MONTIRELIN HYDRATE (NS-3) の代謝産物, 分解物, 夾雑物のマウスにおける単回投与毒性試験

西口 保幸, 中沢 素邦, 岡 高明, 萩台 喜美, 岩倉 啓子, 鷺見 信好

日本新薬株式会社 創薬研究本部
〒601 京都市南区西大路通八条下ル

SINGLE DOSE TOXICITY STUDIES OF METABOLITE, DEGRADATION PRODUCT AND IMPURITY OF MONTIRELIN HYDRATE (NS-3) IN MICE

Yasuyuki NISHIGUCHI, Motokuni NAKAZAWA, Takaaki OKA, Yoshimi HAGIDAI,
Keiko IWAKURA and Nobuyoshi SUMI

*Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.,
Nishiohji Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan*

(Received July 10, 1995 ; Accepted November 9, 1995)

ABSTRACT — Montirelin hydrate (NS-3) is a new drug for the treatment of disturbance of consciousness. The single dose toxicity studies of its degradation product and impurity (CNK-603) and its metabolite (CNK-6004) were conducted in Slc: ddY mice. The compounds were administered intravenously to male and female mice.

Deaths occurred in both sexes of mice receiving more than 125 mg/kg of CNK-603. There were no treatment-related effects on survival in both sexes of mice receiving doses up to 2,000 mg/kg of CNK-6004. Approximate lethal dose of CNK-603 was 125 mg/kg and lethal dose of CNK-6004 was more than 2,000 mg/kg. Decrease in locomotor activity was observed in mice receiving the two compounds. Tremor, prone position and dyspnea were seen in mice receiving CNK-603. The body weight showed no changes attributable to the dosing of the two compounds in mice. In autopsies, congestion and hemorrhage in the lung were observed in dead mice given CNK-603. There were no remarkable changes in mice given CNK-6004.

These results show that the lethal dose of CNK-603 is over 4 times lower than that of montirelin hydrate, and that CNK-6004 is less toxic than montirelin hydrate.

KEY WORDS : Montirelin hydrate, NS-3, Metabolite, Degradation product, Impurity, Single dose toxicity, Mouse.

緒 言

Montirelin hydrate, (–)-*N*-[[*(3R,6R)*-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinyl]carbonyl]-*L*-histidyl-*L*-prolinamide tetrahydrate (NS-3, 以下 montirelin と略称) は, thyrotropin-releasing hormone (TRH) の類縁体で endopeptidase による分解を受け難くすることにより, TRH より強くかつ持続性の中枢神経賦活作用を有する意識障害治療薬として, Grünenthal 社 (Germany) において合成された (Flohé *et al.*, 1983; McIntosh *et al.*, 1988; Ogasawara *et al.*, 1993)。今回, montirelin の安全性評価の一環として, montirelin の夾雑物, 分解物である CNK-603, 代謝産物である CNK-6004 のマウスを用いた静脈内投与による単回投与毒性試験を実施したので, その成績を報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質

CNK-603 および CNK-6004 の化学名, 化学構造, 由来ならびに物性などは, Table 1 に示した通りであり, CNK-603 はロット番号 7 (純度 96.7%) を, CNK-6004 はロット番号 5 (純度 99.0%) を使用した。なお, CNK-603 は, montirelin の夾雑物, 分解物であり, また光学異性体の一つでもある。被験物質は Grünenthal 社 (Germany) より提供を受けた。

2. 使用動物および飼育条件

4 週齢の Slc: ddY 系の SPF 雌雄マウス (日本エスエルシー株式会社) を購入し, 予備飼育の後, 健康でかつ飼育環境に馴化した動物を選択し, 6 週齢で試験に供した。供試動物は, 体重による層別連続無作為化を行って両被験物質ともに各群雌雄各 5 匹に群分けした。なお, 投与日の体重範囲は, CNK-603 で雄 31.9~36.0 g, 雌 26.1~30.4 g, CNK-6004 で雄 30.2~35.9 g, 雌 25.9~28.9 g であった。動物は, 温度 21~25℃, 湿度 45~65%, 人工照明 12 時間および換気回数 15 回/時間以上を環境条件としたバリ

アースシステムの飼育室において, 金網ブラケットケージに 5 匹ずつ収容し, 水道水 (自由摂取) および固型飼料 (日本クレア製 CE-2, 自由摂取) を与えて飼育した。

3. 投与量および投与方法

投与量は, 予備試験の結果を考慮して設定した。すなわち, CNK-603 では 31.25, 125 および 500 mg/kg を投与した結果, 125 mg/kg 投与群の雄 1/3 例および 500 mg/kg 投与群の雌雄とも 3/3 例に死亡が認められ, 一般状態観察では, 31.25 mg/kg 以上の投与群の雌雄で振戦が, 125 mg/kg 以上の投与群の雌雄で自発運動の減少および腹臥位が認められたことから, 最高用量として 500 mg/kg を選択し, 以下公比 1/2 で 250, 125 および 62.5 mg/kg を選択した。CNK-6004 では 125, 500 および 2,000 mg/kg を投与した結果, 雌雄ともに 2,000 mg/kg 投与群においても死亡は認められず, 一般状態観察において 2,000 mg/kg 投与群の雌雄で自発運動の減少が認められたに過ぎなかったことから, 最高用量として 2,000 mg/kg を選択し, 以下公比 1/4 で 500 および 125 mg/kg を選択した。

両被験物質は, 滅菌生理食塩液 (大塚製薬工場製) に用時溶解し, 各用量群ごとにミリポアフィルターで濾過除菌した。なお, CNK-603 は投与容量が 10 ml/kg になるように濃度を調整した。CNK-6004 は 500 mg/kg 以下では投与容量が 10 ml/kg になるように濃度を調整し, 2,000 mg/kg では 10 (W/V) % 濃度液を用い投与容量を調整した。調製した被験物質は, 0.01 ml/sec の注入速度で尾静脈内に単回投与した。また, CNK-603 の対照群には滅菌生理食塩液を 10 ml/kg 投与し, CNK-6004 の対照群には滅菌生理食塩液を 2,000 mg/kg 投与群と同じ投与容量である 20 ml/kg 投与した。

4. 検査項目および方法

全動物の一般状態を投与日には投与後 6 時間観察し, その後は 2 週間にわたり 1 日 1 ないし 2 回観察した。体重は投与日 (投与 0 日), 投与後 1, 2, 3, 7, 10 および 14 日目に測定した。死亡動物は発見後速やかに, 生存動物は観察終了日にエーテル吸入により死亡せしめ, 病理解剖学的検査を実施した。

Table 1. Chemical structures and physical properties of metabolite, degradation product and impurity of montirelin.

Code number	Chemical name	Chemical structure	Molecular formula	Molecular weight	Origin	Appearance
CNK-603	(-)-N-[[[(3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinyl]carbonyl]-L-histidyl]-L-prolinamide		$C_{17}H_{24}N_6O_4S$	408.48	Degradation product Impurity Optical isomer	White crystalline powder
CNK-6004	(-)-N-[[[(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinyl]carbonyl]-L-histidyl]-L-proline		$C_{17}H_{23}N_5O_5S$	409.47	Metabolite	White crystal

実験成績

1. 概略の致死量ならびに死亡率

1) CNK-603

死亡動物は雌雄ともに125 mg/kg 以上の投与群で認められ、125 mg/kg 投与群の雌雄で各々 1/5 例、250 mg/kg 投与群の雄で 3/5 例、雌で 1/5 例、500 mg/kg 投与群の雄で 5/5 例、雌で 4/5 例の死亡が認められた。概略の致死量は、雌雄ともに125 mg/kg であった。

2) CNK-6004

投与後2週間の観察期間を通して死亡動物は認められず、致死量は雌雄ともに2,000 mg/kg 以上であった。

2. 一般状態

1) CNK-603

投与中より全被験物質投与群の雌雄全例に軽度ないし中等度の振戦が認められ、投与直後より62.5 mg/kg 投与群の雄 2 例、雌 1 例ならびに125 mg/kg 以上の投与群の雌雄全例に軽度ないし中等度の自発運動の減少が認められた。さらに125 mg/kg 以上の投与群の雌雄全例に投与直後より腹臥位が認められた。

死亡動物は投与後 3 分までに認められ、上記症状に加え、呼吸困難を呈し死亡した。

生存動物は雌雄ともに投与後 2 時間には全例が正常となり、その後観察終了日まで著明な変化は認められなかった。

2) CNK-6004

投与後 5 分より2,000 mg/kg 投与群の雄 3 例、雌 4 例に軽度の自発運動の減少が認められたが、投与後30分には全例正常となり、その後観察終了日まで著明な変化は認められなかった。

3. 体重の推移

1) CNK-603

投与日に全例死亡した雄の500 mg/kg 投与群を除く、対照群を含む雌雄の各投与群で投与翌日に用量相関性のない体重増加抑制ないし減少が認められたが、投与後 2 日目には増加に転じ、以後ほぼ順調な

増加がみられた。

2) CNK-6004

雄では対照群を含む全投与群で観察期間を通してほぼ順調な増加が観察された。雌では投与翌日に対照群を含む全投与群で用量相関性のない体重減少が認められたが、投与後 2 日目には増加に転じ、以後ほぼ順調な増加がみられた。

4. 病理解剖学的所見

1) CNK-603

雌雄ともに死亡例全例に肺の軽度ないし中等度の充出血が認められた。生存例では、雌雄ともに特に変化は認められなかった。

2) CNK-6004

雌雄の全投与群で特に変化は認められなかった。

考 察

意識障害治療薬である montirelin の夾雑物、分解物である CNK-603 ならびに代謝産物である CNK-6004 のマウスを用いた静脈内投与による単回投与毒性について検討した。

CNK-603 では125 mg/kg 以上の投与群の雌雄で死亡が認められ、概略の致死量は、雌雄ともに125 mg/kg であった。CNK-6004 では死亡は認められず、致死量は雌雄ともに2,000 mg/kg 以上であった。

一般状態として、CNK-603 では、全被験物質投与群で投与中より振戦が、投与直後より自発運動の減少が認められ、さらに125 mg/kg 以上の投与群で投与直後より腹臥位が認められた。死亡動物は投与後 3 分までに認められ、上記症状に加え、呼吸困難を呈し死亡した。生存動物は投与後 2 時間には全例が正常となった。CNK-6004 では、2,000 mg/kg 投与群で投与後 5 分より一過性の自発運動の減少が認められたに過ぎなかった。

体重の推移については、CNK-603 および CNK-6004 ともに被験物質投与に起因する変動は認められなかった。

病理解剖学的検査では、CNK-603 の死亡例で肺の充出血が認められたが、CNK-603 の生存例および CNK-6004 の全例には特に変化は認められなかつ

た。

125, 250 および 500 mg/kg の投与量で実施した montirelin のマウスにおける静脈内単回投与毒性試験（菊森ら, 1995）では、いずれの投与群においても死亡は認められなかったが、雌雄ともに投与中ないし投与直後より振戦および自発運動の減少が認められた。今回実施した CNK-603 では 125 mg/kg 投与群より死亡が認められたことから、montirelin と致死量から比較すると CNK-603 の毒性は montirelin より 4 倍以上強いものと推定された。なお、montirelin の予想臨床用量は 1 日 1 回 0.5 mg であり、この治療薬中に含まれる CNK-603 の含量は 0.01 mg 以下、すなわち概略の致死量の 0.0000016 倍以下と予想されることから、臨床使用上において CNK-603 が毒性を示す可能性は極めて少ないものと考えられた。また、CNK-6004 では 2,000 mg/kg 投与群においても死亡は認められず、montirelin の最高用量と同用量である 500 mg/kg においても毒性変化がみられなかったことから、CNK-6004 の毒性は montirelin より弱いものと考えられた。

要 約

Montirelin の夾雑物、分解物である CNK-603 ならびに代謝産物である CNK-6004 のマウスを用いた静脈内単回投与毒性試験を実施し、以下の成績を得た。

1. CNK-603 では雌雄ともに 125 mg/kg 以上の投与群で死亡が認められ、概略の致死量は、雌雄ともに 125 mg/kg であった。CNK-6004 では死亡は認められず、致死量は雌雄ともに 2,000 mg/kg 以上であった。

2. 一般状態として、CNK-603 では投与中ない

し投与直後より振戦、自発運動の減少および腹臥位が認められ、死亡動物は呼吸困難を呈し死亡した。CNK-6004 では投与後一過性の自発運動の減少が認められた。

3. 体重の推移では、CNK-603 および CNK-6004 ともに特に記すべき変動は認められなかった。

4. 病理解剖学的検査では、CNK-603 の死亡例で肺の充出血が認められた。CNK-603 の生存例および CNK-6004 の投与群全例では、ともに著明な変化は認められなかった。

Montirelin と比較した致死毒性は、マウスの静脈内単回投与毒性試験において、CNK-603 は 4 倍以上強く、CNK-6004 は弱いものであった。

（試験期間：1994 年 1 月 14 日～1994 年 4 月 25 日）

文 献

- Flohé, L., Bauer, K., Friderichs, E., Gunzler, W. A., Hennes, H. H., Herrling, S., Lagler, F., Otting, F. and Schwertner, E. (1983): Biological effects of degradation-stabilized TRH analogues. *In* Thyrotropin-Releasing Hormone (Griffiths, E. C. and Bennett, G. W., eds.), pp. 327-340, Raven Press, New York.
- 菊森幹人, 西田伊久男, 西村孝義, 安平公夫, 中井伸子, 西口保幸, 岩倉啓子, 長沢久充, 鷺見信好 (1995): MONTIRELIN HYDRATE (NS-3) のマウス, ラットおよびイヌにおける単回投与毒性試験. *J. Toxicol. Sci.*, **20**, Suppl. II, 153-163.
- McIntosh, T. K., Vink, R. and Faden, A. I. (1988): An analogue of thyrotropin-releasing hormone improves outcome after brain injury: ³¹P-NMR studies. *Am. J. Physiol.*, **254**, R785-R792.
- Ogasawara, T., Ukai, Y., Tamura, M., Taniguchi, N., Kimura, K. and Sato, A. (1993): Effects of NS-3, an analogue of thyrotropin-releasing hormone, on the central nervous system. *Biomed. Res.*, **14**, 317-328.