目次

略語・略号一覧 4

2.6.6　毒性試験の概要文 6

2.6.6.1　まとめ 6
2.6.6.2　単回投与毒性試験 8
2.6.6.3　反復投与毒性試験 8
2.6.6.3.1　ラットにジアゼパム点鼻液を鼻腔内投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価するための用量設定試験（[8290337]試験） 8
2.6.6.3.2　ラットにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による 28 日間投与試験（[20023862]試験） 12
2.6.6.3.3　ラットにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内滴下による 4 週間反復投与毒性及び TK 試験並びに 4 週間回復性試験（[8290342]試験） 13
2.6.6.3.4　ラットにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（[2502-002]試験） 16
2.6.6.3.5　イヌにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による毒性及び TK を検討する用量設定試験（[8290338]試験） 21
2.6.6.3.6　イヌにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による 28 日間投与試験（[20023863]試験） 23
2.6.6.3.7　イヌにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内滴下による 4 週間反復投与毒性及び TK 試験、並びに 4 週間回復性試験（[8290343]試験） 24
2.6.6.4　遺伝毒性試験 27
2.6.6.5　がん原性試験 27
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 28
2.6.6.7　局所刺激性試験 28
2.6.6.7.1　鼻腔内投与及び静脈内投与による局所刺激性／薬物動態試験（予備試験）（[0852LN45.001]試験） 28
2.6.6.7.2　鼻腔内投与及び静脈内投与による局所刺激性／薬物動態試験（[0852LN45.002]試験） 29
2.6.6.8　その他の毒性試験 30
2.6.6.8.1　依存性 30
2.6.6.8.1.1　薬物乱用 30
2.6.6.8.1.2　薬物依存性 30
2.6.6.8.2　不純物／分解物 31
2.6.6.8.2.1　原薬 31
2.6.6.8.2.2　製剤 31
2.6.6.8.3　ジアゼパム点鼻液製剤に含まれる添加物 37
2.6.6.8.3.1　Intravail® A3 37

2.6.6.8.3.2 その他の添加物の安全性評価.....49
2.6.6.9 考察及び結論.....53
2.6.6.10 図表.....55
2.6.6.11 参考文献.....55

表目次

表 2.6.6-1 ジアゼパム点鼻液の毒性プログラムの概要.....6
表 2.6.6-2 Intravail® A3 の毒性プログラムの概要.....7
表 2.6.6-3 フェーズ A：評価可能な単回又は少数回投与 TK 動物.....9
表 2.6.6-4 フェーズ B：反復投与動物.....9
表 2.6.6-5 20023862 試験における投与群：フェーズ A.....12
表 2.6.6-6 20023862 試験における投与群：フェーズ B.....13
表 2.6.6-7 反復投与動物.....14
表 2.6.6-8 8290342 試験におけるジアゼパム点鼻液を鼻腔内投与後のジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail® A3 の最高濃度及び曝露量.....15
表 2.6.6-9 ラットにおける 26 週間鼻腔内投与毒性試験の試験デザイン.....17
表 2.6.6-10 Day 1 及び 180 でのジアゼパムの平均 TK パラメーター（雌雄併合のデータ）.....19
表 2.6.6-11 Day 1 及び 180 でのノルジアゼパムの平均 TK パラメーター（雌雄併合のデータ）.....20
表 2.6.6-12 Day 1 及び 180 の Intravail® A3 の平均 TK パラメーター（雌雄併合のデータ）.....21
表 2.6.6-13 フェーズ A：単回及び少数回投与動物.....22
表 2.6.6-14 フェーズ B：5 日間反復投与動物.....22
表 2.6.6-15 20023863 試験における投与群及び投与の割り付け.....24
表 2.6.6-16 反復投与動物.....25
表 2.6.6-17 8290343 試験におけるジアゼパム点鼻液投与後のジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail® A3 の最高濃度及び曝露量.....26
表 2.6.6-18 試験デザイン及び投与レジメン（0852LN45.001 試験）.....28
表 2.6.6-19 ラットを用いた RCB の 90 日間鼻腔内投与毒性試験の試験デザイン.....31
表 2.6.6-20 推奨用量.....33
表 2.6.6-21 ジアゼパム関連化合物 B（RCB）の曝露量及び安全域 – 鼻腔表面積.....35
表 2.6.6-22 ジアゼパム関連化合物 B（RCB）の曝露量及び安全域 – 体表面積.....35
表 2.6.6-23 ジアゼパム点鼻液製剤の添加物.....37
表 2.6.6-24 Intravail® A3 投与群への割り付け（0437RA33.001 試験）.....38
表 2.6.6-25 Intravail® A3 投与群への割り付け（8272935 試験）.....39
表 2.6.6-26 Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t.....39
表 2.6.6-27 Intravail® A3 投与群への割り付け（8281782 試験）.....40

表 2.6.6-28 Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t（8281782 試験）.....41
表 2.6.6-29 Intravail® A3 投与群への割り付け（8275552 試験）.....42
表 2.6.6-30 Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t（8275552 試験）.....42
表 2.6.6-31 Intravail® A3 投与群への割り付け（8281784 試験）.....43
表 2.6.6-32 Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t（8281784 試験）.....44
表 2.6.6-33 動物の投与群の割り付け（AA99567 試験）.....47
表 2.6.6-34 ジアゼパム点鼻液製剤（Pilot PK Formulation）組成.....50
表 2.6.6-35 ジアゼパム点鼻液製剤（Original Formulation）組成.....50
表 2.6.6-36 トコフェロールの安全性評価.....52

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
AUC_t	Area under the concentration-time curve (from 0 h to t h)	投与後 0 時間から t 時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the concentration-time curve (from 0 h to 24 h)	投与後 0 時間から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積
BLQ	Below level of quantification	定量下限未満
BSA	Body surface area	体表面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高濃度
CV	Coefficient of variation	変動係数
DE	Dose event	投与イベント
DEREK	Deductive Estimate of Risk from Existing Knowledge	DEREK
DFP-02	Sumatriptan and excipient Dodecylmaltoside	スマトリプタンと添加物ドデシルマルトシド
EPA	US Environmental Protection Agency	米国環境保護庁
FCA	Freund's Complete Adjuvant	フロイント完全アジュバント
FDA	Food and Drug Administration (United States)	米国食品医薬品局
GABA	γ-Aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GD	Gestation day	妊娠日数
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
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Intravail® A3	Dodecylmaltoside	ドデシルマルトシド
K_2EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt dihydrate	エチレンジアミン四酢酸二カリウム二水和物
LD_{50}	Lethal dose in 50% of the population	50%致死量
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
M/P	Metabolite to parent exposure ratio	未変化体に対する代謝物の曝露量比
MRHD	Maximum recommended human dose	ヒト最大推奨用量

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No observed effect level	無影響量
NRL-1	Diazepam nasal spray	ジアゼパム点鼻液
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PR	Measurement from beginning of P wave to beginning of QRS complex	P 波の開始から QRS 群の開始までの間隔
QRS	Mesurement from beginning of Q wave to end of S wave	Q 波の始まりから S 波の終わりまでの間隔
QS	Quantum sufficit	適量
(Q)SAR	(Quantitative) structure-activity relationship	（定量的）構造活性相関
QT	Measurement from beginning of QRS complex to end of T wave	QRS 群の始まりから T 波の終わりまでの間隔
QTc	Corrected QT	補正 QT
RCB	Diazepam Related Compound B	ジアゼパム関連化合物 B
RMI	Relative mitotic index	相対分裂指数
RR	Measurement from one R wave to following R wave	R 波から次の R 波までの間隔
S9	S9	ラット肝臓ホモジネート 9000 × g 上清画分
SD	Sprague Dawley	Sprague Dawley
$t_{1/2}$	Half-life	半減期
t_{max}	Time to maximum concentration	最高濃度到達時間
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

ジアゼパムは経口投与による安全性が知られているため、経鼻投与による影響に重点を置き、ジアゼパム点鼻液の毒性及びトキシコキネティクス（TK）プロファイルを評価する目的で、主に以下のような毒性試験を計画し実施した。

- ラットでは 26 週間まで、イヌでは 4 週間までの反復投与毒性試験
- ラット及びイヌを用いた TK 試験
- ウサギを用いた局所刺激性試験

本概要文中で、ジアゼパム点鼻液と企業開発コード名である NRL-1 とは同義である。

ジアゼパム点鼻液を用いて実施した毒性試験一覧を表 2.6.6-1 に示し、試験報告書を M4 に示す。

表 2.6.6-1　ジアゼパム点鼻液の毒性プログラムの概要

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	GLP Compliance	Study Number
Repeat-Dose Toxicity					
Dose range finding and toxicokinetic study	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	1 day 7 days	No	[8290337]
Toxicity study following once daily or once every 5 days intranasal micro-spray or instillation	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	28 days	No	[20023862]
Repeat-dose toxicity and toxicokinetic study	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	4 weeks	Yes	[8290342]
Repeat-dose toxicity and toxicokinetic study	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	26 weeks	Yes	[2502-002]
Dose-escalation toxicity and toxicokinetic study	Dog / Beagle	Intranasal	1 day 5 days	No	[8290338]
Toxicity study following once daily or once every 5 days intranasal instillation	Dog / Beagle	Intranasal	28 days	No	[20023863]
Repeat-dose toxicity and toxicokinetic study	Dog / Beagle	Intranasal	4 weeks	Yes	[8290343]
Local Tolerance					
Pilot pharmacokinetic and local tolerance study	Rabbit / New Zealand White	Intranasal	1 day	No	[0852LN45.001]
Pharmacokinetic and local tolerance study	Rabbit / New Zealand White	Intranasal	1 day	No	[0852LN45.002]
Other Toxicity Studies					
Impurities repeat-dose (Related Compound B)	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	90 days	Yes	[0470RN45.001]
Impurities genotoxicity (Related Compound B)	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	-	Yes	[AG01VV.502ICH.BTL]
Impurities genotoxicity (Related Compound B)	Chinese hamster ovary cells	In vitro	-	Yes	[AG01VV.331ICH.BTL]

ジアゼパム点鼻液製剤に含まれる Intravail® A3（以降、Intravail A3）は新添加物であり、新添加物についての厚生省通知（審査管理課事務連絡、平成 11 年 8 月 2 日）に基づき以下の毒性試験を実施し、Intravail A3 の毒性プロファイルを明らかにした（表 2.6.6-2）。

- ラットでは 26 週間まで、イヌでは 39 週間までの反復投与毒性試験
- ラット及びイヌを用いた TK 試験
- In vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験
- ラットを用いた胚・胎児発生に関する予備試験
- ウサギを用いた局所刺激性試験及びモルモットを用いた皮膚感作性試験

既承認のジアゼパム製剤、公表文献などの毒性データも要約した。

表 2.6.6-2　Intravail® A3 の毒性プログラムの概要

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	GLP Compliance	Study Number
Repeat-Dose Toxicity					
Subacute toxicity	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	2 weeks	Yes	[0437RA33.001]
Study performed with DFP-02	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	4 weeks	Yes	[8272935]
Study performed with DFP-02	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	26 weeks	Yes	[8281782]
Study performed with DFP-02	Dog / Beagle	Intranasal	4 weeks	Yes	[8275552]
Study performed with DFP-02	Dog / Beagle	Intranasal	39 weeks	Yes	[8281784]
Genotoxicity					
Mutagenicity	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	-	Yes	[963114]
Chromosomal aberration	Human peripheral lymphocytes	In vitro	-	Yes	[963115]
In vivo mammalian micronucleus	Rat bone marrow	Intravenous	Single dose	Yes	[963116]
Reproductive and Developmental Toxicity					
Embryo-fetal development	Rat / Wistar	Intravenous	GD6-17	Yes	[AA99567]
Local Tolerance					
Contact hypersensitivity	Guinea Pig / Dunkin Hartley	Intradermal	1 day	Yes	[C78787]
Dermal Irritation	Rabbit / New Zealand White	Subcutaneous	Day 1, 8	Yes	[503595]

GD = Gestation day

ジアゼパム点鼻液製剤に含まれるベンジルアルコール、無水エタノール及びトコフェロールについて、日本では使用前例の範囲外であり新添加物として扱われるため、これらの安全性評価も記載した。

Intravail A3 は一般名であるドデシルマルトシドと同義である。

毒性試験の概要表を[M2.6.7]に示す。試験報告書を M4 に示す。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

ジアゼパム点鼻液の単回投与毒性試験は実施しなかったが、ラット及びイヌを用いた用量設定試験で急性毒性を評価した。

雌 Sprague Dawley（SD）ラットを用いた用量設定試験（[8290337]試験、フェーズ A）では、ジアゼパム点鼻液を 1、2、8 又は 12 mg/日の用量で鼻腔内単回又は少数回投与した結果、死亡はみられなかった。一般状態所見として鎮静及び運動失調のみが観察されたが、いずれも投与直後の一過性所見であった。体重、体重変動及び摂餌量に変化は認められなかった。これらの試験成績から、ラットにおける概略の致死量は 12 mg/日を超えるものと推定された。

雌ビーグル犬を用いた用量設定試験（[8290338]試験、フェーズ A）では、ジアゼパム点鼻液を最大 80 mg/日で鼻腔内単回又は用量漸増投与した結果、死亡はみられず、一過性の鎮静及び運動失調が観察された。体重、体重変動及び摂餌量に変化は認められなかった。これらの試験成績から、イヌにおける概略の致死量は 80 mg/日を超えるものと推定された。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラットにジアゼパム点鼻液を鼻腔内投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価するための用量設定試験（[8290337]試験）

新規の鼻腔内投与製剤であるジアゼパム点鼻液の毒性を評価し、有効成分であるジアゼパム、活性代謝物のノルジアゼパム及び製剤に含まれる吸収促進剤である Intravail A3 の TK を評価するために、雌 SD ラットに濃度 50 又は 100 mg/mL の NRL-1 を鼻腔内投与した用量設定試験を非 GLP 下で実施した。試験中 1 日以内に単回又は少数回投与したグループをフェーズ A とし、7 日間連日又は 7 日間中の 3 日ごとに反復投与したグループをフェーズ B とした。

両フェーズ共に、鼻腔内投与用に Intravail A3（[redacted]%）を含む非水性アルコール製剤としてジアゼパム点鼻液を投与した。ジアゼパム点鼻液の溶媒対照（溶媒対照）は、ジアゼパムを Intravail A3（[redacted]%）及び高濃度のエタノールに置き換えて製剤化した。

雌ラットを 10 群に割り付け、試験を 2 フェーズ（A 及び B）に分けた。フェーズ A では、ジアゼパムの総用量 1、2、8 又は 12 mg/日に相当するジアゼパム点鼻液を 5 群の雌ラットの鼻腔内に単回又は少数回投与し、ジアゼパム及び Intravail A3 の曝露量を共に最大にするために、投与容量は 1 回あたり 20 µL とした。

フェーズ A では、濃度 50 mg/mL のジアゼパムを含む本剤 20 µL を動物の各鼻腔内に投与した。投与回数、投与時間及び例外は次のとおりである。第 1 群では片方の鼻腔内に 1 回投与した。第 2 群では投与日の午前中に両鼻腔内に 10 分間隔で 2 回投与し、6 時間後の午後にも 10 分間隔で 2 回投与し計 4 回投与とした。第 3 群では両鼻腔内にそれぞれ 1 回投与した。第 4 群では

ジアゼパム 100 mg/mL を両鼻腔内に 3 回投与した（午前中に 10 分間隔で 2 回投与し、6 時間後の午後に 1 回投与）。第 5 群では 40 分かけて 10 分間隔で 4 回投与した。投与群及びジアゼパム点鼻液の投与時期の要約を表 2.6.6-3 に示す。

表 2.6.6-3　フェーズ A：評価可能な単回又は少数回投与 TK 動物

Group	Females	Dosing Day	Dose Regimen Description	Total Number of Doses	Diazepam (mg/mL)	Diazepam Total[a] (mg/day)
1 (Low)	13	1	DE 1: Left Nostril	1	50	1
2 (Mid-High, AM/PM)	13	1	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 10 ± 1 minutes following DE 1 DE 3: Both Nostrils, 6 hours ± 10 minutes following DE 1 DE 4: Both Nostrils, 10 ± 1 minutes following DE 3	8	50	8
3 (Low-Mid)	13	2	DE 1: Both Nostrils	2	50	2
4 (High)	13	3	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 10 ± 1 minutes following DE 1 DE 3: Both Nostrils, 6 hours ± 10 minutes following DE 1	6	100	12
5 (Mid-High AM)	13	4	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 10 ± 1 minutes following DE 1 DE 3: Both Nostrils, 30 ± 2 minutes following DE 1 DE 4: Both Nostrils, 40 ± 1 minutes following DE 1	8	50	8

Note: DE = Dose Event; a dose event in Phase A was considered delivery to one or two nostrils.

a　Daily dose level was determined by the number of intranasal deliveries (20 µL/dose) each day with a concentration of 50 (Groups 1, 2, 3, and 5) or 100 (Group 4) mg/mL diazepam.

フェーズ B では、3 群の雌ラット（各群 13 例）にジアゼパム点鼻液を 1 日 5 回で 7 日間、又は 7 日間中の 3 日ごとに鼻腔内に反復投与した。全ての群で投与 1 回あたり 20 µL を鼻腔内に反復投与し、第 8 群及び第 9 群にはジアゼパム 100 mg/mL、第 10 群にはジアゼパム 50 mg/mL を投与した。投与開始後 0 分から 80 分（1.3 時間）にかけて、20 分ごとに 5 回投与した。さらに、対照群（第 6 群）では Day 1、4 及び 7 に生理食塩液を投与し、溶媒対照群（第 7 群）では Day 1～7 にジアゼパム点鼻液の溶媒対照を投与した。表 2.6.6-4 に示すとおり、ジアゼパム点鼻液、ジアゼパム点鼻液の溶媒対照（溶媒対照）及び生理食塩液対照（生理食塩液）を投与した。

表 2.6.6-4　フェーズ B：反復投与動物

Group	Females	Dosing Day	Dose Regimen Description	Total Number of Doses	Diazepam Total[a] (mg/day)	Diazepam Total (mg/week)
6	7	1, 4, 7	DE 1: Both Nostrils	10	0	0

Group	Females	Dosing Day	Dose Regimen Description	Total Number of Doses	Diazepam Total[a] (mg/day)	Diazepam Total (mg/week)
(Saline Control)			DE 2: Both Nostrils, 20±2 minutes DE 3: Both Nostrils, 40±4 minutes DE 4: Both Nostrils, 60±6 minutes DE 5: Both Nostrils, 80±8 minutes			
7 (Vehicle Control)	7	1 - 7	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20±2 minutes DE 3: Both Nostrils, 40±4 minutes DE 4: Both Nostrils, 60±6 minutes DE 5: Both Nostrils, 80±8 minutes	10	0	0
8 (100 mg/mL)	13	1, 4, 7	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20±2 minutes DE 3: Both Nostrils, 40±4 minutes DE 4: Both Nostrils, 60±6 minutes DE 5: Both Nostrils, 80±8 minutes	10	20	60
9 (100 mg/mL)	13	1 - 7	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20±2 minutes DE 3: Both Nostrils, 40±4 minutes DE 4: Both Nostrils, 60±6 minutes DE 5: Both Nostrils, 80±8 minutes	10	20	140
10 (50 mg/mL)	13	1 - 7	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20±2 minutes DE 3: Both Nostrils, 40±4 minutes DE 4: Both Nostrils, 60±6 minutes DE 5: Both Nostrils, 80±8 minutes	10	10	70

Note: DE = Dose Event; a dose event in Phase B was considered delivery to both nostrils. Phase B started approximately 3 weeks after the last dose administration for Phase A.

a Daily dose level was determined by the number of intranasal deliveries (20 µL/dose) each day with a concentration of 50 or 100 mg/mL diazepam, as appropriate.

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、並びに病理学的検査（フェーズ A では肉眼的所見、フェーズ B では肉眼的所見、鼻及び関連する組織の病理組織学的所見）によって毒性評

価を行った。フェーズ A では各投与日、及びフェーズ B では Day 7 に、ジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の TK 評価のために採血した。

フェーズ A では、ジアゼパム及びノルジアゼパムの C_{max} 及び AUC_{0-24} は、ジアゼパム点鼻液の用量増加（1～12 mg/日）に伴いおおむね増加した（ジアゼパム点鼻液の投与回数又は投与スケジュール、及び／又は製剤濃度の変更に伴い用量増加）。少数回投与によるジアゼパム曝露量の増加割合は用量比を下回った。ジアゼパム点鼻液の 1 日用量が同一で、投与レジメンが異なる 2 群を比較したところ、ジアゼパム及びノルジアゼパムの曝露量は投与レジメンによって大きく異ならなかった。午前中に 4 回投与した群（第 5 群）又は午前中に 2 回／午後に 2 回投与した群（第 2 群）の 2 群におけるジアゼパムの 1 日総投与量は 8 mg であった。ジアゼパムの C_{max} は午前中にのみ投与した群の方が僅かに高かったものの、AUC_{0-24} は午前／午後に投与した群が僅かに高値を示した。ジアゼパム及びノルジアゼパムの最高血中濃度におおむね速やかに到達した（午前中又は午後の初回投与後 30 分から 1 時間以内）。フェーズ A では、AUC_{0-24} の未変化体に対する代謝物の比の群間差はみられず、0.376～0.453 の範囲であった。これは、1 日のうちの反復投与は未変化体に対する代謝物の比に影響を及ぼさないことを示す。Intravail A3 の C_{max} は投与回数の増加に伴い増加した。Intravail A3 の用量増加（0.1 mg から 0.4 mg を午前中投与）に伴い、C_{max} は 0.810 ng/mL から 13.5 ng/mL に増加した。午前中の投与後 4 時間時点での Intravail A3 濃度は定量下限（LLOQ）をおおむね下回っていた。

フェーズ B では、ジアゼパム及びノルジアゼパムの曝露量は、ジアゼパム点鼻液の用量増加（10～20 mg/日、1 日 5 回投与）に伴いおおむね増加した（第 9 群及び第 10 群）。ジアゼパム点鼻液（ジアゼパム 100 mg/mL 含有）によってジアゼパム 20 mg を投与したときのジアゼパム及びノルジアゼパムの曝露量は、Day 1、4 及び 7 に間歇投与された動物（第 8 群）よりも連日投与された動物の方が高かった。フェーズ B での AUC_{0-24} の未変化体に対する代謝物の割合は 0.301～0.339 であり、フェーズ A（単日投与後の曝露量）と類似しており、複数日投与によって未変化体に対する代謝物の割合は変化しないことが示された。

フェーズ B では、全群で各投与日（採血日を含む）の午前中に Intravail A3 を 0.5 mg/日の用量で投与した。ジアゼパム点鼻液の投与群又は溶媒対照群の一部として Day 1～7 に連日投与した場合の Intravail A3 曝露量は、ジアゼパム点鼻液投与群の一部として Day 1、4 及び 7 にのみ投与した場合よりも高かった。午前中の投与後 8～12 時間の Intravail A3 濃度は LLOQ をおおむね下回った。

いずれのフェーズにおいても被験物質に関連した死亡はみられなかった。被験物質に関連した一般状態所見は鎮静及び運動失調に限定され、いずれも投与直後の一過性所見であった。フェーズ B では、これらの一般状態所見の重症度及び発現頻度は反復投与に伴い減少する傾向がみられ、これらの所見の発現に耐性があることが示唆された。

フェーズ B では、溶媒又はジアゼパム点鼻液を投与した動物で鼻の被毛及び皮膚の変色が認められたが、生理食塩液を投与した動物ではみられなかった。これらの所見は、1 週間間歇投与した動物よりも連日投与した動物でより頻繁に認められた。これらの所見の発現頻度は溶媒群とジアゼパム点鼻液群の間で同程度であったことから、この作用は溶媒によるものであり、被験物質とは関連がないと考えられた。

いずれのフェーズにおいても、体重、体重変化又は摂餌量において対照群と処置群の間で差は認められなかった。

被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。フェーズ B では、被験物質に関連した病理組織学的所見は、60～140 mg/週を投与した動物の喉頭に極僅かな好中球浸潤のみが観察された。この所見発現に用量依存性は認められず、この所見は毒性ではないと考えられた。

Intravail A3（溶媒添加剤、[redacted] mg/Intravail A3）に 7 日間曝露した後の C_{max} 及び AUC_{0-24} の値は、それぞれ 2.40～4.58 ng/mL 及び 7.17～15.6 ng·h/mL であった。

以上、ジアゼパム点鼻液の投与量、投与頻度及び投与期間は用量制限的ではないと考えられた。溶媒の投与頻度に関連した刺激性変化が認められたことから、長期投与に際しては 1 日あたりの投与回数を減らすべきであることが示唆された。

最終試験報告書を M4、8290337 試験に示す。

2.6.6.3.2 ラットにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による 28 日間投与試験（[20023862]試験）

この非 GLP 試験は、雌 SD ラットにジアゼパム点鼻液（吸収促進剤 Intravail A3 を用いて製剤化したジアゼパムの非水性溶液）を 28 日間連日又は 28 日間中 5 日ごとに、鼻腔内に微細噴霧又は滴下したときの影響を評価するために実施した。試験は 2 つの異なるフェーズ（A 及び B）を用いて実施した。フェーズ A と B の唯一の違いは、鼻腔内投与によってジアゼパム点鼻液を送達するために用いたデバイス（微細噴霧又は滴下）が異なる点であった（表 2.6.6-5 及び表 2.6.6-6）。ジアゼパム点鼻液（Intravail A3 の [redacted] mg/mL を用いて製剤化）、対照（0.9%塩化ナトリウム注射液）又はプラセボ（Intravail A3 以外のジアゼパム点鼻液の添加物）を 1 日 1 回又は 5 日ごとに左右鼻腔に交互に投与した（各群 6 例）。この試験では吸収促進剤の対照群は設けなかった。当該試験におけるパラメーター及び評価項目として、生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、体重変化、ジアゼパム及びノルジアゼパムの TK パラメーター、剖検所見、器官重量、並びに病理組織学的検査を実施した。

表 2.6.6-5 20023862 試験における投与群：フェーズ A

Group	Dose Material	Dose Level (mg/day)	Dose Volume (µL)	Dose Concentration (mg/mL)	Administration Method	Dosing Regimen
1	Control Article	0	10	0	Micro-spray	Once daily
2	Control Article	0	10	0	Micro-spray	Once every 5 days
3	Placebo Article	0	10	0	Micro-spray	Once daily
4	Placebo Article	0	10	0	Micro-spray	Once every 5 days
5	NRL-1	0.25	2.5	100	Micro-spray	Once daily
6	NRL-1	0.25	2.5	100	Micro-spray	Once every 5 days
7	NRL-1	0.5	5	100	Micro-spray	Once daily
8	NRL-1	0.5	5	100	Micro-spray	Once every 5 days

Group	Dose Material	Dose Level (mg/day)	Dose Volume (µL)	Dose Concentration (mg/mL)	Administration Method	Dosing Regimen
9	NRL-1	1	10	100	Micro-spray	Once daily
10	NRL-1	1	10	100	Micro-spray	Once every 5 days

表 2.6.6-6　20023862 試験における投与群：フェーズ B

Group	Dose Material	Dose Level (mg/day)	Dose Volume (µL)	Dose Concentration (mg/mL)	Administration Method	Dosing Regimen
1	Control Article	0	10	0	Instillation	Once daily
2	Control Article	0	10	0	Instillation	Once every 5 days
3	Placebo Article	0	10	0	Instillation	Once daily
4	Placebo Article	0	10	0	Instillation	Once every 5 days
5	NRL-1	0.25	2.5	100	Instillation	Once daily
6	NRL-1	0.25	2.5	100	Instillation	Once every 5 days
7	NRL-1	0.5	5	100	Instillation	Once daily
8	NRL-1	0.5	5	100	Instillation	Once every 5 days
9	NRL-1	1	10	100	Instillation	Once daily
10	NRL-1	1	10	100	Instillation	Once every 5 days

ラットにジアゼパム点鼻液（Intravail A3 を用いて製剤化）を 0（対照物質群及びプラセボ群）、0.25、0.5 又は 1 mg/日の用量で 1 日 1 回又は 5 日ごとに左右の鼻腔に交代で最長 28 日間投与（微細噴霧又は滴下）したときの忍容性は良好であった。被験物質投与に関連した死亡又は一般状態の異常所見は認められず、体重、体重変化又は摂餌量に対する影響も認められなかった。ジアゼパム点鼻液に関連した肉眼的剖検所見又は器官重量に対する影響は認められず、被験物質に関連した病理組織学的所見も観察されなかった。ラットにおけるジアゼパム点鼻液の無影響量（NOEL）は、検討した最高用量である 1 mg/日の 1 日 1 回又は 5 日ごとの間歇投与と考えられた。ジアゼパム及びノルジアゼパムの曝露量は、どの投与期間中に得られたデータでも一致しており、蓄積性などは認められなかった。ジアゼパム点鼻液を 1 日 1 回又は 5 日ごとに微細噴霧又は滴下によって投与したときのジアゼパムとノルジアゼパムの曝露量の差は、どちらの投与方法の場合でも 2 倍以下であり、一方の投与方法が他方よりも一貫して曝露量が高いことはなかった。

最終試験報告書を M4、20023862 試験に示す。

2.6.6.3.3　ラットにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内滴下による 4 週間反復投与毒性及び TK 試験並びに 4 週間回復性試験（[8290342]試験）

この GLP 適用試験は、ラットにジアゼパム点鼻液を連日又は間歇的（週に 1、3 又は 6 回）に 28 日間鼻腔内滴下によって投与したときの毒性及び TK を評価し、4 週間の休薬期間後に変化の

回復性、持続性又は遅発性について評価するために実施した。鼻組織及び関連する剖検部位での被験物質の局所刺激性を評価した。ジアゼパム、ノルジアゼパム及び製剤に含まれる吸収促進剤である Intravail A3 の TK を評価した。

表 2.6.6-7 に示すとおり、雌雄 SD ラットを 5 群に割り付け、投与を行った。各鼻腔あたり容量 20 µL の生理食塩液（生理食塩液対照）、ジアゼパム点鼻液の溶媒対照（溶媒対照）又は濃度 100 mg/mL のジアゼパムを含むジアゼパム点鼻液を鼻腔内滴下して投与した。動物には週 1、3 又は 6 回の投与頻度（それぞれジアゼパム投与量は 8、24 又は 48 mg/週に相当）で 28 日間投与した。生理食塩液は週 6 日投与した。溶媒対照は、ジアゼパムを Intravail A3（[redacted]%、[redacted] mg/mL）及び高濃度のエタノールに置き換えて製剤化した。溶媒対照も週 6 日投与した。投与期間中の Day 29 に 1 群あたり雌雄各 10 例を剖検した。30 日間の休薬期間終了後に、1 群あたり雌雄各 5 例を剖検した。

表 2.6.6-7 反復投与動物

Group	Sub Group	No. of Animals		Dose Frequency	Dose Regimen Description	Diazepam Total (mg/week)
		M	F			
1 (Saline Control; 6 days/week)	Toxicity	15	15	Days 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28 (24 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 4 hours	0
	Toxicokinetics	4	4			
2 (Vehicle Control; 6 days/week)	Toxicity	15	15	Days 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28 (24 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 4 hours	0
	Toxicokinetics	16	16			
3 (Low; 8 mg/day 1 day/week)	Toxicity	15	15	Days 1, 8, 15, 22, 28 (5 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 4 hours	8
	Toxicokinetics	16	16			
4 (Mid; 8 mg/day 3 days/week)	Toxicity	15	15	Days 1, 3, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28 (12 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 4 hours	24
	Toxicokinetics	16	16			
5 (High; 8 mg/day 6 days/week)	Toxicity	15	15	Days 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28 (24 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 4 hours	48
	Toxicokinetics	16	16			

Note: A Dose Event (DE) was considered administration to both nostrils.
All animals were administered four intranasal deliveries on a dosing day (two Dose Events).

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査、並びに病理組織学的検査によって毒性評価を実施した。表 2.6.6-7 に示すとおり、TK 評価を行うために動物から採血した。

TK データは、第 3～5 群の Day 1 及び 28 におけるジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の曝露量は一致し、蓄積性は認められなかった。第 2 群（溶媒対照）の Day 1 及び 28 における Intravail A3 の曝露量も一致していた。ラットにジアゼパム点鼻液を週 1、3 又は 6

日、4 週間投与したときのジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の曝露量は Day 1 と Day 28 で同程度であった。ただし、ジアゼパム点鼻液を週 6 日投与した雌（第 5 群）では、Day 28 でのジアゼパム及びノルジアゼパム曝露量は Day 1 での曝露量の約 2 倍であった。ジアゼパムを含まない溶媒対照を週 6 日投与した動物（第 2 群）での Intravail A3 の曝露量は、ジアゼパム点鼻液を週 6 日投与した動物（第 5 群）とおおむね同程度であり、ジアゼパムの存在は Intravail A3 曝露量に影響しないことが示された。Day 1 及び 28 でのジアゼパム及びノルジアゼパムの C_{max} 及び AUC_{0-24} 値は、雄よりも雌の方が 2 倍以上高かった。Intravail A3 の C_{max} 及び AUC_{0-24} 値において一貫した性差は認められなかった。Day 1 及び 28 での C_{max} の未変化体に対する代謝物の比は 0.267～0.495 であった。Day 1 及び 28 での AUC_{0-24} の未変化体に対する代謝物の比は 0.354～0.502 であった。未変化体に対する代謝物の比において性差は認められなかった。結果を表 2.6.6-8 に示す。

表 2.6.6-8　8290342 試験におけるジアゼパム点鼻液を鼻腔内投与後のジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail® A3 の最高濃度及び曝露量

	Test Article	Dose Level (mg/week)	Male		Female	
			C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
1 Day/Week						
Day 1	NRL-1 - Diazepam	8	98.1	831	184	1650
	NRL-1 - Nordiazepam	8	42.7	325	75.3	607
	NRL-1 - Intravail® A3	0.2	1.06	1.86	4.42	4.00
Day 28	NRL-1 - Diazepam	8	98.7	592	141	1360
	NRL-1 - Nordiazepam	8	26.4	271	56.2	557
	NRL-1 - Intravail® A3	0.2	0.803	0.857	0.390	0.364
3 Days/Week						
Day 1	NRL-1 - Diazepam	24	91.2	756	256	1950
	NRL-1 - Nordiazepam	24	32.3	293	79.7	717
	NRL-1 - Intravail® A3	0.6	1.53	6.84	2.50	7.57
Day 28	NRL-1 - Diazepam	24	69.3	584	241	2170
	NRL-1 - Nordiazepam	24	34.3	293	87.9	861
	NRL-1 - Intravail® A3	0.6	4.24	3.89	2.05	1.80
6 Days/Week						
Day 1	NRL-1 - Diazepam	48	81.3	730	216	1930
	NRL-1 - Nordiazepam	48	29.6	273	66.6	736
	NRL-1 - Intravail® A3	1.2	1.24	5.04	9.73	8.53
	Intravail® A3 vehicle	1.2	3.02	4.67	1.82	4.49
Day 28	NRL-1 - Diazepam	48	119	790	392	3680
	NRL-1 - Nordiazepam	48	46.0	279	158	1420
	NRL-1 - Intravail® A3	1.2	0.907	1.95	0.983	0.945
	Intravail® A3 vehicle	1.2	1.44	2.65	1.26	1.95

全動物が剖検予定日まで生存した。ジアゼパム点鼻液に関連した一般状態所見は認められなかった。溶媒対照又はジアゼパム点鼻液（全ての投与頻度）で投与した動物において、投与後 5～7 時間に鼻又は眼窩周囲部の被毛の変色（赤色）が散発的に認められたが、生理食塩液を投与した動物（週 6 日投与）では変色はみられなかった。この所見は溶媒に関連したものであり、可逆的変化と考えられた。

溶媒又はジアゼパム点鼻液を投与した動物と生理食塩液投与動物との間で平均体重又は体重変化量の差は認められなかった。

ジアゼパム点鼻液の投与による臨床病理検査結果に対する軽微な影響が少数例に認められた。ただし、その程度は小さかったことから、毒性学的に重要な影響ではないと考えられた。影響は可逆的であり、程度は極く僅かであった。これらの影響は、全用量群の雌における赤血球パラメーター（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の高値、総たん白の高値（アルブミン及びグロブリンの高値による）及びカルシウムの高値、48 mg/週を投与した雌におけるカリウムの高値、並びに 48 mg/週を投与した雄及び 24 mg/週以上を投与した雌におけるリンパ球絶対数の低値（いずれも生理食塩液対照との比較）などであった。

投与終了時及び休薬期間終了時の剖検時に、鼻甲介及び鼻／鼻孔において溶媒に関連した所見が観察された。鼻甲介の所見は、僅かに持続的な軽微ないし軽度の炎症（休薬期間後の剖検時の方が出現頻度の低いことから回復傾向を示した）、可逆的で軽微なびらん／潰瘍、可逆的で軽微ないし軽度の出血などであった。鼻甲介の所見の出現頻度は、溶媒のみを投与した動物の方がジアゼパム点鼻液のどの用量を投与した動物よりもおおむね高かったことから、被験物質に関連した所見ではなく、溶媒対照に関連した所見であることが示唆された。

鼻／鼻孔については、溶媒又はジアゼパム点鼻液を投与した動物で病理組織学的検査によって軽微ないし軽度の表皮過形成／炎症が観察された。鼻孔粘膜への影響は認められなかった。ジアゼパム点鼻液を投与した動物において用量反応関係が認められなかったことから、この鼻／鼻孔の所見は鼻腔内滴下後の溶媒対照物質に対する刺激性の表皮反応と考えられた。回復期間中に溶媒対照群の雌 1 例のみが軽微な限局性の表皮過形成／炎症を示したが、この所見はほぼ完全に回復した。

結論として、ジアゼパム点鼻液に関連した毒性学的に重要な所見は認められなかった。溶媒に関連した鼻／鼻孔（軽微ないし軽度の表皮過形成／炎症）及び鼻甲介（軽微ないし軽度の炎症、可逆的な軽微なびらん／潰瘍、可逆的な軽微ないし軽度の出血）の病理組織学的所見は有害ではないと考えられた。したがって、本試験における無毒性量（NOAEL）は 8 mg/日（48 mg/週）と推定された。

本試験の最終試験報告書は M4、8290342 試験に示す。

2.6.6.3.4　ラットにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（[2502-002]試験）

この GLP 試験は、Crl:CD(SD)ラットに新規臨床製剤であるジアゼパム点鼻液を 1 日 1 回、26 週間まで鼻腔内投与したときの鼻咽頭への毒性及び TK のプロファイルを明確にするために実施した。加えて、てんかん発作をコントロールするための治療薬として、本剤のヒトでの間歇投与をサポートする上で必要な安全性情報を入手するために実施した。投与終了後 8 週間の休薬期間を設け、投与期間中に観察された変化の可逆性を評価した。ジアゼパム、ノルジアゼパム及び製剤に含まれる吸収促進剤である Intravail A3 の TK を評価した。

表 2.6.6-9 に示すとおり、動物を試験に割り付けた。

表 2.6.6-9　ラットにおける 26 週間鼻腔内投与毒性試験の試験デザイン

Group Number	Dose Level[a] (mg/day)	Dose Volume (μL)	Dose Concentration (mg/100 μL)	Number of Animals	
				Male	Female
Main Study[b]					
1	0[c]	80	0	18	18
2	4	40	10	18	18
3	6	60	10	18	18
4	8	80	10	18	18
Toxicokinetic[d]					
5	0[c]	80	0	4	4
6	4	40	10	8	8
7	6	60	10	8	8
8	8	80	10	8	8

a　Half of the total daily dose volume for each animal was administered into each naris, in increments of 10 μL.
b　Following 26 weeks of dosing, six animals/sex/group were maintained on study for an 8-week recovery period.
c　Animals in Groups 1 and 5 received the vehicle control article, NRL-1 vehicle control.
d　One control TK animal/sex and two treated TK animals/sex/group were included as possible replacement animals.

1 群あたり雌雄各 3 例のコホートから、舌下静脈から血液（約 0.5 mL）を採取し、ジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の血漿中濃度を測定した。対照動物からは、Day 1 及び 180 の投与後 0、1、4 及び 8 時間に採血した。投与後 4 時間の検体のみを分析し、残りの検体は直ちに廃棄した。処置群の動物からは、Day 1 及び 180 の投与前並びに投与後 0.5、1、2、4、6、8 及び 24 時間時点で検体を採取した。Day 185（すなわち Day 182 の最終投与後 72 時間）に処置動物 1 群あたり雌雄各 6 例から追加検体を採取した。採血前に動物を絶食させなかった。検体は、抗凝固剤として K_2EDTA を含む採血管内に入れた。最終の検体採取終了後、動物を安楽死させた。血液検体を採取し、氷の上に置き、採取後 30 分以内に冷却遠心分離を行った。

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査、剖検所見、器官重量、並びに病理組織学的検査によって毒性評価を行った。ジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の TK 評価を実施した。

本試験中に被験物質に関連する死亡は認められなかった。ただし、被験物質に関連しないと考えられる以下の死亡が認められた。

動物番号 7001（TK 試験用雄）及び動物番号 8001（TK 試験用雄）はそれぞれ Week 18 及び Week 19（投与後死亡）の期間中に死亡した。動物番号 5001（TK 試験用雄）が、努力呼吸の増加（刺激時に悪化）、開口、聴取可能な呼吸音、及び肺音の異常のために Week 22 の投与前に安楽死させた。いずれの動物においても、被験物質に関連した肉眼的剖検所見は認められなかった。

動物番号 2505（4 mg/日群の雌）は Day 168 のハンドリング中に死亡した。被験物質に関連した肉眼的剖検所見は認められなかった。鼻腔内で軽度の出血及び軽微な浸出液（僅かな炎症性細胞浸潤を伴う）が観察された。鼻甲介内では軽度の粘膜下出血も認められた。肺では多巣性の軽度な急性出血が認められた。出血に至った基礎となる病変のエビデンスはなかった。出血は死戦期による可能性が高く、被験物質とは関連がないと考えられた。死因は肺及び鼻腔内の急性出血によるものであった。

動物番号 4017（回復期間中の 8 mg/日群雄）は Day 198 に死亡した。被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。肺内に軽度な出血及び血管周囲の主に単核細胞浸潤／炎症が認められた。門脈周囲及び肝被膜下領域では、軽度の線維化及び散在性の色素沈着した（おそらく胆汁／鉄／ヘモジデリン）マクロファージがいくつか認められた。これらの所見の正確な原因は不明であるが（瀕死状態による切迫屠殺の可能性もあれば、そうでない可能性もある）、被験物質とは関連がないと考えられた。死因は特定できなかった。

被験物質と直接関連があると考えられる詳細な一般状態所見は認められず、4 つの所見はいずれも鼻腔内投与の処置と関連があると考えられた。これらの所見は、過度の身づくろい、鼻周囲の赤色物質（ポルフィリン染色）、床敷内で頭／鼻を擦る（単に「擦る」とも報告された）、くしゃみであった。これらの徴候はほとんどの場合、投与直後に認められたが、ポルフィリン染色は通常存在していた。くしゃみは試験最初の 5～6 週間にのみ観察され、その他 3 つの徴候はほとんどの場合、試験最初の 10～12 週間に認められた。これらの所見は休薬期間中には観察されなかった。ただし、8 mg/日の雌 1 例で Week 31 に 1 日間、過度の身づくろいが観察された。これらの所見のうち 3 つで、被験物質に関連した発現頻度の増加が雌雄共に認められた。過度の身づくろいは 6 mg/日以上で増加し、鼻周囲の赤色物質及び床敷内での擦り（rubbing）は共に 4 mg/日以上で増加した。これらの発現頻度増加を説明する他のデータはなく、関連する病理組織学的所見も認められなかった。

体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理パラメーター、肉眼的剖検所見、器官重量測定及び病理組織学的検査で被験物質に関連する所見は認められなかった。

Day 1 に処置群動物から採取した投与前の全ての検体中のジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 濃度は LLOQ を下回った（ジアゼパムの LLOQ：1.00 ng/mL、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の LLOQ：0.50 ng/mL）。Day 1 及び 180 に対照群動物から採取した全ての血漿検体中のジアゼパム及びノルジアゼパム濃度は分析の LLOQ を下回っていた。

ジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の全身曝露量は性別に依存せず、血漿中濃度、C_{max} 又は AUC 値において一貫した性差は認められなかった。ジアゼパムの $AUC_{0\text{-}24}$ の雄に対する雌の比は 0.633～1.52 であった。ノルジアゼパム及び Intravail A3 の $AUC_{0\text{-}24}$ の雄に対する雌の比は、十分な濃度－時間データが得られなかったために限定的であり、Day 1 及び 6 の 8 mg/日群並びに Day 180 の 8 mg/日群でのみ報告可能であった。雌雄比はノルジアゼパムでは 1.45～2.17、Intravail A3 では 0.361～1.23 であった。以下の考察は雌雄を併合したデータに基づく。

ジアゼパム

CV 値を指標とした平均血漿中濃度の変動は用量群間で同程度であり、Day 1 では 33.7%～149%、Day 180 では 27.8%～167%、投与後 72 時間時点の Day 185 では 77.3%～117%であった。ジアゼパムは全ての用量範囲で Day 1 及び 180 の投与後 24 時間まで定量可能であり、投与後 72 時間時点の Day 185 でも全ての用量範囲で定量可能であった。ジアゼパムの最高濃度は、Day 1 では 4 mg/日群では投与後 1 時間まで、6 及び 8 mg/日群では投与後 30 分までに認められ、Day 180 では全用量範囲で投与後 1 時間までに認められた。

ジアゼパムを連日鼻腔内投与したときの C_{max} 及び AUC_{0-24} 値は投与量増加に伴いおおむね増加した。Day 1 では、投与量の 1：1.5：2 倍の増加に伴い C_{max} は約 1：1.5：3.5 倍、AUC_{0-24} は約 1：1.3：1.9 倍に増加した。Day 180 では、投与量の 1：1.5：2 倍の増加に伴い C_{max} は約 1：1.0：1.2 倍、AUC_{0-24} は約 1：1.1：1.4 倍に増加した。

反復投与後のジアゼパムの全身曝露量は変化しなかった。4、6 及び 8 mg/日群での累積係数はそれぞれ 1.27、1.01 及び 0.933 であった。

Day 1 及び 180 のジアゼパムの平均 TK パラメーターを表 2.6.6-10 に示す。

表 2.6.6-10　Day 1 及び 180 でのジアゼパムの平均 TK パラメーター（雌雄併合のデータ）

Analyte	Dose (mg/day)	Day	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
Diazepam	4	1	607	1	3050
Diazepam	4	180	858	1	3880
Diazepam	6	1	904	0.5	4080
Diazepam	6	180	867	1	4130
Diazepam	8	1	2150	0.5	5790
Diazepam	8	180	1030	1	5400

ノルジアゼパム

CV 値を指標とした平均血漿中濃度の変動は投与量群間で同程度であり、Day 1 では 25.1%～245%、Day 180 では 22.2%～245%、Day 185 での投与後 72 時間時点の 6 mg/日群では 234%であった（Day 185 での投与後 72 時間時点の 4 及び 8 mg/日群では、濃度の値が全て定量下限未満［BLQ］であり、0 としたため、CV 値は算出できなかった）。観察されたより大きな変動は、パラメーター推定のためにいくつかの BLQ 値を 0 とし、定量可能な結果のみを用いて平均を求めたためである。これらの値を除いた場合のノルジアゼパムの平均血漿中濃度の変動は、Day 1 では 25.1%～107%、Day 180 では 22.2%～100%であった（Day 185 での投与後 72 時間時点の 6 mg/日群では CV 値は BLQ を 0 とした影響を受けた）。Day 1 及び 180 でのノルジアゼパムは、4 mg/日群では投与後 8 時間まで、6 及び 8 mg/日群では投与後 24 時間まで定量可能であった。ノルジアゼパムは、Day 185 での投与後 72 時間時点の 6 mg/日群では 2 例でのみ定量可能であった。ノルジアゼパムの最高濃度は、Day 1 では 4 及び 6 mg/日群では投与後 1 時間時点、8 mg/日群では投与後 30 分時点で認められ、Day 180 では全用量範囲で投与後 30 分までに認められた。

ジアゼパムを連日鼻腔内投与したときのノルジアゼパムの C_{max} 及び AUC_{0-24} は投与量増加に伴いおおむね増加した。ノルジアゼパムの AUC_{0-24} は、血漿中濃度－時間データが不十分であったため、Day 1 及び 180 での 6 及び 8 mg/日群でのみ定量可能であった。投与量の 1：1.5：2 倍の増加に伴い、Day 1 のノルジアゼパムの C_{max} は約 1：1.4：1.7 倍に増加し、Day 180 のノルジアゼパムの C_{max} は約 1：1.2：1.3 倍に増加した。投与量の 1：1.3 倍の増加（6 mg/日から 8 mg/日）に伴い、Day 1 及び 180 のノルジアゼパムの AUC_{0-24} は約 1：1.3 倍増加した。

ノルジアゼパムの全身曝露量（AUC_{0-24}）は、ジアゼパムの反復投与によって変化しなかった。累積係数は 6 及び 8 mg/日群でのみ算出可能であり、それぞれ 0.548 及び 0.543 であった。

ノルジアゼパムの全身曝露量（AUC_{0-24}）は、ジアゼパムを反復投与したときのジアゼパムの全身曝露量を下回った（10 分の 1 未満）。M/P 比（代謝物 AUC_{0-24}／未変化体 AUC_{0-24}）は 6 及び 8 mg/日群でのみ算出可能であり、Day 1 ではそれぞれ 0.0874 及び 0.0819、Day 180 ではそれぞれ 0.0473 及び 0.0477 であった。

Day 1 及び 180 でのノルジアゼパムの平均 TK パラメーターを表 2.6.6-11 に示す。

表 2.6.6-11　Day 1 及び 180 でのノルジアゼパムの平均 TK パラメーター（雌雄併合のデータ）

Analyte	Dose (mg/day)	Day	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
Nordiazepam	4	1	22.5	1	NA[a]
Nordiazepam	4	180	40.5	0.5	NA[a]
Nordiazepam	6	1	30.6	1	357
Nordiazepam	6	180	48.2	0.5	195
Nordiazepam	8	1	39.2	0.5	474
Nordiazepam	8	180	53.7	0.5	257

NA - Not applicable, $\%AUC_{Extrap}$ = The percent of AUC_{0-24} extrapolated from T_{last} to 24 hr; T_{last} = Time of final quantifiable sample

a　AUC_{0-24} not reported due to $\%AUC_{Extrap} > 25\%$

Concentrations of nordiazepam were not detected in vehicle control TK animals on Day 1 or Day 180, at 4 hours post dose, the only time point analyzed from this group.

Intravail® A3

試験中の全動物に固定濃度（[redacted] mg/mL）の Intravail A3 が投与され、ジアゼパム 4、6 及び 8 mg/日群での投与容量はそれぞれ 40、60 及び 80 µL であった。

CV 値を指標とした平均血漿中濃度の変動は投与量群間で同程度であり、Day 1 では 54.8%～170%、Day 180 では 34.4%～245%、Day 185 での投与後 72 時間時点では 189%～346%であった。Day 180 及び 185 にみられたより大きな変動は、パラメーター推定のためにいくつかの BLQ を 0 とし、定量可能な結果で平均を求めたためであった。これらの値を除いた場合の Intravail A3 の平均血漿中濃度の変動は、Day 180 では 34.4%～137%であった（投与後 72 時間時点の Day 185 の CV 値は全て BLQ を 0 とした影響）。Intravail A3 濃度は Day 1 の全ての用量範囲で投与後 8 時間まで定量可能であり、Day 180 の全ての用量範囲で投与後 24 時間まで定量可能であった。Day 185 での投与後 72 時間時点の Intravail A3 は、4 及び 6 mg/日群の各 1 例、8 mg/日群の 3 例で定量可能であった。Intravail A3 の最高濃度は、Day 1 では 4 及び 6 mg/日群で投与後 1 時間まで、8 mg/日群では投与後 30 分まで観察され、Day 180 での 4 mg/日群では投与後 30 分、6 及び 8 mg/日群では投与後 1 時間で認められた。

Intravail A3 を連日鼻腔内投与したときの C_{max} 及び AUC_{0-24} は投与量増加に伴いおおむね増加した。Intravail A3 の AUC_{0-24} は、血漿中濃度－時間データが不十分であったため、Day 1 の 8 mg/日群でのみ定量可能であった。Day 1 では、投与量の 1：1.5：2 倍の増加に伴い、C_{max} は約 1：1.2：4.8 倍に増加した。Day 180 では、投与量の 1：1.5：2 倍の増加に伴い、C_{max} は約 1：0.8：1.2 倍に増加し、AUC_{0-24} は約 1：1.1：1.4 倍に増加した。

Day 1 及び 180 での Intravail A3 の平均 TK パラメーターを表 2.6.6-12 に示す。

表 2.6.6-12 Day 1 及び 180 の Intravail® A3 の平均 TK パラメーター（雌雄併合のデータ）

Analyte	Dose[a] (mg/day)	Day	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
Intravail® A3	4	1	28.5	1	NA[b]
Intravail® A3	4	180	40.2	0.5	160
Intravail® A3	6	1	33.0	1	NA[b]
Intravail® A3	6	180	32.5	1	173
Intravail® A3	8	1	137	0.5	278
Intravail® A3	8	180	47.0	1	218

NA - Not applicable

a All groups received 2.47 mg/mL Intravail® A3 and the dose volume was 40, 60, and 80 µL at the 4, 6, and 8 mg diazepam dose levels, respectively. Vehicle control group animals received equivalent dose volumes (80 µL) to the 8 mg diazepam dose level group.

b AUC_{0-24} not reported due to insufficient concentration-time data

以上の結果、雌雄ラットにジアゼパム点鼻液を 4、6 及び 8 mg/日の用量で 26 週間連日鼻腔内投与したときの忍容性は良好であった。8 mg/日群における Day 180 のジアゼパムの AUC_{0-24} 及び C_{max}（雌雄併合のデータ）は、それぞれ 5400 ng·h/mL 及び 1030 ng/mL であった。8 mg/日群における Day 180 でのノルジアゼパムの AUC_{0-24} 及び C_{max}（雌雄併合のデータ）はそれぞれ 257 ng·h/mL 及び 53.7 ng/mL であった。8 mg/日群における Day 180 での Intravail A3 の AUC_{0-24} 及び C_{max}（雌雄併合のデータ）は、それぞれ 218 ng·h/mL 及び 47.0 ng/mL であった。本試験における NOAEL は 8 mg/日と推定された。

最終試験報告書を M4、2502-002 試験に示す。

2.6.6.3.5 イヌにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による毒性及び TK を検討する用量設定試験（[8290338]試験）

この非 GLP 試験は、ビーグル犬にジアゼパム点鼻液を 50 又は 100 mg/mL の濃度で鼻腔内投与したときの毒性及び忍容性を評価するために実施した。加えて、試験は、ジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の TK を評価するために実施した。

試験は 2 つのフェーズで実施した。フェーズ A はイヌの用量漸増試験であり、鼻腔内滴下によってジアゼパム点鼻液を 1 日で単回及び少数回投与した。フェーズ B では、3 群の動物にジアゼパム点鼻液を 5 日間連日反復鼻腔内滴下し、同様の投与を行った生理食塩液及び溶媒対照群と比較した。両フェーズ共に、Intravail A3（[redacted] mg/mL 又は [redacted]%）を含む非水性アルコール製剤としてジアゼパム点鼻液を鼻腔内投与した。ジアゼパム点鼻液の溶媒対照（溶媒対照）は、ジアゼパムを Intravail A3（[redacted] mg/mL 又は [redacted]%）及び高濃度のエタノールに置き換えて製剤化した。

表 2.6.6-13 及び表 2.6.6-14 に示したとおりに、雌雄ビーグル犬を 6 群に割り付け、各鼻腔あたり 100 µL の生理食塩液の対照物質（生理食塩液対照）、溶媒対照又はジアゼパム点鼻液（ジアゼパム 50 又は 100 mg/mL 含有）を鼻腔内に投与した。同一動物に対し、Day 1、4、8、11 及び 15

に投与した後に動物をストックコロニーに戻した。フェーズ B では、別の群の動物に 5 日間連日投与した後に剖検した。

表 2.6.6-13　フェーズ A：単回及び少数回投与動物

Group	No. of Animals		Dosing Day	Dose Regimen Description	Total Number of 100 µL Deliveries	Diazepam Total[a] (mg/day)
	M	F				
1 (NRL-1, 100 mg/mL)	0	3	1	DE 1: Left Nostril	1	10
			4	DE 1: Both Nostrils	2	20
			8	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 6 hours (±10 minutes) following DE 1	4	40
			11	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 10 minutes (±1 minute) following DE 1 DE 3: Both Nostrils, 6 hours (±10 minutes) following DE 1	6	60
			15	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 10 minutes (±1 minute) following DE 1 DE 3: Both Nostrils, 20 minutes (±2 minutes) following DE 1 DE 4: Both Nostrils, 30 minutes (±3 minutes) following DE 1	8	80

表 2.6.6-14　フェーズ B：5 日間反復投与動物

Group	No. of Animals		Dose Regimen Description	Total Number of 100 µL Deliveries per day	Diazepam Total[a] (mg/day)
	M	F			
2 (Saline Control)	2	2	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 40 minutes (±4 minutes) DE 3: Both Nostrils, 100 minutes (±10 minutes)	6	0
3 (Vehicle Control)	2	2	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20 minutes (±2 minutes) DE 3: Both Nostrils, 40 minutes (±4 minutes) DE 4: Both Nostrils, 60 minutes (±6 minutes) DE 5: Both Nostrils, 80 minutes (±8 minutes) DE 6: Both Nostrils, 100 minutes (±10 minutes)	12	0
4 (NRL-1, 100 mg/mL)	2	2	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 40 minutes (±4 minutes) DE 3: Both Nostrils, 100 minutes (±10 minutes)	6	60
5 (NRL-1, 100 mg/mL)	2	2	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20 minutes (±2 minutes) DE 3: Both Nostrils, 40 minutes (±4 minutes) DE 4: Both Nostrils, 60 minutes (±6 minutes) DE 5: Both Nostrils, 80 minutes (±8 minutes) DE 6: Both Nostrils, 100 minutes (±10 minutes)	12	120
6 (NRL-1, 50 mg/mL)	2	2	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 20 minutes (±2 minutes)	12	60

Group	No. of Animals		Dose Regimen Description	Total Number of 100 µL Deliveries per day	Diazepam Total[a] (mg/day)
	M	F			
			DE 3: Both Nostrils, 40 minutes (±4 minutes) DE 4: Both Nostrils, 60 minutes (±6 minutes) DE 5: Both Nostrils, 80 minutes (±8 minutes) DE 6: Both Nostrils, 100 minutes (±10 minutes)		

Notes: A Dose Event (DE) was considered delivery to one or two nostrils. The dosing was completed within 30 seconds when both nostrils were dosed. Phase B started approximately 2 weeks after the last dose administration for Phase A.

a Daily dose level was determined by the number of intranasal deliveries (100 µL/dose) each day at a concentration of 50 or 100 mg/mL diazepam.

評価項目は、生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、剖検所見及び病理組織学的検査（フェーズ B のみ）とした。フェーズ A では各投与日、及びフェーズ B では投与期間中の Day 5 に、ジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail A3 の TK 評価のために採血した。

フェーズ A では、雌イヌにジアゼパム点鼻液を最大 80 mg/日で鼻腔内滴下投与によって用量漸増した。1 日のうちの投与回数を増やし（最大 4 回まで）漸増投与した。用量制限毒性は認められなかった。被験物質に関連した一般状態所見（鎮静及び運動失調）及び一過性の所見はジアゼパムの薬理作用と一致した。

反復投与フェーズ（フェーズ B）では、雌雄イヌに生理食塩液、溶媒対照又はジアゼパム点鼻液（用量 60 又は 120 mg/日）によって 5 日間連日鼻腔内に投与した。溶媒対照及びジアゼパム点鼻液の忍容性は良好であり、用量制限毒性となるような一般状態所見あるいは毒性学的に意義のある体重又は摂餌量の変化は認められなかった。病理組織学的検査では、溶媒対照を投与した動物に鼻甲介の呼吸上皮の過形成／炎症が観察された。この所見は、雌ではジアゼパム点鼻液の投与によって悪化したが、雄では悪化は認められなかった。ジアゼパム点鼻液を 60 mg/日で 5 日間投与した雌 1 例及び 120 mg/日を 5 日間投与した雄 1 例で、鼻甲介の呼吸上皮の有害な潰瘍が認められたが、1 日あたりの投与頻度（6 回投与）によるものと考えられた。したがって、全ての用量で忍容性は良好であり、軽微な病理組織学的変化のみが観察された。5 日後、ジアゼパム点鼻液の 6 回投与によってジアゼパム 120 mg/日を投与したイヌでのジアゼパムの C_{max} 及び AUC_{0-24} はそれぞれ 705 ng/mL 及び 4870 ng·h/mL（雄）、551 ng/mL 及び 4150 ng·h/mL（雌）であった。最大投与頻度における Intravail A3（溶媒添加剤）の C_{max} 及び AUC_{0-24} は、それぞれ 1.06 ng/mL 及び 3.49 ng·h/mL 以下であった。

以上から、用量制限毒性は認められなかった。Intravail A3 及びジアゼパム点鼻液の忍容性は良好であり、用量制限毒性となるような一般状態所見又は毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

最終試験報告書を M4、8290338 試験に示す。

2.6.6.3.6　イヌにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内投与による 28 日間投与試験（[20023863]試験）

当該試験は、雌ビーグル犬に、ジアゼパム点鼻液を噴霧器によって 28 日間連日又は 28 日間中 5 日ごとに鼻腔内投与（滴下）したときの影響を評価するために、非 GLP 下で実施した。ジア

ゼパム点鼻液（[redacted] mg/mL Intravail A3 を用いて製剤化）、生理食塩液対照又はプラセボ（Intravail A3 以外のジアゼパム点鼻液の添加物）について、鼻腔内滴下によって 1 日 1 回又は 5 日ごとに左右鼻腔に交互に投与した（各群 2 例）（表 2.6.6-15）。当該試験では吸収促進剤の対照群は設定しなかった。

表 2.6.6-15　20023863 試験における投与群及び投与の割り付け

Group	Dose Material	Dose Level (mg/day)	Dose Volume (µL)	Dose Concentration (mg/mL)	Dosing Regimen
1	Control Article	0	200	0	Once daily
2	Control Article	0	200	0	Once every 5 days
3	Placebo	0	200	0	Once daily
4	Placebo	0	200	0	Once every 5 days
5	NRL-1	5	50	100	Once daily
6	NRL-1	5	50	100	Once every 5 days
7	NRL-1	10	100	100	Once daily
8	NRL-1	10	100	100	Once every 5 days
9	NRL-1	20	200	100	Once daily
10	NRL-1	20	200	100	Once every 5 days

当該試験における評価項目は、生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、体重変化、ジアゼパム及びノルジアゼパムの TK パラメーター、肉眼的剖検所見、器官重量、並びに病理組織学的検査とした。病理組織学的検査は鼻腔（上咽頭を含む 5 段階）、中咽頭及び咽頭に限定して全動物で実施した。

イヌにジアゼパム点鼻液を最大 20 mg/日まで鼻腔内投与したときの忍容性は良好であった。被験物質に関連する一般状態所見、体重及び摂餌量の変化、肉眼的病理所見、器官重量の変化、並びに病理組織学的所見は認められなかった。

これらの結果に基づき、ジアゼパム点鼻液の NOEL は、連日鼻腔内投与したジアゼパムの最高用量である 20 mg/日と考えられた。なお、ジアゼパム及びノルジアゼパムの曝露量は、どの投与期間中に得られたデータでも一致しており、蓄積性などは認められなかった。

最終試験報告書を M4、20023863 試験に示す。

2.6.6.3.7　イヌにおけるジアゼパム点鼻液の鼻腔内滴下による 4 週間反復投与毒性及び TK 試験、並びに 4 週間回復性試験（[8290343]試験）

この GLP 試験は、イヌにジアゼパム点鼻液を間歇的（1、3 又は 6 回/週）に 28 日間鼻腔内滴下によって投与したときの毒性及び TK を評価し、4 週間の休薬期間後に回復性、持続性又は遅発性を評価するために実施した。ジアゼパム、ノルジアゼパム、及びジアゼパム点鼻液に含まれる吸収促進剤である Intravail A3 の TK を評価した。

表 2.6.6-16 のとおり、雌雄ビーグル犬を 5 群に割り付け、動物の各鼻腔に生理食塩液（生理食塩液対照）、ジアゼパム点鼻液の溶媒対照（溶媒対照）又は濃度 100 mg/mL のジアゼパム点鼻液のいずれかを容量 130 µL で鼻腔内滴下によって投与した。

表 2.6.6-16 に従い、28 日間投与期間中、鼻腔内投与用に Intravail A3（[redacted]%、[redacted] mg/mL）で製剤化したアルコール製剤のジアゼパム 78 mg/日を週 1、3 又は 6 日の頻度で投与した（ジアゼパム用量 78、234 及び 468 mg/週に相当）。生理食塩液は週 6 日投与した。溶媒対照は、ジアゼパムを Intravail A3（[redacted]%、[redacted] mg/mL）及び高濃度のエタノールに置き換えて製剤化し、週 6 日投与した。各動物の鼻腔あたり投与容量 130 µL を 1 日に 6 回（各鼻腔に 3 回）投与した。Day 29 に雌雄各 4 例を剖検し、33 日間の休薬期間終了後（休薬期間 Day 33）に第 1、2、4 及び 5 群の残りの雌雄各 2 例を剖検した。

表 2.6.6-16　反復投与動物

Group	No. of Animals		Dose Frequency	Dose Regimen Description	Diazepam Total (mg/week)
	M	F			
1 (Saline Control; 6 days/week)	6	6	Days 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, and 28 (24 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 2 hours DE 3: Both Nostrils, 4 hours	0
2 (Vehicle Control; 6 days/week)	6	6	Days 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, and 28 (24 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 2 hours DE 3: Both Nostrils, 4 hours	0
3 (Low; 78 mg/day 1 day/week)	4	4	Days 1, 7, 14, 21, and 28 (5 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 2 hours DE 3: Both Nostrils, 4 hours	78
4 (Mid; 78 mg/day 3 days/week)	6	6	Days 1, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 26, and 28 (12 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 2 hours DE 3: Both Nostrils, 4 hours	234
5 (High; 78 mg/day 6 days/week)	6	6	Days 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, and 28 (24 days total)	DE 1: Both Nostrils DE 2: Both Nostrils, 2 hours DE 3: Both Nostrils, 4 hours	468

Note: A Dose Event (DE) was considered administration to both nostrils.
All animals were administered six total deliveries (three per nostril) on a dosing day.

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理検査、剖検所見、器官重量測定、並びに病理組織学的検査によって毒性評価を行った。TK 評価用の血液検体を分析した。

イヌにジアゼパム点鼻液を週 1、3 又は 6 日投与したときのジアゼパム及びノルジアゼパムの曝露量は Day 1 と Day 28 でおおむね同程度であった。全てのジアゼパム点鼻液投与群で、ジアゼパム及びノルジアゼパムの平均 C_{max} 及び AUC_{0-24} の性差はおおむね 2 倍未満であった。平均 C_{max} 及び AUC_{0-24} の未変化体に対する代謝物の比は全体で 2.25～13.6 であり、Day 1 と Day 28 でおおむね同程度であった。

ジアゼパム点鼻液又は溶媒対照に含まれる Intravail A3 を 1.95 mg/回で投与したときの Intravail A3 の平均 C_{max} は 2.41 ng/mL 以下であった。Intravail A3 の血漿中濃度は、Day 1 及び 28 の初回投与後 8 時間（3 回投与後 4 時間）までに LLOQ をおおむね下回った。ジアゼパム点鼻液を週 1、3 又は 6 日、あるいは溶媒対照を週 6 日、4 週間投与したときの Intravail A3 の曝露量はおおむね同程度であった。休薬期間中の Intravail A3 の血漿中濃度は LLOQ を下回った。全てのジアゼパム点鼻液又は溶媒対照投与群で、Intravail A3 の平均 C_{max} 及び AUC_{0-24} の性差はおおむね 2 倍未満であった。ジアゼパムを含まない溶媒対照を週 6 日投与した動物（第 2 群）での曝露量はジアゼパム点鼻液を週 6 日投与した動物（第 5 群）とおおむね同程度であり、ジアゼパムの存在は Intravail A3 曝露量に影響しないことが示された。TK 結果を表 2.6.6-17 に示す。

表 2.6.6-17　8290343 試験におけるジアゼパム点鼻液投与後のジアゼパム、ノルジアゼパム及び Intravail® A3 の最高濃度及び曝露量

Day	Test Article	Dose Level (mg/week)	Male		Female	
			C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
1 Day/Week						
Day 1	NRL-1 - Diazepam	78	505	1250	648	1990
	NRL-1 - Nordiazepam	78	1120	10800	1850	22400
	NRL-1 - Intravail® A3	1.95	1.36	4.64	2.15	7.53
Day 28	NRL-1 - Diazepam	78	444	919	239	868
	NRL-1 - Nordiazepam	78	1190	11000	1110	12200
	NRL-1 - Intravail® A3	1.95	0.968	2.84	0.653	3.41
3 Days/Week						
Day 1	NRL-1 - Diazepam	234	449	1120	607	1660
	NRL-1 - Nordiazepam	234	1030	10100	1320	12300
	NRL-1 - Intravail® A3	5.85	1.43	4.26	2.33	7.46
Day 28	NRL-1 - Diazepam	234	439	1220	399	1100
	NRL-1 - Nordiazepam	234	1240	11100	1410	13000
	NRL-1 - Intravail® A3	5.85	0.948	2.72	0.809	2.56
6 Days/Week						
Day 1	NRL-1 - Diazepam	468	580	1730	696	1980
	NRL-1 - Nordiazepam	468	1360	15100	1570	17400
	NRL-1 - Intravail® A3	11.7	1.39	5.72	1.94	6.12
	Intravail® A3 vehicle	11.7	2.12	4.25	2.41	7.01
Day 28	NRL-1 - Diazepam	468	635	1830	612	1620
	NRL-1 - Nordiazepam	468	1580	14500	2090	22100
	NRL-1 - Intravail® A3	11.7	0.779	2.41	0.568	2.92
	Intravail® A3 vehicle	11.7	0.838	2.40	1.19	2.45

全動物が計画剖検日まで生存した。被験物質に関連した一般状態所見は、234 又は 468 mg/週を投与した動物でみられた鎮静の評価スコアの僅かな増加のみであり、これはジアゼパムの薬理作用と一致する。溶媒対照及び全被験物質投与群の動物で投与期間中に過度の流涎及び身悶えが観察された。したがって、これらの一般状態所見は製剤投与に関連すると考えられた。

平均体重及び体重変動に差は認められなかった。雄では摂餌量の変化はみられなかった。被験物質投与群の雌では、全ての投与頻度で週平均摂餌量の僅かな増加が認められた。78 mg/週を投与した動物では投与期間中の Day 21、234 mg/週を投与した動物では投与期間中の Day 26 又は休

薬期間中の Day 29、468 mg/週を投与した動物では投与期間中の Day 27 又は休薬期間中の Day 29 に、PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、補正 QT（QTc）間隔、RR 間隔又は心拍数において被験物質に関連する変化は認められなかった。心電図の定性的評価において、ジアゼパム点鼻液による調律異常及び変化はみられなかった。

ジアゼパム点鼻液投与によって、投与期間中に以下の軽微な臨床病理検査値への影響のみが認められた。コレステロールの軽微ないし軽度の上昇（78 mg/週以上の雄及び 234 mg/週以上の雌）、トリグリセリドの軽微な増加（468 mg/週の雌）、アルカリホスファターゼ活性の軽微な上昇（468 mg/週の雌雄）、尿量増加及び尿比重減少（468 mg/週の雄及び 234 mg/週以上の雌）。これらの所見は休薬期間終了時に回復し、変化の程度が僅かであったことから有害又は毒性学的に意義があるとは考えられなかった。

468 mg/週の雌では、肝臓／胆嚢重量の被験物質に関連する増加が認められたが、これは病理組織学的変化を伴わず毒性ではなく、適応反応と考えられた。これらの変化は 4 週間休薬期間終了後に完全に回復した。投与終了時及び休薬期間終了時の剖検において、その他の被験物質に関連する肉眼的病理所見及び病理組織学的所見は認められなかった。鼻甲介では、ジアゼパム点鼻液の溶媒を投与した雌雄で粘膜への好中球浸潤の増加が認められたが、ジアゼパム点鼻液を投与した雌では同様の所見は認められなかったことから、被験物質に関連した変化ではなく、溶媒対照に関連した変化であると考えられた。生理食塩液対照群の動物はこの所見を示さなかったことから、鼻甲介内の粘膜内好中球の増加はジアゼパム点鼻液の溶媒に関連したものであり、鼻腔内滴下の投与手技又は被験物質に関連したものではないことが確認された。休薬期間終了時の剖検において、被験物質又は溶媒を投与した動物ではこの病変を示す動物はいなかったため、この変化は可逆的であると考えられた。

結論として、1 週あたりの投与頻度に関わらず、ジアゼパム点鼻液の投与によって毒性学的に意義のある臨床病理及び病理組織学的変化は認められなかった。動物は投与に対する嫌悪（投与中に過度の流涎及び身悶え）を示した。これは溶媒に関連した影響と推測されるが、毒性とは考えられなかった。さらに、溶媒及び投与手技に関連した影響は認められたが、これらの作用は適応反応であり、毒性ではないと考えられた。本試験における NOAEL は 78 mg/日（468 mg/週）と推定された。

最終試験報告書を M4、8290343 試験に示す。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

今回の承認申請はジアゼパムの投与経路変更によるため、ジアゼパム点鼻液の遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

今回の承認申請はジアゼパムの投与経路変更によるため、ジアゼパム点鼻液のがん原性試験は実施しなかった。

ラット及びマウスにジアゼパム 75 mg/kg/日をそれぞれ 104 及び 80 週間混餌投与したときの腫瘍発生率の上昇は認められないことが示されている（de la Iglesia 1981）。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

ジアゼパム点鼻液の生殖発生毒性試験は実施しなかった。

ジアゼパムを 100 mg/kg 以上（mg/m^2 ベースで最大推奨臨床用量［MRHD=1 mg/kg/日］の約 8 倍）の用量でマウス及びハムスターに単回経口投与したときに催奇形性が示されている。最も多い所見は口蓋裂及び外脳であり、これらの動物種の器官形成期に母動物毒性が生じる高用量のジアゼパムを投与したときに一貫して報告される奇形である。げっ歯類の試験から、出生前に臨床用量付近のジアゼパムを曝露されると細胞性免疫応答、脳神経化学及び行動に長期的な変化が生じることが示されている（Diastat 2016）。

ラットにジアゼパムを経口投与する生殖試験において、交配前及び交配期間中並びに妊娠及び授乳期を通じて 1 日あたり 100 mg/kg（mg/m^2 ベースで MRHD の約 16 倍）の用量で経口投与した結果、妊娠動物数及び生存出生児数が減少した。1 日あたり 80 mg/kg（mg/m^2 ベースで MRHD の約 13 倍）の用量では受胎能及び出生児の生存への毒性はみられなかった（Diastat 2016）。

本邦で承認されたジアゼパム製剤の情報によると、ラットにジアゼパムを 50 mg/kg までの用量で経口投与した妊娠前及び妊娠初期投与試験では、性周期及び生殖能に異常は認められなかった。妊娠ラットにジアゼパムを 10、100 又は 500 mg/kg の用量で妊娠 7～12 日に経口投与した結果、500 mg/kg 投与群では胎児死亡率が上昇したが、100 mg/kg 以下の投与群では対照群と差異はみられなかった。また、胎児に催奇形性は認められなかった。ラットを用いてジアゼパムを 50 mg/kg までの用量で経口投与した周産期、授乳期投与試験では、新生児の生後発育（形態分化、学習能、生殖能など）に影響は認められなかった（ジアパックス®インタビューフォーム）。

2.6.6.7　局所刺激性試験

2.6.6.7.1　鼻腔内投与及び静脈内投与による局所刺激性／薬物動態試験（予備試験）（[0852LN45.001]試験）

New Zealand White 雄ウサギに 6 種類のジアゼパム点鼻液製剤を鼻腔内投与したときのジアゼパムの鼻腔での吸収、血漿中薬物動態及び忍容性をジアゼパムの静脈内投与後と比較し、選択した鼻腔内投与製剤を鼻腔内投与後の鼻粘膜への刺激性を評価するために、局所刺激性／薬物動態試験を実施した。

本試験は 1 群あたり 5 例の雄ウサギを 7 群に無作為に割り付けた単回投与試験とした。鼻腔内投与群の全ての動物に、液剤 3.5 mg（Group 1～3）又は懸濁剤 10 mg（Group 4～6）のいずれかを 50 µL の一定容量で投与した。比較対照群には 1.4 mg/kg（ジアゼパム 5 mg に相当）を単回静脈内投与した（Group 7）。試験デザイン及び投与レジメンを表 2.6.6-18 にまとめた。

表 2.6.6-18　試験デザイン及び投与レジメン（0852LN45.001 試験）

Group	Number of Animals/Sex	Route of Administration	Diazepam Concentration (mg/mL)
1	5/M	Intranasal	70

Group	Number of Animals/Sex	Route of Administration	Diazepam Concentration (mg/mL)
2	5/M	Intranasal	70
3	5/M	Intranasal	70
4	5/M	Intranasal	200
5	5/M	Intranasal	200
6	5/M	Intranasal	200
7	5/M	Intravenous	5

各採血時点で一般状態を観察し、剖検時に選択した製剤投与群から鼻粘膜組織を採取して病理組織学的評価に供した。薬物動態パラメーターの算出は[redacted]が実施した。6 種類全ての製剤において鼻腔内投与での忍容性は良好であった。

一部の鼻腔内投与製剤を投与後に、いくつかの一般状態所見が認められた。バッチ番号 FID 2600（Group 1）製剤又はバッチ番号 FID 2789（Group 2）製剤を 50 µL の容量で鼻腔内投与した結果、1 時間後に各群の全動物 5 例に活動性低下が認められた。これらの個体は投与 2 時間後までに正常な状態に回復した。バッチ番号 FID 2603（Group 4）製剤を 50 µL の容量で鼻腔内投与した結果、1 例で投与 10 分及び 15 分後に努力呼吸が認められたが、30 分後までに正常な状態に回復した。バッチ番号 FID 2790（Group 5）製剤又はバッチ番号 FID 2792（Group 6）製剤を 50 µL の容量で鼻腔内投与した結果、1 時間後に 10 例中 9 例に活動性低下が認められた。これらの個体は投与 2 時間後までに正常な状態に回復した。

ジアゼパムを 1.4 mg/kg の用量で静脈内投与した結果、忍容性が認められた。投与 10 分から 15 分後まで、5 例に歩行異常、姿勢異常、活動性低下及び無活動が観察された。投与 30 分から 2 時間後まで活動性低下は持続しており、5 例中 3 例で身体緊張の弛緩及び反復性の眼球運動が観察された。投与 4 時間後まで、全動物は正常であった。

血液試料は全ての時点で予定どおり採取した。病理組織学的検査のために全ての鼻腔部を採取した。被験物質（Group 3：[redacted]% Intravail A3 含有 70 mg/mL ジアゼパム溶液、Group 6：[redacted]% Intravail A3 含有 200 mg/mL ジアゼパム懸濁液）を投与したとき、いずれの時点でも鼻孔に著しい変化は観察されなかった。病理組織学的検査では、Group 3 と Group 6 の間で差は認められなかった。

薬物動態の成績を[2.6.4.3.1.1]に記載し、最終試験報告書を M4、0852LN45.001 試験に示す。

2.6.6.7.2 鼻腔内投与及び静脈内投与による局所刺激性／薬物動態試験（[0852LN45.002]試験）

New Zealand White 雄ウサギに 6 種類のジアゼパム点鼻液製剤を鼻腔内投与したときのジアゼパムの吸収、血漿中薬物動態及び忍容性をジアゼパムの静脈内投与後と比較し、選択した鼻腔内投与製剤で鼻腔内投与後の鼻粘膜への刺激性を評価するために、局所刺激性／薬物動態試験を非 GLP 下で実施した。

本試験は 1 群あたり 5 例の雄ウサギを 7 群に無作為に割り付けた単回投与試験であった。鼻腔内投与量は 10 mg 又は 5 mg（ジアゼパム 200 又は 100 mg に相当）、比較用の静脈内投与量は 1.4 mg（ジアゼパム 5 mg に相当）とした。第 1～6 群の全例への鼻腔内投与容量は 50 µL とした（新懸濁剤：Group 1～3、旧懸濁剤［[0852LN45.001]試験で使用］：Group 4～5、新液剤：Group

6)。第 7 群には 1.4 mg/kg の用量を単回静脈内投与した。投与後、各個体から血液試料を連続的に採取した。各採血時点で一般状態を観察した。第 5 及び 6 群の動物から剖検時に鼻粘膜組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン中で保存して病理組織学的検査のために [redacted]
に送付した。血漿試料の検査は [redacted] が実施した。

本試験の結果から、6 種類全ての製剤の鼻腔内投与において忍容性は良好であった。一部の鼻腔内投与製剤を投与後に、いくつかの一般状態所見が観察された。第 1、3 及び 4 群では、第 3 群の 1 例（投与後 15 及び 30 分に活動性低下、歩行異常及び姿勢異常）を除く全例で、投与後のいずれの時点でも正常であった。第 2 群では、5 例全例で投与後 30 分及び 1 時間に活動性低下が観察されたが、投与後 2 時間では正常であった。第 5 群では、5 例全例で投与後 30 分から 1 時間まで活動性低下、歩行異常及び姿勢異常が認められたが、投与後 2～3 時間まで正常であった。第 6 群では、5 例中 4 例で投与後 30 分に活動性低下が認められたが、投与後 1 時間では正常であった。ジアゼパムを静脈内投与したところ、5 例全例で投与後約 2 時間まで一般状態所見として活動性低下、歩行異常、姿勢異常及び虚脱が観察された。静脈内投与後 2～4 時間まで全例が正常であった。

血液試料は全ての時点で予定どおり採取した。病理組織学的検査のために全ての鼻腔部を採取した。剖検時では、鼻孔／鼻粘膜に関する肉眼的所見は認められなかった。対照群では病理組織学的検査を実施しなかった。

第 5 群と比較して第 6 群（[redacted]% Intravail A3 含有 100 mg/mL ジアゼパム溶液）で最も多く認められた所見は鼻腔の細胞残渣であった。全ての細胞残渣に量は様々であるが骨片が含まれていたことから、細胞残渣の所見は基底にある血管／組織に損傷を与える処理（骨の薄切）に起因するものであるため、被験物質の影響ではないと考えられた。

病理組織学的検査では、評価した鼻腔組織に被験物質に関連する変化は認められなかった。

薬物動態の成績を[2.6.4.3.1.2]に記載し、最終試験報告書を M4、0852LN45.002 試験に示す。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 依存性

ジアゼパム点鼻液の依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.1.1 薬物乱用

ジアゼパムは他のベンゾジアゼピン系薬剤と同様に乱用される可能性がある。ジアゼパム及びその他のベンゾジアゼピン系薬剤は、特に $GABA_A$ 受容体への作用を介した GABA 作動性神経伝達を増強する。

2.6.6.8.1.2 薬物依存性

ジアゼパムは薬物依存を生じる可能性がある。患者に対するジアゼパム点鼻液の投与頻度は 5 日に 1 回以下かつ月 5 回以下とすることが推奨される。

嗜癖傾向のある者（薬物嗜癖又はアルコール依存症など）は習慣性及び依存性を生じる素因を有するため、そのような患者にジアゼパム又はその他の向精神薬を投与する際は注意深く監視する。

ジアゼパムを定期的に長期間使用した後に突然中止した場合、バルビツール系薬剤やアルコールで認められるものと類似の特徴を有する離脱症状（痙攣、振戦、筋痙攣、嘔吐、発汗）がみられることがある。より重度の離脱症状は通常、長期間にわたり過量投与を受けた患者に限られる。治療用量のベンゾジアゼピン系薬剤を数ヵ月間連用した後に突然中止した場合は通常、より軽度の離脱症状（例：不快気分、不眠症）が報告されている。

2.6.6.8.2　不純物／分解物

2.6.6.8.2.1　原薬

ジアゼパム点鼻液の原薬では安全性の確認が必要な閾値を超える不純物はない。

2.6.6.8.2.2　製剤

ジアゼパム点鼻液の製剤規格では、ジアゼパム関連化合物 B が安全性の確認を必要とする閾値を超えている。以下の試験を実施して安全性を確認した。

2.6.6.8.2.2.1　ジアゼパム関連化合物 B の毒性試験

GLP に準拠した 3 つの毒性試験（ラット 90 日間鼻腔内反復投与毒性試験、細菌を用いる復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる染色体異常試験）によって、ジアゼパム関連化合物 B（RCB）の 8.0%（3.2 mg/日）での安全性が示されているので、ICH Q3B ガイドラインに従い、製剤で 1 日最大投与量 40 mg を投与した場合、最大 8.0%（3.2 mg/日）の安全性は確認されている。

2.6.6.8.2.2.1.1　Sprague-Dawley ラットにおけるジアゼパム関連化合物 B の 90 日間鼻腔内投与毒性試験及び 3 週間回復性試験（[0470RN45.001]試験）

この GLP 適用試験は、SD ラットに不純物である RCB を 2 日に 1 回、最長 90 日間鼻腔内投与したときの安全性を確認するために実施した。3 週間の休薬期間後、観察された変化の回復性を評価した。試験デザインを表 2.6.6-19 に示す。

表 2.6.6-19　ラットを用いた RCB の 90 日間鼻腔内投与毒性試験の試験デザイン

Group	Concentration (mg/mL)	Dose Volume* (µL/dosing day)	Number of Animals**	
			Male	Female
1. Vehicle Control	0	40	15	15
2. RCB Low-Dose	0.9	40	15	15
3. RCB Mid-Dose	4.7	40	15	15
4. RCB High-Dose	9.4	40	15	15

*Animals were administered 20 µL per nostril once every other day

**Ten (10) animals/sex/group in Groups 1-4 were targeted for euthanasia at completion of the dosing phase on day 91. Five (5) animals/sex/group in Groups 1-4 were targeted for a recovery phase lasting at least 3 weeks (Necropsy on Day 115 for males and Day 113 for females).

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査、剖検所見及び病理組織学的検査によって毒性を評価した。

本試験中に被験物質に関連した死亡は認められなかった。全動物が Day 91、113 又は 115 の剖検予定日まで生存した。

被験物質に関連した一般状態所見は認められなかった。高頻度で認められた一般状態所見は動物の鼻孔周囲の赤色化及び脱毛であった。眼周囲の赤色化も観察された。これらの所見の出現頻度は対照動物と処置動物で同程度であり、用量との相関は認められなかった。低頻度で認められた所見は、赤色鼻汁及び痂皮形成であり、雌雄共に認められ、用量との相関は認められなかった。一般状態所見は全て投与終了後 1 週以内に消失し、回復性評価動物は全て休薬期間終了時に正常であった。

体重、体重変動及び摂餌量に対する被験物質に関連した影響は認められなかった。眼科学的検査においても被験物質に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査又は凝固系検査に対する被験物質に関連した影響は認められなかった。高用量群の雄、及び中・高用量群の雌において統計学的に有意なナトリウム高値が認められた。3 週間の休薬期間終了後もナトリウム濃度は高値のままであった。しかし、雌雄共に増加の程度は小さく、過去の正常範囲内であった。尿検査項目に対する被験物質に関連した影響は認められなかった。

剖検時に、絶対及び相対器官重量の被験物質に関連した変化、並びに被験物質に関連した剖検所見は認められなかった。検討した全ての組織で病理組織学的所見は観察されなかった。ただし、一部動物では鼻の尾側に向かって 4 番目（レベル 4）の鼻甲介切片が人為的に変形又は不適切であったために評価できなかった。第 1 群（対照群）の雄 10 例中 4 例及び雌 10 例中 6 例、並びに第 4 群（高用量群）の雄 10 例中 3 例及び雌 10 例中 4 例で、レベル 4 の鼻甲介切片の病理組織学的評価を実施できなかった。適切なレベル 4 の鼻甲介組織切片が得られた第 1 群及び第 4 群の残りの試験動物では病理組織学的所見は認められず、より吻側の鼻の尾側に向かって 1～3 番目（レベル 1～3）の鼻甲介切片においても変化は認められなかった。第 4 群（高用量群）のその他の組織における全ての所見の出現頻度は第 1 群（対照群）と同程度であり、この試験で用いた動物種の年齢及び系統から自然発生的なものと考えられた。

この試験データの概要表は[2.6.7.17.1.1]に示す。

要約すると、雌雄共に、RCB の最高用量群において、対照群と比較して検査結果に相違はみられず、肉眼的病理及び病理組織学的所見も認められなかった。これらの結果に基づき、ジアゼパム RCB を 2 日に 1 回、90 日間投与したときの NOAEL は、最大濃度 9.4 mg/mL を各鼻腔あたり容量 20 µL（合計 40 µL）で投与した用量と推定された。

Emami らによる最近の公表論文によると、鼻腔内投与薬物の安全域は、全身及び局所組織に対する両方の安全性を考慮した方法によって算出することができる。この試験では、1）ラットの鼻腔表面積から求めた NOAEL のヒト鼻腔表面積から求めた臨床用量に対する比、並びに 2）体表面積（BSA）から求めた NOAEL のヒト推定用量に対する比によって安全域を算出した。ど

ちらのアプローチも FDA ガイダンスと一致する。FDA ガイダンス「健康成人被験者を対象とした治療薬の初回臨床試験における最大限安全な開始用量の推定（2005 年 7 月）」では、鼻腔内「治療薬は濃度（例：mg/適用部位面積）で標準化すること」及びラットとヒトの BSA の適切な換算係数を提供することを示している。

鼻腔表面積に基づく計算では、安全域は鼻腔表面積（cm^2）あたりの RCB 量（mg）として算出される。ラットの鼻腔表面積は 20 cm^2 であり、ヒトの鼻腔表面積は 181 cm^2 である（Emami 2018）。BSA に基づく安全域の計算では、前記の FDA ガイダンスに従い、換算係数 0.16 を用いて、ラットの用量をヒト等価用量に標準化した。

ジアゼパム点鼻液の投与方法

添付文書案に記載されている体重に基づくジアゼパム点鼻液の投与方法を表 2.6.6-20 に示す。RCB の安全域の算出では、1 日最大 2 回投与の仮定に基づき、BSA に基づく安全域については、ワーストケースシナリオである各年齢区分での最小体重を用いた。

表 2.6.6-20　推奨用量

年齢／体重別の投与量			
2～5 歳 （0.5 mg/kg）	6～11 歳 （0.3 mg/kg）	12 歳以上 （0.2 mg/kg）	用量 （mg）
体重（kg）	体重(kg)	体重(kg)	
6～11	10～18	14～27	5
12～22	19～37	28～50	10
23～33	38～55	51～75	15
34～44	56～74	76 以上	20

安全域の計算：鼻腔内濃度（mg/cm^2）

[0470RN45.001]試験での NOAEL は RCB の高用量 0.376 mg/日（9.4 mg/mL × 40 µL/日）であった。ラットの鼻腔表面積を 20 cm^2 と仮定すると、これは 0.019 mg/cm^2/日の用量に等しい。

鼻腔表面積に基づく安全域の算出の要約を表 2.6.6-21 に示す。RCB の規格限度値 5.0%、6.0%及び 8.0%の場合の計算結果を示す。RCB の規格限度値 5.0%の場合の安全域は 1.7～6.8、6.0%の場合の安全域は 1.4～5.8 であった。RCB 限度値 8.0%の場合の許容可能な安全域（1.1～4.3）が得られた。

安全域の計算：体表面積

[0470RN45.001]試験の終了時（Day 90）における高用量群の動物の平均体重は 434 g（雄）及び 249 g（雌）であった（ラットの体重は試験終了時が最も大きかったことから、これはワーストケースシナリオである）。これは、雄ラットでは RCB の 1 日用量 0.866 mg/kg/日（0.376 mg/日 ÷ 0.434 kg）、雌ラットでは 1.51 mg/kg/日（0.376 mg/日 ÷ 0.249 kg）に相当する。換算係数 0.16 を用いると、ヒトでの等価用量は、雄ラットでは 0.139 mg/kg/日、雌ラットでは 0.242 mg/kg/日であった。

RCB の規格限度値 5.0%及び 8.0%における体表面積に基づく安全域の要約を表 2.6.6-22 に示す。RCB の規格限度値 5.0%における安全域は、雄ラットでは 2.6～3.9、雌ラットでは 4.6～6.8、格限度値 6.0%における安全域は、雄ラットでは 2.2～3.2、雌ラットでは 3.8～5.6 であった。RCB の限度値 8.0%における許容可能な安全域（雄：1.6～2.4、雌：2.9～4.2）も得られた。

結論

[0470RN45.001]試験の結果に基づき、鼻腔内濃度及び体表面積を用いて RCB 5.0%、6.0%及び 8.0%での安全域を算出した。どちらの方法及び濃度を用いても許容可能な安全域が示され、全身及び局所作用に対する RCB の安全性が確認された。

RCB の最大 8.0%においても許容可能な安全域が得られた。

最終試験報告書を M4、0470RN45.001 試験に示す。

表 2.6.6-21　ジアゼパム関連化合物 B（RCB）の曝露量及び安全域 - 鼻腔表面積

NRL-1 Dose (mg)	5.0% RCB Specification				6.0% RCB Specification				8.0% RCB Specification			
	RCB Dose (mg) (dose × 5.0%)	Maximum RCB Dose (mg/day)*	Human Dose (mg/cm^2)**	Safety Margin***	RCB Dose (mg) (dose × 6.0%)	Maximum RCB Dose (mg/day)*	Human Dose (mg/cm^2)**	Safety Margin***	RCB Dose (mg) (dose × 8.0%)	Maximum RCB Dose (mg/day)*	Human Dose (mg/cm^2)**	Safety Margin***
5	0.25	0.5	0.0028	6.8	0.30	0.6	0.0033	5.8	0.40	0.8	0.0044	4.3
10	0.50	1.0	0.0055	3.4	0.60	1.2	0.0066	2.9	0.80	1.6	0.0088	2.1
15	0.75	1.5	0.0083	2.3	0.90	1.8	0.0099	1.9	1.20	2.4	0.0133	1.4
20	1.00	2.0	0.0110	1.7	1.20	2.4	0.0133	1.4	1.60	3.2	0.0177	1.1

* Maximum of two NRL-1 doses/day

** Assumes a nasal cavity surface area of 181 cm^2

*** Safety Margin = (NOAEL from 90-day rat study in mg/cm^2) ÷ (human dose in mg/cm^2)

表 2.6.6-22　ジアゼパム関連化合物 B（RCB）の曝露量及び安全域 - 体表面積

NRL-1 Dose (mg)	Body Weight (kg)	5.0% RCB Specification				6.0% RCB Specification				8.0% RCB Specification			
		RCB Dose (mg) (dose × 5.0%)	Maximum RCB Dose (mg/day)*	Human Dose (mg/kg/day)	Safety Margin** M / F	RCB Dose (mg) (dose × 6.0%)	Maximum RCB Dose (mg/day)*	Human Dose (mg/kg/day)	Safety Margin** M / F	RCB Dose (mg) (dose × 8.0%)	Maximum RCB Dose (mg/day)*	Human Dose (mg/kg/day)	Safety Margin** M / F
5	10	0.25	0.5	0.050	2.8 / 4.8	0.30	0.6	0.060	2.3 / 4.0	0.40	0.8	0.080	1.7 / 3.0
10	19	0.50	1.0	0.053	2.6 / 4.6	0.60	1.2	0.063	2.2 / 3.8	0.80	1.6	0.084	1.6 / 2.9
15	38	0.75	1.5	0.039	3.5 / 6.1	0.90	1.8	0.047	2.9 / 5.1	1.20	2.4	0.063	2.2 / 3.8
20	56	1.00	2.0	0.036	3.9 / 6.8	1.20	2.4	0.043	3.2 / 5.6	1.60	3.2	0.057	2.4 / 4.2

* Assumes maximum of two NRL-1 doses/day

** Safety Margin = 90-day rat study HED (0.139 mg/kg/day [males] or 0.242 mg/kg/day [females]) ÷ Human Dose (mg/kg/day)

M / F: Male / Female

2.6.6.8.2.2.1.2　細菌を用いる復帰突然変異試験（[AG01VV.502ICH.BTL]試験）

この GLP 適用試験は、細菌を用いる復帰突然変異試験（エームス試験）プレート法を用いて RCB の変異原性を検討するために実施した。代謝活性化のために Aroclor 1254 で誘導したラット肝 S9 存在下及び非存在下で、RCB をネズミチフス菌株（*Salmonella typhimurium*）TA98、TA100、TA1535 及び TA1537、並びに大腸菌株（*E. coli*）WP2 *uvrA* と共にインキュベートした。予備試験で検討した用量は 6.67、10.0、33.3、66.7、100、333、667、1000、3333 及び 5000 µg/plate であった。333、667 又は 1000 µg/plate の用量では、試験開始時に全ての条件下で沈殿物が認められた。667、1000、3333 又は 5000 µg/plate では、試験開始時に一部の条件下で毒性が認められた。これらの結果に基づき、変異原性試験で検討する最高用量は 5000 µg/plate とした。

変異原性試験で検討した用量は 15.0、50.0、150、500、1500 及び 5000 µg/plate であった。500、1500 又は 5000 µg/plate では、試験開始時に全ての条件下で沈殿物が観察された。500、1500 又は 5000 µg/plate では、試験開始時に一部の条件下で毒性が認められた。いずれの試験菌株においても、S9 活性化の存在下及び非存在下で変異原性は認められなかった。S9 活性化の存在下及び非存在下で陽性対照は適切な反応を示したため、試験方法の妥当性が確認された。

これらの結果から、代謝活性化系の存在下又は非存在下において、ネズミチフス菌のいくつかの菌株の一部の遺伝子座及び大腸菌株（WP2 *uvrA*）のトリプトファン遺伝子座において、RCB は復帰突然変異試験で変異原性を示さなかった。

この試験データの概要表を[2.6.7.17.1.2.1]に記載し、最終試験報告書を M4、AG01VV.502ICH.BTL 試験に示す。

2.6.6.8.2.2.1.3　チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる in vitro 哺乳類染色体異常試験（[AG01VV.331ICH.BTL]試験）

この GLP 適用試験は、代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて、RCB の染色体構造異常の誘発能を評価するために実施した。S9 存在下及び非存在下で CHO 細胞を 4 時間処理し、S9 非存在下で 20 時間処理した。

細胞毒性を検討する予備試験では、濃度範囲は 0.0285～285 µg/mL（1 mmol/L）とし、最高濃度は試験で検討できる限界濃度であった。85.5 µg/mL 以上の濃度の 3 つの全処置群で細胞毒性（溶媒対照と比較して細胞増殖指数が 45%以上減少）が観察された。処理終了後、濃度 85.5 µg/mL 以上の 3 つの各処置群では、目視で確認可能な沈殿物が観察された。これらの結果に基づき、染色体異常試験での設定濃度は 15.7～80 µg/mL とした。

染色体異常試験では、代謝活性化系 S9 非存在下 4 時間曝露群では 64 µg/mL 以上、S9 存在下 4 時間曝露群では 51.2 µg/mL 以上、及び S9 非存在下 20 時間曝露群では 41 µg/mL 以上の濃度で細胞毒性（溶媒対照と比較して細胞増殖指数が 45%以上減少）が観察された。処理終了後、S9 存在下及び非存在下 4 時間曝露群では 51.2 µg/mL 以上、S9 非存在下 20 時間曝露群では 64 µg/mL 以上の濃度で目視にて確認可能な沈殿物が認められた。染色体異常評価に用いた濃度は、S9 存在下及び非存在下 4 時間曝露群では 26.2、41 及び 51.2 µg/mL、S9 非存在下 20 時間曝露群では 15.7、32.8 及び 41 µg/mL であった。

S9 の有無に関わらず、処置群のいずれの濃度においても、構造異常又は数的異常（倍数体又は核内倍加細胞）の統計学的に有意な又は用量依存的な増加は認められなかった（$p > 0.05$、Fisher の正確確率検定及び Cochran-Armitage 検定）。これらの結果は背景データの 95%範囲内であった。

これらの結果から、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、RCB は染色体の構造的及び数的異常を誘発しないことが示された。

試験データの概要表は[2.6.7.17.1.2.2]に記載し、最終試験報告書を M4、AG01VV.331ICH.BTL 試験に示す。

2.6.6.8.3 ジアゼパム点鼻液製剤に含まれる添加物

ジアゼパム点鼻液製剤に含まれる添加物組成を表 2.6.6-23 に示す。

表 2.6.6-23 ジアゼパム点鼻液製剤の添加物

Component	Solution Concentration per 100 µL Spray Volume		
	5 mg/100 µL	7.5 mg/100 µL	10.0 mg/100 µL
Tocopherol	[redacted] mg	[redacted] mg	[redacted] mg
Benzyl alcohol	[redacted] mg	[redacted] mg	[redacted] mg
Intravail® A3	[redacted] mg	[redacted] mg	[redacted] mg
Dehydrated ethanol	[redacted] µL	[redacted] µL	[redacted] µL
[redacted]			

ジアゼパム点鼻液製剤に含まれる Intravail A3 は新規の添加物であり、その毒性試験成績を以下のとおり示す。その他の添加物のトコフェロール、ベンジルアルコール及び無水エタノールについては、日本での使用前例の範囲外となり新添加物として扱われるため、これらの安全性評価を示す。

2.6.6.8.3.1 Intravail® A3

Intravail A3 の毒性試験を以下のとおり実施した。

2.6.6.8.3.1.1 Intravail® A3 の単回投与毒性試験

マウス及びモルモットを用いて、Intravail A3 の最初の単回投与毒性試験は非 GLP 下で実施された。マウス 2 例及びモルモット 2 例に Intravail A3 を 10000 µg/kg で腹腔内投与したところ毒性変化は認められなかった。マウス（雌雄各 10 例）に Intravail A3 を 400 µg/kg で静脈内投与した結果、腎尿細管に変化が観察された（Spack 1998）。

ラットに経口投与したときの 50%致死量（LD_{50}）は、2000 mg/kg 超又は 5000 mg/kg 超と推定された（Federal Register 2005）。

2.6.6.8.3.1.2　Intravail® A3 の反復投与毒性試験

2.6.6.8.3.1.2.1　ラットにおける Intravail® A3 の 2 週間鼻腔内反復投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（[0437RA33.001]試験）

この反復投与毒性試験（GLP 適用）は、ラット（1 群あたり雌雄各 15 例）に、2 週間の期間中に Intravail A3 を 0、80、200 又は 400 µg/animal（それぞれ [redacted] 又は [redacted] µg/cm^2 相当）の用量で 2 日に 1 回、合計 7 回鼻腔内投与したときの毒性を評価するために実施した。投与は、Intravail A3 を [redacted] µL [redacted]。試験群及び用量の割り付けを表 2.6.6-24 に示す。14 日間の休薬期間終了後に回復性を評価した。観察及び測定項目は、生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査、剖検所見、選択した器官の重量測定、並びに病理組織学的検査であった。

表 2.6.6-24　Intravail® A3 投与群への割り付け（0437RA33.001 試験）

Group	Treatment	Formulation Conc. (%)	Dose Level (µg/animal/dose)	Nasal dose/day[a] (µg/cm^2/dose)	Number of animals	
					M	F
1	Control	[redacted]	0	[redacted]	[redacted]	[redacted]
2	Low-dose	[redacted]	80	[redacted]	[redacted]	[redacted]
3	Mid-dose	[redacted]	200	[redacted]	[redacted]	[redacted]
4	High-dose	[redacted]	400	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted] cm^2.

2 週間の投与期間又は回復期間中に被験物質に関連した死亡及び一般状態所見は観察されなかった。体重、摂餌量、血液生化学的検査又は血液学的検査項目に対する被験物質に関連した影響はみられなかった。被験物質に関連した眼科学的所見、剖検所見及び器官重量への影響はみられなかった。被験物質の鼻腔内投与によって、中・高用量群の雌雄で鼻腔の炎症が認められた。炎症は鼻腔内の液体貯留及び好中球集積を特徴とし、その程度は雄では軽微から中等度、雌では軽微であった。高用量群の雄 10 例中 1 例で上皮過形成及び壊死が観察され、炎症の拡大と考えられた。高用量群の雄 10 例中 1 例及び高用量群の雌 10 例中 2 例で局所領域の上皮変性が認められた。[redacted]

[redacted] µg/animal ([redacted] µg/cm^2 [redacted]。[redacted]

最終試験報告書を M4、0437RA33.001 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.2.2　DFP-02：ラットにおける 4 週間鼻腔内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（[8272935]試験）

この GLP 適用試験は、DFP-02 製剤に含有する新規添加物 Intravail A3 をラットに 4 週間連日鼻腔内投与したときの Intravail A3 の安全性及び TK を確認した。この試験では、DFP-02 製剤中のスマトリプタン（片頭痛治療薬）の毒性及び TK プロファイルも検討したが、その試験成績は示さない。

Intravail A3 投与群の試験方法及び結果を以下に記載する。1 群あたり雌雄各 10 例の SD ラットに溶媒対照、[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（0、0.1、0.3 及び 10 mg/日）Intravail A3 を鼻腔内に 1 日 1 回 4 週間投与した（表 2.6.6-25）。2 週間の休薬期間で遅発毒性あるいは毒性からの回復性を評価した。

表 2.6.6-25　Intravail® A3 投与群への割り付け（8272935 試験）

Group number	Group description	Dose level (mg/day)	Number of animals in group					
			Toxicity		Treatment free		Toxicokinetics[a]	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	Vehicle control	0	10	10	5	5	3	3
2	Low ([redacted]%)	0.1	10	10	5	5	9	9
3	Mid ([redacted]%)	0.3	10	10	-	-	9	9
4	High ([redacted]%)	10	10	10	5	5	9	9

a　for toxicokinetic investigations only; no other experimental observation data from these animals has been reported

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査など）、剖検、器官重量測定、並びに病理組織学的検査によって毒性を評価した。Intravail A3 の TK についても評価した。

Intravail A3 の鼻腔内投与後 10 分以内に Intravail A3 の平均 C_{max} に到達した。低用量群では Intravail A3 は速やかに消失し、Intravail A3 濃度は投与後 4 時間以内に LLOQ（0.5 ng/mL）をおおむね下回った。Intravail A3 の $t_{1/2}$ は 0.4～2.7 時間であり、Intravail A3 高用量群（10 mg/日）では顕著に延長した。[redacted]（表 2.6.6-26）。

表 2.6.6-26　Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t

Day	Dose level (mg/day)	Male		Female	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)
1	0.1	65.1	11.6	116	16.2
	0.3	512	48.6	46.4	39.5
	10	966	416	499	362
27	0.1	4.98	4.65	10.1	8.59
	0.3	21.9	21.6	7.90	7.77
	10	82.4	159	233	219

試験期間中の死亡又は一般状態所見は観察されなかった。Intravail A3 投与に関連する体重、摂餌量、眼科学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び器官重量に変化はみられなかった。Intravail A3 による剖検及び病理組織学的所見は観察されなかった。

ラットに[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（0.1、0.3 及び 10 mg/日）Intravail A3 を 4 週間連日鼻腔内投与したときの忍容性は良好であった。本試験における NOAEL は[redacted]%（10 mg/日）[redacted]と推定された。

最終試験報告書を M4、8272935 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.2.3 DFP-02：ラットにおける 26 週間鼻腔内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（[8281782]試験）

この GLP 試験は、DFP-02 製剤に含有する新規添加物 Intravail A3 を SD ラットに 26 週間連日鼻腔内投与したときの Intravail A3 の安全性及び TK を確認した。この試験では、DFP-02 製剤中のスマトリプタンの毒性及び TK も検討したが成績は示さない。

Intravail A3 投与群の試験方法及び結果を以下に記載する。1 群あたり雌雄各 15 例の SD ラットに溶媒対照、[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（0、0.1、0.3 及び 10 mg/日）Intravail A3 を鼻腔内滴下によって 1 日 1 回 26 週間投与した（表 2.6.6-27）。4 週間の休薬期間中に遅発毒性あるいは毒性の回復性を評価した。

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査など）、剖検、器官重量、並びに病理組織学的検査によって毒性を評価した。Intravail A3 の TK を Day 1 及び Week 26 に評価した。

表 2.6.6-27 Intravail® A3 投与群への割り付け（8281782 試験）

Group number	Group description	Dose level (mg/day)	Number of animals in group					
			Toxicity		Treatment free		Toxicokinetics[a]	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	Vehicle control	0	15	15	10	10	3	3
2	Low ([redacted]%)	0.1	15	15	10	10	9	9
3	Mid ([redacted]%)	0.3	15	15	-	-	9	9
4	High ([redacted]%)	10	15	15	10	10	9	9

a for toxicokinetic investigations only; no other experimental observation data from these animals has been reported

Intravail A3 の鼻腔内投与後 30 分以内に Intravail A3 の平均 C_{max} に到達した。低用量群では Intravail A3 は速やかに消失し、Intravail A3 濃度は投与後 8 時間以内に LLOQ（0.5 ng/mL）をおおむね下回った。Intravail A3 の $t_{1/2}$ は 0.6～3.8 時間であった。C_{max} 及び AUC の増加は、用量 0.1～0.3 mg/animal/日の範囲では概して用量比例的であったが、10 mg/animal/日では用量比例性を下回った。これらのデータから、吸収経路による飽和の可能性が示唆された（表 2.6.6-28）。

表 2.6.6-28　Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t（8281782 試験）

Day	Dose level (mg/day)	Male		Female	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)
1	0.1	8.15	7.02	14.7	11.9
	0.3	48.7	35.6	42.3	28.9
	10	286	188	160	172
181	0.1	18.6	6.39	32.1	18.2
	0.3	37.2	24.9	54.3	34.4
	10	572	579	923	507

Intravail A3 投与に起因する死亡は認められなかったが、次の 2 例は試験期間中に病的状態に至ったため安楽死させた。

Intravail A3 0.1 mg/日を投与した雄 1 例は Day 178 に瀕死状態となったため試験から除外された。この動物は定期的な血液採取後に無反応となり、安楽死させた。[redacted]。

TK 評価動物に割り付けられ、Intravail A3 0.1 mg/日を投与された雌 1 例が重度の一般状態所見（足の腫脹）のために、Day 120 に試験から除外され、Day 124 に安楽死させた。[redacted]。死因は特定できなかったが、低用量群の動物であったことから、Intravail A3 投与と関連する可能性は低いと考えられる。

死亡例以外の動物では、投与に関連した一般状態所見は認められなかった。体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査において、Intravail A3 に関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、投与に関連した変化は Intravail A3 を単独投与された動物の鼻腔に限定された。Intravail A3 の 0.1、0.3 及び 10 mg/日を投与したラットでは、鼻腔の移行又は呼吸上皮における扁平上皮化生が認められた。この所見は扁平上皮細胞による移行又は呼吸上皮の置き換えを特徴とし、基底細胞から平坦化した表層上皮への進行が認められた。Intravail A3 10 mg/日を投与した雌雄動物の多くで嗅上皮の萎縮も観察された。[redacted]mg/日[redacted]。[redacted]mg/日[redacted]。

Intravail A3 を投与した他の動物では病理組織学的変化は認められなかった。

ラットに[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（0.1、0.3 及び 10 mg/日）Intravail A3 を 26 週間連日鼻腔内投与したときの忍容性は概して良好であった。本試験における NOAEL は[redacted]%（10 mg/日）[redacted] と推定された。

最終試験報告書を M4、8281782 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.2.4 DFP-02：イヌにおける 4 週間鼻腔内投与毒性試験及び 2 週間の回復性試験（[8275552]試験）

この GLP 適用試験は、DFP-02 製剤に含有する新規添加物 Intravail A3 をイヌに噴霧器によって 4 週間連日鼻腔内投与したときの Intravail A3 の安全性及び TK を確認した。この試験では、DFP-02 製剤中のスマトリプタンの毒性及び TK も検討したが成績は示さない。

Intravail A3 投与群の試験方法及び結果を以下に記載する。表 2.6.6-29 に示すとおり、1 群あたり雌雄各 3 例のビーグル犬に溶媒対照、[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（0、1.2、10 及び 40 mg/日）Intravail A3 を 4 週間鼻腔内投与した。2 週間の休薬期間中に遅発毒性あるいは回復性の評価を行った。

表 2.6.6-29 Intravail® A3 投与群への割り付け（8275552 試験）

Group number	Group description	Dose level (mg/day)	Number of animals in group					
			Toxicity		Treatment free		Toxicokinetics	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	Vehicle control	0	3	3	2	2	-	-
2	Low ([redacted]%)	1.2	3	3	2	2	5	5
3	Mid ([redacted]%)	10	3	3	-	-	3	3
4	High ([redacted]%)	40	3	3	2	2	5	5

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図、臨床病理検査（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査など）、剖検、器官重量、並びに病理組織学的検査によって毒性の評価を行った。被験物質の TK についても評価を行った。

Intravail A3 を単回鼻腔内投与したときの吸収は僅かであったが、用量比例性を上回った。Intravail A3 の平均 t_{max} には、Intravail A3 単独又は DFP-02 製剤としての鼻腔内投与後約 0.6 時間以内に到達し、その後は急速に消失し、$t_{1/2}$ は約 0.7 時間であった。Intravail A3 の吸収は Intravail A3 単独投与後よりも増加した。Intravail A3 反復投与による Intravail A3 の TK パラメーターに対する影響は僅かであった。Intravail A3 反復投与による蓄積性は認められなかった。TK 結果を表 2.6.6-30 に示す。

表 2.6.6-30 Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t（8275552 試験）

Day	Dose	Male		Female	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)
1	1.2 mg Intravail® A3	0.998	1.09	2.18	1.83

Day	Dose	Male		Female	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)
	10 mg Intravail® A3	11.3	15.9	21.8	24.0
	40 mg Intravail® A3	58.5	86.9	188	190
24	1.2 mg Intravail® A3	0.902	0.554	4.94	18.9
	10 mg Intravail® A3	4.27	5.34	8.05	10.8
	40 mg Intravail® A3	58.8	72.8	61.9	64.7

試験期間中の死亡は認められなかった。投与群のほとんどの動物及び少数の対照動物で、種々の頻度の一般状態所見（くしゃみ、匂いを嗅ぐ、鼻を擦る、鼻を舐める、頭部反転動作、流涎など）が認められたが、[redacted]。体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び器官重量において、Intravail A3 投与に関連する変化は認められなかった。

投与終了時又は休薬期間後の剖検時に、Intravail A3 投与に関連する肉眼的又は病理組織学的所見は認められなかった。主な投与終了時の剖検まで Intravail A3 を投与された少数の雌雄動物の鼻腔において呼吸上皮の扁平上皮化生が認められた。[redacted]。さらに、投与群において明らかな用量反応性は認められず、鼻腔内での随伴的な刺激の重大なエビデンスは認められなかった。[redacted]。

本試験における NOAEL は[redacted]%（40 mg/日）Intravail A3 と考えられた。

最終試験報告書を M4、8275552 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.2.5 DFP-02：イヌにおける 39 週間鼻腔内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（[8281784]試験）

この GLP 適用試験は、DFP-02 製剤に含有する新規添加物 Intravail A3 をイヌに噴霧器によって 39 週間連日鼻腔内投与したときの Intravail A3 の安全性及び TK を確認した。この試験では、DFP-02 製剤中のスマトリプタン（片頭痛治療薬）の毒性及び TK プロファイルも検討したが成績は示さない。

Intravail A3 投与群の試験方法及び結果を以下に記載する。表 2.6.6-31 に示すとおり、1 群あたり雌雄各 4 例のビーグル犬に溶媒対照、[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（0、1.2、10 及び 40 mg/日）Intravail A3 を 39 週間鼻腔内投与した。4 週間の休薬期間中に遅発毒性あるいは回復性の評価を行った。

表 2.6.6-31 Intravail® A3 投与群への割り付け（8281784 試験）

Group number	Group description	Dose level (mg/day)	Number of animals in group					
			Toxicity		Treatment free		Toxicokinetics	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	Vehicle control	0	4	4	2	2	-	-

Group number	Group description	Dose level (mg/day)	Number of animals in group					
			Toxicity		Treatment free		Toxicokinetics	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female
2	Low ([redacted]%)	1.2	4	4	2	2	6	6
3	Mid ([redacted]%)	10	4	4	-	-	4	4
4	High ([redacted]%)	40	4	4	2	2	6	6

生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図、臨床病理検査（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査など）、剖検、器官重量、並びに病理組織学的検査によって毒性の評価を行った。被験物質の TK についても、Day 1 及び Week 39（Day 269）に評価した。

Intravail A3 を単回鼻腔内投与したときの吸収は、雄では基本的に用量比例的であったが、雌では 10 mg までの用量では用量比例性を上回り、それ以降は用量比例的であった（表 2.6.6-32）。Intravail A3 の平均 C_{max} には、Intravail A3 単独としての鼻腔内投与後 1 時間以内に到達し、その後は急速に消失し、$t_{1/2}$ は約 0.4～0.8 時間であった。

表 2.6.6-32　Intravail® A3 の C_{max} 及び AUC_t（8281784 試験）

Day	Dose	Male		Female	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_t (ng·h/mL)
1	1.2 mg Intravail® A3	8.29	8.82	6.84	6.08
	10 mg Intravail® A3	90.3	113	126	141
	40 mg Intravail® A3	305	313	401	370
269	1.2 mg Intravail® A3	2.68	3.27	4.48	3.96
	10 mg Intravail® A3	34.3	31.2	61.0	68.7
	40 mg Intravail® A3	44.2	53.9	69.6	84.4

試験期間中の死亡はみられなかった。一般状態所見及び投与後の徴候は流涎及び瞳孔拡張におおむね限定していた。流涎は対照群を含む全群で認められ、投与前後に動物を取り扱う際に開始した。これは毒性徴候ではなく、処置に対するパブロフ型反応と考えられ、休薬期間中の全回復評価用動物で取扱い後に持続した。

体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量及び剖検において、Intravail A3 投与に関連する変化は認められなかった。

鼻腔及び鼻咽頭管において Intravail A3 投与に関連する病理組織学的所見が認められた。Intravail A3 の 40、10 又は 1.2 mg/日を単独投与された雌雄イヌに、鼻腔の呼吸上皮における軽微から軽度の扁平上皮細胞化生が認められた。[redacted]mg/日[redacted]。全般的に、鼻腔の変化は強い用量反応関係を示さなかった。

4 週間の回復期間終了後、これらの所見の発現頻度及び程度の低下が認められた。しかし、[redacted]mg/日[redacted]、完全な回復は示されなかった。

[redacted]。

[redacted]。

イヌに[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%（1.2、10 及び 40 mg/日）の Intravail A3 を 39 週間連日鼻腔内投与したときの[redacted]。[redacted]%（[redacted]mg/日）[redacted]。

最終試験報告書を M4、8281784 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.2.6 公表されている反復投与試験

以上の試験の他に、マウス及びサルを対象とした Intravail A3 の反復投与試験成績が報告されている（Spack 1998）。SJL マウス（10 例）では、4、40 及び 400 µg/kg を 14 日間連日静脈内投与した。有害作用は認められなかった。カニクイザル（2 例/性別）では、500 µg/kg を 2 日に 1 回、13 日間静脈内投与した。1 つの群では、更に 4 週間、週 1 回皮下注射を行った。有害作用は認められなかった。

2.6.6.8.3.1.3 Intravail® A3 の遺伝毒性試験

以下に要約した遺伝毒性試験に加え、公表情報として Intravail A3 の変異原性及び染色体異常試験（Federal Register 2005、Spack 1998）で遺伝毒性は認められなかったと報告されている。

2.6.6.8.3.1.3.1 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.6.8.3.1.3.1.1 Intravail® A3 の細菌を用いる復帰突然変異試験（[963114]試験）

この GLP 試験は、Intravail A3 の遺伝毒性を評価するために実施した細菌を用いる復帰突然変異試験である。細菌復帰突然変異試験のプレート法及びプレインキュベーション法によって、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）の試験菌株（TA1535、TA1537、TA98、TA100）及び大腸菌（*Escherichia coli*）の試験菌株 WP2 *uvrA* を補酵素添加肝画分（S9 mix）の存在下及び非存在下で、最大 5000 µg/plate までの濃度の被験物質で処理した。標準的な陽性対照物質と共に試験菌株をインキュベートし、これらの薬剤に対する種々の試験菌株の反応によって試験系の感度及び S9 mix の活性を確認した。S9 mix の非存在下又は存在下で、プレート法及びプレインキュベーション法のいずれかを用いて、被験物質に曝露させた後のどの菌株においても変異コロニー数の顕著な増加は認められなかった。

ICH S2A ガイドライン等に従い実施した in vitro 変異原性試験において、Intravail A3 は遺伝毒性のエビデンスを示さなかった。

最終試験報告書を M4、963114 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.3.1.2 Intravail® A3 の in vitro 染色体異常試験（[963115]試験）

この GLP 試験は、Intravail A3 の遺伝毒性を評価するために実施した in vitro 染色体異常試験である。ヒト末梢血リンパ球を培養液中で刺激し分裂させた後、最大 5000 µg/mL までの濃度の被験物質で処理した。[redacted]

[redacted]。[redacted]

[redacted]%[redacted]

[redacted]。

毒性の限界までの濃度の Intravail A3 で処理した培養液において、分裂中期異常の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照剤は染色体損傷を示す細胞の割合を高度に有意に増加させ、試験系の感度及び S9 mix の有効性が確認された。ICH S2A ガイドライン等に従い実施した in vitro 染色体異常試験において、Intravail A3 は遺伝毒性を示さなかった。

最終試験報告書を M4、963115 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.3.2 In vivo 遺伝毒性試験

2.6.6.8.3.1.3.2.1 Intravail® A3 の in vivo 小核試験（[963116]試験）

この GLP 試験は、Intravail A3 の遺伝毒性を評価するために実施したラット骨髄小核試験である。用量設定試験で本試験における用量を選択した。[redacted]mg/kg[redacted]mg/mL[redacted]mg/kg[redacted]mg/mL[redacted]mg/kg[redacted]mg/kg[redacted]mg/kg[redacted]mg/kg[redacted]mg/kg[redacted]mg/kg[redacted]mg/kg[redacted]。

Intravail A3 投与群では、小核を有する幼若赤血球の頻度の統計学的に有意な増加、又は幼若赤血球の占める割合の統計学的に有意な減少は認められなかった。したがって、ICH S2A ガイドライン等に従い実施した in vivo 染色体異常試験において、24 時間静脈内持続投与した Intravail A3 は遺伝毒性を示さなかった。

最終試験報告書を M4、963116 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.4 Intravail® A3 の生殖発生毒性試験

2.6.6.8.3.1.4.1 妊娠 Wistar ラットにおける Intravail® A3 の持続静注（1 日あたり 24 時間）による影響を検討した予備試験（[AA99567]試験）

この GLP 試験は、妊娠 Wistar ラットに対する Intravail A3 の影響を評価するために実施した。Intravail A3 を 30 mg/kg/日の用量で交配後の雌ラット 8 例に 24 時間持続静注した。対照群には、同一容量（60 mL/kg/日）の溶媒（生理食塩液）を投与した（表 2.6.6-33）。妊娠 6～17 日の雌に持続投与した。

表 2.6.6-33 動物の投与群の割り付け（AA99567 試験）

Group/Treatment	Dose level (mg/kg/day)	Dose volume (mL/kg/day)	Dose concentration (mg/mL)	Number of females
1. Control	0	60	0	8
2. Treated	30	60	0.5	8

試験期間全体を通して、一般状態、体重及び摂餌量をモニタリングした。妊娠 20 日に雌ラットを帝王切開し、同腹児パラメーターを記録した。剖検時に雌の肉眼的病理検査を行い、全ての胎児の重量を測定し、性別を判定し、外表異常を調べた。骨格検査を実施する前に半数の胎児で肉眼的病理検査を行い、残りの胎児は Wilson-Barrow 変法による固定内臓検査のために保存した。

試験中の死亡は認められなかった。被験物質に関連した一般状態所見はみられず、体重、体重変動及び摂餌量に対する被験物質に関連する明らかな変化も認められなかった。いずれの群においても、成熟雌動物に肉眼的病理所見は認められなかった。

[redacted]。本試験において、器官形成期（妊娠 6～17 日）の妊娠ラットに Intravail A3 を 30 mg/kg/日の用量で 24 時間持続静注したときの忍容性は良好であり、Intravail A3 は母動物の変化及び胚胎児毒性を示さないと結論付けられた。本試験における NOAEL は 30 mg/kg/日と推定された。

最終試験報告書を M4、AA99567 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.5 Intravail® A3 の局所刺激性試験及び皮膚感作性試験

ウサギにおける Intravail A3 の皮膚毒性に対する LD_{50} は 2000 mg/kg 超であると確立しており、Intravail A3 は眼刺激性を有すると考えられている（米国環境保護庁［EPA］）。しかし、Intravail A3 の濃度 30%までは皮膚に対する刺激性は認められなかったが、30～100%までの濃度では皮膚に対して刺激性を示す（Federal Register 2005）。

また、モルモットの皮膚感作性試験に基づき、Intravail A3 は皮膚感作物質ではない（Federal Register 2005）。

2.6.6.8.3.1.5.1 接触過敏性を検討するモルモットにおける皮膚感作性試験（[C78787]試験）

Intravail A3 の皮膚アレルギー誘発性を評価するために、Hartley 雄モルモット 15 例（被験物質群 10 例、対照群 5 例）を用いた皮膚感作性試験を GLP 適用下で実施した。被験物質感作群では、[redacted] の [redacted]%精製水希釈液、及びフロイント完全アジュバント（FCA）と生理食塩液のエマルジョンを、項靭帯で皮内注射し感作した。皮内注射後 1 週間目に、同一部位の表皮に被験物質（[redacted]%[redacted]）を 48 時間閉塞パッチした。対照群の動物には、精製水と FCA／生理食塩液を皮内注射した後、精製水を表皮に閉塞パッチした。閉塞パッチ後 2 週間目に、被験物質感作群又は対照群の動物に対し、それぞれ被験物質（精製水中の [redacted]% [redacted]）又は精製水単独を表皮に閉塞パッチして惹起した。

パッチ剥離後の 24 及び 48 時間目に、皮膚反応及び一般状態所見で評価した。対照群及び被験物質投与群のいずれにおいても毒性徴候又は死亡はみられなかった。対照群及び被験物質投与群の動物に、局所的な有害な皮膚反応は認められなかった。経済協力開発機構（OECD）ガイドラインに従い実施した皮膚感作性試験の結果に基づき、Intravail A3 は皮膚感作性を示さないと考えられた。

最終試験報告書を M4、C78787 試験に示す。

2.6.6.8.3.1.5.2 ウサギに Intravail® A3 を週 1 回計 2 回皮下注射したときの皮膚刺激性試験（[503595]試験）

この GLP 試験は、New Zealand White 雄ウサギ 3 例に Intravail A3 を Day 1 及び 8 に 2 回皮下投与したときの皮膚刺激性を評価するために実施した。2 例のウサギに、濃度 30 mg/mL の Intravail A3 を容量 [redacted]mL で背部左側に投与し、0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）を背部右側に投与した。他の 1 例は逆の注射方法とし、Intravail A3 を背部右側に投与し、0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）を背部左側に投与した。Day 1 及び 8 に各々異なる部位に投与した。Day 9 に動物を安楽死させて剖検した。評価パラメーターは一般状態所見、体重、注射部位、血液学的検査（剖検時）、肉眼的剖検所見及び病理組織学的検査（投与部位及び主な組織）。

一般状態所見、体重、投与部位、剖検時の血液学的検査又は肉眼的剖検所見において Intravail A3 に関連する変化は認められなかった。病理組織学的所見としては、Intravail A3 を 2 回（Day 1 及び 8）皮下投与したウサギの投与部位において[redacted]軽微から重度の亜急性炎症が観察された。

ウサギに対し、濃度 30 mg/mL の Intravail A3（約 5 mg/kg）を 7 日間隔で 2 回皮下投与したときの忍容性はおおむね良好であったが、組織学的に軽微から重度の亜急性炎症が認められ、Intravail A3 の皮膚刺激性が示唆された。

最終試験報告書を M4、503595 に示す。

ドデシルマルトシドのラットがん原性試験を実施した。ドデシルマルトシドのラットがん原性試験（104 週間）は、0.1（[redacted]%）、0.3（[redacted]%）、1.0（[redacted]%）又は 3.0（[redacted]%） mg/動物/日鼻腔内

投与で実施し、鼻腔上皮の扁平上皮化生などは投薬により認められているが、発がん性は有さないことが示唆された（[8322452]試験）。

2.6.6.8.3.2 その他の添加物の安全性評価

10 mg のジアゼパム点鼻液製剤（[redacted]μL）には添加物としてベンジルアルコール、無水エタノール及びトコフェロールはそれぞれ[redacted] mg、適量～[redacted] μL（[redacted] μL＝[redacted] mg、無水エタノールの密度：0.785 g/mL [25°C]）及び[redacted] mg を含有しており、これらは片側の鼻腔内に投与する最大用量である。片側の鼻腔内に 1 回投与したときのベンジルアルコール、無水エタノール及びトコフェロールの体重（ヒト体重を 60 kg と仮定）換算量はそれぞれ約[redacted]、[redacted]及び[redacted] mg/kg となる。また、最大臨床用量 20 mg/回を 1 日最大 2 回投与（容量：400 μL）したときの 1 日あたりのベンジルアルコール、無水エタノール及びトコフェロールの最大使用量はそれぞれ[redacted] mg、[redacted]μL（[redacted] mg）及び[redacted] mg であり、最大使用量の体重換算量はそれぞれ約[redacted]、[redacted]及び[redacted]mg/kg となる。

ベンジルアルコール及び無水エタノールの耳鼻科用剤の最高適用濃度はそれぞれ 9 mg/mL 及び 0.01 mL/mL であり（医薬品添加物事典 2021）、本製品によるいずれの使用量もそれらを上回るため、安全性評価が必要となる。ただし、ベンジルアルコール及び無水エタノールの静脈内注射の最大使用量はそれぞれ 0.5 mL（522.5 mg、ベンジルアルコールの比重：1.045 g/mL [25°C]）及び 800 mg であり、ベンジルアルコールの局所麻酔注射の最大使用量は 165.6 mg であることから、両添加物の全身曝露による安全性（一般毒性、遺伝毒性及び生殖発生毒性）については確認されていると判断される。ベンジルアルコール及び無水エタノールの鼻腔粘膜における局所刺激性についてウサギを用いた試験で評価した結果（2.6.6.8.3.2.1 項、2.6.6.8.3.2.2 項）、ヒトでの最大使用量のそれぞれ約 8.8 倍及び 2.7 倍においても明らかな局所刺激性は認められなかったことから、局所刺激性に対する安全性も確認されたと判断された。

トコフェロールについては、耳鼻科用剤への使用前例がないため、鼻腔内又は全身曝露時の安全性を評価した（2.6.6.8.3.2.3 項）。その結果、ヒトでの 1 回鼻腔内使用量（0.9 mg/kg）又は 1 日最大全身使用量（3.8 mg/kg）までのトコフェロールは、懸念される急性毒性、反復鼻腔内投与毒性、遺伝毒性、生殖発生毒性及び局所刺激性を有していないと考えられ、安全性は確認されたと判断された。

2.6.6.8.3.2.1 ベンジルアルコール

New Zealand White 雄ウサギの局所刺激性試験（[0852LN45.002]試験）において、第 6 群の雄 5 例にベンジルアルコールを 105 mg/mL の濃度でジアゼパム点鼻液製剤を 50 μL の容量（使用量：5.25 mg、ウサギ体重を 3 kg と仮定した体重換算量：1.75 mg/kg）で単回鼻腔内投与し、投与翌日に鼻腔粘膜の病理組織学的検査を実施した結果、鼻腔の扁平上皮粘膜、呼吸粘膜、嗅粘膜及び鼻甲介には異常所見が認められなかったことから、1.75 mg/kg までのベンジルアルコールは局所刺激性を有さないと考えられた。1.75 mg/kg は、ヒトに 10 mg のジアゼパム点鼻液製剤を鼻腔内投与したときのベンジルアルコールの使用量の約 8.8 倍に相当する。本項で使用したジアゼパム点鼻液製剤中の添加物組成は表 2.6.6-34 のとおりである。

表 2.6.6-34 ジアゼパム点鼻液製剤（Pilot PK Formulation）組成

Component	Concentration (mg/mL) in non-aqueous solution
Diazepam	[redacted]
Tocopherol	[redacted]
Benzyl alcohol	[redacted]
Intravail® A3	[redacted]
Ethanol	[redacted] mL
[redacted]	

2.6.6.8.3.2.2 無水エタノール

New Zealand White 雄ウサギの局所刺激性試験（予備試験[0852LN45.001]）において、Group 3 及び 6 での雄 10 例）に無水エタノールを 20.8 mg/100 µL の濃度で含むジアゼパム点鼻液製剤を 50 µL の容量（使用量：10.4 mg、ウサギ体重を 3 kg と仮定した体重換算量：3.47 mg/kg）で単回鼻腔内投与し、投与翌日に鼻腔粘膜の病理組織学的検査を実施した結果、鼻腔の呼吸粘膜の軽度なびらんが 1 例に認められたのみで、扁平上皮粘膜、呼吸粘膜、嗅粘膜及び鼻甲介に異常所見は認められなかったことから、3.47 mg/kg までの無水エタノールは明らかな局所刺激性を有さないと考えられた。3.47 mg/kg は、ヒトに 10 mg のジアゼパム点鼻液製剤を鼻腔内投与したときの無水エタノールの使用量の約 2.7 倍に相当する。本項で使用したジアゼパム点鼻液製剤中の添加物組成は表 2.6.6-35 のとおりである。

表 2.6.6-35 ジアゼパム点鼻液製剤（Original Formulation）組成

Component	Concentration (mg/100 mL) in non-aqueous solution
Diazepam	[redacted]
Tocopherol	
Ethanol	
Intravail® A3	

2.6.6.8.3.2.3 トコフェロール

トコフェロール（*dl*-α-トコフェロール）は耳鼻科用剤への使用前例はないが、経口投与並びに直腸、膣及び尿道への適用の最大使用量はそれぞれ 10.5 mg 並びに 4 mg である（医薬品添加物事典 2021）。本剤中のトコフェロールの 1 回あたり及び 1 日あたりのヒトでの最大使用量はそれぞれ 56.47 mg（体重換算量：0.9 mg/kg）及び 225.88 mg（体重換算量：3.8 mg/kg）である。

急性毒性、遺伝毒性及び生殖発生毒性の評価については、鼻腔内投与でなくとも全身曝露される投与経路であれば評価可能であるため、他の投与経路の情報によって評価した。経口投与によるトコフェロールの吸収率は約 70%～80%である（平成 30 年 3 月 27 日付 府食第 194 号）。トコフェロールの鼻腔内反復投与毒性については、ジアゼパム点鼻液のラット（[8290342]試験）及びイヌ（[8290343]試験）を用いた 4 週間鼻腔内反復投与試験で設定した溶媒対照群の結果によって評価し、局所刺激性については、ウサギを用いた鼻腔内投与又は静脈内投与後の局所刺激性／薬物動態試験（[0852LN45.001]試験）の鼻腔内投与例で実施した鼻腔粘膜の病理組織学的検査によって評価した。なお、酢酸 *dl*-α-トコフェロール（トコフェロール酢酸エステル）を使用した試験も安全性評価の一部に用いた。各項目の安全性評価の概略を表 2.6.6-36 に示した。その

結果、ヒトでの 1 回鼻腔内使用量（0.9 mg/kg）及び 1 日最大使用量（7.5 mg/kg）までのトコフェロールは、懸念される急性毒性、反復鼻腔内投与毒性、遺伝毒性、生殖発生毒性及び局所刺激性を有さないと考えられた。

単回投与毒性：マウス、ラット及びウサギに単回静脈内投与したときの LD_{50} はそれぞれ 2000 mg/kg 超、1000 mg/kg 超及び 1000 mg/kg 超である（平成 30 年 3 月 27 日付 府食第 194 号）。

反復投与毒性：ラット及びイヌにそれぞれ 56.5 及び 9.2 mg/kg のトコフェロールを 28 日間反復鼻腔内投与した結果、投与部位又は周囲の軽微ないし軽度で可逆的な炎症がみられた以外、いずれの検査においても投与による悪影響はみられず、忍容性は良好であった。

SD ラット（雌雄各 15 例、うち雌雄各 5 例は 4 週間休薬回復群）にトコフェロールを 565 mg/mL の濃度で含む媒体を 20 µL の容量（使用量：11.30 mg、ラット体重 200 g と仮定した体重換算量：56.5 mg/kg）で週 6 回 28 日間反復鼻腔内投与して、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査を実施して溶媒の毒性を評価した。生理食塩液対照群も設け、同様に投与して検査した。その結果、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査、剖検及び器官重量では媒体の投与に関連した変化は認められなかった。一般状態観察で散発的に投与後に鼻又は眼窩周囲の被毛赤色化がみられ、病理組織学的検査では可逆的な鼻甲介の軽微～軽度な炎症、軽微なびらん／潰瘍及び軽微～軽度の出血がみられ、鼻／鼻孔に可逆的な軽微な表皮過形成／炎症が認められた（[8290342]試験）。

ビーグル犬（雌雄各 6 例、うち雌雄各 2 例は 4 週間休薬回復群）にトコフェロールを 565 mg/mL の濃度で含む媒体を 130 µL の容量（使用量：73.45 mg、8 kg と仮定した体重換算量：9.2 mg/kg）で 28 日間反復鼻腔内投与して、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査を実施して媒体の毒性を評価した。生理食塩液対照群も設け、同様に投与して検査した。その結果、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理検査、剖検及び器官重量では媒体の投与に関連した変化は認められなかった。病理組織学的検査で生理食塩液対照群にみられなかった鼻甲介粘膜における軽微な好中球浸潤が認められた（雄 1 例、雌 2 例）（[8290343]試験）。

遺伝毒性：*dl*-α-トコフェロール又は酢酸 *dl*-α-トコフェロールを使用して in vitro 試験として復帰突然変異及び染色体異常試験が、in vivo 試験として小核試験が実施されており、いずれの試験においても陰性であった（平成 30 年 3 月 27 日付 府食第 194 号）。

生殖発生毒性試験：混餌／経口投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する試験が実施されており、ラットにおいて 75 mg/日の用量で明らかな妊娠率の低下がみられたが、妊娠マウス、ラット及びウサギへの器官形成期投与によって 1600 mg/kg の用量においても催奇形性は認められなかった（Fiume 2018）。

Wistar ラット（各群雌雄各 10 例）の交配前 20 日から妊娠期間を通じて α-トコフェロールの 0.75、7.5 及び 75 mg/日を混餌投与し、妊娠 20 日に剖検した結果、対照群では全例妊娠したが、7.5 及び 75 mg/日群の妊娠率はそれぞれ 90%及び 50%であった。75 mg/日群では生存胎児数が僅

かに低値を示し、両群で吸収胚が散見された。胎児体重は全群で同程度であり、軽微な骨化遅延が観察されたものの異常胎児は認められなかった（Andersen 2002）。

CD-1 異系交配マウス（各群 20～22 例）及び Wistar ラット（各群 21～23 例）の妊娠 6～15 日に酢酸 *dl-α*-トコフェロールの 0、16、74.3、345 及び 1600 mg/kg（媒体：コーン油）を経口投与し、それぞれ妊娠 17 日及び 20 日に剖検した結果、最高用量群においても着床、母体及び胎児の生存性に明らかな影響はみられず、内臓及び骨格検査においても異常数の増加は認められなかった（Andersen 2002）。

Belted ウサギ（各群 10～14 例）の妊娠 6～18 日に酢酸 *dl-α*-トコフェロールの 0、16、74.3、345 及び 1600 mg/kg（媒体：コーン油）を経口投与し、妊娠 29 日に剖検した結果、最高用量群においても着床や母体及び胎児の生存性に明らかな影響はみられず、内臓及び骨格検査においても異常数の増加は認められなかった（Andersen 2002）。

局所刺激性：New Zealand White ウサギ（Group 3 及び 6 での雄 10 例）にトコフェロールを 65.0 mg/100 µL の濃度で含むジアゼパム点鼻液製剤を 50 µL の容量（使用量：32.5 mg、ウサギ体重を 3 kg と仮定した体重換算量：10.83 mg/kg）で単回鼻腔内投与し、投与翌日に実施した鼻腔粘膜の病理組織学的検査の結果、鼻腔の呼吸粘膜の軽度なびらんが 1 例にみられたのみであり、扁平上皮粘膜、呼吸粘膜、嗅粘膜及び鼻甲介に異常所見は認められなかったことから（[0852LN45.001]試験）、10.83 mg/kg までのトコフェロールは明らかな局所刺激性を有さないと考えられた。10.83 mg/kg は、ヒトに 10 mg のジアゼパム点鼻液製剤を鼻腔内投与したときのトコフェロールの曝露量の約 12 倍に相当する。

表 2.6.6-36　トコフェロールの安全性評価

試験種	動物種／投与経路	投与期間／投与量	結果（特記所見）	引用資料
急性毒性	マウス/静脈内 ラット/静脈内 ウサギ/静脈内	単回／- 単回／- 単回／-	LD_{50}：>2000 mg/kg LD_{50}：>1000 mg/kg LD_{50}：>1000 mg/kg	食品健康影響評価の結果の通知について（平成 30 年 3 月 27 日付 府食第 194 号）
反復投与毒性	SD ラット／鼻腔内	4 週間／56.5 mg/kg	鼻又は眼窩周囲の被毛赤色化 鼻甲介の可逆的な軽微～軽度炎症、軽微びらん／潰瘍、軽微～軽度出血 鼻／鼻孔の可逆的な軽微な表皮過形成／炎症	8290342 試験
	ビーグル犬／鼻腔内	4 週間／9.2 mg/kg	鼻甲介粘膜の軽微な好中球浸潤	8290343 試験
遺伝毒性 復帰突然変異 染色体異常 [1)] 小核試験 [1)]	 ネズミチフス菌 ヒト末梢血リンパ球 マウス／50 週	 5～5000 µg/plate (±S9) 75～1800 µg/mL (±S9) 30、1000 mg/kg	陰性	食品健康影響評価の結果の通知について（平成 30 年 3 月 27 日付 府食第 194 号）

試験種	動物種／投与経路	投与期間／投与量	結果（特記所見）	引用資料
	間混餌投与			
生殖発生毒性 受胎能／胚・胎児発生	雌雄 Wistar ラット／混餌	交配前 20 日～妊娠期間／0.75、7.5、75 mg/日	75 mg/日群：妊娠率 50% 催奇形性なし	Fiume 2018 Andersen 2002
胚・胎児発生 1)	CD-1 異系交配マウス／経口	妊娠 6～15 日／16、74.3、345、1600 mg/kg	催奇形性なし	
	Wistar ラット／経口	妊娠 6～15 日／16、74.3、345、1600 mg/kg	催奇形性なし	
	Belted ウサギ／経口	妊娠 6～18 日／16、74.3、345、1600 mg/kg	催奇形性なし	
局所刺激性	New Zealand White ウサギ／鼻腔内	単回／10.83 mg/kg	局所刺激性なし	0852LN45.001 試験

-：不明
1) 酢酸 *dl-α*-トコフェロール

2.6.6.9 考察及び結論

ジアゼパムの毒性は文献で十分明らかにされており、ジアゼパムは本邦で承認済みの製品である。Intravail A3 を含有するジアゼパム点鼻液（ジアゼパム濃度が 200 mg/mL 以下及び Intravail A3 濃度が [redacted]%以下となる用量）について、ラット、イヌ及びウサギで評価した。

ジアゼパム点鼻液製剤（Intravail A3 を含有）をラット、イヌ及びウサギに鼻腔内投与した際、急性の刺激性を示す顕著な毒性徴候はみられず、剖検以降に粘膜組織の肉眼検査及び病理組織学的検査を実施した結果、毒性及び局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。ラットでは最長 6 ヵ月まで投与し、ジアゼパム点鼻液の毒性を検討した際の NOAEL は 8 mg/日であった。イヌに 1 ヵ月間投与した際の NOAEL は、ジアゼパム点鼻液の最高用量である 78 mg/日（468 mg/週）の鼻腔内投与と考えられた。

ジアゼパム及び 2 種類の不純物（ジアゼパム関連化合物 A 及び B）の毒性を、2 種類の相補的(Q)SAR（DEREK 及び Leadscope）を用いて in silico で評価した。(Q)SAR によるとジアゼパム及び両不純物の in vitro 変異原性は陰性と予測された。したがって、ICH M7 ガイドラインに従い、不純物は非変異原性不純物（クラス 5）に分類される。また、不純物はジアゼパムよりも毒性が低いと予測された。

製剤中のジアゼパムの 1 日最大投与量は 40 mg/日である。ジアゼパム関連化合物 B の規格限度値はそれぞれ 0.5%（200 µg/日）及び 6.0%（2.4 mg/日）である。ラットを用いた 90 日間鼻腔内投与毒性試験（[0470RN45.001]試験）、細菌を用いる復帰突然変異試験（[AG01VV.502ICH.BTL]試験）及びチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる in vitro 哺乳類染色体異常試験（[AG01VV.331ICH.BTL]試験）でジアゼパム関連化合物 B の 8.0%まで、安全性が

確認されている。以上から、ジアゼパム関連化合物 B の 8.0%までの患者への曝露は安全かつ適切であると考えられる。

Intravail® A3

Intravail A3 はジアゼパム点鼻液製剤に含まれる吸収促進剤であり、今回、新添加物として評価した。ラット、モルモット、ウサギ及びイヌを用いて安全性を評価するために GLP 適用毒性試験を実施した。毒性試験から、Intravail A3 を長期経鼻吸入投与したところ、[redacted]（調製可能な最高濃度）で忍容性が良好であった。

ラットでの経口投与での LD_{50} は 2000 mg/kg 超であった。

ラットに Intravail A3 を [redacted]、[redacted]及び [redacted]の濃度（0.1、0.3、及び 10 mg/日）で最長 26 週間連日鼻腔内投与したときの忍容性は良好であり、毒性を示唆するエビデンスは認められなかった。これらの試験成績に基づき、Intravail A3 の NOAEL は[redacted]（10 mg/日）と推定された。

イヌに Intravail A3 を [redacted]、[redacted]及び [redacted]の濃度（1.2、10 及び 40 mg/日）で最長 39 週間連日鼻腔内投与したときの忍容性は概して良好であった。これらの試験成績に基づき、Intravail A3 の NOAEL は[redacted]（40 mg/日）と[redacted]。

遺伝毒性試験では、Intravail A3 は変異原性及び染色体異常を示さなかった。妊娠ラットを用いた Intravail A3 の生殖発生毒性試験では、器官形成期（妊娠 6～17 日）に 30 mg/kg/日の用量で 24 時間持続点滴投与したときの忍容性は良好であり、Intravail A3 に関連する母動物への影響及び胚胎児毒性は認められなかった。NOAEL は 30 mg/kg/日と推定された。

モルモットの皮膚感作性試験から、Intravail A3 は皮膚感作性物質ではないことが示され、また、ウサギに Intravail A3 を 30 mg/mL（約 5 mg/kg）の用量で背部皮下投与した結果、おおむね忍容性がみられ、組織学的検査で投与部位に軽微から顕著な亜急性炎症が認められた。

Intravail A3 は粘膜表面の浸透促進剤として有効であることが明らかにされている点をあわせると、本剤の毒性プロファイルの特性は、Intravail A3 の用途（治療薬を製剤化するための吸収促進剤）の裏付けとして十分だと考えられる。

Intravail® A3 以外の添加物

ジアゼパム点鼻液製剤に含まれるその他の添加物であるベンジルアルコール、無水エタノール及びトコフェロールの安全性は、非臨床毒性試験及び文献情報から担保されていると考える。

結論

本 NDA はジアゼパムの経鼻投与に関する承認申請であり、申請者はジアゼパム点鼻液の毒性試験成績によって非臨床安全性を担保していると考えている。ジアゼパムを経口、直腸、静脈内及び筋肉内投与したときの非臨床薬理、薬物動態及び毒性プロファイルは評価されており、承認済みの複数の申請資料に記載されている。

臨床バイオアベイラビリティデータから、経鼻投与による曝露量は直腸投与と同程度であることが立証された（[2.7.2.2.2]）。ただし、経鼻投与時の曝露量の方が変動は小さい。

ジアゼパム点鼻液は、直腸投与に比べ、変動が著しく小さく吸収が速やかである、安全性プロファイルは他のジアゼパム製剤と同様である、また投与が簡便であることから、てんかん発作に

対する有望な鼻腔内投与薬といえる。動物を用いた試験によると、鼻粘膜に対し重大な急性及び慢性の刺激性はないと思われる。全体を考慮すると、てんかん患者におけるてんかん重積状態及びてんかん重積状態に移行するおそれのある発作には著しいアンメットメディカルニーズがあり、ジアゼパム点鼻液を用いた治療がより適切であることは、データから裏付けられる。

2.6.6.10　図表

文中に示した。

2.6.6.11　参考文献

Andersen FA. Final report on the safety assessment of tocopherol, tocopheryl acetate, tocopheryl linoleate, tocopheryl linoleate/oleate, tocopheryl nicotinate, tocopheryl succinate, dioleyl tocopheryl methylsilanol, potassium ascorbyl tocopherol phosphate, and tocophersolan. Int J Toxicol. 2002;21(suppl 3):51-116.

de la Iglesia FA, Barsoum N, Gough A, et al. Carcinogenesis bioassay of prazepam (Verstran) in rats and mice. Toxicology and applied pharmacology. 1981;57(1):39-54.

Diastat® Prescribing Information. Food and Drug Administration: Valeant Pharmaceuticals North America LLC; 12/2016.

Emami A, Tepper J, Short B, et al. Toxicology Evaluation of Drugs Administered via Uncommon Routes: Intranasal, Intraocular, Intrathecal/Intraspinal and Intra-Articular. Int J Toxicol. 2018;37(1):4-27.

Federal Register. Alkyl (C10-C16) Polyglycosides; Exemptions from the Requirement of a Tolerance. In: Agency EP, editor. Federal Register 2005:54281-6.

Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, et al. Safety Assessment of Tocopherols and Tocotrienols as Used in Cosmetics. Int J Toxicol. 2018;37(Supplement 2):61S-94S.

Spack EG, Wehner NG, Winkelhake JL. Preclinical and Pharmacological Studies of AG284, a Soluble HLA-DR2:Myelin Basic Protein Peptide Complex for the Treatment of Multiple Sclerosis. CNS Drug Reviews. 1998;4(3):225-46.

医薬品インタビューフォーム　ジアパックス®錠 2mg　ジアパックス®錠 5mg、2018 年 6 月改訂

医薬品添加物事典 2021（エタノール、トコフェロール、ベンジルアルコール）

平成 30 年 3 月 27 日付 府食発第 194 号「食品健康影響評価の結果の通知について」トコフェロール評価書

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.1.1 毒性試験：ジアゼパム点鼻液（NRL-1）の一覧表 3
2.6.7.1.2 毒性試験：Intravail® A3 の一覧表 5
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.2.1 トキシコキネティクス：ジアゼパム点鼻液（NRL-1）のトキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.2.2 トキシコキネティクス：Intravail® A3 のトキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
2.6.7.3.1 トキシコキネティクス：ジアゼパム点鼻液（NRL-1）トキシコキネティクスデータの一覧表 7
2.6.7.3.2 トキシコキネティクス：Intravail® A3 のトキシコキネティクスデータの一覧表 9
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 10
2.6.7.5 単回投与毒性試験 11
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 13
2.6.7.7.1 ラットにおける 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 13
2.6.7.7.2 ラットにおける 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 17
2.6.7.7.3 イヌにおける 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 20
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 24
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 24
2.6.7.10 がん原性試験 24
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 24
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 24
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 24
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 24
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 24
2.6.7.16 局所刺激性試験 25
2.6.7.17 その他の毒性試験 26
2.6.7.17.1 不純物 26
2.6.7.17.1.1 反復投与毒性試験 26
2.6.7.17.1.2 In Vitro 遺伝毒性試験 28
2.6.7.17.2 添加物 32
2.6.7.17.2.1 Intravail® A3 の反復投与毒性試験 32
2.6.7.17.2.2 Intravail® A3 の in vitro 遺伝毒性試験 34
2.6.7.17.2.3 Intravail® A3 の in vivo 遺伝毒性試験 38
2.6.7.17.2.4 Intravail® A3 の生殖発生毒性試験 39
2.6.7.17.2.5 Intravail® A3 の局所刺激性試験 40

2.6.7 毒性試験概要表

ジアゼパム点鼻液は、2 歳以上のてんかん患者におけるてんかん重積状態及びてんかん重積状態に移行するおそれのある発作を適応とする。

本概要表中で、ジアゼパム点鼻液と企業開発コード名である NRL-1 とは同義である。Intravail® A3 は一般名であるドデシルマルトシドと同義である。

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

2.6.7.1.1 毒性試験：ジアゼパム点鼻液（NRL-1）の一覧表

			Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)				
Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity							
Single-dose studies were conducted as part of the repeat-dose studies. Individual studies were not conducted.							
Repeat-Dose Toxicity							
Dose range finding and toxicokinetic study	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	1 day 7 days	SD: 1, 2, 8, 12 mg/day RD: 0, 60, 70, 140 mg/week	No	[redacted]	[8290337]
Toxicity study following once daily or once every 5 days intranasal micro-spray or instillation	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	28 days	Micro-spray: 0, 0.25, 0.5, 1 mg/day Instillation: 0, 0.25, 0.5, 1 mg/day	No	[redacted]	[20023862]
Repeat-dose toxicity and toxicokinetic study	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	4 weeks	0, 8 mg/day (8 mg/week) 8 mg/day (24 mg/week) 8 mg/day (48 mg/week)	Yes	[redacted]	[8290342]
Repeat-dose toxicity and toxicokinetic study	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	26 weeks	0, 4, 6, 8 mg/day	Yes	[redacted]	[2502-002]
Dose-escalation toxicity and toxicokinetic study	Dog / Beagle	Intranasal	1 day 5 days	SD: 10, 20, 40, 60, 80 mg/day RD: 0, 60, 120 mg/day	No	[redacted]	[8290338]
Toxicity study following once daily or once every 5 days intranasal instillation	Dog / Beagle	Intranasal	28 days	0, 5, 10, 20 mg/day	No	[redacted]	[20023863]
Repeat-dose toxicity and toxicokinetic study	Dog / Beagle	Intranasal	4 weeks	0, 78 mg/day (78 mg/week) 78 mg/day (234 mg/week) 78 mg/day (468 mg/week)	Yes	[redacted]	[8290343]
Local Tolerance							
Pilot pharmacokinetic and local tolerance study	Rabbit / New Zealand White	Intranasal	1 day	3.5, 10 mg/day	No	[redacted]	[0852LN45.001]

			Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)				
						(Pennsylvania)	
Pharmacokinetic and local tolerance study	Rabbit / New Zealand White	Intranasal	1 day	5, 10 mg/day	No	[redacted]	[0852LN45.002]
Other Toxicity Studies							
Impurities repeat-dose (Related Compound B)	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	90 days	0, 0.9, 4.7, 9.4 mg/mL every other day (20 µL/nare; 40 µL total)	Yes	[redacted]	[0470RN45.001]
Impurities genotoxicity (Related Compound B)	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	-	up to 5000 µg/plate	Yes	[redacted]	[AG01VV.502ICH.BTL]
Impurities genotoxicity (Related Compound B)	Chinese hamster ovary cells	In vitro	-	up to 51.2 µg/mL (non-activated and S9-activated 4-hour exposure groups) up to 41 µg/mL (non-activated 20-hour exposure group)	Yes	[redacted]	[AG01VV.331ICH.BTL]

GLP = Good Laboratory Practice; RD = Repeat-dose; SD = Single-dose or small doses

2.6.7.1.2 毒性試験：Intravail® A3 の一覧表

Overview					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)		
Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity: Single-dose toxicity studies were not conducted.							
Repeat-Dose Toxicity:							
Subacute toxicity	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	2 weeks	0, 80, 200 or 400 µg	Yes	[redacted]	[0437RA33.001]
Study performed with DFP-02	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	4 weeks	[redacted]%	Yes	[redacted] (England)	[8272935]
Study performed with DFP-02	Rat / Sprague Dawley	Intranasal	26 weeks	[redacted]%	Yes	[redacted] (England)	[8281782]
Study performed with DFP-02	Dog / Beagle	Intranasal	4 weeks	[redacted]%	Yes	[redacted] (England)	[8275552]
Study performed with DFP-02	Dog / Beagle	Intranasal	39 weeks	[redacted]%	Yes	[redacted] (England)	[8281784]
Genotoxicity:							
Mutagenicity	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	-	up to 5000 µg/plate	Yes	[redacted] (Canada)	[963114]
Chromosomal aberration	Human peripheral lymphocytes	In vitro	-	up to 5000 µg/mL	Yes	[redacted] (Canada)	[963115]
In vivo mammalian micronucleus	Rat bone marrow	Intravenous	Single dose	[redacted] mg/kg	Yes	[redacted] (Canada)	[963116]
Reproductive and Developmental Toxicity:							
Embryo-fetal development	Rat / Wistar	Intravenous	GD6-17	0, 30 mg/kg	Yes	[redacted] (France)	[AA99567]
Local Tolerance:							
Contact hypersensitivity	Guinea Pig / Dunkin Hartley	Intradermal	1 day	[redacted]%	Yes	[redacted] (Switzerland)	[C78787]
Dermal Irritation	Rabbit / New Zealand White	Subcutaneous	Day 1, 8	30 mg/mL	Yes	[redacted] (Canada)	[503595]
Other Toxicity Studies: Other toxicity studies were not conducted.							

GD = Gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; - = Not applicable

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

2.6.7.2.1 トキシコキネティクス：ジアゼパム点鼻液（NRL-1）のトキシコキネティクス試験の一覧表

			Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)		
Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	GLP Compliance	Study Number
Repeat-dose (1 day, 7 days)	Sprague Dawley Rats	Intranasal	1, 2, 8, 12 mg/day	No	[8290337]
Repeat-dose (4 weeks)	Sprague Dawley Rats	Intranasal	0, 8 mg/day (8 mg/week), 8 mg/day (24 mg/week), 8 mg/day (48 mg/week)	Yes	[8290342]
Repeat-dose (26 weeks)	Sprague Dawley Rats	Intranasal	0, 4, 6, 8 mg/day	Yes	[2502-002]
Repeat-dose (1 day, 5 days)	Beagle Dogs	Intranasal	10, 20, 40, 60, 80 mg/day	No	[8290338]
Repeat-dose (4 weeks)	Beagle Dogs	Intranasal	0, 78 mg/day (78 mg/week) 78 mg/day (234 mg/week) 78 mg/day (468 mg/week)	Yes	[8290343]

GLP = Good Laboratory Practice

2.6.7.2.2 トキシコキネティクス：Intravail® A3 のトキシコキネティクス試験の一覧表

			Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)		
Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	GLP Compliance	Study Number
Repeat-dose (4 weeks)	Sprague Dawley Rats	Intranasal	[redacted]% (0.1, 0.3, 10 mg/day)	Yes	[8272935]
Repeat-dose (26 weeks)	Sprague Dawley Rats	Intranasal	[redacted]% (0.1, 0.3, 10 mg/day)	Yes	[8281782]
Repeat-dose (4 weeks)	Beagle Dogs	Intranasal	[redacted]% (1.2, 10, 40 mg/day)	Yes	[8275552]
Repeat-dose (39 weeks)	Beagle Dogs	Intranasal	[redacted]% (1.2, 10, 40 mg/day)	Yes	[8281784]

GLP = Good Laboratory Practice

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

2.6.7.3.1　トキシコキネティクス：ジアゼパム点鼻液（NRL-1）トキシコキネティクスデータの一覧表

				Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)				
Species:	Rat					Dog		
Study:	8290337	2502-002		8290342		8290338	8290343	
Gender:	Female (n = 13)	Male (n = 6)	Female (n = 6)	Male (n = 45)[2]	Female (n = 45)[2]	Female (n = 3)	Male (n = 14)[4]	Female (n = 14)[4]
Parameter:	C_{max} (ng/mL)							
1 mg	91	-	-	-	-	-	-	-
2 mg	149	-	-	-	-	-	-	-
4 mg	-	924	511	-	-	-	-	-
6 mg	-	1020	792	-	-	-	-	-
8 mg	335	3630	1730	90.2[3]	218.7[3]	-	-	-
8 mg[1]	208	-	-	-	-	-	-	-
10 mg	-	-	-	-	-	54.5	-	-
12 mg[1]	230	-	-	-	-	-	-	-
20 mg	-	-	-	-	-	200	-	-
40 mg	-	-	-	-	-	225	-	-
60 mg	-	-	-	-	-	240	-	-
78 mg	-	-	-	-	-	-	511.3[5]	650.3[5]
80 mg	-	-	-	-	-	687	-	-
Parameter:	t_{max} (h)							
1 mg	0.500	-	-	-	-	-	-	-
2 mg	0.500	-	-	-	-	-	-	-
4 mg	-	1.0	6.0	-	-	-	-	-
6 mg	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-
8 mg	0.750	0.5	1.0	6.2[3]	5.5[3]	-	-	-
8 mg[1]	6.50	-	-	-	-	-	-	-
10 mg	-	-	-	-	-	1.17	-	-
12 mg[1]	0.500	-	-	-	-	-	-	-
20 mg	-	-	-	-	-	0.333	-	-
40 mg	-	-	-	-	-	4.25	-	-
60 mg	-	-	-	-	-	0.333	-	-
78 mg	-	-	-	-	-	-	2.97[5]	2.76[5]

				Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)				
80 mg	-	-	-	-	-	0.639	-	-
Parameter:	AUC_t (ng·h/mL)							
1 mg	496	-	-	-	-	-	-	-
2 mg	683	-	-	-	-	-	-	-
4 mg	-	2630	3470	-	-	-	-	-
6 mg	-	4790	3370	-	-	-	-	-
8 mg	2150	5740	5830	772.3[3]	1843.3[3]	-	-	-
8 mg[1]	2620	-	-	-	-	-	-	-
10 mg	-	-	-	-	-	137	-	-
12 mg[1]	3060	-	-	-	-	-	-	-
20 mg	-	-	-	-	-	286	-	-
40 mg	-	-	-	-	-	632	-	-
60 mg	-	-	-	-	-	1140	-	-
78 mg	-	-	-	-	-	-	1366.7[5]	1876.7[5]
80 mg	-	-	-	-	-	1350	-	-

- = Not tested; AUC_t = Area under the concentration-time curve (from 0 h to t h); C_{max} = Maximum plasma concentration; t_{max} = Time to maximum concentration
Additional Information: TK parameters on Day 1

1 AM/PM multi-dosing
2 Groups 8 mg/day (8 mg/week), 8 mg/day (24 mg/week), and 8 mg/day (48 mg/week) were combined to obtain a single 8 mg/day value
3 Mean from Day 1 8 mg/day results
4 Groups 78 mg/day (78 mg/week), 78 mg/day (234 mg/week), and 78 mg/day (468 mg/week) were combined to obtain a single 78 mg/day value
5 Mean from Day 1 78 mg/day results

2.6.7.3.2　トキシコキネティクス：Intravail® A3 のトキシコキネティクスデータの一覧表

					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)			
Species:	Rat				Dog			
Study:	8272935		8281782		8275552		8281784	
Gender:	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Parameter:	C_{max} (ng/mL)							
0.1 mg	65.1	116	8.15	14.7	-	-	-	-
0.3 mg	512	46.4	48.7	42.3	-	-	-	-
1.2 mg	-	-	-	-	0.998	2.18	8.29	6.84
10 mg	966	499	286	160	11.3	21.8	90.3	126
40 mg	-	-	-	-	58.5	188	305	401
Parameter:	t_{max} (h)							
0.1 mg	0.150	0.117	0.167	0.5	-	-	-	-
0.3 mg	0.083	0.167	0.5	0.25	-	-	-	-
1.2 mg	-	-	-	-	0.65	0.66	0.567[a]	0.525[a]
10 mg	0.167	0.167	0.083	0.25	0.65	0.67	0.40[a]	0.25[a]
40 mg	-	-	-	-	0.65	0.68	0.50[a]	0.50[a]
Parameter:	$t_{1/2}$ (h)							
0.1 mg	0.513	0.415	0.762	NR	-	-	-	-
0.3 mg	0.438	NR	NR	NR	-	-	-	-
1.2 mg	-	-	-	-	NR	NR	0.420	0.461
10 mg	1.66	2.65	3.06	1.50	1.14	0.666	0.506	0.572
40 mg	-	-	-	-	0.758	0.750	0.519	0.650
Parameter:	AUC_t (ng·h/mL)							
0.1 mg	11.6	16.2	7.02	11.9	-	-	-	-
0.3 mg	48.6	39.5	35.6	28.9	-	-	-	-
1.2 mg	-	-	-	-	1.09	1.83	8.82	6.08
10 mg	416	362	188	172	15.9	24.0	113	141
40 mg	-	-	-	-	86.9	190	313	370

AUC_t = Area under the concentration-time curve (from 0 h to t h); C_{max} = Maximum plasma concentration; NR = No result; $t_{1/2}$ = Half-life; t_{max} = Time to maximum concentration

a　Median values are presented, and other TK data are shown as means.

Additional Information: TK parameters on Day 1

Source: Study 8272935, Toxicokinetic Report, Table 1.3; Study 8281782, Toxicokinetic Report, Table 1.3; Study 8275552, Toxicokinetic Report, Table 1.3; Study 8281784, Toxicokinetic Report, Table 1.3.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: NRL-1(Diazepam nasal spray)

Batch No.	Purity	Specified Impurities			Study Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION:	Assay	Nordazepam	Related Compound A	Related Compound B		
	85% - 115%*	Report results	Report results	Report results		
436-3	100.3%	ND	ND	ND	[8290337]	Dose range finding rat study
					[8290338]	Dose range finding dog study
436-4	100.4%	ND	ND	ND	[8290337]	Dose range finding rat study
					[8290338]	Dose range finding dog study
					[8290342]	4-week repeat-dose toxicity rat study
					[8290343]	4-week repeat-dose toxicity dog study
16MM-005	100.7%	< LOQ	ND	< LOQ	[2502-002]	26-week repeat-dose toxicity rat study
28960341210	103.3%	ND	ND	ND	[20023862]	28-day repeat-dose toxicity rat study
					[20023863]	28-day repeat-dose toxicity dog study

ND = Not detected, < LOQ = < 0.05%

* = Reported results was set in 16MM-005, 90% - 110% was set in 28960341210

2.6.7.5　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

					Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)		
Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	Gender and No. Per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Sprague Dawley Rat	Intranasal	1 day 7 days	SD: 1, 2, 8, 12 mg/day RD: 0, 60, 70, 140 mg/week	Treated group: 13F Control group: 7F	N/A	No test article-related deaths or macroscopic findings were observed. Test article-related microscopic findings were limited to the larynx (minimal neutrophil infiltrate) but were not considered adverse.	[8290337]
Sprague Dawley Rat	Intranasal	28 days	Micro-spray: 0, 0.25, 0.5, 1 mg/day Instillation: 0, 0.25, 0.5, 1 mg/day	6F	N/A	No treatment related adverse effects	[20023862]
Beagle Dog	Intranasal	1 day 5 days	SD: 10, 20, 40, 60, 80 mg/day RD: 0, 60, 120 mg/day	SD: 3F RD: 2M/2F	N/A	Vehicle control and NRL-1 were well tolerated and resulted in no dose-limiting clinical observations or toxicologically important body weight or food consumption changes. Microscopically, nasal turbinate respiratory epithelial hyperplasia/inflammation in animals given vehicle control; a finding that appeared to be exacerbated by administration of NRL-1 in females, but not in males.	[8290338]
Beagle Dog	Intranasal	28 days	0, 5, 10, 20 mg/day	2F	N/A	No treatment related adverse effects	[20023863]

F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; NOAEL = No observed adverse effect level; RD = Repeat-dose; SD = Single-dose or small doses

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　ラットにおける 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Dose Study with NRL-1 Diazepam Solution in Rats with a 4-Week Recovery										
Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)										
Species/Strain: Rat / Hsd:Sprague Dawley	Duration of Dosing: 4 weeks					Study Number: [8290342]				
Initial Age: 6-7 weeks	Duration of Postdose: 4 weeks					Location in CTD:				
Date of First Dose: 11 December 2013	Method of Administration: Intranasal									
	Vehicle/Formulation: NRL-1 vehicle control					GLP Compliance: Yes				
Special Features: N/A										
No Observed Adverse Effect Level: 8 mg NRL-1 given 6 days/week (48 mg diazepam/week)										
Dose Days/Week[a]	6 (Saline Control)		6 (Vehicle Control)		1 (Low)		3 (Mid)		6 (High)	
Diazepam Total mg/day (mg/week):	0 (0)		0 (0)		8 (8)		8 (24)		8 (48)	
No. of Animals/Sex/Group:	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Toxicity Animals at Study Start:	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Toxicokinetic Animals:	4	4	16	16	16	16	16	16	16	16
Dosing Phase										
Diazepam										
Toxicokinetics – Day 1										
C_{max} (ng/mL)	BLQ[b]	BLQ	BLQ[b]	BLQ[b]	98.1	184	91.2	256	81.3	216
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ[b]	BLQ	BLQ[b]	BLQ[b]	831	1650	756	1950	730	1930
Toxicokinetics – Day 28										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	98.7	141	69.3	241	119	392
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	592	1360	584	2170	790	3680
Nordiazepam										
Toxicokinetics – Day 1										
C_{max} (ng/mL)	BLQ[b]	BLQ	BLQ[b]	BLQ	42.7	75.3	32.3	79.7	29.6	66.6
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ[b]	BLQ	BLQ[b]	BLQ	325	607	293	717	273	736
Toxicokinetics – Day 28										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	26.4	56.2	34.3	87.9	46.0	158
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	271	557	293	861	279	1420
Intravail® A3 (dodecyl maltoside)										

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Dose Study with NRL-1 Diazepam Solution in Rats with a 4-Week Recovery										
Toxicokinetics　– Day 1										
C_{max} (ng/mL)	BLQ[b]	BLQ	3.02	1.82	1.06	4.42	1.53	2.50	1.24	9.73
$AUC_{0\text{-}24}$ (ng·h/mL)	BLQ[b]	BLQ	4.67	4.49	1.86	4.00	6.84	7.57	5.04	8.53
Toxicokinetics　– Day 28										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	1.44	1.26	0.803	0.390	4.24	2.05	0.907	0.983
$AUC_{0\text{-}24}$ (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	2.65	1.95	0.857	0.364	3.89	1.80	1.95	0.945
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations										
Discolored haircoat, nose, red	0	0	15	15	15	15	15	15	6	9
Discolored haircoat, periorbital, red	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0
Discolored haircoat, left periorbital, red	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Discolored haircoat, right periorbital, red	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology										
Day 29										
Red blood cell count ($\times 10^6/\mu L$)	-	8.48	-	8.44	-	8.77*	-	8.72*	-	8.84*
Hemoglobin (g/dL)	-	16.2	-	16.1	-	16.6*	-	16.6*	-	16.9*
Hematocrit (%)	-	48.7	-	48.5	-	50.4*	-	50.2*	-	51.6*
Absolute lymphocytes ($\times 10^3/\mu L$)	6.88	5.10	6.84	5.11	6.86	5.08	6.06	4.15*	5.86*	4.06*
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry										
Day 29										
Total protein (g/dL)	-	6.7	-	6.9	-	7.1*	-	7.2*	-	7.3*
Albumin (g/dL)	-	4.5	-	4.6^	-	4.7^	-	4.8*	-	4.8*
Globulin (g/dL)	-	2.2	-	2.2	-	2.4*	-	2.4*	-	2.4*
Calcium (mg/dL)	-	11.0	-	11.2	-	11.3^	-	11.3^	-	11.4*

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Dose Study with NRL-1 Diazepam Solution in Rats with a 4-Week Recovery										
Potassium (mmol/L)	-	5.3	-	5.5	-	5.7	-	5.6	-	6.0*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights										
Liver										
Absolute Organ Weight (%)[c]	-	6.105 g	-	+1.3	-	+9.5*	-	+11.9*	-	+17.1*
Organ to Body Weight (%)	-	2.8434	-	2.8940	-	3.1165*	-	3.0908*	-	3.2997*
Organ to Brain Weight (%)	-	343.0142	-	346.5497	-	377.3359*	-	380.0549*	-	408.4477*
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology										
Number of Animals Examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Nasal Turbinate										
Erosion/ulcer										
Minimal	0	0	7	2	1	0	0	0	0	0
Hemorrhage										
Minimal	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
Slight	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Inflammation										
Minimal	0	0	5	7	9	3	2	2	0	4
Slight	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0
Nose/Nares										
Hyperplasia/inflammation, epidermal										
Minimal	0	0	7	8	6	4	4	8	8	6
Slight	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Recovery Phase										
Number of Animals in Recovery	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Dose Study with NRL-1 Diazepam Solution in Rats with a 4-Week Recovery										
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology										
Number of Animals Examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Nasal Turbinate										
Inflammation										
Minimal	0	0	3	1	2	0	0	0	0	0
Slight	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Nose/Nares										
Hyperplasia/inflammation, epidermal										
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

- = No noteworthy findings; AUC_{0-24} = Area under the concentration-time curve (from 0 h to 24 h); BLQ = Below level of quantification (<1.05 ng/mL for Diazepam, <0.53 ng/mL for Nordiazepam, and <0.53 ng/mL for Intravail® A3); C_{max} = Maximum plasma concentration; F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; N/A = Not applicable

* = Statistically significant based on actual data (not on percent difference) when compared to both the saline control and the vehicle control groups.

^ = Statistically significant when compared to the saline control group only.

a All animals received four 20 µL deliveries/day. Dose Regimen for all groups was: Dose Event 1: both nostrils, Dose Event 2: both nostrils, 4 hours (± 20 minutes) apart.

b Diazepam was detected in a single saline control male, two vehicle control males, and a single vehicle control female. Nordiazepam was detected in a single saline control male and a single vehicle control male. Intravail® A3 was detected in a single saline control male. All values were considerably lower than the levels detected in animals given NRL-1 and the majority of concentrations detected were only slightly higher than the lower limit of quantification. Therefore, these measurable values in control groups were unlikely to affect inferences or conclusions drawn for the toxicokinetic portion of this study.

c For saline control, group mean is shown. For vehicle control and treated groups, percent difference from saline controls is shown.

2.6.7.7.2　ラットにおける 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

Report Title: NRL-1 Diazepam Solution: A 26-Week Intranasal Toxicity Study in Rats With A 8-Week Recovery Period								
Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)								
Species/Strain: Rat / Crl:CD(SD)	Duration of Dosing: 26 weeks				Study Number: [2502-002]			
Initial Age: Approximately 7.5 weeks of age for male animals and approximately 9 weeks of age for female animals	Duration of Postdose: 8 weeks				Location in CTD:			
Date of First Dose: 19 May 2016	Method of Administration: Intranasal							
	Vehicle/Formulation: NRL-1 vehicle control				GLP Compliance: Yes			
Special Features: N/A								
No Observed Adverse Effect Level: 8 mg/day								
Dose Level (mg/day)[a]:	0 (Vehicle Control)		4		6		8	
No. of Animals/Sex/Group:	M	F	M	F	M	F	M	F
Toxicity Animals at Study Start:	18	18	18	18	18	18	18	18
Toxicokinetic Animals:	4	4	8	8	8	8	8	8
Dosing Phase								
Diazepam								
Toxicokinetics – Day 1								
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	924	511	1020	792	3630	1730
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	2630	3470	4790	3370	5740	5830
Toxicokinetics – Day 180								
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	744	1440	1070	999	1200	1360
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	3240	4520	5060	3210	4290	6510
Nordiazepam								
Toxicokinetics – Day 1								
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	19.6	27.0	26.9	35.7	36.6	53.9
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	N/A[b]	N/A[b]	286	N/A[b]	298	649
Toxicokinetics – Day 180								
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	21.0	59.9	29.2	67.2	75.5	65.7
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	N/A[b]	207	142	249	210	304

Report Title: NRL-1 Diazepam Solution: A 26-Week Intranasal Toxicity Study in Rats With A 8-Week Recovery Period								
Intravail® A3 (dodecyl maltoside)								
Toxicokinetics – Day 1								
C_{max} (ng/mL)	8.29[e]	10.2[e]	46.0	22.5	47.4	31.1	238	110
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	N/A	N/A	N/A[b]	N/A[b]	199	N/A[b]	285	270
Toxicokinetics – Day 180								
C_{max} (ng/mL)	11.8[e]	4.05[e]	41.7	60.0	40.0	30.1	47.4	48.6
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	N/A	N/A	N/A[b]	176	254	91.6	195	241
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund	1[c]	0	0	1	1[c]	0	1[c]	0
Clinical Observations[d]								
Excessive grooming	38(12)	32(12)	32(12)	33(13)	57(18)	68(18)	87(18)	95(18)
Red material around the nose (porphyrin staining)	24(7)	73(12)	66(15)	127(18)	151(18)	162(18)	187(18)	182(18)
Rubbing the head/nose in the bedding	22(16)	33(18)	40(18)	41(18)	30(18)	43(18)	56(18)	66(18)
Sneezing	11(11)	2(2)	4(4)	6(6)	1(1)	6(6)	11(9)	6(6)
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Recovery Phase								
Number of Animals in Recovery	6	6	6	6	6	6	6	6
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	1	0
Clinical Observations[d]								
Excessive grooming	-	-	-	-	-	-	-	1(1)

Report Title: NRL-1 Diazepam Solution: A 26-Week Intranasal Toxicity Study in Rats With A 8-Week Recovery Period								
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings; AUC_{0-24} = Area under the concentration-time curve (from 0 h to 24 h); BLQ = Below level of quantification; C_{max} = Maximum plasma concentration; F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; N/A = Not applicable

a Half of the total daily dose volume for each animal was administered into each naris, in increments of 10 µL.

b AUC_{0-24} not reported due to $\%AUC_{Extrap}$ > 25%, $\%AUC_{Extrap}$ = The percent of AUC_{0-24} extrapolated from T_{last} to 24 hours, T_{last} = Time of final quantifiable sample

c Toxicokinetic animals

d Clinical observations is presented as: Number of times observed (Total number of animals affected).

e Average of plasma concentrations at 4 hours after dosing.

2.6.7.7.3 イヌにおける 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Study with NRL-1 Diazepam Solution in Dogs with a 4-Week Recovery										
Test Article: NRL-1 (Diazepam nasal spray)										
Species/Strain: Dog / Purebred beagles	Duration of Dosing: 4 weeks					Study Number: [8290343]				
Initial Age: 4 to 5 months	Duration of Postdose: 4 weeks					Location in CTD:				
Date of First Dose: 21 November 2013	Method of Administration: Intranasal									
	Vehicle/Formulation: NRL-1 vehicle control					GLP Compliance: Yes				
Special Features: N/A										
No Observed Adverse Effect Level: 78 mg NRL-1 diazepam given 6 days/week (468 mg diazepam/week)										
Dose Days/Week[a]	6 (Saline Control)		6 (Vehicle Control)		1 (Low)		3 (Mid)		6 (High)	
Diazepam Total mg/day (mg/week):	0 (0)		0 (0)		78 (78)		78 (234)		78 (468)	
No. of Animals/Sex/Group:	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Toxicity Animals at Study Start:	6	6	6	6	4	4	6	6	6	6
Dosing Phase										
Diazepam										
Toxicokinetics – Day 1										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	505	648	449	607	580	696
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1250	1990	1120	1660	1730	1980
Toxicokinetics – Day 28										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	444	239	439	399	635	612
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	919	868	1220	1100	1830	1620
Nordiazepam										
Toxicokinetics – Day 1										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1120	1850	1030	1320	1360	1570
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	10800	22400	10100	12300	15100	17400
Toxicokinetics – Day 28										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1190	1110	1240	1410	1580	2090
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	11000	12200	11100	13000	14500	22100
Intravail® A3 (dodecyl maltoside)										
Toxicokinetics – Day 1										

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Study with NRL-1 Diazepam Solution in Dogs with a 4-Week Recovery										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	2.12	2.41	1.36	2.15	1.43	2.33	1.39	1.94
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	4.25	7.01	4.64	7.53	4.26	7.46	5.72	6.12
Toxicokinetics – Day 28										
C_{max} (ng/mL)	BLQ	BLQ	0.838	1.19	0.968	0.653	0.948	0.809	0.779	0.568
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	BLQ	BLQ	2.40	2.45	2.84	3.41	2.72	2.56	2.41	2.92
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations[b]										
Sedation, C2	3 (2)	1 (1)	2 (1)	2 (1)	1 (1)	-	1 (1)	1 (1)	5 (4)	2 (2)
Sedation, C3	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (2)	-
Sedation, C4	-	-	-	-	-	-	1 (1)	1 (1)	1 (1)	-
Struggled during dosing	2 (1)	1 (1)	22 (5)	8 (3)	7 (3)	2 (2)	14 (4)	7 (3)	21 (4)	6 (2)
Excessive salivation	-	-	50 (6)	58 (6)	9 (4)	9 (4)	35 (6)	31 (6)	48 (6)	48 (6)
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (%)[c]										
Days 1 to 8	-	1549 g	-	-10.7	-	+13.8†	-	+15.2†	-	+27.2*
Days 8 to 15	-	1603 g	-	-7.9	-	+9.2	-	+12.2	-	+13.3
Days 15 to 22	-	1486 g	-	-7.5	-	+10.8†	-	+12.9†	-	+24.2*
Days 22 to 29	-	1457 g	-	-5.5	-	+5.1	-	+11.9	-	+25.5*
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiographic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry										
Day 14										
Cholesterol (mg/dL)	188	173	190	164	225*	155	204	192†	231*	242*
Triglycerides (mg/dL)	-	33	-	32	-	35	-	36	-	54*
Alkaline phosphatase (U/L)	91	106	93	93	89	102	88	100	118	132

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Study with NRL-1 Diazepam Solution in Dogs with a 4-Week Recovery										
Day 28										
Cholesterol (mg/dL)	189	171	207	175	226	169	223^	209*	254*	264*
Triglycerides (mg/dL)	-	31	-	29	-	36†	-	35†	-	39*
Alkaline phosphatase (U/L)	85	96	90	91	86	97	87	95	102	111
Urinalysis										
Urine volume (mL)	50.8	54.1	81.4	79.6	175.2	86.5	86.6	141.3^	266.4	350.4*
Specific gravity	1.038	1.039	1.041	1.036	1.023	1.036	1.029	1.018*	1.013*	1.011*
Organ Weights										
Liver/gall bladder										
Absolute Organ Weight (%)[c]	-	233.448 g	-	+1.3	-	+3.5	-	+14.3	-	+28.2*
Organ to Body Weight (%)	-	2.9719	-	3.1000	-	3.1370	-	3.3685	-	4.0082*
Organ to Brain Weight (%)	-	326.1823	-	332.3766	-	343.0985	-	363.5259	-	434.9790*
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology										
Number of Animals Examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Nasal Turbinate										
Infiltrate, neutrophils, mucosa, increased										
Minimal	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Recovery Phase										
Number of Animals in Recovery	2	2	2	2	0	0	2	2	2	2
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	N/A	N/A	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiographic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: 4-Week Toxicity and Toxicokinetics Intranasal Instillation Study with NRL-1 Diazepam Solution in Dogs with a 4-Week Recovery										
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings; AUC_{0-24} = Area under the concentration-time curve (from 0 h to 24 h); BLQ = Below level of quantification (<1.00 ng/mL for Diazepam, <2.50 ng/mL for Nordiazepam, and <262.50 pg/mL for Intravail® A3); C_{max} = Maximum plasma concentration; F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; N/A = Not applicable

* = Statistically significant based on actual data (not on percent difference) when compared to both the saline control and the vehicle control groups.

^ = Statistically significant when compared to the saline control group only.

† = Statistically significant based on actual data (not on percent difference) when compared to the vehicle control group only.

a All animals received six 130 µL deliveries/day. Dose Regimen for all groups was: Dose Event 1: both nostrils, Dose Event 2: both nostrils, 2 hours (± 10 minutes) post Dose Event 1, Dose Event 3: both nostrils, 4 hours (± 20 minutes) post Dose Event 1.

b Clinical observations are presented as: Total number of incidences (Number of animals with sign), with multiple incidences for one animal on the same day counted as a single incident. Assessment of sedation was based on the following level of consciousness scale: C1 - Standing, ambulating, sitting, lying down; animal stands up on its own when personnel approached the cage or the cage door was opened; C2 - Lying down; animal opens eyes when personnel approached the cage or the cage door was opened; animal stands normally when placed on its feet; C3 - Lying down; animal opens eyes once the cage door was opened and personnel petted the animal or clapped their hands to arouse; animal did not stand for more than a few seconds when placed on its feet; C4 - Lying down; animal did not open its eyes when the cage door was opened and personnel petted the animal or clapped their hands to arouse; animal could not stand on its own when placed on its feet.

c For saline controls, group means are shown. For vehicle control and treated groups, percent difference from saline controls is shown.

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.10　がん原性試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.15　幼若動物を用いた試験

ジアゼパム点鼻液の該当試験は実施しなかった。

2.6.7.16　局所刺激性試験

			Test Article: Diazepam suspension and dilution		
Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit / New Zealand White	Intranasal	3.5, 10 mg/animal	5M	Intranasal administration of all six formulations was well-tolerated. Following 50 µL intranasal dose formulation FID 2600 or FID 2789, all groups were observed with decreased activity at one hour. Activity returned to normal by 2 hours post-dose. Following 50 µL intranasal dose formulation FID 2790 or FID 2792, 9 of 10 animals were observed with decreased activity at one hour. Activity returned to normal by 2 hours post-dose.	[0852LN45.001]
Rabbit / New Zealand White	Intranasal	5, 10 mg/animal	5M	Intranasal administration of all six formulations was well-tolerated. All animals in formulation FID 2857, FID 2859, and FID 2860 appeared normal at all times post-dose with the exception of one animal in formulation FID 2859 (decreased activity, abnormal gait and stance at 0.25 and 0.5 hour post-dose). 5 of 5 animals in formulation FID 2858 were observed with decreased activity at 0.5 and 1 hour post-dose; these animals appeared normal by 2 hours post-dose. 5 of 5 animals in formulation FID 2861 exhibited decreased activity, abnormal gait and stance from 0.5 to 1 hour post-dose. They appeared normal by 2-3 hours post-dose. 4 of 5 animals in formulation FID 2862 had decreased activity at 0.5 hours post-dose and appeared normal by 1 hour.	[0852LN45.002]

M = Male

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　不純物

2.6.7.17.1.1　反復投与毒性試験

Report Title: A 90-Day Intranasal Toxicity Study of Diazepam Related Compound B in Sprague-Dawley Rats with a 3-Week Recovery (GLP)								
Test Article: Diazepam Related Compound B								
Species/Strain: Sprague Dawley Rats	Duration of Dosing: 90 days					Study Number: [0470RN45.001]		
Initial Age: 8-9 weeks	Duration of Postdose: 3 weeks					Location in CTD:		
Date of First Dose: 23/25 October 2019	Method of Administration: Intranasal							
	Vehicle/Formulation: Diazepam Nasal Spray Placebo					GLP Compliance: Yes		
Special Features: N/A								
No Observed Adverse Effect Level: 20 µL/nare (40 µL total) at concentration of 9.4 mg/mL every other day								
Concentration (mg/mL):	0 (Control)		0.9		4.7		9.4	
Number of Animals/Sex/Group:	M	F	M	F	M	F	M	F
Main:	10	10	10	10	10	10	10	10
Recovery:	5	5	5	5	5	5	5	5
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations[b] – Day 89								
Hair, red-stained	1(1)	1(1)	1(1)	-	4(4)	-	-	-
Hair, hair loss	-	-	1(1)	-	-	-	-	-
Skin, scab formation	-	-	1(1)	-	-	-	-	-
General, mass right axillary region	-	-	1(1)	-	-	-	-	-
Body Weight Gain[a] Day 1 to Day 90 (g)	171.4	65.6	-3.3	13.3	-4.7	4.0	-3.9	-0.6
Serum Chemistry[c]								
Sodium (mEq/L)	148.1	145.1	148.1	146.2	149.0	147.5B	150.1B	148.6B
Postdose Evaluation: Day 113 or 115								
Number Evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5
Hematology								
Percent Basophils[d]	1.62	2.56	1.30	1.80	1.92	0.36B	1.78	1.10A
Number Basophils[d] ($\times 10^3/\mu L$)	0.188	0.200	0.150	0.128	0.192	0.026B	0.120	0.076A
Percent Large Unstained Cells[d]	0.58	0.80	0.56	0.52	0.58	0.14B	0.50	0.66

Report Title: A 90-Day Intranasal Toxicity Study of Diazepam Related Compound B in Sprague-Dawley Rats with a 3-Week Recovery (GLP)								
Number Large Unstained Cells[d] ($\times 10^3/\mu L$)	0.070	0.062	0.062	0.040	0.058	0.010B	0.040	0.044
Serum Chemistry[c]								
Sodium (mEq/L)	147.2	145.8	147.8	148.0	149.4A	147.8	149.4A	149.6B

- = No noteworthy findings; F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; N/A = Not applicable

a For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown in the direction indicated. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

b Number of occurrences (Number of animals affected).

c Group means are shown.

d Considered incidental.

Dunnett's Test: Significantly different from control group (Group 1) value: A - $p \leq 0.05$; B - $p \leq 0.01$

2.6.7.17.1.2　In Vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.17.1.2.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay			Test Article: Diazepam USP Related Compound B (also known as Diazepam EP Impurity C)				
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells			No. of Independent Assays: 1			Study Number: [AG01VV.502ICH.BTL]	
Strains: *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537; *E.coli* WP2 *uvrA*			No. of Replicate Cultures: 3			Location in CTD:	
Metabolizing System: Liver homogenate (S9) from Aroclor™ 1254 treated rats			No. of Cells Analyzed/Culture: 1.1 to 2.5 × 10^9 cells per mL				
Vehicles:	For Test Article: DMSO		For Positive Controls: DMSO, except sterile water for sodium azide			GLP Compliance: Yes	
Treatment: Plate incorporation						Date of Treatment: 26 March 2020	
Cytotoxic Effects: Toxicity was observed beginning at 500 or 1500 µg per plate with a few conditions.			Genotoxic Effects: None				
			The number of revertant colony (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
Without S9 Activation	DMSO	0	16 ± 3	86 ± 6	11 ± 1	9 ± 3	22 ± 5
	Diazepam USP Related Compound B	15.0	18 ± 6	79 ± 10	7 ± 3	10 ± 1	25 ± 5
		50.0	18 ± 6	82 ± 10	7 ± 3	12 ± 1	25 ± 7
		150	18 ± 5	78 ± 8	9 ± 5	13 ± 3	20 ± 0
		500[P]	15 ± 4	68 ± 10	4 ± 2	11 ± 3	13 ± 2
		1500[P]	11 ± 2	67 ± 5	5 ± 1	12 ± 2	11 ± 1
		5000[P]	14 ± 6	66 ± 11	5 ± 2	7 ± 1	16 ± 6
	2NF	1.00	61 ± 5	-	-	-	-
	SA	1.00	-	655 ± 28	688 ± 10	-	-
	9AAD	75.0	-	-	-	1018 ± 121	-
	MMS	1000	-	-	-	-	391 ± 35

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
With S9 Activation	DMSO	0	31 ± 4	101 ± 7	11 ± 2	14 ± 1	37 ± 5
	Diazepam USP Related Compound B	15.0	25 ± 2	98 ± 4	8 ± 2	12 ± 2	35 ± 7
		50.0	28 ± 2	105 ± 4	6 ± 2	12 ± 1	35 ± 7
		150	21 ± 3	106 ± 13	8 ± 3	12 ± 3	41 ± 6
		500	22 ± 2[P]	92 ± 13	7 ± 4[P]	12 ± 2	35 ± 8[P]
		1500[P]	16 ± 3	85 ± 9	7 ± 2	11 ± 2	14 ± 4
		5000[P]	20 ± 5	75 ± 14	6 ± 1	10 ± 2	14 ± 3
	2AA	1.00	212 ± 12	-	67 ± 3	-	-
	2AA	2.00	-	742 ± 36	-	44 ± 11	-
	2AA	15.0	-	-	-	-	186 ± 23

2AA = 2-aminoanthracene; 2NF = 2-nitrofluorene; 9AAD = 9-aminoacridine; DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; MMS = Methyl methanesulfonate;
P = Precipitate; SA = Sodium azide; SD = Standard Deviation

2.6.7.17.1.2.2　染色体異常試験

Report Title: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells				Test Article: Diazepam USP Related Compound B (also known as Diazepam EP Impurity C)			
Test for Induction of: Chromosome aberration		No. of Independent Assays: 1		Study Number: [AG01VV.331ICH.BTL]			
Strains: Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells		No. of Replicate Cultures: 2		Location in CTD:			
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9		No. of Cells Analyzed/Culture: Diazepam EP Impurity C: 150 for structural, 150 for numerical; Positive controls: 75 for structural, 150 for numerical		GLP Compliance: Yes			
Vehicles	For Test Article: DMSO	For Positive Controls: Water (MMC, CP)		Date of Treatment: 11 Feb 2020 (Definitive Assay)			
Treatment: 20 hr without S9; 4 hr with 16 hr recovery period with and without S9							
Cytotoxic Effects : In the chromosome aberration assay, cytotoxicity (≥ 45% reduction in cell growth index relative to the vehicle control) was observed at doses ≥ 64 µg/mL in the non-activated 4-hour exposure group; at doses ≥ 51.2 µg/mL in the S9-activated 4-hour exposure group; and at doses ≥ 41 µg/mL in the non-activated 20-hour exposure group.				Genotoxic Effects: None			

Metabolic Activation	Test Article	Dose (µg/mL)	Cytotoxicity [a] (% of Control)	Aberrant Cells		Aberrations per Cell [b, d] Mean ± SD	Total Polyploid Cells (Mean %) [e]
				Structural (Mean %) [b]	Numerical (Mean %) [c]		
20-hr Continuous Treatment Without Activation	DMSO	N/A	N/A	1.3	2.3	0.013 ± 0.115	2.3
	Diazepam EP Impurity C	15.7	6	0.0	1.7	0.000 ± 0.000	1.7
	Diazepam EP Impurity C	32.8	26	1.7	2.7	0.017 ± 0.128	2.7
	Diazepam EP Impurity C	41	52	0.3	2.0	0.003 ± 0.058	2.0
	MMC	0.2	46	22.7**	1.3	0.293 ± 0.608	1.3
4-hr Treatment With 16-hr Recovery Without Activation	DMSO	N/A	N/A	1.3	2.3	0.013 ± 0.115	2.3
	Diazepam EP Impurity C	26.2	7	0.7	3.7	0.007 ± 0.082	3.3
	Diazepam EP Impurity C	41	9	1.3	3.7	0.013 ± 0.115	3.0
	Diazepam EP Impurity C	51.2 [f]	36	1.0	4.0	0.013 ± 0.141	2.3
	MMC	0.2	42	17.3**	3.7	0.200 ± 0.478	3.7
4-hr Treatment With 16-hr Recovery With Activation	DMSO	N/A	N/A	1.0	4.0	0.010 ± 0.100	1.7
	Diazepam EP Impurity C	26.2	0	0.3	6.7	0.003 ± 0.058	1.3
	Diazepam EP Impurity C	41	29	1.3	3.7	0.013 ± 0.115	2.0
	Diazepam EP Impurity C	51.2 [f]	46	1.7	3.0	0.020 ± 0.162	2.0
	CP	7.5	51	28.7**	2.7	0.360 ± 0.638	2.0

CP = Cyclophosphamide; DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; MMC = Mitomycin C; N/A = Not applicable; SD = Standard Deviation

Fisher’s Exact Test:　* p < 0.05;** p < 0.01.

a　Based on cell growth inhibition relative to solvent control.

b　Does not include cells with only gaps.

c　Includes polyploid and endoreduplicated cells.

d　Severely damaged cells counted as 10 aberrations.

e　Does not include endoreduplicated cell.

f　Visible precipitate was observed in the treatment medium at the conclusion of the treatment period.

2.6.7.17.2 添加物

2.6.7.17.2.1 Intravail® A3 の反復投与毒性試験

					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)		
Species/ Strain	Dosing Duration	Doses	Route of Admini-stration	Gender/ No Per Group	NOAEL/ NOEL	Noteworthy Findings	Study Number
Sprague Dawley Rats	2 weeks	0, 80, 200, or 400 µg	Intranasal	15M/15F	[redacted]µg	200 and 400 µg: Nasal cavity inflammation in both genders. All evidence of inflammation resolved during the 2-week recovery period.	[0437RA33.001]
Sprague Dawley Rats	4 weeks	[redacted]% (0, 0.1, 0.3, 10 mg/day)	Intranasal	10M/10F	[redacted]% (10 mg)	Study performed with DFP-02 No Intravail® A3 related adverse effects.	[8272935]
Sprague Dawley Rats	26 weeks	[redacted]% (0, 0.1, 0.3, 10 mg/day)	Intranasal	15M/15F	[redacted]% (10 mg)	Study performed with DFP-02 No Intravail® A3 related adverse effects on clinical signs, body weights, ophthalmology, food consumption, organ weights, hematology, blood chemistries, urine analysis, or macroscopic findings. Microscopic findings: Squamous cell metaplasia present in the transitional or respiratory epithelium of the nasal cavity [redacted] mg/day [redacted] mg/day [redacted]. After 4-week recovery period, a reduction in the incidence and severity observed in [redacted] mg/day [redacted] and complete recovery in [redacted] mg/day [redacted].	[8281782]
Beagle Dog	4 weeks	[redacted]% (0, 1.2, 10, 40 mg/day)	Intranasal	3M/3F	[redacted]% (40 mg)	Study performed with DFP-02 No Intravail® A3-related adverse effects.	[8275552]

					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)		
Beagle Dog	39 weeks	[redacted]% (0, 1.2, 10, 40 mg/day)	Intranasal	4M/4F	[redacted]% (40 mg)	Study performed with DFP-02 No evidence of Intravail® A3 toxicity. Microscopically, squamous cell metaplasia present [redacted] mg/day [redacted] mg/day [redacted] mg/day [redacted]	[8281784]

F = Female; M = Male; NOAEL = No observed adverse effect level; NOEL = No observed effect level

2.6.7.17.2.2　Intravail® A3 の in vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.17.2.2.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

Report Title: Dodecyl Maltoside/A3: Bacterial Mutation Test					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells			No. of Independent Assays: 2			Study Number: [963114]	
Strains: *S. typhimurium* and *E. coli*			No. of Replicate Cultures : 3			Location in CTD:	
Metabolizing System: Cofactor-supplemented post-mitochondrial fraction (S9)			No. of Cells Analyzed/Culture: -				
Vehicles:	For Test Article: 0.9% Sodium Chloride for Injection (USP)		For Positive Controls: Sterile water (USP) and DMSO			GLP Compliance: Yes	
Treatment: Plate incubation for 48 to 72 hours						Date of Treatment: July 2010	
Cytotoxic Effects: None					Genotoxic Effects: None		
			The number of revertant colony (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
Without S9 Activation	Saline	0	26 ± 2	127 ± 12	23 ± 4	14 ± 6	51 ± 8
	Intravail® A3	1.58	-	-	-	16 ± 5	-
		5.0	32 ± 7	151 ± 12	16 ± 4	18 ± 5	-
		15.8	35 ± 7	131 ± 5	18 ± 2	13 ± 5	-
		50	35 ± 7	147 ± 11	15 ± 3	16 ± 1	52 ± 2
		158	30 ± 3	140 ± 6	23 ± 10	16 ± 6	51 ± 5
		500	20 ± 3	75 ± 1	20 ± 1	4 ± 2	51 ± 6
		1581	NL/IL	IL	12 ± 4	IL	61 ± 7
		5000	-	-	-	-	31 ± 10
	Positive control*	-	159 ± 19	519 ± 12	368 ± 24	248 ± 31	164 ± 18
With S9 Activation	Saline	0	50 ± 6	121 ± 9	20 ± 3	12 ± 3	70 ± 1
	Intravail® A3	1.58	48 ± 2	140 ± 11	-	11 ± 1	-
		5.0	47 ± 3	137 ± 5	-	13 ± 3	-
		15.8	41 ± 3	148 ± 20	20 ± 5	14 ± 2	-
		50	49 ± 5	157 ± 16	19 ± 4	18 ± 6	60 ± 6
		158	58 ± 15	154 ± 18	20 ± 3	21 ± 3	62 ± 5
		500	26 ± 3	35 ± 5	20 ± 6	3 ± 2	59 ± 11
		1581	NL	IL	20 ± 4	NL	60 ± 2
		5000	-	-	5 ± 2	-	41 ± 10
	Positive control**	-	428 ± 36	1152 ± 38	481 ± 48	97 ± 9	315 ± 11

DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; IL = Incomplete lawn; NL = No lawn; SD = Standard Deviation
* TA98: 2-Nitrofluorene (1 µg/plate); TA100 and TA1535: Sodium azide (0.5 µg/plate); TA1537: 9-Aminoacridine (50 µg/plate);
WP2 *uvrA*: 4-Nitroquinoline N-oxide (0.5 µg/plate)
** TA1535: 2-Aminoanthracene (5 µg/plate); WP2 *uvrA*: 2-Aminoanthracene (15 µg/plate); TA98, TA100, and TA1537: Benzo[a]pyrene (5 µg/plate)
Study Number 963114, Table 1, Table 2, and Table 3

2.6.7.17.2.2.2 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験

Report Title: Dodecyl maltoside/A3: Chromosome Aberration Test						Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)								
Test for Induction of: Chromosome aberration			No. of Independent Assays: 2								Study Number: [963115]			
Strains: human peripheral lymphocytes			No. of Replicate Cultures: 2								Location in CTD:			
Metabolizing System: Cofactor-supplemented post-mitochondrial fraction (S9)			No. of Cells Analyzed/Culture: 200 cells								GLP Compliance: Yes			
Vehicles:	For Test Article: 0.9% Sodium Chloride for Injection (USP)		For Positive Controls: Purified water (USP)								Date of Treatment: July 2010			
Treatment: Plate incubation for 4 and 21 hours														
Cytotoxic Effects: None						Genotoxic Effects: None								
MAIN STUDY														
Metabolic Activation	Test Article	Conc. (µg/mL)	MI	RMI (%)	% Aberrant	Number of aberrations					Incidental observations†			
						b	e	B	E	other	g	G	P	C
4 hours Without S9 Activation	Saline	0	6.8	100	0.0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	Intravail® A3	80	7.6	113	[redacted]	2	0	1	0	0	4	0	1	0
		160	9.3	138		2	0	1	0	0	5	0	0	0
		320	5.7	84		1	0	0	0	0	4	0	1	1
		640	0	0	N/A									
	MMC	0.10	11.8	174	9.0*	14	4	1	0	0	8	0	0	1
4 hours With S9 Activation	Saline	0	8.4	100	1.5	2	1	0	0	0	4	0	2	0
	Intravail® A3	80	8.0	96	[redacted]	2	0	0	0	0	4	0	0	1
		160	9.4	111		2	1	0	0	0	3	0	0	1
		320	4.5	54		3	0	0	0	0	5	0	1	0
		640	0	0	N/A									
	CP	8.0	8.0	96	25.5*	53	6	6	0	0	24	1	0	0
21 hours Without S9 Activation	Saline	0	9.5	100	1.0	1	0	1	0	0	4	0	0	0
	Intravail® A3	80	9.4	99	[redacted]	0	0	0	0	0	3	0	0	0
		160	5.2	55		5	0	0	0	0	11	0	0	0
		320	6.4	67		3	0	1	0	0	5	0	1	0
		640	0	0	N/A									
	MMC	0.05	7.6	80	10.5*	23	2	1	0	0	12	0	0	0
SUPPLEMENTAL STUDY														
Metabolic Activation	Test Article	Conc. (µg/mL)	MI	RMI (%)	% Aberrant	Number of aberrations					Incidental observations†			
						b	e	B	E	other	g	G	P	C
4 hours	Saline	0	13.8	100	1.0	1	1	0	0	0	2	1	0	0

Report Title: Dodecyl maltoside/A3: Chromosome Aberration Test							Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)							
Without S9 Activation	Intravail® A3	225	6.4	46	[redacted]	1	0	0	0	0	1	0	0	0
		270	5.8	42		1	0	0	0	0	1	0	1	0
		323	6.8	49		1	0	0	0	0	1	0	3	2
	MMC	0.10	11.4	82	14.0*	10	6	17	0	1	1	0	0	1
21 hours Without S9 Activation	Saline	0	8.6	100	1.0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Intravail® A3	225	5.9	68	[redacted]	3	0	4	0	0	4	1	0	1
		270	5.4	63		2	0	0	0	0	2	0	0	0
		323	3.4	40		2	0	1	0	0	0	0	0	1
		388	3.8	44	N/A									
	MMC	0.05	7.3	84	9.0*	5	10	6	0	0	3	0	0	0

GLP = Good Laboratory Practice; MI = Mitotic index; RMI = Relative mitotic index

Structural aberration type: b, e, g - Chromatid break, exchange, gap; B, E, G - Chromosome break, exchange, gap; P - Polyploidy and endoreduplication; C - Centromeric disruption; other - Includes pulverized chromosomes and cells with > 8 aberrations; N/A - Not assessable (Not enough cells available due to toxicity)

Positive controls: CP = Cyclophosphamide; MMC = Mitomycin C

* $p \leq 0.001$ (highly significant); † g, G, P and C are excluded from the calculation of % aberrant cells.

Study Number 963115, Table 1 and Table 2

2.6.7.17.2.3 Intravail® A3 の in vivo 遺伝毒性試験

Report Title: Dodecyl Maltoside Rat Micronucleus Test					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)				
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei			Treatment Schedule: Single administration					Study Number: [963116]	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley			Sampling Time: 24 hours after infusion					Location in CTD:	
Age: 9-13 weeks			Method of Administration: Intravenous infusion						
Cells Evaluated: immature erythrocyte			Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection (USP)					GLP Compliance: Yes	
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000								Date of Dosing: January 2011	
Special Features: None									
Toxic/Cytotoxic Effects: Clinical signs observed following a single administration of dodecyl maltoside for 24 hours were dry, red material in urine in all 10 animals (5 males, 5 females); dry, green material in 2 females; and red, liquid material in 2 males. One male animal also had soft, yellow feces.									
Genotoxic Effects: None									
Evidence of Exposure: Intravenous administration									
Test Article	Dose (mg/kg)	No. of Animals	% IE/(IE+ME) Males	% IE/(IE+ME) Females	% IE/(IE+ME) Males & Females	Incidence MIE Males	Incidence MIE Females	Incidence MIE Males & Females	Incidence MME Males & Females
Vehicle control	[redacted]	5M/5F	39.3	42.0	40.7	2.8	4.2	3.5	0.0
Intravail® A3	[redacted]	5M/5F	42.1	40.6	41.4	5.2	4.4	4.8	0.0
Cyclophosphamide	20	3M/3F	32.6	30.8	31.7 *	49.7 *	26.0 *	37.8	0.0

GLP = Good Laboratory Practice

Definitions: % IE/(IE+ME) = Proportion of immature erythrocytes; MIE = Number of micronucleated cells observed per 2000 immature erythrocytes examined; MME = Number of micronucleated mature erythrocytes observed; * = $p \leq 0.001$ compared to vehicle control

Study Number 963116, Table 2

2.6.7.17.2.4 Intravail® A3 の生殖発生毒性試験

				Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)		
Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Wistar Rats	Intravenous	GD6-17	0, 30	8/group	[redacted] NOAEL = 30 mg/kg/day	[AA99567]

GD = Gestation day; NOAEL = No observed adverse effect level

2.6.7.17.2.5 Intravail® A3 の局所刺激性試験

					Test Article: Intravail® A3 (dodecylmaltoside)	
Type of Study	Species/Strain	Doses	Gender/No. Per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number
Contact hypersensitivity	Dunkin Hartley Guinea Pigs	[redacted]% [redacted]%	5M 10M	N/A	No toxic signs or mortality. No local adverse skin effects.	[C78787]
Dermal irritation	New Zealand White Rabbits	30 mg/mL	3M	N/A	Microscopically, minimal to marked subacute inflammation	[503595]

N/A = Not applicable; NOAEL = No observed adverse effect level; M = Male