

## 審査報告書

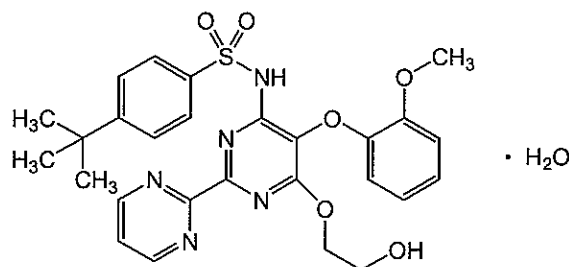
平成 17 年 2 月 9 日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

承認申請のあった下記の医薬品にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下のとおりである。

### 記

[販売名]	トラクリア錠 62.5mg
[一般名]	ボセンタン水和物
[申請者]	アクテリオン ファーマシューティカルズ ジャパン株式会社
[申請年月日]	平成 15 年 4 月 4 日
[剤型・含量]	錠剤：1 錠中、ボセンタンとして 62.5mg 含有
[申請区分]	医療用医薬品 (1) 新有効成分含有医薬品
[化学構造]	



分子式： $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_6\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$

分子量：569.63

化学名：

(日本名) 4-(1,1-ジメチルエチル)-N-[6-(2-ヒドロキシエトキシ)-5-(2-メトキシフェノキシ)-2-(ピリミジン-2-イル)ピリミジン-4-イル]ベンゼンスルホン酸アミド 一水和物

(英名) 4-(1,1-Dimethylethyl)-N-[6-(2-hydroxyethoxy)-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(pyrimidin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzenesulfonamide monohydrate

[特記事項] 希少疾病用医薬品 (平成 15 年 1 月 31 日指定)

[審査担当部] 新薬審査第二部

## 審査結果

平成 17 年 2 月 9 日

[販売名]           トラクリア錠 62.5mg  
[一般名]           ボセンタン水和物  
[申請者]           アクテリオン ファーマシューティカルズ ジャパン株式会社  
[申請年月日]       平成 15 年 4 月 4 日（輸入承認申請）

### [審査結果]

今回提出された国内臨床試験成績は、少数例（21 例）への投与ではあるものの、原発性及び膠原病に伴う肺高血圧症に対して海外臨床試験と同程度の有効性を示しており、臨床試験の対象となった肺動脈性肺高血圧症に対する効果は確認されたと考える。臨床試験対象外の特定の疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症に関しては、個別の臨床試験実施が困難であり、治療の選択肢として必要とされる薬剤であることから、効能・効果を臨床試験対象に限定する必要はないと判断した。ただし重症度に関しては、治療上の有益性が優先する重症の場合にのみ投与が考慮されるべきであることから、WHO 機能クラスⅢ及びⅣの症例に限定されるべきと判断した。市販後調査については、臨床試験対象外の肺動脈性肺高血圧症に対する有効性及び安全性は確認されていないこと、小児患者に対する至適用量が検討されていないことなどから、本薬投与全例を対象とした市販後調査を実施し、本薬の安全性・有効性を確認する必要があると判断した。

以上、医薬品医療機器審査センター及び医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目は、下記の承認条件を付した上で、以下の効能・効果及び用法・用量のもとで承認して差し支えないと判断し、医薬品第一部会で審議されることが妥当と判断した。

[効能・効果] 肺動脈性肺高血圧症（WHO 機能分類クラスⅢ及びⅣに限る）

[用法・用量] 通常、成人には、投与開始から 4 週間は、ボセンタンとして 62.5mg を 1 日 2 回朝夕食後に経口投与する。投与 5 週目から、ボセンタンとして 125mg を 1 日 2 回朝夕食後に経口投与する。

なお、用量は患者の症状、忍容性などに応じ適宜増減するが、最大 1 日 250mg までとする。

[承認条件] 再審査期間中の全投与症例を市販後調査の対象とし、本剤の安全性及び有効性を調査するとともに、集積された結果については定期的に報告すること。

# 審査報告(1)

平成 16 年 11 月 29 日

## I. 申請品目

[販売名] トラクリア錠 62.5mg

[一般名] ボセンタン水和物

[申請者] アクテリオン ファーマシューティカルズ ジャパン株式会社

[申請年月日] 平成 15 年 4 月 4 日 (輸入承認申請)

[剤型・含量] 錠剤：1 錠中、ボセンタンとして 62.5mg 含有

[申請時効能・効果]

肺動脈性肺高血圧症

[申請時用法・用量]

投与開始から 4 週間は、通常、成人にはボセンタン 62.5mg 錠 1 錠を 1 日 2 回朝夕食後に経口投与する。投与 5 週目から、62.5mg 錠 2 錠を 1 日 2 回朝夕食後に経口投与する。

[特記事項]：希少疾病用医薬品 (平成 15 年 1 月 31 日指定)

## II. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構における審査の概要

本審査報告においては、平成 16 年 4 月 1 日、国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター (以下、審査センター) と医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構等が統合され、医薬品医療機器総合機構 (以下、機構) が設立されたことに伴い、同日前に審査センターが行った照会・判断等も機構が行ったものとみなし以下の記載を行った。本申請において、申請者が提出した資料及び機構からの照会事項に対する申請者の回答の概略は、下記のようなものであった。

なお、本申請では、申請書、資料概要等に、多数の誤記載、不明確な記述、不適切な考察などが認められたことから、機構は申請者に対し審査の過程で、申請資料の再確認・再整備を求めた (各項参照)。

### イ. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

本薬 ボセンタン水和物は、ロシュ社 (スイス) で合成された非蛋白性のエンドセリン受容体拮抗薬である。当初、ロシュ社により開発が進められたが、その後、アクテリオン ファーマシューティカルズ社 (スイス) が本薬の全世界における開発・販売権を取得した。本薬は肺高血圧症治療薬として開発が進められ、肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension, PAH) を効能・効果として米国、欧州等 35 カ国で承認されている (平成 16 年 8 月現在)。日本人を対象とした開発は、ドイツで日本人及び外国人健康成人を対象とした第 I 相試験 (単回及び反復) が実施された後、アクテリオン ファーマシューティカルズ ジャパン株式会社により患者を対象にした国内試験が実施された。

今回の申請では、上記の日本人を含む第 I 相試験 (ト-8、9) 及び一般臨床試験 (ト-10) の他、外国人対象第 I 相試験 (ト-1、2、6、7)、プラセボ対照比較試験 (ト-3、4) 及び長期試験 (ト-5)

が評価資料として提出されている。

ロ. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料

原薬ボセンタン水和物は、組成式  $C_{27}H_{29}N_5O_6S \cdot H_2O$ 、分子量 569.63 の、計 4 つの芳香環(ピリミジン環 2 つ、ベンゼン環 2 つ)を有するスルホンアミド化合物であり、不斉炭素は持たない。市販の  を出発原料として  の工程を経て合成される。その化学構造は、元素分析、紫外及び赤外吸収スペクトル、 $^1H$  及び  $^{13}C$ -NMR スペクトル、質量スペクトル並びに粉末 X 線結晶構造解析により確認されている。また、物理的・化学的性質は、性状（外観）、各種溶媒及び緩衝液に対する溶解性、吸湿性、緩衝液中での熱に対する安定性、有機溶媒中での光に対する安定性、熱分析、水溶液の pH、解離定数、分配係数、結晶多形、混在物（有機不純物、分解生成物）について検討されている。

規格及び試験方法として、原薬では、含量、性状（外観）、確認試験（赤外吸収スペクトル及び高速液体クロマトグラフィー）、純度試験（溶状、強熱残分、重金属、類縁物質、残留溶媒）、水分、粒度分布及び定量（含量）、製剤では、性状、確認試験（赤外吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィー）、純度試験（類縁物質）、質量偏差試験、溶出試験及び定量（含量）が設定されている。

原薬は有機溶媒に対しては N,N-ジメチルホルムアミドやジクロロメタンなどには比較的溶けやすいものの、メタノール、ヘキサン、トルエンなどには比較的溶けにくい性質を有する。また各種 pH 緩衝液において、アルカリ性溶液ではやや溶解性が上昇する傾向が見られるものの、試験を実施した pH の範囲内(pH8.5 以下)において溶解度は最大でも 93mg/100mL(pH8.5)であり、また水に対する溶解度は 1mg/100mL で、総じて水には溶解しにくい性質を持つ。

製剤は、ボセンタンとして 62.5mg を含有するフィルムコーティング錠である。添加物は 40℃ 75%RH あるいは 50℃ 成り行き湿度において 4 週間の配合変化試験を行って配合変化がないことを確認している。その上で溶出試験、打錠障害対策及びスケールアップに対応して配合割合や製剤諸条件を検討し、最終的に申請された製剤としている。

本申請に当たって申請者から提出された申請資料について、特に資料概要について規格及び試験方法の設定におけるバリデーションに関する記載がほとんど見られないなど、記載上の不備及びデータの記載不足などが多数見られた。このことから機構は審査の過程において申請者に対して種々の記載が不備である点を指摘し、資料及びその概要の修正を求めた。申請者は機構の求めに対して理由を付した一部を除いて修正に応じ、修正された資料概要及び資料の訂正案を提出した。機構はこれを受領した。

機構は、原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定根拠の妥当性について、主として以下のような検討を行った。

強熱残分、重金属、溶状について申請された試験方法は海外薬局方を準用したものであった。機構はこれらの試験方法については本邦において準用できることが確認されたものではないため、試験方法を記載するよう求めた。これに対して申請者からは試験方法の全文を記載する旨の回答が提出された。なお重金属試験については、申請者側から蛍光 X 線光度を用いた方法に変更したい旨の申し出があったが、最終的には試験の妥当性を確保する容易さ等から、当初申請された米国薬局方の方法を参考にした試験を全文記載したいという申し出があった。機構は申し出られた試験方法について特段

の問題はないと判断し、了承した。

原薬について、提出された資料からは相対湿度 10%未満のごく低い湿度においては、本薬は水和物から無水物に転化することが示されていた。このため機構は相対湿度 10%未満の状態における結晶形あるいは固体状態について尋ねた。申請者は相対湿度 10%未満の無水物状態においても本薬の結晶状態は維持されており、さらに無水物結晶は湿度の増加とともに可逆的に元の水和物結晶に戻ることを確認されていると説明した。機構は本件について特段の問題は生じないと判断し、この回答を了解した。

本薬の分解生成物について、申請者は当初「含量が 0.2%を超えるもの」を分解生成物として取り扱っていた。機構は、「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（平成 7 年 9 月 25 日、薬審第 877 号）」においては、含量が 0.1%を超える不純物については安全性の検討が必要となることなどから、本薬での分解生成物の取り扱いの妥当性について尋ねた。申請者は同ガイドラインに合致した取り扱いとすること、また毒性試験の結果、安全性の問題はない旨の回答を提出した。機構はこの回答を妥当であると判断し、了承した。

原薬及び製剤の確認試験として当初、赤外吸収スペクトル法その他、定量法と同様の高速液体クロマトグラフ法が設定されていた。しかしながら定量法と同様の試験法をあらためて確認試験として設定する意義が明確ではないことから、機構は本試験方法の確認試験からの削除を求めた。申請者はこれに応じ、確認試験から削除することとした。

本薬の類縁物質の規格は当初、類縁物質含量の多い原薬ロット（ロット番号：410003A40、類縁物質 I、II 及び III の含量はそれぞれ、 $\quad$ 、 $\quad$ 及び $\quad$ ％）を用いた毒性試験結果（二項参照）及び「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（平成 7 年 9 月 25 日、薬審第 877 号）」の安全性の確認を必要としない閾値から設定されていた。これに対し機構は、類縁物質の規格値は規格設定用ロットの実測値から設定することが妥当であると判断し、申請者に規格値の再考を求めた。申請者は規格設定用ロットの実測値を示し、これに基づいた規格値を設定した。機構はこの設定を妥当と判断し、了承した。

機構は本薬の残留溶媒に関する規格値のうち、 $\quad$ について規格設定用ロットの実測値 $\sim$ ％に対して高い（ $\quad$ ％以下）ことから、その設定根拠について尋ねた。申請者は、 $\quad$ はクラス $\quad$ に該当し、ヒトに対して毒性は低く、「医薬品の残留溶媒ガイドライン（平成 10 年 3 月 30 日、医審第 307 号）」での PDE 値は $\quad$ mg/day であることから、米国及び EU の承認規格である「 $\quad$ ％以下」を設定したいと説明した。機構は本規格の設定根拠については十分説明がなされたとはいえないと考えるが、規格値自体に特段の問題はないと考え、これ以上の説明は求めなかった。

上述のとおり、本薬の水に対する溶解性はきわめて低く、このことが本薬の溶出性に影響を及ぼす可能性が考えられる。そのため製剤は微粒子化された原薬を用いて製造されており、原薬の規格値としてレーザー回折式粒度分布測定装置を用いた粒度分布が設定されていた。機構は、粒子径分布と溶出特性の関係について、検討結果に基づいて説明するとともに、粒子径の下限が設定されていない妥当性について説明を求めた。申請者は、以下のように説明した。試験の結果、本規格値を大幅に外れた粗い粒子径分布の製剤であっても、予想に反して 50%溶出時間はほとんど変化がなかったことから、微細な粒子があっても溶出の立ち上がりへの寄与はないと思われる。また異なる粒子径の原薬を原料とする製剤の溶出試験結果から、50 パーセントイル $\quad$ µm、90 パーセントイル $\quad$ µm 以下の

粒子径の原薬を用いた製剤において十分な溶出特性の得られることが判明した。以上から粒子径の目標規格は当初 50 パーセントイル  $\mu\text{m}$  以下で、かつ、90 パーセントイル  $\mu\text{m}$  以下であったが、実生産スケールにおいて  $\mu\text{m}$  以下で行ったロットの測定結果を参考に、更に粒子径の細かい積算篩下の 50 パーセントイルが  $\mu\text{m}$  以下で、かつ 90 パーセントイルが  $\mu\text{m}$  以下を規格値として設定した。

機構はさらに粒子を微粉化していくに従って溶出が頭打ちになる現象の理由を申請者に尋ねた。申請者は本件に関する試験結果を提示して、理由として、粒子径以外の要素が考えられること、さらに超微細な粒子径を持つ粉体が溶出の立ち上がりにも多少の差を示したとしても、吸収速度に意味を持つ差はないと考えていると説明し、原薬の品質をさらに一定にするために 10 パーセントイルが  $\mu\text{m}$  以上の規格を追加することを提案した。機構はこれらの説明を了解し、提案を了承した。

ボセンタン標準品の設定について、申請者は当初、純度を重んじるため申請製造プロセスを一部変更した方法により合成し、元素分析、UV、IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析等により構造決定を行った「マスター標準品」と、申請製造プロセスにより合成し、マスター標準品に対して IR、HPLC による確認を行った原薬の中から選定した常用標準品を設定し、製剤中のボセンタンの確認、定量には常用標準品を用いていた。申請上の標準品は常用標準品であるが、申請書には常用標準品の規格についての記載はなく、マスター標準品は社内規格であるにもかかわらず、申請資料中に記載されている標準品の規格はマスター標準品の規格であった。機構は本件について常用標準品を本申請の規格及び試験方法に関する標準品として、適切な規格を設定することを求めた。申請者は機構の要請に対して、以下のような規格の設定を提案した。

ボセンタン水和物標準品はマスター標準品を用いるか、本規格に適合する「ボセンタン水和物」の中から、次式により純度を求めるとき、もっとも純度の高いロットの原薬を常用標準品として用いる。

$$\text{純度} = (100\% - \text{残留溶媒}\% - \text{水分}\% - \text{類縁物質の計}\%) \times 569.63/551.61$$

機構は承認に係る標準品の規格が、申請資料上担保されない社内規格のマスター標準品に依存するのは好ましくないと判断し、マスター標準品と常用標準品について、いずれが「ボセンタン水和物標準品」であるのか明らかにするとともに、マスター標準品と常用標準品それぞれを標準品として設定する必要がある場合には、ボセンタンの標準品であることが明確となるようにそれぞれ適切な名称を付けること、標準品について具体的かつ適切な規格及び試験方法を示すことを求めた。申請者は、原薬及び製剤の「規格及び試験方法」で用いているのは常用標準品であるため、「規格及び試験方法」中では「ボセンタン水和物常用標準品」の名称で統一すること(後日特別審査の結果により名称を「ボセンタン水和物標準品」とした)、適切な規格を設定することを提示した。また、標準品の製造方法について原薬と一部異なる設定となっていたが、品質上のメリットが少ないことなどから原薬と同等の製造方法とし、必要に応じて精製を追加することとしたいと申し出た。機構は後日整備・提出された規格及び試験方法等とともに回答を了承した。

本製剤は質量偏差試験が試験方法として設定されているが、本剤は作用・副作用の強い医薬品の一つであると考えられることから質量偏差試験ではなく含量均一性試験を設定することが妥当であり、本剤で質量偏差試験を含量均一性試験の代わりに設定する場合には、質量偏差試験で含量の均一性を評価できていることが示される必要があると機構は考え、申請者に対して含量均一性試験を設定するか、本剤の質量偏差と含量均一性の関係についての評価結果を示した上で、本剤に質量偏差試験を適

用することの妥当性について説明を求めた。申請者は、質量偏差試験を設定することをあらためて表明し、本剤3ロットについて質量偏差試験の結果と含量均一性試験を行った結果を提示した。また打錠前の混合末についてサンプリングし、その含量を測定した結果から均一性に問題はなく、質量偏差試験の設定が妥当なものであることを主張した。機構は提出された成績から質量偏差試験を含量均一性試験に代えて設定しても、1製剤あたりの本薬含量を逸脱する製剤の発生はコントロール可能であると判断し、申請者の説明を了解した。

本製剤について申請当初、平均質量が規格値として設定されていたが、機構は本剤について定量法及び質量偏差試験が設定されていたことから、その設定意義について説明を求めた。申請者は、平均質量を規格値から削除することとし、機構はこれを了承した。

本剤に設定されている溶出試験の規格値に関して、機構は規格値設定ロットでの成績と比較して規格値が低めに設定されている可能性が考えられたため、現在の試験法及び規格値で、劣化品等（製剤の各種規格に適合しない製剤）との区別が可能であるか、試験結果を示して説明することを求めた。申請者は、加速試験条件下で3～9ヶ月間保存した製剤の試験結果を提示し、溶出が遅くなる傾向が見られることをもって劣化製剤の識別が可能であると主張した。機構は加速試験条件下で保存した製剤の溶出試験成績も申請者が設定した規格値に合致しており、提案された規格値及び試験方法によって劣化製剤の判別が可能であることが示されたとは言えないと判断し、再度申請者に説明を求めた。申請者は検討の結果、加速試験9ヶ月の試験結果は劣化が見られる製剤であるとし、この劣化品を識別できる規格値として「 $\frac{1}{2}$ 分後の溶出率が $\frac{1}{2}$ %以上」を設定した。機構は本規格値を妥当と判断し、了承した。

本剤の生菌数の試験に関して、本剤の製造あるいは保管中における細菌の混入及び繁殖の可能性は低いとして、「新医薬品の規格及び試験方法の設定について（平成13年5月1日、薬審第568号）」によりスキップ試験を適用する設定としていた。機構は、スキップ試験は新医薬品の承認申請時に試作ロットの結果や理論のみでその可否が判断できるものではなく、実生産の製造実績をもってGMP規制当局によりその可否が判断されるものと考え、以上の考えを申請者に伝えた上で、スキップ試験の可否については判断を行わないこととし、スキップ試験を含めた試験方法の妥当性についてのみ確認を行った。申請者は本件について了承した。

機構は生菌数試験をスキップ試験とする妥当性について申請者に説明を求めた。申請者は、これまでに製造した全ロットに対し、本試験を実施してきた結果、すべて適合していたことを踏まえて、「新医薬品の規格及び試験方法の設定について（平成13年5月1日、薬審第568号）」フローチャート#8：非無菌製剤の微生物限度試験に従ってスキップ試験とすることにしたと説明がなされた。また、最初のロットについて試験を実施後、適合していれば、それ以降試験の実施をロット/年とすることを考えており、適合しないロットがでた時点からルーチン試験とする計画である旨の説明があった。機構はこれらの説明を了解した。

上述のように申請資料概要には当初、バリデーションに関する記載がほとんどなく、機構は資料概要等にバリデーションに関する記述を加えるよう求めた。これを受けて各試験方法等についてバリデーションに関する記載が追加されたが、その中の定量法の室内再現精度について、自由度が不足していると考えられたため、申請者の見解を求めた。申請者は自由度の不足を認め、再試験を行うことを表明した。後日申請者より自由度の要件を満たした新たな試験成績が提出された。機構は提出された

試験成績について特段の問題はないと判断した。

以上の審査の結果、本薬及びその製剤の品質について特段の問題は見られないと機構は判断した。

#### ハ、 安定性に関する資料

原薬に関しては、長期保存試験(25℃/60%RH)、加速試験(40℃/75%RH)、苛酷試験(温度安定性・100℃、湿度安定性・60℃/80%RH、光安定性)のほか、中間的試験(30℃/60%RH)の各試験結果が提出されている。包装は苛酷試験以外は、実生産ロットと同じプラスチックインナーライニングを施した金属製ドラム(密栓)であった。長期保存試験及び中間的試験では性状、純度、水分、含量及び粒度分布が測定され、加速試験では粒度分布を除く同項目が測定されている。提出されたデータからは長期保存試験及び中間的試験ではいずれも48ヶ月まで、加速試験では6ヶ月の保存において、品質に影響を及ぼすと考えられる経時変化は認められなかった。苛酷試験として温度安定性、湿度安定性は無色ガラスバイアルを用いてそれぞれ開放、密栓で検討されているが、開放で行った温度安定性試験について48時間で融解が見られたほかは48時間までに大きな変化は見られなかった。また光に対する安定性は、「新原薬及び新製剤の光安定性試験ガイドライン(平成9年5月28日、薬審第422号)」により行った試験において、明確な品質の変化は見られなかった。

製剤に関しては、36ヶ月間の長期保存試験(25℃/60%RH)、9ヶ月間の加速試験(40℃/75%RH)が行われ、長期保存試験では性状、溶出試験、類縁物質、含量、生菌数、加速試験では性状、溶出試験、類縁物質及び含量が検討された。

加速試験中、溶出試験でわずかに溶出率が低下する傾向が見られ、9ヶ月に至って初期値を%以上下回るロットが出現し、あきらかな劣化を認めた。機構は6ヶ月まではその低下傾向はわずかであり、品質を担保する上で大きな問題とはならないと判断した。

製剤について申請時資料には、苛酷状態における安定性を検討した結果が付されていなかった。機構は、当該試験を実施しなかった妥当性について尋ねた。申請者は、以下のように説明した。原薬は固体状態において非常に安定であり、100℃で84時間、60℃/60%RHで2週間でも分解は認められず、光に対しても安定である。さらに、25℃/60%RH及び30℃/75%RHで5年間保存した場合の試験結果(参考資料)においても安定であり、新たな分解物は認められていない。また、製剤の長期(3年間)及び加速(40℃/75%RH、9ヶ月)の安定性試験においても新たな分解物は認められていないことから、原薬は製剤中においても安定であると考え、苛酷試験を実施しなかったとの説明があった。機構は、原薬の安定性については問題はないと考えるものの、それによって製剤の苛酷条件下での有効成分の安定性に関する変化が起こらないとは断定できないと判断し、製剤に関して苛酷条件下での安定性に関する資料を求めた。これに対して申請者は限られた試験条件ではあるものの、熱及び光に対する苛酷試験の成績を提出した。機構は、苛酷試験の試験設定は十分とは言えないものの、本製剤についてこれ以上の成績を求めることは困難であり、得られている成績から判断する限り、通常の保管による36ヶ月の安定性に特段の問題が生じる可能性は低いと判断した。

以上の審査の結果、機構は原薬及び製剤について、36ヶ月の安定性に特段の問題はないと判断した。



## 二、 急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他の毒性に関する資料

### 1. 提出された資料の概要

単回経口投与毒性試験は、ラット及びイヌを用いて実施された。イヌでは投与後5～6時間後に2000mg/kg 群の全例（雄2例）で白色調の軟便が認められた。概略の致死量は、ラット及びイヌとも2000mg/kg 超と判断された。

反復投与毒性試験としてラット及びイヌでの経口投与が実施された。

ラット4週間強制経口投与試験（20、200、2000mg/kg/日）では、2000mg/kg/日群の雄2例、雌5例が投与開始1～2週で死亡している。また、対照群の雄1例が投与29日に死亡している。対照群と2000mg/kg/日群の雄1例及び雌5例の死因は投与過誤によるとされているが、2000mg/kg/日群の雄1例の死因は不明であった。2000mg/kg/日群の雄全例で一過性の鎮静が認められた。また、200mg/kg/日群の雄2例及び2000mg/kg/日群の雄全例に一過性の下痢が、2000mg/kg/日群の雌雄全例で軟便が認められた。これらの所見は2週間の休薬期間中には観察されなかった。血液生化学的検査では、200及び2000mg/kg/日群の雌でビリルビン値の低下がみられた。2000mg/kg/日群の雄でチロキシンが増加したが、2週間の休薬期間終了時には正常値に回復した。しかし、同群雄でrT3及び甲状腺刺激ホルモンの増加傾向が認められた。尿検査では、200及び2000mg/kg/日群の雄で蛋白、2000mg/kg/日群の雄で三リン酸塩の3倍程度の増加がみられた。器官重量では200及び2000mg/kg/日群の雄で腎臓及び甲状腺重量の増加、2000mg/kg/日群の雄で肝臓重量の増加が認められた。これらの変動は肝臓重量を除き、休薬期間中に回復している。なお、剖検及び病理組織学的検査では、腎臓、甲状腺及び肝臓で重量増加に対応する異常はみられていない。以上の結果から本試験における無毒性量は20mg/kg/日と判断された。

ラット4週間混餌投与試験（200、600、1500mg/kg/日）では、いずれの群の雌雄ともに死亡動物はみられなかったが、600mg/kg/日以上投与群で軟便及び灰色便が認められたことから、本試験における無毒性量は200mg/kg/日と判断された。

ラット6ヶ月間混餌投与試験（40、200、1000mg/kg/日）において、いずれの群の雌雄ともに死亡動物はみられなかった。200mg/kg/日群の雌及び1000mg/kg/日群の雌雄で狭窄呼吸音が認められ、これらの変化は4週間の休薬期間で減少する傾向にあった。狭窄呼吸音が観察された200及び1000mg/kg/日群では鼻腔に局所刺激を示唆する組織学的変化が認められたことから、本薬含有粉末飼料を吸入した刺激による局所反応が原因と考えられている。体重は200mg/kg/日群の雌で減少傾向、1000mg/kg/日群の雌では体重増加の抑制が認められている。一方、雄では体重への影響はなく、その原因として、トキシコキネティクス試験の結果から、曝露量が雄に比べ雌で高いことが考えられている。摂餌量は1000mg/kg/日群の雌雄で増加傾向が認められている。血液学的検査で1000mg/kg/日群の雌雄で白血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン量が低下し、平均赤血球色素量(MCH)及び平均赤血球色素濃度(MCHC)の増加等の変化が特に雌で強く認められているが、1000mg/kg/日群の雌でみられたMCHCの増加以外は、生理的変動の範囲内であると判断された。血液像の検査で200mg/kg/日以上投与群の雌雄で好酸球、1000mg/kg/日群の雄で好塩基球が増加しているが、鼻腔での局所刺激作用に関連した変化であるとされている。器官重量については、1000mg/kg/日群の雌で副腎重量、同群の雌雄で肝臓重量の増加が認められている。病理組織学的検査では、狭窄呼吸音が認められた200及び1000mg/kg/日群の鼻腔前部で杯細胞の肥大、過形成及び炎症性の変化が認められ、本薬の刺激による

局所反応と考えられた。以上の成績から、本試験における無毒性量は 200mg/kg/日と判断された。

イヌ 4 週間投与試験 (500、1000 mg/kg/日) では、死亡例はいずれの群にも認められなかったが、1000mg/kg/日群の雌雄で嘔吐が投与後散発的にみられた。体重は 500mg/kg/日群の雌雄で軽度な増加抑制、1000mg/kg/日群の雌雄で増加抑制がみられ、摂餌量は 500mg/kg/日群の雌で軽度、1000mg/kg/日群の雌雄で中等度に減少した。血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の軽度な減少が 500 及び 1000mg/kg/日群の雌雄に認められた。血液生化学的検査では、ALT 及び ALP が 500 及び 1000mg/kg/日群の雌雄で増加した。臓器重量については、肝臓の重量が 500mg/kg/日群の雌雄及び 1000mg/kg/日群の雌で増加し、腎臓及び胸腺の重量増加並びに卵巣の重量減少が 500 及び 1000mg/kg/日群の雌で、副腎の重量増加が 1000mg/kg/日群の雌に認められている。病理組織学的検査では、肝臓の胆管増生が 500mg/kg/日群の雌及び 1000mg/kg/日群の雌雄、単細胞壊死・肉芽腫が 500 及び 1000mg/kg/日群の雌に認められ、また、1000 mg/kg/日群の雄 1 例に分泌腺の発育不良及び粘液減少と睪丸及び副睪丸での精液過少が認められている。以上から、本試験での無毒性量は 500mg/kg/日未満と判断された。

イヌ 6 ヶ月間投与試験 (10、60、400 mg/kg/日) において、死亡例はいずれの群にも認められなかった。血液生化学的検査では、ALP の増加が 400mg/kg/日群の雌雄に認められた。肝臓の重量増加が 400mg/kg/日群の雌雄に認められ、P450 誘導による変化と考えられている (二-8、へ-26)。剖検で肝臓の肥大が 400mg/kg/日群の雌雄に認められ、病理組織学的検査では、400mg/kg/日群の雌雄で肝小葉周囲の肝細胞肥大が認められことから、無毒性量は 60mg/kg/日と判断された。

イヌ 12 ヶ月間投与試験 (60、180、500mg/kg/日) では、死亡例はいずれの群においても認められなかった。500mg/kg/日群の雄 1 例で投与 247 日(35 週)以降に活動性の低下、徐脈、体重減少がみられたため、投与 315 日(45 週)に屠殺しているが、本薬投与との関連は不明とされている。また、500 mg/kg/日群の雌 1 例で投与 69 日(9 週)に体重低下、口腔内粘膜の血色低下と蒼白化及び行動低下がみられ、7 日間投薬を休止している。この 2 例の所見は、雄では循環器系、雌では赤血球と血小板に関連した所見であり、雌雄で異なるため投与との関連は不明であるとしている。胆汁検査では、コレステロール(CHOL)、胆汁酸及びリン脂質(PHLI)の減少並びに無機リンの増加が 180mg/kg/日以上群の雌雄で認められた。器官重量では 180mg/kg/日以上群の雌雄の肝臓、180mg/kg/日以上群の雄で腎臓の増加が認められた。病理組織検査では、胆嚢における粘膜上皮の空胞形成増加が 60mg/kg/日以上群の雌雄、粘膜の黄色色素沈着増加が 180mg/kg/日群の雄及び 500mg/kg/日群の雌雄、尿細管の黄褐色色素増加が 60mg/kg/日群の雄及び 180mg/kg/日以上群の雌雄、肝臓における毛細胆管内に黄色～黄褐色色素沈着が 500mg/kg/日群の雌雄で認められた。胆嚢における粘膜上皮の空胞形成増加は、胆汁中の高濃度被験物質及びその代謝物に対する生理的反応であり、また、尿細管の茶褐色色素増加は対照群にも軽度に見られる病変の亢進であり、直接的な毒性の影響ではないと考えられている。電子顕微鏡検査では、密度の高い斑状沈着物を含む毛細胆管の拡張が 500mg/kg/日群の雄 1 例でみられた。また、6 ヶ月間投与後に本薬に対する血清特異抗体の測定が行われ、いずれの群でも抗体は認められなかった。以上の結果から、本試験における無毒性量は、60 mg/kg/日と判断された。

肝重量の増加については、ラット 4 週間経口投与 (2000mg/kg/日群雄)、ラット 6 ヶ月間混餌投与 (1000mg/kg/日群雌雄)、イヌ 4 週間経口投与 (500mg/kg/日群雌雄、1000mg/kg/日群雌)、イヌ 6 ヶ月経口投与 (400mg/kg/日群雌雄)、イヌ 12 ヶ月経口投与 (180mg/kg/日群以上の雌雄) において認めら

れ、ラット、イヌ共にみられる所見であった。また、赤血球系パラメータの軽度の減少がラット、イヌ共に認められたが生理的変動範囲の変化であった。

トキシコキネティクス試験は単回、反復、がん原性、生殖毒性試験と平行して実施され、本薬はマウス、ラット及びイヌにおいては、ミクロゾーム肝薬物代謝酵素を誘導する結果、血漿中濃度が時間経過と共に減少した。また、マウス、ラット及びイヌに経口投与した時、バイオアベイラビリティは50～60%を示し、ラット及びマウスでは雌の曝露量は雄よりも高く、イヌが最も高い曝露量を示した。一方、本薬をある投与量以上を経口投与した場合、いずれの動物においても、投与量の増加に比例した曝露量の増加が見られなかった。これは胃腸管からの吸収が飽和したと考えられている。

生殖発生毒性試験はラット及びウサギを用いて実施された。

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（60、300、1500mg/kg/日）において、本薬投与に起因すると考えられる一般状態の変化は雌雄とも糊状便のみであり、無毒性量は雌雄ラットの一般毒性学的、生殖能及び胚・胎児に対しいずれにおいても1500mg/kg/日と判断された。

ラット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（60、300、1500mg/kg/日）において、1500mg/kg/日投与群の7例の母動物のうち6例では新生児が全て死亡した。母動物の乳腺の未発達が認められたことから、それが原因と考えられた。300及び1500mg/kg/日投与群で、体重増加量の軽度な減少が妊娠期間（妊娠6～20日）、分娩後1～4日でみられた。母動物の剖検時、全ての新生児死亡の原因と考えられる乳腺組織中の無乳状態が300mg/kg/日投与群で5/19例、1500mg/kg/日投与群で11/17例に認められた。死亡児剖検所見において300及び1500mg/kg/日投与群で翼状突起の変異及び口蓋無形成が用量依存的に増加した。新生児の生後4日生存率及び離乳率では300mg/kg/日以上投与群で有意に低下した。離乳時の体重は、300及び1500mg/kg/日投与群で対照群に比較し高値を示したが、これは同腹児数の減少に起因するものであると考えられている。以上の結果から、本薬の母動物に対する一般毒性学的及び生殖能並びに出生児に対する無毒性量はいずれも60mg/kg/日と判断された。

ラット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（追加試験）（30、60、120、300mg/kg/日）は、ラットの胚・胎児発生に関する試験で投与量依存的に発生した翼状突起の変異及び口蓋の無形成への類縁物質（Ⅲ：0.1%、Ⅱ：0.6%、Ⅰ\*：0.3%含有）の影響を検討するため強制経口投与で実施された。新生児の出生時及び出生後4日の体重は投与群と対照群間で差がなかったが、4日目生存率は300mg/kg/日投与群で低下した。出生後4日目に約半数の生存新生児についての内臓観察の結果、120mg/kg/日投与群及び300mg/kg/日投与群で口蓋の一部無形成がそれぞれ3.1%及び7.9%観察され、死亡児を含めた場合はそれぞれ3.9%、15.6%であった。その他、300mg/kg/日投与群で動脈起始異常及び短縮無名動脈が内臓変異として、それぞれ9.4%に観察された。翼状突起の湾曲は対照群の0%に対し、30、60、120及び300mg/kg/日投与群でそれぞれ3.8%、13.3%、44.9%及び77.9%で用量に依存して増加した。また、舌骨の変形が60mg/kg/日投与群以上で認められている。以上の結果から、本薬の母動物に対する一般毒性学的及び生殖能に関する無毒性量は300mg/kg/日、また、出生児に対する無毒性量は30mg/kg/日未満と判断された。

出生前、出生後の発生及び母動物の機能に関する試験における哺育期間での新生児死亡が増加し、離乳率は300mg/kg/日投与群及び1500mg/kg/日投与群でそれぞれ57.6%、14.3%であったことから、母動物の妊娠、授乳状況、哺育行動及び出生児への影響を明確にするため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（同腹児交換試験）が実施された。その結果、本薬を妊娠6日目から分娩後も投与した場合、妊娠期間、着床数、吸収胚数、分娩児数、出生児数は各投与群間で差が無かったが、出生後、投与群からの出生児は4日目までに多く死亡し、離乳率低下は胎児期での影響が大きいことが原因と考えられた。

胚・胎児発生に関する試験（60、300、1500mg/kg/日）において、一般状態で母動物に対する本薬投与の影響はみられなかったものの、体重増加量及び摂餌量は1500mg/kg/日投与群で減少する傾向が認められた。なお、投与過誤とされる死亡例が2例みられた。生存児での内臓観察では奇形児数の増加が用量依存的にみられた。1500mg/kg/日投与群の奇形は55例（57.9%）であり、54例（56.8%）に口蓋裂がみられ、他の1例では無名動脈が認められた。口蓋裂は300mg/kg/日投与群1例でも認められた。骨格奇形を有する胎児数は1500mg/kg/日投与群では83例（76.9%）であり、90.5%の母動物が奇形骨格児を有していた。最も顕著な奇形は翼状突起の融合であり、57.4%の胎児に認められ、次いで翼状突起の湾曲（17.6%）、下顎骨短小（15.7%）、下顎骨変形（10.2%）及び舌骨短小（7.4%）が認められた。骨格変異の出現頻度は300及び1500mg/kg/日投与群ではそれぞれ52.4%、86.1%と高く、300mg/kg/日投与群の主たる変異は翼状突起のわずかな湾曲、鼓室骨あるいは舌骨の形態変化であった。また、高用量群では主として舌骨の形態変化（68.5%）であり、その他、鼓室輪の形態変化あるいは翼状突起のわずかな湾曲が観察された。以上の結果から、妊娠動物の一般毒性学的無毒性量は300mg/kg/日及び生殖能に関する無毒性量は1500mg/kg/日、並びに胚・胎児に対する無毒性量は60mg/kg/日と判断された。

ウサギの胚・胎児発生試験（150、450、1500mg/kg/日）で、妊娠動物の対照群、150、450、1500mg/kg/日でそれぞれ1例、1例、2例及び4例の切迫屠殺が行われた。一般状態では、立毛及び排便の減少が150mg/kg/日以上投与群で認められ、また、450mg/kg/日投与群の脱腸1例を除き、全て四肢の麻痺を呈していたが、これらは脊髄損傷が関与し、ウサギの経口投与時に生じた排除行動に起因した結果であり、高濃度投与群で多発した理由は、投与物質の粘調度が高く、投与時間がより長かかったことが原因と判断された。いずれの投与群においても母動物の死亡は認められず、体重への影響も認められなかった。一方、胎児に関しては対照群との間に有意差は無いものの、高投与群においては胎児体重、胎児体長の低下傾向が認められた。骨格検査の結果、骨格異常発現は観察されなかった。トキシコキネティクス試験の結果、妊娠7日目のAUC<sub>1-23h</sub>（ $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は150mg/kg/日投与群、450mg/kg/日投与群及び1500mg/kg/日投与群でそれぞれ2.7、12.1及び17.7、妊娠18日目の値は7.4、27.2及び27.7であり、連続投与により低用量の150mg/kg/日で最高約2.7倍の蓄積が認められた。また、450mg/kg投与量以上では腸管からの本薬の吸収が飽和状態となることが示唆された。

以上の結果から、妊娠動物の一般毒性学的無毒性量は150mg/kg/日未満、生殖能に関する無毒性量は1500mg/kg/日であり、胚・胎児に対する無毒性量は450mg/kg/日と判断された。またウサギに対する催奇形作用は無いと判断された。

本薬及び3種の類縁物質（Ⅲ、Ⅱ、Ⅰ）の口蓋発達に対する影響が*in vitro*試験で検討された。妊娠13日齢のNMRIマウス胎児の頭蓋顔面部を摘出し、DMSOに溶解した本薬及び3種の類縁物質を添加したBigger's BGJ mediumで72時間培養し、その後口蓋を生理食塩水で洗浄し二次口蓋の融合程度を観察した。その結果、いずれについても口蓋原基の口蓋閉鎖への影響は認められなかった。

以上の結果より、ラットにおいて交尾行動及び受胎能、着床前胚及び着床に対しボセンタンの影響は認められなかった。更に、精子数、運動率、生存率及び精巣重量に本薬によると考えられる変化はみられなかった。しかし、ラットでの胚・胎児毒性試験においては、用量依存的に催奇形性が認められ、これらの奇形はET-1 ノックアウトマウスにみられる奇形の型と類似していることから、本薬投与により発現した催奇形性作用はこの種の薬剤に共通した作用によるものと考えられた。

一方、ウサギにおいては、1500 mg/kg までの用量で催奇形性は認められなかった。トキシコキネティクス試験により、ウサギの曝露量はラットの約 1/20 であったことから、ウサギにおいて催奇形性作用がみられなかった要因として曝露量の差も考えられる。

以上の結果より、本薬はラットで催奇形性作用が認められ、ヒトにおいても同様の作用を有する可能性があると考えられた。

遺伝毒性試験は *in vitro* 試験として細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験及び培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験、初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験並びに *in vivo* 試験としてマウスを用いた小核試験が実施されている。いずれの試験でも、本薬に遺伝毒性は認められていない。

がん原性試験はマウス及びラットを用いて経口投与で実施された。

マウスにおける 13 週間混餌投与試験 (0、500、1500、4500mg/kg/日) においては、肝臓の重量増加が 500mg/kg/日以上以上の雌雄群で、また小葉周辺性肝細胞肥大が 4500mg/kg/日投与群の雄で認められた。

マウスにおける 2 年間混餌投与によるがん原性試験 (100、450、2000、4500mg/kg/日) における生存率や一般状態では各群に差は認められなかったが、器官重量では投与全群で肝重量の増加が認められ、病理組織学的検査では、腫瘍性病変として 450mg/kg/日以上以上の群の雄で肝細胞腺腫及び肝細胞癌がみられ、腺腫と癌の合計した発現数が有意に増加した。一方、雌においては、肝細胞腺腫及び肝細胞癌単独並びに合計発現数においても増加は認められていない。この肝細胞腫瘍は、通常バルビツール酸などの薬剤でも認められている腫瘍であり、ボセンタンの遺伝毒性や発がん作用により発現したものではないと考えられた。トキシコキネティクスにおいて、投与に 관련된曝露が認められ、4500mg/kg/日投与群における AUC 及び  $C_{max}$  は、雌が雄のそれぞれ 2.3 倍及び 3 倍までの値を示した。投与量に応じた曝露量 (AUC) の増加の程度は低く、投与 2 週以降 2000 及び 4500mg/kg/日投与群の AUC 値には大きな差は認められなかった。450、2000 及び 4500mg/kg/日投与群では投与期間の延長 (投与 2 週から 52 週) により曝露量は約 50%まで減少したが、100mg/kg/日投与群における AUC (最低値 8.06 $\mu$ g $\cdot$ h/ml) はヒト予想臨床用量 250mg 錠における AUC (7600ng $\cdot$ h/ml) より十分に高い値を示した。なお、代謝物である Ro 48-5033 及び Ro 47-8634 の血漿中濃度は投与期間に 관련된増加は認められず、Ro 64-1056 は検出限界以下であった。

2 年間のラットがん原性試験 (0、125、500、2000、3000mg/kg/日) では、ラット 4 週間、20 週間及び 6 ヶ月混餌投与試験結果より、Wistar 系ラットの飼料形態及び投与量が設定された。これらの試験で 1000~3000mg/kg/日投与で明らかな毒性が認められなかったため、最高用量は混餌濃度として

許容されている5%に相当する3000mg/kg/日とし、最低用量はヒト予想臨床用量より高い用量で、無毒性量と推定される125mg/kg/日とされた。一般状態では、うずくまり姿勢が500mg/kg/日以上の子の雌、2000mg/kg/日以上の子の雄、ラッセル音が2000mg/kg/日以上の子の雌でみられた。また、切歯破折が500mg/kg/日以上の子の雌雄でみられた。呼吸異常音及びくしゃみの頻度は、125mg/kg/日以上の子の雌、500mg/kg/日以上の子の雄で増加がみられた。2000mg/kg/日以上の子の雄、500mg/kg/日以上の子の雌で体重増加の抑制が認められた。剖検では雄の3000mg/kg/日投与群で甲状腺の腫大が投与104週に認められた。病理組織学的検査では、125mg/kg/日以上の子の雌雄で鼻炎、歯髄炎症、歯の異形成、歯根炎症が投与52週、鼻炎、歯形成異常、歯根炎症が投与104週にみられた。腫瘍性病変は、3000mg/kg/日投与群の雄で甲状腺の濾胞細胞腺腫及び濾胞細胞癌が、有意に増加した。甲状腺腫瘍は、通常、バルビツールなど他の薬剤でも認められている腫瘍であり、ボセンタンの遺伝毒性や発がん作用により発現したものではないと考えられた。トキシコキネティクスでは、3000mg/kg/日投与群における $C_{max}$ は雄4.67-8.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、雌15.5-21.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $AUC_{0-24h}$ は雄83.9-136 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、雌225-362 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。このように曝露量は雄に比べ雌で高く、雌では雄の4倍までの値を示した。用量に応じた曝露量の増加の割合は低く、投与量の24倍の増加に対し、 $AUC$ は雄では4.2倍、雌では5.2倍の増加にとどまり、2000及び3000mg/kg/日投与群の値に大きな差は認められなかった。125mg/kg/日投与群における $AUC$ （最低値20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ）はヒト予想臨床用量250mg錠における $AUC$ （8791 $\text{ng}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ）より十分に高い値を示した。

免疫毒性試験はモルモット及びマウスを用いASA、PCA試験が実施された。抗体の測定はELISA法であった。モルモットをアジュバントと共に処置した場合、弱い免疫毒性を示したが、マウスでは認められず、本薬がアレルギー反応を誘発する可能性は低いと考えられた。また、イヌに本薬60、180、500mg/kg/日を52週間反復経口投与した毒性試験において、投与後3カ月の時点でそれぞれの投与群から採取した血漿について、モルモットのRo 47-0203に対する抗体を陽性対照に用いたRo 47-0203-GPSA conjugateによるRo 47-0203抗体の検出のためのELISA系で、イヌでの抗体の検出を試みたが、抗体陽性反応は認められなかった。

## 2.機構における審査の概略

ラット反復投与で、薬物曝露量に性差が認められることに対し説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。雌ラットでは雄に比べ排泄が軽度ではあるが、遅延することにより、高用量投与時に曝露量の性差が顕在化した可能性が考えられる。さらに本薬は主として代謝されて糞中に排泄されることが確認された（へ項参照）。ラット及びヒトとも主に本薬はチトクロームP450(CYP)ファミリーによって代謝された後、胆汁に排泄される。ラットでは性の違いによる代謝酵素の多型が知られており、CYP2C、CYP3A等いくつかのCYPサブファミリーには性差が報告されていることより、ラットで雌雄による血中濃度の差が生じたと思われる。ヒトでは本薬は主としてCYP3A4とCYP2C9によって代謝され、これら酵素の性差を示す報告はない。健康成人に単回(ト-8)及び反復(ト-9)投与した $AUC$ 値には性差が認められていない。よってラット認められた性差による曝露量の違いがヒトで見られる可能性は少ないと考える。

機構は申請者の回答を了承した。

機構は投与方法の違いにより甲状腺に対する影響が異なる原因について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。強制経口投与毒性試験の雄においてチロシンの増加、rT3 及び甲状腺刺激ホルモンの増加傾向が見られているが、混餌投与毒性試験では同所見が見られていない。しかし混餌投与では、有意な増加には至っていないが、投与量に応じた増加傾向が見られている。強制経口投与時に甲状腺への影響がより顕在化した原因は、投与方法の違いに基づく本薬の血中への移行速度の違いによるものと考える。Cmax と AUC が同等であっても混餌投与では血中薬物濃度が徐々に上昇するのに対し、強制経口投与では血中薬物濃度がより急速に上昇し、結果として TSH の分泌がより鋭敏になったと考える。

機構は、申請者の回答を証明する直接的な実験結果はなく、強制経口投与と混餌投与時の甲状腺ホルモン値を比較すると、強制経口投与では用量に相関した変動ではないのに対し、混餌投与では投与量に相関した甲状腺ホルモン値の増加が認められ、この変化は本薬の血中への移行速度だけでは説明が困難であると考え。しかし、この変化が認められるのは高用量投与であること、増加値が微小であること、ラットの甲状腺は各種薬物によって容易に反応すること、ヒトでの有害作用が報告されていないことなどから、動物試験の結果がヒトで発現する可能性は低いと考える。

機構はエンドセリン(ET<sub>A</sub>)選択的受容体拮抗作用を有する多くの薬剤でラットへの投与により精細管の拡張が見られることから、本薬投与での精巣機能に対する影響について説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。各毒性試験の雄ラット生殖器官を病理学的に精査したところ、本薬投与によって雄生殖器に影響を認めた試験は2年間がん原性試験のみであり、その他のラット、イヌでの試験さらにマウスがん原性試験では生殖器への影響は認められなかった。ラットがん原性試験でのみ認められた変化は精細管萎縮でその程度は軽度から中等度であった。

しかし以下の理由より本薬投与に起因する毒性所見としなかった。

- ① 精細管萎縮は対照群でも認められた。
- ② 重症度はいずれも軽度であった。
- ③ 中等度及び重度の発生数は対照群と投与群で差がなかった。
- ④ 重症度と投与量に関連がない。
- ⑤ 両側性より片側性に多く見られた。薬物投与に起因する生殖器の変化は通常、片側性に発現しない。
- ⑥ 他の動物種では変化が認められない。

しかしながら、他の ET<sub>A</sub> 選択的受容体拮抗剤の中には不可逆的な精巣への影響が認められていることからヒトへの影響を考慮し、添付文書中に実験結果を記載することとする。

機構はヒトへの影響が不明なことより、添付文書へ実験結果を記載し情報提供することは有用と考え、回答を承諾した。

機構は毒性試験で認められた肝臓の所見について詳細な説明を求めた。

申請者は本薬の肝臓に対する影響として、以下の考察を回答した。

肝重量について、全ての動物種の雌雄で用量依存的に肝重量が軽度増加した。これは大量に本薬が投与されたことにより、肝薬物代謝酵素が誘導されたためと考える。またマウスにおいて、2年間のがん原性試験で雄の高用量群で用量依存的に肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生の増加が見られたが、本薬の遺伝毒性は陰性であり、肝薬物代謝酵素を誘導することによる二次的な腫瘍の増加と考える。ラットにおいて、重量の軽度の増加以外、変化は認められない。イヌにおいては、4週投与の高用量投

与で ALT 及び ALP の増加、軽度な胆管増生、6 ヶ月投与では ALP の増加と肝小葉周囲肝細胞の肥大、12 ヶ月投与では ALP の増加と胆汁酸塩の増加がみられ、病理組織学的には黄色色素沈着及び胆嚢における粘膜上皮の空胞形成の増加、胆汁うっ滞（肝細胞及び毛細胆管内のビリルビン沈着）及び粘液排泄の増加が認められた。以上のように本薬の肝臓に対する影響は各動物種とも肝重量の増加であった。これは薬物代謝酵素誘導作用により肝ミクロソームでの薬物代謝酵素の合成亢進に対応した反応性所見であると考えられる。イヌでみられた胆管系の増性像は本薬の排泄が肝を介することより、排泄亢進に対応した生理機能の亢進による変化であり、ALP 等の上昇は胆汁排泄と本剤の胆汁中への排泄が競合した胆汁うっ滞が原因と考えられる。

機構は、動物では肝臓に対する共通の所見は認められていないものの、臨床試験における有害事象では肝機能障害の発現症例での肝胆道系障害が報告されていることから、ヒトにおいては、代謝、排泄を含め肝臓に対し影響を及ぼす可能性があると考えられる（ト項参照）。

#### ホ. 薬理作用に関する資料

##### 1. 提出された資料の概要

申請時に提出された評価資料中、資料ホ-13 は適合性書面調査により、試験実施過程が生データで確認できないなど信頼性に問題があると指摘されたことから、同様の試験が追加実施された（資料ホ-18～21）。また、審査の過程において、本薬以外のエンドセリン拮抗薬を用いた試験や試験方法の記載がない等記載内容の妥当性について添付資料からは確認できない試験があったため、申請者に対応を求めたところ、資料ホ-3（Circulation(Suppl. I) 100: I-474, 1999）、資料ホ-8 及び資料ホ-10 の一部は参考資料とされ、資料ホ-10 及び II については再試験が実施された（資料ホ-26）。

##### (1)作用機序に関する試験

①エンドセリン A (ET<sub>A</sub>) 受容体及びエンドセリン B (ET<sub>B</sub>) 受容体を発現している細胞及び組織に対する本薬の結合親和性が検討された。本薬は ET<sub>A</sub> 受容体発現細胞（リコンビナント(Sf9 及び CHO 細胞)、ヒト平滑筋及びラットメサンギウム細胞）においてエンドセリン (ET) -1 の結合を濃度依存的に阻害し、K<sub>i</sub> 値は 4.1-43nM であった。ET<sub>B1</sub> 受容体発現細胞（リコンビナント(Sf9 及び CHO 細胞））及び組織膜標品（ヒト胎盤及びブタ小脳）においても濃度依存的阻害が認められ、K<sub>i</sub> 値はそれぞれ細胞では 730 及び 343nM、組織では 95 及び 152nM であった。ET<sub>B2</sub> 受容体発現組織（ブタ気管）に対して、本薬は BQ-3020 及びサラホトキシシン S6c（両者とも ET<sub>B</sub> 受容体選択的作動薬）の結合を濃度依存的に阻害し、K<sub>i</sub> 値は 38 及び 69nM であった。またヒトリコンビナント ET<sub>A</sub> 受容体及びヒト胎盤 ET<sub>B</sub> 受容体に対する結合は、Scatchard plot の結果から競合的であることが示された。

（J Pharmacol Exp Ther 270: 228-235, 1994, 資料ホ-1、②～⑤は同資料。）

②ラット胸部大動脈リング標本（ET<sub>A</sub> 受容体存在）における ET-1 誘発血管収縮反応を本薬（0.3-3μM）は競合的に拮抗し、その pA<sub>2</sub> は 7.28 であった。また、ET-1（500pM）で予め収縮させた標本に対しては、本薬（0.1-3μM）は濃度依存的な弛緩作用を示した。

③ウサギ上腸間膜動脈（ET<sub>B1</sub> 受容体存在）においてプロスタグランジン F<sub>2a</sub>（0.1μM）あるいはメトキシサミン（1μM）添加による収縮安定の後、サラホトキシシン S6c の累積的添加により誘発される弛



緩反応を本薬 (1, 10 $\mu$ M) は競合的に拮抗し、その pA<sub>2</sub> は 6.72 であった。

- ④ラット気管リング標本 (ET<sub>B2</sub> 受容体存在) において、サラホトキシシン S6c の累積的添加により誘発される収縮反応を本薬 (3-10 $\mu$ M) は競合的に拮抗し、その pA<sub>2</sub> は 5.94 であった。
- ⑤脊髄破壊雄性ラットにおける BigET -1 (ET-1 前駆体) 誘発昇圧反応に対して、本薬の静脈内 (3-30mg/kg) 及び経口 (1-100mg/kg) 投与は、用量依存的な抑制作用を示した。また ET-1 静脈内投与により誘発される降圧とそれに続く昇圧反応は、本薬の静脈内投与 (3-30mg/kg) により用量依存的に抑制された。
- ⑥ラット血管平滑筋細胞に対する血小板由来増殖因子 (PDGF、50ng/mL) と ET-1 (10nM) 同時添加による増殖促進作用を本薬 (3-100 $\mu$ M) は濃度依存的に抑制した。(資料ホ-2、⑦は同資料。)
- ⑦ラット気管平滑筋細胞に対する血小板由来増殖因子 (PDGF、50ng/mL) と ET-1 (10nM) 同時添加による増殖促進作用を本薬 10 $\mu$ M は抑制した。本薬 0.01-1 $\mu$ M では増殖促進作用の抑制は認められなかった。
- ⑧Wistar 系雄性ラットにおける一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬 (N<sup>G</sup>-nitro L-arginine methylester、L-NAME) 誘発昇圧反応に対する本薬の作用が検討された。本薬 3mg/kg 静脈内投与で L-NAME 誘発昇圧反応を抑制した。ET<sub>A</sub> 受容体選択的拮抗薬である BQ-123 (3mg/kg) も同様に昇圧反応を抑制した。(Circulation 91: 771-775, 1995、資料ホ-4)
- ⑨SD 系ラットにおける本薬投与による血漿量及びヘマトクリット値に及ぼす影響が検討された。開始時に本薬 10mg/kg を静脈内投与し、その後 100mg/kg が 10 日間経口投与された。10 日目のヘマトクリット値の低下傾向及び体重で補正した血漿量の増加傾向は示されたが、試験開始前と比べ、有意なものではなかった。(資料ホ-5)
- ⑩Wistar 系雄性ラットを用いて ET-1 誘発アルブミン溢血抑制作用が検討された。ET-1 1nmol/kg で誘発されたアルブミン溢血 (気管 (上部及び下部)、胃、十二指腸、脾臓及び腎臓) は、本薬 10mg/kg 静脈内投与により有意に抑制された。(Br J Pharmacol 113: 845-852, 1994、資料ホ-6)
- ⑪DOCA(deoxycorticosterone acetate)食塩高血圧ラットにおける本薬 100mg/kg/日混餌投与は、心内膜下の間質コラーゲン及び血管周囲コラーゲン量を低下させたが、収縮期動脈圧の有意な低下は認められなかった (Cardiovasc Res 31: 287-295, 1996、資料ホ-7)。
- ⑫神経伝達物質 (アデノシンなど計 13 種)、脳腸ペプチド (アンジオテンシン II 1 型など計 17 種) などの各種結合受容体及びイオンチャネルに対する本薬 10 $\mu$ M における結合親和性が検討された。本薬 10 $\mu$ M は、ニューロキニン A の受容体結合に対して 54.1%の阻害を示した他は全て 50%未満の阻害率であり、ET に対する親和性と比較して弱いものであった。(資料ホ-12)

(2) 肺高血圧動物モデルにおける試験 (J Appl Physiol 79: 2122-2131, 1995、資料ホ-9)

- ①事前に 2 週間低酸素曝露 (10% O<sub>2</sub>) した SD 系雄性ラット (低酸素誘発肺高血圧症モデル) に対する本薬 100mg/kg/日低酸素曝露前 2 日間混餌投与は、低酸素曝露 (90 分間) による平均肺動脈圧の上昇及び平均全身動脈圧の上昇を抑制した。
- ②①と同様の処置を行ったラットに、本薬 100mg/kg/日混餌投与を低酸素曝露 2 日前から低酸素曝露期間中 (2 週間) 行ったとき、平均肺動脈圧の上昇、右室心筋重量比の増大及び小肺動脈の内壁の肥厚が抑制された。

③①の事前低酸素曝露期間を6週間とし、低酸素曝露開始2週間後より4週間本薬100mg/kg/日混餌投与を行ったとき、平均肺動脈圧の上昇、右室心筋重量比の増大及び小肺動脈の内壁の肥厚が抑制された。

#### (3) 代謝物の薬理試験 (資料ホ-26)

代謝物3種及び本薬のヒト組換え型ET<sub>A</sub>及びET<sub>B</sub>受容体(CHO細胞及びバキュロウイルス感染昆虫細胞)並びにヒト胎盤ET<sub>A</sub>及びET<sub>B</sub>受容体に対する結合親和性が検討された。<sup>125</sup>I-ET-1の結合に対するIC<sub>50</sub>は、Ro48-5033、Ro47-8634、Ro64-1056及び本薬でそれぞれ、ET<sub>A</sub>受容体に対し、50~100nM、9963~26650nM、4413~7838nM及び24~37nM、ET<sub>B</sub>受容体に対し、456~967nM、5415~11700nM、9628~24650nM及び215~458nMの範囲であった。

#### (4) 胆汁排泄に関する薬理試験

高血圧症を対象とした海外臨床試験(NC-15020試験、追加参考資料ト-3)において、肝アミノ転移酵素及び血清胆汁酸塩の上昇が認められた(本薬100mg群4/48例、500mg群3/46例、1000mg群3/44例、1000mg×2群5/49例、プラセボ群1/47例、エナラプリル20mg群0/48例)。発現機序として本薬の胆汁酸塩排泄とそれに伴う胆汁うっ滞が推測されたため、本薬の胆汁排泄に及ぼす影響について以下の検討がなされた。なお、これらの試験成績は申請時は二項資料として提出された。

①本薬及び代謝物(Ro48-5033)の胆汁酸塩輸送に及ぼす影響が、ラット胆管側肝細胞膜ベシクル(canalicular liver plasma membrane vesicles, cLPMV)を用いて検討された。本薬はATP依存タウロコール酸輸送を競合的に阻害し、そのKi値は3.4μMであった。よって本薬はATP依存性胆汁酸トランスポーター(canalicular bile salt transporter, cBST)の基質と競合することにより胆汁酸排泄を阻害するとされた。また、臨床試験において本薬の肝障害を増強したと判断された併用薬(グリベンクラミド、プラバスタチン、フルバスタチン及びロサルタン)も胆汁酸塩排泄阻害を引き起こしていると考えられた。(資料ホ-22)

②本薬の主な排泄経路は肝臓とされていることから、本薬の肝細胞への取込みの機序について検討された。有機アニオントランスポーター(oatp1及びoatp2)を発現させた卵母細胞における本薬の取込みが検討され、oatp1発現卵母細胞でのみ本薬の取込みが認められた。また、ラット肝細胞から単離したmRNAを注入した卵母細胞において、Na<sup>+</sup>非依存的に本薬の取込が認められたことから、未知のNa<sup>+</sup>非依存的な輸送蛋白の関与も示唆されると考察された。また、cLPMVを用いて、本薬の取込みがATP存在下及び非存在下で計測されたが、ATPの有無にかかわらずわずかであった。(資料ホ-23)

③ATP依存タウロコール酸輸送に与える影響がcLPMVを用いて検討され、本薬は競合的に阻害することが示された(Ki値3.4μM)。(資料ホ-22及び23)

④胆汁酸輸送ポンプ(bile salt export pump, BSGPあるいはSister of p-glycoprotein, Spgp)を発現させたSf9細胞から調製した細胞膜ベシクルを用いて、タウロコール酸取り込みに与える本薬及び代謝物の影響が検討された。本薬及び代謝物Ro47-8634(共に100μM)はATP依存タウロコール酸輸送を阻害したが、代謝物Ro64-1056及びRo48-5033には阻害作用は認められなかった。(資料ホ-23)

⑤ラットを用いて*in vivo*における本薬の胆汁うっ滞誘発が検討された。本薬(3-50mg/kg)単回静脈

内投与後 10 分の血漿中胆汁酸塩濃度が測定され、本薬 20mg/kg 投与以上から血漿中胆汁酸塩濃度の上昇が認められはじめた。本薬とグリベンクラミドの同時投与による検討も実施され、血漿中胆汁酸塩濃度の相加的上昇が認められた。(資料ホ-24)

⑥本薬 (20、500mg/kg/日) の 23 又は 28 日間反復経口投与時の胆汁生産量に与える影響が、イヌを用いて検討された。24 時間平均胆汁産生量 ( $\pm$ SE) は、20mg 投与群 (28 日間) で  $153 \pm 11.9 \rightarrow 179 \pm 2.22$ g (n=3)、500mg 投与群 (23 日間) で  $189 \pm 56.8$  (n=3)  $\rightarrow 360 \pm 76.4$  (n=2) に増大した。(資料ホ-25)

以上の結果から、本薬は胆汁酸塩の胆汁中排泄に競合し、肝臓中に胆汁酸塩の貯留を引き起こし、胆汁酸により肝細胞に障害を引き起こし、結果的に肝酵素の上昇を引き起こすと考察された。

#### (4) 安全性に関する薬理試験

本薬の一般薬理作用はマウス、ラット、モルモット (摘出回腸)、ウサギ及びイヌを用いて検討された。一部の試験 (申請時資料ホ-13) は、資料の信頼性に問題があると判断され、同様の試験が追加実施された (ホ-18~21)。

試験の結果、中枢神経系、自律神経系、呼吸・循環器系及び消化器系には影響を及ぼさないとされた。水・電解質代謝に及ぼす影響については、3mg/kg 経口投与では作用が認められなかったが、30mg/kg 経口投与では尿量の低下傾向、300mg/kg 経口投与では尿量の低下、30 及び 300mg/kg 経口投与では  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  の排出低下、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  比の増加が認められた。これらは本薬の血管拡張作用による灌流圧低下に起因した二次的な影響によるものと考察された。

## 2. 機構における審査の概要

機構は、適合性書面調査において、被験物質の調製及び投与が適切に行われていることを確認できず、計画した投与量が投与できていない可能性があるとして一般薬理試験 (ホ-13) の信頼性が判断できないとされたことから、調査対象とならなかった試験に関して、その試料の調製方法についての確認と調製方法の妥当性について説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。静脈内投与では、全てボセンタン Na 塩を用い、蒸留水 (最大 30mg/mL) 又は 300mM グルコース水溶液 (ホ-6 のみ、最大 10mg/mL) に溶解し、必要に応じて 40°C に加温し、目視で溶解したことを確認後、投与している。経口投与の場合は、ボセンタン水和物を用いたときは、5%アラビアゴム溶液 (最大 20mg/mL) 又は 0.5%CMC-Na 溶液 (最大 75mg/mL) に microsuspension とし、ボセンタン Na 塩を用いたときは、静脈内投与と同じ方法か、0.3% tween80 溶液 (10mg/mL) で懸濁液としている。in vitro 試験の場合は、追加安全性薬理試験 (ホ-20) でボセンタン Na 塩を蒸留水で溶解後 (0.574mg/mL)、水/medium で希釈している以外は、全て DMSO に溶解後 (最大 79.8mg/mL)、DMSO 又は medium で適宜希釈している。被験物質の溶解性は、ボセンタン Na 塩 50mg を水 1mL の割合で、加温及び攪拌なしに室温に放置した場合の試料を 1~3 日後に測定した場合、平均 11.9mg/mL (3.7~19.9mg/mL) の溶解であった。また、40°C に加温した場合の溶解性をボセンタン Na 塩 750mg に水 25mL を加えて確認したところ、加温後 10 分間室温放置後で平均 30mg/mL の溶解が確認できており、加温調製し、目視で溶解が確認できたものに関しては適切な調製がされていたと考える。その他の溶媒では、300mM グルコース水溶液では 10mg/mL、DMSO では