アミファンプリジンリン酸塩
製造販売承認申請
CTD　第 2 部

2.4　非臨床試験の概括評価

ダイドーファーマ株式会社

目次

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.....12
2.4.3　薬物動態試験.....14
2.4.4　毒性試験.....16
2.4.5　総括及び結論.....22
2.4.6　参考文献.....30

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
ACh	Acetylcholine	アセチルコリン
APD	Action potential duration	活動電位持続時間
AUC	Area under the plasma concentration versus time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}6h}$	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 6 hours	0 から 6 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the last measurable concentration	最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳がん耐性タンパク
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
Ca^{2+}	Calcium	カルシウム
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
HED	Human equivalent dose	ヒト等価用量
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト遅延型整流カリウムチャネル遺伝子
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
K^+	Potassium	カリウム
LD	Lactation day	授乳日齢
LEMS	Lambert-Eaton myasthenic syndrome	ランバート・イートン筋無力症候群
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NAT	N-acetyltransferase	N-アセチルトランスフェラーゼ
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporter 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

略号	省略しない表現	日本語
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
SCLC	Small cell lung cancer	小細胞肺がん
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
VGCC	Voltage-gated calcium channel、 Voltage-dependent calcium channel	電位依存性カルシウムチャネル

2.4 非臨床試験の概括評価

申請者は、ランバート・イートン筋無力症候群（LEMS）の治療薬として、アミファンプリジン 10 mg 錠をリン酸塩として開発中である。アミファンプリジン遊離塩基は Firdapse®（アミファンプリジン）錠の *in vivo* での活性部分である。アミファンプリジンリン酸塩の臨床投与経路は経口であり、構造式を図 2.6.1-1 に示した。

LEMS の治療を適用としたアミファンプリジンリン酸塩の経口投与製剤の承認申請のために、包括的な非臨床薬理学、薬物動態学及び毒性学プログラムを作成した。以下の項では、現在得られている非臨床試験成績を簡潔に要約する。

2.4.1 非臨床試験計画概略

2009 年、BioMarin Pharmaceutical 社は EUSA Pharma 社からアミファンプリジンリン酸塩の世界的に開発・商業化するライセンスを取得した。アミファンプリジンリン酸塩の BioMarin Pharmaceutical 社のコード名は BMN125 であった。アミファンプリジンリン酸塩は 2002 年 12 月に欧州医薬品庁で希少疾病用医薬品の指定を受け、その後 2009 年 12 月 23 日に欧州医薬品庁医薬品委員会により LEMS 患者の対症療法薬として製造販売承認を受けた。米国では、アミファンプリジンリン酸塩は 2009 年 11 月 19 日に LEMS の治療薬として米食品医薬品局（FDA）から希少疾病用医薬品の指定を受けた。BioMarin Pharmaceutical 社は 2010 年 12 月 14 日に IND 106263 を申請した。2013 年 3 月 8 日、アミファンプリジンリン酸塩の IND 106263 の治験依頼者である BioMarin Pharmaceutical 社は、本 IND の治験依頼者を Catalyst Pharmaceuticals 社（旧 Catalyst Pharmaceutical Partners 社）に譲渡し、Catalyst Pharmaceuticals 社は LEMS の症状を治療するためのアミファンプリジンリン酸塩の使用について米国で製造販売承認を求め、2018 年 11 月に FDA より、成人患者の LEMS を適用として製造販売承認を受けた。また、2020 年 7 月にカナダ保健省より同じ適応症で承認された。一般的に、アミファンプリジンリン酸塩の非臨床安全性試験は、現在の業界標準や、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3（R2）文書「Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス）」を含む、FDA 及び ICH の規制ガイドラインに準拠して実施した。

アミファンプリジンリン酸塩を用いた *in vitro* での効力を裏付ける試験［ヒトカリウム（K^+）チャネル阻害試験］及び *in vitro* での副次的薬理試験（受容体結合及び酵素阻害試験）を実施している（2.6.2 項）。標準的な安全性薬理評価項目（中枢神経系、呼吸系、循環器系）を評価しており（2.6.2.4 項）、アミファンプリジンの薬物動態試験も実施している（2.6.4 項）。アミファンプリジンリン酸塩の安全性プロファイルは、慢性経口投与毒性試験（ラット 6 ヵ月及びイヌ 9 ヵ月試験）を含むラット及びイヌの反復投与毒性試験で確認している。標準的組合せの遺伝毒性試験、適切に計画されたマウス及びラットがん原性試験、生殖発生毒性試験、薬物乱用に関する非臨床試験を実施した（2.6.6 項）。

令和[redacted]年[redacted]月に実施されたアミファンプリジンリン酸塩の[redacted]相談（令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日受付、＃[redacted]）では、[redacted]を示した。相談時点では、[redacted]されたが、本申請では[redacted]している。[redacted]ことから、#[redacted] 相談時に提示した[redacted]に従って申請している。

アミファンプリジンリン酸塩で実施した非臨床試験を表 2.4.1-1 に示す。

表 2.4.1-1　　アミファンプリジンリン酸塩の非臨床試験の要約

Type	Category	Duration or Subcategory	Route	Species (Strain)	Study Number
Pharmacology	Primary PD	CHO cells transfected with human Kv1.7 potassium channels	*In vitro*	Mammalian cells	BMN125-10-111 (4.2.1.1.01)
		CHO and HEK293 cells transfected with human Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.4, and 1.5 potassium channels	*In vitro*	Mammalian cells	BMN125-10-112 (4.2.1.1.02)
	Secondary PD	Receptor panel screen	*In vitro*	Various species, including: mouse, rat, hamster, and human	BMN125-10-084 (4.2.1.2.01)
		Enzyme inhibition panel screen	*In vitro*	Various species, including: mouse, rabbit, pig, bovine, and human	BMN125-10-085 (4.2.1.2.02)
		Receptor panel and enzyme inhibition panel screen of 3-N-acetyl metabolite of amifampridine phosphate	*In vitro*	Various species, including rat and human	100014186 (4.2.1.2.03)
		Receptor panel screen of amifampridine phosphate and 3-N-acetyl metabolite	*In vitro*	Various species, including rat and human	100034669 (4.2.1.2.04)
	Safety Pharmacology	Cardiovascular - hERG assay	*In vitro*	CHO-K1 cells expressing hERG	1711/AGE/03 (4.2.1.3.01)
		Cardiovascular - Purkinje fiber study	*Ex vivo*	Rabbit (NZW)	1710/AGE/03 (4.2.1.3.02)
		Cardiovascular	Oral	Dog (Beagle)	BMN125-10-059 (4.2.1.3.03)
		CNS - Irwin test	Oral	Rat (Wistar)	20070139PGR (4.2.1.3.04)
		Respiratory- Plethysmography study	Oral	Rat (SD)	BMN125-10-058 (4.2.1.3.05)
PK	Absorption	PK, single-dose	Oral	Rat (SD)	[redacted] 266/009 (4.2.2.2.02)
		PK, single-dose	Oral, i.v.	Rat (SD)	BMN125-10-036 (4.2.2.2.03)

Type	Category	Duration or Subcategory	Route	Species (Strain)	Study Number
		PK, single-dose	i.p.	Rat (SD)	[redacted]4932 (4.2.2.2.04)
		PK, single-dose	Oral, i.v.	Dog (Beagle)	BMN125-10-004 (4.2.2.2.05)
		PK, single-dose	Oral	Dog (Beagle)	[redacted] 266/008 (4.2.2.2.06)
	Distribution	Plasma protein binding	*In vitro*	Rat (SD), Dog (Beagle), Monkey (Cynomolgus), Human	BMN125-10-041 (4.2.2.3.01)
		Tissue distribution	Oral	Rat (SD)	BMN125-10-005 (4.2.2.3.02)
	Metabolism	Hepatocyte clearance	*In vitro*	Rat (SD), Dog (Beagle), Monkey (Cynomolgus), Human	PR6958/CC22[redacted] (4.2.2.4.01)
		Hepatocyte metabolism	*In vitro*	Rat (SD), Rabbit (NZW), Dog (Beagle), Monkey (Cynomolgus), Pig (Göttingen), Human	BMN125-10-038 (4.2.2.4.02)
		Hepatocyte metabolism	*In vitro*	Human	BMN125-10-037 (4.2.2.4.03)
		Liver microsome and S9 fraction metabolism	*In vitro*	Human	BMN125-10-040 (4.2.2.4.04)
		In vivo metabolism	Oral, i.v. (dog only)	Rat (SD), Dog (Beagle)	BMN125-10-006 (4.2.2.4.05)
		CYP inhibition - liver microsomes	*In vitro*	Human	BMN125-10-054 (4.2.2.4.06)
		CYP induction - hepatocytes	*In vitro*	Human	BMN125-10-053 (4.2.2.4.07)
	Excretion	Mass balance	Oral, i.v.	Rat (SD)	BMN125-10-005 (4.2.2.3.02)
		Mass balance	Oral, i.v.	Dog (Beagle)	BMN125-10-004 (4.2.2.2.05)

Type	Category	Duration or Subcategory	Route	Species (Strain)	Study Number
	Drug interaction	P-gp inhibition	*In vitro*	Human Caco-2 cells	BMN125-10-042 (4.2.2.2.01)
Toxicology	Single-dose	Acute	Oral	Mouse (Ico:OF1)	[redacted] 266/005 (4.2.3.1.01)
		Acute	i.v.	Mouse (Ico:OF1)	[redacted] 266/007 (4.2.3.1.02)
		Acute	Oral	Rat (SD)	[redacted] 266/004 (4.2.3.1.03)
		Acute	Oral	Rat (SD)	[redacted] 266/012 (4.2.3.1.04)
		Acute	i.v.	Rat (SD)	[redacted] 266/006 (4.2.3.1.05)
		Acute	Oral	Dog (Beagle)	S12300 (4.2.3.1.06)
	Repeat-dose	7-day	Oral	Rat (SD)	[redacted] 266/011 (4.2.3.2.01)
		21-day	Oral	Rat (SD)	S12741 (4.2.3.2.02)
		4-week	Oral	Rat (SD)	[redacted] 266/013 (4.2.3.2.03)
		4-week	Oral	Rat (SD)	[redacted] AA40848 (4.2.3.2.04)
		13-week	Oral	Rat (SD)	BMN125-10-055 (4.2.3.2.05)
		Pivotal 26-week	Oral	Rat (SD)	S12033 (4.2.3.2.06)
		14-day	Oral	Dog (Beagle)	[redacted] 266/010 (4.2.3.2.07)

Type	Category	Duration or Subcategory	Route	Species (Strain)	Study Number
		4-week	Oral	Dog (Beagle)	[redacted] 266/014 (4.2.3.2.08)
		4-week	Oral	Dog (Beagle)	[redacted] AA40847 (4.2.3.2.09)
		Pivotal 9-month	Oral	Dog (Beagle)	S12032 (4.2.3.2.10)
	Genotoxicity	Bacterial reverse mutation	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains	[redacted] 010310 (4.2.3.3.1.01)
		Bacterial reverse mutation	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains	[redacted] 010506 (4.2.3.3.1.02)
		Mammalian cell mutation	*In vitro*	Mouse lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$) cells	[redacted] 010515 (4.2.3.3.1.03)
		Unscheduled DNA synthesis	Oral	Rat (Fischer)	[redacted] 020404 (4.2.3.3.2.01)
		Micronucleus	Oral	Rat (SD)	[redacted] 010417 (4.2.3.3.2.02)
	Carcinogenicity	26-week dietary study	Oral	Mouse (rasH2-Tg)	20[redacted]9225 (4.2.3.4.1.01)
		104-week dietary study	Oral	Rat (SD)	8264515 (4.2.3.4.1.02)
	Carcinogenicity	7-day oral and dietary study	Oral	Mouse (CD-1, rasH2-Wt)	20[redacted]9237 (4.2.3.4.2.01)
		7- and 28-day dietary study	Oral	Mouse (rasH2-Wt)	20[redacted]9230 (4.2.3.4.2.02)
		3-week dietary study	Oral	Rat (SD)	BMN125-13-011 (4.2.3.4.2.03)
	Reproductive and Developmental	Fertility	Oral	Rat (SD)	BMN125-13-012 (4.2.3.5.1.01)

Type	Category	Duration or Subcategory	Route	Species (Strain)	Study Number
		Embryo-fetal development: range-finding	Oral	Rabbit (NZW)	BMN125-13-013 (4.2.3.5.2.01)
		Embryo-fetal development: range-finding	Oral	Rabbit (NZW)	BMN125-13-014 (4.2.3.5.2.02)
		Embryo-fetal development	Oral	Rabbit (NZW)	BMN125-13-015 (4.2.3.5.2.03)
		Pre- and post-natal development	Oral	Rat (SD)	BMN125-13-025 (4.2.3.5.3.01)
	Other studies	Dependence: drug discrimination	i.p.	Rat (SD)	[redacted]5604 (4.2.3.7.4.01)
		Dependence: self-administration	i.v.	Rat (SD)	[redacted]5336 (4.2.3.7.4.02)
		Dependence: spontaneous withdrawal	Oral	Rat (SD)	[redacted]5401 (4.2.3.7.4.03)
		Metabolites	*In vitro*	Human Caco-2 cells, CHO-K1 hERG cells, human hepatocytes, human liver microsomes	100014186 (4.2.1.2.03)
		Impurities: bacterial reverse mutation	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains	[redacted]-080408 (4.2.3.7.6.01)
		Impurities: Derek evaluation	NA	NA	EUA001[redacted] (4.2.3.7.6.02)
		Impurities: Derek evaluation	NA	NA	OPI0002[redacted] (4.2.3.7.6.03)

CHO = Chinese hamster ovary; CNS = central nervous system; CYP = cytochrome P450; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene; i.p. = intraperitoneal; i.v. = intravenous; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; PD = pharmacodynamics; P-gp = P-glycoprotein; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; Tg = Transgenic; Wt = Wild type.

2.4.2　薬理試験

アミファンプリジンリン酸塩の薬理作用は、その作用機序、すなわち電位依存性 K^+チャネルの遮断によって規定される。非臨床薬理試験では、アミファンプリジンリン酸塩を用い、*in vitro* での効力を裏付ける試験 2 試験（ヒト K^+チャネル阻害試験）、*in vitro* での副次的薬理試験 4 試験（受容体結合及び酵素阻害試験）、安全性薬理試験 5 試験（心血管系試験 3 試験、中枢神経系試験 1 試験、呼吸系試験 1 試験）を実施して評価した。残りの薬理学的情報は、アミファンプリジン遊離塩基を評価した関連文献のデータによって裏付けられている。これらの試験はアミファンプリジン遊離塩基を用いて実施されたが、(a) アミファンプリジンリン酸塩は生理的条件下で遊離塩基に変換すること、(b) アミファンプリジンは遊離塩基として投与してもリン酸塩として投与しても同様の薬物動態 (PK) 特性を有することから、リン酸塩でも同様の結果が期待される。これはラット及びイヌを用いた 2 つの PK 試験（試験番号 [redacted] 266/008（4.2.2.2.06）及び [redacted] 266/009（4.2.2.2.02））及びヒトを対象とした PK 試験（DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））で示されており、詳細は 2.7.2 項で説明している。

アミファンプリジンリン酸塩の推定される作用機序は、電位依存性 K^+チャネル遮断である。電位依存性 K+チャネルが遮断されると、シナプス前膜の脱分極が起こり、再分極が遅延又は抑制される。脱分極が長引くと、遅い電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）が開口し、それに伴いカルシウム (Ca^{2+}) の流入が増加する。細胞内 Ca^{2+}はアセチルコリン (ACh) を含むシナプス小胞のエキソサイトーシスを誘導し、シナプス間隙への ACh 放出を増加させる [1]。アミファンプリジンによる平滑筋緊張の直接刺激は、アトロピンによって部分的に拮抗され [2]、これはアミファンプリジンの薬理作用（シナプス前の K^+チャネルの遮断による ACh 放出の増加）と一致している。アミファンプリジンによる治療により LEMS を有する患者において ACh 放出が増加し、患者の症状が緩和する。

小細胞肺がん（SCLC）は LEMS 患者の約 50%における併存疾患であり、これは時に傍腫瘍性 LEMS と呼ばれる。これらの患者における LEMS は、SCLC に対する免疫応答の二次的発現であると考えられる。SCLC がある LEMS 患者及びこのがん腫がない LEMS 患者の 85%は、シナプス前運動神経終末の細胞膜にある VGCC に対して非常に高い特異性を持つ病原性抗体を保有している [3]。

興味深いことに、LEMS 患者由来の免疫グロブリン G（IgG）を用いた最近の研究では、IgG がラット及びマウス神経細胞の P/Q 型 VGCC に直接作用することが示されており、LEMS IgG が P/Q 型 VGCC に結合する直接的な結果として、ACh 放出速度を低下させることによって神経筋伝達を障害することが示唆されている [4]。

哺乳動物細胞に導入した一連のヒト K^+チャネルを用いた *in vitro* での効力を裏付ける試験において、アミファンプリジンは hKv1.1、hKv1.2、hKv1.3、hKv1.4、hKv1.5 及び hKv1.7 を濃度依存的に阻害することが示された。ヒトの K^+チャネルの各サブタイプに対するアミファンプリジンの 50%阻害濃度を測定した（試験番号 BMN125-10-111（4.2.1.1.01）及び BMN125-10-112（4.2.1.1.02））。

アミファンプリジンのオフターゲット効果を評価する 2 つの試験が、*in vitro* の受容体結

合及び酵素阻害アッセイのパネルを用いて実施された（試験番号 BMN125-10-084（4.2.1.2.01）及び BMN125-10-085（4.2.1.2.02））。評価した 29 種類の異なる受容体／チャネル及び 40 種類の酵素パネルにおいて、10 μmol/L のアミファンプリジンリン酸塩とのインキュベーションで有意な反応（50%以上の阻害又は刺激）はみられなかった。これらのパネルスクリーンでは有意な変化はみられなかったが、10 μmol/L のアミファンプリジンリン酸塩とのインキュベーションでは、ATP 感受性 K^+チャネル及びヒト遅延型整流 K^+チャネル遺伝子（hERG）の K^+チャネルに対して、それぞれ 18%及び 7%の弱い阻害作用がみられた。同様の *in vitro* 試験では、アミファンプリジンリン酸塩の代謝物である 3-N-アセチル体のオフターゲット効果の可能性について、*in vitro* での受容体結合アッセイパネル、並びに阻害及び取り込みを評価する酵素パネルを用いて検討した（試験番号 100014186（4.2.1.2.03））。結果は有意な変化を示さなかった。4 番目の *in vitro* 受容体結合試験では、広範囲にわたる乱用の可能性のある標的（例えば、ドパミン、セロトニン、γ-アミノ酪酸、オピオイド、ベンゾジアゼピン、フェンシクリジン、N-メチル-D-アスパラギン酸、カンナビノイド）を含む 44 種類の異なる受容体、イオンチャネル、又は輸送体に対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体のオフターゲット効果の可能性を評価した結果、薬理学的に有意な作用はみられなかった（試験番号 100034669（4.2.1.2.04））。

アミファンプリジンは伝達に関わるイオンチャネルに作用することから、心筋や血管平滑筋への作用や ACh 放出の特徴についても文献調査を行った。アミファンプリジンリン酸塩（1～10 mmol/L、*in vitro*）は高濃度で心伝導を変化させ、ヒトを含む数種の動物種の異なる動脈で律動性収縮を誘発した[5]。なお、*in vitro* で効果が認められなかった用量（1 mmol/L）と臨床で予想される平均最高血漿中濃度（C_{max}；20 mg 単回経口投与で約 0.6 μmol/L、DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））との間には、かなりの安全域（約 170 倍）があるため、この知見は臨床症状とは関係ないと考えられる。

心血管系、中枢神経系、呼吸系への影響について、アミファンプリジンリン酸塩の安全性薬理を評価した。アミファンプリジンの K^+チャネルに対する薬力学的特性が知られていることに鑑み、GLP を遵守した 2 つの試験（*in vitro* hERG 試験、*ex vivo* ウサギプルキンエ線維試験）及びテレメトリー送信器埋め込みイヌを用いた心血管系試験（GLP）において、心血管系への悪影響の可能性を評価した。

ウサギプルキンエ線維において、アミファンプリジンリン酸塩の 30 及び 100 μmol/L で、クラス III の抗不整脈作用が認められたが（試験番号 1710/AGE/03（4.2.1.3.02））、これはヒトに 20 mg を単回投与したときの平均 C_{max} 値の 50 倍以上であった。これらの濃度で 90%及び 50%再分極時の活動電位持続時間（APD）は延長し、徐脈時に APD_{90} はそれぞれ 18%及び 40%増加した。この所見にもかかわらず、アミファンプリジンの 30 μmol/L までの濃度（20 mg 投与後のヒトにおけるアミファンプリジン平均 C_{max} 値の約 50 倍）では、hERG 系において内向き整流性電位依存性 K^+チャネル電流に対する作用はみられなかった（試験番号 1711/AGE/03（4.2.1.3.01））。

テレメトリー送信器埋め込みイヌにアミファンプリジンリン酸塩を 0.5 mg/kg まで単回経

口投与したところ、投与に関連した影響として PR 間隔の短縮及び動脈圧の上昇がみられた（試験番号 BMN125-10-059（4.2.1.3.03））。しかし、イヌを用いた反復投与毒性試験（GLP）において、血圧及び心電図に変化はみられなかった（試験番号 [redacted] 266/014（4.2.3.2.08）、[redacted] AA40847（4.2.3.2.09）及び S12032（4.2.3.2.10））。

中枢神経系に対する安全性薬理を評価した Irwin 試験（GLP、試験番号 20070139PGR（4.2.1.3.04））の結果、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 40 mg/kg まで経口投与しても、検討したいずれのパラメータにおいても投与に関連した有意な中枢神経系作用は認められなかった。ラットの呼吸機能（一回換気量、呼吸数及び分時換気量）に対して、アミファンプリジンリン酸塩を 10 mg/kg まで単回経口投与しても投与に関連した影響はみられなかった（試験番号 BMN125-10-058（4.2.1.3.05））。

要約すると、アミファンプリジンリン酸塩の薬理作用はその作用機序、すなわち電位依存性 K^+チャネルの遮断によって規定される。一連の受容体、チャネル及び酵素に対するオフターゲット効果を評価したところ、アミファンプリジンに関連した特異的活性や結合の有意な変化は認められなかった。アミファンプリジンの作用機序に基づき、過剰な薬理作用が予測されたことから、*in vitro* 心血管系を用いて評価した結果、ヒトの臨床使用で予想される曝露量と比較して、高曝露濃度で変化が認められた。ラットの Irwin 機能観察試験（GLP）では中枢神経系パラメータの有意な変化はみられず、ラットの呼吸系試験（GLP）では呼吸機能に対して投与に関連した影響は認められなかった。アミファンプリジンの作用機序から考えても、プルキンエ線維において K^+流出に対するクラス III の抗不整脈作用が確認されたことは予想外であった。しかし、その結果生じる APD の延長は高濃度（30 µmol/L）で認められ、ヒトでの臨床投与後の値（20 mg 単回経口投与後の平均 C_{max} 値は 0.6 µmol/L、DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））よりもはるかに高く、臨床使用における安全域は 50 とおおむね確保されている。テレメトリー送信器埋め込みイヌを用いた心血管系試験（GLP）では、PR 間隔の短縮及び動脈圧の上昇がみられた。しかし、このリスクは他の試験系には当てはまらなかった。30 µmol/L までの濃度による hERG 評価では影響は認められず、イヌ反復投与毒性試験（GLP）では心伝導の異常は認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験

アミファンプリジン（遊離塩基又はリン酸塩として投与）の吸収及び排泄は、ラット及びイヌで速やかであることが示されたが、化学形態間で著しい相違は認められなかった。アミファンプリジンリン酸塩の PK 試験の結果、ラットとイヌで PK プロファイルに大きな差異が認められた。おおむね、アミファンプリジンリン酸塩を経口投与したときの曝露量［C_{max}及び血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）］は、ラットと比較してイヌでかなり高かった。イヌでの曝露量が高いのは、ラットやヒトを含む他の動物種に存在する N-アセチル化代謝経路が存在しないためと考えられた。したがって、イヌはヒトにおけるアミファンプリジンの slow acetylator を反映する最適の種として、ラットは fast acetylator を代表する種として選択された。毒性試験に用いた動物種（げっ歯類）におけるアミファンプリジンの PK を評価

するために、ラットにおけるアミファンプリジンの単回静脈内、腹腔内及び 1 日 3 回経口投与 PK 試験を実施した。ラットにおける経口投与（6～75 mg/kg/日）PK 試験の結果、0 から 6 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}6h}$）及び C_{max} に基づくアミファンプリジンの曝露量は、用量に比例して上昇しないことが示された。より高い用量における曝露量が著しく高かったことは、初回通過代謝が飽和した可能性を示している。また、アミファンプリジンの曝露量は、非絶食ラットよりも絶食ラットの方が大きいと思われた。主代謝物である 3-N-アセチル体の血漿中濃度は、いずれの測定時点においてもアミファンプリジンよりも著しく高く、消失半減期（$t_{1/2}$）は 1 時間を超え、アミファンプリジン（$t_{1/2}$ は約 0.5 時間）よりも長かった。更に、3-N-アセチル体の血漿中濃度は、アミファンプリジンリン酸塩の用量の増加に伴い、用量比を下回って増加したことからも、初回通過代謝が飽和した可能性が示された。アミファンプリジンに対する代謝物の比は、アミファンプリジンリン酸塩の用量の増加に伴って減少し、この主要代謝経路の飽和が示唆された。ラットにアミファンプリジンを静脈内投与後のクリアランスは 16 L/h/kg 超と大きかった。また、分布容積は 6 L/kg 超で体内総水分量よりも大きく、全身への広範な分布が示唆された。絶対的経口バイオアベイラビリティは用量依存的（12%～100%超）であり、最高用量（25 mg/kg）で最高値を示し、初回通過代謝の飽和が疑われた。ラットに 2.5、7.5 及び 25 mg/kg を腹腔内投与したときの全身曝露量は、用量比を上回って増加した。性差も明らかであり、アミファンプリジンを 2.5 及び 7.5 mg/kg で投与したときの C_{max} 及び最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}t}$）は、雄よりも雌の方が高かった。毒性のため、25 mg/kg 腹腔内投与では PK パラメータは評価されなかった。ラット及びイヌの PK 試験の概要は 2.6.4.3 項に記載されている。

[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩のラット及びイヌを用いた PK 試験では、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩は、経口投与後迅速かつ広範に吸収され、投与後 168 時間までに主要な排泄経路である腎排泄を経て、ほぼ完全に排泄された（試験番号 BMN125-10-005（4.2.2.3.02）及び BMN125-10-004（4.2.2.2.05））。ラットを用いた組織分布試験の結果、[^{14}C]アミファンプリジンは、全測定時点で血液及び血漿の数倍低いことが認められた中枢神経系（脳）、脂肪及び眼を除き、血液及び血漿と同程度又はそれ以上の濃度で広く分布することが示された（試験番号 BMN125-10-005（4.2.2.3.02））。

ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞を用いて実施した初期の *in vitro* 試験におけるアミファンプリジンの代謝から、アミファンプリジンはラット及びサルの肝細胞により速やかに代謝されることが示された（試験番号 PR6958/CC22[redacted]（4.2.2.4.01））。一方で、アミファンプリジンはイヌ肝細胞によってほとんど代謝されなかった。ヒト肝細胞では、代謝はドナー依存性であったが、概して低かった。したがって、イヌはおそらくヒトにおいてアミファンプリジン投与後の曝露が最も高い場合のモデルであると考えられた。ラット、イヌ及びヒト肝細胞を用いて実施した[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の *in vitro* 代謝試験において、完全な代謝プロファイルが得られた（試験番号 BMN125-10-038（4.2.2.4.02））。ラット、サル及びヒトの肝細胞では、3-N-アセチル体の 1 種類が認められたが、イヌでは認められなかっ

た。個々のヒトドナー由来の肝細胞では、様々な程度の 3-N-アセチル体が観察され、これは N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）の既知の個体間多型を示唆するものである。ラットと同様に、ヒト肝細胞（男女混合プール）では、かなりの量のアミファンプリジン（約 40%）が単一の 3-N-アセチル体に変換された。イヌでは、[^{14}C]アミファンプリジンは代謝に対して比較的安定であり、N-アセチル代謝物は生成されなかった。

ヒト肝組織におけるアミファンプリジンのチトクローム P450（CYP）阻害及び誘導の可能性を評価するため *in vitro* 試験を実施した（試験番号 BMN125-10-054（4.2.2.4.06）及び BMN125-10-053（4.2.2.4.07））。アミファンプリジンは、0.1～30 µmol/L の濃度において、9 つの主要なヒト CYP アイソザイムに対して阻害作用を示さず、50%阻害濃度の中央値は算出できなかった。これらの濃度は、臨床で観察された最高血漿中濃度（1.6 µmol/L ; 178 ng/mL ; DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））の 10 倍を超えていた。同様に、0.3～30 µmol/L のアミファンプリジンは、生体異物によりアップレギュレーションを受けやすい CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 及び UGT1A1 酵素を誘導する可能性が低いことが示された。また、アミファンプリジン 0.3～10 µmol/L の *in vitro* 血漿タンパク結合率は 15%未満と低かった（試験番号 BMN125-10-041（4.2.2.3.01））。以上の *in vitro* 試験の結果から、アミファンプリジンの推奨される治療用量域（単回最大用量 20 mg 未満）とそれに伴うヒトの血漿中濃度の範囲内では、CYP 阻害、CYP 誘導又は血漿タンパク結合に関連した臨床薬物－薬物相互作用のリスクは低いと考えられる。

Caco-2 細胞単層を用いて[^{14}C]アミファンプリジンの見かけの透過性と P-糖タンパク質（P-gp）を介した相互作用を評価した結果、アミファンプリジンは P-gp の基質及び阻害剤ではないことが示された（試験番号 BMN125-10-042（4.2.2.2.01））。

アミファンプリジンリン酸塩及びその 3-N-アセチル体の *in vitro* トランスポーター試験の結果、アミファンプリジンは有機カチオントランスポーター（OCT）1、OCT2、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1、胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）及び乳がん耐性タンパク（BCRP）を介したプローブ基質の輸送を有意に阻害しなかったが、OATP1B3 を介した輸送を 16.8%阻害した（試験番号 BMN125-12-008（4.2.2.6.01））。アミファンプリジンリン酸塩の 3-N-アセチル体は、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、BSEP、BCRP 及び P-gp を含む検討したいずれのトランスポーターに対しても有意な阻害作用を示さなかった（試験番号 BMN125-12-008（4.2.2.6.01））。

総括すると、アミファンプリジンは、その PK 試験から、迅速かつ広範な吸収、幅広い組織分布、単一の主要代謝物である 3-N-アセチル体の生成（ラット及びヒトでみられ、イヌではみられない）、CYP 阻害又は誘導の欠如、及び迅速かつ広範な腎排泄の特徴を有することが示された。

2.4.4　毒性試験

アミファンプリジンリン酸塩の包括的な非臨床毒性試験プログラムの要約を表 2.4.4-1 に示す。

表 2.4.4-1　　アミファンプリジンリン酸塩の毒性試験プログラムの概要

Study Type	Duration or Category	Route	Species (Strain)	Compound Tested	Study Number (GLP Status)
Single-dose	Acute	Oral	Mouse (Ico:OF1)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/005 (4.2.3.1.01) (GLP)
	Acute	i.v.	Mouse (Ico:OF1)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/007 (4.2.3.1.02) (GLP)
	Acute	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/004 (4.2.3.1.03) (GLP)
	Acute	Oral	Rat (SD)	Amifampridine free base	[redacted] 266/012 (4.2.3.1.04) (GLP)
	Acute	i.v.	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/006 (4.2.3.1.05) (GLP)
	Acute	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	S12300 (4.2.3.1.06) (non-GLP)
Repeat-dose	7-day repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/011 (4.2.3.2.01) (GLP)
	21-day repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	S12741 (4.2.3.2.02) (non-GLP)
	4-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/013 (4.2.3.2.03) (GLP)
	4-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] AA40848 (4.2.3.2.04) (GLP)
	13-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-10-055 (4.2.3.2.05) (GLP)
	Pivotal 26-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	S12033 (4.2.3.2.06) (GLP)
	14-day repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/010 (4.2.3.2.07) (GLP)
	4-week repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/014 (4.2.3.2.08) (GLP)
	4-week repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	[redacted] AA40847 (4.2.3.2.09) (GLP)

Study Type	Duration or Category	Route	Species (Strain)	Compound Tested	Study Number (GLP Status)
	Pivotal 9-month repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	S12032 (4.2.3.2.10) (GLP)
Genotoxicity	Bacterial reverse mutation	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains	Amifampridine phosphate	[redacted]010310 (4.2.3.3.1.01) (GLP)
	Bacterial reverse mutation	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains	Amifampridine phosphate	[redacted]010506 (4.2.3.3.1.02) (GLP)
	Mammalian cell mutation	*In vitro*	Mouse lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$) cells	Amifampridine phosphate	[redacted]010515 (4.2.3.3.1.03) (GLP)
	Unscheduled DNA synthesis	Oral	Rat (Fischer)	Amifampridine phosphate	[redacted]020404 (4.2.3.3.2.01) (GLP)
	Micronucleus	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]010417 (4.2.3.3.2.02) (GLP)
Carcinogenicity	26-week dietary study	Oral	Mouse (rasH2-Tg)	Amifampridine phosphate	20[redacted]9225 (4.2.3.4.1.01) (GLP)
	104-week dietary study	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	8264515 (4.2.3.4.1.02) (GLP)
	7-day oral and dietary study	Oral	Mouse (CD-1, rasH2-Wt)	Amifampridine phosphate	20[redacted]9237 (4.2.3.4.2.01) (non-GLP)
	7- and 28-day dietary study	Oral	Mouse (rasH2-Wt)	Amifampridine phosphate	20[redacted]9230 (4.2.3.4.2.02) (GLP)
	3-week dietary study	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-011 (4.2.3.4.2.03) (non-GLP)
Reproductive and Developmental	Fertility and embryo-fetal development	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-012 (4.2.3.5.1.01) (GLP)
	Embryo-fetal 13-day tolerability study	Oral	Rabbit (NZW)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-013 (4.2.3.5.2.01) (non-GLP)
	Embryo-fetal 14-day range-finder	Oral	Rabbit (NZW)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-014 (4.2.3.5.2.02) (non-GLP)
	Embryo-fetal development	Oral	Rabbit (NZW)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-015 (4.2.3.5.2.03) (GLP)

Study Type	Duration or Category	Route	Species (Strain)	Compound Tested	Study Number (GLP Status)
	Pre- and post-natal development	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-025 （4.2.3.5.3.01） (GLP)
Other studies	Dependence: drug discrimination	i.p.	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]5604 （4.2.3.7.4.01） (GLP)
	Dependence: self-administration	i.v.	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]5336 （4.2.3.7.4.02） (GLP)
	Dependence: spontaneous withdrawal	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]5401 （4.2.3.7.4.03） (GLP)
	Metabolites	*In vitro*	Human Caco-2 cells, CHO-K1 hERG cells, human hepatocytes, human liver microsomes	N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide	100014186 （4.2.1.2.03） (non-GLP)
	Impurities: bacterial reverse mutation	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains	*不純物C	[redacted]-080408 （4.2.3.7.6.01） (GLP)
	Impurities: Derek evaluation	NA	NA	*不純物D ; *不純物E ; *不純物C	EUA001[redacted] （4.2.3.7.6.02） (non-GLP)
	Impurities: Derek evaluation	NA	NA	*不純物C	OPI0002[redacted] （4.2.3.7.6.03） (non-GLP)

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-a-go-go related gene; i.p. = intraperitoneal; i.v. = intravenous; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; SD = Sprague-Dawley; Tg = Transgenic; Wt = Wild type.

非臨床毒性試験プログラムは、LEMS 患者におけるアミファンプリジンリン酸塩の長期使用を支持するようデザインした。

アミファンプリジンの代謝プロファイルと安定性に基づいて、試験に使用する動物種を選択した。具体的には、リン酸塩として投与されたアミファンプリジンの毒性プロファイルを評価するため、ラット及びイヌを非臨床試験の動物種として選択した。肝細胞を用いたアミファンプリジンリン酸塩の *in vitro* 代謝試験において、ラット（広範な代謝）及びヒト（ばらつきが大きい代謝）で単一の N-アセチル体の生成が示されたが、イヌでは示されなかった（試験番号 PR6958/CC22[redacted] （4.2.2.4.01））。この所見は、イヌにおける NAT 酵素及びアセチル化経路の欠如と一致する。ヒトの NAT 経路は高度に多型性であり、その結果、アセチル化の代謝速度には大きな個体差が生じる。非げっ歯類としてのイヌは、アセチル化が遅くアミファンプリジンの曝露が高いヒト集団（slow acetylator）に対応し、ラットはアセチル化

が速いヒト集団（fast acetylator）に対応している。したがって、ヒトの NAT 経路の多型性を考慮した代表的な毒性モデルとして、ラット及びイヌを用いた単回及び反復投与毒性試験を実施した。

アミファンプリジンリン酸塩の単回投与毒性試験は、予定臨床投与経路である経口（アミファンプリジン遊離塩基 52.6 mg/kg まで）及び静脈内（アミファンプリジン遊離塩基 26.3 mg/kg まで）投与により、マウス及びラットを用いて実施した。注目すべき毒性は用量に依存した中枢神経系と自律神経系所見であった。大部分のアミファンプリジンリン酸塩は消化管の中性又は弱酸性条件下でプロトン化塩から遊離塩基型に変換されることから、ラットを用いた単回経口投与毒性試験 1 試験においてアミファンプリジン遊離塩基の毒性プロファイルを評価した。アミファンプリジンの遊離塩基型とリン酸型との間には、曝露量や毒性に顕著な差は認められなかった。更に、イヌを用いた漸増単回投与［最大耐量（MTD）］／7 日間反復投与試験を実施し、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基として 3.3 mg/kg/日までの用量で 1 日 3 回経口投与した。ラット及びイヌの単回投与毒性試験の概要は 2.6.6.2 項に記載した。

ラット及びイヌを用いた 1 日 3 回投与の反復経口投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験［イヌを用いた MTD／14 日間試験（試験番号 [redacted] 266/010（4.2.3.2.07））、ラットを用いた 7 日間試験（試験番号 [redacted] 266/011（4.2.3.2.01））、ラット用いた 28 日間試験（試験番号 [redacted] 266/013（4.2.3.2.03）及び [redacted] AA40848（4.2.3.2.04））、イヌ用いた 28 日間試験（試験番号 [redacted] 266/014（4.2.3.2.08）及び [redacted] AA40847（4.2.3.2.09））、ラットを用いた 13 週間試験（試験番号 BMN125-10-055（4.2.3.2.05））］を、アミファンプリジン遊離塩基 39.5 mg/kg/日（リン酸塩として 75 mg/kg/日）までの用量で実施した。臨床投与方法に準じ、投与回数は 1 日 3 回（アミファンプリジンリン酸塩として最大 25 mg/kg/回）とした。中枢神経系（痙攣、不安定歩行、過度の身づくろい及び興奮した前肢運動など）及び自律神経系（流涎及び知覚過敏）に関連する所見は、単回投与試験で認められた所見と一致しており、アミファンプリジンの過剰な薬理作用に関連していた。これらの一般状態変化はおおむね用量に依存しており、未変化体の C_{max} で誘発され、反復投与試験では投与開始数日後に重症度が低下して回復性があった。病理組織学的検査の結果、イヌの反復投与試験で可逆的な筋肉の変化が認められたが、この所見もアミファンプリジンの過剰な薬理作用であると考えられた。ラットを用いた 21 日間反復経口毒性試験を計画して開始したが、中及び高用量群で一般状態に重篤な毒性が認められたため、投与 2 日目以降に試験を中止した（試験番号 S12741（4.2.3.2.02））。

アミファンプリジンリン酸塩のラット及びイヌ慢性反復経口投与毒性試験（ラット 6 ヵ月及びイヌ 9 ヵ月試験）を実施した。ラットを用いた慢性反復経口投与毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基として 39.5 mg/kg/日までの用量（リン酸塩として 75 mg/kg/日）で 1 日 3 回 26 週間反復投与した。また、26 週間反復投与した後、4 週間休薬する群を設けた（試験番号 S12033（4.2.3.2.06））。アミファンプリジン遊離塩基 39.5 mg/kg/日の投与により、非特異的神経学的所見及び唾液腺（下顎）における腺房細胞

肥大が認められたが、いずれも回復性を示した。本試験におけるアミファンプリジンの無毒性量（NOAEL）はアミファンプリジン遊離塩基として 11.8 mg/kg/日であった。

イヌを用いた慢性反復経口投与毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基として 2.0 mg/kg/日までの用量で 9 ヵ月間（39 週間）連日 1 日 3 回カプセルを介して投与した。また、9 ヵ月間反復投与後、4 週間休薬する群を設けた（試験番号 S12032（4.2.3.2.10））。アミファンプリジン投与に関連した一般状態変化として、くしゃみ、振戦、痙攣、流涎、口なめずり及び斜視が認められた。これらは中及び高用量群で最も多く認められたが、投与回数との明確な関連はなかった。試験期間中、死亡及び瀕死は認められなかった。体重及び体重変化、摂餌量、眼科学的検査、心血管系の評価、臨床検査及び病理学的検査において、アミファンプリジン投与に関連した所見は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 1.0 及び 2.0 mg/kg/日投与に関連した所見は、いずれも回復性を示した。アミファンプリジンの NOAEL は、遊離塩基 0.53 mg/kg/日と判断した。ラット及びイヌの反復投与毒性試験の概要は 2.6.6.3 項に記載した。

アミファンプリジンリン酸塩は、標準的組合せの遺伝毒性試験（GLP）で評価した結果、変異原性を示さなかった（2.6.6.4 項参照）。

26 週間トランスジェニックマウス及び 104 週間ラットがん原性試験（GLP、試験番号 20[redacted]9225（4.2.3.4.1.01）及び 8264515（4.2.3.4.1.02）；2.6.6.5 項参照）の初回混餌投与量を決定するため、アミファンプリジンリン酸塩のマウス 7 日間反復経口及び混餌投与毒性試験（試験番号 20[redacted]9237（4.2.3.4.2.01））、マウス 7 及び 28 日間反復混餌投与毒性試験（試験番号 20[redacted]9230（4.2.3.4.2.02））及びラット 3 週間混餌投与嗜好性試験（試験番号 BMN125-13-011（4.2.3.4.2.03））を実施した。アミファンプリジンリン酸塩のラットへの混餌投与では、強制経口投与後にみられた C_{max} に関連した用量を制限する中枢神経系の一般状態変化は認められなかったため、最大投与量を増やすことが可能となり、ラットにおけるアミファンプリジンの実施可能な最大一日曝露量でがん原性の可能性を評価することができた（がん原性用量の妥当性）。マウス 7 日間反復混餌投与毒性試験（試験番号 20[redacted]9230（4.2.3.4.2.02））では、アミファンプリジン遊離塩基として 600 mg/kg/日（リン酸塩 1140 mg/kg/日）以上の用量で死亡／瀕死が認められたため、続く 28 日間反復混餌投与毒性試験（試験番号 20[redacted]9230（4.2.3.4.2.02））の最高用量はアミファンプリジン遊離塩基として 300 mg/kg/日（リン酸塩 570 mg/kg/日）に設定して実施した。その結果、100 mg/kg/日（リン酸塩 190 mg/kg/日）以上の用量ではアミファンプリジンに起因する体重減少が認められたため、マウスがん原性試験の最高用量をアミファンプリジン遊離塩基として 30 mg/kg/日（リン酸塩 57 mg/kg/日）に設定した。マウスがん原性試験では、アミファンプリジンに起因した変化は認められず、アミファンプリジンにがん原性はないと判断した。ラットがん原性試験（NOAEL は雄で 8 mg/kg/日、雌で 8 mg/kg/日未満）では、アミファンプリジン遊離塩基として 25 及び 55 mg/kg/日群の雄並びに 8、25 及び 55 mg/kg/日群（それぞれアミファンプリジンリン酸塩 15、48 及び 105 mg/kg/日に相当）の雌において、投与に関連した神経鞘腫の増加が様々な器官で認められた。すべての用量群の雌で子宮内膜腫瘍の発現率が上昇したが、これは対照群に比べて

アミファンプリジン群の生存期間が長かったことに関連している可能性がある。

ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験［胚・胎児発生に関する評価項目を設定したラットにおける ICH Stage A～D（Segment I／Segment II）の受胎能試験（試験番号 BMN125-13-012（4.2.3.5.1.01））、ウサギにおける ICH Stage C～D（Segment II）の胚・胎児発生試験（試験番号 BMN125-13-015（4.2.3.5.2.03））及びラットにおける ICH Stage C～F（Segment III）の出生前・出生後の発育試験（試験番号 BMN125-13-025（4.2.3.5.3.01））］を、アミファンプリジンリン酸塩を用いて実施した。ラット及びウサギの生殖発生毒性試験の概要は 2.6.6.6 項に記載した。ラットではアミファンプリジン遊離塩基 39.6 mg/kg/日（リン酸塩として 75 mg/kg/日）まで、ウサギでは検討した最高用量のアミファンプリジン遊離塩基 30 mg/kg/日（リン酸塩として 57 mg/kg/日）までの用量では、胚・胎児発生への影響は認められなかった。ラットの出生前及び出生後試験において、アミファンプリジン遊離塩基として 12 mg/kg/日（リン酸塩として 22.5 mg/kg/日）以上で死産児の割合が増加したが、アミファンプリジン遊離塩基 39.6 mg/kg/日（リン酸塩として 75 mg/kg/日）までの用量では、出生後の F_1 児の成長、生存率、繁殖能力及び神経行動に影響はないと結論した。

アミファンプリジンリン酸塩を乱用する可能性について、FDA が承認したプロトコール及び対照薬を用い、GLP に準拠したラットを用いる薬物弁別法による依存性試験、薬物自己投与法による依存性試験及び身体依存性試験で評価した（2.6.6.8.1 項参照）。アミファンプリジンは、いずれの試験においても依存性を示唆する所見を示さなかった。

アミファンプリジンの代謝物である 3-N-アセチル体の 10 µM は、*in vitro* アッセイのパネルを用いた毒性、酵素阻害及びオフターゲット作用の評価において、有意な刺激及び抑制を示さなかった。（2.6.2.3.4 項参照）。

アミファンプリジンリン酸塩を経口投与したときに認められた主な毒性変化は、中枢神経系に関連した一般状態の変化（痙攣、不安定歩行、過度の身づくろい及び興奮した前肢運動）、自律神経系に関連した一般状態の変化（流涎及び知覚過敏）及び筋組織の病理組織学的変化等であった。これらの所見は、K+チャネル遮断薬としての作用機序に一致しており、おおむね用量に依存しており、アミファンプリジンの C_{max} によって誘発され、反復投与試験では投与開始数日後に重症度が低下して回復性が認められた。

LEMS 患者集団におけるアミファンプリジンの使用を制限するような、非臨床プログラムにおける新たな投与関連所見は観察されなかった。

2.4.5　総括及び結論

非臨床試験プログラムは、LEMS 患者におけるアミファンプリジンリン酸塩の長期使用を裏付けるためにデザインした。このプログラムでは、電位依存性 K^+チャネル遮断薬であるアミファンプリジンの広範な臨床使用と過剰な薬理作用について説明した。電位依存性 K^+チャネルを遮断すると、シナプス前膜の脱分極が起こり、再分極が遅延又は阻害される。脱分極が長引くと、遅い VGCC が開口し、それに続いて Ca^{2+}の流入が増加する。細胞内 Ca^{2+}は ACh 含有シナプス小胞のエキソサイトーシスを誘発し、シナプス間隙に放出される ACh

濃度を増加させる[1)]。アミファンプリジンによる治療により LEMS 患者の ACh 放出が増加し、症状が緩和される。LEMS 患者由来の IgG を用いた最近の研究では、IgG がラット及びマウス神経細胞の P/Q 型 VGCC に直接作用することが示されており、LEMS IgG が P/Q 型 VGCC に結合する直接的な結果として、ACh 放出速度を低下させて神経筋伝達を障害することが示唆されている[4)]。アミファンプリジンの K^+チャネルに対する作用は、中枢神経系及び末梢神経系の両方に電気生理学的毒性を及ぼす可能性がある。アミファンプリジンの臨床安全性データベースから明らかになった唯一の注目すべき毒性は、アミファンプリジンの C_{max} 値と相関する痙攣のリスクである。

非臨床毒性試験プログラムは ICH ガイドラインに準拠して実施され、アミファンプリジンリン酸塩の遺伝毒性、生殖発生毒性試験とともに反復投与毒性試験（GLP）が含まれた。

関連する毒性試験の動物種は、アミファンプリジンの代謝プロファイルと安定性に基づいて選択し、ラット及びイヌを非臨床試験の動物種とした。ヒトの NAT 経路は高度に多型性であり、その結果、アセチル化の代謝速度には大きな個体差が生じる。肝細胞を用いたアミファンプリジンリン酸塩の *in vitro* 代謝試験において、ラット（広範な代謝）及びヒト（ばらつきが大きい代謝）で単一の N-アセチル体の生成が示されたが、イヌでは示されなかった。この知見は、イヌにおける NAT 酵素及びアセチル化経路の欠如と一致する。非げっ歯類としてのイヌは、アセチル化が遅くアミファンプリジンの曝露が高いヒト集団（slow acetylator）に対応し、ラットはアセチル化が速いヒト集団（fast acetylator）に対応している。したがって、ヒトの NAT 経路の多型性を考慮した代表的な毒性モデルとして、ラット及びイヌを用いた単回及び反復投与毒性試験を実施し、投与期間はそれぞれ最長 6 ヵ月及び 9 ヵ月であった。

アミファンプリジンリン酸塩の単回投与毒性試験は、予定臨床投与経路である経口（アミファンプリジン遊離塩基 52.6 mg/kg まで）及び静脈内（アミファンプリジン遊離塩基 26.3 mg/kg まで）投与によりマウス及びラットを用いて実施した。両種とも反復する痙攣に起因した死亡がみられた。マウスにおいて、死亡はアミファンプリジン遊離塩基 52.6 mg/kg の単回経口投与後並びにアミファンプリジン遊離塩基 13.2 及び 26.3 mg/kg の単回静脈内ボーラス投与後に生じた。痙攣は、アミファンプリジン遊離塩基 26.3 mg/kg 以上の単回経口投与及び 13.2 mg/kg 以上の単回静脈内投与で認められた。ラットにおいて、死亡及び痙攣は、アミファンプリジン遊離塩基 13.2 及び 26.3 mg/kg の単回静脈内投与で認められた。その他の注目すべき毒性所見として、C_{max} に依存する静脈内投与後の重篤な中枢神経系及び自律神経系所見が認められた。マウス及びラットにおける中枢神経系及び自律神経系所見として、痙攣、流涙、流涎、浅速呼吸、立毛及び興奮した前肢運動に伴う過度の身づくろいがみられた。マウス及びラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回経口投与したときの概略の致死量は、いずれもアミファンプリジン遊離塩基として 13.2 mg/kg（リン酸塩 25 mg/kg）を超える量であった。マウス及びラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回静脈内投与したときの概略の致死量は、マウスではアミファンプリジン遊離塩基として雄では 13.2 mg/kg（リン酸塩 25 mg/kg）、雌ではそれを超える量、ラットではアミファンプリジ

ン遊離塩基として 13.2 mg/kg（リン酸塩 25 mg/kg）であった。アミファンプリジンリン酸塩は消化管の弱酸性又はほぼ中性の条件下でプロトン化塩から遊離塩基型に変換されることから、ラットを用いた単回経口投与毒性試験 1 試験（50 mg/kg まで）において、アミファンプリジン遊離塩基の毒性プロファイルを評価した。アミファンプリジンの遊離塩基型とリン酸型との間には、曝露量や毒性に顕著な差は認められなかった。更に、イヌを用いた漸増単回投与 MTD／7 日間反復投与試験を実施し、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基として 3.3 mg/kg/日（リン酸塩 6.25 mg/kg/日）までの用量で 1 日 3 回経口投与した。

ラット及びイヌを用いた 1 日 3 回投与の反復経口投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験（イヌを用いた MTD／14 日間試験 1 試験、ラットを用いた 7 日間試験 1 試験、各動物種を用いた 28 日間試験 2 試験及びラットを用いた 13 週間試験）を、アミファンプリジン遊離塩基 39.5 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）までの用量で実施した。臨床投与方法に準じ、投与回数は 1 日 3 回（アミファンプリジンリン酸塩として最大 25 mg/kg/回）とした。中枢神経系（痙攣、不安定歩行、過度の身づくろい及び興奮した前肢運動など）及び自律神経系（流涎及び知覚過敏）の毒性所見は、単回投与試験で認められた所見と一致しており、アミファンプリジンの過剰な薬理作用に関連していた。これらの一般状態変化は、おおむね用量に依存しており、未変化体の C_{max} で誘発され、反復投与試験では投与開始数日後に重症度が低下して回復性があった。病理組織学的検査の結果、イヌの反復投与試験で可逆的な筋肉の変化が認められたが、これはアミファンプリジンの過剰な薬理作用によるものと考えられた。ラット 21 日間反復経口投与毒性試験を計画して開始したが、中及び高用量群での一般状態所見に重篤な毒性が認められたため、投与 2 日目以降に試験を中止した。

28 日間反復経口投与毒性試験 2 試験（GLP）において、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基として最大 39.5 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）の用量でラットに 1 日 3 回経口投与した（25 mg/kg/日、試験番号 [redacted] 266/013（4.2.3.2.03）及び AA40848（4.2.3.2.04））。アミファンプリジン遊離塩基 12.6 及び 39.5 mg/kg/日群の動物における用量に関連した一般状態の変化として、流涎、過度の身づくろい及び活動亢進が認められた。投与初日以降、アミファンプリジン遊離塩基 39.5 mg/kg/日群の動物で一般状態の変化が散見されたが、投与終了後に消失した。アミファンプリジン遊離塩基 39.5 mg/kg/日群の雌では、肝臓及び腎臓重量の増加が認められたが、これに対応する血液及び血液生化学的検査値並びに病理組織学的検査値の変化は認められなかった。アミファンプリジン投与に起因する変化は 2 週間の休薬により回復性が認められた。アミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回、28 日間反復経口投与した結果、NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基 12.6 mg/kg/日（リン酸塩 24 mg/kg/日）と判断した（試験番号 [redacted] 266/013（4.2.3.2.03））。

MTD／14 日間反復経口投与毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩を雌雄各 1 例のイヌに、アミファンプリジン遊離塩基として雄は 12.6 mg/kg/日、雌では 6.3 mg/kg/日（それぞれリン酸塩として 24 及び 12 mg/kg/日）までの用量で、更に別の雌雄各 1 例に 4.0 mg/kg/日（リン酸塩 7.5 mg/kg/日）の用量を 1 日 3 回経口投与した（試験番号 [redacted] 266/010

（4.2.3.2.07））。雄は 6.3 mg/kg/日、雌では 4.7 mg/kg/日の投与により、重度の中枢神経系及び自律神経系の一般状態変化が認められた。雄 1 例では、2 回目のアミファンプリジン遊離塩基として 4.2 mg/kg/回（12.6 mg/kg/日）の投与後に痙攣が継続して認められたため、安楽死させた。14 日間の反復投与期間中、4.0 mg/kg/日（リン酸塩 7.5 mg/kg/日）投与で、初回投与後に重度の中枢神経系及び自律神経系の所見並びに毒性学的な一般症状（嘔吐、摂餌量減少及び行動抑制等）が認められた。

イヌを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基として 4.0 mg/kg/日（リン酸塩 7.5 mg/kg/日）までの用量で経口投与した（試験番号 [redacted] 266/014（4.2.3.2.08））。4.0 mg/kg/日群では、痙攣が原因と考えられる瀕死／死亡が雄 2 例で認められたため、投与 1 日目に投与を中止した。4.0 mg/kg/日群の中枢神経系及び自律神経系関連の一般状態の変化として、痙攣、流涎、筋緊張亢進、振戦、浅速呼吸、不安行動、知覚過敏及び攻撃性が認められた。3.0 mg/kg/日（リン酸塩 5.7 mg/kg/日）群では、痙攣はみられず、程度と頻度が低下した同様の一般状態変化が認められた。試験期間を通じて数例で知覚過敏、不安行動及び後肢硬直が散見されたことを除き、大部分の一般状態変化は投与量にかかわらず数日後に改善又は完全に消失した。28 日間の投与期間終了時、対照群と比較して、投与群で体重及び体重増加量の減少が認められた。心機能（動脈血圧、心拍数、心伝導、心調律及び波形）に変化はなかった。3.0 及び 4.0 mg/kg/日群の雌では、投与 4 週目に水晶体後嚢及び硝子体内に白いフィラメントが認められ、投与との関連が示唆された。最も重要な所見は、喉頭における筋変性であり、舌及び骨格筋における筋変性／再生は用量依存的であり、雌よりも雄で高頻度に認められた。イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 28 日間反復経口投与したときの NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基として 1.0 mg/kg/日（リン酸塩 1.9 mg/kg/日）と判断した。

14 日間の休薬群を設けたイヌ 28 日間反復経口投与毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩の用量範囲は高用量をアミファンプリジン遊離塩基として 3.3 mg/kg/日（リン酸塩 6.25 mg/kg/日）に減量した（試験番号 [redacted] AA40847（4.2.3.2.09））。中枢神経系及び自律神経系に関連した一般状態の変化は用量に依存しており、先の 28 日間試験で観察されたものと一致していた。すなわち、強直性痙攣、振戦、活動低下、行動抑制、呼吸困難、不全麻痺、後肢硬直及び／又は流涎が、少数例で投与期間を通じて継続して認められた。一般状態変化はいずれも速やかに回復した。心機能及び肉眼的観察において、本薬投与に関連した変化は認められなかった。筋変性の散在性所見が、投与群（主試験群及び休薬群）と対照群で認められ、投与との関係は不明確であった。本試験では NOAEL は得られなかった。

ラットを用いた慢性毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩を、アミファンプリジン遊離塩基として 39.5 mg/kg/日（リン酸塩として 75 mg/kg/日）までの用量で 1 日 3 回、26 週間反復経口投与した。また、26 週間反復投与後、4 週間休薬する群を設けた（試験番号 S12033（4.2.3.2.06））。39.5 mg/kg/日群の動物では、非特異的神経学的所見及び唾液腺（下顎）における腺房細胞肥大が認められたが、いずれも回復性を示した。本試験におけるアミファンプリジンの NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基として 11.8 mg/kg/日（リン酸塩 22.4 mg/kg/

日）であった。

イヌを用いた慢性反復経口投与毒性試験では、アミファンプリジンリン酸塩をアミファンプリジン遊離塩基量として 2.0 mg/kg/日（リン酸塩 3.8 mg/kg/日）までの用量で 9 ヵ月間（39 週間）連日 1 日 3 回カプセルを介して投与した。また、9 ヵ月間反復投与後、4 週間休薬する群を設けた（試験番号 S12032（4.2.3.2.10））。アミファンプリジンの曝露と明らかに関連のある一般状態変化として、くしゃみ、振戦、痙攣、流涎、口なめずり及び斜視が認められた。これらは中及び高用量群で最も多くみられたが、投薬回数との明確な関連はなかった。高用量群の雌 1 例は 2 日目に痙攣様の動作（振戦）を示した。中用量群の雄 1 例では、投与 111 日目に明らかな痙攣が 1 回認められた。高用量群の雄 1 例では、投与 200 及び 209 日目に痙攣がみられ、その後、難治性の破壊行動が認められたため、投与 213 日目に試験から除外した。試験期間中、死亡及び瀕死はなかった。体重及び体重変化、摂餌量、眼科学的検査、心電図評価並びに臨床検査において、アミファンプリジンに関連した所見は認められなかった。剖検では、アミファンプリジン関連と考えられる肉眼的異常所見はなかった。中及び高用量群の雌では、唾液腺重量が対照群と比較して有意に増加したが、対応する病理組織学的所見はなかった。アミファンプリジンの NOAEL は、アミファンプリジン遊離塩基として 0.53 mg/kg/日（リン酸塩 1.0 mg/kg/日）と判断した。遊離塩基 1.0 及び 2.0 mg/kg/日群のアミファンプリジン曝露に関連した所見は、いずれも 4 週間の休薬期間中に回復した。NOAEL であるアミファンプリジン遊離塩基 0.53 mg/kg/日（0.18 mg/kg/回）の C_{max} は約 75～80 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ は 662 ng· h/mL であった。

アミファンプリジンリン酸塩は、標準的組合せの遺伝毒性試験（GLP）で評価した結果、変異原性を示さなかった。

アミファンプリジンのがん原性は、トランスジェニックマウスを用いた 26 週間及びラットを用いた 104 週間経口投与がん原性試験（GLP）で評価した。トランスジェニックマウスを用いた試験では、アミファンプリジン遊離塩基量として 3、10 及び 30 mg/kg/日に相当するアミファンプリジンリン酸塩（5.7、19 及び 57 mg/kg/日）を混餌投与しても、がん原性は認められなかった（試験番号 20[redacted]9225（4.2.3.4.1.01））。ラットを用いた試験では、遊離塩基として 8､25 及び 55 mg/kg/日に相当するアミファンプリジンリン酸塩（15､48 及び 105 mg/kg/日）を混餌投与した（試験番号 8264515（4.2.3.4.1.02））。その結果、25 及び 55 mg/kg/日群の雄並びに 8、25 及び 55 mg/kg/日群の雌で投与量に依存した良性及び悪性神経鞘腫の発現が認められた。8、25 及び 55 mg/kg/日群の雌では子宮内膜腫瘍が認められ、発生頻度は 60 又は 59 例中 4、13 及び 10 例であった。子宮内膜腫瘍の多く（23/27 例）は 100 週目以降に認められた。子宮内膜腫瘍の後期発症は、アミファンプリジン群の生存期間が延長したことに対応していた。これらの後期の出現は、腫瘍がエピジェネティック（非遺伝毒性）な機序から生じ、子宮内膜はエストロゲン活性に反応することから、下垂体／内分泌軸の用量に依存した変化がこの反応に関与する最も可能性の高いエピジェネティック因子であることを示唆している。NOAEL は、アミファンプリジン遊離塩基として雄では 8 mg/kg/日、雌では 8 mg/kg/日未満と判断した。8 mg/kg/日群において、投与 52 週目の C_{max} は雌雄それぞれ 13.9

及び 9.55 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 149 及び 127 ng· h/mL であった。

ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験［胚・胎児発生に関する評価項目を設定したラットにおける ICH Stage A～D（Segment I／Segment II）の受胎能試験（試験番号 BMN125-13-012（4.2.3.5.1.01））、ウサギにおける ICH Stage C～D（Segment II）の胚・胎児発生試験（試験番号 BMN125-13-015（4.2.3.5.2.03））及びラットにおける ICH Stage C～F（Segment III）の出生前・出生後の発育試験（試験番号 BMN125-13-025（4.2.3.5.3.01））］を、アミファンプリジンリン酸塩を用いて実施した。ラット受胎能／胚・胎児試験では、アミファンプリジン遊離塩基 39.6 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）の投与により、雄では中枢神経系に関連した一般状態変化、雌では妊娠期間中の体重増加抑制が認められた。雌雄の生殖能及び受胎能に影響は認められず、胎児の生存率、発育及び形態においても、最高用量のアミファンプリジン遊離塩基 39.6 mg/kg/日まで影響はなかった。したがって、雄親及び雌親の生殖毒性に対する NOAEL 並びに初期及び後期胚・胎児（発生）毒性に対する NOAEL は、いずれもアミファンプリジン遊離塩基 39.6 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）と判断した。ウサギ胚・胎児発生試験では、アミファンプリジンリン酸塩の経口投与により、中枢神経系に関連する有害な一般状態変化及び／又は体重減少に関連する高用量のアミファンプリジン遊離塩基 30 mg/kg/日（リン酸塩 57 mg/kg/日）で死亡／瀕死が認められた。評価したいずれの胎児パラメータ（生存、成長及び外表、内臓及び骨格の奇形を含む）には影響は認められず、アミファンプリジンは催奇形性がなく、母体毒性用量でもウサギに他の形態の発生毒性を引き起こさないことが示された。母体毒性の NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基 15.9 mg/kg/日（リン酸塩 30 mg/kg/日）と判断し、胚・胎児（発生）毒性の NOAEL は最高用量であるアミファンプリジン遊離塩基 30 mg/kg/日（リン酸塩 57 mg/kg/日）であった。ラット出生前及び出生後発生試験において、F_0 母動物はアミファンプリジン遊離塩基 12.0 及び 39.6 mg/kg/日で中枢神経系関連の一般状態変化を示し、39.6 mg/kg/日で授乳期間中（LD 7～14）に摂餌量の減少が認められたが、体重への影響はなく、有害な変化とは判断しなかった。死産児を有する母動物の用量依存性の増加が認められた。F_1 児の出生後の生存率、成長、性的発達、生殖能力及び行動評価（学習、記憶、運動活動及び音響驚愕）に対する影響は認められなかった。これらの結果に基づき、アミファンプリジンリン酸塩の NOAEL は母体毒性に対してアミファンプリジン遊離塩基として 12.0 mg/kg/日（リン酸塩 22.5 mg/kg/日）、出生前及び出生後毒性に対してアミファンプリジン遊離塩基として 3.9 mg/kg/日（リン酸塩 7.5 mg/kg/日）であった。

アミファンプリジンリン酸塩を乱用する可能性について、FDA が承認したプロトコール及び対照薬を用い、GLP に準拠したラットを用いる薬物弁別法による依存性試験（試験番号 [redacted]5604（4.2.3.7.4.01））、薬物自己投与法に依る依存性試験（試験番号 [redacted]5336（4.2.3.7.4.02））及び身体依存性試験（試験番号 [redacted]5401（4.2.3.7.4.03））で評価した。これらの試験におけるアミファンプリジンの投与量は、規制当局のガイダンス「FDA Guidance for Industry for the Assessment of Abuse Potential of Drugs (January, 2017)」で推奨されているように、臨床で予想される最高の C_{max} 曝露を想定して設定した。アミファンプリジンは、い

ずれの試験においても依存性を示唆する所見を示さなかった。したがって、動物モデルにおいて、アミファンプリジンに乱用の可能性があるという証拠は得られなかった。更に、アミファンプリジンの構造は乱用薬物と類似していないこともアミファンプリジンに乱用の可能性が無いことを示唆した。また、アミファンプリジンの主代謝物である 3-N-アセチル体の 10 μM は、*in vitro* アッセイのパネルを用いた毒性、酵素阻害及びオフターゲット作用の評価において、薬物乱用性に関連する受容体及びチャネルに対して有意な刺激及び抑制を示さなかった。

非臨床毒性試験プログラムにおいて、アミファンプリジンリン酸塩を経口投与したときの毒性及びトキシコキネティクスについて、1）アミファンプリジンの作用機序（K^+チャネル遮断）による過剰な薬理作用、2）代謝安定性の種差とそれに伴うアミファンプリジンへの曝露量の変化に起因する一般状態の重症化の 2 つのカテゴリーの知見が認められている。全体として、アミファンプリジンリン酸塩の単回及び反復投与後の中枢神経系及び自律神経系の一般状態並びに筋組織の病理組織学的変化といった主要所見は、親化合物であるアミファンプリジンの作用機序に一致している。非臨床毒性試験プログラムにおいて、LEMS におけるアミファンプリジンリン酸塩の使用を制限するような新たな所見は認められなかった。

主要な非臨床安全性試験から得られたアミファンプリジンリン酸塩の NOAEL、そのヒト等価用量（HED）及び HED に基づくヒトでの推定安全域を表 2.4.5-1 に示す。

表 2.4.5-1. アミファンプリジンのヒトにおける推定安全域

Study Type	Species	Duration	NOAEL*		HED (mg/kg/day)**	Human Safety Margins†
			(mg/kg/day)	(mg/m^2/day)		
General Toxicology						
Repeat-dose	Rat	6 Months	11.8	70.8	1.9	1.5
	Dog	9 Months	0.53	10.6	0.3	0.2
Reproductive and Developmental Toxicology						
Fertility	Rat	As per ICH	>39.6	>238	6.4	4.9
Embryo-fetal	Rat	As per ICH	>39.6	>238	6.4	4.9
Development	Rabbit	As per ICH	>30	>360	9.7	7.5
Pre-/post-natal Development	Rat	As per ICH	3.9	23.4	0.6	0.5
Carcinogenicity						
Dietary	Mouse	26 Weeks	>30	>90	2.4	1.8
Dietary	Rat	104 Weeks	8	48	1.3	1.0

HED = human equivalent dose; ICH = International Conference on Harmonisation;
NOAEL = no observed adverse effect level.

* NOAELs are expressed as amifampridine free base dose levels.

** Based on allometric conversion between species. Allometric conversion factors used for mouse, rat, rabbit, and dog were 3, 6, 12, and 20, respectively. Allometric conversion factor used for humans was 37 for a human body weight of 60 kg.

† Calculated by dividing the appropriate HED by the proposed maximum daily dose (1.3 mg/kg/day amifampridine free base = 2.5 mg/kg/day amifampridine phosphate) in patients with a body weight of 60 kg (80 mg/day amifampridine free base = 152 mg/day amifampridine phosphate).

‡ NOAEL shown for male rats; female rat NOAEL was determined to be < 8 mg/kg/day free base.

主要な反復投与毒性試験で測定された C_{max} 値及び臨床試験 FIR-001（5.3.3.1.01）のヒト C_{max} 値と、C_{max} に基づくヒトの推定安全域を表 2.4.5-2 に示す。

表 2.4.5-2　　アミファンプリジンのヒト C_{max} に基づく推定安全域

Study Type	Species	Duration	Nonclinical C_{max} (ng/mL)	Clinical C_{max} (ng/mL)	Human Safety Margins
General Toxicology					
Repeat-dose	Rat	6 Months	158*	24.4†	6.5
	Dog	9 Months	74.9**	97.1††	0.8

C_{max} = maximum plasma concentration.

* Combined gender mean C_{max} at NOAEL dose (11.8 mg/kg/day free base) on Day 182 (Dose 3) from Study No. S12033 (4.2.3.2.06) (rat 26-week study).

** Combined gender mean C_{max} at NOAEL dose (0.53 mg/kg/day free base) on Day 273 from Study No. S12032 (4.2.3.2.10) (dog 9-month study).

† Highest clinical mean C_{max} for the fast acetylator phenotype from BioMarin clinical trial FIR-001 (5.3.3.1.01).[6)]

†† Highest clinical mean C_{max} for the slow acetylator phenotype from BioMarin clinical trial FIR-001 (5.3.3.1.01).[6)]

これらの計算は、非臨床受胎能及び胚・胎児発生生殖毒性試験で設定された NOAEL に基づき、患者に対して十分な安全係数があることを示している。反復投与毒性試験で得られた NOAEL 及び C_{max} に基づき推定される安全域は狭いが、アミファンプリジンの毒性プロファイルは、毒性試験における過剰な薬理作用（中枢神経系に関連する一般状態変化など）が主な特徴であり、明らかな毒性徴候は認められていないことから、患者に対する総合的なリスクはごくわずかであると考える。表 2.4.5-1 及び表 2.4.5-2 に示したイヌの毒性学的データに基づくヒトの安全域は、イヌではアミファンプリジンの代謝を担う NAT 酵素が欠如しており、アミファンプリジンの毒性作用に対して異常に感受性が高いことから、患者におけるアミファンプリジン曝露のリスクを過大評価した可能性が高い。したがって、イヌはアミファンプリジンの毒性評価のためには良いモデルではなく、アミファンプリジンに曝露されたヒトへのリスクを過大評価している可能性が高い。

包括的な非臨床毒性試験プログラムにおいて確認されたアミファンプリジンリン酸塩の毒性プロファイルは、LEMS の治療に対するアミファンプリジンの臨床使用を適切に裏付けるものと考える。

2.4.6 参考文献

1) Thomsen RH, Wilson DF. Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at the neuromuscular junction. J Pharmacol Exp Ther 1983;227(1):260-5.【4.3.01】
2) Vohra MM, Pradhan SN. Pharmacology of 3,4-diaminopyridine. Arch Int Pharmacodyn Ther 1964;150(3-4):413-24.【4.3.02】
3) Gilhus NE. Lambert-Eaton myasthenic syndrome; pathogenesis, diagnosis, and therapy. Autoimmune Dis 2011;2011(973808):1-5.【4.3.03】
4) Spillane J, Ermolyuk Y, Cano-Jaimez M, Lang B, Vincent A, Volynski KE, et al. Lambert-Eaton syndrome IgG inhibits transmitter release via P/Q Ca^{2+} channels. Neurology 2015;84(6):575-9.【4.3.04】
5) Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Sumino S, Kato A, Sugimoto T. Phasic contractions of canine and human coronary arteries induced by potassium channel blockers. Jpn Heart J 1986;27(5):727-40.【4.3.05】
6) Haroldsen PE, Garovoy MR, Musson DG, Zhou H, Tsuruda L, Hanson B, et al. Genetic variation in aryl N-acetyltransferase results in significant differences in the pharmacokinetic and safety profiles of amifampridine (3,4-diaminopyridine) phosphate. Pharmacol Res Perspect 2014;3(1):e00099.【4.3.06】