モイゼルト軟膏 0.3%
モイゼルト軟膏 1%

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

大塚製薬株式会社

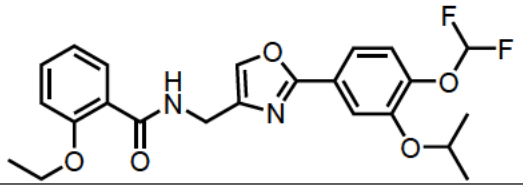
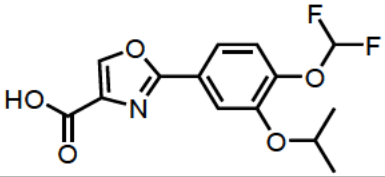
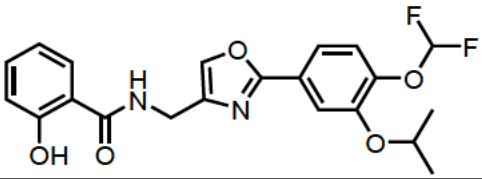
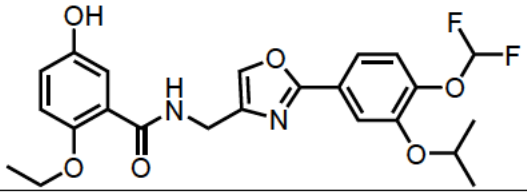
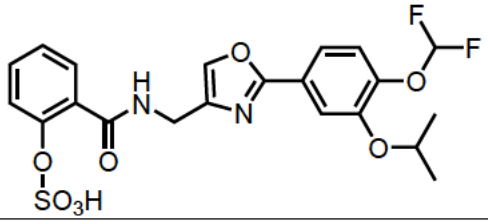
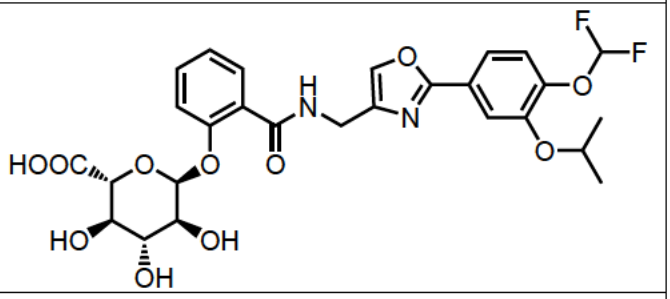
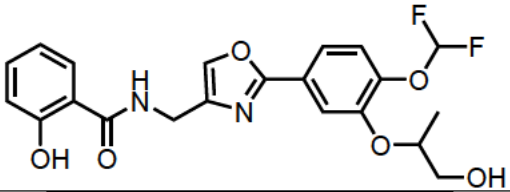
目次

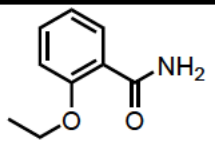
目次 2
略号一覧 4
2.4 非臨床試験の概括評価 7
2.4.1 非臨床試験計画概略 7
2.4.2 薬理試験 7
2.4.2.1 効力を裏付ける薬理試験 9
2.4.2.1.1 PDE4B 選択的阻害作用 9
2.4.2.1.2 細胞内 cAMP 増加作用 9
2.4.2.1.3 サイトカイン産生に及ぼす作用 9
2.4.2.1.4 マウス慢性接触過敏症モデルにおける皮膚炎改善作用 10
2.4.2.1.5 マウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデルにおける皮膚炎改善作用 10
2.4.2.1.6 マウス接触過敏症モデルにおける皮膚炎改善作用 10
2.4.2.2 副次的薬理試験 11
2.4.2.3 安全性薬理試験 11
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.3.1 吸収 11
2.4.3.2 分布 12
2.4.3.3 代謝 12
2.4.3.4 排泄 13
2.4.4 毒性試験 14
2.4.4.1 単回投与毒性試験 14
2.4.4.2 反復投与毒性試験 14
2.4.4.2.1 経皮投与毒性試験 14
2.4.4.2.2 皮下投与毒性試験 15
2.4.4.3 遺伝毒性試験 15
2.4.4.4 がん原性試験 16
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 16
2.4.4.6 幼若動物の毒性試験 17
2.4.4.7 局所刺激性試験 17
2.4.4.8 その他の毒性試験 18
2.4.4.8.1 免疫毒性 18

2.4.4.8.2 製剤中の不純物に関する毒性 18
2.4.5 総括及び結論 18
2.4.5.1 臨床用量における曝露量 20
2.4.6 参考文献 22

略号一覧

略号	省略していない表現
AUC	血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{∞}	投与後（投与開始後）0 時間から無限大時間までの AUC
AUC_{24h}	投与後（投与開始後）0 時間から 24 時間までの AUC
cAMP	サイクリックアデノシン 3′, 5′-一リン酸
C_{max}	最高血漿中濃度
CD_{max}	最大使用条件下の臨床用量（臨床試験 MEDI-MM36-206）
CYP	シトクロム P450
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
IC_{50}	50%抑制濃度
IgE	免疫グロブリン E
IFN-γ	インターフェロン γ
IL	インターロイキン
LPS	リポポリサッカライド
MIP	マクロファージ炎症性蛋白質
MTD	最大耐用量
PBMC	末梢血単核球
PDE	ホスホジエステラーゼ
PKA	プロテインキナーゼ A
S9	ラット肝ホモジネート 9,000g 上清分画
TNF-α	腫瘍壊死因子 α

名称（由来）	構造式
ジファミラスト（JAN） Difamilast（INN） OPA-15406（OPC-271）	
MAP-15484 脱エテンザミド-カルボン酸体 （代謝物）	
MAP-15485 脱 *O*-エチル体 （代謝物）	
MAP-15497 水酸化体 （代謝物）	
MAP-15583 MAP-15485 硫酸抱合体 （代謝物）	
MAP-15585 MAP-15485 グルクロン酸抱合体 （代謝物）	
MAP-15606 MAP-15485 の水酸化体 （代謝物）	
MAP-15487 （不純物）	[redacted]
MAP-15499 （不純物）	[redacted]

OPA-15577 （不純物）	[redacted]
2-Ethoxybenzamide エテンザミド （不純物）	

2.4　非臨床試験の概括評価

ジファミラストは大塚製薬株式会社により創製されたホスホジエステラーゼ（PDE）4B 選択的阻害作用を持つ新規低分子化合物である。PDE4 は，サイクリックアデノシン 3′, 5′-一リン酸（cAMP）を分解することにより細胞の炎症応答を調節する酵素であり，免疫細胞に広く分布することから，喘息，慢性閉塞性肺疾患及びアトピー性皮膚炎等の慢性炎症性疾患の病態に関与することが知られている。実際に Hanifin らは，アトピー性皮膚炎患者の末梢血白血球で PDE 活性が亢進し，細胞内 cAMP 濃度が低下していることを報告している[1]。ジファミラストは，その軟膏製剤等の外用により種々のマウス皮膚炎モデルにおいて皮膚炎改善効果を示したことから，アトピー性皮膚炎等の慢性炎症性皮膚疾患に対して治療効果を示す可能性が考えられた。そこで，ジファミラストの慢性炎症性皮膚疾患の外用治療薬としての可能性を評価する目的で，一連の非臨床薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験を実施した。

2.4.1　非臨床試験計画概略

薬理試験：ジファミラストの薬理作用を評価するために，*in vitro* において PDE4 阻害活性，細胞内 cAMP 濃度増加作用及びサイトカイン産生に及ぼす作用について，*in vivo* においてはマウスの急性及び慢性接触過敏症モデル並びにマウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデルを用いて外用による皮膚炎改善作用について検討した。また副次的薬理試験として，各種受容体に対する作用の検討及び皮膚萎縮作用に関する検討を実施した。加えて，ジファミラストの生体機能への潜在的影響を検討するための安全性薬理試験を実施した。

薬物動態試験：ジファミラストの吸収，分布，代謝，排泄について検討した。単回投与における薬物動態は，臨床適用経路である経皮投与（ラット，ミニブタ）の他に，皮下投与（ラット，イヌ）及び静脈内投与（ラット，イヌ，ミニブタ）により検討した。反復投与時の吸収及び分布は，ラットを用いた経皮投与にて評価した。また，血清（血漿）たん白結合率，血球移行，メラニン結合性，乳汁排泄についても試験を実施した。

毒性試験：ジファミラストの非臨床安全性評価のため，単回及び反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，幼若動物を用いた反復投与毒性試験，局所刺激性試験並びに免疫毒性試験を実施した。また，製剤中不純物の安全性確認のため，不純物を添加したジファミラストを用いて遺伝毒性試験及び一部の反復投与毒性試験を実施した。

2.4.2　薬理試験

PDE は細胞内において環状ヌクレオチドを分解することにより，そのシグナル伝達に基づいて細胞の機能変化を調節する酵素であり，11 種類のアイソザイムからなるファミリーを形成する。環状ヌクレオチドの一つである cAMP は，外部からの刺激により細胞内で産生されるセカンドメッセンジャーとしてプロテインキナーゼ A（PKA）を活性化する。活性化した PKA は種々の転写因子の働きを抑制し，炎症に関連するサイトカインやケモカインの産生を調節する。PDE アイソザイムの一つである PDE4 は，この cAMP を特異的に分解する酵素であり，多くの免疫細胞に存在し，その免疫応答を調節する役割を持つ[2]。また細胞の炎症応答においては 4 つの PDE4 アイソフォーム（PDE4A，PDE4B，PDE4C 及び PDE4D）のうち，PDE4B が最も重要な働きを持つ

ことが報告されている[3]。

ジファミラストの *in vitro* における効力の裏付けとして，リコンビナントヒト PDE を用いて PDE4B 阻害活性とその選択性，培養細胞を用いて細胞内 cAMP 濃度増加作用及び培養末梢血単核球（PBMC）を用いて種々サイトカイン産生に及ぼす作用について評価した。

アトピー性皮膚炎は湿疹及び苔癬化を主病変とする増悪と寛解を繰り返す慢性皮膚疾患であり，その病態形成には皮膚のバリア機能異常，免疫系の異常及びかゆみによる引っ掻きが関与することが知られている。その免疫異常として，アトピー性皮膚炎患者の末梢血白血球で PDE 活性が亢進し，細胞内 cAMP 濃度が低下していることが報告されている[1]。

ジファミラストの *in vivo* における効力の裏付けとして，アトピー性皮膚炎のアレルギー性慢性炎症の側面を反映するマウス慢性接触過敏症モデル[4,5,6]，急性アレルギーの側面を反映するマウス接触過敏症モデル及び引っ掻きにより生じる慢性炎症の側面を反映するマウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデル[7]を用いて，外用による皮膚炎改善作用について検討した。また，既存アトピー性皮膚炎外用治療薬及び他の PDE4 阻害剤との比較から，その効力について評価した。ジファミラストの皮膚炎改善メカニズムの解析として，病変部への炎症性細胞浸潤に及ぼす影響を病理学的に評価するとともに，病変部の各種サイトカイン含量に及ぼす影響について評価した。

ジファミラストの効力を裏付ける主な薬理試験の一覧を表 2.4.2-1 及び表 2.4.2-2 に示した。

表 2.4.2-1　　効力を裏付ける主な試験（in vitro）

主な作用	試験の概要	結果
PDE4B 選択的阻害作用	リコンビナントヒト PDE1～11	ジファミラストは PDE4B に対して最も強い阻害作用を示した。その IC_{50} 値は 0.0112 μmol/L,であり 他の PDE アイソザイムと比較して選択性は 128 倍以上であった（表 2.6.2-1 ）。
細胞内 cAMP 濃度増加作用	U937 細胞 / プロスタグランジン E1 刺激	ジファミラストは 0.01 μmol/L 以上の濃度で細胞内 cAMP 濃度を有意に増加させた（図 2.6.2-1 ）。
サイトカイン産生に及ぼす作用	マウス及びヒト PBMC / LPS 刺激又は抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の共刺激	ジファミラストは LPS 刺激によるマウス PBMC からの TNF-α 産生を，ヒト PBMC からの TNF-α，GM-CSF，MIP-1α 及び MIP-1β 産生を抑制し，IL-6 及び IL-10 産生を促進した（表 2.6.2-4）。また，抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の共刺激によるヒト PBMC からの TNF-α，IL-2，IL-4，IL-5，IL-10，IL-13，IL-22，IFN-γ，GM-CSF 及び RANTES 産生を抑制した。（表 2.6.2-5）

GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；IC_{50} = 50%抑制濃度；IFN-γ = インターフェロン γ；IL = インターロイキン；LPS = リポポリサッカライド；MIP = マクロファージ炎症性蛋白質；RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted；TNF-α = 腫瘍壊死因子 α

表 2.4.2-2　　効力を裏付ける主な試験（in vivo）

主な作用	試験の概要	結果
マウス慢性接触過敏症モデルにおける皮膚炎改善作用	マウス慢性接触過敏症モデル / 被験物質軟膏製剤又は被験物質溶液を病変部皮膚に 1 日 1 回，反復塗布	ジファミラスト軟膏を 4 週間反復塗布した結果，0.03%～3%で用量依存的且つ有意な有効性が認められた。ジファミラスト軟膏 3%の有効性はリンデロン®-V 軟膏 0.12%よりも劣っていたが，プロトピック®軟膏 0.1%よりも優れていた（図 2.6.2-4）。ジファミラスト軟膏は病変部皮膚の CD3 陽性細胞，好中球及び好酸球の浸潤を有意に抑制し，病変部皮膚 MIP-1α 及び MIP-2 含量を有意に低減させた（図 2.6.2-5，図 2.6.2-6）。ジファミラスト 1%（2 週間反復塗布）では，cipamfylline 1%及び crisaborole（1%及び 2%）と比較して有意に高い有効性が認められた（図 2.6.2-9）。
マウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデルにおける皮膚炎改善作用	マウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデル / 被験物質溶液を病変部皮膚に 1 日 1 回，6 週間反復塗布	ジファミラスト（1%及び 3%）は臨床的皮膚スコアを有意に改善した。その効果はタクロリムス 0.1%よりも高いことが示唆された。ベタメタゾン吉草酸エステル 0.1%は皮膚炎を有意に増悪させた（図 2.6.2-10）。またジファミラスト（1%及び 3%）は病変部皮膚の MIP-1α 及び MIP-2 の含有量を有意に低減させた（図 2.6.2-13）。
マウス接触過敏症モデルにおける皮膚炎改善作用	マウス接触過敏症モデル / 被験物質軟膏製剤を病変部皮膚に単回塗布	ジファミラスト軟膏 3%，プロトピック®軟膏 0.1%及びリンデロン®-V 軟膏 0.12%は病変部皮膚の浮腫及び IFN-γ 含有量を有意に低減させた（図 2.6.2-14，図 2.6.2-15）。

2.4.2.1　効力を裏付ける薬理試験

2.4.2.1.1　PDE4B 選択的阻害作用

ジファミラストは全ての PDE4 アイソフォームに対して阻害作用を示した。その 50%抑制濃度（IC_{50}）値は，0.0832 μmol/L（PDE4A），0.0112 μmol/L（PDE4B），0.2493 μmol/L（PDE4C）及び 0.0738 μmol/L（PDE4D）であり，PDE4B に対する阻害作用が最も強力であった。PDE4 以外の PDE アイソザイムに対する IC_{50} 値は PDE4B に対する IC_{50} 値に比べて 128 倍以上高い値であった。

2.4.2.1.2　細胞内 cAMP 増加作用

ジファミラストは 0.01 μmol/L 以上の濃度で，ロリプラムは 0.1 μmol/L 以上の濃度でいずれもプロスタグランジン E1 で刺激された U937 細胞の細胞内 cAMP 濃度を有意に増加させた。ジファミラスト及びロリプラムの cAMP 濃度を対照の 200%まで増加させる有効濃度はそれぞれ 0.009 μmol/L 及び 0.477 μmol/L であった。

2.4.2.1.3　サイトカイン産生に及ぼす作用

ヒト PBMC を用いた検討において，ジファミラストはリポポリサッカライド（LPS）刺激による PBMC からの腫瘍壊死因子 α（TNF-α），顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF），マクロファージ炎症性蛋白質（MIP）-1α及び MIP-1β の産生を抑制し，インターロイキ

ン（IL）-6 及び IL-10 の産生を促進した。また，ジファミラストは抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の共刺激による PBMC からの IL-2，IL-4，IL-5，IL-10，IL-13，IL-22，インターフェロンγ（IFN-γ），GM-CSF，regulated on activation, normal T cell expressed and secreted 及び TNF-α の産生を抑制した。

マウス及びヒト PBMC を用いて，LPS 刺激による TNF-α 産生を指標にジファミラストの効果を他の PDE4 阻害剤と比較したところ，ジファミラストは atizoram，cipamfylline，crisaborole 及びロリプラムと比べて強い抑制作用を示した（無血清条件）。

2.4.2.1.4　　マウス慢性接触過敏症モデルにおける皮膚炎改善作用

マウス慢性接触過敏症モデルを用いて，ジファミラスト軟膏を 1 日 1 回，4 週間局所塗布することにより，その皮膚炎改善作用について検討した。用量反応性の検討では，ジファミラストは 0.03%～3%濃度において耳介肥厚を用量依存的に抑制した。既存アトピー性皮膚炎外用治療薬との比較では，ジファミラスト軟膏 3%の平均耳介厚を指標とした有効性はリンデロン®-V 軟膏 0.12%よりも劣っていたが，プロトピック®軟膏 0.1%よりも優れていた。病変部皮膚のサイトカイン含有量について検討した結果，ジファミラスト軟膏は MIP-1α 及び MIP-2 の含量を有意に低減させた。病変部の炎症性細胞の浸潤と血清免疫グロブリン E（IgE）濃度に及ぼす影響について検討した結果，ジファミラスト軟膏は 1%及び 3%濃度で CD3 陽性細胞と好中球を，3%濃度で好酸球の浸潤を有意に抑制し，1%及び 3%濃度で血清中の総 IgE 濃度及び抗原特異的 IgE 濃度を有意に単調減少させた。

ジファミラストの皮膚炎改善効果に基づく有効性について他の PDE4 阻害剤（atizoram, cipamfylline 及び crisaborole）と比較した。各化合物は 1 日 1 回，2 週間局所塗布した。その結果，ジファミラスト 1%の有効性は cipamfylline 1%及び crisaborole 1%及び 2%と比較して有意に高いものであった。

2.4.2.1.5　　マウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデルにおける皮膚炎改善作用

マウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデルを用いて，ジファミラストの皮膚炎改善効果について検討した。ジファミラスト（1%及び 3%）は 1 日 1 回，6 週間の局所塗布により臨床的皮膚スコア（潰瘍，擦創，びらん，小出血，痂皮などの引っ掻きによる損傷を呈する病変部皮膚の面積に基づく両耳介の皮膚炎の重症度）及び病変部皮膚の MIP-1α 及び MIP-2 含有量を有意に低減させた。ジファミラスト（1%及び 3%）は単回塗布及び反復塗布のいずれにおいても，引っ掻き回数に影響を及ぼさなかった。タクロリムス 0.1%は本モデルの臨床的皮膚スコアを有意に低減させたが，ベタメタゾン吉草酸エステル 0.1%は有意に増加させた。

2.4.2.1.6　　マウス接触過敏症モデルにおける皮膚炎改善作用

皮膚接触過敏症に対するジファミラスト軟膏 3%の効果について，マウス接触過敏症モデルを用いて検討した。ハプテン誘発 30 分後にマウスの耳介に薬物を局所塗布した。ジファミラスト軟膏 3%，プロトピック®軟膏 0.1%及びリンデロン®-V 軟膏 0.12%はいずれも，耳介の浮腫と耳介組織中の IFN-γ 含有量を有意に低減させた。

2.4.2.2　副次的薬理試験

90 種類の受容体，イオンチャンネル及びトランスポーターに対するジファミラストの作用を検討した。ジファミラストが各リガンドの結合に対して 80%を超える阻害を示したのは，アデノシントランスポーター（ヒト）及びモノアミントランスポーター（ウサギ）に対してのみであり，10 μmol/L の濃度での阻害率はそれぞれ 87.59%及び 85.50%であった。

ジファミラストの皮膚萎縮作用について，正常マウスの耳介に被験溶液を 1 日 1 回，1 週間局所塗布することにより検討した。その結果ベタメタゾン吉草酸エステル 0.1%では耳介厚の有意な減少，顕著な表皮菲薄化及び軽微な真皮菲薄化が認められた。一方ジファミラスト（1%及び 3%）では投与期間中に耳介厚に変化はなく，病理学的にも顕著な変化は認められなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

ジファミラストの安全性薬理コアバッテリー試験として，一般症状及び行動に対する作用並びに呼吸及び心血管系に対する作用，ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル電流に対する作用を検討した。また，得られた hERG チャネル電流の抑制について，催不整脈リスクのフォローアップ検討として，心筋活動電位に対する作用試験を実施した。

一般症状及び行動（Irwin 変法による観察）に対する作用は，ラットにジファミラストを皮下投与して観察した。100 及び 200 mg/kg で軟便が，200 mg/kg で流涎がみられた。

呼吸及び心血管系に及ぼす作用については，覚醒下のイヌにジファミラストを皮下投与して検討した。最高用量の 30 mg/kg まで，呼吸及び心血管系パラメータに影響を及ぼさなかった。なお，30 mg/kg 群の 1 例で嘔吐がみられた。

hERG チャネル電流に対する作用では，抑制がみられ，IC_{50} 値は 2.54 μmol/L であった。そのフォローアップ試験として，活動電位に及ぼす影響を，モルモット摘出乳頭筋を用いて検討した。その結果，ジファミラストは 0.2 μmol/L で活動電位パラメータに影響を及ぼさず，1 及び 5 μmol/L では，30%，60%及び 90%再分極時の活動電位持続時間の延長はみられなかった。

2.4.3　薬物動態試験

ジファミラストの吸収，分布，代謝，排泄について検討した。薬物動態試験は，放射性標識体及び非標識体を用いて薬効薬理及び安全性評価に使用された動物種（ラット，イヌ及びミニブタ）において実施した。なお，メラニン結合性の検討は有色ラットで行い，その他は白色ラットを用いた。また，各動物及びヒト由来の生体試料を用いて *in vitro* 試験を実施した。

2.4.3.1　吸収

雌雄ラット及び雄ミニブタにジファミラスト軟膏（0.1%～3%）を単回経皮投与した（ラット：0.3～9 mg/kg，ミニブタ：0.15～1.5 mg/kg）。血漿中ジファミラスト濃度は 24 時間の塗布中に緩やかに増加し，投与開始後 24 時間の拭き取りの後に減衰した。ジファミラストの最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は 3 mg/kg まで用量依存的に増加した。ジファミラスト軟膏 1%を単回経皮投与したときのジファミラストの C_{max} 及び投与開始後 0 時間から無限大時間までの AUC（AUC_{∞}）は，雌ラットのほうが雄ラットより高かった。損傷皮膚の雄ラットにおけるジファミラストの C_{max} 及び AUC_{∞}は，無傷皮膚の雄ラットのそれぞれ 2.0 倍及

び 1.6 倍とやや高かったが，ジファミラスト軟膏 1%を損傷皮膚の雄ミニブタに経皮投与したときの全身曝露量は，無傷皮膚の雄ミニブタと同程度であった。単回経皮投与（無傷皮膚ラット：3 mg/kg，ミニブタ：0.5 mg/kg）における絶対的バイオアベイラビリティはそれぞれ雄ラットで 20.9%，雌ラットで 30.3%，無傷皮膚のミニブタで 4.7%，損傷皮膚のミニブタで 5.4%であった。

雌雄ラット及び雄イヌにジファミラストを単回皮下投与した（ラット：0.3～10 mg/kg，イヌ：0.1～3 mg/kg）。いずれの動物種においても，C_{max} 及び投与後 0 時間から最終測定可能時点までの AUC は投与量の増加と共に増加した。

雌雄ラットに ^{14}C-ジファミラスト軟膏 1%を 3 mg/kg で単回経皮投与した。血中からの放射能の消失は緩慢であり，投与開始後 168 時間でも放射能が検出された。雄ラットに ^{14}C-ジファミラスト軟膏 1%を 3 mg/kg/日で 1 日 1 回，21 日間反復経皮投与したところ，血中放射能濃度は投与開始 13 日目に定常状態に達した。

2.4.3.2　分布

雌雄ラットに ^{14}C-ジファミラスト軟膏 1%を単回経皮投与（3 mg/kg）したところ，投与部位の皮膚内に放射能が長時間残留した。^{14}C-ジファミラストの単回皮下投与（3 mg/kg）では放射能は全身に分布し，血漿と比較して褐色及び白色脂肪組織，副腎，肝臓及び小腸で高い放射能濃度が検出されたが，これらの組織内放射能濃度は，投与後 168 時間にはそれぞれの最高値の 5%未満に減少した。中枢神経系の放射能濃度は，血漿中と比較して特に低かった。雄ラットに ^{14}C-ジファミラスト軟膏 1%を反復経皮投与（3 mg/kg/日，1 日 1 回，21 日間）したところ，ほとんどの組織で，反復経皮投与後の放射能の組織内分布は単回投与後とほぼ同じであった。

有色ラットに ^{14}C-ジファミラストを単回皮下投与（3 mg/kg）したところ，メラニン含有組織における放射能濃度は白色ラットでみられた結果と同様であり，ジファミラスト（及びその代謝物）は，メラニンには容易に結合しないと考えられた。雌雄ラット及び雄イヌにおける ^{14}C-ジファミラスト皮下投与後の血球への放射能の移行率は低かった（ラット：1.3%～10.8%，イヌ：2.59%～5.48%）。マウス，ラット，ウサギ，イヌ，ミニブタ及びヒト血清に対する ^{14}C-ジファミラストの *in vitro* たん白結合率は 99%以上と高値であった。

妊娠ラットにおける胎児内放射能濃度は，母動物の血中濃度の 1.45～3.16 倍であり，胎盤通過性が認められた。

2.4.3.3　代謝

ジファミラストの代謝を *in vitro* 及び *in vivo* で検討したところ，ジファミラストの主要な代謝反応は，MAP-15484 を生成する加水分解反応（脱エテンザミド反応及び脱離体の酸化），MAP-15485 を生成する脱 *O*-エチル化反応及び MAP-15497 を生成する水酸化反応であった。代謝物プロファイルには若干の種差（図 2.4.3.3-1）が認められたが，ヒトでの代謝物はいずれかの動物種において認められた。シトクロム P450（CYP）分子種を特定する *in vitro* 代謝試験において，CYP1A2 及び CYP3A4 がジファミラストの代謝に関与していた。

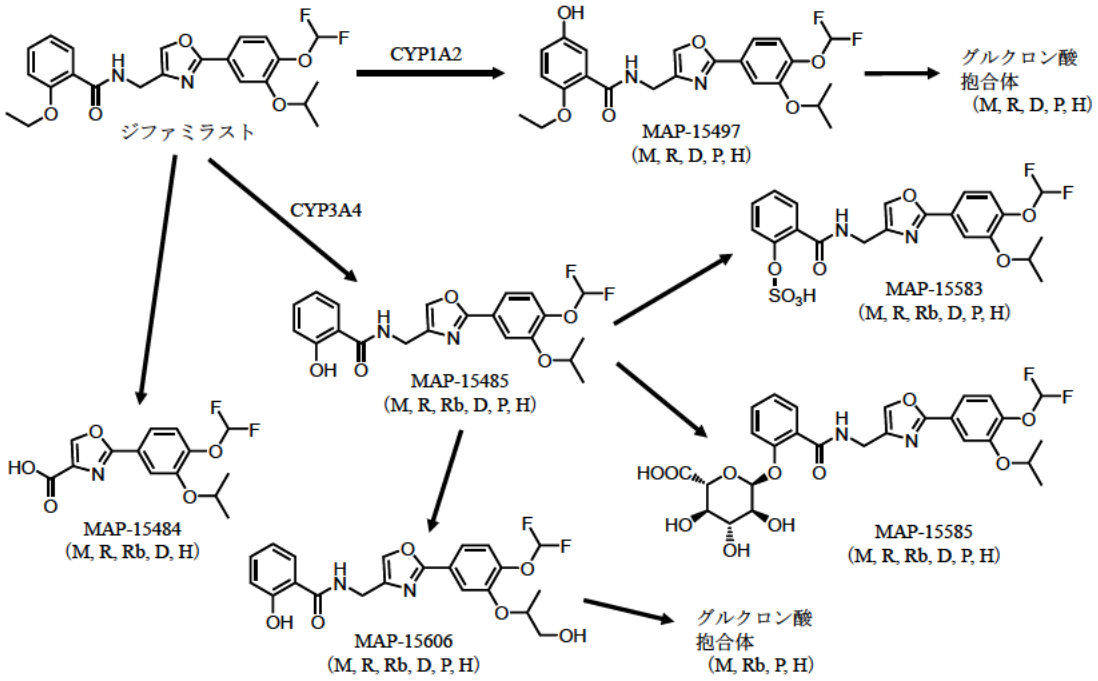


図 2.4.3.3-1　　ジファミラストの推定代謝経路

M：マウス，R：ラット，Rb：ウサギ，D：イヌ，P：ミニブタ，H：ヒト

ジファミラスト又は ^{14}C-ジファミラストを経皮又は皮下投与された動物の血漿中代謝物を検討した結果，MAP-15484，MAP-15485，MAP-15497，MAP-15583（MAP-15485 硫酸抱合体），MAP-15585（MAP-15485 グルクロン酸抱合体）及び MAP-15606 が同定され，MAP-15497 のグルクロン酸抱合体及び MAP-15606 のグルクロン酸抱合体も確認された。これ以外に検出された未同定代謝物の多くはジファミラスト代謝物のグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体であった。

ラットに ^{14}C-ジファミラスト軟膏 1%を経皮投与したところ，投与部位の皮膚における曝露のほとんどは未変化体であった。^{14}C-ジファミラストを経皮又は皮下投与されたラット又は皮下投与された雄イヌにおいて，尿中に未変化体は検出されず，ラットでは MAP-15484，MAP-15485 及びそれらのグルクロン酸抱合体が，イヌでは MAP-15484 が主に検出された。ラット胆汁中では MAP-15585 が最も多かった。ラット糞中では MAP-15485，イヌ糞中では MAP-15485 及び MAP-15497 が多く，他に MAP-15484 及び複数の未同定代謝物も検出された。

2.4.3.4　　排泄

雌雄ラットに ^{14}C-ジファミラスト軟膏 1%を 3 mg/kg で単回経皮投与したところ，投与開始後 24 時間の拭き取りで投与量の約 2/3 の放射能が回収された一方，体内に移行した放射能の尿，糞及び呼気中への排泄が認められた。投与開始後 168 時間までの尿，糞及び呼気中への累積排泄量は，それぞれ投与量の 3.64%～4.86%，16.93%～24.96%，0.28%～0.40%であった。

雌雄ラット及び雄イヌに ^{14}C-ジファミラストを 3 mg/kg で単回皮下投与したとき，投与後 168 時間以内の尿及び糞中への放射能排泄率は，ラットで投与量の 11.42%～12.37%及び 87.10%～

94.91%，イヌで 1.47%及び 100.81%であり，投与された放射能のほとんどが体外に排泄された。雌雄ラットへの投与後 72 時間以内における放射能の胆汁中排泄率は，投与量の 64.59%～71.44%であり，腸肝循環が認められた。ジファミラストの主要排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であった。

授乳ラットに ^{14}C-ジファミラストを 3 mg/kg で単回皮下投与したとき，乳汁中には血液中より高い放射能濃度が認められ，母獣体内のジファミラスト及びその由来成分の一部は乳汁へ移行すると考えられた。

2.4.4 毒性試験

ジファミラストの非臨床安全性評価のため，単回投与毒性（ラット及びイヌ），反復投与毒性（ラット，ウサギ，イヌ及びミニブタ），遺伝毒性（*in vitro* 及び *in vivo*），がん原性（マウス及びラット），生殖発生毒性（ラット及びウサギ），幼若動物を用いた反復投与毒性（ラット），皮膚刺激性（ウサギ），眼刺激性（ウサギ），皮膚感作性（モルモット），光毒性（*in vitro* 及び *in vivo*），皮膚光感作性（モルモット），免疫毒性（ラット）に関する試験を実施した。また，製剤中不純物の安全性確認のため，不純物を添加したジファミラストを用いて遺伝毒性試験（*in vitro* 及び *in vivo*）及び一部の反復投与毒性試験（イヌ及びミニブタ）を実施した。重要な試験は全て Good Laboratory Practice に適用して実施した。

各毒性試験のトキシコキネティクス評価に用いた動物種（マウス，ラット，ウサギ，イヌ及びミニブタ）における血漿中ジファミラスト及び代謝物（MAP-15484，MAP-15485 及び MAP-15497）の濃度測定法はいずれもガイドラインに従ってバリデーションを実施し，各評価項目の判定基準を満たした。また，バリデーションの一環として，毒性試験の残余試料を用いて incurred sample reanalysis（マウス，ラット，イヌ及びミニブタ）を実施したところ，どの動物種も判定基準以内であった。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

ラット及びイヌに投与可能最大量である 400 mg/kg まで単回皮下投与したところ，概略の致死量は，雌雄ラットで 400 mg/kg を超え，雄イヌで 200 mg/kg 未満，雌イヌで 200～400 mg/kg であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 経皮投与毒性試験

ラットを用いた 4，13 及び 26 週間試験では，体重増加抑制及び/又は摂餌量減少がみられたが，最大耐用量（MTD）条件下（体表面積の 3%に 3%軟膏を塗布）でも投与期間の延長による増悪はみられず，標的となる臓器毒性及び投与部位における局所毒性も認められなかった。26 週間反復経皮投与毒性試験における無毒性量は，体重増加抑制がみられなかった，雌雄ともに 0.3%軟膏（雄：0.88 mg/kg/日，雌：1.07 mg/kg/日）と推定された。

損傷又は無傷皮膚のミニブタを用いた 4 週間投与試験では，投与可能最大条件下（体表面積の 10%に 3%軟膏塗布）においても，全身毒性はみられず，投与部位についても損傷の有無に関

わらず影響はみられなかった。無傷皮膚のミニブタを用いた 13 及び 39 週間投与試験でも，投与可能最大条件下で全身及び局所毒性はみられず，39 週間投与試験における無毒性量は雌雄ともに 3%軟膏（雄：8.1 mg/kg/日，雌：8.3 mg/kg/日）と推定された。

ウサギを用いた 4 週間投与試験では，投与可能最大条件下（体表面積の 10%に 3%軟膏を塗布）においても，被験物質投与に関連した明らかな累積皮膚刺激性はみられなかったが，無毒性量は，摂餌量及び体重減少がみられなかった，雄で 0.1%軟膏，雌で 0.3%軟膏（雄：0.44 mg/kg/日，雌：1.32 mg/kg/日）と推定された。

ラット 26 週間，ミニブタ 39 週間及びウサギ 4 週間投与試験の無毒性量と最大使用条件下の臨床用量（臨床試験 MEDI-MM36-206）（CD_{max}）における曝露量［資料番号 5.3.3.2-02］の比較は 2.4.5.1 で述べる。

2.4.4.2.2　皮下投与毒性試験

ラットを用いた 4 週間投与試験では，主な毒性変化として，10 及び 100 mg/kg/日では体重減少及び/又は体重増加抑制が，100 mg/kg/日では腸管及び腸間膜動脈に毒性変化がみられ，無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/日と推定された。

イヌを用いた 4 及び 13 週間投与試験では，嘔吐の発現及び体重への影響を考慮して雌雄ともに，各々3 及び 1 mg/kg/日と推定された。一方，39 週間投与試験でもごく軽度な体重増加抑制と摂餌量低下が最高用量である 3 mg/kg/日でみられたが，投与期間を通じて体重は増加傾向にあり，加えて被験物質投与に起因した死亡及び一般状態の異常はなく，血液学的検査，血液生化学検査，尿検査，心電図，体温，眼科検査，器官重量，剖検及び病理組織学的検査においても毒性変化はみられなかったことを踏まえ，無毒性量は雌雄ともに 3 mg/kg/日と推定された。

ラット 4 週間及びイヌ 39 週間投与試験の無毒性量と CD_{max} における曝露量の比較は 2.4.5.1 で述べる。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

ジファミラストは細菌（ネズミチフス菌）を用いた復帰突然変異試験で，ラット肝ホモジネート 9,000g 上清分画（S9）の有無を問わず 5040 µg/plate まで変異原性は確認されなかった。マウスリンパ腫細胞を用いた前進突然変異試験では，S9 非存在下の 1000 µmol/L までの 3 時間曝露，S9 存在下の 100 µmol/L までの 3 時間曝露及び S9 非存在下の 30 µmol/L までの 24 時間曝露で，変異原性はみられなかった。

骨髄小核試験では，投与可能最大量である 400 mg/kg を高用量に設定した。評価した高用量 400 mg/kg/日を 2 日間皮下投与しても，雄ラットで骨髄幼若赤血球中の小核の出現頻度は増加しなかった。

ジファミラストの曝露量については，別試験において，雄のラットにジファミラストを 100 mg/kg/日の用量で単回皮下投与した結果，投与後 0 時間から投与 24 時間までの AUC（AUC_{24h}）は 56750 ng· h/mL であった。

2.4.4.4　　がん原性試験

マウス及びラット 104 週間のがん原性試験において，マウスでは投与可能最大量（体表面積の 10%に 3%軟膏を塗布／雄：51.79 mg/kg/日，雌：56.77 mg/kg/日）まで，ラットでは MTD（体表面積の 3%に 3%軟膏を塗布／雄：8.20 mg/kg/日，雌：10.20 mg/kg/日）まで経皮投与したが，対照群に比べ発生頻度が有意に増加した腫瘍はみられず，ジファミラストはがん原性を示さないと考えられた。

ジファミラスト 3%軟膏投与群の投与 26 週時の曝露量（AUC_{24h}）は，表 2.4.4-1 に示したように，CD_{max} の曝露量に比べて，マウスは 3.7～4.7 倍，ラットは 3.7～10.2 倍であった。主要代謝物についても，少なくとも 1 種の動物種で，臨床曝露量の 0.68～16 倍であり，概ね適切な曝露条件で試験が行われたものと考えられた。したがって，ジファミラストが臨床使用において発がん性を示す可能性は低いと判断された。

表 2.4.4-1　　がん原性試験の最高用量と最大使用条件下の臨床用量（CD_{max}）における曝露量（AUC_{24h}）比較

測定対象	CD_{max}	マウス		ラット	
		雄	雌	雄	雌
ジファミラスト	237	1106 (4.7)	867.6 (3.7)	873.0 (3.7)	2419 (10)
MAP-15484	69.7	223.3 (3.2)	363.3 (5.2)	356.5 (5.1)	618.4 (8.9)
MAP-15485	141	93.02 (0.66)	77.31 (0.55)	1124 (8.0)	2197 (16)
MAP-15497	163	110.3 (0.68)	101.5 (0.62)	12.43 (0.076)	65.03 (0.40)

括弧内の数値は CD_{max}［資料番号 5.3.3.2-02］の曝露量に対する倍率
単位：ng·h/mL

2.4.4.5　　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：ラットに 1，10 及び 100 mg/kg/日を反復皮下投与し，各群の雌雄で交配させた。100 mg/kg/日で，雌に不規則な発情周期と交尾率及び受胎率の低下が認められ，雄に精子運動性低下，精子形態異常率増加及び精子数減少が認められた。初期胚発生に対する影響としては，100 mg/kg/日を投与した雄と交配した未処置の雌で着床前死亡率の増加傾向が認められた。一般毒性の無毒性量は雄親動物で 1 mg/kg/日，雌親動物で 10 mg/kg/日と推定された。生殖及び初期胚発生の無毒性量は 10 mg/kg/日と推定された。無毒性量 10 mg/kg/日における AUC_{24h}（雄：4699 ng· h/mL，雌：7179 ng· h/mL）は，CD_{max} の曝露量（237 ng·h/mL）と比較して 19.8 倍（雄）及び 30.3 倍（雌）であった。

胚・胎児発生に関する試験：ラットに 1，10 及び 100 mg/kg/日を反復皮下投与して検討した。胚・胎児発生については，100 mg/kg/日で着床後死亡率の増加，胎児体重減少，骨化遅延及び内臓異常の増加が認められた。無毒性量は，母動物の一般毒性では 1 mg/kg/日，母動物の生殖（妊

娠の維持）及び胚・胎児発生では 10 mg/kg/日と推定された。無毒性量 10 mg/kg/日における AUC_{24h}（7179 ng· h/mL）は，CD_{max} の曝露量（237 ng·h/mL）と比較して 30.3 倍であった。

ウサギに 0.1，0.3，1 及び 3 mg/kg/日を反復皮下投与して検討した。母動物では流産（2 例）が 3 mg/kg/日で認められた。胎児では，骨格変異の増加が 3 mg/kg で認められた。無毒性量は，母動物の一般毒性では 0.3 mg/kg/日，母動物の生殖（妊娠の維持）及び胚・胎児発生では 1 mg/kg/日と推定された。無毒性量 1 mg/kg/日における AUC_{24h}（700.3 ng· h/mL）は，CD_{max} の曝露量（237 ng·h/mL）と比較して 3.0 倍であった。

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：ラットに 0.1，0.3 及び 3 mg/kg/日を反復皮下投与して検討した。母体の機能，出生児の発達及び胚に関しては，影響は認められなかった。無毒性量は，母動物の一般毒性では 0.3 mg/kg/日，母動物の生殖機能，児の出生前及び出生後の発生及び胚の着床及び生存率では 3 mg/kg/日と推定された。無毒性量 3 mg/kg/日における AUC_{24h}（3002 ng· h/mL）は，CD_{max} の曝露量（237 ng·h/mL）と比較して 12.7 倍であった。

2.4.4.6　幼若動物の毒性試験

幼若ラットを用いた 8 週間反復経皮投与毒性試験では，生後 25 日齢のラットに MTD 条件（体表面積の 10%に 3%軟膏を塗布）で投与し，体重増加抑制又は摂餌量減少がみられたが，幼若動物に特異的な毒性は認められなかった。無毒性量は，体重に影響がみられなかった，雄で 3%軟膏，雌で 0.3%軟膏（雄：38.52 mg/kg/日，雌：4.23 mg/kg/日）と推定された。無毒性量における AUC_{24h}（雄：731.8 ng· h/mL，雌：248.6 ng· h/mL）は，CD_{max} の曝露量（237 ng·h/mL）と比較して 3.1 倍（雄）及び 1.0 倍（雌）であった。

新生児ラットを用いた 10 週間反復皮下投与毒性試験では，生後 4 日齢のラットに 1，3 及び 10 mg/kg/日を反復皮下投与した結果，体重増加抑制，新生児期の低体重に起因する二次的な変化だと考えられる脳重量の減少が雌雄の 10 mg/kg/日で認められたが，中枢神経系の機能，並びに脳の形態及び病理組織学的検査で異常は認められなかった。10 mg/kg/日における AUC_{24h}（雄：7347 ng·h/mL，雌：10240 ng·h/mL）は，CD_{max} の曝露量（237 ng·h/mL）と比較して 31 倍（雄）及び 43 倍（雌）であった。

2.4.4.7　局所刺激性試験

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験では，0%，0.1%，0.3%，1%及び 3%軟膏は弱い刺激性を示した。苛酷条件保存品を用いてウサギで実施した皮膚一次刺激性試験では，0%，0.1%，0.3%，1%及び 3%軟膏は弱い刺激性を示した。また，ウサギを用いた眼一次刺激試験では，0%，0.1%，0.3%，1%及び 3%軟膏は刺激性を示さなかった。

モルモットを用いた皮膚感作性試験では，Maximization Test で評価した結果，0%，0.1%，0.3%，1%及び 3%軟膏は感作性を示さなかった。

細菌を用いた光復帰突然変異試験では，5000 μg/plate まで光遺伝毒性を示さなかった。BALB/3T3 細胞を用いた *in vitro* 光細胞毒性試験では，200 μg/mL まで光細胞毒性を示さなかった。モルモットを用いた光毒性試験では，0%，0.1%，0.3%，1%及び 3%軟膏は光毒性を示さなかった。

モルモットを用いた皮膚光感作性試験では，Adjuvant and Strip 法で評価した結果，0%，0.1%，

0.3%，1%及び3%軟膏は光感作性を示さなかった。

2.4.4.8　その他の毒性試験

2.4.4.8.1　免疫毒性

ラットに1，3及び10 mg/kg/日の用量で4週間投与し，ヒツジ赤血球の免疫後の免疫グロブリンM抗体反応を評価したが，免疫毒性はなかった。

2.4.4.8.2　製剤中の不純物に関する毒性

最終製剤の不純物に関する医薬品規制調和国際会議ガイドライン（ICH-Q3B）に基づいて安全性を確認する必要がある閾値より高い規格値が設定された。規格値は，軟膏中に含まれるジファミラストに対する不純物規格濃度を指し，1%軟膏に関し，MAP-15487が1.0%以下，MAP-15499が1.0%以下，OPA-15577が0.5%以下，2-Ethoxybenzamide（エテンザミド）が0.5%以下，その他が0.2%以下で合計が5%以下であった。0.3%軟膏に関し，MAP-15487が1.0%以下，MAP-15499が1.0%以下，その他が0.5%以下で合計が5%以下であった。

MAP-15487，MAP-15499及びOPA-15577について，安全性（これらの不純物を添加したジファミラスト軟膏の変異原性，遺伝毒性，ミニブタ13週間反復経皮投与毒性及びイヌ13週間反復皮下投与毒性）を評価した結果，遺伝子突然変異誘発性及び染色体損傷誘導性はいずれも陰性であった。反復経皮毒性試験においても，不純物と関連すると考えられる毒性発現及び増悪はなかった。また，エテンザミドについては，公表論文[8,9,10]の結果からジファミラスト軟膏の臨床推奨用量での使用に問題ないと判断した。

2.4.5　総括及び結論

【薬理試験】

効力を裏付ける薬理試験：リコンビナントヒトPDEを用いた試験において，ジファミラストはPDE4，特にPDE4Bに対して選択的な阻害作用を示した。またU937細胞を用いた検討では，ジファミラストは細胞内cAMP濃度を増加させた。ヒトPBMCを用いた検討では，ジファミラストはTNF-α，IFN-γ及びIL-4などのサイトカインの産生を抑制した。マウス及びヒトPBMCを用いてTNF-α産生抑制を指標にジファミラストの効果を他のPDE4阻害剤と比較したところ，ジファミラストはatizoram, cipamfylline及びcrisaborole に比べて強い作用を示した。

マウス慢性接触過敏症モデルにおいて，ジファミラスト軟膏（0.03%から3%の濃度）は4週間の反復塗布により用量依存的な耳介肥厚改善効果を示した。このジファミラスト軟膏3%の効果はリンデロン®-V軟膏0.12%よりも劣っていたが，プロトピック®軟膏0.1%よりも優れていた。また，ジファミラストの皮膚炎改善効果は，過去にアトピー性皮膚炎患者を対象とした治験において外用により有意な皮膚症状改善作用を示したcipamfylline[11]及び米国にてアトピー性皮膚炎の外用治療薬として販売されているcrisaborole[12]と比較して有意に高いものであった。本モデルにおけるジファミラストの皮膚炎改善のメカニズムを検討したところ，病変部へのCD3陽性細胞，好中球及び好酸球の浸潤の有意な抑制，病変部のMIP-1α及びMIP-2含量の有意な低減が認

められたことから，ジファミラストの皮膚炎改善効果は炎症性細胞浸潤の抑制やケモカインの産生抑制に起因すると考えられる。

マウスの引っ掻きによる慢性皮膚炎モデルを用いた検討では，ジファミラスト（1%及び 3%）は 6 週間の局所塗布により，臨床的皮膚スコアを有意に改善した。このジファミラストの皮膚症状改善効果はタクロリムス 0.1%に勝ることが示唆された。

マウス皮膚接触過敏症モデルを用いた検討では，ジファミラスト軟膏 3%はプロトピック®軟膏 0.1%及びリンデロン®-V 軟膏 0.12%と同様に外用により耳介の浮腫と耳介組織中の IFN-γ 含有量を有意に低減させた。

これらの一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験において，PDE4B 選択的阻害作用を示すジファミラストはヒト PBMC の炎症応答を抑制すると同時に，外用によりマウスの急性及び慢性アレルギー性皮膚炎及び引っ掻きによる慢性皮膚炎を改善することから，アトピー性皮膚炎等の慢性炎症性皮膚疾患に対して治療効果を示す可能性が示唆された。

副次的薬理試験：90 種類の受容体，イオンチャンネル及びトランスポーターに対するジファミラストの作用を検討した結果，ジファミラストが 10 μmol/L の濃度でリガンドの結合に対して 80%を超える阻害を示したのは，アデノシントランスポーター（ヒト）及びモノアミントランスポーター（ウサギ）であった。

ジファミラストはマウス耳介への 1 週間の反復塗布（ベタメタゾン吉草酸エステル 0.1%が皮膚萎縮作用を示す条件）で皮膚萎縮作用を示さなかった。

安全性薬理試験：安全性薬理試験では，ジファミラストの一般症状及び行動への影響はラットを用いて，呼吸及び心血管系への影響はイヌを用いて評価し，特筆すべき作用はみられなかった。イヌに 30 mg/kg 皮下投与時のジファミラストの C_{max} は 1409 ng/mL であり，この値は，CD_{max} 適用時での定常状態の C_{max}（Day15 平均値=16.9 ng/mL，37.9 nmol/L，資料番号 5.3.3.2-01）の約 83 倍であった。一方，*in vitro* では hERG チャネル電流に対して抑制作用を示し，その IC_{50} 値は 2.54 μmol/L であった。そこで，フォローアップ試験としてモルモット摘出乳頭筋における活動電位に及ぼす影響を検討したところ，5 μmol/L まで再分極時の活動電位持続時間の延長はみられなかった。

【薬物動態試験】

ジファミラストの薬物動態試験は，薬理試験及び毒性試験で使用した動物種及び *in vitro* 試験で評価した。ジファミラスト軟膏を経皮投与したところ，体内に移行した放射能の大部分が投与部位の皮膚に分布し，一部が血中に移行した。投与部位の皮膚での曝露の大部分が未変化体であった。血中に移行した放射能は全身に分布し，組織内濃度は多くの組織で血中より高かったが，投与後 168 時間までには大部分が消失した。ジファミラスト（及びその代謝物）のメラニン結合性は低かった。*In vitro* たん白結合率はいずれの動物種でもヒトと同様に高く（99%以上），種差は認められなかった。ジファミラストは主に CYP1A2 及び CYP3A4 により代謝され，生成した代謝物はさらに抱合化された。ヒトで確認された代謝物は動物でも認められたことから，毒性試験で使用した動物種はジファミラスト及び代謝物の安全性評価に適切であったと考えられた。また，胎盤通過性及び乳汁排泄が認められた。主排泄経路は胆汁を介した糞中への排泄であった。

【毒性試験】

反復投与毒性試験では，臨床適用経路である経皮投与により，ラット及びミニブタを用いて毒性を評価した結果，ラット 26 週間投与試験における無毒性量は，体重増加抑制がみられなかった，雌雄ともに 0.3%軟膏（雄：0.88 mg/kg/日，雌：1.07 mg/kg/日）と推定されたが，最大耐用量条件下（体表面積の 3%に 3%軟膏を塗布）でも，標的となる臓器毒性及び投与部位における局所毒性はみられなかった。ミニブタ 39 週間投与試験では投与可能最大条件下（体表面積の 10%に 3%軟膏を塗布）でも，局所毒性及び全身毒性はみられず，無毒性量は雄が 8.1 mg/kg/日，雌が 8.3 mg/kg/日と推定された。加えて，ウサギに 4 週間反復経皮投与した結果，無毒性量は体重減少がみられなかった，雄で 0.1%軟膏，雌で 0.3%軟膏（雄：0.44 mg/kg/日，雌：1.32 mg/kg/日）と推定されたが，投与可能最大条件下（体表面積の 10%に 3%軟膏を塗布）でも，被験物質投与による累積刺激性はみられなかった。経皮投与よりも高曝露条件となる皮下投与により，イヌを用いて毒性を評価した結果，39 週間投与試験における無毒性量は，ごく軽度な体重増加抑制と摂餌量低下がみられた以外に被験物質投与の明らかな影響はみられず，雌雄ともに最高用量である 3 mg/kg/日と推定された。加えて，齧歯類における毒性プロファイルを明らかにするため，ラットに 4 週間反復皮下投与した結果，主な毒性変化として 10 及び 100 mg/kg/日で体重減少及び/又は体重増加抑制が，100 mg/kg/日では本薬の過剰な薬理作用発現により腸管及び腸間膜動脈に毒性変化がみられたことから，無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/日と推定された。

遺伝毒性試験（*in vitro* 及び *in vivo*）において，ジファミラストは遺伝毒性を示さなかった。

がん原性試験（マウス及びラット）において，マウスでは投与可能最大量まで，ラットでは最大耐用量まで経皮投与したが，対照群に比べ発生頻度が有意に増加した腫瘍はみられず，ジファミラストはがん原性を示さないと判断され，臨床使用において発がん性を示す可能性は低いと判断された。

生殖発生毒性に関し，受胎能及び初期胚発生に関する試験（ラット），胚・胎児発生試験（ラット及びウサギ），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（ラット）を皮下投与により実施した。ラット及びウサギの母獣に反復投与毒性でみられた体重減少がみられた。受胎能試験では不規則な発情周期，交尾率と受胎率の低下が，ラットの胚・胎児発生試験では内臓異常（心室中隔膜性部欠損）の増加が，ウサギの胚・胎児発生試験では骨格変異（腰椎過剰の増加及び完全過剰肋骨の増加傾向）がみられた。したがって，妊婦又は妊娠している可能性のある女性には，投与しないことが望ましい。また，使用する場合には，広範囲にわたっての使用は避けるべきと考えられる。

幼若動物（ラット）を用いた毒性試験では，成獣と比べて，幼若動物に特異的な毒性は認められず，新生児においても中枢神経系の機能，並びに脳の形態及び病理組織学的検査で異常は認められなかった。

局所毒性に関し，ジファミラストは白色ワセリンと同等の弱い刺激性を示し，感作性，光毒性及び光感作性はなかった。また，免疫毒性はなく，製剤中不純物についても安全性に懸念はなかった。

2.4.5.1　臨床用量における曝露量

CD_{max} のジファミラスト及びヒト主要代謝物（総曝露量の 10%を超える代謝物）の曝露量と各動物種を用いた反復投与毒性試験の無毒性量における曝露量を表 2.4.5-1 に示した。

CD_{max} の曝露量と比較して，各動物種を用いた反復経皮投与毒性試験の無毒性量におけるジファミラストの曝露量は，ラットでは雄が 0.39 倍，雌が 1.1 倍，ウサギでは雄が 0.49 倍，雌が 2.3 倍であったが，無毒性量より高い用量でみられた主な毒性兆候は体重への影響のみであった。ミニブタでは，投与可能最大量においても CD_{max} 適用時の曝露には達しなかった。ヒト主要代謝物についても CD_{max} 適用時の曝露量に達していない代謝物が各試験でみられたが，イヌ反復皮下投与毒性試験では，ジファミラスト及び代謝物ともに CD_{max} 適用時の曝露を上回っていた。

したがって，反復投与毒性試験でみられた毒性兆候が，ジファミラストの臨床使用において，望ましくない作用として発現する可能性は低いと推察された。

表 2.4.5-1　　反復投与毒性試験の無毒性量と最大使用条件下の臨床用量（CD_{max}）における曝露量（AUC_{24h}）比較

測定対象	CD_{max}	ラット 26 週間経皮		ミニブタ 39 週間経皮		ウサギ 4 週間経皮	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
ジファミラスト	237	92.79 (0.39)	267.0 (1.1)	90.24 (0.38)	71.32 (0.30)	116.1 (0.49)	543.2 (2.3)
MAP-15484	69.7	37.41 (0.54)	66.94 (0.96)	1.257 (0.018)	0.5793 (0.0083)	0.3520 (0.0050)	21.46 (0.31)
MAP-15485	141	99.24 (0.70)	231.6 (1.6)	1.591 (0.011)	2.379 (0.017)	97.34 (0.69)	730.2 (5.2)
MAP-15497	163	0.7803 (0.0048)	4.273 (0.026)	NC	NC	NC	NC

測定対象	CD_{max}	イヌ 39 週間皮下		ラット 4 週間皮下	
		雄	雌	雄	雌
ジファミラスト	237	8444 (36)	5422 (23)	572.5 (2.4)	911.2 (3.8)
MAP-15484	69.7	404.6 (5.8)	565.3 (8.1)	135.3 (1.9)	115.2 (1.7)
MAP-15485	141	929.0 (6.6)	884.9 (6.3)	472.1 (3.3)	550.0 (3.9)
MAP-15497	163	1614 (9.9)	1229 (7.5)	3.619 (0.022)	8.751 (0.053)

括弧内の数値は CD_{max}［資料番号 5.3.3.2-02］の曝露量に対する倍率

NC：全ての時点で検出限界未満のため未算出

単位：ng·h/mL

以上，非臨床における種々の薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験の結果から，PDE4B 阻害活性に基づく抗炎症効果を示すジファミラストは，アトピー性皮膚炎等の慢性炎症性皮膚疾患に対する安全で有効な外用治療薬となるものと考えられる。

2.4.6 参考文献

1 Hanifin JM, Butler JM, Chan SC. Immunopharmacology of the atopic diseases. J Invest Dermatol. 1985;85 Suppl 1:S161-4.

2 Ahluwalia J, Udkoff J, Waldman A, Borok J, Eichenfield LF. Phosphodiesterase 4 inhibitor therapies for atopic dermatitis: Progress and outlook. Drugs 2017;77:1389-97.

3 Jin SL, Conti M. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:7628-33.

4 Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, Hayakawa K, Shiohara T. Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. J Invest Dermatol 1995;105:749-55.

5 Kitagaki H, Ono N, Hayakawa K, Kitazawa T, Watanabe K, Shiohara T. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. J Immunol 1997;159:2484-91.

6 Kitagaki H, Kimishima M, Teraki Y, Hayakawa J, Hayakawa K, Fujisawa S, et al. Distinct in vivo and in vitro cytokine profiles of draining lymph node cells in acute and chronic phases of contact hypersensitivity: importance of a type 2 cytokine-rich cutaneous milieu for the development of an early-type response in the chronic phase. J Immunol 1999;163:1265-73.

7 Kitagaki H, Hiyama H, Kitazawa T, Shiohara T. Psychological stress with long-standing allergic dermatitis causes psychodermatological conditions in mice. J Invest Dermatol 2014;134:1561-9.

8 National Toxicology Program. https://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpViews/?activeTab=detail&studyNumber=967223(April 1, 2020): Chemical Name: 2-Ethoxybenzamide

9 Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined With S9 mix in Vitro. Mutation Research 1979;66:277-290.

10 Naito M, Ito A, Watanabe H, Kawashima K, Aoyama H. Carcinogenicity of o-Ethoxybenzamide in (C57BL/6N X C3H/HeN)F1 Mice. JNCI 1986;76:115-118.

11 Griffiths CEM, Van Leent EJM, Gilbert M, Traulsen J. Randomized comparison of the type 4 phosphodiesterase inhibitor cipamfylline cream, cream vehicle and hydrocortisone 17-butyrate cream for the treatment of atopic dermatitis. Br J Dermatol 2002;147:299-307.

12 Paller AS, Tom WL, Lebwohl MG, Blumenthal RL, Boguniewicz M, Call RS, et al. Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults. J Am Acad Dermatol 2016;75:494-503.