トリヘプタノイン

第 2 部 CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Ultragenyx Japan 株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
µg	microgram：マイクログラム
アシル CoA	acyl-coenzyme A：アシルコエンザイム A
ALT	alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	area under the plasma/serum concentration-time curve：血漿／血清中濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistant protein：乳癌耐性タンパク
BHB	β-hydroxy butyrate：β-ヒドロキシ酪酸
BHP	beta-hydroxypentanoate：β-ヒドロキシペンタン酸
BUN	blood urea nitrogen：血中尿素窒素
C4	4-carbon：炭素数 4
C5	5-carbon (e.g., pentanoate)：炭素数 5（例：ペンタン酸）
C7	7-carbon (e.g., heptanoate)：炭素数 7（例：ヘプタン酸）
CEL	carboxyl ester lipase：カルボキシルエステルリパーゼ
CFR	Code of Federal Regulations：連邦規則集
C_{max}	maximum plasma/serum concentration：最高血漿／血清中濃度
CNS	central nervous system：中枢神経系
CoA	coenzyme A：コエンザイム A
CPK	creatine phosphokinase：クレアチンホスホキナーゼ
CYP	cytochrome P450’s：チトクローム P450
DART	developmental and reproductive toxicity：生殖発生毒性
DCI	daily caloric intake：1 日あたりのカロリー摂取量
DRF	dose-range finding：用量設定
EFD	embryo-fetal development：胚・胎児発生
F1	Filial 1 (first generation)：第 1 世代
FAOD	fatty acid oxidation disorders：脂肪酸代謝異常症
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
g	gram：グラム
GC-MS/MS	gas chromatography：ガスクロマトグラフタンデム質量分析
GLP	Good Laboratory Practice Regulations：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
IC_{50}	inhibitory concentration, 50%：50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
ID	Intraduodenal：十二指腸内
IV	intravenous(ly)：静脈内
kg	kilogram：キログラム
LC-FAOD	long-chain fatty acid oxidation disorders：長鎖脂肪酸代謝異常症
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry：液体クロマトグラフタンデム質量分析
LDH	lactate dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
LLOQ	lower limit of quantification：定量下限
m	meter：メートル
MAD	mutual acceptance of data：データ相互受け入れ制度
MATE	Multidrug and Toxin Extrusion Protein：多剤・毒性化合物排出タンパク質
MCH	mean corpuscular hemoglobin：平均赤血球血色素量
MCT	medium chain triglycerides：中鎖脂肪酸トリグリセリド

略語・用語	内容
MCV	mean corpuscular volume：平均赤血球容積
min	minute(s)：分
mL	milliliter(s)：ミリリットル
mM	millimolar：ミリモーラー
NA	Not Available：入手不能
NOAEL	No-observable adverse effect level：無毒性量
OAT	Organic Anion Transporter：有機アニオントランスポーター
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide : 有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	Organic Cation Transporter：有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
P-gp	P-glycoprotein：P-糖タンパク質
PK	pharmacokinetics：薬物動態
PLRP2	pancreatic triglyceride lipase-related protein 2：膵リパーゼ関連タンパク質 2
PO	oral(ly), by mouth, per os：経口
PPND	Pre- and Post-natal Development：出生前及び出生後の発生
PTL	pancreatic triglyceride lipase：膵トリグリセリドリパーゼ
RDW	red cell distribution width：赤血球容積粒度分布幅
SD	Sprague Dawley
TCA	tricarboxylic acid：トリカルボン酸
TCA cycle	tricarboxylic acid cycle (Kreb’s cycle)：トリカルボン酸回路（Krebs 回路）
TK	Toxicokinetic：トキシコキネティクス
UGT	UDP-glucuronosyltransferase：UDP-グルクロン酸転移酵素
ULOQ	upper limit of quantification：定量上限
UX007	Investigational Product/study drug, pharmaceutical-grade triheptanoin：治験薬、医薬品グレードのトリヘプタノイン
VLCAD	very long-chain acyl-CoA dehydrogenase：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素
$VLCAD^{-/-}$	very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損
医薬品 GLP 省令	Ordinance of the Ministry of Health and Welfare No. 21 on Good Laboratory Practice for Nonclinical Safety Studies of Drugs：厚生省令第 21 号の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令

目次

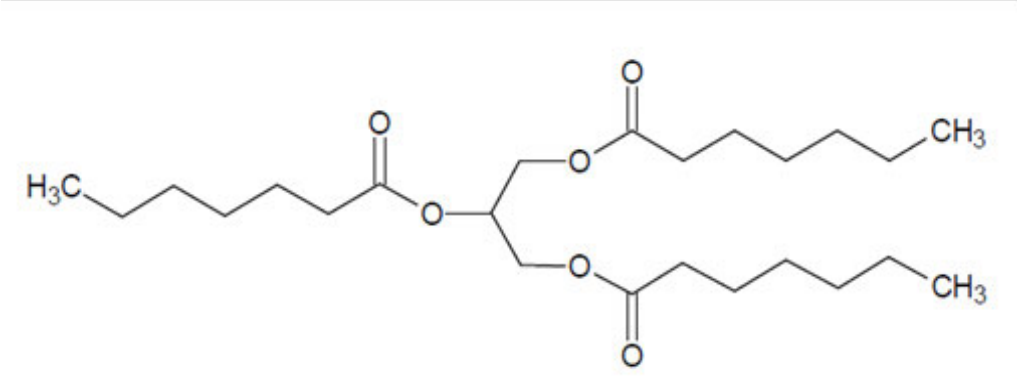
略号一覧表 2
緒言 5
2.4非臨床試験の概括評価 9
2.4.1 非臨床試験計画概略 9
2.4.2 薬理試験 10
2.4.2.1 In vitro 薬理試験 13
2.4.2.2 In vivo 薬力学的試験 13
2.4.2.3 安全性薬理試験 14
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 14
2.4.3 薬物動態試験 14
2.4.3.1 分析法 19
2.4.3.2 吸収 19
2.4.3.3 分布 20
2.4.3.4 代謝 20
2.4.3.5 排泄 21
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 21
2.4.4 毒性試験 22
2.4.4.1 単回投与毒性試験 24
2.4.4.2 反復投与毒性試験 25
2.4.4.3 遺伝毒性試験 26
2.4.4.4 がん原性試験 26
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 27
2.4.4.6 局所刺激性試験 28
2.4.4.7 その他の毒性試験 28
2.4.5 総括及び結論 29
2.4.5.1 結論 34
2.4.6 参考文献 35

緒言

トリヘプタノイン（UX007）は、グリセロール骨格と炭素数 7 の脂肪酸 3 分子から構成される奇数鎖中鎖脂肪酸トリグリセリド（MCT）であり、長鎖脂肪酸代謝異常症（LC-FAOD）患者を対象としたエネルギー補充療法の基質とすることを目的としている。LC-FAOD は、長鎖脂肪酸のエネルギー変換に欠かせないミトコンドリア酵素をコードする 6 種類の核遺伝子のうちの 1 つの欠損に起因する、生命を脅かす常染色体劣性遺伝疾患の一群である。LC-FAOD の影響を受ける酵素は、正常に機能する場合、カルニチンサイクルにおいて長鎖脂肪酸がミトコンドリア膜を通過する輸送過程、及び長鎖脂肪酸がアセト酢酸に代謝される過程に寄与する。LC-FAOD 患者では、酵素欠損による脂肪酸の部分的又は不完全な酸化のため、潜在的に毒性のある脂肪酸中間体の蓄積、トリカルボン酸（TCA）回路の基質の減少、及び糖新生の障害をもたらす。長鎖脂肪酸をエネルギー源として利用することができる基質に代謝することができず、同時に糖新生もできないため、別のエネルギー源であるブドウ糖が枯渇する。そのため、一般的な感染症や中等度の運動のようなエネルギー需要が増大したときに、急激な代謝クライシスを発症することがある。

UX007 原薬（Figure 1）は、医学文献に記載されたトリヘプタノインと構造は同一であるが、純度が高い。

Figure 1: Structure of UX007 Drug Substance



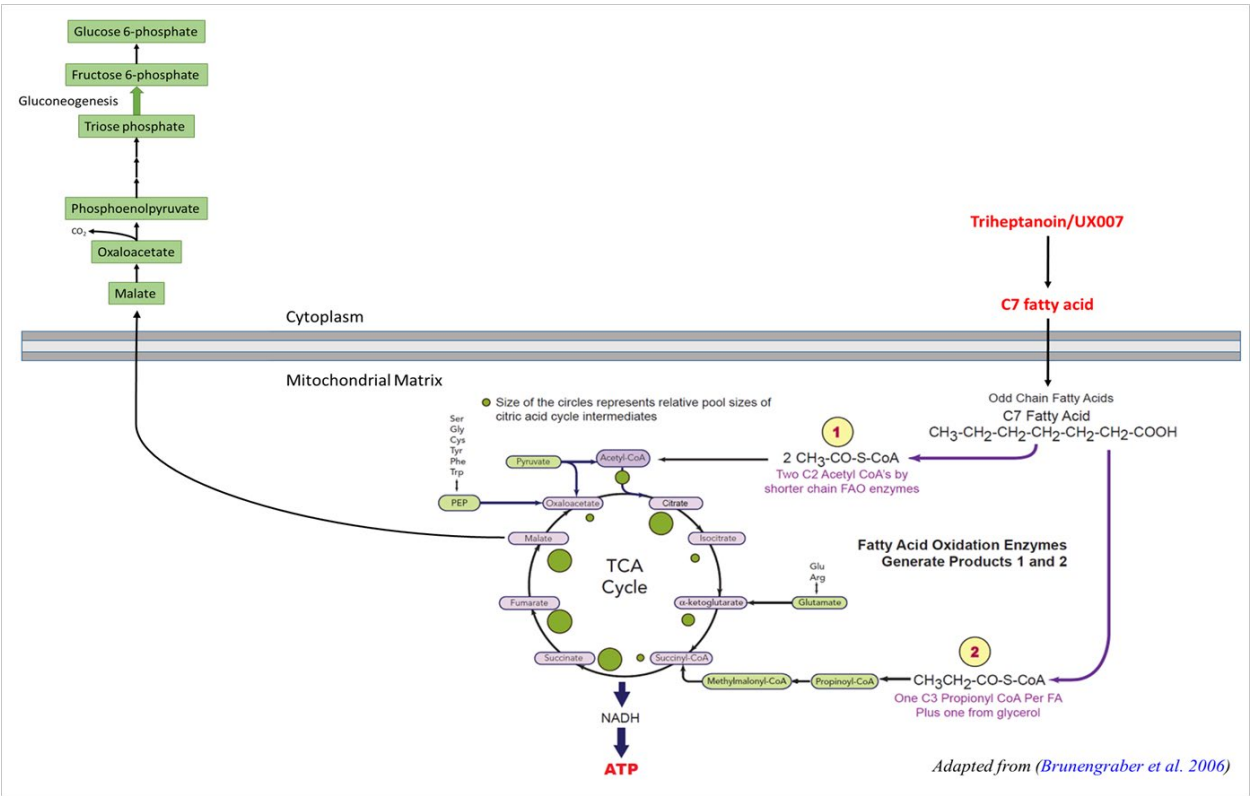
Molecular formula: $C_{24}H_{44}O_6$
Molecular Mass: 428.6 g/mole

トリヘプタノインの化学組成は、人体で通常認められるトリグリセリドと同等である。トリヘプタノインは、経口摂取後速やかに代謝され、細胞膜とミトコンドリア膜を直接拡散することができる炭素数 7 の遊離ヘプタン酸として吸収される。遊離ヘプタン酸は、短鎖脂肪酸及び中鎖脂肪酸の酸化酵素により代謝され、カルニチンサイクルを迂回するため、LC-FAOD 患者で欠損する長鎖脂肪酸酸化酵素の異化活性に依存せずに、エネルギー基質中間体を TCA に補給する（Figure 2；Brunengraber et al. 2006 から抜粋）。これにより、関連するが異なる 2 つの経路［エネルギーを産生する TCA 回路の第一段階である、クエン酸へと濃縮されるアセチルコエンザイム A（CoA）の産生（Figure 2、経路 1）；TCA 回路中間体を回復させ（アナプレロティック反応と

呼ばれる工程）、糖新生に寄与する、スクシニル CoA に変換される炭素数 3 の代謝物であるプロピオニル CoA の産生（Figure 2、経路 2）］によりエネルギー代謝が回復する。これは、十分な濃度のアデノシン三リン酸（ATP）と代謝用のエネルギー産生を維持するために必須の重要な工程である。LC-FAOD に対するアナプレロティック療法は、これらの疾患における TCA 回路中間体の不足がグルコースなどの基質からの ATP 産生を妨害するという仮説に基づいている（Knottnerus et al. 2018）。この不足は、心筋 TCA 回路中間体が枯渇している脂肪酸代謝異常症（FAOD）マウスモデルで認められていることから、アナプレロティック反応の必要性が高まっている（Knottnerus et al. 2018、Houten et al. 2010）。

プロピオニル CoA のアナプレロティック特性と糖新生特性は奇数鎖脂肪酸に特異的であるため（Roe et al. 2002、Marin-Valencia et al. 2013、Deng et al. 2009）、トリヘプタノインにより、偶数鎖 MCT を超えるベネフィットが得られる可能性がある。偶数鎖 MCT 及びトリヘプタノインはいずれも欠損する LC-FAOD 酵素を迂回して、ATP（及びケトン体）を産生するが、トリヘプタノインは TCA 回路の機能も回復させ、感染、長期空腹や運動により生じる急性代謝ストレス中に LC-FAOD 患者で消耗している可能性のある糖貯蔵の回復を支援する。このため、トリヘプタノインは、これらの患者における急性代謝ストレスへの耐性を増強し、より頑健で安定したエネルギー状態をもたらす可能性がある。

Figure 2: Triheptanoin replaces TCA cycle intermediates in LC-FAOD via two metabolic pathways



Information that characterizes the pharmacology, pharmacokinetics and rodent toxicology of triheptanoin exists in the literature. Together with the information supporting clinical use of triheptanoin in the literature, the pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of triheptanoin were characterized in nonclinical studies in rodents, rabbits and minipigs to support the intended chronic administration of triheptanoin mixed with food in all LC-FAOD patients.

トリヘプタノインは、ヘプタン酸への代謝とその後のケトン体生成及びアナプレロティック中間体生成への寄与を通じて、LC-FAOD に薬理学的に影響を及ぼす。これらのアナプレロティック中間体の TCA 回路活性及び糖新生への寄与が、マウス及びラットの肝臓及び筋肉を用いた試験で示されている（Module 2.6.2 及び 2.6.4 参照）。この関係性は、標識炭素を有する炭素数 4（C4）ケトン体及び炭素数 5（C5）ケトン体並びにグルコースへの広がりと濃縮を追跡する放射性標識アイソトポマー分析を用いた非臨床的試験で示されている（Deng et al. 2009、Marin-Valencia et al. 2013）。非臨床試験において、トリヘプタノインは、経口摂取後速やかに代謝され、細胞膜とミトコンドリア膜を拡散することができる炭素数 7 の遊離ヘプタン酸として吸収されて、細胞に TCA 回路のアナプレロティック反応をもたらすことが確認された。経口又は混餌投与したときのラット、ウサギ及びミニブタにおけるヘプタン酸の曝露プロファイルは、用量依存的な変化を示す。簡潔に述べると、トリヘプタノインから加水分解された遊離ヘプタン酸は、短鎖及び中鎖脂肪酸酸化酵素により代謝されるため、LC-FAOD 患者で欠損する長鎖脂肪酸酸化酵素の必要性による影響を受けない。肝灌流試験において、ヘプタン酸はアナプレロティック中間体であるアセチル CoA 及びプロピオニル CoA へと代謝されることが示されている（Kinman et al. 2006、Deng

et al. 2009）。アセチル CoA は TCA 回路に移行し、ATP 産生及びケトン体生成のためのエネルギー代謝に必要とされる。プロピオニル CoA は、スクシニル CoA へとさらに代謝され、TCA 回路中間体を再供給し、糖新生の基質をもたらすことで（Marin-Valencia et al. 2013）、肝グリコーゲン貯蔵を増加させる（Gu et al. 2010）。プロピオニル CoA のアナプレロティック特性と糖新生特性は奇数鎖脂肪酸に特異的であるため（Roe et al. 2002、Marin-Valencia et al. 2013、Deng et al. 2009）、トリヘプタノインにより、偶数鎖脂肪酸を含有する MCT を超えるベネフィットが得られる可能性がある。偶数鎖 MCT 及びトリヘプタノインはいずれも LC-FAOD の障害を迂回して、ATP 及びケトン体を生成するが、トリヘプタノインは TCA 回路の機能も回復させ、糖貯蔵の回復を支援する。

極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（VLCAD$^{-/-}$）マウスを用いた試験において、VLCAD$^{-/-}$マウスにトリヘプタノインを長期間混餌投与することで、これらの動物における心機能障害や酸化ストレスの悪化は認められなかったが、収縮機能障害の発現を防ぐことはできなかった（Tucci et al. 2017）。進行性心筋症は、VLCAD$^{-/-}$表現型の一部であることが知られていることから、トリヘプタノインの長期混餌投与は忍容性が良好であり、本動物モデルにおいて心臓を保護するベネフィットをもたらす可能性があることが示唆される（Module 2.6.2.2.3.2.2 参照）。トリヘプタノインは、圧過負荷により誘発したラットモデルにおいて心室肥大を軽減し、拡張機能を改善した（Nguyen et al. 2015、Module 2.6.2.2.2.3.4）。トリヘプタノイン混餌により、マウスてんかんモデルでアナプレロティック中間体濃度が増加し、発作軽減の薬理学的ベネフィットと相関した（Willis et al. 2010、Module 2.6.2.2.2.3.3）。

食品グレード又は医薬品グレードのトリヘプタノインを混餌投与した新たに離乳したラット又は幼若ミニブタを用いた反復投与一般毒性試験において、毒性作用は認められなかった。1 日あたりの総カロリー摂取量の 50%という高用量で経口投与する生殖発生毒性（DART）試験において、雌雄ラットの受胎能に対する毒性作用は認められなかった（試験番号 UX007-PC012）。摂餌量減少による体重増加量減少は、1 日あたりのカロリー摂取量（DCI）の 10%を超える用量でのラット（UX007-PC010 試験及び UX007-PC013 試験）及びウサギ（UX007-PC011 試験及び UX007-PC014 試験）を用いた医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用用量設定（DRF）試験及び GLP 適用胚・胎児発生（EFD、Seg II）試験（本試験）の特徴と一致した。体重増加量及び摂餌量の減少は、トリヘプタノイン混餌投与形態への味覚嫌悪に対する二次的なものと考えられた。また、ラットを用いて実施した出生前及び出生後の発生に関する試験において、母動物毒性が認められた（UX007-PC017 試験）。50% DCI の用量でトリヘプタノインを投与した妊娠動物における体重増加量減少により、雌雄出生仔の出生時体重の低値及び性成熟の遅延が生じた。

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

LC-FAOD 患者に対するトリヘプタノインの長期経口投与を裏付ける非臨床試験計画には、マウス及びラットにおける薬理作用、薬物動態（PK）及び毒性に関連する重要文献の調査、ラット、ウサギ及びミニブタを用いた PK 試験及びトキシコキネティクス（TK）試験、幼若ミニブタを用いたピボタル長期毒性試験、遺伝毒性評価、並びにラット及びウサギを用いたピボタル DART 試験があった。

マウス及びラットにおいて食品グレードのトリヘプタノイン及びその代謝物の急性投与及び長期投与を評価する非臨床試験を他者が実施しており、トリヘプタノインの急性安全性及び長期安全性を裏付ける目的で参照した。さらに、幼若ミニブタを用いて、トリヘプタノインの GLP 適用 9 ヵ月間長期混餌投与毒性試験を実施した（UX007-PC002 試験）。ミニブタの生殖器官に対する潜在的な影響を UX007-PC002 試験で評価し、投与期間中に動物が性成熟の月齢に達することを鑑みた、雌雄の生殖器官の標準的な病理組織学的検査が含まれた。トリヘプタノインは、新生児を含む全年齢の患者を対象に長期使用することを意図している。UX007-PC002 試験において、技術的に実行可能な最若齢であり、概ねヒトの 2 歳未満に相当する、試験開始時 6～8 ヵ月齢の幼若ミニブタを評価した。より若齢のミニブタの使用は、固形餌が食餌に組み込まれる前の若齢ミニブタの食餌に混餌する必要があること、投与で母動物との別離を強いる必要があること、乳汁代替品に高用量のトリヘプタノインを適切に混合できない可能性があること、そしてこれが（乳汁代替品の使用時に過去に増加した）胃腸障害の正確な評価にどのような影響を及ぼすかなど、複数の理由で不可能であった。さらに、ヒトの 2 歳超に相当する新たに離乳した雄ラット（約 3 週齢で開始）を用いた、公表済みの GLP 非適用 9 ヵ月間経口投与毒性試験（Module 2.6.6.3.1）が実施されている（Ataide et al. 2009）。

受胎能に対する経口投与したトリヘプタノインの影響を評価するため、ラット（UX007-PC012 試験）を用いた生殖発生試験、ラット（UX007-PC010 試験及び UX007-PC013 試験）及びウサギ（UX007-PC011 試験及び UX007-PC014 試験）を用いた EFD 試験を実施した。また、出生仔の発生転帰に対する、妊娠期間中のトリヘプタノイン混餌投与、及びその代謝物に関連した潜在的な毒性を理解するため、ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する毒性試験（UX007-PC017 試験）を実施した。

曝露量と毒性の関係を理解する目的で、トリヘプタノイン及びその活性代謝物の TK を明らかにするため、TK／PK の評価項目をトリヘプタノインの各試験で収集した。さらに、一連の *in vitro* 試験を実施して、トリヘプタノイン及びその代謝物の分布及び代謝を評価し、薬物動態学的薬物相互作用の可能性を評価した。

幼若ミニブタを用いたピボタル長期毒性試験、ラット及びウサギを用いたピボタル DART 試験は、米国食品医薬品局（FDA）GLP 規則 21 連邦規則集（CFR）Part 58 及び厚生省令第 21 号の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（医薬品 GLP 省令）に準拠して実施した。ただし、ラットを用いたトリヘプタノインの雌雄受胎能試験（UX007-PC012 試験）、ラットを用いたトリヘプタノインの経口投与発生毒性試験（UX007-PC013 試験）及びウサギを用いたトリヘプタノインの経口投与発生毒性試験（本試験）（UX007-PC014 試験）は、FDA GLP には準拠したが、医薬品 GLP 省令又は Organisation for Economic Co-operation and Development（OECD）のデータ相互受け入れ制度（MAD）に署名した他の国々の規制の下では取り扱われなかった。非臨床試験の GLP 適用について Table 3 に示す。

LC-FAOD を対象としたトリヘプタノインの臨床開発で使用した経口液剤（オイル）の原料の詳細を Module 2.7.1.1「製剤処方の概要」に示す。トリヘプタノインの臨床開発中に製造工程の変更を導入したが、全てのピボタル毒性試験は IOI 社が製造したトリヘプタノインを用いて実施された。工程変更を行った各時点で、製品の同等性／同質性を評価した。特定の非臨床試験で使用した製剤ロットを Table 3 で特定する。全体として、全ての試験で使用した製剤は物理化学的に同等である。原薬の *in vitro* 試験に基づくと、製品品質特性は、非臨床と臨床の物質間で同等である。

2.4.2 薬理試験

申請者は、動物を用いたトリヘプタノインの特定の薬理試験を実施していない。トリヘプタノインの薬理作用は十分に確立されており、文献に記載されている。そのため、薬理活性に寄与する活性代謝物の存在を評価する、公表された動物を用いた試験を調査することにより、トリヘプタノインの薬力学を評価した。トリヘプタノインの代謝及び薬理活性を評価した文献 8 報を（Table 1）に示す。これらの試験で得られたデータを Module 2.6.2.2.2 に要約する。

Table 1: Pharmacodynamic Studies of Triheptanoin

Study Type	Reference	Study Title	Animal or Model	Test Article	Dose/ Concentration	Route	Duration
Ex Vivo	(Marin-Valencia et al. 2013)	Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain	Adult C57BL/6J Mouse; transgenic Adult GLUT-1 Mouse	[5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate	150 mM infused at a rate providing 50% caloric requirement, equivalent to 95.9 ± 3.9 µmol heptanoate/min/kg	IV infusion	35 min
In Vivo	(Tucci et al. 2014)	Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD$^{-/-}$) mice	Adolescent VLCAD$^{-/-}$ Mouse	Medium chain triglyceride (MCT)	4.4% MCT	Dietary	12 months
	(Tucci et al. 2017)	Triheptanoin: long-term effects in the VLCAD$^{-/-}$ mouse		Triheptanoin (food-grade)	4.4% triheptanoin		
In Vivo	(Willis et al. 2010)	Anti-convulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models	Adult CF1 Mouse	Triheptanoin (food-grade)	Up to 20-35% caloric requirement	Dietary	up to 7.5 weeks
Ex Vivo	(Deng et al. 2009)	Interrelations between C4 Ketogenesis, C5 Ketogenesis,	Adult Sprague Dawley Rat	One of ([1-^{13}C]octanoate, [8-^{13}C]octanoate, [5,6,7-$^{13}C_3$]-	1 mM	Liver perfusion	Approx. 20 min

Study Type	Reference	Study Title	Animal or Model	Test Article	Dose/ Concentration	Route	Duration
		and Anaplerosis in the Perfused Rat Liver		heptanoate,[$^{13}C_3$]propionate, or (octanoate + heptanoate)			
In Vivo	(Kinman et al. 2006)	Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats	Adult Sprague Dawley Rat	Triheptanoin (food-grade)	10-40% caloric requirement	IV infusion (10-40% dose) or ID infusion (40%)	90-120 min
In Vivo	(Gu et al. 2010)	Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. II. Effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile	Adult Sprague Dawley Rat	Triheptanoin (food-grade) or Heptanoate-Na	40% caloric requirement	IV or ID infusion	125 min
In Vivo / Ex Vivo	(Nguyen et al. 2015)	Triheptanoin alleviates ventricular hypertrophy and improves myocardial glucose oxidation in rats with pressure overload	Adolescent Sprague Dawley Rat	Triheptanoin (food-grade for in vivo study) Glucose, heptanoate or oleate (for ex vivo heart perfusion)	7% or 30% total diet (kJ) for in vivo study 5 mM (glucose); 0.5 mM (oleate), 1.2 mM (heptanoate) for ex vivo	Dietary (in vivo); Isolated heart perfusion (ex vivo)	5 weeks (in vivo); 30-60 min perfusion (ex vivo)

2.4.2.1 In vitro 薬理試験

トリヘプタノインの *in vitro* 薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.2 In vivo 薬力学的試験

重要文献 8 報は、トリヘプタノインの（1）肝臓及び（2）肝臓外の薬理作用を実証した *ex vivo* 及び *in vivo* モデルを用いてトリヘプタノイン代謝とアナプレロティック反応及び糖新生との関係を検討することにより、トリヘプタノインのベネフィットの理解に寄与している。これらの試験において、トリヘプタノインの作用機序が明らかにされ、LC-FAOD を対象としたトリヘプタノインの臨床使用の根拠が裏付けられる。

正常ラット及びマウスにトリヘプタノインを反復混餌投与及び単回静脈内投与したとき、アナプレロティック基質の肝臓中濃度の増加が示された。ヘプタン酸の単回静脈内投与に伴い、アセチル CoA、プロピオニル CoA 及びグルコースの濃度が増加したことから、ヘプタン酸代謝により糖新生の基質が得られることが確認された（Marin-Valencia et al. 2013）。また、このことは、正常ラット肝臓の *ex vivo* 灌流試験において組織レベルでも検討された（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009）。トリヘプタノイン代謝から産生されるケトン体は糖新生系であり（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009）、グリコーゲン貯蔵も増加させる可能性がある（Gu et al. 2010）。

進行性心筋症の表現型を有する VLCAD$^{-/-}$マウスを用いた試験において、トリヘプタノイン混餌の長期間（1 年）投与は忍容性が良好であり、肝臓のアナプレロティック反応が増加することが示された。これにより肝臓の脂質含量、複数酵素の活性及びタンパク質の発現量が増加し、その全てが肝臓における TCA 回路の活性増強と相関する（Tucci et al. 2017）。トリヘプタノインは収縮機能障害の発現を完全に阻止しなかったものの、偶数鎖 MCT 混餌を 1 年間投与した後に認められたこれらの動物における心機能障害や酸化ストレスを悪化させなかった（Tucci et al. 2014）。これらのデータから、長期のトリヘプタノイン混餌は本モデルで心臓を保護する可能性があることが示唆される。しかしながら、マウスにおける脂肪酸代謝はヒトと同一ではなく、この VLCAD$^{-/-}$マウスモデルはヒトを完全に再現しないことを考慮することが重要である。このため、Tucci らが観察した進行性の心臓病理は、臨床の極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損を真に予測するものではない可能性がある（Tucci et al. 2014、 Tucci et al. 2017）。いずれにせよ、トリヘプタノインは、心疾患を悪化させた偶数鎖 MCT オイルと比べて本モデルの病態を保護する傾向があった。

大動脈結紮により誘発した心過負荷に供したラットを用いた機能評価から、トリヘプタノイン混餌の短期投与により、心室肥大が軽減し、拡張機能が改善することが示された（Nguyen et al. 2015）。

トリヘプタノインの静脈内投与に伴いアセチル CoA、プロピオニル CoA 及びグルコースの濃度が増加したことから、ヘプタン酸代謝により脳の糖新生の基質が得られることが、3 重安定同位体標識試験に基づいて確認された。このことは、ヘプタン酸が、TCA 活性に直接影響を及ぼすために、細胞（肝代謝以外）内に自由に拡散できることを示唆している（Marin-Valencia et al. 2013）。トリヘプタノイン混餌により、マウスてんかんモデルでアナプレロティック中間体濃度が増加し、発作軽減の薬理学的ベネフィットと相関した（Willis et al. 2010）。これは、アナプレロティック中間体の作用が実証される別のモデルであった。

2.4.2.2.1 副次的薬理試験

トリヘプタノインの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

トリヘプタノインの安全性薬理試験は実施しなかった。トリヘプタノインの全ての臨床及び非臨床経験において、トリヘプタノインと関連する心血管系、中枢神経系（CNS）及び呼吸器系の安全性に関する懸念の徴候は報告されていない。

このことは、1950 年代から栄養食として安全に投与され、1990 年代からは医療現場で使用されている偶数鎖 MCT に関連する心血管安全性プロファイルと一致している（Marten et al. 2006）。例えば、この期間中に、QTc 間隔に対する偶数鎖 MCT の影響と関連する臨床データや非臨床データは得られておらず、このことは、偶数鎖 MCT との構造の類似性により、トリヘプタノインに関連する重要な裏付けデータと考えられる。この関連性は、Ultragenyx 社が治験依頼者として実施した LC-FAOD 患者を対象とした医薬品グレードのトリヘプタノインを用いた臨床試験にさらに裏付けられた。この試験では、心電図に対する影響や QTc に対する影響を示唆する有害事象データは報告されていない。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

トリヘプタノインの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。トリヘプタノインは通常の食事中に存在するその他のトリグリセリドと類似するため、薬力学的相互作用の可能性は予想されない。

2.4.3 薬物動態試験

医療目的でのヒトにおけるトリヘプタノインの使用には長い歴史があり、動物（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009、Gu et al. 2010）及びヒト（Roe et al. 2002）におけるトリヘプタノイン代謝物の PK に関する公表文献が利用可能である。さらに、奇数鎖 MCT であるトリヘプタノインと類似すると予想される偶数鎖 MCT の *in vivo* 吸収及び代謝を明らかにするために、文献の広範なデータを利用できる（Greenberger et al. 1966、Guillot et al. 1993）。トリヘプタノイン（UX007）の開発プログラムにおいて、申請者は、3 種類のトリヘプタノイン製剤の相対的経口バイオアベイラビリティを比較することを目的としたミニブタを用いた PK 試験（UX007-PC007 試験）、並びにラット、ウサギ及びミニブタを用いたトリヘプタノイン及びその代謝物の複数の TK 試験を実施した。さらに、ヒト血漿を用いたヘプタン酸及びその代謝物のタンパク結合性試験、並びにトリヘプタノインの主要代謝経路及び代謝を介した薬物相互作用の可能性を解明することを目的とした、ヒト酵素又は肝細胞を用いた複数の *in vitro* 試験を実施した。

検討した動物種において、トリヘプタノインは腸内投与後に速やかな腸管加水分解と肝初回通過代謝を受けると考えられた（Roe et al. 2002、Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009、Gu et al. 2010）。文献データから、トリヘプタノインが腸管で加水分解されることで、ヘプタン酸（及びグリセロール）を生成し、このヘプタン酸（及びグリセロール）は吸収され、さらに代謝されて C4 ケトン体及び C5 ケトン体が生成されることが示されている。*In vitro* 試験において、トリヘプタノインの加水分解は、主に消化管に分泌される膵リパーゼにより触媒されることが示唆されている（UX007-PC015 試験）。

ヘプタン酸は *in vitro* でラット及びヒト肝細胞により代謝される（UX007-PC023 試験）。この炭素数 7 の脂肪酸は、外因性物質の代謝に関与する肝臓酵素の 2 大クラスであるヒトチトクローム P450（CYP）や UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）の感受性基質ではない（UX007-PC019 試験）。その他の偶数鎖 MCT と同様に、ヘプタン酸の主要代謝経路は、肝臓に特異的又は限定されない細胞内ミトコンドリアにおける β 酸化を介すると予想される。ヘプタン酸のヒト血漿タンパク結合率は比較的高く（約 80%；UX007-PC020 試験）、*in vivo* での肝クリアランスを制限していると考えられる。実際、ラットに静脈内投与したときのヘプタン酸の全身クリアランスは肝血流量よりも著しく大きいことから（Gu et al. 2010）、ヘプタン酸の消失には肝外代謝が重大な役割を果たすことが示唆される。要約すると、ヘプタン酸はトリヘプタノインの主要代謝物であり、肝初回通過代謝を一部が免れて、循環血を介して体組織に分布し、細胞膜に拡散してエネルギー代謝のためミトコンドリアに移行する。その他の中鎖脂肪酸と同様に、ヘプタン酸はエネルギー産生のために完全に代謝され、腎排泄や糞中排泄はわずかであることが予想される（Whyte et al. 1986）。

In vitro 代謝試験（UX007-PC021 試験）の結果に基づくと、7 種類の CYP 主要分子種の阻害を介して、トリヘプタノインの循環血中代謝物であるヘプタン酸、β-ヒドロキシペンタン酸（BHP）及び β-ヒドロキシ酪酸（BHB）が臨床薬物相互作用を生じる可能性はわずかであると判断された。臨床的に意義のある濃度で、トリヘプタノインの循環血中主要代謝物であるヘプタン酸は、*in vitro* でヒト血漿中におけるバルプロ酸の非結合分画を約 2 倍に増加させた。しかしながら、バルプロ酸の抽出率は 0.005 と非常に低いため、この増加は臨床的に意義がないと予想される。抽出率が低い全ての薬物で、総曝露量はタンパク結合に依存しない（Benet et al. 2002）。mRNA 発現量の増加が最大で 2 倍未満であったことから、ヘプタン酸は CYP1A2 及び CYP3A4 の誘導物質ではないと考えられた。CYP2B6 の mRNA は 2 倍を超えて増加したが、増加には明らかな濃度依存性が認められなかったため、ヘプタン酸は誘導物質ではないと解釈された［医薬品規制調和国際会議（ICH）M12, 2024］。ヘプタン酸は OAT1 及び OAT3 の潜在的な阻害物質であると考えられたが、その他の主要な取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）及び排出トランスポーター（P-gp 及び BCRP）は阻害しなかった。

2 種類の粉末製剤と比較してトリヘプタノインのオイル製剤の相対的経口バイオアベイラビリティを評価するため、ミニブタを用いて非臨床 PK 試験（UX007-PC007 試験）を実施した。結果から、粉末徐放性製剤でオイル製剤と同程度の血漿中ヘプタン酸曝露量が得られることが示された。その後、オイル製剤は、LC-FAOD 患者を対象とした臨床開発に選択されており、市販製品を予定する製剤である（Module 2.7.1.1.1.1 を参照）。

トリヘプタノインの吸収、代謝及び分布を評価する、文献及び申請者が実施した試験を、Table 2 に示す。

Table 2: Pharmacokinetic Studies with Triheptanoin

Study Type	Test System Species, Strain Details	Route of dosing Dose	Key Findings	Study No./ Reference
Absorption	Rats, SD	IV infusion or ID 10-40% caloric intake	Intraduodenal (ID) administration of triheptanoin resulted in low circulating heptanoate and glycerol blood concentrations with high circulating levels of C5 ketone bodies due to efficient hepatic clearance when compared to intravenous administration	(Kinman et al. 2006); (Gu et al. 2010)
	Juvenile Minipigs, Yucatan	Oral single dose of 30% of caloric requirement (oil, powder or powder-ER formulation)	Males and females demonstrated similar PK. A bimodal peak for heptanoate (the primary triheptanoin metabolite by plasma exposure) was observed for all three formulations. A powder-ER formulation provides similar triheptanoin metabolites exposure compared to oil formulation	UX007-PC007
Distribution	Human Plasma	In vitro	Human plasma protein binding of valproic acid, decreased in the presence of heptanoate, from 90% to 77% at 50 µg/mL, and 85% to 69% at 125 µg/mL, suggesting that heptanoate may compete with valproic acid for plasma protein binding and increase the valproic acid unbound fraction by ~ 2-fold	UX007-PC018
	Human Plasma	In vitro	Change of heptanoate (400 uM) unbound fraction in human plasma protein in the presence of valproic acid is not significant	UX007-PC020
Metabolism	In vitro – Lipase Mediated Metabolism	In vitro	Triheptanoin is a substrate of the three lipases tested, carboxyl ester lipase (CEL), pancreatic triglyceride lipase (PTL) and	UX007-PC015

Study Type	Test System Species, Strain Details	Route of dosing Dose	Key Findings	Study No./ Reference
			pancreatic triglyceride lipase-related protein 2 (PLRP2). Triheptanoin turnover by PTL appeared to be higher than PLRP2 and CEL.	
	In vitro – human liver microsomal stability	In vitro	Both heptanoate and beta-hydroxypentanoate (BHP) were stable in human liver microsomes, with or without NADPH and UDPGA, co-factors necessary for CYP and UGT mediated metabolism, respectively, suggesting that these two non-endogenous triheptanoin metabolites are not sensitive substrates of human CYP's and UGT's.	UX007-PC019
	In vitro – human and rat hepatocytes	In vitro	The projected in vivo clearance of heptanoate in human is 18.5 mL/min/kg, which corresponds to ~ 90% of hepatic blood flow (the projection does not take account of the plasma protein binding of heptanoate which may restrict its in vivo clearance).	UX007-PC023
	Rats, SD	Ex vivo Liver perfusion 0-1 mM	C4 and C5 ketone bodies were formed in the ex vivo heptanoate perfused rat liver	(Deng et al. 2009)
	Rats, SD	IV infusion of heptanoate or equivalent IV/ID dose of triheptanoin	ID dosing of triheptanoin resulted in less plasma exposure of heptanoate than that from IV dosing. Derived systemic clearance of IV-dosed heptanoate is >2-fold of the typical rat liver blood flow suggesting that heptanoate is	(Gu et al. 2010)

Study Type	Test System Species, Strain Details	Route of dosing Dose	Key Findings	Study No./ Reference
			subjected to significant extrahepatic clearance.	
Pharmacokinetic Drug Interactions	In vitro – human liver microsomes (Evaluation of CYP inhibition)	In vitro	Heptanoate and BHP did not inhibit the 7 major CYPs tested in vitro at concentrations up to 400 µM and 50 µM, respectively.	UX007-PC021
	In vitro – human hepatocytes (Evaluation of CYP induction)	In vitro 50, 155 and 500 µM	An increase in CYP2B6 > 2-fold by heptanoate was observed in donor LFQ at concentrations of 166 µM and 500 µM but was not concentration dependent.	UX007-24-0001
	In vitro – HEK 293 cells (Evaluation of transporter inhibition)	In vitro 33, 333 and 1000 µM	The IC_{50} of heptanoate on key uptake transporters were 30.1 µM for OAT1, 33.1 µM for OAT3, and > 1000 µM for OATP1B1, OATP1B3, OCT2, MATE1, and MATE2-K. The IC_{50} values of BHB and BHP were > 500 µM for OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1, and MATE2-K, respectively.	UX007-24-0002
	In vitro – Caco-2 cells (Evaluation of efflux transporter inhibition)	In vitro	Heptanoate, BHP, or BHB did not inhibit efflux transporters P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistant protein (BCRP). The projected IC_{50} of heptanoate, BHP, and BHB on P-gp and BCRP transporters were >1000 µM, >500 µM, and >500 µM respectively.	UX007-24-0003 UX007-24-0004 UX007-24-0005

2.4.3.1 分析法

最初の生体試料分析法の開発において、ガスクロマトグラフフタンデム質量分析（GC-MS/MS）による方法（Metabolic Screening Lab；St. Louis；MO; CLIA certified）により、ミニブタ血漿中のトリヘプタノイン、ヘプタン酸及び4つのケトン体［BHB、β-ケト吉草酸、アセト酢酸及びβ-ヒドロキシ吉草酸（別名：BHP）］を定量した。簡潔に述べると、抽出前に、分析対象物と同じ化学構造を有する安定同位体標識内標準物質を血漿試料に添加した後、MSTFA（N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド）により誘導体化して、揮発性トリメチルシリル誘導体を生成し、GC-MS/MS で分析した。分析範囲［定量下限（LLOQ）～定量上限（ULOQ）］は、トリヘプタノインが 2.5～200 µM、ヘプタン酸が 50～3000 µM、BHB が 50～400 µM、β-ケト吉草酸が 20～100 µM、アセト酢酸が 50～400 µM、BHP が 2.5～200 µM であった。この方法により、1回の試料調製で全ての分析対象物の血漿中濃度を測定でき、ミニブタを用いた試験で使用した（UX007-PC002 試験、UX007-PC003 試験及び UX007-PC007 試験）。

その後、血漿中トリヘプタノイン濃度の定量用に定量範囲が 0.200～10.0 µM と感度がより高い、GLP に準拠したバリデートされた液体クロマトグラフタンデム質量分析（LC-MS/MS）による生体試料分析法が開発された（MPI Research Inc., Mattawan, MI）。また、ラット及びウサギ血漿試料中のヘプタン酸、BHB 及び BHP 濃度を測定するため、GC-MS/MS 定量法も GLP 規則に従ってバリデートされた。ヘプタン酸の検量線範囲は、ラット及びウサギ血漿中で 10.0～1000 µM、ヒト血漿中で 50.0～2500 µM でバリデートされた。BHB 及び BHP の定量範囲は、ラット、ウサギ及びヒトで 50.0～2500 µM でバリデートされた。ラット及びウサギを用いた GLP 適用 DART 試験で、これらのバリデートされた定量法を使用した（UX007-PC013 試験及び UX007-PC014 試験）。

2.4.3.2 吸収

MCT は天然油に由来し、食事中に存在するため、その吸収は十分に明らかにされている。一般的に、MCT は小腸内腔で膵液由来の膵リパーゼにより加水分解され、その後の中鎖脂肪酸とグリセロールの遊離が生じる。その後、中鎖脂肪酸は腸細胞により吸収され、肝門脈に収集されて肝臓に運び込まれ、循環血に移行する前に、肝初回通過代謝を受ける（Greenberger et al. 1966、Guillot et al. 1993）。ラットを用いて実施した試験の結果（Kinman et al. 2006）、トリヘプタノインを十二指腸内投与したときのトリヘプタノインに由来するヘプタン酸の血漿中濃度は、トリヘプタノインを静脈内投与した場合と比べて、相対的に低かった。腸で吸収された大部分のヘプタン酸は、肝初回通過で C5 ケトン体及び C4 ケトン体へと代謝されると考えられる。血漿中 C5 ケトン体濃度は、静脈内投与と比べて同じ用量の十二指腸内投与の方が高かったことから、十二指腸内投与したときのトリヘプタノインのヘプタン酸への効率的な腸での変換とその後の吸収が間接的に示された。これらのことから、トリヘプタノインの吸収は、MCT の吸収と一致することが示唆される。

2.4.3.2.1 ラット、ウサギ及びミニブタにおけるトリヘプタノインのトキシコキネティクス

ラット及びウサギを用いた反復経口投与生殖毒性試験において、トリヘプタノイン及びその代謝物の TK を評価し、トリヘプタノインを、研究室条件下での動物の DCI に対しラットで 10%、30%及び 50%相当、ウサギで 10%、20%及び 30%相当の用量で混餌投与した（Module 4.2.3.5.1、UX007-

PC012 試験、Module 4.2.3.5.2、UX007-PC013 試験及び UX007-PC014 試験；Module 4.2.3.5.3、UX007-PC017 試験）。いずれの動物種においてもトリヘプタノインの血漿中曝露量は、その代謝物と比べてわずかであったが、ヘプタン酸とその代謝物の平均血漿中曝露量は、用量依存的であった。雌雄ラット間で明らかな TK の差は認められなかった。経時的なトリヘプタノイン代謝物曝露量の顕著な蓄積は認められなかった。30% DCI 以上の用量で中程度の蓄積が認められたが、ウサギでの蓄積は認められなかった。

幼若ユカタンミニブタを用いたトリヘプタノインの 9 ヵ月間毒性試験において、トリヘプタノイン及びその代謝物であるヘプタン酸、BHB 及び BHP の TK 解析を実施した（Module 4.2.3.2、UX007-PC002 試験）。雌雄ミニブタにトリヘプタノインを 10%、30%及び 50% DCI の用量で 273 日以上、混餌投与した。その結果、ヘプタン酸及び BHP の血漿中曝露量の用量依存的な増加が認められた。毎月のトリヘプタノインの血漿中トラフ濃度はわずかであった。9 ヵ月間投与後に、トリヘプタノイン代謝物の血漿中での顕著な蓄積は認められなかった。

2.4.3.3 分布

ヒト血漿を用いて、ヘプタン酸及び BHP の *in vitro* タンパク結合率を明らかにした（UX007-PC020 試験）。ヘプタン酸のヒト血漿タンパク結合率は中程度であり、40 及び 400 µM でそれぞれ約 78% 及び 81%であったが、BHP の明らかな血漿タンパク結合はないと考えられた。

ヘプタン酸、BHB 又は BHP の存在下及び非存在下で、ヒト血漿を用いて、濃度 50 及び 125 µg/mL でバルプロ酸のタンパク結合率を明らかにした（UX007-PC018 試験）。400 µM ヘプタン酸の存在下で、50 µg/mL 及び 125 µg/mL の濃度でのバルプロ酸の血漿タンパク結合率は、それぞれ 89.8% から 76.7%及び 84.6%から 68.5%に低下したことから、ヘプタン酸はバルプロ酸と血漿タンパク結合で競合する可能性があり、非結合分画バルプロ酸は約 2 倍増加することが示唆された。バルプロ酸のヒト血漿タンパク結合率は、BHB 又は BHP の存在により顕著に影響を受けなかった。一方、バルプロ酸の存在により、ヘプタン酸の血漿タンパク結合率は顕著に変化しなかった。

トリヘプタノインで、臨床投与経路を用いた放射性標識薬剤の分布試験は実施しなかった。文献報告において、同位体標識ヘプタン酸をマウスに静脈内投与したとき、標識ヘプタン酸及びその代謝物である BHP がマウス脳中で検出されたことが示された（Marin-Valencia et al. 2012）。

2.4.3.4 代謝

2.4.3.4.1 In vitro 代謝

膵リパーゼ調製物中で、トリヘプタノインは検討した全 3 種類のリパーゼ［カルボキシルエステルリパーゼ（CEL）、膵トリグリセリドリパーゼ（PTL）及び膵リパーゼ関連タンパク質 2（PLRP2）］の基質であった。PTL の加水分解活性が最も顕著であり、PLRP2 及び CEL と比べてそれぞれ約 10 倍及び 24 倍高かった（Module 4.2.2.4、UX007-PC015 試験）。CYP 及び UGT それぞれの触媒活性に必要なコファクターである NADPH 及び UDPGA の存在下で、ヘプタン酸と BHP の両方がヒト肝ミクロソーム中で安定であったため、ヘプタン酸（又は BHP）はヒト CYP 又は UGT の感受性基質ではなかった（Module 4.2.2.4、UX007-PC019 試験）。ラット及びヒトの肝細胞で、ヘプタン酸の半減期はそれぞれ 37 分及び 28 分であった（Module 4.2.2.4、UX007-PC023 試験）。

2.4.3.4.2 ラットにおける *in vivo* 代謝

ラット代謝試験で示されたように、トリヘプタノインは胃腸管内でヘプタン酸及びグリセロールへと加水分解されて、肝臓内に吸収される（Kinman et al. 2006）。トリヘプタノインを十二指腸内投与したときの血中ヘプタン酸濃度が比較的低いことから、トリヘプタノインの腸管加水分解に由来するヘプタン酸はラットで速やかな肝初回通過代謝を受け、ミトコンドリアβ酸化を介してC4ケトン体及びC5ケトン体を生成することが示される（Kinman et al. 2006）。C5ケトン体であるβ-ケトペンタン酸及びその還元体であるBHPは、ミトコンドリア内でプロピオニルCoAへとさらに変換されて、TCA回路中間体（アナプレロティック反応と呼ばれるプロセス）及びエネルギー産生TCA回路の第一段階を開始する炭素数2のアセチルCoAも再補充する（Deng et al. 2009）。C5/C4ケトン体とともにヘプタン酸は組織に分布し、細胞膜を拡散してミトコンドリア内に移行し、エネルギー産生代謝を補助する（Deng et al. 2009、Gu et al. 2010、Marin-Valencia et al. 2012）。

2.4.3.5 排泄

その他のMCTと同様に、ヘプタン酸はエネルギー産生のために完全に代謝され、排泄はわずかであると考えられている（Whyte et al. 1986）。トリヘプタノイン及びその代謝物の排泄を明らかにすることを目的とした非臨床試験は実施しなかった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

4.4項に記載したように、*in vitro*試験において、循環血中の2種類の非内因性トリヘプタノイン代謝物（ヘプタン酸及びBHP）はヒトCYP又はUGT（低分子薬物の代謝に関与する主要な肝酵素）の感受性基質ではなく、これらの代謝物がヒトCYPの主要分子種を阻害する可能性は低いことが示された。トリヘプタノインが通常の食事中に存在するその他のトリグリセリドに類似していること、エネルギー産生のため飽和脂肪酸がミトコンドリアβ酸化を受けることが知られていることをあわせて考慮すると、トリヘプタノインが関与する臨床的に意義のある代謝関連の薬物動態学的薬物相互作用が起こる可能性は低いと結論付けることができる。4.3項に示すように、臨床的に意義のある濃度で、トリヘプタノインの循環血中主要代謝物であるヘプタン酸は、*in vitro*でヒト血漿中におけるバルプロ酸の非結合分画を約2倍に増加させた。しかしながら、この増加は臨床的に意義がないと予想される（Benet et al. 2002）。

ヒト肝細胞で、ヘプタン酸の存在下でのCYP1A2及びCYP3A4のmRNA発現量の増加は2倍未満であったことから、ヘプタン酸はこれらの代謝酵素の誘導物質ではないと考えられる。*In vitro*でヘプタン酸の存在下でのCYP2B6のmRNA発現量は2倍を超えて増加したが、CYP2B6のmRNA発現量の増加はICH M12「薬物相互作用試験に関するガイドライン」（2024年6月）に概説された濃度依存性を明確に示さなかったため、本酵素の直接的な誘導としては解釈されなかった。

ヘプタン酸及びその代謝物のトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及びMATE2-K）阻害能を評価する*in vitro*実験で、OAT1及びOAT3で0.1を超える$C_{max,u}/IC_{50}$比が得られたことから、「薬物相互作用試験に関するガイドライン」（2024年6月）に基づき、これらの2つのトランスポーターに対するヘプタン酸が介在する阻害を否定できないことが示唆される。

ヘプタン酸による OAT1/3 阻害の臨床的な意義について、Module 2.7.2 で考察する。

2.4.4 毒性試験

ラット及びモルモットを用いたトリヘプタノインの GLP 非適用毒性試験 3 件が公表されており、データを関連情報としてここに提示する。ラット、ウサギ及びミニブタにおける UX007 の潜在的な毒性を評価するため、申請者は追加の *in vivo* 試験を実施した。これらの試験の一覧を Table 3 に示す。

Table 3: Summary of the Triheptanoin Toxicology Program

Study Type / Duration	Species	Dose (Route)	GLP Compliance	Study No.	Batch/ Lot No. of Test Article
Single-Dose Toxicity (Acute)					
Single dose	Adult Wistar rat (male and female)	0.5, 1, 2.5, or 5[a] mL/kg (oral gavage administration); no vehicle group used in this study	No	CL74-95-1045	NA[b]
Repeat-Dose Toxicity					
9-months (daily)	Adult Wistar rat (male)	Untreated control, 30%, 50% caloric intake[c] of experimental oil containing triheptanoin (64%), diheptanoin (34%) and monoheptanoin (2%) (dietary administration)	No	(Ataide et al. 2009)	NA[b]
Pilot Tolerability Study: 3 or 7 days (daily)	Juvenile Yucatan minipig (male and female)	10%, 30%, 50% of caloric intake (dietary administration); no vehicle group used in this study	No	UX007-PC001	Z132A
9 months (daily) with 28-day Recovery	Juvenile Yucatan minipig (male and female)	0 (vehicle), 10, 30, and 50% of caloric intake (dietary administration)	Yes	UX007-PC002	302010

Study Type / Duration	Species	Dose (Route)	GLP Compliance	Study No.	Batch/ Lot No. of Test Article
Bridging Toxicokinetic Study	Juvenile Yucatan minipig (male and female)	30% of caloric intake (oral)	No	UX007-PC003	302010 (oil) BREC-1111-043 (powder) BREC-1111-075 (powder-ER)
Genotoxicity Studies					
Ames Assay: Bacterial Reverse Mutation Assay	*In vitro*	1.58 to 4800 µg/plate	Yes	UX007-PC004	Z847
Mammalian Chromosome Aberration Test	*In vitro*	3.45 to 409 µg/mL	Yes	UX007-PC005	Z847
Micronucleus Assay	Adult Sprague Dawley rat	500, 1000 or 2000 mg/kg/day (PO) (two doses administered 24 hours apart)	Yes	UX007-PC006	Z847
Developmental and Reproductive Toxicity Studies					
Fertility (Seg I)	Adult Sprague Dawley rat	0 (vehicle), 10, 30 or 50% of total daily caloric intake; (dietary administration)	Yes	UX007-PC012	Z132A
Embryo-Fetal Development (EFD) dose-range finding (DRF)	Adult Sprague Dawley rat	0 (vehicle), 10, 30 or 50% of total daily caloric intake (for both PO and dietary administration routes)	No	UX007-PC010	U4025
Oral Development Toxicity Study (Segment II) of UX007 in Rats	Adult Sprague Dawley rat	0 (vehicle), 10, 30 or 50% of total daily caloric intake; (dietary administration)	Yes	UX007-PC013	Z132A
Embryo-Fetal Development (EFD) dose-	Adult New Zealand White rabbit	0 (vehicle), 10, 30 or 50% of total daily caloric intake (dietary administration)	No	UX007-PC011	U4025

Study Type / Duration	Species	Dose (Route)	GLP Compliance	Study No.	Batch/ Lot No. of Test Article
range finding (DRF) (Seg II)					
Embryo-Fetal Development (EFD) (Seg II)	Adult New Zealand White rabbit	0 (vehicle), 10, 20 or 30% of total daily caloric intake; (dietary administration)	Yes	UX007-PC014	Z847
Pre- and Post-natal Development (PPND) (Seg III)	Adult Sprague Dawley rat	0 (vehicle), 10, 30 or 50% of total daily caloric intake; (dietary administration)	Yes	UX007-PC017	FB0797 and FB0757[d]
Local Tolerance: Not applicable due to oral formulation (no studies performed)					
Other Toxicity Studies					
Assessment of Abuse Liability Potential	*In vitro*	UX007 (10 µM), heptanoate (30, 100, 1000 µM) and beta-hydroxypentanoic acid (10, 30, 100 µM)	No	UX007-PC022	AK14 (UX007) A0392418 (Heptanoic acid) 9-JES-47-1 (BHP)
Dermal Sensitization Test	Adult Albino Hartley guinea pig	Intradermal injection, every other day for 9 priming injections; followed by a single 0.1 mL challenge injection after 2 week untreated period	No	CL74-95-1045	NA

NA= Not Available
[a] The high dose of 5 mL/kg is approximately equivalent to 13% daily caloric intake. This calculation is based on: the reported body weight of animals in the study (200 g); the typical density reported for triheptanoin (0.96 g/mL); the energy contribution of triheptanoin as 8.3 Kcal/g; the dose of triheptanoin given (5 mL/kg), as well as a historical estimate of 20 g (60 Kcal) of food consumed per day per animal.
[b] food grade triheptanoin
[c] Each dietary group was also divided into diets administered during 'growth' (the first two months of the study) and 'maintenance' (period between end of growth phase and end of study) phases. Therefore, the amount of triheptanoin included in each diet group was 13.44 g/kg and 7.68 g/kg in the Growth and Maintenance 30% Triacylglycerol (TAG) C_7 groups, respectively; and 22.4 g/kg and 12.8 g/kg in the Growth and Maintenance 50% $TAGC_7$ groups, respectively.
[d] The two lots used in the pre- and post-natal development (PPND) study (UX007-PC017) were generated by the same manufacturing process and have similar purity and stability profiles (lot details provided in Module 2.6.7.4)

2.4.4.1 単回投与毒性試験

トリヘプタノイン（食品グレード）をラットに 0.5、1、2.5 又は 5 mL/kg の用量で強制経口投与する GLP 非適用試験において、単回投与（急性）毒性（CL74-95-1045 試験）を評価した。本トリヘ

プタノイン用量は、それぞれ 0.48、0.95、2.38 及び 4.75 g/kg に相当した。本試験において死亡や毒性の徴候は認められず、最大耐用量は検討した最高用量よりも高いと結論付けられた。最高用量はラットの DCI の約 13%であったが、これはヒトにおける 0.76 g/kg 体重の用量に相当する。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラットを用いた GLP 非適用 9 ヵ月間試験（Ataide et al. 2009）及び幼若ミニブタを用いた GLP 適用 9 ヵ月間試験（UX007-PC002 試験）において、反復投与毒性を評価した。これらの試験の目的は、トリヘプタノイン長期投与の影響を評価し、高脂肪食を長期投与することによる忍容性の変化を解釈することであった。

ラットを用いた GLP 非適用 9 ヵ月間試験（Ataide et al. 2009）では、動物の成長、脂質消化性、血液生化学検査及び選択した標的器官（肝臓、腎臓及び小腸）における毒性に対する連日のトリヘプタノイン混餌の影響を明らかにするため、正常雄 Wistar ラットにトリヘプタノイン（又は対照として大豆油）を含有する飼料を給餌した。DCI の 30%及び 50%に相当する用量（1.14 g/kg に相当する用量）で、2 ヵ月間の成長期と 7 ヵ月間の維持期を網羅するよう、トリヘプタノイン混餌を製剤化した。トリヘプタノイン混餌を給餌したラットにおいて、脂質消化性や成長パターンに顕著な違いは認められなかった。全ての群で絶対肝重量に差は認められなかったが、相対肝重量（肝重量／体重）は対照群で高かったことから、大豆油ベースの飼料を給餌した動物の肝臓で脂肪の蓄積がわずかに高いことが示された。また、肝障害や腎機能又は胃腸機能に対する毒性作用を表す血液生化学検査値に群間で顕著な差は認められなかった。脂質プロファイルは群間の飼料の違いにより影響を受けなかったが、投与期間と飼料中脂肪含量により予想された。肝臓の顕微鏡検査で、大豆油対照群を含む全ての飼料群で大滴性脂肪肝が認められた。大豆油対照群を含む全ての投与群で所見が認められたことを考慮すると、このことは、食品グレードのトリヘプタノインに関連するというよりも、長期の油投与に対する生理学的反応を示唆する可能性が高かった。さらに、血液生化学検査値との相関が認められなかったことから、肝機能は影響を受けなかったことが示された。その他の組織では病理組織学的変化を評価しなかった。全体として、トリヘプタノイン混餌を 1.14 g/kg［無毒性量（NOAEL）］以下の用量でラットに長期連日投与することで、毒性作用は生じなかった。

ミニブタを用いた 9 ヵ月間ピボタル長期毒性試験（UX007-PC002 試験）の用量選択は、動物の DCI の 10%（3 日間）、30%（3 日間）又は 50%（7 日間）（それぞれ 5.2、15.6 及び 26.1 g/kg に相当）で 6 時間間隔で 1 日 2 回、動物にトリヘプタノインを給餌した経口（混餌）投与忍容性試験（UX007-PC001 試験）により裏付けられた。死亡、異常な一般状態所見や血液生化学検査値の変化は認められなかったことから、長期試験（UX007-PC002 試験）における 10%、30%及び 50% DCI の用量選択が裏付けられた。

幼若ユカタンミニブタを用いた GLP 適用ピボタル反復投与試験（UX007-PC002 試験）において、トリヘプタノインを 10%、30%及び 50% DCI（それぞれ 2、6 及び 10 g/kg に相当）で 6 時間間隔で 1 日 2 回、9 ヵ月間、混餌投与した。高用量群の雄 2 例は、尿路感染を示唆する徴候を呈する、陰茎脱出と関連する合併症により 9 ヵ月間投与期間の終了前に死亡したが、投与に関連せず、幼若雄ミニブタで一般的なケージ内行動の結果と考えられた。体重及び体重増加量は投与の影響を受けず、臨床病理検査プロファイルに投与に関連した変化は認められなかった。血清生化学検査

［例：血中尿素窒素（BUN）、総タンパク質、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、クレアチンホスホキナーゼ（CPK）及び乳酸脱水素酵素（LDH）の低値］及び血液学的検査［例：平均赤血球容積（MCV）及び平均赤血球血色素量（MCH）の低値、網状赤血球の高値を伴う赤血球指数］のプロファイル変化は、特に 50%投与群の動物では、ミニブタに給餌した飼料の栄養内容の違いに関連する二次的な影響である可能性が高かった（投与を受けたミニブタの飼料中総タンパク質及び鉄含量の低値）。肉眼病理検査及び顕微鏡病理検査では、トリヘプタノイン投与に起因した又は正常範囲内になかった組織の変化は認められなかった。回復期間の終了時に安楽殺した高用量群の雌雄で検査した組織は、対照群の動物と同等であり、正常範囲を超えると考えられた所見は認められなかった。試験期間中にいずれのミニブタにおいても、投与に関連した毒性の一般状態所見は認められず、投与に関連した死亡は生じなかった。いずれの用量においても、トリヘプタノイン投与に起因した肉眼病変や顕微鏡病変は認められなかった。要約すると、トリヘプタノインは、検討した最高用量である 50% DCI 以下で忍容性が良好であり、50% DCI が本試験の NOAEL と考えられた。

オイル製剤、粉末製剤又は徐放性粉末製剤として 30% DCI の用量で、7 日間経口投与したときのトリヘプタノイン及び代謝物の曝露プロファイルを比較するため、幼若ユカタンミニブタ 3 例を用いた GLP 非適用ブリッジング・TK 試験を実施した（UX007-PC003 試験）。7 日間の投与期間とその後の 7 日間の休薬期間の間で、ミニブタ 3 例の同じ群をクロスオーバーした。本試験で溶媒群は使用しなかった。本試験で死亡は認められなかった。トリヘプタノインのオイル製剤又は粉末製剤を投与したミニブタにおいて、嘔吐及び胃腸障害を示唆する一般状態が認められた。粉末製剤又はオイル製剤のトリヘプタノイン投与には、雄 1 例及び雌 1 例における嘔吐の個々の事象が伴った。全体として、30% DCI 用量で粉末製剤を投与した 1 例、30% DCI 用量でオイル製剤を投与した 1 例で胃部不快感が 7 日間投与サイクル中に 1 回認められ、その重症度は嘔吐から身悶えを伴う重度の腹部収縮の範囲であった。これらの動物に Pepto-Bismol®を投与したところ、症状が直ちに緩和した。徐放性粉末製剤の投与を受けた動物では、この製剤を反復投与後に、胃腸障害のエビデンスは認められなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

一連の標準的な GLP 適用遺伝毒性試験をトリヘプタノインで実施し、内訳は、細菌を用いる *in vitro* 突然変異試験（UX007-PC004 試験）、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発試験（UX00 PC005）及びラットを用いた *in vivo* 骨髄小核試験であった。これらの試験で、遺伝毒性作用、染色体異常誘発作用や変異原性作用のエビデンスは認められなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

ICH S1A を踏まえ、がん原性試験は実施しなかった。しかしながら、（1）トリヘプタノインの作用機序、（2）公開されているトリヘプタノインの臨床及び非臨床データの評価結果、（3）潜在的ながん原性リスクのシグナル（例：免疫抑制／免疫毒性、細胞増殖、前がん病変又はがん病変のエビデンス）についての、トリヘプタノインで実施された非臨床毒性試験の解析結果及びトリヘプタノインの遺伝毒性能の評価結果より、トリヘプタノインのがん原性リスク評価を行った。

トリヘプタノインは、奇数鎖脂肪酸（炭素数 7）を有する MCT であり、人体で通常認められるトリグリセリドと化学的に同等である。トリヘプタノインの遺伝毒性試験において、遺伝毒性作用、変異原性作用、染色体異常誘発作用は示されなかった（UX007-PC004 試験、UX007-PC005 試験及び UX007-PC006 試験）。さらに、DCI の 10%、30%又は 50%の用量でトリヘプタノイン混餌を幼若ミニブタに連日投与した GLP 適用 9 ヵ月間長期毒性試験（UX007-PC002 試験）を含めて、動物へのトリヘプタノイン投与で、がん原性歴や前がん病変歴は示されていない。

ここに示したエビデンスの重要度を考慮すると、トリヘプタノインはがん原性物質であるとは予想されない。げっ歯類を用いた標準的な 2 年間がん原性試験又はトランスジェニックマウスを用いた 6 ヵ月間試験からは、トリヘプタノインのがん原性リスク評価に追加情報は得られず、がん原性試験は不要と考えられる。本リスク評価について、Module 2.6.6.5 及び UX007 のがん原性リスク評価報告書で詳細に説明する。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

妊娠ラット及び妊娠ウサギを用いて、トリヘプタノインの GLP 適用 DART 試験が実施されている。ラットを用いた GLP 適用受胎能試験（Seg I）を実施した（UX007-PC012 試験）。さらに、開始時 6～8 ヵ月齢の幼若ユカタンミニブタを用いた 9 ヵ月間長期試験において、生殖組織を検査した（UX007-PC002 試験）。妊娠ラット（UX007-PC010 試験）及びウサギ（UX007-PC011 試験）を用いた GLP 非適用 DRF 試験により、妊娠ラット（UX007-PC013 試験）及びウサギ（UX007-PC014 試験）を用いた GLP 適用ピボタル EFD 試験が裏付けられた。また、妊娠／授乳雌及び出生仔の発達に対するトリヘプタノイン混餌の影響を評価するため、ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（UX007-PC017 試験）も実施した。

Seg I 受胎能試験（UX007-PC012 試験）において、雌雄ラットにトリヘプタノインを 10%～50% DCI の範囲の用量で経口投与したところ、交配行動は影響を受けず、雌雄の生殖器官の絶対重量や相対重量に変化は認められなかった。認められた肉眼病変は、本質的に自然発生的であり、本試験で使用したラットの系統、性別及び週齢にとって正常な背景データの範囲内であると考えられた。本試験で組織に対するさらなる病理組織学的評価は実施しなかった。ピボタル Seg II EFD 試験において、トリヘプタノインを妊娠ラット（UX007-PC013 試験）に 10%～50% DCI の用量範囲で混餌投与し、妊娠ウサギ（UX007-PC014 試験）に 10%～30% DCI の用量範囲で強制経口投与したところ、両動物種においてオイル製剤に対する味覚嫌悪に起因した体重増加量及び摂餌量の減少が伴った。ラットでは、最高用量の 50% DCI でトリヘプタノイン投与を受けた母動物の胎児において、骨格変異が増加した。ウサギでは、2 つの別の妊娠満期の腹の高用量（30% DCI）群胎児 3 例で、癒合／分岐／過剰肋骨から成る骨格奇形が認められた。母動物の体重増加量及び摂餌量の減少を特徴とする群における一腹重量の減少と骨格奇形の発現率増加との関係から、胎児の転帰はこれらの母動物毒性により影響を受けており、母動物と胎児の栄養不良に対する二次的なものと考えられることが裏付けられる。妊娠などのエネルギー感受性が高い状況での母動物の摂餌制限による栄養欠乏は、ラット及びウサギの胎児転帰に影響を及ぼすことが知られている（Khera, 1985、Cappon et al, 2005、Fleeman et al, 2005、Matsuoka et al, 2006）。このため、同腹仔及び胎児転帰に対して認められた全ての影響は、胎児自体への直接的な薬理作用というよりは、（体重及び摂餌量の変化に関連した）母動物毒性と直接的に関連する可能性が高いと結論付けられた。（体重増加が認められない）母動物毒性の NOAEL は、ラットとウサギの両方で 10% DCI であっ

た。胚・胎児発生毒性の NOAEL は、ラット及びウサギでそれぞれ 30% DCI 及び 20% DCI であった。胎児変化の全ては、摂餌量及び母動物体重増加量の減少に対する二次的なものであり、臨床的意義はないと考えられた。

ラットを用いた GLP 適用出生前及び出生後の発生に関する試験（UX007-PC017 試験）において、出生仔の発達及び性成熟に対する妊娠期間及び授乳期間中のトリヘプタノイン混餌投与の潜在的な影響を評価した。トリヘプタノインを 10%、30%及び 50% DCI に相当する用量で、妊娠動物に対して、妊娠期間、並びに授乳及び離乳を通じた分娩後期間に混餌投与した。UX007-PC010 試験及び UX007-PC013 試験における妊娠動物の毒性の特徴と同じく、オイルに対する味覚嫌悪による食欲不振が 30%及び 50% DCI 群で認められ、体重増加量及び摂餌量の減少を伴い、それに次いで、出生仔の体重減少が生じた。トリヘプタノインと関連する 21 日目の第 1 世代（F1）出生仔における血液学的検査及び血清生化学検査の軽微から軽度の変化が、それぞれ 30% DCI 以上の母動物曝露群及び 50% DCI 母動物曝露群で認められた。30%及び 50% DCI 曝露群において、ヘモグロビン、赤血球量の軽度から軽微な変化、赤血球容積粒度分布幅（RDW）の低値、MCV の高値が認められた。50% DCI 曝露群において、血小板数及びリンパ球数の軽微な低値が認められた。血清生化学検査値の変化では、50% DCI 群の雌におけるアルブミンの軽度の低値（-12.0%）があり、それによって総タンパク質の低値（-5.1%）が生じ、アルブミン／グロブリン比の低値（-18.0%）が認められた。これらの変化は、（本試験で摂水量を測定しなかったが）摂餌量と摂水量の減少により生じた脱水に対する二次的なものである可能性があったため、毒性所見とは考えられなかった。軽微な肝細胞空胞化が 50% DCI 群の出生仔で認められたが、程度が低いため毒性ではないと考えられた。50% DCI 群でトリヘプタノイン曝露により出生仔の性成熟が遅延したが（離乳時に認められた低体重及び未成熟な生殖器官を考慮すると妥当）、行動評価、性周期、交配、受胎能に対する影響は認められなかったことから、雌雄の発達は正常であったことが示唆された。10% DCI 以上での体重増加量及び摂餌量の持続的な減少が認められたことから、母動物におけるトリヘプタノインの NOAEL は決定できなかった。F1 の離乳後の成長及び発達に対する NOAEL は、50% DCI であったが、F1 において認められた全ての毒性作用は、離乳前の期間終了時に発現した最初の体重増加量減少に続発したものであった。

2.4.4.6 局所刺激性試験

トリヘプタノインは経口投与を予定するため、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 皮膚感作性

モルモットにおける皮膚感作剤としてのトリヘプタノインの活性を評価するため、皮膚感作性試験が実施された（CL74-95-1045 試験）。まず、雄アルビノモルモット 6 例にトリヘプタノイン 0.1 mL を 2 日ごとに計 9 回皮内投与した。各投与の 24 時間後に注射部位を検査し、Draize 尺度を用いて、紅斑及び浮腫の反応を採点した。動物を 2 週間無処置で放置した後、トリヘプタノイン 0.1 mL の単回皮内投与により惹起した。投与 24 時間後に注射部位の紅斑及び浮腫を検査した。モルモットにおいて、全てのプライミング投与時の注射部位に軽微から中程度の刺激性が認められた。

惹起投与の Draize スコアは、プライミング投与のスコアと同等であった。このため、トリヘプタノインは本試験条件下で皮膚感作を生じなかった。

2.4.4.7.2 薬物乱用の可能性に関する非臨床評価

トリヘプタノインとその代謝物は血液脳関門を通過できるため、薬物乱用の可能性に関する評価を実施しており、Module 2.6.6.8.1 に記載する。本評価では、トリヘプタノインで得られた非臨床データ（*in vitro* 生化学プロファイル、代謝及び動態）を精査するとともに、乱用薬物及び行動、認知又は知覚に顕著な影響を及ぼす薬物に関連する可能性のある標的（GABA 作動性受容体、グルタミン酸作動性受容体、ニコチン性受容体及びイオンチャネルを含む）を対象とした個別パネルの放射性リガンド結合試験を行った。混餌投与後に速やかに加水分解されるトリヘプタノインは、ヒトの曝露量を網羅する可能性が高い検討した濃度で、乱用能又はその他の向精神作用と関連するいずれの標的にも結合しなかった。トリヘプタノイン、ヘプタン酸及び BHP は、乱用の可能性又は他の向精神作用に関連するニューロン部位での活性を示さなかった。Module 2.6.6.8.1 に記載した毒性試験で CNS 毒性を示唆する所見が認められなかったことと合わせると、トリヘプタノインにはヒトで乱用又は依存の可能性がないと予想される。

2.4.5 総括及び結論

げっ歯類に経口投与又は混餌投与する *ex vivo* 及び *in vivo* 試験において、トリヘプタノインの薬理作用、PK 及び毒性が明らかにされており、文献に記載されている。さらに、幼若ミニブタに最長 9 ヵ月間、並びに妊娠ラット及びウサギの妊娠期間に反復混餌投与をしたときのトリヘプタノインの PK、TK 及び毒性が広く明らかにされている。

トリヘプタノイン（UX007）は、グリセロール骨格と炭素数 7 の脂肪酸 3 分子から構成される奇数鎖 MCT であり、LC-FAOD 患者を対象としたエネルギー補充療法の基質とすることを目的としている。十分な ATP 及びエネルギー産生並びに糖新生を維持するために TCA 回路が必要とするアナプレロティック中間体が喪失する結果として、LC-FAOD の発病は、複数組織にわたる細胞レベルのエネルギー不足と関連している。

トリヘプタノインは、ヘプタン酸への代謝とその後のケトン体生成及びアナプレロティック中間体生成への寄与を通じて、LC-FAOD に薬理学的に影響を及ぼす。この関係性は、標識炭素を有する C4 ケトン体及び C5 ケトン体並びにグルコースへの広がりと濃縮を追跡する放射性標識アイソトポマー分析を用いた非臨床的試験で示されている（Deng et al. 2009、Marin-Valencia et al. 2013）。非臨床試験において、トリヘプタノインは、経口摂取後速やかに代謝され、細胞膜とミトコンドリア膜を拡散することができる炭素数 7 の遊離ヘプタン酸として吸収されて、細胞に TCA 回路のアナプレロティック反応をもたらすことが確認された。経口又は混餌投与したときのラット、ウサギ及びミニブタにおけるヘプタン酸の曝露プロファイルは、用量依存的な変化を示す。

In vitro 試験において、循環血中の 2 つの非内因性トリヘプタノイン代謝物（ヘプタン酸及び BHP）は、ヒト CYP 又は UGT の感受性基質ではなく、これらの代謝物がヒト CYP の主要分子種を阻害する可能性は低いことが示された。トリヘプタノインが通常の食事中に存在するその他のトリグリセリドに類似していること、エネルギー産生のため飽和脂肪酸がミトコンドリア β 酸化を受けることが知られていることをあわせて考慮すると、トリヘプタノインが関与する臨床的に意義の

ある代謝関連の薬物動態学的薬物相互作用が起こる可能性は低いと結論付けることができる。4 項に示すように、ヘプタン酸のヒト血漿中曝露により認められたバルプロ酸の非結合分画の約 2 倍の増加は、臨床的に意義がないと予想される。

動物を用いた試験から、トリヘプタノインの吸収は MCT の吸収と一致することが示唆される。簡潔に述べると、トリヘプタノインから加水分解された遊離ヘプタン酸は、短鎖及び中鎖脂肪酸酸化酵素により代謝されるため、LC-FAOD 患者で欠損する長鎖脂肪酸酸化酵素の必要性による影響を受けない。*In vitro* 代謝試験において、トリヘプタノインは 3 種類の脂質リパーゼの基質であることが確認された。ヘプタン酸は CYP や UGT の感受性基質ではなく、臨床的に意義のある濃度で *in vitro* で検討した場合、ヘプタン酸は 7 種類の主要なヒト CYP 分子種のいずれの活性も顕著に阻害しなかった。ヒト肝細胞で、ヘプタン酸の存在下での CYP1A2 及び CYP3A4 の mRNA 発現量の増加は 2 倍未満であったことから、ヘプタン酸はこれらの CYP 分子種の臨床的に意義のある誘導物質ではないと考えられることが示された（ヘプタン酸の存在下での CYP2B6 の mRNA 発現量は 2 倍を超えて増加したが、明確な濃度依存性がなかったことから、本分子種の臨床的に意義のある誘導物質はないと解釈された）。これとは別に、P-gp 又は BCRP 排出トランスポーター活性のヘプタン酸に依存した顕著な *in vitro* 阻害は認められなかったが、（$C_{max,u}/IC_{50}$ 比を指標とすると）OAT1 及び OAT3 薬物トランスポーターの阻害は否定できない。ヘプタン酸による OAT1/3 阻害の臨床的な意義について、Module 2.7.2 で考察する。

肝灌流試験において、ヘプタン酸はアナプレロティック中間体であるアセチル CoA 及びプロピオニル CoA へと代謝されることが示されている（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009）。アセチル CoA は TCA 回路に移行し、ATP 産生及びケトン体生成のためのエネルギー代謝に必要とされる。プロピオニル CoA は、スクシニル CoA へとさらに代謝され、TCA 回路中間体を再供給し、糖新生の基質をもたらすことで（Marin-Valencia et al. 2013）、肝グリコーゲン貯蔵を増加させる（Gu et al. 2010）。プロピオニル CoA のアナプレロティック特性と糖新生特性は奇数鎖脂肪酸に特異的であるため（Roe et al. 2002、Marin-Valencia et al. 2013、Deng et al. 2009）、トリヘプタノインにより、偶数鎖脂肪酸を含有する MCT を超えるベネフィットが得られる可能性がある。偶数鎖 MCT 及びトリヘプタノインはいずれも LC-FAOD の障害を迂回して、ATP 及びケトン体を生成するが、トリヘプタノインは TCA 回路の機能も回復させ、糖貯蔵の回復を支援する。

LC-FAOD で最も影響を受ける組織は、心臓、骨格筋、肝臓などのエネルギー要求が高く、エネルギーに対する脂肪酸酸化への依存が最も高い組織であるが、潜在的に毒性のある長鎖脂肪酸中間体の蓄積により影響を受ける可能性がある。主要代謝臓器として肝臓は、LC-FAOD 患者の疾患の標的器官であり、一つの徴候は代謝ストレスが高い期間におけるグリコーゲン貯蔵の枯渇である。本疾患のマウスモデルに投与後に糖新生及びグリコーゲン貯蔵が増加したことから、疾患のこの側面に対するトリヘプタノインの影響が実証された（Marin-Valencia et al. 2013、Gu et al. 2010）。また、文献において、LC-FAOD に伴う心筋症及び横紋筋融解症と関連する心筋や骨格筋などの他の組織におけるエネルギー代謝に、トリヘプタノインがどのように影響を及ぼすのかが記載されている。正常ラットにおいて、トリヘプタノイン混餌により、通常の飼料と比べて、圧過負荷により誘発した心室肥大が改善された（Nguyen et al. 2015）。VLCAD−/−マウスにおいて、本モデルに特異的な典型的な疾患表現型である心筋細胞の持続するエネルギー不足に伴う進行性の心機能低下は、1 年間のトリヘプタノイン混餌レジメン後に悪化しなかったことから、トリヘプタノ

インは心臓を保護する可能性があることが示唆された（Tucci et al. 2017）。Tucci らが開発した VLCAD$^{-/-}$マウスはヒト表現型を再現しないことに留意することが重要である（Tucci et al. 2014、Tucci et al. 2017）。VLCAD$^{-/-}$モデルの進行性の重症度と比べて、ヒトでは、回復期間がある間欠性心筋症を呈する。ヒトでの所見は長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（LCAD）マウスとよく似ており、アナプレロティック TCA 回路中間体及び心臓エネルギー代謝は枯渇するが、病態の進行はみられない（Bakermans et al. 2013）。このため、Tucci ら（Tucci et al. 2017）によって観察された進行性の病態は、臨床上の VLCAD 欠損を真に予測するものではない可能性がある。肝臓及び筋肉とは別に、標識したヘプタン酸を静脈内投与後にマウス脳においてグルコースが濃縮されることから、これらの代謝物が初回通過代謝に依存せずに他の組織に直接影響を及ぼす可能性があることが確認されている（Marin-Valencia et al. 2013）。同様に、トリヘプタノイン混餌は脳内のアナプレロティック中間体濃度の上昇と関連しており、このことにより、2 種類の発作及び慢性てんかんモデルで示された抗痙攣作用が説明される（Willis et al. 2010）。

トリヘプタノインの経口投与は、直接の毒性を伴わなかった。非臨床試験において、マウス、ラット、ミニブタを含む様々な動物種で、トリヘプタノインの経口投与は忍容性が良好であった。トリヘプタノイン混餌に対する忍容性は、30% DCI トリヘプタノインを 7.5 週間給餌した正常 CF1 マウス（Willis et al. 2010）、4.4%トリヘプタノイン混餌を 12 ヵ月間給餌した VLCAD$^{-/-}$マウス（Tucci et al. 2017）、及び 30%トリヘプタノイン混餌を 5 週間給餌した Sprague Dawley ラット（Nguyen et al. 2015）において示されている。雄ラットに対する急性経口投与（CL74-95-1045 試験）は、5 mL/kg（4.75 g/kg 又は約 13% DCI に相当）の用量で忍容性が良好であり、死亡や毒性の徴候は認められなかった。幼若ラットに対するトリヘプタノイン混餌の長期投与は、9 ヵ月間にわたり忍容性が良好であった（Ataide et al. 2009）。9 ヵ月の給餌期間後に、脂質消化性や成長パターンに顕著な違いは認められなかった。（大豆油を給餌した対照群の動物を含めて）いずれの群においても絶対肝重量に差は認められなかったが、対照群で相対肝重量（肝重量／体重）が高かった。このことは、大豆油ベースの飼料を給餌した動物の肝臓への脂肪蓄積に起因した。また、肝障害や腎機能又は胃腸機能に対する毒性作用を表す血液生化学検査値に群間で顕著な差は認められなかった。脂質プロファイルは群間の飼料の違いにより影響を受けなかったが、投与期間と飼料中脂肪含量によると考えられた。大豆油対照群を含む全ての飼料群で大滴性脂肪肝が認められたが、このことは、食品グレードのトリヘプタノインに関連するというよりも、長期の油投与に対する生理学的反応を示唆する可能性が高い。血液生化学検査値と脂肪肝の相関が認められなかったことから、肝機能は影響を受けなかったことが示された。全体として、トリヘプタノイン混餌を 1.14 g/kg（NOAEL）以下の用量でラットに長期連日投与することで、毒性作用は生じなかった。また、ヒトと類似する胃腸管を有する動物種である幼若ミニブタ（2 歳超のヒトに相当する）においても、トリヘプタノイン混餌の長期投与に対する忍容性を評価した。9 ヵ月間の投与後、DCI の 50%以下でトリヘプタノインの忍容性は良好であり、ミニブタで全身毒性のエビデンスを生じなかった。体重、体重増加量、血液学的検査プロファイル、器官重量や病理組織学的検査に、投与に関連した差は認められず、毒性の標的器官は特定されなかった。回復期間の終了時に安楽殺した高用量群の雌雄で検査した組織は、対照群の動物と同等であり、正常範囲を超えると考えられた所見は認められなかった。総合すると、9 ヵ月間にわたるトリヘプタノインの長期混餌投与は、幼若ラット（Ataide et al. 2009）とミニブタ（UX007-PC002 試験）で類似しており、動物種全体での一致と外挿による予測可能性が支持された。したがって、ミニブタの開始時月齢

と投与期間の組合せにより、長期毒性試験結果から、全ての年齢範囲の患者に対して、ヒト予定用量の約 4 倍の曝露量（ミニブタを用いた長期試験である UX007-PC002 試験におけるヘプタン酸の AUC に基づく）でのトリヘプタノインの安全性及び忍容性に関する情報が得られた。

DCI の 50%以下の用量のトリヘプタノイン混餌投与は、ラットの受胎能に影響を及ぼさなかった（UX007-PC012 試験）。本試験で認められた肉眼病変は、本質的に自然発生的であり、投与を受けたラットの系統、性別及び週齢の正常な背景データの範囲内であると考えられた。発生中の胎児に対する影響がラット（UX007-PC013 試験）及びウサギ（UX007-PC014 試験）のそれぞれの EFD 試験で認められたが、母動物毒性に対する二次的なものと考えられた。トリヘプタノイン含量が高い混餌（ラットで最大 50% DCI、ウサギで最大 30% DCI）を給餌した妊娠動物における体重増加量及び摂餌量の減少は、トリヘプタノイン含量が高い混餌に対する味覚嫌悪に起因した。胎児の転帰はこれらの母動物毒性の影響を受け、母動物の体重増加量及び摂餌量の減少を特徴とする群で、胎児の体重が軽く骨格異常の発現率が高かった。EFD 試験で認められた母動物毒性と同様に、出生前及び出生後の発生に関する試験（UX007-PC017 試験）においても、妊娠ラットでトリヘプタノイン含量が高い混餌（最大 50% DCI）に応答して初期に味覚嫌悪が認められ、それにより体重増加量及び摂餌量が減少した。50% DCI で投与した母動物の出生仔は、離乳時に体重が軽く、生殖器官が未熟であったことから、性成熟の遅延が示唆された。母動物の体重増加量及び摂餌量の減少が胎児発生及び出生後の性成熟に及ぼす影響は、全て母動物の食欲不振を発端とする変化による二次的なものと考えられた。なお、DART 試験で認められた変化は、摂餌を制限した動物試験のデザインによるものであるため、臨床的に問題となるものでないと考えられる。

トリヘプタノインの全ての臨床及び非臨床経験において、トリヘプタノインと関連する心血管系、CNS 及び呼吸器系の安全性に関する懸念の徴候は報告されていない。トリヘプタノイン、ヘプタン酸及び BHP を用いた放射性リガンド結合試験において、薬物乱用又は行動、認知、知覚に対して影響を及ぼす薬物と関連する標的に対する活性は認められなかった。

トリヘプタノインの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験において、遺伝毒性、染色体異常誘発性又は変異原性を示す所見は認められなかった。

主要な非臨床安全性試験における安全域を Table 4 に要約する。これらの安全域は循環血漿中のヘプタン酸濃度に基づいている。

Table 4: Safety Margins Achieved in Pivotal Toxicity Studies of Triheptanoin

Study Number	Study Type	Species	Duration	NOAEL (% daily caloric intake)[a]	Safety Margin (Based on C_{max})	Safety Martin (Based on AUC)
UX007-PC002	Repeat-Dose	Minipig	9 Months	50	6.94[b]	15.34[c]
UX007-PC012	Fertility (Segment I)	Rat	Males (4 weeks prior to and during mating)	50	1.36[d]	4.9[e]
			Females (last 2 weeks prior to mating, during mating and through GD6)	50	0.72[d]	3.41[e]
UX007-PC013	Embryo-Fetal Development (Segment II)	Rat	GD6-17	10[f]	0.075[d]	0.076[e]
				30[g]	1.19[d]	2.22[e]
UX007-PC014	Embryo-Fetal Development (Segment II)	Rabbit	GD6-18	10[f]	0.85[d]	0.20[e]
				20[g]	2.18[d]	2.13[e]
UX007-PC017	Pre- and Post-natal Development (Segment III)	Rat	GD6- Day 20 postpartum (Lactation Day 20 in rats that delivered a litter)	50[f,h]	1.51[d]	4.15[e]

[a] No-observable adverse effect level (NOAEL)
[b] Calculated by dividing the Day 270 C_{max} obtained at the NOAEL dose (1909 µM for 50% dose group) by the clinical mean heptanoate levels in serum in UX007-CL101 for the group treated with 1.25 g/kg/day multiple dose (275 µmol/L). Female and male minipig means averaged for this table.
[c] Calculated by dividing the average $AUC_{0\text{-last}}$ obtained for heptanoate over two separate feedings at the NOAEL dose (i.e. 5616 µmol·hr/L × 2 = 11232 µmol·hr/L) by the total clinical mean heptanoate $AUC_{0\text{-last}}$ in UX007-CL101 with the 1.25 g/kg/day (~30% caloric intake dose level) measured over 4 separate administrations per day (i.e. 732.1 µmol·hr/L). Female and male means averaged for this table.
[d] Calculated by dividing the terminal C_{max} obtained at the NOAEL dose by the clinical mean heptanoate levels in serum in UX007-CL101 for the group treated with 1.25 g/kg/day multiple dose (275 µmol/L). Animals were fed once daily.
[e] Calculated by dividing the average $AUC_{0\text{-last}}$ obtained for heptanoate at the NOAEL dose by the total clinical mean heptanoate $AUC_{0\text{-last}}$ in UX007-CL101 with the 1.25 g/kg/day (~30% caloric intake dose level) measured over 4 separate administrations per day (i.e. 732.1 µmol·hr/L).
[f] NOAEL for developmental effects
[g] NOAEL for maternal toxicity
[h] In UX007-PC017, the NOAEL for maternal toxicity could not be determined, therefore only the NOAEL for developmental effects is included

正常ラット及びミニブタの非臨床データから、LC-FAOD 患者を対象として臨床使用で予定するものと同等のレベルで混餌投与したときのトリヘプタノインの忍容性は良好であることが示唆される。

2.4.5.1 結論

トリヘプタノインの薬理作用、PK 及び毒性は、全ての LC-FAOD 患者を対象としたトリヘプタノインの長期経口投与を支持する非臨床試験で裏付けられ、LC-FAOD を対象としたトリヘプタノイン療法のベネフィットに関する医学文献の既存情報も支持していた。トリヘプタノインは、代謝物へと代謝され、エネルギー枯渇組織における TCA 回路のアナプレロティック反応及び糖新生を介して、LC-FAOD に伴う細胞のエネルギー不足を軽減する。トリヘプタノインの経口投与に伴う、直接の毒性は認められなかった。トリヘプタノイン混餌を用いた試験での死亡は、体重増加量及び摂餌量の減少を伴う味覚嫌悪に関連する毒性に起因したものであり、臨床的に問題となるものではないと考えられる。mRNA 発現量の増加が最大で 2 倍未満であったことから、ヘプタン酸は CYP1A2 及び CYP3A4 の誘導物質ではないと考えられた。CYP2B6 の mRNA は 2 倍を超えて増加したが、増加には明らかな濃度依存性が認められなかったため、ヘプタン酸は誘導物質ではないと解釈された（ICH, 2024）。ヘプタン酸は OAT1 及び OAT3 の潜在的な阻害物質であると考えられたが、その他の主要な取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）及び排出トランスポーター（P-gp 及び BCRP）は阻害しなかった。結論として、文献に記載されているトリヘプタノインの非臨床試験で得られた既存のデータ、同様の用量での 5 年間の市販後経験を含む約 20 年間の臨床使用歴、及び全体的な非臨床パッケージは、LC-FAOD 患者の治療におけるトリヘプタノインの安全性を支持している。

2.4.6 参考文献

Ataide, TR, de Oliveira, SL, da Silva, FM, Vitorino, LGC, Tavares, MCN, and Sant'Ana, AEG. 2009. "Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats." *Int.J.Food Sci.Tech* 44:484-492.

Bakermans, AJ, Dodd, MS, Nicolay, K, Prompers, JJ, Tyler, DJ, and Houten, SM. 2013. "Myocardial energy shortage and unmet anaplerotic needs in the fasted long-chain acyl-CoA dehydrogenase knockout mouse." *Cardiovasc Res* 100 (3):441-9.

Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. Clin Pharmacol Ther. 2002;71:115–21

Brunengraber, H, and Roe, CR. 2006. "Anaplerotic molecules: current and future." *J.Inherit.Metab Dis.* 29 (2-3):327-331.

Cappon GD, Fleeman TL, Chapin RE, et al. (2005) Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 74(5): 424-430.

Deng, S, Zhang, GF, Kasumov, T, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2009. "Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver." *J.Biol.Chem.* 284 (41):27799-27807.

Fleeman TL, Cappon GD, Chapin RE, et al. (2005) The effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in the rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 74(5): 442-449.

Greenberger, NJ, Rodgers, JB, and Isselbacher, KJ. 1966. "Absorption of medium and long chain triglycerides: factors influencing their hydrolysis and transport." *J.Clin.Invest* 45 (2):217-227.

Gu, L, Zhang, GF, Kombu, RS, Allen, F, Kutz, G, Brewer, WU, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2010. "Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. II. Effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile." *Am.J Physiol Endocrinol Metab* 298 (2):E362-E371.

Guillot, E, Vaugelade, P, Lemarchal, P, and Rerat, A. 1993. "Intestinal absorption and liver uptake of medium-chain fatty acids in non-anaesthetized pigs." *Br J Nutr* 69 (2):431-42.

Houten, SM, and Wanders, RJ. 2010. "A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation." *J Inherit Metab Dis* 33 (5):469-77.

Khera, KS. 1985. "Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species." *Teratology* 31 (1):129-53.

Kinman, RP, Kasumov, T, Jobbins, KA, Thomas, KR, Adams, JE, Brunengraber, LN, Kutz, G, Brewer, WU, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2006. "Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats." *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 291 (4):E860-E866.

Knottnerus, SJG, Bleeker, JC, Wust, RCI, Ferdinandusse, S, L, IJ, Wijburg, FA, Wanders, RJA, Visser, G, and Houtkooper, RH. 2018. "Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle." *Rev Endocr Metab Disord* 19 (1):93-106.

Marin-Valencia, I, Good, LB, Ma, Q, Duarte, J, Bottiglieri, T, Sinton, CM, Heilig, CW, and Pascual, JM. 2012. "Glut1 deficiency (G1D): epilepsy and metabolic dysfunction in a mouse model of the most common human phenotype." *Neurobiol Dis* 48 (1):92-101.

Marin-Valencia, I, Good, LB, Ma, Q, Malloy, CR, and Pascual, JM. 2013. "Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain." *J Cereb.Blood Flow Metab* 33 (2):175-182.

Marten B, Pfeuffer M and Schrezenmeir J (2006) Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal* 16(11): 1374-1382.

Matsuoka T, Mizoguchi Y, Serizawa K, et al. (2006) Effects of stage and degree of restricted feeding on pregnancy outcome in rabbits. *J Toxicol Sci* 31(2): 169-175.

Nguyen, TD, Shingu, Y, Amorim, PA, Schwarzer, M, and Doenst, T. 2015. "Triheptanoin Alleviates Ventricular Hypertrophy and Improves Myocardial Glucose Oxidation in Rats With Pressure Overload." *J Card Fail*.

Roe, CR, Sweetman, L, Roe, DS, David, F, and Brunengraber, H. 2002. "Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride." *J.Clin.Invest* 110 (2):259-269.

Tucci, S, Floegel, U, Beermann, F, Behringer, S, and Spiekerkoetter, U. 2017. "Triheptanoin: long-term effects in the very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse." *J Lipid Res* 58 (1):196-207.

Tucci, S, Flogel, U, Hermann, S, Sturm, M, Schafers, M, and Spiekerkoetter, U. 2014. "Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice." *Biochim Biophys Acta* 1842 (5):677-85.

Whyte, RK, Whelan, D, Hill, R, and McClorry, S. 1986. "Excretion of dicarboxylic and omega-1 hydroxy fatty acids by low birth weight infants fed with medium-chain triglycerides." *Pediatr Res* 20 (2):122-5.

Willis, S, Stoll, J, Sweetman, L, and Borges, K. 2010. "Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models." *Neurobiol.Dis.* 40 (3):565-572.