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

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.6 毒性試験の概要文

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ 8
2.6.6.2 単回投与毒性試験....13
2.6.6.3 反復投与毒性試験（TK 評価を含む） 19
2.6.6.4 遺伝毒性試験 45
2.6.6.5 がん原性試験（TK 評価を含む） 49
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む） 60
2.6.6.7 局所刺激性試験 72
2.6.6.8 その他の毒性試験....72
2.6.6.9 考察及び結論 77
2.6.6.10 図表 83
2.6.6.11 参考文献 83

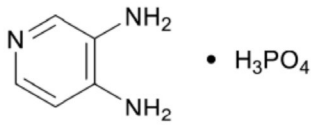
表の目次

表 2.6.6.1-1 アミファンプリジンリン酸塩の毒性評価プログラムの概要....8
表 2.6.6.2-1 イヌ経口投与 MTD 試験デザイン....18
表 2.6.6.3-1 ラット 7 日間反復経口投与毒性試験デザイン....20
表 2.6.6.3-2 ラット 21 日間反復経口投与毒性試験デザイン....21
表 2.6.6.3-3 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験デザイン 22
表 2.6.6.3-4 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アミファンプリジンの TK パラメータ 23
表 2.6.6.3-5 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験デザイン....24
表 2.6.6.3-6 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ....25
表 2.6.6.3-7 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの 投与 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータ....26
表 2.6.6.3-8 ラット 13 週間反復経口投与毒性試験デザイン....27
表 2.6.6.3-9 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 13 週間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ....28
表 2.6.6.3-10 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 13 週間反復経口投与したときの投与 44 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ....29
表 2.6.6.3-11 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 13 週間反復経口投与したときの投与 92 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ....29

表 2.6.6.3-12 ラット 26 週間反復経口投与毒性試験デザイン.....31
表 2.6.6.3-13 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 26 週間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....33
表 2.6.6.3-14 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 26 週間反復経口投与したときの投与 182 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....33
表 2.6.6.3-15 イヌ 14 日間経口投与 MTD 試験デザイン.....34
表 2.6.6.3-16 イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験デザイン.....36
表 2.6.6.3-17 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 0 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....38
表 2.6.6.3-18 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....38
表 2.6.6.3-19 イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験デザイン.....39
表 2.6.6.3-20 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 0 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....41
表 2.6.6.3-21 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....42
表 2.6.6.3-22 イヌ 39 週間反復経口投与毒性試験デザイン.....43
表 2.6.6.3-23 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 9 ヵ月間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....44
表 2.6.6.3-24 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 9 ヵ月間反復経口投与したときの投与 28 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....44
表 2.6.6.3-25 イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 9 ヵ月間反復経口投与したときの投与 273 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ.....45
表 2.6.6.5-1 Tg マウス 26 週間反復混餌投与がん原性試験デザイン.....50
表 2.6.6.5-2 ラット 104 週間反復混餌投与がん原性試験デザイン.....51
表 2.6.6.5-3 マウス 7 日間反復経口及び混餌投与毒性試験デザイン（CD-1 マウス）.....54
表 2.6.6.5-4 マウス 7 日間反復混餌投与毒性試験デザイン（rasH2 野生型マウス）.....55
表 2.6.6.5-5 rasH2 野生型マウス 7 日間反復混餌投与毒性試験デザイン.....56
表 2.6.6.5-6 rasH2 野生型マウス 28 日間反復混餌投与毒性試験デザイン.....56
表 2.6.6.5-7 ラット 3 週間反復混餌投与毒性試験デザイン.....58
表 2.6.6.6-1 ラット受胎能及び胚・胎児に関する経口投与試験デザイン.....60
表 2.6.6.6-2 ウサギ胚・胎児用量設定経口投与試験デザイン.....64
表 2.6.6.6-3 ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験デザイン.....67
表 2.6.6.6-4 ラット出生前及び出生後発育並びに母体の機能に関する経口投与試験デザイン.....70

表 2.6.6.9-1　アミファンプリジンのヒトにおける推定安全域.....82
表 2.6.6.9-2　アミファンプリジンのヒト C_{max} に基づく推定安全域.....83

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替え等
アミファンプリジンリン酸塩	一般名： アミファンプリジンリン酸塩 化学式： $C_5H_7N_3$・H_3PO_4 構造式： 

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
[redacted]	[redacted]	*不純物C
ACh	Acetylcholine	アセチルコリン
ANS	Autonomic nervous system	自律神経系
AUC	Area under the plasma concentration versus time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}18h}$	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 18 hours	0 から 18 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 hours	0 から 24 時間までの血漿中濃度－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
BLQ	Below the limit of quantitation	検出限界未満
Ca^{2+}	Calcium	カルシウム
CDP	Chlordiazepoxide	クロルジアゼポキシド
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CMC	Carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
ET_A	Endothelin receptor type A	エンドセリン受容体 A 型
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GD	Gestation day	妊娠日齢
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-á-go-go related gene	ヒト遅延型整流カリウムチャネル遺伝子
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
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

＊新薬承認情報提供時に置き換え

略号	省略しない表現	日本語
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析
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
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
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
NCE	Normochromatic erythrocyte	正染性赤血球
NMU	N-methyl-N-nitrosourea	N-メチル-N-ニトロソ尿素
NZW	New Zealand White	ニュージーランド白色
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PCE	Polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
Tg	Transgenic	トランスジェニック
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血中濃度到達時間
VGCC	Voltage-dependent calcium channel	電位依存性カルシウムチャネル

2.6.6.1 まとめ

非臨床毒性プログラムは、ランバート・イートン筋無力症候群（LEMS）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ためにデザインされた。アミファンプリジンは非特異的電位依存性カリウム（K^+）チャネル遮断薬である。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、再分極が遅延又は阻害される。脱分極が長引くと、遅い電位依存性カルシウム（Ca^{2+}）チャネル（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+}はアセチルコリン（ACh）含有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 放出が増加する。アミファンプリジン投与により LEMS 患者において ACh 放出を増加させ、症状が緩和する。しかし、アミファンプリジンの K^+チャネルに対する作用は、末梢神経系と同様に中枢神経系（CNS）で、神経生理学的な毒性を示す可能性がある。

非臨床毒性プログラムは、International Council for Harmonisation（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、がん原性、生殖発生毒性、依存性試験とともに、反復投与毒性及びトキシコキネティクス（TK）試験が含まれる。アミファンプリジンリン酸塩で実施した主な毒性試験の概要を表 2.6.6.1-1 に示す。

表 2.6.6.1-1　　アミファンプリジンリン酸塩の毒性評価プログラムの概要

Study Type	Duration or Category	Route	Species (Strain)	Compound Tested	Study Number (GLP Status) Location in CTD
Single-dose	Acute	Oral	Mouse (Ico:OF1)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/005 (GLP) 4.2.3.1.01
	Acute	i.v.	Mouse (Ico:OF1)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/007 (GLP) 4.2.3.1.02
	Acute	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/004 (GLP) 4.2.3.1.03
	Acute	Oral	Rat (SD)	Amifampridine free base	[redacted] 266/012 (GLP) 4.2.3.1.04
	Acute	i.v.	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/006 (GLP) 4.2.3.1.05
	Acute	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	S12300 (non-GLP) 4.2.3.1.06
Repeat-dose	7-day repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/011 (GLP) 4.2.3.2.01
	21-day repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	S12741 (non-GLP) 4.2.3.2.02
	4-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/013 (GLP) 4.2.3.2.03

Study Type	Duration or Category	Route	Species (Strain)	Compound Tested	Study Number (GLP Status) Location in CTD
	4-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] AA40848 (GLP) 4.2.3.2.04
	13-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-10-055 (GLP) 4.2.3.2.05
	Pivotal 26-week repeat-dose	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	S12033 (GLP) 4.2.3.2.06
	14-day repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/010 (GLP) 4.2.3.2.07
	4-week repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	[redacted] 266/014 (GLP) 4.2.3.2.08
	4-week repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	[redacted] AA40847 (GLP) 4.2.3.2.09
	Pivotal 9-month repeat-dose	Oral	Dog (Beagle)	Amifampridine phosphate	S12032 (GLP) 4.2.3.2.10
Genotoxicity	Bacterial reverse mutation	In vitro	Salmonella typhimurium strains	Amifampridine phosphate	[redacted] 010310 (GLP) 4.2.3.3.1.01
	Bacterial reverse mutation	In vitro	Salmonella typhimurium strains	Amifampridine phosphate	[redacted] 010506 (GLP) 4.2.3.3.1.02
	Mammalian cell mutation	In vitro	Mouse lymphoma (L5178Y TK+/-) cells	Amifampridine phosphate	[redacted] 010515 (GLP) 4.2.3.3.1.03
	Unscheduled DNA synthesis	Oral	Rat (Fischer)	Amifampridine phosphate	[redacted] 020404 (GLP) 4.2.3.3.2.01
	Micronucleus	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted] 010417 (GLP) 4.2.3.3.2.02
Carcinogenicity	26-week dietary study	Oral	Mouse (rasH2-Tg)	Amifampridine phosphate	20[redacted]9225 (GLP) 4.2.3.4.1.01
	104-week dietary study	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	8264515 (GLP) 4.2.3.4.1.02
	7-day oral and dietary study	Oral	Mouse (CD-1, rasH2-Wt)	Amifampridine phosphate	20[redacted]9237 (non-GLP) 4.2.3.4.2.01
	7- and 28-day dietary study	Oral	Mouse (rasH2-Wt)	Amifampridine phosphate	20[redacted]9230 (GLP) 4.2.3.4.2.02
	3-week dietary study	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-011 (non-GLP) 4.2.3.4.2.03
Reproductive and Developmental	Fertility and embryo-fetal development	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-012 (GLP) 4.2.3.5.1.01

Study Type	Duration or Category	Route	Species (Strain)	Compound Tested	Study Number (GLP Status) Location in CTD
	Embryo-fetal 13-day tolerability study	Oral	Rabbit (NZW)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-013 (non-GLP) 4.2.3.5.2.01
	Embryo-fetal 14-day range-finder	Oral	Rabbit (NZW)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-014 (non-GLP) 4.2.3.5.2.02
	Embryo-fetal development	Oral	Rabbit (NZW)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-015 (GLP) 4.2.3.5.2.03
	Pre- and post-natal development	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	BMN125-13-025 (GLP) 4.2.3.5.3.01
Other studies	Dependence: drug discrimination	i.p.	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]5604 (GLP) 4.2.3.7.4.01
	Dependence: self-administration	i.v.	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]5336 (GLP) 4.2.3.7.4.02
	Dependence: spontaneous withdrawal	Oral	Rat (SD)	Amifampridine phosphate	[redacted]5401 (GLP) 4.2.3.7.4.03
	Metabolites	In vitro	Human Caco-2 cells, CHO-K1 hERG cells, human hepatocytes, human liver microsomes	N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide	100014186 (non-GLP) 4.2.1.2.03
	Impurities: bacterial reverse mutation	In vitro	Salmonella typhimurium strains	*不純物C	[redacted]-080408 (GLP) 4.2.3.7.6.01
	Impurities: Derek evaluation	NA	NA	*不純物D ; *不純物E ; *不純物C	EUA001[redacted] (non-GLP) 4.2.3.7.6.02
	Impurities: Derek evaluation	NA	NA	*不純物C	OPI0002[redacted] (non-GLP) 4.2.3.7.6.03

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-á-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.

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た。具体的には、アミファンプリジンリン酸塩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クリアランスの動物種間比較試験において、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 N-アセチルトランスフェラーゼ（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への曝露が高いヒト集団に対応し、ラットはアセチル化が速いヒト集団に対応している。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投与（アミファンプリジン遊離塩基 52.6 mg/kg まで）及び静脈内投与（アミファンプリジン遊離塩基 26.3 mg/kg まで）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 CNS 及び自律神経系（ANS）所見であった。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された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 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 回投与の亜慢性反復経口投与毒性試験及び TK 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）までの用量で実施した。臨床投与方法に準じ、投与回数は 1 日 3 回（最大 25 mg/kg/回）とした。CNS（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 ANS（流涎及び知覚過敏など）に関連する毒性所見は、単回投与試験で認められたものと一致しており、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、未変化体の最高血漿中濃度（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。病理組織学的検査では、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と推定している。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。

アミファンプリジンリン酸塩のラット及びイヌにおける慢性反復経口投与毒性試験（ラット 6 ヵ月試験、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量として 39.5 mg/kg/日までの用量で 1 日 3 回 26 週間反復投与した。また、26 週間反復投与後、4 週間休薬する群を設けた。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 ヵ月間投与後、4 週間休薬する群を

設けた。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が、これらは中及び高用量群で最も多く認められ、投与回数との明確な関連はなかった。試験期間中、死亡及び瀕死例は認められなかった。体重、体重変化、摂餌量、眼科学的検査、心血管系の評価、臨床検査及び病理組織学的検査では、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、遊離塩基として 0.53 mg/kg/日と判断した。

アミファンプリジンリン酸塩は、標準的組合せの医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準じて遺伝毒性試験で評価した結果、変異原性を示さなかった。

アミファンプリジンリン酸塩について、トランスジェニック（Tg）マウスを用いた 26 週間がん原性試験及びラットを用いた 104 週間がん原性試験を実施し、がん原性を評価した。Tg 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を混餌投与しても、がん原性は認められなかった。ラットを用いた試験では、アミファンプリジン遊離塩基量として 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、投与に関連した神経鞘腫の増加が様々な器官で認められ、NOAEL は雄で 8 mg/kg/日、雌では 8 mg/kg/日未満であった。雌では、すべての用量で子宮内膜腫瘍の発生率が上昇したが、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。

アミファンプリジンリン酸塩の生殖発生毒性試験として、GLP に準拠した胚・胎児発生に関する評価項目を設定したラットを用いた ICH Stage A～D（Segment I／Segment II）の受胎能試験及び胚・胎児発生試験、ウサギを用いた ICH Stage C～D（Segment II）の胚・胎児発生試験、ラットを用いた ICH Stage C～F（Segment III）の出生前・出生後の発育試験を実施した。ラットの受胎能及び胚・胎児発生に対する影響は、検討した最高用量である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）まで、また、ウサギの胚・胎児発生に対する影響は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）までの用量で、影響は認められなかった。ラット出生前及び出生後試験では、アミファンプリジン遊離塩基 12 mg/kg/日以上（リン酸塩 22.5 mg/kg/日以上）で死産児を出産した母動物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 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認められなかった。

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、米国食品医薬品局（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。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。

アミファンプリジンリン酸塩の経口投与により認められた主な毒性変化は、単回及び反復投与による CNS 関連の臨床症状（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）、ANS 関連の臨床症状（流涎及び知覚過敏）及び筋組織の病理組織学的変化であった。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、おおむね用量に関連しており、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、活性部分であるアミファンプリジンの C_{max} によって誘発された。

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。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

アミファンプリジンをリン酸塩として 100 mg/kg までの用量で、ラット及びマウスを用いた 5 試験の急性毒性試験を実施した。そのうち 4 試験はアミファンプリジンリン酸塩を、1 試験はアミファンプリジン遊離塩基を用いて実施し、アミファンプリジンの遊離塩基型とリン酸型との間で毒性プロファイルに有意差がないことが示された。また、イヌを用いた単回投与毒性試験をアミファンプリジンリン酸塩の 6.25 mg/kg/日（1 日 3 回）までの用量で実施した。

2.6.6.2.1　アミファンプリジンリン酸塩のマウスにおける単回経口投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/005（4.2.3.1.01））

本試験の目的は、マウス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アミファンプリジンの急性毒性を評価することであった。

Ico:OF1 マウスの投与時の週齢は約 6 週齢で、体重は雄が 27～35 g、雌では 21～28 g であった。予備試験を実施し、主試験で投与可能な用量範囲を設定した。予備試験（各群雌雄各 2 例）及び主試験（各群雌雄各 5 例）それぞれ 3 及び 4 用量群に動物を割り付け、アミファンプリジンリン酸塩の単回経口投与を行った。予備試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 13.2、26.4 及び 52.6 mg/kg（それぞれリン酸塩 25、50 及び 100 mg/kg に相当）であった。主試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 0（媒体対照）、1.3、5.3 及び 13.2 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 0、2.5、10 及び 25 mg/kg に相当）であった。投与容量はいずれも 10 mL/kg とし、媒体として 1%のカルボキシメチルセルロース（CMC）を含む注射用水を使用した。

主試験では、動物の生死確認及び一般状態観察は、投与後 15 分、1、2 及び 4 時間、以後毎日 1 回、投与後 14 日目まで行った。予備試験では、投与前に動物の体重を測定した。主

試験では、投与前並びに投与後 7 及び 14 日目に動物の体重を測定した。予備試験では、剖検を実施しなかった。主試験では、全動物について剖検を実施した。

予備試験では、アミファンプリジン遊離塩基 52.6 mg/kg 群の 4 例全例が経口投与後 50 分～1 時間に死亡した。一般状態の変化として、死亡前に痙攣、流涙、流涎及び呼吸促迫が認められた。また、アミファンプリジン遊離塩基 26.4 mg/kg 群の雌 2 例においても投与後約 1 時間に痙攣が認められた。アミファンプリジン遊離塩基 26.4 mg/kg 群においても投与後 1 時間まで呼吸促迫が雌雄ともに認められ、雌 2 例では投与後 2 時間においても呼吸促迫が認められた。いずれの動物も投与後 4 時間以内に回復した。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雄では、軽度な行動抑制も認められた。

主試験では、予備試験の結果に基づき、高用量はアミファンプリジン遊離塩基として 13.2 mg/kg に減らした。いずれの用量においても死亡及び毒性変化は認められず、対照群と比較して、体重及び体重増加量にも差は認められなかった。投与後 14 日目の剖検では動物に肉眼的異常は認められなかった。

結論として、雌雄マウスにアミファンプリジンリン酸塩を単回経口投与した主試験の結果、概略の致死量はアミファンプリジン遊離塩基として雌雄ともに 52.6 mg/kg（リン酸塩として 100 mg/kg）であった。

2.6.6.2.2　アミファンプリジンリン酸塩のマウスにおける単回静脈内投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/007（4.2.3.1.02））

本試験の目的は、マウス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アミファンプリジンの急性毒性を評価することであった。

Ico:OF1 マウスの投与時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 30～34 g、雌では 21～31 g であった。予備試験を実施し、主試験で投与可能な用量範囲を設定した。予備試験（各群雌雄各 1～2 例）及び本試験（各群雌雄各 5 例）それぞれ 3 及び 4 用量群に動物を割り付け、アミファンプリジンリン酸塩の単回静脈内投与を行った。予備試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 6.6、13.2 及び 26.4 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 12.5、25 及び 50 mg/kg に相当）であった。主試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 0（媒体対照）、1.3、5.3 及び 13.2 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 0、2.5、10 及び 25 mg/kg に相当）であった。投与容量はいずれも 10 mL/kg とし、媒体として 0.9%生理食塩液を使用した。

動物の生死確認及び一般状態観察は、投与後 15 分、1、2 及び 4 時間、以後毎日 1 回、投与後 14 日目まで行った。予備試験では、投与前に動物の体重を測定した。主試験では、投与前並びに投与後 7 及び 14 日目に動物の体重を測定した。予備試験及び主試験は、それぞれ投与後 7 及び 14 日目に観察を終了した。予備試験では、剖検を実施しなかった。主試験では、全動物について剖検を実施した。

予備試験では、アミファンプリジン遊離塩基 26.4 mg/kg を雄 1 例に投与したところ痙攣がみられ、投与後数分以内に死亡した。そこで、アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg を

雄 1 例に投与したところ投与後 1 時間に死亡を確認したが、アミファンプリジン遊離塩基 6.6 mg/kg の投与では死亡例は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の全例で 15 分以内に不規則呼吸、流涎及び不安定歩行がみられ、投与後 1 時間においてもほとんどの動物で一般状態の変化が認められた。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雄 2 例及び雄 1 例でそれぞれ流涙及び立毛が認められた。投与後 2 時間以降、異常は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 6.6 mg/kg 群の 4 例全例で、投与後 15 分に不規則呼吸が認められたが、投与後 1 時間以降に異常は認められなかった。

主試験では、アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雄 2 例が投与後 30 分以内に死亡した。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雌 1 例で投与後 15 分に痙攣がみられ、雄 5 例全例で痙攣性運動が認められた。全例で流涎がみられ、雌全例で過度の身づくろいと不安定歩行が認められた。雄では前肢及び／又は頭部の動揺が認められた。投与後 2 時間以降、異常は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 5.3 及び 1.3 mg/kg 群の動物に、一般状態の変化は認められなかった。すべての用量において、対照群と比較して、肉眼的観察、体重及び体重増加量に対照と比較して差はなかった。

結論として、雌雄マウスにアミファンプリジンリン酸塩を単回静脈内投与した主試験の結果、概略の致死量はアミファンプリジン遊離塩基として雄では 13.2 mg/kg（リン酸塩として 25 mg/kg）、雌では 13.2 mg/kg を超える量であった。

2.6.6.2.3　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける単回経口投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/004（4.2.3.1.03））

本試験の目的は、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アミファンプリジンの急性毒性を評価することであった。

Sprague-Dawley ラットの投与時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 138～171 g、雌では 108～137 g であった。予備試験を実施し、主試験で投与可能な用量範囲を設定した。予備試験（各群雌雄各 2 例）及び主試験（各群雌雄各 5 例）それぞれ 3 及び 4 用量群に動物を割り付け、アミファンプリジンリン酸塩の単回経口投与を行った。予備試験における投与量はアミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 13.2、26.4 及び 52.6 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 25、50 及び 100 mg/kg に相当）であった。主試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 0（媒体対照）、1.3、5.3 及び 13.2 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 0、2.5、10 及び 25 mg/kg に相当）であった。投与容量はいずれも 10 mL/kg とし、媒体として 1%CMC 含有注射用水を使用した。

動物の生死確認及び一般状態観察は、投与後 15 分、1、2 及び 4 時間、以後毎日 1 回、投与後 14 日目まで行った。予備試験では、投与前に動物の体重を測定した。主試験では、投与前並びに投与後 7 及び 14 日目に動物の体重を測定した。予備試験及び本試験は、それぞれ投与後 7 及び 14 日目に観察を終了した。予備試験では、剖検を実施しなかった。主試験では、全動物について剖検を実施した。

予備試験では、アミファンプリジン遊離塩基 52.6 mg/kg 群の雌雄各 2 例全例が投与後 1～

3 時間の間に死亡した。52.6 mg/kg 群の動物の一般状態の変化として、死亡前に不規則呼吸、四肢のペダリング動作、流涎、流涙及び間代性痙攣が認められた。アミファンプリジン遊離塩基 26.3 mg/kg 群の雄では、投与後 1～2 時間に不安定歩行、間代性痙攣、流涎、流涙、呼吸促迫及び／又は四肢のペダリング動作が認められた。26.3 mg/kg 群の雌では、投与後 1 時間に不安定歩行のみが認められた。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群のほとんどの動物で、投与後 1 時間に行動抑制及び過度の身づくろいが認められた。

主試験の投与量は、予備試験の結果に基づいて選択した。主試験では死亡例は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg の単回投与により、活動亢進及び過度の身づくろいがほとんどの動物で投与後 1 時間に認められた。投与後 4 時間以降に一般状態の変化は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 5.3 及び 1.3 mg/kg 群の動物に、一般状態の変化は認められなかった。すべての用量において、対照群と比較して、体重及び体重増加量に差は認められず、投与後 14 日目の剖検で肉眼的異常は認められなかった。

結論として、雌雄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主試験の結果、概略の致死量はアミファンプリジン遊離塩基として 13.2 mg/kg（リン酸塩として 25 mg/kg）を超える量であった。

2.6.6.2.4　アミファンプリジン遊離塩基のラットにおける単回経口投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/012（4.2.3.1.04））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジン遊離塩基を単回経口投与したときのアミファンプリジンの急性毒性を評価することであった。

Sprague-Dawley ラットの投与時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 147～172 g、雌では 120～143 g であった。4 用量群にそれぞれ雌雄各 2～5 例を割り付け、アミファンプリジン遊離塩基の単回経口投与を行った。投与量は 0（媒体対照）、2.5、10、25 及び 50 mg/kg であった。投与容量はいずれも 10 mL/kg とし、媒体として 1%CMC 含有注射用水を使用した。

動物の生死確認及び一般状態観察は、0、2.5、10 及び 25 mg/kg 群の動物では投与後 15 分、1、2 及び 4 時間、50 mg/kg 群の動物では投与後 15、30 及び 40 分、1、1.5 及び 2 時間、以後全例について毎日 1 回、投与後 14 日目まで行った。50 mg/kg 群を除く全例について、投与前並びに投与後 7 及び 14 日目に体重を測定した。50 mg/kg 群の動物は、投与後 1、8 及び 14 日目に体重を測定した。観察は 14 日目に終了した。全動物について剖検を実施した。

アミファンプリジン遊離塩基 50 mg/kg 群の雌 1 例では、投与後 1 時間に痙攣が認められ、観察直後に死亡した。アミファンプリジン遊離塩基 50 mg/kg 群では雌雄ともに流涎、過度の身づくろい、前肢の動揺及び立毛が認められた。50 mg/kg 群の他の一般状態の変化として、振戦及び興奮性亢進（跳躍）が雌 1 例のみに、四肢の蒼白が雄 1 例のみに認められた。アミファンプリジン遊離塩基 25 mg/kg 群では、一般状態の変化として、過度の身づくろい、前肢の動揺、半閉眼及び流涎が雌のみに認められた。アミファンプリジン遊離塩基 10 及び 2.5 mg/kg 群の動物に、一般状態の変化は認められなかった。すべての用量において、対照群と比較して、体重及び体重増加量に差は認められず、剖検で肉眼的異常は認められなかっ

た。

結論として、雌雄ラットにアミファンプリジン遊離塩基を単回経口投与した結果、概略の致死量は 50 mg/kg であった。

2.6.6.2.5　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける単回静脈内投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/006（4.2.3.1.05））

本試験の目的は、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アミファンプリジンの急性毒性を評価することであった。

Sprague-Dawley ラットの投与時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 174～209 g、雌では 127～163 g であった。予備試験を実施し、主試験で投与可能な用量範囲を設定した。予備試験（各群雌雄各 2 例）及び主試験（各群雌雄各 5 例）それぞれ 3 及び 4 用量群に動物を割り付け、アミファンプリジンリン酸塩の単回静脈内投与を行った。予備試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 6.6、13.2 及び 26.4 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 12.5、25 及び 50 mg/kg に相当）であった。主試験における投与量は、アミファンプリジン遊離塩基としてそれぞれ 0（媒体対照）、1.3、5.3 及び 13.2 mg/kg（リン酸塩としてそれぞれ 0、2.5、10 及び 25 mg/kg に相当）であった。投与容量はいずれも 10 mL/kg とし、媒体として 0.9%生理食塩液を使用した。

動物の生死確認及び一般状態観察は、投与後 15 分、1、2 及び 4 時間、以後毎日 1 回、投与後 14 日目まで行った。予備試験では、投与前に動物の体重を測定した。主試験では、投与前並びに投与後 7 及び 14 日目に動物の体重を測定した。予備試験及び主試験は、それぞれ投与後 7 及び 14 日目に観察を終了した。予備試験では、剖検を実施しなかった。主試験では、全動物について剖検を実施した。

予備試験では、アミファンプリジン遊離塩基 26.4 mg/kg を雄 1 例に投与したところ痙攣が認められ、投与後数分以内に死亡した。そこで、アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg を雌雄各 2 例に投与したところ、雌雄各 1 例がそれぞれ投与後 15 及び 45 分以内に死亡した。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例では投与後 15 分以内に間代性痙攣が認められた。雄 1 例では、四肢のペダリング動作、着色涙、流涎、不規則呼吸及び不安定歩行が認められた。生存例 2 例では、少なくとも投与後 4 時間まで流涎、不安定呼吸（雄のみ）及び不安定歩行が認められた。投与後 1 日目以降、異常は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 6.6 mg/kg 群では、投与後 15 分以内に全例で不安定歩行、不安定呼吸及び跳躍が認められた。投与後 1 時間以降、異常は認められなかった。

主試験では、アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雌雄各 2 例の死亡を投与後 15 分～2 時間以内に確認した。アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 3 例では、投与後 15 分以内に痙攣が認められた。雌の生存例では流涎及び行動抑制が、雄の生存例では行動抑制が認められた。この群では投与後 4 時間以降に異常は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 5.3 mg/kg 群では、投与直後に全例で不規則呼吸及び立毛が認められた。また、雄では前肢の動揺が、雌では流涎及び行動抑制が認められた。投与後 1 時

間以降に異常は認められなかった。アミファンプリジン遊離塩基 1.3 mg/kg 群の動物に、一般状態の変化は認められなかった。すべての用量において、対照群と比較して、体重及び体重増加量に明らかな差は認められず、剖検で肉眼的異常は認められなかった。

結論として、雌雄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主試験の結果、概略の致死量はアミファンプリジン遊離塩基として 13.2 mg/kg（リン酸塩として 25 mg/kg）であった。

2.6.6.2.6 アミファンプリジンリン酸塩のイヌにおける経口投与 MTD 試験（試験番号 S12300（4.2.3.1.06））

本 MTD 試験の目的は、イヌにおいて 1 日 3 回、単回漸増経口投与したときのアミファンプリジンリン酸塩の毒性を評価し、更に 1 日 3 回、7 日間経口投与したときのアミファンプリジンの毒性と TK プロファイルを評価することであった。

本試験の漸増単回投与期（1～3 群）では、カプセルに充填した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 1.0、2.0 及び 3.0 mg/kg/日の用量で 4 例のビーグル犬（雌雄各 2 例）に 1 日 3 回経口投与した。用量を制限する有害作用が認められない場合は、少なくとも 2 日間の休薬期間を設けた後、より高い用量を 1 日間投与した。本試験の反復投与期（4 群）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 3.3 mg/kg/日の用量をカプセルに充填し、同じ動物（雌雄各 2 例）に 1 日 3 回、7 日間経口投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基の用量を記載した（アミファンプリジン遊離塩基の投与量をリン酸塩の投与量に換算するには、1.9 を乗じる）。

試験デザインを表 2.6.6.2-1 に示す。

表 2.6.6.2-1　　イヌ経口投与 MTD 試験デザイン

Dose No.	No. Animals*		Test Material	Dose Level†		No. Days Dosed
	Male	Female		mg/kg/day**	mg/kg/dose	
1	2	2	AP	1.9	0.63	1
2	2	2	AP	3.8	1.3	1
3	2	2	AP	5.7	1.9	1
4	2	2	AP	6.25	2.08	7

AP = amifampridine phosphate; MTD = maximum tolerated dose.
* The same animals (2/sex) were used for each dose no.
** Equivalent to amifampridine free base dose levels of 1.0, 2.0, 3.0, and 3.3 mg/kg/day, respectively.
† Animals were dosed three times a day.

毒性の評価は、死亡、一般状態、体重及び摂餌量に基づいて行った。1.0、3.0 及び 3.3 mg/kg 群の投与後、1 日目の特定時点で TK 分析用（血漿中濃度を測定）の採血を行った。

試験期間中、死亡はなかった。体重及び摂餌量には投与起因の明らかな変化は認められなかった。投与に関連した最も代表的な一般状態変化は流涎及び下痢であり、いずれも低用量

（1.0 mg/kg）で認められた。3.0 mg/kg 以上の用量では、浅速呼吸、咳、嘔吐、斜視及び振戦が認められた。最も注目すべき一般状態変化は、3.3 mg/kg/日の用量で投与 22 日目の 2 回目投与後約 6 時間に雌で認められた運動失調、流涎、軽度振戦の持続及び刺激への無反応であった。150 mL の 0.9%生理食塩液を静脈内にボーラス投与したところ、その約 30 分後に顕著な筋振戦を呈したため、0.5 mL の 5 mg/mL ミダゾラムを静脈内投与し、動物は直ちに回復した。動物は上記の最初の症状から 1 時間以内に完全に回復したが、有害な一般状態変化であったため、3 回目の投与は行わなかった。この動物は翌日には正常な状態であったため、残りの投与期間には投与を行った。

アミファンプリジンの TK 解析の結果、全身曝露量は雌雄で同程度であり、アミファンプリジンは速やかに吸収され、C_{max} は経口投与後約 45 分であった。アミファンプリジンの消失半減期（$t_{1/2}$）は約 2 時間であり、用量を増加しても変化はなかった。7 日間の反復投与による血漿中に明らかなアミファンプリジンの蓄積は認められなかった。

結論として、カプセルに充填したアミファンプリジンリン酸塩を雌雄イヌに最長 7 日間経口投与したときの MTD は、一般状態に基づきアミファンプリジン遊離塩基 2.0 mg/kg/日（リン酸塩 3.8 mg/kg/日）と判断した。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（TK 評価を含む）

ラット及びイヌにおける亜慢性反復経口投与毒性試験（イヌにおける 14 日間 MTD 試験 1 試験、ラットにおける 7 日間試験 1 試験、各動物種における 28 日間試験 2 試験及びラットにおける 13 週間試験）は、アミファンプリジン遊離塩基として最高 39.5 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）までの用量で実施した。ラット 21 日間経口投与毒性試験を計画して実施したが、中及び高用量群では一般状態観察で毒性変化がみられたため、投与 2 日目に試験を中止した。また、ラット及びイヌにおけるアミファンプリジンリン酸塩を用いた慢性反復経口投与毒性試験も実施されている（それぞれ 6 及び 9 ヵ月間試験）。非げっ歯類としてイヌを選択した理由は、肝細胞を用いたアミファンプリジンリン酸塩のクリアランスの動物種間比較試験において、イヌ肝細胞がヒト肝細胞と同様に低いアセチル化能を示し、アミファンプリジンへの高曝露が期待できること（試験番号 PR6958/CC22[redacted]（4.2.2.4.01））に基づいている。逆に、ラットは、肝細胞において高いアセチル化能を示したことから、アミファンプリジンに加えて N-アセチル体への高曝露を期待して選択した。ラット 21 日間試験及びイヌ 14 日間 MTD 試験を除き、いずれの試験も GLP に準拠して実施した。反復投与毒性試験では、臨床投与方法に準じてアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回経口投与した。

2.6.6.3.1 アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 7 日間反復経口投与毒性予備試験（試験番号 [redacted] 266/011（4.2.3.2.01））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 7 日間経口投与したときの毒性を評価することであった。

Sprague-Dawley ラットの投与開始時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 178～217 g、雌では

138～170 g であった。動物を 5 用量群に割り付け、臨床投与方法に準じてアミファンプリジンリン酸塩を約 6 時間間隔で 1 日 3 回経口投与した。

試験デザインを表 2.6.6.3-1 に示す。

表 2.6.6.3-1　　ラット 7 日間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)**	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Male	Female				
1	5	5	Vehicle*	0	5	0
2	5	5	AP	1	5	0.07
3	5	5	AP	10	5	0.66
4	5	5	AP	30	5	2
5	5	5	AP	60	5	4

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Vehicle was 1% CMC in water.

** Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0, 0.53, 5.3, 15.8, and 31.6 mg/kg/day, respectively.

† Animals were dosed three times a day.

ラット単回経口投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/004（4.2.3.1.03））において、アミファンプリジン遊離塩基 5.3 mg/kg は良好な忍容性を示し、アミファンプリジン遊離塩基 13.2 mg/kg では CNS に関連する有害な一般状態変化が認められたことから、これらの用量を選択した。

動物は生死確認を 1 日 2 回、一般状態観察を少なくとも 1 日 1 回行った。投与開始前及び投与終了時に詳細な観察を実施した。動物は、投与前並びに投与 0、3 及び 6 日目の投与前に体重を測定した。個々の摂餌量を毎週測定した。投与終了時に絶食した動物から血液学的検査及び血液生化学的検査用のサンプルを採取した。投与終了時に剖検を行った。一部の器官重量を測定した（副腎、心臓、腎臓及び肝臓）。

死亡はなかった。試験期間中、CNS 関連の一般状態変化が認められた。アミファンプリジン遊離塩基 31.6 mg/kg/日（10.5 mg/kg、1 日 3 回投与）群の動物では 3 例が活動亢進を示し、雌 1 例では投与 1 日目の 2 回目の投与後に振戦が認められた。過度の身づくろいがアミファンプリジン遊離塩基の 5.3 mg/kg/日以上の用量で散見され、アミファンプリジン遊離塩基 15.8 mg/kg/日の数例と 31.6 mg/kg/日のほとんどの動物で流涎が認められた。体重及び摂餌量に変化は認められなかった。血液学的検査でみられた軽微な変化（アミファンプリジン遊離塩基 15.8 mg/kg/日群の雄の血球容積の微増及び 31.6 mg/kg/日群の雌の大型非染色細胞数の微増）は、偶発的な変化と考えられた。アミファンプリジン遊離塩基 31.6 mg/kg/日群の雌では、対照群と比較して用量に関連した心臓重量の微減がみられた。数例の動物（アミファンプリジン遊離塩基 0.53 mg/kg/日群の雌 1 例、5.3 mg/kg/日群の雌 1 例、15.8 mg/kg/日群の雄 1 例及び 31.6 mg/kg/日群の雌雄各 1 例）では、胃に暗い部分が認められた。

結論として、アミファンプリジン遊離塩基の 31.6 mg/kg/日、1 日 3 回 10.5 mg/kg（リン酸塩 60 mg/kg/日）までの経口投与では、先に実施したアミファンプリジン遊離塩基 26.3 mg/kg/

日の単回経口投与毒性試験でみられた振戦、痙攣及び死亡といった重篤な毒性変化は認められなかった。これらの結果より、アミファンプリジン遊離塩基 31.6 mg/kg/日の 1 日 3 回の分割投与がラットの 4 週間反復投与毒性試験において実施可能な高用量であることが示された。

2.6.6.3.2 アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 21 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 S12741（4.2.3.2.02））

本試験の目的は、ラットにおけるアミファンプリジンリン酸塩の MTD と 1 日 3 回 21 日間経口投与したときのアミファンプリジンの TK プロファイルを評価することであった。

雌雄各 36 例の Sprague-Dawley ラットを主群では雌雄各 5 例/群、TK サテライト群では雌雄各 4 例/群の 4 つの投与群に無作為に割り付けた。群構成は媒体群 1 群、アミファンプリジンリン酸塩 3 群とした。すべての動物に 1 日 3 回の経口投与を行った。遊離塩基はアミファンプリジンの薬理活性部分であるため、本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として記載した。

アミファンプリジンリン酸塩群のアミファンプリジン遊離塩基としての投与量は 39.5、78.9 及び 157.9 mg/kg/日であった。媒体群には等量の滅菌水を 1 日 3 回投与した。各投与後、動物の詳細な観察を行った。

試験デザインを表 2.6.6.3-2 に示す。

表 2.6.6.3-2　　ラット 21 日間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Toxicity		Toxicokinetic					
	Male	Female	Male	Female				
1	5	5	4	4	Vehicle*	0	5	0
2	5	5	4	4	AP	39.5	5	2.6
3	5	5	4	4	AP	78.9	5	5.3
4	5	5	4	4	AP	157.9	5	10.5

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Vehicle was sterile water for injection.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

重篤な毒性が中用量群（78.9 mg/kg/日）の 18 例中 13 例及び高用量群（157.9 mg/kg/日）の全例で投与開始日に認められた。主な一般状態変化として、赤色の口腔内分泌物、神経筋不安定性（攣縮、動揺及び跳躍）及び異常姿勢が認められた。これらの毒性変化は投与初期から発現し、高用量群でより重度であった。動物実験倫理の観点から、高用量群は投与 1 日目の 2 回目の投与後に、残りの動物は投与 2 日目の 3 回目の投与後に投与を中止した。低用量群の 1 例では、投与 1 日目の 3 回目の投与後に 1 回、攣縮及び穴掘り行動が認められたが、時間経過とともに消失し、その後の投与では認められなかった。その他の低用量群の動物及び媒体対照群の動物に異常は認められなかった。

これらの結果から、MTD を明確にするための追加検討ではアミファンプリジンリン酸塩の 75 mg/kg/日、アミファンプリジン遊離塩基として 39.5 mg/kg/日までを 1 日 3 回（遊離塩基 13.2 mg/kg/回）、2 日間反復投与することとした。ラットにアミファンプリジン遊離塩基として 39.5 mg/kg/日を 13 週間経口投与した試験において、重篤な毒性変化がみられないことが確認されたため、本試験は 2 日目に中止した。

2.6.6.3.3　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 4 週間反復経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（試験番号 [redacted] 266/013（4.2.3.2.03））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 28 日間経口投与したときのアミファンプリジンの毒性及び TK プロファイルを評価することであった。28 日間の投与後、2 週間にわたって動物を観察し、回復性、持続性及び遅延毒性発現を評価した。

Sprague-Dawley ラットの投与開始時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 172～215 g、雌では 136～176 g であった。動物を 4 用量群に割り付け、臨床投与方法に準じてアミファンプリジンリン酸塩を約 6 時間間隔で 1 日 3 回経口投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-3 に示す。

表 2.6.6.3-3　　ラット 4 週間反復経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)**	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Toxicity (Recovery)		Toxicokinetic					
	Male	Female	Male	Female				
1	10 (5)	10 (5)	0	0	Vehicle*	0	5	0
2	10 (0)	10 (0)	6	6	AP	7.5	5	0.5
3	10 (0)	10 (0)	6	6	AP	24	5	1.6
4	10 (5)	10 (5)	6	6	AP	75	5	5

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Vehicle was 1% CMC in water.

** Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

† Animals were dosed three times a day.

動物は生死確認を 1 日 2 回、投与 0 日前に 1 回、各投与後に少なくとも 1 回、一般状態の観察を行った。詳細な観察を毎週実施した。投与及び休薬期間中、動物の体重を週 1 回測定した。個々の摂餌量を毎週測定した。眼科学的検査は、投与開始前及び投与 4 週目（1 及び 4 群の動物のみ）に実施した。投与 28 日目に絶食した動物から血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査用のサンプルを採取した。TK 測定のための血漿サンプルは、投与 0 及び 25 日目に投与後 0.5、1、3 及び 5 時間（初回投与後）、2 回目の投与後 1 時間（初回投与後 7 時間）及び 3 回目の投与後 1 時間（初回投与後 13 時間）に、スパースサンプリング（3 例／時点）により非絶食下の動物から採取した。血漿中アミファンプリジン濃度は、電気化学的検出法により高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。定量下限（LOQ）

は 8 ng/mL であった。TK パラメータは WinNonlin ソフトウェアを用いたノンコンパートメント法により算出した。

試験終了時に、剖検を実施し、病理組織学的検査のために組織を採取した。採取した臓器のうち、副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、脾臓、精巣、胸腺及び甲状腺の重量を測定した。4 週間の投与期間終了後に安楽死させた 1（対照）及び 4 群（高用量）の動物のすべての保存組織について病理組織学的検査を実施した。

試験期間中、死亡はなかった。投与期間終了時の眼科学的検査、血液学的検査、剖検及び病理組織的検査では、アミファンプリジン投与に関連した変化は認められなかった。

主な一般状態変化として、12.6 及び 39.5 mg/kg/日群で、1 日の初回投与後に流涎が認められた。39.5 mg/kg/日群では、投与 3～4 週目に 1 日の 2 及び 3 回目投与後にも流涎が散見された。39.5 mg/kg/日群の動物では、投与期間を通じて流涎の発現が増加した。39.5 mg/kg/日群の動物では、過度の身づくろい及び活動亢進も散見された。

すべてのアミファンプリジンリン酸塩群の雄では、対照群と比較して、体重、体重増加量及び摂餌量に変化は認められなかった。39.5 mg/kg/日群の雌では、体重増加の有意な増加が、特に投与 1 週目に認められた。この体重増加量の変化は休薬後には認められなかった。

血液生化学的検査では、39.5 mg/kg/日群の雌雄で、対照群と比較して有意な尿素の増加及びナトリウムの減少が認められた。しかし、平均値は背景値の範囲内であり、腎臓に関連する病理組織学的所見は認められなかったことから、毒性学的意義のない変化であると考えられた。雌では、用量に依存した比重の減少を伴う尿量の増加が認められた。これらの変化は投与に関連した変化と考えられた。39.5 mg/kg/日群の雌では、対照群と比較して、肝臓及び腎臓の絶対及び相対重量の増加がみられたが、関連する病理組織学的変化を伴わず、休薬期間終了後には認められなかった。

アミファンプリジンへの動物の曝露は、分析法及び血液サンプル数が血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）を算出するには不十分であったため、最高血中濃度到達時間（T_{max}）及び C_{max} のみを評価した。投与開始日（投与 0 日目）の初回投与後に得られた TK パラメータを表 2.6.6.3-4 に示す。

表 2.6.6.3-4　　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アミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)	
	M	F	M	F
7.5	1	0.5	16.1	12.4
24	0.5	0.5	16.9	33.0
75	0.5	0.5	135.5	161.4

C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; T_{max} = time to maximum plasma concentration.
*　Equivalent to amifampridine free base dose levels of 4.0, 12.6, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

限定的な TK 結果ではあるが、C_{max} 値はおおむね用量に関連して増加し、12.6 及び

39.5 mg/kg/日群では雄よりも雌の方が高かった。

結論として、雌雄 Sprague-Dawley ラットにアミファンプリジン遊離塩基を 39.5 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）の用量で 1 日 3 回 28 日間経口投与すると、CNS 関連の一般状態変化（雌雄）及び体重増加量、尿量並びに腎臓及び肝臓重量（相対及び絶対；雌のみ）の変化が認められた。これらの所見は、2 週間の休薬期間終了時までに回復した。12.6 mg/kg/日群では 39.5 mg/kg/日群と同様に、軽微な流涎が認められたが、毒性とはみなさなかった。以上の結果から、アミファンプリジン遊離塩基の NOAEL は 12.6 mg/kg/日（リン酸塩 24 mg/kg/日）と考えられた。

2.6.6.3.4　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 4 週間反復経口投与毒性試験（試験番号 [redacted] AA40848（4.2.3.2.04））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 28 日間経口投与したときのアミファンプリジンの毒性とアミファンプリジンの TK プロファイルを評価することであった。この試験は、曝露と毒性の関係を確認することにより、最初のラット 4 週間試験（試験番号 [redacted] 266/013（4.2.3.2.03））をサポートするために実施した。

Sprague-Dawley ラットの投与開始時の週齢は 6 週齢で、体重は雄が 183～216 g、雌では 125～154 g であった。動物を 4 用量群に割り付け、臨床投与方法に準じてアミファンプリジンリン酸塩を約 6 時間間隔で 1 日 3 回投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-5 に示す。

表 2.6.6.3-5　　ラット 4 週間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals Toxicity/Toxicokinetic		Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)**	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Male	Female				
1	14	14	Vehicle*	0	5	0
2	21	21	AP	7.5	5	0.5
3	21	21	AP	24	5	1.6
4	21	21	AP	75	5	5

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Vehicle was 1% CMC in water.

** Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

† Animals were dosed three times a day.

動物は生死確認を 1 日 2 回、投与前に 1 回、各投与後に少なくとも 1 回、一般状態変化について観察を行った。詳細な観察を毎週実施した。動物の体重を週 1 回測定した。TK 測定のための血漿サンプルは、投与初日及び 27 日目の投与前、投与後 5、15、30、45 分後、1、2、3 及び 6 時間（初回投与後）、2 回目の投与後 5、30 分及び 6 時間、3 回目の投与後 5、15、30、45 分後、1、2、3、6 及び 12 時間に、スパースサンプリング（3 例／時点）により

非絶食下の動物から採取した。血漿アミファンプリジン濃度は、バリデート済みの液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）生物学的分析法を用いて測定し、LLOQは 5 ng/mL であった。TK パラメータの C_{max}、T_{max}、及び 0 時間から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-t}）は、Kinetica 4.4.1 を用いたノンコンパートメント法により算出した。投与 28 日目の最終採血後、全動物を安楽死させた。

試験期間中、死亡はなかった。12.6 及び 39.5 mg/kg/日群の動物では流涎がみられ、雌雄ともに用量の増加に伴って発現率の増加が認められた。投与群の雌では用量に関連した体重増加量の増加が認められ、12.6 及び 39.5 mg/kg/日群の雌で統計学的に有意であった。これらの所見は、ラットを用いた最初の 4 週間試験でみられた所見と一致した。

T_{max} は 0.083～1 時間の間に認められ、各投与前の血漿中薬物濃度は 5 ng/mL 未満であったにもかかわらず、投与初日及び 4 週目の同日の 3 回目投与後の C_{max} 値は雌雄ともにおおむね高値を示した。AUC_{0-t} は、雄では同日の 1 及び 3 回目投与では同程度であり、雌ではやや高値（約 1.2 倍）を示した。投与初日（約 2 倍）及び投与 4 週目（2 倍未満）の雌の AUC_{0-t} は、いずれの用量においても雄よりも高値を示し、性差が認められた。また、AUC_{0-t} は投与初日と比較して投与 4 週目に高値を示した（雄で約 2 倍）、投与初日及び 4 週目のアミファンプリジンの主要な TK パラメータである T_{max}、C_{max}、AUC_{0-t} 及び $t_{1/2}$ をそれぞれ表 2.6.6.3-6 及び表 2.6.6.3-7 に示す。

表 2.6.6.3-6　　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
7.5 - 1st dose	ND	0.50	ND	5.68	ND	ND	ND	ND
7.5 - 2nd dose	0.083	0.50	7.55	8.64	ND	ND	ND	ND
7.5 - 3rd dose	0.50	0.50	10.5	13.2	3.44	7.23	0.50	0.75
24 - 1st dose	0.25	0.50	18.3	30.9	ND	13.9	ND	0.75
24 - 2nd dose	0.50	0.50	32.4	43.8	ND	ND	ND	ND
24 - 3rd dose	0.083	0.75	29.3	82.9	20.3	51.1	1.00	1.00
75 - 1st dose	0.50	0.50	131	227	187	287	6.00	3.00
75 - 2nd dose	0.50	0.50	743	219	ND	ND	ND	ND
75 - 3rd dose	0.25	0.75	232	285	156	345	3.00	3.00

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; $t_{1/2}$ = elimination half-life; ND = not determined; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 4.0, 12.6, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

表 2.6.6.3-7　　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
7.5 - 1st dose	0.50	0.25	6.64	12.6	ND	7.22	ND	0.75
7.5 - 2nd dose	0.083	0.083	16.9	12.9	ND	ND	ND	ND
7.5 - 3rd dose	0.25	0.25	10.5	15.7	6.01	8.77	0.75	1.00
24 - 1st dose	0.50	1.00	32.9	64.6	41.6	77.0	2.00	2.00
24 - 2nd dose	0.50	0.50	41.3	55.6	ND	ND	ND	ND
24 - 3rd dose	0.25	0.75	51.9	80.2	34.9	55.2	1.00	1.00
75 - 1st dose	0.50	0.50	243	413	397	449	6.00	3.00
75 - 2nd dose	0.50	0.50	556	835	128	ND	0.50	ND
75 - 3rd dose	0.25	0.50	268	516	358	601	3.00	3.00

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; ND = not determined; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 4.0, 12.6, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

結論として、雌雄 Sprague-Dawley ラットにアミファンプリジン遊離塩基を 39.5 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）までの用量で 1 日 3 回 28 日間経口投与すると、用量の増加に伴って Cmax 及び AUC が増加し、12.6 及び 39.5 mg/kg/日群では流涎が認められた。

2.6.6.3.5　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 BMN125-10-055（4.2.3.2.05））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 13 週間経口投与したときのアミファンプリジンの毒性及び TK プロファイルを評価し、4 週間の休薬期間後に回復性、持続性及び遅延毒性発現を評価することであった。

雌雄の Sprague-Dawley ラットを 8 群に割り付け、経口投与した。動物には媒体又はアミファンプリジンリン酸塩を投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-8 に示す。

表 2.6.6.3-8　　ラット 13 週間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)**	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Toxicity/TK‡		Recovery					
	Male	Female	Male	Female				
1	15	15	10	10	Vehicle*	0	5	0
2	15	15	-	-	AP	7.5	5	0.5
3	15	15	-	-	AP	22.5	5	1.5
4	15	15	10	10	AP	75	5	5
5	4	4	-	-	Vehicle*	0	5	0
6	19	19	-	-	AP	7.5	5	0.5
7	19	19	-	-	AP	22.5	5	1.5
8	19	19	-	-	AP	75	5	5

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration; TK = toxicokinetic.

* Vehicle was reverse osmosis water.

** Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0, 4.0, 11.9, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

† Animals were dosed three times a day.

‡ Toxicity animals were assigned to Groups 1-4, and TK rats were assigned to Groups 5-8.

毒性の評価は、死亡、一般状態観察、体重、体重変化、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査及び病理学的検査に基づいて行った。アミファンプリジン及びその一次代謝物、N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide（3-N-アセチル体）の TK 評価のために血液サンプルを採取した。

39.5 mg/kg/日の TK 群の雌 1 例が投与 92 日目に瀕死状態となったため安楽死させた以外は、毒性及び TK 動物はいずれも計画剖検まで生存した。瀕死例では投与 92 日目の 2 回目の投与後に安楽死させる前に円背、前肢のパドリング、ミオクローヌス性痙攣（全身）、透明な口腔内分泌物及び眼脂並びに不規則呼吸が認められた。39.5 mg/kg/日の TK 群の数例で肢のパドリングと透明な口腔内分泌物が認められたため、この瀕死状態は投与に関連したものと考えられた。

投与及び休薬期間中に認められた投与に関連した一般状態変化として、毒性群の動物では 39.5 mg/kg/日群の雄 1 例で投与 2 日目に透明な口腔内分泌物が認められた。一方、TK 群の動物では、絶食させた後（投与 30 及び 79 日目）、透明な口腔内分泌物、前肢のパドリング及び触覚過敏がそれぞれ雌雄各 3 例、雌 2 例及び雌 1 例で認められた。絶食した TK 群の動物で認められた一般状態変化は、アミファンプリジンの血漿中濃度の上昇とよく相関していた。毒性群では 39.5 mg/kg/日群の雌 1 例に、TK 群では 11.9 mg/kg/日群の雌 1 例に、それぞれ投与 92 及び 64 日目に腫瘤が認められた。発生率が低かったため、腫瘤の原因は不明であった。

投与及び休薬期間中、すべてのアミファンプリジンリン酸塩群の平均体重及び体重増加（投与 1～92 日目）に毒性学的に意義のある変化は認められなかった。対照群と比較して、平均体重のわずかではあるが有意な増加又は減少が散見されたが、一貫性がなく、軽度な変化であったことから、毒性学的に重要ではないと考えられた。39.5 mg/kg/日群では、休薬期間中の平均体重に有意差は認められなかった。39.5 mg/kg/日群の雌では、休薬期間全体としてわずかではあるが有意に低い体重変化が認められた。39.5 mg/kg/日群の雌の最終平均体重

は休薬期間中の対照群の範囲と差がなかったことから、体重の軽微な減少は毒性とはみなさなかった。

投与期間中、4.0 mg/kg/日群の雌では 1 期間、11.9 mg/kg/日群の雄で 1 期間、39.5 mg/kg/日群の雌雄では数期間、対照群と比較して平均摂餌量が有意に高かった。摂餌量の増加は投与に関連したものと考えられたが、関連する体重変化や一般状態の変化が認められなかったことから、毒性ではないと考えられた。休薬期間中、投与に関連した摂餌量の変化は認められなかった。

TK の結果、アミファンプリジンの曝露量は 4.0～39.5 mg/kg/日の用量範囲で、用量増加に伴い増加した。C_{max} 及び 0 から 6 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}6h}$）は、用量比を上回る増加を示した。投与 1 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の曝露量は、3 回目投与と比較して、1 回目投与でおおむね高値を示した。雄では雌と比較してアミファンプリジンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の低値が認められた。反復投与後に蓄積（$AUC_{0\text{-}6h}$ に基づく）が認められた。投与 44 及び 92 日目の $AUC_{0\text{-}6h}$ 蓄積比は、それぞれ 1.05～3.41 及び 1.44～5.27 であった。投与 1、44 及び 92 日目のアミファンプリジンの主要な TK パラメータである T_{max}、C_{max}、$AUC_{0\text{-}6h}$ 及び $t_{1/2}$ をそれぞれ表 2.6.6.3-9、表 2.6.6.3-10 及び表 2.6.6.3-11 に示す。

表 2.6.6.3-9　　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 13 週間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
7.5 - 1st dose	0.50	0.33	11.9	15.5	16.5	21.1	1.04	1.09
7.5 - 2nd dose	0.50	0.50	9.7	13.6	14.4	15.3	ND	ND
7.5 - 3rd dose	0.50	0.25	11.4	15.2	12.1	15.5	ND	ND
22.5 - 1st dose	0.50	0.33	59.5	88.3	74.9	104	1.37	0.859
22.5 - 2nd dose	0.50	0.50	52.2	79.1	65.3	73.7	ND	0.891
22.5 - 3rd dose	0.50	0.50	31.4	76.1	44.5	79.5	ND	1.18
75 - 1st dose	1.00	0.50	278	342	530	543	1.34	1.09
75 - 2nd dose	0.50	0.50	320	266	458	443	0.683	1.06
75 - 3rd dose	0.50	0.50	168	184	222	280	1.71	1.48

$AUC_{0\text{-}6h}$ = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 6 hours post-dose; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; $t_{1/2}$ = elimination half-life; ND = not determined; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 4.0, 11.9, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

表 2.6.6.3-10　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 13 週間反復経口投与したときの投与 44 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
7.5 - 1st dose	0.50	0.50	19.0	33.3	22.1	34.6	1.79	1.39
7.5 - 2nd dose	0.25	0.25	16.8	21.1	22.3	27.7	0.556	0.452
7.5 - 3rd dose	0.50	0.25	10.1	33.8	12.6	25.9	ND	0.814
22.5 - 1st dose	0.50	0.33	62.0	144	83.3	160	1.68	1.02
22.5 - 2nd dose	0.25	0.25	82.4	104	119	128	0.940	0.825
22.5 - 3rd dose	0.50	0.25	50.1	264	60.5	162	1.16	1.10
75 - 1st dose	1.00	0.50	403	902	644	1154	1.14	1.28
75 - 2nd dose	0.25	0.25	592	1240	874	1381	0.767	0.973
75 - 3rd dose	0.50	0.25	326	645	644	955	1.04	1.34

$AUC_{0\text{-}6h}$ = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 6 hours post-dose; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; ND = not determined; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 4.0, 11.9, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

表 2.6.6.3-11　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 13 週間反復経口投与したときの投与 92 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
7.5 - 1st dose	0.50	0.50	18.3	32.5	24.3	30.4	1.48	1.15
7.5 - 2nd dose	0.50	0.25	19.0	30.4	26.9	34.9	1.02	0.407
7.5 - 3rd dose	0.50	0.25	18.0	30.3	19.2	28.8	1.30	1.02
22.5 - 1st dose	0.50	0.33	88.1	196	110	182	1.73	0.975
22.5 - 2nd dose	0.50	0.50	74.8	191	111	184	0.748	0.723
22.5 - 3rd dose	0.50	0.50	88.5	223	93.7	211	1.19	1.00
75 - 1st dose	1.00	0.50	427	924	826	1346	1.26	1.10
75 - 2nd dose	0.25	0.25	938	1204	1423	1451	1.00	0.840
75 - 3rd dose	0.50	0.25	690	941	918	1478	0.957	1.01

$AUC_{0\text{-}6h}$ = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 6 hours post-dose; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 4.0, 11.9, and 39.5 mg/kg/day, respectively.

3-N-アセチル体の曝露量も、4.0～39.5 mg/kg/日の用量範囲で用量に伴い増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の増加は雌では用量比を下回り、雄ではアミファンプリジンリン酸塩の用量にほぼ比例したことから、高用量の成績は初回通過効果又は代謝経路の飽和を示唆した。3-N-アセチル体の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の性差は 2 倍未満であった。なお、本試験の投与スケジュールでは、アミファンプリジンリン酸塩の反復投与による 3-N-アセチル体の蓄積性は認めら

れなかった。アミファンプリジンに対する 3-N-アセチル体の $AUC_{0\text{-}6h}$ 比は、アミファンプリジンリン酸塩の経口投与後、アミファンプリジンが 3-N-アセチル体に多く変換されることを示した。3-N-アセチル体の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ は、アミファンプリジンよりも高く、血漿中濃度は、すべての時点及び用量で 3-N-アセチル体がアミファンプリジンよりも高い濃度で存在することを示した。3-N-アセチル体の日間 $AUC_{0\text{-}6h}$ は、投与 1、44 及び 92 日目でおおむね類似していた。投与後 0.5 時間のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度は、動物が摂餌可能な 1、44 及び 92 日目よりも、投与後に動物を絶食させた 30 及び 79 日目でおおむね高かったことから、食事の影響の可能性が示唆された。

投与 30、58 及び 93 日目に、39.5 mg/kg/日群の雌では、対照群と比較して軽度な尿素窒素濃度の低下が認められた。また、39.5 mg/kg/日群では雌雄ともにアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の軽度な上昇も認められた。これらの変化は非常に軽度で、休薬 15 日目までに回復し、毒性とはみなさなかった。

投与及び休薬期間終了時の剖検では、毒性群及び TK 群のいずれの動物においても投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。39.5 mg/kg/日群の雌雄では、投与に関連した肝臓、副腎及び唾液腺（下顎）の絶対及び／又は相対重量の増加が投与期間終了時に認められた。回復期間終了時の器官重量の変化は、正常な生物学的変動の範囲内であり、投与に関連したものではなかった。

投与期終了時の投与に関連した病理組織学的所見として、39.5 mg/kg/日群の動物で軽微から軽度な唾液腺（下顎）の肥大が認められた。休薬期間終了時には唾液腺（下顎）の肥大はみられず、回復性が認められた。休薬期間終了時に 39.5 mg/kg/日群の雌 1 例で、乳腺に癌腫が認められた。アミファンプリジンリン酸塩を投与した毒性群の動物では乳腺に他の増殖性変化は認められず、本試験の試験施設（Covance Laboratories、Madison、WI）の 13 及び 26 週間試験の背景病変では、雌性 Sprague-Dawley ラットの乳腺腫瘍は発生率が低かったことから、この所見の毒性学的意義は不明であった。投与及び休薬期間終了時に認められたその他の病理組織学的所見は、いずれも自然発生的又は偶発的なものと考えられた。

結論として、アミファンプリジン遊離塩基 0、4.0、11.9 及び 39.5 mg/kg/日（リン酸塩 0、7.5、22.5 及び 75 mg/kg/日）の用量で、雌雄ラットに 1 日 3 回 13 週間経口投与をした結果、39.5 mg/kg/日（リン酸塩 75 mg/kg/日）の TK 群の雌 1 例で早期に瀕死が生じた。39.5 mg/kg/日群では、透明な口腔内分泌物及び肢のパドリングが投与に関連した一般状態変化として認められたが、おおむね投与のために絶食させた TK 群の動物に限られていた。すべてのアミファンプリジンリン酸塩群では、摂餌量の有意な増加が散見されたが、体重変化は認められなかったため、毒性とはみなさなかった。39.5 mg/kg/日群では、軽微で可逆的な臨床検査所見が散見された。アミファンプリジンリン酸塩投与に起因する病理組織学的変化はなかった。39.5 mg/kg/日群の動物の投与期間終了時の剖検では、軽微から軽度な唾液腺（下顎）の肥大が認められたが、4 週間の休薬期間終了時にはみられなかったことから、本所見の回復性が確認された。臨床及び病理学的検査所見は、いずれも頻度及び程度が低く、毒性とはみなさなかった。39.5 mg/kg/日群の雌 1 例及び 11.9 mg/kg/日群の雌 1 例では、それぞれ投与

92 及び 64 日目に腫瘤が認められたが、腫瘤の原因は特定できなかった。

一般状態及び死亡の結果に基づき、NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基 11.9 mg/kg/日（リン酸塩 22.5 mg/kg/日）と判断した。NOAEL における投与 92 日目の 3 回目投与後の C_{max} は、雌雄それぞれ 223 及び 88.5 ng/mL、$AUC_{0\text{-}6h}$ は雌雄それぞれ 211 及び 93.7 ng·h/mL であった。

2.6.6.3.6　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 26 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 S12033（4.2.3.2.06））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 26 週間経口投与したときのアミファンプリジンの毒性及び TK プロファイルを評価し、4 週間の休薬期間後に可逆性、持続性及び遅延性毒性発現を評価することであった。

雌雄 Sprague-Dawley ラットを 4 投与群に割り付け、経口投与した。動物には媒体又はアミファンプリジンリン酸塩を投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-12 に示す。

表 2.6.6.3-12　　ラット 26 週間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Toxicity (Recovery)		TK					
	Male	Female	Male	Female				
1	20 (5)	20 (5)	2	2	Vehicle*	0	5	0
2	20 (5)	20 (5)	12	12	AP	3.9	5	0.26
3	20 (5)	20 (5)	12	12	AP	11.8	5	0.79
4	20 (5)	20 (5)	12	12	AP	39.5	5	2.63

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration; TK = toxicokinetic.

* Vehicle was water for injection.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

主試験の動物は投与 26 週目に安楽死させ、休薬動物は 4 週間の休薬期間終了後、投与 30 週目に安楽死させた。死亡／瀕死の観察、体重及び体重変化、摂餌量、一般状態観察、臨床検査、眼科学的検査及び病理学的検査を評価した。アミファンプリジン及びその一次代謝物である 3-N-アセチル体の TK 評価のために血液サンプルを採取した。

計 3 例のラットの死亡を確認し、誤投与と一致する肺の所見が認められた。歩行困難、腫瘤、誤嚥と推定される 6 例のラットを動物実験倫理の観点から安楽死させた。これらの死亡例はいずれもアミファンプリジン投与に関連するとは考えられなかった。体重・体重変化、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、凝固系検査及び尿検査の臨床検査では、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。

試験期間中、以下のアミファンプリジン投与に関連した所見が認められたため、用量別に記載した。

3.9 mg/kg/日以上のすべての用量では、統計学的に有意な血清ナトリウムの上昇が認められたが、その程度は小さく（1～2%）、生理的範囲内であったため、毒性とはみなさなかった。

11.8 及び 39.5 mg/kg/日の用量では、2 つの所見が認められた。

1. 統計学的に有意な血清塩素の上昇が認められたが、その程度は小さく（1～2%）、生理学的範囲内であったため、毒性とはみなさなかった。
2. 投与期間終了時に肝重量が 5～22%増加したが、統計学的有意性は休薬期間終了時に消失した。また、対応する臨床病理所見や病理組織学的所見は認められなかった。したがって、毒性とはみなさなかった。

39.5 mg/kg/日の用量では、アミファンプリジン投与に関連した 2 つの所見が認められた。

1. 13 週間反復投与毒性試験でも認められたように、アミファンプリジン投与と関連する一般状態変化として、四肢のパドリング、攣縮、振戦、呼吸困難、頻呼吸及び浅速呼吸が認められ、これらは投与 2 週までに最も多く認められた。
2. 唾液腺（下顎）は肥大しており、腺房細胞肥大がみられたが、可逆的であった。

これらの所見はいずれも毒性と判断した。

TK の結果、アミファンプリジンは経口投与後 60 分（T_{max}）までに平均 C_{max} に達して速やかに吸収され、3-N-アセチル体に速やかに変換されることが示された。雌は、雄と比較して、アミファンプリジンの曝露量が約 2 倍高く、3-N-アセチル体の曝露量は同程度であった。アミファンプリジンと 3-N-アセチル体の全身曝露量は用量の増加に伴い直線的に増加した。アミファンプリジンの $t_{1/2}$ は約 1.3 時間であり、用量の増加や長期投与による変化はなかった。3-N-アセチル体の $t_{1/2}$ は約 2.5 時間であった。反復投与後にアミファンプリジンの明らかな蓄積が認められ、投与 182 日目の AUC_{0-t} は投与 1 日目の約 2 倍に増加した。雌は、いずれの採血時点においても、全用量にわたって、雄よりアミファンプリジンの C_{max} が約 1.8 倍高く、AUC_{0-t} が約 1.6 倍高かった。一方、反復投与後に 3-N-アセチル体の明らかな蓄積は認められなかった。投与 1 及び 182 日目のアミファンプリジンの主要な TK パラメータである T_{max}、C_{max}、AUC_{0-t} 及び $t_{1/2}$ をそれぞれ表 2.6.6.3-13 及び表 2.6.6.3-14 に示す。

表 2.6.6.3-13　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 26 週間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
3.9 - 1st dose	0.50	0.33	11.8	22.7	18.3	19.0	2.0	0.6
3.9 - 2nd dose	0.50	0.50	10.8	21.4	13.2	21.1	ND	ND
3.9 - 3rd dose	0.50	0.50	8.74	12.5	8.70	12.5	ND	ND
11.8 - 1st dose	1.00	0.50	23.0	83.1	50.2	81.9	1.6	1.2
11.8 - 2nd dose	0.25	0.50	38.9	41.8	45.9	80.5	ND	ND
11.8 - 3rd dose	0.50	0.25	38.2	109	34.8	56.1	ND	ND
39.5 - 1st dose	1.00	0.50	159	349	294	596	1.4	1.6
39.5 - 2nd dose	1.00	0.25	155	150	313	378	ND	ND
39.5 - 3rd dose	0.50	0.50	363	497	411	673	ND	ND

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; ND = not determined; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose, expressed as amifampridine free base dose levels.

表 2.6.6.3-14　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 26 週間反復経口投与したときの投与 182 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-6h} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
3.9 - 1st dose	0.50	0.50	25.2	25.3	37.0	33.6	2.1	1.6
3.9 - 2nd dose	0.25	0.50	14.5	21.3	22.8	38.6	ND	ND
3.9 - 3rd dose	0.25	0.50	14.1	23.2	10.4	18.9	ND	ND
11.8 - 1st dose	0.50	0.33	84.1	174	108	164	1.4	1.3
11.8 - 2nd dose	0.50	0.50	92.3	142	105	152	ND	ND
11.8 - 3rd dose	0.50	0.50	109	208	66.4	154	ND	ND
39.5 - 1st dose	0.33	0.50	464	801	624	1240	1.3	1.0
39.5 - 2nd dose	0.50	0.25	779	603	749	1000	ND	ND
39.5 - 3rd dose	0.50	1.00	327	752	621	1600	ND	ND

AUC_{0-6h} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 6 hours; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; ND = not determined; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose, expressed as amifampridine free base dose levels.

結論として、雌雄 Sprague-Dawley ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回 26 週間反復経口投与したところ、アミファンプリジン遊離塩基 39.5 mg/kg/日群で一般状態変化及び唾液腺（下顎）に腺房細胞肥大が認められた。これらの所見には回復性が確認された。

上記所見に基づき、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 11.8 mg/kg/日であると判断した。

2.6.6.3.7　アミファンプリジンリン酸塩のイヌにおける 14 日間経口投与 MTD 試験（試験番号 [redacted] 266/010（4.2.3.2.07））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩をイヌに 1 日 3 回 14 日間経口投与したときの MTD 及びアミファンプリジンの TK プロファイルを評価することであった。

雌雄各 2 例のビーグル犬は、投与開始時に 7～8 ヵ月齢、体重は雄が 7.5 及び 7.7 kg、雌が 6.2 及び 7.8 kg であった。本試験は、雌雄の 2 段階の用量漸増期と 2 週間の反復投与期を含む 3 段階で実施した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基の用量を記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-15 に示す。

表 2.6.6.3-15　　イヌ 14 日間経口投与 MTD 試験デザイン

Study Phase	No. Animals		Test Material	Dose Level*		Treatment Days
	Male	Female		mg/kg/day†	mg/kg/dose	
1	1	0	AP	0.75	0.25	0, 1
				1.5	0.5	2, 3
				3	1	4, 5
				6	2	6, 7
				12	4	8, 9
				24	8	10
2	0	1	AP	12	4	0, 1
			No treatment	0	0	2 to 6
			AP	9	3	7, 8
3	1	1	AP	7.5	2.5	0 to 13

AP = amifampridine phosphate; MTD = maximum tolerated dose.

* Animals were dosed three times a day.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.6, 6.3, 0, 4.7, and 4.0 mg/kg/day, respectively.

一般状態及び生死確認については 1 日 2 回以上、一般状態については 1 日 1 回、動物を観察した。体重は、投与開始 7 日以上前、各用量漸増時（第 1 及び 2 段階）の投与初日及び第 3 段階中の週 2 回測定し、個々の摂餌量は毎日測定した。TK 分析用の血漿サンプルは、第 2 及び 3 段階の投与 0 日目に全動物から、第 3 段階の投与 13 日目に 1 回目投与後 0.5、1、2 及び 5 時間、2 回目投与後 1 時間、3 回目投与後 1 時間に採取した。血漿中アミファンプリジン濃度は、電気化学的手法により HPLC 法を用いて測定した。LLOQ は 5 ng/mL であった。すべての動物を安楽死させ、最終投与後に剖検した。ただし、第 1 段階の雄 1 例は 10 日に瀕死状態で発見され、早期に剖検した。病理組織学的検査は行わなかったが、肉眼的病変部位を採取し保存した。

第 1 段階では、雄 1 例で遷延した痙攣がみられたため、12.6 mg/kg/日に増量した 10 日目の 2 回目投与後に剖検した。剖検での主な所見は十二指腸粘膜の部分的な陥凹と脳浮腫であった。第 1 段階投与の前期では、3.2 mg/kg/日まで一般状態の変化は認められなかった。

投与 8 及び 9 日目（6.3 mg/kg/日）の 2 回目投与後、なめずり、前足での鼻部掻痒、頻回の瞬目といった一般状態変化が認められた。毎日の 3 回目投与後には、振戦、自発運動障害及び体後部硬直が認められた。12.6 mg/kg/日を投与した 10 日目の 1 回目投与後の一般状態変化は前の用量で認められたものと同様であった。2 回目の投与後に痙攣、振戦、自発運動障害、心拍数の増加、眼振、嘔吐及び側臥位といった一般状態の変化が認められ、早期に剖検した。漸増投与したこの動物では、試験期間中に体重は増加しなかったが、体重に対する明らかな影響はなかった。

本試験の第 2 段階では、6.3 mg/kg/日を雌 1 例に 0 及び 1 日目に投与したが、一般状態変化は同用量の雄で第 1 段階にみられたものよりも重度であった。0 日目の 1 回目投与後には頭部反転動作、不安定歩行、自発運動障害、振戦及び四肢硬直が、2 及び 3 回目投与後には振戦、流涎、鼻部掻痒、常同行動、嘔気、嘔吐、不安定歩行、行動抑制及び活動性低下といった一般状態変化が認められた。この雌は、1 日目の 1 回目投与前は正常であったが、1 回目投与後に重度の振戦を伴った側臥位で発見された。投与後 1 時間では動物は立ち上がることができたが、振戦、瞬き、流涎、自発運動障害、平衡感覚の喪失並びに視覚及び聴覚刺激に対する反応の欠如が認められた。投与後 4 時間では再び立つことができず、後肢硬直、座位バランスの消失及び結膜炎が認められた。投与後 8 時間ではバランスは正常であったが、自発運動障害、結膜炎及び口腔粘膜赤色化が持続した。一般状態変化の重症度と持続期間のため、投与を 5 日間中断し、7 及び 8 日目に、4.7 mg/kg/日（1.6 mg/kg/回）の用量で 1 日 3 回経口投与した。各投与により頭部反転動作、流涎、自発運動困難及び振戦が認められた。9 日目には、体後部硬直、結膜炎及び赤い耳介がみられたが、剖検では異常はなかった。

第 1 及び 2 段階の観察結果を考慮し、第 3 段階では 4.0 mg/kg/日の雌雄各 1 例への 14 日間反復投与を設定した。雌雄ともに、投与 0 日目の 1 又は 2 回目の投与後に重度の振戦が認められた。一般状態変化は第 1 及び 2 段階で観察されたものと同様であった。一般状態変化の重症度は翌日には軽減する傾向がみられたが、雌は投与期間中、鎮静化していた。両動物の体後部硬直、軽微な振戦、流涎、なめずり及び結膜炎も、投与継続により発現率が低下した。両動物とも 0～3 日目に体重が減少し、雄の体重は 14 日間投与終了時に回復しなかった。投与期間終了時の剖検では異常は認められなかった。

14 日間反復投与の第 3 段階では、4.0 mg/kg/日を雌雄に投与した結果、CNS に関連した重度の一般状態変化及び体重減少が認められた。しかし、投与の継続に伴って一般状態変化の重症度が低下し、痙攣が認められなかったことから、その後の 4 週間反復投与試験における MTD と判断した。

2.6.6.3.8　アミファンプリジンリン酸塩のイヌにおける 4 週間反復経口投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/014（4.2.3.2.08））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩をイヌに 1 日 3 回 4 週間経口投与したときの毒性及びアミファンプリジンの TK プロファイルを評価することであった。

雌雄ビーグル犬は、投与開始時に 5 ヵ月齢、体重は雄が 8～10 kg、雌が 6～7 kg であった。動物を 4 群に割り付け、臨床投与方法に準じてアミファンプリジンリン酸塩を約 6 時間間隔で 1 日 3 回経口投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基の用量を記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-16 に示す。

表 2.6.6.3-16　　イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)**	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Male	Female				
1	4	4	Vehicle*	0	5	0
2	4	4	AP	1.9	5	0.126
3	4	4	AP	5.7	5	0.38
4	4	4	AP	7.5	5	0.5

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Vehicle was 1% CMC in water.

** Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0, 1.0, 3.0, and 4.0 mg/kg/day, respectively.

† Animals were dosed three times a day.

動物は生死確認を 1 日 2 回、一般状態については 1 日 1 回以上、観察を行った。投与開始前及び終了時に詳細な一般状態観察を実施した。体重は、投与前、0 日目の投与前に 1 回、その後は投与前に週 1 回測定した。個々の摂餌量を毎日測定し、週平均値を算出した。眼科学的検査は、投与前及び投与 4 週目に実施した。

心電図（ECG）は、投与前並びに投与 1 及び 27 日目に実施した。血液学的検査及び血液生化学的検査用のサンプルは、投与前及び投与 25 日目に 1 回、絶食した動物から採取した。尿検査用のサンプルは、投与前に 1 回並びに雄は投与 22 日目及び雌は 25 日目に絶食した動物から採取した。TK 解析のための血漿サンプルは、投与 0 及び 26 日に、1 回目投与前並びに投与後 0.5、1、2 及び 5 時間、2 回目投与後 1 時間（1 回目投与後 7 時間）、3 回目投与後 1 時間（1 回目投与後 13 時間）に採取した。アミファンプリジンの血漿中濃度は、電気化学的検出により HPLC 法を用いて測定した。LLOQ は 5 ng/mL であった。主試験動物は 28 日目に剖検し、病理組織学的検査のための標準的な組織を採取した。器官重量は、副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、脾臓、精巣、胸腺及び甲状腺について測定した。各動物の保存組織について病理組織学的に検査した。

4.0 mg/kg/日群では、投与 0 日目の 2 回目投与後に雄 2 例が死亡した以外は、いずれの動物も投与期間終了時まで生存した。雄 1 例は切迫屠殺し、他の雄 1 例は 2 回目投与後 1 時間に死亡した。一般状態変化としては、1 回目投与後に浅速呼吸が、2 回目以降には筋緊張亢進及び痙攣が認められた。死亡及び瀕死の原因は痙攣による可能性が高い。両動物の肉眼的所見として、消化管（液体が充満）、腎臓、肝臓、下垂体、顎下腺、胸腺及び肺に暗い領域又は多巣性の斑点が認められた。雄 1 例では頸部リンパ節に暗い領域が認められた。病理組織学的な筋変性の所見は、マクロファージの浸潤を伴った骨格筋及び舌に認められた。肝

臓及び肺の暗い領域は、軽微から軽度の多病巣性の鬱血と関連した。頸部リンパ節のびまん性出血とともに、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節に軽微から軽度の組織球増加が認められた。

心機能（動脈血圧、心拍数、心伝導、心調律及び波形）、血液生化学的及び器官重量（絶対及び相対）では、アミファンプリジンに関連した変化は認められなかった。

一般状態変化は用量に依存しており、主に投与初期の数日間に発現した。4.0 mg/kg/日群では全動物（死亡例を含む）で、痙攣、振戦、流涎、筋緊張亢進、運動障害及び知覚過敏といった一般状態変化が認められた。大部分の動物で、浅速呼吸、不安行動及び攻撃性といった一般状態変化も認められた。重度の臨床症状や攻撃性のため、4.0 mg/kg/日群の雄 1 例（投与 0 及び 2 日目）及び雌 1 例（投与 5 日目）は休薬して 3 回目投与を行わなかった。3.0 mg/kg/日群では、同様の一般状態変化がみられたが、痙攣は認められず、重症度及び頻度が低下した。1.0 mg/kg/日群の雌全例及び雄 1 例では流涎が認められた。投与量にかかわらず、投与数日後にほとんどの一般状態変化がおおむね改善又は完全に消失した。持続的な一般状態の変化として、知覚過敏（投与 8 日目に 4.0 mg/kg/日群の雌 1 例）、試験期間を通じて認められた 4.0 mg/kg/日群の不安行動、3.0 及び 4.0 mg/kg/日群並びに 1.0 mg/kg/日群の雌 1 例における筋緊張及び後肢硬直が認められた。

3.0 及び 4.0 mg/kg/日群では雌雄ともに投与 1 週目に体重の有意な減少が認められ（4.0 mg/kg/日群の雄を除く）、1.0 mg/kg/日群の雌 2 例でも体重減少が認められた。対照群と比較して、28 日間の投与期間終了時においてもアミファンプリジンリン酸塩群で体重増加量の減少が認められた。対照群及び測定基準値と比較して、アミファンプリジンリン酸塩群では摂餌量の変化は認められなかった。

眼科学的検査では、3.0 及び 4.0 mg/kg/日群の雌で水晶体後嚢及び硝子体内に白色フィラメントが認められ、投与との関連性が示唆された。

血圧には個体差が認められたが、正常な背景値の範囲にあり、投与に関連したものではないと考えられた。全群で心拍数に個体差が認められたが、用量に関連はなく、投与に関連するものではないと考えられた。アミファンプリジンリン酸塩投与は、心伝導、心調律及び波形に変化をもたらさなかった。

ほとんどの投与動物では、血液学的検査に有意な変化は認められなかった。しかし、4.0 mg/kg/日群の雌 2 例では、対照動物と比較して赤血球数、ヘモグロビン濃度及び血中血球容積が減少した。これらの変化とアミファンプリジンリン酸塩投与との関係は不明であった。用量に関連する尿量の減少が雌雄で認められた。

4 週間投与終了時の剖検時の肉眼観察では、空腸、十二指腸及び胃に暗色部又は隆起が認められた。すなわち、4.0 mg/kg/日群の雄 2 例に空腸の暗色部、3.0 及び 4.0 mg/kg/日群の雌各 1 例の十二指腸に蒼白な隆起、1.0 mg/kg/日群の雌 1 例の胃及び十二指腸に暗色の隆起、1.0 mg/kg/日群の別の雌 1 例の空腸に暗色の隆起が認められた。3.0 mg/kg/日群の雌 1 例では、胸腺リンパ節の腫大と暗色化が認められ、びまん性出血と関連していた。

病理組織学的検査で最も重要な所見は、用量におおむね関連した喉頭、舌及び骨格筋の筋

変性であった。筋変性は雌より雄で高頻度にみられた。しかし、1.0 mg/kg/日群の雌 1 例でも骨格筋の変性が認められた。1.0、3.0 及び 4.0 mg/kg/日群の一部の動物の舌並びに 3.0 及び 4.0 mg/kg/日群の一部の動物の骨格筋に、筋肉再生が認められた。その他、病理組織学的検査所見として、次の変化がみられた。すなわち、4.0 mg/kg/日群の雄 2 例（投与 0 日目の死亡例を含む)で心臓のうっ血、各群で散在性にみられた胃及び空腸のうっ血、腎臓の鉱質沈着（対照群の雌 1 例及び 1.0 mg/kg/日以上の群の一部の動物)、胸腺のアポトーシス（1.0 mg/kg/日以上の群の用量に関連のない所見）及びリンパ節の組織球増加症（対照群と比較した場合、用量の増加に伴っておおむね増加）が認められた。

アミファンプリジンリン酸塩をビーグル犬に 4 週間投与したときの C_{max} 及び AUC には用量相関性が認められ、投与 0 日目と 4 週目の間に蓄積性はなく、明らかな性差も認められなかった。

$t_{1/2}$ に用量差や性差はなく、92.2～186.0 分であった。投与 0 日目及び 4 週目に測定したアミファンプリジンの主要な TK パラメータである C_{max} 及び AUC_{0-t} をそれぞれ表 2.6.6.3-17 及び表 2.6.6.3-18 に示す。

表 2.6.6.3-17　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 0 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose (mg/kg)*	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)	
	M	F	M	F
1.9	74.9	72.3	238	240
5.7	204.2	198.6	691	670
7.5	310.8	319.7	982	962

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to the last measurable concentration; Cmax = maximum plasma concentration; F = female; M = male.
*　Equivalent to amifampridine free base dose levels of 1.0, 3.0, and 4.0 mg/kg, respectively.

表 2.6.6.3-18　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)	
	M	F	M	F
1.9	76.9	52.9	276	186
5.7	239.1	178.6	731	599
7.5	311	321.7	997	955

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male.
*　Equivalent to amifampridine free base dose levels of 1.0, 3.0, and 4.0 mg/kg/day, respectively.

結論として、雌雄ビーグル犬に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/日までの用量で 1 日 3 回 4 週間経口投与したところ、CNS に関連した雌雄の一般状態変化、体重増加量の変化並びに消化管組織の暗色化及び筋変性が認められ

たことから、NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基 1.0 mg/kg/日（リン酸塩 1.9 mg/kg/日）と判断した。

2.6.6.3.9　アミファンプリジンリン酸塩のイヌにおける 4 週間反復経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（試験番号 [redacted] AA40847（4.2.3.2.09））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩をイヌに 1 日 3 回 4 週間経口投与したときのアミファンプリジンの毒性及び TK プロファイルを評価することであった。4 週間の投与期間終了後に 2 週間の休薬期間を設定し、有害作用の可逆性、持続性又は遅延毒性を評価した。

雌雄ビーグル犬は投与開始時に 6～8 ヵ月齢、体重は雄が 7～9 kg、雌が 6～8 kg であった。動物を 4 群に割り付け、臨床投与方法に準じてアミファンプリジンリン酸塩を約 6 時間間隔で 1 日 3 回経口投与した。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基の用量を記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-19 に示す。

表 2.6.6.3-19　　イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Main		Recovery					
	Male	Female	Male	Female				
1	3	3	2	2	Vehicle*	0	5	0
2	3	3	0	0	AP	1.0**	5	0.067
3	3	3	0	0	AP	2.5**	5	0.167
4	3	3	2	2	AP	6.25**	5	0.417

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.
*　Vehicle was 1% CMC in water.
**　Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0, 0.5, 1.3, and 3.3 mg/kg/day, respectively.
†　Animals were dosed three times a day.

動物は生死確認を 1 日 2 回、一般状態については 1 日 1 回以上、観察を行った。投与開始前、投与及び休薬期間中は、行動評価を含む検査を週 1 回実施した。1 回の直腸温測定及び行動評価を含む詳細な一般状態観察は、投与開始前並びに投与及び休薬期間終了時に 1 回行った。体重測定は、投与開始前と剖検まで毎週実施した。個々の摂餌量は毎日測定し、週平均値を算出した。眼科学的検査は投与開始前並びに 23 及び 42 日目に実施した。ECG は、投与開始前（Day -6）、1 及び 22 日目の 1 回目投与の前及び投与後 30 分並びに 40 日目に評価した。血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査用のサンプルは、絶食した動物から投与開始前並びに 21、22、26 及び 41 日目（該当する場合）に 1 回採取した。

TK 解析のための血漿サンプルは、0 及び 26 日目の 1 回目投与前並びに 0.25、0.75、2、4、6 及び 24 時間、2 回目投与後 0.25、2 及び 6 時間、3 回目投与後 0.25、0.75、2、4 及び 6 時間に非絶食下で採取した。1 及び 2 回目投与後 6 時間は次の投与の直前に採取した。血漿

サンプルは、LC-MS/MS 法を用いてアミファンプリジンを測定した。LLOQ は 5 ng/mL であった。投与及び休薬期間終了時の剖検は、それぞれ 28 及び 43 日目に行った。剖検で組織病理学的検査用の組織を採取して、器官重量を測定した（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺／副甲状腺及び子宮）。各動物の保存組織について病理組織学的に検査した。

本試験中には死亡はなかった。また、投与に関連した眼科学的検査、血液学的検査及び尿検査のパラメータの変化並びに肉眼的所見は認められなかった。

0.5 mg/kg/日群の雌 1 例では、1 日目の 1 回目投与後 30 分に振に振戦がみられ、別の雌 1 例では投与期間終了時に行動抑制及び活動性低下が認められた。1.3 mg/kg/日群の雄 2 例及び雌 1 例では、0（3 回目投与）、4（1 回目投与）及び 5（1 回目投与）日目に振戦が認められた。雌 1 例では、2 日目の 3 回目投与後に行動抑制、呼吸困難、不全麻痺及び後肢硬直が認められた。3.3 mg/kg/日群のほとんどの動物で、投与開始日に顕著な一般状態変化が認められた。一般状態の変化として、行動抑制、筋緊張亢進、振戦、不安行動、浅速呼吸、流涎過多、虚脱、不全麻痺、平衡感覚喪失、攻撃性、呼吸困難、運動協調性の低下、後肢硬直、液状便及び強直性痙攣が認められた。2 日目以降、これらの一般状態変化は軽減したが、振戦、活動性低下及び流涎は少数例で投与期間の 28 日間持続した。休薬期間中はアミファンプリジンに関連した一般状態変化は認められず、一般状態変化の速やかな回復性が示された。

投与開始 1 週目にほぼ全例で軽微な体重減少が認められた。3.3 mg/kg/日群の雌では、投与終了までの体重増加量に対照群との間に統計学的有意差が認められたが、これは雌 1 例の変化によるものであった。体重の個々の変化は摂餌量の減少とよく相関していた。休薬期間中には体重及び摂餌量への影響はなかった。

PR 及び PQ 間隔並びに QRS 時間の結果より、心拍数、リズム及び心伝導ではアミファンプリジンに関連した変化は認められなかった。1.3 mg/kg/日群の雌 1 例では第 II 度房室ブロックが認められたが、1 例のみであり、若齢イヌで生じる変化のため、アミファンプリジンに関連した変化とは考えられなかった。

3.3 mg/kg/日群の雌では肝臓の相対重量が有意に増加し、同群の雄では統計学的に有意ではないものの、絶対及び相対重量の増加が認められた。しかし、血液生化学的検査及び病理組織学的検査では、肝臓重量の増加に対応する変化は認められなかった。3.3 mg/kg/日群の雄では前立腺重量の増加がみられたが、成熟の程度差に起因すると考えられた。

主試験動物の病理組織学的所見として、軽微なミオパチーが 3.3 mg/kg/日群の雌 1 例の骨格筋、0.5 及び 1.3 mg/kg/日群の雌各 1 例の腰筋、並びに 0.5 mg/kg/日群の雌 1 例の横隔膜で認められた。喉頭及び舌には変性変化は認められなかった。休薬動物では、対照群の雄 1 例及び 3.3 mg/kg/日群の雄 1 例において、それぞれ骨格筋及び腰筋にミオパチーが認められた。イヌの最初の 28 日間試験での評価とは異なるが、対照群 1 例の休薬動物の所見が投与との関連性を不明確にしているものの、ミオパチーは投与に関連している可能性がある。0.5 mg/kg/日群の雌 1 例で、慢性線維症の徴候を伴わない軽度の多巣性心筋炎が認められた。

この所見は、体重、摂餌量並びにアルブミン及び血漿イオン濃度の減少を伴っていた。その他の動物では心筋炎は認められず、アミファンプリジンリン酸塩投与との関係は不明である。1.3 及び 3.3 mg/kg/日群の雌各 1 例では、軽微な肺胞組織球症が認められた。3.3 mg/kg/日群の雌では、軽微な慢性肺胞炎も認められたが、この所見は対照群を含むすべての群で認められた。2 週間の休薬期間終了後、3.3 mg/kg/日群の雌雄各 1 例で軽微な肺胞組織球症が認められ、軽微な慢性肺胞炎と関連していた。対照群を含むすべての休薬動物で肺胞炎が認められたため、アミファンプリジンリン酸塩投与との関連性は不明である。

TK 解析の結果、アミファンプリジンの T_{max} は 0.25～2 時間であった。$AUC_{0\text{-}6h}$ は、投与 0 日目及び 4 週目の 0.5～3.3 mg/kg/日群でほぼ線形性を示し、用量比例性が認められた。TK パラメータに明らかな性差はなく、1 日 3 回投与の投与 0 日目と 4 週目比較で蓄積性は認められなかった。投与 0 日目及び 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータをそれぞれ表 2.6.6.3-20 及び表 2.6.6.3-21 に示す。

表 2.6.6.3-20　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 0 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng•h/mL)	
	M	F	M	F	M	F
1 - 1st dose	0.75	0.25	46	59	136	143
1 - 2nd dose	2.00	0.25	37	31	158	120
1 - 3rd dose	0.75	0.75	57	57	186	151
2.5 - 1st dose	0.75	0.75	145	188	391	421
2.5 - 2nd dose	2.00	2.00	106	96	442	369
2.5 - 3rd dose	0.75	0.75	176	120	473	389
6.25 - 1st dose	0.75	0.75	352	345	918	912
6.25 - 2nd dose	2.00	0.25	271	326	1072	1074
6.25 - 3rd dose	0.75	0.75	329	377	1047	956

$AUC_{0\text{-}6h}$ = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 6 hours post-dose; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0.5, 1.3, and 3.3 mg/kg, respectively.

表 2.6.6.3-21　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 4 週間反復経口投与したときの投与 4 週目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)†	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-6h} (ng•h/mL)	
	M	F	M	F	M	F
1 - 1st dose	0.25	0.25	51	56	136	139
1 - 2nd dose	2.00	2.00	37	36	154	156
1 - 3rd dose	0.75	0.75	46	54	170	185
2.5 - 1st dose	0.75	0.75	95	146	303	396
2.5 - 2nd dose	2.00	2.00	112	96	480	399
2.5 - 3rd dose	0.75	0.75	166	136	514	441
6.25 - 1st dose	0.75	0.75	287	261	833	741
6.25 - 2nd dose	2.00	2.00	241	221	997	922
6.25 - 3rd dose	0.75	0.75	367	324	1094	984

AUC_{0-6h} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 6 hours post-dose; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Animals were dosed three times a day, and values shown are total daily dose.

† Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0.5, 1.3, and 3.3 mg/kg/day, respectively.

結論として、雌雄ビーグル犬に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 4 週間経口投与した結果、すべての投与群で用量に関連した CNS の雌雄の一般状態の変化、用量に関連した体重増加抑制及び肝重量の増加が認められ、本試験では NOAEL は得られなかった。

2.6.6.3.10 アミファンプリジンリン酸塩のイヌにおける 9 ヵ月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 S12032（4.2.3.2.10））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩をイヌに 1 日 3 回 9 ヵ月間（39 週間）経口投与したときのアミファンプリジンの毒性及び TK プロファイルを評価することであった。9 ヵ月間の投与期間終了後に 4 週間の休薬期間を設定し、有害作用の可逆性、持続性又は遅延毒性を評価した。

ビーグル犬 48 例（雌雄各 24 例）を 4 群（6 例/性/群）に無作為に割り付け、4 例/性/群は主試験動物、残りの 2 例/性/群を休薬動物とした。媒体（水）又はアミファンプリジン遊離塩基 0.18、0.33 及び 0.67 mg/kg/回に相当するアミファンプリジンリン酸塩水溶液を含むカプセルをイヌに 1 日 3 回 39 週間経口投与した後、4 週間の休薬期間を設けた。1 日当たりのアミファンプリジン遊離塩基投与量は、それぞれ 0、0.53、1.0 及び 2.0 mg/kg/日であった。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量の用量を記載した。

試験デザインを表 2.6.6.3-22 に示す。

表 2.6.6.3-22　　イヌ 39 週間反復経口投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume** (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Main		Recovery					
	Male	Female	Male	Female				
1	4	4	2	2	Vehicle*	0	0.052	0
2	4	4	2	2	AP	0.53	0.014	13
3	4	4	2	2	AP	1.0	0.025	13
4	4	4	2	2	AP	2.0	0.052	13

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Vehicle was water for injection.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

** Amifampridine phosphate was administered orally in capsules.

動物は生死確認を 1 日 2 回、一般状態については 1 日目の投与前、投与期間の最初の 2 週間は各投与後 30～90 分に、その後は少なくとも週 1 回、各投与後 30～90 分に観察を行った。体重は、馴化期間中 3 回、投与期間の最初の 2 週間は週 2 回、その後は週 1 回及び投与期間終了前に測定した。個々の摂餌量を毎日測定した。眼科学的検査は、投与開始前、24 及び 268 日目並びに休薬期間中は 301 日目に検査を実施した。ECG は、投与開始前（-8 日目）、23 及び 268 並びに休薬期間中は 300 日目に評価した。血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査用のサンプルは、投与開始前、27 及び 272 日目並びに休薬期間中は 300 日目に絶食下で採取した。TK 解析のための血漿サンプルは、投与 1、28 及び 273 日目の投与開始前、1 回目投与後 0.5、1、2 及び 6 時間、2 回目投与後 1 時間、3 回目投与後 1 時間に採取した。血漿サンプルは、LC-MS/MS 法を用いてアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体を測定した。LLOQ はアミファンプリジンでは 0.5 ng/mL、3-N-アセチル体は 1.00 ng/mL であった。主試験動物は 39 週目に投与を終了し、休薬動物は 43 週目に観察を終了した。動物は剖検し、病理組織学的検査用の組織を採取して、器官重量を測定した。各動物の保存組織について病理組織学的に検査した。

アミファンプリジンの曝露と明らかに関連のある臨床所見として、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で最も多く認められたが、経時変化は明確ではなかった。高用量群の雌 1 例では 2 日目に痙攣様の動き（振戦）が認められた。中用量群の雄 1 例では、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、200 及び 209 日目に痙攣がみられ、難治性の破壊行動が認められたため、213 日目に試験から除外した。試験期間中、死亡や瀕死はなかった。また、浅速呼吸は用量に関連して認められた。アミファンプリジンと関連がないと考えられる所見としては嘔吐及び下痢が認められた。

体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、ECG、血液学的検査及び尿検査では、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。全群で加齢に伴う血清リン濃度の経時的な低下が認められ、雌雄ともにアミファンプリジン群の方が顕著であったが、毒性学的に意義はないと考えられた。

剖検では、アミファンプリジンに関連すると考えられる肉眼的異常所見は認められなかった。中及び高用量群の雌では、対照群と比較して唾液腺重量が有意に高値であったが、それに対応する病理組織学的変化はなかった。

TK 解析の結果、曝露量は雌雄で同等であり、C_{max} は経口投与後 1 時間以内であった。0.53 mg/kg/日（0.18 mg/kg/回）群の C_{max} は約 75～80 ng/mL であり、1 日目のアミファンプリジン曝露量[0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-24h}）]は約 640 ng·h/mL であった。用量の増加に伴い線形性の用量反応が認められ、$t_{1/2}$ は約 2 時間と算出された。反復投与による血漿中への明らかな蓄積性は認められなかった。投与 1、28 及び 273 日目のアミファンプリジンの TK パラメータをそれぞれ表 2.6.6.3-23、表 2.6.6.3-24 及び表 2.6.6.3-25 に示す。

表 2.6.6.3-23　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 9 ヵ月間反復経口投与したときの投与 1 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24h} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
0.53	0.58	1.00	81.4	74.0	645	634	1.8	1.9
1.0	0.92	0.67	141	149	1250	1170	1.7	1.7
2.0	0.83	0.67	285	281	2330	2380	1.8	1.6

AUC_{0-24h} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 24 hours post-dose;
C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; $t_{1/2}$ = elimination half-life;
T_{max} = time to maximum plasma concentration.
* Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

表 2.6.6.3-24　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 9 ヵ月間反復経口投与したときの投与 28 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24h} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
0.53	0.92	0.92	72.8	78.4	693	663	2.1	1.9
1.0	1.00	0.75	134	145	1280	1160	2.1	1.9
2.0	1.08	0.75	258	253	2260	2280	2.1	2.0

AUC_{0-24h} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 24 hours post-dose;
C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; $t_{1/2}$ = elimination half-life;
T_{max} = time to maximum plasma concentration.
* Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

表 2.6.6.3-25　イヌにアミファンプリジンリン酸塩を 9 ヵ月間反復経口投与したときの投与 273 日目のアミファンプリジンの TK パラメータ

Dose* (mg/kg/day)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24h} (ng•h/mL)		$t_{1/2}$ (h)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
0.53	1.00	0.58	68.3	81.4	688	653	2.5	2.1
1.0	0.67	0.58	151	159	1300	1220	2.2	2.0
2.0	0.70	0.75	283	260	2590	2310	2.2	1.9

AUC_{0-24h} = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 24 hours post-dose;
C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; $t_{1/2}$ = elimination half-life;
T_{max} = time to maximum plasma concentration.
*　Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

結論として、雌雄ビーグル犬にアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回、最長 39 週間経口投与した結果、アミファンプリジン遊離塩基 1.0 及び 2.0 mg/kg/日群では、非特異的な神経学的所見（痙攣、振戦、流涎、口なめずり及び斜視）の発現と投薬に強い関連性が認められた。アミファンプリジンの NOAEL は、遊離塩基として 0.53 mg/kg/日と判断した。アミファンプリジン遊離塩基 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/日投与時の C_{max} は約 75～80 ng/mL であり、AUC_{0-24h} は 662 ng·h/mL であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

アミファンプリジンリン酸塩の遺伝毒性を調べるために *in vitro*（Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験）及び *in vivo*（ラット小核試験及びラット不定期 DNA 合成試験）試験を実施した。すべての試験は、GLP を遵守し、適切なガイドラインに準拠して実施した。

2.6.6.4.1　非ほ乳類細胞を用いる *in vitro* 試験

2.6.6.4.1.1　アミファンプリジンリン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 [redacted] 010310（4.2.3.3.1.01））

本試験の目的は、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA102、TA1535 及び TA1537 株を用い、アミファンプリジンリン酸塩の遺伝子突然変異誘発能を代謝活性化系の存在下及び非存在下の条件で評価することであった。

本試験は、代謝活性化系（Aroclor 1254 を投与したラットの肝 S9 分画を使用）の存在下及び非存在下の条件で 2 回繰り返し実施した。アミファンプリジンの用量として、細胞毒性を起こさなかった 5000 µg/plate を最高用量とし、以下、1500、500、150 及び 50 µg/plate の 5 用量を用いた。菌株ごとに代謝活性化の有無を考慮した陽性対照及び媒体対照群を設け、更に、無菌試験を実施した。1 回目の試験では、すべてのプレートは 37℃で 48 時間インキュベートした。2 回目の試験では、60 分間のプレインキュベーション後、37℃で 48 時間インキュベートした。いずれの試験においても、インキュベート後、各プレート上の復帰変異コロニー数を計測した。アミファンプリジンによる復帰変異コロニーの誘発を調べるため、

アミファンプリジン群と媒体対照群の復帰変異コロニー数の比を求めた。アミファンプリジン群の復帰変異コロニー数が媒体対照群と比較して、TA1535 株及び TA1537 株については 3 用量以上で少なくとも 3 倍、TA98 株、TA100 株及び TA102 株については 3 用量以上で少なくとも 2 倍増加した場合、それら結果は生物学的に有意であると判断した。

すべてのアミファンプリジン群の復帰変異コロニー数は、いずれの菌株においても、プレインキュベーション及び代謝活性化の有無にかかわらず、有意な増加を示さなかった。

結論として、50、150、500、1500 及び 5000 µg/plate のアミファンプリジンは、本試験条件下で変異原性を示さなかった。

2.6.6.4.1.2　アミファンプリジンリン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 [redacted] 010506（4.2.3.3.1.02））

アミファンプリジンの化学構造には芳香族アミンが含まれるため、ハムスター肝 S9 分画を用いてアミン系代謝物の変異原性を評価する追加試験を実施した。本試験の目的は、ネズミチフス菌 TA98 及び TA1538 を用い、アミファンプリジンリン酸塩の遺伝子突然変異誘発能を代謝活性化系の存在下及び非存在下の条件で評価することであった。

本試験は、代謝活性化系（Aroclor 1254 を投与したハムスターの肝 S9 分画を使用）の存在下及び非存在下の条件で 2 回繰り返し実施した。アミファンプリジンの用量として、細胞毒性を起こさなかった 5000 µg/plate を最高用量とし、以下 1500、500、150 及び 50 µg/plate の 5 用量を用いた。菌株ごとに代謝活性化の有無を考慮した陽性対照及び媒体対照群を設け、更に、無菌試験を実施した。1 回目の試験では、すべてのプレートは 37℃で 48 時間インキュベートした。2 回目の試験の代謝活性化では、60 分間のプレインキュベーション後 37℃で 48 時間インキュベートした。いずれの試験においても、インキュベート後、各プレート上の復帰変異コロニー数を計測した。アミファンプリジンによる復帰変異コロニーの誘発を調べるため、アミファンプリジン群と媒体対照群の復帰変異コロニー数の比を求めた。アミファンプリジン群の復帰変異コロニー数が媒体対照群と比較して、TA1538 株については 3 用量以上で少なくとも 3 倍、TA98 株については 3 用量以上で少なくとも 2 倍増加した場合、それら結果は生物学的に有意であると判断した。

すべてのアミファンプリジン群の復帰変異コロニー数は、いずれの菌株においても、プレインキュベーション及び代謝活性化の有無にかかわらず、有意な増加を示さなかった。

結論として、50、150、500、1500 及び 5000 µg/plate のアミファンプリジンは、本試験条件下で変異原性を示さなかった。

以上、ハムスターの肝 S9 分画を用いた代謝活性化及びプレインキュベーションの有無にかかわらず、5000 µg/plate までのアミファンプリジンは、細菌を用いる復帰変異試験において変異原性を示さなかった。

2.6.6.4.2　ほ乳類細胞を用いる *in vitro* 試験（試験番号 [redacted] 010515（4.2.3.3.1.03））

2.6.6.4.2.1　アミファンプリジンリン酸塩の L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ *TK* 試験

本試験の目的は、ほ乳類細胞（L5178Y TK^{+}/-マウスリンパ腫細胞）を用い、アミファンプリジンのチミジンキナーゼ遺伝子座に対する遺伝子突然変異誘発能を代謝活性化系の存在下及び非存在下の条件で評価することであった。

本試験は、L5178Y TK^{+}/-マウスリンパ腫細胞を用い、代謝活性化系（Aroclor 1254 を投与したラットの肝 S9 分画を使用）の存在下及び非存在下の条件で 2 回繰り返し実施した。アミファンプリジンの処理濃度は、700.3、910.3、1183.4、1538.5 及び 2000 µg/mL（24 時間連続処理のみ 592.6、888.9、1333.3、2000 及び 3000 µg/mL）とし、L5178Y TK^{+}/-マウスリンパ腫細胞に代謝活性化系の存在下及び非存在下の短時間処理（3 時間）、並びに代謝活性化系の非存在下で 24 時間連続処理した。非代謝活性化の陽性対照として、メチルメタンスルホン酸（3 及び 24 時間処理でそれぞれ 10 及び 2 µg/mL）、代謝活性化の陽性対照としてシクロホスファミド（2 µg/mL）を処理した。処理後、細胞を再培養して生存率を算出し、更にトリフルオロチミジン存在下及び非存在下で培養してコロニーサイズごとに突然変異コロニー数を計測し、遺伝子突然変異頻度を算出した。

3 時間処理において、すべてのアミファンプリジン処理群で、代謝活性化の有無にかかわらず突然変異の誘発は認められなかった。24 時間処理において、アミファンプリジンの 3000 µg/mL 処理群で、弱い細胞毒性（相対総増殖率 48.6%）とともに突然変異頻度の増加（自然突然変異体数の 2.8 倍；$p<0.05$）が認められた。また、2000 µg/mL 処理群で、細胞毒性（相対的総成長率 52.7%）と突然変異頻度の増加（自然突然変異体数の 1.8 倍；$p<0.05$）に加えて小コロニー出現頻度のわずかな増加が認められた。

結論として、2000 及び 3000 µg/mL のアミファンプリジンは、非代謝活性化の 24 時間処理において、L5178Y TK^{+}/-マウスリンパ腫細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座に弱い突然変異を誘発した。

2.6.6.4.3　ほ乳類を用いる *in vivo* 試験

2.6.6.4.3.1　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける不定期 DNA 合成試験（試験番号 [redacted] 020404（4.2.3.3.2.01））

本試験の目的は、ラットの肝細胞を用い、アミファンプリジンリン酸塩の不定期 DNA 合成（UDS）誘発能を評価することであった。

雄 Fischer ラットの投与開始時の週齢は 5～6 週齢、体重は 165～204 g であった。MTD 試験は、1 群 4 例の動物を用い、アミファンプリジンリン酸塩の 50、80、125、200 及び 320 mg/kg を 1 回経口投与した。各投与量のアミファンプリジン遊離塩基用量は、26.3、42.1、65.8、105.3 及び 168.4 mg/kg に相当した。UDS 試験の用量は MTD 試験結果に基づいて設定し、肝臓の採取時期は投与後 2～4 及び 12～16 時間の 2 回とした。

MTD 試験では、125 mg/kg 以上の 3 用量群で投与後約 90 分に死亡が認められた（最高用

量の 320 mg/kg を投与した 1 例は倫理的理由により安楽死させた)。50 及び 80 mg/kg 投与群の一般状態に変化はみられなかった。以上の結果より、投与後 12～16 時間に肝臓を採取する UDS 試験では、最高用量を 80 mg/kg とし、以下、40 及び 20 mg/kg の用量を設けた。しかし、80 mg/kg 投与群の 4 例中 3 例が潅流操作中に死亡しているのが発見されたため、以後 UDA 試験の投与量は、最高用量を 40 mg/kg に減量し、20 及び 40 mg/kg とした。

投与後 2～4 及び 12～16 時間に、動物を麻酔し、肝臓を HEPES 緩衝液及びコラゲナーゼで潅流し、初代肝細胞を調製した。次に、[^{3}H]チミジンを添加した培養液で肝細胞を培養し、[^{3}H]チミジン取り込みを指標として DNA 修復を評価した。オートラジオグラフィーと画像解析システムを用いて、核粒子数（NC)、細胞質粒子数（CC)、正味核粒子数（NNG＝NC - CC）を測定した。いずれかの用量又は時間での陽性結果の基準は、1）NNG が 0 を超え、20%以上の細胞が陽性反応（NNG＝5）を示すこと、2）NNG 及び修復中の細胞の割合の両方で増加が観察されることとした。

投与後 12～16 時間に肝臓採取したアミファンプリジンリン酸塩の 40 及び 20 mg/kg 投与群において、NNG は、それぞれ-1.87 及び-2.48 であった。

同様に、投与後 2～4 時間に肝臓採取したアミファンプリジンリン酸塩の 40 及び 20 mg/kg 投与群において、NNG は、それぞれ-3.19 及び-2.95 であった。アミファンプリジンリン酸塩と媒体対照の修復細胞の割合は両肝臓採取時期で同様であり、修復細胞の NNG も媒体対照とアミファンプリジンリン酸塩で同様であった。S 期の細胞頻度は両肝臓採取時期とも 0.1～0.2%であり、アミファンプリジンリン酸塩に増殖作用がないことを示した。

結論として、40 及び 20 mg/kg のアミファンプリジンリン酸塩は、ラットに単回経口投与後 2～4 及び 12～16 時間に採取した肝細胞おいて、不定期 DNA 合成を誘発しなかった。

2.6.6.4.3.2　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける小核試験（試験番号 [redacted] 010417（4.2.3.3.2.02））

本試験の目的は、ラット骨髄由来の小核多染性赤血球を用い、アミファンプリジンリン酸塩の染色体異常誘発能を評価することであった。

雌雄 Sprague-Dawley ラットの投与時の週齢は 5～6 週齢、平均体重は雌雄それぞれ 152 及び 159 g であった。初回 MTD 試験は、1 群雌雄各 2 例の動物を用い、アミファンプリジンリン酸塩の 50、80、125、200 及び 320 mg/kg/日を 1 日 1 回 3 日間反復経口投与した。各投与量のアミファンプリジン遊離塩基用量は、26.3、42.1、65.8、105.3 及び 168.4 mg/kg/日に相当した。

2 回目の MTD 試験は、1 群雌雄各 5 例の動物を用い、アミファンプリジンリン酸塩の 80 及び 125 mg/kg/日（アミファンプリジン遊離塩基用量:42.1 及び 65.8 mg/kg/日）を 1 日 1 回、3 日間反復経口投与した。小核試験の用量選択はこれら MTD 試験結果に基づいた。

初回の MTD 試験において、投与後 48 時間までに一般状態変化及び死亡が観察され、雌雄ラットの MTD は 125 mg/kg/日であった。例数を増やした 2 回目の MTD 試験では、125 mg/kg/日投与群において、最終投与から約 24 時間後に雌雄各 1 例の死亡が認められた。

したがって、小核試験におけるアミファンプリジンリン酸塩の用量として、20、40 及び 80 mg/kg/日を選択した。小核試験では、1 群雌雄各 5 例を用い、陰性対照である媒体及びアミファンプリジンリン酸塩投与群の全例に 1 日 1 回 3 日間強制経口投与し、シクロホスファミド陽性対照群の全例に単回腹腔内投与により 1 回投与した。最終投与の約 24 時間後に動物を安楽死させ、1 mL のウシ胎児血清を用いて大腿骨骨髄を抽出した。

骨髄細胞は遠心分離により回収し、スライド上に広げ、多染性赤血球と正染性赤血球を区別するためにギムザ染色した。1 例当たり 2 枚のスライドを用いて 2000 個の多染性赤血球を観察し、少なくとも 1 個の Howell-Jolly 小体（小核）を有する多染性赤血球数を測定した。多染性/正染性赤血球比（PCE/NCE 比）は、全赤血球を多染性及び正染性赤血球に分けて測定し、動物ごとに多染性赤血球が 1000 個に達したときの正染性赤血球数から算出した。陰性対照群とアミファンプリジンリン酸塩投与群間の PCE/NCE 比について統計解析を行った。アミファンプリジンリン酸塩投与群の小核を有する多染性赤血球数が陰性対照群と比べて有意に増加し、少なくとも 1 用量で陰性対照群の 2 倍であるとき、陽性と判定した。

本試験の陽性対照群及び陰性対照群の値は背景値の範囲内であった。陰性対照の PCE/NCE 比は 3.2 であり、アミファンプリジンリン酸塩投与群の値は同じ範囲であると判定した。更に、すべてのアミファンプリジンリン酸塩投与群において、多染性赤血球 2000 個当たりの小核を有する多染性赤血球数は、陰性対照と比較して増加しなかった。

結論として、20、40 及び 80 mg/kg/日のアミファンプリジンリン酸塩は、3 日間経口投与したラット小核試験において染色体異常を誘発しなかった。

2.6.6.5　がん原性試験（TK 評価を含む）

がん原性試験は、Tg マウス（CByB6F1/Tg rasH2）及び Sprague-Dawley ラットを用いて実施した。長期試験の用量は、マウス及びラットを用いて先に実施した短期及び中期試験（2.6.6.5.2 項参照）で得られた結果に基づいて選択した。

2.6.6.5.1　長期試験

2.6.6.5.1.1　アミファンプリジンリン酸塩の Tg マウスにおける 26 週間反復混餌投与がん原性試験（試験番号 20[redacted]9225（4.2.3.4.1.01））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を 26 週間、Tg マウスに混餌投与したときのがん原性を評価することであった。

雌雄 Tg マウスを 6 群に割り付け、規定濃度のアミファンプリジンを混合した飼料を与えた。TK 評価用の動物には CByB6F1 野生型マウスを用いた。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基として記載した。陽性対照群の動物にはクエン酸緩衝食塩液を媒体とした N-メチル-N-ニトロソ尿素（NMU）を投与 1 日目に腹腔内投与した。

先に実施した 7 日間混餌投与毒性試験（試験番号 20[redacted]9230（4.2.3.4.2.02））において、600 mg/kg/日以上の群で死亡／瀕死が認められたため、続く 28 日間混餌投与毒性試験の最高用量を 300 mg/kg/日に設定して実施した。その結果、100 mg/kg/日以上の群ではアミファ

ンプリジンに起因する体重減少が認められたため、がん原性試験の最高用量は 30 mg/kg/日に設定した。

試験デザインを表 2.6.6.5-1 に示す。

表 2.6.6.5-1　　Tg マウス 26 週間反復混餌投与がん原性試験デザイン

Group No.	Test Material	Dose Route	Dose Level (mg/kg/day)[a]	Dose Volume (mL/kg)	Dose Concentration	Number of Animals			
						Carc Study		TK Study[b]	
						M	F	M	F
1	Control Article[c]	Dietary	0	-	0 ppm[d]	25	25	12	12
2	Amifampridine	Dietary	3	-	15 ppm[d]	25	25	36	36
3	Amifampridine	Dietary	10	-	50 ppm[d]	25	25	36	36
4	Amifampridine	Dietary	30	-	150 ppm[d]	25	25	36	36
5	NMU (Positive Control)	i.p.	75[e]	10	7.5 mg/mL	15	15	-	-
6	Health Screen/Sentinel	-	-	-	-	10	10	5[f]	5[f]

Carc = Carcinogenicity; TK = Toxicokinetic; M = Males; F = Females; i.p. = intraperitoneal; - = Not applicable.
[a] Animals were dosed via dietary administration 7 days a week for at least 26 weeks.
[b] Non-Tg animals were used for the TK phase.
[c] PMI Nutrition International Certified Rodent Chow® Meal No. 5CR4 (14% protein).
[d] Approximate value based on a 25 gram mouse consuming 5 grams of test diet/day.
[e] Dosed only once on Day 1 via intraperitoneal injection.
[f] TK samples were not collected; however, the animals were non-Tg animals.

本試験では、死亡、一般状態観察、腫瘍発現率、体重、体重増加量、摂餌量、TK、器官重量、肉眼的及び病理組織学的検査を評価した。

投与期間中、主試験群では、対照群の雌 1 例、3 mg/kg/日群の雄 1 例及び 30 mg/kg/日群の雌 1 例が死亡した。主試験群の 30 mg/kg/日群及び TK 群の 10 mg/kg/日群の雌各 1 例は、一般状態の悪化により安楽死させた。主試験群では、対照群の動物を含む死亡例／瀕死例（4 例）の全例で死亡／瀕死状態の原因となる腫瘍性病変（血管肉腫及び扁平上皮癌）が認められたが、発現頻度は低く、公開されている範囲内の発現頻度であり、用量に関連がみられないことから、これらの腫瘍／死亡はアミファンプリジンに関係がなく、生存率へのアミファンプリジン投与の影響はないものと考えられた。TK 群の動物の一般状態の悪化の原因は不明であった。

TK の結果、投与 1 及び 183 日目のアミファンプリジンの曝露量は、3～30 mg/kg/日の用量範囲でほぼ用量比例的に増加した。3-N-アセチル体への曝露量は、いずれの採血時点においても用量比を下回る増加であるか、ほぼ用量比例的な増加であった。アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体への曝露に明らかな性差はなく、雌の曝露は雄の約 2 倍であった。反復投与によるアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の蓄積は認められなかった。

一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、肉眼的及び病理組織学的検査において、アミファンプリジン投与に起因する変化は認められなかった。

結論として、Tg マウスに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、10 及び 30 mg/kg/日の用量で 26 週間混餌投与したところ、アミファンプリジンに関連した肉眼的及び病理組織学的所見（腫瘍性及び非腫瘍性）は認められず、アミファンプリジンはがん原性を示さないと考えられた。

2.6.6.5.1.2　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 104 週間反復混餌投与がん原性試験（試験番号 8264515（4.2.3.4.1.02））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を 104 週間、ラットに混餌投与したときのがん原性を評価することであった。

雌雄 Sprague-Dawley ラットを 4 群に割り付け、規定濃度のアミファンプリジンを含む飼料を 2～4 群に与えた。1 群（対照群）の動物には基礎飼料のみを与えた。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基として記載した。実際の投与量は、摂餌量（g/動物/日）にアミファンプリジン混合飼料中のアミファンプリジン濃度（mg/kg 調製物）を乗じて求めた。

アミファンプリジンの混餌投与は、先に強制経口投与でみられた C_{max} に関連した用量を制限する CNS の一般状態変化は認められず、最大投与量を増やすことが可能となり、それによってラットにおけるアミファンプリジンの 1 日の最大曝露量におけるがん原性の評価が可能であると結論づけた（がん原性試験用量の妥当性）。.

試験デザインを表 2.6.6.5-2 に示す。

表 2.6.6.5-2　　ラット 104 週間反復混餌投与がん原性試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Target Dose Level[a,b,c] (mg/kg/day)
	Male	Female		
1	60	60	Control[d]	0
2	60	60	AP	8
3	60	60	AP	25
4	60	60	AP	80/55[e] (M); 60/55[e] (F)

AP = amifampridine phosphate; F = female; M = male.

[a] Doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

[b] Amifampridine dose levels of 8, 25, 55, 60, and 80 mg/kg/day were approximately equivalent to 15, 48, 105, 114, and 152 mg/kg/day amifampridine phosphate salt, respectively.

[c] The target dose on a mg/kg/day basis was estimated based on expected body weight and food consumption values and diet concentrations.

[d] Group 1 received carrier (basal diet) only.

[e] Initial female dose levels were lower than male dose levels due to increased amifampridine exposure ($AUC_{0\text{-}18h}$) in females compared with males at the same dose concentration in a previous study (Study No. BMN125-13-011 (4.2.3.4.2.03)). However, based on food consumption and body weight data through Week 16, the dose levels of 80 (males) and 60 (females) mg/kg/day were not achievable. A target dose level of 55 mg/kg/day appeared feasible and was close to what was actually achieved throughout the study.

毒性評価は、死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査及び病理学的検査に基づいて行った。TK 評価のために血液サンプルを採取した。

投与 16 週までの摂餌量及び体重測定に基づくと、当初の目標投与量である 80（雄）及び

60（雌）mg/kg/日は達成できなかった。変更した目標投与量 55 mg/kg/日は、試験期間を通じて実際に達成されたものに近かった。したがって、高用量は当初の目標投与量ではなく、55 mg/kg/日を指した。

アミファンプリジンへの曝露量は、目標投与量 8～55 mg/kg/日の用量範囲でおおむね用量の増加に伴って増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、すべての採血時点において用量比を上回る増加を示した。アミファンプリジンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の性差は 2 倍未満であり、評価結果の多くで雄の曝露量が低かった。アミファンプリジンの曝露量は、55 mg/kg/日群の雄を除き、投与 5 週目と比較して投与 26 及び 52 週目でおおむね高値を示した。$AUC_{0\text{-}24h}$ に基づく蓄積比は、投与 26 及び 52 週で 0.595～2.51 であり、低及び中用量で最も高い蓄積が認められた。3-N-アセチル体への曝露は、目標投与量 8～55 mg/kg/日の用量範囲で用量の増加に伴って増加した。3-N-アセチル体の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ 曝露の増加には用量相関性が認められ、ほぼ用量比どおりであった。3-N-アセチル体の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の性差は 2 倍未満であり、一貫した差は認められなかった。曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、雄の 55 mg/kg/日を除いて、投与 26 及び 52 週目は投与 5 週目よりおおむね高かった。すべての採血時点及び目標投与量において、3-N-アセチル体の血漿中濃度はアミファンプリジンよりも高かった。更に、アミファンプリジンに対する 3-N-アセチル体の $AUC_{0\text{-}24h}$ 比（8～55 mg/kg/日で 77.9～7.69）から、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を毎日混餌投与すると、アミファンプリジンの多くが 3-N-アセチル体に変換されることが示された。

摂餌量及び体重増加量は減少したが、104 週間の投与期間を通じて測定した体重及び摂餌量で確認されたように、アミファンプリジンの投与量は一定であった。更に、AUC に基づく投与 26 及び 52 週目の曝露量の多くが投与 5 週目より増加し、試験期間を通じた持続的な曝露を示した。混餌投与による 55 mg/kg/日群のアミファンプリジンの AUC は、1 日 3 回強制経口投与したラット 13 週間試験の 75 mg/kg/日群の曝露量よりも高く、C_{max} 値は低かった（試験番号 BMN125-10-055（4.2.3.2.05））。

基礎飼料のみを与えた対照群と比較して、すべてのアミファンプリジン群で、体重増加量の減少に関連した摂餌量の減少、最終体重の減少及び用量増加に伴う生存率の上昇が認められた。

対照群並びに 8、25 及び 55 mg/kg/日群の投与期間終了時までの生存率は、雄でそれぞれ 47、67、73 及び 72%、雌でそれぞれ 48、65、60 及び 73%であった。雌雄ともに、死亡率の低下傾向の検定は有意であった。対照群と比較して、雄では 8、25 及び 55 mg/kg/日）で、雌では 55 mg/kg/日の各用量群で、統計学的に有意な死亡率低下が認められた。

アミファンプリジンとして 55 mg/kg/日以下のアミファンプリジンリン酸塩の 104 週間混餌投与では、アミファンプリジンリン酸塩を強制経口投与したこれまでの試験でみられていた四肢のパドリングなどの毒性と考えられる臨床症状は認められなかった。

アミファンプリジン各群では、対照群と比較して、平均体重の有意な低値が投与期間を通じて認められた。平均体重の有意な低値には、8 mg/kg/日群では断続的に、また 25 mg/kg/日以上の群では早ければ 2 週目以降に常に有意差が認められた。8、25 及び 55 mg/kg/日群の

雄では、対照群と比較して、最大で 9、14 及び 24%低い値がそれぞれ投与 64、60 及び 68 週目に、雌では、各群それぞれ 13、25 及び 30%低い値が投与 84 週目に認められた。

アミファンプリジンの各用量では、投与期間を通じたおおむね絶え間のない平均体重の増加が認められた。投与開始から投与 105 週目までの平均体重は、対照群と比較して、8、25 及び 55 mg/kg/日群の雄でそれぞれ 12、19 及び 28%、雌ではそれぞれ 15、36 及び 40%低かった。

良性及び悪性の神経鞘腫は、頭部、頸部、心臓及び雌の生殖器の様々な軟部組織にアミファンプリジン群のみで認められ、投与に関連したものと考えられた。良性及び悪性の神経鞘腫の発生頻度は、0（対照）、8、25 及び 55 mg/kg/日群の雄ではそれぞれ 60 又は 59 例中 0、0、3 及び 2 例であり、25 及び 55 mg/kg/日群の雄の発現率は同程度であった。0、8、25、55 mg/kg/日群の雌では、これらの腫瘍の発生率が用量の増加に伴って増加し、発生頻度はそれぞれ 60 又は 59 例中 0、2、2 及び 4 例であった。試験施設で実施した Sprague-Dawley ラットを用いた 2 試験の背景病変（雌雄各 170 例）では、良性及び悪性の神経鞘腫は認められなかった。

0、8、25、55 mg/kg/日群の雌では、子宮内膜腫瘍（癌腫及び腺腫）の発生頻度は 60 又は 59 例中でそれぞれ 0、4（1 例の扁平上皮癌を含む）、13 及び 10 例（1 例の良性腺腫を含む）であった。これらの腫瘍の多く（23/27 例）は投与 100 週目以降に、残りの 4 例は投与 86～99 週目に認められた。これらの腫瘍の発症時期が遅かったことは、アミファンプリジン群で生存期間が延長したことに対応している。これらの腫瘍の後期発症は、エピジェネティック（非遺伝毒性）な機序から生じることを示唆しており、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／内分泌軸の用量に関連した変化が、この反応に関与するエピジェネティックな因子である可能性が最も高い。

生存率の上昇及び幾つかの腫瘍性及び非腫瘍性変性の発現率の低下は、カロリー制限による摂餌量及び体重増加量の有意な減少に対する既知の反応と一致しており、アミファンプリジン投与との直接的な関連はなかった。これらの所見の例として、雌では乳腺線維腺腫及び下垂体腫瘍の減少、雄では副腎髄質褐色細胞腫及び膵島細胞腫瘍（腺腫と癌腫）の減少が認められた。55 mg/kg/日群の雄及び 25 mg/kg/日以上の群の雌においても、カロリー制限に一致する非腫瘍性変化及び生存率の上昇が認められ、雄の心筋症の発現率と重症度の低下、精巣の精細管萎縮／変性及び多発性動脈炎の発現率の低下、慢性進行性腎症及び子宮の炎症の発現率と重症度の低下、網膜萎縮の発現率の上昇などが認められた。

結論として、アミファンプリジン遊離塩基の 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を Sprague-Dawley ラットに混餌投与しても臨床的な毒性所見や早期死亡の増加は認められず、摂餌量、体重増加量及び投与期間終了時の体重の低値に関連する生存率の上昇が雌雄で認められた。良性及び悪性の神経鞘腫が、雄では 25 mg/kg/日以上、雌では 8 mg/kg/日以上の用量で認められ、アミファンプリジン投与との関連が示された。以上より、NOAEL は雄で 8 mg/kg/日、雌では 8 mg/kg/日未満と考えられた。雌雄の 8 mg/kg/日

群の投与 52 週目におけるアミファンプリジンの 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。

2.6.6.5.2　短期又は中期試験

2.6.6.5.2.1　アミファンプリジンリン酸塩のマウスにおける 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））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を 7 日間、マウスに経口及び混餌投与したときの毒性及び TK を評価することであった。

まず、雄 CD-1 マウスを 7 群に割り付け、2～4 群にはアミファンプリジン遊離塩基として 5、10 及び 20 mg/kg/回（10、20 及び 40 mg/kg/日）のアミファンプリジンリン酸塩を 8 時間間隔で 1 日 2 回、7 日間強制経口投与した。対照群（1 群）の動物には滅菌水を強制経口投与した。5～7 群の動物には、アミファンプリジン遊離塩基の目標投与量として 10、20 及び 40 mg/kg/日のアミファンプリジンリン酸塩を 7 日間混餌投与した。

次に、雌雄の CByB6F1 野生型マウスを 2 群に割り付け、アミファンプリジン遊離塩基の目標投与量として 60 及び 100 mg/kg/日のアミファンプリジンリン酸塩を 7 日間混餌投与した。

試験デザインを表 2.6.6.5-3 及び表 2.6.6.5-4 に示す。

表 2.6.6.5-3　　マウス 7 日間反復経口及び混餌投与毒性試験デザイン（CD-1 マウス）

Group Number	Dose Route	Test Material	Dose Level† (mg/kg/dose)	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume [a] (mL/kg)	Dose Concentration (per dose) [b]	Number of Animals Main Study Males
1	Oral	Control Article [c]	0	0	10	0 mg/mL	12
2	Oral	Amifampridine	5	10	10	0.5 mg/mL	36
3	Oral	Amifampridine	10	20	10	1 mg/mL	36
4	Oral	Amifampridine	20	40	10	2 mg/mL	36
5	Dietary	Amifampridine	-	10[d]	-	50 ppm	36
6	Dietary	Amifampridine	-	20[d]	-	100 ppm	36
7	Dietary	Amifampridine	-	40[d]	-	200 ppm	36

- = not applicable.

† Animals were dosed twice a day.

[a] Based on the most recent body weight measurement.

[b] Doses are based on the free base.

[c] Sterile Water, United States Pharmacopeia (USP).

[d] Approximate value based on a 25 gram mouse consuming 5 grams of test diet/day.

表 2.6.6.5-4　　マウス 7 日間反復混餌投与毒性試験デザイン（rasH2 野生型マウス）

Group Number	Dose Route	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Concentration (ppm)[a]	Number of Animals Main Study	
					Males	Females
8	Dietary	Amifampridine	60[b]	300	14	14
9	Dietary	Amifampridine	100[b]	500	14	14

[a] Doses are based on the free base.
[b] Approximate value based on a 25 gram mouse consuming 5 grams of test diet/day.

本試験では、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、TK 及び剖検（瀕死／死亡例のみ）を評価した。

アミファンプリジンに起因した死亡はなく、体重、摂餌量及び剖検においても顕著な変化は認められなかった。アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体への曝露量は、各投与方法でアミファンプリジンの増加に伴い、用量比を下回る増加であるか、ほぼ用量比的な増加を示した。雄 CD-1 マウスの 3-N-アセチル体の曝露量は、すべての採血時点においてアミファンプリジンの約 2 倍であった。rasH2 野生型マウスにおけるアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の曝露は雌雄同程度であり、3-N-アセチル体の曝露量はアミファンプリジンより約 2～3 倍高かった。

結論として、アミファンプリジンリン酸塩をマウスに強制経口投与したとき、アミファンプリジン遊離塩基として 40 mg/kg/日まで、また、混餌投与では 100 mg/kg/日まで良好な忍容性を示した。これらの結果から、雄マウスに強制経口投与した際の NOAEL は 40 mg/kg/日で、40 mg/kg/日群のアミファンプリジンの C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 1130 ng/mL 及び 2460 ng·h/mL であった。混餌投与したときの NOAEL は 100 mg/kg/日以上と考えられ、100 mg/kg/日群の実際の被験物質摂取量は雄で 81.79 mg/kg/日、雌では 133.63 mg/kg/日に相当し、そのときの雌雄のアミファンプリジンの C_{max} はそれぞれ 136 及び 160 ng/mL、AUC_{0-t} はそれぞれ 1700 及び 1950 ng·h/mL であった。

2.6.6.5.2.2　アミファンプリジンリン酸塩の rasH2 野生型マウスにおける 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））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を 7 及び 28 日間、マウスに混餌投与したときの毒性及び TK を評価することであった。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基として記載した。

7 日間試験では、雌雄の CByB6F1 野生型マウスを 5 群に割り付け、目標投与量として 0（対照群）、300、600、900 及び 1500 mg/kg/日を 7 日間混餌投与し、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検（死亡／瀕死例のみ）を評価した。

28 日間試験では、雌雄の CByB6F1 野生型マウスを 4 群に割り付け、目標投与量として 0（対照群）、30、100 及び 300 mg/kg/日を 28 日間混餌投与し、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、臨床検査（血液学的検査及び血液生化学的検査）、TK、剖検、器官重量及び

病理組織学的検査を評価した。

表 2.6.6.5-5　　rasH2 野生型マウス 7 日間反復混餌投与毒性試験デザイン

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Concentration (ppm)[a]	Number of Animals	
				Males	Females
1	Control Article[b]	0	0	5	5
2	Amifampridine	300	1500	5	5
3	Amifampridine	600	3000	5	5
4	Amifampridine	900	4500	5	5
5	Amifampridine	1500	7500	5	5

[a] Approximate value based on a 25 gram mouse consuming 5 grams of test diet/day.
[b] PMI Nutrition International Certified Rodent Chow® Meal No. 5CR4 (14% protein).

表 2.6.6.5-6　　rasH2 野生型マウス 28 日間反復混餌投与毒性試験デザイン

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Concentration (ppm)[a]	Number of Animals			
				Main		Toxicokinetic	
				Males	Females	Males	Females
6	Control Article[b]	0	0	10	10	6	6
7	Amifampridine	30	150	10	10	36	36
8	Amifampridine	100	500	10	10	36	36
9	Amifampridine	300	1500	10	10	36	36

[a] Approximate value based on a 25 gram mouse consuming 5 grams of test diet/day.
[b] PMI Nutrition International Certified Rodent Chow® Meal No. 5CR4 (14% protein).

7 日間試験の結果、アミファンプリジンリン酸塩に起因する瀕死／死亡が、雄では 900 mg/kg/日以上、雌では 600 mg/kg/日以上の群で認められた。300 mg/kg/日の雌雄及び 600 mg/kg/日群の雄では死亡はなかった。600 mg/kg/日以上の群では、22 例の死亡又は状態悪化による安楽死処置があった。これらの動物では、死亡前の一般状態変化として、振戦、異常呼吸、呼吸困難、円背、体温低下、自発運動の減少及び協調運動障害がみられた。死亡及び瀕死は雄より早く雌で認められた。一般状態変化は 600 mg/kg/日以上の群でみられ、振戦、異常呼吸、呼吸困難、円背、自発運動の減少及び閉眼がみられた。600 mg/kg/日群では、対照群と比較して、雄では 24.9%、雌では 20.9%の体重減少がみられ、600 mg/kg/日以上の群では投与 2 日目から摂餌量の減少が認められた。900 mg/kg/日以上の群では早期に動物が死亡したため、900 mg/kg/日群の雌 1 例を除いて体重データは得られなかった。

28 日試験は、7 日試験の結果に基づいて投与量を設定した。その結果、瀕死／死亡はなく、アミファンプリジンリン酸塩に起因した一般状態変化もなかった。100 mg/kg/日以上の群では、投薬起因の体重減少（雄 : -2.29～-7.75%、雌 : -1.95～-8.02%）が認められ、300 mg/kg/日群の雄では投与 15 日目から、また 300 mg/kg/日以上の群の雌では投与 22 日目から統計学的に有意な差として認められた。対照群と比較して、体重増加量の 50%以上の減少が 100 mg/kg/日群の雄及び 300 mg/kg/日群の雌雄で認められた。摂餌量に顕著な差はなかった。

30 mg/kg/日以上の雌では、対照群と比較して統計学的に有意な赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少が認められたが、毒性とはみなさなかった。雄の血液学的検査及び雌雄の血液生化学的検査では異常はなかった。剖検、器官重量及び病理組織学的検査では、アミファンプリジンリン酸塩に起因した変化は認められなかった。

結論として、アミファンプリジンリン酸塩の 30、100 及び 300 mg/kg/日を目標投与量として 28 日間混餌投与した結果、死亡はみられず、臨床症状、剖検、器官重量及び病理組織学的検査でも異常は認められなかった。臨床検査所見では、主に 30 mg/kg/日以上の群の雌で赤血球量の減少が認められたが、病理組織学的な関連を伴わず、毒性とはみなさなかった。100 mg/kg/日群の雄及び 300 mg/kg/日群の雌雄では 50%以上の体重増加量の減少が認められたため、NOAEL は 30 mg/kg/日と考えられ、投与 1～4 週目の薬物の平均摂取量は雄で 23.27 mg/kg/日、雌では 32.38 mg/kg/日であった。30 mg/kg/日における投与 28 日目のアミファンプリジンの C_{max} は雌雄それぞれ 149 及び 112 ng/mL、AUC_{0-t} はそれぞれ 1500 及び 1390 ng · h/mL であった。

2.6.6.5.2.3　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける 3 週間嗜好性及び TK 混餌投与試験（試験番号 BMN125-13-011（4.2.3.4.2.03））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を少なくとも 3 週間、ラットに混餌投与したときの嗜好性及び TK を評価することであった。本試験の結果を用いて、ラットにおける 104 週間混餌投与がん原性試験（試験番号 8264515（4.2.3.4.1.02））の初回混餌投与量を決定した。

雌雄の Sprague-Dawley ラットを 5 群に割り付け、規定濃度のアミファンプリジンリン酸塩を含む飼料を与えた。本項の投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として記載した。1～4 群の動物には試験飼料を 32 日間与えた。1～4 群のデータを用いて 5 群のアミファンプリジンの飼料濃度を選択したため、5 群の動物には試験飼料を 18 日間与えた。5 群は、1～4 群の投与 15 日目に投与を開始した。

試験デザインを表 2.6.6.5-7 に示す。

表 2.6.6.5-7　　ラット 3 週間反復混餌投与毒性試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Target Diet Conc.† (ppm)	Target Dose Level† (mg/kg/day)
	Male	Female			
1	9	9	Control*	0	0
2	9	9	AP	36/55**	4
3	9	9	AP	110/170**	12
4	9	9	AP	360/550**	40
5	9	9	AP	550/975***	70

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration.

* Group 1 received carrier (basal diet) only.

** Diet concentrations for Groups 2, 3, and 4 were 36, 110, and 360 ppm, respectively, on Days 1 through 7 of the dosing phase, and 55, 170, and 550 ppm, respectively, for Day 8 until the last day of dosing.

*** Diet concentration for Group 5 was 550 ppm on Days 1 through 5 of the dosing phase, and 975 ppm on Day 6 until the last day of dosing.

† Values are expressed as amifampridine free base.

毒性の評価は、死亡率、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査及び病理学的検査所見に基づいて行った。TK 評価のために血液サンプルを採取した。

いずれの群においても、投与期間終了時まで死亡はなかった。異常所見の投与量別の発現率パターン及び全体的な発現率の低さに基づくと、雄における 975 ppm 以下のアミファンプリジンの混餌投与による曝露と有害作用に関連はなかった。最初の 8 日間、550/975 ppm 投与群の雌 9 例中 3 例ではほとんど糞便がなく、1 例は投与 8 日目に痩せてほとんど糞便がなかった。975 ppm の曝露を継続しても、これらの所見はその後はみられなかったことから、毒性とは判断しなかった。

雄では、360 ppm 以下の濃度でアミファンプリジンに関連した平均体重への影響はみられず、4 群（高用量）の濃度を 360 から 550 ppm に変更した後においても影響は認められなかった。5 群の雄には、投与 1～5 日目までは 550 ppm、投与 6 日目以降は 975 ppm を含む飼料を与えたが、投与 1～4 日目までは体重が減少し、その後は平均体重が増加した。投与 18 日目の平均体重は週齢を対応させた対照群と比較してわずかに 4%低いだけであった。結果として、550/975 ppm でのアミファンプリジンに関連した体重減少は、曝露を継続しても回復した。

雌では、36/55、110/170 及び 360/550 ppm の濃度で、対照群と比較して、投与 15～18 日目に統計学的に有意な平均体重の低値が認められた。これらの群の投与 18 日目の平均体重は、対照群よりも約 5～6%低かった。36/55 ppm 群では、投与 22 日目以降、対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。110/170 及び 360/550 ppm の曝露を継続した場合、対照群より約 6～7%低い平均体重で推移し、投与 22 及び 29 日目に統計学的な差が認められたが、投与 25 及び 32 日目には差はなかった。雌では、550/975 ppm の混餌投与により、飼料中濃度が 550 ppm であった最初の 4 日間で平均体重が 9 g 減少した（対照群に対して-4.0%）。投与 4～8 日目の間、飼料中濃度を投与 6 日目に 975 ppm まで上げたにもかかわらず、平均体重はわずか 3 g 減少（-1.4%）しただけであった。更に、投与 8～18 日目の間、平均体重

が 14 g 増加（+3.8%）した。

したがって、975 ppm 以下のアミファンプリジンに対する体重の変化は、時間の経過とともに適応が認められたため、毒性とはみなさなかった。

36/55 ppm 以上のアミファンプリジンの混餌投与による曝露は、一過性の摂餌量の低下と関連しており、曝露の継続により適応が認められた。TK 評価のためのサンプル採取日には、実験操作起因の摂餌量の減少が顕著であり、動物が飼料の大部分を摂取する夜間における、動物室内での人間の活動に伴う摂餌行動の変化が原因であると推察された。また、初回採血の影響で摂餌量が減少した動物がいた可能性もある。

360/550 及び 550/975 ppm 群で投与期間終了時に認められたアミファンプリジンに関連する臨床検査所見として、投与 33 日目の対照群と比較して、投与 19（5 群、975 ppm）及び 33 日目（4 群、550 ppm）に網状赤血球の絶対数の軽微又は軽度な増加が雌雄で、トリグリセリド濃度の軽微な増加が雄で、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の軽微な増加が雌で認められた。これらの変化が認められた動物の数は、投与 19 日目よりも 33 日目の方が少なかった。これらの臨床検査所見は、いずれも変化の程度が小さいことから毒性とはみなさなかった。36/55 及び 110/170 ppm 群では、血液学的検査値及び血液生化学的検査値に影響は認められなかった。

アミファンプリジンを 975 ppm 以下の濃度で少なくとも 13 日間以上混餌投与したが（投与 1～5 日目は 550 ppm、投与 6～18 日目は 975 ppm）、検査した組織に肉眼的影響は認められず、器官重量においても直接的な影響及び毒性はなかった。

TK の結果では、アミファンプリジンの曝露量は、4～70 mg/kg/日の目標量範囲でおおむね用量の増加に伴って増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はおおむね用量比を上回る増加を示した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、すべての投与量及び採血時点において、雌が雄よりも高かったが、その差はほぼ 2 倍未満であった。投与 4 日目（2～4 群）と比較して、投与 15（2～4 群）及び 29 日目（4 群）の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はおおむね高値を示したが、投与 15～29 日目はおおむね同程度であり、投与 15 日目までにはほぼ定常状態に達することが示された。

3-N-アセチル体への曝露は、一般にアミファンプリジンの目標投与量が 4 から 70 mg/kg/日に上がるのに伴っておおむね増加し、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量にほぼ比例した増加を示した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、おおむね雌が雄よりも高かったが、その差は 2 倍未満であった。投与 4 日目（2～4 群）と比較して、投与 15（2～4 群）及び 29 日目（4 群）の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はわずかに高値を示したが、投与 15～29 日目では同程度であり、投与 15 日目までにほぼ定常状態に達したことが示された。TK の結果、ラットではアミファンプリジンの多くが 3-N-アセチル体に変換されることが示された。

結論として、975 ppm までの濃度のアミファンプリジン遊離塩基を含むアミファンプリジンリン酸塩をラットに混餌投与すると、摂餌量及び体重増加量の一過性の減少が認められたが、数日間で適応し、975 ppm 以下の混合飼料は嗜好性が高いと考えられ、毒性も認められなかった。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む）

アミファンプリジンリン酸塩を用いた生殖発生毒性試験は、ICH S5 の要求事項に従って実施した。GLP 試験には、胚・胎児発生に関する評価項目を設定したラットを用いた ICH Stage A～D（Segment I／Segment II）受胎能試験、ウサギを用いた ICH Stage C～D（Segment II）胚・胎児発生に関する試験、ラットを用いた ICH Stage C～F（Segment III）出生前及び出生後の発育に関する試験が含まれる。

2.6.6.6.1　受胎能及び初期胚の発生

2.6.6.6.1.1　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける受胎能及び初期胚発生並びに胚・胎児に関する経口投与試験（ICH Stage A～D、試験番号 BMN125-13-012（4.2.3.5.1.01））

本試験の目的は、交配及び受胎能並びに雌雄ラットに 1 日 3 回、交配前及び雄の剖検まで、又は雌に妊娠期間を通じて（強制経口投与により）投与した場合の雄親、雌親及び胚・胎児毒性に対するアミファンプリジンリン酸塩としての潜在的な有害作用を評価することであった。

この発生・生殖毒性試験は、生殖過程の ICH ガイドラインの Stage A、B、C 及び D を評価し、一般毒性、性腺機能、交配行動、着床、雌性発情周期、雌雄ラットの一般生殖能及び胚・胎児発生の評価を含めており、通常とは若干異なったデザインである。雌雄 Sprague-Dawley ラットを各群に割り付け、アミファンプリジンリン酸塩を経口投与した。遊離塩基はアミファンプリジンの薬理活性部分であるため、投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジンの遊離塩基の投与量として表示した。

試験デザインを表 2.6.6.6-1 に示す。

表 2.6.6.6-1　　ラット受胎能及び胚・胎児に関する経口投与試験デザイン

Group No.	No. of Animals				Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Main		TK					
	Male	Female	Male	Female				
1	25	25	3	3	Vehicle*	0	5	0
2	25	25	6	6	AP	3.9	5	0.3
3	25	25	6	6	AP	12.0	5	0.8
4	25	25	6	6	AP	39.6	5	2.6

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration; TK = toxicokinetic.

* Vehicle was reverse osmosis water.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

主試験群及び TK 群の雄には、交配前 4 週間、交配期間中 2 週間及び交配後は剖検前日までの 4 週間投与し、最終的に雄には剖検までに 10 週間以上投与した。主試験群の雌には、交配前 2 週間、交配期間中 2 週間及び妊娠 17 日（GD 17）まで投与した。TK 群の雌には GD 6～17 に投与した。

主試験群については、計画剖検又は帝王切開まで、試験期間を通じて一般状態変化、体重

及び摂餌量をモニタリングした。雄は 4 週間の投与後に交配し、少なくとも 10 週間の投与後に剖検を行って生殖器官の重量を測定して保存し、精子の運動性及び総濃度も評価した。雌は、投与の 2 週間前から、交配が確認されるまで性周期を毎日評価した。雌の生存例全例を妊娠 21 日に帝王切開して胎盤及び羊膜嚢の肉眼的異常を検査し、黄体数、着床数並びに早期又は後期吸収胚数を評価した。個々の胎児について性の同定と体重測定を実施し、外表、内臓及び骨格の奇形（変異及び異常）の有無を検査した。雌雄の生殖能力は、交配と雌の妊娠結果に基づいて評価した。

TK 評価のための血液サンプルは、TK 群の雄では最終投与日（投与 71 日目）の初回投与から 1 時間後に、TK 群の雌では GD 17（投与 12 日目）の投与から 0.5 及び 2.0 時間後に採取した。

雌雄において、アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の血漿中濃度は投与量の増加に伴い上昇した。3-N-アセチル体の濃度はアミファンプリジンより高く、アミファンプリジンの大部分が 3-N-アセチル体に変換されることが示された。雄では、1 日の初回投与後 1 時間のアミファンプリジンの平均血漿中濃度は、1.3、4.0 及び 13.2 mg/kg/回（3.9、12 及び 39.6 mg/kg/日）群でそれぞれ 15.5、46.6 及び 401 ng/mL であった。3-N-アセチル体の濃度は、それぞれ 557、1267 及び 2587 ng/mL であった。

妊娠雌では、アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の平均血漿中濃度は、投与後 2 時間と比較した場合、各投与後 0.5 時間で大幅に高かった。アミファンプリジンと 3-N-アセチル体の血漿中濃度は、すべての用量で各投与後 0.5 時間に、最高用量では 0.5 及び 2 時間に上昇した。投与後 0.5 時間のアミファンプリジンの平均血漿中濃度は、1.3、4.0 及び 13.2 mg/kg/回（3.9、12 及び 39.6 mg/kg/日）群の雌でそれぞれ 11.7～17.6、21.0～34.3 及び 124～277 ng/mL であった。0.5 時間の 3-N-アセチル体の雌の平均血漿中濃度は、それぞれ 459～663、635～1047 及び 1055～2933 ng/mL であった。これらの結果から、当試験の投与期間を通じて雌雄ともにアミファンプリジンに適切に曝露されたと考えられた。

試験中に発生した 3 例の死亡例は、いずれもアミファンプリジンに起因したものではなかった。対照群の TK 群の雌 1 例は GD 17 の採血直後に死亡が認められたが、それまでは全般的に良好な一般状態であり、異常な一般状態や体重変化がみられなかったことから、採血に関連したものと考えられた。4.0 mg/kg/回の TK 群の雌 1 例は妊娠 11 日の 2 回目投与に誤投与があったので安楽死させた。食道の穿孔及び胸腔内の液貯留といった剖検所見並びに対応する呼吸困難、不規則呼吸、耳介の蒼白及び斜視の一般状態変化から、誤投与は明らかであった。13.2 mg/kg/回の TK 群の雌 1 例を GD 9 の 2 回目投与後に安楽死させたのは、剖検時の肺の液体貯留からも示唆されるように、経口投与物の吸引によるものと思われた。本例で最後に認められた観察所見は、GD 8～9 における四肢攣縮、呼吸音／呼吸困難、透明な口腔分泌物及び活動性低下であった。しかし、次の 3 つの理由から、この高用量群の TK 群の雌の死亡はアミファンプリジンに関連したものではないと考えられた。(1) 活動性低下は臨床観察に共通したものではなく、アミファンプリジンの薬理作用と一致しないこと、(2) 異常な臨床症状の発現から瀕死状態や安楽死までの時間が長く、げっ歯類、ウサギ、その他

の動物種のアミファンプリジンの C_{max} でみられたアミファンプリジンによる急性 CNS 毒性及び急速な死亡とは異なっていたこと、及び（3）アミファンプリジン投与群のいずれの雌においても、アミファンプリジンに関連した一般状態や死亡は認められず、TK 群の雄及び主試験群の動物はいずれも予定した試験終了時まで生存したこと。

約 9 週間の投与後に、主に口周囲及び四肢の攣縮並びに過度の身づくろいに関連した一般状態変化が 13.2 mg/kg/回群の雄のそれぞれ 16、4 及び 9 例に認められた。これらの一般状態変化は、薬理作用（神経筋接合部での ACh 放出の増加）と一致しており、既報のアミファンプリジンによる CNS 関連毒性／痙攣と本質的に類似していたことから、投与に関連したものと考えられた。約 7 週間の投与期間中、雌ではアミファンプリジンに関連した一般状態の変化はみられなかった。

アミファンプリジン投与は、雄の体重、体重増加量及び摂餌量に影響を及ぼさなかった。アミファンプリジン投与により、13.2 mg/kg/回群の雌で GD 4～6 の体重増加量の減少がみられ（対照群より 35.1%低値）、これが妊娠期間中の体重増加量の全体的なわずかな減少（GD 0～18 の対照群より 8.2%低値）の一因となったが、体重に対する有意な影響は認められなかった。13.2 mg/kg/回群の雌（対照群より最大 15.6%低値）及び 4.0 mg/kg/回群の雌（13.2 mg/kg/回群より軽度）では、投与に関連した摂餌量の減少が GD 0～14 日にみられた。しかし、雌における投与に関連した体重増加抑制及び摂餌量の減少は可逆的であり、GD 21 の妊娠末期までの値は対照群とほぼ同じであったことから、これらの影響は有害ではないと考えられた。

アミファンプリジン投与は、雄親及び／又は雌親の肉眼的観察、生殖指標、性周期、帝王切開パラメータ、雄生殖器重量及び精子運動性／濃度に影響を及ぼさなかった。アミファンプリジン曝露は胎児の生存率及び体重に影響を及ぼさず、胎児の外表、内臓及び骨格の奇形（変異及び異常）も生じなかった。

結論として、雌雄 Sprague-Dawley ラットにおいて、アミファンプリジンを遊離塩基量として 0、1.3、4.0 及び 13.2 mg/kg/回（0、3.9、12.0 及び 39.6 mg/kg/日）の用量を、雄では剖検まで約 10 週間、雌では GD 17 まで 7 週間、1 日 3 回経口投与し、交配、受胎能並びに雄親、雌親及び胚・胎児毒性に対するアミファンプリジンの影響を検討した。13.2 mg/kg/回のアミファンプリジン投与は、9 週間投与後の雄の CNS 関連の一般状態変化（主に口周囲と四肢の攣縮と過度の身づくろい）と関連していた。4.0 mg/kg/回以上のアミファンプリジン投与は妊娠中の雌において、体重増加量及び／又は摂餌量の軽微で可逆的な減少をもたらした。1.3 mg/kg/回では、アミファンプリジンは評価したいずれのパラメータにも影響を及ぼさなかった。したがって、雄親及び雌親の生殖毒性に対する NOAEL は、遊離塩基としていずれも 39.6 mg/kg/日と判断した。また、胎児発生毒性の NOAEL は、遊離塩基として 39.6 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.2　胚・胎児発生

ウサギを用いた主要な胚・胎児毒性試験（試験番号 BMN125-13-015（4.2.3.5.2.03））に加

えて、アミファンプリジンリン酸塩を用いた主要なラット受胎能試験を実施した（試験番号BMN125-13-012（4.2.3.5.1.01））。また、当試験では胚・胎児発生に関する影響も評価した。

主要なウサギ胚・胎児毒性試験用のアミファンプリジンリン酸塩の適切な用量段階を選択するために、ウサギを用いた 2 つの用量設定試験を実施した。これらの用量設定試験について以下に要約する。

2.6.6.6.2.1　アミファンプリジンリン酸塩のウサギにおける経口投与忍容性試験（試験番号 BMN125-13-013（4.2.3.5.2.01））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を非妊娠雌ウサギに 1 日 3 回経口投与したときの忍容性を評価し、少なくとも 13 日間投与の MTD を求めることであった。本試験の結果から、ウサギの胚・胎児発生用量設定試験（試験番号 BMN125-13-014（4.2.3.5.2.02））の用量設定情報を得た。

投与開始時体重が約 2.8～3.5 kg の 5 ヵ月齢の非妊娠雌 New Zealand White（NZW）ウサギを 3 群に割り付けた。2 及び 3 群には、アミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回、3 日間投与した後、少なくとも 3 日間の休薬期間を設けた。一般状態及び体重に基づいて MTD を決定するまで、アミファンプリジンリン酸塩の投与量を増加させた。アミファンプリジン遊離塩基の漸増投与量は 0.53、1.58、5.3 及び 15.8 mg/kg/回の 1 日 3 回投与（それぞれ 1.6、4.74、15.9 及び 47.4 mg/kg/日）とした。試験の MTD を決定する段階で、1 群のウサギには媒体（純水）のみを投与した。MTD 決定後、1 群の動物にアミファンプリジンリン酸塩を最終的に 5.3 mg/kg/回の用量で 1 日 3 回、13 日間投与した。投与量は特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として表記した。

試験期間を通じて、非絶食下で一般状態、体重、体重増加量及び摂餌量をモニターした。漸増投与時の 15.8 mg/kg/回群では、投与に関連した CNS 毒性（痙攣）及び死亡が 1 例で認められ、本用量の投与は 1 日目投与後に中止したため、一般状態観察と体重測定の実施は第 1 日のみであった。最終的には 5.3 mg/kg/回の 13 日間投与後に動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

漸増投与時の 15.8 mg/kg/回群の死亡例では、投与 1 日目の 2 回目投与後の約 1 時間に痙攣が認められ、その直後に死亡した。0.53、1.58 及び 5.3 mg/kg/回のアミファンプリジン投与による死亡はなかった。漸増投与時の 15.8 mg/kg/回群の他の 3 例及び 5.3 mg/kg/回群の 13 日目の 1 例でも、非常に軽度な攣縮及び過度のなめずりといった被験物質関連の CNS の一般状態変化が認められた。

アミファンプリジンに関連した軽度の体重減少（投与 7 日目の平均体重が投与 1 日目に対して約 5%減少）が、5.3 mg/kg/回の 1 日 3 回 13 日間の投与により生じた。体重減少は投与期間前半（投与 7 日目まで）で顕著であり、一過性の摂餌量の減少（投与開始日に対して最大 36%減少）と関連した。7 日目以降、摂餌量は改善したが、漸増投与時の 0.53、1.58 及び 5.3 mg/kg/回群の摂餌量は対照群より低かった。これらの軽度かつ一過性の影響は有害とは考えられなかった。

結論として、当忍容性試験では、非妊娠の非絶食 NZW ウサギ 6 例からなる群に、アミファンプリジンリン酸塩を、遊離塩基量として 0.53、1.58、5.3 及び 15.8 mg/kg/回（それぞれ 1.6、4.74、15.9 及び 47.4 mg/kg/日）の用量で、漸増投与の各用量では少なくとも 3 日間の休薬期間を設け、1 日 3 回、最長 3 日間連続投与した。5.3 mg/kg/回未満のアミファンプリジンを 3 日間投与しても、死亡、一般状態変化、体重及び摂餌量には影響はなかった。5.3 mg/kg/回群では有害な一般状態変化は認められなかったが、3 日間投与後に体重及び摂餌量が減少した。15.8 mg/kg/回群では、6 例中 4 例で CNS 関連の一般状態変化（3 例に攣縮及び／又は過度のなめずり、4 例目は全身振戦及び間代性痙攣が持続し死亡）が認められた。その後、5.3 mg/kg/回を 13 日間投与した結果、死亡及び有害な一般状態の変化は認められず、体重及び摂餌量の一過性の減少のみが認められた。

以上のように、5.3 mg/kg/回（15.9 mg/kg/日）の用量はウサギにおける MTD であることが示され、その後の妊娠ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験におけるアミファンプリジン投与量を設定するための十分な情報が得られた。

2.6.6.6.2.2　アミファンプリジンリン酸塩のウサギにおける胚・胎児発生用量設定経口投与試験（試験番号 BMN125-13-014（4.2.3.5.2.02））

本試験は、ウサギにおける GLP に準拠した最終的な胚・胎児発生試験のための用量を設定することを目的として、アミファンプリジンリン酸塩の母体及び胚・胎児毒性を検討し、器管形成期（GD 7～20）の妊娠ウサギに 1 日 3 回経口投与したときのアミファンプリジンの TK を測定することであった。

交配した雌 NZW ウサギを群分けし、アミファンプリジンリン酸塩を投与した。投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として表記した。

試験デザインを表 2.6.6.6-2 に示す。

表 2.6.6.6-2　　ウサギ胚・胎児用量設定経口投与試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Main	TK				
	Female	Female				
1	8	3	Vehicle*	0	5	0
2	8	6	AP	4.74	5	0.32
3	8	6	AP	15.9	5	1.1
4	8	6	AP	30	5	2.0

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration; TK = toxicokinetic.

* Vehicle was reverse osmosis water.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

妊娠期間中、一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定を実施し、投与期間の開始時及び終了時（それぞれ GD 6 及び 20）に臨床検査パラメータを評価した。動物は剖検を実施し、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、唾液腺（下顎）、卵巣及び子宮（非妊娠動物のみ）を計画外

及び計画剖検時に採取した。GD 29 に主試験群の生存例全例を帝王切開し、子宮重量を測定した。総体重変化量を算出し、黄体数、着床痕数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数を評価した。胎盤及び羊膜嚢の肉眼的異常を調べた。胎児体重を個別に測定し、外表奇形（変異及び異常）の有無を検査した。

投与開始時及び投与期間終了時（それぞれ GD 7 及び 19）に、アミファンプリジン及び主要な代謝物 3-N-アセチル体について母体の TK を評価した。ウサギに経口投与したとき、アミファンプリジンは速やかに吸収され、T_{max} はいずれの投与量及び投与日においても 0.250～2.00 時間であった。T_{max} 以降に血漿中濃度は速やかに低下し、いずれの投与量及び投与日においても $t_{1/2}$ は 1.01～2.32 時間であった。アミファンプリジンの曝露量は、1.58～10 mg/kg/回の用量で増加した。初回投与後の $AUC_{0\text{-}6h}$ 値の上昇は明らかな用量比例性を示さなかった。アミファンプリジン曝露のわずかな増加が GD 19 に認められた。$AUC_{0.25\text{-}6h}$ に基づく蓄積比は 1.34 倍以下であった。これらの結果から、妊娠ウサギにおけるアミファンプリジンリン酸塩の反復経口投与後のアミファンプリジンの蓄積は少ないことが示された。

アミファンプリジンリン酸塩の経口投与後、アミファンプリジンの大部分が 3-N-アセチル体に変換された。3-N-アセチル体は速やかに生成され、その T_{max} 値はすべての投与量及び投与日で 0.500～1.00 時間であった。

T_{max} 後は、3-N-アセチル体の血漿中濃度は速やかに低下し、$t_{1/2}$ の平均値は、いずれの投与量及び投与日においても 1.75～2.85 時間であった。不活性な 3-N-アセチル体への曝露量はアミファンプリジンよりも大きく、1.58～10 mg/kg/回の用量に応じて増加した。初回投与後の $AUC_{0\text{-}6h}$ の増加はおおむね用量比例性を示した。GD 7 から 19 まで、3-N-アセチル体の蓄積はほとんどないか、全くなかった。3-N-アセチル体のアミファンプリジンに対する $AUC_{0.25\text{-}6h}$ の曝露比は 18.8～43.5 倍であり、投与量の増加に伴い低下した。

GD 20 に胎児血液を採取し、薬物曝露を評価した。アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体は、アミファンプリジンの用量とともに増加し、胎児への曝露が確認された。

試験期間中に死亡した 4 例のうち、2 例は CNS に関連した毒性の直接的な結果であったため、アミファンプリジン投与に起因すると考えられた。主試験の 5.3 mg/kg/回群の雌 1 例で、投与初日（GD 7）の 2 回目投与で、継続的な全身の振戦とそれに続く間代性／強直性痙攣及び不規則呼吸が認められたため、投与後約 2 時間に安楽死させた。10 mg/kg/回の TK 群の別の雌は、呼吸困難、透明な口腔分泌物及び腹臥位（痙攣経験示す一般状態変化）を示したことから、投与 2 日目の 2 回目投与後約 3 時間に安楽死させた。上記の CNS 関連の有害な一般状態変化は、アミファンプリジンが神経筋接合部での ACh 放出を増加させるという薬理作用と一致しており、この化合物の痙攣という副作用として知られているものであった。

この雌 2 例で安楽死前に認められたアミファンプリジン血漿中濃度の上昇は、これらの動物はアセチル化が遅い表現型であった可能性を示した。アミファンプリジンの主要代謝経路は NAT を介しているため、アセチル化の遅いウサギは（アセチル化が通常又は速いウサギと比較して）投与量当たりのアミファンプリジンへの曝露量が高く、アミファンプリジ

ンに関連した CNS 毒性及び死亡に対する感受性が高いとが考えられる。他の 2 例の死亡のうち、1 例は投与ミスによるものであり、もう 1 例は被毛の摂取により胃腸閉塞が生じた結果であった。

CNS 関連の観察所見は、主に 5.3 及び 10 mg/kg/回のアミファンプリジン投与と関連していた。瀕死状態で安楽死させた中用量群の雌 1 例で認められた CNS 関連の有害事象である全身の振戦及び痙攣に加えて、過度のなめずり、身づくろい、口周囲の攣縮及び頭部反転動作といった、あまり重度ではない観察所見が、中及び高用量群で認められた。5.3 及び 10 mg/kg/回群の雌では、糞便の異常（少数／無量／無形／小型／液状）及び異常呼吸（浅速／呼吸音／不規則）の発現率の増加も認められた。

10 mg/kg/回群の雌では、対照群と比較して、平均体重、体重増加量及び摂餌量の減少（対照群より最大でそれぞれ 4.7%、71.2%及び 57.1%低値）が投与期間中（GD 7～20）に認められたが、投与期間終了後には増加し、試験終了時までに対照群と同程度の値となったことから、これらの投与に関連した影響は可逆的であることが示された。

アミファンプリジン投与は、評価した母体の帝王切開、臨床病理学的検査及び胎児パラメータのいずれにも影響を及ぼさず、母体の肉眼的異常や胎児の外表奇形（変異及び異常）も生じなかった。

結論として、胚・胎児発生に関する用量設定試験において、妊娠 NZW ウサギにアミファンプリジン遊離塩基 0、4.74、15.9 及び 30 mg/kg/日を GD 7～20 に 1 日 3 回投与した。15.9 及び 30 mg/kg/日では、アミファンプリジン投与により、全身の振戦及び痙攣といった有害作用を含む CNS 関連の一般状態変化が認められ、中及び高用量群ではそれぞれ 1 例の死亡がみられた。30 mg/kg/日群では、アミファンプリジン投与により可逆的な体重、体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。母体の肉眼的観察、帝王切開結果、臨床病理学的検査パラメータ及び胎児パラメータ（外表奇形を含む）は、いずれの用量でもアミファンプリジン投与の影響を受けなかった。この用量設定試験により、ウサギを用いた最終的な胚・胎児発生に関する試験のアミファンプリジンの投与量設定に十分な情報が得られた。

2.6.6.6.2.3　アミファンプリジンリン酸塩のウサギにおける胚・胎児発生に関する経口投与試験（ICH Stage C～D、試験番号 BMN125-13-015（4.2.3.5.2.03））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩の母体及び胚・胎児毒性を評価し、器官形成期（GD 7～20）の妊娠ウサギに 1 日 3 回経口投与した場合のアミファンプリジンの TK を調べることであった。

交配した雌 NZW ウサギを群分けし、アミファンプリジンリン酸塩を投与した。投与量は、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基量として表記した。

試験デザインを表 2.6.6.6-3 に示す。

表 2.6.6.6-3　　ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Main	TK				
	Female	Female				
1	25	5	Vehicle*	0	5	0
2	25	5	AP	4.74	5	0.32
3	25	5	AP	15.9	5	1.1
4	25	5	AP	30	5	2.0

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration; TK = toxicokinetic.

* Vehicle was reverse osmosis water.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

妊娠期間中、一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定を実施した。動物は剖検し、非妊娠動物の脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、唾液腺（下顎）、卵巣及び子宮を計画外及び計画剖検時に採取した。主試験群の生存例全例を GD 29 に帝王切開し、妊娠子宮重量を測定した。総体重変化量を算出し、黄体数、着床痕数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数を評価した。胎盤及び羊膜嚢は肉眼的異常を調べた。対照群、1.58、5.3 及び 10 mg/kg/回群で得られたそれぞれ 21、23、21 及び 19 腹の全胎児の体重を測定し、外表及び内臓の奇形（変異及び異常）を調べた。

GD 7 及び 20 の各投与後 0.5 時間に対照群の TK 群の雌から、またアミファンプリジンの各用量の投与後 0.5 及び 2.0 時間に血液サンプルを採取した。アミファンプリジンと 3-N-アセチル体の血漿中濃度は用量とともに増加し、GD 20 の濃度は GD 7 よりもおおむね高かった。3-N-アセチル体の濃度はアミファンプリジンの濃度より高く、妊娠雌ウサギにおいてアミファンプリジンが主に 3-N-アセチル体に変換されたことを示した。

アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の平均血漿中濃度は、GD 7 及び 20 のいずれにおいても、各投与後 2.0 時間と比較して、おおむね 0.5 時間の方が高かった。アミファンプリジンと 3-N-アセチル体の血漿中濃度は、同じ妊娠日の同じ時点で用量に比例した増加はみられなかったが、GD 7 と 20 を比較すると、各用量ともに血漿中濃度の日間増加が示された。

GD 7 の 4.74、15.9 及び 30 mg/kg/日の投与後 0.5 時間の雌の平均血漿中濃度は、アミファンプリジンはそれぞれ 32.3～56.9、91.2～103 及び 237～283 ng/mL、3-N-アセチル体はそれぞれ 409～761、1428～1888 及び 1792～3258 ng/mL であった。

GD 20 の平均血漿中濃度は、アミファンプリジンはそれぞれ 52.9～67.7、143～176 及び 430～563 ng/mL、3-N-アセチル体はそれぞれ 642～822、2726～3080 及び 3338～3988 ng/mL であった。アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の濃度はいずれも GD 7 と比較して GD 20 にやや上昇し、投与回数による曝露の増加が示された。これらの結果から、本試験の投与期間を通じて、動物はアミファンプリジンに適切に曝露されたと考えられた。

試験中に 8 例の死亡が認められ、うち 5 例は高用量群（30 mg/kg/日）の主試験群の動物であり、アミファンプリジンに起因するものであった。30 mg/kg/日群の雌 1 例は、GD 7 の

初回投与後の約 3 時間に、全身振戦、頭部反転動作、口周囲の攣縮、透明な口腔内分泌物及び浅速呼吸といった異常な CNS 関連の一般状態変化が認められ、GD 7 に安楽死させた。同群の別の雌 1 例は、GD 8 の 2 回目投与後の約 1 時間に激しい旋回行動後に側臥位となり、瀕死状態で安楽死させた。この一般状態変化は CNS に関連した毒性であった。上記の CNS 関連の重度の一般状態変化は、筋接合部での ACh 放出を増加させるアミファンプリジンの薬理作用と一致していたこと及びこの化合物の既知の副作用が痙攣であることから、2 例の雌の早期安楽殺はアミファンプリジン投与が原因と考えられた。

これら雌 2 例における安楽死前の血漿中アミファンプリジン濃度の上昇は、これらの動物が遅いアセチル化型であった可能性を示した。アミファンプリジンの主要代謝経路は NAT を介しているため、アセチル化の遅いウサギは（アセチル化が通常又は速いウサギと比較して）、投与量当たりのアミファンプリジン曝露量が高く、アミファンプリジンに関連した CNS 毒性及び死亡に対して感受性が高い。ウサギのサブセットでは、NAT の多型が知られていることから、曝露量が高く、毒性を伴うことが予想された。

高用量群（30 mg/kg/日）の他の死亡例 3 例では、CNS に関連した重度の一般状態変化は認められなかったが、アミファンプリジンに起因する体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。30 mg/kg/日群の雌 1 例が、GD 9 の 3 回目の投与前に死亡発見された。最後の一般状態変化は、口周囲の攣縮、液状／少量の糞便及び耳介の蒼白であった。別の 30 mg/kg/日群の雌は、GD 12 の 2 回目の投与ができず、その直後に死亡した。30 mg/kg/日群の雌 1 例は、GD 17 の初回投与後に瀕死状態となり安楽死させた（3 例目）。これらの雌 3 例は、CNS に関連した一般状態変化をほとんど又は全く示さなかったが、全例で体重減少（GD 7 の体重に対して最終体重が 7.2%～14%減少）が認められた。これまで体重及び摂餌量の減少がアミファンプリジン曝露に関連することが明らかになっていることから、これらの高用量群 3 例の死亡はアミファンプリジン投与によるものと考えられた。

中用量群の 3 例の死亡は、アミファンプリジン投与との関連はなかった。1 例は GD 8 に投与ができず、その直後に死亡した。剖検では肉眼的変化がなく、死因は不明であった。他の 1 例は GD 23 に流産し、安楽死させた。剖検では肺葉の多色／変色が認められ、瀕死状態との関連が考えられた。3 例目の動物は GD 27 に瀕死状態で安楽死させたが、胃腸にはガス充満が認められ、呼吸困難、活動性低下、紫色皮膚及び冷耳介といった一般状態変化に関連し、瀕死の理由と考えられた。

CNS 関連の所見は、主に 15.9 及び 30 mg/kg/日（中及び高用量群）でのアミファンプリジン投与に関連していた。GD 7 又は 8 に安楽死させた 30 mg/kg/日群の雌 2 例で認められた全身振戦、頭部反転動作及び激しい旋回行動といった CNS 関連の重度の一般状態変化に加えて、中及び高用量群では、軽度の口周囲の攣縮、過度のなめずり／身づくろい及び前肢のミオクローヌ性痙攣といった所見が認められた。15.9 及び 30 mg/kg/日群の雌では、糞便の異常（少数／無量／無形／小型／液状）及び異常呼吸（浅速／呼吸音／不規則）の発現率の増加も認められた。

30 mg/kg/日群の雌では、対照群と比較して、投与期間中又は投与終了時（GD 7～20）に平

均体重、体重増加量及び摂餌量の減少（対照群よりそれぞれ最大 4.0%、22.0%及び 37.0%低値）が認められた。しかし、平均体重、体重増加量及び摂餌量は、投与期間終了後に増加し、試験終了時までに対照値と同程度となり、投与に関連したこれらの影響は可逆的であることが示された。アミファンプリジン投与は、評価した母体の帝王切開や胎児パラメータのいずれにも影響を及ぼさず、母体の肉眼的異常や胎児の外表並びに内臓及び骨格の奇形（変異及び異常）を示さなかった。

結論として、胚・胎児発生試験では、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 0、1.58、5.3 及び 10 mg/kg/回（それぞれ 0、4.74、15.9 及び 30 mg/kg/日）の用量で、妊娠ウサギに GD 7 から 20 まで 1 日 3 回投与した。30 mg/kg/日群では、全身振戦、頭部反転動作及び激しい旋回行動といった重度の CNS 毒性を示した 2 例が死亡したほか、体重増加量及び摂餌量の減少を示した 3 例が死亡した。15.9 mg/kg/日群では、主に口周囲の攣縮と過度のなめずりといった重篤ではない CNS 関連の一般状態変化が認められた。15.9 mg/kg/日以上の群では、体重、体重増加及び摂餌量の可逆的な減少が認められた。母体の肉眼的観察及び帝王切開の結果、いずれの時点でもアミファンプリジン投与の影響はなかった。同様に、アミファンプリジンはいずれの胎児パラメータ（外表、内臓及び骨格奇形を含む）にも影響を及ぼさなかったことから、アミファンプリジンは母体毒性を示す用量でも催奇形性はないことが示された。したがって、母動物に対する NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基として 15.9 mg/kg/日、胎児（発生）に対する NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基として 30 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.3　出生前及び出生後の発育

2.6.6.6.3.1　アミファンプリジンリン酸塩のラットにおける出生前及び出生後発育並びに母体の機能に関する経口投与試験（ICH Stage C～F、試験番号 BMN125-13-025（4.2.3.5.3.01））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を着床から授乳期間を通じて離乳まで母動物に投与したときの出生児の発育へのアミファンプリジンの潜在的有害作用を評価することであった。

本試験では、ICH ガイドラインの Stage C～F の生殖能を評価するとともに、死亡率、一般状態、体重、摂餌量、同腹児、分娩及び剖検データに基づく F_0 世代の毒性を評価した。F_1 世代は、発育指標、神経機能、成熟及び生殖について評価した。別途実施した受胎能／胚・胎児発生に関する複合試験（Stage C 及び D、試験番号 BMN125-13-012（4.2.3.5.1.01））において帝王切開で摘出した胎児を評価したため、本試験ではそれらの評価は行わなかった。アミファンプリジンの影響が遅延して発現する可能性があるため、性成熟期及び妊娠期間を通じて F_1 世代ラットを観察した。母動物の血漿中アミファンプリジン曝露量の評価に加えて、分娩後に授乳中の母動物の乳汁中のアミファンプリジンを定量し、乳汁を介した出生児の曝露を調べた。

交配した雌 Sprague-Dawley ラットを群分けし、アミファンプリジンリン酸塩を経口投与

した。投与量は、特に断りのない限り、すべてアミファンプリジン遊離塩基量として用量を記載した。

試験デザインを表 2.6.6.6-4 に示す。

表 2.6.6.6-4　　ラット出生前及び出生後発育並びに母体の機能に関する経口投与試験デザイン

Group No.	No. of Animals		Test Material	Dose Level† (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Dose Conc. (mg/mL)
	Main	TK				
	Female	Female				
1	25	3	Vehicle*	0	5	0
2	25	6	AP	3.9	5	0.3
3	25	6	AP	12.0	5	0.8
4	25	6	AP	39.6	5	2.6

AP = amifampridine phosphate; conc. = concentration; TK = toxicokinetic.

* Vehicle was reverse osmosis water.

† Animals were dosed three times a day, and doses are expressed as amifampridine free base dose levels.

主試験群の雌には、5 mL/kg/回の容量を GD 6 から分娩を通じて授乳 20 日（LD 20）まで、1 日 3 回投与した。TK 群の雌には GD 6 から LD 14 まで投与した。対照群には同量の媒体（純水）のみを投与した。F_1 世代の児動物にはアミファンプリジンを直接投与せず、母体の妊娠期間中（子宮内曝露）及び授乳期間中の母乳を介してアミファンプリジンに曝露した。F_1 児については、離乳前に発達指標の達成及び成長を評価した。離乳時に、1 腹につき雌雄各 1 例を選抜し、成長、性発達、自発運動、反射発達、学習及び記憶並びに生殖能力（GD 21 の帝王切開による）を評価した。

F_0 雌の毒性評価は、妊娠及び授乳期間中の死亡、一般状態、体重及び摂餌量に基づいて行った。分娩、同腹児、剖検データ及び生殖指標も評価した。F_1 児の毒性評価は、発達指標及び神経学的評価（自発運動、聴覚驚愕及びモリス水迷路）、性周期、帝王切開及び剖検データ並びに生殖能力に基づいて行った。TK 評価のために、GD 6 及び LD 14 に血液を、LD 14 に乳汁を採取した。

血液サンプルは、GD 6 及び LD 14 の 1 及び 3 回目投与後約 30 分に採取した。乳汁は、1 群当たり主試験群の 6 例から、LD 14 の 1 回目投与後約 30 分に採取した。対照群の血漿及び乳汁中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体はいずれも定量限界未満であった。投与群の GD 6 及び LD 14 の投与後 0.5 時間のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の血漿中濃度は投与量に応じて増加した。3-N-アセチル体の濃度はアミファンプリジンより高く、アミファンプリジンの大部分が 3-N-アセチル体に変換されたことが示された。GD 6 の 1 回目投与後のアミファンプリジンの平均濃度は、3.9、12.0 及び 39.6 mg/kg/日群でそれぞれ 12.4、39.4 及び 412 ng/mL であり、3-N-アセチル体濃度はそれぞれ 312、672 及び 1560 ng/mL であった。GD 6 及び LD 14 のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の血漿中濃度は、いずれも 1 回目投与に比べて 3 回目投与後の方が 1.27～2.85 倍高く、アミファンプリジン及び 3-

N-アセチル体の双方への曝露が 1 日以内に経時的に増加したことが示された。しかし、アミファンプリジンと 3-N-アセチル体の GD 6 の血漿レベルは LD 14 と同程度であり、いずれも反復投与しても血液中に蓄積しないことが示された。乳汁中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度は定量可能で、投与量の増加とともに増加した。3.9、12.0 及び 39.6 mg/kg/日群の LD 14 の乳汁中のアミファンプリジンの平均濃度は、それぞれ 9.46、36.5 及び 298 ng/mL であり、3-N-アセチル体はそれぞれ 264、589 及び 2438 ng/mL であった。これらの結果から、アミファンプリジン群の妊娠・授乳中の母動物及びその出生児は、いずれも投与期間を通じてアミファンプリジンと 3-N-アセチル体に曝露されたと考えられた。

本試験期間中にアミファンプリジンに関連した死亡はなかったが、すべての投与群で計画外の剖検があった。39.6 mg/kg/日群では、同腹児の全死亡のため LD 0 に安楽死させた動物が 2 例、LD 0 に瀕死状態のため安楽死させた動物が 1 例認められた。12.0 mg/kg/日群の 2 例と対照群の 1 例は、同腹児の全死亡のため LD 0 に安楽死させた。3.9 mg/kg/日群の 1 例は、分娩延長が認められたため LD 0 に安楽死させた。これらは対照群及び投与群に低頻度に発生しており、アミファンプリジンに関連したものとは判断しなかった。12.0 mg/kg/日群の 1 例は、生存した同腹児がいなかったため、GD 26 に安楽死させた。

F_0 母動物では、12.0 及び 39.6 mg/kg/日群でアミファンプリジンに関連した一般状態の変化が認められ、これらの変化は常同行動及び神経学的関連所見であった。39.6 mg/kg/日群では、GD 9 から、過度の咀嚼、身づくろい、なめずり、攣縮、斜視及び強直性痙攣が認められた。12.0 mg/kg/日群では過度の身づくろい、引っ掻き行動、活動性低下及び斜視が認められた。39.6 mg/kg/日群では、LD 7～14 から摂餌量の減少が認められたが、体重への影響がなかったことから、有害な変化とは判断しなかった。死産児を有する母動物には用量存性の影響が認められ、死産児を有する母動物の割合は対照群、3.9、12.0 及び 39.6 mg/kg/日群でそれぞれ 4.0、8.0、16.7 及び 20%であった。死産児の母動物の割合は、12.0 及び 39.6 mg/kg/日群で背景対照の平均値を上回っていた。また、それらの群の死産児数の平均値は対照群よりそれぞれ 269%及び 75%高かった。

F_1 動物については、LD 21 の雄の体重が 39.6 mg/kg/日群でわずかではあるが有意に減少したが、有害な変化ではなかった。神経学的指標に対するアミファンプリジン関連の影響は認められなかった。更に、受胎能、交配及び胚・胎児発生に対するアミファンプリジン関連の影響もなかった。

結論として、妊娠雌は GD 6 から分娩を経て LD 20 までアミファンプリジンを 1 日 3 回曝露した。F_0 雌から血液及び乳汁を LD 14 に採取し、定量した。F_1 児にはアミファンプリジンを直接投与せず、妊娠期間中は子宮内曝露で、授乳期間中は母乳を介してアミファンプリジンを曝露した。F_0 世代におけるアミファンプリジン関連の影響は、39.6 mg/kg/日群の一般状態変化と常同行動であった。アミファンプリジンに関連すると考えられる出生前及び出生後の毒性は、12.0 及び 39.6 mg/kg/日群での死産児を出産した母動物の割合の増加であった。中及び高用量群の死産児を有する母動物の割合は、背景対照値と比較して増加し、それらの群では平均死産児数の増加も認められた。3.9 mg/kg/日群の死産児を出産した母動物の

割合は、背景対照値の範囲内であった。したがって、一般状態観察に基づく母体毒性に対す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 12.0 mg/kg/日であり、妊娠母体に GD 6 から LD 20 まで 1 日 3 回経口投与したときの死産児数の増加に基づく出生前及び出生後毒性に対する NOAEL はアミファンプリジン遊離塩基として 3.9 mg/kg/日であった。

2.6.6.7　局所刺激性試験

製剤の剤形は経口投与用の錠剤である。非臨床安全性試験では、アミファンプリジンリン酸塩を 1% CMC 又は水を媒体として強制経口投与した。したがって、アミファンプリジンリン酸塩の局所刺激性は反復投与毒性試験で評価した。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　依存性

2.6.6.8.1.1　アミファンプリジンのラットにおけ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））

本試験の目的は、治療用量又はそれ以上の用量のアミファンプリジンリン酸塩が、トレーニング用量の塩酸コカイン（コカイン）と同様の相互受容効果を有するか否か薬物弁別法を用いて確認することであった。アミファンプリジンリン酸塩の薬理活性部分はアミファンプリジン遊離塩基であるため、以下の文中では、特に断りのない限り、アミファンプリジン遊離塩基（アミファンプリジン）の用量を記載した。

オペラント学習によりコカイン 10 mg/kg と生理食塩液の腹腔内投与の薬物弁別が成立した 12 例の雄 Sprague-Dawley ラットを用いた。

本試験では、餌強化スケジュールによるラットのレバー押し学習を最初に実施した。次に、コカインと生理食塩液の弁別訓練を行った。更に、コカインの複数用量及び生理食塩液を交互に投与し、コカインに対する般化を確認した。最後に、コカインに対する般化が確認された動物を用い、アミファンプリジンの 0（生理食塩液；媒体）、0.25、0.75 及び 2.5 mg/kg の般化について試験した。アミファンプリジンの投与量は、過去に実施した薬物動態試験（試験番号 [redacted]4932（4.2.2.2.04））に基づき、予想される臨床上の C_{max}（後述）をカバーし、かつ、毒性試験においてみられたアミファンプリジンによる行動障害を引き起こさない用量とした。

被験物質の般化試験終了後、アミファンプリジンの薬物動態について、投与後 5、30、45 及び 120 分並びに投与後 6 時間に血液を採取した。更に、般化試験セッション終了から約 50 分後に、血液を採取した。

弁別訓練において、コカイン 10 mg/kg の投与では、100%の動物で正反応のコカインレバー押しがみられた。全セッションにおいて、12 例中 10 例が 99.5%以上の確率で正反応のコカインレバー押しを示した。12 例中 2 例はコカインによる弁別を維持できなかったため（正反応のコカインレバー押し率はそれぞれ 12.67 及び 51.95%）、試験から除外した。更に、コ

カインの用量を弁別できなかった 1 例を試験中に除外したため、9 例が訓練を完了した。コカイン 3 mg/kg の投与では、最初の強化及びセッション全体でそれぞれ 82.2%及び 41.66%（群平均）が正反応のコカインレバー押しを示したことから、部分的般化が確認された。コカイン 1 mg/kg の投与では、正反応のコカインレバー押しの群平均値は、最初の強化までは 9.09%、セッション全体では 0.33%であった。

生理食塩液又はアミファンプリジンの 0.25、0.75 及び 2.5 mg/kg を腹腔内投与後、ほとんどのラットは例外なく正反応の生理食塩液レバーを選択したことから、試験した用量のアミファンプリジンは、コカイン 10 mg/kg の弁別刺激効果を有さないことを示した。9 例中 1 例のみがアミファンプリジン 2.5 mg/kg で部分的般化を示した。

アミファンプリジンの 0.25、0.75 及び 2.5 mg/kg を腹腔内投与した動物の C_{max} 値は、それぞれ平均 22.2、138 及び 291 ng/mL であり、アセチル化が遅いヒト（Slow acetylator）に 20 mg を単回投与した時の C_{max}（56.7 ng/mL）のそれぞれ 0.4、2.4、5.1 倍に相当した。

結論として、予想されるヒト臨床通常用量である 20 mg を単回投与した時の曝露量の 5.1 倍に相当する 2.5 mg/kg までの用量のアミファンプリジンは、コカイン 10 mg/kg による薬物弁別に対して般化しないことを示した。

2.6.6.8.1.2　アミファンプリジンのラットにおける薬物自己投与法による依存性試験（試験番号 [redacted]5336（4.2.3.7.4.02））

本試験の目的は、アミファンプリジンが、コカインを自己投与するようにあらかじめ訓練された雄 Sprague-Dawley ラットに対し、コカインと同等レベルの静脈内自己投与を維持するか否かを確認することであった。

大腿静脈にカテーテルをあらかじめ埋め込んだ動物に、コカイン（塩換算で約 0.93 mg/kg/infusion）を固定比率（Fixed ratio：FR）強化スケジュールで自己投与するよう訓練した。訓練中、FR10 まで徐々に増加させ、FR10 ではレバー押し 10 回に対して 1 回のコカイン注入を受けられるように設定した。動物のコカイン自己投与が安定し、一貫した反応が得られた後、以下の投与群と置き換えて代替試験を実施した。

第 1 群：陰性対照: 被験物質媒体（生理食塩液; 100 µL/infusion）
第 2 群：アミファンプリジンリン酸塩、約 0.025 mg/kg/infusion（投与濃度 0.075 mg/mL）
第 3 群：アミファンプリジンリン酸塩、約 0.075 mg/kg/infusion（投与濃度 0.225 mg/mL）
第 4 群：アミファンプリジンリン酸塩、約 0.25 mg/kg/infusion（投与濃度 0.75 mg/mL）
第 5 群（陽性対照）：コカイン塩酸塩、約 0.93 mg/kg/infusion（投与濃度 2.8 mg/mL）

第 2～4 群において、アミファンプリジンリン酸塩の 0.075、0.225 及び 0.75 mg/mL は、フリー体のアミファンプリジンに換算すると 0.039、0.118 及び 0.39 mg/mL であった。使用用量は、ラットの薬物動態試験でアミファンプリジンリン酸塩 0.8 mg/kg を静脈内投与した場合の C_{max} が臨床通常用量である 20 mg の C_{max} を上回る約 119 ng/mL であったことに基づいている（試験番号 BMN125-10-036（4.2.2.2.03））。更に、ラット単回静脈内投与試験（試験番号 [redacted]266/006（4.2.3.1.05））の結果より、致死及び CNS への有害所見を回避するため、総

投与回数は 25 回／セッションとした。アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の全身曝露量は、代替試験セッション開始から約 125 分後に全血を採取して測定した。

試験の結果、コカインの自己投与行動を示すラットにおいて、媒体対照（第 1 群）及びアミファンプリジン（第 2、3 及び 4 群）は自己投与されなかった。一方、第 5 群（コカイン陽性対照）では安定した自己投与行動がみられた。

規制当局のガイダンス「FDA Guidance for Industry for the Assessment of Abuse Potential of Drugs (January, 2017)」では、臨床で予想される最高の C_{max} 曝露をカバーすることが推奨されているが、本試験におけるアミファンプリジンの曝露は、Slow acetylator に 20 mg を投与した際の C_{max}（56.7 ng/mL）を上回ると考えられ、さらに 30 mg 単回投与時の C_{max}（89.6 ng/mL）もカバーする。

結論として、試験用量のアミファンプリジンは、コカインの自己投与行動を示すラットに対して自己投与を誘発しなかった。

2.6.6.8.1.3　アミファンプリジンのラットにおける身体依存性試験（試験番号 [redacted]5401（4.2.3.7.4.03））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 28 日間投与した後、投与中止による退薬症状発現の有無を 14 日間の休薬期間中に確認することであった。

Sprague-Dawley ラット（雄 10 例/群）にアミファンプリジンリン酸塩の 7.5、24 及び 75 mg/kg/日（遊離塩基として 3.9、12.6 及び 39.5 mg/kg/日）を 28 日間経口投与し、その後 14 日間休薬した。また、1 群 10 例の雄ラットに媒体（滅菌注射用水、10 mL/kg/回、1 日 3 回）及び陽性対照物質であるクロルジアゼポキシド（CDP、20～200 mg/kg/日、1 日 2 回）を 28 日間投与した。薬物動態評価のため、1 群 6 例の雄ラットを用い、すべてのアミファンプリジンリン酸塩投与群の投与 1、14 及び 28 日目並びに休薬期間となる投与 30、31、32、35、39 及び 42 日目の投与後又は投与後に該当する 0.25、0.5、1、2、6 及び 24 時間に採血した。依存性及び退薬症状の有無を確認するため、生理学的パラメータである体重、摂餌量及び体温の測定（毎日）、並びに自発運動量測定及び神経行動学的観察（投与 1、14、28 日目並びに休薬期間となる投与 29、30、31、32、35、39 及び 42 日目）を実施した。試験に用いるアミファンプリジンリン酸塩の用量は、Irwin の変法の試験結果に基づいて設定した。この試験では、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 40 mg/kg まで経口投与したが、試験したいずれのパラメータにも、投与に関連した CNS への有意な影響は認められなかった（試験番号 20070139PGR（4.2.1.3.04））。

すべてのアミファンプリジンリン酸塩群の体重、摂餌量及び体温は、投与を中止しても媒体対照群と同様な推移を示した。一方、CDP 群では、体重及び摂餌量の有意な減少並びに体温の急激な上昇がみられた。

自発運動量測定及び神経行動学的観察において、アミファンプリジンリン酸塩群の休薬期間中の総移動距離、立ち上がり時間、垂直方向の活動時間は徐々に段階的増加を示し、24 mg/kg 群では 35 日目から、75 mg/kg 群では 32 日目から、それぞれ 28 日目と比較して有

意に高い値を示した。また、24 mg/kg 群では、30 及び 35 日目から 42 日目にかけて、測定装置辺縁部での滞在時間が有意に減少した。投与中止により、75 mg/kg 群で立毛（29～42 日目）及び排便量減少（30 日目）、24 mg/kg 群で掻傷の増加（32 日目）及び立毛（35 日目）がみられた。これらの症状は、典型的な退薬症状パターンと一致しなかったことから、退薬症状の発現とは無関係と考えられた。CDP 群では、不安レベルの上昇を示唆する測定装置辺縁部での滞在時間が有意に増加し、退薬症状の発現と解釈できる立ち上がり、後弯、泣鳴及び立毛が有意に増加した。

薬物動態評価の結果、雄ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回（1 日目）及び反復（14 及び 28 日目）経口投与したとき、7.5 mg/kg 群では投与後 2.0 時間まで、24 mg/kg 群では投与後 6.0 時間まで、75 mg/kg 群では投与後 6.0～24 時間まで定量可能であった。

アミファンプリジンの一次代謝物である 3-N-アセチル体は、すべてのアミファンプリジンリン酸塩群の全例で投与後 24 時間まで定量可能であり、T_{max} は 7.5 及び 24 mg/kg 群で 1 時間以内、75 mg/kg 群で 2.0 時間であった。休薬中の投与 41 日目に測定したアミファンプリジンの血漿中濃度は BLQ であったが、薬理学的に不活性な代謝物である 3-N-アセチル体は血漿中で定量可能であった。

結論として、75 mg/kg/日までの用量のアミファンプリジンリン酸塩は、投与を突然中止しても、退薬症状の発現に関連する生理学的、運動学的及び神経行動学的パラメータの変化を誘発しなかった。なお、アミファンプリジンリン酸塩 75 mg/kg 群の投与 28 日目の C_{max}（250 ng/mL）は Slow acetylator に 20 mg を単回投与時の C_{max}（56.7 ng/mL）の約 4.4 倍であった。

2.6.6.8.2　代謝物に関する試験

2.6.6.8.2.1　アミファンプリジンの 3-N-アセチル体の安全性プロファイリングアッセイ（試験番号 100014186（4.2.1.2.03））

本試験の目的は、*in vitro* アッセイのパネルを用い、3-N-アセチル体の毒性、酵素阻害、及びオフターゲット作用を評価することであった。

アミファンプリジンの 3-N-アセチル体（以下 3-N-アセチル体）を 38 種類の異なる受容体又はチャンネルを有する細胞系とインキュベートした。各 *in vitro* アッセイは繰り返し 2 回実施し、3-N-アセチル体の 10 µM を標的受容体を有する細胞とインキュベートした。アッセイの結果は、特異的結合又は活性のパーセント阻害又は刺激として示し、50%以上の阻害又は刺激を有意な反応と定義した。3-N-アセチル体の 10 µM は、評価した 38 個の受容体／チャネルを有意に阻害及び刺激しなかった。3-N-アセチル体はこのアッセイで有意な変化を示さなかったが、3-N-アセチル体のエンドセリン受容体 A 型（ET_A）及び Ca^{2+}チャネルの抑制はそれぞれ 40%及び 24%、A_{2A} 受容体に対する刺激は 24%であった。

3-N-アセチル体の 10 µM は P-糖タンパク質（P-gp）を阻害しなかった。3-N-アセチル体の 10 µM をプールしたヒト肝ミクロソームとインキュベートしたところ、チトクローム P450（CYP）: CYP1A、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A に対する

阻害能は認められなかった。

3-N-アセチル体のヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）K^+チャネルに対する 50%阻害濃度（IC_{50}）は 39 µM であり、阻害活性は低かった。

2.6.6.8.3　不純物に関する試験

ピリジンの一般的なニトロ化前駆体は不純物として報告されている。原薬中に確認された主な不純物（3.2.S.3.2 項参照）は、　*不純物D　、　*不純物E　、　*不純物F　、及び　*不純物C　である。

*不純物F　は既知の変異原性物質ではないが、原薬の構造とは関連しない警告構造を有し、遺伝毒性のある化合物である可能性があるため DEREK による評価を実施せず、クラス 3 に分類した。　*不純物F　を除く不純物について、DEREK による *in silico* 評価を実施した。　*不純物D　及び　*不純物E　（試験番号 EUA001[redacted]（4.2.3.7.6.02））に、遺伝毒性、変異原性及び発がん性に関するアラートはみられなかった。*不純物C には変異原性及び発がん性に関するアラートが表示された（試験番号 OPI0002[redacted]（4.2.3.7.6.03）及び EUA001[redacted]（4.2.3.7.6.02））。

更に、*不純物C については、変異原性を調べるために細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

2.6.6.8.3.1　*不純物C　の細菌を用いた復帰突然変異試験（試験番号 [redacted]-080408（4.2.3.7.6.01））

本試験の目的は、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA102、TA1535 及び TA1537 を用い、*不純物C の遺伝子突然変異誘発能を代謝活性化系の存在下及び非存在下の条件で評価することであった。

本試験は、代謝活性化系（Aroclor 1254 を投与したラットの肝 S9 分画を使用）の存在下及び非存在下の条件で 2 回繰り返し実施した。

*不純物C の用量として、1 回目の試験では、代謝活性化の TA1535、TA1537 及び TA98 は 5000～50 µg/plate、TA100 及び TA102 は 3000～50 µg/plate、非代謝活性化の TA1535 は 5000~50 µg/plate、TA98 は 3000～50 µg/plate、TA1537、TA100 及び TA102 は 1500～15 µg/plate を設定した。2 回目の試験では、代謝活性化の TA1535 は 3000～50 µg/plate、TA1537 及び TA98 は 5000～50 µg/plate、TA100 及び TA102 は 1500～15 µg/plate、非代謝活性化の TA1535 は 5000~50 µg/plate、TA98 は 3000～50 µg/plate、TA1537 及び TA100 は 1500～15 µg/plate、TA102 は 300～5 µg/plate を設定した。菌株ごとに代謝活性化の有無を考慮した陽性対照及び媒体対照群を設け、更に、無菌試験を実施した。1 回目の試験では、すべてのプレートは 37℃で 48 時間インキュベートした。2 回目の試験の代謝活性化では、60 分間のプレインキュベーション後 37℃で 48 時間インキュベートした。いずれの試験においても、インキュベ

ート後、各プレート上の復帰変異コロニー数を計測した。*不純物C による復帰変異コロニーの誘発を調べるため、*不純物C 群と媒体対照群の復帰変異コロニー数の比を求めた。*不純物C 群の復帰変異コロニー数が媒体対照群と比較して、TA1535 及び TA1537 については 3 用量で少なくとも 3 倍、TA98、TA100 及び TA102 については 3 用量以上で少なくとも 2 倍増加した場合、それら結果は生物学的に有意であると判断した。

すべての *不純物C 群の復帰変異コロニー数は、いずれの菌株においても、プレインキュベーション及び代謝活性化の有無にかかわらず、有意な増加を示さなかった。

結論として、最高 5000 μg/plate までの *不純物C は、本試験条件下で変異原性を示さなかった。

2.6.6.9　考察及び結論

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^+チャネルが遮断すると、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て神経筋伝達を障害することが示唆されている [2)]。アミファンプリジンの K^+チャネルに対する作用は、CNS と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} 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し、アミファンプリジンリン酸塩の遺伝毒性及び生殖発生毒性試験とともに GLP 反復投与毒性試験が含まれる。

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ラット及びイヌを選択した。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クリアランスの動物種間比較試験において、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への曝露が高いヒト集団に対応し、ラットはアセチル化が速いヒト集団に対応している。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を用いた最長 6 ヵ月間及びイヌを用いた最長 9 ヵ月間の GLP に準拠した反復投与毒性試験を実施した。

単回投与毒性試験は、アミファンプリジンリン酸塩として、予定臨床投与経路である経口（100 mg/kg まで）及び静脈内（50 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リン酸塩 100 mg/kg の単回経口投与後並びにアミファンプリジンリン酸塩 25 及び 50 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リン酸塩 50 mg/kg 以上の単回経口投与及び 25 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リン酸塩 25 及び 50 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 CNS 及び ANS 所見が認められた。マウス及びラットにおける CNS 及び ANS 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静脈内投与したときの概略の致死量は、経口投与より高い C_{max} を反映し、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酸性条件下でプロトン化された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塩型の間には、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 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 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 TK 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（最大 25 mg/kg/回）とした。CNS（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 ANS（流涎及び知覚過敏など）の所見は、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リン酸塩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に起因する変化と考えられた。ラットを用いた 21 日間反復経口投与毒性試験を計画して開始したが、中及び高用量群の一般状態に重篤な毒性変化が認められたため、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、ラットに最大 75 mg/kg/日のアミファンプリジンリン酸塩を 1 日 3 回経口投与した。用量に関連した一般状態変化として、24 及び 75 mg/kg/日群では、流涎、過度の身づくろい及び活動亢進が認められた。投与開始日以降、アミファンプリジンリン酸塩 75 mg/kg/日群で一般状態変化が散見されたが、投与期間終了後に消失した。75 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生化学的検査及び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 日間経口投与した結果、NOAEL は 24 mg/kg/日と判断した。

MTD／14 日間反復投与試験では、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それぞれ雄には 12.6 mg/kg/日、雌には 6.3 mg/kg/日、雌雄に 4.0 mg/kg/日までの用量をイヌに 1 日 3 回経口投与した。雄は 6.3 mg/kg/日、雌は 4.7 mg/kg/日の用量で、重度の CNS 及び ANS の一般状態変化が認められた。12.6 mg/kg/日（4.2 mg/kg/回）の 2 回目投与後に痙攣が持続してみられたため、雄 1 例を安楽死させた。14 日間の反復投与において、4.0 mg/kg/日群で、初回投与後に重度の CNS 及び ANS の一般状態並びに一般毒性症状（嘔吐、摂餌量減少及び行動抑制等）が認められた。

イヌ 28 日間反復投与毒性試験では、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/日までの用量で経口投与した。4.0 mg/kg/日群の雄 2 例の投与を投与 1 日目に中止した。これは痙攣が原因である可能性が最も高かった。4.0 mg/kg/日群の CNS 及び ANS 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/日群では、痙攣は伴わなかったが、程度と頻度の低下を伴う一般状態の変化は同様であった。試験期間を通じて数例の動物で知覚過敏、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間の投与後におおむね改善又は完全に消失した。28 日間の投与期間終了時に、対照群と比較して、投与群の動物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、心伝導及び心調律・波形）に変化は認められなかった。3.0 及び 4.0 mg/kg/日群の雌では、4 週目の検査で水晶体後嚢及び硝子体内に白色フィラメントが認められ、投与との関連性が示唆された。最も重要な所見は、喉頭における用量依存性の筋変性であり、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。アミファンプリジンリン酸塩をイヌに 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/日と判断した。

14 日間の休薬群を設けた 2 回目のイヌ 28 日間経口投与試験では、高用量の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/日に減量した。CNS 及び ANS に関連した一般状態変化は、用量依存的であり、先に実施した 28 日間投与試験で観察されたものと同様であった。すなわち、強直性痙攣、振戦、活動低下、行動抑制、呼吸困難、不全麻痺及び／又は後肢硬直並びに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ではアミファンプリジンリン酸塩に関連した変化は認められなかった。投与群（主試験群及び休薬群）及び対照群ともに筋変性の散在所見が認められ、投与との関係は不明確であった。この試験では NOEAL 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。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 NOAEL は遊離塩基として 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、1 日 3 回 9 ヵ月間（39 週間）、カプセルを用いて経口投与した後、4 週間休薬した。アミファンプリジンへ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が、これらは中及び高用量群（1.0 及び 2.0 mg/kg/日群）で最も多くみられ、時間経過による明確な変化は認められなかった。2.0 mg/kg/日群の雌 1 例は、2 日目に痙攣様の振戦が認められた。1.0 mg/kg/日群の雄 1 例では、111 日目に明らかな痙攣が 1 回認められた。2.0 mg/kg/日群の雄 1 例では 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、213 日目に試験から除外した。試験期間中に死亡及び瀕死はなかった。体重、体重変化、摂餌量、眼科学的検査、心電図評価及び臨床検査において、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。1.0 及び 2.0 mg/kg/日群の雌では、対照群と比較して唾液腺重量が有意に増加したが、対応する病理組織学的所見は認められなかった。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/日と判断した。アミファンプリジン遊離塩基 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）投与時の C_{max} は約 75～80 ng/mL であり、$AUC_{0\text{-}24h}$ 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 GLP 遺伝毒性試験で評価した結果、変異原性を示さなかった。

26 週間 Tg マウス及び 104 週間ラットがん原性試験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、マウス 7 及び 28 日間反復混餌投与毒性試験及びラット 3 週間混餌投与嗜好性試験を実施した。Tg 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を混餌投与しても、がん原性は認められなかった。ラットを用いた試験では、アミファンプリジン遊離塩基量として 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、投与量に関連した神経鞘腫の増加が様々な器官で認められた。アミファンプリジン遊離塩基 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 例中 4、13 及び 9 例であった。子宮内膜腫瘍の多く（22/26 例）は 100 週目以降に認めらた。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。これらの後期発症は、腫瘍がエピジェネティック（非遺伝毒性）な機構で生じ、子宮内膜はエストロゲン活性に応答することから、下垂体／内分泌軸を介した変化にエピジェネティックが関与した可能性が高い。NOAEL

は、雄でアミファンプリジン遊離塩基 8 mg/kg/日、雌では 8 mg/kg/日未満と判断した。アミファンプリジン遊離塩基 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。

アミファンプリジンリン酸塩を用いた生殖発生毒性試験を実施した。これらの GLP 試験には ICH Stage A～D（Segment I／Segment II）受胎能試験として、胚・胎児発生に関する評価項目を設定したラットを用いた試験を実施した。ICH Stage C～D（Segment II）のウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、ラットを用いた ICH Stage C～F（Segment III）出生前及び出生後の発生に関する試験が含まれるラットを用いた受胎能／胚・胎児試験では、アミファンプリジン遊離塩基として 39.6 mg/kg/日の投与により、雄で CNS に関連した一般状態の変化、雌では妊娠期間中の体重増加抑制が認められた。雌雄の生殖能又は受胎能に対する影響は認められなかった。生殖能、胎児の生存、発育及び形態への影響は、最高用量であるアミファンプリジン遊離塩基 39.6 mg/kg/日まで認められなかった。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。ウサギを用いた胚・胎児発生試験では、CNS に関連する有害な一般状態変化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）の経口投与により死亡／瀕死が認められた。いずれの胎児パラメータ（生存、成長及び外表、内臓並びに骨格の奇形を含む）にも影響は認められず、アミファンプリジンには催奇形性がなく、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。ラットを用いた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 及び 39.6 mg/kg/日で CNS 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みられた。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（学習及び記憶、運動活動及び音響驚愕）に対するその他の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、薬物自己投与法に依る依存性試験及び身体依存性試験で評価した。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 TK 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曝露量の変化に起因する一般状態の重症化の 2 つの所見が認められている。アミファンプリジンリン酸塩の単回及び反復投与後の CNS 及び ANS の一般状態変化並びに筋組織の病理組織学的変化といった主要所見は、親薬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 又は神経接合部の他の疾患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 に基づくヒトの推定安全域を表 2.6.6.9-1 に示す。

表 2.6.6.9-1　　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 Development	Rat	As per ICH	>39.6	>238	6.4	4.9
	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 is 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得られた C_{max} 及び臨床試験 FIR-001（5.3.3.1.01）のヒト C_{max} 並

びに C_{max} に基づくヒトの推定安全域を表 2.6.6.9-2 に示す。

表 2.6.6.9-2　　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)[3].
†† Highest clinical mean C_{max} for the slow acetylator phenotype from BioMarin clinical trial FIR-001(5.3.3.1.01)[3].

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 NOEAL に基づき、患者に対して十分な安全係数が存在す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広いとは言えないが、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（CNS 関連の一般状態変化など）が主な特徴であり、明らかな毒性変化はないことから、患者に対する全体的なリスクはごくわずかであると考えられる。

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 及び神経筋接合部の他の疾患患者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。

2.6.6.10 図表

関連する各項目の本文中に記載した。

2.6.6.11 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) 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】
3) 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】

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

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.7 毒性試験概要表

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.7 毒性試験概要表 4
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 5
2.6.7.2 トキシコキネティクス 11
2.6.7.3 毒性試験：被験物質（ロット毎）一覧 21
2.6.7.4 単回投与毒性試験 23
2.6.7.5 反復投与毒性試験 28
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験 33
2.6.7.7 *In vitro* 遺伝毒性試験 49
2.6.7.8 *In vivo* 遺伝毒性試験 54
2.6.7.9 がん原性試験（短期試験） 56
2.6.7.10 がん原性試験（長期試験） 59
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 64
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験 65
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生への影響に関する試験 71
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後発育への影響に関する試験 75
2.6.7.15 生殖発生毒性試験：出生児（幼若動物）投与／評価試験 79
2.6.7.16 局所刺激性試験 79
2.6.7.17 その他の毒性試験 80

表の目次

表 2.6.7.1-1 一覧表 5
表 2.6.7.2-1 一覧表 11
表 2.6.7.2-2 試験データの一覧表 13
表 2.6.7.3-1 使用ロット 21
表 2.6.7.4-1 単回投与毒性試験 23
表 2.6.7.5-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 28
表 2.6.7.6-1 26 週間反復投与毒性試験 33
表 2.6.7.6-2 9 ヵ月間反復投与毒性試験 40
表 2.6.7.7-1 *In Vitro* 遺伝毒性試験 49
表 2.6.7.7-2 *In Vitro* 遺伝毒性試験 51
表 2.6.7.7-3 *In Vitro* 遺伝毒性試験 52
表 2.6.7.8-1 *In vivo* 遺伝毒性試験 54
表 2.6.7.8-2 *In vivo* 遺伝毒性試験 55
表 2.6.7.9-1 短期予備試験 56
表 2.6.7.9-2 忍容性試験 57

表 2.6.7.9-3　短期試験 58
表 2.6.7.10-1　26 週間反復投与がん原性試験 59
表 2.6.7.10-2　104 週間反復投与がん原性試験 61
表 2.6.7.11-1　重要な試験以外の試験 64
表 2.6.7.12-1　受胎能及び初期胚発生に関する試験 65
表 2.6.7.13-1　胚・胎児発生への影響に関する試験 71
表 2.6.7.14-1　出生前及び出生後発育への影響に関する試験 75
表 2.6.7.17-1　その他の毒性試験 80

2.6.7　毒性試験概要表

アミファプリジンリン酸塩を用いて実施した毒性試験の概要表を表 2.6.7.1-1 に示す。特定の毒性データ（入手可能な場合）を表 2.6.7.2-1 から表 2.6.7.17-1 に示す。

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

表 2.6.7.1-1　一覧表

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Single-dose toxicity	Mouse / Ico:OF1	Oral	Single-dose	0, 2.5, 10, 25, 50, and 100 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 13.2, 26.3, and 52.6 mg free base/kg)	Yes	[redacted], France	[redacted] 266/005 (4.2.3.1.01)
Single-dose toxicity	Mouse / Ico:OF1	i.v.	Single-dose	0, 2.5, 10, 12.5, 25, and 50 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 6.6, 13.2, and 26.3 mg free base/kg)	Yes	[redacted], France	[redacted] 266/007 (4.2.3.1.02)
Single-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	Single-dose	0, 2.5, 10, 25, 50, and 100 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 13.2, 26.3, and 52.6 mg free base/kg)	Yes	[redacted], France	[redacted] 266/004 (4.2.3.1.03)
Single-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	i.v.	Single-dose	0, 2.5, 10, 12.5, 25, and 50 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 6.6, 13.2, and 26.3 mg free base/kg)	Yes	[redacted], France	[redacted] 266/006 (4.2.3.1.05)
Escalating single-dose / 7-day toxicity	Dog / Beagle	Oral	Single-dose / 7 days	1.9, 3.8, and 5.7 mg/kg, and 6.25 mg/kg/day (1.0, 2.0, and 3.0 mg free base/kg, and 3.3 mg free base/kg/day)	No	[redacted], [redacted], USA	S12300 (4.2.3.1.06)
Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	7 days	0, 1, 10, 30, and 60 mg/kg/day (0, 0.53, 5.3, 15.8, and 31.6 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], France	[redacted] 266/011 (4.2.3.2.01)

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	21 days	0, 39.5, 78.9 and 157.9 mg free base/kg/day	No	[redacted], [redacted], [redacted], USA	S12741 (4.2.3.2.02)
Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	4 weeks	0, 7.5, 24, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], [redacted], France	[redacted] 266/013 (4.2.3.2.03)
Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	4 weeks	0, 7.5, 24, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], [redacted], France	[redacted] AA40848 (4.2.3.2.04)
Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	13 weeks	0, 7.5, 22.5, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 11.9, and 39.5 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN125-10-055 (4.2.3.2.05)
Repeat-dose toxicity (pivotal)	Rat / Sprague-Dawley	Oral	26 weeks	0, 3.9, 11.8, and 39.5 mg free base/kg/day	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], USA	S12033 (4.2.3.2.06)
Repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	14 days	0, 0.75, 1.5, 3, 6, 7.5, 9, 12, and 24 mg/kg/day (0, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 4.0, 4.7, 6.3, and 12.6 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], [redacted], France	[redacted] 266/010 (4.2.3.2.07)
Repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	4 weeks	0, 1.9, 5.7, and 7.5 mg/kg/day (0, 1.0, 3.0, and 4.0 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], [redacted], France	[redacted] 266/014 (4.2.3.2.08)
Repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	4 weeks	0, 1, 2.5, and 6.25 mg/kg/day (0, 0.5, 1.3, and 3.3 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], [redacted], France	[redacted] AA40847 (4.2.3.2.09)

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Repeat-dose toxicity (pivotal)	Dog / Beagle	Oral	9 months	0, 1.0, 1.9, and 3.8 mg/kg/day (0, 0.53, 1, and 2 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], USA	S12032 (4.2.3.2.10)
Genotoxicity (bacterial mutation)	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537	*In vitro*	NA	Up to 5,000 µg/plate	Yes	[redacted], France	[redacted] 010310 (4.2.3.3.1.01)
Genotoxicity (bacterial mutation)	*S. typhimurium* TA98 and TA1538	*In vitro*	NA	Up to 5,000 µg/plate	Yes	[redacted], France	[redacted] 010506 (4.2.3.3.1.02)
Genotoxicity (mammalian cell mutation)	Mouse lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$) cells	*In vitro*	NA	Up to 2,000 µg/mL	Yes	[redacted], France	[redacted] 010515 (4.2.3.3.1.03)
Genotoxicity (unscheduled DNA synthesis)	Rat / Fischer	Oral	Single-dose	0, 50, 80, 125, 200, and 320 mg/kg (0, 26.3, 42.1, 65.8, 105.3, and 168.4 mg free base/kg)	Yes	[redacted], France	[redacted] 020404 (4.2.3.3.2.01)
Genotoxicity (micronucleus)	Rat / Sprague-Dawley	Oral	3 days	0, 50, 80, 125, 200, and 320 mg/kg/day (0, 26.3, 42.1, 65.8, 105.3, and 168.4 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], France	[redacted] 010417 (4.2.3.3.2.02)
Carcinogenicity	Mouse / CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (Main) CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type (TK)	Oral	26 weeks	0, 15, 50, 150 ppm	Yes	[redacted], USA	2[redacted]9225 (4.2.3.4.1.01)

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Carcinogenicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	104 weeks	0, 15, 48, 152/105 (M), and 114/105 (F) mg/kg/day (0, 8, 25, 80/55 [M], and 60/55 [F] mg free base/kg/day)	Yes	[redacted], USA	8264515 (4.2.3.4.1.02)
Carcinogenicity (short-term preliminary study)	Mouse / CD-1 Mouse / CByB6F1 Hybrid (non-transgenic littermates)	Oral	7 days	0, 10, 20, and 40 mg free base/kg/day (M) 50, 100, and 200 ppm (M) 300 and 500 ppm	No	[redacted], USA	20[redacted]9237 (4.2.3.4.2.01)
Carcinogenicity (tolerance study)	Mouse / CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type	Oral	7 days 28 days	0, 1500, 3000, 4500, and 7500 ppm 0, 150, 500, and 1500 ppm	Yes	[redacted], USA	20[redacted]9230 (4.2.3.4.2.02)
Carcinogenicity (short-term dietary palatability)	Rat / Sprague-Dawley	Oral	3 weeks	36/55, 110/170, 360/550, and 550/975 ppm	No	[redacted], USA	BMN125-13-011 (4.2.3.4.2.03)
Fertility and embryo-fetal development	Rat / Sprague-Dawley	Oral	M: 4 weeks prior to mating, 2 weeks during the mating period, and 4 weeks after mating up to the day prior to necropsy F: 2 weeks prior to mating, 2 weeks during the mating period, and through GD 17	0, 3.9, 12.0, and 39.6 mg free base/kg/day	Yes	[redacted], USA	BMN125-13-012 (4.2.3.5.1.01)

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Embryo-fetal development range-finder	Rabbit / NZW	Oral	Up to 13 days	1.6, 4.74, 15.9, and 47.4 mg free base/kg/day	No	[redacted], USA	BMN125-13-013 (4.2.3.5.2.01)
Embryo-fetal development range-finder	Rabbit / NZW	Oral	GD 7 to 20	0, 4.74, 15.9, and 30 mg free base/kg/day	No	[redacted], USA	BMN125-13-014 (4.2.3.5.2.02)
Embryo-fetal development (pivotal)	Rabbit / NZW	Oral	GD 7 to 20	0, 4.74, 15.9, and 30 mg free base/kg/day	Yes	[redacted], USA	BMN125-13-015 (4.2.3.5.2.03)
Pre- and postnatal development	Rat / Sprague-Dawley	Oral	GD 6 through parturition and through LD 20	0, 3.9, 12.0 and 39.6 mg free base/kg/day	Yes	[redacted], USA	BMN125-13-025 (4.2.3.5.3.01)
Other: Dependence (drug discrimination)	Rat / Sprague-Dawley	i.p.	Single-session (cross-over design, with 4 administrations per animal)	0, 0.25, 0.75, and 2.5 mg free base/kg	Yes	[redacted], [redacted], Italy	[redacted]5604 (4.2.3.7.4.01)
Other: Dependence (self-administration)	Rat / Sprague-Dawley	i.v.	Single-session, with up to 15 administrations per animal	Up to 0.585 mg free base/animal; test dependent total dose	Yes	[redacted], [redacted], Italy	[redacted]5336 (4.2.3.7.4.02)
Other: Dependence (spontaneous withdrawal)	Rat / Sprague-Dawley	Oral	28 days	0, 7.5, 24, and 75 mg free base/kg/day	Yes	[redacted], [redacted], Italy	[redacted]5401 (4.2.3.7.4.03)
Other: Metabolites (safety screen)	Human Caco-2 cells, CHO-K1 hERG cells, human hepatocytes, human liver microsomes	*In vitro*	NA	10 µM (Caco-2 cells, hepatocytes, microsomes), and 0.01 to 100 µM (CHO-K1 hERG cells); N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide	No	[redacted], France	100014186 (4.2.1.2.03)

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Other: Impurities (bacterial mutation)	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537	*In vitro*	NA	Up to 5000 µg/plate; *不純物C	Yes	[redacted], France	[redacted]-080408 (4.2.3.7.6.01)
Other: Impurities (Derek)	Derek software	NA	NA	NA; *不純物D ; *不純物E ; *不純物C	No	[redacted], UK	EUA001[redacted] (4.2.3.7.6.02)
Other: Impurities (Derek)	Derek software	NA	NA	NA; *不純物C	No	[redacted], UK	OPI0002[redacted] (4.2.3.7.6.03)

Test Article: Amifampridine Free Base

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Study Reference (Location)
Single-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	Single-dose	0, 2.5, 10, 25, and, 50 mg free base/kg	Yes	[redacted], France	[redacted] 266/012 (4.2.3.1.04)

CHO = Chinese hamster ovary; F = females; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-á-go-go related gene; i.p. = intraperitoneal; i.v. = intravenous; LD = Lactation Day; M = males; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; TK = Toxicokinetics.

2.6.7.2　トキシコキネティクス

表 2.6.7.2-1　一覧表

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Doses	GLP	Study Number	Location
Escalating single-dose / 7-day toxicity	Dog / Beagle	Oral	1.9, 3.8, and 5.7 mg/kg, and 6.25 mg/kg/day (1.0, 2.0, and 3.0 mg free base/kg, and 3.3 mg free base/kg/day)	No	S12300	4.2.3.1.06
4-week repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 7.5, 24, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted] 266/013	4.2.3.2.03
4-week repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 7.5, 24, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted] AA40848	4.2.3.2.04
13-week repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 7.5, 22.5, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 11.9, and 39.5 mg free base/kg/day)	Yes	BMN125-10-055	4.2.3.2.05
26-week repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 3.9, 11.8, and 39.5 mg free base/kg/day	Yes	S12033	4.2.3.2.06
14-day repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	0, 0.75, 1.5, 3, 6, 7.5, 9, 12, and 24 mg/kg/day (0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.6, 6.3, 0, 4.7, and 4.0 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted] 266/010	4.2.3.2.07
4-week repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	0, 1.9, 5.7, and 7.5 mg/kg/day (0, 1.0, 3.0, and 4.0 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted] 266/014	4.2.3.2.08
4-week repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	0, 1, 2.5, and 6.25 mg/kg/day (0, 0.5, 1.3, and 3.3 mg free base/kg/day)	Yes	[redacted] AA40847	4.2.3.2.09
9-month repeat-dose toxicity	Dog / Beagle	Oral	0, 1.0, 1.9, and 3.8 mg/kg/day (0, 0.53, 1, and 2 mg free base/kg/day)	Yes	S12032	4.2.3.2.10
Carcinogenicity (26-week study)	Mouse / CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type	Oral	0, 15, 50, 150 ppm	Yes	20[redacted]9225	4.2.3.4.1.01
Carcinogenicity (104-week study)	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 15, 48, 152/105 (M), and 114/105 (F) mg/kg/day (0, 8, 25, 80/55 [M], and 60/55 [F] mg free base/kg/day)	Yes	8264515	4.2.3.4.1.02

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Doses	GLP	Study Number	Location
Carcinogenicity (7-day preliminary study)	Mouse / CD-1 and CByB6F1 Hybrid (non-transgenic littermates)	Oral	0, 10, 20, and 40 mg free base/kg/day (M) 50 (M), 100 (M), 200 (M), 300, and 500 ppm	No	20[redacted]9237	4.2.3.4.2.01
Carcinogenicity (7-day and 28-day tolerance study)	Mouse / CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type	Oral	7-day phase: 0, 1500, 3000, 4500, 7500 ppm 28-day phase: 0, 150, 500, 1500 ppm	Yes	20[redacted]9230	4.2.3.4.2.02
Carcinogenicity (3-week dietary palatability)	Rat / Sprague-Dawley	Oral	36/55, 110/170, 360/550, and 550/975 ppm	No	BMN125-13-011	4.2.3.4.2.03
Fertility and embryofetal development	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 3.9, 12.0, and 39.6 mg free base/kg/day	Yes	BMN125-13-012	4.2.3.5.1.01
Embryo-fetal development rangefinder	Rabbit / NZW	Oral	0, 4.74, 15.9, and 30 mg free base/kg/day	No	BMN125-13-014	4.2.3.5.2.02
Embryo-fetal development	Rabbit / NZW	Oral	0, 4.74, 15.9, and 30 mg free base/kg/day	Yes	BMN125-13-015	4.2.3.5.2.03
Pre- and post-natal development	Rat / Sprague-Dawley	Oral	0, 3.9, 12.0, and 39.6 mg free base/kg/day	Yes	BMN125-13-025	4.2.3.5.3.01

GLP = Good Laboratory Practice; NZW = New Zealand White.

表 2.6.7.2-2　試験データの一覧表

Test Article: Amifampridine Phosphate

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
1.0 mg/kg/day (0.53 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	645 (Day 1**); 693 (Day 28**); 688 (Day 273**)	634 (Day 1**); 663 (Day 28**); 653 (Day 273**)
1.9 mg/kg/day (1 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	1250 (Day 1**); 1280 (Day 28**); 1300 (Day 273**)	1170 (Day 1**); 1160 (Day 28**); 1220 (Day 273**)
1 mg/kg/day - 1st dose (0.5 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	-	-	-	136 (Day 0‖); 136 (Week 4‖)	143 (Day 0‖); 139 (Week 4‖)
1 mg/kg/day - 2nd dose (0.5 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	-	-	-	158 (Day 0‖); 154 (Week 4‖)	120 (Day 0‖); 156 (Week 4‖)
1 mg/kg/day - 3rd dose (0.5 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	-	-	-	186 (Day 0‖); 170 (Week 4‖)	151 (Day 0‖); 185 (Week 4‖)
1.9 mg/kg/day (1 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	409‡; 238 (Day 0§); 276 (Week 4§)	416‡; 240 (Day 0§); 186 (Week 4§)
3.8 mg/kg/day (2 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	2330 (Day 1**); 2260 (Day 28**); 2590 (Day 273**)	2380 (Day 1**); 2280 (Day 28**); 2310 (Day 273**)
2.5 mg/kg/day - 1st dose (1.3 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	-	-	-	391 (Day 0‖); 303 (Week 4‖)	421 (Day 0‖); 396 (Week 4‖)
2.5 mg/kg/day - 2nd dose (1.3 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	-	-	-	442 (Day 0‖); 480 (Week 4‖)	369 (Day 0‖); 399 (Week 4‖)
2.5 mg/kg/day - 3rd dose (1.3 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	-	-	-	473 (Day 0‖); 514 (Week 4‖)	389 (Day 0‖); 441 (Week 4‖)
3.9 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	18.3 (Day 1††); 37.0 (Day 182††)	19.0 (Day 1††); 33.6 (Day 182††)	-	-	-
3.9 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	13.2 (Day 1††); 22.8 (Day 182††)	21.1 (Day 1††); 38.6 (Day 182††)	-	-	-
3.9 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	8.70 (Day 1††); 10.4 (Day 182††)	12.5 (Day 1††); 18.9 (Day 182††)	-	-	-
4.74 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	-	-	81.3 (GD 7‡‡); 88.4 (GD19‡‡)	-	-

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
4.74 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	-	-	NA (GD 7[‡‡]); NA (GD19[‡‡])	-	-
4.74 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	-	-	NA (GD 7[‡‡]); NA (GD19[‡‡])	-	-
5.7 mg/kg/day (3 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	1200[‡]; 691 (Day 0[§]); 731 (Week 4[§])	1350[‡]; 670 (Day 0[§]); 599 (Week 4[§])
6.25 mg/kg/day - 1st dose (3.3 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	-	-	-	918 (Day 0[‖]); 833 (Week 4[‖])	912 (Day 0[‖]); 741 (Week 4[‖])
6.25 mg/kg/day - 2nd dose (3.3 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	-	-	-	1072 (Day 0[‖]); 997 (Week 4[‖])	1074 (Day 0[‖]); 922 (Week 4[‖])
6.25 mg/kg/day - 3rd dose (3.3 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	-	-	-	1047 (Day 0[‖]); 1094 (Week 4[‖])	956 (Day 0[‖]); 984 (Week 4[‖])
6.25 mg/kg/day (3.3 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	1330[‡]	1290[‡]
7.5 mg/kg/day - 1st dose (4.0 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	16.5 (Day 1[†]); 22.1 (Day 44[†]); 24.3 (Day 92[†])	21.1 (Day 1[†]); 34.6 (Day 44[†]); 30.4 (Day 92[†])	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 2nd dose (4.0 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	14.4 (Day 1[†]); 22.3 (Day 44[†]); 26.9 (Day 92[†])	15.3 (Day 1[†]); 27.7 (Day 44[†]); 34.9 (Day 92[†])	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 3rd dose (4.0 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	12.1 (Day 1[†]); 12.6 (Day 44[†]); 19.2 (Day 92[†])	15.5 (Day 1[†]); 25.9 (Day 44[†]); 28.8 (Day 92[†])	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 1st dose (4.0 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	ND (Day 0*); ND (Week 4*)	ND (Day 0*); 7.22 (Week 4*)	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 2nd dose (4.0 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	NA (Day 0*); NA (Week 4*)	NA (Day 0*); NA (Week 4*)	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 3rd dose (4.0 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	3.44 (Day 0*); 6.01 (Week 4*)	7.23 (Day 0*); 8.77 (Week 4*)	-	-	-
7.5 mg/kg/day (4.0 mg free base/kg/day)			-	-	-	982 (Day 0[§]); 997 (Week 4[§])	962 (Day 0[§]); 955 (Week 4[§])
11.8 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	50.2 (Day 1[††]); 108 (Day 182[††])	81.9 (Day 1[††]); 164 (Day 182[††])	-	-	-

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
11.8 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	45.9 (Day 1††); 105 (Day 182††)	80.5 (Day 1††); 152 (Day 182††)	-	-	-
11.8 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	34.8 (Day 1††); 66.4 (Day 182††)	56.1 (Day 1††); 154 (Day 182††)	-	-	-
15.9 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	-	-	414 (GD 7‡‡); 567 (GD19‡‡)	-	-
15.9 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	-	-	NA (GD 7‡‡); NA (GD19‡‡)	-	-
15.9 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	-	-	NA (GD 7‡‡); NA (GD19‡‡)	-	-
22.5 mg/kg/day - 1st dose (11.9 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	74.9 (Day 1†); 83.3 (Day 44†); 110 (Day 92†)	104 (Day 1†); 160 (Day 44†); 182 (Day 92†)	-	-	-
22.5 mg/kg/day - 2nd dose (11.9 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	65.3 (Day 1†); 119 (Day 44†); 111 (Day 92†)	73.7 (Day 1†); 128 (Day 44†); 184 (Day 92†)	-	-	-
22.5 mg/kg/day - 3rd dose (11.9 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	44.5 (Day 1†); 60.5 (Day 44†); 93.7 (Day 92†)	79.5 (Day 1†); 162 (Day 44†); 211 (Day 92†)	-	-	-
24 mg/kg/day - 1st dose (12.6 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	NA (Day 0*); 41.6 (Week 4*)	13.9 (Day 0*); 77.0 (Week 4*)	-	-	-
24 mg/kg/day - 2nd dose (12.6 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	NA (Day 0*); NA (Week 4*)	NA (Day 0*); NA (Week 4*)	-	-	-
24 mg/kg/day - 3rd dose (12.6 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	20.3 (Day 0*); 34.9 (Week 4*)	51.1 (Day 0*); 55.2 (Week 4*)	-	-	-
75 mg/kg/day - 1st dose (39.5 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	530 (Day 1†); 644 (Day 44†); 826 (Day 92†)	543 (Day 1†); 1154 (Day 44†); 1346 (Day 92†)	-	-	-
75 mg/kg/day - 2nd dose (39.5 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	458 (Day 1†); 874 (Day 44†); 1423 (Day 92†)	443 (Day 1†); 1381 (Day 44†); 1451 (Day 92†)	-	-	-
75 mg/kg/day - 3rd dose (39.5 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	222 (Day 1†); 644 (Day 44†); 918 (Day 92†)	280 (Day 1†); 955 (Day 44†); 1478 (Day 92†)	-	-	-

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
30 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	-	-	619 (GD 7[‡‡]); 782 (GD19[‡‡])	-	-
30 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	-	-	NA (GD 7[‡‡]); NA (GD19[‡‡])	-	-
30 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	-	-	NA (GD 7[‡‡]); NA (GD19[‡‡])	-	-
30 mg/kg/day (15.8 mg free base/kg/day)	726 (Day 1[§§]); 576 (Day 28[§§])	651 (Day 1[§§]); 639 (Day 28[§§])	-	-	-	-	-
39.5 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	294 (Day 1[††]); 624 (Day 182[††])	596 (Day 1[††]); 1240 (Day 182[††])	-	-	-
39.5 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	313 (Day 1[††]); 749 (Day 182[††])	378 (Day 1[††]); 1000 (Day 182[††])	-	-	-
39.5 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	411 (Day 1[††]); 621 (Day 182[††])	673 (Day 1[††]); 1600 (Day 182[††])	-	-	-
75 mg/kg/day - 1st dose (39.5 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	187 (Day 0*); 397 (Week 4*)	287 (Day 0*); 449 (Week 4*)	-	-	-
75 mg/kg/day - 2nd dose (39.5 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	NA (Day 0*); 128 (Week 4*)	NA (Day 0*); NA (Week 4*)	-	-	-
75 mg/kg/day - 3rd dose (39.5 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	156 (Day 0*); 358 (Week 4*)	345 (Day 0*); 601 (Week 4*)	-	-	-
100 mg/kg/day (52.6 mg free base/kg/day)	1380 (Day 1[§§]); 2510 (Day 28[§§])	2120 (Day 1[§§]); 2760 (Day 28[§§])	-	-	-	-	-
300 mg/kg/day (157.9 mg free base/kg/day)	1970 (Day 1[§§]); 7540 (Day 28[§§])	3090 (Day 1[§§]); 9570 (Day 28[§§])	-	-	-	-	-
1.0 mg/kg/day (0.53 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	81.4 (Day 1**); 72.8 (Day 28**); 68.3 (Day 273**)	74.0 (Day 1**); 78.4 (Day 28**); 81.4 (Day 273**)
1.9 mg/kg/day (1 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	141 (Day 1**); 134 (Day 28**); 151 (Day 273**)	149 (Day 1**); 145 (Day 28**); 159 (Day 273**)
1 mg/kg/day - 1st dose (0.5 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	-	-	-	46 (Day 0[‖]); 51 (Week 4[‖])	59 (Day 0[‖]); 56 (Week 4[‖])
1 mg/kg/day - 2nd dose (0.5 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	-	-	-	37 (Day 0[‖]); 37 (Week 4[‖])	31 (Day 0[‖]); 36 (Week 4[‖])

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
1 mg/kg/day - 3rd dose (0.5 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	-	-	-	57 (Day 0[‖]); 46 (Week 4[‖])	57 (Day 0[‖]); 54 (Week 4[‖])
1.9 mg/kg/day (1 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	152[‡]; 74.9 (Day 0[§]); 76.9 (Week 4[§])	160[‡]; 72.3 (Day 0[§]); 52.9 (Week 4[§])
3.8 mg/kg/day (2 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	285 (Day 1**); 258 (Day 28**); 283 (Day 273**)	281 (Day 1**); 253 (Day 28**); 260 (Day 273**)
2.5 mg/kg/day - 1st dose (1.3 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	11.9 (Day 1[†]); 19.0 (Day 44[†]); 18.3 (Day 92[†])	15.5 (Day 1[†]); 33.3 (Day 44[†]); 32.5 (Day 92[†])	-	145 (Day 0[‖]); 95 (Week 4[‖])	188 (Day 0[‖]); 146 (Week 4[‖])
2.5 mg/kg/day - 2nd dose (1.3 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	9.7 (Day 1[†]); 16.8 (Day 44[†]); 19.0 (Day 92[†])	13.6 (Day 1[†]); 21.1 (Day 44[†]); 30.4 (Day 92[†])	-	106 (Day 0[‖]); 112 (Week 4[‖])	96 (Day 0[‖]); 96 (Week 4[‖])
2.5 mg/kg/day - 2nd dose (1.3 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	11.4 (Day 1[†]); 10.1 (Day 44[†]); 18.0 (Day 92[†])	15.2 (Day 1[†]); 33.8 (Day 44[†]); 30.3 (Day 92[†])	-	176 (Day 0[‖]); 166 (Week 4[‖])	120 (Day 0[‖]); 136 (Week 4[‖])
3.9 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	11.8 (Day 1[††]); 25.2 (Day 182[††])	22.7 (Day 1[††]); 25.3 (Day 182[††])	-	-	-
3.9 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	10.8 (Day 1[††]); 14.5 (Day 182[††])	21.4 (Day 1[††]); 21.3 (Day 182[††])	-	-	-
3.9 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	8.74 (Day 1[††]); 14.1 (Day 182[††])	12.5 (Day 1[††]); 23.2 (Day 182[††])	-	-	-
4.74 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	-	-	52.8 (GD 7[‡‡]); 70.0 (GD19[‡‡])	-	-
4.74 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	-	-	36.7 (GD 7[‡‡]); 45.2 (GD19[‡‡])	-	-
4.74 mg free base/kg/day - 3rd dose			-	-	31.4 (GD 7[‡‡]); 83.2 (GD19[‡‡])	-	-
5.7 mg/kg/day (3 mg free base/kg/day)			-	-	-	412[‡]; 204.2 (Day 0[§]); 239.1 (Week 4[§])	464[‡]; 198.6 (Day 0[§]); 178.6 (Week 4[§])
6.25 mg/kg/day - 1st dose (3.3 mg free base/kg/day - 1st dose)			-	-	-	352 (Day 0[‖]); 287 (Week 4[‖])	345 (Day 0[‖]); 261 (Week 4[‖])
6.25 mg/kg/day - 2nd dose (3.3 mg free base/kg/day - 2nd dose)			-	-	-	271 (Day 0[‖]); 241 (Week 4[‖])	326 (Day 0[‖]); 221 (Week 4[‖])

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
6.25 mg/kg/day - 3rd dose (3.3 mg free base/kg/day - 3rd dose)			-	-	-	329 (Day 0[‖]); 367 (Week 4[‖])	377 (Day 0[‖]); 324 (Week 4[‖])
6.25 mg/kg/day (3.3 mg free base/kg/day)			-	-	-	434[‡]	458[‡]
7.5 mg/kg/day - 1st dose (4.0 mg free base/kg/day - 1st dose)			NA (Day 0*); 6.64 (Week 4*)	5.68 (Day 0*); 12.6 (Week 4*)	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 2nd dose (4.0 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	7.55 (Day 0*); 16.9 (Week 4*)	8.64 (Day 0*); 12.9 (Week 4*)	-	-	-
7.5 mg/kg/day - 3rd dose (4.0 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	10.5 (Day 0*); 10.5 (Week 4*)	13.2 (Day 0*); 15.7 (Week 4*)	-	-	-
7.5 mg/kg/day (4.0 mg free base/kg/day)	-	-	-	-	-	310.8 (Day 0[§]); 311 (Week 4[§])	319.7 (Day 0[§]); 321.7 (Week 4[§])
11.8 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	23.0 (Day 1[††]); 84.1 (Day 182[††])	83.1 (Day 1[††]); 174 (Day 182[††])	-	-	-
11.8 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	38.9 (Day 1[††]); 92.3 (Day 182[††])	41.8 (Day 1[††]); 142 (Day 182[††])	-	-	-
11.8 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	38.2 (Day 1[††]); 109 (Day 182[††])	109 (Day 1[††]); 208 (Day 182[††])	-	-	-
15.9 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	-	-	197 (GD 7[‡‡]); 520 (GD19[‡‡])	-	-
15.9 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	-	-	194 (GD 7[‡‡]); 339 (GD19[‡‡])	-	-
15.9 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	-	-	228 (GD 7[‡‡]); 321 (GD19[‡‡])	-	-
22.5 mg/kg/day - 1st dose (11.9 mg free base/kg/day - 1st dose)			59.5 (Day 1[†]); 62.0 (Day 44[†]); 88.1 (Day 92[†])	88.3 (Day 1[†]); 144 (Day 44[†]); 196 (Day 92[†])	-	-	-
22.5 mg/kg/day - 2nd dose (11.9 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	52.2 (Day 1[†]); 82.4 (Day 44[†]); 74.8 (Day 92[†])	79.1 (Day 1[†]); 104 (Day 44[†]); 191 (Day 92[†])	-	-	-
22.5 mg/kg/day - 3rd dose (11.9 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	31.4 (Day 1[†]); 50.1 (Day 44[†]); 88.5 (Day 92[†])	76.1 (Day 1[†]); 264 (Day 44[†]); 223 (Day 92[†])	-	-	-

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
24 mg/kg/day - 1st dose (12.6 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	18.3 (Day 0*); 32.9 (Week 4*)	30.9 (Day 0*); 64.6 (Week 4*)	-	-	-
24 mg/kg/day - 2nd dose (12.6 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	32.4 (Day 0*); 41.3 (Week 4*)	43.8 (Day 0*); 55.6 (Week 4*)	-	-	-
24 mg/kg/day - 3rd dose (12.6 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	29.3 (Day 0*); 51.9 (Week 4*)	82.9 (Day 0*); 80.2 (Week 4*)	-	-	-
75 mg/kg/day - 1st dose (39.5 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	278 (Day 1†); 403 (Day 44†); 427 (Day 92†)	342 (Day 1†); 902 (Day 44†); 924 (Day 92†)	-	-	-
75 mg/kg/day - 2nd dose (39.5 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	320 (Day 1†); 592 (Day 44†); 938 (Day 92†)	266 (Day 1†); 1240 (Day 44†); 1204 (Day 92†)	-	-	-
75 mg/kg/day - 3rd dose (39.5 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	168 (Day 1†); 326 (Day 44†); 690 (Day 92†)	184 (Day 1†); 645 (Day 44†); 941 (Day 92†)	-	-	-
30 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	-	-	233 (GD 7‡‡); 387 (GD19‡‡)	-	-
30 mg free base/kg/day - 2nd dose			-	-	220 (GD 7‡‡); 400 (GD19‡‡)	-	-
30 mg free base/kg/day - 3rd dose			-	-	326 (GD 7‡‡); 477 (GD19‡‡)	-	-
30 mg/kg/day (15.8 mg free base/kg/day)	51.0 (Day 1§§); 54.4 (Day 28§§)	60.3 (Day 1§§); 63.3 (Day 28§§)	-	-	-	-	-
39.5 mg free base/kg/day - 1st dose	-	-	159 (Day 1††); 464 (Day 182††)	349 (Day 1††); 801 (Day 182††)	-	-	-
39.5 mg free base/kg/day - 2nd dose	-	-	155 (Day 1††); 779 (Day 182††)	150 (Day 1††); 603 (Day 182††)	-	-	-
39.5 mg free base/kg/day - 3rd dose	-	-	363 (Day 1††); 327 (Day 182††)	497 (Day 1††); 752 (Day 182††)	-	-	-
75 mg/kg/day - 1st dose (39.5 mg free base/kg/day - 1st dose)	-	-	131 (Day 0*); 243 (Week 4*)	227 (Day 0*); 413 (Week 4*)	-	-	-
75 mg/kg/day - 2nd dose (39.5 mg free base/kg/day - 2nd dose)	-	-	743 (Day 0*); 556 (Week 4*)	219 (Day 0*); 835 (Week 4*)	-	-	-

Dose	AUC (ng·h/mL)						
	Mice (M)	Mice (F)	Rats (M)	Rats (F)	Rabbits (F)	Dogs (M)	Dogs (F)
75 mg/kg/day - 3rd dose (39.5 mg free base/kg/day - 3rd dose)	-	-	232 (Day 0*); 268 (Week 4*)	285 (Day 0*); 516 (Week 4*)	-	-	-
100 mg/kg/day (52.6 mg free base/kg/day)	132 (Day 1§§); 201 (Day 28§§)	142 (Day 1§§); 182 (Day 28§§)	-	-	-	-	-
300 mg/kg/day (157.9 mg free base/kg/day)	274 (Day 1§§); 550 (Day 28§§)	278 (Day 1§§); 652 (Day 28§§)	-	-	-	-	-

F = females; M = males

* Mean values on Day 0 (first day of dosing) and Week 4 are from Study No. [redacted] AA40848 (4.2.3.2.04) (rat 4-week study). AUC values represent $AUC_{0\text{-}t}$.

† Mean values on Days 1, 44, and 92 are from Study No. BMN125-10-055 (4.2.3.2.05) (rat 13-week study). AUC values represent $AUC_{0\text{-}6h}$.

‡ Mean values from Study No. S12300 (4.2.3.1.06) (dog escalating single-dose / 7-day study). AUC values represent AUC_{last}

§ Mean values from Study No. [redacted] 266/014 (4.2.3.2.08) (dog 4-week study). AUC values represent AUC_{last}.

‖ Mean values from Study No. [redacted] AA40847 (4.2.3.2.09) (dog 4-week study). AUC values represent $AUC_{0\text{-}6h}$.

** Mean values from Study No. S12032 (4.2.3.2.10) (dog 9-month study). AUC values represent $AUC_{0\text{-}24h}$.

†† Mean values from Study No. S12033 (4.2.3.2.06) (rat 26-week study). AUC values represent AUC_{last}.

‡‡ Mean values from Study No. BMN125-13-014 (4.2.3.5.2.02) (rabbit embryo-fetal range-finder). AUC values represent $AUC_{0\text{-}6h}$.

§§ Mean values from Study No. 20[redacted]9230 (4.2.3.4.2.02) (mouse 28-day tolerance study). AUC values represent AUC_{last}.

2.6.7.3　毒性試験：被験物質（ロット毎）一覧

表 2.6.7.3-1　使用ロット

Test Article: Amifampridine Phosphate

Batch Number	Purity (%)	Specified Impurities*	Study Number	Type of Study
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/005 (4.2.3.1.01)	Mouse single-dose oral toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/007 (4.2.3.1.02)	Mouse single-dose i.v. toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/004 (4.2.3.1.03)	Rat single-dose oral toxicity
[redacted]†	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/012 (4.2.3.1.04)	Rat single-dose oral toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/006 (4.2.3.1.05)	Rat single-dose i.v. toxicity
[redacted]	NS	NS	S12300 (4.2.3.1.06)	Dog escalating single-dose / 7-day oral toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/011 (4.2.3.2.01)	Rat 7-day repeat-dose oral toxicity
[redacted]	100.7	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	S12741 (4.2.3.2.02)	Rat 21-day repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/013 (4.2.3.2.03)	Rat 4-week repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99.93	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] AA40848 (4.2.3.2.04)	Rat 4-week repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99.86	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	BMN125-10-055 (4.2.3.2.05)	Rat 13-week repeat-dose oral toxicity
[redacted], [redacted]	100.4, 100.7	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	S12033 (4.2.3.2.06)	Rat 26-week repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/010 (4.2.3.2.07)	Dog 14-day repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99 - 101	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 266/014 (4.2.3.2.08)	Dog 4-week repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99.93	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] AA40847 (4.2.3.2.09)	Dog 4-week repeat-dose oral toxicity
[redacted], [redacted], [redacted]	100.4 - 100.7	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	S12032 (4.2.3.2.10)	Dog 9-month repeat-dose oral toxicity
[redacted]	99	NS	[redacted] 010310 (4.2.3.3.1.01)	Bacterial reverse mutation
[redacted]	99	NS	[redacted] 010506 (4.2.3.3.1.02)	Bacterial reverse mutation
[redacted]	99	NS	[redacted] 010515 (4.2.3.3.1.03)	Mammalian cell mutation
[redacted]	>100	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	[redacted] 020404 (4.2.3.3.2.01)	Rat unscheduled DNA synthesis
[redacted]	≥99	NS	[redacted] 010417 (4.2.3.3.1.02)	Rat micronucleus
[redacted]	99.2	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	20[redacted]9225 (4.2.3.4.1.01)	Mouse 26-week carcinogenicity
[redacted], [redacted], [redacted]	99.6, 99.1, 99.0, 100.8, 101.3	*不純物D < 0.05%; *不純物C <0.05%	8264515 (4.2.3.4.1.02)	Rat 104-week carcinogenicity
[redacted], [redacted]	99.6, 100.0	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	BMN125-13-011 (4.2.3.4.2.03)	Rat 3-week dietary palatability

＊新薬承認情報提供時に置き換え

Batch Number	Purity (%)	Specified Impurities*	Study Number	Type of Study
[redacted]	100.6	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	20[redacted]9237 (4.2.3.4.2.01)	Mouse 7-day preliminary study
[redacted]	100.6	*不純物D < 0.05%; *不純物C < 0.05%	20[redacted]9230 (4.2.3.4.2.02)	Mouse 7- and 28-day tolerance study
[redacted]	100.0	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	BMN125-13-012 (4.2.3.5.1.01)	Rat fertility and embryo-fetal development
[redacted]	99.6	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	BMN125-13-013 (4.2.3.5.2.01)	Rabbit embryo-fetal 13-day tolerability study
[redacted], [redacted]	99.6, 100.7	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	BMN125-13-014 (4.2.3.5.2.02)	Rabbit embryo-fetal development range-finder
[redacted]	100.7	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	BMN125-13-015 (4.2.3.5.2.03)	Rabbit embryo-fetal development
[redacted]	100.7	*不純物D ≤ 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	BMN125-13-025 (4.2.3.5.3.01)	Rat pre- and post-natal development
[redacted]	100.4	*不純物D < 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	[redacted]5604 (4.2.3.7.4.01)	Rat drug discrimination
[redacted]	100.4	*不純物D < 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	[redacted]5336 (4.2.3.7.4.02)	Rat self administration
[redacted]	100.4	*不純物D < 0.05%; *不純物C ≤ 0.05%	[redacted]5401 (4.2.3.7.4.03)	Rat spontaneous withdrawal

*不純物D = [redacted]; *不純物C = [redacted]; i.v. = intravenous; NS = not specified.

* Impurity data for each batch are presented in Module 3.2.S.3.2.

† Test Article: Amifampridine Free base

2.6.7.4　単回投与毒性試験

表 2.6.7.4-1　単回投与毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species (Strain)	Method of Administration	Animals/ Sex/Group	Doses	Observed Maximum Nonlethal Dose	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Mouse / Ico:OF1	Oral	2 (preliminary phase), and 5 (main phase)	0, 2.5, 10, 25, 50, and 100 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 13.2, 26.3, and 52.6 mg free base/kg)	50 mg/kg (26.3 mg free base/kg)	100 mg/kg (52.6 mg free base/kg)	At 100 mg/kg: Clonic convulsions, rapid breathing, lacrimation, and salivation preceding mortality at approximately 1 hour postdose for all animals. At 50 mg/kg: Clonic convulsions and rapid breathing approximately 1 hour postdose in all females. Rapid breathing at approximately 1-2 hours postdose in all males. No adverse clinical signs by 4 hours postdose. At 25 mg/kg: Slight subdued behavior at 1 hour postdose in males only. The approximate lethal dose level of amifampridine phosphate for both males and females was greater than 25 mg/kg (13.2 mg free base/kg).	[redacted] 266/005 (GLP) (4.2.3.1.01)

Species (Strain)	Method of Administration	Animals/ Sex/Group	Doses	Observed Maximum Nonlethal Dose	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Mouse / Ico:OF1	i.v.	1-2 (preliminary phase), and 5 (main phase)	0, 2.5, 10, 12.5, 25, and 50 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 6.6, 13.2, and 26.3 mg free base/kg)	12.5 mg/kg (6.6 mg free base/kg)	50 mg/kg (26.3 mg free base/kg)	At 50 mg/kg: Mortality within minutes after dosing. At 25 mg/kg (preliminary phase): One male found dead 1 hour after injection, and clinical signs included irregular breathing, salivation, and unsteady gait up to 1 hour after dosing. Lacrimation and piloerection were observed in two males and one male, respectively. No abnormalities were noted at 2 hours postdose and later. At 25 mg/kg (main phase): two males died within 30 minutes after injection, and clinical signs included convulsions in one female 15 minutes after treatment, and preconvulsive movements in all five males. All animals had hypersalivation and all females had episodes of excessive grooming and unsteady gait. Males had agitated forelimbs and/or head movements. No abnormalities were noted at 2 hours postdose and later. At 12.5 mg/kg: No deaths, and irregular breathing was recorded in all four animals at the 15 minute timepoint. No abnormalities at 1 hour postdose and later. The approximate lethal dose level of amifampridine phosphate was 25 mg/kg (13.2 mg free base/kg) for males and greater than 25 mg/kg for females.	[redacted] 266/007 (GLP) (4.2.3.1.02)

Species (Strain)	Method of Administration	Animals/ Sex/Group	Doses	Observed Maximum Nonlethal Dose	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Rat / Sprague-Dawley	Oral	2 (preliminary phase), and 5 (main phase)	0, 2.5, 10, 25, 50, and 100 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 13.2, 26.3, and 52.6 mg free base/kg)	50 mg/kg (26.3 mg free base/kg)	100 mg/kg (52.6 mg free base/kg)	At 100 mg/kg: Mortality within the first 3 hours postdose, and clinical signs included irregular breathing, pedaling movements, salivation, lacrimation, and clonic convulsions prior to death. At 50 mg/kg: One animal was found dead 1 hour after dosing. Clinical signs included unsteady gait, clonic convulsions, salivation, lacrimation, rapid breathing, and/or pedaling movements between 1-2 hours postdose. Females administered 50 mg/kg were observed with only unsteady gait at 1 hour postdose. At 25 mg/kg: hyperactivity and excessive grooming were noted in most animals 1 hour after administration. Agitated movements of forelimb were noted for the females prior to grooming. The approximate lethal dose level of amifampridine phosphate for both males and females was greater than 25 mg/kg (13.2 mg free base/kg).	[redacted] 266/004 (GLP) (4.2.3.1.03)
Rat / Sprague-Dawley	Oral	2-5	0, 2.5, 10, 25, and 50 mg free base/kg	25 mg free base/kg	50 mg free base/kg	At 50 mg free base/kg: One female died immediately after observations of convulsions, which occurred at 1 hour postdose. Clinical signs observed in both males and females included hypersalivation, excessive grooming, agitated forelimb movements, and piloerection. At 25 mg free base/kg: Clinical signs were only observed in females and included excessive grooming, agitated forelimb movements, half-closed eyes, and hypersalivation. The approximate lethal dose level of amifampridine free base for both males and females was 50 mg/kg.	[redacted] 266/012 (GLP)* (4.2.3.1.04)

Species (Strain)	Method of Administration	Animals/ Sex/Group	Doses	Observed Maximum Nonlethal Dose	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Rat / Sprague-Dawley	i.v.	2 (preliminary phase), and 5 (main phase)	0, 2.5, 10, 12.5, 25, and 50 mg/kg (0, 1.3, 5.3, 6.6, 13.2, and 26.3 mg free base/kg)	12.5 mg/kg (6.6 mg free base/kg)	25 mg/kg (13.2 mg free base/kg)	At 50 mg/kg: Mortality within minutes after dosing. At 25 mg/kg (preliminary phase): One male and one female found dead within 1 hour postdose. Two males and one female had clonic convulsions within the first 15 minutes postdose. Pedaling movements and colored tears were noted in one male. Salivation, unsteady breathing, and unsteady gait were also observed. The two surviving animals still had salivation and unsteady breathing (male only) at least up to 4 hours postdose. At 25 mg/kg (main phase): two males and two females were found dead within 15 minutes to 2 hours after dosing, respectively. Four males and three females had convulsions within the first 15 minutes after dosing. Hypersalivation and subdued behavior were observed in surviving females and subdued behavior was observed in surviving males. No abnormalities were observed in this group at 4 hours postdose and later. At 12.5 mg/kg: No deaths. Unsteady gait, unsteady breathing, and jumping were observed in all animals within the first 15 minutes after dosing. No abnormalities at 1 hour postdose and later. The approximate lethal dose level of amifampridine phosphate for both males and females was 25 mg/kg (13.2 mg free base/kg).	[redacted] 266/006 (GLP) (4.2.3.1.05)

Species (Strain)	Method of Administration	Animals/ Sex/Group	Doses	Observed Maximum Nonlethal Dose	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Dog / Beagle	Oral	2	1.9, 3.8, and 5.7 mg/kg, and 6.25 mg/kg/day (1.0, 2.0, and 3.0 mg free base/kg, and 3.3 mg free base/kg/day)	6.25 mg/kg/day (3.3 mg free base/kg/day)	ND	No mortalities. Common clinical signs included hypersalivation and diarrhea, both observed at the lowest dose (1.9 mg/kg). At the dose of 5.7 mg/kg or higher, panting, coughing, emesis, squinty eyes, and tremor were observed. The most notable observations were for a female animal on Day 22 following the second daily dose (6.25 mg/kg/day), with clinical signs of ataxia, hypersalivation, enduring mild tremors, and non-responsive to stimuli. The animal completely recovered within 1 hour of the initial observations. MTD determined to be 3.8 mg/kg/day (2.0 mg free base/kg).	S12300 (non-GLP) (4.2.3.1.06)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; MTD = maximum tolerated dose; ND = not determined.

* Test Article: Amifampridine Free base

2.6.7.5　反復投与毒性試験

表 2.6.7.5-1　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Rat / Sprague-Dawley	Oral, t.i.d. (1% CMC in water)	7 days	0, 1, 10, 30, and 60 mg/kg/day (0, 0.53, 5.3, 15.8, and 31.6 mg free base/kg/day)	5	ND	No mortalities. Animals given 60 mg/kg/day were noted with three instances of hyperactivity, and one female had tremors following the second administration on Day 1. Excessive grooming was occasionally observed for doses ≥10 mg/kg/day, and hypersalivation was seen in some animals at 30 mg/kg/day and in most animals at 60 mg/kg/day. There was a slight dose-related decrease in the heart weight in females given 60 mg/kg/day.	[redacted] 266/011 (GLP) (4.2.3.2.01)
Rat / Sprague-Dawley	Oral, t.i.d. (sterile water for injection)	21days (planned)	0, 39.5, 78.9 and 157.9 mg free base/kg/day	5 (Main) and 4 (TK)	ND	Overt toxicity developed for 13 of 18 of the middose group (78.9 mg free base/kg/day), and all of the high dose group (157.9 mg free base/kg/day). Clinical signs included: red oral discharge, neuromuscular instability (twitching, shaking, jumping), and abnormal posturing. These adverse clinical signs developed earlier, and were more severe in the high dose group. For humane reasons, dosing was discontinued for the high dose animals following the second dose on Day 1, and for the rest of the animals following the third dose on Day 2. A single animal in the low dose group was noted on one occasion following the third dose on Day 1 to have developed twitching and burrowing behavior, but this resolved.	S12741 (non-GLP) (4.2.3.2.02)

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Rat / Sprague-Dawley	Oral, t.i.d. (1% CMC in water)	4 weeks	0, 7.5, 24, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg free base/kg/day)	10 (Main), 5 (Recovery, 0 and 75 mg/kg/day dosing group), and 6 (TK)	24 mg/kg/day (12.6 mg free base/kg/day)	No mortalities. The clinical sign of hypersalivation was observed after the first administration per day in some animals at 24 mg/kg/day and all animals at 75 mg/kg/day. Increased incidence of hypersalivation, excessive grooming, and hyperactivity was observed throughout the dosing period in animals given 75 mg/kg/day. Increased body weight gain was recorded in females at 75 mg/kg/day. Increased urine volume along with a concurrent decrease in specific gravity was observed in a dose-dependent fashion in females. Increased absolute and relative weights of liver and kidney were recorded in females at 75 mg/kg/day.	[redacted] 266/013 (GLP) (4.2.3.2.03)
Rat / Sprague-Dawley	Oral, t.i.d. (1% CMC in water)	4 weeks	0, 7.5, 24, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 12.6, and 39.5 mg free base/kg/day)	14 (0 mg/kg/day dosing group) and 21 (7.5, 24, and 75 mg/kg/day dosing group)	ND	No mortalities. The clinical sign of hypersalivation was recorded in increased incidence with increased dose in both males and females. A dose-related increase in body weight gain was observed in females at 24 and 75 mg/kg/day.	[redacted] AA40848 (GLP) (4.2.3.2.04)
Rat / Sprague-Dawley	Oral, t.i.d. (reverse osmosis water)	13 weeks	0, 7.5, 22.5, and 75 mg/kg/day (0, 4.0, 11.9, and 39.5 mg free base/kg/day)	15 (Main), 10 (Recovery, 0 and 75 mg/kg/day dosing group), and 19 (TK)	22.5 mg/kg/day (11.9 mg free base/kg/day)	Early euthanasia of one TK female given 75 mg/kg/day. Treatment-related clinical signs of clear oral discharge and limb paddling were noted in animals given 75 mg/kg/day and were generally limited to TK animals that were fasted for dosing. Significant increases in food consumption at a few intervals in animals given >7.5 mg/kg/day, but did not correspond with body weight changes. A few minor and reversible clinical pathology changes were observed in animals given 75 mg/kg/day. No changes in microscopic observations. Minimal to slight hypertrophy of the mandibular salivary gland was observed at the dosing phase necropsy in animals given 75 mg/kg/day and absent at the end of the 4-week recovery. One toxicity female given 75 mg/kg/day and one TK female given 22.5 mg/kg/day were noted with a mass starting on Days 92 and 64, respectively; the causes of these findings could not be determined.	BMN125-10-055 (GLP) (4.2.3.2.05)

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Dog / Beagle	Oral, t.i.d. (1% CMC in water)	14 days	0, 0.75, 1.5, 3, 6, 7.5, 9, 12, and 24 mg/kg/day (0, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 4.0, 4.7, 6.3, and 12.6 mg free base/kg/day)	1	ND	In Phase 1, the escalating single-dose phase, the male dog was terminated on Day 10 of the dose escalation (24 mg/kg/day) after the second administration due to prolonged convulsions. At necropsy, the main findings were depressed areas in the duodenal mucosa and edematous brain. No clinical signs were observed up to 6 mg/kg/day. On Days 8 and 9 (12 mg/kg/day) clinical signs included licking, scratching of muzzle, frequent blinking, tremors, movement difficulties, reduced activity, subdued behavior, salivation, lacrimation, and dilation of pupils. In Phase 2, the female dog was administered 12 mg/kg/day on Days 0 and 1, and the resulting CNS-related clinical signs were more severe than those seen in Phase 1 at the same dose for the male. In Phase 3, the 14-day repeat-dose phase of the study, severe CNS-related clinical signs and weight loss were observed after administration of 7.5 mg/kg/day in male and female dogs.	[redacted] 266/010 (GLP) (4.2.3.2.07)

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Dog / Beagle	Oral, t.i.d. (1% CMC in water)	4 weeks	0, 1.9, 5.7, and 7.5 mg/kg/day (0, 1.0, 3.0, and 4.0 mg free base/kg/day)	4	1.9 mg/kg/day (1.0 mg free base/kg/day)	Two unscheduled deaths in males administered 7.5 mg/kg/day after the second daily administration on Day 0 (one dog was sacrificed moribund and the other animal died 1 hour after dosing). Clinical signs included panting after the first administration and subsequent hyperesthesia and convulsions after the second. The death of one dog and the moribund condition of the second were likely to be caused by convulsions. Macroscopic findings in both animals included dark areas or multifocal dots in the gastrointestinal tract (fluid filled), kidneys, liver, pituitary, mandibular glands, thymus, and lung. One of the male dogs also had dark areas in the cervical lymph node. Microscopic findings of myodegeneration were seen in the skeletal muscle and tongue that was accompanied by macrophage infiltration. Dark areas in the liver and lung correlated with minimal to slight multifocal congestion. Minimal to slight histiocytosis was seen in the mesenteric and mandibular lymph nodes along with diffuse hemorrhage in the cervical lymph node. Clinical signs were dose-dependent and typically occurred during the first days of the dosing phase. All animals given 7.5 mg/kg/day had clinical signs of convulsions, tremors, salivation, increased muscular tone, locomotor difficulties, and hyperesthesia. Decreased body weight and body weight gain was observed in treated animals compared to controls. Eye examination revealed white filaments in the posterior lens capsule and within the vitreous body in females at 5.7 and 7.5 mg/kg/day. Two females at 7.5 mg/kg/day had decreased red blood cell count, hemoglobin concentration, and packed cell volume. A dose-related decrease in urine volume was observed in males and females.	[redacted] 266/014 (GLP) (4.2.3.2.08)

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
						The most significant microscopic finding was a generally dose-related myodegeneration in larynx, tongue, and skeletal muscles, which was observed more frequently in males than in females.	
Dog / Beagle	Oral, t.i.d. (1% CMC in water)	4 weeks	0, 1, 2.5, and 6.25 mg/kg/day (0, 0.5, 1.3, and 3.3 mg free base/kg/day)	3 (Main) and 2 (Recovery, Groups 1 and 4)	ND	No mortalities. Dose-dependent CNS-related clinical signs were recorded. One female at 1 mg/kg/day had tremors 1 hour after the first daily dose on Day 1, and one female had subdued behavior and decreased activity at the end of the treatment period. Two males and one female at 2.5 mg/kg/day had tremors on Days 0 (third dose), 4 (first dose) and 5 (first dose), respectively. In most animals given 6.25 mg/kg/day, marked clinical signs were observed on the first day of treatment, including subdued behavior, increased muscle tone, tremors, anxious behavior, panting, hypersalivation, prostration, paresis, loss of balance, aggressiveness, labored breathing, poor motor coordination, stiff hindlimbs, liquid feces, and tonic convulsions. Slight body weight loss was observed in all animals during the first week of treatment. Relative liver weight was significantly increased in females, and absolute and relative liver weights were relatively increased in males given 6.25 mg/kg/day. Microscopic findings in the main study animals included minimal myopathy in the skeletal muscles of one female given 6.25 mg/kg/day, the psoas muscle of one female each given 1 and 2.5 mg/kg/day, and the diaphragm of one female at 2.5 mg/kg/day.	[redacted] AA40847 (GLP) (4.2.3.2.09)

CMC = carboxymethylcellulose; CNS = central nervous system; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; ND = not determined; NOAEL = no observed adverse effect level; t.i.d. = three times per day; TK = toxicokinetics.

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7.6-1　26 週間反復投与毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: 26-Week Repeat Dose Toxicology and Toxicokinetic Study of Amifampridine Administered as the Phosphate Salt (BMN 125) in Sprague-Dawley Rats with a 4-Week Recovery		
Species/Strain: Sprague-Dawley Rats	**Duration of Dosing:** 26 weeks	**Study Reference:** S12033
Initial Age: 6.4 weeks upon receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks for recovery groups	**Location in CTD:** 4.2.3.2.06
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage (t.i.d.)	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** Distilled Water	

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**3.9**		**11.8**		**39.5**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
26-Week Results *(duration of main study group)*								
Number of Animals (main group plus recovery group)	25	25	25	25	25	25	25	25
Noteworthy Findings								
Animals Removed Prior to Scheduled Termination (None were considered to be related to test article exposure.)	1	1	2	0	2	0	3	0
Group Mean Body Weight Changes (g/day)	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 2 to Day 3	8.3	3.2	6.0[a]	4.0	8.0	1.6	7.2	6.0[a]
Day 3 to Day 4	1.9	2.6	3.7	2.5	4.1	6.6[a]	1.3	4.2
Day 6 to Day 7	2.7	1.6	3.7	0.9	4.7[a]	1.6	6.0[a]	2.4
Day 7 to Week 2	4.8	2.9	4.6	2.6	4.2[a]	2.5	4.3	2.6
Week 8 to Week 9	0.9	0.1	1.2	0.0	1.0	-0.4	0.0[a]	0.2
Week 10 to Week 11	0.8	0.3	1.4[a]	0.3	1.2	0.1	0.5	0.1
Week 12 to Week 13	1.5	0.4	1.0	0.4	1.2	0.1	0.5[a]	0.5
Week 13 to Week 14	0.8	0.2	1.3[a]	0.2	1.3	0.2	1.0	0.2
Week 15 to Week 16	1.0	0.4	1.0	0.3	1.1[a]	0.5	0.8[a]	0.7
Week 16 to Week 17	0.2	-0.5	0.4	-0.2	1.0[a]	0.5[a]	0.9[a]	0.1[a]

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**3.9**		**11.8**		**39.5**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Week 17 to Week 18	1.2	1.0	0.9	0.7	0.8	-0.1[a]	-0.1[a]	-0.3[a]
Week 18 to Week 19	0.0	-0.4	0.1	-0.3	0.6[a]	0.0	0.7[a]	0.3[a]
Week 19 to Week 20	1.5	0.5	1.2	1.1[a]	1.1	0.4	1.1	0.4
Week 22 to Week 23	1.2	0.2	0.5	0.0	0.9	0.0	0.5	-0.8[a]
Week 24 to Week 25	0.6	0.2	0.8	0.4	0.7	0.7	1.0	1.0[a]
Week 25 to Week 26	-1.4	-1.2	-1.9	-1.1	-1.0	-1.6	-1.6	-2.1[a]
Group Mean Food Consumption (g/day)	-	-	-	-	-	-	-	-
Week 11 to Week 12	20.6	14.5	21.4	14.6	21.8	15.4	20.9	15.3
Week 14 to Week 15	20.5	14.8	21.8	14.6	22.0[a]	14.9	21.0	15.4
Week 16 to Week 17	20.8	14.4	21.3	14.7	21.6	15.0	21.5	15.7[a]
Week 19 to Week 20	21.7	14.3	21.9	14.8	22.1	14.2	21.7	15.4[a]
Week 20 to Week 21	21.2	13.6	21.6	15.0[a]	22.3	14.5	21.5	15.0[a]
Week 25 to Week 26	18.8	13.2	18.3	13.4	19.8	14.2	18.5	15.3[a]
Clinical Observations (no. findings/no. animals affected)	-	-	-	-	-	-	-	-
Red Nasal Discharge	2/2	1/1	8/6	1/1	5/5	1/1	18/10	5/3
Red Ocular Discharge	20/9	4/3	14/5	6/3	16/10	12/6	36/13	4/4
Paddling, twitching, (neurological) tremors	0	0	0	0	0	1/1	8/7	5/5
Dyspnea, tachypnea, (respiratory) panting	0	0	0	0	2/2	0	13/7	2/2
Number of Animals Assessed	19	20	18	20	18	19	18	20
Hematology								
RBC (10^6/μL)	9.18	7.78	9.02	7.74	8.71[a]	7.84	8.92	7.80
Hb (g/dL)	16.5	15.0	16.3	15.1	16.0	15.2	16.1	15.3
Hct (%)	52.1	45.2	51.3	45.4	50.7	45.9	51.4	46.2
MCV (fL)	56.8	58.2	56.9	58.6	58.3[a]	58.6	57.6	59.2
MCH (pg)	18.0	19.3	18.1	19.5	18.5	19.4	18.1	19.6
MCHC (g/dL)	31.7	33.2	31.8	33.3	31.7	33.1	31.4	33.0
Reticulocytes (%)	2.60	1.37	2.51	1.41	2.60	1.54	2.26	1.48

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**3.9**		**11.8**		**39.5**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
WBC ($10^3/\mu L$)	11.00	7.53	10.99	8.11	11.61	7.93	10.71	7.81
Neutrophils (%)	14.0	15.8	13.5	14.2	13.1	16.3	11.7	13.2
PT (sec)	16.9	17.0	17.2	15.9[a]	16.5	16.6	17.2	16.6
APTT (sec)	44.9	38.9	44.4	38.2	41.9	45.3[a]	45.0	37.6
Platelets ($10^3/\mu L$)	696	699	703	647	733	660	703	643
Number of Animals Assessed	19	20	19	20	18	20	18	20
Serum Chemistry								
Sodium (mmol/L)	145	142	147[a]	144[a]	147	145[a]	147[a]	145[a]
Potassium (mmol/L)	7.6	7.9	6.9	7.1	7.8	8.3	7.5	8.1
Chloride (mmol/L)	97	100	97	101	99[a]	101	99[a]	102[a]
Calcium (mg/dL)	14.1	13.8	14.0	13.9	14.0	13.8	13.7[a]	13.5
Phosphorus (mg/dL)	9.4	8.1	8.8	7.8	8.7	8.8	8.7	9.0[a]
Glucose (mg/dL)	287	318	307	330	284	329	299	333
ALT (U/L)	51	43	57	43	55	40	77[a]	44
AST (U/L)	59	83	72	69	65	88	84[a]	94
ALP (U/L)	126	78	126	100[a]	126	80	148	83
Total bilirubin (mg/dL)	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2
GGT (U/L)	3	3	3	3	3	3	3	3
Creatinine (mg/dL)	0.44	0.48	0.46	0.47	0.44	0.49	0.43	0.49
BUN (mg/dL)	19	16	19	16	18	23[a]	16[a]	22[a]
Total protein (g/dL)	6.8	7.0	7.0[a]	6.9	6.8	6.9	6.7	6.8
Albumin (g/dL)	3.7	4.3	3.9	4.2	3.7	4.2	3.8	4.1
Globulin (g/dL)	3.0	2.7	3.2	2.7	3.1	2.7	2.9	2.7
Cholesterol (mg/dL)	154	140	158	133	169	138	137	131
Triglycerides (mg/dL)	117	78	119	80	121	101	88[a]	78

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**3.9**		**11.8**		**39.5**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals Assessed	19	20	19	20	18	20	18	20
Urinalysis								
Mean Urine Volume (mL)	13	9	15	11	12	10	13	8
Mean pH	7.2	6.8	7.6[a]	6.8	7.2	7.0	7.2	7.2
Mean Specific Gravity	1.019	1.020	1.124	1.015	1.027	1.018	1.022	1.020
Number of Animals Assessed	19	20	19	20	18	20	18	20
Number of Animals Assessed	19	20	19	20	18	20	18	20
Organ Weights								
Adrenal (absolute) (grams)	0.068	0.080	0.076	0.076	0.075	0.083	0.075	0.100[a]
Adrenal (relative) (per body weight) (%)	0.013	0.028	0.015	0.026	0.014	0.029	0.015	0.035[a]
Heart (absolute) (grams)	1.962	1.165	1.863	1.185	1.902	1.201	1.776[a]	1.201
Heart (relative) (per body weight) (%)	0.37	0.40	0.36	0.41	0.35	0.42	0.36	0.42
Testes / Ovary (absolute) (grams)	4.492	0.101	4.565	0.118	4.546	0.110	4.476	0.157[a]
Testes / Ovary (relative) (per body weight) (%)	0.84	0.03	0.87	0.04	0.85	0.04	0.90	0.05[a]
Spleen (absolute) (grams)	1.020	0.645	0.939	0.706	0.996	0.678	0.882[a]	0.674
Spleen (relative) (per body weight) (%)	0.19	0.22	0.18	0.24	0.18	0.24	0.18	0.23
Mandibular Salivary Glands (absolute) (grams)	0.834	0.525	0.813	0.574	0.841	0.562	0.930[a]	0.929[a]
Mandibular Salivary Glands (relative) (per body weight) (%)	0.16	0.18	0.15	0.20	0.16	0.20	0.19[a]	0.32[a]
Liver (absolute) (grams)	15.767	7.438	15.833	7.901	17.365[a]	8.158[a]	16.567	9.053[a]
Liver (relative) (per body weight) (%)	3.0	2.6	3.0	2.7	3.2[a]	2.9[a]	3.3[a]	3.1[a]

表 2.6.7.6-1　26 週間反復投与毒性試験（続き）

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**3.9**		**11.8**		**39.5**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
30-Week Recovery Group Results								
Number of Animals	5	4	4	5	5	5	5	4
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Group Mean Body Weight Changes (g/day)	-	-	-	-	-	-	-	-
Week 27 to Week 28	0.0	0.6	0.1	1.1	0.7	0.5	1.3[a]	0.9
Group Mean Food Consumption (g/day)	-	-	-	-	-	-	-	-
Week 27 to Week 28	18.4	13.0	20.0	15.6	22.2[a]	14.2	21.4[a]	16.3[a]
Week 28 to Week 29	19.4	14.0	20.8	16.0	21.8[a]	15.0	22.8[a]	16.3
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals Assessed	5	4	4	5	5	5	5	4
Hematology								
RBC (10^6/µL)	8.96	8.04	8.86	7.73	8.72	7.93	8.72	8.02
Hb (g/dL)	15.8	15.0	15.8	14.6	15.2	14.9	15.6	14.5
Hct (%)	51.5	47.9	51.6	45.1	49.3	47.0	51.2	46.6
MCV (fL)	57.5	59.5	58.2	58.4	56.6	59.4	58.8	58.2
MCH (pg)	17.7	18.6	17.9	19.0	17.4	18.9	17.9	18.1
MCHC (g/dL)	30.8	31.3	30.7	32.5	30.8	31.8	30.5	31.2
Reticulocytes (%)	2.26	2.59	2.37	2.33	2.27	2.50	2.44	2.40
WBC (10^3/µL)	8.24	6.54	11.04	5.91	9.36	5.35	10.43	6.10
Neutrophils (%)	18.5	17.6	30.8	14.2	23.4	17.2	25.6	21.1
PT (sec)	18.0	14.2	16.8	13.8	14.7[a]	13.7	14.3[a]	13.9
APTT (sec)	26.5	24.8	27.9	23.6	27.1	23.9	24.4	24.0
Platelets (10^3/µL)	820	756	821	724	794	812	810	804
Number of Animals Assessed	5	4	4	5	5	5	5	4

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**3.9**		**11.8**		**39.5**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Serum Chemistry								
Sodium (mmol/L)	145	145	147	144	146	145	146	146
Potassium (mmol/L)	6.0	6.5	5.8	6.8	6.2	6.0	6.3	6.0
Chloride (mmol/L)	101	103	101	102	101	102	101	102
Calcium (mg/dL)	13.3	13.5	13.1	13.5	13.3	13.4	13.3	13.2
Phosphorus (mg/dL)	7.7	6.0	6.9	6.7	7.8	5.2	7.8	5.5
Glucose (mg/dL)	242	279	240	268	262	300	256	255
ALT (U/L)	46	49	40	42	43	42	45	39
AST (U/L)	61	80	61	73	70	101	67	71
ALP (U/L)	94	76	73[a]	86	72[a]	62	87	72
Total bilirubin (mg/dL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2
GGT (U/L)	3	3	3	3	3	3	3	3
Creatinine (mg/dL)	0.45	0.50	0.48	0.51	0.44	0.61	0.47	0.48
BUN (mg/dL)	19	14	17	14	17	16	19	14
Total protein (g/dL)	7.5	7.4	7.6	7.0	7.6	7.3	7.8	7.3
Albumin (g/dL)	3.2	3.9	3.2	3.7	3.2	3.9	3.3	3.7
Globulin (g/dL)	4.3	3.4	4.4	3.2	4.4	3.4	4.5	3.6
Cholesterol (mg/dL)	177	156	192	127	172	159	174	159
Triglycerides (mg/dL)	71	58	92	67	164	62	72	59
Number of Animals Assessed	5	3	4	5	5	2	5	3
Urinalysis								
Mean Urine Volume (mL)	3	2	6	4	6	6	6	3
Mean pH	7.4	6.3	7.4	7.0	7.3	6.5	7.4	6.5
Mean Specific Gravity	1.050	1.038	1.034	1.039	1.037	1.020	1.046	1.032

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	Control		3.9		11.8		39.5	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals Assessed	5	4	4	5	5	5	5	4
Organ Weights								
Adrenal (absolute) (grams)	0.090	0.075	0.071	0.080	0.088	0.082	0.080	0.085
Adrenal (relative) (per body weight) (%)	0.018	0.028	0.014	0.027	0.016	0.029	0.016	0.029
Heart (absolute) (grams)	1.693	1.081	1.695	1.104	1.763	1.202	1.690	1.206
Heart (relative) (per body weight) (%)	0.35	0.41	0.33	0.37	0.32	0.42	0.34	0.42
Testes / Ovary (absolute) (grams)	4.219	0.099	4.357	0.140	4.547	0.133	4.348	0.141
Testes / Ovary (relative) (per body weight) (%)	0.86	0.04	0.86	0.05	0.83	0.05	0.88	0.05
Spleen (absolute) (grams)	0.924	0.581	0.992	0.657	0.978	0.619	0.889	0.717
Spleen (relative) (per body weight) (%)	0.19	0.22	0.20	0.22	0.18	0.22	0.18	0.25
Mandibular Salivary Glands (absolute) (grams)	0.887	0.552	0.964	0.564	0.940	0.561	0.945	0.542
Mandibular Salivary Glands (relative) (per body weight) (%)	0.18	0.21	0.19	0.19	0.17	0.19	0.19	0.19
Number of Animals Assessed	5	4	4	5	5	5	5	4
Organ Weights								
Liver (absolute) (grams)	14.687	7.525	15.246	8.054	16.949	8.379	16.062	8.516
Liver (relative) (per body weight) (%)	3.0	2.8	3.0	2.7	3.1	2.9	3.2	3.0

ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine aminotransferase; APTT = activated partial thromboplastin time; AST = aspartate aminotransferase; BUN = blood urea nitrogen;
CTD = Common Technical Document; GGT = gamma glutamyltransferase; GLP = Good Laboratory Practice; Hb = hemoglobin; Hct = hematocrit;
MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; PT = prothrombin time;
RBC = red blood cell count; t.i.d. = three times per day; WBC = white blood cell count.
[a]$p < 0.05$ vs. Group 1 Controls.
‡ Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

表 2.6.7.6-2　9ヵ月間反復投与毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: 9 Month Repeat Dose Oral Toxicology Study of Amifampridine (BMN125) Phosphate in Beagle Dogs		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 9 months	**Study Reference:** S12032
Initial Age: 5.6-6.6 months	**Duration of Postdose:** 1 month for recovery groups	**Location in CTD:** 4.2.3.2.10
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral dosing (t.i.d.)	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** Water for injection	

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**0.53**		**1.0**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Pre-Dose Results								
Number of Animals (all groups)	6	6	6	6	6	6	6	6
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Group Mean Body Weight Changes (kg/day)								
Day (-9) to Day (-2)	0.08	0.05	0.05	0.02	0.07	0.04	0.05	0.03
Day (-2) to Day 2	-0.07	-0.01	-0.09	-0.05	-0.18	-0.07	-0.07	-0.08
Food Consumption (group means in grams per day)								
Week -1 to Week 0	250	246	246	238	249	241	250	239
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals Assessed	6	6	6	6	6	6	6	6
Hematology								
WBC (10^3/µL)	10.41	9.21	10.47	8.99	9.27	9.72	8.91	9.56
RBC (10^6/µL)	6.82	7.13	6.96	7.32	6.87	7.24	7.30	7.46
Hb (g/dL)	15.2	16.1	15.6	16.3	15.3	16.2	16.4	16.8
Hct (%)	46.8	48.5	48.0	49.9	46.8	49.0	49.9	50.6

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**0.53**		**1.0**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Serum Chemistry								
Sodium (mmol/L)	149	151	149	152	150	153	149	151
Potassium (mmol/L)	4.7	5.2	5.1	5.1	5.0	5.3	5.2	4.9
Chloride (mmol/L)	110	111	109	112	109	112	109	112
Calcium (mg/dL)	11.6	12.1	11.7	12.0	11.9	12.1	11.8	11.8
Phosphorus (mg/dL)	6.5	7.9	7.1	7.4	7.7*	7.3	7.6*	7.3
Glucose (mg/dL)	104	106	120*	114	113	104	113	115
ALT (U/L)	24	31	32	32	29	30	25	37
AST (U/L)	22	30	29	25	26	32	21	29
ALP (U/L)	116	115	104	117	117	92	117	101
Total bilirubin (mg/dL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
GGT (U/L)	3	3	3	3	3	3	3	3
BUN (mg/dL)	11	12	11	12	12	13	11	11
Creatinine (mg/dL)	0.6	0.56	0.57	0.58	0.54	0.55	0.59	0.56
Cholesterol (mg/dL)	206	178	188	175	215	174	207	177
Triglycerides (mg/dL)	41	41	36	36	47	34	38	32
Total protein (g/dL)	6.1	6.3	6.1	6.2	6.1	6.2	6.3	6.3
Albumin (g/dL)	3.4	3.6	3.5	3.6	3.4	3.7	3.6	3.7
Globulin (g/dL)	2.7	2.6	2.7	2.6	2.6	2.5	2.7	2.6

表 2.6.7.6-2　９ヵ月間反復投与毒性試験（続き）

Daily Dose (mg/kg/day)‡	**Control**	**0.53**		**1.0**	**2.0**			
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
4-Week Results								
Toxicity Phase								
Number of Animals (main group plus recovery group)	6	6	6	6	6	6	6	6
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Group Mean Body Weight Changes (kg/day)								
Day 13 to Week 3	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.03
Week 3 to Week 4	0.02	-0.01	0.00	-0.04	0.01	-0.01	-0.01	-0.04
Food Consumption (group means in grams per day)								
Week 0 to Week 1	249	229	244	209	242	218	237	209
Week 1 to Week 2	248	234	246	227	244	235	248	224
Week 2 to Week 3	246	236	245	233	240	240	245	224
Week 3 to Week 4	238	209	239	204	235	215	228	200
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals Assessed	6	6	6	6	6	6	6	6
Hematology								
WBC ($10^3/\mu L$)	8.61	8.24	8.74	9.02	10.03	9.27	9.33	8.68
RBC ($10^6/\mu L$)	7.05	7.25	6.80	7.40	6.71	6.81	7.36	7.68
Hb (g/dL)	16.0	16.7	15.6	17.1	15.4	15.6	16.8	17.7
Hct (%)	47.0	48.9	45.9	50.1	45.2	45.9	49.3	52.4
Serum Chemistry								
Sodium (mmol/L)	147	148	150*	149	151*	152*	152*	154*
Potassium (mmol/L)	4.4	4.5	4.6	4.5	4.6	4.5	4.6	4.7
Chloride (mmol/L)	112	112	113	113	116*	116*	113	114*
Calcium (mg/dL)	11.1	11.4	11.2	11.1	11.3	11.4	11.5*	11.5

Phosphorus (mg/dL)	6.9	7.3	6.8	6.7	6.9	6.4	7.2	6.8
Glucose (mg/dL)	111	118	121	115	114	118	120	120
ALT (U/L)	30	36	30	36	41	32	35	38
AST (U/L)	25	30	25	29	30	29	25	36
ALP (U/L)	85	85	82	87	90	69	83	75
Total bilirubin (mg/dL)	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3
GGT (U/L)	3	3	3	3	3	3	3	3
BUN (mg/dL)	14	15	15	14	14	15	14	14
Creatinine (mg/dL)	0.76	0.68	0.70	0.69	0.69	0.66	0.72	0.69
Cholesterol (mg/dL)	175	166	174	160	183	149	169	159
Triglycerides (mg/dL)	37	39	34	39	36	33	34	36
Total protein (g/dL)	5.9	6.1	6.1	6.1	6.0	5.9	6.3*	6.5*
Albumin (g/dL)	3.3	3.6	3.5	3.6	3.4	3.5	3.6*	3.9*
Globulin (g/dL)	2.6	2.5	2.6	2.5	2.6	2.4	2.8	2.6

表 2.6.7.6-2　９ヵ月間反復投与毒性試験（続き）

Daily Dose (mg/kg/day)‡	**Control**		**0.53**		**1.0**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
39-Week Results								
Toxicity Phase								
Number of Animals (main group plus recovery group)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**5**	**6**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1	0
Mean Group Body Weight Change (kg/day)								
Week 5 to Week 6	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01*	0.01
Week 6 to Week 7	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02
Week 24 to Week 25	-0.01	0.02	-0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Week 38 to Week 39	-0.03	-0.05	-0.03	-0.06	-0.01	-0.03	-0.04	-0.07
Food Consumption (group means in grams per day)								
Week 5 to Week 6	250	223	246	229	243	243	246	227
Week 6 to Week 7	250	225	250	217	243	236	240	231
Week 24 to Week 25	250	248	250	233	247	238	248	245
Week 38 to Week 39 (8 days)	273	211	289	198	286	244	272	200
Clinical Observations (no. findings/no. animals)								
Emesis	17/6	15/6	20/5	29/6	28/6	19/6	29/6	26/6
Diarrhea	41/6	36/6	28/6	48/6	66/6	16/3	26/6	63/6
Sneezing	0	0	7/2	2/2	61/6	12/6	99/6	86/6
Tremors	0	0	0	1/1	1/1	2/2	10/3	4/2
Panting	3/2	8/2	4/2	8/3	11/4	8/2	19/5	15/6
Hypersalivation	0	0	1/1	0	1/1	0	6/2	7/3
Lip-Licking	0	0	0	2/1	12/3	5/3	38/6	27/6
Squinty Eyes	0	1/1	0	0	0	0	4/3	5/3

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**0.53**		**1.0**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals Assessed	6	6	6	6	6	6	5	6
Hematology								
WBC (10^3/μL)	9.25	10.70	10.77	9.14	11.26	11.80	11.53	10.38
RBC (10^6/μL)	8.66	7.83	8.07	8.05	8.12	8.17	8.35	8.24
Hb (g/dL)	19.8	18.7	18.6	18.8	18.6	18.9	19.0	19.2
Hct (%)	60.7	55.9	56.7	56.5	56.8	57.0	57.5	58.3
Serum Chemistry								
Sodium (mmol/L)	147	149	148	148	150*	150	149	149
Potassium (mmol/L)	4.6	4.5	4.4	4.4	4.7	4.4	4.3	4.2
Chloride (mmol/L)	112	112	112	111	113	113	112	113
Calcium (mg/dL)	10.0	10.4	10.1	10.1	10.5*	10.4	10.2	9.9
Phosphorus (mg/dL)	4.4	4.3	3.9	3.5	4.6	3.5	3.3*	2.7*
Glucose (mg/dL)	96	99	113*	105	102	95	106*	105
ALT (U/L)	34	36	40	32	38	34	36	38
AST (U/L)	25	33	30	24	32	35	33	38
ALP (U/L)	65	51	62	57	72	55	57	51
Total bilirubin (mg/dL)	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GGT (U/L)	3	3	3	3	3	3	4	3
BUN (mg/dL)	12	11	14	14	14	14	13	13
Creatinine (mg/dL)	0.78	0.70	0.80	0.75	0.76	0.73	0.83	0.80
Cholesterol (mg/dL)	151	163	163	176	179	166	157	149
Triglycerides (mg/dL)	48	57	43	53	45	53	45	51
Total protein (g/dL)	5.7	6.1	5.8	5.8	6.0	6.0	6.1	6.2
Albumin (g/dL)	3.2	3.6	3.3	3.4	3.4	3.6	3.4	3.6
Globulin (g/dL)	2.5	2.5	2.6	2.4	2.7	2.5	2.7	2.7

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**0.53**		**1.0**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals Assessed	4	4	4	4	4	4	4	4
Organ Weights (percent relative to terminal body weight)								
Salivary Gland (Mandibular)	0.102	0.090	0.105	0.100	0.102	0.123*	0.104	0.112*
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.6-2　９ヵ月間反復投与毒性試験（続き）

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	Control		0.53		1.0		2.0	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
43-Week (1-Month Recovery) Results								
Number of Animals	2	2	2	2	2	2	2	2
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Group Mean Body Weight Changes (kg/day)								
Week 39 to Week 40	0.04	0.03	0.00	0.06	0.00	0.02	0.02	0.03
Week 42 to Week 43	-0.06	-0.02	-0.07	-0.03	-0.03	0.02	-0.05	0.00
Food Consumption (group means in grams per day)								
Week 39 to Week 40	300	234	300	268	300	262	274	223
Week 40 to Week 41	272	269	300	243	300	273	300	273
Week 41 to Week 42	244	280	300	252	300	289	300	265
Week 42 to Week 43 (5 days)	261	239	300	228	340	283	300	230
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals Assessed	2	2	2	2	2	2	2	2
Hematology								
WBC (10^3/μL)	8.47	10.42	10.88	9.95	11.26	8.64	9.66	11.71
RBC (10^6/μL)	6.73	6.83	7.36	6.52	7.08	7.46	7.09	7.32
Hb (g/dL)	15.2	16.8	16.9	15.4	16.5	17.3	16.5	17.3
Hct (%)	45.2	48.0	48.4	44.1	48.0	50.1	47.7	50.1
Number of Animals Assessed	2	2	2	2	2	2	2	2
Serum Chemistry								
Sodium (mmol/L)	151	151	151	150	152	151	151	151
Potassium (mmol/L)	4.7	4.4	4.4	4.4	4.7	4.5	4.4	4.1
Chloride (mmol/L)	117	114	116	115	117	115	115	113
Calcium (mg/dL)	12.0	12.4	11.9	11.9	12.3	12.3	11.6	12.0

Daily Dose (mg/kg/day) ‡	**Control**		**0.53**		**1.0**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Phosphorus (mg/dL)	3.9	4.5	4.7	4.9	5.0	4.8	3.9	4.1
Glucose (mg/dL)	129	110	124	118	120	115	109	122
ALT (U/L)	32	32	39	31	35	40	31	34
AST (U/L)	27	34	30	29	34	38	39	46
ALP (U/L)	53	58	98	72	76	72	55	40
Total bilirubin (mg/dL)	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
GGT (U/L)	3	4	3	3	3	3	3	3
BUN (mg/dL)	12	15	16	18	17	14	16	16
Creatinine (mg/dL)	0.93	0.85	0.87	0.84	0.89	0.74	0.96	0.81
Cholesterol (mg/dL)	150	180	183	175	177	155	147	144
Triglycerides (mg/dL)	29	51	46	43	47	50	55	40
Total protein (g/dL)	6.7	7.1	7.0	7.0	7.0	7.1	6.7	7.2
Albumin (g/dL)	3.5	4.0	3.9	3.8	4.0	4.1	3.7	3.7
Globulin (g/dL)	3.2	3.1	3.1	3.2	3.0	3.1	3.0	3.5
Organ Weights (relative to terminal body weight)	-	-	-	-	-	-	-	-

ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; BUN = blood urea nitrogen; CTD = Common Technical Document; GGT = gamma glutamyltransferase; GLP = Good Laboratory Practice; Hb = hemoglobin; Hct = hematocrit; RBC = red blood cell count; t.i.d. = three times per day; WBC = white blood cell count.

*$p \leq 0.05$ using Dunnett's test.

‡ Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

2.6.7.7 *In vitro* 遺伝毒性試験

表 2.6.7.7-1 *In Vitro* 遺伝毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Mutagenicity Test on Salmonella Typhimurium His Using B.N. Ames's Technique with 3,4-Diamino Pyridine		
Test for Induction of: Bacterial reverse mutation	**Number of Independent Assays:** 2	**Study Reference:** [redacted] 010310
Strains: *S. typhimurium*	**Number of Replicate Cultures:** 3	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1.01
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liverS9, 10% v/v	**Number of Cells Analyzed/Culture:** Total colonies/plate	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle for Test Article: Distilled water	**Vehicle for Positive Controls:** DMSO	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted] (Assay #1); [redacted] 20[redacted] (Assay #2)
Treatment: 48-hour treatment (initial and repeat assays) in the presence and absence of S9		**Additional Information:** None
Cytotoxic Effects: None for both assays		**Genotoxic Effects:** None

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SE)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Initial Assay							
Without S9 activation	Vehicle	0	14.0 (5.0)	117.8 (14.9)	159.0 (11.5)	5.0 (1.9)	5.8 (2.2)
	Amifampridine Phosphate	50	18.0 (4.0)	117.3 (7.2)	128.7 (11.8)	9.0 (2.0)	3.7 (1.2)
		150	11.3 (3.2)	120.7 (15.4)	163.7 (14.8)	8.7 (4.7)	5.0 (1.7)
		500	10.7 (4.5)	127.3 (6.7)	140.7 (32.7)	8.7 (2.9)	2.0 (0.0)
		1500	15.3 (5.5)	136.7 (1.5)	149.3 (12.9)	3.3 (2.3)	2.3 (1.2)
		5000	17.0 (8.2)	139.3 (6.7)	161.0 (28.5)	9.3 (3.1)	6.0 (2.6)
	Sodium azide	1.0	NA	479.3 (95.9)	NA	321.7 (13.7)	NA
	9-Amino-acridine	50	NA	NA	NA	NA	874.7 (191.6)
	2-Nitrofluorene	2.0	941.3 (576.1)	NA	NA	NA	NA
	Mitomycin C	0.125	NA	NA	3280.0 (132.2)	NA	NA
With S9 activation	Vehicle	0	21.8 (2.2)	114.2 (7.7)	312.2 (29.5)	9.8 (1.7)	5.2 (0.8)
	Amifampridine Phosphate	50	24.3 (1.2)	135.0 (19.0)	305.3 (48.4)	9.3 (1.2)	4.7 (1.5)
		150	22.7 (4.2)	137.0 (19.7)	293.3 (30.0)	11.0 (3.0)	2.7 (0.6)

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SE)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
		500	26.7 (1.2)	121.3 (4.7)	320.0 (40.6)	7.7 (4.0)	4.3 (1.2)
		1500	24.3 (9.5)	111.3 (6.5)	290.7 (36.1)	7.7 (3.2)	2.7 (2.1)
		5000	19.3 (1.5)	134.3 (7.5)	298.7 (30.3)	8.7 (2.9)	4.3 (2.1)
	2-Anthramine	2.0	2606.7 (433.3)	2545.3 (106.8)	NA	561.7 (39.6)	154.3 (16.8)
	Benzo[a]pyrene	2.0	NA	NA	1751.3 (568.1)	NA	NA
Independent Repeat Assay							
Without S9 activation	Vehicle	0	15.3 (2.7)	114.5 (9.7)	259.0 (18.0)	11.8 (3.5)	3.7 (1.2)
	Amifampridine Phosphate	50	15.0 (2.0)	112.7 (5.7)	260.7 (20.0)	14.3 (1.2)	2.3 (1.5)
		150	14.7 (4.0)	111.0 (2.0)	262.7 (33.5)	12.7 (2.9)	2.3 (0.6)
		500	15.0 (1.0)	108.3 (2.3)	264.0 (16.5)	11.0 (2.6)	4.7 (1.2)
		1500	13.3 (3.8)	115.3 (4.6)	257.3 (31.1)	10.7 (2.1)	3.0 (2.0)
		5000	12.3 (4.0)	110.0 (12.2)	255.0 (11.8)	11.3 (3.8)	3.3 (2.5)
	Sodium azide	1.0	NA	486.7 (22.0)	NA	464.0 (24.0)	NA
	9-Amino-acridine	50	NA	NA	NA	NA	1627.0 (154.0)
	2-Nitrofluorene	2.0	744.0 (159.8)	NA	NA	NA	NA
	Mitomycin C	0.125	NA	NA	2358.7 (159.1)	NA	NA
With S9 activation	Vehicle	0	15.5 (3.9)	92.5 (9.1)	285.8 (24.1)	10.5 (4.5)	6.0 (1.5)
	Amifampridine Phosphate	50	21.3 (4.7)	86.3 (12.7)	304.3 (14.2)	11.3 (3.5)	3.7 (1.2)
		150	19.7 (7.0)	93.0 (7.0)	259.3 (39.3)	9.7 (3.2)	4.7 (3.8)
		500	19.0 (6.6)	102.3 (16.6)	260.7 (32.4)	11.0 (4.4)	3.7 (1.5)
		1500	15.0 (2.0)	96.0 (1.7)	258.0 (19.3)	6.0 (2.0)	2.7 (0.6)
		5000	12.3 (4.2)	106.7 (3.8)	280.0 (23.1)	13.0 (6.6)	5.0 (1.7)
	2-Anthramine	1.0	880.0 (59.7)	1437.3 (206.2)	NA	133.0 (12.5)	168.7 (26.6)
	Benzo[a]pyrene	2.0	NA	NA	1036.0 (65.8)	NA	NA

CTD = Common Technical Document; DMSO = dimethysulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable.

表 2.6.7.7-2　*In Vitro* 遺伝毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Mutagenicity Test on Bacteria (Salmonella typhimurium his) Using B.N. Ames Technique (Strains TA1538 and TA98 with Metabolic Activation by Hamster S9) with 3,4-Diamino Pyridine		
Test for Induction of: Mutagenic Activity	**Number of Independent Assays:** 2	**Study Reference:** [redacted] 010506
Strains: *S. typhimurium*	**Number of Replicate Cultures:** 3 plates	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1.02
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced hamster liver S9, 10% v/v	**Number of Cells Analyzed/Culture:** Total colonies/plate	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle for Test Article: Distilled Water	**Vehicle for Positive Controls:** DMSO	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]; [redacted] 20[redacted]
Treatment: 48-hour incubation in the presence of S9 with and without pre-incubation (1 hour)		**Additional Information:** None
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: No Mutagenic Activity		

48-hours with S9 (with or without Pre-Incubation)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	TA98 Mean Revertants/Plate	TA1538 Mean Revertants/Plate
Without PreIncubation	Vehicle	0	19.3	6.8
	Amifampridine Phosphate	50	18.3	6.7
		150	18.3	5.0
		500	17.7	9.7
		1500	15.7	9.3
		5000	13.0	8.3
	Benzidine	100	342.0	385.3
With Pre-Incubation	Vehicle	0	16.0	4.0
	Amifampridine Phosphate	50	17.0	5.7
		150	14.0	5.0
		500	12.0	1.3
		1500	18.0	3.0
		5000	20.0	6.0
	Benzidine	50.0	539.0	418.7

CTD = Common Technical Document; DMSO = dimethysulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice.

表 2.6.7.7-3　*In Vitro* 遺伝毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Mutation Assay at the TK Locus in L5178Y Mouse Lymphoma Cells Using a Microtiter Cloning Technique (Trifluorothymidine Resistance) with 3,4-Diaminopyridine		
Test for Induction of: Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:** 2	**Study Reference:** [redacted] 010515
Strains: L5178Y Mouse Lymphoma Cells	**Number of Replicate Cultures:** 2	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1.03
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9, 10% v/v	**Number of Cells Analyzed/Culture:** 10^6 cells	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle for Test Article: FM0 (Fischer medium)	**Vehicle for Positive Controls:** Distilled water	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted] to [redacted] 20[redacted]
Treatment: 3- and 24-hour treatment in the absence of S9 (cells harvested immediately after treatment) and 3-hour treatment in the presence of S9.		**Additional Information:** None
Cytotoxic Effects: The test was performed at the maximum concentration compatible with its cytotoxicity, i.e., 2000 µg/mL in the absence of metabolic activation for the 3-hour treatment, 3000 µg/mL for the 24-hour continuous treatment, and 2000 µg/mL in the presence of metabolic activation, as well as at the 4 doses below this with a ratio <2.		
Genotoxic Effects: Weak Mutagenic Activity after 24-hour continuous treatment without metabolic activation		

3-hour without S9				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Cytotoxicity Mean Relative Total Growth (%)**	**Mean Mutation Frequency × 10^{-6} cells**
Without S9 activation	Vehicle	0	100.0	101.3
	Amifampridine Phosphate	700.3	77.4	71.9
		910.3	96.0	98.6
		1183.4	70.8	82.5
		1538.5	62.3	87.7
		2000	31.9	92.7
	Methyl methanesulfonate	10.0	70.7	539.1

3-hour with S9				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Cytotoxicity Mean Relative Total Growth (%)**	**Mean Mutation Frequency × 10^{-6} cells**
With S9 activation	Vehicle	0	100.0	120.9
	Amifampridine Phosphate	700.3	78.8	83.3
		910.3	66.2	99.2
		1183.4	61.6	101.4
		1538.5	28.3	82.9
		2000	15.7	86.4
	Cyclophosphamide	2.0	80.0	692.8
24-hour without S9				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Cytotoxicity Mean Relative Total Growth (%)**	**Mean Mutation Frequency × 10^{-6} cells**
Without S9 activation	Vehicle	0	100.0	102.6
	Amifampridine Phosphate	592.6	100.7	100.9
		888.9	114.6	112.7
		1333.3	113.3	128.5
		2000	52.7	184.7
		3000	48.6	290.5
	Methyl methanesulfonate	2.0	107.1	623.4

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice.

2.6.7.8 *In vivo* 遺伝毒性試験

表 2.6.7.8-1 *In vivo* 遺伝毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Measurement of Unscheduled DNA Synthesis (UDS) in Rat Hepatocytes Using an *in vivo* Procedure with 3,4-Diaminopyridine		
Test for Induction of: *In Vivo* Unscheduled DNA Synthesis in Male Fischer Rat Hepatocytes	**Treatment Schedule:** Single dose	**Study Reference:** [redacted] 020404
Species/Strain: Male Fischer rats	**Sampling Time:** Twice (2-4 and 12-16 hours after dosing)	**Location in CTD:** 4.2.3.3.2.01
Age: 5 to 6 weeks	**Method of Administration:** Oral in water	**GLP Compliance:** Yes
Cells Evaluated: Hepatocytes	**Vehicle/Formulation:** Distilled water	**Date of Dosing:** [redacted] 20[redacted]; [redacted] 20[redacted]
No. of Cells Analyzed/Animal: at least 150		**Additional Information:** Male mice only
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		**Evidence of Exposure:** Not assessed in this study.
Genotoxic Effects: None		

Test Article	**Sex**	**Dose* (mg/kg)**	**Number of Animals**	**Net Nuclear Grain Count of cells in repair (NNG>5) Mean (SD)**	**Percent Cells in Repair (NNG>5) Mean (SD)**
2-4-Hour Time Point					
Vehicle	Male	0	3	5.90 (0.13)	0.81 (0.58)
Amifampridine Phosphate	Male	20	3	6.35 (1.07)	1.32 (0.80)
	Male	40	3	5.69 (0.00)	1.47 (0.19)
Dimethylhydrazine (DMH)	Male	10	3	16.00 (6.07)	88.43 (5.29)
12-16-Hour Time Point					
Vehicle	Male	0	3	6.09 (0.07)	1.27 (0.72)
Amifampridine Phosphate	Male	20	3	5.81 (0.00)	0.22 (0.17)
	Male	40	3	5.92 (0.13)	1.22 (0.77)
2-Acetamidofluorene (2-AAF)	Male	25	3	9.78 (3.39)	58.48 (4.46)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; NNG = Net Nuclear Grain Count; SD = standard deviation.

* Amifampridine phosphate dose levels equivalent to amifampridine free base dose levels of 10.5 and 21.1 mg/kg, respectively.

表 2.6.7.8-2　*In vivo* 遺伝毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Mutagenicity Study Using the Micronucleus Test in Rat with 3-4 Diaminopyridine		
Test for Induction of: Bone-marrow micronuclei	**Treatment Schedule:** 20 - 40 - 80 mg/kg/day (×3)	**Study Number:** [redacted] 010417
Species/Strain: Male and female Sprague-Dawley rats	**Sampling Time:** 24 h after last treatment	**Location in CTD**: 4.2.3.3.2.02
Age: 5 to 6 weeks	**Method of Administration:** Oral in water	**GLP Compliance:** Yes
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes	**Vehicle/Formulation:** Distilled water	**Date of Dosing:** [redacted]20[redacted] to [redacted]20[redacted]
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000 polychromatic erythrocytes		**Additional Information:** 5 males, 5 females per group
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		**Evidence of Exposure:** Not assessed in this study.
Genotoxic Effects: No clastogenic activity		

24-Hour Time Point

Test Article	Sex	Dose (mg/kg/day)	Number of Animals	PCE/NCE Mean (SD)	MN-PCEs Mean (SD)
Vehicle	Male	0 (×3)	5	3.46 (0.65)	0.7 (0.27)
Amifampridine Phosphate	Male	20 (×3)	5	3.18 (0.53)	0.2 (0.27)
	Male	40 (×3)	5	3.3 (0.82)	0.5 (0.35)
	Male	80 (×3)	5	3.39 (0.9)	0.2 (0.45)
Cyclophosphamide (in saline)	Male	25	5	1.82 (0.31)	21.5 (3.57)
Vehicle	Female	0 (×3)	5	2.94 (1.01)	0.4 (0.42)
Amifampridine Phosphate	Female	20 (×3)	5	2.99 (0.68)	0.4 (0.42)
	Female	40 (×3)	5	2.79 (1.32)	0.4 (0.42)
	Female	80 (×3)	5	1.93 (0.77)	0.5 (0.35)
Cyclophosphamide (in saline)	Female	25	5	1.07 (0.41)	11.5 (1.77)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; MN-PCEs = Number of micronucleated cells observed per 1,000 polychromatic erythrocytes examined; PCE = polychromatic (immature) erythrocytes; NCE = normochromatic erythrocytes; SD = standard deviation.

* Amifampridine phosphate dose levels equivalent to amifampridine free base dose levels of 10.5, 21.1, and 42.1 mg/kg, respectively.

2.6.7.9　がん原性試験（短期試験）

表 2.6.7.9-1　短期予備試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Mouse (CD-1, CByB6FL (non-transgenic littermates	Oral, (sterile water) Dietary	7 days	Phase 1 Oral and dietary 0 (only oral), 10, 20, and 40 mg free base/kg/day Phase 2 Dietary 60 and 100 mg free base /kg/day	Phase 1 12 / males (control) 36 / males (test article) Phase 2 14	Oral ≥40 (males) Dietary ≥100	No mortalities. No abnormalities in clinical signs, changes in body weight or food consumption, or abnormalities at gross necropsy in any group following oral or dietary administration.	20[redacted]9237 (non-GLP) (4.2.3.4.2.01)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; NOAEL = no observed adverse effect level.

表 2.6.7.9-2　忍容性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle /Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Animals/ Sex/Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Mouse / CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type	Dietary	7 and 28 days	7-day Phase 0, 300, 600, 900, and 1500 mg/kg/day (157.9, 315.8, 473.7, and 789.5 mg free base/kg/day) 28-day Phase 30, 100, and 300 mg/kg/day (15.8, 52.6, and 157.9 mg free base/kg/day)	7-day Phase 5 28-day Phase 10 (Main) and 3/point (TK)	7-day Phase ND 28-day Phase 30	7-day Phase Mortality was observed at ≥ 900 mg/kg/day in males and at ≥ 600 mg/kg/day in females. Clinical signs observations in males and/or females included tremors, abnormal respiratory rate, labored breathing, hunched posture, decreased activity, and closed eyes noted at ≥ 600 mg/kg/day. Decrease in mean body weights and food consumption at 600 mg/kg/day. 28-day Phase No mortalities. Decreases in mean body weights noted at ≥ 100 mg/kg/day. Decreases in red blood cell, hemoglobin, and hematocrit values in females at ≥ 30 mg/kg/day. No changes in clinical signs, clinical chemistry parameters, gross pathology findings, organ weights, or microscopic pathology findings were noted.	20[redacted]9230 (GLP) (4.2.3.4.2.02)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; ND = not determined; NOAEL = no observed adverse effect level.

表 2.6.7.9-3　短期試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses* (mg/kg/day)	Animals/ Sex/Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Rat (Sprague-Dawley)	Dietary	3 weeks	0, 4, 12, 40, and 70	9	ND	No mortalities. Amifampridine phosphate administered to rats via basal diet containing amifampridine free base as high as 70 mg/kg/day (975 ppm) was associated with transient reductions in food intake and body weight gain. Because adaptation occurred over a period of a few days, all diet combinations ≤ 975 ppm were considered palatable with no adverse effects.	BMN125-13-011 (non-GLP) (4.2.3.4.2.03)

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; ND = not determined; NOAEL = no observed adverse effect level.

*　Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

2.6.7.10 がん原性試験（長期試験）

表 2.6.7.10-1　26 週間反復投与がん原性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: A 26-week Carcinogenicity Study of Amifampridine by DietaryAdministration in CByB6F1/Tg rasH2 Hemizygous Mice		
Species/Strain: Mouse/CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (Main) CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type (TK)	**Duration of Dosing:** 26 weeks	**Study Number:** 20[redacted]9225
Initial Age: 5 weeks at initiation of dosing	**Method of Administration:** Dietary	**Location in CTD:** 4.2.3.4.1.01
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** Diet	**GLP Compliance:** Yes
Basis for High-Dose Selection: The high dose level was selected based on previous palatability and tolerability studies in mice.	**Treatment of Controls:** Basal diet	**Special Features:** None

Daily Dose[a] (mg/kg)		**Control**		**1.58**		**5.26**		**15.8**	
Sex		**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicokinetic Phase:									
Number of Animals/point		3	3	3	3	3	3	3	3
C_{max} (ng/mL):	**Day 1**	0	0	4.39	6.87	13.0	23.5	52.9	61.3
	Day 183	0	0	1.68	2.97	7.47	10.6	22.5	21.5
AUC_{last} (ng·h/mL):	**Day 1**	0	0	49.2	65.0	133	314	694	666
	Day 183	0	0	NR1[‡]	NR1[‡]	80.9	115	260	293
Carcinogenicity Phase:									
Number of Animals:									
At Start		25	25	25	25	25	25	25	25
Died/Sacrificed Moribund		0	1	1	0	0	0	0	2
Terminal Sacrifice		25	24	24	25	25	25	25	23
Survival (%)		100	96	96	100	100	100	100	92
Clinical Observations		-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[§]		37.64 g	27.37 g	0.35	0.28	2.20	-4.19	0	-4.41
Food Consumption (%)[§]		3.79	3.42	2.70	45.61**	11.62	26.90	1.06	26.92

Daily Dose[a] (mg/kg)	Control		1.58		5.26		15.8	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number Evaluated	25	25	25	25	25	25	25	25
Number of Animals with Neoplastic Lesions								
Stomach: Papilloma	0	0	1	1	0	0	0	0
Thoracic body cavity: Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Brain: Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidney: Hemangiosarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Mandibular lymph node: Hemangiosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Ovary: Hemangiosarcoma	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
Skin: Hemangiosarcoma	0	1	0	0	0	1	0	0
Spleen: Hemangiosarcoma	1	2	2	0	0	0	0	0
Testis: Hemangiosarcoma	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
Lung: Bronchioloalveolar adenoma	4	0	4	5	3	0	3	2
Bronchioloalveolar carcinoma	0	1	0	0	0	0	1	0
Harderian gland: adenoma	0	0	0	0	1	1	0	0
Thyroid gland: Follicular cell adenoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Tongue: Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Noteworthy Findings								
Macroscopic Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Non-neoplastic Findings	-	-	-	-	-	-	-	-

AUClast = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to the last measurable concentration; Cmax = maximum plasma concentration;
CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable.

a Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

- No noteworthy findings.

** $p < 0.01$ (control group vs. all test article-treated groups).

‡ Results not reported (less than 3 quantifiable concentrations of amifampridine at consecutive time points).

§ Mean data are presented from the end of the 26-week treatment period (body weights: Day 183; food consumption: Days 176 - 182). For controls, group means are shown, and units for food consumption are g/animal/day. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.10-2　104 週間反復投与がん原性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: 104-Week Dietary Carcinogenicity Study with BMN 125 in Rats		
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 104 weeks	**Study Number:** 8264515
Initial Age: 5 weeks at initiation of dosing	**Method of Administration:** Dietary	**Location in CTD:** 4.2.3.4.1.02
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** Diet	**GLP Compliance:** Yes
Basis for High-Dose Selection: Toxicity-based endpoints from previous studies in rats.	**Treatment of Controls:** Basal diet	**Special Features:** None

Daily Dose[a] (mg/kg)	**Control**		**8**		**25**		**80/55**	**60/55**
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicokinetic Phase:								
Number of Animals	6	6	6	6	6	6	6	6
C_{max} (ng/mL): Week 52	0	0	9.55	13.9	73.5	116	392	565
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL): Week 52	0	0	127	149	762	1120	4820	7000
Carcinogenicity Phase:								
Number of Animals:								
At Start	60	60	60	60	60	60	60	60
Died/Sacrificed Moribund	32	31	19	21	15	24	17	15
Terminal Sacrifice	28	29	41	39	45	36	43	45
Survival (%)	47	48	68	65	75	60	72	75
Body Weight (%)[§]	582 g	367 g	-9*	-10*	-14*	-24*	-20*	-27*
Food Consumption (%)[§]	21	15	1	0	-27*	-15	-21*	-6
Number Evaluated	60	60	60	60	60	60	60	60
Number of Animals with Neoplastic Lesions								
Heart: Malignant endocardial schwannoma	0	0	0	0	1	0	0	2
Harderian gland: Malignant schwannoma	0	0	0	0	0	0	1	1
Skin/Subcutis: Malignant schwannoma	0	0	0	0	1	0	1	0
Benign schwannoma	0	0	0	0	1	0	0	0

Daily Dose[a] (mg/kg)		Control		8		25		80/55	60/55
Sex		**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Cervix:	Malignant schwannoma	NA	0	NA	1	NA	1	NA	3
Uterus:	Malignant schwannoma	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0
	Benign adenoma, endometrial	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
	Malignant carcinoma, endometrial	NA	0	NA	3	NA	13	NA	9
	Malignant squamous cell carcinoma	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
Clitoral gland: Malignant schwannoma		NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
Mandibular salivary gland: Malignant schwannoma		0	0	0	0	0	0	0	1
Mammary gland: Benign fibroadenoma		NA	38	NA	29	NA	20	NA	11
Pituitary gland: Benign adenoma		9	17	11	25	3	15	6	5
Adrenal medulla:	Benign pheochromocytoma	12	0	7	1	5	2	1	2
	Malignant pheochromocytoma	1	1	2	0	1	0	0	0
Pancreas:	Benign adenoma, islet cell	6	2	1	2	4	1	2	0
	Malignant carcinoma, islet cell	2	0	1	0	1	0	0	0
Noteworthy Findings									
Gross Pathology									
Cervix: Mass		NA	0	NA	1	NA	2	NA	2
Mammary gland: Mass		NA	37	NA	32	NA	21	NA	14
Pituitary gland: Mass		2	13	4	14	0	6	3	1
Seminal vesicle: Small		8	NA	5	NA	2	NA	1	NA
Testis: Small		8	NA	6	NA	3	NA	2	NA
Uterus: Mass		NA	1	NA	2	NA	7	NA	5
Histopathology – NonNeoplastic Lesions									
Uterus:	Dilatation	NA	5	NA	14	NA	18	NA	17
	Inflammation, chronic	NA	4	NA	11	NA	18	NA	13
Heart:	Cardiomyopathy	10	0	7	1	5	0	0	1
Kidney:	Chronic progressive nephropathy	49	19	51	19	47	10	24	6
Testis:	Atrophy/degeneration	18	NA	10	NA	7	NA	6	NA

Daily Dose[a] (mg/kg)		Control		8		25		80/55	60/55
Sex		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
	Polyarteritis	20	NA	21	NA	14	NA	1	NA
Eye:	Retinal atrophy	0	3	1	2	0	1	0	12

$AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration versus time-curve from time zero to 24 hours post-dose; C_{max} = maximum plasma concentration;
CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable.

[a] Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

* $p < 0.05$ (control group vs. all test article-treated groups).

§ Mean data are presented from the end of the 104-week treatment period. For controls, group means are shown, and units for food consumption are g/animal/day. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11-1　重要な試験以外の試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Species (Strain)	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dosing Period (Duration)	Doses* (mg/kg/day)	No./Group	Noteworthy Findings	Study Reference (GLP Status); Location in CTD
Embryo-fetal development range-finder	Rabbit (NZW)	Oral gavage (reverse osmosis water)	Up to 13 days	0, 1.6, 4.74, 15.9, and 47.4	6 females	• Administration of amifampridine at 15.9 mg/kg/day for 13 consecutive days resulted in no mortalities or adverse clinical signs. Only transient decreases in body weight and food consumption were observed. • Results indicated that 15.9 mg/kg/day is a tolerable dose in rabbits.	BMN125-13-013 (non-GLP) 4.2.3.5.2.01
Embryo-fetal development range-finder	Rabbit (NZW)	Oral gavage (reverse osmosis water)	GD 7 through 20	0, 4.74, 15.9, and 30	8 females	• At 5.3 and 10 mg/kg/dose, BMN 125 administration was associated with CNS-related clinical observations, including adverse effects of entire body tremors and convulsions, resulting in single mortalities in the mid and high-dose groups. At 10 mg/kg/dose (30 mg/kg/day), BMN 125 treatment resulted in reversible decreases in body weight, body weight gain and food consumption. • Four mortalities on study; two were attributed to BMN 125 treatment (one female each in the 5.3 and 10 mg/kg/dose groups). The other mortalities were a result of a gavage error (control female), and fur ingestion leading to a gastrointestinal blockage (10 mg/kg/dose female).	BMN125-13-014 (non-GLP) 4.2.3.5.2.02

CTD = Common Technical Document; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; NZW = New Zealand White.

* Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験

表 2.6.7.12-1　受胎能及び初期胚発生に関する試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Combination Fertility and Developmental Toxicity Study of BMN 125 Administered to Rats by Oral Gavage		
Design similar to ICH S5A 4.1.1? Yes	**Duration of Dosing:** Main Study and TK males were dosed for 4 weeks prior to mating, 2 weeks during the mating period, and 4 weeks after mating up to the day prior to termination. Males were dosed for more than 10 weeks prior to necropsy. Main Study females were dosed for 2 weeks prior to mating, 2 weeks during the mating period, and through GD 17. Time-mated TK females were dosed from GD 6-17.	**Study Reference:** BMN125-13-012
Species/Strain: Male and female Crl:CD(SD) rats		**Location in CTD:** 4.2.3.5.1.01
Initial Age: At initiation of dosing, the males were 10 weeks old, and their body weights ranged from 299 to 353 grams. At initiation of dosing, the Main Study females were 12 weeks old and their body weights ranged from 245 to 312 grams. The TK females were 11 weeks old at the initiation of dosing and their body weights ranged from 226 to 270 grams. **Day of Mating:** 14 weeks	**Day of C-Section:** GD 21	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: M – [redacted] 20[redacted] F – [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage t.i.d.	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** Reverse osmosis water.	
No Observed Adverse Effect Level[††]**:** **F_0 Males:** 39.6 mg/kg/day (13.2 mg/kg/dose) **F_0 Females:** 39.6 mg/kg/day (13.2 mg/kg/dose) **F_1 Litters:** 39.6 mg/kg/day (13.2 mg/kg/dose)		

Daily Dose (mg/kg/day) [††]	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
Males				
Number Evaluated	25	25	25	25
Number Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations (no. of animals; from PP Day 23 to sacrifice)				
Perioral Twitching	0	0	0	16
Excessive Grooming	0	0	0	9

Daily Dose (mg/kg/day) ††	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
Front Leg Twitching	0	0	0	4
Necropsy Observations (number of animals examined)	25	25	24	25
Epididymis				
Small	1	0	1	0
Testis				
Discolored	0	0	1	0
Small	1	0	2	0
Soft	0	0	1	0
Body Weight Gain per Interval (mean change in grams)				
Number Evaluated	25	25	25	25
PM Day 0 to 3	17.6	20.0	19.7	19.7
PM Day 3 to 7	25.1	27.0	24.2	24.2
PM Day 7 to 10	21.5	21.6	21.6	20.6
PM Day 10 to 14	21.5	23.5	24.9	22.6
PM Day 14 to 17	14.0	16.6	13.9	14.1
PM Day 17 to 21	19.5	17.0	19.0	17.0
PM Day 21 to 24	16.8	17.2	14.8*r	13.2*r
PM Day 24 to 28	18.2	18.6	17.8	17.7
PM Day 28 to PR Day 3	1.8	4.0	5.7	2.3
PR Day 3 to 7	18.5	21.7	17.1	20.3
PR Day 7 to 10	13.2	14.2	15.1	11.5
PR Day 10 to PP Day 0	15.4	16.3	14.4	15.7
PP Day 0 to 3	13.5	12.8	12.2	11.6
PP Day 3 to 7	12.4	14.2	12.7	12.1
PP Day 7 to 10	10.4	8.9	11.1	6.8*H
PP Day 10 to 14	7.6	9.1	7.5	3.6
PP Day 14 to 17	8.4	11.9*H	9.3	10.7
PP Day 17 to 21	9.1	8.9	9.5	9.4

Daily Dose (mg/kg/day) ††	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
PP Day 21 to 24	8.9	8.2	10.3	9.6
PP Day 24 to 28	9.1	12.4	7.3	9.2
PM Day 0 to 28	154.3	161.6	156.0	149.1
PM Day 0 to PP Day 28	282.6	304.3	288.2	271.8
Changes in Food Consumption (mean grams/interval)				
PM Day 0 to 7	371.3	375.1	375.4	365.4
PM Day 7 to 14	384.8	387.6	387.3	380.8
PM Day 14 to 21	389.0	395.8	393.4	387.5
PM Day 21 to 28	404.4	403.5	398.1	388.6
PP Day 0 to 7	207.0	210.3	207.3	206.6
PP Day 7 to 14	198.7	209.7	203.8	194.3
PP Day 14 to 21	201.4	210.6	203.3	198.4
PP Day 21 to 28	203.8	211.5	207.0	205.1
Number of Males that Mated	24	24	22	22
Number of Males Which Sired at Least 1 Litter	23	23	20	21
Mean Pre-Coital Interval (days)	-	-	-	-
Male Fertility Index (%)	92	92	80	84

表 2.6.7.12-1　受胎能及び初期胚発生に関する試験（続き）

Daily Dose (mg/kg/day) ††	Control	3.9	12	39.6
Females				
Number Evaluated	25	25	25	25
Number of Females with Evidence of Mating	24	24	23	24
Number Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations:	-	-	-	-
Necropsy Observations (number of animals examined)	25	25	25	25
Uterus				
Abnormal contents	1	0	0	0
Body Weight Gain per Interval (mean change in grams)				
Pre-Mating (number evaluated)	25	25	25	25
Day 0 to 3	3.5	1.7	5.0	3.2
Day 3 to 7	4.6	4.7	3.7	7.1
Day 7 to 10	6.4	4.5	4.6	6.6
Day 10 to 14	6.0	6.6	7.9	9.3
Day 0 to 14	20.5	17.6	21.2	26.3
Gestation (number evaluated)	23	23	20	23
Day 0 to 2	16.1	13.5	15.0	13.0
Day 2 to 4	9.6	8.4	8.5	7.2
Day 4 to 6	7.4	7.1	7.3	4.8*H
Day 6 to 8	7.2	9.3	6.9	6.2
Day 8 to 10	9.2	8.3	9.5	8.3
Day 10 to 12	11.1	11.6	11.2	10.3
Day 12 to 14	10.9	9.6	10.5	11.0
Day 14 to 16	15.8	15.6	16.2	16.5
Day 16 to 18	26.1	28.5	24.9	26.7
Day 18 to 21	40.9	41.6	38.4	42.4

Daily Dose (mg/kg/day) ††	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
Day 0 to 18	113.4	112.0	109.9	104.1
Day 0 to 21	154.3	153.6	148.3	146.5
Changes in Food Consumption – Premating (mean grams/interval)				
Number Evaluated	12	12	12	12
PM Day 0 to 7	272.6	270.5	258.4	271.8
PM Day 7 to 14	276.3	275.2	268.4	268.1
Significant Changes in Food Consumption – Gestation (mean grams/interval)				
Number Evaluated	23	23	20	23
Day 0 to 2	49.7	46.0	46.4	43.8+H
Day 2 to 4	50.4	47.1	45.0+H	43.6#H
Day 4 to 6	50.2	47.2	46.3	42.8#H
Day 6 to 8	52.5	50.6	47.8	44.3#H
Day 8 to 10	53.4	51.1	49.1	45.1#H
Day 10 to 12	53.2	52.2	49.8	46.4+H
Day 12 to 14	55.9	54.0	50.3+H	47.4#H
Day 14 to 16	54.9	54.4	53.7	51.7
Day 16 to 18	56.4	55.0	53.2	51.8
Day 18 to 21	76.1	76.0	71.2	73.4
Number Evaluated	25	25	25	25
Mean Number Estrous Cycles (Pre-Dose) (from 1st Estrus to the next nonconsecutive stage of the same type)	2.4	2.1	2.3	2.5
Mean Number Estrous Cycles (Pre-Mating) (from 1st Estrus to the next nonconsecutive stage of the same type)	2.5	2.6	2.6	2.2
Mean Cycle Length (Pre-Dose) (days)	4.1	4.0	4.0	4.1
Mean Cycle Length (Pre-Mating) (days)	4.1	4.1	4.2	4.4
Mean Pre-Coitus Interval (days)	-	-	-	-
Female Mating Index (%)	96	96	92	96

Daily Dose (mg/kg/day) ††	Control	3.9	12	39.6
Number of Pregnant Females	23	23	20	23
Female Fertility Index (%)	96	92	83	96
Mean Number Corpora Lutea	17.3	16.7	16.6	16.3
Mean Number Implantations	14.7	15.3	14.1	15.4
Mean % Preimplantation Loss	13.8	8.4	14.1	4.8
Mean Number Viable Fetuses	13.7	14.4	13.6	14.7
Mean Early Resorptions	1.0	0.8	0.4	0.7
Mean Late Resorptions	0.0	0.1	0.1	0.0
Dead Fetuses	0	0	0.1	0
Mean % Postimplantation Loss	7.1	6.0	4.0	4.9

CTD = Common Technical Document; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; t.i.d. = 3 times per day.

PM - Premating PR - Pairing PP - Post Pairing

*H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.05 level

+H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.01 level

#H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.001 level

- No noteworthy findings.

Male Fertility Index (%) = (No. of males siring at least 1 litter/ Total No. of males used for mating) × 100

Female Fertility Index (%) = (No. of females with confirmed pregnancy/Total No. of females used for mating) × 100

†† Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生への影響に関する試験

表 2.6.7.13-1　胚・胎児発生への影響に関する試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report title: Definitive Oral Gavage Developmental and Reproductive Toxicity Study in Rabbits: BMN 125 Effects on Embryo-Fetal Development		
Design similar to ICH S5A 4.1.3? Yes	**Duration of Dosing:** GD 7 through 20	**Study Reference:** BMN125-13-015
Species/Strain: Time-mated female Hra:(NZW) SPF rabbits	**Day of C-Section:** GD 29	**Location in CTD:** 4.2.3.5.2.03
Initial Age: 6 months **Day of Mating:** Unable to determine date of GD 0	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** Reverse osmosis water (placebo)	
No Observed Adverse Effect Level †**:** **F_0 Females:** 15.9 mg/kg/day **F_1 Litters:** 30 mg/kg/day	**Special Features:** None	

Daily Dose (mg/kg/day) †	**Control**	**4.74**	**15.9**	**30**
Dams				
Number Pregnant	21	23	24	24
Number Died or Sacrificed Moribund	0	0	2	5
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	1	0
Clinical Observations (GD Day 4 to GD Day 29)				
Abnormal Fecal Production (number of animals)	6	10	17	18
Abnormal Respiration (audible, irregular, and/or rapid) (# of observations)	10	10	26	5
Perioral Twitching (number of animals)	0	0	2	14
Excessive Licking (number of animals)	0	0	1	6
Excessive Grooming and/or Myoclonic Jerking (number of animals)	0	0	0	1
Entire Body Tremors, Head Swaying, Violent Circling (number of animals)	0	0	0	2

Daily Dose (mg/kg/day) †	**Control**	**4.74**	**15.9**	**30**
Necropsy Observations				
Spleen - Abnormal shape	0	0	1	0
Spleen - Discolored	0	0	0	1
Spleen - Large	0	0	0	2
Thoracic Cavity - Abnormal Contents	0	0	0	1
Significant Changes in Body Weight (mean change in grams)				
GD Day 7 to 21	166.7	145.3	-2.6+H	29.0*H
Mean Terminal Body Weight (grams)	3616	3671	3534	3572
Significant Changes in Food Consumption (mean grams/day)				
GD Day 6 to 7	116.7	146.2+r	138.4*r	143.0+r
GD Day 7 to 8	132.5	141.3	108.8+r	87.9+r
GD Day 8 to 9	120.4	129.9	100.2	77.2+H
GD Day 10 to 11	117.1	114.2	80.3*H	89.1
GD Day 11 to 12	120.2	116.5	87.3*r	90.3+r
GD Day 12 to 13	122.1	122.0	83.5+r	84.1+r
GD Day 13 to 14	114.8	132.0	89.4	83.4*r
GD Day 14 to 15	125.1	125.9	94.1*r	78.8+r
Significant Changes in Food Consumption (mean grams/day)				
GD Day 15 to 16	126.1	123.1	95.1	85.4#r
GD Day 18 to 19	120.2	119.7	89.6	100.3*r
Mean Number Corpora Lutea	9.7	9.7	10.4	9.8
Mean Number Implantations	9.2	9.0	9.5	9.5
Mean % Preimplantation Loss	5.4	6.8	8.2	2.8

表 2.6.7.13-1　胚・胎児発生への影響に関する試験（続き）

Daily Dose (mg/kg/day)†	Control	4.74	15.9	30
Litters				
Number Litters Evaluated	21	23	21	19
Mean Number Live Fetuses	8.8	8.4	9.0	9.0
Mean Number Resorptions	0.4	0.6	0.5	0.4
Number Dead Fetuses	0	0	0	0.1
Mean % Postimplantation Loss	4.6	6.3	5.4	4.6
Mean Fetal Body Weight (g)	40.6	41.5	38.6	39.5
Fetal Sex Ratios (% males)	50.1	49.0	49.7	46.3
Fetal Anomalies				
Gross External				
Domed Head				
Number of Fetuses	0	0	1	0
Number of Litters	0	0	1	0
Limb Hyperflexion				
Number of Fetuses	0	0	1	1
Number of Litters	0	0	0	0
Visceral Anomalies (fetus/litter)				
Subclavian artery - absent	1/1	0/0	0/0	0/0
Brain ventricle - absent	0/0	0/0	1/1	0/0
Internal hydrocephaly	0/0	0/0	1/1	0/0
Gallbladder - absent	0/0	1/1	0/0	0/0
Skeletal Anomalies				
Thoracic vertebra - Hemivertebra				
Number of Fetuses	3	1	0	1
Number of Litters	3	1	0	1

Daily Dose (mg/kg/day) †	Control	4.74	15.9	30
Thoracic Centrum - Fused				
Number of Fetuses	2	0	0	0
Number of Litters	2	0	0	0
Rib - Absent				
Number of Fetuses	0	1	0	0
Number of Litters	0	1	0	0
Rib - Interrupted				
Number of Fetuses	0	0	0	1
Number of Litters	0	0	0	1
Ribs - Fused				
Number of Fetuses	1	2	1	0
Number of Litters	1	2	1	0
Sternebra - Fused				
Number of Fetuses	1	0	2	0
Number of Litters	1	0	2	0
Total Affected Fetuses (litters)	8 (8)	5 (5)	7 (7)	3 (3)

CTD = Common Technical Document; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; NZW = New Zealand White.

+H = Significantly different from control (Group 1) at 0.01 level using Dunnett's test; *H = Significantly different from control (Group 1) at 0.05 level using Dunnett's test.

#r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.001 level; +r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.01 level; *r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.05 level.

† Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後発育への影響に関する試験

表 2.6.7.14-1　出生前及び出生後発育への影響に関する試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Report Title: Oral Gavage Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study of BMN 125 in Rats, Including Postnatal Behavioral/Functional Evaluation		
Design similar to ICH S5A 4.1.2? Yes	**Duration of Dosing:** GD 6 through lactation day 20	**Study Reference:** BMN125-13-025
Species/Strain: Crl:CD(SD) rats (time-mated females)	**Day of Mating:** Day 0	**Location in CTD:** 4.2.3.5.3.01
Initial Age: F: 11 weeks (BW range: 221 to 293 grams)	**Day of C-Section (F_1 females):** GD 21	
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level †**:** **F_0 Females:** 12 mg/kg/day **F_1 Males:** 3.9 mg/kg/day **F_1 Females:** 3.9 mg/kg/day	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Formulation: Reverse osmosis water	
	Litters Culled/Not Culled: Culled to 4 animals/sex/litter	

Daily Dose (mg/kg/day) †	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
F_0 Females				
Number Pregnant	25	25	25	25
Number Died or Sacrificed Moribund	1	1	2	3
Number with Total Litter Loss	1	0	2	2
Clinical Observations (# of animals)(gestation/lactation)				
Excessive Chewing	0/0	0/0	0/0	3/0
Excessive Grooming	0/0	0/0	1/0	3/8
Excessive Licking	0/0	0/0	0/0	7/4
Excessive Twitching	0/0	0/0	0/0	3/5
Squinting Eyes	0/0	0/0	1/0	2/0
Tonic Convulsions	0/0	0/0	0/0	1/0
Necropsy Observations (number of animals examined)	- (25)	- (25)	- (25)	- (25)
Gestation Body Weight Changes (Day 0 to 21)	-	-	-	-
Lactation Body Weight Changes (Day 0 to 21)	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg/day) †	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
Gestation Food Consumption (Day 4 to 20)	-	-	-	-
Lactation Food Consumption (Day 0 to 14; grams/day)				
Day 7 to 10	158.6	157.9	152.3	143.0+r
Day 10 to 14	222.0	219.9	211.2	205.5*H
Mean Duration of Gestation (days)	23.0	23.1	23.0	23.0
Abnormal Parturition	0	0	1	0
F_1 Litters (preweaning)				
Number Litters Evaluated	24	24	22	22
Mean Number Pups/Litter	11.24	11.48	11.46	11.48
Mean Number Liveborn Pups/Litter	11.08	11.4	10.71	11.04
Mean Number of Stillborn Pups/Litter	0.16	0.08	0.75	0.44
Postnatal Survival to Day 4 (%)	95	97	90	89
Postnatal Survival to Weaning (%)	96	99	91	92
Mean Pup Body Weights – Day 21 (g) (male/female)	55.47/53.41	54.98/53.48	52.53/51.23	51.19*H/49.67
Mean Pup Sex Ratios - Day 21 (% Males)	50	52	51	52
Pup Clinical Signs	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations	-	-	-	-
F_1 Males (Postweaning)				
Number Evaluated Postweaning	24	24	22	22
Number Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Mean Body Weight Change (g)				
Maturation Day 49 to 56	32.9	31.6	34.3	35.3
Post-Pairing Day 7 to 14	24.8	22.9	20.2	28.1
Mean Food Consumption (g)				
Maturation Day 7 to 14	366.5	335.3#r	359.8#r	357.2#r
Maturation Day 14 to 21	402.8	366.4#r	405.5	403.6#r

Daily Dose (mg/kg/day) †	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
Post-Pairing Day 7 to 14	219.3	219.0	210.3	225.5
Preputial Separation (average days)	43.6	43.3	44.6	44.4
Sensory Function	-	-	-	-
Learning and Memory	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-
Mean Number of Days Prior to Mating	ND	ND	ND	ND
Number of Males that Mated	22	22	21	19
Number of Fertile Males	20	21	21	18
F_1 Females (Postweaning)				
Number Evaluated Postweaning	24	24	22	22
Number Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Mean Premating Body Weight Change (g)				
Maturation Day 49 to 56	11.9	13.0	11.5	15.7
Mean Gestation Body Weight Change (g)				
GD Day 18 to 21	39.5	37.5	42.8	42.4
Mean Premating Food Consumption (g)				
Maturation Day 21 to 28	301.5	275.6	299.8	308.6
Maturation Day 49 to 56	314.1	275.7	313.6	313.2
Mean Gestation Food Consumption (g)				
GD Day 7 to 10	81.6	80.7	79.4	83.7
GD Day 18 to 21	73.9	71.7	76.4	77.3
Mean Age of Vaginal Patency (days)	32.3	32.0	33.3*r	33.2*r
Sensory Function	-	-	-	-
Learning and Memory	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-
Mean Number of Days Prior to Mating	ND	ND	ND	ND

Daily Dose (mg/kg/day) †	**Control**	**3.9**	**12**	**39.6**
Number of Females Sperm Positive	23	23	22	19
Number of Pregnant Females	21	21	22	18
Mean Number Corpora Lutea	16.6	17.7	18.6	16.6
Mean Number Implantations	15.6	14.3	15.3	15.0
Mean % Preimplantation Loss	7.6	15.6	14.9	8.8
F_2 Litters				
Mean Number Live Conceptuses/Litter	15.3	14.0	14.9	14.8
Mean Number Resorptions	0.3	0.3	0.5	0.1
Mean Number of Dead Conceptuses	0	0	0	0.1
Mean % Postimplantation Loss	2.0	1.9	2.9	1.0
Fetal Body Weights (g)	5.55	5.63	5.50	5.47
Fetal Sex Ratios (% males)	54.5	51.8	46.9	49.7
Fetal Anomalies	1	2	1	1

CTD = Common Technical Document; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ND = not determined.

- = No noteworthy findings.

*r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.05 level; +r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.01 level; #r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.001 level.

*H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.05 level.

† Doses are expressed as amifampridine free base dose levels (to convert free base doses to the phosphate salt doses, multiply by 1.9).

2.6.7.15 生殖発生毒性試験：出生児（幼若動物）投与／評価試験

該当なし。幼若動物を用いた毒性試験は実施していない。

2.6.7.16 局所刺激性試験

該当なし。局所刺激性試験は実施していない。

2.6.7.17 その他の毒性試験

表 2.6.7.17-1　その他の毒性試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Dependence, drug discrimination: amifampridine phosphate	Rat / Sprague-Dawley	i.p.	Single-session (cross-over design, with 4 administrations per animal)	0, 0.25, 0.75, and 2.5 mg free base/kg	Amifampridine at the doses tested did not generalize for the interoceptive cue of cocaine at 10 mg/kg i.p.	[redacted]5604 (GLP) (4.2.3.7.4.01)
Dependence, selfadministration: amifampridine phosphate	Rat / Sprague-Dawley	i.v.	Single-session, with up to 15 administrations per animal	Up to 0.585 mg free base/animal; test dependent total dose	Amifampridine at the doses tested did not support self-administration in animals with a previous history of cocaine self-administration.	[redacted]5336 (GLP) (4.2.3.7.4.02)
Dependence, spontaneous withdrawal: amifampridine phosphate	Rat / Sprague-Dawley	Oral	28 days	0, 7.5, 24, and 75 mg free base/kg/day	Cessation of amifampridine treatment at all doses tested did not induce changes on physiological, neurobehavioral, and locomotor activity parameters that could be associated with the development of a withdrawal syndrome.	[redacted]5401 (GLP) (4.2.3.7.4.03)

表 2.6.7.17-1　その他の毒性試験（続き）

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Test System Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	Noteworthy Findings	Study Number (GLP Status) (Location in CTD)
Metabolite safety screen: N-(4aminopyridin-3-yl) acetamide	Human Caco-2 cells, CHO-K1 hERG cells, human hepatocytes, human liver microsomes	*In vitro*	NA	10 µM (Caco-2 cells, hepatocytes, microsomes), and 0.01 to 100 µM (CHO-K1 hERG cells)	Incubation with the 3-N-acetyl metabolite at 10 µM did not result in any significant response of either inhibition or stimulation of the 38 receptors/channels assessed. Incubation of 10 µM 3-N-acetyl metabolite showed no inhibition potential for CYP1A, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A isoenzymes. The 3-N-acetyl metabolite showed low potency for the hERG K^+ channel, with an IC_{50} of 39 µM.	100014186 (non-GLP) (4.2.1.2.03)
Impurity bacterial mutation: *不純物C	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537	*In vitro*	NA	Up to 5000 µg/plate	No mutagenic effect.	[redacted]-080408 (GLP) (4.2.3.7.6.01)
Impurity Derek evaluation: 4aminopyridine, 4ethoxycarbonyl aminopyridine, and *不純物C	Derek software	NA	NA	NA	*不純物D and *不純物E had no alerts for genotoxicity, mutagenicity, or carcinogenicity. Structural alerts were triggered for mutagenicity by *不純物C.	EUA001[redacted] (non-GLP) (.2.3.7.6.02)
Impurity Derek evaluation: *不純物C	Derek software	NA	NA	NA	Structural alerts were triggered for mutagenicity and carcinogenicity by *不純物C.	OPI0002[redacted] (non-GLP) (4.2.3.7.6.03)

*不純物 = [redacted]; *不純物C = [redacted]; CHO = Chinese hamster ovary; CTD = Common Technical Document; CYP = cytochrome P450; *不純物E = [redacted]; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-á-go-go related gene; IC_{50} = median inhibitory concentration; i.p. = intraperitoneal; i.v. = intravenous; NA = not applicable.