

ルミガン点眼液 0.03%

CTD 第2部 CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概括文及び概要表

千寿製薬株式会社

目次

2.6.1	緒言	1
2.6.2	薬理試験の概要文	2
2.6.2.1	まとめ	4
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	9
2.6.2.3	副次的薬理試験	38
2.6.2.4	安全性薬理試験	39
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	41
2.6.2.6	考察及び結論	42
2.6.2.7	図表	46
2.6.3	薬理試験概要表	49
2.6.4	薬物動態試験の概要文	64
2.6.4.1	まとめ	66
2.6.4.2	分析法	69
2.6.4.3	吸収	70
2.6.4.4	分布	78
2.6.4.5	代謝	90
2.6.4.6	排泄	97
2.6.4.7	薬物動態学的薬物相互作用	98
2.6.4.8	その他の薬物動態試験	98
2.6.4.9	考察及び結論	99
2.6.4.10	図表	101
2.6.5	薬物動態試験概要表	102
2.6.6	毒性試験の概要文	166
2.6.6.1	まとめ	167
2.6.6.2	単回投与毒性試験	175
2.6.6.3	反復投与毒性試験	175
2.6.6.4	遺伝毒性試験	181
2.6.6.5	がん原性試験	181
2.6.6.6	生殖発生毒性試験	186
2.6.6.7	局所刺激性試験	190
2.6.6.8	その他の毒性試験	190
2.6.6.9	考察及び結論	192
2.6.6.10	図表	197
2.6.7	毒性試験概要表	200

2.6.1 緒言

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化合物（プロスタマイド F_{2α}アナログ）である。（図 2.6.1-1）。0.03%ビマトプロスト点眼剤（1日1回）は、米国アラガン社が開放隅角緑内障及び高眼圧症を適応症として開発し、米国で2001年に承認を取得した後、現在までに73の国と地域で市販承認されている。

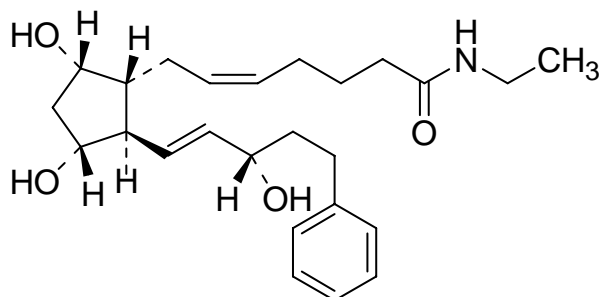


図 2.6.1-1 ビマトプロストの化学構造式

現在、本申請の適応症の一つである緑内障に対するエビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧を下降することである¹⁾。また一般的に、眼圧を低値に維持するほど視野障害が進行しにくいことが知られており、高眼圧症においても眼圧のコントロールは重要な治療方針の一つである²⁾。ビマトプロストは、ラタノプロスト等の PGF_{2α}アナログとは異なる受容体を介して主にぶどう膜強膜流出経路からの房水排出を促進し、ラタノプロストより強力な眼圧下降作用を発現する。さらに、臨床使用上問題となる副作用を誘発しないと考えられたことから、本剤は緑内障・高眼圧症に対して有用な治療薬になることが期待される。

【効能・効果】

緑内障・高眼圧症

【用法・用量】

1回1滴、1日1回点眼する。

参考文献

- 1) 日本緑内障学会緑内障診療ガイドライン作成委員会. 緑内障診療ガイドライン（第2版）. 日眼会誌. 2006;110:777-814.
- 2) 白柏 基宏. 特集／緑内障の治療. 総論 V. 緑内障の目標眼圧の考え方. 眼科. 2002;44:1435-1440.

2.6.2 薬理試験の概要文

本項で使用した用語及び略号を表 2.6.2-1 に示す。

表 2.6.2-1 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-フェニルトリノー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 ノールアマイド (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

表 2.6.2-1 略号一覧表 (つづき)

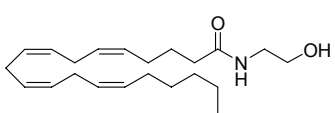
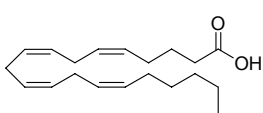
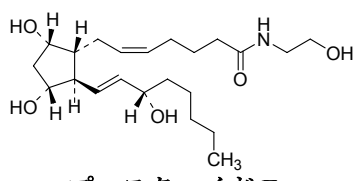
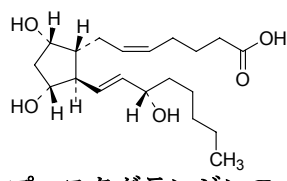
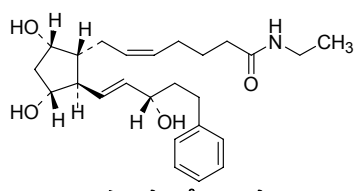
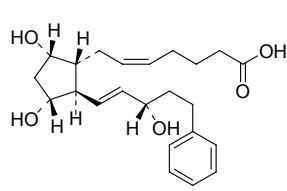
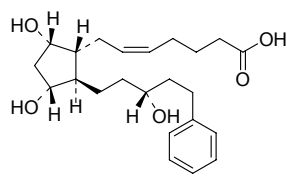
用語及び略号	内容
プロスタグランジン及びプロスタグランジン受容体	
PGD ₂	プロスタグランジン D ₂
PGE ₂	プロスタグランジン E ₂
DP 受容体	PGD ₂ 受容体
EP 受容体	PGE ₂ 受容体
EP _x 受容体	EP 受容体のサブタイプ及びスプライズバリエント (X にはサブタイプの番号及びスプライズバリエントを示すアルファベットが入る)
FP 受容体	PGF _{2α} 受容体
feFP 受容体	遺伝子組換えネコ FP 受容体
huFP 受容体	遺伝子組換えヒト FP 受容体
Alt-FP	FP 受容体スプライズバリエント
IP 受容体	プロスタサイクリン受容体
TP 受容体	トロンボキサン A ₂ 受容体
その他	
³ H	トリチウム標識
■ A*体	■ A*-AGN 192024、ビマトプロストの不純物
■ 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
ADP	アデノシン 2 リン酸
AGN 204396	プロスタマイド拮抗薬
AGN 211335	プロスタマイド拮抗薬
AGN 211336	プロスタマイド拮抗薬
cAMP	環状アデノシン 1 リン酸
COS-7 細胞	アフリカミドリザル腎臓細胞株
cPGI	Carbaprostacyclin (IP 受容体作動薬)
CTGF	Connective tissue growth factor
Cyr61	Cysteine-rich protein 61
EC ₅₀	50%有効濃度
ED ₁	T/B ratio が 1 になる薬物量(mol) (薬物による作用がない場合、T/B ratio=0 となる)
Fluo-4AM	Fluo-4 アセトキシメチルエステル
Fura 2AM	Fura 2 アセトキシメチルエステル
HEK-293 細胞	ヒト胎児腎細胞株 293
IC ₅₀	50%阻害濃度
MMP	Matrix metalloproteinase, 細胞外マトリクス分解酵素
SQ 29548	TP 受容体拮抗薬
T/B ratio	自発性収縮により得られるチャートの曲線下面積(B)と薬物に誘導された収縮の曲線下面積(T)の比
TGF-β	Transforming growth factor-β
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, MMP 阻害酵素
U-46619	TP 受容体作動薬

* : 新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.2.1 まとめ

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。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ことが知られている^{1),2),3)}(表 2.6.2-2)。プロスタマイド F_{2α}はFP受容体とそのスプライスバリエーションとの複合体を受容体とすると近年明らかにされたが⁴⁾、その生理的役割はいまだ解明されていない。プロスタマイド F_{2α}アナログであるビマトプロストは、主としてぶどう膜強膜流出路を介した房水排出を促進して眼圧を下降させると考えられている。その作用は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だが、リモデリングに至る経路に違いがあると示唆されている(図 2.6.2-1)。

表 2.6.2-2 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

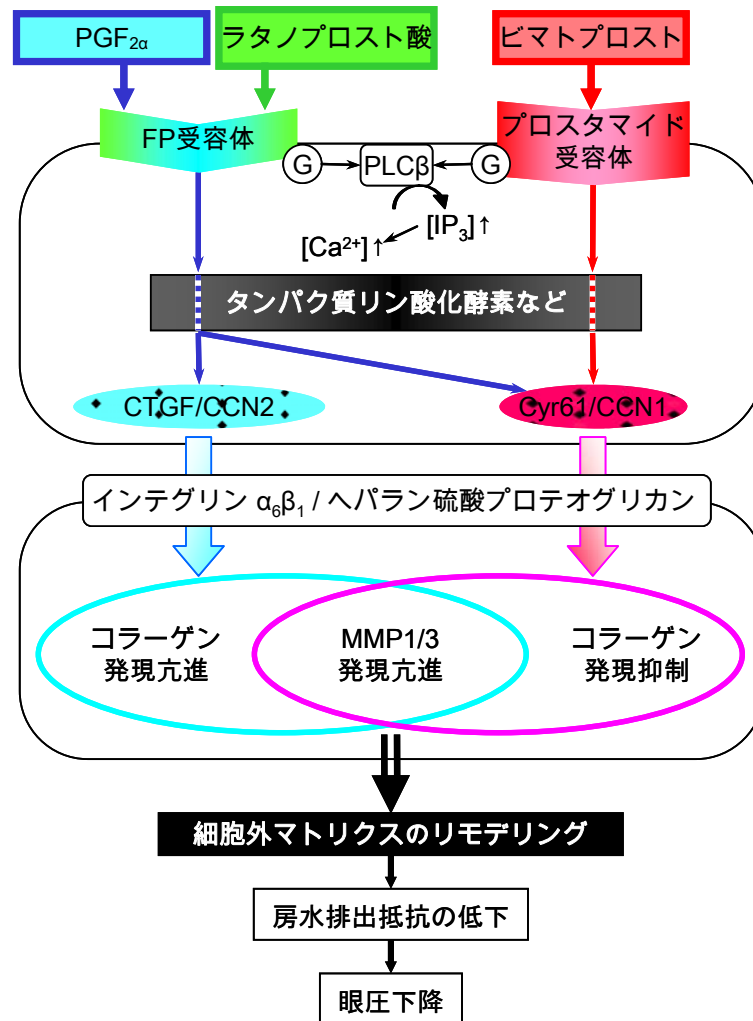


図 2.6.2-1 ビマトプロスト及びFP 受容体作動薬による細胞外マトリクスのリモデリングに至る機序の対比

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)~12)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。

作用機序

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、ビマトプロストと AGN 191522 のネコ及びヒト組換え FP 受容体 (HEK-293 細胞) に対する親和性 (IC_{50}) はそれぞれ 1480 及び 21.9 nM (ネコ)、5010 及び 2.29 nM (ヒト) であり、ビマトプロストの FP 受容体への親和性の低さが示された。ネコ肺実質画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。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 $PGF_{2\alpha}$ 感受性標本のうちネコ虹彩括約筋、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。これらの結果からビマトプロストの作用は 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と示唆された。

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 $PGF_{2\alpha}$ 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。

ネコ虹彩括約筋収縮を指標とした薬理的検討において、ビマトプロストやプロスタマイド $F_{2\alpha}$ による収縮を阻害し、 $PGF_{2\alpha}$ 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) が見出され、ビマトプロストの受容体は $PGF_{2\alpha}$ の受容体とは異なることが証明された⁵⁾。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も示され、プロスタマイド $F_{2\alpha}$ の眼圧調節への関与が示された。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。

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、ヒト FP 受容体のスプライズバリエーション (Alt-FP) を同定し、Alt-FP と huFP 受容体との共発現細胞においてビマトプロストが $PGF_{2\alpha}$ 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と矛盾しない。huFP 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⁾。

房水動態に及ぼす影響

サルにおいてビマトプロスト (0.1%) は房水産生を 10.2% 促進する傾向を示した (フルオロフォトメトリー法)。房水排出に関して、ビマトプロスト (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 (12.1% 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と同程度であった。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に出るぶどう膜強膜流出路の房水排出抵抗の低下に基づくと示された。なお、FP 受容体作動薬による眼圧下降も同様の機序に基づくことが知られている。

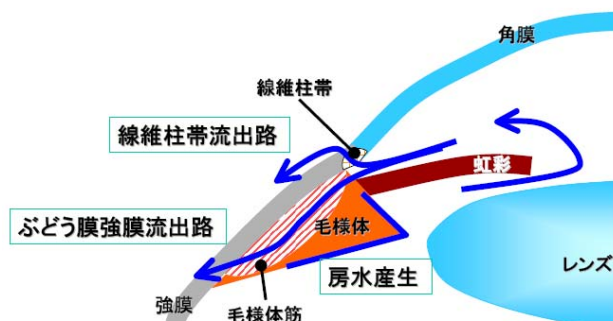


図 2.6.2-2 房水動態の模式図
青色の矢印は房水の流れを示す。

眼圧下降作用

正常眼圧イヌに 0.001%、0.01%及び 0.1%ビマトプロスト溶液を 1 日 2 回 5 日間点眼した試験では、順に最大 3.9、8.1 及び 5.2 mmHg の眼圧下降が認められた。その作用は比較対照とした同濃度のラタノプロスト溶液と同程度であった。正常眼圧イヌに 0.001%、0.01%及び 0.1%ビマトプロスト溶液を 1 日 1 回 5 日間点眼した試験では、順に最大 4.5、6.9 及び 5.9 mmHg の眼圧下降が認められた。その作用は 1 日 2 回投与と同程度であった。正常眼圧イヌに 0.003%、0.006%及び 0.03%ビマトプロスト溶液を 1 日 1 回 5 日間点眼した試験では、順に最大 3.2、4.3 及び 6.2 mmHg の眼圧下降が認められた。以上の 3 試験においてビマトプロストの作用は用量依存的で、0.003%以上では試験期間を通して眼圧下降作用が維持された。また、正常眼圧イヌの片眼に 0.03%ビマトプロスト溶液、反対眼に 0.005%ラタノプロスト溶液を 1 日 1 回 5 日間点眼して眼圧下降作用を比較した試験では、投与 2 日目以降、ほぼ試験期間を通してビマトプロスト投与眼の眼圧はラタノプロスト投与眼の眼圧より低い傾向にあり、4 日目以降その差は 0.4~1.1 mmHg あった。

正常眼圧のサルに 0.001%、0.01%及び 0.1%ビマトプロスト溶液を 1 日 2 回 5 日間点眼した試験では、順に最大 3.7、2.8 及び 2.8 mmHg の眼圧下降が認められた。また、用量に依存して速やかな眼圧下降作用の発現がみられた。レーザー隅角照射により高眼圧を誘発したサルに 0.001%、0.01%、0.03%及び 0.1%ビマトプロスト溶液を単回点眼した試験では、投与前値に対してそれぞれ 26.3、31.7、34.9 及び 40.1%の用量に依存した眼圧下降が認められた。

内因性類縁物質の薬理作用

ビマトプロストは内因性の生理活性物質であるプロスタマイド $F_{2\alpha}$ に類似の構造を有する。プロスタマイド $F_{2\alpha}$ はネコ虹彩括約筋に対して強い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。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 F_{2α} に類似していることが示された。

不純物の薬理活性

ビマトプロスト点眼剤に含まれる不純物の薬理作用を検討した。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、それぞれビマトプロストの 1/41、1/51 及び 1/12 であった。その他のプロスタノイド受容体関連標本に対しては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、活性もビマトプロストに比べて低いことから、これら不純物の本剤の薬理作用への関与はほとんどないと考えられた。

副次的薬理試験

放射標識リガンドを用いた競合阻害実験の結果、ビマトプロストは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のいずれに対しても高い結合親和性を示さなかった。

安全性薬理試験

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。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 作用機序

2.6.2.2.1.1 各種プロスタノイド受容体に対する作用

2.6.2.2.1.1.1 プロスタノイド受容体結合実験.....4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2, 4.2.1.1-20

方法

ビマトプロストの組換えヒト EP₂、EP_{3D}、EP₄、FP、TP 及びネコ FP 受容体に対する親和性を検討した。COS-7 細胞に上記の各ヒトプロスタノイド受容体を一過性発現、HEK-293 細胞にはヒト及びネコの FP 受容体を安定且つ過剰に発現させ、そのホモジネートから受容体画分を分画して使用した。EP₂、EP_{3D}及びEP₄受容体に対しては³H-PGE₂(比放射能:180 Ci/mmol)、FP 受容体に対しては³H-AGN 191522 (比放射能:85 Ci/mmol)、TP 受容体に対しては³H-SQ 29548 (比放射能:41.5 Ci/mmol) (各 5 nM) をリガンドとして用いた。反応は 25°C で 60 分間行い、非特異結合は 10 μM の各非標識体を加えることにより測定した。更に FP 受容体を発現しているマウス Swiss 3T3 細胞及びネコ肺実質の膜画分に対する親和性も同様に検討した。ただし、反応時間は 30 分とした。

結果

各 FP 受容体に対するビマトプロストの親和性 (IC₅₀) を表 2.6.2-3 に示した。COS-7 細胞に発現させたヒト FP 受容体に対するビマトプロスト、PGF_{2α} 及び AGN 191522 の IC₅₀ は 1740 ~ >10000、42.7、及び 9.77~19.5 nM であった。HEK-293 細胞に発現させたヒト FP 受容体に対するビマトプロスト及び AGN 191522 の IC₅₀ は 5010 及び 2.29 nM、ネコ FP 受容体に対しては 1480 及び 21.9 nM であり、ビマトプロストは FP 受容体に対して高い親和性を示さなかった。一方、ネコ肺実質に対してビマトプロストは弱いながら親和性を示した。その他の受容体及びマウス Swiss 3T3 細胞に対するビマトプロストの IC₅₀ は 10000 nM 以上であった。

表 2.6.2-3 各種プロスタノイド受容体画分に対する結合親和性

細胞/組織	組換え受容体	IC ₅₀ (95%信頼区間) [nM]	
		ビマトプロスト	対照物質
COS-7	huEP ₂	>10000	23.4 (10.5 – 52.5), PGE ₂
	huEP _{3D}	>10000	29.5 (16.6 – 51.3), PGE ₂
	huEP ₄	>10000	6.92 (0.123 – 60.3), PGE ₂
	huFP	>10000	42.7 (24.5 – 72.4), PGF _{2α}
			19.5 (11.0 – 34.7), AGN 191522
	huTP	作用なし	1740 (1070 – 2880)
9.77 (8.13 – 11.7), AGN 191522			
HEK-293	huFP	5010 (3240 – 8130)	2.29 (1.66 – 3.24), AGN 191522
	feFP	1480 (1260 – 1700)	21.9 (15.1 – 63.1), AGN 191522
マウス Swiss 3T3	-	>10000	7.41 (5.37 – 10.2), AGN 191522
ネコ肺実質	-	182 (19.1 – 324)	25.1 (15.5 – 41.7), PGF _{2α}
			2.51 (1.58 – 12.0), AGN 191522

hu: ヒト組換え受容体、fe: ネコ組換え受容体、-: 該当しない

IC₅₀ 値及び 95%信頼区間は非線形回帰 (E_{max} model) により再計算した^{4.2.1.1-20}。

2.6.2.2.1.1.2 プロスタノイド受容体関連標本に対する作用.....

.....4.2.1.1-1, 4.2.1.1-3, 4.2.1.1-20

方法

表 2.6.2-4 及び表 2.6.2-5 に示した各種プロスタノイド受容体関連標本に対するビマトプロストの作用を検討した。37°Cのクレブス緩衝液 (1 μ M インドメタシン含有 (ただし、マウス及び発情誘導していないラットの子宮を用いた実験では 2.79 μ M)、95% O₂/ 5% CO₂、pH 7.4) の入ったマグヌス管に各標本を懸垂して 30 分~1 時間平衡化した後、被験物質を加え、等尺性収縮を張力トランスデューサで記録した。ただし、モルモット精管は平衡化の後、20 V の電気パルスを 30 秒間隔で与えて刺激し、刺激に対する応答が安定したところで被験物質を添加した。ウサギ頸静脈は 1000 U のヘパリンを投与した後に安楽死させて摘出した。頸静脈は被験物質を投与する 30 分前にヒスタミンを添加し、前収縮させた。ネコ肺実質は被験物質を添加する前に SQ 29548 (TP 受容体拮抗薬) により前処理した。一部のラット子宮を用いた実験では子宮を摘出する 18~20 時間前に 1 mg/kg の diethylstilbestrol を皮下投与し、発情期と同じ状態にした。ヒト血小板は健康人より採血した新鮮な血液にクエン酸とデキストロースを添加して遠心分離することにより得た。被験物質を加えて 2 分後の血小板凝集を血小板凝集計で観察した後、ADP を加えて最大限凝集させた。被験物質の凝集作用は ADP を加えたときの凝集を 100% として算出した。マウス Swiss 3T3 細胞はトリプシン処理した後、メディウムに懸濁し、Ca²⁺ 蛍光指示薬 (Fura 2AM) を取り込ませた。Fura 2 の蛍光強度は励起波長 340 nm、蛍光波長 492 nm で測定した。

結果

ビマトプロストは FP 受容体に関連した標本のうちネコ虹彩括約筋を収縮させたが、Swiss 3T3 細胞の細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させなかった。ウサギ頸静脈標本に対しては弱い弛緩作用を示した。その他の EP₁、EP₃、DP、IP 及び TP 受容体に対する作用は認められなかった (表 2.6.2-4)。

各種 PGF_{2 α} 感受性平滑筋標本に対するビマトプロストの作用を AGN 191522 及び PGF_{2 α} と比較した結果、ビマトプロストはネコ肺実質及びウサギ子宮を他の 2 つの化合物と同様に収縮させたが、その他の標本に対しては弱い活性 (EC₅₀ \geq 1050 nM) しか示さなかった (表 2.6.2-5)。なお、ウサギに関してはビマトプロストの代謝活性が高いことが知られているため (2.6.4.5 代謝)、マウス子宮の PGF_{2 α} 感受性を利用して、ウサギ子宮収縮における主代謝物 (AGN 191522) の関与についても検討した。ビマトプロストによるウサギ子宮の収縮を測定した後、そのメディウムを回収し、10 分の 1 に希釈してマウス子宮に添加した。その結果、マウス子宮の収縮はみられず、ビマトプロストの添加によるウサギ子宮の収縮は代謝物によるものではなく、ビマトプロストの直接作用であると示唆された。

表 2.6.2-4 ビマトプロストの各種プロスタノイド受容体標本に対する作用

受容体サブタイプ	標本	EC ₅₀ (95%信頼区間) [nM]
DP/IP	ヒト血小板 (ADP 誘導性凝集の阻害)	作用なし
EP ₁	モルモット回腸 (収縮)	作用なし
EP ₃	ニワトリ回腸 (収縮)	作用なし
	モルモット精管 (電気刺激収縮の阻害)	作用なし
EP _{4/2}	ウサギ頸静脈 (ヒスタミン前収縮に対する弛緩)	1860 (759 – 5750)
FP	ネコ虹彩括約筋 (収縮)	22.4 (9.55 – 29.5)
	Swiss 3T3 細胞 (細胞内 Ca ²⁺ 濃度の上昇)	>10000
TP	ラット大動脈 (収縮)	作用なし
	ヒト血小板 (凝集)	作用なし

EC₅₀ 値及び 95%信頼区間は非線形回帰 (E_{max} model) により再計算した^{4.2.1.1-20}。

表 2.6.2-5 PGF_{2α} 感受性平滑筋標本に対するビマトプロスト、
AGN 191522 及び PGF_{2α} の収縮作用

PGF _{2α} 感受性平滑筋	EC ₅₀ (95%信頼区間) [nM]		
	ビマトプロスト	AGN 191522	PGF _{2α}
ウサギ子宮	10.5 (4.90 – 26.3)	0.708 (0.372 – 0.891)	5.01 (1.86 – 7.08)
ラット子宮 (発情誘導)	1050 (182 – 21400)	1.48 (0.603 – 3.63)	26.9 (8.13 – 85.1)
ラット胃底	6920 (6030 – 8130)	4.27 (3.02 – 6.03)	22.9 (13.5 – 38.9)
ラット子宮	>10000	6.61 (5.01 – 14.5)	-
マウス子宮	>10000	7.41 (3.02 – 17.0)	12.3 (2.45 – 49.0)
ラット結腸	>10000	15.5 (9.12 – 537)	12.0 (8.51 – 17.0)
スナネズミ結腸	>10000	70.8 (11.0 – 1480)	95.5 (77.6 – 117)
ネコ肺実質	38.0 (21.4 – 209)	75.9 (38.0 – 151)	170 (110 – 263)

EC₅₀ 値及び 95%信頼区間は非線形回帰 (E_{max} model) により再計算した^{4.2.1.1-20}。

2.6.2.2.1.2 ビマトプロストの受容体の探索

2.6.2.2.1.2.1 ネコ虹彩括約筋組織細胞の細胞内 Ca²⁺応答 4.2.1.1-4

方法

摘出したネコ虹彩括約筋組織を細切し、更に collagenase B 及び pronase により細胞外マトリクスを消化して、細胞内に Ca²⁺蛍光指示薬 (Fluo-4AM) を取り込ませた。組織断片をカバーグラスに吸着させ、共焦点レーザー顕微鏡 (アルゴンレーザー (488 nm) 励起、510-570 nm フィルタで観察) による観察下でメディウムのみ、100 nM 又は 1 μM ビマトプロスト、100 nM 又は 1 μM PGF_{2α} あるいは 1 μM カルバコールを定流速 (0.6 mL/min) で灌流した (37°C)。

結果

ビマトプロスト及び PGF_{2α} は、それぞれ異なる細胞の細胞内 Ca²⁺濃度を選択的に上昇させた (図 2.6.2-3) 観察した細胞のうち約 25~40%の細胞がカルバコールに反応し、約 10~15%の細胞が PGF_{2α} に反応した。ビマトプロストに反応する細胞は 10%未満であった。カルバコールに応答する細胞がビマトプロストや PGF_{2α} にも応答することはあったが、ビマトプロストと PGF_{2α} に反応する細胞は独立しており、両方に反応する細胞はみられなかった (図 2.6.2-4)。

2.6
非臨床試験の概要文及び概要表

また、ビマトプロスト及びPGF_{2α}の添加順序は細胞の応答には影響せず、各細胞は特定の薬物にのみ応答した。繰り返し暴露されることによる応答の強度は一定ではなかったが、脱感作やプライミング効果は示唆されなかった。

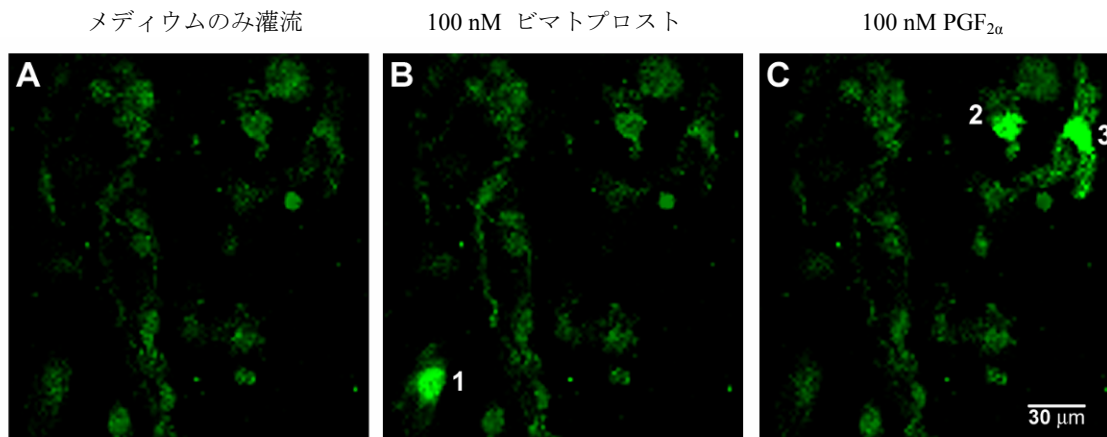


図 2.6.2-3 ネコ虹彩括約筋組織断片の共焦点蛍光画像

A、B及びCは同一視野：(1) ビマトプロスト感受性細胞、(2、3) PGF_{2α}感受性細胞

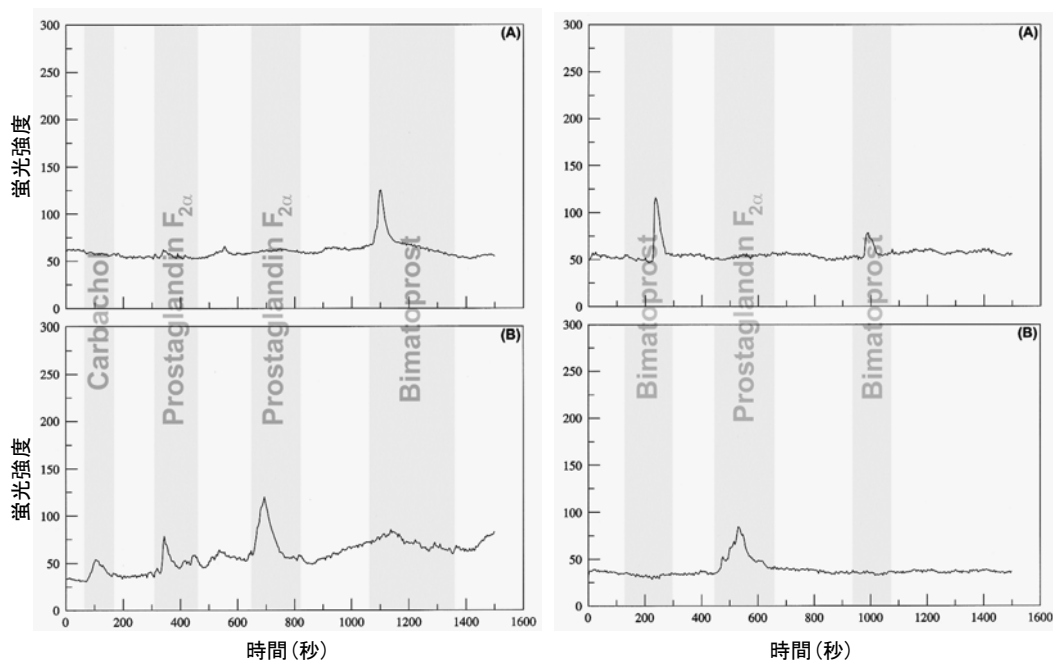


図 2.6.2-4 ネコ虹彩括約筋組織断片における細胞内 Ca²⁺濃度の経時変化

2つの代表例を左右に示した。(A) ビマトプロスト感受性細胞、(B) PGF_{2α}感受性細胞。

図中の網掛け部分はそれぞれに表記された薬物が灌流されていた期間を表す。

2.6.2.2.1.2.2 プロスタマイド拮抗薬の作用..... 4.2.1.1-5

2.6.2.2.1.2.2.1 ネコ虹彩括約筋収縮に対する作用

方法

プロスタマイド $F_{2\alpha}$ と $PGF_{2\alpha}$ の受容体を薬理的に区別するため、プロスタマイド $F_{2\alpha}$ の作用に拮抗し、 $PGF_{2\alpha}$ には拮抗しない化合物（プロスタマイド拮抗薬：AGN 204396）を創出した。ネコ虹彩括約筋収縮を指標として、各種作動薬に対する拮抗作用を定法に従って評価した。なお、作動薬は AGN 204396、又はその基剤（エタノール）を添加した 30 分後より累積投与した。

結果

AGN 204396 はネコ虹彩括約筋収縮におけるプロスタマイド $F_{2\alpha}$ 及びビマトプロストの用量反応曲線を右にシフトさせた。一方、 $PGF_{2\alpha}$ やそのアナログである AGN 191522 による収縮に対しては阻害作用を示さなかった（図 2.6.2-5）。

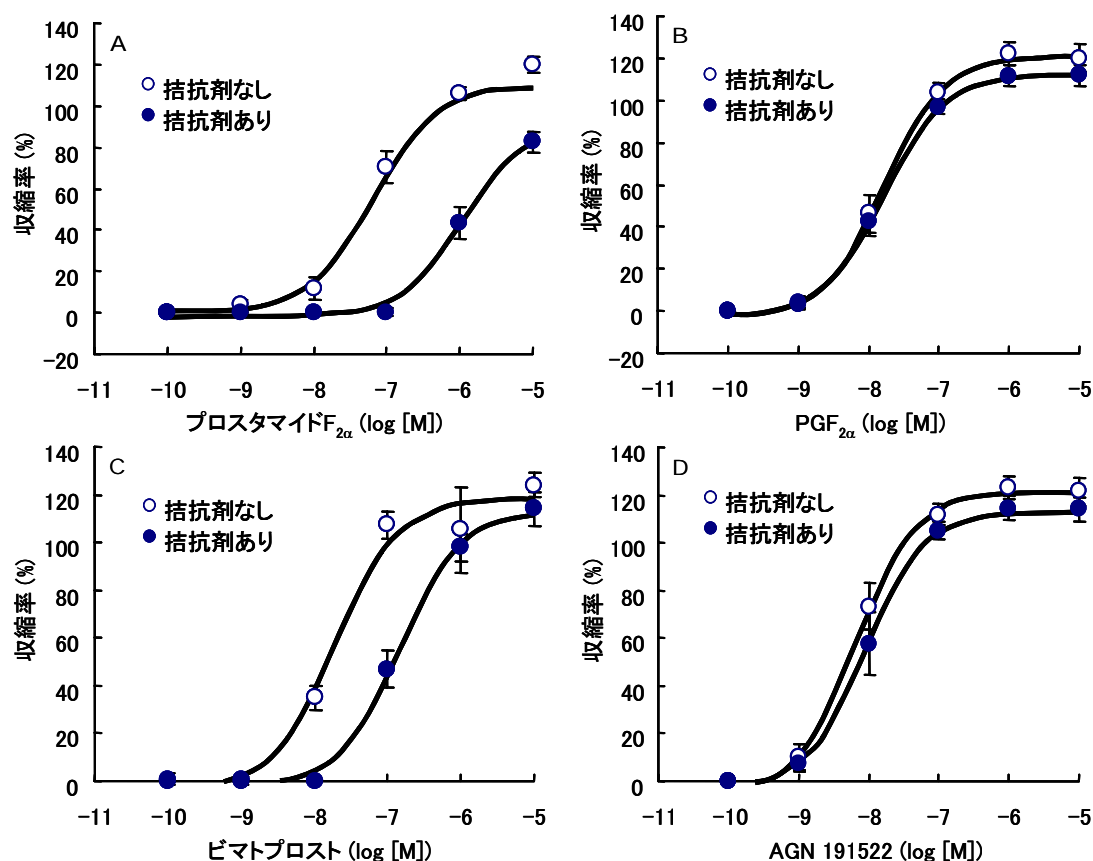


図 2.6.2-5 ネコ虹彩括約筋収縮に対するプロスタマイド拮抗薬（AGN 204396）の阻害作用
AGN 204396 (3×10^{-5} M) 存在下及び非存在下における (A) プロスタマイド $F_{2\alpha}$ 、(B) $PGF_{2\alpha}$ 、(C) ビマトプロスト及び (D) AGN 191522 による収縮率を示した。平均値 ± 標準誤差 (n = 6)

2.6.2.2.1.2.2.2 ヒト組換えプロスタノイド受容体に対する作用

方法

AGN 204396 の既知の各種プロスタノイド受容体に対する作用を確認するため、ヒト組換え受容体を発現した HEK-293 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を指標として各受容体に対応したリガンドに対する拮抗作用を評価した。本来、細胞内 cAMP 濃度の変化を引き起こす DP 及び EP₂₋₄ 受容体にはキメラ G タンパク質を共発現させて細胞内 Ca^{2+} 濃度が変化するようにした^{13),14)}。

結果

AGN 204396 (3×10^{-5} M) はヒト TP 受容体を発現した HEK-293 細胞において、選択的作動薬である U-46619 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を強く阻害し、U-46619 の EC₅₀ は 2000 倍以上増加した。その他の受容体を発現した細胞に対する阻害活性はわずかであった (EC₅₀ の変化率 : 0.3 ~ 1.8 倍) (表 2.6.2-6)。

表 2.6.2-6 各種ヒト組換えプロスタノイド受容体に対する阻害活性

受容体	作動薬	作動薬の EC ₅₀ (log M)		P 値	変化率(倍)
		拮抗薬なし	拮抗薬あり		
DP	PGD ₂	-8.676 ± 0.097	-8.706 ± 0.091	0.8274	0.9
EP ₁	PGE ₂	-9.074 ± 0.094	-9.630 ± 0.093	0.0002	0.3
EP ₂	PGE ₂	-8.300 ± 0.111	-8.493 ± 0.110	0.2280	0.6
EP ₃	PGE ₂	-9.403 ± 0.078	-9.580 ± 0.116	0.2082	0.7
EP ₄	PGE ₂	-9.903 ± 0.065	-9.979 ± 0.061	0.4015	0.8
FP	PGF _{2α}	-8.442 ± 0.055	-8.409 ± 0.062	0.6931	1.1
IP	cPGI	-7.347 ± 0.077	-7.094 ± 0.078	0.0273	1.8
TP	U-46619	-9.494 ± 0.101	-6.175 ± 0.057	<0.0001	2084.5

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

2.6.2.2.1.2.3 FP 受容体スプライスバリエーションに対するビマトプロストの作用

4.2.1.1-6【参考資料】

2.6.2.2.1.2.3.1 FP 受容体スプライスバリエーション (Alt-FP) の同定

方法

ヒト及びカニクイザルの毛様体より Total RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を合成した。FP 受容体の全長をコードするエクソン 2 及びエクソン 3 に相補的なプライマを用いた PCR により得られた cDNA を増幅し、アガロースゲル電気泳動及び塩基配列の分析を行った。

結果

電気泳動の結果、FP 受容体のバンドに加えて塩基数のより大きいバンドが検出された (図 2.6.2-6)。塩基配列の解析の結果、ヒト FP 受容体のエクソン 2 と 3 の間に 5 つのエクソンが単独あるいは複数組み合わせられて挿入されることにより生じる 6 つの Alt-FP が確認された。塩基配列から推定したアミノ酸配列によると、Alt-FP はいずれもエクソン 2 にコードされている N 末端から 266 番目のロイシンまでは FP 受容体と共通の配列を持つが、それ以降はそれぞれ固有の配列を持ち、いずれも 7 番目の膜貫通領域以降を欠いていた。

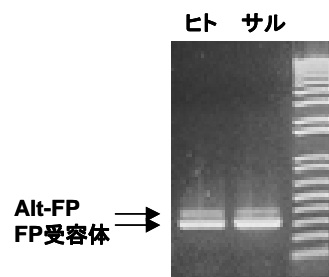


図 2.6.2-6 ヒト及びサルの毛様体における FP 受容体及び Alt-FP の発現

2.6.2.2.1.2.3.2 FP 受容体と Alt-FP の複合体形成

方法

FP 受容体及び Alt-FP の N 末端にそれぞれ FLAG 及びヘマグルチニン (HA) 標識ペプチドを結合させた融合タンパク質をレンチウイルス発現ベクターを用いて HEK-293 細胞に共発現又はそれぞれ単独で発現させた。形質転換された細胞はブラスチジシン耐性を指標に選別した。各細胞溶解液を調製し、抗 HA 抗体による免疫沈降及び抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロットにより両受容体の複合体形成を調べた。

結果

抗 HA 抗体による免疫沈降物を抗 FLAG 抗体のウェスタンブロットにより分析した結果、FLAG 標識 FP 受容体及び HA 標識 Alt-FP を共発現させた細胞由来の免疫沈降物にのみ抗 FLAG 抗体に反応するバンドが検出された (図 2.6.2-7、レーン 3)。すなわち、FLAG 標識 FP 受容体が HA 標識 Alt-FP と複合体を形成することにより、ともに沈殿したものと考えられる。

一方、それぞれ単独で発現させた場合、抗FLAG抗体に反応するバンドは検出されなかった。FLAG 標識 FP は抗 HA 抗体では免疫沈降せず（レーン 1）、他方 HA 標識 Alt-FP は免疫沈降するものの抗FLAG抗体によるウェスタンブロットでは検出されなかったためと考えられる（レーン 2）。

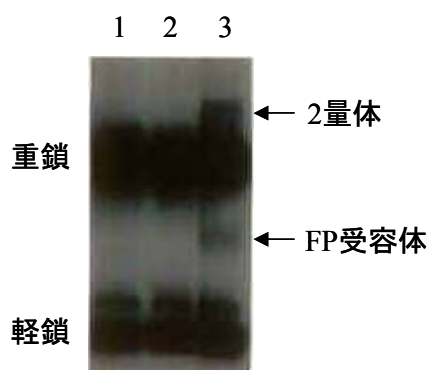


図 2.6.2-7 FLAG 標識 FP 受容体と HA 標識 Alt-FP の複合体形成

抗 HA 抗体による免疫沈降物の抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロット。

レーン 1) FLAG 標識 FP 受容体単発現細胞

レーン 2) HA 標識 Alt-FP 単発現細胞

レーン 3) 両標識タンパク質を共発現させた細胞

2.6.2.2.1.2.3.3 FP 受容体及び Alt-FP 共発現細胞におけるビマトプロストの機能解析

方法

FP 受容体及び Alt-FP 全長の cDNA をレトロウィルスベクタにサブクローンし、それぞれ単独あるいは等量混合して HEK-293 細胞に添加した。形質転換された細胞はヒグロマイシン耐性を指標に選別した。樹立できた細胞株を 96 穴プレートに播種し、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 (Fluo-4 AM) を細胞内に取り込ませた。ビマトプロスト、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 及びプロスタマイド拮抗薬 (AGN 211335^{4.2.1.1-7}【参考資料】(概要表 2.6.3.2)) の添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を蛍光マイクロプレートリーダー FLIPR TETRATM を用いて測定した。

結果

$\text{PGF}_{2\alpha}$ 及びビマトプロスト (10^{-7} M) はともに FP 受容体及び Alt-FP を共発現させた HEK-293 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた (図 2.6.2-8)。しかし、その様式は薬物間で異なり、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与時には一過性の上昇(第 1 相)に続く定常状態(第 2 相)がみられたのに対して(図 2.6.2-8a)、ビマトプロスト投与時には $\text{PGF}_{2\alpha}$ と同様の一過性の上昇ののち、定常状態になることなく Ca^{2+} 濃度は増減を繰り返した (図 2.6.2-8b)。このビマトプロストの第 2 相の変化は AGN 211335 により用量依存的に阻害されたが (図 2.6.2-8d,f,h)、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ による第 2 相の定常状態は影響を受けなかった (図 2.6.2-8c,e,g)。更に、これらの第 2 相の Ca^{2+} 濃度変化は細胞外の Ca^{2+} を除くことによって消失することから (図 2.6.2-8i, j)、第 1 相は細胞内 Ca^{2+} ストアからの放

出、第 2 相は細胞外 Ca^{2+} の流入と示された。なお、FP 受容体のみを発現させた細胞に対して $\text{PGF}_{2\alpha}$ は共発現細胞とほぼ同様の Ca^{2+} 濃度変化を引き起こすがビマトプロストの作用はごくわずかであった (図 2.6.2-8k, l)。

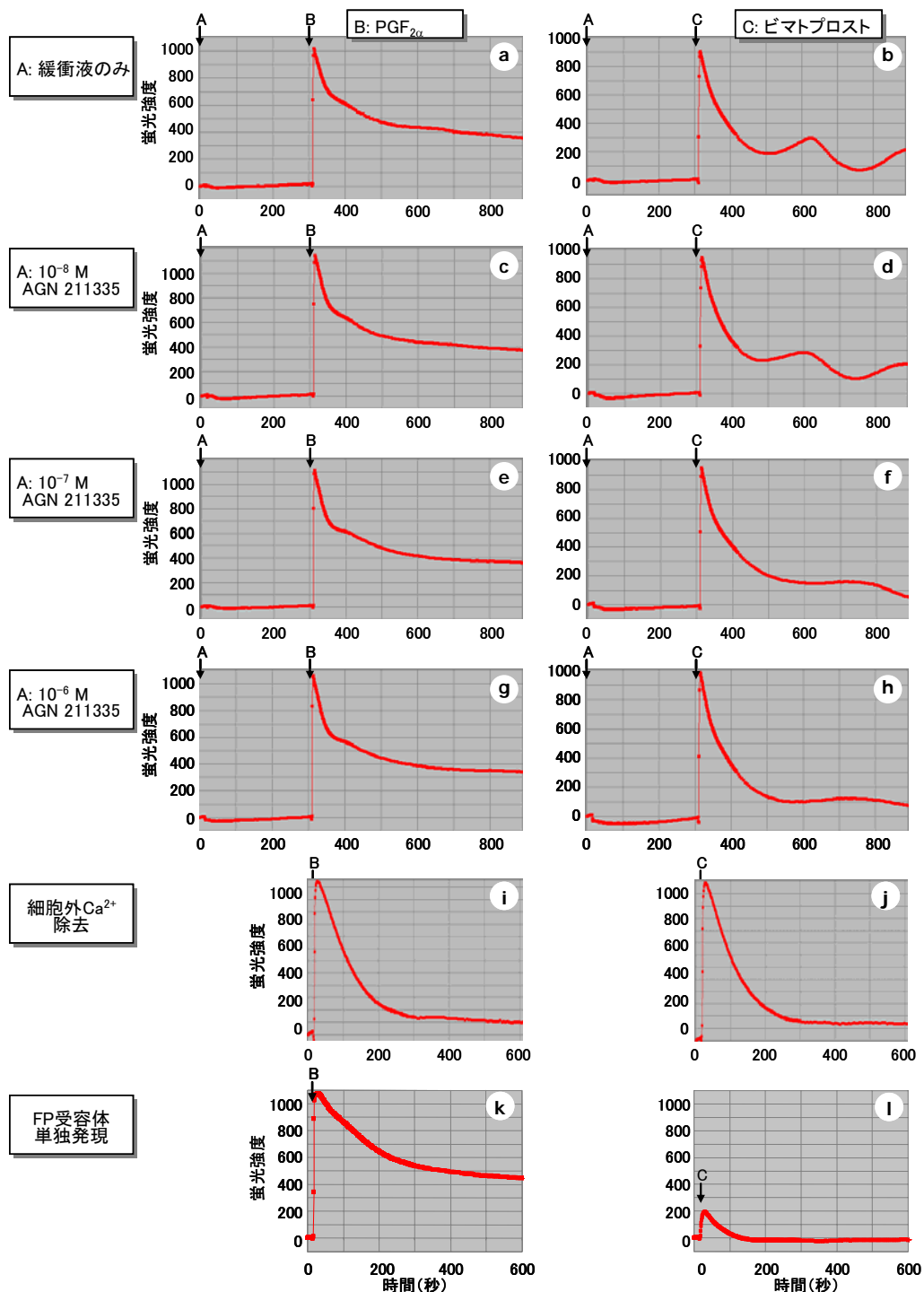


図 2.6.2-8 FP 受容体及び Alt-FP 共発現細胞、及び FP 受容体単独発現細胞におけるビマトプロストの Ca^{2+} 動員とプロスタマイド拮抗薬の阻害作用

矢印はそれぞれ A: AGN 211335 及び緩衝液、B: $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-7} M)及び C: ビマトプロスト (10^{-7} M) の添加時点を表す。

2.6.2.2.1.2.4 ビマトプロストの眼圧下降作用に対するプロスタマイド拮抗薬の作用

方法

実験は2期に分けて実施した。7ヶ月齢以上のビーグル犬を1群あたり雌雄各4例ずつ割り付けた。ただし、眼圧の初期値が13 mmHg未満の動物は解析の対象から除外した（第1期で2例、第2期で3例除外）。5日間の各実験日の0時点及びその2時間後に片眼にプロスタマイド拮抗薬（5% AGN 211336 懸濁液^{4.2.1.1-7【参考資料】}（概要表 2.6.3.2））、反対眼に基剤（ピーナツオイル）を1滴ずつ投与した。0.03%ビマトプロスト溶液（第1期）及び0.03% AGN 191522 溶液（第2期）は1日1回（2時間目の眼圧測定後）5日間反復点眼投与した。眼圧は0時点及び2、4、6時間後に測定した。眼圧下降作用は、ビマトプロスト溶液又はAGN 191522 溶液の初回投与前の眼圧（第1日目の2時間目の眼圧）と各測定時点の眼圧値の間で対応のあるt検定により検定し、危険率5%以下を有意差ありとした。また、各測定時点における左右眼圧の比較も対応のあるt検定により同様に行った。

結果

図 2.6.2-9 に第1日目の2時間目の眼圧を0とした眼圧変化量を経時的に示した。

ビマトプロスト溶液と AGN 211336 懸濁液の基剤を併用した群の眼圧は、初回投与前値（ 18.3 ± 0.9 mmHg：平均値 \pm 標準誤差、 $n=6$ ）に比べて $-0.9 \sim -6.8$ mmHg 変化した。一方、ビマトプロスト溶液と 5% AGN 211336 懸濁液を併用した反対眼の眼圧は、初回投与前値（ 17.0 ± 0.9 mmHg）に比べて $-0.6 \sim -3.4$ mmHg 変化した。

AGN 191522 溶液と AGN 211336 懸濁液の基剤を併用した群の眼圧は、初回投与前値（ 15.8 ± 0.9 mmHg： $n=5$ ）に比べて $0.6 \sim -3.5$ mmHg 変化した。一方、AGN 191522 溶液と 5% AGN 211336 懸濁液を併用した反対眼の眼圧は、初回投与前値（ 16.2 ± 0.9 mmHg）に比べて $-0.2 \sim -3.2$ mmHg 変化した。

AGN 211336 はプロスタマイド $F_{2\alpha}$ アナログであるビマトプロストによる眼圧下降を有意に抑制したが、 $PGF_{2\alpha}$ アナログである AGN 191522 の眼圧下降作用には影響しなかった。

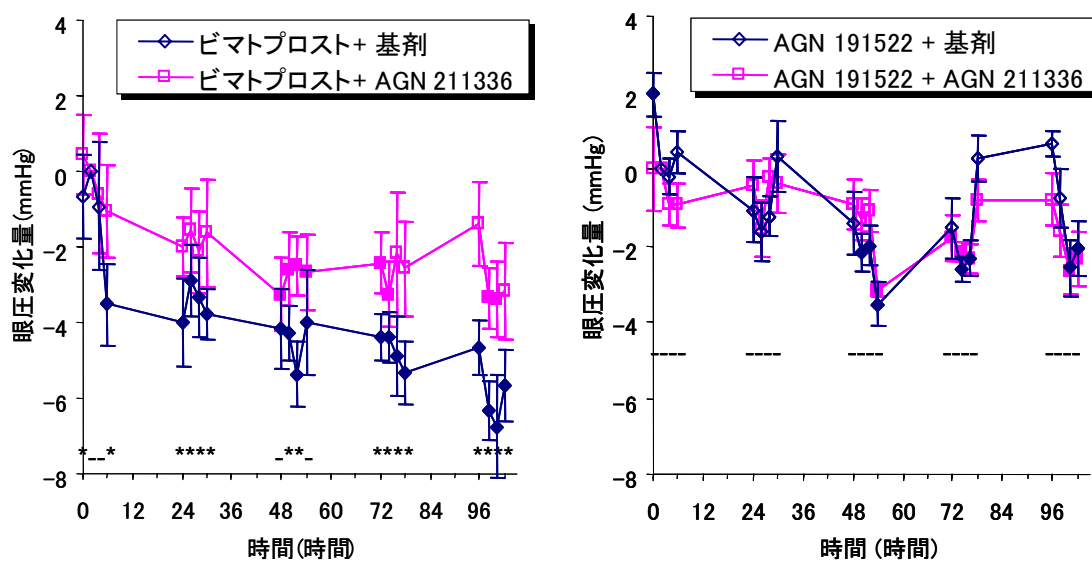


図 2.6.2-9 ビマトプロスト及び AGN 191522 溶液投与後の眼圧の経時変化
及びそれらに対する AGN 211336 の拮抗作用

平均値 ± 標準誤差、n=5~6 * : P<0.05、- : 有意差なし (左右眼比較、Paired t-test、片側)
塗りつぶし : P<0.05、白抜き : 有意差なし (初期値 (2 時間点) との比較、Paired t-test、両側)

2.6.2.2.1.3 房水動態に及ぼす影響

2.6.2.2.1.3.1 房水産生に及ぼす影響 4.2.1.1-9

方法

雌のカニクイザル（体重：2～4 kg）を使用し、フルオロトロン（Coherent）を用いた蛍光光度分析により房水流量を測定した（フルオロフォトメトリ法）。測定前日の午後に自己蛍光を測定し、0.5%プロパラカイン（Ophthetic, Allergan）1滴と2 μLの2%フルオレセインナトリウムを5分間隔にて交互に4回ずつ点眼投与してフルオレセインを眼内に導入した。蛍光測定は1時間間隔にて7時点、1時点あたり2回以上行った。なお、サルはモンキーチェアに保定し、各測定の5分前に1.4 mg/kgのケタミンを筋肉内投与して沈静させた。

房水流量の算出に必要な前房容積を求めるため、前房深度と角膜厚をHaag-Streitスリットランプを用いたパキメトリ、角膜の曲率をケラトメータで測定した。房水流量はYablonski¹⁵⁾が開発した公式に従って算出した。

蛍光測定の前日に6時間間隔にて2回、測定当日の朝に1回、片眼に0.1%ビマトプロスト溶液を25 μL点眼投与した。対照とした0.5%チモロール溶液は測定当日に1回点眼投与した。

房水産生に及ぼす影響は検体投与前の房水流量と検体投与後の房水流量の間で対応のあるt検定により検定し、危険率5%以下を有意差ありとした。

結果

0.1%ビマトプロスト溶液投与群の房水流量は増加する傾向にあったが有意な変化ではなかった。一方、比較対照とした0.5%チモロール溶液は房水流量を有意に減少させた（表2.6.2-7）。

表 2.6.2-7 サルの房水流量に及ぼす影響

	0.5%チモロール (n=4)	0.1%ビマトプロスト (n=5)
投与前 (μL/min)	1.9 ± 0.29	1.41 ± 0.19
投与後 (μL/min)	1.2 ± 0.22*	1.48 ± 0.17
変化率 (%)	-36.2 ± 5.7	10.2 ± 11.3

平均値 ± 標準誤差 *：P < 0.05 (投与前との比較, Paired t-test)

2.6.2.2.1.3.2 房水排出に及ぼす影響 4.2.1.1-10

2.6.2.2.1.3.2.1 Total outflow facility

方法

体重 2.2~4 kg の雌雄のカニクイザル（約 2~3 歳）を使用した。0.3 mL/kg 体重のケタミン（終濃度：25 mg/mL）及びキシラジン（終濃度：10 mg/mL）混合液を筋肉内投与して全身麻酔を施し、眼球運動を止めた。眼球運動と瞬目が回復してきた時点（初回投与の 45~60 分後）で 0.1 mL/kg 体重の同麻酔混合液を追加投与することにより測定期間中の麻酔を維持した。

片眼に 0.01%ビマトプロスト溶液、又は 0.01%ラタノプロスト溶液、反対眼にその基剤を 25 µL ずつ 1 日 2 回（6 時頃と 14 時頃）5 日間点眼投与した。点眼投与の際、サルはモンキーチェアに座らせた。9 回目の投与後 5~7 時間の間で麻酔を施し、以下に示す 2 段階定圧灌流法により Total outflow facility の測定を行った¹⁶⁾。

安定した深麻酔が得られた後、25G のステンレス製注射針を経角膜的に前房内に差し込み、圧力トランスデューサにより眼圧を測定した。前房に刺入した注射針に改変 Mock 人工房水¹⁷⁾を入れたリザーバを接続し、その静水圧により負荷眼圧を調節した。負荷眼圧はリザーバから確実に人工房水が流れるように、圧力を負荷していない真の眼圧から約 2.5 (p₁)及び 10 mmHg (p₂)高い値に設定した。それぞれの眼圧負荷 (p₁ 及び p₂) を 10 分間隔で交互に繰り返し、各負荷眼圧におけるリザーバからの流速 (F₁ 及び F₂) を式 2.6.2-1 を用いて計算した。続いて Total outflow facility (C) を式 2.6.2-2 を用いて算出した。

$$F = \Delta W/t \dots\dots\dots \text{式 2.6.2-1}$$

ただし、ΔW は測定時間中のリザーバ重量の変化、t は測定時間を示す。

$$C = (F_2 - F_1)/(p_2 - p_1) \dots\dots\dots \text{式 2.6.2-2}$$

結果

検体投与によりいずれの群でも対照とした反対眼に比べて Total outflow facility は約 10%高値を示したが、統計学的に有意な差ではなかった（表 2.6.2-8）。

表 2.6.2-8 サルの Total outflow facility に及ぼす影響

投与薬液	Total outflow facility (µL/min/mmHg)	
	検体投与眼	基剤投与眼
0.01%ビマトプロスト	0.418 ± 0.038	0.373 ± 0.015
0.01%ラタノプロスト	0.423 ± 0.068	0.383 ± 0.053

平均値 ± 標準誤差、n=6

2.6.2.2.1.3.2.2 ぶどう膜強膜流出路

方法

ぶどう膜強膜流出路に対する作用を調べるためにフルオレセイントレーサ法を用いた眼房内灌流実験を行った^{18),19)}。

体重 2.2~4 kg の雌雄のカニクイザル (約 2~3 歳) を使用した。0.3 mL/kg 体重のケタミン (終濃度 : 25 mg/mL) 及びキシラジン (終濃度 : 10 mg/mL) 混合液を筋肉内投与して全身麻酔を施し、眼球運動を止めた。眼球運動と瞬目が回復してきた時点 (初回投与の 45~60 分後) で 0.1 mL/kg 体重の同麻酔混合液を追加投与することにより試験期間中の麻酔を維持した。

片眼に 0.01%ビマトプロスト溶液、又は 0.01%ラタノプロスト溶液、反対眼にその基剤を 25 µL ずつ 1 日 2 回 (6 時頃と 14 時頃) 5 日間点眼投与した。点眼投与の際、サルはモンキーチェアに座らせた。9 回目の投与後 5~7 時間の間で麻酔を施し、以下に示すフルオレセイントレーサ法によりぶどう膜強膜流出路を介した房水流出量の測定を行った。

3 本の 25G の注射針を前房内に刺し込み、2 本は相反性のシリンジポンプに接続、残りの 1 本はリザーバと圧力トランスデューサに接続して眼圧を調節した。相反性シリンジポンプを用いて眼圧を一定 (約 12 mmHg) に維持したまま、トレーサ (0.7% (1 × 10⁻⁴ M) フルオレセインデキストラン 70000) を含む人工房水¹⁷⁾を 30 分間両眼に灌流した。前房内を速やかに置換するため、最初の 5 分は 0.2 mL/min、残りの 25 分は 0.05 mL/min で灌流した。これら 2 つの流速における灌流液は 1 次及び 2 次灌流液として別々に回収した。灌流終了時点で動物を安楽死させ、トレーサを含まない人工房水で約 10 分間灌流して前房を洗浄した。直ちに眼球を摘出し、前部強膜 (鋸状縁より前)、後部強膜 (鋸状縁より後)、外眼組織、毛様体、脈絡膜、網膜、硝子体、洗浄液を含む液性成分に分けた。角膜、虹彩及びレンズはぶどう膜強膜流に関係しないと考えられたので除外した。各組織ホモジネート中のトレーサ濃度を測定 (励起波長 493 nm、蛍光波長 515 nm) し、式 2.6.2-3 よりぶどう膜強膜流出路からの総排出量 (F_u) を算出した。

$$F_u = \Sigma(\text{tissue-F}) \times [\text{perfusate-F}]^{-1} \times \text{time}^{-1} \dots\dots\dots \text{式 2.6.2-3}$$

ただし、 $\Sigma(\text{tissue-F})$ はすべての組織に含まれたフルオレセインデキストランの総量、 $[\text{perfusate-F}]$ は 2 次灌流液として回収した前房内のフルオレセインデキストランの濃度、 time は灌流時間、すなわち 30 分を示す。

結果

両薬液はぶどう膜強膜流出路からの総排出量を同程度増加させた (表 2.6.2-9)。トレーサはぶどう膜強膜流出路を構成すると考えられる毛様体、前部強膜及び後部強膜に主に分布し、両群ともに基剤投与眼との差は後部強膜において最も顕著にみられた (図 2.6.2-10)。

表 2.6.2-9 サルのぶどう膜強膜流出路からの房水排出に及ぼす影響

投与薬液	房水流出量 (μL/min)		増加率(%)
	検体投与眼	基剤投与眼	
0.01%ピマトプロスト	1.372 ± 0.268*	0.964 ± 0.198	42
0.01%ラタノプロスト	1.212 ± 0.265*	0.839 ± 0.204	44

平均値 ± 標準誤差、n=6 *: P < 0.05 (基剤投与眼との比較, Paired t-test)

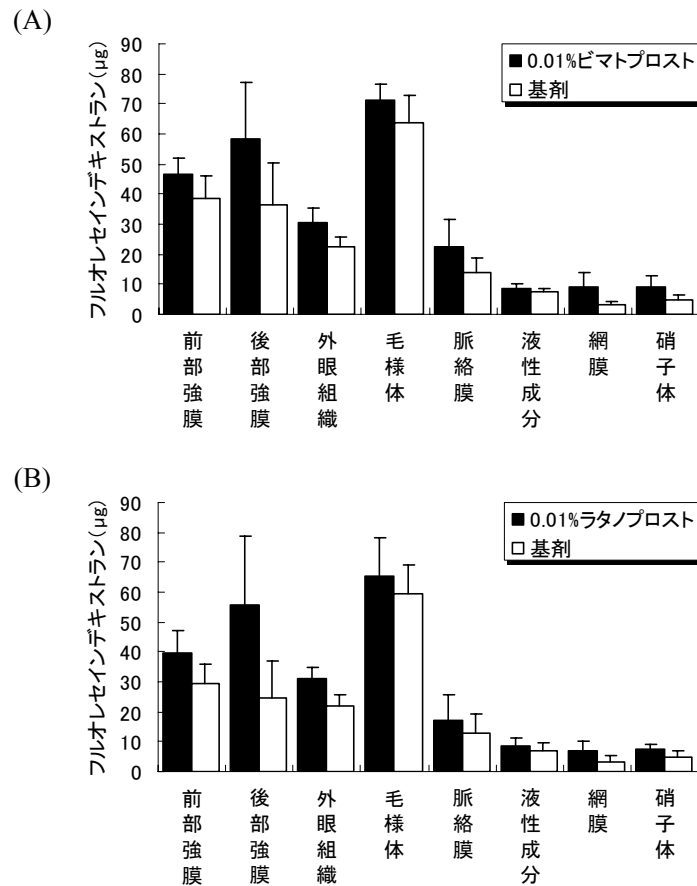


図 2.6.2-10 フルオレセインデキストランの眼内分布

(A) 0.01%ピマトプロスト溶液投与群、(B) 0.01%ラタノプロスト溶液投与群
平均値 + 標準誤差、n=6

2.6.2.2.2 眼圧下降作用

2.6.2.2.2.1 正常眼圧イヌにおけるビマトプロストの眼圧下降作用

2.6.2.2.2.1.1 1日2回投与..... 4.2.1.1-11, 4.2.1.1-21

方法

雌雄のビーグル犬（体重：10～15 kg）を使用した。実験には全身麻酔を使用せず、手で穏やかに保定した。0.001%、0.01%及び0.1%ビマトプロスト溶液、又は0.001%及び0.01%ラタノプロスト溶液を片眼に、反対眼には基剤（0.1%ポリソルベート 80 含有 10 mM トリス緩衝液）を 25 μ L ずつ 1 日 2 回 6 時間間隔にて 5 日間反復点眼投与した。眼圧は圧平式眼圧計を用いて各実験日の初回投与直前、投与 2、4 及び 6 時間後（ただし、0.001%ビマトプロスト溶液群の 4 日目は投与 2、4 及び 8 時間後）に測定した。眼圧測定に際しては 0.1%プロパラクイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のある t 検定により検定し、危険率 5%以下を有意差ありとした。また、各測定時点における左右眼圧の比較も対応のある t 検定により同様に行った。

結果

図 2.6.2-11 にビマトプロスト溶液及びラタノプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。ビマトプロスト 0.001%群の眼圧は、投与 2 時間後以降、初期値（ 17.7 ± 0.6 mmHg：平均値 \pm 標準誤差、n=8）に比べて-0.6～-3.9 mmHg の範囲で推移し、第 1 日目の投与 6 時間後以降、第 2 日目のトラフ時及び投与 6 時間後、及び 4 日目のトラフ時を除くすべての時点で統計学的に有意な眼圧下降がみられた。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。0.01%群では、すべての時点において初期値（ 19.3 ± 0.9 mmHg、n=7）に比べて-3.4～-8.1 mmHg の有意な眼圧下降がみられた。また、反対眼においても 2 日目以降に有意な眼圧下降がみられた。0.1%群の眼圧は投与 2 時間後以降、初期値（ 16.0 ± 0.5 mmHg、n=8）に比べて-0.6～-5.2 mmHg の範囲で推移し、第 1 日目の投与 6 時間後以降、第 5 日目のトラフ時を除くすべての時点で有意な眼圧下降がみられた。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。0.1%群の眼圧変化量は 0.01%群に比べて小さい傾向にあった。

ラタノプロスト 0.001%群の眼圧は投与 2 時間後以降、初期値（ 17.2 ± 0.9 mmHg、n=6）に比べて-0.4～-5.2 mmHg の範囲で推移し、第 1 日目の投与 6 時間後以降、第 3 日目のトラフ時を除くすべての時点で有意な眼圧下降がみられた。反対眼では第 1 日目の投与 6 時間後においてのみ有意な眼圧下降がみられた。0.01%群の眼圧は、投与 2 時間後以降、初期値（ 17.3 ± 0.4 mmHg、n=7）に比べて-1.4～-6.1 mmHg の範囲で推移し、第 1 日目の投与 4 時間後以降すべての時点において有意な眼圧下降がみられた。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。

ビマトプロスト及びラタノプロストは各濃度においてほぼ同程度の眼圧下降作用を示した。

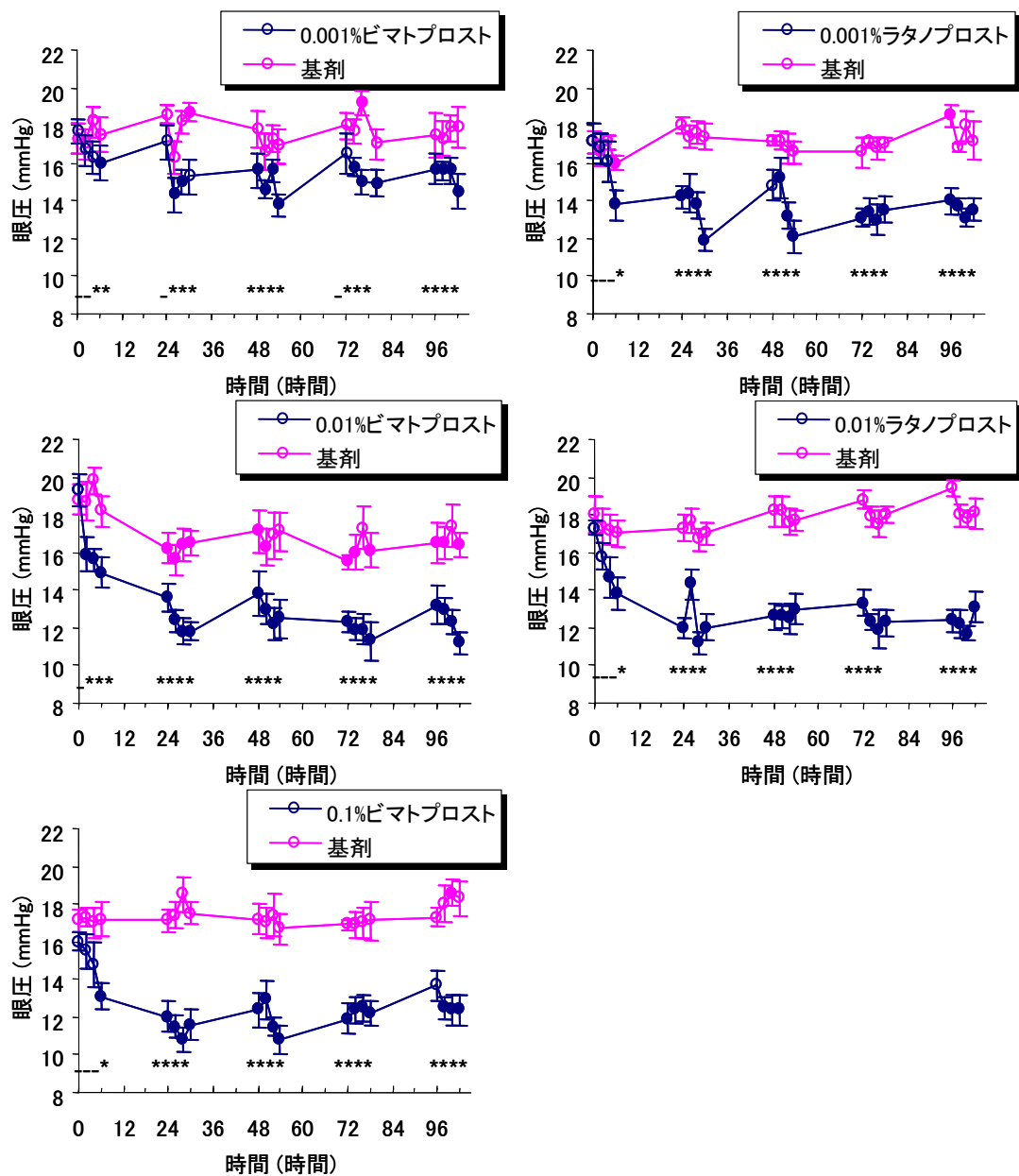


図 2.6.2-11 イヌにおける 1 日 2 回点眼による眼圧下降作用

平均値 ± 標準誤差、n=6~8 * : P<0.05、- : 有意差なし (左右眼比較、Paired t-test、片側)
塗りつぶし : P<0.05、白抜き : 有意差なし (初期値 (0 時間点) との比較、Paired t-test、両側)

2.6.2.2.2.1.2 1日1回投与.....4.2.1.1-12, 4.2.1.1-21

方法

雌雄のビーグル犬（体重：10～15 kg）を1群あたり8例割り付けた。実験には全身麻酔を使用せず、手で穏やかに保定した。0.001%、0.01%及び0.1%ビマトプロスト溶液を片眼に、反対眼には基剤（0.1%ポリソルベート80含有10 mM トリス緩衝液）を25 µLずつ1日1回5日間反復点眼投与した。眼圧は圧平式眼圧計を用いて各実験日の投与直前、投与2、4及び6時間後に測定した。眼圧測定に際しては0.1%プロパラカイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。

眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のあるt検定により検定し、危険率5%以下を有意差ありとした。また、各測定時点における左右眼圧の比較も対応のあるt検定により同様に行った。

結果

図 2.6.2-12 にビマトプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。0.001%群の眼圧は、投与2時間後以降、初期値（ 15.3 ± 0.4 mmHg：平均値±標準誤差）に比べて-1.6～-4.5 mmHgの範囲で推移し、第5日目のトラフ時を除くすべての時点で有意な眼圧下降がみられた。また、反対眼においても投与2時間後以降、初期値に比べて有意に眼圧値が低い時点が散見された。0.01%群の眼圧は、投与2時間後以降、初期値（ 18.3 ± 0.7 mmHg）に比べて-1.1～-6.9 mmHgの範囲で推移し、第1日目の投与4時間後以降すべての時点で有意な眼圧下降がみられた。また、反対眼においても投与6時間後以降、初期値に比べて有意に眼圧値が低い時点が散見された。0.1%群では試験期間を通して初期値（ 16.6 ± 0.6 mmHg）に比べて-2.3～-5.9 mmHgの有意な眼圧下降がみられた。反対眼では第1日目の投与2時間後においてのみ有意な眼圧下降がみられた。0.1%群の眼圧変化量は0.01%群に比べてやや小さい傾向にあった。

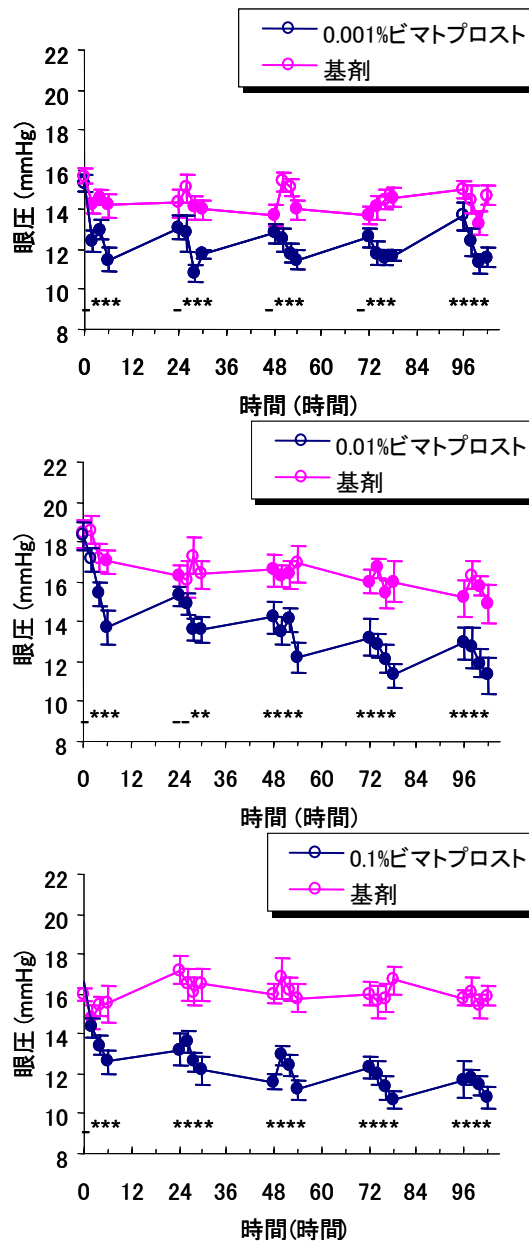


図 2.6.2-12 イヌにおける 1 日 1 回点眼による眼圧下降作用

平均値 ± 標準誤差、n=8 *：P<0.05、-：有意差なし（左右眼比較、Paired t-test、片側）
塗りつぶし：P<0.05、白抜き：有意差なし（初期値（0 時間点）との比較、Paired t-test、両側）

2.6.2.2.2.1.3 1日1回投与 4.2.1.1-13, 4.2.1.1-21

方法

雌雄のビーグル犬（体重：10～15 kg）を使用した。実験には全身麻酔を使用せず、手で穏やかに保定した。0.003%、0.006%及び0.03%ビマトプロスト溶液を片眼に、反対眼には基剤（0.1%ポリソルベート 80 含有 10 mM トリス緩衝液）を 25 μ L ずつ 1 日 1 回 5 日間反復点眼投与した。なお、0.03%濃度に関しては追加試験を行い、再現性を確認した。眼圧は圧平式眼圧計を用いて各実験日の投与直前、投与 2、4 及び 6 時間後に測定した。眼圧測定に際しては 0.1%プロパラカイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。

眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のある t 検定により検定し、危険率 5%以下を有意差ありとした。また、各測定時点における左右眼圧の比較も対応のある t 検定により同様に行った。

結果

図 2.6.2-13 にビマトプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。

0.003%群の眼圧は、投与 2 時間後以降、初期値（ 12.2 ± 0.8 mmHg：平均値 \pm 標準誤差、n=8）に比べて-1.5～-3.2 mmHg の範囲で推移し、第 3 日目のトラフ時を除くすべての時点で有意な眼圧下降がみられた。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。0.006%群の眼圧は、投与 2 時間後以降、初期値（ 13.1 ± 1.1 mmHg、n=7）に比べて-1.8～-4.3 mmHg の範囲で推移し、第 1 日目の投与 4 時間後以降すべての時点で有意な眼圧下降がみられた。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。0.03%群の眼圧は、投与 2 時間後以降、初期値（ 15.7 ± 0.5 mmHg、n=5～6）に比べて-2.5～-6.2 mmHg の範囲で推移し、第 1 日目の投与 4 時間後以降すべての時点で有意な眼圧下降がみられた。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。なお、0.03%濃度について実施した追加試験においても同様の結果が得られた。

ビマトプロストの眼圧下降作用は 0.003%～0.03%まで用量依存的に増強した。

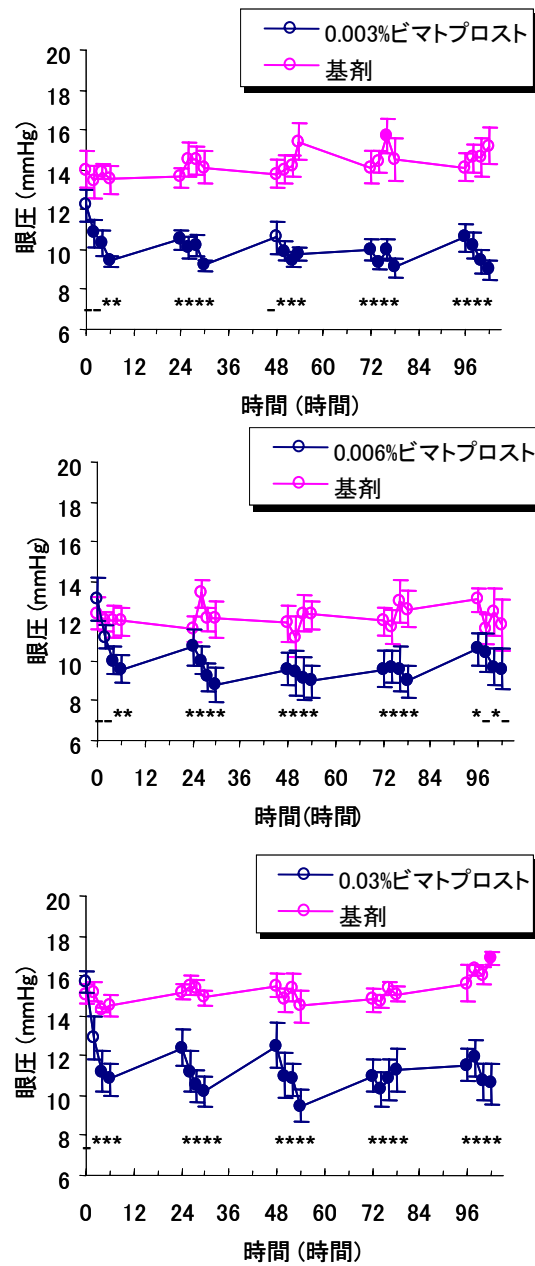


図 2.6.2-13 イヌにおける 1 日 1 回点眼による眼圧下降作用

平均値 ± 標準誤差、n=5-8 * : P<0.05、- : 有意差なし (左右眼比較、Paired t-test、片側)
塗りつぶし: P<0.05、白抜き: 有意差なし (初期値 (0 時間点) との比較、Paired t-test、両側)

2.6.2.2.1.4 1日1回投与（ラタノプロストとの直接比較）4.2.1.1-13, 4.2.1.1-21

方法

雌雄のビーグル犬（体重：10～15 kg）を6例使用した。実験には全身麻酔を使用せず、手で穏やかに保定した。ビマトプロスト溶液とラタノプロスト溶液の眼圧下降作用を直接比較するため、片眼に0.03%ビマトプロスト溶液、反対眼に0.005%ラタノプロスト溶液を25 μLずつ1日1回5日間反復点眼投与した。眼圧は圧平式眼圧計を用いて各実験日の投与直前、投与2、4及び6時間後に測定した。眼圧測定に際しては0.1%プロパラカイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。

眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のあるt検定により検定し、危険率5%以下を有意差ありとした。また、各測定時点における左右眼圧の比較も対応のあるt検定により同様に行った。

結果

図2.6.2-14にビマトプロスト溶液及びラタノプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。0.005%ラタノプロスト溶液投与眼の眼圧は、初期値（15.2 ± 0.7 mmHg：平均値±標準誤差）に比べて-1.0～-5.2 mmHgの範囲で推移し、第1日目の投与4時間後以降すべての時点で有意な眼圧下降がみられた。0.03%ビマトプロスト溶液投与眼の眼圧は、初期値（15.2 ± 0.4 mmHg）に比べて-0.7～-6.3 mmHgの範囲で推移し、第2日目以降すべての時点で有意な眼圧下降がみられた。第2日目以降、0.03%ビマトプロスト溶液投与眼の眼圧変化量は0.005%ラタノプロスト溶液投与眼より大きい傾向にあり、第4日目以降その差は0.4～1.1 mmHgあった。

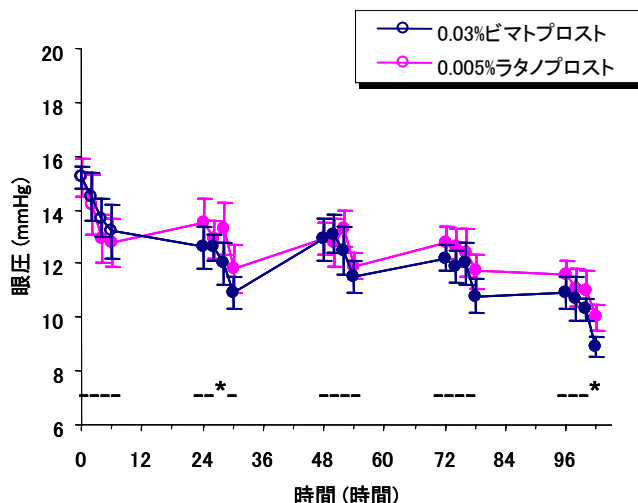


図 2.6.2-14 イヌにおける1日1回点眼による眼圧下降作用

平均値 ± 標準誤差、n=6 *：P<0.05、-：有意差なし（左右眼比較、Paired t-test、両側）
塗りつぶし：P<0.05、白抜き：有意差なし（初期値（0時間点）との比較、Paired t-test、両側）

2.6.2.2.2.2 カニクイザルにおけるピマトプロストの眼圧下降作用

2.6.2.2.2.2.1 正常眼圧サルに対する 1 日 2 回投与 4.2.1.1-9, 4.2.1.1-21

方法

眼圧測定のために訓練した雌のカニクイザル(体重:2~4 kg)を 1 群あたり 6 例使用した。実験には全身麻酔を使用せず、モンキーチェアに座らせて保定した。0.001%、0.01%及び0.1%ピマトプロスト溶液を片眼に、反対眼には基剤(0.1%ポリソルベート 80 含有 10 mM トリス緩衝液)を 25 μ L ずつ 1 日 2 回 6 時間間隔にて 5 日間反復点眼投与した。眼圧は圧平式眼圧計を用いて各実験日の初回投与直前、投与 2、4 及び 6 時間後に測定した。眼圧測定に際しては 0.1%プロパラカイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。

眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のある t 検定により検定し、危険率 5%以下を有意差ありとした。また、各測定時点における左右眼圧の比較も対応のある t 検定により同様に行った。

結果

図 2.6.2-15 にピマトプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。0.001%及び0.01%ピマトプロスト溶液投与眼の眼圧は 5 日の試験期間に漸次低下する傾向にあった。0.001%群では眼圧は初期値(15.8 \pm 0.5 mmHg : 平均値 \pm 標準誤差)に比べて-0.2~-3.7 mmHg の範囲を推移し、3 日目の投与 2 時間後以降、有意な眼圧下降を持続した。なお、反対眼においても 1 日目の投与 4 時間後及び 4 日目以降の 4 時点において、初期値に比べて有意に低い眼圧値がみられた。0.01%群では初期値(15.3 \pm 0.3 mmHg)に比べて-0.2~-2.8 mmHg の範囲を推移し、2 日目の投与 4 時間後以降、有意な眼圧下降を持続した。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。0.1%群では初期値(15.5 \pm 0.6 mmHg)に比べて 0.0~-2.8 mmHg の範囲を推移し、2 日目以降、有意な眼圧下降を持続した。反対眼に有意な眼圧下降はみられなかった。最大眼圧変化量には群間で大きな差がなかったが、眼圧下降は高用量群ほど速やかに発現した。

2.6
非臨床試験の概要文及び概要表

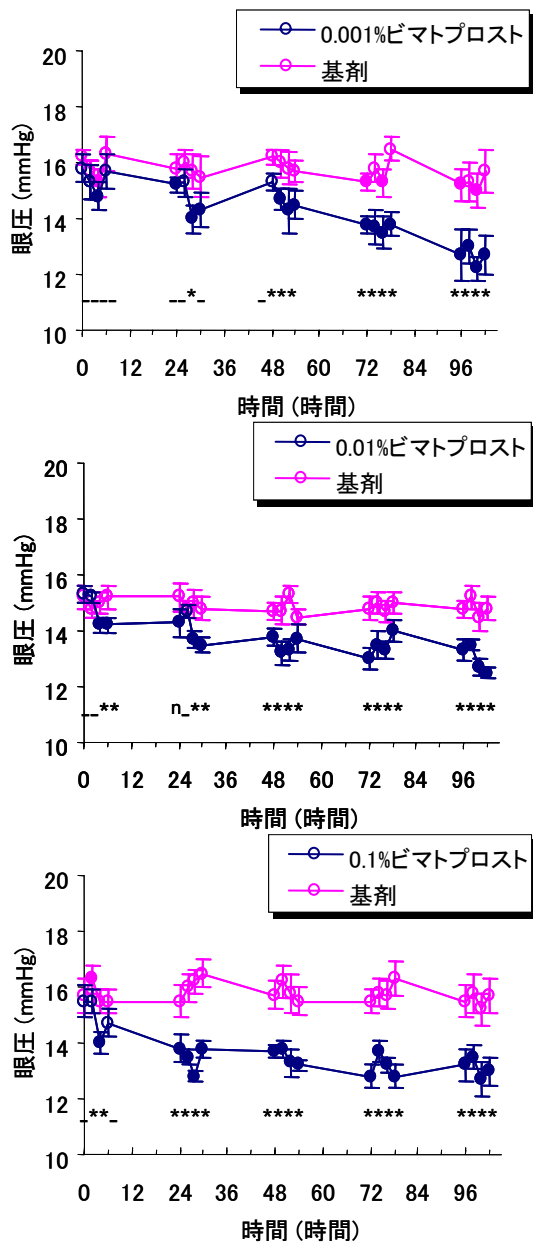


図 2.6.2-15 カニクイザルにおける 1 日 2 回点眼による眼圧下降作用

平均値 ± 標準誤差、n=6 * : P<0.05、- : 有意差なし、n : 検定不能 (左右眼比較、Paired t-test、片側) 塗りつぶし : P<0.05、白抜き : 有意差なし (初期値 (0 時間点) との比較、Paired t-test、両側)

2.6.2.2.2.2.2 隅角レーザー照射誘発高眼圧サルに対する単回投与 4.2.1.1-9 方法

片眼の隅角にレーザーを照射することにより眼圧を上昇させた雌のカニクイザル（体重：2～4 kg）を使用した。実験には全身麻酔を使用せず、眼圧測定のために訓練したサルを測定時にモンキーチェアに座らせて保定した。0.001%、0.01%及び0.1%ピマトプロスト溶液を高眼圧眼にそれぞれ 25 µL 単回点眼投与した。反対眼は無処置とした。眼圧は圧平式眼圧計を用いて投与の 1 時間前、直前、2、4 及び 6 時間後に測定した。眼圧測定に際しては 0.1%プロパラカイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。

眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のある t 検定により検定し、危険率 5%以下を有意差ありとした。

結果

図 2.6.2-16 にピマトプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。レーザー誘発高眼圧モデルにおいて、いずれの群においても投与 2 時間後から著明な眼圧下降がみられた。

0.001%群では投与 6 時間後において初期値 (26.2 ± 1.8 mmHg：平均値±標準誤差、n=6) に比べて最大となる 7.2 mmHg (26.3%) の有意な眼圧下降がみられた。0.01%群では投与 6 時間後において初期値 (31.3 ± 1.5 mmHg、n=6) に比べて最大となる 10.0 mmHg (31.7%) の有意な眼圧下降がみられた。0.1%群では投与 4 時間後において初期値 (32.4 ± 2.2 mmHg、n=5) に比べて最大となる 13.2 mmHg (40.1%) の有意な眼圧下降がみられた。

2.6

非臨床試験の概要文及び概要表

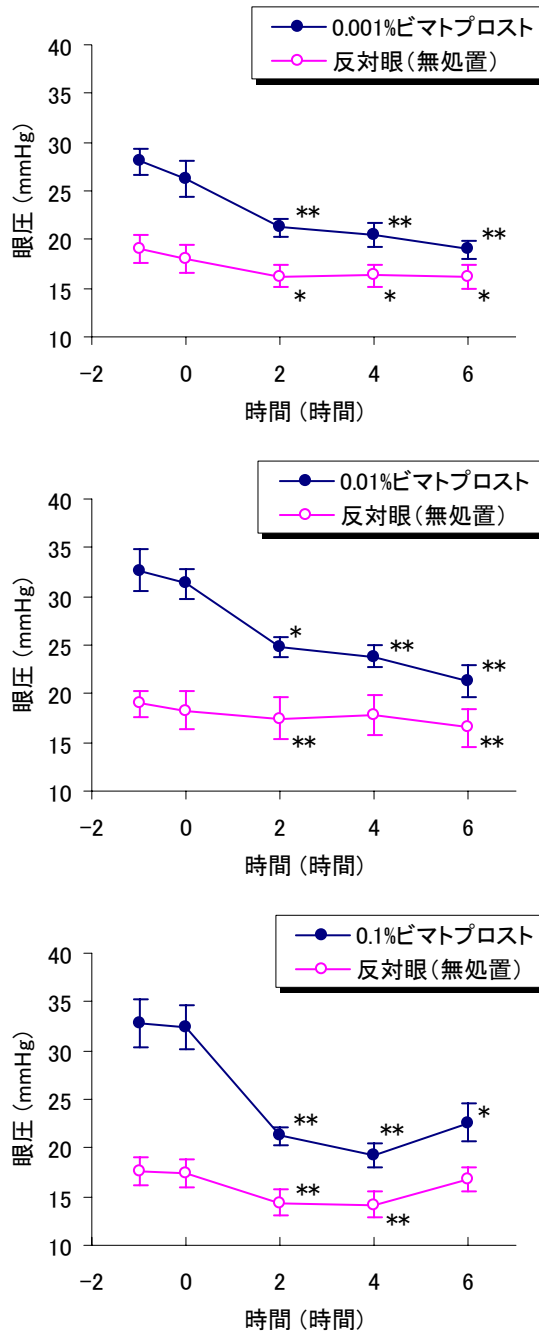


図 2.6.2-16 レーザー誘発高眼圧サルにおける単回点眼投与の眼圧下降作用
(反対眼は正常眼圧)

平均値 ± 標準誤差、n=5~6 * : P<0.05、** : P<0.01 (初期値 (0 時点) との比較、Paired t-test)

2.6.2.2.2.3 隅角レーザー照射誘発高眼圧サルに対する単回投与 4.2.1.1-14
方法

片眼の隅角にレーザーを照射することにより眼圧を上昇させたカニクイザル（体重：2～4 kg）を6例使用した。実験には全身麻酔を使用せず、眼圧測定のために訓練したサルを測定時にモンキーチェアに座らせて保定した。0.03% ビマトプロスト溶液を高眼圧眼に、反対眼には基剤（0.1%ポリソルベート 80 含有 10 mM トリス緩衝液）をそれぞれ 25 μL 単回点眼投与した。眼圧は圧平式眼圧計を用いて投与の1時間前、直前、2、4及び6時間後に測定した。眼圧測定に際しては0.1%プロパラカイン溶液を点眼し、局所麻酔を施した。

眼圧下降作用は初回投与前の眼圧値と各測定時点の眼圧値の間で対応のある t 検定により検定し、危険率 5%以下を有意差ありとした。

結果

図 2.6.2-17 に 0.03%ビマトプロスト溶液投与後の眼圧の経時変化を示した。0.03%ビマトプロスト溶液は投与 2 時間後から著明な眼圧下降作用を示し、投与 6 時間後において初期値（ 42.2 ± 3.8 mmHg：平均値±標準誤差）に比べて最大となる 15.7 mmHg（34.9%）の有意な眼圧下降作用を示した。

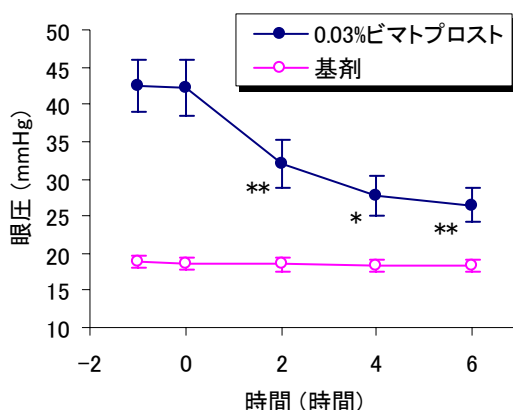


図 2.6.2-17 レーザー誘発高眼圧サルにおける 0.03%ビマトプロスト溶液の
単回点眼投与による眼圧下降作用
(基剤投与眼は正常眼圧)

平均値 ± 標準誤差、n=6 *：P<0.05、**：P<0.01 (初期値 (0 時点) との比較、Paired t-test)

2.6.2.2.3 内因性類縁物質の薬理作用..... 4.2.1.1-15, 4.2.1.1-20

各種プロスタノイド受容体関連標本及び遺伝子組換え FP 受容体画分に対するプロスタマイド F_{2α} と PGF_{2α} 又は AGN 191522 の作用を比較検討した。その結果、プロスタマイド F_{2α} はネコ虹彩括約筋を収縮させたが、その他の標本及び培養細胞に対する作用は弱く、組換え FP 受容体に対する親和性も低かった (表 2.6.2-10 及び概要表 2.6.3.2)。また、プロスタマイド F_{2α} は正常眼圧イヌ及びレーザー誘発高眼圧サルにおいて眼圧下降作用を示した^{4.2.1.1-16}【参考資料】 (概要表 2.6.3.2)。

表 2.6.2-10 PGF_{2α} 感受性標本における FP 受容体作動薬 (PGF_{2α} 又は AGN 191522) とプロスタマイド F_{2α} 及びビマトプロストとの比較

試験項目及び標本	EC ₅₀ /IC ₅₀ (95%信頼区間) [nM]			
	PGF _{2α}	AGN 191522	プロスタマイド F _{2α}	ビマトプロスト
平滑筋収縮/弛緩				
ネコ虹彩括約筋 (収縮)	-	-	61.7 (n.d.)	22.4 ^a (9.55 – 29.5)
内皮付ウサギ頸静脈 (弛緩) ^b	3.02 (2.00 – 4.47)	-	2340 (1290 – 4900)	4790 ^a (2140 – 16200)
細胞内 Ca ²⁺ 濃度上昇				
feFP 受容体発現 HEK-293 細胞	12.6 (4.90 – 17.8)	-	1120 (200 – 12900)	-
CRL1497 (ヒト皮膚線維芽細胞)	10.0 (n.d.)	-	1020 (309 – 2880)	-
イノシトールリン酸生成				
feFP 受容体発現 HEK-293 細胞	-	6.92 (5.50 – 8.71)	603 (355 – 1020)	-
huFP 受容体発現 HEK-293 細胞	-	7.08 (6.03 – 8.13)	1150 (832 – 1580)	-
受容体結合実験				
feFP 受容体画分	-	7.76 (5.01 – 12.3)	912 (389 – 2040)	-
	-	21.9 ^c (15.1 – 63.1)	-	1480 ^c (1260 – 1700)
huFP 受容体画分	-	2.34 (1.74 – 3.24)	2000 (1170 – 3390)	-
	-	2.29 ^c (1.66 – 3.24)	-	5010 ^c (3240 – 8130)

受容体結合実験は IC₅₀、その他の試験項目に関しては EC₅₀ を示す。(n=3~7)

EC₅₀ 値、IC₅₀ 値及びそれらの 95%信頼区間は非線形回帰 (E_{max} model) により再計算した^{4.2.1.1-20}。

a) 4.2.1.1-18、4.2.1.1-20

b) ヒスタミン前処理により収縮させた標本に対する弛緩作用。

c) 4.2.1.1-2、4.2.1.1-20

- : 実施していない

n.d. : 算出できなかった

2.6.2.2.4 不純物の薬理活性..... 4.2.1.1-17, 4.2.1.1-18, 4.2.1.1-19, 4.2.1.1-20

ビマトプロスト点眼剤に微量に含まれる不純物（**■**B*体、**■**A*体及び**■**C*体）のプロスタノイド受容体関連標本に対する薬理活性を表 2.6.2-11 にまとめた。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、それぞれビマトプロストの約 1/41、1/51 及び 1/12 であった。ヒスタミンにより前収縮させた内皮付ウサギ頸静脈に対する弛緩作用は極めて弱く、その他のプロスタノイド受容体標本に対しては作用しなかった。

表 2.6.2-11 各種プロスタノイド受容体関連標本に対する
ビマトプロスト及びその不純物の薬理活性 (EC₅₀ (95%信頼区間): nM)

受容体サブタイプ	標本	ビマトプロスト	■ B*体	■ A*体	■ C*体
FP	ネコ虹彩括約筋	22.4 (9.55 – 29.5)	912 (n.d.)	1150 (851 – 1620)	275 (224 – 501)
EP _{4/2} , FP	内皮付ウサギ頸静脈 ^a	4790 (2140 – 16200)	>10000	作用なし	4170 (2630 – 6920)
EP ₁	モルモット回腸	作用なし	作用なし	作用なし	-
TP	ラット大動脈	作用なし	作用なし	作用なし	-
	内皮付ウサギ頸静脈 ^b	-	-	-	作用なし
	ヒト血小板 (凝集)	作用なし	作用なし	作用なし	-
DP/IP	ヒト血小板 (凝集阻害)	作用なし	作用なし	作用なし	-

n=4~5

EC₅₀ 値及び 95%信頼区間は非線形回帰 (E_{max} model) により再計算した^{4.2.1.1-20}。

a) ヒスタミン前処理により収縮させた標本に対する弛緩作用

b) 前処理なしの標本に対する収縮作用

- : 実施していない

n.d. : 算出できなかった

* : 新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.2.3 副次的薬理試験.....4.2.1.2-1【参考資料】

放射標識リガンドを用いた競合阻害実験の結果、ビマトプロストは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のいずれに対しても高い結合親和性を示さなかった（表 2.6.2-12）。

その他の眼圧下降作用以外の薬理作用（充血、縮瞳、虹彩色素沈着）については 2.6.6 毒性試験の概要文に記載した。

表 2.6.2-12 各種受容体、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（10 μM）の結合親和性

受容体、トランスポーター、イオンチャネル [サブタイプ]	阻害率	受容体、トランスポーター、イオンチャネル [サブタイプ]	阻害率
アデノシン受容体[A ₁ 、A _{2A} 、A _{2B} 、A ₃]*	<50%	イノシトール 3 リン酸(IP ₃)受容体*	<50%
アデノシントランスポーター**		インスリン受容体*	
アドレナリン受容体[α _{1A} *, α _{1B} *, α _{1D} *, α _{2A} *, α _{2B} *, α _{2C} *, β ₁ , β ₂ , β ₃]		インターロイキン受容体[IL-1-]***	
アドレナリン作動性ノルエピネフリントランスポーター		ロイコトリエン (B ₄ 、D ₄ ***) 受容体	
アンギオテンシン II 受容体[AT ₁ 、AT ₂]		メラノコルチン受容体[MC4]	
心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANF)受容体**		メラトニン受容体[ML ₁]****	
ボンベシン受容体*		ムスカリン受容体[M ₁ 、M ₂ 、M ₃ 、M ₄ 、M ₅]	
ブラジキニン受容体[B ₂]		ニューロペプチド受容体[Y ₁ 、Y ₂]	
カルシトニン受容体		ニューロテンシン受容体***	
カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体 [CGRP ₁]		ニコチン性アセチルコリン受容体(中枢)*	
L 型 Ca ²⁺ チャネル[ベンゾジアゼピン、ジヒドロピリジン、フェニルアルキルアミン]*		オピオイド受容体[δ、κ、μ]	
N 型 Ca ²⁺ チャネル*		オルファニン受容体[ORL ₁]	
カンナビノイド受容体[CB ₁ 、CB ₂]		血小板活性化因子(PAF)受容体*****	
ケモカイン受容体 [CCR5、CXCR1(IL-8 _A)、CXCR2(IL-8 _B)]		カリウムチャネル[K _A 、K ₋ 、SK _{CA}]*	
コレシストキニン受容体[CCK _A]		プリン受容体[P2-*****、P2Y*]	
コリントランスポーター*		ロリプラム受容体*	
ドパミン受容体[D ₁ 、D _{2L} 、D ₃ 、D _{4.2} 、D ₅]		セロトニン受容体 [5-HT _{1A} 、5-HT _{1B} 、5-HT _{1D} 、5-HT ₂ *, 5-HT _{2A} 、5-HT _{2B} 、5-HT _{2C} 、5-HT ₃ 、5-HT ₄ **、5-HT _{5A} 、5-HT ₆ 、5-HT ₇]	
ドパミントランスポーター		セロトニントランスポーター	
エンドセリン受容体[ET _A 、ET _B]		シグマ受容体[σ ₁ 、σ ₂ *]	
上皮増殖因子(EGF)受容体		タキキニン受容体[NK ₁ 、NK ₂ 、NK ₃]	
エストロゲン受容体[ER-、ERβ]		テストステロン受容体*	
GABA _A 受容体[GABA 結合部位、ベンゾジアゼピン結合部位(中枢)、Cl ⁻ チャネル]*		トロンボキサン A ₂ (TXA ₂)受容体*****	
ガラニン受容体[GalR ₁]		甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)受容体*	
糖質コルチコイド受容体		腫瘍壊死因子(TNF)受容体	
グルタミン酸受容体[カニン酸、NMDA]*		血管内皮増殖因子(VEGF)受容体	
ストリキニーネ感受性グリシン受容体*		血管作用性腸管ペプチド受容体[VIP ₁]	
ヒスタミン受容体[H ₁ (中枢)**、H ₂ **、H ₃ *]		バソプレッシン受容体[V _{1A}]	
イミダゾリン受容体[I ₂ (中枢)]*			

無印：ヒト、*：ラット、**：モルモット、***：マウス、****：ニワトリ、*****：ウサギ

2.6.2.4 安全性薬理試験

.....4.2.1.3-1, 4.2.1.3-2 【参考資料】 , 4.2.1.3-3 【参考資料】 , 4.2.1.3-4 【参考資料】 , 4.2.1.1-3

安全性薬理試験は一般薬理試験として実施した。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。

試験結果を表 2.6.2-13 にまとめた。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。なお、ペンテトラゾール誘発痙攣に対する協力作用で、ビマトプロスト投与群に強直性痙攣及び死亡例が確認されているが (0.01 mg/kg: 3/10 例, 0.1 mg/kg: 5/10 例, 1 mg/kg: 1/10 例)、これらに用量相関性が認められないことから、ビマトプロストに由来する反応ではなく偶発的なものと判断した。

表 2.6.2-13 ビマトプロストの一般薬理作用

試験項目	動物	投与経路	投与量	試験結果	資料番号 (GLP 適否)	
一般症状	一般症状及び行動	ラット, ♂, SD, 各 6 匹/群	静脈内	0.01, 0.1, 1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
中枢神経系	自発運動量	マウス, ♀, Swiss Webster 各 10 匹/群	腹腔内	0.1, 1, 10 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-2 参考資料 (GLP 否)
		ラット, ♂, SD, 各 5 匹/群	静脈内	0.01, 0.1, 1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
	ヘキソバルビタール誘発睡眠	ラット, ♂, SD, 各 10 匹/群	静脈内	0.01, 0.1, 1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
	ペンテトラゾール誘発痙攣 (協力又は拮抗)	マウス, ♂, ICR, 各 10 匹/群	静脈内	0.01, 0.1, 1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
	Haffner 法による痛覚	マウス, ♂, ICR, 各 10 匹/群	静脈内	0.01, 0.1, 1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
	体温	ラット, ♂, SD, 各 10 匹/群	静脈内	0.01, 0.1, 1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)

表 2.6.2-13 ビマトプロストの一般薬理作用（つづき）

試験項目	動物	投与経路	投与量	試験結果	資料番号 (GLP 適否)
呼吸・循環器系	平均血圧, 心拍数 麻酔ラット, ♂, SD, 各 6 匹/群	静脈内	0.01 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-3 参考資料 (GLP 否)
			0.1 mg/kg	一過性の血圧上昇 (+10%)	
			1 mg/kg	一過性の血圧上昇 (+12%) 及び心拍数減少 (-8%)	
呼吸器系	呼吸数, 平均血圧, 心拍数, 心電図(PR 間隔, QRS 時間, QT 間隔, QTc) 無麻酔イヌ, ♂, ビーグル, 各 3 匹/群	静脈内	0.0001, 0.001 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
			0.01 mg/kg	一過性の血圧上昇 (+27%)	
呼吸器に対する作用	ヒト気管支標本, 4 標本/群 ヒト肺実質標本, 4 標本/群	<i>in vitro</i>	1×10^{-8} ~ 1×10^{-5} M	作用なし	4.2.1.3-4 参考資料 (GLP 否)
消化器系	小腸炭末輸送能 ラット, ♂, SD, 各 10 匹/群	静脈内	0.01, 0.1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
			1 mg/kg	抑制 (-25%)	
水・電解質代謝	尿管内水分貯留 ラット, ♂, SD, 各 10 匹/群	静脈内	0.01, 0.1 mg/kg	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)
			1 mg/kg	尿量及び尿中 Na ⁺ , Cl ⁻ 排泄量の増加 (それぞれ +57%, +49%, +33%)	
体性神経系	角膜反射 モルモット, ♂, Hartley, 各 6 匹/群	点眼	0.001, 0.01, 0.1 w/v%	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)

表 2.6.2-13 ビマトプロストの一般薬理作用（つづき）

試験項目	動物	投与経路	投与量	試験結果	資料番号 (GLP 適否)	
自律神経系・平滑筋	摘出回腸のアセチルコリン、ヒスタミン、塩化バリウム又はセロトニン相互作用	モルモット, ♂, Hartley, 5 標本/群	<i>in vitro</i> 2×10 ⁻⁸ M 2×10 ⁻⁷ M 2×10 ⁻⁶ M	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)	
	摘出子宮に対する作用	非妊娠ラット, SD, 5 標本/群	<i>in vitro</i> 2×10 ⁻⁸ M 2×10 ⁻⁷ M 2×10 ⁻⁶ M	作用なし	4.2.1.3-1 (GLP 否)	
		妊娠ラット, SD, 5 標本/群				
		非妊娠ウサギ, 日本白色種, 5 標本/群	<i>in vitro</i>	2×10 ⁻⁸ M 2×10 ⁻⁷ M 2×10 ⁻⁶ M	作用なし 収縮力の増強 (+23%~37%)	4.2.1.3-1 (GLP 否)
		非妊娠ヒト摘出子宮筋, 5 標本/群	<i>in vitro</i>	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁷ mol	ごく弱い収縮作用 (ED ₁ > 10 ⁻⁷ mol)	4.2.1.1-3 (GLP 否)
	妊娠ヒト摘出子宮筋, 5 標本/群	10 ⁻¹⁰ ~ 5×10 ⁻⁷ mol		ごく弱い収縮作用 (ED ₁ > 5×10 ⁻⁷ mol)		

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

作用機序

受容体に対する作用

ビマトプロストは眼圧下降に関与することが知られている受容体を含む 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高い親和性を示さず²⁰⁾、その構造から予想された FP 受容体をはじめとする各種プロスタノイド受容体とも結合しなかった。また、ネコ虹彩括約筋及び肺実質、及びウサギ子宮を除く多くのプロスタノイド受容体関連標本に対しても活性を示さなかった。ビマトプロストが活性を示した組織に関しても、ネコ肺実質においてはビマトプロスト > AGN 191522 > PGF_{2α} の順に強い収縮作用がみられたが、ネコ肺実質膜画分を用いた受容体結合実験では AGN 191522 > PGF_{2α} > ビマトプロストの順に親和性が高く、薬理活性と受容体親和性の順序が一致しなかった。このことからビマトプロストは FP 受容体作動薬とは異なる受容体を介して収縮作用を発現していると示唆された。また、マウス、ラット及びウサギの子宮を一様に収縮させる FP 受容体作動薬とは異なり、ウサギの子宮のみを収縮させたことも同様にビマトプロストが異なる受容体を介することを示唆している。更にネコ虹彩括約筋では、ビマトプロスト刺激により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇する細胞と PGF_{2α} 刺激により上昇する細胞が独立して存在し、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と示された。

更に、ネコ虹彩括約筋のビマトプロスト及びプロスタマイド F_{2α} による収縮を阻害し、PGF_{2α} 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)が見出され、ビマトプロストの受容体は PGF_{2α} の受容体とは異なることが薬理的に証明された⁵⁾。プロスタマイド拮抗薬はイヌにおいてビマトプロストによる眼圧下降を阻害したが、AGN 191522 の作用は阻害せず、眼組織におけるプロスタマイドの受容体の存在及びその眼圧調節への関与も示された。

ビマトプロストの受容体を分子生物学的に探索する中で、近年クローニングされたヒト FP 受容体のスプライスバリエント²¹⁾ (Alt-FP) を発現した細胞が高濃度 (10⁻⁵ M) のビマトプロストに反応して一過性の細胞内 Ca²⁺濃度上昇を起こす一方、同濃度の PGF_{2α} は作用しないことを見出した。プロスタノイド受容体は 7 回膜貫通型の受容体であり、7 番目の膜貫通領域がプロスタノイドのカルボキシル基の認識、1~6 番目の膜貫通領域は高い疎水性によりプロスタノイドのシクロペンタン環や側鎖の結合に寄与していると考えられている²²⁾。Alt-FP はこのカルボキシル基の認識に重要な役割を果たすと考えられる 7 番目の膜貫通領域を欠いている。このため Alt-FP を発現させた細胞は PGF_{2α} に反応しなかったが、カルボキシル基を持たないビマトプロストは弱いながら PGF_{2α} が活性を示さない濃度で作用を示したと考えられた。更にヒト FP 受容体と Alt-FP の共発現はビマトプロストに対する感受性を増強し、且つ PGF_{2α} とは異なる特徴的な細胞内 Ca²⁺濃度変化を引き起こすことを見出した。このビマトプロストに特異的な Ca²⁺濃度変化はネコ虹彩括約筋の収縮と同様、プロスタマイド拮抗薬により阻害され、また、細胞外の Ca²⁺を除くことによって消失した。平滑筋収縮が細胞外の Ca²⁺を除くことで阻害されることは周知であり、これら組換え受容体を用いた一連の実験はネコ虹彩括約筋の収縮実験で得られ

た結果と矛盾しない。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⁾。

また、ビマトプロストによって作動する細胞内外の情報伝達経路は $\text{PGF}_{2\alpha}$ のそれと全く同じではないこともビマトプロスト及び $\text{PGF}_{2\alpha}$ により誘導される遺伝子に差異があるという報告から示されている⁶⁾ (図 2.6.2-1)。ビマトプロストは細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇、ホスファチジルイノシトール (PI) 代謝の活性化など、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ と共通の細胞応答を誘導する。FP 受容体作動薬の主な眼圧下降機序とされる細胞外マトリクスのリモデリングに関してもその組織学的所見は基本的に同様である。しかし、このリモデリングに関与するタンパク質群として知られる CCN ファミリの発現調節に対して両物質の作用は異なる。CCN ファミリは機械刺激等により誘導されるタンパク質群であり、細胞の増殖や移動などにも関与している²³⁾。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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 Cyr61 及び CTGF 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⁶⁾。Cyr61 及び CTGF はともに線維芽細胞においてインテグリン $\alpha_6\beta_1$ 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^{10),11)}。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 $\text{coll}\alpha 1$ 及び $\text{coll}\alpha 2$ 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²⁴⁾においてコラーゲンの生成に関与するという相反する作用も有する。特に CTGF は TGF- β による線維形成 (コラーゲン合成) を調節する因子であることが知られており¹²⁾、緑内障患者の房水中において TGF- β とともに増加していると報告されている²⁵⁾。一方の Cyr61 は MMP1 や $\text{coll}\alpha 1$ の発現において TGF- β に拮抗的に作用することが知られている¹¹⁾。なお、ヒト線維柱帯の房水排出抵抗は TIMP-1 による MMP の阻害により上昇することがヒト前眼部組織を用いた実験で示されており、細胞外マトリクスの増加は眼圧上昇の一因となり得る²⁶⁾。このことから Cyr61 を選択的に誘導するビマトプロストの方が効率的に細胞外マトリクスを減少させ、強力且つ速やかな眼圧下降作用を発揮すると期待される。

房水動態に及ぼす影響

ビマトプロストの眼圧下降機序は房水産生の抑制や線維柱帯流出路からの房水流出の促進ではなく、主としてぶどう膜強膜流出路からの房水排出の促進であることがサルを用いたフルオロフォトメトリ法、2 段階定圧灌流法及びフルオレセイントレーサ法により示された。なお、FP 受容体作動薬による眼圧下降も同様の機序に基づくことが知られている。その分子メカニズムは未だ解明されていないが、上述のとおり MMP の発現亢進による房水流出路のリモデリングが主な作用であることが示唆されている (図 2.6.2-1)^{7),8),9),27),28)}。しかし、ビマトプロストを 1 年間投与したサルにおいて組織学的に毛様体筋束間隙の拡大だけでなく線維柱帯流出路における組織間隙の拡大もみられたことから、線維柱帯流出路における排出抵抗の低下も示唆されている²⁹⁾。このことはヒトにおいて圧依存性流出 (主に線維柱帯流出路を介した流出) を増加させたとする報告からも支持されている^{30),31)}。サルにおける房水排出を 2 段階定圧灌流法により測定した試験においても 5 日間の反復点眼投与により統計学的に有意でないものの 10%程度

の排出促進がみられ、ビマトプロストの眼圧下降作用における線維柱帯流出路の寄与は否定できるものではないと考えられる。形態学的検討では毛様体突起及び毛様体上皮に組織学的な変化はみられず、房水産生には影響を及ぼさないことが示唆されたが²⁹⁾、ヒトにおいてビマトプロスト点眼剤の点眼による房水産生の亢進が報告されている³⁰⁾。サルにおけるフルオロフォトメトリ法の結果からも房水産生への影響は否定できないが、この試験では0.1%という高濃度のビマトプロストを使用していること、また、サルにおいて眼圧の上昇はみられていないことから、臨床使用において眼圧を上昇させるほどの房水産生の亢進はないものと考えられる。

眼圧下降作用

正常眼圧イヌにおいてビマトプロスト溶液は1日1回及び1日2回の反復点眼投与により、いずれの用法でも0.01%濃度が0.001%濃度よりも強く、0.1%濃度では0.01%濃度より若干作用が低下する傾向にあった。0.003%~0.03%の範囲で用量反応性を検討した試験では0.03%まで用量依存的な作用の増強が認められた。よってイヌでは0.03%が至適用量と考えられた。また、正常眼圧イヌにおいて0.03%ビマトプロスト溶液の眼圧下降作用は1日1回投与により、投与2~5日目までの投与期間を通して0.005%ラタノプロスト溶液よりも強い傾向を示した。

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。

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26.3~40.1%下降させた。

したがって、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。

類縁物質の薬理作用

ビマトプロストは内因性の生理活性物質であるプロスタマイド F_{2α} に類似の構造を有する。プロスタマイド F_{2α} は、眼圧下降作用を有するカンナビノイド受容体の内因性リガンドであるアナンダマイドを前駆体として生合成されることが確認され、また内因性物質であることが確認された生理活性物質である^{1),2),3)}。

プロスタマイド F_{2α} はビマトプロストと同様、ネコ虹彩括約筋に対して強い収縮作用を示したが、その他の PGF_{2α} 感受性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。また、プロスタマイド F_{2α} は正常眼圧イヌ及び高眼圧サルにおいて眼圧下降作用を示した。このことから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 F_{2α} に類似していることが示された。

代謝物の薬理作用

ビマトプロストの主代謝物である AGN 191522 は代謝的に安定な PGF_{2α} のアナログであり、

選択的且つ強力な FP 受容体作動薬である。しかし、ウサギ及びサル之眼組織を用いた *in vitro* 代謝実験あるいは *in vivo* の代謝実験においてビマトプロストはウサギでは活発に代謝されるが、サルではほとんど代謝を受けないことが示されている (2.6.4.5 代謝)。また、サルの高眼圧モデルにおいてラタノプロスト点眼剤とビマトプロスト点眼剤の併用は相加的な効果をもたらす³²⁾ことから、ビマトプロストが代謝されてラタノプロストと同じ FP 受容体を介して作用を発現するとは考えにくい。更にプロスタミド拮抗薬がイヌにおけるビマトプロストの眼圧下降作用を阻害したことも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。

不純物の薬理活性

ビマトプロスト点眼剤に含まれる不純物である 5,6-trans 体、15 β 体及び 15-oxo 体は、ネコ虹彩括約筋に対して弱い収縮作用 (ビマトプロストの 1/12 以下) 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しては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 (2.3.P.5.1 規格及び試験方法) と極めて少ないことから、これら不純物の本剤の薬理作用への関与はほとんどないと考えられた。

安全性薬理試験及び副次的薬理試験

ビマトプロストの静脈内投与により、無麻酔イヌでは 0.01 mg/kg、ラットでは 0.1 mg/kg 以上の用量で呼吸・循環器系、消化器系、水・電解質代謝において作用が認められた。これらの用量は臨床用量である 0.03%をヒトの両眼に点眼 (50 μ L/眼) してそのすべてが吸収されたと仮定した場合 (体重を 60 kg として 0.0005 mg/kg) のそれぞれ 20 倍及び 200 倍以上に相当する。ビマトプロスト投与後の血液中濃度に関して、イヌでは報告がないが、ラットでは 1 mg/kg を静脈内投与した直後の血液中濃度 C_0 (外挿値) は 915 ng/mL と報告されている^{4.2.2.2-5}。静脈内投与における C_0 は薬物の吸収・分布過程を考慮する必要がないことから、0.1 mg/kg 静脈内投与時の C_0 を 1 mg/kg 静脈内投与時の C_0 の 10 分の 1 (91.5 ng/mL) と仮定すると、この濃度は 0.03% をヒトの両眼に点眼投与したときの最高血液中濃度である 0.061 ng/mL (1.47×10^{-10} M) の 1500 倍に相当する (2.7.2.2.2 健康成人における薬物動態)。

ヒトを含む種々の動物の摘出子宮を用いた *in vitro* の実験では、ウサギの子宮のみが特に強い応答を示した。その作用は 2×10^{-7} M から認められた。また、別の薬理試験においても 1×10^{-8} M から収縮作用が認められている^{4.2.1.1-3}。子宮平滑筋の薬物感受性はホルモン状態などによって複雑に影響されるため、実験間で差が生じた原因は不明だが、これらの濃度は点眼後のヒト最高血液中濃度の約 1400 倍及び 68 倍に相当する。

以上のように、認められた作用はいずれも臨床用量投与時と比べて高い血液中濃度において観察されたものであり、ビマトプロストが臨床使用上問題となるような作用を引き起こす可能性は低いと推察された。

なお、ペンテトラゾール誘発痙攣に対する協力作用で、強直性痙攣及び死亡例が対照群で認められていないのに対し、0.01、0.1 及び 1 mg/kg 群にそれぞれ 10 例中 3 例、5 例及び 1 例確認されている。しかしながら、本試験の実施施設における背景値から、対照群で強直性痙攣及び

死亡例が10例中0~4例認められ、陽性対照のレセルピン(5 mg/kg、皮下投与)投与で10例中全例に強直性痙攣及び死亡例が認められている。ペンテトラゾールはGABA_A受容体(ベンゾジアゼピン結合部位)を介して痙攣を誘発するが、ビマトプロストはこの受容体に親和性を示さず(IC₅₀ > 1 × 10⁻⁵ M)、中枢作用に影響を及ぼす各種受容体やトランスポーター、イオンチャネルにも結合しなかった。さらに、本試験で認められた強直性痙攣及び死亡例に本薬の用量反応性が認められなかったことを考慮すると、強直性痙攣及び死亡例は本薬に由来する反応ではなく偶発的なものであり、本薬は痙攣誘発に対する協力作用を示さないと考えられた。

結論

ビマトプロストはラタノプロストをはじめとするPGF_{2α}アナログとは異なる作用機序を有するプロスタマイドF_{2α}アナログであり、主にぶどう膜強膜流出路からの房水排出を促進してラタノプロストよりも強力に眼圧を低下させることが示された。

2.6.2.7 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

引用文献

- 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) Liang Y, Li C, Guzman VM, Evinger AJ 3rd, Protzman CE, Krauss AH, et al. Comparison of prostaglandin F_{2α}, bimatoprost (prostamide), and butaprost (EP₂ agonist) on Cyr61 and connective

- tissue growth factor gene expression. *J Biol Chem.* 2003;278:27267-77.
- 7) Weinreb RN, Lindsey JD. Metalloproteinase gene transcription in human ciliary muscle cells with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:716-22.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) Woodward DF, Krauss AH, Chen J, Liang Y, Li C, Protzman CE, et al. Pharmacological characterization of a novel antiglaucoma agent, Bimatoprost (AGN 192024). *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:772-85.
 - 14) Matias I, Chen J, De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Fezza F, et al. Prostaglandin ethanolamides (prostamides): *in vitro* pharmacology and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:745-57.
 - 15) Yablonski ME, Cook DJ, Gray J. A fluorophotometric study of the effect of argon laser trabeculoplasty on aqueous humor dynamics. *Am J Ophthalmol.* 1985;99:579-82.
 - 16) Bárány EH. Simultaneous measurement of changing intraocular pressure and outflow facility in the vervet monkey by constant pressure infusion. *Invest Ophthalmol.* 1964;3:135-43.
 - 17) Sperber GO, Bill A. A method for near-continuous determination of aqueous humor flow; effects of anaesthetics, temperature and indomethacin. *Exp Eye Res.* 1984;39:435-53.
 - 18) Bill A. Further studies on the influence of the intraocular pressure on aqueous humor dynamics in Cynomolgus monkeys. *Invest Ophthalmol.* 1967;6:364-72.
 - 19) Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Hayashi M. Prostaglandin A₂ increases uveoscleral outflow and trabecular outflow facility in the cat. *Exp Eye Res.* 1995;61:649-57.
 - 20) Woodward DF, Krauss AH, Chen J, Lai RK, Spada CS, Burk RM, et al. The pharmacology of bimatoprost (Lumigan™). *Surv Ophthalmol.* 2001;45 Suppl 4:S337-45.
 - 21) Vielhauer GA, Fujino H, Regan JW. Cloning and localization of hFP₃: a six-transmembrane mRNA splice variant of the human FP prostanoid receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2004;421:175-85.
 - 22) Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. VIII. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994;46:205-29.

- 23) Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol.* 2003;178:169-75.
- 24) Fuchshofer R, Yu AH, Welge-Lüssen U, Tamm ER. Bone morphogenetic protein-7 is an antagonist of transforming growth factor- β 2 in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:715-26.
- 25) Ho SL, Dogar GF, Wang J, Crean J, Wu QD, Oliver N, et al. Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2005;89:169-73.
- 26) Bradley JM, Vranka J, Colvis CM, Conger DM, Alexander JP, Fisk AS, et al. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:2649-58.
- 27) 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.
- 28) Husain S, Jafri F, Crosson CE. Acute effects of PGF_{2 α} on MMP-2 secretion from human ciliary muscle cells: a PKC- and ERK-dependent process. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:1706-13.
- 29) Richter M, Krauss AH, Woodward DF, Lütjen-Drecoll E. Morphological changes in the anterior eye segment after long-term treatment with different receptor selective prostaglandin agonists and a prostamide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4419-26.
- 30) Brubaker RF, Schoff EO, Nau CB, Carpenter SP, Chen K, Vandenburg AM. Effects of AGN 192024, a new ocular hypotensive agent, on aqueous dynamics. *Am J Ophthalmol.* 2001;131:19-24.
- 31) Christiansen GA, Nau CB, McLaren JW, Johnson DH. Mechanism of ocular hypotensive action of bimatoprost (Lumigan) in patients with ocular hypertension or glaucoma. *Ophthalmology.* 2004;111:1658-62.
- 32) Gagliuso DJ, Wang RF, Mittag TW, Podos SM. Additivity of bimatoprost or travoprost to latanoprost in glaucomatous monkey eyes. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:1342-7.

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付資料番号
効力を裏付ける試験					
作用機序					
各種プロスタノイド受容体に対する作用					
プロスタノイド受容体結合実験	細胞膜画分	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -068	4.2.1.1-1
	組換え受容体	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -313	4.2.1.1-2
プロスタノイド受容体関連標本に対する作用	各種平滑筋標本	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -068	4.2.1.1-1
			XXXXXXXXXX / Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -273	4.2.1.1-3
ビマトプロスト受容体の探索					
ネコ虹彩括約筋細胞の細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化に対する作用	ネコ虹彩括約筋組織	<i>In vitro</i>	XXXXXXXXXX / Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -404	4.2.1.1-4
プロスタマイド拮抗薬（AGN 204396）の作用 （平滑筋収縮、細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化）	ネコ虹彩括約筋標本 組換え受容体	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -529	4.2.1.1-5
FP 受容体スプライスバリエントに対するビマトプロストの作用	組換え受容体	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -555	4.2.1.1-6 【参考資料】
新規プロスタマイド拮抗薬の作用 （平滑筋収縮、細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化）	ネコ虹彩括約筋標本 組換え受容体	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -546	4.2.1.1-7 【参考資料】
ビマトプロストの眼圧下降作用に対する AGN 211336 の拮抗作用	イヌ	点眼	XXXXXXXXXX / Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -582	4.2.1.1-8 【参考資料】
房水動態に及ぼす影響					
房水産生に及ぼす影響	サル	点眼	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -067	4.2.1.1-9
房水排出に及ぼす影響					
線維柱帯流出路（Total outflow facility）	サル	点眼	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -323	4.2.1.1-10
ぶどう膜強膜流出路	サル	点眼	Allergan	BIO- XXXXXXXXXX -323	4.2.1.1-10

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付資料番号
眼圧下降作用					
正常眼圧イヌにおけるビマトプロストの眼圧下降作用					
1日2回反復投与	イヌ	点眼	██████████ / Allergan	BIO-████-062	4.2.1.1-11
1日1回反復投与	イヌ	点眼	██████████ / Allergan	BIO-████-112	4.2.1.1-12
1日1回反復投与	イヌ	点眼	██████████ / Allergan	BIO-████-318	4.2.1.1-13
1日1回反復投与（ラタノプロストとの直接比較）	イヌ	点眼	██████████ / Allergan	BIO-████-318	4.2.1.1-13
カニクイザルにおけるビマトプロストの眼圧下降作用					
1日2回反復投与	サル	点眼	Allergan	BIO-████-067	4.2.1.1-9
単回投与	サル (高眼圧モデル)	点眼	Allergan	BIO-████-067	4.2.1.1-9
			Allergan	BIO-████-354	4.2.1.1-14
内因性類縁物質の薬理作用					
プロスタノイド受容体関連標本に対する作用	各種受容体及び平滑筋標本	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO-████-308	4.2.1.1-15
受容体結合実験	組換え受容体	<i>In vitro</i>			
眼圧下降作用（単回投与）	イヌ	点眼	██████████ / Allergan		
眼圧下降作用（1日1回反復投与）	サル (高眼圧モデル)	点眼	Allergan	BIO-████-373	4.2.1.1-16 【参考資料】
不純物のプロスタノイド受容体関連標本に対する薬理活性	各種平滑筋標本	<i>In vitro</i>	Allergan	BIO-████-264	4.2.1.1-17
				BIO-████-330	4.2.1.1-18
				BIO-████-333	4.2.1.1-19
追加解析					
EC ₅₀ 及びIC ₅₀ の95%信頼区間の算出	—	—	千寿製薬	A████-007	4.2.1.1-20
眼圧下降作用に関する追加統計解析	—	—	千寿製薬	A████-008	4.2.1.1-21
副次的薬理試験					
非プロスタグランジン受容体に対する作用					
各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する結合親和性	各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネル	<i>in vitro</i>	██████████	BIO-████-371	4.2.1.2-1 【参考資料】

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目		試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付資料番号
一般薬理試験						
一般症状	一般症状及び行動	ラット	静脈内	██████████	██████████	4.2.1.3-1
中枢神経系	自発運動量	マウス	腹腔内	Allergan	BIO-████-099	4.2.1.3-2 【参考資料】
		ラット	静脈内	██████████	██████████	4.2.1.3-1
	ヘキソバルビタール誘発睡眠	ラット	静脈内	██████████	██████████	██████████
	ペンテトラゾール誘発痙攣 (協力又は拮抗)	マウス	静脈内			
	Haffner 法による痛覚	マウス	静脈内			
	体温	ラット	静脈内			
呼吸・循環器系	平均血圧、心拍数	ラット	静脈内	Allergan	BIO-████-096	4.2.1.3-3 【参考資料】
	呼吸数、平均血圧、心拍数、心電図 (PR 間隔, QRS 時間, QT 間隔, QTc)	イヌ	静脈内	██████████	██████████	4.2.1.3-1
	呼吸器に対する作用	ヒト気管支標本 ヒト肺実質標本	in vitro	██████████ / Allergan	BIO-████-369	4.2.1.3-4 【参考資料】
消化器系	小腸炭末輸送能	ラット	静脈内	██████████	██████████	4.2.1.3-1
	腸管内水分貯留	ラット	静脈内	██████████	██████████	
水・電解質代謝	尿量及び尿中電解質排泄	ラット	静脈内	██████████	██████████	4.2.1.3-1
体性神経系	角膜反射	モルモット	点眼	██████████	██████████	4.2.1.3-1
自律神経系 ・平滑筋	摘出回腸のアセチルコリン、ヒスタミン、 塩化バリウム又はセロトニン相互作用	モルモット	in vitro	██████████	██████████	4.2.1.3-1
		非妊娠ラット	in vitro	██████████	██████████	
		妊娠ラット				
		非妊娠ウサギ	in vitro	██████████	██████████	
	摘出子宮に対する作用	非妊娠ヒト 妊娠ヒト	in vitro	██████████ / Allergan	BIO-████-273	4.2.1.1-3

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号	
作用機序					
各種プロスタノイド受容体に対する作用 (試験成績は追加解析^{4.2.1.1-20}の結果を示す)					
プロスタノイド受容体結合実験	<i>(In vitro)</i>	[Log M]	[n 数] IC ₅₀ (95%信頼区間): nM	4.2.1.1-1 4.2.1.1-20	
		(放射性リガンド： 5 nM ³ H-AGN 191522)			
		マウス Swiss 3T3 細胞	ビマトプロスト [-9~-5]	[1] >10000 (算出せず)	4.2.1.1-2 4.2.1.1-20
		膜画分	AGN 191522 [-9~-6]	[6] 7.41 (5.37 - 10.2)	
		ネコ肺実質膜画分	ビマトプロスト [-9~-5]	[2~3] 182 (19.1 - 324)	
			PGF _{2α} [-10~-5]	[1~4] 25.1 (15.5 - 41.7)	
			AGN 191522 [-10~-6]	[1] 2.51 (1.58 - 12.0)	
		組換えヒト受容体 (COS-7 細胞)			
		FP	ビマトプロスト [-9~-5]	[1] 1740 (1070 - 2880)	
			AGN 191522 [-9~-7]	[1] 9.77 (8.13 - 11.7)	
			ビマトプロスト [-9~-5]	[5] >10000 (算出せず)	
			PGF _{2α} [-9~-5]	[3] 42.7 (24.5 - 72.4)	
			AGN 191522 [-9~-5]	[4] 19.5 (11.0 - 34.7)	
			(5 nM ³ H-PGE ₂)		
		EP ₂	ビマトプロスト [-8~-5]	[4] >10000 (算出せず)	
			PGE ₂ [-9~-6]	[3] 23.4 (10.5 - 52.5)	
EP _{3D}	ビマトプロスト [-8~-5]	[3] >10000 (算出せず)			
	PGE ₂ [-10~-6]	[3] 29.5 (16.6 - 51.3)			
EP ₄	ビマトプロスト [-8~-5]	[3] >10000 (算出せず)			
	PGE ₂ [-9~-6]	[3] 6.92 (0.123 - 60.3)			

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
	TP	(5 nM ³ H-SQ 29548) ビマトプロスト [-9~-5]	[3] 作用なし (算出せず)	
		U-46619 [-9~-5]	[3] 562 (251 - 1350)	
		SQ 29548 [-9~-6]	[3] 20.4 (16.6 - 25.1)	
	組換え FP 受容体 (HEK-293 細胞)	(5 nM ³ H-AGN 191522)		
	ヒト由来	ビマトプロスト [-9~-5]	[3] 5010 (3240 - 8130)	
		AGN 191522 [-10~-5]	[3] 2.29 (1.66 - 3.24)	
	ネコ由来	ビマトプロスト [-9~-5]	[3] 1480 (1260 - 1700)	
		AGN 191522 [-10~-5]	[3] 21.9 (15.1 - 63.1)	
プロスタノイド受容体関連標本に 対する作用	(<i>In vitro</i>)	[Log M]	[n 数] EC ₅₀ (95%信頼区間): nM	4.2.1.1-1
DP/IP 受容体	ヒト血小板 (ADP 凝集阻害)	ビマトプロスト [-7~-5]	[4] 作用なし (算出せず)	4.2.1.1-20
EP ₁ 受容体	モルモット回腸	ビマトプロスト [-8~-5]	[4] 作用なし (算出せず)	
EP ₃ 受容体	ニワトリ回腸	ビマトプロスト [-8~-5]	[4] 作用なし (算出せず)	
EP _{4/2} 受容体	モルモット精管 ウサギ頸静脈 (ヒスタミン前収縮)	ビマトプロスト [-9~-5]	[4] 作用なし (算出せず)	
		ビマトプロスト [-10~-5]	[4] 1860 (759 - 5750)	
TP 受容体	ラット大動脈	ビマトプロスト [-8~-5]	[4] 作用なし (算出せず)	
	ヒト血小板	ビマトプロスト [-7~-5]	[4] 作用なし (算出せず)	
FP 受容体	ネコ虹彩括約筋	ビマトプロスト [-9~-6]	[4] 22.4 (9.55 - 29.5)	
	マウス Swiss 3T3 細胞	ビマトプロスト [-8~-5]	[3] >10000 (算出せず)	
	ネコ肺実質	ビマトプロスト [-9~-5]	[5~6] 38.0 (21.4 - 209)	
		PGF _{2α} [-9~-5]	[6] 170 (110 - 263)	
		AGN 191522 [-9~-5]	[4] 75.9 (38.0 - 151)	

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号	
FP 受容体	ラット子宮 (発情誘導)	ビマトプロスト [-8~-5]	[3~4] 1050 (182-21400)		
		PGF _{2α} [-9~-5]	[18] 26.9 (8.13-85.1)		
		AGN 191522 [-10~-7]	[2~4] 1.48 (0.603-3.63)		
	ラット結腸	ビマトプロスト [-8~-5]	[4] >10000 (算出せず)		
		PGF _{2α} [-9~-6]	[6] 12.0 (8.51-17.0)		
		AGN 191522 [-9~-6]	[6] 15.5 (9.12-537)		
	ラット胃底	ビマトプロスト [-8~-5]	[4] 6920 (6030-8130)		
		PGF _{2α} [-9~-6]	[7] 22.9 (13.5-38.9)		
		AGN 191522 [-9~-7]	[4] 4.27 (3.02-6.03)		
	スナネズミ結腸	ビマトプロスト [-9~-5]	[4] >10000 (算出せず)		
		PGF _{2α} [-10~-6]	[6] 95.5 (77.6-117)		
		AGN 191522 [-10~-6]	[2~4] 70.8 (11.0-1480)		
	マウス子宮	ビマトプロスト [-9~-5]	[8] >10000 (算出せず)		4.2.1.1-3 4.2.1.1-20
		PGF _{2α} [-9~-5]	[8] 12.3 (2.45-49.0)		
		AGN 191522 [-9~-5]	[6] 7.41 (3.02-17.0)		
	ラット子宮	ビマトプロスト [-10~-5]	[6] >10000 (算出せず)		
		AGN 191522 [-10~-5]	[6] 6.61 (5.01-14.5)		
	ウサギ子宮	ビマトプロスト [-10~-5]	[6] 10.5 (4.90-26.3)		
		PGF _{2α} [-10~-5]	[6] 5.01 (1.86-7.08)		
		AGN 191522 [-10~-5]	[6] 0.708 (0.372-0.891)		
マウス子宮 ウサギ子宮	ビマトプロスト [-9~-5]	[6] 作用なし (算出せず)			
	ビマトプロスト [-9~-5]	[6] 33.1 (9.33-132)			
		ただし、ウサギ子宮の収縮を測定した後、そのメディウムを回収し、10分の1に希釈して標本に添加した。	ビマトプロストの添加によるウサギ子宮の収縮はその代謝物であり FP 受容体作用薬である AGN 191522 によるものではなく、ビマトプロストの直接作用であると示唆された。		

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号																																				
FP 受容体	非妊娠ヒト子宮筋	ビマトプロスト [-12 ~ -7]	T/B ratio (at 100 nmol)* ED ₁ (nmol) [n=5] 0.70 ± 0.17 >100																																					
		AGN 191522 [-12 ~ -6]	6.81 ± 0.83 0.06																																					
	妊娠ヒト子宮筋	ビマトプロスト [-10 ~ -6.3]	0.42 ± 0.05 >500																																					
		AGN 191522 [-12 ~ -6]	2.66 ± 0.32 6.0																																					
*: 100 nmol の薬物投与時の T/B ratio (平均値 ± 標準誤差)																																								
ビマトプロストの受容体の探索																																								
ネコ虹彩括約筋細胞の細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化に対する作用	(In vitro) ネコ虹彩括約筋組織	ビマトプロスト: 0.1 及び 1 µM PGF _{2α} : 0.1 及び 1 µM カルバコール: 1 µM	ビマトプロストまたは PGF _{2α} の一方にのみ選択的に応答する細胞の存在が示され、ビマトプロストと FP 受容体作動薬とは作用点が異なると示唆された。	4.2.1.1-4																																				
ネコ虹彩括約筋収縮におけるプロスタマイド拮抗薬 (AGN 204396) の作用	(In vitro) ネコ虹彩括約筋	プロスタマイド F _{2α} 10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M + AGN 204396 1 µM 3 µM 6 µM 10 µM 20 µM 30 µM PGF _{2α} 10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M + AGN 204396 30 µM ビマトプロスト 10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M + AGN 204396 6 µM 10 µM 30 µM	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Log EC₅₀ (M)</th> </tr> <tr> <th>拮抗薬なし</th> <th>拮抗薬あり</th> <th>[n 数]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-7.365</td> <td>-7.150</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.065</td> <td>-6.713</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.220</td> <td>-6.622</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.096</td> <td>-6.429</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.237</td> <td>-6.210</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.116</td> <td>-6.068</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.780</td> <td>-7.780</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.793</td> <td>-7.089</td> <td>[4]</td> </tr> <tr> <td>-7.819</td> <td>-7.084</td> <td>[6]</td> </tr> <tr> <td>-7.654</td> <td>-6.828</td> <td>[6]</td> </tr> </tbody> </table>	Log EC ₅₀ (M)			拮抗薬なし	拮抗薬あり	[n 数]	-7.365	-7.150	[6]	-7.065	-6.713	[6]	-7.220	-6.622	[6]	-7.096	-6.429	[6]	-7.237	-6.210	[6]	-7.116	-6.068	[6]	-7.780	-7.780	[6]	-7.793	-7.089	[4]	-7.819	-7.084	[6]	-7.654	-6.828	[6]	4.2.1.1-5
Log EC ₅₀ (M)																																								
拮抗薬なし	拮抗薬あり	[n 数]																																						
-7.365	-7.150	[6]																																						
-7.065	-6.713	[6]																																						
-7.220	-6.622	[6]																																						
-7.096	-6.429	[6]																																						
-7.237	-6.210	[6]																																						
-7.116	-6.068	[6]																																						
-7.780	-7.780	[6]																																						
-7.793	-7.089	[4]																																						
-7.819	-7.084	[6]																																						
-7.654	-6.828	[6]																																						

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号																																				
		AGN 191522 $10^{-10} \sim 10^{-5}$ M + AGN 204396 10 μ M 30 μ M ラタノプロスト酸 $10^{-10} \sim 10^{-5}$ M + AGN 204396 30 μ M	-8.699 -8.616 [6] -8.127 -8.055 [6] -7.900 -7.905 [6]																																					
			AGN 204396 はビマトプロストの作用を拮抗的に阻害したが、FP 受容体作動薬の作用を阻害しなかった。ビマトプロストは FP 受容体作動薬とは異なる受容体に作用すると示された。																																					
ヒト組換えプロスタノイド受容体に対するプロスタマイド拮抗薬（AGN 204396）の作用（細胞内 Ca^{2+} 濃度変化）	(<i>In vitro</i>) 組換えヒト受容体 (HEK-293 細胞)	拮抗薬 AGN 204396 30 μ M 作動薬 $10^{-10} \sim 10^{-5}$ M	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">作動薬の Log EC₅₀ (M) [n=3]</th> </tr> <tr> <th>拮抗薬なし</th> <th>拮抗薬あり</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DP</td> <td>PGD₂</td> <td>-8.676</td> <td>-8.706</td> </tr> <tr> <td>EP₁</td> <td>PGE₂</td> <td>-9.074</td> <td>-9.630</td> </tr> <tr> <td>EP₂</td> <td>PGE₂</td> <td>-8.300</td> <td>-8.493</td> </tr> <tr> <td>EP₃</td> <td>PGE₂</td> <td>-9.403</td> <td>-9.580</td> </tr> <tr> <td>EP₄</td> <td>PGE₂</td> <td>-9.903</td> <td>-9.979</td> </tr> <tr> <td>FP</td> <td>PGF_{2α}</td> <td>-8.442</td> <td>-8.409</td> </tr> <tr> <td>IP</td> <td>cPGI</td> <td>-7.347</td> <td>-7.094</td> </tr> <tr> <td>TP</td> <td>U-46619</td> <td>-9.494</td> <td>-6.175</td> </tr> </tbody> </table>		作動薬の Log EC ₅₀ (M) [n=3]		拮抗薬なし	拮抗薬あり	DP	PGD ₂	-8.676	-8.706	EP ₁	PGE ₂	-9.074	-9.630	EP ₂	PGE ₂	-8.300	-8.493	EP ₃	PGE ₂	-9.403	-9.580	EP ₄	PGE ₂	-9.903	-9.979	FP	PGF _{2α}	-8.442	-8.409	IP	cPGI	-7.347	-7.094	TP	U-46619	-9.494	-6.175
作動薬の Log EC ₅₀ (M) [n=3]																																								
拮抗薬なし	拮抗薬あり																																							
DP	PGD ₂	-8.676	-8.706																																					
EP ₁	PGE ₂	-9.074	-9.630																																					
EP ₂	PGE ₂	-8.300	-8.493																																					
EP ₃	PGE ₂	-9.403	-9.580																																					
EP ₄	PGE ₂	-9.903	-9.979																																					
FP	PGF _{2α}	-8.442	-8.409																																					
IP	cPGI	-7.347	-7.094																																					
TP	U-46619	-9.494	-6.175																																					
			AGN 204396 は各種プロスタノイド受容体のうち TP 受容体に親和性を示した。																																					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
FP 受容体スプライスバリエーションに対するビマトプロストの作用	(<i>In vitro</i>) 組換えヒト受容体 (HEK-293 細胞)	ビマトプロスト 10 ⁻⁷ M PGF _{2α} 10 ⁻⁷ M AGN 211335 10 ⁻⁸ ~ 10 ⁻⁶ M	ヒト毛様体よりクローニングされた FP 受容体のスプライスバリエーションと FP 受容体を共発現させた細胞に対してビマトプロストはそれぞれを単独で発現させた細胞とは異なる作用（細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化）を示し、これらの受容体複合体がビマトプロストの受容体候補と示唆された。	4.2.1.1-6 【参考資料】
新規プロスタマイド拮抗薬の作用 (平滑筋収縮)	(<i>In vitro</i>) ネコ虹彩括約筋	プロスタマイド F _{2α} 10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁵ M + AGN 211334 30 μM + AGN 211335 30 μM + AGN 211336 30 μM + AGN 204396 30 μM	K _b 値 (nM) [n=4] 236 356 303 2635	4.2.1.1-7 【参考資料】
(細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化)	(<i>In vitro</i>) 組換えヒト受容体 (HEK-293 細胞)	作動薬	拮抗薬 K _b 値 (nM) [n=3] AGN 211334 AGN 211335 AGN 211336 AGN 204396 NA NA 40861 NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA 37048 9046 NA NA NA 33600 13136 NA NA NA NA NA 16 100 111 15	
			NA: 作用なし	

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
ビマトプロストの眼圧下降作用に 対する AGN 211336 の拮抗作用	イヌ	(点眼) ビマトプロスト 0.03% +AGN 211336 5% +AGN 211336 基剤 AGN 191522 0.03% +AGN 211336 5% +AGN 211336 基剤 (下降薬:1日1回5日間) (拮抗薬:1日2回5日間)	初期値からの眼圧変化 (5日間) -0.6~-3.4 mmHg -0.9~-6.8 mmHg [n=6] -0.2~-3.2 mmHg 0.6~-3.5 mmHg [n=5] AGN 211336 はビマトプロストの眼圧下降 作用を阻害したが AGN 191522 の作用は阻 害しなかった。	4.2.1.1-8 【参考資料】
房水動態に及ぼす影響 (平均値±標準誤差)				
房水産生に及ぼす影響 (フルオロフォトメトリ法)	カニクイザル	(点眼) ビマトプロスト 0.1% チモロール 0.5% (ビマトプロスト:測定前日 に2回及び当日に1回投与) (チモロール:単回投与)	投与前 投与後 (μL/min) 1.41±0.19 1.48±0.17 [n=5] 1.9±0.29 1.2±0.22 [n=4] ビマトプロストは房水産生を 10.2%促進す る傾向にあったが、統計学的に有意な変化 ではなかった。(比較対照: 36.2%減少)	4.2.1.1-9
房水排出に及ぼす影響 線維柱帯流出路 (Total outflow facility) (2段階定圧灌流法)	カニクイザル	(点眼) ビマトプロスト 0.01% ラタノプロスト 0.01% (測定前に1日2回4日間及 び当日に1回投与)	投与眼 対照眼 (μL/min/mmHg) 0.418±0.038 0.373±0.015 [n=6] 0.423±0.068 0.383±0.053 [n=6] ビマトプロストは線維柱帯流出路を介す る房水排出を 12.1%促進する傾向にあっ たが、統計学的に有意な変化ではなかつ た。(比較対照: 10.4%促進)	4.2.1.1-10
ぶどう膜強膜流出路 (フルオレセイントレーサ法)	カニクイザル	(点眼) ビマトプロスト 0.01% ラタノプロスト 0.01% (測定前に1日2回4日間及 び当日に1回投与)	投与眼 対照眼 (μL/min) 1.372±0.268 0.964±0.198 [n=6] 1.212±0.265 0.839±0.204 [n=6] ビマトプロストはぶどう膜強膜流出路か らの房水排出を 42%増加させた。(比較対 照: 44%促進)	

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
眼圧下降作用				
正常眼圧イヌにおけるビマトプロストの 眼圧下降作用				
1日2回反復投与	イヌ	(点眼) ビマトプロスト 0.001% 0.01% 0.1% ラタノプロスト 0.001% 0.01%	初期値からの眼圧変化 (5日間) -0.6 ~ -3.9 mmHg [n=8] -3.4 ~ -8.1 mmHg [n=7] -0.6 ~ -5.2 mmHg [n=8] -0.4 ~ -5.2 mmHg [n=6] -1.4 ~ -6.1 mmHg [n=7]	4.2.1.1-11
1日1回反復投与	イヌ	(点眼) ビマトプロスト 0.001% 0.01% 0.1%	初期値からの眼圧変化 (5日間) -1.6 ~ -4.5 mmHg [n=8] -1.1 ~ -6.9 mmHg [n=8] -2.3 ~ -5.9 mmHg [n=8]	4.2.1.1-12
1日1回反復投与	イヌ	(点眼) ビマトプロスト 0.003% 0.006% 0.03%	初期値からの眼圧変化 (5日間) -1.5 ~ -3.2 mmHg [n=8] -1.8 ~ -4.3 mmHg [n=7] -2.5 ~ -6.2 mmHg [n=5~6]	4.2.1.1-13
1日1回反復投与 (ラタノプロストとの 直接比較)	イヌ	(点眼) ビマトプロスト 0.03% ラタノプロスト 0.005%	初期値からの眼圧変化 (5日間) -0.7 ~ -6.3 mmHg [n=6] -1.0 ~ -5.2 mmHg 投与2日目以降、ビマトプロスト投与眼の 眼圧はラタノプロスト投与眼の眼圧より 低い傾向にあり、4日目以降その差は0.4 ~1.1 mmHgあった。	4.2.1.1-13

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
カニクイザルにおけるビマトプロストの 眼圧下降作用				
1日2回反復投与	カニクイザル	(点眼) ビマトプロスト 0.001% 0.01% 0.1%	初期値からの眼圧変化 (5日間) -0.2 ~ -3.7 mmHg [n=6] -0.2 ~ -2.8 mmHg [n=6] 0.0 ~ -2.8 mmHg [n=6]	4.2.1.1-9
隅角レーザー照射誘発高眼圧モデルに 対する単回投与	カニクイザル	(点眼) ビマトプロスト 0.001% 0.01% 0.1%	初期値からの最大眼圧下降率 26.3% [n=6] 31.7% [n=6] 40.1% [n=5]	4.2.1.1-9
隅角レーザー照射誘発高眼圧モデルに 対する単回投与	カニクイザル	(点眼) ビマトプロスト 0.03%	初期値からの最大眼圧下降率 34.9% [n=6]	4.2.1.1-14
内因性類縁物質の薬理作用 (試験成績は追加解析^{4.2.1.1-20}の結果を示す)				
プロスタノイド受容体関連標本に 対する作用	(In vitro)	[Log M]	[n 数] EC ₅₀ (95%信頼区間): nM	4.2.1.1-15 4.2.1.1-20
DP/IP 受容体	ヒト血小板 (ADP 凝集阻害)	プロスタマイド F _{2α} [-7 ~ -5]	[4] 作用なし (算出せず)	
EP ₁ 受容体	モルモット回腸	プロスタマイド F _{2α} [-8 ~ -5]	[4] >10000 (算出せず)	
EP ₃ 受容体	ニワトリ回腸	プロスタマイド F _{2α} [-8 ~ -5]	[4] 1700 (269 - 87100)	
EP _{4/2} , FP 受容体	モルモット精管	プロスタマイド F _{2α} [-8 ~ -5]	[4] 1350 (1050 - 4270)	
	内皮付ウサギ頸静脈 (ヒスタミン前収縮)	プロスタマイド F _{2α} [-10 ~ -5] PGF _{2α} [-11 ~ -6]	[6] 2340 (1290 - 4900) [7] 3.02 (2.00 - 4.47)	
FP 受容体	ネコ虹彩括約筋	プロスタマイド F _{2α} [-8 ~ -5]	[4] 61.7 (算出不能)	
TP 受容体	ラット大動脈	プロスタマイド F _{2α} [-8 ~ -5]	[4] >10000 (算出せず)	
	ヒト血小板	プロスタマイド F _{2α} [-7 ~ -5]	[4] 作用なし (算出せず)	

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
細胞内 Ca ²⁺ 濃度変化	<i>(In vitro)</i> CRL1497 細胞	プロスタマイド F _{2α} [-8~-5] [4]	1020 (309-2880)	
		PGF _{2α} [-9~-5] [4]	10.0 (算出不能)	
	組換えネコ FP 受容体 (HEK-293 細胞)	プロスタマイド F _{2α} [-8~-5] [3]	1120 (200-12900)	
		PGF _{2α} [-10~-5] [3]	12.6 (4.90-17.8)	
イノシトールリン酸の生成	<i>(In vitro)</i> 組換えネコ FP 受容体 (HEK-293 細胞)	プロスタマイド F _{2α} [-8~-5] [3]	603 (355-1020)	
		AGN 191522 [-9~-6] [4]	6.92 (5.50-8.71)	
	組換えヒト FP 受容体 (HEK-293 細胞)	プロスタマイド F _{2α} [-8~-5] [3]	1150 (832-1580)	
		AGN 191522 [-9~-6] [4]	7.08 (6.03-8.13)	
受容体結合実験	<i>(In vitro)</i> 組換えネコ FP 受容体 (HEK-293 細胞) 組換えヒト FP 受容体 (HEK-293 細胞)	(5 nM ³ H-AGN 191522)	[n 数] IC ₅₀ (95%信頼区間): nM	
		プロスタマイド F _{2α} [-9~-5] [3]	912 (389-2040)	
		AGN 191522 [-10~-5] [3]	7.76 (5.01-12.3)	
		プロスタマイド F _{2α} [-9~-5] [3]	2000 (1170-3390)	
眼圧下降作用	イヌ	プロスタマイド F _{2α} 0.1% (単回点眼)	初期値 (16.2 ± 1.1 mmHg : 平均値±標準誤差) からの最大眼圧変化 -5.2 mmHg [n=6] (投与 6 時間後)	
	カニクイザル (高眼圧モデル)	(1 日 1 回点眼) プロスタマイド F _{2α} 0.03% 0.1%	初期値からの眼圧変化 (5 日間) -2.3 ~ -8.2 mmHg [n=3~6] (初期値 : 35.0 ± 2.6 mmHg) -0.8 ~ -9.2 mmHg [n=3~6] (初期値 : 34.7 ± 3.1 mmHg)	
				4.2.1.1-16 【参考資料】

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（つづき）

被験物質：ビマトプロスト

試験項目	試験系	薬物、濃度/用量 (投与経路)	試験成績	添付資料 番号
不純物のプロスタノイド受容体関連標本に対する薬理活性		(試験成績は追加解析 ^{4.2.1.1-20} の結果を示す)		
	(<i>In vitro</i>)	[Log M]	[n 数] EC ₅₀ (95%信頼区間): nM	4.2.1.1-17
DP/IP 受容体	ヒト血小板 (ADP 凝集阻害)	■ A*体	[-7~-5] [4] 作用なし (算出せず)	4.2.1.1-20
FP 受容体	ネコ虹彩括約筋	■ A*体	[-9~-5] [4] 1150 (851 - 1620)	
EP _{4/2} , FP 受容体	内皮付ウサギ頸静脈 (ヒスタミン前収縮)	■ A*体	[-10~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
EP ₁ 受容体	モルモット回腸	■ A*体	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
TP 受容体	ラット大動脈	■ A*体	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
	ヒト血小板	■ A*体	[-7~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
DP/IP 受容体	ヒト血小板 (ADP 凝集阻害)	■ B*体	[-7~-5] [4] 作用なし (算出せず)	4.2.1.1-18
		ビマトプロスト	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	4.2.1.1-20
FP 受容体	ネコ虹彩括約筋	■ B*体	[-9~-5] [4] 912 (算出不能)	
		ビマトプロスト	[-9~-6] [4] 22.4 (9.55 - 29.5)	
EP _{4/2} , FP 受容体	内皮付ウサギ頸静脈 (ヒスタミン前収縮)	■ B*体	[-10~-5] [5] >10000 (算出せず)	
		ビマトプロスト	[-10~-5] [5] 4790 (2140 - 16200)	
EP ₁ 受容体	モルモット回腸	■ B*体	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
		ビマトプロスト	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
TP 受容体	ラット胸部大動脈	■ B*体	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
		ビマトプロスト	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
	ヒト血小板	■ B*体	[-7~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
		ビマトプロスト	[-8~-5] [4] 作用なし (算出せず)	
FP 受容体	ネコ虹彩括約筋	■ C*体	[-10~-5] [4] 275 (224 - 501)	4.2.1.1-19
EP _{4/2} , FP 受容体	内皮付ウサギ頸静脈 (ヒスタミン前収縮)	■ C*体	[-10~-5] [4] 4170 (2630 - 6920)	4.2.1.1-20
TP 受容体	内皮付ウサギ頸静脈	■ C*体	[-10~-5] [4] 作用なし (算出せず)	

*：新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.3.3 副次的薬理試験

概要文中（表 2.6.2- 12）に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

概要文中（表 2.6.2- 13）に記載した。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし