目次

略号一覧 2
2. CTD の概要 5
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 8
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 吸収 10
2.4.3.2 分布 11
2.4.3.3 代謝 13
2.4.3.4 排泄 14
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 15
2.4.3.6 その他の薬物動態試験 15
2.4.4 毒性試験 15
2.4.4.1 単回投与毒性試験 15
2.4.4.2 反復投与毒性試験 15
2.4.4.3 遺伝毒性試験 17
2.4.4.4 がん原性試験 18
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 18
2.4.4.6 局所刺激性試験 19
2.4.4.7 その他の毒性試験 19
2.4.5 総括及び結論 19
2.4.5.1 薬理試験 19
2.4.5.2 薬物動態試験 20
2.4.5.3 毒性試験 22
2.4.5.4 結論 23
2.4.6 参考文献一覧 24

略号一覧

略号	内容
ARG	autoradiography：オートラジオグラフィ
ARGM	autoradiogram：オートラジオグラム
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter：頂端側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター
AUC_{last}	area under the plasma concentration-time curve from 0 to the last measurable point：0 時間から最終測定時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the plasma concentration-time curve from 0 to infinity：0 時間から無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein：乳癌耐性たん白質
bpm	beat per minute：1 分間の拍動回数
BSEP	bile salt export pump：胆汁酸排泄ポンプ
C_0	initial plasma concentration at time zero：投与直後の血漿中濃度
C_{max}	maximum observed plasma concentration：最高血漿中濃度 maximum observed blood concentration：最高血液中濃度
CYP	cytochrome P450：チトクロム P450
DBTC	dibutyltin dichloride：ジブチルスズジクロライド
ECG	electrocardiogram：心電図
ED_{50}	50% effective dose：50%有効用量、50%阻害用量、50%抑制用量
EMA	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
FDA	Food and Drug Administration：アメリカ食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GNTI	5'-guanidinonaltrindole：5'-グアニジノナルトリンドール
hDOR	human delta-(δ) opioid receptor：ヒトデルタオピオイド受容体
hERG	human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
hKOR	human kappa-(κ) opioid receptor：ヒトカッパオピオイド受容体
hMOR	human mu-(μ) opioid receptor：ヒトミューオピオイド受容体
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
K_d	dissociation constant：解離定数
Ki	inhibition constant：阻害定数
KOR	kappa-(κ) opioid receptor：カッパオピオイド受容体
LAT	L-type amino acid transporter：L 型アミノ酸トランスポーター

略号	内容
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry：液体クロマトグラフィ-高分解能質量分析（計）
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィ-タンデム質量分析（計）
LPS	lipopolysaccharide：リポ多糖類
LSC	liquid scintillation counting：液体シンチレーションカウンタ
MATE	multidrug and toxin extrusions：多剤毒性化合物排出
MDR	multidrug resistance protein（P-glycoprotein）：多剤耐性たん白質
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare：厚生労働省
mKOR	mouse kappa-(κ) opioid receptor：マウスカッパオピオイド受容体
mRNA	messenger RNA：メッセンジャー RNA
MRP	multidrug resistance associated protein：多剤耐性関連たん白質
Nor-BNI	nor-binaltorphimine：ノルビナルトルフィミン
OAT	organic anion transporter：有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide：有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter：有機カチオントランスポーター
OCTN	carnitine transport by organic cation transporter：有機カチオン/カルニチントランスポーター
OST	organic solute transporter：有機溶質トランスポーター
PEPT	peptide transporter：ペプチドトランスポーター
P-gp	P-glycoprotein：P 糖たん白質
PK	pharmacokinetic：ファーマコキネティック、薬物動態
QT	心電図の QT 間隔
QTc	心拍数で補正した QT 間隔：補正 QT 間隔
QWBA	quantitative whole body autoradiography：定量的全身オートラジオグラフィ
Radio-HPLC	radio isotope detector- high performance liquid chromatography：ラジオ検出器-高速液体クロマトグラフィ
SD	Sprague-Dawley
SNL	spinal nerve ligation：脊髄神経結紮
$T_{1/2}$、$t_{1/2}$	binding half-life：結合半減期 elimination half-life at terminal phase：消失半減期
TG	transgenic：トランスジェニック
TK	toxicokinetics：トキシコキネティクス
T_{last}	last measurable time point：測定可能な最終採血時間
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸

略号	内容
	転移酵素

2. CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ジフェリケファリン酢酸塩（米国開発コード名：CR845、国内開発コード名：MR13A9。以下、ジフェリケファリンと表記。また、投与量、*in vitro* の設定濃度及び測定濃度は、遊離塩基として表記）は、κ オピオイド受容体（KOR）に選択的なフルアゴニストであり、κ オピオイド受容体に結合し抗掻痒作用を発揮することで、血液透析を受けている慢性腎障害患者における中等度から重度の掻痒症（尿毒症性掻痒症）を改善する。

効力を裏付ける試験では、ジフェリケファリンの受容体選択性、受容体親和性、受容体機能活性及びバインディングキネティクスについて、ヒトオピオイド受容体を発現させた細胞を用いて検討した。また、ジフェリケファリンの各種受容体及び各種イオンチャネル等への結合プロファイルも検討した。ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、複数の掻痒モデル（ヒスタミン、サブスタンス P、compound 48/80 及び 5’-Guanidinonaltrindole（GNTI）により誘発される掻痒モデル）を用いて検討し、また抗掻痒作用の持続時間並びに κ オピオイド受容体拮抗薬の影響を検討した。血液透析を受けている慢性腎障害患者における掻痒の発症には、炎症成分が関与することから、ジフェリケファリンの抗炎症作用についてサイトカイン放出に対する抑制作用及び炎症モデルに対する作用を検討した。副次的薬理試験では、ジフェリケファリンは κ オピオイド受容体のアゴニストであるため、複数の疼痛モデル（酢酸ライジング、慢性膵炎モデル、神経因性疼痛モデル、カラゲニン誘発疼痛モデル、完全フロインドアジュバント誘発疼痛モデル）に対する鎮痛作用について検討し、また鎮痛作用の持続時間並びに κ オピオイド受容体拮抗薬の影響を検討した。さらに、耐性形成の有無についても検討した。安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系、呼吸系及び胃腸管系に及ぼす影響について検討した。

主要な安全性薬理試験は、ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」及び ICH S7B「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」に従って Good Laboratory Practice（GLP）に準拠して実施した。

標識化合物（^{14}C-ジフェリケファリン）を用いた試験では、LSC 及び LC-MS/MS 法を用い、非標識化合物（ジフェリケファリン）を用いた試験では LC-MS/MS 法を用いて、各動物種（ラット、イヌ及びサル）における生体試料中のジフェリケファリン濃度測定法を開発し、その妥当性を評価した。またラットで認められたグリシン抱合体（ジフェリケファリン代謝物；CR845 1f-glycine conjugate）の LC-MS/MS 濃度測定法を開発し、その妥当性を評価した。非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクスは、^{14}C-ジフェリケファリン又はジフェリケファリンを用いて、*in vivo* では主として薬理試験及び毒性試験で評価された各動物種（ラット、イヌ及びサル）を用い、*in vitro* では動物及びヒト肝ミクロソーム、肝細胞及びリコンビナント酵素発現系を用いて実施した。

バリデーション試験は、GLP（FDA）、「生体試料中薬物濃度分析法バリデーションに関するガイダンス（FDA、2001）」、「best-practices-conference whitepapers（Viswanathan et al.、2007a[1]; Viswanathan、2007b[2]）」、「生体試料中薬物濃度分析法バリデーションに関するガイドライン（EMA、2012）」、及び「医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（MHLW、2013）」に従って実施した。TK 試験は GLP 及び ICH ガイドライン　S3A：トキシコキネティクスに関するガイダンス「毒性試験における全身的曝露の評価（ICH S3A、1994（原文））」に従って実施し、非臨床薬物動態試験及び薬物相互作用試験は、S3B：薬物動態「反復投与組織分布試験ガイダンス（ICH S3B、1994（原文））」、FDA ガイダンス「*In vitro* 薬物相互作用試験－チトクロム P450 酵素及びトランスポーターを介した薬物相互作用（FDA、2020）」及び「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて（平成 10 年 6 月 26 日医薬審第 496 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知）」に準拠又は従って実施した。

非臨床安全性評価として、単回静脈内投与毒性試験（マウス、ラット及びサル）、反復静脈内投与毒性試験（ラット 26 週間まで、サル 39 週間まで）、遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びマウス小核試験）、がん原性試験（ラット 2 年間及びトランスジェニックマウス 26 週間）、生殖発生毒性試験（ラット受胎能・初期胚発生試験、ラット及びウサギ胚・胎児発生試験、並びにラット出生前後発生・母体機能試験）、局所刺激性試験（ウサギ血管周囲刺激性）及び依存性試験（ラット場所嗜好性/嫌悪性、薬物自己投与、薬物弁別及び身体依存性）を実施した。ジフェリケファリンの臨床予定投与経路が静脈内であることから、主として毒性試験は静脈内投与により評価したが、がん原性試験においては長期間の反復静脈内投与が技術的に困難であることから、皮下投与により評価した。また、米国でのジフェリケファリンの経口製剤開発に伴い、ヒト経口投与時における安全性を検討するため、ラットへの経口投与による拡張型単回投与毒性試験、4 週間反復投与毒性試験及び 26 週間反復投与毒性試験を行った。主な毒性試験は、ICH M3（R2）ガイドライン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 に準拠して実施した。

また、ジフェリケファリンは、D-体アミノ酸からなる分子量約 680 の低分子ペプチドであり、270 nm 以上の紫外線を吸収しない（3.2.P.5.3 参照）ことから、ICH S10 ガイドラインに従い、光毒性試験は実施しなかった。安全性評価が必要な代謝物は存在しなかったため、代謝物単独の毒性試験は実施しなかった。ICH Q3A（R2）、ICH Q3B（R2）、ICH Q3C（R6）、ICH Q3D（R1）及び ICH M7（R1）ガイドラインに規定された安全性確認の必要な閾値を超える不純物はなかったため、個々の不純物に対する安全性評価は実施しなかった。

---

[1] C.T. Viswanathan, Surendra Bansal, Brian Booth, Anthony J. DeStefano, Mark J. Rose, Jeffrey Sailstad, et al. Workshop/Conference report - quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. AAPSJ. 2007a;9(1):E30-E42. ［資料 4.3-1］

[2] C.T. Viswanathan, Surendra Bansal, Brian Booth, Anthony J. DeStefano, Mark J. Rose, Jeffrey Sailstad, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. Pharm Res. 2007b;24(10):1962-1973.［資料 4.3-2］

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

ジフェリケファリンのヒトκ、μ及びδオピオイド受容体（hKOR、hMOR及びhDOR）に対する選択性について検討した。ジフェリケファリンはhKORへのリガンド結合を選択的に阻害し、hKORに対して高い結合親和性（Ki＝0.32 nmol/L）を示した（2.6.2.2.1.1参照）。また、マウスのκオピオイド受容体（mKOR）、hKOR、hMOR及びhDORに対する受容体機能活性を検討した。ジフェリケファリンは、mKOR及びhKORに対して最大作用活性を示し、その50%効果濃度はそれぞれ0.048 nmol/L及び0.16 nmol/Lであった。ジフェリケファリンは、hMOR及びhDORに対しては10000 nmol/Lまで作用活性を示さなかった（2.6.2.2.1.2参照）。hKORに対するバインディングキネティクスについて検討した。ジフェリケファリンの解離定数（K_d）は0.14 nmol/Lであり半減期（$t_{1/2}$）は92分であった（2.6.2.2.1.3参照）。さらに、オピオイド以外の各種受容体、イオンチャネル、トランスポーターへのリガンド結合及び酵素活性に対するジフェリケファリンの阻害作用について、10 μmol/Lの濃度で検討した。ジフェリケファリンは、各種受容体、イオンチャネル、トランスポーターへのリガンド結合及び酵素活性に対して30%以上の阻害を示さなかった（2.6.2.2.1.4参照）。以上から、ジフェリケファリンは、KOR特異的な作用を有するフルアゴニストであることが示された。

マウスの掻痒モデルを複数用いて、ジフェリケファリンを単回静脈内投与したときの抗掻痒作用について検討した。ヒスタミン及びサブスタンスP誘発掻痒モデルでは、ジフェリケファリンは、それぞれ0.03 mg/kg以上及び0.3 mg/kg以上の用量で抗掻痒作用を示した。また、compound 48/80及びGNTI誘発掻痒モデルでは、それぞれ0.1 mg/kg以上の用量で抗掻痒作用を示した。これらの抗掻痒作用における50%有効用量（ED_{50}）は、それぞれ0.018、0.32、0.077及び0.053 mg/kgであった（2.6.2.2.2.1.1、2.6.2.2.2.1.2、2.6.2.2.2.1.5参照）。また、サブスタンスP誘発掻痒モデルを用いてジフェリケファリンを0.3 mg/kgの用量で単回静脈内投与したときの作用持続時間及び選択的κオピオイド受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン（nor-BNI）の影響について検討した。ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、少なくとも12時間持続し（2.6.2.2.2.1.3参照）、その作用はnor-BNIにより拮抗された（2.6.2.2.2.1.4参照）。以上から、ジフェリケファリンは、抗掻痒作用を有し、その作用は長く、またκオピオイド受容体を介することが示された。

また、*in vitro*及び*in vivo*の炎症モデルを用いてジフェリケファリンの抗炎症作用について検討した。*in vitro*におけるヒト単球由来マクロファージを用いた検討では、ジフェリケファリンは、2 nmol/L以上の濃度でLPS及びIFNγにより刺激したマクロファージによるサイトカイン放出を低下させた（2.6.2.2.1.5参照）。マウスのLPSモデルにおいてジフェリケファリンを単回皮下投与した検討では、LPSによって誘発された炎症誘発性サイトカインの放出を10 mg/kgの用量で抑制した（2.6.2.2.2.2.1参照）。ラットのカラゲニン誘発足浮腫モデルにおいて、ジフェリケファリンを単回静脈内投与した検討では、カラゲニンによる足浮腫を0.3 mg/kg以上の用量で減少させ、用量依存的な抗炎症作用を示した（2.6.2.2.2.2.2参照）。また、*in vitro*において確認されたマクロファージによるサイトカイン産生に対するジフェリケファリンの抑制作用は、

nor-BNI によって減弱した（2.6.2.2.1.5 参照）。これらのことから、ジフェリケファリンは抗炎症作用を有し、その作用は、免疫細胞（マクロファージ）に局在する KOR の活性化を介していることが示唆された。

2.4.2.2 副次的薬理試験

マウス及びラットの各種疼痛モデル（侵害受容性疼痛として酢酸ライジング及び慢性膵炎モデル、神経因性疼痛として SNL モデル、急性及び慢性炎症性疼痛としてカラゲニン誘発痛覚過敏モデル及び完全フロインドアジュバント誘発炎症性疼痛モデル）を用いてジフェリケファリンの鎮痛作用について検討した。

マウスの酢酸ライジング試験では、ジフェリケファリンの静脈内投与により 0.03 mg/kg 以上の用量でライジング反応を用量依存的に抑制し、その ED_{50} は 0.07 mg/kg であった（2.6.2.3.1.1.1 参照）。同試験において、ジフェリケファリンを 0.3 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの抑制作用は、投与後 18 時間持続した（2.6.2.3.1.1.2 参照）。また、ラットのジブチルスズジクロライド（DBTC）誘発慢性膵炎モデルにおいては、ジフェリケファリンの腹腔内投与により 0.1 mg/kg 以上の用量で腹部痛覚過敏を用量依存的に抑制し、その ED_{50} は 0.03 mg/kg であった（2.6.2.3.1.1.3 参照）。同モデルにおけるジフェリケファリンの鎮痛作用は、nor-BNI 及び非選択的な末梢性オピオイド受容体拮抗薬のナロキソンメチオジドによって拮抗されたことから（2.6.2.3.1.1.4 参照）、DBTC 誘発慢性膵炎の腹部痛覚過敏に対するジフェリケファリンの鎮痛作用は、末梢性 KOR を介していることが示唆された。

ラットの SNL モデルでは、ジフェリケファリンの静脈内投与により、0.3 mg/kg 以上の用量でアロディニアを用量依存的に抑制し、その ED_{50} は 0.31 mg/kg であった（2.6.2.3.1.2.1 参照）。その作用は、nor-BNI の足蹠皮下投与により拮抗されたことから（2.6.2.3.1.2.2 参照）、ジフェリケファリンは末梢の KOR に作用し、神経因性疼痛を抑制することが示唆された。また、同モデルを用いて、ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で 7 日間反復静脈内投与することにより、ジフェリケファリンの耐性形成について検討した。ジフェリケファリンの反復投与においても鎮痛作用が示され、耐性を引き起こしにくいことが示唆された（2.6.2.3.1.2.3 参照）。

ラットのカラゲニン誘発痛覚過敏モデルでは、ジフェリケファリンの静脈内投与により、0.3 mg/kg 以上の用量で用量依存的に鎮痛作用を示し、その ED_{50} は 0.33 mg/kg であった（2.6.2.3.1.3.1 参照）。また、ラット完全フロインドアジュバント誘発炎症性疼痛モデルにおいては、ジフェリケファリンの静脈内投与により、0.1 mg/kg 以上の用量で用量依存的に痛覚過敏を減弱させ、その ED_{50} は 0.07 mg/kg であった（2.6.2.3.1.3.2 参照）。以上のことから、ジフェリケファリンは、各種疼痛に対して鎮痛作用を有し、その作用は末梢の KOR を介することが示唆された。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 中枢神経系

中枢神経系の試験では、マウス及びラットを用いて、ジフェリケファリンを静脈内投与したときの一般症状及び行動、並びに自発運動量、運動協調性、睡眠時間、睡眠-覚醒周期への影響について検討した。

ラットの機能観察総合評価試験では、ジフェリケファリン 1～25 mg/kg の投与後 2 時間にすべての機能評価（中枢神経活動性及び覚醒、自律神経系機能、感覚運動機能及び神経筋機能）において活動性の低下による影響が認められた。また、覚醒低下、歩行障害、外観の変化、姿勢の変化、直腸温の低下及び排尿の増加なども認められた。これらの作用は用量反応を示さず、一過性であり、投与後 24 時間までに概ね消失し、48 時間には回復した（2.6.2.4.1.1 参照）。

ジフェリケファリンの投与により、0.3 mg/kg 以上の用量でマウスの自発運動量の低下（2.6.2.4.1.2 参照）、1 及び 3 mg/kg 以上の用量でマウス及びラットの運動協調性の障害（2.6.2.4.1.3、2.6.2.4.1.4 参照）、0.3 mg/kg 以上の用量でマウスのペントバルビタール誘発睡眠時間の延長（2.6.2.4.1.5 参照）、0.1 mg/kg 以上の用量でラットの睡眠-覚醒周期の変化（2.6.2.4.1.6 参照）が認められ、げっ歯類においては、自発運動及び運動協調性への影響が特徴であることが示された。

2.4.2.3.2 心血管系

心血管系の試験では、hERG チャネル発現細胞及び覚醒下サルを用いて、心血管系への影響について検討した。

hERG チャネル発現細胞におけるカリウム電流（hERG 電流）では、1000 μmol/L の濃度で 7.2%の抑制が認められた（2.6.2.4.2.1 参照）。

覚醒下サルのテレメトリー試験では、ジフェリケファリン 0.25～4 mg/kg の漸増した静脈内投与により、血圧パラメータが低下した。低用量の 0.25 mg/kg では、収縮期、拡張期及び平均血圧は、最大で 43%低下し、投与後 18～20 時間持続した。心拍数は、投与後 15 分間に約 30～50 bpm 増加した後、用量に依存しない減少がみられ、3～24 時間持続した。高用量の 4 mg/kg では、収縮期、拡張期及び平均血圧は、最大で 22%低下し、4～7 時間持続した。心電図は、QT 又は QTc 間隔を含む ECG パラメータに影響は認められなかった（2.6.2.4.2.2 参照）。

2.4.2.3.3 呼吸系

呼吸系の試験では、ラットを用いて、ジフェリケファリンを静脈内投与したときの呼吸系への影響について検討した。

ジフェリケファリン 1～25 mg/kg の投与により、1 mg/kg 以上の用量で呼吸数の減少及び 1 回換気量の軽微な増加が認められたが、分時換気量では変化が認められなかった（2.6.2.4.3.1 参照）。

2.4.2.3.4 胃腸管系

胃腸管系の試験では、正常ラット及びラット術後イレウスモデルを用いて、ジフェリケファリンを静脈内投与したときの腸管輸送能及び胃排出能への影響について検討した。

正常ラットでは、1 mg/kg の用量で消化管輸送能へのわずかな影響が認められたが、その影響は、10 mg/kg の用量においても同程度であった。胃排出能への影響は 10 mg/kg においても認められなかった（2.6.2.4.4.1 参照）。また、ラット術後イレウスモデルにおいては、3 mg/kg の用量においても、消化管輸送能及び胃排出能への影響は認められなかった（2.6.2.4.4.2 参照）。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

2.4.3.1.1 単回投与時の薬物動態

雄性ラットに ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg（2.6.4.3.1.1.1 参照）、ジフェリケファリンを 0.5 及び 3 mg/kg（2.6.4.3.1.1.1 参照）、雄性イヌにジフェリケファリンを 0.3～3 mg/kg（2.6.4.3.1.2.1 参照）、雄性サルに ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg（2.6.4.3.1.3.1 参照）、ジフェリケファリンを 0.3～3 mg/kg（2.6.4.3.1.3.1 参照）の各用量を用いて、ジフェリケファリンの単回静脈内投与時の PK プロファイルを評価した。

^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で雄性ラット及び雄性サルに単回静脈内投与したとき、投与直後に血漿中総放射能濃度は C_{max} となり、その後は 2 相性の消失を示した。また雄性サルのジフェリケファリン及び総放射能の AUC_{inf} から血漿中放射能は主にジフェリケファリンであることが示唆された。ジフェリケファリンを 0.5 及び 3 mg/kg の用量で雄性ラット、0.3、1 及び 3 mg/kg の用量で雄性イヌ及び雄性サルに単回静脈内投与したとき、いずれも投与直後に血漿中濃度は C_{max} を示し、その後はラットで 2.7～5.5 時間、イヌで 1.1～1.5 時間、サルで 1.2～1.4 時間の $T_{1/2}$ で消失した。

ラット、イヌ及びサルでは C_{max} 及び AUC_{inf} の用量依存的な増加が認められたことから、この用量範囲での線形性が示唆された。

2.4.3.1.2 反復投与時の薬物動態（トキシコキネティクス）

雌雄ラットにジフェリケファリンを 1～25 mg/kg を 1 日 1 回 4 週間（2.6.4.3.2.1.1 参照）、0.25～25 mg/kg を 1 日 1 回 13 週間（2.6.4.3.2.1.2 参照）及び 26 週間（2.6.4.3.2.1.3 参照）、また雌雄サルにジフェリケファリンを 0.25～4 mg/kg を 1 日 1 回 4 週間（2.6.4.3.2.2.1 参照）、0.06～1 mg/kg を 1 日 1 回 13 週間（2.6.4.3.2.2.2 参照）及び 39 週間（2.6.4.3.2.2.3 参照）の各用量、期間にて、ジフェリケファリンの反復静脈内投与時の PK プロファイルを評価した。

ラットにおける 4～26 週間反復投与の結果から、C_{max} 及び AUC_{inf} は雌雄ともに用量比又は用量比をわずかに上回る増加であり、明らかな雌雄差は認められなかった。4 週間反復投与では、1～25 mg/kg の用量範囲においてジフェリケファリンの線形性が示唆され、反復投与による蓄積等の明らかな影響も認められなかったが、$T_{1/2}$ は T_{last} に依存した延長傾向を示した。サルにおける 4～39 週間反復投与の結果から、ジフェリケファリンの C_{max} 及び AUC_{inf} は雌雄と

もに用量比又は用量比をわずかに上回る増加を示し、明らかな雌雄差は認められなかった。4 週間反復投与の結果から、0.25～4 mg/kg の用量範囲においてジフェリケファリンの線形性が示唆され、13 週間までは反復投与による蓄積等の明らかな影響も認められなかった。また、39 週間反復投与の結果から、0.06 及び 0.25 mg/kg の雄性サルを除きジフェリケファリンの AUC_{last} 及び AUC_{inf} は初回投与から投与 181 日では明らかな増加を示したが、投与 181 日から最終投与（投与 272 日）ではわずかな増加であり、明らかな蓄積が認められたのは投与 181 日までであった。

2.4.3.2 分布

2.4.3.2.1 組織内濃度

2.4.3.2.1.1 単回投与時の組織内濃度

雄性アルビノラット（2.6.4.4.1.1.1 参照）、雌雄アルビノラット（2.6.4.4.1.1.1 参照）、雄性アルビノラット（ARGM 及び QWBA、2.6.4.4.1.1.2 及び 2.6.4.4.2.1.1 参照）及び雄性有色ラット（ARGM 及び QWBA、2.6.4.4.1.2.1 及び 2.6.4.4.2.2.1 参照）に ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの組織内放射能濃度から、組織分布を評価した。また雄性アルビノラットに、ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの脳及び神経組織への移行性を評価した（2.6.4.4.3 参照）。

さらに、雄性サルに ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの ARG（2.6.4.4.2.3.1 参照）から、組織分布を評価した。

アルビノラットでは、放射能は投与後 0.0833 時間（5 分）で全身に分布し、血漿、血液、腎臓、腎臓皮質、腎臓髄質及び膀胱には特に高い放射能が認められた。投与後 2016 時間では腎臓を除くほとんどの組織で検出限界未満又は低値となった。放射能は腎臓、腎臓皮質及び腎臓髄質に特異的に分布したが、中枢神経系にはほとんど分布せず、雌雄差も認められなかった。また有色ラットでは、放射能は投与後 1 時間でほぼ全身に分布し、腎臓、腎臓皮質、腎臓髄質及び肝臓に高い放射能が認められ、投与後 336 時間で腎臓、腎臓皮質及び腎臓髄質を除く組織で検出限界未満となった。中枢神経系にはほとんど分布せず、すべての時点でメラニンを含む眼球には分布しなかった。ARGM 及び QWBA の結果も同様の傾向を示し、アルビノと有色で差は認められなかった。また脳及び神経組織への移行性は、投与後 4 時間までの全時点で脳中ジフェリケファリン濃度は定量限界未満であり、脳への移行性が低いことが示唆された。血漿中濃度以外では坐骨神経中濃度が最も高く、ジフェリケファリンは中枢神経組織に比べ、末梢神経組織への移行性が高いことが示唆された。

サルを用いた ARG 試験では、放射能は投与後 0.5 時間で大脳、小脳、眼球及び脊髄を除く多くの組織に分布したが、投与後 24 時間では多くの組織で放射能は減少した。また、腎臓及び膀胱内尿中の放射能の分布は高く、投与後 24 時間においても 0.5 時間と同程度であった。

2.4.3.2.1.2 反復投与時の臓器・組織内濃度

ジフェリケファリンを 6 日間さらに ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 日間、1 mg/kg の用量で 1 日 1 回計 7 日間、雄性ラットに反復静脈内投与したときの組織内放射能（2.6.4.4.1.1.3 参照）から、反復投与後の組織分布を評価した。

組織内放射能は最終投与後 0.0833 時間（5 分）ですべての組織で最高濃度となり、血漿、腎臓、腎臓皮質及び腎臓髄質には高濃度の放射能が認められた。その後、血漿中放射能濃度は 2 相性で消失し、いずれの組織も経時的に放射能濃度が低下した。腎臓、腎臓皮質及び腎臓髄質には投与後 168 時間においても高い放射能が認められたが、中枢神経系にはほとんど分布せず、単回投与後と反復投与後の組織分布に差は認められなかった。

2.4.3.2.2 胎盤通過性

雌性（妊娠）ラットにジフェリケファリンを 0.6、2.5 及び 10 mg/kg の用量で、妊娠 7 日から 20 日までの期間、1 日 1 回反復静脈内投与したときの妊娠 20 日における母動物及び胎児血漿中ジフェリケファリン濃度から胎盤通過性を評価した。

母動物及び胎児血漿中ジフェリケファリン濃度はおおむね用量依存的な増加を示し、胎児/母動物血漿中濃度比はいずれの用量においてもほぼ一定であり、ジフェリケファリンは胎盤を通過することが示唆された（2.6.4.4.4 参照）。

2.4.3.2.3 血漿たん白結合

^{14}C-ジフェリケファリンを用いて、超遠心法により *in vitro* 及び *in vivo* 血漿たん白結合を評価した。

^{14}C-ジフェリケファリン（1 及び 10 µmol/L）において、ラット、サル及びヒト血漿を用いた *in vitro* 血漿たん白結合率は、いずれの動物種及び濃度においても低かった（17～21%）（2.6.4.4.5.1 参照）。また ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で雄性サルに単回静脈内投与したときの *in vivo* 血漿たん白結合率は約 18%であり、*in vitro* 血漿たん白結合率と同程度であった（2.6.4.4.5.2 参照）。

2.4.3.2.4 血球移行

^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で、雌雄ラット及び雄性サルに単回静脈内投与したときの血球分配率から、血球移行性を評価した。

放射能の血球分配率は、雌雄ラットでは投与後 2 時間までは雄で 3.7～5.5%、雌で 0.9～3.8%であり、雄性サルでは投与後 8 時間までは 0.0～1.7%と低値を示した。しかしながら、いずれも投与後 24 時間以降では、血球分配率は経時的に増加する傾向が認められた（2.6.4.4.6.1、2.6.4.4.6.2 参照）。

2.4.3.3 代謝

ヒトの肝ミクロソーム、ラット（SD）、サル（カニクイザル）、イヌ（ビーグル）及びヒトの肝細胞（凍結又は新鮮）、リコンビナントヒト CYP 酵素発現系及びリコンビナントヒト UGT 酵素発現系を用いて、ジフェリケファリンの *in vitro* における代謝を検討した。また、ラット（SD）及びサル（カニクイザル）において、ジフェリケファリンの *in vivo* における代謝物組成を検討した。これらの各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果から、ジフェリケファリンの代謝を評価した。

ラット、サル及びヒト凍結肝細胞を用いた代謝安定性試験では、いずれの肝細胞においても顕著な代謝物ピークは検出されず、ジフェリケファリンは肝代謝を受けにくいことが示唆された（2.6.4.5.1.1 参照）。ラット、イヌ、サル及びヒト凍結肝細胞を用いた代謝物同定試験では、ジフェリケファリンの代謝プロファイルに種差が認められず、いずれの動物種においても主要代謝物は認められなかったことから、肝細胞中にジフェリケファリンのヒト特異的代謝物は生成されないことが示唆された（2.6.4.5.1.2 参照）。また、リコンビナントヒト CYP 酵素発現系（CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4）を用いた試験結果から、ジフェリケファリンはいずれの CYP の基質にもならないことが示唆された（2.6.4.5.1.4 参照）。ヒト新鮮肝細胞を用いたジフェリケファリンの酵素誘導試験では、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量及び特異的基質の代謝物生成量に明らかな増加が認められなかったことから、ジフェリケファリンは各種 CYP（CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4）を誘導しないことが示唆された（2.6.4.5.1.6 参照）。ヒト肝ミクロソーム及びリコンビナントヒト UGT 酵素発現系（UGT1A3、UGT1A9 及び UGT2B7）を用いた阻害試験では、ジフェリケファリンは各種 CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A）及び各 UGT 分子種に対し阻害作用を示さなかったことから、これらの酵素で代謝される薬物への相互作用の可能性は低いことが示唆された（2.6.4.5.1.3、2.6.4.5.1.5 参照）。

^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で雄性ラットに単回静脈内投与した結果から、血漿、尿、糞、肝臓、腎臓及び胆汁中には未変化体以外に検出されたピークは 3～13 種類であるが、その量は最大で血漿では総放射能の 2%未満、肝臓及び腎臓ではそれぞれ最大で総放射能の 7 及び 8%未満、尿、糞及び胆汁中では投与量に対してそれぞれ最大で 1、2、及び 2%未満であった（2.6.4.5.2.1、2.6.4.5.2.2、2.6.4.5.2.3、2.6.4.5.2.4 参照）。^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で雄性サルに単回静脈内投与した結果から、血漿、尿及び糞中には未変化体以外に検出されたピークは 11～21 種類であるが、その量は最大で血漿では総放射能の 7%未満であり、尿及び糞中では投与量に対して最大でそれぞれ 5 及び 2%未満であった（2.6.4.5.2.8 参照）。以上の結果から、単回静脈内投与後の動物（ラット及びサル）の血漿中の代謝物は総放射能の 2 及び 7%未満であり、主要代謝物は確認されなかった。

^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で雄性ラットに単回静脈内投与したときの腎臓中に認められたジフェリケファリン代謝物を LC-MS を用いて構造解析した結果、ジフェリケファリンのフェニルアラニンにグリシンが結合したグリシン抱合体（ジフェリケファリン代謝物；CR845 1f-glycine conjugate）であることが示唆された（2.6.4.5.2.5 参照）。

ジフェリケファリンを 6 日間さらに ^{14}C-ジフェリケファリンを 1 日間、1 日 1 回 1 mg/kg の用量で計 7 日間、雄性ラットに反復静脈内投与したとき、腎臓中にはジフェリケファリン及び ^{14}C-ジフェリケファリンが主に存在し、グリシン抱合体は少量検出された（2.6.4.5.2.6 参照）。また、雌雄ラットにジフェリケファリンを 25 mg/kg の用量で 1 日 1 回 26 週間反復投与したとき、グリシン抱合体は反復投与終了後 168 時間における腎臓中のジフェリケファリン濃度に対して 18.15%であった（2.6.4.5.2.7 参照）。

2.4.3.4 排泄

2.4.3.4.1 尿、糞、呼気及び胆汁排泄

^{14}C-ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの尿、糞、呼気、胆汁中排泄を雄性ラット（SD）で、尿糞中排泄を雄性サル（カニクイザル）で、またジフェリケファリンを 0.3、1 及び 3 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの尿中排泄を雄性イヌ（ビーグル）で検討した結果から、ジフェリケファリンの排泄を評価した。

ラットでは、投与後 48 時間までに尿、糞及び呼気中に排泄され、その排泄率は投与量に対して 55～71%、20～35%及び 0.1%であり、総排泄率は 90%以上（予備検討；呼気 0.1%含む）を示し、放射能は主として尿中に排泄されることが確認された（2.6.4.6.1.1、2.6.4.6.1.2 参照）。また、胆汁採取用カニューレを挿管した雄性ラットでは、投与後 48 時間までに尿、糞及び胆汁中への排泄率は、投与量に対してそれぞれ 64.9、2.6 及び 13.0%であり、総排泄率は 80%以上を示した（2.6.4.6.1.3 参照）。ジフェリケファリンを投与した雄性イヌでは、投与後 8 時間までの尿中排泄率は 0.3、1、及び 3 mg/kg の投与量に対してそれぞれ 20、19 及び 47%であった（2.6.4.6.2.1 参照）。雄性サルでは、投与後 168 時間までに尿及び糞中の総排泄率は投与量に対してそれぞれ 70.1 及び 12.7%であり、総排泄率は約 83%を示し、放射能は主として尿中に排泄されることが確認された（2.6.4.6.3.1 参照）。以上の結果から、ジフェリケファリンは単回静脈内投与後、ラットでは 48 時間まで、サルでは 168 時間までにほとんどが排泄され、いずれの種においても主排泄経路は尿中であることが確認された。

2.4.3.4.2 乳汁移行

雌性ラットに、ジフェリケファリンを 0.6、2.5 及び 10 mg/kg の用量で妊娠 7 日から授乳 14 日までの期間、1 日 1 回反復静脈内投与したときの授乳 14 日における母動物血漿、乳汁及び乳児血漿中ジフェリケファリン濃度から、ジフェリケファリンの乳汁移行を評価した。

母動物血漿中ジフェリケファリン濃度はおおむね用量依存的な増加を示し、母動物における乳汁/血漿中濃度比は 0.6、2.5 及び 10 mg/kg でそれぞれ 0.044、0.051 及び 0.042 となり、ジフェリケファリンは乳汁への移行が示唆されたものの、乳児血漿中にジフェリケファリンは認められなかった（2.6.4.6.1.4 参照）。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

MDCKII 及び MDR1-MDCKII 細胞（ヒト P-gp 発現細胞）を用いた細胞膜透過性試験では、ジフェリケファリンはいずれの細胞に対しても透過方向に関わらず膜透過性は低く（透過係数は $0.7x10^{-6}$ cm/s 以下）、かつベラパミル（P-gp 阻害剤）による影響を受けなかったことから、ジフェリケファリンは P-gp（MDR1）の基質とならないことが示唆された（2.6.4.7.1 参照）。

各種トランスポーター（ASBT、BCRP、BSEP、LAT1、MATE1、MATE2-K、MRP2、OAT1、OAT2、OAT3、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1、OCTN2、OSTαβ、PEPT1、PEPT2、P-gp（MDR1））の発現膜ベシクル又は各種発現細胞を用いて検討した結果から、ジフェリケファリンは各種トランスポーターの基質とならないことが示唆された（2.6.4.7.2 参照）。また各種トランスポーター（BCRP、BSEP、LAT1、MATE1、MATE2-K 、MRP2、OAT1、OAT3、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OCT3、PEPT1、PEPT2、P-gp（MDR1））の発現膜ベシクル又は各種発現細胞を用いて検討した結果から、ジフェリケファリンは各種トランスポーターの基質輸送に阻害作用を示さなかった（2.6.4.7.3 参照）。以上の結果から、ジフェリケファリンは各種トランスポーターの基質や阻害剤とはならず、これらのトランスポーターの基質又は阻害剤となる他の薬物との相互作用を引き起こす可能性が低いことを示唆している。

2.4.3.6 その他の薬物動態試験

該当なし。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

ジフェリケファリンを静脈内投与したときの概略の致死量は、マウスでは雌雄とも 200 mg/kg（2.6.6.2.1 参照）、ラットでは雌雄とも 100 mg/kg 超（2.6.6.2.2 参照）、サルでは雌雄とも 16 mg/kg 超（2.6.6.2.4 参照）であった。

ラット拡張型単回経口投与毒性試験では、雌雄とも 2000 mg/kg まで良好な忍容性を示し、無毒性量は雄で 500 mg/kg、雌で 2000 mg/kg（2.6.6.2.3 参照）であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 ラット 4 週間反復静脈内投与毒性試験

ラットを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量：0、1、5、25 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。5 mg/kg/day 以上で活性低下、1 mg/kg/day 以上で体重及び摂餌量の減少がみられた。25 mg/kg/day において、剖検では精巣上体及び精巣の矮小、病理組織学的検査では精巣上体管腔内に細胞片及び精巣の精細管の胚上皮の変性がみられた。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 5 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.1 参照）。

2.4.4.2.2 ラット 13 週間反復静脈内投与毒性試験

ラットを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量：0、0.25、2.5、25 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上で、自発運動の減少、よろめき歩行、前肢の外転、体重及び摂餌量の減少、2.5 mg/kg/day 以上で尿量の減少がみられたが、いずれも投与初期に認められた一過性の変化であった。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 25 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.2 参照）。

2.4.4.2.3 ラット 26 週間反復静脈内投与毒性試験

ラットを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量：0、0.25、2.5、25 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上で自発運動の減少、2.5 mg/kg/day 以上でよろめき歩行、前肢の外転がみられた。0.25 mg/kg/day 以上で体重及び摂餌量の減少がみられたた。以上の変化はいずれも投与初期に認められた一過性の変化であった。病理組織学的検査では 25 mg/kg/day の雄で両側性に精巣の精細管の萎縮、精巣上体管腔内に細胞残屑が認められた。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雄が 2.5 mg/kg/day、雌が 25 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.3 参照）。

2.4.4.2.4 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験

ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（投与量：0、10、50、250 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。50 mg/kg/day 以上で活性低下、半眼、体重及び摂餌量の減少がみられ、雌では猫背姿勢もみられた。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 250 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.4 参照）。

2.4.4.2.5 ラット 26 週間反復経口投与毒性試験

ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（投与量：0、10、50、250 mg/kg/day）では、いずれの群においてもジフェリケファリンに関連した死亡例はみられなかった。50 mg/kg/day 以上で活性低下、半眼、体重及び摂餌量の減少が、250 mg/kg/day で立毛、猫背姿勢がみられたが、いずれも投与初期に認められた一過性の変化であった。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 250 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.5 参照）。

2.4.4.2.6 サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験

サルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量：0、0.25、1、4 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上で嗜眠、猫背姿勢が、1 mg/kg/day 以上で体重の減少がみられた。器官重量では 0.25 mg/kg/day 以上で胸腺、甲状腺、上皮小体（雌）、卵巣及び子宮重量の減少がみられ、病理組織学的検査では胸腺及び脾臓でリンパ球枯渇がみられたが、甲状腺、上皮小体、卵巣あるいは子宮には変化はみられなかった。また、投与部位の変化（急性及び慢性炎症、線維化、血管壁の再生/変性、出血及び壊死）は、対照群でもみられ、1 mg/kg/day 以上でその発現頻度は増加したが、回復性試験において

は 4 mg/kg/day と対照群の変化はほぼ同等であった。無毒性量は雌雄とも 0.25 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.6 参照）。

2.4.4.2.7 サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験

サルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量 : 0、0.06、0.25、1 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上で鎮静、傾眠、自発運動減少、口腔粘膜蒼白及び嘔吐、1 mg/kg/day で体重の減少、0.06 mg/kg/day 以上で摂餌量及び尿量の減少がみられたが、いずれも投与初期に認められた一過性の変化であった。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 1 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.7 参照）。

2.4.4.2.8 サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験（国内実施）

サルを用いた 39 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量 : 0、0.06、0.25、1 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上で鎮静、傾眠、自発運動減少、嘔吐、1 mg/kg/day の雄で嗜眠がみられた。0.25 mg/kg/day 以上で摂餌量の減少、0.06 mg/kg/day 以上で尿量の減少がみられた。いずれも投与初期に認められた一過性の変化であった。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 1 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.8 参照）。

2.4.4.2.9 サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験（米国実施）

サルを用いた 39 週間反復静脈内投与毒性試験（投与量 : 0、0.06、0.25、1 mg/kg/day）では、0.25 mg/kg/day の雄 1 例で後肢廃用のため投与 9 日に、1 mg/kg/day の雌 1 例で体重減少及び中等度の腹部腫大のため投与 253 日に切迫屠殺を行った。0.25 mg/kg/day の 1 例は病理組織学的検査により投与前から継続した慢性変化と推察されたことからジフェリケファリンに関連しない変化であったと考えられたが、1 mg/kg/day の 1 例はジフェリケファリンとの関連性はわからなかった。0.06 mg/kg/day 以上で活性低下、半眼、猫背姿勢、瞳孔散大などが、0.25 mg/kg/day 以上で非協調性行動の症状がみられた。いずれも投与初期に認められた一過性の変化であった。これらの所見は回復性試験ではみられなかった。無毒性量は雌雄とも 0.25 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.3.9 参照）。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.6.4.1 参照）、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験（2.6.6.4.2 参照）及びマウスを用いた小核試験（2.6.6.4.3 参照）を実施した結果、いずれも陰性でありジフェリケファリンに遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

2.4.4.4.1 ラット 2 年間反復皮下投与がん原性試験

ラットを用いた 2 年間反復皮下投与がん原性試験（投与量：0、0.25、0.5、1 mg/kg/day）では、生存率は雌雄ともに各群ともほぼ同様であり、統計学的有意差は認められなかった。一般状態では、雌雄の 0.25 mg/kg/day 以上で活性低下がみられた。病理組織学的検査において、腫瘍性病変及び非腫瘍性病変ともにジフェリケファリンに起因する変化は認められなかった。ジフェリケファリンはラットに対してがん原性を示さなかった（2.6.6.5.1.2 参照）。

2.4.4.4.2 TG マウス 26 週間反復皮下投与がん原性試験

TG マウスを用いた 26 週間反復皮下投与がん原性試験（投与量：0、3、10、30 mg/kg/day）では、いずれの群においてもジフェリケファリンに関連した死亡例はみられなかった。一般状態では、3 mg/kg/day 以上で自発運動の減少、浅速呼吸及びよろめき歩行が、10 mg/kg/day 以上で腹臥位及び呼吸困難がみられ、これらの症状は投与 7 日目までみられた。体重及び体重増加率は雌雄ともに対照群と比べて高値であった。病理組織学的検査において、腫瘍性病変及び非腫瘍性病変ともジフェリケファリンに起因する変化は認められなかった。ジフェリケファリンは TG マウスに対してがん原性を示さなかった（2.6.6.5.2.2 参照）。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

2.4.4.5.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

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試験（投与量：0、0.25、2.5、25 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上の雌雄で自発運動の減少、体重の減少、摂餌量の減少などがみられた。交配前投与では 2.5 mg/kg/day 以上の雌で性周期発情休止期の延長がみられ、0.25 mg/kg/day 以上の雌で性周期回数が対照群と比較して有意に減少した。親動物に対する一般毒性学的な無毒性量は雌雄とも 25 mg/kg/day、生殖機能の無毒性量は雄で 25 mg/kg/day、雌で 0.25 mg/kg/day、初期胚発生に対する無毒性量は 25 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.6.1 参照）。

2.4.4.5.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（投与量：0、0.25、2.5、25 mg/kg/day）では、いずれの群においてもジフェリケファリンに関連した死亡例はみられなかった。0.25 mg/kg/day 以上で自発運動の減少、体重増加量及び摂餌量の減少などがみられた。母動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 0.25 mg/kg/day 未満、母動物の生殖機能及び胚・胎児発生に対する無毒性量は 25 mg/kg/day と考えられ、催奇形性は認められなかった（2.6.6.6.2 参照）。

2.4.4.5.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（投与量：0、0.025、0.05、0.1 mg/kg/day）では、0.1 mg/kg/day で 1 例が妊娠 16 日に死亡、妊娠 23 日に 1 例が流産したため安楽死させた。0.05

mg/kg/day 以上で痩身、軽度の脱水などがみられた。0.05 mg/kg/day 以上で体重増加量の低値及び 0.025 mg/kg/day 以上で摂餌量の減少がみられた。0.1 mg/kg/day で妊娠動物数が対照群と比較して減少していたが、母動物毒性の二次的な変化と考えられ、剖検ではいずれの群の妊娠動物及び非妊娠動物においてもジフェリケファリンに関連したと考えられる異常はみられなかった。ジフェリケファリンの母動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 0.025 mg/kg/day 未満、母動物の生殖機能は 0.05 mg/kg/day、胚・胎児発生に対する無毒性量は 0.1 mg/kg/day と考えられ、催奇形性は認められなかった（2.6.6.6.3 参照）。

2.4.4.5.4 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（投与量：0、0.6、2.5、10 mg/kg/day）では、いずれの群においても死亡例はみられなかった。0.6 mg/kg/day 以上で自発運動の減少、体重増加量及び摂餌量の減少などがみられたが、母動物の妊娠期間、同腹児数、生存児数、分娩時症状観察及び剖検において、ジフェリケファリンに関連した所見はみられなかった。出生児（F_1）及び胎児（F_2）においても異常はみられなかった。母動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 0.6 mg/kg/day、生殖機能に関する無毒性量は 10 mg/kg/day、出生児の発育・生殖機能に対する無毒性量は 10 mg/kg/day と考えられた（2.6.6.6.4 参照）。

2.4.4.6 局所刺激性試験

2.4.4.6.1 ウサギ血管周囲刺激性試験

0.1 及び 10 mg/mL の MR13A9（ジフェリケファリン製剤）をウサギ耳介静脈周囲皮下に単回投与し、血管周囲刺激性について検討した。0.1 及び 10 mg/mL の製剤はいずれも軽度の血管周囲刺激性が認められた（2.6.6.7.1 参照）。

2.4.4.7 その他の毒性試験

依存性試験において、ジフェリケファリンをラットに静脈内投与したときに、報酬（2.6.6.8.3.1 参照）及び強化（2.6.6.8.3.2 参照）効果は認められず、自覚効果（2.6.6.8.3.3 参照）は低レベルであった。また、ジフェリケファリン長期投与による耐性や感作は認められず、退薬症状及び身体依存性（2.6.6.8.3.4 参照）も認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

ジフェリケファリンの薬理作用を、*in vitro* 及び *in vivo* において、複数の動物種を用いた各種試験で評価した。*in vitro* 試験では、ジフェリケファリンは、κ オピオイド受容体に選択的で高い親和性を有するフルアゴニストであることが確認された。*in vivo* 試験では、ジフェリケファリンは抗掻痒作用を示し、その作用の持続時間は長いことが確認されたことから、血液透析を受けている慢性腎障害患者における中等度から重度の掻痒症（尿毒症性掻痒症）に対して抗掻痒作用を示すことが期待される。また、ジフェリケファリンは、抗炎症作用及び鎮痛作用も有

することが確認され、血液透析を受けている慢性腎障害患者における掻痒症は、炎症成分を含むことから、ジフェリケファリンの抗炎症作用も抗掻痒作用に寄与すると考えられる。さらに、ジフェリケファリンは、反復投与により耐性を引き起こしにくいと考えられる。

安全性薬理試験では、中枢神経系において、自発運動、運動協調性、睡眠時間及び睡眠-覚醒周期に対して影響が認められた。また、機能観察総合評価試験において、一過性であるが、活動性の低下による影響及び覚醒低下、歩行障害、外観の変化、姿勢の変化、直腸温の低下及び排尿の増加などが認められた。ジフェリケファリンは、脳への透過が制限されているため、末梢に局在する KOR の一次的活性化を介し、二次的な変化を生じさせている可能性が考えられる。これらの影響が認められた 0.1～1 mg/kg のジフェリケファリンの曝露量（C_{max}）は、予定臨床用量である 0.5 μg/kg 投与時の C_{max} の約 60～600 倍に相当することを勘案すると、ヒトでそれらの事象が発現する可能性は低いと考えられる。心血管系において、心電図に影響は認められず、hERG 電流に対しては、1000 μmol/L（680 μg/mL）の高濃度で 7.2%の抑制が認められたのみであった。また、血圧パラメータが低下した。その原因は不明であるが、血圧に対して影響が認められた用量は 0.25 mg/kg であり、この用量での C_{max} は、予定臨床用量における C_{max} の約 300 倍に相当することを勘案すると、ジフェリケファリンはヒトの心血管系機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。呼吸系において、呼吸数の減少及び 1 回換気量の軽微な増加が認められたが、分時換気量では変化が認められなかった。影響が認められなかった 25 mg/kg での C_{max} は、予定臨床用量における C_{max} の約 11000 倍である。また、胃腸管系において、腸管輸送能に対してわずかな影響しか及ぼさず、その影響が認められた 1 mg/kg の用量の C_{max} は、予定臨床用量における C_{max} の約 600 倍の曝露量である。これらのことから、ジフェリケファリンはヒトの呼吸系及び胃腸管系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上の薬理学的プロファイルから、ジフェリケファリンは臨床において抗掻痒作用を示すことが期待でき、また懸念すべき薬理作用が生じる可能性は低いと考えられる。

2.4.5.2 薬物動態試験

単回静脈内投与後のラット、イヌ及びサルの結果から、ジフェリケファリンは投与直後に C_{max} となり、その後は 2 相性の消失を示し、ラットでは 0.5～3 mg/kg、イヌ及びサルでは 0.3～3 mg/kg の用量範囲において線形性が示唆された。ラットにおける 4～26 週間反復投与の結果から、C_{max} 及び AUC_{inf} は雌雄ともに用量比又は用量比をわずかに上回る増加であり、明らかな雌雄差は認められなかった。また 4 週間反復投与の結果から、1～25 mg/kg の用量範囲においてジフェリケファリンの線形性が示唆され、反復投与による蓄積等の明らかな影響も認められなかったが、$T_{1/2}$ は T_{last} の影響を受け延長傾向を示した。サルにおける 4～39 週間反復投与の結果から、C_{max} 及び AUC_{inf} は雌雄ともに用量比又は用量比をわずかに上回る増加であり、明らかな雌雄差は認められなかった。また 4 週間反復投与の結果から、0.25～4 mg/kg の用量範囲においてジフェリケファリンの線形性が示唆され、13 週間までは反復投与による蓄積等の明らかな影響も認められなかった。また、39 週間反復投与の結果から、0.06 及び 0.25 mg/kg の雄性サルを除き AUC_{last} 及び AUC_{inf} は初回投与から投与 181 日では明らかに増加したが、投与 181 日から最終投与（投

与 272 日）ではわずかな増加であり、明らかな蓄積が認められたのは投与 181 日までであった。一方、サルでの毒性試験の結果から、ジフェリケファリンに関連した病理組織学的変化は認められず（2.6.6 参照）、反復投与による蓄積は安全性には影響しないことが示唆された。

単回静脈内投与後のアルビノラットの組織分布の結果から、組織内放射能は速やかに全身に分布し、投与後 2016 時間では腎臓を除くほとんどの組織で検出限界未満又は低値となった。放射能は腎臓皮質及び腎臓髄質に特異的に分布したが、中枢神経にはほとんど分布せず、雌雄差も認められなかった。有色ラットにおいてもアルビノラットと同様の分布及び消失を示し、中枢神経系にはほとんど分布せず、メラニンを含む眼球には分布しなかった。ARGM 及び QWBA においても、同様の傾向を示した。単回静脈内投与後、脳中ジフェリケファリン濃度は投与後 4 時間までに定量限界未満となり、脳への移行性は低かった。血漿中濃度以外では坐骨神経中濃度が最も高く、ジフェリケファリンは中枢神経組織よりも末梢神経組織への移行性が高いことが示唆された。また単回静脈内投与後のサルの結果もラットと同様であり、投与後 0.5 時間では多くの組織に分布したが、投与後 24 時間では多くの組織で放射能は減少した。特に腎臓及び膀胱内尿中の放射能の分布は高く、投与後 0.5 と 24 時間で同程度であった。反復静脈内投与後のラットの組織分布は、単回静脈内投与と差は認められなかった。*in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果から、血漿たん白結合率は低かった（ラット、サル及びヒトで約 20%）。雌雄ラット及び雄性サルに単回静脈内投与したときの血球移行性は、いずれの動物種においても投与後初期では低かったが、投与後 24 時間以降では経時的に増加する傾向が認められた。

In vitro 試験の結果から、ジフェリケファリンは肝代謝を受けにくく、代謝プロファイルに種差が認められなかったことから肝代謝によるヒト特異的代謝物は生成されないことが示唆された。ヒト肝ミクロソームを用いた CYP への阻害作用では、ジフェリケファリンは各 CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A）における基質代謝に阻害作用を示さず、リコンビナントヒト CYP 酵素発現系（CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4）に対して、これらの CYP の基質にはならなかった。リコンビナントヒト UGT 酵素発現系（UGT1A3、UGT1A9、UGT2B7）に対して、ジフェリケファリンは阻害作用を示さなかった。また、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対して、ジフェリケファリンは誘導作用を示さなかった。以上の結果から、ジフェリケファリンがこれらの酵素に起因する薬物相互作用を引き起こす可能性は低いことが示唆された。

単回静脈内投与（*in vivo* 試験）の結果から、雄性ラットにおける血漿、尿、糞、肝臓、腎臓及び胆汁中に未変化体以外に 3～13 種類、雄性サルにおける血漿、尿及び糞中には未変化体以外に 11～21 種類のピークを検出した。雄性ラット及び雄性サルにおいて、いずれも血漿では総放射能に対してそれぞれ最大で 2 及び 7%未満であった。雄性ラットにおいて、肝臓及び腎臓ではそれぞれ最大で総放射能の 7 及び 8%未満、尿、糞及び胆汁中では投与量に対してそれぞれ最大で 1、2 及び 2%未満、雄性サルにおいて、尿及び糞中では投与量に対してそれぞれ最大で 5 及び 2%未満であり、いずれも主要代謝物は認められなかった。また、ラット腎臓中に認められたジフェリケファリンのフェニルアラニンにグリシンが結合したグリシン抱合体（ジフェリ

ケファリン代謝物；CR845 1f-glycine conjugate）は反復静脈内投与後の腎臓中には少量検出されたが、血漿中にはほとんど認められなかった。

ラット又はサルに静脈内投与後、ジフェリケファリンは尿、糞、胆汁又は呼気中に排泄され、主には尿中に排泄された（ラット尿中排泄率は 58.6 及び 74.0%、サル尿中排泄率は 70.1%）。

妊娠ラットにジフェリケファリンを反復静脈内投与すると、ジフェリケファリンは胎盤通過が認められるものの、ラット胚・胎児発生に関する試験において胎児に毒性所見は認められなかった。また授乳ラットにジフェリケファリンを反復静脈内投与すると、乳汁中にジフェリケファリンは認められるものの乳児血漿中にジフェリケファリンは認められなかった。以上の結果から、妊娠及び授乳期のラットにジフェリケファリンを反復静脈内投与後のジフェリケファリンの胎児及び授乳中の乳児に与える影響は少ないものと考えられる。

ジフェリケファリンは、各種トランスポーター（ASBT、BCRP、BSEP、LAT1、MATE1、MATE2-K、MRP2、OAT1、OAT2、OAT3、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OCT1、OCT2、OCT3、OCTN1、OCTN2、OSTαβ、PEPT1、PEPT2、P-gp（MDR1））の基質とならないことが示唆された。また各種トランスポーター（BCRP、BSEP、LAT1、MATE1、MATE2-K、MRP2、OAT1、OAT3、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OCT3、PEPT1、PEPT2、P-gp（MDR1））の基質輸送にも阻害作用を示さなかった。以上の結果から、ジフェリケファリンは各種トランスポーターの基質や阻害剤とはならず、これらのトランスポーターに起因する薬物相互作用を引き起こす可能性が低いことを示唆している。

以上、得られた薬物動態学的プロファイル（吸収、分布、代謝、排泄及び薬物動態学的相互作用）から、ジフェリケファリンは予定臨床用量において薬物動態学的に問題となる可能性は低いと考えられる。

2.4.5.3 毒性試験

単回投与毒性試験において、静脈内投与における概略の致死量は、マウスは雌雄ともに 200 mg/kg、ラットは雌雄ともに 100 mg/kg 超、サルは雌雄ともに 16 mg/kg 超であった。

反復投与毒性試験において、一般状態（自発運動減少、嗜眠、鎮静など）の変化、並びに体重、体重増加量、摂餌量及び尿量の低値は主に投与初期にみられ、回復期間までには消失した。いずれも薬理作用に伴う二次的な変化と考えられ、毒性学的意義は低いと判断した。ラット 26 週間反復静脈投与毒性試験の雄において、25 mg/kg/day で軽微から軽度の両側性の精巣の精細管の胚上皮変性及び/又は精巣上体の管腔細胞片が認められた。雄の無毒性量 2.5 mg/kg/day では両側性の精巣病変は認められなかった。なお、サルを用いたいずれの試験においても、ジフェリケファリンに関連した上記の精巣、精巣上体の病理組織学的変化は認められなかった。反復静脈内投与毒性試験における無毒性量は、ラットでは 4 週間試験で 5 mg/kg/day、13 週間試験で 25 mg/kg/day、26 週間試験で雄 2.5 mg/kg/day、雌 25 mg/kg/day、サルでは 4 週間試験で 0.25 mg/kg/day、13 週間試験で 1 mg/kg/day、国内実施の 39 週間試験で 1 mg/kg/day 及び米国実施の 39 週間試験では 0.25 mg/kg/day であると考えられた。

遺伝毒性試験はいずれも陰性であり、マウス及びラットのがん原性試験においても発がん性が認められなかったことから、ジフェリケファリンはヒトにおいて発がん性を示さないものと考えられる。

生殖発生毒性試験では、ラット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 2.5 mg/kg/day 以上の雌で性周期発情休止期の延長がみられ、0.25 mg/kg/day 以上の雌で性周期回数が減少した。しかしながら、交尾能、受胎能、着床及び初期胚発生への影響は認められなかった。ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験では、いずれの試験でも催奇形性は認められなかった。ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、0.6 mg/kg/day 以上で自発運動の減少、体重増加量及び摂餌量の減少がみられたが、母動物の妊娠期間、同腹児数、生存児数、分娩時症状観察及び剖検において、ジフェリケファリンに関連した所見はみられなかった。出生児（F_1）及び胎児（F_2）においても異常はみられなかった。以上より、母動物の生殖機能及び初期胚発生、胚・胎児発生あるいは出生児の発育・生殖機能に対する無毒性量は、受胎能及び初期胚発生試験では母動物生殖機能 0.25 mg/kg/day、初期胚発生 25 mg/kg/day、ラット胚・胎児発生試験では母動物生殖機能、胚・胎児発生ともに 25 mg/kg/day、ウサギ胚・胎児発生試験では母動物生殖機能 0.05 mg/kg/day、胚・胎児発生 0.1 mg/kg/day、出生前後発生並びに母動物機能試験では母動物生殖機能、出生児発育・生殖機能とも 10 mg/kg/day であると考えられた。

局所刺激性試験では、MR13A9（ジフェリケファリン製剤）の刺激性は軽度であったことから、ヒトへの投与時に血管外へ漏出した場合の忍容性は良好であると考えられた。

薬物依存性試験において、報酬効果、強化効果は認められず、自覚効果は低レベルであった。身体依存性試験では、退薬症状及び身体依存の徴候は認められなかった。したがって、ジフェリケファリンの臨床使用において精神依存及び身体依存を発現する可能性は極めて低いと考えられる。

以上から、ジフェリケファリンの各種毒性試験において、一般状態で薬理作用に関連する種々の変化がみられたが、臨床使用に際して問題となるような重篤な毒性はみられなかった。遺伝毒性のリスクはなく、がん原性についてはジフェリケファリンに関連する腫瘍の発生は認められなかった。生殖発生毒性試験では、母動物の性周期に影響はみられたが、初期胚発生に対する影響、催奇形性、出生児の発育・生殖機能に対する影響は認められなかった。したがって、ジフェリケファリンは予定している臨床用量において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考えられる。

2.4.5.4 結論

以上のことから、非臨床試験で評価したジフェリケファリンの薬理作用、薬物動態及び毒性のプロファイルは十分に特徴づけられており、本薬をヒトの治療薬として使用することは妥当であると考えられる。

2.4.6 参考文献一覧

C.T. Viswanathan, Surendra Bansal, Brian Booth, Anthony J. DeStefano, Mark J. Rose, Jeffrey Sailstad, et al. Workshop/Conference report - quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. AAPSJ. 2007a;9(1):E30-E42.［資料 4.3-1］

C.T. Viswanathan, Surendra Bansal, Brian Booth, Anthony J. DeStefano, Mark J. Rose, Jeffrey Sailstad, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. Pharm Res. 2007b;24(10):1962-1973.［資料 4.3-2］