
ドボベツト[®]軟膏

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

レオ ファーマ株式会社

目次

2.4	非臨床試験の概括評価	5
2.4.1	非臨床試験計画概略	5
2.4.1.1	薬理試験	6
2.4.1.2	薬物動態試験	6
2.4.1.3	毒性試験	7
2.4.2	薬理試験	11
2.4.2.1	効力を裏付ける試験	11
2.4.2.2	副次的薬理試験	12
2.4.2.3	安全性薬理試験	13
2.4.2.3.1	カルシポトリオール水和物の安全性薬理試験	13
2.4.2.3.2	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル物の安全性薬理試験	14
2.4.2.4	薬力学的薬物相互作用試験	15
2.4.3	薬物動態試験	15
2.4.3.1	分析法	15
2.4.3.2	吸収	15
2.4.3.3	分布	17
2.4.3.4	代謝	17
2.4.3.5	排泄	18
2.4.3.6	薬物動態学的薬物相互作用	18
2.4.4	毒性試験	19
2.4.4.1	単回投与毒性試験	19
2.4.4.2	反復投与毒性試験	19
2.4.4.3	遺伝毒性試験	22
2.4.4.4	がん原性試験	22
2.4.4.5	生殖発生毒性試験	24
2.4.4.6	局所刺激性試験	26
2.4.4.7	その他の毒性試験	27
2.4.4.7.1	光安全性試験	27
2.4.4.7.2	不純物の毒性試験	28
2.4.5	総括及び結論	28
2.4.6	引用文献	35

表一覧

表 2.4- 1	LEO 90105 の薬物動態試験一覧	7
表 2.4- 2	LEO 90105 の毒性試験プログラム	8
表 2.4- 3	カルシポトリオール水和物の毒性試験一覧（ドボネックス®軟膏承認取得後実施試験）	9
表 2.4- 4	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル毒性試験一覧（LEO Pharma A/S 実施試験）	10
表 2.4- 5	カルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及び 両剤併用の Th1／Th17 細胞分化に対する作用（分化前処理）	12
表 2.4- 6	カルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及び 両剤併用の Th1／Th17 細胞分化に対する作用（分化後処理）	12
表 2.4- 7	カルシポトリオール水和物の安全性薬理試験成績一覧	14
表 2.4- 8	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル安全性薬理試験成績一覧	14

略号一覧

略号	日本語	英語
AUC	濃度 - 時間曲線下面積	Area under the concentration - time curve
AUC _{0-t}	時間 0 から t 時間までの AUC	Area under the concentration - time curve from zero to t hours
AUC _{0-inf}	時間 0 から無限時間まで外挿した AUC	Area under the concentration - time curve extrapolated to infinity
BrdU	ブロモデオキシウリジン	Bromdeoxyuridine
C _{max}	最高濃度	Maximum concentration
FDA	米国食品医薬品局	Food and Drug Administration
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GR	グルココルチコイド受容体	Glucocorticoid receptor
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	High performance liquid chromatography
IFN γ	インターフェロン- γ	Interferon-gamma
IL	インターロイキン	Interleukin
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー・タンデムマスペクトロメトリー	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MED	最小紅斑量	Minimal erythematous dose
MMP	マトリックスメタロプロテアーゼ	Matrix metalloproteinase
NOAEL	無毒性量	No-observed-adverse-effect-level
PK	薬物動態	Pharmacokinetics
RBU	—	Robertson-Berger Units
SD ラット	Sprague-Dawley 系ラット	Sprague-Dawley rat
t _{1/2}	消失半減期	Apparent elimination half-life
Th1 細胞	1 型ヘルパーT 細胞	Type 1 helper T cells
Th17 細胞	IL-17 産生性ヘルパーT 細胞	IL-17-expressing helper T cells
TK	トキシコキネティクス	Toxicokinetics
t _{max}	最高濃度到達時間	Time to attain C _{max}
TUNEL	—	TdT-mediated dUTP nick-end labeling
UV	紫外線	Ultraviolet

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ドボベツト®軟膏は、活性型ビタミン D₃誘導体であるカルシポトリオール水和物 52.2 µg/g（カルシポトリオール（無水物）¹として 50 µg/g）とコルチコステロイド（以下、ステロイド）であるベタメタゾンジプロピオン酸エステル 0.643 mg/g（ベタメタゾンとして 0.5 mg/g）を含有する配合軟膏剤であり、LEO Pharma A/S（デンマーク）で開発された。

カルシポトリオール（無水物）は、「ドボネックス®軟膏 50µg/g」として本邦において既に市販されており、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル（リンデロン®-DP 軟膏等）とともに乾癬治療の第一選択薬として汎用されている。今回、カルシポトリオールとステロイドとの配合軟膏剤の開発にあたり、有効成分の安定性に影響しない配合に適した基剤を開発した。カルシポトリオール水和物は、この処方及び製造において適切な物理的性質を有する原薬として開発された。

ドボベツト®軟膏は、尋常性乾癬に対する外用剤として 2001 年 10 月にデンマークで初めて上市された。米国では EU やカナダで実施された臨床試験データを利用し、2005 年に承認申請を行い、2006 年に承認された。2012 年（平成 24 年）12 月現在、90 カ国以上の国で承認を取得している。乾癬には尋常性乾癬、関節症性乾癬、滴状乾癬、乾癬性紅皮症や汎発性乾癬などの種類がある。その中で、ドボベツト®軟膏の本申請での予定する効能効果である尋常性乾癬が乾癬全体の約 9 割を占めている。乾癬の発症には表皮細胞の異常増殖と免疫機能の異常が関与しており、角化細胞異常増殖及び免疫異常を改善する治療が実施されている。病変が限局性で軽症の場合には活性型ビタミン D₃ 外用剤やステロイド外用剤を用いることが第一選択であり、また、中等症から重症例の治療においてもこれらの外用は基本となる [1]。

カルシポトリオールをはじめとする活性型ビタミン D₃ 外用剤の乾癬への臨床効果発現機序として、表皮細胞の分化誘導作用や異常増殖抑制作用 [2] に加え、炎症性サイトカイン調節作用 [3]、アポトーシス誘導作用 [4]、制御性 T 細胞誘導作用 [5] などの薬理作用による可能性が報告されている。一方、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルのようなステロイド外用剤は、抗炎症作用及び免疫抑制作用により乾癬に対して効果を発揮すると考えられる。また、肥満細胞に働きかけ、病変部の止痒作用もある [6]。両剤の併用使用では活性型ビタミン D₃ 外用剤による表皮細胞の増殖抑制作用と、両剤が有する抗炎症作用により強い抗乾癬作用を示すと考えられる。また、臨床の場においても両薬剤を同時使用する併用療法が実施されることは少なくなく、実際にステロイド外用剤と活性型ビタミン D₃ 外用剤の併用治療の効果については国内外の複数の臨床試験で確認されている [7、8、9、10、11、12、13]。

ドボベツト®軟膏の有効成分であるカルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの濃度は、単一成分の外用製剤（ドボネックス®軟膏及びリンデロン®-DP 軟膏）と同一であり、これら有効成分の有効性や安全性に関わる非臨床試験については多くの報告がみられ

¹ カルシポトリオールは水和物と無水物が存在する。試験に供した被験物質を特定するなど、区別が必要な場合には、それぞれカルシポトリオール水和物及びカルシポトリオール（無水物）と表記した。区別が必要でない場合又は既に記している場合には、単にカルシポトリオールとした。

る。

本CTDでは、ドボベツト®軟膏の基剤を用いて調製されたカルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステル配合軟膏製剤（カルシポトリオール／ベタメタゾン濃度比1:10）をLEO 90105と総称する。LEO 90105の非臨床試験計画の概要を以下に示す。

2.4.1.1 薬理試験

カルシポトリオール又はベタメタゾンジプロピオン酸エステルの有効性を裏付ける薬理作用については既知であり、多くの報告が行われている。本申請に際し、本剤が配合剤であることを勘案し、効力を裏付ける試験としてカルシポトリオール（無水物）とベタメタゾンジプロピオン酸エステル併用時のヒト1型ヘルパーT細胞（Th1）及びIL-17産生性ヘルパーT細胞（Th17）の分化・活性化に対する作用を検討した。副次的薬理試験ではカルシポトリオール（無水物）とベタメタゾンジプロピオン酸エステル併用時の皮膚萎縮作用を線維芽細胞及び角化細胞を用いて検討し、単独投与時の作用と比較した。また、カルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの単剤での安全性薬理試験を経口投与で実施した。

2.4.1.2 薬物動態試験

カルシポトリオールの薬物動態試験についてはドボネックス®軟膏承認申請時に実施評価済みであり、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの薬物動態試験についても多くの報告がみられる。したがって、LEO 90105の薬物動態試験ではラット及びミニブタでのLEO 90105経皮投与後の吸収、分布及び排泄試験、ミニブタでの*in vivo*代謝試験並びにLEO 90105有効成分の肝S9分画による*in vitro*代謝試験を実施した。また、ミニブタでの反復経皮投与時のトキシコキネティクス（TK）試験結果を反復投与時の薬物動態（PK）評価に使用した（表2.4-1）。なお、*in vivo*試験のカルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステルの併用静脈内投与では混合溶液による投与ではなく、³H-カルシポトリオール又は³H-ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与後、直ちにそれぞれ非標識体ベタメタゾンジプロピオン酸エステル又はカルシポトリオールの投与を行った（以降、³H標識体併用静脈内投与と略す）。また、経皮投与では³H-カルシポトリオール又は³H-ベタメタゾンジプロピオン酸エステル含有LEO 90105（以降、³H標識LEO 90105と略す）を用いた。

2.4 非臨床試験の概括評価

ドボベット®軟膏

表 2.4- 1 LEO 90105 の薬物動態試験一覧

動物種/系統		試験の種類	性別	投与経路	投与期間	GLP 適用	報告書番号
吸収	ラット/SD	血清中放射能濃度	雌雄	静脈内	単回	適	205018
				経皮			
	ミニブタ/ Göttingen	血清中放射能濃度	雌雄	静脈内	単回	適	AME/03/01
				経皮			
		血清中未変化体濃度		経皮	14 日間	適	TK/02/02
		経皮	8 週間	適	48576		
分布	ラット/SD	組織内放射能分布	雌雄	経皮	単回	適	205018
	有色ラット/ Lister Hooded	組織内放射能分布	雌雄	静脈内			
代謝	ミニブタ/ Göttingen	<i>In vivo</i> 代謝	雌雄	静脈内	単回	否	AME/03/01
	マウス、ラット、 ミニブタ、 ウサギ、ヒト	<i>In vitro</i> 代謝	雌雄 ^{a)}	-	-	否	MET/03/01
排泄	ラット/SD	尿、糞中排泄	雌雄	静脈内	単回	適	205018
	経皮						
	ミニブタ/ Göttingen	尿、糞中排泄	雌雄	静脈内	単回	適	AME/03/01
経皮							

a) ウサギは雌のみ実施

2.4.1.3 毒性試験

(1) LEO 90105 の毒性試験

カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルについては各有効成分でこれまで非臨床毒性試験が多数実施されており、LEO 90105 の毒性試験では経皮投与による反復投与毒性試験並びに局所刺激性試験を実施した（表 2.4- 2）。反復投与毒性試験の用量設定では投与容量及びカルシポトリオール／ベタメタゾンの濃度比率（1:10）を固定し、有効成分の濃度を様々に変化させた。また、無毒性量（NOAEL）を決定するために濃度はマウスで 1/400、ミニブタで 1/25 まで引き下げた。LEO 90105 のカルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの濃度及び投与量は、それぞれカルシポトリオール（無水物）及びベタメタゾン量に換算して表示した。

表 2.4- 2 LEO 90105 の毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	被験物質
反復投与毒性試験			
10 日間投与試験	経皮	マウス	LEO 90105
4 週間投与試験	経皮	マウス、ミニブタ	LEO 90105
13 週間投与試験	経皮	マウス	LEO 90105
9 ヶ月間投与試験	経皮	ミニブタ	LEO 90105
局所刺激性試験			
6 週間投与試験	経皮 (1 日 1 回)	ウサギ	LEO 90105
6 週間投与試験	経皮 (1 日 2 回)	ウサギ	LEO 90105

全ての試験は GLP に準拠して実施した。

(2) カルシポトリオール[®]の毒性試験

カルシポトリオール[®]の毒性はドボネックス[®]軟膏承認申請時に既に評価されているが、その後、カルシポトリオール水和物を用いたがん原性及び光がん原性並びに光安全性試験を実施した。また、カルシポトリオール水和物の不純物（類縁物質）の一つである不純物A*のラット単回投与毒性試験を実施した（表 2.4- 3）。カルシポトリオール水和物の投与量（μg/kg）及び製剤濃度（μg/mL 又は μg/g）は、経口投与でのがん原性試験を除き、カルシポトリオール（無水物）に換算して表示した。ドボネックス[®]軟膏申請時に実施した毒性試験ではカルシポトリオール（無水物）を用いたが、カルシポトリオール（無水物）とカルシポトリオール水和物は同一の毒性学的プロファイルを持つことから、被験物質としての無水物と水和物との違いは毒性学的見地からは重要な意味を持たない。

表 2.4- 3 カルシポトリオール水和物の毒性試験一覧
(ドボネックス®軟膏承認取得後実施試験)

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	被験物質
がん原性試験			
13 週間投与用量設定試験	経皮	マウス	カルシポトリオール液剤
24 ヶ月間投与試験	経皮	マウス	カルシポトリオール液剤
13 週間投与用量設定試験	経口	ラット	カルシポトリオール水和物
104 週間投与試験	経口	ラット	カルシポトリオール水和物
光がん原性試験			
13 週間投与用量設定試験	経皮	マウス	カルシポトリオール液剤
12 ヶ月試験 (40 週間投与)	経皮	マウス	カルシポトリオール液剤
光安全性試験	経皮	マウス	カルシポトリオール液剤、 カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステルゲル製剤
不純物の毒性試験			
単回投与毒性試験	経口	ラット	不純物A*

全ての試験は GLP に準拠して実施した。

(3) ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの毒性試験

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは広く使用されており、安全性プロファイルがよく特徴づけられたステロイドである。その代謝及び毒性作用はステロイドとして典型的である。多くの臨床データベースが存在しており、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは乾癬治療の外用剤として安全であることが示されている。しかし、LEO Pharma A/S（デンマーク）は米国食品医薬品局（FDA）の要求に従い、非臨床データベースを補完するためベタメタゾンジプロピオン酸エステルを用いた遺伝毒性、反復投与毒性、生殖発生毒性及びがん原性試験を実施した（表 2.4- 4）。経口投与による反復投与毒性試験の投与量は、mg/kg ベタメタゾンジプロピオン酸エステル量で表示し、経皮投与試験では mg/kg ベタメタゾン量に換算して表示した。

表 2.4- 4 ベタメタゾンジプロピオン酸エステル毒性試験一覧
(LEO Pharma A/S 実施試験)

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	被験物質
反復投与毒性試験			
4 週間投与試験	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
13 週間投与試験	経皮	マウス	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル (軟膏)
	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
遺伝毒性試験			
復帰突然変異試験	<i>in vitro</i>	サルモネラ 菌	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
マウスリンフォーマ <i>tk</i> 試験	<i>in vitro</i>	マウスリン パ腫細胞	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
ラット骨髓小核試験	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
がん原性試験			
104 週間投与試験	経皮	マウス	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル (軟膏)
	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
生殖発生毒性試験			
雄性生殖能試験	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
生殖発生毒性用量設定試験	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
雌の受胎能及び初期胚発生に 関する試験	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
出生前及び出生後の発生並び に母動物の機能に関する試験	経口	ラット	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル

全ての試験は GLP に準拠して実施した。

2.4.2 薬理試験

LEO 90105 の薬理試験としてカルシポトリオール（無水物）とベタメタゾンジプロピオン酸エステルとの併用作用を *in vitro* で検討した。また、カルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの各単剤での安全性薬理試験を経口投与で実施した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

尋常性乾癬は Th1/Th17 細胞が深く関与していると考えられている慢性炎症皮膚疾患である [14]。ヒト Th1/Th17 細胞の分化及び活性化バイオマーカーに対するカルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及び両剤併用の作用を培養上清中の Th1/Th17 サイトカイン産生量の測定により *in vitro* で検討した（報告書番号 REP-PAL-2014-01、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料）。試験は 6 例の健康ドナーの末梢血から分離した T 細胞を用いた。薬剤は Th1/Th17 細胞分化及び活性化に対する作用を検討するため、T 細胞培養開始時及び分化後にそれぞれ添加した。カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの濃度は、それぞれ 100 nmol/L 及び 1 µmol/L とした。

結果を表 2.4- 5 及び表 2.4- 6 に示す。データは溶媒群に対する%として示した。カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルは、いずれも Th1/Th17 細胞の分化及び活性化を溶媒と比較して有意に抑制した。また、両剤併用は Th1/Th17 細胞の分化及び活性化を溶媒と比較して有意に抑制し、その抑制作用はカルシポトリオール又はベタメタゾンジプロピオン酸エステル単独投与と比較して有意に強かった。これらの結果から、カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの併用は、乾癬の発症に深く関与していると考えられる Th1/Th17 細胞分化及び活性化を単独投与と比較してより強く抑制することが示された。

表 2.4-5 カルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及び
両剤併用の Th1/Th17 細胞分化に対する作用（分化前処理）

	溶媒群に対する活性（％）		
	カルシポトリオール ¹⁾	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル ²⁾	両剤併用 ³⁾
Th17 サイトカイン			
IL-22	2.05±0.42**	34.2±4.6**	0.83±0.42**, ††
IL-17A	16.9±4.1**	25.4±2.7**	6.84±1.7**, †, ††
Th1 サイトカイン			
TNFα	46.2±2.5**	69.4±11.1**	19.8±4.4**, †, ††
IFNγ	37.0±5.2**	86.0±8.4	24.3±3.3**, ††

平均値±標準誤差（n=6）

1) カルシポトリオール 100 nmol/L、2) ベタメタゾンジプロピオン酸エステル 1 μmol/L、3) カルシポトリオール 100 nmol/L + ベタメタゾンジプロピオン酸エステル 1 μmol/L

**p<0.01 vs. 溶媒群（一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定）

#p<0.05 及び †p<0.01 両剤併用群 vs. カルシポトリオール群（一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定）

††p<0.01 両剤併用群 vs. ベタメタゾンジプロピオン酸エステル群（一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定）

< 報告書番号 REP-PAL-2019-01 Appendix 1 Table 1 及び 2 >

表 2.4-6 カルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及び
両剤併用の Th1/Th17 細胞分化に対する作用（分化後処理）

	溶媒群に対する活性（％）		
	カルシポトリオール単独 ¹⁾	ベタメタゾンジプロピオン酸エステル単独 ²⁾	両剤併用 ³⁾
Th17 サイトカイン			
IL-22	40.1±1.7**	60.5±4.2**	27.9±1.1**, ††, †††
IL-17A	68.8±3.2**	63.3±2.1**	43.2±2.1**, ††, †††
Th1 サイトカイン			
TNFα	90.0±4.7	68.8±6.7**	58.2±8.2**, †††
IFNγ	83.8±4.8	92.2±4.8	68.8±6.1**, ††

平均値±標準誤差（n=6）

1) カルシポトリオール 100 nmol/L、2) ベタメタゾンジプロピオン酸エステル 1 μmol/L、3) カルシポトリオール 100 nmol/L + ベタメタゾンジプロピオン酸エステル 1 μmol/L

**p<0.01 vs. 溶媒群（一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定）

#p<0.05 及び †p<0.01 両剤併用群 vs. カルシポトリオール群（一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定）

†p<0.05 及び ††p<0.01 両剤併用群 vs. ベタメタゾンジプロピオン酸エステル群（一元配置分散分析後、Tukey 多重比較検定）

< 報告書番号 REP-PAL-2019-01 Appendix 1 Table 3 及び 4 >

2.4.2.2 副次的薬理試験

線維芽細胞及び角化細胞での I 型プロコラーゲン、MMP-1、MMP-3 及びヒアルロン酸産生量を指標として、カルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及び両剤併用時の皮

膚萎縮作用を *in vitro* で検討した（報告書番号 REP-HND-20-03、添付資料 4.2.1.2.1、参考資料）。カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステル濃度は、それぞれ 100 nmol/L 及び 1 µmol/L とした。

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは線維芽細胞の I 型プロコラーゲン、MMP-1 及びヒアルロン酸産生並びに角化細胞の MMP-1、MMP-3 及びヒアルロン酸産生を溶媒と比較して有意に抑制し、これまでの公表論文と一致した結果が得られた [15、16]。一方、カルシポトリオールは線維芽細胞の I 型プロコラーゲン及び MMP-3 並びに角化細胞の MMP-1、MMP-3 及びヒアルロン酸産生を溶媒と比較して有意に増加させた。これらの結果から、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルで誘発される皮膚萎縮バイオマーカーの変化はカルシポトリオール併用により拮抗されることが示唆された。

2.4.2.3 安全性薬理試験

LEO 90105 を用いた安全性薬理試験は実施しなかったが、各有効成分の単剤での安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。なお、本剤は経皮投与であるが、経皮投与では吸収性が低いため安全性薬理試験は経口投与で実施し、有効成分の適切な全身曝露下でそれぞれの作用を検討した。

2.4.2.3.1 カルシポトリオール水和物の安全性薬理試験

ラット及びイヌに投与されたカルシポトリオール水和物の最高経口用量はヒト最高局所用量（カルシポトリオール（無水物）として約 10.7 µg/kg/day）のそれぞれ約 10 倍及び約 0.5 倍であった。イヌはビタミン D 誘導毒性に対して感受性を有することが知られているため、低めの経口用量を設定した。

結果を表 2.4-7 に示した。カルシポトリオールの中樞神経系、心血管系及び呼吸系といった生理機能に対する潜在的な望ましくない薬力学的作用はみられなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価 ドボベツト®軟膏

表 2.4-7 カルシボトリオール水和物の安全性薬理試験成績一覧

試験対象	試験方法	試験系	投与量 (投与経路)	試験成績	報告書番号 (添付資料)
中枢神経系					
一般症状及び 行動観察	Irwin 法	Wistar ラット (覚醒) / 各 群雄 8 匹	8、40、 200 µg/kg (経口投与)	いずれの用量にお いても有意な作用 なし。	20040440PGR (4.2.1.3.1)
心血管系					
心血管系パラ メータ	テレメトリー 法及び 6 誘導 心電図	ビーグル犬 (覚醒) / 雌 雄各 3 匹	0.5、1.5、 5 µg/kg (6 誘導心電 図は 5 µg/kg の み) (経口投与)	いずれの用量にお いても有意な作用 なし。	20030645PCC (4.2.1.3.2)
呼吸系					
呼吸系パラメ ータ	全身プレチス モグラフィ	Wistar ラット (覚醒) / 各 群雄 8 匹	10、30、 100 µg/kg (経口投与)	いずれの用量にお いても有意な作用 なし。	20030646PCR (4.2.1.3.3)

2.4.2.3.2 ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの安全性薬理試験

ラット及びイヌに投与されたベタメタゾンジプロピオン酸エステルの最高経口用量は、mg/kg に換算するとヒト最高局所用量（約 138 µg/kg/day）の約 15 倍であった。

結果を表 2.4- 8 に示した。ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの中枢神経系、心血管系及び呼吸系といった生理機能に対する潜在的な望ましくない薬力学的作用はみられなかった。

表 2.4- 8 ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの安全性薬理試験成績一覧

試験対象	試験方法	試験系	投与量 (投与経路)	試験成績	報告書番号 (添付資料)
中枢神経系					
一般症状及び 行動観察	Irwin 法	Wistar ラット (覚醒) / 各 群雄 8 匹	0.2、0.6、 2 mg/kg (経口投与)	いずれの用量にお いても有意な作用 なし。	20040441PGR (4.2.1.3.4)
心血管系					
心血管系パラ メータ	テレメトリー システム及び 6 誘導心電図	ビーグル犬 (覚醒) / 雌 雄各 3 匹	0.2、0.6、 2 mg/kg (6 誘導心電 図は 2 mg/kg の み) (経口投与)	いずれの用量にお いても有意な作用 なし。	20030647PCC (4.2.1.3.5)
呼吸系					
呼吸系パラメ ータ	全身プレチス モグラフィ	Wistar ラット (覚醒) / 各 群雄 8 匹	0.2、0.6、 2 mg/kg (経口投与)	いずれの用量にお いても有意な作用 なし。	20030648PCR (4.2.1.3.6)

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

健康被験者でのカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの経皮吸収率はいずれも 1%未満であり（報告書番号 MCB 9901 NL [2.7.2.2.1 項]）、臨床投与経路が経皮投与であることから薬物相互作用試験の必要性はないと判断し、実施しなかった。

2.4.3 薬物動態試験

LEO 90105 の薬物動態試験ではラット及びミニブタでの LEO 90105（カルシポトリオール／ベタメタゾン：50/500 µg/g）経皮投与後の吸収、分布及び排泄試験、ミニブタでの *in vivo* 代謝試験並びに LEO 90105 有効成分の肝 S9 分画による *in vitro* 代謝試験を実施した。また、ミニブタでの反復経皮投与時の TK 試験の結果を反復投与時の PK 評価に使用した。

2.4.3.1 分析法

非標識体：血清中カルシポトリオール、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル及びベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルの定量法として LC-MS/MS 法を確立した（報告書番号 VR/04/05、添付資料 4.2.2.1.1、評価資料；報告書番号 VR/02/13、添付資料 4.2.2.1.2、評価資料；報告書番号 VR/08/07、添付資料 4.2.2.1.3、評価資料；報告書番号 VR/04/03、添付資料 4.2.2.1.4、評価資料；報告書番号 VR/08/06、添付資料 4.2.2.1.5、評価資料；報告書番号 VR/03/01、添付資料 4.2.2.1.6、評価資料；報告書番号 KLM0074、添付資料 4.2.2.1.7、評価資料）。血清試料は固相抽出法で前処理を行った。固相抽出後の溶出液を窒素気流下乾固し、残渣を移動相で再溶解後、LC-MS/MS にて測定した。分析カラムに C8 カラム、移動相に 2 mmol/L の酢酸アンモニウム又は酢酸リチウムを含むメタノールを用い、グラジェント法で分離した。測定には PE Sciex API 3000 又は API4000 MS/MS を使用し、ターボイオン Sprey のポジティブイオンモードで検出した。いずれの化合物ともにアンモニウムアダクトイオン又はリチウムアダクトイオンを検出した。

各定量法のバリデーション結果や試料中での安定性については 2.6.4.2.2 項に詳述している。

標識体：カルシポトリオールの標識体については [REDACTED] を ³H 標識した ³H-カルシポトリオールを使用した。また、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの標識体は [REDACTED] を ³H 標識した ³H-ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを使用した。

組織中放射能の測定には液体シンチレーションカウンターを用い、代謝物の分析にはラジオ HPLC を用いた。

2.4.3.2 吸収

SD ラットに ³H 標識体併用静脈内投与（³H-カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン

酸エステル又は ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル／カルシポトリオール）及び ^3H 標識 LEO 90105 (^3H -カルシポトリオール又は ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル含有 LEO 90105) を経皮投与し、投与後の放射能の血清中濃度推移を検討した（報告書番号 205018、添付資料 4.2.2.2.1、評価資料）。

^3H 標識体併用静脈内投与では ^3H -カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与後の放射能の $C_{\max}$ は雌雄でそれぞれ 53 及び 438 ng eq./g、 $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ 1005 及び 2362 ng eq.・h/g であり、曝露量に性差がみられた。また、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル／カルシポトリオール投与後の放射能の $C_{\max}$ は雌雄でそれぞれ 823 及び 513 ng eq./g、 $AUC_{0-\infty}$ は 1545 及び 1062 ng eq.・h/g であった。なお、 ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与及び ^3H 標識体併用静脈内投与後の AUC_{0-t} から算出したバイオアベイラビリティは、 ^3H -カルシポトリオールで雌雄それぞれ 6%及び 3%、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルで 10%及び 7%で、いずれも雄より雌で若干高かった。この差は雌雄における生理学的な違いに起因していると考えられた。また、静脈内及び経皮投与後の放射能排泄率から算出した ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの経皮吸収率は、雌雄平均値でそれぞれ 10.6%及び 8.2%であった。 ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与後の ^3H -カルシポトリオールの $t_{\max}$ は 48 時間、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの $t_{\max}$ は 8 時間であり、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルに比べてカルシポトリオールの経皮吸収は緩慢であると考えられた。

Göttingen ミニブタに ^3H 標識体併用静脈内投与及び ^3H 標識 LEO 90105 を経皮投与し、投与後の放射能及び未変化体の血清中濃度推移を検討した（報告書番号 AME/03/01、添付資料 4.2.2.2.2、評価資料）。 ^3H 標識体併用静脈内投与では ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与後の血清中総放射能濃度推移はいずれも雌雄で類似していた。 ^3H -カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与後の放射能の $AUC_{0-\infty}$ は、雌雄でそれぞれ 4.32 及び 4.21 ng eq.・h/mL であった。未変化体カルシポトリオールの $AUC_{0-\infty}$ は雌雄でそれぞれ 2.30 及び 2.11 ng eq.・h/mL、 $t_{1/2}$ はいずれも 0.66 時間であり、代謝が速やかであることが示唆された。また、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル／カルシポトリオール投与後の $AUC_{0-\infty}$ は雌雄でそれぞれ 30.39 及び 45.24 ng eq.・h/mL であった。ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは投与初期にのみ定量可能で消失が速く、薬物動態パラメータを求めることはできなかった。 ^3H 標識 LEO 90105 の経皮投与では ^3H -カルシポトリオール含有 LEO 90105 投与後の血清中放射能濃度にほとんど上昇はみられず、未変化体濃度は全て定量限界未満 (<61 pg/mL) であった。また、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル含有 LEO 90105 投与後の血清中放射能濃度は経時的に上昇したが、未変化体濃度は全て定量限界未満 (<500 pg/mL) であった。 ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与後の放射能排泄率を ^3H 標識体併用静脈内投与後の排泄率で補正して算出した ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの吸収率は、雌雄平均でそれぞれ 2.12%及び 3.31%であった。

Göttingen ミニブタでの TK 試験では LEO 90105 を 1/10、5/50 及び 25/250 µg/kg/day（カルシポトリオール／ベタメタゾン）で 4 週間及び 9 ヶ月間経皮投与した毒性試験において、それぞれ投与第 14 日（報告書番号 TK/02/02、添付資料 4.2.2.2.3、評価資料）及び投与第 8 週（報告書番号 48576、資料添付 4.2.3.2.6、評価資料）に血清中濃度を測定した。LEO 90105 の 14 日間反復経皮

投与後の血清中カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステル濃度は、いずれの測定時点でも定量限界未満であった。また、投与第 8 週（51 日目）に実施した測定ではいくつかの試料でベタメタゾンジプロピオン酸エステルが定量されたが、最高で 30 pg/mL であった（ジプロピオン酸エステルの定量限界：20 pg/mL）。

2.4.3.3 分布

SD（白色）及び Lister Hooded（有色）ラットでの ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与後の分布試験を実施した（報告書番号 205018、添付資料 4.2.2.2.1、評価資料）。

白色ラットでの組織内放射能濃度は ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルともに塗布部位で最も高い放射能を認めたが、投与 3 時間後以降（特に 6 時間後の拭き取り以降）、120 時間までに減少した。その他の組織では ^3H -カルシポトリオールは肝臓、副腎、ハーダー腺、小腸、小腸内容物及び大腸内容物に高い放射能がみられた。 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは肝臓、脳下垂体、小腸、大腸、小腸内容物及び大腸内容物で高い放射能がみられた。また、いずれの薬剤においても全ての組織及び測定時点において、放射能濃度は雄より雌で高い傾向が認められた。

有色ラットを用いた ^3H 標識体併用静脈内投与後の分布試験ではいずれの薬剤においても肝臓で最も高い放射能が認められた。眼球や有色皮膚での残留性はみられなかった。

2.4.3.4 代謝

ミニブタでの ^3H 標識体併用静脈内投与後の代謝を確認する *in vivo* 試験を実施した（報告書番号 AME/03/01、添付資料 4.2.2.2.2、評価資料）。また、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ及びヒトの肝 S9 分画を用いて ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの代謝プロファイルを *in vitro* で検討した（報告書番号 MET/03/01、添付資料 4.2.2.4.1、評価資料）。

Göttingen ミニブタでの *in vivo* 試験では ^3H 標識体併用静脈内投与後の ^3H -カルシポトリオールの血清中主要代謝物は MC1080 であり、投与後 1～2 時間に最高濃度が検出された。尿中代謝物については未変化体、MC1080、MC1046 及び MC1235 は検出されず、MC1204 と考えられるピークが検出されたが、その割合は総放射能の約 5%であった。また、 β -グルクロニダーゼ/スルファターゼ処理により代謝パターンに変化は認められなかった。 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルについては血清中主要代謝物としてベタメタゾン-17-プロピオン酸エステル又はベタメタゾン-21-プロピオン酸エステルと考えられるピークが検出された。尿中に未変化体は検出されず、ラジオ HPLC においてベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルの溶出位置付近に代謝物が検出されたが、その割合は総放射能の 4%未満であった。また、尿中にグルクロン酸抱合体が排泄されていることが示唆された。

In vitro 代謝試験ではマウス以外の ^3H -カルシポトリオールの代謝安定性は非常に低く、代謝安定性に種差はみられなかった。7 種類の代謝物（MET1～4、MC1204、MC1046 及び MC1080）が

検出され、主要代謝物は MC1046 及び MC1080 であった。また、ミニブタにのみ MET3 が検出された。ヒトにおける主要代謝物は MC1046、MC1080 及び MC1204 であった。ベタメタゾンジプロピオン酸エステル共存下における ^3H -カルシポトリオール代謝速度は非共存下に比べて低かった。 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの代謝安定性はさらに低く、全ての動物種においてインキュベーション 5 分で ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは消失した。代謝プロファイルは全ての動物種で類似しており 4 種類の代謝物が検出され、主要代謝物はベタメタゾン-17-プロピオン酸エステル及び MET2 であった。カルシポトリオール共存下と非共存下で代謝速度に差はみられなかった。

2.4.3.5 排泄

SD ラットに ^3H 標識体併用静脈内投与及び ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与し、投与後の尿・糞中排泄を検討した（報告書番号 205018、添付資料 4.2.2.2.1、評価資料）。 ^3H 標識体併用静脈内投与では投与後 120 時間までに、 ^3H -カルシポトリオール投与で雌雄の尿中にそれぞれ投与放射能の 6.11%及び 4.49%、糞中に 71.55%及び 83.76%、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与で雌雄の尿中にそれぞれ 14.44%及び 20.56%、糞中に 69.27%及び 72.91%が排泄された。また、 ^3H 標識 LEO 90105 の経皮投与では投与後 120 時間までに、 ^3H -カルシポトリオール投与で雌雄の尿中にそれぞれ投与放射能の 0.39%及び 0.25%、糞中に 6.38%及び 4.46%、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与で雌雄の尿中にそれぞれ 0.66%及び 1.23%、糞中に 4.06%及び 6.52%が排泄された。以上のように、ラットにおける ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの主排泄経路はいずれも糞中排泄であった。

Göttingen ミニブタに ^3H 標識体併用静脈内投与及び ^3H 標識 LEO 90105 を経皮投与し、投与後の尿・糞中排泄を検討した（報告書番号 AME/03/01、添付資料 4.2.2.2.2、評価資料）。 ^3H 標識体併用静脈内投与では投与後 120 時間までに、 ^3H -カルシポトリオール投与で雌雄の尿中にそれぞれ投与放射能の 13.94%及び 19.35%、糞中に 46.12%及び 45.83%、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与で雌雄の尿中にそれぞれ 41.75%及び 42.87%、糞中に 24.16%及び 23.71%が排泄された。また、 ^3H 標識 LEO 90105 の経皮投与では投与後 120 時間までに、 ^3H -カルシポトリオール投与で雌雄の尿中にそれぞれ投与放射能の 0.47%及び 0.85%、糞中に 0.43%及び 0.68%、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル投与で雌雄の尿中にそれぞれ 1.35%及び 0.98%、糞中に 0.73%及び 0.45%が排泄された。以上のように、ミニブタにおいては ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの主排泄経路はそれぞれ糞中及び尿中排泄であった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

健康被験者でのカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの経皮吸収率はいずれも 1%未満であり（報告書番号 MCB 9901 NL [2.7.2.2.2.1 項]）、臨床投与経路が経皮投与であることから、薬物相互作用試験の必要性はないと判断し、実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

LEO 90105 を用いた毒性試験として経皮投与による反復投与毒性試験並びに局所刺激性試験を実施した。カルシポトリオール水和物を用いた毒性試験としてがん原性及び光がん原性並びに光安全性試験を実施した。また、カルシポトリオール水和物の不純物（類縁物質）である^{不純物A*}のラット単回投与毒性試験を実施した。さらに、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを用いた毒性試験として遺伝毒性、反復投与毒性、生殖発生毒性及びがん原性試験を実施した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

LEO 90105 を用いた単回投与毒性試験は実施していないが、カルシポトリオール（無水物）及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルそれぞれ単剤で実施された試験が報告されており、これらの結果で評価可能である [17、18]。これらの試験で LEO 90105 の経皮投与に懸念される急性毒性は示唆されない。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

(1) LEO 90105 を用いた試験

LEO 90105 の反復投与毒性試験としてマウス及びミニブタを用いた経皮投与試験を実施した。

マウスでは 10 日間（報告書番号 TTOX0010、添付資料 4.2.3.2.1、参考資料）、4 週間（報告書番号 LOP0051、添付資料 4.2.3.2.2、参考資料）及び 13 週間反復経皮投与試験（報告書番号 LOP0058、添付資料 4.2.3.2.3、評価資料及び報告書番号 TK/04/01、添付資料 4.2.3.2.4、評価資料）を実施した。

10 日間投与試験では雌性 NMRI マウスに LEO 90105（カルシポトリオール／ベタメタゾン：50/500 µg/g）又は基剤を 0.1 g/day の投与容量（体重 30 g でカルシポトリオール 167 µg/kg 及びベタメタゾン 1.67 mg/kg に相当）で背部皮膚に非閉塞投与した。その結果、体重減少、血液学的検査値変動及び病理所見が観察された。2 匹のマウスを投与 5 日及び投与 8 日に、残りのマウスも倫理的理由から投与 11 日に切迫屠殺した。所見の大半はベタメタゾンジプロピオン酸エステルの薬理作用に関連した所見であった。本製剤の濃度での長期投与は毒性所見のタイプ及び重症度から不可能と考えられた。

4 週間投与試験では雌性 CD-1 マウスに 0/0、0.4/4、2/20 及び 10/100 µg/g（カルシポトリオール／ベタメタゾン）の濃度に調製した LEO 90105 を投与容量 0.1 mL/匹で 1 日 1 回背部皮膚に非閉塞投与した（体重を 30 g としたとき 0/0、1.3/13.3、6.7/66.7 及び 33/333 µg/kg/day に相当）。その結果、高用量群で投与部位皮膚に病理変化を引き起こした。また、顕著な体重増加抑制、重度の血液学的変化及び病理変化に一致した脾臓、胸腺及び副腎重量への明らかな影響が認められた。また、中間用量群で脾臓及び胸腺の萎縮がそれぞれ 1 匹に観察され、続く 13 週間経皮投与試験で用いる最高濃度は 2/20 µg/g（6.7/66.7 µg/kg/day 相当）に設定すべきと結論した。

13 週間投与試験では雌雄 CD-1 マウスに 0/0、0.125/1.25、0.5/5、2/20 µg/g（カルシポトリオール

ル／ベタメタゾン）の濃度に調製した LEO 90105 を、投与容量 0.1 mL/匹で 1 日 1 回背部皮膚に非閉塞投与した（体重を 30 g としたとき 0/0、0.42/4.17、1.67/16.67、6.67/66.67 $\mu\text{g/kg/day}$ に相当）。その結果、高用量群で、体重増加抑制、血液学的検査値の変動及び臓器重量（脾臓、胸腺及び副腎）への影響を示し、脾臓及び胸腺については病理組織学的変化を伴った。低及び中間用量群でも作用は弱いながらも体重への影響が認められたが、これらの用量群に毒性学的に意義ある血液学的検査値の変動、臓器重量及び病理所見は観察されなかった。したがって、本試験の NOAEL は雄で 0.125/1.25 $\mu\text{g/g}$ （0.42/4.17 $\mu\text{g/kg/day}$ 相当）、雌で 0.125/1.25 $\mu\text{g/g}$ （0.42/4.17 $\mu\text{g/kg/day}$ 相当）未満と判断した。投与第 4 週に実施した TK 評価ではいずれの血清試料からもカルシポトリオールは検出されず、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは定量限界未満（<88 pg/mL）であった。しかし、代謝物のベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルは全投薬群の大半の試料で定量可能であった（ ≥ 175 pg/mL）。ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルは投与 3 時間後に $C_{\max}$ に達し、全投薬群で雄と比較して雌で $C_{\max}$ 及び AUC が約 3 倍高値であった。 $C_{\max}$ 及び AUC は投与量に比例して増加し、半減期は約 2.8 時間であった。

ミニブタを用いた 4 週間（報告書番号 TTOX0202、添付資料 4.2.3.2.5、評価資料及び報告書番号 TK/02/02、添付資料 4.2.2.2.3、評価資料）及び 9 ヶ月間（報告書番号 48576、添付資料 4.2.3.2.6、評価資料）反復経皮投与試験を実施した。

4 週間投与試験では雌雄 Göttingen ミニブタに 2/20、10/100 及び 50/500 $\mu\text{g/g}$ （カルシポトリオール／ベタメタゾン）の濃度に調製した LEO 90105 を投与容量 0.5 g/kg とし、0/0（基剤）、1/10、5/50 及び 25/250 $\mu\text{g/kg/day}$ の用量で 1 日 1 回背部に閉塞塗布した。その結果、高用量群で皮膚刺激性を示したが、全身毒性はみられなかった。局所変化に関する NOAEL は 10/100 $\mu\text{g/g}$ （5/50 $\mu\text{g/kg/day}$ 相当）、全身毒性に関する NOAEL は 50/500 $\mu\text{g/g}$ （25/250 $\mu\text{g/kg/day}$ 相当）であった。投与第 14 日に実施した TK 評価ではいずれの血清試料もカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステル濃度は定量限界未満（カルシポトリオール：<40 pg/mL、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル：<20 pg/mL）であった。

9 ヶ月間投与試験では雌雄 Göttingen ミニブタに 2/20、10/100 及び 50/500 $\mu\text{g/g}$ （カルシポトリオール／ベタメタゾン）の濃度に調製した LEO 90105 を投与容量 0.5 g/kg、用量 0/0（基剤）、1/10、5/50 及び 25/250 $\mu\text{g/kg/day}$ で 1 日 1 回背部に閉塞塗布した。その結果、5/50 $\mu\text{g/kg/day}$ 以上の用量で投与部位に紅斑を認めた。皮膚刺激性に関する NOAEL は 1/10 $\mu\text{g/kg/day}$ と考えられた。高用量群で認められた投薬に関連したカルシウム及びリン酸塩の尿中濃度の上昇はカルシポトリオールの薬理作用に関連した所見と考えられた。一方、中間用量群以上で認められた副腎重量の低下及び皮膚萎縮はベタメタゾンの薬理作用に関連した所見と考えられた。局所に関する NOAEL は 1/10 $\mu\text{g/kg/day}$ 未満、全身毒性の NOAEL は 1/10 $\mu\text{g/kg/day}$ と判断される。投与第 8 週に実施した TK 評価ではほとんどの血清試料でカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルは定量限界未満（それぞれ<40 pg/mL 及び<20 pg/mL）か、定量限界に近かった。中間及び高用量群のいくつかの試料ではベタメタゾンジプロピオン酸エステルが定量可能であったが、その値は定量限界に近似していた。

(2) ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを用いた試験

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの評価にはマウス及びラットを使用した。

マウスでは 13 週間反復経皮投与試験（報告書番号 LOP051、添付資料 4.2.3.2.7、評価資料）を実施した。雌雄 CD-1 マウスにベタメタゾンジプロピオン酸エステルをベタメタゾンとして 1、3、10 及び 30 µg/g の濃度に軟膏基剤を用いて調製し、1 日 1 回 0.1 g/匹を背部皮膚に非閉塞塗布した（体重 30 g としたとき、3.3、10、33.3 及び 100 µg/kg/day に相当）。その結果、33.3 µg/kg/day 投与群以上で毛の成長抑制が観察された。10 µg/kg/day 群以上の雌及び 33.3 µg/kg/day 群以上の雄で体重増加抑制が観察された。血液学的検査では 10 µg/kg/day 群以上の雄及び 33.3 µg/kg/day 群以上の雌で単球数の高値がみられ、33.3 µg/kg/day 群以上で赤血球パラメーターの高値、好中球数の高値を示した。100 µg/kg/day 群ではリンパ球数の低値がみられた。臓器重量検査では 100 µg/kg/day 群で腎臓重量の増加が観察され、33.3 µg/kg/day 群以上で脾臓及び胸腺重量の低下が認められた。剖検では脾臓の萎縮（33.3 µg/kg/day 群以上の雄及び 100 µg/kg/day 群の雌）、胸腺の萎縮（33.3 µg/kg/day 群以上の雌）及び前胃上皮面の単陥没（主に食道溝）（100 µg/kg/day 群以上の雌雄）が認められた。病理組織学的検査では赤脾髄の細胞充実性低下（33.3 µg/kg/day 群以上の雄及び 100 µg/kg/day 群の雌）及び髄外造血の低下（100 µg/kg/day 群の雌）がみられた。100 µg/kg/day 群の雌雄で胸腺皮質及び髄質の細胞充実性低下が観察され、33.3 µg/kg/day 群の雌 1 匹にも胸腺髄質の細胞充実性低下が認められた。100 µg/kg/day 群の雄では涙腺のリンパ球凝集の頻度低下がみられた。以上のように、10 µg/kg/day 以上の投与で体重増加抑制及び臨床検査値の変動が観察され、NOAEL は 3.3 µg/kg/day と判断した。投与第 13 週に実施した TK 評価ではベタメタゾンジプロピオン酸エステルの主要代謝物であるベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルが全ての投薬群の動物から定量（≥175 pg/mL）されたが、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは定量限界未満（<88 pg/mL）であった。雌の血清中ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステル濃度は雄の 2～3 倍を示した。

ラットでは 4 週間（報告書番号 TTOX0208、添付資料 4.2.3.2.8、評価資料）及び 13 週間（報告書番号 TTOX0301、添付資料 4.2.3.2.9、評価資料）反復経口投与試験を実施した。

4 週間試験では雌雄 SD ラットに 0.02、0.06 及び 0.2 mg/kg/day のベタメタゾンジプロピオン酸エステルを投与容量 10 mL/kg で 1 日 1 回、経口投与した。その結果、軽度の用量関連性の体重増加抑制が全投薬群の雌及び高用量群の雄で観察された。摂餌量低下が全投薬群の雌で用量依存的に観察されたが、雄では明らかでなかった。白血球数の減少が中間及び高用量群の雌雄で観察された。同群で軽度のリンパ球数減少及びリンパ球数減少ほど明確ではないが好酸球数減少も認められた。胸腺の絶対及び相対重量が全投薬群で用量依存的に観察された。中間及び高用量群では脾臓の絶対及び相対重量も用量依存的に低下した。病理組織学的検査では高用量群（0.2 mg/kg/day）で胸腺の細胞充実性低下並びに下顎及び腸間膜リンパ節の活動性低下が観察された。胸腺の所見は中間用量群の雌 1 匹にも観察された。本試験で観察された所見の大半はベタメタゾンの薬理効果である免疫抑制作用に関連した所見と考えられた。以上のように、低用量から体重増加抑制、摂餌量低下及び胸腺重量の低下が観察されたため、NOAEL は算出できなかった（0.02 mg/kg/day 未満）。

13 週間試験では雌雄 Wistar Han ラットに 0.02、0.06 及び 0.2 mg/kg/day のベタメタゾンジプロ

ピオン酸エステルを 1 日 1 回経口投与した。その結果、用量関連性の体重増加抑制が全投薬群の雌並びに中間及び高用量群の雄で観察された。リンパ球数減少を伴う白血球数の減少が中間及び高用量群の雌雄で観察され、好酸球減少が中間及び高用量群の雌並びに高用量群の雄で観察された。用量に関連した胸腺の相対重量低下が全投薬群の雌並びに中間及び高用量群の雄で観察された。より軽度であったが同様の臓器重量変化が脾臓でも認められた。病理組織学的検査では高用量群で脾臓（リンパ球枯渇）、胸腺（皮質萎縮）並びに下顎及び腸間膜リンパ節（リンパ球過形成／枯渇）といったリンパ組織に所見が観察された。本試験で観察された所見の大半はベタメタゾンの薬理効果である免疫抑制作用に関連した所見と考えられた。脾臓及び胸腺の病理所見はそれらの典型的な反応である。これらの変化は血液学的検査及び臓器重量にも関連している。以上のように、低用量から体重増加抑制及び胸腺重量の低下が観察されたため、NOAEL は算出できなかった（0.02 mg/kg/day 未満）。投与第 7 日に実施した TK 評価ではベタメタゾンジプロピオン酸エステルの主要代謝物であるベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルが全投薬群の動物で定量（ ≥ 125 pg/mL）されたが、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは定量限界未満（ < 75 pg/mL）であった。雌の血清中ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステル濃度は雄の約 7 倍高値を示した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの遺伝毒性試験として細菌を用いた復帰突然変異試験（報告書番号 339/84、添付資料 4.2.3.3.1.1、評価資料）、マウスリンフォーマ *tk* 試験（報告書番号 339/86、添付資料 4.2.3.3.1.2、評価資料）及び *in vivo* ラット骨髄小核試験（報告書番号 339/85、添付資料 4.2.3.3.2.1、評価資料）を実施した。その結果、いずれの試験においてもベタメタゾンジプロピオン酸エステルは遺伝毒性を示さなかった。カルシポトリオールに遺伝毒性は認められていない [19]。

2.4.4.4 がん原性試験

LEO 90105 を用いたがん原性試験は実施していないが、カルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルそれぞれ単剤での経皮投与並びに経口投与試験を実施した。

(1) カルシポトリオールを用いた試験

雌雄 CD-1 マウスにカルシポトリオール液剤を 1 日 1 回 24 ヶ月間経皮投与した（報告書番号 01-2731、添付資料 4.2.3.4.1.2、評価資料）。カルシポトリオールは 0.75、2.5 及び 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の液剤を調製し、投与容量 100 μL /匹で投与した（体重 25 g としたとき、3、10 及び 30 $\mu\text{g/kg/day}$ に相当）。その結果、概して忍容性は良好であった。生存率は 10 及び 30 $\mu\text{g/kg/day}$ 群の雄で軽度低下した。投薬に関連した非腫瘍性病変として 10 及び 30 $\mu\text{g/kg/day}$ 群の雄の腎臓に腎盂拡張頻度上昇及び腎皮質尿細管の好塩基性化（上皮細胞の変性及び再生を反映）が認められた。これ

らの群では腎盂拡張に付随して膀胱の拡張の頻度増加が観察された。しかし、膀胱の拡張は 3 µg/kg/day 群の雄及び基剤対照群でも高頻度であった。30 µg/kg/day 群の雌では近位尿細管の拡張が観察された。雄ではこれらの変化は閉塞性尿路疾患の一部であり、10 及び 30 µg/kg/day 群の雄での死亡率上昇の主な原因と考えられた。30 µg/kg/day 群の雄に心筋の鉍質沈着が観察された。これらはカルシポトリオール薬理作用の結果と考えられる。本剤にがん原性は認められなかった。TK 評価 (30 µg/kg/day 群の投与 11 ヶ月後並びに 3 及び 10 µg/kg/day 群の投与 22 ヶ月後に実施) ではいずれの血清試料もカルシポトリオールは定量限界未満 (<60 pg/mL) であった。

経口投与試験では雌雄 Wistar Han ラットにカルシポトリオール水和物を 104 週間投与した (報告書番号 KLM0053、添付資料 4.2.3.4.1.4、評価資料)。投与量は 0、1、5 及び 15 µg/kg/day を設定したが、高用量群の雌で毒性所見が発現したため、第 71 週に 15 µg/kg/day から 10 µg/kg/day に引き下げた。高用量群雌では残りの投与期間に死亡率が上昇したため、生存動物数が 20 匹となった第 92 週に投与を中止した。高用量群雌の生存動物数が 15 匹となった第 102 週に全群の雌を屠殺した。高用量群雌の生存率は低下したが、その他の群の死亡率は対照群と同程度であった。投薬群の雄の生存率は投与に影響されなかった。高用量群で体重増加抑制及び摂餌量低下が観察された。また、低用量群から投薬に関連した臨床検査値の変動が観察された。病理組織学的検査では全ての投薬群でカルシポトリオール薬理作用 (高カルシウム血症) に起因した様々な影響が認められた。投薬に関連した腫瘍性病変として甲状腺の C 細胞腫瘍 (主に腺腫) の頻度増加が中間用量群以上の雌及び高用量群の雄で観察され、同時に高用量群の雄に副腎の良性褐色細胞腫の頻度増加が観察された。これらの病変はカルシポトリオール薬理作用に関連すると考えられたが、カルシポトリ奥ールの健康被験者における経皮吸収率は投与量の 1%未満 (報告書番号 MCB 9901 NL [2.7.2.2.1 項]) と低く、ヒトでのリスクはないと考えられた。また、非腫瘍性病変として主に種々の組織での鉍質沈着、高カルシウム血症に関連した副腎、甲状腺、肝臓、心臓及び脾臓での変化が用量依存的に観察され、高用量群の雌では高い死亡率が認められ、有害と判断した。低用量群では非腫瘍性病変の発現頻度は低く、本質的に有害作用はないと考えられた。投与第 26 週に実施した TK 評価ではカルシポトリオール及び代謝物の MC1080 のいずれも 1 及び 5 µg/kg/day 群の動物から採取した試料の血清中濃度は概して定量限界未満 (カルシポトリオール : <120 pg/mL、MC1080 : <200 pg/mL) であった。15 µg/kg/day 群では雌の全身曝露は雄より高値であった (カルシポトリオールで約 1.6 倍、MC1080 で約 1.4 倍)。また、代謝物の濃度はカルシポトリ奥ールの雄で 5.3、雌で 4.0 倍であった。

光がん原性試験では雌雄 SKH1 アルビノヘアレスマウスにカルシポトリオールを週 5 日、40 週間経皮投与した (報告書番号 1202-031、添付資料 4.2.3.4.1.6、評価資料)。カルシポトリオールは 0.75、2.5 及び 7.5 µg/mL 濃度の液剤を調製し、投与容量 100 µL/匹で投与した (体重 25 g としたとき、3、10 及び 30 µg/kg/day に相当)。基剤対照群及び投薬群には MED (minimal erythema dose、最小紅斑量) の 1.5 倍の UV 光 (UVA 及び UVB) を週 5 日照射した。さらに、無処置対照群を設定し、MED の 1.5 倍又は 3.0 倍量 (600 又は 1200 Robertson-Berger Units (RBU)/週) の UV を同様に照射した。投与終了後、12 週間の観察期間を設定した。カルシポトリオール液剤の経皮投与により、全投薬群の雌雄に皮膚一次刺激性を認めた。作用の大半は高用量群の雄にみられた。高用量群 (30 µg/kg/day) の雄で皮膚腫瘍発生 (1 mm 以上の腫瘍) までの期間短縮が認めら

れ、光がん原性誘発が示唆された。しかし、雄における皮膚腫瘍発生時期の変化は軽微であり、雌では皮膚腫瘍発生への影響がみられず、皮膚腫瘍発生に被験物質誘発性の皮膚一次刺激性が影響している可能性が示唆された。したがって、カルシポトリオール液剤の経皮投与がヒトにおいて光がん原性を誘発する可能性はほとんど無いものと考えられる。

(2) ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを用いた試験

経皮投与試験では雌雄 CD-1 マウスにベタメタゾンジプロピオン酸エステルを 104 週間投与した（報告書番号 LOP0072、添付資料 4.2.3.4.1.7、評価資料）。ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは 0.3、1、3（雄）及び 2（雌） $\mu\text{g/g}$ 濃度（ベタメタゾン換算）の軟膏を調製し、1 日 1 回 0.1 g/匹を背部に塗布した（体重 30 g としたとき、1、3.3 及び 10（雄）又は 6.6（雌） $\mu\text{g/kg/day}$ に相当）。基剤対照群及び投薬群の雌は投与 96 週に死亡率が上昇したため屠殺した。基剤対照群の生存率はわずか 36%であった。全群の雄及び無処置群の雌は 104 週まで投与した。1、3.3 及び 10/6.6（雄/雌） $\mu\text{g/kg/day}$ のベタメタゾンジプロピオン酸エステルの投与で投薬に関連した腫瘍誘発性はみられなかった。腫瘍発生プロファイル及びマウスの生存率に投薬の影響はみられなかった。体重増加抑制及び消瘦が高用量群で観察され、皮膚の菲薄化、紅斑、不規則呼吸及び低体温が軽度から中等度に観察されたが、病理学的所見はみられなかった。投与第 26 週に実施した TK 評価ではベタメタゾンジプロピオン酸エステルの血中濃度はいずれも定量限界未満（ $< 75 \text{ pg/mL}$ ）であった。代謝物ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルはいずれの投薬群でも定量（ $\geq 125 \text{ pg/mL}$ ）され、概して雌雄とも投与量に比例した曝露が認められた。高用量群では雌において雄の 3–7 倍の曝露を認めた。

経口投与試験では雌雄 Wistar Han ラットに 0.02、0.06 及び 0.2 mg/kg/day のベタメタゾンジプロピオン酸エステルを 104 週間投与した（報告書番号 LOP0071、添付資料 4.2.3.4.1.8、評価資料）。その結果、腫瘍発生プロファイル及び生存率に投薬の影響はみられず、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルにがん原性は認められなかった。全投薬群で非腫瘍性病変として腸間膜リンパ節の肥満細胞増加がみられ、末梢白血球数が低下した。中間用量以上の投与では体重増加抑制及び非腫瘍性病変として副腎の空胞化を伴う限局性皮質肥大の発現頻度の減少が観察された。これらの所見は全投薬群でみられたその他の軽度な臨床検査値の変動とともに、このクラスの化合物の所見と一致する [20、21]。投与第 26 週に実施した TK 評価では血清中ベタメタゾンジプロピオン酸エステル濃度は全てのサンプルで定量限界未満（ $< 75 \text{ pg/mL}$ ）であった。主代謝物ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルの C_{max} は雌雄ともに概して投与量に比例したが、雄と比較して雌で 3–5 倍高値であった。AUC は雌雄ともに概して投与量に比例したが、雄と比較して雌で概して 5 倍高かった。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの生殖発生毒性試験を実施した。なお、ベタメタゾンジ

プロピオン酸エステルは皮下投与により催奇形性作用が認められている [22、23] ことから、胚・胎児発生試験は実施していない。カルシポトリオールには生殖機能及び発生に影響はみられず、催奇形性も認められていない [24、25、26、27]。

(1) ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを用いた試験

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを交配前 10 週間及び交配中、雄性ラットに経口投与したときの雄性生殖能への影響を検討した（報告書番号 RTOX0301、添付資料 4.2.3.5.1.1、評価資料）。本試験ではラット 13 週間経口投与がん原性用量設定試験（報告書番号 TTOX0301、2.4.4.2-(2)項）の雄性ラットを投与 10 週目に交配用動物として使用した。すなわち、0.02、0.06 及び 0.2 mg/kg/day のベタメタゾンジプロピオン酸エステルを 10 週間経口投与した雄性 Wistar ラットをそれぞれ無処置の雌と交配させた。妊娠ラットは妊娠 14 日に剖検し、子宮内検査（黄体数、着床数、吸収胚数）を行った。その結果、生殖能パラメータに投薬の影響はみられなかった。雄ラットに認められた一般毒性は中間及び高用量群でみられた体重増加抑制及び主にベタメタゾンの免疫抑制剤の特徴として知られている所見（脾臓及び胸腺萎縮など）であり、精巣及び精巣上体に投薬に関連した病理組織学的所見はみられなかった（2.4.4.2-(2)項）。本試験条件下における雄の生殖能に関する NOAEL は 0.2 mg/kg/day であった。

雌の受胎能及び初期胚発生に関する試験では雌性 CD(SD)ラットに 0.1、0.3 及び 1.0 mg/kg/day のベタメタゾンを 1 日 1 回交配前 14 日間～妊娠 6 日まで経口投与し、雌性生殖能及び初期胚発生への影響を検討した（報告書番号 LOP0079、添付資料 4.2.3.5.1.3、評価資料）。雌ラットは妊娠 13 日に剖検し、子宮内検査（黄体数、着床数、生存胎児数の記録）を実施した。その結果、雌ラットに体重増加抑制が観察された。薬理作用に関連するとみられる胸腺及び脾臓の絶対及び相対重量低下が低用量から観察されたため、NOAEL は算出できなかった（0.1 mg/kg/day 未満）。交尾及び生殖能に影響はなく、生殖能及び交尾行動に関する NOAEL は 1.0 mg/kg/day であった。初期胚発生への影響もみられず、NOAEL は 1.0 mg/kg/day であった。投与第 10 日に実施した TK 評価では高用量群の全試料（投与 0.5、1 及び 2 時間後）及び中間用量群の 2/9 試料（0.5 及び 1 時間後）でベタメタゾンジプロピオン酸エステルが定量された。低用量群のサンプルは全て定量限界未満（<75 pg/mL）であった。主要代謝物ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルは低用量群の 1 匹を除く全試料から定量（≥125 pg/mL）された。

出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では妊娠 CD(SD)ラットに妊娠 6 日～授乳 20 日まで 0.1、0.3 及び 1.0 mg/kg/day ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを 1 日 1 回経口投与した（報告書番号 LOP0081、添付資料 4.2.3.5.3.1、評価資料）。その結果、高用量群の母動物 22 匹中 2 匹が同腹児死亡の後、早期の授乳期間中に途中死亡した。妊娠期間中、中間用量群以上で軽度の体重減少及び体重増加抑制が観察された。中間用量群以上の実測値体重は哺育期間中、低値を示した。妊娠期間は全投薬群で軽度ではあるが有意な延長を示した。投薬に関連した有意な脾臓及び胸腺の絶対及び相対重量の低値が全投薬群で認められた。離乳前の F₁ 世代の 4 日生存率及び累積生存指数は用量依存性をもって有意に低値であった。哺育率も軽度低値を示した。投与量に関連した死亡児数及び共食いによる生存児消失数の増加が認められ、一般状態観察

で胃内にミルクがないか又はほとんどない出生児数の頻度増加及び活動量低下が投薬群の同腹児に観察された。死亡は概して授乳 1 日～4 日にみられた。さらに高用量群の 22 匹中 2 匹ではそれぞれ授乳 1 日及び 3 日までに全同腹児が死亡した。中間用量群（雌のみ）及び高用量群の授乳 1 日の出生児体重（実測値）に統計学的に有意な低値がみられた。統計学的に有意な体重の低値は 14 日齢の雄並びに 14 日及び 21 日齢の雌にも観察された。中間用量群以上で授乳 15 日の眼瞼開裂の割合が有意に上昇し、高用量群では授乳 5 日の立ち直り反射を示す出生児の割合が有意に低下した。胃内にミルクを認めない早期死亡動物数の増加は用量依存的であった。以上の結果から、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを妊娠ラットに妊娠 6 日～授乳 20 日まで投与したときの NOAEL は母動物で 0.1 mg/kg/day 未満、離乳前の F₁ 世代で 0.1 mg/kg/day 未満、離乳後の F₁ 世代で 1.0 mg/kg/day であった。妊娠 10 日に実施した TK 評価では中間用量群以上の全血清試料で、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルが定量されたが、低用量群では全て定量限界未満（<75 pg/mL）であった。ベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルは全試料で定量（≥125 pg/mL）され、全身曝露が確認された。

2.4.4.6 局所刺激性試験

LEO 90105 を用いたウサギ累積皮膚刺激性試験を 2 試験実施した。

1 つ目の試験では雄性ニュージーランド白色ウサギに 100 mg の LEO 90105（カルシポトリオール／ベタメタゾン：50/500 µg/g）、LEO 90105 基剤で調製したカルシポトリオール軟膏、LEO 90105 基剤で調製したベタメタゾンジプロピオン酸エステル軟膏及び LEO 90105 基剤を背部皮膚 4 ヶ所に 1 日 2 回 6 週間非閉塞経皮投与し、累積刺激性を検討した（報告書番号 LTOX/98/05、添付資料 4.2.3.6.1、評価資料）。その結果、LEO 90105 及びカルシポトリオール軟膏を塗布した皮膚で軽微から明確な紅斑が観察され、4～5 週後に最高値に達した。軽微な紅斑がベタメタゾンジプロピオン酸エステル軟膏及び基剤を塗布した皮膚で散見された。無処置皮膚を含め皮膚厚は 6 週間の処理期間中徐々に低下し、病理組織学的検査において処置皮膚で無処置皮膚より強い毛嚢脂腺組織及び角質嚢胞の扁平上皮化生、すなわち面皰形成作用がみられた。剖検では全身性の所見、すなわち肝臓の腫大及び淡色化並びに副腎の萎縮が観察された。全ての肉眼所見及び皮膚の菲薄化はステロイド（ベタメタゾン）のよく知られた作用に起因した。病理組織学的所見はステロイド又は基剤（パラフィン）による可能性が考えられる。以上のように、ウサギにおいて LEO 90105 の 1 日 2 回 6 週間の非閉塞経皮投与により軽度の皮膚刺激性が観察された。皮膚刺激性は主にカルシポトリオールに起因すると考えられた。

2 つ目の試験では雄性ニュージーランド白色ウサギに 100 mg の LEO 90105 及び LEO 90105 基剤を背部皮膚 2 ヶ所に 1 日 1 回 6 週間非閉塞経皮投与した（報告書番号 LTOX/99/02、添付資料 4.2.3.6.2、評価資料）。その結果、LEO 90105 の 1 日 1 回 6 週間の非閉塞経皮投与では皮膚刺激性はみられなかった。病理組織学的検査で観察された面皰形成作用の特徴を示す毛嚢脂腺組織及び角質嚢胞の扁平上皮化生は LEO 90105 及び基剤の両処置皮膚で観察されたことから、面皰形成作用は基剤（パラフィン）に起因すると考えられた。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 光安全性試験

カルシポトリオール水和物で調製したカルシポトリオール液剤及びカルシポトリオール／ベタメタゾンゲル製剤を用いた光安全性試験を2試験実施した。

1 つ目の試験では雌性 SKH1 アルビノヘアレスマウスにカルシポトリオール液剤並びにカルシポトリオール／ベタメタゾンゲル製剤を背部皮膚に28日間連日投与した後、UVを照射し、各種バイオマーカー及び病理組織学的検査により光安全性を検討した（報告書番号 VBE00002、添付資料 4.2.3.7.7.2、評価資料）。カルシポトリオール液剤は0（基剤）、1、3及び10 µg/mL、カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステルゲル製剤は0/0（基剤）、1/10、3/30及び10/100 µg/g濃度製剤を調製し、いずれも投与容量100 µL/匹/dayで経皮投与とした。28日連日投与後、最終投与1〜3時間後に動物を非拘束無麻酔下、わずかに皮膚反応を引き起こすUV量（1MEDif = 800 RBU）に約2時間曝露させた。対照薬群にはゲル基剤で5000 µg/gに調製したトリウムシノロンゲル製剤を投与し、同様にUV（1MEDif）に曝露させた。その結果、液基剤対照群では反復経皮投与により少数例に皰が観察されたことから、軽微な皮膚刺激性が示唆されたが、検鏡検査において上皮の細胞充実性及び皮膚厚に影響はみられなかった。1、3及び10 µg/mLの液剤群では反復経皮投与により用量に依存した皮膚反応（肥厚及び皰）、皮膚厚増加（10 µg/mL群）、体重増加抑制（10 µg/mL群）が認められた。また、基剤投与と比較して1MEDifのUV曝露後のDNA損傷並びにDNA合成及びアポトーシスの修飾（TUNEL標識、BrdU標識及びp53の増加）が示唆され、光がん原性が增強される可能性が示唆された。検鏡検査では投与量に依存した細胞充実性及び皮膚厚の増加が観察された。ゲル基剤群では反復経皮投与により皮膚所見（皰、剥片化及び肥厚）が観察され、検鏡検査において上皮の細胞充実性及び皮膚厚の増加が認められた。1MEDifのUV曝露によるDNA損傷、DNA合成及びアポトーシスへの悪影響はみられなかった。1/10、3/30及び10/100 µg/gゲル製剤群では反復経皮投与により、用量依存的な皮膚所見（紅斑、浮腫及び剥片化の重症化及び頻度増加）、皮膚の菲薄化（目視評価）、皮膚厚低下、体重減少が観察された。1MEDifのUV曝露によるDNA損傷及びアポトーシス修飾への悪影響はみられず、光がん原性の增強を予測する所見はなかった。Sun burn cell 産生、p53発現及びチミン二量体の低下が認められたことから、UV誘発性皮膚腫瘍に対する保護効果の可能性が示唆された。BrdUは用量依存的な増加を認めたが、本所見のみで光がん原性の增強を示唆しているとは考えられなかった。検鏡検査において上皮の細胞充実性及び皮膚厚の低下が認められ、肉眼で観察された皮膚菲薄化と一致した。本所見はステロイド含有製剤でしばしば認められる皮膚萎縮を示唆する。トリウムシノロンゲル製剤群では表皮過形成（細胞質及び皮膚厚）の低下、チミン二量体の低下、p53発現の低下を伴ったBrdU増加が認められた。アポトーシスに変化はみられなかった。

以上のように、カルシポトリオール／ベタメタゾンゲル製剤投与動物でみられた反応はトリウムシノロン投与動物の所見に類似していた。トリウムシノロンは光がん原性を增強しないことが報告されており[28]、カルシポトリオール／ベタメタゾンゲル製剤は光がん原性を增強しないと考えられた。

2 つ目の試験では雌性 SKH1 アルビノヘアレスマウスにカルシポトリオール液剤及びカルシポトリオール／ベタメタゾンゲル製剤を背部皮膚に 28 日間連日投与し、皮膚炎症反応への影響を検討した（報告書番号 VBE00003、添付資料 4.2.3.7.7.3、評価資料）。カルシポトリオール液剤は 0（液基剤）、1、3 及び 10 µg/mL、カルシポトリオール／ベタメタゾンゲル製剤は 0（ゲル基剤）1/10、3/30 及び 10/100 µg/g 濃度製剤を調製し、いずれも投与容量 100 µL/匹/day で経皮投与した。対照薬群にはゲル基剤で 5000 µg/g に調製したトリアムシノロンゲル製剤を投与した。また、28 日間連日投与後に最小の皮膚反応を生じる UV 線量（MED_i）の 0.5～2.8 倍の線量を各動物に単回曝露した。UV 曝露後、曝露部位の炎症反応を Draize 法により評価し、最小紅斑量（MED₀）を求めた。その結果、MED₀は無投与 UV 照射群と比較し、液剤群及びゲル製剤群の全群で同等か高値であった。トリアムシノロン群の MED₀は無投与 UV 照射群の MED₀を上回らなかった。さらに、全投薬群の MED₀はトリアムシノロンの MED₀と同等であった。したがって、本試験においてはいずれの製剤も UV 誘発性の炎症に対し、生物学的に意味ある増強を示さず、これらの反応はトリアムシノロンと同等であった。トリアムシノロンは反復経口投与後の UV 照射により光がん原性を増強しないことが報告されている [28]。これらのデータから、本エンドポイントに基づけば、被験物質製剤は光がん原性を増強しないことが示唆される。

2.4.4.7.2 不純物の毒性試験

カルシポトリオール水和物の主な不純物（類縁物質）は、不純物A*、不純物C*、不純物D*、不純物E*、不純物B*、不純物C*、不純物D*、不純物E*、及び、不純物E*の毒性はドボネックス®軟膏承認申請時に既に評価されており、これらの急性毒性はカルシポトリオールと大きな差異はないと判断されている。今回、新たな不純物である不純物A*の単回投与毒性試験を実施した。雄性 SD ラットに 6.25、12.5、25、50 及び 100 mg/kg の用量で不純物A*を単回経口投与した（報告書番号 931005A4、添付資料 4.2.3.7.6.1、評価資料）。その結果、50 及び 100 mg/kg 投与で自発運動低下及び体重増加抑制が観察され、100 mg/kg 投与で衰弱が観察された。病理所見では投薬群の数例に腎臓の淡色化が観察されたが、明らかな用量依存性はなかった。50 及び 100 mg/kg 投与群では腎臓表面の退縮並びに白色斑及び皮質の放射状条痕が観察された。これらの病理所見は限局性の鈣質化を示しており、ビタミン D の急性毒性所見と推察される。死亡は観察されず、概略の致死量は 100 mg/kg 超であった。

2.4.5 総括及び結論

ドボベツト®軟膏は有効成分としてカルシポトリオール水和物 52.2µg/g（カルシポトリオール（無水物）として 50.0 µg/g）及びベタメタゾンジプロピオン酸エステル 0.643 mg/g（ベタメタゾンとして 0.5 mg/g）を含有する。各有効成分の濃度は単一成分の外用製剤（ドボネックス®軟膏及びリンデロン®-DP 軟膏）と同一であり、これら有効成分の有効性や安全性に関わる非臨床試験については多くの報告がみられる。したがって、薬理試験ではカルシポトリオール（無水物）とベタメタゾンジプロピオン酸エステル併用時の相互作用試験、カルシポトリオール水和物及び

ベタメタゾンジプロピオン酸エステル^{*}のそれぞれ単剤での安全性薬理試験を実施した。薬物動態試験ではラット及びミニブタでの LEO 90105 経皮投与後の吸収、分布及び排泄試験、ミニブタでの *in vivo* 代謝試験並びに LEO 90105 有効成分の肝 S9 分画による *in vitro* 代謝試験を実施した。毒性試験では LEO 90105 経皮投与による反復投与毒性試験及び局所刺激性試験、カルシポトリオール水和物を用いたがん原性及び光がん原性並びに光安全性試験を実施した。また、カルシポトリオール水和物の不純物（類縁物質）である^{不純物A*}のラット単回投与毒性試験、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを用いた遺伝毒性、反復投与毒性、生殖発生毒性及びがん原性試験を実施した。

カルシポトリオール及びベタメタゾンはどちらも核内受容体に結合することにより作用を示すが、薬力学的作用は全く異なる [29、30]。カルシポトリオールは活性型ビタミン D 受容体に親和性があり、受容体と結合することにより、細胞増殖抑制作用、細胞周期調節作用、細胞分化誘導作用、Th17 サイトカイン調節作用及び抗菌ペプチド調節作用を示すことが報告されている [31、32、33、34、35]。また、カルシポトリオールをはじめとする活性型ビタミン D₃ 外用剤の乾癬への臨床効果発現機序として表皮細胞の分化誘導作用や増殖抑制作用 [2] に加え、炎症性サイトカイン調節作用 [3]、アポトーシス誘導作用 [4]、制御性 T 細胞誘導作用 [5] などの薬理作用による可能性が報告されている。一方、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは合成副腎皮質ステロイドであり、標的細胞の糖質コルチコイド受容体（GR）に結合して、活性化することにより作用する。ステロイドーGR 複合体は DNA に直接相互作用して抗炎症性タンパク質の転写を誘導する可能性や、転写因子に相互作用して活性を抑制する可能性がある。結果として、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルを含むステロイドは炎症促進性サイトカインの産生、並びに接着分子 ICAM-1 及び酵素ホスホリパーゼ A2、シクロオキシゲナーゼ 2、誘導型 NO 合成酵素を含む炎症性メディエーターの発現を抑制する。これらの酵素の発現抑制はプロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子及び酸化窒素等の炎症性メディエーターの産生を低下させる [36、37、38、39]。また、*in vivo* 皮膚炎症動物モデルで強力な抗炎症活性を示す [40]。さらに、サブスタンス P 誘発のそう痒動物モデルで有効性を示し [41]、マウス皮膚のランゲルハンス細胞を枯渇させ [42] 及び重度複合免疫不全（SCID）マウス移植乾癬皮膚モデル [43] において有効性が報告されている。

乾癬は T 細胞の浸潤による炎症性皮膚疾患であり、カルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステルの併用により抗炎症効果が増強すると考えられている。本申請に際し実施した試験においてもカルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステルとの併用は、乾癬の炎症症状に深く関与している Th1/Th17 サイトカイン産生を単独投与と比較してより強く抑制することが示唆された。抗炎症活性に関する併用投与の相加効果は Vissers ら [44] 及び van Rossum [45] らによっても報告されている。これらの試験では乾癬性病変皮膚にカルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステルとの配合剤、又は 2 剤の単独療法として投与を行い、皮膚生検を免疫組織化学的検査により評価した。異なる試験方法及びパラメータを使用したいずれの試験においても皮膚の炎症細胞の浸潤の抑制に関し、単独療法と比較して併用療法の優れた活性が認められたことは、カルシポトリオール水和物とベタメタゾンジプロピオン酸エステ

ルの両者を含有する LEO 90105 の臨床効果をより強固なものにする科学的知見であると考えられる。また、カルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステル併用時の皮膚萎縮作用を検討した結果、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルで誘発された皮膚萎縮バイオマーカーの変化はカルシポトリオールの併用により拮抗された。カルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルのそれぞれ単剤での安全性薬理試験ではカルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルともに中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対して何ら作用は認められなかった。

これらの結果から、カルシポトリオール水和物とベタメタゾンジプロピオン酸エステルとの併用療法では中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する有害な作用はなく、カルシポトリオールによる表皮細胞の増殖抑制作用と、カルシポトリオールとベタメタゾンジプロピオン酸エステルの抗炎症作用により強い抗乾癬作用を示すことが期待される。また、カルシポトリオールを併用することによってベタメタゾンジプロピオン酸エステルで誘発される皮膚萎縮バイオマーカーの変化が拮抗されることが示唆された。

ラットでの ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与後（6 時間非閉塞塗布）の ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの吸収率はいずれも約 10%程度で、いずれも雄より雌で若干高かった。ドボネックス®軟膏申請時にカルシポトリオールの雄ラットでの吸収率が 24 時間非閉塞塗布で 16.8%、また雌で雄より吸収率が高いことも報告されており [46]、両製剤からのカルシポトリオールの経皮吸収率に大きな差はないものと考えられる。

ミニブタでの ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与後の ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの吸収率はともに約 3%（それぞれ 2.12 及び 3.31%）で、性差はみられなかった。ミニブタでの TK 測定では LEO 90105 の 14 日間反復経皮投与後の血清中カルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステル濃度はいずれも定量限界未満であったが、投与第 8 週に実施した測定ではいくつかの試料でベタメタゾンジプロピオン酸エステルが定量されており、長期反復投与では経皮吸収が軽度高まるものと考えられる。

ラットでの ^3H 標識 LEO 90105 経皮投与後の組織内放射能濃度は ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルともに塗布部位で最も高い放射能を認めたが、投与 3 時間以降（特に薬剤除去後）は経時的に低下した。その他の組織では ^3H -カルシポトリオールは肝臓、副腎、ハーダー腺、小腸、小腸内容物及び大腸内容物で高い放射能がみられた。 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは肝臓、下垂体、小腸、大腸、小腸内容物及び大腸内容物で高い放射能がみられた。なお、ドボネックス®軟膏申請時のカルシポトリオール及び公表論文でのベタメタゾンジプロピオン酸エステルのラットにおける分布試験においても今回の結果と同様な結果が報告されている [46、47]。有色ラットを用いた ^3H 標識体静脈内投与後の組織内分布試験では眼球や有色皮膚への残留性はみられなかった。

マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ及びヒトの肝 S9 分画を用いた ^3H -カルシポトリオールの *in vitro* 代謝試験においては MC1080、MC1046 及び MC1204 を含む 7 種の代謝物が検出され、MC1080 及び MC1046 が主要代謝物であった。ベタメタゾンジプロピオン酸エステル共存下で代謝速度は低下したが、代謝物の生成パターンに違いはみられなかった。代謝速度の低下はインキ

ュベーション溶液中の基質濃度が高くなったためと考えられる。また、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの *in vitro* 代謝では 4 種の代謝物が検出され、主代謝物はベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルであった。ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの代謝速度にカルシポトリオール共存による影響はみられなかった。

ミニブタにおける ^3H -カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステル併用静脈内投与後の血清中主代謝物は M1080 で、ドボネックス®軟膏申請時に報告された雄ラットでの ^3H -カルシポトリオール皮下投与時 [48] の血漿中主代謝物と同じであった。また、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステル／カルシポトリオール併用静脈内投与後の血清中主代謝物はベタメタゾン-17-プロピオン酸エステルであった。

ラットでの静脈内及び経皮投与後の主排泄経路はいずれも ^3H -カルシポトリオール及び ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルともに糞中であり、性差はみられなかった。一方、ミニブタでの静脈内及び経皮投与後の主排泄経路はいずれも雌雄ともに ^3H -カルシポトリオールは糞中、 ^3H -ベタメタゾンジプロピオン酸エステルは尿中であった。ミニブタにおけるベタメタゾンジプロピオン酸エステルの主排泄経路が尿中排泄であることは糖質コルチコステロイドのヒトにおける主排泄経路が尿中であることと一致しており、ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの類似体である吉草酸ベタメタゾンの主排泄経路が尿中排泄であることとも一致している [49]。なお、ドボネックス®軟膏申請時のカルシポトリオール及び公表論文でのベタメタゾンジプロピオン酸エステルのラットにおける主排泄経路 [46、47、48、50、51] はいずれも糞中であり、今回の結果と一致していた。

このように、LEO 90105 経皮投与後のカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの吸収、分布、代謝及び排泄試験で得られた結果は、ドボネックス®軟膏承認申請時に報告されたカルシポトリオールの試験結果及び公表論文でのベタメタゾンジプロピオン酸エステルの結果と同様であった。また、LEO 90105 経皮投与後のバイオアベイラビリティは低く、吸収後のカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの代謝はいずれも速やかであることから、本剤の全身的な副作用は少ないものと考えられた。

LEO 90105 のマウス 13 週間経皮投与毒性試験（カルシポトリオール／ベタメタゾン：0.42/4.17、1.67/16.67 及び 6.67/66.67 $\mu\text{g/kg/day}$ ）では体重増加抑制、血液学的検査値の変動（リンパ球減少症）、臓器重量変動（脾臓、胸腺及び副腎）及び病理組織学的変化（脾臓及び胸腺）が高用量群で観察された。中間用量群以下では体重の変動は小さく、血液学的検査値、臓器重量及び病理所見に毒性学的に意味ある変化はみられなかった。所見は主にベタメタゾンジプロピオン酸エステルの薬理作用に起因しており、カルシポトリオールに関連した明らかな毒性所見は観察されなかった。血清カルシウム濃度及び尿中カルシウム排泄測定を実施しなかったためカルシウム代謝への影響は不明である。しかし、組織の石灰化は観察されておらず、カルシポトリオール液剤（3、12、30、90、120 及び 180 $\mu\text{g/kg}$ ）を用いたヘアレスマウスへの 3 ヶ月間経皮投与用量設定試験（報告書番号 95639、添付資料 4.2.3.4.1.1）では 12 $\mu\text{g/kg}$ 以上の用量で血清カルシウムが上昇し、3 $\mu\text{g/kg}$ 以上の用量で尿中カルシウム及びクレアチニンに対する尿中カルシウム比率の上昇が認められた。これらを勘案すると、尿中カルシウム排泄の軽度上昇は無視できないが、カルシポト

リオールに関連した所見が観察されることはほとんどないと考えられる。LEO 90105 のマウスに対する局所忍容性は良好であった。

LEO 90105 のミニブタでの 4 週間反復経皮投与試験（1/10、5/50 及び 25/250 $\mu\text{g/kg/day}$ ）では高用量群で軽度の皮膚刺激性を認めたが、全身毒性はみられなかった。9 ヶ月間経皮投与（1/10、5/50 及び 25/250 $\mu\text{g/kg/day}$ ）ではベタメタゾンに関連した副腎皮質萎縮及び皮膚萎縮が中間用量群以上で観察された。皮膚刺激性（紅斑）は高用量群の動物で観察され、中間用量群の動物では軽症化した。カルシポトリオール の全身曝露を示す尿中カルシウム排泄の上昇が高用量群で観察された。

ウサギ累積皮膚刺激性試験では LEO 90105（50/500 $\mu\text{g/g}$ 濃度）は軽度の皮膚刺激性を示した。皮膚刺激性は主にカルシポトリオールの影響であった。全ての投与群の投与部位の病理組織学的検査で観察された毛嚢脂腺組織及び角質嚢胞の扁平上皮化生、すなわち面皰形成作用の特徴的な所見は基剤に起因すると考えられた。

このように、マウス及びミニブタを用いた LEO 90105 の反復経皮投与試験で認められた全ての所見はカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステル の既知の薬理作用に関連した所見であり、予期しない毒性学的相互作用はみられなかった。

ミニブタの 4 週間及び 9 ヶ月間経皮投与試験の結果に基づき LEO 90105 のリスク評価及び安全係数の算出を実施した。ミニブタはヒトと皮膚構造及び経皮吸収が類似しており、経口摂取を避けることが可能で、経皮曝露を保証できることから最適な動物モデルと考えられる。一方、げっ歯類は質的な毒性所見を評価し、標的臓器を見出すには適しているが、経口摂取の可能性があることに加え、皮膚の解剖学的構造（皮膚厚、毛嚢密度の高さ）が異なることからヒトのリスク評価には適していない。安全係数推定には動物での 1 kg 体重あたりの用量（ mg/kg ）及び体表面積あたりの用量（ mg/m^2 ）を使用した。 mg/kg 換算した最大臨床用量（約 10.7/107 $\mu\text{g/kg}$ ）と比較して、ミニブタ 4 週間投与試験で用いた 3 用量は 0.1、0.5 及び 2.3 倍であり、体表面積で換算した最大臨床用量（約 417/4168 mg/m^2 ）と比較して 0.06、0.29 及び 1.45 倍であった。本試験の最高用量で全身毒性は観察されなかったことから安全係数は少なくとも 1.45 以上と推定された。最高用量（臨床製剤濃度）で皮膚の紅斑が観察されたが、LEO 90105 の臨床試験では本剤がヒトにおいて許容できない皮膚刺激性を引き起こすことは示唆されていない。また、ミニブタの経皮吸収率（投与量の約 3%）は健康被験者（投与量の 1%未満）より高く、実際にはさらに高い安全係数と考えられる。ミニブタ 9 ヶ月間投与試験の NOAEL（1/10 $\mu\text{g/kg/day}$ ）を最大臨床用量と比較したとき、ヒトに対する安全域は得られない（1.0 未満）。NOAEL は副腎の束状帯及び網状帯の萎縮及び皮膚萎縮が中間及び高用量群で観察されたことに基づいており、予定される臨床投与期間（4 週間）と比較して長期間の投与で得られた値である。ミニブタ 9 ヶ月間投与試験で観察された副腎の萎縮は 4 週間投与試験では観察されず、持続的な視床下部・下垂体・副腎皮質（HPA）系の抑制による所見と推察される。臨床では、通常 LEO 90105 は 1 ヶ月を超えて漫然と使用されることはない。したがって、ミニブタ 9 ヶ月間投与試験の NOAEL との比較で安全域が狭いことは問題ないと考えられた。

ベタメタゾンジプロピオン酸エステル単剤で実施した一連の遺伝毒性試験では遺伝毒性は認められなかった。カルシポトリオール水和物及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルそれぞれ単

剤で実施したがん原性試験ではカルシポトリオール水和物のラット経口投与ががん原性試験を除き、がん原性は認められなかった。ラット経口投与ががん原性試験（1、5 及び 15/10 µg/kg/day）では腫瘍性病変として甲状腺の C 細胞腫瘍（主に腺腫）の頻度増加が中間用量群以上の雌及び高用量群の雄で観察され、同時に高用量群の雄に副腎の良性褐色細胞腫の頻度増加が観察された。これらの病変はカルシポトリオール薬理作用（高カルシウム血症）に関連すると考えられたが、カルシポトリオール健康被験者における経皮吸収率は低く（投与量の 1%未満）、ヒトでのリスクはないと考えられた。カルシポトリオール液剤を用いた光がん原性試験では高用量群（30 µg/kg/day）の雄で皮膚腫瘍発生までの期間短縮が認められ光がん原性誘発が示唆されたが、変化は軽微で、雌では皮膚腫瘍発生への影響はなく、皮膚腫瘍発生に被験物質誘発性の皮膚一次刺激性が影響している可能性が示唆された。したがって、カルシポトリオール液剤の経皮投与がヒトにおいて光がん原性を誘発する可能性はほとんどないものと考えられた。

カルシポトリオール液剤及びカルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステルゲル製剤を用いた光安全性試験では、カルシポトリオール液剤の経皮投与では皮膚刺激性により光がん原性を増強する可能性が示唆されたが、ヒトでの発現の可能性はほとんどないと考えられた。カルシポトリオール／ベタメタゾンジプロピオン酸エステルゲル製剤では光がん原性の増強は示唆されなかった。

ベタメタゾンジプロピオン酸エステルの生殖発生毒性ではマウス、ラット及びウサギを用いた催奇形性試験 [22、23] で皮下投与後の催奇形性が報告されている。今回実施した経口投与による雌雄生殖能及び初期胚発生試験ではベタメタゾンジプロピオン酸エステルの生殖能及び初期胚発生に対する影響は認められず、出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では母動物毒性（授乳期間中の死亡）が認められた高用量群で離乳前の F₁ 世代に死亡児数増加などの影響がみられたが、母動物及び離乳後の F₁ 世代には影響はみられなかった。カルシポトリオールには生殖機能及び発生に影響はみられず、催奇形性も認められていない [24、25、26、27]。

カルシポトリオール水和物の主な不純物（類縁物質）は不純物A*、不純物C*、不純物D*、不純物E*、及び不純物B*、不純物C*、不純物D*、及び不純物E*の毒性はドボネックス®軟膏の承認申請時に既に評価されており、これらの急性毒性はカルシポトリオールと大きな差異はないと判断されている。新たな不純物である不純物A*のラット単回経口投与毒性試験を実施したが、100 mg/kg までの投与で死亡は認められず、概略の致死量は 100 mg/kg 超であり、不純物の中では最も弱い毒性であると考えられた。

また、LEO 90105 の皮膚光毒性、皮膚感作性及び光感作性については、海外でこれらの臨床薬理試験（光毒性試験：試験番号 MCB 0101 FR [2.7.4.2.1.5.2 項]、皮膚感作性試験：MCB 0202 FR [2.7.4.2.1.5.2 項] 及び光感作性試験：MCB 0204 FR [2.7.4.2.1.5.2 項]）が実施されており、日本においても光パッチテスト（試験番号 MCB 0901 [2.7.4.2.1.5.2 項]）が実施されている。これらの試験の結果は、全て陰性である。

このように、LEO 90105 を用いて実施した反復投与毒性試験及び刺激性試験において、LEO 90105 の臨床使用における安全性上の問題は認められなかった。LEO 90105 の皮膚感作性、皮膚光毒性及び光感作性試験については臨床薬理試験で検討され、いずれも陰性であることが示されている。また、ドボネックス®軟膏承認申請後に実施したカルシポトリオール水和物のがん

原性、光がん原性試験及び光安全性試験並びにベタメタゾンジプロピオン酸エステルで実施した遺伝毒性、反復投与毒性及びがん原性試験においても問題となる毒性所見は認められなかった。生殖発生毒性試験においてベタメタゾンジプロピオン酸エステルは生殖発生に影響を示すが、本剤の健康被験者における経皮吸収率は低く（投与量の 1%未満）、臨床使用において問題となることはないと考えられる。

以上のように、LEO 90105 はカルシポトリオール表皮細胞増殖抑制作用とベタメタゾンジプロピオン酸エステル及びカルシポトリオールの抗炎症作用による相加効果により強い抗乾癬作用を示すと期待される。また、LEO 90105 経皮投与後のバイオアベイラビリティは低く、吸収後のカルシポトリオール及びベタメタゾンジプロピオン酸エステルの代謝はいずれも速やかであることから本剤の全身的な副作用発現の可能性は低いものと考えられた。さらに、LEO 90105 の反復投与毒性試験及び刺激性試験において臨床使用における安全性上の問題は認められず、カルシポトリオール水和物で実施したがん原性試験、光がん原性試験及び光安全性試験並びにベタメタゾンジプロピオン酸エステルで実施した各種毒性試験においても問題となる毒性所見はなく、LEO 90105 の臨床使用における安全性が示唆された。

2.4.6 引用文献

- 1 森田明理. PUVA 療法. 皮膚科診療プラクティス 16 乾癬にせまる. 文光堂. 2004;93-7. (4.3.52)
- 2 水谷仁. 活性型ビタミン D₃外用薬の使用上の留意点. 医薬ジャーナル. 2003;39:830-5. (4.3.51)
- 3 Fukuoka M, Ogino Y, Sato H, Ohta T, Komoriya K, Nishioka K, et al. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D₃ (tacalcitol). Br J Dermatol. 1998;138:63-70. (4.3.11)
- 4 Fukuya Y, Higaki M, Higaki Y, Kawashima M. Effect of vitamin D₃ on the increased expression of Bcl-x_L in psoriasis. Arch Dermatol Res. 2002;293:620-5. (4.3.12)
- 5 Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. J Exp Med. 2002;195:603-16. (4.3.5)
- 6 須田たかね, 照井正. 乾癬の病態 (後編) - 乾癬の治療 -. 西日皮膚. 2006;68:656-64. (4.3.55)
- 7 Kragballe K, Barnes L, Hamberg KJ, Hutchinson P, Murphy F, Moller S, et al. Calcipotriol cream with or without concurrent topical corticosteroid in psoriasis: Tolerability and efficacy. Br J Dermatol. 1998;139:649-54. (4.3.18)
- 8 Ruzicka T, Lorenz B. Comparison of calcipotriol monotherapy and a combination of calcipotriol and betamethasone valerate after 2 weeks' treatment with calcipotriol in the topical therapy of psoriasis vulgaris: A multicentre, double-blind, randomized study. Br J Dermatol. 1998;138:254-8. (4.3.28)
- 9 Ortonne JP. Psoriasis: new therapeutic modality by calcipotriol and betamethasone dipropionate. Nouv Dermatol. 1994;13:746-51. (4.3.26)
- 10 Lebwohl M, Siskin SB, Epinette W, Breneman D, Funicella T, Kalb R, et al. A multicenter trial of calcipotriene ointment and halobetasol ointment compared with either agent alone for the treatment of psoriasis. J Am Acad Dermatol. 1996;35:268-9. (4.3.21)
- 11 Singh S, Reddy DCS, Pandey SS. Topical therapy for psoriasis with the use of augmented betamethasone and calcipotriene on alternative weeks. J Am Acad Dermatol. 2000;43:61-5. (4.3.30)
- 12 市橋直樹, 和泉智子, 高木肇, 楊美雪, 樋口実穂, 南波正ほか. ビタミン D₃外用薬とステロイド外用薬との併用療法の検討 - weekday と weekend の使い分け -. 新薬と臨牀. 2004;53:427-33. (4.3.42)
- 13 猿川麻衣子, 長尾麻由子, 五十嵐敦之. 酪酸プロピオン酸ベタメタゾンとカルシポトリオール併用で改善した尋常性乾癬の 3 例. 新薬と臨牀. 2007;56:47-52. (4.3.54)
- 14 Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. J Invest Dermatol. 2009;129:1339-50. (4.3.9)
- 15 Kolbe L, Kligman AM, Schreiner V, Stoudemayer T. Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin. Skin Res Technol. 2001;7:73-7. (4.3.17)
- 16 Saarni H, Jalkanen M, Hopsu-Havu VK. Effect of five anti-inflammatory steroids on collagen and glycoaminoglycan synthesis in vitro. Br J Dermatol. 1980;103:167-73. (4.3.29)
- 17 今泉尚志, 鶴田真章, 北垣忠温, 小野正博, 白川清美, 永田充宏ほか. Calcipotriol (MC903) のラットおよびイヌを用いた単回投与毒性試験. J Toxicol Sci. 1996;21 Suppl 2:277-85. (4.3.43)
- 18 巖原 馨. Betamethasone 誘導体の急性ならびに亜急性毒性に関する研究. 四国医誌 1973;28:153-79. (4.3.46)
- 19 北垣忠温, 小熊義宏, 横田二三夫, 小野正博, 白川清美, 永田充宏ほか. Calcipotriol (MC903) の変異原性試験. J Toxicol Sci. 1996;21 Suppl 2:465-74. (4.3.47)

- 20 Melby JC. Clinical pharmacology of systemic corticosteroids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1977;17:511-27. (4.3.25)
- 21 Von Eickstedt KW. Corticotrophins and corticosteroids. In Meyler's Side Effects of Drugs, 9th ed, Editor Dukes MNG. Publisher Excerpta Medica, Amsterdam, Holland; 1980:643-58. (4.3.38)
- 22 長谷川靖彦, 吉田豊彦, 光前嗣郎, 大原とも子, 岡本あつ子, 阪口いさ子ほか. Betamethasone 17, 21-dipropionate、Prednisolone および Betamethasone 21-disodium phosphate のマウス・ラットにおける催奇形性試験. *応用薬理*. 1974;8:705-20. (4.3.40)
- 23 長谷川靖彦, 吉田豊彦, 光前嗣郎, 山県英弘, 竹川祐司, 阪口いさ子ほか. ウサギにおける Betamethasone 17, 21-dipropionate (S-3440) の催奇形性. *基礎と臨床* 1977;11:74-84. (4.3.41)
- 24 鈴木登志郎, 内山長久, 小池嘉秀, 小野正博, 白川清美, 永田充宏ほか. Calcipotriol (MC903)の生殖・発生毒性試験 (第1報) —ラット皮下投与による妊娠前および妊娠初期投与試験—. *J Toxicol Sci*. 1996;21 Suppl 2:389-401. (4.3.56)
- 25 内山長久, 鈴木登志郎, 小池嘉秀, 小野正博, 白川清美, 永田充宏ほか. Calcipotriol (MC903)の生殖・発生毒性試験 (第2報) —ラット皮下投与による器官形成期投与試験—. *J Toxicol Sci*. 1996;21 Suppl 2:403-24. (4.3.63)
- 26 内山長久, 鈴木登志郎, 小池嘉秀, 小野正博, 白川清美, 永田充宏ほか. Calcipotriol (MC903)の生殖・発生毒性試験 (第3報) —ウサギ皮下投与による器官形成期投与試験—. *J Toxicol Sci*. 1996;21 Suppl 2:425-38. (4.3.61)
- 27 内山長久, 鈴木登志郎, 小池嘉秀, 小野正博, 白川清美, 永田充宏ほか. Calcipotriol (MC903)の生殖・発生毒性試験 (第4報) —ラット皮下投与による周産期および授乳期投与試験—. *J Toxicol Sci*. 1996;21 Suppl 2:439-55. (4.3.62)
- 28 Lowe NJ, Connor MJ, Breeding J, Chalet M. Inhibition of ultraviolet-B epidermal ornithine decarboxylase induction and skin carcinogenesis in hairless mice by topical indomethacin and triamcinolone acetonide. *Cancer Res*. 1982;42:3941-3. (4.3.22)
- 29 Binderup L, Kragballe K. Origin of the use of calcipotriol in psoriasis treatment. *Rev Contemp Pharmacother*. 1992;3:357-65. (4.3.7)
- 30 Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther*. 2000;13:115-26. (4.3.1)
- 31 Binderup L, Bramm E. Effects of a novel vitamin D analogue MC903 on cell proliferation and differentiation *in vitro* and on calcium metabolism *in vivo*. *Biochem Pharmacol*. 1988;37:889-95. (4.3.6)
- 32 Kragballe K, Wildfang IL. Calcipotriol (MC 903), a novel vitamin D₃ analogue stimulates terminal differentiation and inhibits proliferation of cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 1990;282:164-7. (4.3.19)
- 33 Kobayashi T, Hashimoto K, Yoshikawa K. Growth inhibition of human keratinocytes by MC903 (calcipotriol) is linked to dephosphorylation of retinoblastoma gene product. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1995;5:132-8. (4.3.16)
- 34 Peric M, Koglin S, Dombrowski Y, Gross K, Bradac E, Büchau A, et al. Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis. *PLoS One*. 2009;4:e6340. (4.3.69)
- 35 Hegyi Z, Zwicker S, Bureik D, Peric M, Koglin S, Batycka-Baran A, et al. Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2012;132:1416-24. (4.3.68)
- 36 Ahluwalia A. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. *Mediators Inflamm*. 1998;7:183-93. (4.3.2)
- 37 Umland SP, Nahrebne DK, Razac S, Beavis A, Pennline KJ, Egan RW, et al. The inhibitory effects of topically active glucocorticoids on IL-4, IL-5, and interferon-gamma production by cultured primary CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:511-9. (4.3.35)

- 38 Lange K, Kleuser B, Gysler A, Bader M, Maia C, Scheidereit C, et al. Cutaneous inflammation and proliferation in vitro: differential effects and mode of action of topical glucocorticoids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2000;13:93-103. (4.3.20)
- 39 de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Kapsenberg ML. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol.* 1999;66:201-4. (4.3.8)
- 40 Stanley PL, Steiner S, Havens M, Tramposch KM. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol.* 1991;4:262-71. (4.3.31)
- 41 Andoh T, Katsube N, Maruyama M, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B₄ in substance P-induced itch-associated response in mice. *J Invest Dermatol.* 2001;117:1621-6. (4.3.3)
- 42 Meingassner JG, Kowalsky E, Schwendinger H, Elbe-Bürger A, Stütz A. Pimecrolimus does not affect Langerhans cells in murine epidermis. *Br J Dermatol.* 2003;149:853-7. (4.3.24)
- 43 Zeigler M, Chi Y, Tumas DB, Bodary S, Tang H, Varani J. Anti-CD11a ameliorates disease in the human psoriatic skin-SCID mouse transplant model: comparison of antibody to CD11a with Cyclosporin A and clobetasol propionate. *Lab Invest.* 2001;81:1253-61. (4.3.39)
- 44 Vissers WH, Berends M, Muys L, van Erp PE, de Jong EM, van de Kerkhof PC. The effect of the combination of calcipotriol and betamethasone dipropionate versus both monotherapies on epidermal proliferation, ketatinizaion and T-cell subsets in chronic plaque psoriasis. *Exp Dermatol.* 2004;13:106-12. (4.3.37)
- 45 van Rossum MM, van Erp PE, van de Kerkhof PC. Treatment of psoriasis with a new combination of calcipotriol and betamethasone dipropionate: a flow cytometric study. *Dermatol.* 2001;203:148-52. (4.3.36)
- 46 富田正俊, 白川清美, 正木啓二, 小西良士, 江角凱夫, 二宮真一ほか. MC903 の体内動態 (第 2 報) :ラットにおける単回経皮投与時の吸収, 分布, 代謝および排泄. 薬物動態. 1996;11:81-92. (4.3.59)
- 47 富田正俊, 白川清美, 正木啓二, 小西良士, 江角凱夫, 二宮真一ほか. MC903 の体内動態 (第 3 報) :ラットにおける反復経皮および皮下投与時の吸収, 分布, 代謝, 排泄および肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響. 薬物動態. 1996;11:93-105. (4.3.58)
- 48 富田正俊, 白川清美, 正木啓二, 小西良士, 江角凱夫, 二宮真一ほか. MC903 の体内動態 (第 1 報) :ラットにおける単回皮下投与時の吸収, 分布, 代謝, 排泄, 胎盤通過性および乳汁移行. 薬物動態. 1996;11:57-80. (4.3.57)
- 49 Dollery C, editor. *Therapeutic Drugs.* Churchill Livingstone. 1991;1. (4.3.10)
- 50 山田秀雄, 中野正行, 川原政一, 竹内正治, 西内偉格. Betamethasone 17,21-dipropionate (S-3440) の吸収, 分布, 代謝および排泄に関する研究 (第 1 報) ラットにおける経皮吸収. 応用薬理. 1981;21:613-20. (4.3.65)
- 51 山田秀雄, 富田裕, 中川有造, 中野正行, 川原政一, 桜川栄一ほか. Betamethasone 17,21-dipropionate (S-3440) の吸収, 分布, 代謝および排泄に関する研究 (第 3 報) マウスおよびラットにおける排泄ならびにラットおよびウサギにおける代謝. 応用薬理. 1981;21:633-44. (4.3.67)