目次

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.1.1 単回投与毒性 9
2.6.6.1.2 反復投与毒性（サフィナミド単独） 10
2.6.6.1.3 反復投与毒性（レボドパ／カルビドパ又はプラミペキソール併用） 11
2.6.6.1.4 遺伝毒性 12
2.6.6.1.5 がん原性 12
2.6.6.1.6 生殖発生毒性 12
2.6.6.1.7 その他の毒性試験 13
2.6.6.2 単回投与毒性試験 16
2.6.6.2.1 ラットを用いたサフィナミドの単回経口投与毒性試験 16
2.6.6.2.2 ラットを用いたサフィナミドの単回静脈内投与毒性試験 16
2.6.6.3 反復投与毒性試験 17
2.6.6.3.1 ラットを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験 17
2.6.6.3.2 ラットを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 17
2.6.6.3.3 ラットを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 18
2.6.6.3.4 ラットを用いたサフィナミドの 26 週間反復経口投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 19
2.6.6.3.5 ラットを用いたサフィナミドの 26 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 20
2.6.6.3.6 カニクイザルを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験 21
2.6.6.3.7 カニクイザルを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 21
2.6.6.3.8 カニクイザルを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 22
2.6.6.3.9 カニクイザルを用いたサフィナミドの 39 週間反復経口投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 23
2.6.6.3.10 カニクイザルを用いたサフィナミドの 26/39 週間反復経口投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 23
2.6.6.3.11 反復投与毒性試験（レボドパ／カルビドパ併用投与） 24
2.6.6.3.12 反復投与毒性試験（プラミペキソール併用） 28
2.6.6.3.13 静脈内投与試験 29
2.6.6.4 遺伝毒性試験 32
2.6.6.4.1 In vitro 試験 32
2.6.6.4.2 In vivo 試験 33
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 34
2.6.6.5.1 マウスを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験 34
2.6.6.5.2 マウスを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験 34
2.6.6.5.3 ラットを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験 35
2.6.6.5.4 マウスを用いたサフィナミドの 104 週経口投与がん原性試験 36
2.6.6.5.5 ラットを用いたサフィナミドの 104 週間経口投与がん原性試験 36
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 38
2.6.6.6.1 重要な試験以外の試験（サフィナミド単独） 38

2.6.6.6.2 重要な試験（サフィナミド単独） 41
2.6.6.6.3 重要な試験以外の試験（レボドパ／カルビドパとの併用） 45
2.6.6.6.4 重要な試験（レボドパ／カルビドパ併用） 47
2.6.6.7 局所刺激性試験 49
2.6.6.7.1 静脈内及び血管周囲組織への刺激性試験 49
2.6.6.7.2 皮膚刺激性試験 49
2.6.6.7.3 眼刺激性試験 49
2.6.6.8 その他の毒性試験 51
2.6.6.8.1 抗原性試験 51
2.6.6.8.2 免疫毒性試験 51
2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験 （網膜変性に関する追加試験） 51
2.6.6.8.4 依存性試験 59
2.6.6.8.5 代謝物の毒性試験 61
2.6.6.8.6 不純物の毒性試験 63
2.6.6.8.7 サフィナミド及び 2 代謝物（NW-1153、NW-1689）の紫外可視吸収スペクトル 66
2.6.6.9 考察及び結論 67
2.6.6.9.1 重要な試験における安全域 67
2.6.6.9.2 毒性の標的臓器 68
2.6.6.9.3 その他の毒性 69
2.6.6.9.4 生殖発生毒性 71
2.6.6.9.5 遺伝毒性 72
2.6.6.9.6 がん原性 72
2.6.6.9.7 局所刺激性 72
2.6.6.9.8 免疫毒性 72
2.6.6.9.9 依存性 73
2.6.6.9.10 代謝物の毒性評価 73
2.6.6.9.11 不純物の毒性評価 73
2.6.6.9.12 光毒性 74
2.6.6.9.13 結論 74
2.6.6.10 参考文献一覧 74

略号一覧

AmbF	Azure II-Methylene blue-basic Fuchsin	アズール II・メチレンブルー・塩基性フクシン
ACTH	Adrenocorticotropic hormone	副腎皮質刺激ホルモン
AG	Acyl glucuronide	アシルグルクロニド
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度曲線下面積
BUN	Blood urea nitrogen	尿素窒素
C_{max}	Maximal plasma concentration	最高血漿中濃度
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DA	Dopamine	ドパミン
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DOPAC	3,4-Diphydroxyphenylacetic acid	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸
DRF	Dose range finding	用量設定
ECG	Electrocardiograph	心電図
ERG	Electroretinography	網膜電図
F0	Parental generation	親世代
F1	First filial generation	第 1 世代
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLDH	Glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
HE	Hematoxilin-Eosin	ヘマトキシリン・エオジン
HVA	Homovanillic acid	ホモバニリン酸
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
LD_{50}	Lethal dose 50%	半数致死量
LE	Long Evans	Long Evans
MAO-B	Monoamine oxidase B	モノアミンオキシダーゼ B
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐容投与量
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect-Level	無毒性量
OCT	Optical Coherence Tomography	光干渉断層撮影
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PCEs	Polychromatic erythrocytes	幼若赤血球
SD-OCT	Spectral Domain - Optical Coherence Tomography	分光型光干渉断層撮影
VAP	Average path velocity	平均経路運動速度

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

サフィナミドメシル酸塩（以下、サフィナミド）の毒性評価として、ラット及びサルを用いた単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、局所刺激性試験を実施した。その他の毒性試験として、毒性発現の機序に関する試験、依存性試験、代謝物の毒性試験、不純物の毒性試験及び光毒性に関する試験を実施した。代謝物の毒性試験では、ヒトで確認される代謝物 NW-1153、NW-1689 及び NW-1689 アシルグルクロニド（NW-1689AG）について、また不純物の毒性試験ではサフィナミドの[redacted]である類縁物質A* 、[redacted]である 類縁物質B* （[redacted]）並びに[redacted]である類縁物質C* （[redacted]）について評価した。サフィナミドはレボドパ／カルビドパ及びプラミペキソール等の他のパーキンソン病治療薬と併用投与で使用されるため、これらの薬剤との併用による反復毒性試験及び生殖発生毒性試験についても実施した。毒性発現の機序に関する試験として、ラットで認められた網膜毒性に関する試験を実施した。

In vivo 毒性試験では、臨床投与経路に従い 1 日 1 回経口投与とした。加えて、短期の静脈内投与による臨床試験（海外試験）のために、静脈内投与による 2 週間反復投与毒性試験及び刺激性試験を実施した。薬力学的作用に対する反応性に基づき、毒性学的評価にはラットとサルを選択した。ヒトでの主要な代謝経路はこれらの動物種での主な代謝経路と一致しており、量的な違いはあるものの同じ代謝物が生じた。

重要な試験は、全て医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。毒性試験の概要を表 2.6.6-1に示す。全ての試験はサフィナミドメシル酸塩を使用したが、投与用量はサフィナミドとしての用量を表記した。

表 2.6.6-1 非臨床毒性試験の概略（毒性試験プログラム）

試験の種類及び期間	種／系統 又は試験系	投与方法	投与量 （mg/kg/日）[a]／濃度	GLP	CTD 記載箇所 試験番号 (報告書番号)
単回投与毒性試験					
単回投与 + 14 日間追跡	ラット	経口	0, 500, 1000, 1500, 2000	適用	4.2.3.1-01 N833-Q1511 (9750086)
単回投与 + 14 日間追跡	ラット	静脈内	0, 25, 40, 70, 100	適用	4.2.3.1-02 N832-Q1510 (9750085)
反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（サフィナミド単独）					
4 週間	ラット	経口	0, 50, 100, 200	適用	4.2.3.2-01 N596-Q1354 (9550005)
4 週間	サル	経口	0, 50, 100, 200	適用	4.2.3.2-06 N636-Q1392 (9550237)
反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（L/C[b]併用）					
4 週間	ラット	経口	S+L/C： 0+0/0, 50+80/20, 100+80/20, 150+80/20, 0+80/20	非適用	4.2.3.2-11 SOI0024
4 週間	サル	経口	S+L/C： 0+0/0, 50+80/20, 0+80/20	適用	4.2.3.2-12 SOI0022

＊新薬情報提供時に置き換えた。

試験の種類及び期間	種／系統 又は試験系	投与方法	投与量 （mg/kg/日）[a]／濃度	GLP	CTD 記載箇所 試験番号 (報告書番号)
反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（P 併用）					
1～14 日間	サル	経口	S+P： 25+1, 50+2, 75+3, 0+1, 0+2,0+ 3	非適用	4.2.3.2-15 RE8410 (IMP28941)
反復投与毒性試験：重要な試験（サフィナミド単独）					
4 週間 + 4 週間回復期間	ラット	経口	0, 20, 60, 100, 500	適用	4.2.3.2-02 N814-Q1505 (9750253)
13 週間 + 4 週間回復期間	ラット	経口	0, 15, 30, 80	適用	4.2.3.2-03 7552 IPAS-NW-1015-RTC Prot No. 626/S Vent（トキシコキネティクス報告書） RF3230（病理組織検査再評価報告書）
26 週間 + 8 週間回復期間	ラット	経口	0, 5, 15, 45	適用	4.2.3.2-04 8724, RF3240（病理組織検査再評価報告書）
26 週間 + 6 週間回復期間	ラット	経口	0, 60, 120, 180	適用	4.2.3.2-05 RE6230（IMP28452）, RF3950（電子顕微鏡観察報告書）
4 週間 + 2 週間回復期間	サル	経口	0, 20, 40, 80, 120	適用	4.2.3.2-07 N822-Q1509 (9750107)
13 週間 + 6 週間回復期間	サル	経口	0, 10, 20, 50	適用	4.2.3.2-08 991180 IPAS-NW-1015 (RBM Exp No. 991180)（トキシコキネティクス報告書）
39 週間 + 8 週間回復期間	サル	経口	0, 3.2, 8, 20	適用	4.2.3.2-09 21893TCP
26/39 週間 + 8 週間回復期間	サル	経口	0, 30, 50, 70	適用	4.2.3.2-10 30939TCP 833-001（眼の病理組織検査再評価報告書）
反復投与毒性試験：重要な試験（L/C[b] 併用）					
13 週間 + 4 週間回復期間	ラット	経口	S+L/C： 0+0/0, 25+80/20, 75+80/20, 125+/80/20, 125+0/0, 0+80/20	適用	4.2.3.2-13 SOI0053
13 週間 + 4 週間回復期間	サル	経口	S+L/C： 0+0/0, 50+0/0, 0+40/10, 20+40/10, 50+40/10	適用	4.2.3.2-14 SOI0052
反復投与毒性試験：重要な試験（P 併用）					
13 週間 + 13 週間回復期間	サル	経口	S+P： 0/0, 10/0.4, 10/2, 50/2, 50/0, 0/2	適用	4.2.3.2-16 22972

試験の種類及び期間	種／系統 又は試験系	投与方法	投与量 （mg/kg/日）[a]／濃度	GLP	CTD 記載箇所 試験番号 (報告書番号)
反復投与毒性試験：静脈内投与試験					
1 週間	ラット	静脈内	雄：0, 1.5, 5, 15, 30, 40, 50 雌：0, 1.5, 5, 15, 30, 50, 60	非適用	4.2.3.2-17 RE8520 (IMP28963)
2 週間 + 2 週間回復期間	ラット	静脈内	0, 10, 20, 40	適用	4.2.3.2-18 RE9970 (IMP29396)
1～8 日間 （最大耐量投与）	サル	静脈内	雄：5, 10, 20, 50 雌：5, 10, 20, 30	非適用	4.2.3.2-19 RE8600 (IMP28961)
2 週間 + 2 週間回復期間	サル	静脈内	0, 3, 10, 30	適用	4.2.3.2-20 RE8320 (IMP29153)
遺伝毒性試験					
細菌を用いる遺伝子突然変異試験	in vitro		156.25～5000 µg/プレート	適用	4.2.3.3.1-01 N704-Q1448 (9550240)
哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験	in vitro		1.25～300 µg/mL	適用	4.2.3.3.1-02 8701
哺乳類細胞を用いる DNA 修復試験	in vitro		1～500 µg/mL	適用	4.2.3.3.1-03 N709-Q1452 (9550267)
骨髄小核試験	マウス	経口	0, 250, 500, 1000	適用	4.2.3.3.2-01 8768
がん原性試験					
4 週間（用量設定試験）	マウス	経口	50, 100, 300, 500（9 日目～）	適用	4.2.3.4.1-01 ONP001
13 週間（用量設定試験)	マウス	経口	0, 100, 200, 375/250	適用	4.2.3.4.1-02 ONP002
13 週間（用量設定試験)	ラット	経口	0, 100, 200, 300/250	適用	4.2.3.4.1-03 ONP003
104 週間	マウス	経口	0, 50, 100, 200	適用	4.2.3.4.1-04 ONP004
104 週間	ラット	経口	0, 25, 50, 100	適用	4.2.3.4.1-05 ONP005
生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（サフィナミド単独の用量設定試験）					
胚・胎児発生毒性 （用量設定試験） 妊娠 6～15 日	ラット	経口	0, 200, 300, 400	非適用	4.2.3.5.2-01 9380EXT
胚・胎児発生毒性 （用量設定試験） 妊娠 6～15 日	ラット	経口	0, 50, 100, 150	非適用	4.2.3.5.2-02 12210EXT
非妊娠動物を用いた漸増投与試験（用量設定試験）	ウサギ	経口	0, 15, 30, 90, 270	非適用	4.2.3.5.2-03 9548EXT
胚・胎児発生毒性 （用量設定試験） 妊娠 6～18 日	ウサギ	経口	0, 25, 50, 100, 120	非適用	4.2.3.5.2-04 9381EXT
出生前及び出生後発生並びに母動物の機能 （用量設定試験） 妊娠 6 日～分娩後 20 日	ラット	経口	0, 50, 100, 150	非適用	4.2.3.5.3-01 ONP007
出生前及び出生後発生並びに母動物の機能 （用量設定試験） 妊娠 6 日～分娩後 20 日	ラット	経口	0, 12.5, 25, 37.5, 50	適用	4.2.3.5.3-02 SOI0021

試験の種類及び期間	種／系統 又は試験系	投与方法	投与量 （mg/kg/日）[a]／濃度	GLP	CTD 記載箇所 試験番号 (報告書番号)
生殖発生毒性試験：重要な試験（サフィナミド単独）					
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験					
受胎能及び初期胚の発生 雄：交配 28 日前～交配期間終了の 2 週間後 雌：交配 14 日前～妊娠 6 日	ラット	経口	0, 50, 100, 150	適用	4.2.3.5.1-01 OVZ0006
胚・胎児発生への影響に関する試験					
胚・胎児発生毒性試験 妊娠 6～15 日	ラット	経口	0, 50, 100, 150	適用	4.2.3.5.2-05 9382
胚・胎児発生毒性試験 妊娠 6～18 日	ウサギ	経口	0, 25, 50, 100	適用	4.2.3.5.2-06 19030
出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験					
出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験 妊娠 6 日～分娩後 20 日	ラット	経口	0, 4, 12.5, 37.5	適用	4.2.3.5.3-03 SOI0059
その他の毒性試験：毒性発現の機序に関する試験（胎児毒性）					
出生前及び出生後毒性の機序に関する試験 妊娠 6 日～授乳 20 日	ラット	経口	0, 50	適用	4.2.3.5.3-04 SOI0065
出生前及び出生後毒性の機序に関する試験 妊娠 6～19 日又は授乳 1～20 日	ラット	経口	0, 50	適用	4.2.3.5.3-05 RF0820 (IMP29559.1)
生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（L/C[b]及びサフィナミド併用の用量設定試験）					
胚・胎児発生毒性(用量設定試験) 妊娠 8～17 日	ラット	経口	S+L/C： 0+0/0, 50+80/20, 100+80/20, 150+80/20	非適用	4.2.3.5.2-07 SOI0020
非妊娠動物を用いた用量設定試験 2 週間	ウサギ	経口	S+L/C： 0+80/20, 100/80/20, 200/80/20	非適用	4.2.3.5.2-08 SOI0025
胚・胎児発生毒性（用量設定試験） 妊娠 6～19 日	ウサギ	経口	S+L/C： 0+0/0, 0+80/20, 20+80/20, 40+80/20, 80+80/20, 80+0/0	適用	4.2.3.5.2-09 SOI0045
生殖発生毒性試験：重要な試験（L/C[b]及びサフィナミド併用）					
胚・胎児発生毒性 妊娠 8～17 日	ラット	経口	S+L/C： 0+0/0, 0+80/20, 25+80/20, 50+80/20, 100+80/20, 100+0/0	適用	4.2.3.5.2-10 SOI0057
胚・胎児発生毒性 妊娠 6～19 日	ウサギ	経口	S+L/C： 0+0/0, 0+80/20, 4+80/20, 12+80/20, 40+80/20, 40+0/0	適用	4.2.3.5.2-11 SOI0046
局所刺激性試験					
単回投与	ウサギ	静脈内及び血管周囲組織	0, 5 mg/個体/試験部位	適用	4.2.3.6-01 RF1270 (IMP29611)
単回投与	ウサギ	塗布	0, 500 mg/個体	適用	4.2.3.6-02 N964-Q1568 (9750309)
単回投与	ウサギ	点眼	0, 100 mg/個体	適用	4.2.3.6-03 N965-Q1569 (9850066)

試験の種類及び期間	種／系統 又は試験系	投与方法	投与量 （mg/kg/日）[a]／濃度	GLP	CTD 記載箇所 試験番号 (報告書番号)
その他の毒性試験					
その他の毒性試験：毒性発現の機序に関する試験（網膜変性）					
単回投与	ラット	経口	0, 150	非適用	4.2.3.7.3-01 1209024
2 週間	ラット	経口	50, 100, 150	非適用	4.2.3.7.3-02 SOI0044
2 週間	ラット	経口	S+P：0+0, 50+25, 100+25, 0+25	適用	4.2.3.7.3-03 SOI0055
2 週間 + 2 週間回復期間	ラット	経口	S+P： 0+0, 50+0, 100+0, 100+25	適用	4.2.3.7.3-04 SOI0066
2 週間	ラット	経口	S+P： 0+0, 125+25, 0+25	適用	4.2.3.7.3-05 SOI0064
13 週間	ラット	経口	0, 125	適用	4.2.3.7.3-06 SOI0056
13 週間	ラット	経口	S+P： 0+0, 0+25, 5+25, 15+25, 50+25, 15+0, 50+0	適用	4.2.3.7.3-07 SOI0054
2 週間 + 2 週間回復期間	ラット	経口	S+P： 0+0, 25+0, 125+0, 200+0, 125+25, 0+25	非適用	4.2.3.7.3-08 STC trial 378_10087_[redacted]
1～3 日間 + 2 週間回復期間	ラット	経口	0, 125	非適用	4.2.3.7.3-09 STC trial 378_10092_[redacted]
4 週間	ラット	経口	0, 25, 125	適用	4.2.3.7.3-10 T16169
4 週間	ラット	経口	0, 75, 150	適用	4.2.3.7.3-11 RE8900 (IMP29082)
その他の毒性試験：依存性試験					
身体依存性試験 28 日間＋7 日間観察	ラット	経口	0, 50, 100	非適用	4.2.3.7.4-01 RS1415 4.2.3.7.4-02 RS1425
薬物自己投与試験	サル	静脈内	0, 0.3, 1.0, 1.5/回	非適用	4.2.3.7.4-03 RS1417
d-アンフェタミンとの薬物弁別評価	ラット	経口	0, 50, 100	非適用	4.2.3.7.4-04 RS1414
ミダゾラムとの薬物弁別評価	ラット	経口	0, 50, 100	非適用	4.2.3.7.4-05 RS1426
その他の毒性試験：代謝物の毒性試験					
単回投与毒性試験	ラット	経口	S：800, 1000 NW-1153 及び NW1689：1000	適用	4.2.3.7.5-01 39880
細菌を用いる遺伝子突然変異試験	in vitro		NW-1153：39.1～2500 µg/プレート NW-1689：19.5～5000 µg/プレート	適用	4.2.3.7.5-02 42660
細菌を用いる遺伝子突然変異試験	in vitro		NW-1689 AG 5～5000 µg/プレート	適用	4.2.3.7.5-03 T17788
小核試験	in vitro		NW-1689 AG 0.5～5000 µg/mL	適用	4.2.3.7.5-04 T17789

試験の種類及び期間	種／系統 又は試験系	投与方法	投与量 （mg/kg/日）[a]／濃度	GLP	CTD 記載箇所 試験番号 (報告書番号)
その他の毒性試験：不純物の毒性試験					
2 週間	ラット	経口	類縁物質A*　： 0, 50, 100, 200, 500	非適用	4.2.3.7.6-01 RF3270
4 週間	ラット	経口	類縁物質A*　：0, 25, 50, 100 サフィナミド：100	適用	4.2.3.7.6-02 RF3280
細菌を用いる遺伝子突然変異試験	in vitro		類縁物質B*： 5～5000μg/プレート 類縁物質C*： 5～5000 μg/プレート	非適用	4.2.3.7.6-03 T17514
V79 哺乳類細胞を用いる小核試験	in vitro		類縁物質C* 5～1580 μg/プレート	非適用	4.2.3.7.6-04 T17515
細菌を用いる遺伝子突然変異試験	in vitro		類縁物質A* 5～5000 μg/プレート	適用	4.2.3.7.6-05 T17900
V79 哺乳類細胞を用いる小核試験	in vitro		類縁物質A* 0.5～5000 μg/プレート	適用	4.2.3.7.6-06 T17938
製剤中不純物に対する変異原性ハザード評価	in silico		製剤中不純物（27 化合物）	非適用	4.2.3.7.6-07 S21461
その他の毒性試験：光毒性に関する試験					
吸収スペクトル	in vitro		サフィナミド：0.05 mg/mL NW-1153：0.05 mg/mL NW-1689：0.005 mg/mL	非適用	4.2.3.7.7-01 1208053
a =サフィナミドとしての用量（mg/kg/日） b = L/C は 1 日 2 回投与。1 回目はサフィナミドと同時に投与し、2 回目の投与は約 4 時間後に行った。 S =サフィナミド　P =プラミペキソール L =レボドパ　C =カルビドパ					

2.6.6.1.1 単回投与毒性

2.6.6.1.1.1 ラット

経口投与（500、1000、1500 及び 2000 mg/kg）では投与 5 時間以内又は投与 2～5 日に死亡が認められ、最小致死量は雄で 1500 mg/kg、雌で 1000 mg/kg であった。静脈内投与（25、40、70 及び 100 mg/kg）では投与直後に死亡が認められ、最小致死量は雄で 40 mg/kg、雌で 25 mg/kg であった。いずれの投与経路においても全てのサフィナミド群で、呼吸困難、自発運動低下、不安定歩行等がみられた。

2.6.6.1.1.2 サル

非げっ歯類を用いた単回投与毒性試験は実施しなかったが、サルを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験の結果からサフィナミドの急性毒性を考察した。

4 週間反復経口投与毒性試験は 2 試験（50、100 及び 200 mg/kg/日、並びに 20、40、80 及び 120 mg/kg/日）を実施し、80 mg/kg/日以上の群で投与 11～14 日目に、200 mg/kg/日群では投与初日から死亡がみられた。80 mg/kg/日以上の群では、投与初日から歩行失調、平衡感覚の消失等がみられ、80 mg/kg/日以上の群では痙攣も認められた。

静脈内投与用量漸増試験（5、10、20、30 及び 50 mg/kg をそれぞれ 1、8、1、3 及び 1 日間投与）では、最高用量の 50 mg/kg まで死亡はみられなかった。一般状態観察では、50 mg/kg を投与した約 5 分後に著しい協調運動障害、頻呼吸及び散瞳がみられた。

＊新薬情報提供時に置き換えた。

2.6.6.1.2 反復投与毒性（サフィナミド単独）

2.6.6.1.2.1 ラット

重要な試験として 4、13 及び 26 週間反復経口投与毒性試験を実施した。

4 週間反復経口投与毒性試験（20、60、100 及び 500 mg/kg/日）では、500 mg/kg/日群に中枢神経毒性に起因すると考えられる死亡及び瀕死がみられた。同群では、自発運動の低下、歩行異常及び呼吸困難がみられ、体重増加量及び摂餌量が減少した。死亡例及び安楽殺例の病理組織学的検査では、副腎皮質に過形成、肺及び腸間膜リンパ節に泡沫状マクロファージの浸潤等が認められた。副腎皮質の過形成は 100 mg/kg/日群の雌にもみられた。60 及び 100 mg/kg/日群では病理組織学的検査において肝細胞の脂肪性変化が認められ、雌では肝臓重量の増加もみられた。血液生化学検査では、20、60 及び 100 mg/kg/日群の雌にトリグリセリドの増加がみられ、60 及び 100 mg/kg/日群では ALP の上昇、100 mg/kg/日群では ALT の上昇もみられた。これらの変化は、肺における泡沫状マクロファージの浸潤を除き休薬により回復した。

13 週間反復経口投与毒性試験（15、30 及び 80 mg/kg/日）では、80 mg/kg/日群の雌に副腎の絶対重量の増加がみられた。30 mg/kg/日群の雄及び 80 mg/kg/日群の雌雄では、肝臓の絶対及び相対重量が増加し、ALP の上昇、総コレステロールの増加、トリグリセリドの増加及び／又はグルコースの減少がみられたが、病理組織学的検査において変化は認められなかった。これらの変化はいずれも休薬により回復又は回復傾向を示した。その他に、15 mg/kg/日群の雄を除く全てのサフィナミド群に網膜外層の菲薄化が認められたが、げっ歯類に特異的な変化と考えられた。

26 週間反復経口投与毒性試験 2 試験（5、15 及び 45 mg/kg/日、並びに 60、120 及び 180 mg/kg/日）では、180 mg/kg/日群に自発運動の低下及び立毛が認められ、体重の増加抑制もみられた。病理組織学的検査では、60、120 及び 180 mg/kg/日群において肺胞に泡沫状マクロファージの浸潤巣が用量依存的に認められ、電子顕微鏡検査を実施したところ、肺胞マクロファージの細胞質に同心円状のミエリン様封入体がみられ、リン脂質代謝異常が示唆された。120 mg/kg/日以上の群では、副腎の腫大及び重量増加がみられ、病理組織学的検査では副腎皮質束状帯の肥大が認められた。また、60 mg/kg/日以上の雌雄で肝臓の相対重量が増加し、60 mg/kg/日群の雄及び 120 mg/kg/日以上の群の雌雄に小葉中心性の肝細胞肥大が認められたが、肝薬物代謝酵素誘導に伴う二次的な変化と考えられた。これらの変化はいずれも休薬により回復又は回復傾向を示した。その他に、眼科学的検査で 60 mg/kg/日以上の群に眼底の血管新生がみられ、病理組織学的検査では 45 mg/kg/日以上の群にびまん性の網膜萎縮が認められたが、げっ歯類に特異的な変化と考えられた。

2.6.6.1.2.2 サル

重要な試験として 4、13 及び 26/39 週間反復経口投与毒性試験を実施した。

4 週間反復経口投与毒性試験（20、40、80 及び 120 mg/kg/日）では、80 及び 120 mg/kg/日群に死亡がみられた。同群では、生存例も含めて平衡感覚の消失等が認められ、死亡例では痙攣もみられたことから、死亡は中枢神経毒性に起因すると考えられた。40 mg/kg/日以上の群で副腎皮質の過形成がみられ、120 mg/kg/日群では副腎重量が増加した。また、80 及び 120 mg/kg/日群では雄で ACTH 濃度が増加し、雌ではコルチゾール濃度が減少したが、障害性の組織変化はみられなかった。80 及び 120 mg/kg/日群では、病理組織学的検査において腎尿細管の拡張がみられ、雌では軽微な好塩基性変化が認められた。80 mg/kg/日群の雄及び 120 mg/kg/日群の雌雄では BUN 及びクレアチニンの増加も認められた。死亡例のリンパ節、脾臓及び胸腺、並びに 120 mg/kg/日群の生存した雌 1 匹の胸腺に泡沫状マクロファージの浸潤が観察された。生存例にみられた変化はいずれも休薬により回復又は回復傾向を示した。

13 週間反復経口投与毒性試験（10、20 及び 50 mg/kg/日）では、50 mg/kg/日群の 1/6 例を一般状態の悪化により安楽死させた。同個体では摂餌量及び体重の減少がみられ、剖検及び病理組織学的検査では胃粘膜に糜爛が認められ、この変化が一般状態悪化の原因と考えられた。胃粘膜の糜爛は、20 及び 50 mg/kg/日群の生存例でも 1～2 例に認められた。20 及び 50 mg/kg/日群では、副腎の絶対及び相対重量が増加したが、病理組織学的検査において変化はみられなかった。これらの変化はいずれも休薬により回復又は回復傾向を示した。

26/39 週間反復経口投与毒性試験（30、50 及び 70 mg/kg/日）では、70 mg/kg/日群の雌 1/10 例が平衡感覚の消失、間代性筋攣縮及び散瞳等の中枢神経症状を重度に示した後に死亡した。病理組織学的検査において標的臓器を示す変化がなかったことから、死因は中枢神経毒性に起因すると考えられた。70 mg/kg/日群では生存例においても間代性筋攣縮、振戦、協調運動の異常等がみられ、さらに少数例に横臥位、腹臥位、筋緊張の低下等が認められた。また、同群では嘔吐、軟便及び水様便がみられ、体重の増加抑制も認められた。これらの変化はいずれも休薬により回復した。

2.6.6.1.3 反復投与毒性（レボドパ／カルビドパ又はプラミペキソール併用）

2.6.6.1.3.1 レボドパ／カルビドパ併用

ラットにサフィナミド（25、75 及び 125 mg/kg/日）とレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）を併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験では、サフィナミド単独群で血小板数の減少、総コレステロールの減少、ALT、BUN 及びアルブミン/グロブリン比の上昇等が認められた。総コレステロール及びアルブミン/グロブリン比に関しては、レボドパ／カルビドパとの併用により僅かな増強がみられた。また、眼科学的検査においては併用群の雌 2 例で眼底反射亢進が両側性に認められた。その他の検査において、併用群とサフィナミド単独群の間に差はみられなかった。

サルにサフィナミド（20 及び 50 mg/kg/日）とレボドパ／カルビドパ（第 1～14 日：80/20 mg/kg/日、第 15 日以降：40/10 mg/kg/日）を併用投与した 13 週間併用投与試験では、サフィナミド投与による摂餌量の減少並びに心拍数の減少及び洞性徐脈、レボドパ／カルビドパ投与による異常行動がみられたが、いずれの変化についても併用投与による増強は認められなかった。

また、ラット、サルいずれにおいても、サフィナミドとレボドパ／カルビドパの併用により新たな毒性は発現しないと考えられた。

2.6.6.1.3.2 プラミペキソール併用

有色素ラット及びアルビノラットにサフィナミド（5、15、50 mg/kg/日）をプラミペキソール 25 mg/kg/日と併用投与した 13 週間反復経口投与毒性試験では、サフィナミドの有無に関わらずプラミペキソールを投与した群に体重増加抑制がみられた。サフィナミド 50 mg/kg/日単独投与で認められた副腎の皮質肥大及び重量増加並びに肺の泡沫状マクロファージ集簇巣は、プラミペキソールの併用により増強された。また、アルビノラットではサフィナミド 50 mg/kg/日単独群でみられた外顆粒層の核の減少及び視細胞層の萎縮は、プラミペキソールとの併用により増強傾向が認められた。同様の眼の変化は、有色素ラットにおけるサフィナミド単独群では認められずサフィナミド／プラミペキソール 50/25 mg/kg/日併用群でのみ認められた。

サルにサフィナミド／プラミペキソールを併用投与（10/0.4、10/2 及び 50/2 mg/kg/日）した 13 週間反復経口投与毒性試験では、サフィナミド 50 mg/kg/日単独投与により嘔吐及び一過性の体重減少がみられ、プラミペキソール 2 mg/kg/日単独投与では消耗性の反復行動（常同運動）／昇降動作（不

穏）が認められた。これらの変化はいずれもサフィナミド／プラミペキソール 50/2 mg/kg/日の併用投与においてもみられたが、単独投与による変化と同程度であった。

また、ラット、サルいずれにおいても、サフィナミドとプラミペキソールの併用により新たな毒性は発現しないと考えられた。

2.6.6.1.4 遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異試験では、サフィナミド 156.25～5000 µg/plate の濃度で *S. typhimurium* 及び *E. coli* を処理したところ、代謝活性化の有無に関わらず復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

L5178Y $TK^{+/-}$マウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験では、代謝活性化の有無に関わらず、評価した 1.25～300 µg/mL のいずれの用量においても、突然変異誘発頻度の上昇は認められなかった。

ラット初代肝細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成試験では、サフィナミドの高濃度（100 及び 500 µg/mL）において強い細胞障害性がみられたため、1、5、10 及び 50 µg/mL の濃度で観察を実施したところ、いずれの濃度においても不定期 DNA 合成量の増加は認められなかった。

マウスを用いた骨髄小核試験では、サフィナミドを 0、250、500 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与したところ、500 mg/kg 以上の群では重度の一般状態悪化が観察され、1000 mg/kg 群では死亡が認められた（雄 3/10 例、雌 4/10 例）。1000 mg/kg/日の 24 時間処理群では、対照群と比較して小核を有する幼若赤血球数及びその比率に差は認められなかったが、同用量の 48 時間処理群において小核を有する幼若赤血球数の僅かな増加が認められた。1000 mg/kg（48 時間処理）の追加試験の結果、対照群と比較して小核を有する幼若赤血球数に有意な増加は認められなかったことから、サフィナミドは小核誘発性を示さないと考えられた。

以上の結果から、サフィナミドは遺伝毒性を示さないと考えられた。

2.6.6.1.5 がん原性

CD-1 マウスにサフィナミド（50、100 及び 200 mg/kg/日）を 104 週間反復経口投与した結果、いずれの群においても腫瘍性病変の増加はみられなかった。また、Sprague Dawley ラットにサフィナミド（25、50 及び 100 mg/kg/日）を 104 週間反復経口投与した結果においてもサフィナミド投与による腫瘍性病変の増加はみられなかった。

以上の結果、マウス及びラットを用いたがん原性試験においてサフィナミドのがん原性は認められなかった。

2.6.6.1.6 生殖発生毒性

2.6.6.1.6.1 サフィナミド単独

雌雄ラットに交配前から交配後、さらに雌では妊娠 6 日目までサフィナミド（50、100 及び 150 mg/kg/日）を投与した受胎能及び着床までの初期胚発生毒性試験では、サフィナミドは雄の受胎能に影響を及ぼさなかった。雌においては 150 mg/kg/日群に黄体数及び着床数の軽度の減少がみられたが、初期胚発生に対する影響は認められなかった。

ラットの器官形成期にサフィナミド（50、100 及び 150 mg/kg/日）を投与した胚・胎児発生毒性試験では、50 mg/kg/日以上の群の胎児に異所性精巣がみられ用量に応じて発現が増加した。100 及び 150 mg/kg/日群においては泌尿器系の異常（尿管拡張、屈曲尿管発現率の上昇）がみられた。また、100 mg/kg/日以上で極度の腎盂拡張が少数例で認められたことから催奇形性の可能性が示唆された。

ウサギの器官形成期にサフィナミド（25、50 及び 100 mg/kg/日）を投与した胚・胎児発生毒性試験では、100 mg/kg/日群の胎児で骨格異常（第 13 肋骨出現、両側腰帯の第 2 仙椎への挿入）の発現率が増加したが、母動物毒性（痙攣等）による影響と考えられた。

ラット出生前及び出生後の発生毒性試験（4、12.5 及び 37.5 mg/kg/日）では、37.5 mg/kg/日群の出生児では対照群と比較して分娩 1～4 日目までの死亡率が高く、腹部の膨満、皮膚及び頭蓋骨の黄色／橙色化が認められた。頭蓋骨の橙色化は、21 日齢において回復傾向であった。

出生児における皮膚及び頭蓋骨の黄色／橙色化に関して、出生児を用いた追加検討の結果、4 日齢の出生児でビリルビン及び AST の著明な上昇がみられ、ALT、BUN 及びクレアチニンの上昇もみられた。また、病理組織学的所見では軽微又は軽度のびまん性の肝細胞肥大、胆管上皮肥大、多巣性肝細胞壊死及び胆管炎／胆管周囲炎が認められたことから、出生児にみられた皮膚の黄色／橙色化及び頭蓋骨の橙色化は、サフィナミドの投与に関連した肝胆道系障害による血漿中ビリルビンの著しい増加に起因した変化と考えられた。

2.6.6.1.6.2 レボドパ／カルビドパ併用

ラットの器官形成期にサフィナミド（25、50 及び 100 mg/kg/日）とレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）を併用投与したところ、それぞれの単独投与群でみられた内臓異常及び骨格異常と同様の変化が認められ、併用投与により発現率の上昇がみられた。

ウサギの器官形成期におけるサフィナミド（4、12 及び 40 mg/kg/日）及びレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）との併用投与試験では、レボドパ／カルビドパ単独群において重度の心血管異常の発現率が増加した。同様の変化はサフィナミドとの併用群においても認められ、同群では心臓奇形及び胎児死亡率の上昇もみられた。

2.6.6.1.7 その他の毒性試験

2.6.6.1.7.1 局所刺激性

ウサギにサフィナミドを静脈内又は血管周囲に単回投与して局所刺激性を評価したところ、静脈内に投与した場合の忍容性は良好であった。一方、血管周囲へ投与された場合には、血管周囲組織に対して軽度の炎症が認められた。また、ウサギでの眼刺激性及び急性皮膚刺激性試験から、サフィナミドは眼に対して重度の刺激性を有するが、皮膚に対しては刺激性はないことが示された。

2.6.6.1.7.2 毒性発現の機序に関する試験

ラット反復毒性試験で認められた網膜変性について、変化の特徴及び毒性発現の機序に関して種々試験を実施した。

サフィナミド（0、150 mg/kg）の単回経口投与 1 時間後のラット網膜におけるドパミン、その代謝物 3,4-dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）及び homovanillic acid（HVA）の濃度は、対照群と比較して変動はなかったことから、モノアミン酸化酵素 B（MAO-B）阻害作用を介したドパミン及びドパミン代謝産物により神経細胞へ有害作用が及ぶ可能性は低いと考えられた。

サフィナミドによる網膜変性についてアルビノ及び有色素ラットに対する影響を比較検討した。サフィナミド（0、125 mg/kg/日）を 13 週間反復経口投与したところ、血漿及び脂肪中における曝露量は両系統で同程度であったが、網膜における曝露量はアルビノラットと比較し有色素ラットで顕著に高かった。病理組織学的検査において、両系統で網膜萎縮がみられ時間経過とともに程度が進行した。

両系統ともに、Azure II-Methylene blue-basic Fuchsin（AmbF）染色した準超薄網膜切片の光学顕微鏡観察では顆粒層の萎縮等が認められ、電子顕微鏡観察では桿体細胞核凝縮、外節円板変性、網膜色素上皮における細胞内脂肪滴様封入体及び貪食活性の亢進等が認められた。網膜中濃度に違いがあったものの、両系統における網膜萎縮は同程度であった。

網膜評価における網膜電図（ERG）検査及び分光型光干渉断層撮影（SD-OCT）の有用性を検討するため、雌性有色素ラットにサフィナミド及びプラミペキソール（サフィナミド／プラミペキソール：0/0、25/0、125/0、200/0、0/25、125/25 mg/kg/日）を 15 日間反復経口投与し、その後 55 日間休薬させた。その結果、ERG 検査では桿体と錐体で影響（b 波頂点潜時・振幅、V-logI 関数、19.53Hz フリッカー応答等）が 200/0、125/25 及び 125/0 群にみられ、b 波振幅を除く各パラメータは休薬後に概ね回復した。ERG 検査で変化を示したラットにおいて、SD-OCT 検査及び病理組織学的検査で網膜の中央に損傷領域がみられたが、休薬による回復は認められなかった。以上の結果から、ERG 及び SD-OCT 検査は網膜の機能的及び形態学的な変化を早期に検出するための臨床マーカーとなり得ると考えられた。

ERG における影響について有色素ラットを用いて追加検討した結果、ERG 検査でみられた桿体応答（ERG 振幅の減少）は、125 mg/kg の投与 12 時間後より僅かな変化がみられ、2 又は 3 回の反復投与後には振幅の顕著な減少及び頂点潜時の延長がみられたが、休薬後に回復性を示した。一方、光によるブリーチングを行った場合には、視細胞色素再生時間の延長がみられ、休薬期間後も完全には回復しなかった。電子顕微鏡検査では、2 及び 3 回目投与後に視細胞内節及び外顆粒層の損傷が認められたが、休薬期間後に病変は観察されなかった。以上の結果から、ラット網膜においてサフィナミドは、主として視細胞桿体機能あるいは網膜色素上皮細胞との相互作用に関連しており、視細胞錐体機能への影響は少ないと考えられた。

網膜の経時的変化を検討するため、有色素ラットにサフィナミド（25 及び 125 mg/kg/日）を 4 週間反復経口投与した。Hematoxilin-Eosin（HE）染色による光学顕微鏡検査では 125 mg/kg/日群において投与 7 日以降に網膜外顆粒層の核の数がわずかに減少したが、AmbF 染色準超薄切片の光学顕微鏡観察では、3 日間以上の反復投与により視細胞及び外顆粒層の萎縮がみられ、電子顕微鏡観察では、単回投与 24 時間後に視細胞層内節における変性が認められ、経日的に内節の変性／壊死が進行し、内節外節接合部分及び外節/円板の崩壊が続いた。以上の結果から、サフィナミドは単回投与 24 時間後から網膜へ影響を及ぼし、反復投与により増強すると考えられた。

光曝露が及ぼす影響について評価するため、光線強度が異なる 2 条件下（強及び弱光度）においてアルビノラットにサフィナミド（75、150 mg/kg/日）を 4 週間反復経口投与したところ、強光度照射群のみで眼科学的検査において眼底血管径の縮小及び淡色化がみられた。また、病理組織学的検査では網膜外顆粒層の核の減少が全てのサフィナミド群でみられたが、弱光度照射と比較して強光度照射群でより発生率及び程度が高かった。

2.6.6.1.7.3 依存性

ラットを用いた身体依存性試験において、休薬期間中の体重推移、摂餌量及び一般状態に変化はなく、身体依存性を示唆する兆候はみられなかった。また、アカゲザルを用いた薬物自己投与試験において、明らかな強化効果はみられず、*d*-アンフェタミン又はミダゾラムと生理食塩水との薬物弁別が

成立したラットを用いた薬物弁別試験においても、サフィナミドはいずれの薬物にも般化を示さなかった。これらの結果から、サフィナミドに明らかな精神依存性は認められなかった。

2.6.6.1.7.4 代謝物の毒性評価

NW-1153 及び NW-1689 をそれぞれ 1000 mg/kg ラットに単回経口投与した結果、円背位、運動失調及び立毛が認められたが、投与 2 日目には回復し重度の毒性作用が現れないことが示唆された。また、NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG は、細菌を用いる復帰突然変異試験においていずれも変異原性を示さなかった。さらに NW-1689AG は哺乳類細胞を用いた in vitro 小核試験において、小核を有する細胞の増加は認められなかった。

NW-1689AG はサルでの反復投与薬物動態試験（2.6.4.3.9）において、サフィナミドの 13 週及び 26/39 週間反復毒性試験で用いた投与量レベル（10～50 mg/kg/日）で生成されることが示されており、NW-1689AG はサフィナミドを投与した毒性試験において十分曝露されたと考えられた。

以上の結果から、NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG は、安全性の懸念はないと考えられた。

2.6.6.1.7.5 不純物の毒性評価

類縁物質D* は、サフィナミド原薬及び製剤中に[redacted]又は[redacted]として存在する。また、類縁物質D* 及び 類縁物質A* の規格値は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH） Q3A 及び ICH Q3B ガイダンスで規定された閾値以上であるため、これらの安全性を評価した。類縁物質D*（1000 mg/kg）のラット単回投与毒性試験の結果、投与日に円背位、運動失調及び立毛が認められたが 2 日目には回復し、重度の毒性は現れなかった。また復帰突然変異試験において 類縁物質D* の変異原性は認められなかった。また、 類縁物質A* は、4 週間反復経口投与毒性試験（25、50、100 mg/kg/日）において良好な忍容性を示し、細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いる小核試験においても陰性であった。

[redacted]である 類縁物質B* （[redacted]）は復帰突然変異試験の結果、復帰変異コロニー数の増加が認められた。[redacted]である 類縁物質C* （[redacted]）は、復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いた小核試験において変異原性を示さなかった。

サフィナミド製剤中に含まれる可能性のある不純物について、「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理」ガイドライン（ICH-M7）に従って、データベース検索及び in silico 毒性予測(Q)SAR 法によるハザード評価を実施した。その結果、不純物* 類（ 不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C* ）をクラス 1、 類縁物質B* をクラス 2 に分類した。

2.6.6.1.7.6 光毒性

サフィナミド及びその代謝物（NW-1153 及び NW-1689）は 290～700 nm の領域で吸収を示さなかったことから、光毒性の懸念はないと考えられる。

＊新薬情報提供時に置き換えた。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラットを用いたサフィナミドの単回経口投与毒性試験

【2.6.7.5】：4.2.3.1-01：N833-Q1511（対応する報告書番号 9750086）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 5 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、500、1000、1500 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し、14 日間の観察期間を設けた。本試験では、一般状態観察、体重測定及び剖検を実施した。

その結果、1500 mg/kg の雄 1 匹、1000、1500 及び 2000 mg/kg の雌各 1 匹が投与 5 時間以内に死亡し、1500 mg/kg の雄 1 匹、2000 mg/kg の雄 2 匹及び 2000 mg/kg の雌 3 匹が投与 2～5 日目に死亡した。剖検の結果、投与 5 時間以内に死亡した動物では変化はみられなかったが、投与 2～5 日目に死亡した動物では、脾臓の小型化、胃及び膀胱の顕著な拡張が認められた。

一般状態観察では、全てのサフィナミド投与群で、投与数分後から呼吸困難、自発運動低下及び不安定歩行がみられ、1000 mg/kg 以上の群では、鎮静及び虚脱が観察された。生存例ではこれらの変化は投与 5～10 日後までに消失した。1000 mg/kg 以上の群では投与 4 日目に体重増加抑制がみられたが、観察期間中に徐々に回復した。生存例の剖検では、変化は認められなかった。

以上の結果から、サフィナミドの単回経口投与による最小致死量は雄で 1500 mg/kg、雌で 1000 mg/kg であった。

2.6.6.2.2 ラットを用いたサフィナミドの単回静脈内投与毒性試験

【2.6.7.5】：4.2.3.1-02：N832-Q1510（対応する報告書番号 9750085）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 5 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、25、40、70 及び 100 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、14 日間の観察期間を設けた。本試験では、一般状態観察、体重測定及び剖検を実施した。

その結果、25 mg/kg 群の雌 1 匹、40 mg/kg 群の雄 2 匹、70 mg/kg 群の雄 2 匹及び雌 1 匹、100 mg/kg 群の雄 4 匹及び雌 5 匹が投与直後に死亡した。全てのサフィナミド投与群で、投与直後から一過性の中枢神経性所見（呼吸困難、不安定歩行及び活動性の低下、及び虚脱）がみられ、いずれも 4 時間以内に完全に回復した。剖検では、死亡動物を含むすべての動物に変化は認められなかった。

サフィナミドの単回静脈内投与による最小致死量は雄で 40 mg/kg、雌で 25 mg/kg であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラットを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-01：N596-Q1354（対応する報告書番号 9550005）（参考資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 10 匹/群）に 0（媒体対照）、50、100 及び 200 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 4 週間反復経口投与した。本試験では、一般状態観察、体重、摂餌量及び摂水量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、肝臓組織の総コレステロール及びトリグリセリド濃度測定（3 匹/群）、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。さらに、同じ動物における投与初日及び投与 22 日目の全身曝露を評価した（雌雄各 3 例/群）。

200 mg/kg/日群の雄で体重増加量の減少がみられた。摂餌量は 200 mg/kg/群の雌雄で投与 8 日目に一過性に減少した。

血液学的検査では 200 mg/kg/群に血小板数の僅かな減少がみられ、雌では白血球数の増加も認められた。

血液生化学的検査では、200 mg/kg/日群の雌雄に ALT、ALP 及び総ビリルビンの上昇がみられ、総コレステロール、リン脂質及び総タンパクの減少が認められた。さらに雄ではグルコース及びトリグリセリドの減少も認められた。グルコース及びトリグリセリドの減少は 100 mg/kg/日群の雄においても認められた。50 mg/kg/日群の雌では、トリグリセリドの増加及び総ビリルビンの減少がみられた。

剖検において、200 mg/kg/日群では肝臓の絶対重量の増加を伴う腫大がみられ、病理組織学的検査では小葉中心性肝細胞肥大及び肝細胞脂肪化が観察された。肝細胞脂肪化は 100 mg/kg/日群の雄でも認められた。

50 mg/kg/日以上の雌及び 200 mg/kg/日の雄で、副腎に腫大がみられ、副腎重量は用量依存的に増加した。病理組織学的検査において、これらの群に副腎皮質の肥大がみられ、100 及び 200 mg/kg/日群の雌では皮質のうっ血、200 mg/kg/日群の雌ではびまん性皮質細胞変性も認められた。

その他の変化として、血液生化学検査において 100 mg/kg/日以上の雌雄で BUN の増加がみられ、200 mg/kg の雌においてクレアチニンの減少が認められた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}8h}$ は用量に応じて増加した。50 mg/kg/日群では、雌の $AUC_{0\text{-}8h}$ が雄と比較してやや高かった。

以上の結果から、びまん性肝細胞脂肪化に基づき本試験の NOAEL は 50 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.2 ラットを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

【2.6.7.7.A】：4.2.3.2-02：N814-Q1505（対応する報告書番号 9750253）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 15 匹/群）に 0（媒体対照）、20、60、100 及び 500 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 4 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、一部の動物（雌雄各 5 匹/群）についてはその後 4 週間の休薬期間を設け回復性についても検討した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学検査（コルチコステロン測定含む）、尿検査、眼科学的検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。また、サテライト群（雌雄各 6 匹/群）を設け、全身曝露についても評価した。

500 mg/kg/日群では、雌 9 匹及び雄 6 匹が、第 5 日から第 14 日までに死亡又は瀕死安楽殺となった。同群では、自発運動の低下、歩行異常及び呼吸困難の症状がみられ、体重増加量及び摂餌量の減少も認められたため、トキシコキネティクス群を含め雌は第 10 日、雄は第 11 日に投与を中止し、回

復性を検討する雌雄各 2 匹を除いて安楽殺した。死亡例及び安楽殺例の病理組織学的検査において、副腎皮質の過形成､肺及び腸間膜リンパ節における泡沫状マクロファージの浸潤などの変化が認められたが、これらの変化は肺における泡沫状マクロファージの浸潤を除き休薬により回復した。

血液生化学検査において、雌では 20、60 及び 100 mg/kg/日群にトリグリセリドの増加がみられ、60 及び 100 mg/kg/日群では ALP の上昇、100 mg/kg/日群では ALT の上昇も認められた。また、60 及び 100 mg/kg/日群の雌雄では病理組織学的検査においてびまん性肝細胞脂肪化及びびまん性肝細胞空胞化が認められ、雌では肝臓重量の増加もみられた。

100 mg/kg/日群の雌では副腎にびまん性皮質過形成が観察されたほか、60 mg/kg/日群以上の雌雄に BUN の増加がみられた。以上の変化は休薬期間中に完全に回復した。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、単回投与と比べて反復投与で高い傾向がみられた。

以上の結果から、肝臓の病理組織変化に基づき本試験の NOAEL は 20 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.3 ラットを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

【2.6.7.7.B】：4.2.3.2-03-01：7552（評価資料）
4.2.3.2-03-02：RF3230（病理組織検査再評価報告書）（評価資料）
4.2.3.2-03-03： IPAS-NW-1015 (RTC Prot No.626/S Vent)
（トキシコキネティクス報告書）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 12 匹/群）に 0（媒体対照）、15、30 及び 80 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 13 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、対照群及び 80 mg/kg/日群については 4 週間の休薬期間を設け（雌雄各 5 匹/群）、回復性についても検討した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。加えて、肝臓、肺、副腎、骨髄、ハーダー腺、腸間膜リンパ節、下垂体、小腸及び脾臓に関して病理組織学検査の再評価を実施した。またサテライト群（雌雄 8 匹/群）を設け、全身曝露についても評価した。

80 mg/kg/日群の雄 2 匹が誤投与のために死亡した。

血液生化学検査において、30 及び 80 mg/kg/日群では雌に総コレステロールの増加、雄にグルコースの減少がみられ、80 mg/kg の雌ではトリグリセリドの増加及び ALP の上昇もみられた。30 mg/kg/日群の雄及び 80 mg/kg/日群の雌雄では、肝臓の絶対及び相対重量が増加した。

80 mg/kg/日群の雌では副腎の絶対重量の増加がみられた。

30 mg/kg/日群の雄及び 80 mg/kg/日群の雌雄に軽度な BUN の増加がみられ、80 mg/kg/日群の雄ではクレアチニンの増加も認められ、腎臓の絶対及び相対重量の増加が 80 mg/kg/日群の雌に認められた。BUN 及びクレアチニンの増加は軽度であり、組織学的な変化を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

これらの変化は BUN を除き休薬により回復又は回復傾向を示した。

病理組織学的検査において、15 mg/kg/日群の雄を除くすべてのサフィナミド投与群で用量依存的に網膜萎縮が認められた。サルでは同様の変化はみられず、臨床試験においても投与に起因する変化は報告されていないことから、この網膜萎縮はげっ歯類に特異的な変化と考えられた。

トキシコキネティクスの結果、用量の増加に伴った C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の増加がみられ、曝露量に明らかな性差は認められなかった。

結論として、15 mg/kg/日群から網膜萎縮が認められたため、本試験の NOAEL は 15 mg/kg/日未満と判断した。なお、げっ歯類に特異的な変化と考えられる網膜萎縮を除いた場合の本試験の NOAEL は 80 mg/kg/日である。

2.6.6.3.4 ラットを用いたサフィナミドの 26 週間反復経口投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

【2.6.7.7.C】：4.2.3.2-04-01：8724（評価資料）
4.2.3.2-04-02：RF3240（病理再評価）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 15 匹/群）に 0（媒体対照）、5、15 及び 45 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 26 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、対照群及び 45 mg/kg/日群については 8 週間の休薬期間を設け（雌雄各 5 匹/群）、回復性についても評価した。本試験では、死亡率、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、臓器重量測定、剖検、病理組織学的検査を実施した。加えて、眼、副腎、肝臓及び肺については病理組織学的所見の信頼性を高めるため再評価を実施した。サテライト群（雌雄各 8 匹/群）を設け、全身曝露についても評価した。

対照群雌 1 例（第 173 日）、5 mg/kg/日群の雄 1 例（第 143 日）、45 mg/kg/群の雌 1 例（第 51 日）が死亡した。これらの動物の死因は特定されなかったが、投与に関連する組織学的な変化はみられず、用量反応性もないことから、サフィナミドとの関連はないと考えられた。また、15 mg/kg/日群の雌 1 例及び 45 mg/kg/日群の雄 1 例が 26 週の採血操作により死亡した。

45 mg/kg/日群の雌 1 例で自発運動の低下、円背位及び運動失調が一過性にみられたことを除き、サフィナミドを投与した動物で一般状態に変化はみられなかった。

45 mg/kg/日群にクレアチニンの増加がみられた。雌では BUN の増加も認められ、腎臓重量（絶対及び相対）が増加した。そのほか、45 mg/kg/日群では、雌にトリグリセリドの増加、ビリルビンの減少、心臓重量の減少がみられた。これらの変化は休薬により回復し、組織学的変化を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

病理組織学的検査において、45 mg/kg/日群に網膜萎縮（対照群では外顆粒層の核の数は一般に 10～11 であるのに対し、2～3 個まで消失）が認められた。この変化は雄よりも雌で主に観察され、休薬による回復性は認められなかった。網膜萎縮は、サルではみられず、国内外の臨床試験において同様の変化は報告されていないことから、げっ歯類特異的な変化と考えられた。再評価を含め、その他の臓器は全て正常範囲内であった。

トキシコキネティクスにおいて、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、単回投与と比較して反復投与で高くなった。また、雄と比較して雌の曝露量がやや高かった。

以上の結果から、一般状態の変化は一過性であったこと、血液生化学的検査の所見は軽度であり肝臓及び腎臓に関連した組織学的な変化を伴っていないことから、45 mg/kg/日群で認められた網膜萎縮に基づき本試験の NOAEL は 15 mg/kg/日と判断した。なお、げっ歯類に特異的な変化と考えられる網膜萎縮を除いた場合の NOAEL は 45 mg/kg/日である。

2.6.6.3.5 ラットを用いたサフィナミドの 26 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

【2.6.7.7.D】：4.2.3.2-05-01：RE6230（対応する報告書番号 IMP28452）（評価資料）
4.2.3.2-05-02：RF3950（電子顕微鏡報告書）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 12 匹/群）に 0（媒体対照）、60、120 及び 180 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 26 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、6 週間の休薬期間を設け（雌雄各 6 匹/群）回復性についても評価した。本試験では、死亡率、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施し、180 mg/kg/日群の雌 3 例については肺検体の電子顕微鏡観察も実施した。また、サテライト群（媒体対照群：雌雄 9 匹/群、サフィナミド群：雌雄 15 匹/群）を設け、サフィナミド及び代謝物 NW-1689 の全身曝露についても評価した。

60 mg/kg/日群の雄 3 例、120 mg/kg/日群の雌 1 例及び 180 mg/kg/日群の雌雄各 2 例が死亡したが、病理所見からいずれも誤投与によるものと思われた。

一般状態観察では、180 mg/kg/日群に自発運動低下及び立毛が認められ、化合物の味に起因すると思われる流涎が一過性にみられた。この群では軽度から中等度の体重増加抑制もみられた。

眼科学的検査では、全ての用量で眼底部の血管新生がみられた。この変化は、雄と比較して雌で頻度が高く、120 及び 180 mg/kg/日の雌では 13 週から発現が認められた。この所見は、病理組織学的検査において全てのサフィナミド群に認められた用量依存的な網膜萎縮と関連があると思われた。これらの変化は、回復期間終了後も依然として認められた。

血液学的検査では、120 及び 180 mg/kg/日群の雌において好中球数の軽度な増加が可逆的に認められた。

血液生化学検査では、180 mg/kg/日群の雌雄で総コレステロールの低下、120 及び 180 mg/kg/日群の雄でトリグリセリドの低下がみられた。また全てのサフィナミド群で、BUN、クレアチニン及びアルブミンの増加、カルシウム及びグロブリンの減少が僅かに認められた。さらに尿検査では、120 及び 180 mg/kg/日群の雌にウロビリノーゲンの増加がみられた。6 週間の休薬期間終了時には、アルブミンの増加、グロブリン及びカルシウムの減少が引き続きみられたが、その他の変化は完全に回復した。いずれも用量反応性はなく、ごく軽度の変化であることから毒性学的意義は低いと考えられた。

全てのサフィナミド群に肝臓の相対重量の増加がみられ、適応性の変化と思われる小葉中心性肝細胞肥大が 60 mg/kg/日群の雌を除く全てのサフィナミド群に認められた。また、120 mg/kg/日群以上の雌雄では、重量増加を伴う副腎の腫大がみられ、病理組織学的検査では副腎皮質束状帯の肥大が認められた。

さらに全てのサフィナミド群において肺胞に泡沫状マクロファージが用量依存的に認められた。180 mg/kg/日群雌 3 例の肺検体を電子顕微鏡観察で評価したところ、肺胞マクロファージの細胞質に同心円状のミエリン様封入体の像がみられ、リン脂質代謝異常が示唆された。

休薬期間終了後には、肝臓及び副腎の変化は完全に回復し、肺胞の泡沫状マクロファージの浸潤巣については 60 mg/kg/日群では回復し、120 及び 180 mg/kg/日群でも回復傾向がみられた。

サフィナミド及び NW-1689 の全身曝露量は用量に従い増加し、反復投与後の曝露量はいずれも単回投与後よりも高かった。サフィナミド及び NW-1689 の曝露量に性差はなく、NW-1689 の曝露はサフィナミドよりも高いことが示された（第 180 日では 17～46 倍）。

以上の結果から、肺胞泡沫状マクロファージ浸潤及び網膜萎縮に基づき本試験における NOAEL は 60 mg/kg/日未満と考えられた。

2.6.6.3.6 カニクイザルを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-06：N636-Q1392（対応する報告書番号 9550237）（参考資料）

カニクイザル（雌雄各 2 匹/群）に 0（媒体対照）、50、100 及び 200 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 4 週間反復経口投与し毒性を検討した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学検査、コルチゾール及び ACTH 測定（50 及び 100 mg/kg/日のみ）、尿検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。また、トキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

100 mg/kg/日群の雌 1 例が第 14 日に、200 mg/kg/日群の全例が第 1～23 日（雄：第 1 及び 5 日、雌：第 20 及び 23 日）に死亡した。一般状態観察では、100 及び 200 mg/kg/日群に薬理作用に起因した変化として歩行失調、平衡感覚の消失、運動失調及び自発運動の低下等が認められた。さらに死亡例では著しい鎮静がみられ、第 1 日に死亡した 200 mg/kg/日群の雄 1 例では痙攣も認められた。200 mg/kg/日群の雌では著しい摂餌量の減少が継続し、体重が減少した。その他に、100 及び 200 mg/kg/日群に嘔吐が散発的にみられた。

死亡例では、200 mg/kg/日群の腎臓に軽度なうっ血がみられた。同群の雌ではさらに尿細管拡張、好塩基性変化及び好酸性円柱等がいずれも軽度に認められ、血液生化学検査において BUN 及びクレアチニンの増加が認められた。200 mg/kg/日群の雌では、副腎の皮質球状帯に細胞肥大がみられた。その他に、100 mg/kg/日群の雌 1 例を含む死亡例全例に胃、十二指腸、結腸及び盲腸の粘膜萎縮がみられた。

生存例では、100 mg/kg/日群の雄 1 例の腎臓に好塩基性変化がみられた。

その他に、50 mg/kg/日群の雌及び 100 mg/kg/日群の雌雄で副腎の絶対及び相対重量が増加したが、コルチゾール及び ACTH 濃度に変化はなく、病理組織学的変化もみられないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。また、全ての投与群で胸腺の萎縮がみられたが、ストレス性の変化と考えられた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ には単回投与時と比較し増加がみられた。第 23 日に死亡した 200 mg/kg/日群の 1 例では第 23 日の投与前から投与 1 時間後（死亡直前）までの血漿中サフィナミド濃度が著しく高かった。

以上の結果から、本試験における NOAEL は 50 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.7 カニクイザルを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

【2.6.7.7.E】：4.2.3.2-07：N822-Q1509 試験（対応する報告書番号 9750107）（評価資料）

カニクイザル（対照、中間高用量及び高用量群：雌雄各 5 匹/群、中間低用量及び低用量群：雌雄各 3 匹/群）に 0（媒体対照）、20、40、80 及び 120 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 4 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、対照群並びに 80 及び 120 mg/kg/日群（雌雄各 2 匹/群）については 2 週間の休薬期間を設け回復性についても評価した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、体温、心電図検査、血圧測定、血液学的検査、血液生化学検査、コルチゾール及び ACTH 測定、尿検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。また、トキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

80 mg/kg/日群の雄 1 例が第 11 日に、120 mg/kg/日群の雄 2 例及び雌 1 例がそれぞれ第 14 及び 11 日に死亡した。80 mg/kg/日群の雄 1 例では、第 11 日の投与後に痙攣がみられ、その後虚脱状態とな

り投与約 30 分後に死亡した。120 mg/kg/日群の雄 2 例では、死亡前日の投与後に痙攣、平衡感覚の消失及び散瞳がみられ、その後著しい鎮静又は横臥位となり死亡した。同群の雌 1 例では、死亡前日の投与後に平衡感覚の消失、歩行失調、痙縮及び虚脱がみられ、著しい鎮静状態のまま投与約 30 分後に死亡した。

生存例の一般状態観察では、80 及び 120 mg/kg/日群に薬理作用に起因した変化として自発運動の低下、虚脱、横臥位、歩行失調及び平衡感覚の消失等がみられた。両群では、摂餌量の減少及び嘔吐がみられ、120 mg/kg/日群では体重減少及び体温低下も認められた。

80 及び 120 mg/kg/日群の生存例では、血液生化学検査において BUN 及び／又はクレアチニンが軽度に増加し、80 mg/kg/日群の雌雄及び 120 mg/kg/日群の雌では腎尿細管にごく軽度から中等度の拡張がみられ、両群の雌ではごく軽度の好塩基性変化も認められた。

120 mg/kg/日群の雌 1 例では胸腺に泡沫状マクロファージの浸潤が観察された。

その他に、生存例では 40 mg/kg/日群の雌並びに 80 及び 120 mg/kg/日群において副腎皮質にびまん性の過形成がみられ、120 mg/kg/日群では副腎重量の増加もみられた。また、80 及び 120 mg/kg/日群では雄で ACTH 濃度が増加した一方で、雌ではコルチゾール濃度が減少したが、副腎に障害性の変化はないことから毒性学的意義は低いと判断した。80 及び 120 mg/kg/日群では総コレステロールの減少がみられたが、肝臓に病理組織学的な変化はみられないことから毒性学的意義は低いと判断した。また、80 及び 120 mg/kg/日群では胸腺が小型化し重量の減少もみられたが、ストレス性の変化と考えられた。

生存例にみられた以上の変化は、いずれも回復又は回復傾向が認められた。

死亡例では、リンパ節、脾臓及び胸腺に泡沫状マクロファージの浸潤が観察され、さらに 120 mg/kg/日群の雌雄各 1 例に尿細管の拡張が、雄 1 例に精細管の変性がみられた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ には単回投与時と比較し増加がみられた。

以上の結果から、本試験における NOAEL は 40 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.8 カニクイザルを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

【2.6.7.7.F】：4.2.3.2-08-01：991180（評価資料）
4.2.3.2-08-02：IPAS-NW-1015 (RBM Exp No.991180)
（トキシコキネティクス報告書）（評価資料）

カニクイザル（対照及び高用量群：雌雄各 6 匹/群、低及び中間用量群：雌雄各 4 匹/群）に 0（媒体対照）、10、20 及び 50 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 13 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、対照群及び 50 mg/kg/日群（雌雄各 2 匹/群）については 6 週間の休薬期間を設け回復性についても評価した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定、並びに病理組織学的検査を実施した。また、トキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

50 mg/kg/日群では、雌 1 例に一般状態の悪化がみられ、第 54 日に安楽殺した。同個体では投与期間中に摂餌量と体重の減少が認められた。剖検及び病理組織学的検査では胃粘膜に糜爛がみられ、この変化が一般状態を悪化させた主な原因と考えられた。なお、同群では、雄 1 例が誤投与により死亡した。

一般状態観察では、50 mg/kg/日群において、生存例のほとんどに散発的な嘔吐及び流涎が投与直後にみられ、さらに雄 1 例で第 11 日の投与後に単発的な中枢神経系関連の変化（歩行失調及び頭部

反転動作）が認められた。同群では血液生化学検査において ALT の軽度な上昇がみられたが、肝臓に組織学的な変化はなく、休薬により回復した。

病理検査では、副腎の絶対及び相対重量が用量依存的に増加した。剖検及び病理組織学的検査では、胃粘膜の糜爛が 20 mg/kg/日群の雌雄各 1 例及び 50 mg/kg/日群の雌雄各 1 例（早期安楽殺動物を含む）に認められた。6 週間の回復期間終了時に病理組織学的変化は観察されなかった（対照群及び 50 mg/kg/日群）。胃粘膜の糜爛はより長期の高用量（70 mg/kg/日の 39 週反復投与、2.6.6.3.10）でみられていないため、サフィナミドの作用に起因したものではなく、本試験条件で特異的に発生した変化であると考えられた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ には単回投与時と比較し増加がみられた。

以上の結果から、本試験における NOAEL は 20 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.9 カニクイザルを用いたサフィナミドの 39 週間反復経口投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

【2.6.7.7.G】：4.2.3.2-09：21893TCP（評価資料）

カニクイザル（対照及び高用量群：雌雄各 6 匹/群、低及び中間用量群：雌雄各 4 匹/群）に 0（媒体対照）、3.2、8 及び 20 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 39 週間反復経口投与し毒性を検討するとともに、対照群及び 20 mg/kg/日群（雌雄各 2 匹/群）については 8 週間の休薬期間を設け回復性についても評価した。本試験では、一般状態観察、体重、摂餌量及び摂水量測定、心電図検査、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。また、トキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

この試験においてサフィナミドは全ての用量において良好な忍容性を示し、投与に関連した変化は認められなかった。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ には単回投与時と比較し増加がみられた。

以上の結果から、本試験における NOAEL は 20 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.10 カニクイザルを用いたサフィナミドの 26/39 週間反復経口投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

【2.6.7.7.H】：4.2.3.2-10-01：30939TCP（評価資料）
4.2.3.2-10-02：833-001（眼の病理組織再評価）（参考資料）

カニクイザル（対照及び高用量群：雌雄各 10 匹/群、低及び中間用量群：雌雄各 4 匹/群）に 0（媒体対照）、30、50 及び 70 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 39 週間投与し毒性を検討した。対照群及び 70 mg/kg/日群（1 群雌雄各 4 匹/群）については 26 週間の投与後に中間剖検を行った。さらに、39 週間の投与終了後、対照群及び 70 mg/kg/日群（雌雄各 2 匹/群）に 8 週間の休薬期間を設け回復性についても評価した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、心電図検査、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、ホルモン測定、尿検査、剖検、臓器重量測定、並びに組織学的検査を実施した。また、トキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

70 mg/kg/日群の雌 1 例が第 21 日に死亡した。同個体では、死亡前に平衡感覚の消失、間代性の筋攣縮及び散瞳などの神経症状が重度に認められた。剖検及び病理組織学的検査において毒性の標的臓器を示す変化はなく、死因は中枢神経系に対する作用と関連があると考えられた。

生存例の一般状態観察では、70 mg/kg/日群において、間代性筋攣縮、振戦、協調運動の異常（平衡感覚の消失、歩行失調又は運動失調）などの神経症状が認められた。さらに、横臥位又は腹臥位、筋緊張の低下、散瞳並びに眼瞼下垂も少数例に散見された。70 mg/kg/日群では、多くの個体に嘔吐が認められたが、投与期間の後半には発現頻度が大きく減少した。また、同群では対照群に比べ、軟便や水様便の発現例数及び頻度がやや高かった。これらの一般状態の変化は休薬期間中には認められなかった。50 mg/kg/日群では、雌雄の数例に嘔吐が認められた。同群では、第 15 週に雄 1 例に平衡感覚の消失が、第 22 週に雌 2 例に自発運動の低下がそれぞれ 1 回観察された。

70 mg/kg/日群では、第 1 週をピークとした摂餌量の減少がみられたが、雄では第 6 週以降、雌では第 2 週以降回復した。

血液学的検査では、50 及び 70 mg/kg/日群において第 25 週に雄でリンパ球数の増加とそれに伴う白血球数の増加又は増加傾向がみられたが、投与期間中に回復した。70 mg/kg/日群では第 38 週に雌でリンパ球数の増加がみられたが、軽度な変化であり、脾臓、胸腺及びリンパ組織に病理組織学的変化はなかったことから毒性学的意義は低いと判断した。

血液生化学検査では、70 mg/kg/日群の雌雄に第 12 週からトリグリセリドの増加が、第 25 週から ALT の上昇がみられたが、これらの変化はいずれも軽度であった。トリグリセリドの増加は休薬期間終了時にも 70 mg/kg/日群の雌でみられたが、その他の変化はすべて休薬期間中に回復した。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ には単回投与時と比較し増加又は増加傾向がみられた。

以上の結果から、本試験における NOAEL は 50 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.11 反復投与毒性試験（レボドパ／カルビドパ併用投与）

2.6.6.3.11.1 ラットを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの 4 週間経口投与毒性試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-11：SOI0024（参考資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 5 匹/群）にサフィナミド 50、100 及び 150 mg/kg/日をレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）と併用して 4 週間反復経口投与した。また、媒体対照群及び、レボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）単独群を設けた。なお、レボドパ／カルビドパは 4 時間の間隔をおいて 1 日 2 回投与とし、媒体対照群では 2 回目の投与では媒体を投与した。本試験では、死亡率、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、臓器重量測定及び剖検を実施した。

サフィナミド 150 mg/kg とレボドパ／カルビドパ併用群の雌 1 例で第 2 週に誤投与による死亡がみられた。

投与に伴う一般状態変化として、レボドパ／カルビドパ単独群で、投与直後における自発運動の亢進とその後の自発運度の低下が認められ、立毛、半眼、浅速及び不整呼吸、過剰咀嚼並びに散瞳もみられた。レボドパ／カルビドパとサフィナミドの併用群においては、これらに加えて流涎、涎のふき取りに伴う顎すりがみられ、サフィナミド 150 mg/kg/日との併用群の雌においては円背位が低い発現率で認められ、腹臥位が一過性にみられた。これらの変化は投与 2 時間以内に発現し一時的であったが、自発運動の低下及び立毛は持続的であった。

サフィナミド 150 mg/kg/日とレボドパ／カルビドパ併用群の雄において体重増加量の減少傾向がみられた。全ての群で摂餌量に変化はみられなかった。

臓器重量は、レボドパ／カルビドパ併用群においてサフィナミド 100 及び 150 mg/kg/日の雌雄で肝臓の相対重量の増加、サフィナミド 100 及び 150 mg/kg/日の雌で副腎重量及び肺の相対重量増加がみ

られ、脾臓重量の減少がサフィナミド 150 mg/kg/日の雌に、また脾臓の相対重量増加がレボドパ／カルビドパ単独群の雄に認められた。また、腎臓重量の増加がサフィナミド 100 及び 150 mg/kg/日の併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群の雄にみられた。いずれも軽度であり、用量相関性はみられず、またレボドパ／カルビドパ単独群と比較して顕著な差はみられなかった。また、剖検において明らかに投与に関連する変化はみられなかった。

以上の結果より、レボドパ／カルビドパを併用する場合、サフィナミドの最大耐容投与量（MTD）は 150 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.11.2 カニクイザルを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの 4 週間経口投与毒性試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-12：SOI0022（参考資料）

カニクイザル（雌雄各 2 匹/群）にサフィナミド 50 mg/kg/日をレボドパ／カルビドパ 80/20 mg/kg/日と併用して 4 週間反復経口投与し、併用毒性を検討した。その他に、媒体対照群及びレボドパ／カルビドパ単独群（80/20 mg/kg/日）も設けた。レボドパ／カルビドパは 4 時間の間隔をおいて 1 日 2 回投与とし、媒体対照群には 2 回目の投与で媒体を同様に投与した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、尿検査、剖検、臓器重量測定、並びに組織学的検査を実施した。

いずれの群においても死亡はみられなかった。一般状態観察では、併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群に流涎がみられた。併用群では軽度な摂餌量及び体重の減少もみられた。

尿検査では、併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群に褐色尿がみられた。剖検時に膀胱から採取した尿の色調は正常であったが、放置により褐色化したことから、色調変化は排尿後に起こるレボドパ／カルビドパの影響と考えられた。

剖検では、併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群の雄全例に胸腺の小型化がみられ、重量が減少した。病理組織学的検査では、併用群の雄 1 例及び雌 2 例、並びにレボドパ／カルビドパ単独群の雄 1 例に胸腺皮質の委縮が観察された。

以上の結果から、13 週間反復経口投与毒性試験の最高用量として、サフィナミド 50 mg/kg/日とレボドパ／カルビドパ 80/20 mg/kg/日の併用が適当であると考えられた。

2.6.6.3.11.3 ラットを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの 13 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

【2.6.7.7.I】：4.2.3.2-13：SOI0053（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 10 匹/群）にサフィナミド 25、75 及び 125 mg/kg をレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）と併用して 13 週間反復経口投与した。その他に、媒体対照群、サフィナミド 125 mg/kg/日単独群及びレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）群を設けた。レボドパ／カルビドパは 4 時間の間隔をおいて 1 日 2 回投与とし、媒体対照群及びサフィナミド単独群では 2 回目の投与で媒体を投与した。また、併用群においてサフィナミドの休薬による回復性を評価するため、媒体対照群、サフィナミド 125 mg/kg/日とレボドパ／カルビドパの併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群について、4 週間の休薬期間を設定した（雌雄各 5 匹/群）。なお、レボドパ／カルビドパは休薬期間も投与を継続した。さらに、サテライト群（媒体対照群は雌雄各 3 例、その他雌雄各 9 匹/群）を設け、サフィナミド、NW-1689、レボドパ及びカルビドパの全身曝露について評価した。

試験期間中 3 例が死亡又は安楽殺された。第 7 日目に切迫殺としたサフィナミド単独群の雄 1 例は水頭症がみられ、死亡は偶発的と思われた。レボドパ／カルビドパ単独群の雄 1 例は第 17 日に死亡したが、死因は特定されなかった。また、トキシコキネティクス群のサフィナミド 25 mg/kg/日との併用群雌 1 例が第 6 日に誤投与により死亡した。

一般状態変化は、被験物質投与群に自発運動の低下、異常姿勢及び立毛が認められ、サフィナミドの有無に関わらずレボドパ／カルビドパを投与した群で高頻度にみられた。主にサフィナミドを投与した群において、流涎及び顎擦りが投与直後に一過性にみられ、用量依存的であった。サフィナミド又はレボドパ／カルビドパ単独投与と比較して併用による症状の悪化はみられなかった。

体重増加量はサフィナミド 125 mg/kg/日との併用群で対照群と比較して低値であり、サフィナミド 125 mg/kg/日単独群の雄でも低下傾向がみられた。レボドパ／カルビドパ単独群の雌では対照群と比較してやや高値を示した。サフィナミド 125 mg/kg/日との併用群の雌雄においては、サフィナミドの休薬期間中に回復を示した。摂餌量に関しては、投与に関連した変動はみられなかった。

眼科学的検査では、サフィナミド 125 mg/kg/日との併用群の雌 2 例に眼底に微かな反射亢進が両側性に示された。

血液学的検査において、サフィナミドを投与した全群に血小板数の減少、プロトロンビン時間の延長がみられた。血液生化学検査では、サフィナミドの有無に関わらずレボドパ／カルビドパ投与群では ALT が低下したが、サフィナミド 125 mg/kg/日単独群では雌雄ともに上昇した。サフィナミドを投与した群において、ALP の上昇及び AST の上昇又は低下、BUN 及びクレアチニンの増加、ビリルビン、グルコース及びコレステロールの減少、トリグリセリド及びアルブミン／グロブリン比の増加がそれぞれ僅かにみられ、併用群では単独群と比較して変化の程度はやや強かった。これらの変化は、4 週間の休薬後においてアルブミン/グロブリン比は対照群と比較してごく僅かに高かったものの、回復傾向を示した。尿検査においてはレボドパ／カルビドパ群で尿量の僅かな減少とそれに伴う比重増加が認められたが、サフィナミドとの併用による悪化はみられなかった。

病理組織学的検査では、サフィナミド 75 mg/kg/日以上を投与した群に網膜萎縮がみられ、用量依存的な重症化が認められた。網膜の変化は、用量依存的な外顆粒層における核の平均数減少として認められたが、レボドパ／カルビドパの併用による悪化はみられなかった。なお、サフィナミド 25 mg/kg/日との併用群の一部の雌でも同様の変化が認められたが、極めて軽度であった。サフィナミド 75 及び 125 mg/kg/日との併用群並びにサフィナミド 125 mg/kg/日単独群の肺に淡色域がみられ、病理組織学的検査において対照群と比較して肺胞に泡沫状マクロファージ集簇巣が高頻度で認められた。また、レボドパ／カルビドパの有無に関わらず、サフィナミド 125 mg/kg/日を投与した雌では、副腎重量の増加を伴う副腎皮質肥大がみられた。125 mg/kg/日群の雌雄では、肝臓重量増加を伴う肝細胞肥大、甲状腺の濾胞肥大の発現率上昇がみられたが適応性の反応と考えられた。4 週間の休薬期間後、網膜萎縮、肺の淡色域及び泡沫状マクロファージ集簇巣、甲状腺の濾胞細胞肥大及び雌における副腎皮質の肥大は回復性が認められなかった。

サフィナミド及び NW-1689 の曝露量及びレボドパ／カルビドパの曝露量に関して、併用薬剤による明らかな影響は認められなかった。

以上の結果より、本試験においてレボドパ／カルビドパとサフィナミドの併用群では、それぞれの単独群と比較して血液学的及び血液生化学的パラメータの変動を僅かに強める傾向がみられたが、病理組織学的検査において、明らかな所見の悪化は認められなかった。また、併用による新たな毒性は発現しなかった。

2.6.6.3.11.4 カニクイザルを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

【2.6.7.7.J】：4.2.3.2-14：SOI0052（評価資料）

カニクイザル（雌雄各 3～5 匹/群）にサフィナミド 20 及び 50 mg/kg/日をレボドパ／カルビドパ 80/20 mg/kg/日（第 1～14 日）、40/10 mg/kg/日（第 15 日以降）と併用して 13 週間反復経口投与し、併用毒性を検討した。その他に、媒体対照群、サフィナミド単独群（50 mg/kg/日）及びレボドパ／カルビドパ単独群（第 1～8 日：80/20 mg/kg/日、第 9 日以降：40/10 mg/kg/日）も設けた。レボドパ／カルビドパは約 4 時間の間隔をおいて 1 日 2 回投与とし、媒体対照群及びサフィナミド単独群には 2 回目の投与では媒体を投与した。また、サフィナミドの休薬による回復性を評価するため、媒体対照群、サフィナミド 50 mg/kg/日のレボドパ／カルビドパ併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群については一部の動物（雌雄各 2 匹/群）に 4 週間の休薬期間を設定した。なお、レボドパ／カルビドパは休薬期間中も投与を継続した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。さらに、サフィナミド、代謝物である NW-1153 及び NW-1689、レボドパ、並びにカルビドパのトキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

レボドパ／カルビドパ単独群では、80/20 mg/kg/日投与の第 8 日に著しい中枢神経系関連の変化（頭部、胸部、四肢の皮膚／被毛をかきむしる行動、ケージから取り出す際の過剰反応、ケージバーへの噛みつき、おがくずの大量摂食、洗顔運動の常同行動、眼球陥没、歩行異常、不随意運動／協調運動障害）がみられたため、第 9 日以降の用量を 40/10 mg/kg/日（20/5 mg/kg の 1 日 2 回）に減量した。サフィナミド単独群、並びにサフィナミド 20 及び 50 mg/kg/日との併用群では、投与初期に体重の減少がみられ、サフィナミド 50 mg/kg/日との併用群では摂餌量の減少もみられたが、投与期間中にいずれも回復した。さらに、サフィナミド 20 mg/kg/日との併用群では第 2 週の後半に皮膚／被毛をかきむしる行動や指をしゃぶり舐めまわす行動がみられた。そのため、第 15 日以降、両併用群のレボドパ／カルビドパの用量を 40/10 mg/kg/日（20/5 mg/kg の 1 日 2 回）に減量した。これらの併用群 2 群及びレボドパ／カルビドパ単独群にみられた中枢神経系関連の変化は、サフィナミド単独群にはみられなかったことからレボドパ／カルビドパによる影響と考えられ、レボドパ／カルビドパの減量により消失した。その他に、一般状態観察では、投与期間を通じて両併用群に嘔吐及び軟便がみられ、レボドパ／カルビドパを投与した全ての群に尿の暗色化がみられた。両併用群、サフィナミド単独群及びレボドパ／カルビドパ単独群に流涎がみられたが、投与時の変化であったことから投与手技の影響と考えられた。

心電図検査では、サフィナミド 50 mg/kg/日を投与した併用群及び単独群の雄に心拍数の減少及びそれと関連した徐脈がみられたが、両群の変化は同程度で、休薬により回復した。

剖検では、両併用群、サフィナミド単独群及びレボドパ／カルビドパ単独群に副腎の黄色化がみられ、休薬期間終了時の剖検でもサフィナミド 50 mg/kg/日の併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群に同変化がみられた。しかし、病理組織学的検査において副腎に障害性の変化はなく、副腎の黄色化は媒体対照の回復群にもみられたことから、毒性学的意義のない生理的変化と考えられた。

以上のように、サフィナミド投与により摂餌量及び体重の一過性減少、並びに心拍数の減少がみられ、レボドパ／カルビドパ投与により中枢神経系関連の変化がみられた。これらの変化はいずれも、サフィナミドとレボドパ／カルビドパの併用により増強することはなかった。また、併用による新たな毒性の発現もなかった。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドとレボドパ／カルビドパの併用投与において、サフィナミド、NW-1153、NW-1689、レボドパ及びカルビドパの C_{max} 並びに $AUC_{0\text{-}24h}$ 又は $AUC_{0\text{-}4h}$ に性差はなかった。サフィナミド 50 mg/kg/日のレボドパ／カルビドパ併用群とサフィナミド単独群との間で、サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ に差はなく、曝露に併用による影響は認められなかった。サフィナミドとレボドパ／カルビドパ併用群では、レボドパ／カルビドパ単独群と比較して、第 13 週のレボドパ及びカルビドパの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}4h}$ に増加がみられた。

2.6.6.3.12 反復投与毒性試験（プラミペキソール併用）

2.6.6.3.12.1 カニクイザルを用いたサフィナミド及びプラミペキソールの用量設定経口投与試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-15：RE8410（対応する報告書番号 IMP28941）（参考資料）

カニクイザル（雌雄各 1 匹/群）にサフィナミド及びプラミペキソールを表 2.6.6-2に従って併用又は単独経口投与し、併用毒性を検討した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、心電図検査、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、並びに病理組織学的検査を実施した。

表 2.6.6-2 プラミペキソール単独及びサフィナミド/プラミペキソール併用の投与スキーム

群	投与量（mg/kg/日）		投与回数	投与日	動物番号	
	サフィナミド	プラミペキソール			雄	雌
サフィナミド/プラミペキソール併用	25	1	1	1	M1b	F1b
	50	2	14	2～15		
	75	3	7	16～23	-	
			3	16～18	M1b	-
	休薬		0	19～20		
	50	2	2	21～23		
プラミペキソール単独	-	1	1	1	M1a	F1a
	-	2	1	2		
	-		12	3～14	M1c	
	-	3	8	15～23		

いずれの群にも死亡はみられなかった。一般状態観察では、サフィナミド／プラミペキソール併用群において、25/1 mg/kg の単回投与及び 50/2 mg/kg の 14 日間投与により変化はみられなかったが、75/3 mg/kg の 3 又は 7 日間投与により中枢神経症状である歩行失調及び協調運動障害がみられた。

以上の結果から、13 週間反復経口投与毒性試験の最高用量として、忍容性が良好であったサフィナミド／プラミペキソール 50/2 mg/kg/日の併用が適当であると考えられた。

2.6.6.3.12.2 カニクイザルを用いたサフィナミド及びプラミペキソールの 13 週間反復経口投与毒性試験及び 13 週間回復性試験

【2.6.7.7.K】：4.2.3.2-16：22972（評価資料）

カニクイザル（雌雄各 3～5 匹/群）にサフィナミド及びプラミペキソールを併用又は単独で 14 週間反復経口投与し、併用毒性を検討した。用量は、サフィナミド／プラミペキソール併用群を 10/0.4、10/2 及び 50/2 mg/kg/日、サフィナミド単独群を 50 mg/kg/日、プラミペキソール単独群を 2 mg/kg/日とし、対照群には媒体を同様に投与した。また、対照群、サフィナミド／プラミペキソール 50/2 mg/kg/

日併用群、サフィナミド単独群及びプラミペキソール単独群については一部の動物（雌雄各 2 匹/群）に 13 週間の休薬期間を設定し、回復性についても検討した。本試験では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、聴覚検査、心電図検査、血圧測定、呼吸数測定、性周期観察、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定、病理組織学的検査、並びに右眼網膜のみ電子顕微鏡観察を実施した。さらに、サフィナミド、代謝物である NW-1153、NW-1199 及び NW-1689、並びにプラミペキソールのトキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

一般状態観察では、全てのサフィナミド／プラミペキソール併用群及びプラミペキソール単独群において、落ち着きのないよじ登りの常同行動がみられ、この行動が原因と考えられる外傷が顔面に認められた。その他に、同群では嘔吐が散見され、サフィナミド単独群においても嘔吐がみられた。これらの変化については群間に明らかな差はなく、休薬により全て消失した。

サフィナミド／プラミペキソール 50/2 mg/kg/日併用群及びサフィナミド単独群では、体重の減少又は増加抑制が試験期間を通じてみられたが、両群の変化は同程度で休薬により回復した。

以上のように、プラミペキソール投与により中枢神経系関連の変化がみられ、また、サフィナミド 50 mg/kg/日投与により体重の減少又は増加抑制がみられた。これらの変化はいずれも、サフィナミドとプラミペキソールの併用により増強することはなかった。また、併用による新たな毒性の発現もなかった。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミド、NW-1153、NW-1199、NW-1689 及びプラミペキソールの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。サフィナミド／プラミペキソール 50/2 mg/kg/日併用群とそれぞれの単独群との間で、サフィナミド、NW-1153、NW-1199、NW-1689 及び／又はプラミペキソールの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ に差はなく、曝露に併用による影響は認められなかった。第 13 週の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は第 1 日と比較して、サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 に増加がみられ、NW-1199 及びプラミペキソールでは同程度であった。

2.6.6.3.13 静脈内投与試験

2.6.6.3.13.1 ラットを用いたサフィナミドの 1 週間静脈内投与毒性予備試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-17： RE8520（対応する報告書番号 IMP28963）（参考資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 3 匹/群）にサフィナミドを 1 日 1 回静脈内急速投与し、死亡率、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。用量は、雌雄 0（媒体対照）、1.5、5、15、30 及び 50 mg/kg/日に加え、雄には 40 mg/kg/日、雌には 60 mg/kg/日を投与した。

50 mg/kg/日群の雄全例が初回投与直後に死亡した。一般状態変化はなく、病理組織学的検査においても異常は認められず、死因を明らかにすることはできなかった。これより低い投与量の雄及び雌の全群で死亡は認められなかった。

60 mg/kg/日群の雌では、投与 5～30 分後まで、振戦を伴う歩行失調及び腹臥位が散見された。50 mg/kg/日群の雌全例で投与初日から立毛、40 mg/kg/日群の雄全例で自発運動低下が認められた。

投与期間終了時には 40 mg/kg/日群の雄でのみ体重増加量の減少傾向が認められた。

血液学的検査では、60 mg/kg/日群の雌で好中球数の増加、40 mg/kg/日群の雄及び 50 及び 60 mg/kg/日群の雌で白血球数の増加傾向が認められた。

摂餌量、生化学検査値、尿検査値、臓器重量、剖検及び病理組織学的評価項目に関してはいずれの投与量においても影響はみられなかった。

50 mg/kg/日群の雄における死亡、40 mg/kg/日群の雄及び 60 mg/kg/日群の雌で認められた一般状態変化に基づき、NOAEL は雌で 50 mg/kg/日、雄で 30 mg/kg/日と判断した。観察された最高非致死量は雄で 40 mg/kg/日、雌で 60 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.13.2 ラットを用いたサフィナミドの 2 週間静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

【2.6.7.7.L】：4.2.3.2-18：RE9970（対応する報告書番号 IMP29396）（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 8 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、10、20 及び 40 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 2 週間反復静脈内投与し、局所刺激性及び全身への影響を検討するとともに、一部の動物（雌雄各 3 匹/群）に 2 週間の休薬期間を設け回復性についても評価した。また、全個体について投与 1 及び 14 日目のサフィナミド及び代謝物 NW-1689 の全身曝露を評価した。

一般状態観察では、20 mg/kg/日群の雌 2 例及び 40 mg/kg/日群の雌 1 例において、投与期間中に 6～7 日間、尾の暗色化が認められ、2 例は投与期間終了前に完全に回復した。

体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量測定並びに剖検において、いずれの投与量においても影響はみられなかった。病理組織学的検査において、サフィナミド群では投与部位に血管周囲組織の線維化が軽度から中等度にみられ、対照群の雌 1 例でも認められた。40 mg/kg/日群の雌 1 例及び 20 mg/kg 群の雄 1 例では血管内に血栓が軽度から中等度に認められた。20 及び 10 mg/kg/日群の雌雄にも血管及び／又は血管周囲組織に軽度から重度の線維化が認められたが、明らかな用量依存性はなく、対照群の雌 1 例にもごく軽度な血管周囲の線維化巣がみられた。2 週間の休薬後には、全ての群において投与部位の変化は回復した。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミド及び NW-1689 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に従って増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は単回投与時と比較して増加した。

以上の結果から、本試験の全身における NOAEL は 40 mg/kg/日と判断した。また、血管及び血管周囲組織に認められた変化は、偶発的に組織と接触した少量のサフィナミドに対する反応、及び注射針による外傷のどちらか又は両方によると考えられたことから、投与局所における NOAEL も 40 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.13.3 カニクイザルを用いたサフィナミドの静脈内投与試験

【2.6.7.6】：4.2.3.2-19：RE8600（対応する報告書番号 IMP28961）（参考資料）

長期試験に用いるために最大耐量（MTD）を設定することを目的とし、サフィナミド（媒体：生理食塩水）を表 2.6.6-3のスキームに従い雌雄各 1 匹に単回静脈内急速投与した。

表 2.6.6-3 投与スキーム

動物の構成	投与量（mg/kg）	投与回数	実験日
雄 A／雌 A	5	1	1
雄 A／雌 A	10	8	4～11
雄 A／雌 A	20	1	15
雄 A	50	1	29
雌 A	30	3	30～32

試験中に死亡例はなかった。50 mg/kg を投与した雄で協調運動障害が認められた。いずれの用量でも体重及び摂餌量、血液学的検査値、血液生化学検査値及び尿検査値に変化はなく、投与に関連した臓器重量変化、肉眼的又は組織学的所見は認められなかった。

サフィナミド 50 mg/kg を静脈内投与した場合に、投与 5 分後に協調運動障害、頻呼吸及び散瞳が発現したため、MTD は 30 mg/kg と判断した。

2.6.6.3.13.4 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

【2.6.7.7.M】：4.2.3.2-20：RE8320（対応する報告書番号 IMP29153）（評価資料）

カニクイザル（雌雄各 2 匹/群）に 0（媒体対照）、3、10 及び 30 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 2 週間反復静脈内投与し、局所及び全身に対する毒性を検討した。また、対照及び高用量群においては、2 週間の休薬期間を設け（雌雄各 2 匹/群）、回復性についても評価した。本試験では、生存率、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、心拍数測定、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、サフィナミド及びその代謝物 NW-1689 のトキシコキネティクス測定を行い、全身曝露についても評価した。

30 mg/kg/日群の雄 1 例及び雌 1 例がそれぞれ第 14 日及び第 7 日の投与直後に死亡した。死亡例の雌では、第 1 日から毎日の投与後に強い中枢神経系関連の変化（協調運動障害）がみられたが、雄では一般状態に変化はみられなかった。剖検では、いずれの死亡例においても全身性の変化は認められなかったが、投与部位の血管内に血栓、皮下組織に炎症性変化が認められ、雌では血管組織の壊死及び炎症性変化も伴っていた。

30 mg/kg/日群の生存例雌 1 例で初回投与後にのみ中枢神経系関連の変化（協調運動障害）がみられたが、その他の一般状態の変化はみられなかった。病理組織学的検査では、いずれの群においても全身性の変化は認められなかったが、全てのサフィナミド投与群で投与部位の皮下組織に慢性炎症がみられ、10 及び 30 mg/kg/日群では投与部位の血管内に血栓もみられた。また、対照群も含む全ての群において、投与部位の血管組織に壊死及び亜急性炎症が、皮下組織に出血が観察され、血管の所見は 30 mg/kg/日群において、皮下の所見は全てのサフィナミド投与群において対照群より変化の程度が強かった。30 mg/kg/日群では、これらの投与部位の変化が休薬期間終了後にも認められた。

サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に従って増加した。定常状態でのサフィナミドの曝露量は用量比を上回って増加したが、定常状態での NW-1689 の曝露量はサフィナミドの用量比にほぼ従っていた。反復投与後のサフィナミド及び NW-1689 の曝露量は雌では単回投与後と同程度であったが、雄では反復投与後に増加した。曝露量は未変化体よりも代謝物 NW-1689 の方が高かった。

以上の結果から、本試験の全身における NOAEL は 10 mg/kg/日と判断した。また、投与局所における NOAEL は 3 mg/kg/日未満と考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 In vitro 試験

2.6.6.4.1.1 細菌を用いたサフィナミドの復帰突然変異試験

【2.6.7.8.A】：4.2.3.3.1-01：N704-Q1448（対応する報告書番号 9550240）（評価資料）

ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）並びに大腸菌（WP2 *uvrA*）を用いて、ラット肝 S9 mix の有無の両条件下で復帰突然変異試験を実施した。S9 mix の有無の両条件下でサフィナミドを 156.25、312.5、625、1250、2500 及び 5000 μg/plate の濃度で処理した。陰性対照として脱イオン水（溶媒）を用いた。

その結果、いずれの菌株においても、S9 mix の有無の両条件下で 2500 μg/plate 以上の濃度において生育阻害が認められた。S9 mix の有無の両条件下ともにいずれの菌株においても陰性対照と比較して復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上、サフィナミドはいずれの菌株においても変異原性を示さなかった。

2.6.6.4.1.2 哺乳類培養細胞を用いたサフィナミドの遺伝子突然変異試験

【2.6.7.8.B】：4.2.3.3.1-02：8701（評価資料）

培養マウスリンパ腫細胞 L5178Y $TK^{+/-}$を用いて、S9 mix 非存在下（24 時間処理）及び存在下（3 時間処理）におけるサフィナミドの遺伝子突然変異試験を実施した。S9 mix 非存在下ではサフィナミドを 1.25、2.5、5.0、10、20、30 μg/mL、S9 mix 存在下では 61.4、76.8、96.0、120、150、188 μg/mL の濃度でそれぞれ処理した。陰性対照として DMSO（溶媒）を用いた。

その結果、S9 mix 非存在下では 30 μg/mL、S9 mix 存在下では 150 μg/mL 以上の処理濃度において細胞障害性（生存細胞率 20%以下）がみられた。いずれの処理濃度においても陰性対照と比較して突然変異体発現頻度の上昇は認められなかった。

以上、サフィナミドは培養マウスリンパ腫細胞 L5178Y $TK^{+/-}$において突然変異誘発性を示さなかった。

2.6.6.4.1.3 ラット初代肝細胞を用いたサフィナミドの in vitro 不定期 DNA 合成試験

【2.6.7.8.C】：4.2.3.3.1-03：N709-Q1452（対応する報告書番号 9550267）（評価資料）

ラット初代肝細胞を用いて、in vitro 不定期 DNA 合成試験を実施した。サフィナミドを 1、5、10、50、100 及び 500 μg/mL の濃度で処理した。陰性対照として脱イオン水（溶媒）を用いた。

その結果、100 μg/mL 以上で強い細胞障害性が認められ、500 μg/mL で析出が認められた。また、50 μg/mL で軽度な細胞障害性が認められたが、評価が可能であった 50 μg/mL までの用量を観察した。50 μg/mL まで、不定期 DNA 合成量の増加はみられなかった。

以上、サフィナミドはラット初代肝細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成試験において DNA 損傷能を示さなかった。

2.6.6.4.2 In vivo 試験

2.6.6.4.2.1 マウスを用いたサフィナミドの骨髄小核試験

【2.6.7.9.A】：4.2.3.3.2-01：8768（評価資料）

マウス（雌雄各 5 例/群）にサフィナミドを 250、500 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与 24 時間後又は 48 時間後動物を安楽殺し、大腿骨を採取して骨髄塗沫標本を作製した。48 時間処理は対照群及び 1000 mg/kg 群のみ実施した。対照群には水（媒体）を同様に投与した。各動物あたり少なくとも 2000 個の幼若赤血球（PCE）を観察し、小核を有する PCE（MNPCE）数を求めた。

その結果、500 mg/kg 群以上で自発運動低下、運動失調、眼瞼下垂、円背位、振戦及び嗜眠が観察された。1000 mg/kg を投与した動物では投与当日に雄 3 例及び雌 4 例が死亡し、投与翌日に雄 1 例が死亡した。そのため、予備動物を用いて 24 時間処理群は雌雄各 5 例、48 時間処理群は雄 4 例及び雌 5 例を評価した。24 時間処理群において、サフィナミドはいずれの用量においても対照群と比較して MNPCE 数及びその比に差は認められなかった。48 時間処理群において、1000 mg/kg 群で MNPCE 発現頻度に有意な増加が認められたため、48 時間処理群のみ雌雄各群 10 例で追加試験を実施した。

追加試験の結果、1000 mg/kg 群の雄で 5/10 例、雌で 9/10 例が死亡したため、予備動物を用いて、雄では 8 例を評価したが、雌は評価に適さない用量と判断した。1000 mg/kg 群の雄において、対照群と比較して MNPCE 数に差は認められなかった。

以上の結果から、サフィナミドは小核誘発能を示さないと考えられた。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.5.1 マウスを用いたサフィナミドの 4 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.10.A.1】：4.2.3.4.1-01：ONP001（参考資料）

CD-1 マウス（雌雄各 5 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 300 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与した。また、投与 9 日目から新たに 500 mg/kg/日（雌雄各 5 匹）を追加し、投与 28 日目まで 20 日間反復経口投与した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量測定、剖検並びに臓器重量測定を実施した。

その結果、500 mg/kg/日群の雄 1 匹が死亡し、雄 2 匹及び雌 1 匹が状態悪化により切迫殺された。これら 4 例はいずれも、死亡或いは切迫殺前に歩行異常、円背位、正向反射の低下、立毛及び活動性低下がみられた。その他に、死亡の数日前には異常呼吸、腹臥位、前弯姿勢、歩行・協調運動障害、半眼、全身蒼白、体温低下及び部分的硬化を伴う腹部膨満が認められた。剖検では、胃及び腸管の膨満（ガス貯留）、副腎の暗色化、肝臓及び脾臓の淡色化、右側腎臓のびまん性淡色隆起、胸腺及び脾臓の小型化、胃の膨満（摂取物あり）、前胃陥没及び腎臓の淡色化がみられた。

生存例での一般状態変化は 500 mg/kg/日群の全動物で活動性低下、歩行異常及び円背位が高頻度に認められ、雌よりも雄で頻度が高かった。その他に、立毛、半眼、浅速呼吸、前弯姿勢、挙尾、攻撃行動、自発運動亢進及び腹部における硬結感のある腫脹がみられた。300 mg/kg/日群では雄の 1 例で投与 8 日に歩行異常、活動性低下及び痙攣がみられたが、投与後 4.5 時間までに回復した。体重及び摂餌量では 500 mg/kg/日群において体重増加抑制、摂餌量低下及び飼料効率低下がみられた。臓器重量では 300 mg/kg/日以上の群で肝臓の相対重量増加、500 mg/kg/日群で脾臓の絶対重量の低下がみられた。剖検では 300 mg/kg/日以上の群で肝臓の腫大、淡色化、肺の胸膜淡色化、前胃陥没、前胃粘膜の粗ぞう化がみられた。

結論として、500 mg/kg/日の用量は複数の死亡例がみられたため 13 週間試験には適さないと判断した。

2.6.6.5.2 マウスを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.10.A.2】：4.2.3.4.1-02：ONP002（参考資料）

CD-1 マウス（雌雄各 9 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、100、200 及び 375/250 mg/kg/日の用量で 13 週間反復経口投与した。なお、高用量群は投与 28 日まで 375 mg/kg/日の用量で投与したが重度の毒性がみられたため、投与 29 日から 35 日まで休薬した後に 250 mg/kg/日に減量して投与を再開した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量測定、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。また、サテライト群（対照群：雌雄各 24 匹/群、サフィナミド群：雌雄各 36 匹/群）を設け、投与 1 日目及び第 13 週の全身曝露についても評価した。

その結果、375/250 mg/kg/日群では、減量後の期間も含めた投与期間を通して主群の雄 1 匹及び雌 3 匹並びにサテライト群の雌雄各 3 匹が死亡した。また、一般状態不良のため 100 mg/kg/日群の雌 1 例を切迫殺した。各動物は死亡前に腹部膨満、活動性低下、立毛、体温低下、協調運動障害、呼吸の異常及び体重減少がみられた。死亡例の剖検では 375/250 mg/kg/日群は前胃粘膜粗ぞう化及び陥没、胃腸管膨満並びに肝臓の淡色化がみられ、100 mg/kg/日群の動物では胃腸管膨満及び肺・気管支のうっ血がみられたが、死因は不明であった。その他に 375/250 mg/kg/日群の雄 2 匹で誤投与による死亡が認められた。

生存例の一般状態観察では、375/250 mg/kg/日群において、375 mg/kg/日の投与 28 日まで歩行異常、自発運動低下、半眼、円背位及び立毛等がみられた。これらの変化は 7 日間の休薬期間中に全て回復した。投与再開後にも同様の変化がみられたが、発生頻度は減少した。体重については 200 mg/kg/日以上の群で増加抑制がみられた。摂餌量は 200 mg/kg/日以上の群の雄で有意な低値を示し、飼料効率は 200 mg/kg/日以上の群で低かった。臓器重量では 100 mg/kg/日群の雄及び 200 mg/kg/日以上の群で肝臓の相対重量が有意に増加し、剖検では 200 mg/kg/日群の雄及び 375/250 mg/kg/日群で肝臓腫大が認められた。病理組織学的検査では肝臓において 100 mg/kg/日群の雄及び 200 mg/kg/日以上の群で小葉中心性肝細胞肥大がみられ、100、200 及び 375/250 mg/kg/日群の雌で小葉中間帯肝細胞脂肪空胞化がみられた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量に応じて増加し、性差はみられなかった。反復投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は単回投与時と同等又は増加する傾向がみられた。

結論として、375/250 mg/kg/日の用量で死亡が認められたことから、200 mg/kg/日ががん原性試験における MTD と判断した。

2.6.6.5.3 ラットを用いたサフィナミドの 13 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.10.A.3】：4.2.3.4.1-03：ONP003（参考資料）

Sprague Dawley（Crl:CD(SD)IGS BR）ラット（雌雄各 10 匹/群）に 0（媒体対照）、100、200 及び 300/250 mg/kg/日の用量でサフィナミドを 13 週間反復経口投与した。なお、300 mg/kg では、強い毒性がみられたため投与 18～24 日は休薬し、投与 25 日以降 250 mg/kg の用量で投与を再開した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。またサテライト群（雌雄各 4/群）を設け、全身曝露についても評価した。

300/250 mg/kg/日群では、雄では毒性群 4 例及びサテライト群 1 例、雌では毒性群 3 例及びサテライト群 3 例が死亡し、200 mg/kg/日群においても雄では毒性群 1 例、雌では毒性群 2 例及びサテライト群 2 例、100 mg/kg/日群ではサテライト群雄 1 例が死亡した。剖検の結果、100 mg/kg/日群の雄では腎臓の変化（暗赤色化、肥大及び顆粒性液体の嚢胞）による死亡であると考えられたが、200 mg/kg/日以上の動物では腎臓の組織変化はみられないことから、サフィナミドの毒性に起因するものではないと考えられた。

一般状態観察では、200 mg/kg/日以上の雌雄に、自発運動の低下、歩行異常、立毛、円背位、半眼及び呼吸異常などが投与直後にみられた。

300 mg/kg/日群の体重増加量及び摂餌量は対照と比較して低く、減量後も体重増加量の低値が継続した。体重増加量の減少は 200 mg/kg/日群の雄でもみられ、雌雄で摂餌量の減少がみられた。

200 mg/kg/日以上の雌雄及び 100 mg/kg/日群の雄において血小板の減少と、プロトロンビン時間の延長が認められた。また、200 mg/kg/日以上の雄では網状赤血球の減少も認められた。

血液生化学検査では ALP、AST 及び ALT の上昇が主に 300/250 mg/kg/日群にみられ、程度は低いものの 200 mg/kg/日群でも認められた。関連する変化として雌全例並びに 200 mg/kg/日以上の雄に肝臓の相対重量の増加を伴う肝腫大がみられ、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。その他にサフィナミドを投与したすべての群で BUN の上昇がみられたが、関連する病理変化は認められなかった。

生存例の剖検では副腎の暗色化及び腫大並びに肺の淡色域がみられた。病理組織学的検査においては副腎皮質束状帯の肥大及び変性・壊死、肺胞マクロファージ集簇巣、腸管膜リンパ節マクロファージ空胞化、及び骨髄細胞数の減少並びに両側性網膜変性が認められた。なお、肺胞マクロファージ集

簇巣及び両側性網膜変性は 100 mg/kg/日群においても認められ、雌では副腎皮質束状帯の肥大もみられた。

サフィナミドの全身曝露量は、用量に応じて増加した。雌雄で明らかな変化はなく、また反復投与により増加した。

結論として、200 mg/kg/日以上の用量は長期投与に適した用量ではないが、100 mg/kg/日は忍容性があると考えられた。

2.6.6.5.4 マウスを用いたサフィナミドの 104 週経口投与がん原性試験

【2.6.7.10.B】：4.2.3.4.1-04：ONP004（評価資料）

CD-1 マウス（雌雄各 60 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 200 mg/kg/日の用量で 104 週間反復経口投与した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。また、サテライト群（雌雄各 12 匹/群）を設け、サフィナミド及び代謝物である NW-1153 及び NW-1689 の全身曝露についても評価した。

その結果、200 mg/kg/日群の雄で対照群と比較し死亡率が高かった。死亡率の増加は主に投与 1 年目に発生し、剖検では肺の淡色域及び胃腸管の膨満がみられたが、サフィナミド投与によって死亡率が増加した機序は不明であった。

一般状態観察では 200 mg/kg/日群の雌雄各 2 匹で痙攣がみられ、その他に雌雄でラッセル音及び痩躯が認められた。100 mg/kg/日群の雌及び 200 mg/kg/日群で体重増加抑制がみられ、200 mg/kg/日群の雌では軽度な摂餌量減少が認められた。剖検では 200 mg/kg/日群の雌で肝臓の淡色化、肺における淡色域が認められた。

病理組織学的検査の結果、いずれのサフィナミド投与群においても腫瘍性病変の増加はみられなかった。一方、サフィナミド投与に起因した非腫瘍性病変は主に 200 mg/kg/日群においてみられ、眼球では網膜変性が 200 mg/kg/日群で有意に増加した。また、その他の投与に起因した変化は副腎、肝臓、肺、腸管膜リンパ節、包皮腺、座骨神経、脾臓、膀胱、子宮頸部及び膣で認められた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 のいずれも血漿中での曝露が認められ、投与 1 時間後の血漿中濃度は用量増加に伴い増大した。投与 13 及び 52 週における投与 1 時間後の血漿中濃度に明らかな差はみられなかった。また、血漿中濃度は概ね雌雄で同程度であったが、200 mg/kg/日群における NW-1689 濃度のみは雌が雄より高値を示した。サフィナミド及び NW-1153 の投与 24 時間後における血漿中濃度は投与 1 時間後より低下したが、投与 52 週における 100 mg/kg/日群の雌及び 200 mg/kg/日群では、投与 24 時間後の NW-1689 濃度が投与 1 時間後と同程度であった。

結論として、サフィナミドは 200 mg/kg/日までの用量で経口投与したマウスにおいて発がん性はないことが示された。

2.6.6.5.5 ラットを用いたサフィナミドの 104 週間経口投与がん原性試験

【2.6.7.10.C】：4.2.3.4.1-05：ONP005（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 65 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、25、50 及び 100 mg/kg/日の用量で 104 週間反復経口投与した。なお、雌は生存数減少のため投与期間を短縮し投与 102 週に剖検した。本試験では一般状態観察、体重及び摂餌量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生

化学検査、尿検査、ホルモン測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。また、サテライト群（雌雄各 6 匹/群）を設け、サフィナミド、代謝物である NW-1153 及び NW-1689 の全身曝露を評価した。

その結果、サフィナミド投与による死亡率への影響は認められなかった。

一般状態観察では痙攣が 100 mg/kg/日群において認められた。その他の所見として、粗毛が全サフィナミド投与群、脱毛が 50 mg/kg/日の雌及び 100 mg/kg/日群、円背位、立毛、痩躯、ラッセル音及び不正咬合が 100 mg/kg/日群、半眼が 100 mg/kg/日群の雌でみられた。体重は 50 mg/kg/日群の雄及び 100 mg/kg/日群で増加抑制がみられた。眼科学的検査では、投与 52/54 週に 25 mg/kg/日群の雄で網膜萎縮、25 mg/kg/日群の雌及び 50 mg/kg/日以上の群で網膜血管縮小、視神経乳頭灰色化がみられ、投与 100 週に 50 mg/kg/日群の雄及び 100 mg/kg/日群で中等度から重度の水晶体混濁/白内障の発生が増加した。血液学的検査では 50 mg/kg/日以上の群の雄で網状赤血球が減少し、血液生化学検査では 100 mg/kg/日群で BUN が増加、50 mg/kg/日以上の群でコレステロールが低下し、尿検査では 50 mg/kg/日以上の群の雌で尿 pH が上昇、100 mg/kg/日群の雌で尿タンパクが増加した。剖検では主な変化として、副腎腫大が 100 mg/kg/日群の雌、肺における淡色域が 100 mg/kg/日群でみられた。

病理組織学的検査の結果、いずれのサフィナミド投与群においても腫瘍性病変の増加はみられなかった。一方、サフィナミド投与に起因した主な非腫瘍性病変として、眼における網膜変性及び白内障が全サフィナミド投与群で認められた。また、その他に投与に起因した非腫瘍性病変が 50 mg/kg/日以上の群或いは 100 mg/kg/日群の肝臓、副腎、肺及び甲状腺において認められた。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 のいずれも血漿中での曝露が認められ、$AUC_{0\text{-}24h}$ は用量増加に伴い増大した。投与 13 及び 42 週において反復投与による曝露量は同等もしくは増加傾向がみられた。また、サフィナミド及び代謝物は雌の方が雄より曝露が高い傾向が認められた。

結論として、サフィナミドは 100 mg/kg/日までの用量で経口投与したラットにおいて発がん性はないことが示された。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.6.1 重要な試験以外の試験（サフィナミド単独）

2.6.6.6.1.1 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による胚・胎児発生に関する予備試験-1

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-01：9380EXT（参考資料）

妊娠 Sprague Dawley ラット（8 例/群）に妊娠 6 日から妊娠 15 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、200、300 及び 400 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。妊娠 20 日に母動物を安楽殺し、帝王切開して胎児を摘出した。母動物については生死、一般状態観察、体重及び摂餌量測定を行い、安楽殺後に、黄体数、着床数及び妊娠子宮重量を算出及び測定した。胎児については、生存胎児数、死亡胚・胎児数及び体重を算出・測定し、性別判定及び外表検査を行った。

400 mg/kg/日群の 6 例が死亡又は切迫殺となり、300 mg/kg/日群の 3 例が死亡した。また、一般状態変化はいずれの群でも認められ、200 mg/kg/日群では協調運動障害、自発運動の低下及びラッセル音、300 mg/kg/日群ではそれらに加えて横臥位及び呼吸困難が認められた。400 mg/kg/日群では嗜眠を示し、意識消失が認められた。また、いずれの群でも対照群と比較して体重増加抑制が認められ、200 及び 300 mg/kg/日群では平均妊娠子宮重量が対照群と比べて低かった。400 mg/kg/日群の 1 例で全胚吸収がみられた。

胎児の外表検査において、口蓋裂がいずれの投与群でも認められ、この奇形を有する胎児の割合は 200、300 及び 400 mg/kg/日群でそれぞれ 8.1%、63.6%及び 100%であった。また、全身性浮腫も 300 及び 400 mg/kg/日群で認められた。サフィナミド全群で胎児の小型化が認められ、胎児重量が低下した。

本試験で選択したサフィナミドの投与量ではいずれも顕著な母体毒性がみられ MTD を上回った。また、重度の母体毒性（一般状態変化及び体重増加抑制）の二次的な影響として、胚・胎児発生（着床後胚損失率、胎児重量の減少、口蓋裂）に影響がみられた。

2.6.6.6.1.2 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による胚・胎児発生に関する予備試験-2

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-02：12210EXT（参考資料）

妊娠 Sprague Dawley ラット（8 例/群）に妊娠 6 日から妊娠 15 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、母体及び胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。妊娠 20 日に母動物を安楽殺し、胎児を摘出した。母動物については、生死、一般状態観察、体重及び摂餌量測定を行い、安楽殺後に黄体数及び妊娠子宮全体重量を算出・測定した。胎児については生存胎児数及び胚・胎児死亡数及び体重を算出・測定し、性別判定及び外表検査を行った。

いずれの投与群でも投与に起因した死亡及び一般状態変化は認められなかった。母動物では 150 mg/kg/日で妊娠 9 日目に明かな体重増加抑制が認められ、1 例に全胚吸収がみられた。いずれの投与群でも胚損失率、胎児重量及び性別の割合等は対照群と同程度であった。

胚・胎児発生に対しては母動物へのサフィナミドによる影響はみられなかった。

2.6.6.6.1.3 非妊娠ウサギを用いたサフィナミドの経口投与による予備試験

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-03：9548EXT（参考資料）

New Zealand White ウサギの雌（3 例/群）にサフィナミドを 15、30 及び 90 mg/kg/日の用量でそれぞれ 3 日間漸増して反復経口投与した後 270 mg/kg を 1 日経口投与した。また、180 mg/kg/日を 3 日間反復経口投与する群を設けた。

270 mg/kg/日では、投与後に瀕死となったため人道的観点から安楽殺した。180 mg/kg/日では食欲不振、無便、呼吸困難、自発運動の低下、腹臥位及び体重減少が認められた。90 mg/kg/日では体重の僅かな減少が認められた。

以上の結果から、妊娠ウサギ用量設定試験には 90 mg/kg/日前後を高用量とすることが適していると考えられた。

2.6.6.6.1.4 ウサギを用いたサフィナミドの経口投与による胚・胎児発生に関する予備試験

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-04：9381EXT（参考資料）

妊娠 New Zealand White ウサギ（8 例/群）に妊娠 6 日から妊娠 18 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、25、50 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、母体及び胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。より高用量の影響を評価するため、120 mg/kg/日群及び媒体対照群を追加した。母動物については生死、一般状態観察、体重及び摂餌量の測定を行った。妊娠 29 日に母動物を安楽殺し、帝王切開により卵巣及び子宮を摘出し、黄体数、着床数、吸収胚数、死亡胎児数及び生存胎児数を算定した。胎児については体重測定、性別判定及び外表検査を実施した。

25 mg/kg/日群の 1 例が妊娠 28 日に死亡した。また、50、100 及び 120 mg/kg/日群の各 1 例をそれぞれ妊娠 19 日、妊娠 9 日及び妊娠 20 日に瀕死のため安楽殺した。追加した対照群の 1 例及び 120 mg/kg/日群の 4 例は不妊であり、120 mg/kg/日群の 1 例で全胚吸収がみられた。

母動物において、100 mg/kg/日群で腹臥位、呼吸困難、自発運動低下及び嗜眠が認められた。120 mg/kg/日群ではこれらの症状に加えて頻脈、刺激に対する反応性低下及び運動失調が認められ、1 例で痙攣が認められた。これらの症状の大部分は投与後 2 時間以内に消失した。加えて、摂餌量減少並びに軟便及び／又は便量減少が全てのサフィナミド群で認められた。また、120 mg/kg/日群では妊娠 9 日以降に体重増加抑制が認められた。

胎児において、同腹児重量、平均胎児重量及び性別比に対照群と比較して差はなかったが、全ての投与群で胎児が小型であった。100 mg/kg/日群の 1 例は口蓋裂及び前肢屈曲がみられたが 120 mg/kg/日群の胎児に異常は認められなかった。

ウサギ胚・胎児発生毒性試験の高用量として 100 mg/kg/日が適切であると考えられた。

2.6.6.6.1.5 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による出生前及び出生後発生並びに母動物の機能に関する予備試験-1

【2.6.7.11】：4.2.3.5.3-01：ONP007（参考資料）

妊娠 Sprague Dawley ラットの雌（8 例/群）にサフィナミド を 0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、出生前及び出生後発生への影響を評価した。投与期間について、試験開始時点では妊娠 6 日から分娩後 10 日までを計画していたが、100 mg/kg/日以上の群では母体

及び／又は出生児に顕著な毒性が認められたことから分娩または授乳前に投与を中止した。また、50 mg/kg/日群では出生児に投与に関連した一般状態変化が認められたが、出生後 10 日までに回復傾向がみられたため、分娩後 20 日まで母動物への投与を延長した。

母動物について、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、妊娠期間及び分娩観察を行い、分娩 21 日後に剖検した。全ての出生児／同腹児について、一般状態、同腹あたりの児数・生存率、性別比及び体重を評価し、出生後 28 日に剖検した。

150 mg/kg/日群の母動物では体重減少、散瞳、流涎、ケージ床への顎擦り、自発運動低下、無反応行動、円背位／腹臥位、緊張低下／体温低下、歩行異常及び／又は蒼白眼等が認められた 4 例を安楽殺とした。また、剖検では、前胃の捻転及び膨満、盲腸の内容物減少及び乾燥、回腸及び／又は十二指腸に黄色液が認められた。切迫殺例における胎児はいずれも小型で、かつ全身浮腫が認められた。生存例の母動物 1 例が分娩した出生児は生後 1 日までに死亡し、胃に乳汁が認められなかった。これらの重篤な毒性のため、その他の動物では投与を中止した。

100 mg/kg/日群の母動物では流涎及び瞳孔散大が認められた。出生児は全て出生後死亡又は安楽殺した。また、出生児の剖検で、多くは胃に乳汁が含まれていなかった。

50 mg/kg/日群の母動物では流涎及びケージ床への顎擦りがみられ、体重増加抑制が僅かに認められた。母動物の全例が生存児を出産したが、対照群と比較し出生児の死亡率は高かった。出生児では、生体重及び体重増加量は対照群と比較し低かった。剖検所見として、離乳前の皮膚の黄色化及び離乳後の頭蓋冠の黄色化又は橙色化が認められた。

出生前及び出生後の発生に関する試験において 50 mg/kg/日以上の用量は不適切であると考えられた。また、50 mg/kg/日群では出生児の死亡率増加及び状態悪化が認められたが、母動物 7 例からの各出生児の 4 例以上が生後 28 日まで生存したことから、30～40 mg/kg/日が高用量に適切である可能性が示唆された。

2.6.6.6.1.6 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による出生前及び出生後発生並びに母動物の機能に関する予備試験-2

【2.6.7.11】：4.2.3.5.3-02：SOI0021（参考資料）

妊娠 Sprague Dawley ラットにサフィナミドを 0（媒体対照：16 例/群）、12.5、25、37.5 mg/kg/日（各 8 例/群）及び 50 mg/kg/日（24 例/群）の用量で妊娠 6 日から分娩後 20 日まで 1 日 1 回反復経口投与し、出生前及び出生後の発生への影響を評価した。また、予備試験 1（2.6.6.6.1.5）で 50 mg/kg/日以上の群における出生児に影響がみられたことから、対照群と 50 mg/kg/日群の出生児を交叉哺育し、母動物及び／又は胎児のどちらに起因する影響であるかについて検討した。さらに、非妊娠ラット（8 例/群）にサフィナミドを 50 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与し、同様に検討した。また、妊娠及び非妊娠ラット並びに出生児について、サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の全身曝露についても評価した。

非妊娠母動物（50 mg/kg/日群）では一部で投与直後に流涎がみられたが、その他に投与に関連した一般状態変化は認められなかった。また、投与 1 及び 2 日に体重が僅かに減少したが、摂餌量に変化はなく剖検所見も認められなかった。

妊娠母動物について、いずれの投与群においても死亡例はみられなかった。50 mg/kg/日群で自発運動低下が認められた。25 mg/kg/日以上の群で一部、投与直後に流涎がみられた。いずれの群においても、僅かに体重増加量の抑制がみられ対照群と比較して体重の低値が認められた。

50 mg/kg/日群では、妊娠期間が 23 日以上と対照群と比較して長かった。妊娠率及び剖検所見にサフィナミド投与の影響は認められなかった。平均着床数、分娩完了時の総同腹児数、子宮内での胎児生存率（着床後生存率）及び平均性別比においてサフィナミドの影響はみられなかった。12.5、25 及び 37.5 mg/kg/日群では出生児の死亡率及び一般状態に投与の影響はみられなかった。

出生児について、50 mg/kg/日群では出生児の死亡率が増加した。25 mg/kg/日以上の群で腹部膨満、皮膚の橙色化がみられ、剖検所見として離乳前の出生児の黄色化及び離乳時に頭蓋骨の橙色化が認められた。また、50 mg/kg/日群では自発運動の低下及び冷感もみられた。これら一般状態変化及び剖検所見の発現数は用量に伴って増加した。12.5 mg/kg/日群では、出生児に対する投与の影響はなかった。

交叉哺育された出生児について、対照群の母動物により哺乳された 50 mg/kg/日群から生まれた出生児では死亡率が増加し、交叉哺育されていない出生児と同様の一般状態変化を示した。一方で、50 mg/kg/日群の母動物により哺乳された対照群から生まれた出生児の死亡率に明らかな影響はみられなかった。50 mg/kg/日群及び対照群のいずれの出生児においても、皮膚の橙色化がみられ、剖検では離乳前の出生児の黄色化及び離乳時に頭蓋骨の橙色化が認められた。

トキシコキネティクス評価の結果、投与 14 日目における妊娠ラット及び非妊娠ラットにおけるサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}8h}$ は同等か非妊娠ラットで増加する傾向が見られたが、NW-1153 の $AUC_{0\text{-}8h}$ のみ非妊娠動物で低下した。また、出生児（交叉哺育でない）においては、出生 4 日目において、12.5 mg/kg/日以上の群で NW-1153 及び NW-1689 が検出され、50 mg/kg/日群ではサフィナミドが検出された。

50 mg/kg/日群では出生児の発生に対する影響が認められたため、出生前及び出生後発生並びに母動物の機能に関する試験では高用量は 37.5 mg/kg/日前後が適切であると考えられた。

2.6.6.6.2 重要な試験（サフィナミド単独）

2.6.6.6.2.1 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

【2.6.7.12.A】：4.2.3.5.1-01：OVZ0006（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 25 例/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、受胎能及び着床までの初期胚発生への影響を評価した。投与期間は雄では交配 28 日前から交配期間終了の約 2 週間後（剖検前日）まで、雌では交配 14 日前から妊娠 6 日までとし、一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定を行った。母動物は妊娠 13 日に剖検し、黄体数、着床数、早期吸収胚数、死亡胚数及び生存胚数を計数した。

その結果、全てのサフィナミド投与群において、雄では試験期間を通じて、雌では妊娠期間中に用量に依存した体重増加量の抑制又は抑制傾向がみられた。150 mg/kg/日群では、雌雄いずれにおいても交配前の第 1 週に摂餌量が軽度に減少し、雌では妊娠 1 週にも摂餌量の減少が認められた。一般状態観察では、全てのサフィナミド群の雄に第 4 週から、100 及び 150 mg/kg/日群の雌に妊娠 1 週から投与後に流涎がみられたが、被験物質の味に起因した変化と考えられた。

雄の受胎能については、いずれのサフィナミド群においても交尾までの日数、交尾率及び受胎率に変化は認められなかった。100 及び 150 mg/kg/日群において、精巣の相対重量の増加がみられたが、体重の低値を反映した変化であり毒性学的意義はないと判断した。これらの群では精子評価において平均速度（average path velocity: VAP）及び直線速度（straight line velocity: VSL）の軽度な低下がみら

れたが、形態異常及び VSL については背景データの範囲内であり、VAP については軽度な変化で授胎率に変化がないことから毒性学的意義は低いと判断した。

雌の受胎能については、150 mg/kg/日群において黄体数及び着床数が軽度に減少した。いずれのサフィナミド投与群においても性周期、交尾までの日数、交尾率及び受胎率に変化は認められなかった。

初期胚発生については、いずれのサフィナミド投与群においても着床前及び着床後胚損失率にサフィナミド投与の影響はなかった。

親動物の一般毒性に関する NOAEL は 50 mg/kg/日未満、受胎能に関する NOAEL は雄で 150 mg/kg/日、雌で 100 mg/kg/日、初期胚発生に関する NOAEL は 150 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.2.2 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による胚・胎児発生に関する試験

【2.6.7.13.A】：4.2.3.5.2-05：9382（評価資料）

妊娠 Sprague Dawley ラット（24 例/群）に妊娠 6 日から妊娠 15 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。妊娠 20 日に母動物を安楽殺し、帝王切開して胎児を摘出した。母動物については一般状態観察、体重及び摂餌量の測定を行い、剖検後に黄体数、着床数、吸収胚及び子宮重量を計数及び測定した。胚・胎児については生存胎児数、早期及び後期死亡胚・胎児数、着床後胚損失率及び胎児体重を計数及び測定し、性別判定及び外表検査を行った後、内臓検査又は骨格検査（0 及び 150 mg/kg/日群のみ）に割り当てた。また、各用量にサテライト群（6 例/群）を設定し、妊娠 6 及び 15 日に全身曝露を評価した。

100 及び 150 mg/kg/日群において、剖検時の母動物体重、妊娠子宮重量に対照群と比較して減少傾向がみられた。これらの群では、一腹あたりの平均胎児体重の減少も認められた。

胎児の内臓検査では、全てのサフィナミド投与群に異所性精巣がみられ、対照群と比較して用量に依存して増加する傾向がみられた。100 及び 150 mg/kg/日群において、中等度の尿管拡張がみられ、150 mg/kg/日群では、対照群に比較して屈曲尿管発現率が増加した。また、100 mg/kg/日群の 1 胎児及び 150 mg/kg/日群の 2 胎児に極度の腎盂拡張が認められたことから、催奇形性の可能性が示唆された。これらの変化は全て被験物質の投与に関連すると考えられた。

外表異常（又は奇形）に関しては、50 mg/kg/日群で複合奇形が 1 例認められたが、用量依存性がないことから偶発的なものと考えられた。また 150 mg/kg/日群で全身性浮腫が 1 例認められたが、この所見と被験物質投与との関連は明らかでなかった。

トキシコキネティクス評価では、妊娠 6 日（単回投与）のサフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量の増加に伴って増大した。妊娠 15 日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はいずれの群においても妊娠 6 日の約 2 倍に増加し、反復投与による曝露量の増加が認められた。

母動物の一般毒性における NOAEL は 50 mg/kg/日、生殖能に関する NOAEL は 150 mg/kg/日、胚・胎児発生に関する NOAEL は 50 mg/kg/日未満と判断した。

2.6.6.6.2.3 ウサギを用いたサフィナミドの経口投与による胚・胎児発生に関する試験

【2.6.7.13.B】：4.2.3.5.2-06：19030（評価資料）

妊娠 New Zealand White ウサギ（20 例/群）に妊娠 6 日から妊娠 18 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、25、50 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。妊娠 29 日に母動物を安楽殺し、帝王切開して胎児を摘出した。母動物については一般状

態観察、体重及び摂餌量の測定を行い、剖検後に黄体数、着床数、吸収胚数及び子宮重量を計数及び測定した。胎児については生存胎児数、早期及び後期死亡胚・胎児数、着床後胚損失率及び体重を計数及び測定し、性別判定及び外表検査を行った後、内臓検査及び骨格検査（0 及び 100 mg/kg/日投与群のみ）を実施した。また、各用量にサテライト群（3 例/群）を設定し、妊娠 6 及び 18 日に全身曝露を評価した。

対照群の 2 例及び 50 mg/kg/日群の 1 例で誤投与による死亡がみられたほか、50 mg/kg/日の 1 例を切迫殺とした。

100 mg/kg/日群の少数の母動物に摂餌量減少及び便量減少がみられ、3 例では投与後に痙攣がみられた。さらに妊娠 9 日に体重増加抑制及び妊娠 9～18 日に摂餌量の減少がみられた。また、誤投与で死亡した 50 mg/kg/日群の 1 例においても痙攣が認められた。

胎児の外表及び内臓検査所見に被験物質投与との関連性はみられなかった。骨格検査では、第 13 肋骨出現及び両側腰帯の第 2 仙椎への挿入等の骨格変化（骨格変異）の発現率が対照群に比較して 100 mg/kg/日群の胎児で高かった。これらの変異は骨化遅延を示すものではなく、この群で認められた母動物の毒性によるものと考えられた。

トキシコキネティクス評価では、妊娠 6 日及び妊娠 18 日のサフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量の増加に伴って増加した。妊娠 18 日の $AUC_{0\text{-}24h}$ はいずれの群においても妊娠 6 日の約 1.3 倍に増加し、反復投与によるサフィナミドの増加が認められた。

母動物の一般毒性における NOAEL は 25 mg/kg/日、生殖能に関する NOAEL は 100 mg/kg/日、胚・胎児発生に関する NOAEL は 100 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.2.4 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による出生前及び出生後発生並びに母動物の機能に関する試験

【2.6.7.14.A】：4.2.3.5.3-03：SOI0059（評価資料）

妊娠 Sprague Dawley ラット（22 例/群）に妊娠 6 日から分娩後 20 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、4、12.5 及び 37.5 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与し、出生前及び出生後発生への影響を評価した。母動物（F_0）には自然分娩後に出生児を離乳まで哺育させ、分娩 21 日後に剖検した。出生児（F_1）は分娩 4 日後に同腹生児数調整を行い、1 母動物あたり 10 例として以降の観察及び検査を行った。余剰出生児は分娩 4 日後に剖検した。生存出生児（F_1）については離乳前に反射機能検査を行い、生殖能評価対象外の出生児は分娩 21 日後に剖検した。生殖能評価対象の出生児（雌雄各 20 例/群）については、離乳後に行動機能検査を行い、性成熟するまで飼育した後、F_1 動物内で交配させ、妊娠 14 日に安楽殺して帝王切開し胚（F_2）発生への影響を評価した。また、各群（2 例/群）の母動物（F_0）から妊娠 6 及び 15 日に採血し、全身曝露を評価した。

母動物の一般状態観察ではいずれの用量でも異常はなく、体重への影響もなかった。

37.5 mg/kg/日群では対照群に比較して分娩 1～4 日後までの出生児死亡率が僅かに高く、投与群の計 13 匹（7 腹）が（おそらく喰殺による）死亡で見つかったか人道上の理由で安楽殺されたのに対し、対照群ではこのような出生児は 4 匹（4 腹）であった。

また、37.5 mg/kg/日群では、腹部の膨満／腫脹又は皮膚の黄色／橙色化を示す出生児の比率も高かった。12.5 mg/kg/日群の出生児 1 匹が分娩 3～4 日に腹部の膨満及び皮膚の橙色化を呈したが、この動物は分娩 21 日後における離乳まで生存した。37.5 mg/kg/日群で離乳前に死亡した出生児の肉眼的観察では、削痩、乳汁の無い胃、皮膚／筋肉組織の橙色化及び腹部／胃／消化管の膨満の発現率上

昇がみられた。21 日齢で剖検した出生児の肉眼的観察では、37.5 mg/kg/日群に頭蓋骨の橙色化も認められたが発現率は減少し回復傾向がみられた。

離乳前死亡例の病理組織学的検査において、37.5 mg/kg/日群の全ての出生児に軽微から中等度のびまん性肝細胞肥大が認められ、雌 1 匹を除くそれら全ての出生児で軽微から中等度の限局性又は多巣性肝細胞壊死を伴っていた。また、ほとんどの出生児に軽微又は軽度の胆管炎がみられた。分娩 21 日後まで生存した出生児に被験物質の投与に関連する所見はなかった。分娩 21 日後においては肝臓及び皮膚の脂肪の量並びに髄外造血の程度にサフィナミド投与群と対照群間で差はなかったことから、離乳前死亡例でみられた肝臓の所見は一過性と考えられた。4 及び 12.5 mg/kg/日群では、離乳前死亡例及び分娩 21 日までの出生児の肉眼的観察において、投与に関連する所見はみられなかった。

出生児（F_1）の行動機能検査及び生殖能評価において毒性所見はなかった。

トキシコキネティクスでは、妊娠 6 日のサフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量の増加以上に増加する傾向がみられた。妊娠 15 日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は 12.5 及び 37.5 mg/kg/日群において妊娠 6 日の約 1.5 倍に増加し、反復投与によるサフィナミドの増加が認められた。

以上の結果から、母動物の一般状態における NOAEL は 37.5 mg/kg/日、出生児における NOAEL は 12.5 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.2.5 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による出生前及び出生後毒性の機序に関する試験

【2.6.7.14.B】：4.2.3.5.3-04：SOI0065（評価試験）

サフィナミドの出生前及び出生後の発生に関する予備試験（2.6.6.6.1.5及び2.6.6.6.1.6）及び評価試験（2.6.6.6.2.4）において、妊娠中又は授乳中にサフィナミドを 37.5 あるいは 50 mg/kg/日の用量で反復経口投与した雌ラットの出生児に皮膚及び頭蓋骨の黄色／橙色化が認められた。この色調変化の機序を検討するため、妊娠 Sprague Dawley ラット（10 例/群）に妊娠 6 日から分娩 20 日までサフィナミドを 0（媒体対照）及び 50 mg/kg/日の用量で反復経口投与し、分娩 21 日に剖検した。一部の出生児から、分娩 4 日に血液生化学検査、分娩 21 日に血液学的検査及び血液生化学検査を実施した。また一部の出生児の組織標本を病理組織学的検査に供した。

50 mg/kg/日の 1 例が誤投与により死亡したほか投与に起因した死亡はみられなかった。

50 mg/kg/日群では、妊娠中及び授乳中に対照群と比較して平均摂餌量が顕著に減少したが、平均体重増加量は僅かに低下しただけであった。出産率への影響はなく、被験物質の投与に関連すると考えられる剖検所見はなかった。

50 mg/kg/日群では、平均出生率の低下とともに分娩 4 日目までの出生児死亡率が対照群と比較して高かった。この出生児死亡は、分娩 1 日以降で同腹子全例死亡が 2 腹、同腹子の 6 匹以上の死亡が 3 腹等であった。50 mg/kg/日群の出生児に 14 日齢以降の死亡はなかった。性比に対する被験物質投与の影響はなかった。

一般状態観察では 50 mg/kg/日群の 8 日齢までの出生児において体温低下、胃／腹部の膨満及び皮膚の橙色化がみられた。

血液生化学検査では分娩 4 日の出生児においてビリルビン及び AST の顕著な上昇、ALT、BUN 及びクレアチニンの上昇がみられた。分娩 21 日の出生児では血液学的検査及び血液生化学検査のいずれにおいても変化はみられなかった。

50 mg/kg/日群で早期に死亡した出生児及び分娩 4 日目に剖検した出生児の剖検において、痩躯、皮膚／頭蓋骨／筋組織／腹部の橙色化、尿の黄色／橙色化及び胃／腹部の膨満等の発現増加がみられた。分娩 21 日で剖検した出生児では、頭蓋骨の橙色化の発現上昇がみられたのみであった。

分娩 4 日で剖検した出生児の病理組織学的検査において、50 mg/kg/日群のほとんどの出生児に腎臓でびまん性皮質上皮細胞肥大がみられ、肝臓に軽微から軽度のびまん性肝細胞肥大が認められた。これら出生児の全てに軽微又は軽度の胆管上皮肥大、軽微又は軽度の限局性又は多巣性肝細胞壊死及び軽微又は軽度の胆管炎／胆管周囲炎がみられた。また、出生児の約半数に門脈周囲の肉芽腫性炎症がみられ、胆管過形成及び毛細胆管内／細胆管胆汁も少数例にみられた。分娩後 21 日に剖検した出生児に被験物質の投与に関連する所見はなく、早期死亡動物及び 4 日齢で剖検した出生児にみられた被験物質投与関連の所見は完全に消失したと思われた。

本試験の結果から、サフィナミド 50 mg/kg/日群の分娩 8 日までの出生児にみられた皮膚の橙色化及び分娩 21 日までの出生児にみられた頭蓋骨の橙色化は、分娩 4 日の出生児にみられた肝胆道系障害による血漿中ビリルビンの著しい増加が原因と考えられた。

2.6.6.6.2.6 ラットを用いたサフィナミドの経口投与による出生前及び出生後発生に関する試験（妊娠中又は授乳中投与）

【2.6.7.14.C】：4.2.3.5.3-05：RF0820（対応する報告書番号 IMP29559.1）（評価資料）

妊娠ラット（対照群 10 例/群、投与群 10 例又は 18 例/群）に妊娠 6 日から 19 日、あるいは分娩 1 日から 20 日の期間にサフィナミドを 0（媒体対照）及び 50 mg/kg/日の用量で反復経口投与し、出生児の出生前及び出生後発生に及ぼす影響を評価した。妊娠中投与群については母動物を妊娠 20 日に剖検した。授乳中投与群については、母動物を分娩 21 日に剖検した。出生児については分娩 4、14 及び 21 日に剖検し、血液生化学検査及び肝臓の病理組織学的検査を実施した。また、サテライト群（対照群：2 例、50 mg/kg/群：8 例）を設定し、妊娠 6 及び 19 日の母動物及び妊娠 20 日の胎児、並びに分娩 1 及び 20 日の母動物及び分娩 4、14 及び 21 日の出生児について全身曝露を評価した。

妊娠中のサフィナミド投与に伴い、対照群と比較して胎児体重の減少がみられた。胎児の肝臓への影響はみられなかった。授乳中のサフィナミド投与では出生児体重に影響はみられなかったが、肝細胞内の空胞又はグリコーゲン含有量が対照群と比較して減少した。

妊娠中及び授乳中の母動物におけるサフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はいずれも同程度で、反復投与による蓄積は認められなかった。また、妊娠 20 日の胎児及び分娩 4 日の出生児に少量のサフィナミドが認められた

出生前及び出生後の発生への影響は、妊娠中及び授乳中の被験物質投与の両方において生じる可能性が示唆された。

2.6.6.6.3 重要な試験以外の試験（レボドパ／カルビドパとの併用）

2.6.6.6.3.1 ラットを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの併用経口投与による胚・胎児発生に関する予備試験

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-07：SOI0020（参考資料）

妊娠 Sprague Dawley ラット（6 例/群）に妊娠 8 日から妊娠 17 日までサフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg の用量で 1 日 1 回反復経口投与するとともに、レボドパ／カルビドパを

80/20 mg/kg/日の用量で投与した。レボドパ／カルビドパは4時間の間隔をあけて1日2回投与とし、2回目の投与は対照群では媒体を投与した。妊娠20日に母動物を剖検して生殖毒性評価と胎児に対する肉眼的評価を行った。ラットでは、ドパミンアゴニスト（レボドパ／カルビドパ）は妊娠の成立と初期の妊娠維持のための主要なホルモンであるプロラクチン分泌に影響を及ぼし、初期の妊娠を損なう可能性があることから、投与開始を8日目まで遅らせた。

サフィナミド150 mg/kg/日との併用群では、母動物において大型の白色便が妊娠14日目以降に全例で認められた。また、一般状態観察では立毛、流涎、顎擦り及び被毛の汚れが認められ、さらに体重増加量の抑制及び摂餌量の減少が僅かに認められた。胚・胎児生存率は投与の影響を受けなかったが、胎児重量のごく僅かな減少、胎盤重量のごく僅かな増加及び浮腫のある胎児の高い発現率が認められた。サフィナミド100 mg/kg/日との併用群では母動物において立毛、流涎、顎擦り及び被毛の汚れが認められた。また、体重増加抑制及び摂餌量の減少が僅かに認められた。

サフィナミド50 mg/kg/日との併用群では、立毛、流涎及び顎すりが認められた。

ラット胚・胎児発生毒性試験の最高用量としてサフィナミド100 mg/kg/日がレボドパ／カルビドパ80/20 mg/kg/日との併用投与に適していると判断した。

2.6.6.6.3.2 非妊娠ウサギを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの併用経口投与による予備試験

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-08：SOI0025（参考資料）

雌性New Zealand Whiteウサギ（3例/群又は6例/群）にサフィナミドを100及び200 mg/kg/日の用量で1日1回反復経口投与するとともに、レボドパ／カルビドパを80/20 mg/kgの用量で経口投与し、最長で14日間反復投与して毒性を評価した。また、レボドパ／カルビドパ80/20 mg/kg/日単独群を設け同様に評価した。レボドパ／カルビドパは4時間の間隔をあけて1日2回投与とした。

サフィナミド200 mg/kg/日との併用群では、投与初日にいずれも腹臥位、不安定歩行／失調性歩行及び体温低下等の症状がみられたため、2例を切迫殺し、残りの動物は投与中止して安楽殺とした。剖検では被験物質に関連する所見はみられなかった。

サフィナミド100 mg/kg/日との併用群では1例が失調性歩行及び不安定歩行を示し、摂餌及び飲水がほとんどみられなくなり体重も減少したため、投与7日目に人道的観点から安楽殺した。残り5例は15日目まで生存したが、いずれも切迫殺例と同様の一般状態変化を示し、体重増加量はレボドパ／カルビドパ単独群と比べて低値を示した。剖検では被験物質に起因した所見は認められなかった。

レボドパ／カルビドパ単独群では毒性は認められなかった。

妊娠ウサギ胚・胎児発生毒性予備試験の高用量としてサフィナミド100 mg/kg/日を超えない用量がレボドパ／カルビドパ80/20 mg/kg/日との併用投与として適していると判断した。

2.6.6.6.3.3 ウサギを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの併用経口投与による胚・胎児発生に関する予備試験

【2.6.7.11】：4.2.3.5.2-09：SOI0045（参考資料）

妊娠New Zealand Whiteウサギ（6例/群）に妊娠6日から妊娠19日までサフィナミドを20、40及び80 mg/kgの用量で1日1回反復経口投与するとともに、レボドパ／カルビドパを80/20 mg/kg/日の用量で反復経口投与した。また、サフィナミド80 mg/kg/日単独群、レボドパ／カルビドパ80/20 mg/kg/日単独群及び媒体対照群を設けた。なお、レボドパ／カルビドパは4時間の間隔をあけて1日2回投

与とし、2 回目の投与は対照群及びサフィナミド単独群では媒体を投与した。本試験では、妊娠 29 日に母動物を剖検して、生殖毒性評価と胎児に対する肉眼的評価を行った。

母動物では、全ての用量の併用群で対照群と比べて、一過性の体重減少、体重増加量の低下及び摂餌量の減少が認められた。また、全ての併用群でみられた尿の暗色化は、レボドパ／カルビドパ単独群でも認められた。いずれの群においても被験物質に起因した剖検所見は認められなかった。

サフィナミド 40 又は 80 mg/kg/日との併用群では胚・胎児吸収が増加し、その結果として平均生存同腹児数が減少した。また、サフィナミド 80 mg/kg/日との併用群では、平均胎児重量及び胎盤重量が僅かに減少した。

胚・胎児では、全ての用量の併用群において、心血管異常を有する胎児数が明らかに増加した。また、心臓奇形及び腹部膨満を有する胎児が認められたが発現率は低かった。これらの変化はレボドパ／カルビドパ単独群でもみられたが、併用群で発現が高かった。また、サフィナミド 80 mg/kg/日との併用群では、無気肺／肺の小型化を示す胎児も認められた。媒体対照群の胎児に、このような異常は認められなかった。

サフィナミド 80 mg/kg/日単独群では、対照群と比べて大幅な平均体重の減少、僅かな摂餌量の低値が認められた。被験物質に関連した一般状態変化及び剖検所見はなかった。また、平均胎児重量及び胎盤重量が僅かに減少したが、胚・胎児生存率及び胎児の形態に対する影響はなかった。

レボドパ／カルビドパ 80/20 mg/kg/日単独群では体重及び摂餌量への影響は認められなかった。また胚・胎児の生存及び成長への影響は認められなかった。

ウサギ胚・胎児毒性試験の最高用量にはサフィナミド 40 mg/kg/日とレボドパ／カルビドパ 80/20 mg/kg/日との併用投与が適していると判断した。

2.6.6.6.4 重要な試験（レボドパ／カルビドパ併用）

2.6.6.6.4.1 ラットを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの併用経口投与による胚･胎児発生に関する試験

【2.6.7.13.C】：4.2.3.5.2-10：SOI0057（評価資料）

妊娠 Sprague Dawley ラット（20 例/群）に妊娠 8 日から 17 日までサフィナミドを 25、50 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回反復経口投与するとともに、レボドパ／カルビドパを 80/20 mg/kg/日の用量で反復経口投与した。また、媒体対照群、レボドパ／カルビドパ 80/20 mg/kg/日単独群及びサフィナミド 100 mg/kg/日単独群も設けた。なお、レボドパ／カルビドパは 4 時間の間隔をあけて 1 日 2 回投与とし、2 回目の投与は対照群及びサフィナミド単独群では媒体を投与した。妊娠 20 日に母動物を剖検して生殖能評価及び胎児に対する剖検を行った。また、サテライト群を設け、サフィナミド、NW-1689、レボドパ並びにカルビドパの全身曝露についても評価した。

母動物において、投与に起因する死亡及び一般状態変化はみられなかった。サフィナミド 100 mg/kg/日との併用群及びサフィナミド 100 mg/kg/日単独群では体重増加抑制及び摂餌量減少が僅かにみられた。

サフィナミド 50 及び 100 mg/kg/日との併用群並びにサフィナミド 100 mg/kg/日単独群において、胎児体重の低下がみられたが、レボドパ／カルビドパ単独群と比較して併用群で低値であった。

全ての併用群において肩甲骨の湾曲、長骨の短縮／湾曲／肥厚、腎乳頭の欠損又は痕跡状過剰、腎盂拡張等が認められ、用量に応じて異常の種類及びこれらを有する胎児の 1 腹あたりの発現率が増加した。併用投与でみられた胚・胎児への毒性は、腎盂拡張を除きレボドパ／カルビドパ又はサフィナミド単独群でもみられた。しかし、サフィナミド 50 又は 100 mg/kg/日とレボドパ／カルビドとの併

用群では、それぞれの単独群に比べ、一部の奇形（肩甲骨の湾曲、長骨の短縮／湾曲／肥厚）の発現率が高かった。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミド及びNW-1689は用量に応じた血漿中濃度の増加がみられた。また、サフィナミド、NW-1689、レボドパ及びカルビドパの全身曝露について、併用による影響はみられなかった。

以上の結果から、ラットにサフィナミドをレボドパ／カルビドパと併用する場合において、それぞれの単独投与と比較して胚・胎児毒性の発現が増加すると考えられた。

2.6.6.6.4.2 ウサギを用いたサフィナミド及びレボドパ／カルビドパの併用経口投与による胚･胎児発生に関する試験

【2.6.7.13.D】：4.2.3.5.2-11： SOI0046（評価資料）

妊娠New Zealand Whiteウサギ（22例/群）に妊娠6から妊娠19日までサフィナミドを4、12及び40 mg/kg/日の用量で1日1回反復経口投与するとともに、レボドパ／カルビドパを80/20 mg/kg/日の用量で反復経口投与した。また、レボドパ／カルビドパ80/20 mg/kg/日単独群及びサフィナミド40 mg/kg/日単独群並びに媒体対照群も設けた。レボドパ／カルビドパは4時間の間隔をあけて1日2回投与とし、2回目の投与は対照群及びサフィナミド単独群では媒体を投与した。妊娠29日に母動物を剖検して生殖能評価及び胎児に対する剖検を行った。また、サテライト群を設け、サフィナミド、NW-1153、NW-1689、レボドパ並びにカルビドパの全身曝露についても評価した。

母動物において、全ての併用群及びサフィナミド単独群では、摂餌量の減少が認められたが、体重の変化は媒体対照群と同等であった。また、全ての併用群及びレボドパ／カルビドパ単独群で尿の暗色化が認められたが、被験物質に起因した剖検所見はいずれも認められなかった。

胎児において、併用群では、いずれもの群でもレボドパ／カルビドパ又はサフィナミドそれぞれの単独群に比べ、1腹あたりの胚・胎児死亡数が増加した。また、膜性心室中隔欠損、心臓からの血管拡張、血管1本のみ及び心臓／心房／心室の腫大／奇形が認められ、サフィナミドの用量に応じてこれらを有する胎児／同腹児の発現率が増加した。また、媒体対照群及び施設背景データの両方と比較して骨格異常／変異を有する胎児／同腹児の発現率も増加した。

以上の結果から、ウサギにサフィナミドをレボドパ／カルビドパを併用する場合において、それぞれの単独投与と比較して胚・胎児毒性の発現が増加すると考えられた。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 静脈内及び血管周囲組織への刺激性試験

【2.6.7.16】：4.2.3.6-01：RF1270（対応する報告書番号 IMP29611）（評価資料）

雄性 New Zealand White ウサギ（6 匹）を用いて、サフィナミド（5 mg/site）を静脈内及び血管周囲組織に投与した時の局所刺激性を評価した。静脈内投与では、左伏在静脈にサフィナミドを 2 mg/mL の濃度で 2.5 mL、右伏在静脈に媒体を 2.5 mL それぞれ単回投与した。血管周囲投与では、左前肢にサフィナミドを 2 mg/mL の濃度で 2.5 mL、右前肢に媒体を 2.5 mL それぞれ単回投与した。全例について毎日一般状態観察を実施した。6 匹中 3 匹は投与 2 日後、残りの 3 匹は投与 14 日後に安楽殺し、投与部位について剖検及び病理組織学的検査を行った。

その結果、死亡はなく、一般状態に異常は認められなかった。静脈内投与部位では、投与 3 日目及び 15 日目の剖検及び病理組織学的検査において投与に関連した変化は認められなかった。一方、前肢血管周囲投与では病理組織学的検査において投与 3 日目に血管周囲の軽度な炎症が認められた。投与 15 日目に炎症は認められず、血管周囲／血管又は皮下に線維症が認められた。

以上の結果から、サフィナミドの静脈内投与において刺激性は認められなかったが、血管周囲に投与された場合は軽度な炎症反応が認められた。

2.6.6.7.2 皮膚刺激性試験

【2.6.7.16】：4.2.3.6-02：N964-Q1568（対応する報告書番号 9750309）（評価資料）

雌性 New Zealand White ウサギ（3 匹）を用いてサフィナミド粉末 500 mg を単回経皮投与した時の皮膚刺激性を評価した。体部腹側（塗布部位）を投与前日に剃毛し、ガーゼを用いてサフィナミド粉末 500 mg を 4 時間接触させた。接触時間終了時点で皮膚に残った化合物を水で洗浄した。洗浄の 1、24、48 及び 72 時間後に動物を観察した。経済協力開発機構（OECD）ガイドライン No.404 に従い皮膚変化を記録して、紅斑及び浮腫形成の評点化を実施した。その結果、投与後 72 時間の観察期間を通して、皮膚に紅斑又は浮腫は認められなかった。

2.6.6.7.3 眼刺激性試験

【2.6.7.16】：4.2.3.6-03：N965-Q1569（対応する報告書番号 9850066）（評価資料）

雌性 New Zealand White ウサギ（3 匹）を用いて、サフィナミド粉末 100 mg を眼に単回点眼投与したときの眼刺激性を評価した。投与前日に既存の刺激性や損傷がないか両眼を検査した。投与は、右眼の下瞼を静かに離した後、眼球や結膜を損傷させないようにサフィナミド粉末を 100 mg を結膜嚢に付けた。次いで、下瞼を持ったまま静かに閉じて眼の表面に 2～3 秒間ゆっくりと動かした。左眼は未投与のまま対照として使用した。投与の 1、24、48 及び 72 時間後、並びに 8、11、15、18 及び 22 日後に観察した。なお、投与の 24 時間後に、残っていたサフィナミド粉末は水ですすぎ、眼球をフルオレセインで染色して角膜上皮の損傷を評価した。OECD ガイドライン No.405 に従い、角膜、虹彩及び結膜の病変の変化の記録及び評点化を実施した。1、4、8、15 及び 22 日目に体重を記録した。

その結果、投与 1 時間後に顕著な角膜混濁及び明らかな結膜の腫脹が認められ、1/3 例では結膜が僅かに赤くなっていた。虹彩は角膜混濁により識別できなかった。投与 24 時間後の洗浄後において、

角膜病変が表面全体にみられたが、虹彩は識別でき光に対する反応がみられた。これらの変化は 22 日後の観察期間終了時まで持続し、2/3 例では角膜混濁のため虹彩が目視できず、結膜はわずかに赤く腫脹が認められた。残り 1 例では、虹彩の識別は可能であったが光には反応しなかった。

以上の結果より、サフィナミド粉末 100 mg の単回点眼投与により重度な刺激性（角膜混濁及び結膜の腫脹）が認められ、これらの変化は 22 日間の観察期間中持続し、水による洗浄で軽減しなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性試験

該当なし

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

該当なし

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験　（網膜変性に関する追加試験）

2.6.6.8.3.1 アルビノラット網膜でのドパミン及びドパミン代謝物濃度に対するサフィナミド単回経口投与の影響

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-01：1209024（参考資料）

本試験では、アルビノラット網膜でのドパミン濃度に対するサフィナミドの影響を評価した。

雄性 Sprague Dawley ラット（16 匹/群）に媒体あるいはサフィナミド 150 mg/kg/日を単回経口投与した。1 時間後に、ドパミン代謝に関わる酵素及びトランスポーターを有するアマクリン細胞を含む網膜サンプルを採取し、ドパミン、その代謝物 DOPAC 及び HVA の濃度を測定した。その結果、ドパミン、DOPAC 及び HVA の濃度は媒体と比較して同等であった。

網膜では脳と比較してドパミンの再取込みは低く、さらにドパミン代謝が低下すると、細胞外ドパミン量が過剰となり、代謝物が酸化され神経細胞に対して有害作用が現れることがある[1)~3)]。サフィナミドはドパミン代謝を担う酵素の一つである MAO-B を阻害するが、網膜におけるドパミン代謝物（DOPAC 及び HVA）の濃度に変動がなかったことから、サフィナミドの MAO-B 阻害により神経細胞へ有害作用が及ぶ可能性は低いと考えられた。

2.6.6.8.3.2 有色素ラットを用いたサフィナミドの 2 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-02：SOI0044（参考資料）

有色素（Long Evans）ラット（雌雄各 12 匹/群）に、サフィナミドを 0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg/日の用量で 2 週間反復経口投与した。本試験では、死亡・一般状態観察、体重測定、トキシコキネティクス評価及び剖検を実施した。加えて、それぞれの群の雌雄各 6 例から眼球を摘出し、病理組織学的検査を実施した。

いずれの群においても死亡例はなかった。投与に関連した一般状態変化は、投与直後にみられる一過性の流涎及び／又は顎擦り並びに自発運動の亢進又は低下であった。いずれの変化も一過性であり、各投与日の最終観察時点で変化は消失していた。

剖検では、投与に起因する明らかな肉眼的変化はなかった。眼球の病理組織学的検査では、100 mg/kg/日群の雌及び 150 mg/kg/日群の雌雄において、ごく軽度な網膜外顆粒層の核数の減少がみられた。

トキシコキネティクス評価の結果、サフィナミド、代謝物 NW-1153 及び NW-1689 の投与 13 日目における全身曝露量は、用量の増加に伴い増大した。またいずれも雌の全身曝露量は全般的に雄と比較して高いことが示された。

有色素ラットにサフィナミドを50､100及び150 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与したところ、忍容性は良好であったと判断された。100及び150 mg/kg/日群では網膜変性が認められた。

2.6.6.8.3.3 アルビノラットを用いたサフィナミド及び／又はプラミペキソール2週間経口投与毒性予備試験

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-03：SOI0055（参考資料）

雌性アルビノ（Crl: CD（Sprague Dawley））ラット（5匹/群）にサフィナミド及び／又はプラミペキソールを2週間反復経口投与し、網膜変性を検討するラット13週間経口投与毒性試験の用量設定試験として実施した。サフィナミドとプラミペキソールをそれぞれ50/25 mg/kg/日及び100/25 mg/kg/日又はプラミペキソールを単独で25 mg/kg/日の用量で反復経口投与し、対照群には媒体を投与した。以前の試験で雄よりも雌で全身曝露量が高いことが示されため、本試験には雌のみを用いた。本試験では、死亡・一般状態観察、体重、摂餌量及び摂水量測定、眼科学的検査、臓器重量測定及び眼球のみの病理組織学的検査を実施した。

被験物質に関連する死亡はなかった。被験物質投与群では、全例で投与1日目から床敷の中に隠れる、床敷を食べる、自発運動亢進、半眼、及び円背位等の中枢症状が認められた。被験物質投与群では、投与初期はいずれも体重減少がみられ、それ以降の投与期間では体重増加量の減少がみられた。摂餌量は､投与1週目では被験物質を投与した全群で減少したが､2週目は対照群と同程度となった。眼科学的検査及び剖検では、投与に起因した変化は無かった。被験物質を投与した全群で卵巣重量の高値及び胸腺重量の低値が認められた。サフィナミド50及び100 mg/kg/日群とプラミペキソールの併用群では肝臓重量の高値がみられ、サフィナミド／プラミペキソール100/25 mg/kg/日併用群及びプラミペキソール単独群では肺及び気管支の相対重量並びに副腎の絶対重量が対照群と比較して有意に増加した。

眼球の病理組織学的検査では、サフィナミド50又は100 mg/kg/日とプラミペキソールとの併用群において、網膜外顆粒層での核の減少が用量依存的にみられた。プラミペキソール単独群では同様の所見は認められなかった。

本試験条件下において、プラミペキソール単独では網膜への影響はみられなかったが、サフィナミドを併用することで網膜変性が認められた。サフィナミド100 mg/kg/日とプラミペキソール25 mg/kg/日の併用投与はより長期の投与に適していると思われたが､サフィナミド単独投与との比較が必要と考えられた。

2.6.6.8.3.4 アルビノラットを用いたサフィナミド及び／又はプラミペキソールの2週間反復経口投与毒性補足試験

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-04：SOI0066（参考資料）

雌性アルビノ（Crl:CD（Sprague Dawley））ラット（5匹/群）にサフィナミドを0（媒体対照）、50、100 mg/kg/日、又はサフィナミドとプラミペキソールをそれぞれ100/25 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与し、網膜変性の初期の発症を検討した。以前の試験で全身曝露量が雄よりも雌の方が高いことが示されていたため、本試験では雌のみを用いた。

投与に起因する死亡はなかった。

サフィナミドを投与した全ての群で、顎擦り及び爪先歩行が認められた。サフィナミドとプラミペキソールの併用群で、体重増加量及び摂餌量の低値並びに摂水量の高値が認められた。

眼科学的検査では、投与に起因した変化は無かった。

サフィナミドとプラミペキソールとの併用群で副腎及び卵巣の絶対重量の高値が、サフィナミド 50 及び 100 mg/kg/日単独群では胸腺、肺及び気管支の絶対重量の高値が認められた。

剖検において、肺にうっ血及び／又は白色斑がサフィナミド 100 mg/kg/日の単独群及びプラミペキソールとの併用群で認められ、サフィナミドとプラミペキソールの併用群の 2 例で副腎の腫大が認められた。

眼球の病理組織学的検査では、サフィナミド 100 mg/kg/日単独群の 3 例の視細胞層に、マクロファージと思われる卵円形の核が散見され、そのうち 2 例には外顆粒層の核の軽微な減少が認められた。サフィナミドとプラミペキソールの併用群においても同様に卵円形核の出現及び外顆粒層の核の軽微な減少がみられたことに加え、3 例では外顆粒層の核の明らかな減少が限局性に認められた。サフィナミド 50 mg/kg/日単独群では網膜変化は認められなかった。

雌性アルビノ Sprague Dawley ラットにサフィナミドを 100 mg/kg/日の用量で 2 週間反復経口投与した結果、軽微な網膜変性が発現した。サフィナミドに加え、プラミペキソールを 25 mg/kg/日で併用投与すると網膜の変化が増悪する可能性が示唆された。

2.6.6.8.3.5 アルビノラット及び有色素ラットを用いたサフィナミド及び／又はプラミペキソールの 2 週間反復経口投与毒性予備試験

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-05：SOI0064（参考資料）

雌性アルビノ（Crl:CD（Sprague Dawley））ラット及び有色素（Long-Evans）ラットを用いた 13 週間経口投与毒性試験の予備試験として、2 週間反復経口投与毒性試験を実施した。サフィナミドとプラミペキソールを 125/25 mg/kg/日、又はプラミペキソールを単独で 25 mg/kg/日の用量で両系統のラット（各系統 5 匹/群）に 2 週間反復経口投与した。各系統の対照群には媒体を同様に投与した。本試験では、死亡・一般状態観察、体重、摂餌量及び摂水量測定、眼科学的検査、臓器重量測定、剖検並びに病理組織学的検査（眼は全例、胃は有色素ラットのみ）を実施した。

投与に起因する死亡はなかった。サフィナミドの有無に関わらずプラミペキソールを投与した両系統のラットで投与 1 週目に爪先歩行及び不安定歩行が認められた。これらの症状は有色素ラットでより高頻度に、より長期間継続してみられた。加えて、有色素ラットでのみ体温低下が認められた。サフィナミド投与の有無に関わらず、プラミペキソールを投与した両系統のラットで投与 5 日目以降に顎擦り行動が投与後に最長で 30 分間にわたって散見され、この一般状態変化は併用群でより高頻度にみられた。

併用群及びプラミペキソール単独群では両系統ともに対照群と比較して平均体重増加量が低かった。摂水量は、両系統ともに対照群と比較して併用群及びプラミペキソール単独群で高かった。

眼科学的検査では、投与に起因する変化はみられなかった。

アルビノラットの併用群では甲状腺及び副甲状腺の絶対重量の低下がみられた。両系統の併用群で、副腎の絶対重量及び相対重量が対照群と比較して高かった。また、両系統の併用群及びプラミペキソール単独群で卵巣の絶対重量が対照群よりも高く、胸腺の絶対重量が対照群よりも低かった。

剖検では、両系統の併用群又はプラミペキソール単独群で肺の淡色領域がみられ、有色素ラットでは胃粘膜陥没の発現が増加した。

眼の病理組織学的検査では、両系統の併用群において網膜外顆粒層の核数が減少し、視細胞層でマクロファージと思われる卵円形細胞が散見された。網膜外顆粒層の組織変化は、アルビノラットと比べて有色素ラットでより顕著であった。

2.6.6.8.3.6 アルビノラット及び有色素ラットを用いたサフィナミドの 13 週間経口投与毒性試験

【2.6.7.17.D.1】：4.2.3.7.3-06：SOI0056（評価資料）

サフィナミド投与による網膜変性についてアルビノ（Crl:CD（Sprague Dawley））ラットと有色素（Long-Evans）ラットを用いて比較検討した。各系統のラット（各系統雌 10 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）及び 125 mg/kg/日の用量で 13 週間反復経口投与し、剖検した。さらに、サテライト群を設け、眼の電子顕微鏡検査（各系統雌 4 匹/時点/群）を実施した。また、サフィナミド、NW-1689 及び NW-1153 について全身曝露、網膜中又は脂肪中濃度（各系統雌 3 匹/時点/群）についても評価した。

有色素ラットのサフィナミド群 1 例を一般状態悪化のため 6 週目に切迫屠殺した。一般状態観察において、両系統のサフィナミド群で顎擦り及び流涎がみられた。

4 週目及び 8 週目の眼科学的検査ではいずれの群も投与に起因する変化はみられなかった。しかし、13 週目にはアルビノラットのサフィナミド群 10 例中 4 例でわずかなの眼底反射亢進が認められた。

両系統のサフィナミド群において肝臓の絶対重量及び相対重量が対照群と比較して高かった。剖検では、両系統のサフィナミド群で副腎の腫大及びアルビノラットの肺で淡色域が観察された。サフィナミド投与に関連する主な病理組織学的所見として、副腎の皮質肥大、肺の泡沫状マクロファージ巣並びに眼の網膜視細胞層における核数及び幅の減少（萎縮）があった。これらの投与に関連した変化は両系統で認められ、その程度に明らかな差はみられなかった。

サテライト群で実施した投与 1、2 及び 3 ヶ月後の病理組織検査おいて、両系統のラットでみられた網膜萎縮は時間経過とともに程度が増悪し、投与 1～2 ヶ月では有色素ラットの方がわずかに強かった。

AmbF 染色した準超薄網膜切片の光学顕微鏡観察において、アルビノラットでは外顆粒層の萎縮が 9 例中 3 例に、桿体細胞の変性・消失が 9 例中 9 例に、網膜色素上皮における青緑色の細胞質内封入体が 9 例中 9 例に認められた。有色素ラットでは、外顆粒層の萎縮が 12 例中 11 例に、桿体細胞の変性・消失が 12 例中 11 例に、網膜色素上皮における青緑色の細胞質内封入体が全例で認められた。

網膜の電子顕微鏡観察で、両系統ともに対照群と比較して外顆粒層での桿体細胞の核数の減少と核の凝縮及び外節円板での桿体錐体層の変性（崩壊）と消失（萎縮）並びに網膜色素上皮でのオスミウム酸親和性脂肪滴様封入体、貪食活性の亢進（層状ファゴソーム及びリソソームの増加）及び軽微な細胞質空胞化が認められた。

125 mg/kg/日を経口投与した投与 1 日目、5 及び 13 週目での有色素ラットでのサフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はアルビノラットと同程度であった。代謝物 NW-1689 の全身曝露量は、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ に関して有色素ラットの方がアルビノラットよりも低い傾向があった。反復投与後には両系統ともに代謝物 NW-1689 の蓄積が認められた。また、網膜中及び腹腔内脂肪組織中の薬物濃度測定を行った結果、両系統におけるサフィナミドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は脂肪中では同程度であったが網膜中では有色素ラットの方がアルビノラットより顕著に高かった。

以上のように、125 mg/kg/日群では、眼の後眼房壁内のサフィナミド濃度はアルビノラットよりも有色素ラットで高かったが、両系統ともに網膜萎縮が認められ、13 週間の投与後には両系統ともに同程度であった。

2.6.6.8.3.7 アルビノラット及び有色素ラットを用いたサフィナミド及びプラミペキソールの 13 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.17.D.2】：4.2.3.7.3-07：SOI0054 試験（評価資料）

雌性アルビノ（Crl:CD（Sprague Dawley））ラット（各 12 匹/群）及び雌性有色素（Long-Evans）ラット（各 18 匹/群）に、サフィナミド及びプラミペキソールを併用又は単独で 13 週間反復経口投与し、網膜への影響について検討した。用量はサフィナミド／プラミペキソールを併用で 5/25、15/25 及び 50/25 mg/kg/日、サフィナミドを単独で 15 及び 50 mg/kg/日、プラミペキソールを単独で 25 mg/kg/日とし、対照群には媒体を投与した。一般状態観察、体重、摂餌量及び摂水量測定、投与 4 及び 13 週目に眼科学的検査、投与 5 及び 14 週目に一部の臓器（副腎、脳、眼、肝臓、腎臓、肺、腸間膜リンパ節、脾臓及び肉眼的異常部位）の病理組織学的検査を実施した。また、一部の動物の網膜については電子顕微鏡観察を行った。さらに、サテライト群（媒体対照：雌 6 匹、被験物質投与群：雌 9 匹）を設け、サフィナミド、代謝物（NW-1153、NW-1689、NW-1199）及びプラミペキソールの全身曝露を評価した。

サフィナミド／プラミペキソール 5/25 mg/kg/日群の 1 例で誤投与による死亡がみられた。

両系統のラットにおいて、プラミペキソールを投与した全ての群で体重増加抑制がみられ、両系統のラットでサフィナミド 50 mg/kg/日との併用による増強がみられた。摂餌量については被験物質に関連した影響はなく、摂水量はプラミペキソールを投与した全ての群で対照群と比較してやや増加したがサフィナミドの併用による影響はみられなかった。

投与 5 及び 14 週目では、プラミペキソールを投与した全ての群で卵巣の肥大がみられた。サフィナミド 50 mg/kg とプラミペキソールとの併用群において、副腎皮質の肥大及び重量増加を伴う副腎皮質の腫大及び肺における泡沫状マクロファージ集簇巣の発現率増加がみられたが、有色素ラットにおける副腎及び肺の変化は用量相関性が認められなかった。また、これらの程度は両系統のラットで同様であり、単剤投与と比較して発現頻度がやや高かった。

眼科学的検査において被験物質に起因する変化はみられなかった。眼の光学顕微鏡検査において外顆粒層の核の減少が両系統のサフィナミド 50 mg/kg/日との併用群にみられ第 5 週から第 14 週にかけて進行した。網膜の AmbF 染色結果では、外顆粒層及び視細胞層の萎縮並びに桿体錐体層における単細胞核の出現がみられ、電子顕微鏡検査では、プラミペキソールの有無に関わらず、外顆粒層桿体細胞の核数減少及び核濃縮、桿体錐体層における外節／内節変性及びミクログリア活性化、その他にミュラー細胞突起増殖及び網膜色素上皮における脂肪滴様封入体及び軽度の貪食活性増加が認められた。これらの変化は、第 5 週ではアルビノラットにおけるサフィナミド 50 mg/kg/日を投与した全ての群にみられ、第 14 週ではこれらに加えて有色素ラットにおけるサフィナミド 50 mg/kg/日との併用群及びアルビノラットにおけるサフィナミド 15 mg/kg/日を投与した全ての群においても認められた。

プラミペキソール単独群でみられた体重減少がサフィナミド併用により増強したほかは、プラミペキソールとの併用群及びサフィナミド単独群とで、みられた変化は同様・同等のものであった。

これらの結果から、アルビノラットは有色素ラットに比べて網膜損傷に対し感受性が高く、プラミペキソールの併用により両系統で網膜損傷が増強すると考えられた。

2.6.6.8.3.8 有色素ラットを用いた網膜機能試験

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-08：STC trial 378_10087_[redacted] （参考資料）

網膜への有害作用を早期に検出するための臨床現場で使用可能な機能的及び形態学的マーカーを同定及び確認することを目的とした。雌の有色素（Long Evans）ラットに、サフィナミド 0（媒体対照）、25、125 及び 200 mg/kg/日（各々19、10、11 及び 11 匹）、サフィナミド 125 mg/kg/日及びプラミペキソール 25 mg/kg/日併用（15 匹）、プラミペキソール 25 mg/kg/日（10 匹）を 15 日間反復経口投与した。その後、試験 16 日目から 42 或いは 70 日目まで休薬期間を設定し、この間に観察項目により適宜検査を実施した。試験中に一般症状観察及び体重測定を実施した。高分解能の SD-OCT による網膜の観察は投与開始前、試験 21、35 及び 63 日目に実施した。また、ERG[6)]による観察は初回及び最終投与の 1 時間後、試験 28 及び 56 日目に実施した。試験 21（±7）、42 及び 70 日目に採材を行い、網膜の光学顕微鏡による病理組織学的検査並びに電子顕微鏡の評価を実施した。

ERG 検査では 125 及び 200 mg/kg/日のサフィナミド群において、15 日間反復投与により用量に依存した影響が桿体と錐体の両パラメータで認められた。その影響は特に暗視適応での桿体と錐体の応答である b 波の頂点潜時及び振幅、桿体系の V-logI 関数及び錐体系の 19.53Hz フリッカー応答の各検査で認められた。また、サフィナミド 200 mg/kg/日群及びサフィナミド 125 mg/kg/日とプラミペキソールの併用群においても初回投与 1 時間後に ERG 検査での影響が観察された。

投与及び休薬期間終了後、ERG 検査でみられた頂点潜時の変化はベースラインレベルに回復したが、振幅については回復性を認めなかった。サフィナミド 25 mg/kg/日群では ERG 検査における影響はみられなかった。プラミペキソール群（単独及び併用群）では初回投与後の桿体と錐体の b 波頂点潜時の遅延が認められたが、これらの所見はその後の検査では検出されなかった。

SD-OCT 及び病理組織学的検査では、サフィナミド 25 mg/kg/日群において網膜に形態変化を認めなかった。一方、サフィナミド 125 及び 200 mg/kg/日群並びにサフィナミド 125 mg/kg/日とプラミペキソールの併用群では、ERG 検査で変化を示したラットにおいて SD-OCT 及び病理組織学的検査で網膜の中央に損傷領域がみられた。病理組織学的検査では、網膜の外側域である外顆粒層の顕著な減少を示したが、網膜の内側には影響を示さなかった。さらに SD-OCT 所見又は病理組織学的所見で短期と長期の休薬期間との間に相違は認められなかった。

有色素ラットへのサフィナミド又はプラミペキソール 15 日間反復経口投与において、サフィナミド 25 mg/kg/日の用量では網膜機能（ERG）及び形態（SD-OCT 及び病理組織学的検査）への影響は認められなかった。サフィナミド 125 及び 200 mg/kg/日又はサフィナミド 125 mg/kg/日とプラミペキソール 25 mg/kg/日の併用では、網膜の中心領域の視細胞に損傷が認められた。これら損傷は組織学的検査および SD-OCT で休薬期間に経時的に観察をしても各時点間で相違は認められず、可逆性を示さなかった。

以上の結果から SD-OCT および ERG の検査は、網膜変性及び萎縮の早期検出のための臨床マーカーとなり得ると考えられた。

2.6.6.8.3.9 有色素ラットを用いた網膜機能追加試験

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-09：STC trial 378_10092_[redacted] （参考資料）

網膜の機能を示す ERG におけるサフィナミドの影響について、可逆性及び網膜形態変化を伴うか否か検討することを目的に、有色素ラットにサフィナミド 125 mg/kg/日を投与した後の異なる時点における評価を実施した。

雌の有色素（Long Evans）ラット（76 匹）を評価時点で 6 群（第 1～3 群：対照 4 匹、投与 7 匹、第 4～5 群：対照 6 匹、投与 11 匹、第 6 群：対照 3 匹、投与 6 匹）に分け、全群の ERG ベースライン測定後に媒体又はサフィナミド 125 mg/kg/日を経口投与した。なお、第 1～3 群は単回、第 4 及び 6 群は 2 日間反復、第 5 群は 3 日間反復投与した。

第 1、2、3、4 及び 5 群は、初回投与の各々6、12、24、48 及び 72 時間後に 2 回目の ERG を測定した。また、休薬後（第 5 群の投与終了日から 14 日間）に各群で 3 回目の ERG を実施した。第 6 群は初回投与前、初回投与の 48 時間後、休薬後（投与終了日から 15 日間）に光によるブリーチングに対する回復試験を実施した（動物を 400 cd/m^2 で 30 秒間ブリーチングし、続いて 0.75 及び 10 cd.s/m^2 の二重フラッシュ刺激に対する応答を約 2.5 分毎に 65 分間を記録）。ブリーチングとは視細胞外節内の視細胞色素（主にロドプシン）が光の吸収による反応後から再度光を吸収可能になるまでに一定時間光吸収が不可能となることであり、回復試験では視細胞のブリーチングに対する反応を確認することにより視細胞の機能を検査した。網膜の電子顕微鏡検査及び AmbF 染色準超薄切片の光学顕微鏡による検査は 2 回目の ERG 実施後（第 1～5 群 : 対照 3 匹、投与 5 匹）と 3 回目の ERG 実施後（第 1～3 群：対照 1 匹、投与 2 匹、第 4～6 群：対照 3 匹、投与 6 匹）に実施した。

125 mg/kg のサフィナミド単回投与では第 2 群の投与 12 時間後のラットにおいて桿体応答の ERG 振幅のわずかな減少がみられた。2 及び 3 回目投与後（第 4 及び 5 群）では桿体応答である ERG 振幅のより顕著な減少がみられ、頂点潜時が遅延した。一方、錐体機能への影響（フリッカー刺激）は軽度であり、2 及び 3 回目投与後（第 4 及び 5 群）にわずかな ERG 振幅の減少がみられたのみであった。律動性小波の曲線下総面積（oscillatory potentials AUC）によって表される内側網膜（アマクリン細胞等）の ERG 測定においても 2 及び 3 回目投与後（第 4 及び 5 群）で AUC が減少した。休薬後、全ての ERG パラメーターは完全な回復性を示した。しかし、光によるブリーチングに対する回復性試験（第 6 群）では、初回投与の 48 時間後で視細胞色素再生時間の延長がみられ、休薬期間後でも網膜機能は完全には回復しなかった。

電子顕微鏡検査では、125 mg/kg/日の 2 日又は 3 日間投与後（各々初回投与 48 及び 72 時間後）に、視細胞の内節及び外顆粒層の損傷が認められたが、約 2 週間の回復期間後の電子顕微鏡検査では病変は観察されなかった。また、125 mg/kg 単回投与群では視細胞の内節及び外顆粒層の損傷はみられなかった。

視覚サイクル（visual cycle）、特に視細胞機能は、サフィナミドの 2 日間反復投与後の 2 週間休薬期間後において完全な回復性を示さなかったことから、視細胞の外節の再生に重要である網膜色素上皮に影響が及んでいる可能性があると考えられた。一方、電子顕微鏡検査では 2 日間又は 3 日間のサフィナミド投与後に、視細胞層の変化が示されたが、約 2 週間の回復期間後に完全な回復が認められ、網膜色素上皮においては投与に関連した変化は観察されなかった。

以上のように、ラット網膜におけるサフィナミドの作用機序は、主として視細胞桿体の機能あるいは網膜色素上皮細胞との相互作用に関連しており、視細胞錐体の機能への影響は少ないと考えられた。

2.6.6.8.3.10 有色素ラットを用いたサフィナミド 4 週間反復経口投与による網膜萎縮進行に関する検討

【2.6.7.17.D.3】：4.2.3.7.3-10：T16169（評価資料）

雌性有色素（Long-Evans）ラット（10 匹/群）にサフィナミドを 0（媒体対照）、25 及び 125 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与し、経時的に網膜の萎縮過程を検討した。初回投与の 6 及び 24 時間後、並びに投与 3、7、14 及び 28 日目の投与約 24 時間後にラットを剖検した。眼及び視神経の HE

染色による通常の病理組織学的検査（5 匹/群）に加え、AmbF 染色準超薄切片を用いた光学顕微鏡検査及び電子顕微鏡検査（5 匹/群）を実施した。

サフィナミド投与による死亡はなく、一般状態変化として被験物質の味に起因すると思われる流涎が認められた。体重、眼科学的検査及び剖検において投与の影響はみられなかった。

HE 染色による病理組織学的検査では、125 mg/kg/日の用量で 14 及び 28 日間反復投与したラット全例で網膜の外顆粒層の核の数が僅かに減少し、7 日間反復投与の 1 例でも同様の変化がみられた。25 mg/kg/日の最長 4 週間反復投与又は 125 mg/kg/日の単回及び 3 日間投与では網膜への影響は認められなかった。

AmbF 染色準超薄切片の光学顕微鏡観察では、125 mg/kg/日の用量で 3 日間以上反復投与した動物において桿体錐体層及び外顆粒層の萎縮がみられた。これら網膜病変は視神経に隣接する部位を中心とした網膜の 3 分の 1 の領域でみられ、辺縁領域は影響を受けていないと思われた。

一方、電子顕微鏡観察では 125 mg/kg/日の用量で単回投与した 24 時間後には既に病変が生じていることが示された。初期の変化として桿体錐体層内節におけるミエリン様構造変性、ミトコンドリアの単空胞化がみられ、反復投与 3 日後には桿体錐体層内節に壊死性の変化が認められたが、桿体錐体層外節への影響はみられなかった。投与 7 及び 14 日目に内節の変性及び壊死が進行し、内節と外節の接合部分の崩壊、外節／円板の崩壊が続いた。投与 7、14 及び 28 日目では、桿体錐体層の重篤な損傷に相当する所見として外顆粒層における核濃縮亢進が認められた。28 日間反復投与によって、外顆粒層核の配列数の減少及び桿体錐体層の断片化による桿体錐体層及び外顆粒層の萎縮がみられた。また、網膜の小膠細胞症が投与 7、14 及び 28 日目に認められ、特に投与 14 及び 28 日目のミューラー細胞には、網膜瘢痕形成の徴候としてグリア突起の増殖が認められた。投与 7、14 及び 28 日後の数例の網膜色素上皮細胞ではサフィナミド 125 mg/kg/日の投与に関連する二次的所見として、細胞内において脂肪滴様封入体及び変性桿体錐体層外節の僅かな増加が認められ、貪食活性が増加していることが示された。

以上のように、有色素ラットに 125 mg/kg/日の用量で経口投与した結果、単回投与 24 時間後から網膜への影響がみれれ、反復投与により増強されると考えられた。

2.6.6.8.3.11 アルビノラットを用いたサフィナミド 4 週間反復経口投与毒性試験による光曝露に関する検討

【2.6.7.17.C】：4.2.3.7.3-11-01：RE8900（対応する報告書番号 IMP29082）（参考資料）
4.2.3.7.3-11-02：RE8900：Bioanalytical Assessment（参考資料）

本試験は、光線強度が異なる 2 条件下（強光度：250～350 lux、弱光度：30～40 lux）で雌性アルビノ（Sprague Dawley）ラット（10 匹/群）にサフィナミド 75 及び 150 mg/kg/日を 4 週間反復経口投与し、眼球に対する影響、特に網膜への作用を検討した。試験に使用した強光度の照射条件は、動物室で通常使用している光の強度に近かった。また、サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の全身曝露を評価した。

強光度の 150 mg/kg/日群 1 例及び弱光度の 150 mg/kg/日群 1 例でサフィナミドに関連しない死亡がみられた。一般状態観察では光強度に関わらず、150 mg/kg/日群の 4/10 例に脱毛がみられた。脱毛は投与期間の前半からみられ、投与終了時まで継続してみられた。また、体重及び摂餌量についてはいずれの光強度においても、投与に関連した変化は認められなかった。

眼底検査では、強光度照射群において、投与 2 週目に片側の眼底血管の径の縮小が 150 mg/kg/日群の 1 例に認められた。投与 4 週目には、眼底血管の径の縮小及び淡色化が 150 mg/kg/日の 6 例（両側）

及び 75 mg/kg/日群の 6 例（片側又は両側）に認められた。以上のように、眼底血管の変化の発生率は用量あるいは時間経過に伴って増加した。弱光度の照射群の眼底検査において投与に関連した変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、強光度照射群では、網膜外顆粒層における核の減少がみられ、その発生率（150 mg/kg/日群 9/9 例、75 mg/kg/日群 5/9 例）及び程度（150 mg/kg/日群で中等度、75 mg/kg/日群で軽度）は用量に依存して増加した。また、弱光度照射群では、150 mg/kg/日群の 5/9 例で外顆粒層の核の軽度な減少がみられた。一方、75 mg/kg/日群ではごく軽度の外顆粒層の核の減少が 3/10 例にみられた。

サフィナミドの代謝物である NW-1153 の血漿中濃度はサフィナミドの約 30%である一方で、NW-1689 の曝露量はサフィナミドの約 20～40 倍であった。

上記の結果から、サフィナミドの用量及び飼育環境下の光強度の増加に伴い網膜への投与影響の発生頻度及び程度が増強することが示された。

2.6.6.8.4 依存性試験

2.6.6.8.4.1 ラットを用いたサフィナミドの身体依存性試験

【2.6.7.17.E.1】：4.2.3.7.4-01：RS1415（参考資料）
4.2.3.7.4-02：RS1425（参考資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 10 匹/群）に、サフィナミド 0（媒体対照）、50 及び 100 mg/kg/日を 1 日 1 回 28 日間反復経口投与した後、7 日間の休薬期間を設け自然退薬症状を評価した。比較対照として退薬症状を示すことが知られているモルヒネを 60 mg/kg/日となる様に 1 日 2 回投与した。また、トキシコキネティクス評価のためサテライト群（雌雄各 3 匹/ポイント/群）を設けサフィナミドの全身曝露を測定した。

モルヒネ群では、投与初期には自発運動の低下や腹臥位がみられたが第 2 週には消失し、自発運動の亢進や挙尾、逃避反応、眼球突出及び音に対する反応性の亢進が顕著にみられ、円背位、緊張亢進が軽度にみられたことから、早期の耐性獲得が確認された。雄では投与期間中を通して対照群と比較して体重低値、雌では投与第 1 週に一過性の体重増加がみられ、雌雄ともに摂餌量及び摂水量の低値、直腸温の低下がみられた。雌雄ともに休薬開始早期に体重が減少し、摂餌量及び摂水量が顕著に低下した。その後、過食及び寡飲の症状がみられ、雌では対照群と同等まで体重が増加したが雄は継続して低値であった。投与期間中にみられた直腸温の低下は休薬期間に回復したが、雌では休薬第 2、6 及び 7 日に上昇した。行動変化に関しては、緊張低下、自発運動の低下、首振り、ライジング、過敏症及び呼吸数増加がみられた。投与期間中にみられた運動失調、円背位、流涙は休薬後に顕在化したが、挙尾、過活動、緊張亢進、眼球突出は休薬期間中に頻度が低下した。休薬期間中の体重、摂餌量及び摂水量の顕著な変動と、投与期間と異なる行動変化からモルヒネ投与による身体依存の徴候が確認された。

サフィナミド 50 及び 100 mg/kg/日群では、投与初期に自発運動の低下、眼球突出及び随伴性呼吸がみられ、投与期間中に出現例数が減少した。体重、摂餌量及び摂水量に顕著な変動はなく、雄の 100 mg/kg/日群で第 1 週のみ直腸温の上昇がみられた。サフィナミドの投与期間中、雌雄ともに耐性を示す行動及び生理徴候はみられなかった。投与期間中にみられた行動変化は休薬期間中に徐々に消失し、新たな変化はみられず、体重、摂餌量及び摂水量も変化はみられなかったことから、身体依存の兆候はみられなかった。

以上の結果から、サフィナミド 50 及び 100 mg/kg/日の投与は、モルヒネと異なり薬物耐性及び退薬症状を示さず、身体依存性はないと考えられた。

サフィナミド 100 mg/kg/日群の投与 28 日目の C_{max} は雄で 5060 ng/mL、雌で 6810 ng/mL であった。また、$AUC_{0\text{-}24h}$ は雄で 71.6 μg·hr/mL、雌で 87.4 μg·hr/mL であり、ヒトにサフィナミド 100 mg/日を 7 日間反復投与した際の $AUC_{0\text{-}24h}$（28.8 μg·hr/mL）に対してそれぞれ 2.49 倍、3.03 倍であった。

2.6.6.8.4.2 サルを用いたサフィナミドの薬物自己投与試験

【2.6.7.17.E.2】：4.2.3.7.4-03：RS1417（参考資料）

雌雄各 2 例のアカゲザルを用いて、サフィナミドの 0.3、1.0、1.5 mg/kg の静脈内投与による強化効果を検討するため、コカイン 0.032 mg/kg 又は媒体（生理食塩水）の静脈内投与を対照とした自己投与試験を実施した。また、トキシコキネティクス評価のため 4 例のサテライト群を設け、サフィナミド 1.5 及び 7.5 mg/kg の静脈内投与 120 分後までの全身曝露を評価した。

薬物の自己投与はレバーを 30 回押すことで得られるように設定し、1 日 1 試行を実施した。最初にコカイン投与により、5 試行のうち連続した 3 試行で 1 試行の自己投与回数が 20 回以上となることを確認した。次に媒体投与において、4 試行のうち連続した 3 試行の自己投与回数が 8 回未満であることを確認した後、サフィナミドの 0.3、1.0 及び 1.5 mg/kg 投与による反応を評価した。サフィナミドの評価は 5 試行実施し、1 試行中に 8 回以上の自己投与がみられた場合には引続き 5 試行、合計 10 試行を実施した。なお、サフィナミド 1.5 mg/kg の評価においては、カニクイザルを用いた 2 週間反復毒性試験（2.6.6.3.13.4）において、30 mg/kg/日で死亡がみられたため、20 mg/kg/日を上回らないよう 1 試行の自己投与回数の上限を 12 回とした。サフィナミドの評価は媒体 4 試行を挟み漸増して実施し、最後にコカインを 5 試行実施した。

サフィナミドの評価では、10 試行の平均投与回数が媒体平均を上回り、かつ自己投与回数が媒体とオーバーラップしない場合を強化効果あり、10 試行の平均自己投与回数又は 5 試行の後半 3 試行における平均投与回数が媒体平均を上回らずかつ自己投与回数が媒体とオーバーラップする場合を強化効果なしと判断した。また、平均自己投与回数について統計処理を行い群間比較を行った。

その結果、4 例中 2 例の自己投与回数は全ての用量において媒体と同程度であった。別の 1 例は、0.3 mg/kg では媒体と同等であったが、1.0 及び 1.5 mg/kg の平均自己投与回数が媒体平均を上回った一方でその範囲は媒体とオーバーラップした。残りの 1 例では、サフィナミドの 0.3 及び 1.0 mg/kg では媒体平均を上回らなかったが、1.5 mg/kg では前半 5 試行で 11～12 回、後半 5 試行でも 1 試行で 8 回の自己投与がみられた。一方で、直後に実施した媒体の評価でも 8 回以上の自己投与が複数回認められ、オーバーラップした。

各群の自己投与回数は、コカイン群 23.9±1.2 回（サフィナミド評価前）及び 23.8±0.5 回（サフィナミド評価後）、媒体対照群 2.4±0.6 回（サフィナミド評価前）及び 2.3±1.3 回（サフィナミド評価後）、サフィナミド 0.3、1.0 及び 1.5 mg/kg 群はそれぞれ 2.0±0.8 回、1.9±1.3 回及び 4.0±2.1 回であった。サフィナミド群の自己投与回数は、コカイン群と比較して有意に低く、媒体対照群と有意な差は認められなかった。

1.5 mg/kg の平均総自己投与回数 5 回（評価開始 1 回＋4 回）に相当する 7.5 mg/kg 静脈内投与の C_{max} は雄で 8280 ng/mL、雌で 4950 ng/mL であり、ヒトにサフィナミド 100 mg/日を 7 日間反復投与した際の C_{max}（1819 ng/mL）に対して雄で 4.55 倍、雌で 2.72 倍であった。

以上の結果から、4 例中 2 例でサフィナミド 1.0 mg/kg 以上で媒体と比較して自己投与回数の増加がみられたものの媒体とのオーバーラップがありクライテリアを満たさなかったことから、サフィナミドは明らかな強化効果を示さず、コカイン様の精神依存性を示す可能性は低いと考えられた。

2.6.6.8.4.3 ラットを用いたサフィナミドの薬物弁別試験

【2.6.7.17.E.3】：4.2.3.7.4-04：RS1414（参考資料）
4.2.3.7.4-05：RS1426（参考資料）

Lister Hooded ラット（雌性各 6～7 例/群）を用いて、サフィナミド 50 及び 100 mg/kg の経口投与 60 分後に薬物弁別試験を実施した。本試験ではオペラント学習により *d*-アンフェタミン 0.5 mg/kg の腹腔内投与又はミダゾラム 0.5 mg/kg の腹腔内投与と生理食塩水との薬物弁別が成立した動物を用いて、サフィナミド経口投与による般化を評価した。いずれも訓練薬と同じ反応が 25%以下となる場合を般化なし、26～74%を部分般化、75%以上を完全般化とした。また、トキシコキネティクス評価のためサテライト群（各 3 匹/ポイント/群）を設け、サフィナミド 50 及び 100 mg/kg の全身曝露を評価した。

d-アンフェタミンを訓練薬とした試験では、サフィナミド 50 mg/kg で 8.9±6.5%、100 mg/kg では 18.2±15.7%であり、いずれも *d*-アンフェタミンへの般化はみられなかった。なお、比較対照として評価した *d*-アンフェタミン 0.125、0.5 及び 1.0 mg/kg、又はフェンテルミン 1.0、2.0 及び 3.0 mg/kg の経口投与では、用量依存的に訓練薬への般化を示した。

ミダゾラムを訓練薬とした試験においても、サフィナミド 50 mg/kg で 23.0±27.1%、100 mg/kg では 14.9±20.1%であり、ミダゾラムへの般化作用はみられなかった。なお、比較対照として評価したミダゾラム 0.5、1.0 及び 1.5 mg/kg、又はアルプラゾラム 0.25、0.5、1.0 及び 1.5 mg/kg の経口投与では、用量依存的に訓練薬への般化を示した。

サフィナミド 100 mg/kg の C_{max} は 6750 ng/mL であり、これはヒトに 100 mg/日を 7 日間反復投与した際の C_{max}（1819 ng/mL）の 3.71 倍に相当する。サフィナミドは臨床用量を上回る曝露においても *d*-アンフェタミン及びミダゾラム様の自覚効果を示さず、精神依存性を示す可能性は低いと考えられた。

2.6.6.8.5 代謝物の毒性試験

2.6.6.8.5.1 ラットを用いたサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 のラット単回経口投与毒性試験

【2.6.7.17.F.1】：4.2.3.7.5-01：39880（評価資料）

Sprague Dawley ラット（雌雄各 5 匹/群）にサフィナミドを 800 及び 1000 mg/kg、NW-1153 及び NW-1689 を 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し、その後の 14 日間を観察期間とした。本試験では、死亡率・一般状態観察、体重測定、剖検を実施した。また、サテライト群（雌雄各 3 例/群）を設けてサフィナミドの 800 mg/kg、NW-1153 の 1000 mg/kg 及び NW-1689 の 1000 mg/kg を単回経口投与した際のサフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 の全身曝露についても評価した。

サフィナミド 1000 mg/kg 群では、第 8 日目に雄 1 例、第 14 日目に雌 1 例が死亡した。この群では、円背位、運動失調及び立毛が投与 1 日目に全例でみられた。死亡例においては傾眠及び削痩がみられ、雌では、呼吸困難、チアノーゼ及び腹部腫脹も認められた。生存例の雌においても、同様の変化がみられた。その他の動物では 2 日目以降一般状態の変化は示さなかった。剖検では、雄の死亡例で、肝

臓、腎臓及び胃の暗赤色化がみられた。死亡例を含む雌 2 例では、胃及び消化管のガスによる膨張が観察され、このうち生存例の 1 例では胸腺及び脾臓の小型化が認められた。

サフィナミド 800 mg/kg 群では死亡はみられず、投与日に運動失調及び傾眠が認められたが、2 日目には回復した。剖検においても異常は認められなかった。

NW-1153 群及び NW-1689 群において死亡例はみられなかった。いずれの群も投与日に円背位、運動失調及び立毛が認められ、NW-1689 群では回内運動も認められたが、2 日目には回復した。これらの群においては、剖検時に肉眼的異常は認められなかった。

トキシコキネティクスの結果、サフィナミド 800 mg/kg 群で NW-1153 及び NW-1689 の曝露が確認された。また、NW-1153 群においても血漿中に NW-1689 が確認された。これらの群の血漿中に確認された NW-1689 は、サフィナミド又は NW-1153 と比較して高い曝露を示した。

以上の結果から、ラットに NW-1153 及び NW-1689 を 1000 mg/kg で単回経口投与した場合、重度の毒性作用は現れないことが示された。一方、サフィナミドは 800 mg/kg が MTD と考えられた。

2.6.6.8.5.2 NW-1153 及び NW-1689 の細菌を用いた遺伝子突然変異試験

【2.6.7.17.F.2】：4.2.3.7.5-02：42660（評価資料）

ネズミチフス菌（TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び TA102）を用いて、ラット肝 S9 mix の有無の両条件下で復帰突然変異試験を実施した。

試験 1 では、プレート法にて NW-1153 を 39.1～2500 µg/plate、NW-1689 を 39.1～5000 µg/plate の用量範囲で実施した結果、復帰変異コロニー数の増加はみられなかったため、試験 2 ではプレインキュベーション法を使用した。また、試験 2 の濃度は試験 1 の生育阻害を参考に、NW-1153 は 39.1～2500 µg/plate、NW-1689 は 19.5～5000 µg/plate の用量範囲とした。

復帰変異コロニー数の減少や背景の細菌の生育等の生育阻害は両試験系における処理後にほとんどの試験菌株で観察された。処理方法、用量、菌株、用量及び S9 mix の有無に関わらず復帰変異コロニー数は 2 倍増加しなかった。

以上の結果から、NW-1153 と NW-1689 はいずれの菌株においても変異原性を示さなかった。

2.6.6.8.5.3 NW-1689AG の細菌を用いた遺伝子突然変異試験

【2.6.7.17.F.3】：4.2.3.7.5-03： T17788（評価試験）

ネズミチフス菌（TA1535、TA1537、TA 98 及び TA100）及び大腸菌（WP2 *uvrA*）を用いて、ラット肝 S9 mix の有無の両条件下で復帰突然変異試験を実施した。

S9 mix の有無の両条件下で NW-1689AG を 5～5000 µg/plate の濃度で処理した。陰性対照として DMSO（溶媒）を用いた。

その結果、S9 mix の有無の両条件下ともにいずれの菌株においても陰性対照と比較して復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、NW-1689AG はいずれの菌株においても変異原性を示さなかった。

2.6.6.8.5.4 NW-1689AG の V79 チャイニーズハムスター細胞を用いた in vitro 小核試験

【2.6.7.17.F.4】：4.2.3.7.5-04： T17789（評価資料）

NW-1689AG の小核誘発性について検討するために、NW-1689AG を DMSO に溶解し、V79 チャイニーズハムスター細胞を用いた in vitro 小核試験を実施した。Aroclor 1254 で酵素誘導したラット肝 S9 mix の有無の両条件下で試験を実施した。被験物質の処理時間は S9 mix 非存在下で 3 時間及び 24 時間、S9 mix 存在下で 3 時間とした。

処理濃度は被験物質の溶解性と細胞毒性を基に選択し、0.500～5000 μg/mL の用量範囲で実施した。NW-1689AG は培養液中で析出しなかった。NW-1689AG は S9 mix 非存在下の 3 時間処理と 24 時間処理、S9 mix 存在下の 3 時間処理において、それぞれ≥1580、≥500 及び≥2810 μg/mL の濃度で V79 細胞に対して細胞毒性を示した。

NW-1689AG は S9 mix の有無のいずれの条件下においても、小核を有する細胞の頻度に生物学的に意義のある増加はみられなかった。

以上の結果より、本実験条件下において NW-1689AG は小核誘発性を示さなかった。

2.6.6.8.6 不純物の毒性試験

2.6.6.8.6.1 ラットを用いた　類縁物質A*　の 2 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.17.G.1】：4.2.3.7.6-01： RF3270（参考資料）

Crl:CD（Sprague Dawley）ラット（雌雄各 6 匹/群）に　類縁物質A*　を 0（媒体対照）、50、100、200 及び 500 mg/kg/日の用量で 2 週間反復経口投与し、死亡率・一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。また、50, 200 及び 500 mg/kg/日群に関しては、投与 1 及び 14 日目の　類縁物質A* の全身曝露についても評価した。

500 mg/kg/日群の雄全例及び雌 4 例が死亡又は人道的観点から安楽殺された。死亡例では投与後一時的な起立不能、体重・摂餌量の減少、削痩及び立毛がみられ、一部の動物では呼吸困難、低体温、色素涙、自発運動の低下又は円背位を伴った。投与 7 日目に切迫屠殺した雄 1 例では、好中球比率の増加を伴うリンパ球の減少がみられ、15 日目に死亡が認められた雄 1 例では、血液濃縮、リンパ球の顕著な減少及び血小板の減少が示された。死亡例の病理組織学的検査では、各種炎症性細胞の浸潤を伴う軽微から中程度の心筋線維壊死巣が大部分の動物に認められ、この変化が死因と考えられた。この他に、副腎束状層の肥大、小葉中心性肝細胞肥大及び限局性肝細胞壊死、肺の泡沫状マクロファージ浸潤巣、腸間膜リンパ節及び脾臓にリンパ球枯渇が認められた。

500 mg/kg/日群の生存例雌 2 例では、投与後一時的な起立不能がみられ、外陰部の尿による汚れ及び過活動が投与 11 日目以降で認められた。6 日目以降は 200 mg/kg/日群の雄 2 例でも立毛が認められた。体重増加量及び摂餌量の僅かな減少が 500 mg/kg/日群の生存例に投与期間を通して認められた。

血液学的検査の結果、500 mg/kg/日群の生存例において好中球数及び単球数の増加、リンパ球数の減少がみられ、200 mg/kg/日群の雄においても好中球数の僅かな増加が認められた。血液生化学検査では 500 mg/kg/日群に、BUN、クレアチニン、ALT 及び GLDH の顕著な増加、並びにリン及びカリウム値の僅かな増加がみられた。

病理組織学的検査の結果、500 mg/kg/日群生存例において死亡例に類似した変化がみられ、軽度の網膜萎縮及び腺胃粘膜に限局性のびらんも認められた。200 mg/kg 群の雌 1 例で壊死性肝細胞巣がみ

＊新薬情報提供時に置き換えた。

られ、100 mg/kg/日以上の雌では肺に泡沫状マクロファージ浸潤巣が認められた。100 mg/kg/日以上の群で臓器重量増加を伴う小葉中心性肝細胞肥大がみられたが、適応性の変化と考えられ毒性学的意義は低いと考えられた。

トキシコキネティクスの結果、用量依存的な　類縁物質A*　の曝露が示され、雄と比較して雌で僅かに大きかった。反復投与における蓄積はみられず、単回及び反復投与後に　類縁物質A*　から[redacted]への[redacted]は認められなかった。

以上の結果から、肺の泡沫状マクロファージ浸潤巣が 100 mg/kg/日群にみられたことから本試験における NOAEL は 50 mg/kg と判断した。

2.6.6.8.6.2 ラットを用いた　類縁物質A*　の 4 週間反復経口投与毒性試験

【2.6.7.17.G.2】：4.2.3.7.6-02：RF3280（評価資料）

Crl:CD（Sprague Dawley）ラット（雌雄各 10 匹）に　類縁物質A*　0（媒体対照）、25、50 及び 100 mg/kg、及び(*S*)-サフィナミド 100 mg/kg/日を 1 日 1 回 4 週間反復経口投与し、死亡率・一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、サテライト群（媒体対照群：雌雄各 3 例、被験物質群：雌雄各 9 例）を設け全身曝露についても評価した。

投与に起因した死亡及び一般状態変化はなく、眼科学的検査、体重及び摂餌量、尿検査値、剖検並びに病理組織学的検査における所見はみられなかった。

血液学的検査では、(*S*)-サフィナミド 100 mg/kg/日群において、雌で白血球及びリンパ球数の減少がみられ、　類縁物質A*　100 mg/kg/日群の雌においてもリンパ球数の減少が認められた。血液生化学検査では、　類縁物質A*　100 mg/kg/日群の雌雄に BUN の僅かな増加みられ、(*S*)-サフィナミド及び　類縁物質A*　の全群でカルシウムの増加傾向がみられた。

臓器重量では、全投与群で肝臓及び腎臓の重量増加がみられたが、いずれも組織変化を伴わないことから毒性学的意義は低いと思われた。

類縁物質A*　の曝露量は用量に従って増加した。100 mg/kg/日において、　類縁物質A*　群と比較して(*S*)-サフィナミド群の曝露が高く、両群ともに雄と比較して雌の方で曝露量が高かった。

以上の結果から、本試験における(*S*)-サフィナミド及び　類縁物質A*　の NOAEL は 100 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.8.6.3 類縁物質B* 及び 類縁物質C* の細菌を用いた変異原性スクリーニング試験（ミニエームス試験）

【2.6.7.17.G.3】：4.2.3.7.6-03： T17514（参考資料）

サフィナミドの[redacted]である　類縁物質B*　（[redacted]、物質[redacted]）及び[redacted]である　類縁物質C*　（[redacted]、物質[redacted]）の細菌における遺伝子変異誘発性を評価した。

ネズミチフス菌（TA98、TA100 及び TA102）を用いて、S9 代謝活性化系の有無の両条件下で 5～5000 µg/plate の用量範囲で実施した。陽性対照物質で試験系が正しく機能していることを確認した。

類縁物質C* は本試験で遺伝子変異誘発性を示さなかったが、類縁物質B* は TA100 の試験菌株において遺伝子変異誘発性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。

＊新薬情報提供時に置き換えた。

2.6.6.8.6.4 類縁物質C* の in vitro 小核スクリーニング試験

【2.6.7.17.G.3】：4.2.3.7.6-04：T17515（参考資料）

類縁物質C* （[redacted]、物質[redacted]）の染色体異常誘発性を評価するために、V79 チャイニーズハムスター細胞を用いた in vitro 小核試験を実施した。S9 代謝活性化系の有無の両条件下で 5～1580 µg/ml の濃度範囲で実施した。被験物質の処理時間は S9 mix 非存在下で 24 時間、及び S9 mix 存在下で 3 時間とした。

小核を有する細胞数の増加はなく、類縁物質C*（物質[redacted]）は染色体損傷を誘発しないと判断した。

2.6.6.8.6.5 類縁物質A* の細菌を用いた遺伝子突然変異試験

【2.6.7.17.G.4】：4.2.3.7.6-05：T17900（評価資料）

類縁物質A* の遺伝子変異誘発性を評価する目的で、ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA102、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌（WP2 *uvrA*）を用いて、ラット肝 S9 mix の有無の両条件下でプレート法にて試験を実施した。

類縁物質A* は超純水に溶解し、5.00～5000 µg/plate の用量範囲で評価した。1580 µg/plate 以上の濃度で被験物質と思われる析出物がプレート上に認められ、また、菌の生育阻害が認められた。溶媒対照と比較して復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。陽性対照では、復帰変異コロニー数が明らかに増加した。

以上より、本実験条件下で 類縁物質A* は細菌に遺伝子突然変異を誘発しないものと判断した。

2.6.6.8.6.6 類縁物質A* の V79 チャイニーズハムスター細胞を用いた in vitro 小核試験

【2.6.7.17.G.5】：4.2.3.7.6-06：T17938（評価資料）

類縁物質A* の小核誘発性について検討するために、 類縁物質A* について、V79 チャイニーズハムスター細胞を用いた in vitro 小核試験を実施した。ラット肝 S9 mix の有無の両条件下で、1.58～500 µg/mL の用量範囲で実施した。処理時間は S9 mix 非存在下で 3 及び 24 時間、S9 mix 存在下で 3 時間とした。

処理濃度は被験物質の溶解性と細胞毒性を基に選択した。培養液における被験物質（ 類縁物質A* ）の沈殿は S9mix 非存在下の 500 µg/mL の最高用量でみられた。V79 細胞に対する細胞毒性が、S9 mix 非存在下の 24 時間処理で>50 µg/mL、3 時間処理で>400 µg/ml、S9 mix 存在下では>300 µg/mL で認められた。

類縁物質A* は S9 mix の有無のいずれの条件下においても、生物学的に意義のある小核を有する細胞の頻度の増加はみられなかった。

以上より、in vitro 小核試験の本実験条件下で 類縁物質A* は遺伝毒性を示さなかった。

＊新薬情報提供時に置き換えた。

2.6.6.8.6.7 製剤中不純物に対する変異原性ハザード評価

【2.6.7.17.G.6】：4.2.3.7.6-07：S21461（評価資料）

製剤中に認められ得る不純物 27 化合物に関して、データベース検索、知識ベースの Derek Nexus®（Lhasa 社）及び統計ベースの Leadscope Model Applier®（Leadscope 社）を用いた(Q)SAR 解析による変異原性予測を行った。その結果、Ames 試験陽性である　　類縁物質B*　　（[redacted]：原薬の[redacted]）をクラス 2、Ames 陽性かつ発がん性に関する情報のある　　不純物*　　類（　　不純物A*　、　　不純物B*　、　　不純物C*　　）をクラス 1 に分類した。その他の化合物に関しては、(Q)SAR 解析結果より警告構造が認められなかったことからクラス 5 に分類した。

2.6.6.8.7 サフィナミド及び 2 代謝物（NW-1153、NW-1689）の紫外可視吸収スペクトル

【2.6.7.17.H.1】：4.2.3.7.7-01：1208053（参考資料）

サフィナミド（0.05 mg/mL）、NW-1153（0.05 mg/mL）及び NW-1689（0.005 mg/mL）を 95%エタノールに溶解し紫外可視吸収スペクトルを測定した。

サフィナミドは[redacted]、[redacted]及び[redacted] nm に吸収の極大を認め、[redacted] nm に吸収の肩を認めたが、290 nm より長い波長では吸収を示さはなかった。

NW-1153 及び NW-1689 に関しても 290 nm より長い波長に吸収を示さなかった。

サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 は 290～700 nm の領域に吸収を示さないことから、光毒性の懸念はないと考えられた。

＊新薬情報提供時に置き換えた。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 重要な試験における安全域

一般毒性及び生殖毒性試験の重要な試験における NOAEL 又は NOEL の曝露量を表 2.6.6-4に示す。ヒトに 100 mg/日を 7 日間反復投与した時の薬物動態に基づき、安全域を算出した。

表 2.6.6-4 NOAEL における曝露量及び安全域

試験 (CTD 記載箇所)	用量 [a] (mg/kg/日)	NOAEL (mg/kg/日)	NOAEL を判断した 根拠となる所見	NOAEL における 曝露量 [a]		安全域 [b]	
				$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)	AUC	C_{max}
ラット 4 週間 経口 (2.6.6.3.2)	20, 60, 100, 500	20	びまん性の肝細胞脂肪性変化	M：3.82 F：11.92	M：1.13 F：2.32	M：0.13 F：0.41	M：0.62 F：1.28
ラット 13 週間 経口 (2.6.6.3.3)	15, 30, 80	<15 (80 [c])	網膜萎縮 （最高用量において毒性なし [c])	M：<1.90 (46.00 [c]) F：<2.94 (53.36 [c])	M：<0.68 (4.57 [c]) F：<0.71 (3.63 [c])	M：<0.07 (1.60 [c]) F：<0.10 (1.85 [c])	M：<0.37 (2.52 [c]) F：<0.39 (2.01 [c])
ラット 26 週間 経口 (2.6.6.3.4)	5, 15, 45	15 (45 [c])	網膜萎縮 （最高用量において毒性なし [c])	M：2.16 (18.59 [c]) F：6.13 (31.43 [c])	M：0.55 (2.52 [c]) F：1.03 (4.31 [c])	M：0.08 (0.65 [c]) F：0.21 (1.09 [c])	M：0.30 (1.39 [c]) F：0.57 (2.38 [c])
ラット 26 週間 経口 (2.6.6.3.5)	60, 120, 180	<60	泡沫状マクロファージ浸潤巣（肺胞）、網膜萎縮	M：<63.26 F：<71.13	M：<5.05 F：<6.72	M：<2.20 F：<2.47	M：<2.79 F：<3.71
ラット 2 週間 静脈内 (2.6.6.3.13.2)	10, 20, 40	40	最高用量において毒性なし	M：18.93 F：36.82	M：9.11 F：21.40	M：0.66 F：1.28	M：5.03 F：11.82
サル 4 週間 経口 (2.6.6.3.7)	20, 40, 80, 120	40	死亡、中枢神経症状（痙攣等）、泡沫状マクロファージ浸潤巣（リンパ節、胸腺、脾臓）	M：147.61 F：178.18	M：10.34 F：13.06	M：5.13 F：6.19	M：5.71 F：7.22
サル 13 週間 経口 (2.6.6.3.8)	10, 20, 50	20	一般状態悪化による死亡、中枢神経症状	M：41.01 F：39.56	M：7.52 F：5.61	M：1.42 F：1.37	M：4.01 F：3.10
サル 39 週間 経口 (2.6.6.3.9)	3.2, 8, 20	20	最高用量において毒性なし	M：79.14 F：75.76	M：7.64 F：8.69	M：2.75 F：2.63	M：4.22 F：4.80
サル 26/39 週間 経口 (2.6.6.3.10)	30, 50, 70	50	死亡、中枢神経症状	M：189.28 F：130.90	M：16.39 F：13.53	M：6.57 F：4.55	M：9.06 F：7.48
サル 2 週間 静脈内 (2.6.6.3.13.4)	3, 10, 30	10(全身) <3(局所)	全身：死亡、中枢神経症状（強調運動障害） 局所：投与部位の皮下組織に慢性炎症及び出血	M：35.91 F：26.58	M：5.39 F：5.89	M：1.25 F：0.92	M：2.98 F：3.25
ラット受胎能及び初期胚の発生 経口 (2.6.6.6.2.1)	50, 100, 150	親動物<50	体重増加抑制	NE	NE	NC	NC
		受胎能 M：150 F：100	M：最高用量において毒性なし F：黄体数及び着床数の減少	NE	NE	NC	NC
		胚・胎児 150	最高用量において毒性なし	NE	NE	NC	NC

試験 (CTD 記載箇所)	用量 a) (mg/kg/日)	NOAEL (mg/kg/日)	NOAEL を判断した 根拠となる所見	NOAEL における 曝露量 a)		安全域 b)	
				AUC_{0-24h} (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)	AUC	C_{max}
ラット胚・胎児発生毒性 経口 (2.6.6.6.2.2)	50, 100, 150	母動物 50	体重減少	41.37	4.15	1.44	2.29
		生殖能 150	最高用量において毒性なし	182.51	10.19	6.34	5.63
		胚・胎児 <50	異所性精巣	<41.37	<4.15	<1.44	<2.29
ウサギ胚・胎児発生毒性 経口 (2.6.6.6.2.3)	25, 50, 100	母動物 25	切迫殺	14.7	2.85	0.51	1.57
		生殖能 100	最高用量において毒性なし	142.13	14.97	4.94	8.27
		胚・胎児 100	最高用量において毒性なし	142.13	14.97	4.94	8.27
ラット出生前・出生後発生毒性 経口 (2.6.6.6.2.4)	4, 12.5, 37.5	母動物 37.5	最高用量において毒性なし	15.50 d)	3.01	1.61 e)	1.66
		出生児 12.5	死亡率上昇 肝胆道系障害、皮膚及び頭蓋骨の黄色/橙色化	4.40 d)	1.18	0.46 e)	0.65

M：雄、F：雌、NE：not evaluated、NC：not calculated
a)：サフィナミドとしての用量又は濃度
b)：ヒトにサフィナミド 100 mg/日を 7 日間反復投与した際の AUC_{0-24h}（28.8 μg·hr/mL）及び C_{max}（1.819 μg/mL）【2.7.2.2.1.1.1】に基づく）
c)：げっ歯類に特異的な変化と考えられる網膜萎縮を除いた場合
d)：AUC_{0-8h}
e)：ヒト AUC_{0-24h}（28.8 μg·hr/mL）×1/3=9.6 μg·hr/mL）を基に算出

2.6.6.9.2 毒性の標的臓器

ラット及びサルの単回投与毒性試験、反復投与毒性試験の結果から、サフィナミドの標的臓器は、中枢神経系と考えられた。また、ラット及びマウスにおいては肝臓が標的臓器と考えられた。

中枢神経症状

単回及び反復投与毒性試験においてみられた死亡例では、病理組織学的検査の結果から死因を示唆する所見はみられなかったが、一般状態観察において振戦等の中枢神経症状がみられたことから死亡は中枢神経毒性によるものと考えられた。反復毒性試験では、サル（70 mg/kg/日、39 週間投与試験）、ウサギ（50 mg/kg/日以上、胚・胎児発生毒性試験）、ラット（100 mg/kg/日、がん原性試験）及びマウス（200 mg/kg/日以上、がん原性試験）において痙攣が発現し、協調運動障害、振戦等が前駆症状としてみられた。サフィナミドは脳内に作用することから、高用量で発現する痙攣はサフィナミドの過剰な薬理作用によるものと考えられた。各種動物における痙攣発現時の曝露量は、100 mg/日を 7 日間投与したヒトの曝露量（AUC_{0-24h}: 28.8 μg·hr/mL、C_{max}: 1.82 μg/mL）に対して AUC_{0-24h} 及び C_{max} のそれぞれで、サルで 8.2 倍及び 11.2 倍、ウサギで 2.2 倍及び 5.3 倍、ラットで 2.1 倍及び 2.4 倍、並びにマウスで 2.7 倍及び 2.2 倍であった。これまでにサフィナミド投与を受けたヒトにおいて、投与に関連した発作及び発作様イベントに関わる報告はない。

肝臓

ラットでは 4 週間投与試験 2 試験において 60 mg/kg/日以上の群に肝細胞の脂肪性変化が認められ、脂質代謝の変化が示唆された。他施設で実施した 13 週間及び 26 週間の試験では、より高用量の投与において同様の所見がみられなかったことから、肝細胞の脂肪性変化は 4 週間の試験に特異的に見られた変化と考えられた。ラット反復経口投与試験においては、30 mg/kg/日以上の群で、肝重量の増加及び／又は小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。この所見は肝薬物代謝酵素の誘導に伴う変化と

考えられ、毒性変化ではなく適応性の変化と考えられた。また、ALP 及び ALT の上昇、コレステロール及びトリグリセリドの増加並びにグルコースの低下がラット及びサルの高用量で可逆的に認められたが、これらの変化は臓器毒性と関連しなかった。これまでサフィナミド投与を受けたパーキンソン病患者における肝機能検査結果から系統的な変化は検出されておらず、患者において影響を及ぼす可能性は低いことが考えられる。

2.6.6.9.3 その他の毒性

泡沫状マクロファージ

ラット 4 週間投与試験において 100 mg/kg/日以上でごく軽微から中等度の泡沫状マクロファージ浸潤巣が主に肺に認められ、26 週間投与試験では 60 mg/kg/日以上で同様の所見が認められた。発現部位はほぼ肺に限定され、26 週間投与試験において肺検体の電子顕微鏡観察を行った結果、肺胞マクロファージの細胞質にリン脂質代謝異常を示す同心円状ミエリン様封入体が確認されたことから、泡沫状マクロファージ浸潤はリン脂質症に関連した所見と考えられた。サルでは、4 週間反復投与試験の 80 及び 120 mg/kg/日でのみ、リンパ節、胸腺及び脾臓に泡沫状マクロファージの浸潤が認められたが、13 週間及び 39 週間投与試験ではみられなかった。

ラット、サルともにこの所見が認められた臓器に機能的な変化はなく、これらの所見が臨床において問題となる可能性は低いと考えられた。

副腎

ラット試験では 50 mg/kg/日以上の用量で副腎の重量増加及び皮質肥大が認められた。サルでは 4 週間投与試験の 40 mg/kg/日以上で副腎皮質の過形成が認められたが、最高用量 70 mg/kg/日の 39 週間投与試験においては副腎に変化は認められなかった。これらの変化は十分な休薬期間の後に回復することが示された。加えて、サルでは 4 週間投与試験 2 試験及び 39 週間投与試験で実施した血清コルチゾール及び ACTH 又はアルドステロンレベルに一致しない結果が得られた。すなわち、200 mg/kg/日を最高用量とした 4 週間投与試験の 1 試験及び 70 mg/kg/日を最高用量とした 26/39 週間投与試験においては ACTH 又はアルドステロン及びコルチゾール濃度に変動はみられなかった。しかし、別の 4 週間投与試験では、80 及び 120 mg/kg/日群の雄で ACTH 値が増加したがコルチゾールは影響を受けず、同群の雌ではコルチゾール値が減少傾向にあったが ACTH の変動を伴わなかった。ACTH とコルチゾールに関連性がみられなかったことからこれらの変動意義は不明であるが、病理組織検査において一貫した臓器毒性は認められていないことから、全身状態の悪化によるストレスが要因の一つとして考えられる。

胃粘膜糜爛

サル 13 週間投与毒性試験の 20 mg/kg/日群の 8 匹中 2 匹及び 50 mg/kg/日群の 8 匹中 2 匹（瀕死 1 匹を含む）に胃粘膜糜爛が認められたが、明確な用量依存性はなく、より長期かつ高用量を用いた試験（30, 50 及び 70 mg/kg/日での 39 週間反復投与試験）において同様の所見は認められなかったことから、本試験でのみ見られた胃粘膜糜爛はサフィナミドによる毒性影響ではないと考えられた。

網膜毒性

ラットの反復投与試験では網膜変性が認められた。4 週間投与試験では変化はみられず、13 週間以上の試験の光学顕微鏡検査において網膜萎縮が検出され、最低用量は 15 mg/kg/日であった。初期の網膜変性は、外顆粒層の核のびまん性喪失であり、内顆粒層及び網膜色素上皮に影響はなかった。より長期間の試験では外顆粒層がほぼ消失するステージまで変性が進行し、網膜色素上皮及び内顆粒層へも影響が認められた。

毒性発現機序に関する試験としてラットを用いて実施した種々の試験結果から、網膜変性の特徴として以下の点が示された。

細胞外ドパミン代謝物が酸化されて生じる副産物は視神経へ有害作用を及ぼすが、サフィナミドはラット網膜におけるドパミン及びその代謝物（DOPAC 並びに HVA）の濃度に影響を及ぼさないことから、網膜変性がドパミン代謝副産物を介した影響である可能性は低いと考えられた。また、アルビノラット及び有色素ラットの比較では、網膜中薬物濃度は有色素ラットにおいて高かったが、網膜変化は両系統のラットで発現し、13 週の反復投与後に明らかな程度の違いはみられなかったことから、メラニン結合は網膜変化に関連しないと考えられた。

強光度と弱光度の比較において、強い光で網膜変性の発現頻度および程度の増強が認められた。また、レボドパ／カルビドパとの併用により網膜変性に変化はみられなかったが、げっ歯類で網膜変性を示すプラミペキソールとの併用によりわずかな悪化が認められた。

有色素ラットに対するサフィナミド 125 mg/kg/日の反復経口投与において、AmbF 染色準超薄切片を用いた光学顕微鏡観察では 3 日間投与後から視細胞及び外顆粒層の核の減少という特徴を示した。同試験の電子顕微鏡観察においては単回投与 24 時間後から視細胞層内節のミエリン様構造変性及びミトコンドリアの空砲化が認められることが明らかとなり、反復投与により視細胞層外節の崩壊、外顆粒層の萎縮さらに網膜色素上皮における食細胞活性の上昇及び細胞質空砲変性と時間依存的に認められたことから、光学顕微鏡観察で認められた外顆粒層の萎縮は、視細胞層が重度に破壊された結果と考えられた。

光学顕微鏡観察および電子顕微鏡観察において認められた形態的変化は、ERG 及び SD-OCT の結果と相関しており、機能的変化と相関した。有色素ラットに対するサフィナミド 125 mg/kg/日の投与により、1 回目の投与後において ERG 振幅が減少し、2 及び 3 回目の投与後では桿体反応を示す ERG 頂点潜時の延長や錐体機能に影響がみられた。これらの変化は 14 日間の休薬期間後に完全に機能的及び構造的な回復が認められた。また、ブリーチング（白色光のフラッシュによる網膜の色素退色変化）の結果、ロドプシン再生の時間的経過から光受容体応答の回復遅延が示された。14 日間の休薬期間後に光受容体応答の回復遅延は完全に回復せず、視覚サイクルの減速、すなわち網膜色素上皮が関与する過程である退色後の視覚色素再生遅延が示唆された。

毒性発現機序に関連して実施された種々の試験結果から、網膜変性の作用機序は特定されなかった。サフィナミドの非臨床試験において、マウスでは寿命を通して投与しても網膜変性の程度は軽度であった。また、サルでは高用量での 39 週間反復投与後の電子顕微鏡観察を含め、各試験において一貫して網膜に変化はみられず、レボドパ／カルビドパ及びプラミペキソールとの 13 週間併用投与においても網膜に変化はみられなかった。ラットでは加齢性変化としてびまん性の網膜変性を発現し[5]、アルビノラットの網膜は光刺激に対して感受性が高く変性を起こしやすいとされており[4),5)]、サフィナミドの毒性試験で認められた網膜変性は、げっ歯類に特異的でありラットで顕著に認められる変化であると考えられた。

サフィナミドの海外における臨床試験では、視力・色覚・視野・眼圧・水晶体及び網膜の顕微鏡写真撮影を含む眼底検査を実施し、さらに長期にわたって OTC 評価並びに ERG を実施し、結果は独立した神経眼科医が盲検下でレビューした。その結果、サフィナミド投与患者とプラセボ投与患者間で眼の機能に関して異常や悪化の発現率及び網膜変化の所見に差はみられなかった。また、げっ歯類で網膜変性を示すプラミペキソール又はロピニロールとサフィナミドを併用投与した患者においても網膜の変化はみられなかった。

高用量での長期毒性試験を含む複数のサルを用いた毒性試験において、一貫して網膜変性が認められなかったこと、臨床試験においてサフィナミド投与の影響が認められなかったことから、網膜変性はげっ歯類特異的な現象であり、患者に対して網膜変性のリスクを増加させないと考えられた。

これらの試験結果は外部コンサルタントによるレビューを受け、サフィナミドの非臨床試験での網膜毒性に関する概括評価として報告されている[7)]。

併用投与試験

ラット及びサルにおいてレボドパ／カルビドパ及びプラミペキソールとサフィナミドの併用による 13 週間反復投与試験を実施した。併用投与において、それぞれ単独で投与した変化と同様の変化が認められ、併用により頻度又は程度に軽微な悪化が認められたが、新たな毒性は発現しなかった。

2.6.6.9.4 生殖発生毒性

受胎能及び着床までの初期胚発生に関して、雌雄ラットにサフィナミドを交配前から交配後に反復経口投与した結果、雌において 150 mg/kg/日の投与により平均黄体数及び着床数がわずかに減少したが、雄の受胎能及び初期胚発生には影響がみられなかった。ラット及びサルの反復投与毒性試験で精巣及び卵巣に病理組織学的変化は認められなかったが、雌ラットの受胎能に影響が認められたことから、適切な避妊方法を用いている場合を除き、妊娠の可能性のある女性には投与しないことが望ましいと考えられる。

胚・胎児発生毒性試験において、妊娠ラットの器官形成期にサフィナミドを反復経口投与した結果、胚・胎児毒性が認められ、100 mg/kg/日以上で胎児体重の減少、50 mg/kg/日以上で異所性精巣がみられた。また、100 mg/kg/日以上では少数例ではあるが極度の腎盂拡張等が認められ、催奇形性の可能性が示唆された。サフィナミド（25、50 及び 100 mg/kg/日）とレボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）との併用投与試験における胚・胎児への影響は、それぞれの単独投与と同様の所見がみられたが、サフィナミド 50 及び 100 mg/kg/日との併用においては、それぞれの単独投与と比べ、骨格異常（肩甲骨の湾曲、長骨の短縮／湾曲／肥厚）の発現率が増加した。ウサギ胚・胎児発生毒性試験においては、サフィナミド 100 mg/kg/日で骨格変異の増加が認められたが軽微な母動物毒性に起因すると考えられた。また、レボドパ／カルビドパ（80/20 mg/kg/日）との併用投与により、レボドパ／カルビドパ単独投与で認められた心血管異常の発現増加に加えて、胚・胎児死亡率の増加並びに心臓／心房／心室の奇形が現れた。これらの所見から、レボドパ／カルビドパとの併用投与においては、それぞれの単独投与と比較して胎児異常、特に心血管系異常のリスクが増加することが示唆された。この心血管系奇形については、ラサギリン（Azilect®）などの MAO-B 阻害剤でも知られている（AZILECT Label[8)]）。妊娠女性に対するサフィナミドの使用経験はなく、安全性は確立していないことから、妊娠又は妊娠している可能性のある女性には投与しないことが望ましい。

出生前及び出生後の発生毒性として妊娠ラットに妊娠 6 日から分娩 20 日目までサフィナミドを反復経口投与した結果、生後数日以内の出生児死亡が増加した。死亡した出生児の多くは胃に乳汁が認められなかったことから、乳を飲むことができなかったことが健康に育つことができなかった原因と

推測された。また、剖検において皮膚及び頭蓋骨の黄色／橙色化が認められた。この変化は交叉哺育された出生児、すなわち 50 mg/kg/日を投与した母動物により哺育された対照群の出生児においても認められた。ラット出生児を用いたメカニズム検討の結果、肝胆道系の変性及び損傷に伴うビリルビンの血漿中レベルの顕著な増加が要因であることが示唆された。また、21 日齢の出生児では、肝臓の変化は完全に回復し、皮膚の変化も回復傾向を示したことから、この変化は一過性と考えられた。

分娩 1 日目から 20 日目にサフィナミドを投与した試験において、生後 4 日目の出生児の血漿中から少量のサフィナミドが検出され乳汁移行が示唆されたことから、本剤投与中は授乳を避けることが望ましい。

以上の結果は、外部コンサルタントのレビューを受け、サフィナミドの非臨床試験での生殖発生毒性に関する概括評価として報告されている[9)]。

2.6.6.9.5 遺伝毒性

マウスを用いた骨髄小核試験では、致死量である 1000 mg/kg の投与 48 時間後において小核を有する幼若赤血球（PCE）数の軽度な増加が認められた。一方、同用量の投与 24 時間後では小核を有する PCE 数の増加はみられなかったことから 48 時間処理について追加試験を実施した。その結果、サフィナミド群と対照群間で小核を有する PCE 数に有意な差はみられず、小核誘発性に再現性が認められなかったことから重要な変化ではないと考えられた。また、サフィナミドは細菌を用いた復帰突然変異試験及び L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験並びにラット初代肝細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成試験において変異原性を示さなかったことからも、サフィナミドは遺伝毒性を示さないと考えられた。

なお、サフィナミドの遺伝毒性試験は外部コンサルタントによるエキスパートレビューが実施され、サフィナミドに遺伝毒性はないと判断された[10)]。

2.6.6.9.6 がん原性

マウス及びラットがん原性試験のいずれにおいても腫瘍性病変の増加はみられなかった。

2.6.6.9.7 局所刺激性

ウサギを用いた静脈内及び血管周囲組織投与による局所刺激性試験の結果から、静脈内に正しく投与された場合刺激性は認められないが、正しく投与されない場合には軽度の刺激性が生じる可能性があることが示唆された。また、ウサギでの眼及び急性皮膚刺激性試験の結果から、サフィナミドは眼に対して重度の刺激性を有するが、皮膚に対して刺激性はないことが示された。

2.6.6.9.8 免疫毒性

ラット及びサルの両方を用いた多くの反復投与毒性試験のデータ（血液検査値、生化学検査値、剖検所見、器官重量及び組織学的所見）から、免疫系がサフィナミドの毒性の標的器官であることを示す証拠は得られていない。これはサフィナミド投与を受けた患者に免疫毒性を示唆する臨床所見が得られてないことからも確認されている。上記及び ICH S8「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」（ICH S8 ガイドライン）に基づき、非臨床免疫毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.9.9 依存性

ラットの身体依存性試験では、退薬症状を示唆する一般状態及び体重・摂餌量推移の変化はみられず、サフィナミドが身体依存性を示す可能性は低いと考えられた。

精神依存性を検討したサルの薬物自己投与試験では、明らかな強化効果は認められなかった。さらにラットにおける薬物弁別試験において、サフィナミドは *d*-アンフェタミン及びミダゾラムのいずれに対しても般化を示さなかった。以上の結果から、サフィナミドは精神依存性を示す可能性は低いと考えられた。

精神依存を示すコカインやアンフェタミン等の薬物では、側坐核等の報酬回路におけるドパミン作動性のシグナル伝達が増強することが知られている。サフィナミドはこれらの薬物と異なり、in vitro の試験において、DAT をはじめ、ドパミン受容体、セロトニン受容体、オピオイド μ 受容体、$GABA_A$ 受容体、ベンゾジアゼピン受容体、カナビノイド受容体、NMDA 受容体等薬物依存と関連する受容体に対する親和性が弱いことが示されている。また、ヒヒを用いた脳内 DAT 占有率評価（【2.6.2.2.2.2】）では、サフィナミドは投与後 30～60 分及び 60～90 分において DAT 部位を占有しなかった。撮像時間における血漿中濃度は 2200～7960 及び 1730～5450 ng/mL であり、ヒトに 100 mg/日を 7 日間反復投与した際の最高血漿中濃度（1819 ng/mL）を上回ることから、in vivo においてサフィナミドが両トランスポーターに及ぼす影響は弱いと考えられる。さらに、サルにサフィナミド 10 及び 20 mg/kg/日で 13 週間、8 及び 20 mg/kg/日で 39 週間反復投与した後の、脳内モノアミン量を測定した結果、側坐核におけるドパミン含量は対照群と同等であり、報酬回路に関連する部位に影響はみられなかった（【2.6.2.2.2.3】）。

以上の結果から、サフィナミドが精神依存性及び身体依存性を示す可能性は低いと考えられた。なお、サフィナミドの臨床試験において、退薬症状及び精神依存を示唆する兆候は認められていない。

2.6.6.9.10 代謝物の毒性評価

サフィナミドのヒトにおける主な代謝経路は、毒性学的評価に用いた動物の主要経路と同じであり、非臨床試験において評価が必要な代謝物 NW-1689 はラット及びサルにおける曝露が確認された。ヒトにサフィナミド 100 mg/日を 7 日間投与した際の NW-1689 の $AUC_{0\text{-}24h}$（29.0 μg·hr/mL）と比較し、ラット 26 週間反復毒性試験（2.6.6.3.5）では 114 倍、ラット胚・胎児発生毒性試験（2.6.6.6.4.1）では約 61 倍、ラットがん原性試験（2.6.6.5.5）では約 124 倍の曝露が認められた。

また、NW-1689、NW-1153 及び NW-1689AG について、ラット単回経口投与毒性試験（NW-1153 及び NW-1689）、細菌を用いる遺伝子突然変異試験（NW-1153、NW-1689 及び NW-1689AG）、哺乳類細胞を用いる小核試験（NW-1689）を実施した。その結果、いずれも遺伝毒性を示さず、NW-1689 及び NW-1153 の最小致死量はサフィナミドより高かった。

以上、NW-1689 はサフィナミドの毒性試験に用いた 1 種類以上の動物種において曝露され、その安全性は適切に評価されていると考えられた。

2.6.6.9.11 不純物の毒性評価

[redacted] 類縁物質B* （[redacted]）は細菌を用いる遺伝子突然変異試験にて変異原性を示したが、原薬中の含量は [redacted] ppb 以下であり、毒性学的懸念の閾値（Threshold of Toxicological Concern：TTC）である 1.5 μg/日を下回ることが確認されている。 類縁物質C* （[redacted]）、類縁物質A* については細菌を用いる遺伝子突然変異試験及び哺乳類細胞を用いる in vitro 小核試験の結果、遺伝毒性は認められなかった。また、 類縁物質A* はラットを用いた 4 週間反復経

＊新薬情報提供時に置き換えた。

口投与毒性試験においてサフィナミドの毒性と比較評価した結果、サフィナミドと同様の毒性を示し、NOAEL は 100 mg/kg/日であった。

以上の結果から、不純物である類縁物質B*、類縁物質C*、類縁物質D* 及び 類縁物質A* は臨床使用において安全性に影響する可能性は低いと考えられた。

サフィナミド製剤中に含まれる可能性のある不純物に関する in silico 毒性予測(Q)SAR の結果、不純物* 類(不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C*) をクラス 1、 類縁物質B* をクラス 2 に分類した。いずれの化合物についても製剤中含量は TTC（1.5 µg/日）未満であり、適切に管理されていることが確認されている。

2.6.6.9.12 光毒性

サフィナミド、NW-1153 及び NW-1689 は 290～700 nm の領域で吸収がないため、光毒性の懸念はないと考えられる。

2.6.6.9.13 結論

非臨床毒性試験の成績より、サフィナミドの臨床使用において重篤な副作用が発現する可能性は低いと考えられた。なお、非臨床毒性試験でみられた懸念に対して臨床試験の中でモニターした結果、検出されなかったか、又は安全性に問題はなく、忍容性は良好であると判断されている。以上の結果は、非可逆的で進行性の神経変性疾患であるパーキンソン病患者において、サフィナミドを長期使用するうえでの安全性を支持している。

2.6.6.10 参考文献一覧

1) 【4.3-20】Witkovsky P. and Dearry A., Functional roles of dopamine in the vertebrate retina, Prog. Ret. Res.1991,11, 247-292.
2) 【4.3-21】Witkovsky P. et al., Extracellular dopamine concentration in the retina of the clawed frog, Xenopus laevis, Proc. Natl. Acad. Sci., 1993 90(12), 5667-5671.
3) 【4.3-22】Lima L. and Urbina M., Dopamine and serotonin turnover rate in the retina of rabbit, rat, goldfish, and Eugerres plumieri: light effects in goldfish and rat, J. Neurosci. Res.1994, 39, 595-603.
4) 【4.3-23】Perez J, Perentes E. Light-induced retinopathy in the albino rat in long-term studies: an immunohistochemical and quantitative approach. Exp Toxic Pathol 1994;46(3):229-235
5) 【4.3-24】日本毒性病理学会 編. 新毒性病理組織学 西村書店 2017. 第 10 章-1 眼: 559-584
6) 【4.3-25】高橋洋司, 田澤 豊. 眼科における電気的検査手法. BME 1991;5(5):25-40.
7) 【4.3-26】Prentice DE, Safinamide An Overview of Retinal Toxicity in Preclinical Studies. 2013
8) 【4.3-13】AZILECT Labels for NDA 021641, 05/29/2014. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products
   URL：https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021641s016s017lbl.pdf
9) 【4.3-27】Plassmann S. Safinamide Preclinical Reproductive and Developmental Risk Assessment. 2013
10) 【4.3-28】Brusick D. Expert Review, The Genetic Toxicology of Safinamide (FCE26743A) in Four Tests. 2005

＊新薬情報提供時に置き換えた。