目次

2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 3
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 10
2.6.6.4 遺伝毒性試験 24
2.6.6.5 がん原性試験 25
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 25
2.6.6.7 局所刺激性試験 29
2.6.6.8 その他の毒性試験 29
2.6.6.9 考察及び結論 40
2.6.6.10 図表 47
2.6.6.11 参考文献 47

Confidential

表 2.6.6-1. 非臨床毒性試験概要で用いた略語一覧

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
AUC	Area under the concentration-time curve（濃度-時間曲線下面積）
BLQ	Below the lower limit of quantification（定量下限未満）
C_{max}	Maximum concentration（最高濃度）
EC_{50}	Half maximal effective concentration（50%効果濃度）
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）
IARC	International Agency for Research on Cancer（国際がん研究機関）
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）
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）
NTP	National Toxicology Program（米国毒性プログラム）
PDE	Permitted daily exposure（許容一日曝露量）
PG324 点眼液	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
PIF	Photo irritation factor（光毒性係数）
PK	Pharmacokinetics（薬物動態学）
ROCK	Rho-associated protein kinase（Rho キナーゼ）
ROCK1	Rho-associated protein kinase 1
ROCK2	Rho-associated protein kinase 2
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
TK	Toxicokinetics（トキシコキネティクス）
UVA	Ultraviolet A（紫外線 A 波）
UVB	Ultraviolet B（紫外線 B 波）
(Q)SAR	(Quantitative) structure activity relationship（（定量的）構造活性相関）

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

STN1013900 点眼液はネタルスジルメシル酸塩を有効成分として含有し、Rho キナーゼ（ROCK）及びノルエピネフリントランスポーター（NET）に対して選択的に阻害活性を示す。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。実施した毒性試験プログラムを表 2.6.6.1-1 に示す。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。

Confidential

表 2.6.6.1-1. 毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP 適用	添付資料番号
単回投与毒性試験				
単回投与毒性試験	静脈内	ラット	非適	4.2.3.1-1
	静脈内	イヌ	非適	4.2.3.1-2
反復投与毒性試験				
7 日間	点眼	ウサギ	適[1]	4.2.3.2-1
28 日間	点眼	ウサギ	適	4.2.3.2-2
6 ヵ月間	点眼	ウサギ	適	4.2.3.2-3
3 ヵ月間（PG324 点眼液）	点眼	ウサギ	適	4.2.3.2-4
7 日間	点眼	サル	適	4.2.3.2-5
7 日間	点眼	サル	適	4.2.3.2-6
1 ヵ月間	点眼	サル	適	4.2.3.2-7
9 ヵ月間	点眼	サル	適	4.2.3.2-8
7 日間	静脈内	ラット	適[1]	4.2.3.2-9
28 日間	静脈内	ラット	適	4.2.3.2-10
7 日間	静脈内	イヌ	適[1]	4.2.3.2-11
28 日間	静脈内	イヌ	適	4.2.3.2-12
遺伝毒性試験				
復帰突然変異試験	*in vitro*	ネズミチフス菌、大腸菌	適	4.2.3.3.1-1
マウスリンフォーマ TK 試験	*in vitro*	マウスリンパ腫細胞	適	4.2.3.3.1-2
小核試験	静脈内	ラット	適	4.2.3.3.2-1
生殖発生毒性試験				
受胎能及び着床までの初期胚の発生に関する試験	静脈内	ラット	適	4.2.3.5.1-1
胚・胎児発生に関する試験	静脈内	ラット、ウサギ	適	4.2.3.5.2-2 4.2.3.5.2-5
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	静脈内	ラット	適	4.2.3.5.3-1
その他の毒性試験				
光毒性試験（UVA 照射）	*in vitro*	Balb/c 3T3 マウス線維芽細胞	適	4.2.3.7.7-1
光毒性試験（UVA、UVB 照射）	*in vitro*	Balb/c 3T3 マウス線維芽細胞	適	4.2.3.7.7-2

1: トキシコキネティクス評価は GLP 非適用下で実施された。

Confidential

単回投与毒性試験：

ラットを用いた試験では、AR-13324 を 1、3 及び 45 mg/kg/day の用量で静脈内投与した。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 投与群では、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。

イヌを用いた試験では、AR-13324 を 10、30 及び 60 mg/kg/day の用量で静脈内投与した。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。

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。なお、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、眼局所毒性の結果について記載する。

ウサギを用いた 7 日間反復点眼試験では、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。

ウサギを用いた 28 日間反復点眼試験では、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。

ウサギを用いた6ヵ月間反復点眼試験では、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。

ウサギを用いた3ヵ月間反復点眼試験では、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。

サルを用いた7日間反復点眼試験では、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%群でこれらの病理組織学的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。

追加のサルを用いた7日間反復点眼試験では、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。

サルを用いた1ヵ月間反復点眼試験では、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、投与期間中に0.04%群及び0.06%群では軽度の角膜混濁がみられ、いずれの群でも投与期間終了時まで継続して認め

Confidential

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。

サルを用いた9ヵ月間反復点眼試験では、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、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。

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。

ラットを用いた7日間静脈内投与試験では、0、1、3及び10 mg/kg/dayの用量でAR-13324を静脈内投与した。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。

ラットを用いた28日間静脈内投与試験では、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。

イヌを用いた7日間静脈内投与試験では、0、1、12.5及び25 mg/kg/dayの用量でAR-13324を静脈内投与した。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及び骨髄

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。

イヌを用いた 28 日間静脈内投与試験では、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。

遺伝毒性試験：

細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験及びラット小核試験において、AR-13324 に遺伝毒性は認められなかった。

生殖発生毒性試験：

ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚の発生に関する試験、ラット及びウサギにおける胚・胎児発生に関する試験、及びラットにおける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。

ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚の発生への影響を評価するため、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。

ラットにおける胚・胎児発生への影響を評価するため、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。

ウサギにおける胚・胎児発生への影響を評価するため、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。

ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能への影響を評価するため、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。

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。

その他の毒性試験：

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。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラット単回静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.1-1

1 群あたり雌雄各 2 匹の 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。観察及び検査として、一般状態観察及び体重測定を実施した。

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 投与群では一般状態観察において、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。

2.6.6.2.2 イヌ単回静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.1-2

1 群あたり雌雄各 1 匹のビーグル犬に、AR-13324 を 10、30 及び 60 mg/kg/day の用量で単回静脈内投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、血圧、心拍数、血液学的検査、血液生化学的検査及び剖検を実施した。

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、一般状態観察において、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た。60 mg/kg/day 群において認められた一般状態の異常、体重減少、摂餌量減少及び臨床検査値の変化について、網状赤血球増加が認められないことから、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。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1 ウサギ 7 日間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-1

1 群あたり雌雄各 5 匹のダッチベルテッドウサギの両眼に、1 滴（約 30 μL/eye）の 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 2 時間間隔で 1 日 4 回 7 日間反復点眼投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察（Draize 法）、細隙灯顕微鏡検査（McDonald-Shadduck 法を含む）、

倒像鏡検査、眼圧測定〕、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、基剤群及び0.04%群（1日4回）については、投与期間終了後に7日間休薬する動物を雌雄各3匹設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、倒像鏡検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、0.04%群（1日4回）に軽度から中等度の眼分泌物、軽度から中等度の充血及び眼瞼痂疲が認められた。これらの変化は休薬期間中に回復した。

肉眼観察において、軽度の結膜充血及び結膜浮腫が0.04%群（1日1回）及び0.08%群（1日1回）に散見された。軽度から重度の結膜充血、結膜浮腫及び分泌物が0.04%群（1日4回）に認められた。これらの所見の発生率及び程度は投与期間の進行に伴い減少した。休薬期間終了時、0.04%群（1日4回）のすべての眼に異常は認められなかった。

細隙灯顕微鏡検査において、Day 7に軽度の角膜フルオレセイン染色が0.04%群（1日1回）の1例及び0.04%群（1日4回）の10例に認められた。軽度の結膜浮腫が0.04%群（1日4回）の2例に認められた。休薬期間終了時、0.04%群（1日4回）のすべての眼に異常は認められなかった。

眼圧測定において、薬理作用に基づく眼圧の低下が0.08%群（1日1回）及び0.04%群（1日4回）にみられた。なお、休薬期間においては基剤群と同程度であった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルのC_{max}及びAUCは、投与量の増加に伴い増加する傾向を示した。反復点眼により血漿中ネタルスジルはやや蓄積する傾向が認められ、全身曝露に雌雄差は認められなかった。

以上の結果から、0.04%群（1日1回）及び0.08%群（1日1回）でみられた眼刺激性症状は散発的で増悪はなく、その程度は軽度であったことから、1日1回点眼における無毒性量は雌雄ともに0.08%と考えられた。一方で、0.04%群（1日4回）では重度の眼刺激性症状及び角膜フルオレセイン染色が高頻度で認められたことから、1日4回点眼における無毒性量は雌雄ともに0.04%未満と考えられた。

2.6.6.3.2　ウサギ28日間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-2

1群あたり雌雄各5匹のダッチベルテッドウサギの両眼に、1滴（約30 µL/eye）の0.02%、0.04%及び0.06% STN1013900点眼液あるいはその基剤を約8時間間隔で1日2回28日間反復点眼投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察（Draize法）、細隙灯顕微鏡検査（McDonald-Shadduck法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査〕、

血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、基剤群及び0.06%群については、投与期間終了後に14日間休薬する動物を雌雄各3匹設定し、回復性を検討した。ただし、回復期間中の前眼部刺激症状観察は、Draize法のみ行った。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、投与期間を通して分泌物が0.06%群に認められた。分泌物は0.04%群でもみられたが、一過性のものであり投与期間中に消失した。充血が0.04%及び0.06%群で散見されたが、一過性のものであり投与期間中に消失した。0.06%群に認められたこれらの変化は休薬期間中に回復した。

肉眼観察において、投与期間初期から軽度の結膜充血が0.04%及び0.06%群に認められたが、投与期間が進むにつれて発生頻度は減少した。また、軽度の分泌物が0.04%及び0.06%群で散見された。0.06%群に認められたこれらの変化は休薬期間中に回復した。

細隙灯顕微鏡検査において、すべての実薬群で軽度の眼刺激性症状が認められた。0.02%群ではDay 1に軽度の結膜充血及び軽度の結膜浮腫が1例、軽度の角膜混濁が3例に認められた。また、限局性角膜潰瘍が1例にみられ、この動物では軽度の角膜フルオレセイン染色が認められた。conこれらの変化はDay 7以降の観察ではすべて消失した。0.04%群では投与期間を通じて軽度の結膜充血、軽度の結膜浮腫及び軽度の分泌物が散見された。Day 14にのみ、点状角膜潰瘍が2例にみられ、これらの動物では軽度の角膜混濁及び軽度の角膜フルオレセイン染色が認められた。0.06%群では投与期間を通じて軽度の結膜充血、軽度の結膜浮腫及び軽度の分泌物が認められた。また、Day 1に軽度の限局性角膜混濁が1例にみられた。Day 14には点状角膜潰瘍又は線状角膜潰瘍が各1例にみられ、これらの動物では軽度の角膜混濁及び軽度の角膜フルオレセイン染色が認められた。

剖検において、涙腺の暗色化が0.06%群の4例に認められた。なお、全身性の所見は認められなかった。

病理組織学的検査において、軽度の角膜変性/びらんが0.04%群の1例、0.06%群の3例に認められた。なお、被験物質投与に関連した全身性の所見は認められなかった。休薬期間終了時、0.06%群のすべての動物に異常は認められなかった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルは0.04%群の1試料（Day 7の0.5時間：1.13 ng/mL）、0.06%群の2試料（Day 1の0.5時間：1.03 ng/mL、Day 1の16時間：11.8 ng/mL）でのみ定量された。いずれの試料においても、AR-13503は定量下限未満であった。

以上の結果から、0.02%群では、結膜充血が散見されたもののその程度は軽度であったこと、投与期間の初期に角膜混濁が認められたものの投与期間終了時までには回復したこと、休薬期間においてすべての動物の眼に異常が認められなかったこと、病理組織学的検査で被験物質投与に

関連した変化が認められなかったことから、無毒性量は雌雄ともに 0.02%（1 日 2 回）と考えられた。

2.6.6.3.3　　ウサギ 6 ヵ月間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-3

1 群あたり雌雄各 9 匹のダッチベルテッドウサギの両眼に、1 滴（約 35 µL/eye）の 0.01%、0.02%及び 0.04% STN1013900 点眼液あるいはその基剤を約 8 時間間隔で 1 日 2 回 3 ヵ月間（中間剖検群：雌雄各 4 例）または 6 ヵ月間（最終剖検群：雌雄各 5 例）反復点眼投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察（Draize 法）、細隙灯顕微鏡検査（McDonald-Shadduck 法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査〕、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、基剤群及び 0.04%群については、投与期間終了後に 14 日間休薬する動物を雌雄各 2 匹設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも被験物質投与に関連した死亡は認められなかった。

体重、摂餌量、倒像鏡検査、網膜電位図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量測定及び剖検において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、投与期間中すべての群で結膜発赤、強膜発赤及び分泌物が見られ、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。

肉眼観察において、投与開始後 3 ヵ月間、軽度の眼刺激性症状が認められた。Week 2 では 0.04%群に軽度の結膜充血、軽度の分泌物及び軽度の結膜浮腫が認められた。Week 6 では 0.02%群に軽度の結膜充血、0.04%群に軽度の結膜充血、中等度の結膜浮腫及び軽度から重度の分泌物が認められた。Week 11 では 0.02%群に軽度の結膜充血、0.04%群に軽度の結膜充血及び軽度の分泌物が認められた。これらの所見は Week15 以降（投与開始後 3 ヵ月以降から休薬期間中）の観察では認められなかった。

細隙灯顕微鏡検査において、投与開始後 3 ヵ月間、軽度の眼刺激性症状が認められた。Week 1 では 0.04%群に軽度の結膜充血及び軽度の結膜浮腫が認められた。Week 4 では 0.04%群に軽度の結膜充血及び軽度の分泌物が認められた。Week 13 でのみ軽度の角膜混濁及び角膜フルオレセイン染色が 0.01%群の 1 例、0.02%群の 2 例及び 0.04%群の 1 例に認められた。これらの所見は Week 26 に中等度の分泌物が 0.02%群の 1 例に認められたことを除き、Week 18 以降（投与開始後 4 ヵ月以降から休薬期間まで）では認められなかった。

眼圧測定において、0.01%、0.02%及び 0.04%群は基剤群に比べ、眼圧の有意な減少が認められた。なお、この変化は AR-13324 の薬理作用に基づく変化であり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられた。

Confidential

病理組織学的検査において、投与開始後 3 ヵ月時点（中間剖検時）では、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。投与開始後 6 ヵ月時点（最終剖検時）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が 0.04%群の 3 例にみられ、そのうち 1 例に限局性の角膜潰瘍が認められた。炎症性細胞浸潤のみを伴う角膜病変が 0.04%群の 1 例に認められた。なお、被験物質投与に関連した全身性の変化は認められなかった。休薬期間終了時、すべての動物で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルは 0.04%群の投与後 12 週の 2 回目点眼後 0.5 時間で 1 試料のみ定量 (2.09 ng/mL) され、その他の試料においてはいずれも定量下限未満 (<1.00 ng/mL) であった。血漿中 AR-13503 は、0.02%群の投与初日の 2 回目点眼後 0.5 及び 1 時間にそれぞれ 1 試料 (1.51 及び 1.05 ng/mL)、0.04%群の投与初日の 2 回目点眼後 0.5 及び 1 時間に 10 試料でのみ定量 (1.02-1.60 ng/mL) され、その他試料においてはいずれも定量下限未満 (<1.00 ng/mL) であった。

以上の結果から、0.04%群で角膜の病理組織学的変化が認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 0.02%（1 日 2 回）と考えられた。

2.6.6.3.4 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

1 群あたり雌雄各 5 匹のダッチベルテッドウサギの両眼に、1 滴（約 35 µL/eye）の 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 8 時間間隔で 1 日 2 回 3 ヵ月間反復点眼投与した。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。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察（Draize 法）細隙灯顕微鏡検査（McDonald-Shadduck 法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査〕、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、すべての群について、投与期間終了後に 14 日間休薬する動物を雌雄各 2 匹に設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、倒像鏡検査、網膜電位図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、試験期間中、すべての群で結膜発赤、強膜発赤が観察された。結膜発赤及び強膜発赤は基剤群で 1 例、PG324 点眼液群（1 日 1 回）で 14 例及び PG324 点眼液群（1 日 2 回）で 13 例に認められた。また、分泌物が基剤群で 1 例及び PG324 点眼液群（1 日 2 回）で 2 例に認められた。これらの所見は Day 92（休薬 2 日目）に結膜発赤が PG324 点眼液群（1 日 1 回）の 1 例に認められたことを除き、休薬期間中の観察では認められなかった。

肉眼観察において、投与開始後 3 ヵ月間、すべての群で軽度の眼刺激性症状が認められた。Day 1 では軽度の結膜充血が PG324 点眼液群（1 日 1 回）の 2 例及び PG324 点眼液群（1 日 2

回）の 13 例に認められた。Day 7 では軽度の結膜充血が基剤群の 1 例、PG324 点眼液群（1 日 1 回）の 1 例及び PG324 点眼液群（1 日 2 回）の 2 例に認められた。Day 90（投与開始後 3 ヵ月）では軽度から中等度の結膜充血が PG324 点眼液群（1 日 1 回）の 13 例に認められた。これらの所見は休薬期間中の観察では認められなかった。

細隙灯顕微鏡検査において、Week4 に軽度の分泌物が PG324 点眼液群（1 日 2 回）の 1 例で認められたことを除き、眼刺激性症状はみられなかった。

眼圧測定において、いくつかの測定時点で PG324 点眼液群（1 日 1 回）及び PG324 点眼液群（1 日 2 回）は基剤群に比べ、眼圧の有意な減少が認められた。なお、この変化は AR-13324 及びラタノプロストの薬理作用に基づく変化であり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられた。

以上の結果から、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ため、PG324 点眼液の無毒性量は雌雄ともに 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。

2.6.6.3.5 サル 7 日間反復点眼試験（1）

添付資料 4.2.3.2-5

1 群あたり雌雄各 3 匹のカニクイザルの両眼に、1 滴（約 30 μL/eye）の 0.01%、0.04%及び 0.12% STN1013900 点眼液あるいはその基剤を 3 時間間隔で 1 日 4 回 7 日間反復点眼投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察、細隙灯顕微鏡検査（Modified Hackett-McDonald 法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査〕、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、基剤群及び 0.12%群については、投与期間終了後に 7 日間休薬する動物を雌雄各 2 匹に設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、網膜電位図検査、剖検及び器官重量測定において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、結膜発赤又は強膜発赤が 0.04%群の 3 例及び 0.12%群の 10 例に、眼瞼下垂が 0.04%群の 2 例及び 0.12%群の 6 例に認められた。休薬期間終了時、0.12%群のすべての動物でこれらの所見は認められなかった。

肉眼観察において、投与期間中にすべての実薬群で結膜充血、結膜浮腫及び分泌物がみられた。その頻度及び程度は用量依存的であり、0.01%群では散発的であった。また、Day 7 において 0.01%群では軽度の結膜充血のみが認められた。休薬期間終了時、軽度の結膜充血のみが 0.12%群の 3 例に認められた。

細隙灯顕微鏡検査において、結膜充血、結膜浮腫、分泌物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 0.04%及び 0.12%群の全例に認められた。角膜混濁の程度と範囲は用量依存的であった。休薬期間終了時、角膜混濁が 0.12%群の 2 例に継続して認められた。

倒像鏡検査において、硝子体混濁、視神経乳頭の充血及び網膜浮腫を含む眼内の炎症に関連した所見が 0.04%及び 0.12%群のそれぞれ数例に認められた。休薬期間終了時、0.12%群のすべての動物でこれらの所見は認められなかった。

眼圧測定において、用量依存的な眼圧低下がみられた。休薬期間終了時、0.12%群で眼圧低下は継続してみられた。なお、この変化は AR-13324 の薬理作用に基づく変化であり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられた。

血液学的検査において、フィブリノーゲンの増加が 0.04%及び 0.12%群に、血液生化学的検査において、グロブリンの増加が 0.04%及び 0.12%群に認められた。休薬期間終了時、0.12%群でこれらの変化は回復しており、眼内の炎症に関連するものと考えられた。

病理組織学的検査において、結膜上皮の肥厚及び過形成、炎症性細胞の結膜下浸潤及び鼻涙管粘膜下浸潤の他、角膜上皮の肥厚及び過形成が 0.01%、0.04%及び 0.12%群に認められた。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 0.04%及び 0.12%群に認められた。これらの所見の程度及び頻度は結膜上皮の肥厚及び過形成を除き用量依存的であった。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。

トキシコキネティクス評価において、0.01%及び 0.04%群の点眼初日及び 7 日、並びに 0.12%群の点眼 7 日における血漿中ネタルスジルは、ほとんどの試料において定量下限未満 (<0.100 ng/mL) であったことから、薬物動態パラメータは算出できなかった。0.12%群の点眼初日において、血漿中ネタルスジルは雌雄ともに点眼後 0.5 時間で C_{max} 0.232 ng/mL を示し、全身曝露に雌雄差は認められなかった。

以上の結果から、0.01%群では結膜充血、結膜浮腫及び分泌物を含む眼刺激性症状や病理組織学的変化がみられたものの、その程度は軽微であり、眼刺激性症状の増悪は認められなかった。一方、0.04%及び 0.12%群ではこれらの所見に加え、病理組織学的検査において、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みられ、休薬期間終了時も 0.12%群で継続して認められた。よって、当試験における無毒性量は雌雄ともに 0.01%（1 日 4 回）と考えられた。

2.6.6.3.6　　サル 7 日間反復点眼試験（2）

添付資料 4.2.3.2-6

1 群あたり雌雄各 3 匹のカニクイザルの両眼に、1 滴（約 30 µL/eye）の 0.02%及び 0.04% STN1013900 点眼液あるいはその基剤を 8 時間間隔で 1 日 2 回、もしくは、0.04%及び 0.08% STN1013900 点眼液を 1 日 1 回 7 日間反復点眼投与した。

観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察、細隙灯顕微鏡検査（Modified Hackett-McDonald 法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定〕、剖検及び病理組織学的検査

を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、倒像鏡検査及び剖検において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、Day 4 以降に眼瞼下垂が 0.02%群（1 日 2 回）の 1 例、0.04%群（1 日 2 回）の 1 例及び 0.08%群（1 日 1 回）の 2 例に認められた。その他、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

肉眼観察において、Day 1 に結膜充血がすべての実薬群に認められた他、結膜浮腫及び分泌物が 0.02%群（1 日 2 回）及び 0.04%群（1 日 2 回）群にみられた。Day 1 に認められた眼刺激性症状は Day 7 では減弱がみられた。

細隙灯顕微鏡検査において、結膜充血及び結膜浮腫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。Day 1 に認められた眼刺激性症状は Day 7 では減弱がみられた。

眼圧測定において、眼圧低下がすべての実薬群でみられ、0.02%群（1 日 2 回）は 0.04%群（1 日 1 回）と比べ、0.04%群（1 日 2 回）は 0.08%群（1 日 1 回）と比べ、より大きな眼圧低下がみられた。なお、この変化は AR-13324 の薬理作用に基づく変化であり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられた。

病理組織学的検査において、角膜上皮の肥厚及び過形成が 0.02%群（1 日 2 回）の 5 例、0.04%群（1 日 2 回）、0.04%群（1 日 1 回）及び 0.08%群（1 日 1 回）の全例に認められた。これらの所見の程度は 0.02%群（1 日 2 回）及び 0.04%群（1 日 1 回）はごく軽度、0.04%群（1 日 2 回）及び 0.08%群（1 日 1 回）はごく軽度から軽度であった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルは 0.08%群（1 日 1 回）でのみ定量され、その他の群の試料は定量下限未満 (<0.100 ng/mL) であった。0.08%群（1 日 1 回）で定量された血漿中ネタルスジル濃度はいずれも 0.2 ng/mL 以下であった。

以上の結果から、すべての実薬群で結膜充血及び結膜浮腫を含む前眼部刺激症状、角膜上皮の肥厚及び過形成を含む病理組織学的変化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ことより、当試験における無毒性量は雌雄ともに 1 日 2 回点眼は 0.04%、1 日 1 回点眼は 0.08%と考えられた。

2.6.6.3.7　　サル 1 ヵ月間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-7

1 群あたり雌雄各 3 匹のカニクイザルの両眼に、1 滴（約 30 µL/eye）の 0.02%、0.04%及び 0.06% STN1013900 点眼液あるいはその基剤を 8 時間間隔で 1 日 2 回 1 ヵ月間反復点眼投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔細隙灯顕微鏡検査 (Modified Hackett-

McDonald 法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査〕、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、基剤群及び 0.06%群については、投与期間終了後に 14 日間休薬する動物を雌雄各 2 匹に設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、倒像鏡検査、網膜電位図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量測定において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、眼周囲の発赤が 0.04%及び 0.06%群の各 1 例に、眼周囲の浮腫及び眼瞼下垂が 0.06%群に散見されたものの、一過性の変化であり、投与期間終了時には認められなかった。

細隙灯顕微鏡検査において、軽度の角膜混濁が 0.04%群の 3 例及び 0.06%群の全例に認められた。0.04%群では Day 14 以降、0.06%群では Day 7 以降にみられ、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。休薬期間終了時、すべての動物の眼に異常は認められなかった。

眼圧測定において、用量依存的な眼圧低下がみられた。休薬期間終了時、0.06%群の眼圧は投与前と同程度まで戻っていた。なお、この変化は AR-13324 の薬理作用に基づく変化であり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられた。

病理組織学的検査において、ごく軽度の角膜上皮の過形成が 0.06%群の 2 例に認められた。ごく軽度から中等度の結膜のリンパ球浸潤が基剤群を含めたすべての群に認められ、実薬群では基剤群に比べその程度が強かった。ごく軽度から軽度の涙腺のリンパ球浸潤がすべての群に認められ、その程度は用量依存的な傾向にあった。休薬期間終了時、結膜のリンパ球浸潤のみが基剤群と 0.06%群に認められ、0.06%群では基剤群に比べ程度がわずかに強かった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジル及び AR-13503 はいずれの試料においても定量下限未満 (<1.00 ng/mL) であった。

以上の結果より、角膜混濁が 0.04%及び 0.06%群で投与期間を通じて認められたことから、当試験における無毒性量は雌雄ともに 0.02%（1 日 2 回）と考えられた。

2.6.6.3.8　　サル 9 ヵ月間反復点眼試験

添付資料 4.2.3.2-8

1 群あたり雌雄各 8 匹のカニクイザルの両眼に、1 滴（約 35 µL/eye）の 0.01%、0.02%及び 0.04% STN1013900 点眼液あるいはその基剤を 8 時間間隔で 1 日 2 回 3 ヵ月間（中間剖検群：雌雄各 4 匹）または 9 ヵ月間（最終剖検群：雌雄各 4 匹）反復点眼投与した。なお、0.01%群は中間剖検群及び最終剖検群ともに雌雄各 3 匹とした。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査〔肉眼観察、細隙灯顕微鏡検査（Modified Hackett-McDonald 法を含む）、倒像鏡検査、眼圧測定、網膜電位図検査〕、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病

理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、基剤群、0.02%及び0.04%群については、投与期間終了後に1ヵ月間休薬する動物を雌雄各2匹に設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量、倒像鏡検査、網膜電位図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、眼瞼発赤が0.04%群に、閉目が0.02%群及び0.04%群に散見された。これらの変化は一過性のものであり、0.04%群の1例を除き、Week 8以降には認められなかった。投与期間終了時、すべての動物に異常は認められなかった。

肉眼観察において、投与期間初期にのみ、軽度の眼刺激性症状がすべての群に認められた。Week 1では、結膜充血、結膜浮腫及び分泌物が0.01%群の1例、0.02%群の8例及び0.04%群の15例に認められた。なお、Day 2/3において、2回目の点眼の1時間後に実施された細隙灯顕微鏡検査でこれらの変化は認められず、一過性のものであることが示唆された。Week 4では、結膜充血が基剤群の1例に認められたことを除き、すべての動物の眼に異常は認められなかった。Week 8以降は休薬期間を含め、実薬群のすべての動物の眼に異常はみられなかった。

細隙灯顕微鏡検査において、軽度の角膜混濁が0.02%及び0.04%群に認められた。0.02%群ではWeek 1に2例でみられ、そのうち1例はWeek 26までみられたものの、Week 39には回復した。0.04%群ではWeek 1に5例、Week 13に8例、Week 26に4例でみられたものの、Week 39には1例を除き回復し、その1例も休薬期間終了時には回復が認められた。

眼圧測定において、薬理作用に起因する眼圧低下が実薬群でみられ、その作用は0.04%群で最大であった。なお、この変化はAR-13324の薬理作用に基づく変化であり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられた。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジル及びAR-13503はいずれの試料においても定量下限未満 (<1.00 ng/mL) であった。

以上の結果から、すべての実薬群で結膜充血、浮腫及び分泌物が認められたもののその変化は軽微で増悪が認められなかったこと、0.02%及び0.04%群で認められた角膜混濁もその大半は投与期間中に消失したこと、病理組織学的検査で角膜混濁に関連する変化及びその他の被験物質に関連する器質的変化が認められなかったことから、当試験での無毒性量は雌雄ともに0.04%（1日2回）と考えられた。

2.6.6.3.9　　ラット7日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-9

1群あたり雌雄各10匹の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。観察及び検査として、一般状態観察、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、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために TK サテライト群を設定し、血漿中薬物濃度測定を実施した。また、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雌雄各 5 匹設定し、回復性を検討した。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。また、体重、摂餌量及び眼科学的検査において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察においては、皮膚発赤、立毛、尾の擦過傷及び投与部位の異常（痂、黒化、腫脹）が 10 mg/kg/day 群で認められた。10 mg/kg/day 群で認められた投与部位の異常は休薬期間終了時に継続していたが、その他すべての所見は回復がみられた。

血液学的検査において、平均赤血球容積、平均血色素量、血小板及び網状赤血球数の増加が 3 及び 10 mg/kg/day 群で認められた。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 10 mg/kg/day 群で認められた。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、総ビリルビンの増加が 3 及び 10 mg/kg/day 群で認められた。塩素及びグロブリンの増加、総タンパク、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比の減少が 10 mg/kg/day 群で認められた。また、アルカリフォスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼの減少が 3 及び 10 mg/kg/day 群で認められたが、明らかな毒性を示すものではなかった。

器官重量測定において、脳、心臓、肝臓及び脾臓の重量増加が 10 mg/kg/day 群で認められた。これらの変化について、心臓、肝臓及び脾臓の重量増加は休薬期間終了時にも認められた。一方で、脳は休薬期間終了時に減少が認められた。

病理組織学的検査において、肝臓における髄外造血の発生頻度増加が 3 及び 10 mg/kg/day 群の雄に認められ、貧血との関連が示唆された。なお、投与部位の変化（色素沈着、アカントーシス、痂疲形成、慢性活動性炎症、巣状壊死ないし巣状性上皮びらん）が 3 及び 10 mg/kg/day 群に認められたものの、その程度はごく軽度から軽度であり、毒性学的意義は低いものと考えられた。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルの C_{max} 及び AUC は投与量に応じて増加し、反復投与における明らかな変動は認められなかった。また、薬物動態パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった。

以上の結果から、3 及び 10 mg/kg/day 群で貧血との関連が示唆される血液学的所見及び肝臓の病理組織学的変化が認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と考えられた。なお、1 mg/kg/day 群で臨床検査値の変化が認められたものの、媒体対照群との差はわずかであり、背景値の範囲内であることから、明らかな毒性を示すものではないと考えられた。

Confidential

2.6.6.3.10　　ラット 28 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-10

1 群あたり雌雄各 10 匹の SD ラットに、AR-13324 を 0、0.1、0.3 及び 1 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 28 日間反復静脈内投与した。観察及び検査として、一般状態観察、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、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジル及び AR-13503 の全身的曝露を評価するために TK サテライト群を設定し、血漿中薬物濃度測定を実施した。また、0 及び 1 mg/kg/day 群については、投与期間終了後に 14 日間休薬する動物を雌雄各 5 匹設定し、回復性を検討した。なお、調製物分析の結果、いくつかの調製物は設定濃度を下回っており、実際の投与用量は 0.1 mg/kg/day 群で 0.06-0.10 mg/kg/day、0.3 mg/kg/day 群で 0.23-0.30 mg/kg/day、1 mg/kg/day 群で 0.84-1.06 mg/kg/day であった。

その結果、媒体対照群を含むいくつかの投与群で死亡例が発生したが、投与用量と死亡率に相関は認められなかった。また、すべての死亡例は投与前に異常を示しておらず、投与中または投与直後に死亡したため、投与操作に起因した死亡であると考えられた。

一般状態観察、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、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

トキシコキネティクス評価において、投与量の増加に伴い、血漿中ネタルスジルの C_{max} 及び AUC の増加が認められた。反復投与による血漿中ネタルスジルの蓄積は認めらなかった。いずれの投与量においても血漿中ネタルスジル濃度に雌雄差は認められなかった。血漿中 AR-13503 は、0.3 及び 1 mg/kg/day 群で定量され、反復投与による蓄積は認められず、また雌雄差も認められなかった。

以上の結果から、当試験における無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.84-1.06 mg/kg/day）と考えられた。

2.6.6.3.11　　イヌ 7 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-11

1 群あたり雌雄各 3 匹のビーグル犬に、AR-13324 を 0、1、12.5 及び 25 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 7 日間反復静脈内投与した。観察及び検査として、一般状態観察、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、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジルの全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。

その結果、Day 3 において、12.5 及び 25 mg/kg/day 群の雄は体温の上昇、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。

剖検において、肺、投与部位、副腎、心臓及び胆嚢に肉眼的所見がみられた。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。

12.5 及び 25 mg/kg/day の忍容性がないことが明らかとなったため、これらの群は Day 3 以降（雌）又は Day 4 以降（雄）の投与用量を 3 及び 6 mg/kg/day にそれぞれ低減した（雌は雄の 1 日遅れで投与が開始されたため、Day 3 から投与用量が低減された）。しかしながら、低減後も 12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群のほとんどの動物では重度の投与部位の腫脹が認められたため、当該動物は投与を中止した。結果として、12.5/3 mg/kg/day 群は雌 2 例のみが試験期間を通じて 1 日 1 回の反復投与が実施された（Day 1-2：12.5 mg/kg/day、Day 3-7：3 mg/kg/day）。25/6 mg/kg/day 群は Day 3 で雌 1 例に 1 日のみ投与されたことを除き、低減後の投与が実施された動物はいなかった。

一般状態観察において、1 mg/kg/day 群では Day 3 から眼の発赤、皮膚の発赤（耳、前肢及び腹部）及び投与部位の腫脹がみられた。Day 7 及び Day 8 において、1 mg/kg/day 群の雌ではこれらの症状は回復し、雄では投与部位の腫脹がみられたが、眼の発赤及び皮膚の発赤は回復した。12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群の生存動物では、Day 8 において、投与部位の腫脹及び糞便の異常が認められた。

体重において、12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群の雌は媒体対照群と比べて著しい体重増加量の低下がみられ、12.5/3 mg/kg/day 群の雄の生存例でも顕著な体重低下が認められた。

摂餌量において、12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群の雌では、摂餌量の著しい低下が Day 1 から Day 3 に認められたが、用量の低減後は媒体対照群と同程度の摂餌量であった。12.5/3 mg/kg/day 群の雄の生存例では、ごく軽度かつ散発的な摂餌量の減少がみられたものの、被験物質投与との関連は明らかではなかった。

眼科学的検査において、Day 7 に白内障（左眼）が 25/6 mg/kg/day 群の雌の 1 例に認められた。

血液学的検査において、Day 8 に赤血球の軽度な減少が 12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群の雌に認められた。

血液生化学的検査において、Day 4 及び Day 5 に 12.5/3 mg/kg/day 群の雄の生存例でごく軽度のアラニンアミノトランスフェラーゼの増加が、25/6 mg/kg/day 群の雌でごく軽度のカリウムの減少が認められた。Day 8 に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

病理組織学的検査において、投与部位の変化が媒体対照群を含めたすべての群に認められた。なお、1 mg/kg/day 群でみられた投与部位の変化の程度は軽度であった。心臓、腎臓及び胆嚢の変化が 25/6 mg/kg/day 群の雌の生存例に認められた。また、ごくわずかな卵円形細胞の過形成が 1 mg/kg/day 群の雄の 2 例にみられた。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルの C_{max} 及び AUC は投与量に応じて増加し、反復投与における明らかな変動は認められなかった。また、薬物動態パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった。なお、12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群には安楽殺された動物が多く、限られた試料での評価となった。

以上の結果から、12.5 及び 25 mg/kg/day の忍容性は認められなかった。1 mg/kg/day 群で認められた所見の多くはその程度が軽度であった。また、1 mg/kg/day 群の雄の 2 例で卵円形細胞の過形成が認められたものの、肝細胞の壊死、肝酵素の上昇などの肝毒性を伴う所見ではなく、12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day の生存動物では当該変化が認められなかったことから、明らかな毒性を示すものではないと考えられた。したがって、当試験における無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と考えられた。

2.6.6.3.12　　イヌ 28 日間反復静脈内投与試験

添付資料 4.2.3.2-12

1 群あたり雌雄各 3 匹のビーグル犬に、AR-13324 を 0、0.1、0.3 及び 1 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 28 日間反復静脈内投与した。観察及び検査として、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、眼圧測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ネタルスジル及び AR-13503 の全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。また、0 及び 1 mg/kg/day 群は、投与期間終了後に 14 日間休薬する動物を雌雄各 2 匹に設定し、回復性を検討した。なお、調製物分析の結果、調製物の濃度が設定値を下回っており、実際の投与用量は 0.1 mg/kg/day 群で 0.06-0.07 mg/kg/day、0.3 mg/kg/day 群で 0.21-0.26 mg/kg/day、1 mg/kg/day 群で 0.76-0.96 mg/kg/day であった。

その結果、いずれの動物にも死亡は認められなかった。体重、摂餌量、眼科学的検査、眼圧測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定において被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察において、投与部位の腫脹が 0.1、0.3 及び 1 mg/kg/day 群にみられ、重症度及び発生率の用量依存的な増加がみられた。休薬期間終了時、投与部位の腫脹は 1 mg/kg/day 群のすべての動物で回復した。病理組織学的検査において、投与部位の変化がすべての群に認められたものの、媒体対照群と実薬群に有意な差はみられなかった。したがって、投与部位に認められた変化は、投与操作に起因するものと考えられた。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルの C_{max} 及び AUC は投与量の増加に伴い増加し、雌雄差は認められなかった。反復投与により血漿中ネタルスジルはやや蓄積する傾向が認められた。血漿中 AR-13503 は、1 mg/kg/day 群でのみ定量された。

以上の結果から、当試験における無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.76-0.96 mg/kg/day）と考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

添付資料 4.2.3.3.1-1

ネズミチフス菌株の TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2*uvr*A 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*uvr*A 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。

2.6.6.4.2 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。

2.6.6.4.3 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。

2.6.6.5 がん原性試験

下記に記載した根拠により STN1013900 点眼液にがん原性に関する懸念はないと考えられたため、がん原性試験を実施しなかった。

- ウサギ（6 ヵ月間）及びサル（9 ヵ月間）の反復投与毒性試験において、腫瘍性病変がみられなかった。
- 実施された遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であり、遺伝毒性懸念は認められなかった。
- 非臨床薬物動態試験から、局所的な組織反応またはその他の病態生理学的反応に繋がる可能性のある未変化体や代謝物の長期蓄積は示されなかった。
- 本剤の臨床用法用量でのネタルスジル及び活性代謝物である AR-13503 のヒト血漿中濃度はいずれも 0.01 ng/mL 未満であった。この濃度をモル濃度に換算するとそれぞれ 0.02 nmol/L 未満及び 0.03 nmol/L 未満である。これらの濃度は、ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値のそれぞれ 1/60 未満及び 1/86 未満 (AR-13324) 、1/4 未満及び 1/4 未満 (AR-13503) 〔ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値は 1.19 nmol/L 及び 1.72 nmol/L (AR-13324) 、0.12 nmol/L 及び 0.13 nmol/L (AR-13503) 〕である。また、AR-13324 の NET 阻害作用に対する IC_{50} 値の 1/57,500 未満〔IC_{50} は AR-13324（1.15 μmol/L）〕である。よって、ネタルスジル及び活性代謝物である AR-13503 が全身で活性を示す懸念はないと考えられた。（添付資料 4.2.1.1-1、4.2.1.1-4）

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 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

1 群あたり雌雄各 20 例の SD ラットを用い、AR-13324 を 0、0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg/day の用量で、雄性には交配前 2 週間、交配期間及び剖検前日まで、また雌性には交配前 2 週間、交配期間及び着床日まで 1 日 1 回反復静脈内投与した。雄性については投与開始後 45/46 日に剖検し、雌性については妊娠 15 日に帝王切開し、受胎能及び初期胚発生への影響を検討した。

その結果、1 mg/kg/day 群の雌では一般状態、体重、増体重、摂餌量及び剖検に異常は認められず、雄では一般状態観察及び剖検において投与部位の腫脹が認められた他、体重増加抑制及び体重低値が認められた。0.3 mg/kg/day 以下の群では雌雄動物ともに、一般状態、体重、増体重、摂餌量及び剖検に異常は認められなかった。生殖機能については、性周期、臓器重量（精巣、精巣上体）、交尾率・間隔、受胎率、黄体数、着床数、着床率及び着床前胚損失率に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、胚生存率及び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。

Confidential

以上の結果から、当試験条件下における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。

2.6.6.6.2 ラットにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験

添付資料 4.2.3.5.2-1

1 群あたり 7 匹（基剤群 5 匹）の妊娠 SD ラットに、AR-13324 を 0、0.3、3 及び 10 mg/kg/day の用量で妊娠 6～17 日に 1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 20 日に帝王切開して胚・胎児発生への影響を検討した。なお、調製物分析の結果、いくつかの調製物は設定濃度を下回っていたことが判明し、実際の投与用量は 0.3 mg/kg/day 群で 0.09 mg/kg/day 及び 3 mg/kg/day 群で 2.4 mg/kg/day であった。

母動物に及ぼす影響として、一般状態観察において、妊娠 13 日以降に流産の兆候（赤色の膣分泌物）を示す動物が、0.3 mg/kg/day 群で 1 例、3 mg/kg/day 群で 3 例及び 10 mg/kg/day 群で 7 例に認められた。そのうち安楽殺が必要となったのは、0.3、3 及び 10 mg/kg/day 群でそれぞれ 1、1 及び 5 例であった。また、前肢脱毛、体重減少及び摂餌量減少が 10 mg/kg/day 群でみられた。いずれの用量においても、剖検、妊娠率に被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

胚・胎児に及ぼす影響として、用量依存的な早期吸収胚の増加がみられ、平均早期吸収胚数は 0.3 mg/kg/day 群で 1、3 mg/kg/day 群で 3 及び 10 mg/kg/day 群で 13 であった。生存胎児率の減少もみられ、平均生存胎児率は 0 mg/kg/day 群で 96.8%、0.3 mg/kg/day 群で 80.9%、3 mg/kg/day 群で 61.3%及び 10 mg/kg/day 群で 0%であった。また、子宮重量の減少が 10 mg/kg/day 群でみられた。胎児の肉眼観察において、0.3 及び 3 mg/kg/day 群で異常は認められず、10 mg/kg/day 群は生存胎児がいなかったため、評価されなかった。いずれの用量においても、黄体数及び着床数に被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

以上の結果から、3 mg/kg/day（実際の投与用量：2.4 mg/kg/day）が本試験の高用量として妥当と考えられた。

2.6.6.6.3 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

1 群あたり 24 匹の妊娠 SD ラットに、AR-13324 を 0、0.03、0.1、0.3 及び 3 mg/kg/day の用量で妊娠 6～17 日に 1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 20 日に帝王切開して胚・胎児発生への影響を検討した。さらに、ネタルスジル及び AR-13503 の全身的曝露を評価するために TK サテライト群を設定し、血漿中薬物濃度測定を実施した。なお、調製物分析の結果、いくつかの調製物は設定濃度を下回っており、実際の投与用量は 0.03 mg/kg/day 群で 0.022 mg/kg/day 及び 0.1 mg/kg/day 群で 0.08 mg/kg/day であった。

母動物に及ぼす影響として、一般状態観察において、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 群でそれぞれ 9 及び 11 例に認められ、0.3 mg/kg/day 群の 2 例が安楽殺された。安楽殺された 0.3 mg/kg/day 群の 2 例では、活動量低下、円背位、眼及び耳の蒼白化、体表温度の低下及び立毛等が認められた。器官重量測定において、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。剖検において、臓器の蒼白化や胃内の赤褐色物質等が 0.1 mg/kg/day 群の 1 例、0.3 mg/kg/day 群の 2 例及び 3 mg/kg/day 群の 3 例にみられ、子宮内出血又は自然流産に関連するものと考えられた。また、いずれの用量においても、摂餌量、妊娠率に被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

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。また、いずれの用量においても被験物質投与に関連した黄体数、着床数及び生存胎児の外観、内臓及び骨格の異常はみられなかった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルはすべての実薬群で定量され、C_{max} 及び AUC は投与量に応じて増加し、その増加量は用量比以上であった。また、反復投与による明らかな変動は認められなかった。AR-13503 は 0.3 及び 3 mg/kg/day 群でのみ定量され、反復投与による曝露量の増加がみられた。

以上の結果より、当試験における母動物及び胚・胎児に対する無毒性量はいずれも 0.1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.08 mg/kg/day）と考えられた。

2.6.6.6.4　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験（1）

添付資料 4.2.3.5.2-3

1 群あたり 7 匹の妊娠ニュージーランドホワイトウサギに、AR-13324 を 0、0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg/day の用量で妊娠 6～19 日に 1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 29 日に帝王切開して胚・胎児発生への影響を検討した。なお、調製物分析の結果、いくつかの調製物は設定濃度を下回っており、実際の投与用量は 0.1 mg/kg/day 群で 0.08 mg/kg/day、0.3 mg/kg/day 群で 0.24 mg/kg/day 及び 1 mg/kg/day 群で 0.8 mg/kg/day であった。

母動物に及ぼす影響として、器官重量測定において、子宮重量の軽微な減少が 3 mg/kg/day 群でみられた。その他の群において、一般状態、体重、摂餌量、剖検に被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

胚・胎児に及ぼす影響として、3 mg/kg/day 群で生存胎児数の低下、生存胎児率の低下及び胎児の体重低下がみられたが、いずれの変化も軽微なものであった。いずれの用量においても、被験物質投与に関連した黄体数、着床数、早期吸収胚数、後期吸収胚数、生存胎児数、着床前胚損失率及び生存胎児の外観の異常はみられなかった。

Confidential

以上の結果から、3 mg/kg/day 群で母動物及び胚・胎児に影響がみられたものの、その程度は軽微であったことから、3 mg/kg/day までの忍容性が示された。

2.6.6.6.5　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験（2）

添付資料 4.2.3.5.2-4

1 群あたり 7 匹の妊娠ニュージーランドホワイトウサギに、AR-13324 を 5 及び 9 mg/kg/day の用量で妊娠 6～19 日に 1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 29 日に帝王切開して胚・胎児発生への影響を検討した。

母動物に及ぼす影響として、一般状態観察において、流産の兆候（ケージシート上の赤色物及び赤い染み）を示す動物が 5 mg/kg/day 群の 2 例に認められた。生存胎仔数の減少に起因する子宮重量の低下及び体重増加抑制が 5 及び 9 mg/kg/day 群でみられた。いずれの用量においても、摂餌量、妊娠率に被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

胚・胎児に及ぼす影響として、早期吸収胚数の増加、着床後胚損失数の増加及び生存胎児数の減少が 5 及び 9 mg/kg/day 群でみられ、その程度は用量依存的であった。いずれの用量においても、被験物質投与に関連した黄体数、着床数及び着床前胚損失、後期吸収胚数、死亡胎児数及び生存胎児の外観の異常はみられなかった。

以上の結果から、5 mg/kg/day では生存胎児数の減少がみられたものの、評価に十分な胎児数は得られると考えられたため、5 mg/kg/day が本試験の高用量として妥当と考えられた。

2.6.6.6.6　　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

1 群あたり 19 匹の妊娠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 の用量で妊娠 6～19 日に 1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 29 日に帝王切開して胚・胎児発生への影響を検討した。さらに、ネタルスジル及び AR-13503 の全身的曝露を評価するために TK サテライト群を設定し、血漿中薬物濃度測定を実施した。

母動物に及ぼす影響として、体重測定において、体重増加抑制傾向が 5 mg/kg/day 群でみられ、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。いずれの用量においても、一般状態観察及び摂餌量で被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

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 5 mg/kg/day 群でみられた。いずれの用量においても被験物質投与に関連した黄体数、着床数、後期吸収胚数、死亡胎児数、着床前胚損失率、生存胎児の外観、内臓及び骨格の異常は認められなかった。

トキシコキネティクス評価において、血漿中ネタルスジルはすべての実薬群で定量され、C_{max}及びAUCは投与量に応じて増加し、反復投与による明らかな変動は認められなかった。AR-13503はすべての実薬群で定量され、C_{max}及びAUCは投与量に応じて増加し、反復投与によるC_{max}の明らかな変動は認められず、AUCは減少傾向がみられた。

以上の結果より、当試験における母動物及び胚・胎児に対する無毒性量はいずれも3 mg/kg/dayと考えられた。

2.6.6.6.7 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

各群20例の妊娠SDラットに、AR-13324を0、0.03、0.1及び0.3 mg/kg/dayの用量で、妊娠6日目から出産後20日目まで、1日1回反復静脈内投与し、妊娠、授乳母動物、胎児及び出生児の発達への影響について評価した。

F_0母動物への影響として、いずれの用量においても死亡例は認められなかった。一般状態観察、哺乳行動、体重、増体重、摂餌量、妊娠期間、出産率、着床痕数及び剖検で被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

F_1出生児への影響として、いずれの用量においても、出生時の外表所見、出生数、生存出生児数、出生率、出生時生存率、性比、生後4日目生存児数、生後4日目生存率、離乳時生存児数、離乳率、一般状態、体重、増体重、身体的発達、機能的発達、剖検所見、外性器の形態学的分化、行動、学習、交尾能力、リッターデータ及び胚児に被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

以上の結果より、当試験におけるF_0母動物、F_1出生児の出生前後の発達に対する無毒性量は0.3 mg/kg/dayと考えられた。

2.6.6.7 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。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 光安全性

光安全性に関する初期評価として、本剤の有効成分である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。最大吸収波長におけるモル吸光係数を表 2.6.6.8-1に示した。

表 2.6.6.8-1. 光安全性評価概要

評価項目		モル吸光係数最大値	参考文献
光毒性 初期評価	吸光スペクトル測定 (190-700 nm)	AR-13324： 246 nm において 64291 L/mol·cm 288 nm において 10914 L/mol·cm	(1)

AR-13324 は光安全性評価が必要とされる閾値である 1000 L/mol·cm を上回ったことから、さらなる *in vitro* 光毒性評価を行う必要があると判断された。

2.6.6.8.1.1 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（1）

添付資料 4.2.3.7.7-1

AR-13324 の *in vitro* 光毒性を評価するため、UVA 照射下における Balb/c 3T3 マウス線維芽細胞のニュートラルレッドの取り込みを評価した。UVA 非照射下及び照射下のいずれの場合も AR-13324 として 0.490～30 μg/mL の濃度で処置し、Mean Photo Effect (MPE) 及び Photo-Irritation-Factor (PIF) を算出した。その結果を表 2.6.6.8-2 に示した。

表 2.6.6.8-2. Mean Photo Effect 及び Photo-Irritation-Factor

名称	MPE[1]			PIF[2]		
	用量設定試験	測定（1 回目）	測定（2 回目）	用量設定試験	測定（1 回目）	測定（2 回目）
AR-13324	0.068	-0.010	-0.009	1.09	1.15	1.41

1：MPE < 0.1＝光毒性なし。0.1 ≤ MPE < 0.150＝光毒性の可能性あり。MPE ≥ 0.150＝光毒性あり。

2：PIF < 2.0＝光毒性なし。2.0 ≤ PIF < 5.0＝光毒性の可能性あり。PIF ≥ 5.0＝光毒性あり。

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。

以上の結果から、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。

2.6.6.8.1.2 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（2）

添付資料 4.2.3.7.7-2

UVB への曝露を増加させた条件における AR-13324 及びその活性代謝物である AR-13503 の、*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 マウス線維芽細胞のニュートラルレッドの取り込みを評価した。AR-13324 については、UVA 及び UVB 非照射下及び照射下いずれの場合も 4.64～1000 μg/mL の濃度で処置した。AR-13503 については、UVA 及び

UVB 非照射下は 68.1～1000 μg/mL、UVA 及び UVB 照射下は 6.81～100 μg/mL の濃度で処置した。各被験物質について、細胞生存率が 50%に減少する濃度 (EC_{50}) を基に Photo-Irritation-Factor (PIF) を算出した。その結果を表 2.6.6.8-3 に示した。

表 2.6.6.8-3. EC_{50} 及び Photo-Irritation-Factor

名称	EC_{50} (UVA 及び UVB 非照射下)	EC_{50} (UVA 及び UVB 照射下)	PIF[1]
AR-13324	601.7 μg/mL	189.8 μg/mL	3.2
AR-13503	> 1000 μg/mL	79.1 μg/mL	> 12.65

1：PIF < 2.0＝光毒性なし。2.0 ≤ PIF < 5.0＝光毒性の可能性あり。PIF ≥ 5.0＝光毒性あり。

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。

以上の結果から、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。

2.6.6.8.2 不純物の変異原性に関する評価

添付資料 4.2.3.7.7-3

STN1013900 点眼液及び AR-13324 に不純物として含まれる可能性のある化合物について ICH M7 に基づく評価を実施した。評価においては、文献及びデータベース調査を実施し、信用しうるがん原性又は遺伝毒性に関する情報があれば、それに基づきクラス分類を実施した。がん原性又は遺伝毒性に関する情報がない化合物については、コンピューターで細菌を用いる変異原性試験の結果を予測する (Q)SAR 法による評価を実施した。コンピューターによる (Q)SAR 予測では、一つ目は専門的経験に基づくルールベースの方法として[redacted]、二つ目は統計ベースの方法として[redacted]を使用した。それらの二つの結果をもとに総合的に判断し、クラス分類した。その結果を、表 2.6.6.8.2-1 に示した。

Confidential

表 2.6.6.8.2-1. 原薬及び製剤中の潜在的な不純物の変異原性評価

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	AR-13503 (S) AR-13534 (R) [redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス 5
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]

Confidential

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]

Confidential

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	[redacted]	*in vitro* 変異原性試験で陽性の結果が報告されている。一方で、[redacted]	NA	NA	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	–	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]

Confidential

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	AR-13323	エナンチオマーであるネタルスジルについて、Ames 試験で陰性が確認されている。	NA	NA	クラス 5
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]

Confidential

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]

Confidential

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	[redacted]	－	[redacted]	[redacted]	クラス[redacted]
[redacted]	なし	IARC でグループ[redacted]、NTP で[redacted]に分類されている。	NA	NA	クラス[redacted] 許容摂取量：[redacted]μg/day

Confidential

名称	別称	文献及びデータベース検索	[redacted]	[redacted]	変異原性評価クラス分類
[redacted]	なし	IARC でグループ[redacted]に分類されている。また、NTP では、[redacted]に分類されている。なお、本物質は[redacted]があると報告されている[redacted]。	NA	NA	クラス[redacted] 許容摂取量： [redacted] µg/day
[redacted]	なし	Ames 試験の陽性結果が報告されている。	NA	NA	クラス[redacted] 許容摂取量： [redacted] µg/day

ー: がん原性及び変異原性に関する報告なし、NA: 適用外

Confidential

[redacted] は *in vitro* 変異原性試験で陽性の結果が報告されていた。一方で、[redacted] ため、クラス[redacted] に分類した。

[redacted] は [redacted] であることからクラス[redacted] に分類した。

[redacted] は IARC でグループ[redacted]、NTP で[redacted] に分類されていたため、クラス[redacted] に分類した。

[redacted] は、IARC でグループ[redacted] に、NTP では、[redacted] に分類されていた。また、[redacted] があると報告されてい[redacted]。よって、クラス[redacted] に分類した。

[redacted] は、Ames 試験における陽性の結果が報告されていた。[redacted] を考慮し、クラス[redacted] ではなくクラス[redacted] に分類した。

クラス[redacted] に分類された[redacted]、[redacted] 及び[redacted] について、*in vivo* 変異原性試験における無影響量及びその結果に基づく PDE 値が報告されている。ICH M7 (R1) では「*in vitro* 及び *in vivo* での変異原性に対して閾値が提案されている DNA 反応性化学物質の例として、メタンスルホン酸エチルがある。閾値が確立されているような場合は直線外挿ではなく、不確実係数を用いた PDE 計算の方が適切である。」とされており、これに従い、それぞれ以下の PDE 値による管理とする。

- [redacted] : [redacted] µg/day
- [redacted] : [redacted] µg/day
- [redacted] : [redacted] µg/day

[redacted] は、[redacted] ため、クラス[redacted] に分類した。

[redacted] は [redacted] を示したことからクラス[redacted] に分類した。

Confidential

[redacted]は、[redacted]であることから、クラス[redacted]に分類した。

[redacted]は、[redacted]と判断しクラス[redacted]に分類した。

[redacted]は、[redacted]と判断しクラス[redacted]に分類した。

その他の化合物については、二つのソフトウェアで警告構造がないことが示されたためクラス[redacted]に分類した。

2.6.6.9 考察及び結論

(1) 眼局所への影響

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、ウサギを用いた 6 ヵ月までの反復点眼投与試験及びサルを用いた 9 ヵ月までの反復点眼投与試験を実施した。STN1013900 点眼液の濃度は 0.01%から 0.12%まで、投与回数は 1 日 1 回から 1 日 4 回までの範囲で評価された。また、PG324 点眼液（0.02%ネタルスジル/0.005%ラタノプロスト）については、ウサギを用いた 3 ヵ月間反復点眼投与試験において、1 日 1 回及び 1 日 2 回で評価された。

ウサギを用いた試験では、結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状がみられ、その程度及び頻度は用量（濃度/投与回数）依存的な傾向にあった。臨床適用濃度である 0.02%群（1 日 2 回）（臨床の用法は 1 日 1 回）でみられた眼刺激性症状はほとんどのものが軽度であった。眼刺激性症状は投与期間初期から生じた後、反復投与の進行に伴い減弱する傾向がみられ、ウサギ 6 ヵ月間反復点眼試験では投与開始後 4 ヵ月以降、最高用量である 0.04%群（1 日 2 回）を含め、すべての群で眼刺激性症状は認められなかった。眼刺激性症状の他、ウサギ 28 日間反復点眼試験では、0.02%、0.04%及び 0.06%群（1 日 2 回）で限局性/点状/線状角膜潰瘍が投与期間中にみられたものの、投与期間の進行に伴い回復が認められた。また、病理組織学的検査において、0.04%及び 0.06%群（1 日 2 回）で軽度の角膜変性/びらんがみられたものの、休薬期間終了時に回復が認められた。ウサギ 6 ヵ月間反復点眼試験では、病理組織学的検査において、0.04%群（1 日 2 回）で血管新生、炎症性細胞の浸潤及び角膜上皮の菲薄化を伴う角膜病変が 3 例にみられ、そのうち 1 例は限局性の角膜潰瘍を伴っていた。これらの所見は休薬期間終了時に回復が認められた。PG324 点眼液（0.02%ネタルスジル/0.005%ラタノプロスト）について、ウサギを用いた 3 ヵ月間反復点眼試験で評価した結果、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。

サルを用いた試験でもウサギと同様に、結膜充血及び角膜混濁を含む眼刺激性症状がみられ、その程度及び頻度は用量（濃度/投与回数）依存的な傾向にあった。臨床適用濃度である0.02%群（1日2回）（臨床の用法は1日1回）でみられた眼刺激性症状はほとんどのものが軽度であった。眼刺激性症状は投与期間初期から生じた後、反復投与の進行に伴い減弱する傾向がみられ、サル9ヵ月間反復点眼試験では投与4週間以降、最高用量である0.04%群（1日2回）を含め、すべての群で角膜混濁を除く眼刺激性症状は認められなかった。角膜混濁については、0.02%群（1日2回）では最終投与日（投与開始後9ヵ月）までに、0.04%群（1日2回）では休薬期間中に回復が認められた。これらの眼刺激性症状の他に短期間の投与で認められた変化として、サル7日間反復点眼試験では、倒像鏡検査において、0.04%及び0.12%群（1日4回）で硝子体混濁、視神経乳頭の充血及び網膜浮腫を含む眼内の炎症に関連した所見がみられたものの、休薬期間終了時に回復が認められた。また、病理組織学的検査において、0.01%、0.04%及び0.12%群（1日4回）に結膜上皮の肥厚及び過形成、炎症性細胞の結膜下浸潤及び鼻涙管粘膜下浸潤の他、角膜上皮の肥厚及び過形成がみられ、0.04%群（1日4回）以上では角膜上皮/実質の浮腫及び角膜上皮/内皮のアポトーシスの増加も認められた。これらの所見の程度及び頻度は結膜上皮の肥厚及び過形成を除き用量依存的であり、7日間の休薬期間終了時には角膜上皮のアポトーシスを除いてこれらの所見は回復傾向を示した。サル1ヵ月間反復点眼試験の病理組織学的検査においても、結膜のリンパ球浸潤及び涙腺のリンパ球浸潤が基剤群を含むすべての群（1日2回）で認められ、0.06%群（1日2回）では角膜上皮の過形成が認められた。これらの所見は休薬により回復あるいは回復傾向を示した。これら短期間の投与でみられた変化は、サル9ヵ月間反復点眼試験の検査において、すべての群（1日2回）で認められなかった。

以上の反復点眼投与試験の結果から、STN1013900点眼液を反復点眼したとき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、長期間投与による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[2]、ROCK阻害による血管平滑筋の収縮力低下作用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[3]。よって、本所見はAR-13324のROCK阻害作用に起因するクラスエフェクトであると考えられた。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。また、PG324点眼液（0.02%ネタルスジル/0.005%ラタノプロスト）投与時にも結膜充血が認められたものの、その程度はSTN1013900点眼液投与時と比べ増悪がなく、STN1013900点眼液と同様に回復性が確認された。以上より、本変化は毒性学的意義の低いものと考えられた。

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。ウサギ及びサルを用い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、サル7日間反復点眼試験の最高用量である0.12%群（1日4回）の所見を除き、投与期間中又は休薬期間において回復が認められた。臨床試験において、「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。以上より、非臨床試験でみられた角膜混濁のほとんどは一過性の変化であり回復性が確認されたこと、臨床試験において生じた「渦巻き角膜」について視機能への影響を認めない可逆的な副作用であることが示されたため、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。本所見については、サル7日間反復点眼試験の最高用量である0.12%群（1日4回）の病理組織学的検査における所見を除き、回復性が認められた。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）（臨床の用法は1日1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。以上より、本変化の明確な機序は不明ではあるものの、そのほとんどは回復性が確認されたこと、長期反復点眼試験において臨床適用濃度では認められていないことから、臨床使用上の大きな懸念にはならないと考えられた。

(2) 全身への影響

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、ウサギを用いた6ヵ月までの反復点眼投与試験及びサルを用いた9ヵ月までの反復点眼投与試験を実施した。その結果、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。

AR-13324の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、及びイヌを用いた7日間及び28日間反復静脈内投与試験を実施した。

単回静脈内投与試験における急性反応として、ラットでは45 mg/kg/dayの用量で、投与部位の腫脹及び暗色化を含む局所の炎症が認められた他、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の用量で四肢の発赤が認められ、AR-13324の薬理作用に起因するものと考えられた。イヌでは60 mg/kg/dayの用量で、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。さらに、摂餌量減少、体重減少及び臨床検査値の変化が認められ、これらは非再生性貧血との関連が示唆された。また、60 mg/kg/dayの用量で皮膚発赤、強膜発赤、血圧の低下及び心拍数の増加が認められ、AR-13324の薬理作用に起因するものと考えられた。

一般状態における変化として、ラット7日間反復投与試験の10 mg/kg/dayの用量で投与部位の異常（痣、黒化、腫脹）、皮膚発赤、立毛及び尾の擦過傷が認められた。イヌ7日間反復投与試

験の 12.5 mg/kg/day 以上の用量で体温の上昇、呼吸異常及び活動量の低下を含む瀕死状態を呈した他、投与部位の腫脹及び糞便の異常が認められた。

臨床検査における変化として、ラット 7 日間反復投与試験の 3 mg/kg/day 以上の用量で、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 の用量で赤血球数、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や、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、プロトロンビン時間の延長、塩素及びグロブリンの増加、総タンパク、アルブミン及びアルブミン/グロブリン比の減少が認められた。イヌ 7 日間反復投与試験の 12.5 mg/kg/day 以上の用量で赤血球、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 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。

病理組織学的検査において、ラット 7 日間反復投与試験の 3 mg/kg/day 以上の用量で、投与部位の変化（色素沈着、アカントーシス、痂疲形成、慢性活動性炎症、巣状壊死ないし巣状性上皮びらん）及び肝臓における髄外造血の発生頻度増加が認められた。イヌ 7 日間反復投与試験の 12.5 mg/kg/day 以上の用量で投与部位の浮腫/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。

また、ラット 28 日間反復投与試験及びイヌ 28 日間反復投与試験において、いずれの試験も最高用量である 1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.84-1.06 mg/kg/day（ラット）、0.76-0.96 mg/kg/day（イヌ））まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上の全身毒性試験の結果から、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。さらに、造血系への影響がみられ、投与部位の重度の炎症反応に伴う二次的な影響である可能性も考えられた。なお、心血管への影響の詳細は安全性薬理試験の項で考察した（2.6.2.7）。

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、その安全域を表 2.6.6.9-1 にまとめた。

表 2.6.6.9-1. 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）試験でのヒト血漿中濃度の比較

	第 I 相 PK（反復投与）試験 AR-13324-CS103	ラット 7 日間反復静脈内投与試験	ラット 28 日間反復静脈内投与試験	イヌ 7 日間反復静脈内投与試験	イヌ 28 日間反復静脈内投与試験
	0.02% STN1013900 点眼液 1 日 1 回	無毒性量: 1 mg/kg/day	無毒性量: 1 (0.84-1.06)[1] mg/kg/day	無毒性量: 1 mg/kg/day	無毒性量: 1 (0.76-0.96)[1] mg/kg/day
ネタルスジル C_{max} (ng/mL)	BLQ (0.01 ng/mL 未満)	15.1（雄）	64.5（雄）	45.2（雄）	63.3（雄）
安全域		1,510 倍以上	6,450 倍以上	4,520 倍以上	6,330 倍以上
AR-13503 C_{max} (ng/mL)	BLQ (0.01 ng/mL 未満)	1.75（雄）	7.00（雄）	1.39（雄）	1.51（雄）
安全域		175 倍以上	700 倍以上	139 倍以上	151 倍以上

BLQ: Below the lower limit of quantification

1: 実際の投与用量

その結果、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の無毒性量におけるネタルスジル及び AR-13503 の C_{max} は、本剤の臨床用法用量でのヒト血漿中濃度と比べ、それぞれ 1,510 倍以上及び 175 倍以上（ラット）、4,520 倍以上及び 139 倍以上（イヌ）、の安全域を確認できた。したがって、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において全身への影響が認められたものの、十分な安全域があり、臨床使用における安全性上の懸念はないと考えられた。

(3) 生殖発生毒性

ラットにおける胚・胎児発生に関する試験では、母動物への影響として、0.3 mg/kg/day 以上の群で流産の兆候及び子宮重量の減少が認められた。胚・胎児への影響として、0.3 mg/kg/day 以上の群で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・胎児発生に関する試験では母動物への影響として、5 mg/kg/day 群で体重増加抑制傾向がみられた。胚・胎児への影響として、5 mg/kg/day 群で早期吸収胚数の増加、着床後胚損失率の増加、生存胎児率の減少及び胎児重量の減少がみられた。

また、ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び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では、それぞれの試験の最高用量である 1 mg/kg/day 及び 0.3 mg/kg/day まで異常は認められなかった。

胚・胎児発生に関する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、その安全域を表 2.6.6.9-2 にまとめた。

表 2.6.6.9-2. 胚・胎児発生に関する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）試験でのヒト血漿中濃度の比較

	第 I 相 PK（反復投与）試験 AR-13324-CS103	ラット胚・胎児試験		ウサギ胚・胎児試験	
	0.02% STN1013900 点眼液 1 日 1 回	無毒性量（母動物）：0.1 (0.08)[1] mg/kg/day	無毒性量（胚・胎児）：0.1 (0.08)[1] mg/kg/day	無毒性量（母動物）：3 mg/kg/day	無毒性量（胚・胎児）：3 mg/kg/day
ネタルスジル C_{max} (ng/mL)	BLQ (0.01 ng/mL 未満)	4.07	4.07	133	133
安全域		407 倍以上	407 倍以上	13,300 倍以上	13,300 倍以上
AR-13503 C_{max} (ng/mL)	BLQ (0.01 ng/mL 未満)	NC	NC	47.5	47.5
安全域		NC	NC	4,750 倍以上	4,750 倍以上

BLQ: Below the lower limit of quantification, NC: Not calculated

1: 実際の投与用量

その結果、ラット及びウサギを用いた胚・胎児試験の無毒性量におけるネタルスジルの C_{max} は、本剤の臨床用法用量でのヒト血漿中濃度と比べ、それぞれ 407 倍以上及び 13,300 倍以上の安全域を確認できた。また、ウサギを用いた胚・胎児試験における AR-13503 の C_{max} は、本剤の臨床用法用量でのヒト血漿中 AR-13503 濃度と比べ、4,570 倍以上の安全域を確認できた。一方で、ラットを用いた胚・胎児試験の無毒性量における血漿中 AR-13503 濃度は定量下限未満であり、暴露量を基にした安全域を算出できなかった。そのため、ラットを用いた胚・胎児試験について、無毒性量と臨床用量を比較し、用量差を基にした安全域を表 2.6.6.9-3 にまとめた。

表 2.6.6.9-3. ラット胚・胎児試験の無毒性量と臨床用量度の比較

	臨床用量	ラット胚・胎児試験	
	0.02% STN1013900 点眼液 1 日 1 回	無毒性量（母動物）：0.1 (0.08)[1] mg/kg/day	無毒性量（胚・胎児）：0.1 (0.08)[1] mg/kg/day
投与用量 (mg/kg/day)	0.00028[2]	0.08	0.08
安全域		286 倍	286 倍

1: 実際の投与用量

2: 本剤 0.02%を 50 kg の患者の両眼に 1 回 1 滴（約 35 μL）を点眼投与したときの投与量

その結果、ラットを用いた胚・胎児試験の無毒性量は本剤の臨床用量に比べ、286 倍の安全域を確認できた。したがって、生殖発生毒性評価では胚・胎児発生への影響が認められたものの、十分な安全域があり、臨床使用における安全性上の懸念はないと考えられた。

(4) 光毒性

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において、UVA 照射下の条件で評価した結果、AR-13324 は光毒性を有さなかった。UVB への曝露を増加させた条件で評価した結果、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。本試験条件下において、AR-13324 及び AR-13503 が光毒性を示した最低濃度は 215 μg/mL 及び 31.6 μg/mL であった。0.02% ^{14}C-STN1013900 点眼液をダッチベルテッドウサギに単回点眼したときの眼組織分布を評価した結果、点眼後の眼組織中放射能濃度は角膜が最も高く、そのときの最高組織中放射能濃度は 3972 ng eq/g であった。また、ネタルスジル及び AR-13503 はメラニン親和性を有し、メラニン色素含有組織である虹彩毛様体の最高組織中放射能濃度は 955 ng eq/g であった（添付資料 4.2.2.2-1）。ウサギ単回点眼後の角膜及び虹彩毛様体における最高組織中放射能濃度と、*in vitro* 光毒性評価で光毒性を示した最低濃度の比較から、AR-13324 及び AR-13503 の安全域は 54～225 倍及び 8～33 倍となり、十分な安全域を確認できた。

また、点眼剤の光毒性に関する一般論として、経口や経皮投与時にヒトに光線過敏症を生じることが知られている薬剤をウサギに点眼しても眼局所の光毒性が検出されないこと[4]、「ICH-S10 医薬品の光安全性評価ガイドライン」では、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の医薬品に対する低い特異度の他、陽性結果が得られた場合も臨床的な光毒性を必ずしも示唆するものではないことが示されている。実際、STN1013900 点眼液の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。

以上より、UVB への曝露を増加させた条件における *in vitro* 光毒性評価では潜在的な光毒性が懸念されたものの十分な安全域があること及び臨床試験において光毒性に起因する副作用は認められていないことから、臨床使用における安全性上の懸念はないと考えられた。

(5) 結論

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。

2.6.6.10 図表

図表は各項の本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.6.11 参考文献

(1) [redacted] Molar Absorptivity Determination of AR-13324. Protocol No. [redacted] 参天社内資料

(2) 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.

(3) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara 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.

(4) 西山義広, 重見亮太, 鈴木慶幸, 甲田章, 有江裕子. 毒性質問箱 光毒性（Q&A と用語解説）. 谷本学校 毒性質問箱; 2015;17:126-34.