# 2.4 非臨床試験の概括評価

## 目次

略語一覧 4
2.4.1 緒言 5
2.4.1.1 対象疾患 5
2.4.1.2 製剤の経緯 6
2.4.1.3 化学的特性と処方 6
2.4.1.4 非臨床開発戦略 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 9
2.4.2.1.1 *In vitro* 試験 9
2.4.2.1.2 *In vivo* 試験 9
2.4.2.2 副次的薬理試験 11
2.4.2.3 安全性薬理試験 12
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 12
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.3.1 角膜での取り込みと除去 12
2.4.3.2 経口投与及び皮下投与後の血漿への分布 13
2.4.3.3 組織分布 15
2.4.3.4 代謝と排泄 16
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用（非臨床） 16
2.4.3.6 考察及び結論 16
2.4.4 毒性試験 16
2.4.4.1 単回投与毒性試験 17
2.4.4.2 反復投与毒性試験 18
2.4.4.3 遺伝毒性試験 18
2.4.4.4 がん原性試験 18
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 19
2.4.4.6 局所刺激性試験 19
2.4.4.7 添加剤及び不純物 21
2.4.4.8 光安全性試験 22
2.4.5 総括及び結論 22
2.4.6 引用文献 24

## 表一覧

表 2.4.1-1 システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の定量的及び定性的組成 7
表 2.4.1-2 臨床製剤（1st clinical formula）の定量的及び定性的組成 8
表 2.4.2-1 システアミンの薬効を裏付ける in vitro 試験及び in vivo 試験 9
表 2.4.2-2 Ctns-/-マウスを使用したシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の有効性試験デザインの概要 10
表 2.4.2-3 試験の最後の 2 ヵ月におけるシスチン結晶の数 10
表 2.4.3-1 ラットにシステアミンを強制経口投与したときの RBC、血漿、大脳、小脳中のシステアミン平均濃度±SD（タンパク質 1 mg 中の pmol。各測定時点で n=3） 15
表 2.4.4-1 システアミンの非臨床安全性試験の重要事項の概要 17
表 2.4.4-2 申請者が依頼者として実施したシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の非臨床局所刺激性試験 19

表 2.4.4-3 「2 番目の」臨床処方とシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の定性的及び定量的組成..20
表 2.4.4-4 ウサギにシステアミン塩酸塩点眼液 0.55% 50 µL を 1 日 4 回、最長 3 ヵ月間右眼に投与したときの検査項目及び日程 ..... 21

## 図一覧

図 2.4.3-1 ウサギの角膜におけるシステアミンの平均濃度±SD（n=4）。ほぼ同じ成分であるが濃度の異なるシステアミンを投与した ..... 13
図 2.4.3-2 小児シスチン症患者（n=11）にシステアミン（250～550 mg）を単回経口投与したときのシステアミンの平均血漿中濃度-時間プロファイル（±SD）(34) ..... 14
図 2.4.3-3 健康成人男性 6 例に、ニシスタゴンカプセル 150 mg を 7 カプセル（システアミンとして 1,050mg）絶食時に単回経口投与した場合の血漿中システアミン濃度推移及び薬物動態パラメータ ..... 14
図 2.4.3-4 マウスに 50 mg/kg（システアミン換算量として）を sc 投与したときの平均血漿中濃度-時間プロファイル（±SD）(36) ..... 15

**略語一覧**

| 略語 | 英語 |
|---|---|
| ALT | Alanine Aminotransferase（アラニンアミノトランスフェラーゼ） |
| AST | Aspartate Aminotransferase（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ） |
| CNS | Central Nervous System（中枢神経系） |
| CSF | Cerebrospinal Fluid（脳脊髄液） |
| CVI | Crystal Volume Index（結晶量インデックス） |
| ESRD | End Stage Renal Disease（末期腎不全） |
| GMP | Good Manufacturing Practice（医薬品の製造管理及び品質管理の基準） |
| HPLC-MS | High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometer（液体クロマトグラフィー質量分析法） |
| ip | Intraperitoneal（腹腔内） |
| irSS | Immunoreactive Somatostatin（免疫反応性ソマトスタチン） |
| LOEL | Lowest-Observed-Effect Level（最小影響量） |
| NAC | N-Acetyl-Cystein（N アセチルシステイン） |
| NALFD | Non-Alcoholic Fatty Liver Disease（非アルコール性脂肪肝） |
| NOAEL | No Observed Adverse Effect Level（無毒性量） |
| PRL | Prolactin（プロラクチン） |
| PSUR | Periodic Safety Update Report（安全性定期報告） |
| RBC | Red Blood Cells（赤血球） |
| sc | Subcutaneous（皮下） |
| SCE | Sister Chromatid Exchange（姉妹染色分体交換） |
| SS | Somatostatin（ソマトスタチン） |
| TG2 | Transglutaminase 2（トランスグルタミナーゼ 2） |
| US-NIH | US-National Institutes of Health（アメリカ国立衛生研究所） |

## 2.4.1　緒言

### 2.4.1.1　対象疾患

シスチン症は、リソソームによる輸送の欠損が原因で生じる常染色体劣性のまれな遺伝疾患であり、アミノ酸のシステインがジスルフィド結合したシスチンの細胞内蓄積を特徴とする[1), (2), (3)]。発症率は 10 万人～20 万人に 1 人と推定され、フランス（ブルターニュ）、ドイツ、英国、及びケベック州のフランス語圏でクラスターが報告されている。原因遺伝子は、リソソームからシスチンを運び出す 367 アミノ酸からなる膜内在性タンパク質のシスチノシンをコードする CTNS である[4), (5), (6)]。シスチノシンが欠乏又は欠損するとリソソーム中にシスチンが蓄積し、腎臓、眼（網膜色素上皮、結膜、角膜）及び骨髄、リンパ節、腸、脾臓、肝臓、膵臓、生殖腺、甲状腺、筋肉、中枢神経系など、多くの組織に結晶が沈着する。

CTNS 遺伝子変異の種類によって表現型もさまざまであり、表現型はシスチノシンの活性がどの程度残っているかによって異なる[7), (8)]。通常、シスチン症の表現型は、発症年齢及び症状の重症度によって 3 種類に分類される[2), (9)]。

- 「腎障害型」は、最も重症度の高い病型であり、全体の 95%を占める。出生時には正常であるが、生後 6 か月頃から特発性ファンコーニ症候群（腎尿細管機能障害）を発症し、体重増加不良、アシドーシス、筋緊張低下、くる病、多飲多尿が発現する。また、2 歳頃までにシスチン結晶が眼球角膜に沈着し、痛みや羞明を引き起こす。未治療の場合、10 歳頃までに末期腎不全（end stage renal disease；ESRD）に進行する。
- 「中間型」は、全体の約 5%にみられる病型である。発症年齢（10 代）が遅いことを除き，腎障害型と同様の症状を呈する。腎機能不全や羞明がおもな初発症状である。未治療の場合、10 代後半から 20 代半ばで ESRD に進行する。
- ［非腎型］は、腎障害は伴わず，臨床症状は角膜へのシスチン結晶の蓄積による羞明である。重篤な症状がなく、自覚症状がないことも多いため、診断年齢は幅広い。症例数は非常に少ない。

腎障害型シスチン症は、典型的な病歴、及び角膜におけるシスチン結晶と多形核白血球中の高レベルのシスチンの存在に基づいて診断する[10)]。

初期には、腎臓と眼に臨床症状が現れる。幼児に多尿・多飲症、脱水、アシドーシス及び成長障害がみられる場合にシスチン症が疑われ、腎性ファンコーニ症候群患者及び角膜のシスチン結晶がみられる場合にも全般的に疑われる。通常の症状には、高アミノ酸尿、高血糖を伴わない中等度の糖尿、$\beta_2$ミクログロブリンとリゾチームを伴うネフローゼ症候群又は尿細管性蛋白尿、及びリン酸尿症などがある[11)]。腎糸球体損傷は 2～5 歳に明らかとなり、早期に治療を開始しないと 10 歳になる前に末期腎不全になる[3)]。

シスチン症の治療としては、尿細管の機能障害から生じる血漿の障害を補正することを目的とした対症療法、及び細胞内に蓄積したシスチンのレベルを下げ、腎不全やその他の臓器損傷の進行を遅らせることを目的としたシステアミンの経口投与[12)]が行われる。システアミンは膜透過性化合物で、リソソームに入り、シスチンのジスルフィド交換反応に関与し、システイン及びシステイン-システアミン混合ジスルフィドを形成する。これらは、欠乏したシスチノシン以外のトランスポーター、特にリジントランスポーターを使用してリソソームから出る[13), (14)]。

ただし角膜には血管がないため、システアミンを全身投与しても角膜のシスチン結晶に対する治療効果はない[15)]。シスチン症の治療を行わないと、角膜に沈着したシスチン結晶により羞明、潰瘍性角膜症、角膜実質浮腫が生じ、視力が損なわれる。角膜中のシスチン結晶を溶解するには、シスチン症患者においてはシステアミンを含有する点眼薬を使用する必要がある。

欧州では、システアミンを含む点眼薬処方は主に、シスチン症患者の管理を行っている病院の

薬局で調製している。システアミン点眼剤には種々の塩（塩酸塩又はリン酸塩）が用いられている。点眼薬中の濃度は薬局によって 0.10%～1.13%の幅がある。これらの点眼薬処方の用法用量も様々であり、最高では起きている間 1 時間に 1 回点眼する必要があり、コンプライアンス低下の原因となりうる。患者のコンプライアンスを改善し、視力を改善するには、点眼回数を減らして使いやすくした標準化された処方を提供することが重要である。システアミン塩酸塩点眼液 0.55%はこのようなニーズに応えるために、他のシステアミン製剤と比べてシステアミンの含有量が多く、粘度が高い薬剤として開発された。

### 2.4.1.2　製剤の経緯

経口システアミンとしては次のような薬剤が市販されている。

- Cystagon®：硬カプセル剤で、システアミン（システアミン酒石酸塩として）50 mg 又は 150 mg を含む。本剤は 1997 年 6 月 23 日に中央審査方式で承認され、製造販売業者は Orphan Europe SARL（2019 年 4 月 5 日付で Recordati Rare Diseases SARL に社名変更）である。
- Procysbi®：胃耐性硬カプセルで、システアミン（システアミン酒石酸塩として）25 mg 又は 75 mg を含む。本剤は希少疾病用医薬品で、2013 年 9 月 6 日に中央審査方式で承認され、製造販売業者は Raptor Pharmaceuticals Europe BV（2016 年 10 月 25 日付で Horizon Therapeutics が買収）である。

システアミンは経口投与しても角膜のシスチン結晶沈着を消失させないが、アメリカ国立衛生研究所（US-National Institutes of Health；US-NIH）処方など各処方に従って各薬局が種々の点眼薬を調製している。現在のシステアミン点眼薬処方の多くは、角膜のシスチン結晶沈着を防ぐた
めに一生にわたり 1～2 時間ごとに点眼する必要がある。

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%は、現在使用されている点眼薬に比べて 1 日の点眼回数が少なく使いやすい、医薬品の製造管理及び品質管理の基準（Good Manufacturing Practice；GMP）に基づいたシステアミン点眼薬処方を患者に提供するというアンメットメディカルニーズに応えるために開発された。

### 2.4.1.3　化学的特性と処方

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%は、水溶性の白い結晶性粉末で分子量 113.61 g/mol（CAS：156-57-0）のシステアミン塩酸塩（$HSCH_2CH_2NH_2 \cdot HCl$）を含有する。システアミンは最も簡単で安定なアミノチオールで、アミノ酸システインの分解産物である。これは体内で、パントテン
酸とアデノシン三リン酸に結合して、生化学的に重要な補酵素 A を形成するために使用される。

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%はシステアミン塩酸塩 0.55%を含む粘性のある点眼薬である。表 2.4.1-1 に定性的及び定量的組成を示す。

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%はシスチン症患者の角膜シスチン結晶沈着の治療として適応となる（用法は、起きている時間に両眼に 1 滴ずつ、1 日に 4 回）。

**表 2.4.1-1 システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の定量的及び定性的組成**

| 組成：処方（百分法）（w/w） | システアミン塩酸塩点眼液 0.55% |
|---|---|
| システアミン塩酸塩 | 0.55% |
| カルメロースナトリウム[redacted] | [redacted]% |
| 塩化ベンザルコニウム | [redacted]% |
| エデト酸ナトリウム | [redacted]% |
| クエン酸一水和物 | [redacted]% |
| [redacted] | [redacted]% |
| [redacted] | [redacted]% |
| [redacted] | QS pH=4.4 |
| 注射用水 | QS 100.00% |

Source: 2.3P 表 1

### 2.4.1.4　非臨床開発戦略

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%について新たに行われた非臨床薬理試験及び毒性試験は限られているが、経口処方のシステアミン（システアミン酒石酸塩としてシステアミン 50 mg 又は 150 mg を含む硬カプセル）がすでに市販されていること、及び臨床では各処方で調製された種々の点眼薬が長期にわたって使用されていることから、非臨床データパッケージはシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の製造販売承認申請に適切であると考えられる。また、最近実施された本邦における健康成人男性 6 例を対象とした第 I 相試験において、右眼にシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 滴投与する単回点眼投与を行った結果、内因性システアミンを明らかに超えるような血漿中システアミン濃度の上昇は確認されなかった。また、両眼にシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 1 滴 1 日 4 回 7 日間投与した結果、反復投与による蓄積性は認められなかった。7 日間の反復投与後、8 日目に単回投与し、投与後の血漿中システアミン濃度を測定した結果、治験薬投与 0.083 時間後および 0.25 時間後にわずかな上昇が認められた。この上昇は、治験薬の投与による上昇と考えられたが、治験薬投与後のシステアミンの曝露量は、ごくわずかであることが示唆された（2.7.2）。このことは、理論計算で点眼薬として推奨される 1 日投与量（システアミン換算量として）は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることとも一致している。

アルビノウサギの角膜でシステアミンの濃度を測定する HPLC-MS の方法を開発、バリデートし（4.2.2.1-1、4.2.2.1-2）、臨床処方を選択するための試験に使用した。

オリエンテーション試験として、種々のゲル処方で調製したシステアミンと US-NIH 標準溶液でシステアミンの角膜内濃度を比較する試験を実施した（4.2.2.7-1、4.2.2.7-4）。

システアミンの眼内濃度は下記に応じて決定される：

- 処方に含まれるシステアミン濃度（4.2.2.7-2、4.2.2.7-5）、及び
- ゲル化剤の種類と粘度（4.2.2.7-1、4.2.2.7-4）

一般的にシスチン症でみられる眼症状を呈する C57/Bl/6 系統の CTNS -/-ノックアウトマウスに、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を長期にわたり連日反復投与し、シスチン結晶を低減する有効性、及び眼忍容性を評価した（4.2.1.1）。

カルメロースナトリウムを含有するシステアミン塩酸塩粘稠液についても、眼の局所的忍容性をウサギで評価した。短期投与試験ではゲル 50 µL を 20 分間に 5 回投与し（4.2.3.6-2）、長期投与試験では右眼に 50 µL を 12 週間にわたり反復投与（1 日 3 回又は 6 回）した（4.2.3.6-1）。4.2.3.6-1 で使用した処方は、最初の臨床試験で使用した製剤の処方（1st clinical formula）と同じ

である（詳細は以下の表 2.4.1-2）。臨床開発では粘性を維持するためにカルメロースナトリウムの量をわずかに増やし、2nd clinical formula とした。

製造工程の最適化では、粘性を維持するためにカルメロースナトリウムの濃度を再度調節した。局所忍容性試験（4.2.3.6-3）を行い、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の臨床製剤（2nd clinical formula）と Pre-Industrial formula の本質的な同一性を裏付けた。ウサギの眼忍容性は、臨床製剤（1st clinical formula）と Pre-industrial formula を 1 ヵ月及び 3 ヵ月にわたって連日投与して評価した。

申請者はシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の製造販売承認申請時に、システアミンの非臨床薬理及び毒性について 1980 年から 1996 年 6 月まで検索した文献を提出している。過去のデータを補完するために、2013 年までの期間をカバーする文献検索を実施した。要約のセクションと非臨床試験の概要では、新しい文献データも適宜含めた。

**表 2.4.1-2 臨床製剤（1st clinical formula）の定量的及び定性的組成**

| 組成：処方（百分法）（w/w） | 臨床製剤<br>（1st clinical formula） |
|---|---|
| システアミン塩酸塩 | 0.55% |
| カルメロースナトリウム[redacted] | [redacted]% |
| 塩化ベンザルコニウム | [redacted]% |
| エデト酸ナトリウム | [redacted]% |
| クエン酸一水和物 | [redacted]% |
| [redacted] | [redacted]% |
| [redacted] | [redacted]% |
| [redacted] | QS pH=4.4 |
| 注射用水 | QS 100.00% |

Source: 2.3P 表 7

### 2.4.2 薬理試験

システアミンは哺乳類細胞の自然な産物で、アセチル補酵素 A 分子の末端領域を形成する。システアミンはアミノ酸システインの分解産物であり、酵素パンテテイナーゼの作用によるアセチル補酵素 A の酵素分解で生じる(16)。システアミンは腎性シスチン症で使用できる唯一の治療薬であるが、アセトアミノフェン肝毒性の管理にも使用されており、現在、非アルコール性脂肪肝及びハンチントン病を対象とした臨床試験も行われている。

システアミンの薬効を裏付ける試験として、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験が行われている（表 2.4.2-1）。

**表 2.4.2-1 システアミンの薬効を裏付ける *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験**

| 試験系 | 投与経路／用量 (mg/kg) | 主な結果 | 参考 |
|---|---|---|---|
| シスチン症のヒト皮膚線維芽細胞 | *In vitro*<br>0.1、1mM | 0.1 mM を投与すると、遊離シスチン含有量は 15 分以内に 50%、1 時間以内に 90%減少した。 | Thoene et al., 1976 |
| シスチン症のヒト胎性線維芽細胞 | *In vitro*<br>- | システアミンを投与したときに、シスチン症線維芽細胞のリソソームからシスチンが除去される程度を評価した。 | Pisoni et al., 1985 |
| Ctns ヌル（Ctns−/−）マウス | 1 日 3〜6 回、5 ヵ月にわたり点眼 | 眼で自然に生じる結晶の増加に対する阻害作用は、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の 1 日 6 回投与ではみられたが、3 回投与ではみられなかった。 | 4.2.1.1 |
| Ctns ヌル（Ctns−/−）マウス | 4 週間にわたり点眼 | システアミン点眼薬（0.55%）を投与した眼では、対照眼に比べ結晶量指標で測定した結晶の蓄積が有意に減少した（$p<0.001$）。 | Simpson et al., 2011 |

### 2.4.2.1　効力を裏付ける試験

#### 2.4.2.1.1　*In vitro* 試験

シスチン症患者由来の培養線維芽細胞は、細胞内非タンパク質シスチン含有量を低下させる方法を評価する、便利な *in vitro* 試験系を提供する[12]。1 mM 及び 0.1 mM のシステアミンを投与すると培養線維芽細胞の遊離シスチン含有量は 1 時間以内に 90%超減少し、0.1 mM システアミンを培地に添加すると最初の 15 分間で 50%低下した。

Pisoni らは[14]、システアミンがシスチン症の組織においてシスチン枯渇作用を示すことを、培養線維芽細胞を使用して明らかにし、システアミンがシスチンと反応してシステイン及びシステイン-システアミン混合ジスルフィドを形成し、これらはインタクトなリジンの輸送システムによってリソソームから排出されることを示した。

#### 2.4.2.1.2　*In vivo* 試験

シスチノシンをコード化する遺伝子 CTNS のマウスホモログは、ヒト 17p13 と相同である第 11 染色体の領域にある。Cherqui らは、シスチン症の病因の理解を深め、候補となる治療薬を評価するモデルシステムを開発するために、胚性幹細胞で遺伝子ターゲティングを用いて最初のマウスモデルを作成し、Ctns ヌル（Ctns−/−）マウスの臨床的、組織学的、及び生化学的表現型を発表した[17]。Ctns−/−マウスでは、検討したすべての臓器でシスチンが蓄積しており、最高濃度は一貫して肝臓にみられ、最低濃度は脳にみられた。この蓄積は出生時から存在し、時間と共に増加した。シスチン結晶も観察され、マウスにはシスチン症患者と同様の眼の変化が生じた。

2007 年に、シスチン症で一般的にみられる眼症状が予想どおりに生じている C57/Bl/6 系統の

ノックアウトマウス（Ctns-/-マウス）にシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%臨床処方（臨床製剤（1st clinical formula)）を 1 日 3～6 回点眼し、シスチン結晶低減効果と眼忍容性を長期に評価した（4.2.1.1)。試験には月齢約 4 ヵ月の動物を使用した。試験のデザインの概要を表 2.4.2-2 に示す。

**表 2.4.2-2 Ctns-/-マウスを使用したシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の有効性試験デザインの概要**

| 群 | 処理 | 投与 | | 評価 | 動物数 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 最初の 3 か月 | 4 か月以降 | | 雄 | 雌 |
| 1 | 無処理 | - | - | 眼の観察（スリットランプ）<br>角膜の共焦点顕微鏡検査（製品名：HRT-II） | 2 | 5 |
| 2 | システアミン塩酸塩点眼液 0.55% | 連日 8 時間以内に 3 回 5 µL を点眼 | 連日 8 時間以内に 6 回 5 µL を点眼 | | 7 | 5 |
| 3 | NIH | n/a | | | 3 | 2 |

Source: 4.2.1.1 Section 7.1

最初の 3 ヵ月は、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%投与マウス及び未投与マウスで結晶の数に違いはなかった。標準偏差は大きく、未投与マウス数匹では、結晶数が大きく増加することはなかった。

未投与マウスでは 3～4 ヵ月目からシスチン結晶形成が明らかに進行し、結晶の形成の進行をシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%投与マウスと NIH 処方投与マウスで比較したところ、システアミンの 1 日 6 回点眼で結晶形成の増加が停止すると考えられた（表 2.4.2-3)。

**表 2.4.2-3 試験の最後の 2 ヵ月におけるシスチン結晶の数**

| 投与 | シスチン結晶の総数（平均±SD／n は眼の数） | | |
|---|---|---|---|
| | Month 3 | Month 4 | Month 5 |
| 未投与 | 1,295.0 ± 584.5 (n=11) | 1,848.4 ± 574.6 (n=8) | 2,012.5 ± 721.2 (n=8) |
| NIH 溶液 1 日 6 回 | 1,631.5 ± 399.3 (n=7) | 1,416.5 ± 363.4 (n=8) | 1,473.6 ± 374.3 (n=8) |
| システアミン塩酸塩点眼液 0.55% 1 日 6 回 | 1,255.4 ± 531.9 (n=16) | 1,009.0 ± 351.8 (n=17) | 1,183.2 ± 597.5 (n=17) |

Source: 4.2.1.1 Section 10.1.2

Ctns-/-マウスを使用したこの試験では、システアミン塩酸塩点眼液 0.55% 5 µL の 1 日 3 回の点眼を 3 ヵ月継続しても明らかな利益は示されなかった。点眼頻度を 1 日 6 回に増やし、NIH システアミン溶液と比較したところ、いずれの処置でも明らかに等しい、好ましい効果が観察された。しかし、未投与マウスでの結晶形成も投与マウスでの投与に対する反応も、変動が大きかった。角膜混濁の重症度を定性的に評価したが、投与マウスと未投与マウスに明らかな違いはみられなかった。

システアミン点眼剤がシスチン結晶量に与える作用を Ctns-/-マウスで評価した別の試験が最近報告された[18]。この試験では未投与マウスとシステアミン投与マウスを 5 匹ずつ使用し、*in vivo* 共焦点顕微鏡で結晶量インデックス（crystal volume index；CVI）として変化を検出した。0.55%溶液は 1 日 4 回、1 ヵ月にわたって点眼した。比較試験の前に、未投与 Ctns-/-マウス 25 匹を使用して、シスチン結晶量の経時的な増加を測定した。その結果、CVI の増加は月齢 3 ヵ月から生じ、8 ヵ月でピークに達することが示された。比較試験では月齢 5 ヵ月の Ctns-/-マウスを使用し

たところ、投与 1 ヵ月後にすでにシステアミン投与の作用が明らかになり、CVI の増加はシステアミン投与マウスで 15%、未投与マウスで 173%であった（各動物の両眼を評価し、カウントした）。

#### 2.4.2.2　副次的薬理試験

種々の用量／濃度のシステアミンについて、リソソーム内のシスチン枯渇作用以外の薬理作用が報告されている。最も重要な作用は、(a) 細胞内グルタチオンレベルが増加することによる抗酸化作用（上記参照）、(b) トランスグルタミナーゼ 2 の阻害、及び (c) 組織ソマトスタチンとプロラクチンの枯渇によるものである。システアミンの細胞に対する作用として、上記とは別に、カスパーゼ 3 の阻害、ヒートショックタンパク質の誘導及びメタロプロテイナーゼ発現の低減[19]も報告されているが、研究は進んでいない。繰り返しになるが、点眼薬として推奨される 1 日投与量（システアミン換算量として）は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることを留意する必要がある。

*抗酸化活性*

システアミンの抗酸化作用は、システインの細胞内取り込みを加速し、酸化作用を有する物質に対する細胞防御で主な役割を果たす細胞内グルタチオンの合成を間接的に増加させる性質によると考えられている[20]。現在、治療用抗酸化物質としてのシステアミンの臨床的有用性は、非アルコール性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver disease；NALFD）を対象として検討されている[21]。小児 13 例に 300～1000 mg のシステアミンを 1 日 2 回投与した第 IIa 相試験では、十分に期待がもてるアラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase；ALT）とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase；AST）低減効果がみられ、この患者集団における第 IIb 相試験の根拠が得られた。

*トランスグルタミナーゼ 2 の阻害*

また、システアミンはハンチントン病の治療薬としても研究されており、この神経疾患における効果にはいくつかの機序が寄与していると考えられるが、多くの公表文献では、最初に提案されたトランスグルタミナーゼ 2（Transglutaminase 2；TG2）に対する阻害作用に重点が置かれている[22]。ハンチントン病患者では種々の脳領域で TG2 の活性が亢進しており、変異ハンチンチンの存在下でアクチン-コフィリンのクロスリンクが生じ、細胞のストレス耐性が弱くなって死に至るという観察が報告されており[23]、この観察に基づいて、ハンチントン病に対するシステアミンの潜在的効果が研究されている。

*組織ソマトスタチンとプロラクチンの枯渇*

すでに 1980 年初期には、げっ歯類にシステアミン約 30 mg/kg を経口又は皮下で単回投与すると、種々の臓器で免疫反応性ソマトスタチン（immunoreactive Somatostatin；irSS）が有意に低減することが示されている[24), (25), (26]。その後、システアミンは組織から irSS 分子を枯渇させるのではなく、化学構造を変え、RIA 法で検出できなくなっていることが見いだされた[27]。システアミンがウサギの網膜の irSS に与える作用は、システアミン 0.3～10 mg を 24 時間の間を空けて硝子体内に 2 回注射する試験で評価されている[28]。irSS は 2 回目の注射から 24 時間後の時点で約 50%減少し、10 mg を投与しても特異的な網膜の損傷は生じなかった。

また、システアミンを *in vitro* 又は *in vivo* でラットの下垂体前葉及び血液に投与するとプロラ

クチン（Prolactin；PRL）の生物学的及び免疫学的活性が急速、用量依存的、かつ可逆的（irSS と同様）に枯渇することも示されている[29]。システアミンのプロラクチンに対する作用とソマトスタチン（somatostatin；SS）不活化作用の機序はほぼ同じであり、プロラクチン分子のジスルフィド結合と相互作用して免疫学的及び生物学的に不活化するのではないかと示唆されている。

#### 2.4.2.3　安全性薬理試験

システアミンを点眼投与した場合、点眼薬による全身曝露は非常に少ないと予想されるため、システアミンの局所投与について、標準の安全性薬理試験は行われていない。げっ歯類に 50 mg/kg 以上を経口投与すると中枢神経系（Central Nervous System；CNS）に対する作用がみられるが[30), (31), (32), (33]、これらの作用は点眼投与時に発現する懸念はないものと考えられる。

また、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の点眼薬として推奨される 1 日投与量（システアミン換算量として）は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であるため、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%で呼吸器又は心血管系に対する作用は生じないと予想される。

#### 2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用

具体的な薬力学的薬物相互作用試験は行っていない。システアミンは実験動物でソマトスタチンのレベルを下げ、行動、成長ホルモン、インスリンレベルに作用することが示されている。点眼薬として推奨される 1 日投与量（システアミン換算値として）は、任意の年齢のシスチン症患者に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることから、経口システアミンでみられた臨床的に意味のある薬力学的相互作用に加えて、点眼システアミンによる意味のある作用が生じる可能性はないと考えられる。

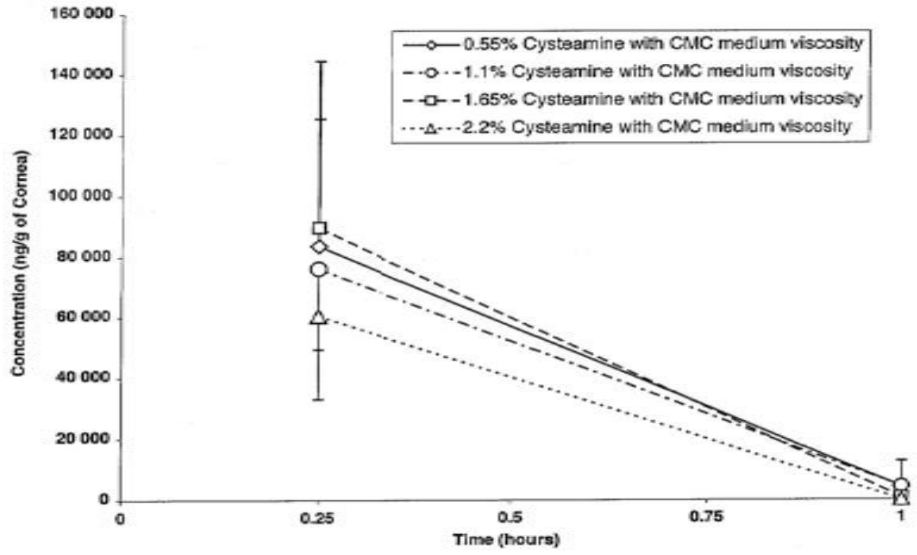
### 2.4.3　薬物動態試験

システアミンを点眼したときの全身吸収や組織分布の程度については、ウサギの角膜における取り込みと除去に関する情報を除いて情報は得られていない。ヒトに経口投与したときの血漿への分布は確認されており、マウスとラットに経口及び皮下投与したときの情報も得られている。システアミンを外因性に投与した後のクリアランス機序については限られた情報しかないが、内因性代謝については文献で適切に記述されている。以下の項では、これらのデータセットから関連のあるデータを要約する。

#### 2.4.3.1　角膜での取り込みと除去

ウサギにシステアミン塩酸塩を点眼したときの角膜での取り込みと除去を評価するために、HPLC-MS 法を開発した（4.2.2.1-2、4.2.2.1-1）。この試験では種々の処方及び同じ処方で種々の濃度を使用した。システアミン 100 µL をウサギに点眼すると、角膜から急速に除去された。定量可能な最終時点は正確には決定できなかったが、Pre-Industrial 処方とほぼ同じ量のカルメロースナトリウムを含有するシステアミンを使用したとき、定量可能なシステアミンが検出されたのは投与後 1 時間までであった（4.2.2.7-1、4.2.2.7-2、4.2.2.7-4、4.2.2.7-5）。濃度を定量したのは 2 時点だけであったため（0.25 時間と 1 時間）、これらの処方について角膜からの消失半減期は決定できなかった。システアミンの角膜中濃度と点眼薬処方中の濃度に明らかな関係はなかった

（図 2.4.3-1；4.2.2.7-2、4.2.2.7-5）。システアミン 0.55%を含むがカルメロースナトリウムを含まない 2 種類の処方を点眼し、角膜での取り込みと除去を評価したところ、角膜における濃度-時間プロファイルから、消失半減期は約 1 時間であることが示唆された（4.2.2.7-3）。




Source: 4.2.2.7-2 Figure 1

**図 2.4.3-1 ウサギの角膜におけるシステアミンの平均濃度±SD（n=4）。ほぼ同じ成分であるが濃度の異なるシステアミンを投与した**

上記のように、システアミンを点眼したとき角膜外への分布の程度は測定されていない。しかし、システアミンを局所投与したときは角膜から（上記）、経口又は皮下投与したときは血漿から（下記）急速に除去されるため、眼のその他のコンパートメントなどにシステアミンが分布しても、急速に代謝／除去されると考えられる。

### 2.4.3.2　経口投与及び皮下投与後の血漿への分布

点眼薬として推奨される 1 日投与量（システアミン換算量として）は任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であるが、全身投与した場合の血漿への分布を確認することで有用な情報が得られる可能性がある。

静脈内投与したときの血漿中薬物動態に関するデータはない。小児シスチン症患者にシステアミンを経口投与したところ（250～550 mg）、$T_{max}$ は約 1 時間で、その後 5 時間の間に比較的急速に除去された[34]（図 2.4.3-2）。健康成人男性を対象とした試験では、システアミン換算量としてで 1.05 g を投与したときの終末相の消失半減期は平均で 4.8 時間であった[35]。また、市販されているニシスタゴンカプセル 150 mg を 7 カプセル（システアミンとして 1,050 mg）、健康成人男性 6 例に単回経口投与した場合（絶食時）、$T_{max}$ は 0.92±0.56 時間であり、消失半減期は 4.90±0.65 時間であり、Schneider らによる報告と近似する結果となった（図 2.4.3-3）。

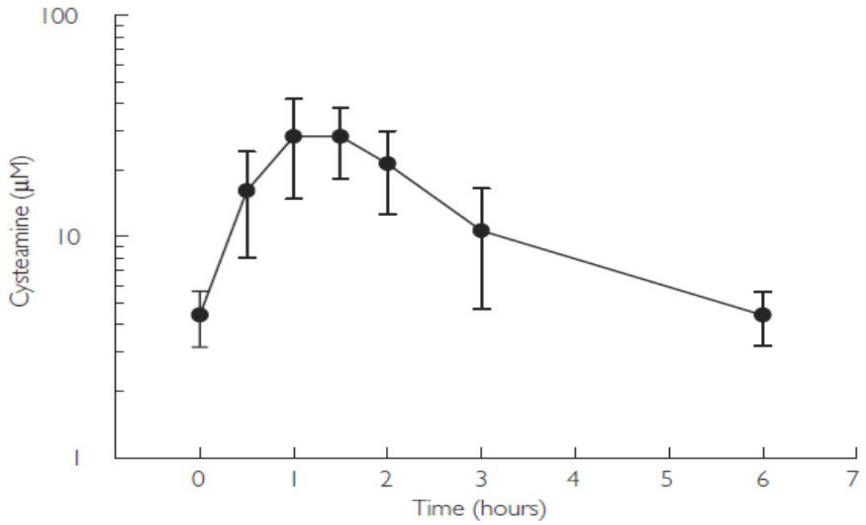
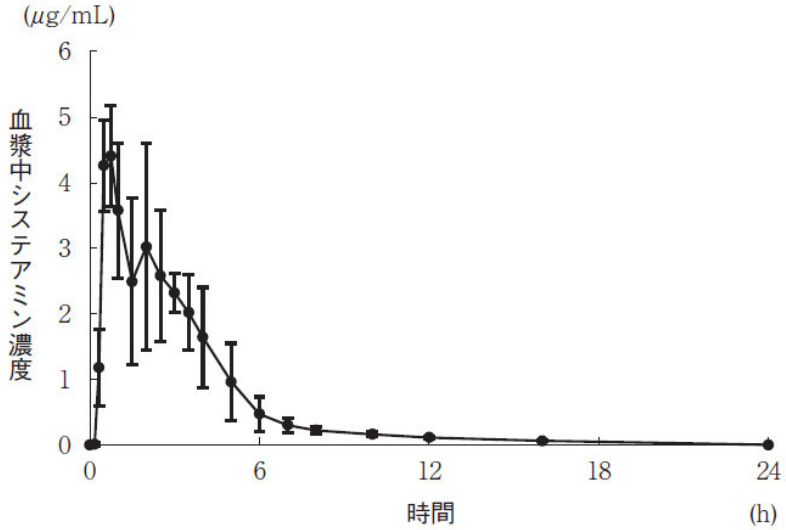



図 2.4.3-2 小児シスチン症患者（n=11）にシステアミン（250～550 mg）を単回経口投与したときのシステアミンの平均血漿中濃度-時間プロファイル（±SD）[34]




| $C_{max}$（μg/mL） | $AUC_{0\text{-}24h}$（μg·h/mL） | $T_{max}$（h） | $T_{1/2}$（h） |
|---|---|---|---|
| 4.83±0.57 | 14.08±1.59 | 0.92±0.56 | 4.90±0.65 |

（mean±sd、n=6）

図 2.4.3-3 健康成人男性 6 例に、ニシスタゴンカプセル 150 mg を 7 カプセル（システアミンとして 1,050mg）絶食時に単回経口投与した場合の血漿中システアミン濃度推移及び薬物動態パラメータ

マウスにシステアミンを皮下（subcutaneous；sc）投与又は腹腔内（intraperitoneal；ip）投与したときの血漿への分布に関しては、公表された試験からの情報がある[36]。動物実験で学習及び記憶に影響を及ぼすことが示されている 50 mg/kg を sc 投与すると、血漿 $C_{max}$（80 μM）は注射後迅速に観察され、血漿からの除去も急速で、投与後 2 時間ではほぼ検出できなくなった（図 2.4.3-3）。マウスにこの用量を投与したときの $AUC_{0\text{-}tlast}$（47.4 μMxh）は、患者に 500 mg（システ

アミン換算量として）を経口投与したときとほぼ同じであった[37]。

ラットの十二指腸内に 20 mg/kg を投与した薬物動態試験では、システアミンは小腸から急速に吸収され、肝臓で初回通過による大幅な代謝を受け（バイオアベイラビリティは 40%）、血液脳関門を通過し、投与後 2 時間で血漿、脳脊髄液（cerebrospinal fluid；CSF）、体内組織でほぼ検出不可能になった[38]。この用量での $C_{max}$ は 80 µM、AUC は 62.7 µMxh であり、マウスに 50 mg/kg を sc 投与したときとほぼ同じであった（上記）。このラットを使用した試験での推定全身用量 8 mg/kg（20 mg/kg の 40%）は臨床で点眼薬として使用したとき（単回投与）と比べ、mg/kg ベースでは 1200 倍超、mg/m$^2$ ベースでは 190 倍である。この結果は、システアミンを点眼したときには、有意な全身曝露はないことを明らかに示唆する。

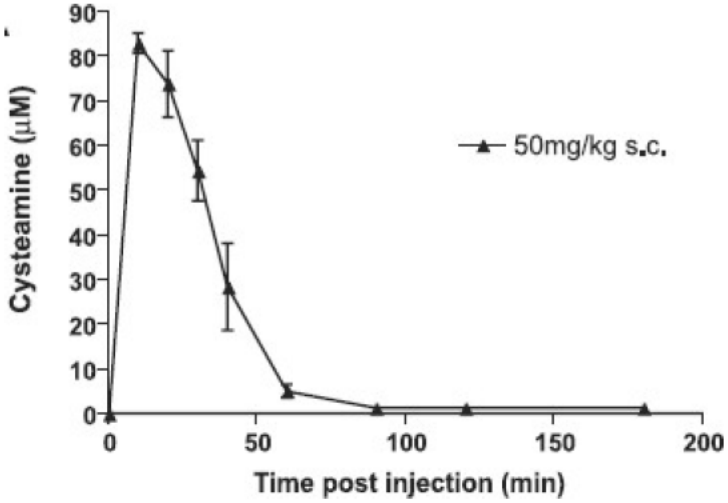



図 2.4.3-4 マウスに 50 mg/kg（システアミン換算量として）を sc 投与したときの平均血漿中濃度-時間プロファイル（±SD）[36]

### 2.4.3.3　組織分布

システアミンを全身投与したときの組織分布については、限られた情報しかない。ラットを使用した試験では、非常に高用量（250 mg/kg）のシステアミン塩酸塩を 4 時間の間隔で強制経口投与した[39]。初回投与から 0、2、6、12、24 時間後に各群の動物を安楽死させ、脳組織（大脳及び小脳）、血漿、赤血球のシステアミン含有量を評価した。表 2.4.3-1 に示すように、赤血球（red blood cells；RBC）、血漿及び大脳と小脳の組織に高濃度が観察され、濃度は 24 時間後（初回投与の 8 時間後の最終投与から 16 時間後）には明らかに低下した。このデータは、非常に高用量を投与したときのデータであるということを留意する必要がある。

表 2.4.3-1 ラットにシステアミンを強制経口投与したときの RBC、血漿、大脳、小脳中のシステアミン平均濃度±SD（タンパク質 1 mg 中の pmol。各測定時点で n=3）

| 時間 | RBC | 血漿 | 大脳 | 小脳 |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0.2 ± 0.1 | 10 ± 8 | 91 ± 65 | 20 ± 14 |
| 2 | 46 ± 29 | 26 ± 13 | 816 ± 591 | 461 ± 317 |
| 6 | 217 ± 90 | 15 ± 9 | 3910 ± 1350 | 2000 ± 299 |
| 12 | 278 ± 66 | 266 ± 88 | 5210 ± 588 | 2450 ± 290 |
| 24 | 71 ± 40 | 45 ± 30 | 962 ± 546 | 840 ± 503 |

Source: Pinto et al., 2009 Table 1

#### 2.4.3.4　代謝と排泄

システアミンは内因性化合物であるため、全身投与したときのクリアランス／代謝は、内因性のクリアランス／代謝と全く同一でなくてもほぼ同じであることが予想される。内因的には、システアミンはシステアミンジオキシゲナーゼにより、豊富なシステイン類縁体タウリンの前駆物質であるヒポタウリンに代謝される[40]。ラットにシステアミンを添加した食餌を与えると、肝臓、腎臓、脳でヒポタウリンレベルが上昇する[41]。また、システアミンはシスタチオニン $\beta$ 合成酵素により、チアリシンに変換されることもある[39]。高用量のシステアミン塩酸塩をラットに経口投与すると、チアリシンが小脳で増加した[39]。したがって、システアミンが体内組織に入ると、通常の代謝経路で代謝されると考えることは科学的に支持される。システアミンは組織から急速に除去されることは明らかであるが、これまでに得られているデータから、このプロセスに関与する他のクリアランス機序（代謝又は排泄）の有無について結論を出すことはできない。

#### 2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用（非臨床）

点眼薬として推奨されるシステアミンの 1 日投与量は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 である。さらに、経口投与したときの血漿中システアミン濃度を考えると、点眼後にシステアミンが有意な量になるとは予想されない。従来の薬物動態学的薬物相互作用試験は行っていないが、安全性には問題がないと考えられる。

#### 2.4.3.6　考察及び結論

システアミン塩酸塩を点眼投与したときの眼内分布については、限られた情報しかない。ウサギの角膜中のシステアミン濃度を測定したところ、眼内からは迅速に消失していた。ウサギの角膜から急速に除去され、ヒトの血漿からも比較的急速に除去されることから[35]、眼のその他のコンパートメントなどにシステアミンが分布しても、急速に代謝／除去されると予想される。システアミンの眼内分布については詳細な知見は得られていないが、点眼薬として推奨される 1 日最大投与量（システアミン換算量として）は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 である。さらに現在では、システアミン塩酸塩を点眼薬として長期に使用した臨床経験が得られている。眼の有害事象が経時的に進行するのであれば（特定の眼内構造でシステアミンが蓄積する可能性に関連する）、臨床安全性データベースで評価できるはずである。しかし現在のところ、眼の有害事象が経時的に有意に増加したことを示すデータは得られていない。

### 2.4.4　毒性試験

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の性質と使用法、また、点眼薬として推奨される 1 日最大量は、任意の年齢のシスチン症患者に経口薬として投与するときに推奨されるシステアミンの 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であるという事実に基づき、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の臨床開発と製造販売承認申請を支持するための安全性試験では、眼の忍容性を中心として評価した。しかし、シスチン症患者の角膜におけるシスチン結晶沈着の治療薬としてシステアミンを使用したときの臨床安全性を全体的に評価するために、この非臨床試験の概括評価に安全性の情報

を要約する。

表 2.4.4-1 に、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%及びすでに承認されている経口薬のニシスタゴンカプセルについて、関連する非臨床安全性試験の概要を示す。

**表 2.4.4-1 システアミンの非臨床安全性試験の重要事項の概要**

| 試験の種類と期間 | 化合物 | 投与経路 | 動物種 |
|---|---|---|---|
| 反復投与毒性 | | | |
| 4 週間 | システアミン塩酸塩 | 経口 | サル |
| 58 週間 | システアミン塩酸塩 | 経口 | サル |
| 13 週間 | システアミン塩酸塩 | 経口（混餌） | ウサギ |
| 遺伝毒性 | | | |
| 文献データ | システアミン | *In vitro* | |
| | | *In vitro* | マウス／チャイニーズハムスター |
| Ames 試験* | シスタゴン | *In vitro* | ネズミチフス菌 |
| 小核試験* | シスタゴン | IV | マウス |
| 生殖毒性 | | | |
| 生殖能／初期発生<br>胚胎仔発生／催奇形性 | システアミン酒石酸 | 経口（混餌） | ラット（♂、♀） |
| ○GD6～GD15 | システアミン酒石酸 | 経口 | ラット（♀） |
| ○GD6.5～GD18.5 | Phosphocysteamine | 経口 | ラット（♀） |
| ○GD7～GD19 | システアミン酒石酸 | 経口 | ウサギ（♀） |
| 周産期及び出生後の発生 | システアミン酒石酸 | 経口 | ラット |
| 局所刺激性 | | | |
| 単回投与<br>（5 回点眼、1 日） | システアミン塩酸塩 0.55% | 眼内 | ウサギ |
| 3 ヵ月反復投与 | システアミン塩酸塩 0.55% | 眼内 | ウサギ |
| 3 ヵ月反復投与* | 臨床製剤（2nd clinical formula）のシステアミン塩酸塩 0.55% vs Pre-Industrial formula のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55% | 眼内 | ウサギ |

*: GLP 試験

### 2.4.4.1　単回投与毒性試験

点眼による公式な単回投与毒性試験は行われていないが、アルビノウサギに点眼薬（濃度 0.1%～10%）を投与した局所刺激性試験の一般状態観察では、全身毒性に関連する臨床症状はみられなかった[42]。1%以上の投与ではシステアミン濃度に比例した炎症反応がみられ、無作用濃度は 0.5%であった。

また、げっ歯類にシステアミン塩酸塩を経口及び ip 投与した試験からも、単回投与毒性データが得られている。これらの試験は研究者主導試験で、データは公表論文からのデータのみである。マウスに ip 及び経口で単回投与したときの致死量（$LD_{50}$）はそれぞれ 250 mg/kg と 625 mg/kg であり[43]、660 mg/kg の単回経口投与は、ラットで致死量であると報告されている[43]。ラットに致死量に近い用量を単回経口投与すると、消化管潰瘍及び副腎の壊死がみられた[44]。

### 2.4.4.2　反復投与毒性試験

システアミンを点眼したときの一般毒性のすべての側面を評価する毒性試験は行われていない。ウサギを使用した 3 ヵ月反復投与局所刺激性試験 2 件では、主に眼に変化が生じる可能性を評価した（2.6.6.7 項）。点眼薬として推奨されるシステアミンの 1 日投与量は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることから、点眼したときの全身曝露量では、経口システアミンの一般毒性のリスクに影響を及ぼす可能性は低い。

反復経口投与したときの毒性に関する情報は、アカゲザル 2 匹を使用した 4 週間試験[45]、ウサギに混餌投与した 13 週間試験[46]、及びアカゲザル 5 匹を使用した 58 週間試験[47]から得られている。アカゲザルを使用した 58 週間試験では、投与期間中 1 群 5 匹からなる 3 群にそれぞれ 0 mg/kg、20 mg/kg～150 mg/kg の漸増投与、及び 20 mg/kg を投与した。20 mg/kg/日の投与では、一過性の軟便及び嘔吐以外に、投与に関連する作用はみられなかった。漸増投与群でも投与に関連する明らかな毒性はみられなかったが、本試験は通常とは異なるデザインのため、この投与群から得たデータの解釈には注意しなくてはならない。

ラットに経口又は皮下でシステアミンを単回又は反復投与した後に潰瘍形成が容易に誘導されるとの報告があるが[48]、アカゲザル又はウサギを使用した反復経口投与試験では、システアミンの潰瘍形成作用はみられなかった。

### 2.4.4.3　遺伝毒性試験

システアミンの遺伝毒性活性は *in vitro* 試験と *in vivo* 試験で評価した。申請者が依頼者として実施した細菌を使用した復帰突然変異試験（Ames 試験）では、変異原性はみられず[49]、公表されているサルモネラ菌を使用した Ames 試験[50]と同じ結果が得られた。

システアミンは、ヒトリンパ球を使用した姉妹染色分体交換（sister chromatid exchange；SCE）*in vitro* 試験で陰性反応を示したが[51), (52]、ハムスター卵巣細胞を使用した同様の試験では陽性反応であった[53]。V79 卵巣細胞は、システアミンが形成する過酸化水素を分解できないと考えられた。

マウスにシステアミン塩酸塩 200 mg/kg を単回投与したところ、骨髄微小核の頻度が増加した。しかし、チャイニーズハムスターの骨髄細胞にシステアミン 100 mg/kg 又は 200 mg/kg を 2 日間投与してから 6 時間後及び 24 時間後にサンプリングしたところ、染色体異常の増加はみられなかった[54]。重要なことであるが、申請者が依頼者となった *in vivo* マウス微小核アッセイでは、2 日間連続して 300 mg/kg を iv 投与し、2 回目の投与から 24 時間後及び 48 時間後に骨髄をサンプリングしたとき、骨髄微小核の増加はみられなかった[55]。

### 2.4.4.4　がん原性試験

システアミンを局所投与した場合、点眼薬による全身曝露は非常に少ないと予想されること、また遺伝毒性試験の結果から *in vitro* / *in vivo* ともに発がんリスクが低いと考えられることから、ICH ガイドライン S1（医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンスについて）を考慮し、がん原性試験は行っていない。上述のように、システアミンは自然に存在する細胞成分であり、意味のある遺伝毒性活性はない（2.4.4.3 項）。

### 2.4.4.5　生殖発生毒性試験

システアミンを点眼した生殖及び発生毒性試験は行われていないが、経口投与による試験は行われている。点眼薬として推奨されるシステアミンの 1 日投与量は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることから、点眼したときの全身曝露量が、経口システアミンの生殖リスクの評価に影響を与える可能性は低い。

雌雄のラットに 75 mg/kg/日を経口投与したとき、受胎能又は生殖能に対する無毒性量（no observed adverse effect level；NOAEL）が観察された(56)（WRC 1965d）。

ラットにおける胚胎仔発生の NOAEL は経口投与で 100 mg/kg であったが(57)、ラットを使用した別の同様の試験では(58)、NOAEL は 75 mg/kg であった。ウサギに経口投与した用量設定胚胎仔発生試験では、最低用量として 50 mg/kg を投与したが NOAEL は特定できなかった(59)。

公表文献では標準の出生前後毒性試験はなかった。

### 2.4.4.6　局所刺激性試験

申請者はシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の開発で局所刺激性試験を 3 件実施した（表 2.4.4-2）。

**表 2.4.4-2 申請者が依頼者として実施したシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の非臨床局所刺激性試験**

| 試験の種類 | レジメン | 動物数 | 検査 | 格納場所 |
|---|---|---|---|---|
| ウサギを使用したパイロット試験－溶媒±NAC | 20 分以内に 5 回点眼 | 1 群 3 匹（対照、溶媒、溶媒＋NAC） | 検眼鏡検査 | 4.2.3.6-2 |
| ウサギを使用して臨床システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の回数を検討する 3 ヵ月試験（臨床製剤（1st clinical formula）） | 1 日 3、6、9 回点眼 | 1 群 10 匹（生理食塩液 6 回点眼、溶媒 6 回点眼、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 3 回点眼、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 6 回点眼、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 9 回点眼） | 検眼鏡検査、スリットランプ、共焦点顕微鏡、知覚計、標準の組織学的検査 | 4.2.3.6-1 |
| ウサギを使用してシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の臨床製剤（2nd clinical formula）と Pre-Industrial formula を比較する 3 ヵ月試験 | 1 日 4 回点眼 | 1 群 10 匹<br>1 ヵ月：臨床製剤（2nd clinical formula）と Pre-Industrial formula の比較<br>3 ヵ月：臨床製剤（2nd clinical formula）と Pre-Industrial formula の比較 | 共焦点顕微鏡を除いて上記と同じ | 4.2.3.6-3 |

パイロット試験（4.2.3.6-2）では、増粘剤としてカルボキシメチルセルロースナトリウムを含む 0.55%システアミン塩酸塩の 2 種類の処方（N アセチルシステインを含有する処方と含有しない処方）の眼忍容性を Draize スケールで評価したところ、すべての動物でわずかから中等度の結膜の発赤が、主に最終投与から 5 分～4 時間後に観察された。また、いずれの投与群でも何匹かにわずかな腫脹もみられた。最終点眼から 24 時間後では、N アセチルシステイン（N-Acetyl-Cystein；NAC）含有システアミンを投与した 1 匹でわずかな腫脹がみられた以外には、肉眼的所

見はなかった。

最初の 3 ヵ月試験では、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の臨床製剤（1st clinical formula）を種々の点眼回数で投与したときの作用を評価した（4.2.3.6-1）。3 ヵ月にわたり 1 日 3 回投与したところ、肉眼的にも顕微鏡的にも忍容性は良好であった。

3 ヵ月にわたり 1 日 6 回投与すると、忍容性は下がり、結膜に血管外遊出したリンパ球と血管拡張などを伴う角膜上皮領域の薄層化という顕微鏡的変化がみられた。2 週間にわたりシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 9 回投与したときには、忍容性はなかった。

2013 年に、以下の理由で 2 回目の 3 ヵ月局所刺激性試験（4.2.3.6-3）を実施した：

- 臨床開発では、カルメロースナトリウムと緩衝液をオートクレーブで滅菌する際のパラメータを調節したため、臨床製剤（1st clinical formula）（表 2.4.1-2）をわずかに修正し、カルメロースナトリウムの濃度を [redacted]%から [redacted]%に変更した（この製剤を臨床製剤（2nd clinical formula）と呼ぶ）。
- 製造工程の最適化の際、カルメロースナトリウムの濃度を再度修正した。そのため、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の Pre-Industrial formula は臨床製剤（2nd clinical formula）とわずかに異なる。
- Recordati Rare Diseases SARL は、EMA で 2012 年 9 月 25 日に行われた治験実施計画書に対する助言（EMEA/H/SA/2335/1/2012/PA/III）で、最近の臨床開発で使用した Formula と Pre-Industrial formula を比較する局所忍容試験を実施するように求められた。

これらの最後の 2 つの処方を以下の表 2.4.4-3 に示す。

**表 2.4.4-3 「2 番目の」臨床処方とシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の定性的及び定量的組成**

| | 臨床製剤<br>（2nd clinical formula） | 臨床製剤<br>（Pre-industrial formula） |
|---|---|---|
| 組成：処方（百分法）（w/w） | | |
| システアミン塩酸塩 | 0.55% | 0.55% |
| カルメロースナトリウム[redacted] | [redacted]% | [redacted]% |
| 塩化ベンザルコニウム | [redacted]% | [redacted]% |
| エデト酸ナトリウム | [redacted]% | [redacted]% |
| クエン酸一水和物 | [redacted]% | [redacted]% |
| [redacted] | [redacted]% | [redacted]% |
| [redacted] | [redacted]% | [redacted]% |
| [redacted] | QS pH=4.4 | QS pH=4.4 |
| 注射用水 | QS 100.00% | QS 100.00% |

Source: 2.3P 表 7

1 日 4 回点眼レジメンで 1 ヵ月間及び 3 ヵ月間投与して、眼忍容性を比較した。実施した検査を表 2.4.4-4 に示す。

新しい処方のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 3 ヵ月投与した群では、Day 40 に雄ウサギ 1 匹の状態が悪化し、同日死亡した。この日以前には一般状態の変化はみられなかった。死因は確認できなかったが、Pre-Industrial formula を 3 ヵ月投与した群で状態が悪化したのはこのウサギのみであったため、投与に関連する可能性は低いと考えられた。

**表 2.4.4-4** ウサギにシステアミン塩酸塩点眼液 0.55% 50 µL を 1 日 4 回、最長 3 ヵ月間右眼に投与したときの検査項目及び日程

| | 1 ヵ月投与群 | 3 ヵ月投与群 |
|---|---|---|
| 体重 | 試験前、Day 0、その後週 1 回、安楽死前日 | 試験前、Day 0、その後週 1 回、安楽死前日 |
| 一般状態 | 毎日 | 毎日 |
| 検眼鏡検査 | 試験前、その後 1 日 2 回 | 試験前、最初の 28 日間は 1 日 2 回、残りの 2 ヵ月は 1 日 1 回 |
| スリットランプ（McDonald-Shadduck の評価基準） | 試験前、その後週 1 回 | 試験前、最初の 28 日間は週 1 回、残りの 2 ヵ月は月 2 回 |
| 角膜の感受性 | 試験前、Day 1、Day 28 | 試験前、Day 1、Day 28、Day 84 |
| 回復期間（オプション） | 投与を行わない 1 週間の回復期間 | 投与を行わない 1 週間の回復期間 |
| 安楽死及び剖検 | Day 29 | Day 85 |
| 組織学的検査 | 両眼球、涙腺／ハーダー腺 | 両眼球、涙腺／ハーダー腺 |

Source: 4.2.3.6-3 Section 7.1

投与 1 ヵ月後の検眼鏡検査では、結膜のわずかな発赤、結膜水腫及び／又は眼脂、わずかな角膜混濁及び／又は虹彩炎反応、前房に角膜後面沈着物と考えられる粉状物質がみられた（臨床システアミン塩酸塩点眼液 0.55%処方のみ）。前房のこれらの沈着物以外には、2 種類のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%処方に明らかな違いはなかった。

2 ヵ月目と 3 ヵ月目の投与では、すべての動物でわずかな結膜の発赤、多くの動物でわずかな結膜水腫及び／又は目脂、並びにわずかな角膜混濁及び／又は虹彩炎反応が検眼鏡検査で観察された。投与 3 ヵ月後の顕微鏡検査では、投与した眼の多くで特に角膜輪部間質で急性炎症の徴候がみられ、血管外遊出リンパ球、血管拡張及びリンパ濾胞が観察された。この時点では、いずれの投与群でも前房に粉状物質はみられなかった。眼の顕微鏡所見は臨床製剤（2nd clinical formula）を投与した動物と Pre-Industrial formula を投与した動物でほぼ同じであった。

忍容性はいずれの処方でもほぼ同じと考えられた。いずれの投与でも、眼の肉眼的所見及び顕微鏡的所見は、投与 2 ヵ月から 3 ヵ月の間に有意に減少した。

### 2.4.4.7　添加剤及び不純物

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%には原薬のシステアミン塩酸塩の他に、酸化防止剤のエデト酸二ナトリウム、抗菌保存剤の塩化ベンザルコニウム、増粘剤のカルメロースナトリウム [redacted] 緩衝剤のクエン酸、水酸化ナトリウム及び塩酸、及び溶媒としての精製水が含まれている。これらの不活性成分は点眼薬処方でよく確立されている添加物であり、毒性学的にも適格性が確認されていると考えられる。さらに、これらの添加物はいずれも、ウサギを対象とした 3 ヵ月局所刺激性試験で使用した市販予定の製剤にも含まれている（4.2.3.6-3）。

システアミン塩酸塩で問題となる不純物又は潜在的な分解産物は、システアミンの自然な酸化によって生成する内因性物質のシスタミンである。この不純物の規格限度は、原薬の 1.0%までと設定した。シスタミンは循環中のシステアミンから容易に形成されるため[39]、システアミンについて実施した毒性試験で毒性学的な適格性も確認されていると考えられる。

### 2.4.4.8　光安全性試験

公表文献[60]に基づき、システアミン塩酸塩の 290-700 nm における吸光度がないため、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%は、光反応性はないと考えられている。また、臨床使用において、安全性定期報告（Periodic Safety Update Report；PSUR）で危険な有害事象は報告されていない。

## 2.4.5　総括及び結論

**有効性及びその他の薬理活性**

角膜のシスチン結晶はシステアミンの経口投与では消失しないが、点眼薬には反応するため[61]、Recordati Rare Diseases SARL では、最高で 1 日 4 回点眼する点眼薬を開発した。

種々の処方のシステアミン塩酸塩を点眼したときの角膜での取り込みと除去を評価するために、HPLC-MS 法を開発した。角膜内のシステアミンは、投与後 1 時間まで測定した。点眼したときの全身吸収の程度についての情報はないが、予定している 1 日量（各眼に 1 日 4 回まで点眼）は、すでに承認されている経口ニシスタゴンカプセルで推奨される 1 日最大投与量（1.95 g/m$^2$）の 1000 分の 1 である。

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の処方と投与レジメンの臨床効果を支持するために、Ctns-/-マウスを使用して連日反復点眼する有効性試験を実施した。システアミン塩酸塩点眼液 0.55% 5 µL を 1 日 3 回、3 ヵ月にわたって投与したところ、明らかな利益はみられなかった。点眼回数を 1 日 6 回に増やし、NIH 処方のシステアミン溶液と比較したところ、いずれの薬剤でも、ほぼ等しい好ましい効果が得られた（シスチン結晶数の時間依存的増加の抑制）。しかし、角膜混濁の重度の定性的評価では、投与したマウスと未投与マウスに明らかな差はみられなかった。

Ctns-/-マウスにシステアミン点眼剤を投与し、シスチン結晶量への作用を評価した試験が最近報告された[18]。月齢 5 ヵ月の Ctns-/-マウスに、システアミン 0.55%点眼液を 1 日 4 回投与するレジメンを 1 ヵ月続けたところ、明らかな効果がみられた。Recordati Rare Diseases SARL が依頼者として実施した試験で観察された結果と比較すると、この試験では明らかに良好な結果が得られたが、使用した動物の月齢、点眼回数、検討したエンドポイントがこの違いにどの程度影響を及ぼしているのかは不明である。しかし、これまでに臨床で有効性のデータが得られているため、Ctns-/-マウスを使用した試験で得られた非臨床有効性の結果にいくらか違いがみられても、問題はないと考えられる。

システアミンには、リソソーム内のシスチン枯渇作用以外にも、いくつかの薬理学的／生物学的効果があることはよく確立されている。最も重要な作用は、(a) 細胞内グルタチオンレベルが増加することによる抗酸化作用、(b) トランスグルタミナーゼ 2 の阻害、及び (c) 組織ソマトスタチンとプロラクチンの枯渇によるものである。これらの作用とは別の、細胞に対する作用としてカスパーゼ 3 の阻害、ヒートショックタンパク質の誘導及びメタロプロテイナーゼの発現低減[19]も報告されているが、研究は進んでいない。システアミンを点眼投与すると角膜局所の濃度は高くなりうるが、Ctns-/-マウスを使用した長期試験での組織学的分析でも、眼に望ましくない作用はみられていない。点眼薬として推奨される 1 日投与量（システアミン換算量として）は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることを留意する必要がある。

システアミンについては、標準の安全性薬理試験は行われていない。げっ歯類にシステアミンを sc 投与及び経口投与した試験では、明らかに起源の異なる中枢神経系毒性を誘発する傾向が示されている。50 mg/kg 以上の sc 投与で学習及び記憶機能に悪影響があると考えられ、1 日量の

3 倍を投与すると運動機能に影響がある。ヒトに経口投与したときに、中枢神経系の有害事象は副作用としては珍しくない。しかし、点眼薬として投与される量は、任意の年齢群に経口薬として推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 という低用量であるため、点眼薬として使用したときの中枢神経系毒性及びその他の重要な器官系に対する毒性のリスクは非常に限られていると考えられる。

**局所刺激性を中心とした安全性**

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の性質と使用法、及び点眼薬として推奨される 1 日投与量は任意の年齢群のシスチン症患者に経口薬として推奨されるシステアミンの 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることから、臨床開発と製造販売承認申請を支持するための非臨床安全性試験では、点眼薬としての眼の忍容性を主に評価した。

ウサギで眼の局所刺激性を評価した 3 ヵ月試験が 2 件実施されており、これらはピボタル試験と考えられる。

最初の試験では、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の最初の臨床試験用処方をウサギに 1 日 3 回、6 回、9 回投与して、眼忍容性を評価し、ウサギの眼に対する点眼回数の効果を評価した。眼に対する作用の評価では、検眼鏡、スリットランプ、知覚計による角膜の潜在的な感覚麻痺の評価、共焦点顕微鏡による検査、及び標準の組織学的検査を実施した。その結果、1 日 9 回の点眼では忍容性は不良であったが、1 日 3 回の点眼では忍容性は良好であり、生理食塩液のみを投与したときと比べ安全性パラメータに大きな違いはなかった。1 日 6 回の投与では、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%でも溶媒でも結膜と角膜にわずかな変化が生じ（混濁及び血管新生）、変化の頻度はシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を投与した眼のほうが高い傾向がみられた。

ウサギを使用した 2 件目の試験では、市販予定のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%処方と以前の局所刺激性試験及び臨床試験で使用した処方で眼忍容性を比較した。またこの試験では、ウサギの眼にシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 4 回投与したときの眼の所見を、1 ヵ月にわたり投与したときと 3 ヵ月にわたり投与したときで比較した。実施した検査は最初の試験とほぼ同じである。1 ヵ月間の投与後、投与した眼には検眼鏡とスリットランプによる検査で結膜と角膜の変化がみられたが、投与しなかった眼にはこのような変化はみられなかった。顕微鏡所見としては、投与した眼の多くで、特に角膜輪部及び角膜実質に急性炎症の徴候がみられた。システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の 2 つの処方に明らかな差はなかった。1 日 4 回の点眼を 3 ヵ月間続けたところ、眼の変化は依然として観察されたが、発現率と重症度は下がっており、投与に適応したことが示唆された。3 ヵ月後でも投与群に差はみられなかった。

これらの非臨床試験は全体として、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の臨床試験用処方と臨床製剤（Pre-Industrial formula）の眼忍容性の特徴を明らかにしている。システアミン塩酸塩点眼液 0.55%自体が結膜及び角膜にもたらす変化は非常にわずかであり、変化は経時的に小さくなると考えられる。システアミン塩酸塩点眼液 0.55%と溶媒について、眼忍容性に明らかな差はなかった。重要なこととして、観察された変化は検眼鏡又はスリットランプによる検査で容易に検出できる。したがって、臨床でもシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の忍容性は容易に把握できると考えられる。

毒性に関しては、ニシスタゴンカプセルの承認審査において得られている情報以外に、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の非臨床安全性評価に影響を及ぼす情報はなかった。たとえば、システアミンの遺伝毒性に関する以前の評価を変えるような新たなデータはない。また、ニシスタゴンカプセルの製造販売承認申請時に得られていた一般毒性及び生殖毒性に関する情報も依然とし

て有効と考えられる。点眼薬として推奨されるシステアミンの 1 日投与量は、任意の年齢群に経口薬として推奨されるシステアミン（ニシスタゴンカプセル）の 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることから、システアミンの経口投与と点眼を併用しても全身曝露量が一般毒性及び生殖毒性のリスク評価に影響を及ぼす可能性は低い。

**全体の結論**

システアミン塩酸塩は、予定している適応を十分に支持する薬理学的プロファイルを示している。さらに、ウサギを使用した最長 3 ヵ月の「局所刺激性」試験で、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の連日反復点眼に伴う潜在的な眼毒性の特徴は明らかになっている。点眼薬として推奨される 1 日投与量は、任意の年齢群に対する経口ニシスタゴンカプセルの推奨される 1 日最大投与量の約 1000 分の 1 であることから、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%点眼による全身毒性は予想されない。警告及び使用上の注意／推奨事項が遵守されることを前提に総合的な臨床安全性データを踏まえた場合、非臨床安全性試験では角膜のシスチン結晶沈着を有するシスチン症患者にシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を投与したときの安全性が疑われるような所見はなかった。

## 2.4.6　引用文献

(1) Erlenmeyer, E. Synthese des Cystins. 1903. p. 2720.-2
(2) Gahl WA, Thoene J, Schneider J. Cystinosis: A disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudetal AL, Sly WS, et al., editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease New York; McGraw-Hill. 2000. p. 5085-108.
(3) Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. N Engl J Med 2002;347:111-21.
(4) Gahl WA, Bashan N, Tietze F, et al. Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. Science 1982;217:1263-5
(5) Town M, Jean G, Cherqui S, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. Nat Genet. 1998;18:319-24.
(6) Kalatzis V, Cherqui S, Antignac C, et al. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. EMBO J. 2001;20:5940-9.
(7) Attard M, Jean G, Forestier L, et al. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosin. Hum Mol Genet. 1999; 8:2507-14.
(8) Anikster Y, Lucero C, Guo J, et al. Ocular nonnephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. Pediatr Res. 2000;47:17-23.
(9) Servais A, Moriniere V, Grunfeld JP, et al. Late-onset nephropathic cystinosis: clinical presentation, outcome, and genotyping. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3:27-35
(10) Geelen JM, Monnens LA, Levtchenko EN. Follow-up and treatment of adults with cystinosis in the Netherlands. Nephrol Dial Transplant. 2002;17(10):1766-70.
(11) Niaudet P, Tête M-J, Broyer M. Renal disease cystinosis. In: Cystinosis. M. Broyer ed. Elsevier, Paris. 1999. pps 36-41.
(12) Thoene et al. Intracellular cystine depletion by aminothiols *in vitro* and *in vivo*. J. Clin. Invest. 1976; 58, 180-189.
(13) Gahl WA, Tietze F, Butler JD, Schulman JD. Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphide interchange. Biochem J. 1985;228:545-50.
(14) Pisoni et al. Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. J. Biol. Chem. 1985;260(8): 4791-4798.
(15) Kaiser-Kupfer MI, Fujikawa L, Kuwabara T, Jain S, Gahl WA. Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephropathic cystinosis. N Engl J Med. 1987;316:775-9.
(16) Gahl et al. Nephropathic Cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. Ann Intern Med. 2007;147:242-250.
(17) Cherqui et al. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. Mol. Cell Biol. 2002;22(21), 7622-7632.

(18) Simpson et al. Evaluation of topical cysteamine therapy in the CTNS$^{-/-}$ knockout mouse using in vivo confocal microscopy. Molecular Vision. 2011;17:2649-2654.
(19) Besouw et al. Cysteamine: an old drug with new potential. Drug Discovery Today. 2013;18(15/16) :785-792.
(20) Meier & Issels. Promotion of cyst(e)ine uptake. Methods in Enzymology. 1995;252:103-112.
(21) Dohil et al. Enteric-coated cysteamine for the treatment of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther. 2011;33(9):1036-44.
(22) Schaertl et al. A profiling platform for the characterization of transglutaminase 2 (TG2) inhibitors. J. Biomol Screen 2010;15(5):478-87.
(23) Munsie et al. Mutant huntingtin causes defective actin remodeling during stress: defining a new role for transglutaminase 2 in neurodegenerative disease. Hum. Mol. Genet. 2011;20:1937-1951.
(24) Szabo & Reichlin. Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration. Endcrinol. 1981;109(6):225-7.
(25) Sagar, et al. Depletion of somatostatin-like immunoreactivity in the rat central nervous system by cysteamine. J. Neuroscience. 1982;2:225-231.
(26) Petersson & Hellerström. Rapid depletion of somatostatin in isolated mouse pancreatic islets after treatment with cysteamine. Acta endocrinologica 1985;110(2):227-31.
(27) Kwok et al. Effects of cysteamine administration on somatostatin biosynthesis and levels in rat hypothalamus. Endocrinol. 1992;131(6):2999-3009.
(28) Sagar & Martin. The effect of cysteamine on immunoreactive somatostatin in the rabbit retina. Neurosci Lett. 1982;34(3):265-9.
(29) Sagar et al. The mechanism of action of cysteamine in depleting prolactin immunoreactivity. Endocrinology. 1985;117(2):591-600.
(30) Haroutunian et al. Cysteamine-induced depletion of central somatostatin-like immunoactivity: effects on behavior, learning, memory and brain neurochemistry. Brain Res. 1987;403(2):234-42.
(31) Fitzgerald & Dokla. Morris water task impairment and hypoactivity following cysteamine- induced reductions of somatostatin-like immunoreactivity. Brain Res. 1989;505(2):246-50.
(32) Nakata et al. Limited impairment of learning performances in mice treated with cysteamine. Bio Pharm Bull. 1995;18(12):1773-5.
(33) Justino et al. Long-term effects of cysteamine on cognitive and locomotor behavior in rats: relationship to hippocampal glial pathology and somatostatin levels. Brain Res. 1997;761(1):127-34.
(34) Belldina, et al. Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of cysteamine bitartrate in paediatric nephropathic cystinosis patients. Br J Clin Pharmacol. 2003;56:520-525.
(35) Schneider et al. Recent advances in the treatment of cystinosis. J Inher Metab Dis. 1995;18:387-397.
(36) Min-Oo et al. Cysteamine, the molecule used to treat cystinosis, potentiates the antimalarial efficacy of artemisinin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(8):3262-3270.
(37) Fidler et al. Pharmacokinetics of cysteamine bitartrate following gastrointestinal infusion. Br J Clin Pharmacol. 2007;63:1 36-40
(38) Dohil et al. Pharmacokinetics of cysteamine bitartrate following intraduodenal delivery. Fundam Clin Pharmacol. 2012;28(2):136-43.
(39) Pinto et al. Measurement of sulfur-containing compounds involved in the metabolism and transport of cysteamine and cystamine. Regional differences in cerebral metabolism. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009;877(28): 3434-3441.
(40) Stipanuk et al. Thiol dioxygenases: Unique families of cupin proteins. Amino Acids. 2011;41(1):91-102.
(41) Stipanuk et al. Mammalian cystein metabolism: New insights into regulation of cysteine metabolism. Supplement to Journal of Nutrition. 2006;1652S-1659S.
(42) Jain et al. Range of toxicity of topical cysteamine in rabbit eyes. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1988;4(2):127-131.
(43) HSDB Cysteamine. National Library of Medicine. Hazardous Substances Data Bank. 2014. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/7353#section=Human-Toxicity-Excerpts-(Complete)
(44) Szabo and Reynolds. Structure-activity relationship for ulcerogenic and adrenocorticolytic effects of alkyl nitriles, amines, and thiols. Environmental Health Perspectives.1975;11:135-140.
(45) WRC 1965a. Safety evaluation of mercaptoethylamine by repeated oral administration to monkeys for four weeks. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.

(46) WRC 1965c. A study of drug induction of agranulocytosis and leukopenia. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.
(47) WRC 1965b. Mercaptoethylamine – safety evaluation by repeated oral administration to monkeys. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.
(48) Szabo. Duodenal ulcer disease. Animal model: cysteamine-induced acute and chronic duodenal ulcer in the rat. Am J Pathol. 1978;93(1):273-276.
(49) Report No 1571/1-1052. Cystagon: reverse mutation in five histidine-required strains of Salmonella typhimurium. Orphan Europe SARL, Paris, France. 1997.
(50) Stich et al. The need for a mammalian test system for mutagens: action of some reducing agents. Cancer Lett. 1978;5(4):199-204.
(51) Speit & Vogel. The effect of sulfhydryl compounds on sister-chromatid exchanges. II. The question of cell specificity and the role of H2O2. Mutat Res. 1982;93(1):175-83.
(52) Inoue et al. Induction of sister-chromatid exchanges by N-nitrosocimetidine in cultured human lymphocytes and its inhibition by chemical compounds. Mutat. Res. 1985;156(1-2):117-21.
(53) MacRae & Stich. Induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by thiol and hydrazine compounds. Mutation Res. 1979;68(4):351-65.
(54) SBA Cystaran™. Pharmacology Review(s) Appl No. 200740Orig1s000. US FDA http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails
(55) Report No 1571/2-1052. Cystagon: induction of micronuclei in the bone marrow of treated mice. Orphan Europe SARL, Paris, France. 1997.
(56) WRC 1966. Effect of mercaptoethylamine on reproduction in the rat. Walter Reed Army Institute of Research, 1966.
(57) Report No. HWI 6482-104. Development toxicity study with cysteamine bitartrate in rats. Hazelton UK, 1994.
(58) Beckman et al. Developmental toxicity of cysteamine in the rat: effects on embryo-fetal development. Teratology. 1998;58 : 96-102.
(59) Report No. HWI-6482-101. Range-finding developmental toxicity study with cysteamine bitartrate in rabbits. Hazelton UK, 1993.
(60) Morakinyo et al. Detailed mechanistic investigation into the S-nitrosation of cysteamine. Can J Chem. 2012; 9(9): 724–738.
(61) Kaiser-Kupfer et al. A randomized placebo-controlled trial of cysteamine eye drops in nehphropathic cystinosis. Arch Ophthalmol. 1990;108(5):689-93.