目次

2.4.1　非臨床試験計画概略....4
2.4.2　薬理試験....9
2.4.2.1　効力を裏付ける試験....9
2.4.2.2　副次的薬理試験....11
2.4.2.3　安全性薬理試験....11
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験....12
2.4.3　薬物動態試験....13
2.4.3.1　吸収....13
2.4.3.2　分布....14
2.4.3.3　代謝....14
2.4.3.4　排泄....14
2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用試験....14
2.4.3.6　その他の薬物動態試験....15
2.4.4　毒性試験....15
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....15
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....17
2.4.4.7　その他の毒性試験：免疫原性試験....17
2.4.5　総括及び結論....18
2.4.6　参考文献....21

略語等一覧

略語	英語	日本語
5-MeTHF	5-Methyltetrahydrofolic acid	5-メチルテトラヒドロ葉酸
AUC_{X-Y}	Area under the concentration-time curve from X to Y	投与 X 時間から Y 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
BLQ	Below the limit of quantification	定量下限値未満
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	医薬品評価研究センター
C_{max}	Maximum concentration	最高血中濃度
CPG1	Carboxypeptidase G1	カルボキシペプチダーゼ G1
CPG2	Carboxypeptidase G2	カルボキシペプチダーゼ G2
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
DAMPA	4-deoxy-4-amino-N^{10}-methylpteroic acid	4-デオキシ-4-アミノ-N^{10}-メチルプテロイン酸
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
HD-MTX	High Dose Methotrexate	大量メトトレキサート
HCl	Hydrochloric acid	塩酸
ICH	International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
K_m	Michaelis constant	ミカエリス定数
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
LLOQ	Lower Limit Of Quantification	定量下限値
LV	Leucovorin	ロイコボリン
$MAPD_X$	Monophasic action potential duration X%	X%単相性活動電位持続時間
MBI	Mechanism-based inhibition	時間依存的阻害
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
SpecAct	Specific Activity	比活性
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス

略語	英語	日本語
$t_{1/2}$	Time to half-life	半減期
t_{max}	Time of maximum observed concentration	最高血中濃度到達時間

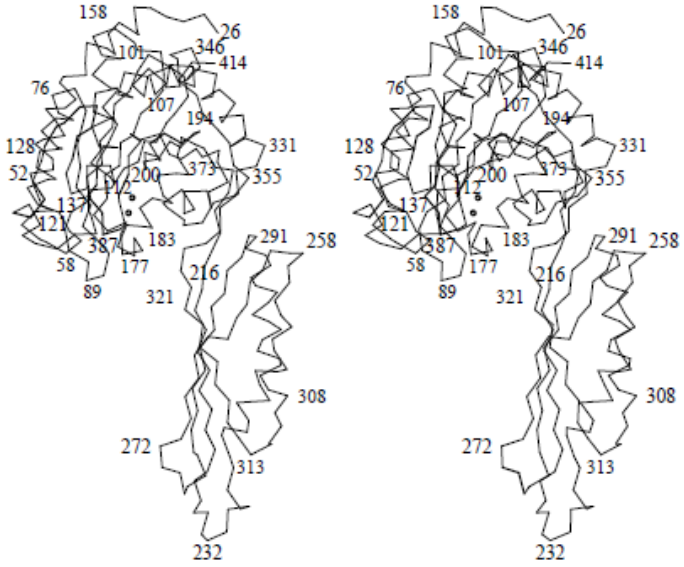
2.4.1　非臨床試験計画概略

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）製剤である OP-07（以下，「本剤」）は，葉酸アナログであるメトトレキサート（MTX）を加水分解する作用を有し，大量メトトレキサート（HD-MTX）療法に伴って MTX 排泄遅延が生じて MTX 中毒となった患者に使用する解毒剤である．

HD-MTX 療法は，急性リンパ性白血病，骨肉腫及び悪性リンパ腫等の腫瘍に対する標準治療として行われ[1)]，ロイコボリン（LV，5-ホルミルテトラヒドロ葉酸）が併用投与される．LV は細胞内に取り込まれて活性型葉酸に変換されることによって細胞の核酸合成を再開させ，MTX の毒性を軽減する[2)]．また，LV は MTX と同じ細胞輸送系によって能動輸送される．細胞への取り込みでは MTX と競合するため，LV 濃度は正常組織細胞への輸送で有利に競合できるだけの高い濃度でなければならず，血中 MTX 濃度が高い場合には LV の解毒作用はそれほど高くないことが報告されている[3)]．また HD-MTX 療法では，MTX が主要排泄経路である腎臓内で結晶化し腎機能障害を引き起こすことが知られており，MTX による腎機能障害は MTX 自体の排泄遅延をきたし，重篤な MTX 中毒のリスクを高める[1)]．さらに，臨床の公表文献の結果から，血中 MTX 濃度，曝露時間及び MTX 毒性との関連性が示されている[4)]．この問題を解決するために，血中 MTX 濃度を低下させる治療方法が求められていた．

今回申請予定のグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）は，*Variovorax paradoxus*（*Pseudomonas* sp. RS16）株由来のカルボキシペプチダーゼ G2（CPG2）を大腸菌 RV308 株でクローン化して生成された，活性中心に亜鉛イオンを有する亜鉛依存性のエキソペプチダーゼである．グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）は，390 個のアミノ酸残基からなるサブユニット 2 個で構成される．サブユニットの分子量は約 41,440，二量体の分子量は約 83,000 である．公表文献により報告されている CPG2 の分子構造図を図 2.4.1-1 に示した[5)]．

図 2.4.1-1　CPG2 の分子構造図

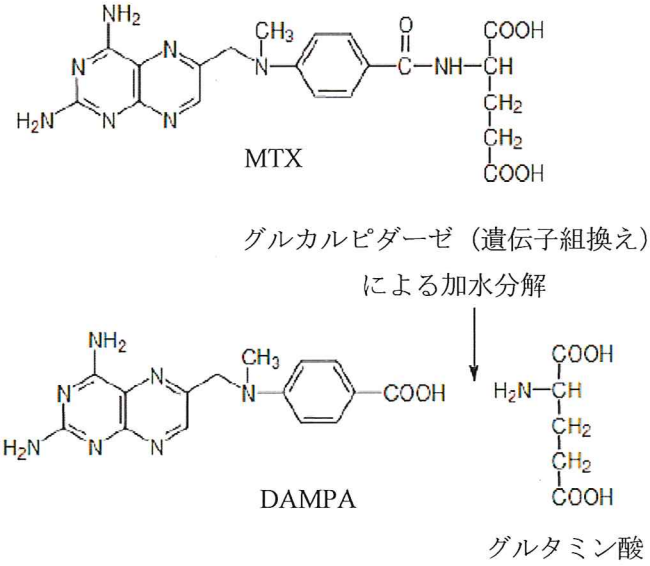


サブユニット α の立体像．炭素骨格と位置番号の抜粋．触媒領域は図の上部，二量体形成領域は下部である．活性部位の亜鉛イオンは「・」で表す．（MOLSCRIPT プログラムにより作成）

引用元：4.3-5（Rowsell 1997）の Figure 2

作用機序は次のとおりである．グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）は葉酸アナログである MTX からカルボキシ末端のグルタミン酸残基を加水分解し，4-deoxy-4-amino-N^{10}-methylpteroic acid（DAMPA）及びグルタミン酸を生成する作用を有することにより（図 2.4.1-2），主要排泄経路（腎臓）に依存しない形で MTX を除去することができる．公表文献にて，CPG2 の緩衝液中のミカエリス定数（K_m）値は，葉酸で 4 μmol/L，MTX で 8 μmol/L，5-メチルテトラヒドロ葉酸（5-MeTHF，LV の代謝物）で 34 μmol/L 及び LV で 120 μmol/L と報告されている[6)]．

図 2.4.1-2 グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）の作用機序



また，MTX を加水分解する酵素として *Pseudomonas* sp. RS16 株由来の CPG2 の他に *Pseudomonas stutzeri* [redacted] 由来のカルボキシペプチダーゼ G1（CPG1）が知られている[6, 7]．*Pseudomonas* sp. RS16 株及び *Pseudomonas stutzeri* [redacted] は，後の研究で共に *Variovorax paradoxus* と判明し，CPG1 及び CPG2 をコードする構造遺伝子も同一であることが明らかになった（3.2.S.2.3 項参照）．そのため，以下に後述する文中ではグルカルピダーゼ（遺伝子組換え），*Pseudomonas* sp. RS16 株由来の CPG2 及び CPG1 を区別せずに「グルカルピダーゼ」と記載する．なお，CPG1 又は *Pseudomonas* sp. RS16 株由来の CPG2 は公表文献に使用されており，CPG1 は効力を裏付ける試験に関する Chabner らによる実験[8]，*Pseudomonas* sp. RS16 株由来の CPG2 は効力を裏付ける試験に関する Adamson らによる実験[9]で使用された．

本剤は米国で 2012 年 1 月に承認され，他の地域では Named Patient Program で臨床に供されており，臨床における有効性及び薬剤プロファイルは広く知られている．国内で本剤の承認申請に必要な非臨床試験に関する資料は新たに実施せず，米国での生物製剤承認申請（BLA）の資料を用いた．また，非臨床試験に使用した本剤，臨床試験用及び市販予定の本剤との同等性については 2.3.S.4.4 項及び 2.3.P.5.4 項に記載した．さらに，本剤に使用する酢酸亜鉛水和物は新規添加剤に該当することから，その安全性についての情報を 2.3.A.3 項に記載した．

薬理試験では，効力を裏付ける試験（*in vivo*）として，C57BL／6N マウス MTX 毒性量決定試験（試験番号：PR001-NCL-TX004），C57BL／6N マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）（試験番号：PR001-NCL-IN001），Swiss Webster マウス HD-MTX 療法の救援試

験（LV 併用投与，MTX 72 時間投与）（試験番号：PR001-NCL-PC002）及びアカゲサル（以下，「サル」）のグルカルピダーゼ投与後 MTX 薬物動態試験（試験番号：PR001-NCL-PK002）の 4 試験を実施した．その他に，*in vivo* 試験に関する公表文献 2 報 [8, 9] を報告した．なお，*in vitro* 効力を裏付ける試験は，海外臨床試験でグルカルピダーゼにより HD-MTX 療法によって生じた MTX 中毒に対する有効性が示唆された [10] ため実施しなかった．ただし薬力学的薬物相互作用試験として，ヒト血漿中でのグルカルピダーゼの酵素的特性（MTX の K_m など）を *in vitro* で検討した，ヒト血漿中における薬力学的薬物相互作用試験（試験番号：PR001-NCL-PK008）を実施している．

副次的薬理試験は，実施しなかった．

グルカルピダーゼを用いた安全性薬理試験は実施しなかったが，グルカルピダーゼにより MTX が分解された際の生成物である DAMPA について 3 試験実施し，加えて公表文献 1 報 [11] を報告した．

DAMPA は通常，ヒトにおける MTX の微量代謝物であり，HD-MTX 治療を受けた患者の尿中の総排泄量（MTX 及び MTX の代謝物含む）に占める割合は 3.2～5.9%[12] であるが，DAMPA はグルカルピダーゼによる MTX の加水分解によっても生成されるため，臨床使用ではグルカルピダーゼ投与後に高濃度になる可能性がある．また，DAMPA の水溶性は MTX の約 10 分の 1 であり [1]，理論的には高濃度の DAMPA が腎臓に析出し，MTX による腎機能障害を増強させる可能性も考えられる．そこで，一連の安全性薬理試験及び公表文献にて DAMPA の安全性を検討した．なお，DAMPA は公表文献にて MTX と比較してジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害作用が弱いことが報告されている [12, 13]．別の公表文献では，DAMPA は MTX よりも 50%致死量が高く，細胞増殖の抑制率が低いことが報告されている [14]．

実施した試験としては，ランゲンドルフ灌流心を用いた New Zealand White ウサギ（以下，「ウサギ」）における DAMPA 及び MTX 心血管系安全性試験（試験番号：PR001-NCL-SP001），ビーグル犬（以下，「イヌ」）DAMPA 忍容性及び薬物動態試験（試験番号：PR001-NCL-PK005）及びイヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験（試験番号：PR001-NCL-PC001）の 3 試験である．なお，ウサギにおける DAMPA 及び MTX 心血管系安全性試験は米国食品医薬品局（FDA），イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106，DIRECTIVE 2004/10/EC 及び経済協力開発機構（OECD）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準じて実施した．呼吸系及び中枢神経系に対する安全性薬理試験は実施しなかった．

薬力学的薬物相互作用試験は，前述のヒト血漿での検討を行った．

本剤の薬物動態試験の内，吸収については，Crl:WI（GLX／BRL／Han）IGSB ラット（以下，「ラット」）3 日間反復投与毒性試験（試験番号：1845/013）及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験（試験番号：PR001-NCL-TX002）のトキシコキネティクス（TK）試験で検討した．なお，これらの試験の投与経路は臨床と同じ静脈内投与であり，United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106 及び OECD の GLP に準じて実施した．

分布は，グルカルピダーゼが高分子量のタンパク質であり，細胞内へ移行せず血中で分解されると考えられることから検討していない．

代謝は，グルカルピダーゼはタンパク質であり，他のタンパク質同様，代謝は小さなペプチド及び各アミノ酸への分解であると推定される．よって，当該試験を実施する必要はないと考えられるため，代謝試験は検討していない．

排泄は，グルカルピダーゼがタンパク質であることから，他のタンパク質同様，消失経路は異化作用を介した低分子ペプチド及び個々のアミノ酸への代謝後に排泄される経路と推定されるため，排泄試験は検討していない．

薬物動態学的薬物相互作用は，DAMPA について，チトクロム P450（CYP）に対する DAMPA の誘導作用試験（試験番号：PR001-NCL-PK007）及び CYP に対する DAMPA の阻害作用試験（試験番号：PR001-NCL-PK006）を実施した．これらの試験は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106 及び OECD の GLP に準じて実施した．さらに，MTX 投与又は非投与の条件下で，グルカルピダーゼの LV 及び 5-MeTHF の動態に対する影響について評価するため，ウサギにおける薬物動態学的薬物相互作用試験（試験番号：PR001-NCL-PK004）を実施した．本試験は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106，DIRECTIVE 2004/10/EC 及び OECD の GLP に準じて実施した．

その他の薬物動態試験は実施していない．

毒性試験は，グルカルピダーゼのヒトにおける静脈内投与による安全性を評価するためにラット 3 日間反復投与毒性試験並びにイヌ用量漸増忍容性試験（試験番号：PR001-NCL-TX001）及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験を実施した．毒性試験の一覧を表 2.4.1-1 に示した．毒性試験に使用した動物種は，一般的にげっ歯類としてラット，非げっ歯類としてイヌが選択されることから，ラット及びイヌの 2 種類を選択した．なお，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験は「ICH S6（R1）バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（平成 24 年 3 月 23 日付け薬食審査発 0323 第 1 号）（以下，「医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 ガイドライン」）に基づき短期投与であっても 2 週間までの反復投与毒性試験を実施することが適当と考えられるため実施した．グルカルピダーゼの投与経路は，臨床予定経路である静脈内投与とした．ラット 3 日間反復投与毒性試験の低投与量は臨床予定用量である 50 U/kg/日，高投与量は臨床予定用量の 100 倍である 5,000 U/kg/日を設定した．イヌ 14 日間反復投与毒性試験の低投与量は 50 U/kg/日，中投与量及び高投与量はイヌ用量漸増忍容性試験成績を基に，グルカルピダーゼによる反応が段階的に評価できるよう 500 及び 2,500 U/kg/日「最大耐量（MTD）」に設定した．なお，ラット 3 日間反復投与毒性試験は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106 及び OECD 並びにイヌ 14 日間反復投与毒性試験は FDA 及び OECD の GLP に準じて実施した．

表 2.4.1-1　毒性試験一覧

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP 適用	試験番号
3 日間＋10 日間（回復）	静脈内	ラット	適用	1845/013 （添付資料番号：4.2.3.2-1）
25 日間（漸増投与）	静脈内	イヌ	非適用	PR001-NCL-TX001 （添付資料番号：4.2.3.2-2）
14 日間	静脈内	イヌ	適用	PR001-NCL-TX002 （添付資料番号：4.2.3.2-3）

単回投与毒性試験は実施していないが，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の初回投与「ラットでは最大 5,000 U/kg/日，イヌでは最大 2,500 U/kg/日（MTD）」から単回投与毒性を評価した．

局所刺激性はラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験内で評価した．

免疫原性はイヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験内で評価した．

遺伝毒性試験は，グルカルピダーゼが組換えタンパク質であり，デオキシリボ核酸（DNA），あるいは他の染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いことから，ICH S6 ガイドラインに従い，実施しなかった．

がん原性試験は，グルカルピダーゼは MTX による毒性発現に対する救済処置として短期間（単回）投与することを想定しており，慢性的に使用される薬剤でないこと，加えて，上述したように遺伝毒性の懸念がないことから，「ICH-S1A 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」（平成 9 年 4 月 14 日付け薬食審査発第 315 号）を考慮し，実施しなかった．

生殖発生毒性試験は後述する理由（2.4.4.5 参照）により実施しなかった．

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

開発初期の効力を裏付ける試験（*in vivo*）に関して，Chabner らによる BDF_1 マウスを用いた MTX 毒性の救援に関する実験が報告されている[8)]．BDF_1 マウスに MTX 1,000 mg/kg を腹腔内投与したところ，3 日間にわたって血漿中 MTX 濃度は 0.01 μmol/L を上回った．一方，MTX 投与後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を単回腹腔内投与したところ，血漿中 MTX 濃度は速やかに減少したが，グルカルピダーゼ投与 12～24 時間後に血漿中 MTX 濃度の遅発性の上昇が見られた．MTX の用量を 350 mg/kg に減量するとグルカルピダーゼ投与により血漿中 MTX は完全に消失し，遅発性の増加も認められなかった．生存率に関しては，MTX 350 mg/kg 投与群で 62.5%であったが，MTX 投与後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を単回腹腔内投与することにより 100%に増加した．同様に MTX 1,000 mg/kg を投与した場合の生存率も，グルカルピダーゼ 800 U/kg 投与により 22%から 50%に増加した．さらに，

MTX 1,000 mg/kg 投与後，グルカルピダーゼ 800 U/kg を 1 日 1 回，2 日間腹腔内投与すると，生存率は 94%に増加した．その他に Chabner らは MTX 投与後にグルカルピダーゼを投与した動物と投与しなかった動物の肝臓中 MTX 濃度を比較したところ，両群に差は認められなかったことから，グルカルピダーゼは細胞膜を通過しない可能性を報告している．

その後，C57BL／6N マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）では，MTX の毒性に対する LV 及び LV＋グルカルピダーゼの効果を検討した．C57BL／6N マウス MTX 毒性量決定試験の結果に基づき，MTX 500 mg/kg/日を 1 日 1 回 4 日間連続腹腔内投与した．MTX を 4 日間連続腹腔内投与した動物と比較して，MTX 投与後に LV 6.75 mg/kg を複数回腹腔内投与した動物及び LV の他にグルカルピダーゼ 50 U/kg を尾静脈に単回投与した動物では，死亡及び瀕死例が低下した．さらに MTX 単独投与及び LV のみ併用投与した動物と比較したところ，LV＋グルカルピダーゼを併用した動物では肉眼的所見（消化管の拡張）が認められた例数は減少した．一方，体重については LV 又は LV＋グルカルピダーゼ併用投与による明らかな改善は認められなかった．また，血漿中 MTX 濃度はグルカルピダーゼ投与により低下し，血漿中 DAMPA 濃度はグルカルピダーゼ投与後に増加した．

Swiss Webster マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与，MTX 72 時間投与）において，MTX 5 mg/kg を 72 時間かけて腹腔内投与した動物と，MTX 投与開始後から LV 2.5 mg/kg を複数回腹腔内投与した動物及び LV の他にグルカルピダーゼ 50 U/kg/日を 1 日 1 回，2 日間静脈内投与した動物とを比較したところ，死亡率及び病理組織学的検査の結果において明らかな改善は認められなかった．一方，体重減少率（最低時）に関しては MTX のみ投与した動物と比較して，LV 又は LV＋グルカルピダーゼ併用投与で改善傾向が認められたが，LV 群と LV＋グルカルピダーゼ群で明らかな差は認められなかった．

サルを用いた効力を裏付ける試験（*in vivo*）として，Adamson らによるグルカルピダーゼ静脈内投与後の MTX 薬物動態に関する実験の報告がある[9]．本実験では，サルに MTX を 300 mg/m^2/h（25 mg/kg/h，以下 kg 当たりの投与量算出には FDA，医薬品評価研究センター（CDER）発行のガイダンス 2005 に記載されている動物の平均体重を用いた[15]）の用量で 1 時間静脈内投与を施した後，60 mg/m^2/h（5 mg/kg/h）を 17 時間かけて静脈内投与した．その後，グルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与することにより，血漿中 MTX 濃度は 15 分以内に 100 分の 1 未満に低下し，2-コンパートメントモデルの α 相半減期（$t_{1/2}$）及び投与 0 時間から∞時間までの血中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）も低下した．血漿中グルカルピダーゼ濃度は一相性で減少し，$t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 55±3 分であった．2 週間毎にグルカルピダーゼ 50 U/kg を静脈内投与すると早くて初回投与後 1 週間で，抗グルカルピダーゼ抗体が検出されたが，最大 8 回反復投与してもアレルギー症状は認められなかった．高い抗グルカルピダーゼ抗体価を示した動物でグルカルピダーゼ投与後の MTX 薬物動態を検討したが，高い抗体価を示した動物でも血漿中 MTX 濃度を低下させた．

サルのグルカルピダーゼ投与後 MTX 薬物動態試験では，MTX を 300 mg/m^2/h（25 mg/kg/h）の用量で 1 時間かけて静脈内投与した後，60 mg/m^2/h（5 mg/kg/h）を 4 時間かけて静脈内投与した．MTX 投与終了時の血漿中 MTX 濃度は 14.61～20.70 μmol/L であった．MTX 投与終

了直後にグルカルピダーゼ 1，5，15 又は 50 U/kg を約 1～5 分間かけて静脈内投与すると，グルカルピダーゼ投与後 5 分で定量下限値未満（BLQ，＜0.05 μmol/L）～0.06 μmol/L の範囲になり，グルカルピダーゼ投与後 15 分までに全投与群で BLQ となった．その後，グルカルピダーゼ投与後 3 時間まで BLQ であった．血漿中 DAMPA 濃度は全投与群において，グルカルピダーゼ投与後 5 分で 3.0～10.8 μmol/L の範囲になり，その後経時的に低下した．最終的には，大部分の動物でグルカルピダーゼ投与後 3 時間までに定量下限値（LLOQ）付近になった．なお，50 U/kg 投与した 1 例でグルカルピダーゼ投与後に一般状態の所見（散瞳など）が認められたが，ラクトリンゲル液などの処置後，翌朝には正常に戻った．これらの状態変化がグルカルピダーゼ，MTX 又は DAMPA のいずれによるものかの判定は困難であった．加えて，グルカルピダーゼ投与後の MTX 濃度及び DAMPA 濃度は他の投与群とほぼ同程度であった．

2.4.2.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない．

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験に関しては，Widemann らによるサルとヒト白血病細胞株 MOLT-4 に対する DAMPA の影響に関する実験の報告がある [11]．サルに DAMPA 200 mg/m^2（約 16.7 mg/kg）を 15 分かけて静脈内投与したところ，全例で投与に関連した一般状態の変化は認められなかった．血漿中 DAMPA 濃度の消失は 3-コンパートメントモデルが最も適しており，γ 相 $t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 51±25 分であった．尿中には DAMPA 投与量の約 46%が，10 時間以内に未変化体として排泄された．血漿中及び尿中には 3 種類の DAMPA 代謝物（ヒドロキシ DAMPA，DAMPA グルクロン酸抱合体及びヒドロキシ DAMPA グルクロン酸抱合体）が確認されたが，これらの代謝物は臨床で MTX 救援薬としてグルカルピダーゼを投与した患者でも同様に同定されている．これらの結果から，Widemann らはγ相 $t_{1/2}$（51 分）に基づくと，DAMPA の 99%超は 10 時間後までに血漿から消失するため，DAMPA の約 50%は代謝される可能性を報告している．一方，ヒト白血病細胞株 MOLT-4 に MTX（最終濃度：0.0001～100 μmol/L）のみ，DAMPA 及び MTX（それぞれの最終濃度：100 μmol/L，0.0001～10 μmol/L），DAMPA（最終濃度：0.00012～100 μmol/L）のみを添加したところ，DAMPA のみでは 100 μmol/L 以下の濃度で，ヒト白血病細胞株 MOLT-4 に対する細胞毒性は認められなかった．MTX は濃度に依存して細胞毒性を示したが，DAMPA（100 μmol/L）は MTX の細胞毒性に影響を及ぼさなかった．

ウサギにおける DAMPA 及び MTX 心血管系安全性試験において，ウサギのランゲンドルフ灌流心を DAMPA 0～250 μmol/L に各濃度約 15 分ずつ段階的に曝露させたところ，全体として血行動態，心電図及び電気生理学的パラメータに対する有害作用は認められなかった．MTX 0～250 μmol/L に曝露させると大部分のランゲンドルフ灌流心で血行動態に顕著な影響は認められなかった．心電図及び電気生理学的パラメータに関しては，MTX 100～

250μmol/L の曝露により QT 間隔，250 μmol/L の曝露により 90%単相性活動電位持続時間（$MAPD_{90}$）が有意に短縮した．また DAMPA と異なり，MTX 50 μmol/L 以上に曝露させた少数例で房室解離が認められた．

イヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験では，イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験の用量を検討するために，DAMPA 15，30 及び 60 mg/kg を約 15～30 分かけて静脈内投与した．その結果，60 mg/kg の忍容性は良好であった．また，DAMPA 投与後 0.25 時間（初回の測定時間）で血漿中 DAMPA 濃度が最大となった（DAMPA 60 mg/kg 投与群で 174～199 μmol/L）．その後，投与終了後 8～12 時間まで低下し，24 時間後には全動物で BLQ（＜0.1 μmol/L）になった．全身曝露量は雌雄で同程度であり，投与 0 時間から t 時間までの血中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}t}$）は用量の増加に伴って増加した．算出可能であった 30 mg/kg 投与の雄 1 例及び 60 mg/kg 投与の雄 1 例の分布容積は，一般的なイヌの体内総水分の容積と類似していた[16]．クリアランスは公表文献の値[16]と比較すると 0.60～0.70 L/h/kg と速やかで，終末相 $t_{1/2}$ は 0.5～1.0 時間であった．

イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験において，雌雄イヌに 15，30 及び 60 mg/kg の DAMPA を約 20 分かけて漸増静脈内投与したところ，15 及び 60 mg/kg 投与時に一般状態の変化が認められた．15 mg/kg 投与時には投与後 0.5 時間に 4 例全てで粘膜退色が認められたが，30 及び 60 mg/kg 投与時では認められなかったことから，DAMPA による影響である可能性は低いと考えられた．60 mg/kg 投与時には，DAMPA 投与後 0.5 時間以降に主に眼，鼻口部，耳又はそれらの周辺部で軽度から高度な赤色化が認められた．特に両眼又は片眼の強膜の赤色化は 4 例全てで認められた．また雄 1 例で右目の強膜の赤色化が投与後 2 日間持続した．他には雌 2 例に眼，鼻口部及び周辺の腫脹，その内 1 例に呼吸数増加などが認められた．血圧，心拍数及び心電図に関しては，有意な変化が認められたものの一過性又は明確な用量依存性がなかったため，DAMPA が影響する可能性は低いと考えられた．DAMPA 投与完了後 2 時間では，血漿中 DAMPA 濃度は用量増加に伴って濃度が増加した．

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

ヒト血漿中における薬力学的薬物相互作用試験では，MTX や LV のエピマー（単一のキラル中心で立体構造が異なる立体異性体）である(6R)及び(6S)-LV 並びに LV の活性代謝物である(6S)-5-MeTHF などに対するグルカルピダーゼの酵素的特性を評価した結果，以下のことが示された．

- MTX，(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF の比活性（SpecAct）の大きさは(6R)-LV＜(6S)-LV＜(6S)-5-MeTHF＜MTX の順であった．
- ヒト血漿中への亜鉛の追加の有無は，グルカルピダーゼによる MTX 分解に影響しなかった．
- 塩酸（HCl）がグルカルピダーゼを効果的に不活性化したと考えられた．また，グルカルピダーゼを添加後に 15 又は 60 分間インキュベートしてから HCl を添加した場合の MTX 濃度は全て極めて低かった．

・DAMPA 又は DAMPA＋グルタミン酸の存在による，グルカルピダーゼの MTX 分解作用の阻害は認められなかった．
・7 種類の添加タイミングで HCl を添加したが，いずれの検体中でも MTX 濃度に明らかな変化はなく MTX の回収率に影響しなかった．
・K_m の推定値及び標準誤差は(6S)-LV は 112±77 μmol/L，MTX は 86±6 μmol/L であった．なお，(6S)-5-MeTHF に関しては，十分なデータが得られなかったため，K_m を算出できなかった．
・個別又は同時添加に関わらず HCl 及びアスコルビン酸の添加は(6S)-LV，(6R)-LV，(6S)-5-MeTHF 及び(6R)-5-MeTHF を安定化させた．また，HCl のみ添加及び HCl＋アスコルビン酸の個別又は同時添加により，グルカルピダーゼが不活性化されたと考えられた．なお，HCl＋アスコルビン酸の個別又は同時添加によるグルカルピダーゼの不活性化には明確な違いは認められなかった．

なお一連の実験において，MTX をグルカルピダーゼで分解した際に微量の MTX が残存することが確認された．これは，グルカルピダーゼにより D-MTX（MTX の異性体，D 体）は分解されないという報告[17]を踏まえると，MTX 製剤中に微量に含まれる D-MTX が残存したと考えられた．

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

グルカルピダーゼをラット及びイヌに臨床と同じ投与経路である静脈内投与した時の血漿中濃度の結果を下記に記載した．

ラット 3 日間反復投与毒性試験において，ラットにグルカルピダーゼ 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日を静脈内投与した時，投与 1 日目の投与後 10 分の平均血漿中濃度（平均値±標準偏差）は，それぞれ 0.5±0.052 及び 139.5±17.7 U/mL であった．この 2 つのデータを比較すると用量が 100 倍になると平均血漿中濃度は約 279 倍になり，投与 10 分後の血漿検体採取時点ではグルカルピダーゼの平均血漿中濃度は用量比を上回る増加を示した．

イヌ 14 日間反復投与毒性試験において，イヌにグルカルピダーゼ 50, 500 及び 2,500 U/kg/日を静脈内投与した時の投与 1 日目及び投与 13 日目の血漿中濃度を測定した．投与 1 日目には全投与群で定量可能な全身曝露が認められた．全身曝露量は用量の増加に伴って増加し，性差は認められなかった．最高血中濃度（C_{max}）は，50～2,500 U/kg/日の範囲で用量依存的に増加した．最高血中濃度到達時間（t_{max}）は，全投与群の大半で投与後 0.0830 時間（5 分，初回採血時点）であった．一方，投与 0 時間から 48 時間までの血中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}48h}$）は 50 U/kg/日投与群と 500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回る曝露量の増加が認められたが，500 U/kg/日投与群と 2,500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回るまでには至らなかった．各投与群における投与後のグルカルピダーゼの血中動態は，基本的に一相性の消失が認められた．$t_{1/2}$ は 50 U/kg/日投与群では算出できなかったが，500 U/kg/日投与群で雌雄それぞれ 4.33 及び 4.56 時間，2,500 U/kg/日投与群で 5.34

及び 6.01 時間であった．50，500 及び 2,500 U/kg/日投与後のそれぞれ 8，24 及び 48 時間までに，全動物が BLQ（＜0.131 U/mL）に減少した．なお，投与 13 日目で得られた TK 成績は少数であったため，評価することはできなかった．

さらに公表文献にて，サルにグルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与（18 時間の MTX 静脈内投与が終了した後）した際，血漿中濃度は一相性で減少し，$t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 55±3 分と報告されている[9]．

2.4.3.2 分布

分布試験は実施していない．グルカルピダーゼは高分子量のタンパク質であり，細胞内へ移行せず血中で分解されると考えられるため，当該試験を実施する必要はないと考えられた．

2.4.3.3 代謝

代謝試験は実施していない．グルカルピダーゼはタンパク質である．したがって，他のタンパク質同様，代謝は小さなペプチド及び各アミノ酸への分解であると推定されるため，当該試験を実施する必要はないと考えられた．

2.4.3.4 排泄

排泄試験は実施していない．グルカルピダーゼはタンパク質である．したがって，他のタンパク質同様，消失経路は異化作用を介した低分子ペプチド及び個々のアミノ酸への代謝後に排泄される経路と推定されるため，当該試験を実施する必要はないと考えられた．

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用試験

CYP に対する DAMPA の誘導作用試験では，異なる 3 例のドナー由来のヒト肝細胞を用いて CYP1A2，CYP2C9 及び CYP3A に対する DAMPA（0.01～1 mg/mL）の誘導作用を *in vitro* で評価した．その結果，CYP3A 活性はいずれの DAMPA 濃度でも増加しなかった．一方，CYP1A2 及び CYP2C9 活性は DAMPA 0.1～1 mg/mL で増加が認められた場合があった．しかし，DAMPA 0.1 mg/mL では 3 例中 1 例のみしか，有意な増加は認められなかった．

CYP に対する DAMPA の阻害作用試験では，ヒト肝ミクロソームを用いて CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 及び CYP3A4 に対する DAMPA の直接阻害（DAMPA 0.01～1 mg/mL）及び時間依存的阻害（MBI）（DAMPA 1 mg/mL）を評価した．その結果，直接阻害に関しては，DAMPA 0.01～1 mg/mL では十分な（50%以上）酵素阻害は認められなかった．MBI に関しても，いずれの CYP においても DAMPA 1 mg/mL での影響は認められなかった．

ウサギにおける薬物動態学的薬物相互作用試験では，ウサギにグルカルピダーゼ 50 U/kg，生理食塩液，MTX 55 mg/kg，LV 13.5 mg/kg（計 4 回）を組み合わせて静脈内投与した．その結果，グルカルピダーゼ＋LV 群と生理食塩液＋LV 群を比較した所，2 回目及び 3 回目

LV 投与後において有意ではないがグルカルピダーゼによる LV の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加傾向が認められた．一方，MTX＋グルカルピダーゼ＋LV 群と MTX＋生理食塩水＋LV 群で，2 回目 LV 投与以降においてグルカルピダーゼの存在により(6S)-LV 及び(6R)-LV の AUC_{0-t} が有意に（p≦0.046）増加した．さらに，グルカルピダーゼ＋LV 群と MTX＋グルカルピダーゼ＋LV 群で，(6R)-LV の AUC_{0-t} は毎回の LV 投与後に MTX＋グルカルピダーゼ＋LV 群で有意に（p≦0.009）高値であり，(6S)-LV の AUC_{0-t} は 1 回目及び 4 回目 LV 投与後にのみ有意に（p≦0.038）高値であった．以上から，MTX の存在下において，グルカルピダーゼが LV の両異性体の曝露量を増加させる可能性が考えられた．LV の活性代謝物である(6S)-5-MeTHF は，大部分の動物で BLQ（＜5 μmol/L）であった．しかし，不活性代謝物の(6R)-5-MeTHF は，グルカルピダーゼを投与したグルカルピダーゼ＋LV 群及び MTX＋グルカルピダーゼ＋LV 群のみ定量可能であった．

2.4.3.6 その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない．

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

グルカルピダーゼに関する単回投与毒性試験は実施していないが，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の初回投与「ラットでは最大 5,000 U/kg/日，イヌでは最大 2,500 U/kg/日（MTD）」から評価した．グルカルピダーゼ初回投与後から次回投与までにおいて，ラット及びイヌ共に死亡例は認められなかった．

以上から，概略の致死量はラットで 5,000 U/kg/日超，イヌで 2,500 U/kg/日超と考えられた．

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット 3 日間反復投与毒性試験は，50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日のグルカルピダーゼを 3 日間連続して静脈内投与した後に，10 日間の回復期間を設けた．その結果，グルカルピダーゼの忍容性は良好であると考えられた．唯一認められた影響は，投与 4 日目（投与初日を 1 日目とする）の 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の雄に認められた対照群（溶媒）と比較した際の体重増加量の抑制傾向であったが，摂餌量に変化がなかったことなどから原因は究明できなかった．局所刺激性を投与部位の病理組織学的検査により検討を行ったところ，対照群（溶媒）との間に炎症反応の差は認められなかった．50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の TK 成績を比較すると，グルカルピダーゼの血漿中濃度は用量比を上回って増加していた．ラット 3 日間反復投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）は 5,000 U/kg/日であると考えられた．

イヌ用量漸増忍容性試験は 50，500，1,000，2,500，3,750（雌のみ）又は 5,000 U/kg/日（雄のみ）のグルカルピダーゼを間歇的「投与 1（投与初日），3，5，7，16（雄のみ）又は 23

日目（雌のみ）」に漸増静脈内投与した．その結果，50～2,500 U/kg/日の忍容性は良好であると考えられた．しかし，3,750 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の投与により，一般状態，血液学的及び血液生化学的パラメータに変化が認められた．以上から，イヌ用量漸増忍容性試験の MTD は 2,500 U/kg/日と考えられた．また，抗グルカルピダーゼ抗体分析において，5 回目投与後にあたる投与 17 日目（雄のみ）及び投与 23 日目（雌のみ）で抗グルカルピダーゼ抗体陽性が認められた．

イヌ 14 日間反復投与毒性試験は，イヌ用量漸増忍容性試験に基づき 50，500，2,500 U/kg/日のグルカルピダーゼを間歇的「投与 1（投与初日），3, 5, 7, 9, 11（雌の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く），13 日目（雄の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）」に静脈内投与した．その結果，主に 500 U/kg/日及び 2,500 U/kg/日の 6 回目投与後に一般状態，血液学的及び血液生化学的パラメータの変化が認められ，死亡又は瀕死動物（7 例）も認められた．いずれの 7 例も，肛門部位からの赤い分泌物，運動失調，虚脱，軟便，嘔吐，赤色化（耳又は全身），努力性呼吸，流涎増加又は過剰な流涎といった一般状態の変化が認められた．しかし，死亡の原因は病理学的検査では特定できなかった．50 U/kg/日投与で有意な血小板数減少が認められたが，変化の程度が小さかったため，毒性学的な影響は低いと考えられた．局所刺激性を投与部位の病理組織学的検査により検討を行ったところ，グルカルピダーゼに関連した影響は認められず，局所の忍容性は良好であった．以上から，イヌ 14 日間反復投与毒性試験における NOAEL は 50 U/kg/日であると考えられた．また，抗グルカルピダーゼ抗体の測定結果からグルカルピダーゼを投与した全動物で投与 15 日までに抗グルカルピダーゼ抗体「免疫グロブリン G（IgG）及び免疫グロブリン M（IgM）」が陽性となり，イヌで免疫原性が認められた．投与 1 日目の TK 成績は，全投与群で定量可能な全身曝露が認められ，用量の増加に伴って増加した．性差は認められず，50，500 及び 2,500 U/kg/日投与後のそれぞれ 8, 24 及び 48 時間までに，全動物が BLQ まで減少した．各投与群における投与後のグルカルピダーゼの血中動態は，基本的に一相性の消失が認められた．なお，投与 13 日目で得られた TK 成績は少数であったため，評価することはできなかった．

2.4.4.3 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は実施していない．グルカルピダーゼは組換えタンパク質であり，DNA，あるいは他の染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いと考えられる．

2.4.4.4 がん原性試験

がん原性試験は実施していない．グルカルピダーゼは MTX による毒性発現に対する救済処置として短期間（単回）投与することを想定しており，慢性的に使用される薬剤でない．加えて，グルカルピダーゼは組換えタンパク質であり，遺伝毒性の懸念がないと考えられる．

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

グルカルピダーゼは催奇形性が認められている MTX[18] を大量に投与し，その結果，予後不良で生命を脅かす疾患，且つ重篤な死亡リスクがある中毒症状を示した患者に使用されることから，生殖発生毒性試験は実施していない．

なお，グルカルピダーゼによる生殖器の影響に関しては，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験において，影響は認められないと判断した．すなわち，ラット 3 日間反復投与毒性試験で生殖器に認められた変化としては，50 U/kg/日の雄で前立腺重量の減少傾向（対照群：0.374 g，50 U/kg/日：0.297 g），50 U/kg/日の雌 1 例で小型卵巣並びに対照群及び 5,000 U/kg/日の雄 1 例で精巣精細管の萎縮であった．また，子宮の病理組織学的検査で各ステージの性周期像が認められた．一方，イヌ 14 日間反復投与毒性試験で生殖器に認められた変化は，50 U/kg/日，500 U/kg/日及び 2,500 U/kg/日の雄全例の精巣未成熟（少なくとも 4 ヵ月齢で投与開始）のみであった．これらの諸変化は用量依存性がなく，対照群にも認められたことからグルカルピダーゼとの関連性はないものと判断した．

ただし，グルカルピダーゼは薬理作用により葉酸を分解し，葉酸欠乏を生じる可能性があり，母体の葉酸が欠乏した場合，胎児の神経管閉鎖障害や無脳症が生じるとの報告がある[19]．葉酸欠乏による受胎能や胎児への有害作用についての文献は多く存在し，葉酸欠乏のリスクを評価するための十分な情報があると考えられるため，2.6.6.9 項の考察にて葉酸欠乏のリスクを公表文献から評価した．

臨床使用ではグルカルピダーゼは単回投与を意図されており，グルカルピダーゼが葉酸を分解し，葉酸欠乏を生じさせるとしても一時的なものと考えられる．加えて，グルカルピダーゼ投与前後に 2 時間以上空けて LV による還元型葉酸の補充も行われる．また，臨床試験及び市販後データ（2.5.5.7 参照）において，「妊娠，産褥および周産期の状態」，「生殖系および乳房障害」に分類される有害事象・副作用は報告されなかった．なお，添付文書には“治療上のベネフィットがリスクに勝ると考えられる場合にのみグルカルピダーゼを投与すること”と記載する予定である．

2.4.4.6 局所刺激性試験

局所刺激性は，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の結果から評価した．ラット（50 及び 5,000 U/kg/日）及びイヌ（50，500 及び 2,500 U/kg/日）で，投与部位に認められた病理組織学的所見（炎症反応）は，対照群と全投与群との間に差が認められなかった．以上から，グルカルピダーゼの局所刺激性はなかった．

2.4.4.7 その他の毒性試験：免疫原性試験

免疫原性は，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の結果から評価した．グルカルピダーゼはタンパク質であるため，抗原性を示すことが予想される．イヌ用量漸増忍容性試験では，5 回目投与後にあたる，投与 17 日目（雄のみ）及び投与 23 日目（雌のみ）に採取した標本で抗グルカルピダーゼ抗体陽性が認められた．同様に，イヌ 14 日間

反復投与毒性試験でも，4 回目投与の翌日にあたる投与 8 日目で少数に抗グルカルピダーゼ抗体の存在が認められ始め，6 回目（500 及び 2,500 U/kg/日）又は 7 回目（50 U/kg/日）投与後にあたる投与 15 日目までに，グルカルピダーゼを投与した全例で抗グルカルピダーゼ抗体の存在が認められた．以上から，複数回投与以降には，2 試験の全例でグルカルピダーゼの免疫原性が認められた．

2.4.5 総括及び結論

一連の薬理試験の結果から，グルカルピダーゼにより血漿中 MTX 濃度が低下することが示された．また臨床の公表文献の結果から，血中 MTX 濃度，曝露時間及び MTX 毒性との関連性が示されている[4]．したがって，グルカルピダーゼは HD-MTX 療法に伴う MTX 中毒のリスクを有する又は生じた患者に対して，MTX を分解することにより治療効果を発揮することが期待される．なお，薬理試験の中には MTX をグルカルピダーゼで分解した際に微量の MTX が残存することが確認されたが，これはグルカルピダーゼにより分解されない D-MTX[17] が残存したと考えられる．

グルカルピダーゼを用いた安全性薬理試験は実施しなかったが，イヌ 14 日間反復投与毒性試験にて心電図検査を実施した（詳細は 2.6.6.3.3 を参照）．結果は，臨床予定用量である 50 U/kg/日のグルカルピダーゼを間歇的に計 7 回投与した雌雄では QT 間隔又は QTcF 間隔に対する対照群（生理食塩液投与）との有意な差は認められず，グルカルピダーゼに関連した影響は認められなかった．

また，グルカルピダーゼにより MTX が分解された際の代謝物である DAMPA は，公表文献[11] からサルでは未変化体として腎排泄される経路の他に代謝経路の存在が示唆され，投与に関連した毒性も見られなかった．また，同公表文献から *in vitro* 試験でも細胞毒性は見られず，MTX の細胞毒性に対して影響することもなかった．心血管系に関しては，ウサギ摘出心及びイヌを用いたいずれの試験からも，DAMPA は明らかな持続的又は用量依存性がある影響は認められなかった．

薬物動態試験では，ラット及びイヌに臨床と同じ投与経路である静脈内投与した時のグルカルピダーゼの吸収について検討した．

ラットにグルカルピダーゼ 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日を静脈内投与した時，投与 1 日目の投与後 10 分の平均血漿中濃度は用量比を上回って増加していた．

イヌにグルカルピダーゼ 50，500 及び 2,500 U/kg/日を静脈内投与した時，投与 1 日目には全投与群で定量可能な全身曝露が認められた．全身曝露量は用量の増加に伴って増加した．性差は認められず，50，500 及び 2,500 U/kg/日投与後のそれぞれ 8，24 及び 48 時間までに，全動物が BLQ まで減少した．$t_{1/2}$ は 50 U/kg/日投与群では算出できなかったが，500 U/kg/日投与群で雌雄それぞれ 4.33 及び 4.56 時間，2,500 U/kg/日投与群で 5.34 及び 6.01 時間であった．C_{max} は，50～2,500 U/kg/日の範囲で用量依存的に増加した．一方，$AUC_{0\text{-}48h}$ は 50 U/kg/日投与群と 500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回る曝露量の増加が認められたが，500 U/kg/日投与群と 2,500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回るま

でには至らなかった.

さらに，サルにグルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与（18 時間の MTX 静脈内投与が終了した後）した際，血漿中濃度は一相性で減少し，$t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 55±3 分と報告されている[9]．

薬物動態学的薬物相互作用試験では, DAMPA による CYP の誘導及び阻害並びに MTX 投与又は非投与の条件下で，グルカルピダーゼの LV 及び 5-MeTHF の動態に対する影響について検討した.

CYP の誘導を *in vitro* で検討した結果, CYP1A2 及び CYP2C9 活性は DAMPA 0.1～1 mg/mL で増加が認められた場合があった．しかし，DAMPA 0.1 mg/mL では 3 例中 1 例のみしか，有意な増加は認められなかった. さらに, ヒトで認められている血漿中の DAMPA 濃度（C_{max}, 平均値±標準偏差）は，患者を対象とした国内第 II 相試験（CPG2-PII）で 0.02±0.05 mg/mL であり，国外の PR001-CLN-006 試験で 0.04±0.07 mg/mL（分子量を 343.56 として算出）であった．これより，臨床時に，これらの CYP を誘導する可能性は低いと考えられた.

CYP の阻害を *in vitro* で検討した結果，直接阻害に関しては DAMPA 0.01～1 mg/mL では十分な（50%以上）酵素阻害は認められなかった．このことから，ヒトで認められている DAMPA 濃度（国内第 II 相試験：0.02±0.05 mg/mL, PR001-CLN-006 試験：0.04±0.07 mg/mL）を踏まえると，臨床時に DAMPA は CYP1A2，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6，CYP2E1 及び CYP3A4 に対して，顕著な直接阻害をもたらさないと考えられた．なお，MBI に関しても，いずれの CYP においても DAMPA 1 mg/mL での影響は認められず，臨床時にこれらの CYP では DAMPA による MBI は生じないと考えられた.

MTX 投与又は非投与の条件下でのグルカルピダーゼの LV 及び 5-MeTHF の動態に対する影響は，ウサギにグルカルピダーゼ（50 U/kg），生理食塩液，MTX，LV（計 4 回）を静脈内投与して検討した．その結果，MTX の存在下において，グルカルピダーゼが LV の両異性体の曝露量を増加させる可能性が考えられた．活性代謝物の(6S)-5-MeTHF は大部分の動物で BLQ であったが，不活性代謝物の(6R)-5-MeTHF は，グルカルピダーゼを投与したグルカルピダーゼ＋LV 群及び MTX＋グルカルピダーゼ＋LV 群のみ定量可能であった．グルカルピダーゼは *in vitro* 試験のデータより LV を分解する可能性が報告されている[6]．しかし，上記のように，グルカルピダーゼと LV を投与した動物では LV 単独投与した動物に比べ LV の全身曝露量が高くなる可能性が考えられた．なお，LV 活性代謝物である(6S)-5-MeTHF の明らかな増加は認められなかった．このように，グルカルピダーゼと LV を投与した場合に，LV 曝露量が増加する機序の原因は究明できなかった.

毒性試験において，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験では，それぞれ主に 5 回目投与以降及び 6 回目投与以降にグルカルピダーゼに関連していると考えられる毒性徴候が認められた．しかし，ラット 3 日間反復投与毒性試験では類似した毒性徴候は認められなかった．この原因としては，グルカピダーゼにより引き起こされた毒性徴候は主に免疫反応によるものと考えられる．すなわち，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験は抗グルカルピダーゼ抗体分析を行っており，イヌ用量漸増忍容性

試験は 5 回目投与以降，イヌ 14 日間反復投与毒性試験は 4 回目投与以降から少数で存在が認められ始め，6 回目又は 7 回目投与以降には全例で確認された．加えて，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験では，それぞれ主に 5 回目投与以降及び 6 回目投与以降の投与後 15 分から毒性所見が認められ，最終的には死亡又は瀕死例も認められた．また，イヌで認められた毒性徴候は葉酸欠乏も影響していた可能性を無視することはできない．グルカルピダーゼは薬理作用として MTX を分解するが，MTX が葉酸アナログであることからグルカルピダーゼが葉酸も分解する可能性がある [6)]．葉酸欠乏した際のラットへの影響に関しては，Chanarin らによる 6 週齢のアルビノラットに，葉酸欠乏飼料（葉酸添加なし，スルファニルアミドを添加）を与えた結果として，9 週目に被毛粗剛や眼の充血及びヘマトクリットの減少が認められたという報告がある [20)]．ラット 3 日間反復投与毒性試験でもグルカルピダーゼによって葉酸が減少した可能性が考えられるが，報告されている所見は認められなかった．

なお，ラット 3 日間反復投与毒性試験では，上述したように毒性がほとんど認められていないが，以下 2 点からラットを毒性評価に用いる動物として選択したことは不適切でないと思われる．1）グルカルピダーゼの単回投与でも抗薬物抗体が発現する可能性はあるものの，抗体価の上昇にはある程度の期間が必要で，本試験のような 3 日間のみの反復投与においては，抗薬物抗体発現による毒性評価への影響は考えにくいこと，2）多くの動物において葉酸欠乏症が知られており，グルカルピダーゼを投与した際にイヌ及びラットでも葉酸欠乏による毒性が発現する可能性があるが，ラットの短期間の投与ではそれが明確ではなかったと考えられる．

グルカルピダーゼの局所刺激性に関しては，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の結果から，認められなかった．

ラット 3 日間反復投与毒性試験から，NOAEL は 5,000 U/kg/日と考えられ，その時の平均血漿中濃度は 139.5 U/mL であった．一方，臨床予定用量 50 U/kg/日のヒトにおける C_{max} は，腎機能が正常な被験者及び重度の腎機能障害を有する被験者対象の PR001-CLN-005 試験の血清中 C_{max} が，それぞれ 1.44 U/mL（酵素－基質分光法による値，酵素結合免疫吸着法（ELISA）では 1.35 U/mL）及び 1.21 U/mL（酵素－基質分光法による値，ELISA では 1.25 U/mL）であった．また，健康成人対象の PR001-CLN-010 試験の血清中 C_{max} は，1.31 U/mL（ELISA による値），国内第 I 相試験の血漿中 C_{max} は 1.20 U/mL（ELISA による値）であった．以上から，ラット 3 日間反復投与毒性試験では，ヒトの C_{max} の 100 倍程度の平均血漿中濃度で検討され，投与の影響は観察されなかった．ただし，原因は究明できなかったが，体重増加量の抑制傾向が認められた．なお，ラット 3 日間反復投与毒性試験において，50 U/kg/日投与した際の平均血漿中濃度は 0.5 U/mL であった．また，イヌ 14 日間反復投与毒性試験から，NOAEL は 50 U/kg/日と考えられ，その時の血漿中の C_{max} は 0.855～0.910 U/mL であった．この C_{max} の値は，臨床予定用量 50 U/kg/日のヒトにおける C_{max} よりやや下回っていた．また，一般状態に異常が認められなかった投与 1 日目の 500 及び 2,500 U/kg/日「赤色化（雌雄各 1 例）及び唾液分泌の増加（雄 1 例）を含む」の C_{max} はそれぞれ 8.68～10.2 及び 42.3～43.2 U/mL

であった．この C_{max} の値は，臨床予定用量 50 U/kg/日のヒトにおける C_{max} と比較して，それぞれ約 7 倍及び約 33 倍であった．なお，国内第 I 相試験では，ラット及びイヌの NOAEL での投与量に対して，それぞれ 1/250 及び 2/5 に相当する 20 U/kg/日を初回投与量として設定し，第 1 コホートの 20 U/kg/日の安全性が確認された後に，50 U/kg/日を第 2 コホートに投与して安全性を確認する増量デザインであった．国内第 I 相試験の安全性の結論としては，最大の解析対象集団（FAS）の 16 名中 11 名（68.8%）に有害事象が認められたが，全ての被験者で用量制限毒性（DLT）の発現は認められず，死亡，重篤な有害事象及び他の重要な有害事象も認められなかった（2.7.6.1.2.6.6 参照）．

2.4.6 参考文献

1） Chabner BA, Allegra CJ. Chapter 7: Antifolates. In: Chabner B and Longo DL. Cancer Chemotherapy, Immunotherapy and Biotherapy: principles and practice, Sixth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer. 2019.

2） ファイザー株式会社. ロイコボリン注 3mg 添付文書. 2010 年 10 月改訂（第 11 版）.

3） Ramsey LB, Balis FM, O'Brien MM, et al. Consensus Guideline for Use of Glucarpidase in Patients with High-Dose Methotrexate Induced Acute Kidney Injury and Delayed Methotrexate Clearance. Oncologist. 2018, 23(1), 52-61.

4） BTG International. Summary of Clinical Efficacy Literature Review (Module 5.4). 2011.

5） Rowsell S, Pauptit RA, Tucker AD, et al. Crystal structure of carboxypeptidase G_2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. Structure. 1997, 5(3), 337-347.

6） Sherwood RF, Melton RG, Alwan SM. et al. Purification and properties of carboxypeptidase G_2 from *Pseudomonas* sp. strain RS-16. Use of a novel triazine dye affinity method. Eur J Biochem. 1985, 148(3), 447-453.

7） McCullough JL, Chabner BA, Bertino JR. Purification and Properties of Carboxypeptidase G_1. J Biol Chem. 1971, 246(23), 7207-7213.

8） Chabner BA, Johns DG, Bertino JR. Enzymatic Cleavage of Methotrexate provides a Method for Prevention of Drug Toxicity. Nature. 1972, 239(5372), 395-397.

9） Adamson PC, Balis FM, McCully CL, et al. Methotrexate Pharmacokinetics Following Administration of Recombinant Carboxypeptidase-G_2 in Rhesus Monkeys. J Clin Oncol. 1992, 10(8), 1359-1364.

10） Bertino JR, Skeel R, Makulu D, et al. INITIAL CLINICAL STUDIES WITH CARBOXYPEPTIDASE G_1 (CPG_1) A FOLATE DEPLETING ENZYME (Abstract). Clin Res. 1974, 22, 483A.

11） Widemann BC, Sung E, Anderson L, et al. Pharmacokinetics and Metabolism of the Methotrexate Metabolite 2,4-Diamino-N^{10}-methylpteroic Acid. J Pharmacol Exp Ther. 2000, 294(3), 894-901.

12）Donehower RC, Hande KR, Drake JC, et al. Presence of 2,4-diamino-N^{10}-methylpteroic acid after high-dose methotrexate. Clin Pharmacol Ther. 1979, 26(1), 63-72.

13）Widemann BC, Balis FM, Adamson PC. Dihydrofolate Reductase Enzyme Inhibition Assay for Plasma Methotrexate Determination Using a 96-Well Microplate Reader. Clin Chem. 1999, 45(2), 223-228.

14）Valerino DM, Johns DG, Zaharko DS, et al. STUDIES OF THE METABOLISM OF METHOTREXATE BY INTESTINAL FLORA-I. IDENTIFICATION AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE METABOLITE 4-AMINO-4-DEOXY-N^{10}-METHYLPTEROIC ACID. Biochem Pharmacol. 1972, 21(6), 821-831.

15）Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005, 1-27.

16）Davies B, Morris T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. Pharm Res. 1993, 10(7), 1093-1095.

17）Cramer SM, Schornagel JH, Kalghatgi KK, et al. Occurrence and Significance of D-Methotrexate as a Contaminant of Commercial Methotrexate. Cancer Res. 1984, 44(5), 1843-1846.

18）ファイザー株式会社. メソトレキセート® 点滴静注液 200mg/1000mg インタビューフォーム. 2020 年 12 月改訂（第 19 版）.

19）厚生労働省. 「日本人の食事摂取基準（2015 年版）」策定検討会報告書 ビタミン（水溶性ビタミン） 6 葉酸. 2015, 215-219.

20）Chanarin I, Smith GN, Wincour V. Development of Folate Deficiency in the Rat. Br J Haematol. 1969, 16(1), 193-195.