短縮するとともにノンレム睡眠及び総睡眠割合が増加し、3 mg/kg 以上の経口投与ではレム睡眠割合が増加した。

ボルノレキサントの代謝物 M1 及び M3 は、ヒト又はラットの OX_1 及び OX_2 受容体に対してボルノレキサント水和物よりも低い結合親和性及び弱いアンタゴニスト作用を示した。また、M3 の 10 mg/kg の経口投与によりラットの入眠潜時が短縮するとともにレム睡眠割合が増加した。

2.4.2.2 副次的薬理試験

ボルノレキサント水和物の 90 種類の標的分子（受容体、トランスポーター及びイオンチャネル）に対する放射性リガンド結合性評価において、1 μmol/L の濃度で 50%以上の結合阻害が認められたのは NK_1 受容体のみで、10 μmol/L の濃度で 50%以上の結合阻害が認められたのはドパミントランスポーター、NK_1 及びシグマ 2 受容体であった。NK_1 受容体に対するボルノレキサント水和物の IC_{50} 値は 784 nmol/L であった。また、M3 の 90 種類の標的分子（受容体、トランスポーター及びイオンチャネル）に対する放射性リガンド結合性評価において、1 μmol/L の濃度で 50%以上の結合阻害が認められた標的分子はなく、10 μmol/L の濃度で 50%以上の結合阻害が認められたのは NK_1 受容体のみであった。

回転棒試験の協調運動機能の評価において、ボルノレキサント水和物単独の経口投与は 30 mg/kg の用量までラットの回転棒上の滞在時間に影響を及ぼさず、協調運動機能に対して影響を認めなかった。また、無作用用量のエタノール存在下でボルノレキサント水和物の 30 mg/kg 経口投与は、ラットの回転棒上の滞在時間に影響を及ぼさず、協調運動機能に対してエタノールとの相互作用は認められなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対するボルノレキサント水和物の影響を評価した。

中枢神経系では、ボルノレキサント水和物を 0、100、300 及び 1000 mg/kg の用量でラットに単回経口投与し、Irwin 変法により一般症状及び行動への影響を評価した。300 mg/kg 以上で睡眠誘発作用に関連した姿勢異常が認められたが、100 mg/kg では一般症状及び行動に影響を及ぼさなかった。

心血管系では、hERG 電流への影響及びイヌにおける血圧、心拍数及び心電図への影響を評価した。hERG 発現細胞にボルノレキサント水和物を 0、3、10 及び 30 μmol/L の濃度で処理した結果、30 μmol/L で hERG 電流の抑制作用が認められたが、10 μmol/L まで hERG 電流に影響を及ぼさなかった。また、無麻酔・非拘束下のイヌにボルノレキサント水和物を 0、0.4、2 及び 10 mg/kg の用量で漸増法により単回経口投与し、血圧、心拍数及び心電図を測定した。0.4 mg/kg 以上で QT 間隔及び QTc の延長並びに睡眠行動の頻度の増加、2 mg/kg 以上で心拍数の低下が認められた。QT 間隔、QTc 及び心拍数の変化に血漿中未変化体濃度との相関性及び用量反応性が認められなかったこと、一般状態においてボルノレキサント水和物投与により睡眠行動が高頻度に認められたことから、ボルノレキサント水和物投与に関連した直接的な変化ではなく、睡眠行動に関連した二次的変化と考えられた。

呼吸系では、ボルノレキサント水和物を 0、100、300 及び 1000 mg/kg の用量でラットに単回経口投与し、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に対する影響を評価した。ボルノレキサント水和物は 1000 mg/kg まで呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

雄性ラットに[pyrazole ring-^{14}C]ボルノレキサント水和物又は[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（各 3 mg/kg）したときの吸収は速やかで、放射能の経口吸収率はそれぞれ 83.7 及び 78.6%であった。雄性イヌに[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（3 mg/kg）したときの吸収は速やかで、放射能の経口吸収率は 74.9%であった。

雌雄ラット及び雄性イヌにボルノレキサント水和物を単回経口投与（3 mg/kg）したときの血漿中未変化体濃度は、ラットでは投与後 1 時間以内に C_{max} に達し、その後は雄性及び雌性ラットでそれぞれ 0.96 及び 0.75 時間の $t_{1/2}$ で消失し、イヌでは 1.5 時間以内に C_{max} に達し、2.7 時間の $t_{1/2}$ で消失した。BA は雄性ラットで 7.6%、雌性ラットで 33.3%、イヌで 58.0%であった。

雌雄ラットにボルノレキサント水和物を 26 週間反復経口投与（雄：300、1000 及び 1500 mg/kg、雌：30、100 及び 300 mg/kg）及び雌雄イヌに 39 週間反復経口投与（60、300 及び 1000 mg/kg）したとき、いずれも血漿中未変化体及び代謝物（M1 及び M3）の曝露量は投与量の増加に伴い概ね増加した。300 mg/kg の投与量において雌性ラットの血漿中未変化体及び代謝物の曝露量は雄性ラットに比べて高かったが、イヌではこれら曝露量に性差は認められなかった。ラット及びイヌいずれも反復投与による曝露量への大きな影響は認められなかった。

2.4.3.2 分布

雄性有色ラットに[pyrazole ring-^{14}C]ボルノレキサント水和物又は[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（各 3 mg/kg）したときの組織中放射能濃度は、大部分の組織において投与後 0.5 時間に最高濃度に達したのち速やかに減少し、投与後 24 時間では肝臓、腎臓及び有色皮膚においてのみ放射能が検出され、それ以外の組織において放射能は検出されなかった。また、投与後 336 時間では全ての組織において放射能は検出されなかった。

[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント（水和物として 0.05～20 μg/mL）の *in vitro* 血漿蛋白結合率は、マウスで 91.6～92.9%、ラットで 89.4～92.6%、ウサギで 86.6～88.4%、イヌで 93.6～97.7%、ヒトで 89.4～96.3%であった。また、ヒト血漿中において[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサントはヒト血清アルブミン、α_1-酸性糖蛋白、LDL 及び HDL のいずれの蛋白質にも結合し、α_1-酸性糖蛋白に最も高率に結合した。ヒトにおける[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント（水和物として 0.05～20 μg/mL）の血液／血漿中濃度比は 0.568～0.845 であった。

雄性ラットにボルノレキサント水和物を単回経口投与（3 mg/kg）したときの脳及び CSF 中未変化体濃度は、いずれも投与後 1 時間で C_{max} に達したのち、血漿中濃度と同様の推移で消失した。また、脳及び CSF 中の未変化体の $AUC_{0\text{-}2h}$ は、血漿中未変化体の $AUC_{0\text{-}2h}$ に比べそれぞれ 0.158 及び 0.0436 倍であった。

妊娠ラットに[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（3 mg/kg）したときの胎児組織中放射能濃度は、母体血液の 0.222～1.89 倍であり、胎児への放射能の移行が確認された。

2.4.3.3 代謝

ラット、イヌ及びヒトの *in vitro* 試料及びラット及びイヌの *in vivo* 試料から 31 種類の代謝物が同定又は推定された。ボルノレキサントは、メチルフェニル部位のメチル基の酸化、オキサアジナン環の脱水素化、オキサアジナン環の酸化的開環及びそれに続くアミド部位 *N*-α 位における開裂又はオキサアジナン部位の脱アルキル化、ピラゾール環 *N*-α 位における酸化的開裂、及びグルクロン酸又はシステインの抱合などにより広範に代謝された。ヒト特異的な代謝物は認められなかった。

[pyrazole ring-^{14}C]ボルノレキサント水和物又は[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物をラット、イヌに単回経口投与（各 3 mg/kg）したとき、血漿中放射能の主要な成分は、ラットでは M10、イヌでは未変化体であった。また、ラット及びイヌの尿及び糞中に未変化体は検出されなかった。

ヒト CYP 発現系ミクロソームによる代謝試験及び CYP 分子種選択的阻害剤によるヒト肝ミクロソーム代謝に対する阻害試験の結果から、ヒトにおけるボルノレキサントの代謝には主に CYP3A4 が、その他 CYP2C8 及び CYP3A5 が関与すると推定された。

2.4.3.4 排泄

雄性ラットに[pyrazole ring-^{14}C]ボルノレキサント水和物又は[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（各 3 mg/kg）したときの尿及び糞中への放射能排泄率は、それぞれ尿中で投与放射能の 56.9 及び 35.1%、糞中で投与放射能の 41.8 及び 58.9%であった。雄性イヌに[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（3 mg/kg）したときの尿及び糞中への放射能排泄率は、それぞれ投与放射能の 51.1 及び 45.3%であった。

授乳期ラットに[carbonyl-^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与（3 mg/kg）したときの乳汁中放射能濃度は血漿中放射能濃度の 0.723～2.42 倍であり、乳汁への放射能の移行が確認された。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝ミクロソームを用いて、ボルノレキサント及び M3 の CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A）に対する阻害作用を評価した。その結果、ボルノレキサントは CYP2C9 及び CYP3A に対して可逆的な阻害を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 49.5 及び 31.7 μmol/L であった。M3 は CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A に対して可逆的な阻害を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 58.6、53.3 及び 55.9 μmol/L であった。その他の CYP 分子種に対するボルノレキサント及び M3 の IC_{50} 値はいずれも 60.0 μmol/L より高い値であった。また、ボルノレキサントは CYP3A に対する時間依存的阻害作用を示した。M3 の CYP3A に対する時間依存的阻害作用は、ボルノレキサントよりも弱く、阻害パラメータは算出できなかった。ヒト凍結肝細胞を用いて、ボルノレキサント及び M3 の CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導作用を評価した。その結果、ボルノレキサントは CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対して、M3 は CYP2B6 及び CYP3A4 に対して誘導作用を持つと考えられた。

ボルノレキサント及びM3のCYP阻害により薬物相互作用を引き起こす可能性について「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について（平成30年7月23日、薬生薬審発0723第6号）（以下、DDIガイドライン）に従い、リスク評価を実施した。その結果、ボルノレキサント及びM3のCYP分子種に対する可逆的阻害作用のR 値はカットオフ基準より低値であったため、薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。一方、ボルノレキサントのCYP3Aに対する時間依存的阻害作用のR値はカットオフ基準より高値であったが、PBPKモデルを用いた解析から、本剤（20 mg）は、CYP3Aの時間依存的阻害により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた（2.7.2.2.2.6(2)項）。また、ボルノレキサント及びM3のCYP誘導により薬物相互作用を引き起こす可能性についてDDIガイドラインに従い、リスク評価を実施した。その結果、CYP3Aの誘導作用のR値はM3ではカットオフ基準より高値であり、CYP3Aの誘導により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。一方、ボルノレキサントではカットオフ基準より低値であったが、PBPKモデルを用いた解析から、本剤（20 mg）は、CYP3Aの誘導により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた（2.7.2.2.2.6(2)項）。また、ボルノレキサント及びM3のCYP3A以外の分子種（CYP1A2又はCYP2B6）に対する誘導作用は、CYP3Aに対する誘導作用よりも弱いことから、これら分子種の誘導により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

ボルノレキサントは主にCYP3A4によって代謝されると推定された。イトラコナゾール併用試験（205試験）及びPBPKモデル解析の結果から、ボルノレキサントは強いCYP3A阻害薬、中程度のCYP3A阻害薬、弱いCYP3A阻害薬及び強いCYP3A誘導薬との併用により薬物相互作用を受けると考えられた（2.7.2.2.2.6(1)項）。

ヒトトランスポーター発現細胞を用いて、ボルノレキサント及びM3のトランスポーターに対する基質性及び阻害作用を評価した。その結果、ボルノレキサントはP-gpに対して弱い基質性（Net efflux ratio: 2.72）を示し、BCRP、OATP1B1及びOATP1B3の基質ではないと考えられた。M3はP-gp、BCRP、OATP1B1及びOATP1B3の基質ではないと考えられた。また、ボルノレキサントはP-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及びMATE2-Kに対して阻害作用を示さなかった。M3はBCRPに対して阻害作用を示し、IC_{50}値は23.5 μmol/Lであったが、P-gp、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及びMATE2-Kに対して阻害作用を示さなかった。これらのことからボルノレキサント及びM3は、最大臨床推奨用量（10 mg）においてこれらのトランスポーターの阻害により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

ラットでは、雌性ラットの単回投与毒性試験及び雌雄ラットの小核試験における初回投与結果から急性毒性を評価した。死亡は認められず、ラットにおける概略の致死量は雌雄ともに2000 mg/kg を超える量と考えられた。イヌでは、1 カ月間反復経口投与毒性試験における初回投与結果から急性毒性を評価した。死亡は認められず、イヌにおける概略の致死量は雌雄ともに1000 mg/kg を超える量であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラットの 1 カ月間及び 26 週間反復経口投与毒性試験、イヌの 1 カ月間、13 週間及び 39 週間反復経口投与毒性試験を実施した。1 カ月間反復投与毒性試験では 1 カ月間、それ以外の反復投与毒性試験では 4 週間の休薬期間を設定し、回復性を検討した。

2.4.4.2.1 ラット

ボルノレキサント水和物を 0、100、300 及び 1000 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに 1 カ月間及び 26 週間反復経口投与した結果、いずれの試験においてもボルノレキサント水和物投与に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった。なお、1 カ月間反復経口投与毒性試験では、300 mg/kg/日の雄 1 例が投与 21 日の投与前に死亡発見されたが、一般状態、剖検及び病理組織学的検査に著変は認められないこと、26 週間反復経口投与毒性試験を含めて、より高用量の1000 mg/kg/日においても死亡例が認められなかったことから、ボルノレキサント水和物投与に関連しない死亡と判断した。

以上のことから、ラットの 1 カ月間及び 26 週間反復経口投与における無毒性量は雌雄いずれも 1000 mg/kg/日と判断した。無毒性量における血漿中未変化体の $AUC_{0\text{-}24h}$ はヒトへ最大臨床推奨用量（10 mg）を投与したときの血漿中未変化体の $AUC_{0\text{-}\infty}$ と比較して、雄で 6～12 倍、雌で 35～64 倍であった。

2.4.4.2.2 イヌ

ボルノレキサント水和物を 0、60、300 及び 1000 mg/kg/日の用量で雌雄イヌに 1 カ月間、13 週間及び 39 週間反復経口投与した結果、いずれの試験においてもボルノレキサント水和物投与に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった。なお、イヌの 39 週間反復投与毒性試験では、300 mg/kg/日の雄 1 例が投与 20 日の投与前に死亡発見されたが、剖検及び病理組織学的検査の結果から投与時に食道あるいは気管を損傷した可能性が考えられたため、ボルノレキサント水和物投与に関連しない死亡と判断した。

以上のことから、イヌの 1 カ月間、13 週間及び 39 週間反復経口投与における無毒性量は雌雄いずれも 1000 mg/kg/日と判断した。無毒性量における血漿中未変化体の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトへ最

大臨床推奨用量（10 mg）を投与したときの血漿中未変化体の $AUC_{0-\infty}$ と比較して、雄で 83～518 倍、雌で 99～239 倍であった。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

ボルノレキサント水和物の遺伝毒性を評価するために、細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 小核試験及びラットを用いる小核試験を実施した。いずれの試験においても、ボルノレキサント水和物に遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

ラットの 24 カ月間がん原性試験及び Tg rasH2 マウスの 26 週間がん原性試験を実施した。ラットでは、雄はガイドラインの限界量とされる 1500 mg/kg/日を、雌はヒトへ最大臨床推奨用量（10 mg）を投与したときの血漿中未変化体の $AUC_{0-\infty_unbound}$ の 25 倍を十分に超えると考えられる 300 mg/kg/日を高用量に設定した。Tg rasH2 マウスでは雌雄のいずれもガイドラインの限界量とされる 1500 mg/kg/日を高用量に設定した。

ラットでは 1500 mg/kg/日の雄で膵臓の膵島細胞腺腫の発生率の増加が認められたが、前がん病変である膵島細胞の過形成の増加は認められず、より高い血漿中未変化体曝露を示した 100 及び 300 mg/kg/日の雌で膵島細胞の増殖性病変の増加は認められなかった。当該変化は 2.4.5.3 項に示すとおり、ボルノレキサント水和物投与とは関連のない変化と考えられた。Tg rasH2 マウスではボルノレキサント水和物の投与による腫瘍性病変の増加は認められなかった。発がん性が認められなかった用量における血漿中未変化体の $AUC_{0-24h_unbound}$ は、ヒトへ最大臨床推奨用量（10 mg）を投与したときの血漿中未変化体の $AUC_{0-\infty_unbound}$ と比較して、ラットで 33～42 倍、Tg rasH2 マウスで 14～37 倍であった。

以上のことから、ヒトの臨床使用においてボルノレキサント水和物の全身曝露により臓器並びに組織にがんが発現する可能性は極めて低いと考えられた。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギにおける胚・胎児発生に関する試験、ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。

2.4.4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

ボルノレキサント水和物を 0、100、300 及び 1000 mg/kg/日の用量で雌雄ラットに反復経口投与した結果、親動物の一般毒性及び生殖機能、初期胚発生にボルノレキサント水和物投与に起因した毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上のことから、親動物の一般毒性及び生殖機能、初期胚発生のいずれに対しても無毒性量は1000 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

2.4.4.5.2.1 ラット

ボルノレキサント水和物を0、100、300及び1000 mg/kg/日の用量で妊娠ラットに反復経口投与した結果、母動物の一般毒性及び生殖機能、胚・胎児の発生において、ボルノレキサント水和物投与に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上のことから、母動物の一般毒性及び生殖機能、胚・胎児の発生のいずれに対しても無毒性量は1000 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.5.2.2 ウサギ

ボルノレキサント水和物を0、100、300及び1000 mg/kg/日の用量で妊娠ウサギに反復経口投与した結果、母動物及び胚・胎児にボルノレキサント水和物投与に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった。母動物では、100 mg/kg/日の3例及び1000 mg/kg/日の1例で流産が認められたが、いずれも偶発的な摂餌減少に起因した母動物の栄養不良による二次的な変化、あるいはボルノレキサント水和物投与に関連のない自然発生的な流産であると考えられた。

以上のことから、母動物の一般毒性、生殖機能及び胚・胎児の発生のいずれに対しても無毒性量は1000 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.5.3 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

ボルノレキサント水和物を0、100、300及び1000 mg/kg/日の用量で妊娠ラットに反復経口投与した結果、母動物の一般毒性及び生殖機能、出生児の離乳前及び離乳後の検査においてボルノレキサント水和物投与に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上のことから、母動物の一般毒性、生殖機能及び出生児のいずれに対しても無毒性量は1000 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

臨床投与経路が経口であるため、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 依存性試験

ラットにおける自己投与試験を実施し、ボルノレキサント水和物の強化効果の有無を評価した。自己投与試験ではケタミン塩酸塩により自己投与を獲得させたラットを用いて、ボルノレキサント水和物を 0.003、0.01、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg/infusion の用量で静脈内投与したときのレバー押し行動による摂取回数を個体ごとに評価した。その結果、いずれの用量においても強化効果ありとする判定基準を満たす個体は認められず、レバー押しに影響を与えるような一般状態の変化も認められなかったことから、ボルノレキサント水和物に強化効果はないと考えられた。

2.4.4.7.2 不純物の毒性試験

ボルノレキサント水和物の原薬における潜在的不純物の変異原性を評価するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。ボルノレキサント水和物の 不純物A* 及び 不純物B* 及び 不純物C* 及び 不純物D* の 4 化合物のうち、ボルノレキサント水和物の 不純物A* において遺伝子突然変異誘作用が認められ、他の 3 化合物では遺伝子突然変異誘発作用は認められなかった。 不純物A* は 2.3.S.3.2 項に示す方法で管理する。

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.4.7.3 光安全性試験

ボルノレキサント水和物は紫外可視光吸収スペクトルの評価において吸収が認められたことから、光毒性ポテンシャルの有無を ROS assay により評価した。その結果、陰性と判定されたことから、ボルノレキサント水和物は光毒性を有さないと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

効力を裏付ける *in vitro* 薬理試験で、ボルノレキサント水和物は OX_1 及び OX_2 受容体に対する強力なアンタゴニストであることが明らかとなった。ボルノレキサント水和物の OX_1 及び OX_2 受容体に対するアンタゴニスト作用は、ヒト及びラットで同程度であったことから、ラットは *in vivo* 薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験に適切な種であることが示された。ラットを用いた効力を裏付ける *in vivo* 試験で、ボルノレキサント水和物は 1 mg/kg 以上の用量で睡眠誘発作用を示した。

副次的薬理試験では、90 種類の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する結合性評価から、ボルノレキサント水和物は選択的 OX_1 及び OX_2 受容体アンタゴニストであることが示された。ボルノレキサント水和物の 30 mg/kg までの用量において、ラットの協調運動機能に影響は認められなかった。

安全性薬理試験では、ラットを用いた中枢神経系の試験において、ボルノレキサント水和物は 300 mg/kg 以上の用量で薬理作用の睡眠誘発に関連した二次的な変化として姿勢異常が認められたが、100 mg/kg では影響は認められなかった。心血管系の試験において、ボルノレキサント水和物は 30 μmol/L で hERG 電流を抑制したが、10 μmol/L まで hERG 電流に影響を及ぼさなかった。無麻酔・非拘束下のイヌを用いた心血管系評価において、0.4 mg/kg 以上で QT 間隔及び QTc の延長及び睡眠行動の頻度の増加、2 mg/kg 以上で心拍数の低下が認められたが、QT 間隔、QTc 及び心拍数の変化に血漿中濃度との相関性及び用量反応性が認められなかったこと、一般状態において睡眠行動がボルノレキサント水和物投与により高頻度に認められたことから、ボルノレキサント水和物投与に関連した直接的な変化ではなく、薬理作用である睡眠行動に関連した二次的な変化と考えられた。ラットを用いた呼吸系の試験において、ボルノレキサント水和物の影響は認められなかった。

2.4.5.2 薬物動態試験

[^{14}C]ボルノレキサント水和物をラット及びイヌに経口投与したときの吸収は速やかで、放射能の吸収率は良好であった。BA は、雄性ラットで 7.6%、雌性ラットで 33.3%、イヌで 58.0%であり、いずれの種でも初回通過効果を受けた。ボルノレキサントを投与したときの曝露量は、ラットでは雄性に比べ雌性で高い傾向が認められたが、イヌでは雌雄で同程度であった。

有色ラットに[^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与したときの放射能は各組織に速やかに分布した。投与後 24 時間では肝臓、腎臓、有色皮膚でのみ放射能が検出され、投与後 336 時間では全ての組織において放射能は検出されず残留性を示す組織は認められなかった。ラットにボルノレキサント水和物を単回経口投与したときの脳及び CSF 中未変化体濃度は、速やかに C_{max} に達したのち、血漿中濃度と同様の推移で速やかに消失した。マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトにおけるボルノレキサントの血漿蛋白結合率は約 90%以上で比較的高かった。ヒト血漿中においてボルノレキサントは、血清アルブミン、α_1-酸性糖蛋白、LDL、HDL に結合し、

α_1-酸性糖蛋白に最も高率に結合した。妊娠ラットに[^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与したとき、放射能の一部は胎盤を通過し胎児へ移行した。

ボルノレキサントは、メチルフェニル部位のメチル基の酸化、オキサアジナン環の脱水素化、オキサアジナン環の酸化的開環及びそれに続く開裂又は脱アルキル化などにより広範に代謝された。 [^{14}C]ボルノレキサント水和物をラット及びイヌに単回経口投与したときの血漿中放射能の主要な成分は、ラットでは M10、イヌでは未変化体であった。ヒトマスバランス試験（206 試験）において、血漿中では未変化体が最も多く、血漿中総放射能に対して曝露量が 10%以上の代謝物は認められなかった（2.7.2.2.2.1(4)項）。ヒト特異的な代謝物は認められなかった。

ラット及びイヌに[^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与した結果から、[^{14}C]ボルノレキサントの排泄には尿及び糞両方の寄与が考えられた。授乳ラットに[^{14}C]ボルノレキサント水和物を単回経口投与したとき、放射能の一部は乳汁へ移行した。

ボルノレキサントは *in vitro* における CYP 分子種推定試験の結果から、主に CYP3A4 で代謝されることが推定された。イトラコナゾール併用試験（205 試験）及び PBPK モデル解析の結果から、ボルノレキサントは強い CYP3A 阻害薬、中程度の CYP3A 阻害薬、弱い CYP3A 阻害薬及び強い CYP3A 誘導薬との併用により薬物相互作用を受けると考えられた（2.7.2.2.2.6(1)項）。ボルノレキサント及び M3 に CYP3A をはじめとする複数の CYP 分子種の阻害作用や誘導作用が認められたが、最大臨床推奨用量（10 mg）において、ボルノレキサント及び M3 が CYP 阻害や誘導により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

ボルノレキサントは *in vitro* 試験の結果、P-gp の弱い基質であったが、ヒトマスバランス試験（206 試験）における消化管吸収率が高いと推定されることから、ボルノレキサントの消化管吸収における P-gp の関与は少なく、ボルノレキサントが P-gp 阻害薬により薬物相互作用を受ける可能性は低いと考えられた。ボルノレキサントは BCRP、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。ボルノレキサント及び M3 の P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対する *in vitro* 阻害試験の結果から、最大臨床推奨用量（10 mg）においてこれらトランスポーターの阻害により薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

2.4.5.3 毒性試験

ボルノレキサント水和物をラット及びイヌにそれぞれ 2000 及び 1000 mg/kg を単回経口投与した際に、死亡は認められなかった。ボルノレキサント水和物の 1000 mg/kg/日を、ラット及びイヌにそれぞれ 26 週間及び 39 週間まで反復経口投与して毒性を評価した結果、ボルノレキサント水和物の投与に関連した死亡例は認められず、毒性学的意義のある変化も認められなかった。イヌでは、ボルノレキサント水和物の投与により 60 mg/kg/日から薬理作用と考えられる傾眠が認められ、300 mg/kg/日以上では投与検体と考えられる白色物を含む正常便が認められた。ラット及びイヌのいずれも反復経口投与による無毒性量は 1000 mg/kg/日であると考えられた。

遺伝毒性試験では、細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 小核試験及びラットを用いる小核試験を実施した結果、いずれも陰性であり、ヒトに対して遺伝毒性を示す可能性はないと判断した。

がん原性試験では、ラットの 24 カ月間がん原性試験及び Tg rasH2 マウスの 26 週間がん原性試験を実施した結果、ラットにおいて 1500 mg/kg/日の雄で膵臓の膵島細胞腺腫の発生率に統計学的に有意な増加が認められた。膵島細胞腺腫はラットの加齢性変化として高頻度に認められる腫瘍であり、雄は雌に比べて発生率が高いこと[1]、薬物投与によりラットの膵島細胞腺腫が誘発される場合は、前がん病変である膵島細胞の過形成の増加を伴っており[2,3]、雌雄いずれも認められること[3]が報告されている。膵島細胞腺腫の発生率は長期間における試験実施施設背景データ（表 2.6.6-15）及び文献[1]で報告されている発生率の範囲と概ね同程度であったこと、膵島細胞腺腫の発生率の増加は雄のみで認められた変化であること、他試験を含めて膵島細胞に前がん病変などの増殖を示唆する変化が認められていないことから、ボルノレキサント水和物投与と関連しない変化と考えられた。Tg rasH2 マウスではボルノレキサント水和物の投与による腫瘍性病変の増加は認められなかった。以上のことから、臨床使用においてボルノレキサント水和物の全身曝露により臓器並びに組織にがんが発現する可能性は極めて低いと考えられた。

生殖発生毒性試験では、ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験、及びラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。いずれの試験においても、ボルノレキサント水和物の投与により、親動物、初期胚発生、胚・胎児発生、又は出生児に対して毒性学的意義のある変化は認められず、いずれも無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した。

依存性及び薬物乱用リスク評価のため、ラットにおける自己投与試験を実施し、ボルノレキサント水和物の強化効果の有無を評価した。ケタミン塩酸塩により自己投与を獲得させたラットにボルノレキサント水和物を静脈内投与し、レバー押し行動による摂取回数を個体ごとに評価した結果、いずれの用量においても強化効果ありとする判定基準を満たす個体は認められず、レバー押しに影響を与えるような一般状態の変化も認められなかったことから、ボルノレキサント水和物に強化効果はないと考えられた。

ボルノレキサント水和物は UVB 領域の波長に吸収が認められたことから、ROS assay により光安全性を評価した。その結果、陰性と判定されたことから、ボルノレキサント水和物は光毒性を有さないと考えられた。

2.4.5.4 結論

非臨床試験の結果から、ボルノレキサント水和物は OX_1 及び OX_2 受容体に対する強力な選択的アンタゴニストであり、協調運動機能に影響を及ぼさずに睡眠誘発作用を示したことから、高い有用性が期待された。また、ボルノレキサント水和物は、速やかに吸収され睡眠誘発作用を示した後、組織に残留せず速やかに消失する良好な薬物動態プロファイルを有すると考えられた。

さらに、ボルノレキサント水和物は、非臨床安全性試験において毒性学的に意義のある変化を示さず、不眠症治療において、ヒトに安全に投与可能であると考えられた。

2.4.6 参考文献

1 岩田聖, 前川昭彦, 土谷稔, 原田孝則. 各論Ⅱ　第2章　ラットの背景病変. In: 日本毒性病理学会, editors. 新毒性病理組織学. 初版. 東京都: 西村書店; 2017年. p. 705-724.

2 Imazawa T, Nishikawa A, Shibutani M, Ogasawara H, Furukawa F, Ikeda T, et al. Induction of pancreatic islet cell tumors in rats by repeated intravenous administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. Toxicol Pathol. 2001; 29(3): 320-327.

3 Zwicker GM, Eyster RC. Chronic effects of corticosteroid oral treatment in rats on blood glucose and serum insulin levels, pancreatic islet morphology, and immunostaining characteristics. Toxicol Pathol. 1993; 21(5): 502-508.