

に BrdU 標識率の増加 (対照群の 5.7 倍) が認められた。膀胱の肉眼所見及び病理組織学的所見はいずれの投与期間でも認められなかった。

一方、プロモーション作用が認められなかった 50 ppm 投与群では、これらの作用は全く観察されなかった。このことから、プロモーション作用の発現と細胞増殖活性の亢進とは密接に関連すると考えられた。(参照 70)

### ③ 亜急性毒性試験における代謝

膀胱毒性の発現機序と、長期間の高用量の投与により特異的な代謝物が生成したことの関連を検証する目的で、亜急性毒性試験のラット (一群雌 3 匹) のうち、50 及び 6,400 ppm 投与群の 90 日間投与終了後に、[phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミドまたは[cyc-<sup>14</sup>C]フェントラザミドを 1.5 mg/kg 体重で単回経口投与し、低用量投与による短期代謝試験との相異点について検討された。また、長期間投与の比較対照群として、50 及び 6,400 ppm の 3 日間投与群を設定した。

#### a) 血中濃度推移

[phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群の  $T_{max}$  は 20~60 分、 $C_{max}$  は 0.288~1.01  $\mu\text{g/g}$  であり、動物体内運命試験 [1. (1)] の低用量群の結果と顕著な差はなかった。一方、[cyc-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群の  $T_{max}$  は 40~90 分、 $C_{max}$  は 0.221~0.498  $\mu\text{g/g}$  であり、 $C_{max}$  はやや低い値を示したものの、同じく動物体内運命試験 [1. (2)] の低用量群の結果と顕著な差はなかった。

前処理投与の投与量と投与期間の関係を比較すると、50 ppm の 3 日間投与群の血漿中濃度は、90 日間投与群と比較し試験期間を通じて概ね低い値であった。一方、6,400 ppm の比較では逆の現象が認められ、3 日間投与群の血漿中濃度は 90 日間投与群より高かった。

#### b) 排泄

主要排泄経路は尿中であり、動物体内運命試験 [1. (1) 及び (2)] と同様の傾向であった。50 ppm 投与群では、投与後 72 時間の尿中に 69.3~86.3% TAR、糞中に 12.3~21.5% TAR、6,400 ppm 投与群では尿中に 57.5~71.9% TAR、糞中に 24.1~38.4% TAR が排泄された。尿中排泄率を投与期間で比較すると、50 ppm では 90 日間投与群の方がやや低く、逆に 6,400 ppm では 90 日間投与群の方がやや高かった。また、[cyc-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群は [phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群よりも低い尿中排泄率であった。

体内への残留放射エネルギーは、[phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群では 0.1~0.3% TAR と低かったが、[cyc-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群では約 10 倍高かった。

#### c) 代謝物同定・定量

糞尿中の代謝物について分析された結果、[phe-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群で

は、II及びXがそれぞれ回収放射能の17.9~39.4%及び31.5~51.0%認められた。Xの生成量は、3日間投与群よりも90日間投与群で多かった。6,400 ppmの3日間投与群では、II及びXはそれぞれ20.2及び31.5%と低く、未同定代謝物が38.3%と他の試験群より高かった。

[cyc-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群における主要代謝物はX IIであり、回収放射能の27.5~37.0%を占めた。他に、XIV (9.5~14.1%)、X I (5.8~14.4%)、X X II (4.5~8.2%) 及びX IX (1.4~1.9%) が認められた。主要代謝物であるX IIは、6,400 ppm 投与群よりも50 ppm 投与群で多く認められ、一方、X X IIは6,400 ppm 投与群で多かった。この差は主に糞中で認められた。未同定代謝物は、50 ppm 投与群 (17.1~23.2%) より6,400 ppm 投与群 (30.8~32.4%) で多かった。

以上のように、両標識体とも、フェントラザミドの長期間高用量投与により特異的な代謝物が生成していることはなく、投与量に関連した代謝物それぞれの量的な変化のみが認められた。

これらの実験結果からでは、4,000 ppm 以上投与群で膀胱病変が発現し、50 ppm のような低濃度では膀胱病変が認められなかったことへの説明にはならないため、さらに、[cyc-<sup>14</sup>C]フェントラザミド投与群の尿中代謝物について検討された。

仮に、標識化合物の挙動が動物に混餌投与された検体の挙動に一致しているとの前提で、1日あたりの尿中代謝物の生成量 (mg/動物/日) を、投与放射能に対する尿中放射能排泄率、尿中代謝物の生成割合、1日の摂餌量 (20 g/動物/日)、飼料中の検体濃度から算出すると、50 及び 6,400 ppm の90日間投与後での尿中代謝物の生成量の比較では、X IIで約95倍、X Iで約50倍、XIVで約65倍であった。これらの生成量の差が、高用量投与での膀胱病変の差になったのではないかと推測された。なお、X II、X I 及びX IVはいずれもシクロヘキシルアミン類であり、このうち、X I 及びX IVには、強い刺激性が報告されている。(参照 71)

#### ④ まとめ

①~③の結果に加え、遺伝毒性試験[13.]にあるように、本剤及び代謝物に遺伝毒性は認められなかったことから、膀胱腫瘍の発生機序は、X II、X I、XIV等のシクロヘキシルアミン類の膀胱上皮への持続的な刺激あるいは細胞毒性による壊死及び再生、さらに、細胞増殖活性の亢進を伴ったプロモーション作用が関連した結果生じるものと推察された。

#### (7) ラットの肝臓、胆汁及びChE活性への影響

Wistar ラット (一群雌雄各5匹) にフェントラザミドを0及び10,000 ppm で28日間混餌投与 (原体、検体摂取量は雄: 0 及び 904 mg/kg 体重/日、雌: 0

及び 1,360 mg/kg 体重/日) する試験が実施された。

本試験は、ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (1)]で肝機能に変化が認められ、さらに、同試験では脳 ChE 活性への影響が検索されていなかったことから、肝薬物代謝酵素活性のパターン、血漿、血球及び脳 ChE 活性について検査する目的で実施された。また、マウスを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (2)]及び 2 年間発がん性試験[11. (3)]で胆汁黒色化及び胆嚢上皮過形成が認められたことから、胆汁中の色素性内容物に重要な関わりを有する、肝及び胆汁中のプロトポルフィリンIXの予備的な検査も実施された。

検体投与群では、雌雄ともに体重増加抑制が認められたが、臨床症状は認められなかった。脳及び赤血球 ChE 活性阻害が認められ、阻害の程度は、脳では雄で 70%、雌で 20%、赤血球では雄で 82%、雌で 94%であった。さらに雌では、血漿 ChE 活性阻害も認められた (63%阻害)。

検体投与群では、肝薬物代謝酵素活性への影響が認められた。雄では、エトキシマリン O-デエチラーゼ (ECOD) は対照群に比べて 1.5 倍増加し、エトキシレゾルフィン O-デエチラーゼ (EROD) 及びアルドリンエポキシダーゼ (ALD) は最大 50%低下した (いずれも有意差なし)。一方、エポキシドヒドロラーゼ (EH) は 4 倍、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) は 4 倍、UDPGT は 2.5 倍、統計学的に有意に増加した。

雌でも雄とほぼ同等の誘導パターンであった。EROD 及び ALD はわずかに統計学的に有意な減少が認められ、ECOD 減少には有意差は認められなかった。一方、EH は 3.7 倍、GST は 2.6 倍、UDPGT は 1.9 倍増加した (UDPGT には有意差なし)。このように、本試験における薬物代謝酵素誘導のパターンは、チトクローム P450 アイソザイム (CYP) 依存性モノオキシゲナーゼ (ECOD、EROD 及び ALD) の変動は比較的わずかであり、一方、第 II 相型酵素 (EH、GST 及び UDPGT) では著明な誘導が認められた。

プロトポルフィリンIX量には、検体投与の影響は認められなかった。(参照 72)

#### (8) マウスの肝臓、胆汁及び胆嚢内容物への影響

マウスを用いた 2 年間発がん性試験[11. (3)]で肝機能の変化、胆汁の黒色化及び胆嚢上皮過形成が認められたことから、検体投与後の肝薬物代謝酵素活性のパターン、胆汁黒色化に関連すると考えられる肝及び胆汁中のプロトポルフィリンIXの予備的な検査を実施するため、B6C3F<sub>1</sub> マウス (一群雌 80 匹) にフェントラザミドを 0 及び 10,000 ppm の濃度で 8 週間混餌投与する試験が実施された。

死亡例及び臨床症状は認められなかった。

肝薬物代謝酵素について、10,000 ppm 投与群ではモノオキシゲナーゼの著しい誘導がみられ、ECOD は 8 倍、EROD は 7 倍、ALD は 3.5 倍にまで増加した。したがって、多くの CYP サブタイプ (1A1、2B、3A 他) の誘導が推測された。

一方、EH、GST及びUDPGTの誘導はわずかで、対照群に比べて2倍程度の増加であった。このように、雌マウスの10,000 ppm投与群でみられた薬物代謝酵素誘導のパターンは、第Ⅱ相酵素のみが誘導されたラット[14. (3)]とは異なり、CYP依存性酵素の誘導が顕著であった。

肝臓及び胆汁中からプロトポルフィリンIX及びその他のポルフィリンは検出されず、ポルフィリン生合成に投与による影響はみられなかった。

胆嚢内でみられた固形物(病理組織学的には好酸性不定形物質)の分析では、高用量であるにもかかわらず、フェントラザミドや代謝物Ⅱは認められず、マウスにおいてはこれらの物質の著明な胆汁排泄はないものと考えられた。また、対照群と比較して、コレステロール濃度の増加はなかったが、タウロコール酸の著明な増加が認められ、胆嚢内固形物の40%に達した。この所見から、胆汁酸組成に変化があったことが示唆された。

以上より、マウスの混餌投与試験でみられた胆嚢の形態学的変化は、まず検体投与によって胆汁組成が変化し、粘膜を刺激することで粘液分泌亢進を伴う上皮過形成が発現し、時に好酸性の不定形物質が形成されるものと考えられた。(参照73)

#### (9) フェントラザミド混餌投与後のマウス胆汁を用いた復帰突然変異試験

マウスを用いた90日間亜急性毒性試験[10. (2)]及び2年間発がん性試験[11. (3)]で胆嚢上皮の過形成が認められ、胆汁中の胆汁組成の変化によるものと考えられた。さらに、胆汁中成分の変異原性について確認する目的で、フェントラザミドを0及び7,200 ppmの濃度で7日間混餌投与したICRマウス(一群雄70匹)の胆汁を用いた、細菌(*S.typhimurium*: TA98及びTA100株)における復帰突然変異試験が実施された。

検体投与群のマウスでは、肝絶対及び比重量の統計学的な有意な増加が認められ、酵素誘導によるものであると考えられた。したがって、今回の試験で供されたマウス胆汁中には、酵素誘導を受けた後に排泄される胆汁中の成分も既に含まれていることが推察された。

採取された胆汁(原液または5倍希釈液)を用いたAmes試験は、胆汁中で化合物が代謝を受ける可能性がないことから、代謝活性化系(S9mix添加条件下)では実施されなかったが、代謝物が抱合体で存在することも考えられることから、β-グルクロニダーゼを添加した系についても実施された。試験結果は陰性であった。

以上の結果から、フェントラザミドを投与されたマウスの胆汁は、細菌に対する復帰突然変異誘発性を持たないと判断された。(参照74)

#### (10) 胆嚢のPCNA免疫染色追加試験

マウスを用いた90日間亜急性毒性試験[10. (2)]及び2年間発がん性試験

[11. (3)], ならびにイヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (3)]及び 1 年間慢性毒性試験[11. (1)]の雌雄で胆嚢上皮過形成が認められた。この変化における細胞増殖の関与を検討するため、亜急性試験で用いたマウス(投与量: 0、20、100、600、3,600 及び 7,200 ppm)の雌各 10 匹及びイヌ(投与量: 0、75、300 及び 1,200 ppm)の雌各 4 匹の胆嚢及び肝臓(陽性対照)を用いた PCNA 免疫染色試験が実施された。

マウスの 7,200 ppm 投与群で PCNA 標識率が有意に増加し、3,600 ppm 投与群では増加傾向がみられた。これらは検体投与の影響と考えられ、胆嚢上皮の過形成に関連するものと判断された。なお、胆嚢上皮過形成はマウスの 600 ppm 投与群、イヌの 300 及び 1,200 ppm 投与群においても観察されたが、これらの用量では明らかな細胞増殖亢進は認められなかった。(参照 75)

#### (11) 肝薬物代謝酵素及び胆嚢への影響についての解明試験(イヌ)

イヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (3)]及び 1 年間慢性毒性試験[11. (1)]の全投与群で認められた肝薬物代謝酵素誘導の回復性、高用量群(亜急性: 1,200 ppm、慢性: 750 ppm)で認められた胆嚢上皮病変の機序を解明する目的で、以下の①~②の試験が実施された。

##### ① 肝臓酵素及び胆嚢のトキシコダイナミックスの解明試験

ビーグル犬(一群雌 4 匹)にフェントラザミドを 0 及び 750 ppm の濃度で 6 週間混餌投与(投与群)して試験が実施された。なお、回復性を観察するため、6 週間の回復期間を設けた回復群についても検討された。投与期間中の平均検体摂取量は、投与群で 30.6 mg/kg 体重/日、回復群で 31.9 mg/kg 体重/日であった。

死亡及び臨床症状は認められなかった。750 ppm 投与群で体重増加抑制傾向が認められたが、回復群では回復傾向を示した。

肝薬物代謝酵素誘導について、750 ppm 投与群で *N*-デメチラーゼ、*O*-デメチラーゼ、チトクローム P450、UDPGT、CYP7A 及び CYP 依存性のモノオキシゲナーゼ(ECOD、ALD)が統計学的有意に増加し、EROD は有意に減少した。このように、フェントラザミド投与による肝薬物代謝酵素誘導が確認されたが、回復群では、これらの項目は対照群のレベルまで回復した。

胆汁酸濃度は、投与群の 750 ppm 投与群(95 M)で対照群(120 M)よりもわずかに減少し、回復群の 750 ppm 投与群(146 M)で対照群(107 M)よりもわずかに増加した。これらの変化は統計的に有意でなく、胆汁酸産生に関与する CYP7A(コレステロールから胆汁酸への変換の第 1 段階であり、律速段階の酵素)の誘導と胆汁酸濃度の変化には一定の傾向がみられなかった。

病理組織学的検査において、肝臓では投与群の 750 ppm 投与群ですりガラス様肝細胞質を示す肝細胞肥大が全例に認められたが、回復群の 750 ppm 投与群ではほぼ完全に回復した。肝重量の変化は、投与群及び回復群ともに比重量の増

加のみであった。胆嚢では、投与群の 750 ppm 投与群で粘膜下の浮腫が 4 例中 3 例にみられた。回復群の 750 ppm 投与群ではこの変化は認められなかったが、4 例中 2 例に過形成がみられ、慢性毒性試験でみられたものと同じであった。

以上の結果から、イヌの亜急性及び慢性毒性試験でみられた肝薬物代謝酵素誘導は回復性であることが確認され、それぞれの試験の低用量群でみられた肝薬物代謝酵素の誘導は、肝重量増加及び形態学的変化を伴わなかったため、有害作用ではないと推察された。なお、本試験の 750 ppm は、肝薬物代謝酵素の誘導に加え、胆嚢病変を発現できるほどの高用量であったため、肝薬物代謝酵素活性は回復性を示すものの、肝重量及び形態学的変化は完全には回復しなかった。また、胆嚢上皮過形成については、本試験で CYP7A の誘導が確認され、胆嚢上皮過形成が再現されたことから、CYP7A 酵素の誘導による胆汁酸の変化によって影響されたものと推察されたが、胆汁酸産生量増加の確認ができなかったため、この関係は明らかにならなかった。(参照 76)

## ② 胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響

胆嚢上皮過形成の病態発生をさらに明らかにするため、胆管カニューレーションを施したビーグル犬（一群雌 4 匹）にフェントラザミドを 750 ppm の濃度（平均検体摂取量：18.7 mg/kg 体重/日）で 6 週間混餌投与し、投与期間中の胆汁流量及び胆汁成分への影響について検討した。なお、胆汁生成に必要な胆汁成分（特に胆汁酸）の枯渇を防ぐために、動物には分泌された胆汁の一部を毎日再補給された。また、投与前に測定された胆汁流量及び胆汁組成を各動物の対照とした。

投与 12 日（術後の感染症）及び投与 35 日（カテーテルの脱離）に各 1 例が切迫と殺された。手術に起因した感染症などを除いて、毒性学的に検体投与に関連性のある臨床所見は認められなかった。また、生存した 1 例では、手術の合併症により摂餌量及び体重低下が認められた。

投与開始 1 週間前から週 1 回実施された血液学的検査においても、検体投与に関連性のある所見は認められず、胆管カテーテル挿管手術時の出血及び細菌感染、カテーテル離脱後の腹腔炎に関連すると考えられる RBC、Hb 及び Ht の低下、MCV 増加、赤血球沈降速度の顕著な増加に伴う WBC 増加等が認められた。一方、血液生化学的検査では ALT、ALP 及び LDH 増加が認められ、長期間の胆管カニューレーションによる臓器へのストレスとともに、検体投与との関連も示唆された。

4 例すべてにおいて、摂餌量と胆汁産生に強い関連性が認められた。3 例では、投与開始 2～4 週目に胆汁の色調が暗緑色から茶褐色へ変化し、その後、投与前に比べ 13～63% の流量増加が認められた。残りの 1 例については、投与 12 日にと殺されたため、胆汁の色や流量への影響の詳細は確認できなかった。

胆汁中のフェントラザミド及び代謝物 II は、いずれもごく低濃度（最高濃度はそれぞれ 0.20 及び 0.84 mM）であり、コレステロール濃度は投与期間中減少し

ていた。

最終投与後の胆汁酸では、タウリンで抱合されたタウロコール酸やタウロデオキシコール酸の濃度が減少し、コール酸やデオキシコール酸のような非抱合胆汁酸が有意に増加した。

剖検の結果、検体投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。胆嚢の変化（のり状、ゼラチン状、黒色あるいは有形の内容物：病理組織学的には血液及び胆汁の残渣として同定）及び胆嚢萎縮が認められたが、これらは手術処置及び胆嚢管結紮に関連した所見であると考えられた。

病理組織学的検査において、肝細胞質の変化（すりガラス様変化及び細胞質の好酸性封入体）が認められ、検体投与によるものと考えられた。これらの影響は、組織学的にはミクロゾーム酵素の誘導と関連しており、①で確認された CYP7A の誘導とも関連していると考えられた。胆嚢上皮過形成は、胆嚢を胆汁の流れから外科的に隔離させた本試験では認められなかった。（参照 77）

### ③ まとめ

イヌで認められた胆嚢上皮過形成の病態発現機序として、フェントラザミド、代謝物Ⅱ及びコレステロールが影響している可能性は考えにくく、CYP7A 活性の増加が引き金となったと考えられる胆汁酸組成の変化が最も関与したと考えられた。すなわち、抱合胆汁酸が減少し、非抱合胆汁酸が増加したことにより、より刺激性が高いとされている非抱合胆汁酸により胆嚢上皮が刺激された結果、粘液分泌亢進を伴った上皮過形成が発現したものと推察された。また、結紮した胆嚢には過形成がみられないことから、この病変は局所的であり、かつ、マウスを用いた発がん性試験[11. (3)]では胆嚢上皮に腫瘍が認められていないことから、フェントラザミド投与により認められた胆嚢上皮の過形成が腫瘍発現につながることはないものと推察された。

### (12) ラットの胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響

イヌで認められた胆嚢上皮への影響は、[14. (10)]の結果から、CYP7A の誘導に関連する胆汁酸組成の変化の関与が考えられた。一方、ラットを用いた試験では、胆道系の生理学的機能に疑わしい影響は認められなかった。したがって、胆嚢上皮への影響の作用機序をさらに精査し、種差を明らかにする目的で、Wistar ラット（一群雄各 15 匹）にフェントラザミドを 0 及び 6,400 ppm（平均検体摂取量：0 及び 581 mg/kg 体重/日）の濃度で 7 週間混餌投与し、胆汁流量、胆汁組成及び肝 CYP7A 活性について解析された。

死亡例及び臨床症状は認められなかった。6,400 ppm 投与群では、体重増加抑制、肝絶対重量増加及び総胆汁量増加が認められた。

肝臓中の CYP7A 活性は、検体投与群では対照群に比べわずかに低かった（対照群の 78%）が、統計学的に有意ではなかった。

抱合体開裂処理された胆汁中にフェントラザミドは認められず、IIが低濃度で認められたのみであった。抱合体開裂処理をしていない胆汁の胆汁酸分析では、6,400 ppm 投与群においてグリコ-デヒドロコール酸がわずかに増えたが、胆汁酸組成は対照群のものとはほぼ変わりなく、主たる胆汁酸はタウロデヒドロコール酸であった。また、6,400 ppm 投与群では、ラットの胆汁中主要代謝物であるVIIIが認められた。

剖検所見は認められなかった。病理組織学的検査では、6,400 ppm 投与群の9例中5例で小葉中心性に細胞質の変化が認められ、肝細胞質には微細な顆粒がより均一に分布していた。また、数例では門脈周囲の肝細胞にわずかな脂肪の蓄積がみられた。

本試験において、肝絶対重量増加、胆汁量増加及び肝細胞質の変化が認められた。しかし、胆汁量を肝絶対重量 (g) あたりで比較すると、対照群に比べほとんど差はなく、統計学的に有意ではなかった。ラットでは、胆汁流量が肝絶対重量に相関することが報告されており、本試験でみられた胆汁量増加は、検体による肝ミクロゾーム薬物代謝酵素誘導の結果、肝絶対重量が増加したことによるものと考えられ、胆汁量に対するフェントラザミドの直接的な影響はなかったと考えられた。また、肝細胞質の変化については、形態学的には外来物質に対する肝臓の代謝活性化 (薬物代謝酵素誘導) によって観察されるものであった。胆汁酸組成に関連するとされる CYP7A の誘導はみられなかった。(参照 78)

#### (13) フェントラザミド及び代謝物の溶血性試験 (*in vitro*)

一般薬理試験[7.]のラットを用いた溶血試験では、*in vivo* での溶血作用は認められなかったが、*in vitro* 条件下で赤血球に直接的に暴露した際の影響について確認する目的で、SD ラット (雄4匹) の血液を、DMSO に溶解したフェントラザミド、代謝物II、XI、XII及びXIVを含むリン酸緩衝液食塩水系列 (いずれも最終濃度  $10^{-7}$ ~ $10^{-4}$  M) に加え、低張溶血性試験が実施された。

フェントラザミド、代謝物II、XI、XII及びXIVは、*in vitro* 条件下で溶血作用を示さなかった。(参照 79)

#### (14) フェントラザミド及び代謝物IIの赤血球に対する影響 (*in vitro*)

ラットの亜急性毒性試験[10. (1)]及び慢性毒性/発がん性試験[11. (2)]の高用量群では、軽度な赤血球に対する影響が一時的に認められた。赤血球と神経細胞 (特に長い軸索を有する神経細胞) は生化学的に共通する性質を有することが知られており、両細胞ともに代謝エネルギーの供給をグルコースに依存している。そこで、[14. (3)③]の試験の神経細胞で解糖系を介したグルコースの利用に影響がみられたように、赤血球においても、同様なメカニズムでその完全な形状を保つ能力 (integrity) が妨害される可能性が推察されることから、赤血球に対するフェントラザミド投与の影響を検討するために、エネルギー供給系への効果に着

眼した試験が実施された。

Wistar ラット (雄) から採取された赤血球をグルコース (4.5 g/L) を高濃度に含有した培地で培養し、フェントラザミド及び代謝物Ⅱを 0、0.1、1、5、10 及び 50 µg/mL の濃度で処理し、培養赤血球を用いた生化学的解析が実施された。

フェントラザミド処理により、溶血性、ATP 量、グルコース消費量及び還元型 GSH 量に影響が認められた。

処理開始 1 日後にグルコース消費量及び還元型 GSH 量が顕著に減少し、ATP 量も軽度ではあるが濃度依存的に減少した。溶血性は、最高濃度でわずかに認められる程度であった。処理開始 3 日後から、ATP 量が最低濃度を除くすべての濃度で統計学的に有意に減少し、一番感受性の高いパラメータであった。グルコース消費量は、低濃度 (0.1 及び 1 µg/mL) で一時的に増加した以外は用量相関的に低下した。処理開始 7 日後ではすべての濃度で ATP 量が低下し、グルコース消費量も強く抑制され、溶血性への影響も中間濃度処理群まで認められた。これらの影響は、濃度依存性や時間経過の点で、神経細胞で観察されたものと極めて類似していた。メトヘモグロビン形成には、フェントラザミドの影響はみられなかった。

代謝物Ⅱ処理による影響は、いずれの項目にもみられなかった。

以上の結果から、ラットの亜急性毒性試験及び慢性毒性/発がん性併合試験の高用量群で認められた、網状赤血球の増加を伴う貧血傾向は、フェントラザミド投与により、赤血球の解糖系を介したグルコースの利用が低下した結果生じたものと考えられた。ただし、フェントラザミドのバイオアベイラビリティが低いため、*in vivo* で観察された影響は極めて弱く、高用量群でしか生じなかったものと考えられた。また、代謝物Ⅱは、フェントラザミドでみられた赤血球に対する影響に関与していないことが示唆され、Ⅱのみならず、XI、XIV 及び XII のような他の主要代謝物は、反応性のあるテトラゾリノンカルボニル構造を欠いていることから、おそらく赤血球の代謝に関し特異的な影響を及ぼさないと考えられた。(参照 80)

#### (15) ラットのフェントラザミドの高用量連続投与による血液への影響

ラットで認められた赤血球系への影響をさらに検討する目的で、SD ラット (一群雄 5 匹) にフェントラザミドを 14 日間連続強制経口投与 (原体: 0、2,500 及び 5,000 mg/kg 体重/日、2%クレモホア EL 水溶液に懸濁) する試験が実施された。

検体投与群では、体重増加抑制、肝絶対及び比重量増加、肝腫大及び肝細胞肥大が認められた。Ht の統計学的に有意な低下、RBC 及び Hb の減少傾向、網状赤血球数の増加傾向が認められたが、いずれも用量相関性がみられなかった。メトヘモグロビンの増加及びハインツ小体の出現はみられなかった。赤血球膜の脆弱性を指標とした溶血性試験及び血清鉄測定において、明らかな所見は認められ

なかった。病理組織学的検査で脾臓のヘモジデリン沈着の増加傾向が認められたが、骨髄では異常所見はみられず、造血機能への影響は認められなかった。

以上のように、フェントラザミドを高用量で連続経口投与した本試験において、軽度の溶血性貧血傾向が認められた。(参照 81)