



サノフィ株式会社

スピラマイシン錠 150 万単位「サノフィ」

CTD 第二部 – 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 31

目 次

略号と用語の定義	5
1 非臨床試験計画概略	7
2 薬理試験	10
2.1 効力を裏付ける試験 - <i>in vitro</i>	10
2.2 効力を裏付ける試験 - <i>in vivo</i>	10
2.3 作用機序.....	11
2.4 耐性.....	11
2.5 副次的薬理試験.....	11
2.6 安全性薬理試験.....	11
3 薬物動態試験	13
3.1 吸収.....	13
3.2 分布.....	14
3.3 代謝.....	15
3.4 排泄.....	16
3.5 薬物動態学的相互作用.....	16
4 毒性試験	18
4.1 単回投与毒性試験.....	18
4.2 反復投与毒性試験.....	19
4.3 遺伝毒性試験	22
4.4 がん原性試験	23
4.5 生殖発生毒性試験.....	23

2.4 非臨床試験の概括評価
XRP5337 - スピラマイシン

5	総括及び結論	27
6	参考文献一覧	30

表 目 次

表 1 - 動物及びヒトにスピラマイシンを経口投与したときの PK パラメータの要約.....	14
---	----

図 目 次

図 1 - スピラマイシンの構造式.....	8
------------------------	---

略号と用語の定義

略号	定義
AUC	Area under the concentration versus time curve (血中濃度-時間曲線下面積)
ALP	Alkaline phosphatase (アルカリホスファターゼ)
ALT (GPT)	Alanine aminotransferase (Glutamic pyruvic transaminase) : アラニンアミノトランスフェラーゼ (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)
AST (GOT)	Aspartate aminotransferase (Glutamic oxaloacetic transaminase) : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)
BUN	Blood urea nitrogen (尿素窒素)
CL/F	Apparent clearance (見かけの全身クリアランス)
C _{max}	Maximum concentration (最高濃度)
C _{min}	Minimum concentration in serum (最低血清中濃度)
CYP	Cytochrome P450 (シトクロム P450)
F	Absolute bioavailability (絶対バイオアベイラビリティ)
GLP	Good Laboratory Practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準)
HPLC	High performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (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)
IC ₅₀	50% inhibitory concentration (50%抑制濃度)
IU	International unit (国際単位)
LC-MS/MS	High performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析)
LD ₅₀	Lethal dose 50% (50%致死量)
LDH	Lactate dehydrogenase (乳酸脱水素酵素)
LVP	Left ventricular pressure (左心室圧)
Mrp	Multidrug resistance-associated protein (多剤耐性関連タンパク質)
P-gp	P-glycoprotein (P-糖タンパク質)
PK	Pharmacokinetics (薬物動態)
t _{1/2}	Elimination half-life (消失半減期)

2.4 非臨床試験の概括評価
XRP5337 - スピラマイシン

略号	定義
TK	Toxicokinetics (トキシコキネティクス)
t_{max}	Time to reach the maximum concentration (最高濃度到達時間)
V_{ss}/F	Apparent volume of distribution at steady state (定常状態における見かけの分布容積)

1 非臨床試験計画概略

ヒトのトキソプラズマ感染は、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)) に感染したネコ (終宿主) の排便後の糞便中にある配偶子嚢 (オーシスト) や、汚染した生肉や加熱が不十分な肉 (中間宿主、ウシ、ブタ、トリ等の家畜肉) にある嚢胞 (シスト)、血中の急増虫体 (タキゾイト) を摂取することによる。摂取されたシストから消化管内で放出された緩増虫体 (ブラディゾイト) 及び胞子虫体 (スポロゾイト) は、消化管壁から細胞内に侵入し、タキゾイトに分化して活発に増殖する。感染細胞はその後破壊され、隣接する細胞や血液を介して、タキゾイト及びブラディゾイトが脳、心臓などあらゆる臓器に広範囲に散在するようになる。単球及び好中球により原虫は殺傷されるが、マクロファージ内で生存し、血液循環によって拡散する。急性感染期に宿主が妊娠中であれば原虫は胎盤を通過して胎児に移行する (1)。

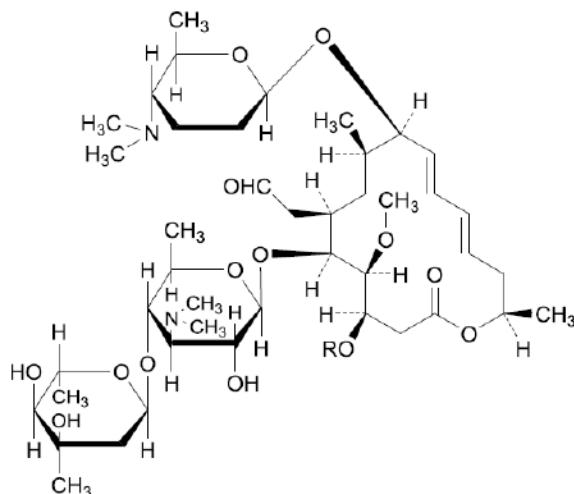
トキソプラズマ感染は世界的にみられる感染症であり、世界の人口の約 25~30% がトキソプラズマに感染している (1)。特に問題なのは、妊娠中に母体が初感染し胎児に垂直感染することによって生じる先天性トキソプラズマ感染症であり、出生児は典型的な症状として水頭症、大脳石灰化、網脈絡膜炎、精神障害、運動障害などの重篤な障害を引き起こす (2), (3)。

スピラマイシンは 1951 年に *Streptomyces ambofaciens* の培養液から単離された 16 員環のマクロライド系抗生物質 (以下、マクロライド) であり、マクロライドに特徴的な抗菌スペクトルを示す (4)。

スピラマイシンはカナダ、フランス、ドイツ等で、気道、口腔、皮膚及び軟組織の感染症治療を適応として使用されている。また、綿密に計画された前向き試験での成績ではないが、スピラマイシンは急性感染した妊娠女性から子宮内の胎児への垂直感染率を下げる事が報告されている (5)。ヨーロッパにおいては、長年にわたり妊娠女性から胎児への垂直感染を予防する試みが行われており (4)、フランスでは 1980 年代から、妊婦のトキソプラズマ症に対して使用されている (1)。スピラマイシンは、日本及び米国においては承認されていないが、米国ではトキソプラズマ症の治療に妊婦を登録する例外的使用プログラムが現在実施されている。急性トキソプラズマ感染の妊娠女性における胎児の垂直感染リスクは、妊娠初期から妊娠後期に向かって高くなるが、逆に感染出生児の臨床兆候の発生は妊娠早期での感染で最も高いため、妊娠早期からの抗原虫薬の投与が重要であり催奇形性のないスピラマイシンの投与が多く研究者から推奨されている (妊娠 18 週まで) (5)。なお、18 週以降ではピリメタミン/スルファジアジン/folinic acid への切替えが推奨されている。

スピラマイシンの構造式を [図 1](#) に示す。

図 1 - スピラマイシンの構造式



スピラマイシンの各成分の R 側鎖、分子量及び含量

成分名	R	分子量	% ^a
スピラマイシン I	H	843.05	≥ 80.0
スピラマイシン II	COCH ₃	885.09	≤ 5.0
スピラマイシン III	COC ₂ H ₅	899.12	≤ 10.0

a 欧州薬局方 6.4 版 2009 年

本申請にあたって、効力を裏付ける試験に関しては、社内試験は *in vitro* 試験 2 試験のみであったので、文献情報も用い、主にヒト細胞株感染トキソプラズマに対する *in vitro* 試験成績並びに妊娠マウス及び妊娠アカゲザルに感染させたトキソプラズマに対する *in vivo* 試験成績からスピラマイシンの効力を評価した。副次的薬理試験に関しては、社内で行われた非臨床薬理試験は存在しないため、すべて文献情報を用い、ヒト白血球の機能に及ぼす成績を評価し、それらの作用がスピラマイシンの効力及び安全性に及ぼす影響を考察した。安全性薬理試験に関しては、心血管系及び呼吸系への影響を検討する試験を実施した。本試験は安全性薬理試験ガイドライン通知（2001 年）以前の 19██ 年に実施されており、GLP 非適用試験である。また、中枢神経系への影響は検討していないため、カニクイザルの静脈内投与毒性試験の一般状態の所見から考察した。薬物動態 (PK) 試験に関しては、社内で行った試験がなかったため、文献情報を用いてマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、ブタ、ヒツジ及びウシにおいて吸収・分布・代謝・排泄及び薬物動態学的相互作用を評価した。その他、イヌでのトキシコキネティクス (TK) 試験を併せて評価した。胎盤通過性に関しては、妊娠サルを用いた試験成績から評価した。毒性試験については単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験を経口あるいは静脈内投与で実施した。本剤の毒性試験は、静脈内投与毒性試験の一部を除き GLP の導入前に実施されたものである。なお、文献あるいは試験報告書で用

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

いたスピラマイシンの単位が重量表記あるいは力価表記のみの場合は、1gが約3MIUに相当すると推定される。

2 薬理試験

以下にスピラマイシンの薬理作用についてのまとめを記載する。

2.1 効力を裏付ける試験 - *in vitro*

ヒト由来 HeLa 細胞若しくは線維芽細胞を用いた試験では、スピラマイシンのトキソプラズマ増殖抑制作用には時間依存性がみられた。スピラマイシンは、1日処理では非常に弱い効果しか示さなかったが、4日若しくは7日以上処理では5 µg/mL以下でも増殖抑制作用がみられた。ヒト線維芽細胞株MRC5を用いた試験では、4日間処理により低濃度で増殖抑制作用が認められ、そのIC₅₀は40 ng/mLであった。スピラマイシンはサル由来細胞を用いた試験においても、時間依存性のトキソプラズマ増殖抑制作用を示した(2.1.5項)。これらの4~7日間以上の処理によるスピラマイシンの抗トキソプラズマ活性は、*in vivo*での血中濃度(例えばヒトで1~3.5 µg/mL(6))に近い濃度で認められた([Module 2.6.2.2.1]参照)。

2.2 効力を裏付ける試験 - *in vivo*

*In vivo*試験では、マウスの急性及び慢性トキソプラズマ感染モデルにおいて、スピラマイシンはマウスの生存率を高め、脳内シスト数を顕著に低下させた。トキソプラズマ感染妊娠マウスにおいては、スピラマイシンの投与により、出産動物数、産児数、新生児体重及び生後5ヵ月生存率が感染対照群より増加し、生後5ヵ月における抗トキソプラズマ抗体陽性マウス数は低下した。トキソプラズマ感染妊娠ブラジルヨルマウスにおいても、スピラマイシンは胎盤及び胚組織中のトキソプラズマのタキゾイト及びブラディゾイトを顕著に低下させた。以上のことから、スピラマイシンは*in vivo*トキソプラズマ感染モデルにおいて抗トキソプラズマ活性を示し、感染妊娠個体への投与により、胎児への感染を防御することが示唆された。また、スピラマイシンは、トキソプラズマ感染妊娠アカゲザルにおいても効果を示し、胎児への感染の確認後から出産までの母動物へのスピラマイシンの投与により、出産時に感染が確認された出生児は5例中0例であった。

マウスの試験では、スピラマイシンは混餌投与又は飲水投与であるため、投与時の薬物曝露量をヒトでの曝露量と比較することは難しい。一方、アカゲザルでは、20 mg/kg/日の1日2回間欠静脈内投与で抗トキソプラズマ活性を示しており、それに近い用量(約16.7 mg/kg/日)を妊娠アカゲザルに1日2回24日間間欠静脈内投与し、25日目に約8.3 mg/kgを静脈内投与したときの、定常状態での血清中スピラマイシン濃度はC_{max}で約1.6 µg/mL、トラフ値で0.24 µg/mLであった(n=1)(7)。一方、若年被験者に0.5 gを1日3回反復静脈内投与したときの最終投与後のスピラマイシンの血清中濃度はC_{max}が3.10 µg/mL、C_{min}が0.37 µg/mL(10例の平均値)(8)であり、また、トキソプラズマ感染者への治療目的で投与したときに通常得られる血清中濃度は3.0~3.5 µg/mLであった(7)。したがって、アカゲザルの母子においてトキソプラズマ感染に対する有効性が得られた用量におけるスピラマイシンの

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

血清中濃度はヒトへの投与で十分得られる濃度であり、この動物データは、妊婦への有効性が期待できる根拠になると考えられる（[Module 2.6.2.2.2]参照）。

2.3 作用機序

スピラマイシンを含め、マクロライドの抗トキソプラズマ活性の作用機序は明らかになっていない。考えられる機序としては、抗菌活性と同様のリボソームのタンパク合成阻害又はミトコンドリアでのタンパク合成阻害であるが、前者に関しては耐性株を用いた検討等において、抗トキソプラズマ活性と必ずしも一致しなかったこと、後者に関しては抗トキソプラズマ活性を示す濃度でミトコンドリア機能に影響を及ぼさないことから、これらはマクロライドの作用機序である可能性は低いと考えられる。最近考えられている機序は、トキソプラズマに特異的に存在する細胞小器官であるアピコプラストにおけるタンパク合成阻害作用である。エリスロマイシン A の誘導体を用いた試験において、アピコプラスト 50S リボソームサブユニットへの結合性と抗トキソプラズマ活性間に構造活性相関があることが示唆されており (9)、アピコプラストがマクロライドの抗トキソプラズマ活性の標的であることが推察される。また、スピラマイシンは、白血球の殺菌活性の増強作用など、リボソームを介さない二次的な機序を介して抗トキソプラズマ活性を発揮する可能性も考えられる（[Module 2.6.2.2.3]参照）。

2.4 耐性

ヒト線維芽細胞内で増殖中のトキソプラズマを突然変異誘発剤であるエチルニトロソ尿素で処理し、生存した原虫をスピラマイシン存在下で培養した結果、*in vitro* においてスピラマイシン耐性のトキソプラズマが出現した。このスピラマイシン耐性株はアジスロマイシンに対して交差耐性を示し、クリンダマイシンに対しては野生株と同様の感受性を示した（[Module 2.6.2.2.4]参照）。

2.5 副次的薬理試験

マクロライドによる免疫細胞の機能やサイトカイン放出等免疫調節に関しては多くの知見が報告されている (10)。スピラマイシンのヒト白血球機能若しくは単球からのサイトカインの放出に対する作用は、いずれの試験でも全体的にみて、比較対照薬であるエリスロマイシンを主としたマクロライドと同様であった（[Module 2.6.2.3]参照）。

2.6 安全性薬理試験

中枢神経系に関して、カニクイザルの 5 日間静脈内投与毒性試験において、一般状態の変化として 0.24 MIU (= 68.8 mg) /kg/日 (0.12 MIU (= 34.4 mg) /kg、1 日 2 回) 以上で流涎、嘔吐発作が、0.54 MIU (= 154.8 mg) /kg/日 (0.27 MIU (= 77.4 mg) /kg、1 日 2 回) で筋緊張低下、呼吸困難がみられた。スピラマイシンはカニクイザルにおいて脳内に移行しないことが示されており (11)、上記の所見は、中枢神経系への直接の影響による可能性は低いと考えられた。

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

心血管系及び呼吸系に関して、麻酔イヌへの 0.25 MIU (= 71.6 mg) /kg (4 例) の静脈内持続投与により、血圧の低下 (4 例)、左心室圧 (LVP) の最大増加速度 (dLVP/dt) の変化 (1 例で上昇、2 例で低下) 並びに呼吸数及び呼吸流量が増加 (4 例) した。血圧の変化は抗ヒスタミン剤で消失したことから、ヒスタミンの関与が示唆された。また、0.125 MIU (= 35.8 mg) /kg (3 例) では 2 例で収縮期圧が上昇した。麻酔サルへの 0.25 MIU (= 71.6 mg) /kg (雌雄各 2 例) の静脈内持続投与により、雄の 1 例に軽度の血圧低下、雌の 2 例に血圧、心拍数及び dLVP/dt の上昇、投与中に呼吸困難期が観察されたが、主要な変化は動脈圧の軽度の変化であった。0.125 MIU (= 35.8 mg) /kg (雌 2 例) では全例に軽度の血圧上昇、1 例で心拍数、dLVP/dt の上昇、別の 1 例で呼吸数、呼吸流量の一過性の低下がみられた。麻酔サルでの変化をまとめると、0.25 MIU (= 71.6 mg) /kg の投与における主要な変化は血圧の軽度の変化であり、サルはイヌよりもスピラマイシンの忍容性が良好であると考えられた。

0.25 MIU (= 71.6 mg) /kg の約 1/8 の用量である約 8.3 mg/kg をサルに反復静脈内投与したときの C_{max} は約 1.6 $\mu\text{g/mL}$ であり (7)、若年被験者に 0.5 g を反復静脈内投与したときの C_{max} (3.10 $\mu\text{g/mL}$) (8) の約 1/2 である。したがって、サルへの 0.25 MIU (= 71.6 mg) /kg 投与はヒトの数倍の曝露量に相当する用量であると考えられるが、スピラマイシンは既に海外で多くの患者に投与されており、サルで認められた血圧変動等の所見に関する安全性上の懸念は認められていない ([Module 1.6 CCSI]参照)。

3 薬物動態試験

スピラマイシンのPKをマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、ブタ、ヒツジ及びウシにおいて検討した文献並びにイヌでのTK試験成績に基づき、動物における吸収、分布、代謝、排泄及び薬物動態学的相互作用について評価した。

なお、スピラマイシンはラクトン環の3位側鎖が異なる3種類の有機塩基（スピラマイシンI、スピラマイシンII及びスピラマイシンIII）の混合物であるが（[図1](#)参照）、このうち活性を有する主要成分はスピラマイシンI（含有率80.0%以上）である。

3.1 吸収

マウス及びブタにスピラマイシンを経口投与したときの血漿中濃度は、それぞれ投与4及び2時間後で C_{max} に達し（[\[Module 2.6.4.3.1\]](#)及び[\[Module 2.6.4.3.5\]](#)参照）、健康被験者での t_{max} （2～3時間：[\[Module 2.7.2.2.3.1\]](#)参照）とほぼ同様であった。ブタにスピラマイシンを経口投与したときのFは60%、混餌投与で45.4%（[\[Module 2.6.4.3.5\]](#)参照）であった。動物及びヒトにスピラマイシンを経口投与したときの代表的なPKパラメータを表1に示す。用量で標準化した曝露量パラメータ（ C_{max}/D 及びAUC/D）はげっ歯類において比較的低く、イヌでの値はヒトに近かった。

マウスにスピラマイシンを経口又は皮下投与したときの $t_{1/2}$ は1.6～1.9時間であり（[\[Module 2.6.4.3.1\]](#)参照）、ラットに ^{14}C 標識スピラマイシンIを静脈内投与したときの $t_{1/2}$ は約1.7時間であった（[\[Module 2.6.4.3.2\]](#)参照）。また、サルにスピラマイシンを静脈内投与後の $t_{1/2}$ は2時間であった（[\[Module 2.6.4.3.4\]](#)参照）。ヒツジに ^{14}C 標識スピラマイシンを静脈内投与後のスピラマイシンの $t_{1/2}$ は14時間、ウシにスピラマイシンを静脈内投与後の $t_{1/2}$ は9～14時間であった（[\[Module 2.6.4.3.5\]](#)参照）。以上のことから、げっ歯類及びサルでの消失は類似していたが、ヒツジ及びウシでの消失は遅い傾向がみられた。健康被験者に経口投与時の $t_{1/2}$ は約9時間であり（[\[Module 2.7.2.2.3.1\]](#)参照）、げっ歯類及びサルよりも長く、大動物（ヒツジ及びウシ）よりも短いか又は同程度であった。

ラットにスピラマイシンを反復経口投与したとき、血漿中濃度に明らかな蓄積性はみられなかった（[\[Module 2.6.4.3.2\]](#)参照）。イヌにスピラマイシンアジピン酸塩を反復投与したとき、血漿中濃度は用量依存的に増加し、反復投与により増加する傾向が若干みられたが、ばらつきが大きかった。血漿中濃度に明らかな性差はみられなかった（[\[Module 2.6.4.3.3\]](#)参照）。また、非妊娠及び妊娠サルにスピラマイシンを持続静脈内投与したときの血清中濃度推移が類似していることが示唆された（[\[Module 2.6.4.4.5\]](#)参照）。

表 1-動物及びヒトにスピラマイシンを経口投与したときの PK パラメータの要約

パラメータ ^a	マウス	ラット	イヌ	ブタ	ヒト
試験番号又は文献	Chew 2012 (12)	Yankell 1971 (13)	Yankell 1974 (14)	Nielsen 1998 (15)	TDU14412 [Module 5.3.3.1-1]
Dose (mg/kg)	400	100	100	56	12.19 ^b
C _{max} (ng/mL)	15290	3080	19250	5200	2640
C _{max} /D ^c	38.23	30.8	192.5	92.86	216.57
t _{max} (h)	4	3	2.0 ^d	2.0	3.0 ^d
t _{1/2} (h)	1.9	NC	NC	NC	9.23
AUC (ng·h/mL)	60750	7130 ^e	102325 ^f	14400	17400
AUC/D ^c	151.9	71.3	1023.25	257.1	1427.4
V _{SS} /F (mL/kg)	33800	NC	NC	NC	9430
CL/F (mL/h/kg)	6600	NC	NC	NC	828

^a ヒトの曝露量パラメータは日本人女性健康被験者における血漿中スピラマイシン I 濃度 (LC-MS/MS 法)、動物でのパラメータはスピラマイシン濃度 (HPLC 法又は微生物学的分析法) から算出した。

^b 用量 : 3 MIU (スピラマイシン I の含有量として 645.3 mg)/body、平均体重 : 52.94 kg より体重あたりの用量に換算した値

^c 用量で標準化した曝露量パラメータ

^d 中央値

^e AUC₀₋₆

^f AUC₀₋₂₄

3.2 分布

ラットでの組織分布試験では、スピラマイシン経口投与後に高濃度を示した組織は消化管、肝臓、脾臓、膵臓及び肺であり、これらの組織では投与 24 時間後でも高濃度のスピラマイシンが検出された。¹⁴C 標識スピラマイシンを静脈内投与したときの全身オートラジオグラフィーでも脾臓、腎皮質、顎下線、肝臓、肺及び消化管に高い放射能が検出され、投与 24 時間後まで持続する傾向がみられた。また、マウスでの肺組織への移行の検討では、肺組織内スピラマイシンの t_{1/2} は 10 時間で他のマクロライド系薬剤よりも長く、肺組織移行率も他のマクロライド系薬剤よりも高かった ([Module 2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.2] 参照)。また、*in vitro* 及び *in vivo* におけるスピラマイシンの食細胞への取り込みも良好であり ([Module 2.6.4.4.3] 参照)、スピラマイシンの肺感染に対する有効性との関連が示唆された (16)。また、ウシにスピラマイシンを 2 回 (48 時間間隔) 筋肉内投与又は混餌により 7 日間経口投与したとき、いずれの投与経路においても、組織内濃度は緩徐に消失することが示された ([Module 2.6.4.4.1] 参照)。

正常及びトキソプラズマに感染させた妊娠サルにおいて、スピラマイシンは胎盤を通過して胎児に移行した ([Module 2.6.4.4.5]参照)。この結果は、トキソプラズマ症が確認された妊娠女性患者において、スピラマイシンが胎盤を通過し胎児に移行した事実と一致する ([Module 2.7.2.3.1.2.3]参照)。一方、スピラマイシンは脳に移行しなかった。

ウマ、ヒツジ及びウシにおけるスピラマイシンの血清タンパク結合率は、17.3~38.0%であった ([Module 2.6.4.4.4]参照)。これらの値は、ヒトでの結合率 (約 30% : [Module 2.7.2.2.2.1]参照) と類似していた。

3.3 代謝

In vitro 試験系において、スピラマイシンは人工胃液又は酸性下でミカロース部分が加水分解を受け、抗菌活性を有するネオスピラマイシンが生成した ([Module 2.6.4.5.1]参照)。ラット肝ホモジネートやラット及びウサギ肝ミクロソーム中では安定で、他のマクロライド系薬剤と異なり脱アルキル化をほとんど受けないことが示された。一方、スピラマイシン I はラット血漿中では不安定であり、構造解析によりラクトン環の加水分解による不活性な極性代謝物、すなわち、3位の水酸基と 17位のアルデヒド基の間でのヘミアセタール環の生成が推察された ([Module 2.6.4.5.2]参照)。なお、ヒト全血中において室温でインキュベートしたとき、スピラマイシンは安定であった ([Module 2.7.2.2.2.2.2 項]参照)。

In vivo においては、ラットに ^{14}C 標識スピラマイシン I を静脈内投与したとき、微生物学的分析法で測定したときの投与 5 分後の血漿中濃度は放射能濃度の 13.3% であり、消失も速やかであったことから、スピラマイシン I は生体内で不活性化を受けることが示唆された。また、尿中代謝物の約 60% 及び胆汁中代謝物の約 80% が水溶性代謝物であり、未変化体を含む脂溶性化合物の割合は低かった。また、スピラマイシンの誘導体であるピテスピラマイシンをラットに経口投与後の代謝経路を検討したところ、その主要代謝物であるスピラマイシンはミカロース基の加水分解によりネオスピラマイシンとなり、その他のスピラマイシンの代謝経路としてアルデヒド基の還元又はシステイン抱合、ラクトン環の加水分解を受けることが示された。ブタ肝臓中代謝物は主にスピラマイシン由来物質 (ネオスピラマイシンを含む) のアルデヒド基にシステインが抱合して生じたチアゾリジン誘導体であることが示唆された。さらにウシの血漿、乳汁及び組織においてネオスピラマイシンが検出された。一方、サルにスピラマイシンを静脈内投与したとき、投与後初期の血清中抗菌活性はほぼ未変化体によるものであり、活性代謝物の生成が限定的であること、また、 ^{14}C 標識スピラマイシンを静脈内投与したヒツジにおいて不活性な代謝物の生成が少ないことが示唆された ([Module 2.6.4.5.3]参照)。ヒトにおいても、スピラマイシンを経口投与したときネオスピラマイシンが検出されたが、その濃度はスピラマイシンと比較して極めて低かった ([Module 2.7.2.2.3.1 項]参照)。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 試験から、動物及びヒトにおける代謝物としてネオスピラマイシンの生成が認められた。その他のスピラマイシンの代謝経路として、ラクトン環の加水分解による不活性な極性代謝物の生成、システインとの抱合反応によるチアゾリジン誘導体の生成が認められた。

3.4 排泄

ラットに¹⁴C標識スピラマイシンIを静脈内投与したときの投与後48時間までの尿中排泄率は39.6%、投与後72時間までの糞中排泄率は39.8%であった ([Module 2.6.4.6.1]参照)。サルにスピラマイシンを静脈内投与後の尿中排泄率は10 ± 4%であり ([Module 2.6.4.6.2]参照)、健康被験者に静脈内投与したときの尿中排泄率 (約14% : [Module 2.7.2.3.1.4]参照) と類似していた。腎クリアランスは15 ± 4 mL/minであった。

胆管カニューレを装着したラットに¹⁴C標識スピラマイシンを静脈内投与したとき、投与後48時間までの胆汁中排泄率は31.4%で、放射能が胆汁を介して糞中に排泄されることが示唆された。また、イヌにスピラマイシン筋肉内投与後の胆汁中スピラマイシン濃度は血中濃度より高濃度であった ([Module 2.6.4.6.3]参照)。ヒトに経口投与後でも、同様に高濃度の胆汁中スピラマイシン濃度が確認され、スピラマイシンの消失に肝が重要な役割を果たしていることが示唆された ([Module 2.7.2.3.1.4]参照)。

以上のことから、スピラマイシン投与後の尿中未変化体排泄率は少なく、主に肝臓及び胆汁を介して糞中排泄により消失すると考えられた。また、スピラマイシンの胆汁中排泄には、Mrp2が主要に関与し、P-gpは副次的に関与することが示された ([Module 2.6.4.6.5]参照)。

ヒツジに¹⁴C標識スピラマイシンを静脈内投与、及びウシにスピラマイシンを静脈内、筋肉内及び皮下投与したとき、乳汁中への移行がみられ、その濃度は血漿又は血清中濃度より高かった ([Module 2.6.4.6.4]参照)。

3.5 薬物動態学的相互作用

トリアセチルオレアンドマイシンやエリスロマイシンなどの14員環マクロライド系薬剤は、アミノ糖部位の第三級アミンが脱メチル化を受けて生じた反応性代謝物がCYP3A4と複合体を形成することにより薬物代謝酵素活性を阻害することが知られている (17), (18), (19), (20), (21)。この複合体形成の可能性はマクロライドの化学構造と関連した、CYP3A4との結合親和性に依存しており、スピラマイシンを含む16員環マクロライドでは、その構造に含まれる中性糖が第三級アミンとCYP内ヘム鉄との近接を妨害する立体障害となるため、酵素阻害を生じないとされている (17), (18), (19), (20), (21)。このことは、実際にラット、ウサギ、ヤギ及びウシ肝ミクロソーム又はCYP3A発現系を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験により、CYPとスピラマイシンとの複合体形成並びにCYP阻害が認められなかった事実により実証され ([Module 2.6.4.7.1]参照)、さらにヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験においてスピラマイシンがCYP3A4基質の代謝を阻害しなかったことも一致する ([Module 2.7.2.2.2.4]参照)。

また、ラット及びウサギにスピラマイシンを反復投与したとき、CYP誘導はみられなかった ([Module 2.6.4.7.2]参照)。このことは、*in vitro* 試験系において、ヒト初代培養肝細胞とスピラマイシンをインキュベートしたとき、CYP3A発現量の誘導がみられなかった事実とも一致している ([Module 2.7.2.2.2.4]参照)。

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

以上より、スピラマイシンは、14員環マクロライド系薬剤などと異なり、CYPを介した薬物相互作用を生じるリスクが低い又はほとんどないものと考えられる。これは、臨床PK試験においてスピラマイシンによるCYPを介した他剤との薬物相互作用がみられていない事実 ([Module 2.7.2.2.6.2]参照)と一致する。

4 毒性試験

スピラマイシンの毒性試験については、経口投与用のスピラマイシン（脂溶性スピラマイシン）及び静脈内投与用の化合物であるスピラマイシンアジピン酸塩を用いて、単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験を経口あるいは静脈内投与で実施した。なお、本剤の毒性試験は、静脈内投与毒性試験の一部を除き GLP 導入前に実施されたものである。これらの試験は、公表文献と特に指定しない限り、サノフィ社（前の社名は Rhône Poulenc）で実施された。

4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験については、マウス、ラット及びイヌを用いて経口あるいは静脈内投与で評価した。

マウスの単回静脈内投与試験では、スピラマイシンアジピン酸塩の投与終了後 30 分間以内に死亡がみられ、概略の致死量は 185 mg/kg、LD₅₀は 220 mg/kg（0.80 MIU/kg に相当）であった。死亡例の剖検では異常は認められなかった。一般状態観察では、運動性低下、運動性亢進、運動失調、振戦、呼吸困難及び攻撃的傾向、跳躍及び流涎あるいは流涙が認められた。これらの症状はいずれも投与後 1～2 時間には消失した。生存例の体重増加及び剖検に異常は認められなかった。

ラットの単回経口投与試験では、スピラマイシンの概略の致死量は 8000 mg/kg、LD₅₀は 9400 mg/kg と推定された。2000 mg/kg 以上の群で食欲不振、下痢及び元気消失がみられた。死亡前に、結膜、耳介及び下肢の蒼白、衰弱、呼吸速度及び直腸温低下、心不全が観察された。6000 mg/kg 以上の群では投与後に体重減少がみられたが、その後回復傾向が認められた。体重減少は摂餌量や摂水量の低下、排糞（固形）減少や下痢と関連していた。死亡例の平均体重は減少し、消化管は急性炎症を起こし暗黄色の液体を含み拡張した。胃には未吸収のスピラマイシンが認められ、一部 CO₂を含むガスが胃以外に、盲腸や結腸にみられる例もあった。器官重量では、小腸、盲腸及び結腸の重量減少がみられた。また、屍体及び多くの器官の水分含量減少がみられ、スピラマイシンの致死量では、下痢及び体液減少を伴う急性胃腸炎が認められた。消化管の病理組織学的検査では、消化管の固有層の毛細血管及び粘膜下組織の血管の著しい拡張、特に小腸、盲腸及び結腸では表層上皮の顕著な剥離が観察された。盲腸固有層には円形細胞の浸潤がみられ、肝細胞や肝類洞、腎曲尿細管に限局性の壊死が認められた。

ラットの単回静脈内投与では、スピラマイシンアジピン酸塩の投与終了後 30 分間以内に死亡が発生し、LD₅₀は投与速度が 1 mL/min の場合は 330 mg/kg（1.21 MIU/kg に相当）、0.2 mL/min の場合は 350 mg/kg（1.28 MIU/kg に相当）であったが、概略の致死量はいずれも 255 mg/kg で投与速度による差はみられなかった。死亡例の剖検では肺と肝臓にうっ血がみられた。全ての薬物投与群の雌雄で運動失調、頭の上下運動、咀嚼及び流涎が、時に流涙及び呼吸困難を伴って観察された。さらに、運動性低下、振戦及び急な跳躍が時々みられた。死亡例の剖検、症状の性質及び発現頻度には投与速度に起因すると

考えられる差はみられなかった。また、これらの症状はいずれも投与後1時間に消失した。生存例の体重増加及び剖検に異常は認められなかった。

イヌの経口投与試験では、スピラマイシン投与後 15～30 分に 1000 mg/kg 群の 1 例を除く全例に嘔吐がみられたが、死亡はみられなかった。ペントバルビタールナトリウム塩投与により嘔吐反射を抑制した結果、6000 mg/kg 以上の群では全例が死亡したが、4000 mg/kg 以下の群では全例とも生存した。本試験でのスピラマイシンの概略の致死量は 6000 mg/kg、LD₅₀は 5200 mg/kg と推定された。一般状態はラットと同様な所見が観察された。無麻酔下では嘔吐が発現した。剖検では胃に急性のうっ血がみられ、胃はガス、液体や未吸収のスピラマイシンで拡張し、内容物を含む胃重量は増加した。小腸も著しく拡張、黄色液体で充満し、内容物を含む全重量は増加した。一方、結腸内はほぼ空でその重量（黄色液体も含む）は減少した。消化管組織の水分含量は減少した。胃小窩を覆う円柱上皮の剥離を伴う胃の固有層及び粘膜下層に急性うっ血がみられた。肝臓の主に小葉中心領域に急性の空胞変性、腎尿細管に壊死がみられた。

イヌの単回静脈内投与試験（5 時間間隔で 2 回投与）では、スピラマイシンアジピン酸塩の 2 MIU/kg/日の雌 1/2 例が 1 回目の投与中に顔面浮腫及び振戦を呈し死亡し、剖検では肝臓、腎臓（広汎な出血を伴う）及び肺（肺気腫を伴う）に強いうっ血が認められた。投与中に薬物投与群では、ヒスタミン様症状（紅斑、耳の浮腫、顔面浮腫）、流涎、振戦が認められ、鳴き声を発した。投与終了時に側臥位を呈した。症状回復には約 1 時間以上かかった。同群の雌では体重増加はみられなかった。投与後 1 日に AST、ALT、ALP あるいは LDH の増加が各投与群にみられた。生存例の剖検では異常は認められなかった。本試験における概略の致死量は 2 MIU/kg/日、LD₅₀は 2 MIU/kg/日超であった（[Module 2.6.6.2]参照）。

4.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験については、ラットの 1 年間混餌投与試験及び 28 日間静脈内投与試験、イヌの 8 週間及び 28 週間経口投与試験、2 年間混餌投与試験並びに 4 週間静脈内投与試験、サル 5 日間静脈内投与試験を実施し、その毒性を評価した。

ラットの 1 年間混餌投与試験（1 群雌雄各 20 例）では、飼料のみ又はスピラマイシンアジピン酸塩の、約 80、240 及び 720 mg/kg/日を 52 週間混餌投与した。試験期間中、80 mg/kg/日群の雄 1 例が投与 17 週に、720 mg/kg/日群の雄 2 例が投与 24 及び 49 週に死亡した。240 mg/kg/日群の雄 1 例は投与 44 週に瀕死状態となったため安楽殺した。この例の剖検では、頸部に中等度の大きさの腫瘍がみられたが、他に肉眼的な変化は観察されなかった。死亡例を含め、薬物投与との関連性が示唆される剖検所見はみられなかった。投与終了時、720 mg/kg/日群の雌の体重は対照群の約 89%であった。720 mg/kg/日群の雌雄で肝臓、腎臓及び副腎の相対重量のごく軽度な増加が認められ、雌ではさらに脾臓、心臓、

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

甲状腺及び卵巣の相対重量が増加した。本薬投与群の全ての雄で前立腺の相対重量の増加が認められた。720 mg/kg/日群の腎臓では、慢性炎症及び腎症の特徴を示す所見がみられたが、所見の質及び重篤度は対照群と同程度であった。全ての本薬投与群の肝臓ではグリコーゲンが枯渇し、軽度の慢性炎症性変化が認められた。以上、720 mg/kg/日の雌で体重増加抑制が認められたが、他の所見は各群とも毒性学的な意義は低いことから、薬物投与との関連性が明らかではない死亡や安楽殺例を除けば、無毒性量は240 mg/kg/日と考えられた。

ラットの28日間静脈内投与試験（投与期間は32日間に延長）（1群雌雄各10例）及び15日間回復試験（1群雌雄各5例）では、スピラマイシンアジピン酸塩の0（対照）、0.09、0.18及び0.27 MIU/kgを約6時間間隔で1日2回投与（各0、0.18、0.36及び0.54 MIU/kg/日に相当）した。薬物投与に関連した死亡はなく、投与部位の毒性反応も認められなかった。0.36 MIU/kg/日以上群では投与中に流涎及び振戦がみられたが、これらの変化の発現頻度及び重症度は試験の進行と共に低下傾向が認められた。0.54 MIU/kg/日群の雄では、軽度の摂餌量及び体重増加量の減少がみられたが、回復期間中にはいずれも対照群と同程度であった。薬物投与の全群では好中球減少を伴う総白血球減少、0.36 MIU/kg/日以上群では尿素の減少がみられたが、いずれも本薬の抗菌作用による健康状態の改善を反映したものと考えられた。これらの変化は回復期間中にある程度持続して認められた。0.54 MIU/kg/日群で観察された電解質濃度のごく軽度の減少も、腸内細菌叢に対する本薬の抗菌作用により生じた可能性があり、回復期間中には認められなかった。肝臓重量の増加が0.54 MIU/kg/日群の雄にみられたが、肝臓の病理組織学的に異常はみられなかった。脾臓にみられた泡沫状マクロファージは、本薬の高い移行性によって出現したと考えられ、毒性学的意義は低い。スピラマイシンのマクロファージへの高い移行性は他のマクロライドと同様に良く知られている（[Module 2.6.4.4.3]参照）。以上、0.54 MIU/kg/日群でみられた所見は軽度なものであり、多くの場合は回復期間中には認められなかった。その他の変化は、本薬の高い移行性又は薬理作用に起因するものであった。0.54 MIU/kg/日で観察された変化はいずれも軽度であり、そのほとんどが可逆的であった。無毒性量は0.36 MIU/kg/日と判断された。

イヌの8週間反復経口投与試験（1群雌雄各3及び7例）では、スピラマイシンの0（対照）及び500 mg/kg/日を投与した。その結果、500 mg/kg/日群の全例で全身に中毒症状がみられ10例中8例が死亡した。発現した中毒症状として、食欲不振、流涎、嘔吐、下痢、易刺激性及び不機嫌がみられ、死亡の1～2週間前に無気力、蒼白、乾燥性鼻炎、視力障害及び眼底色素消失がみられ、死亡1～2日前には衰弱、暗緑色便、便失禁及び部分硬直がみられた。対照群との比較では、死亡前に体重及び摂餌量減少、貧血及び体脂肪の低下、並びに尿中へのアルブミン、胆汁色素の出現が認められた。病理検査では、肝細胞、類洞及び腎尿管の壊死性変化を伴う肝臓及び腎臓の腫大及び浮腫が認められた。また、脾臓、副腎の腫大及び浮腫がみられ、脾臓では髄外造血がみられた。精巣の重量及び水分含量が減少し、精子形成が抑制された。中毒症状の影響は、骨格筋、心筋、胸腺、甲状腺、脾臓及び眼の脈絡膜層にみられ、体脂肪減少を伴っていた。以上、本試験における無毒性量は500 mg/kg/日未満と考えられた。

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

イヌの28週間経口投与毒性試験(1群雌雄各3例)では、スピラマイシンアジピン酸塩の0(対照)、60、120及び240 mg/kg/日を28週間反復経口投与した。240 mg/kg/日群の雌1例が死亡したが、乳腺膿瘍摘出手術によるショックに起因したもので薬物関連ではないと考えられた。主な毒性症状としては、240 mg/kg/日群で投与初日に胃腸刺激及び体重減少がみられた。ヘモグロビン及びヘマトクリットの軽度の減少が240 mg/kg/日群にみられ、120 mg/kg/日以上群でAST、ALT及びBUNの増加が認められた。剖検では甲状腺及び腎臓の蒼白や膀胱及び腎臓の砂状結石の軽微な変化がみられた。器官重量では120 mg/kg/日群で脾臓相対重量が増加した。病理組織学的検査では120 mg/kg/日以上群に胃の刺激性、肝臓及び腎臓の退行性変化が観察されたが、60 mg/kg/日群は対照群と同等であった。以上、120 mg/kg/日群では胃の刺激性、肝臓及び腎臓の退行性変化などが認められたことから、無毒性量は60 mg/kg/日と考えられた。

イヌの2年間混餌投与試験(1群雌雄各4例)では、スピラマイシンアジピン酸塩の0(対照)、3000、4000、5000、6000 ppmを混餌投与した。投与期間を通して全例が生存し、一般状態は概ね良好であった。摂餌量及び体重への影響は認められなかった。血液学的検査値、血液生化学的検査値及び定性的尿検査値にも異常はみられず、血圧及び心拍数も正常範囲内であった。投与28週及びそれ以降の眼科学的検査で、4000 ppm以上の群の脈絡膜タペタムで種々の程度の欠損による着色斑が認められた。網膜の変化は休薬により回復した。5000 ppm以上の群では試験期間中に多数回にわたり、遠近調節の不全及び光感受性の不全が観察された。投与95週の検査では踏み直り反応及び瞳孔反射試験で全例とも視力が確認された。投与65週以降、5000 ppm以上の群のほとんどの例の舌には青味がかかった斑点が認められた。5000 ppm以上の群では心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎及び膵臓の相対重量が増加した。これら2群の数例では、僧帽弁又は三尖弁の組織の肥厚が肉眼的に観察された。病理組織学的検査では本薬の投与全群で、肝臓、脾臓、腎臓、前立腺、膵臓、リンパ節、胃、胆嚢、胆管、副腎及び小腸の実質細胞及び組織球に空胞化が用量相関性をもって認められ、3000 ppm群では軽微であった。さらに、5000 ppm以上の群の数例に心臓の小動脈壁の肥厚及びより大きな動脈の内側細胞の空胞化がみられたが、3000又は4000 ppm群ではごく少数例であった。5000 ppm以上の群では網膜の空胞化及び萎縮がみられた。眼科学的検査でみられた変化は休薬により回復し、眼の病理組織学的検査では正常範囲内だった。以上、4000 ppm以上で脈絡膜タペタムの着色斑、肝臓、腎臓等の組織の変性所見がみられたことから、無毒性量は3000 ppmと考えられた。

イヌの4週間静脈内投与試験(1群雌雄各3例)では、スピラマイシンアジピン酸塩の0(対照)、0.12、0.18及び0.27 MIU/kgを約6時間間隔で1日2回投与(各々0、0.24、0.36及び0.54 MIU/kg/日に相当)した。0.24 MIU/kg/日群での忍容性は良好でありヒスタミン様の反応(紅斑、耳の浮腫、顔面浮腫など)が若干生じるだけであった。0.36 MIU/kg/日群での忍容性も比較的良好であったが、脾臓及び腎臓に細胞レベルで形態的变化がみられ、本薬の薬理活性とヒスタミン様の反応に関連したものであると考えられた。0.54 MIU/kg/日群では、脾臓の絶対及び相対重量の増加及び傍糸球体細胞の肥大を伴

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

う脾臓マクロファージの明らかな肥大に加えトランスアミナーゼの軽度な増加がみられた。この投与群では静脈局所の忍容性は非常に良好であったが、ヒスタミン様の反応の頻度は明らかに増加した。本薬投与後のスピラマイシンの血漿中濃度には用量依存的に増加し、反復投与により増加する傾向が若干みられたが、ばらつきが大きかった。血漿中濃度には明らかな雌雄差はみられなかった。以上、0.24 MIU/kg/日群ではヒスタミン様の反応が若干生じたが忍容性は良好で、0.36 MIU/kg/日群では脾臓及び腎臓に細胞レベルで形態的変化がみられたことから、無毒性量は0.24 MIU/kg/日と考えられた。

サル5日間静脈内投与試験(1群雌雄各1~2例)では、スピラマイシンアジピン酸塩の0(対照)、0.12、0.18及び0.27 MIU/kgを約5時間間隔で1日2回投与(各々0、0.24、0.36及び0.54 MIU/kg/日に相当)した。スピラマイシン投与中に流涎が規則的にみられ、筋緊張低下、嘔気発作及び呼吸困難が観察されたが、ヒスタミン様反応は認められなかった。投与4日に0.54 MIU/kg/日群の雄1例が死亡したが、同用量を用いた2回目の試験で死亡は認められなかった。薬物投与と死亡の関連性は不明であり事故(闘争)の可能性が示唆された。また、0.54 MIU/kg/日群では、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの軽度減少がみられたが、病理組織学的検査では、スピラマイシン投与に関連する異常は認められなかった。以上、0.24 MIU/kg/日投与によっても流涎や嘔気発作がみられたことから、無毒性量は0.24 MIU/kg/日未満と考えられた([Module 2.6.6.3]参照)。

4.3 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験については、細菌を用いる復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる前進突然変異試験及び染色体異常試験、並びにマウス小核試験を実施し、評価した。

ネズミチフス菌(TA1535、TA1537、TA98及びTA100)を用いて、スピラマイシンの突然変異誘発性をスポットテスト及びインコーポレートテストで検討した。その結果、スポットテスト(100 µg/spot)及びインコーポレートテスト(2、10、50及び250 µg/plate)のいずれも、代謝活性化系の存在下及び非存在下にかかわらず、復帰変異コロニー数は対照群との間に明らかな差はなく、スピラマイシンに突然変異誘発性は認められなかった。

CHO-K1細胞(チャイニーズハムスター卵巣由来細胞)を用いて、スピラマイシンアジピン酸塩によるHPRT(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)遺伝子座の前進突然変異を評価した。試験は2回実施した。1回目の試験では代謝活性化系の存在下及び非存在下で、スピラマイシンの313、625、1250、2500、5000、10000、20000及び40000 IU/mLの濃度で実施した。その結果、いずれの条件下でも、それぞれ10000 IU/mL及び20000 IU/mLの濃度で明らかな細胞毒性作用を示したが、スピラマイシンによる突然変異細胞の出現頻度の増加はみられなかった。また、2回目の試験は、非代謝活性化の条件下ではスピラマイシンの5000、7500、10000、15000及び20000 IU/mLの濃度で、代謝活性化では2500、5000、7500、10000及び15000 IU/mLの濃度で実施した。その結果、1回目の試験と同様に細胞毒性作用を示したが、2回目の試験においても突然変異細胞の出現頻度の増

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

加はみられなかったため、CHO-K1 細胞を用いたスピラマイシンの HPRT 遺伝子座への前進突然変異誘発作用はないと判断された。

CHO-K1 細胞を用いてスピラマイシンアジピン酸塩の染色体異常試験を実施した。代謝活性化系の非存在下ではスピラマイシンの 600、3200 及び 5800 IU/mL の濃度で、また代謝活性化系の存在下では 150、300 及び 600 IU/mL の濃度で実施した。その結果、代謝活性化系の存在下及び非存在下にかかわらず、CHO-K1 細胞株を用いたスピラマイシンの染色体異常誘発作用は認められなかった。

マウスにスピラマイシンアジピン酸塩の 0.21、0.42 及び 0.63 MIU/kg を 1 又は 2 回 (24 時間間隔)、静脈内投与して 24 時間後に骨髓細胞を採取した。その結果、1 及び 2 回の静脈内投与とも、小核を有する多染性赤血球の有意な増加は認められず、スピラマイシンアジピン酸塩に染色体異常誘発性は認められなかった ([Module 2.6.6.4]参照)。

4.4 がん原性試験

ラット (1 群雌雄各 50 例) に、飼料のみ (対照) 又はスピラマイシンの 1500、3000 及び 6000 ppm の混餌を 23 ヶ月間摂取させた。これらの用量はそれぞれスピラマイシンの 0 (対照)、平均で約 92、200 及び 400 mg/kg/日に相当する。投与期間中の一般状態については各群とも異常はみられなかった。投与 6 ヶ月間は薬物投与に起因する死亡はなかった。11 ヶ月後の累積死亡率は対照群、92、200 及び 400 mg/kg/日群で各 12、16、0 及び 5%であったが、23 ヶ月後 (屠殺例も含む) には各 64、56、68 及び 77%を示し、自然死亡率が上昇したため 23 ヶ月後に投与を中止した。試験期間中に死亡又は安楽死した例の剖検でみられた異常のうち最も高い発現頻度を示したのは、腎病変 (肥大、表面顆粒状及び囊腫) であり、対照群では雄で 24%及び雌で 2%、92 mg/kg 群では各 12 及び 4%、200 mg/kg 群では各 38 及び 6%並びに 400 mg/kg 群では各 36 及び 30%に認められた。投与期間中の 92 及び 200 mg/kg 群の平均体重は対照群とほぼ同様であったが、投与 98 週目には対照群に比べ 400 mg/kg 群の雄で-14.3%、また雌で-13.5%となり統計学的にも有意な減少を示した。剖検では主にラットに特有な加齢性変化 (下垂体腫瘍、甲状腺腫、副腎腺腫、上皮小体肥大、腎臓変化、精巣発育不全、リンパ節過形成、乳腺腫瘍) がみられた。病理組織学的検査では、特に乳腺、下垂体、甲状腺及び副腎に良性又は悪性腫瘍が認められたが、対照群及び投与群との各腫瘍発生の比較では薬物投与との関連性は認められなかった。また、非腫瘍病変及び特に雌性生殖器の病変にも薬物投与の明らかな影響は認められなかった。以上、スピラマイシンをラットに最高 400 mg/kg/日までを 2 年間経口投与してもがん原性はみられなかった ([Module 2.6.6.5]参照)。

4.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験については、マウス、ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験を経口 (あるいは混餌) 又は静脈内投与により実施し、その毒性を評価した。

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

スピラマイシンのラット、イヌ（死亡がみられた8週間経口投与試験を除く）、サルにおける反復投与毒性試験において、雌性生殖器への影響はみられていないこと、並びにスピラマイシンアジピン酸を約77日投与した雌雄ラットを交配、分娩させ、出生時及び離乳時の観察並びに剖検を行ったラット胚・胎児発生に関する混餌投与試験において、いずれの生殖発生関連パラメータにも本薬に関連した異常は認められていないこと、本申請におけるスピラマイシンの投与はトキソプラズマ感染症の妊婦に限定されていることから、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

マウス胚・胎児発生に関する経口投与試験では、妊娠マウス（1群17～23例）にスピラマイシンの0（対照）、100、200及び400 mg/kg/日を妊娠5～15日に経口投与した。母動物は分娩させ出生児の観察を実施した。各投与群の妊娠動物に死亡はなかった。400 mg/kg/日群では軽度であるが有意な体重減少を示したが、胚毒性はなく、子宮内の胎児成長や出生後の発達にも影響は認められなかった。哺育期間中の死亡率は低く、生後1ヵ月の生存児数への影響もみられなかった。出生児の体重増加量及び生後1ヵ月の平均体重に変化はなく、催奇形性も認められなかった。以上、400 mg/kg/日で母動物の体重増加抑制が認められたことから、母動物の一般毒性学的影響に関する無毒性量は200 mg/kg/日、母動物の生殖に及ぼす影響及び次世代動物の発生に関する無毒性量は400 mg/kg/日と考えられた。

ラット胚・胎児発生に関する混餌投与試験（1群雌雄20例）では、スピラマイシンアジピン酸の0.7%を含む飼料を混餌投与した。約77日間混餌投与した後、雌雄ラットを交配及び分娩させた。出生時及び離乳時の観察並びに剖検を行ったが異常は認められず、催奇形性作用も認められなかった。

ラット胚・胎児発生に関する経口投与試験では、妊娠ラット（1群17～19例）にスピラマイシンの0（対照）、100、200及び400 mg/kg/日を妊娠5～15日に経口投与した。各投与群とも死亡はみられなかった。200 mg/kg/日以上群の平均体重の減少が認められたが、400 mg/kg/日でも体重減少はごく軽度であった。投与群の妊娠率、平均着床数、吸収胚率、1腹当たりの生存児数は対照群とほぼ同等で、胚毒性は認められなかった。また、生存胎児の平均体重、骨化進行度及び子宮内の胎児成長に影響はなく、催奇形性も認められなかった。以上、400 mg/kg/日投与によっても母動物及び胎児への影響は認められなかったことから、母動物の一般毒性及び生殖に及ぼす影響に関する無毒性量並びに次世代動物の発生に関する無毒性量はいずれも400 mg/kg/日と考えられた。

ラット胚・胎児発生に関する静脈内投与試験では、妊娠ラット（1群各20例）にスピラマイシンの0（対照）、0.09、0.18及び0.27 MIU/kgを妊娠6～15日に1日2回投与（各々0.18、0.36及び0.54 MIU/kg/日に相当）した。ほぼ全投与期間中に0.54 MIU/kg/日群で投与直後に短時間の振戦及び運動失調、投与後に時々流涎がみられたが、死亡は認められなかった。体重増加量及び摂餌量に差はなく、母動物の剖検では薬物投与に関連した異常はなかった。妊娠21日の黄体数、着床数、生存胎児数、吸収胚数、着床前及び着床後死亡率、胎児及び胎盤の重量に薬物投与の影響は認められなかった。以上、

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

0.54 MIU/kg/日投与により母動物に振戦、運動失調、流涎がみられたことから、母動物の一般毒性学的影響に関する無毒性量は 0.36 MIU/kg/日、母動物の生殖に及ぼす影響及び次世代動物の発生に関する無毒性量は 0.54 MIU/kg/日と考えられた。

ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験では、妊娠ウサギ（1群 12～20例）にスピラマイシンの 0（対照）、100、200 及び 400 mg/kg/日を妊娠 6～16 日に経口投与した。各投与群とも死亡はみられなかった。200 mg/kg/日以上群の数例に摂餌量及び摂水量の減少が認められた。400 mg/kg/日群の体重増加はみられなかった。妊娠 28 日（最終投与後 12 日）の剖検では、投与群に盲腸の拡張がみられ、盲腸重量の増加がみられた。盲腸拡張はスピラマイシン投与により腸内細菌叢に変化が誘発されたためであり、200 mg/kg/日群で 22% 及び 400 mg/kg/日群で 33% の例に流産又は全吸収胚がみられ剖検予定日まで妊娠維持ができなかった。これらの所見は他の抗生物質の知見とも一致し、特にスピラマイシンのようなグラム陽性菌に対して活性を示すものは、ウサギの消化管に変化を誘発し結果的に流産や胚毒性が生じるため、この動物種ではこれら抗生物質の催奇形性試験の実施は困難であることが良く知られている (22), (23), (24)。明らかな盲腸拡張は、離乳後まもない無菌ウサギにも生じ、交配や繁殖させることは非常に困難であることも報告されている (25)。200 及び 400 mg/kg/日群では胎児毒性がみられた。流産あるいは全吸収胚のため、剖検予定日まで妊娠を継続できなかった割合は各々 22 及び 33% であった。200 mg/kg/日以上群では子宮内の胎児の成長に影響はみられなかった。400 mg/kg/日群では子宮内の胎児成長に阻害作用があった。発育不全の胎児の割合は対照群より有意に高く、生存胎児の平均体重は対照群より有意に低かった。しかし、骨化が軽度遅延した発育不全胎児を除けば胎児の骨化は正常であった。催奇形性はみられなかった。400 mg/kg/日群にみられた唯一の異常は軽微な右心室拡張であった。200 mg/kg/日以下の群では、奇形を有する胎児の割合は対照群に比べ高くなかった。100 mg/kg/日群では胚及び胎児毒性はみられなかった。以上、400 mg/kg/日投与によっても催奇形性は認められなかったが、200 mg/kg/日投与により母動物で流産や吸収胚数の増加が認められたことから、母動物の一般毒性学的影響及び生殖に及ぼす影響に関する無毒性量は 100 mg/kg/日、次世代動物の発生に関する無毒性量は 200 mg/kg/日と考えられた。

ウサギ胚・胎児発生に関する静脈内投与試験では、妊娠ウサギ（1群 14～16例）にスピラマイシンアジピン酸塩の 0（対照）、0.09、0.18 及び 0.27 MIU/kg を妊娠 6～19 日に 1 日 2 回投与（各々 0.18、0.36 及び 0.54 MIU/kg/日に相当）した。試験期間中、対照群の 4 例及び高用量群の 2 例が死亡又は瀕死状態のため切迫安楽殺されたが、剖検では薬物投与に関連する異常は認められなかった。本薬投与の全群で投与中及び投与直後に流涎、瞬目回数増加、呼吸促迫及び不随意咀嚼が観察された。母動物の体重増加量及び摂餌量には薬物投与による変化は認められなかった。妊娠 29 日の母動物の剖検、着床数、生存胎児数、着床前及び着床後死亡率、胎児体重及び胎盤重量にも本薬による影響はみられなかった。胎児観察や骨格観察では少数例に所見がみられたが、そのタイプと発生頻度のほとんどは当該施設のこの種の背景データに認められるものであった。以上、0.18 MIU/kg/日投与により母動物で流涎、瞬目回数増加、呼吸促迫及び不随意咀嚼が認められたことから、母動物の一般毒性学的影響に関する無毒

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

性量は 0.18 MIU/kg/日未満、母動物の生殖に及ぼす影響及び次世代動物の発生に関する無毒性量は 0.54 MIU/kg/日と考えられた ([Module 2.6.6.6]参照)。

出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験は実施されていないが、マウス胚・胎児発生に関する経口投与試験では、胎児の器官形成期にスピラマイシンを投与後、自然分娩させた出生児の 1 ヶ月間観察では生後の発達（生存率、体重）に異常はみられていない。

5 総括及び結論

薬理試験では、スピラマイシンは *in vitro* において 4~7 日間処理により、5 µg/mL 以下でも抗トキソプラズマ活性を示した。*In vivo* では、トキソプラズマ感染妊娠マウスにおいて、スピラマイシンの投与により、新生児体重及び生後 5 ヶ月生存率が増加し、抗トキソプラズマ抗体陽性出生児数は低下した。トキソプラズマ感染妊娠ブラジルヨルマウスにおいては、スピラマイシンは胎盤及び胚組織中のトキソプラズマのタキゾイト及びブラディゾイトを顕著に低下させた。アカゲザルの母子においては、胎児への感染の確認後から出産までの母動物へのスピラマイシンの反復静脈内投与 (20 mg/kg/日、1 日 2 回) により、出産時に感染が確認された出生児は 5 例中 0 例であった。この用量に近い約 16.7 mg/kg/日のサルへの 1 日 2 回反復静脈内投与時の C_{max} は約 1.6 µg/mL、トラフ値は 0.24 µg/mL であり、これらの濃度はヒトへの投与 (0.5 g の 1 日 3 回反復静脈内投与) で十分得られる濃度であった (C_{max} : 3.10 µg/mL、 C_{min} : 0.37 µg/mL)。以上のことから、スピラマイシンが抗トキソプラズマ活性を示す *in vitro* 濃度及び *in vivo* での血清中濃度は、ヒトへの投与により十分達成可能な濃度であり、トキソプラズマ感染妊娠動物への投与により胎児への感染を防御する可能性が示唆されたことから、ヒトにおいて、妊婦から胎児への垂直感染予防における有効性が期待される。

安全性薬理試験では、スピラマイシンの投与により認められた主要な変化は麻酔サルにおける血圧の軽度の変化であり、これはヒトの数倍の曝露量に相当する用量で発現すると考えられるが、海外での豊富な臨床成績及び安全性情報を考慮すると、トキソプラズマに感染した妊娠女性への投与により重篤な副作用が発現する可能性は低いと推察される。

マウス及びブタにスピラマイシンを経口投与したときの t_{max} は 2~4 時間で、ブタに経口投与したときの F は 45.4~60% であった。用量で標準化した曝露量パラメータ (C_{max}/D 及び AUC/D) はげっ歯類において比較的 low、イヌでの値はヒトに近かった。 $t_{1/2}$ はげっ歯類及びサルで類似していたが、ヒツジ及びウシでは遅い傾向がみられた。ラットにスピラマイシンを反復経口投与したとき、血漿中濃度に明らかな蓄積性はみられなかった。イヌにスピラマイシンアジピン酸塩を反復投与したとき、血漿中濃度は用量依存的に増加し、反復投与により増加する傾向が若干みられたが、ばらつきが大きかった。血漿中濃度に明らかな性差はみられなかった。また、非妊娠及び妊娠サルでの血清中濃度推移は類似していることが示唆された。

ラットでの組織分布試験において、スピラマイシンは組織に広範かつ良好に分布することが示された。マウスでの肺組織内スピラマイシンの $t_{1/2}$ は 10 時間で他のマクロライド系薬剤よりも長く、肺組織移行率も高かった。また、*in vitro* 及び *in vivo* におけるスピラマイシンの食細胞への取り込みも良好であった。正常及びトキソプラズマに感染させた妊娠サルにおいて、スピラマイシンは胎盤を通過して胎児に移行した。このことは、上述のサルを用いた薬効薬理試験において、トキソプラズマ感染に対するスピラマイシンの有効性がみられた事実を支持している。一方、スピラマイシンは脳に移行しなかった。ウマ、ヒツジ及びウシにおけるスピラマイシンの血清タンパク結合率は、17.3~38.0% であった。

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

In vitro 試験系において、スピラマイシンは人工胃液又は酸性下でミカロース基が加水分解を受け、抗菌活性を有するネオスピラマイシンが生成した。また、ラット肝ホモジネートやラット及びウサギ肝ミクロソーム中では安定で、他の多くのマクロライド系薬剤と異なり脱アルキル化をほとんど受けないことが示された。*In vivo* 試験系においては、ラットに ^{14}C 標識スピラマイシンを静脈内投与したときの尿及び胆汁中にスピラマイシンを含む脂溶性化合物の割合は低かった。一方、サルにスピラマイシンを静脈内投与したとき、投与後初期の血清中抗菌活性はほぼ未変化体によるものであり、活性代謝物の生成が限定的であること、また、 ^{14}C 標識スピラマイシンを静脈内投与したヒツジにおいて不活性な代謝物の生成が少ないことが示唆された。動物ではミカロース基の加水分解により代謝物としてネオスピラマイシンが、次いでラクトン環の加水分解による不活性な極性代謝物の生成、システインとの抱合反応によるチアゾリジン誘導体の生成が認められた。

ラットに ^{14}C 標識スピラマイシン I を静脈内投与したときの放射能は主に胆汁を介して糞中に排泄され、サルにスピラマイシンを静脈内投与後においても未変化体の尿中排泄は少なく、主に肝臓及び胆汁を介して糞中に排泄されると考えられた。スピラマイシンの胆汁中排泄には、主に **Mrp2** が関与し、**P-gp** は副次的に関与することが示された。また、ヒツジ及びウシにおいて、乳汁中への移行が認められた。

ラット、ウサギ、ヤギ及びウシ肝ミクロソーム又は **CYP3A** 発現系を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験により、**CYP** とスピラマイシンとの複合体形成並びに **CYP** 阻害は認められなかった。また、ラット及びウサギにスピラマイシンを反復投与したとき、**CYP** 誘導はみられなかった。

毒性試験については、経口投与あるいは静脈内投与による単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験を実施し、スピラマイシンの毒性プロファイルを検討した。予定臨床経路である経口投与による単回及び反復投与毒性試験では、ラット及びイヌとも主に共通して消化管への影響がみられ、単回投与の概略の致死量はラットで 8000 mg/kg、イヌで 6000 mg/kg、反復投与の無毒性量はラットで 240 mg/kg/日、イヌで 60~150 mg/kg/日と考えられた。また、イヌでは 200 mg/kg/日以上で脈絡膜タペタムに異常がみられたが、ヒトにはタペタムは存在しないため臨床的な意義はないと考えられた。静脈内投与による反復投与毒性試験では、イヌにおいて本薬の薬理活性及びヒスタミン様の反応に関連した変化がみられたが、サルの静脈内投与及び各種動物の経口投与試験では同様な変化は認められなかったため、今回の申請適用経路の経口投与では临床上問題となる毒性とは考えられなかった。妊娠マウス、ラットあるいはウサギの胚・胎児に関する試験では、経口投与（最高用量 400 mg/kg/日）及び静脈内投与（最高用量 0.54 MIU/kg/日）とも胚毒性及び催奇形性は認められなかった。妊娠ウサギでは 2400 mg/kg/日を経口投与した際に胚毒性がみられたが、グラム陽性菌に対して活性を示す抗生物質では、ウサギの消化管に変化を誘発し結果的に流産や胚毒性が生じることが良く知られていること、またウサギ静脈内投与では認められなかったことから、この胚毒性は動物種及び投与経路に特異的なものと考えられた。なお、スピラマイシンの出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験は実施されていないが、マウス胚・胎児発生に関する経口投与試験では、胎児の器官形成期に本薬投与後、自然分娩させた出生児の 1 ヶ月間観察で生後の発達（生存率、体重）に異常はみられていない。また、本薬の出生前及び出生後の発

2.4 非臨床試験の概括評価 XRP5337 - スピラマイシン

生への影響について、海外での製造販売後の有害事象に関する情報、文献報告等を確認した結果、母体、胎児又は出生児に対する本薬の安全性に問題があることを示唆する情報は認められなかった。

しかし本薬には乳汁中への移行が知られているため、授乳期間中の使用については添付文書の使用上の注意（案）に適切に反映する予定である。また、妊婦への投与は出産までが原則であることから、乳汁中への移行によるスピラマイシンの影響が生じる懸念は低いと考えられた。本薬の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験並びにラットがん原性試験の結果から、ヒトでの発がんリスクは極めて低いと考えられた。本薬の光毒性については、本薬は 290～700 nm で光吸収を示さず、光毒性の懸念はないと考えられた。

結論として、スピラマイシンは妊婦から胎児への垂直感染予防における有効性が期待される。また、本薬の非臨床毒性プロファイル、並びに海外での豊富な臨床成績及び安全性情報から、妊婦のトキソプラズマ症に対する治療においてスピラマイシンは安全に投与可能であると判断した。

6 参考文献一覧

1. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25 (2):264-96.
2. 産婦人科診療ガイドライン 産科編 2017: 日本産科婦人科学会／日本産婦人科医会編集・監修. 2017:345-9.
3. 矢野明彦; 先天性トキソプラズマ症. 矢野明彦編. 日本におけるトキソプラズマ症. 福岡: 九州大学出版会. 2007:25-67.
4. Labro MT. Pharmacology of spiramycin a comparison with other macrolides. *Drug Invest*. 1993;6(Suppl. 1):15-28.
5. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2008;47:554-66.
6. Derouin F, Chastang C. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32 (3):303-7.
7. Schoondermark-Van de Ven E, Galama J, Camps W, Vree T, Russel F, Meuwissen J, et al. Pharmacokinetics of spiramycin in the rhesus monkey: transplacental passage and distribution in tissue in the fetus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(9):1922-9.
8. Frydman AM, Le Roux Y, Desnottes JF, Kaplan P, Djebbar F, Cournot A, et al. Pharmacokinetics of spiramycin in man. *J Antimicrob Chemother*. 1988;22 (Suppl B):93-103.
9. Lee Y, Choi JY, Fu H, Harvey C, Ravindran S, Roush WR, et al. Chemistry and biology of macrolide antiparasitic agents. *J Med Chem*. 2011;54:2792-804.
10. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):590-615.
11. Schoondermark-Van de Ven E, Melchers W, Camps W, Eskes E, Meuwissen J, Galama J. Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(9):1930-6.
12. Chew WK, Segarra I, Ambu S, Mak JW. Significant reduction of brain cysts caused by *Toxoplasma gondii* after treatment with spiramycin coadministered with metronidazole in a mouse model of chronic toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(4): 1762-8.
13. Yankell SL, Leung FC, Gardner JM, Paor WS. Spiramycin excretion in animals: I. A single oral dose in rats. *J Dent Res*. 1971; 50(5): 1359.
14. Yankell SL, Leung FC, Gardner JM, Paor WS. Spiramycin excretion in animals: III. A single oral dose in dogs. *J Dent Res*. 1974; 53(2): 364-8.

15. Nielsen P, Gyrd-Hansen N. Bioavailability of spiramycin and lincomycin after oral administration to fed and fasted pigs. *J vet Pharmacol Therap.* 1998; 21: 251-6.
16. Brook I. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of spiramycin and their clinical significance. *Clin Pharmacokinet.* 1998;34(4):303-10.
17. Pessayre D, Larrey D, Funck-Brentano C, Benhamou JP. Drug interactions and hepatitis produced by some macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1985; 16(Suppl A): 181-94.
18. Anadon A. Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Res Vet Sci.* 1999; 66: 197-203.
19. 杉山正康 編著. 第 1 章 薬動態学的相互作用. (3)マクロライド系. 第 3 版 薬の相互作用としくみ. 医歯薬出版; 1999; p 78-81.
20. Rosenstiel NA, Adam D. Macrolide antibacterials. Drug interactions of clinical significance. *Drug Safety* 1995; 13(2): 105-22.
21. Babany G, Larrey D, Pessayre D. Macrolide antibiotics as inducers and inhibitors of cytochrome P-450 in experimental animals and man. In: *Progress in Drug Metabolism Vol. 11.* ed. Gibson GG. London: Taylor and Francis; 1988. p 61-98.
22. Brown DM, Harper KH, Palmer AK, Tesh SA. Effect of antibiotics upon pregnancy in the rabbit. *Tox Appl Pharmac.* 1968;12:295.
23. Gray JE, Lewis C. Enigma of antibiotic-induced diarrhea in the laboratory rabbits. *Tox appl Pharmac.* 1966;8:342.
24. Madissoon H, Johnston CD, Scott WJ, Holme I, Pindel M. Toxicologic and teratologic study on antibiotics in rabbits. *Tox appl Pharmac.* 1967;10:379.
25. Luckey TD. Germfree life and gnotobiology. Academic Press, New York, Londres. 1963:280-82.