

れている。

#### (4) 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びマウスを用いた小核試験が実施されており、いずれも陰性の結果が得られている。

#### (5) がん原性試験

がん原性試験は、本薬の予想臨床使用期間が6カ月以内であること、反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験において発がん性を示唆する変化が認められなかったこと、及び化学構造上あるいは薬理作用上、がん原性を予測させる根拠がないことから実施されていない。

#### (6) 局所刺激性試験

局所刺激性試験においては、1%クリーム及び1%液剤共に、ウサギ皮膚一次刺激性試験では基剤に由来すると考えられる弱い刺激性が認められたが、累積刺激性試験では皮膚反応の増強は認められていない。しかし、ウサギ眼刺激性試験では1%クリームが無刺激物に分類され、眼刺激性は弱いものと判断されたのに対し、1%液剤では角膜のびまん性の混濁、虹彩の軽度の充血、結膜の発赤、浮腫及び分泌物の亢進が認められ、著しい刺激物に分類され、眼刺激性は強いものと判断されている。1%液剤の刺激性は基剤に由来するものと考えられ、洗眼による刺激性の減弱は認められていない。

#### (7) その他の毒性試験

皮膚感作性は、1%クリームでは Adjuvant and Patch 法及び Buehler 法を用いて検討されており、アジュバントを用いて感作性を高めた場合には皮膚感作性を有するものと考えられるが、アジュバントを用いない系では皮膚感作性はないものと判断されている。1%液剤は Buehler 法により検討されており、皮膚感作性はないものと判断されている（機構注；後の考察により、アジュバント併用系では液剤でも皮膚感作性を有することが示されている）。

光毒性は、モルモットを用いた光毒性試験が実施されており、1%クリーム、1%液剤共に光毒性はないものと判断されている。

皮膚光感作性は、1%クリームにおいて Adjuvant and Strip 法及び Harber 法で、1%液剤において Harber 法で検討されている。アジュバント併用系では、皮膚反応が認められたが、UV照射の有無による反応の差は認められず、皮膚光感作性はないものと判断されている（機構注；後の考察により、液剤のアジュバント併用系では皮膚光感作性を有することが示されている）。

依存性試験は、一般薬理試験及び反復投与毒性試験の結果、本薬の依存性を示唆する所見が認められなかったことから実施されていない。

本薬の類縁物質中で安全性の確認が必要な閾値を超えるものとして、分解生成物である S-E 体では、ラット4週間皮下投与試験（0、1、5、25mg/kg/日）、細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験が実施されており、本薬との毒性の差はないものと判断されている。

本薬の主代謝物である M10 については、ラットを用いた単回投与毒性試験（皮下投与：2080mg/kg、雌雄）が実施されており、投与部位の変化以外に特記すべき所見は認められず、

概略の致死量は 2080mg/kg 以上と判断されている。

製剤の劣化品（経時劣化品及び光劣化品）については、ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験が実施されており、劣化品においても刺激性に変化がないことが確認されている。

以上の毒性学的所見は、他のイミダゾール系抗真菌薬でも認められているものであり、本薬に特異的な毒性学的所見は認められなかったとの考察がなされている。

#### <機構における審査の概略>

機構は、製剤を用いた非臨床試験において臨床使用濃度である 1%までしか検討が行われていないが、なぜ臨床使用濃度を上回る濃度における安全性の確認を行わなかったのかを申請者に尋ねた。これに対し、申請者は、以下の通り回答した。

申請処方では本薬の溶解性に限界があるため、1%までの検討しか実施しなかった。2%製剤の処方は検討したが、経時的な結晶成長により、製剤からの放出性低下が認められるため開発を断念した。

機構は、この回答を了承した。

機構は、本薬投与を行ったラットにおいて卵巣重量の高値、精巣毒性、交尾率の低値、妊娠期間の延長、死産児率の高値等の生殖関連パラメータの変動が認められるが、これらの所見の発生機序及びヒトにおける安全性について申請者に尋ねた。これに対し、申請者より、次の回答を得た。

本薬投与で認められたそれらの変化は、類薬のイミダゾール抗真菌剤でも知られた作用であるステロイドホルモン合成阻害作用によるものと考えている。しかしながら、本薬は経皮的に投与されるものであり、投与時の血漿中濃度は、類薬であるケトコナゾールの内服時に血中テストステロン、エストロゲン濃度に影響が見られる薬物濃度 (Medda F et al. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 161-166, 1987) に比較して極めて低いものであり、これらの作用が臨床投与時に発現する可能性はないものとする。

機構は、この回答を了承した。

機構は、参考資料として提出された本薬液剤のアジュバント併用系の皮膚感作性試験及び皮膚光感作性試験において陽性を疑う結果が得られていることから、この点もふまえた上で本薬の皮膚感作性及び皮膚光感作性について再度考察し、必要に応じて注意喚起を行うことを申請者に求めた。これに対し、申請者は、以下の通り回答した。

本薬のクリーム及び液剤はアジュバントを用いた皮膚感作性試験において、それぞれ陽性及び陽性を否定できない結果が得られたことから、いずれも皮膚感作性のリスクを有すると考える。しかし、非アジュバント法においては両製剤共に感作性は陰性と判定されていることから、臨床使用時に皮膚感作性が発現する可能性は低く、その皮膚反応も弱いものとする。皮膚光感作性については、クリームはアジュバント法及び非アジュバント法共に陰性と判断されているが、液剤ではアジュバント法で陽性、非アジュバント法では陰性と判定されたことから、本薬液剤は皮膚光感作性のリスクを有するものの、臨床使用時に皮膚光感作性が発現する可能性は低く、皮膚反応も弱いものとする。本件については添付文書の「その他の注意」の項に「アジュバントを用いて感受性を高めた動物実験（モルモット）において、本剤に皮膚感作性及び

皮膚光感作性（液剤のみ）が認められている。」と記載し、注意喚起を図る予定である。

機構は本薬の皮膚感作性及び皮膚光感作性については否定できないものの、その作用は決して強いものではないと予測されることから、申請者の回答を了承した。

以上、機構は非臨床安全性試験の結果より、本薬の臨床適用において皮膚感作性及び皮膚光感作性については注意を払う必要があるものと考えている。

ホ. 薬理作用に関する資料

(1) 抗真菌活性に関する試験

1) *In vitro* 試験

① *Trichophyton* 属に対する *in vitro* 抗真菌活性（添付資料ホ-1、2）

マクロ液体希釈法を用いて、白癬の主要原因菌種である *Trichophyton*(*T.*) *mentagrophytes* 及び *Trubrum* の保存株に対する最小発育阻止濃度（MIC）が測定された。その結果、本薬の MIC range は、*T.mentagrophytes*（10 株）0.0025～0.020 $\mu$ g/mL、*Trubrum*（10 株）0.00063～0.0025 $\mu$ g/mL であった。なお、同菌株について、日本医真菌学会標準化委員会提案の糸状菌の抗真菌剤感受性試験法（標準法）を用いて測定された場合の MIC range は、*T.mentagrophytes*（10 株）0.00050～0.0020 $\mu$ g/mL、*Trubrum*（9 株）は 0.00024～0.0010 $\mu$ g/mL であった。

② *C.albicans* に対する *in vitro* 抗真菌活性（添付資料ホ-3）

ミクロ液体希釈法により *C.albicans* の保存株に対する MIC が測定されたところ、本薬の MIC range は 0.063～0.25 $\mu$ g/mL であり、ラノコナゾールは 0.063～1.0 $\mu$ g/mL、テルビナフィン は 4.0～>32 $\mu$ g/mL であった。

③ 臨床新鮮分離株に対する *in vitro* 抗真菌活性（添付資料ホ-4）

日本医真菌学会提案の抗真菌剤感受性試験法及び NCCLS（M-27A）法により新鮮臨床分離株である *T.rubrum* 59 株、*T.mentagrophytes* 26 株、*Epidermophyton*(*E.*) *floccosum* 1 株及び *C.albicans* 5 株に対する MIC が測定された。その結果は下記の通りであった。

菌種(株数)	薬物	MIC ( $\mu$ g/mL)
<i>T.rubrum</i> (59)	ルリコナゾール	0.00012～0.0040
	ラノコナゾール	0.00024～0.016
	テルビナフィン	0.0020～>0.25
	ビホナゾール	0.0080～>1.0
<i>T.mentagrophytes</i> (26)	ルリコナゾール	0.00024～0.0020
	ラノコナゾール	0.00050～0.0040
	テルビナフィン	0.0010～0.060
	ビホナゾール	0.016～1.0
<i>E.floccosum</i> (1)	ルリコナゾール	0.0010
	ラノコナゾール	0.0010
	テルビナフィン	0.0040
	ビホナゾール	0.13
<i>C.albicans</i> (5)	ルリコナゾール	0.031 ～ 0.25
	ラノコナゾール	0.063 ～ 0.25
	テルビナフィン	2.0 ～ >64
	ビホナゾール	0.50 ～ 4.0

④ 表在性真菌症起因菌に対する抗真菌スペクトルの検討 (添付資料ホ-5)

日本医真菌学会提案の抗真菌薬感受性試験法及び NCCLS (M-27A) 法に準じて皮膚糸状菌 29 株、黒色真菌 5 株、無色不完全糸状菌 10 株、酵母様真菌 12 株及び接合菌 2 株に対する MIC が測定された。その結果は下記の通りであった。

菌種(株数)		MIC (µg/mL)			
		ルリコナゾール	ラノコナゾール	テルビナフィン	ビホナゾール
皮膚糸状菌	<i>Trichophyton rubrum</i> (10)	≤0.0040	≤0.0040	0.0040~0.016	0.031~0.25
	<i>T. mentagrophytes</i> (10)	≤0.0040~0.0080	≤0.0040~0.0080	0.0040~0.031	0.25~2.0
	<i>T. violaceum</i> (1)	≤0.0040	≤0.0040	0.016	0.13
	<i>T. verrucosum</i> (1)	≤0.0040	≤0.0040	0.016	0.13
	<i>T. tonsurans</i> (1)	≤0.0040	≤0.0040	0.0040	0.016
	<i>Microsporum canis</i> (2)	≤0.0040	≤0.0040	0.016, 0.031	0.13, 1.0
	<i>M. gypseum</i> (2)	≤0.0040	≤0.0040	0.016, 0.031	0.25, 0.50
	<i>Epidermophyton floccosum</i> (2)	≤0.0040	≤0.0040	0.031, 0.13	0.031, 0.063
黒色真菌	<i>Hortaea werneckii</i> (3)	≤0.0040~0.0080	0.0080~0.016	0.13~0.25	4.0~8.0
	<i>Alternaria alternata</i> (2)	0.063	0.13	0.25, >2.0	4.0
無色不完全糸状菌	<i>Aspergillus fumigatus</i> (3)	≤0.0040	≤0.0040	0.13	1.0
	<i>A. flavus</i> (1)	0.0080	0.016	0.031	>8.0
	<i>A. terreus</i> (1)	≤0.0040	0.0080	0.031	2.0
	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (2)	0.031	0.13	0.13, 0.25	4.0, 8.0
	<i>Fusarium solani</i> (2)	0.13	0.25	1.0, >2.0	>8.0
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (1)	≤0.0040	0.016	0.50	2.0
酵母様真菌	<i>Candida albicans</i> (5)	0.13~0.50	0.13~0.50	>2.0	2.0~8.0
	<i>C. tropicalis</i> (1)	4.0	2.0	>2.0	>8.0
	<i>C. parapsilosis</i> (1)	4.0	2.0	1.0	>8.0
	<i>C. glabrata</i> (1)	1.0	1.0	>2.0	4.0
	<i>Cryptococcus neoformans</i> (2)	0.25	0.25, 1.0	>2.0	4.0, 8.0
	<i>Trichosporon asahii</i> (2)	0.13, 0.25	0.13, 0.25	>2.0	4.0, 8.0
接合菌	<i>Mucor circinelloides</i> (2)	>8.0	>8.0	0.50, >2.0	4.0

⑤ *Malassezia* 属に対する *in vitro* 抗真菌活性 (添付資料ホ-6)

寒天希釈法により *Malassezia(M.) furfur* 25 株、*M. sympodialis* 15 株及び *M. slooffiae* 10 株に対する MIC が測定された。その結果は下記の通りであった。

菌種(株数)	薬物	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>M. furfur</i> (25)	ルリコナゾール	0.13~8.0
	ラノコナゾール	0.13~8.0
	テルビナフィン	0.25~16
	ビホナゾール	1.0~16
<i>M. sympodialis</i> (15)	ルリコナゾール	0.031~0.25
	ラノコナゾール	0.063~0.25
	テルビナフィン	0.13~0.50
	ビホナゾール	0.13~2.0
<i>M. slooffiae</i> (10)	ルリコナゾール	0.50~2.0
	ラノコナゾール	0.50~2.0
	テルビナフィン	1.0~2.0
	ビホナゾール	64~130

⑥ *In vitro* 抗真菌活性に及ぼす諸因子の影響 (添付資料ホ-7、8)

*T. mentagrophytes* 及び *T. rubrum* に対する培地種、培地 pH、接種菌量、血清添加及び尿素添加が本薬の MIC に及ぼす影響について検討がなされた。

*T. mentagrophytes* 及び *T. rubrum* に対する本薬の MIC は、培地種では Sabouraud dextrose broth 及び Yeast morphology agar では大きな変化はなく、Casitone agar で低下した。接種菌量の増大及び血清添加により MIC は上昇し、尿素添加で MIC の低下がみられた。また *C. albicans* に対する本薬の MIC は、培地種では Sabouraud dextrose agar 及び Sabouraud dextrose broth では上昇したが、RPMI1640 及び Synthetic amino acid medium (fungal) では低下した。いずれの菌種においても、接種菌量の増大 ( $10^4 \rightarrow 10^8$ ) 及び血清添加 (0%  $\rightarrow$  20%) により MIC は上昇し、尿素添加 (0%  $\rightarrow$  5%) により減少する傾向であった。

⑦ *Trichophyton* 属に対する *in vitro* 殺真菌活性 (添付資料ホ-9、10)

*T. mentagrophytes* 及び *T. rubrum* に対する最小殺真菌濃度 (MCC) が Neutral red 法、セロハン膜法及びマクロ液体希釈法を用いて測定された。

Neutral red 法における本薬の MIC range は *T. mentagrophytes* (10 株) 0.0025~0.010 $\mu\text{g/mL}$ 、*T. rubrum* (10 株) 0.00030~0.010 $\mu\text{g/mL}$  であり、ラノコナゾール、テルビナフィンと比べ、同程度ないしはそれ以上の優れた抗菌力を有していた。

セロハン膜法における本薬の MIC range は *T. mentagrophytes* (5 株) 0.64~2.6 $\mu\text{g/mL}$ 、*T. rubrum* (5 株) 0.080~0.16 $\mu\text{g/mL}$  であり、その MCC はビホナゾール、ラノコナゾールよりは優れるものの、テルビナフィン (*T. mentagrophytes* (5 株) 0.16~0.32 $\mu\text{g/mL}$ 、*T. rubrum* (5 株) 0.16 $\mu\text{g/mL}$ ) と同等ないしは若干劣る結果であった。

マクロ液体希釈法における本薬の MIC range は *T. mentagrophytes* (7 株) 0.020~0.080 $\mu\text{g/mL}$ 、*T. rubrum* (8 株) 0.0025~0.080 $\mu\text{g/mL}$  であり、その MCC はビホナゾール、ラノコナゾールよりは優れるものの、テルビナフィン (*T. mentagrophytes* (7 株) 0.0025

~0.0050 $\mu$ g/mL、*T.rubrum* (8株) 0.0025 $\mu$ g/mL) と同等ないしは若干劣る結果であった。

## 2) *In vivo* 試験

### ① モルモット足白癬モデルにおける本薬溶液 (PEG400) の治療効果 (添付資料ホ-11)

モルモット足白癬モデルを作製し、菌接種開始 10 日後から本薬、ラノコナゾール及びテルビナフィンの PEG400 溶液が 1 日 1 回、3 日間又は 7 日間塗布され、最終塗布 5 日後の菌陽性率が検討された。その結果、投与期間については、0.5%本薬溶液の 3 日間塗布により菌陽性率は有意に低下し、7 日間塗布により全ての感染局所は真菌学的に陰性化した。用量については、本薬溶液の 3 日間塗布により 0.5%以上の溶液で菌陽性率が有意に低下し、1%溶液では全ての感染局所が真菌学的に陰性化していた。対照に用いられたラノコナゾール及びテルビナフィン溶液はいずれも 0.5%以上の溶液で菌陽性率が有意に低下したが、全ての感染局所を真菌学的に陰性化することは出来なかった (いずれも  $p < 0.05$ 、培養陽性率 (n=10) : Fisher の直接確率法)

### ② モルモット足白癬モデルにおけるルリコナゾールクリーム の治療効果 (添付資料ホ-12)

モルモット足白癬モデルを用い、菌接種開始 17 日後より本薬、ラノコナゾール、テルビナフィン及びビホナゾールのクリーム 0.1mL を 1 日 1 回 3 日間塗布、最終塗布 5 日後の菌陽性率が検討された。

本薬の 3 日間塗布により、0.25%以上の濃度で菌陽性率は有意に低下し、0.5%及び 1%クリームでは、全ての感染局所において真菌学的陰性化が認められた ( $p < 0.05$ 、Fisher の直接確率法)。対照薬の 1%ラノコナゾールクリームにおいては完全な菌陰性化が認められたが、1%テルビナフィンクリーム及び 1%ビホナゾールクリームでは完全な真菌学的陰性化は認められなかった。

### ③ モルモット足白癬モデルにおけるルリコナゾールクリームの短期間塗布による治療効果 (添付資料ホ-13)

モルモット足白癬モデルを用い、菌接種開始 17 日後から本薬、ラノコナゾール、ビホナゾール、テルビナフィンのクリーム 0.1mL を 1 日 1 回 2 日間 (薬剤 2 日間+クリーム基剤 2 日間) 又は 4 日間塗布、最終塗布 5 日後の皮膚局所の菌陽性率が検討された。

1%本薬クリームの 2 日間塗布により有意な菌陽性率の低下が認められた。対照薬の 1%ラノコナゾールクリーム及び 1%テルビナフィンクリームにおいては、4 日間治療で菌陽性率を有意に低下させたが、2 日間治療では有意な低下は認められなかった。1%ビホナゾールクリームでは 4 日間治療でも有意な菌陽性率の低下は認められなかった (各群 n=10、いずれも  $p < 0.05$ 、Fisher の直接確率法)

### ④ モルモット体部白癬モデルにおけるルリコナゾールクリーム の治療効果 (添付資料ホ-14)

モルモット体部白癬モデルを用い、菌接種 10 日後から本薬、ラノコナゾール、ビホナゾール、テルビナフィンのクリーム製剤 0.2mL を 1 日 1 回 7 日間塗布、最終塗布後 5 日目における感染局所皮膚の病変度及び菌陽性率について検討された。

本薬 0.25%、0.5%もしくは 1%クリームの 7 日間塗布により、皮膚病変スコア及び菌陽性率のいずれの指標においても有意な治療効果が認められた。特に本薬 1%クリームは感染局所 10 例中 9 例を真菌学的に陰性化させた。対照薬の 1%ラノコナゾールクリームにおい

でも皮膚病変スコア及び菌陽性率の有意な低下が認められたが、1%テルビナフィンクリームでは、皮膚病変スコアに有意な改善がみられたものの菌陽性率に有意な低下は認められなかった。1%ビホナゾールクリームについては、皮膚病変及び菌陽性率のいずれにおいても有意な治療効果は認められなかった。(皮膚病変スコア(各群 n=10) : p<0.05、Tukeyの多重比較検定(ノンパラメトリック)、菌陽性率(各群 n=10) : p<0.05、Fisherの直接確率法)

⑤ モルモット体部白癬モデルにおけるルリコナゾールクリームの短期間塗布による治療効果(添付資料ホ-15)

モルモット体部白癬モデルを用いて、1%本薬クリームの短期間塗布での治療効果が、1%ラノコナゾールクリーム、1%テルビナフィンクリーム及び1%ビホナゾールクリームと比較された。薬剤投与は、菌接種5日後から、各薬剤0.2mLを1日1回、4日あるいは8日間塗布とされ、最終塗布5日(菌接種17日)後の菌陽性率から治療効果が判定された。

1%本薬クリーム4日間及び8日間塗布群は、ともに感染10日以後皮膚症状の改善が認められた。1%ラノコナゾールクリーム及び1%テルビナフィンクリームもほぼ同様の経過であった。1%ビホナゾールクリーム8日間塗布の効果は、他剤に比較して弱く、皮膚症状の改善効果は感染16日及び17日で観察された。(各群 n=10、p<0.05 vs 無処置感染対照群、Dunnettの多重比較検定(ノンパラメトリック))。菌陽性率については、1%本薬クリーム、1%テルビナフィンクリーム及び1%ラノコナゾールの4日間塗布群では、培養陽性率はそれぞれ10、20及び70%であり、1%本薬クリームはテルビナフィン及びラノコナゾールよりも高い治療効果が認められた。8日間塗布群では、1%本薬クリーム及び1%ラノコナゾールクリーム塗布群において菌陰性化が認められた。1%テルビナフィンクリーム及び1%ビホナゾールクリームの菌陽性率は、各々40及び100%であり、1%本薬クリーム4日間塗布の結果よりも高値を示した。

⑥ モルモット足白癬モデルにおけるルリコナゾール液剤及びクリームの比較試験(添付資料ホ-16)

モルモット足白癬モデルを用い、菌接種開始28日後より本薬の液剤、クリーム剤、ラノコナゾール、テルビナフィン及びビホナゾールのクリーム製剤0.1mLを1日1回2日間塗布、最終塗布14日後の菌陽性率が検討された。

本薬の1%液剤及び1%クリームは、2日間塗布により菌陽性率は有意に低下し、両製剤は同程度の効果を示した(各群とも n=10、有意差検定は p<0.05、Fisherの直接確率法)。1%ラノコナゾールクリームも効果を示したが、その低下率は、本剤の液剤及びクリームより低かった。1%テルビナフィンクリームあるいは1%ビホナゾールクリームは有意な菌陽性率の低下は認められなかった。

⑦ モルモット体部白癬モデルにおけるルリコナゾール液剤及びクリームの比較試験(添付資料ホ-17)

モルモット体部白癬モデルを用いて1%本薬液剤の治療効果について、1%本剤クリーム及び対照薬と比較検討された。対照薬には、ラノコナゾール、テルビナフィン、ビホナゾールが用いられた。菌接種5日後から各薬剤0.2mLが1日1回6日間塗布され、最終塗布5日後の感染局所皮膚の病変度及び培養成績から治療効果が判定された。

本薬の1%液剤及び1%クリーム6日間塗布により、皮膚病変スコア及び培養試験成績のいずれの指標においても有意な治療効果が認められ、両製剤の効果は同程度であった。

1%ラノコナゾールクリームあるいは1%テルビナフィンクリームについても、皮膚病変スコアの改善及び培養試験成績のいずれの指標においても有意な治療効果が認められたが、1%ビホナゾールクリームは皮膚病変スコア及び培養試験成績のいずれにおいても有意な治療効果が認められなかった（各群とも  $n=10$ 、皮膚病変スコアの有意差検定： $p<0.05$ 、Tukey の多重比較検定（ノンパラメトリック）、菌陽性率の有意差検定： $p<0.05$ 、Fisher の直接確率法）。

⑧ モルモット皮膚カンジダ症モデルにおけるルリコナゾールクリームの治療効果（添付資料ホ-18）

モルモット体部皮膚カンジダ症モデルを用いて、①0.25～1%ルリコナゾールクリームの真菌学的治療効果、②1%ルリコナゾールクリームと対照薬剤との効果が比較検討された。菌接種5日後から各薬剤の0.2mLが1日1回3日間塗布され、最終塗布2日後の局所皮膚の培養成績から治療効果が判定された。

本薬クリームの3日間塗布により、0.5%以上の濃度において感染局所皮膚生菌数の有意な減少が認められた（各群とも  $n=10$ 、 $p<0.05$ 、Tukey の多重比較検定）。

1%本薬クリーム塗布群及び1%ラノコナゾール塗布群のコロニー数は、無処置感染対照群と比較して有意に減少したが、その減少は基剤対照群に対しては有意ではなかった。また1%テルビナフィン及び1%ビホナゾールクリーム塗布群については、有意差は認められなかった（各群とも  $n=10$ 、 $p<0.05$ 、Tukey の多重比較検定）。

(2) 作用機序に関する試験

1) 真菌のエルゴステロール合成に及ぼす影響（添付資料ホ-26、27）

① *C.albicans*

*C.albicans* IFO1270 から調製した粗酵素液を用いて本薬、ラノコナゾール及びビホナゾールのエルゴステロール合成に及ぼす影響が<sup>14</sup>C 標識メバロン酸を前駆体として検討された。その結果、いずれの薬剤もエルゴステロール合成経路のラノステロール14 $\alpha$ 位脱メチル化反応を阻害し、各々の50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）は、本薬0.014 $\mu$ mol/L、ラノコナゾール0.036 $\mu$ mol/L、ビホナゾール0.39 $\mu$ mol/Lであった。

② *T.mentagrophytes*

*T.mentagrophytes* TIMM2789 の発芽分生子を用いて本薬、ラノコナゾール、ビホナゾール及びテルビナフィンのエルゴステロール合成に及ぼす影響が<sup>14</sup>C 標識メバロン酸を前駆体として検討された。その結果、いずれの薬剤においてもエルゴステロール合成阻害が認められ、各々のIC<sub>50</sub>は本薬0.45nmol/L、ラノコナゾール1.2nmol/L、ビホナゾール11nmol/L、テルビナフィン1.2nmol/Lであった。

2) 白癬菌の形態変化に及ぼす影響 —電子顕微鏡学的観察—（添付資料ホ-28）

本薬の *Trubrum* 発育菌糸の微細構造ならびに細胞壁に及ぼす影響が組織学的に検討された。その結果、走査型電子顕微鏡による観察では、薬剤無添加の *T. rubrum* 発育菌糸は菌糸



幅が均一で、ほぼまっすぐに伸長し、細胞壁は細かい粒子状の構造物で覆われていたが、本薬添加培養では、0.0049ng/mL (1/1024 MIC) の低濃度から細胞壁に影響がみられ、薬剤の濃度段階に伴う細胞壁の剥離、細胞壁粒子状構造物の剥離及びその下層に存在する鞘状構造が観察された。また、*Trubrum* 通常生育菌糸に対して、1、3、5mg/mL と濃度を変えた lysozyme、zymolyase、chitinase 処理の及ぼす影響を観察した結果、chitinase 処理菌糸において、本薬添加培養菌糸で認められた菌糸の切断や膨潤が顕著に観察されたことから、本薬が細胞壁中のキチン成分と細胞膜との結合やキチン合成に関与する酵素に特異的に影響を与えることが推察されている。

### 3) 白癬菌のプロテアーゼ産生に及ぼす影響 (添付資料ホ-29)

白癬菌 (*T.mentagrophytes* TIMM2789) のプロテアーゼ産生に及ぼす本薬の影響が検討された。検討された抗真菌薬はいずれも抗菌活性を示す濃度域より低い濃度からプロテアーゼ産生阻害作用を示すことが示され、各々の IC<sub>50</sub> は本薬 1.6ng/mL、ラノコナゾール 5.1ng/mL、ビホナゾール 5800ng/mL、テルビナフィン 13ng/mL であった。

### 4) 再構築皮膚モデルを用いた角質侵入阻害 (添付資料ホ-30)

ヒト皮膚再構築モデルを用いて、白癬菌の角質侵入に及ぼす本薬及びテルビナフィンの影響が検討された。

薬物無添加の対照群では、分生子から発芽した菌糸が角質層表面及び角質層内に多数認められ、一部の菌糸は基底層まで達していたのに対し、本薬添加群においては、0.01µg/mL においては角質層表面に菌糸の伸長は観察されたが、角質層内への侵入像は認められず、0.1g/mL 以上の添加群では、角質層表面に分生子あるいは短桿状の菌体が観察され、角質層内への侵入像は認められなかった。

テルビナフィン添加群においては、0.0001~0.1g/mL 添加群では、対照群とほぼ同様の形態であり、1g/mL 添加において、角質層表面に分生子あるいは短桿状の菌体が観察され、角質層への侵入像は認められなかった。また、テルビナフィン添加群では、分生子の発芽及び菌糸の伸長像が観察された場合は全て角質層内への侵入が観察された。

本モデルにおいて、白癬菌の皮膚モデル内への侵入を阻害する本薬最低濃度は、テルビナフィンの 1/100 であった。本薬は白癬菌の発育を阻害しない低濃度で角質侵入を阻害したことより、白癬菌の角質層への侵入に重要な役割を果たすプロテアーゼ産生あるいは活性を阻害している可能性が示唆されたとされている。

### 5) リン酸漏出を指標とした白癬菌膜障害作用 (添付資料ホ-31)

本薬の白癬菌膜障害作用について、細胞膜からのリン酸漏出を指標とした比較検討が実施された。対照薬には、ラノコナゾール、ビホナゾール、テルビナフィンが用いられた。ビホナゾールの膜傷害作用が最も強く、ルリコナゾールの膜障害作用はラノコナゾールと同等であり、テルビナフィンより弱く、本薬の白癬菌細胞膜に対する直接的な障害作用への関与は低いと考えられた。

#### 6) 類縁化合物の *in vitro* 抗真菌活性 (添付資料ホ-32)

本薬の類縁化合物である Z 体、S-E 体及び主代謝物である M10 について、白癬菌及びカンジダ属真菌に対する *in vitro* 抗真菌活性が検討された。白癬菌に対する MIC range は本薬 0.00024~0.0020 $\mu$ g/mL、Z 体 0.0080~0.060 $\mu$ g/mL、S-E 体 0.060~1.0 $\mu$ g/mL、M10>16 $\mu$ g/mL、カンジダ属真菌に対する MIC range は本薬 $\leq$ 0.0080~0.25 $\mu$ g/mL、Z 体 0.50~4.0 $\mu$ g/mL、S-E 体 0.50~8.0 $\mu$ g/mL、M10>16 $\mu$ g/mL であり、類縁化合物の抗真菌活性は本薬と比較して極めて弱いと考えられた。

#### (3) 一般薬理試験 (添付資料ホ-33~37)

##### 1) 一般症状及び行動に及ぼす影響

本薬 20、200 及び 2000mg/kg をマウスに皮下投与した際、一般症状及び行動に対する影響は認められなかった。

##### 2) 中枢神経系に対する作用

###### ① 自発運動量に及ぼす影響

本薬 30、100 及び 300mg/kg をマウスに皮下投与した際、自発運動量に及ぼす影響は認められなかった。

###### ② 麻酔作用

マウスに本薬 1、3 及び 10mg/kg 皮下投与 1 時間後に hexobarbital 80mg/10 mL/kg を腹腔内投与し hexobarbital 投与後から、正向反射が消失するまでの時間 (睡眠導入時間) と正向反射消失から回復するまでの時間 (睡眠時間) が測定された。1mg/kg 投与群では影響は認められなかったが、3 及び 10mg/kg 投与群では対照群に比して有意な睡眠時間の延長が認められた。睡眠導入時間に対しては、いずれの用量においても影響は認められなかった。

###### ③ 電撃痙攣

本薬 30、100 及び 300mg/kg をマウスに皮下投与し、1 時間後にマウスの両眼瞼に電極を当て、小動物用電撃刺激痙攣装置を用いて電気ショックを与えた際に観察される間代性痙攣 (C1) 及び強直性伸展痙攣 (T.E.) の電流値が測定された。その結果、本薬は電気刺激による C1 及び T.E. に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

###### ④ pentetrazol 誘発痙攣

マウスに本薬 30、100 及び 300mg/kg を皮下投与 1 時間後に pentetrazol 75mg/10mL/kg を皮下投与し、C1、T.E. 及び死亡の有無について 30 分間観察したところ、本薬は pentetrazol 誘発による痙攣に対し協力作用を有さなかったとされている。また、マウスに本薬 30、100 及び 300mg/kg を皮下投与 1 時間後に pentetrazol 110mg/10 mL/kg を皮下投与し、C1、T.E. 及び死亡の有無について 30 分間観察したところ、本薬は pentetrazol 誘発による痙攣に拮抗作用を有さなかったとされている。

###### ⑤ 痛覚に及ぼす影響(圧刺激法)

本薬 30、100 及び 300mg/kg をラットに皮下投与し、圧刺激鎮痛効果を測定したところ、

刺激閾値圧に有意な差はなく、痛覚に及ぼす影響は認められなかったとされている。

#### ⑥ 正常体温に及ぼす影響

本薬 30、100 及び 300mg/kg をラットに皮下投与した際、正常体温に及ぼす影響は認められなかったとされている。

#### 3) 自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響

本薬は、 $10^{-5}$ mol/L 以上の濃度でウサギ摘出回腸自動運動を抑制した。モルモット摘出回腸に対し、本剤は  $10^{-4}$ mol/L まで単独作用は認められず、ACh 収縮、Histamine、BaCl<sub>2</sub> 収縮及び 5-HT 収縮に対しては  $10^{-5}$ mol/L 以上の濃度で収縮高の抑制が認められた。

#### 4) 呼吸・循環器系に及ぼす影響

本薬は 3mg/kg までの投与用量においてイヌの心電図、血圧、心拍数、呼吸回数及びヘモグロビン酸素飽和度に対して影響を及ぼさなかった。

#### 5) 消化器系に及ぼす影響

本薬は 300mg/kg までの投与量においてマウスの胃腸管内輸送能に影響を及ぼさなかったとされている。

#### 6) 水及び電解質に及ぼす影響

本薬は 300mg/kg までの投与量においてラットの水及び電解質代謝に影響は認められなかった。

#### 7) 抗炎症作用

本薬は 300mg/kg までの用量において、ラットの毛細血管透過性に影響を及ぼさなかった。また、本薬 300mg/kg 投与によりラットカラゲニン浮腫の有意な抑制が認められた。

### <機構における審査の概要>

機構は、カンジダ感染モデルを用いて本薬液剤の検討を行わなかった理由について申請者に見解を求めた。これに対し、申請者は以下の通り回答した。

液剤はクリーム剤の追加の位置付けで開発したことから、液剤についてはクリームとの生物学的同等性を検証している。また、足白癬モデル及び体部白癬モデルにおいても、液剤はクリームとほぼ同等の治療効果を示すことも確認している。これらのことから、本薬液剤はモルモット皮膚カンジダ症においてもクリーム同様に優れた効果を示すと考え、試験は実施しなかった。

また、機構は、液剤を用いて皮膚中の薬物濃度を測定しなかった理由について申請者に見解を求めた。

これに対し申請者は、液剤の角質層中薬物濃度の測定は、生物学的同等性試験として実施し、その結果、クリームと同等であることを確認していると回答した。