

## (2) 副次的薬理試験

### 1) メタコリン誘発モルモット気管支収縮モデル (J Clin Invest 90: 421-428, 1992、参考資料)

人工換気下の雄性 Hartley 系モルモット (麻酔下) において、メタコリン ( $8.1 \pm 4.3 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) の静脈内投与により上昇した肺粘性抵抗は、NO (5~300ppm) 吸入により用量依存的に低下した。また、メタコリンにより低下した動肺コンプライアンスは、NO 吸入により用量依存的に上昇した。気管支収縮を 50%抑制する NO 濃度 ( $\text{EC}_{50}$  値) は  $15.0 \pm 2.1 \text{ppm}$  であった。一方、メタコリン非投与時の肺粘性抵抗は NO (300ppm) 吸入により有意に低下したが、動肺コンプライアンスに影響はみられなかった。

### 2) メタコリン誘発ウサギ気管支収縮モデル (Eur Respir J 6: 177-180, 1993、参考資料)

人工換気下 ( $\text{FiO}_2=0.3$ ) のニュージーランド白色ウサギ (麻酔下) において、メタコリン ( $4.0 \text{mg}/\text{mL}$ ) 噴霧による気道収縮は、NO (80ppm) 吸入により抑制された。一方、メタコリンによる動肺コンプライアンス及び酸素分圧の低下に、NO 吸入は影響を及ぼさなかった。

### 3) メタコリン又はヒスタミン誘発イヌ気管支収縮モデル (Am J Respir Crit Care Med 150: 233-237, 1994、参考資料)

ヒスタミン ( $200 \mu\text{g}/\text{min}$ ) 又はメタコリン ( $67 \mu\text{g}/\text{min}$ ) の静脈内投与により気道断面積を同程度縮小 (それぞれ対照に対し  $60 \pm 3\%$  及び  $63 \pm 3\%$ ) させたイヌに NO (100~400ppm) を吸入した時、ヒスタミン誘発気道収縮が用量依存的に抑制され、200ppm 以上で完全に抑制された。一方、メタコリン誘発気道収縮に対する抑制作用は軽微であった。

### 4) 卵白アルブミン感作モルモット気道閉塞モデル (Eur J Pharmacol 249: R7-R8, 1993、参考資料)

人工換気下の卵白アルブミン感作モルモット (麻酔下) において、L-NAME (NO 合成酵素阻害剤、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ ) 静脈内投与は卵白アルブミン ( $0.1 \text{mg}$ ) 噴霧による気道収縮 (吸気圧上昇) を有意に増大させたが、NO (20ppm) 吸入はこの吸気圧上昇を有意に減弱させた。

## (3) 安全性薬理試験

### 1) 心血管系及び呼吸器系に対する作用

#### ① 麻酔下のイヌにおける試験 (資料番号: 4.2.1.3-1、評価資料)

麻酔下のビーグル犬に、自発呼吸下で 80~640ppm の NO を、陽圧換気下で 80ppm の NO を 6 時間吸入させ、心血管系、肺及び血液への影響を検討した。640ppm 群において、3 例中 1 例が、投与開始後 4 時間で死亡し、死因は MetHb 血症による酸素欠乏症と推察された。320 及び 640ppm 群において、MetHb 濃度は、対照群に比較してほぼすべての測定時点で有意に上昇し、 $\text{PaO}_2$  は、6 時間の投与期間中有意な低下がみられ、MetHb が血液の酸素運搬能を低下させたためと考えられた。また、全身血管抵抗及び動脈圧の低下、並びに分時換気量、呼吸数及び心拍出量の増加は、低酸素状態に関連したものと考えられた。

心電図検査では、対照群では異常はみられなかったが、心室性期外収縮が、自発呼吸下での NO 80、160、320 及び 640ppm 群でそれぞれ 1、2、1 及び 2 例に、陽圧換気下での 80ppm 群で 2 例にみられた。また、洞性頻脈が自発呼吸下 80ppm 群で 2 例、320ppm 群で

1例にみられ、房室接合部性調律が自発呼吸下 80 及び 160ppm 群で各 1 例にみられたが、陽圧換気下 80ppm 群では何れの事象もみられなかった。さらに、R on T 現象が 640ppm 群で 1 例にみられた。これらの結果は NO が心室刺激及び洞性頻脈を引き起こす可能性を示唆するが、観察された所見に明確な用量依存性や時間依存性がないため、麻酔下でのカテーテル留置による可能性も考えられた。

② 無麻酔下のイヌにおける試験（資料番号：4.2.1.3-2、評価資料）

雌雄各 3 例のビーグル犬にテレメトリー式の心電図電極を埋め込み、無麻酔自発呼吸下で NO 吸入が心電図に及ぼす影響を検討した。試験 1～4 週目に 40、80 又は 160ppm の NO を、試験 6 週目には 320ppm の NO を 1 回 4 時間吸入させ、試験 5 及び 7 週目では N<sub>2</sub> 約 79% 及び酸素約 21% の混合ガスを吸入させ、各吸入時の心電図並びに MetHb 及び Hb 濃度を測定した。心電図検査では、1 例に先天性房室結節副伝導路を有する結果とみられる WPW（Wolf-Parkinson-White）症候群が観察された他は、320ppm までの NO 濃度において、心電図及び脈拍に異常はみられなかった。また、麻酔イヌを用いた SC-0065 試験で観察された心室性期外収縮は観察されなかったことから、NO 吸入は心刺激伝導系、脈拍、調律に影響しないと結論した。血中 MetHb 濃度は、160ppm 以上の NO 吸入で増加したが、80ppm においては明らかな上昇はみられなかった。

2) 中枢神経系に対する作用  
資料は提出されていない。

(4) 薬力学的薬物相互作用試験  
資料は提出されていない。

<審査の概要>

機構は、本薬の吸入開始濃度を 20ppm と設定した妥当性について、非臨床試験成績から説明するよう申請者に求めた。

申請者は、以下のように説明した。本薬の臨床投与濃度域（5～20ppm）における *in vivo* 用量反応性試験（非臨床試験）、ラット及びブタ（5～40ppm）を用いた低酸素性肺血管収縮モデル、U-46619 誘発ヒツジ肺血管収縮モデル（5～80ppm）並びにヒツジ新生児遷延性肺高血圧症モデル（6～100ppm）の肺動脈圧（又は平均肺動脈圧）あるいは PaO<sub>2</sub> において、NO 吸入に対する用量反応性が認められた。いずれも 20ppm を超える濃度では反応が鈍くなることから、20ppm の NO 投与にて収縮した肺血管が完全に拡張するため、それ以上の濃度に対し反応しないものと考えられた。これらの結果から、20ppm の開始濃度で十分な酸素化の改善が期待できると判断した。

安全性の観点から、本薬の使用において最も注意すべき点は、血中 MetHb 濃度及び吸気中 NO<sub>2</sub> 濃度の上昇である。血中 MetHb 濃度の上昇は、血液の総酸素運搬能を低下させ、10%以上になるとチアノーゼ等が発現するとされている。ラット及びイヌの血中 MetHb 濃度を検討したところ、ラット 28 日間反復投与毒性試験では、対照群（血中 MetHb 濃度：1.4%、以下同様）と比較して、160ppm（16.2%）以上で MetHb 濃度の上昇が認められたが、80ppm（2.2%）以下の投与群では顕著な上昇はみられず、反復投与の影響もみられなかった（(ii) <提出された資料の概要> (6) 2 参照）。同様に、イヌ 6 時間単回投与試験では NO の吸入濃度及び吸入時間に依存して MetHb 濃

度が上昇したものの、80ppm 投与群 (3.0%、対照群 1.2%) では顕著な上昇はみられなかった (ii) <提出された資料の概要> (6) 3 参照)。ラット及びイヌ共に 80ppm 以下の吸入では MetHb 濃度の顕著な上昇は認められなかったことから、20ppm を最大耐用量と判断した。

機構は、以下のように考える。非臨床における検討ではあるものの、NO 20ppm までの濃度では概ね用量依存的な有効性を示し、20ppm 以上の増量効果は必ずしも明確でないこと、NO 濃度の上昇に伴う安全性の懸念もあること等から、20ppm を開始用量とすることに一定の妥当性はあると考える。しかしながら、非臨床試験成績のみに基づき、開始用量を 20ppm とする根拠とすることは困難と考えられることから、本薬の吸入開始濃度の妥当性については、更に臨床の項にて検討する必要がある。

## (ii) 薬物動態試験成績の概要

本申請では、本薬の非臨床薬物動態の資料として、評価資料として 4 試験の成績が、参考資料として公表学術論文 2 報が提出された。

### <提出された資料の概要>

#### (1) 吸収 (Int Arch Occup Environ Health 46:71-77, 1980、参考資料)

ラット (各群 3~4 例) を  $^{15}\text{N}$  標識した NO (以下、 $^{15}\text{NO}$ ) で換気したシリンダー中に入れ、 $^{15}\text{NO}$  138、270 及び 880ppm をそれぞれ 77、60 及び 64 分間全身曝露により吸入投与したとき、吸収率はそれぞれ約 90、60 及び 20%であった。高濃度の投与による吸収率の低下は、致死量 (300ppm、(iii) <提出された資料の概略> (1) 1 参照) に近い NO 量の吸入による呼吸数の減少に起因するものと考えられた。

#### (2) 分布

##### 1) ラットにおける吸入投与後の組織分布 (Int Arch Occup Environ Health 46:71-77, 1980、参考資料)

ラット (各実験で 3 例) に、上記 (1) の条件で  $^{15}\text{NO}$  を全身曝露により吸入投与し、1 例からは曝露終了直後に採血し、他の 1 例からは臓器 (肺、気管、肝臓、腎臓、骨格筋) を採取し、残りの 1 例からは曝露後 24 時間採尿した。なお、各臓器は 0.85%塩化ナトリウム液 (以下、NaCl) で灌流後に摘出され、 $^{15}\text{NO}$  138 及び 270ppm 群の赤血球は 0.85%NaCl で洗浄された。各組織及び尿中の  $^{15}\text{N}$  を測定し、 $^{15}\text{N}$  の自然存在比 (0.365%) を差し引いた過剰原子パーセント (atom % excess、以下、APE) 及び組織 g あるいは mL 当たりの  $^{15}\text{N}$  量 ( $\mu\text{g}$ ) を算出した。全血 (0.036~0.078 APE、10~24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、血清 (0.099~0.233 APE、9~21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、赤血球 (洗浄なし: 0.021 APE、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、洗浄後: 0.007 APE、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及び尿 (0.320~0.558 APE、628~902 $\mu\text{g}$ ) で高く、気管、肺、肝臓、骨格筋及び腎臓 (0.004~0.023 APE、1~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) では低かった。

##### 2) ラット赤血球における $^{15}\text{N}$ の存在形態 (Int Arch Occup Environ Health 46:71-77, 1980、参考資料)

ラット 3 例に  $^{15}\text{NO}$  108ppm を 96 分間全身曝露により吸入投与し、投与終了後 15 分に採取

した血液から赤血球あるいは血清を分取した。分取した赤血球に 0.85%<sup>1)</sup> NaCl 又は無処置血清を、分取した血清には無処置赤血球を加え、37°Cで 30 分間インキュベートした時、赤血球の <sup>15</sup>N は血清及び 0.85%<sup>1)</sup> NaCl 中に容易に移行した。したがって、赤血球における <sup>15</sup>N の存在形態は、Hb との化学結合や配位結合ではなく、赤血球細胞におけるニトロシルヘモグロビン（以下、NOHb）に由来する易水溶性化合物であると推測された。

### (3) 代謝

#### 1) ラットにおける静脈内投与後の血中代謝物 (Int Arch Occup Environ Health 46:71-77, 1980、参考資料)

<sup>15</sup>NO で処理した血液 5mL をラット 2 例に静脈内投与し、投与後 1 時間に血液を採取した。ラット血中に投与量の約 13%の <sup>15</sup>N が存在し、<sup>15</sup>N の赤血球と血清中における存在比率は 1 : 0.3 であった。また、血清中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 及び NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度は、対照動物に比べて顕著に高かった。

#### 2) ラットにおける吸入投与後の尿中代謝物 (Environ Health Perspect 73: 201-206, 1987、参考資料)

ラット (各群 2 例) に、<sup>15</sup>NO 145ppm を 123 分間全身曝露により吸入投与した。投与後 48 時間までの尿中の主な成分は、<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (尿中に排泄された <sup>15</sup>N の 75%) 及び <sup>15</sup>N-尿素 (24%) であった。

### (4) 排泄

#### 1) ラットにおける吸入投与後の排泄 (Environ Health Perspect 73: 201-206, 1987、参考資料)

ラット 2 例に、上記 (3) 2) の条件で <sup>15</sup>NO を全身曝露により吸入投与した時、吸入投与後 48 時間で、吸入された <sup>15</sup>N の約 55%が尿中に排泄された。

#### 2) ラットにおける静脈内投与後の排泄 (Int Arch Occup Environ Health 46:71-77, 1980、参考資料)

<sup>15</sup>NO で処理した血液 5mL をラット 3 例に静脈内投与した時、<sup>15</sup>N の尿中排泄率は投与後 0 ~24 時間で投与量の 26~57%、投与後 24~48 時間で 3~5%であった。

### (5) 薬物動態学的薬物相互作用試験

該当資料は提出されていない。しかし、吸入された NO は MetHb の生成を示すため、MetHb 生成を惹起する亜硝酸塩を生じる硝酸イソソルビド等の硝酸薬とは MetHb の生成増大を引き起こす可能性が考えられる。

### (6) その他の薬物動態試験

#### 1) ラット 7 日間反復投与時の MetHb 濃度 (試験番号 : SC-0063、4.2.3.2-1、評価資料)

<sup>1)</sup> 原著論文では「0.58%」となっているが、生理食塩水を使用したことから、「0.85%」とした。

ラット（各濃度雌雄各 15 例：雌雄 5 例×3 曝露期間）に、個別鼻部曝露装置を用いて NO（0、80、200、300、400 及び 500ppm）を 1 日 6 時間、1、3 又は 7 日間吸入投与し、吸入終了直後に血液を眼底より採取した。なお、死亡動物では心臓採血を行った。

400 及び 500ppm 群の全例が 1 日目の吸入期間中に、300ppm 群の 26/30 例（雄 11/15 例、雌 15/15 例）が 2 日目吸入前までに死亡したため、300ppm 以上の吸入群の MetHb 濃度は正確ではないが、1 日目の雌雄平均の MetHb 濃度（総 Hb に対する MetHb の百分率）は NO 吸入濃度 0、80、200、300、400 及び 500ppm でそれぞれ  $2.7 \pm 0.6$ 、 $2.7 \pm 0.7$ （平均値±標準偏差、以下同様）、 $22.0 \pm 5.9$ 、 $67.7 \pm 10.6$ 、 $71.4 \pm 7.1$  及び  $58.1 \pm 7.1\%$  であった。7 日目の MetHb 濃度は、0、80、200 及び 300ppm（300ppm 群のみ 4 例）でそれぞれ  $2.3 \pm 0.4$ 、 $3.7 \pm 0.4$ 、 $22.7 \pm 5.2$  及び  $38.1 \pm 3.8\%$  であり、反復投与による上昇は認められなかった。

## 2) ラット 28 日間反復投与時の MetHb 濃度（試験番号：SC■0064、4.2.3.2-4、評価資料）

ラット（各群雌雄各 15 例、ただし 200ppm 群のみ雄 23 例、雌 20 例）に、個別鼻部曝露装置を用いて NO（0、40、80、160、200 及び 250ppm）を 1 日 6 時間、28 日間吸入投与し、7、14、21 及び 28 日目投与終了直後及び最終投与開始後 24 時間に採血した。

吸入 7 及び 28 日目の雌雄平均の MetHb 濃度は、0ppm 群で  $2.0 \pm 0.9$ （平均値±標準偏差、以下同様）及び  $1.4 \pm 0.7\%$ 、40ppm 群で  $2.6 \pm 0.6$  及び  $1.9 \pm 0.5\%$ 、80ppm 群で  $2.9 \pm 0.6$  及び  $2.2 \pm 0.9\%$ 、160ppm 群で  $16.1 \pm 4.7$  及び  $16.2 \pm 7.2\%$ 、200ppm 群で  $27.3 \pm 5.6$  及び  $34.8 \pm 9.8\%$ 、250ppm 群で  $40.3 \pm 9.3\%$ （28 日目、生存数が少なく、採血回数及び採血量を考慮し、7 日目の採血を中止）であり、MetHb 濃度は反復投与による上昇は認められず、高濃度吸入で高くなることが示唆された。なお、すべての吸入群において MetHb 濃度は吸入終了後、24 時間以内（29 日目）に対照群と同様の値に回復した。

## 3) イヌにおける単回吸入投与時の MetHb 濃度（試験番号：SC■0065、4.2.1.3-1、評価資料 試験番号：RDR-0075-DD、4.2.2.7-1、評価資料）

麻酔下のビーグル犬に濃度 0、80、160、320 及び 640ppm（各群 3~4 例）の NO をそれぞれ気管内チューブを介して 6 時間吸入投与し、吸入中の MetHb 濃度を 1 時間ごとに測定した。別に、小児用人工呼吸器を組み合わせた Ohmeda 臨床曝露装置を用いて 80ppm の NO を吸入した（80ppm CD 群、4 例）。血液は左心室に挿入したミラーカテーテルを介して採取した。なお、640ppm を吸入したイヌ 3 例中 1 例が、吸入開始後 4 時間で死亡した。

MetHb 濃度は NO の吸入濃度及び吸入時間に依存して上昇したが、320 及び 640ppm 群で顕著であった。吸入開始後 6 時間の平均 MetHb 濃度は、NO 濃度 0、80、80（80ppm CD 群）、160、320 及び 640ppm 吸入で、それぞれ 1.2、3.0、2.9、6.6、24.1 及び 78.1% であり、80ppm 群及び 80ppm CD 群でほとんど上昇はみられなかった。

この平均 MetHb 濃度-時間データをモデル（MetHb が最大反応速度で生成すること及び消失が一次消失反応であることを示す指数関数）にあてはめ、薬物動態学的パラメータを求めたところ、NO 濃度 80、160、320 及び 640ppm 吸入投与時の定常状態での MetHb 濃度（ $C_{ss}$ ）の予測値は、それぞれ 3.5、10、32 及び 97%、また、最大 MetHb 生成速度は、それぞれ 0.0129、0.0345、0.1213 及び 0.4297%/min であり、NO 吸入濃度に比例したものではなく、むしろ、両パラメータともに高濃度吸入で高くなる非線形の関係にあった。吸入投与時に MetHb 濃度が

定常状態に達する時間は、消失半減期が3時間であることから、吸入後12～15時間と推測された。

#### <審査の概要>

機構は、非臨床薬物動態の結果、「MetHbの濃度上昇はNOの吸入濃度に比例したものではなく、高濃度吸入で高くなることが示唆された。」と説明していることを踏まえ、MetHbの体内動態を、NOの体内動態の代替とすることの妥当性について申請者に説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。ラット7日間用量設定試験等の結果から、MetHb濃度とNOの吸入濃度は、NOが高濃度吸入になるほど血中MetHb濃度の上昇率が高くなることが示唆されるなど、一次関数的な比例関係ではないものの、NOの吸入量の増加に伴う血中MetHb濃度の上昇がみられた。また、体内に吸収されたNOはヘモグロビンと結合しNOHbを形成し、NOHbは速やかにMetHbへ変換される。これらのことから、体内で生成する血中MetHb濃度は、投与されたNOの体内動態を間接的に示す指標となる。

機構は、NO吸入濃度と血中MetHb濃度の間に、直線的な用量相関関係があるとは言えないと考えるが、NO曝露の増加によりMetHb濃度が増加することは非臨床及び臨床試験成績から明らかであり、安全性の観点からも血中MetHb濃度を測定することは重要であることから、血中濃度の測定ができないNOの代わりに、血中MetHb濃度より本薬の薬物動態を検討することは可能と考える。

#### (iii) 毒性試験成績の概要

##### <提出された資料の概要>

NOの毒性試験として、吸入投与でのラットにおける反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験が実施された。なお、ラットでの28日間を越える長期投与による反復投与試験は、臨床使用が14日間以内であることから実施されなかった。また、非げっ歯類における反復投与毒性試験は、鼻部あるいは頭部曝露での実施が困難であること、ラットの反復投与毒性試験で認められた毒性所見がMetHb濃度の過度の上昇に起因したものであること、ラットにおけるMetHb濃度の上昇は反復投与により影響されないこと、加えて、このMetHb濃度の上昇はイヌを用いた安全性薬理試験においても既に吸入での制限毒性として同様に認められていること等の理由から実施されなかった。なお、申請時にはがん原性試験は実施されていなかったが、申請後に実施され、参考資料として提出された。また、NOの静脈内投与による*in vivo*遺伝毒性試験は実施不可能なため、ヒト末梢血リンパ球を用いた試験が、*in vivo*小核試験の代替として実施された。(4.

##### (i) <提出された資料の概要> (6) 参照

#### (1) 単回投与毒性試験 (添付資料 4.2.1.3-1、4.2.1.3-2、4.2.2.7-1、4.2.3.2-1、評価資料)

吸入投与による急性毒性は、ラット7日間用量設定試験の吸入1日目の成績及び安全性薬理試験を目的として実施されたイヌ単回吸入投与試験成績により評価された。なお、ラットの単回及び反復投与毒性試験は、全身曝露ではNOから窒素酸化物(NO<sub>x</sub>)への速やかな変換が起こるため、NO/N<sub>2</sub>ガスと酸素ガスとを鼻部直前で混合し、1群6例のラットを同時に曝露できる個別鼻部曝露装置を独自に開発して実施された。なお、この曝露装置での両ガスの接触は吸入前に約4秒間と短いため、NO<sub>2</sub>発生の理論値を、NO 500ppm吸入時で0.54ppmに制限で

きるが、動物をチューブ内に拘束するため、1日の最大吸入投与時間は6時間に制限された。

1) ラットにおける単回投与試験 (試験番号: SC-0063)

SD系ラットにおけるNO濃度0、80、200、300、400及び500ppmの6時間吸入投与において、400及び500ppm群のすべての動物(各30例)が1日目の吸入期間中に死亡し、300ppm群では30例中24例が1日目に、2例が2日目吸入前までに死亡した。死因はMetHbの増加による酸素欠乏症と考えられ、概略の致死量は300ppmと判断された。

2) イヌにおける単回投与試験 (試験番号: SC-0065)

ビーグル犬におけるNO濃度0、80、160、320及び640ppmの6時間吸入投与において、640ppm群の3例中1例が吸入開始4時間後に死亡した。死因はMetHbの増加による酸素欠乏症と考えられ、概略の致死量は640ppmと判断された。

(2) 反復投与毒性試験 (添付資料4.2.3.2-1~4.2.3.2-6、評価資料)

1) ラット7日間用量設定試験 (試験番号: RDR-0149-DS)

SD系ラットに、NO濃度0、80、200、300、400及び500ppmで21%の酸素及び79%のN<sub>2</sub>とともに、1日6時間、1、3又は7日間個別鼻部曝露装置を用いて吸入投与した(各濃度雌雄各15例、雌雄各5例×3曝露期間)。実測した各群のNO及び二酸化窒素(以下、NO<sub>2</sub>)の吸入濃度は、それぞれNOで0、79.8、202、303、397及び511ppm、NO<sub>2</sub>で0、0.4、2.2、4.0、6.5及び7.5ppmであった。

300~500ppm群で観察された1日目の死亡(1)1参照)は、NO濃度に依存し、500ppm群では吸入開始後1~2時間、400ppm群では1~3時間、300ppm群では3~6時間に死亡しており、高濃度群ほどより早期に認められた。300ppm群の生存例4例では蒼白化及び軽度の皮膚の青色化が2日目から7日目までみられた。血液学的検査では、200ppm以上の群において、曝露直後における血中MetHb濃度(総Hbに対するMetHbの百分率)の増加が雌雄ともに1日目より認められたが、反復投与による増加はみられなかった。また、血小板数の減少が、500ppm群で1日目にみられた。血液生化学的検査では、血液尿素窒素(以下、BUN)及びクレアチニン値の軽度な上昇、並びに血清カリウム値、グルタミン酸オキサロ酢酸転移酵素(以下、GOT)及び血糖値の上昇が、300ppm以上の群の1日目でみられたが、これらの変動には、採血時に多数の動物が死亡あるいは瀕死の状態にあったことが大きく影響しているものと考えられた。なお、80及び200ppm群では3日間及び7日間吸入終了後の検査に吸入による影響はみられなかった。早期死亡例の剖検で、肺の褐色化が多数例にみられたが、これは血中のMetHb形成によるものと考えられた。200ppm群の肺組織の電子顕微鏡検査では、1日及び7日間曝露後ともに対照群と比較して、肺間質性浮腫の頻度及び程度が増大した。なお、1日及び7日間曝露後の頻度は類似していたが、程度は1日曝露後が中等度、7日間曝露後は軽微であった。低濃度NO<sub>2</sub>の吸入投与で類似の組織変化が観察されるため(Arch Environ Health. 24: 160-79, 1972)、認められた組織変化はNO<sub>2</sub>が肺上皮細胞の酸化を誘発したものと考えられた。以上の結果、80ppm以下のNO濃度ではMetHb濃度の上昇を認められなかったことから、無毒性量は80ppmと判断された。

2) ラット28日間反復投与毒性試験 (試験番号: RDR-0150-DS)

SD 系ラット（1 群雌雄各 15 例）に、NO 濃度 0、40、80、160、200 及び 250ppm で 21% の酸素及び 79% の N<sub>2</sub> とともに、1 日 6 時間、個別鼻部曝露装置を用いて 28 日間連続吸入投与した（直後グループ）。各群雌雄各 5 例の動物には最終吸入後 28 日間の回復期間をおいた（回復グループ）。250ppm 群の 30 例中 19 例が投与 2 日目までに死亡した。第 14 日目（雌）及び第 15 日目（雄）において、個別鼻部曝露装置の不具合によりすべての動物で約 32% の過量投与となり、200ppm 群で 9 例、250ppm 群で 6 例が死亡したため、200ppm 群に 13 例（雄：8 例、雌：5 例）が追加され（追加グループ）、28 日間の吸入投与が行われた。追加グループでは 1 日目に雌 1 例と 15 日目に雄 1 例が死亡した。実測した各群の NO 及び NO<sub>2</sub> の平均濃度は、それぞれ NO で 0、40.3、79.8、159.5、198.0（追加グループで 198.6）及び 247.0ppm、NO<sub>2</sub> で 0、0.2、0.6、1.6、2.6（追加グループで 2.3）及び 3.5ppm であった。

一般状態では、200 及び 250ppm 群で速呼吸、運動失調、嗜眠及び皮膚青色化が観察された。蒼白は対照群を含むすべての群で 28 日目まで観察されたが、0、40 及び 80ppm 群では採血直後に観察されたことから、採血及び採血のための麻酔による影響と考えられた。

血液学的検査では、160ppm 群以上の群で雌雄ともに NO 曝露直後の MetHb 濃度が上昇したが、反復投与による上昇はなく、投与終了後 24 時間以内に回復した。吸入 7、14、21 及び 28 日目の MetHb 濃度の平均値は、雌雄ともに一定した値を示したが、14 日目の雌の値は、吸入過誤の影響により高値を示した。なお、死亡動物では血液生化学的検査において、7 日間用量設定試験と同様の変化が認められた。最終投与後及び 28 日間の回復期間終了後に実施した剖検では、200 及び 250ppm 群の死亡例にみられた肺の褐色化以外、吸入に関連する異常所見は観察されなかった。

電子顕微鏡検査では、対照群及び 200ppm 群の雄で実施され、肺間質性浮腫等の所見が認められたが、その頻度及び程度は投薬群と対照群で類似していた。なお、7 日間用量設定試験（200ppm 群）で認められた肺間質性浮腫の頻度及び程度の増大は、本試験では認められなかった。

病理組織学的検査（対照群及び 200ppm 群で実施）では、網膜萎縮及び心臓の炎症において、対照群に比して 200ppm 群で多数認められた。網膜萎縮は雌で認められ、発現率は、直後グループでは 200ppm 群で 6/10 例（60%）、対照群で 2/10 例（20%）、回復グループでは 200ppm 群で 2/5（40%）、対照群で 1/5 例（20%）であった。重症度は、直後グループでは対照群（中等度 2 例）よりも 200ppm 群（軽度 1 例、中等度 3 例、強度 2 例）で高かったが、回復グループでは 200ppm 群（軽微 2 例）よりも対照群（強度 1 例）で高かった。網膜萎縮が NO 吸入によるものかは、200ppm 以外の群で病理組織学的検査を実施していないため不明であるが、臨床試験の NO 群において、網膜障害は CINRGI 試験（添付資料 5.3.5.1-1）の 1 例（1/110 例）にのみ発生し、市販後の新生児における眼障害の報告はないこと等から、網膜萎縮の発生増大が NO の影響である可能性は低いと考えられた。

心臓の炎症発現率は、対照群及び NO 200ppm 群ともに、直後グループ [対照群：雄 1/10 例（10%）及び雌 2/10 例（20%）、200ppm 群：雄 2/10 例（20%）及び雌 4/10 例（40%）] に比べて、20 日後に剖検した追加グループ [200ppm 群：雄 5/8 例（63%）及び雌 4/5 例（80%）] 及び 28 日後に剖検した回復グループ [対照群：雄 3/5 例（60%）及び雌 1/5 例（20%）、200ppm 群：雌雄ともに 4/5 例（80%）] で明らかに高かった。また、炎症の重症度はほとんどが軽微であり対照群と比して悪化傾向がみられず、さらに追加グループと回復グループの発現率



が類似していた。また、対照群の直後グループと回復グループに差がみられなかったことから、本所見の発現は NO 投与に起因するものか、剖検時のラットの週齢による影響かは不明であった。しかしながら、国内及び海外臨床試験 (CINRGI 試験 (添付資料 5.3.5.1-1)、INO-01/02 試験 (添付資料 5.3.5.1-2)、INOT12 試験 (添付資料 5.3.5.2-1) 及び Ohmeda NO-03 試験 (添付資料 5.3.5.2-2、参考資料) や、市販後に報告された重篤な有害事象に、心臓の炎症 (心筋炎) がなかったこと等から、NO 200ppm 群で認められた心臓の炎症についても、NO の影響である可能性は低いと考えられる。

以上のように、80ppm 以下の NO 濃度では MetHb 濃度に上昇を認めないことから、無毒性量は 80ppm と判断された。

### (3) 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、*in vitro* 試験として細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験及びチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験が実施された。

#### 1) 細菌を用いた復帰突然変異試験 (試験番号：1303/001-1052、評価資料)

*Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) の 4 つのヒスチジン要求性菌株 (TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) 及び *Escherichia coli* (*E. coli*) の 2 つのトリプトファン要求性菌株 (WP2 pKM 101 及び WP2 *uvrA* pKM101) を用いた復帰突然変異試験が、Arochlor1254 で酵素誘導したラット肝 S9 mix を添加した代謝活性化法及び添加しない直接法により実施された。その結果、NO は、TA100 及び TA1535 菌株においてのみ、S9mix の存在下、非存在下にかかわらず高濃度 (5,000ppm) で復帰変異体の有意な増加を示したが、1,580ppm 以下では作用はみられなかった。

#### 2) マウスリンフォーマ TK 試験 (試験番号：1303/002-1052、評価資料)

マウスリンフォーマ TK 試験が、Arochlor 1254 で酵素誘導したラット肝臓の S9 mix を添加する代謝活性化法及び添加しない直接法により実施された。直接法では、4.23mM (126.5ppm (w/w)、2,062ppm (v/v)) 以上で、代謝活性化法では、20.45mM (613.5ppm (w/w)、10,000ppm (v/v)) 以上の濃度で、濃度依存性のある突然変異頻度の増加がみられた。

#### 3) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験 (試験番号：1303/005-1052、評価資料)

チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて、NO の染色体異常誘発能をラット肝臓の S9 mix を添加しない直接法で検討した結果、NO は、1,650ppm の濃度で 51~52% の細胞分裂阻害及び再現性のある染色体構造異常の有意な増加を示し、50% を超える細胞分裂阻害を引き起こす比較的毒性の高い濃度で染色体損傷を示すものと考えられた。

### (4) がん原性試験 (試験番号 N005243、参考資料)

本剤の申請後、■年■の■を検討のため、雌雄 F344/CrIBR ラットを用いた 2 年がん原性試験 (5、10、20ppm の NO を 20 時間/日投与、週 7 日間で最長 105 週間曝露) が実施された結果、発がん性は認められなかった。(■。)

(5) 生殖発生毒性試験

資料は提出されていない。

(6) 局所刺激性試験

吸入によるラットの7日間用量設定試験及び28日間反復投与毒性試験において、局所刺激性が検討された結果、いずれも200ppm吸入で肺の病理組織学的検査において本薬に起因した異常所見は認められなかった。

(7) 不純物の毒性試験

NO<sub>2</sub>の細菌を用いた復帰突然変異試験(試験番号:1303/007-1052、4.2.3.7.7-1、評価資料)が、*S. typhimurium*の2つのヒスチジン要求性菌株(TA100及びTA1535)を用いて、実施された結果、TA1535菌株に対し、NO<sub>2</sub>は代謝活性化法で2回の試験ともに濃度依存性のある復帰変異コロニー数の増加を示した。明確な増加( $p<0.01$ )を生じるNO<sub>2</sub>の最低濃度は、初回の試験で10ppm、2回目の試験で40ppmであった。TA100菌株に対する復帰突然変異作用は代謝活性化法及び直接法ともに認められなかった。NO<sub>2</sub>(10~40ppm)はNO(5,000ppm)と比較して、はるかに低い濃度で復帰変異体の有意な増加を示した。

<審査の概要>

(1) 生殖発生毒性及びがん原性試験の必要性について

機構は、申請時に生殖発生毒性及びがん原性試験が実施されていないことから、これらの試験成績を本申請に必要なとしない理由を尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。本薬は新生児を対象とすること、ラット28日間反復投与毒性試験(添付資料2.6.6.3-(2)参照)で生殖組織(精巣、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣)に組織学的変化が認められなかったこと、臨床での投与期間が14日間以内と短期であること、また、NOは吸入後曝露部位及びその近傍にて速やかにHbと結合しMetHbを経て代謝され血液を介した生殖組織への影響は考えられないことから、ヒトにおける生殖毒性発現の危険性は低いと判断し、生殖発生毒性試験は実施しなかった。

がん原性試験については、本薬のラット反復投与毒性試験の200ppm投与で本薬の曝露器官である肺の病理組織学的検査に異常所見はみられず、7日間用量設定試験の電子顕微鏡検査では肺間質性浮腫の発現頻度及び程度にわずかな増大がみられたものの、順応性のある変化と考えられた。したがって、がん原性試験ガイドラインに基づき、反復投与試験において前がん病変がなく組織学的検査でも毒性は極めて弱いこと、本薬が6ヵ月を超えて連続あるいは頻回使用される可能性はないこと、遺伝毒性試験(*in vitro*)で陽性であるものの20ppmの臨床投与量であれば本薬がヒトに遺伝毒性を発現させる可能性は低いと判断したことから、がん原性試験は当初実施しなかった。

本薬の申請後、20■年末に終了した本薬のラット2年がん原性試験(20、10、5ppmのNOを20時間/日投与)では、気道や他の組織における毒性所見は認めなかった。唯一、雌ラットにおける肝重量がNOの用量依存的に増加し、20ppmでは対照群に対し有意差( $p\leq 0.05$ )がみられたものの、肝毒性を示す所見はなかった。NO投与群では、臨床症状、病理学的変化、

全体・顕微鏡的組織病変が、程度は比較的低いものの散見されたが、特に用量反応性はみられないことから、いずれも NO 曝露に直接原因するものではないと判断した。

機構は、以上の回答を了承した。

## (2) 遺伝毒性試験について

機構は、遺伝毒性試験成績（陽性）の添付文書（案）への記載の必要性について尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。NO の遺伝毒性試験については、細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験及びマウスリンフォーマ TK 試験のいずれにおいても陽性反応が認められたことから、添付文書（案）「9.その他の注意」に遺伝毒性の概要を記載する。

機構は、以上の回答を了承した。

## (3) 毒性試験における NO の曝露時間の妥当性について

機構は、臨床での投与時間を踏まえた場合、非臨床単回及び反復毒性試験での NO の毒性評価が 6 時間の曝露時間で評価可能と考える理由を尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。28 日間反復投与毒性試験の毒性所見は、200ppm 以上の投与で MetHb 濃度の上昇によると考えられる死亡が認められたほか、一般状態では速呼吸、運動失調、嗜眠及び皮膚青色化が観察されたが、生存動物においては MetHb 濃度の上昇を除き、血液学的及び血液生化学的検査に投与に関連した変化はみられなかった。したがって、本薬の毒性は MetHb 濃度の上昇に起因するものと考えられた。一方、NO 吸入時の曝露部位である肺組織の電子顕微鏡検査では、7 日間用量設定試験の 200ppm 群で肺間質性浮腫の頻度及び程度の増大が見られたが、1 日曝露後は中等度、7 日曝露後は軽度であり、28 日間反復投与毒性試験の 200ppm 群では、肺上皮細胞の変化は認められなかった。当該変化は 1 日目、7 日目、28 日目と次第に軽症化したことから、順応性のある反応であり、临床上問題となる所見ではないと考えられた。以上のように、200ppm という高濃度や反復投与により新たな毒性の発現が見られないことから、今回実施した 6 時間吸入投与で本薬の毒性評価は可能と考える。

機構は、以上の回答を了承した。

## (4) 無毒性量のヒト（新生児）への外挿の妥当性について

機構は、ラット反復投与毒性試験における MetHb 濃度の上昇を指標として求められた無毒性量 80ppm を新生児へ外挿するにあたり、新生児での MetHb 濃度の上昇による安全性について、ラットと新生児の感受性の差を踏まえた説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。ラット 28 日間反復投与毒性試験で得られた平均 MetHb 濃度データ及び新生児遷延性肺高血圧症（Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn、以下 PPHN）患者を対象とした INO-01/02 試験で得られた平均 MetHb 濃度データを下表に示す。

MetHb 濃度は、ラット 28 日間反復投与毒性試験では 160ppm 投与時（80ppm：1.7%→160ppm：12.1%）、INO-01/02 試験では 80ppm 投与時（20ppm：2.8%→80ppm：13.3%）に急激に上昇する傾向がみられ、ラットにおいては 80～160ppm、新生児においては 20～80ppm の範囲に MetHb 濃度に関する NO 濃度の閾値が存在すると考えられた。

よって、新生児の NO 吸入投与による MetHb 濃度上昇に関する感受性は、ラットに比べ 2～4

倍程度高くなり、新生児における無毒性量は20~40ppmと考えられた。しかしながら、新生児の血中MetHb濃度のベースライン（プラセボ  $C_8$ : 0.38%）はラットの1.6に比して低く、また、20ppm投与時の平均MetHb濃度が1.05%であることから、ラットと新生児の感受性の差を考慮しても、臨床使用濃度である20ppmは安全性を確保できる濃度であると考えられる。

機構は、以上の回答を了承した。

表：ラット28日間NO反復吸入投与時のMetHb濃度

群	Control	40ppm	80ppm	160ppm	200ppm
平均MetHb濃度 (%)	1.6	2.0	2.8	19.6	32.7
比 (平均/Control)	1.0	1.2	1.7	12.1	20.3

表：新生児PPHN患者におけるNO吸入投与時のMetHb濃度 (INO-01/02試験)

群	プラセボ	5ppm	20ppm	80ppm
n	31	37	30	33
投与開始後8時間値 ( $C_8$ ) †	0.38	0.64	1.05	5.04
比 ( $C_8$ /プラセボ $C_8$ )	—	1.7	2.8	13.3

$C_8$ : NO吸入投与開始後8時間のMetHb濃度 (%)

プラセボ  $C_8$ : プラセボ投与開始後8時間のMetHb濃度 (%)

#### (5) 非臨床試験における投与過誤について

機構は、非臨床試験において、投与過誤（過量投与）が発生していることから、市販後に同様の投与過誤が起こる恐れはないのか、申請者に尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。非臨床試験における投与過誤（過量投与）は、無麻酔下のイヌにおける試験（(i) <提出された資料の概要> (3) 安全性薬理試験の項参照）及びラット28日間反復投与毒性試験で発生している。両試験における投与過誤は、それぞれ校正ガス導入時の接続ミス及びモニタリングガス導入時の接続ミスが原因であり、実際の投与ガスよりも低いモニタリング値が表示されたため、過剰量のNOガスが投与された。このような投与過誤を防ぐためには、①接続ミスが起こる可能性を減らすこと、②誤ったモニタリング値によるNO投与を防ぐこと、が必要である。本薬と組み合わせで販売する予定である吸入療法の専用機器であるアイノベントは、①の対策として、モニタリング機能の校正及び投与中のガスサンプリングのためのサンプルラインの接続に、注射筒などにも使用されているルアーロック方式を採用し、非臨床試験で発生したような接続ミスやエアリークが起きにくくしている。また、②の対策として、人工呼吸器回路内流量を計測し、その流量に基づき、投与量をコントロールし、その結果を系統的に独立したモニタリング機能で監視するため、非臨床試験のような誤ったモニタリング値によるNO投与を含め、機器の異常による過量投与を避けることができる。

以上のことから、非臨床試験において発生した投与過誤と同様の事象は、市販後、アイノベントを使用することにより発生しないと考える。

機構は、以上の回答を了承した。

機構は、提出された毒性試験の結果から、MetHb濃度の上昇による既知の影響以外、新たな毒性を見い出せず、適切な用法・用量で適用することにより、ヒトでの安全性を懸念する毒性