ゼオマイン筋注用 50 単位
ゼオマイン筋注用 100 単位
ゼオマイン筋注用 200 単位

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床試験の概括評価

帝人ファーマ株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 6
2.4.2.1.1 マウス後肢腓腹筋へのA型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋麻痺作用の比較検討 6
2.4.2.1.2 カニクイザル中臀筋へのA型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋活動電位の比較検討 6
2.4.2.1.3 ラット後肢腓腹筋へのA型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋麻痺作用からの回復に関する検討 7
2.4.2.2 副次的薬理試験 7
2.4.2.3 安全性薬理試験 8
2.4.2.3.1 中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響 8
2.4.2.3.2 心血管系に及ぼす影響 8
2.4.2.3.3 消化器系に及ぼす影響 8
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 8
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 分析法 8
2.4.3.2 吸収及び分布 9
2.4.3.3 代謝及び排泄 9
2.4.3.4 胎盤・胎児移行性、乳汁中排泄 9
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 10
2.4.4 毒性試験 10
2.4.4.1 単回投与毒性試験 10
2.4.4.2 反復投与毒性試験 10
2.4.4.3 遺伝毒性及びがん原性試験 11
2.4.4.4 生殖発生毒性試験 11
2.4.4.5 刺激性試験 12
2.4.4.6 その他の毒性試験 12
2.4.5 総括及び結論 12
2.4.6 参考文献 14

略号一覧表

略号	英名	日本語・定義
SNAP-25	Synaptosomal-Associated Protein-25	シナプトソーム関連タンパク質 25 kDa
HA-33	Hemagglutinin-33	血球凝集素 33 kDa
LD50	Lethal Dose, 50%	50%致死量
LDU	Lethal Dose Unit	致死量単位
U	Unit(s)	単位
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene	カリウムイオンチャンネル Kv11.1 をコードする遺伝子
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule	神経細胞接着因子
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酵素結合免疫測定法
^{125}I	Iodine-125	ヨウ素の放射性同位体
pH	Potential of hydrogen	水素イオン指数
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450

略号一覧表（製剤・有効成分）

略号	英名	日本語・定義
Botox®	Botox® for Injection	ボトックス® 複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素［一般名：A 型ボツリヌス毒素（JAN)］を有効成分とする注射剤 （製造販売元：グラクソ・スミスクライン(株) 他）
Dysport®	Dysport® for Injection	複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素 ［一般名：abobotulinumtoxinA（USAN)］を有効成分とする注射剤 （製造販売元：Ipsen 他）
NT 101	incobotulinutoxinA	XEOMIN®の有効成分 複合タンパク質を含まない A 型ボツリヌス毒素 一般名：インコボツリヌストキシン A（JAN）
NT 201 XEOMIN®	XEOMIN 50 units for Intramuscular injection XEOMIN 100 units for Intramuscular injection XEOMIN 200 units for Intramuscular injection	インコボツリヌストキシン A を有効成分とする注射剤 NT 201 は XEOMIN®の治験成分記号 販売名：ゼオマイン筋注用 50 単位 ゼオマイン筋注用 100 単位 ゼオマイン筋注用 200 単位

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

NT 201 は、ドイツの Merz Pharmaceutical GmbH により創製された A 型ボツリヌス毒素製剤である。NT 201 は、2005 年 5 月に眼瞼痙攣及び痙性斜頸の適応で、ドイツで初めて承認され、その後、痙縮、流涎症、顔面上部の皺及び眉間の表情皺などの適応で、米国及び欧州をはじめ世界 73 ヵ国で承認されている（2020 年 1 月 31 日現在）。痙縮に関しては、欧州で 2009 年 11 月に脳卒中後の上肢痙縮の適応で承認され、2017 年 9 月に上肢痙縮に適応拡大された。米国では 2015 年 12 月に上肢痙縮の適応で承認された。

NT 201 と同じ A 型ボツリヌス毒素製剤であるボトックス®及び Dysport®の有効成分は、神経毒素（A 型ボツリヌス毒素）及び複合タンパク質の複合体（複合体毒素）であるが、NT 201 は複合タンパク質が除かれた A 型ボツリヌス毒素と添加物である人血清アルブミン及び精製白糖で構成されている [1)]。A 型ボツリヌス毒素は、A 型ボツリヌス菌によって分子量約 15 万、1296 アミノ酸の単鎖ポリペプチドとして生合成され [2)]、菌体から放出される前に[redacted]により切断され、ジスルフィド結合で架橋された分子量 10 万の H 鎖（Heavy chain）及び 5 万の L 鎖（Light chain）となる。H 鎖は、シナプス前膜への結合に関与するカルボキシル末端（Hc）、L 鎖の細胞内移行に関与するアミノ末端（H_N）の二つの機能ドメインを有する [3, 4)]。L 鎖は、神経伝達物質アセチルコリン放出に関与する SNAP-25（Synaptosomal-Associated Protein-25）を切断する亜鉛依存性プロテアーゼ活性を有し、アセチルコリンの放出を阻害することにより、筋麻痺作用を引き起こす [5)]。

A 型ボツリヌス毒素製剤ボトックス®及び Dysport®は、臨床使用の上で中和抗体産生が問題となる [6)]。A 型ボツリヌス毒素製剤の免疫原性は、主として複合タンパク質である血球凝集素 HA-33 が原因となっている [7)]。一方、NT 201 は複合タンパク質を含まないため、中和抗体産生及び二次無効が問題となる可能性は、ボトックス®及び Dysport®と比較して低くなることが期待される [1, 8)]。

NT 201 及び NT 101 の力価は、マウス腹腔内投与によって算出された LD_{50} を 1 単位と規定した。本文中では「致死量単位：LDU」又は「単位：U」で示し、同義に使用した。

非臨床における有効性検証のため、効力を裏付ける試験として、マウス、サル及びラットを用いて筋麻痺作用及び筋麻痺作用からの回復を検討した。また、安全性薬理試験として、中枢神経系、呼吸器系、心血管系及び消化器系に及ぼす NT 201 又は NT 101 の影響を評価した。これら安全性薬理試験は、hERG チャネル電流に対する影響を除き GLP に準拠して実施した。

非臨床における NT 201 及び NT 101 の薬物動態試験は実施していない。薬物動態評価に使用できる NT 101 の用量はごく微量となるため、生体試料中の NT 101 を特異的かつ高感度に定量することは技術的に困難である。したがって、NT 101 の体内動態は A 型ボツリヌス毒素の文献情報や毒性試験における生物活性に基づいて考察し、さらに本邦又は海外で上市されている A 型ボツリヌス毒素製剤（ボトックス®及び Dysport®：複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素）との薬物動態学的観点からの比較を行った。

NT 201 の毒性評価は、ICH S6（R1）ガイドラインを参考に、NT 201 及び NT 101 を用いて単回投与毒性試験、最長 9 か月間の反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、抗原性試験及び溶血性試験を実施した。主要な試験は GLP に準拠した。遺伝毒性及びがん原性試験は ICH S6（R1）ガイドラインを踏まえて実施しなかった。反復投与毒性試験は、動物種として主にサルを用い、4 週間の投与間隔で行われた。生殖発生毒性試験は、動物種としてラット及びウサギを用い、主に 1 又は 2 週間の投与間隔で行われた。NT 201 の薬理作用である筋弛緩作用の効果は、臨床において通常 12 から 16 週間で消失するとされ、10 週間未満の再投与は避けることとされており、毒性試験における用法及び投与間隔は、ヒトでの安全性を検討するのに適切であると考えられた。A 型ボツリヌス毒素は非常に力価が高く、生体試料中のごく微量の A 型ボツリヌス毒素を特異的かつ高感度に定量することは技術的に困難 である。そのため、NT 201 及び NT 101 についてトキシコキネティクス試験を実施せず、一般状態観察、摂餌量測定及び体重測定で認められた変化を、全身暴露の代替指標とした。また、一部の単回及び反復投与毒性試験では、NT 201 及びボトックス®の毒性像を比較した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験として、マウス、サル及びラットを用いて筋麻痺作用及び筋麻痺作用からの回復を検討した。

2.4.2.1.1 マウス後肢腓腹筋への A 型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋麻痺作用の比較検討

マウスの右後肢腓腹筋に NT 201、ボトックス®及び Dysport®を 3 回筋肉内投与した。2 回目の投与は初回投与から 6 週間後、3 回目の投与は 2 回目の投与から 13 週間後とした。いずれの回の投与においても投与日は投与 2、4 及び 6 時間後に症状観察を行い、投与日以外は筋麻痺から回復するまで 1 日 1 回後肢の症状を観察した。筋麻痺の状態をスコア化し、NT 201、ボトックス®及び Dysport®による筋麻痺作用を比較検討した。その結果、筋麻痺の程度及び持続時間は 3 製剤とも用量依存性があり、投与の回を重ねる毎に筋麻痺の程度がより高度に、持続時間がより長期になる傾向を示した。NT 201 及びボトックス®により誘発された筋麻痺は同程度であった。

2.4.2.1.2 カニクイザル中臀筋への A 型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋活動電位の比較検討

テレメトリー送信器を埋設したカニクイザルの左中臀筋に、NT 201 及びボトックス®を単回筋肉内投与し、覚醒下及び非拘束下で筋電図検査を実施した。右中臀筋には媒体を投与し、右中臀筋活動電位に対する左中臀筋活動電位比（Activity ratio）を算出した。筋線維の活動電位は、0-0.1 mV 及び 0.1-0.2 mV の振幅でそれぞれ午前及び午後の 1 日 2 回計測し、計測ポイントは、投与前、投与日、投与 13 週間後までの週 1 回、及び投与 36 週間後とした。その結果、NT 201 及びボトックス®投与により、午前及び午後いずれもそれぞれ投与 1 及び 2 週間後に筋活動電位が計測ポイント中最も強く阻害され、投与 9 週間後頃から両製剤とも筋活動電位の回復がみられ、投与 36 週間

後には両製剤とも投与前値にまで回復した。以上より、NT 201 及びボトックス®投与による筋活動電位から推測される筋麻痺は同程度であり、回復性を含めた経時的推移も同様であった。

2.4.2.1.3 ラット後肢腓腹筋へのA型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋麻痺作用からの回復に関する検討

ラットの右後肢腓腹筋に、NT 201 を週 1 回 10 週間連続で筋肉内投与した。筋麻痺の評価（オープンフィールド試験、尾懸垂中の後肢の外転及び座位中の足指伸展）を実施するとともに、最終投与 1、17 及び 26 週間後の右腓腹筋について、HE 染色、マーチウス・スカーレットブルー（MSB）染色、NCAM（Neural Cell Adhesion Molecule）及びネスチンに対する免疫組織染色を実施した。なお、筋麻痺の評価は、初回投与前、投与翌日及び 4 日後、2 回目投与以降は投与前、投与終了から解剖まで 2 週間毎に、3 分間症状を観察して筋麻痺の状態をスコア化した。オープンフィールド試験、尾懸垂中の後肢外転及び座位中の足指伸展による機能的評価の結果、NT 201 の反復投与後に誘発された筋麻痺は、最終投与 26 週間後には完全に回復した。投与部位である右腓腹筋の病理組織学的検査では、最終投与 1 週間後に、筋萎縮の指標となる筋線維サイズの減少、付随する脂肪組織及びコラーゲンの増加並びに NCAM 及びネスチン染色陽性の各所見が NT 201 の全投与群において認められた。最終投与 26 週間後には、NT 201 の全投与群において筋線維サイズの減少、脂肪組織及びコラーゲンの増加の各所見が軽度となり、部分的ではあるが筋萎縮から回復した。

以上をまとめると、効力を裏付ける試験として、マウス、サル及びラットを用いて筋麻痺作用及び筋麻痺作用からの回復を検討した。その結果、マウスでは、NT 201 及びボトックス®により誘発された筋麻痺は同程度であった。サルでは、NT 201 及びボトックス®投与による筋活動電位から推測される筋麻痺は同程度であり、回復性を含めた経時的推移も同様であった。ラットでは、3 種類の試験（オープンフィールド試験、尾懸垂中の後肢外転及び座位中の足指伸展）による機能的評価の結果、NT 201 の反復投与後に誘発された筋麻痺は、最終投与 26 週間後には完全に回復した。投与部位である右腓腹筋の病理組織学的検査では、最終投与 1 週間後に、筋萎縮の指標となる筋線維サイズの減少、付随する脂肪組織及びコラーゲンの増加並びに NCAM 及びネスチン染色陽性の各所見が NT 201 の全投与群において認められた。最終投与 26 週間後には、NT 201 の全投与群において筋線維サイズの減少、脂肪組織及びコラーゲンの増加の各所見が軽度となり、部分的ではあるが筋萎縮から回復した。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.4.2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験では、中枢神経系、呼吸器系、心血管系及び消化器系に及ぼすNT 201又はNT 101の影響を評価した。これら試験は、hERGチャネル電流に対する影響を除きGLPに準拠して実施した。

2.4.2.3.1　中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響

中枢神経系及び呼吸器系への影響を検討するために実施したNT 201のマウスにおける静脈内投与による単回投与毒性試験（試験番号：[redacted]）では、45及び68 LDU/kg群で死亡例がみられ、一般状態観察では、20 LDU/kg以上で、立毛、体温低下、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下、散瞳、運動性低下及び運動失調、さらに自発運動測定では、20 LDU/kg以上で静的及び動的動作回数の減少が認められた。9 LDU/kgのNT 201を単回静脈内投与したとき、中枢神経系及び呼吸器系に対して影響を及ぼさなかった。

2.4.2.3.2　心血管系に及ぼす影響

心血管系への影響を検討するために実施したNT 101のhERGチャネル電流に対する影響（試験番号：NT-101 on hERG）では、10000 LDU/mLのNT 101はhERG電流に影響を及ぼさなかった。また、サルにおけるNT 201の単回投与による心電図評価（試験番号：[redacted]）では、16 LDU/kgのNT 201が心電図パラメータに対して影響を及ぼさず、NT 201のサルにおける反復投与毒性試験（試験番号：[redacted]、[redacted]及び[redacted]）での血圧、心拍数及び心電図評価に対して、いずれの投与群も心血管系に対する影響を示さなかった。

2.4.2.3.3　消化器系に及ぼす影響

消化器への影響を検討するために実施したNT 201のラットにおける筋肉内投与による消化管輸送能への影響（試験番号：[redacted]）では、32 LDU/kgまで消化管輸送能に対して影響を及ぼさなかった。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法

薬物動態評価に使用できるNT 201及びNT 101の用量はごく微量となるため、生体試料中のNT 101を特異的かつ高感度に定量することは技術的に困難である。よってマウスを用いたin vivoのバイオアッセイでA型ボツリヌス毒素の生物活性を測定し、NT 101の体内動態を考察するための指標とした。また、非臨床毒性試験における免疫原性評価のために酵素結合免疫測定法（ELISA）

による抗 A 型ボツリヌス毒素抗体分析法とマウス横隔膜を用いた ex vivo のバイオアッセイによる中和抗体分析法を確立した。

2.4.3.2　吸収及び分布

^{125}I 標識した A 型ボツリヌス毒素の神経毒素をマウスの片側横隔膜と反応させた ex vivo 実験の結果[9, 10, 11]から、NT 101 は重鎖を介して神経筋接合部のコリン作動性神経細胞のシナプス前膜に特異的にかつ高い親和性で結合し、不可逆的に取り込まれると考えられた。また、^{125}I 標識した神経毒素（約 150 kDa）又は ^{125}I 標識した複合体毒素（約 900 kDa）をそれぞれラットに単回筋肉内投与したときの組織中総放射能分布率[12]から、NT 101 の投与筋から全身循環血液及び脳を含む他組織への移行性は低く、各組織中分布率及びその経時的変化は複合体毒素と同程度と考えられた。

A 型ボツリヌス毒素製剤の比較として、NT 201（約 150 kDa）、ボトックス®（約 900 kDa）又は Dysport®をそれぞれマウスに単回筋肉内投与したときの神経細胞接着因子（NCAM）の発現量の変化[13]から、NT 201 の投与筋から周辺筋肉への拡散は、ボトックス®及び Dysport®と有意な差は認められなかった。また、NT 201、ボトックス®又は Dysport®をそれぞれマウスに反復筋肉内投与した毒性試験の結果から、NT 201 の用量反応性はボトックス®と同様であり、全身への移行性は 3 製剤間で同程度と考えられた。NT 201 とボトックス®の分布特性が同様となる要因として、ボトックス®や Dysport®のような複合体毒素は pH 6.9 以上の条件下でその大部分が神経毒素と複合タンパク質に速やかに解離することが報告されている[14]。すなわち、正常時の筋肉の生理的 pH 条件下では製剤に関わらず、神経毒素としての構造・物理的化学的性質が類似しているためと推察された。

2.4.3.3　代謝及び排泄

ICH S6（R1）ガイドラインの記載を踏まえて、天然型アミノ酸により構成される NT 101 の代謝及び排泄に関する検討は実施しなかった。なお、^{125}I 標識した神経毒素をラットに単回筋肉内投与したときの尿中及び糞中への累積総放射能排泄率[12]から、NT 101 は生体内タンパク質の異化過程と同様に小さなペプチドや各アミノ酸などへ代謝分解された後、主に尿中に排泄されると考えられた。

2.4.3.4　胎盤・胎児移行性、乳汁中排泄

ICH S6（R1）ガイドラインの記載から、高分子量である NT 101（約 150 kDa）が単純拡散によって胎盤を通過する可能性は低いと考えられた。また、高分子量のタンパク質の乳汁中への排泄は制限されるとの文献情報[15]から、NT 101 が乳汁中へ排泄される可能性は低いと考えられた。前述のとおり、生体試料中のごく微量の NT 101 を定量するには測定上の限界があることを考慮し、胎盤・胎児移行性試験及び乳汁中排泄試験は実施しなかった。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

タンパク質は、チトクローム P450（CYP）に依存しない生化学的な経路により小さなペプチドや各アミノ酸に代謝分解されることから、NT 101 が CYP などの薬物代謝酵素で代謝される薬物と相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。したがって、薬物動態学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は、NT 201 又は NT 101 を用いて、筋肉内、経口、静脈内及び腹腔内投与で実施した。動物種としてマウス及びラットを用いた。NT 201 又は NT 101 投与後、これらの薬理作用である筋弛緩作用に関連する変化又は自律神経伝達の遮断による全身的影響と考えられる変化として、運動性低下、運動失調、筋緊張低下、立毛、眼瞼下垂、流涙、散瞳、体温低下又は呼吸困難などが認められ、高用量では死亡例も認められた。死亡は呼吸筋麻痺によるものと考えられた。臨床投与経路である筋肉内投与で、NT 201 をマウスに単回投与したときの概略の致死量は 50 LDU/kg であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験では、サルを用いて、NT 201 を 4 週間間隔で 13 週間又は 9 カ月間筋肉内投与した。その結果、投与部位である左腓腹筋では、本剤の薬理作用に関連した変化として筋萎縮及び筋重量低値などが認められ、一般状態変化として跛行も認められた。投与部位の病理組織学的検査では、筋線維萎縮及び線維化などが認められた。また高用量群では、薬理作用に関連する全身性の一般状態変化として削痩及び体重低下も認められた。さらに、非投与部位である骨格筋でも筋重量低値、病理組織学的変化として筋線維萎縮などが認められた。非投与部位の骨格筋に認められた所見は、NT 201 が投与部位に及ぼした影響に伴うと思われる活動性低下による二次的な作用（廃用性筋萎縮）又は NT 201 の投与部位以外の筋への拡散による直接影響の可能性が疑われた。サルを用いた 9 カ月間反復投与毒性試験では、6 カ月間の休薬期間により、投与部位及び非投与部位の骨格筋の変化について回復性が認められた。13 週間及び 9 カ月間反復投与毒性試験の無毒性量は、それぞれ 8 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 4 回投与）及び 12 LDU/kg/回（4 週間間隔で計 10 回投与）と考えられ、 1 回あたりの臨床最大用量 400 U（6.67 U/kg/回）の 1.2 及び 1.8 倍であった。

またサルを用いて、16 LDU/kg/回の NT 201 を 4 週間、8 週間又は 12 週間の投与間隔でそれぞれ計 4 回筋肉内投与した際の毒性を比較した。その結果、いずれの投与間隔でも薬理作用に関連する変化が認められ、4 週間間隔投与では全身毒性として体重低下が認められた。全身毒性が認められない投与間隔は 8 週間及び 12 週間間隔と考えられた。

2.4.4.3 遺伝毒性及びがん原性試験

遺伝毒性及びがん原性試験は、ICH S6（R1）ガイドラインを踏まえて実施しなかった。なお、反復投与毒性試験において前がん病変は認められなかった。また、NT 201 の欧米での臨床使用成績では、投与との関連性が疑われる腫瘍発生の報告はない。

2.4.4.4 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は、ラット及びウサギを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。また、ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、NT 201 を連日投与する群も設けた。いずれの試験も親動物では反復投与毒性試験と同様の変化が認められた。

ウサギを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、親動物で後肢麻痺、体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたが、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する影響は認められなかった。親動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量は 3.5 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）と考えられた。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物で投与肢の跛行、体重増加抑制、体重低下、摂餌量減少、投与部位である左腓腹筋の小型及び重量低値が認められた。胚・胎児に投与の影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 10 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）及び 6 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）と考えられた。また、母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量は、30 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）、18 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）及び 7 LDU/kg/回（妊娠 6 日から 19 日にかけての連日投与）と考えられた。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物で流産、後肢麻痺、運動障害、不安定姿勢、跛行、糞量減少、体重増加抑制、体重低下及び摂餌量減少が認められた。胚・胎児に投与の影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、母動物の生殖機能に対する無毒性量は 2.5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、及び胚・胎児に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）と考えられた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、投与部位の筋萎縮、投与肢の跛行及び投与肢に隣接する腹部に限局性膨隆が認められた。限局性膨隆は投与部位の変化と同様に薬理作用に関連していると考えられた。出生児については、離乳前後の発達に NT 201 投与の影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）、母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する無毒性量は 20 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）及び 3 LDU/kg/回（妊娠 6 日から分娩後 21 日にかけて連日投与）と考えられた。

幼若動物を用いた試験は、離乳後 3 週齢のラットを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。その結果、離乳後の発達に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 5 回投与）未満と考えられた。

2.4.4.5 刺激性試験

局所刺激性については、ウサギを用いた眼刺激性試験を実施した。その結果、眼粘膜に対する刺激性は認められなかった。また、筋肉内投与による反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験、並びに皮内投与による抗原性試験で、投与部位の肉眼観察又は病理組織学的検査により、投与部位の局所刺激性を評価した。その結果、明白な局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

2.4.4.6 その他の毒性試験

抗原性については、ウサギを用いて皮内への間歇投与で実施した。その結果、NT 201 は中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体を誘導しなかった。また、NT 101 を用いた in vitro 溶血性試験では、ヒト血液に対する溶血性は認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

効力を裏付ける試験として、マウス、サル及びラットを用いて筋麻痺作用及び筋麻痺作用からの回復を検討した。その結果、マウスでは、NT 201及びボトックス®により誘発された筋麻痺は同程度であった。サルでは、NT 201及びボトックス®投与による筋活動電位から推測される筋麻痺は同程度であり、回復性を含めた経時的推移も同様であった。ラットでは、3種類の試験（オープンフィールド試験、尾懸垂中の後肢外転及び座位中の足指伸展）による機能的評価の結果、NT 201の反復投与後に誘発された筋麻痺は、最終投与26週間後には完全に回復した。投与部位である右腓腹筋の病理組織学的検査では、最終投与1週間後に、筋萎縮の指標となる筋線維サイズの減少、付随する脂肪組織及びコラーゲンの増加並びにNCAM及びネスチン染色陽性の各所見がNT 201の全投与群において認められた。最終投与26週間後には、NT 201の全投与群において筋線維サイズの減少、脂肪組織及びコラーゲンの増加の各所見が軽度となり、部分的ではあるが筋萎縮から回復した。

安全性薬理試験では、中枢神経系、呼吸器系、心血管系及び消化器系に及ぼす NT 201 又は NT 101 の影響を評価した。各試験結果から求めた安全域は、中枢神経系及び呼吸器系については 1.3 倍、心血管系については in vitro 評価で 25 倍、in vivo 評価で 1.8 倍以上、消化器系については 4.8 倍であった。

薬物動態評価に使用できる NT 201 及び NT 101 の用量はごく微量であり、生体試料中の NT 101 を特異的かつ高感度に定量することは技術的に困難であるため、NT 201 及び NT 101 の薬物動態試験は実施しなかった。NT 201 の有効成分である NT 101 の体内動態は、A 型ボツリヌス毒素の文献情報や毒性試験における生物活性から考察した。神経毒素及び複合体毒素の ^{125}I 標識体を用いた組織分布試験や上市されている A 型ボツリヌス毒素製剤（ボトックス®及び Dysport®：複合タンパク質を含む A 型ボツリヌス毒素）を用いた拡散性評価試験などの結果から、NT 201 の筋肉内投与後の薬物動態特性は、本邦及び海外で上市されているボトックス®と同様と考えられた。

NT 201 の毒性を評価するため、NT 201 又は NT 101 を用いて一連の非臨床試験（一般毒性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、抗原性試験及び溶血性試験）を実施した。主な毒性所見は、本剤の薬理作用である筋弛緩作用に関連する変化（筋萎縮、筋緊張低下、筋重量低値、跛行、運

動性低下、運動失調、体重低下及び摂餌量減少）及び自律神経伝達の遮断による全身的影響と考えられる変化（立毛、眼瞼下垂、流涙、散瞳、体温低下、呼吸困難及び死亡）であった。単回投与毒性試験の高用量で認められた死亡は、呼吸筋麻痺によるものと考えられた。臨床投与経路である筋肉内投与で、NT 201 をマウスに単回投与したときの概略の致死量は 50 LDU/kg であった。反復投与毒性試験では、投与部位となった骨格筋での局所作用、及び非投与部位である骨格筋の二次的作用又は NT 201 の投与部位以外の筋への拡散による直接影響が疑われる変化を除き、明確な臓器毒性は認められなかった。サル反復投与毒性試験の無毒性量は、1 回あたりの臨床最大用量 400 U （6.67 U/kg/回）の 1.2 倍以上であった。

遺伝毒性及びがん原性試験は、ICH S6（R1）ガイドラインを踏まえて実施しなかった。なお、反復投与毒性試験において前がん病変は認められなかった。また、NT 201 の欧米での臨床使用成績では、投与との関連性が疑われる腫瘍発生の報告はない。

生殖発生毒性試験は、ラット及びウサギを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。また、ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、NT 201 を連日投与する群も設けた。いずれの試験も親動物では反復投与毒性試験と同様の変化が認められた。ウサギを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、親動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）、親動物の生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量は 3.5 LDU/kg/回（約 2 週間間隔で雄計 5 回及び雌計 3 回投与）と考えられた。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の一般毒性学的無毒性量は 10 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）及び 6 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）と考えられた。また、母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量は、30 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日に投与）、18 LDU/kg/回（妊娠 6、9、12、16 及び 19 日に投与）及び 7 LDU/kg/回（妊娠 6 日から 19 日にかけての連日投与）と考えられた。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.25 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、母動物の生殖機能に対する無毒性量は 2.5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）、及び胚・胎児に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（妊娠 6、18 及び 28 日に投与）と考えられた。ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、母動物の一般毒性学的無毒性量は 6 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）、母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する無毒性量は 20 LDU/kg/回（妊娠 6、12 及び 19 日、並びに分娩後 6、13 及び 20 日に投与）及び 3 LDU/kg/回（妊娠 6 日から分娩後 21 日にかけて連日投与）と考えられた。幼若動物を用いた試験は、離乳後 3 週齢のラットを用いて、筋肉内への間歇投与で実施した。その結果、離乳後の発達に対する無毒性量は 5 LDU/kg/回（2 週間間隔で計 5 回投与）未満と考えられた。

局所刺激性については、ウサギを用いた眼刺激性試験を実施した。その結果、眼粘膜に対する刺激性は認められなかった。また、筋肉内投与による反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験、並びに皮内投与による抗原性試験で、投与部位の肉眼観察又は病理組織学的検査を行い、局所刺激性を評価した。その結果、明白な局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

抗原性については、ウサギを用いて皮内への間歇投与で実施した。その結果、NT 201 は中和活性を有する抗 A 型ボツリヌス毒素抗体を誘導しなかった。また、NT 101 を用いた in vitro 溶血性試験では、ヒト血液に対する溶血性は認められなかった。

一部の単回及び反復投与毒性試験では、NT 201 及びボトックス®の毒性像を比較した。その結果、NT 201 はボトックス®と同様の毒性プロファイルを有すると考えられた。

2.4.6　参考文献

1）Frevert J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. Drugs R D. 2015; 15: 1-9.

2）Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, Niemann H. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. J Biol Chem. 1990; 265: 9153-8.

3）小崎　俊司. ボツリヌス毒素の構造と作用. 国立感染症研究所 感染症情報センター病原微生物検出情報. 2008; 29: 37-8.

4）Dolly JO. Therapeutics and research exploitation of botulinum neurotoxins. Eur J Neurol. 1997; 4: S5-S10.

5）Schiavo G, Montecucco C. The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxins. The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis Eds. Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW. Academic Press. 1997; 295-322.

6）Dressler D. Five-year experience with incobotulinumtoxinA (Xeomin(®)): the first botulinum toxin drug free of complexing proteins. Eur J Neurol. 2012; 19: 385-9.

7）Sharma SK, Singh BR. Immunological properties of Hn-33 purified from type A Clostridium botulinum. J Nat Toxins. 2000; 9: 357-62.

8）Frevert J, Dressler D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? Biologics. 2010; 4: 325-32.

9）Dolly JO, Black J, Williams RS, Melling J. Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. Nature. 1984 Feb 2-8;307(5950):457-60.

10）Black JD, Dolly JO. Interaction of ^{125}I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. J Cell Biol. 1986 Aug;103(2):521-34.

11）Black JD, Dolly JO. Interaction of ^{125}I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. J Cell Biol. 1986 Aug;103(2):535-44.

12）Tang-Liu DD, Aoki KR, Dolly JO, de Paiva A, Houchen TL, Chasseaud LF, et al. Intramuscular injection of ^{125}I-botulinum neurotoxin-complex versus ^{125}I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution. Toxicon. 2003 Oct;42(5):461-9.

13）Carli L, Montecucco C, Rossetto O. Assay of diffusion of different botulinum neurotoxin type A

formulations injected in the mouse leg. Muscle Nerve. 2009 Sep;40(3):374-80.

14）Eisele KH, Fink K, Vey M, Taylor HV. Studies on the dissociation of botulinum neurotoxin type A complexes. Toxicon. 2011 Mar 15;57(4):555-65.

15）Breitzka RL, Sandritter TL, Hatzopoulos FK. Principles of drug transfer into breast milk and drug disposition in the nursing infant. J Hum Lact. 1997 Jun;13(2):155-8.