

ルミガン点眼液 0.03%

CTD 第2部 CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

千寿製薬株式会社

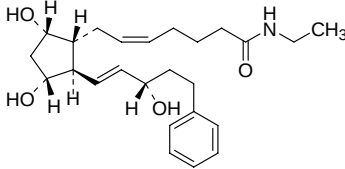
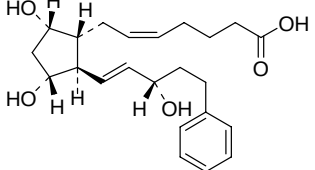
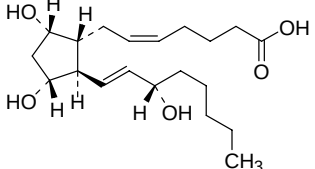
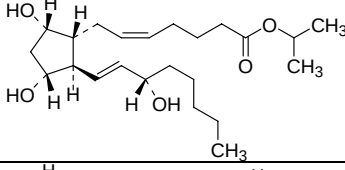
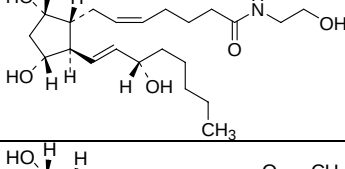
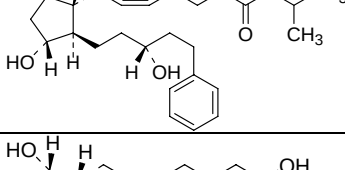
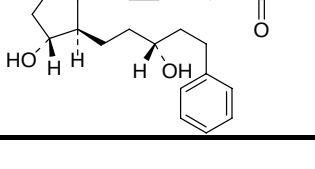
目次

2.4 非臨床に関する概括評価	1
2.4.1 非臨床試験計画概略緒言	3
2.4.2 薬理試験	7
2.4.3 薬物動態試験	9
2.4.4 毒性試験緒言	11
2.4.5 総括及び結論緒言	18
2.4.6 参考文献	23

2.4 非臨床に関する概括評価

本項で使用した用語及び略号一覧を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1 用語及び略号一覧表

略号	一般名	構造式	由来
AGN 192024	ビマトプロスト (Bimatoprost)		原薬
AGN 191522	17-フェニルトリノルプロスタグランジン F _{2α} (17-phenyl trinor prostaglandin F _{2α})		主代謝物、 PGF _{2α} の合成 アナログ
PGF _{2α}	プロスタグランジン F _{2α} (Prostaglandin F _{2α})		内因性 FP 受 容体作動物質
PGF _{2α} -1-IE	プロスタグランジン F _{2α} -1-イソプロピルエステル (Prostaglandin F _{2α} -1-isopropylester)		PGF _{2α} 誘導体
プロスタマイド F _{2α}	プロスタグランジン F _{2α} -1-エタノールアミド (Prostaglandin F _{2α} -1-ethanolamide)		内因性類縁物 質
	ラタノプロスト (Latanoprost)		FP 受容体作 動薬 (プロドラッ グ)
ラタノプロスト酸	ラタノプロスト遊離酸 (Latanoprost free acid)		FP 受容体作 動薬

2.4
非臨床試験の概括評価

表 2.4-1 用語及び略号一覧表（つづき）

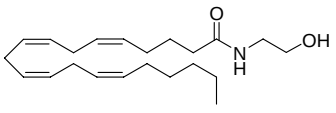
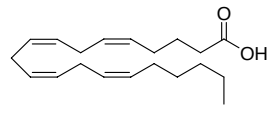
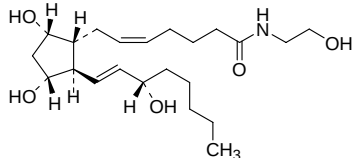
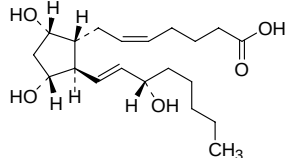
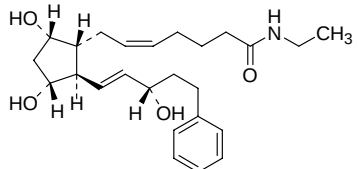
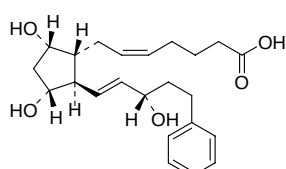
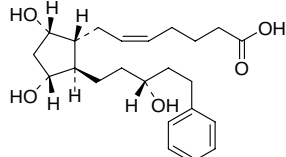
用語及び略号	内容
Alt-FP	FP 受容体スプライスバリエント
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	組織中薬物濃度－時間曲線下面積
Cmax	最高組織中薬物濃度
CTGF	Connective tissue growth factor
CYP	シトクロム P450
Cyr61	Cysteine-rich protein 61
DP 受容体	プロスタグランジン D ₂ 受容体
EP _x 受容体	プロスタグランジン E ₂ 受容体のサブタイプ及びスプライスバリエント（X にはサブタイプの番号及びスプライスバリエントを示すアルファベットが入る）
FP 受容体	プロスタグランジン F _{2α} 受容体
GOT	グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
GPT	グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
³ H	トリチウム標識
HPLC-RAD	高速液体クロマトグラフィー 放射能検出器
HPLC-UV	高速液体クロマトグラフィー 紫外吸光光度検出器
IC ₅₀	50%阻害濃度
IP 受容体	プロスタサイクリン受容体
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフィー／質量分析／質量分析
MMP	Matrix metalloproteinase, 細胞外マトリクス分解酵素
■ C*体	■ C*-AGN 192024、ビマトプロストの不純物（■ D*-AGN 192024 に同じ）
■ B*体	■ B*-AGN 192024、ビマトプロストの不純物
TP 受容体	トロンボキサン A ₂ 受容体
UDP	ウリジン 5'-二リン酸

*：新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.4.1 非臨床試験計画概略

ビマトプロストは、PGF_{2α}の合成アナログである 17-phenyl trinor PGF_{2α}の1位のカルボン酸のエチルアミド誘導体であり、内因性の生理活性物質であるプロスタマイド F_{2α}に類似の構造及び作用を有する（表 2.4.1-1）。プロスタマイド F_{2α}は内因性カンナビノイドのひとつであるアナンダマイドよりシクロオキシゲナーゼ 2 を介して生成される^{1),2),3)}ことや、FP 受容体とそのスプライスバリエントとの複合体を受容体とすることが近年明らかにされたが⁴⁾、その生理的役割は眼圧調節に関わっていること以外、いまだ完全に解明されていない。プロスタマイド F_{2α} アナログであるビマトプロストの緑内障及び高眼圧症の治療薬としての有効性と安全性に関する知見を得る目的で、種々の非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を実施した。

表 2.4.1-1 プロスタマイド F_{2α} 及びプロスタグランジン F_{2α} の
前駆体及び合成アナログの構造式比較

	脂肪酸アミド	脂肪酸
前駆体	 アナンダマイド	 アラキドン酸
代謝産物	 プロスタマイド F _{2α}	 プロスタグランジン F _{2α}
合成アナログ	 ビマトプロスト	 17-phenyl trinor PGF _{2α} (AGN 191522)
		 ラタノプロスト酸

2.4.1.1 薬理試験

効力を裏付ける試験として、0.001～0.1%ビマトプロスト溶液の眼圧下降作用を正常眼圧イヌ、正常眼圧サル及び隅角レーザー照射誘発サル高眼圧モデルを用いて検討した。更に既存薬との効力比較のため、正常眼圧イヌを用いて、0.03% ビマトプロスト溶液と 0.005%ラタノプロスト溶液の1日1回投与による眼圧下降作用を比較した。

ビマトプロストの眼圧下降の作用機序を解明するため、以下の試験を実施した。眼圧の調節に係わる房水の産生及び排出に及ぼす影響を、サルを用いたフルオロフォトメトリ法、フルオレセイントレーサ法及び2段階定圧灌流法で検討した。各種プロスタノイド受容体に対する作用は、組換えヒト各種プロスタノイド受容体及び組換えネコFP受容体、更にマウス Swiss 3T3細胞及びネコ肺実質の細胞膜画分に対するビマトプロストの親和性を放射性リガンド結合試験により検討した。また、ビマトプロストの薬理作用がFP受容体をはじめとする既知のプロスタノイド受容体を介さずに発現していることについて、プロスタノイドの関与が知られている各種組織標本やPGF_{2α}感受性平滑筋標本に対する薬理作用及びネコ虹彩括約筋組織細胞の細胞内Ca²⁺濃度上昇を指標として検討した。更にプロスタノイド拮抗薬の共存下で、ビマトプロストによるネコ虹彩括約筋収縮や正常イヌ眼圧下降作用の阻害実験を実施した。

ビマトプロストの受容体を探索する試験として、組換えヒトFP受容体とそのスプライスバリエント(Alt-FP)の同定や発現形式及びこれらの共発現細胞におけるビマトプロストの機能解析を行った。

内因性類縁物質及び不純物の薬理作用を各種プロスタノイド受容体関連標本を用いて検討した。副次的薬理試験として、プロスタグランジン受容体以外の100種類以上の生理活性物質受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対するビマトプロストの親和性を放射標識リガンドを用いた競合阻害実験により検討した。安全性薬理試験は「安全性薬理試験ガイドライン(医薬審発第902号 平成13年6月21日)」の適用期日である平成15年7月1日より前に非GLP下で一般薬理試験として実施した。

2.4.1.2 薬物動態試験

ビマトプロストの薬物動態試験は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルを用いて、*in vitro*及び*in vivo*試験で検討した。これらの動物種は薬理試験及び毒性試験で用いられたものと同じである。

吸収については、眼組織における薬物移行ルートを検討するために、ヒト角膜及び強膜を用いてビマトプロストの透過係数を比較検討した。ウサギ及びサルに³H-ビマトプロストを単回あるいは反復点眼投与したときの血液中放射能濃度を測定した。また、マウス、ラット及びサルにビマトプロストを静脈内及び経口投与したときの血液中薬物動態パラメータを算出して検討した。

分布については、ウサギ及びサルに³H-ビマトプロストを単回あるいは反復点眼投与した後の眼組織内放射能濃度により検討した。また、ウサギでは眼球オートラジオグラムを作成し、定性的に放射能の眼組織分布を確認した。ラットに³H-ビマトプロストを単回あるいは反復静脈内

投与した後の全身組織への分布について、組織内放射能濃度並びに全身オートラジオグラムにより検討した。また、妊娠ラットを用いて、胎盤を介した胎児への移行性を検討した。ラット、ウサギ、サル及びヒトの血球移行は *in vivo* 及び *in vitro* で検討した。マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒト血漿及びウシ血清アルブミンのたん白結合、マウス及びイヌの血球移行並びに合成メラニンへの結合率は *in vitro* で検討した。

代謝については、ウサギ及びサル眼組織を用いた *in vitro* での検討と ^3H -ビマトプロスト点眼投与後のウサギ及びサルの眼組織中代謝物分析による *in vivo* での検討を行った。また、ラット、イヌ、サル、ヒトの肝スライス及びイヌの肺スライスを用いてビマトプロストの代謝を *in vitro* で検討した。さらに、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトに ^3H -ビマトプロストを単回静脈内投与後の血液中（サルのみ血漿中）代謝物、並びに、ラット、サル及びヒトの尿及び糞中代謝物を検索した。また、ビマトプロストの代謝に関与する P450 分子種の同定を試みた。その他、ビマトプロスト反復投与後の雌雄ラット及びサルの肝ミクロソームを用いて、ビマトプロストによる酵素誘導を検討した。

排泄については、ラット及びサルに ^3H -ビマトプロストを静脈内投与したときの尿又は糞中への放射能の排泄率を検討した。また、授乳期のラットに ^3H -ビマトプロストを単回静脈内投与した後の乳汁排泄を検討した。

2.4.1.3 毒性試験

ビマトプロストの非臨床における安全性を評価する目的で、マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験、ウサギ、イヌ及びサルを用いた点眼による反復投与毒性試験、ラット及びサルを用いた静脈内及び経口投与による反復投与毒性試験、細菌、マウスリンパ腫細胞及びマウスを用いた遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、マウス及びラットを用いた生殖発生毒性試験、モルモット及びマウス・ラットを用いた抗原性試験、モルモットを用いた皮膚感作性試験を実施した。なお、眼局所刺激性は点眼による反復投与毒性試験であわせて評価した。

また、ビマトプロスト点眼剤を点眼投与した際に認められる毒性変化のうち、虹彩色素沈着に関する検討をサルを用いて行った。

これらの試験は虹彩色素沈着に関する検討試験を除きいずれも GLP を遵守して行った。実施した毒性試験の概略を表 2.4.1.3-1 に示した。

2.4
非臨床試験の概括評価

表 2.4.1.3-1 毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路（頻度）	試験系
単回投与毒性試験	腹腔内	マウス
	静脈内	ラット
反復投与毒性試験		
1 ヶ月	点眼（2 回/日）	ウサギ（有色）
1 ヶ月（回復性：2 週）	点眼（4 回/日）	ウサギ（白色）
6 ヶ月（回復性：4 週）	点眼（1 又は 2 回/日）	ウサギ（有色）
1 ヶ月	点眼（4 回/日）	イヌ
52 週（回復性：20-24 週）	点眼（1 又は 2 回/日）	サル
2 週	静脈内	ラット
1 ヶ月	静脈内	ラット
52 週（回復性：8 週）	経口	ラット
4 週	静脈内	サル
17 週（回復性：12 週）	静脈内	サル
遺伝毒性試験		
復帰突然変異試験	—	サルモネラ菌及び大腸菌
マウスリンフォーマ試験	—	マウスリンパ腫細胞
小核試験	静脈内	マウス
がん原性試験		
104 週	経口	マウス
予備試験 2 週	経口	マウス
予備試験 13 週（回復性：4 週）	経口	マウス
104 週	経口	ラット
予備試験 13 週（回復性：4 週）	経口	ラット
予備試験 13 週低用量追加（回復性：4 週）	経口	ラット
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	経口	ラット
胚・胎児発生への影響に関する試験	経口	マウス及びラット、ウサギ*
出生前、出生後の発生並びに母体機能に関する試験	経口	ラット
その他の試験		
抗原性試験	皮下及び静脈内	モルモット
	腹腔内	マウス及びラット
虹彩色素沈着に関する試験（12 ヶ月）	点眼（1 回/日）	サル
	点眼（2 回/日）	サル
皮膚感作性試験	皮内及び閉塞塗付	モルモット

—：該当なし、*：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験は予備試験のみ実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける薬理試験

2.4.2.1.1 眼圧下降作用

正常眼圧イヌにビマトプロスト溶液（0.001%～0.1%）を1日1回及び1日2回5日間反復点眼投与したところ、いずれの用法においても0.01%濃度が0.001%濃度よりも強い眼圧下降作用を示した。なお、0.01%濃度以上では用量に依存した作用の増強はみられなかった。また、1日1回投与の眼圧下降作用は1日2回投与と同程度であった。（2.6.2.2.2.1.1 及び 2.6.2.2.2.1.2）。さらに、正常眼圧イヌを用いてビマトプロスト溶液（0.003%～0.03%）の用量反応性を検討した試験では、0.03%まで用量依存的な眼圧下降作用の増強が認められた（2.6.2.2.2.1.3）。正常眼圧イヌに0.03%ビマトプロスト溶液と0.005%ラタノプロスト溶液を1日1回反復点眼投与したところ、0.03%ビマトプロスト溶液の眼圧実測値は投与2～5日目までの投与期間を通して低値を示した（2.6.2.2.2.1.4）。

正常眼圧サルにおいて0.001～0.1%のビマトプロスト溶液は1日2回5日間の反復点眼投与により、すべての用量で最大3 mmHg 前後の眼圧下降作用を示した。また、用量依存的に効果の発現が早まる傾向がみられた（2.6.2.2.2.2.1）。

隅角レーザー照射誘発高眼圧モデルにおいて0.001%、0.01%、0.03%及び0.1%のビマトプロスト溶液は単回投与により眼圧を用量依存的に投与前値に比較して26.3～40.1%下降させた（2.6.2.2.2.2.2 及び 2.6.2.2.2.2.3）。

上記の試験結果から、正常眼圧動物を用いた実験ではビマトプロストの眼圧下降作用は0.01%～0.03%が至適用量と考えられた。一方、高眼圧モデルでは0.1%濃度まで用量依存的な作用の増強がみられ、高眼圧眼においてはより高濃度での有効性も示唆された。

2.4.2.1.2 作用機序

房水動態

サルにおいてビマトプロスト溶液（0.1%）は房水産生を10.2%促進する傾向にあったが有意な変化ではなかった（フルオロフォトメトリ法）（2.6.2.2.1.3.1）。房水排出に関しては、ビマトプロスト溶液（0.01%）はサルのぶどう膜強膜流出路を介した房水排出を42%増加させた（フルオレセイントレーサ法）。また、線維柱帯を介した房水排出に対する影響もわずかにみられた（約10%促進：2段階定圧灌流法）。その作用は同濃度のラタノプロスト溶液と同程度であった（2.6.2.2.1.3.2）。以上のことから、ビマトプロストの眼圧下降作用は主として毛様体筋間隙を介して強膜から眼外へと至るぶどう膜強膜流出路の房水排出抵抗の低下に基づくことが示された。なお、FP受容体作動薬の眼圧下降も同様の機序に基づくことが知られている。

各種プロスタノイド受容体に対する作用

受容体結合実験において、ビマトプロストは組換えFP受容体をはじめとする既知プロスタノイド受容体に親和性を示さなかった（2.6.2.2.1.1.1）。

各種プロスタノイド受容体（DP/IP、EP₁、EP₃、EP_{4/2}、FP 及び TP）に関連する標本を用いた

検討において、ビマトプロストは FP 受容体に関連するネコ虹彩括約筋のみ収縮させた。一方、各種の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 感受性平滑筋標本を用いた検討では、ネコ肺実質及びウサギ子宮を収縮させたものの、その他の標本に対して強い作用を示さなかった (2.6.2.2.1.1.2)。

ビマトプロストの受容体の探索

ネコ虹彩括約筋組織から分離された細胞を用いた検討から、ビマトプロストに応答して細胞内 Ca^{2+} 濃度が変化する細胞と $\text{PGF}_{2\alpha}$ に応答する細胞は独立して存在し、両薬物の薬理作用の発現には異なる細胞が関与していることが示唆された (2.6.2.2.1.2.1)。

ビマトプロストやプロスタマイド $\text{F}_{2\alpha}$ によるネコ虹彩括約筋の収縮を阻害し、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ や AGN 191522 などの FP 受容体作動薬による収縮を阻害しない化合物 (プロスタマイド拮抗薬) を見出し、ビマトプロストの受容体が $\text{PGF}_{2\alpha}$ の受容体と異なることを証明した (2.6.2.2.1.2.2) ⁵⁾。

イヌにおいて、プロスタマイド拮抗薬の前投与によりビマトプロストによる眼圧下降が阻害されたが AGN 191522 の眼圧下降作用は阻害されず、プロスタマイドの眼圧調節への関与が示された (2.6.2.2.1.2.4)。また、このことはビマトプロストの未変化体が活性の本体であることを裏付けている。

ヒト FP 受容体のスプライスバリエント (Alt-FP) を同定し、Alt-FP とヒト FP 受容体との共発現細胞においてビマトプロストが $\text{PGF}_{2\alpha}$ とは異なる細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を引き起こすことを見出した (2.6.2.2.1.2.3)。ビマトプロストに特異的な Ca^{2+} 濃度変化は細胞外の Ca^{2+} を除くことにより消失することから、この変化は細胞外 Ca^{2+} の流入であると考えられる。細胞外 Ca^{2+} は平滑筋の収縮に必須であることは周知であり、また、ビマトプロストにより誘発されるネコ虹彩括約筋の収縮及び組換え Alt-FP 発現細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度変化がともにプロスタマイド拮抗薬により阻害されたことは、遺伝子組換え細胞と同様の受容体が天然の組織にも存在することを示唆している。なお、組換え FP 受容体と Alt-FP が複合体を形成し得ることも免疫沈降実験により示され、この複合体がビマトプロストの受容体と考えられている ⁴⁾。

2.4.2.2 その他の薬理試験

2.4.2.2.1 内因性類縁物質

プロスタマイド $\text{F}_{2\alpha}$ はネコ虹彩括約筋に対して強力な収縮作用を示したが、その他のプロスタノイド受容体関連標本に対する作用は弱く、ネコ及びヒトの組換え FP 受容体に対する親和性も低かった (2.6.2.2.3)。これらの特性はビマトプロストと類似しており、ビマトプロストは構造だけでなく、薬理的にもプロスタマイド $\text{F}_{2\alpha}$ に類似していることが示された。

2.4.2.2.2 不純物

ビマトプロスト点眼剤に含まれる不純物 (2.3.P.5.5) の薬理作用を検討した (2.6.2.2.4)。ネコ虹彩括約筋に対する [B*体、A*体及びC*体の作用の強さはビマトプロストの 12 分の 1 以下であり、その他のプロスタノイド受容体関連標本に対してほとんど作用しなかった。ビマトプロスト点眼剤に含まれるこれら不純物の総含量は 1.2%以下であり (2.3.P.5.1)、

*：新薬承認情報提供時に置き換えた。

活性もビマトプロストに比べて低いことから、これら不純物の薬理作用への関与はほとんどないと考えられた。

2.4.2.3 副次的薬理試験

プロスタグランジン受容体以外の 100 種類以上の生理活性物質受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対するビマトプロストの親和性について、放射標識リガンドを用いた競合阻害実験により検討した (2.6.2.3)。ビマトプロスト (10 μ M) の結合阻害率はいずれの受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対しても 50%未満であり、ビマトプロストはこれらに高い結合親和性を示さなかった。

2.4.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は 1999 年に GLP を適用しない一般薬理試験として実施した (2.6.2.4)。ビマトプロストの一般薬理作用を、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ及びヒトの生体あるいは摘出標本を用いて検討した。*In vivo* 試験の投与経路は、角膜反射の試験のみ点眼とし、その他の試験については薬理学的影響を直接検討するために静脈内投与及び腹腔内投与とした。

ビマトプロストは、麻酔ラットにおいて 0.1 及び 1 mg/kg で血圧を上昇させ、1 mg/kg で心拍数を減少させた。無麻酔イヌでは 0.01 mg/kg で血圧を上昇させた。また、1 mg/kg でラットの小腸炭末輸送能を抑制し、尿量及び尿中電解質 (Na^+ , Cl^-) 排泄量を増加させた。*In vitro* の試験では、 2×10^{-7} 及び 2×10^{-6} M でウサギ摘出子宮の収縮力を増大させたが、ラット摘出子宮に対しては作用を示さず、ヒト摘出子宮筋に対しても極めて弱い収縮作用を示すのみであった。その他、一般症状及び行動、中枢神経系、呼吸器系、摘出回腸、腸管内水分貯留、並びに角膜反射に対しては作用を示さなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

放射性標識体を用いた試験における生体試料中の放射能濃度は、液体シンチレーションカウンタで測定し、ビマトプロスト及び代謝物由来の放射能は HPLC-RAD を用いて分析した。また、血液中における非標識体のビマトプロスト及び AGN 191522 の定量は LC/MS/MS 法を用いて行った。各定量法のバリデーション結果は、2.6.5 薬物動態試験概要表にまとめて掲載した (2.6.5.2)。なお、開発初期に実施した *in vitro* 眼組織透過性あるいは眼組織代謝試験及び *in vivo* 代謝物プロファイリングでは、HPLC-UV 法及び LC/MS/MS 法を用いた。

2.4.3.2 吸収

ヒト角膜及び強膜を用いた *in vitro* 透過性試験の結果、強膜におけるビマトプロストの透過係数は角膜より 4 倍以上高い値を示した。そのため、点眼投与されたビマトプロストが作用部位と考えられる毛様体へ移行する経路は、角膜－房水ルートだけでなく、結膜－強膜ルートが大きく寄与しているものと考えられた (2.6.4.3.1)。ウサギ及びサルに ^3H -ビマトプロストを点眼

投与後の血液中放射能濃度は大部分の眼組織中濃度と比較して低いことが示された (2.6.4.3.2.1)。雌雄のマウス、ラット及びサルにビマトプロストを静脈内投与したとき、見かけの分布容積 (V_d) は 5.87~27.6 L/kg を示し、全身に広く分布した。また、血液からの消失半減期はマウス及びラットでそれぞれ 0.5 時間及び 0.8 時間であったが、サルの半減期は長く 8 時間であった。経口投与におけるラット及びサルのバイオアベイラビリティはそれぞれ 29% 及び 3% であった。また、マウスのバイオアベイラビリティは雄で 59%、雌で 21% であり、性差が認められた (2.6.4.3.2.2, 2.6.4.3.2.3 及び 2.6.4.3.2.4)。サルに ^3H -ビマトプロスト点眼剤を 1 日 2 回反復点眼投与したとき、血液中放射能濃度は投与 12 回 (投与開始 7 日目) では定常状態に達していると考えられた (2.6.4.3.3.2)。ウサギ及びサルに反復点眼投与又はラット及びサルに反復静脈内投与したトキシコキネティクス試験では、血液中ビマトプロスト濃度及び AUC 値はいずれも投与量に依存して増加した。また、いずれの動物種、投与方法でも初回採血時点で血液中ビマトプロスト濃度は定常状態を示していると考えられ、定常状態に達する日数は、点眼投与ではウサギで 7 日以内、サルで 4 週以内、静脈内投与ではラットで 7 日以内、サルで 23 日以内であると考えられた。(2.6.4.3.3.1, 2.6.4.3.3.3, 2.6.4.3.3.4 及び 2.6.4.3.3.5)

2.4.3.3 分布

ウサギ及びサルに 0.1% ^3H -ビマトプロスト点眼剤を単回点眼投与したとき、放射能は速やかに眼組織へ分布し、前眼部組織及び虹彩、毛様体で比較的高い濃度が認められた (2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.3)。また、ウサギ眼球オートラジオグラムでも同様の分布傾向を示した (2.6.4.4.2)。サルに 0.1% ^3H -ビマトプロスト点眼剤を 12 時間ごとに計 18 回反復点眼投与したときの眼瞼、角膜、結膜、強膜、毛様体、水晶体、硝子体、網脈絡膜及び視神経中放射能濃度は単回投与と比較して高くなる傾向が認められた (2.6.4.4.3)。

雌雄ラットに ^3H -ビマトプロストを静脈内投与したとき、放射能は速やかに組織へ分布し、血漿と同様に消失した。組織中放射能濃度は消化管、肝臓、腎臓及び膀胱等で高濃度が認められた。これら放射能の組織分布には性差が認められなかった (2.6.4.4.4)。ラットに ^3H -ビマトプロストを 1 日 1 回 21 日間反復静脈内投与したとき、放射能の組織及び臓器内濃度は消化管、肝臓及び腎臓等の主要な排泄器官において高く、投与後 168 時間には血漿中の濃度と同程度に低下した (2.6.4.4.5)。ラットに単回及び反復静脈内投与したときの全身オートラジオグラムにおいても、放射能は組織内濃度測定の結果と同様の挙動を示した (2.6.4.4.6)。妊娠ラットでは、ビマトプロスト及びその代謝物は胎盤を介して胎児へ移行する可能性が示唆された (2.6.4.4.8)。

^3H -ビマトプロストの血漿たん白非結合率はマウス、ラット、ウサギ及びサルで約 30~40% であったのに対し、ヒトでは低い値 (約 9%) を示した。ヒトの血清アルブミン及び α_1 -酸性糖たん白への非結合率はそれぞれ約 40% 及び約 60% であった (2.6.4.4.7)。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒトにおける *in vitro* 血液/血漿中放射能濃度比はいずれも 0.58~0.85 であった。また *in vivo* 血液/血漿中放射能濃度比は、雌雄ラット、雌雄サル及びヒトに静脈内投与後 0.5 時間で 0.57~0.81、ウサギに点眼投与後 0.5 時間で 0.56 であった。これらの結果より、いずれの種においてもビマトプロスト及びその代謝物は、血球中に移行し

にくいことが示された。(2.6.4.4.9)。

ビマトプロストのメラニン親和性について *in vitro* で検討した。0.5～250 μM の ^3H -ビマトプロストと合成メラニンを 37℃で 6 時間インキュベートしたときの平均結合率は約 20%であり、その結合は可逆的であることが示された (2.6.4.4.10)。

2.4.3.4 代謝

ウサギ及びサル眼組織を用いてビマトプロストから AGN 191522 への *in vitro* 代謝活性を確認したところ、ウサギはサルよりも 10 倍以上の高値を示した (2.6.4.5.1)。また、ウサギ及びサルに ^3H -ビマトプロストを点眼投与したとき、ウサギの眼組織中にはビマトプロストよりも AGN 191522 が多く認められたが、サルではほとんど代謝されなかった (2.6.4.5.2)。ラット、イヌ、サル及びヒトの肝スライス及びイヌ肺スライスを用いた *in vitro* 代謝試料、マウス、ラット、ウサギ及びサル及びヒトに ^3H -ビマトプロストを単回静脈内投与後の血液 (又は血漿)、並びにラット、サル及びヒトの尿及び糞試料を用いて代謝物を検索したところ、いずれの動物種においてもビマトプロストは、加水分解、水酸化、N-脱エチル化及びグルクロン酸抱合を受けて、多くの代謝物を生成することが示唆された。血液あるいは血漿中において、ウサギでは AGN 191522 が最も多く検出されたのに対し、マウス、ラット、サル及びヒトではビマトプロストが最も多く検出された。ヒト血液中代謝物プロファイルはサルのプロファイルと最も類似していた (2.6.4.5.3, 2.6.4.5.4, 2.6.4.5.5 及び 2.6.4.5.6)。また、ビマトプロストの代謝における酸化反応には CYP3A4/5 が関与しているものと推定された (2.6.4.5.7)。

ビマトプロストを 1 ヶ月反復静脈内投与後の雌雄のラット及びサルの肝ミクロソームにおいて、雌ラットに UDP グルクロン酸転換酵素活性の増加及びトルブタミドのメチル基水酸化活性の低下、雄ラットにテストステロン 16 β -水酸化活性の低下、及び雄ザルにたん白濃度の増加が認められた (2.6.4.5.8)。

2.4.3.5 排泄

雄雌ラットに ^3H -ビマトプロストを静脈内投与したとき、投与放射能に対する尿中排泄率は雄で 26.6%、雌で 42.4%を示し、糞中排泄率は雄で 69.0%、雌で 49.2%であったことから、性差が認められた。一方、サルでは尿及び糞中排泄率に性差は認められず、総放射能の約 30%が糞中に、約 60%が尿中に排泄された (2.6.4.6.1)。授乳期ラットに ^3H -ビマトプロストを静脈内投与したとき、ビマトプロスト及びその代謝物は乳汁へ移行する可能性が示唆された (2.6.4.6.2)。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

マウスに 96 mg/kg を単回腹腔内投与した試験及びラットに 0.03、0.3 及び 3 mg/kg を単回静脈内投与した試験では、雌雄とも薬剤投与に関連した影響は認められなかった。概略の致死量はマウスで 96 mg/kg、ラットで 3 mg/kg を超える量であった (2.6.6.2.1 及び 2.6.6.2.2)。

なお、ビマトプロストのヒトにおける 1 日最大投与量は 0.0005 mg/kg [体重 60 kg のヒトに

0.03 % ビマトプロスト点眼剤を 1 滴 (50 μ L) ずつ両眼に 1 日 1 回点眼投与した場合の換算投与量] であり、上述のマウス単回投与試験あるいはラット単回投与試験 (投与量 3 mg/kg) では、それぞれ約 19 万倍あるいは 6000 倍のビマトプロストが投与されている。非げっ歯類を用いた単回投与毒性試験は実施していないが、サルにビマトプロストを 4 週間静脈内投与した際の最大投与量 (1 mg/kg/日) は、ヒトにおける 1 日最大投与量 (0.0005 mg/kg) の 2000 倍に相当する。この条件において薬剤投与に関連した影響は認められていない。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ビマトプロストの臨床投与経路である点眼投与による毒性評価として、ウサギを用いてビマトプロスト点眼剤の 1 ヶ月点眼投与試験 (有色ウサギ、0.03%、1 日 2 回)、1 ヶ月点眼投与及び回復性試験 (白色ウサギ、0.001%、0.01%及び 0.1%、1 日 4 回) 及び 6 ヶ月点眼投与及び回復性試験 (有色ウサギ、0.03%を 1 日 1 回又は 2 回、0.1%を 1 日 2 回) を実施した (2.6.6.3.1、2.6.6.3.2 及び 2.6.6.3.3)。いずれの試験でも薬物投与に起因した死亡例は認められず、薬剤投与に関連した眼局所及び全身性の影響は認められなかった。

イヌを用いてビマトプロスト点眼剤の 1 ヶ月点眼投与試験 (0.001%、0.01%及び 0.1%、1 日 4 回) を実施した (2.6.6.3.4)。薬物投与に起因した死亡例は認められなかった。薬剤に起因する変化として、一過性の軽微な眼の不快症状が対照群を含むすべての群で、縮瞳がすべての薬剤投与群で、一過性の軽度な結膜充血が 0.01%及び 0.1%投与群でそれぞれ認められたが、眼局所に病理組織学的変化は認められなかった。また、全身性の影響は認められなかった。

サルを用いてビマトプロスト点眼剤の 52 週間点眼投与及び回復性試験 (0.03%を 1 日 1 回又は 2 回、0.1%を 1 日 2 回) を実施した (2.6.6.3.5)。薬物投与に起因した死亡例は認められなかった。薬剤に起因する変化として、虹彩の色素沈着が投与 13 週以降のすべての薬剤群で用量依存的に認められ、休薬期間中に消失しなかった。眼周囲溝が顕著となる変化が投与 26 週以降 (0.03%及び 0.1%を 1 日 2 回) 及び投与 35 週以降 (0.03%を 1 日 1 回) に認められたが、機能的あるいは解剖学的な変化は伴わず、眼周囲の病理組織学的変化 (投与 29 週及び 53 週後) も認められなかった。なお、この変化は休薬期間中に回復性を示した。また、全身性の影響は認められなかった。

ビマトプロストの全身曝露を介した毒性プロファイルを把握するために、ラットを用いた 2 週間静脈内投与試験 (0.03、0.3 及び 1 mg/kg/日)、1 ヶ月静脈内投与試験 (0.1、0.3 及び 1 mg/kg/日)、52 週間経口投与及び回復性試験 (0.1、0.3 及び 2 mg/kg/日) を実施した (2.6.6.3.6、2.6.6.3.7 及び 2.6.6.3.8)。

いずれの試験でも薬物投与に起因した死亡例は認められなかった。薬剤に起因する変化として、体重及び体重増加量の減少が 52 週間試験 (経口投与) の雌の 0.3 mg/kg/日以上 の投与群で認められたが、2 週間試験及び 1 ヶ月試験の高用量群 (1 mg/kg/日) まで認められなかった。空胞化を伴う黄体の増加が 1 ヶ月試験の雌の 1 mg/kg/日の投与群及び 52 週間試験 (経口投与) の雌の 0.3 mg/kg/日以上 の投与群で認められた。AST (GOT) 及び ALT (GPT) のわずかな増加が 52 週間試験 (経口投与) の雄のすべての薬剤投与群及び雌の 2 mg/kg/日投与群で認められたが、

病理組織学的な変化を伴っていないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。52 週間試験（経口投与）で認められた変化はいずれも回復性を示した。

以上より、1 ヶ月静脈内投与試験の 1 mg/kg/日（雌）で空胞化を伴う黄体の増加、52 週間経口投与試験の 0.3 mg/kg/日以上（雌）で体重及び体重増加量の減少及び空胞化を伴う黄体の増加がそれぞれ認められたことから、無毒性量は 2 週間静脈内投与試験では 1 mg/kg/日（雌雄）、1 ヶ月静脈内投与試験では 1 mg/kg/日（雄）及び 0.3 mg/kg/日（雌）、52 週間経口投与試験では 2 mg/kg/日（雄）及び 0.1 mg/kg/日（雌）であると判断した。

サルを用いた 4 週間静脈内投与試験（0.1、0.3 及び 1 mg/kg/日）、17 週間静脈内投与試験及び回復性試験（0.01、0.1 及び 1 mg/kg/日）を実施した（2.6.6.3.9 及び 2.6.6.3.10）。

いずれの試験でも薬物投与に起因した死亡例は認められなかった。薬剤に起因する変化として、眼周囲の異常（眼周囲溝の顕著化）が 17 週間試験の雌雄すべての薬剤投与群で用量依存的に認められたが、機能的あるいは解剖学的な変化は認められなかった。なお、この変化はいずれも回復性を示した。全身性の影響は雌雄いずれの薬剤投与群でも認められなかった。

以上より、17 週間静脈内投与試験の雌雄すべての用量で可逆的な眼周囲の異常が認められたが、全身性の影響は認められなかったことから、無毒性量は 4 及び 17 週間静脈内投与試験のいずれも 1 mg/kg/日（雌雄）であると判断した。なお、サル 52 週間試験は静脈内投与ではなく点眼投与で実施している。52 週間点眼投与試験における最大投与量は 0.07 mg/body（0.1 %、2 回/日）であり、その際の血中薬物濃度はこの 17 週間静脈内投与試験の最低用量 0.01 mg/kg/日より少なく、臨床試験における血中薬物濃度よりも高いことが確認されている（表 2.4.4.7-1）。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験として、細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ試験及びマウス小核試験を実施した（2.6.6.4.1、2.6.6.4.2 及び 2.6.6.4.3）。

サルモネラ菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験では最高用量を 5000 µg/プレートで、マウスリンフォーマ試験では最高用量を 600 µg/mL として検討した結果、代謝活性化の有無にかかわらずいずれも陰性であった。また、マウスに 5、10 及び 20 mg/kg で単回静脈内投与した小核試験において、小核を有する多染性赤血球数の増加は認められなかった。これらの結果からビマトプロストに遺伝毒性はないと判断した。

2.4.4.4 がん原性試験

マウスに 0.3、1 及び 2 mg/kg/日を 104 週間経口投与したがん原性試験では、雌の 2 mg/kg/日投与群で体重増加量の減少が認められたが、いずれの投与量においてもがん原性を疑わせる所見は認められなかった（2.6.6.5.1）。ラットに 0.1、0.3 及び 1 mg/kg/日を 104 週間経口投与したがん原性試験では、雌のすべての薬剤投与群で黄体の空胞化が認められたが、いずれの投与量においてもがん原性を疑わせる所見は認められなかった（2.6.6.5.4）。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

受胎能及び着床までの初期胚発生への影響は、ラットに 0.1、0.3 及び 0.6 mg/kg/日の用量で経口投与して検討した (2.6.6.6.1)。その結果、親動物の一般毒性及び生殖機能、胚発生に対する影響は 0.6 mg/kg/日においても認められなかったことから、無毒性量は親動物・胚ともに 0.6 mg/kg/日と判断した。

胚・胎児発生への影響は、マウスとラットを用いて検討した (2.6.6.6.2 及び 2.6.6.6.3)。妊娠マウスに 0.1、0.3 及び 0.6 mg/kg/日を経口投与したところ、母動物の一般毒性への影響は 0.6 mg/kg/日まで認められなかった。生殖機能に関しては、0.3 mg/kg/日以上で流産が、0.6 mg/kg/日で早産がそれぞれ認められた。胚・胎児発生への影響は 0.6 mg/kg/日まで認められなかった。したがって、マウスにおける無毒性量は、母動物に対して 0.1 mg/kg/日、胚・胎児に対して 0.6 mg/kg/日と判断した。また、妊娠ラットに 0.1、0.3 及び 0.6 mg/kg/日を経口投与したところ、母動物の一般毒性への影響として 0.6 mg/kg/日で局所的な脱毛が認められた。生殖機能に関しては、0.6 mg/kg/日で流産が認められた。胚・胎児発生への影響は 0.6 mg/kg/日まで認められなかった。したがって、ラットにおける無毒性量は、母動物に対して 0.3 mg/kg/日、胚・胎児に対して 0.6 mg/kg/日と判断した。

なお、胚・胎児発生への影響についてウサギを用いて評価するために、妊娠ウサギに 0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日のビマトプロストを経口投与して予備的に検討したところ (2.6.6.6.4)、母動物に関しては、3 mg/kg/日以上で軟便、液状便及び排便量の減少が、すべての薬剤投与群で摂餌量の減少及び用量依存的な体重増加量の減少がそれぞれ認められた。3 mg/kg/日以上で投与群では妊娠率が減少し、すべての薬剤投与群で黄体数及び着床数の著しい減少が認められ、生存胎児は得られず、すべて早期吸収であった。さらに、ビマトプロストのウサギ子宮収縮作用は、マウス、ラット、非妊娠ヒト、妊娠ヒトの子宮収縮作用に比較して強力であること (2.6.2.2.1.1.2 及び 2.6.2.4) 及びビマトプロストのウサギにおける代謝物プロファイルがヒトと異なること (2.6.4.5.4) を考慮すると、ウサギはビマトプロストの生殖発生毒性試験に不適切な動物種であることが示唆されることから、ビマトプロストの胚・胎児発生への影響はマウスとラットを用いて評価した。

出生前、出生後の発生並びに母体機能への影響は、妊娠ラットに 0.05、0.1、0.3 及び 0.6 mg/kg/日の用量で経口投与して検討した (2.6.6.6.5)。母動物 (F₀) の一般毒性への影響は、0.6 mg/kg/日まで認められなかった。母動物 (F₀) の生殖機能については、0.3mg/kg/日以上で投与群で妊娠期間が短縮し、0.6 mg/kg/日投与群では分娩動物数及び出産率が減少したほか、哺育しない母動物が観察された。また帝王切開時に 0.3 mg/kg/日以上で投与群では、胎児死亡及び後期吸収が認められたほか、死産児のあった母動物数及び哺乳 1 日から 4 日に全ての出生児が死亡した母動物数が増加した。出生児 (F₁) については、0.3 mg/kg/日以上で投与群で生存率の低下や授乳期間中に体重の低値が認められた。離乳後は、0.3 mg/kg/日投与群で体重の低値及び摂餌量の減少が認められた。したがって、母動物 (F₀) の一般毒性に対しては 0.6 mg/kg/日まで、母動物 (F₀) の生殖機能に対しては 0.1 mg/kg/日まで、出生児 (F₁) に対しては 0.1 mg/kg/日まで薬剤投与に関連した影響はそれぞれ認められなかったことから、母動物 (F₀) 及び出生児 (F₁) の無毒性

量はともに 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.4.4.6 その他の毒性試験

2.4.4.6.1 抗原性試験

ビマトプロストの抗原性を確認するため、モルモット抗原性試験（全身性アナフィラキシー反応及び同種受動皮膚アナフィラキシー反応）、並びにマウス・ラットを用いたげっ歯類抗原性試験（異種受動皮膚アナフィラキシー反応）により検討した（2.6.6.8.1.1 及び 2.6.6.8.1.2）。いずれの試験結果も陰性であったことから、ビマトプロストに抗原性はないと判断した。

2.4.4.6.2 虹彩色素沈着に関する試験

サルを用いて 1 年間点眼投与によるビマトプロストの虹彩色素沈着に対する影響を検討した。0.03 %ビマトプロスト及び 0.005 %ラタノプロストをサルの片眼に 1 日 1 回、1 年間点眼したところ、臨床使用濃度である 0.005 %ラタノプロストでは明らかな虹彩の色調変化が認められたが、0.03 %ビマトプロストでは変化は認められなかった（2.6.6.8.2.1）。また、0.01 %及び 0.1 %ビマトプロストあるいは 0.1 %ラタノプロストを 1 日 2 回、1 年間点眼したところ、0.01 %ビマトプロストでは虹彩の色調及びメラノサイトに変化は認められなかったが、0.1 %ビマトプロスト及び 0.1 %ラタノプロストでは、虹彩色素の増加が認められ、3 ヶ月の休薬期間中に消失しなかった。虹彩の色調が濃くなった虹彩実質のメラノサイトにおいて、成熟したメラノソームが多数観察されたが、メラノサイトの増殖は認められなかった（2.6.6.8.2.2）。

以上の結果から、ビマトプロストによる虹彩色素沈着は、メラノソームからのメラニン産生増加に起因する変化であり、サルにおける作用はラタノプロストと比較して同程度か、あるいは弱いことが示唆された。

2.4.4.6.3 皮膚感作性試験

ビマトプロストの皮膚感作性を確認するため、モルモットを用いた Maximization 試験により検討したところ、皮膚反応は認められなかった（2.6.6.8.3）。したがって、ビマトプロストに皮膚感作性はないと判断した。

2.4.4.7 トキシコキネティクス試験

血中薬物濃度の測定は、反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験で実施した。主たる試験で得られた血中薬物濃度と臨床試験の血中薬物濃度と比較した曝露量比を一覧に纏めた（表 2.4.4.7-1）。ヒトの血中薬物濃度と比較して約 2.1 倍から 23000 倍の曝露が認められた。

2.4
非臨床試験の概括評価

表 2.4.4.7-1 毒性試験におけるビマトプロストの曝露量とヒトにおける曝露量の比較

試験の種類	投与量 (mg/kg/日) あるいは 投与濃度 (%)		血中薬物濃度 ¹⁾ [() 内数値は曝露量比 (毒性試験の値/臨床試験の値 ²⁾)]			
			雄		雌	
			Cmax (ng/mL)	AUC (ng・h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng・h/mL)
反復投与毒性試験 ³⁾						
ウサギ 6 ヶ月試験 (点眼)	0.1 % ⁴⁾	無毒性濃度	3.08 (50)	1.73 (86)	2.04 (33)	1.61 (80)
サル 52 週間試験 (点眼)	0.03 % ⁵⁾	眼周囲溝の顕著化 虹彩色素沈着	0.513 (8.4)	0.279 (13)	0.382 (6.2)	0.228 (11)
	0.1 % ⁶⁾	全身への影響なし	1.94 (31)	2.22 (111)	1.91 (31)	1.94 (97)
マウス 13 週間試験 (がん原性予備、経口)	4	無毒性量 (雌)			12.5 (204)	
	16	無毒性量 (雄)	62.2 (1019)			
ラット 13 週間試験 (がん原性予備、経口)	0.1	無毒性量 (雌)			0.129 (2.1)	
	1	無毒性量 (雄)	7.03 (115)			
ラット 52 週間試験 (経口)	0.1	無毒性量 (雌)			0.173 (2.8)	0.0729 (3.6)
	2	無毒性量 (雄)	10.8 (177)	15.8 (790)		
サル 17 週間試験 (静脈内)	0.01	眼周囲溝の顕著化	17.2 (281)	8.13 (406)	23.2 (380)	6.00 (300)
	1	全身への影響なし	825 (13524)	465 (23250)	883 (14475)	455 (22750)

空欄: 該当データなし

1) 各試験における最終測定時点の値

2) Cmax = 0.061 ng/mL、AUC_{0-t} = 0.02 ng·h/mL (2.7.2.2.2.2、0.03 %点眼剤、1 滴ずつ両眼に 1 日 1 回点眼投与)

3) がん原性予備試験 (反復経口投与) の結果も含めた

4) 1 日 2 回投与、Cmax: 投与 7、77 及び 169 日目の C_{5min} 値の平均、AUC: AUC_{DE} (AUC_{0-1h} × 投与回数/日) の平均

5) 1 日 1 回投与、AUC: AUC_{DE} (AUC_{0-1h} × 投与回数/日)

6) 1 日 2 回投与、AUC: AUC_{DE} (AUC_{0-1h} × 投与回数/日)

表 2.4.4.7-1 毒性試験におけるビマトプロストの曝露量とヒトにおける曝露量の比較（つづき）

試験の種類	投与量 (mg/kg/日) あるいは 投与濃度 (%)		血中薬物濃度 ¹⁾ [() 内数値は曝露量比 (毒性試験の値/臨床試験の値 ²⁾)]			
			雄		雌	
			Cmax (ng/mL)	AUC (ng・h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng・h/mL)
がん原性試験						
マウス 104 週間試験	2	がん原性なし	6.95 (113)	8.81 (440)	5.54 (90)	7.42 (371)
ラット 104 週間試験	1	がん原性なし	3.70 (60)	9.31 (465)	3.14 (51)	8.91 (445)
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	0.6	無毒性量 (胚、親動物)	3.39 (55)		3.40 ³⁾ (55)	3.23 ³⁾ (161)
マウス胚・胎児発生に 関する試験	0.6	無毒性量 (胎児)			10.0 (163)	3.01 (150)
	0.1	無毒性量 (母動物)			0.774 (12)	0.109 (5.4)
ラット胚・胎児発生に 関する試験	0.6	無毒性量 (胎児)			3.40 (55)	3.23 (161)
	0.3	無毒性量 (母動物)			0.898 (14)	NC
ラット出生前、出生後 の発生並びに母体機能 に関する試験	0.1	無毒性量 (出生児、母動物)			0.262 ⁴⁾ (4.2)	NC ⁴⁾

空欄: 該当データなし、NC: 算出せず

1) 各試験における最終測定時点の値

2) Cmax = 0.061 ng/mL、AUC_{0-t} = 0.02 ng·h/mL (2.7.2.2.2.2、0.03 %点眼剤、1 滴ずつ両眼に 1 日 1 回点眼投与)

3) 2.6.6.6.3 試験の値

4) 予備試験 (概要表 2.6.7.11B) の値

2.4.5 総括及び結論

ビマトプロストは $\text{PGF}_{2\alpha}$ の合成アナログである 17-phenyl trinor $\text{PGF}_{2\alpha}$ の 1 位カルボン酸のエチルアミド誘導体（プロスタマイド $\text{F}_{2\alpha}$ アナログ）であり（図 2.4.5-1）、ラタノプロスト及びその遊離酸をはじめとする $\text{PGF}_{2\alpha}$ 誘導体（プロスタグランジン関連薬）とはプロスタノ酸骨格 1 位の化学構造が異なる（表 2.4.1-1）。

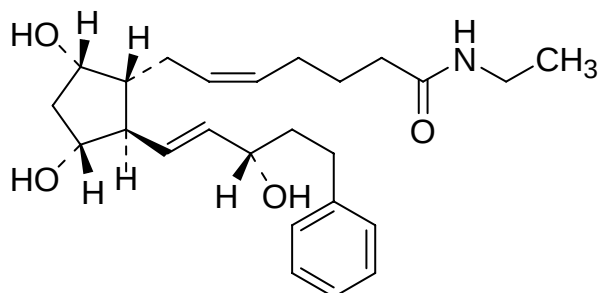


図 2.4.5-1 ビマトプロストの化学構造式

ビマトプロストの受容体選択性について、種々の薬理学的検討を行った。眼圧下降に関与する受容体を含む 100 種類以上の生理活性物質受容体、トランスポーター及びイオンチャネルのいずれに対してもビマトプロストは高い親和性を示さず⁶⁾、その構造類似性から予想された FP 受容体への親和性も低かった (IC_{50} : 1480 nM (組換えネコ FP 受容体)、5010 nM (組換えヒト FP 受容体)。また、FP 受容体を発現しているネコ肺実質の膜面分に対して弱い結合 (182 nM) がみられたが、その他の既知プロスタノイド受容体に対しては親和性を示さなかった。更に、各種プロスタノイド受容体関連標本を用いた検討において、ビマトプロストは作用発現に FP 受容体を介する標本のうちネコ虹彩括約筋を、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 感受性平滑筋標本のうちネコ肺実質及びウサギ子宮を収縮させたものの、その他の標本に対して強い作用を示さなかった。以上の結果からビマトプロストは FP 受容体を含む既知のプロスタノイド受容体とは異なる受容体を介することが示唆された。

ビマトプロストの受容体が既知のプロスタノイド受容体と異なることは、次の検討結果からも支持される。すなわち、(1)ネコ虹彩括約筋組織から分離された細胞に、ビマトプロストと $\text{PGF}_{2\alpha}$ に応答する細胞が独立して存在すること、(2)ビマトプロストやプロスタマイド $\text{F}_{2\alpha}$ によるネコ虹彩括約筋収縮を阻害し、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ や AGN 191522 による収縮を阻害しない化合物（プロスタマイド拮抗薬）が存在すること⁵⁾、(3)プロスタマイド拮抗薬がイヌにおいてビマトプロストによる眼圧下降を阻害し、AGN 191522 の作用を阻害しないこと、である。

一方で、ビマトプロストの受容体として、現在までにヒト FP 受容体のスプライスバリエント (Alt-FP)⁷⁾ の関与が示されている⁴⁾。プロスタノイド受容体に関連した分子生物学的検討において、Alt-FP とヒト FP 受容体との共発現細胞においてビマトプロストが $\text{PGF}_{2\alpha}$ とは異なる細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を引き起こすことを見出した。ビマトプロストに特異的な Ca^{2+} 濃度変化がプロスタマイド拮抗薬により阻害され、且つ細胞外の Ca^{2+} を除くことによって消失したことはネコ虹彩括約筋の収縮実験で得られた結果からも支持される。更に、組換え FP 受容体と Alt-FP が

複合体を形成し得ることも免疫沈降実験により示され、この複合体がビマトプロストの受容体と考えられている。

以上のビマトプロストの受容体に関する種々の検討から、プロスタマイド $F_{2\alpha}$ アナログであるビマトプロストは、その作用の発現に FP 受容体などの既知の受容体を介さないことが明らかとなり、既存のプロスタグランジン関連薬とは異なることが示された。

ビマトプロストの眼圧下降作用は、イヌ及びサルを用いて単回あるいは 5 日間の反復投与で検討した。ビマトプロストは正常眼圧イヌ、正常眼圧サル及び隅角レーザー照射誘発高眼圧サルのいずれのモデルにおいても、1 日 1 回あるいは 2 回投与で投与回数に関わらず眼圧下降作用を示した。イヌにおける眼圧下降作用は 0.01%あるいは 0.03%濃度で効力のピークを迎え、高眼圧サルでは 0.1%濃度まで用量依存的に作用の増強がみられた。したがって、ビマトプロストの非臨床試験における眼圧下降作用の至適用量は 0.01%~0.1%の間にあると考えられた。また、正常眼圧イヌを用いた検討から、0.03%ビマトプロスト溶液は 0.005%ラタノプロスト溶液より強い眼圧下降作用を示した。

ビマトプロスト点眼投与後の房水動態についてサルを用いて検討した。その結果、サルにおいてビマトプロスト (0.1%) は房水産生をやや促進する傾向を示した。一方、ビマトプロスト (0.01%) はぶどう膜強膜流出路を介した房水排出を 42%増加させた。また、線維柱帯を介した房水排出に対する影響もわずかにみられた。以上のことから、ビマトプロストの眼圧下降作用は主として毛様体筋間隙を介して強膜から眼外へと至るぶどう膜強膜流出路の房水排出抵抗の低下に基づくことが示された (図 2.4.5-2)。なお、ラタノプロストをはじめとする FP 受容体作動薬の眼圧下降も同様の機序に基づくことが知られている。

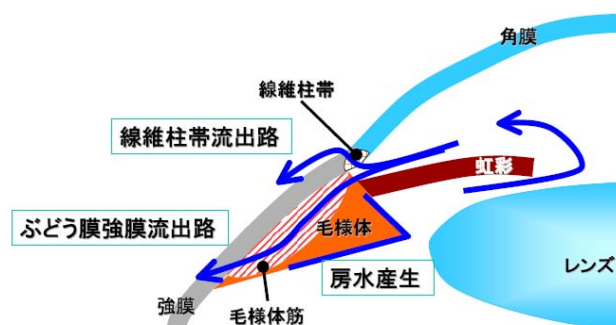


図 2.4.5-2 房水動態の模式図

青色の矢印は房水の流れを示す。

ヒト角膜及び強膜を用いた *in vitro* 透過性試験の結果から、ビマトプロストは点眼投与後に主として強膜を経由して隣接する組織である毛様体へ移行していることが示されている。また *in vivo* 眼組織代謝試験から、ビマトプロストは主に未変化体としてサルの毛様体に存在し、ぶどう膜強膜流出路の抵抗を減少させていると考えられた。

ビマトプロストの眼圧下降作用機序については、MMP の発現亢進により房水排出経路にある

細胞外マトリクスの代謝を活性化し、房水が流れやすいように組織を再構築（リモデリング）することによって考えられ、この観点ではPGF_{2α}やそのアナログと同じ作用機序^{8),9),10),11),12)}だが、リモデリングに至る経路に違いがあることが示唆されている（図 2.4.5-3）。

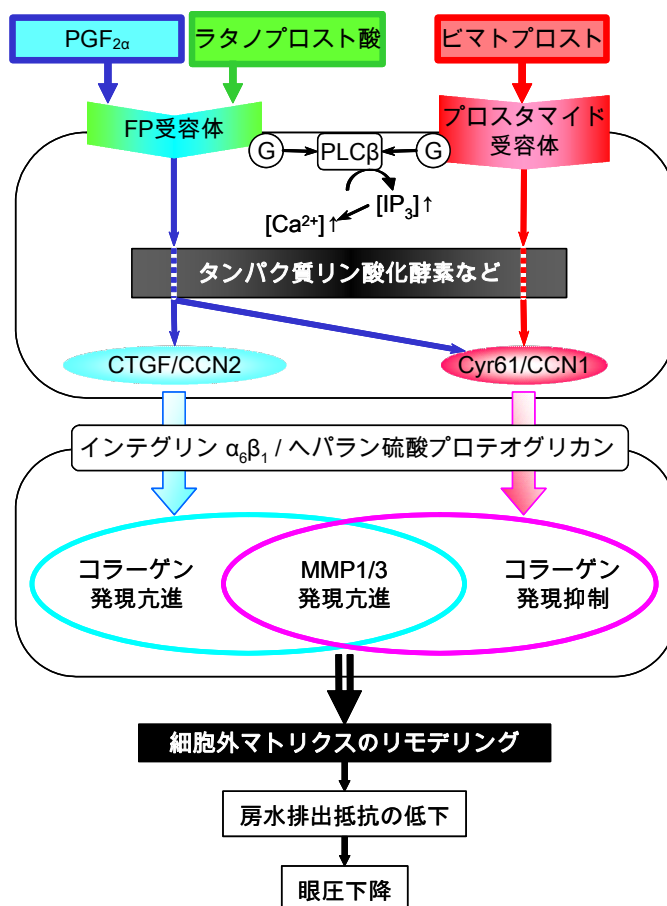


図 2.4.5-3 ビマトプロスト及びFP 受容体作動薬による細胞外マトリクスの
リモデリングに至る機序の対比

赤矢印はビマトプロスト、青矢印はFP 受容体作動薬から始まる情報伝達経路を示す。引用文献 5)、8)、9)、10)、13)、14)、15) 及び16) より。

PGF_{2α} は毛様体平滑筋細胞において種々のタンパク質リン酸化酵素や低分子量 G タンパク質を介して Cysteine rich protein 61 (Cyr61/CCN1) 及び connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) の発現を亢進するのに対し、ビマトプロストは両者のうち Cyr61 のみを選択的に誘導する。Cyr61 及び CTGF はともにインテグリン α₆β₁ 及びヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して細胞外マトリクスの代謝に影響を与えることが知られている。両者はともに MMP1 及び MMP3 の発現を亢進するという共通点を持つ一方、Cyr61 は線維芽細胞における I 型コラーゲンの colla1 及び colla2 サブユニットの発現抑制、CTGF は線維芽細胞や線維柱帯細胞においてコラーゲン生成を促進するという相反する作用も有する。

ビマトプロストの臨床投与経路である点眼投与による毒性評価として、ウサギ、イヌ及びサルを用いた反復点眼投与毒性試験を実施したところ、ウサギでは 0.1%においても 1 ヶ月（1 日

4 回)、6 ヶ月 (1 日 2 回) まで異常は認められなかった。しかし、イヌでは 1 ヶ月の反復点眼投与で全ての濃度 (0.001%以上) に縮瞳が認められ、0.01%及び 0.1%では結膜充血が認められた。サルでは、52 週間の反復点眼投与で、虹彩色素沈着及び眼周囲への影響 (眼周囲溝の顕著化など) が投与 13 週以降に全ての濃度 (0.03%以上) で認められた。これらの眼局所所見のうち、縮瞳は毒性試験に用いた動物種のうちイヌに特異的な反応と考えられ、臨床試験でもビマトプロストに起因する縮瞳は認められていない。一方、結膜充血、虹彩色素沈着及び眼周囲への影響に関しては、本剤の臨床試験や海外の臨床使用でも確認されていることから、これらの毒性所見の発現機序について公表文献等の情報をもとに考察し、臨床使用上問題となる可能性を評価した。

ビマトプロストによる結膜充血は、炎症反応によるものではなく^{17),18),19)}、内皮細胞由来の NO 合成酵素 (eNOS) によって産生された一酸化窒素 (Nitric oxide; NO) による血管拡張作用によるものと考えられている^{20),21)}。なお、構造類似薬であるラタノプロストの充血についてもビマトプロストと同様、NO による血管拡張作用の関与が考えられているが²²⁾、ラタノプロストによる血管拡張はビマトプロストと異なり、NO 合成酵素阻害剤で完全には抑制されないことから、他のメディエーター、例えばニューロペプチドの関与も考えられている²³⁾。したがって、ビマトプロストの点眼投与により結膜充血が誘発されるものの、結膜充血は一過性の変化であることや病理組織学的評価において器質的变化を伴っていないことから、臨床使用上問題となる可能性は低いと考えられた。

サル 52 週間点眼投与試験で認められたビマトプロストによる虹彩色素沈着は、投与 13 週以降に認められ、20 あるいは 24 週の休薬期間中に回復しない所見であった。色素沈着の作用機序は、ビマトプロストを 1 年間投与したサル眼球の病理組織学的検討により、メラノサイトの増殖ではなく、メラノソームからのメラニン産生の増加によることが明らかになった。なお、臨床において色素沈着が報告されている構造類似薬のラタノプロストも、メラノサイトを増殖させずにメラノソームからのメラニン産生を増加させることが知られており²¹⁾、ビマトプロストもラタノプロストと類似の作用機序で虹彩色素沈着を誘発する可能性が考えられる。虹彩色素沈着は、回復性に乏しい変化であることと本剤の臨床試験や海外の臨床使用でも認められていることから、添付文書にその旨を記載し注意を喚起することとした。

ビマトプロストの全身性の毒性評価に関して、マウス (96mg/kg、腹腔内) 及びラット (3 mg/kg、静脈内) を用いた単回投与毒性試験の結果から、臨床使用時の曝露量 (ヒトにおける推定投与量 0.0005 mg/kg/日) より十分高い条件下でも、薬剤投与に関連した異常は認められなかった。

反復投与毒性については臨床投与経路である点眼投与による評価に加えて、ラット及びサルを用いた静脈内及び経口投与による評価を行い、マウス及びラットを用いたがん原性の予備試験で認められた所見も含めて全身曝露を介した毒性プロファイルを考察した。

マウスでは、13 週間経口投与試験 (がん原性予備試験) において、雌に胸腺髄質リンパ球の増加 (8 mg/kg/日以上)、腔粘膜表層の炎症性変化 (16 mg/kg/日) が認められた。いずれの所見も他の動物種 (ラット及びサル) では認められていないことから、これらの所見は種特異的な変化である可能性が示唆された。また、この試験の無毒性量 (4 mg/kg/日) における曝露量が、

2.4 非臨床試験の概括評価

ヒトの曝露量（2.7.2.2.2）に比べて C_{max} で 204 倍高いことから、ヒトで発現する可能性は低いと考えられた。

ラットでは、AST 及び ALT の増加が 52 週間経口投与試験の 0.1 mg/kg/日以上及び 13 週間経口投与試験（がん原性予備試験）の 8 mg/kg/日以上に認められたが、軽度な変化であること及び病理組織学的変化を伴っていないことから、毒性学的に意義のある変化ではないと判断した。

雌では可逆的な卵巣への影響、すなわち卵巣の重量増加が 13 週間経口投与試験（がん原性予備試験）の 4 mg/kg/日以上で認められ、空胞化を伴う黄体の増加が 1 ヶ月静脈内投与試験の 1 mg/kg/日、52 週間経口投与試験及び 13 週間経口投与試験（がん原性予備試験）の 0.3 mg/kg/日以上で認められた。卵巣への影響に関するメカニズムは不明であるが、他の動物種（マウス及びサル）を用いた毒性試験では、ラットを用いた試験よりも曝露量が高い場合においても、卵巣への影響は認められていないことから、種特異的な反応である可能性が示唆された。これらの卵巣への所見が認められた試験のうち、最小の無毒性量（0.1 mg/kg/日）における曝露量は、ヒトの曝露量に比べて C_{max} で 2.1 倍（13 週間経口投与試験）、AUC で 3.6 倍（52 週間経口投与試験）の乖離があり、卵巣の所見が認められた最小の投与量（0.3 mg/kg/日）では、 C_{max} で 13 倍（13 週間経口投与試験）、AUC で 88 倍（52 週間経口投与試験）の乖離が認められたことを考慮すると、ヒトで卵巣への影響が発現する可能性は低いと考えられた。また、体重増加量の抑制が 52 週間経口投与試験の 0.3 mg/kg/日以上（雌）及び 13 週間経口投与試験（がん原性予備試験）の 4 mg/kg/日以上（雌雄）で認められたが、ヒトより高曝露量における所見であることから、ヒトで発現する可能性は低いと考えられた。

サルでは、17 週間静脈内投与試験において 0.01 mg/kg/日以上で両眼に眼周囲の異常が認められ、その発現頻度及び程度は時間と用量に依存することが示された。なお、この所見に機能的あるいは解剖学的な異常は認められず、休薬期間中にその発現頻度及び程度は減弱した。その他に全身性の異常は認められなかった。

がん原性試験はマウス及びラットを用いて行なった。マウスでは、2 mg/kg/日投与群の雌で体重増加量の減少が認められたが、病理組織学的検査において 2 mg/kg/日までがん原性を示唆する変化は認められなかった。ラットでは病理組織学的検査において、雌のすべての薬剤投与群で黄体の空胞化が認められたが、非腫瘍性変化であり、1 mg/kg/日までがん原性を示唆する変化は認められなかった。

生殖発生毒性試験は、ラットを用いて実施した受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では親動物及び胚ともに 0.6 mg/kg/日まで影響はなかった。マウス及びラットを用いて実施した胚・胎児発生への影響に関する試験において、マウスでは、母動物への影響として 0.3 mg/kg/日以上で流産あるいは早産が認められたが、発生毒性は認められなかった。ラットでは、母動物への影響として 0.6 mg/kg/日で流産及び局所的な脱毛が認められたが、発生毒性は認められなかった。また、出生前、出生後の発生並びに母体機能に関する試験において、0.3 mg/kg/日以上で妊娠期間の短縮、胎児死亡及び後期吸収のほか、死産児のあった母動物数及び哺乳 1 日から 4 日に全ての出生児が死亡した母動物数の増加が認められ、0.6 mg/kg/日で分娩動物数及び出産

率の減少のほか、哺育しない母動物が認められた。出生児では 0.3 mg/kg/日以上で生存率の低下や授乳期間中に体重の低値が認められたほか、離乳後には 0.3 mg/kg/日で体重の低値及び摂餌量の減少が認められた。母動物及び出生児ともに無毒性量は 0.1 mg/kg/日であった。これらの生殖発生毒性試験のなかで最も低い無毒性量は 0.1 mg/kg/日であり、その曝露量（ラット出生前、出生後の発生並びに母体機能に関する試験）はヒトの曝露量に比べて C_{max} で 4.2 倍の乖離があった。曝露量の乖離を考慮すると、これらの試験で認められた所見がヒトで発現する可能性は低いと考えられるが、妊婦又は妊娠している可能性のある婦人に対する安全性が確認できていないことから、添付文書にその旨を記載し注意を喚起することとした。また、ビマトプロストはラットにおいて乳汁に移行することから新生児への影響を考慮する必要がある、授乳中の婦人に対する使用に際しても添付文書にその旨を記載し、合わせて注意を喚起することとした。

その他、遺伝毒性試験及び抗原性試験において特記すべき事項はなかった。

以上のビマトプロストの非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の結果、プロスタマイド F_{2α} アナログであるビマトプロストは、既存の PG 関連薬とは異なる受容体選択性に基づく作用機序を持ち、かつ強力な眼圧下降作用を示すこと、さらには臨床使用上問題となる副作用を誘発しないと考えられることから、緑内障及び高眼圧症の治療に有用であることが示された。

2.4.6 参考文献一覧

- 1) Yu M, Ives D, Ramesha CS. Synthesis of prostaglandin E₂ ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. J Biol Chem. 1997;272:21181-6.
- 2) Kozak KR, Crews BC, Morrow JD, Wang LH, Ma YH, Weinander R, et al. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. J Biol Chem. 2002;277:44877-85.
- 3) Yang W, Ni J, Woodward DF, Tang-Liu DD, Ling KH. Enzymatic formation of prostamide F_{2α} from anandamide involves a newly identified intermediate metabolite, prostamide H₂. J Lipid Res. 2005;46:2745-51.
- 4) Liang Y, Woodward DF, Guzman VM, Li C, Scott DF, Wang JW, Wheeler LA, Garst ME, Landsverk K, Sachs G, Krauss AH, Cornell C, Martos J, Pettit S, Fliri H. Identification and pharmacological characterization of the prostaglandin FP receptor and FP receptor variant complexes. Br J Pharmacol. 2008;154:1079-93.
- 5) Woodward DF, Krauss AH, Wang JW, Protzman CE, Nieves AL, Liang Y, et al. Identification of an antagonist that selectively blocks the activity of prostamides (prostaglandin-ethanolamides) in the feline iris. Br J Pharmacol. 2007;150:342-52.
- 6) Woodward DF, Krauss AH, Chen J, Lai RK, Spada CS, Burk RM, et al. The pharmacology of bimatoprost (LumiganTM). Surv Ophthalmol. 2001;45 Suppl 4:S337-45.

- 7) Vielhauer GA, Fujino H, Regan JW. Cloning and localization of hFP_S: a six-transmembrane mRNA splice variant of the human FP prostanoid receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2004;421:175-85.
- 8) Weinreb RN, Lindsey JD. Metalloproteinase gene transcription in human ciliary muscle cells with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:716-22.
- 9) Sagara T, Gatton DD, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Topical prostaglandin F_{2α} treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:794-801.
- 10) Lütjen-Drecoll E, Tamm E. Morphological study of the anterior segment of cynomolgus monkey eyes following treatment with prostaglandin F_{2α}. *Exp Eye Res*. 1988;47:761-9.
- 11) Anthony TL, Lindsey JD, Weinreb RN. Latanoprost's effects on TIMP-1 and TIMP-2 expression in human ciliary muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:3705-11.
- 12) Husain S, Jafri F, Crosson CE. Acute effects of PGF_{2α} on MMP-2 secretion from human ciliary muscle cells: a PKC- and ERK-dependent process. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1706-13.
- 13) Liang Y, Li C, Guzman VM, Evinger AJ 3rd, Protzman CE, Krauss AH, et al. Comparison of prostaglandin F_{2α}, bimatoprost (prostanamide), and butaprost (EP₂ agonist) on Cyr61 and connective tissue growth factor gene expression. *J Biol Chem*. 2003;278:27267-77.
- 14) Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276:10443-52.
- 15) Chen CC, Mo FE, Lau LF. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276:47329-37.
- 16) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J*. 1999;13:1774-86.
- 17) Robert M, Feldman MD. Conjunctival hyperemia and the use of topical prostaglandins in glaucoma and ocular hypertension. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:23-35.
- 18) Higginbotham EJ, Schuman JS, Goldberg I, Gross RL, VanDenburgh AM, Chen K, et al. One-year, randomized study comparing bimatoprost and timolol in glaucoma and ocular hypertension. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1286-93.
- 19) Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Baudouin FB. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, Travoprost, and bimatoprost in conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2444-50.
- 20) Chen J., Dinh T., Woodward DF, Holland JM, Yuan YD, Lin TH, et al. Bimatoprost: Mechanism of ocular surface hyperemia associated with topical therapy. *Cardiovasc Drug Rev* 2005;23:231-46.
- 21) Holló C. The side effects of the prostaglandin analogues. *Expert Opin Drug Saf* 2007;6:45-52.
- 22) Astin M, Stjernschantz J, Selen G. Role of nitric oxide in PGF_{2α}-induced ocular hyperemia. *Exp Eye Res* 1994;59:401-8.

- 23) Astin M, Stjernschantz J. Mediation of prostaglandin $f_{2\alpha}$ -induced ocular surface hyperemia by sensory nerves in rabbits. *Cur Eye Res* 1997;1:886-90.