目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文 8
2.6.4.1 まとめ 8
2.6.4.2 分析法 9
2.6.4.2.1 マウス、ラット及びサル血漿中サフィナミド濃度測定法（HPLC/FL 法） 9
2.6.4.2.2 マウス及びサル脳試料中サフィナミド濃度測定法（HPLC/FL 法） 9
2.6.4.2.3 ラット及びサル血漿試料中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法） 9
2.6.4.2.4 ラット、ウサギ及びサル血漿中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法） 10
2.6.4.2.5 ラット胆汁及び尿中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法） 10
2.6.4.2.6 マウス及びラット血漿中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法） 10
2.6.4.2.7 マウス血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS 法） 10
2.6.4.2.8 ラット血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS 法） 10
2.6.4.2.9 ラット網膜及び脂肪組織中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS 法） 10
2.6.4.2.10 ウサギ血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS） 11
2.6.4.2.11 サル血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS） 11
2.6.4.2.12 酸性化処理サル血漿試料中 NW-1689AG の定量法（LC-MS/MS 法） 11
2.6.4.2.13 ラット、ウサギ及びサル血漿試料中のカルビドパ及びレボドパ定量法（HPLC-ECD 法） 11
2.6.4.2.14 ラット及びサル血漿試料中のプラミペキソール及び NW-1199 定量法（LC-MS/MS 法） 11
2.6.4.2.15 サフィナミド及び主要代謝物（NW-1153、NW-1689）の長期安定性 11
2.6.4.2.16 併用薬剤の長期安定性 12
2.6.4.3 吸収 18
2.6.4.3.1 雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時のサフィナミドの薬物動態 18
2.6.4.3.2 雌雄 Wistar ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時のサフィナミド、NW-1689 及び NW-1689AG の薬物動態 18
2.6.4.3.3 雄性カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時のサフィナミドの薬物動態 20
2.6.4.3.4 雄性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のサフィナミドの薬物動態 20
2.6.4.3.5 雌性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のサフィナミドの薬物動態 20
2.6.4.3.6 雌雄ラットに NW-1153 を単回経口投与した時の NW-1153 及び NW-1689 の薬物動態 21
2.6.4.3.7 雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時のサフィナミド、NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG の薬物動態 21
2.6.4.3.8 雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時のサフィナミドの薬物動態 22
2.6.4.3.9 雌雄カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時の薬物動態 22

2.6.4.4 分布 24
2.6.4.4.1 In vitro 血球移行性試験 24
2.6.4.4.2 マウスにサフィナミドメシル酸塩を経口投与した時の in vivo 血球移行 25
2.6.4.4.3 アルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の組織分布 25
2.6.4.4.4 アルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び反復経口投与した時の組織分布 25
2.6.4.4.5 有色素ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時の組織分布 26
2.6.4.4.6 有色素及びアルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を経口投与した時の網膜及び脳へのサフィナミド及び代謝物の分布 26
2.6.4.4.7 脳移行性 29
2.6.4.4.7.1 マウスにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の脳移行性 29
2.6.4.4.7.2 ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の脳移行性 29
2.6.4.4.7.3 サルにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の脳移行性 29
2.6.4.4.8 マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒトの in vitro 血漿蛋白結合 30
2.6.4.4.9 サフィナミド結合蛋白の同定 31
2.6.4.4.10 妊娠又は授乳動物における試験 31
2.6.4.4.11 その他の分布 31
2.6.4.5 代謝 31
2.6.4.5.1 マウス、ラット、サル及びヒト肝細胞における代謝試験 31
2.6.4.5.2 ウサギ及びイヌ肝細胞における代謝試験 31
2.6.4.5.3 ヒト肝細胞における代謝試験 31
2.6.4.5.4 サフィナミドの代謝に関与する酵素（CYP 分子種・MAO）の同定 32
2.6.4.5.5 サフィナミドから NW-1689 生成に関与する代謝酵素の同定 32
2.6.4.5.6 Met-X から NW-1689 への変換について（ALDH の関与の検討） 34
2.6.4.5.7 NW-1153 の生成に関わる酵素の同定 34
2.6.4.5.8 NW-1153 から NW-1689 への代謝 34
2.6.4.5.9 NW-1689 から NW-1689AG の生成に関わる酵素の同定 35
2.6.4.5.10 NW-1689AG の反応性・共有結合能 35
2.6.4.5.11 マウスでの in vivo 代謝 35
2.6.4.5.11.1 推定代謝経路 35
2.6.4.5.11.2 血漿中放射活性の薬物動態、及び血漿中代謝物 36
2.6.4.5.11.3 尿・糞中代謝物 36
2.6.4.5.12 ラットでの in vivo 代謝 37
2.6.4.5.12.1 血液・血漿中放射活性 37
2.6.4.5.12.2 各種マトリクス中の代謝物・推定代謝経路 37
2.6.4.5.13 イヌでの in vivo 代謝 38
2.6.4.5.13.1 代謝物・推定代謝経路 38
2.6.4.5.13.2 血漿中放射活性の薬物動態及び血漿中代謝物 39
2.6.4.5.13.3 尿・糞中代謝物 39
2.6.4.5.14 サルでの in vivo 代謝 40
2.6.4.5.14.1 単回投与によるマスバランス及び代謝試験 40
2.6.4.5.14.2 血漿中放射活性（サフィナミド、NW-1689 及び NW-1689AG）の薬物動態 40
2.6.4.5.14.3 代謝物・代謝経路 40
2.6.4.5.14.4 血漿中代謝物 41
2.6.4.5.14.5 尿・糞中代謝物 41
2.6.4.6 排泄 42

2.6.4.6.1 マウスに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験 42
2.6.4.6.2 ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内投与及び反復経口投与した時のマスバランス試験 43
2.6.4.6.3 ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験 43
2.6.4.6.4 イヌに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験 44
2.6.4.6.5 サルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験 44
2.6.4.6.6 胆汁排泄 45
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 45
2.6.4.7.1 CYP 阻害 45
2.6.4.7.1.1 ヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミドによる CYP 直接阻害 45
2.6.4.7.1.2 ヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 による CYP 直接阻害 45
2.6.4.7.1.3 ヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の CYP 阻害評価 45
2.6.4.7.1.4 サフィナミドの CYP 阻害のメカニズムの解明 46
2.6.4.7.1.5 NW-1689AG の CYP2C8 に対する阻害 46
2.6.4.7.2 その他の酵素の阻害 47
2.6.4.7.2.1 サフィナミド及び代謝物の ALDH に対する阻害 47
2.6.4.7.2.2 サフィナミド及び主要代謝物の薬物代謝酵素に対する in vitro 阻害作用 47
2.6.4.7.3 酵素誘導 48
2.6.4.7.3.1 サフィナミドによる第 I 相及び第 II 相肝酵素活性の誘導 48
2.6.4.7.3.2 サフィナミドによるテストステロンのヒドロキシル化に対する影響 48
2.6.4.7.3.3 サフィナミドによるラット肝 CYP に対する影響 48
2.6.4.7.3.4 サフィナミドによるヒト CYP3A4 の誘導 48
2.6.4.7.3.5 ヒト肝細胞を用いたサフィナミドの CYP 誘導能の検討 49
2.6.4.7.3.6 ヒト肝細胞を用いたサフィナミドの CYP2B6 誘導能の検討 49
2.6.4.7.3.7 ヒト肝細胞を用いたサフィナミドの CYP1A2、CYP2B6、UGT1A1 及び SULT2A1 誘導能の検討 50
2.6.4.7.4 各種トランスポーターに対する基質となる可能性の検討 52
2.6.4.7.4.1 サフィナミドの Caco-2 培養細胞での膜透過性及び能動輸送 52
2.6.4.7.4.2 サフィナミドが BCRP に対する基質となる可能性の検討 52
2.6.4.7.4.3 サフィナミドが OATP1B1、OATP1B3 、OATP1A2 及び OATP2B1 に対する基質となる可能性の検討 52
2.6.4.7.4.4 NW-1153 が OAT1、OAT3 及び OCT2 に対する基質となる可能性の検討 53
2.6.4.7.4.5 肝細胞への取り込み 53
2.6.4.7.5 薬物トランスポーターに対する阻害 54
2.6.4.7.5.1 サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の P-gp に対する in vitro 阻害 54
2.6.4.7.5.2 NW-1689AG の P-gp に対する in vitro 阻害 54
2.6.4.7.5.3 サフィナミド、NW-1153、NW-1689、NW-1689AG 及び NW-1199 の BCRP に対する in vitro 阻害 55
2.6.4.7.5.4 サフィナミド及び代謝物の BSEP に対する in vitro 阻害 55
2.6.4.7.5.5 サフィナミド及び代謝物の OATP1B1 に対する in vitro 阻害 55
2.6.4.7.5.6 サフィナミド及び代謝物の OATP1B3 に対する in vitro 阻害 55
2.6.4.7.5.7 サフィナミドの OCT2 に対する in vitro 阻害 56

2.6.4.7.5.8 サフィナミド及び代謝物の OAT1、OAT3 及び OAT4 に対する阻害..... 56
2.6.4.7.5.9 サフィナミド及び MW-1153 のヒト各種トランスポーターに対する阻害 56
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 57
2.6.4.9 考察及び結論 57
2.6.4.9.1 生体試料分析 57
2.6.4.9.2 吸収 57
2.6.4.9.3 分布 58
2.6.4.9.4 代謝 58
2.6.4.9.5 排泄 60
2.6.4.9.6 薬物動態学的薬物相互作用 60
2.6.4.10 参考文献一覧 62

略号一覧

略語	省略しない用語	説明又は定義
A-B	Apical to basolateral	頂端側から基底側へ
ABT	1-Aminobenzotriazole	1-アミノベンゾトリアゾール
AG	Acyl glucuronide	アシルグルクロン酸抱合体
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	芳香族炭化水素受容体
ALDH	Aldehyde dehydrogenase	アルデヒド脱水素酵素
AUC	Area under the plasma concentration -time curve	血漿中濃度時間曲線下面積
B-A	Basolateral to apical	基底側から頂端側へ
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
BNPP	Bis-*p*-nitrophenyl phosphate	ビス-*p*-ニトロフェニルリン酸
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
BSP	Sulfobromophthalein	スルホブロモフタレイン
CAR	Constitutively active/androstane Receptor	恒常的活性化/アンドロスタン受容体
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CL	Systemic clearance	全身クリアランス
CL_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
C_{max}	Maximal plasma concentration	最高血漿中濃度
CV%	Percent coefficient of variation	変動係数（%）
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
%Diff	Difference	真度（%）
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
EC_{50}	Half maximal effect concentration	最大効果の 50%を発揮する濃度
E_{max}	Maximal effect	最大効果
ER	Efflux ratio	排出比
EROD	Ethoxyresorufin *O*-deethylase	エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素
ES	Estrone 3-sulfate	エストロン硫酸
F	Extent of bioavailability	生物学的利用率
FAAH	Fatty acid amide hydrolase	脂肪酸アミド加水分解酵素
FMO	Flavin-containing monooxygenase	フラビン含有モノオキシゲナーゼ
GS-Px	Glutathione peroxidase	グルタチオンペルオキシダーゼ
hCE	human carboxylesterase	ヒトカルボキシルエステラーゼ
HEK cells	Human embryonic kidney cells	ヒト胎児由来腎細胞
HLM	Human liver microsome	ヒト肝ミクロソーム
HPLC	High-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー

略語	省略しない用語	説明又は定義
HPLC-ECD	High-performance liquid chromatography -electrochemical detection	高速液体クロマトグラフィー -電気化学的検出
HPLC/FL	High-performance liquid chromatography /fluorescence	高速液体クロマトグラフィー /蛍光検出
IC_{50}	Inhibitory concentration exerting 50% inhibition	50%阻害濃度
Ki	Inhibition constant	阻害定数
K_I	Concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of enzyme inactivation	阻害物質の飽和濃度における酵素不活化の 50%阻害濃度
K_{inact}	Maximal rate of enzyme inactivation at saturating concentrations of inhibitor	最大不活化速度
K_m	Michaelis-Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
LOQ	Limit of quantification	定量限界
LSC	Liqiud scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
LTS	Long Term Stability	長期保存安定性
MAO-A	Monoamine oxidase type A	モノアミン酸化酵素 A 型
MAO-B	Monoamine oxidase type B	モノアミン酸化酵素 B 型
MATE	Multidrug and toxin extrusion transporter	多剤及び毒物排出トランスポーター
MDCKII cells	Madin-Darby canine kidney cells	イヌ腎臓尿細管上皮由来細胞
Metf	Metformin	メトホルミン
Met-A	*N*-dealkylated amine of safinamide	サフィナミドの *N*-脱アルキル化アミン
Met-X	*N*-dealkylated aldehyde of safinamide	サフィナミドの *N*-脱アルキル化アルデヒド
MPP+	*N*-methyl-4-phenylpyridinium	*N*-メチル-4-フェニルピリジニウム
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
My-Px	Myelo peroxidase	ミエロペルオキシダーゼ
NADPH	Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NC	Negative Control	陰性対照
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PAH	p-aminohippuric acid	パラアミノ馬尿酸
Papp	Apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PC	Positive Control	陽性対照

略語	省略しない用語	説明又は定義
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazole [4,5-*b*]pyridine	2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾール[4,5-*b*]ピリジン
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
pKa	Acid dissociation constant	酸解離定数
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	フッ化フェニルメチルスルホニル
PXR	Pregnane X Receptor	プレグナン X 受容体
QSAR	Quantitative structure activity relationship	定量的構造活性相関
R^2	Contribution ratio	寄与率
$R_{BC/P}$	Ratio of blood cell to plasma concentration	赤血球/血漿濃度比
RE%	Percent relative error of measurement	相対誤差（%）
RSD%	Percent relative standard deviation	相対標準偏差（%）
S.D.	Standard deviation	標準偏差
SD rat	Sprague-Dawley rat	スプラーグ・ドーレイ系ラット
SULT	Sulfotransferase	スルホ基転移酵素
$t_{1/2}$	Half-life time	消失半減期
TDI	Time dependent inhibition	時間依存的阻害
t_{max}	Time of maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TR	Total radioactivity	総放射活性
UGT	Uridine-5’-diphospho-glucuronosyl transferase	ウリジン 5’-ジホスホ-グルクロン酸転移酵素
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限
V_{max}	Maximum rate of an enzyme-catalyzed reaction	最大代謝速度
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態分布容積
µg eq/g	µg equvalent/g	µg 当量/g

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

文書全体で、サフィナミドメシル酸塩として示された投与量をサフィナミドに換算する場合には、数値に 0.76 を乗じる。

ラット及びサルにおいてサフィナミドメシル酸塩の吸収は速やかで（t_{max} は 0.25～2 時間）、生物学的利用率（F）は高かった（SD ラット 92%、カニクイザル 80%）。いずれの動物種においても、サフィナミドの曝露量は用量比を上回って増加する傾向を示し、反復投与による蓄積比は最大で約 2 倍であった。

ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を静脈内投与、及び反復経口投与したところ、褐色及び白色脂肪、脂肪組織、骨髄、及び涙腺からの放射能の消失は、その他の組織からの消失よりも遅かった。また、ラット及びサルにおけるサフィナミドの分布容積が大きい（約 2～5 L/kg）ことから、サフィナミドは血管外に広く分布すると考えられた。マウス、ラット及びサルにおいてサフィナミドは脳の広い範囲に速やかに到達することが示され、脳／血漿比（AUC 比）は 9～16 であった。ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を静脈内投与又は経口投与した後、メラニン含有組織である眼、涙腺、褐色脂肪、皮膚の有色部位等に高い放射能が認められたが、時間の経過にともなって消失したため、サフィナミド又は代謝物はメラニンと結合するものの、その結合は可逆的であると推測された。サフィナミドの血漿蛋白結合率は濃度に依存せず、また動物種（マウス、ラット、イヌ、サル）及びヒト間で種差は認められなかった（約 90%）。サフィナミドの血漿中主要代謝物の一つである NW-1689 の蛋白結合率はこれら 4 つの動物種及びヒトで非常に高く、98%以上であった。

動物及びヒトの肝細胞、肝ミクロソーム画分（human liver microsome; HLM）試料等を用いた in vitro 代謝試験を行ったところ、サフィナミドはヒト及び全動物種で概ね共通の代謝経路を介して代謝されていた。共通の主要代謝物として、アミド基の加水分解により生じた NW-1153、及び酸化的 *N*-脱アルキル化により生じた NW-1689 の 2 つが認められた。NW-1689 は、一部グルクロン酸と *O* 型抱合体を形成し、NW-1689AG となった。主要代謝物である NW-1689 の生成には、細胞質酵素のアミダーゼ、MAO-A 及びアルデヒド脱水素酵素が主に関与し、また、NW-1153 の生成は非特異的な細胞質アミダーゼ酵素（一部分は fatty acid amide hydrolase; FAAH と特定された）によって触媒されていた。サフィナミドは非特異的な酵素であるアミダーゼにより代謝され、生体内変換における CYP 分子種の寄与が低いと推測された。

In vivo 排泄／マスバランス試験は、^{14}C-サフィナミドメシル酸塩をマウス、ラット、イヌ、サル及びヒトに投与して検討した。放射能の多くは尿中に排泄され、糞への排泄も認められた。総回収率は概ね 70%以上であった。

ヒト肝ミクロソーム中で、サフィナミドは CYP1A2 を競合的に阻害する（IC_{50} 値=47.7 μM）と同時に、時間依存的阻害（Time dependent inhibition; TDI）も認められた。また、サフィナミドは CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 をほとんど直接阻害（IC_{50} 値>100 μM）しなかったが、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 及び CYP2D6 に対しては TDI が認められた。CYP1A2 以外の分子種については、サフィナミドのヒト肝細胞中最高濃度を 33 μM（100 mg、1 日 1 回、7 日間反復投与したときの定常状態におけるサフィナミドの血漿中非結合型濃度の C_{max} である 0.66 μM の 50 倍）と仮定すると、臨床上意義のある阻害は示さないと考えられた。また、サフィナミドの CYP 分子種に対する誘導作用を検討したところ、ヒト初代培養肝細胞において CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 を誘導する可能性が認められた。

サフィナミドは膜透過性が高かった。また、糖蛋白質（P-gp）や乳癌耐性蛋白質（BCRP）といったトランスポーターの基質ではないと考えられた。また、薬物トランスポーターを介した薬物間相互

作用について検討を行ったところ、サフィナミド及び NW-1689 は BCRP を介した PhIP 輸送を濃度依存的に低下させた。一方で、サフィナミド及びその代謝物は P-gp、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1、OAT3 及び OAT4 に対して臨床上意義があると考えられる阻害作用を有していないと考えられた。

2.6.4.2 分析法

動物の生体試料中のサフィナミド、ヒトにおける主要代謝物及び併用薬剤の定量のために、主として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析（Liquid chromatography tandem mass spectrometry; LC-MS/MS）法による生体試料分析法を開発した。ヒト血漿では定量下限（lower limit of quantitation; LLOQ）を 0.5 ng/mL としてバリデートした。

サフィナミド、主要代謝物及び併用薬を定量するために、特異的で感度の高い分析法を開発した。非臨床試験で用いた分析法のバリデーション試験及び長期保存安定性（LTS : Long Term Stability）の概略をモジュール 2.6.4.2 の表 2.6.4-1、表 2.6.4-2 及び表 2.6.4-3 に示す。ヒト試料を用いた試験で用いた分析法はモジュール【2.7.1.1.6】に示す。

2.6.4.2.1 マウス、ラット及びサル血漿中サフィナミド濃度測定法（HPLC/FL 法）

【2.6.5.2.A】：4.2.2.3-01：METPK-149-95（9550334）（評価資料）
【2.6.5.2.B】：4.2.2.1-01：FCE-26743A-101i（評価資料）
【2.6.5.2.C】：4.2.3.2-06：N636-Q1392（9550237）Appendix8.4（参考資料）

非臨床試験での動物試料中のサフィナミドを定量する方法として当初、高速液体クロマトグラフィー（High perforamance liquid chromatography; HPLC）と蛍光検出を用いた方法を開発した（HPLC/FL 法）。アッセイはバリデートされ、マウス、ラット及びサル血漿中サフィナミドの LLOQ は 10 ng/mL であった。

2.6.4.2.2 マウス及びサル脳試料中サフィナミド濃度測定法（HPLC/FL 法）

【2.6.5.2.A】：4.2.2.3-01：METPK-149-95（9550334）（評価資料）
【2.6.5.2.D】：4.2.2.3-02：METPK-150-95（9550336）（評価資料）

マウス及びサル脳試料中サフィナミドを測定する方法を開発した。バリデートはされていないが、参考値として測定値を脳移行性試験で採用した。これら測定時の LLOQ はマウス、サルともに 20 ng/g であった。

2.6.4.2.3 ラット及びサル血漿試料中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.E】：4.2.2.1-02：9750061（評価資料）
【2.6.5.2.F】：4.2.2.1-03：9750066（評価資料）

毒性評価試験におけるラット及びサル血漿中のサフィナミドを定量する方法として液体クロマトグラフィータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた方法を開発した（Non-GLP）。LLOQ はラットが 23.81 ng/mL、サルが 9.55 ng/mL であった。

2.6.4.2.4 ラット、ウサギ及びサル血漿中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.G】：4.2.2.1-04：87-00（評価資料）
【2.6.5.2.H】：4.2.2.1-05：88-00（評価資料）
【2.6.5.2.I】：4.2.2.1-06：88-00-B（評価資料）
【2.6.5.2.J】：4.2.2.1-07：96-00（評価資料）
【2.6.5.2.K】：4.2.3.5.2-06：19030 AppendixD（評価資料）

非臨床 GLP 試験におけるラット、ウサギ及びサル血漿試料を定量するため、LC-MS/MS を用いた定量法を開発した。LLOQ はラット血漿で 0.5 又は 20 ng/mL、ウサギ血漿で 10 ng/mL、サル血漿で 20 ng/mL であることが確認された。

2.6.4.2.5 ラット胆汁及び尿中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.L】,【2.6.5.2.M】：4.2.2.1-08：98-01（評価資料）

ラット胆汁及び尿中のサフィナミドを定量する方法として開発した。LLOQ は胆汁では 20 ng/mL、尿では 0.5 μg/mL であることが確認された。

2.6.4.2.6 マウス及びラット血漿中サフィナミド濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.N】：4.2.2.1-09：R-035-04（P010-04）（評価資料）
【2.6.5.2.O】：4.2.2.1-10：R-036-04（P013104）（評価資料）

マウス及びラット血漿中サフィナミドの定量法を開発した。LLOQ はいずれも 15 ng/mL であることが確認された。

2.6.4.2.7 マウス血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.P】：4.2.2.1-11：R-027-05（P004-05）（評価資料）

マウス血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の定量法を開発した。サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の LLOQ はそれぞれ 5 ng/mL、5 ng/mL 及び 20 ng/mL であることが確認された。

2.6.4.2.8 ラット血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.Q】：4.2.2.1-12：0070-455（DMPK-79-08）（評価資料）
【2.6.5.2.R】：4.2.2.1-13：R-026-05（P003-05）（評価資料）
【2.6.5.2.S】：4.2.2.1-14：28597（SOI0034, RE7160）（評価資料）

複数の施設でラット血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の定量法を開発した。最も感度良くバリデートされた試験での LLOQ はそれぞれ 5 ng/mL、5 ng/mL 及び 20 ng/mL であった。

2.6.4.2.9 ラット網膜及び脂肪組織中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.T】：4.2.2.1-15：SOI0047（評価資料）
【2.6.5.2.U】：4.2.2.1-16：SOI0051（評価資料）

毒性評価をサポートするため、ラット網膜及び脂肪試料中のサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 を定量する方法を開発した。網膜、脂肪ともにサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の LLOQ はそれぞれ 40 ng/g、40 ng/g 及び 80 ng/g であった。

2.6.4.2.10 ウサギ血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS）

【2.6.5.2.V】,【2.6.5.2.W】：4.2.2.1-17：0070-457(DMPK-83-08)（評価資料）

ウサギ血漿試料でのサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の定量法を開発した。サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の LLOQ はそれぞれ 10 ng/mL、10 ng/mL 及び 20 ng/mL であることが確認された。

2.6.4.2.11 サル血漿中サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 濃度測定法（LC-MS/MS）

【2.6.5.2.X】,【2.6.5.2.Y】：4.2.2.1-18：0070-456（DMPK-82-08）（評価資料）

サル血漿試料でのサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の定量法を開発した。サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の LLOQ はそれぞれ 10 ng/mL、10 ng/mL 及び 20 ng/mL であることが確認された。

2.6.4.2.12 酸性化処理サル血漿試料中 NW-1689AG の定量法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.Z】：4.2.2.1-19：8224857（DMPK-29-10）（評価資料）

加水分解前（アグリコン NW-1689）と加水分解後（アシルグルクロニドから加水分解されたアグリコン）の差を利用した NW-1689 アシルグルクロニドを定量する LC-MS/MS 法を開発した。LLOQ は 400 ng/mL であることが確認された。

2.6.4.2.13 ラット、ウサギ及びサル血漿試料中のカルビドパ及びレボドパ定量法（HPLC-ECD 法）

【2.6.5.2.AA】：4.2.2.1-20：1004-071197（SOI0043）（評価資料）

【2.6.5.2.BB】：4.2.2.1-21：1004-071198（SOI0038）（評価資料）

【2.6.5.2.CC】：4.2.2.1-22：1004-071199（SOI0039）（評価資料）

液体クロマトグラフィーと電気化学的検出の組み合わせによる定量法（HPLC-ECD 法）を開発した。LLOQ はカルビドパ、レボドパともに 10 ng/mL であった。

2.6.4.2.14 ラット及びサル血漿試料中のプラミペキソール及び NW-1199 定量法（LC-MS/MS 法）

【2.6.5.2.DD】：4.2.2.1-23：0070-470（DMPK-81-08）（評価資料）

【2.6.5.2.EE】：4.2.2.1-24：0070-471（DMPK-80-08）（評価資料）

LC-MS/MS 法により同時定量され､LLOQ はプラミペキソール及び NW-1199 ともに 1 ng/mL であった。

2.6.4.2.15 サフィナミド及び主要代謝物（NW-1153、NW-1689）の長期安定性

マウス、ラット、ウサギ及びサル生体試料中のサフィナミド及び代謝物の長期安定性について検討した。結果の要約を表 2.6.4-3 に示す。

サフィナミド及び代謝物は試料を-20°C で保管した際、マウス血漿では最長 162 日間、ラット血漿では 24 ヶ月間、ウサギ血漿では 24 ヶ月間及びサル血漿では 31 ヶ月間安定であった。

2.6.4.2.16 併用薬剤の長期安定性

血漿マトリクス中の併用薬剤の長期安定性を検討した。結果の要約を表 2.6.4-3 に示す。

カルビドパ及びレボドパは、ラット、ウサギ及びサル血漿試料中でそれぞれ-80℃で 81 日間、-65℃で 113 日間及び-65℃で 107 日間安定であった。プラミペキソールは、ラット及びサル血漿試料を-20℃で保管する際、それぞれ 14 及び 9 ヶ月間安定であった。

表 2.6.4-1 動物由来生体試料中のサフィナミド及びその代謝物に関するバリデーション試験の概要

動物種	試験番号 （対応する報告書番号） ［試験施設］	試料	分析物	定量範囲	検出法	内部標準	使用した DMPK 又は TK 試験番号 ［DMPK Subreport No.］	CTD の記載箇所
マウス	METPK-149-95 (9550334) [redacted]	血漿、脳	サフィナミド	10-1500 ng/mL 20-4000 ng/g	HPLC/FL	NA	METPK-149-95 (9550334)	4.2.2.3-01
マウス	P013104 (R-036-04, R036104) [redacted]	血漿	サフィナミド	15-20000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044	ONP002 [P015-04]	4.2.2.1-10
マウス	P004-05 (R-027-05) [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	5-20000 ng/mL 5-20000 ng/mL 20-20000 ng/mL 20000-200000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	ONP004 [P001-06]	4.2.2.1-11
ラット	FCE-26743A-101i [redacted]	血漿	サフィナミド	10-190 ng/mL	HPLC/FL	NA	METPK-99-93 N596-Q1354 (9550005)	4.2.2.1-01
ラット	9750061 [redacted]	血漿	サフィナミド	23.81-45454 ng/mL	LC-MS/MS	$^{13}C_6$-PNU151774	N814-Q1505 (9750253)	4.2.2.1-02
ラット	87-00 [redacted]	血漿	サフィナミド	20-20000 ng/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	9382 [IPAS-AN-20-03] 8724 [IPAS-NW-1015/AN-12-02] R09360 [IPAS-NW-1015] 7552 [IPAS-NW-1015 (RTC Prot. No 626/S Vent)]	4.2.2.1-04
ラット	96-00 [redacted]	血漿	サフィナミド	0.5-20 ng/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	8724 [IPAS-NW-1015/AN-12-02] R09360 (IPAS-NW-1015)	4.2.2.1-07
ラット	98-01 [redacted]	胆汁	サフィナミド	20-20000 ng/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	R09360 [IPAS-NW-1015]	4.2.2.1-08
ラット	98-01 [redacted]	尿	サフィナミド	0.5-50 µg/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	R09360 [IPAS-NW-1015]	4.2.2.1-08
ラット	P010-04 (R-035-04) [redacted]	血漿	サフィナミド	15-20000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044	ONP003 [P011-04]	4.2.2.1-09

動物種	試験番号 （対応する報告書番号） ［試験施設］	試料	分析物	定量範囲	検出法	内部標準	使用した DMPK 又は TK 試験番号 ［DMPK Subreport No.］	CTD の記載箇所
ラット	P003-05 Revision1 (R-026-05) [[redacted]]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	5-20000 ng/mL 5-20000 ng/mL 20-200000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	39880[R-047-05] ONP005[P002-06]	4.2.2.1-13
ラット	SOI0034 (28597, RE7160) [[redacted]]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	5-5000 ng/mL 5-5000 ng/mL 20-10000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	SOI0044 SOI0058 SOI0021	4.2.2.1-14
ラット	SOI0047 [[redacted]]	網膜	サフィナミド NW-1153 NW-1689	40-200000 ng/g 40-200000 ng/g 80-200000 ng/g	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	SOI0056	4.2.2.1-15
ラット	SOI0051 [[redacted]]	脂肪	サフィナミド NW-1153 NW-1689	40-200000 ng/g 40-200000 ng/g 80-200000 ng/g	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	SOI0056	4.2.2.1-16
ラット	0070-455 (DMPK-79-08) [[redacted]]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	10-5000 ng/mL 10-5000 ng/mL 20-5000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	GSP0012CVP [DMPK-123-09] RE9970 (29396) [0070-466 (RE9971)] RE8900 (29082) [0070-477 (RE8901)] RE6230 (28452) [0070-460 (RE6231)] SOI0053 [0070-464 (RE7951)] SOI0054 [0070-473 (RE9021)] SOI0056 [0070-463 (RE7711)] SOI0057 [0070-459 (RE7661)] SOI0059 [0070-465 (RE8061)] RF0820 [8215097 (RF0821)] RF3280 [8247739 (DMPK-79-11)]	4.2.2.1-12

動物種	試験番号 （対応する報告書番号） ［試験施設］	試料	分析物	定量範囲	検出法	内部標準	使用した DMPK 又は TK 試験番号 ［DMPK Subreport No.］	CTD の記載箇所
ラット	0070-470 (DMPK-81-08) [redacted]	血漿	プラミペキソール NW-1199	1-1000 ng/mL 1-1000 ng/mL	LC-MS/MS	プラミペキソール-D_3 （両分析物ともに）	SOI0054 [0070-473 (RE9021)]	4.2.2.1-23
ウサギ	R-136-03 [redacted]	血漿	サフィナミド	10-5000 ng/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	19030 [IPAS-AN-26-03]	4.2.3.5.2-06
ウサギ	0070-457 (DMPK-83-08) [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	10-5000 ng/mL 10-5000 ng/mL 20-5000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	SOI0046 [0070-461 (RE7881)]	4.2.2.1-17
ウサギ	1004-071199 (SOI0039) [redacted]	血漿	レボドパ カルビドパ	10-2000 ng/mL 10-2000 ng/mL	HPLC-ECD	デオキシエピネフリン塩酸塩	SOI0046 [0912-07413]	4.2.2.1-22
サル	9550130 [redacted]	血漿	サフィナミド	10-1500 ng/mL	HPLC/FL	NA	N636-Q1392 (9550237) [9550130]	4.2.3.2-06
サル	METPK-150-95 (9550336) [redacted]	血漿、脳	サフィナミド	10-1500 ng/mL 20-4000 ng/g	HPLC/FL	NA	METPK-150-95 (9550336)	4.2.2.3-02
サル	9750066 [redacted]	血漿	サフィナミド	9.55-30972 ng/mL	LC-MS/MS	$^{13}C_6$-PNU151774	N822-Q1509 (9750107) [9750062]	4.2.2.1-03
サル	88-00 [redacted]	血漿	サフィナミド	20-20000 ng/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	991180 ［IPAS-NW-1015 （RBM Exp. No. 991180）］	4.2.2.1-05
サル	88-00-B [redacted]	血漿	サフィナミド	20-20000 ng/mL	LC-MS/MS	PNU0167779E	21893 TCP [IPAS-サフィナミド NW-1015/AN-09-02]	4.2.2.1-06
サル	0070-456 (DMPK-82-08) [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	10-5000 ng/mL 10-5000 ng/mL 20-5000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1044 NW-1797 NW-1796	RE8320 [0070-467 (RE8321)] 22972 [0070-472 (DMPK-90-08)] 30939TCP [0070-458 (DMPK-91-08)] SOI0052 [0070-462 (RE7261)]	4.2.2.1-18
サル	0070-471 [redacted]	血漿	プラミペキソール NW-1199	1-1000 ng/mL 1-1000 ng/mL	LC-MS-MS	プラミペキソール-D_3 （両分析物ともに）	22972 [0070-472 (DMPK-90-08)]	4.2.2.1-24
サル	8224857 (DMPK-29-10) [redacted]	血漿	NW-1689 (NW-1689 + NW-1689AG)[a]	400-40000 ng/mL	LC-MS/MS	NW-1689-D_4	RF2310 [8229474]	4.2.2.1-19

a：アルカリ加水分解前後の NW-1689

表 2.6.4-2 動物由来生体試料中のサフィナミドと併用投与される化合物に関するバリデーション試験の概要

動物種	試験番号 （対応する報告書番号） ［試験施設］	試料	分析物	定量範囲	検出法	内部標準	使用した DMPK 又は TK 試験番号 ［DMPK Subreport No.］	CTD の記載箇所
ラット	1004-071197 (SOI0043) [[redacted]]	血漿	カルビドパ レボドパ	10-2000 ng/mL 10-2000 ng/mL	HPLC-ECD	デオキシエピネフリン塩酸塩	SOI0053 [0912-07415] SOI0057 [0912-07417]	4.2.2.1-20
ラット	0070-470 [[redacted]]	血漿	プラミペキソール NW-1199	1-1000 ng/mL 1-1000 ng/mL	LC-MS/MS	プラミペキソール-D_3 （両分析物ともに）	SOI0054 [0070-473 (RE9021)]	4.2.2.1-23
ウサギ	1004-071199 (SOI0039) [[redacted]]	血漿	カルビドパ レボドパ	10-2000 ng/mL 10-2000 ng/mL	HPLC-ECD	デオキシエピネフリン塩酸塩	SOI0046 [0912-07413]	4.2.2.1-22
サル	1004-071198 (SOI0038) [[redacted]]	血漿	カルビドパ レボドパ	10-2000 ng/mL 10-2000 ng/mL	HPLC-ECD	デオキシエピネフリン塩酸塩	SOI0052 [0912-07419]	4.2.2.1-21
サル	0070-471 [[redacted]]	血漿	プラミペキソール NW-1199	1-1000 ng/mL 1-1000 ng/mL	LC-MS/MS	プラミペキソール-D_3 （両分析物ともに）	22972 [0070-472 (DMPK-90-08)]	4.2.2.1-24

表 2.6.4-3 動物生体試料中の長期保存安定性（LTS）の概要

動物種	試験番号（対応する報告書番号）［試験施設］	試料	分析物	LTS		CTD の記載箇所
				期間	条件	
マウス	P013104 (R-036-040) [redacted]	血漿	サフィナミド	106 日間	-20°C	4.2.2.1-10
マウス	P004-05 (R-027/05) [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	162 日間	-20°C	4.2.2..1-11
ラット	METPK-110-94 (9550278) [redacted]	血漿	サフィナミド	3 ヶ月間	-20°C	4.2.2.1-25
ラット	P003-05 (R-026-05) [redacted]	血漿	サフィナミド	163 日間	-20°C	4.2.2.1-13
ラット	SOI0034 [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	34 日間	-20°C	4.2.2.1-14
ラット	0070-455 Addendum1 [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	24 ヶ月間 12 ヶ月間 24 ヶ月間	-20°C	4.2.2.1-12
ラット	SOI0043 [redacted]	血漿	カルビドパ レボドパ	81 日間	-80°C	4.2.2.1-20
ラット	0070-470 [redacted]	血漿	プラミペキソール NW-1199	14 ヶ月間 10 ヶ月間	-20°C	4.2.2.1-23
ラット	SOI0047 [redacted]	網膜	サフィナミド NW-1153 NW-1689	41 日間	-70°C	4.2.2.1-15
ラット	SOI0051 [redacted]	脂肪	サフィナミド NW-1153 NW-1689	33 日間	-70°C	4.2.2.1-16
ウサギ	1004-071199 (SOI0039) [redacted]	血漿	カルビドパ・レボドパ	116 日間 113 日間	-65°C	4.2.2.1-22
ウサギ	0070-457 Addendum [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	24 ヶ月間	-20°C	4.2.2.1-17
サル	0070-456 Addendum [redacted]	血漿	サフィナミド NW-1153 NW-1689	31 ヶ月間	-20°C	4.2.2.1-18
サル	8224857 [redacted]	酸性化血漿	NW-1689（NW-1689+ NW-1689AG）[a]	35 日間	-20°C	4.2.2.1-19
サル	1004-071198 (SOI0038) [redacted]	血漿	カルビドパ レボドパ	107 日間	-65°C	4.2.2.1-21
サル	0070-471 [redacted]	血漿	プラミペキソール NW-1199	9 ヶ月間	-20°C	4.2.2.1-24

LTS：長期保存安定性（バリデート済みの最長期間）
a：アルカリ加水分解前後の NW-1689

2.6.4.3 吸収

サフィナミドメシル酸塩、単回投与時の薬物動態パラメータを表 2.6.4-4 に示す。

表 2.6.4-4 サフィナミドメシル酸塩、単回投与時の薬物動態パラメータ

動物種	ラット（Sprague-Dawley）		ラット（Wistar）						サル（Cynomolgus）	
試験番号	METPK-190-96		DMPK-09-08						METPK-193-96	
投与経路	静脈内	経口	静脈内		腹腔内		経口		静脈内	経口
投与量（mg/kg）[a]	6.6 (5)	13.2 (10)	1 (0.76)		4 (3)		4 (3)		6.6 (5)	13.2 (10)
性別	雄	雄	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雄
C_{max} (μg/mL)	1.76 ± 1.36[b]	1.65 ± 0.75	0.31[c]	0.36[c]	0.7	0.89	0.24	0.29	3.85 ± 0.82[b]	2.87 ± 0.30
t_{max} (h)	0.03	0.72 ± 0.39	0.1	0.1	0.1	0.1	0.25	0.25	0.08	1.67 ± 0.58
$AUC_{0-\infty}$ (μg·hr/mL)	1.79 ± 0.17	3.28 ± 0.34	0.27	0.45	0.54	1.38	0.50	1.16	11.5 ± 2.4	18.6 ± 5.7
$t_{1/2}$ (h)	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.3	1.7	1.5	1.6	2.0	3.2	12.7 ± 2.1	10.9 ± 1.6
CL (L/hr/kg)	2.8 ±0.3	-	2.8	1.7	-	-	-	-	0.44±0.08	-
V_{ss} (L/kg)	4.8 ± 2.0	-	3.4	2.9	-	-	-	-	2.4 ± 0.1	-
F (%)	-	92	-	-	50	77	43	54	-	80

a: サフィナミドメシル酸塩としての投与量、（）内はサフィナミドとしての投与量
b: 最初の測定時点
c: C_0（外挿値）

2.6.4.3.1 雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時のサフィナミドの薬物動態

【2.6.5.3.A】：4.2.2.2-01：METPK-190-96（参考資料）

雄性 Sprague-Dawley（SD）ラットにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 5 mg/kg で単回静脈内投与（n=3）、及び、10 mg/kg で経口投与（n=3）し、得られた血漿中サフィナミド濃度より薬物動態パラメータを算出した。

静脈内投与後の $AUC_{0-\infty}$は 1.79 ± 0.17 μg·hr/mL、CL は 2.8 ± 0.3 L/hr/kg、$t_{1/2}$ は 1.7 ± 0.4 時間、V_{ss} は 4.8 ± 2.0 L/kg であった。経口投与後の t_{max} は 0.72 ± 0.39 時間、C_{max} は 1.65 ± 0.75 μg/mL、$AUC_{0-\infty}$は 3.28 ± 0.34 μg·hr/mL、$t_{1/2}$ は 1.3 ± 0.1 時間であった。サフィナミドメシル酸塩を経口投与時の SD ラットにおける生物学的利用率は 92%であった。

2.6.4.3.2 雌雄 Wistar ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時のサフィナミド、NW-1689 及び NW-1689AG の薬物動態

【2.6.5.3.B】：4.2.2.2-02：DMPK-09-08（評価資料）

雌雄 Wistar ラットにサフィナミドメシル酸塩 1 mg/kg を単回静脈内投与、及び 4 mg/kg を単回経口若しくは腹腔内投与し、サフィナミドと代謝物 NW-1689 及び NW-1689AG の血漿中濃度を測定した（n=3）。

静脈内投与後の血漿におけるサフィナミドの $AUC_{0-\infty}$は雄で 0.27 μg·hr/mL、雌で 0.45 μg·hr/mL、CL は雄で 2.8 L/hr/kg、雌で 1.7 L/hr/kg、V_{ss} は雄で 3.35 L/kg 及び雌で 2.94 L/kg であった。$t_{1/2}$ は静脈内及び腹腔内投与後ではともに約 1.5 時間、経口投与後は 2～3 時間であった。雌雄の経口投与後の C_{max} は 0.24 μg/mL 及び 0.29 μg/mL、$AUC_{0-\infty}$は 0.5 μg·hr/mL 及び 1.16 μg·hr/mL であった。

経口及び腹腔内投与後のサフィナミドの t_{max} はそれぞれ 0.25 時間及び 0.1 時間であった。Wistar ラットにおける経口投与時の生物学的利用率は雄で 43%、雌で 54%であり、腹腔内投与時ではそれぞれ 50%及び 77%であった。

経口投与後の NW-1689 の AUC はサフィナミドと比べて雄で約 27 倍、雌で 13 倍高かった。それに対して NW-1689AG の AUC は顕著に低く、サフィナミドの AUC に対して雄で 24%、雌で 6%の範囲であった。両代謝物ともに t_{max} は最終測定時点（投与 8 時間後）であった。

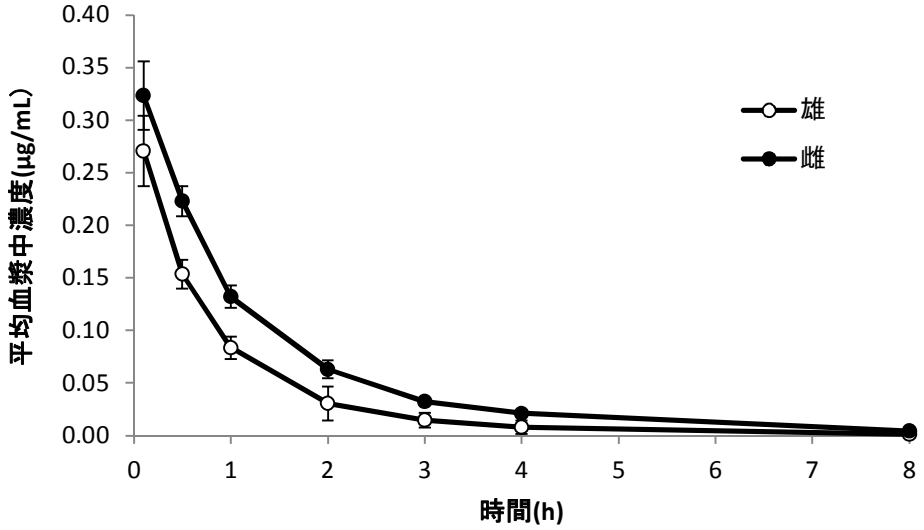


図 2.6.4-1 ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内投与後の血漿中サフィナミド濃度推移（各時点 n=3、平均値 ± 標準偏差）

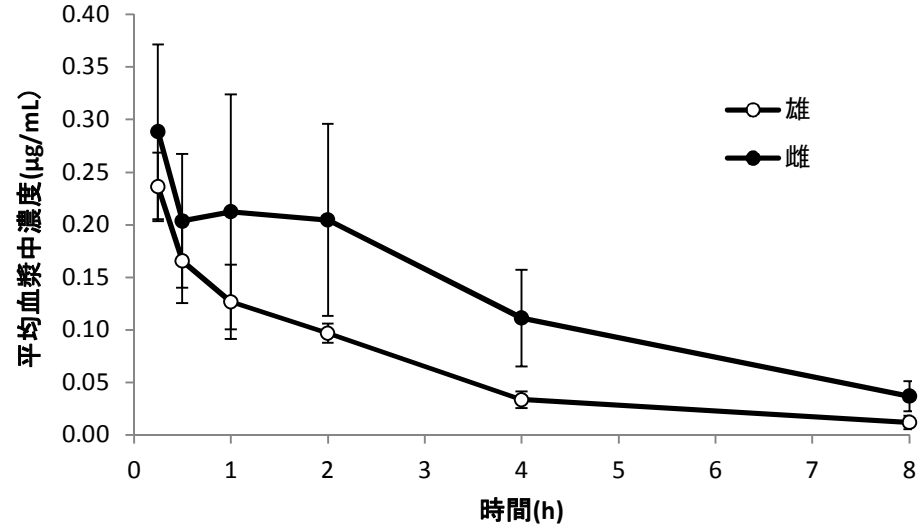


図 2.6.4-2 ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与後の血漿中サフィナミド濃度推移（各時点 n=3、平均値 ± 標準偏差）

2.6.4.3.3 雄性カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時のサフィナミドの薬物動態

【2.6.5.3.C】：4.2.2.2-03：METPK-193-96（参考資料）

雄性カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 5 mg/kg で単回静脈内投与、及び、10 mg/kg で単回経口投与する薬物動態試験を実施した（n=3）。

静脈内投与後の $AUC_{0-\infty}$は 11.5 ± 2.4 μg·hr/mL、CL は 0.44 ± 0.08 L/hr/kg、$t_{1/2}$ は 13 ± 2 時間、V_{ss} は 2.39 ± 0.09 L/kg であった。経口投与後の t_{max} は 1.67 ± 0.58 時間、C_{max} は 2.87 ± 0.30 μg/mL、$AUC_{0-\infty}$は 18.6 ± 5.7 μg·hr/mL、$t_{1/2}$ は 10.9 ± 1.6 時間であった。サフィナミドメシル酸塩を経口投与時のカニクイザルにおける生物学的利用率は 80%であった。

2.6.4.3.4 雄性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のサフィナミドの薬物動態

【2.6.5.3.D】：4.2.2.2-04：NWR-08（参考資料）

雄性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 10 mg/kg で単回経口投与した（n=3）。

サフィナミドの血漿中 $AUC_{0-\infty}$は約 17 μg·h/mL となり、2.6.4.3.3（METPK-193-96）で得られた値と類似していた。

2.6.4.3.5 雌性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のサフィナミドの薬物動態

【2.6.5.3.E】：4.2.2.4-01：DMPK-37-09（評価資料）

雌性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 10 mg/kg で単回経口投与し、血漿中のサフィナミドを測定した（n=3）。

サフィナミドの AUC_{0-72h} は 28.5 μg·h/mL であった。2.6.4.3.3（METPK-193-96）での 5 mg/kg（サフィナミドとして）静脈内投与後の $AUC_{0-\infty}$（11.5 μg·hr/mL）との比較に基づくと、生物学的利用率は約 100%と示唆された。

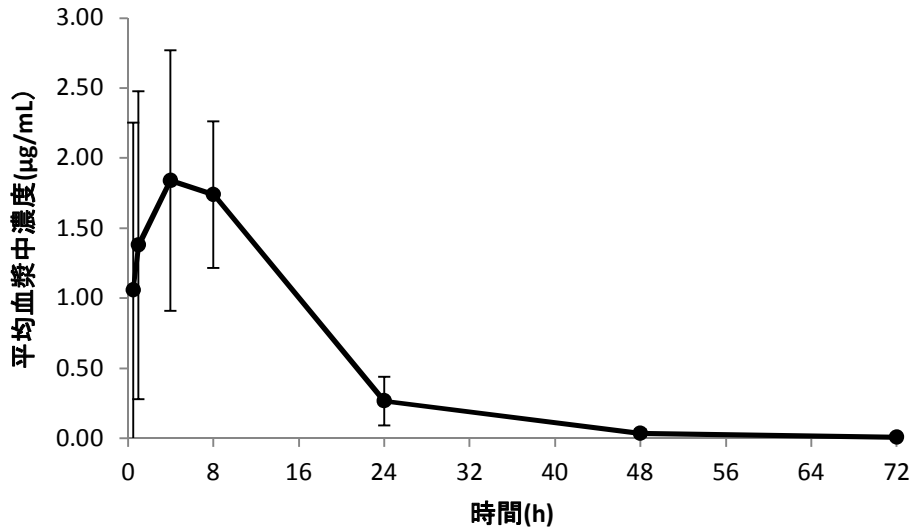


図 2.6.4-3 雌性サルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与後の血漿中サフィナミド濃度推移（各時点 n=3、平均値 ± 標準偏差）

2.6.4.3.6 雌雄ラットに NW-1153 を単回経口投与した時の NW-1153 及び NW-1689 の薬物動態

【2.6.5.9.E】：4.2.2.2-05：DMPK-121-09（評価資料）

雌雄 Wister ラットに NW-1153 を 5 mg/kg 経口投与し、血漿中の NW-1153 及び NW-1689 を測定した。

NW-1153 の血漿中濃度は最初の測定時点（投与 2 時間後）で最高濃度となった後、半減期 1.5 時間で消失した。一方、代謝物 NW-1689 の血漿中濃度は投与後 2～8 時間においてプラトーであり、NW-1153 の C_{max} の 24 倍以上に維持されていた。このような NW-1689 の血漿中濃度推移から、NW-1689 は NW-1153 の代謝により生成することが明らかとなった。

2.6.4.3.7 雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時のサフィナミド、NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG の薬物動態

【2.6.5.4.A】：4.2.2.2-06：DMPK-123-09（参考試験）

雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 30、70 及び 200 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 8 日間経口投与した試験(n=4)で、初回と最終回の投与後にサフィナミド、NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG の血漿中濃度を定量した。

サフィナミドの薬物動態パラメータを表 2.6.4-5 に示す。t_{max}（中央値）は 1～2 時間後の範囲であった。また、曝露量は用量比を上回って増加した（図 2.6.4-4）。

NW-1153 については、投与 1 又は 1.5 時間後が t_{max}（中央値）であった。NW-1689 及び［NW-1689+NW-1689AG］では、t_{max}（中央値）が 1 日目は 5～24 時間の範囲内であったが、8 日目では最終投与約 1～5 時間後にプラトーとなった。

NW-1153 の曝露量は低用量（30 mg/kg）から中用量（70 mg/kg）ではほぼ用量比に従った増加が認められたが、中用量（70 mg/kg）から高用量（200 mg/kg）では用量比を上回って増加した。NW-1689 及び［NW-1689+NW-1689AG］の曝露量は低用量～高用量にわたって用量に比例して増加していた。

反復投与による蓄積（8 日目の曝露量の 1 日目の曝露量に対する比）に関しては、サフィナミドでは、30 及び 70 mg/kg で約 2 倍の蓄積が認められたが、200 mg/kg では蓄積は認められなかった。NW-1153 では、いずれの用量群でも 1.5～2.3 倍の蓄積が認められたが、個体間のバラツキが大きかった。NW-1689 では、いずれの用量群でも約 3 倍の蓄積が認められた。

血漿中のサフィナミドに対する代謝物の比に関しては、NW-1689 はサフィナミドの 12～72 倍となる血中での主要代謝物であり、一方 NW-1153 はサフィナミドの 9～19%であった。NW-1689AG は MS/MS で検出可能であったが、その曝露量は無視できる程度であった。

表 2.6.4-5 ラットにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与時のサフィナミド薬物動態パラメータ

Dose (mg/kg/日)	Time	t_{max} (hr)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-t} (μg·hr/mL)
30	投与 1 日目	1	0.78 ± 0.27	2.77 ± 0.82
	投与 8 日目	1 (1-2)	1.14 ± 0.34	5.14 ± 1.41
70	投与 1 日目	2 (1-6)	1.72 ± 0.42	11.30 ± 2.45
	投与 8 日目	1 (1-6)	2.66 ± 0.24	22.40 ± 1.85
200	投与 1 日目	2 (1-6)	5.47 ± 1.69	83.20 ± 21.50
	投与 8 日目	1.5 (1-4)	5.03 ± 0.56	90.20 ± 11.50

平均値 ± 標準偏差、n=4

t_{max} については中央値と範囲を示す

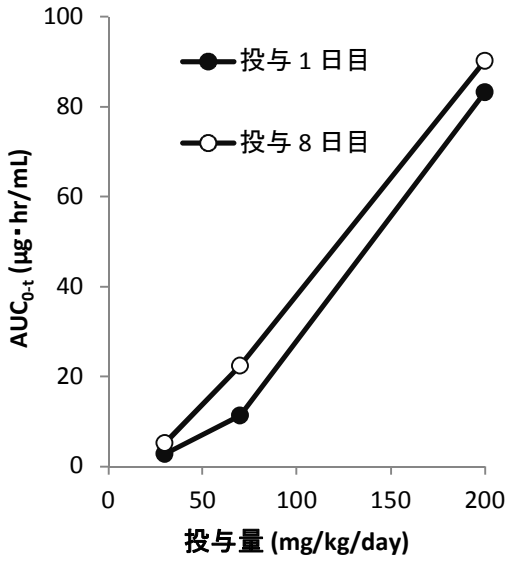


図 2.6.4-4 雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時のサフィナミドの投与量と AUC_{0-t} の関係

2.6.4.3.8 雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時のサフィナミドの薬物動態

【2.6.5.4.B】：4.2.2.2-07：847960（評価資料）

雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 5 mg/kg で 1 日 1 回 7 日間反復経口投与、又は 1 mg/kg を単回静脈内投与した（n=12）。

^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 5 mg/kg 反復経口投与時の AUC_{0-24h} は 71.2 μg eq·hr/mL であった。SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を 13.2 mg/kg で単回経口投与したときの $AUC_{0-\infty}$ は 3.28 μg·hr/mL であった（2.6.4.3.3）（METPK-190-96）ので、サフィナミドのほとんどは生体内で代謝されると考えられた。

2.6.4.3.9 雌雄カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時の薬物動態

【2.6.5.4.C】：4.2.2.2-08：RF2310（評価資料）

雌雄カニクイザルに（雌雄各 n=3）サフィナミドメシル酸塩を 10、30 及び 50 mg/kg、1 日 1 回 14 日間反復経口投与し、初回（1 日目）と最終投与（14 日目）後にサフィナミド、NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG の血漿中濃度を測定した。

投与 1 及び 14 日目ともにサフィナミドの AUC は 10 から 50 mg/kg にかけては用量比を上回って増加した。しかし、30 及び 50 mg/kg での AUC では、用量比におよそ一致した増加となった。雄と雌の 10 mg/kg での投与 1 日目の AUC_{0-24h} はそれぞれ約 11 ± 6 μg·hr/mL 及び 13 ± 6 μg·hr/mL であり、30 mg/kg では 70 ± 6 μg·hr/mL 及び 47 ± 5 μg·hr/mL、50 mg/kg では 97 ± 14 μg·hr/mL 及び 80 ± 20 μg·hr/mL であった。サフィナミドメシル酸塩の反復投与後にはいずれの用量群でも 1.4～2.4 倍の範囲で蓄積が認められた。性差は認められなかった。

この試験の薬物動態の概要を表 2.6.4-6 に示す。

表 2.6.4-6 サルにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与時の薬物動態パラメータ

投与量	10 mg/kg/日		30 mg/kg/日		50 mg/kg/日	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌
			1 日目			
C_{max} (μg/mL)	1.26 ± 0.37	1.84 ± 0.83	9.23 ± 1.59	6.35 ± 1.68	9.60 ± 2.12	8.61 ± 2.10
t_{max} (hr)	2 (0.5-4)	2 (1-2)	2	2 (1-2)	2 (2-4)	2 (1-2)
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·hr/mL)	11.31 ± 5.99	12.79 ± 5.87	69.52 ± 6.22	47.30 ± 4.65	96.52 ± 13.99	80.04 ± 19.59
$AUC_{0\text{-}24h}$ の用量比	1	1	6.1	3.7	8.5	6.3
雄/雌 $AUC_{0\text{-}24h}$ 比	0.9	-	1.5	-	1.2	-
			14 日目			
C_{max} (μg/mL)	2.89 ± 0.22	2.38 ± 0.35	10.61 ± 2.49	8.52 ± 0.69	16.50 ± 1.71	13.43 ± 3.16
t_{max} (hr)	1 (1-2)	1	2	2 (2-7)	2 (2-4)	2 (1-4)
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·hr/mL)	20.71 ± 1.76	17.39 ± 7.11	111.95±25.17	79.25 ± 8.55	175.12±28.25	135.33±41.19
蓄積比	2.4 ± 1.7	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3
$AUC_{0\text{-}24h}$ の用量比	1	1	5.4	4.6	8.5	7.8
雄/雌 $AUC_{0\text{-}24h}$ 比	1.2	-	1.4	-	1.3	-

平均値 ± 標準偏差、n=3、t_{max} については中央値と範囲を示す。
蓄積比=14 日目 $AUC_{0\text{-}24h}$/1 日目 $AUC_{0\text{-}24h}$
雄／雌 $AUC_{0\text{-}24h}$ 比=雄／雌での曝露量比（雄／雌 $AUC_{0\text{-}24h}$ 比）

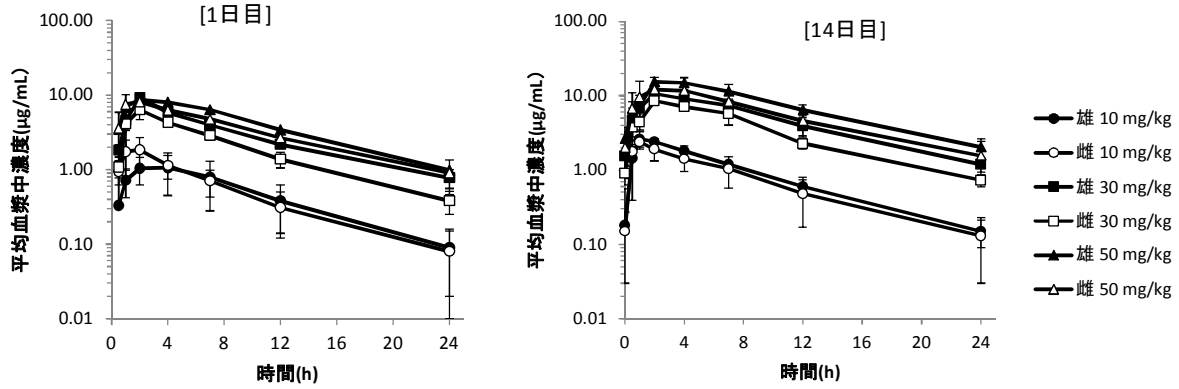


図 2.6.4-5 サルにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時の血漿中サフィナミド濃度推移（各時点 n=3、平均値 ± 標準偏差）

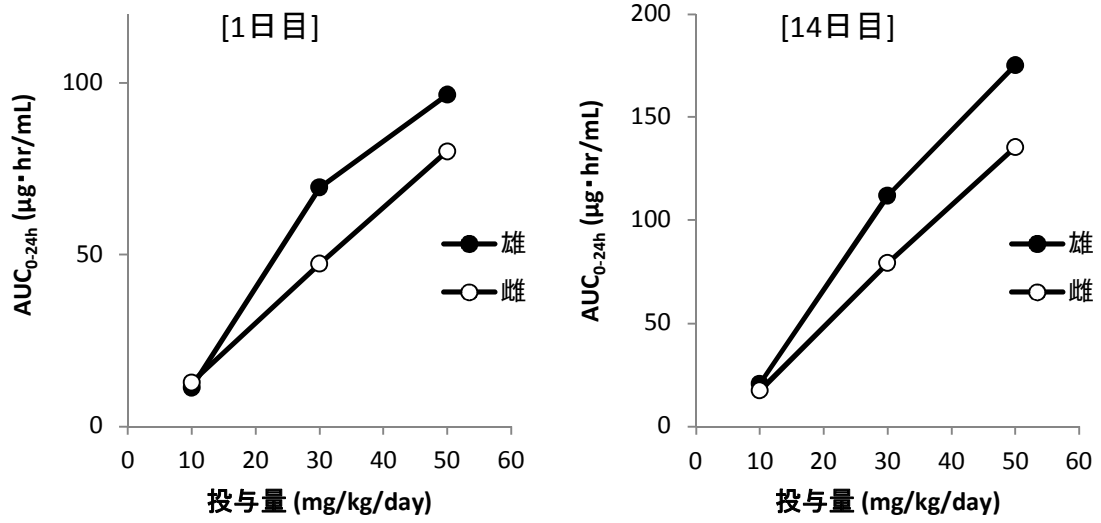


図 2.6.4-6 サルにサフィナミドメシル酸塩を反復経口投与した時の投与量と $AUC_{0\text{-}t}$ の関係

NW-1153 の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、1 日目において雌雄それぞれ 10 mg/kg では 0.80 ± 0.47 μg·hr/mL 及び 0.96 ± 0.45 μg·hr/mL、30 mg/kg では 3.57 ± 0.65 μg·hr/mL 及び 3.11 ± 0.27 μg·hr/mL、50 mg/kg では 4.77 ± 0.77 μg·hr/mL 及び 3.76 ± 0.34 μg·hr/mL であり、サフィナミドと比べて顕著に低かった（約 20 分の 1）。NW-1153 の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 10 から 50 mg/kg の範囲で用量にほぼ比例して増加した。反復投与後にはいずれの用量でも僅かな蓄積（1.3～2.3 倍）が認められた。性差は認められなかった。

NW-1689 の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、1 日目において雌雄それぞれ 10 mg/kg では 50.0 ± 29.9 μg·hr/mL 及び 62.3 ± 29.7 μg·hr/mL、30 mg/kg では 228 ± 54 μg·hr/mL 及び 239 ± 33 μg·hr/mL、50 mg/kg では 310 ± 80 μg·hr/mL 及び 310 ± 82 μg·hr/mL であり、サフィナミドの約 5 倍であった。また、NW-1689 の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 10 から 50 mg/kg の範囲で用量にほぼ比例して増加した。反復投与後にはいずれの用量でも僅かな蓄積（1.5～2.7 倍）が見られた。性差は認められなかった。

NW-1689AG の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、1 日目において雌雄それぞれ 10 mg/kg では 2.32 ± 1.66 μg·hr/mL 及び 1.40 ± 0.46 μg·hr/mL、30 mg/kg では 5.54 ± 1.48 μg·hr/mL 及び 7.65 ± 3.39 μg·hr/mL、50 mg/kg では 5.91 ± 1.98 μg·hr/mL 及び 12.3 ± 4.5 μg·hr/mL であり、サフィナミドの約 5～10 分の 1 であった。反復投与後にはいずれの用量においても蓄積が認められたが、バラツキが大きかった（2.5～7.1 倍）。性差は認められなかった。

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 In vitro 血球移行性試験

【2.6.5.5.A】：4.2.2.3-03：DMPK-126-07（評価資料）

^{14}C-サフィナミド並びに主要代謝物の ^{14}C-NW-1153 及び ^{14}C-NW-1689 の赤血球中分布を HsdWin:NMRI マウス、HsdCpb:WU ラット、ニュージーランド白ウサギ、ビーグル犬、カニクイザル及びヒト血液を用いて検討した。

マウスの血液では、サフィナミドは赤血球に多く分布し、ラット、ウサギ及びイヌの血液では、サフィナミドは赤血球と血漿の両方に同程度に分布していた。一方で、サル及びヒトの血液ではサフィナミドは主に血漿中に認められた。各動物におけるサフィナミド及びその主要代謝物である NW-1153 及び NW-1689 の赤血球／血漿濃度比（$R_{BC/P}$）を表 2.6.4-7 に示す。

表 2.6.4-7 In vitro 全血分布：サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689

動物種	マウス		ラット		ウサギ		イヌ		サル		ヒト	
添加濃度	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
サフィナミド $R_{BC/P}$	1.8	1.9	1.2	1.2	1.3	1.3	0.9	1.0	0.5	0.6	0.4	0.5
NW-1153 $R_{BC/P}$	2.2	2.3	1.0	1.1	1.1	1.1	0.9	0.9	0.7	0.7	0.6	0.6
NW-1689 $R_{BC/P}$	0.05	0.07	0.05	0.07	0.03	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05

サフィナミド：2.5、100 μM（Low、High）
NW-1153：0.5、20 μM（Low、High）
NW-1689：2.5、100 μM（Low、High）
$R_{BC/P}$ = 赤血球中濃度／血漿中濃度

2.6.4.4.2 マウスにサフィナミドメシル酸塩を経口投与した時の in vivo 血球移行

【2.6.5.5.B】：4.2.2.4-02：DMPK-176-07（評価資料）

雌雄 ICR マウスに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 100 mg/kg 単回経口投与し、血液及び血漿中の総放射能濃度を測定した（n=4）。

赤血球中の総放射能の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、血漿中の約 0.4 倍であった。また、投与 0.25 時間後の $R_{BC/P}$ は約 1 倍であるが、投与 24 時間後では 0.2 倍以下にまで減少し、赤血球からの消失は血漿からよりも早いことが示された。

2.6.4.4.3 アルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の組織分布

【2.6.5.5.C】：4.2.2.3-04：R09360（評価試験）

雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩 10 mg/kg を単回経口投与し、168 時間後まで定量的全身オートラジオグラフィーを実施して組織分布を検討した（雌雄合わせて n=6）。

0.5 時間後に放射能が非常に高かったのは、胃壁（107 ± 110 μg eq/g）、腎臓（30 ± 15 μg eq/g）、肝臓（25 ± 9 μg eq/g）、涙腺（21 ± 10 μg eq/g）、脾臓（18 ± 7 μg eq/g）、肺（16±9 μg eq/g）、唾液腺（16 ± 6 μg eq/g）、副腎（15 ± 5 μg eq/g）及び褐色脂肪（14 ± 7 μg eq/g）であった。胃を除くこれらの組織はいずれも、血漿と比べて約 2～3 倍の濃度があった。この時点での小脳及び大脳での濃度はそれぞれ 9.2 ± 4.5 及び 9.8 ± 4.5 μg eq/g で、平均して血漿と比べて 1.2～1.3 倍の濃度であった。

投与 4 時間後に雌雄ともに放射能が高かったのは、涙腺（17 ± 5 μg eq/g）、胃壁（12 ± 15 μg eq/g）、肝臓（9.7 ± 2.5 μg eq/g）、褐色脂肪（8.3 ± 5.1 μg eq/g）、腎臓（8.0 ± 3.5 μg eq./g）及び大腸壁（7.6 ± 4.9 μg eq/g）であった。この時点で血漿よりも高い放射能濃度が認められたのは涙腺（約 2 倍）だけであった。小脳及び大脳で放射能は雄では検出されず、雌ではそれぞれ 3.0 ± 0.7 μg eq/g 及び 3.6 ± 0.9 μg eq/g の濃度で、平均して血漿と比べて約 0.4 倍の濃度であった。

24 及び 168 時間後では、涙腺、褐色脂肪、白色脂肪及び骨髄を除くほぼ全ての組織で放射能が徐々に減少していた。一方で、上記の 4 つの組織では投与 168 時間後も血漿と比べて高い放射能（約 15～67 倍）が残っていた。なお、24 及び 168 時間後では、脳における放射能は検出されなかった。

2.6.4.4.4 アルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び反復経口投与した時の組織分布

【2.6.5.5.D】,【2.6.5.5.E】：4.2.2.2-07：847960（評価資料）

雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩 1 mg/kg を単回静脈内投与（雌雄各 n=4）又は雄性ラットに 5 mg/kg を 7 日間反復経口投与し（n = 4）、組織分布を評価した。

単回静脈内投与 168 時間後では、雄性ラットの精巣上体（0.25 ± 0.09 μg eq/g）及び脂肪（0.69 ± 0.27 μg eq/g）並びに雌の脂肪（0.46 ± 0.10 μg eq/g）で組織濃度が高く、その他の組織ではいずれも 0.1 μg eq/g 未満であった。7 日間反復経口投与 1 時間後に濃度が高かったのは、十二指腸（18 ± 3 μg eq/g）、精巣上体（8.5 ± 2.7 μg eq/g）、脂肪（7.2 ± 0.7 μg eq/g）、腸管（20 ± 3 μg eq/g）、腎臓（6.6 ± 0.1 μg eq/g）、肝臓（11 ± 0.3 μg eq/g）、胃（5.5 ± 2.5 μg eq/g）、尿道（11 ± 2 μg eq/g）及び膀胱（8.8 ± 9.8 μg eq/g）であった。他の臓器はいずれも 5 μg eq/g 未満で、0.28 ± 0.01 μg eq/g（甲状腺）から 4.9 ± 1.2 μg eq/g（前立腺）の範囲にあった。

7 日間反復経口投与 1 時間後に採取した血液、血漿及び脳の試料の放射能を分析した結果、それぞれ 2.1 ± 0.2 μg eq/g（血液）、3.7 ± 0.3 μg eq/g（血漿）、1.6 ± 0.5 μg eq/g（脳）及び 2.6 ± 0.1 μg eq/g（胴体）であった。さらに 7 日間反復投与 96 時間後に放射能が高かったのは、胴体（1.5 ± 0.9 μg eq/g）、

精巣上体（6.0 ± 3.4 µg eq/g）、脂肪（15 ± 11 µg eq/g）、腸管（1.3 ± 0.6 µg eq/g）、皮膚（2.7 ± 1.7 µg eq/g）及び尿道（10 ± 12 µg eq/g）であった。他の臓器はいずれも 1.0 µg eq/g 未満であった。

2.6.4.4.5 有色素ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内及び経口投与した時の組織分布

【2.6.5.5.F】：4.2.2.3-05：DMPK-17-08（評価資料）

雄性 Lister Hooded ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩 1 mg/kg を単回静脈内及び経口投与し、メラニン含有組織、血漿並びに選択した器官及び組織からの総放射能の消失速度を測定した（n=3）。

投与 120 時間後まで血漿、肝臓、腎臓、副腎、眼、皮膚（有色部位及び非有色部位）及び涙腺から試料を採取した。経口又は静脈内投与後の推定平均半減期は同程度であった。総放射能の半減期は肝臓及び涙腺で最も短く（35～40 時間）、次に血漿（49～50 時間）、腎臓（51～59 時間）及び副腎（経口で 70 時間、静脈内で 129 時間）の順で短かった。眼（有色）の半減期は静脈内及び経口投与でともに約 65 時間であったが、有色部位の皮膚ではそれぞれ 65 時間及び 91 時間であった。加えて、120 時間後までの AUC を全組織と器官で算出した。血漿、肝臓、腎臓及び副腎では、経口及び静脈内投与での放射能は同程度であった。非有色部位の皮膚と比べると有色部位の皮膚の曝露量は静脈内投与では 3 倍、経口投与では 2 倍高かった。涙腺でも高い曝露量が認められ、投与 120 時間後の涙腺の放射能濃度は血漿に対して静脈内投与で 8.7 倍、経口投与で 12 倍となった。有色部位の皮膚及び眼を含めた検討したいずれの組織でも、総放射能の消失が認められ、メラニンへの結合は可逆的である可能性が示された。

2.6.4.4.6 有色素及びアルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を経口投与した時の網膜及び脳へのサフィナミド及び代謝物の分布

【2.6.5.5.G】：4.2.2.3-06：DMPK-122-08（評価資料）

【2.6.5.5.H】：4.2.2.3-07：DMPK-146-08（評価資料）

【2.6.5.5.I】：4.2.2.3-08：DMPK-176-08（評価資料）

【2.6.5.5.J】：4.2.2.3-09：DMPK-48-08（評価資料）

げっ歯類で網膜変性が認められたため、以下の放射標識試験 4 件を実施し、有色素（Lister Hooded）及びアルビノ（Wistar）ラットの網膜に存在する代謝物の同定を行った。所見の要約を表 2.6.4-8 に示す。

試験 1（DMPK-48-08）：有色素及びアルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を、それぞれ 5 及び 10 mg/kg で単回経口投与して血漿と眼のサフィナミドの代謝プロファイルを検討した。

試験 2（DMPK-122-08）：定常状態での有色素ラットの血漿及び眼のサフィナミド代謝物プロファイルを評価するため投与量及び頻度を増やした。サフィナミドメシル酸塩を 80 mg/kg/日で 5 日間投与（最初の 4 日間は非標識サフィナミドメシル酸塩、5 日目は ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 1 日 1 回経口投与）し、眼でのメラニン結合を飽和させた状態で検討した。

試験 3（DMPK-146-08）：長期曝露後の有色素ラットの血漿及び眼のサフィナミド代謝物プロファイルを検討するため投与量及び頻度を増やした。150 mg/kg/日を 14 日間投与（最初の 13 日間は非標識サフィナミドメシル酸塩、14 日目は ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 1 日 1 回経口投与）し、眼でのメラニン結合を推定上完全に飽和させて検討した。

試験 4（DMPK-176-08）：アルビノラットを用いて試験 3（DMPK146-08）と同様の試験を実施し、試験 3 における有色素ラットでのプロファイルと比較した。

試験 3 と 4 については NW-1689 の血液脳関門及び血液眼透過も検討した。さらに有色素及びアルビノラットに ^{14}C-NW-1689 を低用量（5 mg/kg）と高用量（100 mg/kg）で皮下投与し、血漿、眼及び脳の NW-1689 濃度を測定した。

以上の 4 試験から以下の結果が得られた。

サフィナミドは有色素及びアルビノラットの両方でほとんどが代謝され、主に NW-1689 となった。この代謝物は単回及び反復投与後の総血漿放射能の 70%以上を占めた。

アルビノラットの眼と比べて有色素ラットの眼での総サフィナミド濃度は約 40 倍高かった。

サフィナミドメシル酸塩の投与量と関係なく両系統ともに血中での主要代謝物は NW-1689 で、この代謝物はアルビノラットの眼には認められたが、有色素ラットの眼には認められなかった。それに対して、NW-1689 自体を皮下投与した場合は、NW-1689 の眼への取り込みに系統特異的な差は認められなかった。

サフィナミドメシル酸塩を投与したアルビノラットの脳抽出物にはサフィナミドのみが含まれていたが、NW-1689 を投与したアルビノ及び有色素ラットの脳抽出物には NW-1689 のみが含まれていた。

表 2.6.4-8 サフィナミドメシル酸塩の単回及び反復経口投与後の有色素ラット及びアルビノラットの血漿及び眼におけるサフィナミド及び代謝物の分布（投与放射能に対する%）

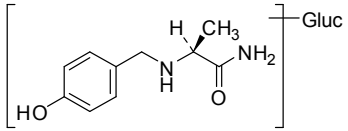
試験番号	DMPK-48-08				DMPK-122-08		DMPK-146-08		DMPK-176-08			
系統；性別	Lister Hooded；雄		Wistar；雌		Lister Hooded；雄		Lister Hooded；雌		Wistar；雌		Wistar；雌	
投与量（塩）	5 mg/kg		10 mg/kg		80 mg/kg		150 mg/kg		150 mg/kg		150 mg/kg	
投与方法	単回投与				1 日 1 回× 5 日間 [a]		1 日 1 回× 14 日間 [b]		単回投与		1 日 1 回× 14 日間 [b]	
マトリクス	血漿	眼	血漿	眼	血漿	眼	血漿	眼	血漿	眼	血漿	眼
最終投与からの時間	6	6	6	6	8	8	6	6	6	6	6	6
代謝物												
M370-2	0.0897 (14)	-	0.254 (7.7)	0.00049 (19)	0.1672 (9.5)	-	0.190 (7.6)	-	-	0.00052 (7.4)	-	-
NW-1199	-	0.0038 (6.7)	-	-	0.0176 (1.0)	0.0035 (3.1)	0.0172 (1.2)	-	-	-	-	-
NW-1689	0.538 (84)	-	2.94 (89)	0.00145 (56)	1.390 (79)	-	0.958 (67)	-	3.24 (99)	0.00212 (30)	1.48 (82)	0.00108 (22)
NW-1689AG M422	微量	-	0.0429 (1.3)	-	微量	-	0.127 (8.9)	-	微量	0.00044 (6.2)	微量	0.00016 (3.3)
NW-1153	微量	-	微量	-	0.0986 (5.6)	-	0.0315 (2.2)	-	微量	0.00019 (2.7)	微量	-
サフィナミド	微量	0.051 (91)	微量	0.00025 (9.7)	0.0986 (5.6)	0.110 (97)	0.139 (9.7)	0.135 (100)	微量	0.00345 (49)	0.324 (18)	0.00350 (71)
総放射能に対する%	0.641	0.056	3.30	0.00259	1.76	0.113	1.43	0.135	3.27	0.00705	1.80	0.00492

( )：カッコ内は試料内の総放射能の割合（%）を示す。　　-：検出されず

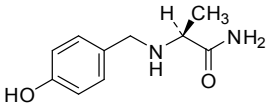
微量：HPLC での放射能の検出の定量下限（LOQ）（検体中放射能の 1%）未満であったが、LC-MS-MS で確認された。

a：最初の 4 日間は非標識サフィナミド、5 日目は ^{14}C-サフィナミドを 1 日 1 回経口投与

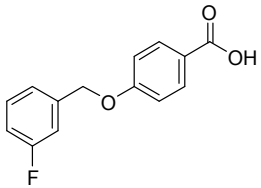
b：最初の 13 日間は非標識サフィナミド、14 日目は ^{14}C-サフィナミドを 1 日 1 回経口投与



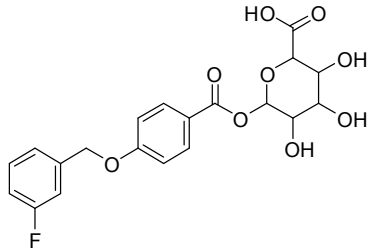
M370-2



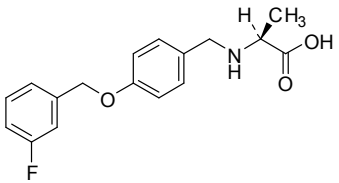
NW-1199



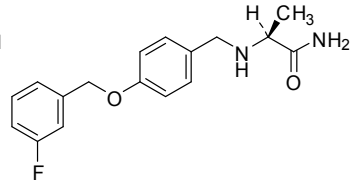
NW-1689



NW-1689AG (M422)



NW-1153



サフィナミド

2.6.4.4.7 脳移行性

雄性 ICR マウス、雄性 SD ラット及び雌雄カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した後に血漿及び脳でのサフィナミド濃度を測定する試験を実施した。各動物種での脳及び血漿での曝露量、並びにその比率の概要を下記の表 2.6.4-9 に示す。

表 2.6.4-9 投与量当たりのサフィナミドの脳／血漿比（AUC 比）

AUC／投与量[1]	血漿	脳	脳／血漿
マウス[2]	219	3450	15.8
ラット[3]	129	2060	16.0
サル[4]	751	6620	8.8

(1) 総濃度に基づき（ng·h/mL）/（mg/kg）
(2) 雄性マウス単回経口投与（7 mg/kg）試験（試験番号 METPK-149-95）
(3) 雄性ラット単回経口投与（10 mg/kg）試験（試験番号 METPK-99-93）
(4) 雌性サル単回経口投与（5 mg/kg）試験（試験番号 METPK-134-95）

2.6.4.4.7.1 マウスにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の脳移行性

【2.6.5.5.K】：4.2.2.3-01：METPK-149-95（9550334）（評価資料）
4.2.2.3-10：DMPK-23-11（評価資料）

雄性 ICR マウスにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 7 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与後 16 時間までの血漿及び脳におけるサフィナミド濃度を定量した（n=3）。

血漿及び脳で濃度が最高であったのは投与 0.25 時間後で、それぞれ平均値として 567 ± 52 ng/mL 及び 6971 ± 1592 ng/g tissue であり、脳中濃度は血漿中濃度に対して平均して 12.3 倍であった。また、投与後 16 時間の脳中濃度は 66 ± 15 ng/g tissue、血漿においては LLOQ 未満であった。脳中濃度は血漿中濃度に対して投与後 6 時間まで約 9～14 倍を維持した。

2.6.4.4.7.2 ラットにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の脳移行性

【2.6.5.5.K】：4.2.2.3-10：DMPK-23-11（評価資料）
4.2.2.3-11：METPK-99-93(9550284)（評価資料）

雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 10 mg/kg の用量で経口投与し、48 時間後まで血漿及び脳を採取した。

投与 20 分後には血漿では最高濃度（962 ± 106 ng/mL）となり、脳では 30 分後に最高濃度となった（11,227 ± 2,083 ng/g）。投与 30 分後から血漿で定量可能であった最後の時点（6 時間後）まで、脳での濃度は血漿に対して約 16～20 倍であった。

2.6.4.4.7.3 サルにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時の脳移行性

【2.6.5.5.K】：4.2.2.3-02：METPK-150-95（9550336）（評価資料）
4.2.2.3-10：DMPK-23-11（評価資料）
4.2.2.3-12：METPK-134-95(9550335)（評価資料）

雄性カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 50 又は 100 mg/kg の用量で経口投与し、投与 2 時間後の血漿及び脳試料を採取した（各用量、n=2）。50 mg/kg 投与の血漿中濃度は約 6,400～8,700 ng/mL、脳中濃度は約 34,000～39,000 ng/g であり、100 mg/kg 投与の血漿中濃度

は約 11,000～12,000 ng/mL、脳中濃度は約 76,000～93,000 ng/g であった。脳中濃度は血漿中濃度の 4.5～8.7 倍であった。

また、雌性カニクイザルにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 5 mg/kg の用量で経口投与し、0.5～8 時間後まで血漿及び脳から試料を採取した（各時点、n=1）。血漿中濃度は投与 1 時間後に最高濃度 946 ng/mL となり、脳中濃度は投与 3 時間後に最高濃度 9,987 ng/g となった。脳中濃度は血漿中濃度の 4.5～15 倍であった。

2.6.4.4.8 マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒトの in vitro 血漿蛋白結合

【2.6.5.6.A】：4.2.2.3-13：DMPK-127-07（評価資料）
【2.6.5.6.B】：4.2.2.3-14：DMPK-162-07（評価資料）
【2.6.5.6.C】：4.2.2.3-15：DMPK-20-11（評価資料）
【2.6.5.6.D】：4.2.2.3-16：NWR-12（評価資料）

平衡透析法又は限外ろ過法を用いて、サフィナミド並びに NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG の 3 つの代謝物について ICR マウス、SD ラット、ニュージーランド白ウサギ、ビーグル犬、カニクイザル、ヒト血漿及び精製ヒト血漿中蛋白結合率を検討した。

サフィナミド及び代謝物の結合率の概要を表 2.6.4-10 に示す。血漿蛋白結合率は全体として NW-1689、サフィナミド、NW-1153 の順に高く、ヒトにおけるサフィナミドの血漿蛋白結合率は約 89%であった。

表 2.6.4-10 マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒト血漿並びに精製蛋白質へのサフィナミド及び代謝物の in vitro 結合率

fb ± S.D.（%）(1)	サフィナミド (0.004～50 μg/mL; 0.0125～165 μM)	NW-1153 (0.5～20 μg/mL; 0.5～66 μM)	NW-1689 (0.5～20 μg/mL; 2.0～95 μM)	NW-1689AG (0.5～20 μg/mL; 1.2～48 μM)
マウス（報告書番号）	88 ± 2（NWR-12）	72 ± 3（NWR-12）	98 ± 0（NWR-12）	-
ラット（報告書番号）	89 ± 2（NWR-12）	78 ± 4（NWR-12）	100 ± 0（NWR-12）	-
ウサギ（報告書番号）	83 ± 0（DMPK-162-07）	71 ± 0（DMPK-162-07）	100 ± 0（DMPK-162-07）	-
イヌ（報告書番号）	81 ± 0（DMPK-162-07）	59 ± 1（DMPK-162-07）	100 ± 0（DMPK-162-07）	-
サル（報告書番号）	85 ± 1（DMPK-162-07）	62 ± 1（DMPK-162-07）	100 ± 0（DMPK-162-07）	94 ± 0（DMPK-20-11）
ヒト（報告書番号）	89 ± 0（DMPK-127-07）	71 ± 2（NWR-12）	100 ± 0（DMPK-127-07）	97 ± 0（DMPK-20-11）
ヒト α1-酸性糖蛋白質（報告書番号）	7 ± 1（DMPK-127-07）	-	4 ± 2（DMPK-127-07）	-
ヒト血清アルブミン（報告書番号）	89 ± 0（DMPK-127-07）	-	100 ± 0（DMPK-127-07）	-
ヒト VLDL（報告書番号）	11 ± 1（DMPK-127-07）	-	9 ± 7（DMPK-127-07）	-
ヒト HDL（報告書番号）	26 ± 1（DMPK-127-07）	-	67 ± 15（DMPK-127-07）	-
ヒト LDL（報告書番号）	52 ± 1（DMPK-127-07）	-	25 ± 4（DMPK-127-07）	-

(1)：全ての濃度における値の平均、標準偏差（standard deviation; S.D.）は Doerffel の誤差伝播に従い算出

2.6.4.4.9 サフィナミド結合蛋白の同定

【2.6.5.6.A】：4.2.2.3-13：DMPK-127-07（評価資料）

精製ヒト血漿蛋白質を用いて蛋白結合率を測定した。

精製ヒト蛋白結合率の概要を表 2.6.4-10 に示す。精製ヒト血漿蛋白質を用いた検討から、サフィナミド及び NW-1689 が血漿中で主に結合している蛋白質はヒト血清アルブミンであることが示された。

2.6.4.4.10 妊娠又は授乳動物における試験

該当する試験なし。

2.6.4.4.11 その他の分布

該当する試験なし。

2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 マウス、ラット、サル及びヒト肝細胞における代謝試験

【2.6.5.10.A】：4.2.2.4-03：NWR-03（評価資料）
4.2.2.4-04：NWR-05（評価資料）

^{14}C-サフィナミドをマウス、ラット、サル及びヒトの初代（新鮮）肝細胞とインキュベートし、radio-HPLC 及び LC-MS/MS により代謝プロファイルを比較した。

いずれの動物種でも 2 つの主要代謝物として NW-1153 及び NW-1689（化学構造については図 2.6.4-7 参照）が同定された。

2.6.4.5.2 ウサギ及びイヌ肝細胞における代謝試験

【2.6.5.10.B】：4.2.2.4-05：DMPK-165-07（評価資料）

【2.6.5.10.C】：4.2.2.4-06：DMPK-54-08（評価資料）

^{14}C-サフィナミドをニュージーランド白ウサギ及びビーグル犬の初代肝細胞とインキュベートし、radio-HPLC 及び LC-MS/MS により代謝プロファイルを検討した。

ウサギにおける主要代謝物は NW-1153（M303-1）、NW-1689（M246）及び NW-1199（M194）であった。また、NW-1689 のアシルグルクロニド（NW-1689AG）が微量代謝物として検出された。イヌにおける主要代謝物は、NW-1153（M303-1）及び M318 であった。

2.6.4.5.3 ヒト肝細胞における代謝試験

【2.6.5.10.D】：4.2.2.4-07：DMPK-30-08（評価資料）

^{14}C-サフィナミドとヒト初代肝細胞を 0.5～24 時間インキュベートし、代謝物を同定するとともにサフィナミドの肝クリアランスを予測した。

蛋白非結合型サフィナミド濃度に基づいて算出された肝固有クリアランスは 1.4 ± 0.4 μL/min/10^6 cells であった。さらに well-stired model を用いて肝クリアランスを予測したところ、0.023 ± 0.007 L/h/kg となり、肝血流の約 1.5%に相当した。主要代謝物として NW-1153、NW-1689AG 及び NW-1689AG の異性体の 3 種が認められた。

2.6.4.5.4 サフィナミドの代謝に関与する酵素（CYP 分子種・MAO）の同定

【2.6.5.10.E】：4.2.2.4-08：NWR-04（評価資料）

【2.6.5.10.F】：4.2.2.4-09：NWR-14（評価資料）

サフィナミドの代謝に関与する CYP 分子種の同定を、15 ドナーのヒト肝ミクロソームを用いた相関分析、CYP 選択的阻害剤を用いた in vitro 阻害実験及び発現系ヒト CYP アイソザイムを用いた in vitro 代謝実験により検討した。

1) 15 ドナーからのヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミドの代謝速度と、それぞれ CYP3A4/5 及び CYP2B6 活性選択的反応であるテストステロン 6β-ヒドロキシル化活性及びデキストロメトルファン *N*-脱メチル化活性との間には有意な相関関係（$p<0.01$）が認められた。また、3 つの NADPH 依存性主要代謝物（MET3, MET7, MET8）の生成速度と、テストステロン 6β-ヒドロキシル化活性及びデキストロメトルファン *N*-脱メチル化活性との間にも有意な相関関係（$p \leqq 0.01$）が認められた。
2) プールヒト肝ミクロソーム中で、^{14}C-サフィナミドをケトコナゾール（CYP3A4 に対する選択的阻害剤）共存下でインキュベートしたところ、代謝はほぼ完全に阻害された（94%）。他の阻害剤はサフィナミドの代謝にほとんど影響を及ぼさなかった。
3) 発現系ヒト CYP アイソザイムとインキュベーションしたところ、CYP1A2、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 はサフィナミドに対して代謝活性を有していたが、CYP3A4 はヒト肝ミクロソームと最もよく似た代謝プロファイルを示した。

以上のことからプールヒト肝ミクロソーム中でサフィナミドは比較的遅い速度で多数の代謝物に代謝されるが、その過程に CYP3A4 が主に関与していると考えられた。

次に、サフィナミドの代謝に対するモノアミン酸化酵素（MAO）の関与の有無を検討した（概要表 2.6.5.10.F；試験番号 NWR/14 参照）。新鮮ヒト肝細胞中で ^{14}C-サフィナミドを 50 μM の濃度でインキュベートしたところ、NW-1689 及び NW-1153 に加えて、サフィナミドの *N*-グルクロニドが形成された。MAO-A に対する選択的阻害剤（クロルジリン）の共存下では、NW-1689 の生成が顕著に減少し、NW-1689 への中間体である Met-A が検出された。更に、Met-A の構造式を考慮すると、MAO-A は Met-A から NW-1689 が生成する過程に関与していると推定された。選択的 MAO-B 阻害剤（パルギリン）又は CYP3A4 阻害剤（トロレアンドマイシン）の共存下では Met-A は検出されなかった。

2.6.4.5.5 サフィナミドから NW-1689 生成に関与する代謝酵素の同定

【2.6.5.10.G】：4.2.2.4-10：DMPK-123-07（評価資料）

サフィナミドから NW-1689 の生成に対する CYP 及び CYP 以外の酵素の関与を明らかにする目的で、以下の各試験を実施した。

1) ヒト肝ミクロソーム及びその他の in vitro 試験系における検討
ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝ミトコンドリア、ヒト肝サイトゾル、ヒト脾臓 S9 画分、ヒトミクロソーム（肺、小腸、腎）、発現系ミクロソーム（CYP3A4、CYP3A5、CYP2C19、CYP4F2、CYP2J2、MAO-A、MAO-B）、ヒト血液（全血、血漿）及び人工体液（胃液、腸液）中における ^{14}C-サフィナミドから NW-1689 への生成を検討した。その結果、発現系 CYP3A4 及び CYP2C19 において、わずかにサフィナミドの減少が認められ、NW-1689 の生成もわずかに認

められた。また、発現系 CYP3A4、CYP2C19 及び CYP2J2 において Met-A の生成が認められ、発現系 MAO-A において Met-X の生成が認められた。

2) ラット肝ミクロソーム、脳 S9 画分及び全血における検討

^{14}C-サフィナミド及び ^{14}C-NW-1153 をラット肝ミクロソーム、ラット脳 S9 画分及びラット全血中でインキュベートした。

ラット肝ミクロソーム中では ^{14}C-サフィナミドのほとんどが代謝され、主な代謝物は NW-1199 及び NW-1689 であった。また、ラット脳 S9 画分中でも僅かではあるがサフィナミドは NW-1689 に代謝された。

一方、ラット肝ミクロソーム中では ^{14}C-NW-1153 から NW-1689 の生成は認められなかった。

ラット全血中では、サフィナミドは安定であった。

3) MAO-A 及び MAO-B の寄与の検討

ヒト肝ミクロソーム、発現系 MAO-A 及び MAO-B における Met-A から Met-X 及び NW-1689 への代謝生成に対する CYP 非特異的阻害剤（ABT）及び MAO-A 特異的阻害剤（クロルジリン）の影響を検討した。

ヒト肝ミクロソーム及び発現系 MAO-A においては、Met-A から Met-X 及び NW-1689 の生成が認められ、そのうち Met-X の生成はクロルジリンにより完全に阻害された。ABT では、ヒト肝ミクロソーム及び発現系 MAO-A における Met-X の生成は部分的に阻害された。一方、発現系 MAO-B においては、Met-A から Met-X の生成は認められなかった。

以上のことから、サフィナミドは CYP3A4、CYP2C19、CYP2J2 及び MAO-A によって Met-A に代謝され、更に MAO-A により Met-X に代謝されることが明らかになった。

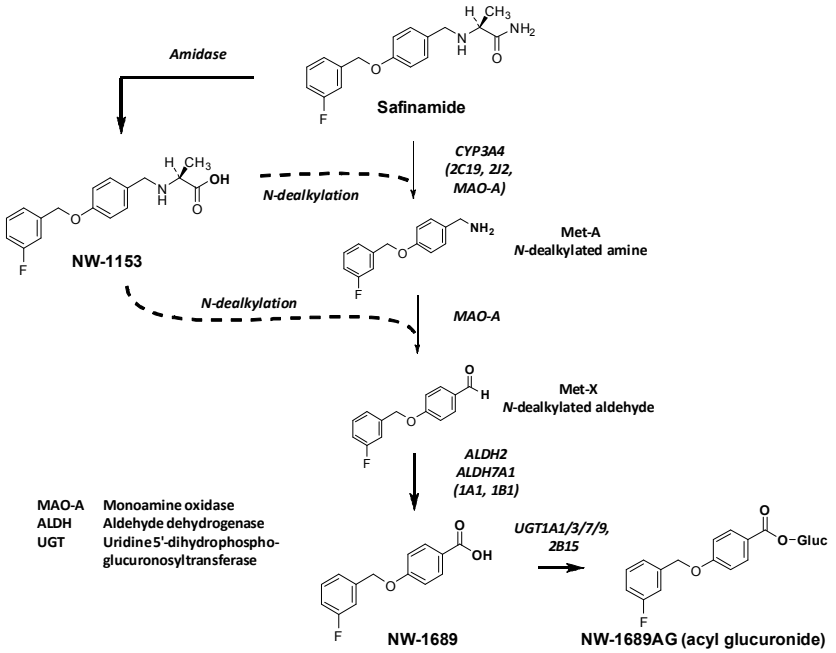


図 2.6.4-7 サフィナミドのヒトでの推定代謝経路

2.6.4.5.6 Met-X から NW-1689 への変換について（ALDH の関与の検討）

【2.6.5.10.H】：4.2.2.4-11：DMPK-125-07（評価資料）

Met-X から NW-1689 への代謝生成にアルデヒド脱水素酵素（aldehyde dehydrogenase; ALDH）が関与するか検討した。ALDH 分子種としては ALDH1A1、ALDH1B1、ALDH2 及び ALDH7A1 の 4 分子種を用いた。

全ての分子種において Met-X から NW-1689 への酸化反応が認められた。これらのうち、ALDH2 及び ALDH7A1 が高い基質親和性を示し、K_m 値はそれぞれ 6.3 μM 及び 5.1 μM であった。特に、ALDH2 及び ALDH7A1 の V_{max}/K_m はそれぞれ 24.9 mL/min/mg 及び 6.67 mL/min/mg であったことから、Met-X の酸化に ALDH2 が最も寄与していると考えられた。

2.6.4.5.7 NW-1153 の生成に関わる酵素の同定

【2.6.5.10.I】：4.2.2.4-12：DMPK-124-07（評価資料）

^{14}C-サフィナミドから NW-1153 への水酸化反応に関与する代謝酵素を明らかにするため、ヒト及びラット初代肝細胞、ヒト血漿、ヒト及びラット肝ミクロソーム、ヒト肝 S9、並びに特定の発現系ミクロソームを用いた in vitro 試験を行った。

ヒト肝細胞において ^{14}C-サフィナミドをインキュベートしたところ、NW-1153 が主要代謝物として認められたが、その生成はエステラーゼ阻害剤（Phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF）、及びアミダーゼ阻害剤（Bis-p-nitrophenyl phosphate; BNPP）により完全に阻害された。一方、ヒトカルボキシルエステラーゼ（hCE）-1 及び hCE-2 においては、サフィナミドの減少は認められなかった。更に、発現系ヒト脂肪酸アミド加水分解酵素（fatty acid amide hydrolase; FAAH）において、サフィナミドをインキュベーションしたところ、NW-1153 の生成が認められたが、その生成は FAAH 阻害剤（URB597）により完全に阻害された。これらの結果から、FAAH がサフィナミドから NW-1153 への代謝に関与することが明らかとなった。

2.6.4.5.8 NW-1153 から NW-1689 への代謝

【2.6.5.10.I】：4.2.2.4-12：DMPK-124-07（評価資料）

NW-1153 を被験物質として投与した毒性試験（概要表 2.6.7.17.F.1；試験番号 39880）において、NW-1153 から NW-1689 への変換が認められた。また、NW-1153 が NW-1689 に変換されることがラット及びヒト肝細胞で確認されたことから、両種においてサフィナミドが NW-1153 を経て NW-1689 に代謝される主要経路が存在することは明らかである。

そこで、その主要経路に寄与する代謝酵素の同定を試みた。ヒト及びラット肝細胞において NW-1153 をインキュベートしたところ、NW-1689 の生成が認められた。一方、ヒト肝ミクロソームにおいては NW-1153 が代謝されて NW-1689 が生成することはなかった。更に、MAO-A、MAO-B、フラビン含有モノオキシゲナーゼ（flavin-containing monooxygenase; FMO）-1、FMO-3、グルタチオンペルオキシダーゼ（glutathione peroxidase; GS-Px）及びミエロペルオキシダーゼ（myelo peroxidase; My-Px）においては NW-1153 から NW-1689 の生成は認められなかった。FMO-5 においてのみ、僅かに NW-1689 の生成が認められた。

2.6.4.5.9 NW-1689 から NW-1689AG の生成に関わる酵素の同定

【2.6.5.10.J】：4.2.2.4-13：XT104133 (DMPK-145-10)（評価資料）

NW-1689 から NW-1689AG への代謝に関与する UDP-グルクロン酸転移酵素（UDP-glucuronosyl transferase; UGT）の分子種同定を、UGT 遺伝子導入 Supersomes™を用いて行った。

NW-1689（10 μM）を発現系ヒト UGT（UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9、UGT1A10、UGT2B4、UGT2B7、UGT2B15 及び UGT2B17）においてインキュベートしたところ、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A7、UGT1A9 及び UGT2B15 において NW-1689AG の生成が認められた。このことから、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A7、UGT1A9 及び UGT2B15 が NW-1689 をグルクロン酸抱合すると示唆された。

また、ヒト肝ミクロソームにおける NW-1689 から NW-1689AG へのグルクロン酸抱合反応の代謝速度パラメータは、K_m=211 ± 10 μM 及び V_{max}=4350 ± 78 pmol/min/mg であり、in vitro 固有クリアランス（V_{max}/K_m）は 20.6 μL/min/mg であった。

2.6.4.5.10 NW-1689AG の反応性・共有結合能

【2.6.5.10.K】：4.2.2.4-14：DMPK-164-07（評価資料）

NW-1689AG のヒト血清アルブミンに対する共有結合能、及びアシルグルクロニドのリン酸緩衝液中での転位活性を評価した。

ヒト血清アルブミンにおいて 48 時間インキュベートした際の共有結合率は約 0.3%と、市販薬（ジクロフェナク、イブプロフェン及びバルプロ酸）のアシルグルクロニド（AG）と比較して低値であった。一方、リン酸緩衝液中における安定性実験では、NW-1689AG の半減期は 5.4 時間であった。また、定量的構造活性相関（Quantitative structure activity relationship; QSAR）に基づいて算出したグルクロン酸抱合体の異性化の半減期は 3～5 時間であった。これらより、NW-1689AG の共有結合のリスクは低～中であることが示された。

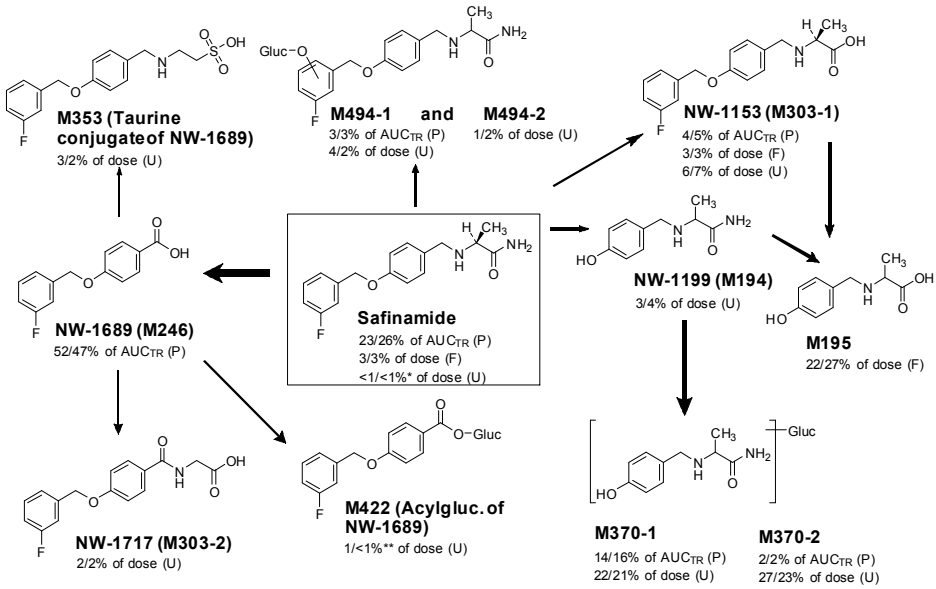
2.6.4.5.11 マウスでの in vivo 代謝

【2.6.5.5.B】,【2.6.5.9.A】：4.2.2.4-02：DMPK-176-07（評価資料）

雌雄 ICR マウスに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 100 mg/kg（サフィナミドとして 76 mg/kg）の投与量で単回経口投与して代謝試験を実施した。マウスでの主要生体内変換経路を図 2.6.4-8 に示す。

2.6.4.5.11.1 推定代謝経路

3 つの主要代謝経路により合計で 11 の放射性代謝物が生成されることが確認された。第一の経路では、酸化的脱アミノ化を経て主要代謝物 NW-1689（M246）が生じ、この代謝物からは更にグリシン抱合体 NW-1717（M303-2）及びタウリン抱合体（M353）、並びに、微量ではあるが NW-1689AG（M422）が生成する。第二の経路ではエーテル結合の開裂により *O*-脱ベンジル化 NW-1199（M194）が生成し、この代謝物は更にアミド加水分解を受けて M195 となるか、又は、グルクロン酸抱合反応を受けて、M370-1 及び M370-2 となる。第三の経路ではアミドの加水分解により NW-1153 が生成し、更に脱 *O*-ベンジル化を受けて代謝物 M195 となる。



Values are given as female/male mean of 4 mice for plasma and 6 for feces and urine;
(P) Plasma: as % $AUC_{(0\text{-}8h)}$ of total radioactivity (AUC_{TR})
(F) Feces: as % of administered dose
(U) Urine: as % of administered dose; *: in males, found by mass spectrometry only
Bold arrows indicate main metabolic routes

図 2.6.4-8 サフィナミドの推定代謝経路：マウス

2.6.4.5.11.2 血漿中放射活性の薬物動態、及び血漿中代謝物

経口投与 8 時間後に雌雄マウスともに総 ^{14}C-放射活性の平均血漿中濃度が約 44 μg eq/mL の最高値に達した。24 時間後の血漿中濃度は、雄で最高血漿中濃度の約 20%、雌で約 6%にまで低下した。経口投与 24 時間までの総 ^{14}C-放射活性の平均曝露量（$AUC_{TR(0\text{-}24h)}$）は雄マウスで 629 μg eq·h/mL、雌マウスで 525 μg eq·h/mL であった。

雌雄マウスの血漿にはサフィナミドが認められ、その $AUC_{(0\text{-}8h)}$は $AUC_{TR(0\text{-}8h)}$の約 25%に相当していた。血中の主要代謝物は NW-1689 で、その $AUC_{(0\text{-}8h)}$は $AUC_{TR(0\text{-}8h)}$の約 50%を占め、*O*-脱ベンジル化グルクロニド M370-1 の $AUC_{(0\text{-}8h)}$は $AUC_{TR(0\text{-}8h)}$の最大で 15%を占めた。

2.6.4.5.11.3 尿・糞中代謝物

経口投与後 72 時間以内に雄では投与量の 64%、雌では 72%の放射能が尿中に排泄され、糞には雄で 35%、雌で 28%の放射能が排泄された。同期間でサフィナミドは投与量の僅か約 3%が排泄物中に認められたにすぎないため、サフィナミドは胃腸管で吸収された後、その大部分は代謝を受けて代謝物として排泄されることが示された。尿中の主要代謝物は、投与量の約 21～27%の割合で存在するグルクロニド M370-1 及び-2 の 2 つの異性体、並びに投与量の約 7%を占める代謝物 NW-1153 であった。糞中の主要代謝物は、NW-1153 の脱ベンジル化産物である M195 で、投与量の約 22～27%を占めた。

2.6.4.5.12 ラットでの in vivo 代謝

2.6.4.5.12.1 血液・血漿中放射活性

【2.6.5.9.B】：4.2.2.2-07：847960（評価資料）

【2.6.5.3.A】：4.2.2.2-01：METPK-190-96（参考資料）

1) 雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩 1 mg/kg を単回静脈内投与し、血漿中総放射能の薬物動態パラメータを求めた。総放射能の血漿クリアランスは雄で 0.083 L/h/kg、雌で 0.049 L/h/kg であった。総放射能の曝露量 $AUC_{TR(0-\infty)}$は、雄で 12.1 μg eq·h/mL、雌で 20.4 μg eq·h/mL であった。それに対して、METPK-190-96 試験におけるサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 5 mg/kg 静脈内投与時のサフィナミドの曝露量を 1 mg/kg 投与時に補正した値が 0.36 μg·h/mL となったことから、$AUC_{TR(0-\infty)}$との比較からサフィナミドのほとんどが代謝を受けることが示された。また、総放射能の消失半減期は雄で 7.4 時間、雌で 11.5 時間であったが、サフィナミドの半減期は 1.7 時間であった。

2) 雄性ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 5 mg/kg/日で 7 日間反復経口投与した後の血漿における総放射能の曝露量 $AUC_{TR(0-\infty)}$は 80.0 μg eq·h/mL、消失半減期は 20.6 時間であった。

2.6.4.5.12.2 各種マトリクス中の代謝物・推定代謝経路

【2.6.5.13.C】：4.2.2.4-15：NWR-09（評価資料）

ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 10 mg/kg 単回経口投与した場合の血漿、尿、糞、及び脳中における代謝物の検討を行った。

血漿中の主要代謝物は NW-1689 と確認され、この代謝物は試料中の放射能の約 50%を占めていた（1.5、4 又は 24 時間試料）。血漿抽出物には、サフィナミドに由来する放射能は微量であった。

尿中には 6 つの代謝物に加えて微量のサフィナミド（投与した放射能の<1%）が含まれていた。尿中での主要代謝物は NW-1689（約 3%）及び NW-1199（4%）で、他に構造が明らかでない極性物質（3 化合物）が認められ、これらは投与後 0～24 時では投与した放射能の合わせて約 18%を占めた。

糞抽出物中で主要代謝物として同定されたのは、*O*-脱ベンジル化サフィナミド NW-1199 の 1 つであり、投与した放射能の約 23%を占めた。

脳抽出物では、主要な放射性成分としてサフィナミドが認められ、1.5 時間後の時点で試料中の放射能のうち約 48%を占めていた。

ラットで想定される生体内推定代謝経路の概要を図 2.6.4-9 に示す。

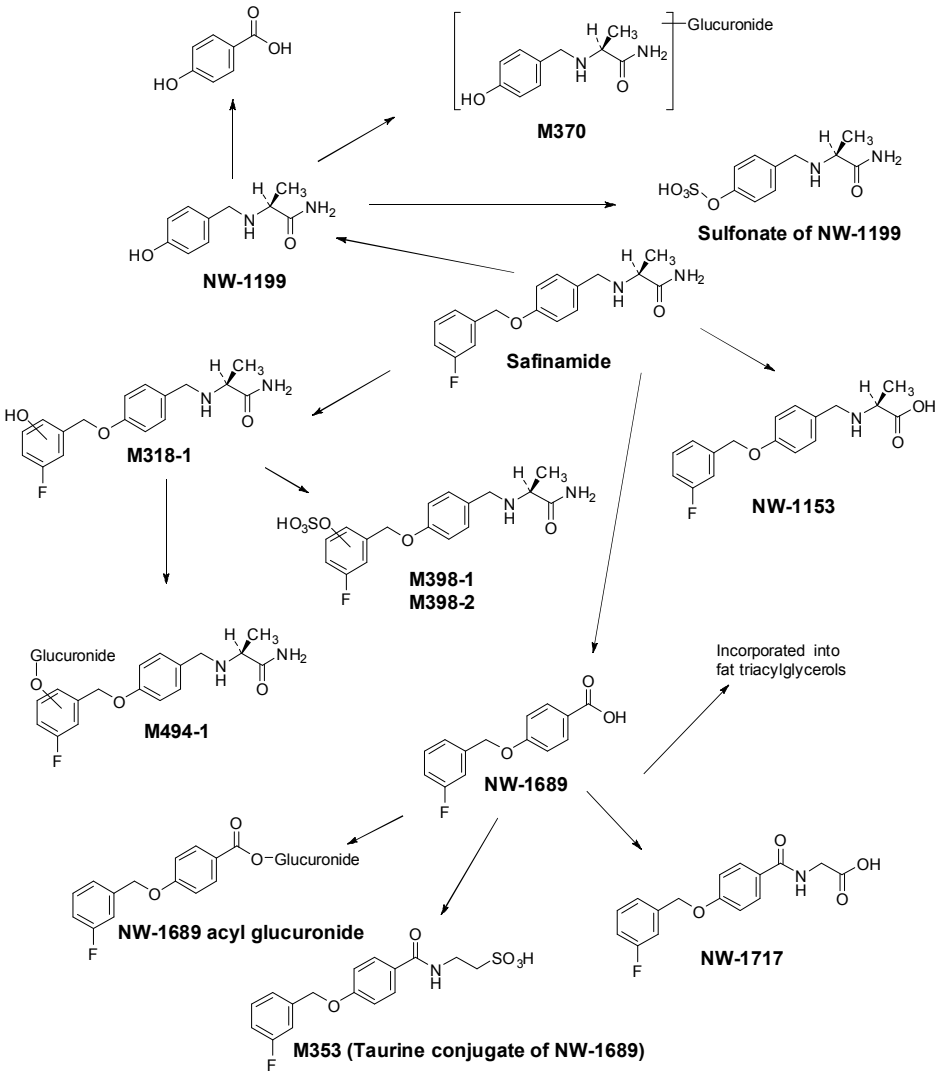


図 2.6.4-9 サフィナミドの推定代謝経路：ラット

2.6.4.5.13 イヌでの in vivo 代謝

【2.6.5.9.C】：4.2.2.4-16：DMPK-175-08（評価資料）

雌性ビーグル犬に ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 13.2 mg/kg で単回経口投与して代謝試験を実施した。イヌでの主要生体内推定代謝経路を図 2.6.4-10 に示す。

2.6.4.5.13.1 代謝物・推定代謝経路

4 つの主要代謝経路により合計で 14 の放射性代謝物が生成することが確認された。第一の経路では酸化的脱アミノ化を経て NW-1689 が生成した。この代謝物は、グルクロン酸と複数回抱合反応（M422 及び M422-2）や、モノヒドロキシル化（M262-1 及び M262-2）を受けた後にグルクロン酸抱合（M438-1）を受けた。第二の経路では、エーテル結合の開裂により *O*-脱ベンジル化サフィナミドの NW-1199（M194）が生成し、この代謝物は更にグルクロン酸抱合（M370）を受けた。第三の経路ではアミドの加水分解により NW-1153 が生成し、この代謝物は更に *O*-脱ベンジル化を受けて代謝物 M195 となった。第四の経路では、サフィナミドのモノヒドロキシ化（M318-1）が生じ、更にグルクロン酸抱合を経て M494-1、M494-4 及び M494-6 が生成した。

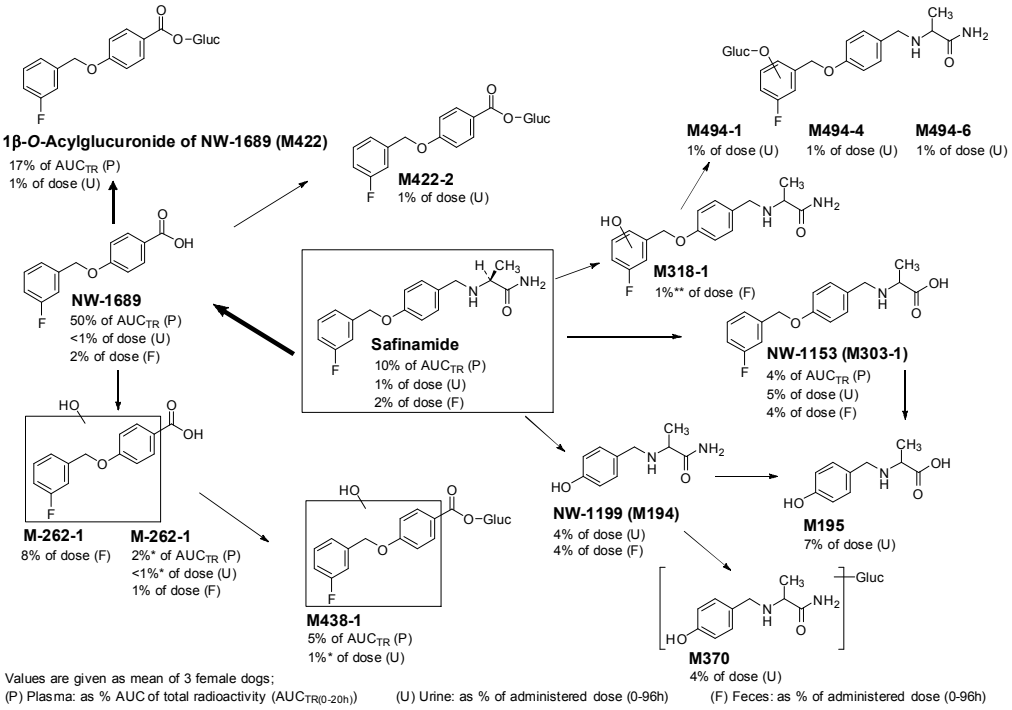


図 2.6.4-10 サフィナミドの推定代謝経路：イヌ

2.6.4.5.13.2 血漿中放射活性の薬物動態及び血漿中代謝物

経口投与4時間後に雌性イヌで総 ^{14}C-放射活性の平均血漿中濃度が 11 μg eq/mL の最高値に達した。24 時間後の血漿中濃度は最高血漿中濃度の約 35%にまで低下した。総 ^{14}C-放射活性の平均曝露量は 162 μg eq·h/mL であった。

投与 0～24 時間後において、サフィナミドの AUC は総 ^{14}C-放射活性の AUC（AUC_{TR}）の約 10%を占めた。血漿中での主要代謝物は NW-1689 及び NW-1689AG で、それぞれ $AUC_{TR(0\text{-}24h)}$の約 50%及び 17%を占めた。NW-1689 のモノ-ヒドロキシ体である M262-2 及びそのグルクロン酸抱合体 M438-1 も認められ、それぞれ $AUC_{TR(0\text{-}24h)}$の約 2%及び 5%に相当していた。NW-1153 は $AUC_{TR(0\text{-}24h)}$の約 4%を占めていた。

2.6.4.5.13.3 尿・糞中代謝物

経口投与 96 時間以内に投与放射能の 36%が尿中に排泄され、34%が糞に排泄された。これらの期間においてサフィナミドは投与量の僅か約 3%が排泄物中に認められた。このことから、サフィナミドは胃腸管で吸収された後、その大部分は代謝を受けた後、代謝物として排泄されると考えられた。尿中に主に認められた代謝物は M195 が投与量の約 7%を占め、他に、NW-1153（約 5%）、NW-1199 及びそのグルクロニド M370（それぞれ約 4%）が認められた。糞中の主要代謝物は NW-1689（投与量の約 2%）で、他にそのヒドロキシ化代謝物 M262-1（約 8%）、NW-1199（約 4%）及び NW-1153（約 4%）が認められた。

2.6.4.5.14 サルでの in vivo 代謝

2.6.4.5.14.1 単回投与によるマスバランス及び代謝試験

【2.6.5.3.E】【2.6.5.9.D】：4.2.2.4-01：DMPK-37-09（評価資料）

雌性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 13.2 mg/kg、単回経口投与するマスバランス及び代謝試験を実施した。サルでの主要生体内推定代謝経路を図 2.6.4-11 に示す。

2.6.4.5.14.2 血漿中放射活性（サフィナミド、NW-1689 及び NW-1689AG）の薬物動態

経口投与 7 時間後に雌性サルで総 ^{14}C-放射活性の平均血漿中濃度が 12.6 µg eq/mL の最高値に達した。24 時間後の血漿中濃度は最高血漿中濃度の 35%にまで低下した。総 ^{14}C-放射活性の平均曝露量は 263 µg eq·h/mL であった。血漿中でのサフィナミド、NW-1689 及び NW-1689AG の曝露量（$AUC_{0-\infty}$）はそれぞれ約 29、140 及び 3.4 µg eq·h /mL であった。よって、血漿中での主要代謝物は NW-1689 であり、モル換算でサフィナミドの約 6 倍の曝露量であった。また、NW-1689AG の曝露量はモル換算でサフィナミドの約 8%に相当した。

2.6.4.5.14.3 代謝物・代謝経路

4 つの主要代謝経路により合計で 12 の放射性代謝物が生成することが確認された。第一の経路では、酸化的脱アミノ化を経て主要代謝物 NW-1689 が生成した。この代謝物からは、グルクロン酸抱合により NW-1689AG が、グリシン及びタウリン抱合によりそれぞれ代謝物 M303-2 及び M353 が生じた。第二の経路では、エーテル結合の開裂により NW-1199 が生成し、更にグルクロン酸抱合により M370 が生成した。第三の経路ではアミド部分の加水分解酸化により NW-1153 が生成し、この代謝物は更に *O*-脱ベンジル化を受けて代謝物 M195 となった。第四の経路ではサフィナミドのモノヒドロキシ化の後に、グルクロン酸抱合（M494-1 及び-5）及び硫酸抱合（M398-1 及び-2）が続いた。

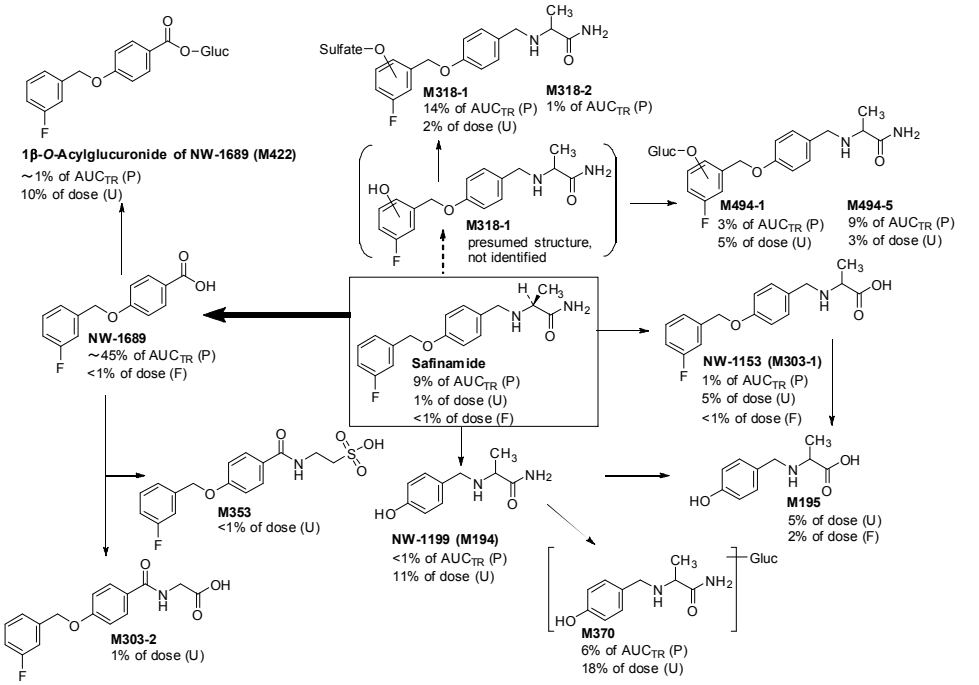


図 2.6.4-11 サフィナミドの推定代謝経路：サル

2.6.4.5.14.4 血漿中代謝物

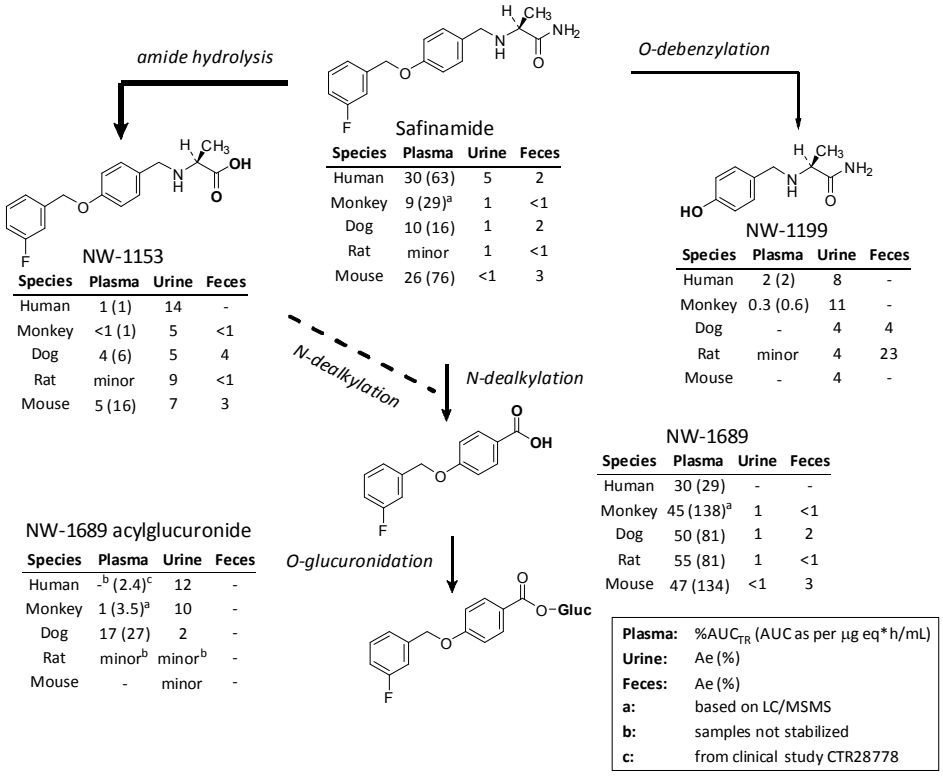
雌性カニクイザルの血漿では、サフィナミドが $AUC_{TR(0-24h)}$の約 9%を占めていた。NW-1689 は血漿中での主要代謝物として同定され、$AUC_{TR(0-24h)}$の約 46%に相当していた。NW-1689AG も認められたが量は少なかった（AUC_{TR} の約 1%）。他の血漿中代謝物としては、*O*-グルクロニドの M494-1（AUC_{TR} の 3%）及び M494-5（9%）、モノヒドロキシ硫酸の M398-1（14%）及び M398-2（1%）、並びに NW-1199 のグルクロニド抱合体の M370（6%）が認められた。NW-1199 自体及び NW-1153 はそれぞれ $AUC_{TR(0-24h)}$の 1%以下であった。

2.6.4.5.14.5 尿・糞中代謝物

経口投与 96 時間以内に投与放射能の 72%が尿中に排泄され、糞中には 4%が排泄された。この期間において、尿中の主要な放射性成分は NW-1199、そのグルクロニド M370 及び NW-1689AG で、それぞれ投与量の 11%、16%及び 10%に相当していた。他の尿中代謝物としては、NW-1153（投与量の 5%）、*O*-脱ベンジル化 NW-1153（M195、5%）、*O*-グルクロニドの M494-1（5%）及び M494-5（3%）、並びにヒドロキシ硫酸の M398-1（2%）が認められた。NW-1689 のタウリン抱合体（M353）及びグリシン抱合体（M303-2）も認められたが、少量でそれぞれ投与量の 1%以下に相当していた。

糞中の主要放射性成分は M195（NW-1153 の *O*-脱ベンジル化産物）で、投与量の約 2%を占めていた。サフィナミドは投与量の 1%以下であった。その他に微量の NW-1153 及び NW-1689 が認められ、それぞれ投与量の 0.5%未満であった。

サフィナミドの in vivo 主要代謝経路の種間比較を図 2.6.4-12 に示す。



Safinamide			
Species	Plasma	Urine	Feces
Human	30 (63)	5	2
Monkey	9 (29)[a]	1	<1
Dog	10 (16)	1	2
Rat	minor	1	<1
Mouse	26 (76)	<1	3

NW-1153			
Species	Plasma	Urine	Feces
Human	1 (1)	14	-
Monkey	<1 (1)	5	<1
Dog	4 (6)	5	4
Rat	minor	9	<1
Mouse	5 (16)	7	3

NW-1199			
Species	Plasma	Urine	Feces
Human	2 (2)	8	-
Monkey	0.3 (0.6)	11	-
Dog	-	4	4
Rat	minor	4	23
Mouse	-	4	-

NW-1689			
Species	Plasma	Urine	Feces
Human	30 (29)	-	-
Monkey	45 (138)[a]	1	<1
Dog	50 (81)	1	2
Rat	55 (81)	1	<1
Mouse	47 (134)	<1	3

NW-1689 acylglucuronide			
Species	Plasma	Urine	Feces
Human	-[b] (2.4)[c]	12	-
Monkey	1 (3.5)[a]	10	-
Dog	17 (27)	2	-
Rat	minor[b]	minor[b]	-
Mouse	-	minor	-

図 2.6.4-12 サフィナミドの in vivo 推定代謝経路の種間比較

2.6.4.6 排泄

^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を用いたマスバランス試験での放射能の回収率の種間比較を表 2.6.4-11 に示す。

表 2.6.4-11 ^{14}C-マスバランス試験での回収率の種間比較

種（試験番号）	投与量 a	回収期間（時間）	尿中排泄	糞便中排泄	ケージ洗浄液	合計	器官	14C の終末期半減期（t1/2）	サフィナミド半減期（t1/2）
マウス (DMPK-176-07)	100 mg/kg 経口	72 時間	雄 64.4% 雌 72.0%	雄 35.1% 雌 28.0%	雄 1.39% 雌 2.93%	雄 103% 雌 105%	1.7%（胴体）	nd	nd
ラット (847960)	1 mg/kg 静脈内	168 時間	雄 69.4% 雌 71.9%	雄 19.3% 雌 15.3%	雄 0.76% 雌 1.84%	雄 96.5 ± 3.8% 雌 96.3 ± 3.8%	7.2%（主に脂肪）	nd	nd
ラット (847960)	5 mg/kg 経口 7 回	240 時間（144 時間目に最終投与）	74.6%	30.9%	1.9%	94.9 ± 1.3%	5.5%（主に脂肪）	nd	nd
ラット (R09360)	10 mg/kg 経口	168 時間	雄 60.7% 雌 59.5%	雄 19.8% 雌 16.9%	雄 1.7% 雌 6.2%	雄 82.2 ± 5.1% 雌 82.6 ± 8.1%	12%（主に白色脂肪）	116 時間	1.3 時間
イヌ (DMPK-175-08)	13.2 mg/kg 経口	96 時間（n=3） 168 時間（n=1）	35.7% 37.1%	34.4% 41.3%	0.7% 0.1%	69.4 ± 5.0% 78.5%		77 時間	nd
サル (DMPK-37-09)	13.2 mg/kg 経口	120 時間	73.7%	4.9%	1.4%	80.0 ± 2.4%		42 時間	8.5 時間

a: サフィナイドメシル酸塩として
nd：測定せず

2.6.4.6.1 マウスに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験

【2.6.5.13.A】：4.2.2.4-02：DMPK-176-07（評価資料）

雌雄 ICR マウスに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 100 mg/kg の用量で単回経口投与し、尿及び糞を投与 72 時間後まで回収した（n=5～6）。

0～24 時間後までの間に投与量の約 90%が排泄され、残りは 72 時間後までに排泄された。尿中への排泄率は雄で投与量の 64.4%、雌で 72.0%であり、一方、糞便中への排泄率は雄で 35.1%、雌で 28.0%であった。投与 72 時間後に組織、器官及び胴体に残った放射能は雄で投与量の 1.8%、雌で 1.6%であった。組織、器官及び胴体とケージ洗浄液を合わせた総回収率は平均して雄で 103%、雌で 105%であった。

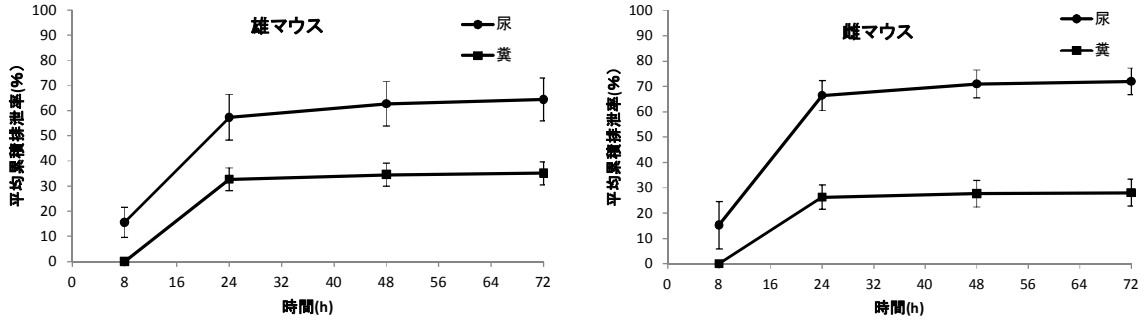


図 2.6.4-13 マウスに 100 mg/kg のサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与時の尿中及び糞中累積排泄率
（雄：各時点 n=6、平均値 ± 標準偏差、雌：各時点 n = 5、平均値 ± 標準偏差）

2.6.4.6.2 ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内投与及び反復経口投与した時のマスバランス試験

【2.6.5.13.B】：4.2.2.2-07：847960（評価資料）

雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 1 mg/kg で単回静脈内投与（n=4）若しくは雄性 SD ラットに 5 mg/kg で 7 日間反復経口投与（n=4）後に尿及び糞の放射能を測定した。

単回静脈内投与では投与 168 時間後まで尿及び糞を回収した。尿中への排泄率は雄では投与量の 69.4 ± 5.1%、雌では 71.9 ± 10.7%、糞便中への排泄率はそれぞれ 19.3 ± 2.1%及び 15.3 ± 6.1%であった。放射能の大部分は 0～24 時間後の間に排泄された。投与 168 時間後まで組織、器官及び胴体に残った放射能は平均して雄で 7.1 ± 1.8%、雌で 7.4 ± 0.8%であった。ケージ洗浄液を合わせた総回収率は平均して雄で 96.5 ± 3.8%、雌で 96.3 ± 3.8%であった。

7 日間反復経口投与後では最終投与後 0～96 時間までの最終投与量に対する排泄率（%）は、尿中では 74.6 ± 8.2%、糞便中では 30.9 ± 10.5%であった。ケージ洗浄液、組織、器官及び胴体を合わせた総回収率は 94.9 ± 1.3%であった。

2.6.4.6.3 ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験

【2.6.5.14.A】：4.2.2.3-04：R09360（評価資料）

雌雄 SD ラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 10 mg/kg 単回経口投与して、尿、糞便及び胆汁への放射能の排泄を定量した（各 n=3）。

尿及び糞便中への放射能の回収率は、投与 168 時間後までででそれぞれ雄で 60.7 ± 6.2%、雌で 59.5 ± 4.2%及び雄で 19.8 ± 10.4%、雌で 16.9 ± 4.8%であった（加えてケージ洗浄液は雄 1.7 ± 0.9%、雌 6.2 ± 1.6%）。

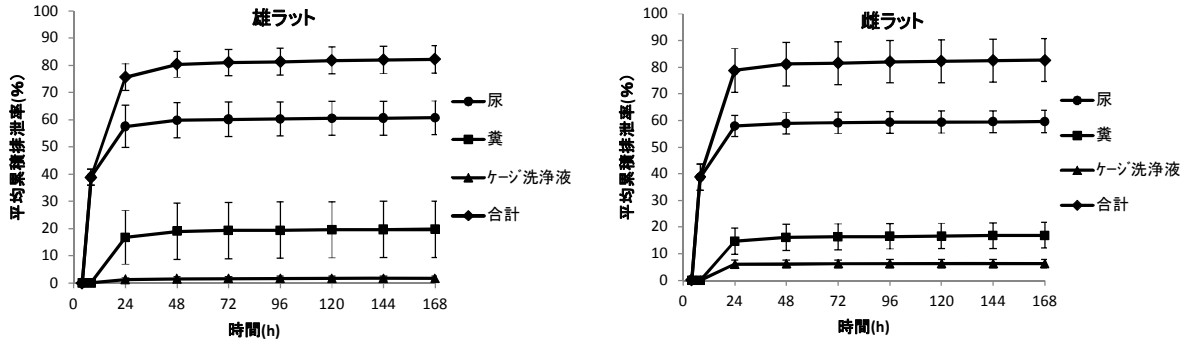


図 2.6.4-14 ラットに 10 mg/kg のサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与時の尿中及び糞中累積排泄率（各時点 n=3、平均値 ± 標準偏差）

別の群のラットを用いて胆汁中の放射能を測定したところ、投与 24 時間後までの間の回収率は雄で 11.5 ± 5.6%、雌で 12.1 ± 8.8%であった。

2.6.4.6.4 イヌに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験

【2.6.5.9.C】：4.2.2.4-16：DMPK-175-08（評価資料）

雌性ビーグル犬に ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 13.2 mg/kg の用量で単回経口投与し、排泄物中の放射能を測定した（n = 4）。

尿及び糞便中への放射能の排泄率は投与 96 時間後までで、それぞれ 35.7%及び 34.4%であった。さらに 1 個体では投与 168 時間後まで排泄物を回収したところ、尿及び糞便中にそれぞれ 37.1%及び 41.3%が回収された。投与後 96 時間までのケージ洗浄液を含む総回収率は投与量の 71.7%であった。

2.6.4.6.5 サルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与した時のマスバランス試験

【2.6.5.9.D】：4.2.2.4-01：DMPK-37-09（評価資料）

雌性カニクイザルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を 13.2 mg/kg の用量で単回経口投与し、マスバランス試験を実施した（n=3）。

尿中への排泄率は投与量の 73.7%で、一方、糞便への排泄率は 4.9%であった。ケージ洗浄液を含む放射能の総回収率は 80%であった。

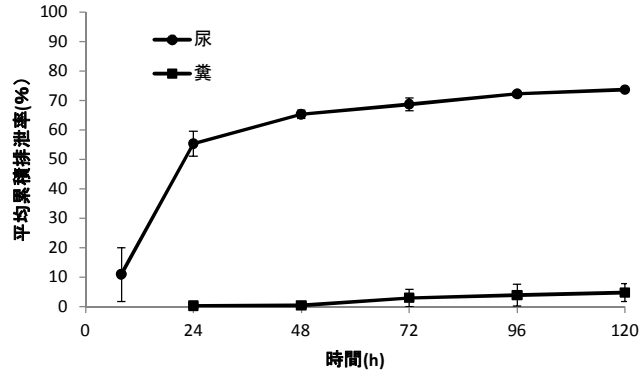


図 2.6.4-15 雌性サルにサフィナミドメシル酸塩を単回経口投与時の尿中及び糞中累積排泄率（各時点 n=3、平均値 ± 標準偏差）

2.6.4.6.6 胆汁排泄

2.6.4.6.3 に記載

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1 CYP 阻害

2.6.4.7.1.1 ヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミドによる CYP 直接阻害

【2.6.5.15.A】：4.2.2.6-01：IPAS-MET-99-04（評価資料）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYPlA2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 に対するサフィナミドの直接阻害作用の試験を実施した。

CYP1A2 はサフィナミドによって阻害され、IC_{50} 値は 47.7 μM であった。その一方で、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 に対する IC_{50} 値は>100 μM であった。

2.6.4.7.1.2 ヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 による CYP 直接阻害

【2.6.5.15.A】：4.2.2.6-02：NWR-17（評価資料）

ヒト肝ミクロソームを用いて、サフィナミドの CYP2C8 活性に対する直接阻害作用、及び主要代謝物の NW-1153 及び NW-1689 の CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 活性に対する直接阻害作用について検討した。

サフィナミドの CYP2C8 に対する IC_{50} 値は>100 μM であった。

また、NW-1153 及び NW-1689 については、試験した 7 つの CYP 分子種に対する IC_{50} 値は>100 μM であった。

ヒトにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 100 mg、1 日 1 回、7 日間反復経口投与したときの定常状態におけるサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の血漿中非結合型濃度の C_{max} は、それぞれ 0.66 μM、0.15 μM 及び 0.001 μM であることから（2.6.4.7.1）、これらの in vivo 肝細胞中最高濃度を、それぞれ 33 μM、7.5 μM 及び 0.05 μM と仮定（血漿中非結合型濃度の C_{max} の 50 倍）した。これらの肝細胞中濃度と IC_{50} 値から、臨床において、サフィナミドは CYP1A2 を直接阻害する可能性があるが、その他の分子種を阻害する可能性は低いと考えられた（2.6.4.7.1）。また、NW-1153 及び NW-1689 は、試験した全ての CYP 分子種を阻害する可能性は低いと考えられた。

2.6.4.7.1.3 ヒト肝ミクロソームにおけるサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の CYP 阻害評価

【2.6.5.15.B】：4.2.2.6-03：XT075070（DMPK-121-07）（評価資料）

ヒト肝ミクロソームを用いてサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の CYP 分子種（CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4/5）に対する直接阻害及び TDI を評価した。直接阻害については、各 CYP の典型基質及び試験化合物をヒト肝ミクロソーム中でインキュベートして、試験化合物の各 CYP に対する阻害を評価した。TDI については、ヒト肝ミクロソームと試験化合物を 30 分間プレインキュベートした後に各 CYP の典型基質を加え、更に 5 分間インキュベートした。プレインキュベートせずにヒト肝ミクロソームに CYP 典型基質を加えた場合と比較することで TDI を評価した。（TDI のパラメータについては、2.6.4.7.1.4 において評価を行った）

CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 及び CYP2D6 に対するサフィナミドの直接阻害及び TDI が確認された。直接阻害については、サフィナミド 100 μM において、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 及び CYP2D6 に対する阻害率がそれぞれ 50%、20%、33%及び 33%であったことから、これらの CYP に対する IC_{50} 値は>100 μM と判断された。また、CYP1A2 に対するサフィナミドの Ki 値は 54 μM であった。一方、その他の分子種（CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2E1 及び CYP3A4/5）については、サフィナミドは 100 μM の濃度まで直接阻害又は TDI を殆ど示さなかった。

NW-1153 及び NW-1689 については、試験したいずれの CYP 分子種に対しても直接阻害は認められなかった。一方、NW-1153 は CYP1A2 及び CYP2B6 に対して TDI を示したが、NW-1689 は示さなかった。

2.6.4.7.1.4 サフィナミドの CYP 阻害のメカニズムの解明

【2.6.5.15.C】：4.2.2.6-04：XT085009（DMPK-10-08）（評価資料）

サフィナミドの CYP に対する TDI に関して、阻害形式及び速度論的パラメータを求めるための試験を行った。サフィナミド（10 及び 100 μM）とヒト肝ミクロソームを NADPH 生成系存在下又は非存在下でプレインキュベーションした。プレインキュベーション後に希釈した後、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 及び CYP2D6 の典型基質とインキュベーションしたところ、NADPH に依存的な阻害が認められたことから、サフィナミドはこれらの酵素に対し TDI を有することが示唆された。また、CYP1A2 及び CYP2B6 については、希釈の影響を受けなかったことから、サフィナミドのこれらの分子種に対する阻害形式は不可逆的又は準不可逆的と考えられた。一方、サフィナミドの CYP2C19 及び CYP2D6 に対する TDI は希釈により抑制されたことから、サフィナミドのこれらの分子種に対する阻害形式は可逆的である可能性が示された。

サフィナミドの CYP1A2 に対する時間依存的な不活性化は酵素活性消失の一次式に従い、K_I 及び K_{inact} 値はそれぞれ 33.5 μM 及び 0.075 min^{-1} であった。陽性対照であるフラフィリンの K_I 及び K_{inact} 値（それぞれ 3.0 μM 及び 0.18 min^{-1}）と比べると、サフィナミドは CYP1A2 に対してそれほど強力な代謝依存的阻害剤でないと考えられた。また、CYP2B6 活性においては、サフィナミド濃度を上昇させても、プレインキュベーション時間を延ばしても阻害は認められなかったため、K_I 及び K_{inact} 値の算出は不可能であった。このことから、サフィナミドは CYP2B6 に対しても、それほど強力な代謝依存的阻害でないと考えられた。

2.6.4.7.1.5 NW-1689AG の CYP2C8 に対する阻害

【2.6.5.15.D】：4.2.2.6-05：XT105058 (DMPK-89-10)（評価資料）

ゲムフィブロジルアシルグルクロニドは CYP2C8 の活性部位に結合することにより代謝阻害するとの報告がある[1]ことから、NW-1689 のアシルグルクロニド（NW-1689AG）が CYP2C8 に対する阻害作用を有するか検討した。CYP2C8 の典型基質アモジアキンを、NW-1689AG 存在下、ヒト肝ミクロソーム中でインキュベーションすることにより直接阻害を検討した。また、TDI については、ヒト肝ミクロソームを NW-1689AG と NADPH 存在下又は非存在下で 30 分間プレインキュベーションした後に、そのミクロソームにおけるアモジアキンの *N*-脱アルキル化反応を測定することで評価を行った。

ヒト肝ミクロソームの CYP2C8 活性は NW-1689AG により直接的に阻害され、30 μM の NW-1689AG 存在下での阻害率は 22%であった。したがって、IC_{50} 値は>30 μM であった。また、TDI については、30 μM の NW-1689AG 存在下において 29%の阻害作用が認められたが、NADPH 依存性は認められなかった。したがって、NW-1689AG は代謝依存的な阻害作用を有さないと考えられた。

2.6.4.7.2 その他の酵素の阻害

2.6.4.7.2.1 サフィナミド及び代謝物の ALDH に対する阻害

【2.6.5.10.H】：4.2.2.4-11；DMPK-125-07（評価資料）

サフィナミド及びその 6 つの代謝物（Met X、Met A、NW-1689、NW-1689AG、NW-1153、NW-1199）について、組み換えヒト ALDH（1A1、1B1、2、3A1、7A1）及びヒト肝細胞癌由来 HuH7 細胞株の ALDH 活性に対する阻害作用をスクリーニングした。

代謝物 NW-1689AG がヒト ALDH1A1 に対する阻害剤として特定され、プロピオンアルデヒド（100 μM）をアルデヒド基質として用いた場合の IC_{50} 値は 35 μM であった。この阻害は部分的不競合モデルに最もよく当てはまり（R^2=0.95）、見かけの K_i 値は 4.12 μM であった。

代謝物 NW-1689AG は ALDH1B1 に対する阻害剤であったが、アセトアルデヒドを基質として用いた場合に IC_{50} 値が 200 μM を上回った。

2.6.4.7.2.2 サフィナミド及び主要代謝物の薬物代謝酵素に対する in vitro 阻害作用

サフィナミド及びその主要代謝物の薬物代謝酵素に対する in vitro 阻害作用について表 2.6.4-12 にまとめた。

表 2.6.4-12 サフィナミド及びその主要代謝物：薬物代謝酵素に対する in vitro 阻害作用

酵素	サフィナミド		NW-1153		NW-1689		NW-1689AG	
	直接	TDI	直接	TDI	直接	TDI	直接	TDI
CYP1A2	K_i = 54 μM	K_I = 33.5 μM K_{inact} = 0.075 s^{-1} NADPH 依存的、準又は不可逆的	無	IC_{50} >100 μM NADPH 依存的、部分的可逆的	無	無	-	-
CYP2A6	無	無	無	無	無	無	-	-
CYP2B6	無	IC_{50} = 57 μM NADPH 依存的、準又は不可逆的、速度論的には解析不可能	無	IC_{50} = 47 μM NADPH 依存的、可逆的	無	無	-	-
CYP2C8	無	無	無	無	無	無	無	無
CYP2C9	無	無	無	無	無	無	-	-
CYP2C19	無	IC_{50} = 63 μM NADPH 依存的、可逆的	無	無	無	無	-	-
CYP2D6	無	IC_{50} > 100 μM NADPH 依存的、可逆的	無	無	無	無	-	-
CYP2E1	無	無	無	無	無	無	-	-
CYP3A4/5[a]	無	無	無	無	無	無	-	-
MAO-A	-	-	無	無	無	無	-	-
レボドパ脱炭酸酵素	無	-	無	-	無	-	-	-
ALDH1A1							K_i = 4.1 μM	
ALDH1B1					IC_{50} > 200 μM		IC_{50} > 200 μM	

無：検討した最高濃度でも阻害は≤50%

-：検討せず

a：テストステロン、ミダゾラム及びニフェジピンを用いて検討

2.6.4.7.3 酵素誘導

2.6.4.7.3.1 サフィナミドによる第 I 相及び第 II 相肝酵素活性の誘導

【2.6.5.15.E】：4.2.2.6-06：9650281（評価資料）

雌雄 SD ラット又は雄性モルモットにサフィナミドメシル酸塩を 120 mg/kg/日で 4 日間連続経口投与した際の第 I 相酵素活性（レゾルフィンエーテルの *O*-脱アルキル化、エポキシド加水分解及び β-酸化）及び第 II 相酵素活性（グルクロン酸抱合及びグルタチオン抱合）の誘導を評価した。

その結果、7-エトキシレゾルフィン及び 7-ペントキシレゾルフィンの脱アルキル化活性がそれぞれ 1.6 倍及び 1.7 倍増加した。また、雌性ラットでミトコンドリアの β-酸化活性が 2.3 倍増加した。一方で、1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンを基質として測定したグルタチオン *S*-転移酵素活性が対照群の雄で 74%にまで僅かに減少した。

2.6.4.7.3.2 サフィナミドによるテストステロンのヒドロキシル化に対する影響

【2.6.5.15.F】：4.2.2.6-07：FCE-26743-801i（評価資料）

テストステロンの部位及び立体選択的ヒドロキシル化に対するサフィナミドの影響についてラット肝を用いて検討した。雄性 SD ラットにサフィナミドメシル酸塩を 120 mg/kg/日で 4 日間連続して経口投与し、採取した肝ミクロソームでのテストステロンのヒドロキシル化に対するサフィナミドの影響を測定した。

その結果、いずれのラットにもサフィナミドメシル酸塩投与による重大な影響は認められなかった。同様に、いずれのテストステロン水酸化物（2α-、2β-、6α-、6β-、7α-、15β-、16α-及び 16β-ヒドロキシテストステロン）についても、その産生に対してサフィナミドは重大な影響を及ぼさなかった。

2.6.4.7.3.3 サフィナミドによるラット肝 CYP に対する影響

【2.6.5.15.G】：4.2.2.6-08：METPK-208-96（評価資料）

In vivo におけるラット肝 CYP に対するサフィナミドの影響について検討した。雌雄ラットにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 0（媒体）、20、60、及び 100 mg/kg/日で 4 週間経口投与した。また、500 mg/kg/日で雄性ラットには 11 日間、雌性ラットには 10 日間投与した。その後、採取した肝ミクロソーム中の CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C12、CYP2E1、CYP3A1、CYP3A2 及び CYP4A の含量をウェスタンブロッティングにより評価した。

その結果、総 CYP 含量はいずれの投与量でも変化しなかった。また、CYP1A2 及び CYP3A2 蛋白質含量は低用量から投与量依存的に増加した。一方で、CYP1A1、CYP2B1/2、CYP2C12、CYP2E1、CYP3A1 及び CYP4A に対しては、最高用量投与群のみで増加が認められた。

サフィナミドに対する CYP1A の影響をエトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化（ethoxyresorufin *O*-deethylase; EROD）アッセイを用いて更に検討した。その結果、20 mg/kg/日で投与した動物のミクロソームでの EROD 活性は殆ど不変であった。また、デキサメタゾン又はプレグネノロン l6α-カルボニトリルを投与したラットから得た陽性対照ミクロソームと比較して、CYP3A2 の誘導レベルはいずれの投与量でも低かった。

2.6.4.7.3.4 サフィナミドによるヒト CYP3A4 の誘導

【2.6.5.15.H】：4.2.2.6-09：030242（参考資料）

CYP3A4 遺伝子含有ベクター又はコントロールベクターをトランスフェクションした HepG2 細胞に、1、10 又は 50 μM の濃度でサフィナミドを 48 時間曝露した際の CYP3A4 遺伝子発現を評価した。

その結果、サフィナミドは 50 μM において CYP3A4 を誘導したが、その最大誘導量は媒体のみで処理した対照群と比較して 1.7 倍で、かつ陽性対照のリファンピシンの 10 μM での反応の 34%であった。

2.6.4.7.3.5 ヒト肝細胞を用いたサフィナミドの CYP 誘導能の検討

【2.6.5.15.I】：4.2.2.6-10：DMPK-122-07(MSO1)（評価資料）

サフィナミドの誘導作用についてヒト肝細胞を用いて検討した。3～6 名のドナーから得た初代培養ヒト肝細胞を 3、30 及び 100 μM のサフィナミドで 72 時間処理した。単層の肝細胞又は細胞ホモジネートから調製したミクロソーム中の CYP1A2、CYP2C9 及び CYP3A4/5 活性を直接測定して誘導を評価した。加えて、CYP1A2 誘導については、細胞ミクロソーム中のアポ蛋白質及び mRNA 発現を測定した。

サフィナミドは、ドナー6 名からの肝細胞の CYP1A2 活性を媒体対照と比べて 1.3～5 倍に増加させた。しかし、その作用は陽性対照のオメプラゾール 50 μM での作用の 13%以下であった。同様に、ミクロソーム CYP1A2 での mRNA の発現が濃度依存的に僅かに増加したが、サフィナミド 30 μM でプラトーになった。すなわち、サフィナミドによる CYP1A2 mRNA 発現の増加は、3 μM で媒体対照と比べて 1.2、2.0、2.3 倍、30 μM で 2.8、4.9、4.0 倍、100 μM で 1.4、4.7、0.9 倍であった。しかし、この増加は、オメプラゾールによる CYP1A2 mRNA 発現の増加（132～266 倍）と比べて小さかった。

試験に組み入れたドナー3 名の培養ヒト肝細胞における、サフィナミドによる CYP2C9 活性の増加は、3 μM で媒体対照と比べて 0.8、1.2、1.1 倍、30 μM で 0.9、1.4、1.3 倍、100 μM で 0.8、0.9、1.3 倍であり、いずれも 2 倍未満であった。

培養ヒト肝細胞の CYP3A4/5 活性は、ドナー6 名中 4 名の細胞でサフィナミドの濃度依存的に増加した。3 μM のサフィナミドでは、ドナー6 名からの肝細胞において CYP3A4/5 活性が媒体対照と比べて増加したのは最大で 1.3 倍、陽性対照であるリファンピシン 10 μM の増加に対して最大で 4.8%にすぎなかった。30 及び 100 μM のサフィナミドでは、ドナー6 名中 4 名の肝細胞において CYP3A4/5 活性がそれぞれ 1.7～2.5 倍及び 2.8～5.9 倍増加したが、陽性対照での増加のそれぞれ 8.6～53%及び 22～84%であった。残りのドナー2 名からの肝細胞のうち、1 名の 1 濃度（30 μM）でのみ CYP3A4/5 活性が陽性対照の 2 倍以上に増加した。全体として、CYP3A4/5 活性は、3 μM のサフィナミドでは媒体対照と比べて 2 倍未満しか増加せず、30 及び 100 μM でのみ 2 倍以上に増加し、その反応は 30 μM で 1 名、100 μM で 4 名の肝細胞で陽性対照の 20%を上回った。

2.6.4.7.3.6 ヒト肝細胞を用いたサフィナミドの CYP2B6 誘導能の検討

【2.6.5.15.J】：4.2.2.6-11；DMPK-42-09(MS-042009-01)（評価資料）

サフィナミド（3、30、100 μM）の CYP2B6 活性及び mRNA 発現に対する影響についてヒト肝細胞を用いて検討した。ドナー4 名中 3 名で、CYP2B6 活性に対する影響は検討した最低濃度（3 μM）で最大（2.2 倍）となり、3 名の 1 濃度以上で増加の程度が陽性対照であるフェノバルビタール 1000 μM での増加の 20%を上回った。1 名では、検討した最高濃度（100 μM）まで濃度依存的に増加した。

CYP2B6 mRNA 発現を検討したドナー3 名における、サフィナミドによる mRNA の媒体対照群に対する増加倍数は、3 μM のサフィナミドで 1.5 倍、1.0 倍及び 1.3 倍、30 μM のサフィナミドで 1.2 倍、2.5 倍及び 5.0 倍（3 名中 2 名で 2 倍を上回った）、及び 100 μM のサフィナミドで 2.5 倍であった（100 μM のサフィナミドでは、細胞毒性により、2 名でデータが取れなかった）（1 名中 1 名で 2 倍を上回った）。各ドナーでの CYP2B6 mRNA 発現の最大誘導量は、陽性対照のそれぞれ 27%（3 μM）、60%（30 及び 100 μM）及び 35%（30 μM）であった。

2.6.4.7.3.7 ヒト肝細胞を用いたサフィナミドの CYP1A2、CYP2B6、UGT1A1 及び SULT2A1 誘導能の検討

【2.6.5.15.K】：4.2.2.6-12；DMPK-31-10(MS-032010-02)（参考資料）

サフィナミドの CYP1A2、CYP2B6、UGT1A1 及びスルホ基転移酵素（sulfotransferase 2A1; SULT2A1）に対する影響を、ヒト肝細胞初代培養を用いて検討した。ドナー2 名からの肝細胞を 8 水準の濃度（1～80 μM）のサフィナミドで毎日処理し、その後細胞ミクロソーム及びサイトゾルを調製して、ミクロソーム（CYP1A2、CYP2B6 及び UGT1A1）及びサイトゾル（SULT2A1）の酵素活性を測定した。肝細胞に対しても CYP1A2、CYP2B6、UGT1A1 及び SULT2A1 mRNA レベルについて評価した。

CYP1A2 活性はサフィナミド濃度に依存して増加し、15～80 μM のサフィナミドの存在下で媒体対照の 2～4 倍であった。しかし、この活性の増加量は陽性対照の誘導剤である 100 μM のオメプラゾールと比べると 40% 以下であった。一方、CYP1A2 mRNA 発現も 1～80 μM のサフィナミドにより媒体対照の 2～40 倍に増加したが、ドナー2 名での最大誘導量は 30 μM 及び 45 μM で、それぞれ陽性対照の 10%及び 9%であった。

CYP2B6 活性もサフィナミドにより増加し、30～60 μM のサフィナミドの存在下で媒体対照の 2～4 倍（2 名中 1 名）、及び 80 μM で媒体対照の 3～5 倍（2 名中 2 名）であった。一方、CYP2B6 mRNA 発現もサフィナミドにより上昇し、15～80 μM で媒体対照の 2～5 倍（2 名中 2 名）であったが、いずれの場合も陽性対照の 31% 以下であった。この 2 名のドナーの CYP2B6 mRNA の Fold induction の平均値を、E_0 を含む E_{max} モデルを用いて解析して求めた CYP2B6 の誘導パラメータは、EC_{50} が 71.35 μM、E_{max} が 4.92 であった。

UGT1A1 活性はサフィナミドによって増加したが臨床的な意義はないと考えられた。

SULT2A1 活性については、サフィナミドに対する肝細胞の反応は媒体対照活性の 1.8 倍を超えることはなかった。ドナー1 例で SULT2A1 mRNA 発現が約 2 倍増加したが、濃度依存性はなかった。

サフィナミド及びその主要代謝物による薬物代謝酵素の in vitro 誘導について表 2.6.4-13 にまとめた。

表 2.6.4-13 サフィナミド： In vitro における薬物代謝酵素の誘導

酵素 (NR[a])	測定値	PC[b] 倍	3 μM サフィナミド 倍	3 μM サフィナミド % PC	30 μM サフィナミド 倍	30 μM サフィナミド % PC	100 μM サフィナミド 倍	100 μM サフィナミド % PC	E_{max} % PC	EC_{50} μM
CYP 酵素										
CYP1A2 (AhR)	酵素活性	35 / 80 / 170 48 / 14 / 21	4.0 / 4.5 / 2.8 1.6 / 1.5 / 1.3	8.8 / 4.5 / 1.0 1.3 / 3.7 / 1.6	2.3 / 3.7 / 5.0 2.0 / 2.6 / 1.6	3.8 / 3.4 / 2.4 2.0 / 13 / 3.1	0.5 / 1.7 / 2.9 2.1 / 2.6 / 2.8	-1.4 / 0.8 / 1.1 2.3 / 13 / 8.7	18 / 28[c]	15 / 24[c]
	mRNA	132 / 143 / 266	1.2 / 2.0 / 2.3	0.2 / 0.7 / 0.5	2.8 / 4.9 / 4.0	1.4 / 2.7 / 1.1	1.4 / 4.7 / 0.9	0.5 / 1.1 / 0.0	nc	nc
CYP2B6 (CAR)	酵素活性	3.2 / 3.0 3.1 / 3.4	2.2 / 1.2 1.7 / 1.3	53 / 9 33 / 13	1.7 / 0.9 1.2 / 1.6	30 / -3 9 / 24	nc / nc 0.7 / 1.9	nc / nc -14 / 37	156 / 98[c]	58 / 66[c]
	mRNA	2.8 / 3.6 nd / 13	1.5 / 1 nd / 1.3	27 / 0 nd / 3	1.2 / 2.5 nd / 5	12 / 60 nd / 35	nc / 2.5 nd / nc	nc / 60 nd / nc	4.92[d]	71.35[d]
CYP2C9 (PXR)	酵素活性	2.0 / 2.5 / 1.8	0.8 / 1.2 / 1.1	-22 / 12 / 13	0.9 / 1.4 / 1.3	-8 / 24 / 35	0.8 / 0.9 / 1.3	-22 / -7.1 / 35	-	-
CYP3A4/5 (PXR)	酵素活性	19 / 15 / 3.2 12 / 5.5 / 15	1.2 / 1.0 / 1.1 1.2 / 0.9 / 1.3	1.0 / -0.3/4.8 1.8 / -1.8/2.2	2.2 / 0.4 / 2.1 2.0 / 1.7 / 2.5	6.5 / -4.7 /53 8.6 / 17 / 11	0.9 / 0.2 / 2.8 3.4 / 2.9 / 5.9	-0.4 / -6.1/84 22 / 44 / 35	-	-
第 II 相酵素										
		PC [b]	4 μM サフィナミド		30 μM サフィナミド		80 μM サフィナミド		E_{max}	EC_{50}
	測定値	倍	倍	% PC	倍	% PC	倍	% PC	% PC	μM
UGT1A1 (AhR/CAR)	酵素活性	1.1 / 1.3	1.1 / 1.0	nc/ nc	0.9 / 0.7	nc / nc	0.9 / 0.9	nc / nc	nc	nc
	mRNA	3.0 / 3.5	1.3 / 1.1	13 / 5	1.9 / 1.3	37 / 11	1.1 / 2.4	2 / 54	nc	nc
SULT2A1 (AhR)	酵素活性	1.4 / 1.4	1.5 / 1.4	nc / nc	1.7 / 1.5	nc / nc	1.8 / 0.9	nc / nc	nc	nc
	mRNA	5.0 / 1.2	2.4 / 1.0	34 / nc	2.4 / 1.4	32/ nc	1.0 / 1.2	nc / nc	nc	nc

-：検討せず　　倍：媒体対照での誘導量に対する倍率　　PC：陽性対照　　NR：核内受容体　　nc：算出せず　　nd：測定せず

a：Faucette ら［2)］による

b：PC として、CYP1A2 にはオメプラゾール（25 又は 50 μM）、CYP2B6、UGT 及び SULT にはフェノバルビタール（1000 μM）並びに CYP3A4/5 にはリファンピシン（10 μM）を用いた。

c：4.2.2.6-12 の CYP1A2 または CYP2B6 の酵素活性の%PC（各ドナーの個別値）を基に算出

d：4.2.2.6-12 の CYP2B6 の mRNA の Fold induction（ドナー2 名の平均値）を基に算出

2.6.4.7.4 各種トランスポーターに対する基質となる可能性の検討

2.6.4.7.4.1 サフィナミドの Caco-2 培養細胞での膜透過性及び能動輸送

【2.6.5.15.L】：4.2.2.6-13：DIXG1000（評価資料）

サフィナミドの膜透過性を検討する試験を、頂端膜側から基底膜側の方向（A to B）と、その逆（B to A）の両方向について Caco-2 細胞単層を用いて 2 つの濃度条件（10 及び 2500 μM）で実施した。見かけの透過係数（P_{app}）を、膜透過性が低い化合物、膜透過性が高い化合物及び排出輸送能の高い化合物の 3 つの基準化合物（マンニトール、プロプラノロール、ジゴキシン）と比較した。

膜透過性が高い基準化合物であるプロプラノロールでは、P_{app}^{A-B}=24.3 ± 2.8×10^{-6} cm/s であった。また、P-糖蛋白質（P-glycoprotein; P-gp）の陽性対照のジゴキシンで、P_{app}^{B-A}/P_{app}^{A-B} 比が 17.8 であり、本 Caco-2 細胞に P-gp が発現していることが確かめられた。

サフィナミドの膜透過性は高く、P_{app} の平均値（n=3）は、10 μM では頂端膜側から基底膜側（P_{app}^{A-B}）の方向については 22.9 ± 1.0×10^{-6} cm/s、基底膜側から頂端膜側（P_{app}^{B-A}）の方向については 25.7 ± 1.7×10^{-6} cm/s であり、P_{app}^{B-A}/P_{app}^{A-B} 比は 1.12 であった。また、高い濃度（2500 μM）では、P_{app}^{A-B} が 21.3 ± 5.7、P_{app}^{B-A} が 19.7 ± 0.8×10^{-6} cm/s であり、P_{app}^{B-A}/P_{app}^{A-B} 比は 0.928 であった。

検討した濃度範囲にわたり、膜輸送の偏りは認められず、サフィナミドの透過性は能動輸送メカニズムの阻害（2-デオキシグルコースと併用したアジ化ナトリウム）の影響を受けなかったことから、サフィナミドは P-gp の基質ではないと考えられた。

2.6.4.7.4.2 サフィナミドが BCRP に対する基質となる可能性の検討

【2.6.5.15.M】：4.2.2.6-14：HLS-16-02Apr2014（評価資料）

MDCK2-BCRP 細胞を用いてサフィナミド（0.5、5、13.2、50、132 及び 1320 μM）が乳癌耐性蛋白質（Breast cancer resistance protein; BCRP）の基質となるか評価した。

その結果、全体としての排出比（net ER = ER_{BCRP} - ER_{MDCKII}）はいずれの濃度（それぞれ 0.23、0.42、0.30、0.10、0.00 及び-0.06）においても 2 未満であった。これらのデータからサフィナミドは BCRP の基質ではないことが示された。

2.6.4.7.4.3 サフィナミドが OATP1B1、OATP1B3 、OATP1A2 及び OATP2B1 に対する基質となる可能性の検討

【2.6.5.15.M】4.2.2.6-14：HLS-16-02Apr2014（評価資料）

サフィナミドが肝取り込みトランスポーターである有機アニオン輸送ポリペプチド（Organic anion transporting polypeptide：OATP）1B1 及び OATP1B3 の基質となるかを、0.5、5、60 及び 600 μM のサフィナミド濃度で検討した。また、血液脳関門での取り込みトランスポーターである OATP1A2 及び OATP2B1 についても、サフィナミドが基質となる可能性があるかを、0.05～50 μM の濃度で検討した。

検討した濃度では高い取り込みは認められなかった（細胞への取り込みはほぼ 2 倍未満）ことから、サフィナミドは有機アニオントランスポーターである OATP1B1、OATP1B3、OATP1A2 及び OATP2B1、の基質とならないと考えられた。

2.6.4.7.4.4 NW-1153 が OAT1、OAT3 及び OCT2 に対する基質となる可能性の検討

【2.6.5.15.M】：4.2.2.6-14：HLS-16-02Apr2014（評価資料）

腎臓でのトランスポーターの有機アニオントランスポーター（Organic anion transporter: OAT）1、OAT3 及び有機カチオントランスポーター（Organic cation transporter: OCT）2 それぞれについて NW-1153 が基質となる可能性があるかを、0.05、0.1、0.5 及び 5 μM の濃度で検討した。

OAT1 及び OCT2 を発現している CHO-K1 細胞での NW-1153 の高い取り込みは 2 及び 20 分後のいずれの時点でも検討した濃度では認められず（取り込みは 2 倍未満）、NW-1153 は OAT1 及び OCT2 のいずれの基質にもならないことが示された。

しかし、OAT3 については検討したいずれの条件でも 2 倍を超える取り込みが認められ、最も高い NW-1153 の取り込み（4.84 倍）が認められたのは 5 μM での 2 分後であった。その相互作用のトランスポーター特異性を確認するため、トランスポーターの特異的阻害剤（プロベネシド）の非存在下と存在下でアッセイを繰り返した。その結果、プロベネシド非存在下の取り込み（3.78 倍）に対して存在下では、NW-1153 の取り込みを 0.98 倍にまで低下させたため、NW-1153 は OAT3 の基質であることが確認された。

2.6.4.7.4.5 肝細胞への取り込み

【2.6.5.15.N】：4.2.2.6-15：DMPK-15-10（評価資料）

凍結ヒト肝細胞を用いて、^{14}C-サフィナミドの肝細胞取り込みに関する検討を行った。

肝細胞に 7.3 μM の ^{14}C-サフィナミドを添加し 37°C でインキュベートした結果、約 40 倍（29～62 倍）の非常に速やかな取り込みが認められ、この取り込みは実験中を通じて一定のレベルであった。さらに塩化アンモニウム（酸性化阻害剤、弱塩基性試薬）を添加した実験では取り込みが阻害され、サフィナミドの pK_a が 7.4 であることから、リソソーム（pH 5.5 以下）による捕捉がこの取り込みのメカニズムとして示唆された。

2.6.4.7.5 薬物トランスポーターに対する阻害

サフィナミド及びその主要代謝物の薬物トランスポーターに対する in vitro 阻害作用について表 2.6.4-14 にまとめた。

表 2.6.4-14 サフィナミド及びその主要代謝物 : 薬物トランスポーターに対する in vitro 阻害作用

トランスポーター	発現部位	サフィナミド	NW-1153	NW-1689	NW-1689AG
P-gp	腎臓 肝臓 消化管	無	無	無	無
BCRP	肝臓 消化管	IC_{50}=43 ± 23 μM	無	IC_{50}=3.7 ± 0.5 μM	無
BSEP	肝臓	無	無	弱い	無
OATP1B1 OATP1B3	肝臓	無 無	無 無	無 無	無 無
OCT2	腎臓	弱い (IC_{50}=130 ± 20 μM)	-	-	-
OAT1 OAT3 OAT4	腎臓	無 弱い 無	無 無 無	無 無 無	無 弱い 無

無：検討した最高濃度でも阻害は≤50%
-：検討せず

2.6.4.7.5.1 サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の P-gp に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.O】：4.2.2.6-16：DMPK-120-07（評価資料）

サフィナミド及び 2 つの主要代謝物 NW-1153 及び NW-1689 の P-gp 排出機能に対する阻害能を Caco-2/TC7 細胞単層膜を用いて評価した。3 つの化合物を基底膜側及び頂端膜側に 0.3～1000 μM の濃度範囲で添加し、P-gp 基質である ^{3}H-ジゴキシンの輸送速度を 2 時間にわたって測定した。

インキュベーション中に被験化合物は代謝されなかった。

サフィナミドは 30 μM の濃度まで Caco-2 細胞単層膜での ^{3}H-ジゴキシン輸送に影響を及ぼさなかった。100 μM 以上の高濃度では、^{3}H-ジゴキシンの $P_{app}^{B-A}/P_{app}^{A-B}$ 比が低下したが、その原因はサフィナミドにより Caco-2 細胞単層膜の細胞間隙が緩み P_{app}^{A-B} が増大したことが原因と推定され、P_{app}^{B-A} の減少は最大でも 45% 程度であったことから、サフィナミドは P-gp を阻害しないと考えられた。

一方、NW-1153 及び NW-1689 は P-gp を介した ^{3}H-ジゴキシン輸送に影響を及ぼさなかった。

2.6.4.7.5.2 NW-1689AG の P-gp に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.P】：4.2.2.6-23：DMPK-145-11（参考資料）

NW-1689AG の P-gp 排出機能に対する阻害能を Caco-2/TC7 細胞単層膜を用いて評価した。NW-1689AG を基底膜側及び頂端膜側コンパートメントに 1.5 及び 7.5 μM の濃度で添加し、P-gp 基質である ^{3}H-ジゴキシンの輸送速度を 1 時間にわたって測定した。

NW-1689AG は 7.5 μM の濃度まで、P-gp を介した ^{3}H-ジゴキシン輸送に影響を及ぼさなかった。（サフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 100 mg、1 日 1 回、7 日間反復経口投与したときの 7

日目の蛋白非結合型 NW-1689AG の C_{max} は 0.0195 μM であるため、300 倍以上乖離があると考えられた）

2.6.4.7.5.3 サフィナミド、NW-1153、NW-1689、NW-1689AG 及び NW-1199 の BCRP に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.Q】：4.2.2.6-17：DMPK-103-10（評価資料）

サフィナミド、NW-1153、NW-1689、NW-1689AG 及び NW-1199 の BCRP を介した 2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾール[4,5-*b*]ピリジン（2-amino-1-methyl-6-phenylimidazole[4.5-*b*]pyridine; PhIP）の輸送に対する影響を MDCKII-BCRP 細胞モデルを用いて検討した。

サフィナミド（1～100 μM）は BCRP を介した PhIP 輸送を濃度依存的に低下させ、およその IC_{50} 値は 43 ± 23 μM であった。

NW-1689（1～100 μM）も指標基質の BCRP を介した輸送を低下させ、およその IC_{50} 値は 3.7 ± 0.5 μM であった。

NW-1153、NW-1689AG 及び NW-1199 は BCRP を介した輸送に対して検討した最高濃度である 50 μM まで阻害作用を示さなかった。

2.6.4.7.5.4 サフィナミド及び代謝物の BSEP に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.R】：4.2.2.6-18：DMPK-55-09（評価資料）

サフィナミド及びその代謝物のヒト胆汁酸塩排出ポンプ（Bile salt export pump; BSEP）に対する影響を検討した。BSEP とサフィナミド（3 及び 300 μM）、NW-1153（3 及び 300 μM）、NW-1689（3 及び 300 μM）、NW-1689AG（1 及び 100 μM）及び NW-1199（1 及び 100 μM）との相互作用を、プローブ基質のタウロコール酸の輸送の変化に基づくベシクル輸送アッセイの阻害タイプを用いて検討した。

サフィナミド、NW-1153、NW-1689AG 及び NW-1199 は BSEP を阻害しなかった。

NW-1689 は BSEP を介したタウロコール酸輸送を高濃度で弱く阻害した。最大の阻害作用は 300 μM での 43%及び 34%で、陽性対照のシクロスポリン A（20 μM で 92～96%阻害）よりもはるかに低かった。

2.6.4.7.5.5 サフィナミド及び代謝物の OATP1B1 に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.S】4.2.2.6-19：DMPK-84-08（評価資料）

サフィナミド（50 μM）、NW-1153（20 μM）、NW-1689（2 μM）、NW-1689AG（30 μM）及び NW-1199（120 μM）の OATP1B1 を介したスルホブロモフタレイン（sulfobromophthalein; BSP）の取り込みに対する影響を検討した。

検討した化合物はいずれも OATP1B1 を阻害しなかった。

2.6.4.7.5.6 サフィナミド及び代謝物の OATP1B3 に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.T】：4.2.2.6-20：DMPK-142-10（評価資料）

サフィナミド、NW-1153、NW-1689、NW-1689AG 及び NW-1199 の OATP1B3 を介した BSP の取り込みに対する影響を検討した。

サフィナミド（50 μM）、NW-1153（20 μM）、NW-1689（2 μM）、NW-1689AG（34 μM）及び NW-1199（134 μM）は OATP1B3 による BSP の取り込みを阻害しなかった。

2.6.4.7.5.7 サフィナミドの OCT2 に対する in vitro 阻害

【2.6.5.15.U】：4.2.2.6-21：DMPK-166-07（評価資料）

腎取り込みトランスポーターである OCT2 に対するサフィナミドの影響について、OCT2 を安定的に発現しているヒト胎児由来腎（human embryonic kidney; HEK）細胞を用いて検討した。また、^{3}H-*N*-メチル-4-フェニルピリジニウム（*N*-methyl-4-phenylpyridinium; MPP^{+}）の取り込みに対するサフィナミドの影響を検討した。

サフィナミドは 1 及び 10 μM では OCT2 を介した MPP^{+}取り込みに対して阻害作用がないか、又は僅かであった。より高い濃度では、MPP^{+}輸送を濃度依存的に阻害し、IC_{50} 値はおよそ 130 ± 20 μM で、サフィナミドは OCT2 に対する中程度の阻害剤であることが示唆された。更に、OCT2 に対するサフィナミドによる阻害の程度はキニジンと比べると低かった。

2.6.4.7.5.8 サフィナミド及び代謝物の OAT1、OAT3 及び OAT4 に対する阻害

【2.6.5.15.V】：4.2.2.6-22：DMPK-53-10 (PCT-003-10)（評価資料）

腎取り込みトランスポーターである OAT1、OAT3 及び OAT4 に対するサフィナミド、NW-1153、NW-1689、NW-1689AG 及び NW-1199 の影響を検討する試験を、形質導入した OAT1、OAT3 及び OAT4 を発現させた HEK 細胞を用いて実施した。

サフィナミド（50 μM）、NW-1153（20 μM）、NW-1199（120 μM）、NW-1689（2 μM）、又は NW-1689AG（30 μM）の存在下で、典型基質のパラアミノ馬尿酸（p-aminohippuric acid; PAH）又はエストロン硫酸（Estrone 3-sulfate; ES）の取り込みを 2 つの濃度（K_m 値及び 1/10 K_m 値）で測定した。

検討した化合物はいずれも OAT1 及び OAT4 を形質導入した HEK 細胞への PHA 又は ES の取り込みを顕著に阻害しなかった。

サフィナミドは OAT3 を形質導入した HEK 細胞への ^{3}H-ES の取り込みをいずれの基質濃度でも阻害した（^{3}H-ES の濃度が 16 μM 及び 1.6 μM の場合、それぞれ 27%及び 39%）。また、NW-1689AG は OAT3 を形質導入した HEK 細胞への ^{3}H-ES の取り込みを、1.6 μM においてのみ阻害し（30%）、16 μM の場合では阻害しなかった。

2.6.4.7.5.9 サフィナミド及び MW-1153 のヒト各種トランスポーターに対する阻害

【2.6.5.15.M】：4.2.2.6-14：HLS-16-02Apr2014（評価資料）

1) サフィナミドの OATP1A2、OATP2B1、OCT1、MATE1 及び MATE2-K に対する阻害

血液脳関門でのトランスポーターである OATP1A2 及び OATP2B1、並びに、腎臓でのトランスポーターである OCT1、MATE1 及び MATE2-K に対するサフィナミドの阻害について、0.5～50 μM の濃度で評価した。

サフィナミドは OATP1A2、OATP2B1 及び OCT1 トランスポーターを介したプローブ基質（^{3}H-ES 又は ^{14}C-メトホルミン（Metformin; Metf））の取り込みを 50 μM でそれぞれ最高で 55%、25%及び 58%阻害した。OCT1 の場合、IC_{50} 値は 39.3 μM と算出された。

サフィナミドは MATE1 及び MATE2-K を介した ^{14}C-Metf 輸送に 50 μM まで影響を及ぼさなかった。したがって、これらトランスポーターの基質を併用投与しても臨床上重要な薬物間相互作用が生じる可能性は低いと推定された。

2) NW-1153 の OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対する阻害

腎臓でのトランスポーターである OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対する NW-1153 の阻害を、0.05～5 μM の濃度範囲で評価した。

NW-1153 は、検討した濃度では OCT2、MATE1 及び MATE2-K を介したプローブ基質（^{14}C-Metf）の取り込みに影響を及ぼさなかった。上記のデータから NW-1153 は臨床上重要な濃度では OCT2、MATE1 及び MATE2-K の阻害剤とならないことが示された。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

該当する試験なし。

2.6.4.9 考察及び結論

2.6.4.9.1 生体試料分析

動物（マウス、ラット、ウサギ及びサル）の生体試料中のサフィナミドの定量は、高速液体クロマトグラフィーと蛍光検出（HPLC/FL）、又は液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を組み合わせた手法により、$^{13}C_6$ 標識サフィナミド、又は構造的ホモログの NW-1044（PNU0167779E）を内部標準として用いて行った（2.6.4.2.1、2.6.4.2.2、2.6.4.2.3、2.6.4.2.4、2.6.4.2.5、2.6.4.2.6、2.6.4.2.7、2.6.4.2.8、2.6.4.2.9、2.6.4.2.10、2.6.4.2.11）。

ヒトでの主要代謝物である NW-1153 及び NW-1689 の定量は、LC-MS/MS によりそれぞれ NW-1797 及び NW-1796、又は重水素化 NW-1689 を内部標準として用いて行った。NW-1689AG はアルカリ加水分解の前（NW-1689 の非グルクロン酸抱合体を反映）と後（加水分解によりアシルグルクロニドから生じたアグリコンの追加分を反映）での NW-1689 の差として LC-MS/MS により測定した（2.6.4.2.12）。

毒性試験で併用投与される薬剤を定量するための生体試料分析法をバリデートした。

全てのバリデート済みの分析アッセイの真度及び精度は、LLOQ については±20 以内及び 20%以下、それ以外の濃度については±15%以内及び 15%以下の判定基準の範囲内であり、特異的で感度が高い定量法であることが確認された。

2.6.4.9.2 吸収

単回経口投与（13.2 mg/kg）後、サフィナミドメシル酸塩は SD ラット（t_{max}<1 h）、及び、カニクイザル（t_{max}=1～2 h）で速やかに吸収された。経口投与時のラット及びサルでのサフィナミドメシル酸塩の生物学的利用率は、それぞれ 92%及び 80%と高かった（2.6.4.3.1、2.6.4.3.3）。Wistar ラットでは、経口投与時（4 mg/kg）の生物学的利用率は 43/54%（雄/雌）で、腹腔内投与（4 mg/kg）後では 50/77%（雄／雌）であった（2.6.4.3.2）。これらのデータから経口投与後の消化管からのサフィナミドメシル酸塩の吸収は速やかで吸収率は高いと考えられた。ラット及びサルのいずれにおいても、サフィナミドの曝露量は用量比を上回って増加する傾向を示し、反復投与による蓄積比は最大で約 2 倍であった。ラット及びサルの単回静脈内投与時の分布容積（V_{ss}）は、それぞれ約 4.8 L/kg 及び 2.4 L/kg と高く、サフィナミドは血管外に広く分布すると考えられた（2.6.4.3.1、2.6.4.3.3）。これは、サフィナミドの特徴である脂溶性と細胞膜透過性が高いことと一致すると考えられた。血漿中サフィナミド濃度は最大値に達したのち低下し、ラット及びサルでの見かけの半減期（$t_{1/2}$）はそれぞれ約 1～2 時間及び 11～13 時間であった（2.6.4.3.1、2.6.4.3.3）。また、サルにおいて、血中薬物動態に性差は認められなかった（2.6.4.3.1）。

2.6.4.9.3 分布

^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回静脈内投与、及び反復経口投与したアルビノラットにおける器官及び組織の放射能を定量したところ、放射能の褐色及び白色脂肪、骨髄、及び涙腺からの消失は、その他の組織からの消失よりも遅かった（2.6.4.4.3）。また、脳及び精巣で高い放射能が検出されたことから、サフィナミド及び代謝物の類縁物質は血液脳関門及び血液精巣関門を通過することが示された（2.6.4.4.4）。^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を有色素ラットに静脈内投与を行った組織分布試験で、放射能のメラニン結合が示され、放射能の曝露は非有色皮膚よりも有色皮膚で 2～3 倍高かった。メラニン結合組織（網膜、皮膚）での半減期が 65 時間と長く滞留が認められたが、時間の経過によって、いずれの組織でも総放射能の消失が認められたため、そのメラニン結合は可逆的であると考えられた（2.6.4.4.5）。また、有色素及びアルビノラットともに、高レベルの放射能が涙腺で認められた（2.6.4.4.3、2.6.4.4.5）。

げっ歯類特異的にみられたサフィナミドの網膜変性に代謝物が関与している可能性を明らかにするため、有色素ラット及びアルビノラットに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を低用量と高用量で単回及び反復経口投与し、^{14}C-サフィナミド及び代謝物の分布を、特に眼に注目して検討した（2.6.4.4.6）。その結果、アルビノラットと比べて有色素ラットの眼において高い放射能が認められた。また、両系統の血中での主要代謝物である NW-1689 は、アルビノラットの網膜でのみ認められたが、網膜変性は有色素ラット及びアルビノラットの両方に認められたため、NW-1689 の網膜変性への関与は不明である。

サフィナミドは、マウス、ラット及びサルの脳への速やか、かつ広範な透過性を示し、脳中の C_{max} は血漿中の C_{max} とほぼ同じ測定時点に認められ、血漿中に対する脳での曝露量（脳及び血漿でのサフィナミド総量）の比（AUC 比）は 9～16 の範囲であった（2.6.4.4.7.2、2.6.4.4.7.2、2.6.4.4.7.3）。

In vitro での各動物種及びヒトでの血漿蛋白結合率は、NW-1689、NW-1689AG、サフィナミド及び NW-1153 の順で高く、これらの結合率は濃度によって変化がなかった。ヒト血漿でのサフィナミドの結合率は 89%、NW-1153 は 71%、NW-1689 は 100%、及び NW-1689AG は 97%であり、動物血漿でも同様であった（2.6.4.4.8）。精製ヒト血漿蛋白質を用いた検討から、サフィナミド及び NW-1689 が血漿中で主に結合している蛋白質はヒト血清アルブミンであることが示された（2.6.4.4.9）。

^{14}C-サフィナミド、^{14}C-NW-1153 及び ^{14}C-NW-1689 の血球移行を、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒトの血液を用いて検討したところ、サフィナミド及び NW-1153 の $R_{BC/P}$ は、マウスで約 2、ラット、ウサギ及びイヌで約 1、サル及びヒトで約 0.5 であった。また、NW-1689 の $R_{BC/P}$ は、いずれの動物及びヒトでも 0.1 未満であった（2.6.4.4.1）。

2.6.4.9.4 代謝

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞を用いた in vitro/in vivo 試験で、共通の主要代謝物として、アミド基の加水分解により生じた NW-1153 と酸化的 *N*-脱アルキル化により生じた NW-1689 の 2 つが認められた（表 2.6.4-15 及び図 2.6.4-7 参照）。ヒトの in vivo において最も多く認められた代謝物は NW-1689 であった。NW-1689 は一部グルクロン酸と *O* 型抱合体を形成して NW-1689AG となった。また、サフィナミドが *O*-脱ベンジル化されて生成する NW-1199 も認められた。

表 2.6.4-15 ヒト及び各動物種で認められた代謝物：in vitro と in vivo の比較

動物種	NW-1153	NW-1689	NW-1689AG	NW-1199
	in vitro / in vivo[c]			
ヒト[a]	+++ / ++	+ / +++	+++ / +	+ / +
マウス[b]	+++ / +	+++ / +++	- / -	- / +++ (G)
ラット[b]	+++ / +	+++ / +++	- / +	- / +
イヌ[b]	+++ / +	- / +++	- / +++	- / -
サル[b]	+++ / +	+++ / +++	- / +	- / +

-：形成されず
(G)：グルクロニド抱合体として存在（肝細胞インキュベーション）
血漿中の代謝物の相対量を少量の場合は+で、多い場合は+++で示す
a：肝細胞初代培養（24 時間以下のインキュベーション）で得た in vitro データ
b：初代肝細胞浮遊液（4 時間以下のインキュベーション）で得た in vitro データ
c：血漿中濃度（ヒトは 2.7.2 より引用）

サフィナミドをヒト肝細胞中でインキュベートしたところ（2.6.4.5.1）、NW-1153 及び NW-1689 が生成したが（2.6.4.5.1）、NW-1153 の生成はエステラーゼ阻害剤（PMSF）／アミダーゼ阻害剤（BNPP）を添加することにより完全に阻害された（2.6.4.5.7）。したがって、サフィナミドから NW-1153 の生成は、非特異的な細胞質アミダーゼによって触媒されると考えられた。そこで、サフィナミドを NW-1153 に代謝するアミダーゼの特定を試みた結果、ヒト脂肪酸アミド加水分解酵素（FAAH）が、関与する可能性のある酵素の 1 つとして特定された（2.6.4.5.7）。一方、hCE-1 及び hCE-2 はサフィナミドを代謝しなかった。NW-1153 の生成には、FAAH、hCE-1 及び hCE-2 以外のアミダーゼも関与していると考えられた。

NW-1153 のラット単回経口投与毒性試験で NW-1689 が認められた（2.6.4.5.8）こと、及び、ヒト肝細胞を用いた in vitro 実験系において、NW-1153 から NW-1689 となる経路が確認された（2.6.4.5.8）ことから、サフィナミドが NW-1153 を経て NW-1689 に代謝される経路が存在する可能性が考えられた。しかしながら、NW-1153 を NW-1689 へ代謝する酵素を同定することはできなかった。

一方、サフィナミドが NW-1153 を経ずに NW-1689 に代謝される経路に関しては、以下のように推定された。

ヒト肝ミクロソーム（アミダーゼ及び ALDH を含まない）中でのサフィナミドの代謝反応はケトコナゾールにより 94%阻害されたこと（2.6.4.5.4）、及び、発現系 CYP3A4 に ^{14}C-サフィナミドを添加して反応させたところ、Met-A（中間代謝物）及び NW-1689 の生成が認められたこと（2.6.4.5.4）から、CYP3A4 がサフィナミドから NW-1689 へ代謝される過程に関与していると推定された。

Met-A を基質とし、ヒト肝ミクロソーム、又は発現系 MAO-A 中でインキュベートすると Met-X 及び NW-1689 が生成するが、その系に MAO-A 阻害剤（クロルジリン）を添加すると、NW-1689 の生成が完全に阻害されることから、Met-A の Met-X への代謝には MAO-A が関与していると考えられた（2.6.4.5.4、2.6.4.5.5）。更に、Met-X を基質とし、各種の ALDH 分子種（ALDH1A1、ALDH1B1、ALDH2、ALDH7A1）と反応させたところ、いずれの場合も NW-1689 が生成した（2.6.4.5.6）。

最後に、NW-1689 から NW-1689AG への代謝に関しては、UGT 遺伝子導入 Supersomes™を用いた検討により、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A7、UGT1A9 及び UTG2B15 が関与していることが明らかとなった（2.6.4.5.9）。

アシルグルクロニドの中には細胞中の巨大分子と反応し、体質によっては薬物毒性をもたらす可能性があるため、NW-1689AG の蛋白質に対する反応性を in vitro で検討した。NW-1689AG は、6 種類の異性体に転位したり、加水分解を受けて消失したりするが、その半減期（$t_{1/2}$）は 5.4 時間であった

（ジクロフェナック AG の $t_{1/2}$ は 0.5 時間であった）。また、NW-1689AG のヒト血清アルブミンとの共有結合は、48 時間インキュベート後に 0.3%の割合で認められた（イブプロフェン AG の場合の約半分）（2.6.4.5.10）。Boelsterli [3] が導入した評価尺度に従うと、NW-1689AG の反応性は in vitro では低～中程度であると分類された。アシルグルクロニドの化学的安定性は体質による薬物毒性のリスクと相関すると考える Sawamura ら [4] のアプローチで判断すると、NW-1689AG は「安全な」アシルグルクロニドと分類された。これは「ベンジリックアシルグルクロニドの反応性は低い」とする一般的に認められている Wang et al. [5] らの知見と一致した。

雌雄マウス、雌雄ラット、雌性イヌ及び雌雄サルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩を単回経口投与して、血漿、尿及び糞中の in vivo 代謝物パターンについて検討した。サフィナミド及びその代謝物の血漿中 AUC、尿中又は糞中への排泄量を種間で比較した（図 2.6.4-12）。

ラット及びサルに ^{14}C-サフィナミドメシル酸塩（^{14}C-サフィナミドとして 10 mg/kg）を単回経口投与したところ、サフィナミドの血漿濃度は総放射能濃度よりもはるかに低かった。すなわち、両動物種でサフィナミドの大部分が全身で生体内変換を受けた。ラットでは、血漿中 NW-1689AG 濃度は加水分解法を適用できないほど低かったが、サルでの NW-1689AG の曝露量は総放射能の約 1%であった。

以上の結果から、サフィナミドの消失は、ほぼ完全に代謝に基づくことが明らかとなった。ヒトで検出された代謝物は、検討した全ての動物種においても検出されており、ヒトのみに認められた代謝物は存在しなかった。

2.6.4.9.5 排泄

^{14}C-サフィナミドメシル酸塩をマウス、ラット、イヌ及びサルに投与してマスバランス試験を検討した（2.6.4.6）。

サフィナミドは、ほぼ完全に代謝された後、代謝物として主に尿中に排泄され、糞中への排泄は極めて低いと考えられた。検討したほぼ全種（極めて高い用量の投与を受けたマウスを除く）において 96～240 時間後の平均累積排泄率は 70～97%であった（表 2.6.4-11）。

また、ラットを用いて胆汁中の放射能を検討したところ、投与後 24 時間後までの回収率は約 12%であった（2.6.4.6.3）。

2.6.4.9.6 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝ミクロソーム中で、サフィナミドは CYP1A2 を競合的（IC_{50} 値=47.7 μM; K_i 値=54 μM、ミクロソーム蛋白質の結合は無視できる）に阻害すると同時に、TDI も認められた（K_I=33.5 μM、K_{inact}=0.075 min^{-1}）（2.6.4.7.1）。また、サフィナミドは CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 をほとんど直接阻害しなかったが（IC_{50} 値>100 μM）、CYP2B6、CYP2C19 及び CYP2D6 に対しては TDI が認められた。しかし、これらの阻害は、ヒトでの肝臓における曝露濃度（100 mg/日、1 日 1 回反復投与での定常状態における肝細胞中最高濃度の仮定値：0.66 μM×50=33 μM）を考慮すると、サフィナミドは CYP1A2 を直接阻害する可能性があるが、その他の分子種を阻害する可能性は低いと考えられた。

また、ヒト肝ミクロソームを用いて、NW-1689AG が CYP2C8 に対する阻害作用を有するか検討したところ、直接阻害の IC_{50} 値>30 μM であった。また、TDI 又は代謝依存的阻害については僅かに認められたか、又は認められなかった（2.6.4.7.1）。

ヒト肝細胞を用いた in vitro 試験において、CYP1A2、CYP2B6（サフィナミド濃度：1～80 μM の 8 水準）及び 2C9、3A4/5（サフィナミド濃度：3、30 及び 100 μM）の誘導の有無について検討した（2.6.4.7.3）。

サフィナミドは CYP1A2 活性を 15～80 μM において媒体対照の 2～4 倍に増加させ（ドナー2 名中 2 名）、CYP1A2 mRNA 量も 1～80 μM において媒体対照の 2～40 倍に増加させた（ドナー2 名中 2 名）。サフィナミドは CYP1A2 活性を阻害するので、上記の CYP1A2 活性の増加は阻害によって相殺されたものと考えると、サフィナミドは CYP1A2 の誘導剤となる可能性が考えられた。一方、サフィナミドは CYP2B6 活性を 30～60 μM において媒体対照の 2～4 倍に増加させ（ドナー2 名中 1 名）、CYP2B6 mRNA 量も 15～80 μM で媒体対照の 2～5 倍に増加させた（ドナー2 名中 2 名）。また、CYP2B6 の mRNA 発現誘導の EC_{50} 及び E_{max} がそれぞれ 71.35 μmol/L 及び 4.92 であったことから、サフィナミドは CYP2B6 の誘導を引き起こす可能性があると考えられた。更に、サフィナミドによる CYP2C9 活性の増加は 3～100 μM で 2 倍未満、CYP3A4/5 活性は 30 μM 以上で 2 倍以上であったことから、サフィナミドは CYP2C9 を誘導する可能性は小さいが、CYP3A4/5 を誘導する可能性はあると考えられた。

サフィナミドによる UGT1A1 活性又は mRNA 発現の濃度依存的増強、及び著明な増強は認められなかった。SULT2A1 活性が 1.8 倍超に増強することはなく、mRNA 発現は 1 名のドナーに由来する肝細胞において約 2 倍に増加したにとどまり、どちらにも濃度依存性は認められなかった。活性への濃度依存的影響はなく、活性増強も最小限であったことから、サフィナミドは SULT2A1 の臨床的に重要な誘導剤とはならないと考えられた。

Caco-2 細胞では、サフィナミドは膜透過性が高く、この細胞株に発現している P-gp やその他のトランスポーターの基質ではなかった（2.6.4.7.5）。また、サフィナミド 100 mg を経口投与後の消化管における予測最大濃度である 1,323 μM（100 mg/250 mL）近辺の濃度（1,000 μM）でも、サフィナミドは P-gp を阻害しなかった。同様に、代謝物である NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG は P-gp を阻害しなかった（2.6.4.7.5.1）。したがって、サフィナミド及びその主要代謝物の P-gp に関連する臨床上問題となる薬物動態学的相互作用はないと考えられた。

サフィナミドは BCRP を介した PhIP 輸送を濃度依存的に低下させ、IC_{50} 値は 43 ± 23 μM であった。サフィナミド 100 mg を経口投与後の消化管における予測最大濃度は 1,323 μM（100 mg/250 mL）であるため、サフィナミドは消化管における BCRP を阻害する可能性があると考えられた。一方、NW-1689 は BCRP を 3.7 ± 0.5 μM の IC_{50} 値で阻害したが、サフィナミドのその他の代謝物は BCRP への阻害作用を示さなかった（2.6.4.7.4）。

サフィナミド及びその代謝物は、OATP1B1、OATP1B3 及び BSEP に対して阻害能は認められなかった。

サフィナミド及び代謝物の OAT1、OAT3 及び OAT4 に対する阻害を検討したところ、サフィナミド（50 μM）及び NW-1689AG（30 μM）が OAT3 に対して 27～39%の阻害を示したが、その他に関しては 20% 未満の阻害しか認められなかった（2.6.4.7.5）。ヒトにサフィナミドメシル酸塩を、サフィナミドとして 100 mg、1 日 1 回、7 日間反復経口投与したときのサフィナミド及び NW-1689AG の血漿中非結合型濃度の C_{max} は、それぞれ 0.66 μM 及び 0.02 μM であり、上記の in vitro 試験における添加濃度のそれぞれ 1/76 及び 1/1500 であったため、この in vitro 阻害は臨床上重要でないと考えられた。

サフィナミドは OCT2 を阻害し、IC_{50} 値は約 130 ± 20 μM であった（2.6.4.7.5）。サフィナミドの臨床における最大血漿中非結合型濃度（0.66 μM）を考慮すると、サフィナミドの OCT2 阻害の臨床上の意義は小さいと考えられた。

サフィナミドは非特異的な細胞質アミダーゼによって NW-1153 へと代謝されることが確認されたが、その代謝経路を主に担っているアミダーゼの種類は特定できなかった。しかし、一般的にアミダーゼは高い酵素活性を有しているため、薬物動態学的相互作用によってアミダーゼの酵素活性がサフィナミドの薬物動態に影響を与えるほど阻害される可能性は低いと考えられた。

中間代謝物 Met-X が NW-1689 へと代謝される経路には複数の ALDH 分子種（ALDH1A1、ALDH1B1、ALDH2、ALDH7A1）が関与することが確認された。したがって、これらの ALDH 分子種の 1 つが薬物動態学的相互作用により阻害されたとしても、サフィナミドの薬物動態に対して臨床上重要な影響が生じる可能性は低いと考えられた。

以上のことから、サフィナミドは CYP1A2 を阻害及び誘導する可能性が示唆されたため、カフェインとサフィナミドメシル酸塩を併用した臨床薬物相互作用試験を実施したところ、サフィナミドメシル酸塩を併用することにより、カフェインの AUC はわずかに増大した（2.6.4.7.1）。また、サフィナミドは CYP3A4/5 を誘導する可能性が示唆されたため、ミダゾラムとサフィナミドメシル酸塩を併用した臨床薬物相互作用試験を実施したところ、サフィナミドメシル酸塩を併用することにより、ミダゾラムの AUC はわずかに減少した（2.6.4.7.1）。更に、サフィナミド及びその代謝物が BCRP を阻害する可能性が示唆されたため、ロスバスタチンとサフィナミドメシル酸塩を併用した薬物動態学的相互作用臨床試験を実施したところ、サフィナミドメシル酸塩を併用することにより、ロスバスタチンの C_{max} 及び AUC はわずかに増大した（2.6.4.7.1）。しかし、いずれの場合も、臨床使用上で問題になる程度のものではないと考えられた。

2.6.4.10 参考文献一覧

1) 【4.3-15】Parkinson A, Kazmi F, Buckley DB et al. System-Dependent Outcomes during the Evaluation of Drug Candidates as Inhibitors of Cytochrome P450 (CYP) and Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) Enzymes: Human Hepatocytes versus Liver Microsomes versus Recombinant Enzymes. Drug Metab Pharmacokinet 2010;25(1):16-27.
2) 【4.3-16】Faucette SR, Sueyoshi T, Smith CM et al. Differential Regulation of Hepatic CYP2B6 and CYP3A4 Genes by Constitutive Androstane Receptor but Not Pregnane X Receptor. J Pharmacol Exp Ther 2006;317:1200-9.
3) 【4.3-17】Boelsterli UA. Xenobiotic Acyl Glucuronides and Acyl CoA Thioesters as Protein-Reactive Metabolites with the Potential to Cause Idiosyncratic Drug Reactions. Curr Drug Metab 2002;3:439-50.
4) 【4.3-18】Sawamura R, Okudaira N, Watanabe K et al. Predictability of Idiosyncratic Drug Toxicity Risk for Carboxylic Acid-Containing Drugs Based on the Chemical Stability of Acyl Glucuronide. Drug Metab Disp 2010;38:1857-64.
5) 【4.3-19】Wang J, Davis M, Li F et al. A Novel Approach for Predicting Acyl Glucuronide Reactivity via Schiff Base Formation: Development of Rapidly Formed Peptide Adducts for LC/MS/MS Measurements.. Chem Res Toxicol 2004;17:1206-16.