目　次

2.4　非臨床試験の概括評価 3
2.4.1　非臨床試験計画概略 3
2.4.2　薬理試験 8
2.4.3　薬物動態試験 10
2.4.4　毒性試験 13
2.4.5　総括及び結論 18

略号一覧

略号	内容
ABC	ATP binding cassette
APD	活動電位持続時間
AUC	Area under the concentration-time curve、血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	0 時間から t 時間後までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BA	Bioavailability、バイオアベイラビリティ、生物学的利用率
C_{max}	Maximum plasma concentration、最高血漿中濃度
CES	Carboxylesterase、カルボキシルエステラーゼ
DTH	Delayed-type hypersensitivity、遅延型過敏
EHBR	Eisai Hyper-bilirubinemia Rat、先天性高ビリルビン血症ラット
FAO	国連食糧農業機関
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK293	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子
HEV	High endothelial venule、高内皮細静脈
IBD	Inflammatory bowel disease、炎症性腸疾患
IC_{50}	50%阻害濃度
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin、インターロイキン
JC	John Cunningham
K_i	阻害定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
MAdCAM-1	Mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1
MRP2 / Mrp2	Multidrug resistance-associated protein 2、ABCC2/Abcc2、cMOAT
NK	Natural killer、ナチュラルキラー
Oatp1	Organic anion transporting polypeptide 1
Oatp4	Organic anion transporting polypeptide 4
OATP1B1	Organic anion transporting polypeptide 1B1、SLCO1B1、OATP2
OATP1B3	Organic anion transporting polypeptide 1B3、SLCO1B3、OATP8
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell、末梢血由来単核球
PHA-L	Phytohemagglutinin-L
PML	Progressive multifocal leukoencephalopathy、進行性多巣性白質脳症
SCID	Severe combined immunodeficiency
SRBC	Sheep red blood cells、ヒツジ赤血球
$t_{1/2}$	Elimination half-life、血漿中濃度消失半減期
T_{max}	Time of maximum concentration、最高血漿中濃度到達時間
TK	トキシコキネティクス
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WHO	世界保健機関

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

AJM300 は低分子 α4 インテグリン拮抗型のエステル型プロドラッグであり、経口投与可能であることを特徴とする。AJM300 はエステルの加水分解によって活性代謝物である HCA2969 に代謝される。なお、AJM300 の代謝物には HCA2969 の他に、AJM300 の *N*-脱メチル体である HCA3053、HCA3053 のエステル加水分解体である HCA3047 及び HCA2969 グルクロン酸抱合体が存在する。

2.4.1.1 薬理試験概略

効力を裏付ける試験として、α4 インテグリンに対する親和性及び選択性、α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用、α4 インテグリンの生物活性に対する作用、実験的腸炎に対する作用及び代謝物の α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用を検討した。副次的薬理試験として、細胞性免疫機能に対する AJM300 及び HCA2969 の作用を検討した。効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の *in vitro* 試験には被験物質として AJM300、HCA2969、HCA3053 及び HCA3047 を用いた。*In vivo* 試験には AJM300、メチルセルロース及びクロスカルメロースナトリウムを[redacted]の割合で混合した製剤（AJM300M1 製剤）を用いた。

実施した効力を裏付ける試験の一覧を表 2.4-1 に、副次的薬理試験の一覧を表 2.4-2 に示した。

表 2.4-1　効力を裏付ける試験一覧表

試験の種類		試験系（動物種）	投与方法
α4 インテグリンに対する親和性及び選択性（被験物質：HCA2969 及び AJM300）	ヒト α4β1 インテグリンに対する親和性	ヒト α4β1 インテグリン発現細胞（Jurkat）	*in vitro*
	ヒト α4β7 インテグリンに対する親和性	ヒト α4β7 インテグリン発現細胞（RPMI-8866）	*in vitro*
	マウス α4β7 インテグリンに対する親和性	マウス α4β7 インテグリン発現細胞（TK-1）	*in vitro*
	各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する親和性	各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーター	*in vitro*
	酵素に対する親和性	各種酵素	*in vitro*
α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用（被験物質：HCA2969 及び AJM300）	ヒト α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト α4β1 インテグリン発現細胞（Jurkat）	*in vitro*
	ヒト α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト α4β7 インテグリン発現細胞（RPMI-8866）	*in vitro*
	ヒト αLβ2 インテグリンと ICAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト αLβ2 インテグリン発現細胞（Jurkat）	*in vitro*
	ラット α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ラット α4β1 インテグリン発現細胞（RBL-2H3）	*in vitro*
	ラット α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 の結合に対する阻害作用	ラット α4β7 インテグリン発現細胞（RBL-1）	*in vitro*
	マウス α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	マウス α4β1 インテグリン発現細胞（L1-2）	*in vitro*
	マウス α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 の結合に対する阻害作用	マウス α4β7 インテグリン発現細胞（TK-1）	*in vitro*
	血清存在下におけるヒト α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト α4β1 インテグリン発現細胞（Jurkat）	*in vitro*
	その他細胞機能に対する作用	各種細胞	*in vitro*
α4 インテグリンの生物活性に対する作用（被験物質：AJM300M1 製剤）	マウスリンパ球のホーミングに対する作用	マウス（BALB/c）	経口投与
	ラットリンパ球のホーミングに対する作用	ラット（SD）	経口投与
	マウス末梢血中のリンパ球数に対する作用	マウス（BALB/c）	経口投与
	ラット末梢血中のリンパ球数に対する作用	ラット（SD）	経口投与
実験的腸炎に対する作用（被験物質：AJM300M1 製剤）	腸炎発症に対する作用	マウス（C.B-17/Icr-scid）	経口投与（混餌）
	血漿中の AJM300 及び HCA2969 濃度測定	マウス（C.B-17/Icr-scid）	経口投与（混餌）
	抗 α4 インテグリン抗体との薬効比較	マウス（C.B-17/Icr-scid）	経口投与（混餌）
代謝物の α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用（被験物質：HCA2969、HCA3053、HCA3047 及び AJM300）	ヒト α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト α4β1 インテグリン発現細胞（Jurkat）	*in vitro*

表 2.4-2　副次的薬理試験一覧表

試験の種類		試験系（動物種）	投与方法
細胞性免疫に及ぼす作用（被験物質：HCA2969 及び AJM300M1 製剤）	NK 活性に対する作用	ヒト PBMC	*in vitro*
	ヒト PBMC 増殖能に対する作用	ヒト PBMC	*in vitro*
	ラット遅延型過敏反応に対する作用	ラット（SD）	経口投与

AJM300 及びその活性代謝物である HCA2969 の安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす作用を検討した。イヌ覚醒下循環器に対する作用検討では、被験物質として AJM300M1 製剤を用いた。その他の安全性薬理試験では、被験物質として AJM300 を用い、さらに *in vitro* 試験では、被験物質として HCA2969 を用いた。

実施した安全性薬理試験の一覧を表 2.4-3 に示した。

表 2.4-3　安全性薬理試験一覧

試験項目		動物種等	投与経路	被験物質	GLP
中枢神経系に及ぼす影響	一般症状に及ぼす影響（Irwin の多次元観察法）	ラット	経口	AJM300	適用
心血管系に及ぼす影響	収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍数及び心電図に及ぼす影響	イヌ	経口	AJM300M1 製剤	適用
	hERG 電流に及ぼす影響（パッチクランプ法）	hERG 導入 HEK293 細胞	*in vitro*	AJM300	適用
	hERG 電流に及ぼす影響（パッチクランプ法）	hERG 導入 HEK293 細胞	*in vitro*	HCA2969	適用
	静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間（APD_{50} 及び APD_{90}）及び最大立ち上がり速度に及ぼす影響	モルモット摘出乳頭筋	*in vitro*	AJM300	適用
	静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間（APD_{50} 及び APD_{90}）及び最大立ち上がり速度に及ぼす影響	モルモット摘出乳頭筋	*in vitro*	HCA2969	適用
呼吸系に及ぼす影響	1 分間の呼吸回数並びに 1 回及び 1 分間の換気量に及ぼす影響（whole body plethysmograph 法）	ラット	経口	AJM300	適用

2.4.1.2　薬物動態試験概略

AJM300 の *in vivo* 薬物動態試験は、毒性試験及び薬効試験で使用した動物種であるラット（SD）及び毒性試験で使用した動物種であるイヌ（ビーグル）を用いて、臨床投与経路である経口投与又はバイオアベイラビリティ算出のための静脈内投与で行った。*In vitro* 試験は、主としてラット、イヌ及びヒト由来の生体試料を用いて、血漿たん白結合率、薬物代謝及び薬物輸送を検討した。薬物動態試験に関する申請データパッケージの概略を表 2.4-4 に示した。

表 2.4-4　薬物動態試験一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	被験物質
吸収			
単回投与時の血漿中放射能濃度	ラット	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
単回投与時の血漿中濃度	ラット	経口、静脈内	AJM300、HCA2969
単回投与時の血漿中放射能濃度	イヌ	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
吸収部位	ラット	消化管ループ内	^{14}C-AJM300
反復投与時の血漿中放射能濃度	ラット	経口	^{14}C-AJM300
摂餌の影響	イヌ	経口	AJM300
分布			
単回投与時の組織中放射能濃度/血球移行率	ラット	経口	^{14}C-AJM300
単回投与時の組織中放射能濃度	有色ラット	経口	^{14}C-AJM300
単回投与時の組織中放射能濃度/血球移行率	イヌ	経口	^{14}C-AJM300
血漿たん白結合	マウス、ラット、イヌ、ヒト	*In vitro*	^{14}C-AJM300 ^{14}C-HCA2969
胎盤･胎児移行性	妊娠ラット	経口	^{14}C-AJM300
代謝			
血漿中代謝物組成	ラット	経口	AJM300M1 製剤
血漿中代謝物組成	イヌ	経口	AJM300M1 製剤
生体試料中代謝物組成	ラット尿、糞	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
生体試料中代謝物組成	ラット胆汁	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
生体試料中代謝物組成	イヌ尿及び糞	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
生体試料中代謝物組成	イヌ胆汁	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
代謝酵素の同定	マウス、ラット、イヌ、ヒト肝ミクロソーム	*In vitro*	^{14}C-AJM300
代謝物の検索及び同定	ラット、イヌ、ヒト血漿	経口	AJM300M1 製剤 AJM300 錠
肝薬物代謝酵素の誘導	ラット	経口	AJM300
排泄			
単回投与後の尿糞中排泄	ラット	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
単回投与後の尿糞中排泄	イヌ	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
反復投与時の尿糞中排泄	ラット	経口	^{14}C-AJM300
単回投与後の胆汁中排泄	ラット	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
単回投与後の胆汁中排泄	イヌ	経口、静脈内	^{14}C-AJM300
単回投与後の腸肝循環	ラット	被験物質投与後の胆汁を十二指腸内投与	^{14}C-AJM300
単回経口投与時の乳汁移行性	哺育ラット	経口	^{14}C-AJM300
血漿中動態及び胆汁排泄	ラット	静脈内	^{14}C-HCA2969
血漿中動態及び胆汁排泄	EHBR	静脈内	^{14}C-HCA2969
有機アニオントランスポーター評価 rOatp1、OATP1B1、OATP1B3	発現 oocytes	*In vitro*	^{3}H-HCA2969
有機アニオントランスポーター評価 rOatp4、OATP1B3*1、OATP1B3*2	発現 oocytes	*In vitro*	^{3}H-HCA2969
血漿中濃度推移及び組織内分布	FVB マウス Mdr 1a/b ノックアウトマウス Bcrp ノックアウトマウス	静脈内	^{3}H-HCA2969

2.4.1.3 毒性試験概略

AJM300 の安全性試験として、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及びその他の毒性試験を実施した。

短期の一般毒性試験及び *in vitro* 試験では、被験物質として AJM300 を用いた。その後に実施した安全性試験では、被験物質として、AJM300 及び AJM300M1 製剤を用いた。

実施した安全性試験の一覧を表 2.4-5 に示した。

表 2.4-5 毒性試験一覧表

試験項目及び期間	動物種等	投与経路	被験物質	GLP
単回投与毒性試験				
	ラット	経口	AJM300	適用
	イヌ	経口	AJM300	適用
反復投与毒性試験				
4 週間	ラット	経口	AJM300	適用
4 週間（低用量）	ラット	経口	AJM300	適用
26 週間	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
4 週間	イヌ	経口	AJM300	適用
13 週間	イヌ	経口	AJM300M1 製剤	適用
39 週間	イヌ	経口	AJM300M1 製剤	適用
遺伝毒性試験				
復帰突然変異	ネズミチフス菌、大腸菌	*in vitro*	AJM300	適用
染色体異常	CHL/IU 細胞※	*in vitro*	AJM300	適用
in vivo 小核試験	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
in vivo 小核試験（高用量）	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
がん原性試験				
13 週間（予備）	マウス	経口	AJM300M1 製剤	適用
24 ヵ月	マウス	経口	AJM300M1 製剤	適用
13 週間（予備）	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
24 ヵ月	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
生殖発生毒性試験				
受胎能及び初期胚発生	マウス	経口	AJM300M1 製剤	適用
胚・胎児発生（予備）	マウス	経口	AJM300M1 製剤	非適用
胚・胎児発生	マウス	経口	AJM300M1 製剤	適用
胚・胎児発生（予備）	ラット	経口	AJM300M1 製剤	非適用
受胎能及び胚・胎児発生	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
胚・胎児発生（予備）	ウサギ	経口	AJM300M1 製剤	非適用
胚・胎児発生	ウサギ	経口	AJM300M1 製剤	適用
出生前・後発生及び母体機能	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
その他の毒性試験				
免疫毒性試験（抗 SRBC 抗体産生能）	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用
2 週間反復 TK 測定試験	マウス	経口	AJM300M1 製剤	適用
2 週間反復 TK 測定試験	ラット	経口	AJM300M1 製剤	適用

※：チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

α4 インテグリンは生体内で β1 インテグリン又は β7 インテグリンと二量体を形成し、主として α4β1 インテグリンは Vascular cell adhesion molecule-1（VCAM-1）と、α4β7 インテグリンは Mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1（MAdCAM-1）といった接着分子と結合することが知られている。HCA2969 はヒト α4β1 インテグリン及びヒト α4β7 インテグリンに対し、同程度の親和性を示した。また、HCA2969 はヒト α4β1 インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合及びヒト α4β7 インテグリン発現細胞と MAdCAM-1/Fc との結合に対して、それぞれ濃度依存的かつ同程度の阻害作用を示し、ヒト αLβ2 インテグリン発現細胞と Inter-cellular adhesion molecule 1（ICAM-1）/Fc との結合に対して 1000 倍以上の選択性を示した。α4β1 インテグリンと VCAM-1、α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 との結合に対する阻害活性は、ヒト、ラット及びマウスの間で大きな違いは認められなかった。また、AJM300 及び HCA2969 の α4 インテグリン以外の受容体やイオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対する親和性は低かった。さらに、その他細胞機能（各種刺激による各種サイトカイン及び炎症性メディエーターの放出）に対する作用は認められなかった。上記のように、ヒト α4β1 インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合に対して HCA2969 は高い阻害活性を示すものの、ヒト血清存在下では約 50 倍の低下が認められた。その理由として、HCA2969 のヒトの血漿たん白結合率が高いことが考えられた。

α4 インテグリンの生理的役割であるリンパ球ホーミング現象を利用し、AJM300 の小腸パイエル板へのリンパ球ホーミング阻害作用について検討した。AJM300 はマウス及びラットへの経口投与において、リンパ球ホーミングを用量依存的に阻害した。また、別試験において、そのホーミング阻害を示す用量範囲において、末梢血中のリンパ球数の増加が確認された。この現象は、前述のホーミング現象を阻害することにより、末梢血リンパ球のリンパ組織系への移行が抑制されるため、結果として末梢血中のリンパ球数が増加したと考えられた。

炎症性腸疾患（IBD）の病態には消化管炎症部位へのリンパ球を含む炎症性細胞の浸潤が関与していることが知られており、そこではリンパ球ホーミングと同様に α4 インテグリンを介した接着分子への結合が寄与していることが示唆されている。成長する過程で腸炎を自然発症する IL-10 ノックアウトマウスより $CD4^+$ T 細胞を単離・精製し、生来リンパ球を生体内に有していない免疫不全 Severe combined immunodeficiency（SCID）マウスに移入した実験的腸炎モデルを用いて、AJM300 の薬効評価を実施し、腸管組織への T 細胞浸潤阻害作用も併せて検討した。細胞移入の前日から混餌で経口摂取させることにより、AJM300 は用量依存的に腸管重量増加、便性状スコア及び T 細胞浸潤を抑制した。さらに、有意な T 細胞浸潤面積率の低下が認められた用量（AJM300M1 製剤として混餌 1%）における腸管重量増加抑制効果は、α4 インテグリン占有率飽和を試験期間中維持させた用法用量における抗マウス α4 インテグリンモノクローナル抗体（PS/2）による効果と同程度であった。

なお、AJM300 の代謝物には HCA2969 の他に HCA3053、HCA3047 及び HCA2969 グルクロン酸抱合体が存在し、評価した代謝物の中で HCA3047 のみが HCA2969 と同等の α4β1 インテグリンと VCAM-1 との結合に対する阻害活性を示した。しかし、ラットに AJM300M1 製剤（AJM300 と

して 300 mg/kg）を経口投与したときの各代謝物の薬物動態パラメータで比較すると、HCA3047 は HCA2969 に対して 1 割程度の存在比率であり、AJM300 投与における薬効への HCA3047 の寄与はほとんどないと考えられる。

2.4.2.2 副次的薬理試験

臨床において既に米国で臨床使用されている抗 α4 インテグリン抗体ナタリズマブの進行性多巣性白質脳症（PML）発症リスクが報告されている。PML 発症は JC ウイルスに対する細胞性免疫能の低下が何らかの関連性を持っていると考えられていることから、副次的薬理試験として細胞性免疫機能に対する AJM300 及び HCA2969 の作用を検討した。

ヒト末梢血由来単核球のナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害活性（NK 活性）及び Phytohemagglutinin-L（PHA-L、リンパ球の表面受容体に対して高親和性を持ち、細胞凝集及び増殖活性を有する活性化因子）刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対し HCA2969 は α4β1 インテグリン発現細胞（Jurkat）とヒト VCAM-1/Fc との結合に対する IC_{50} 値の約 1000 倍の濃度において阻害作用を示さなかった。また AJM300 はラットにおいて 300 mg/kg の 1 日 2 回、8 日間の反復経口投与においても Keyhole limpet hemocyanin（KLH）で誘導される遅延型過敏（DTH）反応に対し影響を及ぼさなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

中枢神経系に及ぼす影響では、AJM300 のラットへの経口投与において、300 及び 1000 mg/kg で軽度な縮瞳が認められた。縮瞳の原因は不明であるが、縮瞳以外の症状が見られなかったこと、及び用量に関連して程度が増強する傾向は認められなかったことから、作用はきわめて弱いものと考えられた。

心血管系に及ぼす影響では、AJM300 はモルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する影響は認められなかったが、10^{-5} mol/L の濃度で hERG 電流を抑制した（抑制率は 32.4%）。hERG 電流を抑制した AJM300 の濃度である 10^{-5} mol/L は、臨床投与量である 960 mg/回（1 日 3 回）を投与した際のヒトにおける遊離型最高血漿中濃度と比較し、800 倍以上高い濃度であった。一方、HCA2969 は 10^{-5} mol/L の濃度まで hERG 電流及びモルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する影響は認められなかった。また、AJM300M1 製剤の覚醒イヌへの経口投与において、心血管系に対して 1000 mg/kg（AJM300 換算）まで影響は認められなかった。

呼吸系に及ぼす影響では、AJM300 のラットへの経口投与において、1000 mg/kg まで影響は認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性ラットに 1、3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与したときの血漿中放射能濃度は、投与 0.25 時間後に C_{max} に達し、4.24～6.66 時間の $t_{1/2}$ で減少した。血漿中放射能濃度の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例して増加した。

AJM300 を絶食下の雄性ラットに 3、10 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与したときの血漿中 AJM300 濃度は低レベルで検出された。血漿中には AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の速やかな生成が認められ、投与 0.25 時間後に C_{max}（1960、2640、4650 ng/mL）を示した後、1.68～5.98 時間の $t_{1/2}$ で減少した。HCA2969 の $AUC_{0\text{-}24h}$（1880、3520、10700 ng·h/mL）は投与量の増加に伴って増加した。HCA2969 を絶食下の雄性ラットに静脈内投与したときの血漿中 HCA2969 濃度は、0.93 時間の $t_{1/2}$ で減少した。

^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性イヌに 0.3、1 及び 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの血漿中放射能濃度は、投与 0.42～0.58 時間後に C_{max} を示し、3.80～4.51 時間の $t_{1/2}$ で減少した。血漿中には HCA2969 が徐々に生成し、投与 1.00～1.33 時間後に C_{max} に到達した。血漿中濃度の C_{max}（AJM300：368、970、2753 ng/mL、HCA2969：183、713、1684 ng/mL）及び $AUC_{0\text{-}24h}$（AJM300：373、1293、3190 ng·h/mL、HCA2969：542、2215、4818 ng·h/mL）は投与量にほぼ比例して増加し、HCA2969 の $t_{1/2}$（1.87～2.55 時間）は投与量によらずほぼ一定の値を示した。HCA2969 を静脈内投与したときの血漿中 HCA2969 濃度は、2.10 時間の $t_{1/2}$ で減少した。

AJM300 経口投与時と HCA2969 静脈内投与時の、HCA2969 の $AUC_{0\text{-}inf}$ 比から算出した HCA2969 の BA は、ラットでは 11.7%～20.1%、イヌでは 32.8%～43.8%であった。

AJM300 を非絶食下の雄性ラットに 15 mg/kg の用量で 1 日 1 回 4 週間反復経口投与したとき、初回投与日の血漿中濃度の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、AJM300 が 48.6 ng/mL 及び 140 ng·h/mL、HCA2969 が 1740 ng/mL 及び 5730 ng·h/mL、最終投与日の血漿中濃度の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、AJM300 が 41.8 ng/mL 及び 141 ng·h/mL、HCA2969 が 1500 ng/mL 及び 5840 ng·h/mL であり、初回投与及び最終投与間で、ほぼ同様であった。^{14}C-AJM300 を非絶食下の雄性ラットに 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回 7 日間反復経口投与したとき、7 日目の血漿中放射能濃度の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24\,h}$ は 1 日目よりも低い傾向を示した。また、AJM300 を非絶食下の雄性イヌに 25 mg/kg の用量で 1 日 1 回 4 週間反復経口投与したとき、初回投与日の血漿中濃度の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、AJM300 が 1920 ng/mL 及び 4250 ng·h/mL、HCA2969 が 756 ng/mL 及び 2730 ng·h/mL、最終投与日の血漿中濃度の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、AJM300 が 3100 ng/mL 及び 6350 ng·h/mL、HCA2969 が 1570 ng/mL 及び 4620 ng·h/mL であった。

胆管カニュレーションを施した雄性ラット及びイヌに、^{14}C-AJM300 を絶食下で単回経口投与したときの胆汁及び尿中放射能排泄率の和から、AJM300 の吸収率はラットでは 41%、イヌでは 46%と算出された。*In situ* ループ法によりラットにおける吸収部位を検討した結果、^{14}C-AJM300 の吸収部位は胃から結腸までの消化管の広い範囲に及ぶと考えられた。

AJM300 40 mg 錠を絶食下、食前又は食後に、雄性イヌに単回経口投与したときの T_{max} は、AJM300 及び HCA2969 共に絶食下及び食前投与に比べ食後投与において有意に延長した。C_{max} 及

び $AUC_{0\text{-}24h}$ はいずれの投与条件においても有意差は認められなかった。したがって、食後投与においては、絶食下及び食前投与と比較し、AJM300 及び HCA2969 の血漿中濃度は、なだらかに上昇し消失するという特徴が認められた。

2.4.3.2 分布

^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性ラットに 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの大部分の組織中放射能濃度は、投与 1 時間後に最高濃度に到達し、血漿中放射能濃度の減少とともに速やかに減少した。消化管、腸間膜リンパ節、骨格筋及び精巣中放射能濃度は、投与 4 時間後まで高濃度を示したが、投与 24 時間後には最高濃度の 2%未満にまで減少した。投与 72 時間後には、大部分の組織中放射能濃度は検出限界未満にまで減少した。^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性有色ラットに 3 mg/kg の用量で単回経口投与し、定量的全身オートラジオグラフを作製した。投与 1 時間後、すべての組織中放射能濃度は最高濃度に到達したが、肝臓を除くすべての組織の放射能濃度は血液よりも低かった。投与 4 時間後、肝臓、腎臓及び肺を除くすべての組織の放射能濃度は血液よりも低かった。投与 24 時間後以降、すべての組織中放射能濃度は定量限界未満にまで減少した。^{14}C-AJM300 を 1 mg/kg の用量で絶食下の雄性イヌに単回経口投与したときの投与 24 時間後のすべての組織中放射能濃度は、投与 30 分後の 15%以下にまで減少し、投与 168 時間後には、大部分の組織中放射能濃度は検出限界未満にまで減少した。

AJM300（0.9～9 μmol/L）の *in vitro* 血漿たん白結合率は、マウスで 99.3%～99.4%、ラットで 99.5%～99.6%、イヌで 99.5%～99.6%、ヒトで 99.2%～99.3%と高値を示した。HCA2969（3～30 μmol/L）の血漿たん白結合率は、マウスで 99.8%～99.9%、ラットで 99.6%～99.9%、イヌで 98.6%～98.7%、ヒトで 99.6%～99.7%であり、AJM300 とほぼ同様の値を示した。

^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性ラット及びイヌに単回経口投与したときの放射能の血球移行率は、ラットでは投与 24 時間後まで 12.8%以下、イヌでは投与 8 時間後まで 0.0%であった。

^{14}C-AJM300 を妊娠 13 及び 18 日目ラットに 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの、投与 24 時間後までの胎児 1 匹あたりの放射能分布率は、投与量の 0.01%以下であった。

2.4.3.3 代謝

^{14}C-AJM300 又は AJM300 を雄性ラット及びイヌに投与したときの血漿中には AJM300 のほか、HCA2969、AJM300 の *N*-脱メチル体（HCA3053、M-I）、HCA3053 のエステル加水分解体（HCA3047、M-II）及び HCA2969 のグルクロン酸抱合体（HCA2969-gluc）の 4 種類の代謝物が検出・同定された。血漿中の AJM300 及びその代謝物について、ラットでは HCA2969 が、イヌでは AJM300 及び HCA2969 が大部分を占めていた。^{14}C-AJM300 をラット及びイヌに経口投与したときの胆汁中、糞中及び尿中では、排泄された放射能の大部分が HCA2969 であった。胆汁中、糞中及び尿中に排泄された放射能のうち、未変化体（AJM300）として排泄された量はわずかであった。

各種動物の肝ミクロソームを用いて、AJM300 から HCA2969 への水解活性を測定したところ、種差が認められ、ラット、ヒト、マウス、イヌの順に高値を示した。また、検討したすべての種で、有機リン系化合物であるジクロルボス及びカルボキシルエステラーゼ（CES）特異的な阻害剤であるビス-p-ニトロフェニルリン酸により、水解活性が阻害されたことから、肝ミクロソーム中の CES が AJM300 から HCA2969 への加水分解に関与していると考えられた。

AJM300 を非絶食下の雄性ラットに 30、100 及び 300 mg/kg の用量で 1 日 1 回 14 日間反復経口投与したところ、肝薬物代謝酵素系への影響は認められなかった。

2.4.3.4 排泄

^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性ラット及びイヌにそれぞれ 3 及び 1 mg/kg の用量で単回経口投与したときの投与 168 時間後までの糞中に、ラットで投与量の 82.8%、イヌで 90.4%と、大部分の放射能が排泄されたが、尿中への排泄量はラットでは投与量の 8.3%、イヌでは 6.6%と低値を示した。^{14}C-AJM300 を非絶食下の雄性ラットに 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回 7 日間反復経口投与したときの最終投与 168 時間後までの糞中には、投与量の 94.0%、尿中には 0.9%の放射能が排泄された。屍体中の放射能残存率は投与量の 0.05%未満とわずかであり、反復投与においても投与された放射能のほとんどが体外に排泄された。絶食下の胆管カニュレーションを施した雄性ラット及びイヌに ^{14}C-AJM300 をそれぞれ 3 及び 1 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、投与 48 時間後までの胆汁中放射能累積排泄率は、ラットでは投与量の 39.9%、イヌでは 40.7%であった。また、単回静脈内投与では、投与 48 時間後までに、ラットで投与量の 92.3%、イヌで 77.5%の放射能が胆汁中に排泄された。以上のことから、ラット及びイヌ共に胆汁を介した糞中排泄が主たる排泄経路と考えられた。

^{14}C-AJM300 を絶食下の雄性ラットに 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの投与 8 時間後までの胆汁を、別の雄性ラットの十二指腸内に投与した。このときの胆汁中と尿中の放射能累積排泄率の合計は、投与量の 10%未満と低値を示したことから、腸肝循環を介して再吸収される放射能は少ないと考えられた。

^{14}C-AJM300 を分娩後 9 日目の哺育中ラットに 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの乳汁中放射能濃度は、母体血漿中放射能濃度の約 10 倍高濃度で推移し、母体血漿より消失が緩慢である傾向が認められた。しかしながら、投与 24 時間後以降は母体血漿と同様の速度で消失することから、投与された放射能が長期にわたって乳汁中に残留する可能性は低いと考えられた。

^{14}C-AJM300 を分娩後 9 日目の哺育中ラットに 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの乳汁中放射能濃度は、母体血漿中放射能濃度の約 10 倍高濃度で推移し、母体血漿より消失が緩慢である傾向が認められた。しかしながら、投与 24 時間後以降は母体血漿と同様の速度で消失することから、投与された放射能が長期にわたって乳汁中に残留する可能性は低いと考えられた。

Mrp2（有機アニオン性化合物の肝細胞から胆汁中への排泄に関与する ATP 依存性の ABC トランスポーター）を欠損したラット（EHBR）に、^{14}C-HCA2969 を 0.3 mg/kg の用量で静脈内投与したときの胆汁中排泄は、正常ラットよりも遅延した。このことから、ラットにおける HCA2969 の排泄には少なくとも Mrp2 が関与していると考えられた。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

2.7.2 に記載した〔2.7.2 参照〕。

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なかった。

2.4.4 毒性試験

AJM300 の非臨床安全性試験として、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及びその他の毒性試験を実施し、毒性を評価した。TK はラット及びイヌの反復投与毒性試験、マウス及びラットのがん原性試験、マウス、ラット及びウサギの生殖発生毒性試験で検討した。投与経路は予定臨床投与経路である経口投与とし、予定臨床投与期間を考慮し、反復投与毒性試験の投与期間はラットで最長 26 週間及びイヌで最長 39 週間とした。

予定臨床投与経路は経口投与のため、局所刺激性試験は実施しなかった。薬力学プロファイル、組織分布、*in vivo* 非臨床試験における行動及び一般症状から、AJM300 が依存性を示す可能性は示唆されなかったため、依存性試験は実施しなかった。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

強制経口投与におけるラットの概略の致死量は 1000 mg/kg 超、イヌの概略の致死量は 800 mg/kg 超であった。これらの試験において、ラットでは AJM300 投与の影響は認められなかったが、イヌでは 800 mg/kg 群の雌雄で嘔吐回数の増加と、雌で投与翌日の軽度の体重減少が認められた。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット 4 週間試験では、AJM300 を 60、250 及び 1000 mg/kg/day の用量で強制経口投与した。その結果、AJM300 投与の影響と考えられる死亡は認められず、一般症状、体重、摂餌量、眼底検査、尿検査、血液生化学的検査、解剖検査及び器官重量に AJM300 投与の影響は認められなかった。血液学的検査において、250 mg/kg 以上の群でリンパ球数の高値を伴う総白血球数の高値が観察された。また、病理組織学的検査において、60 mg/kg 以上の群で脾臓の辺縁帯における細胞数減少が観察された。これらの変化は AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用である α4 インテグリン阻害作用と関連した変化と考えられ、毒性とは判断しなかった。投与終了時に認められた変化は、いずれも休薬後に回復した。無毒性量は 1000 mg/kg/day 超と考えられた。

無影響量を検索する目的で追加実施したラット 4 週間試験（低用量）では、AJM300 を 15、30 及び 60 mg/kg/day の用量で強制経口投与した。その結果、AJM300 投与の影響と考えられる死亡は認められず、一般症状、体重、摂餌量、眼底検査、尿検査、血液生化学的検査、器官重量及び解剖検査に AJM300 投与の影響は認められなかった。病理組織学的検査において、脾臓の辺縁帯における細胞数減少はいずれも軽微ながら、雄では 15 mg/kg 以上、雌では 30 mg/kg 以上の群に認められた。また、血液学的検査では、雄の 60 mg/kg 群において総白血球数、好中球数、リンパ球数、好酸球数及び好塩基球数が高値を示した。これらの変化はラット 4 週間試験と同様、AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用と関連した変化と考えられた。無影響量は 15 mg/kg/day 未満と考えられた。

ラット 26 週間試験では、AJM300M1 製剤を 30、100、300 及び 600 mg/kg/day の用量で強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、いずれの群においても死亡は認められず、一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液生化学的検査、器官重量及び解剖検査に AJM300 投与と関連する変化は認められなかった。血液学的検査において、100 mg/kg 以上の群でリンパ球比率及び実数の高値を伴う総白血球数の高値がみられた他、病理組織学的検査では脾臓の辺縁帯

における細胞数減少が 30 mg/kg 以上の群で認められた。これらの変化は AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用と関連した変化と考えられ、毒性とは判断しなかった。100 mg/kg 以上の群では分葉核好中球比率の低値も認められたが、リンパ球比率及び実数の高値を反映した相対的な変化と考えられた。また、白脾髄（辺縁帯を除く）細胞成分の増加が、雄では 30 mg/kg 以上、雌では 600 mg/kg 群に認められた。本変化の発生機序は明らかでないが、加齢に伴う白脾髄の退縮が抑制されたとも考えられ、その程度も軽微であることから、毒性学的意義はないものと判断した。投与終了時に認められた変化は、休薬後に回復又は回復傾向を示したことから、可逆性の変化と考えられた。無毒性量は 600 mg/kg/day 超と考えられた。

イヌ 4 週間投与試験では、AJM300 を 25、100 及び 400 mg/kg/day の用量で強制経口投与した。その結果、いずれの群においても死亡は認められず、一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、解剖検査及び病理組織学的検査に AJM300 投与の影響は認められなかった。無毒性量は 400 mg/kg/day 超と考えられた。

イヌ 13 週間試験では、AJM300M1 製剤を 100、300 及び 1000 mg/kg/day の用量で強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、いずれの群においても死亡は認められず、一般症状、体重、摂餌量、尿検査、血液生化学的検査、器官重量及び解剖検査に AJM300 投与の影響は認められなかった。血液学的検査において、雌の 1000 mg/kg 群でリンパ球比率及び実数の高値、分葉核好中球比率の低値が認められた。リンパ球比率及び実数の高値については AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用と関連した変化と考え、毒性とは判断しなかった。分葉核好中球比率の低値については、リンパ球比率及び実数の高値を反映した相対的な変化と考えられた。また、病理組織学的検査では、肝臓に軽微な中心静脈周囲の細胞浸潤が雄では 1000 mg/kg 群、雌では 300 mg/kg 以上の群に認められた。これらは、AJM300 の投与に起因する変化であり、背景的に見られる変化の頻度が増加したものと考えられた。しかしながら、肝細胞に病理組織学的な異常はなく、さらに肝臓の障害を示唆する臨床検査値の変動も認められないことから、毒性学的な意義はないものと判断した。投与終了時に認められた変化は、いずれも休薬後に回復した。無毒性量は 1000 mg/kg/day 超と考えられた。

イヌ 39 週間試験では、AJM300M1 製剤を 30、100、300 及び 1000 mg/kg/day の用量で強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、いずれの群においても死亡は認められず、一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖検査及び器官重量に AJM300 投与の影響は認められなかった。病理組織学的検査では、背景的に見られる変化である肝臓の中心静脈周囲の細胞浸潤の程度及び頻度が 300 mg/kg 以上の群で増加した。これらは AJM300 の投与に起因した変化と考えられた。しかしながら、肝細胞に病理組織学的な異常はなく、さらに肝臓の障害を示唆する臨床検査値の変動も認められないことから、毒性学的な意義はないものと判断した。無毒性量は 1000 mg/kg/day 超と考えられた。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験において変異原性はなく、ほ乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験においても染色体異常誘発性は認められなかった。また、ラットを用いた *in vivo* 小核試験において小核誘発作用は認められなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

マウスがん原性試験では、AJM300M1 製剤を 30、100 及び 300 mg/kg/day の用量で 24 ヵ月間強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、特定の腫瘍あるいは非腫瘍性病変による死亡又は瀕死動物が増加することはなく、一般症状、体重、摂餌量、血液学的検査、解剖検査及び病理組織学的検査に AJM300 投与の影響は認められなかった。また、生存率に対する影響もなかった。病理組織学的検査において、本試験でみられた腫瘍はいずれも自然発生腫瘍であり、AJM300 投与に起因した腫瘍の発生はなかった。非腫瘍性病変では、いずれの器官・組織にも AJM300 投与によると考えられる変化は認められなかった。以上より、AJM300 はマウスに対して発がん性を示さないと判断した。

ラットがん原性試験では、AJM300M1 製剤を 30、100 及び 300 mg/kg/day の用量で 24 ヵ月間強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、特定の腫瘍あるいは非腫瘍性病変による死亡又は瀕死動物が増加することはなく、一般症状、体重、摂餌量、血液学的検査及び解剖検査に AJM300 投与の影響は認められなかった。また、生存率に対する影響もなかった。病理組織学的検査において、本試験でみられた腫瘍はいずれも自然発生腫瘍であり、AJM300 投与に起因した腫瘍の発生はなかった。非腫瘍性病変では、各投与群で脾臓の辺縁帯における細胞数減少と白脾髄（辺縁帯を除く）細胞成分の増加が認められた。これらの変化は、先に実施した 26 週間反復経口投与毒性試験でも認められており、さらに長期間にわたりこれらの変化が持続してみられた本試験ではリンパ造血器系腫瘍の発生や免疫学的異常を示唆する病変の発生がないことから、脾臓における辺縁帯の細胞数減少と白脾髄（辺縁帯を除く）細胞成分の増加の毒性学的意義はほとんどないと考えられた。以上より、AJM300 はラットに対して発がん性を示さないと判断した。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

マウス受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、AJM300M1 製剤を 30、100、300 及び 600 mg/kg/day の用量で、雄には交配前 4 週間及び交配期間を経て解剖検査前日まで、雌には交配前 2 週間及び交配期間を経て交尾成立後 6 日まで強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。親動物の一般毒性及び生殖機能に AJM300 投与の影響は認められなかった。初期胚発生に対しても AJM300 投与と関連する変化はみられなかった。また、生存胎児の外表検査、内臓検査、骨格検査及び骨化進行度に AJM300 投与と関連する変化はみられなかった。以上より、親動物の一般毒性、生殖機能及び初期胚発生に対する無毒性量はいずれも 600 mg/kg/day 超と考えられた。

マウス胚･胎児発生に関する予備試験では、AJM300M1 製剤を 30、100、300 及び 600 mg/kg/day の用量で、妊娠 6 日から 15 日まで強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。母動物に及ぼす影響では、いずれの群においても死亡及び流・早産は認められず、AJM300 投与と関連する変化は認められなかった。胚・胎児発生に及ぼす影響では、着床後死亡数及び着床後死亡率の高値とこれに伴う生存胎児数の低値が 100 mg/kg 以上の群でみられた。また、左心房小型の出現率に関連した内臓異常の出現率の高値が 100 mg/kg 以上、雌胎児体重の低値が 600 mg/kg 群でみられた。以上より、AJM300 投与による胚・胎児発生に対する影響が 100 mg/kg/day 以上で確認された。

マウス胚･胎児発生に関する試験では、AJM300M1 製剤を 12、60、300 及び 600 mg/kg/day の用量で、妊娠 6 日から 15 日まで強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。母動物に及ぼす影響では、いずれの群においても死亡及び流・早産は認められず、AJM300 投与と関連する変化は認め

られなかった。胚・胎児発生に及ぼす影響では、着床後死亡数及び着床後死亡率の高値とこれに伴う生存胎児数の低値が 600 mg/kg 群でみられた。また、左心房小型の出現率の高値及び胸骨分節糸状癒合の出現率の高値が 300 mg/kg 以上の群で、腸短小（結腸）の出現率の高値及び胸骨分節配列異常の出現率の高値が 600 mg/kg 群でみられた。以上より、母動物の一般毒性及び生殖機能に対する無毒性量は 600 mg/kg/day 超、胚・胎児発生に対する無毒性量は 60 mg/kg/day と考えられた。

ラット受胎能及び胚･胎児発生に関する試験では、AJM300M1 製剤を 30、100 及び 300 mg/kg/day の用量で交配前 2 週間及び交配期間を経て、雄には解剖検査前日まで、雌には妊娠 17 日まで強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、雌雄親動物の一般毒性及び生殖機能並びに胚・胎児発生に対し AJM300 投与による影響は認められず、無毒性量は 300 mg/kg/day 以上と考えられた。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、AJM300M1 製剤を 30、100 及び 300 mg/kg/day の用量で妊娠 6 日より 18 日まで強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、母動物の一般毒性について、300 mg/kg 群において、摂餌量の低値及び排糞量の減少が認められた。また、顕著な摂餌量の低値を示し、体重及び排糞量が減少した 1 例が流産した。流産動物の血液学的検査では白血球数の高値が認められたほか、解剖検査では胃粘膜の暗赤色巣及び肝臓の白色化、胃及び肝臓の癒着、更に胆嚢の肥大がみられた。この流産は AJM300 投与の影響による母動物の一般状態の悪化に伴う二次的な変化と考えられた。流産動物以外では、解剖検査において AJM300 投与による影響は認められなかったが、血液学的検査において赤血球数の低値が観察された。300 mg/kg 群で認められたこれらの所見については AJM300 投与による毒性と判断した。血液学的検査ではさらに、300 mg/kg 群で総白血球数及びリンパ球比の高値のほか、偽好酸球比の低値が認められた。100 mg/kg 群では総白血球数の高値が認められた。これらの変化は AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用と関連した変化と考えられ、毒性とは判断しなかった。母動物の生殖機能及び胚･胎児発生については AJM300 投与の影響は認められなかった。以上より、無毒性量は母動物の一般毒性に関して 100 mg/kg/day、母動物の生殖機能及び胚･胎児発生に関して 300 mg/kg/day 超と考えられた。

ラット出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、AJM300M1 製剤を 30、100 及び 300 mg/kg/day の用量で妊娠 7 日から授乳 20 日まで強制経口投与した（用量は AJM300 換算）。その結果、妊娠及び授乳期の母動物、受胎産物及び出生児の発生に AJM300 投与の影響は認められず、無毒性量は 300 mg/kg/day 超と考えられた。

2.4.4.6　その他の毒性試験

(1)　ラットを用いたヒツジ赤血球（SRBC）に対する特異抗体産生能

AJM300M1 製剤を 30、100 及び 300 mg/kg/day の用量で 4 週間強制経口投与し、ヒツジ赤血球（SRBC）に対する特異抗体産生能を評価した（用量は AJM300 換算）。その結果、いずれの群においても死亡は認められず、一般症状、体重、血液学的検査及び解剖検査に AJM300 投与と関連する変化は認められなかった。また、免疫機能に関連する器官である胸腺及び脾臓の重量に変化はなく、抗 SRBC 抗体産生能にも影響はなかった。なお、脾臓の病理組織学的検査では 30 mg/kg

以上の群で辺縁帯の細胞数減少が観察された。以上より、AJM300 は SRBC に対する特異抗体産生能に影響を与えないと考えられた。

(2) 代謝物の安全性評価

ヒトにおける AJM300 の主要代謝物は HCA2969、HCA3053（M-I）、HCA3047（M-II）及び HCA2969 のグルクロン酸抱合体（HCA2969-gluc）である。HCA2969 の血漿中濃度は、実施した AJM300 の毒性試験において測定しており、その安全性が評価されている。M-I、M-II 及び HCA2969-gluc の血漿中濃度は、ラット及びマウスに毒性試験の最高用量（300 もしくは 600 mg/kg）を 2 週間反復投与したトキシコキネティクス試験で測定し、当該試験における血漿中 AUC と薬物相互作用試験（AJM300/CP7）におけるヒト 2 週間反復投与時の血漿中 AUC とを比較した。その結果、マウス及びラットに 300 及び 600 mg/kg を投与した時の M-I 及び M-II の血漿中 AUC は、ヒトの M-I 及び M-II の血漿中 AUC を超えていた。また、マウスに 600 mg/kg、ラットに 300 及び 600 mg/kg を投与した時の HCA2969-gluc の血漿中 AUC は、ヒトの HCA2969-gluc の血漿中 AUC の 50%とほぼ同等もしくはそれ以上であった。毒性評価において、300 mg/kg はラットの生殖発生毒性試験並びにラット及びマウスのがん原性試験における最高用量、600 mg/kg はラット 26 週間反復試験及びマウス生殖発生毒性試験における最高用量である。このことから、HCA2969-gluc の毒性の特徴づけは、実施した AJM300 の反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験及びがん原性試験で少なくとも 1 種の動物で十分になされていると考えた。

(3) 不純物の安全性評価

安全性の確認が必要とされる閾値以上の規格値が設定されている不純物として、 類縁物質C※ 、HCA2969 及び M-I が該当した。HCA2969 及び M-I は、それぞれ AJM300 の代謝物であり、いずれもヒト、ラット及びイヌの血漿中で共通にみられていることから、実施した毒性試験において安全性が評価されていると判断した 類縁物質C※ は毒性試験で使用した被験物質中に含まれていることから、AJM300 の無毒性量から算出された 類縁物質C※ の無毒性量と、規格値の上限（[redacted]%）まで 類縁物質C※ が原薬に含まれると仮定した場合のヒトの推定 類縁物質C※ 曝露量（ヒトの体重を 60 kg とした場合、最大で[redacted] mg/kg/day に相当）とを比較した。その結果、 類縁物質C※ の無毒性量はヒトの推定 類縁物質C※ 曝露量以上であった。また、変異原性及び発がん性を示さなかった AJM300 の最高用量から算出された 類縁物質C※ の用量とヒトの推定 類縁物質C※ 曝露量とを比較した。その結果、変異原性及び発がん性を示さなかった 類縁物質C※ の用量はヒトの推定 類縁物質C※ 曝露量以上であった。以上より、 類縁物質C※ の安全性については確認されたと考え、新たな試験は実施しなかった。

(4) 光毒性試験

AJM300 は、波長 290～700 nm においてモル吸光係数が 1000 L mol^{-1} cm^{-1} を上回ったが、ラット及びイヌを用いた評価において、眼球への移行は低く、皮膚への残留性は認められなかったことから、AJM300 の光毒性について懸念はなく、更なる光毒性評価は必要ないと考え、新たな試験は実施しなかった。

(5) 新添加物の安全性評価

AJM300 製剤の予定される 1 日最大臨床用量に含有されるメチルセルロースの 1 日最大使用量は[redacted] mg（ヒトの体重を 60 kg とした場合の用量は[redacted] mg/kg）となり、1 日摂取量において医薬

※新薬承認情報提供時に置き換え

品添加物としての使用前例（607.5 mg）を上回ることから新添加物に該当するため、その安全性について考察した。

メチルセルロースの安全性については、AJM300M1 製剤を投与した毒性試験のプラセボ群（高用量群と同じ量のメチルセルロースとクロスカルメロースナトリウムを投与）より得られた結果から評価されている。さらに、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）において食品添加物としての安全性が評価されている。これらを参考に、医薬品添加物としての使用前例を上回る量のメチルセルロースを投与した際の安全性について評価を行った。

その結果、AJM300M1 製剤を投与した毒性試験のプラセボ群の評価において、反復投与毒性試験におけるメチルセルロースの無毒性量は、マウス（13 週間）で 300 mg/kg/day 超、ラット（26 週間）で 600 mg/kg/day 超、イヌ（39 週間）で 1000 mg/kg/day 超と考えられた。また、小核試験の結果は陰性であり、ラット胚・胎児発生に関する試験におけるメチルセルロースの無毒性量はラットで 300 mg/kg/day 超と考えられた。また、JECFA による評価では、単回投与毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性及び生殖発生毒性の結果から、メチルセルロースの ADI（一日最大許容摂取量）は特定しない（not specified）とされている。

以上より、メチルセルロースを 1 日最大[redacted] mg（[redacted] mg/kg/day）服用することによる安全性上の問題はないと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

非臨床試験の結論は以下のとおりである。

- 効力を裏付ける試験の結果から、AJM300 は生体内で活性代謝物 HCA2969 となり、α4β1 インテグリンと VCAM-1 との結合及び α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 との結合を同時に同程度に阻害することによって、T 細胞を含む炎症性細胞の血管内皮細胞への接着、引き続く炎症部位への浸潤を阻害することで抗炎症作用を発揮していると推定された。AJM300 は潰瘍性大腸炎患者において抗炎症作用を発揮し、その症状を緩和させることが期待される。
- 副次的薬理試験の結果から、AJM300 の細胞性免疫機能に及ぼす影響は小さい可能性が示された。
- 安全性薬理試験の結果から、臨床用量を投与した場合のヒト血漿中薬物濃度域では、臨床において標的組織以外の中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用が発現する可能性は低いと判断された。
- 薬物動態試験において、ラット及びイヌに AJM300 経口投与時の HCA2969 の BA は、ラットで 11.7%～20.1%、イヌで 32.8%～43.8%と、イヌで高い傾向が認められた。
- 肝ミクロソームを用いて、AJM300 から HCA2969 への水解活性を測定したところ、種差が認められ、ラット、ヒト、マウス、イヌの順に高値を示した。また、AJM300 から HCA2969 への加水分解には、肝ミクロソーム中の CES が関与していると考えられた。
- ^{14}C-AJM300 をラット及びイヌに経口投与したときの組織中放射能濃度は、血漿中放射能濃度の減少とともに速やかに減少し、ラットでは投与後 72 時間後に、イヌでは投与 168 時間後にはほとんどの組織で検出限界未満にまで減少した。また、脳中濃度の Kp 値は、ラットで 0.01～0.04、イヌで 0.06～0.07 であり、放射能の中枢組織への移行は低かった。

- ラット及びイヌの排泄試験及び胆汁、糞及び尿中代謝物組成の結果から、ラット及びイヌにおける AJM300 の主排泄経路は、HCA2969 に代謝された後の胆汁を介した糞中排泄であると考えられた。EHBR を用いた検討の結果、ラットにおける HCA2969 の胆汁中排泄には少なくとも Mrp2 が関与していると考えられた。また、ラットの肝有機アニオントランスポーターである Oatp1 及び Oatp4 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた検討の結果、HCA2969 はこれらのトランスポーターを介して肝臓に取り込まれることが示唆されている。以上より、ラットにおいて AJM300 は HCA2969 に加水分解された後、少なくとも Oatp1 及び Oatp4 を介して血液中から肝細胞内に取り込まれ、Mrp2 を介して肝細胞内から胆汁中に排泄されると考えられた。
- 単回投与毒性試験におけるラットの概略の致死量は 1000 mg/kg 超、イヌの概略の致死量は 800 mg/kg 超であった。
- 反復投与毒性試験では、AJM300 投与の影響として、リンパ球数の高値、脾臓の辺縁帯における細胞数減少及び白脾髄（辺縁帯を除く）細胞成分の増加が認められた。白脾髄（辺縁帯を除く）細胞成分の増加の発生機序は明らかでないが、リンパ球数の高値及び脾臓の辺縁帯における細胞数減少については、AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用である α4 インテグリン阻害作用と関連した変化と考えられた。これらの変化は、休薬により回復もしくは回復傾向を示すと共に、がん原性試験においてリンパ造血器系腫瘍の発生や免疫学的異常を示唆する病変の発生はなく、免疫毒性試験において AJM300 は SRBC に対する特異抗体産生能に影響を与えなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。
- 遺伝毒性及びがん原性は認められなかった。
- 生殖発生毒性試験では、マウスの胚･胎児発生に関する試験において、AJM300 の活性代謝物である HCA2969 の薬理作用である α4 インテグリン阻害作用と関連した変化と考えられる催奇形性が認められた。同様の催奇形性変化は、マウス受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験で実施した生存胎児を用いた検査では認められなかったことから、HCA2969 の催奇形性作用については器官形成期における曝露が大きく関与しているものと推察された。
- 代謝物の毒性の特徴づけは、実施した AJM300 の反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験及びがん原性試験で少なくとも 1 種の動物で十分になされていると考えた。
- 不純物の安全性については実施した毒性試験において評価されていると判断した。
- 医薬品添加物としての使用前例を超えるメチルセルロースの投与量について、実施した安全性試験の結果及び JECFA による評価結果から、安全性上の問題はないと考えられた。
- AJM300 の最大臨床用量において、予測不可能で重篤な副作用が発現する可能性は低いと考えられたが、生殖発生毒性試験の結果を考慮して、本剤は妊婦又は妊娠している可能性のある女性への投与は避けるべきであると考えられた。