ロゼックスゲル0.75%

第2部（モジュール2）
CTDの概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
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
HGPRT	ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
H_2O_2	Hydrogen peroxide：過酸化水素
IARC	International Agency for Research on Cancer：国際がん研究機関
MMP	Matrix metalloproteinase：マトリックスメタロプロテアーゼ
NO	Nitric oxide：一酸化窒素
$OH\cdot$	Hydroxyl radical：ヒドロキシラジカル
O_2^-	Superoxide anion：スーパーオキシドアニオン
PBRER	定期的ベネフィット・リスク評価報告
ROS	Reactive oxygen species：活性酸素種
TLR2	Toll-like receptor 2：Toll様受容体 2
TNF-α	Tumor necrosis factor-α：腫瘍壊死因子-α

目次

頁
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1 薬理試験計画の概略 4
2.4.1.2 薬物動態試験計画の概略 4
2.4.1.3 毒性試験計画の概略 4
2.4.2 薬理試験 4
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 4
2.4.2.1.1 酒さの発症メカニズム 4
2.4.2.1.2 メトロニダゾールの薬理作用 5
2.4.2.1.2.1 抗炎症作用 5
2.4.2.1.2.2 免疫抑制作用 5
2.4.2.2 副次的薬理試験 5
2.4.2.3 安全性薬理試験 5
2.4.3 薬物動態試験 5
2.4.4 毒性試験 5
2.4.4.1 単回投与毒性試験 5
2.4.4.2 反復投与毒性試験 5
2.4.4.3 遺伝毒性試験 6
2.4.4.4 がん原性試験 6
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 6
2.4.4.6 局所刺激性試験 7
2.4.4.7 その他の毒性試験 7
2.4.5 総括及び結論 7
2.4.5.1 効力を裏付ける試験 7
2.4.5.2 副次的薬理試験 7
2.4.5.3 安全性薬理試験 7
2.4.5.4 薬物動態試験 7
2.4.5.5 毒性試験 7
2.4.5.6 結論 8
2.4.6 参考文献 8

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

メトロニダゾールは、国内において、偏性嫌気性菌感染症等に対する治療薬として内服錠、膣錠及び注射剤の剤型で既に50年以上広範に臨床使用されてきた実績のある医薬品である。また、外国では、メトロニダゾール外用剤は、酒さ治療薬として長年臨床使用されており、酒さの標準治療薬の一つとして使用されている。したがって、メトロニダゾールの酒さに対する有効性及び安全性については多くの研究が公表論文に報告されている。以上のことを踏まえ、非臨床試験データパッケージは、公表論文及びGalderma S.A.が実施した試験成績を用いて構築した。

2.4.1.1 薬理試験計画の概略

効力を裏付ける試験は公表論文を引用した。副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験については、がん性皮膚潰瘍部位の殺菌・臭気の軽減を適応とした製造販売承認申請時に提出した資料で評価可能であることから、本申請に際して新たな試験は実施しなかった。

2.4.1.2 薬物動態試験計画の概略

薬物動態試験については、がん性皮膚潰瘍部位の殺菌・臭気の軽減を適応とした製造販売承認申請時に提出した資料で評価可能であることから、本申請に際して新たな試験は実施しなかった。

2.4.1.3 毒性試験計画の概略

単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、局所刺激性試験、その他の安全性試験（皮膚感作性試験）は、がん性皮膚潰瘍部位の殺菌・臭気の軽減を適応とした製造販売承認申請時に提出した資料で評価済みであり、本申請に際して新たな試験は実施しなかった。本申請では、先の申請時に提出していないGalderma S.A.が実施した遺伝毒性試験に関する新たな評価資料を提出したほか、一部の遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験及びがん原性試験は公表論文を参考資料とした。本申請で提出する遺伝毒性試験については、導入元であるGalderma S.A.によりGLP適合試験として実施された。

2.4.2 薬理試験

薬理試験の一覧表を2.6.3.1に示す。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

以下に、酒さの発症メカニズムとメトロニダゾールの薬理作用を示す。

2.4.2.1.1 酒さの発症メカニズム

酒さは、顔面の紅斑、丘疹・膿疱、毛細血管拡張、発作性潮紅を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患である。

発症メカニズムとして、紫外線曝露や常在微生物叢などにより、Toll-like receptor 2（TLR2）などの自然免疫の活性化、活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）の生成、カセリシジンペプチドの発現増加、並びにサイトカイン及びケモカインの産生などが誘導されて、皮膚への炎症性細胞の浸潤及び血管変性などの炎症が惹起されると考えられている[1)]。これらTLR2、ROS及びカセ

リシジンペプチドの発現は酒さ病変部で増加している[2)-4)]。

紫外線曝露はROSの生成を誘導し、Tumor necrosis factor-α（TNF-α）などのサイトカイン及びケモカインの産生を誘導する[5)-10)]。*Demodex*や常在微生物叢はTLR2を介してTNF-α及びInterleukin-8などの産生や、セリンプロテアーゼの発現及びその分解産物であるカセリシジンペプチドの産生を誘導する[1)-3), 10), 11)]。このカセリシジンペプチドをマウスに皮下投与すると、局所における紅斑及び炎症性細胞の浸潤が誘導される[3)]。

2.4.2.1.2 メトロニダゾールの薬理作用

2.4.2.1.2.1 抗炎症作用

メトロニダゾールは、ザイモザン刺激によるヒト好中球からの過酸化水素（H_2O_2）及びヒドロキシラジカル（OH·）の生成をそれぞれ100 μg/mL及び10 μg/mL以上で有意に抑制した。また、メトロニダゾールは、ヒト皮膚に常在する遊離脂肪酸であるパルミトレイン酸（0.05～5 μg/mL）の存在下において、ヒト好中球による活性酸素種（H_2O_2、OH·及びスーパーオキシドアニオン（O_2^-））の生成を5～100 μg/mLの濃度域で濃度依存的かつ相乗的に阻害した。

2.4.2.1.2.2 免疫抑制作用

メトロニダゾールは、細胞障害性をもたらさない濃度域（41.5及び83 μg/mL）で、ヒト末梢血単核細胞からのTNF-α産生を有意に抑制した。また、メトロニダゾールは、ヒト及びマウス脾細胞の混合リンパ球反応をそれぞれ10～200 μg/mL及び50～200 μg/mLの濃度域で濃度依存的かつ有意に抑制した。更に、メトロニダゾールは、マウスマクロファージの*in vitro*貪食能及びTNF-α産生を5～200 μg/mLの濃度域で濃度依存的かつ有意に抑制した。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.4.2.3 安全性薬理試験

該当資料なし。

2.4.3 薬物動態試験

該当資料なし。

2.4.4 毒性試験

毒性試験の一覧表を2.6.7.1に示す。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

該当資料なし。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

該当資料なし。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

メトロニダゾールの細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames試験）では陽性であったが、陽性を示した菌株のニトロレダクターゼ欠損株では、復帰突然変異コロニーの減少が確認された。培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HGPRT試験）及びトランスジェニック動物（Muta™マウス）を用いた遺伝子突然変異試験では、陰性の結果を得ている。以上のことから、メトロニダゾールにおけるAmes試験の陽性は、主に菌株特有のニトロ基還元酵素（ニトロレダクターゼ）によって、メトロニダゾールが還元されたことで突然変異を誘発した（陽性）ものであると考えられ、哺乳類ではニトロレダクターゼの活性が低いことが知られており[12]、*in vitro*及び*in vivo*における哺乳類細胞での陰性の結果から、ヒトで遺伝子突然変異は誘発されないものと考えられた。

メトロニダゾールの培養細胞を用いた染色体異常試験及びマウス骨髄小核試験では、陰性の結果を得ている。

以上のことから、メトロニダゾールは、生体にて遺伝毒性を誘発しないものと考えられた。

2.4.4.4 がん原性試験

メトロニダゾールの経口投与によるがん原性試験が3種のげっ歯類（マウス、ラット及びハムスター）で実施され、マウス及びラットでは陽性、ハムスターでは陰性であった。国際がん研究機関（IARC）では、メトロニダゾールはヒトに対する発がん性が疑われる物質（IARCグループ2B）に分類されており、実験動物の経口投与における発がん性は陽性であると考えられる。

本剤の経皮投与によるがん原性試験は実施されていないが、本剤は1988年より約30年にわたる臨床使用実績があり、定期的ベネフィット・リスク評価報告（PBRER）における腫瘍発生に関する副作用報告は、医薬品の発がんに対する生涯許容リスクレベル（10万分の1）よりも明らかに低いものとなっている。また、ヒトにおける発がん性を明確に示すデータや疫学的な証拠は報告されていない[13]。

以上のことから、本剤の経皮投与による発がん性評価は実施していないが、これまでの臨床使用実績から、ヒトの経皮投与による腫瘍発生のリスクは低いものと考えられた。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

マウス及びラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する影響の報告、マウス、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する影響の報告がある。なお、出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する影響の報告はなかった。

雄性マウスを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において、マウスでは500 mg/kgの経口投与による精巣、精巣上体及び雄性生殖器（精嚢及び前立腺）の重量の減少、精子運動能及びテストステロン濃度の低下が認められている。ラットでは、マウスと同様に100 mg/kgより精巣の病理組織学的検査で精子及び精子細胞の退行性断片化が認められているが、休薬により回復性が確認されている。また、200及び400 mg/kgを投与した際、精子形成と性ホルモンへの影響が認められている。

胚・胎児発生に関する試験において、マウス、ラット及びウサギの経口投与で胚・胎児への影響は認められず、催奇形性も認められなかった。

以上のことから、マウス及びラットで精巣への影響が認められているものの、既承認の申請で提出したウサギ及びミニブタを用いた反復経皮投与では精巣への影響は認められていない。また、本剤の開発において、酒さ患者に本剤の単回経皮投与あるいはメトロニダゾール溶液の単回経口

投与した臨床薬理試験（1.CG.03.SUM.0442試験）が実施されており、経皮投与による全身曝露量は、経口投与による全身曝露量よりも十分に低いことが示されている。

以上のことから、本剤の経皮投与による生殖発生毒性のリスクは低いものと考えられた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

該当資料なし。

2.4.4.7 その他の毒性試験

該当資料なし。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 効力を裏付ける試験

酒さ病変における炎症は、ROS生成の増加や種々の因子によって誘導されるTNF-αなどのサイトカイン産生の増加によって生じると考えられている[1)]。

メトロニダゾールの酒さに対する薬効発現メカニズムとして抗炎症作用及び免疫抑制作用が挙げられる。まず、抗炎症作用として、メトロニダゾールはヒト好中球によるROSの生成を有意に抑制することが報告されている。次に、免疫抑制作用として、メトロニダゾールはヒト末梢血単核細胞からのTNF-α産生、ヒト及びマウス脾細胞の混合リンパ球反応、マウスマクロファージの*in vitro*貪食能及びTNF-α産生を濃度依存的かつ有意に抑制することが報告されている。

以上の薬理作用によって、皮膚におけるROSの生成や炎症反応を抑制することで、メトロニダゾールは酒さに対する治療効果を示すと考える。

2.4.5.2 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.4.5.3 安全性薬理試験

該当資料なし。

2.4.5.4 薬物動態試験

該当資料なし。

2.4.5.5 毒性試験

遺伝毒性試験に関して、Ames試験では陽性を示したが、陽性を示した菌株におけるニトロ基還元酵素（ニトロレダクターゼ）欠損株では、突然変異誘発性は減少した。哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*遺伝子突然変異試験及び*in vivo*突然変異試験の結果は陰性であった。これらの結果から、メトロニダゾールにおけるAmes試験の陽性は、主に菌株特有のニトロレダクターゼによって、メトロニダゾールが還元されたことで突然変異を誘発したものであると考えられた。一方、哺乳類ではニトロレダクターゼの活性が低いことが知られており[12)]、*in vitro*及び*in vivo*突然変異試験における哺乳類細胞での陰性の結果が得られたことから、生体では遺伝子突然変異誘発性のリスクはないものと考えられた。また、メトロニダゾールの培養細胞を用いた染色体異常試験及びマウス骨髄小核試験では、陰性の結果を得ている。以上のことから、メトロニダゾールは、生体にて遺

伝毒性を誘発しないもの（陰性）と判断した。

がん原性試験に関して、メトロニダゾールの経口投与により、マウス及びラットでは陽性、ハムスターでは陰性の結果が報告されている。国際がん研究機関（IARC）では、メトロニダゾールはヒトに対する発がん性が疑われる物質（IARCグループ2B）に分類されており、実験動物の経口投与における発がん性は陽性であると考えられる。一方、本剤の経皮投与によるがん原性試験は実施していない。しかし、本剤は1988年より約30年にわたる臨床使用実績があり、定期的ベネフィット・リスク評価報告（PBRER）における腫瘍発生に関する副作用報告は、医薬品の発がんに対する生涯許容リスクレベル（10万分の1）よりも明らかに低いものとなっている。また、ヒトにおける発がん性を明確に示すデータや疫学的な証拠は報告されていない[13)]。以上のことから、本剤の経皮投与による発がん性評価は実施していないが、これまでの臨床使用実績から、ヒトの経皮投与による腫瘍発生のリスクは低いものであると考えられた。しかしながら、添付文書では、本剤の経皮投与によるがん原性試験の成績がないことを注意喚起する予定である。

生殖発生毒性試験に関して、雄性マウス及びラットを用いた経口投与による受胎能及び初期胚発生に関する影響を評価した試験では、精巣に関する影響が報告されている。一方、ウサギ及びミニブタを用いた本剤の反復経皮投与毒性試験（初回承認申請時資料）では精巣に関する影響は認められていない。また、本剤の開発において、酒さ患者に本剤の単回経皮投与あるいはメトロニダゾール溶液の単回経口投与した臨床薬理試験（1.CG.03.SUM.0442試験）の結果、経皮投与による全身曝露量は、経口投与による全身曝露量よりも十分に低いことが示されている。以上のことから、本剤の臨床使用条件下では精巣に対して安全性の懸念が生じる可能性は低いものと考えられた。胚・胎児発生に関する影響について、マウス、ラット及びウサギの経口投与では、胚・胎児への影響は認められず、催奇形性は認められなかった。以上のことから、本剤の経皮投与による生殖発生毒性のリスクは低いものと考えられた。

以上のことから、本剤の酒さに対する使用において、ヒトへの安全性は有するものと考えられた。

2.4.5.6 結論

本剤の酒さに対する有効性及び安全性プロファイルは、上記提出資料により適切に評価されたものと考える。メトロニダゾールの臨床成績及び長年にわたる臨床使用経験を考慮すると、本剤は酒さ患者の治療に安全に使用できるものと考える。

2.4.6 参考文献

1) Yamasaki K, Gallo RL. The molecular pathology of rosacea. J Dermatol Sci. 2009. 55: 77-81.
2) Yamasaki K, Kanada K, Macleod DT, Borkowski AW, Morizane S, Nakatsuji T. *et al*. TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes. J Invest Dermatol. 2011. 131: 688-697.
3) Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, *et al*. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. Nat Med. 2007. 13: 975-980.
4) Bakar Ö, Demirçay Z, Yuksel M, Haklar G, Sanisoglu Y. The effect of azithromycin on reactive oxygen species in rosacea. Clin Exp Dermatol. 2007. 32: 197-200.
5) Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. J Invest Dermatol. 1999. 112:

751-756.
6) Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, *et al*. H_2O_2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. J Invest Dermatol. 1998. 110: 966-971.
7) Young CN, Koepke JI, Terlecky LJ, Borkin MS, Boyd SL, Terlecky SR. Reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha-activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. J Invest Dermatol. 2008. 128: 2606-2614.
8) Philippe AG, Christiane C, Joël R, Carole N, Bernard W, Nicolas D, *et al*. Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes*-induced inflammation of the skin. PLoS Pathog. 2009. 5: e1000527.
9) Lee HM, Shin DM, Kim KK, Lee JS, Paik TH, Jo EK. Roles of reactive oxygen species in CXCL8 and CCL2 expression in response to the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Immunol. 2009. 29: 46-56.
10) Yang CS, Shin DM, Lee HM, Son JW, Lee SJ, Akira S, *et al*. ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signaling. Cell Microbiol. 2008. 10: 741-754.
11) Margalit A, Kowalczyk MJ, Żaba R, Kavanagh K. The role of altered cutaneous immune responses in the induction and persistence of rosacea. J Dermatol Sci. 2016. 82: 3-8.
12) McGregor DB, Edwards I, Wolf CR, Forrester LM, Caspary WJ. Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. Mutat Res 1991; 26: 29-39.
13) Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? Mutat Res 2002; 511: 133-144.