フィラジル皮下注 30 mg シリンジ

2.4　非臨床試験の概括評価

シャイアー・ジャパン株式会社

目次

目次 ……2
表一覧 ……3
図一覧 ……4
2.4　非臨床試験の概括評価 ……5
2.4.1　非臨床試験計画の概略 ……7
2.4.2　薬理試験 ……8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 ……8
2.4.2.1.1　ブラジキニン受容体との相互作用 ……8
2.4.2.1.2　ブラジキニン拮抗作用 ……9
2.4.2.2 副次的薬理試験 ……10
2.4.2.2.1　受容体結合プロファイル ……10
2.4.2.3 安全性薬理試験 ……11
2.4.2.3.1　安全性薬理プロファイル ……11
2.4.2.3.2　心血管系に及ぼす作用 ……12
2.4.2.3.3　薬力学的相互作用 ……14
2.4.3　薬物動態試験 ……14
2.4.3.1 分析法 ……14
2.4.3.2 吸収 ……15
2.4.3.3. 分布 ……16
2.4.3.4 代謝 ……17
2.4.3.5 排泄 ……17
2.4.3.6 薬物動態学的相互作用 ……18
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 ……20
2.4.4.2.1　マウス ……21
2.4.4.2.2　ラット ……22
2.4.4.2.3　イヌ ……26
2.4.4.3 標的臓器に対する毒性 ……29
2.4.4.3.1　腎毒性 ……29
2.4.4.3.2　生殖器官に及ぼす作用 ……30
2.4.4.4 動物及びヒトにおけるイカチバント，M1，及び M2 の相対的曝露量 ……32
2.4.4.5 遺伝毒性試験 ……35
2.4.4.6 がん原性試験 ……36

2.4.4.6.1 マウス 36
2.4.4.6.2 ラット 38
2.4.4.7 生殖発生毒性試験 39
2.4.4.7.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験 40
2.4.4.7.2 胚及び胎児発生に関する試験 40
2.4.4.7.3 出生前及び出生後の発生に関する試験 41
2.4.4.8 局所刺激性試験 42
2.4.4.9 その他の毒性試験 43
2.4.4.9.1 抗原性試験 43
2.4.4.9.2 新生児を用いた試験 43
2.4.4.9.3 代謝物の毒性試験 44
2.4.4.9.4 不純物の毒性試験 45
2.4.4.9.5 非天然アミノ酸—単回投与毒性試験 46
2.4.4.9.6 光毒性試験 47
2.4.4.9.7 非臨床試験で使用した材料 47
2.4.4.9.8 試験の実施 47
2.4.5 総括及び結論 47
2.4.6 参考文献 49

表一覧

表 2.4-1 [3H]–ブラジキニンの受容体結合の置換に関する IC50 値 (nM) 8
表 2.4-2 B1 又は B2 受容体を含む摘出臓器におけるイカチバントの阻害及びアゴニスト作用 9
表 2.4-3 In Vivo 安全性薬理試験のまとめ 11
表 2.4-4 イカチバントの単回投与毒性試験 19
表 2.4-5 イカチバントの反復投与毒性試験 20
表 2.4-6 イカチバント，M1 及び M2 の臨床での血漿中曝露量 33
表 2.4-7 ヒトと反復投与毒性試験及びがん原性試験の NOAEL/LOAEL における曝露量の比較 34
表 2.4-8 イカチバントを用いた遺伝毒性試験 36
表 2.4-9 イカチバントの生殖発生毒性試験 39

図一覧

図 2.4-1　イカチバントの構造……5
図 2.4-2　ブラジキニンの構造……6
図 2.4-3　放射性標識部位及び主要代謝物 M1 及び M2 の構造を示したイカチバントの構造……17

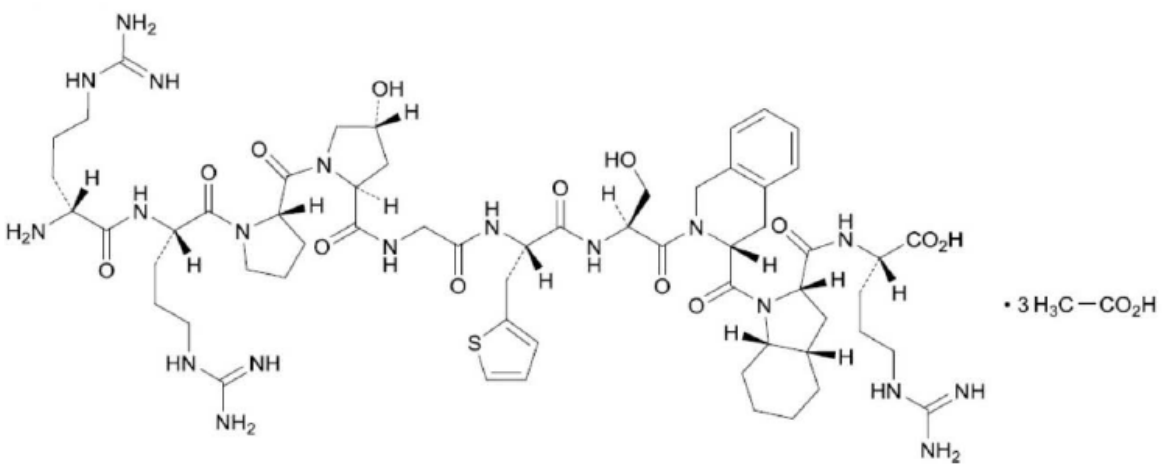
2.4 非臨床試験の概括評価

緒言

イカチバント（JE049，S 89 0140，HOE 140 としても知られている）は，ブラジキニン（BK）に類似した構造を有する合成デカペプチドである。

イカチバントは，1，4，6，8 及び 9 番目に 5 つの非たん白質原性アミノ酸を有している（それぞれ D-Arg，L-Hyp [L-(4R)-4-hydroxyproline]，L-Thi [L-3-(2-thienyl) alanine]，D-Tic[D-(1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolyl) carbonic acid]及び L-Oic [L-(3aS, 7aS)-(hexahydro-2-indolinyl) carbonic acid]）。イカチバント及びブラジキニンの全アミノ酸配列と構造を図 2.4-1 並びに図 2.4-2 に示す。

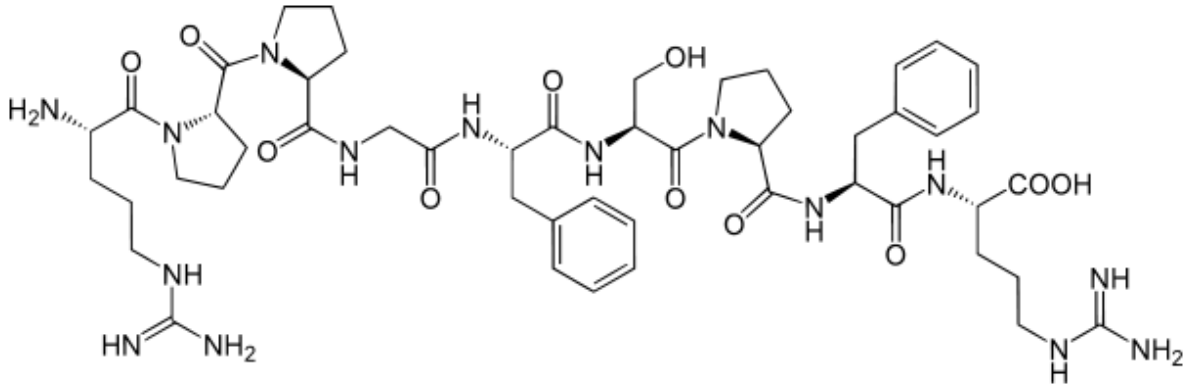
図 2.4-1 イカチバントの構造



H-D-Arg[1]-Arg[2]-Pro[3]-Hyp[4]-Gly[5]-Thi[6]-Ser[7]-D-Tic[8]-Oic[9]-Arg[10]-OH, triacetate

- イカチバントの分子式：
  - $C_{59}H_{89}N_{19}O_{13}S$（フリー体）
  - $C_{59}H_{89}N_{19}O_{13}S•3C_2H_4O_2$（イカチバント酢酸塩）
- イカチバントの分子量：1304.55 g/mol イカチバントは酢酸塩として得られる。

図 2.4-2　　ブラジキニンの構造



Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (RPPGFSPFR)

- ブラジキニンの分子式：$C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$

イカチバントはBK 拮抗剤である。イカチバントはBK とは異なり, BK の極めて短い半減期($t_{1/2}$)の原因となっている 2 つの酵素，すなわちアンジオテンシン変換酵素（ACE）及び中性エンドペプチダーゼに対して安定である。*In vitro* の検討から，イカチバントの代謝はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）非依存性で，結果的にチトクローム P450（CYP450）を介さず，おそらくタンパク分解により代謝されることが示唆されている。

カリクレイン–キニン系は，α2-グロブリン前駆体（キニノーゲン），及びハーゲマン因子により活性化された後，対応するキニン（BK 及びカリジン［lys–BK］）を生成する特異的プロテアーゼ（カリクレイン）から構成されている。いずれのキニンも，それぞれの活性代謝物である desArg-BK 及び Lys-desArg-BK に速やかに分解される。2 種類のキニン受容体，ブラジキニン B1（B1）及びブラジキニン B2（B2）受容体が同定され，クローニングされている。ブラジキニンが B2 受容体により選択的であるのに対し，カリジンは B1 及び B2 受容体の両方に等しく作用する。キニンの生物学的作用はかなり多様であり，末梢血管拡張，浮腫，炎症，平滑筋の収縮から，肥満細胞，マクロファージ，交感神経，副交感神経及び感覚神経細胞の細胞を含む様々な種類の細胞の活性化まで多岐にわたる。BK の強力な疼痛作用により，BK による感覚神経の刺激はほとんどの臓器で疼痛を生じる。

生理的条件下では，BK の産生は，C1 エステラーゼインヒビター（C1–INH）による血漿カリクレインの不活化により調節されている。C1–INH は，プレカリクレインを活性のあるカリクレインに変換する第 XIIa 因子（活性化ハーゲマン因子）を阻害することで，カリクレイン―キニン系を更に調節している。生理的条件下では，約 40%の血漿カリクレインが C1–INH により不活化さ

れている。BK は遺伝性血管性浮腫（HAE）の特徴である血管透過性の亢進の原因として認識されている中心的なメディエーターであり，C1–INH の欠損は BK 放出の増加を伴う。

HAE の最もよくみられる表現型（I 型及び II 型）の病因には，機能性 C1–INH の欠損が関与している。このセリンプロテアーゼ阻害剤は，主に肝細胞により産生され，標的プロテアーゼと複合体を形成することにより“自殺阻害剤”として機能する。その主な機能として，C1 補体自己活性化の抑制，凝固因子 XIIa，XIIf 及び XIa の不活性化，そして活性カリクレインの直接阻害がある。HAE の病態における BK の中心的役割は，C1–INH 欠損マウスを用いた公表論文でも裏付けられている（Han et al. 2002，Han Lee et al. 2003）。これらの動物における血管透過性の亢進は，ヒト C1–INH，血漿カリクレイン阻害剤（DX88）及びイカチバントの静脈内投与によって抑制された。BK の血漿レベルは，通常 0.2 pM から 7.1 pM であるのに対し，急性 HAE 発作の期間中は約 50 pM に上昇する。

この非臨床試験の概括評価の目的は，これまでに得られた成人における HAE の急性発作の治療に関連するイカチバントの非臨床データを要約し，考察することである。

承認された場合，イカチバント（商品名：フィラジル皮下注 30 mg シリンジ）は，成人における HAE の急性発作の治療に用いられる。イカチバントの推奨用量として，通常 1 回 30 mg を腹部にゆっくりと皮下注射する。

2.4.1　非臨床試験計画の概略

イカチバントは，1990 年代初頭に発見され，初期の臨床試験は，喘息，鼻炎及び特定の臨床状況における鎮痛の治療を目的としていた。Jerini AG 社がイカチバントを HAE の治療薬として開発することを決定したことにより，臨床で想定される投与経路である皮下投与に焦点を当てた非臨床安全性プログラムが構築された。しかし，実施されたすべての非臨床試験の情報を提供するため，種々の動物モデルで異なる投与経路を評価した初期の試験も，補助データとして本申請中に含めている。

イカチバントの主な薬理作用を特徴づけるための幅広い試験が *in vivo* 及び *in vitro* で実施され，試験の多さは，イカチバントの長い歴史と以前に計画されていた複数の臨床プログラム/適応症を反映したものとなっている。本申請資料中で示す薬理試験の概要では，イカチバントの B2 拮抗作用を裏付けるデータ，及び HAE における潜在的な有用性に焦点を当てている。主要な生理学的システムにおけるイカチバントの安全性は，心血管系（CV），呼吸器系，中枢神経系（CNS）及び腎臓に対する作用を評価した一連の詳細な安全性薬理試験で検討されている。BK が心血管系に及ぼす作用の特徴付けを行った多数の文献を考慮し，複数の虚血―再灌流及び心筋梗塞の動物モデルで，イカチバントを用いた試験を実施した。これら疾患モデルからのデータが，HAE 患者におけるイカチバントの作用へ外挿できるかどうかは不明である。

効力を裏付ける試験，副次的薬理試験及び安全性薬理試験として，本申請には JE049-0001 試験の報告書が含まれている。本報告書は，異なる施設からの多数の試験の報告書をまとめたもので

あるが，一部の試験は安全性薬理試験に現行の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）が適用される以前の [redacted] 年代に実施されている。そのため，本試験は現在の GLP 基準下で実施されたものではなく，報告書の裏付けとなる情報や生データは利用できない。Shire 社はこれらの問題点を認識しているが，本報告書には薬理作用を裏付けるデータが含まれており，本報告書の内容は本剤の申請にとって重要であると考えている。このため，JE049-0001 試験の試験報告書は，参考資料ではなく評価資料として提出する。

イカチバントの吸収，分布，代謝，排泄（ADME）を検討するため，また，毒性学的評価を裏付けるため，頑健な分析方法が開発され，使用された。血漿試料中のイカチバントの定量には，ラジオイムノアッセイ（RIA）及び UV 検出による高速液体クロマトグラフィー（HPLC–UV）又は高速液体クロマトグラフィー–タンデム質量分析（LC–MS/MS）を組み合わせた方法を用いた。非臨床試験では，RIA と，特にトキシコキネティクス（TK）のモニタリング用に開発された LC–MS/MS 法を用いた。イカチバントの非臨床薬物動態試験では，未変化体と 2 つの主要代謝物（M1 及び M2）のいずれも評価した。ラット及びイヌの皮下投与試験では，当初の試験計画中に抗体の探索が含まれていた。しかし，陽性血清を惹起する試みがうまくいかず（JE049-0166 試験），抗体を検出することはできなかった。

非臨床安全性データパッケージには，単回及び反復投与試験，ラット及びウサギを用いた胚・胎児毒性試験，受胎能及び出生前及び出生後の試験が含まれ，いずれの試験も皮下投与で実施した。これらの試験の一部には TK 測定が組み入れられ，TK の裏付けが得られている。非臨床安全性パッケージには遺伝毒性試験も含まれ，長期がん原性試験はラット及びマウスを用いて実施した。また，非臨床安全性試験ですべての不純物を評価した。

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 ブラジキニン受容体との相互作用

イカチバントは，モルモット回腸，モルモット気管上皮細胞及びヒトの滑膜細胞の BK 受容体への[^{3}H]-BK の結合を置換し，50%阻害濃度（IC_{50}）値は 1.2 nM から 4.0 nM の範囲と，BK と同程度であった（表 2.4-1；JE049-0001，JE049-0002 試験）。

表 2.4-1 [^{3}H]–ブラジキニンの受容体結合の置換に関する IC_{50} 値 (nM)

組織	イカチバント	ブラジキニン
モルモット回腸	1.2	1.6
モルモット気管上皮細胞	4.0	1.8
ヒト滑膜細胞	3.0	8.0

IC_{50} = 50%阻害濃度

結合試験は，遺伝子導入したチャイーニズハムスター卵巣（CHO）細胞で発現させたヒト BK 受容体を用いて実施した。イカチバントは B1 及び B2 受容体の両方に結合し，IC_{50} 値は，それぞれ 6 μM 及び 4.3 nM であった。K_i 値は, B1 受容体で 1.2 μM, B2 受容体で 2 nM であった（JE049-0003 試験）。代謝物 M1 及び M2 のブラジキニン受容体への結合も，ヒト受容体を発現する CHO 細胞及びモルモット回腸を用いて検討した（JE049-0004 試験）。M2 は，BK のモルモット及びヒト B2 受容体への結合を阻害した（それぞれ 10 μM で 58%阻害及び 100 μM で 56%阻害）。M1 はヒト B1 及び B2 受容体には作用を示さなかったが，モルモット B2 受容体には弱い作用を示した（10 μM で BK の結合を 48%阻害）。100 μM の濃度では，M2 は B1 受容体への結合を 45%阻害した。したがって，イカチバントの B2 受容体に対する作用に比べ，M1 及び M2 はいずれもイカチバント投与後のブラジキニンに対する拮抗作用には関与しないと考えられた。

2.4.2.1.2 ブラジキニン拮抗作用

イカチバントは，*in vitro* 及び *in vivo* のいずれの試験においても，BK の作用に拮抗することが示されている。イカチバントは，BK に誘発される血管内皮由来弛緩因子（EDRF），PGE_2，PGI_2 等のメディエーターの放出を顕著に阻害し，また，培養ブタ及びウシ血管内皮細胞（JE049-0001 試験），モルモット気管上皮細胞及びヒト滑膜細胞（JE049-0002 試験）において，BK 刺激による細胞内カルシウム上昇も阻害した（IC_{50} 値は 1 nM から 10 nM の範囲）。

イカチバントは，B1 又は B2 受容体を含む複数の摘出臓器を用いた *in vitro* の試験で検討されている。その結果, イカチバントは強力かつ選択的な B2 拮抗剤であることが示されている（表 2.4-2）。B1 受容体を含むウサギ大動脈では，イカチバントの阻害作用は認められなかった。モルモット回腸及び肺動脈では，イカチバント 100 μM の濃度で弱いアゴニスト活性が観察されたが，この濃度は，B2 アンタゴニスト活性の IC_{50} と比較して 10000 倍以上高い濃度である。摘出モルモット心臓において，BK（100 nM）により誘発される冠動脈血流量の増加は，イカチバント濃度の上昇（3，10，30，100 nM）に伴って拮抗され，IC_{50} は 31 nM であった（JE049-0001 試験）。

表 2.4-2　　B1 又は B2 受容体を含む摘出臓器におけるイカチバントの阻害及びアゴニスト作用

組織	イカチバント阻害 (IC_{50} nM)	100 μM でのイカチバントのアゴニスト活性
モルモット回腸	11.0	16%
ラット子宮	4.9	なし
モルモット肺動脈	5.4	100%
ウサギ大動脈 (B1)[a]	10 μM で作用なし	ND
モルモット心臓	31.0	ND

ND = 決定せず；IC_{50} = 50%阻害濃度
[a] Des-Arg-BK の拮抗

ウサギ頸静脈，モルモット回腸，モルモット気管，ハムスター膀胱，ヒト回腸，ヒト膀胱を含む複数の摘出臓器において，イカチバントは BK の作用を特異的に阻害した。アンジオテンシン II，サブスタンス P，ニューロキニン A，アセチルコリン，ノルアドレナリン等，その他のペプチド性又は非ペプチド性物質に対しては，イカチバントは不活性であった（Rhaleb et al. 1992）。

In vivo では，イカチバントは，麻酔下ラットにおいて BK の動脈内注射により誘発される降圧作用を阻害した。

全身プレチスモグラフィーによる測定では，プロプラノロールで前処理した麻酔下モルモットにおいて，イカチバントは BK により誘発される気管支収縮を長時間にわたって阻害した。BK の皮内注射 15 分前にイカチバント（0.3 及び 1.0 mg/kg）をモルモットに腹腔内投与することにより，疼痛反応に特徴的な行動が阻害された（JE049-0010 試験）。

イカチバントによる BK の拮抗作用は，HAE のモデルマウス（C1–INH 欠損マウス）でも示されており，イカチバントを静脈内投与したとき，血管透過性は完全に回復した（Han Lee et al. 2003）。この阻害は用量反応性で，最大効果（E_{max}）は 500 ng を超える用量で得られた。また，イカチバント 3 μg の静脈内投与は，ほぼ投与直後から 8 時間以上持続する作用を示した（Han Lee et al. 2003）。

2.4.2.2　副次的薬理試験

2.4.2.2.1　受容体結合プロファイル

イカチバント並びにその代謝物 M1 及び M2 と，広範囲の受容体，イオンチャンネル及びトランスポーターとの相互作用の可能性を，高濃度のイカチバント，M1 及び M2（10 μM；13.04 mg/L，30 mg をヒトに皮下投与したときのイカチバントの最高濃度［C_{max}］の約 10 倍）を用いた複数の結合試験で検討した（JE049-0201，JE049-0218 試験）。イカチバントは，ブラジキニンの B2 受容体への結合を 98%阻害した。また，M_3，NK_2，VIP_1，VIP_2 及び V_{1a} 受容体で，30%を超える対照特異的な結合の阻害が検出された。

さらに，イカチバントは 10 μM（13.04 mg/L）で様々な酵素（ホスホリパーゼ A，ヒトシクロオキシゲナーゼ 2［COX2］，エンドセリン変換酵素，ヒトカテプシン G，中性エンドペプチダーゼ［NEP］）と基質との反応に対して阻害活性を示さなかった。ヒトシクロオキシゲナーゼ 1（COX1）及びヒト（ACE）に対しては，イカチバントによる濃度依存的な（0.1 nM から 10 μM）わずかな阻害が認められた（COX1；1 μM で 19%阻害，ACE；保存溶液では IC_{50} は 2.3 μM，フレッシュな溶液では 5.1 μM）。これらの作用は比較的高濃度で観察されたため，これらの所見に何らかの臨床的意義があるとは考えられない。臨床における 30 mg 単回投与後の曝露量は 1 μg/mL（0.7 nM）未満である。M2 では，30%を超える阻害が観察されたのは B2 受容体のみで（62%），また，M1 ではいずれの標的分子でも 30%を超える阻害は観察されなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 安全性薬理プロファイル

イカチバントの全体的な安全性薬理プロファイルを表 2.4-3 に示す。これには呼吸器系，腎/泌尿器系及び消化器系に及ぼす作用の評価に加え，イカチバントが糖代謝に及ぼす作用の評価が含まれている。心血管系に及ぼす作用は，2.4.2.3.2 項で詳述する。

表 2.4-3 *In Vivo* 安全性薬理試験のまとめ

試験の種類/ 試験番号/ (GLP 適用)	動物種	投与経路/投与量	特記すべき所見
中枢神経系			
行動観察 JE049-0001 (非 GLP)	マウス/NMRI (雄)	静脈内投与/ 0.01，0.1，1，10 mg/kg	NOEL = 0.1 mg/kg
自発運動量 JE049-0001 (非 GLP)	マウス (雄)	静脈内投与/ 0.01，0.1，1 mg/kg	NOEL = 1.0 mg/kg 検討した用量では自発運動量に影響はなかった。
ヘキソバルビタール睡眠の増強 JE049-0001 (非 GLP)	マウス/NMRI (雄)	静脈内投与/ 0，0.01，0.1，1 mg/kg	NOEL = 1.0 mg/kg 検討した用量ではヘキソバルビタール睡眠時間を増強しなかった。
心血管系			
血圧及び心拍数 JE049-0001 (非 GLP)	イヌ/ビーグル	静脈内投与/ 0.01，0.1，0.6，1 mg/kg	0.01 又は 0.1 mg/kg で作用なし。0.6 及び 1 mg/kg では，2 頭のイヌで血圧が 5 分間から 10 分間顕著に低下し，疼痛反応，不穏，散瞳及び流涎過多を伴っていた。1 mg/kg 群のイヌでは，血圧及び心拍数が 5 分間測定不能であった。
血行動態及び心電図に及ぼす作用 JE049-0205 (非 GLP)	イヌ/雑種	静脈内投与/ 0.1，0.3，0.5 mg/kg	0.1 及び 0.3 mg/kg では有意な作用なし。0.5 mg/kg では，全身動脈血圧の軽微な上昇及び心拍数の有意な増加。変動は一過性で，15 分以内に投与前値に戻った。0.5 mg/kg では，運動後の血管拡張作用を増強すると思われた。いずれかの用量で心室性異所性活動が誘発されるというエビデンスはなかった。
心電図に及ぼす作用 (反復投与毒性試験の一部) JE049-0116 (GLP)	イヌ/ビーグル	静脈内投与/ 1，3.3 mg/kg 1 日 3 回を週 2 日 (6 時間ごと)	Days 1，15，25 (投与日)の投与 4 時間後まで，予め規定した間隔で心電図測定。心電図に影響は認められなかった。
急性腎血管性高血圧 JE049-0001 (非 GLP)	ラット/ Sprague-Dawley (雄) 麻酔下	静脈内インフュージョン/ 40 µg/0.05 mL/min	急性腎血管性高血圧の発現に顕著な影響なし。

試験の種類/ 試験番号/ (GLP 適用)	動物種	投与経路/投与量	特記すべき所見
心血管系 JE049-0206 (非 GLP)	イヌ/ジャーマンシェパード	冠動脈内インフュージョン/ 0.5 ng/kg/min x 1hour	軽度から中等度の血行動態変化。梗塞面積に影響なし。致死率の上昇がみられたが，おそらくブラジキニン受容体の遮断が原因であり，イカチバントが心血管系に及ぼす有害又は毒性作用が原因ではないと考えられた。
虚血誘発性不整脈 JE049-0207 (非 GLP)	ラット/ Sprague Dawley (雄)	静脈内ボーラス/ 40, 400 µg/kg, 4 mg/kg	心室性期外収縮，心室細動，心室性頻脈の平均回数及び死亡率の用量依存的な低下。プレコンディショニングの有益な作用を減弱させず。4 mg/kg は抗不整脈作用を示した。
血漿レニン活性 JE049-0001 (非 GLP)	ラット/ Wistar (雄)	動脈内インフュージョン/ 0.83 nmol/min/kg	血漿中レニン活性の上昇をもたらさなかった。
呼吸器系			
呼吸器系 JE049-0208 (GLP)	ラット/ Wistar (Han) (雄)	静脈内投与/ 0，1，3，10 mg/kg	1 及び 3 mg/kg で作用なし。10 mg/kg では，ポーズが軽微かつ一過性に減少し，軽微な気管支拡張が示唆された。
腎臓/尿路系			
腎機能 JE049-0213 (非 GLP)	イヌ/ビーグル	静脈内投与/ 0.03，0.3 mg/kg	0.3 mg/kg の静脈内投与では，GFR 及び腎血流量に影響はなかったが，尿量及びナトリウム排泄が減少した。
消化器系			
消化管通過 JE049-0209 (GLP)	ラット/ Rj:Wistar (Han) (雄)	静脈内投与/ 0，1，3，10 mg/kg	検討した用量では消化管通過時間に影響なし。
胃酸分泌 JE049-0210 (非 GLP)	ラット/Wistar (雄)	静脈内投与/1，3，10 mg/kg ボーラス (30 秒)	1 及び 3 mg/kg では影響はみられなかったが，10 mg/kg 静脈内投与では，胃液量及び酸度が低下した。
ヒスタミン誘発性胃酸分泌 JE049-0211 (非 GLP)	ラット/ Sprague-Dawley (雄)	静脈内投与/ 0.3 mg/kg	0.3 mg/kg 静脈内投与で影響なし。
イカチバントが糖代謝に及ぼす作用			
血糖 JE049-0001 (非 GLP)	ラット/Wistar (雄)	静脈内投与/ 0.1，0.5，1 mg/kg	有意な差がいくつか認められたが，初期値がすでに有意に異なっていため，最終的には意味のあるものではないと考えられた。検討した用量では，6 時間まで血糖値に影響はなかった。

GFR = 糸球体ろ過率，GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準，NOEL = 無作用量

2.4.2.3.2 心血管系に及ぼす作用

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）介在性カリウム電流に対するイカチバントの阻害作用を，遺伝子導入した *Xenopus laevis* 卵母細胞及び CHO 細胞を用いて評価した。それぞれ 100 µM 及び

300 μM までの濃度では阻害作用は認められなかった（JE049-0202，JE049-0203 試験）。CHO 細胞を用いた試験では，M1 及び M2 も 308 μM の濃度まで評価したが，いずれも影響は認められなかった。イカチバント 300 μM は約 420 μg/mL に相当し，これは，臨床投与量である 30 mg を投与したときの平均 C_{max}（0.979 μg/mL）の約 400 倍に相当する（[2.7.2 臨床薬理試験]，HGT-FIR-061 試験）。

イカチバントの静脈内投与が血圧及び心拍数に及ぼす作用の評価では，イカチバントの投与量を 0.01 mg/kg から 1 mg/kg まで増量しながら覚醒下ビーグル犬に静脈内投与した（JE049-0001 試験）。0.01 mg/kg 又は 0.1 mg/kg では影響はみられなかった。0.6 mg/kg 及び 1 mg/kg の投与量では，2 頭のイヌで血圧が 5 分間から 10 分間低下し，疼痛反応，不穏，散瞳及び流涎過多を伴っていた。1 mg/kg では，血圧及び心拍数は測定不能であった。

トレッドミルの訓練をしたイヌにイカチバントを 0.1，0.3，0.5 mg/kg の用量で投与したとき，運動中の電気生理学的又は血行動態的パラメータに影響はみられなかった（JE049-0205 試験）。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH） S7B ガイドラインを踏まえ，イヌを用いた心電図の *in vivo* モニタリングにより hERG に対する作用の可能性を補完する試験を実施した。この評価は，成犬を用いた 4 週間反復投与毒性試験に組み込まれた（JE049-0116 試験）。イカチバント 1 mg/kg 及び 3.3 mg/kg を 6 時間間隔で 1 日 3 回，週 2 回投与するスケジュールで動物に投与した。心電図は，Day 1，15，25 の各投与日の初回投与 45 分前から投与後 20 時間まで，テレメトリーによりモニタリングした。心電図の解析は，事前に規定した間隔で，各投与の 4 時間後まで実施した。その結果，心電図に対する影響は観察されなかった。

本試験は TK モニタリングも含んでおり（Day 22 に実施），3.3 mg/kg/injection 投与時のイカチバントの血漿中 C_{max} 値は，3 回の投与全体で，雄では 2.45 μg/mL から 5.12 μg/mL，雌では 2.43 μg/mL から 6.42 μg/mL の範囲であった。ヒトでは，30 mg 単回投与後の平均 C_{max} 値は，試験群全体（男性及び女性；18 歳から 50 歳，［2.7.2 臨床薬理試験］；HGT-FIR-061 試験）を通して 0.979 μg/mL であった。

イカチバント静脈内投与がラットの急性腎血管性高血圧の発現に及ぼす作用の評価では（JE049-0001 試験），麻酔下ラットにイカチバントを静脈内投与（40 μg/0.05 mL/min，30 分間）したとき，急性腎血管性高血圧の発現に有意な作用は認められなかった。

BK は心臓保護に重要な役割を果たしており，ACE 阻害剤及びアンジオテンシン受容体拮抗剤の治療効果にも関係している（Perez et al. 2001）。そのため，イカチバントが BK の有益な作用を妨げる可能性が考えられる。

冠動脈閉塞を伴うイヌの冠動脈虚血モデルでは，イカチバントの冠動脈内投与は梗塞面積に影響を及ぼさなかったが，死亡率は溶媒が投与された虚血対照群（14 頭中 4 頭）に比べ上昇した（12 頭中 7 頭）。いずれの群においても，早期の死亡は心室細動が原因であったが，閉塞後 210 分から 320 分の間にみられた後期の死亡はイカチバント群のみで観察され，おそらく急性左室不全が原因と考えられた（JE049-0206 試験）。イヌでの結果とは対照的に，ラットで左主冠動脈の 30 分間

の閉塞期間の 10 分前に投与したとき，イカチバント 0.4 mg/kg は，心室性期外収縮の回数，心室細動の発現頻度並びに死亡率を減少させた（JE049-0207 試験）。

イカチバントが心血管系に及ぼす潜在的な影響について，非臨床試験から得られたデータのレビューを専門家に依頼した（JE049-5101）。専門家レビューには，BK の作用にはおそらく種差が存在するが，ヒトにおける臨床的意義は不明である，と記載されている。さらに専門家レビューは，イカチバントによる BK の拮抗作用は，特に心血管系疾患を有する患者において有害な心血管イベントの仮定的なリスクにつながる可能性があるが，イカチバントによる有益な治療効果は，すべての仮定的な心血管リスクを大きく上回るものであると結論づけている。

2.4.2.3.3　薬力学的相互作用

特別な薬力学的相互作用試験は実施されていない。B2 受容体拮抗剤としてのイカチバントの既知の作用に基づき，ACE 阻害を介して作用する降圧薬との相互作用の可能性が考えられ，このことは，複数の公表文献により認知されている。この相互作用の可能性については，上記の 2.4.2.3.2 項で心血管系に対する全般的な作用に関する文章中で考察している。また，裏付けとなるデータとして，Farhy et al. 1992 及び Martorana et al. 1990 の公表文献に例が示されている。イカチバントの薬理活性からは，その他の薬力学的相互作用は予想されず，追加の試験は不要と考えられる。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法

血漿試料中のイカチバントの定量には，RIA，HPLC–UV 又は LC–MS/MS 法を用いた。大部分の非臨床試験で RIA を用い，特に TK モニタリングのために開発された LC-MS/MS 法も使用した。

放射能の測定は，prolyl-3,4-^{3}H 又は Oic-6,7-^{3}H のいずれかの位置でトリチウム標識したイカチバントを投与した後，液体シンチレーション計測（LSC）を用いて実施した（図 2.4-3）。イカチバントは構造内にフェノール環を有さず，^{125}I を用いた直接放射性標識ができなかったため，類似体として [redacted] を使用した。RIA 法にはこの ^{125}I–リガンドトレーサーを用いることで良好な再現性と 0.2 µg/L の低い検出限界が得られ，さらにイカチバントの 2 つの主要代謝物との交差反応性も認められなかった（JE049-0301 試験）。HPLC-UV 法で得られた分析結果と比較したところ，一致した結果が得られた（JE049-0302 試験）。

最近実施した毒性試験のモニタリングのため，イカチバントに加えて代謝物 M1 及び M2 も測定できる新しい LC–MS/MS 法を開発した。この LC–MS/MS 法は，ラット血漿中（JE049-0141，JE049-0332，JE049-0333，JE049-0334，JE049-0335 試験），イヌ血漿中（JE049-0122，JE049-0337，JE049-0338，JE049-0339，JE049-0340 試験），及びマウス血漿中（JE049-0348 試験），また，ラット乳汁中（JE049-0141，JE049-0341，JE049-0342，JE049-0343，JE049-0344 試験）のイカチバント及び M2 測定法としてバリデートされた。また，イカチバント，M2 及び各内部標準の保存溶液の

安定性を検討し，要約を作成した（JE049-0336 試験）。さらに，M1 の測定法バリデーションがイヌ血漿で完了しており（JE049-0350 試験），ラット血漿（JE049-0351 試験）及びマウス血漿（JE049-0352 試験）では M1 の部分バリデーションが完了している。

2 つのラット 14 日間皮下投与毒性試験（JE049-0127 及び JE049-0128 試験）では，ラット血漿中イカチバントの測定に別の LC–MS/MS 法を用いて TK を評価した。毒性試験の試料分析において，ラット及びイヌの LC–MS/MS 法の使用にいくつかの問題点が発生した。各測定に含まれる QC サンプルが時折許容範囲外の結果となり，したがって当該測定時の全ての試料の測定結果が除外された。これにより，イヌの 1 カ月間静脈内投与毒性試験（JE049-0122 試験）の結果が影響を受けた。なお，分析結果は報告書に含めているが，TK パラメータは，個々の試験内の特定の群のデータと同様に計算していない。しかし，毒性試験の詳細な解釈を可能にするに足る有効な TK データが十分得られており，全体として，データのある要素が欠損していることで開発プログラムに支障が出ることはなかった。

抗イカチバント抗体の測定は，非臨床試験の薬物動態（PK）又は毒性プログラム中で完了することができなかった。イカチバント―[redacted]複合体，及び[redacted]をアジュバントとして用い，ラット，イヌ，サル，ウサギで抗体を惹起する試みを行った。酵素免疫測定（ELISA）並びにアフィニティクロマトグラフィーによる抗体含有血清の精製により抗体の検出を試みた（JE049-0166 試験）。しかし，ウサギ以外のすべての動物種で抗体を検出することができず，イカチバントの免疫原性が低いことが示唆された。

2.4.3.2 吸収

イカチバントの PK 及び TK 特性は，静脈内及び皮下投与によるマウス，ラット及びイヌの単回及び反復投与試験（GLP 及び非 GLP 試験）で検討した。イカチバントは，単回及び反復皮下投与により高いバイオアベイラビリティを示した。

^{3}H-Prolyl 及び ^{3}H-Oic で分子内の異なる部位を標識した 2 つの化合物を利用したが，代謝試験で示されたように（2.4.3.4 項），これら 2 つの標識部位は，イカチバントの 2 つの主要代謝物である M1 と M2 に対応している（図 2.4-3 放射性標識部位を参照）。

[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバント及び[Oic-6,7-^{3}H]-イカチバントを皮下又は静脈内投与によりラット及びイヌに投与したときの放射能の血中濃度は，消失の早い初期相（半減期 0.6 時間から 1.8 時間）に続く，かなり消失の遅い二次相（[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバントでは半減期 6 日から 17 日，[Oic-6,7-^{3}H]-イカチバントでは半減期 14 時間から 92 時間）からなる 2 相性の低下を示した（JE049-0305，JE049-0306，JE049-0308，JE049-0309 試験）。吸収及び分布試験では，皮下投与経路による高いバイオアベイラビリティが示された。

反復投与後のイカチバントの PK に関するデータは，主としてマウス（JE049-0303, JE049-0159, JE049-0170, JE049-0175 試験），ラット（JE049-0127, JE049-0128, JE049-0160, JE049-0163, JE049-0162, JE049-0108，JE049-0141 試験），ウサギ（JE049-0353 試験）及びイヌ（JE049-0120，JE049-0307，

JE049-0115，JE049-0116，JE049-0117，JE049-0164 試験）の TK 試験から得られた。イカチバント，M1 又は M2 の曝露に何らかの性差があるという明らかなエビデンスはない。イカチバント，M1 及び M2 の曝露量は投与量の増加に伴って増加するが，投与量レベル及び投与経路によっては，増加量は投与量比より少ない，あるいは投与量比より多い可能性がある。イカチバントを反復投与したとき，イカチバント並びに代謝物 M1 及び M2 の曝露に何らかの変化があるという明らかなエビデンスはない。ラット及びイヌのいずれにおいても，イカチバントの曝露は，M1 及び M2 より著しく高かった。

イカチバントを幼若及び成熟ラットに反復皮下投与し，イカチバント並びに代謝物 M1 及び M2 の TK を比較した（JE049-0172 試験）。イカチバント及び M1 の曝露については，投与量を補正した C_{max} は幼若及び成熟ラット間で同程度であったが，投与量を補正した濃度―時間曲線下面積（AUC）は，幼若ラットでは成熟ラットに比べ約半分であった。M2 の曝露については，投与量を補正した C_{max} は，成熟ラットに比べ幼若ラットで高かったが，投与量を補正した AUC は，2 つの動物群間で同程度であった。

ラット及びイヌにイカチバントを吸入投与したとき（ラット : JE049-0111 試験，イヌ : JE049-0123 試験），同様にラット及びイヌに経鼻投与したとき（ラット : JE049-0113 試験，イヌ : JE049-0124，JE049-0125 試験）の付加的な TK データを評価した。

2.4.3.3 分布

In vitro でのイカチバントのラット，イヌ，サル及びヒト血清たん白質への結合は低く（38%から 49%），濃度依存性のエビデンスもみられなかった（JE049-0310 試験）。

[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバント及び[Oic-6,7-^{3}H]-イカチバントのラットへの皮下投与による，全身オートラジオグラフィを用いた分布試験では，投与 4 時間後までの初期のサンプリング時間で，投与部位及び排泄に関わる臓器（腎臓，肝臓，膀胱）で最も高い放射能濃度が認められた。比較的放射能濃度が高かった他の臓器は，リンパ節，骨端軟骨，脾臓，消化管内容物，及び骨髄であった。放射能は中枢神経系ではほとんど認められず，血液脳関門の通過性や脂肪組織からの移動が少ないことが示された。[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバント及び[Oic-6,7-^{3}H]-イカチバントをマウス及びラットに皮下投与し，96 時間又は 168 時間にサンプリングを実施した組織分布試験では，放射能が主として肝臓で長時間残存していた（JE049-0311，JE049-0312 試験）。

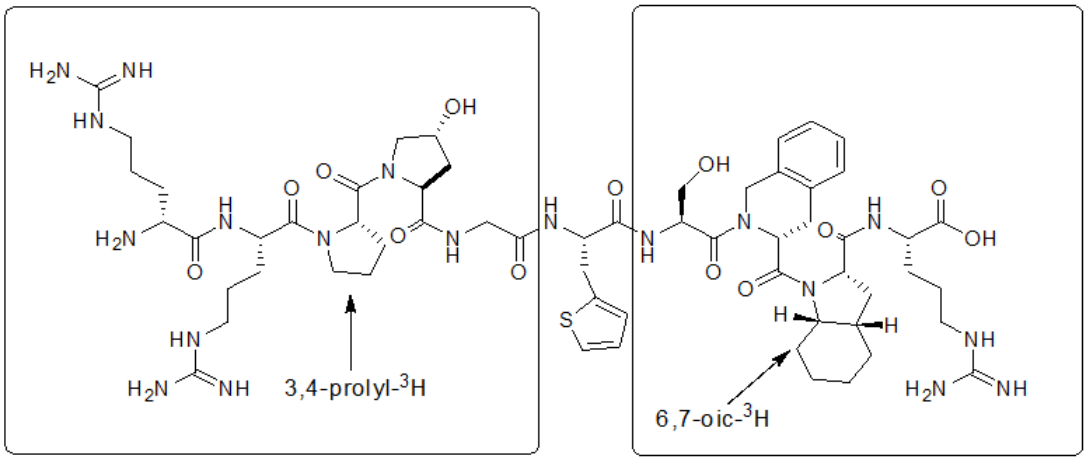
[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバントを妊娠及び授乳ラットに静脈内投与し，胎盤移行性及び乳汁分泌を検討した。胎児中の放射能濃度は，妊娠 14 日目及び 18 日目のいずれにおいても母体の血中濃度と類似しており，投与した放射能の 1%未満であった。ラット血液中では終末相半減期が長いため，放射能は投与 48 時間後の胎児でも検出された（JE049-0316 試験）。乳汁中では，投与 7 時間後に放射能濃度がピークに達し，投与 0.5 時間後の最初の試料を除き，すべての採取時点で乳汁中濃度は血液中濃度より高かった。このことは，乳腺への分布を反映したものである可能性が高い。乳汁産生量の文献値を用いると，48 時間の採取期間にわたって乳汁に分泌された量の投与量に対

する割合は，約 2%であった（JE049-0329 試験）。ラットの出生前及び出生後の毒性試験における出産 4 日後の TK モニタリングにおいても，イカチバントが乳汁中に分泌されることが確認された（JE049-0141 試験）。

2.4.3.4　代謝

イカチバントの代謝試験は，2 つの主要代謝物の存在を示し，ラット，ウサギ，ヒト間で一致していた（JE049-0308，JE049-0321，JE049-0322，JE049-0323，JE049-0325 試験）。これらは H-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH（M1 又はイカチバント (1–5)と命名）及び H-Ser-D-Tic-Oic-Arg-OH（M2 又はイカチバント (7–10)と命名）と同定された（図 2.4-3）。

図 2.4-3　放射性標識部位及び主要代謝物 M1 及び M2 の構造を示したイカチバントの構造



代謝物 M1　　**代謝物 M2**

In vitro の検討から，イカチバントの代謝は NADPH 非依存性で，結果的に CYP450 を介さないことが示された（JE049-0317，JE049-0318，JE049-0319，JE049-0320 試験）。ペプチド性の分子であることから，イカチバントはたん白分解により代謝される可能性が高い。

放射性標識したイカチバントをマウス，ラット，イヌに静脈内又は皮下投与したときの尿試料の分析により，イカチバントは *in vivo* でも代謝されることが示された。マウスの尿では，イカチバント及び M1 の濃度はそれぞれの 2 倍以内であった。一方ラット及びイヌの尿では，代謝物 M1 及び M2 が主要成分であった。

2.4.3.5　排泄

[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバント又は[Oic-6,7-^{3}H]-イカチバントをマウス（JE049-0326, JE049-0327 試験），ラット（JE049-0305，JE049-0329 試験）及びイヌ（JE049-0308，JE049-0309 試験）に静脈内又は

皮下投与したときの排泄を評価した結果，尿中排泄が主排泄経路であることが明確に示された。低投与量での試験（12 μg/kg 皮下，ラット：JE049-0305 試験）を除き，ラット及びイヌに静脈内又は皮下投与したときの放射能の回収率は 70%を超えていた。[Pro-3,4-^{3}H]-イカチバントを投与したとき，尿中の放射能量は，投与した量の 61%から 90%を占め，一方，糞便には投与した量の 2.3%から 8.8%が含まれていた。[Oic-6,7-^{3}H]-イカチバントを投与したとき，尿中の放射能量は，投与した量の 63%から 90%を占め，一方，糞便には投与した量の 17%から 31%が含まれていた。

2.4.3.6 薬物動態学的相互作用

イカチバントがヒト CYP450 アイソザイムに及ぼす作用を検討した *in vitro* 試験では，これらの酵素に対する臨床的に意味のある阻害又は誘導の可能性を示すエビデンスは示されなかった（JE049-0330，JE049-0331 試験）。

2.4.4 毒性試験

臨床におけるイカチバントの用法は間欠投与であり，通常は 30 mg の単回投与が用いられるが，1 日 3 回まで追加投与できる。臨床試験で患者に投与された 1 カ月あたりの最大用量は，30 mg の 8 回投与である。曝露量を最大にして，イカチバント及びその代謝物の潜在的な毒性を評価するため，いくつかの非臨床毒性試験では，長期間の過剰な投与スケジュール（すなわち連日投与）を用いた。

毒性試験の試験戦略のその他の重要要素として，皮下投与の使用をサポートし，全身曝露をさらに最大化して全身毒性を十分に評価するための静脈内投与，また，生殖器官における所見を詳細に調査するための未成熟及び/又は性的に成熟した動物（ラット及びイヌ）の使用がある。これと併せて，反復投与試験では，循環血中の性ホルモンを一定の間隔で測定した。イカチバントに関連する作用の投与中止後の消失を評価するため，多くの試験で長期間の回復群を含めた。ピボタル毒性試験では，ほとんどの試験で TK 評価を取り入れた。

生殖毒性は，マウス，ラット，及びウサギを用いて評価し，また，マウス及びラットを用いた 2 年間のバイオアッセイでがん原性を評価した。イカチバント投与溶液をウサギに動脈内，関節内，静脈内，静脈傍及び皮下投与したときの局所忍容性を評価するとともに，ウサギの無傷及び擦過皮膚並びに目における刺激性について評価した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

イカチバントの単回投与毒性を，マウス及びラットでは皮下及び静脈内投与により，また，イヌでは静脈内投与により検討した（表 2.4-4）。

表 2.4-4　　イカチバントの単回投与毒性試験

動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	LD_{50} (mg/kg)	試験番号（GLP 適用）
マウス	皮下	483，614，767	614–767	JE049-0101 (GLP)
	静脈内	19.2，30.7，48.3，76.7	48.3–76.7	JE049-0102 (GLP)
ラット	皮下	1227	> 1227	JE049-0103 (GLP)
	静脈内	12.3，19.2	12.3–19.2	JE049-0104 (GLP)
	静脈内インフュージョン	0，4，20，100	> 100	JE049-0105 (GLP)
イヌ	静脈内	0.4，2，10	> 10	JE049-0106 (GLP)
	静脈内インフュージョン	15，30，60	> 60	JE049-0107 (GLP)

GLP =医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準，LD_{50} =半数致死量

マウス及びラットに皮下投与したときの一般症状は，静脈内投与したときと類似しており，充血, 運動性低下, 攣縮, 振戦（マウス）及び不規則呼吸（マウス）がみられた（JE049-0101, JE049-0103 試験）。

3 つの動物種すべてにおいて，静脈内ボーラス投与は急速な毒性症状を引き起こした。マウスは充血，あえぎ呼吸，運動性低下及び強直間代性痙攣を示し，注射後 30 秒以内の死亡例がみられた。同様の症状はラットでも観察されたが，死亡は概ね注射後 30 分以内のより遅い時間でみられた。両動物種において，生存動物は注射後 1 時間から 2 時間以内に正常に戻ると思われた。イヌでは死亡例はなかったが，イカチバントのボーラス投与は，臥位，下痢，呼吸緩慢，充血及び潮紅を引き起こした。

ラット及びイヌに 1 時間かけて静脈内インフュージョン投与したとき，静脈内ボーラス投与に比べてイカチバントは良好な忍容性を示した。ラットの予備試験では，100 mg/kg で 3 匹中 1 匹，300 mg/kg で 3 匹すべての動物が死亡したが, 主要試験では 100 mg/kg まで死亡はみられなかった。自発運動量の低下と頻呼吸が 20 及び 100 mg/kg で観察され，100 mg/kg の 1 匹はチアノーゼを示した（JE049-0105 試験）。イヌでは，最高用量である 60 mg/kg 群の一部の動物で，軽微な流涎と頻脈のみが観察された（JE049-0107 試験）。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

非臨床試験計画の概要（2.4.1 項）で概述したように，イカチバントは，静脈内，経鼻，エアロゾル，並びに HAE の治療のために臨床で想定される投与経路である皮下投与等，異なる投与経路による多数の適応症を対象に検討されてきた。イカチバントで実施された反復投与毒性試験のプログラムを表 2.4-5 に要約する。ラットの 6 カ月間反復投与試験（JE049-0163 試験）及びイヌの 9 カ月間反復投与試験（JE049-0164 試験）は，本申請をサポートするピボタル試験と位置づけられる。他のすべての試験は，イカチバントの全体的な毒性プロファイルを決定するための補助的な試験と位置づけられる。

表 2.4-5 イカチバントの反復投与毒性試験

動物種	投与経路	投与期間	投与量 (mg/kg/day)	試験番号 (GLP 適用)
マウス	皮下	13 週間 [a]	0，10，25，50，100	JE049-0159 (GLP)
	皮下	13 週間 [a]	0，5，15，50	JE049-0170 (GLP)
ラット	皮下	14 日間 [a]	0，1，10，50	JE049-0127 (GLP)
	皮下	14 日間 [a]	0，0.1，1，50	JE049-0128 (GLP)
	皮下	14 日間 [a]	0，6.25，12.5，25	JE049-0172 (GLP [幼若動物])
	皮下	13 週間 [a]	0，1，3，10	JE049-0108 (GLP)
	皮下	26 週間 [a]	0，3，10，30	JE049-0163 (GLP)
	皮下	13 週間 [a]	0，10，20，30	JE049-0160 (GLP)
	皮下	104 週間 [a]	0，1，3，6	JE049-0162 (GLP)
	皮下	7 週間	0，3，9，25	JE049-0173 (GLP [幼若動物])
	静脈内	1 カ月間	0，0.1，1，10	JE049-0109 (GLP)
	静脈内–皮下–経鼻	1 カ月間 [a]	10 –10 – 2.5 mg/rat	JE049-0110 (GLP)
	吸入	4 週間 [a]	0，0.5，4，32	JE049-0111 (GLP)
	経鼻	1 カ月間	0，0.025，0.25，2.5 mg/rat	JE049-0112 (GLP)
	経鼻	6 カ月間 [a]	0，0.025，0.25，2.5 mg/rat	JE049-0113 (GLP)
	経鼻	6 カ月間	0，0.025，0.25，2.5 mg/rat	JE049-0114 (GLP)

動物種	投与経路	投与期間	投与量 (mg/kg/day)	試験番号 (GLP 適用)
イヌ	皮下	3 日間, 10 日間 [a]	10，25，75，100，150 (phase 1) 100 (phase 2)	JE049-0115 (非 GLP)
	皮下	4 週間 [a]	0，1，3.3， 1 日 3 回，週 2 回投与	JE049-0116 (GLP)
	皮下	13 週間 [a]	0，10，30，100/2 x 30	JE049-0117 (GLP)
	皮下	13 週間 [a]	0，3，10 及び 3.3 mg/kg，1 日 3 回，週 2 回投与	JE049-0118 (GLP)
	皮下	39 週間 [a]	0，1，10 及び 1 mg/kg，1 日 3 回，週 2 回投与	JE049-0164 (GLP)
	静脈内	7 日間	0.5，1	JE049-0119 (非 GLP)
	静脈内	2 週間 [a]	5，10，15，30	JE049-0120 (非 GLP)
	静脈内	1 カ月間	0，0.1，0.25，0.8	JE049-0121 (GLP)
	静脈内	4 週間 [a]	0，3.3，10，30	JE049-0122 (GLP)
	吸入	4 週間 [a]	0，0.1，1.0，9.6	JE049-0123 (GLP)
	経鼻	1 カ月間 [a]	0，0.125，0.32，0.80	JE049-0124 (GLP)
	経鼻	6 カ月間 [a]	0，0.125，0.32，1.6	JE049-0125 (GLP)

GLP =医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
[a] TK 評価を含む試験。

これらの試験は，皮下及び静脈内経路を主眼とした投与経路の観点，また，同定された毒性の主要標的臓器の観点から以下に考察している。大部分の試験は TK 測定を含んでいるが，初期の試験における血漿分析には RIA を用い，一方，本申請にとってピボタル試験と位置づけられる試験を含む後期の試験では，LC-MS/MS を用いてイカチバント及びその代謝物の両方を測定した（2.4.3.1 項参照）。

2.4.4.2.1　マウス

マウスにおけるイカチバント皮下投与による毒性作用を，イカチバントを連日投与した 13 週試験で検討した（JE049-0159 試験）。最初に，マウスに 10，25，又は 50 mg/kg/day を投与したが，投与 9 週間後に毒性のエビデンスが認められなかったため，試験に新たな 1 群の動物を追加し，100 mg/kg/day を投与した。試験期間中に投与に関連した死亡はみられなかった。50 及び 100 mg/kg/day での投与に関連する一般症状は，投与 3 週目以降からほとんどの動物でみられた注射部位のただれ及び病変に限られていた。10 及び 25 mg/kg/day 投与でもただれ，病変及び被毛の

菲薄化がみられたが，より高用量の動物に比べて発現頻度はかなり低かった。すべての投与量群で，雌雄とも溶媒投与群の動物より体重が増加したが，摂餌量に相関する増加はみられなかった。最高投与量群（100 mg/kg/day）でのみリンパ球数の平均値が減少し，これは雌雄両方で観察された。

50 及び 100 mg/kg/day を投与した動物の副腎，頸部，注射部位，胸腺及び子宮で組織病理学的所見が認められた。雌マウスでのみ，投与に関連するごく軽微又は軽度の副腎束状帯の肥厚がみられた。50 mg/kg/day を 13 週間投与された雌における発現頻度及び程度は，100 mg/kg/day を 5 週間投与された雌の場合よりも強かった。注射部位の組織学的所見の重症度は用量相関的で，潰瘍化，炎症，浮腫，及び筋変性は高投与量群で最も多くみられた。

TK 解析により，すべての投与量群のマウスがイカチバント及び主要代謝物 M2 に曝露されたことが示され，曝露プロファイルに性差は認められなかった。13 週間の投与期間にわたり，イカチバント又は M2 の蓄積のエビデンスはなかった。本試験は，その後のがん原性試験に用いる用量レベルに関する情報を提供するよう設計されており，本試験の結果に基づき，最大投与量として 100 mg/kg/day が推奨された。しかし，がん原性試験においてマウスに 100 mg/kg を連日投与したとき，予想を超える死亡がみられた。この試験の詳細は 2.4.4.6 項で考察する。この高用量が不耐容であったため，2 回目の用量設定試験（JE049-0170 試験）が開始された。

2 回目のマウスの用量設定試験は，皮下経路により開始した（JE049-0170 試験）。イカチバントを CD-1 マウスに 0，5，15，及び 50 mg/kg の投与量で週 2 回皮下投与したとき，有害ではない投与に関連する所見が膣，注射部位及び肝臓で認められた。15 又は 50 mg/kg を投与した雌の 20%は発情休止期にあることが判明したが，これに対して溶媒投与群の動物では 0%であった。注射部位のただれは，50 mg/kg を週 2 回投与した動物のすべて，また，15 mg/kg を投与した動物の半数弱で認められたが，一方 5 mg/kg を投与した動物では認められなかった。OECD ガイドライン 404 に基づいたスケールによる注射部位の病理所見に対応するスコアは，ごく軽微から軽微で，少数の所見が中等度と判定された。

イカチバントを投与した動物では，投与しなかった動物より摂餌量が多かった。イカチバントの投与は，肝臓におけるグリコーゲン胞の減少ももたらした。イカチバントを実験動物に投与した回復期間を含む以前の試験では，注射部位反応，膣，肝臓のグリコーゲン胞及び摂餌量に関連した所見が，回復期間中に元に戻ることが示された。これらの所見に基づき，最大耐量（MTD）は 50 mg/kg 週 2 回投与と考えられた。

2.4.4.2.2　ラット

ラット 6 カ月間皮下投与試験（ピボタル試験）

ラットの 6 カ月間毒性試験は，投与量 0，3，10 及び 30 mg/kg/day で実施し，対照群及び高投与量群の動物では 4 週間の回復期間を設けた（JE049-0163 試験）。10 及び 30 mg/kg/day 群の動物では，注射部位で局所での不耐容性の徴候が観察されたが，これは投与する容量を増やす（濃度を

下げる）ことでほぼ軽減された。投与期間中に雄の体重増加量に用量依存的な減少がみられたが，このことは，これらの動物で認められたテストステロン濃度の低下の結果と考えられ，回復期間中には体重増加量に反動的な上昇がみられた。摂餌量には有意な影響はみられなかった。雌雄両方で肝酵素のわずかな上昇（対照群の値の 2.5 倍まで）が，主として 30 mg/kg/day で認められたが，回復期間中に対照群のレベルに戻った。

雄では用量依存的なテストステロン濃度の低下が明らかに認められ，26 週目までに測定下限値未満のレベルに達したが，4 週間の回復期間の終了時までに，ほぼ対照群のレベルに戻った。雄では卵胞刺激ホルモン（FSH）濃度も低下したが，回復期間中に対照群のレベルを超えるまでに回復した。雌では黄体形成ホルモン（LH）濃度の低下のエビデンスがみられたが，対照群の動物を含め，多くの値が測定下限未満であったため，明確な結論を下すことはできなかった。30 mg/kg/day 群では肝臓の重量が増加し（最大 29%増加），10 mg/kg/day でもわずかな（< 10%）増加がみられた。

すべての投与量群で，副腎重量の増加，並びに胸腺及び脾臓重量の低下がみられた。雌では卵巣重量の増加，また，雄では前立腺重量の低下がみられた。対照群の動物と比較したこれらの臓器重量の変化は，脾臓重量（増加）を除いて，回復期間の終了時には観察されなかった。

組織学的検査では，注射部位の変化に加え，副腎（束状帯のびまん性肥厚），肝臓（小葉中心性肥大），胸腺（リンパ球枯渇），骨髄（造血組織の減少），脾臓（髄外造血の減少，雌のみ），腎臓（乳頭/髄質の結石，雄のみ），褐色脂肪（大型小胞形成）並びに生殖器（雄では両側性の精液過少症及び精巣上体における精細管内変性精子/精細胞，前立腺及び精嚢における分泌低下，精巣における両側性生殖上皮変性：雌では乳腺の男性化，卵巣における黄体数の増加及び発育卵胞の減少，ごく軽微から顕著な子宮萎縮及び膣粘膜の粘液分泌及び/又は萎縮）で変化が認められた。10 mg/kg 群の雄 1 匹で肝臓に小葉中心性肥大がみられ，3 及び 10 mg/kg 群の雌では脾臓に所見がみられた。肝臓（雌雄），精巣上体と腎臓（雄），及び脾臓（雌）における投与に関連した他のすべての所見は，30 mg/kg/day を投与した動物に限られていた。10 又は 30 mg/kg/day を投与した動物では，注射部位及び子宮に変化が認められた。他の投与に関連する所見は，すべての投与量群でみられた。

骨髄，褐色細胞，精巣上体，腎臓，肝臓，乳腺，前立腺，精嚢，脾臓，胸腺，子宮及び膣内における所見は，4 週間の回復期間中に完全に消失した。副腎と精巣では部分的な消失が観察され，このことは，十分な時間を与えればこれらの投与に関連した変化も完全に消失する可能性があることを示している。30 mg/kg/day を投与した雄の脾臓では，髄外造血の頻度と重症度が対照群の動物を上回っており，また，30 mg/kg/day を投与した雌の卵巣では，発育卵胞の数が対照群の動物よりも多かった。これらの所見は，いずれもリバウンド効果を示しているものと考えられた。

すべての投与量でさまざまな顕微鏡的所見がみられたため，本試験では無毒性量（NOAEL）は確定できなかった。しかし，投与に関連した変化は，十分な回復時間を与えれば完全に消失する可能性があると考えられた。イカチバント 3 mg/kg/day 投与時の平均 $AUC_{0\text{-}t}$（Week 26）は，雄では 7.27 μg·h/mL，雌では 5.17 μg·h/mL であった。この用量は最小毒性量（LOAEL）と考えられる。

補助的なラット皮下投与試験

雄ラットに皮下投与したときのイカチバントの作用に関する最初のデータは，イカチバントを28 日間静脈内及び皮下投与（10 mg/kg/day）並びに経鼻投与（2.5 mg/rat/day）した比較試験から得られた（JE049-0110 試験）。この試験は対照群を含まず，限定したパラメータに絞って検討した。

組織学的検査により，皮下投与した動物 10 匹中 4 匹で尿細管の萎縮が，また，10 匹中 1 匹で尿細管の壊死が認められた。以下で考察するように，腎毒性は静脈内投与でより高頻度にみられた。皮下投与では，1 匹でごく軽微な精巣精子形成の成熟停止がみられたが，一方静脈内投与した動物では大多数で影響がみられた。経鼻投与した動物では，精子形成に影響はみられなかった。10 mg/kg/day では，TK データは静脈内投与と皮下投与で同程度の曝露を示した（それぞれ，20.33 及び 17.30 μg·h/mL の $AUC_{0\text{-}4h}$）が，皮下投与後の C_{max}（12.77 μg/mL）は，静脈内投与後（24.09 μg/mL）のおよそ半分であった。しかし，本試験の最も早いサンプリング時刻は投与 30 分後であったことに注意しなければならない。

ラットがん原性試験における適切な投与量レベルを決定するため，ラットの 13 週間皮下投与試験を実施した（JE049-0160 試験）。本試験では，0，10，20 及び 30 mg/kg/day の投与量で，ラットに 13 週間連日投与した。本試験中に投与に関連した死亡はみられなかった。すべての用量群で，雌雄とも体重の群平均値が低かった。雄は非用量依存的な摂餌量の減少を示したが，雌では溶媒投与群の動物と比較して摂餌量に何の変化もみられなかった。

検討したすべての血液学的あるいは血液生化学パラメータに，毒性学的に意味のある変化はみられなかった。イカチバントが投与された雌雄の動物では，すべての投与量で副腎重量の群平均値の増加及び胸腺重量の群平均値の減少（いずれも体重で補正）が認められた。副腎では，軽微から中等度の束状帯のびまん性肥厚，胸腺ではごく軽微又は軽微なリンパ球枯渇を伴っていた。

雄では，生殖器で，前立腺及び精嚢機能の低下に伴う精子絶対数のごく軽微な減少に関連した前立腺及び精巣重量の群平均値の低下を含む所見がみられた。雌では，すべての投与量で卵巣重量の群平均値が相対的に増加し，ごく軽微な乳腺の男性化，黄体数の増加，及び子宮内膜腺のごく軽微な萎縮がみられた。

TK データから，すべての動物がイカチバント及び代謝物 M2 に曝露されたことが示され，また，イカチバント又は M2 の曝露量に性差はみられなかった。イカチバント及び M2 の曝露量は，いずれもすべての投与量群で，Day 1 の試料に比べて Week 13 の試料で増加していた。イカチバント及び M2 の $AUC_{0\text{-}t}$ 値に関する用量相関は，Day 1 及び Week 13 の両方で，10 mg/kg/day から 30 mg/kg/day の用量範囲でほぼ投与量に比例していた。本試験の結果に基づき，その後のラットがん原性試験の最高用量として，10 mg/kg/day（3 mL/kg）が提案された。

ラットでは，13 週間毒性/受胎能複合試験（JE049-0108 試験）で，1，3 又は 10 mg/kg/day の連日投与の影響を検討した。本試験の投与量は，先の 28 日間静脈内/皮下/経鼻投与試験において，10 mg/kg/day で腎毒性がみられたことにより決定した。この所見に基づき，より長期の試験における投与可能な最高用量は 10 mg/kg/day であると考えられた。

腎毒性については，2.4.4.3.1 項でより詳細に考察する。受胎能に関するデータは，2.4.4.3.2 項及び 2.4.4.7 項で詳細に考察する。

投与に関連する一般症状あるいは体重増加に及ぼす影響はなかったが，高投与量群の雄では，投与 1 週目の摂餌量がより少なかった。10 mg/kg/day が投与された雌雄及び 3 mg/kg/day が投与された雌では，白血球数が対照群の値より非統計学的に高かった。肉眼的検査では，イカチバントに関連した所見は観察されなかった。

組織学的検査では，皮下組織の壊死及び炎症が認められた 10 mg/kg/day 群の雄における注射部位を除いて，イカチバントに関連した変化は認められなかった。腎毒性のエビデンスはみられなかった。また，雌雄の生殖器官にも影響はみられなかった。本試験の 13 週間反復投与部分の動物について精子の分析を行ったが，対照群の動物と投与群の動物間で違いは観察されなかった。さらに，以下で考察するように，雄の授胎能にも影響はみられなかった。一般毒性に関する NOAEL は，投与した最高用量である 10 mg/kg/day と結論付けられ，当該用量の Week 13 における曝露量（$AUC_{0.5\text{-}t}$）は，雄で 15.9 μg·h/mL，雌で 17.2 μg·h/mL であった。

この 13 週試験に加え，その後より高用量の 1，10 及び 50 mg/kg/day でラットの 2 週試験を実施した（JE049-0127 試験）。腎毒性のエビデンスは認められなかったが，終了時の検査では，すべての投与量で付属腺の低重量を伴う精巣及び精巣上体の精子形成減少及び精子減少症が認められた。これらは，投与開始時点で 6 週齢から 7 週齢であったこれらの動物における性的成熟の遅延が原因と考えられた。NOAEL は 10 mg/kg/day と結論付けられ，当該用量の Day 14 における曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は，雄で 22.08 μg·h/mL，雌で 16.92 μg·h/mL であった。投与量 50 mg/kg/day での $AUC_{0\text{-}24h}$ は，93.8 及び 80.0 μg·h/mL であった。

補助的なラットの試験－静脈内投与

イカチバントを 0，0.1，1，又は 10 mg/kg/day の投与量でラットに 1 カ月間静脈内ボーラス投与し，投与終了時点で各群 5 匹の動物を 28 日間の回復期間用に保持した（JE049-0109 試験）。0.1 mg/kg 又は 1 mg/kg/day を投与したラットでは，イカチバントに関連した影響はみられなかった。10 mg/kg/day では，赤血球，ヘモグロビン，及びヘマトクリット値が低下した（しかし，網状赤血球数に変化はないと思われた）。血中尿素窒素の群平均値が上昇し，尿酸及び血清クレアチニンの上昇も（個々の動物で）みられた。また，腎臓，肝臓（雄のみ），及び卵巣の重量が増加した。これらの変化は，腎臓及び肝臓重量の増加を除いて 28 日間の回復期間の終了時にはみられなかったが，腎臓及び肝臓重量の増加は雄では完全に可逆的ではなかった。10 mg/kg/day 群のラットの尿の多くでは，ヘモグロビン量及び上皮細胞数が増加していた。投与終了時の組織学的検査では，10 mg/kg/day 群の雄 10 匹中 10 匹，また，雌 10 匹中 5 匹の腎臓には，上皮が壊死している領域や修復されている領域，また，尿細管萎縮の病巣がみられた。回復期間後，雄 5 匹中 5 匹，また，雌 5 匹中 1 匹で不可逆的な尿細管萎縮がみられた。これらの変化は，雌に比べ雄でより重度であった。肝臓又は卵巣では，化合物に関連した組織学的変化は認められなかった。本試験の NOAEL は 1 mg/kg/day と結論付けられた。

2.4.4.2.3 イヌ

イヌ 9 カ月間皮下投与試験（ピボタル試験）

イヌのピボタル毒性試験は，性的に成熟した動物を用いた 39 週試験であり，投与量は 0，1 及び 10 mg/kg/day（連日投与）に加え，追加の投与群の動物には，1 mg/kg を 1 日 3 回，週 2 回投与した（JE049-0164 試験）。本試験には 4 週間の回復期間を設けた。

10 mg/kg/day の初回投与後数分以内に，すべての雌及びほとんどの雄で，特に顔面と耳に発赤や腫脹などの一般症状がみられ，単離したヒト肥満細胞で観察されたように（JE049-0214，JE049-0215 試験），ヒスタミン放出の結果である可能性が高いと考えられた。この反応の頻度及び重症度は，反復投与に伴って低下した。10 mg/kg/day を投与した雄では，39 週間の投与期間後に平均で対照群の 4 倍を超えて体重が増加し（2.03 kg 対 0.47 kg），臨床的に肥満と記録された。摂餌量の状態は投与の影響を受けていないと考えられた。回復期間後の体重増加量は対照群と同程度であった。検査したすべての血液学的パラメータで投与に関連した明らかな変化はみられず，雄で用量依存的なコレステロール値のわずかな増加（対照より最大+36%）が回復期間中も引き続きみられた点以外は，血液生化学検査で毒性学的に意味のある変化はみられなかった。

10 mg/kg/day を投与した雄のテストステロン濃度は，大多数の動物で Week 13 以降測定下限値未満に低下した。4 週間の回復期間の終了時には，この投与群から回復期間に移行した雄のテストステロン濃度は，測定下限値の 6 倍から 9 倍のレベルまで増加した。FSH 濃度も両性で低下傾向を示し，4 週間の無投与期間内に回復した。10 mg/kg/day を投与した雄では，Week 8 週以降精巣サイズの減少が明らかに認められた。回復期間の終了時点では，精巣は顕著な増大を示し，投与前値のレベルに戻ったものの，月齢の等しい対照群の動物より小さいままであった。1 mg/kg/day 又は 1 mg/kg を 1 日 3 回，週 2 日投与した雄の精巣は，ある程度変動を示したが，試験期間を通して概ね増大し，Week 19 以降は対照群と同程度であった。剖検時に採取した精液試料中には，10 mg/kg/day では精子がないか，あるいは非常に少数の非運動性の精子しかみられなかった。

4 週間の回復期間の終了時に，試料を採取した高投与量群の 2 頭のうち 1 頭で，ある程度の精子が観察された。10 mg/kg/day を投与した雄の前立腺及び精巣（及び精巣上体）の平均重量は，投与終了時点で減少していたが，4 週間の回復期間内に回復傾向がみられた。1 又は 10 mg/kg/day を投与した雌の卵巣及び子宮の平均重量は，対照群の値より有意に低かったが，回復期間の終了時点では対照群の値と同程度であった。

ホルモンに対する作用は，顕微鏡的には 10 mg/kg/day を投与した雌雄の生殖器官における投与に関連した変化として現れており，具体的には精巣の重度の両側性精細管萎縮，乳腺の萎縮と不活性化，前立腺の重度の萎縮，軽微から中等度の子宮萎縮，卵巣における無黄体又は無発育卵胞，及び精巣上体管中の精子の欠如がみられた。1 mg/kg/day を投与した動物では，雌雄ともに顕微鏡的所見はより少なく（はっきりしない），具体的には雄 1 頭で精巣上体に軽微な両側性の精子減少がみられ，雌 2 頭でごく軽微な子宮萎縮がみられた。

4 週間の回復期間の後，ほとんどの所見は少なくとも部分的な回復のエビデンスを示した。10 mg/kg/day を投与した雌の生殖器官は，正常の周期性活動に戻っていると思われたが，回復期間の動物のうち 1 頭の雌の乳腺は，萎縮したままであると考えられた。雄では，精母細胞及び精子細胞を有する精細管の再集合のエビデンスがみられた。精細管中に精細胞はみられなかったが，十分な時間があれば，正常な精子形成に戻る可能性が高いと考えられた。イカチバント 10 mg/kg/day では一連の所見がみられたが，それらの所見は低用量では不明瞭であったことから，1 mg/kg/day と 1 mg/kg 1 日 3 回，週 2 回投与の両方が，本試験における NOAEL と考えられた。当該用量におけるイカチバントの平均 AUC_{0-t} 値（Day 1 と Week 39 を併合）は，それぞれ 3.83 μg·h/mL 及び 9.10 μg·h/mL であった。

補助的なイヌ皮下投与試験

イヌでは，投与開始時点で性的に未成熟の動物（6.6 カ月齢から 7.3 カ月齢）を用いた連日投与による 13 週試験を実施した（JE049-0117 試験）。当初の投与量は 0，10，30 及び 100 mg/kg/day であったが，高用量での局所忍容性が不良だったため，Day 32 に 100 mg/day/kg を 60 mg/kg/day に減量し，また，30 mg/kg の 2 回投与に分割して，1 回目は朝に，2 回目は約 4 時間の間隔を空けて午後に投与した。

試験期間中に予期しない死亡例はなかった。すべての投与量で，試験開始後数日間にわたって嘔吐が観察され，100/2 × 30 mg/kg/day を投与した雌雄及び 30 mg/kg/日を投与した雌では軟便/液状便もみられた。すべての投与量で観察された主な一般症状は，体の一部と耳の紅斑及び腫脹で，試験実施期間全体を通して観察された。体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図，血圧又は尿検査には，投与に関連した変化はみられなかった。100/2 ×30 mg/kg/day 群の雌雄では，血小板数及び血漿中フィブリノゲンの増加がみられ，30 mg/kg/day の雄でも血小板数の増加がみられた。高投与量群の動物（雄でより顕著）及び 30 mg/kg/day 群の雌で，投与前値及び/又は対照群の値と比較したアルカリホスファターゼ（ALP）活性の増加がみられた。また，雄では用量依存的なトリグリセリド値の増加（高用量でのみ統計学的に有意）も認められた。

肉眼的所見及び臓器重量の変化は，組織病理学的検査での所見（高用量群の動物における皮質細胞の空胞化を伴う副腎肥大及び副腎重量増加；リンパ球枯渇を伴う用量相関性の胸腺サイズの減少及び重量低下；全投与量群でみられた生殖器官［卵巣，精巣，精巣上体及び前立腺］のサイズ及び重量の低下）と関連していた。生殖器官における所見は，組織病理学的検査で未成熟又は発達停止と記載された所見と相関しており，子宮，膣及び乳腺構造でみられた。生殖器官に関する所見は，2.4.4.3.2 項で詳細に考察する。すべての投与量で，雌雄の生殖器官に影響が観察されたことから，本試験で NOAEL を決定することはできなかった。Week 13 における TK 解析では，10 mg/kg/day, 30 mg/kg/day 及び 30 mg/kg 1 日 2 回投与群の AUC_{0-t} は，それぞれ 38.2/31.6, 80.9/83.0 及び 246/213 μg·h/mL（雄/雌）であった。

このイヌ 13 週試験で生殖器官に影響が観察されたことを受け，イカチバントが生殖器官に及ぼす作用並びにそのメカニズムをさらに解明するため，追加の試験が実施された。

性的に成熟したイヌ（試験開始時点で 12 カ月齢以上）を用いた 4 週間の試験では，臨床で用いられる間欠投与のスケジュールで，イカチバント 1 及び 3.3 mg/kg を 1 日 3 回，週 2 回投与した。この試験では回復期間を設けた（JE049-0116 試験）。若いイヌ（試験開始時点で 5 カ月齢から 6 カ月齢）を用いた 13 週間の試験では，10 mg/kg/day と，より低用量である 3 mg/kg/day を反復投与した。さらに，臨床での典型的な用法である間欠投与により近いと思われるイカチバントの投与方法を検討するため，3.3 mg/kg/injection を 1 日 3 回，週 2 回のスケジュールで投与する群も含めた。この試験でも回復期間を設けた（JE049-0118 試験）。

これらの試験における一般毒性所見は，その他の試験でみられた所見と類似しており，両試験の焦点は生殖器官にあることから，これら試験については 2.4.4.3.2 項で詳細に考察する。

補助的なイヌ試験－静脈内投与

イヌにおける最初の 1 カ月間静脈内投与試験は，0，0.1，0.25，及び 0.8 mg/kg/day の投与量で実施され，投与終了で各投与量雌雄各 1 匹の動物を 28 日間の回復期間用に保持した（JE049-0121 試験）。高投与量群の雄では，ヒスタミン放出に関連する可能性がある徴候（口唇部分の腫脹）がみられたが，これらは予備試験（JE049-0119 試験）で 1 mg/kg/day を 7 日間投与した雌 1 頭でも報告されていた。心電図パラメータに影響はみられなかった。0.25 及び 0.8 mg/kg/day を投与した動物では，雌雄とも投与に対する反応はほとんどみられなかった。本試験では，イカチバントが原因である有害な所見はなく，したがって，NOAEL は 0.8 mg/kg/day であると結論付けられた。本試験は TK を含まなかった。

イヌにおける 2 番目の 1 カ月（4 週）試験では，イカチバントを 0，3.3，10，及び 30 mg/kg/day の用量で 1 時間かけて静脈内インフュージョン投与した（JE049-0122 試験）。すべての動物が，即時反復として観察された耳の紅斑と腫脹を示した。10 及び 30 mg/kg/day 群で認められた嘔吐の発現頻度は用量依存性であった。生殖器官のサイズ及び重量の低下が数頭の雄で観察され，組織学的検査による精巣，精巣上体及び前立腺の性的未成熟と関連していた。この明らかな性的成熟の遅延は，当初試験開始時の動物の月齢が若かったこと（6 カ月齢から 7 カ月齢）及び実験手順のストレスが原因であると考えられていた。しかし，上述したように，その後のイヌ皮下投与試験の結果を踏まえると，この 1 カ月試験における雄性生殖器に関する観察所見は，同じ現象の一部であり，イカチバントの投与と関連している可能性が高い。

雄動物で NOAEL を決定することはできなかったが，雌の NOAEL は 3.3 mg/kg/day であると結論付けられた。本試験には TK 用の試料採取が含まれていたが，分析上の問題によって許容できない数の QC 試料が目標範囲外の値となったため，TK パラメータは算出されなかった。

2.4.4.3 標的臓器に対する毒性

2.4.4.3.1 腎毒性

ラットの初期試験では腎毒性のエビデンスが示され，このことが以後の試験の用量選択における決定因子であった。1 カ月間の静脈内投与試験（JE049-0109 試験）及び 1 カ月間の静脈内/皮下/経鼻投与による比較試験（JE049-0110 試験）のいずれにおいても，10 mg/kg/day の用量で腎毒性が示された。しかし，腎毒性のエビデンスは，1，3 及び 10 mg/kg/day の皮下投与による 13 週間毒性/受胎能複合試験（JE049-0108 試験）及びその後の 1，10 及び 50 mg/kg/day の皮下投与による 14 日間試験（JE049-0127 試験）のいずれにおいても認められなかった。

1 カ月静脈内投与試験（JE049-0109 試験）では，腎毒性は血清中尿素の増加，また，個々の動物では，クレアチニン及び尿素窒素の増加として認められ，併せて尿検査では，ヘモグロビン及び不規則な顆粒状上皮細胞の頻度の増加もみられた。組織病理学的検査では，修復及び尿細管萎縮病巣への移行の両方の徴候を伴った近位尿細管における上皮壊死が示され，これらの所見は，28 日間の回復期間の終了時までに完全には消失しなかった。比較試験（JE049-0110 試験）においても，静脈内投与では雄 10 匹中 7 匹，皮下投与では雄 10 匹中 4 匹で腎尿細管萎縮がみられ，それぞれ 10 匹中 4 匹及び 10 匹中 1 匹で尿細管壊死がみられた。100 mg/kg の投与量をラットに単回インフュージョン投与した試験（JE049-0105 試験）においても，血中尿素窒素の増加とともに，腎臓で顕微鏡的変化がみられた。比較試験（JE049-0110 試験）における曝露量（$AUC_{0\text{-}4h}$）は，静脈内及び皮下投与（10 mg/kg）でそれぞれ 20.33 及び 17.30 µg·h/mL であった。13 週試験における $AUC_{0.5\text{-}4h}$ は，15.9/17.2 µg·h/mL（雄/雌）と先に見られた値と同程度であり，一方 14 日試験における 50 mg/kg/day での $AUC_{0\text{-}24h}$ は 93.7/80.0 ng·h/mL（雄/雌）であった。

ラットの初期の試験で腎毒性の所見が認められたにもかかわらず，これらは 10 mg/kg/day の高投与量を用いた 13 週試験（JE049-0108 試験）では確認されなかった。6 カ月間のピボタル試験では，腎乳頭又は腎髄質領域における結石の発現頻度は，対照群よりも 30 mg/kg/day を投与した雄で多かった。壊死や萎縮のエビデンスはなかった。これらの所見は 4 週間の回復期間後に完全に消失した。30 mg/kg/day の高用量（JE049-0163 試験）では，イカチバントの平均曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$）は，50.38 µg·h/mL（Day 1 及び Week 26，雄及び雌を併合）であった。

イヌにおいて腎臓に対する作用の可能性がある唯一の徴候は，皮下投与の 2 期用量設定試験（JE049-0115 試験）におけるもので，100 mg/kg/day を 10 日間皮下投与した 2 頭のいずれもが，ごく軽微な尿細管上皮変性/壊死を示した。これら 2 頭の動物における Day 10 の曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は，415 及び 522 µg·h/mL であった。腎毒性のエビデンスは，イヌのピボタル試験ではみられなかった。1 カ月間静脈内投与試験（JE049-0122 試験）（最大用量 30 mg/kg/day）及び 13 週間皮下投与試験（JE049-0117 試験）（最大用量である 100/2 × 30 mg/kg/day での Week 13 における $AUC_{0\text{-}t}$ は 246/213 µg·h/mL［雄/雌]）のいずれにおいても，腎毒性の徴候はまったく認められなかった。これらの曝露量は，JE049-1103 試験でイカチバント 30 mg が 1 日 3 回投与された高齢女性（> 65 歳）で観察された値に基づく，14.27 µg·h/mL という 1 日あたりの臨床曝露量を大きく上回っている。さらに臨床試験では，健康被験者及び患者のいずれにおいても腎毒性の徴候はみられていない。

全体として，ラットの初期の試験で見られた腎臓の壊死及び萎縮の徴候は，その後のラットの試験（より長期間あるいはより高用量でのデータ）では立証されなかった。腎臓の変化が認められた試験は，Hoechst AG 社において，同社の施設で飼育された Wistar 系のラットを用いて実施されたが（JE049-0109 試験），他の供給業者からの Wistar ラットでは影響はみられなかった。腎臓の所見はビーグル犬を用いた 1 試験（JE049-0115 試験）でも観察されたが，高投与量の 100 mg/kg を 3 日間投与したときにのみみられた。同様の高用量でのより長期の試験では，これらの所見は再現されなかった（JE049-0116 試験）。また，腎臓の所見は，検討したすべての動物種で，他の反復投与試験のいずれにおいても観察されなかった。このように，これらのデータは，腎毒性は Hoechst AG 社の施設で飼育されたラットの亜系に特異的な現象である可能性を示唆しており，HAE 患者にイカチバントを皮下投与したときの安全性評価を検討するうえでは，不確かなものと考えられる。なお，ヒトでは腎臓に対する作用のエビデンスはみられていない。

2.4.4.3.2 生殖器官に及ぼす作用

いくつかの初期のラットの試験では，雄の生殖器官に明らかな影響がみられた。1 カ月間の経鼻投与試験（JE049-0112 試験）では，0.25 及び 2.5 mg/animal/day 投与の終了時点で精巣重量が低下しており，0.025，0.25 及び 2.5 mg/animal/day 群のそれぞれ 10 匹中 1 匹，10 匹中 1 匹，及び 10 匹中 3 匹で，精巣及び精巣上体における精子形成減少が認められたのに対し，対照群では 10 匹中 0 匹であった。静脈内/皮下/経鼻投与の比較試験（JE049-0110 試験）では，同様の影響が静脈内投与後 10 匹中 8 匹（精巣における精子成熟の障害）及び 10 匹中 7 匹（精巣上体における精子減少症）で認められたが，曝露量が同程度であるにもかかわらず，皮下投与では精巣への影響は認められず，精巣上体における精子減少症が 10 匹中 1 匹みられたのみであった。6 カ月間の経鼻投与試験の 1 試験（JE049-0114 試験）では，0.25 mg/animal/day を投与した 10 匹中 3 匹で，精巣で萎縮病巣が見られたが，2.5 mg/animal/day での発現頻度はゼロであった。もう 1 つの 6 カ月間の経鼻投与試験（JE049-0113 試験），1 カ月間の静脈内投与試験（JE049-0109 試験）及び吸入投与試験（JE049-0111 試験）では，雄の生殖器官に影響は観察されなかった。これらの試験に用いた雄動物は，投与開始時点でおよそ 5 週齢から 6 週齢であった。

初期のイヌの試験，すなわち最大投与量 0.8 mg/kg/day の 1 カ月間静脈内投与試験（JE049-0121 試験），最大投与量 0.8 及び 1.6 mg/kg/day の 1 カ月間及び 6 カ月間経鼻投与試験（JE049-0124，JE049-0125 試験），及び最大投与量 9.6 mg/kg/day の 4 週間吸入投与試験（JE049-0123 試験）では，生殖器官に影響はみられなかった。しかし，これらのイヌの試験における曝露量は比較的低かった。マウスにおける初期の観察結果から，また，当時施行されていた日本の規制要件にしたがい，10 週齢の雄マウスを用い，交配前から 5 週間皮下投与（16.2，80.8 mg/kg/day）あるいは静脈内投与（5，30 mg/kg/day）する授胎能試験（JE049-0137 試験及び JE049-0138 試験）を実施したが，雄の授胎能に有害な作用はみられなかった。

イカチバントを血管性浮腫の治療薬として開発するという決定がなされた後，イヌの 1 カ月間静脈内投与試験，ラット及びイヌの 13 週間皮下投与試験を含む追加の試験を実施した。ラットの

13 週間毒性/受胎能複合試験（投与量 1，3 及び 10 mg/kg/day）（JE049-0108 試験）では，雄の授胎能又は精子パラメータには何の影響もみられなかったのに対し（Week 13 における 10 mg/kg/day での AUC は 15.9 μg·h/mL），イヌの試験では生殖器官に影響がみられた。ラットの 26 週間皮下投与ピボタル試験（JE049-0163 試験）では，生殖ホルモンと，顕微鏡的には雌雄の生殖器官にイカチバントに関連する影響が示された。

イヌにおける最初の試験は，3.3，10 及び 30 mg/kg/day を 1 時間かけてインフュージョン投与する 1 カ月間静脈内投与試験（JE049-0122 試験）と，10，30 及び 100/2 × 30 mg/kg/day での 13 週間皮下投与試験（JE049-0117 試験）であり，いずれの試験でも，投与開始時点でおよそ 7 カ月齢の未成熟の動物を用いた。2.4.4.2.3 項に記載したように，13 週試験における所見を受けて 2 つの追加試験を実施した。1 つは，未成熟のイヌ（投与開始時点でおよそ 6.5 カ月齢）を用いた，10 mg/kg/day と，より低用量の 3 mg/kg/day の反復投与，並びに 3.3 mg/kg/injection を 1 日 3 回，週 2 回投与のスケジュールで投与する群を含む，13 週試験であった（JE049-0118 試験）。もう 1 つのイヌの試験は，性的に成熟したイヌ（試験開始時点でおよそ 12 カ月齢）を用い，臨床で想定される間欠投与のスケジュールにより，イカチバント 1 及び 3.3 mg/kg を 1 日 3 回，週 2 回投与する 4 週間の試験であった（JE049-0116 試験）。

さらなる追加試験をラット及びイヌで実施した。ラットの試験では，より高用量（1，10 及び 50 mg/kg/day）の 2 週間投与を評価した（JE049-0127 試験）。イヌの試験には，ホルモン（テストステロン，LH，FSH，エストラジオール及びプロゲステロン）濃度の測定を含めた。

これらの後期試験に関与した病理学者及び試験責任者が下した結論に加え，Jerini AG 社（かつてのイカチバントの開発会社）は，この分野の専門家として広く認められている [redacted] 社の [redacted] に，試験のレビューと所見の解釈を求めた。[redacted] は，イヌの試験－1 カ月間静脈内投与試験，1 カ月間皮下投与試験及び 3 カ月間皮下投与試験 2 試験からの生殖器官の画像，及びラットの 13 週間/受胎能複合試験の画像を受け取った。[redacted] は自身の結論に関する報告書（JE049-0153）を作成し，その内容を「2.6.6 毒性試験の概要文」に要約した。[redacted] は雌雄の組織を評価したが，焦点は雄動物に絞った。雌イヌの組織は [redacted] によりレビューされ，その報告書（JE049-0157）は「2.6.6 毒性試験の概要文」で要約している。

いくつかの初期のラットの試験で観察された影響は，50 mg/kg/day の高用量を用いたその後の 14 日間皮下投与試験（JE049-0127 試験）でも，また，高用量を 30 mg/kg/day としたラットの 6 カ月間皮下投与試験（JE049-0163 試験）でもみられた。投与量 10 mg/kg/day までの 13 週間投与は，臓器重量又は組織学的に何ら影響を示さず，さらに，受胎能の評価及び精子パラメータの検査でも，イカチバント投与の影響は全く認められなかった。

イヌでは，13 週間の連日皮下投与でも，また，4 週間の連日静脈内投与でも，未成熟なイヌ（投与開始時点でおよそ 6 カ月齢）で明らかな影響が認められた。しかし，成熟したイヌに臨床で想定される間欠投与のスケジュールで 4 週間（3.3 mg/kg を 1 日 3 回，週 2 回）又は 39 週間（1 mg/kg を 1 日 3 回，週 2 回）投与したとき，臓器重量に影響はみられず，組織学的にもほとんどあるいは全く変化はなかった。間欠投与による未成熟な雄のイヌへの投与は，連日投与で見られた影響

に質的に類似する影響を生じたが，重症度はごく軽微なもののみであった。未成熟なイヌを用いた 13 週試験（JE049-0118 試験）並びに成熟したイヌを用いた 4 週試験（JE049-0116 試験）及び 39 週試験（JE049-0164 試験）にはいずれも回復期間が含まれ，これらの影響が投与の中止によって回復することが示された。臓器重量及び組織学的観点からだけでなく，ホルモン濃度に関しても可逆性がみられた。さらに，成熟したイヌを用いた 1 日 3 回の間欠投与による 4 週試験での測定では，ホルモン濃度が，投与の翌日には初回投与前のレベルに回復することが示された。

組織学的及び臓器重量のデータは，ラット及びイヌの両方でみられた，雄動物で観察されたテストステロン濃度の低下と一致しており，LH 濃度の低下を介したものである可能性があるが，これらの試験で測定した LH レベルには変動があり，これについて明確な結論を出すのは難しい。雌で観察された所見は，FSH 濃度の低下と一致していた。専門家レビュー（JE049-0157 試験）の中で，[redacted] は，イカチバントが視床下部―下垂体軸に対する直接的な阻害作用を有し，それによって FSH と LH の濃度を低下させるという仮説を提唱している。この仮説は，下垂体でのホルモン放出の調節において，B2 受容体を介して作用するブラジキニンの役割を示した文献データによっても裏付けられている（Shi et al. 1998）。

臨床では，若年及び高齢の男女に 30 mg を 1 日 3 回投与した JE049-1103 試験で FSH 及び LH 濃度を測定した。その結果，ホルモン濃度に影響はみられなかった。第 I 相試験（HGT-FIR-062 試験）では，健康な成人男性及び女性被験者において，イカチバントの反復投与は，基底状態又は刺激した状態での循環血中の性ホルモン濃度，また，他の生殖能パラメータに臨床的に懸念される作用を示さなかった。イカチバント反復投与の忍容性は良好であり，イカチバントの安全性プロファイルは，他の臨床試験で観察されたものと一致していた。

まとめると，生殖器官に直接的な影響がみられたものの（イカチバントはラットの受胎能試験で着床を阻害したが，これは B2 拮抗剤では想定外のことではなく，これについては以下の 2.4.4.7 項でさらに詳しく考察する），これらの結果は，成人の生殖能には有害作用のリスクがほとんどあるいはまったくないということを示唆している。間欠投与のスケジュールでは，未成熟のイヌで軽微な作用のみが生じ，さらに，臨床で想定される 1 日 3 回，週 2 回の間欠投与スケジュールを用いた成熟イヌにおける結果は，症状の重症度及び臨床ではさらに少ない頻度で使用される可能性が高いことを考えると，ベネフィット―リスクのバランスが良好であることを示唆している。

2.4.4.4　動物及びヒトにおけるイカチバント，M1，及び M2 の相対的曝露量

非臨床試験におけるイカチバントの血漿中曝露量と臨床使用で得られる曝露量との関係を検討するにあたり，HGT-FIR-061 試験のデータを利用した（[2.7.2 臨床薬理試験] 参照）。この臨床試験は，健康な成人志願者（男性及び女性，18 歳から 50 歳）を対象とし，イカチバント 30 mg を単回皮下投与，又はイカチバント 90 mg（1 回 30 mg を 1 日 3 回皮下注射）を投与した。これら両投与方法での血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC）を表 2.4-6 に示す。

表 2.4-6　　イカチバント，M1 及び M2 の臨床での血漿中曝露量

	24 時間内に 30 mg 単回皮下注射		24 時間内に 30 mg を 6 時間間隔で 3 回皮下注射	
	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (h·ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (h·ng/mL)
	男性 + 女性 (N = 76)		男性 + 女性 (N = 72)	
イカチバント	979 (262)	2178 (0.565)	2719 (666)	6734 (1221)
M1	301 (54)	1700 (0.296)	862 (143)	4957 (801)
M2	317 (55)	1891 (0.327)	869 (141)	5399 (072)

出典：HGT-FIR-061 試験
注：データは平均値 (標準偏差) を示した。
AUC_{0-24} = 投与 24 時間までの濃度―時間曲線下面積，C_{max} = 最高濃度

表 2.4-6 に示したように，1 日 3 回投与で許容される 3 回の投与をすべて受けた患者における 24 時間までの男性+女性の平均 AUC は，6734±1221 ng·h/mL と算出された。

イカチバントの代謝試験では 2 つの主要代謝物が認められたが，これらはラット，イヌ及びヒト間で一定しており，H-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH（M1 と命名）及び H-Ser-D-Tic-Oic-Arg-OH（M2 と命名）と同定されている。*In vitro* 試験により，イカチバントの代謝は NADPH 非依存性で，結果として CYP450 を介さないことが明らかになっている。放射標識したイカチバントを静脈内又は皮下投与したマウス，ラット及びイヌの代謝試験からの尿試料の分析により，イカチバントが *in vivo* で代謝されることが示された（2.6.4.5 項参照）。

代謝物 M1 及び M2 は，ヒトのほかにマウス，ラット及びイヌで検出されたことから，特異的な代謝物ではないと考えられる。イカチバントの臨床試験から得られた血漿中の M1 及び M2 の曝露量を評価し，非臨床安全性試験における曝露量と比較した（[2.6.6 毒性試験の概要文]参照）。イカチバントの臨床使用のための十分な安全性マージンを担保するため，反復投与の一般毒性試験及びがん原性試験において血漿中 M1 及び M2 曝露量を測定した（ICH M3 R2 Q&A）。動物での曝露量がヒトでみられた曝露量（AUC ベース）の少なくとも 50%以上あれば，一般に，代謝物の毒性の特徴づけは十分になされていると考えられる。

ヒトにおけるイカチバントの最大曝露量と，ラット及びイヌのピボタル毒性試験及び齧歯類のがん原性試験における LOAEL 及び NOAEL でのイカチバントの曝露量との比較を表 2.4-7 に示す。イカチバントは間欠投与で投与され，臨床使用において患者が受ける最大用量は，1 カ月あたり 30 mg の 8 回投与である。この臨床における間欠投与法を考慮に入れるため，非臨床の安全性マージンは，1 日単位と 1 カ月単位の両方で算出した。なお，ラット及びイヌにおける曝露量を外挿するため，1 カ月は 4 週間又は 28 日間としている。

表 2.4-7 ヒトと反復投与毒性試験及びがん原性試験の NOAEL/LOAEL における曝露量の比較

動物種/試験番号	用量/投与スケジュール	投与期間	1 日の平均 $AUC_{0-\infty}$[a] (μg·h/mL)	1 カ月の平均 AUC (ng·h/mL)	安全性マージン (1 日単位)	安全性マージン (1 カ月単位)
イカチバント						
ヒト[b] HGT-FIR-061	30 mg	単回投与	2.18	–	–	–
	3[c] x 30 mg	1 日に単回投与 3 回	6.73	–	–	–
	8[d] x 30 mg	1 カ月に単回投与 8 回	–	(2.18 x8) 17.44	–	–
ラット JE049-0163	3 mg/kg/day[e]	26 週間	6.22	(6.22 x 28) 174.16	0.92	9.99
イヌ JE049-0164	1 mg/kg 1 日 3 回, 週 2 回	39 週間	9.57	(9.57 x 8) 76.56	1.42	4.39
マウス JE049-0175	15 mg/kg/day; 週 2 回	26 週間(2 年間試験の一部)	21.15	(21.15 x 8) 169.2	3.14	9.70
ラット JE049-0162	6 mg/kg/day	26 週間 (2 年間試験の一部)	13.0	(13.0 x 28) 364	1.93	20.87
代謝物 M1						
ヒト[b] HGT-FIR-061	30 mg	単回投与	1.70	–	–	–
	3[c] x 30 mg	1 日に単回投与 3 回	4.96	–	–	–
	8[d] x 30 mg	1 カ月に単回投与 8 回	–	(1.70 x 8) 13.44	–	–
ラット JE049-0163	3 mg/kg/day[e]	26 週間	0.589	(0.589 x 28) 16.5	0.12	1.21
イヌ JE049-0164	1 mg/kg 1 日 3 回, 週 2 回	39 週間	1.52	(1.52 x 8) 12.16	0.31	0.89
マウス JE049-0175	15 mg/kg/day；週 2 回	26 週間 (2 年間試験の一部)	2.62	(2.62 x 8) 20.96	0.53	1.54
ラット JE049-0162	6 mg/kg/day	26 週間 (2 年間試験の一部)	1.37	(1.37 x 28) 38.22	0.28	2.81
代謝物 M2						
ヒト[b] HGT-FIR-061	30 mg	単回投与	1.89	–	–	–
	3[c] x 30 mg	1 日に単回投与 3 回	5.40	–	–	–
	8[d] x 30 mg	1 カ月に単回投与 8 回	–	(1.89 x 8) 15.12	–	–
ラット JE049-0108	10 mg/kg/day	13 週間	0.735	(0.735 x 28) 20.58	0.14	1.36
イヌ JE049-0164	1 mg/kg 1 日 3 回, 週 2 回	39 週間	0.50	(0.50 x 8) 4.00	0.09	0.26
マウス JE049-0175	15 mg/kg/day; 週 2 回	26 週間 (2 年間試験の一部)	2.59	(2.59 x 8) 20.72	0.48	1.37
ラット JE049-0162	6 mg/kg/day	26 週間 (2 年間試験の一部)	1.48	(1.48 x 28) 41.44	0.27	2.74

AUC = 濃度—時間曲線下面積,

注：非臨床試験からの値は雌雄の平均であり，各試験の試験終了時又は血液採取期間の最も遅い時点からのデータである。

a ヒト AUC_{0-24hr} (単回投与試験) ；動物 $AUC_{0-\infty}$ (反復投与試験)

b 男性及び女性の平均値 (N = 76 [30 mg], N = 72 [90 mg])

c 1 日に 3 回投与 (用量 30 mg)，出典：HGT-FIR-061 試験
d 計算：1 カ月内に投与される最大用量として 8 回投与 (30 mg)
e 最小毒性量 (LOAEL)

上で示したように，反復投与毒性試験の LOAEL（JE049-0163 試験）及び NOAEL におけるイカチバントの曝露量は，ヒトで予想される最大全身曝露量を十分カバーするものであった。ヒトにおける循環血中の代謝物 M1 及び M2 は，ラット及びイヌにおいても存在していた。毒性試験の LOAEL/NOAEL における M1 及び M2 の 1 日曝露量は，臨床で 30 mg を投与したときに得られる曝露量よりも低かった。しかし，非臨床と臨床での曝露量を 1 カ月の期間で比較すると，毒性試験の動物種で得られた M1 及び M2 の曝露量は，臨床における曝露量をカバーするのに十分であると考えられる。

2.4.4.5 遺伝毒性試験

イカチバントを用いて実施された遺伝毒性試験を表 2.4-8 に記載する。*In vitro* の *Salmonella typhimurium* 及び *Escherichia coli* を用いた変異原性試験において，また，ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験においても，遺伝毒性のエビデンスは認められなかった。復帰突然変異試験における最大濃度は，4000 µg/plate から 10000 µg/plate であった。2 つの試験では，毒性及び/又はイカチバントの沈殿物が認められ（JE049-0130，JE049-0132 試験），濃度範囲が変異原性を評価するのに十分に高かったことを示している。ヒトの末梢リンパ球を用いた *in vitro* の細胞遺伝学的試験（JE049-0133 試験）では，2500 µg/mL 以上で細胞毒性が認められ，本試験で使用した最高濃度（5000 µg/mL）が *in vitro* での染色体異常の可能性を評価するのに十分であったことを示している。

In vivo では，ハムスターの骨髄を用いた試験並びにマウス及びラットの小核試験において細胞遺伝学的作用の可能性を検討した。イカチバントは，*in vivo* の 3 試験すべてで陰性であった。マウス小核試験（JE049-0134 試験）では，50 mg/kg 静脈内投与後に一過性の毒性の徴候（運動量低下，立毛，及び皮膚のピンク変色）が認められ，この曝露量がほぼ最大であり，*in vivo* での細胞遺伝学評価に適切であることが示唆された。ラット小核試験（JE049-0135 試験）では，選択した投与量は，予備的な毒性に基づいて決定した MTD であった。ハムスター染色体異常試験（JE049-0136 試験）では，イカチバントを毒性として一般症状（痙攣及び失調歩行）を伴う 100 mg/kg の用量まで腹腔内投与した。腹腔内投与では，確実に良好な全身曝露が得られる可能性が高い。したがって，マウス，ラット，及びハムスターの *in vivo* 試験では曝露量を測定しなかったが，用いた投与量はすべて MTD である可能性が高い。

表 2.4-8　　イカチバントを用いた遺伝毒性試験

投与経路	試験	濃度/用量	試験番号 GLP 適用
In vitro	細菌遺伝子変異試験	4–4000 µg/plate	JE049-0126 GLP
		4–10000 µg/plate	JE049-0130 GLP
		4–5000 µg/plate	JE049-0131 GLP
		39–5000 µg/plate	JE049-0132 GLP
	ヒトリンパ球染色体異常試験	39–5000 µg/mL	JE049-0133 GLP
静脈内投与	マウス小核試験	50 mg/kg	JE049-0134 GLP
	ラット小核試験	雄：3.75，7.5，15 mg/kg 雌：2.5，5，10 mg/kg	JE049-0135 GLP
腹腔内投与	ハムスター染色体異常試験	10，50，100 mg/kg	JE049-0136 GLP

GLP =医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

実施した一連の遺伝毒性試験（JE049-0126，JE049-0130，JE049-0131，JE049-0132，JE049-0133，JE049-0134，JE049-0135，及び JE049-0136 試験）により，イカチバントに遺伝毒性はないことが示され，その化学構造の検討からも懸念材料はないと考えられる。

2.4.4.6　がん原性試験

実施した一連の遺伝毒性試験（2.6.6.4 項）では，*in vitro* 及び *in vivo* 試験においてイカチバントに遺伝毒性や染色体異常誘発性がないことが示された。臨床におけるイカチバントの長期間欠投与をサポートするため，マウス及びラットの長期（2 年）がん原性試験を実施した。検討した用量で，腫瘍の発生頻度や形態にイカチバントのがん原性の可能性を示す投与の影響はみられなかった。

2.4.4.6.1　マウス

マウスで最初の用量設定試験（JE049-0159 試験）を実施し，イカチバントを 0，10，30，100 mg/kg/day の用量で投与した。JE049-0159 試験のデータに基づき，104 週がん原性試験（JE049-0161 試験）が用量設定試験と同じ用量で開始された。この 104 週の試験は，早期の死亡により，投与 2 週間後に中止された。検討の結果，当該試験は誤った投与量で開始され，結果的に，投与量が意図したものの 2 倍に増えたと判断された。

新たな用量設定試験（JE049-0170 試験）が開始され，その結果，マウスがん原性試験で投与される高投与量として，15 mg/kg/dose，週 2 回が選択された。

この 104 週試験（JE049-0175 試験）では，マウスへの 104 週間の皮下投与を評価した。ICR マウスに 0（溶媒），2，5 又は 15 mg/kg/dose を週 2 回投与し，イカチバントの TK プロファイルも評価した。

Day 1 及び Week 26 における TK 評価の結果，イカチバントの曝露量は投与量の増加に伴って増加し，高投与量群の Week 1 における雌の C_{max} が雄に比べて約半分であったことを除き，曝露量は雌雄間で概ね類似していることが示された。Day 1 における曝露量は，Week 26 における曝露量と同程度と考えられた。Day 1 と Week 26 の両方におけるイカチバントの主要代謝物（M1 及び M2）の曝露量も投与量の増加に伴って増加し，イカチバントの投与量にほぼ比例した。M1 及び M2 の曝露量に明らかな性差はなく，Day 1 における曝露量は Week 26 における曝露量と同程度と考えられた。

雌雄の全体的な体重増加量あるいは摂餌量に，イカチバントが原因と考えられる投与群間の差はなかった。イカチバントが投与された雄では，平均テストステロン濃度が対照群に比べて約 50%低かった（投与群間で差なし）。これは，イカチバントの既知の薬理作用から予測されるものであった。

脱毛，皮膚の剥離，ただれ及び病変，被毛の汚染，菲薄化又は湿潤などの一般症状がみられ，高投与量（15 mg/kg/dose）で最も高頻度であった。投与後の観察所見（円背位，半眼，努力性呼吸，及び逆毛）の頻度は少なく，5 又は 15 mg/kg/dose 群に限られていた。イカチバントの投与が原因と考えられるその他の一般症状はなかった。イカチバントの投与との関連が疑われる肉眼的所見はなかった。

イカチバントを 2，5 又は 15 mg/kg/dose の投与量で週 2 回皮下投与した CD-1 マウスにおいて，発がんのエビデンスは認められなかった。

イカチバントを CD-1 マウスに 104 週間まで（雌には 99 週間），週 2 回皮下投与したとき，雌雄の注射部位において様々な炎症性変化の発現頻度が増加した。所見の重症度や性質，及び関連する変性変化がないことから，すべての所見は動物の健康全般には軽微な影響しか及ぼさず，おそらく投与の中止により消失するであろうと考えられた。

結論として，イカチバントを 2，5，又は 15 mg/kg/dose の投与量で週 2 回，104 週間（雌には 99 週間）マウスに皮下投与したとき，腫瘍形成の頻度は無投与の動物に比べて増加せず，忍容性も良好であった。腫瘍の発現頻度や形態に影響がなかったことから，イカチバントは検討した用量でがん原性を示さないと考えられる。

2.4.4.6.2 ラット

イカチバントをラットに 104 週間連日皮下投与したときの腫瘍の発生頻度及び形態に及ぼす潜在的な影響を評価するため，ラットの 104 週間がん原性試験（JE049-0162 試験）を実施した。HsdHan®WIST ラットに 0（溶媒），1.0，3.0 又は 6.0 mg/kg/day を連日投与した。イカチバント，M1 及び M2 の TK プロファイルも評価した。

Day 1 及び Week 26 における TK 評価の結果，イカチバントの曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ により測定）は投与量の増加に伴って増加し，雌雄で概ね類似していることが示された。Day 1 における曝露量は，Week 26 における曝露量と同程度と考えられた。イカチバントの主要代謝物（M1 及び M2）の曝露量も，Day 1 及び Week 26 のいずれにおいても投与量の増加に伴って増加し，イカチバントの投与量にほぼ比例した，あるいは投与量比をわずかに下回る増加を示した。M1 及び M2 の曝露量に明らかな性差はなかったが，Week 26 において，高用量のイカチバントを投与した雄で M2 の曝露量が高くなる傾向がわずかにみられた。反復投与によるイカチバント代謝物のわずかな蓄積のエビデンスが認められ，M1 及び M2 の曝露量範囲は Day 1 に比べて Week 26 では 1.3 倍から 2.5 倍高かった。Day 1 及び Week 26 において，イカチバントの曝露量は M1 及び M2 の曝露量よりも高く，曝露量の相対的差はイカチバントの用量に依存しないと考えられた。イカチバントと代謝物 M1 及び M2 間の曝露量比に，性別に関連した明らかなパターンはなかったが，雌で差がわずかに大きくなる傾向がみられた。

高投与量群（6.0 mg/kg/day）では，雄で全体的な体重増加量が対照群に比べて少なかったが（17%低い），摂餌量の減少とは関連していなかった。テストステロン濃度の平均値は，3.0 又は 6.0 mg/kg/day を投与された雄でわずかに低かった（それぞれ，55%又は 64%低値）。これは，イカチバントの既知の薬理作用から予測されるものであった。

全体的な死亡率には，対照群と投与された動物との間で統計的に有意な差はなかった。しかし，雄のみで，イカチバントに関連した試験の最初の 1 年間における死亡率の明らかな増加傾向がみられた。死亡動物の組織病理学的検査からは，イカチバントの投与が早期死亡の原因であるというエビデンスは認められなかった。

イカチバントを 1, 3.0 又は 6.0 mg/kg/day の投与量で連日皮下投与した Wistar 系ラットにおいて，がん原性のエビデンスは認められなかった。

3.0 又は 6.0 mg/kg/day を投与した雌では，褐色脂肪の大型空胞化がみられたが，副腎（束状帯のびまん性肥大）及び骨髄（大腿骨及び胸骨の髄腔における脂肪組織の増加）における変化は，高投与量群の雌のみでみられた。6.0 mg/kg/day を投与した雌雄では，足の蜂巣炎の発現頻度が明らかに多く，雌と雄を併せると極めて有意な正の傾向を示した。

注射部位の所見として，6.0 mg/kg/day を投与した雌雄で，脱毛，皮膚炎又は付属器の萎縮がみられた。これらの所見のほとんどはごく軽微又は軽度と評価され，ごくわずかなもののみが中等度又は顕著な変化と評価された。

その他にはイカチバントに関連する所見はみられなかった。結論として，イカチバントを 1.0, 3.0 又は 6.0 mg/kg/dose の投与量でラットに 104 週間皮下投与したとき，無投与の動物に比べて腫瘍形成の頻度は増加せず，忍容性も良好であった。イカチバント投与は高投与量群（6.0 mg/kg/day）の雄における体重増加量のわずかな低下，また，雌の副腎，褐色脂肪及び骨髄における非腫瘍性の顕微鏡的変化と関連していた。また，各投与量の雌雄で，注射部位及び足における所見もみられた。

注射部位反応及びテストステロン濃度の低値は，これまでの齧歯類の試験でも観察されており，無投与期間中に概ね回復している。本非臨床試験で用いた 2 年間に及ぶ連日投与は，臨床での治療条件より過大なものである。HAE 発作及びイカチバントの使用が間欠的であることを考慮すると，本試験の結果は，イカチバントの治療を受ける成人患者で同様の有害反応が発現する可能性が低いことを示唆している。

2.4.4.7　生殖発生毒性試験

イカチバントを非経口経路で投与したときの生殖及び発生に及ぼす影響として，受胎能（雄及び雌，マウス及びラット），胚及び胎児発生（ラット及びウサギ）並びに出生前及び出生後の発生（ラット）について検討した。実施した試験を表 2.4-9 に記載する。

雌雄の成熟ラットにおけるイカチバント及び代謝物 M2 の曝露，並びに授乳ラットにおける乳汁分泌の特徴を明らかにした。妊娠ラットを用い，放射標識したイカチバントの胎児分布を決定した。

ラットの受胎能データは，JE049-0108 試験からのものである。この試験の反復投与毒性データは，2.4.4.2 項で考察する。雄の授胎能の一部は，2.4.4.3.2 項の考察中にも含まれている。

表 2.4-9　イカチバントの生殖発生毒性試験

試験	投与期間	投与経路	投与量 (mg/kg/day)	試験番号 GLP 適用
雄マウス授胎能	交配 5 週前から	皮下	0，16.2，80.8	JE049-0137 GLP
	交配 5 週前から	静脈内	0，5，30	JE049-0138 GLP
ラット受胎能	雄－交配 10 週前から 雌－交配 2 週前から	皮下	0，1，3，10	JE049-0108 GLP
ラット胚及び胎児発生	交尾後 Day 7–18	皮下	0，0.25，2.5，25.0	JE049-0139 GLP
ウサギ胚及び胎児発生	交尾後 Days 6–18	皮下	0，0.1，1，10	JE049-0140 GLP
ラット出生前及び出生後	交尾後 Day 6 から出産後 Day 21 まで	皮下	0, 1，3，10	JE049-0141 GLP

GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

2.4.4.7.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験

雄マウスの授胎能試験では，精子数，運動性又は形態あるいは繁殖成績に，イカチバント投与の影響は示されなかった。したがって，雄マウスにおける授胎能に関する NOAEL は，これらの試験で検討された最高用量である 30 mg/kg/day 静脈内投与及び 80.8 mg/kg/day 皮下投与であった（JE049-0137，JE049-0138 試験）。

13 週間の毒性評価と受胎能及び初期胚発生に及ぼす影響（イカチバントを交配後 Day 7 まで投与）を併せて評価したラットの試験では，雄の授胎能又は精子学的パラメータに影響はみられなかった（JE049-0108 試験）。雄と雌のペアリングは，すべての投与量で影響はみられず，すべての群が交配までにほぼ同じ時間を要し，また，大多数の雌が妊娠した。交配後 Day 15 に子宮摘出した結果，投与した雄（10 mg/kg/day）と交配した 10 mg/kg/day 群の雌で，着床前死亡率の増加が示された（高投与量群で 16.0%，対照群では 6.4%）。着床後死亡率も，10 mg/kg/day 群でわずかに高かった（24 の胚損失，対照群では 16）。しかし，イカチバントを投与した雄を未投与の雌と交配させたとき，着床に影響はみられなかった。ブラジキニンは，ラットの着床に関与するとされており（Corthorn et al. 1997，Figueroa et al. 2001，Valdes et al. 1993），観察された高用量での着床への影響は，ブラジキニンに対する拮抗作用と一致していると考えられる。本試験における NOAEL は，雄の交配及び授胎能については 10 mg/kg/day，雌の交配及び受胎能については 3 mg/kg/day と結論付けられた。

ラット及びウサギの胚胎児毒性試験のいずれにおいても，イカチバントは催奇形性作用を示さなかった（JE049-0139，JE049-0140 試験）。

2.4.4.7.2 胚及び胎児発生に関する試験

ラットの胚及び胎児発生に関する試験（JE049-0139 試験；形態学的及び受胎能を含む出生後の発生の評価を含む）では，イカチバントの投与は F0 母動物の全身状態，摂餌量又は体重に影響を及ぼさなかった。妊娠終了時の検査では，高投与量群の母動物で心臓重量のごくわずかな増加が示された。子の子宮内及び出生後の発生も投与による影響を受けず，感覚機能の発達，行動又は F1 世代の受胎能にも影響は観察されなかった。帝王切開した胎児の外表，内臓及び骨格異常に関する形態学的検査では，イカチバントが胚毒性や催奇形性の可能性を有するという徴候は示されなかった。NOAEL は 25 mg/kg/day を超えると考えられた。

予備的なウサギの胚及び胎児発生に関する試験（JE049-0140 試験）では，母動物の全身状態に影響はみられなかったが，すべての投与量（10，25，50 mg/kg/day，皮下）で妊娠の障害がみられた。同試験内のフォローアップ評価ではより低用量（0.1，1，及び 10 mg/kg/day）を評価したが，主として 1 及び 10 mg/kg/day 群で流産及び早産が認められ，0.1 及び 1 mg/kg/day 群で追加動物の評価が必要となった。追加の群の結果は，先の試験の所見を再現したものではなかった。黄体数，着床数又は生存胎児数，胚胎児死亡率及び生存率に，対照群と投与群との間で差は認められなかった。主試験と補足試験に基づき，イカチバントは 0.1 及び 1 mg/kg/day の投与量では有害作用は

ないが，10 mg/kg/day では胚胎児死亡率を上昇させると結論付けられた。本試験ではイカチバントの催奇形性作用は検出されなかった。

2.4.4.7.3 出生前及び出生後の発生に関する試験

ラットの出生前及び出生後の発生に関する試験（JE049-0141 試験）では，妊娠中の母動物には顕著な影響は何もみられなかったが，10 mg/kg/day では明らかに出産が遅れ，より低用量でもごくわずかな遅延が認められた。高投与量では，母動物は交配後 Day 23 以降に出産を開始したが，対照群では Day 21 以降であり，出産中にも顕著な一般症状が観察された。

この試験内のスケジュール設定により，高投与量群の雌のサブグループでは，投与を妊娠 Day 21 又は Day 19 に中止し，出産後 Day 1 に再開することが可能であった。これによる影響はなく，これらの動物でも出産は依然として遅れていた。全体として，妊娠期間（平均値±標準偏差［SD］）は対照群，1，3 及び 10 mg/kg/day 群で，それぞれ 21.3 ± 0.4，21.8 ± 0.4，22.0 ± 0.4 及び 23.0 ± 0.7 日であった（すべての投与群について $p < 0.001$）。10 mg/kg/day 群の母動物のうち数匹は投与困難のため殺処分され，また，2 匹は Day 23/24 に死亡しており，剖検ではすべての動物で子宮角に死亡胎仔が認められた。無事に出産した 10 mg/kg/day 群の母動物の多くは，一般症状として蒼白を示し続け，生まれた出生児の大多数は出産後 Day 1 又は Day 2 に死亡した。これにより，10 mg/kg/day では試験に用いる子の数が減少し，Day 4 で予定していた同腹児の調整までに生存していたのは，他の群では 306 匹から 326 匹であったのに比べ，51 匹のみであった。したがって，10 mg/kg/day 群では同腹児の調整は行わず，その後の検査ですべての子を追跡した。

出産後初期の数日を生き残った高投与量群（10 mg/kg/day）の子は，最初はより小さい傾向にあったが，その後の数日間で体重が回復し，発達にその他の有害な作用は認められなかった。F1 世代の受胎能は影響を受けなかった。

この出生前及び出生後の発生に関する試験でみられたラットの出産に及ぼす顕著な影響を，ラットの胚及び胎児発生に関する試験のデータと比較すると，ラットの胚及び胎児発生に関する試験（JE049-0139 試験）における高用量は 25 mg/kg/day であり，妊娠 Day 7 から Day 18 にかけて投与されたため，出生前及び出産後の発生に関する試験の 10 mg/kg/day 群よりも 1 日早く投与を中止していた（最も早い投与中断日は Day 19）。胚及び胎児発生に関する試験では，数匹の動物を自然分娩に任せたが，出生前及び出生後の発生に関する試験と同じような，出産の著しい遅延は示さなかった。妊娠期間がごくわずかに延びる傾向があり（0，0.25，2.5 及び 25.0 mg/kg/day でそれぞれ 22.3，22.4，22.5 及び 22.7 日），高投与量群の 1 匹では，比較的良好に発生していた死亡胎児が 1 匹認められた。しかし，これらの観察所見が，出生前及び出生後の発生に関する試験でみられたのと同じ現象を反映したものか，あるいは単なる自然発生的な的な事象かどうかを明確に判断するのは困難である。

ブラジキニンはラットの出産における役割が想定されており，カリクレイン阻害剤は妊娠を延長させ，出産を遅らせることが示されている（Senior et al. 1976，Whalley et al. 1978）。したがって，イカチバントによる所見は予期せぬものではなく，ラットの出産におけるブラジキニンの役割を裏付けるものと思われる。ブラジキニンがヒトの出産に関与するかどうかは，明らかになっていない。

2.4.4.8　局所刺激性試験

イカチバント投与溶液のウサギにおける局所忍容性を，動脈内，静脈内及び静脈傍投与（それぞれ，1 mg/mL 溶液を 0.5，0.5 及び 0.1 mL）（JE049-0143 試験），関節内投与（0.01 及び 0.06 mg/mL 溶液を 0.5 mL）（JE049-0144 試験）及び皮下投与（イカチバント酢酸塩の 0.5，10，20 及び 40 mg/mL 溶液を 1 mL）（JE049-0142 試験）により評価した。いずれの場合でもイカチバント溶液の忍容性は良好であった。ウサギの無傷及び擦過皮膚及びウサギの目に対する刺激性を検討した試験でも，イカチバントは同様に良好な忍容性を示した（JE049-0145，JE049-0146 試験）。

これらの正式な試験で良好な局所忍容性が観察されたにもかかわらず，イヌ及びヒトの両方で注射部位反応が観察されている。イヌでは静脈内投与後ヒスタミン放出と一致する症状として，耳及び鼻面の腫脹も観察された。ヒスタミン放出は多くのペプチドによって誘発されるが，ラットとヒトの皮膚の肥満細胞を用いた初期の試験では，イカチバント（1 μM）はこの細胞種からのヒスタミン放出を刺激しなかった（JE049-0214 試験）。しかし，より高濃度（50 μM から 100 μM）のイカチバントを用いた同様の試験では，単離したヒト肥満細胞からの用量依存的なヒスタミンの放出と，より長時間のインキュベーション後には，トリプターゼ，ロイコトリエン C4 及びプロスタグランジン D2 の放出が示された（JE049-0215 試験）。

したがって，イカチバントは，皮下投与後に考えられる局所濃度（> 10 μM）で，ヒト肥満細胞からの貯蔵成分の脱顆粒及び炎症メディエーターの *de novo* 合成の両方を誘発する性質を有していると考えられる。他の実験では，マウスの皮膚において，イカチバント（1 mM から 10 mM）が肥満細胞の活性化とは無関係にカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）の放出も刺激することができること，また，B2 受容体の発現に依存して，HI5 及び HEK293 細胞においてイカチバントが 0.003 mM から 10 mM の濃度で部分アゴニストとして作用し得ることが示されている（JE049-0216 試験）。

ヒトでは，イカチバント 10 mg/mL 溶液 3 mL の皮下注射は，紅斑及び腫脹と関連している。この局所反応は 2 時間から 4 時間後に自然に消失し，人によっては灼熱感を伴うことがある。総合すると，これら非臨床試験からのデータから，ヒトでのイカチバント注射部位における有害な限局性皮膚反応の基礎にあるメカニズムとして，イカチバントにより誘発される肥満細胞の活性化，末梢神経からのニューロペプチドの放出，及び部分アゴニスト作用の関与が考えられる。

2.4.4.9 その他の毒性試験

2.4.4.9.1 抗原性試験

モルモットを用いてイカチバントの抗原性を調べた。イカチバントのみを用い，経鼻又は皮下投与により感作した場合には，抗体形成は観察されなかった。フロイントアジュバントと併せて感作した場合には，ウシ血清アルブミン（BSA）―イカチバント混合物を用いてチャレンジしたときに弱い抗体形成が認められたが，イカチバントのみのチャレンジでは，反応は認められなかった（JE049-0147 試験）。Magnusson and Kligman テストでの評価では（JE049-0148 試験），フロイントアジュバントに混ぜたイカチバントで予め感作した動物を用い，イカチバントを用いて皮膚でのチャレンジを行ったところ，極めて軽微な紅斑が生じた。イカチバントは，アジュバントとともに投与したとき，軽度の抗原性を有し，したがって，本試験により弱い感作性物質に分類されると結論付けられた。

イカチバントが，フロイントアジュバントの同時投与を伴う感作スケジュールにおいても弱い抗原性しか示さないことは，反復投与毒性試験において抗イカチバント抗体の出現を測定する試みによってさらに強調される。ラット及びイヌ両方の皮下投与試験では，当初の試験計画では抗体の探索が含まれていた。しかし，陽性血清を惹起する試み（JE049-0166 試験）が失敗したため，抗体を検出することはできなかった。いずれの動物種においても抗体形成の徴候はみられず，何らかの免疫を介した反応の関与が考えられる毒性，あるいは抗体が形成されたときに起こり得る反復投与によるイカチバント血漿中濃度の低下のどちらもみられなかった。

2.4.4.9.2 新生児を用いた試験

幼若ラットの毒性試験における用量を決定するため，幼若ラットを用いた皮下投与試験を実施した（JE049-0172 試験）。この試験では，ラットの出生後 Day 22 から，イカチバントを 0，6.25，12.5 及び 25 mg/kg/day の投与量で 14 日間連日投与した。イカチバントに関連する死亡はみられず，体重増加量の群平均値は，12.5 及び 25 mg/kg/day 群の雌でごくわずかに減少したが，雄は影響を受けなかった。雌は 25 mg/kg/day で摂餌量のわずかな減少を示したが，雄は影響を受けなかった。雄のみで，体重で調整した脾臓重量に，ごくわずかではあるが用量相関性の増加がみられた。また，雌雄で胸腺重量のごくわずかな低下もみられた。体重，摂餌量及び臓器重量の絶対量の変化はごくわずかであったため，これらは用量制限毒性ではないと考えられた。

幼若ラットを用いて，イカチバントが生殖器官及び性的成熟に及ぼす潜在的影響を検討した（JE049-0173 試験）。1 投与量群当たり 12 匹の幼若雄ラット及び 12 匹の幼若雌ラットに，イカチバントを 3，9 又は 25 mg/kg/day の投与量で，出生後 Day 22 からラットが性的に成熟するまでの 7 週間投与した。

22 日齢の雌雄ラットにイカチバントを 25 mg/kg/day の投与量で 7 週間皮下投与したとき，雄ラットで，包皮分離の平均日数の延長，精子学的パラメータへの部分的に可逆的な影響及び授胎能の障害が生じた。その他の所見として，子宮内着床前死亡の増加，精巣，精巣上体，前立腺及び

子宮重量の低値，また，顕微鏡的所見では，精巣及び精巣上体に部分的に可逆的な変化，並びに投与部位に完全に可逆的な変化がみられた。

9 mg/kg/day の投与量は，雄ラットにおける包皮分離の平均日数の延長，異常精子数の増加，精子数の減少，及び精巣，精巣上体及び前立腺重量の低値と関連していた。また，顕微鏡的所見では，精巣及び精巣上体に部分的に可逆的な変化，並びに投与部位に完全に可逆的な変化がみられた。

3 mg/kg/day の投与量は，雄で精巣/精巣上体重量の低値を生じた。顕微鏡的所見では，精巣において精細管細胞の空胞化及び生殖細胞の変性がみられ，これらはごく軽微から中等度と判定され，回復期間後に部分的な回復を示した。

雌の NOAEL は 9 mg/kg/day であった。雄ではすべての用量で精巣及び精巣上体に顕微鏡的所見が認められ，4 週間の無投与期間後も部分的な回復であったため，本試験では無作用量（NOEL）を決定することはできなかった。

性的に未成熟なイヌ（試験開始時点でおよそ 6 カ月齢）を用いた毒性試験では，イカチバントに性的成熟を可逆的に遅らせる作用があることが示された（JE049-0117，JE049-0118，JE049-0122 試験）。

雄でみられたホルモンへの作用及びそれによる生殖器官に及ぼす影響のほとんどは，B2 受容体拮抗剤であるイカチバントの既知の作用から予測されるものである。先の試験（ラットの 26 週間反復投与毒性試験；JE049-0163 試験）では，3 mg/kg/day 及び 10 mg/kg/day の投与量で同様の所見がみられた。しかし，これらの所見は，雄ラットの交尾能及び授胎能に関して，機能的障害をもたらさなかった。

雌雄の生殖組織に関する所見は，先述した生殖ホルモンに及ぼす作用，すなわち既知の B2 受容体拮抗作用から大部分予測されるもので，無投与の回復期間中に部分的又は完全な回復がみられた。また，この試験で用いた投与スケジュールは，イカチバントの臨床使用より過大なものであり，したがって，臨床状況で観察される可能性については，これら所見の影響は最小限であると考えられる。

2.4.4.9.3　代謝物の毒性試験

イカチバントの代謝試験では，ラット，イヌ及びヒト間で一致していると考えられる，2 つの主要代謝物の存在が示され，それぞれ H-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH（M1 と命名）及び H-Ser-D-Tic-Oic-Arg-OH（M2 と命名）と同定された。*In vitro* の検討では，イカチバントの代謝は NADPH 非依存的であり，結果的に CYP450 を介さないことが示された。

代謝物は，イカチバントを用いて実施した毒性試験の中で適切に検討されていると考えられため，個々の代謝物を用いた個別の毒性試験は実施していない。主要代謝物の薬理活性に関するデータは，上記の 2.4.2.1.1 項及び 2.4.2.2.1 項で考察している。

反復投与毒性試験，ラットの胚及び胎児発生に関する試験，及びがん原性試験に基づき，M1 及び M2 は，ICH M3 R2 にしたがって，非臨床的には十分に評価されていると考えられる。

イカチバントを反復投与したときのイカチバント並びに代謝物 M1 及び M2 の TK は，マウス，ラット及びイヌで評価された。イカチバント，M1 又は M2 の曝露量に何らかの性差があるという明らかなエビデンスはなかった。イカチバント，M1 及び M2 の曝露量は，投与量の増加に伴って増加した。イカチバントの反復投与により，イカチバント，代謝物 M1 及び M2 の曝露量が何らかの変化を示すという明らかなエビデンスはなかった。ラット及びイヌの両方で，イカチバントの曝露量は M1 及び M2 の曝露量よりも明らかに高かった。

M1 及び M2 は，ヒトに加えてマウス，ラット及びイヌでも検出されたことから，これらは特異的な代謝物ではないと考えられた。イカチバントの臨床試験から得られた血漿中の M1 及び M2 の曝露量を評価し，非臨床安全性試験における曝露量と比較した。イカチバントの臨床使用にあたって適切な安全性マージンを担保するため，反復投与の一般毒性試験及びがん原性試験から得られた血漿中の M1 及び M2 の曝露量を測定した（ICH M3 R2 Q&A）。動物での曝露量がヒトでみられた曝露量（AUC ベース）の少なくとも 50%以上あれば，一般に，代謝物の毒性の特徴づけは十分になされていると考えられる。

臨床では，イカチバントの用法は間欠投与である。30 mg の単回投与が，1 日のうち 3 回まで許容され，1 カ月内では，臨床使用で患者に投与された最大用量は，30 mg の 8 回投与であった。この臨床における間欠投与法を考慮に入れるため，非臨床の安全性マージンは，1 日単位と 1 カ月単位の両方で算出した。なお，ラット及びイヌにおける曝露量を外挿するため，1 カ月は 4 週間又は 28 日間としている。

幼若ラット及び成熟ラットにイカチバントを反復皮下投与し，イカチバント，代謝物 M1 及び M2 の TK を比較した。イカチバント及び M1 の曝露量は成熟ラットに比べて幼若ラットで低かったが，一方 M2 の曝露量は幼若ラットと成熟ラット間で同程度であった。吸収及び分布試験では，皮下経路による高いバイオアベイラビリティが示された。

2.4.4.9.4　不純物の毒性試験

イカチバント製剤の安定性試験では，一部の分子が開裂し，イカチバント (1–6)とイカチバント (7-10)の 2 つの断片が生じることが示されている。イカチバント (7–10)は代謝物 M2 と同一であり，したがって，毒性学的に評価されていると考えられる。イカチバント (1–6)については，単回及び反復投与毒性並びに変異原性試験を実施した。100 mg/kg の投与量でラットに単回静脈内投与したとき，一般症状や体重増加量に影響はみられず，剖検でも異常は認められなかった（JE049-0155 試験）。13 週間反復投与試験でラットに連日投与したときも，毒性学的に意味のある所見はみられなかった（JE049-0171 試験）。

イカチバント(1–6)の変異原性を Ames 試験で評価したが，変異原性のエビデンスは認められなかった（JE049-0154 試験）。培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では，S9 mix を添加せず

に 2500 及び 5000 μg/mL の濃度で 44 時間インキュベーションしたとき，イカチバント (1–6)は統計学的に有意な染色体異常の増加を誘発した。S9 mix を添加又は添加せずに 3 時間インキュベーションしたときには影響はみられなかったが, 5000 μg/mL での 20 時間のインキュベーションは，統計学的に有意ではないわずかな増加を生じた（JE049-0156 試験）。この試験では，分裂指数の測定を通して細胞毒性をモニタリングしたが，2500 及び 5000 μg/mL 濃度での 20 時間及び 44 時間のインキュベーションでは，いずれも同程度の分裂指数の低下（40%から 63%）がみられた。細胞毒性又は細胞増殖抑制が生じる濃度での長期間の曝露は，この試験では偽陽性の結果をもたらす可能性があること（Galloway et al. 1994，Kirkland et al. 2007），さらに，細胞毒性の指標として分裂指数を用いると，例えば細胞数やコロニー形成能によってモニターされる真の毒性の程度が過小評価されうること（Armstrong et al. 1992）が示唆されている。しかし，通常は，ヒトリンパ球における細胞毒性の評価に，分裂指数以外に代替できる測定法はない。したがって，これらの高濃度かつ長時間のインキュベーション時間で観察された，ヒトリンパ球における染色体異常の増加は，細胞毒性の結果であり，真の遺伝毒性作用ではない可能性が高いと考えられる。

マウスの骨髄を用いた小核試験により，*in vitro* の試験を補完した（JE049-0167 試験）。イカチバント (1-6)を 20，60 又は 200 mg/kg/day の投与量で 2 日間マウスに静脈内投与した結果，200 mg/kg/day を投与したマウスでは，死亡により解析に適したデータを供するに十分な試料数を得ることができなかったが，20 及び 60 mg/kg/day の投与量は，この試験で遺伝毒性を何ら示さなかった。エビデンスの全体的な重要性は，イカチバント (1–6)が遺伝毒性のリスクを有さないことを示唆していると考えられる。

イカチバント (1–6)を連日投与した 13 週試験で，イカチバント (1–6)を Han Wistar 系ラットに皮下投与したときの毒性作用を検討した（JE049-0171 試験）。0.4，2 又は 10 mg/kg/day の投与量をラットに投与した。この試験では，摂餌量，体重増加，眼科学的検査及び臨床病理学的パラメータに，イカチバント (1–6)に関連する所見はみられなかった。また，検討したいずれの投与量でも，被験物質に関連した組織病理学的所見や臓器重量に対する影響はみられなかった。有害事象の徴候はなく，イカチバント (1–6)の投与の忍容性は，この試験で用いたすべての投与量で良好であると考えられた。この試験における NOAEL は 10 mg/kg/day であった。この試験に基づき，臨床製剤中に最大 2%まで存在するイカチバント (1–6)は，以下の計算により適切に評価されていると考えられる：

合計 1 日投与量 90 mg の 2% = 1.8 mg，体重を 60 kg と仮定すると，この量は 0.03 mg/kg に相当する。臨床製剤中の最大量が 2%であることから，NOAEL である 10 mg/kg/day は，イカチバント (1–6)の 1 日最大用量（0.03 mg/kg）の 300 倍を超える用量である。

2.4.4.9.5　非天然アミノ酸—単回投与毒性試験

イカチバントは，分子内アミノ酸配列の [redacted] 及び [redacted] 番目に，2 つの非天然アミノ酸，[redacted] 及び [redacted] を含んでいる（構造式は図 2.4-3 参照）。これらのそれぞれについて，1000 mg/kg の単一用量で 2 匹の

雄マウス及び 2 匹の雌マウスに単回皮下投与したときの単回投与毒性を検討した。[redacted] を投与したときには影響はみられなかったが（JE049-0151 試験），一方 [redacted] は運動性低下，運動失調，努力性呼吸及び衰弱を誘発し，雌は 2 匹とも死亡した（JE049-0152 試験）。このアミノ酸のマウスにおける 50%致死量は約 1000 mg/kg となり，イカチバント自身で得られた用量よりわずかに高かった。

2.4.4.9.6　光毒性試験

イカチバントは，光毒性の懸念を直接呈することはない。イカチバントは，290 nm から 700 nm の範囲内に吸収帯を有さない（3.2.P.2.2 項参照）。ガイダンス（ICH S10，Dec 2012）によれば，化学物質が光毒性及び/又は光アレルギーを示すには，いくつかの性質が重要である。それらの条件の 1 つ以上があてはまらない場合，通常その化合物は光毒性の懸念を直接呈することがないと考えられる。

2.4.4.9.7　非臨床試験で使用した材料

イカチバント酢酸塩の原薬の製造工程は，2 つの異なるペプチド合成法，すなわち[redacted]と[redacted]を使用して開発された。毒性試験で使用した原薬は，[redacted] と [redacted] 法を用いて製造された。市販用の原薬は [redacted] 法によって製造される。これら 2 つの方法によって製造されたイカチバント酢酸塩は，[redacted]を有し，[redacted]に異なるだけである。市販用物質を代表する不純物を評価するため，また，2 つの製造法での不純物の量的変化を説明するため，ラットの 13 週間反復投与毒性試験（JE049-0160 試験）では，[redacted] によって合成したイカチバントを使用した。この試験でみられた毒性プロファイルは，他の試験でみられたものと類似していたことから，合成法やこの方法で合成した材料中の不純物の[redacted]の変更は，適切に評価されていると考えられる。

2.4.4.9.8　試験の実施

2.4.1 項で考察したように，イカチバントでは多くの臨床適用が検討され，複数の投与経路による非臨床安全性試験が実施された。安全性薬理の側面を評価した試験については該当しないものの，初期の毒性試験は GLP 基準に従って実施された。より最近の試験は，皮下投与によるすべてのピボタル毒性試験並びに安全性薬理試験を含め，GLP 基準に従って実施されている。

2.4.5　総括及び結論

イカチバントは，B2 受容体に選択的なブラジキニンの拮抗剤であり，その薬理活性は，*in vitro* 及び *in vivo* のモデルで示されている。いくつかの動物種及び試験系では，局所濃度が一時的に高くなるため，部分アゴニスト活性の徴候が観察されている。薬物動態的な半減期は，ラットで 0.5

時間から 1.5 時間と比較的短いが（皮下投与ではヒトでも同様），薬理活性の発現期間はかなり長く，ブラジキニン拮抗作用は皮下投与後 5 時間まで持続するというエビデンスが得られている。

イカチバントの代謝により分子が開裂し，2 つの基本構成成分であるイカチバント (1–5)（M1）及びイカチバント (7–10)（M2）が生じ，これらの代謝物はラット，イヌ，ヒトで共通している。したがって，毒性試験に用いた動物種の選択は妥当であると考えられる。分子内の M1 又は M2 に該当する部分のどちらかを標識した[^{3}H]-イカチバントをラットに投与したとき，放射能は主として尿中に排泄され，尿中の放射性成分は，標識部位によって代謝物 M1 又は M2 であった。イカチバントの未変化体は，尿中にほとんど存在しなかった。

反復投与毒性試験における主な所見は，ラット及びイヌの両方の生殖器官でみられた。未熟なイヌ（試験開始時で約 6 月齢）を用いた試験では，性的な成熟の障害が認められたが，投与の中止により回復性を示した。HAE の治療に用いられる典型的なイカチバントの用法により近い，1 日 3 回，週 2 回投与のスケジュールで動物に投与したとき，イカチバントの作用は連日投与と比較して顕著ではなかった。性的に成熟したイヌ（試験開始時で 12 月齢）に 1 日 3 回，週 2 回のスケジュールで投与したとき，生殖器官には完全な回復性を示すごくわずかな影響しか認められなかった。

ラット（26 週試験）及びイヌの両方で，ホルモン濃度の低下が観察された。イヌのホルモン濃度の測定では，雄ではテストステロンの低下，雌では FSH の低下が示された。測定した他のホルモンの濃度はばらつきが大きく，断定的な結論は下せなかったが，LH 濃度も全体的に低下傾向を示した。成熟したイヌへの 1 日 3 回，週 2 回投与でも，投与 24 時間後以内にホルモン濃度の低下が観察されたが，ホルモン濃度は次の投与日前に対照群のレベルに回復した。ブラジキニンは，B2 受容体を介して作用し，視床下部におけるホルモン分泌を調節すると考えられており（Shi et al. 1998），したがって，ホルモン分泌に及ぼす影響，また，その結果としての生殖器官に及ぼす影響は予測されたものである。ブラジキニンは，ラットの着床及び出産の両方に関与していることも知られており（Corthorn et al. 1997，Figueroa et al. 2001，Valdes et al. 1993，Senior et al. 1976，Whalley et al. 1978），イカチバントの投与は，着床障害及び出産遅延の両方に影響を及ぼした。

成熟したイヌに 1 日 3 回，週 2 回投与した試験では，ホルモンに対する作用が示されたが，生殖器官にはほとんどあるいはまったく影響はなかった。臨床データ（JE049-1103 試験）と併せ，このことは，イカチバントの反復投与が，基底及び刺激された状態での循環血中の生殖ホルモン濃度に臨床的に問題となる作用を及ぼさないことを示しており，HAE 発作が間欠的であり，したがってイカチバントの使用も間欠的であることを考えると，イカチバントを投与された成人患者が生殖器官に悪影響を受ける可能性は低いことを示している。イカチバントの遺伝毒性試験では，遺伝毒性は全く示されなかった。マウスとラットの完了した試験では，検討した投与量でイカチバントは発がん性を示さなかった。

イカチバントの不純物であるイカチバント (1–6)は，遺伝毒性については *in vitro* で，急性及び反復毒性については *in vivo* で検討した。*In vitro* 試験では，変異原性及び染色体異常誘発性がない

ことが示された。*In vivo* の毒性試験では，予想される 1 日曝露量の 300 倍を超える用量で何の所見もなく，イカチバント (1–6)は 2%存在しても問題ないことが確認された。

反復投与毒性試験, ラットの胚及び胎児発生に関する試験, 及びがん原性試験の結果に基づき，M1 及び M2 は，ICH M3 R2 に従って，非臨床的に十分に評価されていると考えられる。

毒性試験におけるイカチバントの全身性の有害作用は，ホルモンかく乱を生じ，着床及び出産に影響を及ぼす B2 拮抗剤としての薬理作用に起因すると考えられる。その他の薬理作用を介さない毒性はみられていない。イヌ及びヒトの両方でみられた注射部位反応は，肥満細胞の活性化及び投与部位局所での高濃度のイカチバントによるペプチド放出の結果と一致しており，イヌ及びヒトの両方で観察されたものの，反応は一過性であった。この事象の結果として治療を中止した患者はいない（［2.5 臨床に関する概括評価］）。

全体として, 成人における HAE の治療を目的としたイカチバントの使用をサポートするための包括的な試験プログラムにより，イカチバントの非臨床安全性プロファイルは確立されたものと結論づけられる。イカチバントで観察された有害作用は，大部分が B2 受容体を遮断するという薬理作用に起因するものであった。非臨床のピボタル安全性試験が長期間にわたる連日投与で実施されたのに対し，HAE 患者はイカチバントをかなり少ない頻度で使用する。このため，算出された安全域は，患者におけるイカチバントの使われ方に比べ，過少評価されている可能性が高いと考えられる。

2.4.6　参考文献

[1] Armstrong MJ, Bean CL, Galloway SM (1992). A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. Mutat Res; 265:45-60.

[2] Corthorn J, Figueroa C, Valdes G (1997). Estrogen and luminal stimulation of rat uterine kallikrein. Biol Reprod; 56: 1432-38.

[3] Farhy RD, Ho KL, Oscar A Carretero OA Scicli AG (1992). Kinins mediate the antiproliferative effect of ramiprik in rat carotid artery. Biochemical and Biophysical Research Communications; 182: 283-288.

[4] Figueroa CD, Chacon C, Corthorn J, Ehrenfeld P, Muller-Esterl W, Valdes G (2001). Temperospatial changes of kinin B2 receptors during the estrous cycle and pregnancy in the rat uterus. Biol Reprod; 64: 1590-9.

[5] Galloway SM, Aardema MJ, Ishidate M Jr, Ivett JL, Kirkland DJ, Morita T, et al. (1994). Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. Mutat Res; 312:241-61.

[6] Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis (2002). Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. J Clin Invest; 109:1057-63.

[7] Han Lee ED, Pappalardo E, Scafidi J, Davis AE 3rd (2003). Approaches toward reversal of increased vascular permeability in C1 inhibitor deficient mice. Immunol Lett; 89(2-3):155-60.

[8] Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, et al. (2007). How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of an ECVAM workshop. Mutat Res; 628:31-55.

[9] Martorana PA, Kettenbach B, Breipohl G, Linz W, Schölkens (1990). Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradkykinin antagonist. Eur J Pharmacol; 182(2):395-6.

[10] Perez M, Molinaro G, Adam A (2001). Bradykinin, an Important Mediator of the Cardiovascular Effects of Metallopeptidase Inhibitors: Experimental and Clinical Evidences. J Clin Basic Cardiol; 4:39-46.

[11] Rhaleb NE, Rouissi N, Jukic D, Regoli D, Henke S, Breipohl G, et al. (1992). Pharmacological characterization of a new highly potent B sub 2 receptor antagonist HOE 140: D-Arg-(Hyp3,Thi5, D-Tic7, Oic8) bradykinin. Eur J Pharmacol; 210: 115-20.

[12] Senior J, Whalley E (1976). The influence of drugs on the kinin-forming system in relationship to pregnancy and parturition in the rat. J Reprod Fertil; 47:319-23.

[13] Shi B, Mahesh VB, Bhat GK, Ping L, Brann DW (1998). Evidence for a role of bradykinin neurons in the control of gonadotrophin-releasing hormone secretion. Neuroendocrinology; 67:209-18.

[14] Valdes G, Corthorn J, Scicli CA, Gaete V, Soto J, Ortiz ME, et al. (1993). Uterine kallikrein in the early pregnant rat. Biol Reprod; 49: 802-8.

[15] Whalley ET, Riley AJ (1978). The kallikrein-kinin system in pregnancy and parturition in the rat: use of the kallikrein inhibitor aprotinin to prolong parturition. J Endocrinol; 77:20-1.