# カーバグル分散錠 200 mg

## 医薬品製造販売承認申請書　添付資料

## 第 2 部：CTD の概要（サマリー）

## 2.4　非臨床試験の概括評価

株式会社ポーラファルマ

# 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 ..... 3
2.4.2 薬理試験 ..... 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 ..... 5
2.4.2.2 副次的薬理試験 ..... 6
2.4.2.3 安全性薬理試験 ..... 6
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 ..... 8
2.4.3 薬物動態試験 ..... 8
2.4.3.1 吸収 ..... 8
2.4.3.2 分布 ..... 8
2.4.3.3 代謝 ..... 8
2.4.3.4 排泄 ..... 8
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 ..... 9
2.4.3.6 その他の薬物動態試験 ..... 9
2.4.4 毒性試験 ..... 9
2.4.4.1 単回投与毒性試験 ..... 9
2.4.4.2 反復投与毒性試験 ..... 9
2.4.4.3 遺伝毒性試験 ..... 10
2.4.4.4 がん原性試験 ..... 10
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 ..... 11
2.4.4.6 局所刺激性試験 ..... 12
2.4.4.7 その他の毒性試験 ..... 12
2.4.5 総括及び結論 ..... 12
2.4.5.1 薬理試験 ..... 12
2.4.5.2 薬物動態試験 ..... 13
2.4.5.3 毒性試験 ..... 14

## 略語一覧表

| 略語 | 定義（英語） | 定義（日本語） |
|---|---|---|
| APD50 | APD of 50% repolarization | 50%再分極時の活動電位持続時間 |
| APD70 | APD of 70% repolarization | 70%再分極時の活動電位持続時間 |
| APD90 | APD of 90% repolarization | 90%再分極時の活動電位持続時間 |
| AUC | Area under the plasma concentration-time curve | 血漿中濃度-時間曲線下面積 |
| $AUC_{0-24}$ | Area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24h | 投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 |
| $C_{max}$ | Maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度 |
| CPS I | Carbamoyl phosphate synthetase I | カルバミルリン酸合成酵素 I |
| CYP | Cytochrome(s) P450 | チトクローム P450 |
| Diaza | Diaza-1,3-Dione-2,4-Carboxy-7-Cycloheptane | ジアザ - 1、3 - ジオン - 2、4 - カルボキシ - 7 - シクロヘプタン |
| GLP | Good laboratory practice | 医薬品の安全性に関する非臨床試験の基準に関する省令 |
| 5-HPA | Hydantoin-5-propionic acid | ヒダントイン-5-プロピオン酸 |
| IVA | Isovaleric acidaemia | イソ吉草酸血症 |
| HPLC | High-performance liquid chromatography | 高速液体クロマトグラフィー |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography with tandem mass spectrometry | 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 |
| MMA | Methylmalonic acidaemia | メチルマロン酸血症 |
| NAGA | N-acetyl-L-glutamic acid | N-アセチル-L-グルタミン酸 |
| NCGA | N-carbamoyl-L-glutamic acid | N-カルバミル-L-グルタミン酸 |
| NAGS | N-acetylglutamate synthase | N-アセチルグルタミン酸合成酵素 |
| NOAEL | No Observed Adverse Effect Level | 無毒性量 |
| NOEL | No Observed Effect Level | 無作用量 |
| PA | Propionic acidaemia | プロピオン酸血症 |

## 2.4 非臨床試験の概括評価

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

カルグルミン酸は、1980年にNAGS欠損症として診断された患者に初めて治療薬として用いられた*(Bachmann 1981)*。当初、　A*　社が試薬レベルのカルグルミン酸を継続提供していたが、1997年から、Orphan Europe社が提供を引き継ぐとともに医薬品としての開発に着手した。

カルグルミン酸を有効成分とするCarbaglu®は分散錠として開発された。欧州では2003年1月にNAGS欠損症による高アンモニア血症に対する治療薬として承認され、2011年5月に先天性有機酸血症(PA、MMA及びIVA)による高アンモニア血症が適応症として追加承認された。

米国では2010年3月に、NAGS欠損症による急性高アンモニア血症及びNAGS欠損症による慢性高アンモニア血症に対する治療薬として承認された。

Orphan Europe社の欧州、米国における承認申請資料及び米国における Postmarketing Requirementsで追加実施された試験の成績を、本邦における非臨床試験の承認申請資料とした。なお、これらの知見に公表文献情報を加えて、非臨床試験を総括した。

#### 2.4.1.1 薬理試験概略

効力を裏付ける試験については、作用機序を検討した試験及び公表文献を評価した。

カルグルミン酸の作用機序であるCPS Iの活性化作用を、ラット肝のCPS Iを用い*in vitro*で NAG を対照として検討した。カルグルミン酸は、　A*　社製、　B*　社製（Orphan Europe社が提供）、　C* 社製精製試薬の3種を用いた（**添付資料4.2.1.1-1参考資料**）。

*In vivo* の試験として、カルグルミン酸の腹腔内予防投与によるラットにおける致死用量の酢酸アンモニウム腹腔内投与30分以降の生存数を検討した（**添付資料4.2.1.1-2参考資料**）。同様に、部分肝切除ラットに致死量の約1/3用量の酢酸アンモニウムを腹腔内投与し、カルグルミン酸の腹腔内予防投与による血中アンモニア濃度に及ぼす作用を検討した（**添付資料4.2.1.1-3参考資料**）。

生化学的処置（カルグルミン酸及びL-シトルリンの投与）により生存した成熟期のNAGS欠損マウス（*Nags*$^{-/-}$マウス）を用い、生化学的処置中止後にカルグルミン酸を経口摂取させ、生存率及び血漿中アンモニア濃度に及ぼす作用を検討した（**添付資料4.2.1.1-4参考資料**）。

副次的薬理作用は検討しなかった

安全性薬理試験は、安全性薬理コアバッテリーとして、中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を検討した。試験は全てGLPに準拠して実施した。

中枢神経系への影響では、雌雄ラット（SD）にカルグルミン酸を単回経口投与し、Irwin

＊新薬承認情報提供時に置き換えた

行動観察と体温に対する作用を検討した。心血管系への影響では、雌雄覚醒イヌ（ビーグル犬）にカルグルミン酸を単回経口投与し、血圧、心拍数及び心電図に対する作用を検討した。また、イヌ（ビーグル犬）から摘出したプルキンエ線維を用いカルグルミン酸の活動電位パラメータに対する作用を検討した。呼吸系への影響では、雌雄ラット（Wistar）に無拘束覚醒下でカルグルミン酸を単回経口投与し、呼吸数、最大吸気流量、最大呼気流量、吸気時間、呼気時間、一回換気量及び気道抵抗に対する作用を検討した。

薬力学的相互作用は検討しなかった。

#### 2.4.1.2　薬物動態試験概略

吸収については、雌雄ラット（SD）に[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与時の血漿中放射能濃度推移について、雌雄イヌ（ビーグル犬）に[$^{13}$C]カルグルミン酸及び[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与又は静脈内投与時の血漿中濃度推移あるいは放射活性濃度推移についてそれぞれ検討した。また、雌雄幼若ラット（SD）にカルグルミン酸を単回経口投与及び反復経口投与時の血漿中濃度推移（TK 試験）について、妊娠ウサギ（New Zealand white）にカルグルミン酸を単回経口投与及び反復経口投与時の血漿中濃度推移（TK 試験）についてそれぞれ検討した。

分布については、雌雄ラットに[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与時の臓器・組織中放射活性濃度推移について、授乳期雌ラット（SD）にカルグルミン酸を単回経口投与時の乳汁中濃度（TK 試験）についてそれぞれ検討した。

代謝については、雌雄ラットに[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与時の血漿、尿、糞及び呼気中の代謝物について、雌雄イヌに[$^{13}$C]カルグルミン酸及び[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与又は静脈内投与時の血漿、尿、糞及び呼気中の代謝物についてそれぞれ検討した。また、ラット（SD）、ミニブタ（Göttinger）、イヌ（ビーグル犬）、カニクイザル及びヒトの培養肝細胞を用い、*in vitro* における[$^{14}$C]カルグルミン酸の代謝安定性を検討した。

排泄については、雌雄ラットに[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与時の尿、糞及び呼気中排泄について、雌雄イヌに[$^{13}$C]カルグルミン酸及び[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与又は静脈内投与時の尿、糞及び呼気中排泄についてそれぞれ検討した。

薬物動態学的薬物相互作用については、ヒト肝細胞又はヒト肝ミクロソームを用いて、カルグルミン酸の各種 CYP 分子種に対する誘導あるいは阻害作用を検討した。

#### 2.4.1.3　毒性試験概略

カルグルミン酸の安全性を評価するため非臨床毒性試験として、単回投与毒性試験（ラット）、反復投与毒性試験（ラット）、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験（ラット、ウサギ）を実施した。カルグルミン酸の対象疾患は先天性の疾患であり、生後直後から投与が開始される可能性があることから、反復投与毒性試験では新生児ラット及

び幼若ラットを用いた。また、生涯にわたり投与を継続する可能性があることから、がん原性試験（ラット）を実施した。更に、カルグルミン酸の不純物である 5-HPA 及び Diaza の遺伝毒性試験を実施した。なお、原薬合成の技術的課題により、不純物の少ない原薬が大量に合成できないため、非げっ歯類の毒性試験は実施できなかった。全ての毒性試験は GLP を遵守して実施した。

## 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

**（添付資料 4.2.1.1-1 参考資料）**

ラット肝の CPS I を用いた *in vitro* 試験において、カルグルミン酸と NCGA は NAGA と同様に CPS I を活性化し、50%有効濃度は 1.18±0.06～1.67±0.11 mM であった。NAGA の 50%有効濃度は 0.097±0.013～0.11±0.01 mM と *in vitro* ではカルグルミン酸の 12~15 倍の活性を示した。

#### 2.4.2.1.2 正常動物を用いた試験

**(1) ラットにおける致死用量の酢酸アンモニウムに対するカルグルミン酸の作用**

**（添付資料 4.2.1.1-2 参考資料）**

24 時間絶食したラット(SD)に NCGA 1 mmol/kg 又は 4 mmol/kg を腹腔内投与した 1 時間後に、致死用量($LD_{99.9}$)の酢酸アンモニウム 10.8 mmol/kg を腹腔内投与し,30 分を超えて生存した数を評価した。

その結果、比較対照群であるNAGA 4 mmol/kg群では22%（7/32匹）、L-アルギニン 1 mmol/kg群では24%（5/21匹）が、L-グルタミン酸4 mmol/kg群では8%（1/13匹）が生存したのに対し、カルグルミン酸1 mmol/kg群では61%（14/23匹）、4 mmol/kg群では76%（29/38匹）が30分を超えて生存し、NCGAのアンモニア毒性に対する保護作用が認められた。

**(2) 部分肝切除ラットにおける酢酸アンモニウム負荷後の血中アンモニア濃度に及ぼす影響**

**（添付資料4.2.1.1-3参考資料）**

雄ラット(SD)の中間葉及び外側左葉を切除して、2/3部分肝切除ラットを作製した。切除13時間後、カルグルミン酸1 mmol/kgを腹腔内に投与し、その1時間後に酢酸アンモニウム 3.4 mmol/kg（ラット致死用量の約1/3）を腹腔内に投与した。カルグルミン酸及び酢酸アンモニウムはいずれもリン酸緩衝溶液に溶解し、対照群にはリン酸緩衝液を投与した。酢酸アンモニウム投与30分後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血し血中アンモニア濃度を測定した。

その結果、対照群の血中アンモニア濃度415.72±166.38 μmol/L(n=11)に対し、カルグルミン酸1 mmol/kg群は278.09±60.02 μmol/L(n=11)と有意に低い血中アンモニア濃度を示した($p<0.05$)。

#### 2.4.2.1.3　NAGS欠損（*Nags*$^{-/-}$）モデルマウスを用いた試験

**（添付資料4. 2. 1. 1-4参考資料）**

生化学的処置により生存した成熟期におけるカルグルミン酸及びL-シトルリンの効果について、雌雄6週齢の*Nags*$^{-/-}$マウスを用いて検討した。*Nags*$^{-/-}$マウスに水、カルグルミン酸水溶液、L-シトルリン水溶液及びカルグルミン酸＋L-シトルリン水溶液をそれぞれ摂取させた。カルグルミン酸及びL-シトルリンの濃度は、約150 mg/kg/日の投与量になるように調製した。

無処置対照群では24時間以内に全例が死亡し、L-シトルリン水溶液を摂取した群では、24～48時間以内に全例が死亡した。カルグルミン酸水溶液及びカルグルミン酸＋L-シトルリン水溶液を摂取した群での14日の時点の生存率はそれぞれ50%及び89%であった。また、カルグルミン酸水溶液群及びカルグルミン酸＋L-シトルリン水溶液群は30日を超えて生存した。

カルグルミン酸、L-シトルリン水溶液による生化学的処置で生存した生後2ヶ月の*Nags*$^{-/-}$マウスに対する処置を中止し、重篤な高アンモニア血症の症状（嗜眠、けいれん、横臥、除脳硬直）が発現した時点で屠殺し、血漿中のアンモニア濃度を測定した。生化学的処置を中止した全ての*Nags*$^{-/-}$マウスは、10～28時間の間に重篤な高アンモニア血症の症状を発現した。

*Nags*$^{+/+}$マウス、*Nags*$^{+/-}$マウス、カルグルミン酸処置*Nags*$^{-/-}$マウス及びカルグルミン酸+L-シトルリン処置*Nags*$^{-/-}$マウスの血漿中アンモニア濃度に有意な差は認められなかったが、生化学的処置を中止した*Nags*$^{-/-}$マウスの血漿中アンモニア濃度は他の群に比べ有意に高く($p<0.0001$)、約10倍の濃度を示した。

#### 2.4.2.2　副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

#### 2.4.2.3　安全性薬理試験

**（添付資料 4. 2. 1. 3-1～4）**

安全性薬理試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対してカルグルミン酸は影響を及ぼさなかった。

**(1) 中枢神経系への影響**

カルグルミン酸を投与した雄雌の250、500及び1000 mg/kgの経口投与では有意な神経行動、自律神経、神経毒性及び向精神作用を示さず、体温低下も示さなかった。一方、陽性対照であるクロジニン(3 mg/kg経口投与)では、典型的な鎮静と自律神経作用を示し、体温低下も

示した。

**(2) 心血管系への影響**

カルグルミン酸の250、500及び1000 mg/kg単回経口投与において、血圧、心電図PR間隔、QT間隔あるいはQRS持続時間に有意な作用を示さなかったが、250 mg/kg投与でのみ心拍数の有意な減少が認められた。この心拍数の変化は投与後20時間と24時間において認められたが、500と1000 mg/kgの高用量において確認できなかったことから、カルグルミン酸の作用によるものではないと考えられた。

カルグルミン酸の250、500及び1000 mg/kg単回経口投与において、心電図(第II誘導)及びT波には変化を示さず、その他の6誘導(I、II、III、aVL、aVR、aVF)についても1000 mg/kg投与後2時間で変化を示さなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸は250～1000 mg/kg単回経口投与において動脈血圧、心拍数及び心伝導時間に影響を及ぼさないと考えられた。また、覚醒イヌにおける単回経口投与によるカルグルミン酸の無作用量は少なくとも1000 mg/kgと考えられた。

摘出イヌプルキンエ線維を用い、活動電位パラメータ（振動、静止電位、脱分極最大速度及び活動電位持続時間APD50、APD70及びAPD90）を測定した。薬物は0.1%ジメチルスルフォキシドに溶解した。陽性対照としてシサプリドを用いた。

カルグルミン酸は、$10^{-7}$ M、$10^{-6}$ M、$10^{-5}$ M及び$10^{-4}$ Mで正常（60パルス/分）あるいは低（20パルス/分)刺激速度の活動電位パラメータに作用を示さなかった。いずれの濃度においても早期後脱分極は観察されなかった。この結果は、カルグルミン酸が$10^{-7}$ M～$10^{-4}$ Mで活動電位持続時間、特にAPD90に影響を及ぼさないと考えられた。一方、陽性対照であるシサプリドは$3\times10^{-7}$ Mにおいて典型的な電気生理学的作用、即ち、活動電位持続時間の延長を示した。

**(3) 呼吸系への影響**

雌雄ラットを各4匹5群に分け、カルグルミン酸を250、500、1000 mg/kg、陽性対照のカルバミルコリンを30 mg/kg経口投与した。薬物投与開始から4時間後まで、呼吸数、最大吸気流量、最大呼気流量、吸気時間、呼気時間、一回換気量及び気道抵抗を測定した。

カルグルミン酸250、500、1000 mg/kgの単回経口投与では呼吸機能に対して統計的に有意な影響を及ぼさなかった。また、雄雌ラットにおける個別データにおいても呼吸パラメータへの変化は認められなかった。一方、陽性対照であるカルバミルコリンは典型的な気管支収縮作用（主に、気道抵抗の増大と呼吸数、最大吸気・呼気流量と一回換気量の増大及び呼気時間の減少）を示した。

#### 2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用

該当する試験は実施していない。

### 2.4.3　薬物動態試験

#### 2.4.3.1　吸収

（添付資料 4.2.2.2-1,2 、4.2.3.2-2、4.2.3.5.2-1）

ラットとイヌにカルグルミン酸を単回経口投与した時、未変化体カルグルミン酸は投与後2～4時間で$C_{max}$を示した。反復経口投与後の$C_{max}$及び$AUC_{0-24}$は、初回投与時とほぼ同様であり、反復投与による蓄積性は認められなかった。ラットにおいて$C_{max}$は用量に従った増加傾向はほとんど認められておらず、$AUC_{0-24}$は用量増加よりも下回った増加傾向を示した。また、ラット、イヌともに吸収挙動において雌雄差は認められなかった。

妊娠ウサギにカルグルミン酸を単回経口投与した時の未変化体カルグルミン酸の曝露量は、用量依存的に増加したが、反復経口投与後の曝露量は、単回経口投与と比べて低かった。

イヌにおける単回経口投与と単回静脈内投与で得られたAUC比から得られた未変化体カルグルミン酸の吸収率は、32~33%であった。

#### 2.4.3.2　分布

（添付資料4.2.2.2-1、4.2.3.5.3-1）

ラットに[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与した3時間後の放射活性は各組織に広く分布し、標的器官である肝臓にも比較的高く分布した。96時間後にはほとんどの組織で減少した。また、授乳期のラットを用いた試験において、乳汁への移行が認められた。

#### 2.4.3.3　代謝

（添付資料4.2.2.2-1,2、4.2.2.4-1,2）

[$^{13}$C]又は[$^{14}$C]カルグルミン酸を投与したラット、イヌの代謝物を分析した結果、何れの動物種においても、未変化体のみが検出された。カルグルミン酸由来の想定代謝物はラット、イヌでは定量下限未満であった。また、ラット、ミニブタ、イヌ、カニクイザル及びヒトの培養肝細胞を用い、[$^{14}$C]カルグルミン酸の *in vitro* における代謝の有無を検討したが、何れの肝細胞においてもカルグルミン酸はほぼ未変化体のままで、代謝物は確認されなかった。

カルグルミン酸の最終的な代謝産物である $CO_2$ は、ラット、イヌで共通であったが、その割合は数%と少なかった。

#### 2.4.3.4　排泄

（添付資料4.2.2.2-1,2）

イヌに[$^{13}$C]カルグルミン酸を静脈内投与、ラット及びイヌに[$^{14}$C]カルグルミン酸を経口投与した時の主排泄経路は尿中であった。ラット及びイヌでは、経口投与後速やかに尿、糞及び呼気中に排泄された。

#### 2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用

（添付資料4. 2. 2. 6-1～3）

CYP各分子種に対するカルグルミン酸の誘導及び阻害作用をヒト肝細胞で検討した。

ヒト肝細胞におけるCYP1A1/2、CYP2B6及びCYP3A4/5肝酵素活性誘導に及ぼすカルグルミン酸の影響を検討した。カルグルミン酸はCYP1A1/2、CYP2B6及びCYP3A4/5の酵素活性を誘導しなかった。

ヒト肝ミクロソームを用いて、各CYP分子種(CYP1A2、CYP2B6、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1及びCYP3A4/5)に対するカルグルミン酸の阻害作用を検討した。カルグルミン酸はこれらのCYP分子種の酵素活性を阻害しなかった。

#### 2.4.3.6　その他の薬物動態試験

該当する試験は実施していない

### 2.4.4　毒性試験

#### 2.4.4.1　単回投与毒性試験

（添付資料4. 2. 3. 1-1, 2）

単回投与毒性試験はラットを用いて経口投与と静脈内投与により実施された。経口投与の最高濃度である2806 mg/kgにおいて、一般状態に特記すべき所見は認められず、体重の変動や剖検時の異常も認められなかったことから、経口投与時の概略の致死量は、2806 mg/kg超と判断された。また、静脈内投与では、生理食塩水における溶解上限の238.6 mg/kgで毒性を示さなかったことから、静脈内投与時の概略の致死量は238.6 mg/kg超と判断された。

#### 2.4.4.2　反復投与毒性試験

（添付資料4. 2. 3. 2-1, 2）

NAGS欠損症患者ではカルグルミン酸が生涯にわたり投与されることから、反復投与毒性試験では、新生児ラットの2週間反復経口投与毒性試験により生後初期の毒性について検討するとともに、幼若ラットの26週間反復経口投与毒性試験により長期投与の毒性について検討した。

新生児ラットにおけるカルグルミン酸の2週間反復経口投与毒性試験では、2000 mg/kg/日で全例が死亡に至り、1000 mg/kgで1例の死亡、橙色便、胸腺重量の低下、体重増加抑制及び腎盂拡張が認められたことから、無毒性量（NOAEL）は500 mg/kg/日と推定された。

幼若ラットにおけるカルグルミン酸の26週間反復経口投与毒性試験では、1000 mg/kg/日

で唾液分泌過多がみられるとともに、肝臓の多巣性肝細胞壊死及びハーダー腺の壊死性炎症の増加が認められた。本試験におけるカルグルミン酸のNOAELは500 mg/kg/日と推定された。

#### 2.4.4.3 遺伝毒性試験

（添付資料4. 2. 3. 3. 1-1～5, 添付資料4. 2. 3. 3. 2-1～3）

カルグルミン酸の遺伝毒性試験では、不純物である5-HPAの含量が異なる2つのバッチ（規格外の0.3%、規格内の0.05%未満）を用いて、それぞれAmes試験、ヒト末梢リンパ球を用いた染色体異常試験及び小核試験が実施された。

カルグルミン酸は復帰突然変異試験で陰性を示した。ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験では陽性（構造異常）であったが、不純物を用いた遺伝毒性試験の結果より、不純物が関与している可能性は乏しく、投与液添加後の培地を中和処理することで陰性を示したことから、この陽性反応はカルグルミン酸に起因する培地中の pH 変化が原因と考えられた。ラット小核試験では、高用量条件下で実施された試験 において陽性結果が得られ、小核誘発性を有する可能性を否定できなかった。しかし、幼若ラットを用いた26 週間反復経口投与毒性試験の一部として実施した再試験（4 週間投与時の骨髄を用いて実施）では陰性を示し、ヒト推定曝露量との安全域を踏まえると、臨床使用下で小核誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

#### 2.4.4.4 がん原性試験

（添付資料 4. 2. 3. 4. 1-1）

ラットを用いた 2 年間反復経口投与がん原性試験では、カルグルミン酸（100、300及び1000 mg/kg/日）を1日1回経口投与（5mL/kg）した。雄は104週間投与後に剖検を行ったが、雌は、1000 mg/kg群と溶媒対照群の生存動物減少により、1000 mg/kg群は97週で、その他の動物は102週で剖検を行った。

カルグルミン酸の生存率への影響は、雌では1000 mg/kg群で生存動物数が15匹まで減少したため、97週で剖検を行った。その他の雌（溶媒対照群、100及び300 mg/kg群）は、溶媒対照群の生存動物数が20匹に達した102週まで試験を継続した。一般状態観察では、唾液過多が、1000 mg/kg群の雌雄で高頻度に観察された。触診可能な腫瘍の発生率（群ごと及び動物ごと、発生部位、大きさ、形態）は、同系統のラットの背景データ範囲内であったため、被験物質投与に関連した違いは認められなかった。

1000 mg/kg群雄の体重増加は、溶媒対照群と比べ低値を示し、投与10週以降に統計学的有意差を認めた。またこの変化に関連して、同群の摂餌量減少も認められた。血液学的検査では、1000 mg/kg群雌雄で、網状赤血球の僅かな低下を認めた。病理組織学的検査では、被験物質の投与に関連する前がん病変もしくはがん病変はみられなかった。一方で、被験物質投与に関連すると考えられる非腫瘍性病変が、心臓及び腎臓で認められた。心臓では、

雄の全被験物質群及び雌の1000 mg/kg群において、弁の粘液腫様変化の発生率増加を認め、雌雄ともに用量依存的な重症化がみられた。また、僧帽弁血栓症は、粘液腫様変化に起因する変化として、被験物質群にのみ認められた。弁の血栓は、投与33週（約8ヶ月間の投与）から観察され、雌雄共に全ての被験物質群で認められ、さらに雄では用量依存的な発生率の増加及び重症化がみられた。特に、重篤な弁血栓症は、最も可能性のある死因と考えられた。

腎臓では、腎梗塞が雌雄共に全ての被験物質群で認められ、その発生率に用量依存的な増加を認めた。腎梗塞は、投与34週（約8ヶ月間の投与）から認められ、僧帽弁血栓症の塞栓が腎動脈を通過したことによる2次的変化であると考えられた。

以上の結果から、非腫瘍性変化として、弁の粘液腫様変化の発生率増加もしくは重症化が認められるとともに、僧帽弁血栓症及び腎梗塞がみられた。一方で、被験物質に関連すると考えられる腫瘍性病変は観察されなかったことから、本試験条件下においてカルグルミン酸は、がん原性を示さないと結論された。

### 2.4.4.5　生殖発生毒性試験

**（添付資料4. 2. 3. 5. 1-1、添付資料4. 2. 3. 5. 2-1、添付資料4. 2. 3. 5. 3-1）**

雌受胎能及び胚・胎児発生に関する試験では、雌ラットを用いてカルグルミン酸を交配前 15 日から妊娠 17 日まで 1 日 1 回経口投与した。2000 mg/kg/日で唾液分泌過多及び摂餌量と体重増加の僅かか軽度の減少があった。母動物に対する NOAEL は 500 mg/kg/日、受胎能と胚・胎児形成に対する NOAEL は 2000 mg/kg/日と推定された。

幼若ラットの 26 週間反復経口投与毒性試験内で、雄受胎能と雌性周期への影響を評価した。雄受胎能については、投与 26 週目から投与雄を非投与雌と交配した。雌性周期については、膣洗浄液により評価した。1000 mg/kg/日で唾液分泌過多が認められた以外、毒性は認められなかったため、雄受胎能と雌性周期に対する NOAEL は、1000 mg/kg/日と推定された。

胚・胎児発生毒性試験では、ウサギを用いて器官形成期間中の妊娠雌ウサギに交配後 6 日から 18 日までカルグルミン酸を 250 あるいは 1000 mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与した。1000 mg/kg/日投与群で体重増加の減少が認められた。親動物に対する NOAEL は 250 mg/kg/日、発生毒性に対する NOAEL は 1000 mg/kg/日と推定された。

出生前後の発生毒性試験では、妊娠ラットの着床から離乳（妊娠 6 日から分娩 21 日）までカルグルミン酸を 1 日 1 回経口投与した。母動物については、2000 mg/kg 群において 3 例の死亡、唾液過多、妊娠期間の体重増加及び摂餌量の減少を認めた。交尾及び分娩に関連する毒性変化は観察されなかった。出生児については、2000 mg/kg 群において、授乳開始の 4 日間に高い死亡率を認め、500 mg/kg 及び 2000 mg/kg 群の体重増加抑制が授乳終了まで認められた。乳汁中に排泄されたカルグルミン酸により、授乳期間中に 500 mg/kg 群の F1 出生児に体重低下がみられたが、交配前期間終了までに対照群と同程度まで回復した。

出生児の身体的発達、性成熟において毒性変化は認められず、行動・機能検査においても異常はみられなかった。また、F1 出生児の交尾、受胎能、分娩へも影響は認められなかった。母動物に対する NOAEL は、500 mg/kg/日と判断された。一方で、出生児の体重、摂餌量への影響を考慮し、出生児に対する NOAEL を定めることはできなかった。

#### 2.4.4.6 局所刺激性試験

該当する試験は実施していない。

#### 2.4.4.7 その他の毒性試験

**(添付資料 4. 2. 3. 7. 6-1～6)**

その他の毒性試験として、カルグルミン酸の不純物である 5-HPA と Diaza の遺伝毒性試験を実施した。

5-HPA は染色体異常試験において陽性と判定されたが、Ames 試験、小核試験及び *in vivo* コメット試験において陰性と判定されたため、遺伝毒性はないと考えられた。

DiazaはAmes試験において陰性と判定されたため、遺伝毒性はないと考えられた。

### 2.4.5 総括及び結論

#### 2.4.5.1 薬理試験

カルグルミン酸は、Carbaglu®の有効成分で、経口投与により、NAGS 欠損症あるいは MMA、PA 及び IVA の有機酸代謝異常症において欠損あるいは減少した NAGA に代わって CPS I を活性化し、尿素サイクルを始動あるいは活性化させることによって、蓄積したアンモニアを低減する。

効力を裏付ける試験における、ラット肝の CPS I を用いた *in vitro* 試験において、カルグルミン酸は CPS I を活性化した。正常動物を用いた *in vivo* 試験では、カルグルミン酸 1 mmol/kg 及び 4 mmol/kg を腹腔内に投与した後、致死量（10.8 mmol/kg）の酢酸アンモニウムを静脈内投与したラットの生存率は、それぞれ 61%及び 76%であり、アンモニア毒性に対する保護作用を示した。また、肝部分切除ラットにカルグルミン酸 1 mmol/kg を腹腔内投与した後、酢酸アンモニウム 3.4 mmol/kg を腹腔内投与した時の血中アンモニア濃度は、溶媒対照投与群（415.72±166.38 μmol/L）に比べ 278.09±60.02 μmol/L と有意に低い値を示した($p<0.05$)。NAGS 欠損（$Nags^{-/-}$）モデルマウスでは、カルグルミン酸の経口摂取（約 150 mg/kg/日）により、生化学的処置を中止した NAGS 欠損モデルマウスの生存率が増加した。また、カルグルミン酸の経口摂取により、NAGS 欠損モデルマウスの血漿中アンモニア濃度が正常マウスのレベルにまで低下していることが示された。

カルグルミン酸は、非臨床薬理試験において、CPS I を活性化し、酢酸アンモニウム負荷モデル及び NAGS 欠損モデルにおいて生存率の増加及び血中アンモニア濃度の低下作用を示したことから、高アンモニア血症を発症する NAGS 欠損症、メチルマロン酸血症、プロ

ピオン酸血症及びイソ吉草酸血症に対して効果が期待できることが示唆された。

安全性薬理試験において、安全性薬理コアバッテリーとして、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響を検討した。

・中枢神経系への影響

雌雄ラットにカルグルミン酸250～1000 mg/kgを単回経口投与した結果、Irwinスコアと体温に有意な変化は認められなかった。

・心血管系への影響

雌雄イヌに覚醒下でカルグルミン酸 250～1000 mg/kg を単回経口投与した結果、血圧、心拍数、心電図（PR 間隔、QT 間隔及び QRS 持続時間）に有意な変化はなかった。また、カルグルミン酸は $10^{-7}$ M～$10^{-4}$ M の濃度範囲で、摘出イヌプルキンエ線維の活動電位パラメータに影響を及ぼさなかった。

・呼吸器系への影響

雌雄ラットに覚醒下でカルグルミン酸250～1000 mg/kgを単回経口投与した結果、呼吸数、最大吸気流量、最大呼気流量、吸気時間、一回換気量、気道抵抗の各呼吸パラメータに変化はなかった。

安全性薬理試験の最大用量である 1000 mg/kg 群の曝露量は、健常人における 250 mg/kg 投与時の推定曝露量の 13～30 倍となるが、カルグルミン酸 1000 mg/kg 単回経口投与では何れの試験でも影響は認められなかった。

### 2.4.5.2 薬物動態試験

ラットとイヌにカルグルミン酸を単回経口投与した時、未変化体カルグルミン酸は投与後2～4時間で$C_{max}$を示した。反復経口投与後の$C_{max}$及び$AUC_{0-24}$は、初回投与時とほぼ同様であり、反復投与による蓄積性は認められなかった。ラットにおいて$C_{max}$は用量に従った増加傾向はほとんど認められておらず、$AUC_{0-24}$は用量増加よりも下回った増加傾向を示した。また、ラット、イヌともに吸収挙動において雌雄差は認められなかった。

妊娠ウサギにカルグルミン酸を単回経口投与した時の未変化体カルグルミン酸の$AUC_{0-24}$は、用量依存的に増加したが、反復経口投与後の$AUC_{0-24}$は、単回経口投与の$AUC_{0-24}$と比べて減少した。この反復経口投与による$AUC_{0-24}$低下の原因は不明であるが、要因の一つとしてカルグルミン酸の自己誘導代謝の可能性が考えられた。

ヒトに[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与したときの血漿中放射能濃度は，投与1日目と$T_{max}$（投与24時間～36時間）以降の2峰性を示し、ラットやイヌと異なる推移を示した。ヒトと動物の推移の原因は明らかにされていないが、2つ目のピークは、$CO_2$として呼気中に排泄される前に水溶性の物質が血漿中に循環していることが推察された（**第2.7.2.2.2項1）（2）、（3）及び（5）参照**、*Norbert 2009*）。

ラットに[$^{14}$C]カルグルミン酸を単回経口投与した 3 時間後の放射活性は各組織に広く分布し、標的器官である肝臓にも比較的高く分布した。96 時間後にはほとんどの組織で減少

した。また、授乳期のラットを用いた試験において、乳汁への移行が認められた。

カルグルミン酸の代謝物として、5-HPA、Diaza及びL-グルタミン酸が想定されていたが、ラット、イヌ及びヒトの血漿中及び尿中には、これらの代謝物はLC-MS/MS法あるいはラジオ-UV検出器付きHPLC法にて検出されなかった（**第2.7.2.2.2項1）(5) 参照**）。ヒトの糞中においては5-HPAがLC-MS/MS法で、L-グルタミン酸がラジオ-UV検出器付きHPLC法で、いずれも僅かに検出された（**第2.7.2.2.2項1）(5) 参照**）。また、ラット、ミニブタ、イヌ、カニクイザル及びヒトの培養肝細胞を用い、[$^{14}$C]カルグルミン酸の*in vitro*における代謝の有無を検討したが、何れの肝細胞においてもカルグルミン酸はほぼ未変化体のままで、代謝物は確認されなかった。

ラット、イヌ及びヒトにおいて共通して検出されたのは、呼気中のカルグルミン酸由来の$CO_2$のみであったが、現時点ではその代謝経路は明らかにされていない。

イヌに[$^{13}$C]カルグルミン酸を静脈内投与、ラット及びイヌに[$^{14}$C]カルグルミン酸を経口投与した時の主排泄経路は尿中であった。ラット及びイヌでは、経口投与後速やかに尿、糞及び呼気中に排泄された。一方、ヒトに[$^{14}$C]カルグルミン酸を経口投与した時の主排泄経路は糞中で（**第2.7.2.2.2項1）(1) 参照**）、ラット及びイヌとは異なった。

ヒト肝細胞において、カルグルミン酸は200 μMまでの濃度で、CYP1A1/2、CYP2B6及びCYP3A4/5の酵素活性を誘導しなかった。

ヒト肝ミクロソームにおいて、カルグルミン酸は200 μMまでの濃度で、CYP1A2、CYP2B6、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1及びCYP3A4/5の酵素活性を阻害しなかった。

カルグルミン酸は培養肝細胞で代謝されないこと、また、CYP分子種の酵素活性を誘導又は阻害しないことから、薬物動態学的相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

#### 2.4.5.3　毒性試験

単回投与毒性試験では、ラットへの経口投与（2806 mg/kg）及び静脈内投与（238.6 mg/kg）のいずれにおいても、全身性の症状は認められず、経口投与時の概略の致死量は、2806 mg/kg超、静脈内投与時の概略の致死量は238.6 mg/kg超と判断された。

新生児ラットを用いた2週間反復経口投与毒性試験では、2000 mg/kg/日で全例が死亡した。また、1000 mg/kg/日では橙色便、胸腺重量の低下、体重増加抑制及び腎盂拡張が認められたことから、NOAELは500 mg/kgと推定された。また、幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験では、1000 mg/kg/日で唾液分泌過多がみられるとともに、肝臓の多巣性肝細胞壊死及びハーダー腺の壊死性炎症の増加が認められた。その他幼若動物に対する成長への影響、追加で実施された雌雄生殖能への影響は認められなかった。これらの結果から、一般毒性試験において、カルグルミン酸のNOAELは500 mg/kg/日と推定された。

遺伝毒性試験では、カルグルミン酸は復帰突然変異試験で陰性を示した。ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験では陽性（構造異常）を示した。一方で、投与液添加後の

培地 pH を中和処理した条件では陰性が確認された。また、カルグルミン酸の不純物である 5-HPA を用いた遺伝毒性試験では、Ames 試験、ラット小核試験、マウスコメット試験で陰性を示したことから、生体内で遺伝毒性は示さないと考えられたことから、染色体異常試験での陽性結果は、不純物が関与している可能性は乏しく、カルグルミン酸に起因する培地中の pH 変化が原因と考えられた。ラット小核試験では、高用量条件下で実施された試験において陽性結果が得られ、小核誘発性を有する可能性を否定できなかった。しかし、幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験の一部として実施した再試験（4 週間投与時の骨髄を用いて実施）では陰性を示し、ヒト推定曝露量との安全域を踏まえると、臨床使用下で小核誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

ラットを用いた 2 年間反復経口投与がん原性試験では、弁粘液腫様変化の発生率増加もしくは重症化を認めるとともに、僧帽弁血栓症及び腎梗塞が認められた。一方で、被験物質に関連すると考えられる腫瘍性病変は観察されなかった。したがって、本試験条件下においてカルグルミン酸は、がん原性を示さないと結論された。

生殖発生毒性試験では、ラットを用いた雌受胎能および胚・胎児発生に関する試験が実施され、母動物に対する NOAEL は 500 mg/kg/日、受胎能と胚・胎児形成に対する NOAEL は 2000 mg/kg/日と推定された。また、雄受胎能と雌性周期への影響を、幼若ラットの 26 週間反復経口投与毒性試験内で評価した結果、雄受胎能と雌性周期に対する NOAEL は、1,000 mg/kg/日と推定された。ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験では、親動物に対する NOAEL は 250 mg/kg/日、発生毒性に対する NOEL は 1000 mg/kg/日と推定された。ラットを用いた出生前後の発生毒性試験では、母動物の NOAEL は 500 mg/kg/日、出生児に対する NOAEL は定めることはできなかった。また、カルグルミン酸の乳汁移行が確認された。

カルグルミン酸の不純物である 5-HPA と Diaza について、遺伝毒性試験が実施された。5-HPA はヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験では陽性を示したが、復帰突然変異試験、ラット小核試験、マウスコメット試験で陰性を示し、生体内で遺伝毒性は示さないと考えられた。Diaza は復帰突然変異試験で陰性を示した。

**参考文献**

Bachmann C, Krahenbuhl S, Colombo JP et al. N-acetylglutamate synthetase deficiency: a disorder of ammonia detoxication [letter]. N Engl J Med. 1981; 304(9): 543.

Norbert E.:DATA REVIEW – Absorption, distribution, metabolism and elimination of Carglumic acid in animals and humans- Cross species metabolic profile comparison. BROMET- April 2009