アイラミド配合懸濁性点眼液

CTD 第 2 部 CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

千寿製薬株式会社

目 次

2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 単回投与毒性試験 8
2.6.6.3 反復投与毒性試験 8
2.6.6.4 遺伝毒性試験 8
2.6.6.4.1 *In vitro* 試験 8
2.6.6.4.1.1 申請法* ブリンゾラミドの細菌を用いる復帰突然変異試験 8
2.6.6.4.1.2 申請法* ブリンゾラミドの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 8
2.6.6.4.2 *In vivo* 試験 8
2.6.6.4.2.1 申請法* ブリンゾラミドのマウスを用いる小核試験 8
2.6.6.4.2.2 非申請法* 及び申請法ブリンゾラミド*のマウスを用いる小核試験 9
2.6.6.4.2.3 申請法* ブリンゾラミドのマウスを用いる染色体異常試験 10
2.6.6.4.2.4 申請法* ブリンゾラミドのマウスを用いる小核誘発機序解明のための試験 10
2.6.6.5 がん原性試験 12
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 12
2.6.6.7 局所刺激性試験 12
2.6.6.8 その他の毒性試験 12
2.6.6.8.1 不純物の毒性試験 12
2.6.6.8.1.1 *In silico* 予測による不純物の変異原性及び発がん性評価試験 12
2.6.6.8.1.2 ウサギ 13 週間反復点眼投与毒性試験 12
2.6.6.8.1.3 細菌を用いる復帰突然変異試験 13
2.6.6.8.1.4 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 13
2.6.6.9 考察及び結論 15
2.6.6.9.1 考察 15
2.6.6.9.2 結論 17
2.6.6.10 図表 17
2.6.6.11 引用文献 18

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6 毒性試験の概要文

本項で使用した用語及び略号を表 2.6.6-1 に示した。

表 2.6.6-1　用語及び略号一覧表

用語及び略号	内容
AAP	Antikinetocore antibody-positive
CHL/IU 細胞	チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Dutch	Dutch-belted 種
IE	Immature erythrocyte
JW	日本白色種
MI	Mitotic index
MNIE	Micronucleated immature erythrocyte
MNPCE	Micronucleated polychromatic erythrocyte
$NaHCO_3$	炭酸水素ナトリウム
PCE	Polychromatic erythrocyte
S9 mix	ホモジネートの 9000g 上清分画と補酵素の混合液

2.6.6.1 まとめ

0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤は緑内障及び高眼圧症治療を目的とした配合点眼剤である。ブリモニジン酒石酸塩及びブリンゾラミドをそれぞれ有効成分とする点眼剤は既に国内で上市されており、両点眼剤の安全性は評価されている。また、ブリモニジン酒石酸塩及びブリンゾラミドの各単剤は本邦において十分な併用実績があるため [1)]、本剤は医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（平成 22 年 2 月 19 日薬食審査発 0219 第 4 号、以下、ICH M3 ガイダンス）の「臨床での十分な併用投与経験がある後期開発ステージの 2 つの被験薬による配合剤」に該当する。当該配合剤について、ICH M3 ガイダンスでは「臨床試験あるいは製造販売承認のための配合剤としての毒性試験は、毒性学的に大きな懸念がない限り、一般的に必要ない」とされている。さらに、米国ではブリモニジン酒石酸塩を本剤の 2 倍量含有する 1%ブリンゾラミド／0.2%ブリモニジン酒石酸塩配合懸濁性点眼剤である SIMBRINZA®が既に上市されている。

以上のことから、本剤の開発においては、臨床における併用投与実績に基づき配合剤としての慢性毒性試験は必要ないと判断し、製剤の評価としては本剤の眼刺激性試験のみを実施した。また、本剤の原薬であるブリンゾラミドの製造方法*として　申請法*　を選択したことから（2.3.S.2.2）、　申請法*　ブリンゾラミドの遺伝毒性についても評価した。さらに、その他の試験として、*in silico* 予測による不純物の変異原性及び発がん性評価、並びにブリンゾラミド原薬の不純物について、一般毒性試験、細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。表 2.6.6-2 に本剤の毒性試験プログラムを示した。

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.6-2　毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	試験系	GLP 適用
遺伝毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験（　申請法*　ブリンゾラミド）	*In vitro*	ネズミチフス菌、大腸菌	適
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（　申請法*　ブリンゾラミド）	*In vitro*	CHL/IU 細胞	適
マウスを用いる小核試験（　申請法*　ブリンゾラミド）	経口	Crl:CD1(ICR)マウス	適
小核誘発機序解明のための試験			
マウスを用いる小核試験（　非申請法*　ブリンゾラミド及び　申請法*　ブリンゾラミド）	経口	Crl:CD1(ICR)マウス	非適
マウスを用いる染色体異常試験（　申請法*　ブリンゾラミド）	経口	Crl:CD1(ICR)マウス	非適
マウスを用いる小核誘発機序解明のための試験（　申請法*　ブリンゾラミド）	経口	Crl:CD1(ICR)マウス	非適
局所刺激性試験			
7 日間眼刺激性試験	点眼	JW ウサギ	適
その他の毒性試験 不純物の毒性試験			
In silico 予測による不純物の変異原性及び発がん性評価試験	–	*In silico*	非適
13 週間反復点眼投与毒性試験	点眼	Dutch ウサギ	適
細菌を用いる復帰突然変異試験	*In vitro*	ネズミチフス菌、大腸菌	適
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	*In vitro*	CHL/IU 細胞	適

遺伝毒性試験

申請法*　ブリンゾラミドの細菌を用いる復帰突然変異試験：156～5000 µg/プレートの　申請法*　ブリンゾラミドは代謝活性化の有無に関わらず、ネズミチフス菌並びに大腸菌のいずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

申請法*　ブリンゾラミドの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：384 µg/mL（1 mM）、192 µg/mL 及び 96.0 µg/mL の　申請法*　ブリンゾラミドは代謝活性化の有無に関わらず、CHL/IU 細胞に対して染色体異常を誘発しなかった。

申請法*　ブリンゾラミドのマウスを用いる小核試験：　申請法*　ブリンゾラミドを 250、500 及び 1000 mg/kg の用量でマウスに単回経口投与した結果、MNPCE の出現頻度は 250 mg/kg 群では陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかったが、500 及び 1000 mg/kg 群では統計学的に有意な増加が認められた。また、MNPCE の出現頻度の増加は用量相関性が認められた。さらに、有意差が認められた用量の内、投与 48 時間後の 500 及び 1000 mg/kg 群並びに投与 72 時間後の 1000 mg/kg 群での MNPCE の出現頻度は、試験施設の陰性対照の背景データから求めた基準値の上限を上回っていた。したがって、本試験条件下において　申請法*　ブリンゾラミドはマウス骨髄細胞に対して小核誘発性を示すと判断した。

非申請法*　及び申請法ブリンゾラミド*のマウスを用いる小核試験：　非申請法*　ブリンゾラ

＊新薬承認情報提供時に置換

ミドを 250、500 及び 1000 mg/kg の用量で、　申請法*　ブリンゾラミドを 1000 mg/kg の用量でそれぞれマウスに単回経口投与した結果、すべての被験物質投与群において、MNPCE の出現頻度の有意な増加が認められた。また、　非申請法*　品に関しては、用量相関性も認められた。有意差が認められた用量の内、　非申請法*　ブリンゾラミドの 500 mg/kg 群の投与 72 時間後及び　非申請法*　並びに申請法ブリンゾラミド*の 1000 mg/kg 群のすべての時点において、MNPCE の出現頻度は試験施設の陰性対照の背景データから求めた基準値の上限を上回っていた。したがって、本試験条件下においてブリンゾラミドは　申請法*　の有無に関わらずマウス骨髄細胞に対して小核誘発性を示すと判断した。

申請法*　ブリンゾラミドのマウスを用いる染色体異常試験：　申請法*　ブリンゾラミドを 1000 mg/kg の用量でマウスに単回経口投与し、投与 24、48 及び 72 時間後に骨髄染色体標本を作製した。その結果、被験物質投与群では、陰性対照群と比較し、構造異常細胞出現率及び倍数性異常細胞出現率の増加は認められなかった。したがって、本試験条件下では　申請法*　ブリンゾラミドはマウス骨髄細胞への染色体構造異常及び倍数性異常誘発作用を有さないと判断した。

申請法*　ブリンゾラミドのマウスを用いる小核誘発機序解明のための試験：　申請法*　ブリンゾラミドを 1000 mg/kg の用量でマウスに単回経口投与した。その他に、$NaHCO_3$ を単回腹腔内投与する群、　申請法*　ブリンゾラミド及び $NaHCO_3$ を併行投与する群を設けた。投与 48 及び 72 時間後に骨髄塗抹標本及び動原体観察用標本を作製した。その結果、　申請法*　ブリンゾラミドを単独投与した群及び併行投与した群において MNIE の有意な増加が認められた。また、
申請法*　ブリンゾラミドを単独投与した群において AAP の有意な増加が認められた。したがって、　申請法*　ブリンゾラミドによる小核形成には異数性が関与していると考えられた。

局所刺激性試験

ウサギ 7 日間眼刺激性試験：ウサギに 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤を 1 回 50 µL、1 日 4 回、約 3 時間間隔で 7 日間反復点眼投与した試験では、被験物質投与に関連した眼の異常は認められなかった。

不純物の毒性試験

***In silico* 予測による不純物の変異原性及び発がん性評価試験：**0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤及びブリンゾラミド原薬の不純物について変異原性及び発がん性を評価した結果、評価した不純物のうち 物質イをクラス 2 に、物質ロ*をクラス 3 に分類した。これらの不純物の許容限度値は 1.5 µg/day に設定した。その他の不純物は、いずれもクラス 5 に分類した。クラス 5 に分類した不純物は、許容限度値を設定しなかった。

ウサギ 13 週間反復点眼投与毒性試験及び回復性試験：0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド原薬の不純物を添加した投与液、及び 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤をウサギに 1 日 4 回、13 週間反復点眼投与した試験では、不純物の存在による毒性プロファイルの違いは認められなかった。

細菌を用いる復帰突然変異試験：0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼

＊新薬承認情報提供時に置換

剤にブリンゾラミド原薬の不純物を添加した被験液について検討した結果、代謝活性化の有無に関わらず、ネズミチフス菌及びに大腸菌のいずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド原薬の不純物を添加した被験液について検討した結果、CHL/IU 細胞に対して 385 μg/mL ブリンゾラミド換算の不純物を含有する被験液では代謝活性化の存在下で染色体異常を誘発したが、193 μg/mL ブリンゾラミド換算の不純物を含有する被験液では染色体異常を誘発しなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

該当資料なし

2.6.6.3 反復投与毒性試験

該当資料なし

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 申請法* ブリンゾラミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

……4.2.3.3.1-1

申請法* ブリンゾラミドの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、ネズミチフス菌 TA100、TA98、TA1535 及び TA1537 株並びに大腸菌 WP2*uvrA* 株を用いて復帰突然変異試験を行った。試験は代謝活性化系存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法により行った。用量は 156、313、625、1250、2500 及び 5000 μg/プレートを設定した。

その結果、 申請法* ブリンゾラミド処理群において代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。陽性対照物質は各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

以上の結果から、本試験条件下において 申請法* ブリンゾラミドは遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定した。

2.6.6.4.1.2 申請法* ブリンゾラミドの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

……4.2.3.3.1-2

申請法* ブリンゾラミドの染色体異常誘発性の有無を検討するため、CHL/IU 細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。

代謝活性化系存在下及び非存在下での短時間処理法（6 時間処理）並びに代謝活性化系非存在下での連続処理法（24 時間処理）のいずれにおいても、384 μg/mL（1 mM）を最高用量とし、以下 192 及び 96.0 μg/mL の計 3 用量について染色体異常の観察を実施した。

その結果、いずれの処理法において染色体構造異常細胞及び倍数性細胞の出現頻度の増加は認められなかった。一方で、短時間処理法（代謝活性化系非存在下）及び連続処理法の陽性対照物質 mitomycin C 並びに短時間処理法（代謝活性化系存在下）の陽性対照物質 cyclophosphamide では、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

以上の結果から、本試験条件下において 申請法* ブリンゾラミドは染色体異常を誘発しないもの（陰性）と判定した。

2.6.6.4.2 *In vivo* 試験

2.6.6.4.2.1 申請法* ブリンゾラミドのマウスを用いる小核試験

……4.2.3.3.2-1

申請法* ブリンゾラミドの *in vivo* における小核赤血球誘発性の有無を検討するため、Crl:CD1(ICR)系雄マウスを用いる小核試験を実施した。

最大耐量付近と考えられる 1000 mg/kg を最高用量とし、公比 2 で除した 500 及び 250 mg/kg の計 3 用量を設定した。雄性 Crl:CD1(ICR)マウスに単回経口投与し、投与 24、48 及び 72 時間後に各 5 匹ずつ骨髄塗抹標本を作製して小核を有する多染性赤血球（MNPCE）の出現頻度及び観察全赤血球に対する多染性赤血球（PCE）の割合を計測した。

陰性対照として被験物質の媒体であるコーン油を単回経口投与し、投与 24、48 及び 72 時間後に骨髄塗抹標本を作製する群（5 匹／時点）、陽性対照として mitomycin C を単回腹腔内投与し、投与 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製する群（5 匹）を設けた。

その結果、MNPCE の出現頻度は、250 mg/kg 群では陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかったが、500 及び 1000 mg/kg 群では有意な増加が認められた。また、MNPCE の増加は用量相関性が認められた。有意差が認められた用量の内、投与 48 時間後の 500 及び 1000 mg/kg 群並びに投与 72 時間後の 1000 mg/kg 群での MNPCE の出現頻度は、試験施設の陰性対照の背景データから求めた基準値の上限を上回っていた。また、陽性対照群では全例において MNPCE の出現頻度が上昇し、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示した。また、PCE の割合は、投与 48 時間後の 500 mg/kg 群及び投与 72 時間後の 1000 mg/kg 群で、陰性対照群と比較して有意な減少が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において　申請法*　ブリンゾラミドはマウス骨髄細胞に対して小核誘発性を示すもの（陽性）と判定した。

2.6.6.4.2.2　　非申請法*　　及び 申請法ブリンゾラミド* のマウスを用いる小核試験

……4.2.3.3.2-2

申請法*　の有無と小核多染性赤血球の出現頻度との関連性を明らかにするために、 **非申請法***　ブリンゾラミドと　申請法*　ブリンゾラミドの小核赤血球の誘発性を比較した。 **申請法***　品（　申請法*　品 A 及び B）に関しては、　申請法*　を異なる 2 施設にて実施し、　非申請法*　品と含めて 3 種類の被験物質にて試験を実施した。

各被験物質の用量として、最大耐量付近である 1000 mg/kg を設定した。　非申請法*　品については、500 及び 250 mg/kg の用量も設定した。雄性 Crl:CD1(ICR)マウスに単回経口投与し、投与 48 及び 72 時間後に各 5 匹ずつ骨髄塗抹標本を作製して小核を有する多染性赤血球（MNPCE）の出現頻度及び観察全赤血球に対する多染性赤血球（PCE）の割合を計測した。

陰性対照として被験物質の媒体であるコーン油を単回経口投与し、投与 48 及び 72 時間後に骨髄塗抹標本を作製する群（5 匹／時点）、陽性対照として mitomycin C を単回腹腔内投与し、投与 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製する群（5 匹）を設けた。

その結果、すべての被験物質投与群においても MNPCE の出現頻度に有意な増加が認められた。また、　非申請法*　品に関しては、MNPCE の増加に用量相関性も認められた。有意差が認められた用量の内、　非申請法*　ブリンゾラミドの 500 mg/kg 群（投与 72 時間後）及びすべての被験物質の 1000 mg/kg 群（投与 48 及び 72 時間後）での MNPCE の出現頻度は、試験施設の陰性対照の背景データから求めた基準値の上限を上回っていた。　非申請法*　品並びに　**申請法***　品 A 及び B の MNPCE の出現頻度に明確な差は認められなかった。また、PCE の割合は、投与 48 時間後及び投与 72 時間後共に、　非申請法*　品投与群における 500 mg/kg 群及び 1000 mg/kg 群、並びに　申請法*　品 A 及び B 投与群において、陰性対照群と比較して有意な減少が認められた。

以上の結果から、本試験条件下においてブリンゾラミドは　申請法*　の有無に関わらず、マ

＊新薬承認情報提供時に置換

ウス骨髄細胞に対して小核誘発性を示すもの（陽性）と判定した。また、　非申請法*　品並びに　申請法*　品 A 及び B の小核赤血球の誘発性に明確な差はないと判断した。

2.6.6.4.2.3　　申請法*　ブリンゾラミドのマウスを用いる染色体異常試験

……4.2.3.3.2-3

申請法*　ブリンゾラミドのマウス骨髄細胞への染色体異常誘発性について検討するため、1000 mg/kg の　申請法*　ブリンゾラミドを 15 匹の雄性 Crl:CD1(ICR)マウスに単回経口投与し、投与 24、48 及び 72 時間後に各 5 匹について骨髄染色体標本を作製した。さらに、1 個体あたり 1000 細胞（有核細胞及び分裂中期像）中の分裂中期細胞の割合（MI）及び 1 個体あたり 150 個の分裂中期像における構造異常細胞及び倍数性異常細胞の出現率を求めた。

陰性対照として被験物質の媒体であるコーン油を単回経口投与し、投与 24、48 及び 72 時間後に骨髄染色体標本を作製する群（5 匹/時点）、陽性対照として mitomycin C を単回腹腔内投与し、投与 24 時間後に骨髄染色体標本を作製する群（5 匹）を設けた。

その結果、被験物質投与群では陰性対照群と比較し、構造異常細胞出現率及び倍数性異常細胞出現率の増加は認められなかった。一方で、陽性対照群では陰性対照群と比較し、構造異常細胞出現率の有意な増加が認められた。また、被験物質投与群の MI は、投与 48 時間後において低下したが、72 時間後には回復が認められた。

以上の結果から、本試験条件下では　申請法*　ブリンゾラミドはマウス骨髄細胞への染色体構造異常及び倍数性異常誘発作用を有さないと判断した。

2.6.6.4.2.4　　申請法*　ブリンゾラミドのマウスを用いる小核誘発機序解明のための試験

……4.2.3.3.2-4

申請法*　ブリンゾラミドの小核誘発機序を検討するため、雄性 Crl:CD1(ICR)マウスを用いて以下の群構成（各群 5 匹/時点）で試験を実施した。

- コーン油を単回経口投与する陰性対照群
- ブリンゾラミド（1000 mg/kg）を単回経口投与する被験物質群
- $NaHCO_3$（4 mmol/kg）を単回腹腔内投与する $NaHCO_3$ 群
- ブリンゾラミド（1000 mg/kg）の単回経口投与及び $NaHCO_3$（4 mmol/kg）の単回腹腔内投与を実施する被験物質+ $NaHCO_3$ 群
- Mitomycin C（2 mg/kg）を単回腹腔内投与する小核陽性対照群
- Colchicine（2 mg/kg）を単回腹腔内投与する動原体抗体陽性対照群

観察及び検査として一般状態観察、体重、体温及び血液ガス測定、血液学的検査並びに剖検を行い、脾臓の病理組織学的検査を実施した。小核誘発に関しては、投与 48 及び 72 時間後に骨髄塗抹標本を作製し、小核を有する幼若赤血球の出現率（MNIE）及び全赤血球に占める幼若赤血球の割合（IE）を算出した。さらに、染色体の異数性誘発作用の検出を目的として、小核試験用に採取した骨髄細胞の残液の一部を用いて、キネトコア（動原体）タンパク特異的な抗体を使用して蛍光抗体染色で検出する方法で標本を作製し、動原体を有する幼若赤血球の出現率（AAP）を算出した。なお、小核及び動原体抗体の陽性対照群については投与 24 時間後に各 5 匹について骨髄塗抹標本を作製した。

被験物質群では、死亡が投与翌日と投与 2 日後に各 1 例ずつ認められ、他の 1 例で運動性の低下、不規則呼吸及び体表温度の低下が認められたため切迫剖検を行った。被験物質+$NaHCO_3$ 群で

は、投与翌日に 1 例の死亡が認められ、他の 1 例で運動性の低下、不規則呼吸及び体表温度の低下が認められたため切迫剖検を行った。

被験物質群及び被験物質+$NaHCO_3$ 群ともに陰性対照群と比較し、体重及び体温の有意な減少又は減少傾向が認められ、血中 pH の低下、二酸化炭素分圧の上昇及び重炭酸イオン濃度の低下も認められたことからアシドーシスが誘発されているものと考えられた。

血液学的検査では、被験物質群で赤血球数の増加、ヘモグロビン濃度及び血小板数の上昇並びに網赤血球数の低下が認められ、被験物質+$NaHCO_3$ 群では、さらにヘマトクリット値の上昇も認められた。

剖検では、被験物質群の死亡例及び切迫剖検例で腹腔に黄褐色物又は直腸に穿孔が認められた。被験物質群及び被験物質+$NaHCO_3$ 群の生存例においては、投与 72 時間後剖検例の 3 例中 1 例又は 4 例中 3 例で腹腔に黄褐色物及び直腸に穿孔が認められ、さらに、被験物質+$NaHCO_3$ 群の 1 例では、直腸と後腹膜との癒着も認められた。直腸の穿孔については陰性対照群、$NaHCO_3$ 群及び陽性対照群では認められていないことから、被験物質投与による何らかの影響があったものと考えられるが、本試験では体温測定時に直腸内にプローブを挿入することから、直腸の穿孔にはプローブの挿入操作が関連しているものと思われる。

病理組織学的検査では、被験物質群の投与 48 時間後で脾臓の委縮、髄外造血の減少及び可染体マクロファージの増加が認められ、これらの変化は投与 72 時間後では程度及び頻度が増強し、リンパ球減少も観察された。また、同様の変化が被験物質+$NaHCO_3$ 群においても同程度に認められたことから、被験物質投与に起因する組織学的変化に対して、$NaHCO_3$ 投与による減弱効果はみられなかった。

小核試験では、被験物質群の MNIE は投与 48 及び 72 時間後でそれぞれ 0.56%及び 0.85%であり、陰性対照群（0.10%及び 0.12%）と比較し、いずれも有意な増加が認められた。同様に、被験物質+$NaHCO_3$ 群の MNIE は、投与 48 及び 72 時間後でそれぞれ 0.26%及び 0.51%であり、いずれも有意な増加が認められた。被験物質群と比較し、被験物質+$NaHCO_3$ 群の MNIE は低値を示した。また、被験物質+$NaHCO_3$ 群の投与 72 時間後において、陰性対照群と比較して IE の有意な減少が認められた。

異数性に関しては、被験物質群の AAP は、投与 48 及び 72 時間後でいずれも 0.3%であり、陰性対照群（0.0%）と比較し、いずれも有意な増加が認められた。被験物質+$NaHCO_3$ 群は、いずれの時点においても有意な変動はみられなかった。

本試験では、被験物質群において 1000 mg/kg の投与により小核出現率の有意な増加が認められ、かつ動原体を有する幼若赤血球の有意な増加が認められた。一方、　申請法*　ブリンゾラミドのマウスにおける染色体異常試験（2.6.6.4.2.3 ）では、1000 mg/kg の投与により、染色体構造異常及び倍数性異常の有意な増加は認められなかった。これらの結果より、小核（染色体異常）の形成は染色体断片によるものではなく、染色体の損失、即ち異数性の関与によるものと考えられた。

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6.5 がん原性試験

該当資料なし

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

該当資料なし

2.6.6.7 局所刺激性試験

……4.2.3.6-1

0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤の眼局所への刺激性を検討するため、白色雄性ウサギ（Kbl:JW、n=3）に 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤を 1 回 50 µL、1 日 4 回、約 3 時間間隔で 7 日間反復点眼投与し、眼刺激性を評価した。

その結果、被験物質投与に関連した眼の異常は認められなかった。以上の結果から、0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤は、本試験条件下でウサギに眼刺激性を有さないと判断した。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 不純物の毒性試験

2.6.6.8.1.1 *In silico* 予測による不純物の変異原性及び発がん性評価試験

……4.2.3.7.6-1

本剤及びその原薬である [redacted] 製ブリンゾラミドの不純物について、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補遺［ICH M7（R1）］（平成 30 年 6 月 27 日薬生薬審発 0627 第 1 号）に従い、変異原性及び発がん性の評価並びに許容限度値の設定を実施した。

その結果、管理が必要なクラス 2 に 物質ｲ* クラス 3 に 物質ﾛ*を分類した。これらの不純物の許容限度値は ICH M7（R1）の threshold of toxicological concern（製造販売承認申請後の投与期間が 10 年超一生涯の場合は 1.5 µg/day）とした。また、クラス 5 に類縁物質 B、類縁物質 D、類縁物質 E、類縁物質 C（　物質ﾊ*　）、物質ﾆ*、物質ﾎﾞ物質ﾍ*、物質ﾄ*、物質ﾁ*、類縁物質 A を分類した。クラス 5 に分類した不純物については許容限度値を設定しなかった。

2.6.6.8.1.2 ウサギ 13 週間反復点眼投与毒性試験

……4.2.3.7.6-2

ブリンゾラミド原薬の不純物について安全性評価を行うため、0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド不純物（類縁物質 B [redacted]%、類縁物質 C [redacted]%、類縁物質 D [redacted]%及び類縁物質 E [redacted]%）を添加した投与液を各群雌雄 5 匹の有色ウサギ（Kbl:Dutch）の左眼に 1 回 50 µL で約 3 時間間隔で 1 日 4 回、13 週間反復点眼投与したときの眼局所及び全身に対する毒性を評価した。また、比較対照物質である 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤（本剤）及び媒体対照物質として本剤の基剤を同様に投与し、比較した。さらに、4 週間の休薬群を設け、5 匹中 2 匹についてその回復性を検討した。

＊新薬承認情報提供時に置換

検査項目として、一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査（肉眼及び検眼鏡的検査、眼底検査、角膜厚）、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査を実施した。

一般状態観察では、いずれの群においても全例に死亡及び異常はみられなかった。

体重、摂餌量、肉眼及び検眼鏡的検査、眼底検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査では、被験物質及び比較対照物質に起因すると考えられる変化はみられなかった。

角膜厚の有意な高値が、被験物質群では投与 21 日目に、比較対照物質群では投与 21 及び 84 日目に雄でみられたが、肉眼及び検眼鏡的検査並びに病理組織学的検査において角膜に異常はみられていないこと、角膜厚の増加は程度に差はあるものの媒体対照群でもみられる変化であり、個別値では媒体対照群の変動範囲から大きく外れる個体はいないことから、毒性学的に意義のない変化と考えられた。

以上の結果から、本試験条件下では、不純物の含有による眼局所の変化の増悪、及び新たな変化は認められなかった。また、今回の試験ではいずれの群においても全身毒性は認められなかった。

2.6.6.8.1.3 細菌を用いる復帰突然変異試験

……4.2.3.7.6-3

ブリンゾラミド原薬の不純物について、0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド不純物（類縁物質 B [redacted]%、類縁物質 C [redacted]%、類縁物質 D [redacted]%及び類縁物質 E [redacted]%）を添加した被験液の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、ネズミチフス菌 TA100、TA98、TA1535 及び TA1537 株並びに大腸菌 WP2*uvrA* 株を用いて、復帰突然変異試験を行った。試験は、代謝活性化系存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法により行った。さらに、基剤が試験系に影響を及ぼすか否かを確認するために媒体対照群を設けた。用量は、代謝活性化系非存在下の TA100、TA1535 及び WP2*uvrA* 株は 6、13、25、50 及び 100 µL/プレートを設定し、TA98 及び TA1537 株では 3、6、13、25、50 及び 100 µL/プレートを設定した。代謝活性化系存在下はいずれの菌株においても 6、13、25、50 及び 100 µL/プレートを設定した。

その結果、被験物質群及び媒体対照群において、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照群の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上から、本試験条件下において、0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド不純物（類縁物質 B、類縁物質 C、類縁物質 D 及び類縁物質 E）を添加した被験液は細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を有さないと結論した。

2.6.6.8.1.4 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

……4.2.3.7.6-4

ブリンゾラミド原薬の不純物について、0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド不純物（類縁物質 B [redacted]%、類縁物質 C [redacted]%、類縁物質 D [redacted]%及び類縁物質 E [redacted]%）を添加した被験液の染色体異常誘発性の有無を検討するため、CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

代謝活性化系存在下及び非存在下での短時間処理法（6 時間処理）並びに代謝活性化系非存在下での連続処理法（24 時間処理）のいずれにおいても、ブリンゾラミド濃度が約 1 mM となる

385 μg/mL を最高用量とし、以下 193 及び 96 μg/mL の計 3 用量について染色体異常の観察を実施した。さらに、基剤が試験系に影響を及ぼすか否かを確認するために媒体対照群を設けた。

その結果、最高用量である 385 μg/mL において、代謝活性化系の存在下での短時間処理法で、陰性対照群と比較して染色体の構造及び数的異常を有する細胞の出現数に統計学的に有意な増加が認められ、用量依存性も確認された。しかし、193 μg/mL では染色体の構造及び数的異常を有する細胞の出現数に統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、代謝活性化系の非存在下での短時間処理法及び連続処理法では、陰性対照群と比較して染色体の構造及び数的異常を有する細胞の出現数に有意な増加は認められなかった。被験液添加時に pH の変動を示す培養液の色調の変化は認められなかった。析出は、すべての処理条件において 48 μg/mL 以上で認められ、媒体対照群においても認められた。すべての処理条件において、媒体対照群における染色体異常細胞の出現数が試験施設の陰性対照の背景データの範囲内にあったことから、基剤は試験系に影響を及ぼさないと判定した。さらに、陰性及び陽性対照群における染色体異常細胞の出現頻度は、試験施設の背景データの範囲内にあったことから、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

以上から、本試験条件下において、0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤にブリンゾラミド不純物（類縁物質 B、類縁物質 C、類縁物質 D 及び類縁物質 E）を添加した被験液は CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を有すると結論した。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 考察

0.1%ブリモニジン酒石酸塩点眼剤及び 1%ブリンゾラミド懸濁性点眼剤は既に国内で上市されており、両点眼剤の安全性は十分に評価されている。本剤の申請にあたって、表 2.6.6-2 に示した毒性試験を実施した。

本剤の眼刺激性試験では、被験物質投与に関連した眼の異常は認められなかった。

申請法*　ブリンゾラミド原薬の遺伝毒性について

ブリンゾラミドの製造方法*が　申請法*　であることから、　申請法*　ブリンゾラミドの遺伝毒性について評価したところ、細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞及びマウスを用いる染色体異常試験で、陰性の結果を得た（2.6.6.4.1.1 、2.6.6.4.1.2 、2.6.6.4.2.3 ）。マウスを用いる小核試験では　申請法*　の有無に関わらず、ブリンゾラミドの投与により小核誘発性が認められた（2.6.6.4.2.1 、2.6.6.4.2.2 、2.6.6.4.2.4 ）。これらの結果は、　申請法*　の有無がブリンゾラミドの遺伝毒性試験結果に影響していないことを示している。

申請法*　の有無による遺伝毒性への影響を検討する中で、ブリンゾラミドをマウスに投与した試験では小核誘発が確認された。しかし、以下に示すように、この小核は生理的変化を伴う二次的な反応により誘発されると考えられ、臨床使用における　申請法*　ブリンゾラミド原薬の遺伝毒性の懸念はないと判断した。小核誘発に関して、既報[2)3)4)]では、*in vivo* 及び *in vitro* における検討では染色体異常並びに小核の誘発に低 pH 又は低体温といった生理条件が関与することが示唆されている。また、造血系亢進が小核の誘発を招くことが報告されている。ブリンゾラミドに関してもこれらの生理的要因の関与を検討するため小核誘発機序解明試験を実施した。その結果、ブリンゾラミドを投与した群において、逆に造血系の抑制が示唆されたものの、体温及び血液中 pH の有意な減少を含むアシドーシスが認められた。ブリンゾラミドの投与により生じるアシドーシスを改善するために $NaHCO_3$ を併行投与した群を設けたところ、小核誘発はブリンゾラミドのみを投与した群と比較して低値を示した。さらに、小核誘発機序の特定のため AAP の測定を実施したところ、ブリンゾラミドの単独投与群では陰性対照群と比較して AAP の有意な増加が認められた（2.6.6.4.2.4 ）。また、　申請法*　ブリンゾラミドのマウスにおける染色体異常試験では、1000 mg/kg 群において染色体構造異常及び倍数性異常は認められなかった（2.6.6.4.2.3 ）。したがって、ブリンゾラミドによる小核（染色体異常）の形成は染色体断片によるものではなく、異数性が関与していると考えられた。また、被験物質投与による血液中 pH 及び体温の有意な低下が上述の小核誘発に関与していることが考えられた。

さらに、本剤の臨床使用におけるブリンゾラミドの全身用量（0.033 mg/kg/日、表 2.6.6-3 参照）は、*in vivo* 小核試験の陰性用量（250 mg/kg/日）に比べて約 7500 倍低いことから、臨床使用における　申請法*　したブリンゾラミドの遺伝毒性の懸念はないと判断した。

以上のことから、臨床使用における　申請法*　ブリンゾラミド原薬の遺伝毒性の懸念はないと判断した。

申請法*　ブリンゾラミド原薬の不純物の遺伝毒性について

ブリンゾラミド原薬の不純物について安全性評価の一環として、製剤にこれら不純物を添加した被験液を用いて哺乳類細胞を用いる染色体異常試験を実施した結果、代謝活性化の存在下で最

＊新薬承認情報提供時に置換

高用量の 385 µg/mL（ブリンゾラミドの量として）で染色体構造異常及び倍数性異常誘発作用が認められた（2.6.6.8.1.4 ）。そこで、臨床使用に際しての懸念について、本剤の申請にあたって実施した遺伝毒性試験の結果とヒト臨床曝露量との比較を表 2.6.6-3 に示すとともに、以下に *in vivo* 遺伝毒性結果及び一日最大投与量、臨床用量との比較の観点から考察した。

申請法* ブリンゾラミドのマウスを用いる染色体異常試験では、ブリンゾラミドを経口投与した結果、1000 mg/kg 群で染色体構造異常及び倍数性異常誘発作用は示さなかった（2.6.6.4.2.3 ）。このとき、ブリンゾラミド不純物は最小で [redacted]µg/mL が全身へ曝露されていると考えられる。一方、*in vitro* 染色体異常試験で陽性反応が認められた被験液中に、ブリンゾラミド不純物は最大で [redacted]µg/mL 含まれていた。これらのことより、*in vivo* 染色体異常試験では、*in vitro* 染色体異常試験より約 2 倍多いブリンゾラミド不純物が曝露されているが陰性であることから、生体で染色体異常は示さないと判断した。

また、規格値から算出されたブリンゾラミド不純物の臨床 1 日最大投与量は約 [redacted]µg/kg/日である。一方、マウスを用いる小核試験（2.6.6.4.2.1 ）で 250 mg/kg 群では、ブリンゾラミド不純物は最小で [redacted]µg/kg/日投与されており、ブリンゾラミド不純物の臨床 1 日最大投与量より約 750 倍多く投与されているが陰性のため、生体への遺伝毒性の懸念はないと考える。

また、第 III 相試験（3-03 試験）において、観察期に 1%ブリンゾラミド点眼剤を 1 回 1 滴、1 日 2 回、4 週間反復点眼投与した後、治療期に 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤を同様に 4 週間反復点眼投与したときの最終投与後 2 時間の血液中ブリンゾラミド濃度は 2.734±0.7120 µg/mL であった（2.7.2.2.2）。このとき規格値から算出されたブリンゾラミド不純物の推定血液中濃度は最高で [redacted] µg/mL であると考えられる。これに対し、*in vitro* 染色体異常試験で陽性の時のブリンゾラミド不純物濃度は、最小で約 [redacted]µg/mL であるため、*in vitro* 染色体異常試験で陽性の時のブリンゾラミド不純物濃度は、不純物の推定血液中濃度よりも約 50 倍高く、本剤では不純物がこの濃度に達することはないと考えられる。

以上のように、*in vivo* 遺伝毒性結果及び一日最大投与量、臨床用量との比較の観点から、本剤の臨床使用における遺伝毒性の懸念はないと判断した。

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.6-3　ヒト臨床曝露量との比較（遺伝毒性試験）

		ブリンゾラミドの投与又は処理濃度（血液中濃度）	不純物量の投与又は処理濃度（血液中濃度）	曝露量比（/ヒト）
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	陰性	193 µg/mL	[redacted] µg/mL[a)]	24 – 120[b)]
	短時間処理（+S9mix）構造異常・数的異常の増加	385 µg/mL	[redacted] µg/mL[a)]	47 – 239[b)]
マウスを用いる小核試験	陰性	250 mg/kg/日 (3472 µg/mL)[c)]	[redacted] µg/kg/日[d)] ([redacted] µg/mL)[c)]	127 – 2032[e)]
	異数性由来の小核出現率増加	500 mg/kg/日 (6944 µg/mL)[c)]	[redacted] µg/kg/日[d)] ([redacted] µg/mL)[c)]	254 – 4064[e)]
マウスを用いる染色体異常試験	陰性	1000 mg/kg/日 (13889 µg/mL)[c)]	[redacted] µg/kg/日[f)] ([redacted] µg/mL)[c)]	508 – 13547[e)]
ヒト		0.033 mg/kg/日[g)] (2.7 µg/mL)[h)]	[redacted] µg/kg/日[i)] ([redacted] µg/mL)[i)]	

a) 被験液中に不純物が [redacted]%～[redacted]%含有
b) 不純物の細胞処理濃度/ ヒトの臨床用量の血液中の推定不純物濃度
c) マウスの循環血液量は 72 mL/kg である[5)]ことから算出
d) 投与液中に不純物が [redacted]%～[redacted]%含有
e) マウス血液中の推定不純物濃度/ ヒトの臨床用量の血液中の推定不純物濃度
f) 投与液中に不純物が [redacted]%～[redacted]%含有（参考値）
g) 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤を体重 60 kg のヒトに 50 µL/眼で 1 日 2 回、両眼に点眼した場合
h) 第 III 相試験（3-03 試験）において、観察期に 1%ブリンゾラミド点眼剤を 1 回 1 滴、1 日 2 回、4 週間反復点眼投与した後、治療期に 0.1%ブリモニジン酒石酸塩／1%ブリンゾラミド配合懸濁性点眼剤を同様に 4 週間反復点眼投与したときの、最終投与後 2 時間の血液中ブリンゾラミド濃度（2.7.2.2.2）
i) 不純物の規格値（[redacted]%）から算出

2.6.6.9.2　結論

これらの試験の結果から、本剤の臨床使用にあたって眼局所で新規の毒性の懸念はないこと、原薬であるブリンゾラミドの小核誘発性は　申請法*　の影響ではないことが示された。また、ブリンゾラミドは生理的変化を伴う二次的な反応により小核を誘発し、その機序には異数性が関与していると考えられた。さらに、本剤の臨床使用におけるブリンゾラミドの全身用量（0.033 mg/kg/日）は、*in vivo* 小核試験の陰性用量（250 mg/kg/日）に比べて約 7500 倍低いことから、臨床使用における　申請法*　したブリンゾラミドの遺伝毒性の懸念はないと判断した。

また、不純物を含有した被験液を使用した *in vitro* 染色体異常試験で構造異常及び数的異常が認められたが、*in vivo* 染色体異常試験において約 2 倍の不純物が曝露されているにもかかわらず、陰性であることから、本不純物の生体への影響はないと判断した。また、本剤の臨床使用における不純物の 1 日最大投与量（[redacted]µg/kg/日）は、*in vivo* 小核試験の陰性の時の不純物の用量（[redacted]µg/kg/日）に比べて約 750 倍低い。さらに、不純物を含有した被験液及び投与液を使用した細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性は認められず、13 週間反復点眼において明らかな毒性は認められなかった。

以上のことから、本剤の臨床使用における安全性の懸念はないと判断した。

2.6.6.10　図表

表は本文中の適切な場所に記載した。

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6.11 引用文献

1)2014 年 4 月～2018 年 3 月における縮瞳薬及び緑内障治療剤：局所用の使用状況．株式会社 JMDC.

2)Asanami S, Shimono K, Kaneda S. Transient hypothermia induces micronuclei in mice. Mutat Res. 1998;413:7-14.

3)Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T, et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. Mutat Res. 2007;627:78-91.

4)Morita T, Watanabe Y, Takeda K, Okumura K. Effects of pH in the in vitro chromosomal aberration test. Mutat Res. 1989;225:55-60.

5)Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D et al.: A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J. Appl. Toxicol. 2001;21:15-23.