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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧.....3
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表.....4
2.6.1　緒言.....4
2.6.1.1　エダラボンの構造及び薬理学的特性.....4
2.6.1.2　申請する効能又は効果，用法及び用量（案）.....4

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
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

本申請は，MT-1186 内用懸濁液（以下，本剤）の筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する製造販売に関するものである．既承認製剤（販売名：ラジカット注 30mg・ラジカット点滴静注バッグ 30mg，一般名：エダラボン）は，2001 年 4 月に脳梗塞急性期（AIS）に伴う神経症候，日常生活動作障害，機能障害の改善を，2015 年 6 月に ALS における機能障害の進行抑制を効能・効果として，承認を取得している．

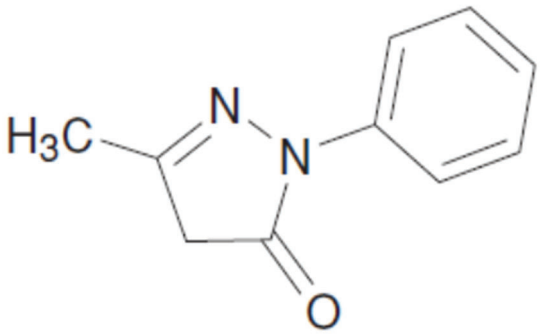
田辺三菱製薬株式会社（以下，申請者）は，ALS 患者，医師及び介護者にとって利便性が良いと考えられるエダラボンの内用懸濁液を開発した．初回申請/承認（AIS）及び一部変更申請/承認（ALS）時にエダラボンの AIS 及び ALS に対する薬理学的特性や静脈内投与の薬物動態及び毒性試験に関する結果については報告済みである．今回は，初回申請/承認（AIS）及び一部変更申請/承認（ALS）時以降，主に本剤の臨床使用をサポートする薬物動態及び毒性試験について報告する．

2.6.1.1　エダラボンの構造及び薬理学的特性

エダラボンは，申請者が開発した神経保護剤（フリーラジカル消去薬）である．

エダラボンは，フリーラジカル消去作用，脂質過酸化抑制作用，細胞傷害保護作用を有し，脳虚血モデルでラジカル消去作用や脳虚血保護作用が認められている．更に ALS 様の症状を示すモデルである変異型スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）トランスジェニックラット，wobbler マウス，変異型 SOD1 トランスジェニックマウスに対する薬理学的，神経病理学的な検討の結果，病態進展抑制の有効性が示唆されている．

なお，構造式は以下のとおりである．



2.6.1.2　申請する効能又は効果，用法及び用量（案）

本剤は販売名：ラジカット内用懸濁液 2.1%として，効能又は効果，用法及び用量（案）を以下のとおりとする．

効能又は効果

筋萎縮性側索硬化症（ALS）における機能障害の進行抑制

用法及び用量

通常，成人に 1 回 5 mL（エダラボンとして 105 mg）を起床時に 1 日 1 回経口投与する．投与後 1 時間は水以外の飲食は避ける．

通常，本剤投与期と休薬期を組み合わせた 28 日間を 1 クールとし，これを繰り返す．第 1 クールは 14 日間連日投与する投与期の後 14 日間休薬し，第 2 クール以降は 14 日間のうち 10 日間投与する投与期の後 14 日間休薬する．

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.2　薬理試験の概要文 4
2.6.2.1　まとめ 4
2.6.2.1.1　筋萎縮性側索硬化症（ALS）とフリーラジカル説 4
2.6.2.1.2　エダラボンのラジカル消去作用及び細胞傷害保護作用 4
2.6.2.1.3　エダラボンによる ALS 病態進展抑制 5
2.6.2.1.4　報告内容 5
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1　ラジカル消去及び脂質過酸化抑制作用（*in vitro* 試験） 6
2.6.2.2.2　細胞傷害保護作用（*in vitro* 試験） 9
2.6.2.2.3　変異型 SOD トランスジェニックラットに対するエダラボンの効果（*in vivo* 試験） 11
2.6.2.3　副次的薬理試験 14
2.6.2.3.1　受容体，チャネル，トランスポーターに対する結合性（*in vitro* 試験） 14
2.6.2.4　安全性薬理試験 15
2.6.2.4.1　hERG 電流測定試験 16
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 16
2.6.2.5.1　ヘパリン及びアスピリン併用時の脂質過酸化抑制及びラジカル消去作用 16
2.6.2.6　考察及び結論 17
2.6.2.7　図表 19
2.6.2.8　参考文献 19

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
C_{max}	maximum (plasma) concentration after administration	最高（血漿中）濃度
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル
ESR	electronic paramagnetic resonance	電子スピン共鳴装置
FALS	familial amyotrophic lateral sclerosis	家族性筋萎縮性側索硬化症
Fe^{2+}	ferrous iron	二価鉄イオン
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
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
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal	4-ヒドロキシノネナール
H_2O_2	hydrogen peroxide	過酸化水素
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}, IC_{25}	concentration associated with 50% or 25% inhibition	50%又は 25%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
LOO・	polyunsaturated fatty acid peroxyl radical	高度不飽和脂肪酸ペルオキシルラジカル
Nrf2	nuclear erythroid 2-related factor 2	核赤血球 2 関連因子 2
3-NT	3-nitrotyrosine	3-ニトロチロシン
O_2^-	superoxide	スーパーオキシド
・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
OPC	oligodendrocyte precursor cell	オリゴデンドロサイト前駆細胞
QTc	corrected QT	補正 QT
SALS	sporadic amyotrophic lateral sclerosis	孤発性筋萎縮性側索硬化症
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
TDP-43	transactive response DNA-binding protein 43 kDa	トランスアクティブ反応 DNA 結合たん白 43 kDa

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

2.6.2.1.1　筋萎縮性側索硬化症（ALS）とフリーラジカル説

ALS は，運動ニューロンが選択的に変性・脱落し，呼吸筋を含む全身の筋萎縮が進行性に起こる神経変性疾患である. 病態の発症や進展に大きく影響を及ぼす運動ニューロンの変性メカニズムについては，フリーラジカルを含む酸化ストレスをはじめ，栄養因子の欠乏，ミトコンドリア傷害によるアポトーシス，グルタミン酸過剰放出やチャネル・トランスポーター異常による興奮毒性, 異常たん白の凝集による小胞体ストレスや軸索輸送障害などが報告されている[1),2),3),4)]．また，近年になり，ニューロンだけでなく，ニューロン周囲をとりまくアストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞と血管を含む，いわゆる“Neurovascular unit”の ALS 病態への関与についても示されている[4),5),6),7)]．

一方，疾患関連遺伝子も多数報告されており，酸化ストレスに関係するスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）1 や RNA 代謝に関係する transactive response DNA-binding protein 43 kDa（TDP-43），fused in sarcoma の遺伝子変異と病態の関連が示唆されている[1),4),6)]．なかでも，chromosome 9 open reading frame 72 の遺伝子異常の家系が 2011 年に報告され，今日までに確認された ALS の原因遺伝子として欧米では最も頻度が高いことから注目された[6)]．この遺伝子変異は, 核小体ストレスを生じてニューロン変性の引き金になっていることが報告されている[8)]．このように，新たな知見が数々と報告されているにも関わらず，なお根本的な原因解明には至っていない.

かかる状況下，1993 年に家族性 ALS（FALS）で，第 21 染色体に位置する銅／亜鉛に結合する SOD1 の遺伝子変異が解明されたことは，印象的な発見となった[9)]．この変異は FALS の約 20%で見られるが，酵素活性は低下しておらず，この変異型 SOD1 を発現させたトランスジェニックマウスでは，酵素活性の低下なしに運動ニューロンが変性することから，変異たん白が何らかの毒性を獲得することが疾患の本態と考えられている（gain of toxic function 仮説）[1),2),4)]．この仮説の要因の一つに，ヒドロキシルラジカル（・OH）の産生促進やペルオキシナイトライト（$ONOO^-$）を介したチロシン残基のニトロ化促進が報告されており[2),3),4)]，FALS や孤発性 ALS（SALS）の脊椎（腰椎灰白質）や脳脊髄液中にて，3-ニトロチロシン（3-NT）の上昇が確認されている[2),3),10)]．更に，SALS の脳脊髄液や尿，血漿，血清において，8-オキソデオキシグアノシンや 4-ヒドロキシノネナール（4-HNE）が上昇していることが報告されている[3)]．これらの発生は，フリーラジカルによる DNA やたん白質，脂質の過酸化反応によるものと考えられ，FALS のみならず SALS の原因にフリーラジカルが関与している可能性が示唆されている[2),3)]．

2.6.2.1.2　エダラボンのラジカル消去作用及び細胞傷害保護作用

フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンは，・OH の消去作用を有し，脂質過酸化を抑制し, 血管内皮や神経細胞の培養細胞を用いた検討による酸化ストレス誘発細胞傷害を抑

制した．また，脳虚血ラットへのエダラボン静脈内投与により，脳浮腫抑制作用，組織傷害保護作用，神経症候改善作用，遅発性神経細胞死抑制作用などが認められ，虚血周辺部位，虚血再開通部位で見られる細胞傷害と･OH の増加は，脳虚血保護作用を示した用量では抑制された. これらの結果より, エダラボンは, 虚血によって発生したラジカルを消去することにより，神経細胞を保護する効果を有していることが示された.

2.6.2.1.3　エダラボンによる ALS 病態進展抑制

フリーラジカルによる酸化ストレスが，ALS 病態の発症や進行に関与していると考えられていることから [2), 3)]，エダラボンが ALS 病勢進展を阻止するのに有効であると期待される.

病態の進行が緩徐で，静脈内反復投与が可能な変異型 SOD（H46R）トランスジェニックラット [11)]を雌雄とも用い，エダラボンの効果を薬理学的，神経病理学的に検討した．エダラボンは，静注剤の臨床での用法用量を参考に，3 mg/kg/h を 1 時間かけて静脈内投与し，2 日間連続の投与と休薬を繰り返す用法で, 18 週齢から正向反射消失時まで投与した. 主要評価項目は, 生存期間と動物が 5 秒以上滑り落ちない傾斜板の角度とし, 副次評価項目は, 罹病期間, 体重, 後肢反射テスト，着地開脚幅，ロータロッドの歩行時間，脊髄運動神経細胞数として，溶媒投与群の動物の半数死亡日に最も近く，かつ半数死亡日以前の測定時点に統計解析した．その結果，四肢の運動機能を総合的に評価する指標である溶媒投与群で見られる傾斜板角度の低下は，雌のエダラボン投与群で有意に抑制された．エダラボンは，生存期間を延長させる効果は見いだされなかったが，四肢の運動機能低下を抑制し，病態の進行を遅延させる作用を有することが示唆された.

2.6.2.1.4　報告内容

上述したエダラボンの効力を裏付ける試験はすべて初回申請/承認｛脳梗塞急性期（AIS）｝と一部変更申請/承認（ALS）で提出済みの内容である．一部変更申請/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，エダラボンの包括的安全性薬理試験について述べられている非臨床試験報告書は，初回申請/承認（AIS）時に提出済みである．これらの試験は，ICHS7A（2000）（安全性薬理試験ガイドライン）及び ICHS7B（2005）［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］が発行される前の 1985～1996 年に実施した．申請者は，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血漿中濃度（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，ラジカット静注剤（以下，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，MT-1186 内用懸濁液（以下，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.

下記は本剤の臨床使用をサポートするための初出の試験とその結果である. 副次的薬理試験として，エダラボン並びに 2 種の代謝物（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. 安全性薬理試験として, ヒト胎児由来腎臓 293（HEK293）細胞に安定的に発現させたヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）に対する作用を検討し，その結果，エダラボンは 100 μmol/L で hERG 電流を阻害しなかった．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，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.

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　ラジカル消去及び脂質過酸化抑制作用（*in vitro* 試験）

2.6.2.2.1.1　安定ラジカル DPPH（1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル）に対する作用

2.6.2.2.1.1.1　ESR（電子スピン共鳴装置）を用いた測定

［初回申請/承認（AIS）ホ－5］

方法

室温で安定なラジカル種である DPPH（200 μmol/L）に対するエダラボンの作用を ESR で検討した.

結果

エダラボン，*L*-アスコルビン酸（*L*-ascorbate）は，DPPH の ESR スペクトルを 200 μmol/L でほぼ完全に消去した（図 2.6.2.2－1）.

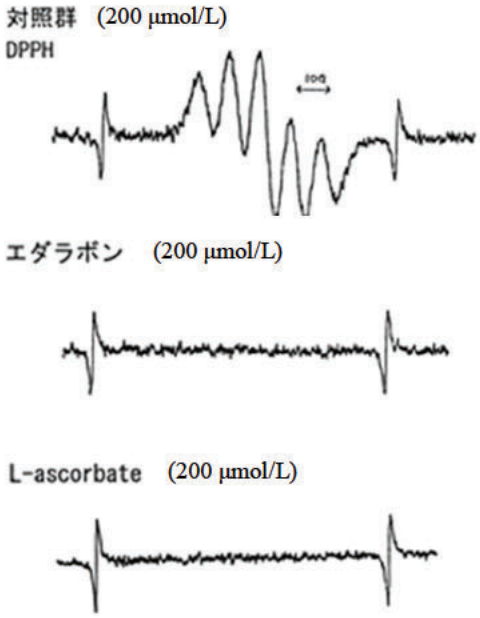


図 2.6.2.2－1　安定ラジカル DPPH に対する作用

2.6.2.2.1.1.2　吸光度法による測定

［初回申請/承認（AIS）ホ－1］

方法

DPPH（50 μmol/L）溶液にエダラボンを加え，DPPH に対する消去作用を，吸光度法で測定した．

結果

エダラボンは，濃度依存的に DPPH を消去した（IC_{50} 値＝29.3 μmol/L）．消去活性は，*L*-アスコルビン酸と同程度であった（IC_{50} 値＝24.0 μmol/L）．

2.6.2.2.1.2　·OH に対する消去作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－1］

方法

過酸化水素（H_2O_2）（0.003%）と二価鉄イオン（Fe^{2+}）（10 μmol/L）から·OH を発生させ，エダラボンの作用を検討した．

結果

エダラボンは，サリチル酸 100 μmol/L 共存下，サリチル酸と·OH との反応物である 2,3-ジヒドロキシ安息香酸の生成を濃度依存的に抑制し，その IC_{50} 値は 6.7 μmol/L であった（表 2.6.2.2－1）．

2.6.2.2.1.3　·OH によって誘発される不飽和脂肪酸の過酸化に対する抑制作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－1］

方法

H_2O_2（100 μmol/L）と Fe^{2+}（80 μmol/L）から·OH を発生させてリノール酸（100 μmol/L）の過酸化を開始し，エダラボンの作用を検討した．

結果

エダラボンは，濃度依存的に·OH によるリノール酸の過酸化を抑制し，その IC_{25} 値は 33.8 μmol/L であった（表 2.6.2.2－1）．

2.6.2.2.1.4　脳ホモジネートでの脂質過酸化に対する消去作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－1］

方法

ラット脳より調製したホモジネートを，37℃ で 30 分間インキュベーションすることで生じる脂質過酸化に対するエダラボンの作用を検討した．

結果

エダラボンは濃度依存的に脳ホモジネートの脂質過酸化を抑制し，その IC_{50} 値は 15.3 μmol/L であった（表 2.6.2.2－1）．

2.6.2.2.1.5　スーパーオキシド（O_2^-）に対する作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－1］

方法

キサンチンにキサンチンオキシダーゼを作用させることで O_2^-を発生させ，エダラボンの作用を検討した．

結果

エダラボンは，100 μmol/L で，O_2^-に対し作用を示さなかった（表 2.6.2.2－1）．

表 2.6.2.2－1　ラジカル及び脂質過酸化に対する作用

項目	用量〔μmol/L〕	n	〔μmol/L〕
·OH 消去	5, 10, 20	4	IC_{50} 値 = 6.7 (3.0- 15.3)
·OH によるリノール酸過酸化に対する抑制	10, 30, 100	4	IC_{25} 値 = 33.8 (26.0- 44.1)
脳ホモジネート脂質過酸化に対する抑制	3, 10, 30, 100	2	IC_{50} 値 = 15.3 (7.9- 29.9)
O_2^-消去	100	4	作用なし

IC_{25} 値，IC_{50} 値はそれぞれ直線回帰法により算出した
(　　)：95%信頼限界

2.6.2.2.1.6　高度不飽和脂肪酸ペルオキシルラジカル（LOO·）による脂質過酸化に対する作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－3］

方法

人工リン脂質膜リポソームに，水溶性，又は脂溶性のラジカル種を作用させることにより進行する，脂質過酸化の連鎖反応に対するエダラボンの作用を検討した．

結果

エダラボンは，水溶性，又は脂溶性のラジカル種を用いた脂質過酸化をいずれも抑制した．エダラボンが，*L*-アスコルビン酸（ビタミン C；VC），α-トコフェノール（ビタミン E；VE）様の作用を併せ持つことが認められ，その作用は VC，又は VE の共存下で増強された（図 2.6.2.2－2）．

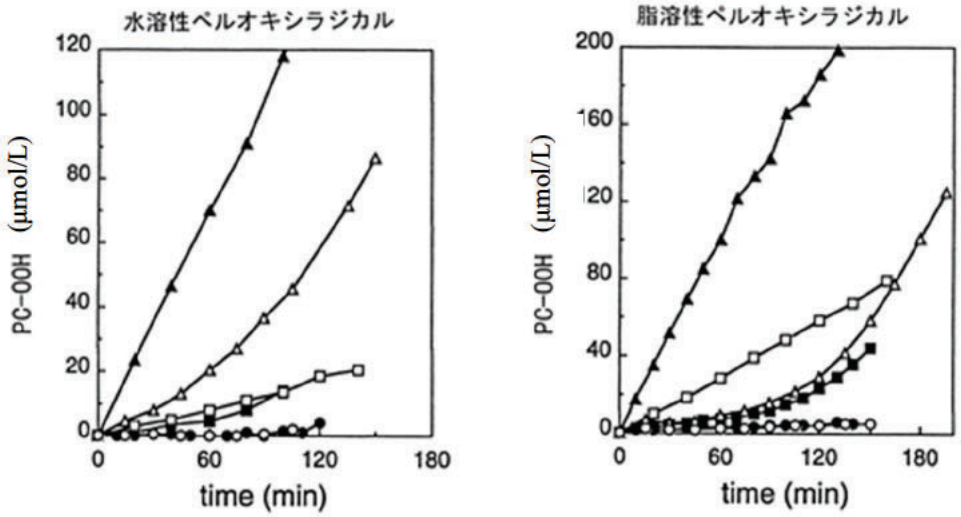


図 2.6.2.2－2　LOO·による脂質過酸化に対する作用

PC-OOH：フォスファチジルコリン過酸化物

▲　阻害薬なし　　□　VC（100 μmol/L）

■　エダラボン（50 μmol/L）　　○　エダラボン（50 μmol/L）＋VE（2 μmol/L）

△　VE（2 μmol/L）　　●　エダラボン（50 μmol/L）＋VC（100 μmol/L）

2.6.2.2.2　細胞傷害保護作用（*in vitro* 試験）

2.6.2.2.2.1　15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸（15-HPETE）による培養血管内皮細胞傷害に対する作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－2］

方法

ウシ大動脈由来の血管内皮細胞の培養液中に，アラキドン酸過酸化物である 15-HPETE を加えることで引き起こされる，細胞の酸化的傷害に対するエダラボンの保護作用を検討した．

結果

エダラボンは，濃度依存的に内皮細胞傷害を抑制し，最小有効濃度は 1 μmol/L であった（図 2.6.2.2－3）．

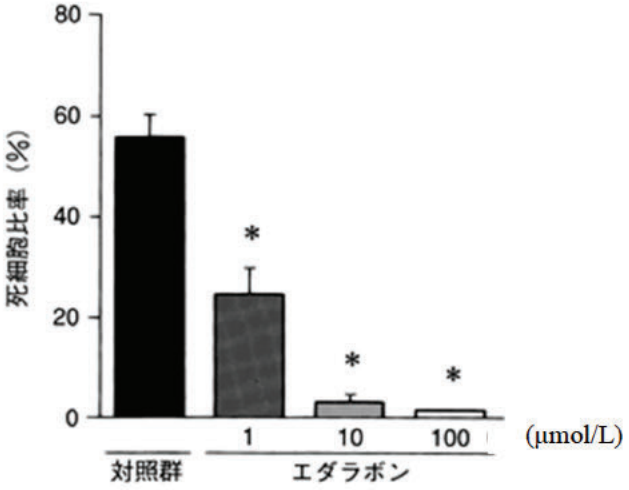


図 2.6.2.2－3　15-HPETE による培養血管内皮細胞傷害に対する作用

（平均値±標準誤差（n=3））

*：$p<0.05$（対照群に対する Dunn の多重比較検定）

2.6.2.2.2.2　グルタミン酸による初代培養神経細胞傷害に対する作用

［初回申請/承認（AIS）ホ－参－1］

方法

ラット胎児の大脳皮質神経細胞の培養液中に，グルタミン酸を加えることで引き起こされる，神経細胞傷害に対するエダラボンの保護作用を検討した．

結果

エダラボンは，50 μmol/L で神経細胞傷害を抑制した（図 2.6.2.2－4）．

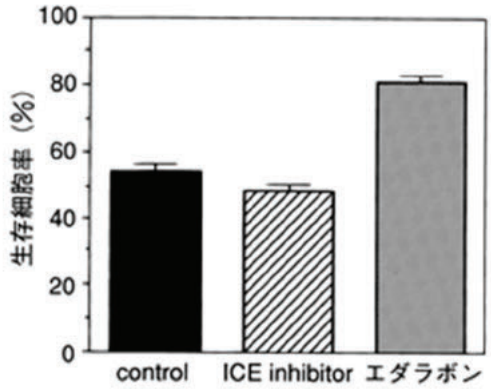


図 2.6.2.2－4　グルタミン酸による神経細胞傷害に対する作用

（平均値±標準誤差（n=3））

ICE：interleukin-1β-converting enzyme

2.6.2.2.3　変異型 SOD トランスジェニックラットに対するエダラボンの効果（*in vivo* 試験）

［一部変更申請/承認（ALS）4.2.1.1－1］

方法

変異型 SOD（H46R）トランスジェニックラットを雌雄とも用いた．エダラボンを 1 日あたり 3 mg/kg/h で 1 時間かけて静脈内投与し，2 日間投与し 2 日間休薬する用法で，18 週齢の時点から動物の正向反射が消失した日まで繰り返し投与した. 溶媒投与群には生理食塩水を投与した.

主要評価項目は，生存期間と傾斜板の角度とした．副次評価項目は，罹病期間，体重，後肢反射テスト，着地開脚幅，ロータロッド，脊髄運動神経細胞数とした．なお，傾斜板の角度，体重，後肢反射テスト，着地開脚幅，ロータロッドの有意差検定は，溶媒投与群の動物の半数死亡日に最も近く，かつ半数死亡日以前の測定時点で実施した.

結果

主要評価項目

生存期間

正向反射消失日を死亡日として，それまでに生存した日数を生存期間とした．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の生存期間（中央値）は，雄，雌それぞれ 205 日，215 日に対し 201 日，212 日であった．変異型 SOD トランスジェニックラットの生存期間について，エダラボン投与群と溶媒投与群の差は有意ではなかった（Log-rank 検定）.

傾斜板の角度

傾斜板装置に動物を上向きに置き，5 秒以上滑り落ちない傾斜板の角度の平均を求めた．評価時点は，雄は 199 日目，雌は 213 日目であった．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の評価時点における傾斜板角度（平均値±標準誤差）は，雄では 36.7±1.2 度に対して 38.0±1.4 度，雌で 36.5±1.2 度に対して 41.2±1.6 度であった．変異型 SOD トランスジェニックラットにおいて，溶媒投与群では傾斜板の角度が低下するが，雌のエダラボン投与群は溶媒投与群と比べてその低下を有意に抑制した（Wilcoxon 検定）．なお，参考データとして評価時点の前後 2 時点（雄：185 日，192 日，206 日並びに 213 日，雌：199 日，206 日，220 日並びに 227 日）で統計解析を実施した．その結果，雄ではすべての時点で有意差は認められなかったが，雌では評価時点の 213 日に加え，220 日と 227 日において有意差が認められた.

副次評価項目

罹病期間

後肢反射テストでスコアが 1 となった日を発症日とし，それから死亡日までの日数を罹病期間とした．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の罹病期間（中央値）は，雄，雌それぞれ 43 日，51 日に対し 37 日，55 日であった．変異型 SOD トランスジェニックラットの罹病期間について，エダラボン投与群と溶媒投与群の差は有意ではなかった（Log-rank 検定）.

体重

17 週齢以降，毎日体重を測定し，雄は 205 日目，雌は 215 日目で評価した．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の評価時点における体重（平均値±標準誤差）は，雄，雌それぞれ 351±21 g，195±11 g に対し，339±23 g，199±13 g であった．変異型 SOD トランスジェニックラットの体重について，エダラボン投与群と溶媒投与群の差は有意ではなかった（t 検定）．なお，参考データとして評価時点の前後 2 時点（雄 : 203 日，204 日，206 日並びに 207 日，雌 : 213 日，214 日，216 日並びに 217 日）で統計解析を実施した．その結果，雄雌ともすべての時点で有意差は認められなかった．

後肢反射テスト

動物の尾を持ち, 逆さにつり上げて四肢の伸展状態を, 以下のスコアに基づいて評価した.

スコア 0：四肢の伸展が正常で伸びきった状態を示す

スコア 1：四肢の 1 つが屈曲した状態を示す

スコア 2：四肢の 2 つが屈曲した状態を示す

スコア 3：四肢の 3 つが屈曲した状態を示す

スコア 4：四肢の全部が屈曲した状態を示す

後肢反射テストの評価時点は，雄は 204 日目，雌は 215 日目であった．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の評価時点におけるスコア（平均値±標準誤差）は，雄，雌それぞれ 3.2±0.2，3.4±0.2 に対し，3.1±0.3，3.2±0.3 であった．変異型 SOD トランスジェニックラットの後肢反射テストのスコアについて, エダラボン投与群と溶媒投与群の差は有意ではなかった（Wilcoxon 検定）．なお，参考データとして評価時点の前後 2 時点（雄 : 199 日，201 日，206 日並びに 208 日，雌 : 211 日，213 日，218 日並びに 220 日）で統計解析を実施した．その結果，雄雌ともすべての時点で有意差は認められなかった．

着地開脚幅

動物の体を着地地点に対して並行に保ち，約 30 cm の高さから落下させ，着地した際の後肢間の距離を測定した．雄は 204 日目，雌は 211 日目で評価した．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の評価時点における着地開脚幅（平均値±標準誤差）は，雄，雌それぞれ 3.9±0.5 cm，3.2±0.4 cm に対し，4.1±0.5 cm，3.2±0.3 cm であった．変異型 SOD トランスジェニックラットの着地開脚幅について, エダラボン投与群と溶媒投与群の差は有意ではなかった（t 検定）．なお，参考データとして評価時点の前後 2 時点（雄 : 190 日，197 日，211 日並びに 218 日，雌 : 197 日，204 日，218 日並びに 225 日）で統計解析を実施した．その結果，雄雌ともすべての時点で有意差は認められなかった．

ロータロッド

5 回/分に回転速度を設定した直径 9 cm のロータロッドを歩行する時間を測定した．評価時点は，雄は 200 日目，雌は 214 日目であった．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の評価時点における歩行時間（平均値±標準誤差）は，雄で 9.1±5.0 秒に対して 8.3±4.4 秒，雌で 2.1±0.3 秒に対して 9.3±5.1 秒であった．変異型 SOD トランスジェニックラットのロータロッド歩行時間について，雌のエダラボン投与群は溶媒投与群と比べて延長させたものの，解

析時点における差は有意ではなかった．(t 検定)．なお，参考データとして評価時点の前後 2 時点（雄 : 186 日，193 日，207 日並びに 214 日，雌 : 200 日，207 日，221 日並びに 228 日）で統計解析を実施した．その結果，雄雌ともすべての時点で有意差は認められなかった．

脊髄生存細胞数

脊髄の L3 レベルの病理標本を作製（ニッスル染色）し，灰白質前角を中心管より左右の領域に分け，やや大型の円形核が認められる生存細胞数を数え，6 切片の平均値を求めた．雄は 26 週齢，雌は 28 週齢の時点で検討した．溶媒投与群に対するエダラボン投与群の生存細胞数 (平均値±標準誤差) は，雄，雌それぞれ 32.2±1.3，33.2±1.2 に対し，31.8±2.4，33.7±2.0 であった．変異型 SOD トランスジェニックラットの脊髄生存細胞数について，エダラボン投与群と溶媒投与群の差は有意ではなかった（t 検定)．

以上の結果について表 2.6.2.2－2 に要約した．エダラボンは本モデルにおいて，生存期間を延長させる作用は見いだされなかったが，四肢の運動機能低下を抑制し，症状の進行を遅延させる作用を有することが示唆された．

表 2.6.2.2－2　変異型 SOD トランスジェニックラットに対する作用

主要評価項目	指　標	解析時点	結　果
生存期間 [1)]	生存日数（正向反射消失日を死亡日とする）	－	溶媒投与群　　：雄 205 日（198, 213），雌 215 日（209, 223） エダラボン投与群：雄 201 日（198, 212），雌 212 日（205, 224）
傾斜板の角度 [2)]	傾斜板装置に動物を上向きに置き，5 秒以上滑り落ちない角度の平均値	雄：199 日 雌：213 日	溶媒投与群　　：雄 36.7±1.2 度，雌 36.5±1.2 度 エダラボン投与群：雄 38.0±1.4 度，雌 41.2±1.6*度
副次評価項目	**指　標**	**解析時点**	**結　果**
罹病期間 [1)]	発症日（後肢反射テストでスコアが 1 となった日）から死亡日までの日数	－	溶媒投与群　　：雄 43 日（33, 48），雌 51 日（48, 55） エダラボン投与群：雄 37 日（34, 50），雌 55 日（42, 66）
体重 [3)]	17 週齢以降，毎日測定（g）	雄：205 日 雌：215 日	溶媒投与群　　：雄 351±21，雌 195±11 エダラボン投与群：雄 339±23，雌 199±13
後肢反射テスト [2)]	動物の尾を持ち逆さにつり下げ，四肢の伸展状態を評価（スコア付け）	雄：204 日 雌：215 日	溶媒投与群　　：雄 3.2±0.2，雌 3.4±0.2 エダラボン投与群：雄 3.1±0.3，雌 3.2±0.3
着地開脚幅 [3)]	約 30 cm の高さから動物を落下させた際の後肢間の距離を測定（cm）	雄：204 日 雌：211 日	溶媒投与群　　：雄 3.9±0.5，雌 3.2±0.4 エダラボン投与群：雄 4.1±0.5，雌 3.2±0.3
ロータロッド [3)]	回転速度を 5 回/分に設定した直径 9 cm のロータロッドを歩行する時間を測定（秒）	雄：200 日 雌：214 日	溶媒投与群　　：雄 9.1±5.0，雌 2.1±0.3 エダラボン投与群：雄 8.3±4.4，雌 9.3±5.1
脊髄生存細胞数 [3)]	脊髄の L3 レベルで切片作製し，生存細胞数をカウント（6 切片の平均値）	雄：26 週齢 雌：28 週齢	溶媒投与群　　：雄 32.2±1.3，雌 33.2±1.2 エダラボン投与群：雄 31.8±2.4，雌 33.7±2.0

n=15（雄）　n=13（雌），ただし，脊髄生存細胞数については n=3（雄）　n=2-3（雌）

1)　Log-rank 検定　vs 溶媒投与群（中央値（第 1 四分位値，第 3 四分位値））

2)　Wilcoxon 検定　vs 溶媒投与群（平均値±標準誤差）*; $p<0.05$

3)　t 検定　vs 溶媒投与群（平均値±標準誤差）

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　受容体，チャネル，トランスポーターに対する結合性（*in vitro* 試験）

［添付資料番号 4.2.1.2－1（評価資料）］

ヒト，マウス，ラット，ウサギ，モルモット，ハムスター組織を用いて，79 の各種受容体，チャネル及びトランスポーターへのエダラボン並びに 2 種の代謝物（硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体）の結合性を検討した．その結果，それぞれ 10 μmol/L において，検討したすべての受容体，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（表 2.6.2.3－1）．なお，ヒト臨床投与量である 105 mg 経口投与時の非結合型エダラボン C_{max} は 139 ng/mL であり，10 μmol/L（1740 ng/mL）はおよそ 13 倍の濃度である．

表 2.6.2.3－1　受容体，チャネル，トランスポーターに対する結合性

被験物質	エダラボン	代謝物（硫酸抱合体）	代謝物（グルクロン酸抱合体）
評価濃度	10 μmol/L		
評価項目	Adenosine A_1, A_{2A}, Adrenergic α_1 (non-selective), α_2 (non-selective), β_1, β_2 Angiotensin AT_2 Atrial Natriuretic Factor Bombesin (non-selective) Bradykinin B_2 Calcitonin Gene-Related Peptide $CGRP_1$ Cannabinoid CB_1 Chemokine CCR1, CCR2B Cholecystokinin CCK_1 (CCK_A), CCK_2 (CCK_B) Corticotropin Releasing Factor CRF_1 Dopamine D_1, D_{2L}, D_3 $GABA_A$ Chloride Channel TBPS, Flunitrazepam Central, Muscimol Central $GABA_B$ (non-selective) Glucocorticoid Glutamate AMPA, Kainate, Metabotropic $mGlu_2$, Metabotropic $mGlu_5$, NMDA Agonism, NMDA Phencyclidine, Non-selective Glycine Strychnine-Sensitive Histamine H_1, H_2, H_3 Interleukin IL-1 Leukotriene, Cysteinyl $CysLT_1$ Muscarinic M_1, M_2, M_3 Neuropeptide Y Y_2 Nicotinic Acetylcholine Opiate δ1, κ, μ Orexin OX_1 Orphanin ORL_1 Platelet Activating Factor Purinergic P2X, P2Y Ryanodine RyR3 Serotonin 5-HT_1 (non-selective), 5-HT_{1A}, 5-HT_2 (non-selective), 5-HT_{2A}, 5-HT_3, 5-HT_4 Sigma (non-selective)		
50%以上の結合を示した項目	なし	なし	なし

表 2.6.2.3－1　受容体，チャネル，トランスポーターに対する結合性（続き）

被験物質	エダラボン	代謝物 （硫酸抱合体）	代謝物 （グルクロン酸抱合体）
評価濃度	10 μmol/L		
評価項目	Somatostatin sst1 Tachykinin NK_1, NK_2, NK_3 Tumor Necrosis Factor, non-selective Vasoactive Intestinal Peptide VIP_1 Vasopressin V_{1A}, V_2 Calcium channel (L-Type Dihydropyridine, N-Type) Potassium channel K_A, K_{ATP} Sodium channel site2 Adenosine transporter Choline transporter Dopamine transporter GABA transporter Glycine transporter Norepinephrine transporter Serotonin transporter		
50%以上の結合を示した項目	なし	なし	なし

2.6.2.4　安全性薬理試験

本申請では，既承認薬申請時に提出してない *in vitro* ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル電流測定試験（hERG 電流測定試験，試験番号[redacted]1335，2.6.3.4 に要約）が実施済みであるため，報告する．以下に，報告済の試験結果も含め，概要を述べる．

マウス，ラット，ウサギ，モルモット，ネコ及びイヌの摘出組織又は *in vivo* において，中枢神経系，心血管系，呼吸系，腎／泌尿器系，自律神経系，消化器系，体性神経系及び血液系に対するエダラボンの影響を検討した．また，HEK293 細胞に安定的に発現させた hERG に対するエダラボンの影響の有無も検討した．

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した安全性薬理試験は，本申請で報告する hERG チャネル電流に対する影響を評価する *in vitro* 試験のみである．

マウス及びラットにエダラボンを 100 mg/kg までの用量で単回急速静脈内投与して中枢神経系への影響を検討したところ，一般症状の変化が認められたが，いずれも一過性かつ可逆的であった．オープンフィールド試験及び回転籠試験で自発運動量の減少が認められた．エダラボンは酢酸ライジングを抑制したが，Haffner 試験及びテールフリック試験のいずれにおいてもエダラボンの影響は認められなかった．モルヒネはこれらの疼痛モデルに効果を示すことから，エダラボンの鎮痛作用はモルヒネとは大きく異なると考えられた．マウス及びラットで一過性かつ可逆的な体温低下が認められた．検討したその他の中枢神経系パラメータにおいても，エダラボンの影響は認められなかった．

エダラボンは hERG 電流を阻害しなかった（2.6.2.4.1）．イヌを用いて実施した一連の試験において，30 mg/kg 以上の用量で平均血圧の一過性の低下並びに心拍数，大腿動脈血流量，総頸動脈血流量及び心拍出量の一過性の増加が認められた．更に，100 mg/kg の用量では，上記の

変化に加えて冠動脈血流量の増加が認められた. 左心室内圧最大変化率には一過性に減少後増加する二相性の変化が認められた．エダラボンは心電図及び呼吸数に影響を及ぼさなかった．

エダラボンは有意ではないものの用量依存的に尿量を増加させ，100 mg/kg の用量では尿量の増加を反映して尿中電解質排泄が増加した. イヌの血行動態試験で大腿動脈血流量が増加したことから，尿量の増加は，大腿動脈血流量の増加による末梢への血流量の増加及びそれに伴う糸球体濾過量の増加に起因すると考えられた.

エダラボンを 30 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したとき，*in situ* での胃腸管運動に対して，収縮力のごく軽度の減弱が認められた．100 mg/kg の用量では，運動が一過性に抑制された後，亢進した．腸管輸送能の検討試験では，エダラボンは 30 mg/kg 以上の用量で腸管内輸送を抑制し，この抑制作用は *in situ* で認められた胃腸管運動に対する作用が反映されたものと考えられた．エダラボンは，摘出回腸のアセチルコリン，ヒスタミン及び塩化バリウムで惹起した収縮にいかなる影響も及ぼさなかった．したがって，胃腸管にエダラボンの直接的な影響は認められなかった.

その他の試験において，エダラボンは 100 mg/kg の用量で空腹時血糖値を増加させたが，血液系には影響を及ぼさず，局所麻酔作用も示さなかった.

初出の hERG 試験について，結果を 2.6.2.4.1 に要約し，2.6.2.6 で考察する.

2.6.2.4.1　hERG 電流測定試験

［添付資料番号 4.2.1.3－1（評価資料）］

hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞において，ホールセルパッチクランプ法を用いてエダラボンの hERG 電流に対する影響を評価した（試験番号 [redacted]1335，2.6.3.4 に要約）．本試験ではエダラボンを 3 濃度（10^{-6}，10^{-5} 及び 10^{-4} mol/L）で検討する予定であった．10^{-4} mol/L 適用時の hERG 電流（適用前の hERG 電流に対して 96.6%）と，0.1%ジメチルスルホキシド媒体対照適用時の hERG 電流（96.9%）との明らかな差は認められなかった．したがって，エダラボンのほかの 2 つの低濃度は検討しなかった．陽性対照の E-4031（10^{-7} mol/L）は hERG 電流を著しく阻害した（6.5%）ことから，試験系の感度が確認された.

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1　ヘパリン及びアスピリン併用時の脂質過酸化抑制及びラジカル消去作用

［添付資料番号 4.2.1.4－1（参考資料）］

ラット脳ホモジネートの脂質過酸化抑制及び DPPH ラジカル消去作用に対するヘパリン（0.01，0.1，1 U/mL），及びアスピリン（10，100，1000 μmol/L）併用の影響を検討した．その結果，エダラボンの脂質過酸化抑制及び DPPH ラジカル消去作用に対してヘパリンの影響は認められなかった．一方で，脂質過酸化抑制作用に関して，エダラボンの IC_{50} 値は 15.0 μmol/L であったのに対して，高濃度（1000 μmol/L）のアスピリン共存下では 13.9 μmol/L とやや低値を示し，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．しかし

ながら，共存試験におけるエダラボン単独群の 95%信頼区間 9.9~37.4 μmol/L の範囲に含まれる程度の低値であり，アスピリン併用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，アスピリン単独は 1000 μmol/で 4.4%，エダラボン単独は 30 μmol/で 82.2%の時，両者を併用した時の DPPH ラジカル消去作用は 93.0%であり，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．

2.6.2.6　考察及び結論

ALS は，運動ニューロンが選択的に変性・脱落し，呼吸筋を含む全身の筋萎縮が進行性に起こる神経変性疾患である．ALS 病態の発症や進行には様々な原因が報告されており，フリーラジカルによる酸化ストレスの関与もその一つである [3]．SALS，FALS 共に，脊椎（腰椎灰白質）や脳脊髄液中，血漿中等の 3-NT や 4-HNE の上昇が確認されている [2), 3), 10)]．これらの発生は，・OH や $ONOO^-$などのフリーラジカルによる DNA やたん白質，脂質の過酸化反応によるものと考えられ，細胞に傷害を与え細胞死へ導く要因となっている可能性がある [2), 3)]．

フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンは，脳虚血に伴い発生する・OH を消去し，脂質過酸化の発生を抑え，虚血領域，あるいはその周囲の神経細胞を保護する作用を有することから，ALS 病態で上昇するフリーラジカルの発生を抑制して，運動ニューロンを酸化ストレスから保護し，筋萎縮の進行を遅らせる効果が期待される．近年，変異型 SOD/Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2（Nrf2）ダブルトランスジェニックマウスの脊髄運動ニューロン並びに下肢筋において，病態進行に伴い酸化ストレスマーカーNrf2 が上昇するが，エダラボン投与により，Nrf2 低下及びロータロッドの歩行時間で評価した運動機能改善が認められることが報告された [12)]．

変異型 SOD トランスジェニックラットを用い，エダラボンの効果を薬理学的，神経病理学的に検討した．主要評価項目は，生存期間と傾斜板の角度とし，副次評価項目は，罹病期間，体重，後肢反射テスト，着地開脚幅，ロータロッド，脊髄運動神経細胞数として，溶媒投与群の動物の半数死亡日に最も近く，かつ半数死亡日以前の測定時点に統計解析した．エダラボンは，国内第 II 相試験での用法用量を参考に，3 mg/kg/h を 1 時間かけて静脈内投与し，2 日間連続の投与と休薬を繰り返す用法で，18 週齢から正向反射消失時まで投与した．その結果，主要評価項目については，溶媒投与群で傾斜板の角度の低下が見られたが，雌のエダラボン投与群では，その低下が有意に抑制された．また，副次評価項目のロータロッドの歩行時間については，雌のエダラボン投与群では溶媒投与群に対して延長する傾向が認められたものの，評価時点における解析では有意な差ではなかった．以上の結果より，エダラボンの反復投与は，変異型 SOD トランスジェニックラットにおいて，四肢の運動機能の低下を抑制することが示された（2.6.2.2.3）．同様に，変異型 SOD1 トランスジェニックマウスを用いた検討でも，四肢の麻痺やロータロッドの歩行時間，握力で評価した運動機能は，発症後時間に伴って低下するが，エダラボン投与（15 mg/kg の腹腔内投与）はその低下を溶媒投与群に比べて有意に抑制し

た[13]．その他に，TDP-43 の過剰発現による凝集やユビキチン化といったヒトの ALS 病態と類似した表現型を呈する wobbler マウス[14]では，エダラボンを 10 mg/kg で 4 週間経口又は腹腔内投与すると，握力の低下や筋重量の減少が抑制され[15), 16)]，脊髄運動ニューロン数の増加及びアストロサイト数の低下が認められた[16)]．以上の結果より，エダラボンは，ALS 病態において，四肢の運動機能低下を抑制し，病態の進行を遅延させる作用を有することが示唆された．上記腹腔内投与時の C_{max} は，健常人に対してエダラボン 105 mg を含有する懸濁液を経口投与，及び 60 mg を 1 時間かけて静脈内投与した際と同程度に達している（2.7.2.2.2.3, MT-1186-J03 試験）[13), 17)]．

これらの報告で認められたエダラボンの運動機能の低下抑制は，運動機能を司るニューロンの保護効果によるものと考えられる．運動ニューロン傷害のメカニズムについては，フリーラジカルを含む酸化ストレスをはじめ，アポトーシスを誘発するミトコンドリア傷害，グルタミン酸過剰放出やチャネル・トランスポーター異常による興奮毒性，構造異常や分解系（オートファジー）の機能異常による変異たん白の蓄積やその結果生じる小胞体ストレス，ニューロフィラメントの凝集や軸索輸送障害などが報告されている[1), 2), 3), 4)]．エダラボンは，ラットやマウスの培養神経細胞を用いてグルタミン酸や過酸化水素で誘導される神経細胞の減少を抑制した（2.6.2.2.2.2）[18), 19), 20)]．この時，蛍光プローブを用いて評価した酸化ストレスは，エダラボンによって減少した[18), 19)]．実際に，ALS 患者にエダラボンを投与した既承認薬の国内第 II 相試験では，Revised ALS Functional Rating Scale スコアの低下を抑制すると共に，髄液中の 3-NT が減少していることを，吉野らは確認している[21)]．また，齧歯類の培養神経細胞を用いた検討では，酸化ストレス以外にも，アポトーシスや小胞体ストレスを軽減する効果をエダラボンは有し，その結果として，細胞死を抑制するとの報告がある[19), 22)]．これらの報告から，エダラボンは，酸化ストレスやアポトーシス，小胞体ストレスを抑制することにより，運動ニューロンを保護する効果を発揮していると考えられる．

一方，近年になって，アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞と血管内皮が，運動ニューロン生存に影響を及ぼしている報告が数多くなされている[4), 5), 6), 7)]．ALS 患者の剖検脳や脊髄において，アストロサイトの活性化やアストログリオーシスの出現が報告され，オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）が傷害を受けミエリンが脱落している像が観察されている[7)]．また，SALS では血液脊髄関門の破綻が見られ[23)]，SOD1 トランスジェニックマウスでの検討により，運動ニューロン傷害に血管内皮傷害が関与していることが報告されている[24)]．エダラボンは，酸化ストレスや炎症惹起によるアストロサイトの傷害に対して保護作用を示し[25), 26)]，酸化ストレスにより抑制された OPC からオリゴデンドロサイトへの分化を改善する[27)]．そして，15-HPETE 誘発による血管内皮細胞傷害を抑制する（2.6.2.2.2.1）．したがって，エダラボンは，グリア細胞や血管内皮を酸化ストレス等から保護し，運動ニューロンの生存に一部寄与していると考えられる．

以上の結果より，エダラボンは運動ニューロンのみならず，グリア細胞や血管内皮の酸化ストレスを軽減することで運動ニューロンを保護し，ALS の病態進行を遅延させる作用を有することが示唆された．

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）[17]．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，一部変更申請/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．

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た結果，それぞれ 10 μmol/L において，検討したすべての受容体，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（2.6.2.3.1）．更に，GLP 適用下で hERG 電流測定試験を実施した結果，エダラボンは hERG 電流を阻害しなかった（2.6.2.4.1）．また，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（2.6.2.5.1）．初回申請/承認（AIS）時に提出したげっ歯類及びイヌを用いた一連の安全性薬理試験において，中枢神経系（ラットでの自発運動低下），心機能（イヌでの一過性の血圧低下及び心拍数増加），腎臓／尿路（ラットでの電解質排泄増加），及び消化管（マウス及びウサギでの消化管運動の変化）に影響が認められた．これらの変化は 30 mg/kg 以上で認められた．げっ歯類に 30 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したときの非結合型エダラボンの C_{max} は，ヒトで予想される非結合型エダラボン C_{max} の 43 倍以上であった．

以上より，初回申請/承認（AIS）時に提出した試験結果を含め，エダラボンは臨床において重篤な副作用を発現しないと考えられ，薬物依存性や相互作用といった，特に長期使用にあたっての懸念が低い可能性が示唆された．

2.6.2.7　図表

全て本文中に記載した．

2.6.2.8　参考文献

1) 永井真貴子, 西山和利. 筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療戦略. 北里医学. 2012;42:85-93.（資料番号：4.3－03）
2) Parakh S, Spencer DM, Halloran MA, Soo KY, Atkin JD. Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:408681.（資料番号：4.3－04）
3) 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）
4) Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. Trends Neurosci. 2014;37:433-42.（資料番号：4.3－06）

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) Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Neurosci. 2013;14:248-64.（資料番号：4.3－08）
7) Philips T, Rothstein JD. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol. 2014;262:111-20.（資料番号：4.3－09）
8) Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, Simko EAJ, Shaw PG, Kim MS, et al. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. Nature. 2014;507:195-200.（資料番号：4.3－10）
9) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 1993;362:59-62.（資料番号：4.3－11）
10) Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH Jr. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 1997;42:644-54.（資料番号：4.3－12）
11) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, et al. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. J Neurosci. 2001;21:9246-54.（資料番号：4.3－13）
12) Ohta Y, Nomura E, Shang J, Feng T, Huang Y, Liu X, et al. Enhanced oxidative stress and the treatment by edaravone in mice model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 2019;97:607-19.（資料番号：4.3－14）
13) 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）
14) Dennis JS, Citron BA. Wobbler mice modeling motor neuron disease display elevated transactive response DNA binding protein. Neuroscience. 2009;158:745-50.（資料番号：4.3－16）
15) Ikeda K, Iwasaki Y, Kinoshita M. Treatment of wobbler mice with free radical scavenger. In: Abe K, editor. Molecular Mechanisms and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Elsevier Science B.V.; 2001. p. 335-9.（資料番号：4.3－17）
16) Ikeda K, Iwasaki Y. Edaravone, a free radical scavenger, delayed symptomatic and pathological progression of motor neuron disease in the wobbler mouse. PLoS One 2015;10:e0140316.（資料番号：4.3－18）
17) Shimizu H, Nishimura Y, Shiide Y, Yoshida K, Hirai M, Matsuda M, et al. Bioequivalence study of oral suspension and intravenous formulation of edaravone in healthy adult subjects. Clin Pharmacol Drug Dev. 2021;10:1188-97.（資料番号：4.3－19）
18) Hisano K, Watanabe M, Morimoto Y. Protective effects of the free radical scavenger edaravone against glutamate neurotoxicity in nearly pure neuronal culture. J Anesth. 2009;23:363-9.（資料番号：4.3－20）
19) Zhao ZY, Luan P, Huang SX, Xiao SH, Zhao J, Zhang B, et al. Edaravone protects HT22 Neurons from H_2O_2-induced apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway. CNS Neurosci Ther. 2013;19:163-9.（資料番号：4.3－21）
20) Wu HT, Yu Y, Li XX, Lang XY, Gu RZ, Fan SR, et al. Edaravone attenuates H_2O_2 or glutamate-induced toxicity in hippocampal neurons and improves $AlCl_3$/D-galactose induced cognitive impairment in mice. Neurotoxicology. 2021;85:68-78.（資料番号：4.3－22）

21) Yoshino H, Kimura A. Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II stuty). Amyotroph Lateral Scler. 2006;7:247-51.（資料番号：4.3－23）
22) Fan J, Long H, Li Y, Liu Y, Zhou W, Li Q, et al. Edaravone protects against glutamate-induced PERK/EIF2α/ATF4 integrated stress response and activation of caspase-12. Brain Res. 2013;1519:1-8.（資料番号：4.3－24）
23) 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）
24) 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）
25) Lee BJ, Egi Y, van Leyen K, Lo EH, Arai K. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress in vitro. Brain Res. 2010;1307:22-7.（資料番号：4.3－27）
26) Guo Z, Wu HT, Li XX, Yu Y, Gu RZ, Lan R, et al. Edaravone protects rat astrocytes from oxidative or neurotoxic inflammatory insults by restoring Akt/Bcl-2/Caspase-3 signaling axis. IBRO Rep. 2020;8:122-8.（資料番号：4.3－28）
27) Miyamoto N, Maki T, Pham LDD, Hayakawa K, Seo JH, Mandeville ET, et al. Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. Stroke. 2013;44:3516-21.（資料番号：4.3－29）

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.3　薬理試験概要表 4
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3　副次的薬理試験 6
2.6.3.4　安全性薬理試験 9
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 10

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）
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル
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

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

一覧表

被験物質：MT-1186（エダラボン）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
None					
Secondary Pharmacodynamics					
Radioligand binding study of 79 receptors/channels/transporters	Binding assay	*In vitro*	[redacted] ([redacted])	[redacted]2785	4.2.1.2-1
Safety Pharmacology					
hERG potassium channel	HEK293 cells	*In vitro*	[redacted] (Japan)	[redacted]1335	4.2.1.3-1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Effects of heparin and aspirin on inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity of edaravone	Rat brain homogenate, DPPH	*In vitro*	[redacted] (Japan)	[redacted]13	4.2.1.4-1

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

該当する資料なし.

2.6.3.3　副次的薬理試験

Type of Study	Radioligand binding study of 79 receptors/channels/transporters		
Test Substance	Edaravone	Sulfate conjugates	Glucuronide conjugates
Concentration	10 μmol/L		
Assay Name	Adenosine A_1, A_{2A}, Adrenergic α_1 (non-selective), α_2 (non-selective), β_1, β_2 Angiotensin AT_2 Atrial Natriuretic Factor Bombesin (non-selective) Bradykinin B_2 Calcitonin Gene-Related Peptide $CGRP_1$ Cannabinoid CB_1 Chemokine CCR1, CCR2B Cholecystokinin CCK_1 (CCK_A), CCK_2 (CCK_B) Corticotropin Releasing Factor CRF_1 Dopamine D_1, D_{2L}, D_3 $GABA_A$ Chloride Channel TBPS, Flunitrazepam Central, Muscimol Central $GABA_B$ (non-selective) Glucocorticoid Glutamate AMPA, Kainate, Metabotropic $mGlu_2$, Metabotropic $mGlu_5$, NMDA Agonism, NMDA Phencyclidine, Non-selective Glycine Strychnine-Sensitive Histamine H_1, H_2, H_3 Interleukin IL-1 Leukotriene, Cysteinyl $CysLT_1$ Muscarinic M_1, M_2, M_3		
≥ 50% inhibition	None	None	None
Study Number	[redacted]2785		
Location in CTD	4.2.1.2-1		

2.6.3.3　副次的薬理試験（続き）

Type of Study	Radioligand binding study of 79 receptors/channels/transporters		
Test Substance	Edaravone	Sulfate conjugates	Glucuronide conjugates
Concentration	10 μmol/L		
Assay Name	Neuropeptide Y Y_2 Nicotinic Acetylcholine Opiate δ1, κ, μ Orexin OX_1 Orphanin ORL_1 Platelet Activating Factor Purinergic P2X, P2Y Ryanodine RyR3 Serotonin 5-HT_1 (non-selective), 5-HT_{1A}, 5-HT_2 (non-selective), 5-HT_{2A}, 5-HT_3, 5-HT_4 Sigma (non-selective) Somatostatin sst1 Tachykinin NK_1, NK_2, NK_3 Tumor Necrosis Factor, non-selective Vasoactive Intestinal Peptide VIP_1 Vasopressin V_{1A}, V_2 Calcium channel (L-Type Dihydropyridine, N-Type) Potassium channel K_A, K_{ATP} Sodium channel site2 Adenosine transporter Choline transporter Dopamine transporter		
≥ 50% inhibition	None	None	None
Study Number	[redacted]2785		
Location in CTD	4.2.1.2-1		

2.6.3.3　副次的薬理試験（続き）

Type of Study	Radioligand binding study of 79 receptors/channels/transporters		
Test Substance	Edaravone	Sulfate conjugates	Glucuronide conjugates
Concentration	10 μmol/L		
Assay Name	GABA transporter Glycine transporter Norepinephrine transporter Serotonin transporter		
≥ 50% inhibition	None	None	None
Study Number	[redacted]2785		
Location in CTD	4.2.1.2-1		

2.6.3.4　安全性薬理試験

以下を除く試験資料は，初回申請/承認（AIS）にて提出済である．

Organ Systems Evaluated	Species, Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Cardiovascular system								
hERG potassium current	HEK293 cells stably expressing the hERG channel	*In vitro*	0 (vehicle control), 0 (positive control), 10^{-4} mol/L	5 cells	Edaravone was to be applied at 10^{-6}, 10^{-5}, and 10^{-4} mol/L. However, no significant differences were observed between the vehicle control (DMSO) and the 10^{-4} mol/L group (Student's t test); therefore, the low and middle concentrations were not tested. The positive control (E-4031, 10^{-7} mol/L) significantly inhibited hERG current (to 6.5% of current prior to application). In conclusion, edaravone did not inhibit the hERG potassium current *in vitro*.	Yes	[redacted]1335	4.2.1.3-1

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

詳細は 2.6.2 に記載した.