ラジカット内用懸濁液 2.1%

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床試験の概括評価

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.4　非臨床試験の概括評価 5
2.4.1　非臨床試験計画概略 5
2.4.2　薬理試験 7
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 7
2.4.2.2　副次的薬理試験 7
2.4.2.3　安全性薬理試験 7
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 8
2.4.3　薬物動態試験 8
2.4.3.1　分析法 8
2.4.3.2　吸収 8
2.4.3.3　分布 9
2.4.3.4　代謝 9
2.4.3.5　排泄 10
2.4.3.6　薬物間相互作用 10
2.4.4　毒性試験 10
2.4.4.1　反復投与毒性試験 11
2.4.4.2　がん原性試験 12
2.4.4.3　その他の毒性試験 12
2.4.4.3.1　毒性機序に関する試験：神経毒性の検討 12
2.4.4.3.2　不純物の毒性試験 13
2.4.4.3.3　新規添加物の毒性試験 14
2.4.5　総括及び結論 14
2.4.5.1　薬理試験 14
2.4.5.2　薬物動態試験 16
2.4.5.3　毒性試験 16
2.4.5.3.1　反復投与毒性試験 16
2.4.5.3.2　がん原性試験 17
2.4.5.3.3　神経毒性試験 17
2.4.5.3.4　まとめ 17
2.4.6　参考文献一覧 18

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AIS	acute ischemic stroke	脳梗塞急性期
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
AUC	area under the (plasma) concentration-time curve	（血漿中）濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	area under the (plasma) concentration-time curve from zero up to infinity with extrapolation of the terminal phase	末端消失相を無限大時間まで外挿した（血漿中）濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24h}	area under the (plasma) concentration-time curve from zero up to 24 hours	投与開始から 24 時間までの（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
BBB/BSCB	blood brain and blood spinal cord barriers	血液脳関門及び血液脊髄関門
C_{max}	maximum (plasma) concentration after administration	最高（血漿中）濃度
C	—	[redacted]
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
DDI	drug-drug interaction	薬物間相互作用
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル
[^{14}C]エダラボン	[^{14}C]-labeled edaravone	[^{14}C]標識エダラボン
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry	ガスクロマトグラフィー質量分析法
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
グルクロン酸抱合体	glucuronide conjugate of edaravone	エダラボンのグルクロン酸抱合体
h	hour	時間
HEK293	human embryonic kidney 293	ヒト胎児由来腎臓 293
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
15-HPETE	15(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid	15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸
IC_{50}	concentration associated with 50% inhibition	50%抑制濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
min	minute(s)	分

＊新薬承認情報提供時に置き換え

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
NCI	National Cancer Institute	米国国立がん研究所
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
3-NT	3-nitrotyrosine	3-ニトロチロシン
•OH	hydroxyl radical	ヒドロキシルラジカル
$ONOO^-$	peroxynitrite	ペルオキシナイトライト
A	impurity A, degradation product A or Impurity A	不純物 A，分解物 A 又は Impurity A
D	impurity D, degradation product D or Impurity D	不純物 D，分解物 D 又は Impurity D
B	impurity B, degradation product B or Impurity B	不純物 B，分解物 B 又は Impurity B
Impurity D	Impurity D	Impurity D
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
QTc	corrected QT	補正 QT
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
硫酸抱合体	sulfate conjugate of edaravone	エダラボンの硫酸抱合体
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

エダラボンは，田辺三菱製薬株式会社（以下，申請者）により神経保護剤として開発された，フリーラジカル消去作用を有する化合物である．ラジカット静注剤（以下，既承認薬）は脳梗塞急性期（AIS）の治療を適応として 2001 年に日本で初めて承認された．また，筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者を対象に日本で実施された一連の臨床試験に基づき，2015 年 6 月に日本で，2015 年 12 月に韓国で，2017 年 5 月に米国で，2018 年 10 月にカナダで，2019 年 1 月にスイスで，2020 年 7 月にインドネシアで，2021 年 4 月にタイで，2021 年 12 月にマレーシアで承認された．申請者は，ALS 患者，医師及び介護者にとって利便性が良いと考えられるエダラボンの内用懸濁液（以下，本剤）を開発した．

非臨床の効力を裏付ける試験，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はいずれも 2.6.2 薬理試験の概要文で示し，2.6.3 にも概要表として簡潔に要約する．

エダラボンの効力を裏付ける試験は全て初回申請（AIS）と一部変更申請（ALS）時に提出済みの内容である．一部変更承認（ALS）以降，新規の効力を裏付ける薬理試験は実施していない．また，エダラボンの安全性薬理試験については，初回申請（AIS）時に報告済みである．これらの試験は，ICHS7A（2000 年）（医薬品開発における安全性薬理試験ガイドライン）及び ICHS7B（2005 年）［ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価に関するガイドライン］の発行に先立ち 19[redacted]～19[redacted] 年に実施した．これら静脈内投与安全性薬理試験において，経口投与による想定臨床曝露量［非結合型エダラボン最高濃度（C_{max}）：0.139 μg/mL］を大きく超えた曝露量（非結合型エダラボン C_{max} ラット：約 35.2 μg/mL，イヌ：約 63.5 μg/mL）まで，評価が実施されていると考えられること，既に経口投与による臨床試験を実施しており安全性上の懸念が認められておらず，既承認薬を用いた補正 QT（QTc）試験（2.7.2.2.2.9，MCI-186-J25 試験）において QTc 間隔の延長が認められなかったこと，本剤の臨床経口投与において静脈内投与と比較してエダラボンの全身曝露が増加しないこと（2.7.2.2.2.3，MT-1186-J03 試験）から，経口投与による安全性薬理試験の実施は不要と判断した．ただし，*in vitro* 試験のヒト胎児由来腎臓 293（HEK293）細胞におけるヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）チャネル電流評価試験については，2005 年に，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して評価した．

更に，本剤の臨床使用をサポートするための新規提出する試験は下記のとおりである．副次的薬理試験として，エダラボン並びに 2 種の代謝物［エダラボンの硫酸抱合体（硫酸抱合体）及びエダラボンのグルクロン酸抱合体（グルクロン酸抱合体）］の 79 の各種受容体，チャネル及びトランスポーターへの結合性を検討した．また，薬力学的薬物相互作用試験として，エダラボンの脂質過酸化抑制及びラジカル消去作用へのヘパリン及びアスピリン併用の影響を検討した．

エダラボンの非臨床薬物動態に関する試験成績は初回申請（AIS）と一部変更申請（ALS）時に提出済みである．新投与経路医薬品として本剤の承認申請を行うにあたり，一部追加試験

を実施した．新規に提出する非臨床薬物動態試験，並びにヒト由来試料を用いた *in vitro* 代謝及び薬物間相互作用（DDI）試験の結果については，それぞれ 2.6.4 及び 2.7.2 に示す．ヒト由来試料を用いた *in vitro* 試験を除き，分析バリデーション試験を含め，本申請にて新規提出する薬物動態試験の概要表は 2.6.5 に示す．

エダラボンの吸収，分布，代謝，排泄及び DDI に関する特性を明らかにするため，げっ歯類（マウス，ラット），非げっ歯類（イヌ，サル）及びヒトを含む生体由来試料を用いて非臨床薬物動態（PK）試験を実施した．これらの PK 試験では，非臨床毒性試験及び薬理試験で用いた動物種及び系統を使用した．すなわち，追加試験としてエダラボンをサルに静脈内投与したときの薬物動態試験，イヌの経口投与 PK 試験，ラット及びイヌにエダラボンを経口並びに静脈内投与したときの血漿中代謝物プロファイルの比較，反復経口投与時のラット及びイヌのトキシコキネティクス（TK）試験，神経毒性評価に関連する TK 試験，主要代謝物の *in vitro* たん白結合率，排泄における動物種間の比較，*in vitro* 代謝及び薬物トランスポーターに関する評価を実施した．

非臨床毒性試験の概要文を 2.6.6 に示し，2.6.7 にも概要表として簡潔に要約する．主な毒性試験は，医薬品規制調和国際会議（ICH）M3 (R2) ガイドライン（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス）及びその他安全性評価に関する ICH ガイドラインに従い，GLP を遵守して実施した．

AIS の治療を目的とした日本での製造販売承認をサポートするために実施した主要な毒性試験は，GLP を適用し，マウス，ラット，モルモット，ウサギ，イヌ及びサルを用いて実施した．それらの試験結果は初回申請（AIS）時に報告済みである．

加えて，AIS の治療薬としてエダラボンが 2001 年に日本で最初に承認された後，欧州において AIS 用の新たな投与レジメンを開発するため，ラット，イヌ及びサルを用いた持続静注による非臨床試験を実施した．イヌを用いた 28 日間反復投与毒性試験で神経系の毒性学的変化がみられたため，サルを用いた 28 日間反復投与毒性試験及びイヌを用いた神経毒性に関する検討試験を，20[redacted] 年[redacted] 月から 20[redacted] 年[redacted] 月にかけて実施した．これらの試験結果の概要は研究報告にて報告済みである．

本剤の臨床使用をサポートするため，ラットで最長 26 週間，イヌで最長 39 週間の反復経口投与毒性試験を実施した．また，製剤中に含まれる可能性のある不純物 A，B 及び[redacted]（　C　）の毒性試験を実施した．

更に，初回申請（AIS）及び一部変更申請（ALS）時には，エダラボンのがん原性に関する情報として，米国国立がん研究所（NCI）が実施したエダラボンの混餌投与によるがん原性試験結果[1)]を報告していたが，本薬注射剤の米国食品医薬品局（FDA）の Postmarketing Requirements の一環として，CB6F1-Tg rasH2 マウスを用いたエダラボンの 26 週間反復経口投与がん原性試験及びラットを用いたエダラボンの 104 週間反復経口投与がん原性試験を実施した．

本剤は，エダラボンの作用機序並びに非臨床薬理，薬物動態及び毒性データから，添付文書（案）に従って想定臨床用量で ALS 患者に安全に使用することができ，重篤な副作用を起こ

す可能性は低いと結論づけられた.

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

エダラボンのフリーラジカル消去作用, 脂質過酸化抑制作用及び細胞保護作用を検討するため，培養神経細胞及び血管内皮細胞を用いたいくつかの *in vitro* 試験を実施した.

エダラボンは，電子を供与して自身を最終形の開環 2-オキソ-3-(フェニルヒドラゾノ)-酪酸に変換することにより，ラジカルを消去すると考えられる．フリーラジカルに対する作用を検討したところ, エダラボンは 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）消去作用を示し，50%抑制濃度（IC_{50}）は 29.3 μmol/L であった．エダラボンは *in vitro* でヒドロキシルラジカル（•OH）を強力に抑制し，IC_{50} は 6.7 μmol/L であり生物学的作用が確認された．エダラボンは 100 μmol/L ではスーパーオキシドアニオンに対するラジカル消去作用を全く示さなかった.

エダラボンは脳ホモジネートでの脂質過酸化を濃度依存的に抑制し，IC_{50} は 15.3 μmol/L であった．エダラボンは，15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸（15-HPETE）誘発内皮細胞傷害では最小有効濃度 1 μmol/L で，グルタミン酸誘発神経細胞傷害では 50 μmol/L の濃度で，酸化的傷害に対する保護作用を示した.

ALS のげっ歯類モデルである変異型スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）(H46R）トランスジェニックラットを用いて，エダラボンの薬理作用及び神経学的作用の *in vivo* 評価を実施した．このトランスジェニックラットは，46 番目のアミノ酸がヒスチジンからアルギニンへ変異している H46R を有するヒト SOD1 導入遺伝子を発現している．エダラボン（3 mg/kg/h）又は生理食塩液は持続点滴静注（1 時間持続投与/1 日）を 2 日間行った後，2 日間の休薬期間を設けて投与された．本試験では，ラットにエダラボン又は生理食塩液を 18 週齢から正向反射消失まで，また脊髄運動神経細胞数の評価については，雄は 26 週齢及び雌は 28 週齢まで，反復投与した．エダラボンは雌雄のいずれにおいても生存期間に明らかな効果を示さなかった．エダラボンは 30～32 週齢の雌の SOD トランスジェニックラットに対して，傾斜板から 5 秒以上滑り落ちない角度の減少を有意に抑制した．エダラボンは雌雄の SOD トランスジェニックラットにおいて，副次的パラメータである罹病期間，体重，後肢反射テストスコア，着地開脚幅, ロータロッド試験における落下までの最大時間及び脊髄運動神経細胞数には明らかな効果を示さなかった．以上の結果より，雌ラットで認められた傾斜板角度の低下抑制で示される滑り落ちに対する耐久能の低減抑制は, エダラボンの運動機能低下に対する抑制作用及び症状進行に対する遅延作用を示唆するものと考えられた.

2.4.2.2　副次的薬理試験

エダラボン並びに 2 種の代謝物（硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体）の 79 の各種受容体, チャネル及びトランスポーターへの結合性を検討し, その結果, それぞれ 10 μmol/L において, 結合性は認められなかった.

2.4.2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験は，ICHS7A 及び ICHS7B が発行される前に実施し，初回申請（AIS）にて報告した．ICHS7A 及び ICHS7B の発行以降に，hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞において，hERG チャネル電流に対するエダラボンの影響を評価する *in vitro* 試験を，GLP を遵守して実施した．エダラボンは hERG 電流を阻害しなかった．

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

エダラボンの脂質過酸化抑制及びラジカル消去作用へのヘパリン及びアスピリン併用の影響を検討し，その結果，ヘパリンの影響は認められなかった．アスピリンは，エダラボンの脂質過酸化抑制作用に対して影響を及ぼす可能性が示唆されたが, その影響は小さいと考えられた．また，DPPH ラジカル消去作用に関して，エダラボン単独群とアスピリンとの併用群との間に差が認められたものの，その差はわずかであり，相加的な作用であると考えられた．

2.4.3　薬物動態試験

エダラボンの非臨床薬物動態特性を明らかにするため，各種 *in vitro* 並びに *in vivo* 試験（吸収，分布，代謝，排泄及び DDI）を実施した．

2.4.3.1　分析法

非臨床 PK 及び TK 試験で得た生体試料中のエダラボンの分析は，液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）又はガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）により実施した．GLP 非適用の PK 試験では，バリデーション又は適格性確認済み条件下にて LC-MS/MS 又は GC-MS を用いて血漿及び組織中のエダラボン濃度を測定した．GLP 適用の TK 試験では，バリデーション実施済みの LC-MS/MS 法又は GC-MS 法を用いてイヌ及びサル血漿中のエダラボンを定量した．分析法のバリデーションは，バリデーション実施時期に適用されていたガイドラインに準拠して実施した．既承認薬の申請以前の分析バリデーションは，試料の凍結／融解及び処理中の安定性などの一部評価を除き，Guidance for industry：Bioanalytical Method Validation（FDA, 2001 年 5 月）に準拠して実施した．一方，既承認薬の承認後に新たに実施したバリデーションに関しては, 薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン（厚生労働省，2013 年 9 月）に準拠した．

血漿を採取する際，抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを使用した．分析は，ジクロロメタン／n-ペンタン（3:7, v/v）を用いた液－液抽出，又はアセトニトリル除たん白の後，LC-MS/MS 法又は GC-MS 法を用いて行った．内部標準物質として安定同位体である[$^{13}C_4$]エダラボン，安定化剤として 4'-メチル-エダラボンを使用した．

2.4.3.2　吸収

多くの非臨床安全性及び薬物動態試験は静脈内投与又は持続静脈内投与により実施した．ALS 治療薬としての新たな投与経路である経口投与の評価として，単回経口投与 PK 試験（イヌ）及び反復経口投与 TK 試験（ラット，イヌ）を含む追加非臨床 PK 試験を実施した．

雄イヌにエダラボンを単回経口投与（50 mg/個体）及び静脈内投与（1.5 mg/kg）したときのエダラボン，並びに硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体の PK パラメータを評価した．エダラボンは速やかに吸収され，経口投与後及び静脈内投与後のエダラボン，並びに硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体の末端消失相を無限大時間まで外挿した血漿中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）の合計から推定されるエダラボン（水溶液投与）の消化管吸収率は 93.2%であった．エダラボンを水溶液として投与したときのバイオアベイラビリティ（BA）は 25.2%であった．一方，粉末カプセル投与したときの BA も 21.6%と同程度であり，消化管内でのエダラボンの溶解性は十分であることが示唆された．

エダラボン又は ^{14}C 標識されたエダラボン（[^{14}C]エダラボン）を単回静脈内投与したときの雄サルの PK プロファイルを取得した．2 mg/kg の用量で[^{14}C]エダラボンを静脈内投与したとき，血漿中エダラボン濃度は二相性を描いて血漿から速やかに消失し，β 相の消失半減期は，1.24 時間，全身クリアランスは 1.57 L/kg/h，及び分布容積は 0.76 L/kg であった．加えて，既報の評価動物種であるラット，イヌも含め，エダラボンの $AUC_{0-\infty}$は放射能 $AUC_{0-\infty}$と比較し，5.2～14.9%の範囲であった．

反復経口投与 TK 試験において，ラットに 25，75 及び 250 mg/kg/日の用量で 26 週間，イヌに 10，30，100 及び 300 mg/kg/日の用量で 39 週間反復経口投与したとき，エダラボンの血漿中曝露は用量比を上回る増加を示した．反復投与による明らかな蓄積性はなく，血漿中曝露に性差は認められなかった．臨床投与間隔を模した非臨床反復投与試験は実施していないが，種々の動物に静脈内及び経口投与したときの PK 及び TK プロファイルから，ヒトにおける安全性を推察可能と考えた（2.6.6，表 2.6.6.9－2）．

2.4.3.3　分布

エダラボンの *in vitro* 血清たん白結合率は，ヒトで 91～92%，マウスで 89～90%，ラットで 81～86%，イヌで 37～52%，サルで 85～89%であった．硫酸抱合体の *in vitro* 血清たん白結合率は，ヒトで約 99%，マウスで約 93%，ラットで約 98%，イヌで約 98%であった．また，グルクロン酸抱合体の血清たん白結合率は，ヒトで 36～39%，マウスで 11～15%，ラットで 24～28%，イヌで 19～20%であった．

2.4.3.4　代謝

LC-MS/MS 及び紫外線クロマトグラムを用いた定性評価により，雄ラット及び雄イヌにエダラボンを単回静脈内投与及び経口投与したときの血漿中代謝物プロファイルを比較した．結果，いずれの動物種及び投与経路においても主要代謝物は硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体であり，代謝物プロファイルに顕著な差は認められなかった．

エダラボンの代謝は速やかであり，既報のラット，イヌ及びヒトと同様にサルでも主要代謝物として，2 種類の抱合体，すなわち，5-エノール体の硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体が検出された．なお，サル血漿では，硫酸抱合体が主代謝物であった．

今回新たに評価したサルも含め，未変化体（エダラボン）の尿中排泄率は低く，エダラボン

は主に肝臓での代謝により消失することが示唆された．更に，尿中の主要代謝物は，ラット及びイヌでは硫酸抱合体であり，ヒトではグルクロン酸抱合体であったが，サルでは，硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体が同程度尿中に排泄され，種差が認められた（図 2.4.3－1）．

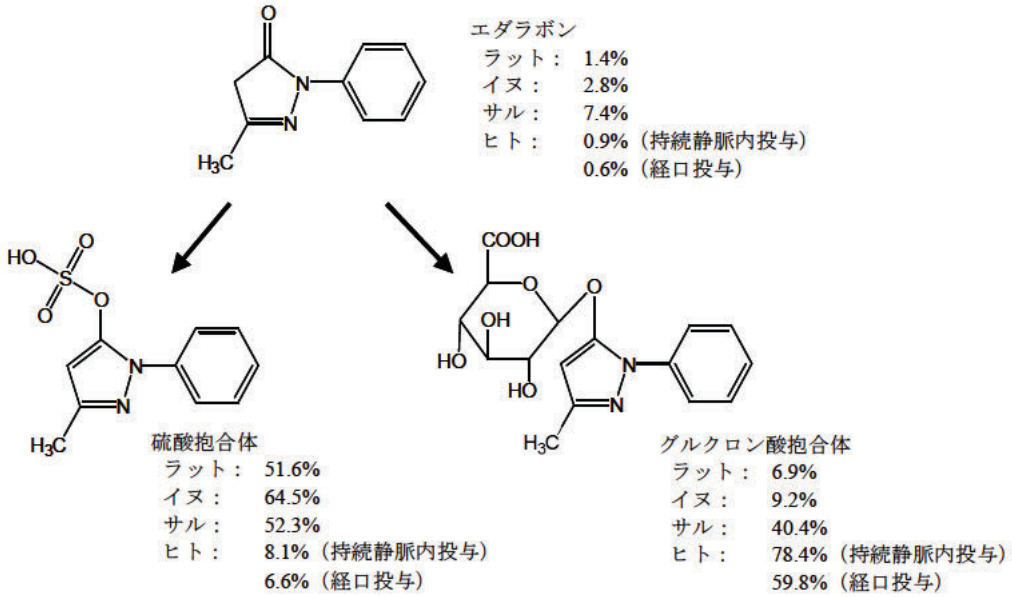


図 2.4.3－1　エダラボンの推定代謝経路及びラット，イヌ，サル及びヒトでの尿中排泄率

注：ラット（へ－10［初回申請資料］），イヌ（へ－4［初回申請資料］）及びサル（4.2.2.4－3［試験番号 B020876］）：[^{14}C]エダラボン 2 mg/kg 静脈内投与．
ヒト：エダラボン 60 mg/60 分 持続静脈内投与又は 105 mg 経口投与（5.3.3.1－2［試験番号 MT-1186-J03］参照）．
雄ラット，雄イヌ，雄サルに投与後 0-24 時間及びヒトに投与後 0-48 時間の尿中への未変化体及び代謝物の排泄率を示す．

エダラボン及びその抱合体を基質として，*in vitro* での肝臓及び腎臓での抱合及び脱抱合酵素活性を測定し，ヒトを含む代謝種差の検討を行った．結果の詳細は 2.7.2.2.1.2 及び 2.7.2.2.1.3 に示す．また，2.6.4.1.4 には，概説のみを示す．

2.4.3.5　排泄

新たに取得したサルの試験結果を，ラット及びイヌの既報結果とともに示す．ラット，イヌ及びサルに[^{14}C]エダラボンを単回静脈内投与したとき，それぞれ，投与後 192，120 及び 168 時間までに，投与放射能のほぼ全量が尿及び糞中に排泄され，投与量の 84～92%の放射能が尿中に排泄された．動物種を問わず，未変化体並びに代謝物である硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体は主に尿中に排泄されることが示された．

2.4.3.6　薬物間相互作用

in vitro DDI 評価の概要，及び新規投与経路である経口投与での影響を考察するために新たに実施した試験について，詳細は 2.7.2.2.1 に示す．また，2.6.4.1.6 には，概説のみを示す．

2.4.4　毒性試験

主要な毒性試験（単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験及びその他の毒性試験）は，GLP を遵守して実施した．研究報告で試験結果の概要を報告している試験も含め，新規提出する試験結果について，以下の項に記載する．

2.4.4.1　反復投与毒性試験

本剤の臨床使用をサポートするため，エダラボンの反復経口投与による毒性評価を，ラット及びイヌを用いて実施した．これらの試験概要を表 2.4.4－1 に示す．加えて，初回承認（AIS）後に実施し，研究報告にて報告した，24 時間持続静注による 28 日間反復投与毒性試験についても表 2.4.4－1 に示す．

表 2.4.4－1　エダラボンの主要な反復投与毒性試験の一覧

試験の種類	動物種	投与経路	用量（mg/kg/日）	NOAEL（mg/kg/日）	試験番号
経口					
2 週間	ラット	経口	30，100，300，1000	300	[redacted]0427
26 週間	ラット	経口	25，75，250	75	[redacted]0034
2 週間	イヌ	経口	10，30，100，300	30（雌），100（雄）	[redacted]0428
39 週間	イヌ	経口	10，30，100，300	30	[redacted]1033
24 時間持続静注					
28 日間	ラット	24 時間持続静注	50，100，300，1000	100	[redacted]39
28 日間	イヌ	24 時間持続静注	30，60，120，200	30	[redacted]62
28 日間	サル	24 時間持続静注	20，100，1000	100	[redacted]95

ラット及びイヌにおける反復経口投与

ラットで最長 26 週間，イヌで最長 39 週間の反復経口投与試験における無毒性量（NOAEL）は，ラットで 75 mg/kg/日，イヌで 30 mg/kg/日であった．経口投与毒性試験で認められた所見は，静脈内投与毒性試験で認められたものと類似していた．イヌの 39 週間経口投与試験の 100 mg/kg/日以上の用量においてのみ，イヌ及びサルの反復 24 時間持続静注試験と類似した神経毒性が認められた．

ラット，イヌ及びサルにおける反復 24 時間持続静注

28 日間の 24 時間持続静注試験において，神経毒性が，イヌでは 60 mg/kg/日，サルでは 1000 mg/kg/日の用量で認められた．神経毒性として末梢神経及び脊髄の神経線維変性がみられ，それに関連して四肢動作の限定などの一般状態変化が認められた．ラットの最高用量である 1000 mg/kg/日において，これらの神経毒性所見は認められなかった．120 mg/kg/日以上の投与群のイヌは，状態悪化及び四肢動作の限定のため安楽致死させた．ラット及びサルでは，最高用量の 1000 mg/kg/日まで死亡は認められなかった．NOAEL はイヌでは 30 mg/kg/日，ラット及びサルでは 100 mg/kg/日であった．

2.4.4.2　がん原性試験

初回申請（AIS）及び一部変更申請（ALS）時には，エダラボンのがん原性に関する情報として，NCI が実施したエダラボンの混餌投与によるがん原性試験結果[1)]を報告したが，本薬注射剤に関する FDA の Postmarketing Requirements の一環として，CB6F1-Tg rasH2 マウスを用いたエダラボンの 26 週間反復経口投与がん原性試験及びラットを用いた 104 週間反復経口投与がん原性試験を実施した．CB6F1-Tg rasH2 マウスにおいて，エダラボンは最高用量の 350 mg/kg/日までの用量でがん原性を示さなかった．ラットにおいて，エダラボンは最高用量の 200 mg/kg/日（雄），250 mg/kg/日（雌）までの用量でがん原性を示さなかった．

2.4.4.3　その他の毒性試験

2.4.4.3.1　毒性機序に関する試験：神経毒性の検討

20[redacted] 年から 20[redacted] 年に提出した研究報告のとおり，エダラボンを 24 時間持続静注した試験において，イヌでは 60 mg/kg/日以上，サルでは 1000 mg/kg/日の用量で神経毒性が認められた．イヌに経口投与したところ，100 mg/kg/日以上の用量で神経毒性が認められた．ラットに 1000 mg/kg/日以下の用量で 24 時間持続静注及び 250 mg/kg/日以下の用量で経口投与したところ，評価した最高用量においても神経毒性の徴候は認められなかった．神経毒性の詳細な検討をするため，イヌを用いて一連の 24 時間持続静注試験を実施した．以下に概略を示す．

神経組織の病理組織学的検査

イヌの 24 時間持続静注試験において，60 mg/kg/日以上の群で四肢動作の限定が認められた．神経組織の病理組織学的変化は，肋間，橈骨／坐骨，横隔及び脛骨神経並びに腰部脊髄において他の神経組織より重度であった．病変は神経線維のみに限定され，神経細胞体に影響は認められなかった．坐骨神経及び腰部脊髄背索の電子顕微鏡検査で，軸索原形質の構造成分の変性が認められたことから，軸索障害が示唆された．以上の結果に基づき，エダラボンにより誘発される神経病変は軸索変性の結果として発現する神経線維変性であり，坐骨，橈骨及び脛骨神経といった末梢神経並びに腰部脊髄における病変が，四肢動作の限定及び歩行異常といった神経症状に関連すると考えられた．

神経毒性の回復性

イヌの 24 時間持続静注試験の 120 mg/kg/日の用量では，14 日間の投与期間中に投与関連の一般状態の異常は認められなかった．投与期間中の膝蓋腱反射はおおむね正常であったが，休薬開始後 1 週目に 6 例中 1 例に反射の低下，4 例に反射の消失が認められた．休薬 6 週以降，徐々に反射の低下又は反射の消失が認められた個体の数が減少し，休薬 12 週には全例が正常な反射を示すようになった．したがって，エダラボン投与による神経機能的な影響は休薬の初期には悪化する個体もみられたが，その後回復していくことが示唆された．神経組織の病理組織学的検査の結果，14 日間投与後には 6 例中 1 又は 2 例に脊髄（腰部脊髄背索）及び末梢神

経（肋間，坐骨，橈骨及び脛骨神経）の神経線維変性が認められた．13 週間の休薬期間終了後には，6 例中 3 例で腰部脊髄背索に神経線維変性が認められ，回復性はみられなかった．一方，6 例中 5 例の末梢神経では神経線維変性が認められず，神経線維変性の修復に関連する貪食細胞がびまん性に認められた．これらの末梢神経組織の所見から，軽度な初期変化であれば休薬による回復が見込まれた．

神経病変の発現時期と曝露量との関係

イヌを用いて 60，120 及び 300 mg/kg/日の用量で 24 時間持続静注による 5，10 及び 14 日間投与を行った試験において，120 及び 300 mg/kg/日の用量の 14 日間投与群でのみ神経症状が認められた．神経症状の最短発現日は 300 mg/kg/日での投与 12 日目であった．300 mg/kg/日群では投与 11 及び 15 日目，120 mg/kg/日群では投与 15 日目で，病理組織学検査で末梢神経線維変性が認められた．脊髄の神経線維変性は，300 mg/kg/日群の投与 15 日目のみに認められた．60 mg/kg/日群では神経症状及び神経病変は認められなかった．これらの所見により，神経線維変性はまず末梢神経に発現し，その病変が脊髄に拡大した結果，四肢動作の限定に代表される神経症状が発現することが示唆された．これらの試験条件下では，神経毒性に関する NOAEL は，5 日間投与では 300 mg/kg/日，10 日間投与では 120 mg/kg/日，14 日間投与では 60 mg/kg/日であった．

5 日間投与及び 4 週間休薬試験

24 時間持続静注試験の最高用量である 300 mg/kg/日までの用量で，5 日間の投与期間中，一般状態及び神経機能検査で異常を示す動物は認められなかったが，4 週間の休薬期間後に，末梢神経の神経線維変性及び貪食細胞の出現が，180 mg/kg/日群の雌 3 例中 1 例及び 300 mg/kg/日群の雌雄全例に認められた．更に 300 mg/kg/日群の雄 3 例中 1 例には腰部脊髄背索の神経線維変性も認められた．60 及び 120 mg/kg/日の用量では異常は認められなかった．

2.4.4.3.2　不純物の毒性試験

4 種類の不純物の毒性について検討した．

Impurity D

分解物である不純物 D（　　Impurity D　　，Impurity D）の毒性試験は実施しなかった．ヒトにおける Impurity D 曝露量の妥当性を 5.3.5.3 に示す．

不純物 A

[redacted]不純物 A（Impurity A）の毒性を，マウスを用いた急性毒性試験において，267，400 及び 600 mg/kg の用量で単回静脈内投与により評価した．その結果，雌雄のマウスにおける不純物 A の概略の致死量は 600 mg/kg であった．400 mg/kg では死亡は認められなかった．600 mg/kg の用量では，エダラボン静脈内投与時の 50%致死量（雄で 588 mg/kg，雌で 602 mg/kg）との明らかな違いは認められなかった．ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験では，不純物 A を 0.1 及び 1.0 mg/kg/日の用量で 14 日間反復静脈内投与した

ところ，1.0 mg/kg/日群において不純物 A の投与に起因する変化は認められなかった．13 週間反復投与毒性試験では，ラットにエダラボン（25，75 及び 250 mg/kg/日）又はエダラボン／不純物 A （25/1.25，75/3.75 及び 250/12.5 mg/kg/日）を強制経口投与した．不純物 A を添加したエダラボンの毒性プロファイルはエダラボン単独での毒性プロファイルと極めて類似していたことから，不純物 A は 12.5 mg/kg/日（エダラボンの 5%）までの用量でエダラボンによる毒性学的変化に影響を及ぼさないことが示された．不純物 A は，細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスを用いる *in vivo* 小核試験において遺伝毒性を示さなかった．*In vitro* 染色体異常試験において，不純物 A は染色体構造異常を有する細胞を増加させたが，現行の ICH S2(R1)ガイドライン（医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス）の推奨最高濃度（1 mmol/L）を超える濃度においてのみであった．したがって，不純物 A がヒトで遺伝毒性を示す懸念はないと結論づけられた．

不純物 B

[redacted]分解物である不純物 B（Impurity B） の毒性を検討するため，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した．不純物 B により，遺伝子突然変異は誘発されなかった．したがって，不純物 B について安全性上の懸念はないと結論づけられた．

不純物 C

[redacted]分解物である不純物 C の毒性を検討するため，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した. 不純物 C により, 遺伝子突然変異は誘発されなかった. したがって，不純物 C について安全性上の懸念はないと結論づけられた．

2.4.4.3.3　新規添加物の毒性試験

新規添加剤シメチコンエマルションの試験は実施しなかったが，公知情報を基に作成した 4.3－2 MT-1186 内用懸濁液 2.1%におけるシメチコンエマルションの安全性に関する報告に，シメチコンエマルションの安全性について示した．公知情報から，シメチコンエマルションの安全性は担保されていると判断した．

2.4.5　総括及び結論

以下のとおり，非臨床におけるエダラボンの投与経路の相違及び種差に関して検討した結果，エダラボンの臨床における経口投与に関する重要な問題はないことが示唆された．本剤は添付文書（案）に従って想定臨床用量で ALS 患者に使用することができ，重篤な副作用を起こす可能性は低いと結論づけられた．

2.4.5.1　薬理試験

ALS 病態の発症及び進行を引き起こす原因がいくつか報告されている．その一つは，•OH 及びペルオキシナイトライト（$ONOO^-$）といったフリーラジカルや活性酸素種により誘導される酸化ストレスである．高度に酸化された物質は，たん白質，脂質及び核酸の酸化的修飾を主に誘導し，フリーラジカルの濃度が上昇すると，酸化されやすいアミノ酸残基を含むたん白質が，

カルボニル化並びにシステイン及びチロシン残基の酸化といった種々の酸化的修飾を受ける．例えば，$ONOO^-$がチロシン残基のフェノール環に結合すると，チロシン残基のニトロ化により3-ニトロチロシン（3-NT）が生成する．ALS 患者及び ALS の動物モデルの脳，脳脊髄液（CSF）及び末梢血において，チロシン残基のニトロ化により生成した 3-NT が認められており，たん白質に対する酸化ストレスのマーカーとして使用されている[2)]．

エダラボンは•OH を消去して脂質過酸化を抑制するとともに，培養血管内皮細胞及び神経細胞における酸化ストレス誘発細胞傷害を抑制することが *in vitro* で示されている．$ONOO^-$とエダラボンとの反応性は，内因性の抗酸化物質である尿酸との反応性より約 30 倍高いことが報告されており[3)]，既承認薬の臨床試験 MCI-186-12 試験においては，エダラボン投与により ALS 患者の CSF 中 3-NT 濃度が速やかかつ持続的に低下した．非臨床では，SOD1 マウスにおいて，エダラボンの投与期間中，運動ニューロンが保存され，3-NT／チロシン比の減少が認められている[4)]．また，エダラボンは，雌の変異型 SOD（H46R）トランスジェニックラットにおいて，運動機能の全体的な評価指標である傾斜板の耐久角度の減少に対して有意な抑制作用を示した（2.6.2.2.3）．これらの結果より，エダラボンは，ALS の病態で増加するフリーラジカルを消去することにより，運動ニューロンを酸化ストレスから保護し，疾患の進行も遅延させると考えられた．

更に，早期 ALS の患者及び動物モデルで血液脳関門及び血液脊髄関門（BBB/BSCB）の破綻が認められており，これらの破綻が早期運動ニューロン変性及び疾患進行に寄与することが示唆されている[5), 6), 7), 8)]．BBB/BSCB の破綻の主な原因の一部として，内皮細胞傷害並びに周皮細胞及びアストロサイトのエンドフィートの変性が挙げられる．BBB/BSCB の破綻により血液から有害物質が侵入し，運動ニューロン変性が促進される場合がある．また，活性化ミクログリア及び反応性アストロサイトから放出されたサイトカインは，運動ニューロンに影響を及ぼすだけでなく，血管内皮にも有害な影響を及ぼす[5), 6), 7)]．エダラボンは 15-HPETE 誘発血管内皮傷害を抑制し（2.6.2.2.2），*in vitro* における有効濃度の約 1 μmol/L，及び *in vivo* における薬効用量での血漿中濃度は，ヒトにエダラボン 105 mg を経口投与したときの非結合型エダラボンの血漿中濃度（C_{max}：0.139 μg/mL＝0.80 μmol/L）とほぼ同程度であった（2.7.2.2.2.3，MT-1186-J03 試験）．したがって，エダラボンは血管内皮を酸化ストレスから保護することにより，運動ニューロンの生存に寄与することが示された．

要約すると，エダラボンは，フリーラジカルを消去することで神経細胞及び血管内皮の酸化ストレスを軽減することにより，運動ニューロン死を抑制すると考えられる．エダラボンは，神経血管ユニットを構成する種々の細胞を酸化ストレスから保護することにより，筋力の低下に関連する筋萎縮を抑制し，四肢の運動機能の低下を遅らせ，ALS の進行を遅延させると考えられる．

健常人において，本剤投与後のエダラボン未変化体の血漿中濃度は，既承認薬と類似していることが報告されている（2.7.2.2.2.3, MT-1186-J03 試験）．また，エダラボンの薬理効果は，血液中及び血液中から速やかに移行した脳脊髄液を含む組織中のエダラボンが運動ニューロンや血管内皮細胞及びグリア細胞に対する酸化ストレスを軽減させることで示されると考えら

れる．エダラボン未変化体の血漿中濃度が既承認薬と同等であれば，同等の有効性を示すと考えられることから，一部変更承認（ALS）以降，新規の効力を裏付ける薬理試験は実施しなかった．

副次的薬理試験結果から，エダラボン並びに 2 種の代謝物（硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体）の 79 の各種受容体，チャネル及びトランスポーターへの結合性は認められなかった．

安全性薬理試験結果に関しては，臨床使用時に中枢神経系，心血管系，呼吸器系及び腎／泌尿器系に有害な影響を及ぼす可能性は低いと判断された．

また，薬力学的薬物相互作用試験結果より，エダラボンの脂質過酸化抑制及びラジカル消去作用について，ALS 患者においても使用が想定される 2 種の薬剤であるヘパリン及びアスピリン併用の顕著な影響は認められなかった．

2.4.5.2　薬物動態試験

イヌにエダラボン（水溶液）を経口投与したとき，速やかに吸収され（最高血漿中濃度到達時間：0.25 時間），主要代謝物との合算 AUC から算出した消化管吸収率は 93%であった．エダラボンを水溶液として投与したときの BA は 25.2%であった. エダラボンをカプセル（粉末）として経口投与したときの BA（21.6%）は溶液投与したときと同等であり，カプセルとして投与したエダラボンが消化管内で十分可溶化することが示された．反復経口投与 TK 試験（ラット 25～250 mg/kg，イヌ 10～300 mg/kg）を実施した結果，エダラボンの血漿中曝露量は用量比を上回る増加を示した．反復投与による明らかな蓄積はなく，血漿中曝露量に性差は認められなかった．

ラット及びイヌに経口及び静脈内投与したときの定性的な血漿中代謝物プロファイルを比較した結果, いずれの動物種及び投与経路においても主要代謝物は硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体であり，大きな相違は無いと考察した．

エダラボン及びその代謝物は主に尿中に排泄されることが示唆された. エダラボン未変化体の尿中総排泄率はわずかで，投与量の 10%未満であった．ラット及びイヌでは，硫酸抱合体が尿中の主要代謝物であった．サルでは，硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体の尿中排泄率は同程度であった．ヒトでは，尿中の主要代謝物はグルクロン酸抱合体であった．

以上の結果から，非臨床においてエダラボンの投与経路の相違や種差に関して検討した結果, エダラボンの臨床における経口投与に影響を及ぼす非臨床における重要な問題はないことが示唆された．

2.4.5.3　毒性試験

研究報告で試験結果の概要を報告している試験も含め, 新規提出する試験について試験項目ごとに考察した後に，総合的な結論を述べる．

2.4.5.3.1　反復投与毒性試験

ラットで最長 26 週間，イヌで最長 39 週間の反復経口投与毒性試験における NOAEL は，ラットで 75 mg/kg/日，イヌで 30 mg/kg/日であった．経口投与後の毒性所見は静脈内投与試験で

みられたものと類似していた．静脈内投与で認められなかった毒性変化については，いずれも十分な安全域があった．2.6.6，表 2.6.6.9－2 に示したとおり，ラット及びイヌのエダラボンの血漿中曝露に対する安全域は，C_{max} 及び投与開始から 24 時間後までの血漿中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）のいずれにおいても 10 倍以上であった．また，主要代謝物である硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体の血漿中曝露に対する安全域も 10 倍以上であった．

最長 28 日間の 24 時間持続静注毒性試験において，神経毒性がイヌでは 60 mg/kg/日，サルでは 1000 mg/kg/日の用量で認められた．神経毒性として，末梢神経及び脊髄の神経線維変性並びに関連する四肢動作の限定といった一般状態変化が認められた．ラットを用いた 24 時間持続静注試験での最高用量では，これらの所見は認められなかった．

2.4.5.3.2　がん原性試験

本薬注射剤に関する FDA の Postmarketing Requirements の一環として，CB6F1-Tg rasH2 マウスを用いたエダラボンの 26 週間反復経口投与がん原性試験及びラットを用いた 104 週間反復経口投与がん原性試験を実施した．CB6F1-Tg rasH2 マウスにおいて，エダラボンは最高用量の 350 mg/kg/日までの用量でがん原性を示さなかった．ラットにおいて，エダラボンは最高用量の 200 mg/kg/日（雄），250 mg/kg/日（雌）までの用量でがん原性を示さなかった．

2.4.5.3.3　神経毒性試験

エダラボンを 24 時間持続静注した試験において，イヌでは 60 mg/kg/日以上，サルでは 1000 mg/kg/日の用量で，神経毒性が認められた．経口投与による神経毒性がイヌにおいて 100 mg/kg/日以上の用量で認められた．ラットでは，評価した最高用量である 1000 mg/kg/日以下の用量での 24 時間持続静注及び 250 mg/kg/日以下の用量での経口投与により，神経毒性の徴候は認められなかった．また，イヌを用いて，24 時間持続静注により神経毒性を検討する一連の試験を実施した．エダラボン投与の結果として生じた神経毒性は，(1) 四肢動作の限定，歩行異常を含む一般状態変化並びに末梢神経及び脊髄の神経線維変性で構成され（神経細胞体の病変は認められず，主な変化は軸索変性で，中枢神経系障害はほぼ感覚神経に限定された），（2）イヌ及びサルで発現したがラットでは発現せず，（3）変化がエダラボン投与初期段階の末梢神経の軽度の変化である場合には，休薬により回復が見込まれる．経口投与毒性試験で得られた曝露量に基づくと，ヒト曝露量に対する神経毒性の安全域は，$AUC_{0\text{-}24h}$ については 13～14 倍，C_{max} 値については 10～15 倍であった（2.6.6，表 2.6.6.9－1）．持続静注による神経毒性の安全域は，イヌ（$AUC_{0\text{-}24h}$ については 12～13 倍，C_{ss} については 0.46 倍）とサル（$AUC_{0\text{-}24h}$ については 26～28 倍，C_{ss} については 1.5～1.6 倍）で同程度であった（2.6.6，表 2.6.6.9－1）．神経毒性が認められたのは毒性試験においてエダラボンを高用量で持続曝露した後のみであり，ヒトへの経口投与後の曝露量と比較すると，良好な安全域が得られた（2.6.6，表 2.6.6.9－1）．更に，20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日までに，AIS 及び ALS 患者において，エダラボン投与による神経毒性を示唆する症例は認められていない．したがって，添付文書（案）に従って使用した場合に神経毒性が誘発される可能性は低いと考える．

2.4.5.3.4　まとめ

反復経口投与毒性試験における所見は，静脈内投与毒性試験でみられたものと類似していた．毒性試験で認められた主な所見は回復性があり，臨床モニタリングが可能である．初回申請（AIS）時に示したとおり，エダラボンには遺伝毒性及び催奇形性は認められておらず，また本申請で報告するとおり発がん性もない．

以上の結果から，本剤は添付文書（案）に従って想定臨床用量で ALS 患者に使用することができ，重篤な副作用を起こす可能性は低いと結論づけられた．

2.4.6　参考文献一覧

1) National Toxicology Program. Bioassay of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone for possible carcinogenicity. Natl Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser. 1978;141:1-100.（資料番号：4.3－01）
2) D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Free Radic Biol Med. 2013;65:509-27.（資料番号：4.3－05）
3) Fujisawa A, Yamamoto Y. Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. Redox Rep. 2016;21:98-103.（資料番号：4.3－30）
4) Ito H, Wate R, Zhang J, Ohnishi S, Kaneko S, Ito H, Nakano S, et al. Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. Exp Neurol. 2008;213:448-55.（資料番号：4.3－15）
5) Garbuzova-Davis S, Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Louis MK, Willing AE, Borlongan CV, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurovascular disease. Brain Res. 2011;1398:113-25.（資料番号：4.3－07）
6) Garbuzova-Davis S, Hernandez-Ontiveros DG, Rodrigues MCO, Haller E, Frisina-Deyo A, Mirtyl S, et al. Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients. Brain Res. 2012;1469:114-28.（資料番号：4.3－25）
7) Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, et al. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 2011;89:718-28.（資料番号：4.3－31）
8) Winkler EA, Sengillo JD, Sagare AP, Zhao Z, Ma Q, Zuniga E, et al. Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. Proc Natl Acad Sci. 2014;111:E1035-42.（資料番号：4.3－26）