

グラナテック点眼液 0.4%

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

興和株式会社

2.4 非臨床試験の概括評価

目次

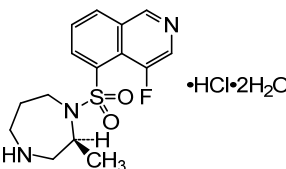
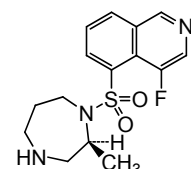
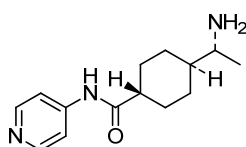
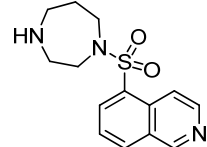
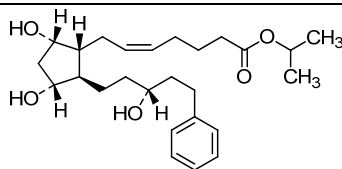
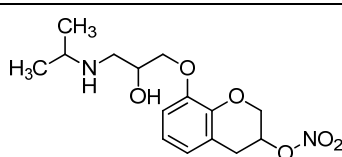
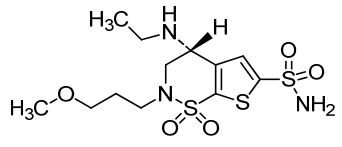
2.4 非臨床試験の概括評価	3
2.4.1 非臨床試験計画概略	6
2.4.1.1 緒言	6
2.4.1.2 薬理試験	7
2.4.1.3 薬物動態試験	7
2.4.1.4 毒性試験	7
2.4.2 薬理試験	9
2.4.2.1 効力を裏付ける試験	9
2.4.2.2 副次的薬理試験	9
2.4.2.3 安全性薬理試験	10
2.4.3 薬物動態試験	11
2.4.3.1 分析法	11
2.4.3.2 吸収	11
2.4.3.3 分布	12
2.4.3.4 代謝	13
2.4.3.5 排泄	14
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用	15
2.4.4 毒性試験	16
2.4.4.1 単回投与毒性試験	16
2.4.4.2 反復投与毒性試験	16
2.4.4.3 遺伝毒性試験	21
2.4.4.4 がん原性試験	22
2.4.4.5 生殖発生毒性試験	22
2.4.4.6 局所刺激性試験	24
2.4.4.7 その他の毒性試験	24
2.4.5 総括及び結論	26
2.4.5.1 薬理試験	26
2.4.5.2 薬物動態試験	26
2.4.5.3 毒性試験	27
2.4.5.4 まとめ	29
2.4.6 参考文献一覧	30

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4 非臨床試験の概括評価

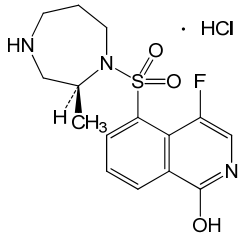
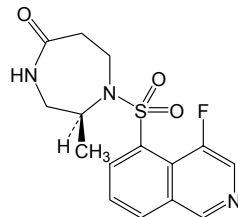
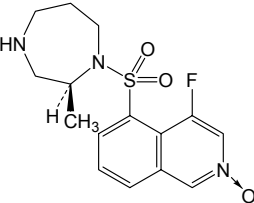
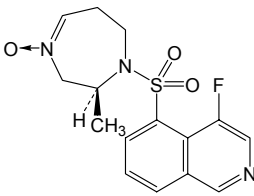
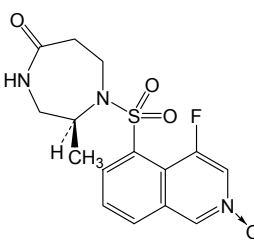
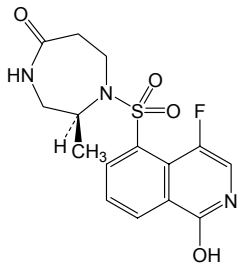
本項で使用した略号及び用語を示した(表 2.4-1, 表 2.4-2及び表 2.4-3)。また, リバスジルの構造を含む薬物(放射性標識体を含む)の投与量, 点眼濃度及び *in vitro* 試験における添加量は, すべてリバスジルとして記載した。

表 2.4-1 化合物略号表 1

略号及び薬物名	化学名(一般名)	構造式
リバスジル塩酸塩水和物 K-115	4-Fluoro-5-[(2 <i>S</i>)-2-methyl-1,4-diazepan-1-yl]sulfonyl]-isoquinoline monohydrochloride dihydrate	
リバスジル	4-Fluoro-5-[(2 <i>S</i>)-2-methyl-1,4-diazepan-1-yl]sulfonyl]-isoquinoline	
Y-27632	(1 <i>R</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(1 <i>R</i>)-1-Aminoethyl]- <i>N</i> -(4-pyridin-4-yl)cyclohexane-1-carboxamide	
HA-1077	Hexahydro-1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-1 <i>H</i> -1,4-diazepine (Fasudil)	
ラタノプロスト	(+)-Isopropyl(<i>Z</i>)-7-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-dihydroxy-2-[(3 <i>R</i>)-3-hydroxy-5-phenylpentyl]cyclopentyl]-5-heptenoate	
ニプラジロール	3,4-Dihydro-8-(2-hydroxy-3-isopropylamino)propoxy-3-nitroxy-2 <i>H</i> -1-benzopyran	
プリンゾラミド	(4 <i>R</i>)-4-(Ethylamino)-3,4-dihydro-2-(3-methoxypropyl)-2 <i>H</i> -thieno-[3,2, <i>e</i>]-1,2-thiazine-6-sulfonamide-1,1-dioxide	

2.4 非臨床試験の概括評価

表 2.4-2 化合物略号表 2

略号	名称	構造式
M1	1-hydroxy-K-115 (合成標準物質は 1 塩酸塩, 代謝物はフリー体として表 示)	
M2	5-keto-K-115	
M3	K-115-N-oxide	
M4	K-115-nitrone	
M5	5-keto-K-115-N-oxide	
M6	1-hydroxy-5-keto-K-115	

2.4 非臨床試験の概括評価

表 2.4-3 略号及び用語の定義

略号及び用語	内容
AUC	濃度-時間曲線下面積
BA	生物学的利用率
CHO	コレステロール
CL	クリアランス
CLint	代謝固有クリアランス
Cmax	最高濃度
CYP	チトクロム P450
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-RAD	高速液体クロマトグラフィー-放射能検出(on-line)
HPLC-RLG	高速液体クロマトグラフィー-放射能検出(off-line)
IC ₅₀	50%阻害濃度
JAN	Japanese Accepted Name for Pharmaceuticals
Km	ミカエリス-メンテン定数
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置
PT	プロトンビン時間
ROCK	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase
S9	組織ホモジネートを 9000×g で遠心分離した上清分画
tmax	最高濃度到達時間
UDS	不定期 DNA 合成
Vmax	最大生成速度
ヒト臨床用量	リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%の 1 日 2 回点眼

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 緒言

リパスジル塩酸塩水和物は、Rho キナーゼ選択的な阻害作用を有する薬物である。リパスジル塩酸塩水和物の構造式を図 2.4.1-1 に示す。

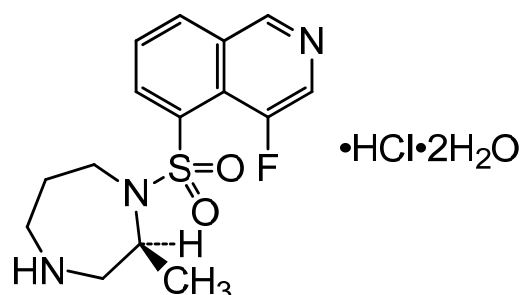


図 2.4.1-1 リパスジル塩酸塩水和物の化学構造式

一般名: (日本名)リパスジル塩酸塩水和物(JAN)

(英名)Ripasudil Hydrochloride Hydrate(JAN)

化学名: 4-Fluoro-5-[(2S)-2-methyl-1,4-diazepan-1-yl]sulfonyl}isoquinoline monohydrochloride dihydrate

分子式: $C_{15}H_{18}FN_3O_2S \cdot HCl \cdot 2H_2O$

分子量: 395.88

Rho キナーゼは、低分子量 G 蛋白質 Rho と結合するセリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素である¹⁾。Rho キナーゼは Rho と結合し、Rho/Rho キナーゼシグナル伝達系として様々な生理機能に参与している。代表的な機能としては、血管平滑筋の収縮弛緩への関与、細胞の遊走制御及び遺伝子発現制御などが報告されている²⁾。

ヒトでは ROCK-1 と ROCK-2 の 2 つのアイソフォームが存在し、多くの組織に分布している³⁾。眼局所では、主に毛様体筋、線維柱帯、虹彩、網膜で ROCK-1 及び ROCK-2 の発現が認められている⁴⁾。Rho キナーゼ阻害薬を点眼投与すると眼圧下降作用を示すが、この機序は線維柱帯-シュレム管を介する主流出路からの房水流出促進であることが報告されている^{5),6),7)}。

リパスジル塩酸塩水和物は、より強力な Rho キナーゼ阻害作用を目的として創薬された薬物であり、優れた眼圧下降作用が期待される。また、既存の緑内障治療薬とは異なる眼圧下降機序であることから、既存の緑内障治療薬との併用使用も可能であり、緑内障治療の現場に新たな選択肢を提供できる臨床的に意義の高い薬物である。そこで興和株式会社では点眼剤としての開発に着手し、種々の非臨床試験を実施してリパスジル塩酸塩水和物の有効性及び安全性を評価した。

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1.2 薬理試験

効力を裏付ける試験として、リパスジル塩酸塩水和物の酵素阻害活性及び眼圧下降作用について検討した。酵素阻害作用は、ROCK 及び ROCK 以外のセリン・スレオニン蛋白リン酸化酵素に対する阻害活性を評価した。ウサギ及びサルを用いてリパスジル塩酸塩水和物点眼液を単回及び反復点眼し、眼圧下降作用とその持続時間を評価した。更に高眼圧ウサギに対する効果や他の緑内障治療薬との併用効果について検討した。

副次的薬理項目として、ウサギにリパスジル塩酸塩水和物点眼液を点眼した際の房水流出率、ぶどう膜強膜流量及び房水産生に対する影響を評価した。また、リパスジル塩酸塩水和物の代謝物の酵素阻害作用と眼圧下降作用を評価した。

安全性薬理試験として、*in vivo* で全身投与による一般症状・中枢神経系及び呼吸器系、*in vivo* および *in vitro* で心血管系に及ぼす影響を評価した。安全性薬理試験は GLP を遵守して実施した。

2.4.1.3 薬物動態試験

リパスジル塩酸塩水和物の眼局所及び全身の薬物動態を検討した。*In vivo* 試験では、臨床投与経路である点眼投与はウサギを用いて実施し、経口及び静脈内投与はラットを用いて実施した。また、リパスジルはメラニン親和性があるため有色動物を用いて組織分布を評価した。更に、*in vitro* 試験ではヒト及び各種動物の生体試料やヒト遺伝子発現蛋白を用いた分布及び代謝試験を実施した。

2.4.1.4 毒性試験

リパスジル塩酸塩水和物点眼液又はその有効成分であるリパスジル塩酸塩水和物の非臨床での安全性評価を目的として、マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験、イヌを用いた急性毒性試験、ラット、ウサギ、イヌ及びサルを用いた反復投与毒性試験、細菌、哺乳類細胞、ラット及びウサギを用いた遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、ウサギを用いた局所刺激性試験、マウス及びモルモットを用いた皮膚感作性試験及び皮膚光感作性試験、ウサギ及びサルを用いた眼毒性試験を実施した。また、ヒト水晶体上皮細胞を用いた毒性発現(水晶体混濁)の機序に関する試験、ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性及び充血確認試験(併用点眼)、サルを用いた角膜内皮細胞形態変化確認試験、ウサギ、イヌ及びサルを用いた眼内濃度測定試験を実施した(表 2.4.1-1)。なお、がん原性試験は不要と判断し、実施しなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価

表 2.4.1-1 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	GLP 適用
単回投与毒性試験 急性毒性試験	経口及び静脈内 経口	マウス及びラット イヌ	適 適
反復投与毒性試験 4 週	経口 点眼	ラット及びイヌ イヌ	適 適
13 週	経口及び点眼	イヌ	適
26 週	点眼	ウサギ	適
52 週	点眼	サル	適
遺伝毒性試験 復帰突然変異試験	<i>in vitro</i>	ネズミチフス菌及び 大腸菌	適
染色体異常試験	<i>in vitro</i>	培養ヒトリンパ球	適
小核試験	経口	ラット	適
ウサギ角膜における UDS 試験	点眼	ウサギ	適
生殖発生毒性試験 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	経口	ラット	適
胚・胎児発生に関する試験	経口	ラット及びウサギ	適
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	経口	ラット	適
局所刺激性試験 眼粘膜一次刺激性試験	点眼	ウサギ	適
眼粘膜累積刺激性試験	点眼	ウサギ	適
その他の毒性試験 皮膚感作性試験	経皮	マウス及びモルモット	適
皮膚光感作性試験	経皮	マウス及びモルモット	適
毒性発現の機序に関する試験	<i>in vitro</i>	ヒト水晶体上皮細胞	非適
眼粘膜一次刺激性及び充血確認試験(併用点眼)	点眼	ウサギ	非適
眼毒性試験	点眼	ウサギ及びサル	適
角膜内皮細胞形態変化確認試験	点眼	サル	非適
眼内濃度測定試験	点眼	ウサギ, イヌ及びサル	非適

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

リパスジル塩酸塩水和物は ROCK のアイソフォームであるヒト ROCK-1 及び ROCK-2 に対して IC₅₀ 値でそれぞれ 0.051 及び 0.019 μ mol/L の阻害強度を示し、他の ROCK 阻害薬である Y-27632 や HA-1077 と比較して強力であった。更に他のセリン・スレオニン蛋白リン酸化酵素に対する阻害作用は ROCK 阻害作用と比べ弱く、リパスジル塩酸塩水和物は ROCK に対して選択的な阻害作用を示した。また、 α_1 、 β 、プロスタノイド受容体や炭酸脱水酵素など既知の眼圧下降作用に関連した受容体や酵素、その他の受容体、チャネルに対する親和性及び酵素に対する抑制作用を示さず、リパスジル塩酸塩水和物は ROCK に対して選択的な阻害作用を示すことが明らかとなった。(I2.6.2.2.1)

リパスジル塩酸塩水和物点眼液を点眼した際の眼圧下降作用についてウサギ、サルを用いて検討した。正常眼圧白色ウサギに対するリパスジル塩酸塩水和物点眼液の単回点眼試験では、0.0625%以上の濃度で点眼後速やかに有意かつ濃度依存的な眼圧下降作用を示した。反復点眼では初回点眼と同様の眼圧下降推移を示した。正常眼圧サルにおける単回点眼試験において、リパスジル塩酸塩水和物点眼液は点眼後速やかに濃度に依存した眼圧下降作用を示し、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%の最大眼圧下降作用はプロスタグランジン受容体作動薬であるラタノプロスト点眼液 0.005%と比べ有意に強力であった。また、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%の眼圧下降作用の持続時間はラタノプロスト点眼液 0.005%と同程度であった。高眼圧白色ウサギにおいても、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%は基剤に対して有意な眼圧下降作用を示した。更に、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%は正常眼圧サルにおいてラタノプロスト点眼液 0.005%と、正常眼圧白色ウサギにおいて α 受容体及び β 受容体遮断薬であるニプラジロール点眼液 0.25%又は炭酸脱水酵素阻害薬であるブリンゾラミド点眼液 1%との併用点眼により、いずれも相加的な眼圧下降作用を示した。(I2.6.2.2.2)

2.4.2.2 副次的薬理試験

リパスジル塩酸塩水和物の眼圧下降作用機序を解明するために、白色ウサギを用い房水動態に対する作用を検討した。リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%の点眼により房水流出率の増加を示した一方で、ぶどう膜強膜及び房水産生量に対して影響を示さなかったことから、眼圧下降作用機序として線維柱帯-シュレム管を介する主流出路からの房水流出増加作用が推定できた(I2.6.2.3.1)。またリパスジル塩酸塩水和物点眼液 1.0%を正常眼圧有色ウサギに頻回点眼した際に前房内の蛋白濃度及び細胞数に変化は認められず、リパスジル塩酸塩水和物は血液房水柵に影響を与えないことが明らかとなった(I2.6.2.3.2)。

リパスジル塩酸塩水和物の代謝物の薬理作用について検討した結果、M1、M2 及び M6 の ROCK-1 に対する阻害作用(IC₅₀ 値)はリパスジル塩酸塩水和物と比較してそれぞれ約 1/6、約 1/27 及び約 1/390 であり、ROCK-2 に対する阻害作用(IC₅₀ 値)はリパスジル塩酸塩水和物と比較してそれぞれ約 1/9、約 1/25 及び約 1/370 であった。更にリパスジル塩酸塩水和物の代謝物である M1 点眼液 0.4%の眼圧下降作用は点眼後 2 時間に

2.4 非臨床試験の概括評価

においてピークとなり、最大の眼圧下降作用はリパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%と比較して約 1/3 であった(2.6.2.3.3)。以上の結果から、リパスジル塩酸塩水和物及び M1 の眼圧下降作用強度は ROCK-1 及び ROCK-2 に対する酵素阻害作用に基づくものであると考えられた。

2.4.2.3 安全性薬理試験

リパスジル塩酸塩水和物をラット又はイヌに経口投与した際に 3mg/kg まで中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に変化は認められず、安全域はリパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%の臨床 1 日投与量に比べ約 230 倍であった。*In vitro* 試験ではリパスジル塩酸塩水和物は 0.82 μ mol/L からウサギプルキンエ線維における活動電位持続時間の延長作用を示し、10 μ mol/L から hERG 電流の抑制作用を示した。健康成人日本人男性を対象とした第 I 相臨床試験でリパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%を 1 日 2 回 7 日間反復点眼した際の C_{max}(表 2.5.3-1)と比較して、ウサギプルキンエ線維において活動電位持続時間の延長作用を示した 0.82 μ mol/L は約 410 倍、hERG 電流の抑制作用を示した 10 μ mol/L は約 5000 倍の乖離があった。これらより、リパスジル塩酸塩水和物の点眼により中枢神経系、呼吸器系及び心血管系への影響は低いと考えられた(2.6.2.4)。

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

被験物質にはリパスジル塩酸塩水和物原薬，リパスジル塩酸塩水和物標準物質及びリパスジル塩酸塩水和物点眼液を用いた。また， ^{14}C 標識した放射性標識体(^{14}C -リパスジル塩酸塩)を試験に用いた。一部の試験では代謝物標準物質を用いた。

^{14}C -リパスジル塩酸塩を用いた試験では，生体試料中の総放射能は液体シンチレーションカウンタで測定し，未変化体及び代謝物は HPLC で分離後に放射能検出器で測定(HPLC-RAD 法)若しくは HPLC 溶離液をプレートに分取しバイオイメージングアナライザーシステムで放射エネルギーを測定(HPLC-RLG 法)した。

非標識体を用いた試験では，生体試料中の未変化体及び代謝物濃度は前処理後に LC-MS/MS 法により測定した。

2.4.3.2 吸収

雄性有色ウサギにリパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%(50 μL)を単回両眼点眼した際の角膜及び眼房水中リパスジル濃度は，最初の採取時点である点眼後 0.25 時間で最高濃度に達し，その後速やかに消失した。水晶体中リパスジル濃度は点眼後 0.5 時間に最高濃度に達し，その後緩やかに消失した。リパスジルは点眼後，点眼部位から角膜，眼房水その後内部組織という順に移行することが示唆された(2.6.4.3.1)。

雌雄ラットにリパスジル塩酸塩水和物を 1, 3, 10mg/kg の投与量で単回経口投与した際には，血漿中リパスジル濃度は速やかに最高濃度に達し， C_{max} は雄性ラットでそれぞれ 72.9, 487, 2850ng/mL，雌性ラットでそれぞれ 186, 740, 2790ng/mL であった。消失半減期は雄性ラットで 30.9～54.2 分，雌性ラットで 30.1～66.6 分であった。また，経口投与した際の C_{max} 及び AUC はいずれも用量比以上の増加を認めた。1mg/kg の投与量で単回静脈内投与した際の CL は雄性ラットで 35.0mL/min/kg，雌性ラットで 36.8mL/min/kg であった[2.6.4.3.2(1)及び2.6.4.3.2(2)]。

雄性ラットに ^{14}C -リパスジル塩酸塩を 1, 3, 10mg/kg の投与量で単回経口投与した際の血漿中放射能濃度の C_{max} はそれぞれ 0.315, 1.36, 3.27 $\mu\text{g} \cdot \text{eq.}/\text{mL}$ であった。 ^{14}C -リパスジル塩酸塩を単回経口投与した際の血漿中放射能濃度の C_{max} 及び AUC と投与量との相関性は良好であり，AUC から算出した吸収率は 84～86%と高い割合であった。 ^{14}C -リパスジル塩酸塩を単回静脈内投与した際の血漿中放射能濃度の消失半減期は経口投与時と同様に長かったが(27.5 時間)，未変化体ではなく代謝物の存在が影響していると考えられた(2.6.4.3.2)。

雄性白色ウサギにリパスジル塩酸塩水和物点眼液 1.0%(50 μL)を単回片眼点眼した際には，最初の採血時点でリパスジルは最高血漿中濃度を示し(t_{max} : 6.26 分， C_{max} : 63.9ng/mL)，点眼後の循環血への薬物移行が速やかであることが示された[2.6.4.3.2(3)]。また，消失半減期は 24.9 分と短かったが，BA は 95.8%であり，高い体循環移行性を認めた。1, 3, 10mg/kg の投与量で単回静脈内投与した際の CL はそれぞれ 109, 87.7, 64.4mL/min/kg であった[2.6.4.3.2(4)]。

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.3.3 分布

雄性白色ラットに ^{14}C -リパスジル塩酸塩を 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際の放射能は、15 分後にほとんどの組織で最高濃度を示し、速やかな組織移行性を認めた。投与後 168 時間には組織内濃度は減少し、組織への蓄積性はないと推察された[!2.6.4.4.1(1)]。

雄性有色ラットに ^{14}C -リパスジル塩酸塩を 1mg/kg の投与量で単回静脈内投与した際の放射能は、メラニンを含有していない組織では投与後 168 時間まで白色ラットとおおむね同様の分布を示したが、メラニンを含有する眼球ぶどう膜などからの消失は緩やかであった[!2.6.4.4.1(3)]。

雄性白色ウサギに ^{14}C -リパスジル塩酸塩点眼液 1.0%(50 μL)を単回片眼点眼した際の眼部オートラジオグラフィ試験では、放射能は水晶体を除く眼組織で点眼後 15 分に最高濃度を示し、眼球内移行性は良好であった。点眼側と非点眼側を比較すると、涙腺はおおむね同程度の濃度を示したが、眼球の各組織では点眼側が高濃度を示した。雄性有色ウサギではメラニンを含有しない組織の放射能分布は白色ウサギと同様であり、メラニンを含有する虹彩・毛様体及び網膜・脈絡膜には高濃度に分布し、緩やかに消失した[!2.6.4.4.2(1)]。

雄性有色ウサギに ^{14}C -リパスジル塩酸塩点眼液 1.0%(50 μL)を単回及び反復(1 日 2 回、投与間隔 10 時間、7 日間)両眼点眼した際の眼組織中放射能濃度を測定した結果、反復時に特にメラニン含有組織では放射能濃度の増大を認めたが、オートラジオグラフィ試験と同様の速やかな眼内移行分布を示した[!2.6.4.4.2(2)]。

平衡透析法(*in vitro*)による ^{14}C -リパスジル塩酸塩のヒト、イヌ、ウサギ及びラット血漿での蛋白結合率はそれぞれ 55.4～59.8%，41.8～43.1%，41.2～41.9%及び 35.3～36.7%であった。また、ヒト血漿の構成蛋白であるヒト血清アルブミン(HSA)及び酸性糖タンパク(α_1 -AGP)に対する蛋白結合率はそれぞれ 19.7～22.7%及び 27.6～30.4%であった(!2.6.4.4.3)。

^{14}C -リパスジル塩酸塩の *in vitro* 血球移行率はヒト、イヌ、ウサギ及びラットでそれぞれ 37.7～45.8%，47.5～52.2%，47.6～50.9%及び 48.0～49.4%であった。 ^{14}C -リパスジル塩酸塩を雄性ラットに 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際の血球移行率は、15 分後では 22%であったが、経時的に上昇して 168 時間後では 86%を示した(!2.6.4.4.4)。

リパスジル塩酸塩水和物及び代謝物(M1 及び M2)の合成メラニンに対する結合率及び解離率を評価した結果、それぞれのメラニン親和能は対照薬物としたクロロキンの 10 分の 1 以下であった。また、結合は可逆的であると考えられた(!2.6.4.4.5)。

摘出角膜を用いた *in vitro* でのリパスジルの角膜透過性定数はヒト、サル、イヌ及びウサギでそれぞれ 6.81, 6.44, 2.91 及び 5.96 ($\times 10^{-6}$ cm/sec)であり、大きな種差は認めなかった(!2.6.4.4.6)。

摘出水晶体を用いた *in vitro* 超遠心分離法でのリパスジルの水晶体蛋白結合率はヒト、サル、イヌ及びウサギでそれぞれ 27.91%，23.55%，20.31～25.63%及び 17.55～24.36%と、大きな種差は認めなかった(!2.6.4.4.7)。

妊娠ラットに ^{14}C -リパスジル塩酸塩を 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際の全身オートラジオグラフィ試験では、放射能は 15 分後にほとんどの組織で最高濃度を

2.4 非臨床試験の概括評価

示し、胎児の肝臓で若干高濃度を示したが、母体の血液中濃度を下回った。投与後 72 時間では胎児の消化管内容物に母体の血液中濃度を上回る放射能が検出されたが、他の部位ではほとんどが消失した(12.6.4.4.8)。

2.4.3.4 代謝

リパスジルの代謝物としては M1, M2, M3, M4, M5 及び M6 が同定された。

雄性有色ウサギに ^{14}C -リパスジル塩酸塩点眼液 1.0%(50 μL)を単回及び反復(1 日 2 回, 投与間隔 10 時間)両眼点眼した際の 7 日目最終点眼後の角膜, 眼房水及び虹彩・毛様体中には代謝物として M1 のみが認められた(12.6.4.5.1)。存在割合はリパスジルよりも明らかに低い値であり, 点眼後の眼内組織ではリパスジルが薬効本体であることが示された。

雄性ラットに ^{14}C -リパスジル塩酸塩を 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際の血漿中代謝物ピークはその多くが既知代謝物(M1, M2, M3, M4, M5, M6)であり, 存在割合の大きい代謝物は M5(18.9~27.9%)及び M3(14.9~27.4%)であった。尿中の代謝物は血漿と同様であったが, 糞中の代謝物には未同定代謝物が多く認められた。尿及び糞の脱抱合反応(β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ酵素処理)後のプロファイルは脱抱合反応していない結果と同様であり, 抱合体代謝物は存在しなかった[12.6.4.5.2(1)]。

リパスジル塩酸塩水和物を雌雄ラットに 1, 3 及び 10mg/kg の投与量で単回経口投与後のリパスジル及びその代謝物の血漿中濃度を測定した結果, 雄性ラットでは M5, 雌性ラットでは M2 の濃度が高く性差も認められたが, いずれの代謝物濃度もヒト臨床曝露量を上回った[12.6.4.5.2(2)]。

臨床第 I 相頻回・反復投与試験でのリパスジル塩酸塩水和物点眼液を点眼後の血漿及び尿を用いて, ヒトでの代謝物を検索した。臨床試験で測定対象とした M1 及び M2 のほか, M6 の存在が確認された。その存在量は血漿中では極めてわずかであり, 尿中ではリパスジルより多かった(12.6.4.5.3)。

ヒト及び各種動物の肝 S9 を用いた ^{14}C -リパスジル塩酸塩の代謝試験では, 代謝固有クリアランス(CL_{int})はウサギ, サル, ヒト, ラット, イヌの順で大きく, ヒトの CL_{int} は 38.0 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ であった。補酵素(NRS: NADPH-regenerating system)非添加条件下でもサル, ヒト, ウサギでリパスジルの減衰を確認した。代謝物生成は種差が大きく, ヒトでは M1 が最も多く生成し, その他の代謝物として M2, M4 及び M6 の生成をわずかに認めた[12.6.4.5.4(1)]。

ヒト肝 S9 を用いた ^{14}C -リパスジル塩酸塩の代謝試験での, キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールの添加では, 代謝の阻害を認めなかったが, アルデヒドオキシダーゼの阻害剤であるメナジオン及びラロキシフェンの添加では代謝が阻害された。また, アルデヒドオキシダーゼの単一発現系を用いた場合には M1 の生成を確認したことから, アルデヒドオキシダーゼが主に M1 への代謝に関与していることが示唆された[12.6.4.5.4(3)]。

ヒト及び各種動物の凍結肝細胞を用いた ^{14}C -リパスジル塩酸塩の代謝試験では, CL_{int} はヒトで細胞間差が認められ(4.19~63.6 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$), 動物の CL_{int} はウサギ,

2.4 非臨床試験の概括評価

サル、イヌ、ラットの順で大きかった。代謝物生成も種差が大きく、ヒトでは M1 が最も多く生成し、その他の代謝物として M2, M3, M4 及び M6 のわずかな生成を認めた(!2.6.4.5.5)。

ヒト肝 S9 を用いたリパスジル塩酸塩水和物及び代謝物の代謝試験では、代謝物の CLint はリパスジルと比較して低値であった。ヒト CYP 単一発現系を用いた代謝試験ではリパスジルの減衰は少ないものの、分子種の中では CYP3A4 及び CYP3A5 でのリパスジルの CLint が最も高い値であった。代謝物生成の Vmax/Km の値よりリパスジルから M1 への代謝が主代謝経路であり、アルデヒドオキシダーゼがこの代謝に関与することが示された。また、リパスジルはアルデヒドオキシダーゼ、CYP3A4 及び CYP3A5 により M2 へ代謝され、CYP2C8, CYP3A4 及び CYP3A5 により M4 へ代謝されることが示された。更に、M2 はアルデヒドオキシダーゼにより M6 へ代謝されることが示唆された(!2.6.4.5.6)。

ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 酵素誘導試験では、誘導倍率は陽性対照と比較し明らかに低い倍率を示し、0.0032～10µmol/L のリパスジル塩酸塩水和物による CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導作用は認められなかった(!2.6.4.5.8)。

ヒト肝ミクロゾーム、ヒト肝 S9 及び HRP(horseradish peroxidase)/H₂O₂ の各種酵素源を用い、リパスジル及び陽性対照(クロザピン及びアプラクロニジン)を GSH(還元型グルタチオン)存在下でインキュベーションし、反応性代謝物のグルタチオン付加体を検索した結果、リパスジル及びその代謝物のグルタチオン付加体ピークは認めなかったことから、ヒトで反応性代謝物が生成する可能性は低いと考えられた(!2.6.4.5.9)。

2.4.3.5 排泄

リパスジル塩酸塩水和物を雄性及び雌性ラットに 1, 3, 10mg/kg の投与量で単回経口投与した際には、尿中にはリパスジルとしてそれぞれ 0.570～3.55%及び 3.91～4.35%が、糞中にはそれぞれ 0.324～0.693%及び 0.190～0.246%が排泄された[!2.6.4.6.1(1)]。

¹⁴C-リパスジル塩酸塩を雄性ラットに 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際には、投与放射能の 43.80%が尿中に、42.10%が糞中に、3.60%が呼気中に排泄された[!2.6.4.6.1(2)]。尿及び糞中への未変化体としての排泄は少なく、その多くが代謝物として排泄されることが示唆された。

リパスジル塩酸塩水和物を雄性及び雌性ラットに 1mg/kg の投与量で単回静脈内投与した際には、尿中にはリパスジルとしてそれぞれ 5.65%及び 6.30%が、糞中にはそれぞれ 0.212%及び 0.215%が排泄された[!2.6.4.6.1(1)]。

¹⁴C-リパスジル塩酸塩を雄性ラットに 1mg/kg の投与量で単回静脈内投与した際には、投与放射能の 39.15%が尿中に、49.45%が糞中に、3.32%が呼気中に排泄され、経口投与時と同様に尿及び糞中に排泄された放射能の多くは代謝物であることが示唆された[!2.6.4.6.1(2)]。

胆管カニューレを処置した雄性ラットに ¹⁴C-リパスジル塩酸塩を 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際には、投与放射能の 45.98%が尿中に、38.91%が胆汁中に、9.84%が糞中に排泄されており、ラットでの体循環からの排泄経路は尿中排泄並びに胆汁を介した糞中排泄であることが示された(!2.6.4.6.2)。

2.4 非臨床試験の概括評価

リパスジル塩酸塩水和物点眼液 1.0%(50 μ L)を雄性白色ウサギに単回片眼点眼した際の尿及び糞中への未変化体排泄率は、それぞれ 1.66%及び 0.417%であった。リパスジル塩酸塩水和物を雄性白色ウサギに 1, 3, 10mg/kg の投与量で単回静脈内投与した際の尿及び糞中への未変化体排泄率は、それぞれ 0.616~0.826%及び 0.238~0.797%であった[!2.6.4.6.1(3)]。ウサギでも未変化体としての排泄は少なく、多くが代謝物として排泄されることが示唆された。

出産 13~14 日目の授乳期ラットに 14 C-リパスジル塩酸塩を 3mg/kg の投与量で単回経口投与した際には、放射能は乳汁中に移行することが確認されたが、その濃度は血漿中濃度の低下に伴って消失したことから(!2.6.4.6.3)、蓄積性はなく、点眼投与ではヒト血漿中濃度は低いことから乳児への曝露は低いと考えた。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 試験では、リパスジルは CYP2D6 阻害作用を示し、IC₅₀ 値は 5.1 μ mol/L(競合阻害群)及び 3.8 μ mol/L(プレインキュベーション群)であった。また、リパスジルはプレインキュベーション群で CYP3A4/5 阻害作用を示し、IC₅₀ 値は 14 μ mol/L であった。その他の CYP 分子種(CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2C19)に対する阻害作用並びに M1 の各 CYP 分子種に対する阻害作用はほとんど認められなかった(IC₅₀ 値: >25 μ mol/L)(!2.6.4.7.1)。

ヒト肝サイトゾルを用いた *in vitro* 試験では、リパスジルはアルデヒドオキシダーゼ阻害作用を示し、IC₅₀ 値は 1.4 μ mol/L であった。陽性対照阻害剤として用いたメナジオン及びラロキシフェンの IC₅₀ 値はそれぞれ 0.12 μ mol/L 及び 0.0012 μ mol/L であり、リパスジルは陽性対照と比較し阻害作用は低いことが示された(!2.6.4.7.2)。リパスジルの CYP 及びアルデヒドオキシダーゼ阻害の IC₅₀ 値は点眼時の血漿中濃度と比較すると非常に低く、代謝酵素阻害を介した循環血液中での薬物相互作用は起こさないと考えられた。

雄性有色ウサギにリパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%(50 μ L)及びザラカム配合点眼液(0.005%ラタノプロスト・0.5%チモロールマレイン酸塩配合点眼液, 50 μ L)を単独若しくは併用点眼した際の角膜、眼房水及び水晶体中リパスジル濃度、眼房水中チモロール濃度及び眼房水中ラタノプロスト酸濃度を測定した結果、各組織中濃度は単独と併用でほとんど差がないと考えられ(!2.6.4.7.3)、リパスジル塩酸塩水和物点眼液とザラカム配合点眼液は相互の眼内動態へはほとんど影響しないものと推察した。

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は、マウス及びラットで、急性毒性試験は、イヌで実施した。

マウスの経口投与(12.6.6.2.1)では、概略の致死量は雌雄共に 122.55mg/kg であり、静脈内投与(12.6.6.2.2)では、雄が 20.42mg/kg、雌が 20.42mg/kg を上回る量であった。一般状態観察では、自発運動減少、頻呼吸、振戦、攣縮、体温低下、部分的閉眼、立毛が認められたが、翌日には回復した。

ラットの経口投与(12.6.6.2.3)では、概略の致死量は雌雄共に 101.96mg/kg、静脈内投与(12.6.6.2.4)では、雌雄共に 20.42mg/kg を上回る量であった。一般状態観察では、自発運動減少、頻呼吸、歩行異常、痙攣、攣縮、うずくまり、部分的閉眼、立毛、皮膚発赤などが認められたが、観察期間中に回復した。

イヌの短期(2～4 日間)反復投与(12.6.6.2.5)での最大耐量は、雄では 25mg/kg/日を下回る量、雌では 18mg/kg/日付近であった。一般状態観察では、痙攣、振戦、自発運動減少、強直性歩行などが認められた。

なお、ラット経口投与での最大非致死量(81.70mg/kg)の曝露量(AUC_{0-6h})は、雄 64700ng・h/mL、雌 19100ng・h/mL(12.6.7.5)であり、それぞれヒト臨床曝露量(リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%を 1 日 2 回 7 日間投与時の最終点眼後の AUC_{0-τ}の 2 倍値: 0.508ng・h/mL)(表 2.5.3-1)の約 120000 倍、37000 倍であることから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないと判断した。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 ラットを用いた反復投与毒性試験

ラットを用いた反復投与毒性試験として、4 週間反復経口投与毒性試験(0, 10, 30, 90mg/kg/日) (12.6.6.3.7)を実施した。なお、雄の 90mg/kg/日群では死亡例、痙攣、歩行異常及び刺激に対する過敏反応などを示す動物が認められたため、投与を 15 日間で終了し途中剖検を実施した。一般状態観察では雌雄の 10mg/kg/日以上群で四肢の発赤が認められたが、薬理作用に基づく変化と判断した。肝臓では、雄の 30mg/kg/日以上群及び雌の 90mg/kg/日群で小葉中心性肝細胞肥大が、雌雄の 90mg/kg/日群で胆管過形成が認められ、これらに伴う重量の高値、CHO の高値、PT の延長などが認められた。肺では、雄の 30mg/kg/日以上群で、血管周囲でのマクロファージ褐色色素沈着を伴う炎症性細胞浸潤、肺胞でのマクロファージ褐色色素沈着、赤血球貪食細胞増加などが認められ、これらに伴う重量の高値、好中球数、単球数の高値などが認められた。また、下顎や腸管膜のリンパ節でも、雄の 90mg/kg/日群で赤血球増加及び赤血球貪食細胞の増加が認められた。また、血液学的検査では、これらの変化に伴う赤血球数の低値が雄の 90mg/kg/日群で認められ、組織学的には脾臓で髄外造血が認められた。精巣上体では、雄の 90mg/kg/日群で管腔内精細胞変性、精子数減少、精液瘤肉芽腫、精巣上体管拡張が認められ、重量の高値も認められた。精巣では、雄の 90mg/kg/日群で精細管の拡張などが認められ、重量の高値が認められた。涙腺では、雄の 30mg/kg/日以上群で腺房細胞の萎縮が認められた。腎臓では、雄の 90mg/kg/日群で皮質塩基性尿細管が認められた。なお、これらの変化は休薬期間で完全に回復、若しくは回復

2.4 非臨床試験の概括評価

傾向が認められたことから回復性のある変化と判断した。

2.4.4.2.2 ウサギを用いた反復投与毒性試験

ウサギを用いた反復投与毒性試験として、26 週間反復点眼投与毒性試験、26 週間反復点眼投与毒性試験(無毒性量確認試験)、水晶体変化の回復性試験を実施した。

26 週間反復点眼投与毒性試験[基剤(4 回/日), 1.0%(4 回/日), 2.0%(4 回/日)](2.6.6.3.1)では、一般状態観察で、雌雄の 1.0%(4 回/日)以上の群で眼瞼結膜及び眼球結膜の充血が認められた。また、眼科学的検査では、雌雄の 1.0%(4 回/日)以上の群で水晶体前皮質の白色点が認められ、雌の 2.0%(4 回/日)群では水晶体前皮質の混濁も認められた。病理組織学的検査では、水晶体線維細胞への分化、その後の伸展、遊走を阻害することによる水晶体前部の線維の変性像(以下、線維変性)が雌雄の 2.0%(4 回/日)群で、水晶体前部の上皮細胞多層化が雄では 2.0%(4 回/日)群で、雌では 1.0%(4 回/日)以上の群で認められた。

26 週間反復点眼投与毒性試験(無毒性量確認試験)[基剤(2 回/日), 0.5%(2 回/日), 1.0%(2 回/日)](2.6.6.3.2)では、一般状態観察で、0.5%(2 回/日)以上の群で眼瞼結膜及び眼球結膜の充血が認められたが、眼科学的検査、病理組織学的検査では被験物質に起因する変化は認められなかった。

水晶体変化の回復性試験[基剤(4 回/日), 2.0%(4 回/日)](2.6.6.3.3)では、眼科学的検査で認められた水晶体前皮質の白色点(斑)及び混濁は 13 週間の休薬期間でも回復性は認められなかった。また、病理組織学的検査で認められた水晶体前部の上皮細胞多層化は回復性が認められたが、水晶体前部の線維変性は程度の増強はないものの回復性が認められず、水晶体深部へと移動することが確認された。また、本試験で水晶体の変化を詳細に観察したところ、縫合線の白色点、水晶体前皮質の白色点、白色斑、混濁が認められ、縫合線部に限定して起きる変化であることが確認された。また、眼科学的検査で水晶体の縫合線に変化が認められた動物のみで多数例に水晶体前部の線維変性が認められ、そのうちの数例で上皮細胞多層化が認められたことから、線維変性は眼科学的検査での水晶体の縫合線の変化を表す像であり、上皮細胞多層化は線維変性に伴う二次的变化であると判断した。

2.4.4.2.3 イヌ反復投与毒性試験

イヌを用いた反復投与毒性試験として、4 週間反復点眼及び経口投与毒性試験、13 週間反復点眼及び経口投与毒性試験を実施した。

4 週間反復点眼及び経口投与毒性試験[点眼: 2.0%(2 回/日), 経口: 0, 3.75, 7.5, 15mg/kg/日](2.6.6.3.4)では、15mg/kg/日群の雌雄で痙攣による切迫剖検例が認められ、一般状態観察では生存例も含め振戦、自発運動減少、硬直性歩行などが認められた。また、眼球の充血及び瞬膜露出が、経口投与では雌雄の 3.75mg/kg/日以上で、点眼投与では雌雄の 2.0%(2 回/日)群で認められた。また、病理組織学的検査では、15mg/kg/日群の雄で肝臓の炎症性細胞集簇を伴う限局性肝細胞壊死、精巣の未成熟及び分節的低形成が認められた。

13 週間反復点眼及び経口投与毒性試験[点眼: 基剤(4 回/日), 1.0%(4 回/日), 2.0%(4

2.4 非臨床試験の概括評価

回/日), 経口: 3.75, 7.5mg/kg/日](2.6.6.3.5)では, 一般状態観察で, 点眼投与の雌雄の 1.0%(4 回/日)以上の群で眼球結膜及び眼瞼結膜の充血が認められたが, その他に被験物質に起因した変化は認められなかった。

2.4.4.2.4 サル反復投与毒性試験

サルを用いた反復投与毒性試験として, 52 週間反復点眼投与毒性試験[基剤(4 回/日), 1.0%(2 回/日), 2.0%(2 回/日), 2.0%(4 回/日)](2.6.6.3.6)を実施した。一般状態観察では, 雌雄の 2.0%(4 回/日)群で, 眼球結膜, 又は眼瞼結膜の充血が認められた。また, 眼科学的検査の角膜内皮細胞の観察では, 雌雄の 1.0%(2 回/日)群から境界不明瞭及び大小不同が認められたが, その他に被験物質に起因した変化は認められなかった。

2.4.4.2.5 主な所見及び考察

(1) 全身毒性

1) 死亡及び切迫剖検

ラット 4 週間反復投与毒性試験では雄の 90mg/kg/日群で死亡例が, イヌ 4 週間反復投与毒性試験では雌雄の 15mg/kg/日群で切迫剖検例が認められ, 主な一般症状として痙攣が認められた。死亡や切迫剖検が認められない最大用量は, ラットは雄 30mg/kg/日, 雌 90mg/kg/日, イヌは雄 7.5mg/kg/日, 雌 7.5mg/kg/日であり, その曝露量をヒト臨床曝露量と比較すると, それぞれ約 49000 倍, 67000 倍, 850 倍, 1300 倍であること(表 2.4.4-1)から, リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないと判断した。

2) 肝臓

ラット 4 週間反復投与毒性試験では, 雄の 30mg/kg/日以上群及び雌の 90mg/kg/日群で小葉中心性肝細胞肥大が, 雌雄の 90mg/kg/日群で胆管過形成が認められ, これらに伴う重量の高値, CHO の高値, PT の延長などが認められた。胆管過形成の組織像は, 小葉内に浸潤性に増殖する卵円形細胞増殖ではなく, 一般的にいわれる化学物質誘発性の胆管過形成と同様であったことから, 小葉中心部で代謝された代謝物, 又は直接胆汁排泄された未変化体が毛細胆管を經由し小葉周辺部の胆管上皮に障害性に作用した可能性があるかと判断した[2.6.6.9.1(2)]。なお, これらの変化の程度は軽微から軽度であること, また, 最大非発現用量での曝露量はヒト臨床曝露量の約 5500 倍であること(表 2.4.4-1)から, リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないと判断した。

イヌ 4 週間反復投与毒性試験では, 雄の 15mg/kg/日群で炎症性細胞集簇を伴う限局性肝細胞壊死が認められた。限局性肝細胞壊死はいずれも軽微な変化であること, 最大非発現用量での曝露量はヒト臨床曝露量の約 850 倍であること(表 2.4.4-1)から, リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないと判断した。

3) 肺及びリンパ節

ラット 4 週間反復投与毒性試験では, 肺で, 雄の 30mg/kg/日以上群で血管周囲

2.4 非臨床試験の概括評価

にマクロファージ褐色色素沈着を伴う炎症性細胞浸潤、肺胞にマクロファージ褐色色素沈着、赤血球貪食細胞増加などが認められ、これらに伴う重量の高値、好中球数、単球数の高値などが認められた。また、リンパ節でも、雄の 90mg/kg/日群で洞内の赤血球増加及び赤血球貪食細胞の増加が認められた。また、血液学的検査ではこれらの変化に伴う赤血球数の低値が、雄の 90mg/kg/日群で認められた。詳細な機序に関しては不明だが、リパスジル塩酸塩水和物の薬理作用(ROCK 阻害作用)に基づく血管拡張作用⁸⁾で毛細血管での血流量が増加し血管壁に何らかの作用を及ぼすことで赤血球が漏出し、これらの変化を誘発した可能性があるかと判断した。なお、これらの変化の最大非発現用量は、肺では 10mg/kg/日、リンパ節では 30mg/kg/日であり、その曝露量をヒト臨床曝露量と比較すると、それぞれ約 5500 倍、49000 倍であること(表 2.4.4-1)から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないかと判断した。

4) 精巣及び精巣上体

ラット 4 週間反復投与毒性試験では、雄の 90mg/kg/日群で、精巣での精細管拡張、精巣上体での管腔内精細胞変性、精子数減少、精液瘤肉芽腫、精巣上体管拡張が認められ、重量の高値も認められた。イヌ 4 週間反復投与毒性試験では、雄の 15mg/kg/日で精巣の未成熟及び分節的低形成が認められた。これらの機序に関しては不明だが、最大非発現量であるラットの 30mg/kg/日、イヌの 7.5mg/kg/日の曝露量は、それぞれヒト臨床曝露量の約 49000 倍、850 倍であること(表 2.4.4-1)、また、雄ラット授胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、30mg/kg/日でも生殖能に及ぼす影響はないことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないかと判断した。

5) 腎臓

ラット 4 週間反復投与毒性試験の雄の 90mg/kg/日群で皮質塩基性尿細管が認められた。本変化は対照群でも認められた変化であり、その組織像は自然発生的に認められる塩基性尿細管と同様であった。詳細な機序に関しては不明だが、尿中排泄された未変化体又は代謝物(!2.6.4.6.1)が近位尿細管上皮に何らかの作用を及ぼし、自然発生的に起こる尿細管上皮の変性、壊死の程度を増強し、尿細管上皮細胞の再生の発現頻度を増加した可能性があるかと判断した[!2.6.6.9.1(5)]。なお、最大非発現用量での曝露量は、ヒト臨床曝露量の約 49000 倍であること(表 2.4.4-1)から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないかと判断した。

6) 涙腺

ラット 4 週間反復投与毒性試験の雄の 30mg/kg/日以上群で腺房細胞の萎縮が認められた。機序及び毒性学的意義は不明だが、ラットのみで認められた変化でその程度は軽微から軽度であること、最大非発現用量での曝露量はヒト臨床曝露量の約 5500 倍であること(表 2.4.4-1)から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で問題となることはないかと判断した。

2.4 非臨床試験の概括評価

表 2.4.4-1 臨床曝露量との比較(反復投与毒性試験)

試験の種類	標的器官 又は所見	性	非発現用量[発現用量] (mg/kg/日)	AUC _{0-24h} ^a (ng・h/mL)	曝露量比 (/ヒト)
ラット 4週間反復 経口投与 毒性試験	死亡	雄	30 [90]	25000 [71300 ^b]	49213 [140354]
		雌	90 [該当せず]	34300 [該当せず]	67520 [該当せず]
	肝臓	雄	10 [30]	2810 [25000]	5531 [49213]
		雌	30 [90]	6780 [34300]	13346 [67520]
	肺	雄	10 [30]	2810 [25000]	5531 [49213]
	涙腺				
	リンパ節	雄	30 [90]	25000 [71300 ^b]	49213 [140354]
	精巣				
	精巣上体				
	腎臓				
イヌ 4週間反復 経口投与 毒性試験	切迫剖検	雄	7.5 [15]	433 [2230]	852 [4390]
		雌	7.5 [15]	687 [2050]	1352 [4035]
	肝臓	雄	7.5 [15]	433 [2230]	852 [4390]
	精巣				
ヒト 0.4%(2 回/日)				0.508 ^c	

a: ラット試験は!2.6.7.7.G の Day28 値を引用, イヌ試験は!2.6.7.7.D の Day28 値を引用

b: 雄 90mg/kg/日群は切迫剖検したため, Day1 値を引用

c: 1 日 2 回 7 日間投与時の最終点眼後の AUC_{0-τ} の 2 倍値(!表 2.5.3-1 から引用)

(2) 眼局所毒性

1) 眼球及び眼瞼結膜の充血

点眼投与を実施したウサギ, イヌ及びサルで投与後一過性に眼球及び眼瞼結膜の充血が認められた。この変化は, リパスジル塩酸塩水和物点眼液の薬理作用(ROCK 阻害作用)に基づく血管拡張作用⁸⁾に起因した変化であり, 一般状態観察, 病理組織学的検査を含め, 結膜出血や眼局所での炎症を示唆する所見が認められないことから, 毒性学的意義の低い変化と判断した。

2) 水晶体変化

ウサギ 26 週間反復点眼投与毒性試験の 1.0%(4 回/日)以上の群で水晶体前皮質浅層下の縫合線部での発現を特徴とした水晶体混濁(病理組織学的には水晶体の線維変性)が認められた。ウサギのみで認められており, 発現に種差が認められたが, リパスジル塩酸塩水和物点眼液点眼時のウサギの眼内濃度がイヌ及びサルと比較して高いことが要因と判断した(!2.6.6.8.7)。ウサギで変化の認められない 1.0%(2 回/日)は, ヒト臨床用量の 2.5 倍であるが, ウサギの眼内濃度がヒト及びサルに比べて高いことは他の点眼薬でも一般的であること, 解剖学的にヒトの眼の構造に近いサルではヒト臨床用量の 10 倍用量である 2.0%(4 回/日)でも水晶体変化が認められてい

2.4 非臨床試験の概括評価

ないこと、他剤との併用点眼による眼内濃度への影響はないことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で水晶体変化が問題となる可能性は低いと判断した[!2.6.6.9.2(2)]。また、機序に関しては、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の薬理作用(ROCK 阻害作用)でアクチンストレスファイバーの形成阻害がおき、水晶体線維細胞への分化、その後の伸展、遊走が阻害され、前皮質浅層下の縫合線部に水晶体混濁(病理組織学的には水晶体の線維変性)が生じたと判断した(!2.6.6.8.3)。

3) 角膜内皮細胞(境界不明瞭及び大小不同)

サル 52 週間反復点眼投与毒性試験の角膜内皮細胞の観察で、1.0%(2 回/日)以上の群で境界不明瞭及び大小不同が認められたが、最終投与後 24 時間の検査では正常像に戻る一過性の変化であること、角膜内皮細胞の機能の指標となる角膜内皮細胞数及び角膜厚に変化がないこと、病理組織学的検査でも器質的な変化が認められないことから、毒性学的意義の低い変化と判断した。なお、本変化は、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の薬理作用(ROCK 阻害作用)でアクチンストレスファイバーの形成阻害がおき、角膜内皮細胞の平滑面がゆがむことで、撮影に用いたスペキュラーマイクロスコプの光軸に沿った反射光を得られなくなり、ぼやけた像(境界不明瞭及び大小不同)として観察されたものと判断した[!2.6.6.9.2(3)]。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、細菌を用いた復帰突然変異試験、培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験、ラットを用いた小核試験、ウサギ角膜における UDS 試験を実施した。

In vitro の復帰突然変異試験(!2.6.6.4.1)は陰性であったが、染色体異常試験(!2.6.6.4.2)では、代謝活性化無しの短時間処理法では 36.5µg/mL 以上で、連続処理法では 18.25µg/mL で倍数性細胞の増加が認められた。しかし、倍数性細胞数の増加が認められない用量(9.13µg/mL)は、ヒト臨床用量の C_{max} の約 14000 倍に相当すること(表 2.4.4-2)から、ヒトで染色体異常が誘発される可能性は極めて低いと判断した。また、*in vivo* のラット小核試験(!2.6.6.4.3)では、ヒト臨床用量の C_{max} の約 8200 倍の曝露で陰性であり、更にウサギ角膜 UDS 試験(!2.6.6.4.4)ではヒト臨床濃度の 5 倍の濃度で陰性であること(表 2.4.4-2)から、生体における遺伝毒性発現の懸念はないと判断した。

なお、有糸細胞分裂時に形成される収縮環の収縮に ROCK が関与していることが報告されていること⁹⁾から、リパスジル塩酸塩水和物の薬理作用(ROCK 阻害作用)で細胞分裂が阻害され、倍数性細胞数の増加が認められた可能性があるかと判断した。

2.4 非臨床試験の概括評価

値傾向が認められた。これらの変化は、器官形成期初期の胚発生阻害及びそれに伴う発育遅延に起因した変化と判断した。胎児の形態形成には細胞遊走が重要であること¹⁰⁾、ROCK 阻害薬である Y-27632 は、器官形成期初期の胚発生を阻害すること¹¹⁾が報告されている。リパスジル塩酸塩水和物は、Y-27632 と同様に細胞遊走を阻害すること(2.6.6.8.3)から、器官形成期初期の胚発生阻害(早期吸収胚数の高値)は、リパスジル塩酸塩水和物の薬理作用(ROCK 阻害作用)により誘発された可能性があるとは判断した。なお、これらの変化が認められない 10mg/kg/日の曝露量は、ヒト臨床曝露量の約 2300 倍であること(表 2.4.4-3)から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用でこれらの変化が問題となることはないとは判断した。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験(0, 3, 10, 30mg/kg/日)(2.6.6.6.4)では、30mg/kg/日群の母動物で継続的な痙攣や後肢の動作不能による切迫剖検例、一般状態観察での頻呼吸、痙攣、部分閉眼、自発運動減少、自発運動増加、流涎、体重増加量及び摂餌量の低値が認められたが、胚・胎児への影響は認められなかった。なお、これらの変化が認められない 10mg/kg/日の曝露量は、ヒト臨床曝露量の約 540 倍であること(表 2.4.4-3)から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用でこれらの変化が問題となることはないとは判断した。

ラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験(0, 3, 10, 30mg/kg/日)(2.6.6.6.5)では、F₀ 母動物の 30mg/kg/日群で体重、体重増加量及び摂餌量の低値が認められ、生殖能に及ぼす影響として 30mg/kg/日群で分娩率の低値及び妊娠期間の軽微な延長、分娩兆候なし、分娩時全児死亡が認められた。また、F₁ 出生児では、30mg/kg/日群で平均産児数、平均出生児数、出生率及び体重の低値、離乳後のオープンフィールドテストでの移動区画数の低値が認められた。リパスジル塩酸塩水和物投与による乳汁移行(2.6.4.6.3)が確認されていることから、前述の器官形成期初期の胚発生阻害、又は出生児へのリパスジル塩酸塩水和物曝露が、これらの変化を誘発した可能性があるとは判断した。なお、これらの変化が認められない 10mg/kg/日の曝露量は、ヒト臨床曝露量の約 2300 倍であること(表 2.4.4-3)から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用でこれらの変化が問題となることはないとは判断した。

2.4 非臨床試験の概括評価

表 2.4.4-3 ヒト臨床曝露量との比較(生殖発生毒性試験)

試験の種類	主な所見	投与量 (mg/kg/日)	AUC _{0-24h} (ng・h/mL)	曝露量比 (/ヒト AUC)
ラット 胚・胎児発生に関する試験	無毒性量	10	1170 ^a	2303
	早期吸収胚数の 高値など	30	7120 ^a	14016
ウサギ 胚・胎児発生に関する試験	無毒性量	10	276 ^b	543
	切迫剖検, 頻呼吸, 痙攣など	30	2770 ^b	5453
ラット 出生前及び出生後の発生並び に母体の機能に関する試験	無毒性量	10	1170 ^c	2303
	分娩率低値, 出生児体重低値など	30	7120 ^c	14016
ヒト		0.4% (2 回/日)	0.508 ^d	

a: !2.6.7.13.A から引用

b: !2.6.7.13.B から引用

c: 測定は実施していないが, ラット胚・胎児発生に関する試験の同一用量の AUC が近い値と想定し代用

d: 1 日 2 回 7 日間投与時の最終点眼後の AUC_{0-τ} の 2 倍値(!表 2.5.3-1 から引用)

2.4.4.6 局所刺激性試験

局所刺激性試験は, ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性試験及び眼粘膜累積刺激性試験を実施した。

眼粘膜一次刺激性試験[2.0%(8 回/日)](!2.6.6.7.1)では, 結膜の発赤が認められ, 刺激性は「極軽度の刺激性あり」に分類された。また, 角膜上皮の障害性は認められなかった。

眼粘膜累積刺激性試験[2.0%(4 回/日), 2 週間] (!2.6.6.7.2)では, 投与期間を通して結膜の発赤が認められ, 刺激性は「極軽度の刺激性あり」に分類されたが, 累積刺激性は認められなかった。また, 角膜上皮の障害性, 眼組織の病理組織学的変化は認められなかった。

なお, 結膜の発赤はリパスジル塩酸塩水和物点眼液の薬理作用(ROCK 阻害作用)に基づく血管拡張作用⁸⁾に起因した結膜の充血と判断した。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 皮膚感作性試験

皮膚感作性試験は, マウス局所リンパ節増殖試験及びモルモット皮膚感作性試験(Adjuvant and Patch Test 法)を実施した。

マウス局所リンパ節増殖試験[!2.6.6.8.1(1)]では, 実施可能な最大濃度である 8.17w/v%でも皮膚感作性は認められなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価

モルモット皮膚感作性試験(Adjuvant and Patch Test 法) [!2.6.6.8.1(2)]では、2.0%の1/10 例(10%)で、弱い陽性反応(非常に軽度な紅斑)が認められたが、30%以上で陽性反応が認められた場合に感作性陽性と判断するのが一般的であること^{12),13)}、モルモット皮膚感作性試験の感作濃度と陽性率から感作強度を分類する方法¹⁴⁾に従うとリパスジル塩酸塩水和物点眼液は軽度以下(評価の範囲外)とされることが、サル 52 週間反復点眼投与毒性試験(!2.6.6.3.6)では本剤 2.0%(4 回/日)点眼群の長期投与でも眼瞼皮膚に感作性を示唆する病理組織学的所見が認められないことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液は感作性を有する可能性は低いと判断した。

2.4.4.7.2 皮膚光感作性試験

皮膚光感作性試験は、マウス光照射局所リンパ節増殖試験及びモルモット皮膚光感作性試験(Adjuvant and Strip Test 法)を実施した。

マウス光照射局所リンパ節増殖試験[!2.6.6.8.2(1)]では、実施可能な最大濃度である 8.17w/v%でも皮膚光感作性は認められなかった。

モルモット皮膚光感作性試験(Adjuvant and Strip 法) [!2.6.6.8.2(2)]では、2.0%でも皮膚光感作性は認められなかった。

2.4.4.7.3 ウサギ眼粘膜一次刺激性及び充血確認試験(併用点眼)

併用点眼に関する試験として、ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性及び充血確認試験(併用点眼)[0.4%(2 回/日)]を実施した(!2.6.6.8.4)。併用点眼剤としてキサラン点眼液 0.005%、チモプトール XE 点眼液 0.5%及びザラカム配合点眼液を設定した。

前眼部刺激性の観察では、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%とチモプトール XE 点眼液 0.5%との併用点眼により、刺激性が「實際上刺激性なし」から「軽度の刺激性あり」に上昇したが、リパスジル塩酸塩水和物点眼液での発赤とチモプトール XE 点眼液 0.5%での分泌物の相加的作用による上昇であった。また、眼粘膜充血の観察では、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%とキサラン点眼液 0.005%又はザラカム配合点眼液との併用点眼で、充血の発現時期の違いによる充血発現時間の延長が認められたが、充血の程度に対する影響はほとんど認められなかった。

以上のことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液と他の緑内障治療薬との併用点眼による眼粘膜一次刺激性及び充血に及ぼす影響はほとんどないと判断した。

2.4.4.7.4 眼毒性試験

ウサギ 26 週間反復点眼投与毒性試験(!2.6.6.3.1)で水晶体への影響が認められたため、眼局所に対する影響の詳細な評価を目的として、ウサギ及びサルを用いた 13 週間反復点眼投与眼毒性試験を実施した。

ウサギ 13 週間反復点眼投与眼毒性試験[基剤(2 回/日), 1.0%(2 回/日), 2.0%(2 回/日)] (!2.6.6.8.5)では、2.0%(2 回/日)群の雌で水晶体皮質浅層下の混濁が認められ、病理組織学的には水晶体線維の変性が認められた。

サル 13 週間反復点眼投与眼毒性試験[基剤(2 回/日), 1.0%(2 回/日), 2.0%(2 回/日)] (!2.6.6.8.6)では、2.0%(2 回/日)群でも被験物質に起因した眼毒性は認められなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価

水晶体変化に関する考察は、2)に記載した。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

リパスジル塩酸塩水和物はヒト ROCK-1 及び ROCK-2 に対して強力且つ選択的な阻害作用を示す Rho キナーゼ阻害薬である。ウサギ及びサルを用いて眼圧下降作用について検討した結果、リパスジル塩酸塩水和物点眼液は単回点眼並びに反復点眼において安定した眼圧下降作用を示した。また、高眼圧白色ウサギにおいても眼圧下降作用を示した。更に、リパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%はサルにおいてラタノプロスト点眼液 0.005%と、白色ウサギにおいてニプラジロール点眼液 0.25%又はブリンゾラミド点眼液 1%との併用点眼により、いずれも相加的な眼圧下降作用及び眼圧下降作用の持続時間延長を示し、作用機序の異なる緑内障治療薬との併用効果が確認できた。

眼圧下降作用機序として房水動態に対する作用を検討した結果、リパスジル塩酸塩水和物は房水流出率の増加を示した一方で、ぶどう膜強膜流量及び房水産生量に対して影響を示さなかったことから、眼圧下降作用機序として線維柱帯-シュレム管を介する主流出路からの房水流出増加作用が推定できた。また、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の眼圧下降作用は主に未変化体によるものであると考えられた。

リパスジル塩酸塩水和物の安全性薬理試験として、一般症状、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響を評価した結果、毒性の発現用量は臨床試験でリパスジル塩酸塩水和物点眼液 0.4%を 1 日 2 回 7 日間反復点眼した際の C_{max} から大きく乖離することから、リパスジル塩酸塩水和物の点眼により一般症状、中枢神経系、呼吸器系に対して影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上、リパスジル塩酸塩水和物は Rho キナーゼ阻害作用により、線維柱帯-シュレム管を介した主流出路からの房水流出を促進して眼圧下降作用を示す事が示唆された。この作用機序から房水産生抑制作用やぶどう膜強膜流量増加作用を作用機序とする既存薬との併用効果や薬剤選択性の拡大において高い有用性が期待される。

2.4.5.2 薬物動態試験

リパスジル塩酸塩水和物投与後のリパスジルの眼内組織及び循環血液への吸収は動物種、投与経路によらず速やかであった。また、代謝 CL が高く循環血からの消失は速やかであった。白色ラット及び有色ラットを用いた分布試験の結果、蓄積性のある組織は認められなかったが、メラニンを含む眼球ぶどう膜などからの薬物消失は他の組織と比較して緩やかであった。合成メラニンを用いた *in vitro* 試験ではリパスジルのメラニンへの結合が示されたが、メラニン親和性はクロロキンの 10 分の 1 以下であり、結合は可逆的であった。有色ウサギやサルを用いた反復点眼投与毒性試験の結果では、メラニン含有組織での毒性所見は認められていないことから、リパスジルとメラニンとの結合による安全性への影響はほとんどないと判断した。

妊娠ラットを用いた試験では ¹⁴C-リパスジル由来の放射能は胎盤を介し胎児に移行したが、母体の血液と比較すると低いことから、その移行量は少ないと考えられた。授乳期ラットを用いた試験では放射能は乳汁中に移行することが確認されたが、乳汁

2.4 非臨床試験の概括評価

中濃度は血漿中濃度の低下に伴って消失すること及び点眼投与でのヒト血漿中濃度は低いことから乳児への曝露は低いと考えられた。リパスジルの主代謝酵素は肝アルデヒドオキシダーゼであり、ヒトでの代謝物はその多くが M1 であった。代謝には種差が認められ、ラットではその他代謝物(M2, M3, M4, M5, M6)も認められた。有色ウサギを用いて点眼後の眼局所での代謝物について評価したところ、M1 のみが認められたが、その存在量はリパスジルと比較して明らかに少なく、薬効にはリパスジルが関与していることが示唆された。

ラットを用いた試験では排泄経路は尿及び糞であり、未変化体としての排泄は少なく、多くは代謝物として排泄された。

In vitro 酵素阻害試験及び酵素誘導試験や有色ウサギを用いた併用点眼での眼内濃度評価の結果から、リパスジル塩酸塩水和物点眼後の肝代謝酵素を介した薬物相互作用及び眼内移行に関わる薬物相互作用を起こす可能性は低いと判断した。

2.4.5.3 毒性試験

リパスジル塩酸塩水和物点眼液又はその有効成分であるリパスジル塩酸塩水和物の非臨床での安全性評価を目的として、マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験、イヌを用いた急性毒性試験、ラット、ウサギ、イヌ及びサルを用いた反復投与毒性試験、細菌、哺乳類細胞、ラット及びウサギを用いた遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、ウサギを用いた局所刺激性試験、マウス及びモルモットを用いた皮膚感作性試験及び皮膚光感作性試験、ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性及び充血確認試験(併用点眼)などを実施した。

全身への影響として、死亡例及び切迫剖検例が認められた。単回投与毒性試験でのマウスの概略の致死量は、経口投与では雌雄共に 122.55mg/kg、静脈内投与では雄が 20.42mg/kg、雌が 20.42mg/kg を上回る量、ラットの概略の致死量は、経口投与では雌雄共に 101.96mg/kg、静脈内投与では雌雄共に 20.42mg/kg を上回る量であった。急性毒性試験でのイヌの最大耐量は、雄では 25mg/kg/日を下回る量、雌では 18mg/kg/日付近であった。反復経口投与毒性試験では、ラットの雄の 90mg/kg/日群で死亡例が、イヌの雌雄の 15mg/kg/日群で切迫剖検例が認められ、ウサギの胚・胎児発生に関する試験では、30mg/kg/日群で切迫剖検例が認められた。死亡や切迫剖検が認められない最大用量での曝露量をヒト臨床曝露量と比較すると、ラットの単回経口投与では、雄は約 120000 倍、雌は約 37000 倍、ラットの反復経口投与では、雄は約 49000 倍、雌は約 67000 倍、イヌの反復経口投与では、雄は約 850 倍、雌は約 1300 倍、ウサギの反復経口投与では、約 540 倍であった。また、標的器官として、ラットでは肝臓、肺、リンパ節、精巣、精巣上部、腎臓、涙腺が、イヌでは肝臓、精巣が考えられたが、これらの全ての器官に影響が認められない最大用量での曝露量をヒト臨床曝露量と比較すると、ラットは雄で約 5500 倍、雌で約 13000 倍、イヌは雄で約 850 倍、雌で約 4000 倍であった。以上より、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の全身への影響が臨床使用で問題となることはない判断した。

眼局所への影響として、眼球結膜及び眼瞼結膜の充血、水晶体変化、角膜内皮細胞の形態学的変化が認められた。眼球結膜及び眼瞼結膜の充血は、リパスジル塩酸塩水

2.4 非臨床試験の概括評価

和物点眼液の薬理作用(ROCK 阻害作用)に基づく血管拡張作用⁸⁾で投与後一過性に起きる変化であること、一般状態観察、病理組織学的検査を含め、結膜出血や眼局所での炎症を示唆する所見は認められないことから、毒性学的意義の低い変化と判断した。また、局所刺激性試験では、同様に結膜の充血が認められたが、刺激性は「極軽度の刺激性あり」に分類され累積刺激性もないことが確認されていること、眼粘膜一次刺激性及び充血確認試験(併用点眼)では、リパスジル塩酸塩水和物点眼液と他の緑内障治療薬との併用点眼で眼粘膜一次刺激性及び充血に及ぼす影響はほとんど認められなかったことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で重篤な副作用に至ることはないと判断した。水晶体変化は、水晶体前皮質浅層下の縫合線部で発現する変化であった。ウサギのみで認められており発現に種差が認められたが、リパスジル塩酸塩水和物点眼液点眼時のウサギの眼内濃度がイヌ及びサルと比較して高いことが要因と判断した。なお、他の緑内障治療薬でも、ウサギの眼内濃度がヒト及びサルに比べて高いことが確認されている。ウサギで変化の認められない1.0%(2回/日)はヒト臨床用量の2.5倍であるが、解剖学的にヒトの目の構造に近いサルではヒト臨床用量の10倍用量である2.0%(4回/日)でも水晶体変化が認められていないこと、他の緑内障治療薬との併用点眼で眼内濃度への影響は認められないことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で水晶体変化が問題となる可能性は低いと判断した。角膜内皮細胞の形態学的変化は、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の薬理作用(ROCK 阻害作用)に基づく一過性の変化であり、長期反復投与で程度の増強、器質的な変化、機能への影響がないことから、毒性学的意義の低い変化と判断した。以上より、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用での眼局所への影響として、一過性の充血の発現が考えられるが、重篤な副作用が発現することはないと判断した。

遺伝毒性試験では、染色体異常試験で倍数性細胞数の増加が認められたが、最大陰性用量は、ヒト臨床用量で点眼投与時の血漿中リパスジルのC_{max}の約14000倍に相当すること、ラット小核試験ではヒト臨床用量のC_{max}の約8200倍で陰性であり、更にウサギ角膜UDS試験ではヒト臨床濃度の5倍の濃度で陰性であることから、生体での遺伝毒性発現の懸念はないと判断した。

生殖発生毒性試験では、前述のウサギの切迫剖検例の他に、ラットで器官形成期初期の胚発生阻害及びそれに伴う発育遅延に起因した変化、乳汁を介した出生児への影響が認められたが、最大非発現用量での曝露量は、ヒト臨床曝露量の約2300倍であることから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用でこれらの変化が問題となることはないと判断した。

皮膚感作性試験では、マウス局所リンパ節増殖試験は陰性であったが、モルモット皮膚感作性試験(Adjuvant and Patch Test法)で弱い陽性反応(1/10例で非常に軽度の紅斑)が認められた。しかしながら、30%以上で陽性反応が認められた場合に感作性陽性と判断するのが一般的であること、モルモット皮膚感作性試験の感作濃度と陽性率から感作強度を分類する方法に従うと軽度以下(評価の範囲外)に分類されること、サル52週間反復点眼投与毒性試験では本剤2.0%(4回/日)点眼群の長期投与でも眼瞼皮膚に感作性を示唆する病理組織学的所見が認められないことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用で感作性が問題となる可能性は低いと判断した。なお、皮膚光感

2.4 非臨床試験の概括評価

作性は認められなかった。

以上のことから、リパスジル塩酸塩水和物点眼液の臨床使用では、眼局所での一過性の充血の発現が考えられるが、危惧すべき重篤な副作用が発現する可能性は低いと判断した。

2.4.5.4 まとめ

リパスジル塩酸塩水和物点眼液は、緑内障治療薬として初めての Rho キナーゼ阻害薬であり、線維柱帯-シュレム管を介した房水流出を促進することにより眼圧下降作用を示す。すなわち、リパスジル塩酸塩水和物は β 受容体遮断薬、炭酸脱水酵素阻害薬の持つ房水産生抑制作用や α 受容体作動薬、プロスタグランジン関連薬の持つぶどう膜強膜流量増加作用と異なる作用機序を持つことから、既存薬との併用効果や薬剤選択肢の拡大など、有用性の高い薬剤となることが期待できる。また、点眼投与後のリパスジルは速やかに薬効作用部位に到達することが示唆され、循環血液中では曝露濃度は低く速やかに消失することが示された。更に非臨床試験の結果から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液は臨床使用で危惧すべき重篤な副作用が発現する可能性は低いと判断した。

以上の非臨床試験成績から、リパスジル塩酸塩水和物点眼液は、緑内障及び高眼圧症に対して有効かつ安全な薬剤であると判断した。

2.4.6 参考文献一覧

- 1) Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO Journal*. 1996; 15(8): 1885-93.
- 2) Shimokawa H, Takeshita A. Rho-Kinase Is an Important Therapeutic Target in Cardiovascular Medicine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25(9): 1767-75.
- 3) Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*. 1996; 392(2): 189-93.
- 4) Fukiage C, Mizutani K, Kawamoto Y, et al. Involvement of Phosphorylation of Myosin Phosphatase by ROCK in Trabecular Meshwork and Ciliary Muscle Contraction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 288(2): 296-300.
- 5) Waki M, Yoshida Y, Oka T, Azuma M. Reduction of intraocular pressure by topical administration of an inhibitor of the Rho-associated protein kinase. *Current Eye Research*. 2001; 22(6): 470-4.
- 6) Honjo M, Tanihara H, Inatani M, et al. Effects of Rho-Associated Protein Kinase Inhibitor Y-27632 on Intraocular Pressure and Outflow Facility. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001; 42(1): 137-44.
- 7) Koga T, Koga T, Awai M, et al. Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Experimental Eye Research*. 2006; 82(3): 362-70.
- 8) 天野睦紀, 貝淵弘三. Rho/Rho-キナーゼと血管収縮機構. *脈管学*. 2007; 47: 337-41.
- 9) Kosako H, Yoshida T, Matsumura F, et al. Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*. 2000; 19(52): 6059-64.
- 10) Aman A, Piotrowski T. Cell migration during morphogenesis. *Dev Biol*. 2010; 341(1): 20-33.
- 11) Wei L, Roberts W, Wang L, et al. Rho kinases play an obligatory role in vertebrate embryonic organogenesis. *Development*. 2001; 128(15): 2953-62.
- 12) 経済産業省. 呼吸器感作性または皮膚感作性. 事業者向け GHS 分類ガイダンス (平成 21 年度改訂版). 2010; 152-160.
- 13) OECD. Skin Sensitization. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 1992; OECD test guideline 406.
- 14) Kimber I, Basketter DA, Butler M, et al. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(12): 1799-809.