目次

2.4　非臨床試験の概括評価----4
2.4.1　非臨床試験計画概略----4
2.4.1.1　薬理試験----4
2.4.1.2　薬物動態試験----5
2.4.1.3　毒性試験----5
2.4.2　薬理試験----6
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 ----6
2.4.2.2　副次的薬理試験 ----7
2.4.2.3　安全性薬理試験 ----7
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----9
2.4.3.2　吸収----10
2.4.3.3　分布----10
2.4.3.4　代謝----11
2.4.3.5　排泄----12
2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用 ----13
2.4.4　毒性試験----14
2.4.4.1　単回投与毒性試験 ----15
2.4.4.2　反復投与毒性試験 ----16
2.4.4.3　遺伝毒性試験----16
2.4.4.4　がん原性試験----16
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 ----17
2.4.4.6　局所刺激性試験 ----18
2.4.4.7　その他の毒性試験 ----18
2.4.5　総括及び結論----18
2.4.6　引用文献----22

略語一覧

略号	省略していない表現
ALT	Alanine aminotransferase（アラニンアミノトランスフェラーゼ）
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 concentration-time curve（濃度－時間曲線下面積）
AUC_{0-24}	投与後 0 時間から 24 時間までの AUC
$AUC_{0-\infty}$	投与後 0 時間から無限時間まで外挿した AUC
BCRP	Breast cancer resistance protein（乳がん耐性タンパク質）
BSEP	Bile-salt export pump（胆汁酸トランスポーター）
C_{max}	Maximum concentration（最高濃度）
CPMA	Cyclopentyl mandelic acid（シクロペンチルマンデル酸）
CYP	Cytochrome P450（チトクローム P450）
DB20	[redacted]（[redacted]添加剤）
E. coli	*Escherichia coli*（大腸菌）
F	生物学的利用率又は吸収率
FOB	Functional observational battery（機能観察総合評価法）
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）
HEK293 細胞	ヒト胎児腎臓（Human embryonic kidney, HEK）293 細胞
hERG	Human ether-a-go-go related gene（ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子）
HPLC	High performance liquid chromatography（高速液体クロマトグラフィー）
IC_{50}	50% inhibitory concentration（50%抑制濃度）
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use（医薬品規制調和国際会議）
I_{Kr}	遅延整流 K^+チャネルの速い成分
IPM	Isopropyl myristate（ミリスチン酸イソプロピル）
K_i	阻害定数
k_{off}	解離速度定数
k_{on}	結合速度定数
LC-FTMS	Liquid chromatography-fourier transform mass spectrometry（液体クロマトグラフィーフーリエ変換質量分析）
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry（液体クロマトグラフィータンデム質量分析）
LLNA 法	Local Lymph Node Assay 法（局所リンパ節試験法）
LSC	Liquid scintillation counter（液体シンチレーションカウンター）
M	単位として使用する場合、「mol/L」を表す
M1 ～ M5	ムスカリン受容体サブタイプ 1～5
MATE	Multidrug and toxin extrusion
MDR1	Multidrug resistance protein（多剤耐性タンパク質：P 糖タンパク質）
OAT	Organic anion transporter（有機アニオン輸送トランスポーター）
OATP	Organic anion transporting polypeptide（有機アニオン輸送ポリペプチド）
OCT	Organic cation transporter（有機カチオン輸送トランスポーター）
pA_2	アゴニストよる濃度反応曲線を 2 倍高濃度側に平行移動させるために必要な競合的アンタゴニストのモル濃度の負の対数
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*（ネズミチフス菌）
$T_{1/2}$	Elimination half-life（消失半減期）
T_{max}	Time to reach C_{max}（最高濃度到達時間）
T/P 比	組織中放射能濃度 / 血漿中放射能濃度比

用語一覧

用語	定義
BBI-4000 gel	BBI-4000 のゲル製剤
DB20 製剤	BBI-4000 gel の 1 製剤。[redacted]添加物を含む
IPM1 製剤	BBI-4000 gel の 1 製剤。[redacted]添加物を IPM に置き換えた
IPM2 製剤	BBI-4000 gel の 1 製剤。IPM1 製剤から[redacted]をした
不純物含 BBI-4000	不純物を添加した BBI-4000

2.4 非臨床試験の概括評価

ソフピロニウム臭化物（BBI-4000）は、グリコピロニウム臭化物のアナログとして Bodor Laboratories 社が創製した新規化合物である（図 2.4-1）。BBI-4000 は、コリン作動性のムスカリン受容体サブタイプ 3（M3）に強い結合親和性を有し、*in vitro* 及び *in vivo* 試験において、抗コリン作用を示す。また、BBI-4000 は局所で作用する化合物であることから、有効性と安全性を併せ持つ原発性腋窩多汗症の治療剤として期待された。このことから、BBI-4000 を有効性成分とする原発性腋窩多汗症治療剤を開発するため、非臨床試験を実施した。

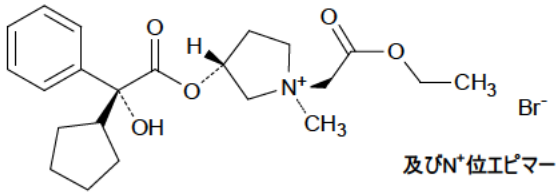


図 2.4-1 BBI-4000 の化学構造式

2.4.1 非臨床試験計画概略

原発性局所多汗症診療ガイドラインによると、多汗症とは、温熱や精神的負荷の有無に関わらず、手掌、足底等に大量の発汗が起こり、日常生活に支障をきたす状態で [1]、QOL を著しく低下させる疾患である。ヒトの汗腺にはエクリン汗腺とアポクリン汗腺が存在し、このうち多汗症の原因となる汗はエクリン汗腺 [2]から分泌される。エクリン汗腺はコリン作動性神経により調節されており、アセチルコリンがエクリン汗腺の M3 を刺激することにより発汗を誘発すると考えられている [3]。

原発性腋窩多汗症の既存治療には侵襲性や副作用の点で問題があり、これらを回避できる薬剤が強く求められている。そこで、侵襲性が低く、局所投与で作用を発揮する新規外用剤の開発を考えた。

BBI-4000 は、グリコピロニウム臭化物のアナログとして Bodor Laboratories 社が創製した新規化合物である。BBI-4000 は、コリン作動性の M3 に強い結合親和性を有することから、原発性腋窩多汗症に対する新たな外用剤として期待されたため、以下の非臨床試験を実施した。

2.4.1.1 薬理試験

BBI-4000 の効力を裏付ける試験として、*in vitro* 及び *in vivo* で各種試験を実施した。*In vitro* については、ヒトムスカリン受容体に対する結合親和性及びモルモット摘出回腸の収縮抑制作用を評価した。また、*in vivo* で抗コリン活性を評価するため、ウサギに対する散瞳作用及びラットに対する発汗抑制作用を評価した。

副次的薬理試験として、BBI-4000 のムスカリン受容体以外の分子に対する作用を検討するため、種々の酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する作用の網羅的解析を実施した。また、BBI-4000 は、投与局所で抗コリン作用を示す一方で、血中に到達した後は低活性代謝物（BBI-4010）に変換されることが推定されている [4]ことから、BBI-4010 の抗コリン活性をモルモット摘出回腸の収縮抑制作用にて評価した。

安全性薬理試験として、*in vitro* 及び *in vivo* 試験にて、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対する影響を評価した。これらの安全性薬理試験は、安全性薬理試験ガイドライン（医薬審発第 902 号）に基づき、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。

2.4.1.2　薬物動態試験

BBI-4000 の臨床投与経路は腋窩の皮膚への塗布であるため、主に経皮投与での薬物動態試験を実施した。加えて、経皮吸収後の薬物動態を検討するため、静脈内投与及び皮下投与も行った。動物種は毒性試験で使用されたラット及びミニブタを用いた。各試験は、薬物動態試験ガイドライン [5]及び非臨床薬物動態試験ガイドライン [6]に準拠して実施した。

吸収については、ラット及びミニブタの経皮投与、皮下投与及び静脈内投与したときの血漿中濃度推移を検討した。分布については、ラットの経皮投与あるいは皮下投与により検討し、全身の各臓器組織への分布や消失を調べた。代謝については、ラットの経皮投与試験、ラット及びミニブタの皮下投与試験及び臨床薬理試験で得られた試料を用いた代謝物検索並びに各種動物の肝細胞、肝ミクロソーム、肝 S9 及び皮膚 S9 を用いた *in vitro* 代謝試験を実施し、主代謝物の同定と代謝経路の推定を行った。排泄については、ラットに経皮投与したとき並びにラット及びミニブタに皮下投与したときの尿糞中排泄、ラットに皮下投与したときの胆汁中排泄及び乳汁中排泄について検討した。薬物相互作用については、医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン [7]に準拠して、非臨床薬物相互作用試験を実施した。ヒト CYP に対する誘導作用並びにヒト CYP 及びトランスポーターに対する阻害作用を検討し、臨床において薬物相互作用が生じる可能性について考察した。臨床薬理試験及び非臨床試験のデータを用いて、ヒトの消失クリアランスの合計に対する各種消失クリアランスの寄与率を推定した。

2.4.1.3　毒性試験

BBI-4000 の臨床投与経路は腋窩の皮膚への塗布であるため、ミニブタを用いた反復投与毒性試験及びマウスを用いたがん原性試験は、経皮投与により実施した。製剤の経皮投与毒性試験では、BBI-4000 gel（DB20 製剤、IPM1 製剤、IPM2 製剤）を用いた。また、全身曝露による影響を評価するため、ラットを用いた単回投与毒性試験は皮下投与及び静脈内投与により、ラットを用いた反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験及びラットを用いたがん原性試験は皮下投与により実施した。これらの試験と遺伝毒性試験、局所刺激性試験及び皮膚感作性試験は、ICH ガイドライン等各種毒性試験法ガイドラインに従い、GLP を遵守して実施した。

主だった反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験及びがん原性試験に関しては、各試験の全身曝露量とヒトでの曝露量を対比して、臨床使用における安全性を考察した。

また、原薬中に含まれる可能性のある不純物については、ラットを用いた反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験を実施した。製剤中に含まれる可能性のある不純物 D2-1 は、BBI-4000 の主代謝物である BBI-4010（D2-1 及び D2-2 からなる）と同一であることから、BBI-4000 の毒性試験（反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験）の結果からその安全性を考察した。

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その成績の一覧を以下の表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1 効力を裏付ける試験一覧

分類	試験項目	試験成績	被験物質
in vitro	ムスカリン受容体結合親和性	BBI-4000 の K_i（nmol/L） M1：6.76 M2：12.8 M3：4.13 M4：6.08 M5：7.45	BBI-4000
	M3 に対する結合親和性の速度論的解析	BBI-4000 の k_{on}、k_{off} 及び解離半減期 k_{on}：4.61×10^7 M^{-1} min^{-1} k_{off}：0.149 min^{-1} 解離半減期：4.66 min	BBI-4000
	モルモット摘出回腸標本収縮反応に対する作用	BBI-4000 の pA_2 pA_2：8.53	BBI-4000
in vivo	ウサギ散瞳作用	BBI-4000 溶液（0.1%及び 1%溶液）の点眼により用量に応じた散瞳作用が示された。	BBI-4000 溶液（媒体：生理食塩液）
	ラット発汗抑制作用	BBI-4000 の 20%溶液の足蹠塗布により、ピロカルピン（ムスカリン受容体アゴニスト）投与で誘発された発汗に対する抑制作用が示された。	BBI-4000 溶液（媒体：エタノール）

(1) *In vitro* 試験

In vitro において、BBI-4000 のムスカリン受容体に対する結合親和性を検討した結果、BBI-4000 は M1 から M5 のいずれの受容体に対しても結合親和性を有し、M3 に対して最も強い結合親和性を示した。また、BBI-4000 の M3 に対する結合親和性の速度論的解析を実施した結果、BBI-4000 の k_{on} は 4.61×10^7 M^{-1} min^{-1}、k_{off} は 0.149 min^{-1}、解離半減期は 4.66 min であった。更に、BBI-4000 はカルバミルコリン誘発のモルモット摘出回腸収縮反応を濃度依存的に阻害した。

(2) *In vivo* 試験

In vivo において、BBI-4000 の 0.1%及び 1%溶液をウサギに点眼することにより、用量に応じた散瞳作用が示された。また、BBI-4000 の 20%溶液をラットの足蹠に塗布することにより、ピロカルピンで誘発された発汗に対する抑制作用が示された。

2.4.2.2　副次的薬理試験

試験と成績の一覧を以下の表 2.4-2 に示す。

表 2.4-2 副次的薬理試験一覧

試験項目	試験成績	被験物質
各種分子に対する作用の網羅的解析（90 項目）	BBI-4000 はムスカリン受容体に加え、ラット L 型 Ca^{2+}チャネル（ジルチアゼム結合サイト及びベラパミル結合サイト）に結合親和性を示し、それぞれの K_i は 7.83 及び 2.23 μmol/L であった。	BBI-4000
モルモット摘出回腸標本収縮反応に対する BBI-4000 代謝物（BBI-4010）の作用	BBI-4010 及び BBI-4000 の IC_{50} BBI-4010：3.43×10^{-5} mol/L BBI-4000：2.77×10^{-8} mol/L	BBI-4010 BBI-4000

種々の酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーター（90 項目）に対する作用の検討において、BBI-4000 は M3 に対して結合活性を示す濃度では、ムスカリン受容体以外の分子に作用しなかった。また、BBI-4000 の主代謝物である BBI-4010 は、カルバミルコリンで誘発されたモルモット摘出回腸の収縮反応を阻害するものの、その IC_{50} は BBI-4000 に比して 1000 倍以上高値であり、抗コリン作用が著しく減弱していることが示された。

2.4.2.3　安全性薬理試験

試験と成績の一覧を以下の表 2.4-3 に示す。

表 2.4-3 安全性薬理試験一覧

評価対象	動物種／細胞種	投与方法	投与量	結果
中枢神経系	ラット	皮下（28 日間反復）	1、5 及び 10 mg/kg/day	FOB パラメータに影響なし
心血管系・呼吸器系	イヌ	静脈内（単回）	0.001、0.01、0.1 及び 1 mg/kg	心血管系：0.01 mg/kg 以上で用量依存性の心拍数増加及びその持続時間延長 0.1 mg/kg 以上で血圧及び心電図の変動
	ミニブタ	経皮（28 日間反復）	32 及び 66 mg/kg/day	心拍数及び心電図への影響なし
hERG I_{Kr} 電流	hERG チャネル発現 HEK293 細胞	*in vitro*	10、100 及び 300 μmol/L	有意な阻害率の増加（100 μmol/L: 6.9%、300 μmol/L: 22.6%）

安全性薬理試験では、ラット中枢神経系及びイヌ及びミニブタの呼吸器系に対して、BBI-4000 の特記すべき作用は認められなかった。心血管系については、イヌに BBI-4000 を単回静脈内投与することで、抗コリン作用によると考えられる心拍数増加及びその持続時間延長が 0.01 mg/kg 以上で、それに伴う血圧及び心電図項目の変動が 0.1 mg/kg 以上で認められた。一方、ミニブタに BBI-4000 gel 10%（32 mg/kg/day）及び 20%（66 mg/kg/day）を 28 日間反復経皮投与した試験では、心拍数及び心電図への影響は認められなかった。また、*in vitro* において BBI-4000 は 100 μmol/L 以上で hERG I_{Kr} 電流に対して有意な阻害作用

を示したものの、その IC_{50} は 300 µmol/L 超と推定された。hERG I_{Kr} 電流を阻害しなかった濃度（10 µmol/L）は、ミニブタを用いた反復経皮投与毒性試験（無毒性量）での BBI-4000 の血漿中濃度の最大値（190 ng/mL）から換算した 317 nmol/L（非結合型分率 0.652 を乗じ、モル換算した値）及び国内治験で BBI-4000 gel 5%を外用塗布したときの BBI-4000 の C_{max} の最大値（7.42 ng/mL、5.3.3.2-1）から換算した 12.4 nmol/L と開きがあることから、外用塗布された BBI-4000 が hERG I_{Kr} 電流を阻害する可能性は低いことが示唆された。

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なかった。

2.4.3　薬物動態試験

実施した試験の一覧を以下の表 2.4-4 に示す。

表 2.4-4 薬物動態試験の一覧（1/2）

試験の種類		動物種（試験系）	被験物質	投与方法	資料番号
吸収	血漿中動態	ラット	BBI-4000 gel（IPM1 製剤） BBI-4000	単回経皮（正常皮膚、損傷皮膚） 単回静脈内 14 日間反復経皮 7 日間反復皮下	4.2.2.2-1
		ラット	BBI-4000 gel（IPM2 製剤）	単回経皮（正常皮膚）	4.2.2.2-2
		ラット	^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤） ^{14}C-BBI-4000	単回経皮（正常皮膚） 単回皮下 単回静脈内	4.2.2.2-3
		ミニブタ	BBI-4000 gel（IPM2 製剤） BBI-4000	単回経皮（正常皮膚） 単回皮下 単回静脈内	4.2.2.2-4
		ミニブタ	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.2-5
分布	組織内分布	ラット	^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤） ^{14}C-BBI-4000	単回経皮 単回皮下	4.2.2.2-3
		有色ラット	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	
	組織内分布	ラット	^{14}C-BBI-4000	14 日間反復皮下	4.2.2.3-1
	血漿タンパク結合	血漿（マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ及びヒト）	^{14}C-BBI-4000 BBI-4010	*in vitro*	4.2.2.3-2
	血球中への移行	ラット	^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤） ^{14}C-BBI-4000	単回皮下 単回経皮	4.2.2.2-3
	血球中への移行	ミニブタ	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.2-5
	血球中への移行	新鮮血液（マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ及びヒト）	^{14}C-BBI-4000	*in vitro*	4.2.2.3-3
	胎盤・胎児への移行	ラット	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.3-4

表 2.4-4 薬物動態試験の一覧（2/2）

試験の種類		動物種（試験系）	被験物質	投与方法	資料番号
代謝	投与部位の皮膚中代謝物検索	ラット	^{14}C-BBI-4000 gel（IPM2 製剤）	単回経皮	4.2.2.4-1
	In vivo 代謝物検索	ラット（血漿、尿、糞及び胆汁）、ミニブタ（血漿、尿及び糞）	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.4-2
	In vivo 代謝物検索	ヒト（血漿及び尿）	BBI-4000 gel（IPM1 製剤）	28 日間反復塗布	4.2.2.4-3
	代謝物曝露評価	ラット血漿	BBI-4000	26 週間反復皮下	4.2.2.4-4
		ヒト血漿	BBI-4000 gel（IPM1 製剤）	28 日間反復塗布	
	生体内キラル反転	ラット	BBI-4000	単回皮下	4.2.2.4-5
	In vitro 代謝物検索	凍結肝細胞（ラット、ミニブタ及びヒト） 肝ミクロソーム（マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ミニブタ及びヒト） 肝 S9（ラット及びヒト） 皮膚 S9（ラット及びヒト）	^{14}C-BBI-4000	*in vitro*	4.2.2.4-6
	加水分解反応	ヒト（肝 S9、皮膚 S9 及び血漿）	^{14}C-BBI-4000	*in vitro*	4.2.2.4-7
	ヒト CYP 分子種同定	ヒト CYP 発現系酵素及びヒト肝ミクロソーム	^{14}C-BBI-4000	*in vitro*	4.2.2.4-8
排泄	尿、糞及び呼気中排泄	ラット	^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤） ^{14}C-BBI-4000	単回経皮 単回皮下	4.2.2.2-3
	尿及び糞中排泄	ミニブタ	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.2-5
	胆汁中排泄及び腸肝循環	ラット	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.2-3
	乳汁中排泄	ラット	^{14}C-BBI-4000	単回皮下	4.2.2.3-4
薬物動態学的薬物相互作用	ヒト CYP 酵素阻害	ヒト肝ミクロソーム	BBI-4000 BBI-4010	*in vitro*	4.2.2.6-1
	In vitro CYP 阻害に基づく *in vivo* 代謝酵素阻害の推定	—	—	—	4.2.2.6-2
	ヒト CYP 酵素誘導	凍結ヒト肝細胞	BBI-4000 BBI-4010	*in vitro*	4.2.2.6-3
	ヒトトランスポーター阻害及び基質認識性	ヒトトランスポーター発現細胞及びベシクル	BBI-4000 BBI-4010 ^{14}C-BBI-4000	*in vitro*	4.2.2.6-4
	ヒトにおける消失クリアランスの推定	—	—	—	4.2.2.6-5

2.4.3.1　分析法

^{14}C-BBI-4000 を用いて実施した *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で採取した試料に含まれる放射能は LSC で測定した。また、代謝試験における放射能成分の分析はラジオ HPLC を用いて実施した。非標識の BBI-4000 及び代謝物の定量分析並びに代謝物の定性分析は LC-MS/MS あるいは LC-FTMS を用いて実施した。

2.4.3.2　吸収

正常皮膚ラットに BBI-4000 gel（IPM1 製剤）を 20、40 及び 60 mg/kg で単回経皮投与したときの血漿中 BBI-4000 の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ はいずれも用量に応じて増加した。T_{max} は 7.00～15.0 時間、$T_{1/2}$ は 6.3～10.1 時間及び F は 1.6%～2.1%であった。角質を除去した損傷皮膚ラットに 40 mg/kg で単回経皮投与したときの血漿中 BBI-4000 の T_{max} は 0.250 時間、$T_{1/2}$ は 9.5 時間及び F は 43.2%であった。角質を除去することにより、正常皮膚と比較し血漿中 BBI-4000 の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ約 73 倍及び約 28 倍増加した。正常皮膚ラットに BBI-4000 gel（IPM2 製剤）を 20 mg/kg で単回経皮投与したときの血漿中 BBI-4000 の T_{max} は 0.875 時間、$T_{1/2}$ は 17.4 時間及び F は 0.7%であった。ラットに BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回静脈内投与したときの血漿中 BBI-4000 の薬物動態パラメータは雌雄ラットで同程度であったため性差はないと考えられた。正常皮膚ラットに ^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤）を 40 mg/kg で単回経皮投与したときの血漿中放射能の T_{max} は 14 時間、$T_{1/2}$ は 13.1 時間及び F は 6.1%であった。ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回静脈内投与したときの血漿中放射能は二相性に消失し、$T_{1/2}$ は 10.5 時間であった。同様に単回皮下投与したときの血漿中放射能の T_{max} は 0.25 時間、$T_{1/2}$ は 8.6 時間及び F は 109.9%であった。ラットに ^{14}C-BBI-4000 を単回で経皮投与、皮下投与及び静脈内投与したときの $T_{1/2}$ は同程度であり、投与経路による消失速度に大きな違いは認められなかった。

ミニブタに BBI-4000 gel（IPM2 製剤）を 60 mg/kg で単回経皮投与したときの血漿中 BBI-4000 の T_{max} は 8.50 時間、$T_{1/2}$ は 15.5 時間及び F は 1.7%であった。また、BBI-4000 を 0.25 mg/kg で単回皮下投与したときの血漿中 BBI-4000 の T_{max} は 0.0833 時間、$T_{1/2}$ は 4.2 時間及び F は 125.2%であった。BBI-4000 を 0.25 mg/kg で単回静脈内投与したときの BBI-4000 は血漿中から二相性で消失し、$T_{1/2}$ は 9.0 時間であった。

正常皮膚ラットに BBI-4000 gel（IPM1 製剤）を 40 mg/kg で 1 日 1 回 14 日間反復経皮投与したときの血漿中 BBI-4000 の C_{max} 及び AUC_{0-24} は投与 1 日目と比較し、いずれも投与 14 日目で約 7 倍に増加した。また、投与 14 日目の $T_{1/2}$（46.7 時間）は、40 mg/kg で単回経皮投与したときの $T_{1/2}$（7.3 時間）と比較し、約 6 倍延長した。血漿中 BBI-4000 濃度のトラフ値は投与 10 日目以降一定となり、定常状態に達したと考えられた。ラットに BBI-4000 を 0.5 mg/kg で 1 日 1 回 7 日間反復皮下投与したときの血漿中 BBI-4000 濃度のトラフ値が投与 4 日目以降一定となり、定常状態に達したと考えられた。投与 1 日目と投与 7 日目の AUC_{0-24} に大きな差は認められなかったことから、反復皮下投与では単回皮下投与からの予測を大きく上回る蓄積性はないと考えられた。

2.4.3.3　分布

正常皮膚ラットに ^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤）を 40 mg/kg で単回経皮投与したときの組織中放射能濃度は、大腸では投与後 24 時間に、それ以外の組織では投与後 8 時間に最高濃度を示した。投与後 2 時間では血漿中放射能濃度（14.9 ng eq./mL）に対して、膀胱、肝臓及び腎皮質の放射能濃度が 10.42～12.95 倍高かった。投与後 8 時間では血漿中放射能濃度（84.7 ng eq./mL）に対して、膀胱及び肝臓の放射能濃度がそれぞれ 18.29 及び 18.10 倍高かった。投与後 168 時間ではすべての組織の放射能濃度は各組織の最高濃度の 2%以下あるいは検出されなかった。投与後 2、8、24、72 及び 168 時間の組織中分布率は、投与部位の皮膚以外ではすべての時点で 0.2%以下であったが、投与部位の皮膚では、それぞれ 3.2%、6.3%、9.0%、7.2%及び 4.5%であった。

ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与したときの体内に吸収された放射能の組織中濃度推移は、経皮投与したときとほぼ同様であり、投与経路による組織への移行及び消失に大きな違いはないと考えられた。

有色ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与したときの眼球中放射能濃度から眼球における BBI-4000 のメラニンへの親和性が示されたが、その濃度は時間経過とともに減少しておりメラニンへの結合は可逆的であると考えられた。また、有色皮膚においても BBI-4000 のメラニンへの親和性が示されたが、皮膚中放射能は有色以外の皮膚及び有色の皮膚の両組織から同様に消失すると考えられた。有色ラットのその他の組織中放射能濃度推移はおおむねアルビノラットと同様であった。

ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で 1 日 1 回（最大 14 日間）反復皮下投与し、1、7、10 及び 14 回投与後 24 時間の組織中放射能濃度の結果より、大部分の組織でその濃度は 10 回投与したときまでに定常状態に達していることが示された。大部分の組織において 14 回投与後 24 時間の血漿中放射能濃度に対する組織中放射能濃度の比（T/P 比）は単回投与後 24 時間の T/P 比と同程度であった。更に、蓄積率の比（実測値 / 予測値）は大動脈、白色脂肪、血液、大腿骨及び胸腺では 3.1～5.4 で、それらを除く組織において 3 以下であり、実測値と予測値の蓄積率の差は比較的小さかった。反復皮下投与したときの全身への放射能分布（T/P 比）は単回皮下投与したときと類似しており、^{14}C-BBI-4000 を反復皮下投与することにより単回皮下投与からの予測を大きく上回る蓄積性はないことが示された。

^{14}C-BBI-4000 及び BBI-4010 の *in vitro* 血漿タンパク結合率は、20～2000 ng/mL の濃度範囲でマウス、ラット、ウサギ、ミニブタ及びヒトのいずれにおいても 39.1%以下と低く、薬物濃度による結合率の大きな変化は認められなかった。

ラットに ^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤）を 40 mg/kg で単回経皮投与したとき、ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与したとき及びミニブタに ^{14}C-BBI-4000 を 0.25 mg/kg で単回皮下投与したときの血球移行率はそれぞれ、10.5%～32.5%、8.5%～30.8%及び 2.0%～20.9%であった。^{14}C-BBI-4000 の *in vitro* 血球移行率はマウス、ラット、ウサギ、ミニブタ及びヒトのいずれにおいても 0.0%～12.3%と低く、薬物濃度による移行率の大きな変化は認められなかった。

妊娠ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与したときの組織中放射能濃度の検討により、妊娠後の器官形成期及び妊娠後期で胎児（全身）の組織中放射能濃度は母体の血漿中放射能濃度よりも低いが、BBI-4000 及びその代謝物は胎盤を通過していることが確認された。また、妊娠後期の母動物では、卵巣、乳腺、胎盤、胎膜及び子宮に放射能が分布するが、これらの組織中放射能濃度は経時的に減少し、また羊水への分布の程度は低いことが確認された。投与後 1 時間から投与後 24 時間の主要な組織中放射能濃度は雄性ラットに単回皮下投与したときとほぼ同様であり、^{14}C-BBI-4000 を単回皮下投与したときの放射能分布は雄性ラット及び妊娠ラットで大きな違いはないことが示唆された。

2.4.3.4　代謝

ラットに ^{14}C-BBI-4000 gel（IPM2 製剤）を 20 mg/kg で単回経皮投与したときの投与部位皮膚中において、主代謝物は BBI-4010 で、その割合は投与後 72 時間でも 10%未満であり、ほとんどは未変化体であった。経皮投与された BBI-4000 は薬効標的部位である投与部位皮膚中において、主に未変化体として存在することが明らかになった。

ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 5 mg/kg で単回皮下投与したときの血漿、0.5 mg/kg で単回皮下

投与したときの尿、糞及び胆汁並びにミニブタに ^{14}C-BBI-4000 を 0.25 mg/kg で単回皮下投与したときの血漿、尿及び糞において検出された代謝物は、加水分解（脱エチル化）による BBI-4010 の生成、加水分解による CPMA の生成、CYP による水酸化及び水酸化体の脱水による不飽和化の 4 種類の反応の組み合わせで生成すると推定され、いずれも主代謝物は BBI-4010 であった。

臨床薬理試験（BBI-4000-03 試験）でヒトに BBI-4000 gel（IPM1 製剤）15%を 1 日 1 回 28 日間反復塗布したときの血漿及び尿において検出された主代謝物は BBI-4010 であった。ヒトで検出された代謝物は、ラット及びミニブタで確認された 4 種類の代謝反応にグリシン抱合を加えた 5 種類の反応の組み合わせで生成すると推定された。

各種動物の凍結肝細胞（ラット、ミニブタ及びヒト）、肝ミクロソーム（マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ミニブタ及びヒト）、肝 S9（ラット及びヒト）及び皮膚 S9（ラット及びヒト）を用いて *in vitro* 代謝試験を実施した結果、主代謝物は BBI-4010 であり、検出された代謝物は *in vivo* 代謝物検索試験の結果をおおむね反映していると考えられた。

ヒト肝 S9、ヒト皮膚 S9 及びヒト血漿を用いた ^{14}C-BBI-4000 の *in vitro* 代謝反応の結果より、BBI-4000 から BBI-4010 及び CPMA が生成する加水分解反応は、主に非酵素的に進行することが示された。ヒト CYP 発現系酵素並びにヒト肝ミクロソーム及びヒト CYP 分子種の選択的阻害剤を用いた検討より、BBI-4000 の代謝に関与する主なヒト CYP 分子種は CYP2D6 及び CYP3A4 であると考えられた。

ラットに BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与したときの血漿において、BBI-4000 ジアステレオマー及び BBI-4000 エナンチオマーは定量下限未満（それぞれ 0.04 及び 0.1 ng/mL）であり、ラット生体内で BBI-4000 のキラル反転は起こらないと推察された。

臨床薬理試験（BBI-4000-03 試験）及びラット 26 週間反復皮下投与毒性試験の血漿試料を用いて、代謝物の曝露量を比較した結果、ヒトでの BBI-4000 に関連する総曝露量に対する割合が 10%を超え、かつ、ヒトでの曝露量がラットの曝露量の 2 倍以上であると推定された代謝物は存在しなかった。

2.4.3.5　排泄

ラットに ^{14}C-BBI-4000 gel（IPM1 製剤）を 40 mg/kg で単回経皮投与後 168 時間までの尿中に投与放射能量の 0.7%、糞中に 0.6%が排泄され、呼気中への排泄は 0.05%未満であり、尿、糞及び呼気中総排泄率は 1.3%であった。投与後 24 時間の塗布部製剤中残存率は投与放射能量の 90.2%であった。また、投与後 168 時間での塗布部皮膚及び塗布部皮膚を除く屍体中残存率はそれぞれ投与放射能量の 5.2%及び 0.05%未満であった。

ラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与後 168 時間までの尿中に投与放射能量の 54.0%、糞中に 45.0%及び呼気中に 0.1%が排泄され、尿、糞及び呼気中総排泄率は 99.1%であった。また、投与後 168 時間での屍体中残存率は投与放射能量の 0.6%であった。

ミニブタに ^{14}C-BBI-4000 を 0.25 mg/kg で単回皮下投与後 168 時間までの尿中に投与放射能量の 52.8%、糞中に 43.3%が排泄され、尿及び糞中総排泄率は 96.1%であった。

胆管カニュレーションしたラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中排泄率はそれぞれ、36.7%、47.9%及び 8.2%であった。投与後 8 時間までの胆汁の一部を別の胆管カニュレーションしたラットの十二指腸内に投与すると、投与後 48 時間までの胆汁中に投与放射能量の 3.8%、尿中に 10.1%が排泄されたことから、胆汁中に排泄された放射能の 13.9%は消化管から再吸収を受け、腸肝循環することが示唆さ

れた。

哺育中のラットに ^{14}C-BBI-4000 を 0.5 mg/kg で単回皮下投与したときの ^{14}C-BBI-4000 由来の放射能は乳汁中に移行することが確認されたが、母動物の血漿とほぼ同様に消失し、乳汁中に残留する可能性は低いと考えられた。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

ヒト CYP 酵素活性（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A）に対する BBI-4000 及び BBI-4010 の阻害作用（直接阻害及び時間依存的阻害）について、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験により検討した。BBI-4000 は CYP2D6（Quinidine）及び CYP3A（Midazolam）に対して直接阻害を示し、IC_{50} はそれぞれ、 44.4 及び 77.8 μmol/L であった。また、BBI-4000 は CYP3A（Testosterone 及び Midazolam）に対して時間依存的阻害を示し、IC_{50} はそれぞれ、50.7 及び 24.9 μmol/L であった。BBI-4010 では 100 μmol/L まで上記 7 種のヒト CYP に対する直接阻害及び時間依存的阻害を示さなかった。

BBI-4000 がヒトにおいて CYP を阻害し、他剤に対して薬物相互作用を起こす可能性を推定するため、臨床薬物相互作用試験が必要になると判断される臨床血漿中 BBI-4000 濃度（カットオフ C_{max} 値：総濃度）を算出した。CYP2D6 に対する可逆的阻害（直接阻害）による BBI-4000 のカットオフ C_{max} 値は 235 ng/mL と推定した。また、CYP3A に対する可逆的阻害及び時間依存的阻害による BBI-4000 のカットオフ C_{max} 値は 90.6（Testosterone）及び 117 ng/mL（Midazolam）と推定した。

凍結ヒト肝細胞を用いた薬物代謝酵素誘導試験より BBI-4000 及び BBI-4010 の CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導能はいずれも 100 μmol/L まで認められなかった。

各種ヒトトランスポーター（MDR1、BCRP、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1、MATE2-K 及び BSEP）による典型的基質の輸送に対する BBI-4000 及び BBI-4010 の阻害作用について検討した結果より、OCT1、OCT2 及び MATE1 に対して BBI-4000 は阻害作用を示し、それぞれの IC_{50} は 2.56、4.36 及び 26.4 μmol/L であった。その他のトランスポーター（MDR1、BCRP、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、MATE2-K 及び BSEP）では、BBI-4000 は 100 μmol/L まで阻害作用を示さなかった。BBI-4010 は、本試験で検討したいずれのトランスポーターでも 100 μmol/L まで阻害作用を示さなかった。

各種ヒトトランスポーター（MDR1、BCRP、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1、MATE2-K 及び BSEP）での ^{14}C-BBI-4000 の基質認識性について検討した結果より、BBI-4000 は OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質であると考えられた。

臨床薬理試験（BBI-4000-03 試験）データ、非臨床試験データ（4.2.2.3-2、4.2.2.3-3、4.2.2.4-8）及び文献情報 [8), 9), 10), 11)]を基に、BBI-4000 のヒトの消失クリアランスの合計に対する各消失クリアランスの割合（寄与率）を推定した結果、CYP2D6 による代謝クリアランス、CYP3A4 による代謝クリアランス、腎クリアランス及びみかけの加水分解クリアランスの寄与率はそれぞれ、22.4%、35.6%、20.7%及び 21.4%であった。また、腎の能動分泌が関与する腎分泌クリアランスの寄与率は、9.8%であった。

2.4.4 毒性試験

実施した試験の一覧を以下の表 2.4-5 に示す。

表 2.4-5 毒性試験の一覧（1/2）

試験の種類	投与経路、期間	動物種	被験物質	GLP 適用	資料番号
単回投与毒性試験					
	皮下及び静脈内、単回	ラット	BBI-4000	非適／参考	4.2.3.1-1
反復投与毒性試験					
	経皮、15 日間（回復 14 日間）	マウス	BBI-4000 gel（IPM1 製剤）	適／参考	4.2.3.2-1
	皮下、7 日間	ラット	BBI-4000	非適／参考	4.2.3.2-2
	皮下、28 日間（回復 14 日間）	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.2-3
	皮下、26 週間	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.2-4
	経皮、14 日間	ミニブタ	BBI-4000 gel	非適／参考	4.2.3.2-5
	経皮、28 日間（回復 14 日間）	ミニブタ	BBI-4000 gel（DB20 製剤）	適	4.2.3.2-6
	経皮、28 日間（回復 14 日間）	ミニブタ	BBI-4000 gel（DB20 製剤及び IPM1 製剤）	適	4.2.3.2-7
	経皮、28 日間（回復 21 日間）	ミニブタ	BBI-4000 gel（IPM1 製剤及び IPM2 製剤）	適	4.2.3.2-8
	経皮、39 週間	ミニブタ	BBI-4000 gel（DB20 製剤）	適	4.2.3.2-9
遺伝毒性試験					
復帰突然変異試験	*in vitro*	*S. typhimurium* 及び *E. coli*	BBI-4000	適	4.2.3.3.1-1
染色体異常試験	*in vitro*	ヒト末梢血リンパ球	BBI-4000	適	4.2.3.3.1-2
小核試験	皮下、単回	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.3.2-1
がん原性試験					
用量設定試験	経皮、13 週間	マウス	BBI-4000 gel（DB20 製剤）	適	4.2.3.4.1-1
	皮下、13 週間	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.4.1-3
がん原性試験	経皮、104 週間	マウス	BBI-4000 gel（IPM1 製剤）	適	4.2.3.4.1-2
	皮下、104 週間	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.4.1-4

表 2.4-5 毒性試験の一覧（2/2）

試験の種類	投与経路、期間	動物種	被験物質	GLP 適用	資料番号
生殖発生毒性試験					
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	皮下 雄：交配 4 週前～剖検前日まで（48～51 日間） 雌：交配 2 週前～妊娠 7 日まで	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.5.1-1
胚・胎児発生に関する試験（用量設定試験）	皮下、妊娠 6～17 日	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.5.2-1
	皮下、妊娠 6～19 日	ウサギ	BBI-4000	適	4.2.3.5.2-3
胚・胎児発生に関する試験（本試験）	皮下、妊娠 6～17 日	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.5.2-2
	皮下、妊娠 6～19 日	ウサギ	BBI-4000	適	4.2.3.5.2-4
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（用量設定試験）	皮下、妊娠 6 日～授乳 10 日	ラット	BBI-4000	非適／参考	4.2.3.5.3-1
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（本試験）	皮下、妊娠 6 日～授乳 20 日	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.5.3-2
新生児を用いた試験	皮下、生後 7～98 日（回復 4 週間）	ラット	BBI-4000	適	4.2.3.5.4-1
局所刺激性試験					
眼刺激性試験	10 分間	ウシ角膜	BBI-4000 gel（IPM1 製剤）	適	4.2.3.6-1
皮膚累積刺激性試験	経皮、7 日間	ウサギ	BBI-4000 gel（IPM1 製剤及び IPM2 製剤）	非適／参考	4.2.3.6-2
その他の毒性試験					
皮膚感作性試験					
皮膚感作性試験	Buehler 法、経皮 感作：3 回 誘発：1 回	モルモット	BBI-4000 gel（DB20 製剤）	適	4.2.3.7.1-1
局所リンパ節試験	LLNA 法、経皮 3 日間	マウス	BBI-4000 gel（IPM2 製剤）	適	4.2.3.7.1-2
不純物の毒性試験					
[redacted]不純物の毒性試験					
反復投与毒性試験	皮下、28 日間	ラット	BBI-4000、BBI-4000-B1 及び BBI-4000-B2	適	4.2.3.7.6-1
復帰突然変異試験	*in vitro*	*S. typhimurium* 及び *E. coli*	BBI-4000-B1	適	4.2.3.7.6-2
	in vitro	*S. typhimurium* 及び *E. coli*	BBI-4000-B2	適	4.2.3.7.6-3
染色体異常試験	*in vitro*	ヒト末梢血リンパ球	BBI-4000-B1	適	4.2.3.7.6-4
	in vitro	ヒト末梢血リンパ球	BBI-4000-B2	適	4.2.3.7.6-5

2.4.4.1　単回投与毒性試験

ラットを用いた単回投与毒性試験（皮下投与：25 及び 50 mg/kg、静脈内投与：1 及び 25 mg/kg）では、BBI-4000 の静脈内投与 25 mg/kg 群で死亡が認められた。皮下投与（25 及び 50 mg/kg）では投与部位でびらん、変色等の変化が認められた。両投与経路で BBI-4000 の抗コリン作用による散瞳が認められた。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

ラットを用いた 28 日間反復皮下投与毒性試験（0、1、5 及び 10 mg/kg/day）では、BBI-4000 の抗コリン作用による散瞳が認められた。投与部位では痂皮及び変色が認められ、病理組織学的検査では筋変性／再生等の炎症性所見が認められた。最高用量の 10 mg/kg/day 群では、投与部位の炎症と関連した白血球数、フィブリノーゲン、AST、ALT 等の高値が認められた。これらの所見は、14 日間の休薬により回復又は回復傾向を示した。無毒性量は雌雄ともに 5 mg/kg/day と推定された。

ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性試験（0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg/day）では、BBI-4000 の薬理作用に起因すると考えられる死亡が 1.5 mg/kg/day 群（雄 1 例、雌 2 例）及び 5 mg/kg/day 群（雄 1 例）で認められた。死亡動物の主な所見として、喘ぎ呼吸、口腔及び咽頭内に食餌あるいは床敷が認められた。本事象は他の抗コリン薬（アクリジニウム臭化物）でも認められており [12]、BBI-4000 の薬理作用（抗コリン作用）によって唾液分泌が減少し、摂取した食餌や床敷の嚥下が困難になった結果、気道閉塞を引き起こした可能性が考えられた。BBI-4000 投与群の全例で抗コリン作用による散瞳が認められた。病理組織学的検査では筋線維の変性／壊死が媒体対照群、1.5 及び 5 mg/kg/day 群で認められた。また、血液学的検査で認められた白血球数及びリンパ球数の増加は投与局所の炎症と関連した変化と考えられた。無毒性量は雌雄ともに 0.5 mg/kg/day と推定された。

ミニブタを用いた 28 日間反復経皮投与毒性試験（DB20 製剤、0、32 及び 66 mg/kg/day）では、投与部位に軽微な紅斑が認められたが、14 日間の休薬により回復した。他に毒性所見は認められなかった。無毒性量は雌雄ともに 66 mg/kg/day と推定された。

ミニブタを用いた 39 週間反復経皮投与毒性試験（DB20 製剤、0、16、32 及び 67 mg/kg/day）では、16 mg/kg/day 群の雌 1 例で直腸脱が認められたため安楽死処置した。本事象には BBI-4000 gel 投与との因果関係はないと考えられた。投与部位では、媒体対照群及びすべての BBI-4000 投与群で一過性の紅斑及び浮腫が低頻度で認められた。病理組織学的検査では、投与部位の上皮の肥厚及び潰瘍、腋窩リンパ節の赤血球貪食が、媒体対照群及びすべての BBI-4000 投与群で認められた。上皮の肥厚及び潰瘍は反復投与による上皮の傷害／修復変化であり、腋窩リンパ節の赤血球貪食はこれに伴う二次的な変化と考えられた。ミニブタで認められた皮膚の変化は全身症状を伴わず用量にも依存しなかったことから、毒性学的意義が低い所見と考えられた。無毒性量は雌雄ともに 67 mg/kg/day と推定された。

本薬の開発過程において製剤の処方が変更されたことから、処方変更による毒性評価への影響を検討することを目的にミニブタを用いてブリッジング試験（DB20 製剤、IPM1 製剤及び IPM2 製剤）を実施した。各製剤間で投与部位における局所毒性及び曝露量に差異はみられているものの、いずれの製剤においても全身性の毒性変化は認められなかったことから、製剤の処方変更による毒性評価への影響はないと考えられた。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験で、BBI-4000 に遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.4　がん原性試験

マウスを用いた 104 週間反復経皮投与がん原性試験（IPM1 製剤、0、83、169 及び 355 mg/kg/day）では、169 及び 355 mg/kg/day 群の雄で生存動物数が減少したため、

169 mg/kg/day 群の雄では投与 92 週目に投与を中止し、355 mg/kg/day 群の雄では投与 78 週目に投与を中止して投与 90 週目には剖検した。いずれの用量においても腫瘍の誘発は認められなかった。生存率は、雄の 83、169 及び 355 mg/kg/day 群並びに雌の 355 mg/kg/day 群で対照群に比較して有意に低かった。投与期間中に死亡した動物の剖検では宿便が認められ、更に病理組織学的検査ではそれに関連して腸管の拡張、潰瘍／びらん、粘膜過形成及び炎症性変化が認められた。また、すべての BBI-4000 gel 投与群において雌雄ともに糞便量の減少が認められた。雄では長期的に BBI-4000 の薬理作用によって腸管運動が抑制された結果、宿便や腸管拡張が生じ、全身状態が悪化して死亡に至ったと推察された。病理組織学的検査では、BBI-4000 gel 投与に関連した非腫瘍性病変として直腸の管腔拡張及び投与部位の表皮過形成が認められた。

ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験（雄：0、0.3、0.75 及び 1.5 mg/kg/day、雌：0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg/day）では、BBI-4000 投与群の生存率は媒体対照群と比較して有意な変化はなく、腫瘍の誘発も認められなかった。途中死亡した BBI-4000 投与群の雄の 17 例及び雌の 30 例では上部消化管／気道に食餌が認められ、BBI-4000 の薬理作用による死亡と考えられた。病理組織学的検査では、BBI-4000 投与に関連した非腫瘍性病変として媒体対照群を含むすべての群の投与部位で炎症性変化及び変性が認められ、5 mg/kg/day 群の雌では表皮過形成が認められた。

以上の結果から、BBI-4000 はがん原性を有さないと判断した。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

ラットを用いた皮下投与による受胎能及び着床までの初期胚発生試験（0、1、3 及び 10 mg/kg/day）では、受胎能及び初期胚発生に BBI-4000 の影響は認められなかったことから、無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。

ラットを用いた皮下投与による胚・胎児発生への影響に関する試験（0、1、3 及び 10 mg/kg/day）では、母動物に問題となる毒性は認められず、胚・胎児発生に関しても BBI-4000 に起因する変化は認められなかった。無毒性量は母動物に対して 10 mg/kg/day、胚・胎児発生に対して 10 mg/kg/day と推定された。

ウサギを用いた皮下投与による胚・胎児発生への影響に関する試験（0、0.4、2 及び 10 mg/kg/day）では、0.4 mg/kg/day 群の 1 例を瀕死期殺した。本動物では喘ぎ呼吸、口腔及び食道内に糞便様物質が認められ、マウス及びラットを用いた試験の場合と同じ薬理学的メカニズムに起因する所見と考えられた。胚・胎児発生では BBI-4000 に起因する変化は認められなかった。無毒性量は母動物に対して 0.4 mg/kg/day 未満、胚・胎児発生に対して 10 mg/kg/day と推定された。

ラットを用いた皮下投与による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（0、1、3 及び 6 mg/kg/day）では、母動物に問題となる毒性は認められず、出生児にも BBI-4000 に起因する変化は認められなかった。母動物、生殖能及び出生児に対する無毒性量は 6 mg/kg/day と推定された。

いずれの生殖発生毒性試験においても、親動物で認められた一般毒性への影響は反復投与毒性試験で認められた所見と同質であった。

幼若ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験（0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg/day）では、BBI-4000 に関連した変化は 5 mg/kg/day 群の雌雄の投与部位に限定され、全身毒性は認められなかった。無毒性量は雌雄ともに 5 mg/kg/day と推定された。

2.4.4.6　局所刺激性試験

ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験では、BBI-4000 gel（IPM1 製剤）20%の眼に対する刺激性（不可逆的な影響）が示唆された。

2.4.4.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　皮膚感作性試験

モルモットを用いた皮膚感作性試験（DB20 製剤）及びマウスを用いた局所リンパ節試験（IPM2 製剤）では、BBI-4000 gel による感作性を示唆する所見は認められなかった。

2.4.4.7.2　不純物の毒性試験

原薬中に含まれる可能性のある不純物のうちBBI-4000-B1及びBBI-4000-B2に関しては、ラットを用いた反復皮下投与毒性試験、細菌を用いた復帰突然変異試験及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験を実施した。ラット反復皮下投与毒性試験［0、1 及び 10 mg/kg/day（BBI-4000 及び不純物含 BBI-4000)］では、BBI-4000 の抗コリン作用による散瞳と、被験物質の刺激性による投与局所の炎症性変化がみられたが、その程度に BBI-4000 群及び不純物含 BBI-4000 群の間で差は認められなかった。遺伝毒性試験では、BBI-4000-B1 及び BBI-4000-B2 に遺伝毒性は認められなかった。

製剤中に含まれる可能性のある不純物のうち D2-1 に関しては、BBI-4000 の主代謝物である BBI-4010（D2-1 及び D2-2 からなる）と同一であることから、その安全性は BBI-4000 の毒性試験で評価されており、臨床使用において製剤中に含有される D2-1 の毒性が問題となる可能性は低いと考えられた。

2.4.5　総括及び結論

効力を裏付ける *in vitro* 試験において、BBI-4000 は M1 から M5 のいずれの受容体に対しても結合親和性を有し、M3 に対する結合親和性が最も強かった。また、BBI-4000 はカルバミルコリン誘発のモルモット摘出回腸収縮反応を濃度依存的に阻害した。*In vivo* 試験において、BBI-4000 の 0.1%及び 1%溶液をウサギに点眼することにより、用量に応じた散瞳作用が示された。また、BBI-4000 の 20%溶液をラットの足蹠に塗布することにより、ピロカルピンで誘発された発汗に対する抑制作用が示された。

以上の結果より、BBI-4000 は投与局所でエクリン汗腺に発現する M3 を介したコリン作動性反応を阻害することで、原発性腋窩多汗症の発汗を抑制することが期待された。

種々の酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーター（90 項目）に対する作用の検討において、BBI-4000 は M3 に対して結合活性を示す濃度では、ムスカリン受容体以外の分子に作用しなかった。安全性薬理試験では、中枢神経系及び呼吸器系に対して、BBI-4000 の特記すべき作用は認められなかった。心血管系については、イヌに BBI-4000 を単回静脈内投与することで、抗コリン作用によると考えられる心拍数増加及びその持続時間延長が 0.01 mg/kg 以上で、それに伴う血圧及び心電図項目の変動が 0.1 mg/kg 以上で認められた。一方、ミニブタに BBI-4000 gel 10%（32 mg/kg/day）及び 20%（66 mg/kg/day）を 28 日間反復経皮投与した試験では、心拍数及び心電図への影響は認められなかった。また、*in vitro* 試験において、BBI-4000 は高濃度（100 μmol/L 以上）で hERG I_{Kr} 電流に対して有意な阻害作用を示した。hERG I_{Kr} 電流を阻害しなかった濃度（10 μmol/L）は、ミニブタを用いた反復経皮投与毒性試験（無毒性量）での血漿中 BBI-4000 濃度の最大値

（190 ng/mL）から換算した 317 nmol/L 及び国内臨床試験で BBI-4000 gel 5%を外用塗布したときの BBI-4000 の C_{max} の最大値（7.42 ng/mL、5.3.3.2-1）から換算した 12.4 nmol/L と開きがあることから、外用塗布された BBI-4000 が hERG I_{Kr} 電流を阻害する可能性は低いことが示唆された。

以上の結果より、BBI-4000 は中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対して、臨床上問題となる安全性薬理学的作用を示さないと判断した。

非臨床の薬物動態試験では、正常皮膚ラット及びミニブタに BBI-4000 を単回及び反復経皮投与したときの全身循環血液中への移行はわずかであった（ラットに BBI-4000 を単回経皮投与したときの BBI-4000 の曝露量は単回皮下投与したときの 0.01 倍程度）。一方、角質を除去した損傷皮膚では正常皮膚と比べて BBI-4000 の吸収性が高くなったことから、臨床使用においては、投与部位に損傷がある場合に吸収性が高まる可能性があることに留意する必要があると考えられた。

ラットに単回経皮投与したときの皮膚から循環血液中に吸収された ^{14}C-BBI-4000 由来の放射能は、代謝及び排泄にかかわる組織に分布し、投与後 168 時間では多くの組織で放射能濃度が検出されなかった。ラットに反復皮下投与したときの全身への放射能分布（T/P 比）は一部の組織を除き、単回皮下投与と類似しており、単回皮下投与からの予測を大きく上回る蓄積性は認められなかった。

妊娠ラットに ^{14}C-BBI-4000 を単回皮下投与したときの胎児（全身）の組織中放射能濃度は母体の血漿中放射能濃度より低いことから、BBI-4000 は胎盤を通過するが、胎児への移行性は低いことが考えられた。また、哺育中のラットに単回皮下投与したときの ^{14}C-BBI-4000 由来の放射能は乳汁中に移行することが確認されたが、母動物の血漿とほぼ同様に消失し、乳汁中に残留する可能性は低いと考えられた。

ラットに単回経皮投与したときに、BBI-4000 は薬効標的部位である皮膚中に主に未変化体として存在した。ヒトの *in vitro* 代謝反応試験では、BBI-4000 は CYP2D6 及び CYP3A4 による代謝及び非酵素的に加水分解を受け、主代謝物は BBI-4010 であった。また、ラット生体内で BBI-4000 のキラル反転は起こらないと推察された。臨床薬理試験（BBI-4000-03 試験）及びラット 26 週間反復皮下投与毒性試験の血漿試料を用いて、代謝物の曝露量を比較した結果、ヒトでの BBI-4000 に関連する総曝露量に対する割合が 10%を超え、かつ、ヒトでの曝露量がラットの曝露量の 2 倍以上であると推定された代謝物は存在しなかった。以上より、ヒトで認められた BBI-4000 の代謝物について、非臨床安全性試験で評価する必要はないと考えられた。

ラット及びミニブタにおいて、BBI-4000 及び代謝物は、尿及び糞の両経路から同程度に排泄されることが確認された。

BBI-4000 は CYP2D6（Quinidine）及び CYP3A（Testosterone 及び Midazolam）に対して直接阻害を示したものの、BBI-4000 gel 5%をヒトに外用塗布したときの BBI-4000 の C_{max} の最大値（7.42 ng/mL、5.3.3.2-1）は、臨床薬物相互作用試験が必要になると判断される臨床血漿中濃度［CYP2D6 に対する直接阻害：235 ng/mL（Quinidine）、CYP3A に対する直接阻害及び時間依存的阻害：90.6（Testosterone）及び 117 ng/mL（Midazolam）］よりも十分下回っていることから、CYP 阻害作用に起因する薬物相互作用が起こる可能性は低いと考えられた。

BBI-4000 はヒトトランスポーターの OCT1、OCT2 及び MATE1 に対して阻害作用を示したものの、医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン [7]で、臨床薬

物相互作用を検討する対象となっていない OCT1 を除いて、最も強い阻害を示した OCT2 の IC_{50}（4.36 μmol/L）は、BBI-4000 gel 5%をヒトに外用塗布したときの BBI-4000 の C_{max} の最大値（7.42 ng/mL、5.3.3.2-1）から換算した 12.4 nmol/L との間に大きな開きがあることから、BBI-4000 gel 5%を外用塗布したときに OCT2 及び MATE1 を阻害する可能性は低いと考えられた。

ラットを用いた反復皮下投与毒性試験（28 日間及び 26 週間）では、BBI-4000 の抗コリン作用に起因する散瞳が認められた。26 週間反復皮下投与試験では、BBI-4000 の抗コリン作用（唾液分泌抑制作用）に起因すると考えられる死亡例が認められた最低用量（1.5 mg/kg/day）での AUC は、国内臨床試験における臨床曝露量の 19～170 倍であった（表 2.6.6-2）。本事象は他の抗コリン薬（アクリジニウム臭化物）でも認められている [12]。また、本剤の臨床試験で認められた口渇はいずれも軽度であったことから、非臨床毒性試験でのこの問題は臨床上の安全性に関連しないと考えられた。

ヒトと皮膚構造が類似しているミニブタ [13]を用いた 39 週間反復経皮投与毒性試験では、BBI-4000 の局所刺激性に起因すると考えられる変化（一過性の紅斑及び浮腫）が認められたものの、全身症状を伴わず、その変化は用量にも依存せず回復性も確認された。このことから、BBI-4000 の局所刺激性が臨床使用において問題となる可能性は低いと考えられた。

細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験のいずれにおいても、BBI-4000 に遺伝毒性は認められなかった。

マウスでの経皮及びラットでの皮下の 104 週間投与によるがん原性試験では、BBI-4000 投与による腫瘍の誘発は認められなかった。マウスがん原性試験では、BBI-4000 の抗コリン作用（腸管運動抑制作用）に起因すると考えられる死亡例が認められたものの、ラット及びミニブタを用いた反復投与毒性試験では同様の死亡は認められなかったことから、マウスに特有の所見と推察された。更に、国内臨床試験で認められた抗コリン作用によると考えられる有害事象のほとんどが軽度でいずれも回復していることから、この問題は臨床上の安全性に関連しないと考えられた。

生殖発生毒性試験では、初期胚発生、胚・胎児発生及び出生児に対して BBI-4000 投与の影響は認められなかった。また、ラット及びウサギでは親動物の死亡が認められたものの反復投与毒性試験で認められた所見と同質であり、生殖発生に関して臨床使用における懸念はないと考えられた。

また、幼若ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験では、BBI-4000 投与に関連した変化として投与部位皮膚で主に皮筋に単核細胞性の炎症及び変性／壊死が認められたが、回復期間後に消失した。その他全身症状及び生体機能への影響は認められなかったことから、小児での使用に対して懸念すべき問題はないと考えられた。

ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験では、BBI-4000 gel（IPM1 製剤）20%は眼に対する不可逆的な影響を有すると考えられた。したがって、本剤の臨床使用においては眼への混入を避ける等の注意が必要であると考えられた。

モルモットを用いた皮膚感作性試験及びマウスを用いた局所リンパ節試験では、BBI-4000 gel に皮膚感作性は認められなかった。したがって、臨床使用における皮膚感作性の懸念は低いと考えられた。

主たる毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比を表 2.4-6 に示した。BBI-4000 は十分な安全域が得られていることから、臨床での用法・用量により前述の全身毒性が発現する可能性は低いと考えられた。

表 2.4-6 主たる毒性試験における曝露量と臨床曝露量との比

試験		性	無毒性量（mg/kg/day）	AUC（ng·h/mL）	臨床曝露量との比
ラット 26 週間皮下		雄	0.5	116	5.9 a) ／ 52 b)
		雌	0.5	78.9	4.0 a) ／ 36 b)
ミニブタ 39 週間経皮		雄	67	331	17 a) ／ 150 b)
		雌	67	161	8.2 a) ／ 73 b)
マウス 104 週間経皮がん原性		雄	355	228	12 a) ／ 103 b)
		雌	355	1260	64 a) ／ 570 b)
ラット 104 週間皮下がん原性		雄	1.5	489	25 a) ／ 221 b)
		雌	5	1380	70 a) ／ 624 b)
ラット受胎能及び初期胚発生	受胎能	雄	10	8290	421 a) ／ 3751 b)
		雌	10	2410	122 a) ／ 1090 b)
ラット胚・胎児発生	胚・胎児発生	雌	10	3730	189 a) ／ 1688 b)
ウサギ胚・胎児発生	胚・胎児発生	雌	10	6750	343 a) ／ 3054 b)
新生児ラット		雄	5	1780	90 a) ／ 805 b)
		雌	5	1330	68 a) ／ 602 b)

a) 国内臨床試験（BBI-4000-03 試験）で BBI-4000 gel（IPM1 製剤）5%を投与したときの投与 15 日目の AUC_{0-24}（平均値）：19.7 ng·h/mL
b) 国内臨床試験（BBI-4000-08 試験）で BBI-4000 gel（IPM2 製剤）5%を投与したときの投与 2 週目の AUC_{0-24}（平均値）：2.21 ng·h/mL

原薬中に含まれる可能性のある不純物（BBI-4000-B1 及び BBI-4000-B2）の安全性を確認するため、ラットを用いた反復皮下投与毒性試験及び遺伝毒性試験を実施した結果、いずれの試験でも不純物に起因する毒性は認められなかった。また、製剤中に含まれる可能性のある不純物のうち D2-1 は、BBI-4000 の主代謝物と同一であることから、その安全性は BBI-4000 の毒性試験で評価されており、臨床使用において製剤中に含有される D2-1 の毒性が問題となる可能性は低いと考えられた。

BBI-4000 の主代謝物である BBI-4010 は、副次的薬理試験において、カルバミルコリンで誘発されたモルモット摘出回腸の収縮反応を阻害したものの、その IC_{50} は BBI-4000 に比して 1000 倍以上高値であり、抗コリン作用が著しく減弱していることが示された。また、BBI-4010 は検討したヒトの CYP 及びトランスポーターに対して阻害作用を示さなかった。更に、BBI-4000 を用いた非臨床毒性試験における BBI-4010 の曝露量は国内臨床試験における臨床曝露量に比較しておおむね高かったことから、BBI-4010 の安全性は評価されていると考えられた。

以上、BBI-4000 は外用塗布後、薬効標的部位である皮膚中に主に未変化体として存在し、投与局所でエクリン汗腺に発現する M3 を介したコリン作動性反応を阻害することで、原発性腋窩多汗症の発汗を抑制することが期待された。更に、非臨床試験の結果から、BBI-4000 はその代謝物も含めて臨床使用において全身毒性が発現する可能性は非常に低いと考えられた。総じて、BBI-4000 は、原発性腋窩多汗症の外用剤として明らかな治療効果が期待でき、既存治療で問題となる侵襲性及び副作用を回避できる有用な薬剤となり得ることを明らかにした。

2.4.6 引用文献

1) 藤本智子, 横関博雄, 片山一朗, 金田眞理, 室田浩之, 田村直俊ら. 原発性局所多汗症診療ガイドライン. 日本皮膚科学会雑誌. 2015; 125: 1379-1400.
2) 中村元信. 汗腺の発生と構造. MB Derma. 2014; 220: 9-12.
3) Schlereth T, Dieterich M, Birklein F. Hyperhidrosis - Causes and treatment of enhanced sweating. Dtsch Arztebl Int. 2009; 106: 32-7.
4) Wu WM, Buchwald P, Mori N, Ji F, Wu J, Bodor N. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations of the zwitterionic metabolite of a new series of N-substituted soft anticholinergics. Pharm Res. 2005; 22: 2035-44.
5) 薬物動態試験ガイドライン（薬新薬第 6 号平成 3 年 1 月 29 日）
6) 非臨床薬物動態試験ガイドライン（医薬審第 496 号平成 10 年 6 月 26 日）
7) 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（薬生薬審発 0723 第 4 号平成 30 年 7 月 23 日）
8) Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res. 1993; 10: 1093-5.
9) Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA, Sugiyama Y. Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. Pharmacol Ther. 1997; 73:147-71.
10) Peters AM. Expressing glomerular filtration rate in terms of extracellular fluid volume. Nephrol Dial Transplant. 1992; 7: 205-10.
11) Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Intern Med (Chic). 1916;XVII (6_2):863-71.
12) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. TUDORZA® PRESSAIR® (Aclidinium Bromide Inhalation Powder). NDA No.: 202-450. Pharmacology/Toxicology NDA Review and Evaluation. p.71-101. 2011
13) Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ Jr, Frazier KS. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. Vet Pathol. 2012; 49: 344-56.