リフキシマ錠 200mg

医薬品製造販売承認申請書添付資料

2.4 非臨床試験の概括評価

あすか製薬株式会社

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 5
2.4.1.2　薬物動態試験 6
2.4.1.3　毒性試験 6
2.4.2　薬理試験 7
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 7
2.4.2.1.1　作用機序及び特性 7
2.4.2.1.2　*In vitro* 試験 7
2.4.2.1.3　*In vivo* 試験 7
2.4.2.1.4　薬剤耐性 8
2.4.2.2　副次的薬理試験 9
2.4.2.3　安全性薬理試験 9
2.4.2.4　薬理総括 10
2.4.3　薬物動態試験 12
2.4.3.1　吸収 12
2.4.3.1.1　単回投与後における血漿中濃度 12
2.4.3.1.2　反復投与後における血漿中濃度（トキシコキネティクス） 13
2.4.3.2　分布 14
2.4.3.3　代謝 15
2.4.3.4　排泄 15
2.4.3.5　トランスポーターとの相互作用 15
2.4.3.6　非臨床薬物動態総括 16
2.4.4　毒性試験 18
2.4.4.1　単回投与毒性試験 18
2.4.4.2　反復投与毒性試験 18
2.4.4.3　遺伝毒性試験 19
2.4.4.4　がん原性試験 19
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 19
2.4.4.6　局所刺激性試験 20
2.4.4.7　その他の毒性試験 20
2.4.4.8　毒性総括 22
2.4.5　総括及び結論 24
2.4.6　参考文献一覧 25

表

表 2.4.3-1. L-105 単回投与後の薬物動態パラメーター 13

表 2.4.3-2. L-105 反復経口投与後の薬物動態パラメーター 14

略語一覧表

略語	省略しない形	
	日本語	英語
ALP	アルカリホスファターゼ	Alkaline phosphatase
ALT	アラニンアミノ基転移酵素	Alanine aminotransferase
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積	Area under the plasma concentration-time curve
BCRP	乳癌耐性タンパク質	Breast cancer resistance protein
BSEP	胆汁酸塩排出ポンプ	Bile salt export pump
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum plasma concentration
CYP	チトクローム P450	Cytochrome P450
ED_{50}	50%有効量	Median effective dose
eq.	当量	Equivalent
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
HEK	ヒト胎児由来腎臓	Human embryonic kidney
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子	Human ether-a-go-go related gene
HGPRT	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IC_{50}	50%阻害濃度	Half maximal (50%) inhibitory concentration
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LSC	液体シンチレーション計測	Liquid scintillation counting
MC	メチルセルロース	Methylcellulose
MIC	最小発育阻止濃度	Minimum inhibitory concentration
MRP2	多剤耐性関連タンパク質 2	Multidrug resistance-associated protein 2
MRP4	多剤耐性関連タンパク質 4	Multidrug resistance-associated protein 4
NOAEL	無毒性量	Non-observed adverse effect level
OATP	有機アニオン輸送ポリペプチド	Organic anion transport polypeptide
PEG	ポリエチレングリコール	Polyethylene glycol
P-gp	P-糖タンパク質	P-glycoprotein
RNA	リボ核酸	Ribonucleic acid
Tg.rasH2	rasH2 トランスジェニック	rasH2 transgenic
TK	トキシコキネティクス	Toxicokinetics
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間	Time to reach C_{max}

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

リファキシミン（開発コード：L-105）は、イタリア Alfa Wassermann 社が開発したリファマイシン系の抗菌薬であり、広い抗菌スペクトルと難吸収性という特徴を有している。1985 年にイタリアで初めて製造販売承認を取得して以来、既に 66 の国又は地域で腸内感染症、夏季下痢症、旅行者下痢症、下痢型過敏性腸症候群等の治療薬として承認されており、肝性脳症関連の適応では 64 ヵ国で承認を取得している。また、本邦では食品安全委員会によって動物用医薬品としての評価が行われている [1)]。

L-105 の本邦における承認申請用非臨床試験データパッケージは、Alfa Wassermann 社が欧州申請用に実施した一連の試験に Salix 社と Alfa Wassermann 社が米国申請用に追加実施した試験を加え、更にあすか製薬が実施した薬理試験、薬物動態試験及び遺伝毒性試験を加えて構成した。すなわち、Alfa Wassermann 社の欧州申請当初の非臨床試験データパッケージは、微生物学的影響に関する薬理試験、吸収、分布及び排泄に関する薬物動態試験、安全性試験としてラットを用いた単回経口投与毒性試験、ラットとイヌを用いた反復経口投与毒性試験（1～26 週間投与）、細菌及び酵母を用いた遺伝子突然変異試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験で構成されていた。米国申請用の非臨床データパッケージでは、Salix 社と Alfa Wassermann 社が抗菌活性を中心とした作用機序や薬効及び耐性菌の検討を追加し、薬物動態・代謝については ^{14}C 標識体又は非標識体の投与による吸収、分布及び排泄の検討、トキシコキネティクス（TK）データを利用した反復投与時の曝露評価及び薬物代謝酵素への影響評価を追加した。また、安全性については、一連の安全性薬理試験、マウスとラットを用いた単回投与毒性試験、マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験（4～39 週間投与）、遺伝毒性試験（*in vitro* 及び *in vivo*）、ラットと rasH2 トランスジェニック（Tg.rasH2）マウスを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、免疫毒性試験、皮膚感作性試験並びに消化管吸収性が高い[redacted]の L-105 を用いたイヌの単回投与及び反復投与毒性試験を追加した。さらに、本邦申請用の非臨床データパッケージでは、あすか製薬が肝性脳症モデル動物を用いた薬理試験、乳汁移行や胎盤通過性試験及びヒトの代謝プロファイルに関する代謝試験を信頼性基準で追加実施し、ラットの胃粘膜細胞を用いた *in vivo* 遺伝毒性試験を GLP で追加実施した。

2.4.1.1　薬理試験

効力を裏付ける試験では、L-105 の抗菌活性を中心に、各種薬理学的特性及び薬剤耐性を検討した。作用機序及び特性について、RNA 合成阻害作用、殺菌作用、上皮細胞に及ぼす影響、細菌の病原性因子に及ぼす影響、細菌の形態及びプラスミドに及ぼす影響を検討した。*in vitro* 試験で標準菌株及び臨床分離株の抗菌活性、ウイルスなどに対する活性並びに臨床菌株に対する抗菌活性の他剤比較などを検討し、経口投与による *in vivo* 試験でラット糞便細菌叢に及ぼす影響、マウス全身性感染モデルに対する活性、ラット血中アンモニア濃度に対する作用及びラット肝性脳症モデルにおける昏睡抑制効果を検討した。また、薬剤耐性について、耐性機構、自然耐性変異、各種臨床分離株及び腸球菌における耐性変異について検討した。

副次的薬理試験では、*Helicobacter pylori*（*H. pylori*）に対する活性及び *H. pylori* 耐性変異、*Clostridium difficile*（*C. difficile*）及び *Mycobacterium tuberculosis*（*M. tuberculosis*）に対する活性とリファンピシン交差耐性について検討した。

安全性薬理試験では、マウス、ラット、イヌ及びネコに L-105 を単回経口投与又は十二指腸内投与して、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、腎／泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響を評価した。心血管系については、ヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞を用いた *in vitro* 試験でも評価した。

2.4.1.2　薬物動態試験

L-105 の薬物動態は、マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いて吸収、分布、代謝及び排泄を検討した。また、動物又はヒト由来の *in vitro* 試験系を用いて代謝及び薬物相互作用等を検討した。これらの検討には ^{14}C 標識体及び非標識体の L-105 を用い、^{14}C 標識体は放射能により、非標識体は微生物学的測定法［*Staphylococcus aureus*（*S. aureus*）209 P FDA］又はバリデートされた液体クロマトグラフィーータンデム質量分析（LC-MS/MS）法により、測定した。

吸収については、ラット及びイヌに L-105 を単回経口投与し、血中濃度を測定して薬物動態パラメーターを求めた。反復投与後における薬物動態は、TK 試験の結果から評価した。分布については、ラットに ^{14}C 標識した L-105（[^{14}C]L-105）を経口投与（24 mg/kg）して、組織中の放射能を測定した。代謝については、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの凍結肝細胞を用いて L-105 の *in vitro* 代謝プロファイルを比較した。排泄については、ラット及びイヌに[^{14}C]L-105 を経口投与し、経時的に尿、糞及び胆汁を採取して放射能を測定した。

2.4.1.3　毒性試験

L-105 の毒性試験としては、マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験、マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験、ラット及びマウスを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、モルモットを用いた皮膚感作性試験並びにラットを用いた免疫毒性試験を実施した。また、消化管からの吸収性が高い[redacted]の L-105 をイヌに単回投与及び反復投与し、全身曝露を上昇させたときの毒性を検討した。光毒性試験については、諸外国での臨床使用実績等から懸念はないと判断し、実施しなかった。

なお、動物試験の多くでは、臨床投与経路と同じ経口投与を選択した。また、生殖発生毒性試験は、ラットでは交配前～器官形成期に反復投与する試験と妊娠 6 日～授乳 20 日に反復投与する試験を実施し、ウサギでは器官形成期に反復投与する試験を実施した。TK については、マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、ウサギを用いた生殖発生毒性試験及びイヌを用いた[redacted] L-105 の毒性試験で実施した。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1　作用機序及び特性

Escherichia coli（*E. coli*）を用いて L-105 が細菌増殖のどの過程に作用するかを検討した結果、L-105 はリファンピシンと同様に選択的な RNA 合成阻害作用を示した。また、*E. coli* 0124 K221、*S. aureus* FDA 209 P 及び *Staphylococcus epidermidis* RP62A を用いて L-105 の作用様式を検討した結果、L-105 はリファンピシンと同様に殺菌的な作用様式を示した。抗菌活性以外の作用として、L-105 は細菌の培養上皮細胞への接着及び侵入を抑制した。また、L-105 は腸管毒素原性 *E. coli* などで病原性因子（耐熱性毒素、易熱性毒素、表面接着因子、マトリックスメタロプロテアーゼ-9）の発現を抑制した。さらに、L-105 は *E. coli*（感受性株及び耐性株）に対して形態学的変化、プラスミドの除去及びプラスミド伝達の抑制を示した。L-105 の細菌に対する影響は濃度範囲に特徴があり、L-105 は最小発育阻止濃度（MIC）以上で殺菌作用を、MIC 未満で細菌の形態学的変化などの殺菌以外の作用を有すると考えられた。

2.4.2.1.2　*In vitro* 試験

標準菌株（13 株）及び臨床分離株（717 株）に対する L-105 の抗菌活性をまとめた。L-105 は好気性及び嫌気性グラム陽性菌並びにグラム陰性菌に対し、幅広い抗菌スペクトルを示した。臨床分離株｛好気性グラム陽性菌［*S. aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Enterococcus faecalis*（*E. faecalis*）及び *Bacillus cereus* など］、嫌気性グラム陽性菌（*C. difficile*）及びグラム陰性菌［*E. coli*、*Shigella* spp.、*Salmonella enteritidis*（*S. enteritidis*）及び *Bacteroides* spp.など］｝に対する L-105 の抗菌活性を検討した結果、MIC_{50} は好気性グラム陽性菌で≦0.015～2 μg/mL、嫌気性グラム陽性菌で 0.004 μg/mL、グラム陰性菌で≦0.03～12.5 μg/mL であった。一方、*Candida* spp.、Herpes virus、*Trichomonas vaginalis* などの微生物に対して L-105 は不活性であった。

臨床分離株（177 株）に対する L-105 及びリファンピシンの MIC を比較検討した。L-105 は、*E. coli*、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp.及び *Aeromonas hydrophila* の分離株に対して良好な抗菌活性（MIC_{50} = 4～8 μg/mL）を示し、リファンピシンと同程度の活性であった。また、*C. difficile*（93 株）に対する L-105、メトロニダゾール及びバンコマイシンの MIC を比較検討した結果、L-105 の MIC_{50} はメトロニダゾール又はバンコマイシンと比べて 1/30 以下であった。さらに、*Bacteroides fragilis*（*B. fragilis*）、*Clostridium perfringens* 及び *Peptostreptococcus* spp.などに対する L-105 及びリファンピシンの MIC を比較検討した結果、L-105 はリファンピシンとほぼ同程度の良好な抗菌活性を示した。

2.4.2.1.3　*In vivo* 試験

ラット糞便中の好気性及び嫌気性細菌に及ぼす L-105 の影響を経口投与で検討した。L-105 は総嫌気性菌、好気性大腸菌群、好気性及び嫌気性球菌の菌数を減少させたが、用量依存性は認めら

れなかった。また、ラット糞便細菌叢を検討した結果、L-105 はほとんど全ての好気性菌及び *Salmonella* spp.に対して菌数を減少させたが、大腸菌群及び好気性 *Lactobacillus* spp.については無影響であった。L-105 の糞便細菌叢に対する影響は、一部の細菌に対して認められることが示唆された。

S. aureus Colliva をマウスに感染させ、全身性の感染に対する L-105、リファンピシン及びゲンタマイシン経口投与の 50%有効量（ED_{50}）を検討した。*S. aureus Colliva* の致死的な感染に対し、L-105 及びゲンタマイシンは最大用量まで防御作用を示さなかった。一方、リファンピシンは良好な *in vivo* 活性を示し、全身性の感染に対して明確な防御を示した。

正常ラットの腸間膜静脈血中アンモニア濃度に対する L-105 経口投与の作用を評価したところ、L-105 は腸間膜静脈血中のアンモニア濃度を有意に低下させた。また、ラット肝性脳症モデル（門脈体循環シャント形成、部分肝切除及び門脈狭窄）における昏睡発症及び血中アンモニア濃度に対する L-105 経口投与の作用を評価したところ、L-105 は本病態モデルでの昏睡の発症を用量依存的に抑制し、静脈血中アンモニア濃度を用量依存的に低下させた。L-105 はラット肝性脳症モデルにおいて血中アンモニア濃度の上昇を抑制し、その結果、脳症の発症を抑制することが示唆された。

2.4.2.1.4　　薬剤耐性

Bifidobacterium infantis BI07 を用い、L-105 耐性の分子機序を検討した。BI07 及び L-105 耐性 BI07 の RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードする *rpoB* コア領域（129 bp）の解析から、コドン 513 のミスセンス突然変異が認められ、抗菌薬との結合にコドン 513 でコードされるアミノ酸が役割を果たしている可能性が示唆された。また、L-105 耐性 BI07 の *rpoB* 遺伝子の配列決定を行い、コドン 513、516、522 及び 529 上の 5 種類のミスセンス突然変異が特定された。*Bifidobacterium* spp. における L-105 耐性機序は、RNA ポリメラーゼの点突然変異であり、リファンピシンに対する耐性機序と同様であることが確認された。また、耐性菌の性質として、膜透過性に影響を及ぼす脂肪酸組成の変化も示唆された。

L-105 に対する自然耐性変異の出現を検討した。嫌気性菌 18 株（*B. fragilis*、*Fusobacterium nucleatum* 及び *C. difficile* など）及び好気性菌 28 株（*S. aureus*、*E. faecalis* 及び *S. enteritidis* など）について試験した結果、L-105 耐性変異は比較的容易に自然発生した。また、臨床分離株（*E. coli* ent. 0124 K221、*Salmonella wien* LP 及び *Serratia* Galleri II など）における L-105 耐性の出現を検討した結果、いずれの分離株においても L-105 耐性株が出現した。これらの試験成績から、L-105 耐性変異は偶発的に自然発生することが示唆された。一方、L-105 投与患者の糞便試料から分離した腸球菌について L-105 耐性及びリファンピシン交差耐性を検討した結果、L-105 及びリファンピシンの MIC 値は、L-105 の投与前後で変化しなかった。したがって、L-105 短期間投与後の腸球菌において L-105 耐性及びリファンピシン交差耐性は生じないことが示唆された。

2.4.2.2　副次的薬理試験

胃炎症状を有する患者から分離した *H. pylori* 43 株を用い、L-105、リファンピシン及びアモキシシリンの抗菌活性を検討した。L-105 は良好な抗菌活性を示し、pH の低下による影響をほとんど受けなかった。一方、*H. pylori* 5 株について耐性の出現を検討したところ、5 株全てが耐性を獲得した。*H. pylori* に起因する胃炎を治療する場合には、L-105 を単独療法として使用すべきではないと考えられた。

C. difficile 関連下痢症は、予後不良であり、耐性及び再発リスクが増加する疾患である。*C. difficile* に対して L-105 がリファンピシン交差耐性を誘導する可能性について、臨床分離株 80 株を用いて検討した。分離株の *rpoB* の配列分析を行った結果、全ての耐性株において、*rpoB* の保存領域における遺伝子配列の変化に起因するアミノ酸置換が特異的に認められた。7 つの異なる *rpoB* アミノ酸置換が特定されたことより、リファマイシン耐性に関連するアミノ酸置換は特定のリファマイシン耐性クローンから広まったのではなく、独立して生じたことが示唆された。また、*C. difficile* における L-105 耐性は、*rpoB* の点突然変異に起因しており、リファンピシン耐性によって予測できることが示唆された。一方、別に 359 株の *C. difficile* 分離株を用いて検討した結果、リファンピシン耐性分離株と L-105 耐性分離株は遺伝子構成が異なると考えられた。両試験間の矛盾は患者集団の違いなどに原因があると考えられ、結論として *C. difficile* において L-105 とリファンピシンの交差耐性が出現する可能性やそのメカニズムは不明であった。

結核菌に感染している患者に L-105 を投与することを想定し、リファンピシン感受性に与える影響を検討した。*M. tuberculosis* の 5 つの臨床分離株（肺結核由来 3 株、腎結核由来 2 株）を用い、L-105 処理の前後で L-105 又はリファンピシンの MIC を検討したところ、L-105 及びリファンピシン共に L-105 処理の前後で同じ MIC であり、耐性は選択されなかった。また、モルモットを用いた実験的な結核感染症において、L-105 の経口投与は結核菌感染症におけるリファンピシンへの感受性に対して影響しなかった。これらの結果より、結核菌感染患者に L-105 を投与したときに L-105 耐性及びリファンピシン交差耐性が出現する可能性は極めて低いと考えられた。

2.4.2.3　安全性薬理試験

マウス、ラット、イヌ、ネコ及び HEK293 細胞を用い、中枢神経系、心血管系、呼吸器系に及ぼす影響を評価した。また、補足的安全性薬理試験として腎／泌尿器系、自律神経系、胃腸管系に及ぼす影響を評価した。

中枢神経系に及ぼす影響については、マウスを用いて自発運動、神経行動（Irwin 法）、運動協調性（ロータロッド運動時間）、メトラゾール又は電気刺激による痙攣誘発作用、ジアゼパムの抗痙攣作用に対する影響を検討した結果、L-105 投与の影響は認められなかった。ヘキソバルビタール誘発睡眠時間に及ぼす影響を検討した結果、1000 mg/kg を投与した雌で有意な睡眠時間の延長を認めたが、雄では影響が認められなかった。

心血管系に及ぼす影響については、ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）由来のカリウムチャネルを安定発現させた HEK293 細胞を用いた *in vitro* 試験及びイヌに 1000 mg/kg を単回十二指腸内投与して心血管系パラメーターを測定する *in vivo* 試験を実施した。イヌの試験

では、呼吸器系パラメーターについても測定した。*in vitro* 試験の結果、30、100 及び 300 μmol/L の濃度で hERG カリウム電流の有意な抑制が認められたが、50%阻害濃度（IC_{50}）は 100 μmol/L 以上であり、QT 間隔延長のリスクは低いと考えられた。また、イヌに 1000 mg/kg を単回投与しても、動脈圧、心拍数、左室圧、第 II 誘導心電図、大腿動脈血流量及び血管抵抗等の心血管系パラメーター並びに呼吸量や呼吸数等の呼吸器系パラメーターに L-105 投与の影響は認められなかった。

腎／泌尿器系に及ぼす影響については、ラットを用いて尿量及び尿中電解質排泄量に及ぼす影響を検討した。1000 mg/kg 投与群では、投与 5 時間後までの尿量、尿中 K^+及び Cl^-排泄量に有意な増加が認められたが、投与 24 時間後までの尿量及び各電解質排泄量、並びに投与 5 時間後までの尿中タンパク排泄量に有意な変化は認められなかった。

自律神経系に及ぼす影響については、ネコを用いて瞬膜収縮への影響並びに両側頸動脈閉塞及びノルアドレナリン投与後の心拍数と平均動脈圧への影響を検討したが、L-105 投与の影響は認められなかった。

胃腸管系に及ぼす影響については、マウスを用いて腸管内の炭末輸送能（移動距離）を、ラットを用いて胃液量、胃液中の電解質濃度及び胃粘膜（肉眼的観察）に及ぼす影響をそれぞれ検討したが、L-105 投与の影響は認められなかった。

2.4.2.4　　薬理総括

L-105 は、リファマイシン系の他の薬物と同様に、細菌の RNA の合成を阻害すると考えられた。また、L-105 の抗菌活性は、殺菌的な作用様式を有し、各種細菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示した。抗菌活性以外の作用としては、細菌の上皮細胞への接着抑制又は侵入抑制、細菌の形態学的変化、病原性因子の発現抑制及びプラスミドの除去などが示された。作用濃度範囲から、L-105 は MIC 以上では殺菌作用を示し、MIC 未満では細菌の形態学的変化などの殺菌以外の作用を示すと考えられた。

肝性脳症の病態において、血中アンモニア濃度の上昇は中心的な役割を担っている。正常ラットの腸間膜静脈血中アンモニア濃度及び実験的肝性脳症モデルにおける静脈血中アンモニア濃度に対し、L-105 は著明な低下作用を示すことが確認された。さらに、肝性脳症モデルで認められる昏睡の発症に対し、L-105 は用量依存的な抑制効果を示した。L-105 は血中アンモニア濃度を低下させ、肝性脳症の病態を改善することが示唆された。

L-105 に対する耐性の出現機序は、RNA ポリメラーゼの点突然変異に起因し、リファンピシン耐性の出現機序と同様であった。L-105 耐性変異は偶発的に自然発生すると考えられ、複数の臨床分離株において確認された。*C. difficile* において L-105 のリファンピシン交差耐性を検討した結果、L-105 とリファンピシンの交差耐性が出現する可能性やそのメカニズムは不明であった。また、*M. tuberculosis* においても L-105 のリファンピシン交差耐性を検討したが、L-105 は結核菌感染症におけるリファンピシン感受性に影響しなかった。L-105 は経口投与後の消化管吸収がほとんどないため、少なくとも全身性の結核菌感染症において L-105 はリファンピシンの感受性を変化させないと考えられた。

L-105 の安全性薬理試験において、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、腎／泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に対する影響を検討した結果、L-105 投与による明らかな影響は認められなかった。ヘキソバルビタール誘発睡眠時間の延長や尿量及び尿中電解質排泄量の増加が一部で認められたが、いずれも軽微な影響であり、片性のみ又は 24 時間値には有意な変化が認められない等、一貫性に乏しいことから、偶発的な変化であると考えられた。また、*in vitro* 試験で急速活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）の抑制が認められたが、その IC_{50} 値は 100 μmol/L 以上と高く、臨床における QT 間隔延長のリスクは低いと考えられた。これらの試験では L-105 の血中濃度を測定していないが、反復投与毒性試験の TK 測定結果から、ヒトの血中濃度に近い曝露条件下で安全性を確認できたと考えられる。また、[redacted]の L-105 を投与して血漿中濃度を上昇させたイヌの一般状態及び心電図検査、尿検査等において L-105 投与の影響が認められなかったこと、長年の海外使用実績で特段の懸念が報告されていないことも考慮すると、L-105 は重篤な薬力学的作用を示さないと考えられた。

2.4.3　薬物動態試験

L-105 の単回静脈内投与又は経口投与後及び反復経口投与後の薬物動態について、薬理試験及び毒性試験で使用した動物種（マウス、ラット、ウサギ及びイヌ）を用いて検討した。反復投与後における薬物動態は、TK 試験の結果から評価した。また、代謝及び薬物相互作用等に関する検討は、目的に応じて動物又はヒト由来の *in vitro* 試験系を用いて実施した。これらの検討には ^{14}C 標識体及び非標識体の L-105 を用い、^{14}C 標識体は放射能により、非標識体は微生物学的測定法（*S. aureus* 209 P FDA）又はバリデートされた LC-MS/MS 法により測定した。

2.4.3.1　吸収

2.4.3.1.1　単回投与後における血漿中濃度

ラットに L-105（100 mg/kg）を単回経口投与して血清中 L-105 濃度を微生物学的測定法により測定したところ、絶食下において L-105 は投与後 4 時間にわずかに検出された（0.1 μg/mL）以外は、いずれも検出限界未満であった。非絶食下では投与後 4 時間の血清中濃度は若干上昇する（0.2 μg/mL）ものの、他の測定時点ではほとんど検出されなかったことから、食餌条件によらず L-105 の消化管吸収性は低いと考えられた。ラット及びイヌに[^{14}C]L-105 を単回経口投与（24 mg/kg）又は静脈内投与（2.4 mg/kg）した後の血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）から算出した放射能の吸収率は、ラットで 2%、イヌで 0.5%であり、経口投与した L-105 はほとんど吸収されないと考えられた。L-105 の単回投与後における薬物動態パラメーターを表 2.4.3-1 に示した。

表 2.4.3-1. L-105 単回投与後の薬物動態パラメーター

動物種	性	投与量（mg/kg）	投与経路	分析法	C_{max}（μg/mL）	AUC（μg·hr/mL）	T_{max}（hr）	F（%）
ラット	雄	100	経口	微生物学的測定法	0.1[a]／0.2[b]	NC	4	NA
ラット	雄	2.4	静脈内	^{14}C（LSC）	1.12[c]	0.9[d]	NA	
		24	経口		0.0792	0.2[d]	0.25	2
	雌	2.4	静脈内	^{14}C（LSC）	0.958[c]	0.8[d]	NA	
		24	経口		0.0891	0.2[d]	0.5	2
イヌ	雄	2.4	静脈内	^{14}C（LSC）	1.29[c]	2.4[e]	NA	
		24	経口		0.0389	0.1[e]	2	0.5
	雌	2.4	静脈内	^{14}C（LSC）	1.44[c]	2.6[e]	NA	
		24	経口		0.0466	0.1[e]	1	0.5

[^{14}C]L-105 投与試験においては放射能濃度を L-105 当量（μg eq./mL）として示している。

NC：算出されず、NA：適用外、LSC：液体シンチレーション計測

F：経口又は静脈内投与後の AUC から算出した経口投与時の放射能吸収率

[a]絶食下、[b]非絶食下、[c]投与後 5 分の測定値、[d]投与後 0～4 時間、[e]検出限界未満の値を 0 とみなして算出

L-105 には本剤の結晶形である*1形を含めて 5 つの結晶形（*1、*2、*3、*4及び*5）が存在することから、結晶形が消化管吸収性に及ぼす影響についてイヌを用いて検討した。各結晶形の L-105（100 mg/kg）をイヌに単回経口投与して血漿中濃度を LC-MS/MS 法により測定したところ、*3 形を経口投与したときの血漿中 L-105 濃度は他の結晶形に比べて最も高く、次いで*4形、以下*5形、*1 形、*2形の順であった。*2形及び*1形を経口投与したときの血漿中 L-105 濃度は、ともに低かった。*3 形を経口投与したときの $AUC_{0\text{-}24}$ は他の結晶形の 6～480 倍と最も吸収性が高く、次いで*4形が吸収されやすかった。一方、*1形、*2形及び*5形は、難吸収性の結晶形であると考えられた。また、*3形を投与した後の血漿中 L-105 濃度について投与量依存性を検討したところ、L-105 の AUC は用量比を上回って上昇した。*3 形は*1形の L-105 に比べて高い消化管吸収性を示し、その $AUC_{0\text{-}\infty}$ は同一投与量の*1形の約 80 倍であった。

2.4.3.1.2　反復投与後における血漿中濃度（トキシコキネティクス）

L-105 をマウス、ラット、ウサギ及びイヌに反復経口投与したときの血漿中濃度は、TK 試験の結果から評価した。血漿中の L-105 濃度は、LC-MS/MS 法により測定した。

L-105 を反復経口投与した後の全身曝露は、いずれの動物種においても低かった（表 2.4.3-2）。全般的に、血漿中濃度には明確な投与量依存性は認められず、高投与量では L-105 の最高血漿中濃度（C_{max}）及び AUC が用量比以下で上昇した。また投与回数に依存した明らかな蓄積は認められなかった。[redacted]の L-105（1000 mg/kg/day）をイヌに 4 週間反復投与したときの AUC は、*1

形に比べて雄で約 155 倍、雌で 63 倍高かった。妊娠ウサギ及び非妊娠ウサギにおける L-105 反復経口投与したときの血漿中濃度を比較したところ、両者の全身曝露に差は見られなかった。

表 2.4.3-2. L-105 反復経口投与後の薬物動態パラメーター

動物種	性	投与量 (mg/kg/day)	測定時期	C_{max} (ng/mL)	AUC[a] (ng·hr/mL)	蓄積比
マウス	雄	250 1000 2000	投与 27 日	10.2 9.78 11.8	95.9 69.6 88.4	NA NA NA
	雌	250 1000 2000		15.0 13.1 25.8	117 176 215	NA NA NA
ラット	雄	50 150 300	投与 1 日／ 投与 26 週	14.86／6.11 23.10／9.54 30.31／5.75	59.2／NC 100.1／NC 137.9／NC	0.41[b] 0.41[b] 0.19[b]
	雌	50 150 300		13.56／10.05 18.56／5.59 19.76／6.97	42.1／NC 84.6／NC 115.5／NC	0.74[b] 0.30[b] 0.35[b]
イヌ	雄	100 300 1000	投与 1 日／ 投与 39 週	2.84／25.41 19.34／33.69 14.51／19.39	6.8／80.0 93.8／102.5 70.8／102.7	6.6[c] 0.7[c] 1.4[c]
	雌	100 300 1000		15.74／8.53 20.86／9.94 11.16／24.36	76.7／42.7 110.4／48.4 61.3／108.7	0.5[c] 0.5[c] 1.8[c]
妊娠ウサギ	雌	62.5 250 1000	妊娠 6 日／ 妊娠 19 日	NC／1.385 1.046／1.705 2.200／4.006	NC／NC 6.63／8.25 10.95／16.97	NC 1.4[c] 1.8[c]

NC：算出されず、NA：適用外

[a] マウスにおいては投与後 0～24 時間、その他の動物種では投与後 0～8 時間の AUC を示している

[b] 初回投与後に対する反復投与後の C_{max} の比

[c] 初回投与後に対する反復投与後の AUC の比（幾何平均）

2.4.3.2　分布

[^{14}C]L-105（24 mg/kg）をラットに経口投与して組織分布を検討した結果、放射能の大部分は標的器官である消化管内に存在していた。わずかに吸収された放射能は全身に広く分布し、うち、肝臓、大動脈及び甲状腺で 1～3 μg eq./g 程度が認められた。脳及び眼球にはほとんど移行せず、骨及び大静脈中には検出されなかった。また、投与後 72 時間以降には、消化管以外の組織で放射能は検出されなかった。同様の結果は、[^{14}C]L-105 経口投与後の全身オートラジオグラフィーからも確認された。一方、有色ラットを用いて[^{14}C]L-105 経口投与後の眼球、腎臓、肝臓、皮膚（有色部及び非有色部）への放射能分布を評価したところ、特定の組織への放射能の残留は見られなかった。また、妊娠ラット及び妊娠ウサギに[^{14}C]L-105 又は L-105 を経口投与したところ、胎児組織中に放射能又は L-105 はほとんど検出されなかった。

L-105 のヒト血漿タンパク結合率は 62%～68%であり、健康被験者と肝機能障害患者間で大きな差は見られなかった。

2.4.3.3　代謝

ラット、ウサギ、イヌ及びヒト凍結肝細胞を用いて L-105 の *in vitro* 代謝プロファイルを比較したところ、肝細胞で生成する代謝物には種差が見られた。ヒト肝細胞では主代謝物として L-105 の 25-*O*-脱アセチル体が検出された。ヒト肝細胞で見られたその他の代謝物については、少なくとも 1 種以上の動物種で存在することが確認された。ヒト肝ミクロソーム中で生成する代謝物として、L-105 の 25-*O*-脱アセチル体、27-*O*-脱メチル体及び複数の酸化体が推定された。

チトクローム P450（CYP）発現系及びヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験の結果から、L-105 は肝臓で主に CYP3A4 により代謝されると考えられた。9 種類のヒト CYP 分子種に対する L-105 の阻害作用を検討したところ、CYP3A4 に対する IC_{50} 値は 25 μmol/L（約 20 μg/mL）であり、その他の CYP 分子種に対する IC_{50} 値は>50 μmol/L であった。L-105 は、CYP に対する時間依存的な阻害を示さなかった。ヒト初代培養肝細胞を用いた酵素誘導試験では、L-105 は検討した濃度範囲（0.005～5 μmol/L）で CYP1A2 を誘導しなかったが、CYP2B6 及び CYP3A4 については弱い誘導作用を示した。L-105 のヒトで認められた最も高い血漿中濃度が 100 ng/mL（0.127 μmol/L 相当）であることを考慮すると、L-105 の代謝酵素の阻害又は誘導作用に基づいた臨床的に意義のある薬物相互作用が生じる懸念は少ないと推察された。

2.4.3.4　排泄

[^{14}C]L-105 をラット及びイヌに単回経口投与した後の放射能は、その大部分が糞中に排泄され、尿中に排泄された放射能は投与量の 1%未満であった。胆管カニュレーションを施したラットに[^{14}C]L-105 を単回経口投与した後の尿及び胆汁中放射能排泄率は 5%未満であり、L-105 の低い消化管吸収性を裏付けるものであった。

授乳期のラットに[^{14}C]L-105 を単回経口投与したところ、乳汁中放射能は血漿に比べてやや高く推移したことから、L-105 及び代謝物は乳汁中に排泄されると考えられた。

2.4.3.5　トランスポーターとの相互作用

Caco-2 細胞を用いた試験から、L-105 は P-糖タンパク質（P-gp）の基質であり、L-105 の排出には他の排出トランスポーターも関与していることが示唆された。L-105 は P-gp 基質であるジゴキシンの Caco-2 細胞における経細胞輸送を阻害し、その IC_{50} 値は約 40 μmol/L であった。ヒトで認められた最も高い血漿中濃度及び人工腸液への溶解度から推定した L-105 の最高消化管中濃度（2～7 mg/L）を考慮すると、L-105 は全身及び消化管での P-gp 阻害により併用薬の薬物動態を変化させないと推察された。

排出トランスポーター発現膜小胞を用いた検討結果から、L-105 は P-gp、MRP2、MRP4、BSEP 及び BCRP に対して阻害作用を示した（IC_{50} 値：2.0～108 μmol/L）。ヒトで認められた最も高い血漿中濃度を考慮すると、L-105 の各排出トランスポーターに対する阻害作用により臨床上問題となる薬物相互作用が生じる懸念は少ないと推察された。

L-105 は取込みトランスポーターである OATP1A2、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるものの、OATP2B1 の基質ではないと考えられた。また、L-105 は OATP1A2、OATP1B1 及び OATP1B3 に対して阻害作用（3 μmol/L 存在下で 40～71%阻害）を示したが、OATP2B1 に対しては阻害作用を示さなかった。

2.4.3.6　非臨床薬物動態総括

L-105 の薬物動態の評価は、主に薬理試験及び毒性試験で使用した動物種又はヒト由来の *in vitro* 試験系を用いて実施した。

[^{14}C]L-105 をラット又はイヌに単回経口投与したときにおける放射能の吸収率はそれぞれ 2%及び 0.5%と低かった。また、胆管カニュレーションを施したラットに経口投与した後の放射能の胆汁及び尿中排泄率の合計は 5%未満であり、L-105 が難吸収性の薬物であることを裏付けるものであった。一方で、イヌを用いた検討から、L-105 の消化管吸収性は結晶形の影響を顕著に受けることが示された。L-105 の結晶形はその消化管吸収性から二つのグループに分類でき、一つは十分に吸収される結晶形（*3形及び*4 形）、もう一つはほとんど吸収されない結晶形（*1形、*2 形及び*5 形）であった。また、TK 試験の結果から、[redacted]の L-105 も高い消化管吸収性を示すことが示唆された。本剤の結晶形は*1形であることから、その低い消化管吸収性には結晶形が影響していると推察された。

TK 試験の結果から、反復経口投与後における L-105 の全身曝露はいずれの動物種（マウス、ラット、イヌ及びウサギ）においても低いことが明らかとなった。全般的な傾向として、高投与量では投与量増加に伴う明確な投与量依存性は示さず、L-105 の C_{max} 及び AUC は用量比以下で上昇した。反復投与後における血漿中 L-105 濃度は投与回数に依存した明らかな蓄積は示さなかった。[redacted]の L-105（1000 mg/kg/day）をイヌに 4 週間反復投与した後の AUC は*1形に比べて顕著に増加したが、全身曝露の上昇にもかかわらず特記すべき毒性は検出されなかった。このことから、予期せぬ L-105 の全身曝露の上昇が見られた場合においても、安全性上の懸念は小さいと推察された。

[^{14}C]L-105 をラットに経口投与した後の放射能はその大部分が標的器官である消化管内に存在していた。わずかに吸収された放射能は全身に広く分布していたが、脳にはほとんど移行しなかった。有色ラットを用いた検討においても特定の組織への残留は見られなかった。妊娠ラット及びウサギを用いた検討結果から、L-105 及び代謝物の胎盤通過性は低いと考えられた。

ラット、ウサギ、イヌ及びヒト肝細胞を用いて L-105 の *in vitro* における代謝プロファイルを比較したところ、ヒト肝細胞で見られた代謝物はいずれも少なくとも 1 種以上の動物種において存在しており、ヒト特異的な代謝物は存在しないと推察された。ヒト肝細胞における主代謝物は L-105 の 25-*O*-脱アセチル体であった。ヒト肝ミクロソーム中で生成する代謝物として、25-*O*-脱アセチル体、27-*O*-脱メチル体及び複数の酸化体が推定された。

CYP 阻害試験の結果から、臨床において L-105 の CYP 阻害に基づく薬物相互作用が生じる懸念は小さいと考えられた。ヒト肝細胞を用いた酵素誘導試験においては、検討した濃度範囲（0.005～5 μmol/L）で L-105 は CYP1A2 を誘導しなかったが、CYP2B6 及び CYP3A4 については弱い誘

導作用を示した。ヒトで認められた最も高い血漿中 L-105 濃度（0.127 μmol/L）を考慮すると、肝臓における代謝酵素誘導に起因した臨床上意義のある薬物相互作用が生じる懸念は少ないと推察された。

[^{14}C]L-105 をイヌ及びラットに経口投与した後の放射能は主に糞中に排泄され、尿中に排泄された放射能は投与量の 1%未満であった。授乳期ラットにおいて、L-105 又は代謝物は乳汁中に排泄されることが示された。

In vitro における Caco-2 細胞膜透過性試験の結果から、L-105 は P-gp の基質であり、更には他の排出トランスポーターの基質であることから、L-105 の低い消化管吸収性には P-gp を含めた排出トランスポーターが関与している可能性が示唆された。また、L-105 は P-gp の弱い阻害剤であった（ジゴキシンの経細胞輸送に対する IC_{50} 値：約 40 μmol/L）。排出トランスポーター発現膜小胞を用いた検討結果から、L-105 は P-gp、MRP2、MRP4、BSEP 及び BCRP に対して阻害作用を示した（2.0～108 μmol/L）。*1形の L-105 は難吸収性であり、ヒトで認められた最も高い血漿中濃度及び推定消化管中濃度を考慮すると、臨床において L-105 の各排出トランスポーターに対する阻害作用により併用薬の薬物動態を変化させる可能性は低いと推察された。

L-105 は取込みトランスポーターである OATP1A2、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるものの、OATP2B1 の基質ではなかった。また、L-105 は OATP1A2、OATP1B1 及び OATP1B3 に対して阻害作用を示したが、OATP2B1 に対しては阻害作用を示さなかった。

2.4.4　毒性試験

L-105 の毒性試験としては、単回投与毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性、皮膚感作性及び免疫毒性に関する一連の試験を実施した。また、消化管吸収性が高い[redacted]の L-105 をイヌに単回投与及び反復投与して、全身曝露を上昇させたときの毒性を評価した。光毒性試験については、諸外国での臨床使用実績等から懸念がないと判断し、実施しなかった。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

雌雄のマウスとラットに L-105 の懸濁液を 300～2000 mg/kg の用量範囲で単回経口投与した結果、立毛や着色便が認められた以外に明らかな影響は認められなかった。概略の致死量は、マウス及びラット共に 2000 mg/kg 超であった。

50%ポリエチレングリコール（PEG）400 水溶液に L-105 を溶解し、40 mg/kg の用量で雌雄マウスと雌雄ラットに単回静脈内投与した結果、立毛、円背姿勢、呼吸窮迫、眼瞼下垂、蒼白、嗜眠、爪先歩行、振戦、低体温、衰弱及び死亡などが認められた。概略の致死量はマウス及びラット共に 40 mg/kg であったが、対照群でも立毛や呼吸窮迫等の同様の一般状態変化や死亡が認められたことから、溶媒である 50% PEG 400 の影響による可能性が高いと思われた。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

雌雄マウスに L-105 の懸濁液を 0、250、1000 及び 2000 mg/kg の用量で 4 週間反復経口投与した結果、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査結果や器官重量に L-105 投与による明らかな影響は認められず、剖検及び病理組織学的検査でも特記所見は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 2000 mg/kg であった。

雌雄ラットに L-105 の懸濁液を 0、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で 4 週間、0、25、50 及び 100 mg/kg の用量で 13 週間、0、25、50 及び 100 mg/kg の用量で 26 週間反復経口投与し、反復投与毒性を検討した。L-105 投与群では体重増加抑制や白血球数の減少などが認められ、一部の非 GLP 試験では血中コレステロールの増加や肝肥大などが認められた。追加実施した GLP 試験で雌雄ラットに L-105 の懸濁液を 0、50、150 及び 300 mg/kg の用量で 26 週間反復経口投与した結果、体重増加抑制以外に L-105 投与による明らかな影響は認められず、白血球数の減少や血液生化学的変化は L-105 投与との関連性又は毒性学的意義が低いと考えられた。NOAEL は雌雄とも 150 mg/kg と判断され、認められた変化にはほぼ回復性が認められた。

雌雄ビーグル犬に L-105（ゼラチンカプセルに充填）を 2000 及び 3000 mg/kg の用量で 7 日間、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で 4 週間、0、25、50 及び 100 mg/kg の用量で 13 週間、0、25、50 及び 100 mg/kg の用量で 26 週間反復経口投与し、反復投与毒性を検討した。一部の非 GLP 試験で血中コレステロールの増加や腸管粘膜びらんが認められたが、他に L -105 投与による明らかな影響は認められなかった。追加実施した GLP 試験では、0、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で 39 週間反復経口投与しても、胸腺萎縮／退縮が認められた以外に明らかな影響は認められなかっ

た。なお、39 週間反復経口投与試験では、胸腺萎縮／退縮により NOAEL を求められなかったが、胸腺の萎縮／退縮には回復傾向が認められた。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

in vitro 試験として細菌及び酵母（*Salmonella typhimurium*、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Schizosaccharomyces pombe*）を用いた遺伝子突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いたヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）遺伝子突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験を実施した結果、代謝活性化系の存在下及び非存在下のいずれにおいても L-105 の遺伝毒性は認められなかった。また、*in vivo* 試験としてラット骨髄細胞を用いた小核試験、ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験、ラットの胃粘膜細胞を用いたコメットアッセイを実施した結果でも、L-105 の遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.4　がん原性試験

ラットを用いたがん原性試験では、雌雄ラットに L-105 の懸濁液を 0、20、50 及び 150 mg/kg の用量で 2 年間反復経口投与した。ただし、高用量投与群では、28 週目以降は 150 mg/kg から 200 mg/kg に、39 週目以降は 250 mg/kg に、それぞれ投与量を増加させて反復経口投与した。生存率、一般状態、体重、摂餌量、触知腫瘤、肉眼所見及び非腫瘍性病変に L-105 投与と関連する明らかな影響は認められず、いずれの器官・組織にも腫瘍発生率の増加は認められなかった。雄の心臓で悪性シュワン細胞腫の増加傾向が認められたが、対照群との比較で有意差は認められなかった。L-105 は、ラットで腫瘍の発生率を増加させないと結論された。

マウスを用いたがん原性試験では、Tg.rasH2 マウスに L-105 の懸濁液を 0、150、500、1500 mg/kg（雄）又は 0、250、750、2000 mg/kg（雌）の用量で、それぞれ 26 週間反復経口投与した。雌の 750 及び 2000 mg/kg 群で一過性の体重増加又は散発的な体重減少が認められたが、雌雄とも摂餌量に明らかな影響は認められなかった。鼻腔に滲出性炎症が認められた以外に L-105 投与による病変は認められず、いずれの器官・組織にも腫瘍性病変の増加は認められなかった。以上のことから、L-105 は、Tg.rasH2 マウスで腫瘍の発生率を増加させないと結論された。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験では、雌雄ラットに L-105 の懸濁液を反復経口投与して、受胎能、胚・胎児発生毒性、出生前及び出生後の発生毒性を評価した。また、妊娠ウサギに L-105 の懸濁液を反復経口投与して、胚・胎児発生毒性を評価した。

GLP 施行前に実施した古い非 GLP 試験では、雌雄ラットに 300 mg/kg までを交配前 15 日～授乳 9 日まで反復経口投与した結果、親動物（F_0）で体重増抑制と摂餌量の減少が認められたが、性周期、交尾行動、受胎能、妊娠期間、同腹児数、出生児（F_1）の体重等に L-105 投与の影響は認められなかった。また、妊娠ウサギの器官形成期に 1000 mg/kg までを反復経口投与した結果、

投与初期に体重減少が認められ、1000 mg/kg 投与群では体重増抑制と摂餌量の減少が認められた。着床数、吸収胚数、生存胎児数及び胎児体重に L-105 投与の影響は認められなかったが、100 及び 300 mg/kg 投与群の胎児各 1 例で短顎及び無顎等が認められた。

GLP 試験として、妊娠ラットの交配前から器官形成期に反復投与する試験、妊娠ウサギの器官形成期に反復投与する試験、及びラットの出生前及び出生後の発生毒性試験を追加実施した。

ラットの交配前から器官形成期に L-105 を 0、50、150 及び 300 mg/kg の用量で反復経口投与した結果、300 mg/kg 投与群の母動物で体重増加抑制が認められたが、性周期、交配率、受胎率、黄体数、着床数、吸収胚数、同腹児数、同腹児体重、胎児体重及び性比に L-105 投与の影響は認められなかった。150 及び 300 mg/kg 群の胎児で出血（皮下及び肝臓）と骨格異常（頭蓋骨及び骨盤骨の不完全骨化）が認められたが、人為的過誤や軽微な発達遅延によるものであり、L-105 の催奇形性を示すものではないと考えられた。その他、外表、内臓及び骨格検査において、L-105 投与の影響は認められなかった。親動物への影響に関する NOAEL は 150 mg/kg、生殖能・受胎能に関する無毒性量（NOAEL）は 300 mg/kg、胎児（F_1）への影響に関する NOAEL は 300 mg/kg であった。

ウサギの器官形成期に L-105 を 0、62.5、250 及び 1000 mg/kg の用量で反復経口投与した結果、各用量投与群の母動物で体重、体重増加量及び摂餌量の減少が認められ、胎児で第 13 肋骨、20 胸腰椎体、過剰胸骨核及び骨盤帯接合部の離隔が認められたが、用量反応性はなかった。胎児の外表及び内臓の検査では、L-105 投与の影響が認められなかった。全ての用量投与群で母動物への影響と胎児の骨格異常が認められたため、NOAEL は求められなかった。

ラットの出生前及び出生後の発生毒性試験では、妊娠 6 日～授乳 20 日に L-105 を 0、50、150 及び 300 mg/kg の用量で反復経口投与した結果、150 及び 300 mg/kg 群で母動物の体重増加抑制と摂餌量の減少が認められた。妊娠期間、分娩の状況、同腹児数並びに出生児の体重、成長、成熟度及び生殖能については、L-105 投与の影響は認められなかった。NOAEL は、母動物が 50 mg/kg、胎児（F_1）が 300 mg/kg であった。

2.4.4.6　局所刺激性試験

実施しなかった。

2.4.4.7　その他の毒性試験

（1）　免疫毒性試験

雌雄ラットに L-105 を 0、50、150 及び 500 mg/kg の用量で 4 週間反復経口投与した結果、白血球数、白血球分画、骨髄検査、免疫系組織の器官重量及び病理組織学的検査並びに体液性免疫応答を検査するプラーク形成細胞試験のいずれにおいても明らかな影響は認められなかった。リンパ球サブセット分析の結果、150 及び 500 mg/kg 投与群の雄で T リンパ球数の増加が認められたが、片性のみの変化であり、免疫系器官の重量や組織、体液性免疫応答に影響が見られないことから、毒性学的な意義はないと考えられた。

（2） 代謝物の毒性

ヒトの主要代謝物 25-*O*-脱アセチル体については、L-105 の消化管吸収率が極めて低いためにヒト血漿中曝露量は明らかでない。しかし、[^{14}C]L-105 経口投与後のヒト尿中及び糞中排泄から推測される 25-*O*-脱アセチル体の構成比は投与薬物に関連する全ての物質の曝露量の 10%よりも低いと考えられることから、非臨床試験で特徴づける必要はないと考えられた。

（3） 不純物の毒性

L-105 の不純物である類縁物質 D+H の毒性については、反復投与毒性、遺伝毒性及びがん原性で不純物の影響を含めた評価が行われており、これら毒性試験では特段懸念される毒性は認められていない。したがって、類縁物質 D+H によって著しい毒性が発現することはないと考えられた。

（4） 皮膚感作性試験

L-105 の懸濁液をモルモットに皮内投与及び経皮投与（貼付）して感作し、最終感作の 2 週間後に経皮投与して惹起した結果、惹起部位に発赤や浮腫は認められず、L-105 に皮膚感作性はないと判断された。

（5） [redacted]L-105 を用いたイヌの毒性試験

L-105 は、消化管からほとんど吸収されないことから、高用量を動物に経口投与しても血中濃度を肝性脳症患者より高めることができない。そこで、消化管吸収性が高い[redacted]の L-105 をゼラチンカプセルに充填し、イヌに単回経口投与及び 4 又は 26 週間反復経口投与して、全身曝露を高めた状態での毒性を評価した。

[redacted]の L-105 を 0、100、300 及び 1000 mg/kg の用量でイヌに単回経口投与した結果、C_{max} は 936～6769 ng/mL と著しく上昇した。また、0、300 及び 1000 mg/kg の用量で 4 週間及び 26 週間反復経口投与した場合でも、1000 mg/kg 群における C_{max} は 1370～4050 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24}$ は 7155～40700 ng·hr/mL と、通常の結晶形（*1形）を投与したときと比較して 40 倍以上に曝露が上昇した。このように全身曝露を高めた状態で一般状態観察、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査等を実施した結果、単回投与毒性試験では異常が全く認められなかった。4 週間反復投与毒性試験では、雌の 300 及び 1000 mg/kg 投与群で好酸球の増加と ALP、ALT などの肝機能に関連する血液生化学的パラメーターの軽度上昇が認められたが、器官重量や病理学的検査を含め、他に L-105 投与の影響は全く認められなかった。また、26 週間反復投与毒性試験では、雄で胸腺の萎縮／退縮が認められた以外に L-105 投与の影響は認められなかった。胸腺への影響も、他に関連する影響が認められないことから、毒性学的な意義はないと考えられた。

2.4.4.8　毒性総括

単回投与毒性試験では、雌雄のマウスとラットに 2000 mg/kg までを単回経口投与した結果、立毛や着色便が認められた以外に L-105 投与による明らかな影響は認められなかった。

反復投与毒性試験では、雌雄マウス、ラット及びイヌに反復経口投与した結果、ラットでは体重増加抑制と白血球数の減少が、イヌでは胸腺の萎縮／退縮が主に認められたのみであり、マウスでは特記所見が全く認められなかった。ラットとイヌの古い非 GLP 試験では肝肥大や血液生化学的検査値の変化が散見されたが、病理組織学的に異常が認められていないことや、追加実施した GLP 試験では高い用量を反復投与しても同様の所見が認められないことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。ラットで認められた白血球数の減少やイヌで認められた胸腺の萎縮／退縮についても、免疫毒性試験で L-105 投与の影響が認められないことや、他に免疫毒性を示唆する変化が認められないことから、L-105 の免疫毒性を示すものではないと考えられた。したがって、臨床用量（1200 mg/50 kg）の約 13 倍及び 42 倍に相当する 300 mg/kg 及び 1000 mg/kg を長期反復投与しても、ラットとイヌで特段懸念となる毒性は認められないと考えられた。L-105 は、消化管からほとんど吸収されない特徴を有するため、各用量投与群における動物の血漿中濃度は、ラットが約 6～30 ng/mL、イヌが約 3～34 ng/mL と、1100 mg を投与した健常人の血漿中濃度（C_{max}：4.660 ng/mL、2.7.1.2.1）の 0.6～7.3 倍であった。[redacted]の L-105 を単回及び反復経口投与したイヌでは、1000 mg/kg 群で C_{max} が 1370～4050 ng/mL（健常人血漿中濃度の 294～869 倍）に上昇したものの、明らかな毒性は認められなかった。したがって、肝性脳症患者に反復投与して血漿中濃度が 19.5～35.5 ng/mL［2.7.2.2.1.1（2）］に上昇した場合でも、特段の懸念は生じないと考えられた。

遺伝毒性については、細菌、酵母、CHO 細胞及びヒトリンパ球を用いた *in vitro* 試験、ラット骨髄細胞を用いた小核試験、ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験及びラットの胃粘膜細胞を用いたコメットアッセイのいずれにおいても、L-105 の遺伝毒性は認められなかった。また、SD 系ラット及び Tg.rasH2 マウスを用いたがん原性試験においても、有意な腫瘍の発生率増加は認められなかった。したがって、L-105 の遺伝毒性及びがん原性はないと判断された。なお、ラットのがん原性試験では、雄ラットの高用量投与群で心臓に悪性シュワン細胞腫の増加傾向が認められたが、対照群との比較で有意差は認められず、心内膜に増殖性病変が認められないこと、雌の心臓を含めた他の臓器に増殖性病変の頻度増加が認められないこと、自然発生的にも散見されることなどから、L-105 投与との関連はないと考えられた。

生殖発生毒性については、L-105 を 25～300 mg/kg の用量範囲で雌雄ラット及び妊娠ウサギに反復投与した結果、受胎能、胎児体重、並びにラット出生児（F_1）の体重、成熟度及び生殖能等に L-105 投与の影響は認められなかったが、高用量を投与した母動物で体重増加量や摂餌量の減少が認められた。ラットとウサギの器官形成期に L-105 を反復投与した結果、ラットの胎児で頭蓋骨及び骨盤骨の不完全骨化が認められ、ウサギの胎児で第 13 肋骨、20 胸腰椎体、過剰胸骨核及び骨盤帯接合部離隔の増加が認められた。これら骨格異常の原因については、L-105 投与による腸内細菌叢の変化が動物への栄養供給に影響を及ぼし、二次的に胎児の骨化に影響が及んだものと考えられた。すなわち、げっ歯類やウサギでは、栄養素の一部を腸内細菌からの供給に依存しているため、抗生物質の経口投与によって腸内細菌叢が変化した場合には、全身性に影響が及びやす

いとされている[2)3)]。さらにウサギでは、食糞行動によっても栄養を補給している[4)]ため、糞中栄養素の変化や糞中に残存するL-105の再摂取により影響が強く現れた可能性も考えられた。一方、出生直前の胎児では骨化が急速に進行しており、妊娠20日目のラット胎児では骨化の程度にばらつきが見られるとされている[5)]。また、ウサギでは正常児でも肋骨・椎骨数に変異が見られ、いずれの成熟動物においても機能的な異常は認められないとされている[6)7)8)9)]。したがって、母動物の栄養状態によって胎児の骨化が多少遅延したとしても児の成長と共に解消する[7)8)9)10)]限りは軽度な影響と考えることができ、実際にラットの出生前及び出生後の発達に関する試験では出生児の成長や発育に影響は認められなかった。よって、ラットとウサギの胎児で認められた骨格異常は、他に外表異常や内臓異常が認められないこと、消化管からの吸収性や胎盤通過性が低く、胎児がL-105にほとんど曝露されないことをも考え合わせると、L-105の催奇形性作用を示すものではないと考えられた。

その他、皮膚感作性試験で陽性反応は認められず、海外での臨床使用実績等から光毒性の懸念もないと考えられた。類縁物質D+Hの毒性については、各種毒性試験で不純物の影響を含めた評価が行われており、これら毒性試験結果から特段懸念となる毒性は認められないと考えられた。

以上のように、L-105には遺伝毒性やがん原性が認められず、ラットとウサギで体重増加抑制や胎児の骨格異常が認められた以外、一連の毒性試験で特段懸念される毒性は認められなかった。[redacted]のL-105を経口投与して全身曝露を著しく上昇させたイヌの反復投与試験でも特記所見は認められず、肝性脳症患者等で血中濃度が高まった場合でも特段の懸念は生じないと考えられた。

2.4.5　総括及び結論

L-105 経口投与は、血中アンモニア濃度を低下させることで肝性脳症の病態を改善することが薬理学的に示された。L-105 は *in vitro* で各種細菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示し、殺菌作用を有していた。また、L-105 の殺菌以外の作用も MIC 未満で示された。一方、L-105 に対する耐性機序は RNA ポリメラーゼの点突然変異に起因すると考えられるが、リファンピシンとの交差耐性が出現する可能性は確認できなかった。また、L-105 は消化管からほとんど吸収されないことから、全身性の結核菌感染症においてリファンピシン感受性を変化させないと考えられた。

[^{14}C]L-105 をラット又はイヌに単回経口投与時の放射能吸収率はそれぞれ 2%及び 0.5%と低く、放射能の大部分が消化管内に分布していたことから、L-105 は難吸収性の薬物であると考えられた。Caco-2 細胞を用いた検討から、L-105 の低い消化管吸収性には P-gp を含めた排出トランスポーターが関与している可能性が示唆された。また、L-105 の消化管吸収性は結晶形の影響を顕著に受けることが示され、*1 形の結晶はほとんど吸収されないと考えられた。一方、ラットでわずかに吸収された[^{14}C]L-105 は全身に広く分布したが、脳にはほとんど移行しなかった。また、妊娠ラット及び妊娠ウサギに経口投与しても胎児への分布はほとんどなく、L-105 の胎盤通過性は低いと考えられた。動物及びヒトの肝細胞を用いた検討から、L-105 は肝臓で広範な代謝を受けるものの、ヒト特異的な代謝物は生成しないと推察された。また、ヒト肝細胞の CYP2B6 及び CYP3A4 に対して弱い誘導作用を示し、主要な取込み及び排出トランスポーターに対して阻害作用を示したが、明らかな CYP 阻害作用は認められなかった。ヒトにおける最高血漿中濃度を考慮すると、L-105 の代謝酵素阻害及び誘導並びに排出トランスポーターの阻害作用により臨床上意義ある薬物相互作用を生じる可能性は低いと考えられた。ラット及びイヌに[^{14}C]L-105 を経口投与したところ、放射能のほとんどが糞中に排泄された。なお、授乳期のラットを用いた検討から、L-105 及び代謝物は乳汁中に排泄されると考えられた。

L-105 の安全性については、一連の安全性薬理試験で明らかな影響が認められず、単回投与試験でも死亡や明らかな影響は認められなかった。また、マウス、ラット及びイヌに反復経口投与しても体重増加抑制以外に明らかな影響は認められず、[redacted]の L-105 を投与して全身曝露を高めたイヌでも懸念となる毒性変化は認められなかった。さらに、L-105 に遺伝毒性及びがん原性は認められず、免疫毒性及び皮膚感作性も認められなかった。生殖発生毒性試験ではラットとウサギの胎児に骨格異常が認められたが、胎児の外表や内臓並びにラット出生児の発達に異常が認められないこと、消化管からの吸収性や胎盤通過性が低いことなどから、L-105 の催奇形性作用によるものではなく、栄養供給の一部を腸内細菌叢に依存するげっ歯類で抗菌作用の影響が比較的強く認められたものと考えられた。

以上 L-105 は、リファマイシン系抗菌薬と同様の殺菌作用等により血中のアンモニア濃度を低下させ、肝性脳症の病態を改善すると考えられた。また、消化管からほとんど吸収されないために全身性にほとんど影響を及ぼさない特徴を有しており、実際、単回投与及び反復投与試験で懸念される毒性は認められなかった。さらに、遺伝毒性、がん原性及び免疫毒性が認められないこと、長年にわたる海外使用実績をも考慮すると、ヒトで特段懸念される影響は認められないと考えられた。したがって、L-105 は、肝性脳症の治療薬としての有効性は明らかであり、安全性も高い薬物であると考えられた。

2.4.6 参考文献一覧

1) 動物用医薬品評価書リファキシミン 食品安全委員会動物用医薬品専門調査会 2008 年 6 月.【4.3-1】

2) 医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について [薬審第 316 号 (平成 9 年 4 月 14 日), 医薬審第 1834 号 (平成 12 年 12 月 27 日一部改正)]. 【4.3-2】

3) Hood RD, Miller DB. Maternally mediated effects on development. In: Hood RD, editor. Developmental and Reproductive Toxicology, A Practical Approach, 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2006. p.93-124. 【4.3-3】

4) 猪股 智夫. 7.3 各種実験動物の特性 h.ウサギ. 笠井 憲雪, 吉川 康弘, 安居院 高志 編. 現代実験動物学. 東京: 朝倉書店; 2009. p.140. 【4.3-4】

5) Aliverti V, Bonanomi L, Giavini V, Leone VG. Mariani L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratology studies in the rat. Teratology, 1979;20:237-42. 【4.3-5】

6) Wilby OK. A Review of the Significance of Supernumerary Ribs and Altered Thoraco-lumbar Vertebrae in Rodent and Rabbit Embryo-fetal Developmental Toxicity Studies. Reproductive Toxicology. 2006;22:287. 【4.3-6】

7) Carney EW, Kimmel CA. Interpretation of Skeletal Variations for Human Risk Assessment: Delayed Ossification and Wavy Ribs. Birth. Defects Research (Part B). 2007;80:473-96. 【4.3-7】

8) Chernoff N, Rogers JM. Supernumerary ribs in developmental toxicity bioassays and in human populations: incidence and biological significance. J Toxicol Environ Health, Part B, 2004;7:437-49. 【4.3-8】

9) Greenway JB, Partlow GD, Gonsholt NL, Fisher KR. Anatomy of the lumbosacral spinal cord in rabbits. Journal of the American Animal Hospital Association 2001;37(1):27-34. 【4.3-9】

10) Khera KS. Common fetal aberrations and their teratologic significance: a review. Fundam Appl Toxicol 1981;1:13-8. 【4.3-10】