目次

2.6.1　緒言 2
2.6.1.1　参考文献 3

2.6.1　緒言

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（以下，「MTX」）を加水分解する作用を有し，大量メトトレキサート（以下，「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（以下，「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)]．また本療法では，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，この障害が 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)]．この問題を解決するため，血中 MTX 濃度を低下させる治療方法が求められていた．

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（以下，「CPG2」）を大腸菌 RV308 株でクローン化した，活性部位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．390 個のアミノ酸残基からなる 2 つのサブユニットから構成され，サブユニットの分子量は約 41,440 であり，二量体の分子量は約 83,000 である．グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）の作用機序は，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（以下，「DAMPA」）及びグルタミン酸を生成する．つまり，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）は，MTX を DAMPA とグルタミン酸に変換することにより，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．なお公表文献において，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[3)]．

本剤は米国で 2012 年 1 月に承認され，現在，欧州医薬品庁（EMA）申請中である．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．国内では新たに非臨床試験を実施せず，米国での生物製剤承認申請（BLA）の資料を用いて評価した．

今般，国内において，HD-MTX 療法に伴う MTX 中毒に対して本剤の一定の有効性及び安全性が確認されたことから，以下の用法及び用量，効能又は効果にて製造販売承認申請を行うこととした．

申請時の効能又は効果：
メトトレキサート中毒

申請時の用法及び用量：
通常，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）として 50 U/kg を 5 分間かけて静脈内投与する．

2.6.1.1 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, 92-113.

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） 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.

目次

2.6.2.1　まとめ 4
2.6.2.2　効力を裏付ける試験....10
2.6.2.2.1　BDF_1 マウス MTX 毒性の救援（Chabner 1972）....10
2.6.2.2.2　C57BL／6N マウス MTX 毒性量決定試験（試験番号：PR001-NCL-TX004）..11
2.6.2.2.3　マウスにおける HD-MTX 療法による毒性からのグルカルピダーゼによる救援 13
2.6.2.2.3.1　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）....13
2.6.2.2.3.2　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）（試験報告書中にタイトルの記載なし）（試験番号：PR001-NCL-PC002）....16
2.6.2.2.4　グルカルピダーゼ静脈内投与後の MTX 薬物動態（Adamson 1992）....18
2.6.2.2.5　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）....21
2.6.2.3　副次的薬理試験....24
2.6.2.4　安全性薬理試験....25
2.6.2.4.1　サルとヒト白血病細胞株 MOLT-4 に対する DAMPA の影響（Widemann 2000）....25
2.6.2.4.2　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）....27
2.6.2.4.3　イヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験（試験番号：PR001-NCL-PK005）....29
2.6.2.4.4　イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験（試験番号：PR001-NCL-PC001）....32
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用....36
2.6.2.5.1　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）....36
2.6.2.6　考察及び結論....51
2.6.2.7　図表 54
2.6.2.8　参考文献 54

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
＋dP/dt	maximal rate of increase in left ventricular pressure	左室圧最大増加速度
－dP/dt	minimal rate of increase in left ventricular pressure	左室圧最小増加速度
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
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
D_5W	5% dextrose in water	5%デキストロース液
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
DTT	Dithiothreitol	ジチオスレイトール
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
HPLC	High-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
k_l	－	一次速度定数
K_m	Michaelis constant	ミカエリス定数
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
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
$NaHCO_3$	Sodium hydrogen carbonate	炭酸水素ナトリウム
NaOH	Sodium Hydroxide	水酸化ナトリウム
OD	Optical Density	光学密度
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
SpecAct	Specific Activity	比活性

略語	英語	日本語
$t_{1/2}$	Time to half-life	半減期
$ZnSO_4$	Zinc sulfate	硫酸亜鉛

2.6.2.1 まとめ

大量メトトレキサート（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）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，メトトレキサート（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)]．また本療法では，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，この障害が 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，血中 MTX 濃度を低下させる治療方法が求められていた．

MTX を加水分解する酵素として，*Pseudomonas* sp. RS16 株由来のカルボキシペプチダーゼ G2（CPG2）及び *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[5, 6)]．グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）は CPG2 をクローン化した大腸菌 RV308 株に生産させたものである．*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 参照）．そのため，本概要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，各試験及び公表文献に使用した被験物質を表 2.6.2.1-1 に示した．

表 2.6.2.1-1　薬理試験に使用した被験物質

被験物質	使用した試験番号又は公表文献（添付資料番号）
CPG1	・効力を裏付ける試験：Chabner 1972（4.3-8）
Pseudomonas sp. RS16 株由来の CPG2	・効力を裏付ける試験：Adamson 1992（4.3-9）
グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）	・効力を裏付ける試験：PR001-NCL-IN001（4.2.1.1-2） ・効力を裏付ける試験：PR001-NCL-PC002（4.2.1.1-3） ・効力を裏付ける試験：PR001-NCL-PK002（4.2.1.1-4） ・薬力学的薬物相互作用試験：PR001-NCL-PK008（4.2.1.4-1）

効力を裏付ける試験（*in vivo*）は，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）及びアカゲザル（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[7, 8]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[9]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 のミカエリス定数（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独立した安全性薬理試験は実施しなかったが，グルカルピダーゼの安全性薬理コアバッテリー（中枢神経系，心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響）をラット及びイヌの反復投与毒性試験結果より評価した．

ラット 3 日間反復投与毒性試験（試験番号：1845/013，詳細：2.6.6.3.1 参照）では，約 53 日齢の雌雄のラット（各群雌雄各 10 例）に 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日のグルカルピダーゼを 1 日 1 回，3 日間連続して静脈内投与し，10 日間の回復期間を設けた．中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響について，一般状態観察により評価した．結果は，一般状態観察において、いずれの用量においても異常は認められなかった．

イヌ用量漸増忍容性試験（試験番号：PR001-NCL-TX001，詳細：2.6.6.3.2 参照）では，少なくとも 6 ヵ月齢の雌雄のイヌ（雌雄各 1 例）に 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 日目（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．中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響について，一般状態観察により評価した．結果は，一般状態観察において，中枢神経系及び呼吸器系へのグルカルピダーゼによる影響は認められなかった．

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（試験番号：PR001-NCL-TX002，詳細：2.6.6.3.3 参照）では，少なくとも 4 ヵ月齢の雌雄のイヌ（各群雌雄各 3 例）に 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）並びに 13 日目（雄の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）」に静脈内投与した．中枢神経系に及ぼす影響については一般状態観察及び体温，呼吸器系に及ぼす影響は一般状態観察，心血管系に及ぼす影響は心電図により評価した．結果は，一般状態観察において，中枢神経系及び呼吸器系へのグルカルピダーゼによる影響は認められなかった．また，投与 13 日目に心電図検査が実施された 50 U/kg/日群の雌雄及び 2,500 U/kg/日の雌において，心電図に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 が分解された際の生成物である 4-deoxy-4-amino-N^{10}-methylpteroic acid（DAMPA）について安全性薬理試験を 3 試験実施し，加えて公表文献 1 報[10]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%[11]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（pH 7.0 での溶解度は DAMPA 0.85 mg/mL，MTX

9.04 mg/mL）[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[11, 12]．別の公表文献では，雄性 CDF_1 マウスに 1 日 1 回×2 日のデザインで MTX 又は DAMPA を腹腔内投与した際の 50%致死量が，MTX と比較して DAMPA で高かったと報告されている（MTX：58 mg/kg, DAMPA：260 mg/kg）[13]．加えて同文献にて，*in vitro* において DAMPA 又は MTX を添加（0～1 μg/ml）して L1210 細胞の増殖を比較した際，DAMPA の細胞増殖の抑制率は MTX の約 6 分の 1 であった（MTX：70%，DAMPA：11%）ことが報告されている．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 *in vitro* 試験として，前述のヒト血漿中での検討を行った．

開発初期の効力を裏付ける試験（*in vivo*）に関して，Chabner らによる雄性 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[7]．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 毒性量決定試験で決定した MTX 500 mg/kg/日を 1 日 1 回，4 日間連続腹腔内投与した雌性 C57BL／6N マウスと比較して，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雄性 Swiss Webster マウスと，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 薬物動態に関する報告がある [8]．MTX 静脈内投与（初回量 300 mg/m^2/h *1 を 1 時間投与後，60 mg/m^2/h*2 を 17 時間投与）後にグルカルピダーゼ 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を示した動物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．

＊1：25 mg/kg/h，2.6.2.2.4 及び 2.6.2.6 項を含む以下，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 [14]．

＊2：5 mg/kg/h，2.6.2.2.4 及び 2.6.2.6 項を含む以下，kg 当たりの投与量算出には 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 [14]．

サルのグルカルピダーゼ投与後 MTX 薬物動態試験では，MTX 静脈内投与（初回量 300 mg/m^2/h*3 を 1 時間投与後，60 mg/m^2/h*4 を 4 時間投与）終了時における雄性サルの血漿中 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血漿中 MTX 濃度はグルカルピダーゼ投与後 5 分で定量下限値未満（BLQ）～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．

＊3：25 mg/kg/h，2.6.2.2.5 及び 2.6.2.6 項を含む以下，kg 当たりの投与量算出には 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[14]．

＊4：5 mg/kg/h，2.6.2.2.5 及び 2.6.2.6 項を含む以下，kg 当たりの投与量算出には 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[14]．

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 の影響に関する報告がある[10]．雄性サルに DAMPA 200 mg/m^{2}＊5 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．

＊5：約 16.7 mg/kg，2.6.2.4.1 及び 2.6.2.6 項を含む以下，kg 当たりの投与量算出には 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[14]．

ウサギにおける DAMPA 及び MTX 心血管系安全性試験において，雌性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（$MAPD_{90}$）に有意な影響が認められた．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，雌雄イヌに DAMPA 15，30 及び 60 mg/kg を約 15～30 分かけて静脈内投与した．また，DAMPA は腎臓などで pH 7 未満の環境になると析出する可能性が

知られているため，イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験で腎臓を保護するためのレジメン（水分補給及びアルカリ化並びに食事療法）の検討も行った．その結果，60 mg/kg の忍容性は良好であった．また，DAMPA の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-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 [15]．クリアランスは公表文献の値 [15] 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．以上から，イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験では DAMPA 60 mg/kg を最大用量として静脈内投与することとした．また，尿検査及び肉眼的観察の結果から腎臓に明らかな影響は認められなかったため，本試験で検討した水分補給及びアルカリ化並びに食事療法を行うこととした．

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変化が認められた．特に両眼又は片眼の強膜の赤変化は 4 例全てで認められた．また雄 1 例で右目の強膜の赤変化が投与後 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 時間において，血漿中 DAMPA 濃度は用量増加に伴って増加した．

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-メチルテトラヒドロ葉酸（5-MeTHF）などに対するグルカルピダーゼの酵素的特性を，計 12 の実験（実験 1～5c）からなる *in vitro* 試験で検討した．結論としては実験 1 及び実験 3 から，MTX，(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF に対するグルカルピダーゼの比活性（SpecAct）の大きさは(6R)-LV＜(6S)-LV＜(6S)-5-MeTHF＜MTX の順であった．実験 2a から，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．そのため，一連の実験で使用したヒト血漿中にはグルカルピダーゼが作用するために十分量の亜鉛イオンを含んでいると考えられた．実験 2b から，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．実験 2c から，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．実験 2d から，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．実験 4a 及び 4c から 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，実験 4b は(6S)-5-MeTHF の K_m を推定するために実施した

が，十分なデータが得られなかったため算出しなかった．実験 5a～5c から，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．

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　BDF_1 マウス MTX 毒性の救援（Chabner 1972）

（添付資料：4.3-8）

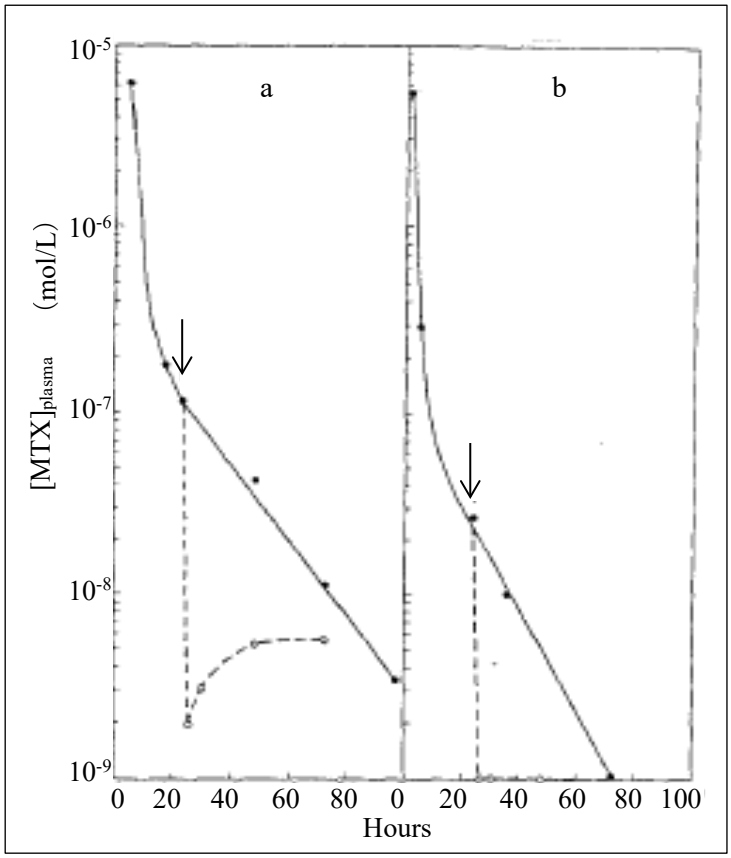
実験 1 では，雄性 BDF_1 マウスに MTX 350 mg/kg を腹腔内投与した群（MTX 投与日を投与 0 日目とする）（8 例），MTX 350 mg/kg を腹腔内投与した 24 時間後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を腹腔内投与した群（8 例），MTX 1,000 mg/kg を腹腔内投与した群（32 例）及び MTX 1,000 mg/kg を腹腔内投与した 24 時間後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を腹腔内投与した群（16 例）の 4 群において，MTX の血漿中からの消失を検討した．さらに，これら 4 群に MTX 1,000 mg/kg を腹腔内投与した 24 時間後及び 48 時間後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を連続腹腔内投与した群（17 例）を加えて，60 日間観察を行い生存率を検討した．

実験 2 では，雄性 BDF_1 マウスに MTX 5 mg/kg を腹腔内投与した群（3 例），MTX 5 mg/kg を腹腔内投与した 24 時間後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を腹腔内投与した群（3 例）及び MTX は投与せず投与 1 日目にグルカルピダーゼ 800 U/kg のみを腹腔内投与した群（3 例）において，投与 2 日目の肝臓の MTX 濃度を検討した．

実験 1 の血漿中 MTX 濃度に対するグルカルピダーゼの影響を図 2.6.2.2.1-1 に示した．MTX 1,000 mg/kg を投与したところ，3 日間にわたって血漿中 MTX 濃度は 0.01 μmol/L を上回った．次に MTX 1,000 mg/kg 投与後，投与 1 日目にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与したところ，血漿中 MTX 濃度は速やかに減少したが，遅発性の上昇がグルカルピダーゼ投与 12～24 時間後に見られた. Chabner らは, 血漿中 MTX 濃度で遅発性の上昇が見られたのは，消化管の内腔などグルカルピダーゼが到達できなかった部位に MTX が残存していた可能性を報告している．MTX 350 mg/kg 投与後，投与 1 日目にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与したところ，グルカルピダーゼ投与により血漿中 MTX が完全に消失した，遅発性の増加も認められなかった．

実験 1 で，MTX 350 mg/kg の投与群の生存率は 62.5%であった（4.3-8 の Table 1）．一方，MTX 350 mg/kg 投与後，投与 1 日目にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与した群の生存率は 100%であった．また，MTX 1,000 mg/kg を投与した群の生存率は 22%であったのに対し，MTX 1,000 mg/kg 投与後，投与 1 日目にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与した群の生存率は 50%であり，さらに MTX 1,000 mg/kg を投与後，投与 1 及び 2 日目にグルカルピダーゼ 800 U/kg を連続投与すると，生存率は 94%に増加した．MTX のいずれの用量を用いた場合においても，グルカルピダーゼ投与により生存率の増加が見られた．

図 2.6.2.2.1-1　血漿中 MTX 濃度に対するグルカルピダーゼの影響



a：（●）MTX 1,000 mg/kg を投与，（○）MTX 1,000 mg/kg を投与した 24 時間後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与，（↓）グルカルピダーゼ投与時点

b：（●）MTX 350 mg/kg を投与，（○）MTX 350 mg/kg を投与した 24 時間後にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与，（↓）グルカルピダーゼ投与時点

引用元：4.3-8（Chabner 1972）の Figure 1 から一部改変

実験 2 の結果，MTX を 5 mg/kg 投与した群と MTX を 5 mg/kg 投与 24 時間後（投与 1 日目）にグルカルピダーゼ 800 U/kg を投与した群を比較すると，どちらも肝臓内に MTX は存在していたが両群で濃度に違いはなかった（4.3-8 の Table 2）．Chabner らはこの結果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．

2.6.2.2.2　C57BL／6N マウス MTX 毒性量決定試験（試験番号：PR001-NCL-TX004）

（添付資料：4.2.1.1-1）

本試験の目的は，C57BL／6N マウスにおける HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）に使用する MTX の用量を設定することであった．

雌性 C57BL／6N マウス（6～8 週齢）を 4 群のいずれかに割付けた（表 2.6.2.2.2-1）．第 1 群の動物は血液パラメータのベースラインを得るために，何も投与しなかった．第 2 群の動物には MTX 投与群の対照群として，等容量のリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を 1 日 1 回，

5 日間，連続腹腔内投与した．第 3 群及び第 4 群の動物には，健康状態に応じて MTX（3 群：250 mg/kg/日，4 群：500 mg/kg/日）を 1 日 1 回，3 又は 4 日間，連続腹腔内投与した．本試験では死亡又は瀕死，一般状態，体重，血液学的検査，肉眼的観察及び病理組織学的検査について検討した．第 1 群の動物は投与 1 日目（投与初日を投与 1 日目とする）に，他の投与群は投与 7 日目に安楽死させて剖検した．

表 2.6.2.2.2-1　C57BL／6N マウス MTX 毒性量決定試験の試験デザイン

群	動物数	用量	投与経路	投与回数
1*	5	－	－	－
2	10	PBS	腹腔内	1 日 1 回×5 日
3	15	MTX 250 mg/kg/日	腹腔内	1 日 1 回×3～4 日
4	15	MTX 500 mg/kg/日	腹腔内	1 日 1 回×3～4 日

－：該当事項なし

＊：投与前に採血

引用元：4.2.1.1-1（PR001-NCL-TX004）の EXPERIMENTAL DESIGN の Table 1 から一部改変

本試験の結果として，投与 6 日目又は投与 7 日目に第 3 群の 2 例と第 4 群の 6 例の死亡が確認された．なお，これらの動物は組織の自己融解が激しく，肉眼的観察及び病理組織学的検査には使用できなかった．一般状態は，第 2 群では特筆すべき変化は認められなかったが，第 3 及び 4 群では投与 5 日目以降に変化（円背，脱水，粗毛及び嗜眠）が認められた．体重は，第 2 群の平均体重は比較的一定であったが，第 3 群と第 4 群は投与 3 日目以降，顕著に減少した．投与 3 日目又は投与 4 日目に MTX の投与を中止したが，体重減少は安楽死させた投与 7 日目まで継続した．血液学的検査は，第 1 群と第 2 群の血液学的パラメータは類似していた．一方，第 3 及び 4 群では，第 1 及び 2 群と比較して白血球，赤血球，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板及び網状赤血球などの減少傾向が認められた．肉眼的観察は，第 2 群では変化は認められなかったが，第 3 及び 4 群の消化管に液体が認められた．また，肝臓の変色，胆嚢の肥大，腎臓の小型化（片側性），腎臓の陥凹（両側性）なども認められた．病理組織学的検査は，第 2 群では変化は認められなかった．第 3 群と第 4 群の病変は類似しており，主要な所見は小腸内の絨毛及び陰窩の顕著な消失であった．また，小腸及び盲腸の粘膜表面上の上皮細胞の空胞化又は盲腸の粘膜の菲薄化なども認められた．なお，病理組織学的所見は第 3 群より第 4 群の方が重度な傾向があると考えられた．

本試験の結論として，C57BL／6N マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）には，500 mg/kg/日の MTX を腹腔内投与することとした．

2.6.2.2.3 マウスにおける HD-MTX 療法による毒性からのグルカルピダーゼによる救援

2.6.2.2.3.1 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）

（添付資料：4.2.1.1-2）

本試験の目的は，MTX による毒性を LV 存在下でグルカルピダーゼにより軽減できるかを明らかにし，グルカルピダーゼ投与により血中 MTX 濃度が低下するかを確認することであった．

雌性 C57BL／6N マウス（5～6 週齢）を 4 群のいずれかに割付けた（表 2.6.2.2.3.1-1）．なお，第 3 群と第 4 群は更に A 群と B 群のサブグループに分けた．第 1 群は対照として PBS を 4 日間連続腹腔内投与した（投与初日を投与 1 日目とする）．第 2 群は MTX 500 mg/kg/日を 4 日間連続腹腔内投与した．第 3 群は MTX 500 mg/kg/日を 4 日間連続腹腔内投与し，投与 2 日目以降の MTX 投与後 6 及び 18 時間後に LV 6.75 mg/kg を腹腔内投与した．第 4 群は MTX 500 mg/kg/日を 4 日間連続腹腔内投与し，投与 2 日目以降の MTX 投与後 6 及び 18 時間後に LV 6.75 mg/kg を腹腔内投与した．さらに投与 4 日目の MTX 投与後 30 分にグルカルピダーゼ 50 U/kg を尾静脈に投与した．なお，MTX は各群の体重の中央値が 10～20%減少するまで投与することとし，投与 4 日目で 20%を超えたため全群の最終投与は投与 4 日目とした．また，MTX の投与を終了したときに LV の投与も中止した．

本試験では死亡又は瀕死，一般状態，体重，肉眼的観察（第 3B 及び 4B 群を除く），病理組織学的検査（第 3B 及び 4B 群を除く），骨髄検査（第 3B 及び 4B 群を除く）及び血液学的検査（第 3B 及び 4B 群を除く）を検討した．また，第 3B 及び 4B 群はバリデートされた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）蛍光法「バリデーション報告書：PTU 025（添付資料：4.2.2.1-1）」により MTX 及び DAMPA 濃度を評価した．MTX 及び DAMPA 濃度測定用の血漿検体は投与 1 日目の MTX 投与後 15 分（第 3B 群）並びに投与 4 日目の MTX 投与後 15 分（第 4B 群，グルカルピダーゼ投与前）及び投与後 45 分「第 3B 及び 4B 群（グルカルピダーゼ投与後 15 分）」に採取した．投与 6 日目に第 1 群 15 例，第 2 群 14 例，第 3A 群 12 例及び第 4A 群 12 例を剖検し，残りの生存していた動物（第 1 群 5 例，第 2 群 1 例，第 3A 群 2 例及び第 4A 群 2 例）は投与 8 日目に剖検した．なお，試験期間中に死亡又は瀕死の状態となった動物の一部はその時点で剖検した．

本試験において DAMPA 及び MTX 濃度の測定は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106, OECD 及び DIRECTIVE 2004/10/EC の GLP に準じて[redacted]で実施した．

表 2.6.2.2.3.1-1　C57BL/6N マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）の試験デザイン

群番号	動物数	MTX	投与経路	LV（MTX 投与後の 6 及び 18 時間）	投与経路	グルカルピダーゼ（最終 MTX 投与後 30 分）	投与経路
1*	20	－	－	－	－	－	－
2	20	500 mg/kg/日	腹腔内	－	－	－	－
3A	15	500 mg/kg/日	腹腔内	6.75 mg/kg	腹腔内	－	－
3B	10	500 mg/kg/日	腹腔内	6.75 mg/kg	腹腔内	－	－
4A	15	500 mg/kg/日	腹腔内	6.75 mg/kg	腹腔内	50 U/kg	静脈内
4B	10	500 mg/kg/日	腹腔内	6.75 mg/kg	腹腔内	50 U/kg	静脈内

－：該当事項なし

＊：MTX の代わりに PBS を腹腔内投与した.

引用元：4.2.1.1-2（PR001-NCL-IN001）の EXPERIMENTAL DESIGN の Table 2 から一部改変

本試験の結果として, 試験中に 7 例（第 2 群で 5 例, 第 3A 群で 1 例及び第 4A 群で 1 例）の死亡及び瀕死が認められた.

一般状態は，第 1 群に特筆すべきことはなかったが，第 2，3 及び 4 群の動物では投与 5 日目以降に変化（痩せ，円背，脱水，粗毛及び嗜眠）が認められた.

体重は，第 1 群（対照群）の平均体重は試験期間中ほぼ一定であった．一方，第 2，3 及び 4 群の平均体重は投与 1 日目から投与 6 日目又は投与 8 日目までに 20%を超えて減少した．なお，第 2，3 及び 4 群でレジメンに関わらず体重減少の程度は試験期間を通して同様であった.

肉眼的観察は，第 1 群に変化は認められなかった．一方，第 2，3A 及び 4A 群では，それぞれ 16 例中 9 例，14 例中 6 例，15 例中 1 例で消化管の拡張が認められた．また，脾臓又は腎臓の小型化，肝臓の変色などの変化が認められる個体があった.

病理組織学的検査は，第 1 群は特記すべき所見はなく，おおむねこの系統と日齢の動物に認められる通常の所見であった．第 2，3A 及び 4A 群の評価可能な全例で軽度から重度の小腸粘膜の壊死が認められ，十二指腸で最も重度であった．また第 2 群と比較して，小腸粘膜の壊死は第 3A 及び 4A 群で軽度であった．第 2，3A 及び 4A 群の肝臓ではグリコーゲンの枯渇（グリコーゲン貯蔵によって空胞化した肝細胞の減少）が認められた．なお，肝細胞のリピドーシスが第 3A 群にのみ認められた．第 4A 群の約半数の動物には，ネフローゼ及び鉱質沈着が認められたが軽微から軽度であった.

骨髄検査は，第 1 群では特筆すべきことはなかった．一方，第 2，3A 及び 4A 群の細胞密度は，第 1 群と比較して低下していた．このような細胞密度の低下は骨髄系前駆細胞，赤血

球前駆細胞，リンパ球及び巨核球の減少を反映していた．なお，第 2，3A 及び 4A 群の結果はレジメンに関わらず同様であった．

血液学的検査は，投与 6 日目又は投与 8 日目のいずれかにおいて，採血ができなかったか又は採血量が十分ではなかったため，全動物からの血液学的データは得られなかった．なお，投与 8 日目で生存していた動物は極めて少数であり，結果が得られたのは第 1 群（5 例）及び第 3A 群（1 例）のみであった．投与 6 日目の限られたデータから第 1 群と比較して，第 2，3A 及び 4A 群で赤血球及び白血球が低値を示した．また，第 2 群及び第 3A 群と比較して，第 4A 群で多形核好中球（絶対値及び相対値），単球（絶対値及び相対値），好酸球（相対値），好塩基球（絶対値及び相対値）及びペルオキシターゼ陰性大型細胞（絶対値及び相対値）が増加した．

MTX 濃度は，第 3B 群で MTX 投与後 15 分の血漿中濃度は 37.1～956 μmol/L（投与 1 日目）であり，MTX 投与後 45 分では 61.2～2,000 μmol/L（投与 4 日目）であった．第 4B 群で MTX 投与後 15 分（グルカルピダーゼ投与前）の血漿中 MTX 濃度は 71.7～2,950 μmol/L（投与 4 日目）だった．血漿中 MTX 濃度に対するグルカルピダーゼの効果は顕著であり，第 4B 群で MTX 投与後 45 分（グルカルピダーゼ投与後 15 分）には 1.19～7.27 μmol/L（投与 4 日目）に低下した．

DAMPA 濃度は第 4B 群で高く，MTX 投与後 15 分（グルカルピダーゼ投与前）では 0.211～0.607 μmol/L（投与 4 日目）であり，MTX 投与後 45 分（グルカルピダーゼ投与後 15 分）では 3.35～57.1 μmol/L（投与 4 日目）であった．

本試験の結論としては，第 2 群（MTX のみ投与）と比較して，第 3 群（MTX＋LV 投与）及び第 4 群（MTX＋LV＋グルカルピダーゼ投与）では死亡及び瀕死例が低下した．さらに第 2 群及び第 3A 群と比較したところ，第 4A 群で肉眼的所見（消化管の拡張）が認められた例数は減少した．しかし，体重の減少において明らかな改善は認められなかった．第 4B 群の結果から，血漿中 MTX 濃度はグルカルピダーゼの投与により 71.7～2,950 μmol/L「投与 4 日目，MTX 投与後 15 分（グルカルピダーゼ投与前）」から 1.19～7.27 μmol/L「投与 4 日目，MTX 投与後 45 分（グルカルピダーゼ投与後 15 分）」に低下した．一方，DAMPA 濃度は 0.211～0.607 μmol/L「投与 4 日目，MTX 投与後 15 分（グルカルピダーゼ投与前）」から 3.35～57.1 μmol/L「投与 4 日目，MTX 投与後 45 分（グルカルピダーゼ投与後 15 分）」に増加した．

2.6.2.2.3.2　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）（試験報告書中にタイトルの記載なし）（試験番号：PR001-NCL-PC002）

（添付資料：4.2.1.1-3）

本試験の目的は，次の 2 点の仮説を検証することであった．1 点目は，マウスにおいてグルカルピダーゼ及び LV の投与が MTX 誘発毒性を軽減すること．2 点目は，MTX 投与後にグルカルピダーゼ＋LV を併用投与すると，MTX 誘発毒性を LV 単独投与に比べて軽減することであった．

雄性 Swiss Webster マウス（5～6 週齢）を，MTX 投与用ポンプ留置 4 日前に A，B 及び C 群のいずれかに割付けた（表 2.6.2.2.3.2-1）．浸透圧ポンプに 1.89 mg/mL の MTX を充填し，留置前に 6 時間，滅菌生理食塩液中で平衡化した．MTX の投与速度は 0.07 mg/kg/h とした．動物をケタミン（100 mg/kg）及びキシラジン（10 mg/kg）の腹腔内投与により麻酔し，ポンプを肩部の背側皮下に外科的に留置した．ポンプからカテーテルを腹腔に挿入し，MTX を腹腔内投与した．A, B 及び C 群の各動物に MTX 5 mg/kg を 72 時間かけて腹腔内投与した．A 群には生理食塩液を腹腔内投与（LV の代わり）及び静脈内投与（グルカルピダーゼの代わり）した．B 群には LV 2.5 mg/kg を 6 時間ごとに腹腔内投与し（MTX 投与開始後 32，38，44，50，56，62，68，74，80 及び 86 時間），生理食塩液（グルカルピダーゼの代わり）を静脈内投与した．C 群には LV 2.5 mg/kg を 6 時間ごとに腹腔内投与し（MTX 投与開始後 32，38，44，50，56，62，68，74，80 及び 86 時間），グルカルピダーゼ 50 U/kg/日を MTX 投与開始後 24 及び 48 時間に静脈内投与した．MTX 投与開始後 72 時間の時点で浸透圧ポンプを除去した．本試験では死亡率及び体重減少率（最低時）「（ベースラインの体重－最低体重）／ベースラインの体重×100%」を算出した．動物が死亡した場合，死亡前日の体重を用いて体重減少率（最低時）を算出した．なお，試験中に死亡した動物のデータを含めた場合と除いた場合の両方で投与群間比較を行った．MTX 投与終了から 7 日後（投与開始から 10 日目）に生存例をすべて剖検し，病理組織学的検査を実施した．

表 2.6.2.2.3.2-1　Swiss Webster マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与，MTX72 時間投与）の試験デザイン

群	動物数	MTX	投与経路	LV	投与経路	グルカルピダーゼ（MTX 投与後の 24 及び 48 時間）	投与経路
A*1,2	10	5 mg/kg	腹腔内	－	－	－	－
B*2	10	5 mg/kg	腹腔内	2.5 mg/kg	腹腔内	－	－
C	11	5 mg/kg	腹腔内	2.5 mg/kg	腹腔内	50 U/kg/日	静脈内

－：該当事項なし

＊1：LV の代わりに生理食塩液を腹腔内投与した．

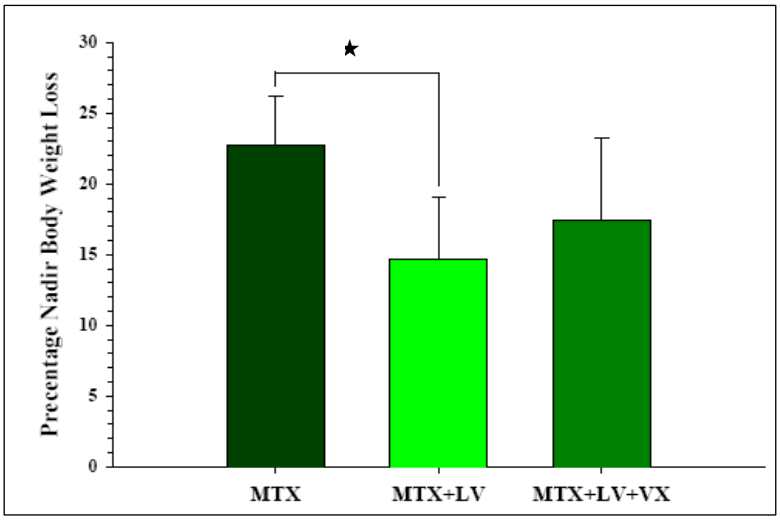
＊2：グルカルピダーゼの代わりに生理食塩液を静脈内投与した．

引用元：4.2.1.1-3（PR001-NCL-PC002）の Pathology Report の Table 1 から一部改変

死亡率の結果はA群（MTX）40%，B群（MTX＋LV）60%及びC群（MTX＋LV＋グルカルピダーゼ）63.6%であった．

全動物の体重減少率（最低時）を図2.6.2.2.3.2-1に示した．体重減少率（最低時）は，全動物のデータを含めたとき，B群ではA群と比べて有意に低く，C群ではA群と比べて低い傾向があることが示された．しかし，B群とC群を比較したとき，体重減少率（最低時）に有意差は認められなかった．一方，試験を通して生存した動物のデータのみを含めた体重減少率（最低時）については，A群に比べてB群とC群の両方で有意に低いことが示された（詳細は4.2.1.1-3のFigure 2b参照）．

図 2.6.2.2.3.2-1　全動物の体重減少率（最低時）



MTXはA群（n＝10）を，MTX＋LVはB群（n＝10）を，MTX＋LV＋VXはC群（n＝11）を示す．なお，VXはグルカルピダーゼを指す．

★：有意差あり．

引用元：4.2.1.1-3（PR001-NCL-PC002）のRESULTSのFigure 2a

病理組織学的検査の結果は，肝臓に髄外造血がA群の3例，B群の4例及びC群の3例に認められたが，これはマウスの一般的な所見であった．大半の動物には肝壊死が確認された（A群の2例，B群の5例及びC群の9例）．肝壊死が認められたC群の1例は肝膿瘍を伴っていた．門脈周囲の炎症が各群1例に認められた．腎炎がC群の4例に認められた．また，C群では1例に近位曲尿細管の肥大が認められた．消化管に認められた全ての所見は，壊死や壊死に対する修復反応に一致していた．これらの変化はA群の3例では胃に，2例（自己融解を除く）では小腸に，2例では大腸に認められた．B群では，胃で1例に変化が認められたが，小腸及び大腸に変化は認められなかった．C群の3例では胃に，1例では小腸に，1例（自己融解を除く）では大腸に変化が認められた．

本試験の結論として，死亡率及び病理組織学的検査の結果において，MTXのみ投与したA群と比較して，B群及びC群で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 A 群と比較して，B 群及び C 群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は明らかな差は認められなかった．

2.6.2.2.4　グルカルピダーゼ静脈内投与後の MTX 薬物動態（Adamson 1992）

（添付資料：4.3-9）

実験 1 では，雄性サルに 25 mg/kg/h の MTX を 1 時間かけて静脈内投与した後，5 mg/kg/h の MTX を 17 時間かけて静脈内投与した．18 時間の MTX 静脈内投与が終了した後，グルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与（3 例）した時の，MTX の薬物動態におけるグルカルピダーゼの影響を検討した．対照群は，生理食塩液を静脈内投与（3 例）した．血漿検体は, MTX 投与終了 1 時間前, MTX 投与終了直後並びにグルカルピダーゼ投与終了後 5, 10, 15，30，45，60，90，120，180，240 及び 360 分に採取した．

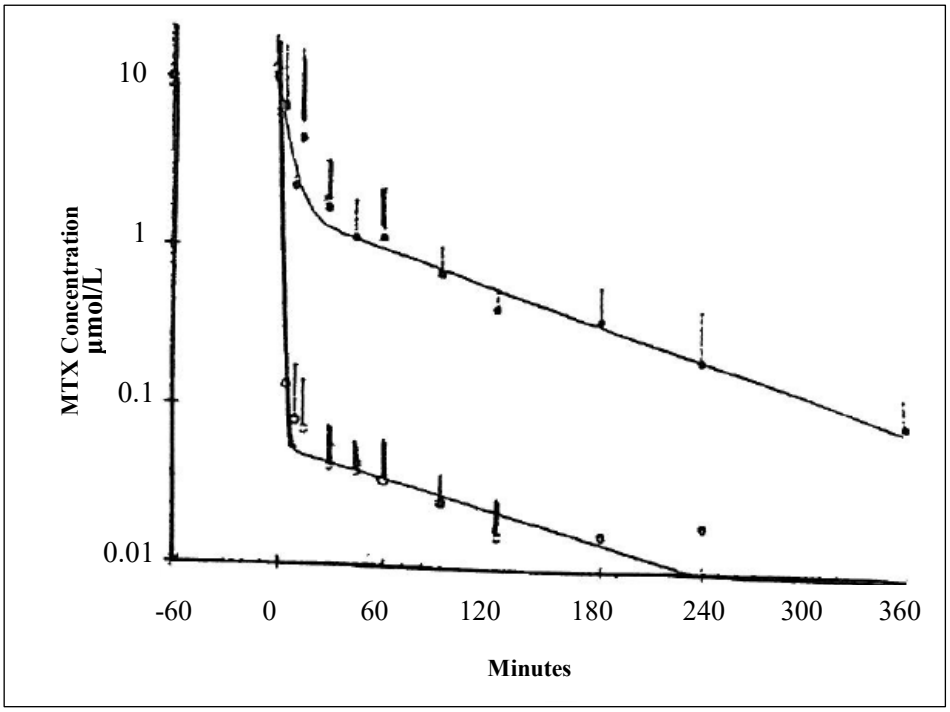
実験 2 では，グルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与（2 例）した時のグルカルピダーゼの薬物動態を検討した．血漿は，グルカルピダーゼ投与終了後 5，10，15，30，45，60，90，120，180，240 及び 360 分に採取した．血漿中グルカルピダーゼ濃度は，McCullough らの測定法[6)]により求めた．

実験 3 では，グルカルピダーゼ 50 U/kg を 2 週間ごとに 3 回（3 例）あるいは 8 回（1 例）静脈内投与した時の抗グルカルピダーゼ抗体の産生の有無を検討した．血漿標本は，それぞれの投与群の各投与前（合計 8 回投与する 1 例では毎週）に採取した．抗グルカルピダーゼ抗体の測定は，酵素結合免疫吸着法（ELISA）「光学密度（OD）：405 nm」で行った．

実験 4 では，実験 3 で高い抗グルカルピダーゼ抗体価を示した 2 例の動物で，グルカルピダーゼ投与後の MTX の薬物動態を検討した．1 例の動物には 25 mg/kg/h の MTX を 1 時間かけて静脈内投与し，5 mg/kg/h の MTX を 17 時間かけて静脈内投与した直後にグルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与した．別の 1 例の動物には 25 mg/kg/h の MTX を 1 時間かけて静脈内投与し，5 mg/kg/h の MTX を 17 時間かけて静脈内投与した直後及びその 1 時間後の計 2 回，グルカルピダーゼ 50 U/kg を静脈内投与した．

実験 1 の結果，対照群では 0.05 μmol/L を超える血漿中 MTX 濃度が約 7 時間持続したのに対し，グルカルピダーゼ 50 U/kg 単回静脈内投与群では，投与後 15 分以内に血漿中 MTX 濃度は対照群の 100 分の 1 未満に低下し，30 分以内に血漿中 MTX 濃度が MTX の無毒性濃度（＜0.05 μmol/L）に達した（図 2.6.2.2.4-1 参照）．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，対照群と比較して，MTX の 2-コンパートメントモデルの α 相 $t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 5.8±2.1 分から 42±1.2 秒に短縮し，また， MTX の $AUC_{0-\infty}$は 301±171 μmol･min/L から 19.6±6.1 μmol･min/L に減少した．

図 2.6.2.2.4-1　血漿中 MTX 濃度（平均値±標準偏差，n＝3）



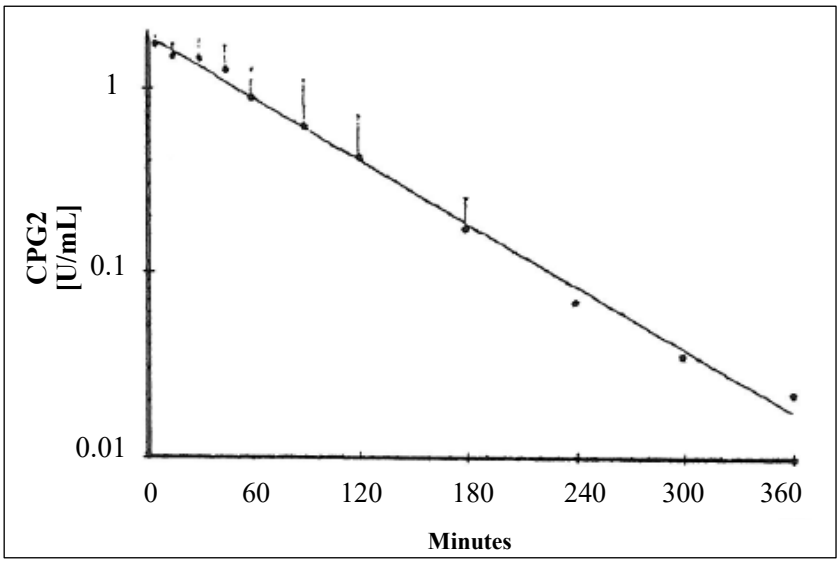
●：MTX のみ投与した対照群，○：MTX 投与後に 50 U/kg のグルカルピダーゼを投与した群

最も適合する biexponential 曲線を示す.

引用元：4.3-9（Adamson 1992）の Figure 2 から一部改変

実験 2 の結果，グルカルピダーゼ 50 U/kg を単回静脈内投与すると，血漿中グルカルピダーゼ濃度は一相性で減少した（図 2.6.2.2.4-2 参照）．グルカルピダーゼの $t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 55±3 分であった.

図 2.6.2.2.4-2　血漿中グルカルピダーゼ濃度（平均値±標準偏差，n＝2）

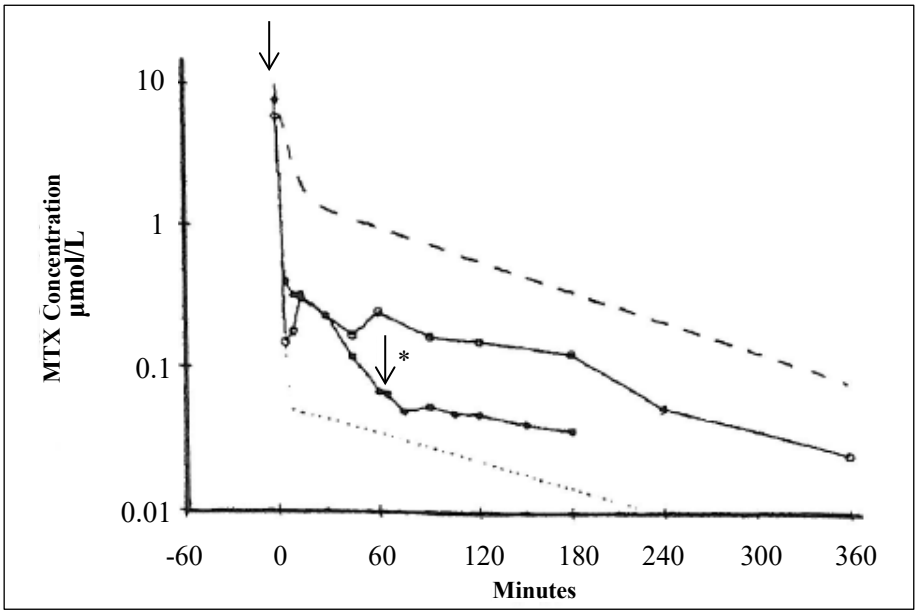


引用元：4.3-9（Adamson 1992）の Figure 3 から一部改変

実験 3 の結果，1 回目にグルカルピダーゼを静脈内投与してから早くて 1 週間で，抗グルカルピダーゼ抗体が検出された（4.3-9 の Figure 4）．実験 3 で用いられた動物に，グルカルピダーゼを反復静脈内投与することによってアレルギー症状は認められなかった．

実験 4 の結果，高い抗グルカルピダーゼ抗体価を示した 2 例の動物でも血漿中 MTX 濃度を低下させた．（図 2.6.2.2.4-3 参照）．実験 1 で MTX を 18 時間静脈内投与後，グルカルピダーゼを投与しなかった時の MTX の $AUC_{0-\infty}$は，301±171 μmol･min/L であった．一方，実験 4 において MTX を 18 時間静脈内投与後，グルカルピダーゼ 50 U/kg を 1 回又は 2 回静脈内投与した MTX の $AUC_{0-\infty}$は，48±14 μmol･min/L であり，実験 1 の MTX 投与及びグルカルピダーゼ非投与時の MTX の $AUC_{0-\infty}$と比較して顕著に減少した．血漿中 MTX 濃度が 0.05 μmol/L を超えていた時間は，実験 1 の MTX を 18 時間静脈内投与後，グルカルピダーゼを投与しなかった動物では 7 時間であったが，実験 4 の MTX を 18 時間静脈内投与後，グルカルピダーゼ 50 U/kg を 2 回静脈内投与した場合では約 3 時間まで短縮した．また実験 4 において，2 回目のグルカルピダーゼ投与時点で血漿中 MTX 濃度が既に 0.1 μmol/L 未満であったため，2 回目のグルカルピダーゼ投与は MTX の分解に付加的な効果はないと考えられた．

図 2.6.2.2.4-3　高い抗グルカルピダーゼ抗体価を示した 2 例のグルカルピダーゼ投与後の MTX の薬物動態（抗グルカルピダーゼ抗体陰性動物の MTX の薬物動態との比較）



（…）：抗グルカルピダーゼ抗体陰性のサルにおけるグルカルピダーゼ投与時の濃度－時間曲線

（- - -）：抗グルカルピダーゼ抗体陰性のサルにおけるグルカルピダーゼ非投与時の濃度－時間曲線

（○）：抗グルカルピダーゼ抗体陽性のサルにおけるグルカルピダーゼ単回投与時の濃度－時間曲線

（●）：抗グルカルピダーゼ抗体陽性のサルにおけるグルカルピダーゼ 2 回投与時の濃度－時間曲線

（↓）：グルカルピダーゼ投与時点，（↓*）：抗体陽性動物のうち 1 例（●）の，初回投与後 60 分の 2 回目グルカルピダーゼ投与時点

引用元：4.3-9（Adamson 1992）の Figure 5 から一部改変

2.6.2.2.5　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）

（添付資料：4.2.1.1-4）

本試験の結果は 2003 年 7 月に行われた American Association for Cancer Research で発表された（以下の文書を使用：a brief protocol，abstract，a summary table of analytical results，data sheets relating to individual monkeys and their treatment）．

本試験の目的は，サルにおける血漿中 MTX 濃度に対する種々な用量のグルカルピダーゼの影響を評価すること及び投与後 15 分以内に血漿中 MTX 濃度を 90%超減少させるグルカルピダーゼの最小用量を決定することであった．

雄性サル（11～16 年齢）に MTX を投与し，血漿中 MTX 濃度約 10 µmol/L の定常状態を得ることとした．MTX 25 mg/kg/h を 1 時間かけて静脈内投与し，その後 5 mg/kg/h を 4 時間かけて静脈内投与した．MTX 投与終了後，グルカルピダーゼ 1 U/kg（3 例），5 U/kg（1 例），又は 15 U/kg（1 例）を約 1 分間かけて，さらに 50 U/kg（1 例）を約 5 分間かけてそれぞれ

静脈内投与した．MTX 投与開始から 24 時間後に全動物に 50 mg の LV を筋肉内投与し，その後 12 時間ごとに 4 回反復投与した．

本試験では一般状態並びに血漿中 MTX 及び DAMPA 濃度について検討した．MTX 及び DAMPA 濃度測定用の血漿検体は MTX 投与前，MTX 投与開始後 2 及び 3 時間，グルカルピダーゼ投与直前の MTX 投与終了時，グルカルピダーゼ投与後 5，15，30 及び 45 分並びに 1，2 及び 3 時間の時点で採取した．なお，MTX 及び DAMPA 濃度は逆相 HPLC-UV 法により測定した．

本試験の結果として，一般状態は 1，5 及び 15 U/kg 投与群に変化は認められず，グルカルピダーゼに忍容性を示した．しかし，50 U/kg 投与群はグルカルピダーゼ投与後 14 分に反応がなくなり，散瞳が認められた．ラクトリンゲル液を投与したところ，直ちに反応性が回復したが, グルカルピダーゼ投与後 1～2 時間に症状が再発した. デキサメタゾン（0.5 mg/kg）を静脈内投与したところ，不整脈が認められた．電解質の分析によりカルシウムの低値が確認されたため，カルシウムを静脈内投与した．翌朝には一般状態は正常に戻った．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．

グルカルピダーゼ投与前及び投与後 3 時間までの血漿中 MTX 濃度を表 2.6.2.2.5-1 に示した．MTX 投与開始後 2，3 及び 5 時間において，いずれの投与群でも血漿中 MTX 濃度は 14 μmol/L 以上であった. MTX 投与開始後 5 時間（MTX 投与終了時）では 14.61～20.70 μmol/L の範囲であり，一般状態に変化が認められた 50 U/kg 投与群の MTX 濃度（20.70 μmol/L）は他の投与群（14.61～19.87 μmol/L）とほぼ同程度であった．グルカルピダーゼ 1 U/kg 投与群の 3 例中 2 例では，投与後 5 分の時点で低濃度の MTX が検出されたが，それを除くとグルカルピダーゼの投与後は，すべての用量及び時間帯で BLQ（＜0.05 μmol/L）であった．

表 2.6.2.2.5-1　グルカルピダーゼ投与前及び投与後 3 時間までの血漿中 MTX 濃度

測定時点	グルカルピダーゼ用量（U/kg）					
	1	1	1*1	5	15	50*2
	MTX 濃度（μmol/L）					
MTX 投与前	BLQ	BLQ	BLQ	NA	BLQ	BLQ
MTX 投与後 2 時間	25.35	19.63	17.24	28.09	22.51	27.79
MTX 投与後 3 時間	19.87	19.75	15.70	25.35	24.71	22.48
MTX 投与後 5 時間（MTX 投与終了）	15.29	16.95	16.20	19.87	14.61	20.70
グルカルピダーゼ投与後 5 分	0.05	BLQ	0.06	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 15 分	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 30 分	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 45 分	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 1 時間	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 2 時間	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 3 時間	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

NA：実施せず（検体紛失），BLQ：定量下限値未満（＜0.05 μmol/L）

＊1：MTX 投与速度が 50 mL/h ではなく 60 mL/h であったため，投与が 30 分早く終了

＊2：グルカルピダーゼ投与後 14 分で所見が認められた．

引用元：4.2.1.1-4（PR001-NCL-PK002）の RESULTS の Table 1 から一部改変

グルカルピダーゼ投与前及び投与後 3 時間までの血漿中 DAMPA 濃度を表 2.6.2.2.5-2 に示した．一般状態に変化が認められた 50 U/kg 投与群のグルカルピダーゼ投与後 5 分の DAMPA 濃度（10.8 μmol/L）は他の動物の DAMPA 濃度（3.0～9.6 μmol/L）とほぼ同程度であった．全投与群において DAMPA 濃度はグルカルピダーゼ投与後 5 分時点で最高濃度となり，その後速やかに低下し，投与後 15 分には 1.3～5.0 μmol/L の範囲となった．グルカルピダーゼ投与後 3 時間には，1 U/kg 投与群の 2 例で 0.1～0.2 μmol/L，1 例で BLQ（＜0.1 μmol/L）となった．5，15 及び 50 U/kg 投与群はそれぞれ BLQ，0.2 μmol/L 及び 0.8 μmol/L となった．

表 2.6.2.2.5-2　グルカルピダーゼ投与前及び投与後 3 時間までの血漿中 DAMPA 濃度

測定時点	グルカルピダーゼ用量（U/kg）					
	1	1	1[*1]	5	15	50[*2]
	DAMPA 濃度（μmol/L）					
MTX 投与前	BLQ	BLQ	BLQ	NA	BLQ	BLQ
MTX 投与後 2 時間	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
MTX 投与後 3 時間	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
MTX 投与後 5 時間（MTX 投与終了）	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
グルカルピダーゼ投与後 5 分	4.9	9.6	4.4	3.0	3.2	10.8
グルカルピダーゼ投与後 15 分	2.8	5.0	2.7	1.3[*3]	2.0	5.0[*4]
グルカルピダーゼ投与後 30 分	1.4	3.7	1.5	1.6[*5]	0.9	5.1
グルカルピダーゼ投与後 45 分	0.9	2.7	1.8	1.2	0.9	3.6
グルカルピダーゼ投与後 1 時間	0.7	2.3	0.9	0.8	0.6	3.7
グルカルピダーゼ投与後 2 時間	0.2	0.9	0.4	0.4	0.3	1.0
グルカルピダーゼ投与後 3 時間	0.1	BLQ	0.2	BLQ	0.2	0.8

NA：実施せず（検体紛失），BLQ：定量下限値未満（＜0.1 μmol/L）

＊1：投与速度が 50 mL/h ではなく 60 mL/h であったため，投与が 30 分早く終了

＊2：グルカルピダーゼ投与後 14 分で所見が認められた.

＊3：検体採取の遅れ，グルカルピダーゼ投与後 24 分

＊4：検体採取の遅れ，グルカルピダーゼ投与後 27 分

＊5：検体採取の遅れ，グルカルピダーゼ投与後 36 分

引用元：4.2.1.1-4（PR001-NCL-PK002）の RESULTS の Table 2 から一部改変

本試験の結論として，グルカルピダーゼの投与により 1 U/kg の用量においても投与後 5 分から 3 時間にわたって MTX 量を 99.5%以上低下させ続けることが明らかとなり，投与 15 分以内に 90%超減少させるグルカルピダーゼの最小用量は 1 U/kg 以下と推定された．グルカルピダーゼ投与後 MTX 濃度の低下を反映して血漿中 DAMPA 濃度は増加し，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 LLOQ 付近となった.

2.6.2.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない.

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 サルとヒト白血病細胞株 MOLT-4 に対する DAMPA の影響（Widemann 2000）

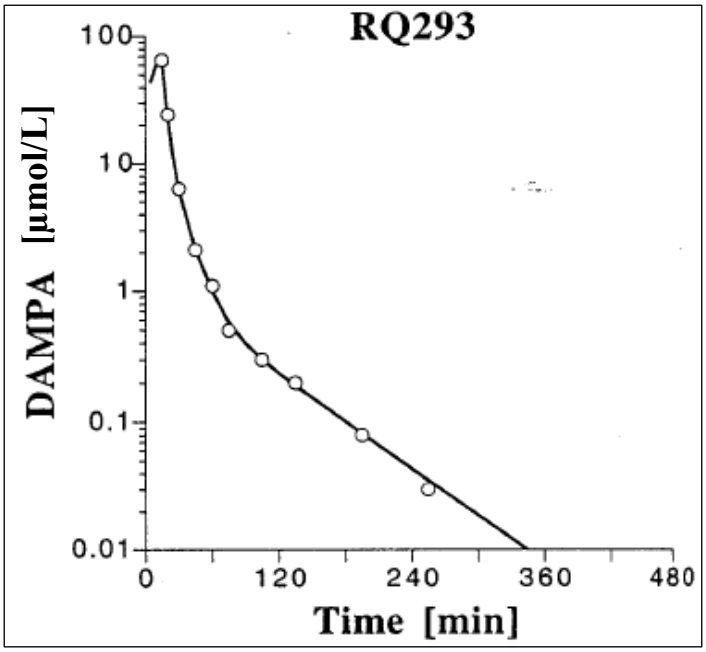
（添付資料：4.3-11）

実験 1 において，4 例の雄性サルに DAMPA 約 16.7 mg/kg を 15 分かけて静脈内投与し，DAMPA の薬物動態及び代謝を検討した．DAMPA 投与 2 時間前から 10 時間後まで，炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）含有 5%デキストロース液（D_5W）を 20 ml/kg（$NaHCO_3$：0.5 mmol/kg）静脈内投与し，水分補給及びアルカリ化を施した．血漿検体は，DAMPA 投与前，DAMPA 投与終了後 5，15，30，45，60 及び 90 分並びに 2，3，4，5，6，7，8，9，10 及び 24 時間に採取した．尿検体は，水分補給及びアルカリ化開始から DAMPA 投与後 10 時間まで採取した．さらに 2 週間にわたって週 2 回，一般状態を観察すると共に，血球数，血清電解質，血中尿素窒素及び血清クレアチニンを測定した．血漿及び尿中の DAMPA 及び DAMPA 代謝物を逆相 HPLC-UV 法により同定した．

実験 2 において，ヒト白血病細胞株 MOLT-4 における DAMPA の細胞毒性を，同細胞株に対する MTX 毒性と比較することにより検討した．ヒト白血病細胞株 MOLT-4 を培養した 24 時間後に，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）のみの条件で 48 時間曝露させた．細胞の生存率が 50%になる濃度（50%生存濃度）を算出した（n＝3～6）．

実験 1 の結果，DAMPA 約 16.7 mg/kg を 15 分かけて静脈内投与した直後の平均血漿中 DAMPA 濃度は 51 µmol/L（26～69 µmol/L の範囲）であり，投与完了後 1～2 時間以内に血漿中濃度は 1.0 µmol/L 未満まで低下した．DAMPA の血漿中からの消失は速く，3-コンパートメントモデルが最も適していた（図 2.6.2.4.1-1）．

図 2.6.2.4.1-1　RQ293 番の動物における DAMPA 投与後の血漿中濃度－時間曲線



○：血漿中濃度実測値

血漿中時間－濃度データにフィットさせた 3 コンパートメントモデルを示す.

引用元：4.3-11（Widemann 2000）の Figure 1 から一部改変

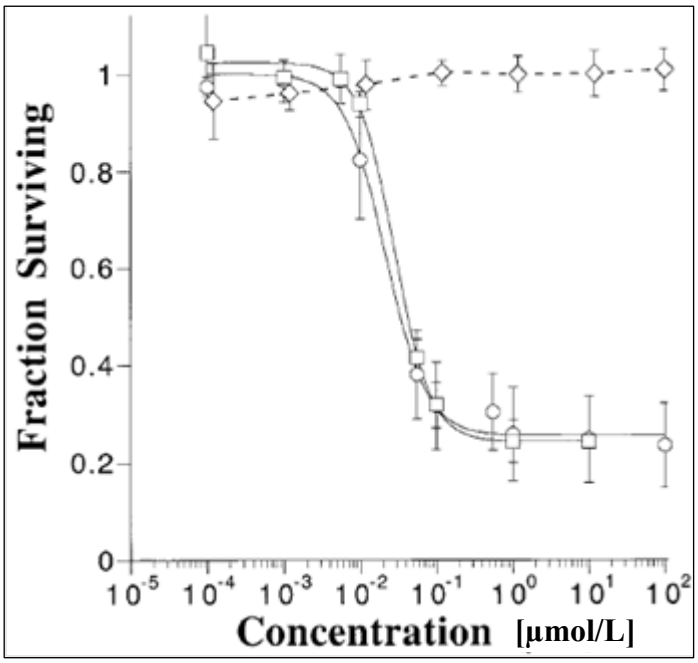
4 例のサルの γ 相 $t_{1/2}$（平均値±標準偏差）は 51±25 分であった．この 4 例には，投与に関連した一般状態の変化は認められなかった. 1 例で DAMPA 投与後 4 日に血清クレアチニン及び血中尿素窒素が一時的に増加したが，輸液の追加後にベースライン濃度に回復した. Widemann らはこの結果は，他の動物では DAMPA 投与後の輸液投与が 10 時間行われたのに対し，この 1 例のみ 6 時間であったことによるものと報告している.

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．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，これら 3 種の代謝物が同定されている.

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.

実験 2 の結果，DAMPA のみでは 100 µmol/L 以下の濃度で，ヒト白血病細胞株 MOLT-4 に対し細胞毒性を示さかった（図 2.6.2.4.1-2）．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．MTX の 50%生存濃度（平均値±標準偏差）は 0.038±0.02 µmol/L で，100 µmol/L DAMPA 存在下での MTX の 50%生存濃度（平均値±標準偏差）は 0.043±0.012 µmol/L であった.

図 2.6.2.4.1-2　ヒト白血球細胞株 MOLT-4 細胞の生存率（平均値±標準偏差，n＝3～6）



○：DAMPA 非存在下で 0.0001～100 µmol/L MTX を添加

□：100 µmol/L DAMPA 存在下で 0.0001～10 µmol/L MTX を添加.

◇：0.00012～100 µmol/L DAMPA を添加

実線は 4 パラメータモデルでフィットさせた曲線を示す.

引用元：4.3-11（Widemann 2000）の Figure 7

2.6.2.4.2　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）

（添付資料：4.2.1.3-1）

本試験の目的は，様々な濃度の DAMPA 及び MTX が雌性ウサギのランゲンドルフ灌流心での血行動態，心電図及び電気生理学的パラメータに及ぼす影響を明らかにすることであった.

試験デザインを表 2.6.2.4.2-1 に示した．雌性ウサギ（13～15 週齢）から摘出した心臓をランゲンドルフ装置に取り付け，Krebs-Henseleit 緩衝液で灌流した．その後，DAMPA 又は MTX（それぞれ 0，2.5，50，100 及び 250 µmol/L）に各濃度約 15 分ずつ低濃度から段階的に曝露させた．また，各濃度の曝露終了時にランゲンドルフ灌流心から灌流液を採取して凍結融解後に DAMPA 及び MTX 濃度をバリデートされた HPLC-UV 法「バリデーション報告書：PTU 0057（添付資料：4.2.2.1-2）」により測定した．血行動態パラメータとしては，左室拡張期圧，左室収縮期圧，左室拡張末期圧，左室圧最大増加速度（＋dP/dt），左室圧最小増加速度（－dP/dt），冠灌流圧及び心拍数を評価した．心電図及び電気生理学的パラメータとしては，QT 間隔，QRS 間隔及び PR 間隔並びに 30%，50%単相性活動電位持続時間（$MAPD_{30}$ 及び $MAPD_{50}$）及び $MAPD_{90}$ を評価した.

なお，本試験においてDAMPA及びMTX濃度の測定は[redacted]にて，United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106，OECD及びDIRECTIVE 2004/10/ECのGLPに準じて実施した．

表 2.6.2.4.2-1　ウサギにおけるDAMPA及びMTX心血管系安全性試験の試験デザイン

被験物質	濃度（μmol/L）	各濃度の曝露時間（分）	原液濃度（mg/mL）	600 mL灌流液に添加する原液容量（μL）	ランゲンドルフ灌流心（個）
DAMPA	0，2.5，50，100，250	15	30	0，17.2，326，344，1,031	7
MTX	0，2.5，50，100，250	15	40	0，17.0，324，341，1,022	7

引用元：4.2.1.3-1（PR001-NCL-SP001）のSTUDY OVERVIEWのTableから一部改変

DAMPAの血行動態パラメータについては，DAMPA 250 μmol/Lの曝露により左室拡張期圧，左室収縮期圧，左室拡張末期圧の軽度な減少傾向が認められたが，＋dP/dt及び－dP/dt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ついては，DAMPA 0 μmol/Lと比較して，DAMPA 100 μmol/Lの曝露により$MAPD_{30}$及び$MAPD_{50}$が軽度ではあるが有意に（$p<0.05$）延長した．DAMPA 250 μmol/Lでは$MAPD_{30}$のみ軽度ではあるが有意に（$p<0.05$）延長した．なお，DAMPA 250 μmol/Lの灌流液中で沈殿が生じていた可能性があったため，各濃度の曝露終了時にランゲンドルフ灌流心から灌流液を採取して凍結融解後にDAMPA濃度の測定を行ったところ，DAMPA 250 μmol/L曝露終了時点では測定濃度が73.6 μmol/Lとなっていた．一方，DAMPA 2.5，50及び100 μmol/L曝露終了時点ではそれぞれ2.2，43.6及び91.0 μmol/Lとなった．

MTXの血行動態パラメータについては，MTX 50 μmol/L以上に曝露させた1例のランゲンドルフ灌流心で心機能の低下（左室拡張期圧など）が認められた．一方，残りの6例では血行動態パラメータ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ついては，MTX 0 μmol/Lと比較して，MTX 250 μmol/Lの曝露により$MAPD_{90}$が軽度ではあるが有意に（$p<0.05$）短縮した．また，MTX 100 μmol/L以上の曝露によりQT間隔が有意に（$p<0.05$）短縮した．DAMPAと異なり，MTX 50 μmol/L以上に曝露させた3例のランゲンドルフ灌流心で房室解離が認められた．なお，灌流液中のMTX濃度はMTX 2.5，50，100及び250 μmol/L曝露終了時点ではそれぞれ2.7，43.4，92.1及び236.8 μmol/Lとなった．

本試験の結論としては，雌性ウサギのランゲンドルフ灌流心において，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DAMPAの有害作用は認められなかった．MTXに関しては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 $MAPD_{90}$ に有意な影響が認められた．また DAMPA と異なり，MTX 50 μmol/L 以上に曝露させた 7 例中 3 例で房室解離が認められた．

2.6.2.4.3　イヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験（試験番号：PR001-NCL-PK005）

（添付資料：4.2.1.3-2）

本試験の目的は，DAMPA を短時間（約 15～30 分）静脈内投与した際の忍容性を評価し，イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験の用量を決定することであった．また，DAMPA は腎臓などで pH 7 未満の環境になると析出する可能性が知られている．そのため，次に実施するイヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験で腎臓を保護するための水分補給及びアルカリ化の検討も行った．

雌雄イヌ（約 23～27 週齢）を表 2.6.2.4.3-1 のように割り付けた．投与 1 日目（投与初日を投与 1 日目とする）に伏在静脈に投与用カテーテルを挿入した．雌雄各 1 例ずつに 15, 30 又は 60 mg/kg の DAMPA を約 15～30 分かけて単回静脈内投与し，その後 7 日間の観察期間（投与 8 日目まで）を設けた．なお，DAMPA は溶解性が低く（最大濃度：約 6.7 mg/mL），投与時間も短いことから 60 mg/kg が最大投与可能量だった．また本試験では腎臓を保護するため，水分補給及びアルカリ化並びに食事療法を実施した．水分補給及びアルカリ化として，$NaHCO_3$ 含有 D_5W（$NaHCO_3$：1.0 mmol/kg）を DAMPA 投与前に投与速度 10 mL/kg/h で 1 時間（I 期）及び投与速度 3 mL/kg/h で DAMPA 投与後から約 5 時間まで（II 期）の 2 回にわたって静脈内投与した．なお，II 期の水分補給及びアルカリ化の終了後にカテーテルを抜去した．食事療法として，試験 1 週間前から試験期間中，尿 pH を 7 以上に維持するよう調製された餌を使用した．

本試験では死亡又は瀕死，一般状態，体重，摂餌量，血液ガス及び血液 pH の解析，尿検査，DAMPA の薬物動態及び肉眼的観察について検討した．血液ガス及び血液 pH の解析用の検体は，I 期の水分補給及びアルカリ化の開始後約 45 分及び DAMPA 投与後 1 時間に採取した．尿検査の検体は I 期の水分補給及びアルカリ化の開始前，投与 1 日目（I 期の水分補給及びアルカリ化の開始後約 30 分，DAMPA 投与後 1，2 及び 3 時間）並びに投与 6 日目に採取した．なお，I 期の水分補給及びアルカリ化の開始前及び投与 6 日目は絶食及び絶水条件で一晩収容して採取した．DAMPA の薬物動態解析用の血漿検体は投与 1 日目の DAMPA 投与前，DAMPA 投与後 0.25，0.5，1，2，4，8，12，24，48 及び 72 時間に採取した．なお，DAMPA 濃度はバリデートされた HPLC 蛍光法「バリデーション報告書：PTU 0048（添付資料：4.2.2.1-3）」により測定した．

表 2.6.2.4.3-1　イヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験の試験デザイン

用量（mg/kg）	投与濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）	投与速度（mg/kg/分）	動物数		投与時間（分）	
				雄	雌	雄	雌
15	5	3	1.0	1	1	15	15
30	6.7	4.5	1.3	1	1	23	23
60	6.7	9	＞1.8	1	1	33	24

引用元：4.2.1.3-2（PR001-NCL-PK005）の STUDY SCHEDULE AND STRUCTURE 及び TEST SUBSTANCE AND FORMULATION の Table から一部改変

本試験の結果として死亡は認められなかった．

一般状態は，60 mg/kg 投与群の雌雄で投与 1 日目の DAMPA 投与後約 30 分に振戦が認められ，投与後 1 時間には消失した．この所見が認められたのが短時間であり，動物の健康状態は良好であったことから，毒性学的重要性はないと考えられた．

体重及び摂餌量には DAMPA に関する影響は認められなかった．

尿検査の結果，I 期の水分補給及びアルカリ化の開始前又は投与 6 日目と比較して，DAMPA 投与後 1, 2 及び 3 時間の尿比重及び尿クレアチニン濃度はおおむね低値であった．これは，静脈内投与した液体量により腎クリアランスが上昇した結果であり，DAMPA に関連した影響ではないと考えられた．尿 pH は，I 期の水分補給及びアルカリ化の開始後約 30 分，DAMPA 投与後 1 及び 2 時間に採取可能だった検体については，7 以上に維持されていた．DAMPA 投与後 3 時間は雄のみ採取可能であり，DAMPA 15 mg/kg 投与群の雄では 7 未満（I 期の水分補給及びアルカリ化の開始前と同じ値）であった．一方，DAMPA 30 又は 60 mg/kg 投与群の雄は pH が 7 以上であった．

血液ガス及び血液 pH の解析結果については，DAMPA 投与前後の血液ガス及び血液 pH パラメータに問題はなく，忍容性は良好であった．

DAMPA の薬物動態について，DAMPA 単回静脈内投与後の血漿中 DAMPA 濃度を表 2.6.2.4.3-2 に示した．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．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，$AUC_{0\text{-}t}$ は用量の増加に伴って増加し，15 mg/kg 投与群で 30.9～33.1 μmol･h/L，30 mg/kg 投与群で 122～123 μmol･h/L 及び 60 mg/kg 投与群で 225～300 μmol･h/L となった．なお，$AUC_{0\text{-}t}$ の増加は用量比を上回っていたが，各投与群は DAMPA の投与速度が異なることから，直接的には比較できないと考えられた．大半の動物で終末相 $t_{1/2}$，クリアランス及び分布容積は算出できなかったが，30 mg/kg 投与の雄 1 例及び 60 mg/kg 投与の雄 1 例は算出可能であった. 2 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 [15]．クリアランスは公表文献の値「心拍出量（血漿）：4.2 L/h/kg，肝血流量（血漿）：1.1 L/h/kg，腎血漿流量：0.752 L/h/kg」[15] 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．

表 2.6.2.4.3-2　血漿中 DAMPA 濃度

時間（h）	用量（mg/kg）					
	15		30		60	
	濃度（μmol/L）					
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
投与前	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0.25	28.7	32.4	96.8	88.2	199	174
0.5	19.0	24.2	61.3	44.9	129	99.6
1	2.92	2.75	28.1	26.5	74.2	38.7
2	1.33*1	1.46*1	3.69	2.81	23.9	8.21
4	0.133	BLQ	0.779	0.436*2	4.27	1.04
8	0.109	0.145	NS	0.642*3	0.249	0.224
12	BLQ	BLQ	BLQ	0.177	0.136	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ*1	BLQ*1	BLQ	BLQ
48	BLQ	BLQ	BLQ*1	BLQ*1	BLQ	BLQ
72	BLQ	BLQ	BLQ*1	BLQ*1	BLQ	BLQ

NS：検体を採取していない，BLQ：定量下限値未満（＜0.1 μmol/L）

＊1：検体が規定量に達しなかったため，データ解析から除いた．

＊2：再検査により結果を確認し，中央値を表に記載（0.372，0.436，0.448 μmol/L）

＊3：再検査により結果を確認し，中央値を表に記載（0.629，0.642，0.648 μμmol/L）

引用元：4.2.1.3-2（PR001-NCL-PK005）の ANNEX2 の Table 1 から一部改変

肉眼的観察では腎臓に所見は認められず，他の臓器に関しても DAMPA に関連すると考えられる所見は認められなかった．

本試験の結論としては，DAMPA 60 mg/kg の短時間（約 15～30 分）静脈内投与は忍容性が良好であった．また，DAMPA の全身曝露量は雌雄で同程度であり，$AUC_{0\text{-}t}$ 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[15]．クリアランスは公表文献の値[15]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．以上から，イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験には DAMPA 60 mg/kg を最大用量として静脈内投与することとした．また，尿検査及び肉眼的観察の結果から腎臓に明らかな影響は認められなかったため，イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験においては腎臓保護するために水分補給及びアルカリ化並びに食事療法を行うこととした．

2.6.2.4.4　イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験（試験番号：PR001-NCL-PC001）

（添付資料：4.2.1.3-3）

本試験の目的は，テレメトリーを装着したイヌにおける，DAMPA を静脈内投与した際の心血管系への影響を評価することであった．

雌雄イヌ（約 23～34 ヵ月齢）を表 2.6.2.4.4-1 のように割り付けた．DAMPA の用量はイヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験に基づき，15，30 及び 60 mg/kg を選択した．各動物には麻酔下でテレメトリー装置を腹腔に留置した．加えて，血圧測定用のカテーテルを大腿動脈に挿入し，カテーテルの先端が腹部大動脈に達するまで挿入後に縫合固定した．心電図電極は胸部皮下に縫合固定した．なお，試験開始までに少なくとも 4 週間の回復期間を設けた．伏在静脈に投与用カテーテルを挿入し，動物に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム（NaOH，溶媒），15，30 及び 60 mg/kg の DAMPA を約 20 分かけて投与 1（投与初日を投与 1 日目とする），8，15 及び 22 日目（週 1 回）に漸増静脈内投与した．また本試験では腎臓を保護するため，イヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験で確立した水分補給及びアルカリ化並びに食事療法を実施した．水分補給及びアルカリ化として，$NaHCO_3$ 含有 D_5W（$NaHCO_3$：1.0 mmol/kg）を溶媒及び DAMPA 投与前に投与速度 10 mL/kg/h で 1 時間（I 期）並びに投与速度 3 mL/kg/h で溶媒及び DAMPA 投与完了後から約 5 時間（II 期）までの 2 回にわたって静脈内投与した．食事療法として，試験期間中は尿 pH を 7 以上に維持するよう調製された餌を使用した．

本試験では一般状態，心血管系パラメータ（血圧，心拍数及び心電図）及び血漿中 DAMPA 濃度について検討した．心血管系パラメータは，テレメトリー装置留置などの処置後（ベースラインとして）並びに I 期の水分補給及びアルカリ化開始前 45 分から溶媒及び DAMPA 投与完了後 12 時間まで測定した．なお，統計解析はベースラインを基に測定値を補正した数値で行った．DAMPA 濃度測定用の血漿検体は I 期の水分補給及びアルカリ化完了後並びに溶媒及び DAMPA 投与完了後 2 時間に採取した．なお，DAMPA 濃度はバリデートされた HPLC 蛍光法「バリデーション報告書：PTU 0048（添付資料：4.2.2.1-3）」により測定した．

表 2.6.2.4.4-1　イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験の試験デザイン

投与日	1	8	15	22
雄 2 例	NaOH*1	DAMPA 15 mg/kg*2	DAMPA 30 mg/kg*3	DAMPA 60 mg/kg*4
雌 2 例				

＊1：投与容量 9.15 mL/kg

＊2：投与濃度 4.95 mg/mL，投与容量 3.1 mL/kg

＊3：投与濃度 6.67 mg/mL，投与容量 4.6 mL/kg

＊4：投与濃度 6.7 mg/mL，投与容量 9.15 mL/kg

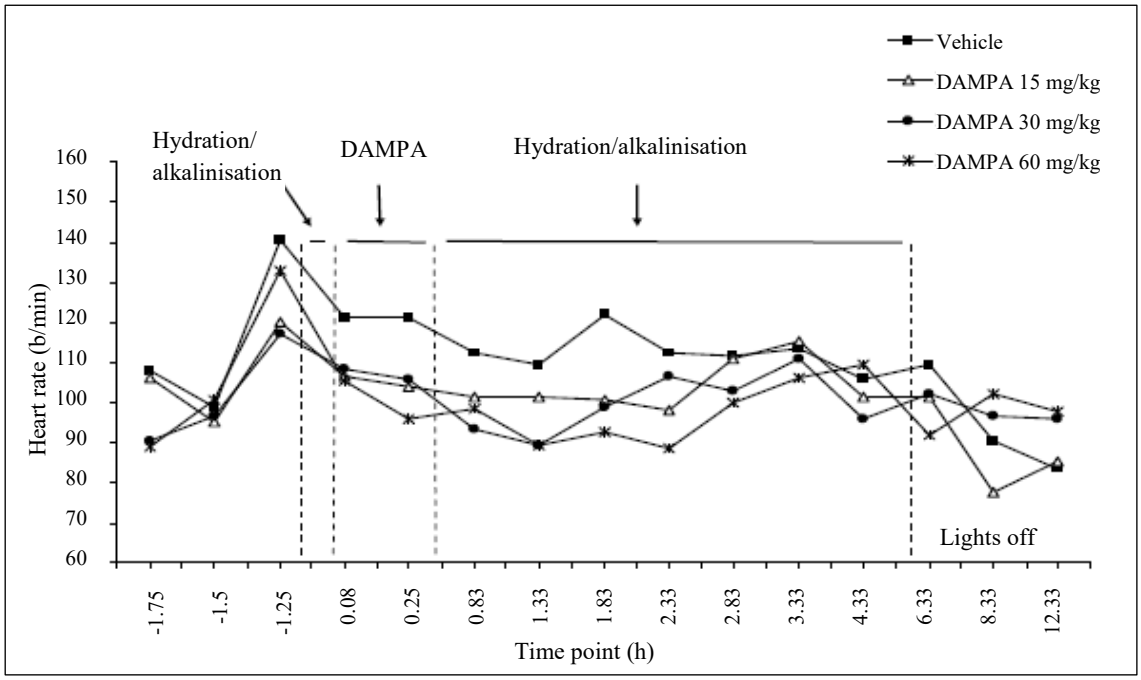
引用元：4.2.1.3-3（PR001-NCL-PC001）の STUDY DESIGN の Table A 及び MATERIALS AND METHODS の Table B から一部改変

本試験の結果として，溶媒（対照群）投与時の一般状態に変化は認められなかった．DAMPA 15 mg/kg 投与時には，DAMPA 投与後 0.5 時間に 4 例全てで粘膜退色が認められ，その内の雄 2 例では毛細血管再充満時間の遅延を伴っていた．しかし，この所見は DAMPA 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．DAMPA 30 mg/kg 投与時には変化は認められなかった．DAMPA 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変化が認められた．特に両眼又は片眼の強膜の赤変化は 4 例全てで認められた．また雄 1 例で右目の強膜の赤変化が投与後 2 日間持続した．他には雌 2 例に眼，鼻口部又は周辺の腫脹，その内 1 例に呼吸数増加などが認められた．

血圧は，補正値（ベースラインを基に測定値を補正した値）を溶媒と比較すると，DAMPA 15，30 及び 60 mg/kg の投与完了後 3 時間で収縮期血圧が有意に（それぞれ $p<0.05$，$p<0.05$，$p<0.01$）増加した．しかし，溶媒投与時の補正値との増加量としては，DAMPA 15，30 及び 60 mg/kg それぞれ 22 mmHg，23 mmHg，8 mmHg となり，用量依存性を伴わない変化であった．また溶媒と比較して，DAMPA 60 mg/kg の投与完了後 8 時間で収縮期，拡張期及び平均血圧がそれぞれ 18 mmHg 有意に（それぞれ $p<0.01$，$p<0.05$，$p<0.05$）増加した．しかし，前後の測定ポイントである DAMPA 投与完了後 6 時間及び 12 時間では有意差は認められなかったことから，この増加は一過性の変化であった．以上から，DAMPA 投与完了後 3 時間及び 8 時間に生じた増加は，用量依存性を伴わない変化や一過性の変化であったことから，DAMPA による影響の可能性は低いと考えられた．

心拍数の測定値は，DAMPA 投与開始から投与完了後 2.5 時間（図 2.6.2.4.4-1 の該当箇所：2.83 h）まで，各用量（15，30 及び 60 mg/kg）において溶媒投与に比べて低値であった（図 2.6.2.4.4-1）．これは漸増投与していく試験デザインにより動物に慣れが生じ，処置によるストレスからの回復が速やかになった可能性が考えられた．補正値に関しては，溶媒と比較して DAMPA 60 mg/kg の投与開始 15 分後で有意な（$p<0.001$）減少が認められた（減少量：26 bpm）．他には DAMPA 30 mg/kg の投与完了後 0.5 時間，DAMPA 60 mg/kg の投与完了後 0.5 時間及び 1.5 時間で有意な（$p<0.05$）減少が認められた（減少量：それぞれ 30 bpm，15 bpm，35 bpm）．しかし，いずれの DAMPA 投与後の心拍数の減少においても明確な用量依存性は認められなかったため，DAMPA による影響の可能性は低いと考えられた．

図 2.6.2.4.4-1　I 期の水分補給及びアルカリ化開始前 45 分から溶媒及び DAMPA 投与完了後 12 時間までの心拍数の測定値（n＝4）



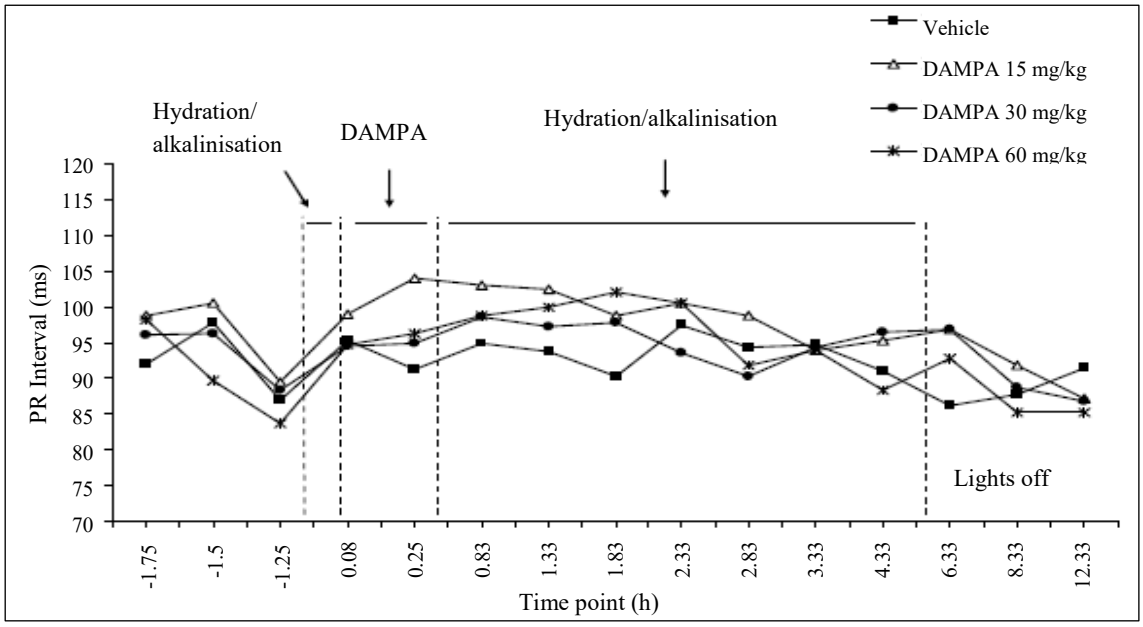
Lights off：部屋のライトを消したタイミング．なお，ライトは毎日 12 時間点灯．

横軸の時間は，溶媒及び DAMPA 投与開始時点を 0 h として記載

引用元：4.2.1.3-3（PR001-NCL-PC001）の Figure 4

心電図から求めた PR 間隔の測定値は，I 期の水分補給及びアルカリ化開始前 45 分（図 2.6.2.4.4-2 の該当箇所：－1.75 h）から DAMPA 投与完了後 1 時間（図 2.6.2.4.4-2 の該当箇所：1.33 h）において，溶媒に比べて DAMPA 投与群で高値になる傾向を示したが，用量依存性は認められなかった（図 2.6.2.4.4-2）．補正値に関しては，溶媒と比較して DAMPA 60 mg/kg の投与完了後 1.5 及び 2 時間において PR 間隔がそれぞれ 11 ms，7 ms 有意に（$p<0.05$）延長した．QT 間隔は，溶媒と比較して DAMPA 60 mg/kg の投与開始 5 及び 15 分後においてそれぞれ 20 ms の有意な（$p<0.01$）延長が認められた．QTcR 間隔（Van de Water の式に基づき補正した QT 間隔）は，溶媒と比較して DAMPA 60 mg/kg の投与開始 5 及び 15 分後においてそれぞれ 20 ms 及び 15 ms の有意な（それぞれ $p<0.01$ 及び $p<0.05$）延長が認められた．以上の結果から，PR 間隔，QT 間隔及び QTcR 間隔の一部に有意な影響が散発的に認められたものの，用量依存性を示す明確な所見は得られなかった．したがって，DAMPA による影響の可能性は低いと考えられた．リズム解析及び波形解析に関しては，雌 1 例で溶媒並びに DAMPA 30 及び 60 mg/kg の投与時に単発性 P 波が散発的に発生し，DAMPA 60 mg/kg の投与時に PR 間隔の延長が認められた．しかし，その他には所見は認められなかったことから，リズム解析及び波形解析において，DAMPA 15，30 及び 60 mg/kg の投与は有害作用を生じさせる可能性は低いと考えられた．

図 2.6.2.4.4-2　I 期の水分補給及びアルカリ化開始前 45 分から溶媒及び DAMPA 投与完了後 12 時間までの PR 間隔の測定値（n＝4）



Lights off：部屋のライトを消したタイミング．なお，ライトは毎日 12 時間点灯．

横軸の時間は，溶媒及び DAMPA 投与開始時点を 0 h として記載

引用元：4.2.1.3-3（PR001-NCL-PC001）の Figure 5

投与完了後 2 時間の DAMPA 濃度の結果を表 2.6.2.4.4-2 に示した．なお，溶媒投与前及び投与後並びに各 DAMPA 濃度の投与前の結果としては全て BLQ（＜0.1 μmol/L）となった．DAMPA 15～30 mg/kg 投与時において，DAMPA 投与完了後 2 時間では用量増加に伴って DAMPA 濃度が増加した．

表 2.6.2.4.4-2　血漿中 DAMPA 濃度（n＝4）

用量（mg/kg）	投与完了後 2 時間の DAMPA 濃度（μmol/L）	濃度範囲（μmol/L）
15	1.573	0.508～3.47
30	14.473	3.65～24.2
60	42.95	15.5～64.9

引用元：4.2.1.3-3（PR001-NCL-PC001）の BIOANALYSIS の Table 及び ANNEX B の Table 1 から一部改変

本試験の結論としては，一般状態は DAMPA 15 及び 60 mg/kg 投与時に変化が認められた．DAMPA 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，DAMPA 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．DAMPA 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変化が認められた．特に両眼

又は片眼の強膜の赤変化は 4 例全てで認められた．また雄 1 例で右目の強膜の赤変化が投与後 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．血漿中の DAMPA 濃度は，DAMPA 投与完了後 2 時間では用量増加に伴って増加した．

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

2.6.2.5.1　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）

（添付資料：4.2.1.4-1）

本試験は計 12 の実験（実験 1～5c）からなる．各実験の目的，実験デザイン及び結果を後述した．なお，一連の実験で採取したヒト血漿検体中の MTX，DAMPA，(6R)及び(6S)-LV 並びに(6R)及び(6S)-5-MeTHF の濃度はバリデートされた HPLC 蛍光法により測定した「MTX 及び DAMPA のバリデーション報告書：PTU 018 及び PTU 030（添付資料：4.2.2.1-4 及び 4.2.2.1-5），それ以外のバリデーション報告書：PTU 0045（添付資料：4.2.2.1-6）」．

実験 1 の目的は，ヒト血漿でのグルカルピダーゼ活性を推定することであった．実験 1 では MTX 100 µmol/L を含むヒト血漿検体にグルカルピダーゼ 0，0.5，1.5，5，15，50，150 又は 500 U/L（最終濃度として）を添加し 37℃で 15 分間インキュベートした．その後，グルカルピダーゼを HCl 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）により不活性化した．

結果を表 2.6.2.5.1-1 に示した．実験 1 の結果から，グルカルピダーゼの用量の増加に伴い，MTX から DAMPA への分解の増加が認められた．グルカルピダーゼ 50 U/L 以上のときは，大部分の MTX が 15 分以内に加水分解された．しかし，グルカルピダーゼ 500 U/L でも微量（1.01 µmol/L）の MTX が残存していた．なお，本実験において，グルカルピダーゼ非添加時における MTX 濃度が設定濃度よりも約 20%低下していた原因は不明である．

表 2.6.2.5.1-1　様々な濃度のグルカルピダーゼで処理した場合のヒト血漿中 MTX 濃度（MTX 設定開始濃度：100 µmol/L）

グルカルピダーゼ（U/L）	MTX 濃度（µmol/L）	DAMPA 濃度（µmol/L）	グルカルピダーゼ 0 U/L 条件の MTX 濃度に対する，相対 MTX 濃度（%）
0	79.7	BLQ	100.0
0.5	84.3	0.425	105.8
1.5	85.7	1.37	107.5
5	69.1	16.1	86.7
15	52.1	28.1	65.4
50	1.91	81.4	2.4
150	0.904	79.6	1.1
500	1.01	81.2	1.3

BLQ：定量下限値未満（＜0.1 µmol/L）

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 1 から一部改変

次に測定した MTX 濃度を基に，実験開始時点の MTX 濃度，グルカルピダーゼの SpecAct 及び MTX 中の D-MTX（MTX の異性体，D 体）の割合（以下，「DmtxFraction」）の推定及び標準誤差の算出をおこなった「推定に使用したモデルの詳細は 4.2.1.4-1 の Results の 9.1.1 を参照，K_m を 8 µmol/L（公表文献での緩衝液中の数値[5)]）と推定」．実験開始時点の MTX 濃度は 83.3±2.3 µmol/L，SpecAct は 0.156±0.003 µmol/min/U 及び DmtxFraction は 0.0115±0.0005 となった．

実験 2a の目的は，一連の実験で使用した保存ヒト血漿中のグルカルピダーゼの活性が，硫酸亜鉛（$ZnSO_4$）として添加される亜鉛イオンに対して影響を受けるかを明らかにすることであった．グルカルピダーゼの活性は亜鉛に依存する．しかし一連の実験で使用した血漿中の亜鉛含量，このうちグルカルピダーゼが利用する血漿中亜鉛はどの程度か，また保存血漿中で亜鉛が安定しているかは不明である．実験 2a は $ZnSO_4$ 1.8 µmol/L（最終濃度として）添加又は非添加の条件で，MTX 100 µmol/L を含むヒト血漿検体にグルカルピダーゼ 15 U/L（最終濃度として）を加えた．その後，37℃で 0 分又は 15 分インキュベートし，HCl 1 mol/L を反応系に対して 1/10 量を添加した．

結果を表 2.6.2.5.1-2 に示した．実験 2a の結果から，$ZnSO_4$ の添加又は非添加において，インキュベーション時間が 0 分では MTX 濃度は設定開始濃度（100 µmol/L）に近いが，15 分のインキュベーション後にはそれぞれ 48.6 µmol/L，47.0 µmol/L に低下した．また，MTX 濃度の低下に伴い，DAMPA 濃度は BLQ からそれぞれ 66.3 µmol/ L，62.7 µmol/ L に増加した．したがって，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

に影響しないと考えられた．そのため，一連の実験で使用したヒト血漿中にはグルカルピダーゼが機能するために十分量の亜鉛イオンを含んでいると考えられた．

表 2.6.2.5.1-2　$ZnSO_4$ 添加又は非添加におけるヒト血漿中 MTX 及び DAMPA 濃度（MTX 設定開始濃度：100 µmol/L，n＝3）

$ZnSO_4$ 添加（1.8 µmol/L）

インキュベーション時間（分）	平均 MTX 濃度（µmol/L）	平均 DAMPA 濃度（µmol/L）
0	97.0＊	BLQ
15	48.6	66.3

$ZnSO_4$ 非添加

インキュベーション時間（分）	平均 MTX 濃度（µmol/L）	平均 DAMPA 濃度（µmol/L）
0	99.9	BLQ
15	47.0	62.7

BLQ：定量下限値未満（＜0.1 µmol/L）

＊：1 例で異常低値を示したことから平均値の算出から除外したため 2 例のデータ

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 2 から一部改変

実験 2b の目的は，臨床試験で被験者から採取した検体中で顕著な MTX の分解が生じるか否かを明らかにすること及び HCl によるグルカルピダーゼの不活性化の効果を評価することであった．実験 2b では 1，10，100 又は 1,000 µmol/L の MTX を含むヒト血漿検体に対して 6 種類の検体処理方法を実施した．処理方法としては，HCl を添加後にインキュベーションを 0 分，水を添加後に 15 分インキュベートしてから HCl 添加，HCl 添加後にグルカルピダーゼを添加し 15 分インキュベート，グルカルピダーゼを添加後に 15 分インキュベートしてから HCl 添加，グルカルピダーゼを添加後に 60 分インキュベートしてから HCl 添加，グルカルピダーゼを添加後に 15 分インキュベートしてから凍結し解凍後に HCl 添加であった．なお，HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加），グルカルピダーゼは 500 U/L（最終濃度として）とし，インキュベーションは 37℃で行った．

結果を表 2.6.2.5.1-3 に示した．実験 2b の結果から，水を添加後に 15 分インキュベートしてから HCl 添加した場合の MTX 濃度は，HCl 添加後にインキュベーションを 0 分した場合と類似していた．同様に HCl 添加後にグルカルピダーゼを添加し 15 分インキュベートした場合の MTX 濃度も，HCl 添加後にインキュベーションを 0 分した場合と類似していた．以上から，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 分又は 60 分インキュベートしてから HCl 添加した場合の MTX 濃度は全て極めて低かった．HCl 添加後にインキュベーションを 0 分した場合と比較すると MTX が 99.8%以上低下するか又は BLQ（＜0.1 µmol/L）となり，MTX 1,000 µmol/L の場合でも大部分の MTX がインキュベーション 15 分で加水分解された．しかし MTX 100 µmol/L 以上

において，15 分又は 60 分インキュベートしてから HCl 添加した場合に微量の MTX が残存していた．

表 2.6.2.5.1-3 様々な検体処理方法におけるヒト血漿中 MTX 濃度（n＝2）

検体処理方法	MTX 設定開始濃度（μmol/L）			
	1	10	100	1,000
	平均 MTX 濃度（μmol/L）（%低下）	平均 MTX 濃度（μmol/L）（%低下）	平均 MTX 濃度（μmol/L）（%低下）	平均 MTX 濃度（μmol/L）（%低下）
HCl 添加後にインキュベーションを 0 分	0.947	8.99	59.2	773
水を添加後に 15 分インキュベートしてから HCl 添加	1.01	8.61	65.7	873
HCl 添加後にグルカルピダーゼを添加しインキュベーション 15 分	1.04	8.61	96.7	734
グルカルピダーゼを添加後に 15 分インキュベートしてから HCl 添加	BLQ（＞89.4%）	BLQ（＞98.9%）	0.126（99.8%）	0.827（99.9%）
グルカルピダーゼを添加後に 60 分インキュベートしてから HCl 添加	BLQ（＞89.4%）	BLQ（＞98.9%）	0.124（99.8%）	0.567（99.9%）
グルカルピダーゼを添加後に 15 分インキュベートしてから凍結し解凍後に HCl 添加	BLQ（＞89.4%）	BLQ（＞98.9%）	BLQ（＞99.8%）	0.569（99.9%）

BLQ：定量下限値未満（＜0.1 μmol/L）

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 4 から一部改変

実験 2c の目的は，グルカルピダーゼが MTX を検出不能になるまで加水分解し続けない理由に関して，2 つの仮説について検討することであった．一つは，MTX と DAMPA との間で平衡状態が成り立つため，もう一つは DAMPA がグルカルピダーゼの阻害因子として働くためである．実験 2c では 3 種類の組み合わせの MTX，DAMPA 又はグルタミン酸を含むヒト血漿検体を各 6 本ずつ用意した．具体的な組み合わせとしては MTX（1 又は 8 μmol/L），MTX（1 又は 8 μmol/L）＋DAMPA，MTX（1 又は 8 μmol/L）＋DAMPA＋グルタミン酸とした．用意した 6 本の内，4 本にグルカルピダーゼを添加し，2 本には水を添加した．その後，グルカルピダーゼを添加した場合はインキュベーション 5 分又は 15 分（各 2 本），水を添加した場合はインキュベーションを 0 分行った．0，5 及び 15 分のインキュベーション後に HCl を添加した．なお，DAMPA 及びグルタミン酸の最終濃度は 100 μmol/L，グルカルピダーゼの最終濃度は 6 U/L，HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）とし，インキュベーションは 37℃で行った．

実験 2c の結果から，DAMPA 100 µmol/L 又は DAMPA 100 µmol/L＋グルタミン酸 100 µmol/L の添加により，インキュベーション後の MTX 濃度低下に明らかな差は認められなかった（データ示さず，詳細は 4.2.1.4-1 の Table 5 参照）．したがって， DAMPA 又は DAMPA＋グルタミン酸による，グルカルピダーゼの MTX 分解作用の阻害はないものと考えられた．

実験 2d は実験 2b の追加実験として実施し，目的は MTX の回収率に HCl の添加タイミングが影響するか否かを評価することであった．実験 2d では MTX 100 µmol/L を含むヒト血漿検体に HCl 1 mol/L を 7 種類の添加タイミングで反応系に対して 1/10 量を添加した．添加タイミングとしては反応系調製直後（2 分未満）に HCl を添加，調製後 5 分以内に HCl を添加，調製後 30 分以内に HCl を添加，調製直後（2 分未満）凍結前に HCl を添加，検体を凍結してから融解前（冷凍庫から取り出した直後）に HCl を添加，検体を凍結してから融解後 2 分以内に HCl を添加及び検体を凍結してから融解後 30 分以内に HCl を添加とした．

結果を表 2.6.2.5.1-4 に示した．実験 2d の結果から，いずれの検体中でも MTX 濃度に明らかな変化はなく，HCl の添加タイミングは MTX の回収率に影響しなかった．

表 2.6.2.5.1-4　様々なタイミングで HCl を添加した際のヒト血漿中 MTX 濃度（設定開始濃度：100 µmol/L，n＝2）

HCl 添加タイミング	平均 MTX 濃度（µmol/L）
調製直後（2 分未満）に HCl を添加*	100
調製後 5 分以内に HCl を添加*	103
調製後 30 分以内に HCl を添加*	102
調製直後（2 分未満）凍結前に HCl を添加	110
検体を凍結してから融解前（冷凍庫から取り出した直後）に HCl を添加	109
検体を凍結してから融解後 2 分以内に HCl を添加	118
検体を凍結してから融解後 30 分以内に HCl を添加	110

＊：凍結せずに検体を測定

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 6 から一部改変

実験 3 の目的は，(6R)及び(6S)-LV 並びに(6S)-5-MeTHF のグルカルピダーゼによる分解速度を評価することであった．実験 3 では(6R)-LV 及び(6S)-LV を各 50 µmol/L ずつ含むヒト血漿検体にグルカルピダーゼ 0，5，15，50，150 又は 500 U/L（最終濃度として）を添加した．その後，インキュベーションを 15 分行ってから HCl を添加した．また，グルカルピダーゼ 0 U/L 及びインキュベーション 0 分条件下で HCl を添加する処理も実施した．(6S)-5-

MeTHF 100 µmol/L を含むヒト血漿検体は LV と同様に処理した．なお，HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）とし，インキュベーションは 37℃で行った．

結果を表 2.6.2.5.1-5 に示した．実験 3 の結果から(6R)-LV は，最大用量である 500 U/L のグルカルピダーゼを添加した際にも明らかな分解は認められなかった．(6S)-LV は，グルカルピダーゼ 500 U/L により 40%程度の分解が認められた．(6S)-5-MeTHF は，グルカルピダーゼ 50，150，500 U/L で濃度依存的な分解が認められた．

表 2.6.2.5.1-5　様々な量のグルカルピダーゼを添加した際のヒト血漿中(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF 濃度（n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	(6R)-LV 設定開始濃度（µmol/L）	(6S)-LV 設定開始濃度（µmol/L）	(6S)-5-MeTHF 設定開始濃度（µmol/L）
	50	50	100
	平均(6R)-LV 濃度（µmol/L）	平均(6S)-LV 濃度（µmol/L）	平均(6S)-5-MeTHF 濃度（µmol/L）
0*1	60.8	57.2	101.5
0	59.3	56.5	97.1
5	54.0	48.1	97.9
15	53.6	50.6	95.4
50	53.1	49.5	80.8
150	53.9	46.6	61.3
500	52.3	32.1*2	11.3

＊1：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし．

＊2：妨害ピークの存在が認められた．

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 7 及び Table 8 から一部改変

次に測定した各被験物質濃度を基に，実験開始時点の濃度及びグルカルピダーゼの SpecAct の推定及び標準誤差の算出を行った「実験 1 と同様のモデルを使用，LV 及び(6S)-5-MeTHF の K_m をそれぞれ 120 及び 34 µmol/L（公表文献での緩衝液中の数値[5)]）と推定」．(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF の実験開始時点の濃度はそれぞれ 56.0±1.3，53.1±1.1 及び 96.9±1.3 µmol/L となった．また(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF の SpecAct は 0.0018±0.0013，0.0109±0.0011 及び 0.0212±0.0003 µmol/min/U となった．推定された SpecAct は実験 1 で推定した MTX の値（0.156±0.003 µmol/min/U）よりも低かった．また，値の大きさの順序としては(6R)-LV＜(6S)-LV＜(6S)-5-MeTHF＜MTX であった．

実験 4a の目的は，グルカルピダーゼに様々な濃度の(6S)-LV を添加したときの K_m を推定することであった．実験 4a では(6S)-LV 5，20 又は 100 µmol/L 含むヒト血漿検体にグルカルピダーゼ 500 U/L（最終濃度として）を添加した．その後，0，15，45 又は 120 分インキュ

ベートしてから HCl を添加した．また，グルカルピダーゼ 0 U/L 条件下で 0 又は 120 分インキュベーションを行い，HCl を添加する処理も実施した．さらに(6S)-LV を含まないヒト血漿検体を用意し，グルカルピダーゼ 0 U/L 及びインキュベーション 0 分条件下で，HCl を添加する処理も実施した．なお，HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）とし，インキュベーションは 37℃で行った．

各(6S)-LV 濃度の結果を表 2.6.2.5.1-6 に示した．なお，(6S)-LV を含まないヒト血漿検体の結果としては(6S)-LV 濃度は BLQ（＜0.5 µmol/L）となった．また(6S)-LV 設定開始濃度が 5 又は 20 µmol/L の場合，グルカルピダーゼ 500 U/L 及びインキュベーション 45 分条件下で濃度はほぼ半減した．設定開始濃度が 100 µmol/L であった場合，半減までの時間は約 120 分間に延長した．

表 2.6.2.5.1-6　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中(6S)-LV 濃度（n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	(6S)-LV 設定開始濃度（µmol/L）		
		5	20	100
		平均(6S)-LV 濃度（µmol/L）	平均(6S)-LV 濃度（µmol/L）	平均(6S)-LV 濃度（µmol/L）
0	0*1	4.45	12.5	80.3
0	120	4.60	10.4	93.5
500	0*1	4.46	17.5	89.0
500	15	3.44	14.8	78.9
500	45	2.56	11.3	71.2*2
500	120	1.54	6.52	44.8

＊1：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし．

＊2：抽出中に検体紛失した物があるため 1 例のデータ

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 10，11 及び 12 から一部改変

次に測定した(6S)-LV 濃度を基に，パラメータの推定及び標準誤差の算出を行った．しかし本実験では酵素飽和に必要な濃度を下回っていたため，K_m 及び SpecAct のいずれについても正確に推定することはできなかった．そこで実験 1 と同様のモデルを，次式のように一次速度定数（k_l）について再パラメータ化した：$k_l = SpecAct / K_m$

(6S)-LV 設定開始濃度が 5，20 又は 100 µmol/L の場合の，実験開始時点の濃度はそれぞれ 4.1±0.2，14.4±0.7 及び 86±5 µmol/L となった．k_l は $1.6\times10^{-5}\pm0.2\times10^{-5}$ L/min/U，K_m は 112±77 µmol/L（公表文献での緩衝液中の数値：120 µmol/L[5)] ）となった．

実験 4b の目的は，グルカルピダーゼに様々な開始濃度の(6S)-5-MeTHF を添加したときの K_m を推定することであった．実験 4b では(6S)-5-MeTHF 5，20 又は 100 µmol/L 含むヒト血

漿検体にグルカルピダーゼ 500 U/L（最終濃度として）を添加した．その後， 0，5，15 又は 45 分インキュベートしてから HCl を添加した．また，グルカルピダーゼ 0 U/L 条件下でインキュベーションを 0 又は 45 分行い，HCl を添加する処理も実施した．さらに(6S)-5-MeTHF を含まないヒト血漿検体を用意し，グルカルピダーゼ 0 U/L 及びインキュベーション 0 分条件下で，HCl を添加する処理も実施した．なお，HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）とし，インキュベーションは 37℃で行った．

各(6S)-5-MeTHF 濃度の結果を表 2.6.2.5.1-7～2.6.2.5.1-9 に示した．なお，(6S)-5-MeTHF を含まないヒト血漿検体の結果としては(6S) -5-MeTHF 濃度は BLQ（＜0.5 µmol/L）となった．(6S)-5-MeTHF 設定開始濃度が 5 µmol/L の場合，グルカルピダーゼ 0 U/L やインキュベーション 0 分条件下で濃度測定値が 1 µmol/L 付近であったが，グルカルピダーゼ 500 U/L でインキュベーション 5 分以上は全て BLQ となった．設定開始濃度が 20 µmol/L の場合はグルカルピダーゼ 500 U/L でインキュベーション 5 分以上は定量可能であり，設定開始濃度が 100 µmol/L の場合はインキュベーションを 5 分及び 15 分は定量可能であった（設定開始濃度 20 及び 100 µmol/L 共に妨害ピークの存在が認められた）．

表 2.6.2.5.1-7　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中(6S)-5-MeTHF 濃度（設定開始濃度：5 µmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	平均(6S)-5-MeTHF 濃度（µmol/L）
0	0*	1.12
0	45	1.19
500	0*	1.16
500	5	NC
500	15	NC
500	45	NC

NC：測定値が BLQ のため算出せず

＊：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし．

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 13 から一部改変

表 2.6.2.5.1-8　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中(6S)-5-MeTHF 濃度（設定開始濃度：20 µmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	平均(6S)-5-MeTHF 濃度（µmol/L）
0	0*	23.3
0	45	21.2
500	0*	19.3
500	5	9.10
500	15	5.75
500	45	1.06

＊：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし.

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 14 から一部改変

表 2.6.2.5.1-9　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中(6S)-5-MeTHF 濃度（設定開始濃度：100 µmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	平均(6S)-5-MeTHF 濃度（µmol/L）
0	0*	156
0	45	171
500	0*	141
500	5	32.1
500	15	22.5
500	45	NC

NC：測定値が BLQ のため算出せず

＊：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし.

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 15 から一部改変

次に測定した(6S)-5-MeTHF 濃度を基に，パラメータの推定及び標準誤差の算出を行った．しかし本実験では酵素飽和に必要な濃度を下回っていたため，K_m 及び SpecAct のいずれについても正確に推定することはできなかった．そこで実験 1 と同様のモデルを，次式のように k_l について再パラメータ化した：$k_l = SpecAct / K_m$

(6S)-5-MeTHF 設定開始濃度が 5 及び 20 µmol/L の場合の，実験開始時点の濃度はそれぞれ 1.15±0.09 及び 18.2±1.3 µmol/L となった（設定開始濃度 100 µmol/L の実験開始時点の濃度は算出せず）．k_l は $1.32\times10^{-4}\pm0.07\times10^{-4}$ L/min/U となった．なお，K_m は十分なデータが得られなかったため算出せず，他パラメータ算出に使用する場合は恣意的に大きい値（1,000 µmol/L）として設定した（公表文献での緩衝液中の数値：30 µmol/L[5)]）．

実験 4c の目的は，ヒト血漿中 MTX に対するグルカルピダーゼの K_m を推定することであった．実験 4c では MTX 5，50 又は 500 µmol/L 含むヒト血漿検体にグルカルピダーゼ 15 U/L（最終濃度として）を添加した．その後，インキュベーションを 0，5，15 又は 45 分行ってから HCl を添加した．また，グルカルピダーゼ 0 U/L 条件下でインキュベーションを 0 又は 45 分行い，HCl を添加する処理も実施した．さらに MTX を含まないヒト血漿検体を用意し，グルカルピダーゼ 0 U/L 及びインキュベーション 0 分条件下で，HCl を添加する処理も実施した．なお，HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）とし，インキュベーションは 37℃で行った．

各 MTX 濃度の結果を表 2.6.2.5.1-10～2.6.2.5.1-12 に示した．なお，MTX を含まないヒト血漿検体の結果としては，MTX 濃度は BLQ（＜0.1 µmol/L）となった．MTX 設定開始濃度が 5 及び 50 µmol/L の場合，グルカルピダーゼ 15 U/L 及びインキュベーション 0 分条件での MTX 濃度に対して，インキュベーション 5 分で MTX 濃度は 50%未満となった．一方，設定開始濃度が 500 µmol/L の場合，インキュベーション 45 分で MTX 濃度は 50%未満となった．

表 2.6.2.5.1-10　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中 MTX 濃度（MTX 設定開始濃度：5 µmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	平均 MTX 濃度（µmol/L）	0 時点の平均 MTX 濃度に対する相対濃度（%）
0	0*1	4.92	96.9
0	45	5.22	102.8
15	0*1,2	5.08	100.0
15	5	1.75	34.4
15	15	0.310	6.1
15	45	NC	NC

NC：測定値に BLQ を含むため平均値を算出せず

＊1：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし．

＊2：0 時点

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 16 から一部改変

表 2.6.2.5.1-11　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中 MTX 濃度（MTX 設定開始濃度：50 μmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	平均 MTX 濃度（μmol/L）	0 時点の平均 MTX 濃度に対する相対濃度（%）
0	0*1	66.7	98.7
0	45	65.6	97.0
15	0*1,2	67.6	100.0
15	5	31.2	46.2
15	15	5.60	8.3
15	45	1.18	1.7

＊1：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし.

＊2：0 時点

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 17 から一部改変

表 2.6.2.5.1-12　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中 MTX 濃度（MTX 設定開始濃度：500 μmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	インキュベーション時間（分）	平均 MTX 濃度（μmol/L）	0 時点の平均 MTX 濃度に対する相対濃度（%）
0	0*1	1,008	102.5
0	45	1,060	107.8
15	0*1,2	983	100.0
15	5	931	94.7
15	15	730	74.3
15	45	243	24.7

＊1：直ちに HCl を添加し，インキュベートなし.

＊2：0 時点

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 18 から一部改変

次に測定した MTX 濃度を基に, 実験開始時点の MTX 濃度, SpecAct, K_m 及び DmtxFraction を実験 1 と同様のモデルを用いて推定及び標準誤差の算出を行った．MTX 設定開始濃度が 5，50 及び 500 μmol/L の場合の，実験開始時点の濃度はそれぞれ 5.1±0.4，66.3±1.8 及び 1,001±18 μmol/L となった．SpecAct は 1.31±0.04 μmol/min/U，K_m は 86±6 μmol/L 及び DmtxFraction は 0.018±0.004 となった．設定開始濃度が 50 及び 500 μmol/L での実験開始時点の MTX 濃度は，設定開始濃度に比べて高かった．なお，設定開始濃度より高かった原因は不明である．本実験で推定された K_m は公表文献における緩衝液中の K_m 8 μmol/L[5)] よりもはるかに高値であった.

実験 5a の目的は，検体の調製及び保存中に(6S)-5-MeTHF を安定化させる一連の条件を見出すことであった．実験 5a では(6S)-5-MeTHF 2 μmol/L を含むヒト血漿検体に対して 10 種類の検体処理方法を実施した．処理方法としては，血漿のみ，HCl のみ添加，HCl＋NaOH 添加，HCl＋アスコルビン酸添加，アスコルビン酸のみ添加，クエン酸のみ添加，ジチオスレイトール（DTT）のみ添加，アスコルビン酸＋DTT 添加，HCl＋DTT 添加及び HCL＋アスコルビン酸＋DTT 添加とした．10 種類の検体処理後，室温（設定温度 22℃）に 2 時間置いてから凍結保存（設定温度－70℃，少なくとも一晩かけて凍結）し，融解は測定前 1 時間以内に実施した．なお，HCl 添加処理を実施しなかった検体又は保存前に HCl が中和された検体は，測定までに HCl を添加した．HCl，NaOH 及びクエン酸は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加）とした．また，アスコルビン酸及び DTT の最終濃度は Patring らの実験 [16] を参考に，それぞれ約 2 w/v%及び約 0.1 w/v%とした．

結果を表 2.6.2.5.1-13 に示した．HCl＋アスコルビン酸添加処理と比較して，血漿のみの場合は(6S)-5-MeTHF が約 30%「次の式で算出：「100－（表 2.6.2.5.1-13 の HCl＋アスコルビン酸処理条件の濃度に対する相対濃度）」．以下同様の式で算出．」消失，HCl＋NaOH 添加処理の場合は 50%超消失，HCl 添加及びクエン酸添加処理の場合は BLQ となった．一方 DTT 添加処理の場合は，(6S)-5-MeTHF はほぼ消失せず安定化したが，HCl＋DTT 添加処理を行うと約 14%消失した．アスコルビン酸添加，HCl＋アスコルビン酸添加，アスコルビン酸＋DTT 添加及び HCl＋アスコルビン酸＋DTT 添加処理の場合は，おおむね 2%以下の消失であった．

表 2.6.2.5.1-13　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中(6S)-5-MeTHF 濃度（設定開始濃度：2 μmol/L，n＝2）

検体処理法	平均(6S)-5-MeTHF 濃度（μmol/L）	HCl＋アスコルビン酸処理条件の平均濃度に対する相対濃度（%）
血漿のみ	1.55	69.5
HCl のみ	NC	0.0
HCl＋NaOH	0.906	40.6
HCl＋アスコルビン酸	2.23	100.0
アスコルビン酸のみ	2.18	97.8
クエン酸のみ	NC	0.0
DTT のみ	2.17	97.3
アスコルビン酸＋DTT	2.19	98.2
HCl＋DTT	1.92	86.1
HCl＋アスコルビン酸＋DTT	2.22	99.6

NC：測定値が BLQ のため算出せず

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 19 から一部改変

実験 5b の目的は, 検体の調製及び保存中に(6S)及び(6R)-LV 並びに(6S)及び(6R)-5-MeTHF を安定化させる一連の条件を見出すことであった．実験 5b では 2 μmol/L の(6S)-LV，(6R)-LV，(6S)-5-MeTHF 及び(6R)-5-MeTHF を含むヒト血漿検体に対して，それぞれ 3 種類の検体処理方法を実施した. 処理方法としては, 血漿のみ, HCl 添加後にアスコルビン酸添加（個別添加），HCl＋アスコルビン酸混合液を添加（同時添加）とした．3 種類の検体処理後，室温（設定温度 22℃）に 2 時間置いてから凍結保存（設定温度－70℃，少なくとも一晩かけて凍結）し，融解は測定前 1 時間以内に実施した．なお，血漿のみの検体は測定までに HCl を添加した．HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加），アスコルビン酸は約 2 w/v%（最終濃度として）とした.

結果を表 2.6.2.5.1-14 に示した．個別添加又は同時添加に関わらず HCl＋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，血漿のみの条件の濃度に対する相対濃度が±8%の範囲内であった.

表 2.6.2.5.1-14 様々な検体処理方法におけるヒト血漿中(6S)-LV，(6R)-LV，(6S)-5-MeTHF 及び(6R)-5-MeTHF 濃度（各被験物質の設定開始濃度：2 μmol/L，n＝2）

検体処理法	平均濃度（μmol/L）	血漿のみの条件の平均濃度に対する相対濃度（%）
(6S)-LV		
血漿のみ	1.74	100.0
HCl＋アスコルビン酸（個別添加）	1.61*	92.5
HCl＋アスコルビン酸（同時添加）	1.61	92.5
(6R)-LV		
血漿のみ	1.81	100.0
HCl＋アスコルビン酸（個別添加）	1.73*	95.6
HCl＋アスコルビン酸（同時添加）	1.80	99.4
(6S)-5-MeTHF		
血漿のみ	1.84	100.0
HCl＋アスコルビン酸（個別添加）	1.89*	102.7
HCl＋アスコルビン酸（同時添加）	1.89	102.7
(6R)-5-MeTHF		
血漿のみ	1.68	100.0
HCl＋アスコルビン酸（個別添加）	1.73*	103.0
HCl＋アスコルビン酸（同時添加）	1.77	105.4

＊：検体を紛失したため 1 例のデータ

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 20 から一部改変

実験 5c の目的は，実験 5a 及び実験 5b で確認した安定化条件の下で，グルカルピダーゼが不活性化されるか否かを確認することであった．実験 5c では MTX 50 μmol/L 含むヒト血漿検体に 4 種類の処理を実施してからグルカルピダーゼ 500 U/L（最終濃度として）を添加し, インキュベーションを 5 分行った. 具体的な検体処理方法は, 血漿のみ, HCl のみ添加, HCl 添加後にアスコルビン酸添加（個別添加），HCl＋アスコルビン酸混合液を添加（同時添加）とした．さらに，同様の検体処理方法をグルカルピダーゼ添加前ではなく，インキュベーション 5 分後に実施するパターンも行った．また，グルカルピダーゼ 0 U/L 及び血漿のみの条件下でインキュベーションを 0 分行うパターンも実施した．インキュベーション後，室温（設定温度 22℃）に 2 時間置いてから凍結保存（設定温度－70℃，少なくとも一晩かけて凍結）し，融解は測定前 1 時間以内に実施した．なお，血漿のみの検体は測定までに HCl を添加した．HCl は 1 mol/L（反応系に対して 1/10 量を添加），アスコルビン酸は約 2 w/v%（最終濃度として），インキュベーションは 37℃で行った.

結果を表 2.6.2.5.1-15 に示した．本実験において，MTX 濃度は設定開始濃度より低くなったが，このような低値を示した原因は不明である．結果を相対的に比較すると，HCl のみ添加及び HCl＋アスコルビン酸の個別又は同時添加処理をインキュベーション前に実施することで DAMPA 濃度は BLQ となり，グルカルピダーゼが不活性化されたと考えられた．また，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.

表 2.6.2.5.1-15　様々な検体処理方法におけるヒト血漿中 MTX 及び DAMPA 濃度（MTX 設定開始濃度：50 μmol/L，n＝2）

グルカルピダーゼ（U/L）	検体処理法				平均 MTX 濃度（μmol/L）	平均 DAMPA 濃度（μmol/L）
	グルカルピダーゼ添加前		インキュベーション 5 分後			
	HCl	AA	HCl	AA		
0*1	－	－	－	－	13.3	NC
500	－	－	－	－	NC	13.0
500	○	－	－	－	12.4	NC
500*2	○	○	－	－	26.5	NC
500*3	○	○	－	－	27.4	NC
500	－	－	－	－	NC	8.79
500	－	－	○	－	NC	7.45
500*2	－	－	○	○	NC	7.79
500*3	－	－	○	○	NC	12.0

－：該当事項なし，○：該当事項あり，NC：BLQ のため算出せず，AA：アスコルビン酸

＊1：インキュベーション 0 分

＊2：HCl 及びアスコルビン酸を個別添加

＊3：HCl 及びアスコルビン酸を同時添加

引用元：4.2.1.4-1（PR001-NCL-PK008）の Table 21 から一部改変

本試験の結論としては, 実験 1 及び実験 3 から, MTX, (6R)-LV, (6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF の SpecAct の推定値は(6R)-LV（0.0018±0.0013 μmol/min/U）＜(6S)-LV＜(6S)-5-MeTHF＜MTX（0.156±0.003 μmol/min/U）であった「MTX，LV 及び(6S)-5-MeTHF の K_m をそれぞれ 8，120 及び 34 μmol/L（公表文献での緩衝液中の数値[5)]）と推定」．実験 2a から，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 分解に影響しないと考えられた．そのため，一連の実験で使用したヒト血漿中にはグルカルピダーゼが機能するために十分量の亜鉛イオンを含んでいると考えられた．実験 2b から，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 分又は 60 分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．実験 2c から，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．実験 2d（実験 2b の追加実験）から，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．実験 4a 及び 4c から K_m の推定値が(6S)-LV は 112±77 μmol/L，MTX は 86±6 μmol/L であった．なお，実験 4b は(6S)-5-MeTHF の K_m を推定するために実施したが，十分なデータが得られなかったため算出しなかった．実験 5a～5c から，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．

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける試験（*in vivo*）に関してChabnerらの実験[7)]において，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日間静脈内投与すると，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 濃度に差が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．

C57BL／6NマウスHD-MTX療法の救援試験（LV併用投与）では，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，MTX投与後の体重減少については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は差は認められなかった．

効力を裏付ける試験（*in vivo*）に関して Adamson らの実験[8]において，サルに MTX 静脈内投与（初回量 25 mg/kg/h を 1 時間投与後，5 mg/kg/h を 17 時間静脈内投与）後にグルカルピダーゼ 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 未満に低下した．同様に，2-コンパートメントモデルのα相 $t_{1/2}$ 及び $AUC_{0-\infty}$ 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，$t_{1/2}$ は 55±3 分（平均値±標準偏差）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初回投与から早くて 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を示した動物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 薬物動態試験において，MTX 静脈内投与（初回量 25 mg/kg/h を 1 時間投与後，5 mg/kg/h を 4 時間静脈内投与）後にグルカルピダーゼ 1，5，15 又は 50 U/kg を約 1～5 分間かけて投与すると血漿中 MTX 濃度はグルカルピダーゼ投与後 5 分で BLQ～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 LLOQ 付近になった．グルカルピダーゼの投与により 1 U/kg の用量においても投与後 5 分から 3 時間にわたって MTX 量を 99.5%以上低下させ続けることが明らかとなり，投与 15 分以内に 90%超減少させるグルカルピダーゼの最小用量は 1 U/kg 以下と推定された．

安全性薬理試験に関して Widemann らの実験[10]において，サルに DAMPA 約 16.7 mg/kg を 15 分かけて静脈内投与した際の血漿中 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．なお，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．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，これら 3 種類の代謝物は臨床で 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 対し細胞毒性を示さなかった．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，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ると，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 $MAPD_{90}$ に有意な影響が認められた．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 の全身曝露量は雌雄で同程度であり，$AUC_{0\text{-}t}$ 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 [15)]．クリアランスは公表文献の値 [15)] 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では，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変化が認められた．特に両眼又は片眼の強膜の赤変化は 4 例全てで認められた．また雄 1 例で右目の強膜の赤変化が投与後 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．血漿中の DAMPA 濃度は，DAMPA 投与完了後 2 時間では用量増加に伴って濃度が増加した．

ヒト血漿中における薬力学的薬物相互作用試験では，実験 1 及び実験 3 から，MTX，(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF に対するグルカルピダーゼの SpecAct の大きさは(6R)-LV＜(6S)-LV＜(6S)-5-MeTHF＜MTX の順であった．実験 2a から，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 分解に影響せず，一連の実験で使用したヒト血漿中にはグルカルピダーゼが作用するために十分量の亜鉛イオンを含んでいると考えられた．実験 2b から，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 分又は 60 分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．実験 2c から，DAMPA 又は DAMPA＋グルタミン酸による，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．実験 2d から，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．実験 4a 及び 4c から K_m の推定値及び標準誤差が(6S)-LV は 112±77 μmol/L，MTX は 86±6 μmol/L であった．なお，実験 4b は(6S)-5-MeTHF の K_m

を推定するために実施した実験だったが，十分なデータが得られなかったため算出しなかった．実験 5a～5c から，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が，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 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る．

要約すると非臨床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，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（試験番号：PR001-NCL-TX002）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[10]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．

2.6.2.7 図表

本文中に含めた．

2.6.2.8 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) 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.

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

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

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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.

14) 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.

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

16) Patring JDM, Johansson MS, Yazynina E, et al. Evaluation of impact of different antioxidants on stability of dietary folates during food sample preparation and storage of extracts prior to analysis. Anal Chim Acta. 2005, 553, 36-42.

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.

目次

2.6.3.1　薬理試験：一覧表.....2
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.....8

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

一覧表（次頁に続く）

被験物質：MTX

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験（*in vivo*）					
C57BL／6N マウス MTX 毒性量決定試験*1	C57BL／6N マウス	腹腔内投与	[redacted]（米国）	PR001-NCL-TX004	4.2.1.1-1
C57BL／6N マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）*2	C57BL／6N マウス	静脈内投与	[redacted]（米国）	PR001-NCL-IN001	4.2.1.1-2
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）*2, 3	Swiss Webster マウス	静脈内投与	[redacted]（米国）	PR001-NCL-PC002	4.2.1.1-3
サルのグルカルピダーゼ投与後 MTX 薬物動態試験*2	アカゲザル	静脈内投与	[redacted]（米国）	PR001-NCL-PK002	4.2.1.1-4
副次的薬理試験	実施していない.				

＊1：被験物質は MTX

＊2：被験物質はグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

＊3：試験報告書中にタイトルの記載なし.

一覧表（続き）

被験物質：MTX
DAMPA
(6S)及び(6R)-LV
(6S)及び(6R)-5-MeTHF
グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
安全性薬理試験					
ウサギにおける DAMPA 及び MTX 心血管系安全性試験*1, 2	New Zealand White ウサギの摘出心	*ex vivo*	[redacted]（米国）	PR001-NCL-SP001	4.2.1.3-1
イヌ DAMPA 忍容性及び薬物動態試験*3	ビーグル犬	静脈内投与	[redacted] [redacted]（英国）	PR001-NCL-PK005	4.2.1.3-2
イヌにおける DAMPA 心血管系安全性試験*1, 3	ビーグル犬	静脈内投与	[redacted] [redacted]（英国）	PR001-NCL-PC001	4.2.1.3-3
薬力学的薬物相互作用					
ヒト血漿中における薬力学的薬物相互作用試験*4	ヒト血漿に種々の被験物質を添加しインキュベート	*in vitro*	[redacted] [redacted]（英国）	PR00I -NCL-PK008	4.2.1.4-1

＊1：GLP 適用試験

＊2：被験物質は DAMPA 及び MTX

＊3：被験物質は DAMPA

＊4：被験物質は MTX，(6S)及び(6R)-LV，(6S)及び(6R) -5-MeTHF 並びにグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験（次頁に続く）

被験物質：MTX

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
C57BL ／ 6N マウス MTX 毒性量決定試験*1	C57BL ／ 6N マウス	腹腔内投与	0，250，500 mg/kg/日	雌性：5～15 例／群	MTX 250 mg/kg/日と 500 mg/kg/日を 3 又は 4 日間, 連続腹腔内投与すると毒性徴候が認められた．病理組織学的検査でも類似の病変がみられ，500 mg/kg/日投与群の方が重度な傾向があると考えられた.	非適用	PR001-NCL-TX004
C57BL／6N マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与）*2	C57BL ／ 6N マウス	静脈内投与	0，50 U/kg	雌性：10～20 例／群	MTX のみ腹腔内投与した群と比較して，LV の腹腔内投与又は LV の腹腔内投与及びグルカルピダーゼ（遺伝子組換え） 50 U/kg の静脈内投与を併用すると，死亡及び瀕死例が減少した．また，肉眼的所見（消化管の拡張）に関しては，MTX 単独及び LV のみの併用した群と比較して，LV＋グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）併用した群で認められた例数が減少した.	非適用	PR001-NCL-IN001
Swiss Webster マウス HD-MTX 療法の救援試験（LV 併用投与，MTX72 時間投与）*2, 3	Swiss Webster マウス	静脈内投与	0，50 U/kg/日	雄性：10～11 例／群	MTX のみ腹腔内投与した群と比較して，LV の腹腔内投与又は LV の腹腔内投与及びグルカルピダーゼ（遺伝子組換え） 50 U/kg の静脈内投与を併用すると，体重減少率（最低時）は改善傾向が認められた.	非適用	PR001-NCL-PC002

＊1：被験物質は MTX

＊2：被験物質はグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

＊3：試験報告書中にタイトルの記載なし.

効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
サルのグルカルピダーゼ投与後 MTX 薬物動態試験	アカゲザル	静脈内投与	1，5，15，50 U/kg	雄性：1～3 例／群	MTX の静脈内投与終了時は血漿中 MTX 濃度が 14.61～20.70 μmol/L だったが，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）を静脈内投与すると，投与後 5 分で BLQ～0.06 μmol/L の範囲になった．その後，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）投与後 15 分までに全投与群で BLQ となり，投与後 3 時間まで BLQ であった． 血漿中 DAMPA 濃度はグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）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，大部分の動物で投与後 3 時間までに LLOQ 付近になった． 一般状態は 1，5 及び 15 U/kg 投与群に変化は認められず，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）に忍容性を示した．しかし，50 U/kg 投与群は散瞳［グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）投与後 14 分］などが認められた．	非適用	PR001-NCL-PK002

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当試験なし．

2.6.3.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験（次頁に続く）

被験物質：DAMPA
MTX

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
心血管系	New Zealand White ウサギの摘出心	*ex vivo*＊1	0 ～ 250 µmol/L	雌性：7 例／群	DAMPA の血行動態パラメータについては，250 µmol/L の曝露（15 分，以下同様）により左室拡張期圧，左室収縮期圧，左室拡張末期圧の軽度な減少傾向が認められた．心電図及び電気生理学的パラメータについては 0 µmol/L と比較して，DAMPA 100～250µmol/L の曝露により $MAPD_{30}$，100 µmol/L の曝露により $MAPD_{50}$ が軽度ではあるが有意に（$p<0.05$）延長した．なお，250 µmol/L の灌流液中で沈殿が生じていた可能性があった． MTX の血行動態パラメータについては，50 µmol/L 以上に曝露させた 1 例で心機能の低下が認められた．心電図及び電気生理学的パラメータについては，0 µmol/L と比較して，MTX 100～250µmol/L の曝露により QT 間隔，250 µmol/L の曝露により $MAPD_{90}$ が有意に（$p<0.05$）短縮した．また，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．	適用	PR001-NCL-SP001
心血管系（予備試験）	ビーグル犬	静脈内投与＊2	15, 30, 60 mg/kg	雌雄:各 1 例／群	DAMPA 60 mg/kg の約 15～30 分の静脈内投与は忍容性が良好であった．血漿中 DAMPA 濃度は，投与後 0.25 時間（初回の測定時間）で最大となった．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 になった．全身曝露量は雌雄で同程度であり，$AUC_{0\text{-}t}$ 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．クリアランスは 0.60～0.70 L/h/kg，終末相 $t_{1/2}$ は 0.5～1.0 時間であった．	非適用	PR001-NCL-PK005

＊1：被験物質は DAMPA 及び MTX

＊2：被験物質は DAMPA

安全性薬理試験（続き）

被験物質：DAMPA

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
心血管系	ビーグル犬	漸増静脈内投与	0, 15, 30, 60 mg/kg	雄 2 例，雌 2 例	一般状態は，DAMPA 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．60 mg/kg 投与時には，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変化が認められた．特に両眼又は片眼の強膜の赤変化は 4 例全てで認められた．また雄 1 例で右目の強膜の赤変化が投与後 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相関性が認められない変化であった．DAMPA 濃度は，DAMPA 投与完了後 2 時間では用量増加に伴って濃度が増加した．	適用	PR001-NCL-PC001

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験（次頁に続く）

被験物質：MTX

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験番号：PR001-NCL-PK008　GLP 適用：非適用

実験の種類	添加物質及び反応系中濃度	特記すべき所見
1. ヒト血漿中のグルカルピダーゼ（遺伝子組み換え）活性の推定*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0～500 U/L MTX：100 μmol/L HCl：0.1 mol/L（1 mol/L を反応系に対して 1/10 量を添加，以下同様）	グルカルピダーゼ(遺伝子組換え)の用量増加に伴い, MTX から DAMPA への分解の増加が認められた．50 U/L 以上で大部分の MTX が 15 分以内に加水分解された．MTX 濃度測定値を基に推定した SpecAct（平均値±標準誤差）は 0.156±0.003 μmol/min/U となった．
2a. 亜鉛添加の影響*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：15 U/L MTX：100 μmol/L $ZnSO_4$：0，1.8 μmol/L HCl：0.1 mol/L	ヒト血漿中への亜鉛の添加の有無は, グルカルピダーゼ(遺伝子組換え)による MTX 分解に顕著に影響しないと考えられた．
2b. 様々な時点での HCl 添加の影響*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0，500 U/L MTX：1～1,000 μmol/L HCl：0.1 mol/L	HCl がグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）を効果的に不活性化したと考えられた．なお，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）を添加後に 15 又は 60 分間インキュベートしてから HCl 添加した場合の MTX 濃度は全て極めて低かった．
2c. MTX 分解への DAMPA の影響*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0，6 U/L MTX：1，8 μmol/L DAMPA：0，100 μmol/L グルタミン酸：0，100 μmol/L HCl：0.1 mol/L	MTX の分解産物である DAMPA 及びグルタミン酸による，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）の MTX 分解作用の阻害は認められなかった．
2d. MTX の回収率に対する HCl の添加タイミングの影響*2	MTX：100 μmol/L HCl：0.1 mol/L	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回収率に影響しなかった．

＊1：被験物質はグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

＊2：被験物質は MTX

薬力学的薬物相互作用試験（続き）

被験物質：(6S)-5-MeTHF

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験番号：PR001-NCL-PK008　GLP 適用：非適用

試験の種類	添加物質及び反応系中濃度	特記すべき所見
3. LV 及び 5-MeTHF に対するグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）活性の推定*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0～500 U/L (6S)及び(6R)-LV：各 50 µmol/L (6S)-5-MeTHF：100 µmol/L HCl：0.1 mol/L	(6R)-LV 濃度は，500 U/L のグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）を添加した際に顕著な影響は認められなかった．(6S)-LV 濃度は，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え） 500 U/L で 32.1 µmol/L となった．(6S)-5-MeTHF 濃度は，グルカルピダーゼ（遺伝子組換え） 500 U/L で 11.3 µmol/L となった．各被験物質濃度測定値を基に推定した(6R)-LV，(6S)-LV 及び(6S)-5-MeTHF の SpecAct（平均値±標準誤差）は，それぞれ 0.0018±0.0013，0.0109±0.0011 及び 0.0212±0.0003 µmol/min/U となった．
4a.グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）に対する(6S)-LV の K_m*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0，500 U/L (6S)-LV：0～100 µmol/L HCl：0.1 mol/L	(6S)-LV 濃度測定値を基に推定した K_m（平均値±標準誤差）は，112±77 µmol/L となった．
4b. グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）に対する(6S)-5-MeTHF の K_m*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0，500 U/L (6S)-5-MeTHF：0～100 µmol/L HCl：0.1 mol/L	十分なデータが得られなかったため，K_m は算出しなかった．
4c. グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）に対する MTX の K_m*1	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0，15 U/L MTX：0～500 µmol/L HCl：0.1 mol/L	MTX 濃度測定値を基に推定した K_m（平均値±標準誤差）は 86±6 µmol/L であった．
5a. (6S)-5-MeTHF の安定化条件の検討*2	(6S)-5-MeTHF：2 µmol/L HCl：0.1 mol/L NaOH：0，0.1 mol/L（1 mol/L を反応系に対して 1/10 量を添加） クエン酸：0，0.1 mol/L（1 mol/L を反応系に対して 1/10 量を添加） アスコルビン酸：0，約 2 w/v% DTT：0，約 0.1 w/v%	アスコルビン酸添加，HCl＋アスコルビン酸添加，アスコルビン酸＋DTT 添加及び HCl＋アスコルビン酸＋DTT 添加処理の場合は，(6S)-5-MeTHF がおおむね 2%以下の消失であった．

＊1：被験物質はグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

＊2：被験物質は(6S)-5-MeTHF

薬力学的薬物相互作用試験（続き）

被験物質：(6S)及び(6R)-LV
(6S)及び(6R)-5-MeTHF
グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）
試験番号：PR001-NCL-PK008　GLP 適用：非適用

試験の種類	添加物質及び反応系中濃度	特記すべき所見
5b. (6R)及び(6S)-LV 並びに(6S)及び(6R)-5-MeTHF の安定化条件の検討*1	(6S)及び(6R)-LV：各 2 µmol/L (6S)及び(6R)-5-MeTHF：各 2 µmol/L HCl：0.1 mol/L アスコルビン酸：0，約 2 w/v%	HCl 及びアスコルビン酸の個別添加又は同時添加に関わらず，(6S)-LV，(6R)-LV，(6S)-5-MeTHF 及び(6R)-5-MeTHF を安定化させ，血漿のみの条件の濃度に対する相対濃度が±8%の範囲内であった.
5c. 実験 5a 及び 5b で確認した安定化条件でのグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）不活性化の検証*2	グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）：0，500 U/L MTX：50 µmol/L HCl：0.1 mol/L アスコルビン酸：0，約 2 w/v%	結果を相対的に比較すると, HCl のみ添加及び HCl＋アスコルビン酸の個別又は同時添加処理をインキュベーション前に実施することで DAMPA 濃度は BLQ となり，グルカルピダーゼが不活性化されたと考えられた.

＊1：被験物質は(6R)及び(6S)-LV 並びに(6S)及び(6R)-5-MeTHF

＊2：被験物質はグルカルピダーゼ（遺伝子組換え）