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 1
2.4.1 非臨床試験計画概略 3
2.4.1.1 試験計画 3
2.4.1.2 GLP 適合性 5
2.4.1.3 LCIG の品質特性 6
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 薬効薬理試験 6
2.4.2.2 安全性薬理試験 7
2.4.2.2.1 重要な問題及び解決法 8
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 用いた分析法の妥当性 8
2.4.3.2 薬物動態試験概説 8
2.4.3.3 用いた動物モデルの妥当性 10
2.4.4 毒性試験 12
2.4.4.1 単回投与毒性 12
2.4.4.2 反復投与毒性 12
2.4.4.3 遺伝毒性 12
2.4.4.4 がん原性 13
2.4.4.5 生殖発生毒性 13
2.4.4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 13
2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験 13
2.4.4.5.3 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 13
2.4.4.6 局所刺激性 14
2.4.4.7 その他の試験 15
2.4.4.8 動物からヒトへの外挿性 19
2.4.5 総括及び結論 19
2.4.5.1 LCIG の特性 22
2.4.5.2 LCIG の安全性プロファイル 23
2.4.5.3 総括 24
2.4.6 参考文献一覧 25

表一覧

表 2.4-1. 毒性試験一覧：LCIG の消化管における局所刺激性試験及び DHPA 及び DHPPA の分解不純物の毒性試験 4
表 2.4-2. ラット，サル，イヌ及びヒトに単回経口投与した後のカルビドパの代謝物とその尿中回収率 10
表 2.4-3. LCIG をミニブタに十二指腸投与した際のカルビドパ及び DHPPA の C_{max} 17
表 2.4-4. 雄ミニブタにおけるカルビドパの単回十二指腸及び単回静脈内投与又は Sinemet® CR の単回経口投与時のカルビドパ，DHPPA 及び DHPA の C_{max} 18

図一覧

図 2.4-1. ラットに経口投与後又はミニブタ若しくはヒトに十二指腸内注入後のカルビドパ及び代謝物 / 分解物の AUC 11
図 2.4-2. LCIG を雄のミニブタに十二指腸投与した際の DHPPA の C_{max} 18

2.4.1 非臨床試験計画概略

注：本章ではレボドパ / カルビドパ水和物配合経腸用液（以下「LCIG」）について記載する。LCIG は Duodopa®と記載する場合もある。Duodopa®とは米国及び日本以外における販売名である。

レボドパ / カルビドパ水和物配合経腸用液は，レボドパ及びカルビドパ一水和物をそれぞれ，4：1 の割合で炭酸カルボキシメチルセルロースに懸濁した水溶性ゲルである。「通常の経口薬物療法で十分な効果が得られない重度の運動合併症を有する進行期 PD 患者」を対象に，2004 年にスウェーデンで初めて承認され，2015 年 6 月現在，46 ヵ国で承認され，Duodopa®の販売名で市販されている [6]。一方，本邦では，レボドパ / カルビドパ配合剤として，レボドパ及びカルビドパ水和物を 10：1 の割合で含有するレボドパ / カルビドパ配合錠が 1980 年より市販されている。[7]

2.4.1.1 試験計画

LCIG は，レボドパの濃度を 20 mg/mL，カルビドパ一水和物の濃度を 5 mg/mL 含む，他のパーキンソン病治療薬で十分にコントロールできなかった進行期パーキンソン病患者に対する運動症状の日内変動の長期治療を目的としたゲル剤である。LCIG は近位小腸に，注入システムである周辺機器及び腸内注入チューブ製品のそれぞれが付属したソフトウエア駆動式携帯型インフュージョンポンプを用いて，直接投与する。上部消化管投与後，レボドパは能動輸送により速やかに近位小腸から吸収される。LCIG の近位小腸への直接投与が，レボドパの血漿中濃度のバラツキを抑制し，脳のドパミン受容体への持続的刺激を可能にする。多くの場合，LCIG 投与初日から運動症状の変動に対する治療効果が見られる。

LCIG の投与に際し，朝のボーラス投与後，持続投与を行う。レボドパとカルビドパの質量比は 4：1 であり，この比はパーキンソン病治療薬として 40 年以上使用されている。一日当たりのレボドパの最大推奨投与量が 2000 mg である Sinemet®と同じである。

レボドパ単剤，カルビドパ単剤及びレボドパ /カルビドパの併用による新規の薬効薬理試験及び一般毒性試験は実施しなかった。2015 年の 5 月をカットオフにした公表論文を参考に，LCIG の毒性を評価した [1-6]。これらのデータを 2.4.4 項に示す。

LCIG の投与方法による消化管の局所刺激性を評価し，カルビドパの不純物の規格値を設定するために，新規の毒性試験を実施した（表 2.4-1）。すなわち，ミニブタを用いて LCIG 投与後の消化管に対する刺激性を評価するための毒性試験を実施し，レボドパ，カルビドパ及び 3-オルソ-メチルドパ（3-OMD，レボドパの代謝物）の血中曝露量を測定した（2.4.4.6 項）。

その他，カルビドパの代謝物である 3,4-dihydroxyphenylacetone（以下「DHPA」）及びカルビドパの分解物である 2-methyl-3-(3,4-dihyroxyphenyl)-propanoic acid（以下「DHPPA」）の毒性試験を実施した。すなわち，DHPA 及び DHPPA の *in vitro* 遺伝毒性試験（GLP）及びラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（GLP）を実施した。DHPA 及び DHPPA のトキシコキネティクスの評価には，ラット，ミニブタ及びヒトのデータを用いた（R&D/12/997）。規格値設定の要約を 2.4.5 項に記載する。

カルビドパの分解不純物であるヒドラジンのリスク評価も実施し（R&D/12/714），2.4.5 項に記載する。

LCIG 投与システムからの溶出物のリスク評価を実施し，2.6.6.8.4 項に記載する。

表 2.4-1. 毒性試験一覧：LCIG の消化管における局所刺激性試験及び DHPA 及び DHPPA の分解不純物の毒性試験

動物種 / 系統	投与経路	投与量 (mg/kg/日) 又は濃度	報告書番号	GLP 適用
局所刺激性 [a]				
ミニブタ/Göttigen	十二指腸	0, 50/12.5, 100/25, 150/37.5	R&D/11/1277	不適
ミニブタ/Göttigen	十二指腸	50/12.5 から 140/35	R&D/11/1278	不適
ミニブタ/Göttigen	十二指腸	フェーズ 1: 60/15 から 360/90 フェーズ 2: 90/22.5, 120/30	R&D/11/1279	不適
ミニブタ/Göttigen	十二指腸	フェーズ 1: 30/7.5 から 120/30 フェーズ 2: 60/15, 90/22.5 フェーズ 3: カルビドパ 1, 3 (ID, IV) Sinemet® CR: 100/25, 300/75(経口)	R&D/11/1303	適
ミニブタ/Göttigen	十二指腸	0, 45/11/25, 90/22.5	R&D/11/1302	適
ミニブタ/Göttigen	十二指腸	0, 45/11.25[b], 90/22.5	R&D/11/1304	適
その他の毒性試験 (不純物)				
ネズミチフス菌，大腸菌 (復帰突然変異試験)				
DHPA	*in vitro*	1.5 から 5000 µg/プレート	R&D/11/884	適
DHPPA	*in vitro*	1.5 から 5000 µg/プレート	R&D/11/1023	適

表 2-4-1. 毒性試験一覧：LCIG の消化管における局所刺激性試験及び DHPA 及び DHPPA の分解不純物の毒性試験（続き）

動物種 / 系統	投与経路	投与量 (mg/kg/日) 又は濃度	報告書番号	GLP 適用
ヒトリンパ球 (染色体異常試験)				
DHPA	*in vitro*	143, 285, 570 µg/mL (-S9; 4 時間) 285, 810, 1660 µg/mL (+S9; 4 時間) 36, 72, 162 µg/mL (-S9; 4 時間)	R&D/11/943	適
DHPA	*in vitro*	1000, 1500, 1960 µg/mL (±S9; 4 時間) 250, 500, 550 µg/mL (-S9; 20 時間)	R&D/11/942	適
In vivo				
ラット/Sprague-Dawley	経口	0 (溶媒), 6/4, 15/10 mg/kg/日 [c]	R&D/11/831	適
リスク評価				
DHPA, DHPPA	N/a	N/a	R&D/12/997	N/a
ヒドラジン	N/a	N/a	R&D/12/714	N/a
溶出物	N/a	N/a	R&D/11/571	N/a

ID = 十二指腸; IV = 静脈内; S9 = ラット肝臓ミクロソーム（Aroclor™ 1254 で誘導）; N/a = 適用外

a. レボドパの投与量 / カルビドパの投与量

b. Day 19 に 30/7.5 mg/kg/日へ減量

c. DHPA の投与量 / DHPPA の投与量; 1 日 2 回投与

2.4.1.2 GLP 適合性

すべてではないが複数の試験を GLP に準拠して実施した。すなわち，LCIG の 4 週間反復投与における消化管の刺激性試験，DHPA 及び DHPPA の規格値設定のための試験は GLP に準拠して実施した。

米国で実施したラットの 4 週間反復投与毒性試験，DHPA 及び DHPPA の規格値設定のための試験は US FDA GLP（US FDA Good Laboratory Practice（GLP）Regulations for Nonclinical Laboratory Studies as published in 21 CFR Part 58, September 4, 1987）に準拠して実施した。

英国で実施した LCIG の 4 週間反復投与における消化管の刺激性試験は次の GLP に準拠して実施した：

- The UK Good Laboratory Practice Regulations（Statutory Instrument 1999 No. 3106, as amended by Statutory Instrument 2004 No. 994）.
- OECD Principles of Good Laboratory Practice（as revised in 1997）, ENV/MC/CHEM（98）17.

- EC Commission Directive 2004/10/EC of 11 February 2004（Official Journal No. L 50/44）.

なお，公表文献情報については，特に断りがない限り GLP 適合性は確認されていない。

2.4.1.3 LCIG の品質特性

レボドパ由来の不純物はみられなかった。

LCIG の不純物又はカルビドパの *in vivo* における代謝物でもある DHPA 及び DHPPA の規格設定をサポートするための遺伝毒性試験及びラットの 4 週間反復投与毒性試験を実施した（2.4.4.7 項及び 2.6.6.8 項）。

ヒドラジンは，カルビドパの分解により生成される不純物であり，動物のがん原性試験の結果から，ヒトに対してがん原性を示す可能性が報告されている。LCIG のヒドラジンに関連したパーキンソン病患者に対するリスク評価を実施し，ヒドラジンによりリスクが低いと結論付けた（2.4.5 項）。

LCIG の投与に際して 3 つの溶出物のリスク評価を実施した（3.2.P.2.4 項）。すなわち，ビスフェノール A，シクロヘキサノン及び 2-エチル-1-ヘキサノール- (2-EH) についてリスク評価した（2.6.6.8 項）。LCIG からの溶出する可能性のある化合物について，毒性学的懸念はないと考えられる。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 薬効薬理試験

レボドパ及びカルビドパの薬効薬理学的特性は確立されており，レボドパの抗パーキンソン作用を仲介する主要なドパミン受容体は，ドパミン D1 受容体及びドパミン D2 受容体で，どちらも解剖学的及び機能的に分類されている。レボドパ及びカルビドパ等の L-芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害剤との併用は，パーキンソン病に対する治療の主流となっている。ドパミンの前駆物質であるレボドパは，脳内に移行する前に生体内で速やかに脱炭酸化されるため，レボドパ単独ではほとんど作用を示さない。中枢移行性がほとんどなく，末梢における脱炭酸酵素阻害作用を示すカルビドパを併用することにより，末梢におけるレボドパの脱炭酸化を軽減し，レボドパの脳移行性が高められている。さらに，カルビドパは，末梢のレボドパ脱炭酸化により生じる悪心・嘔吐を軽減することが明らかとなっている[8,9]。

カルビドパは，ラット及びイヌの骨格筋細胞外液でみられたのと同じく，レボドパ使用量を軽減させ，血漿中アミノ酸量を維持する重要な役割を担っていることが明らかとなっている[10,11]。レボドパとカルビドパの併用により，線条体におけるレボドパ量を 8 倍に上昇させることが明らかとなっている。また，カルビドパは，線条体におけるレボドパの代謝物である，3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸量及びホモバニリン酸量を上昇させる[12]。これらの結果から，カルビドパとの併用により血液脳関門におけるレボドパの移行量が増加すると考えられる。

レボドパ・カルビドパ水和物経口製剤の長期使用にともなって，脳内及び血漿中レボドパ濃度への順化及び下流の伝達系の変化により生じ，パーキンソン病患者における運動機能に対する有効性の低下がみられる。投与量及び投与頻度を上げることで固縮及び無動の改善がみられるものの，血漿中レボドパがピーク濃度に達するときにみられるジスキネジアの発現により，投与量及び投与頻度を上げることには制限がある。On-off 時の運動合併症につながるこれらの事象は，レボドパ・カルビドパ水和物経口製剤を長期に投与されたパーキンソン病患者でしばしばみられるが，血漿中濃度を一定濃度に最適化することによりこれらの事象は軽減される[13]。

6-hydroxydopamine 投与により脳線条体を壊死させ運動合併症を誘発させたラット PD モデルにおいても同様な症状がみられる。これらの疾患モデルに対してレボドパを反復投与することで，レボドパの作用時間が減少しジスキネジアの発現がみられる[14,15]。本剤は，レボドパ・カルビドパ水和物を近位小腸に直接投与することから，これらの経口製剤と比較して，血漿中レボドパ濃度が変化しにくく，より持続的に脳内ドパミン受容体を刺激することが可能となる。

2.4.2.2 安全性薬理試験

本申請にあたり ICH ガイドライン（S7A 及び S7B）に準拠したレボドパ及びカルビドパの単独及び併用下の安全性薬理試験は実施していない。しかしながら，レボドパ及びカルビドパ配合剤は Sinemet®が米国で四半世紀前に米国で承認されて以来広く患者の治療に用いられている。Zwickey RE らによる，ラットおよびサルの反復投与毒性試験の結果の報告があり[16]，レボドパ / カルビドパを投与した中枢神経系の所見として，ラットの反復投与試験において，30 mg/30 mg/kg/日の用量で流涎（唾液分泌過多）が，250 mg/25 mg/kg/日の用量で活動量の増加及び排尿過多がみられた。サルにおいて，60 mg/30 mg/kg/日の用量で活動量の増加がみられた。また，レボドパ及びカルビドパ単独投与によるラット反復投与試験の結果から，これらの併用投与時にみられた中枢神経系の作用は，いずれもレボドパによるものと考えられた。レボドパ / カルビドパ水和物配合経腸用液を持続経腸投与したミニブタの反復投与試験において，45 mg/11.25 mg/kg/日の用量で，驚愕/恐怖反応，攻撃行動，吠声反応及び反復興奮がみられた（R&D/11/1304）。その他の安全性薬理エンドポイントの所見として，ラットにおいて 30 mg/30 mg/kg/日の用量で呼吸異常，500 mg/50 mg/kg/日の用量で心重量の増加がみられた[16]。臨床上意義のある安全性薬理試験エンドポイントに対するレボドパ及びカルビドパ配合剤の所見の多くは，臨床使用成績より得られている。上記の非臨床試験と同様に，臨床使用成績により共通してみられた主要な安全性薬理エンドポイントは，中枢神経系関連の所見であり，ジスキネジア/多動，不穏，不安，緊張及び幻覚であった[17]。また，多くの臨床試験でレボドパに起因した血管降圧性の所見の報告がある[18]。

本剤は，レボドパ・カルビドパ水和物を近位小腸に直接投与することから，これらの経口製剤と比較して，血漿中レボドパ濃度が変化しにくく，より持続的に脳内ドパミン受容体を刺激することが可能となる。また，経口投与と経腸投与を比較したとき，期待される平均血漿中濃度はほぼ等しく，経腸投与時の C_{max} は経口投与と比較してより低く，また血漿中濃度は変化しにくい。したがって，高暴露時にみられるこれらの所見は，経腸投与による C_{max} の低下及び暴

露量の変動の低下により軽減され，その結果，本剤の臨床試験における副作用が低減されたと考えられる（2.7.4 項）。

2.4.2.2.1 重要な問題及び解決法

レボドパ / カルビドパ配合剤の安全性は，30 年以上のパーキンソン病の治療経験により十分に確立されている。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 用いた分析法の妥当性

LCIG の投与に関連する化合物を定量するため 3 種類の分析法のバリデーションを行った。最初の 2 種類の分析法では 10%過塩素酸水溶液によるたん白沈殿法を用いて測定対象物質を血漿マトリックスから分離した。いずれの方法でも，最終的な抽出物をカラムスイッチング HPLC 及び正イオンエレクトロスプレーを用いる MS/MS 検出で分析した。最初にバリデーションを実施した方法は，K_3EDTA 及びピロ亜硫酸ナトリウムを含む一定量（50 µL）の血漿中のカルビドパ及びレボドパ（添加濃度範囲 10–5000 ng/mL）並びに 3-*O*-メチルドパ（添加濃度範囲 400–25000 ng/mL）の定量に用いることができる（PPD. P1074，PPD. P1104，PPD. Analytical Report Project AEVD2）。二番目にバリデーションを実施した方法は，K_2EDTA 及びピロ亜硫酸ナトリウム 0.5%を含む一定量（100 µL）の血漿中のカルビドパの分解物 / 代謝物である DHPA 及び DHPPA（添加濃度範囲 10–500 ng/mL）の定量に用いることができる（R&D/11/1259，R&D/11/1260）。

三番目の分析法では，血漿中のヒドラジンを定量するため塩析効果を利用した液抽出（SALLE）とそれに続くアセトン誘導体（acetone azine）の HPLC-MS/MS による測定を行った。バリデーションを実施した方法は，K_2EDTA 及びピロ亜硫酸ナトリウム 0.5%を含む一定量（50 µL）の血漿中のヒドラジン（添加濃度範囲 5–3000 ng/mL，LLOQ 4.87 ng/mL）の定量に用いることができる（R&D/11/678）。

いずれの測定対象化合物も Guidance for Industry "Bioanalytical Method Validation"（2001 年 5 月）及び業界標準（PPD. P1074，PPD. P1104）に概説された要求事項及び基準を満たすように，マトリックス効果，選択性，安定性評価，希釈の妥当性，回収率及び incurred samples reanalysis 等を実施した[19,20]。

2.4.3.2 薬物動態試験概説

ラット及びイヌにおけるレボドパの薬物動態は，肝血流量に匹敵する高い血漿クリアランス値，低い又は中程度の分布容積（V_c 約 0.4 L/kg），1 時間以内の短い半減期及び約 35%–40%の経口バイオアベイラビリティで特徴づけられる[21-23]。ヒトにおけるレボドパの薬物動態プロファイルは非臨床動物種と同様で，血漿クリアランスが高く，消失半減期が 1 時間以内で，見かけ

の経口バイオアベイラビリティは 20%–30%であった [24,25]。ラット，サル及びイヌにおけるカルビドパの薬物動態は，高い分布容積及び低い血漿クリアランス値で特徴づけられる [23,26-28]。カルビドパの吸収には変動があり，サル及びラットのバイオアベイラビリティは各々約 8%及び約 20%と低かったが，イヌでは 88%と高い値であった。非臨床試験動物種及びヒトにおいて，カルビドパ（末梢の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素競合阻害剤）と併用投与したとき，レボドパのバイオアベイラビリティは約 3–4 倍になり，半減期は約 2 倍の延長を示す [29-31]。ラット，ミニブタ及びヒトにおいて，レボドパ及びカルビドパの長期投与はいずれの化合物の薬物動態も変化させない（R&D/11/1302）[32]。

レボドパのヒト血漿たん白との結合率は非常に低く（< 6%），カルビドパのヒト血漿たん白との結合率も低かった（36%）[33,34]。カルビドパをあらかじめ投与すると，レボドパのラットにおける脳内濃度は 20 倍を超えて増加し，イヌの骨格筋中濃度は 3 倍を超えて増加した [35,36]。血漿中レボドパ濃度は筋肉内濃度に比べて 20 倍高かった。

カルビドパはラット脳内に検出されず，最も高い組織内濃度は腎臓 > 肺 > 小腸，肝臓及び血漿に認められた [34]。レボドパ及びカルビドパはいずれもヒトの胎盤関門を通過し，胎児組織中に認められた。一方，レボドパは母乳中にも低濃度認められ，AUC 比（乳汁 / 血漿）は 0.28 であった。ヒト乳汁中のカルビドパに由来する放射能濃度は，血漿中に比べて約 1/12 であった [37,38]。

レボドパは脱炭酸，*O*-メチル化，アミノ基転移及び酸化を介して代謝され，芳香族アミノ酸脱炭酸酵素によるドパミンへの脱炭酸が主代謝経路である [39,40]。ヒトにおいて尿中放射能の 69%がドパミン及びその代謝物である 3-OMD として回収される。3-OMD はメチル化により生成し，半減期が 15 時間のため長期投与で蓄積する。尿中のバニルピルビン酸，バニル酢酸及び 2,4,5-トリヒドロキシフェニル酢酸代謝物はレボドパのアミノ基転移により生成する。レボドパをカルビドパと併用投与すると，親薬物及び 3-OMD の血漿中濃度は増加し，フェノールカルボン酸類（主として HVA 及び 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸）の血漿中濃度は減少する [41]。

ラットにレボドパを投与した後の尿中排泄は速やかで，放射能の大部分が 20 分以内に回収された [42]。パーキンソン病患者においても同様に，レボドパの放射能標識体投与後 2 及び 8 時間までに放射能の 42%及び 81%が回収された。一方，カルビドパをあらかじめ投与すると同じ時間間隔で投与量の 13%及び 37%しか回収されなかった [43]。カルビドパの排泄に関するデータはその経口バイオアベイラビリティの報告値と一致し，イヌにおいて投与量の大部分（> 60%）が尿中に排泄された（F > 80%）。ラットにおいては単回経口投与後投与量の 16%のみが尿中に回収された（F 約 20%）[34]。ヒトでは経口投与したカルビドパ用量の約 50%が尿中に回収されたが，そのうち約 30%が未変化体であった。

レボドパは高分子量の中性アミノ酸（LNAA）担体系に対する基質であり，小腸での吸収及び脳内への輸送を促進する。ラット脳内皮細胞モデル（*in vitro*）においてレボドパは排出トランスポーターである ABCB1/P 糖たん白質の基質であるが，阻害剤ではない [44]。

ラットに経口投与後，カルビドパの加水分解産物である DHPA 及び DHPPA は速やかに吸収され，速やかに消失し，半減期は約 15 分であり，経口バイオアベイラビリティは 50%を超えた

（LCIG Memo 01）。カルビドパの代謝物であるDHPPAの血漿中濃度は親化合物の約1/10であり，DHPAの血漿中濃度はごくわずかであった。ミニブタにカルビドパ / レボドパ（1：4）を持続十二指腸内注入したところ，DHPPAの最高血漿中濃度もカルビドパの血漿中濃度の約1/10であり，DHPAの濃度は定量下限未満であった（R&D/11/1302）。ヒドラジンの最高濃度はLLOQ（約5 ng/mL）の2–3倍であり，AUCの値はDHPPAと同程度であった。同じミニブタにおいて3-OMD濃度はレボドパ濃度の約2–3倍であり，カルビドパの曝露量の100倍を超過した。

経口投与後ヒドラジンは速やかに吸収され，消失した。マウスにおける半減期は約0.5–0.6 hであり，ラットでは1–1.4 hであった（Hydrazine Memo 01，Hydrazine Memo 02）。

ラットにおける代謝試験では，投与後2時間以内に投与量の約40%が親化合物及び代謝物として尿中に排泄され，投与量の約30%–35%が呼気（$^{15}N_2$）として排泄された[45,46]。

2.4.3.3 用いた動物モデルの妥当性

非臨床試験動物種及びヒトにおいて，レボドパの血漿中主代謝物は3-*O*-メチルドパ（3-OMD）であり，その濃度は親薬物と同程度以上であった[39]。カルビドパと併用投与したとき，3-OMD及びレボドパの血漿中濃度は増加し，フェノールカルボン酸（主としてHVA及び3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸）の血漿中濃度は連動して減少した。これはおそらく脳以外の組織における脱炭酸反応の阻害によるものと考えられる[41]。ヒトにおいて尿中に回収され，同定されたカルビドパの代謝物は，DHPPA（投与量の10%），3-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸（10%）及び3-(3-ヒドロキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸（10%）であり，未変化体として30%が回収された[47]。ヒトの代謝物はいずれもイヌ又はラットに同程度以上の回収率で存在していた（表2.4-2）。ヒドラジン基の喪失はカルビドパの主代謝経路であったが，ヒドラジンは検討したいずれの種にも代謝物として検出されなかった[47]。

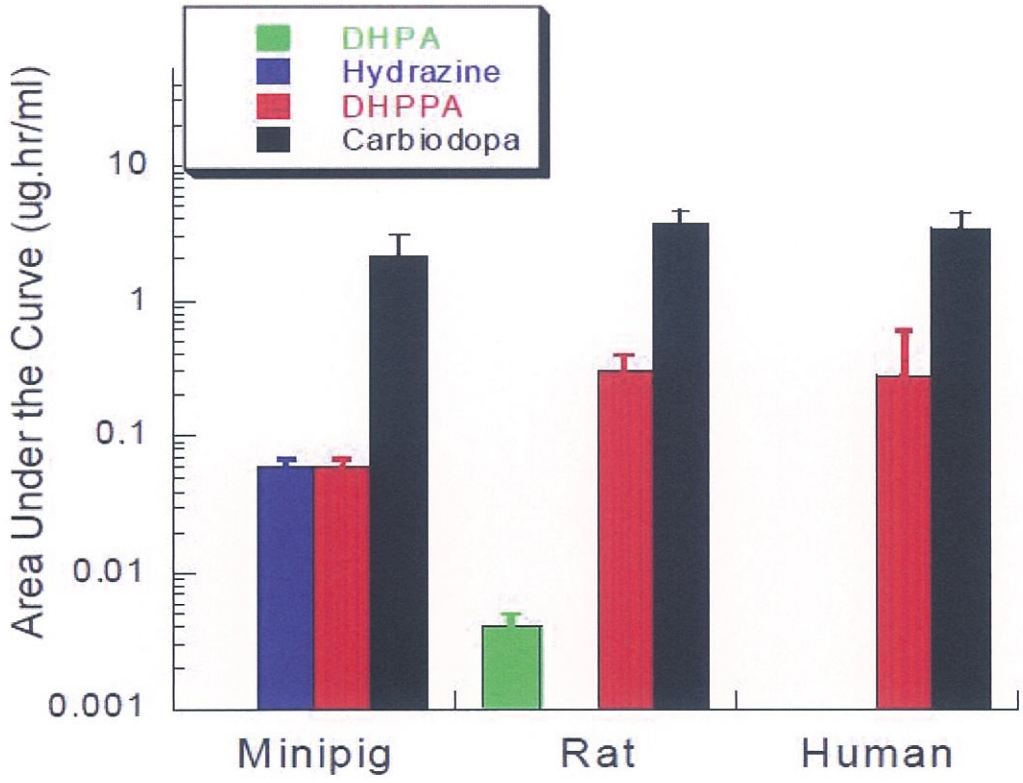
表2.4-2. ラット，サル，イヌ及びヒトに単回経口投与した後のカルビドパの代謝物とその尿中回収率

	投与量に対する割合%[47]			
化合物	ラット	サル	イヌ	ヒト
カルビドパ	37	20	65	30
DHPA			<5	<5
DHPPA		17	19	10
3-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸		10	16	10
3-(3-ヒドロキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸	20	10		10

血漿中のカルビドパの代謝物プロファイルもラット，ミニブタ及びヒトで実施された試験間で比較した（図2.4-1；R&D/11/1302，LCIG Memo 01，Pharmacokinetics Memorandum R&D/12/260）。3種いずれもカルビドパが血漿中主成分であり，血漿中DHPPA濃度は親薬物の

1/10 以下であった。ミニブタ及びヒトの両方で，血漿中 DHPA 濃度は定量下限未満であった（LLOQ 9.97 ng/mL）。一方，ラットでは経口投与後 3 時間以内でのみ痕跡量の濃度が測定可能であった。血漿中ヒドラジン濃度は被験者 11 例中 1 例のみで検出され（LLOQ 4.9 ng/mL），値は 8.3–18.3 ng/mL の範囲であり，AUC は 0.16 μg•h/mL（カルビドパの AUC の 1/20 以下）であった。ミニブタにおいて DHPPA 及びヒドラジンの AUC はカルビドパの曝露量の約 1/35 であった。ミニブタ及びヒトに LCIG を投与した後のカルビドパ及びその代謝物の曝露量を図 2.4-1 に示したが，ラットにカルビドパを懸濁液として経口投与した後の血漿中代謝物のプロファイルも得られた。その懸濁液は投与直前に水を用いて調製した。カルビドパ / 代謝物の曝露量の類似性は，レボドパ / カルビドパ水和物配合経腸用液注入時に比べて差異がないことを示唆している。

図 2.4-1. ラットに経口投与後又はミニブタ若しくはヒトに十二指腸内注入後のカルビドパ及び代謝物 / 分解物の AUC



LCIG を十二指腸内投与したミニブタ及びヒトのデータ；ラットのデータはカルビドパの懸濁液を単回経口投与して得られた。
ミニブタにおけるヒドラジン及び DHPPA の AUC は 0–4 h の時間間隔を反映している。
ラット試験血漿試料でヒドラジン濃度は測定しなかった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性

マウスにカルビドパ及びレボドパの用量比を 10：1 として単回投与毒性を検討した [1]。LD_{50} は 3440 mg/kg であった。死亡は投与後 1 日から 4 日にみられた。レボドパ単剤の LD_{50} は 1460 mg/kg であった。痙攣はカルビドパでは非経口投与の場合にのみみられた。

2.4.4.2 反復投与毒性

ラット

レボドパ / カルビドパのラットを用いた反復投与毒性は 4 週間，13 週間，26 週間及び 54 週間の反復投与毒性試験 [1] のデータを用いて評価した。レボドパ：カルビドパの 500：25，500：50 及び 500：100 mg/kg/日で死亡例がみられた。250：100 mg/kg/日以下では死亡はみられなかった。唾液過多が 50：10 mg/kg/日以上でみられた。体重増加量の減少は，4 週間試験では 500：25 mg/kg/日以上，26 週間試験では 100：10 mg/kg/日以上，54 週間試験では 50：10 mg/kg/日以上でみられた。4 週間試験では血液検査を実施しなかった。13 週間試験では 120：30 mg/kg/日で，54 週間試験では 100：10 mg/kg/日まで，血液学的検査及び血液生化学的検査において変化はみられなかった。関連する器官の病理組織学的変化はみられなかった。唾液腺の腺房細胞の肥大がレボドパを 500 mg/kg/日投与した群でみられた。胃粘膜のびらん及び壊死は 4 週間試験の 500：25 mg/kg/日以上でみられた。

サル

アカゲザルにレボドパ / カルビドパを投与した 85 日試験では，投与 3 週に 120：30 mg/kg/日群で瀕死状態を呈した動物がみられ，安楽死した [1]。60：30 mg/kg/日以上の群から活動性亢進が，120：30 mg/kg/日群では歩行失調及び自発運動の減少がみられた。120：30 mg/kg/日群ではヘモグロビン及びヘマトクリット値の減少並びに肝臓及び腎臓重量の増加がみられたが，関連した病理組織学的所見はみられなかった。アカゲザルにおける 54 週試験では，活動性亢進が，50：10 mg/kg/日群では投与 14 週まで，100：10 mg/kg/日では投与 40 週までみられた [1]。100：10 mg/kg/日群では一過性の筋協調不能及び自発運動の減少がみられた。

2.4.4.3 遺伝毒性

レボドパ単剤を 1500 μg/プレートまでの用量で検討した復帰突然変異試験の結果，代謝活性化系の存在下 / 非存在下において突然変異誘発能を示さなかった [3]。一方，カルビドパ単剤は細菌及び *in vitro* 哺乳類細胞において変異原性誘発能を示した [5]。しかし，カルビドパの *in vivo* マウス小核試験では，遺伝毒性はみられなかった [48]。したがって，レボドパ / カルビドパの併用投与による遺伝毒性リスクは低いと考えられる。

2.4.4.4 がん原性

レボドパ / カルビドパのがん原性は，25：10，50：10 及び 100：10 mg/kg/日の用量を 106 週間反復経口投与したラットを用いたがん原性試験の結果を用いて評価した [1]。レボドパ / カルビドパ群と対照群における生存率に差はみられなかった。一時的な唾液過多及び自発運動の減少が 100：10 mg/kg/日でみられた。雄の 50：10 mg/kg/日群及び 100：10 mg/kg/日群において，それぞれ 8%及び 14%の体重増加量の減少がみられた。一方，雌では体重に変化はみられなかった。レボドパ / カルビドパに起因した非腫瘍性変化はみられず，腫瘍性変化の発現率はレボドパ / カルビドパ群と対照群で同様であった。以上，レボドパ / カルビドパはラットにおいてがん原性を示さなかった。

カルビドパ単剤のがん原性は，25，45 及び 135 mg/kg/日を 96 週間反復投与したラットがん原性試験の結果を用いて評価した [1]。カルビドパに関連した死亡はみられなかった。生存率の減少に基づいて投与を投与 96 週に終了した。軽微な筋弛緩が全群でみられたが，カルビドパに起因する体重減少及び非腫瘍性変化はみられなかった。腫瘍性変化の発現率はカルビドパ群と対照群で同様であった。カルビドパはラットにおいてがん原性を示さなかった。

2.4.4.5 生殖発生毒性

2.4.4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

レボドパ/カルビドパを，カルビドパはヒトの臨床投与量の 2 倍量相当及びレボドパは 4 倍量相当投与した際，受胎能に影響はみられなかった [48]。

2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

レボドパ / カルビドパの胚・胎児発生毒性は，ヒトの臨床投与量の 20 倍量相当をマウスに投与した結果，催奇形性はみられなかった [48]。レボドパ / カルビドパをヒトの臨床投与量のそれぞれ 10 から 20 倍及び 5 から 10 倍量相当をウサギに投与した結果，内臓異常及び骨格異常がみられた [48]。

2.4.4.5.3 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

レボドパ / カルビドパをヒトの臨床投与量のそれぞれ 5 倍及び 2 倍量相当をラットに投与した結果，同腹あたりの生存児数の減少がみられた [48]。

2.4.4.6 局所刺激性

LCIG を小腸へ最大 4 週間持続注入することによる胃腸管への刺激性を，ヒトと同様の投与方法を用いてミニブタ（Göttingen minipigs）で検討した。ミニブタの胃腸管はヒトと類似しているおり[49]，外科的にチューブを装着でき，また，ヒトで使用する LCIG 持続注入用のポンプを含めたジャケット装着が可能であることから，ミニブタを本検討の動物種として選択した。初期の試験では雌を用いて，外科的処置方法やその他試験方法の検討を行った（R&D/11/1277，R&D/11/1278，R&D/11/1279）。雌のミニブタにヒトへの装着と同様に PEG チューブを外科的装着した。J チューブは PEG チューブ内を通し，ヒトのトライツ靭帯に相当する箇所に装着させた。

本試験の投与方法は，予備試験に基づき，ヒトの投与と同様に 2 日間の導入投与及び各日の投与は 1 日量のうちの 5%から 10%の量を 1–5 分でボーラス投与し，残量を 24 時間かけて持続注入した（R&D/11/1302，R&D/11/1304）。レボドパ，その代謝物である 3-OMD 及びカルビドパのトキシコキネティクス測定用サンプルとして採取した。

1 群あたり 3 例から 4 例のミニブタを用いた本試験では，用量群として LCIG の 0（生理食塩水），0（溶媒），45：11.25 mg/kg/日（MTD の半量）及び 90：22.5 mg/kg/日（MTD）を 4 週間反復投与した（R&D/11/1302）。高用量では，飛び跳ね行動，繰り返し行動に起因すると考えられた鼻部や蹄に出血や擦り傷，を含む中等度から高度の一般状態がみられた。高用量群の 3 例及び中用量群の 1 例では，一般状態をコントロールし，28 日間投与を可能にするためにジアゼパムを投与した（筋肉内投与又は坐剤投与）。生理食塩水，溶媒，LCIG 群において十二指腸における刺激性を示唆する剖検及び病理組織学的変化はみられなかった。

雄については，まず，1 群当たり 3 例のミニブタを割り当て，用量群として LCIG の 0（生理食塩水），0（溶媒），45：11.25 mg/kg/日又は 30：7.5 mg/kg/日（半量又は MTD の⅓量）及び 90：22.5 mg/kg/日（MTD）を 4 週間反復投与した（R&D/11/1304）。LCIG 投与群では，飛び跳ね行動，繰り返し行動に起因すると考えられた鼻部や蹄に出血や擦り傷を含む中等度から高度の一般状態が雌と同様にみられた。これらの変化はジアゼパムの投与（筋肉内投与又は坐剤投与）で抑制することができた。ジアセパム等のベンゾジアゼピンは GABA に影響を及ぼし，消化管に影響を与える可能性があり，消化管の刺激性にも影響を及ぼす可能性があったため，低用量群はジアゼパム投与を中断するために，MTD の半量から MTD の⅓量に減量した。消化管は複数の機能により制御され，複雑であり，GABA は間接的な消化管の調節物質であり，他の生体内物質と強調し，中枢性及び末梢性並びに腸神経系を通して影響を及ぼしていると考えられる[50-53]。ミニブタの 4 週間反復投与試験では，下痢や便秘のようなジアゼパムの消化管に対する影響はみられていないことから，ジアゼパム投与によるミニブタの消化管への影響はほとんどなかったと考えられる。

試験計画書で規定したとおり採取した十二指腸からの 4 ヵ所の病理標本では，病理組織学的変化はみられなかった。剖検でみられた十二指腸の赤色領域の病理組織学的標本では，チューブの先端が接触する箇所の周辺の固有層の血管壁にうっ血がみられた。うっ血の程度は対照群及び低用量群では軽微から軽度であった。うっ血の発現頻度は試験実施施設の背景データと同様であった。対照群及び LCIG 投与群においてみられた変化はチューブの接触と関連し，毒性とは考えなかった。

以上，LCIG を十二指腸から 4 週間持続投与した結果，MTD は 90：22.5 mg/kg/日と考えられ，雌では刺激性，雄では毒性と考えられる刺激性は，いずれもみられなかった。

2.4.4.7 その他の試験

LCIG の不純物又はカルビドパの *in vivo* における代謝物でもある DHPA 及び DHPPA の規格設定をサポートするための毒性試験を実施した [34,47]。DHPA はアルファーメチルードーパ（Aldomet®）[54] の代謝物でもある（R&D/12/997）。

DHPA 及び DHPPA の遺伝毒性試験

DHPA 及び DHPPA の突然変異誘発性を検討するため，ネズミチフス菌（TA1535，TA1537，TA100 及び TA98）及び大腸菌（WP2pKM101 及び WP2uvrApKM101）を用いて，DHPA の復帰突然変異試験を代謝活性化の存在下 / 非存在下で，プレインキュベーション法及びプレート法を用いて実施した（GLP 試験，R&D/11/884，R&D/11/1023）。

1 つ目の試験では DHPA 及び DHPPA を 1.5–5000 µg/プレートの範囲で，代謝活性化の存在下 / 非存在下でプレート法を用いて実施した。析出及び背景細菌叢による毒性もみられず，いずれの濃度においても復帰突然変異頻度の増加はみられなかった。これらの結果に基づいて，DHPA 及び DHPPA を 1.5–5000 µg/プレートの範囲で，代謝活性化の存在下 / 非存在下でプレインキュベーション法を用いて確認試験を実施した。析出はみられなかったが，代謝活性化の非存在下における DHPA の 5000 µg/プレートにおいてすべての細胞株で細胞毒性がみられた。代謝活性化系の存在下/非存在下においても復帰突然変異頻度の増加はみられなかった。したがって，DHPA 及び DHPPA は突然変異誘発性がみられなかった。

DHPA 及び DHPPA の染色体異常誘発性を検討するため，ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験を，代謝活性化の存在下/非存在下で実施した（R&D/11/943，R&D/11/942）。予備試験を実施し添加濃度を設定した。

DHPA の予備試験の結果に基づいて，代謝活性化系の非存在下の 4 時間培養では 143，285 及び 5700 µg/mL，存在下の 4 時間培養では 285，810 及び 1660 µg/mL に設定した（R&D/11/943）。代謝活性化系の非存在下の 20 時間培養には 36，72 及び 162 µg/mL に設定した。細胞は培養開始

後 20 時間に採取した。数的異常及び構造異常は代謝活性化系の存在下 / 非存在下の 4 時間培養ではみられなかった。代謝活性化系の非存在下における 20 時間培養では，数的異常はみられなかったが，72 μg/mL 以上で構造異常を示す細胞が増加した。コクラン－アーミテージの用量相関性検定では相関性が示された。以上から，DHPA はヒト末梢リンパ球において突然変異誘発性が示唆された。

DHPPA の予備試験の結果に基づいて，代謝活性化系の存在下/非存在下の 4 時間培養では 1000，1500 及び 1960 μg/mL を，代謝活性化の非存在下の 20 時間培養では 250，500 及び 550 μg/mL を設定した（R&D/11/942）。細胞は培養開始後 20 時間に採取した。構造異常を示す細胞率が，4 時間培養の代謝活性化系の非存在下（1000 μg/mL 以上)及び存在下（1500 μg/mL），20 時間細胞（550 μg/mL）で増加した。コクラン－アーミテージの用量相関性検定では代謝活性化系の存在下の 4 時間及び 20 時間培養で相関性が示された。数的異常の増加はみられなかった。以上から，DHPPA はヒト末梢リンパ球において突然変異誘発性が示唆された。

DHPA 及び DHPPA の反復投与毒性試験

本試験は LCIG に含まれるカルビドパの分解物である DHPA 及び DHPPA の規格設定のために，実施した（R&D/11/831）。1 群あたり雌雄各 10 例の SD ラットに DHPA/DHPPA の 0：0（溶媒；25 mM クエン酸，pH 3.0），3：2 及び 7.5：5 mg/kg を 1 日 2 回 4 週間反復投与した。1 日投与量は，6：4 及び 15：10 mg/kg/日となった。高用量は体重換算で規格値を DHPA 及び DHPPA をそれぞれ 4%及び 3%に設定した場合のヒトの最大 1 日投与量の 22 倍（DHPA）及び 20 倍（DHPPA）に相当する。

DHPA/DHPPA に関連した死亡例はみられず，一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，血液凝固検査，血液生化学的検査，尿検査に著変はみられなかった。DHPA/DHPPA 群の雄において，リンパ球が 22%，白血球が 17%から 19%減少した。減少の程度が小さかったことから毒性とは判断しなかった。DHPA/DHPPA 群の雌雄で甲状腺の絶対重量及び相対重量が 18%から 23%減少したが，関連する病理組織学的変化がみられていないことから，毒性とは判断しなかった。DHPA/DHPPA に関連する剖検及び病理組織学的変化はみられず，無毒性量は 15：10 mg/kg/日と考えられた。

ミニブタにおける DHPA 及び DHPPA の曝露量

DHPPA の血漿中濃度をミニブタの十二指腸投与試験 2 試験で測定した。DHPA と異なり，LCIG の MTD である 90：22.5 mg/kg/日を投与した際，DHPPA の血漿中濃度は検出された（検出限界：10.2 ng/mL）（R&D/11/1303，R&D/11/1302）。C_{max} の平均値はミニブタの試験ではカルビドパの用量に依存せず，カルビドパの 7.8 ± 4.2%であった（表 2.4-3）。DHPPA の C_{max} は雄では 3 用量で有意な増加はみられなかった（図 2.4-2）。

カルビドパを十二指腸投与，静脈内投与及び経口投与した際の DHPPA の C_{max} は，それぞれカルビドパの 9.0 ± 4.8%，1.2 ± 4.8%及び 19.3 ± 1.8%であった（R&D/11/1303）（表 2.4-4）。一方，カルビドパの十二指腸投与及び Sinemet®の経口投与におけるカルビドパの血漿中濃度は LCIG を十二指腸投与した際と同様であった。

表 2.4-3. LCIG をミニブタに十二指腸投与した際のカルビドパ及び DHPPA の C_{max}

		C_{max} (ng/mL)		
試験	投与量 (mg/kg/日)	カルビドパ	DHPPA	DHPPA/カルビドパ (%)
R&D/11/1303				
雄				
フェーズ 3[a]	30:7.5	243	13.2	5.43
	60:15	599	24.0	4.01
	90:22.5	609	20.5	3.37
フェーズ 2[b]	90:22.5 (Day 2)	583	31.6	5.42
	90:22.5 (Day 7)	480	23.3	4.85
R&D/11/1302[c]				
雌	45:11.25 (Day 2)	273	23.5	8.61
	90:22.5 (Day 2)	407	50.0	12.29
	45:11.25 (Day 28)	217	23.0	10.6
	90:22.5 (Day 28)	235	36.3	15.4
		Mean ± SD		7.8 ± 4.20

C_{max} =最高血中濃度; AUC = 濃度-時間曲線下面積; SD = 標準偏差.

a. 動物は，導入期にそれぞれの投与量を 2 日間投与された。値は投与 2 日のもの。

b. 持続投与を 7 日間実施した

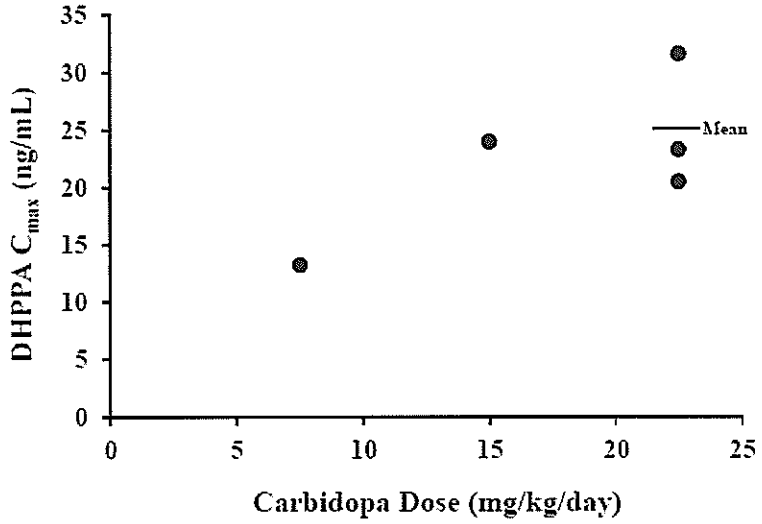
c. 持続投与を 28 日間実施した

表 2.4-4. 雄ミニブタにおけるカルビドパの単回十二指腸及び単回静脈内投与又は Sinemet® CR の単回経口投与時のカルビドパ，DHPPA 及び DHPA の C_{max}

			C_{max} (ng/mL)					
試験	被験物質	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	カルビドパ	DHPPA	DHPPA/カルビドパ (%)	DHPA	DHPA/カルビドパ (%)
R&D/11/1303	カルビドパ	ID	1.5	194	24.1	12.4	< LLOQ	-
雄			3.0	269	15.0	5.58	< LLOQ	-
				Mean ± SD		9.0 ± 4.84	Mean ± SD	-
	カルビドパ	IV	1.5	6880	91.8	1.33	26.6	0.39
			3.0	11300	126	1.12	42.0	0.37
				Mean ± SD		1.2 ± 4.84	Mean ± SD	0.38 ± 0.01
	Sinemet® CR	Oral	100:25	78.1	14.1	18.0	< LLOQ	-
			300:75	88.3	18.2	20.6	< LLOQ	-
				Mean ± SD		19.3 ± 1.81	Mean ± SD	-

C_{max} =最高血中濃度; AUC =濃度-時間曲線下面積; DHPPA = 2-methyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoic acid; DHPA = 3,4-dihydroxyphenylacetone; LLOQ = 検出限界 (9.92 ng/mL); SD = 標準偏差; ID =十二指腸投与; IV =静脈内投与; Oral =経口投与

図 2.4-2. LCIG を雄のミニブタに十二指腸投与した際の DHPPA の C_{max}



参考文献（R&D/11/1303）

DHPA の血漿中濃度をミニブタの十二指腸投与試験 2 試験で測定した。雌のミニブタの 4 週間試験の採取サンプルでは，MTD として 90：22.5 mg/kg/日を投与したが，すべてが検出限界（9.92 ng/mL）未満であり（R&D/11/1302），雄の試験でも同じ MTD を投与したがほとんどで検出限界未満であった（R&D/11/1303）。同様に Sinemet®を最大 300：75 mg/kg で経口投与した際も，DHPA は検出限界未満であった。DHPA の血漿中濃度（C_{max}）はカルビドパの 3.0 mg/kg を単回静脈内投与した際（R&D/11/1303），カルビドパの 0.4%未満であった（表 2.4-4）。

2.4.4.8 動物からヒトへの外挿性

Sinemet®の 30 年以上の臨床使用及び最近の Duodopa®の使用において，パーキンソン病患者においてレボドパ / カルビドパの安全性は確立されてきている。2015 年 5 月までの公表データに基づくと，これまで確立された Sinemet®の安全性情報に影響を及ぼすデータはない。

カルビドパの不純物である DHPA 及び DHPPA の規格値設定のための試験は ICH ガイドラインに基づき，遺伝毒性試験及びげっ歯類の毒性試験を実施した。

LCIG を小腸へ最大 4 週間持続注入することによる胃腸管への刺激性を，ヒトと同様の投与方法を用いてミニブタ（Göttingen minipigs）で検討した。ミニブタの胃腸管はヒトと類似しているおり [49]，外科的にチューブを装着でき，また，ヒトで使用する LCIG 持続注入用のポンプを含めたジャケット装着が可能であることから，ミニブタを本検討の動物種として選択した。

2.4.5 総括及び結論

2015 年の 5 月をカットオフにした公表論文を参考に，LCIG の毒性を評価した。毒性評価の概要を 2.6.6.2 項から 2.6.6.6 項に示す。2002 年以降，レボドパ / カルビドパの非臨床安全性の情報に大きく影響がある情報は発表されていない。

消化管への刺激性

LCIG を小腸へ最大 4 週間持続注入することによる胃腸管への刺激性を，ヒトと同様の投与方法を用いて評価した。用量設定試験では 90：22.5 mg/kg/日がレボドパ / カルビドパ MTD として考えられた。本試験では MTD の½量又は⅓量，及び MTD の 2 用量の刺激性を検討した。飛び跳ね行動，繰り返し行動に起因すると考えられた鼻部や蹄に出血や擦り傷が一般状態においてみられたが，これらはジアゼパムによりコントロール可能であった。生理食塩水，溶媒，LCIG 群において十二指腸における刺激性を示唆する剖検及び病理組織学的変化はみられなかった。雄において剖検でみられた十二指腸の赤色領域の病理組織学的標本では，チューブの先端が接触する箇所の周辺の固有層の血管壁にうっ血がみられた。うっ血の程度は対照群及び低用量群では軽微から軽度であった。うっ血の発現頻度は試験実施施設の背景データと同様であった。

対照群及びLCIG投与群においてみられた変化はチューブの接触と関連し，毒性とは考えなかった。LCIGを十二指腸から4週間持続投与した結果，MTDにおいても毒性と考えられる刺激性はみられなかった。

不純物の規格値設定

LCIGの不純物又はカルビドパの*in vivo*における代謝物でもあるDHPA及びDHPPAの規格設定をサポートするための毒性試験を実施した[34,47]。DHPAはアルファーメチルードーパ（Aldomet®）[54]の代謝物でもある（R&D/12/997）。

DHPA及びDHPPAは変異原性物質ではないが，*in vitro*ヒトリンパ球の染色体異常試験で構造異常を誘発した。これはDHPA及びDHPPAがカテコール構造を有するためであり，予測と一致した[55-57]。カテコール構造は，親化合物であるカルビドパにも含まれており，細菌及び*in vitro*哺乳類細胞における変異原性と関連しているが[5]，*in vivo*遺伝毒性試験では陰性を示している[48]。カルビドパにおける*in vitro*遺伝毒性ポテンシャルは，カルビドパ単剤並びにレボドパ及びカルビドパ併用で実施されたがん原性試験で陰性を示したことから，がん原性ポテンシャルを予測するものではない[1]。すなわち，DHPA及びDHPPAは親化合物であるカルビドパに対して，特にLCIG投与によって到達される曝露量においては，遺伝毒性の追加的ハザードになることはないと考えられる。

DHPAの最大15 mg/kg/日をDHPPAの最大10 mg/kg/日と併用してラットに4週間反復投与した結果，著変はみられなかった。投与量換算では，これらの投与量は100-mLのLCIGカセットを2カセット（総量としてレボドパを4000 mg，カルビドパを1000 mg），60 kgのヒトに投与した際に，DHPA及びDHPPAの規格値をそれぞれ4%及び3%に設定した場合，DHPAでは22倍，DHPPAでは20倍量に相当する。

ミニブタにおける胃腸管に対する刺激試験で得られたトキシコキネティクスデータにより，LCIG十二指腸内投与後のDHPA及びDHPPA濃度は低いことが示されている（各々最高カルビドパ濃度実測値の0.4%未満及び8.8%以下）。これらの低い曝露量は，28日間反復投与した試験において毒性変化が認められないことと関連している。更に，LCIG又はSinemet®（LCIGよりも低濃度の両不純物を含む）投与後のDHPA及びDHPPAの曝露量は同程度低かった。したがって，LCIG使用の結果生ずるDHPA及びDHPPAの曝露量は，代謝によって生ずる量に比べて実質的に増加しないと結論づけることができる。ミニブタに十二指腸内投与した後，3用量を通じてDHPPA濃度の顕著な増加が認められなかったことは上記の結論を指示する。もし吸収が全身曝露量に顕著に寄与しているならば，用量に関連した曝露量の増加が認められたはずである。

治験の結果により，LCIG又はSinemet®（レボドパ / カルビドパ経口錠）を投与された被験者でもDHPA及びDHPPAの濃度は低いことが示された（2.7.2項参照）。

LCIG を投与された 11 例の被験者及び Sinemet®を経口投与された 5 例の被験者から 16 時間にわたり複数の血液試料が採取された。これらの被験者から得られた 85 試料中 1 例のみで DHPA の濃度は LLOQ（9.8 ng/mL）を超過した。

LCIG を投与された 1 例の被験者で 10.8 ng/mL の DHPA 濃度が認められた。この濃度が定常状態の濃度であると仮定すると，DHPA の AUC_{0-16} は保守的に約 173 ng•h/mL（10.8 ng/mL × 16 h）と見積もることができる。この値はカルビドパの AUC_{0-16}（これらの被験者で 3378 ng•h/mL）の約 5%に相当する。しかし，試料の 99%が LLOQ 未満とすると，カルビドパ濃度と比べた DHPA 濃度はこの値よりも顕著に低いと考えられる。DHPA と異なり，LCIG を投与された 11 例中 7 例の被験者及びレボドパ / カルビドパ経口錠を投与された 5 例中 4 例の被験者で DHPPA は測定可能であった（> LLOQ ［10.8 ng/mL］）。LCIG を投与された被験者の DHPPA の AUC_{0-16} の平均値は 277 ng•h/mL であり，カルビドパの AUC_{0-16} である 3383 ng•h/mL の 9%未満であった。レボドパ / カルビドパ経口錠を投与された被験者の対応する値は 5%未満であった。

結論として，実験動物及びヒトにおけるカルビドパの代謝物の DHPA 及び DHPPA の循環血中濃度は低く，LCIG の不純物から生ずる DHPA 及び DHPPA の循環血中濃度に及ぼす影響が無視できるほど小さいことは，不純物の規格値を DHPA で 4%，DHPPA で 3%までとすることを支持する。

ヒドラジン

LCIG の投与を達成するために，投与剤形として液体であることが必要である。カルビドパは分解しやすく投与媒体中にヒドラジンが生じる。分解は温度及び pH 依存的に生じる。分解率は低温における保管及び配送並びに製造管理により抑制している。ヒドラジンのレベルを ICH の許容範囲へ抑制するために保管及び出荷時に凍結する。

ヒドラジンの曝露に関して，発がん性のポテンシャル及び LCIG を投与された患者に関する安全性のリスクを評価した（R&D/12/714）。ヒドラジンを投与した実験動物においてがん原性を示す報告が多く蓄積しているものの，ヒドラジンが代謝物になるイソニアジドを投与された患者の発がん頻度の疫学的解析から示されるようにヒトへの外挿性は不確実である（LCIG を投与された患者のヒドラジン血漿中濃度はイソニアジドを投与された患者で報告されている濃度の約 1/38 であった）。更に，1970 年代にがん患者に対する治療上のベネフィットを評価した臨床試験において，ヒトにおける発がん誘発の報告はなかった。

ヒドラジンは *in vitro* の遺伝毒性試験における陽性結果を示す報告があるが，*in vivo* の lacZ 遺伝子突然変異試験（Muta™ マウス）において陰性であった。この結果は，ヒドラジンは変異原性物質ではあるが，おそらく弱い変異原性を有しており，その作用は *in vivo* では発揮されない程度であることを示唆している。ヒドラジンの DNA のメチル化への影響を示した報告では，動物における腫瘍は DNA 付加体を直接形成するのではなく，間接的な，閾値を有した機序によっ

て発現すると示唆している。投与量及び曝露量に基づくと，動物におけるヒドラジンによる腫瘍は，進行期のパーキンソン病患者に投与される LCIG に含まれるヒドラジン量よりも高いレベルで発現する。

これらの報告は，LCIG を進行期のパーキンソン病患者に投与する際に含まれるヒドラジンの発がん性リスクを，閾値を有したアプローチ（即ち，投与量依存性及びヒドラジンが動物に腫瘍を誘発する際のエピジェネティックな性質を考慮したアプローチ）で評価することの妥当性を示唆している。最も感受性が高い動物種であるラットにおいて腫瘍の発現がみられない用量は，体重換算（mg/kg）で LCIG の 1 カセットから投与されるヒドラジン量より 8 倍高い。ヒドラジンの推定曝露量に基づくと，LCIG を投与される患者に投与されるヒドラジン量（曝露量）は，ラットにおいて腫瘍発現がみられない用量よりも，4 倍以上低い値である。マウス又はハムスターにおける腫瘍発現がみられない用量と比較する場合は，患者に投与されるヒトラジン量は更に低い値（マウス，25 倍；ハムスター，75 倍）になる。動物にヒドラジンを投与して腫瘍が発現する用量は，LCIG をパーキンソン病患者に投与されるヒドラジン量よりも高い（ラット，40 倍；マウス，124 倍；ハムスター，149 倍）。

これらの結果から，ヒドラジンによるリスクの程度は，LCIG の全体のベネフィット－リスクを評価する上では，小さいと考えられる。

2.4.5.1 LCIG の特性

LCIG は，近位小腸に，注入システムである周辺機器及び腸内注入チューブ製品のそれぞれが付属したソフトウエア駆動式携帯型インフュージョンポンプを用いて，直接投与する。上部消化管投与後，レボドパは能動輸送により速やかに近位小腸から吸収される。LCIG の近位小腸への直接投与が，レボドパの血漿中濃度のバラツキを抑制し，脳のドパミン受容体への持続的刺激を可能にする。多くの場合，LCIG 投与初日から運動変動に対する治療効果が見られる。

LCIG は水溶性カルメロースナトリウムにレボドパ / カルビドパを 4：1 の質量比で懸濁したゲルであり，粉砕粒子が均一に分布している。レボドパ及びカルビドパのゲル粘度と粒子径の組み合わせにより，LCIG 懸濁液の物理的安定性が確保されている。LCIG は，レボドパ及びカルビドパの濃度が，それぞれ 20 mg/mL 及び 5 mg/mL であり，臨床用のカセットは，1 カセットあたり，100 mL の LCIG（2000 mg レボドパ及び 500 mg カルビドパ）が含まれる。

レボドパとカルビドパの質量比は 4：1 であり，この比はパーキンソン病治療薬として 40 年以上使用されている，一日当たりのレボドパの最大推奨投与量が 2000 mg である Sinemet®と同じである。

LCIG に含まれるカルビドパの分解物としてヒドラジンが生じる。LCIG の投与を達成するために，投与剤形として液体である必要がある。カルビドパは分解しやすく投与媒体中にヒドラジンが生じる。分解は温度及び pH 依存的に生じる。分解率は低温における保管及び配送並びに

製造管理において抑制している。ヒドラジンのレベルを ICH の許容範囲へ抑制するために保管及び出荷時に凍結する。

ヒドラジンは pH 5 から 6 で分解しやすい。pH が 7 を超えると，酸化経路が変わるためカルビドパの不安定度が増す。pH が 5 を下回ると，カルボキシル基がプロトン化し，脱炭酸が抑制され，溶液中のカルビドパは最も安定になる。臨床使用では，LCIG は直接小腸へ投与されるので，刺激性を考慮し，pH を 6.5 に設定し，安定性を確保するために保存中は温度を管理している。

温度はカルビドパの溶解性及び安定性に重要な影響を及ぼす。LCIG 中のカルビドパは–20°C で安定であり，2–8°C では比較的分解も少ない。したがって，LCIG は患者へ投与する前の輸送時は冷凍で，患者に投与する前に冷蔵で保存される。

消化管の刺激性は，ヒトとほぼ同様の投与用法を用いてミニブタを用いて評価したが，投与部位の忍容性が確認された。

レボドパの不純物は ICH の基準以下であったため，規格値設定用の試験は実施していない。カルビドパの不純物である，DHPA 及び DHPPA（カルビドパの代謝物でもある）は，ICH の規格基準を上回っていたことから，*in vitro* 遺伝毒性試験及びラットの 4 週間反復投与毒性試験を実施した（規格値として DHPA を 4%及び DHPPA を 3%として設定した）。さらに，LCIG を投与した患者において血漿中 DHPA 及び DHPPA 濃度を測定した結果，カルビドパの濃度の 10%未満であり，LCIG の不純物からの血漿中濃度への影響が小さいと考えられた。

使用期限内における LCIG のヒドラジンの規格値は 40 µg/g である。規格値はヒドラジンレベルが，使用期限まで許容濃度になるように設定された。ヒドラジンは，安定性試験によると（3.2.P.5.6 項），治験中の使用期限である冷蔵 15 週間目には 5 µg/g 未満，使用期限終了時は 20 µg/g を超える。LCIG の投与によってヒドラジンの曝露を受けた患者に対するリスク評価において，ヒドラジンは LCIG のベネフィット-リスクから考えるとそのリスクは小さいと考えられる（R&D/12/714）。

2.4.5.2 LCIG の安全性プロファイル

レボドパ / カルビドパはパーキンソン病治療薬として長く利用されている。レボドパ / カルビドパの配合剤である Sinemet®は 1974 年に承認申請（NDA 17-555）されて以来，約 40 年臨床使用されている。

ヒドラジンは，動物のがん原性試験の結果から，ヒトに対してがん原性を示す可能性が報告されており，カルビドパの分解物 / 不純物として存在するヒドラジンは，患者のポテンシャルリスクとなる。遺伝毒性発現の機序及びがん原性の結果から，LCIG の持続投与から患者に摂取されるヒドラジンの 1 日量は，動物においてみられたがん原性の閾値を下回っている

（R&D/12/714）。患者に対するがん原性リスクが低いことを示唆するデータとして，結核の治療薬及び予防薬として使用されるイソニアジドの報告がある。イソニアジドの代謝物であるヒドラジンのヒトに対するがん原性リスクは，約 1 年間，あるいは数年間の標準療法後，最大 20 年間追跡したイソニアジドを投与された結核患者の複数のプラセボ対照試験の結果から推測可能である。これらの試験から，イソニアジド投与とがん原性の増加について一貫した関連性はみられていない。さらに，2004 年の米国以外の諸国における初回承認申請以来の LCIG 投与（Duodopa®の臨床試験データ及び市販後データ）と発がんの因果関係はみられていない。

不純物である DHPA 及び DHPPA の規格設定のための毒性試験は代謝物及び不純物の規格を設定する十分な試験であると考えられた。

LCIG 投与システムからの溶出物のリスク評価を実施し，LCIG からの溶出する可能性のある化合物について，毒性学的懸念はないと考えられる（2.6.6.8.4 項）。

以上，パーキンソン病患者に対して許容されないリスクと考えられるような安全性リスクはみられなかった。

2.4.5.3 総括

Sinemet®及びレボドパ / カルビドパはパーキンソン病患者の治療薬として長い間使用されてきた。レボドパ / カルビドパの非臨床及び臨床安全性プロファイルは既に知られている。LCIG の十二指腸投与は Sinemet®及びメネシット配合錠を含む他の公開情報によって知られているこれまでのレボドパ / カルビドパの安全性プロファイルを変えるものではない。不純物である DHPA 及び DHPPA の規格設定のための毒性試験は代謝物及び不純物の規格を設定する十分な試験であると考えられた。ヒドラジンは，動物のがん原性試験の結果から，ヒトに対してがん原性を示す可能性が報告されており，カルビドパの分解物 / 不純物として存在するヒドラジンは，患者のポテンシャルリスクとなる。遺伝毒性発現の機序及びがん原性の結果から，LCIG の持続投与から患者に摂取されるヒドラジンの 1 日量は，動物においてみられたがん原性の閾値を下回っている。イソニアジドを投与された患者において，イソニアジドの代謝物であるヒドラジンの血漿中濃度は，LCIG を投与された患者よりも約 38 倍高いが，発がんの因果関係はみられていない。ヒドラジンは LCIG のベネフィット-リスクから考えるとそのリスクは小さいと考えられる。

以上のとおり，薬理試験，安全性薬理試験，薬物動態学試験及び毒性試験情報は，パーキンソン病患者に対してレボドパ/カルビドパを十二指腸投与した場合の有効性及び安全性を支持するものであった。

2.4.6 参考文献一覧

1. Zwickey RE, Peck HM, Bagdon WJ, Bokelman DL, Brown WR, Hite M, et al. Preclinical toxicological studies of carbidopa and combinations of carbidopa and levodopa. Toxicol Appl Pharmacol. 1974;29:181-95.(4.3.4-6)
2. Rauws AG, Vos JG, Garbis-Berkvens JM, Peters PWJ, de Vries T, van Logten MJ. Comparative 90-day toxicity of two decarboxylase inhibitors, benserazide and carbidopa, in the rat. Toxicol Appl Pharmacol. 1982;66:201-20.(4.3.4-1)
3. Suter W, Matter-Jaeger I. Genotoxicity of apomorphine and various catecholamines in the Salmonella mutagenicity test（Ames test）and in tests for primary DNA damage using DNA repair-deficient B. Subtilis（Rec assay）. Mutat Res. 1984;137:17-28.(4.3.4-2)
4. Leifer Z, Kada T, Mandel M, Zeiger E, Stafford R, Rosenkranz HS. An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene -TOX Program. Mutat Res. 1981;87:211-97.(4.3.4-3)
5. Kitamura J, Mori H, Sugie S, Kawai K. Genetic toxicity of several antihypertensive drug responses possessing a hydrazine groups. Res Comm Chem Pathol Pharmacol. 1985;49:415-22.(4.3.4-4)
6. Duodopa 米国添付文書 (4.3.1-1)
7. メネシット配合錠 100，メネシット配合錠 250 添付文書 第 14 版（2013 年 8 月改訂版）(4.3.1-2)
8. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Ninth Edition. 1996;pp.158, 506-507, 509-511.(4.3.2-3)
9. Wooten GF. Anatomy and function of dopamine receptors. Parkinsonism Relat. Disord. 2001;8:79-83.(4.3.2-4)
10. Deleu D, et al. The effect of carbidopa on the pharmacokinetics and metabolism of intravenously administered levodopa in blood plasma and skeletal muscle.
Archives Pharmacology. 1993;348:576-581.(4.3.2-5)
11. Deleu D, et al. The effects of carbidopa and entacapone pre-treatment on L-dopa pharmacokinetics and metabolism in blood plasma and skeletal muscle in beagle dogs. JPET. 1995;273:1323-1331.(4.3.2-6)
12. Nakashima M, et al. *In vivo* micro dialysis to determine the relative pharmacokinetics of drugs. Biol. Pharm. Bull. 1996;19:988-994.(4.3.2-7)

13. Stern MB. Parkinson's Disease: early diagnosis and management. J Family Practice 1993;36:439-446.(4.3.2-8)

14. Lee EA, Lee WY, Kim YS, Kang UJ. The effects of chronic L-DOPA therapy on pharmacodynamic parameters in a rat model of motor response fluctuations. Exp Neurol 2003;184:304-312.(4.3.2-9)

15. Song L, Yang X, Wu N, Liu Z. The CBI cannabinoid receptor agonist reduces L-DOPA-induced motor fluctuations and ERK1/2 phosphorylation in 6-OHDA-lesioned rats. Drug Design, Devel Ther 2014;8:2173-2180.(4.3.2-10)

16. Zwickey RE, Peck HM, Bagdon WJ, Bokelman DL, Brown WR, Hite M, et al. Preclinical toxicological studies of carbidopa and combinations of carbidopa and levodopa. Toxicol Appl Pharmacol 1974;29:181-95.(4.3.2-11)

17. Bracco F, Battaglia A, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, Masso JFM, et al. The long-acting dopamine receptor agonist cabergoline in early Parkinson's disease: Final results of a 5-year, double-blind, levodopa-controlled study. CNS Drugs 2004;18:733-46.(4.3.2-12)

18. Noack, C, Schroeder, C, Heusser, K, and Lipp, A. Cardiovascular effects of levodopa in Parkinson's disease. Parkinonism Related Disorders 2014;20:815-8.(4.3.2-13)

19. Food and Drug Administration. FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2001. (4.3.1-8)

20. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. AAPS J. 2007;9:E30-E42. (4.3.1-9)

21. Cotler S, Holazo A, et al. Influence of route of administration on physiological availability of levodopa in dogs. J. Pharm Sci. 1976;65(6):822 -827. (4.3.1-10)

22. Sasahara K, Nitanai T, et al. Dosage form design for improvements of bioavailability of levodopa II: bioavailability of marketed L -dopa preparations in dogs and parkinsonian patients. J. Pharm. Sci. 1980;69:261-265. (4.3.1-11)

23. Bredberg E, Lennernaes H, et al. Pharmacokinetics of levodopa and carbidopa in rats following different routes of administration. Pharmaceutical Research. 1994;11:549-555. (4.3.1-12)

24. Contin M, Riva R, et al. Pharmacokinetic optimization in the treatment of Parkinson's disease. Clin. Pharmacokinetics. 1996;30(6):463-481. (4.3.1-13)

25. Bredberg E, Tedroff J, et al. Pharmacokinetics and effects of levodopa in advanced Parkinson's disease. Eur J Clin Pharmacol. 1990;39:385-389. (4.3.1-14)

26. Lin JH, Los LE. Time-and concentration-dependent inhibitory effects of carbidopa on the elimination kinetics of L-dopa in rats. Pharm Res. 1990;7(7):PPDM 8312. (4.3.1-15)

27. Lin JH, Los LE. Pharmacokinetics of carbidopa in rats, monkeys and dogs. Pharm Res. 1990;7(9):S283. (4.3.1-16)

28. Obach R, Menargues A, et al. The pharmacokinetic profile of carbidopa in dogs. J Pharmacy Pharmacology. 1984;36(6):415 -416. (4.3.1-17)

29. Leppert P, Cortese M, et al. The effects of carbidopa dose and time and route of administration on systemic L-dopa levels in rats. Pharm Res. 1988;5(9):587-591. (4.3.1-18)

30. Huebert ND, Palfreyman MG, et al. A comparison of the effects of reversible and irreversible inhibitors of aromatic L-amino acid decarboxylase on the half-life and other pharmacokinetic parameters of oral L-3, 4-dihydroxyphenylalanine. Drug Metabol. Dispos. 1983;11:195-200. (4.3.1-19)

31. Nutt JG, Woodward WR, et al. The effect of carbidopa on the pharmacokinetics of intravenously administered levodopa: the mechanism of action in the treatment of parkinsonism. Ann. Neurol. 1985;18:537-543. (4.3.1-20)

32. Rose S, Jenner P, et al. Chronic administration does not alter the pharmacokinetic profile of L-dopa in the rat. J. Pharm. Pharmacol. 1993;45:725-730. (4.3.1-21)

33. Hinterberger H, Andrews CJ. Catecholamine metabolism during oral administration of levodopa. Arch. Neurol. 1972;26:245-252. (4.3.1-22)

34. Vickers S, Stuart EK, et al. Metabolism of carbidopa [L-(-)-α-hydrazino-3,4- dihydroxy-α-methylhydrocinnamic acid monohydrate], an aromatic amino acid decarboxylase inhibitor, in the rat, dog, rhesus monkey and man. Drug Metabolism and Disposition. 1974;2:9-22.(4.3.4-29)

35. Komai T, Kawai K, et al. Effect of carbidopa MK-486 on the metabolic fate of L-dopa part 1: effect of carbidopa on the tissue dopa decarboxylase and on the L-dopa-2-^{14}C uptake by the brain in rats. J Pharmacobio-Dynamics. 1978:1271-1280. (4.3.1-23)

36. Dhole D, Sarre S, et al. The effect of carbidopa on the pharmacokinetics and metabolism of intravenously administered levodopa in blood plasma and skeletal muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1993;348(6):576-581. (4.3.1-24)

37. Merchant C, Cohen G, et al. Human transplacental transfer of carbidopa/levodopa. J Neural Transm. 1995;9:239-242. (4.3.1-25)

38. Thulin PC, Woodward WR, et al. Levodopa in human breast milk: clinical implications. Neurology. 1998;50(6): 1920-1921. (4.3.1-26)

39. Nutt J, Fellman J. Pharmacokinetics of levodopa. Clin. Neuropharmacol. 1984;7:35-49. (4.3.1-27)

40. Mena MA, Casarejos MJ, et al. Half a century of L-dopa. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2009;9:880-893. (4.3.1-28)

41. Kuruma I, Bartholini G, et al. Comparative investigation of inhibitors of extracerebral dopa decarboxylase in man and rats. J Pharm. Pharmacol. 1972;24:289-294. (4.3.1-29)

42. Bergstrom M, Lu L, et al. Modulation of organ uptake of 11C-labelled L-dopa. Nuclear Medicine and Biology. 1997;24(1):15 -19. (4.3.1-30)

43. Bianchine JR, Messiha FS, et al. Peripheral aromatic L-amino acids decarboxylase inhibitor in parkinsonism. II. effect of metabolism of L-2-^{14}C-dopa. Clin Pharmacol Therapeutics. 1972;13(4):584-594. (4.3.1-31)

44. Vautier S, Milane A, et al. Interactions between antiparkinsonian drugs and ABCB1/P-glycoprotein at the blood-brain barrier in a rat brain endothelial cell model. Neurosciences Letters. 2008;442:19-23. (4.3.1-32)

45. Nelson SD, Gordon WP. Metabolic activation of hydraz ines. Adv. Exp. Med. Biol. 1982;136B: 971-981. (4.3.1-33)

46. Springer DL, Krivak BM, et al. Metabolic fate of hydrazine. J Toxicology and Environmental Health. 1981;8:21-29. (4.3.1-34)

47. Vickers S, Stuart EK, et al. Further studies on the metabolism of carbidopa, (-)-L-α-hydrazino-3,4-dihydroxy-α-methylbenzenepropanoic acid monohydrate, in the human, rhesus monkey, dog and rat. J. Med. Chem. 1975;18(2):134-138. (4.3.1-35)

48. Stalevo 米国添付文書 (4.3.1-40)

49. Bode G, Clausing P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Nogues V, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010;62:196-220.(4.3.4-7)

50. Krantis A. GABA in the mammalian enteric nervous system. News Physiol Sci. 2000;15:284-90.(4.3.4-25)

51. Hansen MB. Neurohumeral control of gastrointestinal motility. Physiol Res. 2003;52:1-30.(4.3.4-26)

52. Costa M, Brookes SJH, Henning GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. Gut. 2000;47（suppl IV）:iv15 -iv19.(4.3.4-27)

53. Yee LF, Mulvihill SJ. Neuroendocrine disorders of the gut. West J Med. 1995;163:454-62.(4.3.4-28)

54. Au WYW, Dring LG, Grahame-Smith DG, Isaac P, Williams RT. The metabolism of ^{14}C-labelled α-methyldopa in normal and hypertensive human subjects. Biochem J. 1972;129:1-10. (4.3.1-36)

55. Derek for Windows report for DHPA. Derek for Windows Version 12.0.0 run and report created December 10, 2010（available upon request）.

56. Derek for Windows report for DHPPA. Derek for Windows Version 12.0.0 run and report created December 10, 2010（available upon request）.

57. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1999;71:433 -51. (4.3.1-39)