2.6.6 毒性試験の概要文

目次

略語一覧.....3
2.6.6　毒性試験の概要文.....4
2.6.6.1　まとめ.....4
2.6.6.2　単回投与毒性試験.....5
2.6.6.3　反復投与毒性試験.....5
2.6.6.4　遺伝毒性試験.....6
2.6.6.5　がん原性試験.....6
2.6.6.6　生殖発生毒性試験.....7
2.6.6.7　局所刺激性試験.....8
2.6.6.8　その他の毒性試験.....11
2.6.6.8.1　その他の毒性試験：添加剤及び不純物.....11
2.6.6.8.2　その他の毒性試験：光安全性試験.....11
2.6.6.9　考察及び結論.....12
2.6.6.10　引用文献.....13

表一覧

表 2.6.6-1 システアミンの非臨床安全性試験の重要事項の概要.....4
表 2.6.6-2 申請者が依頼者としてシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%及び変更した処方を検討した非臨床局所刺激性試験.....8
表 2.6.6-3 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.....10

略語一覧

略語	英語
Ames	Ames（復帰突然変異）
CNS	Central Nervous System（中枢神経系）
GLP	Good Laboratory Practice（医薬品の非臨床試験の安全性に関する信頼性を確保するための基準）
LOEL	Lowest-Observed-Effect Level（最小影響量）
ip	Intraperitoneal（腹腔内）
LD_{50}	50% Lethal Dose（半数致死量）
NAC	N-Acetyl-Cystein（N アセチルシステイン）
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level（無毒性量）
PSUR	Periodic Safety Update Report（安全性定期報告）
SCE	Sister Chromatid Exchange（姉妹染色分体交換）

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

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 日の総投与量は、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。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、この毒性試験の概要文に安全性の情報を要約する。

表 2.6.6-1 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 2.6.6-1 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 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 （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

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%臨床処方の眼忍容性は、ウサギを使用した 3 ヵ月局所刺激性試験で適切に評価された。システアミン塩酸塩点眼液 0.55%の溶媒は、結膜と角膜に非常にわずかな変化を誘発したが、経時的に消失すると考えられた。システアミン塩酸塩点眼液 0.55%自体と溶媒で眼忍容性に明らかな違いはなかった。

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。申請者が行った GLP 試験では、サルモネラを使用した復帰突然変異試験（Ames 試験）で変異原性はみられず、マウスを使用した小核試験で骨髄小核の誘導もみられなかったが、文献にもシステアミンの遺伝毒性についてこの評価が変わるような新たなデータはなかった。

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 日の総投与量は、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。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

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ため、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[(1)]（2.6.6.7）。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腹腔内（Intraperitoneal；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（50% Lethal Dose：LD_{50}）はそれぞれ 250 mg/kg と 625 mg/kg であり[(2)]、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[(2)]。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[(3)]。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

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ため、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では、主に眼に変化が生じる可能性を評価した（2.6.6.7）。点眼薬として推奨されるシステアミンの 1 日の総投与量は、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[(4)]、ウサギに混餌投与した 13 週間試験[(5)]、及びアカゲザル 5 匹を使用した 58 週間試験[(6)]から得られている。

アカゲザルを使用した 4 週間試験では、雌雄 1 匹ずつに 150 mg/kg を 1 日 1 回投与した。

Day 11 の投与後、中枢神経系（central nervous system；CNS）に対する作用、血便及び頻脈などの種々の有害作用が一過性にみられた。この所見がみられた後に毒性徴候はみられず、組織学的検査を含む臨床検査でも他に毒性のエビデンスはなかったため、アカゲザルに 1 日 1 回経口投与したときの無毒性量（no observed adverse effect level；NOAEL）は、150 mg/kg/日に近いと考えられる。

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、20～150 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。漸増投与群では明らかに投与に関連した毒性はみられなかったが、この試験は通常とは異なるデザインで行われているため、解釈は困難である。

またウサギを使用した 13 週間混餌投与試験でも、脾臓を摘出した動物 5 匹でシステアミンの作用を評価しているため、通常とは異なるデザインであった。システアミンの 1 日量は 100 mg/kg であり、病理組織学的所見としては、投与した 5 匹中 1 匹に中等度の骨髄萎縮がみられたのみであった。

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[7]、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。

2.6.6.4　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 Ames 試験では、変異原性はみられず[8]、公表されているサルモネラ菌を使用した Ames 試験[9]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[10), (11)]、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[12]。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（SBA Cystaran™）。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[13]。

2.6.6.5　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、システアミンのがん原性試験は行っていない。

2.6.6.6　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 日の総投与量は、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。

受胎能及び初期胚発生

受胎能及び初期胚発生試験では、ラットを使用し、餌にシステアミンを混入した（1 日摂取量は 0、75、375 mg/kg）[14]。最初、用量 750 mg/kg として混餌したが忍容性が不良だったため、1 週間後に 1 日 375 mg/kg に減量した。高用量を投与した動物では受胎能の低下がみられ、体重増加も遅延し、授乳中の仔の体重増加と生存率も低下した。75 mg/kg/日の経口投与では雌雄のラットの受胎能及び生殖性能に障害はみられなかった。375 mg/kg の投与でみられた受胎能の低下が雄に対する作用なのか、雌に対する作用なのか、又は雌雄に対する作用なのかを評価するために、投与量を 375 mg/kg/日のみとした受胎能試験を追加で行った[15]。受胎能の低下は、雌に投与したときのみにみられた。

胚胎仔発生

胚胎仔発生試験では、ラットに妊娠 6 日から 15 日まで、システアミン 0、50、100 及び 150 mg/kg/日を投与した[16]。150 mg/kg の投与では平均早期吸収率及び総吸収率の有意な増加、着床後胚損失率の有意な増加、及び胎仔平均生存率の有意な減少がみられた。発生毒性の NOAEL は 100 mg/kg と考えられた。

妊娠ラットを使用した別の試験では、妊娠 6.5 日から 18.5 日まで、システアミン（phosphocysteamine）0、37.5、75、100 又は 150 mg/kg/日（システアミンとして）を経口投与し、胎仔の生存、成長、構造の異常を 20.5 日に評価した[17]。用量依存的な発生毒性がみられ、見かけ上の NOAEL は 75 mg/kg/日であった。100～150 mg/kg/日の投与では、母動物に毒性徴候はなかったが、奇形（口蓋裂、脊柱後弯）及び子宮内成長遅延と胎仔の死亡が観察された。

用量設定試験では、ウサギに妊娠 7 日から 19 日まで、0、50、100、250、400 mg/kg/日を経口投与した[18]。250 mg/kg/日と 400 mg/kg/日の投与ではほとんどの動物が死亡した（1 群あたり 5 匹）。100 mg/kg の投与では 1 匹が死亡し、4 匹が Day 16 の最終投与後の別々の時点で流産した。50 mg/kg 群の平均体重は妊娠期間を通じて対照動物より少なかったが、差は有意ではなかった。またこの群では、対照群に比べ吸収部位の平均パーセントのわずかな増加及び着床後胚損失率のわずかな増加もみられた。100、250 又は 400 mg/kg を投与した動物では、胃及び十二指腸のびらん、穿孔、壁の肥厚及び暗色領域がみられた。

出生前及び出生後の毒性

出生前及び出生後の発生について標準的な試験は行われておらず、公表文献にもない。しかし、子宮内／出生後の曝露について特定の側面を評価した試験が 2 件行われている。システアミンが発生中の中枢神経系に与える長期的な作用を評価するために、妊娠ラットに交配後 Day 6.5 から投与し、仔には出生後 21 日まで連日投与した[19]。胎仔の脳のソマトスタチンは投与後 8 時間まで有意に減少したが、24 時間後には回復した。出生後の評価では、1 日最大投与量（75 mg/kg）を投与した仔で聴覚性驚愕反射の開始が遅延した。他の神経行動パラメータ又は生

理学的パラメータに変化はみられなかった。もう 1 件の試験では、胎仔が器官形成時に子宮内で曝露したとき（母動物への投与量は最高 150 mg/kg）及び出生後 4 日から 21 日まで曝露したとき（母動物への投与量は最高 75 mg/kg、新生仔への投与量は最高 75 mg/kg）について、ラットの腎臓に与える作用を評価した[20]。Day 35 に測定したところ、組織学的変化も機能の変化もなかった。

2.6.6.7　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 2.6.6-2）。

表 2.6.6-2 申請者が依頼者としてシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%及び変更した処方を検討した非臨床局所刺激性試験

試験の種類	レジメン	動物数	検査	試験番号
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 1 ヵ月：臨床製剤（2nd clinical formula）と Pre-Industrial formula の比較 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

アルビノウサギに 20 分間に 5 回点眼したときの急性眼刺激性を評価するパイロット試験（4.2.3.6-2）

この最初のパイロット試験の目的は、増粘剤としてカルメロースナトリウムを含み、N アセチルシステイン（N-acetyl-cystein；NAC）を含む処方と含まない処方の 0.55%システアミン塩酸塩の忍容性を、NAC を含む溶媒の忍容性と比較して評価することであった。本試験では 1 群が 3 匹からなるニュージーランドウサギ 3 群を使用し、右眼に 20 分以内に 50 µL を 5 回投与して作用を評価した。すべてのウサギの投与した眼と未投与眼を検眼鏡と Draize 法で評価し、観察は投与前（ベースライン）、最初の点眼から 1 分後、及び最終点眼から 5 分後、30 分後、1 時間後、4 時間後、24 時間後に行った。

すべての動物で、主に最終投与から 5 分後から 4 時間後の時点でわずかから中等度の結膜の発赤がみられた。また、すべての投与群の少数の動物でわずかな腫脹も観察された。最後の点眼か

ら 24 時間後には、NAC 含有システアミンを投与した 1 匹におけるわずかな腫脹を除いては、肉眼で確認できる作用はみられなくなった。

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%-アルビノウサギに 3 ヵ月にわたり連日反復点眼したときの眼忍容性の評価（4.2.3.6-1）

本試験では、1 群が 10 匹（雌雄 5 匹ずつ）からなるニュージーランドウサギ 5 群を使用し、すべての動物の右眼に 50 µL を最長 12 週間反復点眼した。第 1 群には 0.9% NaCl を 1 日 6 回、第 2 群にはシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%溶媒を 1 日 6 回、第 3、4、5 群にはシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%をそれぞれ 1 日 3 回、6 回、9 回投与した。1 日 9 回投与した動物（第 5 群）では 2 週間後に眼に強い作用がみられたため、倫理的な理由で安楽死させた。

全般的な忍容性の評価として、体重を週 1 回測定し、摂餌量と摂水量、一般状態を毎日記録し、剖検時に肉眼的観察を行った。眼忍容性の評価としては、検眼鏡と Draize 法による検査を投与期間の前（ベースライン）、その後 28 日間は 1 日 2 回（毎日の最初の投与前と最後の投与後）、残りの 56 日間は 1 日 1 回（毎日の最後の投与後）行い、スリットランプと McDonald-Shadduck の評価基準による検査を投与期間の前（ベースライン）、その後 4 週間は週 1 回（毎日の最初の投与の前）、その後 8 週間は 2 週間に 1 回行った。角膜の感受性は知覚計を使用して Day 1、28、84 の最初の投与から 5 分後と 30 分後に評価し、角膜の厚さ及び内皮細胞の密度は投与前（ベースライン）と安楽死時に共焦点顕微鏡（製品名：HRT-II）で測定した。1 日 9 回投与した動物では Day 15 又は Day 16、動物 R#14 は Day 72、その他の動物は Day 85 に安楽死させた後、剖検を行い、肉眼観察を行って両眼と付属器からサンプルを採取し、組織学的検査を行った。

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%又は溶媒の連日反復投与では、多くの動物で結膜に発赤、うっ血、腫脹及び眼脂がみられ、角膜への作用（混濁、血管新生及び染色）はみられる場合もみられない場合もあった。作用の強度は 1 日の点眼回数に関連していた。システアミン塩酸塩点眼液 0.55% 1 日 3 回又は 6 回の投与、又は溶媒 1 日 6 回の投与では、角膜の感覚消失はみられず、共焦点顕微鏡の観察でも角膜損傷（全厚、内皮細胞密度）はなかった。標準の組織学検査では、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 3 回投与した動物と生理食塩液を 1 日 6 回投与した動物の間に差はみられなかった。システアミン塩酸塩点眼液 0.55% 50 µL 又は溶媒を 1 日 6 回、3 ヵ月にわたって投与した動物では、顕微鏡で角膜の変化（一部の表皮の菲薄化、時に結膜に血管外遊出したリンパ球と血管拡張を伴う）が観察された。

したがって、システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 3 回、3 ヵ月にわたって投与したときの忍容性は、肉眼所見でも顕微鏡所見でも良好であった。1 日 6 回、3 ヵ月にわたって投与すると忍容性は下がり、1 日 9 回の投与では 2 週間でも忍容性は不良であった。

アルビノウサギに新しい処方のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 4 回、1 ヵ月又は 3 ヵ月にわたって点眼したときの眼忍容性（4.2.3.6-3）

Pre-Industrial formula のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の眼忍容性を、臨床試験で使用した臨床製剤（2nd clinical formula）との比較で評価した（Pre-Industrial formula では、カルメロースナトリウムの濃度がわずかに低い）。

ニュージーランドアルビノウサギ 40 匹を体重ごとに 4 群に無作為化し（1 群に雌雄 5 匹ずつ）、右眼にシステアミン塩酸塩点眼液 0.55% 50 µL を 1 日 4 回、1 ヵ月又は 3 ヵ月にわたり投与した。この試験で行った検査を表 2.6.6-3 に示す。

表 2.6.6-3 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

システアミン塩酸塩点眼液 0.55%（Pre-Industrial formula）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。

1 ヵ月投与群における観察

1 ヵ月投与後の眼科検査では、結膜のわずかな発赤、結膜浮腫及び／又は眼脂、並びにわずかな角膜混濁及び／又は虹彩炎反応が観察された。スリットランプ検査所見も、検眼鏡検査所見とほぼ同じであった。未投与の左眼では眼に対する作用は観察されなかった。角膜の感覚麻痺のエビデンスはなかった。顕微鏡では、投与した眼の多くに急性炎症がみられ、特に角膜輪部と角膜実質で著明であった。また、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（臨床製剤（2nd clinical formula）のみ）。前房の沈着物以外には、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。

3 ヵ月投与群における観察

2 ヵ月目と 3 ヵ月目には、いずれの処方でも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／又は眼脂、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。眼の徴候の重症度は 2 投与群間でほぼ同じであり、スリットランプ検査の所見も、検眼鏡検査の結果と相関していた。角膜の感覚消失は検出されなかった。

顕微鏡検査では、投与した眼の多くで、特に角膜輪部実質領域に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。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 2 処方間でほぼ同じであった。いずれの処方でも、眼の所見は 3 ヵ月投与後には有意に減少し、治療へ適応したことが観察された。

公表文献からの情報

ウサギを使用した 3 週間試験では、システアミン点眼液 0.11%（10 mM）又は 0.55%（50 mM）を 1 群 8 匹からなる各群のウサギの片方の眼に、8 時間の間に毎時間、21 日間にわたって投与し、対側の眼には生理食塩水を投与した[21]。結膜感染症やその他の眼の有害作用が生じてい

ないか連日検査を行い、試験終了時には眼組織の組織学的検査を行った。システアミンを投与した眼と生理食塩水を投与した対照眼の間に差は報告されていない。

Jain らはウサギを使用した一連の実験 3 件で、保存剤を含まない生理食塩水を使用して複数の濃度の無菌システアミン点眼剤を調製し、1 日 8 時間の間に毎時間投与した(1)。最初の実験では、アルビノウサギ 10 匹の左眼に 5%システアミン点眼剤、右眼に 10%システアミン点眼剤を投与した。この実験では 10%システアミン点眼剤の投与は 10 日後に中止されたが、5%被験物質の投与は 4 週間継続された。2 番目の実験では、アルビノウサギ 10 匹の右眼に濃度 1%、左眼に濃度 2%を 4 週間投与し、3 番目の実験では、アルビノウサギ 18 匹の右眼に濃度 0.1%、左眼に濃度 0.5%を 3 ヵ月間投与し、結膜感染症やその他の眼の有害作用が生じていないか、連日検査を行った。眼の表面を撮影して変化を確認し、試験終了時には眼組織の組織学的検査を行った。

濃度 10%の点眼では有害作用が生じたため、投与は 10 日後に中止された。この濃度では 10 眼のうち 5 眼で軽度から中等度の充血、及び上下の瞼の肥厚が生じたが、投与中止後 7～10 日の間に消失した。10%未満の濃度では一般状態の変化は報告されていない。顕微鏡での炎症反応の所見としては、投与完了後に角膜縁の上皮下結合組織でリンパ球浸潤がみられたのみであった。この所見の重症度は、濃度 5%を投与した 10 眼中 3 眼では中等度から著明、5%を投与した 10 眼中 3 眼、2%を投与した 10 眼中 6 眼と 1%を投与した 10 眼中 4 眼では軽度であった。0.1%又は 0.5%を 3 ヵ月投与した眼（18 眼）ではいずれも、異常所見はないと考えられた。10%システアミンを 10 日間投与した眼については、投与中止後 2.5 週間時点で組織学的検査を行ったところ、角膜周囲に軽度の血管新生が変化としてみられたのみであった。その他の点では、どの濃度を投与したときでも角膜上皮は正常であり、眼組織にも病的変化はなかったと報告されている。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　その他の毒性試験：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(22)、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。

2.6.6.8.2　その他の毒性試験：光安全性試験

公表文献(23)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）で光反応性によるものと考えられる有害事象は報告されていない。

2.6.6.9　考察及び結論

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 日の総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、Pre-Industrial formula とわずかに異なる処方のシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%（カルメロースナトリウムの濃度がわずかに高い）をウサギに 1 日 3 回、6 回又は 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%の臨床処方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%自体と溶媒について、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 日の総投与量は、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。

2.6.6.10 引用文献

(1) Jain et al. Range of toxicity of topical cysteamine in rabbit eyes. J Ocul Pharmacol. 1988;4:127-131.
(2) 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)
(3) Szabo and Reynolds. Structure-activity relationship for ulcerogenic and adrenocorticolytic effects of alkyl nitriles, amines, and thiols. Environ. Health Perspect.1975;11:135-140.
(4) WRC 1965a. Safety evaluation of mercaptoethylamine by repeated oral administration to monkeys for four weeks. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.
(5) WRC 1965c. A study of drug induction of agranulocytosis and leukopenia. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.
(6) WRC 1965b. Mercaptoethylamine – safety evaluation by repeated oral administration to monkeys. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.
(7) Szabo. Duodenal ulcer disease. Animal model: cysteamine-induced acute and chronic duodenal ulcer in the rat. Am J Pathol. 1978;93(1):273-276.
(8) Report No 1571/1-1052. Cystagon: reverse mutation in five histidine-required strains of Salmonella typhimurium. Orphan Europe SARL, Paris, France. 1997.
(9) Stich et al. The need for a mammalian test system for mutagens: action of some reducing agents. Cancer Lett. 1978;5(4):199-204.
(10) 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.
(11) 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.
(12) MacRae & Stich. Induction of sister-chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells by thiol and hydrazine compounds. Mutation Res. 1979;68(4):351-65.
(13) Report No 1571/2-1052. Cystagon: induction of micronuclei in the bone marrow of treated mice. Orphan Europe SARL, Paris, France. 1997.
(14) WRC 1965d. Effect of mercaptoethylamine on reproduction in the rat. Walter Reed Army Institute of Research; 1965.
(15) WRC 1966. Effect of mercaptoethylamine on reproduction in the rat. Walter Reed Army Institute of Research; 1966.
(16) Report No. HWI 6482-104. Development toxicity study with cysteamine bitartrate in rats. Hazelton UK. 1994.
(17) Beckman et al. Developmental toxicity of cysteamine in the rat: effects on embryo-fetal development. Teratology. 1998;58: 96-102.
(18) Report No. HWI-6482-101. Range-finding developmental toxicity study with cysteamine bitartrate in rabbits. Hazelton UK. 1993.
(19) Fawcett et al. Pregnancy alters the pharmacokinetics of cysteamine in the pregnant rat and effects postnatal development. Teratology Society: Platform sessions abstracts of Teratology Society 40th Annual Meeting; 2000 Jun 24-29. p.445.
(20) Assadi et al. Effects of pre- and postnatal cysteamine exposure on renal function in the rat. Pediatr Nephrol. 1999;13: 812-815.
(21) 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.
(22) 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.
(23) Morakinyo et al. Detailed mechanistic investigation into the S-nitrosation of cysteamine. Can J Chem. 2012; 9(9): 724–738.

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験

試験の種類	動物種	投与経路	投与期間	用量 (mg/kg)	GLP／非 GLP	試験施設	試験番号	場所
急性毒性	ウサギ	点眼		0.1～10%	非 GLP	-	Simpson et al.,2011(1)	モジュール 4
局所忍容性	ウサギ	点眼		0.1～10%	非 GLP	-	Jain et al., 1988(2)	モジュール 4
局所忍容性	ウサギ	点眼	単回又は反復投与	0.1～10%	非 GLP	-	Simpson et al., 2011(1)	モジュール 4
局所忍容性	ウサギ	点眼	1 日 5 回	0.55%	非 GLP	[redacted]（フランス[redacted]）	4.2.3.6-2	モジュール 4
局所忍容性	ウサギ	点眼	3 ヵ月	0.55%	非 GLP	[redacted]（フランス[redacted]）	4.2.3.6-1	モジュール 4
局所忍容性	ウサギ	点眼	3 ヵ月	0.55%	GLP	[redacted]（フランス[redacted]）	4.2.3.6-3	モジュール 4

被験物質：システアミン又はシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%

2.6.7.1.1　ウサギを用いた 3 カ月反復点眼投与局所刺激性試験（4.2.3.6-1）の試験成績抜粋

投与群	1	2	3	4	5
投与溶液及び投与量	0.9% NaCl 1 日 6 回	システアミン塩酸塩点眼液 0.55%溶媒を 1 日 6 回	システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 3 回	システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 6 回	システアミン塩酸塩点眼液 0.55%を 1 日 9 回
検眼鏡検査	結膜の軽度の発赤、軽度の結膜浮腫	結膜の中程度の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度の眼脂、軽度の角膜混濁、虹彩炎	結膜の軽度～中程度の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度の眼脂、角膜混濁、虹彩炎	結膜の中程度の発赤、軽度～中程度の結膜浮腫、軽度の眼脂、軽度の角膜混濁、虹彩炎	結膜の中程度～重度の発赤、軽度～中程度の結膜浮腫、軽度の眼脂、軽度～中程度の角膜混濁、虹彩炎
スリットランプ検査	結膜の軽度のうっ血	結膜の軽度のうっ血、軽度の結膜腫脹、軽度の眼脂、軽度の角膜混濁、角膜血管新生	結膜の軽度のうっ血、軽度の結膜腫脹、軽度の眼脂、角膜血管新生	結膜の軽度のうっ血、軽度の結膜腫脹、軽度の眼脂、軽度の角膜混濁、角膜血管新生	結膜の軽度～重度のうっ血、軽度～中程度の結膜腫脹、軽度の眼脂、軽度～中程度の角膜混濁、角膜血管新生、軽度の充血
病理組織検査	結膜、瞬膜、眼瞼の異常	結膜、角膜上皮、瞬膜、眼瞼の異常	結膜、瞬膜、眼瞼の異常	結膜、角膜上皮、瞬膜、眼瞼の異常	結膜、角膜上皮、角膜実質、毛様体突起、前眼房、後眼房、瞬膜、眼瞼の異常

2.6.7.1.2　ウサギを用いた 1 又は 3 カ月反復点眼投与局所刺激性試験（4.2.3.6-3）の試験成績抜粋

投与群	Cystadrops (former formulation)	Cystadrops (new formulation)	Cystadrops (former formulation)	Cystadrops (new formulation)
被験物質 （Formula 名称）	システアミン塩酸塩点眼液 0.55%			
	2nd clinical formula	Pre-Industrial formula	2nd clinical formula	Pre-Industrial formula
検査日	Day 29		Day 85 [a]	
検眼鏡検査	結膜の軽度の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度の眼脂、軽度の角膜混濁、虹彩炎	結膜の軽度の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度の眼脂、軽度及び中等度の角膜混濁、虹彩炎	結膜の軽度の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度の眼脂、軽度の角膜混濁、虹彩炎	結膜の軽度の発赤、軽度の結膜浮腫、軽度の目脂、軽度及び中等度の角膜混濁、虹彩炎
スリットランプ検査	結膜の軽度のうっ血、軽度の腫脹及び眼脂、軽度の角膜混濁、角膜血管新生、角膜着色、眼房水フレア、虹彩充血	結膜の軽度のうっ血、軽度の腫脹及び眼脂、軽度の角膜混濁、角膜血管新生、角膜着色、眼房水フレア、虹彩充血	結膜の軽度のうっ血、軽度の腫脹及び眼脂、角膜血管新生、角膜着色、眼房水フレア	結膜の軽度のうっ血及び腫脹、軽度の角膜混濁、角膜血管新生、角膜着色、眼房水フレア
病理組織検査	結膜、角膜上皮、角膜実質、輪部上皮、輪部実質、前眼房の異常	結膜、角膜実質、輪部上皮、前眼房の異常	結膜、輪部実質、網膜の異常	結膜、輪部実質の異常

[a] 検眼鏡検査及びスリットランプ検査については、2 か月目～3 か月目の検査結果を合算している。

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

申請者は C_{max} と AUC の最良の比に基づいてシステアミン塩酸塩点眼液 0.55%の処方を選択するために、HPLC-MS 分析法をバリデートし、ウサギに点眼で投与するいくつかの試験を行った（2.6.4.3 参照）。

2.6.7.3　毒性試験：被験物質一覧

被験物質	バッチ番号	純度（%）	個別規格設定不純物（処方）	試験番号	試験の種類
システアミン塩酸塩点眼液 0.55%	LSI N°17412103P1033 Recordati N°12100249	98.4% 99.3%	製剤処方 （臨床製剤 （2nd clinical formula）及びPre-Industrial formula）	Iris Pharma, 2013	局所忍容性

被験物質：システアミン塩酸塩

2.6.7.4　引用文献

(1) Simpson et al. Evaluation of topical cysteamine therapy in the CTNS−/− knockout mouse using in vivo confocal microscopy. Molecular Vision. 2011; 17:2649-2654.
(2) Jain et al. Range of toxicity of topical cysteamine in rabbit eyes. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1988;4(2):127-131.