

Ⅸ. 非臨床試験に関する項目

1. 薬理試験

(1) 薬効薬理試験

「Ⅵ. 薬効薬理に関する項目」の項参照

(2) 安全性薬理試験^{61, 62)}

試験項目		使用動物等	例数/群	投与経路	投与量 (mg/kg) ※1	結果
中枢神経系に及ぼす影響	一般症状及び行動	SD ラット	雄 6	単回経口	0、50、150、500	・無影響量：500mg/kg ・ヒト全身曝露量に対する比率※2：1, 291
心血管系に及ぼす影響	hERG 電流	hERG 導入 HEK293 細胞	5	<i>in vitro</i>	0、10、30、100	・無影響量：100mg/kg ・ヒト全身曝露量に対する比率※3：740
	血圧、心拍数、心電図	カニクイザル	雄 4	単回経口	0、10、30、100	
呼吸系に及ぼす影響	呼吸数、一回換気量、分時換気量、一般状態	SD ラット	雄 8	単回経口	0、50、150、500	・無影響量：150mg/kg ・ヒト全身曝露量に対する比率※4：461

※1： HEK293 細胞における投与量の単位は $\mu\text{mol/L}$

※2： ラット単回投与毒性試験における 500mg/kg 投与群の C_{max} (543 $\mu\text{g/mL}$) と、ヒトでの C_{max} (420.67ng/mL) *との比率

※3： サル 13 週間経口投与毒性試験における 100mg/kg/日投与群の投与 1 日目の C_{max} (311.5 $\mu\text{g/mL}$) と、ヒトでの C_{max} (420.67ng/mL) *との比率

※4： ラット 13 週間経口投与毒性試験における 100mg/kg/日投与群の投与 1 日目の C_{max} (194 $\mu\text{g/mL}$) と、ヒトでの C_{max} (420.67ng/mL) *との比率 (ラット 150mg/kg 投与時の血漿中薬物濃度がないため、近傍の用量群の成績で算出)

*： 健康成人男性にドチヌラド 4mg を 1 日 1 回、7 日間反復投与したときの投与 7 日目の C_{max} (「Ⅶ. 1. (2) 臨床試験で確認された血中濃度」の項参照)

(3) その他の薬理試験

[参考情報] 各種酵素、イオンチャネル、トランスポーター、受容体に及ぼす影響 (*in vitro*)⁶³⁾

各種酵素、イオンチャネル、トランスポーター、受容体に対するドチヌラドの影響を処置濃度 10 $\mu\text{mol/L}$ で評価した結果、いずれの標的にも影響 (50%を超える阻害や結合) しなかった。

[試験方法]

計 33 種の各種酵素、イオンチャネル、トランスポーター、受容体に対するドチヌラドの影響を処置濃度 10 $\mu\text{mol/L}$ (n=2) で評価した。

検討した酵素、イオンチャネル、トランスポーター、受容体は下記のとおり。

- ・ 酵素：シクロオキシゲナーゼ (COX-1)、モノアミノオキシダーゼ-A (MAO-A)、モノアミノオキシダーゼ-B (MAO-B)、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)、アセチルコリンエステラーゼ、キサンチンオキシダーゼ
- ・ イオンチャネル：カルシウムチャネル(L型、ジヒドロピリジン結合部位)、ATP 感受性 K⁺チャネル (K_{ATP})
- ・ トランスポーター：ノルアドレナリントランスポーター、セロトニントランスポーター
- ・ 受容体：アデノシン (A₁)、アドレナリン (α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 、 β_3)、カンナビノイド (CB₁)、ドパミン (D₁)、末梢性ベンゾジアゼピン、GABA_B、グルタミン酸、ヒスタミン (H₁、H₂、H₃)、ムスカリン、ニコチン、オピオイド、セロトニン (5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、5-HT₃、5-HT₄)、PPAR (α 、 γ)

2. 毒性試験

(1) 単回投与毒性試験^{64, 65)}

使用動物	例数/群	投与経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量 (mg/kg)
SD ラット	雌雄各 5	経口	0、500、1,000、2,000	1,000
カニクイザル [*]	雌雄各 1	経口	0、10、100、300、1,000	>1,000 (300mg/kg、1,000mg/kg で嘔吐がみられた)

※：4 週間経口投与毒性試験の投与 1 日目の一般状態及び血漿中ドチヌラド濃度測定により、急性毒性を評価

(2) 反復投与毒性試験⁶⁶⁾

1) SD ラットの 13 週間経口投与毒性試験 (雌雄各 10 例/群、投与量：0、30、100、300mg/kg/日) 300mg/kg/日群の雌で体重の減少、300mg/kg/日群の雌雄で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が認められたが、いずれの変化も休薬により回復性が示された。なお、100mg/kg/日群及び 300mg/kg/日群の雌雄で肝臓重量の増加、300mg/kg/日群の雌雄で軽度な肝細胞肥大、300mg/kg/日群の雄で肝細胞の滑面小胞体の増生が認められたが、肝薬物代謝酵素の誘導作用に関連した適応性変化と考えられた。無毒性量は 100mg/kg/日と推定された。

2) SD ラットの 26 週間経口投与毒性試験 (雌雄各 12 例/群、投与量：0、12、60、300mg/kg/日) 300mg/kg/日群の毒性試験群の雄 1 例及びサテライト群^{*}の雄 1 例が死亡した。300mg/kg/日群の雌で体重の減少、体重増加抑制、摂餌量の減少並びに赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血小板数の減少が認められたが、いずれの変化も休薬により回復性が示された。また、大腿骨に骨小柱の増加が認められた。なお、12mg/kg/日群及び 60mg/kg/日群の雌並びに 300mg/kg/日群の雌雄で肝臓重量の増加、60mg/kg/日群の雄及び 300mg/kg/日群の雌雄で肝細胞肥大が認められたが、肝薬物代謝酵素の誘導作用に関連した適応性変化と考えられた。無毒性量は 60mg/kg/日と推定された。

※：血漿中薬物濃度測定を目的とした群 (対照群：雌雄各 4 例/群、ドチヌラド投与群：雌雄各 12 例/群)

3) カニクイザルの 13 週間経口投与毒性試験 (雌雄各 3 例/群、投与量：0、10、30、100mg/kg/日) 100mg/kg/日群の雄 1 例を全身状態悪化のため投与 71 日目に切迫殺に供した。本例では、病理組織学的検査で骨髄細胞の減少が認められ、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、血小板数の著しい減少等の変化が認められた。また、投与 4 週目の血液学的検査でヘモグロビン濃度の減少及び大型非染色細胞数の増加が認められた。生存例では、100mg/kg/日群の雌で大型非染色細胞数の増加が認められた。100mg/kg/日群の雌 1 例では投与 13 週目に赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が認められ、本例を含む雌 2 例で胸骨及び大腿骨の骨髄細胞の増加が認められた。いずれの変化も休薬により回復性が示された。免疫組織化学的検査では、骨髄細胞の増加が認められた 2 例で T リンパ球からなる濾胞形成が認められた。無毒性量は 30mg/kg/日と推定された。

4) カニクイザルの 39 週間経口投与毒性試験 (雌雄各 4 例/群、投与量 : 0、3、12、50mg/kg/日) 50mg/kg/日群の雌 1 例を全身状態悪化のため投与 84 日目に切迫殺に供した。本例では、病理組織学的検査で胃粘膜の壊死、出血、水腫、血栓、腹壁漿膜から周辺臓器の漿膜面の炎症性変化が認められた。なお、本例で認められた胃の病変は背景疾患が明らかではないことから被験物質投与の影響が完全には否定できないものの、サル の 13 週間経口投与毒性試験 (最高用量 100mg/kg/日) 及び本試験の 50mg/kg/日群の他の動物で同様の所見が認められていないこと、急性の転帰を示す自然発生性の胃の梗塞と所見が類似していることから、自然発生病変である可能性も考えられた。また、50mg/kg/日群の雄 1 例を事故による骨折のため投与 85 日目に切迫殺に供した。無毒性量は 12mg/kg/日と推定された。

(3) 遺伝毒性試験⁶⁷⁾

ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、ドチヌラドによる遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。

CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験では、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、陽性判断基準 (10%以上) を超える染色体構造異常細胞の出現頻度の増加が認められ、ドチヌラドが CHL/IU 細胞に対して染色体異常を誘発することが示された。

ラットを用いた小核試験 (*in vivo*) 及びラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験では、それぞれドチヌラドによる小核赤血球誘発性及び DNA 損傷誘発性は認められなかった。

(4) がん原性試験⁶⁸⁾

雌雄 B6C3F1 マウス (各 50 例/群) 及び雌雄 F344 ラット (各 50 例/群) に、ドチヌラド 0、3、10、30mg/kg/日を 1 日 1 回 104 週間経口投与した結果、ドチヌラド投与に関連した生存率の変化並びに腫瘍性病変及び非腫瘍性病変の増加は認められなかった。

(5) 生殖発生毒性試験

1) 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (ラット)⁶⁹⁾

雌雄 SD ラット (各 20 例/群) にドチヌラド 0、30、100、300mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与した (投与期間はそれぞれ、雄 : 交配前 4 週間から解剖検査前日まで、雌 : 交配前 2 週間から妊娠 7 日まで) 結果、300mg/kg/日群の雌雄の親動物で、摂餌量の減少及び体重増加抑制、雌の親動物で体重の減少並びに黄体数、着床数、生存胚数の減少が認められた。雌雄の親動物の一般毒性及び生殖機能に対する無毒性量並びに初期胚発生に対する無毒性量は、いずれも 100mg/kg/日と推定された。

2) 胚・胎児発生に関する試験 (ラット、ウサギ)⁷⁰⁾

妊娠 SD ラット (19 又は 20 例/群) にドチヌラド 0、30、100、300mg/kg/日を妊娠 7 日から 17 日まで 1 日 1 回経口投与した結果、300mg/kg/日群の母動物で、摂餌量の減少、体重増加抑制、体重の減少が認められ、300mg/kg/日群の胎児で、骨格変異 (短小過剰肋骨、完全過剰肋骨、腰椎過剰) の発現頻度の増加が認められた。母動物の一般毒性及び生殖機能に対する無毒性量並びに胚・胎児発生に対する無毒性量は、いずれも 100mg/kg/日と推定された。

妊娠 NZW ウサギ (19 又は 20 例/群) にドチヌラド 0、10、30、100、300mg/kg/日を妊娠 6 日から 18 日まで 1 日 1 回経口投与した結果、300mg/kg/日群の母動物で、摂餌量の減少、

体重増加抑制、便量の減少、無便が認められ、100mg/kg/日群及び300mg/kg/日群の胎児で、骨格変異（完全過剰肋骨及び腰椎過剰）の発現頻度の増加又は増加傾向が認められた。母動物の一般毒性及び生殖機能に対する無毒性量は100mg/kg/日、胚・胎児発生に対する無毒性量は30mg/kg/日と推定された。

3) 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（ラット）⁷¹⁾

妊娠SDラット（20例/群）にドチヌラド0、30、100、300mg/kg/日を妊娠7日から分娩後21日まで1日1回経口投与した結果、300mg/kg/日群の母動物で、摂餌量の減少、体重増加抑制、体重の減少、妊娠期間の延長が認められた。300mg/kg/日群の離乳前の出生児で、出生率、出生後0日の生存率、生存出生児数、出生後4日の生存児数の減少並びに離乳時点の体重の減少傾向が認められ、100mg/kg/日群及び300mg/kg/日群の離乳後の出生児で、雌出生児の外陰部正中皮膚の不完全な癒合、300mg/kg/日群の離乳後の出生児で、雌出生児の膣開口の遅れが認められた。雌雄出生児を交配させた生殖能検査（初回交配）では、100mg/kg/日群及び300mg/kg/日群で交尾率の減少、300mg/kg/日群で受胎率の減少が認められた。生殖能検査用雄出生児と無処置雌動物及び無処置雄動物と行動検査用雌出生児の生殖能検査（追加交配）から、交尾率及び受胎率の減少は雌出生児に起因した変化と考えられた。母動物の一般毒性及び生殖機能に対する無毒性量は100mg/kg/日、出生児に対する無毒性量は30mg/kg/日と推定された。

(6) 局所刺激性試験

該当しない

(7) その他の特殊毒性

1) 抗原性試験（モルモット、マウス）⁷²⁾

雄Hartleyモルモットを用いて能動的全身性アナフィラキシー反応（5例/群）及び同種受身皮膚アナフィラキシー反応（5例/群）を検討した結果、いずれも陰性であり、雄BALB/cマウス（6例/群）及び雄C3Hマウス（6例/群）を用いて異種受身皮膚アナフィラキシー反応を検討した結果、いずれも陰性であった。これらのことから、ドチヌラドはモルモット及びマウスに対して抗原性を示さないと考えられた。

2) 免疫毒性試験（*in vitro*）⁷³⁾

無処置雄カニクイザル（5例）から採取した全血をドチヌラドとIL-2（最終濃度30U/mL）添加培地で約72時間インキュベート後、BrdUの細胞への取り込みを測定し、陽性細胞の比率をリンパ球幼若化の指標として評価した結果、300µg/mLでリンパ球幼若化作用が認められたことから、ドチヌラドはサルのリンパ球に対して幼若化作用を有することが確認された。また、同条件で無処置の日本人男性（5例）及び雄SDラット（3例）から採取した全血を用いて検討した結果、それぞれの最高濃度300µg/mL及び1,000µg/mLでリンパ球幼若化作用は認められず、ドチヌラドのリンパ球幼若化作用には種差があることが示唆された。

3) 肝薬物代謝酵素誘導の検討 (*in vitro*、ラット)⁷⁴⁾

雌SDラット(5例/群)に、ドチヌラド1、3、10mg/kg/日を1日1回7日間経口投与した結果、ドチヌラドはラットに対して、1~10mg/kg/日の用量では肝薬物代謝酵素を誘導しないことが示された。また、雌SDラット(5例/群)に、ドチヌラド30mg/kg/日及び300mg/kg/日を1日1回14日間経口投与した結果、ドチヌラドはラットに対して、300mg/kg/日の用量では肝薬物代謝酵素を誘導することが示された。

ラット肝細胞を用いて、ドチヌラド濃度1、3、10、30、100、300 μ mol/LでのCYP2B1及びCYP3A1に対する誘導作用を検討した結果、ドチヌラドはラット肝細胞においてCYP2B1の誘導作用を示したと考えられた。なおCYP3A1については、陽性対照(フェノバルビタール1,000 μ mol/L)で明確な誘導作用がみられず、試験の妥当性が担保されなかったため評価できなかった。

4) 光毒性試験(ラット)⁷⁵⁾

雄Long-Evansラット(5例/群)に、ドチヌラド0、1、10、100mg/kgを単回経口投与し、UVAを照射した結果、ドチヌラド投与に関連した皮膚の肉眼的観察、耳介厚の測定、眼科的検査並びに病理組織学的検査における変化はみられず、ドチヌラドはLong-Evansラットに対して光毒性を示さないと考えられた。

5) ミトコンドリアに対する影響の検討 (*in vitro*)⁷⁶⁾

無処置ラットの肝臓からミトコンドリア懸濁液を調製し、酸素消費測定システムを用いてミトコンドリアの呼吸を測定し、またMitoCheck[®] Complex Activity Assay Kit(ウシ心ミトコンドリア)を用いてミトコンドリア酵素複合体の活性を測定した結果、ドチヌラドによるミトコンドリア機能の障害を介した薬物性肝障害リスクを示唆する所見は認められなかった。

6) 共有結合能の検討 (*in vitro*)⁷⁷⁾

ヒト肝細胞懸濁液に¹⁴C-ドチヌラド(最終濃度10 μ mol/L)を添加して2時間インキュベート後、肝細胞の放射能を測定し、共有結合量を評価した結果、ドチヌラドによる肝細胞への共有結合を介した薬物性肝障害リスクを示唆する所見は認められなかった。

7) IL-8産生を指標とした検討 (*in vitro*)⁷⁸⁾

THP-1細胞(ヒト急性単球性白血病由来細胞株)にドチヌラドを3、10、30、100 μ mol/Lの濃度で添加してヒト肝マイクロソーム存在下で24時間培養後、上清中のIL-8濃度及び細胞生存率を評価した結果、ドチヌラドによる免疫反応の刺激を介した薬物性肝障害リスクを示唆する所見は認められなかった。