# ノベルジン錠 25 mg 及び同 50 mg

# ノベルジンカプセル 25 mg 及び同 50 mg

# 製造販売承認事項一部変更承認申請添付資料

## 第 2 部（モジュール 2）

## 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.1　緒言

ノーベルファーマ株式会社

目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 . . . . . 3
2.6.1 緒言 . . . . . 3

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.1 緒言

NPC-02 は、酢酸亜鉛水和物を含有する経口剤である。2008 年 1 月にウィルソン病の効能・効果で承認され、「ノベルジンカプセル 25 mg 及び同 50 mg」として販売されている。さらに服薬しやすい製剤の開発要望に基づいて、錠剤を開発し臨床試験を実施し、「ノベルジン錠 25 mg及び同 50 mg」として 2014 年 9 月に承認を取得し販売されている。

今回申請する NPC-02 の低亜鉛血症に関する非臨床試験として、薬理試験のうち酢酸亜鉛を投与したときの血中亜鉛濃度増加作用及び安全性薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の成績は、初回承認申請時(ウィルソン病) に提出済みである。従って、今回の効能追加としての低亜鉛血症の申請に際して、薬理試験における効力を裏付ける試験成績については、血中亜鉛濃度低下動物モデルを用い、本薬を含む各種亜鉛化合物又は亜鉛を投与したときにも血中の亜鉛濃度が増加することを示した文献情報を収集し、それらの文献の試験成績を CTD 様式に編集して参考資料とした。

また、本申請における ICH M7 ガイドラインの適用に関する CTD への反映については以下の理由により[redacted]とした。

(1) [redacted]

(2) [redacted]

(3) [redacted]と考えられる。

# ノベルジン錠 25 mg 及び同 50 mg

# ノベルジンカプセル 25 mg 及び同 50 mg

# 製造販売承認事項一部変更承認申請添付資料

## 第 2 部（モジュール 2）

## 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.2　薬理試験の概要文

ノーベルファーマ株式会社

# 目次

略語・略号一覧 . . . . . 3
2.6.2 薬理試験の概要文 . . . . . 4
2.6.2.1 まとめ . . . . . 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 . . . . . 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 . . . . . 8
2.6.2.4 安全性薬理試験 . . . . . 8
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 . . . . . 8
2.6.2.6 考察及び結論 . . . . . 9

## 略語・略号一覧

| 略語・略号 | 内容 |
|---|---|
| $CCl_4$ | 四塩化炭素 |
| SD | Sprague Dawley |

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

今回 NPC-02 の新効能として申請する「低亜鉛血症」に係わる薬理試験の中で、効力を裏付ける試験としては、本薬を動物に投与することで、血中の亜鉛濃度が確実に増加することを確認することである。

効力を裏付ける試験において、動物に亜鉛を投与して血中濃度が増加する試験成績については、ノベルジンカプセルの初回承認申請時（効能・効果：ウィルソン病）に、酢酸亜鉛を含む各種亜鉛塩を動物に反復投与した試験結果として、血中亜鉛濃度が一定濃度上昇し維持されることを確認した試験成績は提出済みである。

今回の効能追加としての低亜鉛血症に関する試験成績に関しては、文献検索を行い、四種類の血中亜鉛濃度低下動物モデル、すなわち卵巣摘出ラット、四塩化炭素（$CCl_4$）誘発性肝硬変障害ラット、アルドステロン/Na 誘発性アルドステロン血症ラット及び低亜鉛食投与の離乳後幼若ラットにおいて､これらのラットに酢酸亜鉛又は硫酸亜鉛を経口又は腹腔内投与したとき、血中亜鉛濃度は増加したことが報告されていることを確認した。

以上の結果から、血中亜鉛濃度低下動物モデルにおいて酢酸亜鉛又は硫酸亜鉛を投与することにより血中亜鉛濃度低下は改善されることが示された。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

種々の血中亜鉛濃度低下モデルでの血中亜鉛濃度に対する亜鉛又は亜鉛化合物を投与したときの影響

(1) 卵巣摘出による血中亜鉛濃度低下モデルラットに対する亜鉛投与の影響

**＜添付資料 4.2.1.1-1 参＞**

30 匹の SD 系雌ラットを用いた。卵巣保持ラット（Control）群、卵巣摘出（ケタミン＋キシラジン塩酸塩麻酔下に卵巣摘出）ラット群及び卵巣摘出後に硫酸亜鉛 3 mg/kg/day を腹腔内投与(毎日 9:00 am に投与)したラット群の 3 群に分け、各群 10 匹(それぞれ体重 202.50±10.34、201.50±15.99 及び 202.00±9.19 g）とした。血清中亜鉛濃度は、6 週間後、採血し、原子吸光法により測定した。

結果を表 2.6.2-1 に示す。卵巣摘出によりラットの血清中の亜鉛濃度は有意に低下したが、この血清中の亜鉛濃度の低下は、硫酸亜鉛 3 mg/kg/day を腹腔内投与することにより有意に Control 群のレベル以上にまで回復した。

以上の結果から卵巣摘出による血中亜鉛濃度低下に対し亜鉛投与は有効であることが明らかとなった。

**表 2.6.2-1 卵巣摘出による血清中亜鉛濃度低下ラットに対する亜鉛投与の影響**

| 群 | 例数 | 血清中亜鉛濃度（μg/dL） |
|---|---|---|
| Control | 10 | 91.30±6.52 |
| 卵巣摘出 | 10 | 80.60±7.69 * |
| 卵巣摘出＋亜鉛 3 mg/kg | 10 | 129.20±11.50 ** |

*　p<0.05: control 群 vs 卵巣摘出群
** p<0.05: control 群又は卵巣摘出群 vs 卵巣摘出＋亜鉛 3 mg/kg 投与群
by Student's t-test
Data: mean±SEM

(2) 四塩化炭素（$CCl_4$）誘発性肝硬変ラットにみられる血中亜鉛濃度低下に対する亜鉛投与の影響

**＜添付資料 4.2.1.1-2 参＞**

Wistar 系雄性ラット（体重約 200 g）を用いた。Control 群、$CCl_4$群及び$CCl_4$＋亜鉛負荷群の 3 群に分けた。$CCl_4$群に関してはエーテル麻酔下のラットに$CCl_4$を一週間毎に 10 週間経口投与した。最初の$CCl_4$投与量は 100μL/ラットとし、その後体重変化をチェックし、最初の 3 日間の体重減少率が 10%以下の場合は$CCl_4$投与量を 50%増加した。その他の場合は$CCl_4$投与量を 50%減少して投与した。貯留する腹水を肝障害の指標とし、$CCl_4$最終投与後少なくとも 3 週間は腹水が貯留していることを確認した。$CCl_4$最終投与（10 週）後 3 週目に尾静脈より採血し、血清中の亜鉛濃度を原子吸光法により測定した。$CCl_4$＋亜鉛負荷群については、酢酸亜鉛 381.9 mg/mL を含んだ飲水を用いたことを除いて$CCl_4$群と同一であった。

$CCl_4$最終投与後（10 週）3 週間の各群（Control、$CCl_4$及び$CCl_4$＋亜鉛負荷群）の飲水量は同等であった。$CCl_4$＋亜鉛負荷群では飲水中より摂取した平均亜鉛量は 8.6±0.11 mg/day であった。投与した$CCl_4$の総量は$CCl_4$群と$CCl_4$＋亜鉛負荷群とで同じであった。図 2.6.2-1 に示したように、$CCl_4$を投与したラットにみられる血中亜鉛濃度低下は亜鉛投与により有意に回復することが認められた。

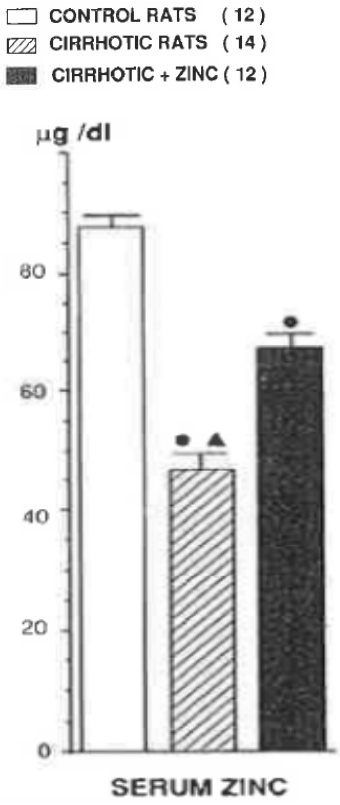



**図 2.6.2-1 四塩化炭素（$CCl_4$）誘発性肝硬変動物にみられる血清中亜鉛濃度低下に対する亜鉛投与の影響**

Mean±SD、括弧内の数字は例数を示す
● $p<0.05$ vs control rats
▲ $p<0.05$ vs cirrhotic + Zinc
データは ANOVA 及び Newman-Keuls test を用いて解析した

(3) ラットアルドステロン/Na 誘発性アルドステロン血症モデルでの血中亜鉛濃度低下に対する硫酸亜鉛の影響

＜添付資料 4.2.1.1-3 参＞

8 週齢の SD 系雄性ラットを用いた。ラットのアルドステロン/Na 誘発性アルドステロン血症モデルは、一側性腎摘出後、全身循環のアルドステロンレベルを持続的に増加させることにより作製した。すなわち、ラットの皮下にアルドステロンを含む浸透圧ミニポンプを植え込み、4 週間持続的にアルドステロンを投与した。なお、これらのラットには 1%NaCl 及び 0.4%KCl を含ませた飲水を与えて低カリウム血症を予防した。アルドステロン血症ラットの一部には、同時に硫酸亜鉛（40 mg/day）を 4 週間経口投与した。一側性腎摘出をせず、アルドステロン及び亜鉛を投与しない無処理ラット群を Control とした。アルドステロン処理を 4 週間行った時点でラットから採血し、血漿中の亜鉛濃度を原子吸光法により測定した。

結果を図 2.6.2-2 に示す。血漿中の亜鉛濃度は Control 群で 103±3μg/dL、アルドステロン/Na 4 週間投与群では 72±5μg/dL と Control 群に比べ有意に低下（p<0.05）した。アルドステロン/Na 4 週間投与による血漿中亜鉛濃度の低下は硫酸亜鉛の併用投与（アルドステロン/Na＋硫酸亜鉛投与群）により血漿中亜鉛濃度は 99±6μg/dL に増加した。

以上の結果から、ラットアルドステロン症モデルにおける血中亜鉛濃度低下は硫酸亜鉛を投与することにより改善されることが確認された。

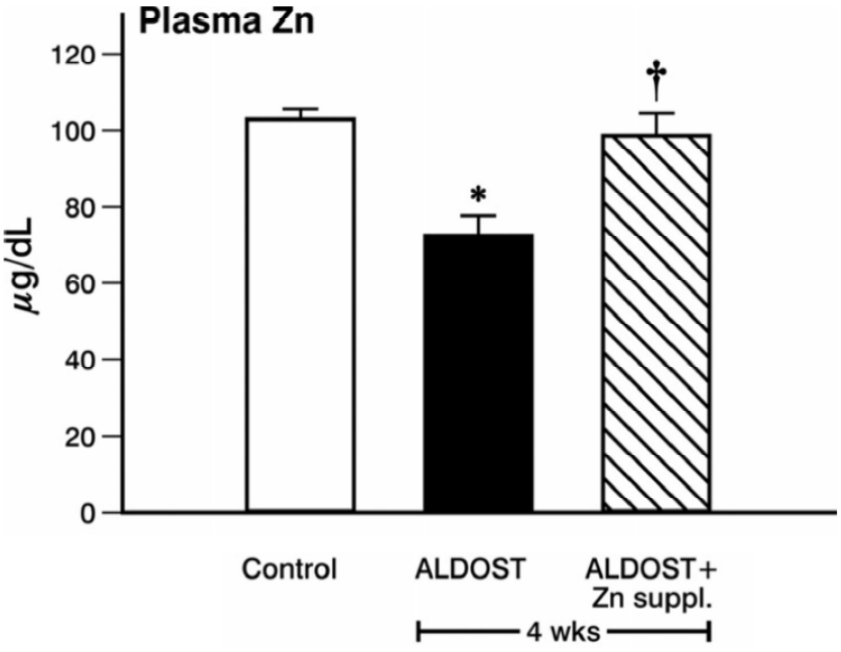



**図 2.6.2-2 ラットアルドステロン/Na 誘発性アルドステロン血症モデルでの血漿中亜鉛濃度に対する硫酸亜鉛投与の影響**

Mean±SEM、＊ p<0.05 vs control、† p<0.05 vs ALDOST
データは Mann-Whitney rank sum test により解析
n=6（文献に記載ないが、彼らの一連の研究で各群 6 匹使用）
白カラム：Control、黒カラム：アルドステロン/Na 投与群
斜線カラム：アルドステロン/Na＋硫酸亜鉛投与群

(4) 離乳後幼若ラットの血中亜鉛濃度低下に対する亜鉛投与の影響

＜添付資料 4.2.1.1-4 参＞

離乳後の幼若 SD 系雄性ラット（25 日齢、体重約 60 g）を用いた。ラットを屠殺し首部分より採血した後、血漿中の亜鉛濃度は原子吸光法により測定した。実験 1 では 12 匹のラットを用い、6 匹には 24 日間低亜鉛食（0.4μgZn/g 摂餌量：$ZnSO_4.7H_2O$ として餌に加えた）を自由に摂取できるように（ZD 群）、6 匹には 24 日間、ZD 群ラットの前日の摂餌量と同量の普通食（55μgZn/g 摂餌量）を摂取できるように与え（PF 群）、このときのラット血漿中の亜鉛濃度を測定した。実験 2 では合計 8 匹のラットを使用 し、25 日間 ZD 群と同じ処理（低亜鉛食）後以下の 2 群に分けた。1 群は分けた直後に屠殺し（ZDBL 群）、他の群はさらに 26 日目から 47 日目までの 22 日間、摂餌量は変えず、普通食に戻した後屠殺し、それぞれのラットの血漿中の亜鉛濃度を測定した。

結果を表 2.6.2-2 に示す。実験 1 において、24 日間普通食を与えたラット群（PF 群）に比べ、24 日間低亜鉛食を与えたラット群（ZD 群）の血漿中亜鉛濃度は有意に低下した。実験 2 では 25 日間低亜鉛食を与えた、継続して低亜鉛食を与えたラット群（ZDBL 群）と 26 日目から 47 日目までの 22 日間普通食に切り替えて与えたラット群（RCI 群）に分けて血漿中の亜鉛濃度を測定した。その結果、低亜鉛食を与えたラットでは、普通食を与えたラット（PF 群）に比べ血漿中亜鉛濃度は有意に低下したが、普通食に戻すことにより改善がみられた。

以上の結果から、離乳後の幼若ラットでみられる血中亜鉛濃度低下は亜鉛を負荷することにより改善することが示された。

**表 2.6.2-2 離乳後幼若ラットの血中亜鉛濃度低下に対する亜鉛投与の影響**

| 群 | 例数 | 血漿中亜鉛濃度(μg/g dry weight) |
|---|---|---|
| 実験 1 | | |
| PF | 6 | 202.5±10.2 |
| ZD | 6 | 68.1±4.6 ＊ |
| 実験 2 | | |
| ZDBL | 4 | 50.8±3.3 ＊ |
| RCI | 4 | 120.4±5.8 |

Mean±SE、＊ p<0.01:ZD vs PF 及び ZDBL vs RCI by Student's t-test

## 2.6.2.3 副次的薬理試験

追加資料なし。

## 2.6.2.4 安全性薬理試験

追加資料なし。

## 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

追加資料なし。

### 2.6.2.6 考察及び結論

四種類の血中亜鉛濃度低下動物モデル、すなわち卵巣摘出ラット、$CCl_4$誘発性肝硬変ラット、アルドステロン/Na 誘発性アルドステロン血症ラット及び低亜鉛食投与の離乳後幼若ラットにおいて、酢酸亜鉛又は硫酸亜鉛を腹腔内又は経口投与したとき、血中の亜鉛濃度は増加し、これらの動物モデルにおける血中亜鉛濃度低下が改善することが示された。

以上の結果から低亜鉛血症の治療において、血中亜鉛濃度の上昇には酢酸亜鉛又は硫酸亜鉛などの亜鉛化合物の投与は有効であると推察される。

# ノベルジン錠 25 mg 及び同 50 mg

# ノベルジンカプセル 25 mg 及び同 50 mg

# 製造販売承認事項一部変更承認申請添付資料

## 第 2 部（モジュール 2）

## 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.3　薬理試験概要表

ノーベルファーマ株式会社

# 目次

略語・略号一覧 . . . . . 3
2.6.3 薬理試験概要表 . . . . . 4
2.6.3.1 薬理試験の一覧表 . . . . . 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 . . . . . 5

## 略語・略号一覧

| 略語・略号 | 内容 |
|---|---|
| $CCl_4$ | 四塩化炭素 |

## 2.6.3 薬理試験概要表

### 2.6.3.1 薬理試験の一覧表

被験物質：酢酸亜鉛又は硫酸亜鉛

| | 試験の種類 | 動物種/組織 | 投与方法 | 報告書発行年及び実施施設 | 添付資料 |
|---|---|---|---|---|---|
| 効力を裏付ける試験 | 血中亜鉛濃度低下動物モデルにおける亜鉛投与 | ラット／血清 | 腹腔内投与 | 2009 年　セルチュク大学メラム医学部生理学研究室 | ＜4.2.1.1-1 参＞ |
| | 血中亜鉛濃度低下動物モデルにおける亜鉛投与 | ラット／血清 | 経口投与 | 1992 年　ローマ・ラ・サピエンツァ大学第二消化器内科及びラクイラ大学食料科学研究室など | ＜4.2.1.1-2 参＞ |
| | 血中亜鉛濃度低下動物モデルにおける亜鉛投与 | ラット／血漿 | 経口投与 | 2008 年　テネシー大学健康科学センター心血管系部門、内科学及び外科学研究室など | ＜4.2.1.1-3 参＞ |
| | 血中亜鉛濃度低下動物モデルにおける亜鉛投与 | ラット／血漿 | 経口投与 | 1984 年　ロンドン・スクール・オブ・ハイジーン・アンド・トロピカル・メディスン（ロンドン大学）人間栄養学研究室 | ＜4.2.1.1-4 参＞ |

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

| 筆頭著者・雑誌名 | 表題 | 試験目的 | 動物種／被験物質 | 試験結果 | 添付資料 |
|---|---|---|---|---|---|
| Sunar F et al.<br>Pak J Pharm Sci.,<br>2009;22:150-154 | Zinc deficiency and supplementation in ovariectomized rats: their effect on serum estrogen and progesterone levels and their relation to calcium and phosphorus | 卵巣摘出動物にみられる血中亜鉛濃度低下に対する硫酸亜鉛投与の影響を検討する | ラット／硫酸亜鉛 | 卵巣摘出によりラットの血清中の亜鉛濃度は有意に低下したが、この血清中の亜鉛濃度の低下は、硫酸亜鉛 3 mg/kg を腹腔内投与することにより有意に Control 群のレベル以上にまで回復した。 | ＜4.2.1.1-1参＞ |
| Riggio O et al.,<br>Hepatology,<br>1992;16:785-789 | Zinc supplementation reduces blood ammonia and increases liver ornithine transcarbamylase activity in experimental cirrhosis | 四塩化炭素（$CCl_4$）誘発性肝硬変動物にみられる血中亜鉛濃度低下に対する亜鉛投与の影響を検討する | ラット／酢酸亜鉛 | $CCl_4$投与群ではControl群に比べ有意に血清中の亜鉛濃度は低下した。$CCl_4$を投与し、さらに酢酸亜鉛381.9 mg/Lを含む飲水を与えたラットは、$CCl_4$のみ投与したラットに比べ血清中の亜鉛濃度は有意に増加した。 | ＜4.2.1.1-2参＞ |
| Gandhi M S et al.,<br>J Cardiovasc Pharmacol.,<br>2008;52:245-252 | Causes and consequences of zinc dyshomeostasis in rats with chronic aldosteronism | アルドステロン／Na誘発性アルドステロン血症における血中亜鉛濃度低下に対する硫酸亜鉛投与の影響を検討する | ラット／硫酸亜鉛 | 血漿中の亜鉛濃度はControl群で103±3μg/dL、アルドステロン/Na 4週間投与では72±5μg/dLとControl群に比べ有意に低下した。アルドステロン/Na 4週間投与による血漿中亜鉛濃度の低下は硫酸亜鉛の併用投与により血漿中亜鉛濃度は99±6μg/dLに増加した。 | ＜4.2.1.1-3参＞ |
| Giugliano R& Millward,<br>Bri J Nutr.,<br>1984;52:545-560 | Growth and zinc homeostasis in the severely Zn-deficient rat | 離乳後幼若動物の低亜鉛食負荷による血中亜鉛濃度低下に対する硫酸亜鉛投与の影響を検討する | ラット／硫酸亜鉛 | 実験1において、24日間普通食を与えたラット群に比べ、24日間低亜鉛食を与えたラット群の血漿中亜鉛濃度は有意に低下した。実験2では25日間低亜鉛食を与えたラットでみられた血漿中亜鉛濃度の低下が普通食に切り替えることにより改善した。 | ＜4.2.1.1-4参＞ |