目次

2.4 非臨床試験に関する概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1 薬理試験 4
2.4.1.2 薬物動態試験 4
2.4.1.3 毒性試験 5
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.2 副次的薬理試験 6
2.4.2.3 安全性薬理試験 6
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 7
2.4.3 薬物動態試験 7
2.4.3.1 分析法 7
2.4.3.2 吸収 7
2.4.3.3 分布 8
2.4.3.4 代謝 8
2.4.3.5 排泄 9
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 10
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 10
2.4.4 毒性試験 10
2.4.4.1 単回投与毒性試験 10
2.4.4.2 反復投与毒性試験 10
2.4.4.3 遺伝毒性試験 14
2.4.4.4 がん原性試験 15
2.4.4.5 生殖発生毒性試験、 15
2.4.4.6 局所刺激性試験 17
2.4.4.7 その他の毒性試験 17
2.4.5 総括及び結論 17
2.4.5.1 薬理総括 17
2.4.5.2 薬物動態総括 18
2.4.5.3 毒性総括 19
2.4.5.4 結論 21
2.4.6 参考文献一覧 21

Confidential

表 2.4-1. 非臨床概括評価で用いた略語一覧

略語又は用語	略さない表現又は定義
AR-13324	ネタルスジルメシル酸塩
AR-13503	ネタルスジルの活性代謝物
AR-13323	ネタルスジルの R-エナンチオマー体
AR-13534	AR-13503 の R-エナンチオマー体
AR-13165	ネタルスジルのラセミ体
AR-13084	AR-13503 のラセミ体
^{14}C-AR-13324	AR-13324 の ^{14}C-標識体
C_{max}	Maximum concentration（最高濃度）
CYP	Cytochrome P450（チトクロム P450）
EVP	Episcleral venous pressure（上強膜静脈圧）
FOB	Functional observational battery（機能観察総合評価法）
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）
HEK293 細胞	Human embryonic kidney 293 細胞
hERG	Human ether-a-go-go related gene
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration（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）
Ki	Inhibition constant（阻害定数）
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry（高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析）
LSC	Liquid scintillation counter（液体シンチレーションカウンター）
MPE	Mean photo effect（平均光作用）
NET	Norepinephrine transporter（ノルエピネフリントランスポーター）
PIF	Photo irritation factor（光毒性係数）
SD ラット	Sprague Dawley ラット
STN1013900 点眼液	有効成分としてネタルスジルメシル酸塩を含有する点眼液
STN1013900 溶液	有効成分としてネタルスジルメシル酸塩を含有する静脈内投与液
^{14}C-STN1013900 点眼液	有効成分として ^{14}C-AR-13324 を含有する点眼液
^{14}C-STN1013900 溶液	有効成分として ^{14}C-AR-13324 を含有する静脈内投与液
PG324 点眼液	有効成分として 0.02%ネタルスジル/0.005%ラタノプロストを含有する点眼液
PK	Pharmacokinetics（薬物動態学）

略語又は用語	略さない表現又は定義
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROCK1	Rho-associated protein kinase 1
ROCK2	Rho-associated protein kinase 2
S9	Submitochondrial fraction（サブミトコンドリア画分）
$T_{1/2}$	Elimination half-life（消失半減期）
UVA	Ultraviolet A（紫外線 A 波）
UVB	Ultraviolet B（紫外線 B 波）

Confidential

2.4 非臨床試験に関する概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

緑内障に対するエビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧下降であり、既存の眼圧下降薬のひとつとして、Rho キナーゼ (ROCK) 阻害薬が知られている。ROCK 阻害薬は、ROCK1 及び ROCK2 を阻害して、線維柱帯細胞におけるアクチンストレス線維の脱重合及び細胞接着能を低下させる[1][2]。これに伴う線維柱帯の弛緩及び上強膜静脈圧 (EVP) の低下は、線維柱帯流出路からの房水流出を増大させ、眼圧が下降する[1][3]。またノルエピネフリントランスポーター (NET) を阻害することで増大するノルエピネフリンは、アドレナリン α_2 受容体を刺激することで EVP 低下や房水産生を抑制して眼圧下降作用を示す[3][4][5]。

STN1013900 点眼液の有効成分であるネタルスジルメシル酸塩のフリー体であるネタルスジルは、ROCK 阻害作用及び NET 阻害作用を有する。点眼後、ネタルスジルは生体内で加水分解され、活性代謝物である AR-13503 に代謝される。この AR-13503 はネタルスジルよりもさらに強力な ROCK 阻害作用を有する化合物であり、ネタルスジルの ROCK/NET デュアル阻害による房水流出促進作用及び房水産生抑制作用に加えて、AR-13503 の強力な ROCK 阻害による房水流出促進作用が発揮されることから、既存の ROCK 阻害薬よりも優れた眼圧下降プロファイルを有する新規眼圧下降薬となる可能性が考えられた。そこで、ネタルスジルの新規眼圧下降薬としての妥当性を評価するため、以下の薬理、薬物動態及び毒性試験を実施した。

2.4.1.1 薬理試験

STN1013900 点眼液の効力を裏付ける試験として、*in vitro* 試験系を用いて AR-13324 及び AR-13503 の ROCK1 及び ROCK2 に対する阻害活性、並びに AR-13324 の NET に対する阻害活性を評価した。*In vivo* 試験系としてウサギ房水動態試験（トノグラフィー法）及びウサギ房水動態試験（リカバリー法）を実施し、STN1013900 点眼液による房水流出促進作用及び房水産生抑制作用を評価した。安全性薬理試験については、ICH ガイドラインで定められた中枢神経系、呼吸器系及び心血管系対する作用について検討した。すべての安全性薬理試験は GLP を遵守して実施された。

2.4.1.2 薬物動態試験

吸収については、^{14}C-STN1013900 点眼液をウサギに単回点眼時の血液及び血漿中放射能濃度を測定した。また、トキシコキネティクスとして STN1013900 点眼液をウサギ及びサルにそれぞれ反復点眼、並びに STN1013900 溶液をラット及びイヌに反復静脈内投与したときの血漿中ネタルスジル及びその活性代謝物である AR-13503（いずれも S-エナンチオマー体）、並びにこれらの R-エナンチオマー体濃度を測定して、反復投与時の動態を評価した。

分布については、^{14}C-STN1013900 点眼液をウサギに単回及び反復点眼して眼組織分布を、^{14}C-STN1013900 溶液をラットに単回静脈内投与して全身組織分布を評価した。*In vitro* においては、

ネタルスジル及びAR-13503のメラニン親和性、並びに各種動物及びヒト血漿蛋白結合を評価した。

代謝については、*in vivo*試験としてSTN1013900点眼液をウサギに単回点眼したときの眼局所における代謝を評価、*in vitro*試験として各種動物及びヒトの肝ミクロソーム、肝S9、摘出角膜及び血漿を用いて代謝プロファイルを評価し動物種間の比較を行うとともに、代謝経路を推定した。また、ネタルスジル及びそのラセミ体、AR-13503のラセミ体を用いて、CYP代謝阻害を検討した。

排泄については、^{14}C-STN1013900点眼液をウサギに単回及び反復点眼、並びに^{14}C-STN1013900溶液をラット単回静脈内投与したときの尿及び糞中への排泄を評価した。

2.4.1.3 毒性試験

単回投与毒性試験としては、ラット及びイヌを用いた単回静脈内投与試験を実施した。反復投与毒性試験としては、臨床投与経路での毒性を評価するために、ウサギを用いた6ヵ月までの反復点眼投与試験、サルを用いた9ヵ月までの反復点眼投与試験を実施した。加えて、ラット及びイヌを用いた28日までの反復静脈内投与試験を実施した。遺伝毒性試験としては、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンフォーマTK試験及びラットを用いた小核試験を実施した。生殖発生毒性試験としては、ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚の発生に関する試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験及びラットを用いた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を実施した。その他の毒性試験としてはBalb/c 3T3細胞を用いた光毒性試験を実施した。単回投与毒性試験以外のすべての毒性試験はGLPを遵守して実施された。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 キナーゼ阻害活性及びトランスポーター阻害活性に関する試験

添付資料4.2.1.1-1、4.2.1.1-4

AR-13324及び、活性代謝物であるAR-13503のヒトROCK1、ヒトROCK2に対する阻害活性（Ki値）は1 nmol/L、1 nmol/L (AR-13324) 及び0.2 nmol/L、0.2 nmol/L (AR-13503) であり、両化合物は強力なROCK阻害剤であることが報告されている[6]。AR-13324及びAR-13503のROCK1及びROCK2に対する阻害活性を確認した結果、AR-13324のROCK1に対するKi値は1.19 nmol/L、ROCK2に対するKi値は1.72 nmol/Lであり、AR-13503のROCK1に対するKi値は0.12 nmol/L、ROCK2に対するKi値は0.13 nmol/Lであった。なお、ROCK1、ROCK2に対する阻害活性はAR-13503がAR-13324に比較して9.9倍、13.2倍高活性であった。また、AR-13324はNETに対して結合能を有することが知られており[6]、NETに対するAR-13324の阻害活性を検

討した結果、AR-13324 の NET 阻害活性が確認された（IC_{50}値は 1.15 μmol/L）。このことから、AR-13324 は ROCK 阻害作用及び NET 阻害作用を有することが明らかとなった。

2.4.2.1.2 作用機序に関する試験

添付資料 4.2.1.1-5、4.2.1.1-6

正常眼圧ウサギを用いた房水動態試験（トノグラフィー法）において、STN1013900 点眼液を投与した群の C 値 (0.28 μL/min/mmHg) は生理食塩水を点眼した群の C 値 (0.18 μL/min/mmHg) と比べて統計学的有意に高値であった。この結果から、AR-13324 は ROCK 阻害に基づく線維柱帯流出路を介した房水流出促進作用を有することを確認した。また、正常眼圧ウサギを用いた房水動態試験（リカバリー法）において、STN1013900 点眼液を投与した群での低眼圧状態からの眼圧回復率 (0.09 mmHg/min) は生理食塩水を点眼した群の眼圧回復率 (0.18 mmHg/min) と比べて統計学的有意に低かった。この結果から、AR-13324 は NET 阻害を介する房水産生抑制作用を有することを確認した。これらの検討により、AR-13324 による眼圧下降への ROCK 阻害作用及び NET 阻害作用の寄与が明らかとなり、AR-13324 は ROCK/NET デュアル阻害薬であることが確認された。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験はない。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす作用

添付資料 4.2.3.2-9、4.2.1.3-2

ラットを用いた 7 日間反復静脈内投与試験において FOB 法により AR-13324 の中枢神経系に及ぼす影響及び呼吸数を評価した結果、10 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。無影響量は 10 mg/kg/day であった。

イヌに AR-13324 を単回静脈内投与したときの心血管系への影響を評価した試験において体温の評価が実施され、25 mg/kg/day まで体温への影響は認められなかった。無影響量は 25 mg/kg/day であった。

2.4.2.3.2 心血管系に及ぼす作用

添付資料 4.2.1.3-1、4.2.1.3-2

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いた *in vitro* 電気生理学的検討において、AR-13324 は 0.3 μmol/L より hERG チャネル電流を阻害し、その IC_{50} 値は 0.4 μmol/L であった。

イヌに AR-13324 を単回静脈内投与したときの心血管系への影響を評価した結果、12.5 mg/kg/day 以上の用量で血圧の低下及び心拍数の増加が認められた。心電図について、25 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。血圧及び心拍数に対する無影響量は 1 mg/kg/day、心電図に対する無影響量は 25 mg/kg/day であった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験はない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

^{14}C-AR-13324 を用いた試験においては、生体試料中の放射能は LSC 及び定量的オートラジオグラフィーを用いて測定した。トキシコキネティクスにおいては、各動物種における血漿中ネタルスジル及び AR-13503（いずれも S-エナンチオマー体）、並びにこれらの R-エナンチオマー体濃度を LC-MS/MS により定量した。

2.4.3.2 吸収

添付資料 4.2.2.2-1、4.2.3.2-1、4.2.3.2-3、4.2.3.2-5、4.2.3.2-8、4.2.3.2-10、4.2.3.2-12

有色ウサギに ^{14}C-STN1013900 点眼液を単回点眼したとき、血液及び血漿中放射能濃度は、それぞれ点眼後 0.25 時間及び 0.5 時間に C_{max} に達した後、緩やかに消失した。

有色ウサギに 0.04%及び 0.08% STN1013900 点眼液をそれぞれ 1 日 1 回又は 4 回 7 日間反復点眼したとき、ネタルスジルの全身曝露量は、投与量の増加に伴い増加する傾向を示し、蓄積傾向が認められたものの、雌雄差は認められなかった。サルに 0.01%、0.04%及び 0.12% STN1013900 点眼液をそれぞれ 1 日 4 回 7 日間反復点眼したとき、0.12%群の点眼初日のみ血漿中ネタルスジルが定量され、血漿中ネタルスジルに蓄積は認められず、全身曝露量に雌雄差は認められなかった。

有色ウサギ及びサルに 0.02%及び 0.04% STN1013900 点眼液をそれぞれ 1 日 2 回 6 ヵ月及び 9 ヵ月反復点眼したとき、ほとんどの試料において、血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度はいずれも定量下限未満となり、全身曝露は極めて低いことが明らかとなった。

白色ラット及びイヌに STN1013900 溶液を 28 日間反復静脈内投与したとき、ラットにおいて反復投与による血漿中ネタルスジル及び AR-13503（S-エナンチオマー体）の蓄積は認められなかったものの、イヌにおいては血漿中ネタルスジルが蓄積する傾向が認められた。いずれも全身

曝露量に雌雄差は認められなかった。また、血漿中に存在する AR-13323 は、[redacted]AR-13534（AR-13503 の R-エナンチオマー体）は血漿中に検出されなかった。

2.4.3.3 分布

添付資料 4.2.2.2-1、4.2.2.3-1、4.2.2.3-2、4.2.2.3-3、4.2.2.3-4

有色ウサギに ^{14}C-STN1013900 点眼液を単回点眼したとき、ほとんどの眼組織における放射能濃度は点眼後 0.25–0.5 時間で C_{max} に達し、房水中放射能濃度は点眼後 8 時間に C_{max} に達した。点眼後の眼組織中放射能濃度は、角膜が最も高く、次いで結膜、虹彩毛様体、網脈絡膜、房水、硝子体、及び水晶体の順に高値を示した。メラニン色素含有組織である虹彩毛様体及び網脈絡膜中放射能濃度の $T_{1/2}$ は、メラニン色素非含有組織における $T_{1/2}$ よりも長い傾向を示した。

有色ウサギに ^{14}C-STN1013900 点眼液を 7 日間反復両眼点眼したとき、各眼組織中放射能濃度は、単回点眼時とほぼ同様の順で高値を示した。房水、角膜及び結膜中放射能濃度の蓄積傾向は認められず、硝子体、水晶体、視神経、強膜及び瞬膜中放射能濃度は定常状態に達していると考えられた。また、メラニン色素含有組織のうち、虹彩毛様体中放射能濃度は定常状態に達していると考えられたものの、網脈絡膜中放射能濃度においては、反復点眼後 7 日においても蓄積傾向を示した。

有色ラットに ^{14}C-STN1013900 溶液を単回静脈内投与したとき、大部分の組織における放射能濃度は、投与後 0.5–1 時間に C_{max} に達し、肺、副腎（皮質）、肝臓、小腸、小腸内容物及び胆汁で高値を示した。大部分の組織における放射能濃度は、投与後 4 時間から減少傾向を示し、投与後 168 時間において定量下限未満又は定量下限付近まで減少したものの、肺、肝臓、副腎（髄質）、眼窩外及び眼窩内涙腺における放射能の消失は緩やかであると考えられた。副腎（皮質）及び包皮腺、並びにメラニン色素含有組織である眼（ぶどう膜）及び髄膜では、投与後 168 時間まで放射能濃度がほとんど消失しなかった。

ネタルスジルのラット、イヌ及びヒトにおける *in vitro* 血漿蛋白結合率は、いずれの動物種においても 97.3%より高かった。一方、AR-13503 の結合率は、ラットで 47.7%–49.9%、イヌで 42.4%–45.4%及びヒトで 60.7%–70.9%であった。

ネタルスジル及び AR-13503 の *in vitro* メラニン親和性を評価したとき、いずれも高いメラニン親和性を示した。

2.4.3.4 代謝

添付資料 4.2.2.4-1、4.2.2.4-2、4.2.1.1-3

白色ウサギにSTN1013900点眼液を単回点眼したとき、角膜中にネタルスジル及び活性代謝物であるAR-13503が定量されたことから、点眼されたネタルスジルは角膜中でその一部がAR-13503に代謝されると考えられた。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒト肝ミクロソームとネタルスジルをインキュベーションしたとき、インキュベーション後のネタルスジル濃度はウサギで最も低く、次いでマウス、ヒト、サル、ラット及びイヌの順であり、雌雄差は認められなかった。いずれの動物種においてもAR-13503が生成したことから、肝ミクロソーム中でネタルスジルはAR-13503に代謝されると考えられた。AR-13503を各動物種の肝ミクロソームとインキュベーションしたとき、いずれの動物種においてもAR-13503濃度は初濃度と同程度の値を示したことから、AR-13503は肝ミクロソームにおいて代謝されないと考えられた。

ヒト肝ミクロソーム及びS9、並びにラットアルクロール1254誘導肝S9とネタルスジルをそれぞれインキュベーションしたとき、いずれにおいてもネタルスジルは代謝され、AR-13503の生成が認められた。

ウサギ、イヌ、ブタ、サル及びヒト摘出角膜とネタルスジルをインキュベーションしたとき、ネタルスジルはいずれの動物種の角膜においても代謝された。

ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒト血漿とネタルスジルをインキュベーションしたとき、ラット、イヌ、サル及びヒト血漿中ネタルスジル残存率は、それぞれ88%、89%、96%及び88%となりほとんど代謝されなかった。一方、ウサギ血漿中のネタルスジル残存率は17%と、他の動物種と比較して速やかに代謝された。

ヒト組換えCYP及びこれらCYPの特異的基質を用いて、ネタルスジル、AR-13165（ネタルスジルのラセミ体）及びAR-13084（AR-13503のラセミ体）のCYP代謝活性に及ぼす影響を*in vitro*で評価した。その結果、ネタルスジル及びAR-13165はすべてのCYP分子種に対し高い阻害活性を示し、AR-13084はCYP2C19及び2D6に対し高い阻害活性を示した。

2.4.3.5　排泄

添付資料4.2.2.3-1、4.2.2.3-2

有色ウサギに^{14}C-STN1013900点眼液を単回点眼したとき、点眼後48時間までの尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の11.99%及び57.95%が排泄され、点眼後168時間までにそれぞれ投与放射能の12.43%及び61.81%が排泄された。また、反復点眼の初回点眼後168時間までの尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の15.99%及び52.54%が排泄された。

有色ラットに^{14}C-STN1013900溶液を単回静脈内投与したとき、投与後8時間までの尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の7.2%及び0.2%、投与後8時間から24時間までの尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の5.6%及び65.8%、投与後24時間から48時間までにそれぞれ0.8%及び6.9%、並びに投与後168時間までに尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の14.4%及び75.9%が排泄された。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

該当する試験はない。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

該当する試験はない。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

2.4.4.1.1 ラット単回静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.1-1

SD ラットに AR-13324 を 1、3 及び 45 mg/kg/day の用量で単回静脈内投与した。その結果、1 及び 3 mg/kg/day 群の忍容性は良好であった。45 mg/kg/day 群では、尾の腫脹及び暗色化を含む投与部位の刺激性が認められた他、自発運動低下、円背位、立毛、摂餌量減少、乏便及び紅涙等が認められた。また、45 mg/kg/day 群で四肢の発赤が認められ、AR-13324 の薬理作用に関連する可能性が考えられた。

2.4.4.1.2 イヌ単回静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.1-2

ビーグル犬に AR-13324 を 10、30 及び 60 mg/kg/day の用量で単回静脈内投与した。その結果、10 及び 30 mg/kg/day 群の忍容性は良好であった。60 mg/kg/day 群では、自発運動低下、斜視、姿勢異常、歩行異常及び黒色便等が認められた。また、摂餌量減少及び体重減少がみられた。血液学的検査及び血液生化学的検査では、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板及びカリウムの低値や平均赤血球容積、絶対的及び相対的単球数、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、アルカリフォスファターゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼの高値の他、軽度の赤血球大小不同、少量の多染性赤血球及びごく少量の有核赤血球が認められ、非再生性貧血との関連が示唆された。また、60 mg/kg/day 群で皮膚発赤、強膜発赤、血圧の低下及び心拍数の増加が認められ、AR-13324 の薬理作用に関連する変化と考えられた。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

臨床投与経路である点眼投与時の毒性を評価するために、ウサギを用いた 7 日間、28 日間、3 ヵ月間及び 6 ヵ月間反復点眼試験を、さらにサルを用いた 7 日間、1 ヵ月間及び 9 ヵ月間反復点眼試験を実施した。ウサギ 3 ヵ月間反復点眼試験では被験物質として PG324 点眼液（0.02%ネタ

ルスジル/0.005%ラタノプロスト）が投与された。なお、すべての反復点眼試験において全身毒性も評価したが、いずれの試験でも全身毒性はみられなかったため、以下、反復点眼試験は眼局所毒性の結果について記載する。また、全身への毒性作用をより詳細に評価するために、ラットを用いた7日間及び28日間反復静脈内投与試験、イヌを用いた7日間及び28日間反復静脈内投与試験を実施した。

2.4.4.2.1　　ウサギ7日間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-1

ダッチベルテッドウサギに0.04%及び0.08% STN1013900点眼液を1日1回、もしくは、0.04% STN1013900点眼液あるいはその基剤を1日4回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、0.04%群（1日1回）及び0.08%群（1日1回）では軽度の結膜充血を含む眼刺激性症状が散見されたものの、試験期間中の増悪はなかった。一方で、0.04%群（1日4回）では軽度から重度の結膜充血を含む眼刺激性症状や角膜フルオレセイン染色が高頻度に認められた。これらの所見は7日間の休薬で回復がみられた。無毒性量は0.08%（1日1回）、0.04%未満（1日4回）と考えられた。

2.4.4.2.2　　ウサギ28日間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-2

ダッチベルテッドウサギに0.02%、0.04%及び0.06% STN1013900点眼液あるいはその基剤を1日2回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、0.02%群では軽度の結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状や軽度の角膜フルオレセイン染色が投与期間初期に散見されたものの、投与期間終了時までには回復した。0.04%群及び0.06%群では軽度の結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状や軽度の角膜フルオレセイン染色が試験期間を通じて認められた。病理組織学的検査において、0.04%群及び0.06%群では軽度の角膜変性/びらんが認められた。これらの病理所見は休薬期間終了時点では認められなかった。無毒性量は0.02%（1日2回）と考えられた。

2.4.4.2.3　　ウサギ6ヵ月間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-3

ダッチベルテッドウサギに0.01%、0.02%及び0.04% STN1013900点眼液あるいはその基剤を1日2回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、投与期間初期から結膜充血を含む眼刺激性症状がすべての群で認められ、その頻度及び程度は用量依存的であり、基剤群及び0.01%群では散発的であった。眼刺激性症状は投与期間の進行に伴い減弱し、投与期間中に回復がみられた。また、投与期間中期に0.01%、0.02%及び0.04%群では軽度の角膜混濁及び角膜フルオレ

セイン染色が散見されたが、投与期間終了時までに回復した。病理組織学的検査において、0.04%群では血管新生、炎症性細胞浸潤及び角膜上皮の菲薄化を伴う角膜病変や限局性の角膜潰瘍が認められた。これらの病理所見は休薬期間終了時点では認められなかった。無毒性量は0.02%（1日2回）と考えられた。

2.4.4.2.4　ウサギ3ヵ月間反復点眼試験（PG324点眼液）

添付資料 4.2.3.2-4

ダッチベルテッドウサギにPG324点眼液（0.02%ネタルスジル/0.005%ラタノプロスト）を1日1回もしくは2回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。対照群としてSTN1013900点眼液の基剤を1日2回点眼する群を設けた。その結果、いずれの群でも結膜充血を含む軽度の眼刺激性症状が投与期間を通じて認められたものの、0.005%ラタノプロスト配合による新たな毒性は認められなかった。PG324点眼液の無毒性量は0.02%ネタルスジル/0.005%ラタノプロスト（1日2回）と考えられた。

2.4.4.2.5　サル7日間反復点眼試験（1）

添付資料 4.2.3.2-5

カニクイザルに0.01%、0.04%及び0.12% STN1013900点眼液あるいはその基剤を1日4回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、0.01%群では軽度の結膜充血を含む眼刺激性症状が散見されたものの、試験期間中の増悪はなかった。0.04%群及び0.12%群では結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状及び角膜フルオレセイン染色が全例に認められた。さらに、病理組織学的検査において、0.04%群及び0.12%群では角膜上皮/実質の浮腫及び角膜上皮/内皮のアポトーシスの増加が認められた。休薬期間終了時、0.12%群でこれらの変化は継続して認められたものの、角膜上皮のアポトーシスの増加を除き、その程度及び頻度は減少がみられた。無毒性量は0.01%（1日4回）と考えられた。

2.4.4.2.6　サル7日間反復点眼試験（2）

添付資料 4.2.3.2-6

カニクイザルに0.02%及び0.04% STN1013900点眼液あるいはその基剤を1日2回、もしくは、0.04%及び0.08% STN1013900点眼液を1日1回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、結膜充血を含む眼刺激性症状がすべての実薬群に認められ、その程度は用量依存的であった。眼刺激性症状は試験期間の進行に伴い減弱がみられた。病理組織学的検査において、0.02%群（1日2回）、0.04%群（1日2回）及び0.08%群（1日1回）では角膜上皮の肥厚及び過形成が認められたものの、その程度は全体として軽微なものであった。無毒性量は0.04%（1日2回）及び0.08%（1日1回）と考えられた。

Confidential

2.4.4.2.7　　サル 1 ヵ月間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-7

カニクイザルに 0.02%、0.04%及び 0.06% STN1013900 点眼液あるいはその基剤を 1 日 2 回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、0.04%群及び 0.06%群では軽度の角膜混濁が投与期間中にみられ、いずれの群でも投与期間終了時まで継続して認められたものの、休薬期間終了時には回復がみられた。病理組織学的検査において、0.06%群にごく軽度の角膜上皮の過形成が認められたが、休薬期間終了時点では認められなかった。無毒性量は 0.02%（1 日 2 回）と考えられた。

2.4.4.2.8　　サル 9 ヵ月反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-8

カニクイザルに 0.01%、0.02%及び 0.04% STN101390 点眼液あるいはその基剤を 1 日 2 回点眼投与し、眼局所への毒性を評価した。その結果、軽度の結膜充血を含む眼刺激性症状がすべての群に認められ、その頻度は用量依存的であった。眼刺激性症状は一過性のものであり、角膜混濁を除き、投与開始後 1 ヵ月以降では認められなかった。0.02%群及び 0.04%群では投与初期から軽度の角膜混濁がみられたものの、投与期間の進行に伴い回復がみられた。病理組織学的検査において、すべての群で被験物質投与に関連する変化は認められなかった。無毒性量は 0.04%（1 日 2 回）と考えられた。

2.4.4.2.9　　ラット 7 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-9

SD ラットに 0、1、3 及び 10 mg/kg/day の用量で AR-13324 を静脈内投与し、全身への毒性を評価した。その結果、10 mg/kg/day 群で皮膚発赤、立毛、尾の擦過傷及び投与部位の異常（痣、黒化、腫脹）が認められた。血液学的検査において、3 及び 10 mg/kg/day 群で平均赤血球容積の増加、平均血色素量、血小板及び網状赤血球数の増加が認められた。10 mg/kg/day 群で赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値及び平均血色素濃度の減少、有核赤血球、大小不同及び多染性赤血球の発現増加を含む赤血球形態の異常、及びプロトロンビン時間の延長が認められた。10 mg/kg/day 群で認められた平均赤血球容積の増加は休薬期間終了時にも継続していたが、その他すべての所見は回復がみられた。血液生化学的検査において、3 及び 10 mg/kg/day 群で総ビリルビンの増加が認められた。10 mg/kg/day 群で塩素及びグロブリンの増加、総タンパク、アルブミン、アルブミン／グロブリン比の減少が認められた。病理組織学的検査において、3 及び 10 mg/kg/day 群で肝臓における髄外造血の発生頻度増加が認められた。無毒性量は 1 mg/kg/day と考えられた。

Confidential

2.4.4.2.10 ラット 28 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-10

SD ラットに 0、0.1 (0.06-0.10)、0.3 (0.23-0.30) 及び 1 (0.84-1.06) mg/kg/day の用量で AR-13324 を静脈内投与し、全身への毒性を評価した（括弧内の数値は実際の投与用量を示す）。その結果、すべての群で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。無毒性量は 1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.84-1.06 mg/kg/day）と考えられた。

2.4.4.2.11 イヌ 7 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-11

ビーグル犬に 0、1、12.5 及び 25 mg/kg/day の用量で AR-13324 を静脈内投与し、全身への毒性を評価した。その結果、12.5 及び 25 mg/kg/day 群は体温の上昇、呼吸異常、活動量の低下を含む瀕死状態を呈したため、12.5 mg/kg/day 群の雄 2 例及び 25 mg/kg/day 群の雄 3 例が安楽殺された。これらの動物では臨床検査において、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、リンパ球数及びカルシウムの減少、相対的好中球数、総ビリルビン（25 mg/kg/day 群のみ）及びアルカリフォスファターゼの増加並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。また、病理組織学的検査において、投与部位の浮腫/出血/顆粒球浸潤、腎尿細管円柱/顆粒球浸潤、肺の浮腫/出血/顆粒球浸潤、心臓の出血/うっ血/血管炎、胆嚢の胆石、副腎皮質の顆粒球浸潤、骨髄の枯渇が認められた。1 mg/kg/day 群では、眼の発赤、皮膚の発赤及び投与部位の腫脹がみられ、眼の発赤及び皮膚の発赤は投与期間中に回復した。また、病理組織学的検査において、投与部位の変化が認められたものの、その程度は軽度であった。無毒性量は 1 mg/kg/day と考えられた。

2.4.4.2.12 イヌ 28 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-12

ビーグル犬に 0、0.1 (0.06-0.07)、0.3 (0.21-0.26) 及び 1 (0.76-0.96) mg/kg/day の用量で AR-13324 を静脈内投与し、全身への毒性を評価した（括弧内の数値は実際の投与用量を示す）。その結果、すべての群で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。無毒性量は 1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.76-0.96 mg/kg/day）と考えられた。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

2.4.4.3.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

添付資料 4.2.3.3.1-1

Confidential

ネズミチフス菌株の TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2*uvrA* の 5 菌株を使用した。試験は非代謝活性化条件及び代謝活性化条件下でプレート法により実施した。用量検討試験をネタルスジルとして 1.5～5000 μg/plate で実施し、本試験は明らかな生育阻害が認められる用量を最高用量として、非代謝活性化条件では TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 で 0.20～60.0 μg/plate、WP2*uvrA* で 2.0～600 μg/plate、代謝活性化条件下では、すべての試験菌株で 2.0～600 μg/plate で試験を実施した。その結果、用量検討試験及び本試験のいずれの試験菌株においても、代謝活性化条件の有無にかかわらず、復帰変異コロニーの増加は認められなかった。以上の結果から、AR-13324 は本試験条件下において変異原性を有さないと結論した。

2.4.4.3.2 マウスリンフォーマ TK 試験

添付資料 4.2.3.3.1-2

マウスリンパ腫細胞 L5178Y ($Tk^{+/-}$ -3.7.2c) を使用した。代謝活性化及び非代謝活性化での短時間処理法（4 時間）ではネタルスジルとして 3～7 μg/mL 及び 0.1～2 μg/mL の濃度で、非代謝活性化での連続処理法（24 時間）では 0.5～1.1 μg/mL の濃度で処置した。その結果、代謝活性化条件の有無にかかわらず、90×10^{-6} 以上の突然変異頻度を示すクローン化細胞はなかった。また、突然変異頻度に用量依存的な増加は認められなかった。以上の結果から、AR-13324 は本試験条件下において染色体異常誘発性を有さないと結論した。

2.4.4.3.3 ラット小核試験

添付資料 4.2.3.2-9

SD ラットに、AR-13324 を 0、1、3 及び 10 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 7 日間反復静脈内投与した。0 及び 10 mg/kg/day 群については、投与期間終了後に 7 日間休薬する動物をさらに雌雄各 5 匹設定した。最終投与翌日（全群）及び投与後 1 週間の休薬期間終了時（0 及び 10 mg/kg/day 群）に骨髄を採取、骨髄塗抹標本を作製し、小核誘発作用の有無を検討した。その結果、いずれの群においても小核誘発作用は認められず、陰性と判定した。

2.4.4.4 がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。実施しなかった理由を 2.6.6.5 項に記載した。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験、

2.4.4.5.1 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

添付資料 4.2.3.5.1-1

SD ラットに AR-13324 を 0、0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg/day の用量で静脈内投与した。その結果、親動物の一般毒性として、1 mg/kg/day の雄でのみ体重増加抑制及び体重の低値、投与部位の腫脹が認められた。生殖機能への影響に関しては、性周期、臓器重量（精巣、精巣上体）、交尾率・間隔、黄体数、着床数、着床率及び着床前胚損失率に被験物質投与による影響は認められなかった。初期胚発生への影響については、生存胚、着床後胚損失数、胚生存率、着床後胚損失率に被験物質投与による影響は認められなかった。無毒性量は雄親動物について 0.3 mg/kg/day、雌母動物について 1 mg/kg/day、受胎能及び初期胚発生について 1 mg/kg/day と考えられた。

2.4.4.5.2　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験

添付資料 4.2.3.5.2-2

SD ラットに AR-13324 を 0、0.03 (0.022) 、0.1 (0.08)、0.3 及び 3 mg/kg/day の用量で静脈内投与した（括弧内の数値は実際の投与用量を示す）。その結果、母動物に及ぼす影響として、流産の兆候（赤色、褐色又は黒色の膣分泌物）を示す動物が 0.3 及び 3 mg/kg/day 群に認められ、0.3 mg/kg/day 群の 2 例が安楽殺された。また、子宮重量の減少が 3 mg/kg/day 群で認められ、0.3 mg/kg/day 群でもその傾向がみられた。胚・胎児に及ぼす影響として、早期吸収胚数の増加、着床後胚損失率の増加及び生存胎児数の低下が 3 mg/kg/day 群で認められ、0.3 mg/kg/day 群でもその傾向がみられた。無毒性量は母動物及び胚・胎児についていずれも 0.1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.08 mg/kg/day）と考えられた。

2.4.4.5.3　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

添付資料 4.2.3.5.2-5

ニュージーランドホワイトウサギに AR-13324 を 0、0.5、3 及び 5 mg/kg/day の用量で静脈内投与した。その結果、母動物に及ぼす影響として、5 mg/kg/day で体重増加抑制傾向がみられ、胎児重量のわずかな減少に起因する可能性が考えられた。胚・胎児に及ぼす影響として、5 mg/kg/day 群で早期吸収胚数の増加、着床後胚損失率のわずかな増加、生存胎児率のわずかな減少及び胎児重量のわずかな減少がみられた。無毒性量は母動物及び胚・胎児についていずれも 3 mg/kg/day と考えられた。

2.4.4.5.4　　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

添付資料 4.2.3.5.3-1

SD ラットに AR-13324 を 0、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg/day の用量で静脈内投与した。その結果、F_0 母動物及び F_1 出生児において、被験物質投与に関連する変化は認められなかった。無毒性量は 0.3 mg/kg/day と考えられた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

AR-13324 の局所刺激性に関する情報は、ウサギ及びサルを用いた反復点眼毒性試験において評価できるため、独立した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 光安全性

添付資料 4.2.3.7.7-1、4.2.3.7.7-2

光安全性に関する初期評価として、AR-13324 の紫外線-可視光における吸収スペクトルの検討を行った。その結果、AR-13324 のモル吸光係数（288 nm: 10914 L/mol·cm）は、ICH S10 で規定される光安全性評価が必要な閾値である 1000 L/mol·cm を上回ったため、*in vitro* 光毒性評価を実施した。

Balb/c 3T3 細胞を用いるニュートラルレッド取り込み光毒性試験では、UVA 照射下における *in vitro* 光毒性を評価した。その結果、AR-13324 の MPE 及び PIF はいずれも、「光毒性なし」と予測される値を示した。本試験条件下において、AR-13324 は光毒性を有さないと結論した。

UVB への曝露を増加させた条件における *in vitro* 光毒性を評価するため、UVA 及び UVB 照射下における Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み光毒性試験を実施した。その結果、AR-13324 の PIF は「光毒性の可能性あり」、AR-13503 の PIF は「光毒性あり」と予測される値を示した。本試験条件下において、AR-13324 は光毒性の可能性を有する、AR-13503 は光毒性ありと結論した。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理総括

AR-13324 は ROCK1 及び ROCK2 に対する強力な阻害活性及び NET に対する阻害活性を有する ROCK/NET デュアル阻害薬であることが明らかとなった。また、活性代謝物である AR-13503 は AR-13324 よりも強力な ROCK1 及び ROCK2 阻害活性を示した。房水動態試験において、STN1013900 点眼液による線維柱帯を介する房水流出率の増大及び房水産生抑制が確認された。これらの結果から、STN1013900 点眼液が示す強力かつ持続的な眼圧下降の作用機序は、AR-13324 の ROCK/NET デュアル阻害作用による房水流出促進及び房水産生抑制に続き、AR-13503 の強力な ROCK 阻害作用による房水流出促進が発揮されることと考えられた。

安全性薬理試験では、中枢神経系及び呼吸器系への作用は認められなかった。心血管系への作用について、AR-13324 の ROCK 阻害作用に起因する血圧の低下やその副次的効果と考えられる心拍数の増加が認められた。それぞれの作用への無影響量における血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度と、第 I 相 PK（反復投与）試験 (AR-13324-CS103)（添付資料 5.3.3.1-1）でのヒト血

漿中濃度を比較したところ、十分な安全域があったことから、本剤の臨床使用時における安全性上の懸念はないと考えられた。

2.4.5.2 薬物動態総括

白色ウサギに STN1013900 点眼液を単回点眼したとき、角膜中に未変化体のネタルスジル及び活性代謝物である AR-13503 が定量され、*in vitro* 摘出角膜試験においてネタルスジルは角膜で代謝されたことから、点眼されたネタルスジルは角膜中でその一部が AR-13503 に代謝されると考えられた。

有色ウサギに ^{14}C-STN1013900 点眼液を点眼したとき、放射能は投与部位近傍組織である角膜及び結膜に高濃度に分布し経時的に減少した。メラニン色素含有組織についてはメラニン色素非含有組織に比べて $T_{1/2}$ が長い傾向を示し、虹彩毛様体中放射能濃度は反復点眼後 7 日に定常状態に達したものの、網脈絡膜においては反復点眼後 7 日においても蓄積傾向を示した。また、ネタルスジル及び AR-13503 は *in vitro* 試験において高いメラニン親和性を示すことが明らかとなっている。しかしながら、サル 9 ヵ月間反復点眼毒性試験（添付資料 4.2.3.2-8）において、最高用量の 0.04% STN1013900 点眼液を反復点眼したとき、眼局所に重篤な所見は認められなかったことから、反復点眼によるメラニン色素含有眼組織中の薬物蓄積が眼局所安全性に影響を及ぼす懸念はないと考えられた。

有色ウサギに ^{14}C-STN1013900 点眼液を単回点眼したときの血漿中放射能濃度は点眼後 30 分に C_{max} に達したのち、緩やかに減少したことから、投与されたネタルスジル及びその代謝物は比較的速やかに全身に吸収されると考えられた。有色ウサギ及びサルに STN1013900 点眼液をそれぞれ 6 ヵ月間及び 9 ヵ月間反復点眼したとき、血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度は、ほとんどの試料において定量下限未満 (<1.00 ng/mL) であったことから、STN1013900 点眼液を反復点眼したときの全身曝露は極めて低く、反復投与による蓄積の懸念はないと考えられた。

有色ラットに ^{14}C-STN1013900 溶液を単回静脈内投与したとき、大部分の組織における放射能濃度は、投与後 4 時間から減少傾向を示したものの、副腎（皮質）及び包皮腺、並びにメラニン色素含有組織である眼（ぶどう膜）及び髄膜においては、投与後 168 時間まで消失傾向は認められなかった。しかしながら、ラット 28 日間反復静脈内投与試験（添付資料 4.2.3.2-10）において、被験物質投与に関連した全身における変化は認められなかったことから、全身安全性に影響を及ぼす懸念はないと考えられた。

ネタルスジルのラット、イヌ及びヒトにおける血漿蛋白結合率は、いずれの動物種においても 97.3%より高く、AR-13503 の結合率はラットで 47.7%–49.9%、イヌで 42.4%–45.4%、及びヒトで 60.7%–70.9%であった。第 I 相 PK（反復投与）試験 (AR-13324-CS103) において、0.02% STN1013900 点眼液を 1 日 1 回、8 日間反復両眼点眼したときの血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度は、定量下限未満 (<0.0100 ng/mL) で（添付資料 5.3.3.1-1）、ヒト血漿中アルブミン濃度（約 40 mg/mL）[7]と比較して著しく低いことから、ネタルスジル及び AR-13503 が併用薬剤の血漿蛋白結合に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

各動物種及びヒトの摘出角膜及び肝ミクロソームを用いてネタルスジルの代謝安定性を評価した結果、ネタルスジルは角膜中及び肝臓中で代謝され、肝ミクロソームにおいては代謝物としてAR-13503の生成が確認された。角膜や肝臓中にはエステラーゼの存在が報告されている[8][9]ことから、ネタルスジルは生体内のエステラーゼにより AR-13503 に加水分解代謝されると推測された。肝ミクロソームを用いて AR-13503 の代謝安定性を評価した結果、AR-13503 は CYP 等の酵素で代謝されないと考えられた。

ネタルスジルはヒト CYP1A2、2C19、2C9、2D6 及び 3A4 に対して、AR-13084（AR-13503 のラセミ体）はヒト CYP2C19 及び 2D6 に対し阻害活性を示した。ヒトに 0.02% STN1013900 点眼液を 8 日間反復点眼したときの血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度（いずれも<0.01 ng/mL）（添付資料 5.3.3.1-1）は、CYP 阻害活性を示す濃度に比べて著しく低かったことから、これら CYP 阻害による薬物相互作用の懸念はないと考えられた。

有色ウサギに ^{14}C-STN1013900 点眼液を単回点眼したとき、点眼後 168 時間までに尿中及び糞中にそれぞれ投与放射能の 12.43%及び 61.81%が排泄され、それらのほとんどが点眼後 48 時間までに排泄された。したがって、ネタルスジルの主排泄経路は糞中と考えられた。また反復点眼時における排泄率プロファイルは単回点眼と同様であった。

有色ラットに ^{14}C-STN1013900 溶液を単回静脈内投与したとき、投与後 168 時間までに尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の 14.4%及び 75.9%が排泄され、それらのほとんどがウサギ点眼時と同様に投与後 48 時間までに排泄された。

以上、非臨床薬物動態試験によって、ネタルスジルは点眼後に眼局所において加水分解されるとともに、ネタルスジル及び活性代謝物である AR-13503 は眼組織及び全身に分布し、生体内から排泄されると考えられた。ネタルスジル及び AR-13503 は反復点眼によりメラニン含有組織に蓄積性を示す可能性はあるものの、全身及び眼局所における安全性に関する懸念は低いと考えられた。

2.4.5.3 毒性総括

STN1013900 点眼液の臨床投与経路である点眼投与による毒性評価として、ウサギ及びサルを用いた反復点眼投与試験を実施した。その結果、反復点眼時の主要な影響として、結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状がみられた。また、投与期間初期に眼組織及び眼周辺組織への炎症性細胞浸潤や眼内の炎症に起因する所見がみられたが、長期間投与に伴う増悪傾向はみられず、また回復性も認められた。

結膜充血については、他の ROCK 阻害薬でもみられる所見であり[10]、ROCK 阻害による血管平滑筋の収縮力低下に基づく血管拡張により引き起こされたものと考えられた[11]。本所見は投与期間初期に生じる一過性の、回復性のある変化であり、ウサギ 6 ヵ月間反復点眼試験では投与開始 3 ヵ月以降、サル 9 ヵ月間反復点眼試験では投与 4 週以降に認められなかった。よって、臨床使用上の大きな懸念にならないと考えられた。

角膜混濁については、サル9ヵ月間反復点眼試験では「角膜表層の複数の非常に細かい点状の沈着物または液滴」と報告されており、本所見は臨床試験において報告された副作用である「渦巻き角膜」との関連が示唆された。薬剤誘発性の「渦巻き角膜」はリン脂質症（リソソーム内の薬剤・脂質複合体の蓄積）が原因とされており、抗不整脈薬であるアミオダロンを服用する患者によくみられる。ネタルスジルでもアミオダロンと同様に、リン脂質症に基づく「渦巻き角膜」が生じた可能性が考えられた。反復点眼試験において、角膜混濁は投与初期からみられたものの、そのほとんどは投与期間中又は休薬期間で回復が認められた。臨床試験においては「渦巻き角膜」を生じた症例の多くは、投与中又は投与中止/終了後、軽快または回復している。また、渦巻き角膜の発現中又は発現前後の最高矯正視力、コントラスト感度、渦巻き角膜のグレード分類・位置を評価した結果、渦巻き角膜と視機能との関連は認めなかった。よって、臨床使用上の大きな懸念にならないと考えられた。

眼局所の炎症反応については、ラット及びイヌを用いた反復静脈内投与試験においても投与部位の炎症が認められていることから、高曝露された投与局所において炎症が誘発された可能性があるものの、その明確な機序は不明である。しかしながら、本所見のほとんどは回復性が認められたこと、また、ウサギ6ヵ月間反復点眼試験では臨床適用濃度である0.02%群（1日2回）、サル9ヵ月間反復点眼試験では最高用量である0.04%群（1日2回）まで、病理組織学的検査において変化は認められなかったことから、臨床使用上の大きな懸念にはならないと考えられた。

ウサギ及びサルを用いた反復点眼投与試験において、臨床投与用量の100倍（ウサギ）及び67倍（サル）まで全身性の所見は認められなかった。全身への毒性作用をより詳細に評価するために、ラット及びイヌを用いた反復静脈内投与試験を実施した結果、全身への主要な影響として心血管への影響及び投与部位の腫脹がみられたものの、それぞれの反復静脈内投与試験の無毒性量における血漿中ネタルスジル及びAR-13503濃度と、第I相PK（反復投与）試験 (AR-13324-CS103)（添付資料5.3.3.1-1）でのヒト血漿中濃度を比較したところ、十分な安全域があったことから、本剤の臨床使用時における安全性上の懸念はないと考えられた。

生殖発生毒性試験において、ラットにおける胚・胎児試験では、母動物への影響として、流産の兆候及び子宮重量の減少が、胚・胎児への影響として、早期吸収胚数の増加、着床後胚損失率の増加及び生存胎児数の低下がみられた。ウサギにおける胚・胎児試験では、母動物への影響として、体重増加抑制傾向が、胚・胎児への影響として、早期吸収胚数の増加、着床後胚損失率の増加、生存胎児率の減少及び胎児重量の減少がみられた。それぞれの胚・胎児試験の無毒性量における血漿中ネタルスジル及びAR-13503濃度と、第I相PK（反復投与）試験 (AR-13324-CS103)（添付資料5.3.3.1-1）でのヒト血漿中濃度、及び無毒性量と臨床用量を比較したところ、十分な安全域があったことから、本剤の臨床使用時における安全性上の懸念はないと考えられた。

Balb/c 3T3細胞を用いるニュートラルレッド取り込み光毒性試験では、UVBへの曝露を増加させた条件で、AR-13324のPIFは「光毒性の可能性あり」、活性代謝物であるAR-13503のPIFは「光毒性あり」と予測される値が示され、潜在的な光毒性が懸念された。しかしながら、AR-13324及びAR-13503が光毒性を示した最低濃度と0.02% ^{14}C-STN1013900点眼液を有色ウサギに

単回点眼したときの角膜及び虹彩毛様体の最高組織中放射能濃度を比較した結果、十分な安全域を確認できた。また、臨床試験においても、光毒性に起因すると考えられる副作用は認められなかった。よって、臨床使用における安全性上の懸念はないと考えられた。

以上の非臨床安全性試験成績から、STN1013900 点眼液及びその有効成分である AR-13324 は非臨床毒性試験プログラムを通じて、眼局所への影響、即ち結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状が濃度依存的にみられたものの、いずれも臨床適用濃度では軽度かつ一過性の回復性のある変化であり、視機能に影響を及ぼす懸念も低いと判断された。また、全身への影響及び胚・胎児発生への影響が認められたものの、いずれも十分な安全域が確認された。潜在的な光毒性の懸念についても、十分な安全域があること及び臨床使用時に光毒性を示す可能性は極めて低いことが考えられた。以上より、STN1013900 点眼液の臨床適用に際しては、用法用量を守って適正に使用することにより、安全性上の大きな懸念は生じないものと考えられた。

2.4.5.4 結論

ネタルスジルは ROCK 及び NET デュアル阻害薬であり、その活性代謝物である AR-13503 はネタルスジルよりもさらに強力な ROCK 阻害薬である。STN1013900 点眼液の強力な眼圧下降作用機序はネタルスジル及び AR-13503 の ROCK 阻害作用による線維柱帯流出路を介した房水流出促進に加え、ネタルスジルの NET 阻害作用による房水産生抑制であることが明らかとなった。また、ネタルスジルに続き、AR-13503 が作用することにより、既存の ROCK 阻害薬よりも持続的な眼圧下降作用が発揮されると考えられた。これらのことから、STN1013900 点眼液は、既存の ROCK 阻害薬よりも優れた作用強度及び持続性を兼ね備えた、新規薬理プロファイルを有する眼圧下降薬となることが期待できる。また、ネタルスジルは点眼後に眼局所において AR-13503 に加水分解されるとともに、これらは眼組織及び全身に分布し、生体内から排泄されると考えられた。非臨床安全性試験の結果から、STN1013900 点眼液は、用法用量を守って適正に使用することにより、臨床適用に際して安全性上の大きな懸念は生じないものと判断した。以上の非臨床試験成績から、STN1013900 点眼液は有効かつ安全な薬剤であり、緑内障及び高眼圧症に対する新規眼圧下降薬になりえると判断した。

2.4.6 参考文献一覧

(1) Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, et al. Effects of Rho-Associated Protein Kinase Inhibitor Y-27632 on Intraocular Pressure and Outflow Facility. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(1):137-44.

(2) Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, Mizuno K, Isobe T, Tanabe S, et al. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. Sci Rep. 2016;6:19640.

(3) Yamagishi-Kimura R, Honjo M, Aihara M. Effect of a fixed combination of ripasudil and brimonidine on aqueous humor dynamics in mice. Sci Rep. 2024;14:7861.

(4) Wang RF, Williamson JE, Kopczynski C, Serle JB. Effect of 0.04% AR-13324, a ROCK, and Norepinephrine Transporter Inhibitor, on Aqueous Humor Dynamics in Normotensive Monkey Eyes. J Glaucoma. 2015;24(1):51–4.

(5) Kiel JW, Kopczynski CC. Effect of AR-13324 on Episcleral Venous Pressure in Dutch Belted Rabbits. J Ocul Pharmacol Ther. 2015;31(3):146–51.

(6) Lin CW, Sherman B, Moore LA, Laethem CL, Lu DW, Pattabiraman PP, et al. Discovery and Preclinical Development of Netarsudil, a Novel Ocular Hypotensive Agent for the Treatment of Glaucoma. J Ocul Pharmacol Ther. 2018;34(1,2):40–51.

(7) Davies B, Morris T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. Pharm Res. 1993;10(7):1093-5.

(8) Lee VHL, Morimoto KW, Stratford RE Jr. ESTERASE DISTRIBUTION IN THE RABBIT CORNEA AND ITS IMPLICATIONS IN OCULAR DRUG BIOAVAILABILITY. Biopharm Drug Dispos. 1982;3:291-300.

(9) McCracken NW, Blain PG, Williams FM. HUMAN XENOBIOTIC METABOLIZING ESTERASES IN LIVER AND BLOOD. Biochem Pharmacol. 1993;46(7):1125-9.

(10) Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Fukushima A, et al. One-year clinical evaluation of 0.4% ripasudil (K-115) in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. Acta Ophthalmol. 2016;94(1):e26-e34.

(11) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahata T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature. 1997;389(6654):990-4.