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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表.....3
2.6.1　緒言.....3

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

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。

ボツリヌス毒素は、偏性嫌気性有芽胞菌であるボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）によって産生される神経毒素である [1)]。ボツリヌス菌は芽胞の形で自然界に広く分布し、食品内での増殖により産生された毒素をヒトが摂取することで、ボツリヌス症を引き起こす [2, 3)]。ボツリヌス菌は産生する毒素の抗原性の違いにより、A～G の毒素型に分類される [4)]。すべての型の毒素は、菌体内で神経毒素及び複合タンパク質の複合体（複合体毒素）を形成し、菌融解時に放出される。複合体毒素は分子量の違いにより、LL 毒素（分子量 90 万）、L 毒素（分子量 50 万）、M 毒素（分子量 30 万）に分類される。A 型毒素を産生するボツリヌス菌は LL、L 及び M 毒素を産生する。LL 毒素及び L 毒素の複合タンパク質は、血球凝集活性を有する。複合タンパク質は、神経毒素を胃酸などの消化酵素から保護し、小腸の微絨毛への結合を介して吸収促進作用を示すことから、ボツリヌス毒素が経口毒として作用する際に重要な役割を担っている [4, 5)]。

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 [6)]。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 [7)]、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（図 2.6.1-1）。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 [4, 8)]。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 [9)]。

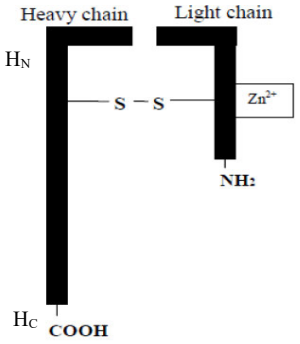


図 2.6.1-1　A 型ボツリヌス毒素の構造

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[10]。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[11]。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[6, 12]。

なお、2.6 項における NT 201 及び NT 101（A 型ボツリヌス毒素単体）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。

本剤の予定する効能・効果及び用法・用量を表 2.6.1-1 に示した。

表 2.6.1-1　本剤の効能・効果及び用法・用量（案）

効能・効果	上肢痙縮
用法・用量	通常、成人にはインコボツリヌストキシン A として複数の緊張筋[注)] に合計 400 単位を分割して筋肉内注射する。1 回あたりの最大投与量は 400 単位であるが、対象となる緊張筋の種類や数により、投与量は必要最小限となるよう適宜減量する。また、再投与は前回の効果が減弱した場合に可能であるが、投与間隔は 12 週以上とすること。なお、症状に応じて投与間隔は 10 週まで短縮できる。 注）緊張筋：橈側手根屈筋、尺側手根屈筋、浅指屈筋、深指屈筋、腕橈骨筋、上腕二頭筋、上腕筋、方形回内筋、円回内筋、長母指屈筋、母指内転筋、短母指屈筋/母指対立筋等

参考文献

1）Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K; Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001; 285: 1059-70.

2）Poulain B, Popoff MR. Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic? Toxins. 2019; 11: E34.

3）Ohyama T. Structure and Function of Botulinum Toxin Complex. J Agric Sci Tokyo Univ Agric. 2013; 57: 223-32.

4）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.

5）Fujinaga Y, Inoue K, Nomura T, Sasaki J, Marvaud JC, Popoff MR, Kozaki S, Oguma K. Identification and characterization of functional subunits of Clostridium botulinum type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. FEBS Letters. 2000; 467: 179-83.

6）Frevert J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A

products. Drugs R D. 2015; 15: 1-9.

7）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.

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

9）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.

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

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

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

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2　薬理試験の概要文

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 4
2.6.2.1　まとめ 4
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 4
2.6.2.3　副次的薬理試験 11
2.6.2.4　安全性薬理試験 11
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 14
2.6.2.6　考察及び結論 14
2.6.2.7　図表 16
2.6.2.8　参考文献 16

略号一覧表

略号	英名	日本語・定義
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule	神経細胞接着因子
CD-1	CD-1	マウスの系統名
Wistar	Wistar	ラットの系統名
SNAP-25	Synaptosomal-Associated Protein-25	シナプトソーム関連タンパク質 25 kDa
SV2	Synaptic Vesicle Glycoprotein 2	シナプス小胞膜タンパク質
SNARE	Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor	可溶性 N-エチルマレイミド感受性因子付加タンパク質受容体
U	Unit (s)	単位
LDU	Lethal Dose Unit	致死量単位
HE	Hematoxylin Eosin	ヘマトキシリン・エオジン染色
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
CHO	Chinese Hamster Ovary	チャイニーズハムスター卵巣細胞
SD	Sprague-Dawley	ラットの系統名

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

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

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 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)]。痙縮とは、上位運動ニューロンの障害により運動速度依存性の伸張反射の亢進を呈し、腱反射の亢進を伴う運動障害と定義されている [2)]。一般に、痙縮では上肢の屈筋群、下肢の伸筋群において筋緊張が著しく亢進している [3)]。NT 201 は、コリン作動性神経終末からの神経伝達物質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 [4)]。

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 又は 2.4 倍、消化器系については 4.8 倍であった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

NT 201 の効力を裏付ける試験一覧を表 2.6.2-1 に示す。

表 2.6.2-1　効力を裏付ける試験一覧

試験の種類	使用動物	投与方法	投与物質	項番号
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	CD-1 マウス	筋肉内投与	NT 201 ボトックス® Dysport®	2.6.2.2.2
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	カニクイザル	筋肉内投与	NT 201 ボトックス®	2.6.2.2.3
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	Wistar ラット	筋肉内投与	NT 201	2.6.2.2.4

2.6.2.2.1　　作用メカニズム

痙縮とは、上位運動ニューロンの障害により運動速度依存性の伸張反射の亢進を呈し、腱反射の亢進を伴う運動障害と定義されている [2)]。痙縮が生じる原因は、大脳から脳幹、脊髄までの中枢神経系内の様々なレベルに生じる機械的損傷、血流障害及び変性などの障害である。具体的疾患としては、脳卒中、脳性麻痺、頭部外傷、無酸素脳症、脊髄損傷、多発性硬化症及び神経変性疾患などが挙げられる。一般に、痙縮では上肢の屈筋群、下肢の伸筋群において筋緊張が著しく亢進している [3)]。

筋の収縮には、錘外筋線維を支配するα運動ニューロン、錘内筋線維の感受性を変化させ、α-γ連関を介して二次的に筋線維の収縮を制御するγ運動ニューロンの両者が関与することが知られている。A 型ボツリヌス毒素が痙縮を改善するメカニズムは明確にされていないが、コリン作動性神経終末からのアセチルコリン放出阻害により、錘外筋及び錘内筋線維の収縮抑制すなわち筋麻痺を惹起することがメカニズムの一つとして報告されている [5) -8)]。

A 型ボツリヌス毒素の標的部位である神経筋接合部では、(1) A 型ボツリヌス毒素のシナプス前膜への結合、(2) A 型ボツリヌス毒素の細胞内侵入、(3) A 型ボツリヌス毒素の L 鎖の細胞質内への移行、(4) SNAP-25（Synaptosomal-Associated Protein-25）の分解、の 4 段階の連続的プロセスにより、アセチルコリンの放出が阻害される [9) -13)]（図 2.6.2-1）。

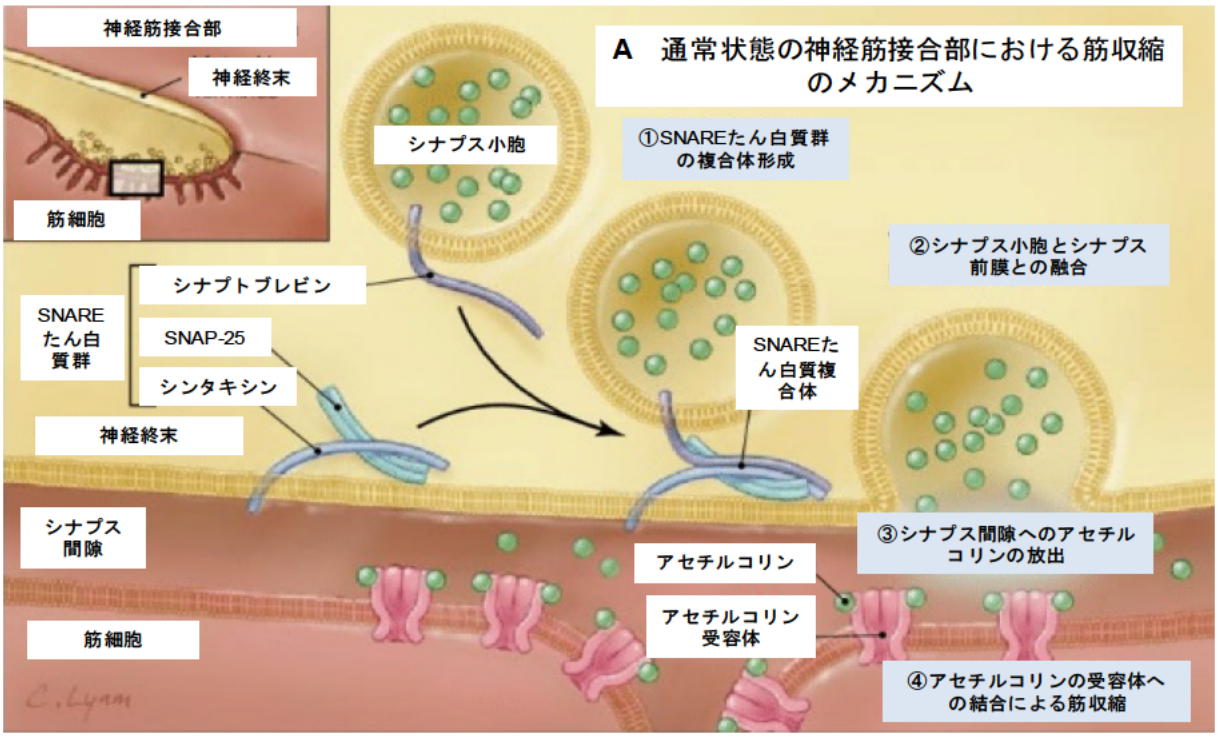
(1) A 型ボツリヌス毒素のシナプス前膜への結合
A 型ボツリヌス毒素の H 鎖カルボキシル末端（Hc）が神経終末のシナプス前膜に存在するガングリオシド GT1b に結合する。

(2) A 型ボツリヌス毒素の細胞内侵入
GT1b との結合に加えて、A 型ボツリヌス毒素はシナプス小胞膜タンパク質 SV2（Synaptic Vesicle Glycoprotein 2）に結合する。シナプス小胞は、アセチルコリンを放出後、再び細胞内に取り込まれるが、SV2 に結合した A 型ボツリヌス毒素は、このシナプス小胞のリサイクリングを利用することで細胞内へ侵入する。

(3) A 型ボツリヌス毒素　の L 鎖の細胞質内への移行
A 型ボツリヌス毒素がシナプス小胞に取り込まれた後、酸性環境下で H 鎖及び L 鎖間のジスルフィド結合が還元され L 鎖が H 鎖から切り離される。H 鎖は膜貫通ドメインと類似した両親媒性ヘリックスを介してチャネルを形成し、エンドソーム膜に孔が形成され、L 鎖が細胞質へと移行する。

(4) SNAP-25 の分解
シナプス小胞内のアセチルコリンを放出するにはシナプス小胞とシナプス前膜との融合が必要であるが、その一連の過程には SNARE（Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor）タンパク質群（シナプトブレビン、SNAP-25 及びシンタキシン）が関与する。細胞質において亜鉛依存性プロテアーゼ活性を保持する L 鎖が SNAP-25 を分解することにより SNARE タンパク質群の複合体形成が阻害され、シナプス小胞とシナプス前膜との融合が不能となる。その結果、シナプス小胞からシナプス間隙へのアセチルコリンの放出が阻害され、筋収縮抑制すなわち筋麻痺が誘発される。

A　通常状態



B　A型ボツリヌス毒素暴露時

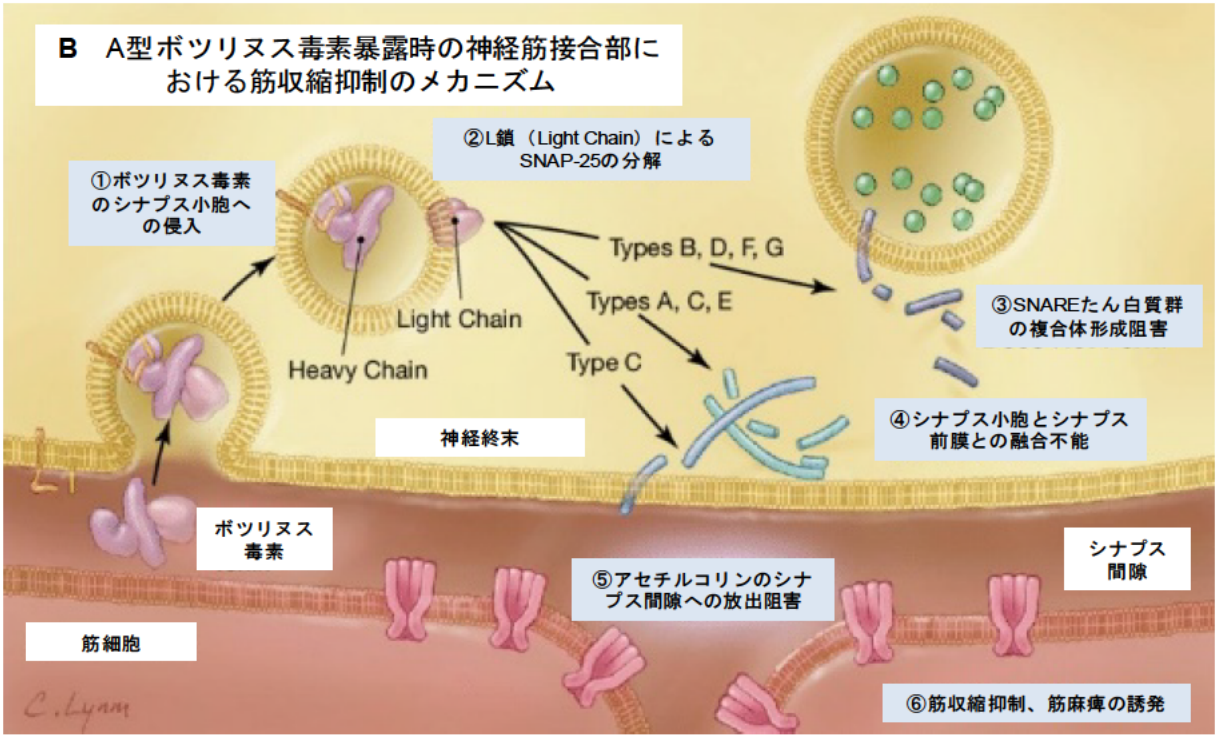


図 2.6.2-1 神経筋接合部におけるボツリヌス毒素の作用機序（参考文献[4)]）より引用、一部改変）

A 型ボツリヌス毒素によりアセチルコリンのシナプス間隙への放出が阻害された神経筋接合部では、神経枝の新生及び神経終板の回復により、約 3 ヵ月後には筋麻痺から回復する[14]。

2.6.2.2.2　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

［概要表 2.6.3.2；報告書 4.2.1.1-1（[redacted]）］

（目的）

マウスを用いて A 型ボツリヌス毒素製剤 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。

（方法）

各群 10 匹の雄性 CD-1 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。NT 201 及びボトックス®の各回の投与量は 0.262、0.328、0.410、0.512 及び 0.641 U/animal/回、Dysport®の投与量は 0.640、0.800、1.000、1.250 及び 1.562 U/animal/回とした。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て、筋麻痺の状態を 0 点（正常）から 3 点（完全な麻痺）の間でスコア化した。各個体の筋麻痺スコアを群毎（各群 10 匹）に投与回毎に累積化し、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。

（結果）

筋麻痺の累積スコアを図 2.6.2-2 に示した。

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。また、Dysport 及びボトックスが同程度の筋麻痺を示すことが報告されている用量比をもとに Dysport の用量を設定したが[15]、本試験では想定よりも強く Dysport による筋麻痺が認められた。

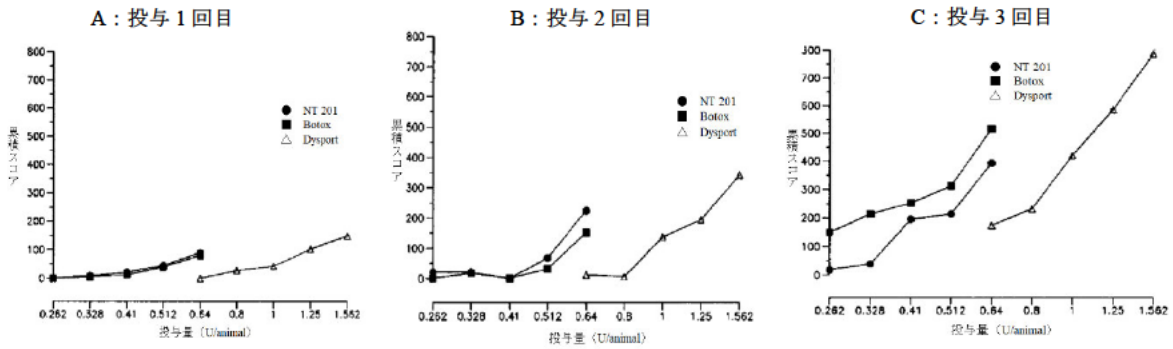


図 2.6.2-2　マウス右後肢腓腹筋への A 型ボツリヌス毒素筋肉内投与による筋麻痺累積スコア

各群 10 匹の麻痺の累積スコア（3 点のみの累積）

2.6.2.2.3　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

［概要表 2.6.3.2；報告書 4.2.1.1-2（[redacted]）］

（目的）

サルを用いてA型ボツリヌス毒素製剤NT 201及びボトックス®投与後の筋活動電位を筋麻痺の指標として比較検討した。

（方法）

テレメトリー送信器を埋設した雄性カニクイザル（NT 201: 6匹、ボトックス®: 5匹）の左中臀筋に、NT 201及びボトックス®の16 LDU/kg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（人血清アルブミンを含む生理食塩液）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。

（結果）

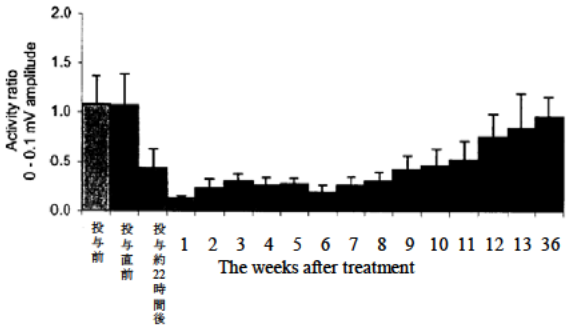
NT 201及びボトックス®投与による筋活動電位比の推移は、0-0.1 mV及び0.1-0.2 mVの振幅で同様の傾向を示した。

0-0.1 mVの振幅における活動電位比を図 2.6.2-3に示した。

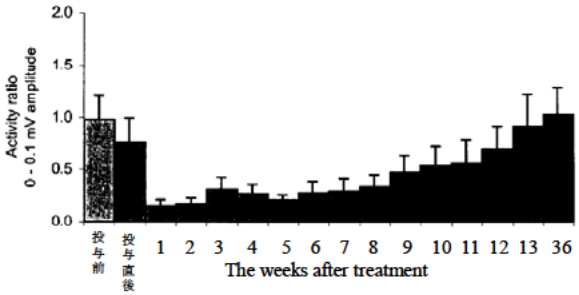
NT 201及びボトックス®投与により、午前及び午後いずれもそれぞれ投与1及び2週間後に筋活動電位が計測ポイント中最も強く阻害され、投与9週間後頃から両製剤とも筋活動電位の回復がみられ、投与36週間後には両製剤とも投与前値にまで回復した。

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。

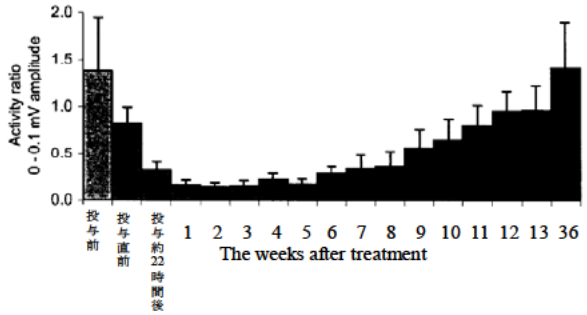
A：NT 201 筋肉内投与による中臀筋活動電位比の経時的推移
（振幅：0-0.1 mV、計測：午前）



B：NT 201 筋肉内投与による中臀筋活動電位比の経時的推移
（振幅：0-0.1 mV、計測：午後）



C：ボトックス®筋肉内投与による中臀筋活動電位比の経時的推移
（振幅：0-0.1 mV、計測：午前）



D：ボトックス®筋肉内投与による中臀筋活動電位比の経時的推移
（振幅：0-0.1 mV、計測：午後）

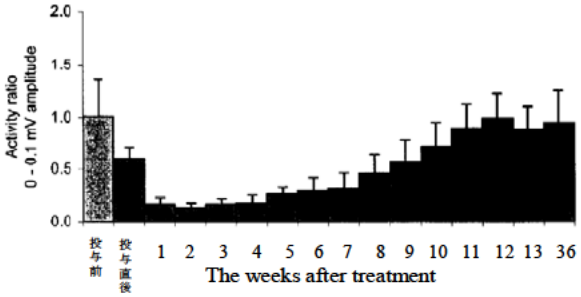


図 2.6.2-3　カニクイザル中臀筋へのＡ型ボツリヌス毒素筋肉内投与による中臀筋活動電位比
中臀筋活動電位比：左中臀筋活動電位（被験物質投与）/ 右中臀筋活動電位（媒体投与）

2.6.2.2.4　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

［概要表 2.6.3.2；報告書 4.2.1.1-3（[redacted]）］

（目的）

ラットを用いて A 型ボツリヌス毒素製剤 NT 201 反復筋肉内投与後の筋麻痺作用からの回復を機能的及び病理組織学的に検討した。

（方法）

各群 6 匹の雄性 Wistar ラットの右後肢腓腹筋に、NT 201 の 0（1 mg/mL 人血清アルブミンを含む生理食塩液）、2、8 及び 16 LDU/kg 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。

（結果）

オープンフィールド試験における筋麻痺の最大平均スコアは、NT 201 の各投与群（2、8 及び 16 LDU/kg）でそれぞれ 1.2、2.2 及び 3.0 であった。筋麻痺から 2 LDU/kg 群では最終投与 15 週間後、8 及び 16 LDU/kg 群では 23 週間後に完全に回復した。尾懸垂中の後肢外転における筋麻痺の最大平均スコアは、NT 201 の各投与群でそれぞれ 0.6、1.8 及び 2.0 であった。筋麻痺から 2 LDU/kg 群では最終投与 5 週間後、8 LDU/kg 群では 15 週間後、16 LDU/kg 群では 17 週間後に完全に回復した。座位中の足指伸展における筋麻痺の最大平均スコアは、NT 201 の各投与群でそれぞれ 1.3、2.0 及び 2.0 であった。筋麻痺から 2 LDU/kg 群では最終投与 16 週間後、8 及び 16 LDU/kg 群では 25 週間後に完全に回復した。以上より、最終投与 26 週間後には、すべての評価で NT 201 の全投与群において筋麻痺から完全に回復した。

投与部位である右腓腹筋の病理組織学的検査結果を表 2.6.2-2 に示した。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。

表 2.6.2-2　ラット後肢腓腹筋への NT 201 反復筋肉内投与後の病理組織学的検査（右腓腹筋）

投与後解剖日（週）	1				17				26			
投与量（LDU/kg）	0	2	8	16	0	2	8	16	0	2	8	16
筋線維サイズ減少												
Minimal		**1**				**4**	**2**			**1**	**6**	**6**
Slight			**1**			**1**	**2**	**5**				
Moderate							**2**					
Marked		**4**	**4**	**2**								
Severe			**1**	**4**								
筋線維サイズ増加												
Minimal								**1**				
脂肪組織増加												
Minimal		**3**	**5**	**3**		**4**	**4**	**3**		**2**	**4**	**6**
Slight		**1**	**1**	**2**				**2**				
Moderate				**1**			**1**					
コラーゲン増加												
Minimal		**3**	**3**	**4**		**5**	**2**	**2**		**2**	**4**	**3**
Slight		**1**	**3**	**2**			**3**	**3**				
Moderate		**1**					**1**					
NCAM 染色陽性												
Minimal					**2**	**2**	**1**	**2**	**4**	**4**	**4**	**5**
Slight		**1**					**3**	**3**				
Moderate		**2**	**3**	**2**			**2**					
Marked		**2**	**3**	**4**								
ネスチン染色陽性												
Minimal	**5**	**2**	**1**	**3**	**3**				**4**	**6**	**4**	**5**
Slight	**1**	**3**	**4**	**2**	**2**	**5**	**4**					**1**
Moderate		**1**	**1**	**1**		**1**	**2**	**5**				

表中の数字は例数を表す。

2.6.2.3　副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.4　安全性薬理試験

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。安全性薬理試験の一覧を表 2.6.2-3 に示す。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。

表 2.6.2-3　安全性薬理試験一覧

試験の種類	投与経路	試験系	投与物質 投与量又は適用濃度 b)	試験番号	GLP 適用
中枢神経系及び呼吸器系					
単回投与毒性試験	静脈内投与	CD-1 系マウス	NT 201、ボトックス®及び Dysport® 0、9、20、30、45、68 LDU/kg	[redacted]	適
心血管系					
hERG チャネル電流に対する影響	In vitro	CHO 細胞	NT 101 10000 LDU/mL	NT-101 on hERG c)	否
単回投与による心電図評価	筋肉内投与	カニクイザル	NT 201 及びボトックス® 16 LDU/kg	[redacted]	適
13 週間反復投与毒性試験 (a)	筋肉内投与	カニクイザル	NT 201 及びボトックス® 0、4、8、16 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回）	[redacted]	適
9 か月間反復投与毒性試験及び 6 か月間回復性試験 a)	筋肉内投与	カニクイザル	NT 201 0、4、8、12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回）	[redacted]	適
様々な投与間隔での毒性比較	筋肉内投与	カニクイザル	NT 201 16 LDU/kg/回 （4、8 又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回）	[redacted]	適
消化器系					
消化管輸送能への影響	筋肉内投与	SD 系ラット	NT 201 0、8、16、32 LDU/kg	[redacted]	適

a）投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。
b）マウス腹腔内投与 LD_{50} を 1 LDU（Lethal Dose Unit）とした。
c）試験名を省略して試験番号とした。

2.6.2.4.1　中枢神経系及び呼吸器系

2.6.2.4.1.1　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

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-1（[redacted]）］

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]）の一般状態観察及び自発運動量測定により、中枢神経系及び呼吸器系への影響を評価した。NT 201、ボトックス®及び Dysport®を CD-1 系マウス（馴化開始時 28 日齢）の各群雄 10 匹に 0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、9、20、30、45 及び 68 LDU/kg の投与量で単回静脈内投与し、投与後 14 日間、死亡有無の確認及び一般状態観察、並びに自発運動量測定（投与 24、48 及び 72 時間後）を行った。

NT 201 の 45 及び 68 LDU/kg 群で、投与後 2 から 4 日目にかけて、それぞれ 2 例及び全例が死亡した。ボトックス®の 45 及び 68 LDU/kg 群で、投与後 2 から 5 日目にかけて、それぞれ 3 例及び全例が死亡した。Dysport®の 68 LDU/kg 群で、投与後 2 から 6 日目に 8 例が死亡した。

一般状態観察では、20 LDU/kg で立毛、30 LDU/kg では立毛に加えて体温低下、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下及び散瞳、45 及び 68 LDU/kg では 30 LDU/kg でのいくつかの所見に加えて運動性低下及び運動失調も認められた。また、ボトックス®の 30 LDU/kg 以上及び Dysport®の 20 LDU/kg 以上で、同様な一般状態変化がみられた。

自発運動測定では、いずれの製剤も、20 LDU/kg の投与 48 時間後に静的及び動的動作回数の減少が認められ、30 LDU/kg 以上では投与 24 時間後から静的及び動的動作回数が減少した。

本試験条件下、マウスに 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。

2.6.2.4.2　心血管系

2.6.2.4.2.1　NT 101 の hERG チャネル電流に対する影響（非 GLP）

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-2（NT-101 on hERG）］

NT 101 の hERG チャネルを介するカリウム電流に対する影響を、hERG チャネルを発現させた CHO 細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）を用いてパッチクランプ法で評価した（6 細胞／濃度）。NT 101 の投与液濃度は、臨床での NT 201 最高濃度 400 LDU/mL と比較して高濃度である 10000 LDU/mL とした。陽性対照薬としてシサプリドを評価した。

NT 101 は hERG 電流を阻害しなかった。陽性対照薬であるシサプリドは hERG 電流を濃度依存的に阻害し、IC_{50} 値は 38±10 nM であった。

本試験条件下、10000 LDU/mL の NT 101 は hERG 電流に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.2　NT 201 のサルにおける単回筋肉内投与による心電図評価

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-3（[redacted]）］

テレメトリー送信機を埋め込んだカニクイザル（試験開始時 28 から 39 ヶ月齢）の雄 5 又は 6 匹の左中臀筋に、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心電図パラメータへの影響を評価した。また、左中臀筋の筋電図を測定した。NT 201 及びボトックス®の投与量は、カニクイザルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験（試験番号：[redacted]）を参考に、それぞれ 16 LDU/kg とした。24 時間の心電図測定を、投与開始前及び投与当日に行い、それ以降は投与後 9 週目まで週 1 回実施した。各測定日において、最大 10 時点の心電図データを解析に供した。解析項目は心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔、QTc [Bazett 式及び Fridericia 式による補正]）及び心拍数とした。ボトックス®についても同様に評価した。

NT 201 及びボトックス®の投与 22 時間後から、投与部位の骨格筋の筋細胞活動電位が低下し、この低下は投与後 1 から 2 週目に最大に達した。このことから投与部位の筋麻痺が示唆された。

投与当日の心電図及び心拍数測定では、NT 201 投与群では、いずれの項目も影響は認められなかったが、ボトックス®投与群では軽度の QTc 延長が認められた。投与後 1 週目以降、NT 201 及びボトックス®投与群で心拍数高値がみられ、投与後 4 から 9 週目までに回復した。この心拍数高値は筋麻痺によるストレスに関連する変化と考えられた。心電図パラメータについては、いずれの評価時点でも、NT 201 及びボトックス®投与による影響は認められなかった。

本試験条件下、カニクイザルに 16 LDU/kg の NT 201 を単回筋肉内投与したとき、心電図パラメータに対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.3　NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-4（[redacted]）］

NT 201 のカニクイザルにおける筋肉内投与による 13 週間反復投与毒性試験（試験番号[redacted]）において、各群雌雄 3 匹に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、4、8 及び 16 LDU/kg/回を、4 週間間隔で計 4 回筋肉内投与し、覚醒下及び拘束下で、血圧及び心拍数測定、心電図検査（PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔及び QTc[Fridericia 式による補正]）を実施した。同用量のボトックス®についても同様に評価を実施した。

NT 201 及びボトックス®は、血圧、心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった。

本試験条件下、カニクイザルに NT 201 を 4 週間間隔で計 4 回筋肉内投与したとき、16 LDU/kg/回まで心血管系に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.4　NT 201 のサルにおける筋肉内投与による 9 か月間反復投与毒性試験及び 6 か月間回復性試験

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-5（[redacted]）］

NT 201 のカニクイザルにおける筋肉内投与による 9 か月間反復投与毒性試験及び 6 か月間回復性試験（試験番号：[redacted]）において、各群雌雄 4 又は 6 匹に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、4、8 及び 12 LDU/kg/回を、4 週間間隔で計 10 回筋肉内投与し、また、一部の動

物には 6 か月間の休薬期間を設けた。覚醒下及び拘束下で、血圧及び心拍数測定、心電図検査（PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔及び QTc[Fridericia 式による補正]）を実施した。

NT 201 は血圧、心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった。

本試験条件下、カニクイザルに NT 201 を 4 週間間隔で計 10 回筋肉内投与したとき、12 LDU/kg/回まで心血管系に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.5　NT201 のサルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与毒性比較

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-6（[redacted]）］

NT201 のカニクイザルにおける様々な投与間隔での筋肉内投与毒性比較（試験番号:[redacted]）において、各群雌雄 4 匹に、16 LDU/kg/回を、4 週間、8 週間又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回筋肉内投与し、覚醒下及び拘束下で、血圧及び心拍数測定、心電図検査（PR 間隔、QRS 幅及び QT 間隔）を実施した。

NT 201 は血圧、心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった。

本試験条件下、カニクイザルに 16 LDU/kg/回の NT 201 を 4 週間、8 週間又は 12 週間間隔で計 4 回筋肉内投与したとき、いずれの投与間隔でも心血管系に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.3　消化器系

2.6.2.4.3.1　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

［概要表 2.6.3.4；報告書 4.2.1.3-7（[redacted]）］

NT 201 を SD 系ラット（試験開始時 7 から 8 週齢）の各群雄 10 匹の左腓腹筋に単回筋肉内投与し、消化管輸送能への影響を評価した。投与量は、用量設定試験（[redacted]）を参考に、0（0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩液）、8、16 及び 32 LDU/kg とした。NT 201 投与後 4 日目に charcoal meal を投与した。投与 20 分後にラットを解剖し、消化管内 charcoal meal の移動距離を測定した。また、陽性対照群としてモルヒネの 20 mg/kg をラットに皮下投与し、投与 45 分後の消化管内 charcoal meal の移動距離を測定した。

いずれの NT 201 投与群も、消化管輸送能への影響は認められなかった。モルヒネは charcoal meal の輸送を有意に抑制した。

本試験条件下、ラットに NT 201 を単回筋肉内投与したとき、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。

2.6.2.5　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。

2.6.2.6　考察及び結論

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は同様であった。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を表 2.6.2-4 に示す。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 又は 2.4 倍、消化器系については 4.8 倍の安全域を示した。

表 2.6.2-4　安全性薬理試験での安全域

試験の種類 （試験番号）	投与物質	投与 経路	試験系	無影響量	安全域 a)
中枢神経系及び呼吸器系					
単回投与毒性試験 （[redacted]）	NT 201	静脈内 投与	CD-1 系 マウス	9 LDU/kg	1.3
心血管系					
hERG チャネル電流 に対する影響 （NT-101 on hERG b)）	NT 101	-	In vitro	10000 LDU/mL	25
単回投与による 心電図評価影響 （[redacted]）	NT 201	筋肉内 投与	カニクイ ザル	16 LDU/kg	2.4
13 週間反復投与 毒性試験 （[redacted]）	NT 201	筋肉内 投与	カニクイ ザル	16 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回 投与）	2.4
9 か月間反復投与毒性試験 及び 6 か月間回復性試験 （[redacted]）	NT 201	筋肉内 投与	カニクイ ザル	12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回 投与）	1.8
様々な投与間隔での 毒性比較 （[redacted]）	NT 201	筋肉内 投与	カニクイ ザル	16 LDU/kg/回 （4、8 又は 12 週間間隔 でそれぞれ計 4 回投与）	2.4
消化器系					
単回投与による 消化管輸送能への影響 （[redacted]）	NT 201	筋肉内 投与	SD 系 ラット	32 LDU/kg	4.8

a）In vivo 試験の安全域は、1 回当たりの臨床最高用量（400 U）のヒト 60kg 換算値（6.67 U/kg/回）に対して算出した。
In vitro 試験については、臨床での NT 201 最高濃度 400 U/mL に対して算出した。
b）試験名を省略して試験番号とした。

2.6.2.7　図表

図表は本文中に示した。

2.6.2.8　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）Lance JW. Symposium synopsis in spasticity: disordered motor Control Eds. Feldman RG, Young RR, Koella WP. Year Book Medical Publishers. 1980; 485-94.
3）大澤　美貴雄. 日本神経治療学会治療指針作成委員会編. 標準的神経治療: ボツリヌス治療. 神経治療. 2013; 30: 471-94.
4）Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K; Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001; 285: 1059-70.
5）Filippi GM, Errico P, Santarelli R, Bagolini B, Manni E. Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. Acta Otolaryngol. 1993; 113: 400-4.
6）Rosales RL, Arimura K, Takenaga S, Osame M. Extrafusal and intrafusal muscle effects in experimental botulinum toxin-A injection. Muscle Nerve. 1996; 19: 488-96.
7）Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. J Neurol. 2001; 248 Suppl 1: 3-10.
8）Dressler D, Adib Saberi F. Botulinum toxin: mechanisms of action. Eur Neurol. 2005; 53: 3-9.
9）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.
10）Ginalski K, Venclovas C, Lesyng B, Fidelis K. Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides residue level information about the putative ganglioside binding site. FEBS Lett. 2000; 482: 119-24.
11）Stenmark P, Dupuy J, Imamura A, Kiso M, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. PLoS Pathog. 2008; 4: e1000129.
12）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.
13）Ohyama T. Structure and Function of Botulinum Toxin Complex. J Agric Sci Tokyo Univ Agric. 2013; 57: 223-32.
14）de Paiva A, Meunier FA, Molgó J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 3200-5.

15）Dressler D, Mander G, Fink K. Measuring the potency labelling of onabotulinumtoxinA (Botox ®) and incobotulinumtoxinA (Xeomin ®) in an LD50 assay. J Neural Transm (Vienna). 2012; 119: 13-5.

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3　薬理試験概要表

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.3　薬理試験概要表 3
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3　副次的薬理試験 5
2.6.3.4　安全性薬理試験 6
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 7

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与物質・投与方法・投与期間 [a]	実施施設	試験番号	報告書番号
効力を裏付ける試験					
筋麻痺作用	マウス ／CD-1 系	NT 201、ボトックス®及び Dysport® 筋肉内投与 単回×3 回	[redacted]	[redacted]	［4.2.1.1-1］
筋麻痺作用	カニクイザル	NT 201 及びボトックス® 筋肉内投与 単回	[redacted]	[redacted]	［4.2.1.1-2］
筋麻痺作用からの回復	ラット ／Wistar 系	NT 201 筋肉内投与 週 1 回×10 回	[redacted]	[redacted]	［4.2.1.1-3］
安全性薬理試験					
中枢神経系及び呼吸器系	マウス ／CD-1 系	NT 201、ボトックス®及び Dysport® 静脈内投与 単回	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-1]
心血管系	CHO 細胞	NT 101 In vitro	[redacted]	NT-101 on hERG [b]	[4.2.1.3-2]
心血管系	カニクイザル	NT 201 及びボトックス® 筋肉内投与 単回	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-3]
心血管系	カニクイザル	NT 201 及びボトックス® 筋肉内投与 13 週間	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-4]
心血管系	カニクイザル	NT 201 筋肉内投与 9 か月間	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-5]
心血管系	カニクイザル	NT 201 筋肉内投与 13、25 又は 37 週間	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-6]
消化器系	ラット ／SD 系	NT 201 筋肉内投与 単回	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-7]

a：反復投与毒性試験の投与期間は試験開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。b：試験名を省略して試験番号とした。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

試験内容	動物種・系統／試料	試験方法	投与量／濃度	動物数／群	特筆すべき所見	試験番号	報告書番号
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	雄性 CD-1 マウス	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て、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。	NT 201 及びボトックス®いずれも 0.262、0.328、0.410、0.512 及び 0.641 U/animal/回 Dysport® 0.640、0.800、1.000、1.250 及び 1.562 U/animal/回	10 匹/群	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。	[redacted]	［4.2.1.1-1］
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	雄性カニクイザル	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。	NT 201 及びボトックス®いずれも 16 LDU/kg	NT 201: 6 匹、ボトックス®: 5 匹	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。	[redacted]	［4.2.1.1-2］

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

試験内容	動物種・系統／試料	試験方法	投与量／濃度	動物数／群	特筆すべき所見	試験番号	報告書番号
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	雄性 Wistar ラット	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 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。	NT 201 0、2、8 及び 16 LDU/kg	6 匹/群	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。	[redacted]	［4.2.1.1-3］

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

試験の種類	試験系 例数／ 群、性	投与方法 （投与期間）	投与物質 投与量	特記事項	GLP 適用	試験番号
中枢神経系及び呼吸器系	マウス／ CD-1 系 10／群、 雄	静脈内投与 （単回）	NT 201、ボトックス®及び Dysport® 0、9、20、30、45、68 LDU/kg	NT 201 45 及び 68 LDU/kg 群では、それぞれ 2 及び全例が、投与後 4 日目までに死亡した。一般状態観察では、20 LDU/kg で立毛、30 LDU/kg では立毛に加えて体温低下、眼瞼下垂、流涙、呼吸困難、筋緊張低下及び散瞳、45 及び 68 LDU/kg では 30 LDU/kg でのいくつかの所見に加えて運動性低下及び運動失調も認められた。自発運動測定では、20 LDU/kg から静的及び動的動作回数の減少が認められた。 ボトックス® 45 及び 68 LDU/kg 群では、それぞれ 3 及び全例が、投与後 5 日目までに死亡した。一般状態観察及び自発運動測定では、それぞれ 30 及び 20 LDU/kg から、NT 201 と同様の変化が認められた。 Dysport®： 68 LDU/kg 群では、8 例が投与後 6 日目までに死亡した。一般状態観察及び自発運動測定では、それぞれ 20 LDU/kg から NT 201 と同様の変化が認められた。	適	[redacted]
心血管系	hERG 導入 CHO 細胞 6 細胞／濃度	In vitro	NT 101 10000 LDU/mL	10000 LDU/mL の NT 101 は､hERG 電流を阻害しなかった｡陽性対照薬シサプリドは hERG 電流を濃度依存的に阻害し、IC_{50} 値は 38±10 nM であった。	否	NT-101 on hERG [b]
心血管系	カニクイザル 5 又は 6／ 群、雄	筋肉内投与 （単回）	NT 201 及びボトックス® 16 LDU/kg	NT 201 の 16 LDU/kg は心血管パラメータに対して影響を及ぼさなかった。ボトックス®投与群では、投与当日に軽度の QTc 延長が認められた。NT 201 及びボトックス®群で、筋麻痺のストレスに関連する変化と考えられる心拍数高値が、投与後 1 週目からみられ、投与後 4 から 9 週目までに回復した。	適	[redacted]
心血管系	カニクイザル 3／群、雌雄	筋肉内投与 （13 週間 [a]）	NT 201 及びボトックス® 0、4、8、16 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 4 回投与）	NT 201 及びボトックス®は 16 LDU/kg/回まで心血管系に対して影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]

a：投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。b：試験名を省略して試験番号とした。

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

試験の種類	試験系 例数／群、性	投与方法 （投与期間）	投与物質 投与量	特記事項	GLP 適用	試験番号
心血管系	カニクイザル 4 又は 6／群、雌雄	筋肉内投与 （9 か月間 [a]）	NT 201 0、4、8、12 LDU/kg/回 （4 週間間隔で計 10 回投与）	NT 201 は 12 LDU/kg/回まで心血管系に対して影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]
心血管系	カニクイザル 4／群、雌雄	筋肉内投与 （13、25 又は 37 週間 [a]）	NT 201 16 LDU/kg/回 （4 週間、8 週間又は 12 週間間隔でそれぞれ計 4 回投与）	16 LDU/kg/回の NT 201 は、いずれの投与間隔でも心血管系に対して影響を及ぼさなかった。	適	[redacted]
消化器系	ラット／SD 系 10／群、雄	筋肉内投与 （単回）	NT 201 0、8、16、32 LDU/kg	NT 201 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。	適	[redacted]

a：投与期間は投与開始から最終投与終了後の剖検までの期間を示す。

2.6.3.5 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。