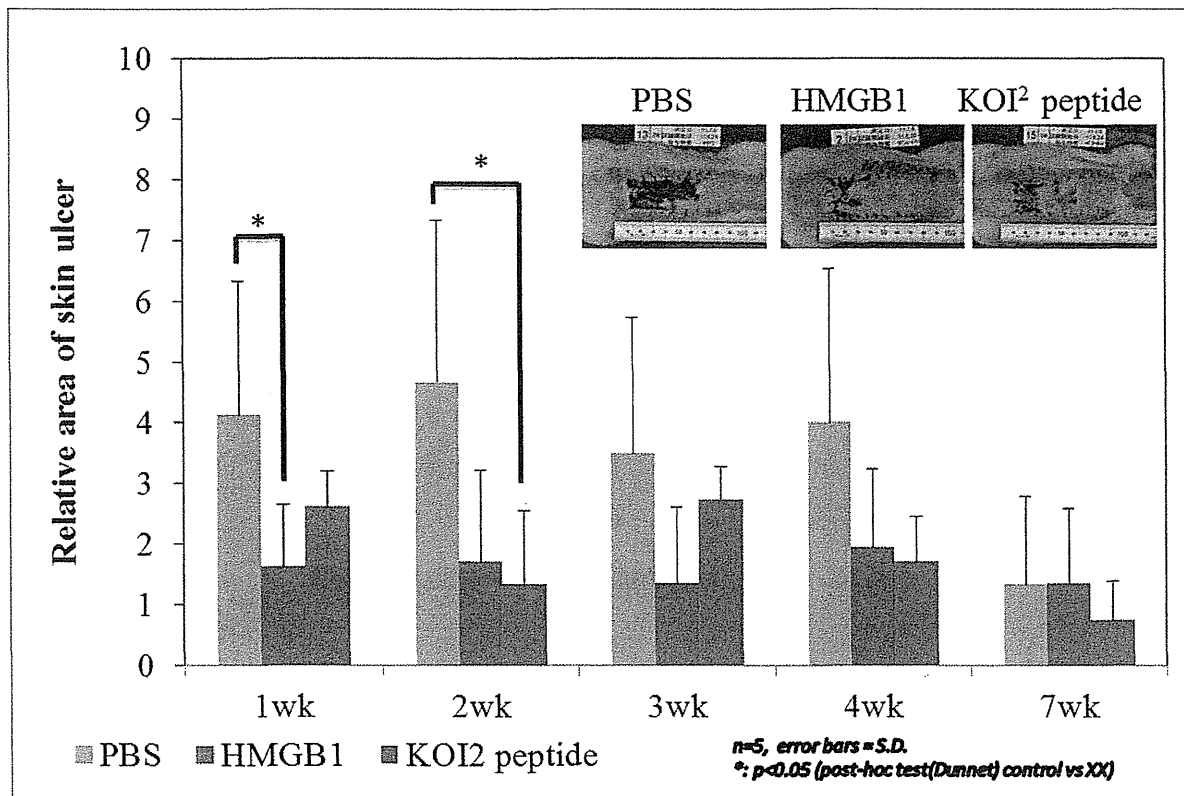


図 4-3 KO12 の難治性皮膚潰瘍治癒促進効果



4.1.4 表皮水疱症モデルマウスに対する治療効果

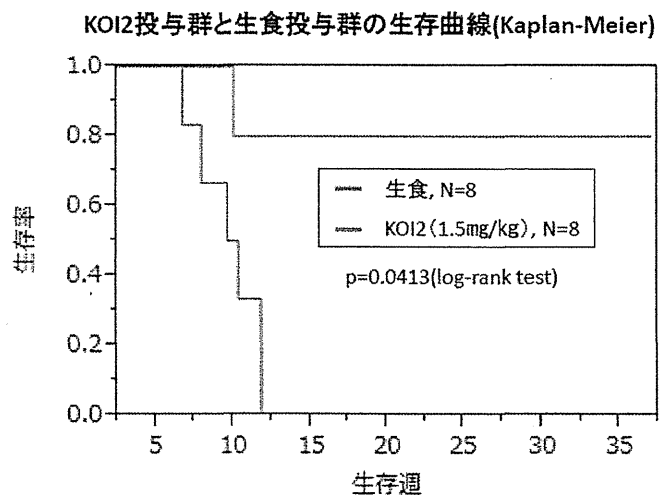
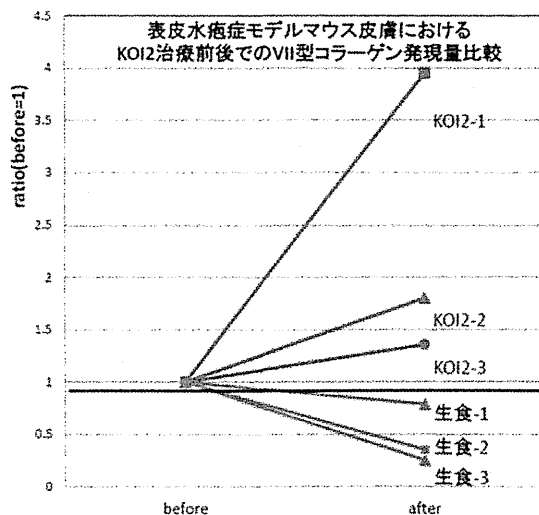
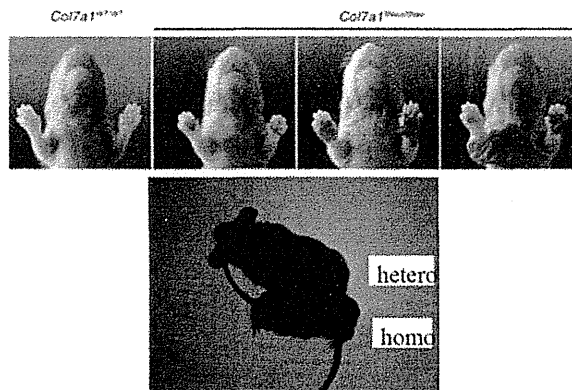
【方法】

KOI2 1.5mg/kg/生理食塩液 (100 μ L) を表皮水疱症モデルマウス (VII型コラーゲン低形成マウス) (n=8) の尾静脈から週2回、4週間 (計8回) 投与し、皮膚におけるVII型コラーゲン発現量および生存率の経時的変化について生理食塩液単独投与群 (n=8) と比較した。

【結果と考察】 KOI2 投与群は明らかに皮膚 VII 型コラーゲン発現量および生存率のいずれも生理食塩液投与群と比較して明らかな改善効果を示した (図 4-4 参照)。また、治療群は未治療群と比較して有意に高い体重増加が認められている。これらの治療効果発現メカニズムとしては、血中動員された骨髄 MSC が損傷していた皮膚および口腔・食道粘膜に集積して VII 型コラーゲンを発現し、皮膚・粘膜の脆弱性を改善しつつ組織再生を誘導した結果、マウスの飲水および摂食行動が改善したためと考えられる。

図 4-4 表皮水疱症モデルマウス治療効果

表皮水疱症モデルマウス (VII型コラーゲン低形成マウス) に対する
経静脈的HMGB1ペプチド投与による治療効果の検討



4.2 安全性薬理試験

4.2.1 中枢神経系への影響

中枢神経系に及ぼす影響は、ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験において実施した。KOI2 は 5、12 及び 25mg/kg/日の静脈内投与で一般状態観察、一般症状及び神経行動学的機能観察で KOI2 投与による影響は認められなかった。

KOI2 はいずれの用量でも中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられた。

4.2.2 呼吸器系及び循環器系への影響

4.2.2.1 カニクイザルの呼吸器系及び循環器系への影響

KOI2 の呼吸器系及び循環器系に及ぼす影響を検討するために、3 匹のカニクイザルにテレメトリーシステムを装着して試験を行った。KOI2 は、2、6 および 20mg/kg (急速単回静注、1 分静注) および 20、25 mg/kg (持続静注、20 分あるいは 22 分静注) の静脈内投与を行った。

被験物質による QRS 幅、QTc の変化等心電図において異常は認めなかった。またいずれの用量においても臨床症状に異常は認められなかった。KOI2 は 6 及び 20mg/kg の急速静注時に、血圧の低下と心拍数の上昇をきたした。また、同様に 2mg/kg の投与は、一過性の血圧上昇と心拍数の上昇をきたした。KOI2 を 20mg/kg で 22 分間持続注入した場合には、血圧の低下は急速静注に比べて弱く、一過性であった。すなわち、急速静注で見られた血圧の低下と心拍数の上昇は 22 分間の持続注入により減弱した。

4.2.2.2 KOI2 のサル持続静脈内投与の循環器系に及ぼす影響 (速報)

カニクイザル 6 匹に KOI2 を 12mg/kg で 20 分かけて持続静脈内投与し、循環器系に対する影響を検討した。その結果、サル 6 匹全例とも 12 mg/kg の持続静脈内投与では 4.2.2.1 に観察された血圧の低下は認められず、血圧低下の原因と考えられる、血中ヒスタミン濃度の上昇はいずれの固体にも認められなかった。

4.3 動物における薬物動態と代謝

4.3.1 血漿薬物濃度の測定法

薬物濃度の測定は、採取した血漿サンプルをトリフルオロ酢酸で酸性化し、メタノールでタンパクを沈殿させ、得られる上清を測定資料として、LC/MS/MS法により測定した。

4.3.2 ラット単回静脈内投与による予備 TK 試験

CrI:CD (SD) 系雄性ラット (各群3匹) に尾静脈より KOI2 を 2mg/kg および 20mg/kg 投与した後、経時的に末梢血を採血して血漿中の残存 KOI2 を定量した。その結果、2mg/kg 濃度で投与した KOI2 は、投与 2 分後で既に血中での検出感度以下であった。一方、20mg/kg 濃度で投与した場合は、投与 2 分後までは検出されたものの、5 分後には検出感度以下であった。

2mg/kg の投与群では、血漿中の KOI2 は投薬完了の 1 分後には測定可能であったが、それ以降では検出限界以下であったため、 $AUC_{0-60min}$ および C_{0min} を評価することができなかった。

20mg/kg の投与群では、血漿中 KOI2 濃度は投与完了後 5 分まで測定可能であった。

$AUC_{0-60min}$ および C_{0min} の平均値はそれぞれ 76.7 ng・hr/mL および 3637ng/mL であった。

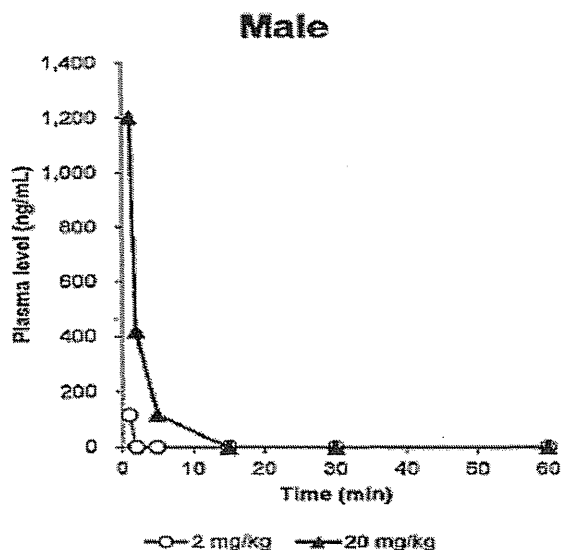
2 および 20mg/kg のグループの C_{1min} を比較すると、値は 20mg/kg の用量に比例して増加した。表 4-1 に試験の成績の概要及び図 4-5 に個々の投与量別 KOI2 血漿中濃度推移を示した。

表 4-1 ラットによる KOI2 の単回静脈内投与試験 (予備的試験)

被験薬	KOI2 (Lot No.06)	
	2	20
投与量 (mg/kg)	2	20
投与速度 (sec./rat)	4.56~4.80	4.44~4.80
動物数	雄 : 3	雄 : 3
Toxicokinetics		
C_{0min} (ng/mL)	NE	3637
$AUC_{0-60min}$ (ng・hr/mL)	NE	76.7
$T_{1/2}$ (min)	NE	1.3

NE : 評価不能

図 4-5 ラット血漿中 KOI2 濃度の経時的推移



4.3.3 カニクイザル単回静脈内予備 TK 試験

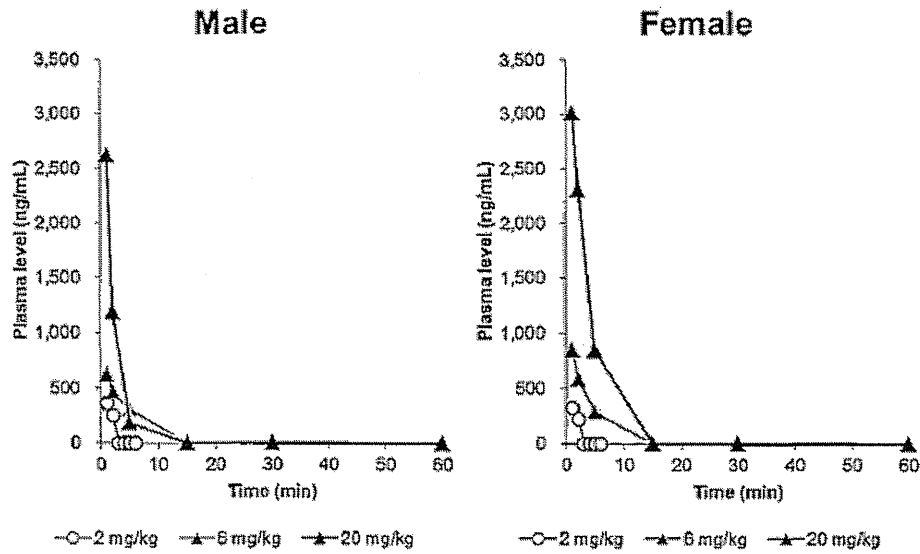
カニクイザル（各群 1 匹）に KOI2 2、6 及び 20mg/kg を静脈内投与した後、経時的に末梢血を採血して血漿中の KOI2 を定量した。AUC_{0-60min} および C_{0min} は投与量にほぼ比例して増加した。ラットの試験で見られたと同様、2mg/kg で投与した場合には投与 2 分後で既に血中での検出感度以下であった。一方、6 および 20mg/kg を投与した場合は、投与 2 分後までは検出されたものの、5 分後には検出限界以下であった。また雌雄間に明白な差はなかった。試験成績の概要を表 4-2 に、また KOI2 の個々の血漿中濃度推移を図 4-6 に示した。

表 4-2 カニクイザル単回静脈内予備 TK 試験概略

被験薬	KOI2 (Lot No.09)					
	2		6		20	
投与量 (mg/kg)						
投与速度 (sec./rat)	68	32	61	35	56	34
動物数	雄：1	雌：1	雄：1	雌：1	雄：1	雌：1
Toxicokinetics						
C _{0min} (ng/mL)	530	479	860	1250	5870	3980
AUC _{0-60min} (ng·hr/mL)	18.6	16.7	66.0	74.2	151	252
T _{1/2} (min)	NE	NE	4.2	2.6	1.0	2.2

NE：評価不能

図 4-6 カニクイザル血漿中 KOI2 濃度の経時的推移



4.3.4 4.3.2 および 4.3.3 の結果を踏まえた反復静脈内 TK 試験の実施について

4.3.2 及び 4.3.3 の結果のとおり、KOI2 の血中濃度は 2~20mg/kg の単回投与後速やかに減少し、投与後 5 分以降、血中の KOI2 濃度を測定することができなかつた。KOI2 の血中半減期が極めて短いこと、KOI2 が生理活性タンパクの部分ペプチドであることと合わせて考えると、反復投与試験において TK 試験を行う意味が無いと考え、実施しなかつた。

4.4 一般毒性試験

実施した KOI2 の毒性試験の一覧を表 4-3 に示した。

表 4-3 毒性試験一覧

試験	試験系	投与経路	投与量
カニクイザル単回静脈内投与試験 (非GLP)	カニクイザル	単回静脈内投与 (投与時間：0.5 ～1分)	2、6、20mg/kg 雄 3 匹、雌 3 匹
ラット単回静脈内投与試験 (非 GLP)	ラット	単回静脈内投与 (投与時間：5 ～10 秒間)、	2、20mg/kg 雄：6 匹
細菌を用いた復帰変異原性予備 試験 (FAT)		添加	7.81~1000 µg/mL
マウスリンフォーマ TK 試験 (GLP)	マウスリン パ腫細胞 (L5178Y <i>tk^{+/-}</i> -3.7.2c)	添加	62.5、125、250、 500µg/mL (短時間処理 法) 31.3、62.5、125、250、 500µg/mL (連続処理 法)
染色体異常試験 (GLP)	CHL/IU 細胞 (雌新生仔チ ャイニーズ・ ハムスター肺 由来の線維芽 様細胞株)	短時間処理法 (6 時間処理)、代 謝活性化系の非 存在下での 24 時間連続処理法	125、250、500µg/mL
ラット 4 週間静脈内投与試験及び 4 週間回復性試験 (GLP)	CD ラット	静脈内投与 (投与時間：1 分間)	5、12、25mg/kg/日 雄 50 匹、雌 50 匹
カニクイザル 4 週間静脈内投与 試験及び 4 週間回復性試験 (GLP)	カニクイザル	静脈内投与 (投与時間：20 分間)	5、12、25mg/kg/日 雄 16 匹、雌 16 匹

4.4.1 単回投与毒性試験

4.4.1.1 ラット単回静脈内投与試験 (4.3.2 項参照)

CrI:CD (SD) 系雄性ラット (各群3匹) に尾静脈より KOI2 を 2 および 20mg/kg 投与した後、経時的に末梢血を採血して血漿中の KOI2 を定量するとともに臨床症状等の観察を行った。

本試験において、切迫屠殺例又は死亡例はなかった。またいずれの用量においても、臨床観察上、変化を認めなかった。

4.4.1.2 カニクイザル単回静脈内投与試験 (4.3.3 項参照)

カニクイザル (各群 1 匹) に KOI2 を 2、6 および 20mg/kg で急速静脈内投与し、臨床観察、摂餌量、血漿ヒスタミンレベルの項目について評価した。試験の成績の概要を表 4-4 に示した。

その結果、顔面の紅潮は、20mg/kg で投与終了直後から発現し、数分内に消失した。さらに、20mg/kg を投与された雄で、投薬完了直後から 15 分後に低体温が観察された。更に、20mg/kg のでは血漿中ヒスタミン濃度の上昇も観察された。一方、2 および 6mg/kg の投与では 20mg/kg の投与より緩徐な血漿中ヒスタミン濃度の増加が認められたが、両群ともに臨床的異常所見はなかった。個々の動物の血漿中ヒスタミン濃度の経時的変化を図 4-7 に示した。

KOI2 の一次配列中に塩基性アミノ酸が比較的多く含まれることから、KOI2 による肥満細胞からのヒスタミン遊離は ACTH 等で知られる塩基性アミノ酸残基による肥満細胞からの非特異的ヒスタミン遊離反応であると予想される⁸⁾。同様の肥満細胞からの非特異的ヒスタミン遊離は抗生剤 vancomycin 投与時にも生じ得ることが知られ、血圧低下や蕁麻疹様皮疹の他に顔面及び頸部の紅潮を特徴とすることから red man (red neck) syndrome と呼ばれている⁹⁾。Red man syndrome はアレルギー性アナフィラキシー反応と異なり、時間をかけて緩徐に薬剤を投与して血中濃度の急激な上昇を避けることにより予防可能であり、また抗ヒスタミン薬の投与により治療が可能である⁹⁾。

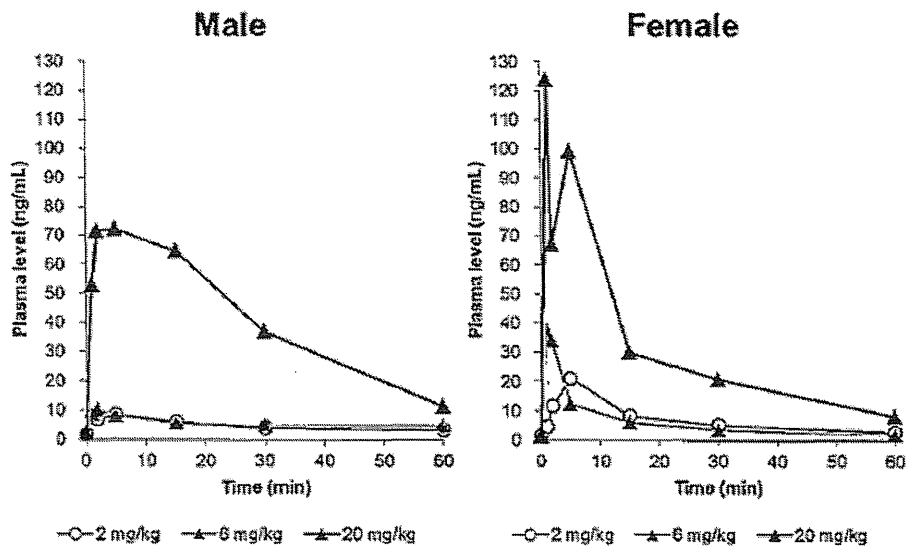
表 4-4 カニクイザル単回静脈内投与試験

被験薬	KOI2 (Lot No.09)					
	2		6		20	
投与量 (mg/kg)						
投与速度 (sec/rat)	68	32	61	35	56	34
動物数	雄：1	雌：1	雄：1	雌：1	雄：1	雌：1
死亡例又は切迫屠殺例*1	0	0	0	0	0	0
臨床症状*1						
皮膚の異常紅潮 (顔面)	0	0	0	0	1	1
摂飼量	—	—	—	—	—	—
血漿ヒスタミン量 (ng/mL) *2	8.4 (5)	21.1 (13)	10.0 (4)	37.3 (23)	72.0 (35)	123.8 (81)

*1：確認された動物数 —：特記事項なし NE：評価不能

*2：血漿ヒスタミンレベルは1、2、5、15、30、60分の最大値で示した。括弧内の数値は基礎値との比を個々の例ごとに示している。

図 4-7 カニクイザル KOI2 投与後の血漿中ヒスタミン濃度の経時的推移



4.4.2 反復投与毒性試験

4.4.2.1 ラット 4 週間反復静脈内投与試験及び 4 週間回復性試験

KOI2 を 7 週齢の Crl:CD (SD) ラット (各群雌雄各 10 匹) に 25、12 及び 5 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、4 週間反復静脈内投与 (投与時間 1 分) し、毒性影響を検討した。

投与量の設定はヒトでの薬効量が 1.5 mg/kg と考えられたことから、その約 17 倍量の 25 mg/kg を高用量群に設定し、中及び低用量を 12 及び 5 mg/kg に設定した。

対照群には媒体 (生理食塩液) のみを被験物質投与群と同様の方法で投与した。さらに回復性を評価するために、4 週間の休薬期間終了後の剖検例として、対照群及び 25 mg/kg/日群にそれぞれ雌雄各 5 匹を設定した。

試験群の構成及び投与量は表 4-5 のとおりである。

表 4-5 試験群の構成及び投与量

群	被験物質 対照物質	投与量 (mg/kg/日)	投与容量 (mL/kg/日)	投与液濃度 (mg/mL)	剖検 時期	動物数 (動物番号)	
						雄	雌
1	生理食塩液	-	5	-	ERC	5	5
					EDA	10	10
2	KOI2	5	5	1	EDA	10	10
3	KOI2	12	5	2.4	EDA	10	10
4	KOI2	25	5	5	ERC	5	5
					EDA	10	10

EDA : 投与期間終了時、ERC : 休薬期間終了時、投与速度 : 5 mL/kg/min (1 min/body)

結果として、投与及び休薬期間中、いずれの群にも死亡はみられなかった。また、一般状態観察、一般症状及び神経行動学的機能観察、体重、摂餌量、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査のいずれの検査においても、被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。また、注射部位についても被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下において、いずれの用量でも変化はみられなかったことから、KOI2 の無毒性量は雌雄ともに 25 mg/kg/日以上であると判断した。

4.4.2.2 カニクイザル 4 週間反復持続静脈内投与試験及び 4 週間回復性試験 (速報)

KOI2 を年齢 2~6 才のカニクイザル (各群、雌雄それぞれ 3 匹) に毎日 1 回 4 週間反復持続静脈内投与 (投与時間 20 分) したときの毒性影響を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設け、その回復性について検討した。ヒトでの薬効量は 1.5 mg/kg とされていることから、その約 17 倍量の 25 mg/kg を高用量群に設定した。また、中及び低用量を 12 及び 5 mg/kg に設定した。試験群の構成と投与量を表 4-6 にまとめた。

表 4-6 試験群の構成及び投与量

群	被験物質及び対照物質	投与量 mg/kg/日	投与容量 mL/kg/日	投与液濃度 mg/mL	剖検時期	動物数	
						雄	雌
1	生理食塩液	—	5	—	ERC	2	2
					EDA	3	3
2	KOI2	5	5	1	EDA	3	3
3	KOI2	12	5	2.4	EDA	3	3
4	KOI2	25	5	5	ERC	2	2
					EDA	3	3

EDA:投薬期間終了時、ERC:休薬期間終了時、投与速度：1 mL/min

投与及び休薬期間中、いずれの群にも死亡例は見られなかった。

一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査、心電図検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量において、被験物質に起因すると考えられる毒性変化はみられなかった。

病理組織学的検査において、12 mg/kg/日以上群の雌雄で投与部位に血栓、その二次的変化である器質化及び再疎通がみられた。これら血栓性変化は、肺を含むその他の全身諸臓器、組織にはみられず、血液凝固系にも異常はみられなかったことから、投与部位に限局した変化であると考えられた。

また 25 mg/kg/日群には、これら血栓性変化のみられない投与部位もみられた。対照群を含む雌雄全群で投与操作に伴う刺激性変化がみられたことから、これら血栓性変化は被験物質単独ではなく、投与操作に伴う機械的刺激を背景に生じる局所変化であると考えられた。これら血栓性の変化は、休薬期間終了時剖検例では消失あるいは再生像がみられていることから、4週間の休薬期間を経て回復傾向があると判断した。

以上に示したように、本試験条件下では、KOI2 は 25 mg/kg/日においても全身性には毒性変化を誘発しなかった。投与局所では 12 mg/kg/日以上群で血栓性の変化が認められたが、これらは投与操作による機械的刺激に KOI2 の作用が加わったことに起因すると考えられた。

4.4.3 遺伝毒性試験

4.4.3.1 細菌を用いた復帰変異原性予備試験 (FAT)

KOI2 の FAT の結果は陽性であった。陽性変化は肝臓抽出物 S9 ミックス添加の TA98 中の連続する濃度で観察され、S9 ミックス添加の TA100 では、陽性の変化は最高濃度でのみ観察された (表 4-7、表 4-8 参照)。

しかし、FATでは生育にHistidine (His) を要求する2種のサルモネラ菌が使用されており、KOI2にはHisが2残基含まれることを考慮すると、FAT陽性の結果は復帰突然変異によるものではなく、本剤ペプチド由来のHisが試験系に供給されたことが原因であることが考えられ⁷⁾、判定は擬陽性と推察した。

表 4-7 細菌を用いた復帰変異原性予備試験 (FAT) 結果 (TA100)

被験薬	S9	TA100								
		Dose (µg/mL)								
		7.81	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	判定
MTS-0571913A (lot No. 06)	-	3	1	3	5	0	0	0	0	-
		1	5	3	7	7	4	1	48	-*
陰性コントロール	-	2	7	4	0	3	7	5		平均
		9	10	5	5	5	1	3	3	4.6
	+	2	2	9	8	5	3	5		平均
		3	2	5	3	5	7	5	5	4.8
陽性コントロール	-	44 (AF2、 0.005µg/mL)								
	+	48 (2AA、 0.4µg/mL)								

表 4-8 細菌を用いた復帰変異原性予備試験 (FAT) 結果 (TA98)

被験薬	S9	TA98								
		Dose (µg/mL)								
		7.81	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	判定
MTS-0571913A (lot No. 06)	-	2	1	0	0	2	0	0	0	-
		0	0	03	11	48	48	48	48	+
陰性コントロール	-	2	7	4	0	3	7	5		平均
		9	10	5	5	5	1	3	3	4.6
	+	2	2	9	8	5	3	5		平均
		3	2	5	3	5	7	5	5	4.8
陽性コントロール	-	25 (4NQO、 1µg/mL)								
	+	48 (2AA、 0.8µg/mL)								

Each number: Number of positive wells in 48 wells per dose

*The positive wells were increased only at one dose but not at continuous doses

Positive Controls

	Without S9mix	With S9mix
TA100	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide	2-aminoanthracene
TA98	4-Nitroquinoline-1-oxide	2-aminoanthracene

4.4.3.2 マウスリンフォーマ TK 試験

KOI2 の遺伝毒性誘発性の有無を評価するため、マウスリンパ腫細胞 (L5178Y *tk*^{+/−}-3.7.2c) のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標とするマウスリンフォーマ TK 試験を、代謝活性化系の存在下及び非存在下での短時間処理法 (3 時間処理)、代謝活性化系の非存在下での 24 時間連続処理法の各処理条件で実施した。陰性対照として媒体の生理食塩液を、陽性対照として Methyl methanesulfonate (代謝活性化系の非存在下) 及び Cyclophosphamide monohydrate (代謝活性化系の存在下) を用いた。

用量設定試験の結果から、マウスリンフォーマ TK 試験では 500 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で下記の計 4~5 段階の用量を設定した。

短時間処理法

代謝活性化系の存在下及び非存在下： 62.5、125、250 及び 500 µg/mL

24 時間連続処理法

代謝活性化系の非存在下： 31.3、62.5、125、250 及び 500 µg/mL

- 1) いずれの処理条件においても、陰性対照群と比較して、被験物質群の総遺伝子突然変異頻度 (T-MF) に有意な増加はみられなかった。
- 2) いずれの処理条件の被験物質群においても、被験物質処理直後及び突然変異発現期間終了後のコロニー形成率 (PE0 及び PE2) に減少はみられなかった。2 日間の突然変異発現期間中の細胞増殖率から求めた相対浮遊細胞増殖率 (RSG) についても明らかな減少はみられず、被験物質による相対総増殖率 (RTG) の減少と考えられるものはなかった。
- 3) 被験物質調製液添加時に pH の変動を示す培養液の色調の変化はみられなかった。被験物質の析出は、被験物質処理開始時及び終了時ともに 500 µg/mL まで認められなかった。
- 4) 陰性対照群の PE 及び T-MF が基準値 (PE : 65~120%、T-MF : $50 \times 10^{-6} \sim 170 \times 10^{-6}$) にあったこと、陽性対照群の T-MF が当施設の背景データの範囲内 (mean ± 3SD) にあったことから、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

以上の結果から、KOI2 は、L5178Y *tk*^{+/−}-3.7.2c 細胞に対して遺伝子突然変異誘発性を有しないと結論した。

4.4.3.3 ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

KOI2 の染色体異常誘発性の有無を評価するため、CHL/IU 細胞（雌新生仔チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽様細胞株）を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下での短時間処理法（6 時間処理）、代謝活性化系の非存在下での 24 時間連続処理法の各処理条件で染色体異常試験を実施した。なお、陰性対照として媒体の生理食塩液を、陽性対照としてマイトマイシン C（代謝活性化系の非存在下）及びシクロホスファミド一水和物（代謝活性化系の存在下）を用いた。

用量設定試験の結果から、染色体異常試験は 500 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で 250 及び 125 µg/mL の 3 用量を設定した。すべての処理条件において、細胞増殖率が 50%未満となる用量がなかったため、染色体異常の観察用量としてはすべての用量を選択し、染色体の構造異常及び数的異常を有する細胞の出現数及びその頻度を調べた。

- 1) いずれの処理条件においても、陰性対照群と比較して染色体の構造あるいは数的異常を有する細胞の出現数に有意な増加はみられなかった。
- 2) いずれの処理条件においても、集団倍加（Population doubling : PD）から求めた細胞増殖率は減少しなかった。
- 3) 被験物質調製液添加時に pH の変動を示す培養液の色調の変化はみられなかった。被験物質の析出は、被験物質処理開始時及び終了時ともに 500 µg/mL まで認められなかった。
- 4) 陰性及び陽性対照における染色体異常細胞の出現頻度は、当施設の背景データの範囲内（Mean ± 3SD）にあったことから、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

以上の結果から、KOI2 は代謝活性化系の有無及び処理時間の長短にかかわらず、CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性は有さないと結論した。

これら 3 試験の結果により、KOI2 は変異原性を有しないと判断した。

4.4.4 生殖発生毒性試験

サル及びラットを用いた4週間反復投与毒性試験の検討項目として雄性生殖器に対する影響を評価することとしたが、サル及びラットの試験とも、雄性生殖器に関して被験物質による影響は認められなかった。

4.4.5 がん原性試験

実施は予定されていない。

4.4.6 局所刺激性試験

ラットにおいては単回および反復静脈内投与において局所刺激性は認められていない。カニクイザルにおいては12 mg/kg/日以上 of 群の雌雄で投与部位に血栓、その二次的変化である器質化及び再疎通がみられた。これら血栓性変化は、肺を含むその他の全身諸臓器、組織にはみられず、血液凝固系にも異常はみられなかったことから、投与部位に限局した変化であると考えられた。これら血栓性変化は被験物質単独ではなく、投与操作に伴う機械的刺激を背景に生じる局所変化であると考えられた(4.4.2.2、5.3を参照)。

4.4.7 免疫毒性試験

サルとラットを用いた4週間反復投与毒性試験の検討項目として免疫毒性の可能性を示す変化(兆候;血液学的変化、免疫系器官の重量変化および病理組織学的変化、血清グロブリン濃度の変化等)について評価が行なわれたが、被験物質による影響は認められなかった。

5. 非臨床試験データ又は関連化合物から推測される起こりうる危険性及び有害反応

KOI2のアミノ酸配列はLPS結合ドメインを含まずTLRの活性化を介した炎症反応の喚起がおこらないように設計されたペプチドである。これまでに実施した動物(ラット及びサル)での毒性試験の結果から、サルを用いた試験にて血圧の低下、心拍数の増加、体温下降、顔面紅潮とヒスタミンの血中濃度増加及び投与部位(繰り返し静脈内注射を行った部位)での局所刺激性反応が見られたが、その他重要な好ましくない反応は確認されていない。またKOI2は生体構成成分の部分ペプチドでもあるため、投与による危険性は低いものと予測される。しかし、これらの有害事象につながる事象への対処法は臨床試験を行うにあたって考慮すべきである。

5.1.1 血圧低下、心拍数増加、顔面紅潮等の循環器系の有害事象(4.4.1.2参照)

サルの安全性薬理試験において高~中用量(6および20mg/kg)KOI2の急速静脈内投与により観察された、血圧の低下、心拍数の増加、体温下降及び顔面紅潮は血中ヒスタミン濃

度の上昇を伴っており、これら事象の要因は KOI2 刺激による肥満細胞からのヒスタミン遊離に伴う末梢血管拡張であると考えられる。KOI2 は生体内蛋白 HMGB1 の部分ペプチドであることから KOI2 反応性 IgE の存在は考えにくく、KOI2 投与によるヒスタミン遊離機序としてアレルギー性アナフィラキシー反応は否定的である。一方、KOI2 の一次配列中に塩基性アミノ酸が比較的多く含まれることから、KOI2 による肥満細胞からのヒスタミン遊離は ACTH 等で知られる塩基性アミノ酸残基による肥満細胞からの非特異的ヒスタミン遊離反応であると予想される。同様の肥満細胞からの非特異的ヒスタミン遊離は抗生物質バンコマイシン投与時にも生じ得ることが知られ、血圧低下や蕁麻疹様皮疹の他に顔面及び頸部の紅潮を特徴とすることから red man (red neck) syndrome と呼ばれている。Red man syndrome はアレルギー性アナフィラキシー反応と異なり、時間をかけて緩徐に薬剤を投与して血中濃度の急激な上昇を避けることにより予防可能であり、また実際にこれらの症状が現れた場合には点滴静注を中断し、速やかに回復させるため、適切な薬剤（コルチコステロイド、抗ヒスタミン薬、解熱薬、静脈内輸液及び/又は酸素補給など）で治療することが可能と考えられる。実際、KOI2 (12mg/kg) の急速静脈内投与で認められた血圧低下反応は、同用量の緩徐な静脈内投与では観察されなかった。

5.1.2 局所刺激性

KOI2 局所投与部位では生食投与群も KOI2 投与群も同様に留置針刺入血管に局限した炎症反応が著明に観察されており、連日の留置針挿入に伴う機械的刺激による血管内皮の損傷による変化と考えられる。

しかし、高用量 KOI2 投与群 (12 および 25mg/kg) では上肢の留置針刺入部位血管に、1) の炎症所見に加えて器質的变化による閉塞像が認められ、症例によっては血栓の残存も観察されている。しかし、同様の組織反応は下肢の刺入血管には殆ど認められず、また同じ個体の肺には血栓形成に伴う病理組織変化は認められないことから、留置針刺入部位に局限した反応であることはほぼ疑いない。即ち、KOI2 の毒性が主たる原因として血管内に生じる変化ではなく、留置針刺入による血管内皮の損傷部位に高濃度 KOI2 が貯留する場合に限定して生じる複合的局所反応であると考えられる。このことは、留置針刺入が比較的スムーズに行われた上肢には同様の血栓および器質化による閉塞像は観察されていないという事実からも支持された。臨床試験における安全性を確保するために、刺入部位に高濃度 KOI2 が貯留することのないように投与法に留意することは妥当である (4.4.2.2 参照)。

6. 臨床試験

臨床試験は国内、国外いずれにおいても実施されていない。

7. 参考文献

- 1) Tamai K, Yamazaki T, et al, PDGFRa-positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. ,Proc Natl Acad Sci USA 108:6609-6614, 2011. Epub 2011 Apr 4.
- 2) Magna M, Pisetsky DS. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases., Mol Med. 2014 Mar 24;20:138-46. doi: 10.2119/molmed.2013.00164. Review.
- 3) Iinuma et al, J Immunol, under revision
- 4) Aikawa et al. Scientific Report, under revision, Iinuma et al, J Immunol, under revision
- 5) Takashima Y, Era T, et al, Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation., Cell. 2007 Jun 29;129 (7) :1377-88.
- 6) Morikawa S, Mabuchi Y, et al, Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. , J Exp Med. 2009 Oct 26;206 (11) :2483-96. doi: 10.1084/jem.20091046. Epub 2009 Oct 19.
- 7) 薬食審査発0920第2号 医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて
- 8) Jasani B, Kreil G, et al., Further studies on the structural requirements for polypeptide-mediated histamine release from rat mast cells., Biochem J 181: 623-632, 1979.
- 9) Sivagnanam S and Deleu D. Red man syndrome. ,Critical Care 7:119-120, 2003

VIII. 治験実施計画書（案）

治験実施計画書案

間葉系幹細胞動員医薬 KOI2 の安全性および忍容性の検討

(第 I 相臨床試験)

CONFIDENTIAL

本文書情報は、付録及び添付資料とともに大阪大学の機密情報です。治験責任医師、治験分担医師、治験協力者、治験実施医療機関、治験審査委員会・倫理委員会及び規制当局関係者、その他本治験に関与する者に限定して、情報提供するために作成されたものです。従って、本文書情報は、被験者に本治験の内容を説明する場合を除き、大阪大学の文書による同意なしに、いかなる第三者にも開示できません。また、本治験の目的以外に使用することはできません。

自ら治験を実施する者

大阪大学大学院医学系研究科

再生誘導医学寄附講座教授

玉井 克人

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2